(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-517352
(P2022-517352A)
(43)公表日　令和4年3月8日(2022.3.8)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/407(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/407	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*47/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全28頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-540186(P2021-540186)
(86)(22)出願日　令和2年1月11日(2020.1.11)
(85)翻訳文提出日　令和3年9月6日(2021.9.6)
(86)国際出願番号　PCT/IB2020/050205
(87)国際公開番号　WO2020/144657
(87)国際公開日　令和2年7月16日(2020.7.16)
(31)優先権主張番号　62/791,718
(32)優先日　平成31年1月11日(2019.1.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517326763
リポメディックス・ファーマシューティカルズ・リミテッド
Ｌｉｐｏｍｅｄｉｘ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ Ｌｔｄ.
イスラエル９１３９１０２エルサレム、ピーオービー３９２６２
(71)出願人　518129938
シャーレ・ゼデック・サイエンティフィック・リミテッド
ＳＨＡＡＲＥ ＺＥＤＥＫ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ ＬＴＤ.
イスラエル９１０３１０２エルサレム、シュムエル・ベイト・ストリート１２番
(74)代理人　100145403
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグを含むリポソーム組成物および製造法

(57)【要約】
薬物動態プロファイルが改善されたマイトマイシンＣの親油性プロドラッグを含むリポソーム組成物が記載される。適切な比で混合されたエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒系を用いて組成物を調製する方法も記載される。ある実施態様において、リポソーム組成物は、脂質ナノ粒子の集団および薬学的に許容される媒体であり、ここで、脂質ナノ粒子の集団が球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二の画分が該脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
脂質ナノ粒子の集団および
薬学的に許容される媒体
を含む組成物であって、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満であり、ここで、球状リポソームは、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分からなる、組成物。
【請求項２】
マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量が、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である、請求項１の組成物。
【請求項３】
マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量が、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約１０モル％である、請求項２の組成物。
【請求項４】
第二画分の脂質ナノ粒子の集団が約５％未満である、請求項１～３の何れかの組成物。
【請求項５】
第二画分の脂質ナノ粒子の集団が約０.１～５％である、請求項４の組成物。
【請求項６】
脂質ナノ粒子の集団が、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解することを含む、方法により製造される、請求項１～６の何れかの組成物。
【請求項７】
エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)が約５：１～２０：１である、請求項６の組成物。
【請求項８】
エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)が約９：１である、請求項７の組成物。
【請求項９】
組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグが、マウスで少なくとも約１５時間のＩＶ血液循環半減期を有する、請求項１～８の何れかの組成物。
【請求項１０】
約１５％以上の棒状脂質ナノ粒子を含む組成のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグと比較して、組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグが、ペグ化リポソームドキソルビシンのマウスにおけるＩＶ血液循環半減期に近い値であるマウスにおけるＩＶ血液循環半減期を有する、請求項１～９の何れかの組成物。
【請求項１１】
該小胞形成リポソームがＨＳＰＣである、請求項１～１０の何れかの組成物。
【請求項１２】
場合により存在する脂質成分がｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびコレステロールから選択される、請求項１１の組成物。
【請求項１３】
リポソームがＨＳＰＣ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み、５５／３０／５／１０のモル比でＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣが存在する、請求項１～１２の何れかの組成物。
【請求項１４】
組成物のマウスへの静脈内注射約２４時間後、マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラ

ッグが、マウス血漿におけるマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグのＣｍａｘの２０％を超えるマウス血漿における濃度を有する、請求項１～１３の何れかの組成物。
【請求項１５】
リポソームの製造方法であって、
約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび三級ブタノールからなる溶媒混合物に小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を溶解した脂質溶液を形成し、そして脂質ナノ粒子の集団を形成し、ここで、脂質ナノ粒子の集団が球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分が脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である、方法。
【請求項１６】
脂質ナノ粒子の集団の形成が、脂質が溶解した溶液と水性緩衝液を混合して懸濁液を形成し、懸濁液をフィルターを通して押出成形し、エタノールと第三級ブタノールの混合物を除去することを含む、請求項１５の方法。
【請求項１７】
脂質ナノ粒子の集団の形成が滅菌濾過をさらに含む、請求項１６の方法。
【請求項１８】
マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量が、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である、請求項１４５～１７の何れかの方法。
【請求項１９】
マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量が、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約１０モル％である、請求項１８の方法。
【請求項２０】
場合により存在する脂質成分が、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される、請求項１５～１９の何れかの方法。
【請求項２１】
エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)が約５：１～２０：１である、請求項１５～２０の何れかの方法。
【請求項２２】
エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)が約７：１～１５：１である、請求項２１の方法。
【請求項２３】
エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)が約９：１である、請求項２２の方法。
【請求項２４】
第二画分の脂質ナノ粒子の集団が約５％未満である、請求項１５～２０の何れかの方法。
【請求項２５】
第二の画分の脂質ナノ粒子の集団が約０.１～５％である、請求項２４の方法。
【請求項２６】
マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートがパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣである、請求項１５～２５の何れかの方法。
【請求項２７】
小胞形成リポソームがＨＳＰＣである、請求項１５～２６の何れかの方法。
【請求項２８】
場合により存在する脂質成分がコレステロールおよびｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥから選択される、請求項１５～２７の何れかの方法。
【請求項２９】
リポソームがＨＳＰＣ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み、ＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２

