(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-501769
(P2025-501769A)
(43)公表日　令和7年1月23日(2025.1.23)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/4439(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4439	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/127(2025.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/10 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全224頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-538431(P2024-538431)
(86)(22)出願日　令和4年12月22日(2022.12.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月23日(2024.8.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/082290
(87)国際公開番号　WO2023/122759
(87)国際公開日　令和5年6月29日(2023.6.29)
(31)優先権主張番号　63/292,899
(32)優先日　令和3年12月22日(2021.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　522492059
アカゲラ・メディスンズ，インコーポレイテッド
ＡＫＡＧＥＲＡ ＭＥＤＩＣＩＮＥＳ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州，ボックスフォード，エセックス・ストリート ５
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山 尚一
(74)代理人　100125380
弁理士　中村 綾子
(74)代理人　100142996
弁理士　森本 聡二
(74)代理人　100166268
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　オキサゾリジノンリポソーム組成物

(57)【要約】
本開示の一態様は、オキサゾリジノン化合物の種々のリポソーム組成物、ならびにオキサゾリジノンリポソーム組成物の製造および使用の関連方法に関する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、成分の分解に関して改善された保存安定性を有する。
【選択図】図１

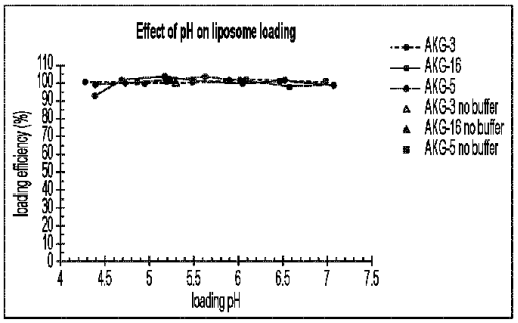
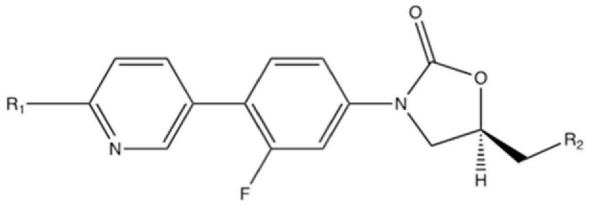


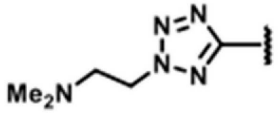
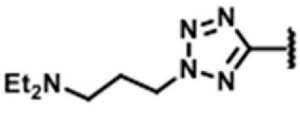
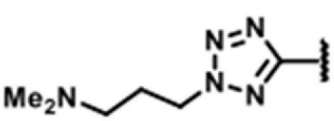
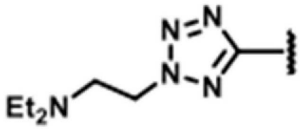
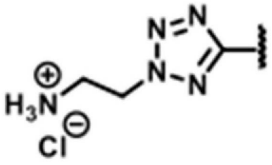
FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）
【化１】



式(I)

［式中、
Ｒ１は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環であり、
Ｒ２は、アミンまたはアセトアミドである。］
の化合物、またはその薬学的に許容される塩のリポソーム組成物であって、
前記式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩が、ｐＨが６．７を超える水性媒体中のリポソームにカプセル封入され、
前記リポソームが、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含み、前記リポソーム中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールを有する、リポソーム組成物。
【請求項２】
Ｒ２が、アセトアミド（ＮＨＣＯＣＨ３）である、請求項１に記載のリポソーム組成物。
【請求項３】
Ｒ１が、
【化２】


,

,

,

,および

.

からなる群から選択される、請求項２に記載のリポソーム組成物。
【請求項４】
前記ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質が、ホスファチジルコリンに対して５ｍｏｌ％の量である、請求項３に記載のリポソーム組成物。
【請求項５】
前記式（Ｉ）の化合物の硫酸塩が、４５：５５：２．２５のモル比で前記ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含むリポソームにカプセル封入されている、請求項４に記載のリポソーム組成物。
【請求項６】
前記ホスファチジルコリンが、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）である、請求項５に記載のリポソーム組成物。
【請求項７】

前記ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質が、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である、請求項６に記載のリポソーム組成物。

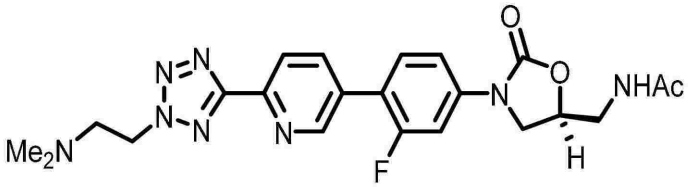
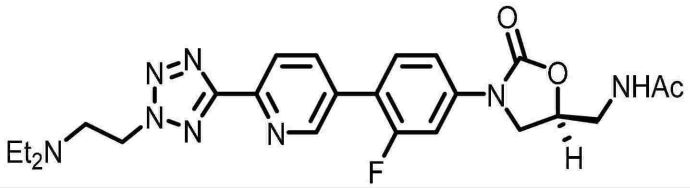
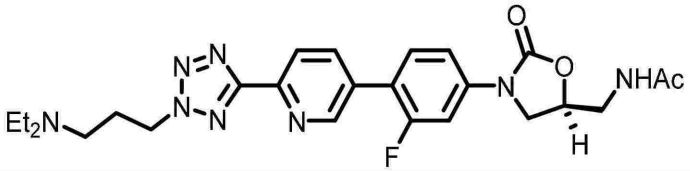
【請求項８】

デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含み、前記キレート剤が０．１～１ｍＭの濃度である、請求項７に記載のリポソーム組成物。

【請求項９】

前記式（Ｉ）の化合物が、ＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３９およびＡＫＧ－４０

【表１】

AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１～８のいずれか１項に記載のリポソーム組成物。

【請求項１０】

前記式（Ｉ）の化合物が、ＡＫＧ－３８の硫酸塩である、請求項９に記載のリポソーム組成物。

【請求項１１】

前記リポソーム組成物のｐＨが、７を超え８以下である、請求項１０に記載のリポソーム組成物。

【請求項１２】

前記リポソーム組成物のｐＨが、７．３～７．７である、請求項１０に記載のリポソーム組成物。

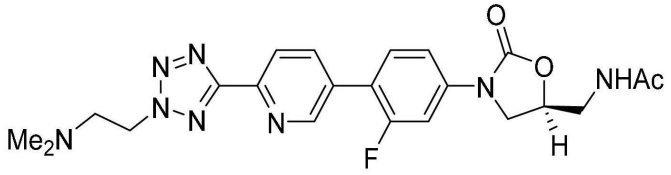
【請求項１３】

前記リポソーム組成物のｐＨが、７．５である、請求項１０に記載のリポソーム組成物。

【請求項１４】

前記式（Ｉ）の化合物が、ＡＫＧ－３８

【化３】



(AKG-38)

の硫酸塩であり、前記化合物が、ｐＨが７．３～７．７の水性媒体中、４５：５５：２．２５のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成されるリポソームにカプセル封入されている、請求項１に記載のリポソーム組成物。

【請求項１５】

キレート剤をさらに含み、前記キレート剤がデフェロキサミン（ＤＦＯ）であり、前記キレート剤が０．１～１ｍＭの濃度である、請求項１４に記載のリポソーム組成物。

【請求項１６】

前記組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、４３０～６８０ｇ／ｍｏｌである、請求項１４または１５に記載のリポソーム組成物。

【請求項１７】

前記組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、６００ｇ／ｍｏｌである、請求項１４または１５に記載のリポソーム組成物。

【請求項１８】

ａ．前記リポソーム組成物が、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含み、

ｂ．前記リポソーム組成物が、０．１５未満の多分散指数を有する、

請求項１４または１５に記載のリポソーム組成物。

【請求項１９】

全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が、少なくとも９０％である、請求項１４または１５に記載のリポソーム組成物。

【請求項２０】

前記水性媒体が、塩化ナトリウムをさらに含む、請求項１４または１５に記載のリポソーム組成物。

【請求項２１】

ａ．前記水性媒体が、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有し、

ｂ．前記塩化ナトリウムが、１３０～１５０ｍＭの濃度であり、

ｃ．前記キレート剤が、０．５ｍＭの濃度である、

請求項２０に記載のリポソーム組成物。

【請求項２２】

前記水性媒体が、２０～６０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含み、前記塩化ナトリウムが、５０～８０ｍＭの濃度である、請求項２０に記載のリポソーム組成物。

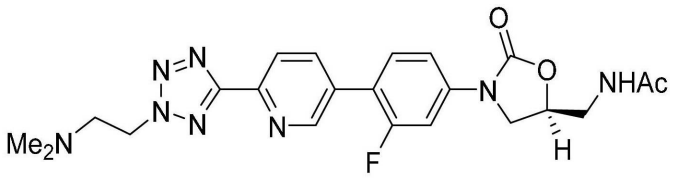
【請求項２３】

ＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含む、請求項２１または２２に記載のリポソーム組成物。

【請求項２４】

ｐＨが少なくとも７．０であり８．０以下であるＡＫＧ－３８リポソーム組成物であって、前記リポソーム組成物が、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを含むとともに、ＡＫＧ－３８

【化４】



(AKG-38)

の薬学的に許容される塩を含み、

前記リポソーム組成物が、以下の特徴：

ａ．前記リポソーム組成物が、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか、または前記リポソーム組成物が、１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含む；

ｂ．前記リポソーム組成物が、０．１５未満の多分散指数を有するか、または前記リポソーム組成物が、０．１０未満の多分散指数を有する；

ｃ．前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、４３０～４８０ｇ／ｍｏｌであるか、または前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、５００～６５０ｇ／ｍｏｌであるか、またはリポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、４３０～６５０ｇ／ｍｏｌであるか、または前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、４５０ｇ／ｍｏｌであるか、または前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４５０ｇ／ｍｏｌであるか、または前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、６００ｇ／ｍｏｌであるか、または前記リポソーム組成物中の前記ＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、６００ｇ／ｍｏｌである；

ｄ．前記リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が、１２～２５ｍｇ／ｍＬであるか、または前記リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が、１３．５～１６．５ｍｇ／ｍＬであるか、または前記組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が、１５ｍｇ／ｍＬであるか、または前記リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が、１６ｍｇ／ｍＬ（１０ｍＬバイアル中１６０ｍｇ）である；

ｅ．前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が、少なくとも９０％であるか、または前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が、少なくとも９５％であるか、または前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が、少なくとも９７％であるか、または前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が、少なくとも９８％である；

ｆ．前記リポソーム組成物が、塩化ナトリウムと、任意選択的にアンモニウムイオンとを含む水性媒体を含む；

ｇ．前記水性媒体が、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか、または前記水性媒体が、２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有し；

ｈ．前記水性媒体が、２０～６０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、５０～８０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、０．５ｍＭ未満の濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、１ｍＭ未満の濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、１～１０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含む；

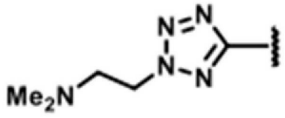
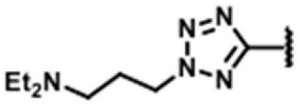
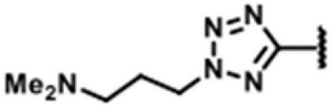
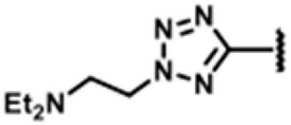
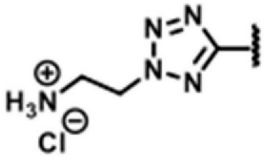
ｉ．前記水性媒体が、１３０～１５０ｍＭの濃度の塩化ナトリウムを含む；

ｊ．前記水性媒体が、緩衝液をさらに含み、前記緩衝液が、７．３～７．７のｐＨまたは７．５のｐＨで前記リポソーム組成物を緩衝する；

ｋ．前記水性媒体が、ＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または前記水性媒体が、５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、また

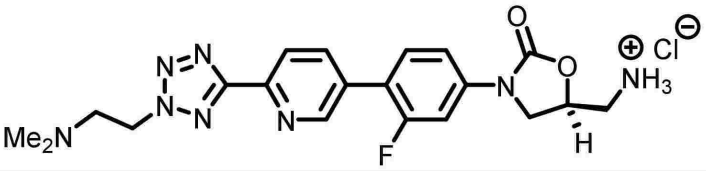
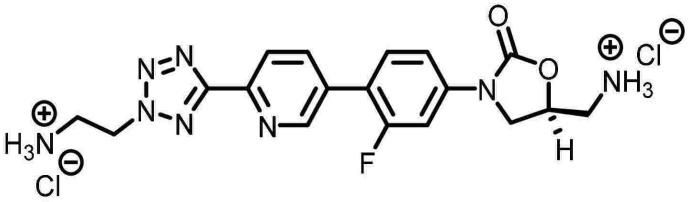
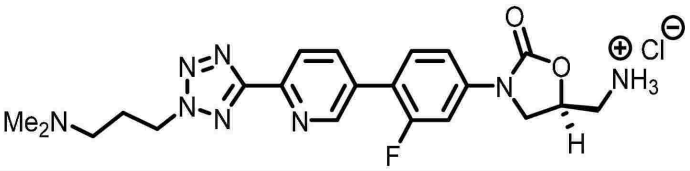
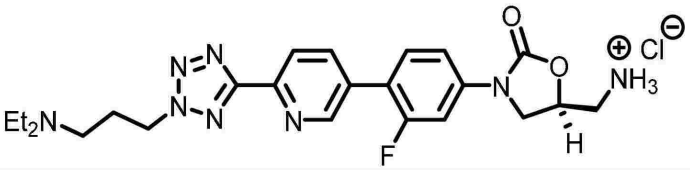
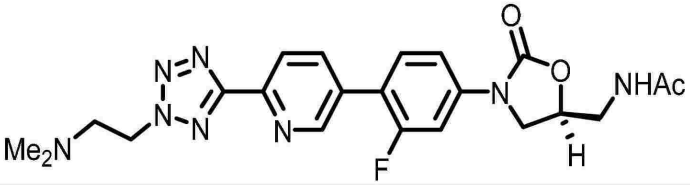
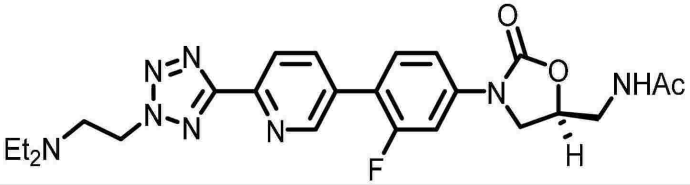
は前記水性媒体が、２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を含む；
ｌ．前記水性媒体が、キレート剤をさらに含むか、または前記水性媒体が、０．１～１ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または前記水性媒体が、０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または前記水性媒体が、デフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または前記水性媒体が、０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または前記水性媒体が、０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含む；
ｍ．前記リポソーム組成物が、保存安定性である；または
ｎ．前記ＡＫＧ－３８が、ＡＫＧ－３８の硫酸塩として前記リポソームにカプセル封入されている
のうちのいずれか１つまたは複数によってさらに特徴付けられる、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物。
【請求項２５】
デフェロキサミン（デスフェリオキサミン、デスフェラル）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、および１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）からなる群から選択されるキレート剤を含む水性媒体中にて、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩で製剤化され、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロール、および（ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（ＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ）を含むリポソームにカプセル封入された、等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
【請求項２６】
６．７を超え８．０以下のｐＨを有する、請求項２５に記載の等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
【請求項２７】
ａ．前記等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体が、７．５のｐＨを有し、
ｂ．前記リポソームが、４５：５５：２．２５のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成され、
前記キレート剤が、デフェロキサミンである、
請求項２６に記載の等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
【請求項２８】
前記リポソーム分散体が、ホスファチジルコリン、５５ｍｏｌ％コレステロールおよび５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＧまたは５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む組成物から形成される脂質小胞を含む、請求項２５または２６に記載の等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
【請求項２９】
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置する方法であって、必要とする対象に、治療有効量の請求項１～２８のいずれか１項に記載のリポソーム組成物を投与することを含む、方法。
【請求項３０】
押し出された脂質懸濁液を調製することを含む、請求項１～２８のいずれか１項に記載のリポソーム組成物を作製する方法であって、
ａ．１種または複数のリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質誘導体をエタノールに溶解させて脂質溶液を得るステップと、
ｂ．ステップ（ａ）の前記脂質溶液を捕捉剤溶液と組み合わせて、所望のリン脂質濃度を有する均一な脂質懸濁液を得るステップと、

ｃ．５０～２００ｎｍの名目孔径を有するポリカーボネートトラックエッチド（ＰＣＴＥ）メンブレンなどの規定の孔径を有する膜を通してステップ（ｂ）の前記脂質懸濁液を押し出すステップと、
ｄ．前記押し出された脂質懸濁液中のリポソーム外捕捉剤からリポソームを精製して、精製された押し出されたリポソーム調製物を得るステップと、
ｅ．水性媒体中で前記リポソームを前記式（Ｉ）の化合物と接触させて、前記リポソーム中への前記化合物のカプセル封入を行うステップと、
ｆ．任意選択的に、カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、
ｇ．非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中に前記リポソームを提供するステップと
を含み、
ステップ（ｂ）の前記捕捉剤溶液が、０．２５Ｍを超える濃度の硫酸アンモニウム水溶液を含み、
ステップ（ｇ）の前記生理学的に許容される媒体が、キレート剤を含む、方法。
【請求項３１】
ステップ（ｂ）の前記捕捉剤溶液が、０．５Ｍの濃度の硫酸アンモニウムを含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記キレート剤が、デフェロキサミンである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
ステップ（ｃ）にて前記押し出されたリポソームが、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
R_2が、アミン（NH_2）である、請求項１に記載のリポゾーム組成物。
【請求項３５】
R_1が、
【化５】

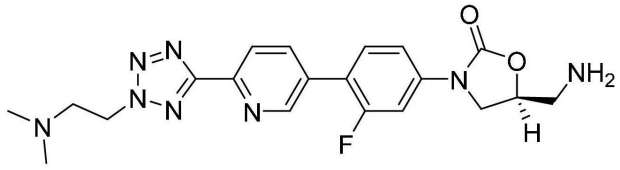

,

,

,


，および

からなる群から選択される、請求項３４に記載のリポゾーム組成物。
【請求項３６】
前記ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質が、ホスファチジルコリンに対して５ｍｏｌ％の量である、請求項３４に記載のリポソーム組成物。
【請求項３７】
ａ．前記式（Ｉ）の化合物の硫酸塩が、４５：５５：２．２５のモル比で前記ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含むリポソームにカプセル封入され、
ｂ．前記ホスファチジルコリンが、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆フォスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）であり、
ｃ．前記ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質が、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である、

請求項３６に記載のリポソーム組成物。
【請求項３８】
デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含み、前記キレート剤が０．１～１ｍＭの濃度である、請求項３４～３７のいずれか１項に記載のリポソーム組成物。
【請求項３９】
前記式（Ｉ）の化合物が、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、ＡＫＧ－３０、ＡＫＧ－３１、ＡＫＧ－３８およびＡＫＧ－３９
【表２】

AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	

から選択される化合物である、請求項３８に記載のリポソーム組成物。
【請求項４０】
前記式（Ｉ）の化合物がＡＫＧ－２８
【化６】

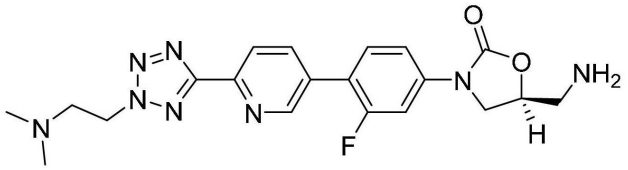

(AKG-28)

の硫酸塩であり、前記化合物が、ｐＨが７．３～７．７の水性媒体中、４５：５５：２．２５のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成されるリポソームにカプセル封入されている、請求項３８に記載のリポソーム組成物。

【請求項４１】

リポソームを含むＡＫＧ－２８リポソーム組成物であって、前記リポソームが、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを含むとともに、前記リポソームにカプセル封入されたＡＫＧ－２８

【化７】



(AKG-28)

の薬学的に許容される塩を含み、

前記リポソーム組成物が、以下の特徴：

ａ．前記リポソーム組成物が、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか、または前記リポソーム組成物が、１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含む；

ｂ．前記リポソーム組成物が、０．１５未満の多分散指数を有するか、または前記リポソーム組成物が、０．１０未満の多分散指数を有する；

ｃ．前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、９９～５３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、もしくはＡＫＧ－２８遊離塩基（ＦＢ）として８５～４５６ｇ／ｍｏｌ；９９～４７０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、もしくはＡＫＧ－２８遊離塩基（ＦＢ）として８５～４００ｇ／ｍｏｌ；２３０～２８０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして１９０～２４０ｇ／ｍｏｌであるか；または、前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、２９０～３６０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして２４５～３０５ｇ／ｍｏｌであるか；または、前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、３００～３４０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして２５６～２９０ｇ／ｍｏｌであるか；または、前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、２５０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして２１５ｇ／ｍｏｌであるか；または、前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、３３０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして２８０ｇ／ｍｏｌであるか；または前記組成物中の前記ＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が、３３０ｇ／ｍｏｌ、もしくはＦＢとして２８０ｇ／ｍｏｌである；

ｄ．前記組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が、８～１５ｍｇ／ｍＬ、もしくはＦＢとして６．８～１２．８ｍｇ／ｍＬであるか；または、前記組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が、９～１１ｍｇ／ｍＬ、もしくはＦＢとして７．６～９．４ｍｇ／ｍＬであるか；または、前記組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が、１０ｍｇ／ｍＬ、もしくはＦＢとして８．５ｍｇ／ｍＬであるか；または、前記組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が、１０ｍｇ／ｍＬ（１０ｍｌバイアル中１００ｍｇ）、もしくはＦＢとして８．５ｍｇ／ｍＬ（１０ｍｌバイアル中８５ｍｇ）である；

ｅ．前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が、少なくとも９０％であるか；または、前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が、少なくとも９５％であるか；または、前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が、少なくとも９７％であるか；または、前記リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－

２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が、少なくとも９８％である；
ｆ．前記リポソーム組成物が、塩化ナトリウムと、任意選択的にアンモニウムイオンを含む水性媒体とを含む；
ｇ．前記水性媒体が、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか、または前記水性媒体が、２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか、または前記水性媒体が、等張である；
ｈ．前記水性媒体が、２０～６０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、５０～８０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、０．５ｍＭ未満の濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、１ｍＭ未満の濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、１～１０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含むか、または前記水性媒体が、１３０ｍＭ未満の濃度のアンモニウムイオンを含む；
ｉ．前記水性媒体が、緩衝液をさらに含み、前記緩衝液が、７．３～７．７のｐＨまたは７．５のｐＨで前記リポソーム組成物を緩衝する；
ｊ．前記水性媒体が、ＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または前記水性媒体が、５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または前記水性媒体が、２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を含む；
ｋ．前記組成物が、キレート剤をさらに含むか、または前記組成物が、０．１～１ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または前記組成物が、０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または前記組成物が、デフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または前記組成物が、０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または前記組成物が、０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含む、または
ｌ．ＡＫＧ－２８が、ＡＫＧ－２８の硫酸塩としてリポソーム内にカプセル封入されている
のうちのいずれか１つまたは複数によってさらに特徴付けられる、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物。
【請求項４２】
押し出された脂質懸濁液を調製することを含む、請求項３４～４１のいずれか１項に記載のリポソーム組成物を作製する方法であって、
ａ．１種または複数のリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質誘導体をエタノールに溶解させて脂質溶液を得るステップと、
ｂ．ステップ（ａ）の前記脂質溶液を捕捉剤溶液と組み合わせて、所望のリン脂質濃度を有する均一な脂質懸濁液を得るステップと、
ｃ．５０～２００ｎｍの名目孔径を有するポリカーボネートトラックエッチド（ＰＣＴＥ）メンブレンなどの規定の孔径を有する膜を通してステップ（ｂ）の前記脂質懸濁液を押し出すステップと、
ｄ．前記押し出された脂質懸濁液中のリポソーム外捕捉剤からリポソームを精製して、精製された押し出されたリポソーム調製物を得るステップと、
ｅ．水性媒体中で前記リポソームを前記式（Ｉ）の化合物と接触させて、前記リポソーム中への前記化合物のカプセル封入を行うステップと、
ｆ．任意選択的に、カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、
ｇ．非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中に前記リポソームを提供するステップと
を含み、
ステップ（ｂ）の前記捕捉剤溶液が、０．２５Ｍを超える濃度の硫酸アンモニウム水溶液を含み、
ステップ（ｇ）の前記生理学的に許容される媒体が、キレート剤を含む、方法。
【請求項４３】
ステップ（ｂ）の前記捕捉剤溶液が、０．５Ｍの濃度の硫酸アンモニウムを含む、請求

項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記キレート剤が、デフェロキサミンである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
ステップ（ｃ）にて前記押し出されたリポソームが、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
前記キレート剤が、デフェロキサミンであり、ステップ（ｃ）において押前記し出されたリポソームが、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４７】
マイコバクテリア感染を処置する方法であって、必要とする対象に、治療有効量の請求項３４～４１のいずれか１項に記載のリポソーム組成物を投与することを含む、方法。
【請求項４８】
マイコバクテリア感染が、結核菌による感染、または結核菌の多剤耐性（ＭＤＲ）株による感染、または結核菌の極度の薬剤耐性（ＸＤＲ）株による感染である、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置するための、請求項１～２８のいずれか１項に記載のリポソーム組成物の使用。
【請求項５０】
マイコバクテリア感染を処置するための、請求項３４～４１のいずれか１項に記載のリポソーム組成物の使用。
【請求項５１】
必要とする対象に治療有効量のリポソーム組成物を投与することを含む、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置する方法において使用するための、請求項１～２８のいずれか１項に記載のリポソーム組成物。
【請求項５２】
必要とする対象に治療有効量のリポソーム組成物を投与することを含む、マイコバクテリア感染を処置する方法において使用するための、請求項３４～４１のいずれか１項に記載のリポソーム組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願］
本特許出願は、引用によってその全てが本明細書の一部をなすものとする、２０２１年１２月２２日に出願された米国仮特許出願第６３／２９２,８９９号の利益および優先権を主張する。
【０００２】
本開示は、オキサゾリジノン化合物を含むリポソーム組成物、その作製方法、ならびに結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）および他のグラム陽性細菌感染の処置におけるアミノアルキルオキサゾリジノン化合物の使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
リポソーム組成物は、治療用化合物の送達に有用である。リポソーム組成物は、脂質によって形成された膜によって形成される小胞内に治療用化合物をカプセル封入するリポソームを含み得る。リポソームは、通常、微細な袋または小胞を形成する１種または複数の二重層の膜によって外部媒体から隔離された内部空間を有することによって特徴付けられる。
【０００４】

しかし、治療用化合物をカプセル封入するリポソームは、保存中および治療的投与前に分解し得る。例えば、治療用化合物を含むリポソーム組成物の保存中に、リポソーム成分の酸化的分解およびリポソーム粒径または多分散指数（ＰＤＩ）の変化が起こり得る。改善された保存安定性を備え、保存中の減少したリポソーム分解を実証する、治療薬を含むリポソーム組成物が依然として必要とされている。

【発明の概要】

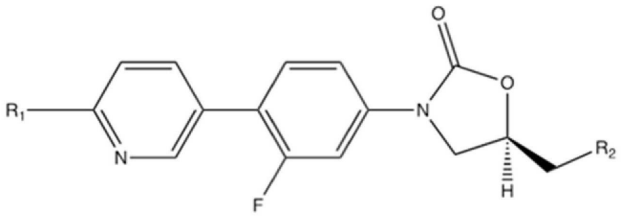
【０００５】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置するためのリポソーム組成物および方法が、本明細書にて提供される。

【０００６】

本開示の一態様は、式（Ｉ）

【化１】



式(I)

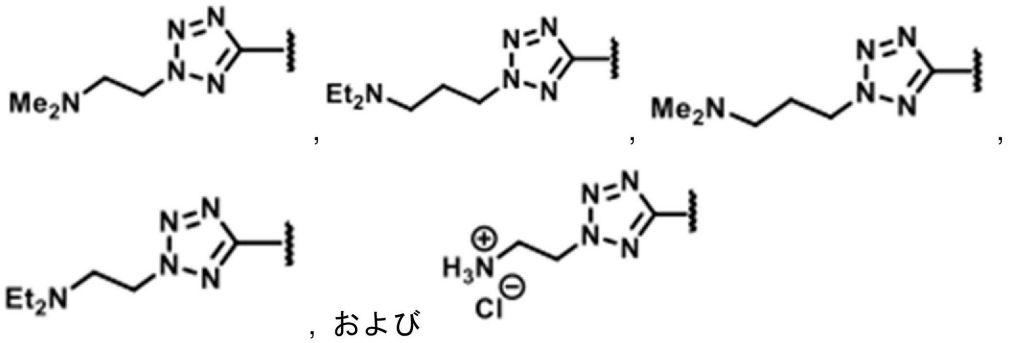
［式中、R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環であり；R_2はアミノまたはアセトアミドである。］

の化合物またはその薬学的に許容される塩のリポソーム組成物に関し、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩は、ｐＨが６．７を超える水性媒体中のリポソームにカプセル封入され、リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含み、リポソーム中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールを有する。

【０００７】

一部の実施形態では、R_2は、アセトアミド（ＮＨＣＯＣＨ$_3$）である。一部の実施形態では、R_1は、

【化２】



，および

からなる群から選択される。

【０００８】

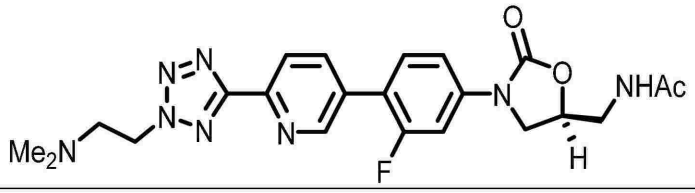
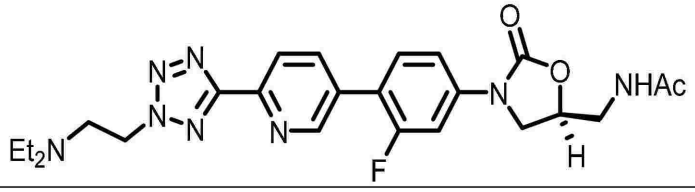
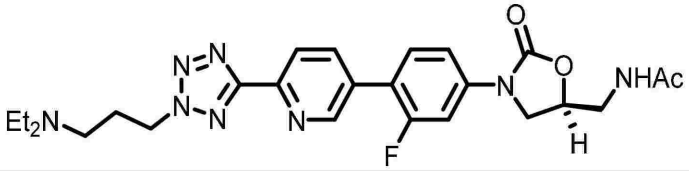
一部の実施形態では、ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質は、ホスファチジルコリンに対して５ｍｏｌ％の量である。一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物の硫酸塩は、４５：５５：２．２５のモル比でホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含むリポソームにカプセル封入されている。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンは、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）である。一部の実施形態では、

ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質は、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である。一部の実施形態では、このリポソーム組成物は、デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含み、キレート剤は０．１～１ｍＭの濃度である。

【０００９】

一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、ＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３９およびＡＫＧ－４０から選択される化合物またはその薬学的に許容される塩である。

【表１】

AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

【００１０】

一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物はＡＫＧ－３８の硫酸塩である。

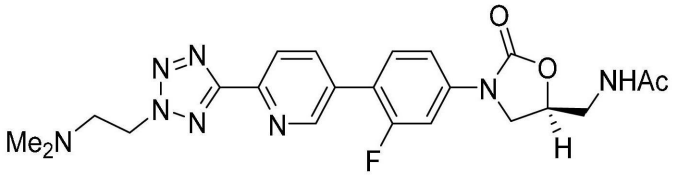
【００１１】

一部の実施形態では、リポソーム組成物のｐＨは７を超え８以下である。一部の実施形態では、リポソーム組成物のｐＨは７．３～７．７である。一部の実施形態では、リポソーム組成物のｐＨは７．５である。

【００１２】

一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物はＡＫＧ－３８の硫酸塩であり、

【化３】



(AKG-38)

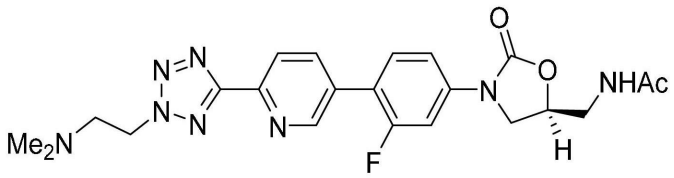
化合物は、７．３～７．７のｐＨの水性媒体中に、４５：５５：２．２５のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成されるリポソームにカプセル封入される。一部の実施形態では、リポソーム組成物はキレート剤をさらに含み、キレート剤はデフェロキサミン（ＤＦＯ）であり、キレート剤は０．１～１ｍＭの濃度である。一部の実施形態では、組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比は４３０～６８０ｇ／ｍｏｌである。一部の実施形態では、組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比は６００ｇ／ｍｏｌである。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含み；リポソーム組成物は、０．１５未

満の多分散指数を有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９０％である。一部の実施形態では、水性媒体は、塩化ナトリウムをさらに含む。一部の実施形態では、水性媒体は２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有し；塩化ナトリウムは１３０～１５０ｍＭの濃度であり；キレート剤は０．５ｍＭの濃度である。一部の実施形態では、水性媒体は２０～６０ｍＭの濃度のアンモニウムイオンを含み、塩化ナトリウムは５０～８０ｍＭの濃度である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、ＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含む。

【００１３】

本開示の一態様は、少なくとも７．０であり８．０以下のｐＨを有するＡＫＧ－３８リポソーム組成物に関し、リポソーム組成物は、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比で脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、およびＡＫＧ－３８

【化４】



(AKG-38)

の薬学的に許容される塩を含み、リポソーム組成物は、さらに、（ａ）リポソーム組成物が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか、またはリポソーム組成物が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含む；（ｂ）リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有するか、またはリポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する；（ｃ）リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～４８０ｇ／ｍｏｌであるか、またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が５００～６５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～６５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質の比が６００ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質の比が６００ｇ／ｍｏｌである；（ｄ）リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１２～２５ｍｇ／ｍＬであるか、またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１３．５～１６．５ｍｇ／ｍＬであるか、または組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１５ｍｇ／ｍＬであるか、またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が２０ｍｇ／ｍＬ（１０ｍＬバイアル中２００ｍｇ）である；（ｅ）リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９０％であるか、またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９５％であるか、またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９７％であるか、またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９８％である；（ｆ）リポソーム組成物が、塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む水性媒体を含む；（ｇ）水性媒体が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか、または水性媒体が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有する；（ｈ）水性媒体が２０～６０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含むか、または水性媒体が５０～８０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含むか、または水性媒体は０．５ｍＭ未満の濃度でアンモニウムイオンを含むか、ま

たは水性媒体が１ｍＭ未満の濃度でアンモニウムイオンを含むか、または水性媒体が１～１０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含む；（ｉ）水性媒体は１３０～１５０ｍＭの濃度で塩化ナトリウムを含む；（ｊ）水性媒体が緩衝液をさらに含み、緩衝液はリポソーム組成物を７．３～７．７のｐＨ、または７．５のｐＨで緩衝する；（ｋ）水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または水性媒体が５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または水性媒体が２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含む；（ｌ）水性媒体がキレート剤をさらに含むか、または水性媒体が０．１～１ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または水性媒体が０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または水性媒体がデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または水性媒体は０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または水性媒体が０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含む；（ｍ）リポソーム組成物が保存安定性である；または（ｎ）ＡＫＧ－３８がＡＫＧ－３８の硫酸塩としてリポソームにカプセル封入されるという特徴のいずれか１つまたは複数によって特徴付けられる。

【００１４】

本開示の一態様は、デフェロキサミン（デスフェリオキサミン、デスフェラル）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、および１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）からなる群から選択されるキレート剤を含む水性媒体中で、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン、またはその薬学的に許容される塩で製剤化され、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロール、およびＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（ＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ）を含むリポソームにカプセル封入された等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体に関する。

【００１５】

一部の実施形態では、等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体は、６．７を超え、８．０以下のｐＨを有する。一部の実施形態では、等張ＡＫＧ－３８リポソーム分散体は７．５のｐＨを有する。一部の実施形態では、リポソームは、４５：５５：２．２のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成される。一部の実施形態では、キレート剤はデフェロキサミンである。一部の実施形態では、リポソーム分散体は、ホスファチジルコリン、５５ｍｏｌ％コレステロールおよび５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＧまたは５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む組成物から形成される脂質小胞を含む。

【００１６】

本開示の一態様は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置する方法に関し、本方法は、それを必要とする対象に治療有効量のリポソーム組成物を投与することを含む。

【００１７】

本開示の一態様は、リポソーム組成物を作製する方法に関し、本方法は、（ａ）１種または複数のリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質誘導体をエタノールに溶解して、脂質溶液を得るステップと、（ｂ）ステップ（ａ）の脂質溶液を捕捉剤溶液と組み合わせて、所望のリン脂質濃度を有する均一な脂質懸濁液を得るステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の脂質懸濁液を５０～２００ｎｍの名目孔径を有するポリカーボネートトラックエッチド（ＰＣＴＥ）メンブレンなどの規定の孔径を有する膜を通して押し出すステップと、（ｄ）押し出された脂質懸濁液中のリポソーム外の捕捉剤からリポソームを精製して、

精製された押し出されたリポソーム調製物を得るステップと、（ｅ）リポソームを水性媒体中で式（Ｉ）の化合物と接触させて、リポソーム中の化合物のカプセル封入を行うステップと、（ｆ）任意選択的に、カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、（ｇ）非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中でリポソームを提供するステップとを含み、ステップ（ｂ）の捕捉剤溶液が０．２５Ｍを超える濃度の硫酸アンモニウム水溶液を含み、ステップ（ｇ）の生理学的に許容される媒体がキレート剤を含む。

【００１８】

一部の実施形態では、ステップ（ｂ）の捕捉剤溶液は、０．５Ｍの濃度で硫酸アンモニウムを含む。一部の実施形態では、キレート剤はデフェロキサミンである。一部の実施形態では、ステップ（ｃ）における押し出されたリポソームは、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である。

【００１９】

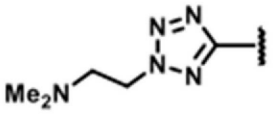
マイコバクテリア感染を処置するためのリポソーム組成物および方法が、本明細書にて提供される。

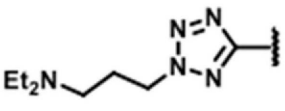
【００２０】

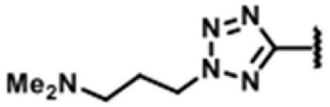
一部の実施形態では、リポソーム組成物は、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩を含み、式中、R_2はアミン（NH_2）である。

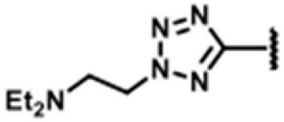
一部の実施形態では、R_1は、

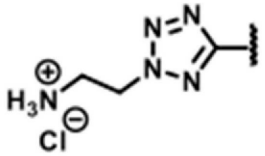
【化５】



,


,


,




，および

からなる群から選択される。

【００２１】

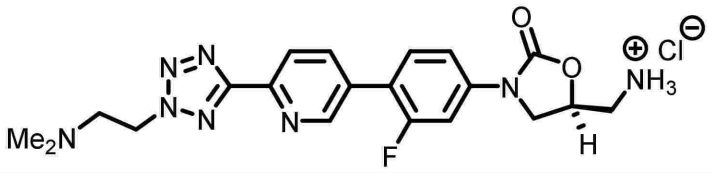
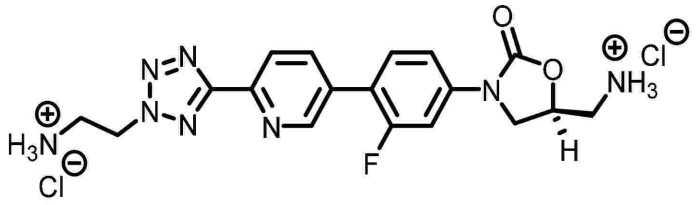
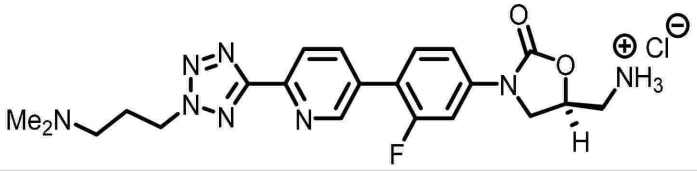
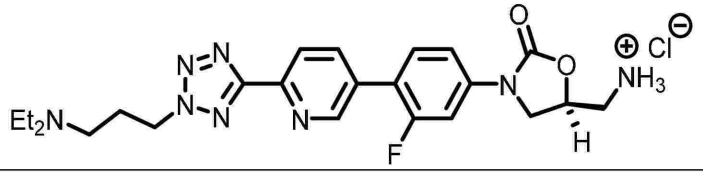
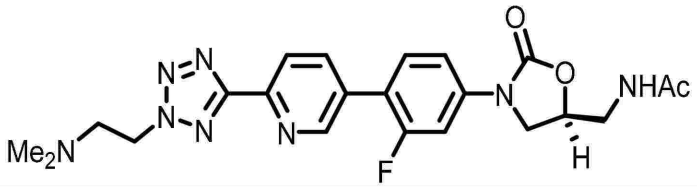
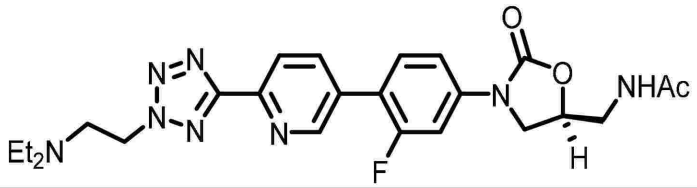
一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩は、６．７を超えるｐＨを有する水性媒体中のリポソームにカプセル封入され；リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含み、リポソーム中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールを有する。一部の実施形態では、ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質は、ホスファチジルコリンに対して５ｍｏｌ％の量である。一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物の硫酸塩は、４５：５５：２．２５のモル比でホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質を含むリポソームにカプセル封入されている。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンは、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）である。一部の実施形態では、ＰＥＧポリマーコンジュゲートされた脂質は、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含み、キレート剤は０．１～１ｍＭの濃度である。

【００２２】

一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、ＡＫＧ－３０、ＡＫＧ－３１、ＡＫＧ－３８およびＡＫＧ－３９から選択される化合物またはその薬学

的に許容される塩である。

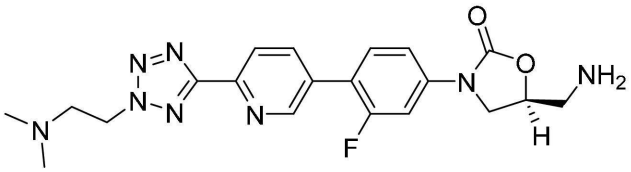
【表２】

AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	

【００２３】

一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物はＡＫＧ－２８

【化６】



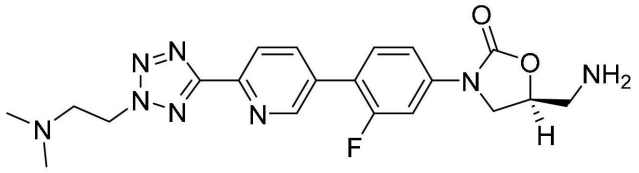
(AKG-28)

の硫酸塩であり、化合物は、ｐＨが７．３～７．７である水性媒体中、４５：５５：２．２５のモル比で水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥから形成されるリポソームにカプセル封入される。

【００２４】

本開示の一態様は、リポソームを含むＡＫＧ－２８リポソーム組成物に関し、リポソームは、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比で脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ならびに前記リポソームにカプセル封入されるＡＫＧ－２８

【化７】



(AKG-28)

の薬学的に許容される塩を含み、リポソーム組成物は、さらに、（ａ）リポソーム組成物が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか、またはリポソーム組成物が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含む；（ｂ）リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有するか、またはリポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する；（ｃ）組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が９９～５３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、またはＡＫＧ－２８遊離塩基（ＦＢ）として８５～４５６ｇ／ｍｏｌ；９９～４７０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、またはＡＫＧ－２８遊離塩基（ＦＢ）として８５～４００ｇ／ｍｏｌ；２３０～２８０ｇ／ｍｏｌ、またはＡＫＧ－２８遊離塩基（ＦＢ）として１９０～２４０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２９０～３６０ｇ／ｍｏｌもしくはＦＢとして２４５～３０５ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が３００～３４０ｇ／ｍｏｌもしくはＦＢとして２５６～２９０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２５０ｇ／ｍｏｌもしくはＦＢとして２１５ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が３３０ｇ／ｍｏｌもしくはＦＢとして２８０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が３３０ｇ／ｍｏｌもしくはＦＢとして２８０ｇ／ｍｏｌである；（ｄ）組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が８～１５ｍｇ／ｍＬもしくはＦＢとして６．８～１２．８ｍｇ／ｍＬであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が９～１１ｍｇ／ｍＬもしくはＦＢとして７．６～９．４ｍｇ／ｍＬであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が１０ｍｇ／ｍＬもしくはＦＢとして８．５ｍｇ／ｍＬであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が１０ｍｇ／ｍＬ（１０ｍｌバイアル中１００ｍｇ）もしくはＦＢとして８．５ｍｇ／ｍｌ（１０ｍｌバイアル中８５ｍｇ）である；（ｅ）リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９０％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９５％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９７％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９８％である；（ｆ）リポソーム組成物が、塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む水性媒体を含む；（ｇ）水性媒体が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか；または水性媒体が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有するか；または水性媒体が等張である；（ｈ）水性媒体が２０～６０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含むか；または水性媒体が５０～８０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含むか；または水性媒体が０．５ｍＭ未満の濃度でアンモニウムイオンを含むか；または水性媒体が１ｍＭ未満の濃度でアンモニウムイオンを含むか；または水性媒体が１～１０ｍＭの濃度でアンモニウムイオンを含むか；または水性媒体が１３０ｍＭ未満の濃度でアンモニウムイオンを含む；（ｉ）水性媒体が緩衝液をさらに含み、緩衝液は、７．３～７．７のｐＨまたは７．５のｐＨでリポソーム組成物を緩衝する；（ｊ）水性媒体がＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含むか；または水性媒体が５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含むか；または水性媒体が２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含む；（ｋ）組成物がキレート剤をさらに含むか；または組成物が０．１～１ｍＭの濃度

でキレート剤をさらに含むか；または組成物が０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか；または組成物がデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか；または組成物が０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか；または組成物が０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含む；または（ｌ）ＡＫＧ－２８がＡＫＧ－２８の硫酸塩としてリポソーム内にカプセル封入されるという特徴のいずれか１つまたは複数によって特徴付けられる。

【００２５】

本開示の一態様は、リポソーム組成物を作製する方法に関し、該方法は、（ａ）１種または複数のリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質誘導体をエタノールに溶解して、脂質溶液を得るステップと、（ｂ）ステップ（ａ）の脂質溶液を捕捉剤溶液と組み合わせて、所望のリン脂質濃度を有する均一な脂質懸濁液を得るステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の脂質懸濁液を５０～２００ｎｍの名目孔径を有するポリカーボネートトラックエッチド（ＰＣＴＥ）メンブレンなどの規定の孔径を有する膜を通して押し出すステップと、（ｄ）押し出された脂質懸濁液中のリポソーム外の捕捉剤からリポソームを精製して、精製された押し出されたリポソーム調製物を得るステップと、（ｅ）リポソームを水性媒体中で式（Ｉ）の化合物と接触させて、リポソーム中の化合物のカプセル封入を行うステップと、（ｆ）任意選択的に、カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、（ｇ）非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中でリポソームを提供するステップとを含み、ステップ（ｂ）の捕捉剤溶液が０．２５Ｍを超える濃度の硫酸アンモニウム水溶液を含み、ステップ（ｇ）の生理学的に許容される媒体がキレート剤を含む。

【００２６】

一部の実施形態では、ステップ（ｂ）の捕捉剤溶液は、０．５Ｍの濃度で硫酸アンモニウムを含む。一部の実施形態では、キレート剤はデフェロキサミンである。一部の実施形態では、ステップ（ｃ）において押し出されたリポソームは、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である。一部の実施形態では、キレート剤はデフェロキサミンであり、ステップ（ｃ）において押し出されたリポソームは、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である。

【００２７】

本開示の一態様は、マイコバクテリア感染を処置する方法に関し、該方法は、それを必要とする対象に、治療有効量のリポソーム組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、マイコバクテリア感染は、結核菌による感染、または結核菌の多剤耐性（ＭＤＲ）株による感染、または結核菌の極度の薬剤耐性（ＸＤＲ）株による感染である。

【００２８】

マイコバクテリア感染を処置するためのリポソーム組成物の使用が、本明細書にて提供される。

【００２９】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）細菌感染を処置するためのリポソーム組成物の使用が、本明細書にて提供される。

【００３０】

一部の実施形態では、改善された保存安定性を有するオキサゾリジノン化合物のリポソーム調製物が提供される。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含み、７以上のｐＨを有するオキサゾリジノンリポソーム組成物は、驚くほどに改善された保存安定性を有する。一部の実施形態では、デフェロキサミンまたはＥＤＴＡなどのキレート剤の添加は、オキサゾリジノンリポソーム組成物の保存中のコレステロールの酸化的分解を減少させた。一部の実施形態では、オキサゾリジノン薬物充填中に（例えば、充填後の緩衝液交換を省略することによる）硫酸アンモニウム捕捉剤を含むリポソームから置換されたアンモニウムを含むオキサゾリジノンリポソーム組成物が、改善されたホスファチジルコリン保存安定性を示した。

【００３１】
一部の実施形態では、本明細書にて提供されるオキサゾリジノンリポソーム組成物は、約５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥからなる脂質からなる。一部の実施形態では、本明細書にて提供されるオキサゾリジノンリポソーム組成物は、４５：５５：２．２５のモル比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥからなる脂質からなる。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、ＡＫＧ－２８からなるオキサゾリジノンまたはその薬学的に許容される塩を含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、ＡＫＧ－３８からなるオキサゾリジノンまたはその薬学的に許容される塩を含む。

【００３２】
一部の実施形態では、リポソーム小胞およびオキサゾリジノンを含むリポソーム組成物が提供される。一部の実施形態では、硫酸オキサゾリジノンをカプセル封入したリポソーム小胞を含むオキサゾリジノンリポソーム組成物が提供される。一部の実施形態では、リポソーム小胞は水性媒体中にある。

【００３３】
一部の実施形態では、オキサゾリジノン化合物およびその塩を使用して、リポソーム組成物を調製できる。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、オキサゾリジン化合物を、オキサゾリジノンリポソームを形成するのに有効な条件下で、精製され、押し出された脂質懸濁液と組み合わせるステップを含むプロセスによって得ることができる。精製され、押し出された脂質懸濁液は、所望の濃度で水性媒体中に組み合わされたリン脂質、コレステロール、および任意選択的に、ＰＥＧ－脂質誘導体、ならびに硫酸アンモニウム（ＡＳ）などの捕捉剤からなる脂質成分を含むことができる。一部の実施形態では、押し出された脂質懸濁液の脂質成分は、ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる。一部の実施形態では、押し出された脂質懸濁液の脂質成分は、４５：５５のモル比でＨＳＰＣおよびコレステロールを含む。一部の実施形態では、押し出された脂質懸濁液の脂質成分は、５：３の重量比でＨＳＰＣおよびコレステロールを含む。一部の実施形態では、押し出された脂質懸濁液の脂質成分は、４５：５５：２．２５のモル比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる。一部の実施形態では、押し出された脂質懸濁液の脂質成分は、５：３：１の重量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる。

【００３４】
一部の実施形態では、精製され、押し出された脂質懸濁液は、（ａ）１種または複数のリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質誘導体をエタノールに溶解するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）の脂質溶液を捕捉剤溶液（例えば、０．５Ｍ硫酸アンモニウム）と組み合わせて、所望のリン脂質濃度（例えば、６０ｍＭリン脂質）を有する均一な脂質懸濁液を得るステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の脂質懸濁液を、名目孔径５０～２００ｎｍのポリカーボネートトラックエッチド（ＰＣＴＥ）メンブレンなどの規定孔径を有する膜を通して押し出すステップと、（ｄ）押し出された脂質懸濁液中のリポソーム外の捕捉剤から（例えば、中空繊維カートリッジでの接線流濾過によって）リポソームを精製して、精製された押し出されたリポソーム調製物を得るステップとを含むプロセスによって得られる。一部の実施形態では、リポソームは、９０～１３０ｎｍもしくは１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である。一部の実施形態では、リポソームは、０．１５未満もしくは０．１０未満の多分散指数を有するモノまたはオリゴラメラ小胞である。

【００３５】
精製された押し出されたリポソームは、その後の薬物充填ステップにおいてオキサゾリジノン薬物を充填できる。オキサゾリジノン薬物化合物またはその塩の薬物ストックは、所望の薬物とリン脂質の濃度で、ステップ（ｄ）で精製され、押し出された脂質懸濁液と組み合わせて、精製された押し出されたリポソーム調製物内のリポソーム内に薬物を充填するのに有効な条件下で薬物－リポソーム混合物を形成できる。一部の実施形態では、薬

物充填ステップは、捕捉剤アンモニウムカチオンとオキサゾリジノン化合物のリポソーム二重層膜を横切る交換を含み、薬物充填プロセス中にリポソーム内から置換される薬物－リポソーム混合物中のリポソーム外のアンモニウムの生成を生じる。

【００３６】

薬物充填プロセスの後、カプセル封入されていない薬物化合物は、薬物－リポソーム混合物から精製され得（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、ＳＥＣ、透析、または接線流濾過などの透析濾過により）、オキサゾリジノン薬物リポソームを含む組成物が単離され、保存され得る。

【００３７】

一部の実施形態では、化合物は、補捉剤でリポソーム小胞に捕捉され、捕捉剤は、ポリアニオンを含む。一部の実施形態では、捕捉剤は、八硫酸トリエチルアンモニウムスクロースまたは硫酸アンモニウムである。一部の実施形態では、捕捉剤は、八硫酸トリエチルアンモニウムスクロースである。一部の実施形態では、捕捉剤は、硫酸アンモニウムである。

【００３８】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、化合物の塩を含み、塩は、硫酸塩、クエン酸塩、スクロソファート、リン酸化もしくは硫酸化ポリオールとの塩、またはリン酸化ポリアニオンポリマーもしくは硫酸化ポリアニオンポリマーとの塩である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、化合物の硫酸塩を含む。例えば、一部の実施形態では、リポソーム組成物は、式（Ｉ）のオキサゾリジノン化合物の硫酸塩またはヒドロスルフェート塩を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、（ＡＫＧ－２８）の硫酸塩またはヒドロスルフェート塩を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、（ＡＫＧ－３８）の硫酸塩またはヒドロスルフェート塩を含む。

【００３９】

一部の実施形態では、リポソーム小胞中の化合物は、１ｍｇ／ｍＬ未満の水溶解度を有する。一部の実施形態では、リポソーム小胞中の化合物は、０．１ｍｇ／ｍＬ未満の水溶解度を有する。

【００４０】

一部の実施形態では、リポソーム小胞は、ホスファチジルコリンおよびコレステロールを含む膜を含む。一部の実施形態では、リポソーム小胞は、ホスファチジルコリンおよびコレステロールを含む膜を含み、膜は、リポソーム小胞の内部を水性媒体から分離する。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンは、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）である。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンとコレステロールのモル比は、約６０：４０～３５：６５である。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンとコレステロールのモル比は、約５５：４５～約３５：６５である。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンとコレステロールのモル比は、約５０：５０～約４０：６０である。一部の実施形態では、ホスファチジルコリンとコレステロールのモル比は、約５０：５０～約４５：５５である。一部の実施形態では、膜は、ポリマーコンジュゲートされた脂質をさらに含む。一部の実施形態では、リポソーム小胞は、約４５：５５：２．７５のモル比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびポリマーコンジュゲートされた脂質を含む。一部の実施形態では、リポソーム小胞は、４５：５５：２．２５のモル比のＨＳＰＣ、コレステロールおよびポリマーコンジュゲートされた脂質を含む。一部の実施形態では、ポリマーコンジュゲートされた脂質は、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のリポソームは、約８０～約１３０ｎｍのＺ平均粒径を有する。

【００４１】

一部の実施形態では、薬物リポソームは、塩化ナトリウムを含み、任意選択的に、薬物充填プロセス中にリポソームから置換されたアンモニウムをさらに含む水性媒体中に提供

される。一部の実施形態では、リポソーム組成物中の塩化ナトリウムの濃度は５０～８０ｍＭである。一部の実施形態では、リポソーム水性組成物中の塩化ナトリウムの濃度は、１３０～１５０ｍＭである。一部の実施形態では、薬物リポソームは、薬物充填プロセス中にリポソームから置換された２０～６０ｍＭアンモニウムを含む水性媒体中に提供される。一部の実施形態では、リポソーム水性媒体中のアンモニウムの濃度は、０．５ｍＭ未満である。一部の実施形態では、リポソーム組成物の水性媒体の浸透圧は、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである。一部の実施形態では、リポソーム組成物の水性媒体の浸透圧は、２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである。

【００４２】

一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は約６．７よりも高いｐＨを有する。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は７～８のｐＨを有する。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、リポソーム水性媒体のｐＨを約７．３～７．７にするための緩衝液をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、リポソーム水性媒体のｐＨを約７．５にするための緩衝液をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、ＨＥＰＥＳおよびリン酸塩からなる群から選択される緩衝物質を含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物はＨＥＰＥＳ緩衝液を含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物はリン酸緩衝液を含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳおよびリン酸塩からなる群から選択される緩衝物質を含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳおよびリン酸塩からなる群から選択される緩衝物質を含む。

【００４３】

一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、キレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む。

【００４４】

一部の実施形態では、オキサゾリジノン薬物化合物は、薬物対脂質比が低い（実施例５３）リポソームに近い血液ＰＫ特性を有する、増加した薬物対脂質比（実施例５１）で、押し出されたリポソームに効率的に（＞９５％）充填された。

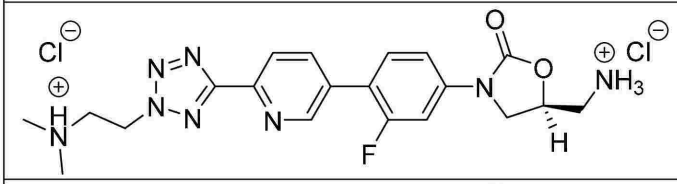
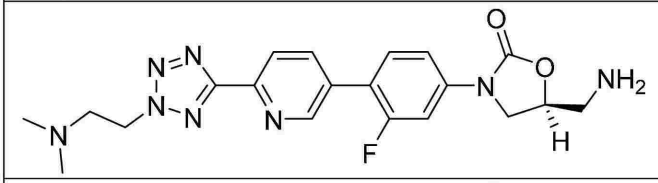
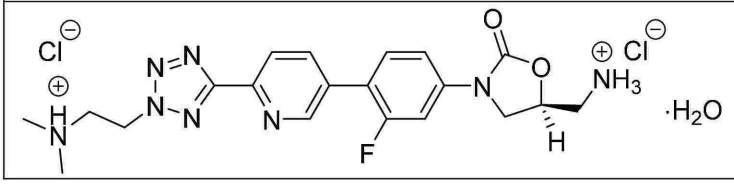
【００４５】

一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム調製物は、薬物充填プロセス中に（例えば、緩衝液交換ステップを省略することによって）捕捉剤から置換されたアンモニウムをリポソーム内に保持することによって安定化することができる。

【００４６】

一部の実施形態では、オキサゾリジノン薬物化合物はＡＫＧ－２８であり、リポソーム組成物は、薬物充填プロセス中にリポソーム内で形成されるＡＫＧ－２８の硫酸塩を含む。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソームは、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン（ＡＫＧ－２８）の塩形態を溶解することによって得られる薬物ストック溶液を使用して調製される。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８の塩酸塩を含むＡＫＧ－２８の塩が提供される。ＡＫＧ－２８の塩は、ＡＫＧ－２８リポソームを充填するための薬物ストック溶液を調製するのに有用である。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８は、リポソーム内の硫酸アンモニウム捕捉剤から置換されたアンモニウムとイオン交換し、ＡＫＧ－２８リポソーム内にＡＫＧ－２８塩を形成する。

【表３】

化学構造	化合物	分子量
	AKG-28	Mol. wt 499.4
	AKG-28 遊離塩基	Mol. wt 426.5
	AKG-28 二塩酸一水和物	Mol. wt 517.4

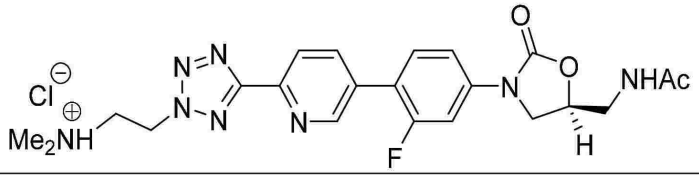
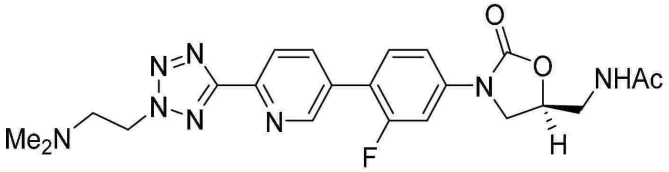
【００４７】

一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、２３０～３８０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、２３０～２９０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、２９０～３６０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、３００～３４０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、約２５０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、約３３０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－２８を有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－２８の全（または総）濃度は８～１５ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度は、９～１１ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合は、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％または少なくとも９８％である。

【００４８】

一部の実施形態では、オキサゾリジノン薬物化合物はＡＫＧ－３８であり、リポソーム組成物は、薬物充填プロセス中にリポソーム内で形成されたＡＫＧ－３８の硫酸塩を含む。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソームは、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン（ＡＫＧ－３８）の塩形態を溶解することによって得られる薬物ストック溶液を使用して調製される。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８の塩酸塩を含むＡＫＧ－３８の塩が提供される。ＡＫＧ－３８の塩は、ＡＫＧ－３８リポソームを充填するための薬物ストック溶液を調製するのに有用である。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８は、リポソーム内の硫酸アンモニウム捕捉剤から置換されたアンモニウムとイオン交換し、ＡＫＧ－３８リポソーム内にＡＫＧ－３８塩を形成する。

【表４】

化学構造	化合物	分子量
	AKG-38 塩酸塩	Mol. wt 505.0
	AKG-38 遊離塩基	Mol. wt 468.5

【００４９】

一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物は、４３０～６８０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－３８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物は、５００～６５０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－３８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物は、５５０～６５０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－３８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物は、約４５０ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－３８を有する。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物は、約６００ｇ／ｍｏｌ総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比でＡＫＧ－３８を有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度は、１２～２５ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度は、１３．５～１６．５ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度は、約１５ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度は、約２０ｍｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合は、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％または少なくとも９８％である。

【００５０】

オキサゾリジノンリポソーム調製物の加速された安定性試験中に、ある特定のＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８リポソーム組成物において、コレステロールおよびＨＳＰＣ分解が観察された（実施例５４、６５）。図１７は、２つの主要なコレステロール酸化分解生成物である７－ヒドロキシ－コレステロール（アルファおよびベータ異性体）、および７－ケトコレステロールを示すスキームである。図１８は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）のリゾホスファチジルコリン（ｌｙｓｏ－ＰＣ）およびステアリン酸への分解を示すスキームである。水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）は、１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリンであり、１および２アシル鎖位置は、主としてステアリン酸（Ｃ１８）およびパルミチン酸（Ｃ１６）である、飽和脂肪酸Ｃ１６～Ｃ２２である。ジステアロイルホスファチジルコリンはＨＳＰＣの最大の成分である。

【００５１】

しかし、加速された安定性研究において、緩衝液交換ステップなしで調製されたＡＫＧ－２８のある特定の未精製の緩衝化リポソーム製剤では、ＨＳＰＣ分解生成物リゾ－ＰＣ、ステアリン酸およびパルミチン酸の形成は、緩衝液交換後の製剤が既にＨＳＰＣ分解を示した時点で検出することができなかった（実施例５４）。これらの製剤中のリポソーム外の媒体は、薬物充填ステップの前に、リポソーム内部内に含有される硫酸アンモニウム捕捉剤から置換される増加したレベルのアンモニウム（置換されたアンモニウム）を有した。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソームは、リポソームに充填されたＡＫＧ－２８薬物のモル当量に等しいか、またはそれを超える量で置換されたアンモニウムを含み

得る。同様に、ＨＳＰＣの分解は、薬物充填後の緩衝液交換なしにＡＫＧ－３８リポソームにおける加速された安定性試験中に最小化された（実施例５５）。

【００５２】

コレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含むＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８リポソーム組成物のリポソーム賦形剤緩衝液へのデフェロキサミンキレート剤の添加は、３７℃の加速された安定性試験で少なくとも３カ月を通してコレステロールの分解を驚くほどに妨げた（実施例５６）。しかし、薬剤充填前の薬剤ストックへのＤＦＯ、ＥＤＴＡおよびＤＴＰＡキレート剤の添加は、ＨＳＰＣと、コレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含むＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８リポソームにおける脂質分解に対して保護しなかった（実施例５７）。キレート剤（ＤＦＯまたはＥＤＴＡ）なしでは、ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８リポソーム製剤において、コレステロールの酸化的分解が観察された（実施例５８、６７）。

【００５３】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、リポソーム脂質成分の分解に対して安定であり、ｐＨ＞７．０を有する。脂質の分解速度、特にコレステロールの分解速度は、リポソーム製剤のｐＨに依存し、７．０を超えるｐＨではより低いことが発見された（実施例６５）。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも７．１、少なくとも７．２、または少なくとも７．３であり、ｐＨ８．０以下、ｐＨ７．７以下、またはｐＨ７．６以下のｐＨを有する。一部の実施形態では、３７℃で３カ月後のコレステロール分解の程度は、総コレステロールの１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、３７℃で６週間後のリン脂質分解の程度は、総リン脂質の１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、リン脂質はホスファチジルコリンである。一部の実施形態では、リン脂質はＨＳＰＣであり、ｐＨはｐＨ７．３～７．６である。

【００５４】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、コレステロールを含み、コレステロールの分解に対して安定であり、３７℃で３カ月後のコレステロール分解の程度は、総コレステロールの１０％未満、５％未満、または１％未満である。コレステロール分解の生成物は有毒であり、これは血管内皮損傷を引き起こし得るため、コレステロールの分解を避けることは重要である（Ｒｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ，Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ，ａｎｄ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９８，ｖｏｌ．１８，ｐ．１８８５－１８９４；Ｓｅｖａｎｉａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ，１９９５，ｖｏｌ．３６，ｐ．１９７１－１９８６）。一部の実施形態では、リポソーム組成物がキレート剤を含む。一部の実施形態では、キレート剤は、ヒトにおいて忍容性であることが公知であるキレート剤である。一部の実施形態では、キレート剤は、デフェロキサミン（デスフェラル、ＤＦＯ）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）であり、それらの薬学的に許容される塩を含む。一部の実施形態では、キレート剤は、少なくとも０．０１ｍＭ、少なくとも０．０５ｍＭ、少なくとも０．１ｍＭ、少なくとも０．２ｍＭ、または少なくとも０．５ｍＭであり、１ｍＭ以下、２ｍＭ以下、５ｍＭ以下、または１０ｍＭ以下の濃度で組成物中に存在する。一部の実施形態では、キレート剤はデフェロキサミンまたはデフェロキサミンメシレートであり、キレート剤濃度は約０．５ｍＭである。

【００５５】

一部の実施形態では、リポソーム組成物の外部媒体は、０．５ｍＥｑ／Ｌ（ミリグラム当量／リットル）未満のアンモニウムまたは置換されたアンモニウムを有する。一部の実

施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも１０ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１５ｍＥｑ／Ｌ、または少なくとも２０ｍＥｑ／Ｌであり、２００ｍＥｑ／Ｌ以下、１５０ｍＥｑ／Ｌ以下、１００ｍＥｑ／Ｌ以下、８０ｍＥｑ／Ｌ以下、または６０ｍＥｑ／Ｌ以下の濃度でアンモニウムまたは置換されたアンモニウムをリポソーム外の媒体中に含有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも１０ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１５ｍＥｑ／Ｌ、または少なくとも２０ｍＥｑ／Ｌであり、２００ｍＥｑ／Ｌ以下、１５０ｍＥｑ／Ｌ以下、１００ｍＥｑ／Ｌ以下、８０ｍＥｑ／Ｌ以下、または６０ｍＥｑ／Ｌ以下の濃度でアンモニウムまたは置換されたアンモニウムをリポソーム外の媒体中に含有し、リン脂質の分解に対して安定であり、３７℃で６週間後のリン脂質の分解の程度は、総リン脂質の１０％未満、５％未満または１％未満である。一部の実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンである。一部の実施形態では、リン脂質はＨＳＰＣであり、アンモニウム塩は、１０～８０ｍＭもしくは１５～６０ｍＭのアンモニウム濃度の塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、リポソーム組成物の外部媒体中のアンモニウムの正規度は、薬物充填ステップでのカプセル封入された薬物の正規度の９０～１１０％以内であり、正規度は、グラム当量／Ｌ（ｅｑ／Ｌ）で表される濃度である。

【００５６】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、３００～３５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの薬物／脂質（ＤＬ）比で式１ｂのカプセル封入された化合物を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、３００～３５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ比で式１ｂのカプセル封入された化合物を含み、８０時間を超えるか、２００時間を超えるか、または３００時間を超える、ＣＤ－１マウスの血液中でのｉｎ　ｖｉｖｏ薬物放出半減期によって特徴付けられる。

【００５７】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、５００～６５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ比で式１ｃのカプセル封入された化合物を含む。

【００５８】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、水性媒体中にリポソームを含み、リポソームは、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥで構成され、リポソームは、９０～１３０ｎｍまたは１００～１３０ｎｍのｚ平均直径、および０．１５未満または０．１０未満の多分散指数を有するモノまたはオリゴラメラ小胞であり、リポソームは、２３０～２８０ｇ／ｍｏｌリン脂質（ＰｈＬ）、２９０～３６０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、３００～３４０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、約２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、または約３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの薬物／脂質（ＤＬ）比でカプセル封入された化合物ＡＫＧ－２８を含有し、組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度は８～１５ｍｇ／ｍｌまたは９～１１ｍｇ／ｍｌであり、組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合は、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９８％である。一部の実施形態では、水性媒体は、塩化ナトリウムおよび任意選択的にアンモニウムイオンを含む。一部の実施形態では、水性媒体の浸透圧は、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇまたは２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである。一部の実施形態では、水性媒体中のアンモニウム濃度は２０～６０ｍＭであり、塩化ナトリウムの濃度は５０～８０ｍＭである。一部の実施形態では、水性媒体中のアンモニウムの濃度は０．５ｍＭ未満であり、塩化ナトリウムの濃度は１３０～１５０ｍＭである。一部の実施形態では、組成物はまた、水性媒体のｐＨを約７．３～７．７、または約ｐＨ７．５にするための緩衝物質を含有する。一部の実施形態では、緩衝物質は、５～５０ｍＭ、または約２０ｍＭの濃度のＨＥＰＥＳまたはリン酸塩である。組成物はまた、キレート剤を含有することができ、キレート剤はデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡであり、０．１～１ｍＭまたは約０．５ｍＭの濃度である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は保存安定性である。

【００５９】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、水性媒体中にリポソームを含み、リポソームは４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥで構成され、リポソームは、９０～１３０ｎｍまたは１００～１３０ｎｍのｚ平均直径および０．１５未満または０．１０未満の多分散指数を有するモノまたはオリゴラメラ小胞であり、リポソームは、４３０～４８０ｇ／ｍｏｌリン脂質（Ｐｈｌ）、５００～６５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、５５０～６５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、約４５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、または約６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの薬物／脂質比でカプセル封入された化合物ＡＫＧ－３８を含有し、組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度は１２～２５ｍｇ／ｍｌ、１３．５～１６，５ｍｇ／ｍｌ、約１５ｍｇ／ｍｌ、または約２０ｍｇ／ｍｌであり、組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合は、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９８％である。一部の実施形態では、水性媒体は、塩化ナトリウムおよび任意選択的にアンモニウムイオンを含む。一部の実施形態では、水性媒体の浸透圧は、２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇまたは２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである。一部の実施形態では、水性媒体中のアンモニウム濃度は２０～６０ｍＭであり、塩化ナトリウムの濃度は５０～８０ｍＭである。一部の実施形態では、水性媒体中のアンモニウム濃度は０．５ｍＭ未満であり、塩化ナトリウムの濃度は１３０～１５０ｍＭである。一部の実施形態では、組成物はまた、水性媒体のｐＨを約７．３～７．７、または約ｐＨ７．５にするための緩衝物質を含有する。一部の実施形態では、緩衝物質は、５～５０ｍＭ、または約２０ｍＭの濃度のＨＥＰＥＳまたはリン酸塩である。組成物はまた、キレート剤を含有することができ、キレート剤はデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡであり、０．１～１ｍＭまたは約０．５ｍＭの濃度である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は保存安定性である。

【００６０】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、保存時のカプセル封入された化合物の分解に対して安定である。一部の実施形態では、加速された分解条件（３７℃）下での保存時のカプセル封入された化合物の分解は、パーセンテージポイントで表される化合物純度の低下によって測定した場合、３カ月の保存後に５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、または約１％以下である。一部の実施形態では、加速された分解条件（３７℃）下での保存時のカプセル封入された化合物の分解は、リポソーム組成物中のインタクトな化合物の全濃度の低下によって測定した場合、３カ月の保存後に２０％未満、１０％未満、または５％未満である。一部の実施形態では、カプセル封入された化合物はＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８である。したがって、３７℃で３カ月間保存したＡＫＧ－３８のリポソーム組成物は、ＡＫＧ－３８純度の９８．９９％から９８．０７％への著しく低い減少（０．９２パーセンテージポイント）およびインタクトなＡＫＧ－３８濃度の１９．９ｍｇ／ｍｌから１９．０６ｍｇ／ｍｌへの低い全減少（４．２％低下）を示した（実施例６８）。

【図面の簡単な説明】

【００６１】

【図１】化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のリポソーム充填に対するｐＨの効果を示すグラフである。

【図２】異なる薬物と脂質（ＤＬ）の比のＴＥＡ－ＳＯＳ捕捉剤を用いた、化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のリポソーム中へのカプセル封入を示すグラフである。図２Ａは、充填後の薬物と脂質の比（ＤＬ）として表される、リポソームペイロードに対する、リポソームリン脂質（ＰｈＬ）１モルあたりの薬物のグラム数の、添加薬物と脂質（ＤＬ０）の比の効果を示す。図２Ｂは、ＤＬ０に対する充填後ＤＬのパーセントとして算出される、リポソーム充填効率に対するＤＬ０比（薬物と脂質の入力比）の効果を示すグラフである。

【図３Ａ】異なるＤＬ比の捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いた、化合物ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のリポソーム中へのカプセル封入を示すグラフである。Ａ

ＫＧ－５およびＡＫＧ－１６に関するリポソームペイロードに対するＤＬ０比の効果を示す。
【図３Ｂ】異なるＤＬ比の捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いた、化合物ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のリポソーム中へのカプセル封入を示すグラフである。ＡＫＧ－５およびＡＫＧ－１６に関するリポソーム充填効率に対するＤＬ０比の効果を示す。
【図３Ｃ】異なるＤＬ比の捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いた、化合物ＡＫＧ－３のリポソーム中へのカプセル封入を示すグラフである。ＡＫＧ－３に関するリポソームペイロードに対するＤＬ０比の効果を示す。
【図３Ｄ】異なるＤＬ比の捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いた、化合物ＡＫＧ－３のリポソーム中へのカプセル封入を示すグラフである。ＡＫＧ－３に関するリポソーム充填効率に対するＤＬ０比の効果を示す。
【図４】異なるＤＬ０比の捕捉剤としてのＴＥＡ－ＳＯＳおよび硫酸アンモニウムを用いたＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のカプセル封入を示すグラフである。図４Ａは、リポソームペイロードに対するＤＬ０比の効果を示す。図４Ｂは、充填効率に対するＤＬ０比の効果を示す。
【図５Ａ】実施例１９に記載される通り、マウス（「マウス」と表記）またはヒト（「ヒト」と表記）の血漿とのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの接触時の化合物ＡＫＧ－２８をカプセル封入するリポソームからの迅速な薬物漏出の依存性を示すグラフである。リポソームは、５ｍｏｌ％のＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ（「ＤＳＰＥ」と表記）またはＰＥＧ－ＤＳＧ（「ＤＳＧ」と表記）を含有していた。捕捉剤：０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）。
【図５Ｂ】実施例１９に記載される通り、マウス（「マウス」と表記）またはヒト（「ヒト」と表記）の血漿とのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの接触時の化合物ＡＫＧ－３８をカプセル封入するリポソームからの迅速な薬物漏出の依存性を示すグラフである。リポソームは、５ｍｏｌ％のＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ（「ＤＳＰＥ」と表記）またはＰＥＧ－ＤＳＧ（「ＤＳＧ」と表記）を含有していた。捕捉剤：０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）。
【図５Ｃ】実施例１９に記載される通り、マウス（「マウス」と表記）またはヒト（「ヒト」と表記）の血漿とのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの接触時の化合物ＡＫＧ－２８をカプセル封入するリポソームからの迅速な薬物漏出の依存性を示すグラフである。リポソームは、５ｍｏｌ％のＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ（「ＤＳＰＥ」と表記）またはＰＥＧ－ＤＳＧ（「ＤＳＧ」と表記）を含有していた。捕捉剤：１Ｎ八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース（ＴＥＡ－ＳＯＳ）。
【図５Ｄ】実施例１９に記載される通り、マウス（「マウス」と表記）またはヒト（「ヒト」と表記）の血漿とのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの接触時の化合物ＡＫＧ－３８をカプセル封入するリポソームからの迅速な薬物漏出の依存性を示すグラフである。リポソームは、５ｍｏｌ％のＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ（「ＤＳＰＥ」と表記）またはＰＥＧ－ＤＳＧ（「ＤＳＧ」と表記）を含有していた。捕捉剤：１Ｎ八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース（ＴＥＡ－ＳＯＳ）。
【図６】式（Ｉ）の化合物の番号付き環構造を表す図である。
【図７】１０ｍｇ／ｋｇ（菱形）、２０ｍｇ／ｋｇ（四角）、および４０ｍｇ／ｋｇ（丸）のＬｓ－ＡＫＧ２８の単回静脈内用量（ＩＶｘ１）の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。５％メチルセルロース（ｐＨ３～４）中の５０ｍｇ／ｋｇ（単回経口用量、ＰＯｘ１）のリネゾリドの血漿濃度対時間プロファイルも、比較のために含ませた。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図８】２０ｍｇ／ｋｇ（菱形）、４０ｍｇ／ｋｇ（四角）、および８０ｍｇ／ｋｇ（菱形）のＬｓ－ＡＫＧ３８の単回静脈内用量（ＩＶｘ１）の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。５％メチルセルロース（ｐＨ３～４）中の５０ｍｇ／ｋｇ（単回経口用量、ＰＯｘ１）のリネゾリドの血漿濃度対時間プロファイルも、比較のために含ませた。平均およびＳＤ濃度を

、各時点で提示する。
【図９Ａ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、１０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図９Ｂ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、２０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図９Ｃ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、４０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１０Ａ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、２０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ３８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１０Ｂ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、４０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ３８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１０Ｃ】１日目（丸）、１５日目（四角）、２９日目（菱形）、および４３日目（三角）での、８０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ３８、ＩＶｘ１の投与後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける総薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１１Ａ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈内注射後のＣＤ－１マウスにおける、脂質（非交換性ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ標識）と、リポソームＡＫＧ－２８のための薬物との両方の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１１Ｂ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈内注射後のＣＤ－１マウスにおける、脂質（非交換性ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ標識）と、リポソームＡＫＧ－３８のための薬物との両方の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１１Ｃ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈内注射後のＣＤ－１マウスにおける、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の両方に関する、リポソームからの薬物放出速度の尺度である、血漿薬物と脂質の比の変化を示すグラフである。平均およびＳＤ濃度を、各時点で提示する。
【図１２】第１および第４の週用量後のリポソームＡＫＧ－２８およびリポソームＡＫＧ－３８の複数製剤である、比較されたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の注射用量％として提示される血漿薬物濃度を示すグラフである。マウスに、合計４回の注射にわたって週１回、示された用量および製剤を注射した。
【図１３Ａ】経時的なメスのＣＤ－１マウスの体重に対するＬｓ－ＡＫＧ２８の用量漸増の効果を示すグラフである。
【図１３Ｂ】経時的なメスのＣＤ－１マウスの体重に対するＬｓ－ＡＫＧ３８の用量漸増の効果を示すグラフである。
【図１３Ｃ－１】メスのＣＤ－１マウスにおける血液パラメータ（ＲＢＣ、ＨＴＣ、ＰＬＴ、ＷＢＣ）および血液生化学（ＡＬＴ、ＡＳＴ）パラメータに対するＢＰまたはＢＰＭと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１３Ｃ－２】メスのＣＤ－１マウスにおける血液パラメータ（ＲＢＣ、ＨＴＣ、ＰＬＴ、ＷＢＣ）および血液生化学（ＡＬＴ、ＡＳＴ）パラメータに対するＢＰまたはＢＰＭ

と組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１３Ｄ】メスのＣＤ－１マウスにおける組織病理学的所見に対するＬｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８単剤療法の効果を示すヒートマップである。
【図１４Ａ】経時的なメスのＣＤ－１マウスの体重に対する、ベダキリンおよびプレトマニド（ＢＰ）またはベダキリン、プレトマニド、およびモキシフロキサシン（ＢＰＭ）と組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８の効果を示すグラフである。
【図１４Ｂ】経時的なメスのＣＤ－１マウスの体重に対する、ＢＰまたはＢＰＭと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１４Ｃ－１】メスのＣＤ－１マウスにおける血液パラメータ（ＲＢＣ、ＨＴＣ、ＰＬＴ、ＷＢＣ）および血液生化学（ＡＬＴ、ＡＳＴ）パラメータに対する、ＢＰまたはＢＰＭと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１４Ｃ－２】メスのＣＤ－１マウスにおける血液パラメータ（ＲＢＣ、ＨＴＣ、ＰＬＴ、ＷＢＣ）および血液生化学（ＡＬＴ、ＡＳＴ）パラメータに対する、ＢＰまたはＢＰＭと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１４Ｄ】メスのＣＤ－１マウスにおける組織病理学的所見に対するＢＰまたはＢＰＭと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すヒートマップである。
【図１５Ａ】経時的な、単独の、またはＢＰと組み合わせた、５０ｍｇ／ｋｇで週２回（２ｑｗ）または１００ｍｇ／ｋｇで週１回（１ｑｗ）、注射したＬｓ－ＡＫＧ２８で処置したメスのＣＤ－１マウスにおける体重変化を示すグラフである。
【図１５Ｂ】単独の、またはＢＰと組み合わせた、１００ｍｇ／ｋｇで２ｑｗまたは２００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ注射したＬｓ－ＡＫＧ３８で処置したメスのＣＤ－１マウスにおける体重変化を示すグラフである。
【図１５Ｃ－１】単独の、またはＢＰと組み合わせた、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは１００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（１００ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは２００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）で処置したメスのＣＤ－１マウスにおける血液および血液生化学パラメータを示すグラフである。
【図１５Ｃ－２】単独の、またはＢＰと組み合わせた、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは１００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（１００ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは２００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）で処置したメスのＣＤ－１マウスにおける血液および血液生化学パラメータを示すグラフである。
【図１５Ｄ】単独の、またはＢＰと組み合わせた、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは１００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（１００ｍｇ／ｋｇで２ｑｗもしくは２００ｍｇ／ｋｇで１ｑｗ）で処置したメスのＣＤ－１マウスにおける組織病理学的結果を示すヒートマップである。
【図１６Ａ】経時的な合計８週間にわたって慢性的に処置されたオスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける体重に対するＬｓ－ＡＫＧ２８の効果を示すグラフである。
【図１６Ｂ】経時的な合計８週間にわたって慢性的に処置されたオスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける体重に対するＬｓ－ＡＫＧ３８の効果を示すグラフである。
【図１７】２つの主要なコレステロール酸化分解生成物である７－ヒドロキシ－コレステロール（アルファおよびベータ異性体）、および７－ケトコレステロールを示すスキームである。
【図１８】ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）のリゾホスファチジルコリンおよびステアリン酸への分解を示すスキームである。水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）は、１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリンであり、１および２アシル鎖位置は、主としてステアリン酸（Ｃ１８）およびパルミチン酸（Ｃ１６）である、飽和脂肪酸Ｃ１６～Ｃ２２である。ジステアロイルホスファチジルコリンはＨＳＰＣの最大の成分である。
【図１９Ａ】室温での１２週間のＡＫＧ－３８リポソーム組成物のコレステロール分解についてのデータを示すグラフである。

【図１９Ｂ】室温での１２週間のＡＫＧ－２８リポソーム組成物のコレステロール分解についてのデータを示すグラフである。
【図２０Ａ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈注射後のＡＫＧ－２８薬物、リポソーム脂質（交換不可能なＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ標識を使用する）、ならびにリポソームＡＫＧ－２８ロットＬｓ－３３８（試料７１）、Ｌｓ－３３９（試料７４）、およびＬｓ－３４０Ｓ（試料７６）についての血漿薬物対脂質比の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。リポソームの特徴を実施例５９に示す。データポイントは３匹の動物の平均である。
【図２０Ｂ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈注射後のＡＫＧ－２８薬物、リポソーム脂質（交換不可能なＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ標識を使用する）、ならびにリポソームＡＫＧ－２８ロットＬｓ－３３８（試料７１）、Ｌｓ－３３９（試料７４）、およびＬｓ－３４０Ｓ（試料７６）についての血漿薬物対脂質比の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。リポソームの特徴を実施例５９に示す。データポイントは３匹の動物の平均である。
【図２０Ｃ】ＣＤ－１マウスにおける単回静脈注射後のＡＫＧ－２８薬物、リポソーム脂質（交換不可能なＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ標識を使用する）、ならびにリポソームＡＫＧ－２８ロットＬｓ－３３８（試料７１）、Ｌｓ－３３９（試料７４）、およびＬｓ－３４０Ｓ（試料７６）についての血漿薬物対脂質比の血漿濃度対時間プロファイルを示すグラフである。リポソームの特徴を実施例５９に示す。データポイントは３匹の動物の平均である。
【図２１】様々な濃度のデフェロキサミンの存在下、３７℃で保存した際のＡＫＧ－３８リポソーム組成物ロットＬｓ－３７１（実施例６７）のコレステロール分解についてのデータを示すグラフである。
【図２２】様々な濃度のデフェロキサミンの存在下、３７℃で保存した際のＡＫＧ－３８リポソーム組成物ロットＬｓ－３７１（実施例６７）のＨＳＰＣ分解についてのデータを示すグラフである。
【図２３】様々な濃度のデフェロキサミンの存在下、３７℃で保存した際のＡＫＧ－３８リポソーム組成物ロットＬｓ－３７１（実施例６７）のｐＨ変化を示すグラフである。
【図２４】本開示の一実施形態による合成スキーム１を示す。
【図２５】本開示の一実施形態による合成スキーム２を示す。
【図２６】本開示の一実施形態による合成スキーム３を示す。
【図２７】本開示の一実施形態による合成スキーム４を示す。
【図２８】本開示の一実施形態による合成スキーム５を示す。
【発明を実施するための形態】
【００６２】
本開示では、オキサゾリジノンリポソーム組成物を記載する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、脂質小胞にカプセル封入された式（Ｉ）の化合物を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質およびコレステロールを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールとを含む脂質小胞とを含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールとを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールとを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよ

び非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６０ｍｏｌ％のコレステロールとを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～５５ｍｏｌ％のコレステロールとを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％のコレステロールとを含む脂質小胞を含む。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、その薬学的に許容される塩としてのオキサゾリジノン化合物、ならびにリン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５５ｍｏｌ％のコレステロールとを含む脂質小胞を含む。