０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣが５５／３０／５／１０のモル比で存在する、請求項１５～２８の何れかの方法。
【請求項３０】
小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解して、脂質が溶解した溶液を形成し；そして
脂質が溶解した溶液と水性緩衝液を混合して脂質ナノ粒子の集団を形成することを含み、ここで、脂質ナノ粒子の集団が球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、該第二の画分が脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である、方法により調製された脂質ナノ粒子の集団。
【請求項３１】
癌を処置する方法であって、
請求項１～１４の何れかのリポソーム組成物を提供し；そして癌処置のための治療有効量のマイトマイシンＣを提供する量で、それを必要とする患者にリポソームを投与することを含む、方法。
【請求項３２】
リポソームをそれを必要とする患者に投与することが、(第二の)化学療法剤と組み合わせてリポソームを投与することを含む、請求項３１の方法。
【請求項３３】
リポソームをそれを必要とする患者に投与することが、放射線療法と組み合わせてリポソームを投与することを含む、請求項３１の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
技術分野
ここに記載される内容は、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグを含むリポソーム組成物、その製造およびその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
背景
癌は米国で主たる死亡原因であり、世界中の人々に影響を与える。手術、放射線および化学療法が最も広く使用されている治療モダリティである。化学療法剤は、細胞内に細胞増殖および複製を制限する状態を作り、癌化学療法はここ数年で劇的に進歩している。化学療法剤は、一般に新生物ならびに骨髄、毛包および腸上皮などの正常組織の急速に増殖している細胞の両方に影響する。摂食障害、悪心、嘔吐、下痢、骨髄機能抑制および脱毛は、一般に化学療法に付随する負の影響の一部である。最小の毒性で有効な抗腫瘍治療を提供する化学療法剤の開発は有利である。
【０００３】
５モルパーセントのマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグコンジュゲートを含むリポソーム製剤およびその製造は、ＵＳ６,３６５,１７９に開示された。十分量のマイトマイシンＣプロドラッグを送達するための脂質添加物の量を減らすために、約１０モルパーセントなど、５モルパーセントを超えるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグを含むリポソーム製剤が望まれる。リポソーム製剤の調製のための５モルパーセントのマイトマイシンＣプロドラッグを含むリポソーム成分の溶解に使用された溶媒であるエタノールは、約１０モルパーセントのマイトマイシンＣプロドラッグを含むリポソーム成分を適切に溶解できないことが判明した。三級ブタノールを用いずには、マイトマイシンＣプロドラッグの可溶化は、沈殿および小胞サイズ成長に終わる困難かつ不完全な処理である。エタノール／第三級ブタノール(５０／５０、ｖ／ｖ)の溶媒混合物は、約１０モルパーセントのマイトマイシンＣプロドラッグを含むリポソーム成分を溶解できる。
【０００４】

エタノール／第三級ブタノール(５０／５０、ｖ／ｖ)の溶媒混合物にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム製剤は、棒状粒子(崩壊しやすく円盤状となる)の形成および速い血漿クリアランスなどの欠点がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本出願は、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートを含むリポソーム製剤を製造する新規方法を開示する。ここに開示するリポソーム製剤は、棒状脂質ナノ粒子を本質的に含まず、先のマイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートを含むリポソーム組成物と比較して、改善されたマイトマイシンＣプロドラッグの血中濃度およびマイトマイシンＣプロドラッグの血液循環時間を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

概要

ここに記載し、説明する実施態様は、その範囲を限定するものではなく、例示的および説明的であることを意図する。

【０００７】

ある態様において、組成物が提供される。該組成物は脂質ナノ粒子の集団および薬学的に許容される媒体を含み、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満であり、ここで、球状リポソームは、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分からなる。

【０００８】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが、３０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である。

【０００９】

ある実施態様において、棒状脂質ナノ粒子の第二画分は、該脂質ナノ粒子の集団が約５％未満である。

【００１０】

別の実施態様において、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団が約０.１～５％である。

【００１１】

さらに他の実施態様において、脂質ナノ粒子の集団は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解することを含む、方法により製造される。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約５：１～２０：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。

【００１２】

さらに別の実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される。

【００１３】

なおさらに別の実施態様において、ここに開示する組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスで少なくとも約１５時間のＩＶ血液循環半減期を有する。

【００１４】

なおさらに別の実施態様において、ここに開示する組成物のマイトマイシンＣのリポソー

ム化プロドラッグは、マウスに静脈内投与後、マウスにおけるドキシル(登録商標)として知られるもののようなペグ化リポソームドキソルビシン組成物の静脈内投与後の血液循環半減期と同じまたは短縮が約１０％、１５％または２０％以内である、血液循環半減期を有する。対照的に、約１５％以上の棒状脂質ナノ粒子を含む組成のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスに静脈内投与後、マウスにおけるドキシル(登録商標)として知られるもののようなペグ化リポソームドキソルビシン組成物の静脈内投与後の血液循環半減期より２５％、３５％または４５％短い血液循環半減期を有する。

【００１５】

ある実施態様において、マウスへのここに開示する組成物の静脈内注射約２４時間後、該マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグのマウス血漿における濃度は、静脈内注射後のマウス血漿におけるマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグのＣｍａｘの２０％を超える。

【００１６】

別の態様において、脂質ナノ粒子の製造法が提供される。該方法は、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を溶解した脂質溶液を形成し、そして脂質ナノ粒子の集団を形成することを含み、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である。

【００１７】

ある実施態様において、脂質ナノ粒子の集団の形成は、脂質を溶解した溶液と水性緩衝液を混合して懸濁液を形成し、懸濁液をフィルターを通して押出成形し、エタノールと第三級ブタノールの混合物を除去することを含む。ある実施態様において、脂質ナノ粒子の集団の形成は、滅菌濾過をさらに含む。

【００１８】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが、３０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である。

【００１９】

さらに別の実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される。

【００２０】

ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は約５：１～２０：１または約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。

【００２１】

ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は、約５％未満である。

【００２２】

ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は約０.１～５％である。

【００２３】

さらに別の態様において、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解して、脂質が溶解された溶液を形成し；そして、脂質が溶解された溶液と水性緩衝液を混合して、脂質ナノ粒子の集団を形成させることを含む方法であって、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分が脂質ナノ粒

子の集団の約１５％未満である、方法により製造された脂質ナノ粒子の集団が提供される。

【００２４】

さらに別の態様において、癌を処置する方法が提供される。該方法は、薬学的に許容される媒体に懸濁された脂質ナノ粒子の集団からなるリポソーム組成物であって、脂質ナノ粒子の集団が球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分が脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である、リポソーム組成物を提供し；そしてリポソームを、それを必要とする患者に、癌処置のために治療有効量のマイトマイシンＣプロドラッグを提供する量で投与することを含む。

【００２５】

上記例示的態様および実施態様に加えて、さらなる態様および実施態様は、図面を引用する以下の記載から、明らかとなる。

【００２６】

態様の各々のさらなる実施態様は、次の記載、図面、実施例および特許請求の範囲から明らかである。上記および下記の記載から、ここに記載するそれぞれおよびすべての特性および複数の特性の各それぞれおよびすべての組み合わせが、このような組み合わせに含まれる特性が相互に矛盾しない限り、本開示の範囲内に含まれることは明らかである。さらに、何らかの特性または特性の組み合わせは、本発明の何れかの実施態様から特に除外され得る。特に添付する実施例および図面と組み合わせて考慮したときの、本発明のさらなる態様および利点を、次の説明および特許請求の範囲に記載する。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】図１Ａ～１Ｄは、それぞれ５０：５０(図１Ｄ)、７５：２５(図１Ｃ)、９０：１(図１Ａ)および１００：０(図１Ｂ)比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製した、リポソームの低温透過型電子顕微鏡(ｃｒｙｏ－ＴＥＭ)画像である。

【００２８】

【図２】図２Ａは、５０：５０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒またはエタノールにリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソームプロドラッグのインビトロでのジチオトレイトール(ＤＴＴ)開裂を示すグラフである。図２Ｂは、５０：５０または９０：１０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのインビトロでのジチオトレイトール(ＤＴＴ)開裂を示すグラフである。