【００６３】

一部の実施形態では、保存中のリン脂質またはコレステロール分解の量の減少によって特徴付けられるオキサゾリジノンリポソーム組成物が提供される。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、約７以上（例えば、７～８）のｐＨを有し、リン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロール（例えば、５０～６５ｍｏｌ％、５０～６０ｍｏｌ％、５０～５５ｍｏｌ％、約５０ｍｏｌ％、または約５５ｍｏｌ％）とを含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、リン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールと組み合わせて、ＤＦＯまたはＥＤＴＡなどのキレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、７～８（７～７．７、７．１～７．７、７．３～７．７、および約７．５を含む）のｐＨを有するオキサゾリジノンリポソーム組成物は、リン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールと組み合わせて、ＤＦＯまたはＥＤＴＡなどのキレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、リン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールとを含む小胞と組み合わせて、リポソーム外のアンモニウムをさらに含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、リン脂質と、リポソーム組成物中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールとを含むリポソーム小胞へのオキサゾリジノンの薬物充填中に生成されるリポソーム外のアンモニウムをさらに含む。

【００６４】

上記した一般的な説明および以下の詳細な説明は、単に例示的かつ説明的なものであって、本開示の組成物および方法を限定するものではないことを理解されたい。

【００６５】

［定義］

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲において採用されるある特定の用語をここに集める。別段の定義がない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【００６６】

本明細書にて、以下の用語および語句は、以下の意味を有することを意図される。

【００６７】

「ａ」および「ａｎ」は、本明細書にて、冠詞の文法的対象物の１つまたは複数（すなわち、少なくとも１つ）を指すために使用される。例として、「要素」は、１つの要素または複数の要素を意味する。

【００６８】

「含んでいる」または「含む」は、本明細書にて、所与の実施形態に存在するが、特定されていない要素を含めることができる、組成物、方法、およびそれぞれの構成要素（複

数可）を参照するために使用される。

【００６９】

「から本質的になる」は、本明細書にて、所与の実施形態に必要とされる要素を指す。この用語は、本開示のその実施形態の基本的および新規のまたは機能的特徴（複数可）に実質的に影響しない追加の要素の存在を可能にする。

【００７０】

「からなる」は、本明細書に記載の組成物、方法、およびそれらの各構成要素を指し、これらは、実施形態のその説明に記載されていない任意の要素を排除する。

【００７１】

「含んでいる」は、本明細書にて、「からなる」および「から本質的になる」を含む。

【００７２】

「上記で言及されるように」または「上記で言及された」、「前出の」と本明細書にて言及される場合、先行する頁のいずれかにおいて本明細書内で行われた開示のいずれかに言及される。

【００７３】

「本明細書において言及されるように」、「本明細書に記載の」、「本明細書にて提供される」、または「本テキストに言及されるように」、または「本明細書に記述された」と本明細書にて言及される場合、本明細書は、先行するかまたは後述の頁のいずれかにおいて明細書内で行われる開示のいずれかに言及される。

【００７４】

「約」は、本明細書にて、記述値の２０％以内、１０％以内、および５％以内の許容可能な変動を意味する。ある特定の実施形態では、「約」は、±１％、２％、３％、４％、５％、１０％または２０％の変動を意味し得る。

【００７５】

「有効量」とは、本明細書にて、化合物または組成物に関し、殺菌効果または静菌効果を引き起こすのに十分な活性化合物（本明細書では活性剤または薬物とも称する）の量を意味する。一実施形態では、有効量は、処置される細菌感染の症状を十分に緩和する活性化合物の量を意味する「治療有効量」である。

【００７６】

「対象」（または代替的に「患者」）は、本明細書にて、予防的または治療的処置を受ける、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを指す。

【００７７】

「投与」または「投与すること」は、本明細書にて、化合物または医薬組成物を、それを必要とする対象に、限定されないが、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、吸入、頬、眼、舌下、膣、直腸などに導入する全ての手段を含む。化合物または組成物の投与は、適切には非経口的である。例えば、化合物または組成物は、優先的には静脈内に投与できるが、腹腔内にまたは吸入などにより投与することもでき、現在、トリ型結核菌の処置においてリポソームアミカシンについて臨床において使用されている（Ｓｈｉｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｍｉｋａｃｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｖｉｕｍ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｌｕｎｇ Ｄｉｓｅａｓｅ．Ｄｒｕｇｓ．２０１９ Ａｐｒ；７９（５）：５５５－５６２を参照されたい。）。

【００７８】

「処置する」、「処置すること」、および「処置（treatment）」は、本明細書にて、本明細書に記載のものなどの治療的または予防的手段を指す。

【００７９】

「相乗」および「相乗的」は、本明細書にて、一緒に使用される化合物を用いて達成される効果が、化合物を別々に使用することから生じる効果の合計よりも大きいこと、すなわち、別々に投与される２つの活性成分に基づいて予測される効果よりも大きいことを意味する。

【００８０】
「薬学的に許容される塩」は、所望の薬理活性を有する本開示に係る化合物の、比較的に非毒性な、無機または有機酸付加塩を指す。
【００８１】
「アルキル」は、炭素鎖が別途定義されない限り、直鎖もしくは分枝鎖の、またはそれらの組合せであり得る飽和炭素鎖を意味する。アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ｓｅｃ－およびｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどが挙げられる。
【００８２】
「アミノアルキル」は、アルキル炭素鎖の少なくとも１つの炭素が、アミノ基と結合を形成するアルキルを意味し、上記アミノ基は、第１級アミノ基、モノアルキル置換（第２級）アミノ基、ジアルキル置換（第３級）アミノ基、またはアルキル置換アミノ基であり、アミン窒素原子、およびアミン水素を置換するアルキル鎖は複素環を形成する。
【００８３】
「リポソーム」は、二重層（単層）および／または、中央の水性コンパートメントを囲むリン脂質などの両親媒性分子によって形成される水性コンパートメントによって分離された同心円状の複数の二重層（多層）で構成される小胞を意味する。リポソーム薬物製品では、原薬は、一般的にリポソームに含有される。典型的には、水溶性薬物は水性コンパートメント（複数可）に含有され、疎水性薬物はリポソームの脂質二重層（複数可）に含有される。リポソーム製剤からの薬物の放出、とりわけリポソームクリアランスおよび循環半減期などの他の特徴は、リポソーム中のポリエチレングリコールおよび／またはコレステロールまたは他の潜在的添加剤の存在によって修飾できる。
【００８４】
「単層リポソーム」は、「単層小胞」とも呼ばれ、単一の閉鎖された水性コンパートメントを画定する１つの脂質二重層膜を含むリポソームである。二重層膜には、内層と外層（リーフレット）の２層の脂質が含まれる。外層の脂質分子は、それらの親水性（「頭部」）部分が外側の水性環境に向かって配向され、それらの疎水性（「尾部」）部分がリポソームの内部に向かって下向きに向かって指向される。脂質の内層は外層の直下にあり、脂質の頭部はリポソームの水性内部に面し、尾部は脂質の外層の尾部に向いている。
【００８５】
「多層リポソーム」は、「多層小胞」または「複数の層状小胞」とも呼ばれ、１を超える脂質二重層膜を含み、これらの膜は、複数の閉鎖した水性コンパートメントを画定する。膜は同心円状に配置されており、異なる膜は水性コンパートメントによって分離されている。
【００８６】
「カプセル封入」および「捕捉される」は、本明細書にて、リポソーム中またはリポソームとともに、オキサゾリジノン医薬剤の取り込みまたは会合を指す。
【００８７】
「ＤＬ」、「ＤＬ比」、「Ｄ／Ｌ」、または「Ｄ／Ｌ比」は、互換的に使用され、薬物対リポソーム脂質の比を指す。特に断らない限り、それはリポソームリン脂質（ＰｈＬ）のモルあたりの薬物のグラムとして表される。
【００８８】
コレステロールに関し、「ｍｏｌ％」は、パーセンテージポイントで表されるコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質のモル量の合計に対するコレステロールのモル量を指す。例えば、コレステロールとＨＳＰＣを含有するリポソーム中の「５５ｍｏｌ％コレステロール」とは、４５ｍｏｌ部のＨＳＰＣあたり５５ｍｏｌ部のコレステロールの組成物を指す。
【００８９】
ＰＥＧ－脂質に関し、「ｍｏｌ％」は、パーセンテージポイントで表されるＰＥＧ－脂質と非ＰＥＧ化リン脂質のモル量の比を指す。例えば、ＨＳＰＣとＰＥＧ－ＤＳＰＥを含

有するリポソーム中の「５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＰＥ」とは、１００ｍｏｌ部のＨＳＰＣあたり５ｍｏｌ部のＰＥＧ－ＤＳＰＥを有する組成物を指す。

【００９０】

「八硫酸スクロース（sucrose octasulfate）」、「スクロソファート」、および「スクロオクタ硫酸塩」とは、同じ化合物、八硫酸スクロース（sucrose octasulfuric acid）またはそのアニオンを指し、本明細書では互換的に使用される。

【００９１】

「Ａｃ」、「Ｍｅ」、および「Ｅｔ」は、化学式中において、それぞれ、アセチル基（CH_3CO）、メチル基（CH_3）、およびエチル基（C_2H_5）を指す。

【００９２】

「遊離塩基濃度」または「ＦＢ濃度」は、その遊離塩基形態における塩形成化合物の質量濃度を表すために使用される。デフォルトでは、塩の形態で合成および単離された化合物（例えば、二塩酸塩の塩酸塩）について、質量に基づく濃度または比（例えば、ｍｇ／ｍｌまたはｇ／ｍｏｌリン脂質）は、この塩の形態の濃度または比として表される。しかし、記述する場合、塩の形態で単離された化合物（例えば、ＡＫＧ－２８二塩酸塩）の濃度はまた、無水遊離塩基（ＦＢ濃度）としての化合物の当量濃度として表される。ＦＢ濃度を得るために、遊離塩基形態の化合物の算出された分子量を塩形態の算出された分子量で割り、濃度にこの係数を乗じる。例えば、遊離塩基としてのＡＫＧ－２８の分子量は４２６．４６であり、二塩酸塩形態（この化合物が単離される）の分子量は４９９．３７である。したがって、ＦＢ基準でＡＫＧ－２８の濃度を算出するための係数は、４２６．４６／４９９．３７＝０．８５４なので、例えば、１０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８二塩酸塩は、８．５４ｍｇ／ｍｌのＦＢ濃度を有する。化合物がさらに既知量の水（例えば、ＡＫＧ－２８二塩酸塩一水和物）を含有する場合、既知の含水量に対しても補正が行われる。遊離塩基として単離された化合物（例えば、ＡＫＧ－３８）の質量濃度は、常にＦＢ濃度として表される。

【００９３】

本明細書にて開示する質量濃度および比は、化合物の塩形態に依存するが、化合物の濃度および比は、それらの塩形態とは無関係にモル単位で表すことができる。例えば、ＡＫＧ－２８の質量濃度または量を、二塩酸塩のその単離された合成生成物形態に基づいて、本明細書において引用されるように、モル濃度に変換するために、質量濃度または量は、４９９．４ｇ／ｍｏｌのＡＫＧ－２８二塩酸塩の分子量で除される。したがって、３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬとして本明細書において引用される、リポソーム組成物中のＡＫＧ－２８のＤＬ比は、３３０／４９９．４＝０．６６１ｍｏｌ／ｍｏｌ　ＰｈＬとして表され；１０ｍｇ／ｍＬとして引用されるＡＫＧ－２８の濃度は、１０／４９９．４＝２０．０ｍＭとして表される。化合物遊離塩基基準で濃度を引用した場合、質量の量および濃度は化合物遊離塩基の分子量で除される。したがって６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬとして本明細書において引用される、リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８のＤＬ比は、６００／４６８．５＝１．２８１ｍｏｌ／ｍｏｌ　ＰｈＬとして表され、ＡＫＧ－３８は、４６８．５の分子量を有する遊離塩基の形態で合成から単離される。したがって、引用されたＡＫＧ－３８の２０ｍｇ／ｍＬ濃度は、モル換算で２０／４６８．５＝４２．７ｍＭとして表される。

【００９４】

様々な態様および実施形態について、以下のサブセクションにて詳細に記載する。

【００９５】

［化合物］

一部の実施形態にて、オキサゾリジノン化合物を含むリポソーム組成物が提供される。

【００９６】

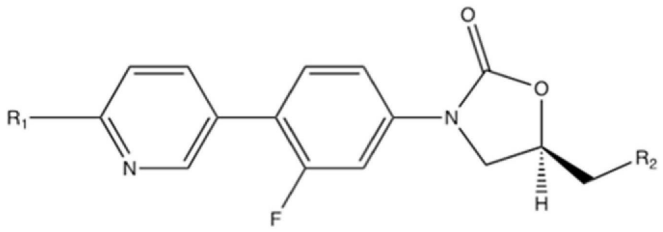
オキサゾリジノンは、タンパク質合成を阻害することによってそれらの機能を発揮する合成抗生物質である。リネゾリド（ＬＺＤ）は、結核菌に対して静菌活性を示すオキサゾリジノン化合物である。しかし、ＬＺＤの投与は、貧血、血小板減少症、および末梢神経

障害などの重篤な副作用を引き起こすことがある。テジゾリドは、グラム陽性細菌を阻害することが示されているオキサゾリジノン化合物である。リン酸テジゾリドの副作用は類似しているが、一般的にリネゾリドよりも軽度である。しかし、リン酸テジゾリドは、リネゾリドの長期投薬の経験と比較して、結核の処置に必要とされるような長期投薬の経験は限られている。

【００９７】

本開示の一態様は、オキサゾリジノンのアミノアルキル誘導体である化合物に関する（図６を参照されたい。）。一部の実施形態では、以下の化学式（Ｉ）：

【化８】



式(I)

［式中、

R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、

R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。］

を有する化合物およびその薬学的に許容される塩。

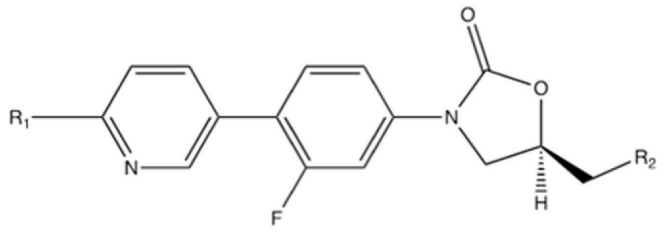
【００９８】

一部の実施形態では、アミノアルキルは、ジメチルアミノアルキルである。一部の実施形態では、オキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、オキサゾリジノン環のR_2位置におけるアミン基またはアセトアミド基のいずれか、およびテトラゾール環上にジメチルアミノエチル基を含む。

【００９９】

他の一実施形態では、以下の化学式（Ｉ）：

【化９】



式(I)

［式中、

R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、

R_1は、１’においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。］

を有する化合物およびその薬学的に許容される塩。

【０１００】

下記の表１の化学構造を有するオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体を実施例１に記載されるように合成した。

【０１０１】

本開示に係る化合物は、遊離形態、例えば、遊離塩基として、遊離酸として、または両性イオンとして存在できるか、または塩の形態で存在できる。上記塩は、薬学において慣用的に使用される任意の塩、有機もしくは無機付加塩、または共結晶、特に任意の薬学的に許容される有機もしくは無機付加塩、または共結晶であり得る。特定の塩形態またはイオン形態の化合物を示す化学式は、非解離遊離塩基（または遊離酸）形態のこの化合物も開示することが理解される。

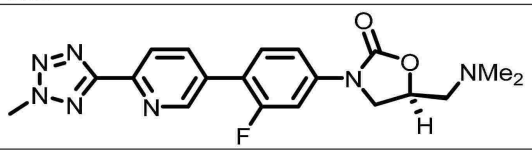
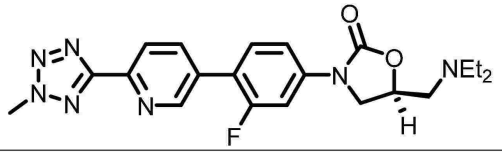
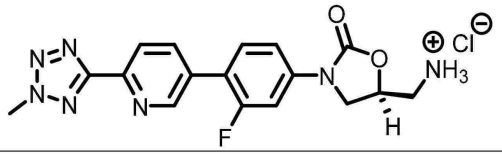
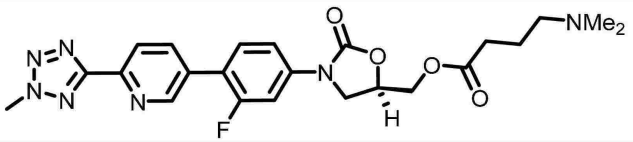
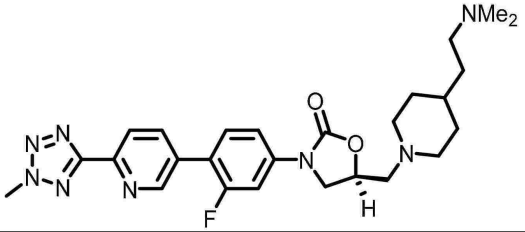
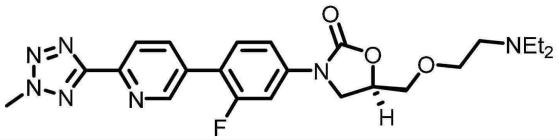
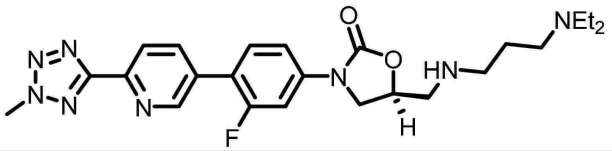
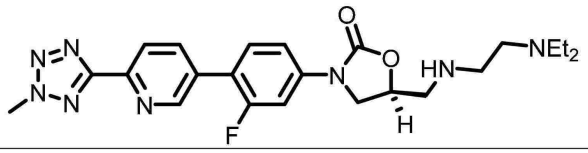
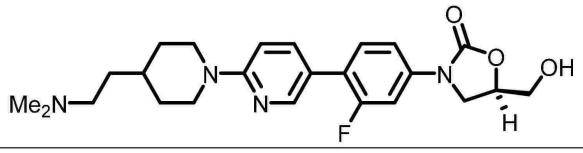
【０１０２】

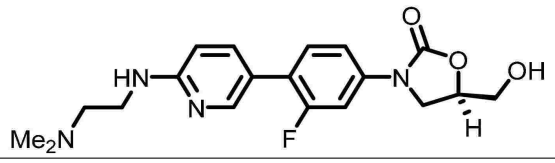
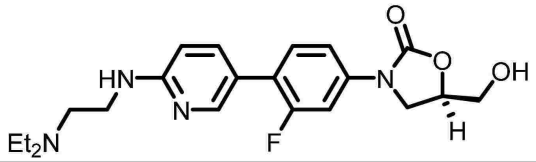
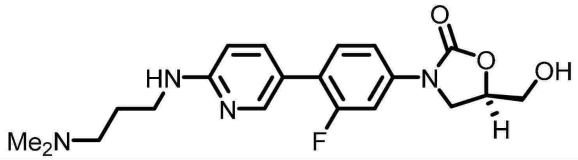
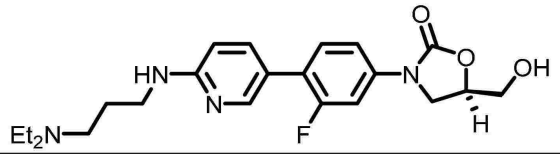
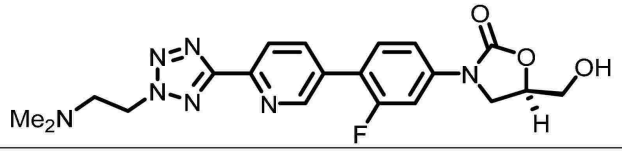
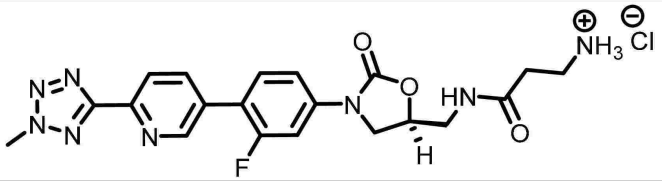
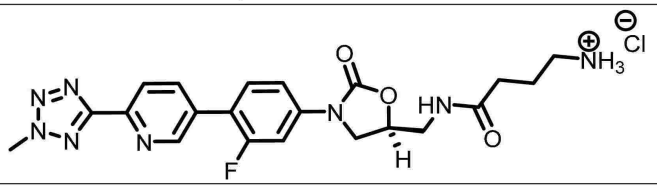
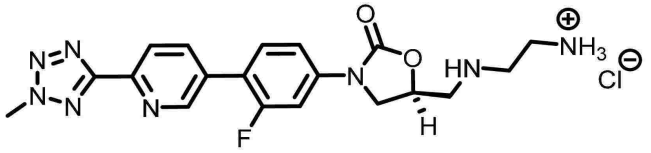
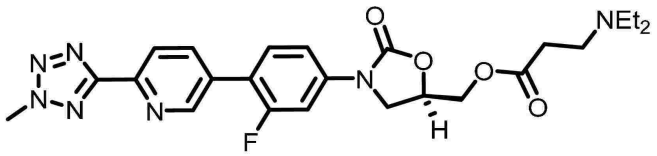
本開示は、化合物の全ての立体異性体形態を包含する。一部の実施形態では、以下の表１の化合物は、実施的に純粋である（すなわち、少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、例えば、１００％である。）。

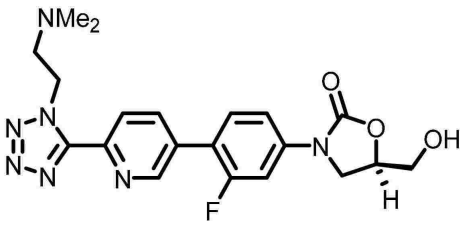
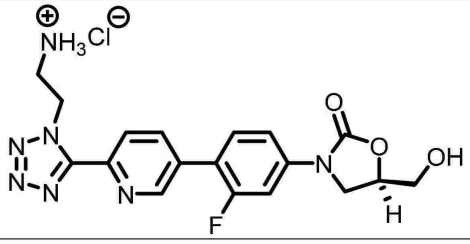
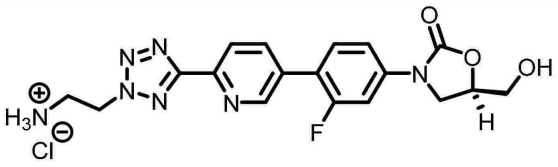
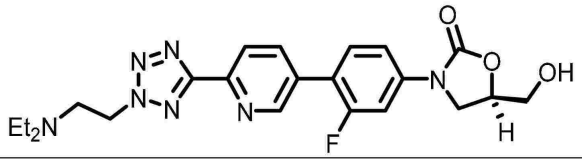
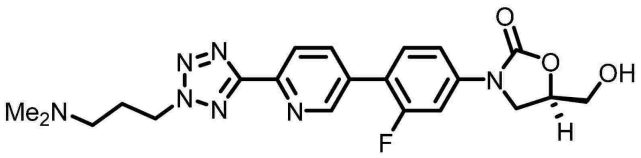
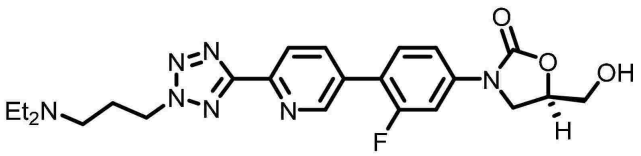
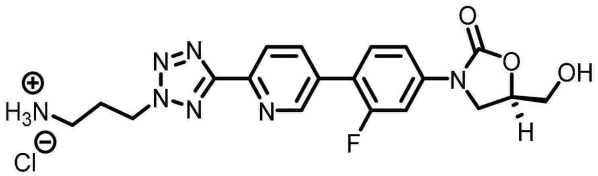
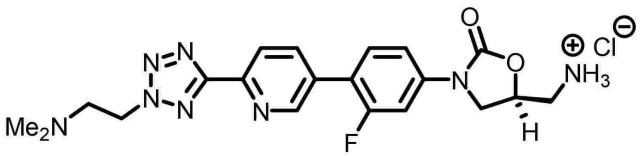
【０１０３】

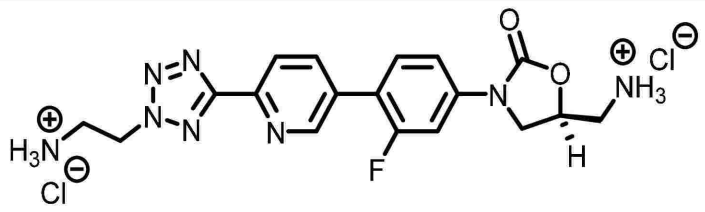
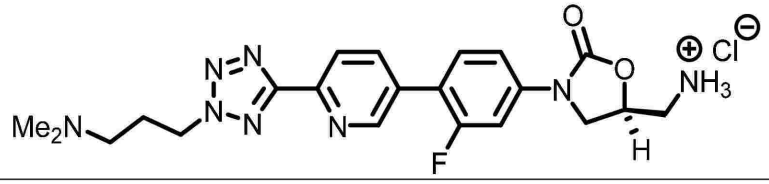
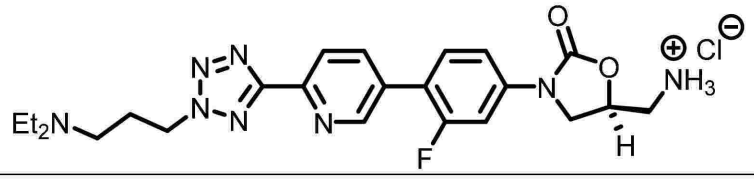
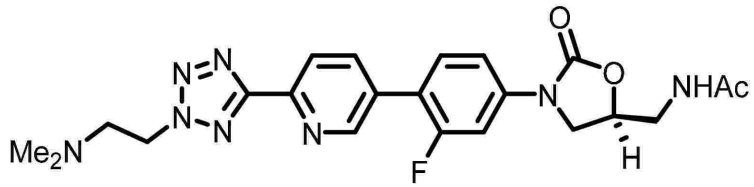
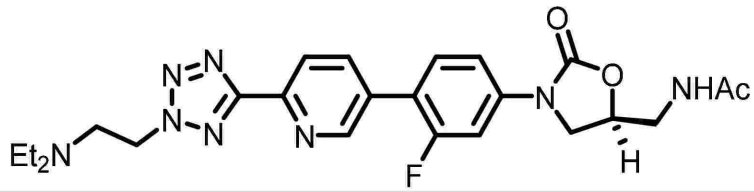
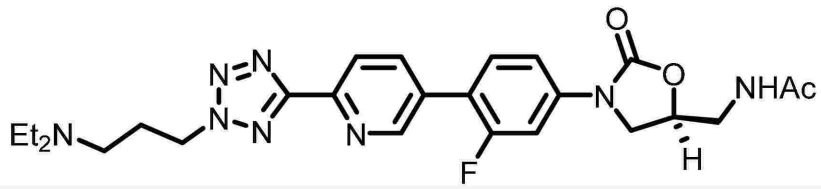
【表５】

表1

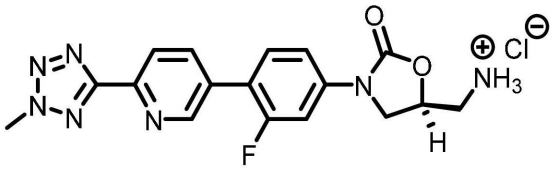
名称	構造
AKG-1	
AKG-2	
AKG-3	
AKG-5	
AKG-6	
AKG-7	
AKG-8	
AKG-9	
AKG-11	

AKG-12	
AKG-13	
AKG-14	
AKG-15	
AKG-16	
AKG-17	
AKG-18	
AKG-19	
AKG-20	

AKG-21	
AKG-22	
AKG-23	
AKG-24	
AKG-25	
AKG-26	
AKG-27	
AKG-28	

AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

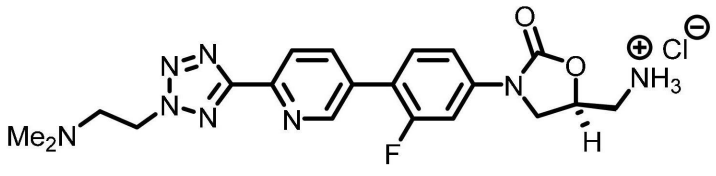
【０１０４】
一部の実施形態では、化合物は、以下の化学式：
【化１０】



式1a

を有する。
【０１０５】
一部の実施形態では、化合物は、以下の化学式：

【化１１】



式1b

を有する。

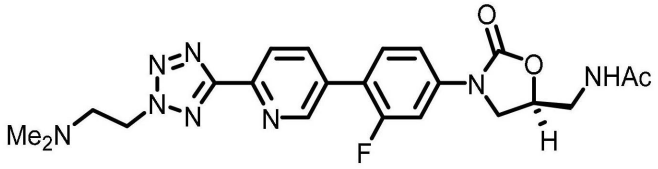
【０１０６】

一部の実施形態では、式１ｂの化合物は水性エタノールから結晶化される。一部の実施形態では、式１ｂの化合物は、二塩酸塩または二塩酸塩一水和物の形態である。

【０１０７】

一部の実施形態では、化合物は、以下の化学式：

【化１２】



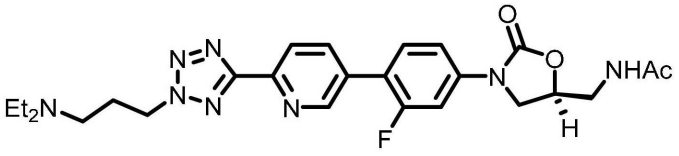
式1c

を有する。

【０１０８】

一部の実施形態では、化合物は、以下の化学式：

【化１３】



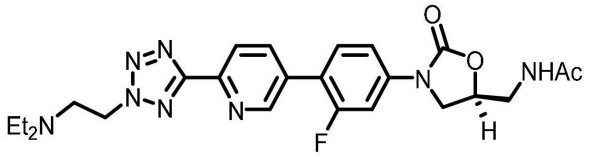
式1d

を有する。

【０１０９】

一部の実施形態では、化合物は、以下の化学式：

【化１４】



式1e

を有する。

【０１１０】

本明細書では、マイコバクテリウム感染の処置に有用である、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩が開示される。一部の実施形態では、化合物は、化学式１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄまたは１ｅを有する。一部の実施形態では、化合物は、化学式１ｂを有する。一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、最小阻止濃度（ＭＩＣ）、例えば、結核菌に対して、０．１μｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌ、０．２５μｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌ、０．１μｇ／ｍｌ～０．２５μｇ／ｍｌ、０．１μｇ／ｍｌ～０．５μｇ／ｍｌ、０．２５μｇ／ｍｌ～０．５μｇ／ｍｌ、０．０１μｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌ、０．０１μｇ／ｍｌ～０．２５μｇ／ｍｌ、０．０１μｇ／ｍｌ～０．５μｇ／ｍｌ、０．０１μｇ／ｍｌ～０．１μｇ／ｍｌの範囲のＭＩＣを有する。一部

の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、最小阻止濃度（ＭＩＣ）、例えば、結核菌に対して、１μｇ／ｍｌ未満、０．２５μｇ／ｍｌ未満、または０．１μｇ／ｍｌ未満のＭＩＣを有する。一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、０．０１μｇ／ｍｌ～０．２５μｇ／ｍｌの範囲のＭＩＣを有する。一部の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、０．０１μｇ／ｍｌ～０．１μｇ／ｍｌの範囲のＭＩＣを有する。ＭＩＣ値は、細菌に応じて、本明細書にて提供される範囲よりも低くてもよいことが理解されるべきである。

【０１１１】

マイコバクテリウム、例えば、結核菌を処置するための一部の実施形態では、化合物（ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８）は０．１μｇ／ｍＬ未満のＭＩＣを有する。マイコバクテリウム、例えば、結核菌を処置するための一部の実施形態では、化合物は、少なくとも１，０００の、結核菌対ヒト腎臓細胞（ＶＥＲＯ）を死滅させる選択性指数（ＳＩ）を有する。マイコバクテリウム、例えば、結核菌を処置するための一部の実施形態では、化合物は、０．１μｇ／ｍＬ未満のＭＩＣ、および少なくとも１，０００の、結核菌対ヒト腎臓細胞（ＶＥＲＯ）を死滅させる選択性指数（ＳＩ）を有する。一部の実施形態では、化合物は、ＡＫＧ－２８（式１ｂ）またはＡＫＧ－３８（式１ｃ）の構造を有する。一部の実施形態では、ＭＩＣは０．０５μｇ／ｍＬ未満であり、ミトコンドリアタンパク質合成阻害（ＳＩ－ＭＰＳ）と比較した結核菌におけるＭＩＣの選択性指数は、ＡＫＧ－２８のように２０を超える。

【０１１２】

一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物は、結核菌用のリネゾリドと比較して、効力を調整した用量で、２～２０倍の増加（約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０）を有する。

【０１１３】

一部の実施形態では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）を処置するために、化合物は、２μｇ／ｍＬ未満の、ＭＲＳＡ株に対するＭＩＣを有する。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）を処置するための一部の実施形態では、化合物は、ヒトＶＥＲＯ腎細胞に対して１００μｇ／ｍＬを超えるＩＣ５０を有する。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）を処置するための一部の実施形態では、化合物は、２μｇ／ｍＬ未満の、ＭＲＳＡ株に対するＭＩＣ、およびヒトＶＥＲＯ腎細胞に対して１００μｇ／ｍＬを超えるＩＣ５０を有する。一部の実施形態では、化合物は、ＡＫＧ－３８（式１ｃ）、ＡＫＧ－３９（式１ｅ）、およびＡＫＧ－４０（式１ｄ）の構造を有する。

【０１１４】

（水溶解度）

一部の実施形態では、化合物は、塩の形態、例えば、塩酸塩またはメシル酸塩の形態であり、リポソーム中にカプセル封入する前に、１ｍｇ／ｍｌを超えて、好ましくは１０ｍｇ／ｍｌを超えて（および最大１ｇ／ｍｌ）で水に可溶性である。カプセル封入前の追加の塩には、限定されないが、ベシル酸塩、重酒石酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、エシル酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコール酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メチル硫酸塩、ナプシル酸塩、リン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、およびトシル酸塩が含まれ得る。一部の実施形態では、化合物は、リポソーム中にカプセル封入する前に、水和物または溶媒和物または共結晶の形態である。

【０１１５】

一部の実施形態では、薬物は、水溶解度が減少した、例えば、１ｍｇ／ｍＬ未満、好ましくは０．１ｍｇ／ｍＬ未満（０．１～０．００１ｍｇ／ｍＬ）の異なる塩形態でリポソームの内部に捕捉される。リポソームに一旦捕捉された化合物の塩には、限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、スクロソファート、あるいは種々のリン酸化もしくは硫酸化ポリオールまたはポリアニオンポリマーが含まれる。例示的なポリオールには、限定されないが、スクロース、エリスリトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトー

ル、イノシトール、およびそれらの組合せが含まれる。例示的なポリアニオンポリマーには、限定されないが、ポリビニルスルホン酸塩、ポリビニルスルホン酸塩、ポリリン酸塩、アクリル酸と硫酸ビニルアルコールとのコポリマー、およびそれらの組合せが含まれる。

【０１１６】

化合物の作業ストックを以下のように調製した。粉末形態の化合物（遊離塩基）のアリコートに、１Ｎ水溶液の形態の１～１．５当量のＨＣｌを添加し、混合物を均一になるまでボルテックスした。得られたケーキまたはシロップに、水を典型的には最終１０ｍｇ／ｍｌになるように添加し、完全な溶解を観察した。一部の例では、０．９５当量のＨＣｌを薬物の遊離塩基形態に添加し、２０ｍｇ／ｍｌストック溶液を調製した。

【０１１７】

本開示に係る化合物の水溶解度は、視覚的に透明な溶液を得るための以下の観察によって例示される。

【０１１８】

【表６】

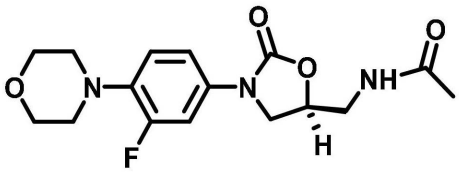
化合物	量, mg	添加される1N HCl の体積, ml	添加される水の体積, ml	遊離塩基の濃度% (w/w)
AKG-16 (遊離塩基)	22.3	0.052	-	30.0
AKG-28 (2HCl)	32.5	-	0.35	7.3
AKG-38 (遊離塩基)	31.7	0.067	0.35	7.1

【０１１９】

これらの結果は、本明細書にて提供される化合物が、

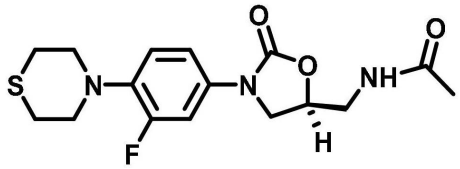
－リネゾリド（３ｍｇ／ｍｌ）（ｗｗｗ．ｄｒｕｇｂａｎｋ．ｃａ／ｄｒｕｇｓ／ＤＢ００６０１）

【化１５】



－ステゾリド（０．２３７ｍｇ／ｍｌ）（ｗｗｗ．ｄｒｕｇｂａｎｋ．ｃａ／ｄｒｕｇｓ／ＤＢ１１９０５）

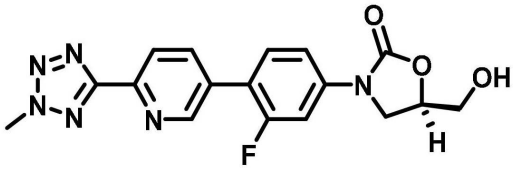
【化１６】



および

－テジゾリド（０．３８２ｍｇ／ｍＬ）（ｗｗｗ．ｄｒｕｇｂａｎｋ．ｃａ／ｄｒｕｇｓ／ＤＢ１４５６９）

【化１７】



の公知の水溶解度よりも高い水溶解度を有することを示す。

【０１２０】

一部の実施形態では、リポソームへのカプセル封入前に、本明細書に記載の化合物の水溶解度は、上記オキサゾリジノンの少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、または少なくとも４０倍である。

【０１２１】

本明細書に記載の化合物の優れた水溶性、およびそれらの両親媒性の弱塩基の特性は、膜貫通勾配ベースおよびリポソーム内錯体形成（能動充填）アプローチの効率的な使用を可能とし、薬物の全身投与後に、カプセル封入された薬物の感染組織への送達に好ましい高薬物／担体（薬物／脂質）比および薬物動態特性を有するこれらの化合物のリポソームカプセル封入形態を生成する。本明細書で使用される場合、両親媒性の弱塩基は、７～１２のｐＫａ、および１～６のｌｏｇＰを有する。

【０１２２】

（リポソーム充填特性および抗マイコバクテリア活性）

本明細書に記載の化合物の重要な特徴は、それらの弱い両親媒性塩基特性であり、これらの化合物のリポソームへの膜貫通勾配駆動充填を容易にする。一部の実施形態では、本開示に係る化合物の弱い塩基特性は、７．０～１２．０、７．５～１１．０、７．８～１０．５、または８．０～１０．０のｐＫａ範囲における電解解離定数によって特徴付けられる。一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物の両親媒性特性は、０．５～５．０、１．０～４．０、１．０～３．５、または１．０～３．０の範囲のｌｏｇＰパラメータによって特徴付けられる。リポソーム充填に関してこれらの好ましい特性を有するある特定の実施形態はまた、効率的であり、安定なリポソームカプセル封入に対して好ましくない特性を有する同じクラスの薬物中の類似化合物の活性に適合するかまたはそれを上回るマイコバクテリアに対して優れた活性を有することが、予想外に発見された。

【０１２３】

（リポソーム組成物）

結核、ならびに他のマイコバクテリアおよびグラム陽性細菌感染を処置するための組成物および組成物の使用が開示される。本明細書にて提供されるこれらの組成物は、低毒性薬物の投薬可能性を最大にするために高効率でカプセル封入された非常に強力であり、選択的なオキサゾリジノンを含有し、血漿の存在下で安定である。一部の実施形態では、組成物は、細菌またはマイコバクテリア感染部位での効率的な蓄積を可能にするために、静脈内投薬後の循環において、長期循環性であり、それらのカプセル封入薬物を保持する。一部の実施形態では、長期循環特性および薬物の非常に安定した保持と組み合わせた場合に達成され得る高用量は、これらの感染を処置するために典型的に利用される他の薬物の１日１回または１日２回の投与と比較した場合に、投与の頻度を減少させることを可能にする。

【０１２４】

本明細書には、細菌感染、特に結核菌感染を処置するための医薬組成物が開示される。一部の実施形態では、医薬組成物は、ポリアニオンまたはポリアニオンを含有する硫酸塩およびアミノアルキルオキサゾリジノン化合物を含むリポソーム組成物である。

【０１２５】

本開示の他の一態様は、細菌感染を処置する方法に関し、本方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の本明細書にて提供されるリポソーム組成物を投与することを含む。

【０１２６】
一部の実施形態では、細菌感染は結核菌感染である。一部の実施形態では、リポソーム小胞中の化合物は、約０．０１μｇ／ｍｌ～約０．２５μｇ／ｍｌの範囲の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を有する。一部の実施形態では、リポソーム小胞中の化合物は、約０．０１μｇ／ｍｌ～約０．１μｇ／ｍｌの範囲の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を有する。
【０１２７】
一部の実施形態では、組成物は、媒体中にリポソームを含み、リポソーム内空間は、ポリアニオンおよび式（Ｉ）の化合物を有する水相を含む。一部の実施形態では、組成物は、媒体中にリポソームを含み、リポソーム内空間は、ポリアニオンまたはポリアニオンを含有する硫酸塩および化合物ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８を含む。一部の実施形態では、媒体は水性媒体であり、その媒体中の一次組成物は、式（Ｉ）の化合物および対応する捕捉剤である。
【０１２８】
式（Ｉ）の化合物は、適切なポリアニオン、例えば、八硫酸スクロース（例えば、トリエチルアンモニウムスクロース八硫酸塩、（ＴＥＡ－ＳＯＳ）勾配から誘導される）または硫酸塩（例えば、硫酸アンモニウム勾配から誘導される）を用いてリポソーム内に捕捉できる。追加のポリアニオン捕捉剤には、限定されないが、イノシトール六リン酸、イノシトール六硫酸、ポリビニルスルホン酸、硫酸デキストラン、クエン酸塩、ポリリン酸塩、およびスラミンが含まれる。
【０１２９】
外側の水性媒体は、典型的には、適切な緩衝剤および等張剤で構成される。適切な緩衝剤には、ヒスチジン、クエン酸塩、ＨＥＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＥＳ、ＴＲＩＳ、リン酸塩、グリシン、イミダゾール、ホウ酸塩、炭酸塩、およびコハク酸塩が含まれ得る。等張剤には、塩化ナトリウム、塩化カリウム、スクロース、グリセリン、デキストロース、またはマンニトールなどの塩が含まれ得る。
【０１３０】
一部の実施形態では、組成物は、１種または複数のリン脂質、ステロール、および任意選択的に親水性ポリマーにコンジュゲートされた脂質（ポリマーコンジュゲートされた脂質）から形成された主として単層小胞中のポリアニオンでカプセル封入された、式（Ｉ）、または式１ａ、１ｂ、１ｃもしくは１ｄの化合物、あるいはその薬学的に許容される塩を含む。一部の実施形態では、組成物は、単層小胞および多層小胞（例えば、２つまたは３つの層を有する）中のポリアニオンでカプセル封入された、式（Ｉ）、または式１ａ、１ｂ、１ｃもしくは１ｄの化合物、あるいはその薬学的に許容される塩を含むことができる。多層小胞は、単層小胞よりも、循環からより迅速に除去され得ることは理解されるべきである。一部の実施形態では、リン脂質は、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、または卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）である。本明細書で使用される「リン脂質」という用語は、リポソームを形成できる任意の１つのリン脂質またはリン脂質の組合せを指す。中性リン脂質には、ジアシルホスファチジルコリン、ジアルキルホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、およびジアシルホスファチジルエタノールアミンが含まれ得る。ホスファチジルコリン（ＰＣ）には、卵、大豆もしくは他の植物源から得られるもの、または部分的もしくは完全に合成されるもの、または脂質鎖長および不飽和の可変性のものが含まれ、本組成物における使用に適している。合成、半合成および天然産物のホスファチジルコリンには、限定されないが、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、大豆ホスファチジルコリン（大豆ＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（卵ＰＣ）、水素化卵ホスファチジルコリン（ＨＥＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）およびジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）が含まれ、本開示における使用に適したホスファチジルコリンである。荷電リン脂質には、ホスファチジルセリン、ホスファチジル酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、またはＮ－スクシニル－ホスファチジルエタノールアミン、

Ｎ－グルタリル－ホスファチジルエタノールアミン、およびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミンなどの頭部修飾された脂質が含まれ得る。

【０１３１】

ポリマーコンジュゲートされた脂質は、ポリ（エチレングリコール）コンジュゲートされた（ペグ化された）リン脂質（ＰＥＧ－脂質）、例えば、ＰＥＧ（分子量２，０００）メトキシ－ポリ（エチレングリコール）－１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール（ＰＥＧ（２０００）－ジステアロイルグリセロール、ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ（分子量２，０００）１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ、またはＰＥＧ（分子量２，０００）Ｎ－パルミトイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］｝（ＰＥＧ－セラミド）を含み得る。ＰＥＧ－脂質成分中のＰＥＧ部分の分子量はまた、５００～１０，０００ｇ／ｍｏｌ、１，５００～６０００ｇ／ｍｏｌの範囲で変化し得るが、好ましくは約２，０００ＭＷである。脂質アンカーへのコンジュゲーションに使用される他のポリマーは、ポリ（２－メチル－２－オキサゾリン）（ＰＭＯＺ）、ポリ（２－エチル－２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）、ポリ－Ｎ－ビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリグリセロール、ポリ（ヒドロキシエチルＬ－アスパラギン）（ＰＨＥＡ）、およびポリ（ヒドロキシエチルＬ－グルタミン）（ＰＨＥＧ）を含み得る。

【０１３２】

一部の実施形態では、ステロールは、コレステロールである。他のステロールとしては、限定されないが、例えば、エルゴステロール、β－シトステロールなどのフィトステロール、およびホパノイドが挙げられる。一部の実施形態では、リン脂質（複数可）とコレステロールの比は、リポソームからの式（Ｉ）の化合物の漏出の十分に減少した量を維持しながら、所望の量のリポソーム膜剛性を提供するように選択される。一部の実施形態では、任意選択的にポリマーコンジュゲートされた脂質を添加して、リポソームが凝集する傾向を減少させることができる。ポリマーコンジュゲートされた脂質の種類および量は、血流中の所望レベルのタンパク質結合、リポソーム安定性および循環時間を提供するように選択できる。例えば、リポソーム小胞は、約４５：５５のモル比でホスファチジルコリン（例えば、ＤＳＰＣまたはＨＳＰＣ）とコレステロールを含む。ホスファチジルコリンとコレステロールのモル比は、約６０：４０～３５：６５、約５０：５０～３５：６５、約５０：５０～約４５：５５の範囲で変化し得る。特に、リポソームは、リン脂質の濃度に対して５モル％のＰＥＧ－脂質濃度に対応する、約４５：５５：２．７５のモル比で、ＨＳＰＣ、コレステロールおよびポリマーコンジュゲートされた脂質（ＰＥＧ－ＤＳＧまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥ）からなる小胞を含むことができる。ＰＥＧ－脂質の濃度は、（非ＰＥＧ化）リン脂質と比較して０．５～１０ｍｏｌ％の範囲で変化することができ、好ましい比は３～１０ｍｏｌ％であり、さらにより好ましい比は４～８ｍｏｌ％である。

【０１３３】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、免疫能力のあるマウスにおける静脈内注射から６または２４時間後に、血中に残存する注射用量（ＩＤ）（または注射量）のパーセンテージとして測定される血漿半減期延長などの望ましい薬物動態学的特性を提供し、マウスにおけるｉｖ投与後の薬物と脂質比（ＤＬ比）の変化によって決定した場合、血漿中に２４時間にわたって薬物の安定なカプセル封入を可能にする。一部の実施形態では、血中に残存する薬物のパーセンテージは、６時間で注射用量の２０％を超え、好ましくは３０％を超え、最も好ましくは４０％を超える。２４時間後に血中に保持されるパーセントは、好ましくは、注射用量の１０％を超え、より好ましくは２０％を超える。ＤＬ比は、２４時間で２０％を超え、好ましくは、元の注射されたリポソーム薬物の５０％を超え、最も好ましくは８０％を超える。望ましいリポソーム組成物はまた、バースト放出法を用いると、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒト血漿の存在下で安定なカプセル封入を示し、リポソームは、２０分間にわたって５０％を超える薬物を保持し、２０分間にわたって、６０％を超

える、７０％を超える、好ましくは８０％を超える、最も好ましくは９０％を超えるカプセル封入された薬物を保持する。

【０１３４】

本開示に係るリポソームは、当該技術分野において公知である任意の方法によって作製できる。例えば、Ｇ．Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ（ｅｄｉｔｏｒ），Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１－３，１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８３； ２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９３； ３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００６； ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａを参照されたい。本開示に係るリポソーム組成物を作製するのに適した方法の例には、膜押出、逆相蒸発、超音波処理、溶媒（例えば、エタノール）注入（マイクロ流体、Ｙ接合およびＴ接合混合を含む）、マイクロ流動化、界面活性剤透析、エーテル注入、および脱水／再水和が含まれる。リポソームのサイズは、押出に使用される膜の孔径、またはマイクロ流動化または任意の他の適切な方法で使用される通過の圧力および数を制御することによって制御できる。一部の実施形態では、所望の脂質は、最初に薄膜水和またはエタノール注入によって水和され、その後、５０ｎｍ、８０ｎｍ、１００ｎｍ、または２００ｎｍ、またはその組合せなどの規定の孔径の膜を通して押し出すことによってサイズ調整され、７０～１５０ｎｍ、または８０～１３０ｎｍの範囲の平均サイズ、および０．１以下の多分散指数を有するリポソームを生成する。カプセル封入される薬物化合物は、リポソーム形成の前にリポソーム脂質に添加され、リポソームが上記の方法によって形成される水性媒体に溶解され、それによって薬物がリポソーム内に隔離される。一部の実施形態では、薬物化合物は、リポソームの内部空間に組み込まれた捕捉剤を用いて、リポソームにカプセル封入される（Ｄｒｕｍｍｏｎｄ，Ｄ．Ｃ．，ｅｔ ａｌ．（２００６）ｉｎ：Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅｄ．Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ，Ｇ．）Ｖｏｌｕｍｅ ２，ｐ．１４９－１６８を参照されたい。）。

【０１３５】

一部の実施形態では、本開示に係るリポソーム組成物を作製する方法は、（ｉ）リン脂質、コレステロール、およびＰＥＧ－脂質を含み、捕捉剤を実質的に含まない媒体中に捕捉剤を含む内部空間を有するリポソームを調製するステップと、（ｉｉ）リポソーム中の化合物をカプセル封入するために、水性媒体中で本開示に係る化合物と上記リポソームを接触させるステップと、（ｉｉｉ）カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、（ｉｖ）非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中のリポソームを提供するステップとを含む。一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）のカプセル封入効率が十分に高く、典型的には＞９５％、＞９７％、または＞９９％である場合、カプセル封入されていない化合物を除去するステップ（ｉｉｉ）は省略される。

【０１３６】

一部の実施形態では、リポソームをその中で化合物とともに生成する方法は、（ａ）アンモニウムまたはポリアニオンの置換アンモニウム塩からなる捕捉剤を含有するリポソームを調製するステップと、（ｂ）続いて、膜を横切る電気化学的勾配を形成するためにリポソーム外の捕捉剤を除去するステップと、（ｃ）化合物がリポソームに入り、対応する量のアンモニアまたは置換アンモニアをリポソームから離れることを可能にするのに有効な条件下で、リポソームを化合物と接触させるステップ（それによって、得られるリポソームを横切るｐＨ勾配を消耗または減少させる）とを含む。リポソームの内部に捕捉剤を含有するリポソーム組成物は、捕捉剤の溶液中でリポソームを形成することによって製造できる。捕捉剤の膜貫通濃度勾配は、リポソーム形成後または薬物の充填（捕捉）前のいずれかで、リポソームの外側の捕捉剤の除去またはリポソームの希釈によって、リポソームを横切って形成できる。

【０１３７】

一部の実施形態では、接触させるステップは、リポソームを、周囲温度より高く水の沸点より低い温度、好ましくは３０℃～９０℃、４０℃～８０℃、５０℃～８０℃、または６０℃～７５℃の温度で、水性媒体中で薬物とインキュベートすることを含む。一部の実

施形態では、インキュベーションは、５０ｍＭ　ＮａＣｌに相当するイオン強度未満、またはより好ましくは、３０ｍＭ　ＮａＣｌに相当するイオン強度未満のイオン強度で行われる。インキュベーション後、濃縮塩、例えば、ＮａＣｌ溶液を添加して、イオン強度を５０ｍＭ　ＮａＣｌ、または約１００ｍＭ　ＮａＣｌのそれよりも高くすることができる。薬物充填インキュベーションステップ後のイオン強度の増加は、リポソームの充填後の凝集の減少に役立った。インキュベーション時間は、数分から数時間の範囲であり得る。一部の実施形態では、インキュベーション時間は、５～４０分、１０～３０分、または１５～２５分である。インキュベーション後、リポソームを冷却し、次いで周囲温度に到達させる。一部の実施形態では、リポソームを２～１５℃に冷却する。一部の実施形態では、リポソームを４～１０℃に冷却する。冷却ステップ後、濃縮塩、例えば、ＮａＣｌ、溶液を添加して、イオン強度を５０ｍＭ　ＮａＣｌ、または約１００ｍＭ　ＮａＣｌのそれよりも高くすることができる。薬物充填インキュベーションステップ後のイオン強度の増加は、リポソームの充填後の凝集の減少に役立った。

【０１３８】

他の一実施形態では、充填は、２０～３５０ｍＥｑ／Ｌ、２０～１００ｍＥｑ／Ｌ、または５０～８０ｍＥｑ／Ｌで、薬剤ＮａＣｌ、ＫＣｌ、NH_4Cl、Na_2SO_4、K_2SO_4、または$(NH_4)_2SO_4$などのイオン剤の存在下で行われる。低いイオン強度（低い塩濃度）という本分野における慣例に反して、本開示に係る化合物、特にＡＫＧ－２８のリポソームへの充填は、ＮａＣｌなどの比較的高いイオン強度の薬剤の存在下で、特に充填がより高濃度の薬物で行われた場合に、より効率的であることが見出された。したがって、リポソーム充填混合物中の１０～１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８では、０～２０ｍＭ　ＮａＣｌでの充填は、約９０～９４％のカプセル封入効率をもたらし、一方、約８０～３６０ｍＭ　ＮａＣｌでは、充填効率は＞９７％であった（実施例６２）。したがって、本開示の一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物の充填は、イオン強度剤の２０～３５０ｍＥｑ／Ｌ、２０～１００ｍＥｑ／Ｌ、または５０～８０ｍＥｑ／Ｌで行われる。一部の実施形態では、イオン剤はＮａＣｌである。一部の実施形態では、添加されるイオン強度剤の濃度は、充填後のリポソームが等張である（２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／Ｌの浸透圧、または２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの浸透圧を有する）ように選択される。一部の実施形態では、薬物はＡＫＧ－２８であり、イオン強度剤はＮａＣｌであり、充填は、約１２～１３ｍｇ／ｍｌの薬物および５０～８０ｍＭのＮａＣｌ濃度で行われる。９５％以上、９７％以上、または９８％以上のカプセル封入効率を達成できる。

【０１３９】

一部の実施形態では、接触ステップはまた、浸透圧（張性）平衡剤の存在下で水性媒体中で薬物とともにリポソームをインキュベーションすることを含む。一部の実施形態では、浸透圧平衡剤（本明細書では浸透圧剤とも呼ばれる）は、非イオン性薬剤である。例示的な非イオン性浸透剤としては、限定されないが、デキストロース（グルコース）、スクロース、トレハロース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、およびポリビニルピロリドンが挙げられる。一部の実施形態では、浸透剤の濃度は、薬物充填の前に、リポソームの内部空間における捕捉剤溶液の浸透圧濃度と等しい浸透圧濃度（浸透圧（osmolarity）または浸透圧（osmolality）として表される。）を有する。捕捉剤溶液の浸透圧濃度は、溶液が脂質と合わさってリポソームを形成する前に、当該技術分野において公知の方法によって測定できる。別の実施形態では、浸透剤の濃度は、捕捉剤溶液の浸透圧濃度よりも低く、捕捉剤溶液の浸透圧濃度の約９０％未満、約８０％未満、約７０％未満、約６０％未満、約５０％未満、約４０％未満、約３０％未満、約２０％未満、または約１０％未満である浸透圧濃度を提供する。さらに別の実施形態では、薬物充填プロセス中の浸透剤の濃度は、２００～４００ｍｍｏｌ／ｋｇ、好ましくは２５０～３５０ｍｍｏｌ／ｋｇの範囲である。さらに別の実施形態では、浸透剤はデキストロースであり、濃度は４５ｇ／Ｌである。さらに別の実施形態では、浸透剤は、リポソームと薬物とのインキュベーション中に使用されない。さらに別の実施形態では、インキュベーションは、イオン強度調整剤の存在下で行われる。イオン強度調節剤の非限定的な例は、塩化ナトリウムであ

り、例えば、５～５０ｍＭ、１０～２０ｍＭ、または約１０ｍＭの濃度でリポソーム－薬物溶液に添加される。リポソームの分野における慣例に反して、本開示に係る化合物、例えば、ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８は、薬物－リポソーム接触ステップ中に、浸透剤の量が、添加された浸透剤が完全に不在となるまで、捕捉剤溶液（浸透圧的に不均衡なリポソーム）の浸透濃度よりも低い浸透濃度を提供する場合であっても、安定であり、非常に効率的な方法で、本開示に係るリポソームに充填される。

【０１４０】

化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８については、驚くべきことに、達成可能なＤＬ比の上限（ＡＫＧ－２８、３００～３５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ；ＡＫＧ－３８、５００～６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）およびリポソーム－薬物充填混合物中の薬物の高濃度（ＡＫＧ－３８について１６ｍｇ／ｍｌを超える、ＡＫＧ－２８について１２ｍｇ／ｍｌを超える）でさえ、充填は非常に効果的（＞９５％充填、＞９７％充填および＞９８％充填）であることが見出された。典型的に、一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８のリポソーム充填は３００～３５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬで行われ、薬物濃度は６ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、または少なくとも１２ｍｇ／ｍｌを超え、一方ＡＫＧ－３８のリポソーム充填は５００～６５０ｍｇ／ｍｌ、または５００～６００ｍｇ／ｍｌの薬物で行われ、薬物濃度は８ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１２ｍｇ／ｍｌ、または少なくとも１６ｍｇ／ｍｌを超え、少なくとも９５％充填、少なくとも９７％充填、または少なくとも９８％充填の効率が達成される。

【０１４１】

一部の実施形態にて、本開示に係る化合物は、ｐＨ４．５～７などの広範囲のｐＨでリポソームに充填される。ＡＫＧ－２８については、ｐＨ５．５～７．０の範囲で９５％以上、または９７％以上の最適充填効率が達成された（実施例６２）。充填ｐＨは、ｐＨ５．３～７．０の範囲で選択される薬物水性ストック溶液（４０ｍｇ／ｍｌ）のｐＨによって定義される。一部の実施形態では、４０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８ストック溶液のｐＨは、ＮａＯＨで調整されたｐＨ５．７～６．９の範囲である。

【０１４２】

リポソームおよび他の脂質ナノ粒子組成物は、保存中に脂質成分の分解を受けやすく、それによりそれらの薬学的品質に好ましくない影響を与える。脂質の分解は、一般にアレニウスの法則に従うと仮定されるが、分解がより速く起こるように、示唆された保存温度よりも高い温度でリポソーム試料を保存する加速された安定性研究フォーマットで研究できる。例えば、ＰＣおよびコレステロールの脂質組成中に化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８を含有する本開示に係るリポソームは、コレステロール酸化的分解生成物（図１７）とホスファチジルコリン加水分解による分解生成物（図１８）の両方を蓄積することが見出された。不飽和炭化水素鎖を有する脂質では典型的に酸化的分解が観察されるが、コレステロールの酸化的分解は一般的ではない現象である。本明細書に記載のカプセル封入された化合物によるリポソームの安定化は、キレート剤の組込みによって達成できる。キレート剤は、金属および配位結合を含む１種または複数の安定な複素環基を形成することによって金属イオンを結合する分子である。例示的なキレート剤は、デフェロキサミン（デスフェリオキサミン、デスフェラル）（本明細書ではＤＦＯと略す）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、コレステロールを含み、コレステロールの分解に対して安定であり、３７℃で３カ月後のコレステロール分解の程度は、総コレステロールの１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、リポソーム組成物はキレート剤を含む。一部の実施形態では、キレート剤は、デフェロキサミン（デスフェラル、ＤＦＯ）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エ

チレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）であり、それらの薬学的に許容される塩を含む。キレート剤は、少なくとも０．０１ｍＭ、少なくとも０．０５ｍＭ、少なくとも０．１ｍＭ、少なくとも０．２ｍＭ、または少なくとも０．５ｍＭであり、１ｍＭ以下、２ｍＭ以下、５ｍＭ以下、または１０ｍＭ以下の濃度で組成物中に存在できる。一部の実施形態では、キレート剤は、デフェロキサミンまたはデフェロキサミンメシレートであり、キレート剤濃度は約０．５ｍＭである。デフェロキサミンは、本開示に係るリポソームにおけるコレステロールの分解を妨げるのに特に有効であることが見出された。本開示のカプセル封入された化合物、特にＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８を有する脂質の安定性は、リポソーム外の媒体のｐＨによって影響された。この分野における一般的な教示は、リポソーム中の脂質の最適安定性は約６．５のｐＨで達成されるというものであるが、本開示に係るリポソームについては、コレステロールとＰＣ成分の両方についての最適脂質安定性は７．０を超えるｐＨで達成されることが発見された。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも７．１、少なくとも７．２、または少なくとも７．３であり、ｐＨ８．０以下、ｐＨ７．７以下、またはｐＨ７．６以下のｐＨを有する。一部の実施形態では、３７℃で３カ月後のコレステロール分解の程度は、総コレステロールの１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、３７℃で６週間後のリン脂質分解の程度は、総リン脂質含量の１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンである。一部の実施形態では、リン脂質はＨＳＰＣであり、ｐＨはｐＨ７．３～７．６である。

【０１４３】

本開示のリポソーム中の脂質の安定性における予期せぬ効果を与えた別の因子は、外部媒体中のアンモニウムまたは置換されたアンモニウムの存在であった。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８などの本明細書に記載の化合物の、リポソームへの充填をもたらすための捕捉剤として、アンモニウム塩が使用される。したがって、リポソーム内部に入る薬物の各分子について、１または２分子のアンモニアが、リポソームの内部を離れ、リポソーム外の媒体に蓄積し、続いて、充填後の緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去ステップにおいて、例えば、接線流濾過、透析、またはサイズ排除クロマトグラフィーによって、蓄積されたアンモニウムからパージされる。驚くべきことに、緩衝液交換を受けなかった充填後のリポソーム調製物の加速された保存安定性研究において、リン脂質は、緩衝液交換調製物におけるよりも分解に対してより安定であった。緩衝液交換有りおよび無しでの充填後のリポソーム中のアンモニウムの分析は、緩衝液交換されたリポソームが、実際に、リポソーム外の媒体中に著しく低いレベルのアンモニウムを有することを示した。したがって、薬物充填ステップ中のアンモニウム－薬物膜貫通交換から生じる量のリポソーム外の媒体中のアンモニウム（「交換されたアンモニウム」）の存在は、脂質の保存関連分解を減少するのに好ましい。本発明者らは、驚くべきことに、１．７ｍＥｑ／Ｌなどの比較的少量であっても、外部（リポソーム外）のアンモニウムが、リポソーム脂質の顕著な安定化効果を有することを見出した（実施例７１）。（便宜上、アンモニウムの塩の形態が定義されていないｍＥｑ／Ｌ単位のNH_4^+濃度を示すために「ｍＭ」という語を使用する。）一部の実施形態では、リポソーム組成物の外部媒体は、０．５ｍＥｑ／Ｌ未満のアンモニウムまたは置換されたアンモニウムを有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも１ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも２ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも５ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１０ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１５ｍＥｑ／Ｌ、または少なくとも２０ｍＥｑ／Ｌであり、２００ｍＥｑ／Ｌ以下、１５０ｍＥｑ／Ｌ以下、１００ｍＥｑ／Ｌ以下、８０ｍＥｑ／Ｌ以下、または６０ｍＥｑ／Ｌ以下の濃度でアンモニウムまたは置換されたアンモニウムをリポソーム外の媒体中に含有する。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも１ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも２ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも５ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１０ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１５ｍＥｑ／Ｌ、また

は少なくとも２０ｍＥｑ／Ｌであり、２００ｍＥｑ／Ｌ以下、１５０ｍＥｑ／Ｌ以下、１００ｍＥｑ／Ｌ以下、８０ｍＥｑ／Ｌ以下、または６０ｍＥｑ／Ｌ以下の濃度でアンモニウムまたは置換されたアンモニウムをリポソーム外の媒体中に含有し、リン脂質の分解に対して安定であり、３７℃で６週間後のリン脂質分解の程度は、総リン脂質の１０％未満、５％未満、または１％未満である。一部の実施形態では、リポソーム組成物は、少なくとも１ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも２ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも５ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１０ｍＥｑ／Ｌ、少なくとも１５ｍＥｑ／Ｌ、または少なくとも２０ｍＥｑ／Ｌであり、２００ｍＥｑ／Ｌ以下、１５０ｍＥｑ／Ｌ以下、１００ｍＥｑ／Ｌ以下、８０ｍＥｑ／Ｌ以下、または６０ｍＥｑ／Ｌ以下の濃度でアンモニウムまたは置換されたアンモニウムをリポソーム外の媒体中に含有し、リン脂質の分解に対して安定であり、３７℃で３カ月後のリン脂質分解の程度は、総リン脂質の１０％未満、７％未満、５％未満、または４％未満である。一部の実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンである。一部の実施形態では、リン脂質はＨＳＰＣであり、アンモニウム塩は、１０～８０ｍＭまたは１５～６０ｍＭのアンモニウム濃度の塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、リン脂質はＨＳＰＣであり、アンモニウム塩は、１～１０ｍＭまたは２～５ｍＭのアンモニウム濃度の塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、リポソーム組成物の外部媒体中のアンモニウムの正規度は、薬物充填ステップでのカプセル封入された薬物の正規度の９０～１１０％以内であり、正規度は、グラム当量／Ｌ（ｅｑ／Ｌ）で表される濃度である。

【０１４４】

リポソーム外の媒体中のアンモニウムの所望の濃度は、上記で説明されるように、リポソーム内部から逃げるアンモニウム（捕捉剤の一部として使用される）を犠牲にして、薬物充填ステップ中のリポソーム外のアンモニウムの蓄積によって達成され得る。あるいは、リポソーム外のアンモニウムの所望のレベルは、薬物充填の前にリポソーム外のアンモニウムを除去した後にリポソーム中に残るリポソーム外のアンモニウムによって寄与されるか、または塩化アンモニウムもしくは硫酸アンモニウムなどのアンモニウム塩をリポソーム製剤の外部媒体に添加することによって達成される。後者の場合、カプセル封入されていない材料からのリポソームの充填後の精製が望まれる場合、充填後の緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物除去ステップの後に、アンモニウム塩をリポソーム調製物に添加するか、または交換緩衝液に添加できる。

【０１４５】

一部の実施形態では、本明細書にて提供されるリポソーム組成物は、リポソーム製剤中にアルファ－トコフェロールなどの親油性フリーラジカル捕捉剤をさらに含み得る。

【０１４６】

一部の実施形態では、本明細書にて提供されるオキサゾリジノンリポソーム組成物は、約５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む。一部の実施形態では、本明細書にて提供されるオキサゾリジノンリポソーム組成物は、約４５：５５：２．２５のモル比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、ＡＫＧ－２８またはその薬学的に許容される塩からなるオキサゾリジノンを含む。一部の実施形態では、オキサゾリジノンリポソーム組成物は、ＡＫＧ－３８またはその薬学的に許容される塩からなるオキサゾリジノンを含む。

【０１４７】

［使用方法］

本明細書では、結核菌などのマイコバクテリア、またはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）などのグラム陽性細菌の増殖を阻害する方法が開示される。追加のマイコバクテリアおよびグラム陽性細菌には、限定されないが、トリ型結核菌複合体、ハンセン菌、マイコバクテリウム・ゴルドナエ、マイコバクテリウム・アブセッサス、マイコバクテリウム・ムコゲニカム、連鎖球菌、バンコマイシン耐性腸球菌（ＶＲＥ）、肺炎ブドウ球菌、エンテロコッカス・フェシウム、Ｂ群連鎖球菌、肺炎連鎖球菌、化膿連鎖球菌、緑色

連鎖球菌、リステリア・モノサイトゲネス、ノカルジア菌、およびコリネバクテリア属が含まれる。一部の実施形態では、本明細書にて提供される化合物および組成物は、結核菌の薬物耐性株の増殖を阻害する。一部の実施形態では、マイコバクテリア感染を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書にて提供される化合物および組成物は、非結核性マイコバクテリア感染を処置するために使用できる。一部の実施形態では、本方法は、本開示のアミノアルキルオキサゾリジノンおよび／またはその薬学的に許容される塩の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、本開示のアミノアルキルオキサゾリジノン化合物および／またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量のリポソーム組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【０１４８】

マイコバクテリアは、結核（ＴＢ）の原因となる細菌の属である。世界保健機関によれば、世界中のＴＢは、死亡原因の上位１０位に入り、単一の感染性病原体による死亡原因となっている。リファンピシンは、ＴＢを処置するための第１選択薬物として最も効果的である。しかし、リファンピシンに耐性である結核菌に感染する症例が増えている。多剤耐性結核（ＭＤＲ－ＴＢ）は、イソニアジドおよびリファンピシンに反応しない細菌によって引き起こされるＴＢの形態である。

【０１４９】

一部の実施形態では、組成物は、非経口投与のための液体医薬製剤である。一部の実施形態では、液体医薬製剤は、本明細書に記載の適切な量のオキサゾリジノン化合物を含有するリポソーム製剤であり、オキサゾリジノン化合物はリポソームの内部にカプセル封入される。別の実施形態では、その化合物は、硫酸塩、クエン酸塩、八硫酸スクロース、六リン酸イノシトールなどのポリアニオンとリポソームの内部で塩の形態である。一部の実施形態では、化合物は、限定されないが、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびペグ化ホスファチジルエタノールアミンを含む、複数の脂質賦形剤からなるリポソーム内に硫酸塩を含む沈殿したまたはゲル化した塩である。本開示に係るリポソームは、８５％を超える、９０％を超える、および９５％を超える捕捉効率を示す。一部の実施形態では、捕捉されていない薬物の残存量は、リポソーム組成物から除去される。これは、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換、透析、限外濾過、接線流濾過、吸着、または沈殿などの種々の手段によって達成できる。捕捉されていない薬物除去ステップの間または後に、リポソームを、所望の薬学的に許容される担体、例えば、生理食塩水、等張デキストロース、等張スクロース、リンゲル溶液、またはハンクス溶液に取り込むことができる。緩衝物質を添加して、所望の生理学的に許容されるｐＨを得ることができる。リポソーム組成物は、所望の薬物濃度に合わせて調節され得、例えば、０．２～０．２２μｍフィルターを介して無菌濾過によって滅菌され得る。一部の実施形態では、リポソーム組成物中の化合物濃度は、１～５０ｍｇ／ｍｌ、３～３０ｍｇ／ｍｌ、または５～２５ｍｇ／ｍｌの範囲である。

【０１５０】

一部の実施形態では、本明細書にて提供されるリポソーム組成物を含む医薬調製物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。次に、水溶液は、使用のためにパッケージされるか、または無菌条件下で濾過され、凍結乾燥され得、凍結乾燥した調製物は、投与前に無菌水溶液と合わせられる。組成物は、生理学的条件に近づけるのに必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、ｐＨ調整剤および緩衝剤、張度調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどを含有し得る。さらに、脂質懸濁液は、保存中のフリーラジカルおよび脂質過酸化物による損傷に対して脂質を保護する脂質保護剤を含み得る。アルファ－トコフェロールなどの親油性フリーラジカルクエンチャーが適切である。

【０１５１】

一部の実施形態では、リポソームは、等張性またはｐＨ制御のための１種または複数の追加の賦形剤と混合される。一部の実施形態では、賦形剤は、限定されないが、塩化ナト

リウム、Ｈｅｐｅｓ緩衝液、リン酸緩衝液、およびヒスチジン緩衝液を含む。

【０１５２】

リポソーム組成物はまた、生理学的条件に近づけるのに必要とされる他の薬学的に許容される物質、例えば、ｐＨ調整剤および緩衝剤、張度調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどを含有し得る。さらに、このリポソーム懸濁液は、保存中のフリーラジカルおよび脂質過酸化物による損傷に対して脂質を保護する脂質保護剤を含み得る。アルファ－トコフェロールなどの親油性フリーラジカルクエンチャーが適切である。

【０１５３】

他の一実施形態では、組成物は経口製剤である。一部の実施形態では、組成物は、液体製剤である。一部の実施形態では、組成物は、固体製剤（例えば、錠剤、カプセル、丸剤、糖衣錠、カプレットなど）である。経口使用に用いる場合、例えば、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性または油性懸濁液、分散性粉末または顆粒、乳濁液、硬質または軟質カプセル、シロップまたはエリキシルを調製できる（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．））。経口使用を意図した組成物は、医薬組成物の製造のために当該技術分野において公知である任意の方法に従って調製できる。組成物は、口当たりの良い調製物を提供するために、酸化防止剤、甘味剤、香味剤、着色剤および保存剤などの１種または複数の薬剤を含有できる。錠剤の製造に適している非毒性の薬学的に許容される賦形剤または補助剤と混合した活性成分を含有する錠剤は許容される。適切な賦形剤または補助剤には、限定されないが、例えば、不活性希釈剤、可溶化剤、懸濁化剤、アジュバント、湿潤剤、甘味剤、香料または香味物質、等張物質、コロイド分散剤および界面活性剤が含まれる。

【０１５４】

錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬、顆粒、座薬、溶液、懸濁液および乳濁液、ペースト、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、粉末およびスプレーは、適切な医薬組成物であり得る。

【０１５５】

化合物または組成物は、局所的に、経口的に、非経口的に、腹腔内に、および／または直腸に投与できる。

【０１５６】

投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整される。例えば、１または複数の用量を経時的に投与することができ、または治療状況の緊急性によって示すように、用量を比例的に減量または増量できる。

【０１５７】

化合物および／もしくはそれらの薬学的に許容される塩、または化合物および／もしくはそれらの薬学的に許容される塩を含むリポソームの投薬量は、広い範囲内で変化することができ、各々の特定の場合には、個々の状態におよび制御されるべき病原体に自然に調節されるべきである。

【０１５８】

一部の実施形態では、細菌感染症の処置における使用のために、化合物または医薬リポソーム組成物は、７日毎に１回（すなわち、毎週１回）、１４日毎に１回（すなわち、２週間毎に１回）、２１日毎に１回（すなわち、３週間毎に１回）、２８日毎に１回（すなわち、４週間毎に１回）、４２日毎に１回（すなわち、６週間毎に１回）、それを必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、平均週投薬量は、約１ｍｇ～約１５００ｍｇ、約１０～約７００ｍｇ、約２５～約５００ｍｇ、または約７０～約２５０ｍｇである。一部の実施形態では、平均週投薬量は、約１ｍｇ～約１０ｍｇ、約１０ｍｇ～約２５ｍｇ、約２５ｍｇ～約５０ｍｇ、約５０ｍｇ～約１００ｍｇ、約１００ｍｇ～約２００ｍｇ、約２００ｍｇ～約３００ｍｇ、約３００ｍｇ～約４００ｍｇ、約４００ｍｇ～約５００ｍｇ、約５００ｍｇ～約６００ｍｇ、約６００ｍｇ～約７００ｍｇ、約７００ｍｇ～約８

００ｍｇ、約８００ｍｇ～約９００ｍｇ、約９００ｍｇ～約１０００ｍｇ、約１０００ｍｇ～約１１００ｍｇ、約１１００ｍｇ～約１２００ｍｇ、約１２００ｍｇ～約１３００ｍｇ、約１３００ｍｇ～約１４００ｍｇ、約１４００ｍｇ～約１５００ｍｇである。一部の実施形態では、化合物または組成物は、最大１カ月、最大２カ月、最大３カ月、最大４カ月またはそれ以上投与される。特定の治療有効量は、様々な因子、例えば、処置される細菌感染、投与される特定の化合物の活性、採用される医薬組成物、対象の年齢、体重、性別など、投与経路、細菌感染の重症度、特定の化合物と組み合わせて（連続的にまたは同時に）使用される任意選択的な薬物／活性剤、および当業者の医師に公知である同様の因子に依存する。一部の実施形態では、化合物または組成物は、結核または他のマイコバクテリウム感染の処置に使用できる。一部の実施形態では、化合物は、単剤療法として使用できる。一部の実施形態では、処置は、本明細書に記載の有効量の化合物と、結核菌および他のグラム陽性細菌感染を処置するための有効量の１種または複数の追加の活性剤とを同時におよび／または連続的に投与することを含むことができる。一部の実施形態では、処置は、本明細書に記載の有効量の化合物と、結核菌および他のグラム陽性細菌感染を処置するための有効量の２種または以上の追加の活性剤（２、３、４種など）を同時におよび／または連続的に投与することを含むことができる。相乗的な抗菌効果は、組合せの個々の化合物の予測される純粋な相加効果よりも大きい抗菌効果を意味する。同時に投与される場合、化合物および活性剤は、同じ組成物中または別々の組成物中に含有され得る。連続的に投与する場合、化合物を含む組成物および追加の活性剤を含む組成物は、時間分離（例えば、２０分、４０分、６０分またはそれ以上）で投与できる。一部の実施形態では、追加の活性剤は、異なる投与経路を使用して、または異なる注射によって投与できる。例えば、本開示に係る化合物は静脈内投与することができ、１種または複数の追加の薬剤を経口投与できる。

【０１５９】

一部の実施形態では、１種または複数（例えば、１、２、３または４種）の追加の活性剤との化合物の投与は、処置期間の長さの減少をもたらすことができる。例えば、１種または複数（例えば、１、２、３または４種）の追加の活性剤との化合物の投与は、１種の活性剤のみによる処置と比較して、処置期間を少なくとも３倍、少なくとも２倍、少なくとも１．５倍短くすることができる。一部の実施形態では、追加の薬剤（複数可）は、抗細菌剤である。一部の実施形態では、追加の活性剤には、限定されないが、フルオロキノリン、例えば、モキシフロキサシン、ガチフロキサシン、またはレボフロキサシン、ベダキリンおよび他のジアリールキノリン類似体（例えば、ＴＢＡＪ－５８７およびＴＢＡＪ－８７６）、デラマニド、プレトマニド、イソニアジド、リファンピシン、リファペンチン、ピラジンアミド、クロファジミン、スペクチンアミド、エタンブトール、ストレプトマイシン、カナマイシン、カプレオマイシン、アミカシン、ロイシル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＬｅｕＲＳ）阻害剤ＧＳＫ３０３６６５６、トリプトファンシンターゼ阻害剤ＧＳＫ８３９、ＤｐｒＥ１阻害剤ＯＰＣ－１６７８３２およびマコジノン（ＰＢＴＺ－１６９）、Ｔｅｌａｃｅｂｅｃ、ＧＳＫ－６５６、ＴＢＡ－７３７１、ならびにアモキシシリン＋クラブラン酸塩、それらの各々の薬学的に許容される塩、およびそれらの任意の組合せを含むことができる。グラム陽性細菌感染症の処置のために、追加の活性剤には、限定されないが、バンコマイシン、ゲンタマイシン、ダプトマイシン、テイコプラニン、セフタロリン、セフトロビプロール、テラバンシン、ダルババンシン、オリタバンシン、フルオロキノリン（例えば、デラフロキサシン）、テトラサイクリン（例えば、エラバサイクリンおよびオマダサイクリン）、スルホンアミド（例えば、スルファメトキサゾール）、トリメトロプリム、レファムリン、およびそれらの任意の組合せが含まれ得る。一部の実施形態では、処置は、本明細書に記載の有効量の化合物、および有効量のベダキリン、プレトマニド、ピラジンアミド、モキシフロキサシン、もしくはそれらの各々の薬学的に許容される塩、または前述のものの組合せを同時におよび／または連続的に投与することを含むことができる。

【０１６０】

本明細書にて開示の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に毒性を示すことなしに、特定の患者、組成物、および投与様式に対する所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変化させることができる。

【０１６１】

「非経口」は、本明細書にて、投与の文脈において、通常は注射による経腸および局所投与以外の投与様式を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射ならびに注入が含まれる。

【０１６２】

「非経口投与」および「非経口投与された」は、本明細書にて、通常は注射または注入による経腸（すなわち、消化管を介した）および局所投与以外の投与様式を指し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、吸入、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射ならびに注入が含まれる。リポソーム薬物投与には、しばしば（ただし、それだけではない）静脈内注射および注入が用いられる。

【０１６３】

一部の実施形態では、液体組成物は、静脈内注射される。一部の実施形態では、化合物または医薬組成物は、７日毎に１回（すなわち、毎週１回）、１４日毎に１回（すなわち、２週間毎に１回）、２１日毎に１回（すなわち、３週間毎に１回）、２８日毎に１回（すなわち、４週間毎に１回）、および４２日毎に１回（すなわち、６週間毎に１回）、それを必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、平均週投与量は、約１ｍｇ～約１５００ｍｇ、約１０～約７００ｍｇ、約２５～約５００ｍｇ、または約７０～約２５０ｍｇである。一部の実施形態では、平均週投与量は、約１ｍｇ～約１０ｍｇ、約１０ｍｇ～約２５ｍｇ、約２５ｍｇ～約５０ｍｇ、約５０ｍｇ～約１００ｍｇ、約１００ｍｇ～約２００ｍｇ、約２００ｍｇ～約３００ｍｇ、約３００ｍｇ～約４００ｍｇ、約４００ｍｇ～約５００ｍｇ、約５００ｍｇ～約６００ｍｇ、約６００ｍｇ～約７００ｍｇ、約７００ｍｇ～約８００ｍｇ、約８００ｍｇ～約９００ｍｇ、約９００ｍｇ～約１０００ｍｇ、約１０００ｍｇ～約１１００ｍｇ、約１１００ｍｇ～約１２００ｍｇ、約１２００ｍｇ～約１３００ｍｇ、約１３００ｍｇ～約１４００ｍｇ、約１４００ｍｇ～約１５００ｍｇである。特定の治療有効量は、様々な因子、例えば、処置される細菌感染、投与される特定の化合物の活性、採用される医薬組成物、対象の年齢、体重、性別など、投与経路、細菌感染の重症度、特定の化合物と組み合わせて（連続的にまたは同時に）使用される任意選択的な薬物／活性剤、および当業者の医師に公知である同様の因子に依存する。

【０１６４】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、非経口的に投与される。

【０１６５】

一部の実施形態では、本方法は、１種または複数の追加の活性剤を同時にまたは連続して投与することを含む。一部の実施形態では、１種または複数の活性剤が、ベダキリン、プレトマニド、ピラジナミド、モキシフロキサシン、その薬学的に許容される塩またはそれらの組合せを含む。

【０１６６】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、週に１回から６週間毎に１回投与される。

【０１６７】

一部の実施形態では、それを必要とする対象への投与後に血中に残存する化合物のパーセンテージは、６時間で投与量の２０％を超える。一部の実施形態では、血中に残存する化合物のパーセンテージは、投与量の１０％を超える。

【０１６８】

本開示の一態様は、（ｉ）捕捉剤を実質的に含まない媒体中で、リン脂質、コレステロール、およびＰＥＧ－脂質を含み、捕捉剤を含有する内部空間を有するリポソームを調製するステップと、（ｉｉ）水性媒体中で、リポソームを本明細書において開示される化合

物と接触させて、リポソーム中の化合物のカプセル封入を行うステップと、（ｉｉｉ）カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、（ｉｖ）非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中にリポソームを提供するステップとを含む、リポソーム組成物を作製する方法に関する。

【０１６９】

一部の実施形態では、細菌感染の処置における使用のために、化合物または医薬経口組成物を１日１回または２回投与する。特定の治療有効量は、様々な因子、例えば、処置される細菌感染、投与される特定の化合物の活性、採用される医薬組成物、対象の年齢、体重、性別など、投与経路、細菌感染の重症度、特定の化合物と組み合わせて（連続的にまたは同時に）使用される任意選択的な薬物／活性剤、および当業者の医師に公知である同様の因子に依存する。

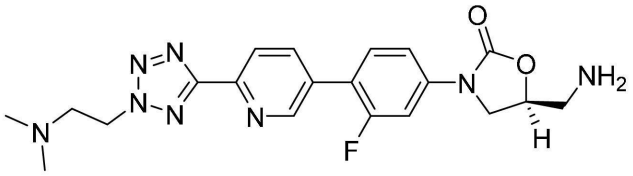
【０１７０】

［追加の実施形態］

以下の追加の実施形態は、例示の目的で提供される。

１．４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ならびにＡＫＧ－２８

【化１８】



(AKG-28)

の薬学的に許容される塩を含むＡＫＧ－２８リポソーム組成物。

２．リポソーム組成物が、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含む、実施形態１に記載の組成物。

３．モノまたはオリゴラメラ小胞が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有する、実施形態２に記載の組成物。

４．リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有する、実施形態１に記載の組成物。

５．リポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する、実施形態４に記載の組成物。

６．組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２３０～２９０ｇ／ｍｏｌである、実施形態１に記載の組成物。

７．組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２９０～３６０ｇ／ｍｏｌである、実施形態１に記載の組成物。

８．組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が３００～３４０ｇ／ｍｏｌである、実施形態１に記載の組成物。

９．組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約２５０ｇ／ｍｏｌである、実施形態１に記載の組成物。

１０．組成物中のＡＫＧ－２８対総全リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約３３０ｇ／ｍｏｌである、実施形態１に記載の組成物。

１１．組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が８～１５ｍｇ／ｍＬである、実施形態１に記載の組成物。

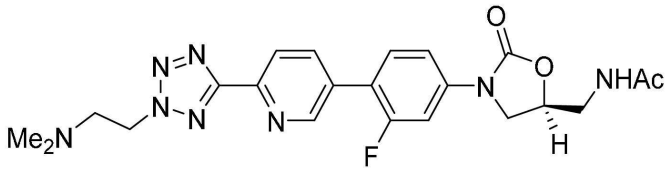
１２．組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が９～１１ｍｇ／ｍＬである、実施形態１に記載の組成物。

１３．組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９０％である、実施形態１に記載の組成物。

１４．組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少

なくとも９５％である、実施形態１に記載の組成物。
１５．組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９７％である、実施形態１に記載の組成物。
１６．組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９８％である、実施形態１に記載の組成物。
１７．組成物が水性媒体中にリポソーム小胞を含み、水性媒体が塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む、実施形態１に記載の組成物。
１８．水性媒体の浸透圧が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである、実施形態１７に記載の組成物。
１９．水性媒体の浸透圧が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである、実施形態１７に記載の組成物。
２０．水性媒体中のアンモニウム濃度が２０～６０ｍＭである、実施形態１７に記載の組成物。
２１．水性媒体中のアンモニウム濃度が５０～８０ｍＭである、実施形態１７に記載の組成物。
２２．水性媒体中のアンモニウム濃度が０．５ｍＭ未満である、実施形態１７に記載の組成物。
２３．水性媒体中のアンモニウム濃度が１３０～１５０ｍＭ未満である、実施形態１７に記載の組成物。
２４．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、７．３～７．７のｐＨで組成物を緩衝する、実施形態１に記載の組成物。
２５．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、約７．５のｐＨで組成物を緩衝する、実施形態１に記載の組成物。
２６．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、７．５のｐＨで組成物を緩衝する、実施形態１に記載の組成物。
２７．ＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
２８．組成物が５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態２７に記載の組成物。
２９．組成物が約２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態２７に記載の組成物。
３０．組成物が２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態２７に記載の組成物。
３１．キレート剤をさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３２．０．１～１ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３３．約０．５ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３４．０．５ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３５．デフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３６．０．１～１ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３７．約０．５ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３８．０．５ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態１に記載の組成物。
３９．組成物が保存安定性である、実施形態１に記載の組成物。
４０．組成物がＡＫＧ－２８の硫酸塩としてＡＫＧ－２８を含む、実施形態１～３９のいずれか１つに記載の組成物。
４１．４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ならびにＡＫＧ－３８