【００２９】

【図３】図３Ａ～３Ｃは、マウスにおける、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソームの静脈内投与後の、時間(時間)の関数としてのマイトマイシンＣプロドラッグの血漿レベル(μｇ／ｍＬ)を示すグラフである。

【００３０】

【図４】図４は、マウスにおける、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒に小胞形成脂質およびマイトマイシンＣプロドラッグを溶解することを含む方法により調製したリポソームの静脈内投与２４時間後のＣｍａｘのパーセンテージとして、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの血漿レベルを示す棒グラフである。

【００３１】

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、５０：５０(図５Ａ)または９０：１０(図５Ｂ)比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのインビトロでの血漿安定性を示すグラフである。

【００３２】

【図６】図６は、９０／１０または５０／５０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのＩＶ注射２４時間後の時点での、各腫瘍におけるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ(ＭＬＰ)の濃度(ＭＬＰのμｇ／腫瘍のｇ)を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００３３】

詳細な記載

Ｉ．定義

次に、種々の態様をより詳細に以下に記載する。しかしながら、このような態様は、多くの異なる形態で具体化され得て、下記実施態様に限定されると解釈されてはならない；むしろ、これら実施態様は、本開示が徹底的かつ完全であり、当業者にその範囲を十分伝えるように、提供される。

【００３４】

ここで使用する「投与する」または「投与」は、細胞または宿主への外来分子の導入を意味する。該用語は、用語「送達」または「送達する」と同義であることが意図される。適当な投与経路は、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、胸膜内、髄腔内、膀胱内または腫瘍内、滑液嚢内、注入、舌下、経皮、経口または局所であるが、これらに限定されない。

【００３５】

ここで使用するＣｍａｘは、薬物(例えばリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ)が、対象(例えばマウスなどの動物または例えばヒト)に投与された後に、対象の血漿で達成される薬物の最大濃度をいう。薬物動態試験で使用される標準的測定である。

【００３６】

ここで使用する用語「化学療法剤」は、「抗新生物剤」または「抗増殖剤」と同義であり、癌または過増殖性細胞の増殖を阻止する化合物をいう。一般に、抗新生物剤は、(１)細胞がＤＮＡを複製させる能力を妨害するおよび(２)癌細胞で細胞死および／またはアポトーシスを誘導することにより、癌細胞の増殖を阻止し得る。

【００３７】

投与後治療有効量のマイトマイシンＣを生じるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの量は、単回または複数回用量で、新生物の臨床的機能障害または症状を改善または最小化するのに有効である、マイトマイシンＣプロドラッグの量である。

【００３８】

「静脈内血液循環半減期」または「ＩＶ血液循環半減期」は、言及されている対象(例えばマウス)に静脈内注射を介して投与された、言及されている薬物(例えばリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ)の血液循環半減期をいう。

【００３９】

ここで使用する「腫瘍」または「新生物」は、細胞の異常増殖により特徴づけられる増殖性疾患を意味する。一般に、新生物は、癌および腫瘍形成と関連する。ここで使用する「固形腫瘍」は、乳房または結腸などの臓器に生じるものである。

【００４０】

用語「患者」は、新生物により特徴づけられる疾患を有する個体をいう。特に、患者(すなわち、宿主)は、動物(すなわち、哺乳動物)またはヒトである。

【００４１】

ここで使用する「医薬製剤」は、顕著な有害作用がない、ヒトおよび動物における使用のための製剤を含む。ここで使用する「薬学的に許容される担体」は、所望の活性に最も適する身体的位置への本発明の薬物の有効な分布を可能にする組成物または製剤をいい、「薬学的に許容される担体」は、緩衝液、安定化剤または当業者に周知のその他の材料をいう。このような材料は非毒性であり、活性成分の有効性を妨害してはならない。担体または他の材料の厳密な性質は、投与経路に依存し得る。

【００４２】
ここで使用する「プロドラッグ」は、対象への投与後、プロドラッグが腫瘍の細胞に毒性である生成物に変換されるように、いくつかの化学的または生理学的過程を経て、インビボで薬物を放出する、薬物前駆体である化合物を意味する。
【００４３】
「治療有効量」の使用は、個体が利益を示すのに十分である化合物の量を意図する。この量は、腫瘍量もしくは体積の減少または腫瘍増殖速度の減速などの、患者における新生物と関連する症状を予防する、軽減する、低減するまたは他に重症度を低減する。
【００４４】
ここで使用する用語「処置する」、「処置」および「治療効果」は、細胞増殖速度の低減または停止(例えば、腫瘍増殖減速または停止)または増殖している癌細胞数の低減をいう。
【００４５】
脂質ナノ粒子の集団に対する棒状脂質ナノ粒子の第二画分のパーセンテージは、集団における脂質ナノ粒子数に対する棒状脂質ナノ粒子数のパーセンテージをいう。
【００４６】
値の範囲が提供されるとき、該範囲の上限と下限の間の各値およびその記載される範囲内の何らかの他の記載されるまたは間の値は、本開示に包含される。例えば、１μｍ～８μｍの範囲が記載されているならば、２μｍ、３μｍ、４μｍ、５μｍ、６μｍおよび７μｍならびに１μｍ以上の値の範囲かつ８μｍ以下の値の範囲も明白に開示される。
【００４７】
単数表現は、文脈からそうでないことが明らかでない限り、複数を含む。故に、例えば、「リポソーム」の記載は、単一リポソームならびに２以上の同一または異なるリポソームを含み、「添加物」の記載は、単一添加物ならびに２以上の同一または異なる添加物を含むなどである。
【００４８】
特にある量に関して、用語「約」は、±５％、１０％、１５％または２０％の偏差を包含することを意味する。
【００４９】
II. リポソーム組成物
ある態様において、組成物が提供される。組成物は、脂質ナノ粒子の集団および薬学的に許容される媒体を含み、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は脂質ナノ粒子集団の約１５％未満であり、ここで、球状リポソームは小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分からなる。
【００５０】
ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満、例えば５モル％を超えるが２０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％、例えば１０％である。
【００５１】
ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は、約５％未満である。
【００５２】
ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は約０.１～５％である。
【００５３】
ある実施態様において、脂質ナノ粒子の集団は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物

に溶解することを含む、方法により製造される。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約５：１～２０：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。

【００５４】

ある実施態様において、ここに開示する組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスで少なくとも約１５時間のＩＶ血液循環半減期を有する。

【００５５】

ある実施態様において、約１５％以上の棒状脂質ナノ粒子を含む組成のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグと比較して、ここに開示する組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスにおけるペグ化リポソームドキソルビシンのＩＶ血液循環半減期に近い、マウスにおけるＩＶ血液循環半減期を有する。

【００５６】

ある実施態様において、ここに開示する組成物のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスにおけるペグ化リポソームドキソルビシン組成物の静脈内投与後の血液循環半減期と実質的に同じまたは短縮が約１０％、１５％または２０％以内である、マウスにおける静脈内投与後の血液循環半減期を有する。対照的に、約１５％以上の棒状脂質ナノ粒子を含む組成のマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグは、マウスに静脈内投与後、マウスにおけるドキシル(登録商標)として知られるもののようなペグ化リポソームドキソルビシン組成物の静脈内投与後の血液循環半減期より２５％、３５％または４５％短い血液循環半減期を有する。

【００５７】

ある実施態様において、マウスへのここに開示する組成物の静脈内注射約２４時間後、マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグのマウス血漿における濃度は、静脈内注射後のマウス血漿におけるマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグのＣｍａｘの２０％を超える。

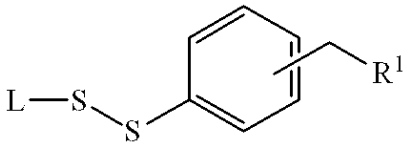
【００５８】

Ａ．リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ

ここに記載する組成物および方法において使用するために提供されるマイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグコンジュゲートまたはリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグコンジュゲートは、リポソーム送達プラットフォームに組み込まれたマイトマイシンＣのプロドラッグコンジュゲートをいい、ある実施態様において、マイトマイシンＣのプロドラッグコンジュゲートは親油性または疎水性部分に放出可能に結合されたマイトマイシンＣからなり、一般に次の形態のものである。