【化１９】



(AKG-38)

の薬学的に許容される塩を含むＡＫＧ－３８リポソーム組成物。

４２．リポソーム組成物が、９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含む、実施形態４１に記載の組成物。

４３．モノまたはオリゴラメラ小胞が、１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有する、実施形態４２に記載の組成物。

４４．リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有する、実施形態４１に記載の組成物。

４５．リポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する、実施形態４４に記載の組成物。

４６．組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～４８０ｇ／ｍｏｌである、実施形態４１に記載の組成物。

４７．組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が５００～６５０ｇ／ｍｏｌである、実施形態４１に記載の組成物。

４８．組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～６５０ｇ／ｍｏｌである、実施形態４１に記載の組成物。

４９．組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約４５０ｇ／ｍｏｌである、実施形態４１に記載の組成物。

５０．組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約６００ｇ／ｍｏｌである、実施形態４１に記載の組成物。

５１．組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１２～２５ｍｇ／ｍＬである、実施形態４１に記載の組成物。

５２．組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１３．５～１６．５ｍｇ／ｍＬである、実施形態４１に記載の組成物。

５３．組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が約１５ｍｇ／ｍＬである、実施形態４１に記載の組成物。

５４．組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が約２０ｍｇ／ｍＬである、実施形態４１に記載の組成物。

５５．組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９０％である、実施形態４１に記載の組成物。

５６．組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９５％である、実施形態４１に記載の組成物。

５７．組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９７％である、実施形態４１に記載の組成物。

５８．組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９８％である、実施形態４１に記載の組成物。

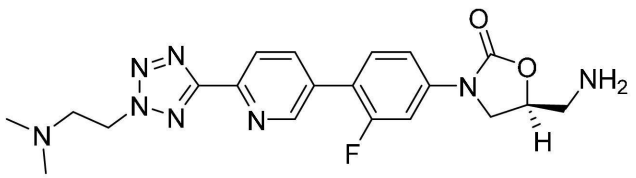
５９．組成物が水性媒体中にリポソーム小胞を含み、水性媒体が塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む、実施形態４１に記載の組成物。

６０．水性媒体の浸透圧が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである、実施形態５９に記載の組成物。

６１．水性媒体の浸透圧が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである、実施形態５９に記載の組成物。

６２．水性媒体中のアンモニウム濃度が２０～６０ｍＭである、実施形態５９に記載の

組成物。
６３．水性媒体中のアンモニウム濃度が５０～８０ｍＭである、実施形態５９に記載の組成物。
６４．水性媒体中のアンモニウム濃度が０．５ｍＭ未満である、実施形態５９に記載の組成物。
６５．水性媒体中のアンモニウム濃度が約０．５ｍＭ未満である、実施例５９に記載の組成物。
６６．塩化ナトリウムの濃度が１３０～１５０ｍＭである、実施形態５９に記載の組成物。
６７．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、７．３～７．７のｐＨで組成物を緩衝する、実施形態４１に記載の組成物。
６８．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、約７．５のｐＨで組成物を緩衝する、実施形態４１に記載の組成物。
６９．緩衝液をさらに含み、緩衝液が、７．５のＰＨで組成物を緩衝する、実施形態４１に記載の組成物。
７０．ＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液をさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
７１．組成物が５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態７０に記載の組成物。
７２．組成物が約２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態７０に記載の組成物。
７３．組成物が２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳまたはリン酸緩衝液を含む、実施形態７０に記載の組成物。
７４．キレート剤をさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
７５．０．１～１ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
７６．約０．５ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施例４１に記載の組成物。
７７．０．５ｍＭの濃度のキレート剤をさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
７８．デフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
７９．０．１～１ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
８０．約０．５ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態４１の組成物。
８１．０．５ｍＭの濃度のデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡをさらに含む、実施形態４１に記載の組成物。
８２．組成物が保存安定性である、実施形態４１に記載の組成物。
８３．ＡＫＧ－２８の硫酸塩としてＡＫＧ－２８を含む、実施形態１～８２のいずれか１つに記載の組成物。
８４．４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ならびにＡＫＧ－２８
【化２０】



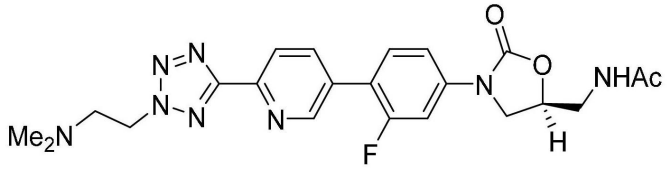
(AKG-28)

の薬学的に許容される塩を含むＡＫＧ－２８リポソーム組成物であって、リポソーム組成物が、

ａ．リポソーム組成物が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか；またはリポソーム組成物が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノもしくはオリゴラメラ小胞を含むか；またはリポソーム組成物が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含む；
ｂ．リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有するか；またはリポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する；
ｃ．組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２３０～２８０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が２９０～３６０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が３００～３４０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約２５０ｇ／ｍｏｌであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が約３３０ｇ／ｍｏｌである；
ｄ．組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が８～１５ｍｇ／ｍＬであるか；または組成物中のＡＫＧ－２８の全濃度が９～１１ｍｇ／ｍＬである；
ｅ．リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９０％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９５％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９７％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－２８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－２８の割合が少なくとも９８％である；
ｆ．リポソーム組成物が、塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む水性媒体を含む；
ｇ．水性媒体の浸透圧が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇであるか；または水性媒体の浸透圧が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである；
ｈ．水性媒体中のアンモニウム濃度が２０～６０ｍＭであるか；または水性媒体中のアンモニウム濃度が５０～８０ｍＭであるか；または水性媒体中のアンモニウム濃度が０．５ｍＭ未満であるか；または前記水性媒体中のアンモニウム濃度が０１３０～１５０ｍＭ未満である；
ｉ．水性媒体が緩衝液をさらに含み、緩衝液が７．３～７．７のｐＨ；約７．５のｐＨ；または７．５のｐＨでリポソーム組成物を緩衝する；
ｊ．水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか；または水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を５～５０ｍＭの濃度で含むか；または水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を約２０ｍＭの濃度で含むか；または水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を２０ｍＭの濃度で含む；
ｋ．組成物がキレート剤をさらに含むか；または組成物がキレート剤を０．１～１ｍＭの濃度でさらに含むか；または組成物がキレート剤を約０．５ｍＭの濃度でさらに含むか；または組成物がキレート剤を０．５ｍＭの濃度でさらに含むか；または組成物がデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか；または組成物がデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡを０．１～１ｍＭの濃度でさらに含むか；または組成物がデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡを約０．５ｍＭの濃度でさらに含むか；または組成物がデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡを０．５ｍＭの濃度でさらに含む；または
ｌ．ＡＫＧ－２８がＡＫＧ－２８の硫酸塩としてリポソーム内にカプセル封入されているという特徴のうちのいずれか１つまたは複数によってさらに特徴付けられる、ＡＫＧ－２８リポソーム組成物。

８５．４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比の脂質ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ならびにＡＫＧ－３８

【化２１】



(AKG-38)

の薬学的に許容される塩を含むＡＫＧ－３８リポソーム組成物であって、リポソーム組成物が、

ａ．リポソーム組成物が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含む；

ｂ．リポソーム組成物が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するモノまたはオリゴラメラ小胞を含む；

ｃ．リポソーム組成物が０．１５未満の多分散指数を有するか、またはリポソーム組成物が０．１０未満の多分散指数を有する；

ｄ．リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～４８０ｇ／ｍｏｌであるか、またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が５００～６５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４３０～６５０ｇ／ｍｏｌであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が４５０ｇ／ｍｏｌであるか、またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８対総リン脂質（ＰｈＬ）の薬物／脂質比が６００ｇ／ｍｏｌである；

ｅ．リポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１２～２５ｍｇ／ｍＬであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が１３．５～１６．５ｍｇ／ｍＬであるか；または組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が約１５ｍｇ／ｍＬであるか；またはリポソーム組成物中のＡＫＧ－３８の全濃度が約２０ｍｇ／ｍＬである；

ｆ．リポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９０％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９５％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９７％であるか；またはリポソーム組成物中の全ＡＫＧ－３８に対するカプセル封入されたＡＫＧ－３８の割合が少なくとも９８％である；

ｇ．リポソーム組成物が塩化ナトリウムを含み、任意選択的にアンモニウムイオンを含む水性媒体を含む；

ｈ．水性媒体の浸透圧が２７０～３３０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇであるか、または水性媒体の浸透圧が２７０～３１０ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇである；

ｉ．水性媒体中のアンモニウム濃度が２０～６０ｍＭであるか；または水性媒体中のアンモニウム濃度が５０～８０ｍＭであるか；または水性媒体中のアンモニウム濃度が０．５ｍＭ未満であるか；または水性媒体中のアンモニウム濃度が０．５ｍＭ未満である；

ｊ．塩化ナトリウムの濃度が１３０～１５０ｍＭである；

ｋ．水性媒体が緩衝液をさらに含み、緩衝液が７．３～７．７のｐＨ、約７．５のｐＨ、または７．５のｐＨでリポソーム組成物を緩衝する；

ｌ．水性媒体がＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液をさらに含むか、または水性媒体が５～５０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を含むか、または水性媒体が約２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を含むか、または水性媒体が２０ｍＭの濃度でＨＥＰＥＳもしくはリン酸緩衝液を含む；

ｍ．水性媒体がキレート剤をさらに含むか；または０．１～１ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または約０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、または０．５ｍＭの濃度でキレート剤をさらに含むか、またはデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤ

ＴＡをさらに含むか、または０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または約０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含むか、または０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）もしくはＥＤＴＡをさらに含み；
ｎ．リポソーム組成物が保存安定性である；または
ｏ．ＡＫＧ－３８がＡＫＧ－３８の硫酸塩としてリポソームにカプセル封入されている
という特徴のうちのいずれか１つまたは複数によってさらに特徴付けられる、ＡＫＧ－３８リポソーム組成物。

８６．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩で製剤化されたＡＫＧ－２８リポソーム分散体。

８７．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン二塩酸塩一水和物で製剤化されたリポソーム分散体。

８８．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン二塩酸塩一水和物の等張性リポソーム分散体。

８９．硫酸塩として（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンを含有する水性空間をカプセル封入する単層脂質二重層リポソーム小胞を含む、実施形態８６～８８のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

９０．リポソーム小胞が、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロール、および（ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（ＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ）から構成される、実施形態８９に記載のリポソーム分散体。

９１．リポソーム小胞中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して４５～６５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態９０に記載のリポソーム分散体。

９２．リポソーム小胞中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態９０に記載のリポソーム分散体。

９３．リポソーム小胞中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態９０に記載のリポソーム分散体。

９４．リポソーム小胞中のコレステロールと非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態９０に記載のリポソーム分散体。

９５．リポソーム分散体脂質内容物がＨＳＰＣ、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態９０に記載のリポソーム分散体。

９６．ＨＳＰＣおよびコレステロールを約５：３の重量比で含む、実施形態９５に記載のリポソーム分散体。

９７．ＨＳＰＣおよびコレステロールを約４５：５５のモル比で含む、実施形態９５に記載のリポソーム分散体。

９８．ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを約５：３：１の重量比で含む、実施形態９５に記載のリポソーム分散体。

９９．ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを約４５：５５：２．２５のモル比で含む、実施形態９５に記載のリポソーム分散体。

１００．２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液またはリン酸緩衝液をさらに含む、実施形態８７～９９のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

１０１．５０～８０ｍＭの濃度で塩化ナトリウムをさらに含む、実施形態１００に記載

のリポソーム分散体。
１０２．２０～６０ｍＭの濃度で、薬物充填プロセス中に置換されたアンモニウムをさらに含む、実施形態９９～１０１のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１０３．リポソーム小胞が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有する、実施形態９９～１０２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１０４．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩で製剤化されたＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
１０５．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩で製剤化されたリポソーム分散体。
１０６．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩の等張性リポソーム分散体。
１０７．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンを硫酸塩として含有する水性空間をカプセル封入する、単層脂質二重層小胞を含む、実施形態１０４～１０６のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１０８．リポソーム小胞が、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、コレステロール、および（ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（ＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ）から構成される、実施形態１０７に記載のリポソーム分散体。
１０９．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１０８に記載のリポソーム分散体。
１１０．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１０８に記載のリポソーム分散体。
１１１．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１０８に記載のリポソーム分散体。
１１２．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１０８に記載のリポソーム分散体。
１１３．リポソーム分散体脂質内容物がＨＳＰＣおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１０８に記載のリポソーム分散体。
１１４．ＨＳＰＣとコレステロールを約５：３の重量比で含む、実施形態１１３に記載のリポソーム分散体。
１１５．ＨＳＰＣとコレステロールを約４５：５５のモル比で含む、実施形態１１３に記載のリポソーム分散体。
１１６．ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを約５：３：１の重量比で含む、実施形態１１３に記載のリポソーム分散体。
１１７．ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥを約４５：５５：２．２５のモル比で含む、実施形態１１３に記載のリポソーム分散体。
１１８．２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液またはリン酸緩衝液をさらに含む、実施形態１０４～１１７のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１１９．５０～８０ｍＭの濃度で塩化ナトリウムをさらに含む、実施形態１１８に記載のリポソーム分散体。

１２０．２０～６０ｍＭの濃度で薬物充填プロセス中に置換されたアンモニウムをさらに含む、実施形態１１８～１１９のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２１．リポソームが９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有する、実施形態１１８～１２０のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２２．分散体が９０～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するリポソーム小胞を含む、実施形態８６～１２０のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２３．分散体が１００～１３０ｎｍのｚ平均直径を有するリポソーム小胞を含む、実施形態８６～１２１のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２４．分散体が約１００ｎｍのｚ平均直径を有するリポソーム小胞を含む、実施形態８６～１２１のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２５．分散体がキレート剤をさらに含む、実施形態８６～１２４のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２６．分散体が、デフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む、実施形態８６～１２４のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２７．分散体が、０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む、実施形態８６～１２４のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２８．分散体が、０．５ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）およびＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤をさらに含む、実施形態８６～１２４のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１２９．分散体が、２０～６０ｍＭの濃度でアンモニウムをさらに含む、実施形態８６～１２８のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１３０．分散体が、５０～８０ｍＭの濃度で塩化ナトリウムをさらに含む、実施形態８６～１２９のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１３１．７．０～８．０のｐＨを有するＡＫＧ－２８リポソーム分散体であって、リポソーム分散体が、
ａ．リン脂質および５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含む単層脂質二重層小胞；ならびに
ｂ．リポソーム小胞内に形成される硫酸塩としての（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン
を含む、ＡＫＧ－２８リポソーム分散体。
１３２．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩を用いて製剤化される、実施形態１３１に記載のリポソーム分散体。
１３３．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して４５～６５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１３２に記載のリポソーム分散体。
１３４．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１３２に記載のリポソーム分散体。
１３５．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１３２に記載のリポソーム分散体。
１３６．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１３２に記載のリポソーム分散体。
１３７．リポソーム分散体が、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩を薬物充填溶液

に溶解し、薬物充填溶液を、硫酸アンモニウム捕捉剤を含む抽出された精製リポソーム小胞と接触させて、ＡＫＧ－２８をリポソーム小胞に充填するステップを含むプロセスによって得られる、実施形態１３２に記載のリポソーム分散体。

１３８．単層脂質二重層小胞が、４５：５５のモル比または５：３の質量比でＨＳＰＣおよびコレステロールを含む、実施形態１３１～１３７のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

１３９．単層脂質二重層小胞が、ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１３８に記載のリポソーム分散体。

１４０．単層脂質二重層小胞が、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１３９に記載のリポソーム分散体。

１４１．７～７．７のｐＨを有する、実施形態１３１～１４０のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

１４２．７．０～８．０のｐＨを有するＡＫＧ－２８リポソーム分散体であって、リポソーム分散体が、

ａ．リン脂質および少なくとも４５ｍｏｌ％のコレステロールを含む単層脂質二重層小胞；

ｂ．リポソーム小胞内に形成される硫酸塩としての（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン；ならびに

ｃ．０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤

を含む、ＡＫＧ－２８リポソーム分散体。

１４３．７．０～８．０のｐＨを有するＡＫＧ－３８リポソーム分散体であって、リポソーム分散体が、

ａ．リン脂質および少なくとも５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む単層脂質二重層リポソーム小胞；ならびに

ｂ．リポソーム小胞内に形成される硫酸塩としての（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン

を含む、ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。

１４４．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩を用いて製剤化される、実施形態１４３に記載のリポソーム分散体。

１４５．リポソーム分散体が、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン塩酸塩を薬物充填溶液に溶解し、薬物充填溶液を、硫酸アンモニウム捕捉剤を含む抽出された精製リポソーム小胞と接触させて、ＡＫＧ－３８をリポソーム小胞に充填するステップを含むプロセスによって得られる、実施形態１４３～１４４のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

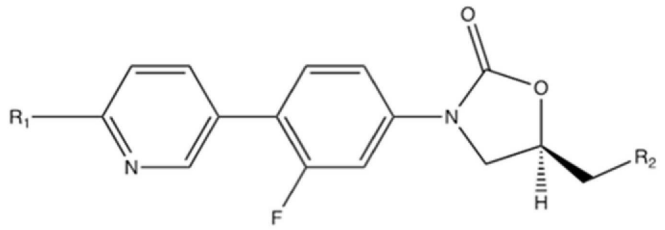
１４６．脂質小胞が、４５：５５のモル比または５：３の質量比でＨＳＰＣおよびコレステロールを含む、実施形態１４４～１４５のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。

１４７．脂質小胞がＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１４６に記載のリポソーム分散体。

１４８．脂質小胞が、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１４７に

記載のリポソーム分散体。
１４９．７～７．７のｐＨを有する、実施形態１４６～１４８のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１５０．７～８のｐＨを有するＡＫＧ－３８リポソーム分散体であって、リポソーム分散体が、
ａ．リン脂質および少なくとも５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む単層脂質二重層小胞；
ｂ．リポソーム小胞内に形成される硫酸塩としての（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン；ならびに
ｃ．０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤
を含む、ＡＫＧ－３８リポソーム分散体。
１５１．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンの塩酸塩を用いて製剤化される、実施形態１５０に記載のリポソーム分散体。
１５２．リポソーム分散体が、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンの塩酸塩を薬物充填溶液に溶解し、薬物充填溶液を硫酸アンモニウム捕捉剤を含む抽出された精製リポソームと接触させてＡＫＧ－３８をリポソーム小胞に充填するステップを含むプロセスによって得られる、実施形態１５１に記載のリポソーム分散体。
１５３．脂質単層脂質二重層小胞が、４５：５５のモル比または５：３の質量比でＨＳＰＣおよびコレステロールを含む、実施形態１５０～１５２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１５４．単層脂質二重層小胞が、ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１５３に記載のリポソーム分散体。
１５５．単層脂質二重層小胞が、４５：５５：２．２５のモル比または５：３：１の質量比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥからなる、実施形態１５４に記載のリポソーム分散体。
１５６．７～７．７のｐＨを有する、実施形態１５０～１５５のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１５７．リポソーム小胞中にコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～６５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１４２～１４５および１５０～１５２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１５８．リポソーム小胞中にコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して５０～５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１４２～１４５および１５０～１５２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１５９．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５０ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１４２～１４５および１５０～１５２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１６０．リポソーム小胞中のコレステロールおよび非ＰＥＧ化リン脂質の合計に対して約５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１４２～１４５および１５０～１５２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１６１．７～８のｐＨを有するオキサゾリジノンリポソーム分散体であって、リポソーム分散体が、
ａ．リン脂質および５０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含む単層脂質二重層小胞；
ｂ．リポソーム小胞内に形成される硫酸塩としての式（Ｉ）

【化２２】

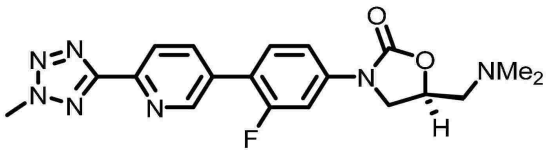
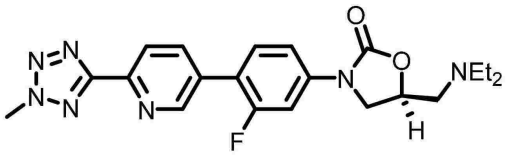
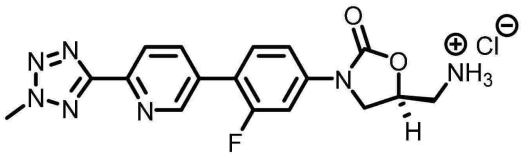
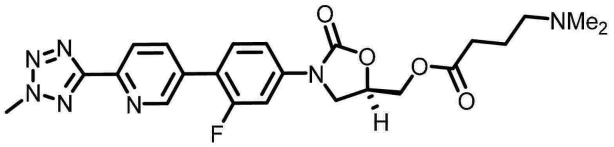
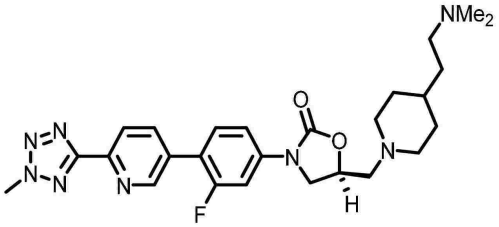
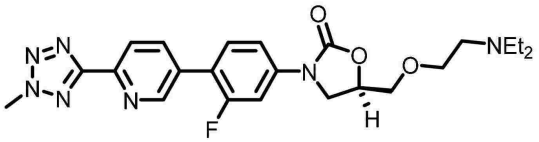
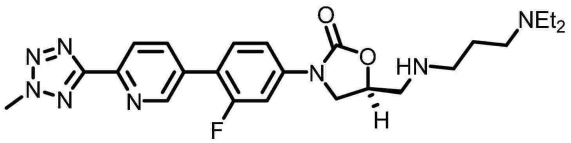
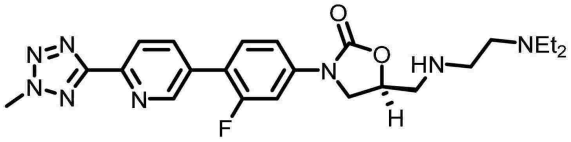


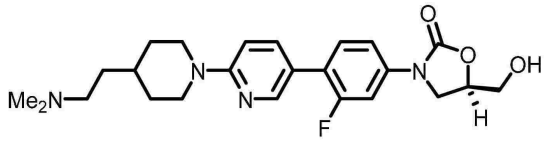
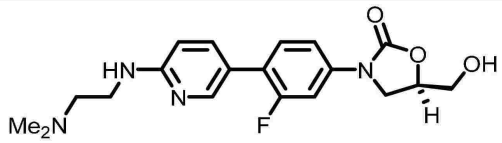
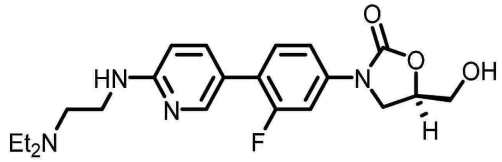
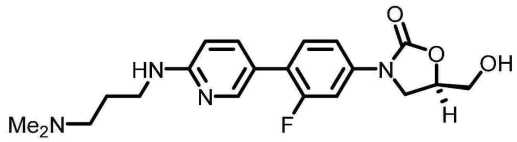
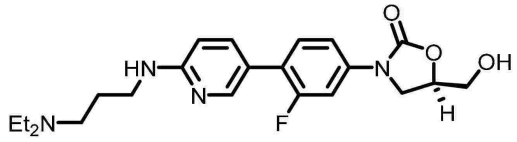
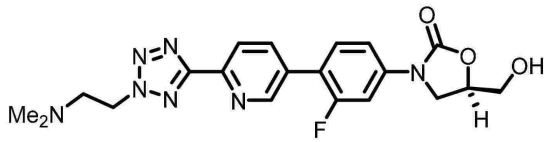
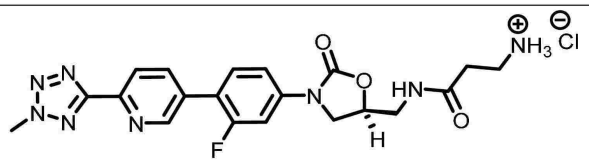
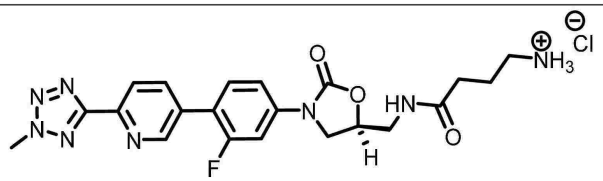
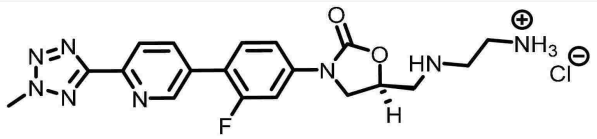
式(I)

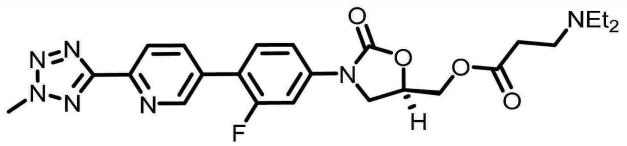
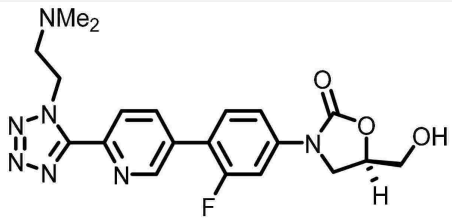
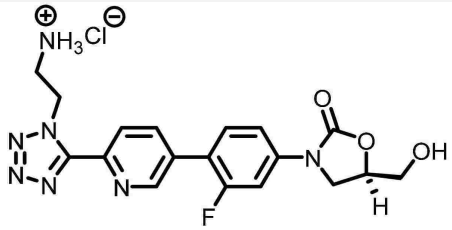
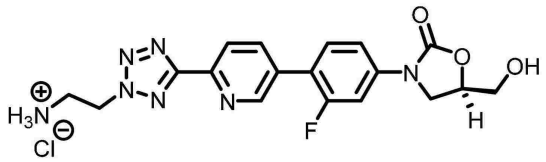
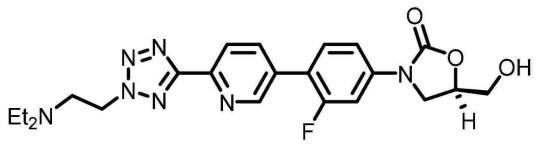
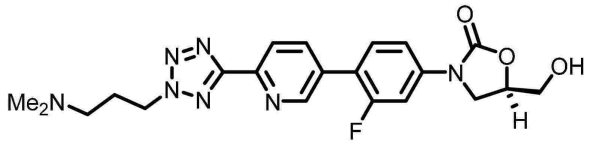
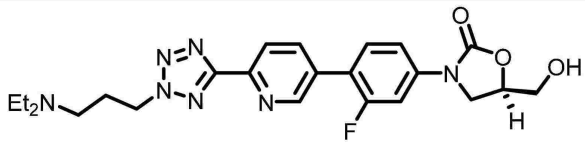
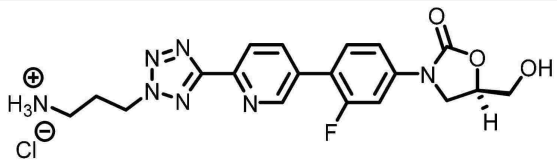
［式中、
Ｒ１は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環であり；
Ｒ２は、アミン（ＮＨ２）またはアセトアミド（ＮＨＣＯＣＨ３）である］
のオキサゾリジノン；および
ｃ．０．１～１ｍＭの濃度でデフェロキサミン（ＤＦＯ）またはＥＤＴＡからなる群から選択されるキレート剤
を含む、オキサゾリジノンリポソーム分散体。
１６２．約５対３の質量比でリン脂質およびコレステロールを含む、実施形態１６１に記載のリポソーム分散体。
１６３．ＰＥＧ－ＤＳＰＥをさらに含む、実施形態１６１に記載のリポソーム分散体。
１６４．リポソーム組成物が、約５：３：２．２５の質量比でリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む、実施形態１６３に記載のリポソーム分散体。
１６５．リポソーム組成物が、約４５：５５：２．２５ｍｏｌ％のモル比でリン脂質、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥを含む、実施形態１６４に記載のリポソーム分散体。
１６６．リン脂質がＨＳＰＣである、実施形態１６１～１６５のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１６７．オキサゾリジノンが、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩である、実施形態１６１～１６６のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１６８．オキサゾリジノンが、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩である、実施形態１６１～１６６のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１６９．オキサゾリジノンが、リポソーム分散体内に硫酸アンモニウム（ＡＳ）捕捉剤を含むリポソーム小胞内で形成される硫酸塩である、実施形態１６７～１６８のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１７０．単層脂質二重層小胞が、リポソーム分散体中のリン脂質の総量に対して合計５５ｍｏｌ％のコレステロールを含む、実施形態１６１～１６９のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１７１．リン脂質が、リポソーム分散体中のリン脂質の総量に対して合計４５ｍｏｌ％のコレステロールで存在する、実施形態１６１～１７０のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１７２．リン脂質が、リポソーム分散体中のリン脂質の総量に対して合計４５ｍｏｌ％のコレステロールで存在する、実施形態１６１～１７１のいずれか１つに記載のリポソーム分散体。
１７３．オキサゾリジノンが、表１から選択される化合物またはその薬学的に許容される塩である、実施形態１６１～１７２のいずれか１つに記載のリポソーム分散体：

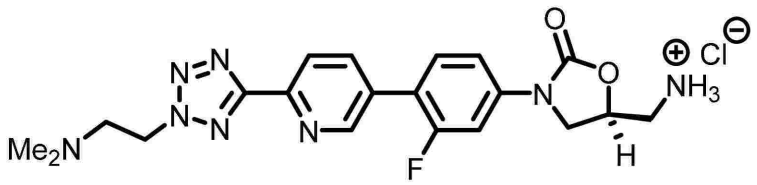
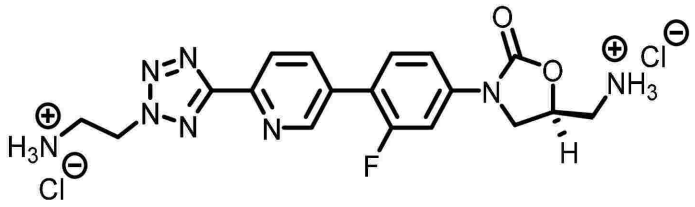
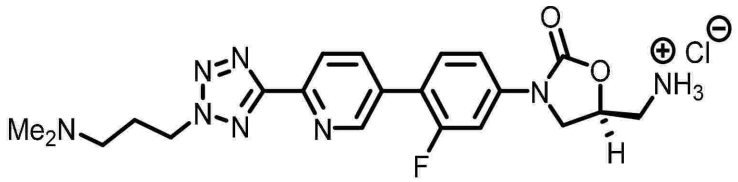
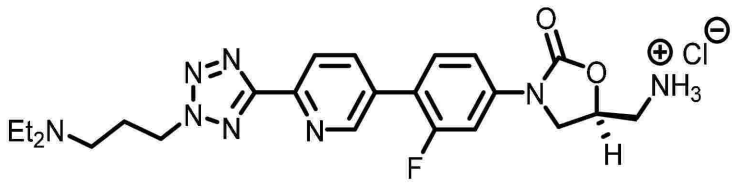
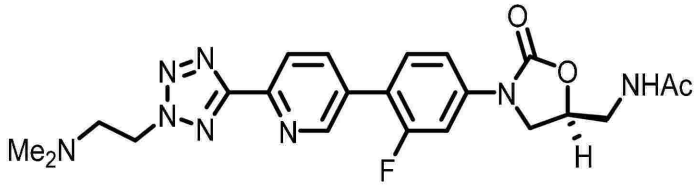
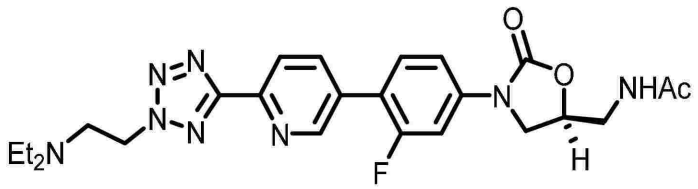
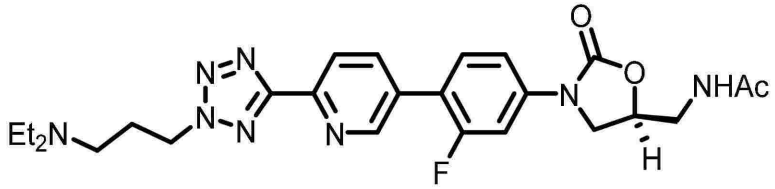
【表７】

表1

名称	構造
AKG-1	
AKG-2	
AKG-3	
AKG-5	
AKG-6	
AKG-7	
AKG-8	
AKG-9	

AKG-11	
AKG-12	
AKG-13	
AKG-14	
AKG-15	
AKG-16	
AKG-17	
AKG-18	
AKG-19	

AKG-20	
AKG-21	
AKG-22	
AKG-23	
AKG-24	
AKG-25	
AKG-26	
AKG-27	

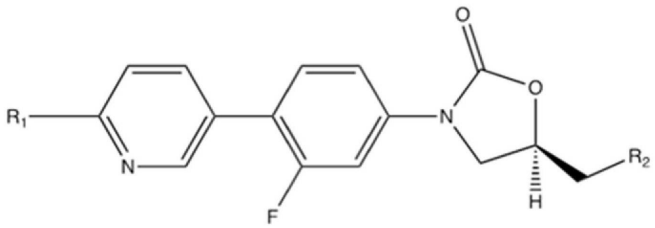
AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

１７４．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩、ならびにリン脂質、５５ｍｏｌ％コレステロールおよび５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＧから形成される脂質小胞を含むリポソーム分散体。

１７５．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩、ならびにリン脂質および５５ｍｏｌ％コレステロールから形成される脂質小胞を含む、ｐＨ７～８

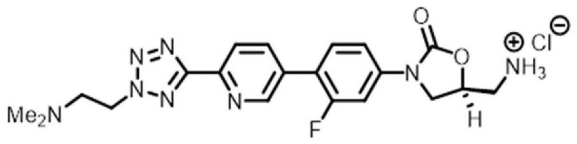
のリポソーム分散体。
１７５．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩；リン脂質および５５ｍｏｌ％コレステロールから形成される脂質小胞；ならびにキレート剤を含むリポソーム分散体。
１７６．キレート剤が、デフェロキサミン（デスフェリオキサミン、デスフェラル）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、および１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）からなる群から選択される、実施形態１７５に記載のリポソーム分散体。
１７７．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩、ならびにリン脂質、５５ｍｏｌ％コレステロールおよび５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＧから形成される脂質小胞を含むリポソーム分散体。
１７８．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩、ならびにリン脂質および５５ｍｏｌ％コレステロールから形成される脂質小胞を含む、ｐＨ７～８のリポソーム分散体。
１７９．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩；リン脂質および５５ｍｏｌ％コレステロールから形成される脂質小胞；ならびにキレート剤を含むリポソーム分散体。
１８０．キレート剤が、デフェロキサミン（デスフェリオキサミン、デスフェラル）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、エチレングリコール－Ｏ，Ｏ’－ビス（２－アミノエチル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－三酢酸（ＨＥＤＴＡ）、および１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）からなる群から選択される、実施形態１７９に記載のリポソーム分散体。
１８１．（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンまたはその薬学的に許容される塩、ならびにリン脂質、５５ｍｏｌ％コレステロールおよび５ｍｏｌ％ＰＥＧ－ＤＳＧから形成される脂質小胞を含むリポソーム分散体。
【０１７１】
［追加の実施形態］
（さらなる実施形態）
以下の追加の実施形態は、例示の目的で提供される。追加の実施形態には、以下の追加の実施形態に記載されるオキサゾリジノンリポソーム組成物、およびそこに列挙される特徴の他の組合せが含まれる。
１．７．３～７．７のｐＨを有し、
ａ．ＤＦＯ、ＥＤＴＡおよびＤＴＰＡからなる群から選択されるキレート剤、
ｂ．リン脂質、およびリポソーム組成物中の総リン脂質に対して４０ｍｏｌ％を超えるコレステロールを含むリポソーム小胞、ならびに

ｃ．リポソーム小胞にカプセル封入された式（Ｉ）
【化２３】



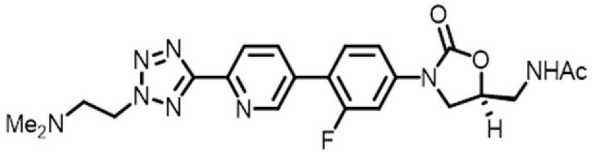
式(I)

［式中、
R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、
R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。］
の化合物の硫酸塩を含むリポソーム医薬組成物。
２．アミノアルキルがジメチルアミノエチルである、実施形態１に記載のリポソーム組成物。
３．リポソーム小胞が、式１ｂ：
【化２４】



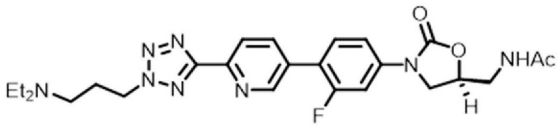
式1b

の化合物を含む、実施形態１に記載のリポソーム組成物。
４．リポソーム小胞が、式１ｃ
【化２５】

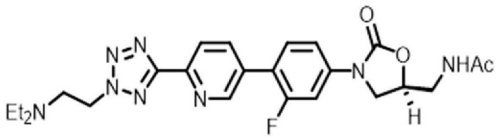


式1c

の化合物を含む、実施形態１に記載のリポソーム組成物。
５．リポソーム小胞が、式１ｄまたは式１ｅ
【化２６】



式 1d



式1e

の化合物を含む、実施形態１のリポソーム組成物。
６．リポソーム小胞が水性媒体中にある、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
７．化合物が捕捉剤とともにリポソーム小胞に捕捉され、捕捉剤がポリアニオンを含む、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
８．捕捉剤がスクロースオクタ硫酸トリエチルアンモニウムまたは硫酸アンモニウムで

ある、実施形態７に記載のリポソーム組成物。
９．捕捉剤がスクロースオクタ硫酸トリエチルアンモニウムである、実施形態７に記載のリポソーム組成物。
１０．捕捉剤が硫酸アンモニウムである、実施形態７に記載のリポソーム組成物。
１１．化合物の塩を含み、塩が硫酸塩、クエン酸塩、スクロソフェート、リン酸化もしくは硫酸化ポリオールとの塩、またはリン酸化もしくは硫酸化ポリアニオン性ポリマーとの塩である、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
１２．化合物の塩を含み、塩が硫酸塩である、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
１３．リポソーム小胞中の化合物が１ｍｇ／ｍＬ未満の水溶解度を有する、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
１４．リポソーム小胞中の化合物が０．１ｍｇ／ｍＬ未満の水溶解度を有する、実施形態１～５のいずれか１つに記載の組成物。
１５．リポソーム小胞がホスファチジルコリンおよびコレステロールを含む膜を含む、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
１６．膜が、リポソーム小胞の内側を水性媒体から分離する、実施形態１～５に記載のリポソーム組成物。
１７．ホスファチジルコリンがジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）または水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）である、実施形態１５に記載のリポソーム組成物。
１８．ホスファチジルコリン対コレステロールのモル比が約６０：４０～約３５：６５である、実施形態１５に記載のリポソーム組成物。
１９．ホスファチジルコリン対コレステロールのモル比が約５５：４５～約３５：６５である、実施形態１５に記載のリポソーム組成物。
２０．ホスファチジルコリン対コレステロールのモル比が約５０：５０～約４５：５５である、実施形態１５に記載のリポソーム組成物。
２１．ホスファチジルコリン対コレステロールのモル比が約５０：５０～約４０：６０である、実施形態１５に記載のリポソーム組成物。
２２．膜がポリマーコンジュゲートされた脂質をさらに含む、実施形態１５～２１のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
２３．リポソーム小胞が、約４５：５５：２．７５のモル比でＨＳＰＣ、コレステロールおよびポリマーコンジュゲートされた脂質を含む、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
２４．ポリマーコンジュゲートされた脂質がＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）またはＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である、実施形態２２または実施形態２３のリポソーム組成物。
２５．組成物が非経口投与のための液体医薬製剤である、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
２６．リポソームが、約８０～約１３０ｎｍの範囲のＺ平均粒径を有する、実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物。
２７．細菌感染を処置する方法であって、必要とする対象に、治療有効量の実施形態１～５のいずれか１つに記載のリポソーム組成物を投与することを含む、方法。
２８．細菌感染が結核菌感染である、実施形態２７に記載の方法。
２９．リポソーム小胞中の化合物が、約０．０１μｇ／ｍｌ～約０．２５μｇ／ｍｌの範囲の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を有する、実施形態２７または実施形態２８に記載の方法。
３０．リポソーム小胞中の化合物が、約０．０１μｇ／ｍｌ～約０．１μｇ／ｍｌの範囲のＭＩＣを有する、実施形態２７または実施形態２８に記載の方法。
３１．リポソーム組成物を非経口的に投与することを含む、実施形態２７～３０のいず

れか１つに記載の方法。
３２．方法が、同時にまたは連続的に１種または複数の活性剤を投与することを含む、実施形態３１に記載の方法。
３３．１種または複数の活性剤が、ベダキリン、プレトマニド、ピラジナミド、モキシフロキサシン、その薬学的に許容される塩またはそれらの組合せを含む、実施形態３２に記載の方法。
３４．リポソーム組成物が、１週間に１回から６週間に１回投与される、実施形態３１に記載の方法。
３５．それを必要とする対象への投与後に血液中に残存する化合物のパーセンテージが、６時間での投与量の２０％を超える、実施形態３１に記載の方法。
３６．それを必要とする対象への投与後に血液中に残存する化合物のパーセンテージが、投与量の１０％を超える、実施形態３１に記載の方法。
３７．リポソーム組成物を作製する方法であって、
（ｉ）捕捉剤を実質的に含まない媒体中で、リン脂質、コレステロール、およびＰＥＧ－脂質を含み、捕捉剤を含有する内部空間を有するリポソームを調製するステップと、
（ｉｉ）リポソームを、水性媒体中で実施形態１～８のいずれか１つに記載の化合物と接触させて、化合物をリポソームにカプセル封入するステップと、
（ｉｉｉ）カプセル封入されていない化合物を除去するステップと、
（ｉｖ）非経口使用に適した生理学的に許容される媒体中に前記リポソームを提供するステップと
を含む方法。
【実施例】
【０１７２】
以下の実施例は、行われた実験および達成された結果を含み、例示目的でのみ提供され、本開示を限定すると解釈されるべきではない。
【０１７３】
［実施例１］
［オキサゾリジノン誘導体の合成］
化合物ＡＫＧ－１、ＡＫＧ－２、ＡＫＧ－６、ＡＫＧ－８、ＡＫＧ－９およびＡＫＧ－１９を、溶媒としてのＮ－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ）中、６０℃でメシル酸テジゾリド（テジゾリド－ＭＳ）と、それぞれのアミンとを反応させることによって合成した（スキーム１）。室温（ＲＴ）で塩基の存在下、メタンスルホニルクロリドを用いたテジゾリドの１°ヒドロキシル基のメシル化によって、テジゾリド－ＭＳを得た。テジゾリド－ＭＳをアジ化ナトリウムで処理した後、得られたアジド（ＡＫＧ－３－Ａ）を還元したところ、精製のために選択された溶離液に応じて、遊離塩基としての中間体１または塩酸塩としてのＡＫＧ－３が得られた。中間体１の対応する酸によるアミド化、次いで、ＨＣｌ／ＥｔＯＡｃを使用する塩酸塩形成により、化合物ＡＫＧ－１７およびＡＫＧ－１８が得られた。標準的なエステル化条件下でテジゾリドと対応するジアルキルアミノ酸とを反応させたところ、化合物ＡＫＧ－５およびＡＫＧ－２０が得られた。塩基として水素化ナトリウムを使用する２－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノエチルアミンによるテジゾリドのＯ－アルキル化により、化合物ＡＫＧ－７が得られた。
【０１７４】
中間体２を、ビス（ピノコラト）ジボロンを使用する市販のアリールブロミドのホウ素化によって合成した（スキーム２）。容易に入手可能な５－ブロモ－２－フルオロピリジンによる中間体２の鈴木カップリングにより、中間体３が得られ、これを対応するアミンとともに密閉されたチューブ中、ＮＭＰ中で加熱したところ、化合物ＡＫＧ－１１～ＡＫＧ－１５が得られた。
【０１７５】
化合物ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２１～ＡＫＧ－２７を、中間体４から出発する収束合成において調製した（スキーム３および４）。５－ブロモ－２－シアノピリジン上でのアジ

化ナトリウムを使用するクリック化学により、中間体４が得られた。中間体４におけるテトラゾールのＮ－アルキル化により、３：１の比の中間体５および６が得られた。これらの中間体の構造を、ＨＭＢＣ分析から推定した。中間体７～１２を合成し、位置異性体を同様の様式で得た（所望の異性体のみをスキーム４中に示す。）。中間体２を用いた中間体５～１２の鈴木カップリングおよび適用可能な場合、アミン基の脱保護により、化合物ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２１～ＡＫＧ－２７が得られた。

【０１７６】

容易に入手可能なアリールブロミドのメシル化によって、中間体１３を合成した。中間体１４をヒドラジンで還元することによって、中間体１５を得た（スキーム５）。中間体１５中の第１級アミンのＢｏｃ保護またはアセチル化、次いで、ホウ素化によって、それぞれ、中間体１８および１９が得られた。対応するアリールブロミド中間体を用いたボロン酸中間体の鈴木カップリング（その全体が引用により本明細書の一部をなす米国特許出願公開第２０１０／００２２７７２号明細書、国際公開第２０１３／０４４８４５号）および適用可能な場合、アミン基の脱保護により、化合物ＡＫＧ－２８～ＡＫＧ－３１およびＡＫＧ－３８～ＡＫＧ－４０が得られた。

【０１７７】

［合成スキーム］

中間体１９の合成については、引用によってその全体が本明細書の一部をなす米国特許出願公開第２０１０／００２２７７２号、国際公開第２０１３／０４４８４５号を参照されたい。

【０１７８】

図２４に、合成スキーム－１を示す。

【０１７９】

図２５に、合成スキーム－２を示す。

【０１８０】

図２６に、合成スキーム－３を示す。

【０１８１】

図２７に、合成スキーム－４を示す。

【０１８２】

図２８に、合成スキーム－５を示す。

【０１８３】

［合成］

（材料および方法）

テジゾリド、（Ｒ）－３－（４－ブロモ－３－フルオロフェニル）－５－（ヒドロキシメチル）オキサゾリジン－２－オンを、Ｓｋｙｃｈｅｍｉｃａｌから購入し、ジメチル－（２－ピペリジン－４－イル－エチル）－アミンを、Ｅｎａｍｉｎｅから購入し、他の試薬および溶媒を、Ａｄａｍｓから購入し、受領した通り使用した。最終生成物の化学構造を、Ｂｒｕｋｅｒ　ＮＭＲ分光計（５００ＭＨｚまたは４００ＭＨｚ）上で決定された核磁気共鳴スペクトル（^{1}Ｈ　ＮＭＲ、^{13}Ｃ　ＮＭＲ）によって特徴付けた。^{13}Ｃ　ＮＭＲスペクトルを完全に分離させた。化学シフトは、重水素化溶媒ピークまたは内部標準としてのテトラメチルシラン（内部）を使用して１００万分の１（ｐｐｍ）で表した。^{1}ＨＮＭＲに関するデータは、以下のように記録される：化学シフト（ｄ、ｐｐｍ）、多重度（ｓ、シングレット；ｂｒ　ｓ、ブロードシングレット；ｄ、ダブレット；ｔ、トリプレット；ｍ、マルチプレット）、積分値、カップリング定数（Ｈｚ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲに関するデータは、化学シフト（ｄ、ｐｐｍ）を単位として記録される。最終生成物の純度（９５％以上）を、分析的ＨＰＬＣによって確認した。分析的ＨＰＬＣを、Ｓｕｎｆｉｒｅカラム、３．５μｍ（１５０ｃｍ×４．６ｍｍ）および勾配システム（水（０．０１％ＴＦＡ）／ＡＣＮ（０．０１％ＴＦＡ））および１ｍＬ／分の流速を使用するＡｇｉｌｅｎｔ分析的ＨＰＬＣシステム上で実施し、２５４および２１４ｎｍで検出した。フラッシュクロマトグラフィー（ＦＣ）精製を、Ｓａｎｔａｉ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのシ

リカゲル６０（０．０４～０．０６３ｎｍ；２３０～４００メッシュ）を用いて実施した。

【０１８４】

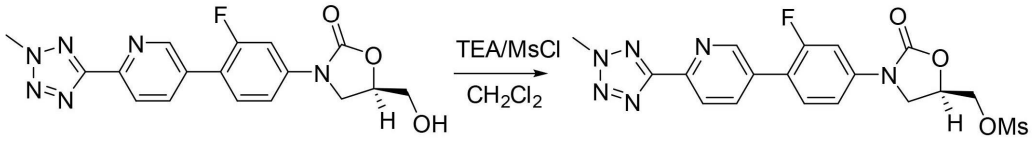
手順Ａ。ＮＭＰ（１０ｍＬ）中のテジゾリド－ＭＳ（１．０当量）、R_1R_2NH（４．０当量）の反応混合物を、密閉チューブ中、６０℃に１５時間加熱した。完了時に（ＬＣＭＳ）、反応物をH_2O（４０ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ５０ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を、ＦＣを使用して精製したところ、９５％を超える純度の生成物が得られた。

【０１８５】

（１．テジゾリド－Ｍｓの合成）

【０１８６】

【化２７】



テジゾリド　　テジゾリド-Ms

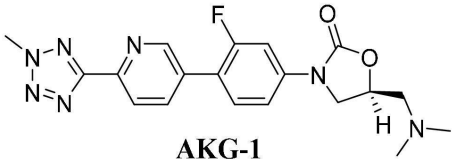
０℃のCH_2Cl_2（５０ｍＬ）中のテジゾリド（７．００ｇ、１８．９０ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（３．８３ｇ、３７．８０ｍｍｏｌ）の溶液に、Ａｒ下、０℃でメタンスルホニルクロリド（３．２５ｇ、２８．３６ｍｍｏｌ）を滴下添加した。ＲＴで２時間撹拌した後、反応混合物を水中に注ぎ入れ、CH_2Cl_2で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過によって収集した。溶媒を減圧下で除去したところ、黄色の固体として純粋な生成物テジゾリド－Ｍｓ（７．０ｇ、８２．６％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.31 - 8.14 (m, 2H), 7.88 - 7.65 (m, 2H), 7.53 (d, J= 8.6 Hz, 1H), 5.14 - 4.96 (m, 1H), 4.59 - 4.39 (m, 5H), 4.28 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 9.2, 6.3 Hz, 1H), 3.28 (s, 3H). MS (ESI+) m/z 449.1 ([M + 1]$^+$).

【０１８７】

（２．ＡＫＧ－１、２、６、８、９および１９の合成）

【０１８８】

【化２８】

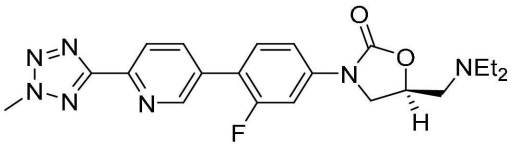


AKG-1

手順Ａを使用して、テジゾリド－Ｍｓおよびジメチルアミンから白色の固体（０．５ｇ、５６．４％収率）としてＡＫＧ－１を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.32 - 8.13 (m, 2H), 7.83 - 7.64 (m, 2H), 7.54 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.21 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 3.84 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 2.62 (s, 2H), 2.25 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ164.3, 161.0, 158.6, 154.6, 149.9, 145.5, 140.9, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.0, 72.0, 62.1, 48.7, 46.4, 40.2. MS (ESI+) m/z 398.2 ([M + 1]$^+$).

【０１８９】

【化２９】



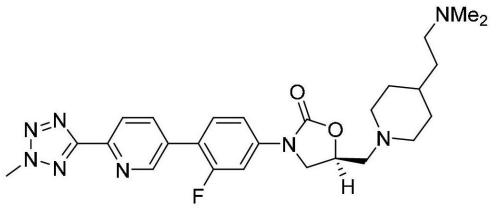
AKG-2

【０１９０】

手順Ａを使用して、テジゾリド－Ｍｓおよびジメチルアミンから白色の固体（０．５２ｇ、５４．８％収率）としてＡＫＧ－２を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.29 - 8.11 (m, 2H), 7.81 - 7.65 (m, 2H), 7.52 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 4.89 - 4.73 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.19 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 8.7, 7.0 Hz, 1H), 2.75 (dd, J = 5.1, 3.7 Hz, 2H), 2.57 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.7, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.3, 122.5, 119.1, 114.6, 106.1, 72.6, 56.1, 48.6, 47.7, 40.3, 12.3. MS (ESI+) m/z 426.3 ([M + 1]$^{+}$).

【０１９１】

【化３０】



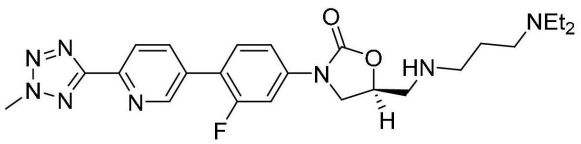
AKG-6

【０１９２】

手順Ａを使用して、テジゾリド－ＭｓおよびＮ，Ｎ－ジメチル－２－（ピペリジン－４－イル）エタン－１－アミンから白色の固体（０．６６ｇ、５８．２％収率）としてＡＫＧ－６を得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.93 (s, 1H), 8.30 (dd, J = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 7.56 - 7.47 (m, 1H), 7.45 - 7.37 (m, 1H), 4.89 - 4.74 (m, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.11 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 3.86 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 28.8, 10.9 Hz, 2H), 2.80 - 2.64 (m, 2H), 2.50 - 2.04 (m, 11H), 1.69 (d, J= 10.8 Hz, 2H), 1.48 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.37 - 1.19 (m, 4H).^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.7 , 161.3, 158.8 , 154.3 , 149.9 , 145.4 , 140.2 , 137.0, 132.3 , 130.5 , 122.0 , 120.0 , 113.8 , 106.4, 71.5 , 61.4 , 57.0 , 55.3 , 54.3 , 48.9 , 45.0 , 39.7 , 33.6 , 32.4. MS (ESI+) m/z 509.2 ([M + 1]$^{+}$).

【０１９３】

【化３１】



AKG-8

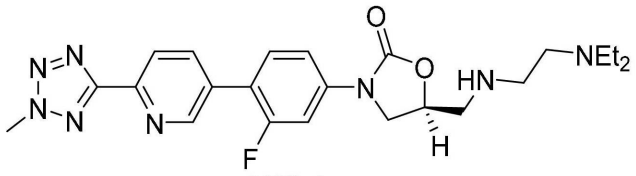
【０１９４】

手順Ａを使用して、テジゾリド－ＭｓおよびＮ^{1}，Ｎ^{1}－ジエチルプロパン－１，３－ジアミンから白色の固体（０．６２ｇ、５７．６％収率）としてＡＫＧ－８を得た。^{1}H

NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.34 - 8.11 (m, 2H), 7.84 - 7.59 (m, 2H), 7.52 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 4.80 (dd, J= 8.3, 5.7 Hz, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.18 (t, J= 8.9 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 8.8, 6.5 Hz, 1H), 2.94 - 2.77 (m, 2H), 2.66 - 2.53 (m, 7H), 1.65 - 1.51 (m, 2H), 0.99 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.6, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.1, 73.2, 52.1, 50.7, 48.2, 48.0, 46.7, 40.3, 26.4, 11.4. m/z 483.2 ([M + 1]$^+$).

【０１９５】

【化３２】



AKG-9

【０１９６】

手順Ａを使用して、テジゾリドーＭｓおよびＮ^1，Ｎ^1－ジエチルエタン－１，２－ジアミンから白色の固体（０．３６ｇ、３４．４％収率）としてＡＫＧ－９を得た。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.26 - 8.16 (m, 2H), 7.78 - 7.66 (m, 2H), 7.53 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 4.85 - 4.73 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.18 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.90 (t, J= 7.5 Hz, 1H), 2.88 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.7, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.1, 73.3, 52.6, 52.2, 48.1, 47.6, 47.1, 40.3, 12.0. m/z 469.3 ([M + 1]$^+$).

【０１９７】

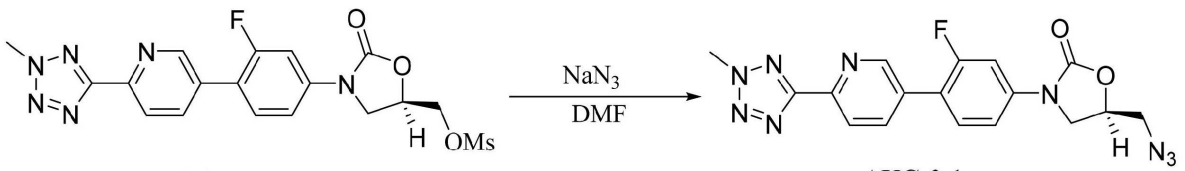
手順Ａを使用して、テジゾリドーＭｓおよびエタン－１，２－ジアミンから白色の固体（０．６０ｇ、５５％収率）としてＡＫＧ－１９を得た。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.33 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.58 (s, 3H), 8.23 (q, J= 8.3 Hz, 2H), 7.79 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 - 5.19 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.33 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 9.1, 6.7 Hz, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.43 - 3.23 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ164.26, 160.94, 158.50, 153.79, 149.84, 145.51, 140.58, 137.78, 132.04, 131.42, 122.61, 119.50, 114.94, 106.46, 69.38, 49.59, 47.87, 45.16, 40.34, 35.58.

【０１９８】

（３．ＡＫＧ－３の合成）

【０１９９】

【化３３】



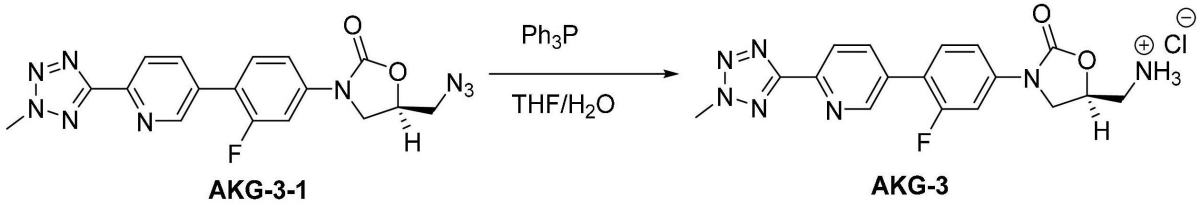
テジゾリド-Ms　　AKG-3-1

ＤＭＦ（２０ｍＬ）中のテジゾリドーＭｓ（１．００ｇ、２．２３ｍｍｏｌ）の溶液に、ＮａＮ３（０．４４ｇ、６．６９ｍｍｏｌ）を添加した。９０℃で３時間撹拌した後、反応混合物を水中に注ぎ入れ、ＥｔＯＡｃで抽出した。有機層をブラインで洗浄し、無水ＭｇＳＯ$_4$上で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーに

よってさらに精製したところ、白色の固体として表題の化合物ＡＫＧ－３－１（０．７ｇ、７９．４％収率）が得られた。

【０２００】

【化３４】



【０２０１】

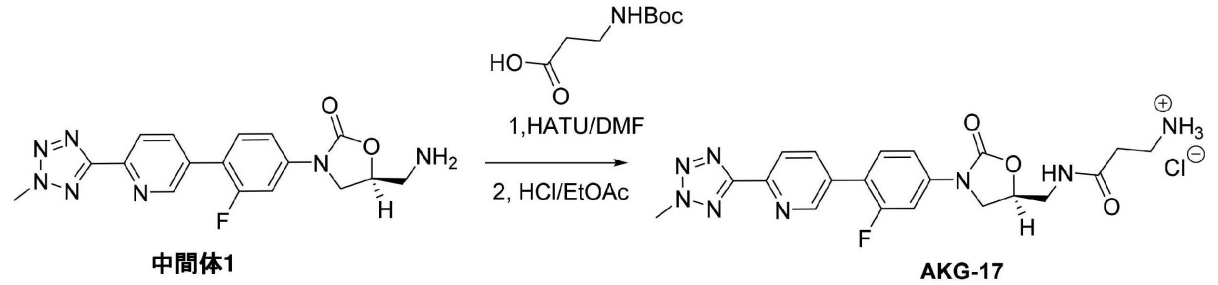
H_2O（２ｍＬ）およびＴＨＦ（２０ｍＬ）中のＡＫＧ－３－１（０．７ｇ、１．７７ｍｍｏｌ）およびPh_3P（１．３９ｇ、５．３１ｍｍｏｌ）の反応混合物を、１時間加熱還流した。（ＬＣＭＳ）の完了後、反応物を減圧下で濃縮し、逆相ＦＣを使用して精製した。溶離液としてＤＣＭ中のＭｅＯＨ　０～１０％を使用して精製し、凍結乾燥したところ、黄色の固体として遊離塩基である中間体１（２．５ｇ、７６．５％収率）が得られたが、溶離液としてH_2O中の０．００６Ｍ　ＨＣｌ中のＭｅＣＮ／０～３０％を用いるＦＣ精製を行ったところ、凍結乾燥後に黄色の固体として塩酸塩であるＡＫＧ－３（０．３５ｇ、４８．８％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.61 (s, 3H), 8.28 - 8.18 (m, 2H), 7.79 (t, J= 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.5, 2.1 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.13 - 5.00 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.29 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.02 (dd, J= 9.3, 6.6 Hz, 1H), 3.34 - 3.23 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ163.8, 160.4, 158.0, 153.4, 149.4, 145.1, 140.2, 137.2, 131.5, 130.9, 122.1, 118.9, 114.3, 105.9, 69.8, 47.1, 41.4, 39.8. m/z 370.3 ([M -HCl + 1]$^+$).

【０２０２】

（４．ＡＫＧ－１７の合成）

【０２０３】

【化３５】



ＤＭＦ（１０ｍＬ）中の３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸（０．６２ｇ、３．２５ｍｍｏｌ、１．２当量）およびＴＥＡ（０．６３ｇ、６．２５ｍｍｏｌ、２．５当量）の溶液に、Ａｒ下、ＲＴでＨＡＴＵ（１．４４ｇ、３．７８ｍｍｏｌ、１．４当量）を添加した。混合物を０．５時間撹拌した後、中間体１（１．０ｇ、２．７０ｍｍｏｌ、１．０当量）を添加した。全混合物をＲＴで一晩撹拌した。ＬＣＭＳにより、反応が完了したことが示され、それをH_2O中に注ぎ入れ、固体を濾過によって収集し、H_2Oで洗浄した。固体を減圧下で乾燥し、残渣をＥｔＯＡｃ中に溶解することによって、それを次のステップにおいて使用した後、ＨＣｌ／ＥｔＯＡｃ（４Ｍ、２０ｍＬ）を添加した。全混合物を１６時間撹拌し、溶媒をN_2によって除去した。残渣を逆相ＦＣ（H_2O中の０．００６Ｍ　ＨＣｌ中のＭｅＣＮ／０～３０％を用いる溶離液）によって精製したところ、凍結乾燥後に黄色の固体として生成物ＡＫＧ－１７（０．５ｇ、３９．５％収率）が得られた。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.67

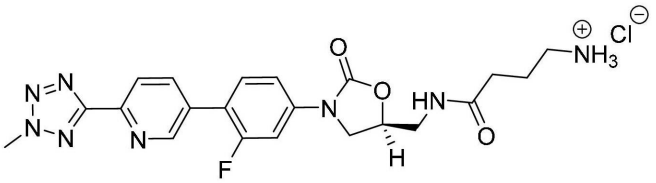
(s, 1H), 8.23 (q, J = 8.3 Hz, 2H), 8.14 (s, 3H), 7.77 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.87 - 4.78 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.22 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 3.50 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.98 (dd, J = 12.5, 6.4 Hz, 2H), 2.58 (t, J = 7.1 Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.60, 164.22, 160.97, 158.53, 154.42, 149.78, 145.42, 140.89, 137.79, 132.11, 131.41, 122.61, 119.19, 114.72, 106.23, 105.95, 72.13, 47.77, 40.33, 35.58, 32.58.

【０２０４】

（５．ＡＫＧ－１８の合成）

【０２０５】

【化３６】



AKG-18

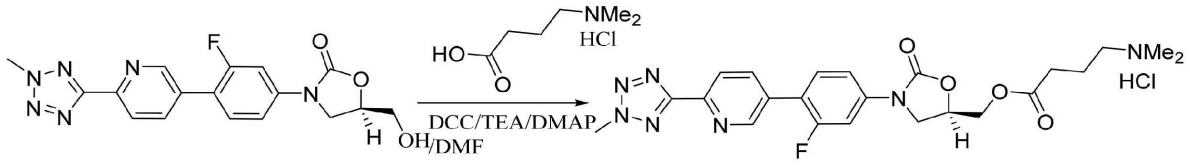
ＡＫＧ－１７の手順を使用して、中間体１および４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ブタン酸から黄色の固体（０．５ｇ、３７．６％収率）としてＡＫＧ－１８を得た。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.52 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.29 - 8.08 (m, 5H), 7.77 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.87 - 4.76 (m, 1H), 4.50 (s, 3H), 4.22 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.93 - 3.83 (m, 1H), 3.49 (t, J= 5.3 Hz, 2H), 2.83 - 2.72 (m, 2H), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.88 - 1.75 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.59, 164.23, 160.96, 158.52, 154.44, 149.00, 145.39, 140.88, 137.78, 132.10, 131.40, 122.61, 119.17, 114.70, 106.21, 72.17, 47.78, 41.88, 40.37, 38.78, 32.44, 23.60.

【０２０６】

（６．ＡＫＧ－５の合成）

【０２０７】

【化３７】



テジゾリド

AKG-5

テジゾリド（１．０ｇ、２．７０ｍｍｏｌ）、４－（ジメチルアミノ）ブタン酸塩化水素（０．５７ｇ、３．３７ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．２７ｇ、２．７０ｍｍｏｌ）の混合物に、N_2下でＤＭＦ（２０ｍＬ）中の触媒量のＤＭＡＰ、ＤＣＣ（０．８４ｇ、４．０５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＲＴで１６時間撹拌した。反応（ＬＣＭＳ）の完了時に、それをH_2O（１００ｍＬ）で希釈し、濾過した。濾液を０．０２Ｍ ＨＣｌでｐＨ＝５～６に酸性化した後、ＲＰ－ＦＣ（０．５％ギ酸／H_2O中のＭｅＣＮを用いる溶離液）を使用して精製したところ、凍結乾燥後、ギ酸塩として生成物ＡＫＧ－５が得られた。生成物をH_2O中に再溶解し、１当量の水性ＨＣｌ（０．０２Ｍ）を添加した。生成物を凍結乾燥したところ、ＨＣｌ塩としてＡＫＧ－５が得られた（６００ｍｇ、４２．７％収率）。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ10.40 (br, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.23 (q, J= 8.5 Hz, 2H), 7.78 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 13.6, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.03 (dd, J = 5.6, 3.1 Hz, 1H),

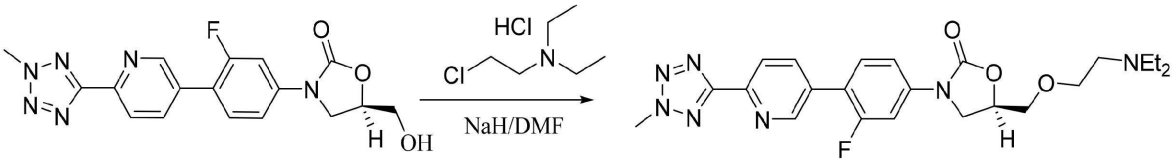
4.48 (s, 3H), 4.36 (qd, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 4.26 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.95 (dd, J = 9.2, 6.2 Hz, 1H), 2.99 - 2.86 (m, 2H), 2.64 (s, 6H), 2.45 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.87 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 172.3, 164.3, 158.8, 154.3, 149.9, 145.6, 140.8, 137.7, 132.0, 131.5, 122.6, 119.4, 114.7, 106.2, 71.1, 64.8, 56.3, 46.7, 40.3, 30.9, 19.9. m/z 469.3 ([M + 1]$^+$). m/z 484.1 ([M -HCl + 1]$^+$).

【０２０８】

（７．ＡＫＧ－７の合成）

【０２０９】

【化３８】



テジゾリド　　AKG-7

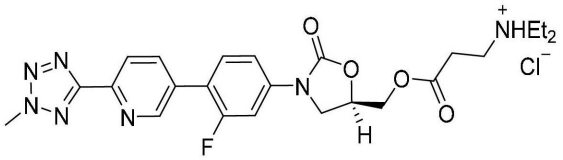
テジゾリド（ＤＭＦ（２０ｍＬ）中の１．０ｇ、２．７０ｍｍｏｌ）の混合物に、N_2下、ＲＴでＮａＨ（０．１３ｇ、６０％、５．４０ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を０℃で０．５時間撹拌した後、２－ジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩（９３０ｍｇ、５．４０ｍｍｏｌ）を一度に添加した。全混合物を、ＲＴで３時間撹拌した。ＬＣＭＳにより、反応の完了が示された。反応物を氷／H_2O（２０ｍＬ）中に注意深く注ぎ入れ、ＤＣＭ（２Ｘ５０ｍＬ）で抽出した。合わせた有機抽出物を飽和ブラインで洗浄した後、Na_2SO_4上で乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、ＦＣ（ＤＣＭ　０～１５％中のＭｅＯＨを用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、白色の固体（０．５ｇ、３９．４％収率）としてＡＫＧ－７が得られた。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.93 (s, 1H), 8.30 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.34 - 4.26 (m, 1H), 4.18 - 4.08 (m, 2H), 4.00 - 3.93 (m, 1H), 3.87 (qd, J = 10.8, 2.9 Hz, 2H), 3.19 - 3.11 (m, 2H), 3.06 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 164.7, 161.1, 159.1, 154.3, 149.8, 145.5, 140.0, 137.0, 132.2, 130.6, 122.0, 120.1, 113.8, 106.3, 71.3, 71.3, 66.9, 51.9, 48.2, 46.6, 39.7, 8.9. m/z 470.3([M + 1]$^+$).

【０２１０】

（８．ＡＫＧ－２０の合成）

【０２１１】

【化３９】



AKG-20

ＤＭＦ（２０ｍＬ）中のテジゾリド（１．０ｇ、２．７０ｍｍｏｌ）、４－（ジエチルアミノ）ブタン酸塩化水素（０．６１ｇ、３．３７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（０．０５ｇ）の反応混合物に、N_2下、ＲＴでＤＣＣ（０．８４ｇ、４．０５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＲＴで１６時間撹拌した。完了時（ＬＣＭＳ）に、反応物をH_2O（１００ｍＬ）で希釈し、濾過した。濾液を０．０２Ｍ　ＨＣｌでｐＨ＝５～６に酸性化した後、

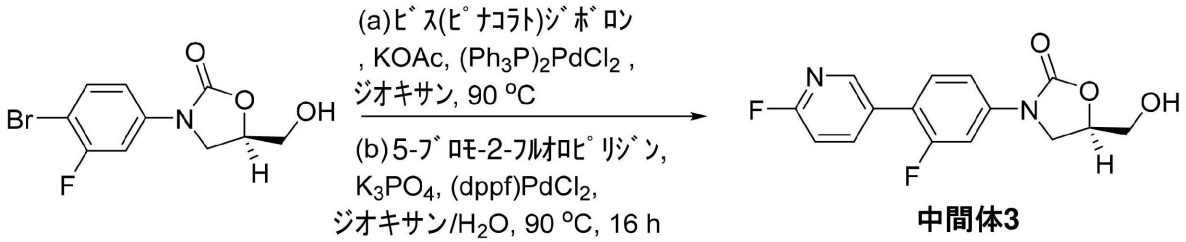
ＲＰ－ＦＣ（０．５％ＦＡ／H_2O中のＭｅＣＮを用いる溶離液）を使用して精製したところ、凍結乾燥後、ギ酸塩として生成物が得られた。次いで、塩をH_2O中に再溶解し、１当量のＨＣｌ（０．０２Ｍ）を添加し、凍結乾燥後、ＨＣｌ塩として生成物ＡＫＧ－２０が得られた（０．６１ｇ、４２％収率）。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.28 - 8.14 (m, 2H), 7.82 - 7.66 (m, 2H), 7.53 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 5.11 - 4.97 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.43 - 4.33 (m, 2H), 4.27 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 4.01 - 3.91 (m, 1H), 3.08 - 2.99 (m, 2H), 2.90 - 2.69 (m, 6H), 1.08 (t, J = 7.2 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ171.00, 164.33, 158.55, 154.32, 149.90, 145.58, 140.71, 137.63, 132.02, 131.45, 122.58, 119.33, 114.69, 106.21, 71.01, 65.04, 46.86, 46.63, 40.31, 29.99, 9.95(s).

【０２１２】

（９．中間体３の合成）

【０２１３】

【化４０】



ジオキサン（２００ｍＬ）中の（Ｒ）－３－（４－ブロモ－３－フルオロフェニル）－５－（ヒドロキシメチル）オキサゾリジン－２－オン（９．０ｇ、３１．０２ｍｍｏｌ）、ビス（ピナコラト）ジボロン（１１．８８ｇ、４６．５４ｍｍｏｌ）およびＫＯＡｃ（４．５６ｇ、４６．５４ｍｍｏｌ）の混合物を、Ａｒを用いて１０分間パージした後、（$Ph_3P)_2PdCl_2$（１．０９ｇ、１．５５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージした後、それを９０℃に１５時間加熱した。ＬＣＭＳにより、反応の完了が示された。それを室温に冷却し、セライト上で濾過したところ、濾液として中間体２が得られた。濾液に、５－ブロモ－２－フルオロピリジン（６．５５ｇ、３７．２２ｍｍｏｌ）、K_3PO_4（１４．４７ｇ、６．８０ｍｍｏｌ）およびH_2O（２０ｍＬ）を添加した。混合物をＡｒで１０分間パージし、（ｄｐｐｆ）$PdCl_2$（２．２７ｇ、３．１０ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージした。次いで、それを９０℃に１５時間加熱した。反応をＬＣＭＳによってモニタリングした。完了時に、それを減圧下で濃縮し、残渣をH_2O（２００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ２００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄した後、Na_2SO_4上で乾燥した。濾過し、減圧下で溶媒を除去したところ、残渣が得られ、これをＦＣ（ＤＣＭ　０～１５％中のＭｅＯＨを用いる溶離液）を使用して精製したところ、黄色の固体として生成物である中間体３（６．８ｇ、２ステップについて７１．６％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.43 (s, 1H), 8.23 - 8.14 (m, 1H), 7.72 - 7.61 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J= 8.6, 2.7 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.80 - 4.71 (m, 1H), 4.15 (t, J= 9.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.75 - 3.67 (m, 1H), 3.63 - 3.55 (m, 1H). MS (ESI+) m/z 307 ([M + 1]$^+$).

【０２１４】

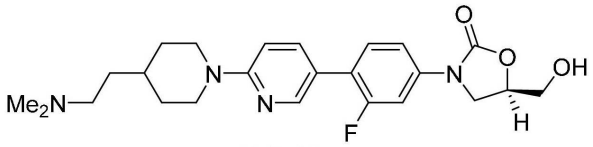
（１０．ＡＫＧ－１１、１２、１３、１４、１５の合成）

手順Ｂ。ＮＭＰ（１０ｍＬ）中の中間体３（１．０当量）、R_1R_2NH（４．０当量）および触媒量のＤＭＡＰを、密閉チューブ中、１００℃に１６時間加熱した。反応の完了時に（ＬＣＭＳ）、それをH_2O（５０ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ５０ｍＬ）

で抽出した。合わせた有機抽出物を飽和ブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、ＲＰＦＣ（０．１％NH_4HCO_3／H_2O中のＭｅＣＮ、０～４０％、Ｃ１８を用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、生成物が得られた。

【０２１５】

【化４１】



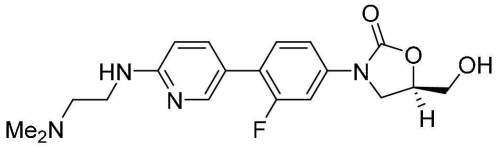
AKG-11

【０２１６】

手順Ｂを使用。中間体３およびＮ，Ｎ－ジメチル－２－（ピペリジン－４－イル）エタン－１－アミンから白色の固体（０．４０ｇ、３０．１％収率）としてＡＫＧ－１１を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.28 (s, 1H), 7.73 - 7.65 (m, 1H), 7.60 (dd, J = 13.6, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.78 - 4.68 (m, 1H), 4.33 (d, J = 13.0 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 1H), 3.62 - 3.52 (m, 1H), 2.87 - 2.71 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.72 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.64 - 1.49 (m, 1H), 1.34 (dd, J = 14.3, 7.0 Hz, 2H), 1.18 - 1.04 (m, 2H). 13C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.68, 158.33, 154.81, 147.54, 139.15, 137.82, 130.32, 120.72, 119.11, 114.35, 106.97, 106.03, 105.74, 73.82, 62.09, 56.98, 46.45, 45.73, 45.39, 34.29, 34.15, 31.94. MS (ESI+) m/z 443.1 ([M + 1]$^+$).

【０２１７】

【化４２】



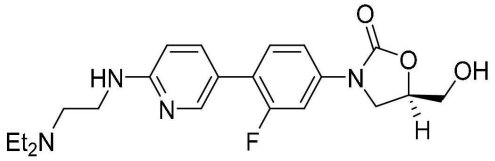
AKG-12

【０２１８】

手順Ｂを使用。中間体３およびＮ^1，Ｎ^1－ジメチルエタン－１，２－ジアミンから白色の固体（０．５２ｇ、４２．６％収率）としてＡＫＧ－１２を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.16 (s, 1H), 7.64 - 7.46 (m, 3H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.9, 5.6 Hz, 2H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.80 - 4.66 (m, 1H), 4.11 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.76 - 3.65 (m, 1H), 3.61 - 3.49 (m, 1H), 3.37 (dd, J = 12.3, 6.5 Hz, 2H), 2.42 (t, J= 6.6 Hz, 2H), 2.18 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ160.60, 158.48, 158.19, 154.82, 147.57, 138.92, 137.10, 130.22, 121.18, 118.53, 114.30, 108.37, 106.02, 105.74, 73.81, 62.10, 58.76, 46.45, 45.76, 39.21. MS (ESI+) m/z 375.1 ([M + 1]$^+$).

【０２１９】

【化４３】



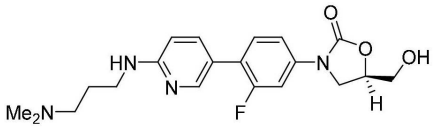
AKG-13

【０２２０】

手順Ｂを使用。中間体３およびＮ^{1}，Ｎ^{1}－ジエチルエタン－１，２－ジアミンから白色の固体（０．６８ｇ、５１．９％収率）としてＡＫＧ－１３を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.17 (s, 1H), 7.67 - 7.46 (m, 3H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.63 - 6.44 (m, 2H), 5.25 (s, 1H), 4.74 (dd, J = 9.2, 5.8 Hz, 1H), 4.12 (t, J= 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.76 - 3.65 (m, 1H), 3.63 - 3.52 (m, 1H), 3.34 (dd, J = 13.2, 6.2 Hz, 2H), 2.60 - 2.55 (m, 2H), 2.54 - 2.50 (m, 4H), 0.97 (t, J= 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.60, 158.53, 158.18, 154.81, 147.62, 138.91, 137.13, 130.20, 121.16, 118.54, 114.29, 108.24, 105.87, 73.80, 62.10, 52.19, 47.13, 46.45, 39.48, 12.31. MS (ESI+) m/z 417.1 ([M + 1]$^{+}$).

【０２２１】

【化４４】



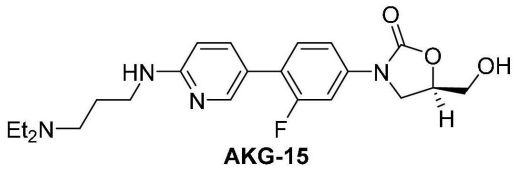
AKG-14

【０２２２】

手順Ｂを使用。中間体３およびＮ^{1}，Ｎ^{1}－ジメチルプロパン－１，３－ジアミンから白色の固体（０．６ｇ、４７．３％収率）としてＡＫＧ－１４を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.16 (s, 1H), 7.63 - 7.54 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.73 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.78 - 4.68 (m, 1H), 4.11 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.75 - 3.66 (m, 1H), 3.64 - 3.53 (m, 1H), 3.33 - 3.23 (m, 2H), 2.28 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 1.72 - 1.62 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.60, 158.62, 158.18, 154.81, 147.62, 138.89, 137.08, 130.19, 121.21, 118.39, 114.29, 108.10, 106.02, 105.74, 73.81, 62.10, 57.44, 46.45, 45.72, 39.58, 27.54. MS (ESI+) m/z 389.1 ([M + 1]$^{+}$).

【０２２３】

【化４５】



AKG-15

【０２２４】

手順Ｂを使用。中間体３およびＮ^{1}，Ｎ^{1}－ジエチルプロパン－１，３－ジアミンから白色の固体（０．６５ｇ、４８．０％収率）としてＡＫＧ－１５を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.16 (s, 1H), 7.63 - 7.54 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.9 Hz,

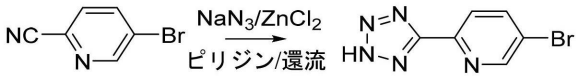
1H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.75 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.79 - 4.68 (m, 1H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.75 - 3.66 (m, 1H), 3.63 - 3.54 (m, 1H), 3.32 - 3.23 (m, 2H), 2.49 - 2.40 (m, 6H), 1.70 - 1.61 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.60, 158.65, 158.18, 154.81, 147.64, 138.89, 137.05, 130.18, 121.21, 118.37, 114.29, 108.01, 106.02, 105.74, 73.80, 62.09, 50.81, 46.80, 46.45, 40.11, 27.10, 12.23. MS (ESI+) m/z 417.1 ([M + 1]$^+$).

【0225】

（11．AKG－16の合成）

【0226】

【化46】

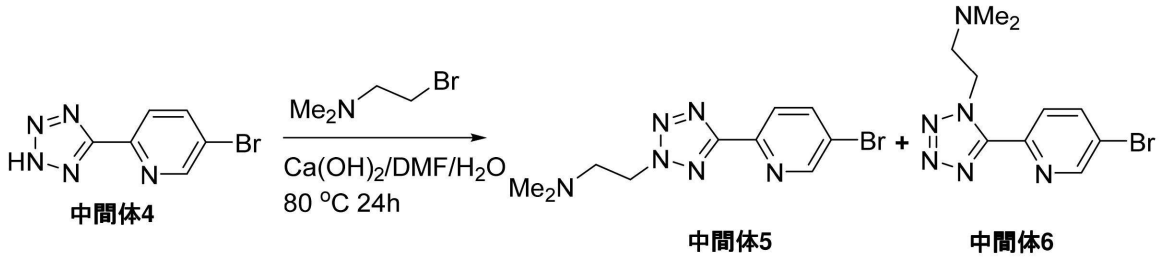


5-ブロモピコリノニトリル　　中間体4

$ZnCl_2$（11．2g、81．9mmol）を、ピリジン（40mL）に一部ずつ添加した後、RTでNaN3（8．90g、137mmol）および5－ブロモ－2－シアノピリジン（10．0g、54．6mmol）を添加し、反応混合物を120℃で2時間、加熱還流した。混合物をRTに冷却した後、それを水（200mL）で希釈し、RTで1時間撹拌し、濾過し、水（200mL）で洗浄した。濾過された固体を収集し、HCl（200mL、6M）中にRTで2時間懸濁した。生成物を濾過によって収集し、H_2Oで洗浄した。それを減圧下で乾燥したところ、白色の固体として中間体4（10．0g、81．3%収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.96 (s, 1H), 8.36 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H). MS (ESI+) m/z 225.9 227.9 ([M + 1]$^+$).

【0227】

【化47】



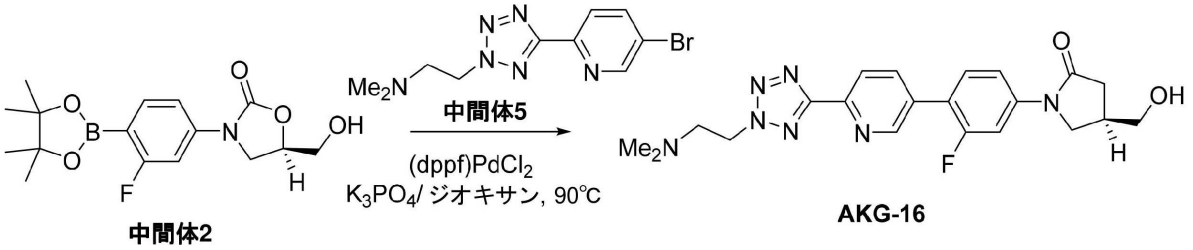
中間体4　　中間体5　　中間体6

【0228】

H_2O（150mL）およびDMF（20mL）中の中間体4（10．0g、44．25mmol）および$Ca(OH)_2$（7．20g、97．35mmol）の混合物を、rtで0．5時間撹拌した後、（2－ブロモエチル）ジメチルアミンヒドロブロミド（25．0g、107．3mmol）を添加した。混合物を80℃で24時間加熱した。LCMSにより、それぞれ、中間体5および6の3：1混合物が示された。混合物をH_2O（40mL）で希釈し、EtOAc（2X50mL）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、FC（DCM　0～15%中のMeOHを用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、粗生成物が得られた。粗生成物を、RPFC（0．1%NH_4HCO_3／H_2O中のMeCN　0～30%、C18、中間体5が最初に溶出し、次いで、中間体6が溶出する）によってさらに精製したところ、白色の固体として中間体5（0．74g、5．6%収率）および中間体6（0．25g、明黄色の固体として）が得られた。

【０２２９】
中間体５：^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.89 (dd, J = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 8.27 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 8.4, 0.6 Hz, 1H), 4.87 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.87 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.17 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 163.74, 151.48, 145.51, 140.81, 124.40, 122.21, 57.73, 51.54, 45.29. MS (ESI+) m/z 297.1, 299.1 ([M + 1]$^{+}$). 中間体6: ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.98 (s, 1H), 8.38 (dd, J = 8.4, 2 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.00 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.10 (s, 6H), MS (ESI+) m/z 297.1, 299.1 ([M + 1]$^{+}$).

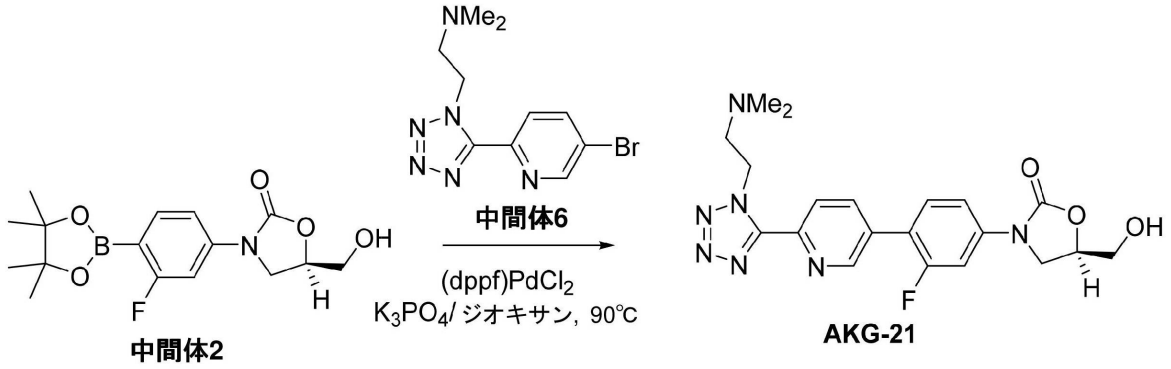
【０２３０】
【化４８】



【０２３１】
ジオキサン（５０ｍＬ）およびＨ$_2$Ｏ（５ｍＬ）中の新鮮に調製された中間体２（１．６８ｇ、４．９８ｍｍｏｌ）（中間体３の手順を使用して１．４４ｇの（Ｒ）－３－（４－ブロモ－３－フルオロフェニル）－５－（ヒドロキシメチル）オキサゾリジン－２－オンから）、中間体５（７４０ｍｇ、２．４９ｍｍｏｌ）およびＫ$_3$ＰＯ$_4$（１．１６ｇ、５．４８ｍｍｏｌ）の混合物を、Ａｒで１０分パージした。これに、（ｄｐｐｆ）ＰｄＣｌ$_2$（１８２ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージした。次いで、それを９０℃に１５時間加熱した。ＬＣＭＳにより、反応の完了が示された。それを減圧下で濃縮し、残渣をＨ$_2$Ｏ（２００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ２００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、ＲＰＦＣ（Ｈ$_2$Ｏ中のＭｅＣＮ、０～４０％を用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、白色の固体として生成物ＡＫＧ－１６（５２０ｍｇ、４９．０％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.23 (dd, J = 18.3, 8.2 Hz, 2H), 7.82 - 7.66 (m, 2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.89 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 4.82 - 4.71 (m, 1H), 4.17 (t, J= 9.0 Hz, 1H), 3.98 - 3.87 (m, 1H), 3.77 - 3.65 (m, 1H), 3.64 - 3.53 (m, 1H), 2.90 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.17, 161.02, 158.58, 154.81, 149.91, 145.59, 141.03, 137.63, 132.10, 131.39, 122.59, 119.05, 114.47, 105.97, 105.69, 73.95, 62.07, 57.72, 51.46, 46.46, 45.26. MS (ESI+) m/z 428.1 ([M + 1]$^{+}$).

【０２３２】
（１２．ＡＫＧ－２１の合成）
【０２３３】

【化４９】



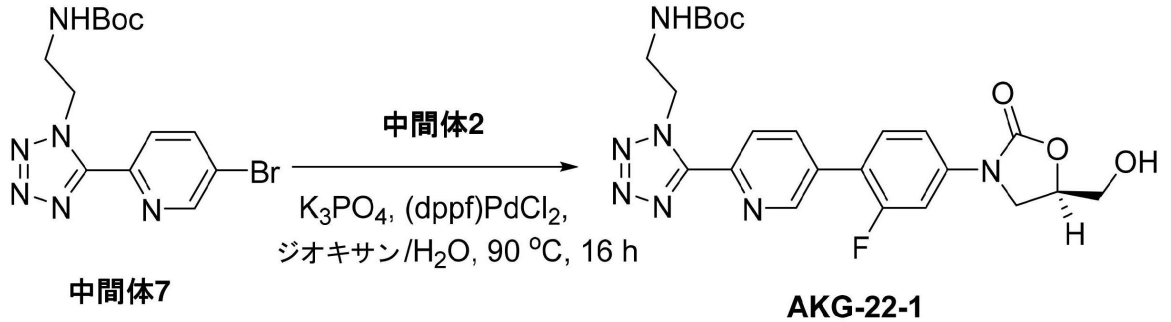
ジオキサン（３０ｍＬ）およびH_2O（５ｍＬ）中の中間体２（１．５ｇ、４．５ｍｍｏｌ）、中間体６（０．９ｇ、３ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ２（２４７ｍｇ、０．３ｍｍｏｌ）およびK_3PO_4（１．３ｇ、６ｍｍｏｌ）の溶液を、Ａｒで１０分間パージし、１００℃に１５時間加熱した。反応の完了時に（ＬＣＭＳ）、それを減圧下で濃縮し、残渣をH_2O（１００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ５０ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、ＦＣ（０～１０％のＤＣＭ（NH_4OHの１０％）中のＭｅＯＨを用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、３５％の収率でＡＫＧ－２１（白色の固体として４５０ｍｇ）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.01 (s, 1H), 8.36 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.81 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 5.26 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.08 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 4.79 - 4.75 (m, 1H), 4.18 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.93 - 3.89 (m, 1H), 3.74 - 3.68 (m, 1H), 3.62 - 3.56 (m, 1H), 2.80 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 161.09, 158.64, 154.80, 152.10, (149.45, 149.40), 143.46, (141.35, 141.23), (138.19, 138.15), (132.77, 132.76), (131.53, 131.48), 124.58, (118.69, 118.56), (114.51, 114.49), (105.97, 105.68), 73.96, 62.06, 58.38, 47.26, 46.47, 45.42.

【０２３４】

（１３．ＡＫＧ－２２の合成）

【０２３５】

【化５０】

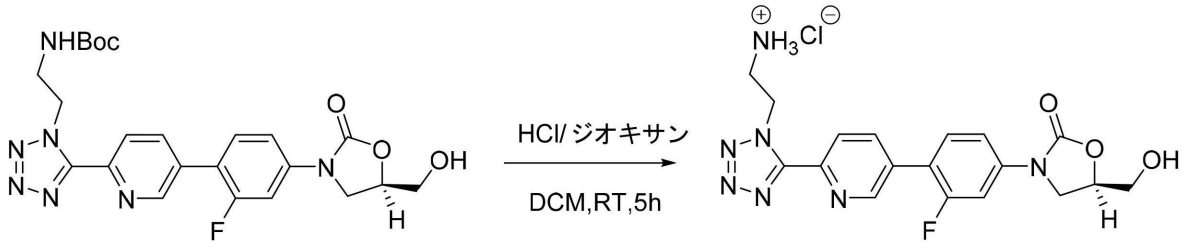


H_2O（２ｍＬ）およびジオキサン（８ｍＬ）中の中間体７（５００ｍｇ、１．３５４ｍｍｏｌ）の混合物に、中間体２（６８５ｍｇ、２．０３ｍｍｏｌ）、K_3PO_4（８６２ｍｇ、４．０６ｍｍｏｌ）および（ｄｐｐｆ）$PdCl_2$（９９ｍｇ、０．１３５ｍｍｏｌ）を添加した。フラスコを空にし、Ａｒで埋め戻した。次いで、混合物を９０℃で１６時間撹拌した。水（２０ｍＬ）を添加し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ２０ｍＬ）で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Ｂｉｏｔａｇｅ、４０ｇシリカゲルカラム@３０ｍＬ／分

、石油エーテル中の０～１００％ＥｔＯＡｃで溶出）によって精製したところ、灰色の固体として所望の生成物ＡＫＧ－２２－１（４５０ｍｇ、収率：６６％）が得られた。

【０２３６】

【化５１】



AKG-22-1　　AKG-22

【０２３７】

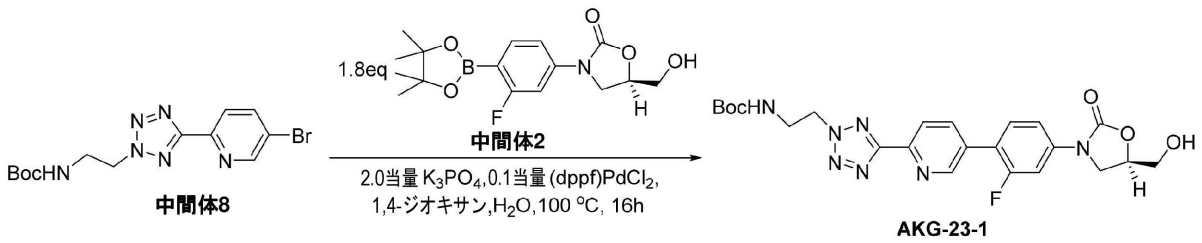
ＤＣＭ（８ｍＬ）中のＡＫＧ－２２－１（４５０ｍｇ、０．９ｍｍｏｌ）の混合物に、４Ｍ　ＨＣｌ／ジオキサン（２ｍＬ）を添加した。次いで、混合物をＲＴで５時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去したところ、灰色の固体として所望の生成物ＡＫＧ－２２（３９０ｍｇ、収率：９９％）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.03 (s, 1H), 8.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (brs, 3H), 7.82 - 7.70 (m, 2H), 7.57 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.17 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 3.53 - 3.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ (161.07,158.63), 154.82, 152.52, 149.54, 143.25, (141.39,141.28), 138.24, 124.54, (118.66,118.53), 114.60, (106.01,105.73), 73.97, 62.02, 47.37, 46.48, 38.84.

【０２３８】

（１４．ＡＫＧ－２３の合成）

【０２３９】

【化５２】

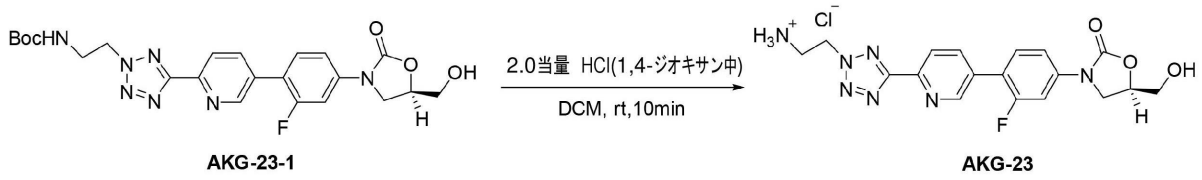


中間体8　　AKG-23-1

２０ｍＬの１，４－ジオキサンおよび５ｍＬのH_2O中の中間体８（１．０ｇ、２．７１ｍｍｏｌ）に、中間体２（４．８６ｍｍｏｌ、１．６３ｇ）、K_3PO_4（１．１４ｇ、５．４２ｍｍｏｌ）および（ｄｐｐｆ）$PdCl_2$（０．２３ｇ、０．２７ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を１００℃で１６時間撹拌した。出発材料が消費された後、１００ｍＬの飽和$NaHCO_3$を添加した。水性相をＥｔＯＡｃ（３Ｘ３０ｍＬ）で抽出し、合わせた有機抽出物をH_2Oで洗浄し、減圧下で濃縮し、ＦＣにより精製したところ、所望の化合物ＡＫＧ－２３－１（１．０ｇ、７０％収率）が得られた。

【０２４０】

【化５３】



【０２４１】

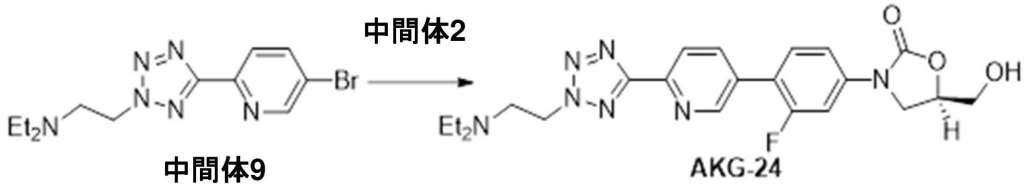
３０ｍＬのＤＣＭ中のＡＫＧ－２３－１（１．０ｇ、２ｍｍｏｌ）に、１ｍＬのＨＣｌ（１，４－ジオキサン中の４Ｍ）を添加し、混合物を１時間撹拌させた。出発材料が消費された後、混合物を濾過したところ、粗生成物が得られた。粗生成物を３ｍＬのＭｅＯＨ中で１時間撹拌し、濾過したところ、白色の固体として所望の生成物ＡＫＧ－２３（０．５３ｇ、６３％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.97 (s, 1H), 8.26 (m, 5H), 7.83-7.64 (m, 2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.16 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.92 (dd, J= 8.8, 6.2 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 12.3, 3.2 Hz, 1H), 3.61-3.57 (dd, J = 12.3, 3.2 Hz, 1H), 3.53 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ38.31, 46.49, 50.86, 62.01, 73.96, [105.69, 105.97], 114.46, [118.90, 119.03], 122.73, [131.37, 131.47], 132.21, [137.66, 137.70], [140.99, 141.10], 145.42, 149.86, 154.82, [158.57, 161.02], 164.50.

【０２４２】

（１５．ＡＫＧ－２４の合成）

【０２４３】

【化５４】

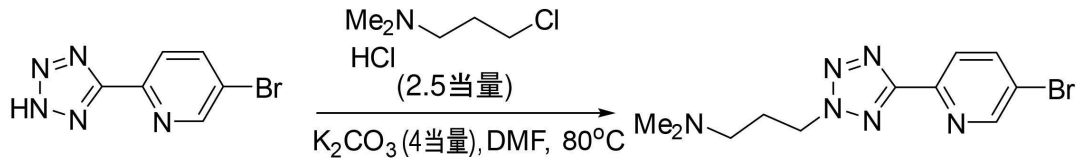


ジオキサン（５０ｍＬ）およびH_2O（５ｍＬ）中の中間体２（１．６６ｇ、４．９８ｍｍｏｌ）、中間体９（８００ｍｇ、２．４９ｍｍｏｌ）およびK_3PO_4（１．１６ｇ、５．４８ｍｍｏｌ）の混合物を、Ａｒで１０分間パージし、（ｄｐｐｆ）$PdCl_2$（１８２ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージした。次いで、それを９０℃に１５時間加熱した。ＬＣＭＳにより、反応の完了が示された；それを減圧下で濃縮し、残渣をH_2O（２００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ２００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄した後、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、ＲＰＦＣ（H_2O、０～４０％中のＭｅＣＮを用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、白色の固体として生成物ＡＫＧ－２４（４４０ｍｇ、３９．０％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.28 - 8.16 (m,2H), 7.81 - 7.67 (m,2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.93 - 4.70 (m, 3H), 4.17 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.04 (s, 2H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.13, 161.03, 158.59, 154.81, 149.94, 149.90, 145.66, 141.09, 140.98, 137.66, 137.62, 132.10, 132.08, 131.41, 131.37, 122.54, 119.15, 119.02, 114.50, 114.47, 105.99, 105.71, 73.95, 62.08, 52.09, 51.60, 46.85, 46.48, 12.26. MS (ESI+) m/z 456 ([M + H]$^+$).

【０２４４】

（１６．ＡＫＧ－２５の合成）

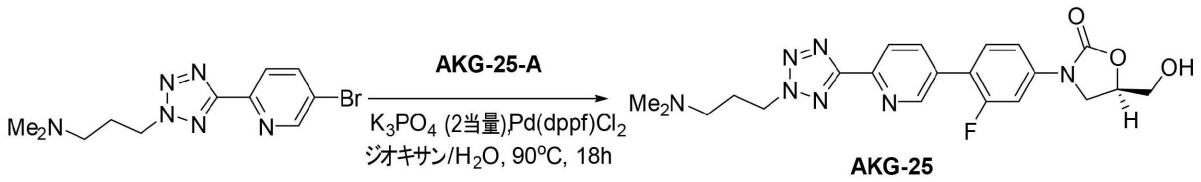
【０２４５】
【化５５】



中間体4　　中間体10

ＤＭＦ（２０ｍＬ）中の中間体４（２．２５ｇ、１０ｍｍｏｌ）およびK_2CO_3（５．５２ｇ、４０ｍｍｏｌ）の混合物に、３－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－１－アミン塩化水素（３．９５ｇ、２５ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を８０℃に４時間加熱した。それをH_2O（４０ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ１００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄した後、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去したところ、残渣はＮ－アルキル化の２つの位置異性体の存在を示した。異性体を、ＦＣ（ＤＣＭ　０～１５％中のＭｅＯＨを用いる溶離液）を使用して分離したところ、白色の固体として中間体１０（０．９８ｇ、３１．６％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.83 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 8.0, 0.4 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 4.78 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 3.2 Hz, 2H), 2.27-2.22 (m, 8H).MS (ESI+) m/z 311.1, 313.1 ([M + 1]$^+$).

【０２４６】
【化５６】

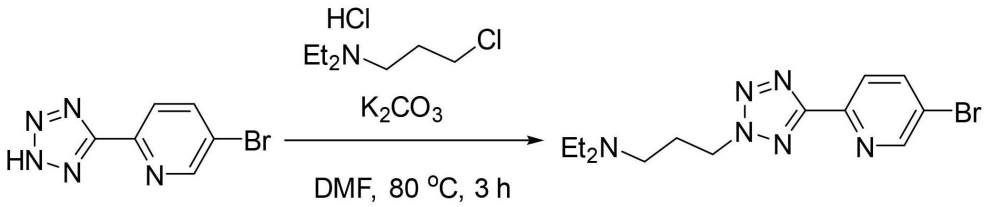


AKG-25

【０２４７】
ジオキサン（３０ｍＬ）およびH_2O（５ｍＬ）中の中間体１０（０．７４ｇ、２．４ｍｍｏｌ）、中間体２（１．６２ｇ、４．８ｍｍｏｌ）およびK_3PO_4（１ｇ、４．８ｍｍｏｌ）の混合物を、Ａｒで１０分間パージし、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2（１７５ｍｇ、０．２４ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージし、９０℃に１５時間加熱した。それを減圧下で濃縮し、残渣をH_2O（８０ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ１００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を飽和ブラインで洗浄した後、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で除去し、ＦＣ（ＤＣＭ　０～１５％中のＭｅＯＨを用いる溶離液）を使用して残渣を精製したところ、灰色の固体として生成物ＡＫＧ－２５（０．７３ｇ、６９．５％収率）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (s, 1H), 8.24-8.26 (m, 1H), 8.19-8.21 (m, 1H), 7.78-7.70 (m, 2 H), 7.54 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 5.27 (t, J=5.6 Hz, 1H), 4.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.77-4.75 (m, 1H), 4.16 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.92 (dd, J=8.8 Hz, 6.0 Hz, 1H), 3.74 - 3.69 (m, 1H), 3.63 - 3.58 (m, 1H), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 2.10 - 2.17 (m, 8H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.26, 161.03, 158.58, 154.81, 149.92, 145.58, 141.09, 137.65, 132.10, 131.37, 122.60, 119.12, 118.99, 114.46, 105.98, 105.70, 73.95, 62.07, 55.96, 51.65, 46.47, 45.53, 27.21. MS (ESI+) m/z 442.1 ([M + 1]$^+$).

【０２４８】
（１７．ＡＫＧ－２６の合成）
【０２４９】

【化５７】

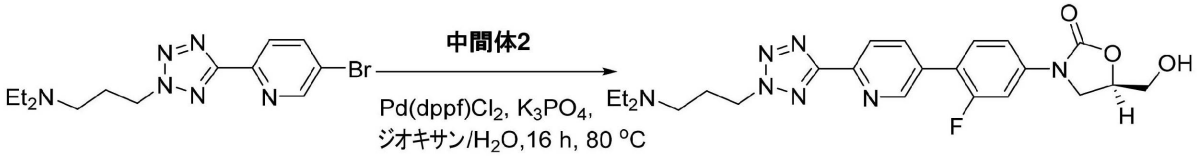


中間体4　　中間体11

ＤＭＦ（３０ｍＬ）中の中間体４（５．０ｇ、２２．１２ｍｍｏｌ）の溶液に、８０℃で３時間、（３－クロロプロピル）ジエチルアミン塩酸塩（８．２３ｇ、５５．３０ｍｍｏｌ）およびＫ$_2$ＣＯ$_3$（９．１７ｇ、６６．３６ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を冷却し、氷水浴中に注ぎ入れ、ＥＡ（２Ｘ２００ｍＬ）で抽出した。合わせた有機相を塩水（２Ｘ５０ｍＬ）で洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥した。溶媒の除去時に、Ｎ－アルキル化位置異性体を含む粗生成物をＦＣ（ＰＥ／ＥＡ＝１：１０）によって精製したところ、白色の固体として中間体１１（１．７０ｇ、２２．６５％）が得られた。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 2H), 4.77 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.53-2.49 (m, 6H), 2.26-2.20 (m, 2H), 0.99 (t, J = 7.5 Hz, 6H). MS (ESI$^+$) m/z 339.1, 341.1 ([M + 1]$^+$).

【０２５０】

【化５８】



中間体11　　AKG-26

【０２５１】

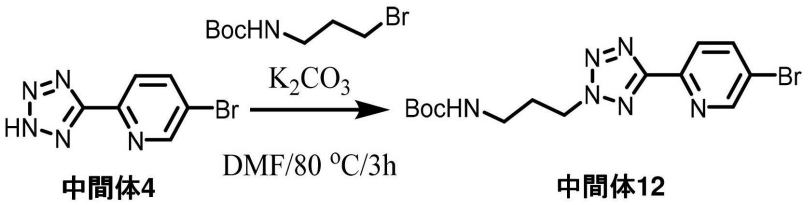
中間体１１（０．６８ｇ、２．００ｍｍｏｌ）、中間体２（１．０７ｇ、３．９９ｍｍｏｌ）、リン酸三カリウム（０．８５ｇ、３．９８５ｍｍｏｌ）およびＰｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ$_2$（０．１５ｇ、０．２０ｍｍｏｌ）の混合物を、１，４－ジオキサン：水（１２ｍＬ、６：１）中に懸濁した。反応物を還流下で１６時間撹拌した。混合物をＥｔＯＡｃ（２Ｘ１００ｍＬ）と水との間に分配し、ブラインで洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥し、濾過した。溶媒の除去時に、位置異性体を含有する残渣を、（ＤＣＭ／ＭｅＯＨ＝２０／１）で溶出するＦＣを使用して精製したところ、灰色の固体としてＡＫＧ－２６（０．５４ｇ、５６．０４％）が得られた。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.26-8.19 (m, 2H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.53 (dd, J= 10.5, 2.5 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.83-4.75 (m ,2H), 4.17 (t, J= 11.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 3.74-3.69 (m, 1H), 3.62-3.58 (m, 1H), 3.51-3.28 (m, 8H), 2.14 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 0.93 (t, J = 8.5 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.24, 161.03, 158.59, 154.52, 149.91, (d, J= 3.2 Hz),145.59, 141.03 (d, J = 11.8 Hz), 137.64 (d, J = 3.2Hz), 132.12, 131.40 (d, J = 4.5 Hz), 122.57, 119.06(d, J = 12.8 Hz), 114.47 (d, J = 2.8 Hz,), 105.97, 105.70, 73.96, 62.07, 51.70, 49.19, 46.75, 46.48. MS (ESI$^+$) m/z 470.1 ([M + 1]$^+$).

【０２５２】

（１８．ＡＫＧ－２７の合成）

【０２５３】

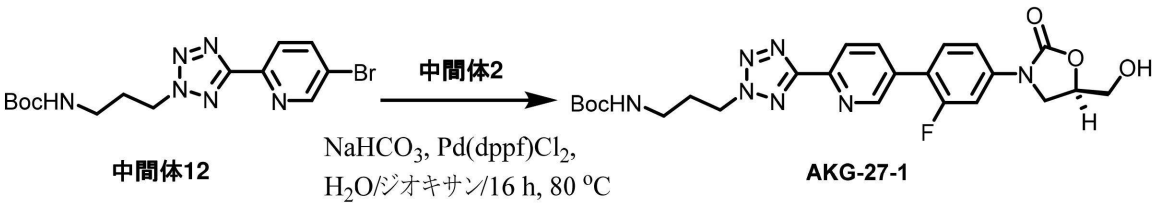
【化５９】



ＤＭＦ（４２ｍＬ）中の中間体４（６．３ｇ、２７．８７ｍｍｏｌ）の溶液に、８０℃で３時間、ＢｏｃＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$Ｂｒ（１６．６ｇ、６９．７１ｍｍｏｌ）およびＫ$_2$ＣＯ$_3$（１１．１ｇ、８０．０２ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を冷却し、氷水浴中に注ぎ入れ、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ２００ｍＬ）で抽出した。有機相をブライン（２Ｘ５０ｍＬ）で洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥し、濾過し、減圧下で溶媒を蒸発させた。Ｎ－アルキル化の位置異性体を含む粗生成物を、ＦＣ（ＰＥ／ＥＡ＝２：１）によって精製したところ、黄色の固体として中間体１２（１４ｇ、１３．１％）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.89 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.28 (dd, J = 8.4 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.77 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.03 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 2.15-2.08 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm. MS (ESI+) m/z 383.0 ([M + 1]$^+$).

【０２５４】

【化６０】

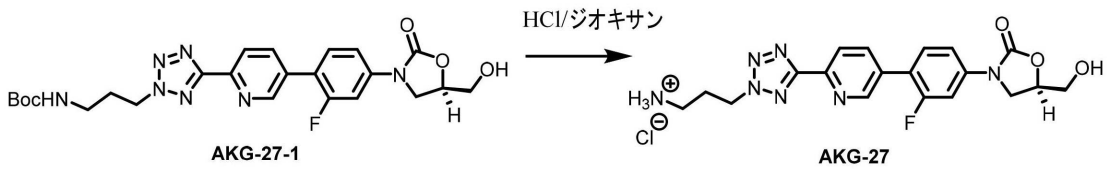


【０２５５】

中間体１２（０．８３ｇ、２．１５ｍｍｏｌ）、ＮａＨＣＯ$_3$（０．３６ｇ、４．３１ｍｍｏｌ）および中間体２（１．２４ｇ、３．６８ｍｍｏｌ）の溶液を、１．４－ジオキサン（３２ｍＬ）および水（８ｍＬ）の中に懸濁した。混合物を、Ｎ$_2$を用いて５分間泡立てた後、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ$_2$（０．０７８ｇ、０．０９５ｍｍｏｌ）を入れた。混合物を９０℃で１５時間撹拌した後、ＲＴに冷却した。混合物を、ＥｔＯＡｃ（２Ｘ１００ｍＬ）と水との間に分配した。有機層を、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥し、濾過し、濃縮した。濾液を濃縮し、シリカゲル上でのシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ＤＣＭ／ＭｅＯＨ＝２０／１）によって精製したところ、白色の固体としてＡＫＧ－２７－１（０．７５ｇ；６６．９％）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.26 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.80-4.75 (m, 3H), 4.17 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.91 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.71-3.69 (m, 1H), 3.60-3.59 (m, 1H), 3.06-3.03 (m, 2H), 2.15-2.12 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm. MS (ESI+) m/z 514.0 ([M + 1]$^+$).

【０２５６】

【化６１】



【０２５７】
乾燥ＤＣＭ（１６ｍＬ）中のＡＫＧ－２７－１（０．９ｇ、１．７５ｍｍｏｌ）の溶液に、N_2雰囲気下、ＲＴでジオキサン（４．０ｍＬ）中のＨＣｌを添加した。反応混合物を同じ温度で６時間撹拌し、ＲＴに冷却した。混合反応物の溶媒を減圧下で蒸発させたところ、淡黄色の固体としてＡＫＧ－２７（０．６５ｇ、８２．５％）が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.26-8.20 (m, 5H), 7.77-7.70 (m, 2H), 7.53 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.16 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.93 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.71 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 2.94 (s, 2H), 2.34 (t, J = 6.8 Hz, 2H) ppm. MS (ESI+) m/z 414.0 ([M + 1]$^+$).

【０２５８】
（１９．ＡＫＧ－２８～３１の合成）
ＤＣＭ（１００ｍＬ）中の（Ｒ）－３－（４－ブロモ－３－フルオロフェニル）－５－（ヒドロキシメチル）オキサゾリジン－２－オン（９ｇ、３１ｍｍｏｌ）の溶液に、（３．９２ｇ、３４ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（３．７６ｇ、３７ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＲＴで２時間撹拌した。混合物を水（２Ｘ３０ｍＬ）およびブライン（２Ｘ３０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過し、濃縮したところ、中間体１３（１１．４ｇ、収率９９％）が得られた。MS (ESI+) m/z 368 ([M + 1]$^+$).

【０２５９】
ＤＭＦ（２００ｍＬ）中の中間体１３（１１．４ｇ、３１ｍｍｏｌ）の溶液に、カリウム１，３－ジオキソイソインドリン－２－イド（６．０２ｇ、３２ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を９０℃で一晩撹拌した。混合物を冷却し、水（１０００ｍＬ）中に注ぎ入れ、０．５時間撹拌した。沈降物を収集し、減圧下で乾燥したところ、中間体１４（１１ｇ、収率８５％）が得られた。MS (ESI+) m/z 419 ([M + 1]$^+$).

【０２６０】
ＥｔＯＨ（１５０ｍＬ）中の中間体１４（１１ｇ、２６．３ｍｍｏｌ）の溶液に、NH_2NH_2－H_2O（８５％、７．７ｇ、１３１ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を９０℃で一晩撹拌した。混合物を濾過し、ＥｔＯＨ（２Ｘ５０ｍＬ）でリンスした。濾液を濃縮したところ、中間体１５（７．６ｇ、収率１００％）が得られた。MS (ESI+) m/z 289 ([M + 1]$^+$).

【０２６１】
ＴＨＦ（５０ｍＬ）および水（５０ｍＬ）中の中間体１５（７．６ｇ、２６．４ｍｍｏｌ）の溶液に、$(Boc)_2O$（６．９ｇ、３２ｍｍｏｌ）およびK_2CO_3（７．２９ｇ、５２．８ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を２時間撹拌した。混合物を水（１００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（３Ｘ５０ｍＬ）で抽出した。合わせた有機抽出物をブライン（２Ｘ５０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過し、濃縮した。残渣をＦＣ（Ｂｉｏｔａｇｅ、８０ｇシリカゲルカラム@６５ｍＬ／分、石油エーテル中の０～６０％ＥｔＯＡｃで３０分溶出する）によって精製したところ、中間体１６（７．８ｇ、収率７５％）が得られた。MS (ESI+) m/z 411 ([M + 23]$^+$).

【０２６２】
ジオキサン（１００ｍＬ）中の中間体１６（７．８ｇ、２０ｍｍｏｌ）、ビス（ピナコラト）ジボロン（６．５４ｇ、３０ｍｍｏｌ）およびＫＯＡｃ（２．９４ｇ、３０ｍｍｏｌ）の混合物を、Ａｒで１０分間パージした後、$(Ph_3P)_2PdCl_2$（１．０６ｇ、１．５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒで再度パージし、９０℃で一晩撹拌した。混合物を冷却し、水（３００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（３Ｘ１００ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物をブライン（２Ｘ５０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥し、濾過し、濃縮した。残渣をＦＣ（Ｂｉｏｔａｇｅ、８０ｇシリカゲルカラム@６５ｍＬ／分、石油エーテル中の０～６０％ＥｔＯＡｃで３０分溶出する）によって精製したところ、中間体１８（６．２ｇ、収率７０％）が得られた。MS (ESI+) m/z 459 ([M + 23]$^+$).

【０２６３】

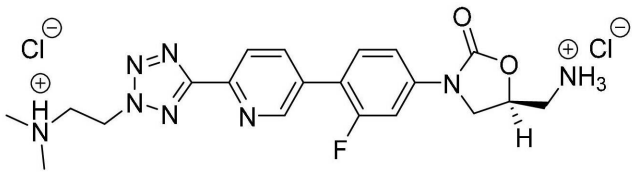
手順Ｃ：ジオキサン／H_2O（１０：１、０．０６Ｍ）中の中間体５／８／９／１０／１１の１つ（１．０当量）、中間体１８／１９の１つ（１．５当量）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2ＤＣＭ（０．１当量）、およびK_3PO_4（２．０当量）の混合物を、N_2でパージし、９０℃で一晩撹拌した。混合物をＥｔＯＡｃで希釈し、水およびブラインで洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、濾過し、濃縮した。残渣をＦＣによって精製したところ、化合物ＡＫＧ－２８－１／ＡＫＧ－２９－１／ＡＫＧ－３０－１／ＡＫＧ－３１－１／ＡＫＧ－３８／ＡＫＧ－３９／ＡＫＧ－４０の１つが得られた。

【０２６４】

ＤＣＭ（１ｍＬ／１００ｍｇ）中の化合物ＡＫＧ－２８－１／ＡＫＧ－２９－１／ＡＫＧ－３０－１／ＡＫＧ－３１－１の１つの溶液に、ＥｔＯＡｃ中の３Ｎ　ＨＣｌ（２０当量）を添加した。混合物を２時間撹拌した後、濾過した。固体を減圧下で乾燥したか、または凍結乾燥したところ、最終化合物ＡＫＧ－２８／ＡＫＧ－２９／ＡＫＧ－３０／ＡＫＧ－３１の１つが得られた（２ステップについて収率３５～４４％）。

【０２６５】

【化６２】



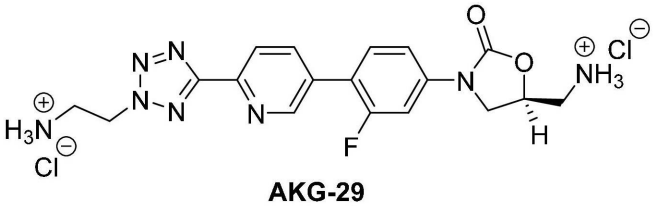
AKG-28

【０２６６】

手順Ｃを使用。この生成物を中間体５および中間体１８から白色の固体（０．３５ｇ、３５％収率）として得た。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.53 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.37 (s, 3H), 8.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.5, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 5.31 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 5.04-4.99 (m, 1H), 4.28 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.87 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 163.90 (s), 160.30 (s), 158.33 (s), 154.86 (s), 148.55 (s), 142.64 (s), 138.93 (d, J = 11.0 Hz), 137.74 (s), 132.43 (s), 130.39 (s), 122.46 (s), 119.03 (s), 114.36 (s), 106.41 (s), 106.18 (s), 70.31 (s), 55.23 (s), 48.07 (s), 47.69 (s), 43.29 (s), 42.19 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 427.1 ($[M + 1]^+$).

【０２６７】

【化６３】



AKG-29

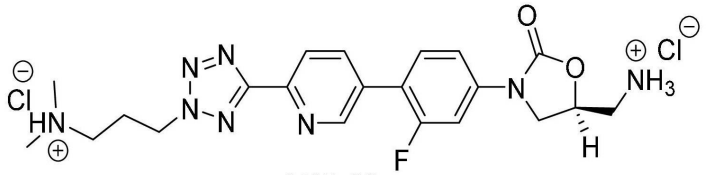
【０２６８】

手順Ｃを使用。この生成物を中間体８および中間体１８から白色の固体（０．４ｇ、４４％収率）として得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ8.97 (s, 1H), 8.57-8.41 m, 6H),8.29-8.13 (m, 2H), 7.80 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.5, 2.5 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 5.12 - 5.03 (m, 3H), 4.28 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.02-3.98 (m, 1H), 3.54-3.51 (m, 2H), 3.33-3.26 (m, 2H). 8.28 (s, 1H), 7.73 - 7.65 (m, 1H), 7.60 (dd, J = 13.6, 2.1 Hz, 1H),

7.54 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.78 - 4.68 (m, 1H), 4.33 (d, J = 13.0 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 1H), 3.62 - 3.52 (m, 1H), 2.87 - 2.71 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.72 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.64 - 1.49 (m, 1H), 1.34 (dd, J = 14.3, 7.0 Hz, 2H), 1.18 - 1.04 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 161.52, 160.59, 158.12, 154.86, 145.70, 141.05, 140.16, 139.65, 133.57, 130.44, 123.64, 117.70, 114.54, 106.50, 106.22, 70.34, 50.81, 47.68 ppm. MS (ESI+) m/z 399.2 ([M + 1]$^+$).

【0269】

【化64】



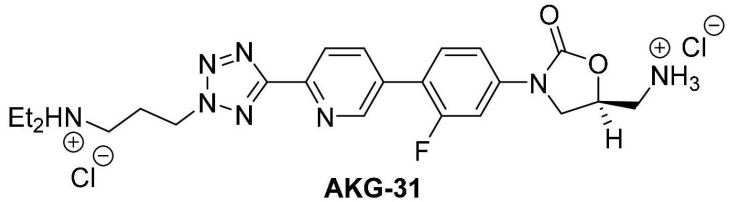
AKG-30

【0270】

手順Cを使用。この生成物を中間体10および中間体18から白色の固体（0.36g、40%収率）として得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.94 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.52 (s, 3H), 8.28-8.22 (m, 2H), 7.79 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J= 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.08-5.01 (m, 1H), 4.93 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.28 (t, J= 9.2 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 9.2, 6.8 Hz, 1H), 3.29 - 3.26 (m, 2H), 3.21-3.16 (m, 2H), 2.75 (d, J = 4.8 Hz, 6H), 2.49-2.43 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 162.39 (s), 160.58 (s), 158.11 (s), 154.88 (s), 147.20 (s), 141.66 (s), 139.28 (d, J = 11.3 Hz), 132.86 (s), 130.45 (s), 122.90 (s), 118.44 (d, J = 12.0 Hz), 114.44 (s), 106.46 (s), 106.17 (s), 70.30 (s), 54.56 (s), 50.62 (s), 47.68 (s), 42.89 (s), 42.16 (s), 23.74 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 441 ([M + 1]$^+$).

【0271】

【化65】



AKG-31

【0272】

手順Cを使用。この生成物を中間体11および中間体18から白色の固体（0.36g、42%収率）として得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.10 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.390- 8.21 (m, 5H), 7.80 (t, J= 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.04-4.97 (m, 1H), 4.94 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 9.6, 6.4 Hz,, 1H), 3.31-3.26 (m, 2H), 3.21-3.17 (m, 2H), 3.15-3.12 (m, 4H), 2.46-2.42 (m, 2H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 163.04 (s), 160.53 (s), 158.07 (s), 154.84 (s), 147.95 (d, J = 5.4 Hz), 142.36 (s), 139.05 (d, J = 11.3 Hz), 138.32 (s), 132.44 (s), 130.38 (d, J = 4.0 Hz), 122.50 (s), 118.72 (d, J = 12.8 Hz), 114.35 (s), 106.37 (s),

106.09 (s), 70.29 (s), 50.65 (s), 48.55 (s), 47.64 (d, J = 7.4 Hz), 42.17 (s), 23.05 (s), 8.24 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 469 ([M + 1]$^+$).

【０２７３】

ＤＣＭ（１５０ｍＬ）中の中間体１５（７．６ｇ、２６．４ｍｍｏｌ）の溶液に、トリエチルアミン（ＴＥＡ、４．５７ｇ、６．２７ｍＬ、５２．７７ｍｍｏｌ、２．０当量）、次いで、塩化アセチル（ＡｃＣｌ、２．６ｇ、２．７４ｍＬ、３９．５８ｍｍｏｌ、１．５当量）および４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ、０．０２８ｇ、２．６４ｍｍｏｌ、０．０１当量）を、N_2下、０～５℃で添加した。続いて、得られた反応混合物を、０～５℃で２時間撹拌した。ＴＬＣおよびＬＣＭＳが、反応が完了したことを示した時、反応混合物をH_2O（１００ｍＬ）でクエンチした。２つの層を分離した後、水性層をCH_2Cl_2（２Ｘ５０ｍＬ）で抽出し、合わせた有機抽出物をH_2O（２Ｘ１００ｍＬ）および飽和ＮａＣｌ水溶液（１００ｍＬ）で洗浄し、$MgSO_4$上で乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をＦＣ（Ｂｉｏｔａｇｅ、８０ｇシリカゲルカラム@６５ｍＬ／分、石油エーテル中の０～６０％ＥｔＯＡｃで３０分溶出する）によって精製したところ、中間体１７（６．５ｇ、収率７５％）が得られた。MS (ESI+) m/z 332 ([M + 1]$^+$).

【０２７４】

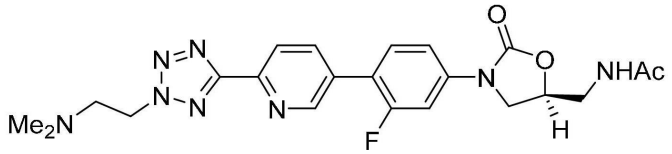
１，４－ジオキサン（１００ｍＬ）中の中間体１７（６．５ｇ、１９．７ｍｍｏｌ）の溶液に、１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン－パラジウム（ＩＩ）ジクロリドジクロロメタン複合体（１．６１ｇ、１．９７ｍｍｏｌ）、ビス（ピナコラト）ジボロン（１０ｇ、３９．３９ｍｍｏｌ）およびＫＯＡｃ（４．８３ｇ、４９．２４ｍｍｏｌ）を添加した。得られた反応物を、９０℃で４時間撹拌した。ＴＬＣおよびＬＣＭＳが、反応が完了したことを示した時、反応混合物をＲＴに冷却した後、水（１００ｍＬ）およびＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で処理した。２つの層を分離し、水性層をＥｔＯＡｃ（２Ｘ５０ｍＬ）で抽出した。合わせた有機抽出物を水（２Ｘ５０ｍＬ）および飽和水性ＮａＣｌ（５０ｍＬ）で洗浄し、$MgSO_4$上で乾燥し、減圧下で濃縮した。残留する褐色の油をＦＣ（Ｂｉｏｔａｇｅ、８０ｇシリカゲルカラム@６０ｍＬ／分、石油エーテル中の０～１００％ＥｔＯＡｃで３０分溶出する）によって精製したところ、中間体１９（６．６ｇ、収率８８．７％）が得られた。MS (ESI+) m/z 379 ([M + 1]$^+$).

【０２７５】

（２０．ＡＫＧ－３８～４０の合成）

【０２７６】

【化６６】

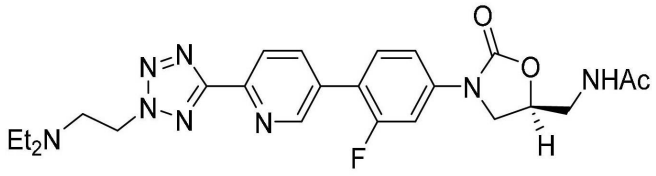


AKG-38

手順Ｃを使用。この生成物を中間体５および中間体１９から白色の固体（０．４８ｇ、６０％収率）として得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.95 (s, 1H), 8.29-8.19 (m, 3H), 7.77 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J= 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.89 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.81-4.76 (m, 1H), 4.20 (t, J= 9.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.2, 6.8 Hz, 1H), 3.45 (t, J = 5.6Hz, 2H), 2.90 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H), 1.85 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.51 ,164.17 , 154.46 , 149.94 , 145.62 , 140.90, 137.63, 132.07 , 131.39 , 122.59 , 119.25 , 114.66 , 106.18 , 105.90 , 72.34 , 57.71 , 51.45 , 47.67 , 45.25 , 41.87, 22.92 ppm. MS (ESI+) m/z 469.2 ([M + 1]$^+$).

【０２７７】

【化６７】



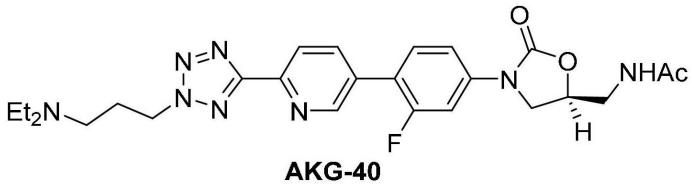
AKG-39

【０２７８】

手順Ｃを使用。この生成物を中間体９および中間体１９から白色の固体（０．３５ｇ、４０％収率）として得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.95 (s, 1H), 8.29-8.19 (m, 3H), 7.76 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.84-4.76 (m, 3H), 4.21 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.46 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.04 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.50-2.47 (m, 4H), 1.85 (s, 3H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.50, 164.11, 154.46, 149.91, 145.68, 137.68, 132.04, 131.40, 122.53, 119.27 (d, J= 13.3 Hz), 114.65, 106.18, 105.90, 72.34, 52.11, 51.61, 47.67, 46.83, 41.87, 40.63, 40.42, 40.22, 40.01, 39.80, 39.59, 39.38, 22.92, 12.28 ppm. MS (ESI+) m/z 497 ([M + 1]$^{+}$).

【０２７９】

【化６８】



AKG-40

【０２８０】

手順Ｃを使用。この生成物を中間体１１および中間体１９から白色の固体（０．３６ｇ、５０％収率）として、得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.31 - 8.18 (m, 3H), 7.77 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.88 - 4.71 (m, 3H), 4.20 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.45 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.14 (s, 2H), 1.85 (s, 3H), 0.93 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 137.70, 131.45, 114.69, 46.79, 41.86, 40.64, 40.43, 40.22, 40.01, 39.80, 39.59, 39.38 ppm. MS (ESI+) m/z 511 ([M + 1]$^{+}$).

【０２８１】

［実施例２］

［結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）におけるｉｎ ｖｉｔｒｏ活性に関するアッセイ］

使用される微量液体希釈ＭＩＣ法は、Ｃｏｌｌｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，１９９７およびＧｒｕｐｐｏ ｅｔ ａｌ．，２００６に記載されている。一晩のインキュベーション後の細菌の目に見える増殖を防止する化合物のＭＩＣまたは最小阻止濃度。

【０２８２】

要約すると、Ｃｏｌｌｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，１９９７（Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｌ，Ｆｒａｎｚｂｌａｕ ＳＧ（１９９７）．Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ ａｌａｍａｒ ｂｌｕｅ ａｓｓａｙ ｖｅｒｓｕｓ ＢＡＣＴＥＣ ４６０ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｏｆ ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ ａｇａｉｎｓｔ Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ ａｎｄ Ｍｙｃｏｂａｃｔｅ

rium avium．AAC．41（5）：1004－1009）およびGruppo et al．，2006（Gruppo V，Johnson CM，Marietta KS，Scherman H，Zink EE，Crick DC，Adams LB，Orme IM，Lenaerts AJ．（2006）Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against Mycobacterium tuberculosis．AAC 50：1245－1250）によって記載されたような、Alamar blueエンドポイント（MABA）を用いる微量液体希釈アッセイによって、MICを決定した。MABAは、酸化還元指標Alamar blueが、ブロス培地中のマイコバクテリア増殖活性の存在下で青色からピンク色に変わる96ウェル比色アッセイである。

【0283】

要約すると、1Lのフラスコ中にMiddlebrookの4．7gの7H9ブロス粉末（Millipore Sigmaカタログ#M0178）、2mLのグリセロール、および898の精製水を、溶解するまで混合しながら添加すること、続いて、同じ1Lのフラスコに100mLのADC溶液（100mLの水に溶解した、6gのウシ血清アルブミン、2gのデキストロース、および3mgのカタラーゼ）を添加することによって、7H9完全培地を調製した。化合物を、DMSO中で10mg／mLの濃度にした後、DMSOでさらに80μg／mLに、または2μg／mLの所望の出発濃度の40倍に希釈した。第1のウェル中の50μlの薬物溶液を、次のウェル中の50μlのDMSOに添加すること、および薬物調製プレート中でこのプロセスを次の8個のウェルに対して前に運ぶことによって、9つの1：2希釈系列を調製した。M．tuberculosis（M．tb）H34RvおよびM．tb Erdman株のストックを、培地を用いて3～4x10^7CFU／mLのそれらの初期濃度から、5x10^5CFU／mLの最終濃度に希釈し、マルチチャネルピペッターを用いてピペットを上下に動かすことによって完全に混合した。

【0284】

5x10^5CFU／mLを接種した培地100μlを全てのウェルに移すことによって、アッセイプレートを調製した。続いて、薬物調製プレートからのそれぞれの薬物希釈液2．5μLを、アッセイプレート中の対応するウェルに移した。続いて、アッセイプレートをジップロック（登録商標）バッグに入れ、インキュベーターの内部に置き、それらを37℃でインキュベートした。次に、3および10日目にプレートリーダー上、OD600nmでプレートを読み取った。10日目のOD600の読取り後、10μlのAlamar Blue染料をそれぞれの分析ウェルに添加した。12日目に、全てのアッセイプレートを、フラットベッドカラースキャナー上で走査した。Alamar Blueを用いて青色からピンク色への目に見える色の変化をもたらさない、および／または薬物非含有対照ウェルに対してOD600の80％以上の減少を示す最も低い連続抗菌濃度（典型的には、2倍連続希釈液）を、これらの化合物に関するMICとみなした。

【0285】

2つのユニークな薬物感受性株（M．tb ErdmanおよびM．tb H37Rv）を使用してアッセイを行った。MICアッセイを、4％（w／v）ヒト血清アルブミン（huSA）（Sigma #A1653）の存在下で実施して、潜在的なタンパク質結合を評価することもできる（血清シフトアッセイ）。一般的には、2つのウェルのMICにおけるシフト（MICの4倍のシフト）は有意であると考えられる。PA－824（陽性対照）については、MICにおける4倍のシフトが予想される。

【0286】

MICを、Alamar Blue（MABA）リードアウトによって、またはアッセイの限界内にある、1回の2倍希釈によってのみ一致した、もしくは異なっていた光密度リードアウト（OD600）によって測定した。試験した全ての化合物は、Mtb ErdmanとH37Rvとの両方に対してMIC値の一貫性を示したか、またはErdma

ｎに対して１～２μｇ／ｍＬのより高いＭＩＣ値、およびＨ３７Ｒｖに対して０．５のＭＩＣを示した１つの化合物ＡＫＧ－４０を除いて、１回の２倍希釈以内にあった。この相違は、Ｅｒｄｍａｎプレート上でのより遅い増殖（より低いＯＤ読取り）に起因するものであり得る。

【０２８７】

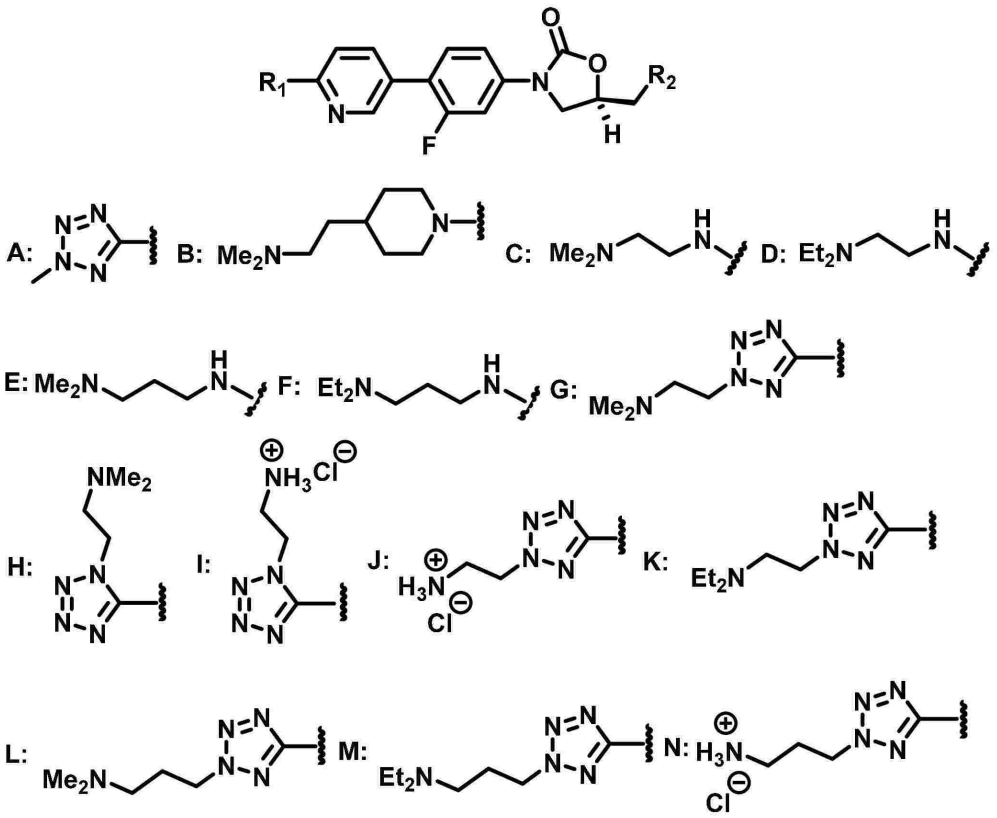
リネゾリドは２μｇ／ｍＬ、テジゾリドは０．２５μｇ／ｍＬおよびベダキリンは０．１２５μｇ／ｍＬの予想されるＭＩＣ値を示した。これらの値は、過去のＭＩＣデータおよび公開された値と一致している（Ｒｕｉｚ ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．２０１９，Ｍａｒ ２７；６３（４），ｐｉｉ：ｅ０１９３９－１８、Ｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．２０１０ Ｊｕｌ；５４（７）：２８４０－６、Ｔｏｒｒｅａ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．２０１５ Ａｕｇ；７０（８）：２３００－５）。ＡＫＧ－２８は、０．０３～０．０１５μｇ／ｍＬのＭＩＣを示し、テジゾリドよりも有意に高い活性を示した。アセトアミド基を含有するオキサゾリジノンアナログのうち、ＡＫＧ－３９は、０．５μｇ／ｍＬのＭＩＣを示し、ＡＫＧ－４０は１～０．５μｇ／ｍＬのＭＩＣを示した。０．０６μｇ／ｍＬのＭＩＣを示すＡＫＧ－３８もまた、テジゾリドよりも数倍高い活性を示した。

【０２８８】

オキサゾリジノンのＣ５位にアミン基またはアセトアミド基を有する分子は、活性がより高く（ＡＫＧ－３対テジゾリド、ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８対ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－３９対ＡＫＧ－２４、ＡＫＧ－４０対ＡＫＧ－２６）、テトラゾール上にアミノアルキル側鎖を有する化合物は、好ましい活性を示した。オキサゾリジノンのＣ５位のｔ－ブトキシカルボニルアミノ（Ｂｏｃ－ＮＨ）基の、第１級アミン（ＡＫＧ－２８－１対ＡＫＧ－２８）またはアセトアミド（ＡＫＧ－２８－１対ＡＫＧ－３８）への置換は、活性の低下をもたらした。ジメチルアミノアルキル側鎖を含有する化合物は、アミノエチルまたはジエチルアミノエチルアナログと比較した場合、特に優れていた（ＡＫＧ－１６対ＡＫＧ－２４、ＡＫＧ－２８対ＡＫＧ－２９、ＡＫＧ－３０対ＡＫＧ－３１）。同様に、テトラゾール環上のより短いジアルキルアミノアルキル側鎖（エチレン対プロピレンなど）は、より高い活性を示した（ＡＫＧ－１６対ＡＫＧ－２５、ＡＫＧ－２４対ＡＫＧ－２６、ＡＫＧ－２８対ＡＫＧ－３０）。テトラゾールの２’位上に置換を有するアナログは、１’位に置換を有するものよりも活性が高かった（ＡＫＧ－１６対ＡＫＧ－２１、ＡＫＧ－２３対ＡＫＧ－２２）。

【０２８９】

【化６９】


R1
N
F
O
O
N
R2
H
A:
B: Me2N
C: Me2N
D: Et2N
E: Me2N
F: Et2N
G: Me2N
NMe2
H:
NH3 Cl
I:
J:
H3N
Cl
K: Et2N
L: Me2N
M: Et2N
N: H3N
Cl

【０２９０】

【表８】

表2

化合物ID	R_1	R_2	結核菌 MIC (μg/ml)	
			Erdman	H37Rv
リネゾリド		-NHCOMe	1	1
ステゾリド		-NHCOMe	0.5	0.5
テジゾリド		-OH	0.25	0.25
AKG-1	A	$-NMe_2$	>8	>8
AKG-2	A	$-NEt_2$	>8	>8
AKG-3	A	$-NH_2.HCl$	0.125	0.06
AKG-5	A	$-OCO(CH_2)_3NMe_2$	1	1
AKG-6	A	B	>8	>8
AKG-7	A	$-O\ (CH_2)_2NEt_2$	>8	>8
AKG-8	A	$-N\ (CH_2)_3NEt_2$	>8	>8
AKG-9	A	D	>8	>8
AKG-11	B	-OH	4	4
AKG-12	C	-OH	4	4
AKG-13	D	-OH	>8	>8
AKG-14	E	-OH	8	8
AKG-15	F	-OH	>8	>8
AKG-16	G	-OH	0.25	0.25
AKG-17	A	$-NHCO(CH_2)_2NH_2.HCl$	2	2
AKG-18	A	$-NHCO(CH_2)_3NH_2.HCl$	2	2
AKG-19	A	$-NH(CH_2)_2NH_2.HCl$	>8	>8
AKG-20	A	$-OCO(CH_2)_2NEt_2$	0.5	0.5
AKG-21	H	-OH	>8	>8
AKG-22	I	-OH	1	0.5
AKG-23	J	-OH	0.25	0.25
AKG-24	K	-OH	1	1
AKG-25	L	-OH	1	1
AKG-26	M	-OH	2	2
AKG-27	N	-OH	0.5	0.5
AKG-28	G	$-NH_2.HCl$	0.03	0.015
AKG-28-1	G	$-NHCOOCMe_3$	0.25	0.125
AKG-29	J	$-NH_2.HCl$	0.25	0.125
AKG-30	L	$-NH_2.HCl$	0.125	0.125
AKG-31	M	$-NH_2.HCl$	0.5	0.5
AKG-38	G	-NHCOMe	0.06	0.06
AKG-39	K	-NHCOMe	0.5	0.5
AKG-40	M	-NHCOMe	1	0.5

【０２９１】

［実施例３］

［ヒト腎臓およびヒト肝細胞に対するｉｎ ｖｉｔｒｏでの細胞傷害性に関するアッセイ］

アフリカミドリザル腎臓（Ｖｅｒｏ；ＡＴＣＣ＃ＣＣＬ８１）またはヒト肝細胞／肝臓（ＨｅｐＧ２；ＡＴＣＣ＃ＨＢ８０６５）細胞中でのＩＣ５０を決定するために、１０倍希釈系列にわたって化合物をｉｎ ｖｉｔｒｏで試験した。これらの分子は一般的には、非毒性であると予想されるため、ドキソルビシンの陽性対照を全ての試験において含有させた。データは、全細胞生存曲線、ならびに各化合物に関する実際のＩＣ５０値の計算値として報告される。

【０２９２】

接着細胞を、約８０％の集密度まで増殖させた。０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ＃２５２００－０７２）を添加することによって細胞をトリプシン処理した後、

細胞をスピンダウンし、５ｍｌの増殖培地（ＭＥＭ培地；Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１００１０ＣＭ）を添加して、細胞を分散させた。血球計を使用して細胞密度を決定した。増殖培地（１０％ＦＢＳを含有するＭＥＭ培地；Ｃｏｒｎｉｎｇ＃３５０１５ＣＶ）を細胞に添加して、適切な細胞濃度に調整した。次いで、２００μｌの細胞（５，０００細胞／ウェル）を９６ウェルの透明平底プレート（Ｃｏｓｔａｒ＃９８０４）に添加し、５％CO_2を含む加湿インキュベーター中、３７℃で２４時間にわたってプレート中でインキュベートした。

【０２９３】

溶媒として増殖培地を使用して試験化合物の連続希釈液を調製する（表２）。これらの化合物を、５ｍｇ／ｍｌの濃度を有するＨＣｌ塩の滅菌水性溶液として提供した。希釈液を作製するために、それぞれの薬物ストックを室温に温め、ボルテックスし、沈降物について目視検査した。固体の薬物が存在していた場合、ストックを６０℃の水浴上で加熱した後、室温近くまで冷却させた。処理濃度に基づいて、２０倍の希釈標準ストックを連続希釈によって作製した。これらのものを増殖培地中で１倍にさらに希釈し、２５０μｇ／ｍｌの最も高い薬物濃度を試験した。

【０２９４】

古い培地を吸引し、それを、２００μｌの薬物含有培地と置き換えることによって、各化合物について初期の２５０μｇ／ｍｌの濃度から１：２の希釈系列で化合物をウェルに添加した。プレートを、５％CO_2を含む加湿インキュベーター中、３７℃で７２時間にわたってインキュベートした。化合物のインキュベーション期間の終わりに、各ウェル中の培地を、１００μｌの１Ｘ ＰｒｅｓｔｏＢｌｕｅ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｒｅａｇｅｎｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒカタログ＃Ａ１３２６１）と置き換える。５％CO_2を含む加湿インキュベーター中、３７℃で３０分～２時間、プレートをインキュベートする。３０、６０、および１２０分で読取りを行う。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用して５６０ｎｍの励起および５９０ｎｍの放出で蛍光を読み取る。全ての試料の読取り値から培養培地のみを含有する対照（バックグラウンド対照ウェル）のＲＦＵを差し引くことによって、バックグラウンドを補正する。以下の式を使用して細胞傷害性のパーセンテージを算出する：

細胞傷害性％＝［（ＲＦＵ．Ｍｅｄｉｕｍ－ＲＦＵＴｒｅａｔｍｅｎｔ）／ＲＦＵ．Ｍｅｄｉｕｍ］×１００％。

【０２９５】

以下の式を使用するＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍを使用してＩＣ５０を決定した：

Ｙ＝１００／（１＋１０＾（（ＬｏｇＩＣ５０－Ｘ）＊ヒル勾配））。

【０２９６】

【表９】

表3

化合物ID	細胞生存度 IC50 (μg/ml)	
細胞株	VERO	HepG2
AKG-1	112.6	116.0
AKG-2	67.9	24.5
AKG-3	17.8	21.2
AKG-5	32.5	30.8
AKG-6	27.4	15.5
AKG-7	103.6	11.2
AKG-9	139.3	28.1
AKG-11	31.9	42.8
AKG-12	89.1	67.6
AKG-13	93.9	31.8
AKG-14	155.8	45.6
AKG-15	156.2	35.6
AKG-16	97	91
AKG-17	>250	37.3
AKG-18	>250	9.5
AKG-19	>250	42.2
AKG-20	>250	15.1
AKG-21	>250	156.3
AKG-22	57.7	17.2
AKG-23	>250	7.3
AKG-24	31.3	11.4
AKG-25	182	9.4
AKG-26	128.5	9.0
AKG-27	5.6	9.0
AKG-28	83.0	13.4
AKG-29	109.9	74.4
AKG-30	110.5	18.9
AKG-31	111.5	13.2
AKG-38	395	97
AKG-39	201	70
AKG-40	>250	113

【０２９７】

驚くべきことに、リン酸テジゾリドのための活性代謝物テジゾリドの置換基を模倣する、オキサゾリジノン環のＣ５側鎖上にヒドロキシル基を含有するアナログの多くは、最も高い肝毒性を示し、ＨｅｐＧ２肝細胞の細胞株に関して１桁のＩＣ５０を示した。テジゾリドは、ＭＲＳＡの処置について現在認可されている最も活性が高いオキサゾリジノンであり、テトラゾールＤ環、ピリジルＣ環、およびアリールＢ環において本明細書に記載の化合物との構造的類似性を有する（図６を参照されたい。）。ここで、しかし、肝細胞に対する毒性の増大は、Ｃ５側鎖上の同じ位置にアミノまたはアセトアミド基を有するもの（ＡＫＧ２８－３１、ＡＫＧ３８－４０、およびＡＫＧ－３）と比較した場合、Ｃ５側鎖上にヒドロキシルを有するテオキサゾリジノン（ＡＫＧ－２３、ＡＫＧ－２５、ＡＫＧ－２６、およびＡＫＧ－２７）に関する比較的低い選択性指数をもたらす。

【０２９８】

［実施例４］

［選択性指数の決定］

それぞれ、実験例２および３に記載されるように、哺乳動物細胞、すなわち、アフリカミドリザル腎臓（ＶＥＲＯ）またはヒト肝細胞由来（ＨｅｐＧ２）細胞に対するものと比較した、２つの結核菌株、ＥｒｄｍａｎおよびＨ３７Ｒｖに対する化合物の相対的阻害活

性を決定するために、選択性指数（ＳＩ）を算出した。高いＳＩは、体内の正常細胞に対してあまり有害ではない薬物の濃度で結核菌株の好ましい殺傷を示すため、それが好ましい。選択性指数を、以下の式を使用して算出した：

$$SI = IC_{50,mammalian} / MIC_{bacteria}$$

（式中、細菌は、ＥｒｄｍａｎまたはＨ３７Ｒｖ株のいずれかの結核菌であり、哺乳動物細胞は、ＶＥＲＯまたはＨｅｐＧ２細胞株である。）。

【０２９９】

ＩＣ５０がＶＥＲＯまたはＨｅｐＧ２細胞について試験した最も高い値より高かった場合、ＳＩは、その最高濃度を使用して算出された比よりも高い（＞）と示される。同様に、ＥｒｄｍａｎまたはＨ３７Ｒｖ株に関するＭＩＣが、試験した薬物の最高濃度（８μｇ／ｍｌ）よりも高い場合、ＳＩは、その最高濃度を使用して算出された比より低い（＜）と示される。両方の数字が試験した最高濃度より上である場合の計算値は、決定されず（ｎｄ）と示される。その結果を、表４に示す。ＳＩは、結核菌株または哺乳動物細胞株のいずれかにおける分子の活性と直接相関せず、結核菌株における効力の増大は、哺乳動物細胞株に対する毒性の増大と直接相関しなかった。例えば、ＡＫＧ－３８は、結核菌の両方の株に対するナノモル濃度のＭＩＣを示したが、それは、パネル中の他の分子と比較して、ＶＥＲＯとＨｅｐＧ２細胞株との両方に対して相対的に不活性であり、高いＳＩを与えた。これは、ＡＫＧ－２８についても同様に見られた。ＡＫＧ－２８とＡＫＧ－３８との両方の分子が、テトラゾール環の２’位にジメチルアミノエチル置換基を有していたことは注目に値する。

【０３００】

【表１０】

表4

化合物ID	選択性指数(SI)			
	Erd/VERO	Erd/HepG2	H37Rv /VERO	H37Rv /HepG2
AKG-1	<14.1	<14.5	<14.1	14.5
AKG-2	<8.5	<3.1	<8.5	3.1
AKG-3	142.4	169.6	296.7	353.3
AKG-5	32.5	30.8	32.5	30.8
AKG-6	3.4	<1.9	<3.4	1.9
AKG-7	13.0	<1.4	<13.0	1.4
AKG-9	<17.4	<3.5	<17.4	3.5
AKG-11	8.0	10.7	8.0	10.7
AKG-12	22.3	16.9	22.3	16.9
AKG-13	<11.7	<4.0	<11.7	<4.0
AKG-14	19.5	5.7	19.5	5.7
AKG-15	<19.5	<4.5	<19.5	<4.5
AKG-16	388.0	364.0	388.0	364.0
AKG-17	>125	18.7	>125	18.7
AKG-18	>125	4.8	>125	4.8
AKG-19	>31.3	5.3	>31.3	5.3
AKG-20	>500	30.2	>500	30.2
AKG-21	nd	<19.5	nd	<19.5
AKG-22	57.7	17.2	115.4	34.4
AKG-23	>1000	29.2	>1000	29.2
AKG-24	31.3	11.4	31.3	11.4
AKG-25	182.0	9.4	182.0	9.4
AKG-26	64.3	4.5	64.3	4.5
AKG-27	11.2	18.0	11.2	18.0
AKG-28	2766.7	446.7	5533.3	893.3
AKG-29	439.6	297.6	879.2	595.2
AKG-30	884.0	151.2	884.0	151.2
AKG-31	223.0	26.4	223.0	26.4
AKG-38	6583.3	1616.7	6583.3	1616.7
AKG-39	402.0	140.0	402.0	140.0
AKG-40	>250.0	113.0	>500.0	226.0

【０３０１】

一部の実施形態では、目的の化合物は、１００より高い、２００より高い、３００より高い、４００より高い、５００より高い、１０００より高い、１５００より高い、２０００より高い、２５００より高い、３０００より高い、３５００より高い、４０００より高い、４５００より高い、５０００より高い、５５００より高い、６０００より高い、６５００より高い、１００～７０００、１００～６０００、１００～５０００、１００～４０００、１００～３０００、１００～２０００、１００～１０００、１００～９００、１００～８００、１００～７００、１００～６００、１００～５００、１００～４００、１００～３００、１００～２００、２００～７０００、２００～６０００、２００～５０００

、２００～４０００、２００～３０００、２００～２０００、２００～１０００、２００～９００、２００～８００、２００～７００、２００～６００、２００～５００、２００～４００、２００～３００、３００～７０００、３００～６０００、３００～５０００、３００～４０００、３００～３０００、３００～２０００、３００～１０００、３００～９００、３００～８００、３００～７００、３００～６００、３００～５００、３００～４００のＥｒｄ／ＨｅｐＧ２およびＨ３７Ｒｖ／ＨｅｐＧ２に関するＳＩ指数を有する。一部の実施形態では、目的の化合物は、１００～１７００、２００～１７００、３００～１７００の範囲のＥｒｄ／ＨｅｐＧ２およびＨ３７Ｒｖ／ＨｅｐＧ２に関するＳＩ指数を有する。

【０３０２】

オキサゾリジノン環のＣ５側鎖上にアミノまたはアセトアミド基およびテトラゾール環の２’位にアミノアルキル基を有する化合物は、Ｃ５側鎖上にヒドロキシル基を有するものと比較して、比較的高いＳＩを示した。さらに、特定のテトラゾール置換は、ＳＩをさらに改善し、テトラゾール環の２’位のジメチルアミノエチル置換は、同じ位置のメチル、ジエチルアミノエチル、アミノエチル、またはジメチルアミノプロピル置換よりも好ましかった（ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８）。テトラゾール環の１’位にジメチルアミノエチル基を移動させたところ（化合物ＡＫＧ－２１対ＡＫＧ－２８）、予想外に、結核菌に対する活性の劇的な喪失をもたらした。

【０３０３】

［実施例５］

［メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）（ＭＲＳＡ）に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性に関するアッセイ］

リードオキサゾリジノン阻害剤の活性を測定して、グラム陽性細菌メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）に対する十分な効力を示して、その処置のためにリポソームの形態でのその後の送達を正当化した。一部の実施形態では、３つの評価した株のうちの２つにおけるＭＩＣは、６μｇ／ｍＬ未満である。一部の実施形態では、３つの評価した株のうちの２つにおけるＭＩＣは２μｇ／ｍＬ未満であり、２μｇ／ｍＬ未満がより好ましい。

【０３０４】

３つの黄色ブドウ球菌株を、５％ヒツジ血液細胞を添加したトリプチカーゼ大豆寒天プレート上、周囲雰囲気下、３７℃で一晩増殖させた。培養物を無菌的に拭き取り採取し、滅菌水のチューブに移し、光密度を６００ｎｍで０．５に調整した。次いで、培養物を１：１００に希釈して、１２０μＬ中、ウェルあたり約５ｘ１０^{5}個の細胞を送達した。インキュベーション後、被験物質のＭＩＣを、各ウェル中での増殖の存在／非存在によって決定した。ＭＩＣ分析を、３回反復で実施した。

【０３０５】

テジゾリドは、米国特許第７,８１６,３７９号明細書に記載された０．５μｇ／ｍｌと同様、０．２０６～０．６１７μｇ／ｍｌのＭＩＣを示した。興味深いことに、オキサゾリジノン環のＲ２に第１級アミン改変を有する全ての分子（ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、およびＡＫＧ－３０）が、３種全てのＭＲＳＡ株に対する無視できる程度の活性を示した（＞５０μｇ／ｍｌ）。同じ位置にアセトアミド基を有する分子（ＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３９、およびＡＫＧ－４０）は、３つのＭＲＳＡ株に対してテジゾリド自体の３分の１～９分の１の活性を示した。

【０３０６】

【表１１】
表5

化合物ID	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) MIC (μg/ml)		
株	ATCC BAA-1556	ATCC 43300	880 NR-49120
テジゾリド	0.617	0.617	0.206
AKG-3	50	50	50
AKG-16	1.85	1.85	1.85
AKG-22	1.85-5.55	16.67	5.55
AKG-28	>50	>50	>50
AKG-29	50	>50	50
AKG-30	>50	>50	>50
AKG-38	1.85	1.85	0.617
AKG-39	1.85	1.85	1.85
AKG-40	1.85	5.55	1.85

【０３０７】
［実施例６］
［リポソーム組成物］
（一般的プロトコール）
１．脂質成分（リン脂質（ＰｈＬ）、コレステロール、および必要に応じて、ＰＥＧ－脂質誘導体および／または脂質蛍光標識）を、約６０ｍＭのリン脂質を含む脂質懸濁液を得るために算出された体積（Ｖ）の１０分の１に等しい１００％エタノールの量と混合し、脂質の溶解が完了するまで６５～６８℃の温度で撹拌した。
【０３０８】
中性リン脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアルキルホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、およびジアシルホスファチジルエタノールアミンが挙げられる。水素化大豆ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、および卵スフィンゴミエリンは、好ましいリン脂質の一部である。
【０３０９】
ＰＥＧ－脂質成分は、ＰＥＧ（分子量２，０００）－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）またはＮ－パルミトイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝（ＰＥＧ－セラミド）を含んでもよい。ＰＥＧ－脂質成分の分子量はまた、１，５００～６，０００ｇ／ｍｏｌで変化してもよいが、好ましくは、約２，０００ＭＷである。
【０３１０】
脂質蛍光標識としては、１，１’－ジオクタデシル－３，３，３’，３’－テトラメチルインドカルボシアニン－５，５’－ジスルホン酸（ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ）、１，１’－ジオクタデシル－３，３，３’，３’－テトラメチルインドジカルボシアニン－５，５’－ジスルホン酸（ＤｉＩＣ８（５）－ＤＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（シアニン７）（１８：０　Ｃｙ７　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ－（シアニン７）（ＤＳＰＥ　ＰＥＧ（２０００）－Ｎ－Ｃｙ７）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノール

アミン－Ｎ－（シアニン５）（１８：０　Ｃｙ５　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ－（シアニン５）（ＤＳＰＥ　ＰＥＧ（２０００）－Ｎ－Ｃｙ５）、１－オレオイル－２－［１２－［（７－ニトロ－２－１，３－ベンゾオキサジアゾール－４－イル）アミノ］ドデカノイル］－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：１－１２：０　ＮＢＤ　ＰＣ）が挙げられる。

【０３１１】

２．エタノール性脂質溶液を、均一な懸濁液が得られるまで、６５～６８℃で撹拌しながら、体積Ｖの捕捉剤溶液（０．２５～０．５Ｍ硫酸アンモニウムまたは１Ｎ八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース）と混合した。

【０３１２】

潜在的な捕捉剤としては、限定されるものではないが、０．１～２ｇ当量／Ｌ（０．１～２Ｎ）、好ましくは、０．２～１．５Ｎの濃度の、スクロースオクタサルフェートのジエチルアンモニウムもしくはトリエチルアンモニウム塩、硫酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、クエン酸、硫酸デキストラン、ポリビニルスルホン酸、またはイノシトールヘキサホスフェートのアンモニウム塩が挙げられる。典型的には、アンモニウム塩が使用され、アンモニウム自体、モノアルキル－、ジアルキル－、またはトリアルキル－アンモニウム塩を含んでもよい。

【０３１３】

３．４００～４５０ｐｓｉの圧力、６５～６８℃でサーモバレル（ｔｈｅｒｍｏｂａｒｒｅｌ）押出装置（Ｌｉｐｅｘ、Ｃａｎａｄａ）を使用して、トラックエッチド（ｔｒａｃｋ－ｅｔｃｈｅｄ）ポリカーボネートメンブレンのスタック、典型的には、１００ｎｍの名目孔径を有する２つまたは４つのメンブレンおよび名目孔径２００ｎｍを有する１つのメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ、ＵＳＡ）を介して少なくとも３回、脂質懸濁液を押し出した。２つの１００ｎｍメンブレンを１００ｍｌのＬｉｐｅｘ押出装置中で使用した場合、押出圧力は、典型的には、２６０～３００ｐｓｉであった。得られるリポソームは、約８０～約１３０ｎｍのＺ平均粒径（直径）Ｘｚ、および０．１未満のＰＤＩを有する。

【０３１４】

４．押し出された脂質懸濁液（単層および／またはオリゴラメラリポソームを含有することが知られる）を、冷蔵庫（２～８℃）中で冷やし、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）メンブレンフィルターを通して濾過した。

【０３１５】

５．このように作製され、押し出され、濾過されたリポソーム懸濁液のアリコートを、重力送りのＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂサイズ排除カラム（溶離液－１型水）上でのクロマトグラフィーにかけて、リポソーム外の捕捉剤からリポソームを精製した。精製されたリポソームを、カラムの空隙容量画分近くで収集した。スケールアップ試験のために、このステップを、１型またはＵＳＰ「注射用水」内毒素非含有水を用いて８～１０倍容量の交換（またはリポソーム懸濁液の伝導度が２００μＳ／ｃｍ未満に低下するまで）を行う、中空繊維カートリッジ（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　ＭｉｃｒｏＫｒｏｓ　ＰＳまたは５００ＫＤａのＭＷＣＯを有するｍＰＥＳメンブレン）上での接線流濾過（ＴＦＦ）を使用して実施した。

【０３１６】

６．精製され、押し出されたリポソーム調製物中の脂質濃度を、コレステロールの濃度を測定すること、および既知のリン脂質／コレステロールモル比について補正することによって、ＵＶ検出を用いるＨＰＬＣを使用して決定した。あるいは、分光測光的ホスホモリブデンブルー法を使用して、リン脂質含量を直接定量した。

【０３１７】

７．薬物を、５～２０ｍｇ／ｍｌの薬物の濃度で、塩酸塩の形態で１型または内毒素非含有純水中に溶解した（例えば、ＡＫＧ－３およびＡＫＧ－５を一塩酸塩として使用し、

ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－２９を二塩酸塩として使用した）。遊離塩基形態で調製された薬物（例えば、ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－３８）に、等量のＨＣｌを添加した。必要に応じて、溶液のｐＨを、１Ｎ　ＮａＯＨ、ＨＣｌ、またはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）塩基溶液を使用して、ｐＨ２．５～５．５にし、溶液を、陽圧下で０．２μｍのＰＥＳフィルターを通して濾過した。必要に応じて、そのように作製されたストック溶液中の薬物濃度を、３０５ｎｍでのＵＶ検出を用いるＨＰＬＣによって検証した。

【０３１８】

８．ステップ５の精製されたリポソームおよび薬物ストック溶液を、所望の薬物：リン脂質（ＤＬ）比、１．５～３．３ｍｇ／ｍｌの範囲の薬物濃度、ステップ２の捕捉剤溶液の測定されたオスモル濃度に等しいオスモル濃度を提供するのに必要な量の浸透圧剤（典型的には、デキストロース）および水の存在下で混合した。必要に応じて、所望のｐＨ（典型的には、ｐＨ４～ｐＨ７）の緩衝液を添加した。一部の例では、添加される浸透圧剤の量（例えば、約４５ｇ／Ｌのデキストロース）は、捕捉剤溶液の測定されたオスモル濃度より低いオスモル濃度をもたらし、充填を６～８ｍｇ／ｍｌの薬物で行った。

【０３１９】

９．薬物－リポソーム混合物を、６５～６８℃で約１５～２０分間一定に撹拌しながらインキュベートし、氷上で急速に冷却した。５～１０分後、混合物を周囲温度に到達させ、計算量の３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液を添加することによって０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した。

【０３２０】

１０．薬物充填リポソームを、重力送りのＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂカラム、溶離液－１４０～１４４ｍＭ　ＮａＣｌ中の１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液、ｐＨ７．０（ＨＢＳ－７）上でのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、カプセル封入されなかった薬物から精製した。リポソーム画分を、カラム空隙容量近くで収集した。スケールアップ試験のために、精製および緩衝液交換を、上記の項目５の下で記載されたＴＦＦを使用し、ＨＢＳ－７緩衝液を用いた１０倍容量の交換を使用して実施した。スケールアッププロセスにおいては、典型的には、約８倍容量の交換が使用された。必要に応じて、精製されたリポソームを、緩衝液を供給せずにＴＦＦプロセスを継続することによって濃縮した。精製された、薬物充填リポソームを、陽圧下で０．２μｍの滅菌ＰＥＳフィルターを使用して無菌的に濾過し、冷蔵庫（２～８℃）中で保存した。

【０３２１】

１１．精製された薬物充填リポソーム調製物中の薬物および脂質の濃度を、ＨＰＬＣによって決定した。あるいは、リン脂質定量のために分光測光（ホスホモリブデンブルー）法を使用し、６．５ｍｇ／ｍｌのドデシル硫酸ナトリウムの存在下、７０％イソプロパノール－０．１Ｎ　ＨＣｌ中で可溶化したリポソーム試料中でのＵＶ吸収（３０２～３０５ｎｍ）によって薬物を定量した。カプセル封入効率を、

ＥＥ、％＝ＤＬ／ＤＬ０＊１００％

（式中、ＤＬ０は、ＳＥＣまたはＴＦＦ精製前のリポソーム充填混合物中の薬物とリン脂質の比であり、ＤＬは、精製（ステップ１０）後の薬物充填リポソーム中の薬物とリン脂質の比である。）

として決定した。

【０３２２】

１２．平均リポソームサイズ（Ｚ平均直径、Ｘｚ）および多分散指数（ＰＤＩ）を、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　ｍｕ－Ｖ、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ、またはＺｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｐｒｏ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ、ＵＳ）上でのキュムラントの方法による動的レーザー散乱を使用して決定した。

【０３２３】

［実施例７］

［リポソームのｉｎ　ｖｉｖｏでの安定性および血中クリアランス］

本開示に係る化合物をカプセル封入するリポソームの薬物カプセル封入の安定性および血中クリアランス速度を、以下の一般的プロトコールに従ってマウスにおいて試験した。３つの群の所与の実験室株のマウス（Ｃ３Ｈメスまたは Ｃ Ｄ － １ オス）に、体重１ｋｇあたり９ｍｇの薬物の用量で尾静脈を介して薬物充填リポソームを注射した。時点１および２で、後眼窩洞から血液を採取し、動物を犠牲にした。典型的には、血液採取時点は、注射後、５分、１時間、６時間、および２４時間を含んでいた。血漿を遠心分離によって分離し、必要に応じて、可溶化剤（オクタ硫酸ナトリウム）を含有する、酸性化イソプロパノールで抽出し、薬物および脂質（リポソームが脂質標識、ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳを含む場合）についてＨＰＬＣによって分析した。リポソーム薬物の血中クリアランスを、所与の時点で残存する注射用量のパーセントで表した。薬物カプセル封入のｉｎ ｖｉｖｏでの安定性を、注射前のＤＬ値と比較して所与の時点での血漿中のＤＬ比のパーセント変化（減少）によって評価した。

【０３２４】

［実施例８］

［異なるｐＨでのリポソーム中へのＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６の充填］

水素形態のＤｏｗｅｘ ５０Ｗｘ８ １００～２００メッシュの５００ｍｌイオン交換カラムに市販のカリウムスクロースオクタサルフェート（水１４５ｍｌ中４０．２ｇ）の溶液を通過させ、得られる遊離酸形態のスクロースオクタサルフェートを原液のトリエチルアミンでｐＨ６．２に滴定することによって、トリメチルアンモニウムスクロースオクタサルフェート捕捉剤溶液を調製した。八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース（ＴＥＡ－ＳＯＳ）の濃度（１Ｎ、０．１２５Ｍのスクロースオクタサルフェートに対応する）を、滴定において消費されるトリエチルアミンの量から見積もった。残存するカリウムを、添加方法によってＨｏｒｉｂａ ＬＡＱＵＡＴｗｉｎ Ｋ－１１カリウム分析装置を使用して見積もったところ、初期カリウム量の０．１％未満であった。

【０３２５】

捕捉剤として１Ｎトリメチルアンモニウムスクロースオクタサルフェート（ＴＥＡ－ＳＯＳ）を用いて水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）（Ｌｉｐｏｉｄ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、コレステロール（３：２のモル比）、および１，２－ジステアロイルグリセロールのメトキシポリ（エチレングリコール）エーテル（ＰＥＧ－ＤＳＧ、ＰＥＧ分子量２０００、ＮＯＦ、Ｊａｐａｎ）から構成されるリポソーム（０．５ｍｏｌ％のＨＳＰＣ）を、本質的には上記の一般的プロトコールに記載された通りに調製した。薬物充填ステップを、４．３～７．１の範囲のｐＨを有する１６ｍＭモルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ）－４ｍＭクエン酸ナトリウム緩衝液の存在下、ならびにいかなる緩衝物質も添加せずに（ｐＨ５．２～５．９）、５００ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬのＤＬ比（ＤＬ０）で実施した。試験した全てのｐＨ範囲で、全ての薬物が、高い効率でリポソーム中にカプセル封入された（９８％を超える、９３．３％の効率で充填された、ｐＨ４．３８のＡＫＧ－１６を除く）（図１）。緩衝物質の添加は、効率的なカプセル封入にとって必要ではなかった。

【０３２６】

［実施例９］

［異なるＤＬ比でのＴＥＡ－ＳＯＳ捕捉剤を用いたリポソーム中へのＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のカプセル封入］

捕捉剤として１Ｎ ＴＥＡ－ＳＯＳを用いたＨＳＰＣ、コレステロール（３：２のモル比）、およびＰＥＧ－ＤＳＧ（ＨＳＰＣの０．５ｍｏｌ％）から構成されるリポソームを、本質的には一般的プロトコール（実施例６）に記載された通りに調製した。薬物充填ステップを、緩衝物質を添加せずに（ｐＨ４．９８～６．２２）、７５０～１５００ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬの範囲のＤＬ０比で実施した。化合物３、５、および１６に関する最大薬物充填は、それぞれ、９００～９３０ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬ、９８２～１１９７ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬ、および９３８～９５１ｇ／ｍｏｌ ｐＨＬの範囲で観察され、最大薬物充填での、またはその近辺での充填効率は、それぞれ、少なくとも９７．６％、９６．０％、また

は８５．２％であった（図２Ａおよび図２Ｂ）。

【０３２７】

［実施例１０］

［捕捉剤として高いＰＥＧ化度または０．２５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）を用いた、リポソーム中へのＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６のカプセル封入］

ＨＳＰＣおよび種々のＰＥＧ－ＤＳＧ含量を有するコレステロール（３：２のモル比）および捕捉剤から構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、２５０または５００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比で実施例９に記載のように化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６を充填した。３つ全ての化合物が、以下の表６に示すように高い効率でリポソーム中に充填された。

【０３２８】

【表１２】

表6.