【００５９】

【化１】

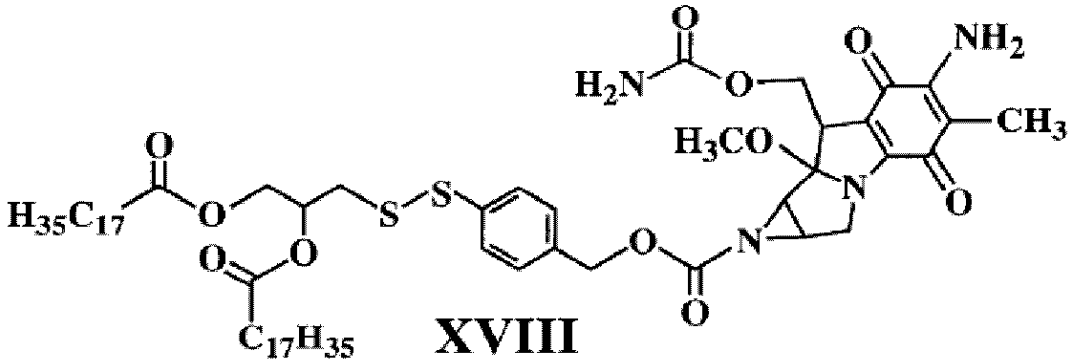


〔式中、Ｌは疎水性部分であり、Ｒ１はジチオベンジル部分に共有結合したマイトマイシンＣ残基を表す。〕。ＣＨ２Ｒ１基の配向は、オルト位およびパラ位から選択される。これらのコンジュゲートの合成は、各々引用により本明細書に包含させる米国特許６,３６５,１７９；６,９８４,３９６；および７,３０３,７６０に記載される。

【００６０】

疎水性部分Ｌは、一般にジアシルグリセロール、ステロール、リン脂質、これら脂質の誘導体、他の天然に存在する脂質およびそれらの合成アナログなどの脂質である。疎水性部分は、マイトマイシンＣコンジュゲートをリポソーム送達媒体に固定するために、リポソーム二重層への組み込みに適する。

【００６１】
ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートは、次の構造を有する。
【化２】



XVIII

パラ－ジアシルジグリセロールジチオベンジル－マイトマイシンＣ(パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣ)
【００６２】
リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグコンジュゲートは、還元条件、すなわち、システインまたはグルタチオンなどの還元剤に暴露された後、分解してマイトマイシンＣを生ずる。すなわち、コンジュゲートのチオール開裂はマイトマイシンＣならびに疎水性部分およびジチオベンジル部分の非毒性副生成物をもたらす。認識され得るとおり、プロドラッグコンジュゲートは、対象へのインビボ投与のためにリポソームに容易に組み込まれる。プロドラッグコンジュゲートは毒性ではなく、投与後および内因性還元剤への暴露または外因性還元剤への暴露により、コンジュゲートは分解して、天然に存在している状態であって、かつ生物学的活性を有するマイトマイシンＣを生ずる。
【００６３】
Ｂ．リポソーム
リポソームは、多様な治療目的で、特に、リポソームの全身投与により治療剤を標的領域または細胞に送達するために使用される、密閉脂質小胞である。特に、ポリエチレングリコール(ＰＥＧ)などの親水性ポリマー鎖の表面コーティングを有するリポソームは、これらリポソームが、ポリマーコーティングを欠くリポソームより長い血液循環存続期間を提供するため、薬物運搬体として望ましい。ポリマーは、血液タンパク質に対するバリアとして作用し、それによりタンパク質の結合ならびに網内系のマクロファージおよび他の細胞による組み込みおよび除去のためのリポソームの認識を阻止する。限外濾過可能サイズ範囲(直径２００ｎｍ未満)のリポソームは、脂質性脂質ナノ粒子または単に脂質ナノ粒子と考えられ、しばしばそう称される。
【００６４】
本開示の範囲内のリポソームは、ある実施態様において小胞形成脂質であり、場合により、少なくとも１つの脂質成分である脂質と組み合わせたコンジュゲートを含み得る。本開示において使用する少なくとも１つの場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび脂質二重層安定化脂質、例えば、メトキシ－ポリエチレングリコール－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(ｍＰＥＧ－ＤＳＰＥ)などの親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択され得る。
【００６５】
「小胞形成脂質」は、水中で二重層小胞を自発的に形成する脂質である。該小胞形成脂質は、好ましくは２個の炭化水素鎖、一般にアシル鎖および極性頭部基を有する。２個の炭化水素鎖が一般に約１２～約２４炭素原子長であり、種々の不飽和度を有する、当分野で知られる多様な合成小胞形成脂質および天然に存在する小胞形成脂質がある。例は、ホスファチジルコリン(ＰＣ)、ホスファチジルエタノールアミン(ＰＥ)、ホスファチジン酸(

ＰＡ)、ホスファチジルイノシトール(ＰＩ)およびスフィンゴミエリン(ＳＭ)などのリン脂質を含む。本発明で使用するために好ましい脂質は、水素化大豆ホスファチジルコリン(ＨＳＰＣ)である。他の好ましい脂質のファミリーは、ジアシルグリセロール類である。これらの脂質は購入可能であるかまたは公開された方法により調製され得る。