PEG-DSG,	捕捉剤	DL0比	薬物充填効率		
PhLのmol%		g/mol PhL	AKG-3	AKG-5	AKG-16
0.5*	1 N TEA-SOS	500	100.8	101.3	102.6
5	1 N TEA-SOS	500	107.4	99.3	104.8
0.5	0.25 M AS	250	100.4	98.5	90.6
0.5	0.25 M AS	500	80.3	97.7	82.9

*この行のデータは、実施例８「緩衝液添加無し」の充填による。

【０３２９】

このように、化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６は、高レベルのＰＥＧ化およびリポソーム内薬物捕捉剤としての硫酸アンモニウムとともに、リン脂質－コレステロールリポソーム中に効率的に充填された。しかし、捕捉剤として０．２５Ｍ硫酸アンモニウムを使用して５００ｇの薬物／ｍｏｌ　ＰｈＬのより高い薬物：脂質比で充填した場合、３つのオキサゾリジノンのうちの２つ（ＡＫＧ－３およびＡＫＧ－１６）に関して充填効率が低下した。

【０３３０】

［実施例１１］

［捕捉剤として０．５ＭのＡＳを使用するリポソーム中への化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６の充填］

ＨＳＰＣおよび０．５ｍｏｌ％または５％ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧ（ＰｈＬに対して）を有するコレステロール（３：２のモル比）および捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）から構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、５００～１５００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの範囲のＤＬ０比で、実施例８に記載のように、化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６を充填した。結果を、図３Ａ、図３Ｂ、図３Ｃおよび図３Ｄに示す。３つ全ての化合物が、９３～１００％のカプセル封入効率で４２０～４５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ比で両方のリポソーム中に充填された；最大薬物ペイロードは、以下の通りであった：

【０３３１】

【表１３】
表7

薬物	最大カプセル封入薬物ペイロード, g/mol PhL	
	0.5 mol% PEG	5 mol% PEG
AKG-3	590	600-606
AKG-5	627	nd
AKG-16	668-675	614-619

【０３３２】
試験した３つ全ての化合物が、０．５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧを含む調製物ならびに化合物ＡＫＧ－３およびＡＫＧ－１６については、５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧを含有する製剤中、５００ｇの薬物／ｍｏｌ　ＰｈＬよりも多く、０．５Ｍ硫酸アンモニウムリポソーム中に充填可能であった。これらの高レベルの充填は、疾患の処置のために投与される薬物の十分な用量を達成し得る点において重要である。充填効率が、０．２５Ｍ硫酸アンモニウムを使用してより低かった、実施例１０よりも充填が有意に改善されたが、これは、より高いオスモル濃度および浸透圧バーストの可能性にも拘わらず、０．５Ｍのより高い硫酸アンモニウム濃度が、リン脂質１モルあたりに充填できる薬物の量に関して、および好ましくは、低毒性および高用量が改善されたアウトカムをもたらすことができる場合、抗感染剤について改善されることを示している。
【０３３３】
［実施例１２］
［蛍光脂質標識を含む種々の組成物のリポソーム中への化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、ＡＫＧ－１６、およびＡＫＧ－２８の充填］
ＨＳＰＣおよび０．５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧ（ＰｈＬに対して）を有するコレステロール（６０：４０のモル比）、０．１５ｍｏｌ％の脂質蛍光標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ＵＳＡ）、および捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）または１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳから構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、ｐＨ４．７～５．８（緩衝物質を添加しない）で、実施例１１に記載のように、化合物ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５、およびＡＫＧ－１６を充填した。リポソームは、以下の特徴を有していた：
【０３３４】

【表１４】
表8

バッチID	化合物	捕捉剤	DL0, g/mol PhL	カプセル封入薬物, g/mol PhL	リポソームのz-平均サイズ, nm	リポソームのPDI
76	AKG-3	1 N TEA-SOS	500	497.0	112.7	0.008
85	AKG-3	1 N TEA-SOS	1000	830.7	104.3	0.111
78	AKG-3	0.5 M AS	693	632.9	104.9	0.013
79	AKG-5	1 N TEA-SOS	500	515.6	114.3	0.124
80	AKG-5	1 N TEA-SOS	1000	1003.2	110.5	0.071
81	AKG-5	0.5 M AS	693	709.3	111.4	0.060
82	AKG-16	1 N TEA-SOS	500	489.2	114.8	0.046
86	AKG-16	1 N TEA-SOS	1000	854.2	107.6	0.097
84	AKG-16	0.5 M AS	693	708.0	112.6	0.092

【０３３５】
３つ全ての薬物が、リポソーム中に効率的に充填された。リポソーム充填中のＡＫＧ－５の分解が、ＨＰＬＣ上での第２のピークの出現として検出された。
【０３３６】
種々のリン脂質（ＨＳＰＣ、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ、ＵＳＡ）、または卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ、Ｌｉｐｏｉｄ、Ｇｅｒｍａｎｙ））および種々の量のＰＥＧ－ＤＳＧまたはＮ－メトキシポリ（エチレングリコール）オキシカルボニル－１，２－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ、ＰＥＧ分子量２０００、Ｌｉｐｏｉｄ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を含有するコレステロール（６０：４０のモル比）、および脂質蛍光標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（ＰｈＬに関して０．１５ｍｏｌ％）から構成されるリポソームを、同じ一般的プロトコールに従って異なる捕捉剤を用いて調製し、同様の様式でＡＫＧ－１６を充填した。示された場合、一般的プロトコールのリポソーム押出しステップに、５０ｎｍ孔径を有する２つのスタックされたポリカーボネートメンブレンを通す押出しを追加した。リポソームは、以下の特徴を有していた：
【０３３７】

【表１５】
表9

バッチID	リン脂質	50 nm押出し	PEG-脂質 (mol.%)	捕捉剤	DL0比 g/mol PhL	薬物充填量, g/mol PhL	リポソームのz-平均サイズ, nm	PDI
88	HSPC	なし	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	547.0		
90	DSPC	あり	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	514.0	83.3	0.182
91	DSPC	あり	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	1000	599		
93	HSPC	なし	PEG-DSG (5)	1 N TEA-SOS	500	490.2	108.6	0.046
94	DSPC	なし	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	504.0	112.7	0.081
95	ESM	なし	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	539.9	101.3	0.074
97	HSPC	あり	PEG-DSPE (9.2)	0.25M AS	150	128.2	81.5	0.073

【０３３８】
ＨＳＰＣおよび９．２ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＰＥ（ＰｈＬに対して）を有するコレステロール（３：２のモル比）、０．１５ｍｏｌ％の脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ、および捕捉剤としての０．２５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）から構成されるリポソームを、追加の５０ｎｍの押出しを用いて一般的プロトコールおよび実施例１２に従って調製し、薬物：脂質比（ＤＬ０）１５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬでＡＫＧ－２８を充填した。リポソーム（バッチＩＤ９８）は、７３．８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ比、Ｚ平均リポソームサイズ７７．８ｎｍ、およびサイズ多分散指数（ＰＤＩ）０．０９０を有する。
【０３３９】
これらの試験は、ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－５およびＡＫＧ－１６を、中性リン脂質成分としてＨＳＰＣ、ＤＳＰＣ、またはＥＳＭ、または低い（０．５ｍｏｌ％）もしくは高い（５ｍｏｌ％）のＰＥＧ－脂質含量を含む、脂質組成物の範囲を有するリポソーム中に効率的に充填できることを示している。しかし、１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳと比較して、０．２５ＭのＡＳを使用した場合、効率は約５００ｇのＡＫＧ－１６／ｍｏｌ　ＰｈＬから１２８ｇのＡＫＧ－１６／ｍｏｌ　ＰｈＬまで有意に低下した。０．２５ＭのＡＳを用いてＡＫＧ－２８を充填する場合、同様の低い充填効率（すなわち、７３．８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）が観察された。これは、ＴＥＡ－ＳＯＳまたはより高濃度のＡＳが、高濃度の化合物をリポソーム中に充填するために好ましい場合があることを示唆している。
【０３４０】
［実施例１３］
［マウスにおける実施例１２のリポソームの血中持続性およびｉｎ　ｖｉｖｏでのカプセル封入安定性］
試験を、上記一般的プロトコールに記載のように、オスのＣＤ－１マウスに対して実施した。
【０３４１】

【表１６】
表10

リポソームのバッチID	血漿中での% ID (リポソーム脂質)		初期のDL比%	
	5分	6時間	5分	6時間
88	82.4 ± 9.8	30.6 ± 7.0	89.2 ± 0.6	75.6 ± 2.7
90	84.7 ± 1.2	35.2 ± 5.1	95.9 ± 0.2	81.0 ± 2.5
93	85.4 ± 3.5	38.2 ± 1.4	94.5 ± 0.5	82.9 ± 1.1
94	83.1 ± 6.1	23.9 1.2	97.7 ± 0.5	89.2 ± 0.0
95	79.3 ± 3.5	36.7 ± 2.0	97.9 ± 0.8	101.9 ± 8.8
96	80.2 ± 4.3	39.7 ± 7.0	102.8 ± 1.7	99.2 ± 2.8
97	83.5 ± 6.9	34.4 ± 2.8	88.7 ± 10.8	3.7 ± 0.3
98	80.3 ± 6.6	43.7 ± 4.7	100.2 ± 2.8	86.7 ± 1.1

【０３４２】
これらの試験は、変化する中性リン脂質成分（ＨＳＰＣ、ＤＳＰＣ、またはＳＭ）から構成され、ＴＥＡ－ＳＯＳ捕捉剤を使用してＡＫＧ－１６を充填されたリポソームが、３０％を超える注射用量に関してゆっくりと除去され、多くの製剤について、６時間で血漿中に残存していたことを示す。さらに、多くの製剤は、０．２５ＭのＡＳを使用して充填されたＡＫＧ－１６を含む、リポソームバッチＩＤ９７を除いて、良好な薬物保持を示したが、０．２５Ｍ硫酸アンモニウムを使用する薬物の充填は、表９に示されたように低い充填効率をもたらすだけでなく、この製剤中でのリポソームからの有意な漏出に起因して６時間で低いＤＬ比（３．７％）ももたらすことを示唆している。
【０３４３】
［実施例１４］
［異なるＤＬ比の、種々の捕捉剤を用いたリポソーム中への化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のカプセル封入］
ＨＳＰＣおよび０．５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧ（ＰｈＬに対して）を有するコレステロール、０．１５ｍｏｌ％の脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ、および捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）または１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳから構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、ｐＨ４．９５～５．１７（緩衝物質を添加しない）および３００～１０５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＡＫＧ－２８）または４００～１４００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＡＫＧ－３８）の範囲のＤＬ０比で、実施例８に記載のように、化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８を充填した。０．５ＭのＡＳを使用する場合、化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８に関する最大薬物充填量は、それぞれ、４０４～４２４ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬおよび８１８～８４２ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの範囲であり、９５％を超える充填効率は、それぞれ、３０２ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（定量的充填）および３８７～７６４ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（９５．５～９６．７％充填）の薬物充填量であった。１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを使用する場合、化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８に関する最大薬物充填量は、それぞれ、３１５～３２８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬおよび９８９ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬの範囲であり、最大充填効率は、それぞれ、２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬおよび４００～７７７ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（９７．２％を超える充填）の薬物充填量で８３．５％であった（図４Ａおよび図４Ｂ）。
【０３４４】
ＡＫＧ－３８は、４００～８００ｇ　ＡＫＧ－３８／ｍｏｌ　ＰｈＬのほぼ定量的な充

填を示したが、得られた薬物と脂質の比は、２５０～１０００ｇ　ＡＫＧ－２８／ｍｏｌ　ＰｈＬの範囲にわたってＡＫＧ－２８について平坦なままであり、これは、ＡＫＧ－３８よりもＡＫＧ－２８について最大薬物充填量が低いことを示唆している。ＡＫＧ－２８について以前に示されたより高い効力は、ＡＫＧ－２８のリポソーム製剤を結核のような感染症の処置にとって有効なものにすることが理解されるべきである。

【０３４５】

［実施例１５］

［種々のリン脂質組成、ＰＥＧ化度、および捕捉剤を用いた、リポソーム中への化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のカプセル封入］

捕捉剤としての０．５Ｍ　ＡＳまたは１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを用いたリン脂質（ＰｈＬ）およびコレステロール（３：２のモル比）、ＰＥＧ－ＤＳＧ、およびＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（ＰｈＬの０．１５ｍｏｌ％）から構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、薬物充填量およびカプセル封入効率（ＥＥ）を最適化するために選択されたＤＬ０比で化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８を充填した（添加される緩衝物質の非存在下で）。結果を、以下の表１０および表１１に示す。

【０３４６】

【表１７】

表11. 化合物AKG-28のカプセル封入

バッチID	PhL	PEG-DSG, PhLのmol%	捕捉剤	DL0比 g/mol PhL	薬物充填量, g/mol PhL	EE, %	リポソームのz-平均サイズ, nm	リポソームのPDI
128	HSPC	0.5	0.5M AS	300	265.9	88.6	116.7	0.031
129	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	300	273.9	91.3	115.2	0.038
130	HSPC	5	1N TEA-SOS	300	260.4	86.8	109.2	0.031
131	ESM	0.5	1N TEA-SOS	300	109.4	36.5	109.8	0.054
138	HSPC	0.5	0.5M AS	400	260.4	65.1		
139	HSPC	0.5	0.5M AS	400	232.2	58.1		

【０３４７】

【表１８】

表12. 化合物AKG-38のカプセル封入

バッチID	PhL	PEG-DSG, PhL のmol%	捕捉剤	DL0比 g/mol PhL	薬物充填量, g/mol PhL	EE, %	リポソームのz-平均サイズ, nm	リポソームのPDI
132	HSPC	0.5	0.5M AS	600	532.1	88.7	127	0.023
133	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	600	590.7	98.5	115.1	0.019
134	HSPC	5	1N TEA-SOS	600	565.6	94.3	110.6	0.074
135	ESM	0.5	1N TEA-SOS	600	529.3	88.2	106.7	0.049
140	HSPC	0.5	0.5M AS	800	739.5	92.4		
141	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	800	864.0	108.0		

【０３４８】

本実施例では、ＡＫＧ－２８を、２３０～２７５ｇ　ＡＫＧ－２８／ｍｏｌ　ＰｈＬの最大薬物充填量で捕捉剤として０．５Ｍ　ＡＳまたは１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを使用してＨＳＰＣから構成されるリポソーム中に効率的に充填できることを示す。しかし、この化合物のために中性リン脂質としてスフィンゴミエリンを含有する製剤は、比較的低い充填を示し、最大でも約１１０ｇ　ＡＫＧ－２８／ｍｏｌ　ＰｈＬに過ぎなかった。

【０３４９】

化合物ＡＫＧ－３８は、薬物を６００ｇ　ＡＫＧ－３８／ｍｏｌ　ＰｈＬで添加した場合、０．５Ｍ　ＡＳもしくは１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを使用して、５２５～６００ｇ／ｍｏｌの、または８００ｇ　ＡＫＧ－３８／ｍｏｌ　ＰｈＬで添加した場合、７３５ｇ／ｍｏｌを超える、有意により高いＤ／Ｌ比で充填された。化合物ＡＫＧ－３８の充填は、ＡＫＧ－２８よりもスフィンゴミエリンの存在に対して感受性が低かった。

【０３５０】

［実施例１６］

［高いＰＥＧ化および捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いた、リポソーム中への化合物ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、およびＡＫＧ－３８のカプセル封入］

捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いたＨＳＰＣおよびコレステロール（３：２のモル比）、ＰＥＧ－ＤＳＧ（５ｍｏｌ％）、およびＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（０．１５ｍｏｌ％）から構成されるリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、薬物充填量およびカプセル封入効率（ＥＥ）を最適化するために選択されたＤＬ０比で化合物ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、またはＡＫＧ－３８を充填した（添加される緩衝物質の非存在下で）。結果を、以下の表１３に示す。

【０３５１】

【表１９】

表13

バッチID	化合物	DL0比, g/mol PhL	薬物充填量, g/mol PhL	EE, %
145	AKG-16	600	598.9	99.8
142	AKG-28	300	292.3	97.4
143	AKG-29	300	43.6	14.5
144	AKG-38	600	506.2	84.4

【０３５２】

このデータは、テトラゾール環の２位にジメチルアミノエチル置換基を含有する全ての化合物が、８０％を超えてリポソーム中に効率的に充填されたが、同じ位置にアミノエチル置換基を有するＡＫＧ－２９は、１４．５％の効率および４３．６ｇ　ＡＫＧ－２９／ｍｏｌ　ＰｈＬの最終薬物充填量でリポソーム中にわずかしか充填されなかったことを示す。これは、試験した全ての化合物における滴定可能なアミンの存在にも拘わらず、テトラゾール環に置換されたアンモニウム（例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチル基）を有する化合物は、同じ位置に第１級アミン（アミノエチル基）を有するものよりも効率的な薬物充填を可能にしたことを示す。

【０３５３】

［実施例１７］

［マウスにおける実施例１５および１６のリポソームの血中持続性およびｉｎ　ｖｉｖｏでのカプセル封入安定性］

試験を、上記の一般的プロトコールに記載のようにオスのＣＤ－１マウスに対して実施した。

【０３５４】

【表２０】

表14

リポソームのバッチID	血漿中の%ID (リポソーム脂質)		初期DL比%	
	5分	6時間	5分	6時間
128	80.6 ± 1.3	34.9 ± 0.8	75.2 ± 1.1	67.9 ± 4.0
129	83.6 ± 0.6	42.2 ± 3.4	95.7 ± 0.9	88.7 ± 3.1
130	83.4 ± 11.9	54.6 ± 3.8	94.4 ± 4.0	93.2 ± 1.1
132	83.2 ± 8.3	42.4 ± 1.7	48.6 ± 0.2	29.5 ± 0.5
133	71.3 ± 6.0	21.9 ± 8.1	97.3 ± 2.6	93.2 ± 4.3
134	78.8 ± 2.3	46.5 ± 3.2	93.8 ± 2.6	83.3 ± 4.7
135	77.9 ± 3.6	38.7 ± 2.9	102.6 ±2.5	102.3 ± 1.8
142	80.9 ± 2.9	48.9 ± 2.8	52.9 ± 1.1	40.0 ± 0.3
144	83.3 ± 5.6	42.0 ± 4.4	50.4 ± 1.1	24.0 ± 0.5
145	80.6 ± 1.3	40.3 ± 0.1	41.4 ± 1.7	13.1 ± 0.0

【０３５５】

データは、捕捉剤として全て０．５ＭのＡＳを有する、リポソームバッチＩＤ１２８、

１３２、１４２、１４４、および１４５中の薬物が、５分での低いＤＬ比、ならびにＡＫＧ－３８およびＡＫＧ－１６を充填したリポソームについて特に顕著な、６時間でのＤＬ比のさらなる低下によって示すように、血液との接触時にほとんど即時にカプセル封入された薬物の２５～６０％を喪失することを示していた。かくして、０．５ｍｏｌ％または５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧおよび４０ｍｏｌ％のコレステロール、０．５ＭのＡＳ（捕捉剤として）の製剤は、５分と６時間の両方の時点での初期ＤＬ比の％が８０％を超えていた場合、１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを用いる製剤（リポソームバッチＩＤ１２９、１３０、１３３～１３５）ほど効率的に薬物を保持できなかった。

【０３５６】

［実施例１８］

［変化するリン脂質とコレステロールの比を有するＰＥＧ化されたリポソーム中でのＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の調製および充填］

５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥ（ＰｈＬに対して）、０．１５ｍｏｌ％の脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ、および捕捉剤としての０．５Ｍ硫酸アンモニウム（ＡＳ）または１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳを含有するリポソームを、一般的プロトコールに従って調製し、ｐＨ５．０７～５．８２（緩衝物質を添加しない）で、実施例８に記載のように、化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８を充填した。

【０３５７】

血液との接触時に迅速な薬物放出に対して捕捉剤として０．５ＭのＡＳを有するリポソームを安定化する試みにおいて（実施例１７に記載されている）、ＤＳＰＣ（一般的には、ＨＳＰＣと比較してより高い薬物漏出安定リポソームをもたらすことが知られている）および減少する割合のコレステロール（Ｃｈｏｌ）を使用するリポソームを調製し、ＤＬ０　２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬでＡＫＧ－２８、または６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬでＡＫＧ－３８を充填した（表１５）。予想に反して、４０ｍｏｌ％から１０ｍｏｌ％のコレステロールへのコレステロール含量の減少は、ＡＫＧ－２８とＡＫＧ－３８との両方に関してカプセル封入効率の劇的な低下をもたらした。より低いコレステロールはまた、凝集に対してリポソームを不安定化した。３０ｍｏｌ％のコレステロール（ＰｈＬ－コレステロールのモル比７０：３０）で、１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳおよび５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥを使用して作製されたＡＫＧ－２８を含有するリポソームは、ＡＫＧ－３８の３０ｍｏｌ％のコレステロール、５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＰＥを含有する製剤と同様、薬物充填中に不可逆的に凝集したが、３０ｍｏｌ％のコレステロールのＡＫＧ－３８の５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧ製剤は、７７．１％または４６２．４ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬの低下した充填効率を示した。

【０３５８】

【表２１】

表15

バッチID	化合物	PEG-脂質(脂質部分)	捕捉剤	Chol (mol%)	薬物充填量, (g/mol PhL)	EE, (%)
158	AKG-28	DSG	0.5MAS	40	231.2	92.5
159	AKG-28	DSG	0.5MAS	30	173.5	69.4
160	AKG-28	DSG	0.5MAS	20	116.4	46.6
161	AKG-28	DSG	0.5MAS	10	92.4	36.9
162	AKG-28	DSPE	0.5MAS	30	130.5	52.2
166	AKG-38	DSG	0.5MAS	40	462.8	77.1
167	AKG-38	DSG	0.5MAS	30	280.2	46.7
168	AKG-38	DSG	0.5MAS	20	120.0	20.0
169	AKG-38	DSG	0.5MAS	10	69.8	11.6
170	AKG-38	DSPE	0.5MAS	30	114.9	19.1

【０３５９】

対照的に、ＨＳＰＣを使用して調製され、４０ｍｏｌ％以上のコレステロール、最大で６５ｍｏｌ％のコレステロール（試験した最大値）を含有するリポソームは、８７％を超える優れたカプセル封入効率を示し、ＡＫＧ－２８（ＤＬ０　２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）およびＡＫＧ－３８（ＤＬ０　５００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）の両方、ＰＥＧ－脂質（ＰＥＧ－ＤＳＧおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、および捕捉剤（ＡＳまたはＴＥＡ－ＳＯＳ）についてリポソーム凝集を示さなかった（表１６）。

【０３６０】

さらに、０．５ＭのＡＳと１Ｎ　ＴＥＡ－ＳＯＳ製剤との両方において、このクラスに由来する現在の標準治療薬、リネゾリドを充填するための最適化された製剤の能力を評価した。テジゾリドは、実施例６の一般的プロトコールに従ってリポソーム中への膜貫通勾配支援充填を実施するには水に十分溶解しなかった。リネゾリドに関する両方の場合、カプセル封入効率は５％未満であったが、これは、ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のこれらのリポソーム製剤が、リネゾリドと比較した場合、薬物を安定にカプセル封入するその能力において劇的に優れていたことを示している。

【０３６１】

リポソームのＺ平均サイズ（x_z）および多分散指数（ＰＤＩ）を、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｐｒｏ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ）を１７３°の測定角で使用する動的光散乱（ＤＬＳ）キュムラント法によって決定した。

【０３６２】

【表２２】

表16

バッチID	化合物	PEG-脂質(脂質部分)	捕捉剤	Chol (mol %)	薬物充填量, (g/mol PhL)	リポソームの平均サイズ x_z, nm	多分散指数	EE, (%)
174	AKG-28	DSG	0.5 M AS	40	249.8			99.9
175	AKG-28	DSG	0.5 M AS	45	253.9			101.6
176	AKG-28	DSG	0.5 M AS	50	252.6			101.0
201	AKG-28	DSG	0.5 M AS	55	228.2	107.2	0.0495	91.3
202	AKG-28	DSG	0.5 M AS	60	233.0	109.4	0.0333	93.2
203	AKG-28	DSG	0.5 M AS	65	235.3	111.0	0.0359	94.1
177	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	40	223.5			89.4
178	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	45	258.7			103.5
179	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	50	259.5			103.8
180	AKG-38	DSG	0.5 M AS	40	440.4			88.1
181	AKG-38	DSG	0.5 M AS	45	488.7			97.7
182	AKG-38	DSG	0.5 M AS	50	468.4			93.7
207	AKG-38	DSG	0.5 M AS	55	460.7	109.2	0.0034	92.1
208	AKG-38	DSG	0.5 M AS	60	475.1	111.3	0.0201	95.0
209	AKG-38	DSG	0.5 M AS	65	475.3	111.9	0.0118	95.1
183	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	40	505.4			101.1
184	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	45	495.8			99.2
185	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	50	489.4			97.9
186	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	40	244.4	108.9	0.0250	97.8
187	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	45	241.6	107.8	0.002	96.6
188	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	50	250.4	109.1	0.0076	100.1
204	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	55	223.5	117.0	0.0037	89.4
205	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	60	237.8	114.8	0.0113	95.1
206	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	65	233.0	115.1	0.0266	93.2
189	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	40	244.6	109.3	0.0480	97.8
190	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	45	245.6	107.7	0.0165	98.2

191	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	50	245.0	107.9	0.0221	98.0
192	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	40	434.8	115.1	0.0040	87.0
193	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	45	462.7	112.9	0.0202	92.5
194	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	50	467.0	109.4	0.0323	93.4
210	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	55	463.3	114.5	0.0183	92.7
211	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	60	479.6	114.9	0.0020	95.9
212	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	65	475.0	114.2	0.0511	95.0
195	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	40	503.6	109.1	0.002	100.7
196	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	45	489.8	108.5	0.0298	98.0
197	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	50	481.4	107.3	0.0395	96.3
229	リネゾリド	DSPE	0.5 M AS	55	21.0			4.2
230	リネゾリド	DSPE	1 N TEA-SOS	55	19.7			3.9

【０３６３】

［実施例１９］

［血漿の存在下でのＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８および変化する比のリン脂質対コレステロールを含有するＰＥＧ化されたリポソームのｉｎ　ｖｉｔｒｏでのバースト放出］

５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＰＥまたはＰＥＧ－ＤＳＧおよび変化する比のＨＳＰＣ対Ｃｈｏｌ（５０～６５ｍｏｌ％のＣｈｏｌ）を含有するＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のリポソーム製剤のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの安定性を、マウスＣＤ－１またはヒトのプールされた血漿（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈからのリチウム－ヘパリンで安定化されたもの）の存在下で安定性について評価した。血漿を解凍し、必要に応じて、１Ｎ　ＨＣｌでｐＨ７．４に調整し、ガラスマイクロファイバーフィルター（ＧＦ／Ｃ）、１μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）、および０．２２μｍのＰＥＳフィルターを通して連続的に濾過した。血漿（８０μｌ）を、０．５ｍｌのエッペンドルフチューブ中、リポソーム薬物製剤（２０μｌ）と混合した。続いて、混合物を３７℃で２０分間インキュベートした後、冷水中に入れた。混合物（０．１ｍＬ）を、２ｍＬのＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂカラム上で遅延なしにクロマトグラフィーにかけ、Ｈｅｐｅｓ緩衝化食塩水（ｐＨ７．０）で溶出し、０．２５ｍＬのリポソーム薬物を空隙容量画分中で収集した。次いで、薬物およびＤｉＩ（３）－ＤＳ脂質標識を、実施例７に記載されたようにＨＰＬＣによって分析し、カプセル封入された残存薬物％を、以下の式：

（A_d／A_I／（$A_{d,0}$／$A_{I,0}$）＊１００＝カプセル封入された残存薬物％

（式中、A_dは、薬物ピークのものであり、A_Iは脂質標識ピークの面積であり、$A_{d,0}$は、血漿とのインキュベーション前の薬物ピークの面積であり、$A_{I,0}$は、インキュベーション前の脂質標識ピークのものである。）

を使用して決定した。

【０３６４】

図５Ａ、図５Ｂ、図５Ｃおよび図５Ｄに、結果を示す。ＡＫＧ－２８が封入されたリポソームについては（図５Ａ）、バースト放出現象（リポソームからの薬物放出を示すＤＬ

比の急速な低下）が、４０ｍｏｌ％のコレステロールを含有する製剤についてヒト血漿中で観察されたが、４５ｍｏｌ％以上のコレステロールを含む製剤については観察されなかった。ＡＫＧ－３８が封入されたリポソームについては（図５Ｂ）、バースト放出現象は、４０ｍｏｌ％および４５ｍｏｌ％のコレステロール含量を含む製剤についてはヒトとマウスとの両方の血漿中で観察されたが、５０ｍｏｌ％以上のコレステロール含量では観察されなかった。

【０３６５】

［実施例２０］

［ＡＫＧ－３８および４０または５５ｍｏｌ％のコレステロールを含有する５ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質リポソームのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの血漿放出およびｉｎ　ｖｉｖｏでの薬物動態］

０．５Ｍ　ＡＳ捕捉剤を使用する実施例１８の３つのリポソーム製剤を、５分と６時間との両方で血中に残存するリポソーム脂質の注射用量のパーセント（％ＩＤ）を測定し、薬物と脂質の比（ＤＬ）の決定によりリポソームからの薬物放出を測定する、実施例７に記載のメスＣＤ－１マウスにおいて２つの時点の薬物動態試験で評価した。５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＧまたは５ｍｏｌ％のＰＥＧ－ＤＳＰＥを有し、５５ｍｏｌ％のＣｈｏｌを含有するリポソームは、５分で９５％を超える、および６時間で８５％を超える注射前Ｄ／Ｌを示したが、４０ｍｏｌ％のＣｈｏｌを含有するＰＥＧ－ＤＳＧ製剤は、５分と６時間との両方で劇的に低下したＤＬ比を示し、これは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの血漿の存在下での薬物漏出データと一致していた（表１７）。この知見は、ＰＥＧ化されたリポソームドキソルビシンおよびナノリポソームイリノテカンのような、臨床使用について認可されたいくつかの非常に安定なリポソーム薬物は、約５０ｍｏｌ％の比率でコレステロールを含有するため、この知見は、薬物充填リポソーム製剤に関する以前の経験とは対照的であった（例えば、２０１９年８月にアップデートされた、Ｄｏｘｉｌ（Ｃ）薬物情報添付文書、およびＤｒｕｍｍｏｎｄ，Ｄ．Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．（２００６）．「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ａ　ｈｉｇｈｌｙ　ａｃｔｉｖｅ　ｎａｎｏｌｉｐｏｓｏｍａｌ　ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ　ｕｓｉｎｇ　ａ　ｎｏｖｅｌ　ｉｎｔｒａｌｉｐｏｓｏｍａｌ　ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ　ｓｔｒａｔｅｇｙ」、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６６（６）：３２７１－３２７７を参照されたい。）。

【０３６６】

【表２３】

表17

リポソームのロットID		180	207	210
Chol, mol% (Chol+PC の)		40	55	55
PEG-脂質		DSG	DSG	DSPE
充填後のD/L比		440.4 ± 8.5	460.7 ± 16.2	463.3 ± 13.7
カプセル封入効率, %		88.1 ± 1.7	92.1 ± 3.2	92.7 ± 2.7
in vitro, 20分37℃での血漿安定性 (カプセル封入されたままの薬物%)	マウスCD1	54.6 ± 1.6	92.4 ± 0.7	95.0 ± 0.8
	ヒト	55.9 ± 3.7	94.3 ± 0.6	96.8 ± 0.9
2点PKデータ (CD-1 マウス, 9 mg/kg iv):				
リポソーム脂質 % ID	5分	103.4 ± 11.7	114.9 ± 14.9	104.3 ± 5.6
	6時間	51.1 ± 5.2	52.6 ± 3.6	50.3 ± 5.7
D/L比,注射前の値の%	5分	60.8 ± 1.2	95.1 ± 1.2	96.8 ± 0.2
	6時間	30.9 ± 2.4	86.6 ± 5.7	90.0 ± 4.1

【０３６７】

［実施例２１］

［ＡＫＧ－３、ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２２、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、ＡＫＧ－３０、ＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３９、およびＡＫＧ－４０によるミトコンドリアタンパク質合成（ＭＰＳ）の阻害ならびにＭＰＳ阻害と比較した結核菌（Ｈ３７Ｒｖ）に対する選択

性］

製造業者の使用説明書に従って、ＡｂＣａｍからの比色ＭｉｔｏＢｉｏｇｅｎｅｓｉｓ（商標）細胞内ＥＬＩＳＡキット（カタログ＃ａｂ１１０２１）を使用して、ミトコンドリアタンパク質合成の阻害を決定した。ミトコンドリアタンパク質合成阻害は、リネゾリドおよび他のオキサゾリジノンに関する重要な毒性、最も顕著には、眼および末梢ニューロパチー、ならびに乳酸アシドーシスと相関していた（Ｒｅｎｓｌｏ（２０１０）Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖｅ Ａｎｔｉ Ｉｎｆｅｃｔ Ｔｈｅｒ ８（５）５６５－５７４；Ｆｌａｎａｇａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ ５９（１）１７８－１８５；Ｓａｎｔｉｎｉ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｓａｆ １６（７）８３３－８４３）。複合体ＩＶのミトコンドリアＤＮＡによりコードされるサブユニットＩ（ＣＯＸ－１）および複合体ＩＩの核ＤＮＡによりコードされる７０ｋＤａサブユニット（ＳＤＨ－Ａ）を含む、２つのミトコンドリアタンパク質のレベルを同時に測定した。Ｈ９Ｃ２ラットＢＤＩＸ心筋芽細胞株を、３８４ウェルプレートアッセイ形式でこれらの試験において使用した。細胞を、１０％ＦＢＳおよび１ｘグルタミンを含むＤＭＥＭ培地中、３７℃および５％CO_2で増殖させた。細胞を、４７．５μｌ／ウェルで３８４ウェルプレート中に１，５００細胞／ウェルの密度で播種した。２００μＭの高い濃度で出発し、９つの３倍希釈液を含む各化合物の濃度および条件あたり１回の反復物を、２．５μｌで細胞に添加し、３７℃および５％CO_2で５日間、細胞とともにインキュベートした。試験した化合物は、テジゾリドおよびリネゾリド対照、ならびにＡＫＧ－３、ＡＫＧ－１６、ＡＫＧ－２２、ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－２９、ＡＫＧ－３０、ＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３９、およびＡＫＧ－４０を含んでいた。

【０３６８】

次いで、ＭｉｔｏＢｉｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｉｎ－Ｃｅｌｌ Ｅｌｉｓａを、製造業者の使用説明書（Ａｂｃａｍｅカタログ＃ａｂ１１０２１）に従って実施し、プレートリーダー中、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）を、１５分間（２０秒～１分間隔）動的モデルにおいて４０５ｎｍでのＳＤＨ－１Ａの検出のために現像し、ＨＲＰを、１５分間（２０秒～１分間隔）動的モードにおいて５００ｎｍでのＣＯＸ－Ｉの検出のために現像した。ＣＯＸ－ＩおよびＳＤＨ－Ａシグナルを、各化合物の濃度に対してＣＯＸ－１／ＳＤＨ－Ａの比としてプロットし、９つの調査化合物の各々および２つの対照についてＩＣ５０を算出した。

【０３６９】

μｇ／ｍｌでのＭＰＳ ＩＣ５０を、実施例２に記載のように決定された薬物感受性Ｈ３７Ｒｖ結核菌株におけるＭＩＣで除算することによって、ＭＰＳ選択性指数（ＳＩ－ＭＰＳ）を決定した。試験した２つの化合物、ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－２９は、リネゾリドについて決定されたものよりも１０倍を超えて高く、テジゾリドについて決定されたものよりも２０倍を超えて高いＳＩ－ＭＰＳを有していた。これらの化合物は両方とも、オキサゾリジノン環のＲ２位に第１級アミノ基を含有していた。ミトコンドリアタンパク質合成と比較して結核菌に対するその高い効力（ＭＩＣ＜０．１）および高い選択性のため、ＡＫＧ－２８は、リポソーム中への封入および結核または他のマイコバクテリア疾患の処置のための優れた候補である。

【０３７０】

【表２４】
表18

化合物	テトラゾール環位置, R_1 (式(I))	R_2 (式(I))	MIC (H37Rv) (μg/ml)	MPS IC50 (μg/ml)	SI-MPS MPS/H37
リネゾリド	適用不能	-$NHCOCH_3$	1.00	2.157	2.16
テジゾリド	2', CH_3-	-OH	0.25	0.143	0.57
AKG-3	2', CH_3-	-NH_2	0.06	0.115	1.91
AKG-16	2', $(CH_3)_2N(CH_2)_2$-	-OH	0.25	0.244	0.98
AKG-22	1', NH_2 $(CH_2)_2$-	-OH	0.5	1.184	2.37
AKG-28	2', $(CH_3)_2N(CH_2)_2$-	-NH_2	0.015	0.411	27.41
AKG-29	2', $NH_2(CH_2)_2$-	-NH_2	0.125	4.11	32.80
AKG-30	2', $(C_2H_5)_2N(CH_2)_3$-	-NH_2	0.125	0.252	2.02
AKG-38	2', $(CH_3)_2N(CH_2)_2$-	-$NHCOCH_3$	0.06	0.041	0.69
AKG-39	2', $(C_2H_5)_2N(CH_2)_2$-	-$NHCOCH_3$	0.5	0.060	0.12
AKG-40	2', $(C_2H_5)_2N(CH_2)_3$-	-$NHCOCH_3$	0.5	0.064	0.13

【０３７１】
［実施例２２］
［リポソームＡＫＧ－２８ロット２７５のスケールアップ調製］
ロット２６７。実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ ＡＧ）４．９５ｇ（６．３０ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、Ｈｉｇｈ ｐｕｒｉｔｙ）２．９８ｇ（７．７１ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ ＡＧ）８５０ｍｇ（０．３１５ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ ４５：５５：２．２５のモル比）を、９ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで６８℃浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、９３．３ｇの０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム（０．２μｍ濾過された）を、６８℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を６８℃浴上で２０分間撹拌し、６８℃の水を循環しながら加熱したＬｉｐｅｘ １００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍの１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して２６０～３００ｐｓｉで８回押し出した。得られた押し出されたリポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。残存する伝導度が２００μＳ／ｃｍ未満（５．２倍量の交換後に１４３μｓ／ｃｍ）に低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５７．４ｍＭであった。
【０３７２】
２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ５．０３に調整）の形態の７２０ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４５ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび６ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２５０

ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６０～６３℃に急速に加熱し、６５℃浴上で撹拌しながらインキュベーションを継続した。２０分間のインキュベーション後、混合物を氷水中で１０℃未満に急速に冷却し、この温度で約１０分間保持した。周囲温度に達し、０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、分子量カットオフ５００ＫＤを有するポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって薬物充填リポソームを精製した。リポソームを、透析濾過によって約１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計８倍量の交換にわたって内毒素非含有水（ＨＢＳ－７緩衝液）を用いて作製された０．１４４Ｍ　ＮａＣｌを含有する１０ｍＭのＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液ｐＨ７．０中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製前の非封入薬物の割合を、濃縮前の透析濾液中、３０５ｎｍで分光測光的に見積もったところ、約０．９％（９９．１％の充填効率に対応する）であることがわかった。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。この手順を、さらに３回繰り返した（ロット２６９、２７１、２７３）。得られたリポソームは、表１９に示される特徴を有していた。

【０３７３】

【表２５】

表19

ロットID	スケール, AKG-28のmg	DL比 g AKG-28/mol PhL	平均粒径 Xz, nm	PDI
267	720	251.9	115.4	0.0248
269	750	248.7	112.6	0.0282
271	750	268.0	114.0	0.0482
273	766	244.9	114.7	0.0153

【０３７４】

これらのロットを混合して、リポソーム形態、粒径Ｘｚ　１１３．７ｎｍ、ＰＤＩ０．０４１７の１２．０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８を有するロット２７５を得た。

【０３７５】

［実施例２３］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２７６のスケールアップ調製］

ロット２６８。以下の相違で実施例２２のプロトコールを使用した：等量の１Ｎ　ＨＣｌ中に薬物を溶解し、２０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８（遊離塩基として）、ｐＨ５．０８を得るように体積を調整することによって、ＡＫＧ－３８（遊離塩基として）のストック水性溶液を調製した。充填混合物は、１３００ｍｇのＡＫＧ－３８を含有しており、これを、８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８および４５０ｇ／ｍｏｌのリン脂質のＤＬ比で調製し、さらに１０ｍＭのＮａＣｌを含有していた。充填後のリポソームを、約２２ｍｇ／ｍｌの薬物に予め濃縮した；精製前の非封入薬物の割合を、濃縮前の透析濾液中、３０５ｎｍで分光測光的に見積もったところ、約３．２％（９６．８％の充填効率に対応する）であることがわかった。このプロセスを、さらに３回繰り返した（ロット２７０、２７２、２７４）。得られたリポソームは、表２０に示される特徴を有していた。

【０３７６】

【表２６】

表20

ロットID	スケール AKG-38のmg	DL比 g AKG-38/ mol PhL	平均粒径Xz, nm	PDI
268	1300	445.9	114.6	0.0419
270	1360	444.9	114.2	0.0456
272	1350	463.7	115.3	0.0245
274	1375	437.3	115.0	0.0349

【０３７７】

これらのロットを混合して、リポソーム形態、粒径Ｘｚ　１１３．１ｎｍ、ＰＤＩ０．０４５４の２２．３ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８を有するロット２７６を得た。

【０３７８】

［実施例２４］

［「空のリポソーム」ロット２７７の調製］

２ｍｍｏｌのＨＳＰＣ、２．４４４ｍｍｏｌのコレステロールおよび０．１ｍｍｏｌのＰＥＧ－ＤＳＰＥ（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比）をエタノール中に溶解し、リポソーム懸濁液中に形成し、０．５Ｍ硫酸アンモニウムの代わりに、非交換カチオンの硫酸塩、０．１３Ｍ硫酸ナトリウムを採用した以外は、実施例２２に記載のようにポリカーボネートメンブレンを通して押し出した。押し出されたリポソームを、リポソーム外の硫酸ナトリウムから精製し、合計１０倍量の交換にわたってＭＷＣＯ５００ｋＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦ緩衝液交換によってＨＢＳ－７緩衝液中に入れた。精製されたリポソームは、４２．９ｍＭのリン脂質、粒径Ｘｚ１１３．７ｎｍ、およびＰＤＩ０．０６１２を有していた。それらを０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、滅菌ＨＢＳ－７を用いて２０ｍＭのリン脂質に調製した。

【０３７９】

［実施例２５］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２７９］

実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）１３．１０２ｇ（１６．６７ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、Ｈｉｇｈ　ｐｕｒｉｔｙ）７．８７７ｇ（２０．３７ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）２．２５０ｇ（０．８３３ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比）を、２５ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで６８℃浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、２５９．１ｇ（２５０ｍｌ）の０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム（０．２μｍ濾過された）を、７０℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を７０℃浴上で少なくとも２０分間撹拌し、４つの部分に分割した。それぞれの部分を、７０℃の水を循環させながら加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍ　１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して２８０ｐｓｉで５回押し出した。これらの部分的に押し出されたリポソーム部分を混合し（Ｘｚ　１２９．７ｎｍ）、同じメンブレンスタックを通してさらに５回、一緒に押し出したところ、サイズＸｚ　１１５．９ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２１２のリポソームが得られた。リポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。リン脂質濃度は、６０．２２±０．３４ｍＭであることがわかった。残存する伝導度が５．１倍量の交換後に１８０μＳ／ｃｍに低下

するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５４．９７±０．３２ｍＭであった。

【０３８０】

ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、２０ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．１６）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、３９５８ｍｇの薬物を含有する量の濾液をＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロース、１０ｍＭのＮａＣｌ、および８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．５４の存在下、４５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。５分間一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６１℃に加熱し、６５℃浴上、さらに２２分間撹拌しながらインキュベーションを継続した。次いで、混合物を氷水浴中に移し、７分間撹拌して、温度を１０℃に低下させ、氷水浴中でさらに８分間保持した。氷浴から取り出し、周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストックを添加することによって０．１Ｍ　ＮａＣｌに調製した後、薬物充填リポソーム（ｐＨ６．５３）を、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計８倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍのＰＥＳ大流量滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　２１．１±０．１９ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４５４±４．７ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１６．４ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２３１。製剤化された薬物の収量は、３８３４ｍｇ（９６．９％）であった。

【０３８１】

［実施例２６］

［リポソームＡＫＧ－２８ロット２８１］

実施例６の一般的手順に従った。０．５Ｍ硫酸アンモニウムを含有する４５：５５：２．２５のモル比のＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥから構成される押し出されたリポソームを、実施例２５に記載のように調製した。残存する伝導度が１５０μＳ／ｃｍ（４．１倍量の交換）に低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリエーテルスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５５．４ｍＭであった。

【０３８２】

２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ５．２４に調整）の形態の９６９．５ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび６ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を２．５分で６５．４℃に加熱し、６５℃浴上で撹拌しながらインキュベーションを継続した。２０分のインキュベーション後、混合物を氷水中、２．７５分で９．３℃に冷却し、約１０分間、氷水中で保持した。次いで、混合物を周囲温度に到達させた後、０．１Ｍ　ＮａＣｌ；ｐＨ６．４３に調整した。１３３．４ｇの充填混合物を、分子量カットオフ５００ＫＤを有するポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによる精製にかけた。リポソームを、透析濾過によって約１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計８．１倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製前の非封入薬物の割合を

、濃縮前の透析濾液中、３０２ｎｍで分光測光的に見積もったところ、約０．７％（９９．３％の充填効率に対応する）であることがわかった。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－２８　１３．２６±０．２１ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比２５８．２±３．７ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１７．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０４２１。

【０３８３】

［実施例２７］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２８５］

実施例６の一般的手順に従った。０．５Ｍ硫酸アンモニウムを含有する４５：５５：２．２５のモル比のＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥから構成される押し出されたリポソームを、本質的には実施例２５に記載のように調製した。残存する伝導度が１３８μＳ／ｃｍ（５．６倍量の交換）に低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリエーテルスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５３．１ｍＭであった。

【０３８４】

ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、１９．９ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．１３）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、１４００ｍｇの薬物を含有する量の濾液をＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロース、１０ｍＭのＮａＣｌ、および８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．５８の存在下、４５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。２．２５分間にわたって一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６３℃に加熱し、６５℃浴上、合計２１分間撹拌しながらインキュベーションを継続した。次いで、混合物を氷水浴中に移し、３分間撹拌して、温度を１０．３℃に低下させ、氷水浴中でさらに７分にわたって保持した。氷浴から取り出し、周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストックを添加することによって０．１Ｍ　ＮａＣｌに調製した後、薬物充填リポソーム（ｐＨ６．７０）を、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計７．７倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームは、２３．１ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度を有していた。薬物濃度を、ＨＢＳ－７緩衝液で２０ｍｇ／ｍｌに調整し、リポソームを、０．２μｍ　ＰＥＳ大流量滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳによって粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　２０．３５±０．２６ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４３７．８±６．５ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１２１．１ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２００。製剤化された薬物の収量は、１３５５ｍｇ（９６．８％）であった。

【０３８５】

［実施例２８］

［リポソームＡＫＧ－２８ロット２８６］

０．５Ｍ硫酸アンモニウムを含有し、リポソーム外の捕捉剤を含有しない押し出されたリポソーム（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比）を、実施例２７に記載のように取得した。

【０３８６】

２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ５．１８に調整）の形態の６００ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび６ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２

５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。混合物を、撹拌しながら６５℃水浴上に置き、４．５分で６０℃に到達させた。合計２０分間撹拌しながらインキュベーションを継続し、混合物を氷水中、２分で１０．０℃に冷却し、約１０分間、氷水浴中で保持した。次いで、混合物を周囲温度に到達させた後、０．１Ｍ ＮａＣｌ；ｐＨ６．２３に調整した。１０４．６ｇの充填混合物を、分子量カットオフ５００ＫＤを有するポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによる精製にかけた。リポソームを、透析濾過によって約１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計８．３倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ（ＨＢＳ－７緩衝液で追い出した）、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－２８ １２．０５±０．１３ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比２３９．４ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ １２０．１ｎｍ、ＰＤＩ ０．０２９４。製剤化された薬物の収量は、５５５．５ｍｇ（９２．６％）であった。

【０３８７】

［実施例２９］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２９２］

ロット２８８。実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ ＡＧ）９．１７ｇ（１１．６７ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ，Ｈｉｇｈ ｐｕｒｉｔｙ）５．５１ｇ（１４．２６ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ ＡＧ）１．５７５ｇ（０．５８３ｍｍｏｌ）を、１７．５ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで６９～７０℃の浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、１８１．４ｇ（１７５ｍｌ）の０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム（０．２μｍ濾過された）を、７０℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を７０℃浴上で少なくとも２０分間撹拌し、３つの部分に分割した。それぞれの部分を、７０℃の水を循環させながら加熱したＬｉｐｅｘ １００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍ １００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して２８０ｐｓｉで５回押し出した。これらの部分的に押し出されたリポソーム部分を混合し（Ｘｚ １２６．７ｎｍ）、同じメンブレンスタックを通してさらに４回、一緒に押し出したところ、サイズＸｚ １１９．２ｎｍ、ＰＤＩ ０．０３８５のリポソームが得られた。リポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。リン脂質濃度は、５９．０８±０．４４ｍＭであることがわかった。残存する伝導度が５．４倍量の交換後に１５２μＳ／ｃｍに低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５７．７６±０．５３ｍＭであった。

【０３８８】

ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、１９．７ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．１１）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、３５０９ｍｇの薬物を含有する量の濾液をＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロース、１０ｍＭのＮａＣｌ、および８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．５０の存在下、４５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。５分間にわたって一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６１．６℃に加熱し、６５℃浴上、さらに２０分間撹拌しながらインキュベーションを継続した。次いで、混合物を氷水浴中に移し、７分間

撹拌して、温度を１０℃に低下させ、氷水浴中でさらに８分間保持した。氷浴から取り出し、周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストックを添加することによって０．１Ｍ　ＮａＣｌに調製した後、薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計７．８倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍのＰＥＳ大流量滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　２２．４７±０．３８ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４４１．６ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１２１．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０４６５。製剤化された薬物の収量は、３３７５ｍｇ（９６．２％）であった。

【０３８９】

ロット２８９。Ｌｓ－２８８のプロセスを、１５０６ｍｇのＡＫＧ－３８を使用して繰り返した（同様に調製された２０．０ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液、ｐＨ５．１５）。溶液を、同じＴＦＦ後の押し出されたリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロース、１０ｍＭ　ＮａＣｌ、および８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．５３の存在下、４５０ｇ／ｍｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。２分間にわたって一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６４．３℃に加熱し、６５℃浴上、さらに２０分間撹拌しながらインキュベーションを継続した。次いで、混合物を氷水浴中に移し、２．７５分間撹拌して、温度を９．６℃に低下させ、氷水浴中でさらに１４分間保持した。氷浴から取り出した後、充填混合物を周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック；ｐＨ６．５４を用いて０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計８．１倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍのＰＥＳ大流量滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　２２．８４±０．４１ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４５２．７ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１２０．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０５２２。製剤化された薬物の収量は、１４０７ｍｇ（９３．４％）であった。

【０３９０】

ロット２９０。実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）７．８６ｇ（１０．００ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、Ｈｉｇｈ　ｐｕｒｉｔｙ）４．７３ｇ（１２．２２ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）１．３５ｇ（０．５０ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比）を、１５ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで６９～７０℃の浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、１５５．５ｇ（１５０ｍｌ）の０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム（０．２μｍ濾過された）を、７０℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を７０℃浴上で少なくとも２０分間撹拌し、２つの部分に分割した。それぞれの部分を、７０℃の水を循環させながら加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍ　１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して２８０ｐｓｉで４回押し出した。これらの部分的に押し出されたリポソーム部分を混合し（Ｘｚ　１３１．５ｎｍ）、同じメンブレンスタックを通してさらに４回、一緒に押し出したところ、サイズＸｚ　１２２．７ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２１５のリポソームが得られた。リポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。リン脂質濃度は、５８．９９±

０．２２ｍＭであることがわかった。残存する伝導度が５．５倍量の交換後に１４６μＳ／ｃｍに低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、５６．９４±０．４１ｍＭであった。

【０３９１】

ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、２０ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．１５）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、２３１５ｍｇの薬物を含有する量の濾液をＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、４４．５ｍｇ／ｍｌのデキストロース、１０ｍＭのＮａＣｌ、および８．０２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．５２の存在下、４５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。３．２５分間にわたって一定に撹拌しながら外部加熱によって混合物を６４．４℃に加熱し、６５℃浴上、さらに１７分間撹拌しながらインキュベーションを継続した。次いで、混合物を氷水浴中に移し、撹拌して１０℃より下となるように温度を低下させ、合計１０分間氷水浴中で保持し、周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック；ｐＨ６．６３を用いて０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計８．０倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍのＰＥＳ大流量滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　２２．０７±０．２３ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４４１．６ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１２０．４ｎｍ、ＰＤＩ　０．０３９５。製剤化された薬物の収量は、２１４１ｍｇ（９２．５％）であった。

【０３９２】

ロット２９２。ロット２８８（１５０．３ｇ）、２８９（６１．２ｇ）、および２９０（１９．５ｇ）を混合して、２２．５ｍｇ／ｍｌのリポソーム製剤化されたＡＫＧ－３８で２７８．４ｇのロット２９２を得た。全てのリポソーム製剤を２～８℃で保存した。

【０３９３】

［実施例３０］

［リポソームＡＫＧ－２８ロット２３５の調製］

実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）９４０ｍｇ（１．２０ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ，Ｈｉｇｈ　ｐｕｒｉｔｙ）５６８ｍｇ（１．４７ｍｍｏｌ）、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）１６３ｍｇ（０．０６ｍｍｏｌ）、および０．００１８ｍｍｏｌの親油性蛍光標識$DiIC_{18}$（３）－ＤＳ（ＡＡＴ　Ｂｉｏｑｕｅｓｔ，ＵＳＡ）（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ：$DiIC_{18}$（３）－ＤＳ　４５：５５：２．２５：０．０６７５のモル比、ＨＳＰＣに対して０．１５ｍｏｌ％のＤｉＩ３－ＤＳ）を、２ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで６８℃浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、２０ｍｌの０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム溶液（０．２μｍ濾過された）を、６８℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を６８℃浴上で２０分間撹拌し、６８℃の水を循環しながら加熱したＬｉｐｅｘ１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍの１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して３００ｐｓｉで８回押し出した。得られた押し出されたリポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ

）フィルターを通して濾過した。残存する伝導度が６０μＳ／ｃｍ（１０倍量の交換）に低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、３７．５６±０．６２ｍＭであった。

【０３９４】

２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ４．９９に調整）の形態の５０ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、１４０ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび３ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。混合物（ｐＨ５．５３）を６５℃浴上で撹拌しながら２０分間インキュベートし、氷水中で急速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは５．８０であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約５ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計１０倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームを、シリンジ操作された小型の５００ＫＤの中空繊維カートリッジ（ＭｉｃｒｏＫｒｏｓ，Ｓｐｅｃｔｒｕｍ）を使用するＴＦＦによってさらに２倍濃縮した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－２８　８．２２±０．１６ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比２５７．３±１０．３ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１８．２ｎｍ、ＰＤＩ　０．０１８８。製剤化された薬物の収量は、４１．４ｍｇ（８２．８％）であった。

【０３９５】

［実施例３１］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２３６の調製］

実施例３０の０．５Ｍ硫酸アンモニウムを含有するＴＦＦ後の押し出されたリポソームを使用した。ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、２０ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．１１）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、７０ｍｇの薬物を含有する量の濾液をＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して（実施例３０）、１４０ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび３ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度の存在下、４５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。混合物を６５℃浴上で撹拌しながら２０分間インキュベートし、氷水中で急速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは６．３３であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約６ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計約１０倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームを、シリンジ操作された小型の５００ＫＤの中空繊維カートリッジ（ＭｉｃｒｏＫｒｏｓ，Ｓｐｅｃｔｒｕｍ）を使用するＴＦＦによってさらに２倍濃縮した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　９．０４±０．１６ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４６３．９±１９．８ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１９．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２６７。製剤化された薬物の収量は、５６ｍｇ（８０％）であった。

【０３９６】

［実施例３２］

［血漿の存在下、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのロット２３５および２３６のリポソーム中での封入された薬物の保持］

３７℃の８０％マウスのヒト血漿の存在下でのリポソーム中での封入された薬物の保持を、本明細書の実施例１９に記載のように決定した。インキュベーション時間は２０分であった。

【０３９７】

【表２７】

表21

リポソームのロットID	235	236
マウス血漿	100.2 ± 4.3	91.0 ± 2.5
ヒト血漿	99.6 ± 3.9	94.8 ± 2.6

【０３９８】

これらのリポソームは、血漿と接触した薬物のバースト放出に対して安定的であった。

【０３９９】

［実施例３３］

［リポソームＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８ロット２３１、２３２（ＨＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比、捕捉剤０．５Ｍ硫酸アンモニウム）の調製］

実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）４．２５５ｇ（５．４１ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、Ｈｉｇｈ　ｐｕｒｉｔｙ）２．５６ｇ（６．６２ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）７２９ｍｇ（０．２７ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５のモル比）を、９ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と混合し、全ての脂質が溶解するまで７０℃浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、９０ｍｌの０．５Ｍ水性硫酸アンモニウム溶液（０．２μｍ濾過された）を、７０℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を７０℃浴上で２５分間撹拌し、７０℃の水を循環しながら加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、２つの４７ｍｍの１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して２６０ｐｓｉで８回押し出した。得られた押し出されたリポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。残存する伝導度が６０μＳ／ｃｍ（１０倍量の交換）に低下するまで、ＭＷカットオフ５００ＫＤａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上、内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によって、リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）を除去した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー法によって決定したところ、４６．９７±０．８０ｍＭであった。

【０４００】

ロット２３１。２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ５．０２に調整）の形態の３５０ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、１３７．６ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび２．５３ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。混合物（ｐＨ５．６０）を６５℃浴上で撹拌しながら２０分間インキュベートし、氷水中で急速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達させ、３ＭＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは５．６８であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジ

を使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約９ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計１０．９倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームを、緩衝液を供給せずにＴＦＦ透析濾過を継続することによって約１２ｍｇ／ｍｌの薬物にさらに濃縮した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－２８　１１．４２±０．０９ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比２４７．７±７．１ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１６．５ｎｍ、ＰＤＩ　０．０５１１。製剤化された薬物の収量は、３２２．７ｍｇ（９２．２％）であった。

【０４０１】

ロット２３２。ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、内毒素非含有水で埋め合わせて、２０ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液（ｐＨ５．０９）を得た。溶液を、０．２μｍフィルターを通過させ、５８０ｍｇの薬物を含有する量の濾液を、本実施例のＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、１３７．６ｍｇ／ｍｌのデキストロース、２．５３ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．７２の存在下、５００ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比で充填混合物を形成させた。混合物を６５℃浴上で撹拌しながら２０分間インキュベートし、氷水中で急速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは６．４０であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予め濃縮し、合計８．５倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームを、緩衝液を供給せずｎＴＦＦ透析濾過を継続することによってさらに２倍濃縮した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－３８　１６．０３±０．０７ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比４８７．３±１３．９ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１２０．０ｎｍ、ＰＤＩ　０．００６９。製剤化された薬物の収量は、５３８．９ｍｇ（９２．９％）であった。

【０４０２】

［実施例３４］

［リポソームＡＫＧ－２８ロット２３３（ＨＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ＤＳＧ６０：４０：３のモル比、捕捉剤１Ｎ八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース）の調製］

実施例６の一般的手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）１．８８ｇ（２．４ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、Ｈｉｇｈ　ｐｕｒｉｔｙ）６１９ｍｇ（１．６ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＧ（Ｓｕｎｂｒｉｇｈｔ　ＧＳ－０２０、ＮＯＦ、Ｊａｐａｎ）３１２ｍｇ（０．１２ｍｍｏｌ）を、３ｍｌの無水エタノール中で混合し、全ての脂質が溶解するまで６７℃浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器中で、３１．５ｇ（３０ｍｌ）の１Ｎ水性八硫酸トリエチルアンモニウムスクロース溶液（０．２μｍ濾過、ｐＨ６．２０、実施例８を参照）を、６５℃浴上で予め加熱し、熱い脂質エタノール溶液中に撹拌しながら注ぎ入れた。得られた懸濁液を６５℃浴上で５分間撹拌し、６５℃の水を循環しながら加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出装置（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、４つの４７ｍｍの１００ｎｍ孔径および１つの２００ｎｍ孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを通して４００ｐｓｉで３回押し出した。得られた押し出されたリポソームを、冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、陽圧下で０．２μｍのポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。保持液の伝導度が２１μＳ／ｃｍ（１４．５倍量の交換）に低下するまで、ＭＶカットオフ５００ｋ

Ｄａを有するポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上での内毒素非含有水へのＴＦＦ緩衝液交換によってリポソーム外の捕捉剤（ＴＥＡ－ＳＯＳ）から９．２ｇの押し出されたリポソームを精製した。ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液中のリン脂質濃度を、ホスホモリブデンブルー分光測光法によって決定したところ、３１．３２±０．８５ｍＭであった。

【０４０３】

２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液（ＮａＯＨでｐＨ５．０２に調整）の形態の１４０ｍｇのＡＫＧ－２８（二塩酸塩として）を、ＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と混合して、１１６．１ｍｇ／ｍｌのデキストロースおよび２．５２ｍｇ／ｍｌの濃度のＡＫＧ－２８の存在下、２５０ｇ／ｍｏｌの薬物とリン脂質（ＤＬ）の比の充填混合物を形成させた。混合物（ｐＨ５．４３）を６５℃浴上で撹拌しながら２０分間インキュベートし、氷水中で急速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達させ、３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは５．８０であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを使用するＴＦＦによって精製した。リポソームを、透析濾過によって約９ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に予め濃縮し、合計１０．９倍量の交換にわたってＨＢＳ－７緩衝液中でのＴＦＦ交換によってリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームを、緩衝液を供給せずにＴＦＦ透析濾過を継続することによって約１２ｍｇ／ｍｌの薬物にさらに濃縮した。濃縮、精製されたリポソームを、０．２μｍの滅菌フィルターを無菌的に通過させ（ＨＢＳ－７緩衝液で追い出した）、ＤＬＳにより粒径について、ならびに分光法により薬物およびリン脂質濃度について分析した。リポソームは、以下の特徴を有していた：ＡＫＧ－２８　１０．６４±０．２０ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比２４６．８±１１．７ｇ／ｍｏｌリン脂質、Ｘｚ　１１６．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．００２２。製剤化された薬物の収量は、１１８．２ｍｇ（８４．４％）であった。

【０４０４】

［実施例３５］

［リポソームＡＫＧ－３８ロット２３４の調製物（ＨＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５モル比、捕捉剤１Ｎトリエチルアンモニウムスクロオクタ硫酸塩）］

実施例６の一般的な手順に従った。ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）３．３０ｇ（４．２０ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、高純度）１．９８５ｇ（５．１３ｍｍｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）５６７ｍｇ（０．２１ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ＤＳＰＥ　４５：５５：２．２５モル比）を７ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）中で混合し、全ての脂質が溶解するまで７０℃の浴上で撹拌しながら加熱した。別個の容器中で、１Ｎのトリエチルアンモニウムスクロオクタ硫酸塩（ＴＥＡ－ＳＯＳ）水溶液（０．２ミクロン濾過）１０ｍｌを７０℃の浴上で予熱し、撹拌しながら熱い脂質エタノール溶液に注いだ。得られた懸濁液を７０℃の浴上で１０分間撹拌し、循環７０℃の水で加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出機（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を用いて、２つの４７ｍｍ　１００ｎｍの孔径および１つの２００ｎｍの孔径ポリカーボネートトラックエッチング膜（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）の積層体を通して２６０ｐｓｉで８回、押し出した。得られた押出リポソームを冷蔵庫（２～８℃）中で一晩保持し、０．２μｍポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）フィルターを通して陽圧下で濾過した。リン脂質濃度は５４．６ｍＭであった。１１．３３ｇの押出リポソームを、ＭＷカットオフ５００ＫＤａ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）のポリスルホン中空繊維カートリッジを用いたＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステム上のエンドトキシン不含水のためのＴＦＦ緩衝交換によりリポソーム外の捕捉剤（ＴＥＡ－ＳＯＳ）から精製し、残留物の導電性が６４μＳ／ｃｍに低下するまで維持した（１３．８体積交換）。ＴＦＦ後リポソーム懸濁液中のリン脂質濃度は、ブルーリンモリブデン酸分光光度法により２８．６７±１．０１ｍＭであると測定した。

【０４０５】
ＡＫＧ－３８（遊離塩基）を０．９５当量の１Ｎ　ＨＣｌと混合し、エンドトキシン不含水で調製して、２０ｍｇ／ｍｌ水性原液（ｐＨ５．０９）を得た。溶液を０．２μｍフィルターに通し、２５０ｍｇの薬物を含有する濾液の量を、本実施例のＴＦＦ後リポソーム懸濁液と合わせて、１１６．４ｍｇ／ｍｌデキストロース、２．５３ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８濃度、ｐＨ５．２４の存在下で５００ｇ／ｍｏｌの薬物－リン脂質（ＤＬ）比で充填混合物を形成した。混合物を６５℃の浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、氷水中で迅速に冷却し、氷水浴中で約１０分間保持した。周囲温度に到達し、３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した後、ｐＨは６．６０であった。薬物充填リポソームを、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを用いて、ＴＦＦにより精製した。リポソームを、約１０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８への透析濾過によって予め濃縮し、全８．０体積交換のためにＨＢＳ－７緩衝液中へのＴＦＦ交換によって任意のリポソーム外の薬物から精製した。精製されたリポソームは、緩衝液供給なしでＴＦＦ透析濾過を継続することにより、さらに約２倍濃縮された。濃縮精製リポソームを無菌的に０．２μｍ滅菌フィルターに通し、ＤＬＳにより粒径を分析し、分光光度法により薬物およびリン脂質濃度を分析した。リポソームは、ＡＫＧ－３８　１５．７１±０．３３ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比５１８．６±１８．４ｇ／ｍｏｌリン脂質、リポソームサイズＸｚ　１１４．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２８４の特徴を有した。製剤化薬物の収量２３５．７ｍｇ（９４．３％）。

【０４０６】
［実施例３６］
［リポソームへのＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の充填効率および血漿中のリポソームによる薬物保持における浸透剤濃度の影響］
実施例６の一般的なプロトコールに従った。０．５Ｍ硫酸アンモニウムおよび４５：５５：２．２５：０．０６７５のモル比のＨＰＳＣ、コレステロール、ＰＥＧ－ＤＳＰＥおよびＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（蛍光脂質標識）の脂質組成物を含有する押出リポソームを実施例３０に記載されるように調製した。リポソームを、注射用水（ＷＦＩ）のための無エンドトキシン水（Ｈｙｃｌｏｎｅ）とのＴＦＦ交換により、シリンジ作動マイクロクロスポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ５００ＫＤａ、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）（１３．８体積交換、残留伝導率８８μＳ／ｃｍ、リン脂質濃度５５．４ｍＭ）を用いて、リポソーム外の硫酸アンモニウムから精製した。種々の濃度の浸透剤（デキストロース）の存在下、薬物濃度２．２２ｍｇ／ｍｌおよびＤＬ比２５０ｇ／ｍｏｌリン脂質（ＡＫＧ－２８）または４５０ｇ／ｍｏｌリン脂質（ＡＫＧ－３８）で、リポソームに、薬物（実施例３０および３１に記載されたように水性２０ｍｇ／ｍｌストックとして調製される）を、２０分間、６５℃の水浴中の水溶液中の精製押出リポソームとともにインキュベーションすることによって、ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８を充填した。Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂ、溶出液ＨＢＳ－７緩衝液を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによりカプセル封入されていない薬物を除去し、薬物およびリン脂質分析の結果から充填（カプセル封入）効率を測定した。浸透剤濃度は、絶対的な用語で、およびリポソームを形成するために使用される０．５Ｍ硫酸アンモニウム溶液に対して等浸透性であると決定された１６８ｍｇ／ｍｌデキストロース濃度のパーセントとして表した。リポソーム分野における一般的なコンセンサスからの期待に反して、薬物は、低浸透圧条件下（すなわち、リポソーム内捕捉剤溶液の浸透圧よりも低いリポソーム外の溶液の浸透圧で）でさえ、添加された浸透圧平衡剤（デキストロース）の完全な非存在下まで、開示のリポソームに効果的に充填された（封入効率が８５％を超え、大部分が９０％を超える）（表２２）。さらに、実施例１９に記載されたｉｎ　ｖｉｔｒｏ血漿放出アッセイの条件下で血漿に曝露すると、浸透剤の最低濃度で充填されたリポソーム中の薬物カプセル封入は、ほぼ完全な（８６．３％）浸透圧平衡で充填されたものと少なくとも同程度に安定であった。

【０４０７】

結果は、リポソームが５５ｍｏｌ％Ｃｈｏｌ、４５ｍｏｌ％ＰＣ、５ｍｏｌ％ＨＳＰＣでＰＥＧ－ＤＳＰＥ、および０．５ＭＡＳ捕捉剤でＡＫＧ－２８（表２２）とＡＫＧ－３８（表２３）の両方を効率＞８５％、大部分＞９０％で２５０または５００ｇ／ｍｏｌＰｈＬで充填し、デキストロースゼロパーセントまでの低浸透圧条件下で、低浸透圧条件下で充填したリポソームが血漿の存在下で薬物を効率的に保持することを示した。

【０４０８】

【表２８】

表22

ロットID	デキストロース, g/L	0.5 M ASによる浸透圧平衡%	アウトプットDL比, g/mol PhL	カプセル封入効率, %	リポソームに保持された薬物%, 80% 血漿, 20 分, 37°C	
					マウス	ヒト
237	144.9	86.3	243.1 ± 7.5	97.2 ± 3.0	98.8 ± 4.6	98.0 ± 4.0
238	130.4	77.6	243.1 ± 4.9	97.2 ± 2.0		
239	115.9	69.0	253.1 ± 5.2	101.2 ± 2.1		
240	86.9	51.8	246.1 ± 3.5	98.4 ± 1.4		
241	58.0	34.5	253.7 ± 8.1	101.5 ± 3.3		
242	29.0	17.3	246.5 ± 5.4	98.6 ± 2.2	99.4 ± 4.3	100.3 ± 4.9
243	0	0	249.2 ± 5.4	99.7 ± 2.2	100.6 ± 4.3	102.2 ± 4.8

【０４０９】

【表２９】

表23

ロットID	デキストロース, g/L	0.5 M ASと比較した浸透圧平衡%	アウトプットDL比, g/mol PhL	カプセル封入効率, %	リポソームに保持された薬物%, 80% 血漿, 20 分, 37°C	
					マウス	ヒト
244	144.9	86.3	464.9 ± 14.6	93.0 ± 2.9	82.0 ± 2.4	86.8 ± 2.8
245	130.4	77.6	463.5 ± 18.2	92.7 ± 3.6		
246	115.9	69.0	453.2 ± 8.7	90.6 ± 1.7		
247	86.9	51.8	459.8 ± 13.8	92.0 ± 2.8		
248	58.0	34.5	466.1 ± 14.5	93.2 ± 2.9	85.0 ± 3.3	89.6 ± 3.7
249	29.0	17.3	455.8 ± 12.9	91.2 ± 2.6	89.7 ± 3.1	92.8 ± 3.0
250	0	0	433.1 ± 17.7	86.6 ± 3.5	93.8 ± 3.5	91.2 ± 3.2

【０４１０】

［実施例３７］

［ラットにおけるＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の全形態（カプセル封入＋放出薬物）の単回用量薬物動態試験］

本研究は、ラットにおいてＬｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８を単回用量として投与

したＡＫＧ２８とＡＫＧ３８のＰＫを評価するために行われた。本研究は、雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおいて、体重１ｋｇあたり２０、４０、８０ｍｇのリポソームＡＫＧ－３８（Ｌｓ－ＡＫＧ３８）、または体重１ｋｇあたり１０、２０、４０ｍｇのリポソームＡＫＧ－２８（Ｌｓ－ＡＫＧ２８）のＩＶ投与を用いて行われた。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２７５）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２７６）を、それぞれ実施例２２および２３に記載したように調製した。比較のため、０．５％メチルセルロースを製剤化したリネゾリド５０ｍｇ／ｋｇ体重を強制経口投与し、２０ｍｇ／ｍＬの濃度でｐＨ３～４（Ｓｉｇｍａ　Ｍ０４３０）に酸性化した。血漿薬物測定のために、血液０．５ｍＬをリチウムヘパリンチューブに５分、１５分、１時間、３時間、６時間、２４時間、４８時間、および７２時間で回収した。試料を遠心分離し、得られた血漿を分離し、二重透明ポリプロピレンチューブに移し、ドライアイス上で直ちに凍結し、分析まで－８０℃で保存した。ラットの血漿中濃度をＨＰＬＣにより決定した。Ｐｈｏｅｎｉｘ　ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（バージョン７．０）を用いて非コンパートメントＰＫ分析を行った。Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８については、このＰＫソフトウェアを使用して、血漿最大濃度（C_{max}）、血漿最大濃度を用量で割った値（C_{max}／用量）、C_{max}の時間（T_{max}）、最後に測定された濃度（C_{last}）、最後に測定された濃度の時間（T_{last}）、０ｈから最後の時点までの時間曲線に対する血漿濃度下面積（AUC_{0-last}）および０ｈから無限大（AUC_{0-inf}）、AUC_{0-last}を用量で割った値（AUC_{0-last}／用量）、クリアランス（ＣＬ）、分布体積（Ｖｄ）、および排出半減期（Ｔ１／２）を推定した。リネゾリドについては、このＰＫソフトウェアを用いて、見かけのクリアランス（ＣＬ／Ｆ）および見かけの分布体積（Ｖｄ／Ｆ）以外の同じＰＫパラメータを推定した。

【０４１１】

１０、２０、および４０ｍｇ／ｋｇの単回ＩＶ内投与（ＩＶ×１）でのＬｓ－ＡＫＧ２８の投与後の全薬物の血漿濃度対時間プロファイルを図７に示す。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を１０、２０、４０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１で投与した後の全薬物の血漿ＰＫパラメータの概要を表２４に示す。

【０４１２】

全用量で、Ｌｓ－ＡＫＧ２８の血漿濃度対時間プロファイルは５分から７２時間まで検出可能であった。C_{max}／用量およびＡＵＣ／用量の結果に基づき、Ｌｓ－ＡＫＧ２８の血漿ＰＫは１０、２０、および４０ｍｇ／ｋｇ投与後に直線（用量比例）であった。全用量で、Ｌｓ－ＡＫＧ３８（約２．５９ｍＬ／ｈ／ｋｇ）の血漿クリアランス（ＣＬ）はＬｓ－ＡＫＧ２８（約１．６７ｍＬ／ｈ／ｋｇ）より大きかった。同じ用量（２０または４０ｍｇ／ｋｇ）で、Ｌｓ－ＡＫＧ２８のＶｄはＬｓ－ＡＫＧ３８より大きかった。

【０４１３】

【表３０】

表 24. 10、20、および 40 mg/kg IVでLs-AKG28の投与後の全薬物についての血漿PKパラメータの概要

PKパラメータ 全AKG28	リネゾリド	Ls-AKG28		
	50 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
C_{max} [μg/mL]	26.73	272.23	413.83	577.70
C_{max} / 用量 [μg/mL]/[mg/kg]	0.53	27.22	20.69	14.44
T_{max} [hr]	1.0	0.083	0.083	0.083
C_{last} [μg/mL]	5.35	8.95	31.05	94.89
T_{last} [hr]	24.0	72	72	72
$AUC_{0\text{-}last}$ [hr*μg/mL]	282.01	5,565.17	11,287.31	20,712.25
$AUC_{0\text{-}last}$ / 用量 [hr*μg/mL]/[mg/kg]	5.64	556.52	564.37	517.81
$AUC_{0\text{-}inf}$ [hr*μg/mL]	373.53	5,764.67	12,143.11	24,218.25
クリアランス [mL/hr/kg]	133.86	1.73	1.64	1.65
Vd [mL/kg]	2,291.26	38.66	45.40	61.03
$T_{1/2}$ [hr]	11.86	15.45	19.11	25.61

【０４１４】

図８に、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の２０、４０、および８０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１での投与後の全薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示す。

【０４１５】

表２５に、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の２０、４０、８０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１投与後の全薬物の血漿ＰＫパラメータの概要を示す。

【０４１６】

全用量で、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の血漿濃度対時間プロファイルは５分から７２時間まで検出可能であった。Ｃｍａｘ／用量およびＡＵＣ／用量の結果に基づいて、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の血漿ＰＫは２０、４０、および８０ｍｇ／ｋｇの投与後に直線（用量比例）であった。全用量で、Ｌｓ－ＡＫＧ３８（約２．５９ｍＬ／ｈ／ｋｇ）の血漿クリアランス（ＣＬ）はＬｓ－ＡＫＧ２８（約１．６７ｍＬ／ｈ／ｋｇ）より大きかった。同じ用量（２０または４０ｍｇ／ｋｇ）で、Ｌｓ－ＡＫＧ２８のＶｄはＬｓ－ＡＫＧ３８より大きかった。

【０４１７】

【表３１】

表 25. 20、40、および 80 mg/kg IVでLs-AKG38の投与後の全薬物についての血漿PKパラメータの概要

PK パラメータ 全 AKG38	リネゾリド	Ls-AKG38 用量		
	50 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
C_{max} [μg/mL]	26.73	452.84	856.42	1,555.85
C_{max} / 用量 [μg/mL]/[mg/kg]	0.53	22.64	21.41	19.44
T_{max} [hr]	1.0	0.083	0.083	0.083
C_{last} [μg/mL]	5.35	1.29	5.29	27.14
T_{last} [hr]	24.0	72	72	72
$AUC_{0\text{-}last}$ [hr*ug/mL]	282.01	7,532.62	15,402.45	31,313.26
$AUC_{0\text{-}last}$ / 用量 [hr*μg/mL]/[mg/kg]	5.64	376.63	385.06	391.42
$AUC_{0\text{-}inf}$ [hr*μg/mL]	373.53	7,548.80	15,468.95	31,784.91
クリアランス [mL/hr/kg]	133.86	2.65	2.59	2.52
Vd [mL/kg]	2,291.26	33.26	32.48	43.74
$T_{1/2}$ [hr]	11.86	8.70	8.71	12.05

【０４１８】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８を１０、２０、および４０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１で投与した後、ならびにＬｓ－ＡＫＧ３８を２０、４０、および８０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１で投与した後の全薬物の血漿濃度対時間プロファイルをそれぞれ図７および図８に示す。単回ＩＶ用量研究では、全用量において、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の血漿濃度対時間プロファイルが５分から７２時間まで検出可能であった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８の血漿ＰＫは、１０、２０、４０ｍｇ／ｋｇ投与後には直線（用量比例）であった。Ｌｓ－ＡＫＧ３８の血漿ＰＫは、２０、４０、および８０ｍｇ／ｋｇ投与後に直線（用量比例）であった。全用量で、Ｌｓ－ＡＫＧ３８（約２．５９ｍＬ／ｈ／ｋｇ）の血漿クリアランス（ＣＬ）はＬｓ－ＡＫＧ２８（約１．６７ｍＬ／ｈ／ｋｇ）より大きかった。同じ用量（２０または４０ｍｇ／ｋｇ）で、Ｌｓ－ＡＫＧ２８のＶｄはＬｓ－ＡＫＧ３８より大きかった。４０ｍｇ／ｋｇでのＬｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８の全血漿ＰＫ曝露量は、リネゾリドの血漿ＰＫ（０から最後までのＡＵＣを使用）の約７３倍と約１１０倍高かった。

【０４１９】

血漿中のＡＵＣおよび循環中の薬物持続性は、リネゾリドと比較して両リポソーム製剤ではるかに大きかった。ＡＵＣ／用量の値によって見られるように線形用量依存性を有する両リポソーム製剤のＰＫは、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８にそれぞれ非常に類似している。

【０４２０】

［実施例３８］

［Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける反復ＩＶ投薬後の全形態（カプセル封入＋放出）のＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の血漿薬物動態（ＰＫ）］

本研究は、ラットにおいて、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８の漸増用量で、計８週間、週１回投与したＡＫＧ２８とＡＫＧ３８のＰＫを評価するために行われた。この試験は、Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに ＩＶ投与して行われた。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２７５）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２７６）を実施例２２および２３にそ

れぞれ記載したように調製し、ラットにおける血漿濃度をＨＰＬＣにより決定した。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を１０、２０、および４０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１で、１日目、１５日目、２９日目、および４３日目に投与した後の全薬物の血漿濃度対時間プロファイルを、表２６および図９Ａ、図９Ｂ、および図９Ｃに示す。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を１０、２０、４０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１日目、１日目、１５日目、２９日目、４３日目に投与した後の全薬物の血漿ＰＫパラメータの概要を表２６に示す。図９Ａ、図９Ｂ、および図９Ｃの全てのデータは、表２６におけるＰＫパラメータ結果を生成するために使用された。

【０４２１】

単回および複数回用量のＰＫ研究では、Ｌｓ－ＡＫＧ２８の血漿中動態は初回投薬後に同様であった。１０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８では、血漿C_{max}とＡＵＣは第１、１５、２９、および４３日で同様であった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８の２０ｍｇ／ｋｇでは、血漿C_{max}とＡＵＣは２９日目と４３日目に増加した。４０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８では、血漿C_{max}とＡＵＣは１～４３日目の投薬後に増加した。

【０４２２】

表２７および図１０Ａ、図１０Ｂ、および図１０Ｃに、１日目、１５日目、２９日目、および４３日目にＬｓ－ＡＫＧ３８を２０、４０、および８０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ×１で投与した後の全薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示す。表２７に、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の２０、４０、８０ｍｇ／ｋｇ静注×１日目、１日目、１５日目、２９日目、４３日目に投与した後の全薬物の血漿ＰＫラメータの概要を示す。単回および複数回用量のＰＫ試験では、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の血漿中動態は初回投薬後と同様であった。２０、４０、８０ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ３８では、血漿C_{max}とＡＵＣは１日目から４３日目に増加した。非細胞傷害性薬物ペイロードを含むペグ化リポソームに対する血液クリアランス（ＡＢＣ）の加速に対する懸念を考慮すると、後のサイクルでクリアランスの増加がないことは驚くべきことであり、ＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８を含有するリポソームは哺乳動物に慢性的に投薬し得ることが示唆される。

【０４２３】

【表３２】

表26. 1、15、29、および43日目に10、20、および40 mg/kg IV x 1でLs-AKG28の投与後に全薬物についての血漿PKパラメータの概要

	C_{max} [µg/mL]	$AUC_{0\text{-}last}$ [hr*µg/mL]	クリアランス [mL/hr/kg]	Vd [mL/kg]	$T_{1/2}$ [hr]
Ls-AKG28 (10 mg/kg) - d1	271.28	7,766.70	0.92	36.01	27.27
Ls-AKG28 (10 mg/kg) - d15	270.78	6,093.17	1.36	36.94	18.83
Ls-AKG28 (10 mg/kg) - d29	277.67	6,807.48	1.19	34.84	20.23
Ls-AKG28 (10 mg/kg) - d43	292.14	7,780.12	0.93	34.37	25.48
Ls-AKG28 (20 mg/kg) - d1	423.81	11,133.88	1.49	42.87	19.99
Ls-AKG28 (20 mg/kg) - d15	514.07	11,757.75	1.36	39.97	20.41
Ls-AKG28 (20 mg/kg) - d29	560.15	14,997.08	1.00	35.06	24.31
Ls-AKG28 (20 mg/kg) - d43	561.51	15,702.04	0.91	35.13	26.73
Ls-AKG28 (40 mg/kg) - d1	596.89	19,970.35	1.63	53.70	22.88
Ls-AKG28 (40 mg/kg) - d15	1,018.25	26,606.26	1.07	40.29	26.02
Ls-AKG28 (40 mg/kg) - d29	1,163.03	33,635.70	0.81	34.14	29.19
Ls-AKG28 (40 mg/kg) - d43	1,269.07	37,580.42	0.73	30.78	29.17

【０４２４】

【表３３】

表 27. 1、15、29、および43日目に20、40、および80 mg/kg IV x 1でLs-AKG38の投与後に全薬物についての血漿PKパラメータの概要

	C_{max} [μg/mL]	$AUC_{0\text{-}last}$ [hr*μg/mL]	クリアランス [mL/hr/kg]	Vd [mL/kg]	$T_{1/2}$ [hr]
Ls-AKG38 (10 mg/kg) - d1	485.39	7,702.72	2.49	38.12	10.61
Ls-AKG38 (10 mg/kg) - d15	529.93	8,792.21	2.16	35.41	11.36
Ls-AKG38 (10 mg/kg) - d29	576.14	9,875.80	1.89	34.05	12.52
Ls-AKG38 (10 mg/kg) - d43	639.70	12,053.96	1.53	29.59	13.43
Ls-AKG38 (20 mg/kg) - d1	880.03	15,364.53	2.50	38.91	10.78
Ls-AKG38 (20 mg/kg) - d15	1,011.05	18,314.30	2.07	35.16	11.78
Ls-AKG38 (20 mg/kg) - d29	1,017.30	21,373.77	1.69	35.96	14.74
Ls-AKG38 (20 mg/kg) - d43	1,013.54	23,414.28	1.51	35.57	16.38
Ls-AKG38 (40 mg/kg) - d1	1,648.38	31,180.74	2.41	43.10	12.40
Ls-AKG38 (40 mg/kg) - d15	2,025.67	38,874.97	1.90	36.31	13.21
Ls-AKG38 (40 mg/kg) - d29	2,231.92	45,921.63	1.62	31.15	13.36
Ls-AKG38 (40 mg/kg) - d43	2,428.35	50,694.28	1.45	29.22	13.99

【０４２５】

［実施例３９］

［ＣＤ－１マウスにおけるＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の薬物およびリポソーム脂質の薬物動態研究］

本研究は、ｉｎ ｖｉｖｏ血漿中の薬物およびリポソーム脂質の血中薬物動態パラメータ、ならびにＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のリポソーム製剤のリポソームにおける薬物保持の安定性を決定するために設計された。試験は、実施例７の一般的なプロトコールに記載されているように、雄ＣＤ－１（２０～２２ｇ）マウスについて行われた（時間点あたり５匹のマウス）。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２３５）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２３６）を、それぞれ実施例３０および３１に記載したように調製した。５０ｍｇ／ｋｇ（Ｌｓ－ＡＫＧ２８）または９０ｍｇ／ｋｇ（Ｌｓ－ＡＫＧ３８）の用量のリポソームを時間０に側尾静脈に注射し、血液を注射後０．０８３、１、３、６、２４、および４８時間に採取した。ＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－３８および蛍光リポソーム脂質標識（ＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳ）の血漿濃度をＨＰＬＣにより決定した。リポソームロット２３５および２３６を標準として、蛍光標識定量からリポソームリン脂質の血漿濃度を計算した。非カプセル封入オキサゾリジノン薬物の組織親和性は、リポソームカプセル封入薬物のそれよりも何倍も高いことが予想されるため（例えば、ラットにおけるリポソームカプセル封入ＡＫＧ－２８のＶｄ３３．２７～４３．７４ｍＬ／ｋｇと比較して、非カプセル封入オキサゾリジノン、リネゾリドのＶｄ２，２９１．２６ｍＬ／ｋｇによって支持されるように、実施例３７を参照されたい。）、血漿薬物濃度は主にリポソーム関連薬物に起因すると考えられ、元の（注射前）ＤＬ値に対して標準化された血漿薬物－リポソーム脂質（ＤＬ）比はリポソームによる薬物保持の尺度として採用された。非コンパートメントＰＫ分析は、Ｓｕｍｍｉｔ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＰＫ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ ２．０を用いて行われた。Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８については、このＰＫソフトウェアを使用して、血漿最大濃度（C_{max}）、血漿最大濃度を用量で割った値（C_{max}／用量）、C_{max}の時間（T_{max}）、最後に測定された濃度（C_{last}）、最後に測定された濃度の時間（T_{last}）、０ｈから最後の時点までの時間曲線

に対する血漿濃度下面積（ＡＵＣ$_{0-last}$）および０ｈから無限大（ＡＵＣ$_{0-inf}$）、ＡＵＣ$_{0-last}$を用量で割った値（ＡＵＣ$_{0-last}$／用量）、クリアランス（ＣＬ）、分布体積（Ｖｄ）、および排出半減期を推定した。

【０４２６】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８（図１１Ａ）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（図１１Ｂ）の投与後の薬物の血漿濃度対時間プロファイルを示す。表２８に、血漿中のＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８薬物の血漿ＰＫパラメータの概要を示し、表２９に、リポソームリン脂質の概要を示す。図１１Ｃおよび表３０に、ｉｎ　ｖｉｖｏでの薬物カプセル封入の安定性を示すＤＬ比の動力学を示す。

【０４２７】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８は、ほぼ完全なｉｎ　ｖｉｖｏ安定性を有し、マウスにおけるＩＶ注射後の４８時間まで、薬物の検出不能な喪失を伴う。Ｌｓ－ＡＫＧ２８の薬物放出の半減期は、一指数式（R^2＝０．８２２）を用いると８６６．３時間である。Ｌｓ－ＡＫＧ２８は薬物放出速度が速い。Ｌｓ－ＡＫＧ３８の薬物放出の半減期は、一指数式（R^2＝０．９５０）を用いると２２．９時間である。

【０４２８】

【表３４】

表28. Ls-AKG28 および Ls-AKG38の投与後の薬物についての血漿PKパラメータの概要

PK パラメータ	Ls-AKG28	Ls-AKG38
C_{max} [mg/L]	1261.1	2320.3
C_{max} / 用量 [mg/L]/[mg/kg]	25.22	25.78
T_{max} [hr]	0.083	0.083
C_{last} [mg/L]	81.17	41.48
T_{last} [hr]	48	48
AUC_{0-last} [hr*mg/L]	19,820	30,346
AUC_{0-last} / 用量 [hr*mg/L]/[mg/kg]	396.4	337.2
AUC_{0-inf} [hr*mg/L]	21,156	45,114
クリアランス [mL/hr/kg]	2.35	2.93
Vd [mL/kg]	42.13	30.12
$T_{1/2}$ [hr]	12.42	7.14

【０４２９】

【表３５】

表29. Ls-AKG28 および Ls-AKG38の投与後のリポソーム性リン脂質についての血漿PKパラメータの概要

PK パラメータ	Ls-AKG28	Ls-AKG38
C_{max} [mol/L]	0.00485	0.00493
C_{max} / 用量 [mol/L]/[mol/kg]	24.87	25.54
T_{max} [hr]	0.083	0.083
C_{last} [mol/L]	0.00033	0.00041
T_{last} [hr]	48	48
$AUC_{0\text{-}last}$ [hr*mol/L]	0.0769	0.0817
$AUC_{0\text{-}last}$ / 用量 [hr*mol/L]/[mol/kg]	394.3	421.1
$AUC_{0\text{-}inf}$ [hr*mol/L]	0.0826	0.0979
クリアランス [mL/hr/kg]	2.34	2.17
Vd [mL/kg]	43.3	41.0
$T_{1/2}$ [hr]	12.82	13.09

【０４３０】

【表３６】

表30.マウスにおけるIV 投与後のLs-AKG28 および Ls-AKG38の血漿薬物とリポソーム性リン脂質の比

時間 (h)	Ls-AKG28薬物とリン脂質の比		Ls-AKG38薬物とリン脂質の比	
	元の(%)	標準偏差	元の(%)	標準偏差
0.083	101.1	1.75	101.7	4.29
1	102.4	2.10	97.6	1.56
3	101.9	1.27	94.2	4.20
6	101.2	0.89	97.4	2.08
24	98.7	1.92	63.3	2.36
48	98.4	2.54	22.7	1.75

【０４３１】

［実施例４０］

［リポソームの反復投薬後のマウスにおけるＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８薬物の薬物動態研究、ＡＢＣ効果の存在］

抗ＰＥＧ抗体の生成は、加速された血液クリアランスとして公知である現象である、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート（ペグ化リポソーム）を含有するリポソームのより速いクリアランス（ＡＢＣ）効果を、反復注射後に引き起こすことが示されている（Ｉｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １０５（

２００５）３０５－３１７；Ｌａｖｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＪＰＥＴ ２９８（２００１）６０７－６１２）。本研究は、種々の組成物を有するＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の種々の用量の反復投与後にＡＢＣ効果があるかどうかを決定するために行われた。リポソームは、実施例３３～３５、ロット２３１、２３２、２３３および２３４に従って調製された。この研究は、実施例７に一般的に記載したように、雄ＣＤ－１マウスに対して行われた。群５匹のマウスを用いた。マウスにおけるＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の血漿濃度をＨＰＬＣにより決定した。マウスは、指示された用量および製剤を週１回、計４回注射された。薬物は、１回目および４回目の投薬後の６時間の時間点で血漿中で測定した（図１２）。試験した群のいずれも、４回目の注射の有意な加速されたクリアランスを示さなかった（両側偏差ｔ検定、全てのｐ値＞０．０５）。このデータは、これらのリポソーム性オキサゾリジノンは、薬物曝露に有意な負の影響を与えることなく、週１回のサイクルを複数回にわたって慢性的に投薬できることを確認する。

【０４３２】

【表３７】

表31. Ls-AKG28およびLs-AKG38の投与後のリポソーム性リン脂質に対するLs-AKG28およびLs-AKG38の血漿薬物濃度。 略語: SOS, 1 N TEA-SOS; AS, 0.5 M 硫酸アンモニウム; Chol, コレステロールとHSPCの合計のmol%としてのコレステロール含量; DL,薬物と脂質の比, g/mol リポソームリン脂質; %ID-注射用量のパーセント, 群ごとの平均; SD-標準偏差.

						１回目投薬		４回目投薬	
群	薬物	捕捉剤	Chol (mol%)	DL 比	注射用量 (mg/kg)	%ID	SD	%ID	SD
1	AKG-28	SOS	40	266.9	65	61.99	7.20	55.71	13.88
2	AKG-28	SOS	40	266.9	90	55.74	6.73	63.23	11.07
3	AKG-28	AS	55	252.5	65	56.15	18.3	70.17	3.91
4	AKG-28	AS	55	252.5	90	62.90	3.41	67.11	7.67
5	AKG-38	SOS	55	538.1	90	54.67	6.49	51.57	8.55
6	AKG-38	SOS	55	538.1	120	58.53	9.52	56.79	6.29
7	AKG-38	AS	55	524.5	90	53.57	1.20	44.25	8.66
8	AKG-38	AS	55	524.5	120	55.39	7.99	48.95	8.66

【０４３３】

このデータは、４サイクルの処置後に、本開示に係るリポソームＡＫＧ－２８またはリポソームＡＫＧ－３８の血液クリアランス速度が、リポソームに関連する細胞傷害性薬物を含有しない他のペグ化リポソームについて以前に報告されたものとは対照的に、増加しなかったことを示す。

【０４３４】

［実施例４１］

［ＣＤ－１マウスにおけるリポソームＡＫＧ－２８およびリポソームＡＫＧ－３８の用量依存的忍容性］

本研究の目的は、マウスに異なる用量で単剤として注射したＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の忍容性を評価することであった。２０～２２ｇ（各群５匹）の雌ＣＤ－１マウスは、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０、６５、９０または１００ｍｇ／ｋｇ／用量）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（５０、９０、１２０または２００ｍｇ／ｋｇ／用量）を週１回、４週間、静脈内注射（尾静脈）で投与された。リポソーム製剤（Ｌｓ－ＡＫＧ２８ロット２３１およびＬｓ－ＡＫＧ３８ロット２３２）は、実施例３３に先に記載したように調製された。対照群は、同量のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ＨＢＳ、ｐＨ７）を４週間、週１回注射された。研究期間中、体重を週３回測定し、データは０日目に測定した体重に対する体重変化のパーセンテージとして提示した。

【０４３５】

研究終了時（最終処置から７２時間後）にCO_2吸入を用いて動物を安楽死させた。血液試料を心臓穿刺によって回収し、血液学的分析のためにＥＤＴＡがプレフィルドされた

マイクロテーナー（ホモロジーＡＤＶＩＡ　１２０／２１２０ｉ　Ａｎａｌｙｚｅｒ）および血漿分離のためにリチウムヘパリンでプレフィルドされたマイクロテーナーに移した。血漿を１００００ｒｐｍで５分間遠心分離により細胞画分から分離し、生化学分析に使用した（Ｃｏｂａｓ　６０００　Ａｎａｌｙｚｅｒ）。組織試料（肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、小腸、および柱）を、１０％緩衝ホルマリンをプレフィルドした５０ｍｌチューブに回収し、２４時間後に７０％エタノールに置き換えた。組織をパラフィンに包埋し、切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色し、委員会の認定を受けた獣医病理学者により組織病理学的検査を行った。

【０４３６】

図１３Ａおよび図１３Ｂに示すように、生理食塩水対照群と比較して、Ｌｓ－ＡＫＧ２８については９０ｍｇ／ｋｇまでの用量で、およびＬｓ－ＡＫＧ３８については２００ｍｇ／ｋｇまでの用量で、合計４週間の用量で処理した場合、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８の両方について観察されたマウス体重に有意な影響はなかった。

【０４３７】

対照群と比較して、高用量のＬｓ－ＡＫＧ３８（９０、１２０および２００ｍｇ／ｋｇ）で処理されたマウスでは、生理食塩水対照群と比較して、赤血球数およびヘマトクリット（図１３Ｃ）の有意な減少はなかった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を投与したマウスでは、このような効果は観察されなかった。最高用量９０ｍｇ／ｋｇ（図１３Ｃ）でＬｓ－ＡＫＧ２８で処理されたマウスにおいて、対照群と比較して血小板数の有意な減少が見られたが、生理食塩水対照と比較して依然として２５％未満の減少であった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８のいずれかによる処置は、白血球（ＷＢＣ）数または血中肝酵素（ＡＬＴおよびＡＳＴ）のそれに有意な影響を及ぼさなかった。

【０４３８】

組織病理学的分析では、５０および６５ｍｇ／ｋｇのＬｓ－ＡＫＧ２８を投与された動物において被験物質に関連した所見は示されなかった（図１３Ｄ）。９０ｍｇ／ｋｇのＬＳ－ＡＫＧ２８を投与された動物の肝臓、脾臓、および腎臓において、マクロファージ（クッパー細胞を含む）の最小限の空胞化からなる被験物質に関連する所見が認められた。Ｌｓ－ＡＫＧ３８による処置は、９０ｍｇ／ｋｇおよび１２０ｍｇ／ｋｇの用量で、肝臓および脾臓において被験物質に関連した所見と関連していた。肝臓では、５０および９０ｍｇ／ｋｇで軽度から軽度の空胞化およびクッパー細胞の肥大、５０および１２０ｍｇ／ｋｇで中等度のクッパー細胞の空胞化および肥大、９０ｍｇ／ｋｇおよび１２０ｍｇ／ｋｇで空胞化マクロファージの最小限の多巣性凝集が認められた。

【０４３９】

最高用量のＬｓ－ＡＫＧ３８（２００ｍｇ／ｋｇ）での処置は、肝臓および脾臓における髄外造血（ＥＭＨ）のわずかな増加、軽微ないし軽度の多巣性混合細胞浸潤、および肝臓におけるごくわずかな個々の肝細胞壊死、ならびにごく軽微な限局性肝細胞壊死と関連していた（図１３Ｄ）。これらの顕微鏡的所見は、被験物質に関連したものとは考えられなかったが、これは、この動物種によく見られるバックグラウンド所見であったためである。

【０４４０】

全般的に、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８単独療法の両方は、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８に対してそれぞれ９０と２００ｍｇ／ｋｇのリポソーム薬物を各々の最高評価用量で注射した場合でさえも、マウスにおいて良好なｉｎ　ｖｉｖｏ忍容性を示した。

【０４４１】

［実施例４２］

［マウスにおけるＢＤＱ／ＰＭＤまたはＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８のｉｎ　ｖｉｖｏ忍容性］

本実施例では、リポソーム性オキサゾリジノンのｉｎ　ｖｉｖｏ忍容性を、治療に関連する抗ＴＢ薬物と併用して評価した。ベダキリン、プレトマニド、およびリネゾリド（Ｂ

ＤＱ／ＰＭＤ／ＬＮＺまたはＢＰＬ）、またはベダキリン、プレトマニド、およびモキシフロキサシン（ＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸＩまたはＢＰＭ）の３つの薬物レジメンは、多剤耐性結核を処置する場合、臨床において強い活性を示したが（Ｃｏｎｒａｄｉｅ ｅｔ ａｌ（２０２０）Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３８２（１０）８９３－９０２ ａｎｄ Ｔｗｅｅｄ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｌａｎｃｅｔ Ｒｅｓｐｉｒ Ｍｅｄ ７（１２）１０４８－１０５８）、ＢＰＬレジメンは、主にリネゾリドの追加に関連する毒性によって制限されている（Ｃｏｎｒａｄｉｅ ｅｔ ａｌ（２０２０）Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３８２（１０）８９３－９０２）。ここでは、２種のリポソーム性オキサゾリジノン、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の安全性および忍容性を、ＢＰＬレジメンにおけるリネゾリドの置換またはＢＰＭレジメンへの追加のいずれかにより、両レジメンの一部として使用した場合に評価した。ＣＤ－１マウス（各群５匹）を、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２３１）もしくはＬｓＡＫＧ３８（ロット２３２）単独、またはベダキリン（ＢＤＱ）およびプレトマニド（ＰＭＤ）併用のいずれかで処理した。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２３１）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２３２）を実施例３３に記載したように調製した。さらに、マウスをＢＤＱ、ＰＭＤおよびモキシフロキサシン（ＭＯＸＩ）およびリポソームオキサゾリジノンの三重組合せで同時処理した。

【０４４２】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇ／用量）およびＬｓＡＫＧ３８（９０ｍｇ／ｋｇ／用量）を、尾静脈を介して週１回、４週間、静脈内注射した。ＢＤＱ、ＰＭＤおよびＭＯＸＩの併用（それぞれ２５／１００／１００ｍｇ／ｋｇ／用量）を1日1回、週５回、４週間強制経口投与した。追加の対照として、マウスは、１００ｍｇ／ｋｇ／用量を1日1回、週５回、４週間、経口的に与えられる、ＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸまたはＢＤＱ／ＰＭＤ（それぞれ２５／１００ｍｇ／ｋｇ／用量）＋リネゾリド（ＬＮＺ）で処理された。体重測定、組織回収および分析は、実施例４１にて前述したように行った。

【０４４３】

図１４Ａおよび図１４Ｂに示すように、マウス体重に対するＬｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８のいずれも、ＢＤＱ／ＰＭＤ（ＢＰ）またはＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸ（ＢＰＭ）と併用して同時処理した場合には、有意な効果は研究中に観察されなかった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓＡＫＧ３８はともに、ＢＤＱ／ＰＭＤまたはＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸと組み合わせて良好な忍容性を示し、処置されたマウスにおける血液学または血液生化学に影響を及ぼさなかった（図１４Ｃ）。

【０４４４】

組織病理学的データ（図１４Ｄ）は、ＢＤＱ／ＰＭＤと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８の場合、処理に関連した変化を示さなかった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８＋ＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸの組合せは、肺および心臓における混合細胞および単核細胞浸潤と関連する最小限の事象を有する。単剤療法としてのＬｓ－ＡＫＧ３８による処置は、肝臓において最小限の被験物質に関連した所見（炎症性浸潤および肝細胞壊死）と関連していた。Ｌｓ－ＡＫＧ３８＋ＢＤＱ／ＰＭＤの投与は、処置に関連した所見を示さず、Ｌｓ－ＡＫＧ３８＋ＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸの併用は、肺における最小限の混合細胞浸潤と関連した。ＢＤＱ／ＰＭＤ／ＬＮＺ併用により処理された動物は、肝臓の炎症性浸潤、最小限の肝細胞壊死、および肺の空胞化マクロファージの浸潤の処置関連所見と関連した。したがって、Ｌｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇ／用量）とＬｓ－ＡＫＧ３８（９０ｍｇ／ｋｇ／用量）の両方を週１回、４週間投与すると、ＢＤＱ／ＰＭＤまたはＢＤＱ／ＰＭＤ／ＭＯＸと組み合わせたマウスにおいて良好な忍容性が示された。

【０４４５】

［実施例４３］

［マウスにおけるＢＤＱ／ＰＭＤと組み合わせたＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の忍容性における用量スケジューリングの効果］

本研究では、週２回投与したＬｓ－ＡＫＧ２８（５０ｍｇ／ｋｇ／用量）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（１００ｍｇ／ｋｇ／用量）のｉｎ ｖｉｖｏ忍容性を、週１回投与したＬｓ

－ＡＫＧ２８（１００ｍｇ／ｋｇ／用量）またはＬｓ－ＡＫＧ３８（２００ｍｇ／ｋｇ／用量）と比較した。リポソームを実施例２５（Ｌｓ－ＡＫＧ３８、ロット２７９）および実施例２６（Ｌｓ－ＡＫＧ２８、ロット２８１）に従って調製した。両リポソーム薬物を、ＣＤ－１雌マウス（各群５匹）に単独またはＢＤＱ／ＰＭＤ（ＢＰ）と組み合わせて注射した。ＢＤＱ／ＰＭＤ（それぞれ２５および１００ｍｇ／ｋｇ／用量）を１日１回、週５回、４週間強制経口投与した。対照群には、ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ＨＢＳ、ｐＨ７）を４週間、週１回注射した。血液および組織試料を回収し、実施例４１および４２に記載したように分析した。

【０４４６】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８を週２回またはより高い用量で週１回投与したマウスの単独療法および併用療法のいずれも、体重（図１５Ａおよび図１５Ｂ）または血球数および生化学（図１５Ｃ）に影響を及ぼさなかった。

【０４４７】

回収された組織の組織病理学的分析（図１５Ｄ）では、５０ｍｇ／ｋｇ（２ｑｗ）のＬｓ－ＡＫＧ２８を投与されたマウス５匹中２匹にマクロファージと好中球からなる微小な間質性混合細胞浸潤、および１００ｍｇ／ｋｇ（１ｑｗ）のＬｓ－ＡＫＧ２８を投与された動物５匹中１匹に軽度の間質性混合細胞浸潤が認められた。

【０４４８】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８＋ＢＰを５０ｍｇ／ｋｇ（１ｑｗ）で投与されたマウスの肺では、マクロファージ（５匹中１匹）または混合型（マクロファージおよび好中球）炎症細胞（５匹中３匹）からなるわずかな間質浸潤が認められた。１００ｍｇ／ｋｇ（１ｑｗ）のＬｓ－ＡＫＧ２８＋ＢＰを投与されたマウスでは、５匹中４匹にわずかな間質性混合細胞浸潤が認められた。さらに、Ｌｓ－ＡＫＧ２８＋ＢＰを１００ｍｇ／ｋｇ（１ｑｗ）で投与された５匹中２匹の動物の肺に、淡い好塩基性異物と関連する軽微な多巣性異物肉芽腫が認められた。これらの顕微鏡的所見は、Ｌｓ－ＡＫＧ２８＋ＢＰ５０ｍｇ／ｋｇ（２ｑｗ）を投与された動物５匹中１匹の肝臓において、軽微な多巣性混合細胞浸潤およびごくわずかな個々の肝細胞壊死がこの種での共通のバックグラウンド所見としての発生のため、被験物質に関連したものとは考えられなかった。

【０４４９】

Ｌｓ－ＡＫＧ３８処置に関連する同様の顕微鏡的所見（単独または併用）は、被験物質との関連性はないと考えられ、肝臓および脾臓における髄外造血（ＥＭＨ）のわずかな増加、肝臓におけるわずかないし軽度の多巣性混合細胞浸潤およびごくわずかな個々の肝細胞壊死、肺におけるわずかな限局性肝細胞壊死、ごくわずかな限局性異物肉芽腫（淡い好塩基性異物と関連）、および肺におけるわずかな混合細胞浸潤が含まれた。これらの所見は、その軽微から軽度の性質、散発的な発生率、生理食塩水対照群での存在、およびこの種での共通のバックグラウンド所見としての発生のため、処置に関連したものとはみなされなかった。

【０４５０】

したがって、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８（単独またはＢＤＱ／ＰＭＤとの併用）をそれぞれ５０ｍｇ／ｋｇおよび１００ｍｇ／ｋｇの用量で週２回、または１００ｍｇ／ｋｇおよび２００ｍｇ／ｋｇの倍加用量で週１回投与したマウスでは、いずれも忍容性が良好であり、処置動物の体重、血液学的検査、または組織病理学的検査に影響を及ぼさなかった。

【０４５１】

［実施例４４］

［ラットにおけるＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８のｉｎ　ｖｉｖｏ忍容性］

本研究の目的は、ラットにおけるＬｓ－ＡＫＧ２８（ロット２７５）とＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２７６）の潜在的毒性を決定することであった。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２７５）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２７６）を、それぞれ実施例２２および２３に記載されるように調製した。雄Ｓｐｒａｇｕｅ－ＤａｗｌｅｙラットにＬｓ－ＡＫＧ２８（

１０、２０または４０ｍｇ／ｋｇ／用量）またはＬｓＡＫＧ－３８（２０、４０または８０ｍｇ／ｋｇ／用量）を８週間、週１回静脈注射（尾静脈）で投与した。対照群には、同量のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ＨＢＳ、ｐＨ７）を８週間、週１回注射した。研究のエンドポイント前に、イソフルラン麻酔後に腹部大動脈からの放血により動物を安楽死させた。血液および組織試料を回収し、臨床病理学的パラメータを評価した。組織の代表的試料を回収し、１０％中性緩衝液に保存し、パラフィンに包埋し、切片化し、ガラススライド上に載せ、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、委員会の認証を受けた獣医病理学者により組織病理学について評価した。血液学的分析はホモロジーＡＤＶＩＡ　１２０／２１２０ｉ　Ａｎａｌｙｚｅｒを用いて行われ、血液生化学的分析はＣｏｂａｓ　６００　Ａｎａｌｙｚｅｒを用いて行われた。

【０４５２】

死亡率および瀕死チェック、臨床観察、体重、摂餌量、神経伝導速度（ＮＣＶ）および筋活動電位（ＭＡＰ）、機能観察バッテリー（ＦＯＢ）のパラメータおよびエンドポイントも評価した。

【０４５３】

神経伝導速度（ＮＣＶ）および筋活動電位（ＭＡＰ）を８週目に行った。記録セッション中、動物をイソフルランで麻酔した。尾神経ＮＣＶは、尾部の中心骨に沿って走る尾神経の伝導速度を測定する。この神経はラットの他の任意の神経よりも約５０％長く、特に長さ依存性の遠位軸索障害を起こしやすい。ＮＣＶは５０ｍｍの距離にわたって測定され、節電流および膜貫通電流、応答する軸索の構造および平均断面直径、ならびに関連するミエリン鞘の完全性に感受性である。誘発された応答の振幅は、活性化された繊維の数および同期を反映する。データは、尾部の毛髪線の約１０ｍｍ下に位置する活性記録電極（視覚的に決定される）およびさらに５０ｍｍ遠位の刺激カソードで記録した。シグナルの振幅と開始待ち時間を記録し、刺激カソードと活性電極の間の距離を初期脱分極電流の絶対開始待ち時間で割ることにより速度を計算した。

【０４５４】

指神経ＮＣＶは、感覚指神経における伝導速度を測定する。指神経は、後足の背面を支配する坐骨神経の遠位端である。神経伝導速度は、節電流および膜貫通電流、応答する軸索の構造および平均断面直径、ならびに関連するミエリン鞘の完全性に感受性である。データは、外果の後方の足首に位置する能動記録電極と後足の第２指の基部に位置する刺激カソードで記録された。シグナルの振幅と開始待ち時間を記録し、刺激カソードと活性電極の間の距離を初期脱分極電流の絶対開始待ち時間で割ることにより速度を計算した。

【０４５５】

脛骨運動伝導（開始潜時）は、脛骨神経遠位部の運動線維刺激後のラット後足の内在筋の応答特性を測定する。データは、後足の外側背筋（ヒトの短指伸筋と同等）に位置決めされた活性電極と、外果の後ろの足関節近位に位置決めされた刺激陰極で記録した。運動軸索における神経伝導速度は、誘導された複合筋活動電位（ＣＭＡＰ）の開始潜時から推定した。ＣＭＡＰの振幅は、関連神経の超最大刺激後の応答のピークで測定した。

【０４５６】

Ｌｓ－ＡＫＧ２８、Ｌｓ－ＡＫＧ３８関連の予定外死亡、臨床観察、体重への影響（図１６Ａおよび図１６Ｂ）、ＮＣＶおよびＭＡＰ（表３４）、ＦＯＢ（表３５）、摂餌量、凝固パラメータ、臓器重量または肉眼的所見（データは示されていない）への影響はなかった。リポソーム処置群では、Ｌｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８に対する効力調整用量（実施例２の結核菌Ｅｒｄｍａｎｎ株に対する遊離薬物効力に基づく）がリネゾリドと比較して１６．５倍増加したにもかかわらず、いずれのリポソーム処置群でも尾部または左指神経の神経コンダクタンス速度が最も低下したのは５％未満であった。

【０４５７】

２０ｍｇ／ｋｇ以上の用量でのＬｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の投与は、血小板数の統計学的に有意な低下をもたらした（対照群と比較して最大２０％の差）。他の血液学的および血液生化学的パラメータには、追加の影響は観察されなかった（表３２、

表３３）。

【０４５８】

雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットへの、１０ｍｇ／ｋｇ／用量以上の用量で週１回８週間の静脈内注射によるＬｓ－ＡＫＧ２８の投与は、脾臓、腎臓、および肝臓の顕微鏡的所見をもたらした（表３６）。脾臓には、２０または４０ｍｇ／ｋｇ／用量を投与したラットにおいて、好塩基性顆粒を伴うごく軽度から中等度のマクロファージ空胞化および好塩基性物質のごく軽度から軽度の蓄積が認められた。４０ｍｇ／ｋｇ／用量を与えられたラットの腎臓では、糸球体メサンギウム細胞の微小空胞化が認められた。肝臓には、全用量で軽微な小葉中心性単細胞壊死および軽微ないし軽度の小葉中心性肝細胞変性が認められた。

【０４５９】

【表３８】

表32 雄Sprague Dawleyラットに対する週8回の投薬による処置後の血中肝酵素レベルにおけるリポソーム性AKG-28 および AKG-38の影響

群	ALT (U/L)	AST (U/L)
生理食塩水	105.7 ± 23.0	52.2 ± 9.2
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	89.5 ± 16.5	37.7 ± 9.4
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	97.5 ± 20.3	38.0 ± 8.1
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	98.5 ± 10.5	56.3 ± 16.8
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	98.7 ± 14.0	38.8 ± 10.2
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	92.0 ± 23.6	38.2 ± 8.1
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	93.3 ± 9.4	45.8 ± 10.1

【０４６０】

【表３９】

表33 雄Sprague Dawleyラットにおける週8回の投薬による処置後の血液細胞数およびヘマトクリット(HCT)に対するリポソーム性AKG-28 および AKG-38の影響

群	RBC (10^6/μl)	HCT (%)	WBC (10^3/μl)	PLT (10^3/μl)
生理食塩水	52.2 ± 9.2	8.11 ± 0.48	9.92 ± 3.13	1234 ± 113
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	37.7 ± 9.4	8.13 ± 0.26	9.26 ± 1.10	1143 ± 88
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	38.0 ± 8.1	8.26 ± 0.35	8.83 ± 1.30	1089 ±118
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	56.3 ± 16.8	8.15 ± 0.34	8.79 ± 2.44	973 ± 66
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	38.8 ± 10.2	7.74 ± 0.41	10.46 ± 1.62	1090 ± 50
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	38.2 ± 8.1	7.90 ± 0.39	7.23 ± 1.18	1039 ± 75
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	45.8 ± 10.1	7.65 ± 0.43	9.37 ± 3.56	984 ± 74

【０４６１】

【表４０】

表34 雄Sprague Dawleyラットにおける週8回の投薬による処置後の神経伝導に対するリポソーム性AKG-28 および AKG-38の影響

群	尾側NCV (m/sec)	左指NCV (m/sec)	左脛骨MAP (msec)
生理食塩水	48.7 ± 2.7	31.5 ± 1.8	1.675 ± 0.099
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	49.6 ± 1.9	32.6 ± 2.3	1.678 ± 0.092
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	49.1 ± 2.3	32.3 ± 4.6	1.707 ± 0.124
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	46.8 ± 3.4	33.9 ± 2.2	1.667 ± 0.078
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	47.6 ± 1.8	32.7 ± 1.8	1.680 ± 0.055
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	45.6 ± 2.6	32.9 ± 3.2	1.752 ± 0.084
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	48.6 ± 4.8	31.0 ± 1.7	1.717 ± 0.153

【０４６２】

【表４１】

表35. 雄Sprague Dawleyラットにおける週8回の投薬による処置後の神経機能観察用バッテリーに対するリポソーム性AKG-28 および AKG-38の影響

群	後肢(Hindlind)の広がり (cm)	後肢握り平均(g)	前肢握り平均(g)
生理食塩水	11.10 ± 1.50	670.2 ± 68.9	1274.8 ± 132.9
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	11.20 ± 2.00	715.9 ± 50.9	1335.2 ± 153.0
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	12.20 ± 1.50	695.7 ± 125.9	1331.9 ± 117.1
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	11.50 ± 1.60	709.9 ± 61.9	1140.2 ± 169.9
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	12.10 ± 1.30	741.5 ± 92.9	1373.6 ± 107.2
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	11.70 ± 2.70	740.9 ± 74.6	1281.6 ± 114.8
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	11.40 ± 2.60	737.6 ± 75.7	1350.1 ± 147.7

【０４６３】

【表４２】

表36. 雄Sprague Dawley ラットにおけるリポソーム性AKG-28 および AKG-38 を週8回の投薬による処置後の組織の顕微鏡所見の概要

群	1	2	3	4	5	6	7	8
試験物質		リネゾリド		Ls-AKG28			Ls-AKG38	
用量 (mg/kg/投薬)	0	50	10	20	40	20	40	80
群あたりの動物数	6	6	6	6	6	6	6	6
肝臓 (試験された数)	6	6	6	6	6	6	6	6
変性, 肝細胞性, 小葉中心性	(0)[a]	(0)	(1)	(3)	(6)	(1)	(4)	(6)
最小	0	0	1	3	2	1	3	1
軽度	0	0	0	0	4	0	1	5
単細胞壊死, 小葉中心性	(0)	(2)	(3)	(4)	(6)	(4)	(5)	(6)
最小	0	2	3	4	6	4	5	6
脾臓 (試験された数)	6	6	6	6	6	6	6	6
空胞化, マクロファージ	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)	(0)	(0)	(0)
最小	0	0	0	1	0	0	0	0
軽度	0	0	0	2	0	0	0	0
中等度	0	0	0	3	6	0	0	0
蓄積, 好塩基性物質	(0)	(0)	(0)	(4)	(6)	(0)	(0)	(0)
最小	0	0	0	1	0	0	0	0
軽度	0	0	0	3	6	0	0	0
腎臓 (試験された数)	6	6	6	6	6	6	6	6
空胞化, メサンギウム細胞, 糸球体	(0)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
最小	0	0	0	0	6	0	0	0

[a] 括弧内の数字は知見のある動物の数を表す。

【０４６４】

２０ｍｇ／ｋｇ／用量以上の用量でのＬｓ－ＡＫＧ３８の投与は、全用量で小葉中心性の軽微な単細胞壊死および小葉中心性の軽微から軽度の肝細胞変性の肝臓の顕微鏡的所見もたらした。

【０４６５】

対照的に、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８を投薬したラットは、リネゾリドを投薬されたラットと比較して、全用量で肝単細胞壊死の発生率が増加した。Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８を投薬したラットの肝臓では、小葉中心性肝細胞変性の発生率および重症度が全用量で同程度であった。また、Ｌｓ－ＡＫＧ２８を投薬したラットでは、２０または４０ｍｇ／ｋｇ／用量で脾臓に空胞化したマクロファージおよび好塩基性物質が認められ、４０ｍｇ／ｋｇ／用量で腎臓に糸球体メサンギウム細胞の空胞化が認められた。

【０４６６】

結論として、８週間にわたる反復静脈内注射によるＬｓ－ＡＫＧ２８の投与は、１０、２０および４０ｍｇ／ｋｇ／用量のラットにおいて良好な忍容性を示した。Ｌｓ－ＡＫＧ３８の８週間にわたる反復静脈内注射による投与は、２０、４０および８０ｍｇ／ｋｇ／用量のラットにおいて良好な忍容性を示した。実施例２は、ＡＫＧ－２８がリネゾリドよりもｉｎ　ｖｉｔｒｏ（Ｅｒｄｍａｎｎ株）で結核菌を死滅させる能力が３３倍、ＡＫＧ－３８が１７倍高いことを示した。したがって、効力を修正した場合、ラットは、臨床的に妥当な用量であるリネゾリド８０ｍｇ／ｋｇの１６．５倍である、リネゾリド相当量１３２０～１３３６ｍｇ／ｋｇでは、有意な神経障害（神経伝導速度の変化）、肝酵素の上昇、赤血球数またはヘマトクリットの減少、体重の減少は認められていない。

【０４６７】
［実施例４５］
［Ｋｒａｍｎｉｋ（肺結核菌感染のＣ３ＨｅＢ／ＦｅＪマウスモード）におけるリポソームＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８とベダキリンおよびプレトマニドの併用、またはベダキリン（Ｂ）、プレトマニド（Ｐａ）、およびモキシフロキサシン（Ｍ）の有効性］
Ｃ３ＨｅＢ／ＦｅＪ（Ｋｒａｍｎｉｋ）マウス感染モデルは、ＴＢ感染後の肺における進行した低酸素性の乾酪性肉芽腫を示す（Ｄｒｉｖｅｒ Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，ｖｏｌ．５６，ｐ．３１８１－３１９５）。Ｃ３ＨｅＢ／ＦｅＪマウスにおいて観察された肺病理学は、ＴＢ患者において見られる病変病理学および細菌集団における不均一性に、より近似しており、５０および９０ｍｇ／ｋｇの中等量の週１回投与でのリポソームＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の有効性を評価するために用いられた。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２７５）およびＬｓ－ＡＫＧ３８（ロット２７６）を、それぞれ実施例２２および２３に記載されるように調製した。Ｃ３ＨｅＢ／ＦｅＪマウスの肺病理は、コラーゲン縁（Ｉ型）、劇症好中球性肺胞炎（ＩＩ型）、および細胞性病変（ＩＩＩ型）により描出された乾酪性壊死性病変として分類された３種類の異なるタイプの病変を示す（Ｉｒｗｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｄｉｓ Ｍｏｄｅｌ Ｍｅｃｈ ８，５９１－６０２を参照されたい。）。８～１０週齢のＣ３ＨｅＢ／ＦｅＪ雌マウスをＬＤＡ（低用量エアロゾル感染）に感染させた。Ｇｌａｓ－Ｃｏｌ吸入曝露システムを用いて、約５０～７５桿菌／マウス（Ｅｒｄｍａｎ株）の標的をマウスに感染させた。１回のエアロゾル投与につき５匹のマウスを感染から１日後に　殺し、細菌の取り込みを決定した。
【０４６８】
感染後の８週間で、８匹のマウスを　殺して、治療開始時の肺および脾臓における細菌負荷を測定した。マウスを　殺する前に体重を測定した。肺および脾臓の肉眼による病理学的観察を行った。全肺および脾臓を抽出し、－８０℃で凍結した。以前に凍結した組織を回収し、Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓホモジナイザーを用いて１×ＰＢＳ中でホモジナイズした。肺および脾臓ホモジネートを７Ｈ１１寒天クワッドプレート上にプレートした。ＣＦＵの計数は、乾燥空気インキュベーター内で３７℃にて３～５週間、インキュベートした後に行われた。治療は、経口強制投与または腹腔内（ｉ．ｐ．）注射により、感染後の８週間から開始し、４～６週間連続して継続した（強制経口投与の場合はＭ－Ｆ、腹腔内注射の場合は週１回）。ベダキリン（Ｂ）、プレトマニド（Ｐａ）、モキシフロキサシン（Ｍ）、およびリネゾリド（Ｌ）を計２００μＬ／用量で、４または６週間、週５日、経口強制投与した。ベダキリン（２５ｍｇ／ｋｇ）を最初に投与し、その後、少なくとも１時間後にプレトマニド（１００ｍｇ／ｋｇ）を投薬した。モキシフロキサシン（１００ｍｇ／ｋｇ）またはリネゾリド（１００ｍｇ／ｋｇ）は、プレトマニド投薬より４時間後に投与された。リポソーム製剤を、計４または６週間、週１回投与した。
【０４６９】
投薬時にマウスを毎日観察し、体重を少なくとも週１回測定した。４～６週間の処理完了から２週間後に　殺した。処置群あたり８匹のマウスを　殺前に体重測定した。全肺および脾臓を、全投与群について無菌的に採取した。肺および脾臓の肉眼による病理学的観察を図示した。肉眼による病変分析のために肺を撮影した。全肺および脾臓を－８０℃で凍結し、以前凍結した組織を回収し、Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓホモジナイザーを用いて１×ＰＢＳ、または１×ＰＢＳ中の１０％牛血清アルブミン（ＢＳＡ）のいずれかでホモジナイズした（薬剤のキャリーオーバーを避けるためである。＊説明のために下記を参照されたい。）。肺および脾臓ホモジネートを、均質化後、７Ｈ１１クワッドプレートを含有する７Ｈ１１寒天またはチャコール上にプレートし、１×ＰＢＳまたは１０％ＢＳＡで連続希釈した。ＣＦＵの計数は、乾燥空気インキュベーター内で３７℃にて５週間、インキュベートした後に行われた。
【０４７０】
ＢＰａＭ処置へのＬｓ－ＡＫＧ２８の添加は、肺におけるＢＰａＭに対してさらに０．

６４ｌｏｇ１０ＣＦＵ減少をもたらしたが、ＢＰａＭ＋Ｌｓ－ＡＫＧ３８処置は、４週間の処置後にＢＰａＭに対して０．２５対ＢＰａＭのさらなるｌｏｇ１０ＣＦＵ減少を生じさせた。Ｌｓ－ＡＫＧ２８またはＬｓ－ＡＫＧ３８のいずれかをＮＩＸ（ＢＰａＬ）レジメンでリネゾリド（Ｌ）に置換すると、６週間の処置でＢＰａＬよりも有効性が改善した。６週間の処置で、ＢＰａＬレジメンにおけるリネゾリドでＬｓ－ＡＫＧ３８を置換すると、ＢＰａＬ処置群と比較して有効性が有意に改善した。具体的には、ＢＰａＬを６週間投与すると４．１８ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少が見られ、８匹中１匹のプレートではＣＦＵが認められなかった。ＢＰａ＋Ｌｓ－ＡＫＧ２８を６週間投与したところ、４．６８ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少が認められたが、ＢＰａＬとの統計的有意差は認められなかった。ＢＰａ＋Ｌｓ－ＡＫＧ３８を６週間処理すると、５．２６ｌｏｇ１０　ＣＦＵが減少し、８匹中２匹のプレートでＣＦＵが認められなかった。これは、ＢＰＡＬに対して統計的に有意な減少であった（ｐ＝０．０４、Ｄｕｎｎｅｔｔ検定）。

【０４７１】

処置の６週間後の脾臓では、ＮＩＸレジメンでリネゾリドのリポソーム製剤を置換すると、ＢＰａＬ処置群と比較して肺の有効性がわずかに改善した。ＮＩＸレジメンによる６週間の処置は３．５６ｌｏｇ１０ＣＦＵの減少をもたらし、８匹中３匹のプレートはＣＦＵを示さなかった。ＢＰａ＋Ｌｓ－ＡＫＧ２８による６週間の処置は、４．１８ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少をもたらし、８匹中５匹のマウスのプレートはＣＦＵを示さなかった。ＢＰａ＋Ｌｓ－ＡＫＧ３８による６週間の処理は、４．３８ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少をもたらし、８匹中６匹のマウスのプレートはＣＦＵを示さなかった。６週間の薬物処置におけるマウスの脾臓のＣＦＵ負荷は低く、検出下限の０．６６ｌｏｇ１０　ＣＦＵに近かった。

【０４７２】

【表４３】

表37 - 肺 Log CFU

処置	用量	4週 (Log CFU)	6週 (Log CFU)
未処置		7.71 ± 0.65	
BPaM	25/100/100 mg/kg	3.05 ± 0.31	
BPaM+Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg	2.41 ± 0.37	
BPaM+Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg	2.80 ± 0.57	
BPaL	25/100/100 mg/kg		2.83 ± 1.28
BPa + Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg		2.33 ± 0.95
BPa + Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg		1.75 ± 0.59*

*2/8マウスが測定可能なCFUを有しなかった;全てのマウスが0.96 log CFUの検出限界で列挙された。

【０４７３】

【表４４】
表38 - 脾臓 Log CFU

処置	用量	4 週 (Log CFU)	6 週 (Log CFU)
未処置		5.36 ± 0.48	
BPaM	25/100/100 mg/kg	2.07 ± 0.65	
BPaM+Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg	1.15 ± 0.45	
BPaM+Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg	1.85 ± 0.96	
BPaL	25/100/100 mg/kg		1.56 ± 0.82*
BPa + Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg		0.94 ± 0.45**
BPa + Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg		0.74 ± 0.23***

*3/8マウスが測定可能なCFUを有しなかった
**5/8マウスが測定可能なCFUを有しなかった;.
***6/8マウスが測定可能なCFUを有しなかった; 全てのマウスが0.66 log CFUの検出限界で列挙された。

【０４７４】
測定可能なＣＦＵを有しない全てのマウスを、検出限界０．６６ｌｏｇ ＣＦＵで列挙した。これは、Ｌｓ－ＡＫＧ３８とＬｓ－ＡＫＧ２８が、ベダキリンとプレトマニドを併用した場合、わずか６週間の処置後、両薬剤の中等度および高い認容性用量でリネゾリドよりも活性であることを示す。実施例４２および４３が示すように、Ｌｓ－ＡＫＧ２８とＬｓ－ＡＫＧ３８の両方は、この組み合わせにおいて、本研究で使用された用量の少なくとも２倍の用量で安全に投薬できる。また、Ｌｓ－ＡＫＧ２８をＢＰａＭのレジメンに追加した場合、この同じく高い忍容性用量で肺と脾臓の両方のＣＦＵがさらに低下することも示されている。
【０４７５】
［実施例４６］
［肺結核菌感染のＢａｌｂ／ｃモデルにおけるリポソームＡＫＧ－２８単剤療法の有効性］
Ｌｓ－ＡＫＧ２８のスケジュールおよび用量依存性の有効性は、結核の慢性Ｂａｌｂ／ｃモデルにおいて５０および１００ｍｇ／ｋｇの臨床的に妥当な用量で遊離リネゾリドと比較して決定された。慢性Ｂａｌｂ／ｃマウスモデルでは、肺の細菌負荷は結核菌感染後の４～５週間で定常状態に達する（Ｌｅｎａｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）ＡＡＣ ４９（６）２２９４－２３０１）。Ｌｓ－ＡＫＧ２８（ロット２８６）を実施例２８に記載されるように調製した。６～８週齢のＢａｌｂ／ｃ雌マウスをＪａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手し、マウスをＧｌａｓ－Ｃｏｌ吸入曝露システムを用いて、ＬＤＡ（低用量エアロゾル感染）で感染させて、結核菌Ｅｒｄｍａｎの約５０～１００桿菌／マウスに感染させた。
【０４７６】
マウス（ｎ＝３）を感染から１日後に 殺し、細菌取り込みを決定した。Ｐｒｅｃｅｌｌｙチューブ（Ｂｅｒｔｉｎ ｃａｔ# ＫＴ０３９６１－１－３９６．７）中で全肺を無菌的に回収し、Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓ組織ホモジナイザーを用いて４ｍｌの１×ＰＢＳ中でホモジナイズした。未希釈ホモジネートを２つの大型７Ｈ１１寒天プレート（１５０×１５ｍｍ）に移し、コロニーを計数できるまで、３７℃で乾燥空気インキュベーター中で少なくとも２１日間、密封ジップトップバッグ内でプレートをインキュベートした。エアロゾル感染後の２８日目に、マウス（ｎ＝５）を 殺し、治療開始時の肺および脾臓における細菌負荷を決定した。マウスを 殺する前に体重を測定した。肺および脾臓の肉眼に

よる病理学的観察を行った。肺（左葉と上部右［頭蓋］葉に分けられる）＋副葉）と脾臓を無菌的に採取し、－８０℃で凍結した。下部右肺葉［尾側］を４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で組織学的検査のために回収した。以前に凍結した組織を回収し、Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓホモジナイザーを用いて１×ＰＢＳ中でホモジナイズした。肺および脾臓ホモジネートを７Ｈ１１寒天クワッドプレート上にプレートした。ＣＦＵの計数は、乾燥空気インキュベーター内で３７℃で３～５週間インキュベートした後に行う。

【０４７７】

５％ＰＥＧ－２００（Ｓｉｇｍａ　Ｐ３０１５、ロットＭＫＢＷ３１１９Ｖ）／９５％（０．５％）のメチルセルロース（Ｓｉｇｍａ　Ｍ０４３０、ロット０３１Ｍ０００５１）中のリネゾリドを、エアロゾル感染後の２８日目（月）に強制経口投与により開始し（マウスあたり２００μＬ）、１週間に７日のうち５日を２～８週間継続した。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を５０または１００ｍｇ／ｋｇの用量で週１または２回腹腔内注射により投与した。最終　　殺は、２、４または８週間の薬物で処置されたマウスの最終投与日の３日後に行った。マウスを　　殺する前に体重を測定した。肺および脾臓の肉眼による病理学的観察を行った。肺（左葉、右上葉＋副葉に分けられる）および脾臓を無菌的に採取し、－８０℃で凍結し、組織学的検査のために４％のＰＦＡに右下葉を回収した。薬剤のキャリーオーバーを避けるため、以前に凍結した組織を回収し、１×ＰＢＳ中の１０％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）中でホモジナイズした。均質化後、肺および脾臓ホモジネートを１×ＰＢＳおよび１０％ＢＳＡ中で連続希釈し、次に７Ｈ１１寒天または７Ｈ１１クワッドプレートを含むチャコール上にプレートした。ＣＦＵの計数は、乾燥空気インキュベーター内で３７℃で３～５週間インキュベートした後に行った。

【０４７８】

肺ＣＦＵ数の減少を表３９に、脾臓ＣＦＵ数を表４０に示す。Ｌｓ－ＡＫＧ２８を５０ｍｇ／ｋｇで週２回または１００ｍｇ／ｋｇで週１回処置すると、肺ではわずか２週間後に１．５Ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少が見られたが、リネゾリド１００ｍｇ／ｋｇでは０．１５Ｌｏｇ１０　ＣＦＵの減少が見られなかった（ｑ１×５）。この減少は、Ｌｓ－ＡＫＧ２８について２週間で脾臓においてほぼ３Ｌｏｇ１０ＣＦＵであった。８週間で、Ｌｓ－ＡＫＧ２８で処置されたマウスは全て、８週間で完全に無菌であった（肺では１．１３、脾臓では０．６６の検出限界未満）のに対し、肺では２．４５ｌｏｇ１０ＣＦＵ、リネゾリド１００ｍｇ／ｋｇの高用量では脾臓では３．１５ｌｏｇ１０ＣＦＵであった。この単剤療法の活性は、ベダキリンのような活性のある併用パートナーが存在せず、わずか８週間で比較的短期間であるオキサゾリジノンには驚くべきものである。例えば、処置の８週間で、リネゾリド単独療法は、Ｂａｌｂ／ｃおよびＣ３ＨｅＢ／ＦｅＪマウス（Ｌａｎｏｉｘ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｄｉｓ　Ｍｏｄｅｌｓ　Ｍｅｃｈ．８，６０３－６１０）において４～６の範囲でｌｏｇ１０　ＣＦＵ数を示し、活性は、３～１４用量／週の範囲のスケジュールで１０００ｍｇ／ｋｇ／週までででさえ中等度のままである（Ｂｉｇｅｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ（２０２１）Ｊ　Ｉｎｆｅｃ．Ｄｉｓ．２２３（１１）１８５５－１８６４）。

【０４７９】

【表４５】

表39 - 肺 Log CFU

処置	用量, スケジュール	2週間 (Log CFU)	4週間 (Log CFU)	8週間 (Log CFU)
未処置		5.71 ± 0.15	5.47 ± 0.19	
リネゾリド	50 mg/kg, q1x5		4.61 ± 0.31	
	100 mg/kg, q1x5	5.58 ± 0.10	4.17 ± 0.21	2.45 ± 0.37
Ls-AKG28	50 mg/kg,		3.81 ± 0.33	
Ls-AKG28	50 mg/kg,	4.01 ± 0.20	2.30 ± 0.57	
Ls-AKG28	100 mg/kg,	4.09 ± 0.34	2.65 ± 0.70	1.13 ± 0.00*

*6/6マウスが測定可能なCFUを有しなかった; 全てのマウスが1.13 log CFUの検出限界で列挙された。

【０４８０】

【表４６】

表40 - 脾臓 Log CFU

処置	用量, スケジュール	2週間 (Log CFU)	4週間 (Log CFU)	8週間 (Log CFU)
未処置		5.08 ± 0.31	4.77 ± 0.21	
リネゾリド	50 mg/kg, q1x5		4.32 ± 0.28	
	100 mg/kg, q1x5	4.53 ± 0.25	3.90 ± 0.28	3.15 ± 0.27
Ls-AKG28	50 mg/kg,		1.74 ± 0.65	
Ls-AKG28	50 mg/kg,	1.71 ± 0.59	0.67 ± 0.02*	
Ls-AKG28	100 mg/kg,	2.25 ± 0.82	1.07 ± 0.93**	0.66 ± 0.00***

*4/5マウスが測定可能なCFUを有しなかった

**1/6マウスが測定可能なCFUを有しなかった;.

***6/6マウスが測定可能なCFUを有しなかった; 全てのマウスが0.66 log CFUの検出限界で列挙された。

【０４８１】

測定可能なＣＦＵを有しない全てのマウスを、検出限界０．６６ｌｏｇ ＣＦＵに列挙した。

【０４８２】

［実施例４７］

［メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）のウサギ心内膜炎モデルにおけるリポソームＡＫＧ－３８の有効性］

黄色ブドウ球菌感染、特に血管内系（例えば、ＩＥ；心臓および血液透析装置感染など）を伴うものが蔓延しており、容認できないほど高い罹病率、死亡率および治療後再発率と関連している。これは、ＭＲＳＡの多剤耐性株によってこのような感染が引き起こされる場合に特に当てはまる。さらに、ＭＲＳＡ株が、承認された臨床標準研究所（ＣＬＳＩ）の「感受性」範囲（すなわち、２ｕｇ／ｍｌ以下）内でバンコマイシン（「ワークハウス」抗ＭＲＳＡ薬）に対して最小阻止濃度（ＭＩＣ）を有する場合でさえ、臨床転帰は最

適ではないままである。

【０４８３】

典型的な高接種血管内バイオフィルムＭＲＳＡ感染モデル、左側大動脈弁ウサギＩＥを、６カ月齢および２．２～２．５ｋｇの雌ニュージーランド白色ウサギに使用した。ウサギにキシラジンとケタミンを筋肉注射して全身麻酔を行った。次に、皮膚を露出させるために、右頸動脈上に毛皮を刈り込んだ。右頸動脈上の切断部位を１％リドカインで局所麻酔した。その後、右頸動脈を露出させるために切断を行った。これを分離し、近位結紮し、次にポリエチレンカテーテルを用いて大動脈弁を横切って左心室に逆行性にカニューレ挿入し、その後、研究期間中、左心室に固定し、留置した。カテーテル留置後の４８時間の左側ＩＥ（滅菌大動脈弁および心室の疣贅を誘導するため）では、動物はＭＷ２株の約２×１０^{5}ｃｆｕの静注チャレンジによってＩＥが誘導された。使用したＭＲＳＡ株ＭＷ－２（ＵＳＡ４００－クローナル複合体［ＣＣ］１）は、ｉ）臨床的に由来し、ｉｉ）ゲノム配列を決定し、ｉｉｉ）一般的な院内感染ＭＲＳＡクローン型を示し、ｉｖ）実験ＩＥモデルにおいて毒性を示し、ｖ）ダプトマイシン（ＤＡＰ）にｉｎ　ｖｉｔｒｏで感受性である。感染は心臓弁に感染した疣贅から腎臓および脾臓に広がる。

【０４８４】

リポソームＡＫＧ－３８（Ｌｓ－ＡＫＧ３８）は、別々の動物群において、４０ｍｇ／ｋｇ／用量の用量で、１回（ＤＡＰとの併用療法で）または２回（ＤＡＰとの併用療法で１回；次に、さらなるＤＡＰ療法を受けていない「動物の再発群」におけるＤＡＰ処置後の　殺時に２回目の注入）のいずれかで与えられた。Ｌｓ－ＡＫＧ３８（ロット２９２）を実施例２９に記載されるように調製した。最初のＬｓ－ＡＫＧ３８注入は、ＤＡＰの初回ｉｖ投薬から約１時間後までに行われる。ＤＡＰは、１日２ｍｇ／ｋｇの致死量以下の用量で４日間、単独またはＬｓ－ＡＫＧ３８との併用のいずれかで投与された。

【０４８５】

動物を安楽死させ、主要標的臓器は、６日目（ＤＡＰ単独またはＤＡＰ＋単回用量のＬｓ－ＡＫＧ３８）または１２日目（ＤＡＰ＋１日目と６日目のＬｓ－ＡＫＧ３８の２回用量）のいずれかで、滅菌的に取り出され、定量培養された（左側ＩＥに対して血液、心臓疣贅；腎臓および脾臓）。計量、均質化、連続希釈およびプレート培養により、滅菌的に取り出された臓器の標準的調製によって、定量的な標的組織培養を行った。血液の連続希釈および定量培養を同様に行った。血液培養物および異なる処置群の標的臓器のデータは、それぞれｌｏｇ$_{10}$　ｃｆｕ／ｍｌまたはｌｏｇ$_{10}$　ｃｆｕ／ｇｍ組織（±ＳＤ）の平均値および中央値として算出した。

【０４８６】

ウサギにおけるＭＲＳＡの左室心内膜炎モデルからの予備データを以下の表４１に示す。ダプトマイシン単独またはダプトマイシン＋Ｌｓ－ＡＫＧ３８の単回投薬は、接種後の６日目に有意な効果を示さなかった。驚くべきことに、Ｌｓ－ＡＫＧ３８の２回目の注射は１２日目に顕著な有効性をもたらし、５種の全組織におけるウサギの４／５での殺菌、および複数臓器におけるＣＦＵの６ｌｏｇ以上の減少を含んだ。このデータは、心内膜炎が毎日のダプトマイシンの中止後にＬｓ－ＡＫＧ３８で効果的に処置できることを示唆する。

【０４８７】

【表４７】

表41

	病的増殖	腎臓	脾臓	肝臓	肺
対照(4)	7.45 ± 0.60	5.93 ± 0.54	5.71 ± 0.85	5.03 ± 0.51	4.73 ± 0.46
ダプトマイシン	8.13 ± 0.17	6.90 ± 0.61	7.43 ± 0.38	6.77 ± 0.90	6.37 ± 0.64
ダプトマイシン(再発)	9.18 ± 0.22	8.11 ± 0.49	7.91 ± 0.54	7.65 ± 0.26	8.00 ± 0.66
ダプトマイシン+Ls-AKG38(1用量)	8.26 ± 0.66	6.70 ± 0.83	5.65 ± 0.61	5.75 ± 0.83	5.97 ± 0.77
ダプトマイシン+Ls-AKG38(2用量)	1.14 ± 0.97 (4/5無菌)	1.05 ± 0.69 (4/5無菌)	0.89 ± 0.08 (5/5無菌)	0.93 ± 0.46 (4/5無菌)	1.18 ± 0.61 (4/5無菌)

【０４８８】

［実施例４８］

［ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける種々の非結核性マイコバクテリアにおけるＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の活性］

ＭＩＣ試験は、ＣＬＳＩ標準Ｍ７－Ａ７（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で推奨されているカルシウムイオンおよびマグネシウムイオン濃度に対してＭｕｅｌｌｅｒ　Ｈｉｎｔｏｎ（ＭＨ）ブロス（カチオン調整）を用いて、マイクロブロス希釈法（Ｏｂｒｅｇｏｎ－Ｈｅｎａｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ　５９，６９０４－６９１２）によって行われた。ＭＩＣ試験はまた、７Ｈ９ブロス（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いたマイクロブロス希釈法（Ｓｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　６，ｅ２４７２６；　Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ａｍ　Ｊ　Ｒｅｓｐｉｒ　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　４３，２８７－３９３）により行われた。目標は、本発明者らのマイクロブロス希釈法において異なるブロスを用いることにより、ＮＴＭに対して活性を有するより多くの化合物を検出する能力を最適化することであった。ＮＴＭは、７Ｈ１１寒天プレート（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）上で３５～３７℃で３～２５日間、（細菌株に応じて）大気中で増殖させた。ＣＦＵを寒天プレートから採取し、０．０５％のＴｗｅｅｎ　８０を含むＭＨブロスのいずれかに置かれ、増殖７日後に採取した光学濃度（ＯＤ）吸光度が（ＯＤ）０．０８～０．１（０．５ＭｃＦａｒｌａｎｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ）になるまで周囲空気中で３５～３７℃で増殖させた。次に、細菌細胞懸濁液が、生理食塩水中でそれらを調製することにより、（ＯＤ）０．０８～０．１（０．５ＭｃＦａｒｌａｎｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ）と一致することを確認した。

【０４８９】

ブロス（ＭＨ）１８０μｌを９６ウェルプレートの第１カラムに添加した。次に、１００μｌのブロス（ＭＨ）を９６ウェルプレートの他のカラムに添加した。化合物は、ＤＭＳＯ中で１．２８ｍｇ／ｍＬを使用して作製され、試験範囲６４～０．０６２μｇ／ｍｌのために直ちに使用され、２０μｌの化合物がウェルの第１カラムに添加され、１００μｌが連続希釈される。最後に、１００μｌのＮＴＭ細胞懸濁液を、培地のみの対照ウェルを除く全てのウェルに添加した。各微生物に特異的なＱＣ剤　１）陰性対照のみの細菌　２）陰性対照のみの培地　３）テジゾリド陽性薬剤対照　４）任意選択的な大腸菌対照。

【０４９０】

ＲＧＭは３日目にＯＤについてアッセイされた。その後、Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｂｒｏｗｎ－Ｅｌｌｉｏｔｔ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｃｌｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ｖｏｌ．２５（３），ｐ．５４５－５８２）によって推奨されるレサズリンマイクロタイターアッセイプレート法を用いることにより、プレートをアッセイした。簡単に説明すると、この方法は、ＭＩＣ９６ウェルプレートへのレサズリン（７－ヒドロキシ－３Ｈ－フェノキサジン－３－オン１０－オキシド）の添加を使用した。レザズリンは青色の色素であり、それ自体は弱い蛍光を示し、ピンク色で非常に赤い蛍光レゾルフィンに不可逆的に還元される。細菌細胞生存度ＭＩＣアッセイにおける酸化還元指標として使用した。

【０４９１】

結果は、ＡＫＧ－２８とＡＫＧ－３８の両方が、異なるＮＴＭ種および系統において、テジゾリドより一般的に強力であることを示す。これは、トリ型結核菌、マイクロバクテリウム・ケロナエ、マイクロバクテリウム・アブセッサス、およびマイクロバクテリウム・カンサシに含まれた。マイクロバクテリウム・マシリエンセでのみ、評価された３株全てにおいてテジゾリドの活性が高かった。

【０４９２】

【表４８】

表42

NTM種	菌株	AKG-28 MIC (μg/mL)	AKG-38 MIC (μg/mL)	テジゾリド MIC (μg/mL)
トリ型結核菌亜種 avium	2285 S	0.125	0.125	0.25
トリ型結核菌亜種 avium	3993	0.125	0.125	0.25
トリ型結核菌亜種 avium	2285 R	0.06	0.06	0.25
マイコバクテリウム・ケロナエ	49	0.06	0.06	0.25
マイコバクテリウム・ケロナエ	69	0.5	0.5	2
マイコバクテリウム・ケロナエ	35752	0.125	0.06	0.125
マイコバクテリウム・アブセッサス亜種 abscessus	21	0.25	0.06	0.5
マイコバクテリウム・アブセッサス亜種 abscessus	1948	0.125	0.06	0.5
マイコバクテリウム・アブセッサス亜種 abscessus	1513	32	32	4
マイコバクテリウム・マシリエンセ	CIP 108297	1	0.5	0.25
マイコバクテリウム・マシリエンセ	CRM0019	0.25	0.25	0.06
マイコバクテリウム・マシリエンセ	M154	0.25	0.25	0.06
マイコバクテリウム・カンサシ	662	>32	>32	>32
マイコバクテリウム・カンサシ	824	0.125	0.06	0.25
マイコバクテリウム・カンサシ	732	0.125	0.03	0.25
マイコバクテリウム・カンサシ	MK13D6	0.125	0.03	0.25
マイコバクテリウム・カンサシ	WT171017	0.125	0.03	0.125

【０４９３】

［実施例４９］

［ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける結核菌の薬剤耐性株に対する選択された化合物の活性］

結核菌の薬剤感受性株に対する活性を示す本開示に係る化合物は、いくつかの多剤耐性（ＭＤＲ）臨床分離株Ｍ７０、Ｍ２８、Ｍ９４、Ｍ１４（Ｃｈｅｎｇ　Ａ．Ｆ．，ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．ｖ．４８，ｐ．５９６－６０１）ａｎｄ　ＴＮ５９０４（Ｐａｌａｎｉｓａｍａｙ　Ｇ．Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ（Ｅｄｉｎｂ．）ｖｏｌ．８８　ｐ．２９５－３０６）に対する活性についてさらに評価された。

これらの株は、以下の耐性特性によって特徴付けられる。

【０４９４】

表４３．本研究において使用した結核菌ＭＤＲ株の薬剤耐性特性。（略語：Ｒ－耐性；Ｓ－感受性；ＳＴＲ－ストレプトマイシン、ＩＮＨ－イソニアジド；ＲＩＦ－リファンピン、ＥＭＢ－エタンブトール、ＰＺＡ－ピラジンアミド。

【０４９５】

【表４９】

表43

菌株\薬物	STR	INH	RIF	EMB	PZA
M70	R	R	R	S	R
M28	S	R	R	R	R
M14	R	R	S	S	R
M94	R	R	S	S	S
TN5904	R	R	R	S	R

【０４９６】

比較／耐性対照（ＲＩＦ、ＩＮＨ、ＳＴＲ、モキシフロキサシン（ＭＯＸ）、およびリネゾリド（ＬＮＺ））を含む試験化合物のＭＩＣは、本質的に実施例２に記載されたように、アラマーブルーエンドポイント（ＭＡＢＡ）を用いた液体微量希釈法を用いて、以下の修正を加えて決定された。ＤＭＳＯ中の２倍の倍数で連続希釈した試験化合物および比較物質は、１００μＬのＡＤＣが添加された７Ｈ９－グリセロール培地を含有する９６ウェルアッセイプレートのウェルに添加された。化合物をＤＭＳＯ中で希釈し、化合物濃度を所望の範囲に維持し、最終ＤＭＳＯ濃度をウェル中で２％（Ｍ７０、Ｍ２８、Ｍ９４）または２．５％（Ｍ１４、ＴＮ５９０４）に維持したが、ＤＭＳＯ中の溶解度が低いため、ＳＴＲを段階希釈し、水溶液として添加した。ＭＤＲ株および感受性Ｈ３７Ｒｖ株（陽性対照）の細菌ストックを冷蔵庫から取り出し、解凍し、７Ｈ９－ＡＤＣ－グリセロール培地で希釈して、10^6ＣＦＵ／ｍＬ（Ｈ３７Ｒｖ、ＴＮ５９０４）、２×10^6ＣＦＵ／ｍＬ（Ｍ７０、Ｍ１４）、または３×10^6ＣＦＵ／ｍＬ（Ｍ２８、Ｍ９４）の細菌密度を得、ウェル中の化合物含有培地に希釈した細菌ストック５０μＬを添加した。ウェル中の最終薬物濃度の範囲を以下の表に示す。プレートをジップロックバッグに封入し、３７℃でインキュベートし、６００ｎｍ（ＯＤ６００）での周期的光学濃度測定により細菌増殖をモニタリングした。１４日目（ＯＤ６００が０．４０に達したか、または０．４０を超えた場合）または１７日目に、アラマーブルー溶液１５μＬをウェルに添加し、インキュベーションを継続し、３日後（増殖が遅いＭ２８株の場合は７日後）にインキュベーション混合物の色を記録した。薬物を含まない対照ウェルと比較して、アラマーブルーで可視的な色変化を生じなかった２倍系列希釈液の最低連続抗菌濃度を、これらの化合物のＭＩＣとみなした。ＯＤ６００に基づくＭＩＣの測定（薬物を含まない対照ウェルと比較してＯＤ６００が８０％以上減少）は、ＭＡＢＡの結果と一致していた。２つのウェルのＭＩＣのシフト（４倍）は有意であると考えられた。結果を以下の表４４に概要する。

【０４９７】

【表５０】

表44.ｉｎ ｖｉｔｒｏでの結核菌の薬物感受性株および薬剤耐性株における様々な化合物の最小阻止濃度(MIC)(MABA アッセイ)。

化合物	濃度範囲, μg/mL	MIC, μg/mL 結核菌株における:					
		H37Rv	M70	M28	M94	M14	TN5904
RIF	8 - 0.03	0.06	>8	>8	0.125	0.06	>8
INH	2 - 0.008	0.06	>2	>2	>2	>2	2
MOX	8 - 0.03	0.125	1	2	0.125	0.125	0.125
STR	8 - 0.03	0.5	2	0.125	>8	>8	1
LNZ	8 - 0.03	2	0.5	0.5	0.5	0.5	1
AKG-3	4 - 0.015	0.125	≦0.015	0.06	0.06	0.03	0.06
AKG-16	8 - 0.03	0.25	0.125	0.25	0.06	0.06	0.06
AKG-28	1 - 0.004	0.03	≦0.004	0.015	0.015	0.015	0.015
AKG-29	8 - 0.03	0.25	≦0.03	0.125	0.125	0.06	0.06
AKG-38	4 - 0.015	0.03	≦<0.015	0.03	0.03	0.03	0.03
AKG-39	8 - 0.03	0.5	0.125	0.5	1	0.5	0.25

【０４９８】

比較／対照化合物であるＲＩＦ、ＩＨＮ、ＭＯＸおよびＳＴＲは、ＤＲ－ＴＢ／ＭＤＲ－ＴＢ株およびＨ３７Ｒｖに対して期待されるｉｎ ｖｉｔｒｏ活性を示した。典型的なＭＩＣアッセイの分散の範囲内で、本開示の試験された全ての化合物は、薬物感受性株Ｈ３７Ｒｖに対するものと少なくとも同程度にＭＤＲ－ＴＢ株に対して活性であった。最も活性が高かったのはＡＫＧ－２８、次にＡＫＧ－３８、ＡＫＧ－３であった。化合物ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８は、それらの構造的に近い類似体と比較しても最も活性の高い化合物であった。

【０４９９】

［実施例５０］

［リポソーム調製物中の脂質およびそれらの分解生成物の分析。］

本実施例の目的は、脂質の酸化的分解生成物（図１７）およびリン脂質の加水分解生成物（図１８）を検出できる方法を開発することであった。リポソームの脂質成分（ＨＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ならびにそれらの分解生成物（１７－ヒドロキシコレステロール、７－ケトコレステロール、リゾ－ＰＣ、ステアリン酸、およびパルミチン酸）を、荷電化粒子検出器（ＣＡＤ）およびＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｃｃｕｃｏｒｅ（商標）Ｃ１８＋ＵＨＰＬＣカラム（Ｌ＝５０ｍｍ、Ｄ＝２．１ｍｍ、粒径＝１．５μｍ）を備えたＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｖａｎｑｕｉｓｈ Ｆｌｅｘ ＵＨＰＬＣを使用するＨＰＬＣによって、リポソーム試料中で定量した。ＵＨＰＬＣ操作条件を以下の表（表４５）に列挙する。

【表５１】

表45. 脂質およびその分解生成物を分析するためのクロマトグラフィー条件

HPLC装置	Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC
HPLCカラム	Accucore(商標) Vanquish(商標) C18+ UHPLC カラム
カラム温度	50 °C
流速	0.5 mL/分
注射体積	2 µL
吸光度検出	230 nm
CAD	10Hz
稼働時間	10 分
試料温度	21°C
試料溶媒	MeOH/THF (85:15)
移動相	移動相A: 水中の5mM 酢酸アンモニウム (pH 4)
	移動相 B: メタノール

移動相プログラム:

時間, 分	移動相A, %	移動相B, %
-0.5	15	85
0	15	85
2	10	90
4	0	100
8	0	100
9	15	85
10	15	85

【０５００】

個々の脂質およびそれらの分解生成物のピークを同定するために、５ｍｇ／ｍｌの脂質標準は、商業的に入手した個々の脂質をメタノール／テトラヒドロフラン溶液（ＭｅＯＨ：ＴＨＦ＝８５：１５　ｖｏｌ：ｖｏｌ）に溶解することによって調製され、使用するまで－２０℃で保存された。各々の個々の脂質およびそれらの分解生成物についての検量線は、ＨＰＬＣ稼働の前に５ｍｇ／ｍｌ標準から調製された（表２）。５μｌのリポソーム製剤を、４９５μｌ　ＭｅＯＨ／ＴＨＦ（希釈係数＝１００）に高速で１０秒間、ボルテックスにより溶解した。Ｃｈｒｏｍｅｌｅｏｎ（商標）７．２．１０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いてクロマトグラムを分析した。

コレステロール酸化生成物の相対的な含量は、式：

$D\% = 100 * C_D / (C_{Chol} + C_{D1} + C_{D2})$

ここで、$C_{D1、2}$＝ＨＰＬＣで検出された酸化生成物濃度、ｍｇ／ｍｌ

C_{chol}＝ＨＰＬＣで検出されたコレステロール濃度、ｍｇ／ｍｌ

を用いて算出された。

種々のリン脂質誘導体の相対的な含量は、式：

$D\% = 100 * C_D / (C_{HSPC} + C_{PEG-DSPE})$

ここで、C_D＝ＨＰＬＣで検出された分解生成物濃度、ｍｇ／ｍｌ
C_{HSPC}＝ＨＰＬＣで検出されたＨＳＰＣ濃度、ｍｇ／ｍｌ
$C_{PEG-DSPE}$＝ＨＰＬＣで検出されたＰＥＧ－ＤＳＰＥ濃度、ｍｇ／ｍｌ
を用いて算出された。

分析物の特徴および検量線を以下の表（表４６）に要約する。

【表５２】

表46. 分析物および検量線の特徴

チャネル	成分	保持時間, 分	Cal.タイプ	ポイント数	濃度範囲, µg/ml	決定計数	C0 (オフセット)	C1 (傾き)
CAD	リゾ-PC	1.05	Lin, AddZero	5	5-60	0.999	0.014	0.031
CAD	パルミチン酸	1.23	Lin, AddZero	5	5-60	0.999	0.030	0.035
CAD	7-HO-コレステロール	1.81	Lin, AddZero	5	5-60	0.991	0.078	0.028
CAD	ステアリン酸	2.16	Lin, AddZero	5	5-60	0.993	0.071	0.038
UV230 nm	7-ケトコレステロール	2.05	Lin, AddZero	5	5-60	0.999	-0.057	0.116
CAD	コレステロール	4.78	Lin, AddZero	5	25-400	0.990	0.620	0.027
CAD	PEG-DSPE	5.34	Lin, AddZero	5	25-300	0.993	0.416	0.036
CAD	HSPC	6.33	Lin, AddZero	5	50-600	0.996	0.593	0.029

*ステアリン酸および7-ケトコレステロールの近接した位置にあるピークは230nmでの7-ケトコレストロール特異的UV検出を用いて分解されたことに留意されたい。

【０５０１】

［実施例５１］

［ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の薬物充填（ＤＬ比）を高めたリポソーム調製物（ロットＬｓ－２９３～Ｌｓ－３０２）；調製、特性および保存安定性。］

【０５０２】

高い薬物対脂質比でのＡＫＧ－２８またはＡＫＧ－３８の充填の可能性、および充填の高い効率の保持を評価した。ＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥを、２．５ｇ　ＨＳＰＣのスケールで、５：３：１の質量比（それぞれ７８６、３８６．７および２７００のＨＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－ＤＳＰＥの分子量に基づくモル比４５：５４．９：２．６２）で合わせた。$DiIC_{18}$（３）－ＤＳを０．１５ｍｏｌ％のＨＳＰＣでエタノール溶液として添加した；脂質をエタノールに溶解させ、０．５Ｍ硫酸アンモニウム溶液中に約６０ｍＭリン脂質および最終９．１ｖｏｌ％のエタノールで分散させ、本質的に実施例３０に記載されるようにポリカーボネートメンブレンフィルターを通して押し出して、押し出されたロットＬ－９４を得た。Ｌ－９４材料の一部（Ｘｚ　１２２．９ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１８）を、２×８０ｎｍ孔径ＰＣＴＥメンブレンフィルターのスタックを通して押し出して、押し出されたロットＬ－９５（Ｘｚ　１０２．６ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１９３）を得、Ｌ－９５の一部を、２つの５０ｎｍ　ＰＣＴＥメンブレンフィルターのスタックを通してさらに４回押し出して、押し出されたロットＬ－９６（Ｘｚ　８０．１ｎｍ、ＰｄＩ　０．０３７８）を得た。押し出されたリポソームを０．２μｍシリンジフィルターに通し、リポソーム外の硫酸アンモニウムを水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が２００μＳ／ｃｍ未満（５．７～８．３体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後のリポソーム中のリン脂質濃度は、ホスホモリブデンブルー法によって決定され、リポソームのアリコートをＡＫＧ－３８（８ｍｇ／ｍｌ）またはＡＫＧ－２

８（６ｍｇ／ｍｌ）とともに、所定の薬物対脂質（ＤＬ０）比（表３を参照）で、４５ｍｇ／ｍｌデキストロースの存在下、ＡＫＧ３８の場合は１０ｍＭ　ＮａＣｌの存在下で、６５℃の水浴中で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で冷却した。リポソームを０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整し、２～８℃で一晩保存し、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）（７～８体積交換（Ｖｅｘ））を用いたＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去に供し、緩衝液供給なしで透析濾過を継続することにより濃縮し、０．２μｍのＰＥＳシリンジフィルターを通す濾過により滅菌し、それぞれの交換／賦形剤緩衝液、ＨＢＳ－７またはＨｉｓ－６．５（０．１４４Ｍ　ＮａＣｌ中１０ｍＭヒスチジン－ＨＣｌ、ｐＨ６．５）で１８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８または１０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８の最終薬物濃度に調整した。しかし、ｐＨ６．５は、分解に対するリポソーム脂質の安定性にとって好ましくないことが観察によって示されたため（実施例６５）、Ｈｉｓ－６．５を含有する試料を、１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ（最終２０ｍＭ）の添加によって、ｐＨ７．４１～７．５２（目標ｐＨ７．５）に再調整した。リポソームは以下の特徴を有した。

【表５３】

表47．種々のD/L比におけるリポソームAKG-38およびAKG-28の製剤特徴。

ロットID	薬	pH	Xz	PDI	D/L比、g/mol PhL		EE	薬物濃度、	体積、
			nm		充填前	充填後	%	mg/ml	ml
Ls-293-7.0	AKG-38	7.05	123.2	0.0089	451.1	439.8±9.2	97.5	17.7	5.35
Ls-293		7.43	122.1	0.0342	451.1	442.0±9.5	98.0	17.8	5.86
Ls-294		7.45	121.7	0.0144	600.8	584.2±13.1	97.2	17.8	6.07
Ls-295		7.52	105.3	0.0302	450.9	441.0±9.3	97.8	17.8	7.15
Ls-296		7.41	104.7	0.0503	602.3	574.6±7.4	95.4	17.8	7.56
Ls-297		7.49	83.4	0.0876	452.2	440.7±9.3	97.5	17.81	3.76
Ls-298-7.0	AKG-28	7.05	121.8	0.0535	250.5	256.6±5.0	102.4	9.8	5.49
Ls-298		7.40	122.1	0.0257	250.5	249.8±7.5	99.7	9.9	5.27
Ls-299		7.44	122.4	0.0120	327.0	326.0±8.4	99.7	9.9	4.21
Ls-300		7.44	104.5	0.0362	249.0	245.7±4.8	98.7	9.9	7.10
Ls-301		7.50	104.5	0.0255	330.5	326.1±7.0	98.7	9.9	7.40
Ls-302		7.43	82.5	0.0578	286.8	267.6±4.8	93.3	9.91	3.08

【０５０３】

驚くべきことに、ＡＫＧ－２８とＡＫＧ－３８の両方は、それぞれ約６００ｇ　ＡＫＧ－３８／ｍｏｌ　ＰｈＬと約３３０ｇ　ＡＫＧ－２８／ｍｏｌ　ＰｈＬの増加したＤＬ０比で１００ｎｍと８０ｎｍ押し出しリポソームに効率的に（＞９５％）充填された。

【０５０４】

［実施例５２］

［ＰＫ血漿試料中のＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－３８、およびＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳのＨＰＬＣ分析。］

ＡＫＧ－２８とＡＫＧ－３８薬物の両方、ならびに親油性ＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳリポゾームトレーサーを、ＨＰＬＣを用いて測定するための生物分析アッセイを開発した。ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ３８リポソームの薬物動態特性は、ＨＰＬＣを用いてマウス血漿中の薬物およびリポソームリン脂質を測定することによって決定された。薬物濃度を直接的に測定し、血漿中のリン脂質濃度を、交換不可能な蛍光脂質標識ＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳ（ＡＡＴ　Ｂｉｏｑｕｅｓｔ、カタログ番号２２０５２）を用いて決定した。薬物とＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳは０．１％トリフルオロ酢酸を用いて１：３（ｖ：ｖ）の比率で抽出された。必要であれば、血漿をＰＢＳで希釈した。血漿／イソプロパノール中０．１％トリフルオロ酢酸混合物を２０秒間高速でボルテックスし、続いて１３．４　ＲＣＦで１０分間遠心分離し、上清をＨＰＬＣオートサンプラーバイアルに移し、抽出後２４

時間以内にＨＰＬＣで分析するまで２３℃で光から保護して保存した。リポソーム試験品から標準を調製し、マウス血漿に使用したのと同じ手順を用いて抽出した。ホスホモリブデンブルー分光光度アッセイを用いて、リポゾーム試験品をリン脂質について分析し、ＤｉＩＣ$_{１８}$（３）－ＤＳピーク対リン脂質濃度のキャリブレーションのための参照標準として用いた。マウス血漿中のＡＫＧ－２８、ＡＫＧ－３８および蛍光脂質標識ＤｉＩＣ$_{１８}$（３）－ＤＳのＨＰＬＣ分析は、Ｃ８ガードカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＳｅｃｕｒｉｔｙＧｕａｒｄ　内径４×３ｍｍ、カタログ番号ＡＪ０－４２９０）の前に、Ｃ８逆相カラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｋｉｎｅｔｅｘ　Ｃ１８カラム、内径５０ｍｍ×４．６ｍｍ、粒径５μｍ、細孔径１００Å、カタログ番号００Ｂ－４６０８－Ｅ０）を使用するＴｈｅｒｍｏ　Ｖａｎｑｕｉｓｈシステムで行われた。２μｌの試料注射体積を使用し、カラムをＡ）０．０１％トリフルオロ酢酸、Ｂ）アセトニトリル中０．０１％トリフルオロ酢酸、およびＣ）イソプロパノール中０．０１％トリフルオロ酢酸からなる移動相で、以下に列挙する勾配溶出プログラムを使用して、１．０ｍＬ／分の流速で溶出した。

【表５４】

表48.　薬物および蛍光脂質(DiIC$_{18}$(3)-DS)のHPLC勾配溶出プロトコール

分	%A	%B	%C
0	95	5	0
3	71	29	0
8	0	29	71
10	0	29	71
11	95	5	0
15	95	5	0

【０５０５】

ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８はそれぞれ保持時間２．７と３．６分で３０５ｎｍの吸収により検出され、ＤｉＩＣ$_{１８}$（３）－ＤＳは保持時間９．２分で５５０ｎｍの励起と５７０ｎｍの発光により検出された。

【０５０６】

［実施例５３］

［マウスにおけるリポソームＬｓ－２９３－Ｌｓ－３０２の血漿薬物動態。］

高い薬物対脂質充填（実施例５１）を有するＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８の新規のリポソーム製剤が、アンモニウム勾配のさらなる消耗にもかかわらず、マウスにおいて長期循環薬物動態特性を保持する可能性を評価した。実施例５１に従って調製したリポソームは、雌ＣＤ－１マウスに５０ｍｇ／ｋｇ　ＡＫＧ－３８リポソームまたは３０ｍｇ／ｋｇ　ＡＫＧ－２８リポソームの用量で２連にしてｉ．ｖ．投与された。注射の５分（０．０８３時間）、１、３、６、２４、および４８時間後に、血液をＬｉ－ヘパリン化マイクロベット（Ｓａｒｓｔｅｄｔ）にサンプリングし、遠心分離し、血漿を直接ＨＰＬＣ分析によりＡＫＧ－２８について分析し、実施例５２に記載されるように間接（ＤｉＩＣ$_{１８}$（３）－ＤＳ標識）ＨＰＬＣ分析によりリポゾームリン脂質について分析した。結果は以下の表の通りである。

【表５５】

表49. CD-1マウスにおけるリポソームAKG-38、ロットLs-293-Ls-297 (実施例51) の血漿薬物動態

AKG-38, mg/ml						
ロット ID	Ls-293-7	Ls-293	Ls-294	Ls-295	Ls-296	Ls-297
時間, 時						
0.083	1.451	1.896	1.375	1.650	1.462	1.385
1	1.517	1.234	1.376	1.192	1.249	1.103
3	0.908	1.276	0.831	0.948	1.008	0.968
6	0.859	0.948	0.822	0.754	0.696	0.748
24	0.284	0.383	0.210	0.179	0.287	0.183
48	0.0360	0.0514	0.0224	0.0225	0.0108	0.0076
C_0, mg/ml	1.423	1.599	1.347	1.361	1.485	1.417
k, 1/hr	0.0750	0.0695	0.0839	0.0855	0.0963	0.1044
R^2	0.9888	0.9836	0.9927	0.9955	0.9662	0.9856
$T_{1/2}$, hr	9.2	10.0	8.3	8.1	7.2	6.6
脂質, μM PhL						
ロットID	Ls-293-7	Ls-293	Ls-294	Ls-295	Ls-296	Ls-297
時間, 時						
0.083	3367.4	4473.9	2353.9	3738.4	2506.4	3141.9
1	3828.0	2871.4	2360.3	2831.7	2220.2	2469.7
3	2387.3	2987.5	1428.6	2290.0	1835.1	2234.1
6	2163.2	2348.6	1465.8	1838.9	1309.6	1975.2
24	1015.7	1294.7	509.0	673.8	755.7	766.9
48	216.6	345.8	83.3	220.4	69.2	163.0
C_0, μM PhL	3368.1	3550.5	2235.3	2940.4	2445.5	2844.5
k, 1/hr	0.05607	0.04757	0.06740	0.05581	0.06973	0.05870
R^2	0.9826	0.9716	0.9879	0.9806	0.9619	0.9946
$T_{1/2}$, hr	12.4	14.6	10.3	12.4	9.9	11.8
$T_{1/2}$, hr, 薬物放出	36.6	31.6	41.9	23.3	26.1	15.2

【表５６】

表50. CD-1マウスにおけるリポソームAKG-28、ロットLs-298-Ls-302 (実施例51) の血漿薬物動態

AKG-28, mg/ml						
ロットID	Ls-298-7	Ls-298	Ls-299	Ls-300	Ls-301	Ls-302
時間, 時						
0.083	0.879	0.637	0.790	0.678	0.851	0.381
1	0.687	0.579	0.760	0.777	0.567	0.461
3	0.612	0.438	0.593	0.502	0.504	0.315
6	0.473	0.329	0.475	0.470	0.426	0.309
24	0.144	0.112	0.210	0.137	0.157	0.0891
48	0.0479	0.0280	0.0817	0.0262	0.0322	0.0034
C_0, mg/ml	0.733	0.561	0.715	0.708	0.673	0.425
k, 1/hr	0.0592	0.0637	0.0466	0.0687	0.0631	0.0646
R^2	0.9847	0.9914	0.9857	0.9945	0.9877	0.9715
$T_{1/2}$, hr	11.7	10.9	14.9	10.1	11.0	10.7
脂質, μM PhL						
ロットID	Ls-298-7	Ls-298	Ls-299	Ls-300	Ls-301	Ls-302
時間, 時						
0.083	3480.0	2937.0	2794.1	3284.1	3234.1	1797.6
1	2696.5	2598.3	2505.9	3805.1	2159.8	1871.0
3	2335.4	1970.9	2067.8	2573.6	1910.8	1525.4
6	2061.6	1485.0	1631.3	2392.0	1418.1	1391.6
24	517.8	459.7	796.5	674.6	506.3	456.1
48	185.5	106.5	263.6	123.7	122.6	138.8
C_0, μM PhL	2914.8	2560.0	2493.5	3538.0	2446.5	1854.5
k, 1/hr	0.06032	0.06763	0.04728	0.06970	0.06343	0.05482
R^2	0.9800	0.9924	0.9904	0.9957	0.9837	0.9970
$T_{1/2}$, hr	11.5	10.2	14.7	9.9	10.9	12.6
$T_{1/2}$, hr, 薬物放出	ND	ND	ND	ND	ND	70.7

ND - 検出不能

【０５０７】

濃度データをＥｘｃｅｌスプレッドシートＬＯＧＥＳＴ関数を用いて単一指数式に当てはめた。薬物放出半減期を式：

$T_{1/2\text{放出}} = T_{1/2\text{薬物}} * T_{1/2\text{脂質}} / (T_{1/2\text{脂質}} - T_{1/2\text{薬物}})$

により算出した。

【０５０８】

薬物とリポソームの脂質成分の両方についての血液レベルは、ｉｎ　ｖｉｖｏで比較的強い薬物保持を有する長時間循環するリポソームについて予想されるように、単一指数（単一コンパートメント）モデルによく適合する。両方の薬物について、脂質マトリックスの血漿半減期は、９．９～１４．７時間の範囲であった。ＡＫＧ－３８リポソームの薬物放出半減期はＡＫＧ－２８よりも顕著に低く、これは一価陽イオンを形成するＡＫＧ－３８とは対照的に、ＡＫＧ－２８とリポソーム内部の捕捉剤対イオン（硫酸塩）とのイオン相互作用の二価特性による可能性が高い。実際に、より低い（約２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）とより高い（約３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）薬物／脂質比の両方における約１００ｎｍまたは約１２０ｎｍのリポソームからのＡＫＧ－３８のｉｎ　ｖｉｖｏ薬物放出速度は、本発明者らの実験設定において信頼性をもって決定するには遅すぎた。ＡＫＧ－３８では、薬物放出半減期は、より大きなリポソームサイズの製剤およびより低いＤＬ比（約４５０対約６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）の製剤でより高かったが、その差は、約１２０ｎｍの平均サイズ（Ｘｚ）のリポソームではそれほど顕著ではなかった。より小さいサイズ（約８０ｎｍ）のリポソームは、ｉｎ　ｖｉｖｏで顕著に増加した薬物放出速度を示した。

予想に反して、約１００～１２５ｎｍのリポソーム平均サイズ（Ｘｚ）範囲において、ＡＫＧ－３８に対して約６００ｇ／ｍｏｌ　ＰおよびＡＫＧ－２８に対して約３３０ｇ／ｍｏｌ　Ｐのより高いＤＬ比を有するリポソームは、約４５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＡＫＧ－３８）および約２５０　ｄ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＡＫＧ－２８）のより低いＤＬ比を有するリポソームのそれに非常に近い血液ＰＫ特性を示した。

【０５０９】

［実施例５４］

［種々の薬物充填および充填後の処理条件におけるＡＫＧ－２８リポソームの調製および特性］

本実施例では、本発明者らは、薬物充填または充填後の処理ステップを変更することによってリン脂質の分解を減少させるための様々な戦略を評価した。ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポゾーム（押し出されたロットＬ－９７、Ｘｚ　１１７．３ｎｍ、ＰＤＩ　０．０４５３）は、$DiIC_{18}$（３）－ＤＳの量がＨＳＰＣ（ロットＬ－９７）に対して０．０５ｍｏｌ％であったことを除き、本質的に実施例３０に記載されるように、３ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで調製された。押し出されたリポソームを０．２μｍシリンジフィルターに通し、リポソーム外の硫酸アンモニウムを水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が１１５μＳ／ｃｍ（６．０体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後のリポソーム中のリン脂質濃度をホスホモリブデンブルー法によって決定し、リポソームのアリコートをデキストロースの存在下、２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比でＡＫＧ－２８（ｐＨ５．１４）の２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液と混合し、６５℃水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で冷却し、以下の条件下でさらに処理した（ＬＭは薬物－リポソーム充填混合物を意味する）：

ロットＬｓ－３０７－１－Ａ：ＬＭ、６ｍｇ／ｍｌ薬物、４５ｍｇ／ｍｌデキストロース、充填後の０．１Ｍ　ＮａＣｌ添加、ＴＦＦ緩衝液交換（実施例２Ａによる）：２０ｍＭのＨｅｐｅｓ－Ｎａ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液ｐＨ７．５（ＨＢＳ－２０－７．５）（１０Ｖｅｘ）；

Ｌｓ－３０７－１－Ｂ：交換／賦形剤緩衝液が１０ｍＭリン酸ナトリウム、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．５（ＰＢＳ－１０－７．５）であったことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ；

Ｌｓ－３０７－１－Ｃ；交換／賦形剤緩衝液が１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０（ＨＢＳ－７）であったことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ；

Ｌｓ－３０７－２：ＬＭ、６ｍｇ／ｍｌ薬物、４５ｍｇ／ｍｌデキストロース、充填後のＮａＣｌ添加なし、充填後の緩衝液交換なし、１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａを最終の２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．５に添加する。

Ｌｓ－３０８：６５℃のインキュベーション終了の５分前に１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ（ｐＨ７．６３、２０ｍＭ希釈でｐＨ７．５０を生じる）をＬＭに添加したことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ。