【００６６】

小胞形成脂質は、一定の流動性または剛性を達成するように、血清中のリポソームの安定性を制御するようにおよびリポソームに封入された薬物の放出速度を制御するように選択され得る。より硬い脂質二重層または液晶二重層を有するリポソームは、比較的硬い脂質、例えば、比較的高い、例えば、約６５℃までの相転移温度を有する脂質の組み込みにより調製され得る。硬い脂質、すなわち、飽和された脂質は、脂質二重層におけるより大きな膜剛性に寄与する。コレステロールなどの他の脂質成分も、脂質二重層構造の膜剛性に寄与することが知られる。

【００６７】

脂質流動性は、比較的流動性の脂質、一般に比較的低い、例えば、室温(約２０～２５℃)以下の液体から液晶相転移温度の脂質相を有する脂質の組み込みにより達成される。

【００６８】

リポソームは、ステロールなどの脂質二重層に組み込まれ得る他の脂質成分も含み得る。これら他の脂質成分は、一般に二重層膜の内側の疎水性領域と接触した疎水性部分および該膜の外側の極性表面に向けた極性頭部基部分を有する。

【００６９】

リポソームにおける他の脂質成分は、親水性ポリマーで誘導体化された小胞形成脂質であり得る。この脂質成分において、誘導体化脂質は、内部および外部両方の脂質二重層表面の親水性ポリマー鎖の表面コーティングの形成をもたらす。一般に、約１～２０モルパーセントの誘導体化脂質が脂質組成物に含まれる。

【００７０】

小胞形成脂質での誘導体化に適する親水性ポリマーは、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコールおよびポリアスパルトアミドを含む。ポリマーは、ホモポリマーとしてまたはブロックもしくはランダムコポリマーとして使用され得る。

【００７１】

好ましい親水性ポリマー鎖は、好ましくは分子量約５００～約１０,０００ダルトン、好ましくは約１,０００～約５,０００ダルトンを有するポリエチレングリコール(ＰＥＧ)鎖としての、ＰＥＧである。ＰＥＧのメトキシまたはエトキシキャップアナログも好ましい親水性ポリマーである。これらのポリマーは、例えば、約１２～約２２０,０００ダルトンの多様なポリマーサイズで、購入可能である。

【００７２】

リポソームは、一般に脂質－マイトマイシンＣプロドラッグコンジュゲートを約１～約３０モルパーセント、好ましくは約５～約３０モルパーセント、より好ましくは約５～約２０モルパーセント、例えば、５モルパーセントを超えるが３０モルパーセント未満、５モルパーセントを超えるが２０モルパーセント未満または約８モルパーセント、９モルパーセント、１０モルパーセント、１１モルパーセントおよび１２モルパーセント含む。

【００７３】

ある実施態様において、小胞形成リポソームはＨＳＰＣであり得る。ある実施態様において、場合により存在する脂質成分はｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびコレステロールから選択される。

【００７４】

ある実施態様において、リポソームは、ＨＳＣＰ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－

ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み得て、ＨＳＣＰ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣは５５／３０／５／１０のモル比で存在する。

【００７５】

Ｃ．製造法

リポソーム成分をエタノール／第三級ブタノール(５０／５０、ｖ／ｖ)の溶媒混合物に溶解することを含む方法により製造されたリポソーム製剤は、速い薬物動態クリアランスなどの欠点がある。溶媒混合物中の第三級ブタノールの量を減らしたとき、親油性マイトマイシンＣプロドラッグの薬物動態クリアランス速度は予想外に低下し、棒状リポソームの量も減少した。

【００７６】

故に、リポソームの新規製造法が提供される。該方法は、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を溶解して脂質溶液を形成し、そして脂質ナノ粒子の集団を形成することを含み、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である。

【００７７】

ある実施態様において、脂質ナノ粒子集団の形成は、脂質が溶解された溶液と水性緩衝液を混合して懸濁液を形成し、懸濁液をフィルターを通して押出成形し、エタノールと第三級ブタノールの混合物を除去することを含む。ある実施態様において、脂質ナノ粒子の集団の形成は、滅菌濾過をさらに含む。

【００７８】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満、例えば、５モル％を超えるが２０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である。

【００７９】

さらに別の実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される。

【００８０】

ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は約５：１～２０：１または約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。

【００８１】

ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は、約５％未満である。

【００８２】

ある実施態様において、第二の画分は、脂質ナノ粒子の集団の約０.１～５％である。

【００８３】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートは、パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣである。