Ｌｓ－３０９：ＬＭが３ｍｇ／ｍｌの薬物と１４０ｍｇ／ｍｌのデキストロースを含有したことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ｃと同じ。

Ｌｓ－３１０：ＬＭが５．４ｍｇ／ｍｌの薬物を含有したことを除いて、Ｌｓ－３０９と同じ。

【０５１０】

リポソームを透析濾過により約８ｍｇ／ｍｌの薬物に濃縮して、丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）中に無菌濾過した（０．２ｕｍ　ＰＥＳ）。薬物濃度（ＵＶ分光光度法による）、リポソーム粒径、およびｐＨを本明細書に記載のように決定し、リポソームを３７℃で２週間インキュベートした。脂質の完全性および分解生成物をＨＰＬＣによって定量した（実施例５０を参照）。結果は以下の表の通りである。

【表５７】
表51．リポソームAKG-28製剤特徴(Ls-307～Ls-310)および2週間の安定性

				リポソームサイズ		インキュベーション前			37° Cで2週間		
ロットID	DL比	EE, %	AKG-28	Xz	PDI	pH	脂質分解, %		pH	脂質分解, %	
	g/mol PhL		mg/ml	nm			Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-307-1-A	245.0	97.3	7.95	119.1	0.0050	7.48	0.00	0.00	7.40	0.33	0.38
Ls-307-1-B	245.6	97.6	8.15	117.6	0.0152	7.36	0.00	0.04	7.16	0.00	0.82
Ls-307-1-C	244.0	96.9	7.87	119.2	0.0163	6.92	0.00	0.22	6.46	56.55	3.91
Ls-307-2	245.5	97.3	8.00	119.1	0.0418	7.46	0.00	0.00	6.63	45.93	0
Ls-308	240.5	97.4	8.03	119.2	0.0198	7.48	0.00	0.00	7.34	8.17	0.96
Ls-309	247.2	97.7	8.66	116.2	0.0316	6.89	0.00	0.39	6.36	57.02	5.13
Ls-310	245.5	97.1	8.59	119.7	0.0083	6.93	0.00	0.18	6.32	60.63	2.75

EE - カプセル封入効率

【０５１１】
加速された安定性研究条件下（３７℃、４℃のアレニウス係数は９．８５である）では、ｐＨ７．０以下の試料および未精製の緩衝化ＬＭ（ロットＬ－３０７－２）において、脂質の相当な分解が検出された。コレステロール分解生成物は、ＨＰＬＣのピーク溶出時間およびＵＶ分光法により７－ヒドロキシコレステロールおよび７－ケトコレステロールとして同定された；ＨＳＰＣ分解生成物は、リゾ－ＰＣ、ステアリン酸、およびパルミチン酸を含んだ。しかし、驚くべきことに、緩衝液交換ステップのない未精製の緩衝化ＬＭでは、コレステロールの高度の分解にもかかわらず、ＨＳＰＣの分解は検出できなかった。

【０５１２】
［実施例５５］
［種々の薬物充填および充填後の処理条件におけるＡＫＧ－３８リポソームの調製および特性。］
保存中のリン脂質の分解を減少させる可能性について、異なる薬物充填および処理ステップを評価した。押し出されたリポソームを調製し、リポソーム外の捕捉剤から精製し、実施例５４のように分析した。リポソームのアリコートをデキストロースの存在下、ＡＫＧ－３８（ｐＨ４．９９）の２０ｍｇ／ｍｌ水性ストック溶液と４５０ｇ／ｍｏｌ ＰｈＬのＤＬ０比で混合し、６５℃水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で冷却して、以下の条件下でさらに処理した：
ロットＬｓ－３０３－１－Ａ：ＬＭ、８ｍｇ／ｍｌ薬物、４５ｍｇ／ｍｌデキストロース、充填後の０．１Ｍ ＮａＣｌ添加、ＴＦＦ緩衝液交換（実施例５１による）：２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ、１４４ｍＭ ＮａＣｌ緩衝液ｐＨ７．５（ＨＢＳ－２０－７．５）（１０Ｖｅｘ）；
Ｌｓ－３０３－１－Ｂ：交換／賦形剤緩衝液が１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１４４ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．５（ＰＢＳ－１０－７．５）であったことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ；
Ｌｓ－３０３－１－Ｃ；交換／賦形剤緩衝液が１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ、１４４ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０（ＨＢＳ－７）であったことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ；
Ｌｓ－３０３－２：ＬＭ、８ｍｇ／ｍｌ薬物、４５ｍｇ／ｍｌデキストロース、充填後のＮａＣｌ添加なし、充填後の緩衝液交換なし、１Ｍ Ｈｅｐｅｓ－Ｎａを最終の２０ｍＭ

Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．５に添加する。
Ｌｓ－３０４：６５℃のインキュベーション終了の５分前に１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ（ｐＨ７．６３、２０ｍＭ希釈でｐＨ７．５０を生じる）をＬＭに添加したことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ａと同じ。
Ｌｓ－３０５：ＬＭが３ｍｇ／ｍｌ薬物および１４０ｍｇ／ｍｌ　デキストロースを含有したことを除いて、Ｌｓ－３０７－１－Ｃと同じ。
Ｌｓ－３０６：ＬＭが７．４ｍｇ／ｍｌ薬物を含有したことを除いて、Ｌｓ－３０９と同じ。
リポソームを透析濾過により約１５ｍｇ／ｍｌの薬物に濃縮して、丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）中に無菌濾過した（０．２ｕｍ　ＰＥＳ）。
薬物濃度（ＵＶ分光光度法による）、リポソーム粒径、およびｐＨを本明細書に記載のように決定し、リポソームを３７℃で２週間インキュベートした。脂質の完全性および分解生成物をＨＰＬＣによって定量した（実施例５０を参照）。結果は以下の表の通りである。

【表５８】

表52. リポソームAKG-38製剤特徴(Ls-303～Ls-306)および2週間の安定性

				リポソームサイズ		インキュベーション前			37° Cで2週間		
ロットID	DL比	EE,%	AKG-38	Xz	PDI	pH	脂質分解,%		pH	脂質分解,%	
	g/mol PhL		mg/ml	nm			Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-303-1-A	442.6	96.4	15.63	118.5	0.0309	7.49	0.00	0.00	7.40	0.00	0.81
Ls-303-1-B	445.9	97.1	15.30	117.8	0.0092	7.32	0.00	0.00	7.15	0.00	1.46
Ls-303-1-C	452.6	98.5	15.10	120.2	0.0185	6.90	0.00	0.67	6.64	0.00	8.76
Ls-303-2	455.3	100.5	15.00	117.9	0.0443	7.39	0.00	0.00	7.33	20.11	0
Ls-304	438.2	95.8	15.40	118.5	0.0065	7.47	0.00	0.00	7.38	0.00	2.29
Ls-305	449.8	99.5	14.91	116.9	0.0308	6.85	0.00	5.00	6.50	0.00	10.22
Ls-306	459.9	100.6	15.02	120.2	0.0246	6.88	0.00	1.90	6.63	0.00	6.66

【０５１３】
リポソーム脂質の分解は、３７℃での２週間の保存後に検出可能であったが（加速された安定性研究）、同様に調製したＡＫＧ－２８リポソーム（実施例５４）と比較してより低い速度であった。コレステロールの有意な分解が、リポソームロットの１つで観察された；しかし、予想外に、同じロット（充填後の緩衝液交換なしの薬物充填リポソーム）におけるＨＳＰＣの分解は最低であった。
【０５１４】
［実施例５６］
［ＤＬ比が増加したＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８のリポソーム：調製、脂質安定性、およびキレート剤によるコレステロール安定化。］
本実施例では、重金属キレート剤を使用した保存中に観察されるコレステロール酸化分解生成物を減少させる可能性を評価した。ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－９９、Ｘｚ　１１７．９ｎｍ、ＰｄＩ　０．００７８）は、５．９ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで実施例５４のように調製された。押し出されたリポソームを０．２μｍのシリンジフィルターに通し、リポソーム外の硫酸アンモニウムを水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が１３８μＳ／ｃｍ（６．１体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後のリン脂質濃度をホスホモリブデンブルー法によって決定し、リポソームのアリコートをＡＫＧ－３８（８ｍｇ／ｍｌ）またはＡＫＧ－２８（６ｍｇ／ｍｌ）と、所定の薬物対脂質（ＤＬ０）比（下記表５３を参照されたい。）で、４５ｍｇ／ｍｌのデキストロースの存在下で、ＡＫＧ３８の場合は１０ｍＭ　ＮａＣｌの存在下で、６５℃の水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で冷却した。リポソーム

を０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整し、２～８℃で一晩保存し、各ロットを６つの部分に分割した。部分３および６に、キレート剤、１００ｍＭデフェロキサミンメシレート（Ｄｅｓｆｅｒａｌ、ＤＦＯ）を１ｍＭの最終濃度まで添加し、全ての部分を、ＨＢＳ－２０－７．５（部分１～３）またはＰＢＳ－２０－７．５（２０ｍＭリン酸Ｎａ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．５；部分４～６）緩衝液のいずれかを用いて、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）上のＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去（８～１１．２体積交換（Ｖｅｘ））に供した。ＴＦＦ精製されたリポソームを、緩衝液供給なしで透析濾過を継続することによって濃縮して、０．２μｍ　ＰＥＳシリンジフィルターを通す濾過によって滅菌し、それぞれの交換／賦形剤緩衝液で、１５ｍｇ／ｍｌ　ＡＫＧ－３８または８ｍｇ／ｍｌ　ＡＫＧ－２８の薬物濃度に調整した。部分３および６には、無菌１００ｍＭ　ＤＦＯストックを最終０．１ｍＭ　ＤＦＯまで添加し、部分２および４には、ＤＦＯストックを最終０．５ｍＭ　ＤＦＯまで添加した。薬物濃度（ＵＶ分光光度法による）、リポソーム粒径、およびｐＨを本明細書に記載のように決定した。Ｈｅｐｅｓ緩衝化試料中のリン脂質濃度はホスホモリブデン（Ｍｏ）ブルー分析により、リン酸塩緩衝化試料中のリン脂質濃度はＭｏ分析Ｈｅｐｅｓ緩衝化試料を標準として用いて７０％酸性化イソプロパノール中の$DiIC_{18}$（３）－ＤＳ脂質標識の蛍光測定により決定された。リポソームを無菌の丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）に無菌的に分注し、バイアルを３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１、２、および３カ月目に、リポソームをサンプリングし、ｐＨ、粒径、ならびに薬物および脂質の分解について分析した。脂質および薬物分解生成物を、実施例５０に記載されるように、ＨＰＬＣによって同定し、定量した。以下の結果が得られた。

【表５９】

表53. AKG-38リポソームのpHおよび脂質分解におけるpH、DL0、およびDFOの影響

AKG-38リポソーム						初期	1カ月			2カ月			3カ月		
ロットID	DL0比	カプセル封入されたDL	LM中のDFO	賦形剤緩衝液		pH	pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%	
Ls-...	g/mol P	g/mol P	充填後	緩衝液	DFO			Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC
311-1	450	450.6 ± 3.1	なし	HBS-20-7.5	なし	7.49	7.25	19.86	6.39	7.15	34.43	5.2	6.90	40.59	10.75
311-2	450	452.4 ± 5.2	なし	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.46	7.28	0	5.76	7.25	0	8.85	7.12	0	13.51
311-3	450	456.6 ± 3.1	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.47	7.30	0	5.28	7.27	0	9.42	7.19	0	15.29
311-4	450	451.8 ± 6.3	なし	PBS-20-7.5	なし	7.39	7.15	0	6.09	7.01	30.43	9.92	6.84	33.21	18.6
311-5	450	453.5 ± 9.9	なし	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.39	7.13	0	5.61	7.07	0	8.63	6.94	0	13.87
311-6	450	447.9 ± 9.6	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.39	7.13	0	7.08	7.11	0	9.54	7.00	0	14.96
312-1	600	599.9 ± 5.6	なし	HBS-20-7.5	なし	7.47	6.59	48.49	5.10	6.52	50.43	4.77	6.41	49.90	11.19
312-2	600	601.4 ± 6.3	なし	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.48	7.01	0	11.72	nd	nd	nd	nd	nd	nd
312-3	600	587.6 ± 6.3	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.44	7.37	0	3.17	7.31	0	7.92	7.25	0	15.23
312-4	600	613.3 ± 14.0	なし	PBS-20-7.5	なし	7.40	7.26	0	5.32	7.16	29.13	8.79	6.87	43.04	21.79
312-5	600	613.3 ± 16.2	なし	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.36	7.25	0	3.67	7.20	0	6.96	7.10	0	13.25
312-6	600	606.0 ± 13.3	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.44	7.25	0	4.00	7.20	0	7.91	7.13	0	15.51

【表６０】

表54. AKG-28リポソームのpHおよび脂質分解におけるpH、DL0、およびDFOの影響

AKG-28リポソーム						初期	1カ月			2カ月			3カ月		
ロットID	目標DL	カプセル封入されたDL	LM中のDFO	賦形剤緩衝液		pH	pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%	
Ls-...	g/mol P	g/mol P	充填後	緩衝液	DFO			Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC
313-1	250	257.5 ± 3.4	なし	HBS-20-7.5	なし	7.50	7.20	41.09	2.46	7.17	39.26	3.40	7.07	39.42	3.57
313-2	250	257.4 ± 2.7	なし	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.50	7.34	0	3.91	7.27	0	4.85	7.21	0	8.52
313-3	250	258.8 ± 2.9	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.50	7.34	0	4.17	7.27	0	6.66	7.20	0	11.78
313-4	250	257.1 ± 6.2	なし	PBS-20-7.5	なし	7.50	7.01	42.12	2.24	7.02	34.60	3.22	6.83	38.81	3.31
313-5	250	261.8 ± 5.7	なし	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.41	7.14	0	4.50	7.07	0	6.85	6.97	0	11.30
313-6	250	261.1 ± 6.0	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.40	7.14	0	5.23	7.10	0	7.89	7.02	0	13.35
314-1	330	338.3 ± 4.8	なし	HBS-20-7.5	なし	7.48	6.99	52.12	3.53	nd	nd	nd	nd	nd	nd
314-2	330	337.9 ± 6.4	なし	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.48	7.25	0	7.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd
314-3	330	341.4 ± 3.7	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.48	7.36	0	2.28	7.33	0	5.93	7.28	6.98	10.07
314-4	330	350.2 ± 21.1	なし	PBS-20-7.5	なし	7.41	7.12	40.92	2.18	7.00	46.96	3.36	6.80	50.87	4.48
314-5	330	350.1 ± 21.1	なし	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.41	7.24	0	2.00	7.14	0	5.94	7.06	0	9.35
314-6	330	346.2 ± 22.8	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.41	7.25	0	3.43	7.15	0	7.84	7.06	0	13.42

【０５１５】

脂質分解生成物の初期レベルは検出できなかった。コレステロール分解生成物、７－ヒドロキシおよび７－ケトコレステロールの出現は酸化的分解を示唆したが、ＨＳＰＣ分解はエステル結合（複数可）で加水分解的に進行した。リポソーム賦形剤緩衝液へのキレート剤デフェロキサミンの添加は、３７℃で３カ月保存（４℃で約２９カ月の冷蔵保存に相当する）しても、コレステロールの分解を完全に防止した。ＤＦＯは不飽和脂肪酸の金属触媒酸化を阻害することが公知であるが、ＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８オキサゾリジノン薬物を含有するリポソーム中のコレステロールの酸化的分解を阻害するＤＦＯのこの並外れた能力は驚くべきことであった。コレステロールの酸化的分解は、弱塩基性の親油性薬物を充填した医薬用リポソームでは頻繁には観察されない。コレステロール分解は、同一組成のリポソームでは観察されなかったが、薬物を欠くため、本発明者らは、理論に拘束されることなく、分解は、単独で、または医薬製剤および賦形剤中に一般的に存在する微量の重金属との複合体で、これらのカプセル封入された薬物によるコレステロール酸化の触媒作用に関連する可能性があると仮定する。ＤＦＯのこの安定化効果は、Ｈｅｐｅｓまたはリン酸塩で緩衝化したリポソーム調製物において等しく観察された。また、増加したＤＬ０比（ＡＫＧ－２８、３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、ＡＫＧ－３８、６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）を有するリポソームの高いカプセル化効率は、調製物に最初に添加された薬物のより高い濃度にもかかわらず、高く、効果的に定量的であった。

【０５１６】

［実施例５７］

［充填前の薬物ストックへのキレート剤の添加は、ＡＫＧ－２８（Ｌｓ　３１５～３１８）およびＡＫＧ－３８（Ｌｓ　３１９～３２２）のリポソーム製剤における脂質分解に対して保護しない。］

充填前に元の薬物ストックにキレート剤を含めることにより、コレステロール酸化生成物を減少させる可能性を評価した。ＤＬ０　２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＡＫＧ－２８またはＤＬ０　４５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＡＫＧ－３８を充填したリポソームは、いくつかのロットにおいて、１ｍＭのキレート剤ＤＦＯ、ＥＤＴＡ）またはＤＴＰＡを、リポソームへの添加前に２０ｍｇ／ｍｌの薬物ストック溶液に添加したことを除いて、本質的に実施例５６のように調製した。充填後、リポソームをＨＢＳ－２０－７．５とのＴＦＦ緩衝液交換に供し、追加のキレート剤なしで保存した。リポソームを濾過滅菌し、分析し、無菌ガラスバイアルに分注し、３７℃でインキュベートし、実施例５６に記載されるようにサンプリングした。試料分析の結果およびリポソームの特徴を以下の表に示す。

【表６１】

表55. キレート剤含有薬物ストックを用いて充填したAKG-28およびAKG-38リポソームの安定性

			薬物ストック	初期	2週間			1カ月			2カ月			3カ月		
ロットID	薬物	カプセル封入されたDL	溶液中のキレート剤	pH	pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%		pH	脂質分解、%	
		g/mol P	充填前			Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-315	AKG-28	248.2 ± 3.1	なし	7.47	7.32	22.31	1.37	7.14	46.01	2.26	7.14	40.26	2.86	7.02	38.8	4.59
Ls-316	AKG-28	250.2 ± 3.3	DFO 1 mM	7.47	7.37	0	3.36	7.32	0	4.13	7.22	18.47	7.12	6.37	55.18	7.15
Ls-317	AKG-28	252.8 ± 2.6	EDTA 1 mM	7.47	7.35	0	4.25	7.33	0	5.81	7.15	28.00	9.3	7.02	30.02	15.55
Ls-318	AKG-28	250.2 ± 2.3	DTPA 1 mM	7.48	7.37	0	4.73	7.32	0	5.65	7.17	16.20	9.37	7.12	25.95	12.3
Ls-319	AKG-38	440.1 ± 4.3	なし	7.45	7.32	16.4	3.87	7.18	38.72	2.81	7.13	34.94	3.53	6.98	38.94	9.13
Ls-320	AKG-38	445.4 ± 5.0	DFO 1 mM	7.44	7.32	0	5.2	7.27	0	6.03	7.15	28.16	9.83	6.97	32.77	18.98
Ls-321	AKG-38	442.6 ± 4.2	EDTA 1 mM	7.44	7.32	0	5.28	7.27	0	6.86	7.20	15.48	11.25	7.02	30.34	18.22

【０５１７】

リポソームとの混合前に３種のキレート剤のいずれかを薬物ストック溶液に添加すると、コレステロール分解生成物の形成が遅れたが、その分解は観察の全３カ月間にわたり妨げられなかった。したがって、キレート剤をリポソーム保存媒体に添加することが好ましい。

【０５１８】

［実施例５８］

［キレート剤の存在下でのＬｓ－ＡＫＧ２８調製物の安定性］

最終リポソーム薬物生成物中のＤＦＯまたはＥＤＴＡキレート剤のいずれかが、保存中に生成されるコレステロール酸化生成物の存在を減少させる可能性を評価した。ロットＬｓ－３２３、Ｌｓ－３２４。蛍光脂質標識ＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳを添加しなかったことを除いて、１０ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで、本質的に実施例５４のように、ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－１００、Ｘｚ　１２１．４ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１３１）を調製した。約６０ｍＭリン脂質の０．５Ｍ硫酸アンモニウム－９．１ｖｏｌ％エタノール中の水和脂質分散体を２つの部分に分割し、それぞれをＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレル押出機を用いて７０℃および２８０ｐｓｉで２×１００ｎｍ＋１×２００ｎｍのＰＣＴＥメンブレンのスタックに４回通した。２つの部分を合わせ、同じ膜スタックをさらに６回通して、押し出されたロットＬ－１００、Ｘｚ　１２１．４ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１３１を得た。押し出されたリポソームを２～８℃で一晩保持し、０．２μｍシリンジフィルターに通し、リポソーム外の硫酸アンモニウムを、水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が１５２μＳ／ｃｍ（５．９体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後の押し出されたリポソーム中のリン脂質濃度（５４．７ｍＭ）をホスホモリブデンブルー法によって決定した。これらのリポソームのアリコートは、４５ｍｇ／ｍｌデキストロースの存在下、ＡＫＧ－２８（６ｍｇ／ｍｌ）と、ＤＬ０比を２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ロットＬｓ－３２３）または３２０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ロットＬｓ－３２４）でそれぞれ薬物の１．６１ｇまたは０．５９ｇのスケールで８５℃水浴上にて、充填混合物が６４℃（４分間）になるまで撹拌しながらインキュベートし、６５℃水上でさらに２３分間続け、続いて氷水中で１０分間冷却した。リポソームを３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整し、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）でのＴＦＦ透析濾過によって、１３～１４ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８に濃縮した。各濃縮ロットの一部を、ＨＢＳ－２０－７．５緩衝液を用いて、同じカートリッジ（６．９～７．９Ｖｅｘ）上でＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去に供した。ＴＦＦ精製および未精製の薬物充填リポソームをＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で１２．５ｍｇ／ｍｌ（ロット－Ｌｓ－３２３）または１３．４ｍｇ／ｍｌ（Ｌｓ－３２４）の薬物濃度に調整し、０．２μｍ　ＰＥＳシリンジフィルターを通すことにより滅菌した。カプセル封入された薬物のＤＬ比を、ＴＦＦ後の部分の薬物およびリン脂質分析から決定し、２４６．０±２．３ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（Ｌｓ－３２３；ＥＥ９８．４％）および３１５．６±４．８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（Ｌｓ－３２４；ＥＥ９５．６％）であることを見出した。

【０５１９】

ロットＬ－１００のＴＦＦ後の押し出されたリポゾームの別の一部を３８．５ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８水性ストック溶液（ｐＨ５．１３）と混合し、デキストロースの非存在下で、薬物０．３６５ｇのスケールおよび３２０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比で最終１２．８ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８にした（ロットＬｓ－３２６）。充填混合物（ＬＭ）を６５℃水浴上で２３分間撹拌し、続いて氷水中で１０分間冷却し、３Ｍ　ＮａＣｌを最終６０ｍＭまで添加した。添加されたＮａＣｌ濃度は、２７０～３１０ｍＯｓｍ／Ｌの等張浸透圧範囲内のＬＭの充填後の張性を提供するように選択された。Ｗｅｓｃｏｒ　Ｖａｐｒｏ　５５２０露点浸透圧計を用いて決定されたＮａＣｌ調整されたＬＭの浸透圧は２９１±３ｍＯｓｍ／ｋｇであった。Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂ上のＳＥＣによってカプセル封入されていない薬物から精製されたインキュベーション後のＬＭのアリコートは、３２０．４±３．５ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＥＥ９７．０％）のカプセル封入されたＤＬ比を示した。インキュベーション後のＬＭ（ｐＨ５．７）を２つの部分に分けた；部分１は、１Ｎ　ＮａＯＨ（Ｌｓ－３２６ＬＭ）でｐＨ６．４９に調整され、部分２は、１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ　ｐＨ７．５（Ｌｓ－３２６ＬＭＨ；調整後ｐＨ７．１６）で２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓに調整された。各部分を０．２μｍ無菌濾過し、さらに３つの部分に分割した：部分１は、非キレート剤対照として使用し、部分２は、無菌の１００ｍＭデフェロキサ

ミンメシレートで０．５ｍＭデフェロキサミン（ＤＦＯ）に調整され、部分３は、無菌の１００ｍＭ　ＥＤＴＡ－Ｎａ、ｐＨ６．０で０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ－Ｎａに調整された。Ｌｓ－３２３（ＴＦＦ精製／緩衝液交換）およびＬｓ－３２３ＬＭ（未精製のインキュベーション後の充填混合物）の各々の３つのアリコートを、０．５ｍＭ　ＤＦＯ、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するか、またはキレート剤を含有しないように同じ方法で処理した。薬物濃度（ＵＶ分光光度法による）、リポソーム粒径、およびｐＨを、本明細書に記載のように決定した。リン脂質はホスホモリブデン（Ｍｏ）ブルー分析により決定した。リポソームを無菌の丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）に無菌的に分注し、バイアルを３７℃でインキュベートした。インキュベーションの２週間、１カ月、６週間、および１０週間目にリポソームをサンプリングし、ｐＨ、粒径、ならびに薬物および脂質の完全性について分析した。脂質の完全性および分解生成物は、実施例５４に記載されるように、ＨＰＬＣによって同定および定量された。以下の結果が得られた。

【表６２】

表56. 保存安定性における最終のリポソーム薬物調製物中のキレート剤の影響

AKG-28 リポソーム				初期	2週間			1カ月			10週間		
ロットID	DL0 比	薬物	キレート剤*	pH	pH	脂質分解, %		pH	脂質分解, %		pH	脂質分解, %	
	g/mol P	mg/ml				Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-323	250	12.5	なし	7.50	7.36	7.46	0.00	7.06	41.98	0.52	5.06	74.62	4.06
Ls-323	250	12.5	DFO	7.50	7.39	0.00	0.29	7.35	0.00	1.38	7.16	0.00	6.42
Ls-323	250	12.5	EDTA	7.50	7.37	0.00	0.41	7.27	0.00	1.83	7.07	0.00	6.62
Ls-323LM	250	13.4	なし	6.07	4.76	37.03	0.47	4.13	39.63	5.06	3.44	47.51	82.97
Ls-323LM	250	13.4	DFO	6.07	5.73	0.00	0.11	5.43	0.00	1.42	4.78	0.00	13.70
Ls-323LM	250	13.4	EDTA	6.07	5.83	0.00	0.05	5.48	0.00	0.94	4.72	0.00	12.74
Ls-326	323	12.2	EDTA	6.49	6.51	0.00	0.00	6.47	0.00	0.00	6.40	0.00	0.00
Ls-326	323	12.2	DFO	6.49	6.53	0.00	0.00	6.49	0.00	0.00	6.36	0.00	0.16
Ls-326	323	12.2	なし	6.49	6.37	25.41	0.00	4.99	59.31	1.13	3.93	70.62	14.38
Ls-326H	323	12.0	なし	7.16	7.16	0.00	0.00	7.12	21.34	0.00	6.21	67.86	0.00
Ls-326H	323	12.0	DFO	7.16	7.16	0.00	0.00	7.15	0.00	0.00	7.08	0.00	0.95
Ls-326H	323	12.0	EDTA	7.16	7.15	0.00	0.00	7.15	0.00	0.00	7.12	0.00	1.01

*0.5mMの最終濃度でEDTAまたはDFOを添加した

【０５２０】

キレート剤なしでは、コレステロールの酸化的分解は、ＴＦＦ精製／緩衝液交換試料ならびにｐＨ７．０未満の初期ｐＨでの未精製ＬＭにおける２週間のインキュベーション後に既に観察されていた。最終的に、コレステロールの有意な分解（１０週間で４７．５～７４．６％）が、キレート剤なしの全ての試料において観察された。対照的に、０．５ｍＭキレート剤、ＤＦＯまたはＥＤＴＡを含有する試料では、１０週間のインキュベーション後でさえ、コレステロール分解は検出できなかった。また、浸透圧剤、デキストロースなしで充填し、等張に塩化ナトリウムで調整されたＬｓ－３２６試料では、キレート剤の存在下でのＨＳＰＣの加水分解は著しく低かった（１０週間のインキュベーション後０～１．０１％）。コレステロール分解を有する試料はまた、分解の程度と相関するｐＨの低下を示した。

【０５２１】

［実施例５９］

［ＡＫＧ－２８リポソーム（ロットＬｓ－３３８－３４０）の特性および保存安定性における種々の充填条件およびリポソーム外の媒体組成の効果。］

リポソームＡＫＧ－２８製剤の保存安定性における様々の充填条件および外部媒体組成の影響を評価した。ロットＬｓ－３３８、Ｌｓ－３３９。ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－１０２、Ｘｚ　１１７．８ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１１８）は、ＰＣＴＥメンブレンスタックを通る通過回数が１０回であったことを除いて、５．９ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで、本質的に実施例５４に記載されるように調製された。押し出されたリポソームを２～８℃で一晩保持し、０．２μｍのシリンジフィルターに通した。リポソーム外の硫酸アンモニウムを、水に対するＴＦＦによって、残存する伝導

度が５４２μＳ／ｃｍ（４．２体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後の押し出されたリポソーム中のリン脂質濃度（５７．２ｍＭ）を、ホスホモリブデンブルー法によって決定した。これらのリポソームのアリコートは、４５ｍｇ／ｍｌデキストロースの存在下、薬物１００ｍｇのスケールで、２５９ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ロットＬｓ－３３８）または３４５ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ロットＬｓ－３３９）のＤＬ０比で、ＡＫＧ－２８（６ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌストック溶液として添加、ｐＨ５．１７）と混合し、６６℃水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて１０分間氷水中で冷却した。リポソームを３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液で０．１ＭのＮａＣｌに調整し、ＨＢＳ－２０－７．５緩衝液を用いて、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）（８．０～９．４Ｖｅｘ）上のＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去に供した。リポソーム保持物は、緩衝液供給なしで同じカートリッジ上で透析濾過により濃縮された。ＴＦＦ精製された濃縮リポソームをＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で９ｍｇ／ｍｌの薬物濃度に調整し、０．２μｍ　ＰＥＳシリンジフィルターを通すことにより滅菌した。ＴＦＦ後の部分の薬物とリン脂質分析から決定したカプセル封入された薬物のＤＬ比は、Ｌｓ－３３８で２５３．７±５．３ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＥＥ９９．９％）、Ｌｓ－３３９で３２９．９±６．３ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＥＥ９５．８％）であった。

【０５２２】

ロットＬ－１０２のＴＦＦ後の押し出されたリポゾームの別の一部を４０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８水性ストック溶液と混合し、デキストロースの非存在下、３４５ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比で薬物０．４００ｇのスケールで最終１２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８にした（ロットＬｓ－３４０）。充填混合物（ＬＭ）を６６℃水浴上で２０分間撹拌し、続いて氷水中で１０分間冷却して、３Ｍ　ＮａＣｌを５０ｍＭの最終ＮａＣｌ増加まで添加した。添加されたＮａＣｌ濃度は、添加された緩衝液によるさらなる浸透圧の増加の要因となるように選択された。薬物充填後であるがＮａＣｌおよびｐＨ調整前のＬＭの浸透圧は１３３±６ｍＯｓｍ／ｋｇであった。Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂ上のＳＥＣによってカプセル封入されていない薬物から精製したインキュベーション後ＬＭのアリコートは、３２１．７±５．８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＥＥ９５．０％）のカプセル封入ＤＬ比を示した。インキュベーション後、ＮａＣｌで調整されたＬＭ（ｐＨ５．７）をいくつかのロットに分け、さらに以下のように処理した：

ロット３４０Ｓ：精製し／緩衝液をＴＦＦによって０．８５％　ＮａＣｌ（８．３Ｖｅｘ）に交換し、交換後、２０Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａ、ｐＨ７．５および９ｍｇ／ｍｌの薬物に調整した。

ロット３４０Ｈ：精製し／緩衝液をＴＦＦによってＨＢＳ－２０－７．５緩衝液（８．３Ｖｅｘ）に交換し、同じ緩衝液で９ｍｇ／ｍｌの薬物に調整した。

ロット３４０Ｐ：精製し／緩衝液をＴＦＦによってＰＢＳ－２０－７．５緩衝液（８．２Ｖｅｘ）に交換し、同じ緩衝液で９ｍｇ／ｍｌの薬物に調整した。

ロット３４０ＬＭＨ：緩衝液交換／精製なしで、１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａストック溶液を用いて２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ－Ｎａに調整し、追加のＮａＯＨでｐＨ７．４８とし、少量のＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で１０ｍｇ／ｍｌの薬物とした。

ロット３４０ＬＭＰ：緩衝液交換／精製なしで、１Ｍのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５を用いて２０ｍＭリン酸ナトリウムに調整し、追加のＮａＯＨでｐＨ７．５１とし、少量のＰＢＳ－２０－７．５緩衝液で１０ｍｇ／ｍｌの薬物とした。

【０５２３】

各ロットは０．２μｍ無菌濾過した。次に、Ｌｓ－３３８およびＬｓ－３３９を３つの部分に分割した：部分１は、非キレート剤対照として使用し、部分１は、無菌の１００ｍＭデフェロキサミンメシレートで０．５ｍＭデフェロキサミン（ＤＦＯ）に調整され、部分２は、無菌の１００ｍＭ　ＥＤＴＡ－Ｎａ、ｐＨ６．０で０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ－Ｎａに調整され、部分３は、非キレート剤対照として使用した。Ｌｓ－３４０シリーズの各ロットを２つの部分に分け、同様に０．５ｍＭ　ＤＦＯまたは０．５ｍＭ　ＥＤＴＡに調整した。薬物濃度（ＵＶ分光光度法による）、リポソーム粒径、およびｐＨを本明細書に記

載のように決定した。リン脂質はホスホモリブデン（Ｍｏ）ブルー分析により決定され、リン酸塩緩衝試料ではＭｏ分析Ｈｅｐｅｓ緩衝試料を標準として用いて７０％酸性化イソプロパノール中のＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳ脂質標識の蛍光測定により決定された。リポソームを無菌の丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）に無菌的に分注し、バイアルを３７℃でインキュベートした。インキュベーションの２、４、および６週間目に、リポソームをサンプリングし、ｐＨ、粒径、ならびに薬物および脂質の完全性について分析した。脂質の完全性および分解生成物を同定し、ＨＰＬＣによって定量した（実施例５０）。以下の結果が得られた（表５７）。

【表６３】

表57A.

試料	ロットID	DL比	充填後の処理				脂質分解, %					
コード		g/mol P	TFF	緩衝液 pH 7.5	キレート剤	pH	2週間		4週間		6週間	
				20 mMに	0.5 mMに		Chol	PC	Chol	PC	Chol	PC
71	Ls-338	253.7 ± 5.3	HBS-20-7.5		DFO	7.51	0.00	0.40	0.00	0.48	0.00	2.33
72	Ls-338	253.7 ± 5.3	HBS-20-7.5		EDTA	7.51	4.05	0.00	10.29	0.00	10.35	0.86
73	Ls-338	253.7 ± 5.3	HBS-20-7.5		なし	7.51	21.19	0.33	24.58	0.54	27.32	1.07
74	Ls-339	329.9 ± 6.3	HBS-20-7.5		DFO	7.49	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	1.11
75	Ls-339	329.9 ± 6.3	HBS-20-7.5		EDTA	7.49	7.38	0.00	9.97	0.00	13.09	1.05
76	Ls-339	329.9 ± 6.3	HBS-20-7.5		なし	7.49	24.46	0.00	33.36	0.29	38.92	0.89
77	Ls-340S	321.7 ± 5.8	0.85% NaCl	Hepes	DFO	7.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67
78	Ls-340S	321.7 ± 5.8	0.85% NaCl	Hepes	EDTA	7.47	2.99	0.00	6.55	0.00	7.93	0.58
79	Ls-340H	320.7 ± 7.2	HBS-20-7.5		DFO	7.47	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.69
80	Ls-340H	320.7 ± 7.2	HBS-20-7.5		EDTA	7.47	4.77	0.00	7.49	0.18	8.18	0.72
81	Ls-340P	325.1 ± 7.4	PBS-20-7.5		DFO	7.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70
82	Ls-340P	325.1 ± 7.4	PBS-20-7.5		EDTA	7.38	15.63	0.00	16.90	0.00	18.91	0.34
83	Ls-340LMH	344.5 ± 7.9*	なし	Hepes	DFO	7.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42
84	Ls-340LMH	344.5 ± 7.9*	なし	Hepes	EDTA	7.37	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.54
85	Ls-340LMP	344.5 ± 7.9*	なし	リン酸塩	DFO	7.34	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.53
86	Ls-340LMP	344.5 ± 7.9*	なし	リン酸塩	EDTA	7.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60

*除去されていないカプセル封入された薬物およびカプセル封入されていない薬物を含む

【０５２４】

最初の時点では、脂質分解生成物は検出できなかった。キレート剤の非存在下では、コレステロールの有意な酸化的分解が２週間の時点で既に観察され、以前の観察と一致した。ＥＤＴＡは部分的な保護を与え、コレステロール分解を遅らせ、一方、ＤＦＯは６週間にわたるインキュベーションでコレステロール分解から完全に保護した。薬物充填後に緩衝液交換を行わなかった試料は、より低いリン脂質の加水分解速度を示した。６週間のインキュベーション後、４つの非交換キレート剤安定化試料における平均リン脂質分解は０．５２±０．０８％であり、１０個の緩衝液交換キレート剤安定化試料では０．９１±０．５５％であった。６ｍｇ／ｍｌ（Ｌｓ－３３９）または１２ｍｇ／ｍｌ（Ｌｓ－３４０Ｈ）の薬物濃度で充填した同様に処理したロット間で脂質不安定性の増加はなかった；実際に、充填混合物中のより高い薬物濃度での充填は、より低いリン脂質分解に有利であった（試料７９、０．９％対試料７４、１．１１％、および試料８０、０．７２％対試料７５、１．０５％）。

【０５２５】

［実施例６０］

［マウスにおけるＬｓ－３３８、Ｌｓ－３３９、Ｌｓ－３４０のリポソームの血液薬物動態。］

異なるＤＬ比で調製されたＡＫＧ－２８のキレート剤および安定化リポソーム製剤がそれらの長期循環薬物動態特性を保持する可能性を評価した。実施例５９のリポソームロットＬｓ－３３８（試料７１）、Ｌｓ－３３９（試料７４）、およびＬｓ－３４０Ｓ（試料７７）のＤＦＯ安定化試料は、雌ＣＤ－１マウス（２２～２５ｇ）に５０ｍｇ／ｋｇ　ＡＫＧ－２８の用量で３連にしてｉ．ｖ．注射された。注射の５分（０．０８３時間）、１、３、６、２４、および４８時間後に、血液をＬｉ－ヘパリン化マイクロベットにサンプリングし、遠心分離し、血漿を直接ＨＰＬＣ分析によりＡＫＧ－２８について分析し、実

施例５２に記載されるように間接（ＤｉＩＣ$_{18}$（３）－ＤＳ標識）ＨＰＬＣ分析によりリポソームリン脂質について分析した。薬物動態パラメータは、ｉ．ｖ．ボーラス投与に適するようにC_{max}の代わりに初回濃度（C_0）を決定したことを除いて、実施例３９に記載されるように、ＰＫ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓソフトウェア（Ｓｕｍｍｉｔ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いて、薬物およびリポソームリン脂質の血漿濃度から決定された。リポソーム投与後の薬物、リポソーム脂質、および血漿中のＤＬ比についての血漿濃度対時間プロフィールを、それぞれ図２０Ａ、図２０Ｂ、および図２０Ｃに示す。血漿薬物動態パラメータの概要を表５８に示す。ＨＢＳ－７緩衝液中の５ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８の溶液を、遊離薬物薬物動態研究のために使用した。ＡＫＧ－２８溶液を２０ｍｇ／ｋｇで注射し、注射の５分、３０分、１時間、３時間、および６時間後、同様の方法で血漿試料を得た。ＡＫＧ－２８を３０５ｎｍの励起および４１０ｎｍの発光を用いる蛍光によって検出したことを除いて、実施例５２の方法を用いて、ＨＰＬＣによってＡＫＧ－２８について血漿試料を分析した。標準は、カプセル封入されていないＡＫＧ－２８の２ｍｇ／ｍｌストック溶液から調製された。注射用量％（％ＩＤ）として表した薬物濃度対時間を表５９に示す。

【表６４】

表58. 異なるDL0で調製されたリポソームAKG-28製剤のPK

AKG-28薬物			
試料コード	71	74	77
ロットID	Ls-338	Ls-339	Ls-340S
DL比, g/mol PhL	253.7 ± 5.3	329.9 ± 6.3	321.7 ± 5.8
用量, mg/kg	50	50	50
C_0, mg/L	1212	1293	1209
$C_{最終}$, mg/L	165.2	104.3	199.0
$T_{最終}$, hr	48	48	48
$AUC_{0-最終}$, hr*mg/L	23,702	22,709	25,687
$AUC_{0-l最終}$/用量, [hr*mg/L]/[mg/kg]	474.0	454.2	513.7
AUC_{0-inf}, hr*mg/L	27,540	24,700	30,621
CL, mL/hr/kg	1.82	2.02	1.63
V_d, mL/kg	42.2	38.6	40.5
$T_{1/2}$, hr	16.1	13.2	17.2
単一指数フィット, R^2	0.9800	0.9889	0.9642
リポソームリン脂質			
試料コード	71	74	77
用量, mmol/kg	0.1971	0.1516	0.1554
C_0, mmol/L	4.734	3.753	3.821
$C_{最終}$, mmol/L	0.709	0.323	0.654
$T_{最終}$, hr	48	48	48
$AUC_{0-最終}$, hr*mmol/L	98.31	69.28	81.31
$AUC_{0-最終}$/Dose, [hr*mmol/L]/[mmol/kg]	498.8	457.0	523.2
AUC_{0-inf}, hr*mmol/L	115.66	75.54	98.15
CL, mL/hr/kg	1.70	2.01	1.58
V_d, mL/kg	41.7	38.9	40.7
$T_{1/2}$, hr	16.9	13.4	17.8
単一指数フィット, R^2	0.9868	0.9925	0.9669
$T_{1/2}$, hr, 薬物放出	325.3	908.3	471.9

【表６５】

表59. 遊離(カプセル封入されていない)AKG-28のPK

AKG-28 溶液	
時間，時	注射用量の%
0.0833	0.557
0.5	0.191
1	0.182
3	0.049
6	0.029

【０５２６】

約３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比で調製されたリポソームは、２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのより低いＤＬ０比で調製されたリポソームの優れた血漿安定性および長期循環薬物動態特性を保持した。薬物の注射用量に対して標準化された、リポソーム薬物成分についてのＡＵＣ値は、４５４～５１３時間－ｍｇ／Ｌ／ｍｇ／ｋｇの範囲であり、この研究におけるＤＬ０が２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬであるリポソームについての４７４時間－ｍｇ／Ｌ／ｍｇ／ｋｇの値と以前の研究（実施例３９）における３９６時間－ｍｇ／Ｌ／ｍｇ／ｋｇの値に十分に匹敵する。薬物とリポソーム脂質の両方に関する血漿濃度データは、０．９６４～０．９９３の範囲の決定係数（R^2）を有する単一指数モデルに良好に適合することを示した。全てのリポソームは長期循環（血漿半減期１３．４～１７．８時間）であった。薬物放出半減期は、式：

$T_{1/2\,放出} = T_{1/2\,薬物} * T_{1/2\,脂質} / (T_{1/2\,脂質} - T_{1/2\,薬物})$

により算出され、非常に緩慢な放出（半放出時間３２５～９６０時間）を示した。ＤＬ０＝２５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬおよびＤＬ０＝３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬで充填したリポソームのＡＵＣ値および薬物放出速度は同様であった。遊離薬物は、非常に迅速に血漿から除去された。

【０５２７】

［実施例６１］

［ＡＫＧ－２８再結晶］

活性ＡＫＧ－２８原薬中の潜在的な不純物のレベルを減少させるための再結晶の可能性を評価した。充填後の緩衝液交換ステップなしにＡＫＧ－２８のリポソーム製剤中の潜在的な不純物のレベルを減少させるために、ＡＫＧ－２８の一部を以下の手順により水性エタノールから再結晶した。２ｇのＡＫＧ－２８を１０ｍｌのＷＦＩ当量の水に溶解し、溶液を０．２μｍのＰＥＳフィルターを通して陽圧下で濾過した。撹拌しながら、１００％エタノール（Ｓｉｇｍａ　Ｅ７０２３）を周囲温度で溶液にゆっくりと添加した。約８．５ｍｌ後、結晶化が始まった。約７０ｖｏｌ％のエタノールに、２５ｍｌが添加されるまでエタノールの添加を続けた。混合物を１時間撹拌し、冷蔵庫に一晩放置した。沈殿をブフナー漏斗で濾別し、１００％エタノールでリンスし、風乾した後、真空中で一晩乾燥した。再結晶ＡＫＧ－２８の収量は１．７４２ｇ（９６．３％）であった。母液中の薬物の喪失は、ＵＶ分光光度法により水中で３０２ｎｍで決定され、５９．０ｍｇ（２．９５％）、エタノールリンス中では、２．５ｍｇ（０．１３％）であった。水に２０ｍｇ／ｍｌで溶解した再結晶薬物は、ｐＨ４．５３を生成したが、出発物質の溶液は、有意により酸性であった。塩化物含量は、ＱｕａｎｔｉＣｈｒｏｍ比色塩化物アッセイキット（ＢｉｏＡｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、再結晶されたバッチ（ＡＫＧ－２８Ｒ）および再結晶なしの分析参照バッチにおいて決定された。塩化物含量は、無水物基準で薬物１モルあたり塩化物１．９４当量と一致するか、または一水和物基準で薬物１モルあたり塩化物２．０１当量と一致した。ＡＫＧ－２８Ｒ中のエンドトキシンレベルは、０．０１～１

ＥＵ／ｍｌカートリッジでＥｎｄｏｓａｆｅ　ＰＴＳシステム（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を用いて決定すると、０．０４ＥＵ／ｍｇ未満であった。４～４０℃、および６０～７５％ＲＨの範囲で数カ月後のエタノールで再結晶したＡＫＧ－２８二塩酸塩の保存安定性研究は、３．２～３．３％（Ｋａｒｌ　Ｆｉｓｈｅｒ滴定法により）の一定の含水率を示し、一水和物状態（計算された含水率３．４８％）と一致した。

【０５２８】

［実施例６２］

［リポソームＡＫＧ－２８（Ｌｓ－３４５－３５５ロット）の封入効率における充填前のＮａＣｌおよびｐＨの影響］

ＡＫＧ－２８Ｒの充填効率におけるイオン強度調整および薬物ストック溶液ｐＨの効果を研究した。４２．７ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８Ｒ水性ストック溶液の一部を、５．７～７．０の範囲の種々のｐＨエンドポイントまで１Ｎ　ＮａＯＨで滴定した。ｐＨ＞７．０では、薬物溶液のゲル化が観察された。再結晶しないＡＫＧ－２８の４０ｍｇ／ｍｌストック溶液も使用した。ロットＬ－１０２（実施例５９）の押し出されたリポソームは、ＷＦＩ等価水（５．８Ｖｅｘ；残存する伝導度４１５μＳ／ｃｍ、リン脂質５８．４ｍＭ）とのＴＦＦ交換を使用して、リポソーム外の硫酸アンモニウムから精製された。ＴＦＦ後の押し出されたリポソームのアリコートは、算出された体積の薬物ストック、３Ｍ　ＮａＣｌ、および水と混合して、約３３０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬのＤＬ０比、約１２ｍｇ／ｍｌの薬物濃度、およびＮａＣｌ（イオン強度剤）の所望の充填前濃度を達成した。混合物を６５℃の水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、氷水中で１０分間クエンチした。ロットＬｓ－３４８およびＬｓ－３４９（下記を参照）には、充填後に３Ｍ　ＮａＣｌを６０ｍＭの濃度になるように添加した。６５℃のインキュベーションの前後に、充填混合物のｐＨを二重接合ガラス微小電極を用いて測定した。充填混合物のアリコートは、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂカラム上のカプセル封入されていない薬物から精製し、３０２ｎｍでのＵＶ分光光度アッセイによって薬物について分析し、ホスホモリブデンブルーアッセイによってリン脂質について、カプセル封入されたＤＬ比を算出し、プレカラム試料のＤＬ比で除して、カプセル封入効率を得た。結果を表６０に示す。

【表６６】

表60. Ls-AKG28ロットLs-345-355の充填条件およびカプセル封入効率

		充填条件					カプセル封入結果	
ロットID	薬物ロット	薬物	添加されたNaCl	pH			カプセル封入されたDL比	EE、%
		mg/ml	mM	薬物ストック	充填前	充填後	g/mol P	
Ls-346	AKG-28R	11.3	188	5.29	5.55	6.05	333.1±3.3	97.8
Ls-347	AKG-28R	10.7	357	5.29	5.63	6.26	341.2±6.5	99.5
Ls-348	AKG-28	11.8	0	5.17	5.37	5.74	316.5±3.1	90.7
Ls-349	AKG-28R	11.8	20	5.29	5.44	5.87	323.6±9.3	93.8
Ls-350	AKG-28R	12.0	80	5.29	5.49	5.95	342.6±7.3	98.8
Ls-351	AKG-28R	12.0	80	5.70	5.78	6.44	336.5±4.3	98.2
Ls-352	AKG-28R	12.0	80	6.15	6.21	6.91	348.5±10.7	99.6
Ls-353	AKG-28R	12.0	80	6.51	6.60	7.17	340.9±3.9	98.0
Ls-354	AKG-28R	12.0	80	6.83	7.01	7.42	343.0±7.2	100.6
Ls-355	AKG-28R	12.0	80	6.96	~7.6 (不安定	7.55	332.6±4.8	97.7

【０５２９】

予想に反して、６５℃のインキュベーションステップの前にＮａＣｌを添加することによる充填混合物のイオン強度の増加は、充填効率を低下させなかっただけでなく、その代わりに明らかに充填効率を増加させた。無充填または低濃度のＮａＣｌ（０～２０ｍＭ）を充填した試料は９０～９５％のカプセル封入効率を示したが、８０ｍＭ以上で、３５７

ｍＭまでＮａＣｌを充填した試料は９５％を超えるＥＥを示し、典型的には９７％を超え、８０ｍＭのＮａＣｌでは５．２９～７．０１の薬物ストック溶液ｐＨの範囲で９８％を超えることを示した。充填後の混合物中の残存したカプセル封入されていない薬物の最小化は、カプセル封入されていない薬物除去ステップを経ないリポソーム製剤にとって特に重要である。重要なことに、ＥＥの喪失なしに７．５の最適安定性に近い充填後のｐＨを達成するために薬物ストックｐＨを調整する可能性は、保存中の製剤ｐＨのより良好な安定性のためにリポソーム賦形剤緩衝能力を保存することを可能にする。７．０に近いより高いｐＨ範囲では、充填混合物が周囲温度でゲル化し、充填混合物の取扱いを不便にする。

【０５３０】

［実施例６３］

［選択されたＬＭの充填後の外部媒体中のアンモニウム］

リポソームＡＫＧ－２８調製物中のリポソーム外のアンモニウム含量における製剤処理の影響を評価した。本発明者らは、充填混合物中の薬物のグラム当量濃度に近いレベルなどの、充填ステップ中に生成されるある特定のレベルのリポソーム外のアンモニウムイオンを保持するリポソーム調製物が、保存中のリン脂質の分解の減少を示すことを観察した。薬物充填ステップ中にカプセル封入された弱塩基性の薬物分子によってリポソームから置換されるこのようなレベルのアンモニウムは、充填後の緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物除去を受けない充填後の混合物において生成される。あるいは、必要なレベルのアンモニウム（または置換されたアンモニウム）塩は、充填後の緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去ステップの後に、リポソームに添加するか、または交換／賦形剤緩衝液に含めることができる。本明細書における実施例に従って調製されたリポソームロットの交換されていない充填混合物中のリポソーム外のアンモニアのレベルを決定するために、充填後のリポソーム充填混合物のリポソーム外の媒体を、ＭＷＣＯ　３００ＫＤａ（３０分間、１２０００ｘｇ）を有するマイクロ遠心分離限外濾過デバイス（Ｎａｎｏｓｅｐ　Ｏｍｅｇａ　３００、Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．）を使用して、リポソームから分離した。透析液中のアンモニウム濃度は、Ａｍｐｌｉｔｅ比色アンモニア／アンモニウム定量キット（ＡＡＴ　Ｂｉｏｑｕｅｓｔ、ＵＳＡ）を用いて決定した。結果を下記の表６１に示す。

【表６７】

表61. 充填後のリポソームの外部媒体中のアンモニア濃度

試料	充填条件			充填後			アンモニウム、mM	
	DL0	薬物	デキストロース	TFF 交換	pH 調整	キレート剤	実測	概算
	g/mol P	mg/ml	mg/ml	(緩衝液)	(緩衝液)	(0.5 mM)		
ブランク							<0.5	0
Ls-323	250	6.0	45	HBS-20-7.5	なし	なし	<0.5	0
Ls-323	250	6.0	45	なし	pH 6.07	なし	21.3±1.2	約22
Ls-324	320	6.0	45	HBS-20-7.5	なし	なし	<0.5	0
Ls-324	320	6.0	45	なし	pH 5.93	なし	19.4±0.3	約22
Ls-326	320	12.8	0	なし	pH 6.49	なし	55.5±0.6	約50
Ls-326	320	12.8	0	なし	pH 7.16 (Hepes 20 mM)	なし	48.4±0.3	約50
Ls-338	259	6.0	45	HBS-20-7.5	なし	DFO	<0.5	0
Ls-339	345	6.0	45	HBS-20-7.5	なし	DFO	<0.5	0
Ls-340H	345	12.0	0	HBS-20-7.5	なし	DFO	<0.5	0
Ls-340LMH	345	12.0	0	なし	pH 7.5 (Hepes 20 mM)	DFO	34.1±1.0	約38

【０５３１】

リポソーム充填混合物中のアンモニウム濃度の推定は、以下のように行った。

［ＮＨ$_4^+$］＝Ｃ$_{薬物}$／４９９．４＊２ｅｑ／ｍｏｌ＊ＥＥ＊ＤＦ　ここで、
Ｃ$_{薬物}$－　６５℃のインキュベーションステップ中の充填混合物における薬物濃度
４９９．４－ＡＫＧ－２８モル重量（二塩酸塩）
２ｅｑ／ｍｏｌ－薬物カチオンの価数
ＥＥ－カプセル封入効率（１００％＝１．０）
ＤＦ－充填後処理によって導入される希釈係数
【０５３２】
　充填後の緩衝液交換ステップのない調製物のリポソーム外の媒体中のアンモニウム濃度は顕著であり、薬物充填中にリポソームに入る薬物のイオン化分子に対するリポソーム内アンモニウムイオンの等価膜貫通交換を通して生成されたリポソーム外のアンモニウムの推定値と一致した。充填後の緩衝液交換に供された調製物では、アンモニウム濃度は０．５ｍＭ未満であった（緩衝液交換前のアンモニウムレベルの１～２．５％）。
【０５３３】
［実施例６４］
［加速された安定性研究におけるリポソームサイズにおける保存の効果。］
　経時的なリポソームサイズにおける保存の影響を評価した。ｚ－平均直径（Ｘｚ、ｎｍ）として表されるリポソームサイズおよび多分散指数（ＰＤＩ）は、実施例５１、５４、５７、５８および５９の保存されたリポソーム試料において、後方散乱モードのＭａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｐｒｏでのキュムラント法を用いる動的光散乱によって決定された。２～４μＬのリポソームのアリコートを１～１．２ｍｌのＨＢＳ－７（０．２μｍ濾過）と混合し、測定を適切な屈折率と粘度パラメータを用いて２５℃にて自動モードで行った。さらに、実施例５９の１１個のインキュベーション前の試料のセットを２回測定し、１回目と２回目の測定結果の差を測定の変動性の指標として用いた。Ｘｚデータを、対応するインキュベーション前の試料に対するパーセンテージ変化として表した。注目すべきことに、上記の実施例における全てのリポソームは粒径に関して安定であり、Ｘｚの変化は本質的に測定の変動性の範囲内であった（表６２）。ロットＬｓ－３１２－１（実施例５６）およびＬｓ－３２１（実施例５７）において、３７℃で３カ月間にわたって保存したときの最大変化率は、それぞれ４．９１％および４．３１％であった。全ての試料のＰＤＩは０．１未満のままであったが、唯一の例外はＬｓ－３０２（実施例５１）であり、最初のＰＤＩ　０．０５７８は、３７℃のインキュベーションの１カ月にわたって０．１１０７に増加し、これはリポソームの若干の凝集の証拠を与えた。
【表６８】
表62. 加速(37° C)安定性研究におけるリポソーム試料中の粒子径の相対的変化

ロット ID	実施例	試料数	安定性時点	Xz 変化, %		
Ls-…				最大	平均	SD
293-302	51	12	1 カ月	1.66	0.31	0.82
303-310	54, 55	14	2 週間	2.66	0.23	1.44
313-322	56, 57	28	3 カ月	4.91	2.06	1.30
323-326	58	12	10 週間	2.77	-0.27	1.64
338-340	159	16	1 カ月	2.13	0.25	1.20
方法の変動性		11	n/a	3.37	1.36	1.51

SD - 標準偏差

【０５３４】
［実施例６５］
［Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８リポソームにおけるコレステロール安定性における保存緩衝液ｐＨの効果。］
　リポソームＡＫＧ－２８とリポソームＡＫＧ－３８の両方について、保存中のコレステロール酸化に対する保存緩衝液ｐＨの影響を評価した。リポソームＬｓ－ＡＫＧ２８（ロットＬｓ－２８１）を実施例２６に記載されるように調製した。ＡＫＧ－３８ストック溶

液を実施例２５に記載されるように調製し、４４．５ｍｇ／ｍｌデキストロース、１０ｍＭ　ＮａＣｌ、および８ｍｇ／ｍｌの薬物の存在下、ＤＬ０　４５０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬで押し出されたＴＦＦ後のリポソームと合わせたことを除いて、本質的に同じ手順（実施例２６）を用いて、薬物（遊離塩基として）１４７１ｍｇのスケールのリポソームＬｓ－ＡＫＧ３８（ロットＬｓ－２８０）を調製した。０．１Ｍ　ＮａＣｌに調整した６５℃インキュベーション後の充填混合物のｐＨは６．７７であった。濃縮およびＨＢＳ－７のＴＦＦ緩衝液交換後、Ｌｓ－２８０リポソームは１８．０４±０．１５ｍｇ／ｍｌ　ＡＫＧ－３８、ＤＬ比４２６．３±５．２ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、Ｘｚ　１１７．０ｎｍ、およびＰＤＩ　０．０２５０を有した。Ｌｓ－２８０およびＬｓ－２８１ロットからの６５℃インキュベーション、氷水クエンチ、およびＮａＣｌ調整ステップ後のリポソーム充填混合物の一部を、１０ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン－ＨＣｌ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液、ｐＨ６．５（Ｈｉｓ－６．５）の８．０～８．２体積交換を用いて、前濃縮によるＴＦＦ緩衝液交換に供した。緩衝液交換されたロットの各々のＨＢＳ－７部分およびＨｉｓ－６．５部分をさらに部分に分割し、各々の部分のｐＨをＮａＯＨまたはＨＣｌで必要に応じて、以下の表に従って調整した。

【表６９】

表63.

ロットID	TFF交換緩衝液	調整したpH
Ls-280-1; Ls-281-1	His-6.5	6.0(HClを用いて調整した)
Ls-280-2; Ls-281-2	His-6.5	6.5(調整なし)
Ls-280-3; Ls-281-3	HBS-7	7.0(調整なし)
Ls-280-4; Ls-281-4	HBS-7	7.5(NaOHを用いて調整した)

【０５３５】

リポソームを０．２μｍフィルター滅菌し、薬物濃度をＵＶ分光光度法によって決定し、同じ組成およびｐＨの無菌交換緩衝液で１０．０ｍｇ／ｍｌに調整した（ｐＨ調整した試料については、同様にｐＨ調整した交換緩衝液を使用した）。濃度調整したリポソームを無菌の丸い栓付き無菌ガラスホウケイ酸バイアル（Ｇｅｒｒｅｓｈｅｉｍｅｒ）に無菌的に分注し、周囲温度（２０～２５℃）でインキュベートした。インキュベーションの１、２、４、８、および１２週目に、脂質完全性について、ＨＰＬＣにより、リポソームを分析した（実施例５０）。リポソームは、脂質不安定性の異常な特徴、すなわち、コレステロールの顕著な分解を示した（図１９Ａ、図１９Ｂ）。１２週間後、ＡＫＧ－３８リポソーム製剤において、インタクトなコレステロール含量は、そのインキュベーション前の値の約５０～６０％まで低下し、ＡＫＧ－２８リポソーム製剤において、この効果はさらにより顕著であり、３５～４５％のコレステロールがインタクトなままであった。保持時間約１．７７分の新しいピークが検出され、これはインタクトなコレステロールピークの低下と同時に増加した。この成分はさらに７－ヒドロキシコレステロール（ＲＴ　１．８１分）と同定された。コレステロール分解は、リポソーム保存緩衝剤のｐＨに依存した：ｐＨ６．０～６．５で、コレステロール分解の開始は最も速く、研究したｐＨ値の範囲では、最も遅い分解の開始は、最も高いｐＨ７．５で観察された。リポソームの分野における慣習は、最大の脂質安定性が約６．５のｐＨを必要とすることであるが、Ｌｓ－ＡＫＧ２８およびＬｓ－ＡＫＧ３８の場合、ｐＨ６．０～６．５での脂質安定性は最低であり、より良好な安定性は、ｐＨ＞７．０、例えば、ｐＨ７．５で観察された。

【０５３６】

［実施例６６］

［ＡＫＧ－３８の再結晶。］

本実施例では、望ましくない不純物を除去するためのＡＫＧ－３８を再結晶するための

方法を記載する。１．００ｇの（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オン（ＡＫＧ－３８遊離塩基）を、８０℃の水浴上の密閉ガラスバイアル中で撹拌しながら１２．５ｍｌの１００％エタノール（Ｓｉｇｍａ　Ｅ７０２３）に溶解させた。熱い溶液を０．１ｇのセライト５４５とともに２０分間撹拌し、濾過した。濾液を室温に冷却し、次に氷浴上に置き、冷蔵庫で１時間保持した。結晶性沈殿をブフナー漏斗で濾別し、冷１００％エタノール２ｍｌでリンスし、風乾後、真空乾燥した。再結晶したＡＫＧ－３８の収量は０．７５ｇ（７５％）であった。

【０５３７】

［実施例６７］

［キレート剤の存在下でのＡＫＧ－３８リポソームの保存安定性。］

本実施例では、ＡＫＧ－３８リポソームの保存安定性における様々な濃度のキレート剤デフェロキサミンの効果を記載する。

【０５３８】

リポソーム調製。（ロットＩＤ　Ｌｓ－３７１）ＨＳＰＣ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）１８．８９ｇ（２４．０ｍｍｏｌ）、コレステロール（Ｄｉｓｈｍａｎ、高純度）１１．３４ｇ（２９．３ｍｍｏｌ）、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＡＧ）３．３７ｇ（１．２０ｍｍｏｌ）（ＨＳＰＣ／コレステロール／ＰＥＧＤＳＰＥモル比を４５／５５／２．２５にする）を４０ｍｌの無水エタノール（Ｓｉｇｍａ、Ｅ－７０２３）と合わせ、全ての脂質が溶解するまで６８～６９℃の浴上で撹拌しながら加熱した。別の容器において、３７３ｇ（３６０ｍｌ）の０．５Ｍ硫酸アンモニウム水溶液（０．２ミクロン濾過）を７０℃の浴上で予熱し、撹拌しながら熱い脂質エタノール性溶液中に注いだ。得られた懸濁液を、７０℃の浴上で３５分間撹拌し、循環する７０℃の水で加熱したＬｉｐｅｘ　１００ｍｌサーモバレルリポソーム押出機（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、３７ｍｍのポリエステルのドレインディスクをインターレイした２つの４７ｍｍの１００ｎｍの孔径および１つの２００ｎｍの孔径のポリカーボネートトラックエッチドメンブレン（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ）のスタックを、４００～４２０ｐｓｉで５回通過させた（通過あたり４つの押出機の充填）。リポソームは、ＤＬＳによりＸｚ　１１８．５ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２１４を有していた。リポソームを冷蔵庫（２～８℃）に一晩保持し、陽圧下で０．２μｍポリエーテルスルフォン（ＰＥＳ）フィルターを通して濾過した。濾過されたリポソームのリン脂質濃度は５６．７６±０．６７ｍＭであった。リポソーム外の捕捉剤（硫酸アンモニウム）は、透析濾過の残存する伝導度が４４６μＳ／ｃｍに下がるまで（４．６体積交換）、ＭＷカットオフ５００ＫＤａのポリスルホン中空繊維カートリッジ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用するＫｒｏｓＦｌｏ　ＴＦＦシステムで、ＷＦＩ品質エンドトキシン不含水とＴＦＦ緩衝液交換することによって除去された。残留物の残存する伝導度は３５５μＳ／ｃｍであり、リン脂質濃度（ホスホモリブデンブルー法）は５８．０４±５．０８ｍＭであった。

【０５３９】

エタノール（８．１２ｇ、１７．３４ｍｍｏｌ）から再結晶したＡＫＧ－３８を０．９当量の１Ｎ　ＨＣｌ（１５．６ｍｌ）と混合し、ＷＦＩ品質水で補って、３９．９ｍｇ／ｍｌの水性ストック溶液、ｐＨ５．６１を得た。周囲温度（２１℃）での予備濾過溶液の比重測定は１．０１０の密度値を与えた。溶液を０．２μｍフィルターに通し、２０２．７ｇ（２００．７ｍｌ）の濾液を５６．１ｇのＷＦＩ品質水、１３．３５ｍｌの３Ｍ　ＮａＣｌストック溶液、および２２９．９ｇのＴＦＦ後のリポソーム懸濁液と合わせて、１６ｍｇ／ｍｌ　ＡＫＧ－３８、ＤＬ０比６００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、および８０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．７５を有する充填混合物を形成した。混合物を２５１．６ｇの２等分に分け、薄壁ガラス製の３００ｍｌ三角フラスコ中の各部分を、温度が６４．５℃に達するまで（２．５分）８５℃浴上で撹拌しながら予熱し、フラスコを６５℃浴に移し、撹拌しながら２０分間インキュベートし、撹拌しながら氷水浴中で１０分間冷却し（＜１０℃に

達するまでの冷却時間は５分）、周囲条件に移した。充填後のｐＨは６．６３（部分１）、ｐＨは６．６１（部分２）。各部分を、分子量カットオフ５００ＫＤのポリスルホン中空繊維カートリッジを用いてＴＦＦにより精製した。リポソームを透析濾過により約２２ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に予備濃縮して、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ　ｐＨ７．５０の緩衝液（ＨＢＳ－２－７．５）へのＴＦＦ交換により総量８．０の体積交換を行うことによって、任意のリポソーム外の薬物から精製した。透過液を回収し、重量を測定した。透過液中のＡＫＧ－３８の濃度（充填混合物から除去されたカプセル封入されていない薬物）および透過液の最後の数ｍｌ中の濃度（カプセル封入されていない残存薬物）を、４００ｎｍバックグラウンド補正を用いて２９８ｎｍの薬物スペクトル最大でＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００マイクロ分光光度計（１ｍｍ経路）を用いた直接ＵＶ分光光度法により測定した。透過液中のカプセル封入されていない薬物の量をＴＦＦ精製ステップに取り込まれた充填混合物中の総薬物で除することから推定されるカプセル封入効率は、部分１については９７．２％であり、部分２については９７．１％であった。８体積交換後の透過液中の薬物量から推定されたカプセル封入されていない残存薬物は約０．００６ｍｇ／ｍｌ（約０．０４％）であった。ＤＬＳによるリポソームの平均サイズＸｚは、部分１で１１８．２±２．３ｎｍ、部分２で１１８．７±２．６ｎｍであった（Ｎ＝３）。各部分に、計算量の１Ｍ　ＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液ストックｐＨ７．６３（１４４ｍＭ　ＮａＣｌで２０ｍＭに希釈した場合、ｐＨ７．５０）を添加して、ＨＥＰＥＳ濃度を１８ｍＭ増加させ、ＨＥＰＥＳの最終濃度２０ｍＭにした。カプセル封入効率、充填後のｐＨ、および両部分における粒径は実質的に同一であったため、これらの部分を合わせて、２１．７５±０．０８ｍｇ／ｍｌの薬物濃度（７０％ＩＰＡ－０．１Ｎ　ＨＣｌ中のＵＶ分光法による）を有する３６１．８のリポソームを得た。計算量の２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．５０（ＨＢＳ－２０－７．５）緩衝液を添加して、薬物濃度を２０．２ｍｇ／ｍｌにした。合わせたリポソームの１２ｍｌのアリコートを保存安定性研究のために取っておいた。残りに、１００ｍＭデフェロキサミンメシレートｐＨ６．０（ＤＦＯ）（Ｅｘｃｅｌｌａ　ＵＳＰグレード）のストック溶液を、ＤＦＯの最終０．５ｍＭまで添加した。合わせた精製リポソームを０．２μｍ　ＰＥＳ高流量無菌フィルターに無菌的に通過させ、ＤＬＳによって粒径について分析し、分光光度法によって薬物およびリン脂質濃度について分析した。力価を最終的に、無菌の完全賦形剤緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１４４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．５ｍＭ　ＤＦＯ、ｐＨ７．５０）で２０．０ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－３８に調整した。リポソームは、リン脂質３４．０８±０．５５ｍＭ；ＡＫＧ－３８（ＵＶ）１９．９９±０．０８ｍｇ／ｍｌ、ＤＬ比５８６．６±３．９ｇ／ｍｏｌリン脂質、ｐＨ７．４９、浸透圧（Ｗｅｓｃｏｒ　Ｖａｐｒｏ露点浸透圧計）３００．３±６．４ｍＯｓ、Ｘｚ　１１７．６±０．９ｎｍ、ＰＤＩ　０．０１３０の特徴を有した。

【０５４０】

安定性アリコート（１２ｍｌ）をさらに３つの部分に分割し、ＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で２０ｍｇ／ｍｌ　ＡＫＧ－３８に調整し、ＤＦＯなし、０．１ｍＭ　ＤＦＯ、または１００ｍＭ　ＤＦＯのストック溶液で０．５ｍＭ　ＤＦＯに調整した。各部分を濾過滅菌し、灰色のブチル栓付きの２つの滅菌２ｍｌガラスバイアルに無菌的に分注した。残りの量を「時間ゼロ」インキュベーション時点として保持した。バイアルを３７℃でインキュベートし、０．２５ｍｌの分析試料を、バイアル１とバイアル２の間で交互に、３カ月間、月に２回、無菌的に採取した（０．１ｍＭ　ＤＦＯバリアントを月に１回サンプリングした）。試料を、ｐＨおよび脂質（コレステロールおよびＨＳＰＣ）分解について分析した。

【０５４１】

図２１、図２２、および図２３に、結果を示す。チャートの凡例の数字０、０．１、および０．５は、試料中のＤＦＯ濃度（ｍＭ）を示す。分析アリコートを、ＤＦＯなしと０．５ｍＭ　ＤＦＯバリアントの両方について、バイアル１とバイアル２の間で交互に、１カ月に２回、保存バイアルから採取した。結果を各バイアルについて別々にプロットする

。

【０５４２】

加速された分解研究は、３７℃で行った。３７℃と４℃（冷蔵保存）の間のアレニウス係数を９に等しいものとすると、最終時点（１５．６週間）は冷蔵保存の２．７年と同等である。

【０５４３】

０．１ｍＭおよび０．５ｍＭ　ＤＦＯでの試料中のコレステロール分解は検出できなかった。ＤＦＯの非存在下では、２～４週間の遅滞期間の後、両試料において有意なコレステロール分解が観察された。このことから、ＡＫＧ－３８のリポソーム製剤におけるＤＦＯの安定化役割は、０．１ｍＭと０．５ｍＭのＤＦＯ濃度の両方で確認された。ＰＣ分解生成物（リゾ－ＰＣおよびステアリン酸）は全ての試料に線形的に徐々に蓄積した。Ｅｘｃｅｌ　ＬＩＮＥＳＴ関数を用いた、組み合わせた（バイアル１およびバイアル２）ＨＳＰＣ分解データの線形近似は、ＨＳＰＣ分解率がＤＦＯの存在にわずかな依存しか有しないことを示唆した（表６４）。冷蔵（４℃）保存時のＰＣの予想分解率は約０．２４％／月であった。

【表７０】

表64.

DFO, mM	37°CでのPC分解物生成物率, %/週, 平均 ± SE	4°Cでの予測率, %/月,	R^2
0	0.415 ± 0.051	0.20	0.918
0.1	0.444 ± 0.076	0.21	0.944
0.5	0.501 ± 0.046	0.24	0.950

【０５４４】

全ての試料でｐＨの漸減が観察された（図２３）。最も顕著なｐＨの低下は、ＤＦＯを含まない試料においてであった。０．５ｍＭのＤＦＯおよび３７℃では、ｐＨは０．０１３±０．０００２２単位／週（Ｒ２＝０．８５３）の速度で低下し、４℃では０．００６２５単位／月と推定された。

【０５４５】

［実施例６８］

［リポソーム製剤中のＡＫＧ－３８化合物の保存安定性。］

本実施例では、加速された分解条件（３７℃）下、デフェロキサミンの存在下で保存中のリポソーム製剤中にカプセル封入されたＡＫＧ－３８化合物の化学的安定性を記載する。脂質がＨＳＰＣに対して０．０５ｍｏｌ％の量の蛍光脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳをさらに含むことを除いて、実施例６７の手順に従って、１．７ｇのＡＫＧ－３８のスケールのリポソーム（ロットＩＤ　Ｌｓ－３７８）を調製した。充填混合物は、充填前ｐＨ５．８９、充填後ｐＨ６．７４を有した。薬物は９６．４±１．６％のカプセル封入効率でリポソームにカプセル封入された。最終製剤は０．５ｍＭデフェロキサミンを含有し、ＡＫＧ－３８　１９．９±０．１５ｍｇ／ｍｌ；リン脂質３５．７６±０．５２ｍＭ；ＤＬ比５５６．６±９．１ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ；粒径（３回の平均）Ｘｚ　１１７．８±０．７ｎｍ、ＰＤＩ　０．０２７５；ｐＨ７．５０の特徴を有した。濾過滅菌したリポソームを、灰色のブチルゴム栓付きの無菌ガラスバイアルに３連にして無菌的に分注し、３７℃で保存した。分析試料を所与の間隔で無菌的に取り出し、ｐＨ、粒径（Ｘｚ、ＰＤＩ；３つの並列した装置稼働）、脂質（コレステロールおよびＨＳＰＣ）分解について分析した。３７℃で６週間および３カ月保存した試料を、３０５ｎｍ（ＡＫＧ－３８　ＵＶ吸収極大）でＵＶ検出するＨＰＬＣによって、薬物および不純物のピークについて分析した。結果を表６５に示す（Ｎ－並列した装置稼働数）。ＨＳＰＣ分解生成物の量は、ＨＰＬＣ上のインタクトなＨＳＰＣ脂質ピーク面積に対する％として示される。コレステロール

の分解生成物はいずれの保存時点でも検出できなかった。ＡＫＧ－３８純度は、全ての検出されたピークに対する主要なＨＰＬＣピーク（インタクトなＡＫＧ－３８）の面積％として表された。ＡＫＧ－３８濃度は、インタクトな薬物の濃度を指す。３７℃で３カ月の期間にわたって、ＡＫＧ－３８純度は約９８．９９％から約９８．０７％に０．９２パーセントポイントだけ減少し、全体のインタクトな薬物濃度は、約１９．９ｍｇ／ｍｌから約１９．１ｍｇ／ｍｌへのわずかな変化（４．２％の減少）のみを有した。これらのデータは、Ｌｓ－３７８リポソーム製剤中のＡＫＧ－３８が、３７℃で３カ月の保存期間中、化学的に安定であったことを示す。アレニウスの法則に従い、速度増加係数を１０℃につき２倍と仮定すると、３７℃での３カ月間の保存は、冷蔵（４℃）での約２７カ月間の保存と同等である。

【表７１】

表65. 37° CでのAKG-38リポソームロット Ls-378の保存。N -並列した装置稼働の回数。

37° Cでの保存時間	0	6週間	3カ月
pH	7.50	7.27 ± 0.06	7.19 ± 0.02
コレステロール分解生成物, %	検出不能	検出不能	検出不能
HSPC分解生成物, %	検出不能	2.74 ± 0.52	11.29 ± 0.35
AKG-38純度, %	98.99	98.50	98.07
AKG-38濃度 mg/mL	19.9 ± 0.2	19.7 ± 0.62	19.06 ±0.03
Z-平均粒径, nm (N=3)	117.8 ± 0.7	120.6 ± 1.4	119.0 ± 1.4
PDI	0.0275	0.0258	0.0185

【０５４６】

［実施例６９］

［リポソーム製剤中のＡＫＧ－２８化合物の保存安定性。］

本実施例では、加速された分解条件（３７℃）下、デフェロキサミンの存在下で保存中のリポソーム製剤中にカプセル封入されたＡＫＧ－２８化合物の化学的安定性を記載する。リポソーム（ロットＩＤ　Ｌｓ－３７６）を、２２０ｍｇのスケールで、本質的に実施例６７および６８に記載されるように調製した。ＡＫＧ－２８（エタノール再結晶化）が、ｐＨ調整なしで水中の４０ｍｇ／ｍｌストック溶液として調製された。薬物充填は、ＤＬ比３４０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＡＫＧ－２８純粋無水遊離塩基（ＦＢ）基準で２８０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）および充填混合物中の薬物濃度１２ｍｇ／ｍＬで行われた。充填混合物は、充填前ｐＨ６．１１、充填後ｐＨ６．７８を有した。薬物は９８．６±１．９％のカプセル封入効率でリポソームにカプセル封入された。最終製剤は０．５ｍＭデフェロキサミンを含有し、ＡＫＧ－２８　８．７０±０．０７ｍｇ／ｍｌ（ＦＢ基準）；リン脂質３１．５±０．５ｍＭ；ＤＬ比（ＦＢ）２７６．２±５．１ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ；粒径（３回のランの平均）Ｘｚ１１８．７±０．８ｎｍ、ＰＤＩ　０．０１６；ｐＨ７．５２の特徴を有した。３７℃での保存安定性試験は、実施例６８に記載されるように行われた（２５４ｎｍでの薬物のＨＰＬＣ検出を用いる）。結果を表６６に示す。

【表７２】

表66. 37°CでのAKG-28リポソームロットLs-376の保存. N - 並列した装置稼働の回数

37°Cでの保存時間	0	6週間	3カ月
pH	7.52	7.40 ± 0.03	7.36 ± 0.03
コレステロール分解生成物, %	検出不能	検出不能	検出不能
HSPC分解生成物, %	検出不能	2.95 ± 0.24	6.58 ± 0.13
AKG-28純度, %	99.12	99.00	98.82
AKG-28濃度 mg/mL (FB)	8.69± 0.0	9.12 ± 0.72	8.47 ±0.13
Z-平均粒径, nm (N=3)	118.7 ± 0.8	118.2± 1.7	118.3 ± 0.6
PDI	0.0162	0.0279	0.0345

【０５４７】

３７℃での３カ月間にわたり、ＡＫＧ－２８純度は約９９．１％から約９８．８％に０．３パーセントポイント減少し、全体のインタクトな薬物濃度は、約８．７ｍｇ／ｍｌから約８．５ｍｇ／ｍｌへのわずかな変化（２．３％低下）のみを有し、これは分析不確実性に近い。これらのデータは、Ｌｓ－３７６リポソーム製剤中のＡＫＧ－２８が、３７℃で３カ月の保存期間中、化学的に安定であったことを示す。

【０５４８】

［実施例７０］

［マウスにおけるＡＫＧ－２８およびＡＫＧ－３８リポソームの血液薬物動態における保存の効果。］

ＡＫＧ－２８リポソーム（ロットＬｓ－３７６、実施例６９）およびＡＫＧ－３８リポソーム（ロットＬｓ－３７８、実施例６８）中の薬物の血液薬物動態を、３７℃で３カ月間保存する前後で、実施例３９および６０に記載されるようにＣＤ－１マウスにおいて研究した。結果（表６７）は、薬物ＡＵＣおよび半減期のわずかな増加、ならびに薬物クリアランスおよび分布体積のわずかな減少を示し、これは、リポソームの長期循環特性および／またはｉｎ　ｖｉｖｏ薬物保持特性が保存中に損なわれなかったことを示す。

【表７３】

表67. マウスにおけるAKG-28およびAKG-28のリポソームの薬物動態特性の保存の効果

ロットID	Ls-378			Ls-376		
カプセル封入された薬物	AKG-38			AKG-28		
保存時間, 月	0	3	変化, %	0	3	変化, %
注射用量, mg/kg	90	90		50	50	
$AUC_{0\text{-last}}$ (obs面積) μg-hr/ml	30097	34814	15.7	20611	22417	8.8
AUC_{inf} (expo) μg-hr/ml	28316	34887	23.2	20830	23319	11.9
AUC/用量	314.6	387.6	23.2	412.2	448.3	8.8
Vd (面積) mL/kg	41.71	39.29	-5.8	38.12	38.08	-0.1
CL (面積) mL/hr/kg	2.89	2.46	-14.9	2.29	2.07	-9.6
$T_{1/2}$ (VdおよびCLから), hr	9.99	11.08	10.9	11.52	12.75	10.7

【０５４９】
［実施例７１］
［様々な濃度のデフェロキサミンでのＡＫＧ－２８リポソームの保存。］
リポソームＡＫＧ－２８製剤の保存安定性におけるデフェロキサミン（ＤＦＯ）の様々な濃度、および充填後のリポソーム処理条件の影響を評価した。ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ、およびＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳ（４５：５５：２．２５：０．０２２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－１０５、Ｘｚ　１１９．２ｎｍ、ＰｄＩ　０．０３９１）は、ＰＣＴＥメンブレンスタックを通る通過回数が３５０ｐｓｉの作業圧力で７回であったことを除いて、１１ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで本質的に実施例３０に記載されるように調製された。押し出されたリポソームを２～８℃で一晩保持し、０．２μｍのシリンジフィルターに通した。リポソーム外の硫酸アンモニウムを、水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が４２８μＳ／ｃｍ（５．９体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後の押し出されたリポソーム中のリン脂質濃度（６３．６ｍＭ）を、ホスホモリブデンブルー法によって決定した。これらのリポソームのアリコートを、８０ｍ　ＮａＣｌの存在下で、薬物１．１ｇのスケールで、３４０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（無水遊離塩基（ＦＢ）基準で２８０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）のＤＬ０比で、ＡＫＧ－２８（エタノールから再結晶化；１１ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌストック溶液として添加）と混合し、６５℃水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で１０分間冷却した。充填混合物のインキュベーション前（充填前）のｐＨは６．１１、インキュベーション後（充填後）のｐＨは６．８３であった。リポソームを、非緩衝化０．８５％ＮａＣｌ（ロットＬｓ－３５７Ｓ）またはＨＢＳ－２０－７．５緩衝液（ロットＬｓ－３５７Ｈ）のいずれかを用いて、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）（９．９Ｖｅｘ）上のＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去に供した。リポソーム保持物を、緩衝液供給なしで同じカートリッジ上で透析濾過により濃縮した。ＴＦＦ精製後、ロットＬｓ－３５７Ｓのリポソームを、１Ｍ　ＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液ストック、ｐＨ７．６３を添加することによって、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液（ｐＨ７．５）に調整した。ＴＦＦ精製した濃縮リポソームをＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で、二塩酸塩一水和物としてのＡＫＧ－２８の薬物濃度１０．４ｍｇ／ｍｌ（無水遊離塩基として８．５ｍｇ／ｍｌ）に調整し、０．２μｍ　ＰＥＳシリンジフィルターを通すことにより滅菌した。ＴＦＦ後部分の薬物とリン脂質分析から決定したカプセル封入された薬物のＤＬ比は、Ｌｓ－３５７Ｈについては３４４．３±３．６ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ、Ｌｓ－３５７ｓについては３３６．２±３．９ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬであった（実際的な定量充填）。各ロットをさらに３つの部分に分割し、デフェロキサミンメシレート（ＤＦＯ）の１００ｍＭ滅菌溶液を０．１ｍＭまたは０．５ｍＭのいずれかに添加し、第１の部分ではデフェロキサミンを添加しなかった。
【０５５０】
リポソームを無菌的に無菌ガラスバイアルに分配し、実施例６８に記載されるように、３７℃の保存安定性試験を行い、等間隔で月に２回アリコートを採取した。リポソームを、ｐＨおよび脂質分解について分析した（表６８）。

【表７４】

表68．種々の濃度のDFO存在下でのAKG-28リポソームの安定性

保存時間	Ls-357H			Ls-357S		
月	DFOなし	0.1 mM DFO	0.5 mm DFO	DFOなし	0.1 mM DFO	0.5 mm DFO
インタクトなコレステロールピーク面積のコレステロール分解生成物 %						
0.5	0	0	0	0 ± 0	0	0
1.0	0	0	0	0 ± 0	0	0
1.5	0	0	0	0 ± 0	0	0
2.0	0	0	0	0 ± 0	0	0
2.5	0.47 ± 0.54	0	0	0 ± 0	0	0
3.0	20.7 ± 4.33	0	0	0.9 ± 1.27	0	0
3.5	27.9 ± 3.37	0	0	14.7 ± 1.95	0	0
4.0	64.1 ± 3.68	0	0	34.7 ± 4.43	0	0
インタクトなHSPCピーク面積のHSPC分解生成物 %						
0.5	2.48 ± 0.11	2.25 ± 0.21	2.05 ± 0.06	0.94 ± 0.00	0.97 ± 0.10	0.85 ± 0.11
1.0	4.52 ± 0.24	4.25 ± 0.13	3.38 ± 0.13	1.80 ± 0.02	1.77 ± 0.12	1.72 ± 0.09
1.5	6.72 ± 0.19	6.13 ± 0.10	4.66 ± 0.09	2.51 ± 0.07	2.60 ± 0.08	2.35 ± 0.14
2.0	7.24 ± 0.42	6.06 ± 0.54	4.70 ± 0.29	2.26 ± 0.38	2.40 ± 0.20	2.33 ± 0.32
2.5	11.3 ± 0.27	9.27 ± 0.51	6.22 ± 0.32	3.25 ± 0.36	3.28 ± 0.24	3.01 ± 0.30
3.0	11.6 ± 0.56	11.1 ± 1.37	7.23 ± 0.21	3.72 ± 0.46	3.53 ± 0.21	3.78 ± 0.18
3.5	12.6 ± 0.49	12.7 ± 0.75	8.01 ± 0.44	4.43 ± 0.05	4.70 ± 0.11	4.53 ± 0.63
4.0	12.6 ± 2.53	15.5 ± 0.97	12.2 ± 1.40	5.35 ± 0.10	7.43 ± 0.18	7.56 ± 0.27
pH						
0.5	7.40 ± 0.01	7.40 ± 0.00	7.41 ± 0.00	7.53 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.52 ± 0.01
1.0	7.37 ± 0.00	7.37 ± 0.00	7.38 ± 0.02	7.51 ± 0.00	7.53 ± 0.00	7.50 ± 0.02
1.5	7.33 ± 0.00	7.35 ± 0.00	7.38 ± 0.02	7.51 ± 0.04	7.52 ± 0.01	7.51 ± 0.00
2.0	7.32 ± 0.01	7.33 ± 0.01	7.37 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.49 ± 0.03
2.5	7.30 ± 0.01	7.31 ± 0.00	7.33 ± 0.02	7.49 ± 0.02	7.51 ± 0.01	7.50 ± 0.00
3.0	7.18 ± 0.02	7.25 ± 0.01	7.21 ± 0.09	7.45 ± 0.02	7.44 ± 0.00	7.41 ± 0.01
3.5	7.11 ± 0.03	7.26 ± 0.02	7.27 ± 0.03	7.43 ± 0.00	7.46 ± 0.02	7.43 ± 0.00
4.0	6.18 ± 0.07	7.25 ± 0.00	7.27 ± 0.01	7.34 ± 0.03	7.48 ± 0.01	7.44 ± 0.00

【０５５１】

０．１ｍＭおよび０．５ｍＭでのＤＦＯの添加は、全観察期間（４カ月）の間、ＡＫＧ－２８リポソーム中のコレステロール分解に対して等しく保護し、これはアレニウスの法則に従い、１０℃につき２の係数を仮定すると、冷蔵（４℃）保存の３６カ月（３年）にほぼ等しい。キレート剤（ＤＦＯ）なしの試料では、コレステロール分解が観察された。非緩衝生理食塩水（０．８５％ＮａＣｌ）への充填後の交換によって得られたＬｓ－５３７Ｓ試料中のＨＳＰＣ分解は、ＨＥＰＥＳでｐＨ７．５に緩衝化された生理食塩水への充填後の交換によって得られた試料中の約２倍遅かった。

【０５５２】

０．５ｍＭ　ＤＦＯを含有する試料において、実施例６８の方法（薬物について２５４ｎｍ　ＨＰＬＣ　ＵＶ検出を使用する）を使用して薬物化学分解を研究し、以下の結果を得た（表６９）。

【表７５】

表69. 37℃でのAKG-28リポソームの保存中のAKG-28の化学的純度
(HPLCによるインタクト薬物の%とする)

保存時間，月	Ls-357H	Ls-357S
0	99.939 ± 0.002	99.931 ± 0.002
1	99.795 ± 0.013	99.742 ± 0.008
2	99.701 ± 0.006	99.604 ± 0.010
2.5	99.638 ± 0.005	99.553 ± 0.007
3	99. 604 ± 0.006	99.503 ± 0.008
0-3 カ月の変化	-0.335 ± 0.008	-0.428 ± 0.010

【０５５３】

薬物は、両方の充填後の精製バリアントのリポソーム中での保存の際に極めて安定であった。３カ月後のＡＫＧ－２８純度の低下は、０．３３～０．４３パーセンテージポイントであった。

【０５５４】

［実施例７２］

［異なる充填後の精製条件下で調製したＡＫＧ－２８リポソームにおける脂質安定性：リポソーム外のアンモニウムの量との関係。］

ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－１１１、Ｘｚ　１１８．５ｎｍ、ＰｄＩ　０．０３１７）は、ＰＣＴＥフィルタースタックが３×１００ｎｍおよび１×２００ｎｍのフィルターを含み、リポソームが４６０ｐｓｉの作業圧力および７０℃でフィルタースタックを４回通過したことを除いて、本質的に１０．３ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで実施例３０に記載されるように調製された（しかし、脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳを使用しなかった）。押し出されたリポソームを２～８℃で一晩保持し、０．２μｍのシリンジフィルターに通した。リポソーム外の硫酸アンモニウムを、水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が４０８μＳ／ｃｍ（４．７体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後の押し出されたリポソーム中のリン脂質濃度（５３．１ｍＭ）を、ホスホモリブデンブルー法によって決定した。リポソームをＡＫＧ－２８（エタノールから再結晶化）と混合し、８０ｍ　ＮａＣｌの存在下、薬物３．３７ｇのスケールで３４０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（無水遊離塩基（ＦＢ）基準で２８０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）のＤＬ０比で最終１２ｍｇ／ｍｌ（４０ｍｇ／ｍｌストック溶液として添加）とした。充填混合物を８５℃水浴中で撹拌しながら６５℃に予熱し、さらに６５℃水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で＜１０℃に冷却し、この温度で１０分間インキュベートした。充填混合物のインキュベーション前（充填前）のｐＨは６．１３、インキュベーション後（充填後）のｐＨは６．９１であった。リポソームを、非緩衝化０．８５％（１４６ｍＭ）ＮａＣｌ（ロット３８９－０）、または１ｍＭ（ロット３８９－１）、２ｍＭ（ロット３８９－２）もしくは２０ｍＭ（ロット３８９－２０）ＨＥＰＥＳ－Ｎａ、ｐＨ７．５０で緩衝化した１４４ｍＭ　ＮａＣｌのいずれかを用いて、ポリスルホン中空繊維カートリッジ（ＭＷＣＯ　５００ＫＤａ）でのＴＦＦによるＴＦＦ緩衝液交換／カプセル封入されていない薬物の除去（８体積交換）に供した。ＴＦＦ精製後、リポソーム組成物を、必要であれば、１ＭのＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液ストック、ｐＨ７．６３を添加することによって２０ｍＭのＨＥＰＥＳ－Ｎａ緩衝液、ｐＨ７．５に調整し、１００ｍＭのＤＦＯストック溶液を添加することによって全てを０．５ＭのＤＦＯに調整した。ＴＦＦ精製濃縮リポソームを、さらに、０．５ｍＭ　ＤＦＯを含むＨＢＳ－２０－７．５緩衝液で、

無水遊離塩基（ＦＢ）含量で計数して８．３４ｍｇ／ｍｌのＡＫＧ－２８の薬物濃度に調整し、０．２μｍ　ＰＥＳシリンジフィルターを通すことにより滅菌した。ＴＦＦ精製ステップの間に除去されたカプセル封入されていないＡＫＧ－２８の量から算出された充填効率は、９８．９～９９．１％であり、ＤＬ比は、３２３．９ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＦＢ基準で２７６．６ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）であった。リポソームを無菌ガラスバイアルに無菌的に分配し、３７℃保存安定性試験を行った。アリコートを約２週間間隔で採取し、実施例６８に記載されるようにｐＨおよび脂質の完全性について分析した。リポソームはまた、リポソーム外のアンモニウムに加えて、リポソーム組成物中の総アンモニウム濃度が、６５℃で２分間のＣ１２Ｅ１０界面活性剤（６７ｍｇ／ｍｌ）によるリポソームの溶解後に測定されたことを除いて、実施例６３の方法によってアンモニウム含量について分析された。結果を表７０に示す。

【表７６】

表70. 種々の充填後の緩衝液交換条件下で調製されたAKG-28リポソームにおける脂質安定性およびアンモニウムアッセイ

交換緩衝液中のHEPES, mM:	0	1	2	20
37° Cでの日数	HSPC分解, %			
0	0.00	0.00	0.00	0.00
16	0.60 ± 0.18	0.70 ± 0.17	0.84 ± 0.17	0.90 ± 0.45
33	1.52 ± 0.14	2.23 ± 0.46	2.25 ± 0.34	2.77 ± 0.25
47	2.67 ± 0.59	3.15 ± 0.49	3.29 ± 0.25	4.16 ± 0.75
62	3.17 ± 0.39	4.42 ± 0.40	4.95 ± 0.41	5.10 ± 0.44
77	4.50 ± 0.17	6.13 ± 0.41	6.40 ± 0.07	7.05 ± 0.33
95	5.49 ± 0.14	7.34 ± 0.02	7.99 ± 0.32	8.98 ± 0.13
分解率, %/日	0.0559	0.0750	0.0806	0.0895
R^2	0.9937	0.9938	0.9943	0.9943
	$[NH_4^+]$, mM			
合計	22.93 ± 0.70	22.48 ± 0.92	21.74 ± 0.72	21.76 ± 0.49
リポソーム外	1.70 ± 0.20	0.80 ± 0.03	0.83 ± 0.21	0.61 ± 0.02
合計の%としてリポソーム外	7.4 ± 0.9	3.5 ± 0.2	3.8 ± 1.0	2.8 ± 0.1

【０５５５】

保存時の分解に対するリン脂質の安定性は、非緩衝生理食塩水を用いた充填後の精製の組成物において顕著に高かった。本発明者らは、この良好なリン脂質の安定性が、リポソーム組成物中のアンモニウムイオンのより高いリポソーム外の濃度と相関することを予期せずに見出した。非緩衝生理食塩水の充填後の緩衝液交換で調製された組成物は、ｐＨ７．５に緩衝化された充填後の緩衝液交換媒体で調製したものよりＨＳＰＣの平均分解速度が１．３～１．６倍低く、同時に、ｐＨ７．５に緩衝化された充填後の交換生理食塩水緩衝液（０．６～０．８ｍＭ、総量の２．８～３．８％）で調製された組成物中のリポソーム外アンモニウムの量が１．７ｍＭ（総量の７．４％）の２倍高かった。したがって、１ｍＭを超えるリポソーム外の媒体中のアンモニア濃度（リポソーム外の濃度）は、リン脂質のより良好な保存安定性と関連する。

【０５５６】

［実施例７３］

［様々な薬物対脂質比でコレステロール含量を増加させたＡＫＧ－２８のリポソームへの

カプセル封入。]

ＨＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（４５：５５：２．２５モル比）の押し出されたリポソーム（押し出されたロットＬ－１１５、Ｘｚ　１１２．５ｎｍ、ＰｄＩ　０．０１８６）を、ＰＣＴＥフィルタースタックが（下から上へ）１×８０ｎｍ、３×１００ｎｍ、および２×２００ｎｍのフィルターを含み、このリポソームを、７０℃で７００ｐｓｉの作業圧力でフィルタースタックに２回通過させたことを除いて、１５ｍｍｏｌのＨＳＰＣのスケールで、本質的に実施例３０に記載されるように調製した（しかし、脂質標識ＤｉＩＣ１８（３）－ＤＳを使用しなかった）。押し出されたリポソームを２～８℃で一晩保持し、０．２μｍのシリンジフィルターに通した。リポソーム外の硫酸アンモニウムを、水に対するＴＦＦによって、残存する伝導度が４２６μＳ／ｃｍ（４．７体積交換）になるまで除去した。ＴＦＦ後の押し出されたリポソーム中のリン脂質濃度（５５．１ｍＭ）を、ホスホモリブデンブルー法によって決定した。リポソームをＡＫＧ－２８（エタノールから再結晶）（３９．８ｍｇ／ｍｌストック溶液として添加）と、最終容量０．８ｍｌ中、薬物３．７～９．６ｍｇのスケールで、１００～８００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（無水遊離塩基（ＦＢ）基準で８５．４～６８３．２ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）のＤＬ０比で、８０ｍのＮａＣｌの存在下で混合した。充填混合物を６５℃の水浴上で２０分間撹拌しながらインキュベートし、続いて氷水中で＜１０℃に１０分間冷却した。充填混合物のインキュベーション前（充填前）のｐＨは６．１～６．１８、インキュベーション後（充填後）のｐＨは６．３４～７．２６であった。カプセル封入されていないＡＫＧ－２８を、ＰＤ－１０重力供給カラム（溶出液ＨＢＳ－７緩衝液）におけるＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂでのクロマトグラフィーによって除去し、リポソームを空隙容量画分で回収し、ＡＫＧ－２８（５０％イソプロパノール－０．１Ｍ　ＨＣｌ中、３０２ｎｍでのＵＶ分光光度法を使用して）およびリン脂質（ホスホモリブデンブルー法を使用して）について分析した。カプセル封入された薬物についての薬物対脂質（ＤＬ）比を算出し、リポソーム充填混合物中の初期薬物対脂質比（ＤＬ０）と比較した。結果を表７１に示す。効率的な（＞９０％）カプセル封入がＤＬ０範囲１００～５００ｇ／ｍｏｌで観察され、ＤＬ比約９９～４７０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＦＢとして８５～４００ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）のリポソームが得られた。より高いＤＬ０比では、封入効率は減少し、リポソームは約５３０～５４０ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ（ＦＢとして４５６～４５８ｇ／ｍｏｌ　ＰｈＬ）のカプセル封入されたＤＬ比の限界に達した。

【表７７】

表71.

DL0	DL(カプセル封入された)		カプセル封入効率
g/mol PhL	g/mol PhL	g/mol PhL (FB)	%
100	99.4 ± 3.3	84.8 ± 2.8	99.4 ± 3.3
200	192.6 ± 6.8	164.5 ± 5.8	96.3 ± 3.5
300	292.3 ± 5.3	249.6 ± 4.6	97.4 ± 1.8
400	393.0 ± 14.6	335.6 ± 12.5	98.3 ± 3.7
500	473.3 ± 3.3	404.2 ± 2.8	94.7 ± 0.7
600	516.2 ± 5.3	440.9 ± 4.5	86.0 ± 1.0
700	533.9 ± 4.9	455.9 ± 4.2	76.3 ± 0.9
800	536.6 ± 7.8	458.2 ± 6.7	67.1 ± 1.5

【０５５７】

[実施例７４]

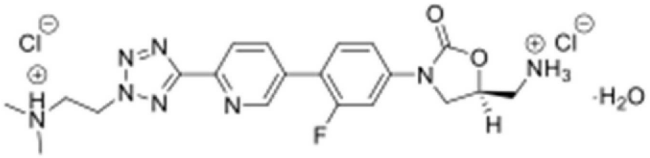
[例示的なリポソーム生成物]

（ＡＫＧ－２８リポソーム注射生成物）

ＡＫＧ－２８リポソーム注射生成物は、抗菌剤であるＡＫＧ－２８の二塩酸塩一水和物を用いて、静脈注射用のリポソーム分散体に製剤化される。ＡＫＧ－２８二塩酸塩一水和物塩の化学名は、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミ

ノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアミノ）－１，３－オキサゾリジン－２－オン二塩酸塩一水和物である。分子構造は、

【化７０】



である。

【０５５８】

ＡＫＧ－２８二塩酸塩一水和物の濃度のＡＫＧ－２８遊離塩基の濃度への換算係数は０．８２４である。

【０５５９】

リポソーム注射生成物は、１０ｍｌのガラスバイアルにパッケージされた無菌の白色からわずかにオフホワイトの不透明な等張液体リポソーム分散体である。各１０ｍＬ単回投与バイアルは８５ｍｇ（８．５ｍｇ／ｍＬ）のＡＫＧ－２８遊離塩基（２－オキサゾリジノン、５－（アミノメチル）－３－［４－［６－［２－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－２Ｈ－テトラゾール－５－イル］－３－ピリジニル］－３－フルオロフェニル］－、（５Ｓ）－）を含有する。リポソームは、直径約１１５ｎｍ（Ｚ平均）の単層脂質二重層小胞であり、硫酸塩として不溶性のゲル化または沈殿状態のＡＫＧ－２８を含有する水性空間を封入する。小胞は、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）２２．６ｍｇ／ｍＬ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）１３．６ｍｇ／ｍＬ、およびメトキシ末端ポリエチレングリコール（ＭＷ２０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＭＰＥＧ－２０００－ＤＳＰＥ）４ｍｇ／ｍＬから構成され、生理食塩水緩衝液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１４１ｍＭ ＮａＣｌ、０．５ｍＭ デフェロキサミン、ｐＨ７．５）中に懸濁され、各ｍＬはまた、緩衝液として４．８ｍｇ／ｍＬの２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）、キレート剤として０．３３ｍｇ／ｍＬのデフェロキサミンメシレート、および注射用水中に等張性試薬として８．２ｍｇ／ｍＬの塩化ナトリウムを含有する。水酸化ナトリウムおよび／または塩酸をｐＨ７．５になるまで添加する。リポソーム内の脂質のモル比は、４５：５５：２．２５（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＭＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である。ＡＫＧ－２８は、２８０ｇ／ｍｏｌのＡＫＧ－２８（遊離塩基）－リン脂質比で、硫酸アンモニウム勾配法によってカプセル封入される。

【０５６０】

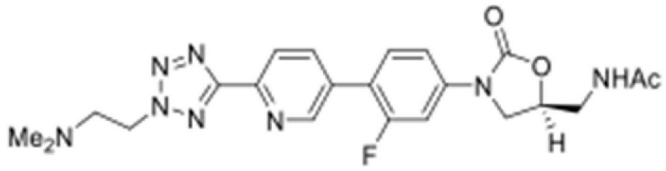
ＡＫＧ－２８リポソーム注射は、結核菌などのマイコバクテリア感染患者の処置に有用な抗菌剤である。一部の実施形態では、ＡＫＧ－２８リポソーム注射は、多剤耐性（ＭＤＲ）または極度の薬剤耐性（ＸＤＲ）結核菌などのマイコバクテリア感染を有する患者の処置に有用な抗菌剤である。

【０５６１】

（ＡＫＧ－３８リポソーム注射生成物）

ＡＫＧ－３８リポソーム注射生成物は、抗菌剤であるＡＫＧ－３８の遊離塩基を用いて、静脈注射用のリポソーム分散体に製剤化される。ＡＫＧ－３８の化学名は、（５Ｒ）－３－｛３－フルオロ－４－［６－（２－（２－ジメチルアミノエチル）－２Ｈ－テトラゾール－５－イル）－３－ピリジニル］フェニル｝－５－（メチルアセトアミド）－１，３－オキサゾリジン－２－オンである。分子構造は、

【化７１】



である。

【０５６２】

ＡＫＧ－３８リポソーム注射生成物は、１０ｍｌのガラスバイアルにパッケージされた無菌の白色からわずかにオフホワイトの不透明な等張性リポソーム分散体である。各１０ｍＬ単回投与バイアルは、１６ｍｇ／ｍＬの濃度で１６０ｍｇのＡＫＧ－３８遊離塩基を含有する。リポソームは、直径約１１５ｎｍの単層脂質二重層小胞であり、硫酸塩として不溶性のゲル化または沈殿状態のＡＫＧ－３８を含有する水性空間をカプセル封入する。小胞は、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）２０ｍｇ／ｍＬ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）１２ｍｇ／ｍＬ、およびメトキシ末端ポリエチレングリコール（ＭＷ２０００）－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＭＰＥＧ－２０００－ＤＳＰＥ）３．５ｍｇ／ｍＬから構成され、生理食塩水緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１４１ｍＭ　ＮａＣｌ、０．５ｍＭデフェロキサミン、ｐＨ７．５）に懸濁され、各ｍＬはまた、緩衝液として４．８ｍｇ／ｍＬの２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）、キレート剤として０．３３ｍｇ／ｍＬデフェロキサミンメシレート、および注射用水中の等張性試薬として８．２ｍｇ／ｍＬ塩化ナトリウムを含有する。水酸化ナトリウムおよび／または塩酸をｐＨ７．５になるまで添加する。リポソーム内の脂質のモル比は、４５：５５：２．２５（ＨＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＭＰＥＧ－ＤＳＰＥ）である。ＡＫＧ－３８は、６００ｇ／ｍｏｌのＡＫＧ－３８（遊離塩基）－リン脂質比で、硫酸アンモニウム勾配法によってカプセル封入される。

【０５６３】

ＡＫＧ－３８リポソーム注射は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）細菌感染症の治療を含むグラム陽性細菌感染症患者の処置に有用な抗菌剤である。ＡＫＧ－３８リポソーム注射は、結核菌などのマイコバクテリア感染を有する患者の処置に有用な抗菌剤である。一部の実施形態では、ＡＫＧ－３８リポソーム注射は、多剤耐性（ＭＤＲ）または極度の薬剤耐性（ＸＤＲ）結核菌などのマイコバクテリア感染を有する患者の処置に有用な抗菌剤である。

【０５６４】

本明細書には、細菌感染の処置に関する化合物、組成物および方法が開示される。本明細書にて、「化合物」および「薬物」は、互換的に使用される。本開示の一部の態様は、オキサゾリジノンの新規アミノアルキル誘導体に関する。本開示の一部の態様は、オキサゾリジノン化合物の新規アミノアルキル誘導体を合成するプロセスに関する。他の一態様は、リポソーム中のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体を含む組成物に関する。本開示の他の一態様は、細菌感染の処置におけるオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体、またはオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体を含むリポソーム組成物の使用に関する。一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、マイコバクテリアおよびグラム陽性細菌からの感染を処置するために使用できる。一部の実施形態では、細菌感染は、結核菌である。一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、マイコバクテリアおよびグラム陽性細菌の増殖を阻害する。これらには、限定されないが、結核菌、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス複合体、ハンセン菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｅｐｒａｅ）、マイコバクテリウム・ゴルドナエ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇｏｒｄｏｎａｅ）、マイコバクテリウム・アブセッサス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｂｓｃｅｓｓｕｓ）、マイコバクテリウム・ムコゲニカム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｍｕｃｏｇｅｎｉｃｕｍ）、連鎖球菌、バン

コマイシン耐性腸球菌（ＶＲＥ）、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）（ＭＲＳＡ）、肺炎ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、エンテロコッカス・フェシウム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃｉｕｍ）、Ｂ群連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、肺炎連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、化膿連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、緑色連鎖球菌（ｖｉｒｉｄａｎｓ　ｇｒｏｕｐ　ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、ノカルジア菌（Ｎｏｃａｒｄｉａ）、およびコリネバクテリア属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）が含まれる。

【０５６５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、ヒト腎臓または肝細胞などの哺乳動物細胞と比較した場合、結核菌に対して選択的に活性である。一部の実施形態では、本明細書に記載のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、腎臓または肝細胞の哺乳動物細胞などの哺乳動物細胞と比較した場合、結核菌に対して少なくとも１０００倍の予想外に高い選択性を示す。一部の実施形態では、本明細書に記載のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、少なくとも１００倍の予想外に高い選択性を示す。一部の実施形態では、本明細書に記載のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、腎臓または肝細胞の哺乳動物細胞などの哺乳動物細胞と比較した場合、結核菌に対して１００～６，５００倍、１００～６，０００倍、１００～５，５００倍、１００～５，０００倍、１００～４，５００倍、１００～４，０００倍、１００～３，５００倍、１００～３，０００倍、１００～２，５００倍、１００～２，０００倍、１００～１，５００倍、１００～１，０００倍、５００～６，５００倍、５００～６，０００倍、５００～５，５００倍、５００～５，０００倍、５００～４，５００倍、５００～４，０００倍、５００～３，５００倍、５００～３，０００倍、５００～２，５００倍、５００～２，０００倍、５００～１，５００倍、５００～１，０００倍、１，０００～６，５００倍、１，０００～６，０００倍、１，０００～５，５００倍、１，０００～５，０００倍、１，０００～４，５００倍、１，０００～４，０００倍、１，０００～３，５００倍、１，０００～３，０００倍、１，０００～２，５００倍、１，０００～２，０００倍、１，０００～１，５００倍の予想外に高い選択性を示す。

【０５６６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、肝臓、脾臓、または肺におけるマイコバクテリウム常駐マクロファージにおける選択的取り込みを促進し、強力な細胞内死滅を提供するのを助けることができる。マクロファージは、マイコバクテリウムのような外来の感染性病原体と、リポソームなどの実験室由来のナノ粒子の両方を含む、食作用を介した異物粒子のクリアランスに関与する。これは、両者が同じ生物学的保有宿主に共局在化し、疾患の重要な貯蔵場所に活性剤を効果的に濃縮する機会をもたらす。

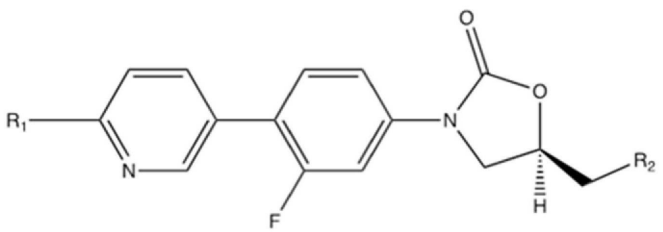
【０５６７】

結核、ならびに他のマイコバクテリアおよびグラム陽性細菌感染を処置するための組成物および方法を開示する。

【０５６８】

本開示の一態様は、式（Ｉ）

【化７２】



式(I)

［式中、
R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、
R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。］
の化合物またはその薬学的に許容される塩を提供する。

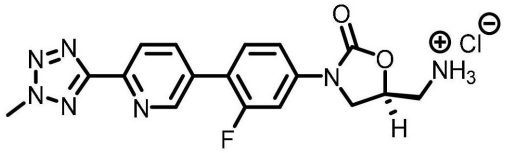
【０５６９】

一部の実施形態では、アミノアルキルは、ジメチルアミノアルキルである。一部の実施形態では、オキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、オキサゾリジノン環のR_2位にアミンまたはアセトアミド基のいずれかと、テトラゾール環上のジメチルアミノエチル基とを含む。

【０５７０】

一部の実施形態では、式１ａの化合物が提供される。

【化７３】

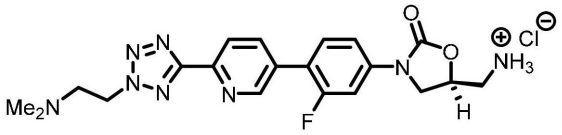


式1a

【０５７１】

一部の実施形態では、式１ｂの化合物が提供される。

【化７４】



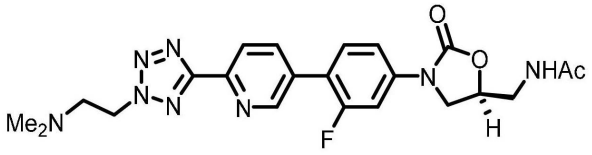
式1b

一部の実施形態では、式１ｂの化合物は、水性エタノールから結晶化される。一部の実施形態では、式１ｂの化合物は、二塩酸塩または二塩酸塩一水和物の形態である。

【０５７２】

一部の実施形態では、式１ｃの化合物またはその薬学的に許容される塩が提供される。

【化７５】

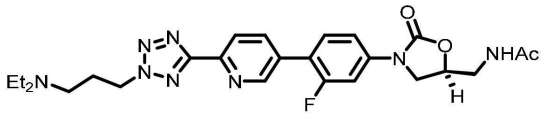


式1c

【０５７３】

一部の実施形態では、式１ｄの化合物またはその薬学的に許容される塩が提供される。

【化７６】

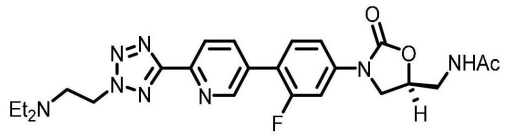


式1d

【０５７４】

一部の実施形態では、式１ｅの化合物が提供される。

【化７７】



式1e

【０５７５】

一部の実施形態では、Ｅｒｄ／ＨｅｐＧ２およびＨ３７Ｒｖ／ＨｅｐＧ２に対する選択性指数（ＳＩ）が１００～１７００の範囲である。

【０５７６】

一部の実施形態では、Ｅｒｄ／ＨｅｐＧ２およびＨ３７Ｒｖ／ＨｅｐＧ２に対するＳＩが２００～１７００の範囲である。

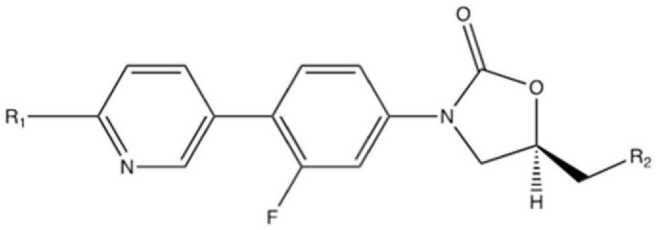
【０５７７】

一部の実施形態では、Ｅｒｄ／ＨｅｐＧ２およびＨ３７Ｒｖ／ＨｅｐＧ２に対するＳＩが３００～１７００の範囲である。

【０５７８】

本開示の別の一態様は、リポソーム小胞を含むリポソーム組成物であって、リポソーム小胞は、式(Ｉ)：

【化７８】



式(I)

[式中、

R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、

R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。]

の化合物またはその医薬として許容される塩を含む、リポソーム組成物を提供する。

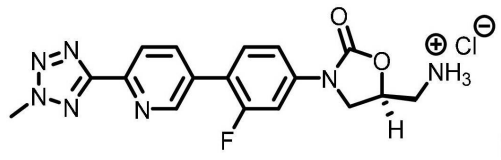
【０５７９】

一部の実施形態では、アミノアルキルは、ジメチルアミノアルキルである。一部の実施形態では、オキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、オキサゾリジノン環のR_2位置におけるアミン基またはアセトアミド基のいずれか、およびテトラゾール環上にジメチルアミノエチル基を含む。

【０５８０】

一部の実施形態では、リポソーム組成物は、リポソーム小胞を含み、リポソーム小胞は、式１ａ：

【化７９】



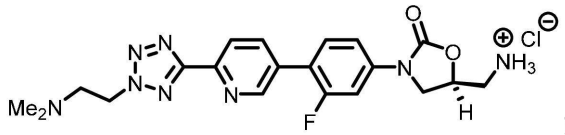
式1a

の化合物を含む。

【０５８１】

一部の実施形態では、リポソーム小胞を含むリポソーム組成物が提供され、リポソーム小胞は、式１ｂの化合物を含む。

【化８０】



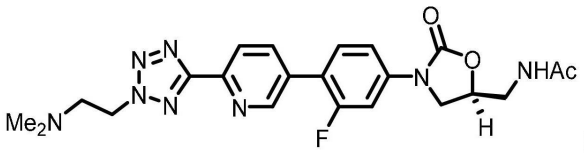
式1b

一部の実施形態では、式１ｂの化合物は、水性エタノールから結晶化される。一部の実施形態では、式１ｂの化合物は、二塩酸塩または二塩化塩一水和物の形態である。

【０５８２】

一部の実施形態では、式１ｃの化合物またはその薬学的に許容される塩を含むリポソーム小胞を含むリポソーム組成物が提供される。

【化８１】

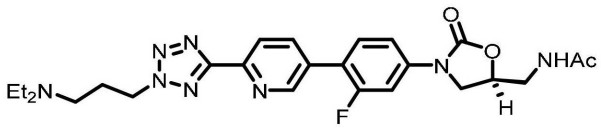


式1c

【０５８３】

一部の実施形態では、式１ｄの化合物を含むリポソーム小胞を含むリポソーム組成物が提供される。

【化８２】

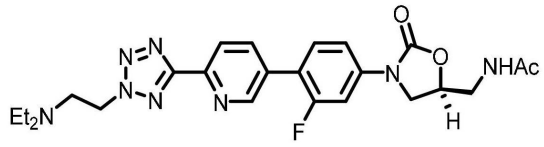


式1d

【０５８４】

一部の実施形態では、式１ｅの化合物を含むリポソーム小胞を含むリポソーム組成物が提供される。

【化８３】

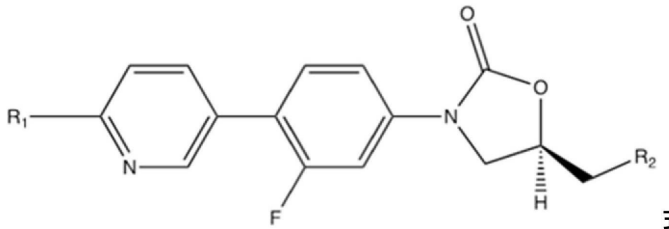


式1e

【０５８５】

本開示の一態様は、オキサゾリジノンのアミノアルキル誘導体である化合物に関する（図６を参照）。一部の実施形態では、以下の化学式（Ｉ）

【化８４】



式(I)

[式中、

R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、

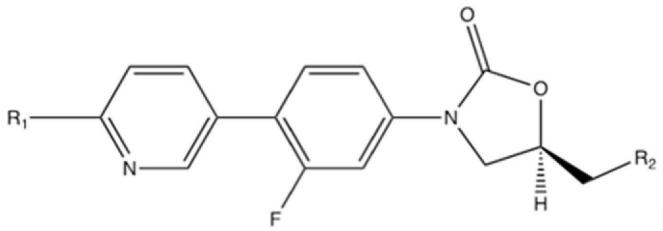
R_1は、２’位においてアミノアルキルで置換されたテトラゾール環である。]

を有する化合物およびその薬学的に許容される塩。

【０５８６】

他の一実施形態では、以下の化学式（Ｉ）

【化８５】



式(I)

［式中、

R_2は、アミン（NH_2）またはアセトアミド（$NHCOCH_3$）であり、

R_1は、１’においてアミノアルキル基で置換されたテトラゾール環である。］

を有する化合物およびその薬学的に許容される塩。

【０５８７】

一部の実施形態では、アミノアルキルは、ジメチルアミノアルキルである。一部の実施形態では、オキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体は、オキサゾリジノン環のR_2位置におけるアミン基またはアセトアミド基のいずれか、およびテトラゾール環上にジメチルアミノエチル基を含む。

【０５８８】

本開示は、オキサゾリジノン環のR_2位置におけるアミン基またはアセトアミド基のいずれか、およびテトラゾール環上にジメチルアミノエチル基を含む、本明細書に記載のオキサゾリジノン化合物のアミノアルキル誘導体についての非常に特異的な構造－活性相関（ＳＡＲ）を示す。これらの化合物は、（１）哺乳動物細胞（例えば、ヒト腎臓または肝細胞）における活性と比較した場合、結核菌に対して高度に選択的であり、（２）結核菌に対して高度に活性であり、（３）リポソームに効率的に充填される。

【０５８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のオキサゾリジノンのアミノアルキル誘導体は、勾配に基づく薬物充填方法を用いて、８５％またはそれより良好な効率でリポソームに充填する。一部の実施形態では、これらの誘導体の充填効率は、９０％以上である。一部の実施形態では、これらの誘導体の充填は、９５％以上、または定量的でさえある。一部の実施形態では、オキサゾリジノンのアミノアルキル誘導体をリポソームに充填する方法が記載される。一部の実施形態では、充填方法は、リポソーム内部水性空間において、効率的に充填し、その後、弱塩基性両親媒性剤を安定化させるために、膜貫通勾配および捕捉剤を採用する。勾配は、（１）例えばクエン酸溶液を使用して形成される単純なｐＨ勾配、（２）クエン酸または硫酸アンモニウム塩を採用するアンモニウムイオン勾配、（３）アルキル、ジアルキル、またはトリアルキルアンモニウム塩、（４）遷移金属（Cu^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}）の勾配、またはさらに（５）薬物溶解度の膜貫通勾配を含むことができる。引用によりその全体が本明細書の一部をなす、米国特許第５,３１６,７７１号明細書、同第５,８００,８３３号明細書、同第８,１４７,８６７号明細書、同第７,７４４,９２１号明細書、同第８,３４９,３６０号明細書、同第６,１１０,４９１号明細書、米国特許出願公開第２０１８／０３６９１４３Ａ１号明細書、および国際公開第１９９０／０１４０５号を参照されたい。Ａｌｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）ＩｎｔＪ　Ｃａｎｃｅｒ　６２：１９９－２０４も参照されたい。理論に拘束されることなく、リポソーム内部に含まれるカチオンは、弱塩基性薬物のリポソーム内部への蓄積を駆動するか、または薬物分子と直接的に交換することを助ける、膜を横切るｐＨ勾配を確立する上で役割を果たす。これは、一部の実施形態では、勾配の全容量未満での薬物の定量的充填をもたらす。対イオンは、リポソーム内部で薬物と安定な複合体を形成することにより

、循環中または貯蔵中の早期漏出に対する製剤の安定化において重要な役割を果たすことができる（Ｄｒｕｍｍｏｎｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ．Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ　９７，４６９６－４７４０を参照されたい。）。

【０５９０】

結核、ならびに他のマイコバクテリアおよびグラム陽性細菌感染を処置するための組物成および方法が開示される。これらの組成物は、低毒性薬物の投薬可能性を最大限にするために高効率でカプセル封入された非常に強力であり、選択的なオキサゾリジノンを含有し、血漿の存在下で安定である。組成物は、細菌またはマイコバクテリア感染部位での効率的な蓄積を可能にするために、静脈内投薬後の循環において、長期循環性であり、それらのカプセル封入された薬物を保持する。組成物は、成分の分解に関して保存安定性である。長期循環特性および薬物の非常に安定した保持と組み合わせた場合に達成され得る高用量は、これらの感染を処置するために典型的に利用される他の薬物の１日１回または１日２回の投与と比較した場合に、投与の頻度を減少させることを可能にする。

【０５９１】

本開示の種々の態様は、単独で、組み合わせて、または前述の実施形態において具体的に説明されていない種々の配列で使用することができ、したがって、その適用において、前述の説明に記載された、または図面に図示された構成要素の詳細および配列に限定されない。例えば、一実施形態に記載された態様は、他の一実施形態に記載された態様と任意の態様で組み合わせることができる。

【０５９２】

本開示の特定の実施形態について説明したが、上記の明細書は例示的なものであり、限定的なものではない。本開示の多くの変形は、本明細書の考察により当業者に明らかになる。本開示の全範囲は、特許請求の範囲、それらの同等物の全範囲、およびこのような変形とともに、本明細書を参照することによって決定されるべきである。

【０５９３】

［引用による組込み］

本明細書において引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個別の刊行物、特許または特許出願が、引用によりそのように組み込まれることが具体的に示されたのと同程度に、全ての目的のために、引用によってその全体が本明細書の一部をなるものとする。

【図面】

【図１】

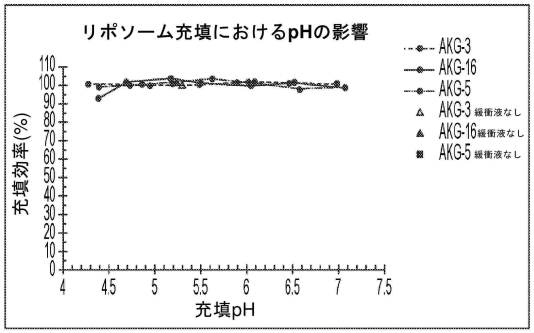


FIG. 1

【図２】

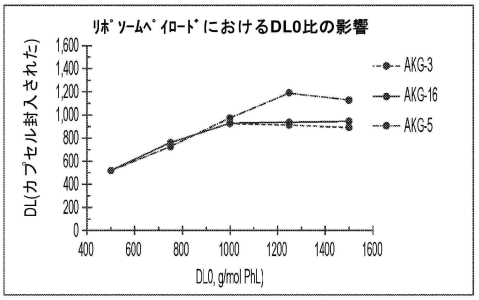


FIG. 2A

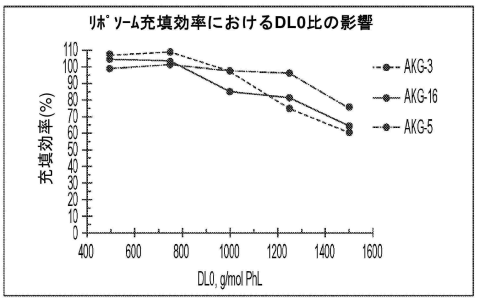


FIG. 2B

【図３Ａ】

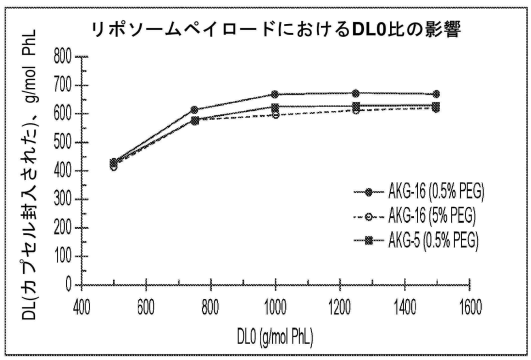


FIG. 3A

【図３Ｂ】

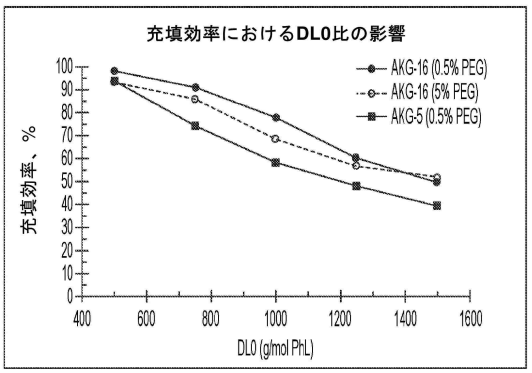


FIG. 3B

【図３Ｃ】

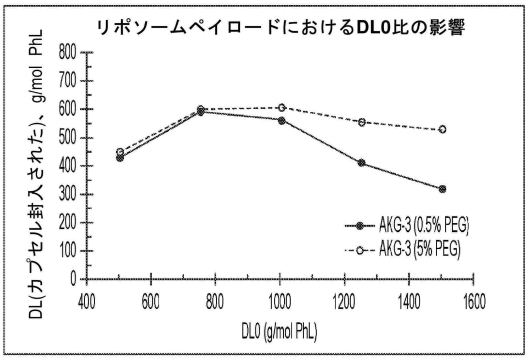


FIG. 3C

【図３Ｄ】

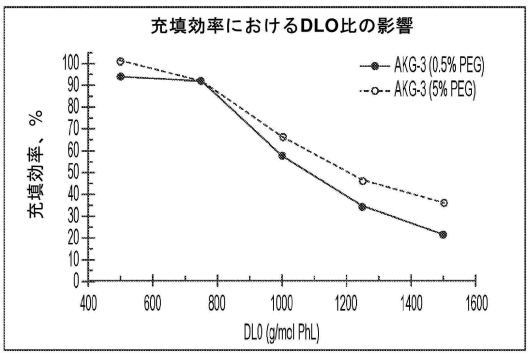


FIG. 3D

【図４】

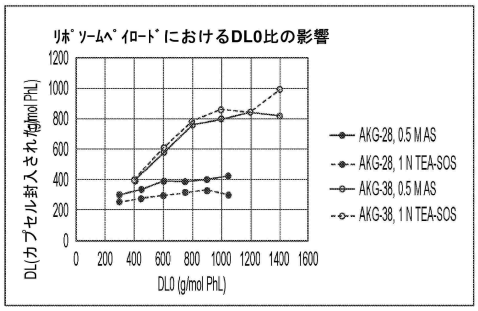


FIG. 4A

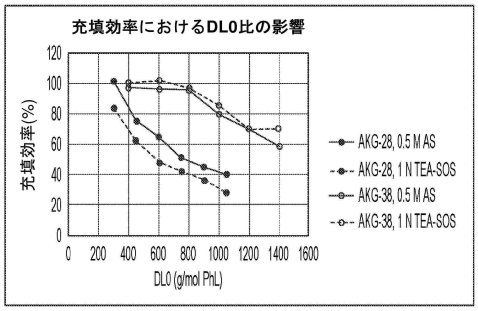


FIG. 4B

【図５Ａ】

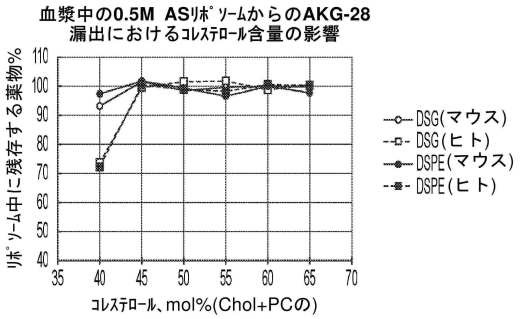


FIG. 5A

【図５Ｂ】

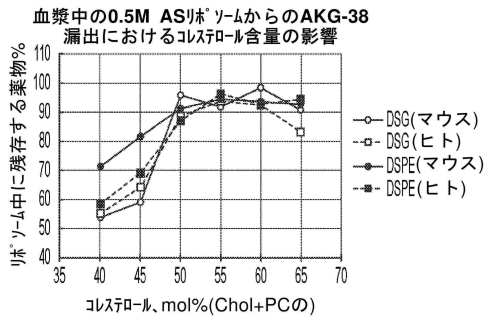


FIG. 5B

【図５Ｃ】

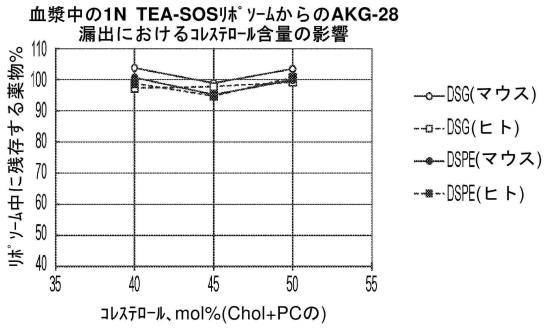


FIG.5C

【図５Ｄ】

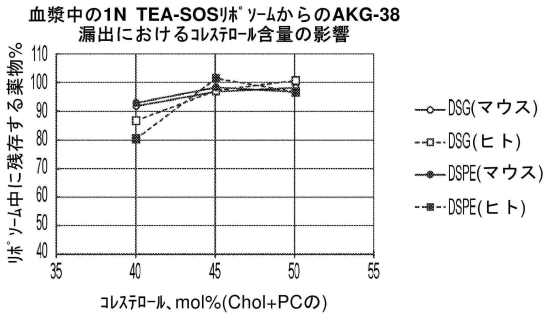


FIG.5D

【図６】

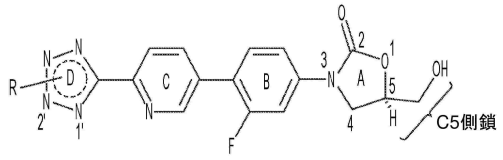


FIG. 6

【図７】

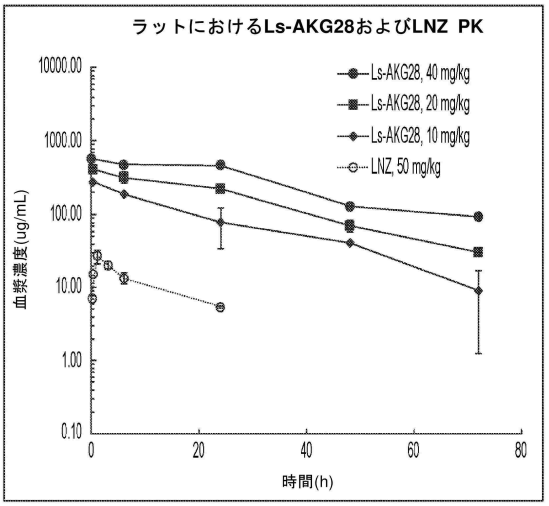


FIG. 7

【図８】

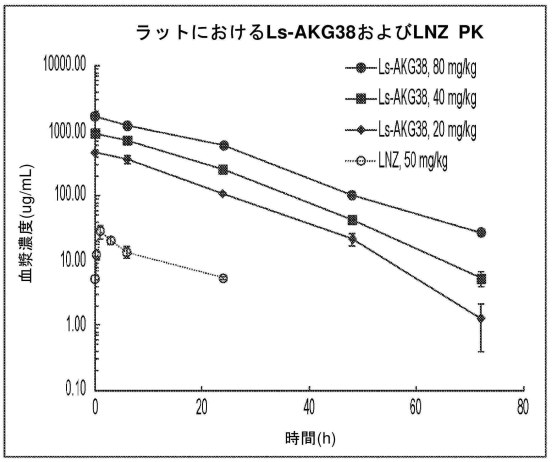


FIG. 8

【図９Ａ】

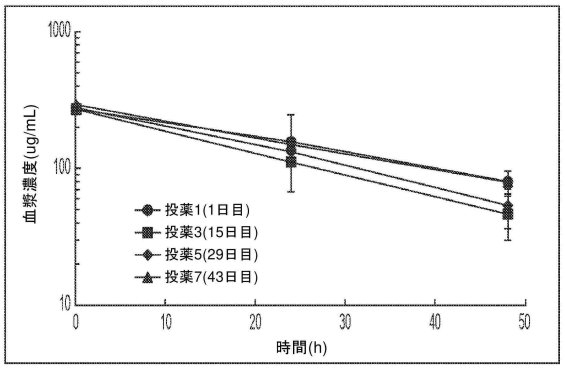


FIG. 9A

【図９Ｂ】

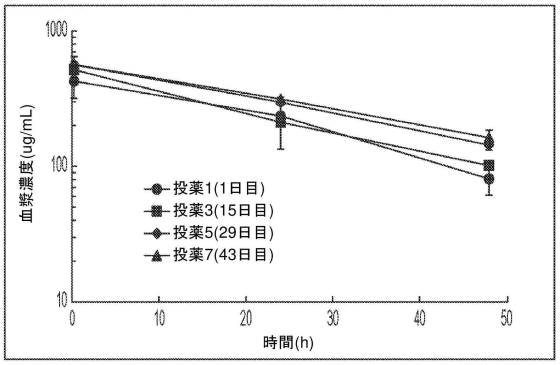


FIG. 9B

【図９Ｃ】

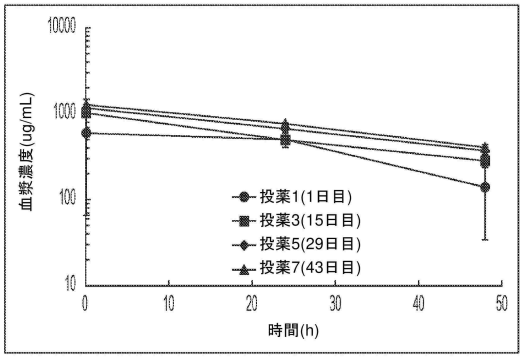


FIG. 9C

【図１０Ａ】

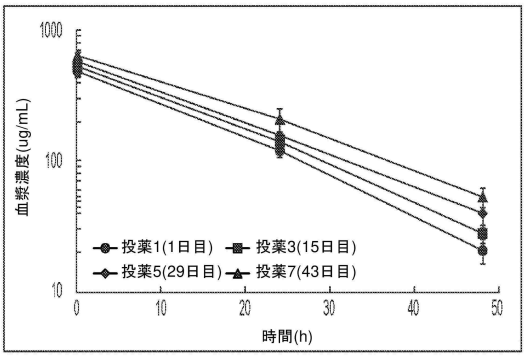


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

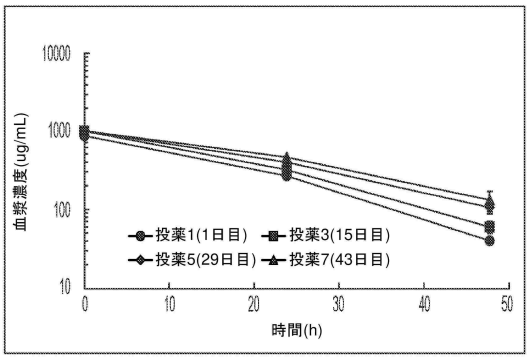


FIG. 10B

【図１０Ｃ】

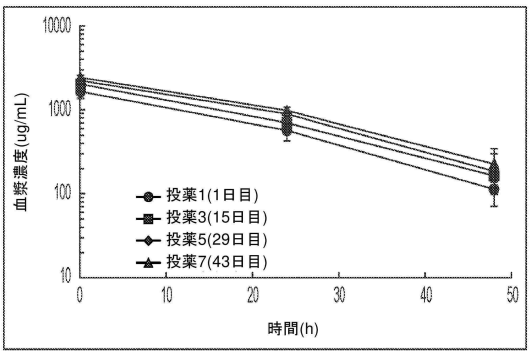


FIG. 10C

【図１１Ａ】

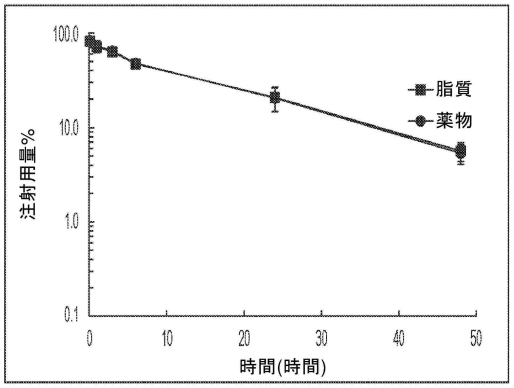


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

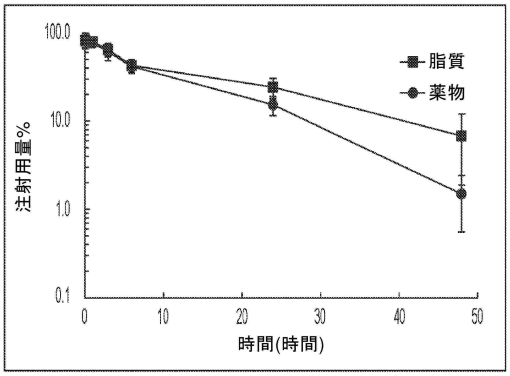


FIG. 11B

【図１１Ｃ】

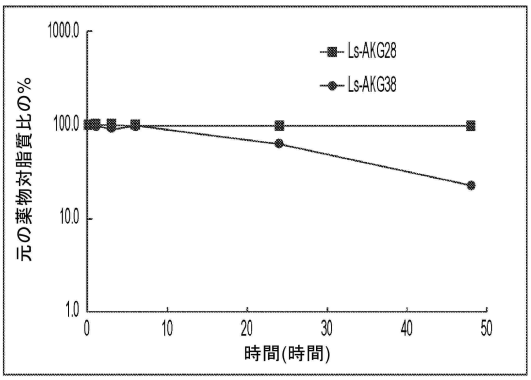


FIG. 11C

【図１２】

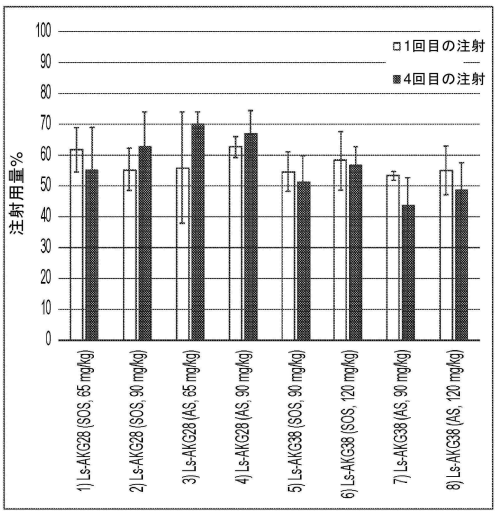


FIG. 12

【図１３Ａ】

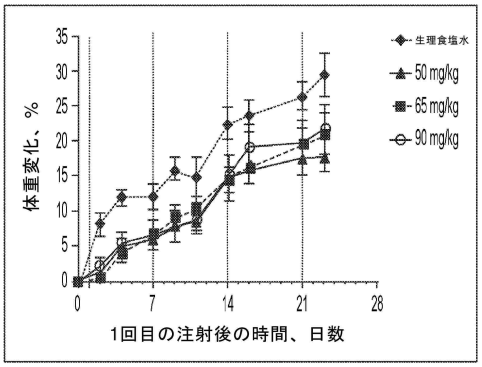


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

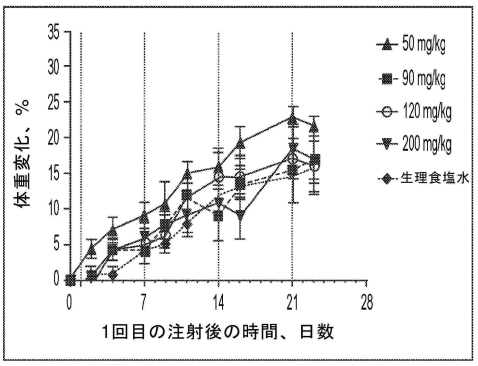


FIG. 13B

【図１３Ｃ－１】

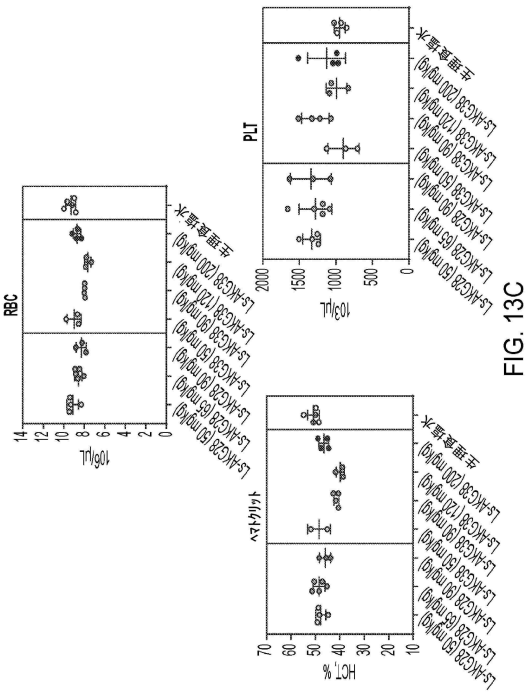


FIG. 13C

【図１３Ｃ－２】

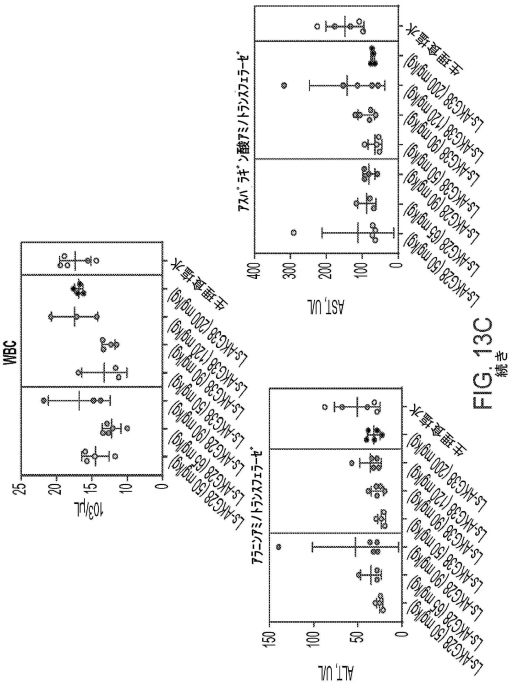


FIG. 13C
続き

【図１３Ｄ】

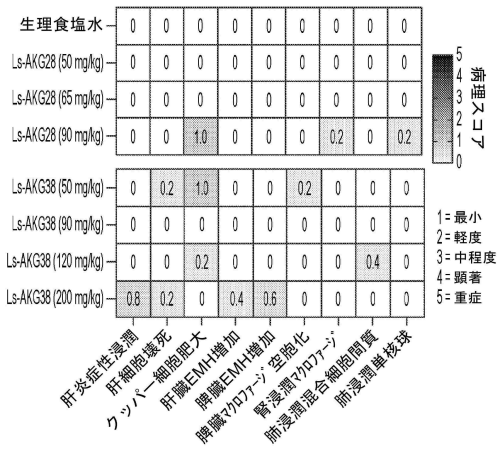


FIG. 13D

【図１４Ａ】

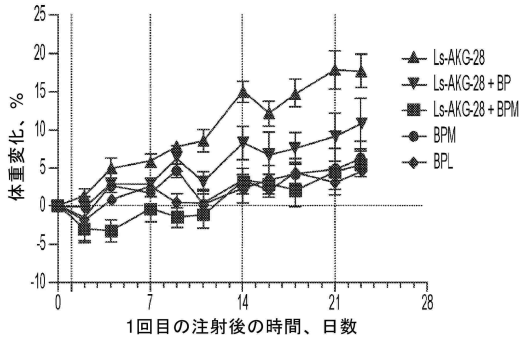


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

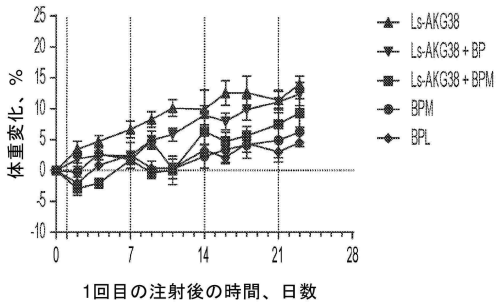


FIG. 14B

【図１４Ｃ－１】

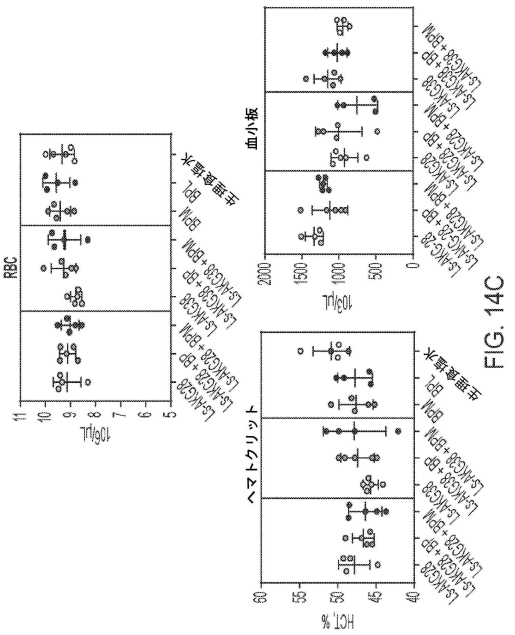


FIG. 14C

【図１４Ｃ－２】

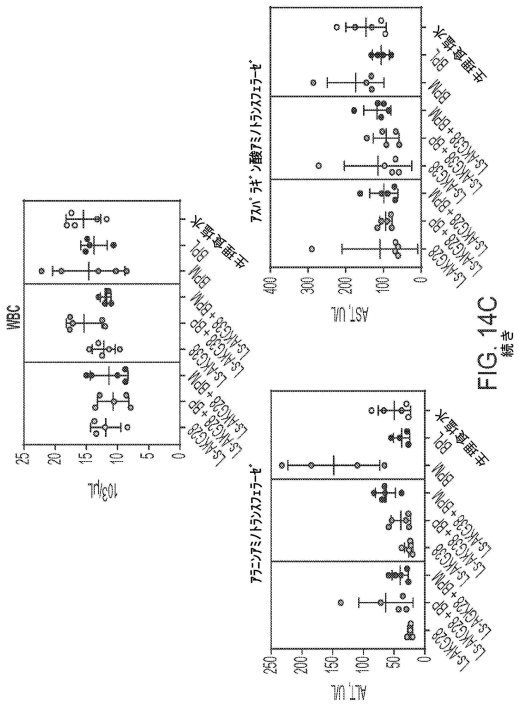


FIG. 14C
続き

【図１４Ｄ】

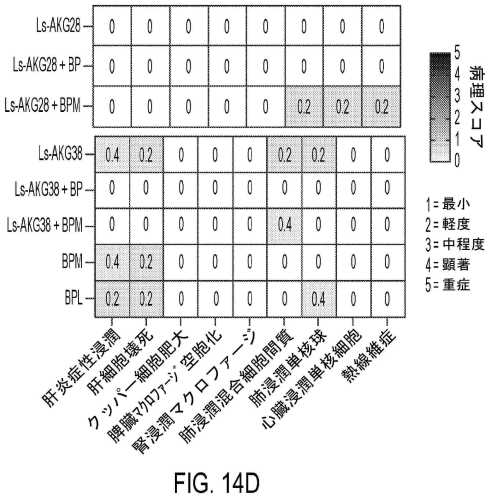


FIG. 14D

【図１５Ａ】

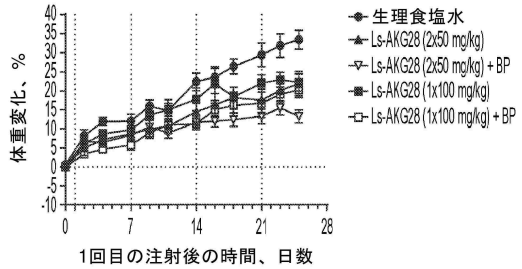


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

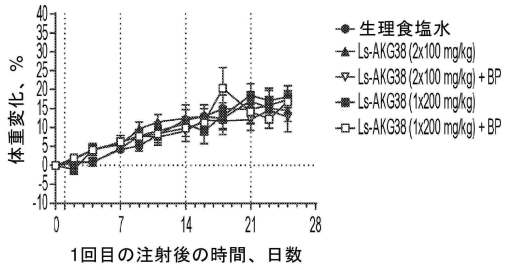


FIG. 15B

【図１５Ｃ－１】

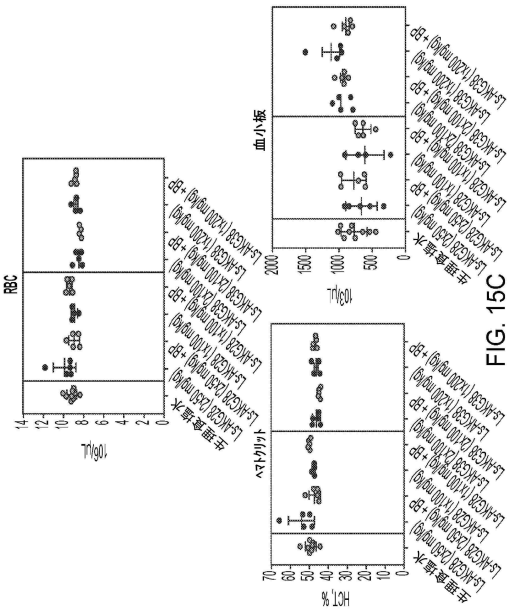


FIG. 15C

【図１５Ｃ－２】

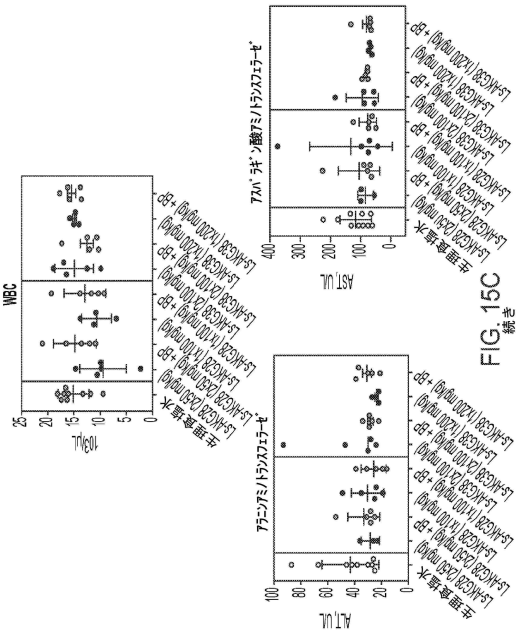


FIG. 15C 続き

【図１５Ｄ】

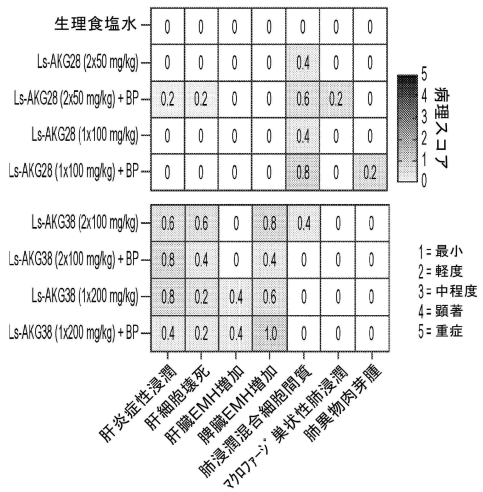


FIG. 15D

【図１６Ａ】

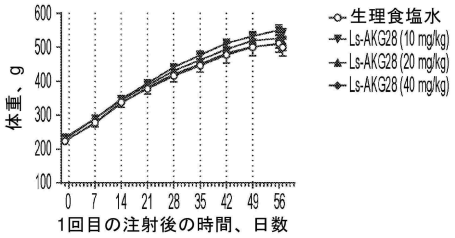


FIG. 16A

【図１６Ｂ】

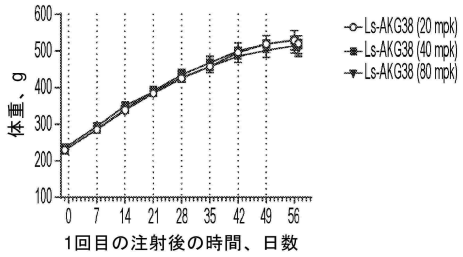


FIG. 16B

【図１７】

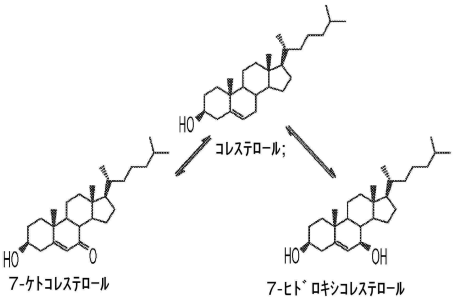


FIG. 17

【図１８】

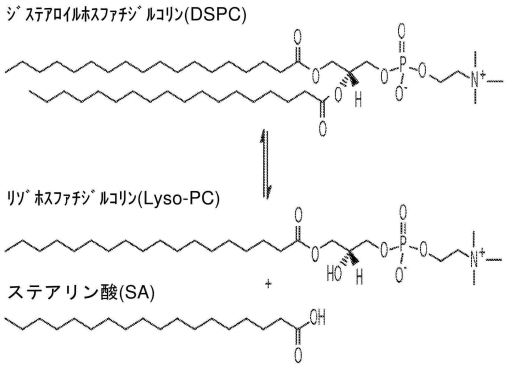


FIG. 18

【図１９Ａ】

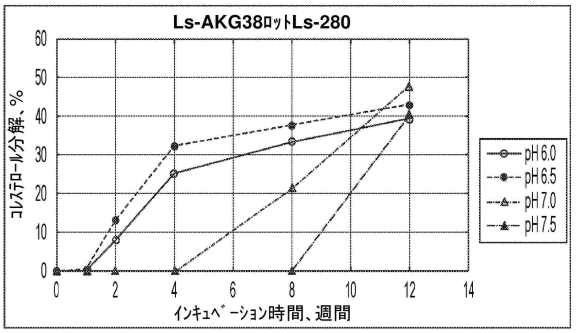


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

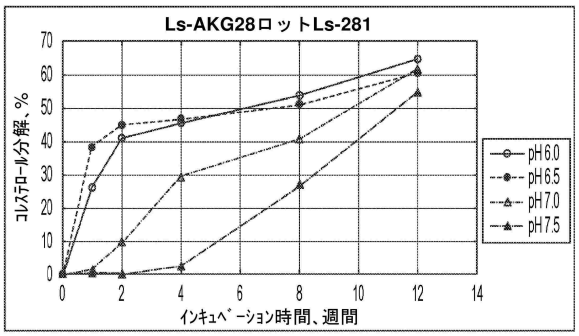


FIG. 19B

【図２０Ａ】

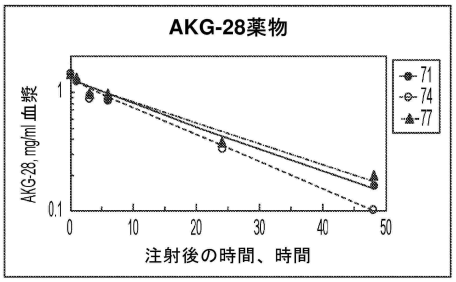


FIG. 20A

【図２０Ｂ】

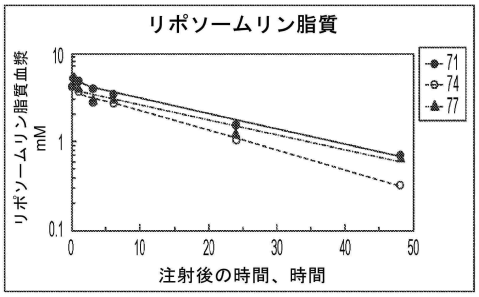


FIG. 20B

【図２０Ｃ】

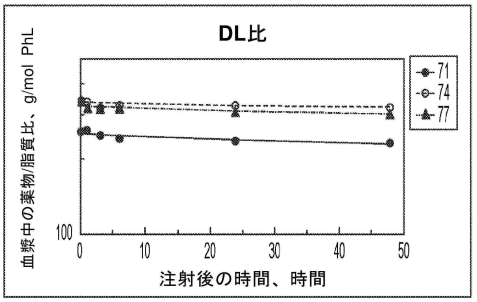


FIG. 20C

【図２１】

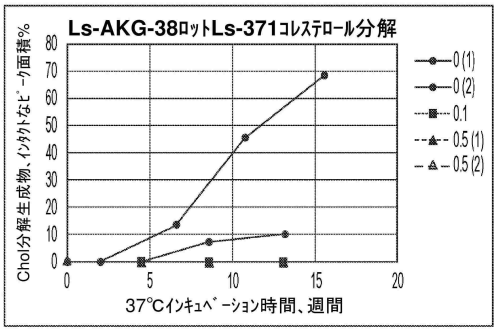


FIG. 21

【図２２】

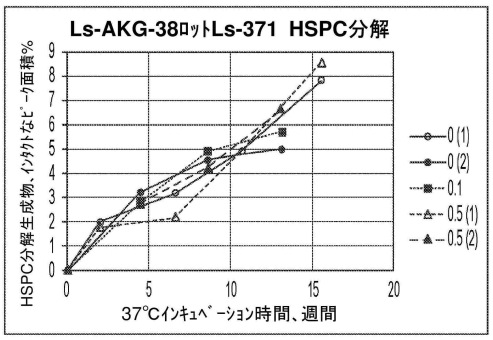


FIG. 22

【図２３】

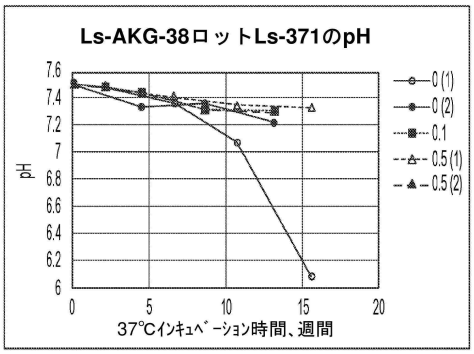


FIG. 23

【図２４】

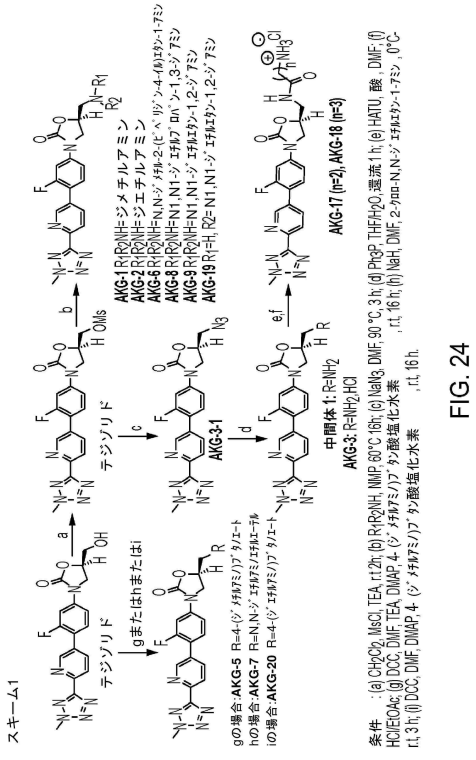


FIG. 24

【図２５】

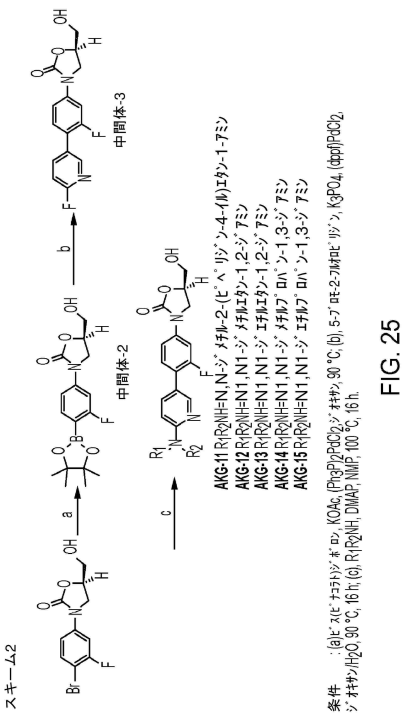


FIG. 25

【図２６】

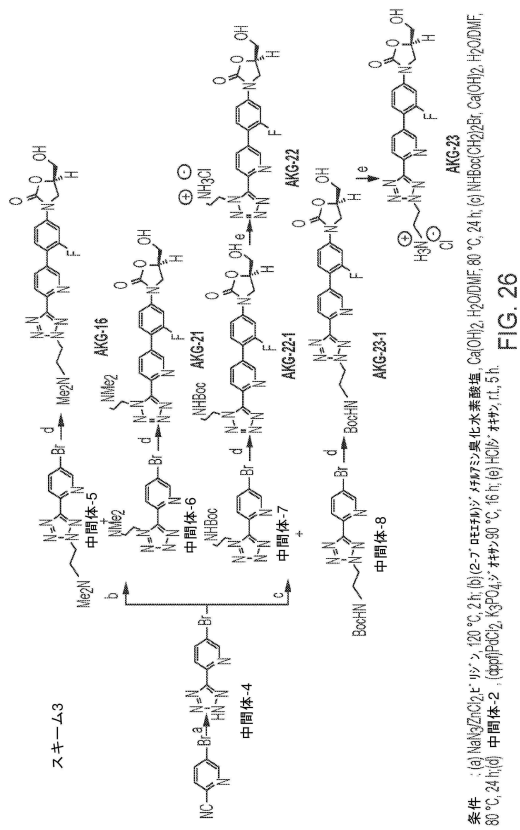


FIG. 26

【図２７】

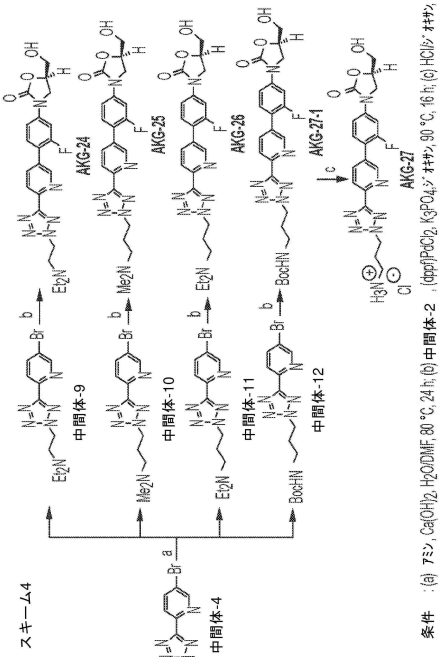


FIG. 27

【図２８】

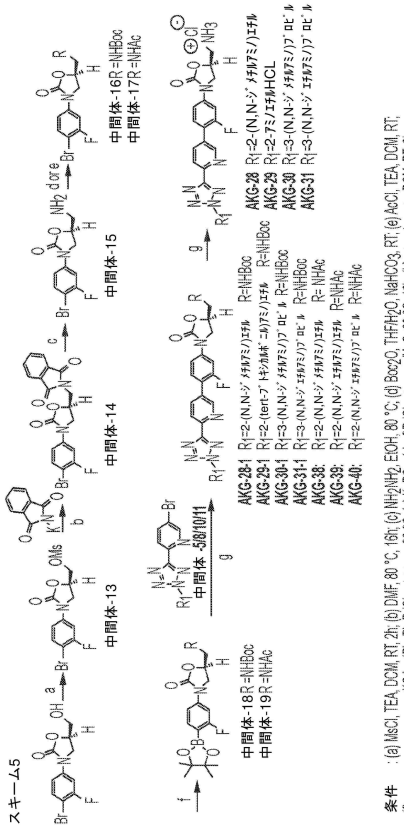


FIG. 28

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 31/33, A61K 31/335, A61K 31/395 (2023.01)
ADD. A61K 49/18 (2023.01)

CPC - INV. A61K 31/33, A61K 31/335, A61K 31/395

ADD. A61K 31/351, A61K 49/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/0078345 A1 (DONG-A ST CO LTD) 12 March 2020 (12.03.2020), especially: abstract, pg 7, Table, formula 25; pg 9, table, compound 40; pg 9, Table, Compound 41; para [0021].	1-22,34-40
Y	US 2015/0072970 A1 (MELINTA THERAPEUTICS INC) 12 March 2015 (12.03.2015), especially: pg 26, compound 1011; pg 60, Table, compound 2027; para [0010] fifth formula; para [0013]; para [0153]; para [0147]; para [0157].	1-22,34-40
Y	CHIU et al. "Effects of phosphatidylserine on membrane incorporation and surface protection properties of exchangeable poly(ethylene glycol)-conjugated lipids", Biochimica et Biophysica Acta. 2002. 1560, 37-50, especially: pg 38, col 1, para 2; pg 38, col 2, para 1; pg 39, col 1, para 3; pg 39, col 1, para 3 to col 2, para 1.	1-22,34-40
Y	BULBAKE et al. "Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review", Pharmaceutics. 2017. 9, 12, 33 pages, especially: abstract; pg 5, para 3; pg 5, para 4; pg 10, para 3.	14-20,22,40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
18 May 2023	JUN 23 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82290

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 23, 29-33 and 42-52
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(see extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-22,34-40

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82290

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOZAFARI "Nanoliposomes: Preparation and Analysis", Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) January 2010, DOI: 10.1007/978-1-60327-360-2_2, pp 29-50, especially: abstract; pg 39, para 2.	21
A	RICHARDSON et al. "The Effect of the Iron(III) Chelator, Desferrioxamine, on Iron and Transferrin Uptake by the Human Malignant Melanoma Cell", Cancer Res. 1994. 54: pp 685-689, especially: pg 685, col 1, para 2; pg 685, col 2, para 3.	1-22,34-40
A	DANAEI et al. "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems", Pharmaceutics. 2018. 10, 57, 17 pages, especially: abstract; pg 8, para 3.	1-22,34-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82290

--Box III - Lack of Unity--

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-22 and 34-40, directed to a liposome composition of a compound of Formula (I), or a pharmaceutically acceptable salt thereof; the compound of Formula (I) or pharmaceutically acceptable salt thereof is encapsulated in liposomes in an aqueous medium having a pH greater than 6.7; and the liposomes comprise a phosphatidylcholine, cholesterol and a PEG polymerconjugated lipid with 50 -65 mol% cholesterol relative to the sum of cholesterol and nonpegylated phospholipid in the liposomes.

Group II: Claims 24-28, directed to an AKG-38 liposome composition having a pH of at least 7.0 and not more than 8.0, the liposome composition comprising lipids HSPC, cholesterol, and PEG(2000)-DSPE in a molar ratio of 45:55:2.25 or in a mass ratio of 5:3:1 and a pharmaceutically acceptable salt of AKG-38 wherein the liposome composition is further characterized by any one or more of the following characteristics: (indicated in claim 24); or an isotonic AKG-38 liposomal dispersion formulated with (5R)-3-[3-Fluoro-4-[6-(2-(2-dimethylaminoethyl)-2H-tetrazol-5-y1)-3-pyridinyl]pheny11-5-(methylacetamido)-1,3-oxazolidin-2-one, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, encapsulated in liposomes comprising hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol, and (PEG(Mol. weight 2,000)-distearoylphosphatidylethanolamine, PEG-DSPE) (PEG(2000)-DSPE), in an aqueous medium comprising a chelator selected from the group consisting of: deferoxamine (desferrioxamine, Desferal), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), nitrilotriacetic acid (NTA), ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), N-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid (HEDTA), and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA).

Group III: Claim 41, directed to an AKG-28 liposome composition comprising liposomes, the liposomes comprising lipids HSPC, cholesterol, and PEG(2000)-DSPE in a molar ratio of 45:55:2.25 or in a mass ratio of 5:3:1, and a pharmaceutically acceptable salt of AKG-28 encapsulated into said liposomes wherein the liposome composition is further characterized by any one or more of the following characteristics: (indicated in claim 41).

The inventions listed as Groups I, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires a liposome composition of a compound of Formula (I), or a pharmaceutically acceptable salt thereof; the compound of Formula (I) or pharmaceutically acceptable salt thereof is encapsulated in liposomes in an aqueous medium having a pH greater than 6.7; and the liposomes comprise a phosphatidylcholine, cholesterol and a PEG polymerconjugated lipid with 50-65 mol% cholesterol relative to the sum of cholesterol and nonpegylated phospholipid in the liposomes, which is not required by Group II or Group III.

Group II requires an AKG-38 liposome composition having a pH of at least 7.0 and not more than 8.0, the liposome composition comprising lipids HSPC, cholesterol, and PEG(2000)-DSPE in a molar ratio of 45:55:2.25 or in a mass ratio of 5:3:1 and a pharmaceutically acceptable salt of AKG-38 wherein the liposome composition is further characterized by any one or more of the following characteristics: (indicated in claim 24); or an isotonic AKG-38 liposomal dispersion formulated with (5R)-3-[3-Fluoro-4-[6-(2-(2-dimethylaminoethyl)-2H-tetrazol-5-y1)-3-pyridinyl]pheny11-5-(methylacetamido)-1,3-oxazolidin-2-one, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, encapsulated in liposomes comprising hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol, and (PEG(Mol. weight 2,000)-distearoylphosphatidylethanolamine, PEG-DSPE) (PEG(2000)-DSPE), in an aqueous medium comprising a chelator selected from the group consisting of: deferoxamine (desferrioxamine, Desferal), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), nitrilotriacetic acid (NTA), ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), N-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid (HEDTA), and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), which is not required by Group I or Group III.

Group III requires an AKG-28 liposome composition comprising liposomes, the liposomes comprising lipids HSPC, cholesterol, and PEG(2000)-DSPE in a molar ratio of 45:55:2.25 or in a mass ratio of 5:3:1, and a pharmaceutically acceptable salt of AKG-28 encapsulated into said liposomes wherein the liposome composition is further characterized by any one or more of the following characteristics: (indicated in claim 41), which is not required by Group I or Group II.

Shared Common Features

The only feature shared by Groups I, II, and III that would otherwise unify the groups is a liposome composition of a compound of Formula (I). However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is obvious over US 2020/0078345 A1 to Dong-A St Co Ltd (hereinafter 'Dong-A') in view of US 2015/0072970 A1 to Melinta Theratpeutics Inc (hereinafter 'Melinta').

--continued on next page--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82290

--from previous page--

Dong teaches a compound of Formula (I) wherein R1 is a tetrazole ring substituted at position 2'; R2 is an amine (pg 9, compound 40), but Dong doesn't teach wherein R1 is substituted at position 2' with an aminoalkyl (Dong teaches alkyl instead), and Dong doesn't teach liposomes. However, Melinta teaches a highly similar compound wherein the azole ring is substituted with an aminoalkyl (pg 26, compound 1011) and Melinta further teaches wherein the compound may be formulated in liposomes (para [0157] Liposomal suspensions can also be used as pharmaceutically acceptable carriers; see also para [0153] Liposomal formulations or biodegradable polymer systems may also be used to present the drug for both intra-articular and ophthalmic administration). It would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to combine Melinta with Dong because Dong teaches oxazolidinone derivatives to be used as an antibiotic (abstract, The present invention relates to novel derivatives of oxazolidinone, a method thereof and pharmaceutical compositions comprising the derivatives for use in an antibiotic) and Melinta also teaches antibiotic oxazolidinone compounds (para [0013] The present invention provides a family of compounds that can be used as anti-proliferative agents and/or anti-infective agents. The compounds may be used without limitation, for example, as anti-cancer, anti-microbial, anti bacterial, anti-fungal, anti-parasitic and/or anti-viral agents; see also para [0010] fifth formula) which can be formulated in liposomes (para [0157] Liposomal suspensions can also be used as pharmaceutically acceptable carriers), which can protect the compound against rapid elimination (para [0157] The active compounds may be prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems), and formulation in liposomes could protect the compound of Dong from rapid elimination.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups. Groups I, II, and III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Cont. of item 4: Claims 23, 29-33 and 42-52 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note:
Claim 1 language lacks clarity regarding R2, which is defined as: "an amine or an acetamide", but there is no specification as to whether R2 may be substituted or unsubstituted. However, para [00120] of the instant specification defines aminoalkyl portion of R1 as the following: "The term "aminoalkyl" means an alkyl wherein at least one carbon of an alkyl carbon chain forms the bond with an amino group, wherein said amino group is primary amino group, mono-alkyl-substituted (secondary) amino group, di-alkyl-substituted (tertiary) amino group, or an alkyl-substituted amino group where the amine nitrogen atom and the alkyl chain that substitutes for amine hydrogens form a heterocycle". Since the aminoalkyl moiety of R1 may be substituted or unsubstituted, it was assumed that R2 may also be substituted or unsubstituted for the purposes of completing this ISR.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/02	
Ａ６１Ｋ	*47/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/20	
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	*31/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/06	

,MC,ME,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,NE,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,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．ＴＷＥＥＮ

弁理士　田中 祐
(74)代理人　100180231
弁理士　水島 亜希子
(72)発明者　キルポーチン，ディミトリィ，ビー．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州，サンフランシスコ，ポイント・ロボス・アベニュー １０１，アパートメント ＃４０６
(72)発明者　コシュカレフ，アレクサンダー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州，ニュートン，クラーク・ストリート １５
(72)発明者　ノーブル，チャールズ，オー．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州，サンフランシスコ，キャロライナ・ストリート ９９０
(72)発明者　ドラモンド，ダリル，シー．
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州，リンカーン，ブルックス・ロード １

Ｆターム（参考）　4C076　AA19 CC31 DD23 DD26Z DD37 DD49 DD57Z DD60 DD63 DD70 EE23 FF36 GG41
4C086　AA01 AA02 BC69 GA07 GA08 GA09 GA16 MA05 MA24 MA55 NA14 ZB35