【００８４】

ある実施態様において、小胞形成リポソームはＨＳＰＣである。

【００８５】

ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥを含む。

【００８６】

ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよびｍＰＥＧ

２０００－ＤＳＰＥを含む。
【００８７】
ある実施態様において、リポソームはＨＳＣＰ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み、ＨＳＣＰ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣは５５／３０／５／１０のモル比で存在する。
【００８８】
また提供されるのは、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解して、脂質が溶解された溶液を形成し；そして、脂質が溶解された溶液と水性緩衝液を混合して、脂質ナノ粒子の集団を形成させることを含む方法により製造された脂質ナノ粒子の集団であり、ここで、脂質ナノ粒子の集団は球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である。
【００８９】
ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、モルで、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満、例えば５モル％を超えるが２０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である。
【００９０】
さらに別の実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される。
【００９１】
ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、脂質の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、リポソームの総モルの約１０モル％である。
【００９２】
ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は約５：１～２０：１または約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。
【００９３】
ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は、約５％未満である。
【００９４】
ある実施態様において、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団の約０.１～５％である
【００９５】
ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートは、パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣである。
【００９６】
ある実施態様において、小胞形成リポソームはＨＳＰＣである。
【００９７】
ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥを含む。
【００９８】
ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよびｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥを含む。
【００９９】
ある実施態様において、リポソームはＨＳＣＰ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み、ＨＳＣＰ／コレ

ステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣは５５／３０／５／１０のモル比で存在する。

【０１００】

III. 処置方法

ある態様において、癌を処置する方法が提供される。方法は、薬学的に許容される媒体に懸濁された脂質ナノ粒子の集団からなるリポソーム組成物であって、脂質ナノ粒子の集団が球状リポソームの第一画分および棒状脂質ナノ粒子の第二画分からなり、ここで、第二画分が該脂質ナノ粒子の集団の約１５％未満である、リポソーム組成物を準備し；そして癌処置のための治療有効量のマイトマイシンＣを提供する量で、それを必要とする患者にリポソームを投与することを含む。

【０１０１】

ある実施態様において、球状リポソームは、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を含む。

【０１０２】

ある実施態様において、脂質ナノ粒子の集団は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分を、約２：１～２０：１のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)のエタノールおよび第三級ブタノールからなる溶媒混合物に溶解することを含む、方法により製造される。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約５：１～２０：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約５：１～２０：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は約９：１である。

【０１０３】

ある実施態様において、組成物中のマイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満、例えば５モル％を超えるが２０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、小胞形成脂質、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグおよび場合により存在する脂質成分の総モルの約８モル％、９モル％、１０モル％、１１モル％または１２モル％である。

【０１０４】

さらに別の実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよび親油性部分に結合したポリエチレングリコールのコンジュゲートから選択される。

【０１０５】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、脂質の総モルの５モル％を超えるが３０モル％未満である。ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグの量は、リポソームの総モルの約１０モル％である

【０１０６】

ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は約５：１～２０：１または約７：１～１５：１である。ある実施態様において、エタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)は、約９：１である。

【０１０７】

ある実施態様において、第二画分の脂質ナノ粒子の集団は、約５％未満である。

【０１０８】

ある実施態様において、第二画分は、脂質ナノ粒子の集団の約０.１～５％である。

【０１０９】

ある実施態様において、マイトマイシンＣの親油性プロドラッグコンジュゲートは、パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣである。

【０１１０】

ある実施態様において、小胞形成リポソームはＨＳＰＣである。

【０１１１】

ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥを

含む。
【０１１２】
ある実施態様において、場合により存在する脂質成分は、コレステロールおよびｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥを含む。
【０１１３】
ある実施態様において、リポソームはＨＳＣＰ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを含み、ＨＳＣＰ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣは５５／３０／５／１０のモル比で存在する。
【０１１４】
ある実施態様において、リポソームをそれを必要とする患者に投与することは、(第二の)化学療法剤と組み合わせてリポソームを投与することを含む。第二の化学療法剤は、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグまたはマイトマイシンＣまたは非リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグではない。リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせた使用が意図される化学療法剤は、如何なる特定の化合物または化合物群にも限定されない。本明細書で後記の試験に基づいて、ある化学療法剤と組み合わせて投与したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグが相乗的効果を生じることが判明した。
【０１１５】
ある実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与される化学療法剤はゲムシタビンである。ゲムシタビンは、２’－デオキシ－２’,２’－ジフルオロ－シチジンに付された一般名である。一塩酸塩およびベーター異性体として市販されている。化学名では１－(４－アミノ－２－オキソ－１Ｈ－ピリミジン－１－イル)－２－デスオキシ－２,２－ジフルオロリボースとして知られる。ゲムシタビンは、米国特許４,８０８,６１４および５,４６４,８２６に開示され、これらのゲムシタビンの合成、製剤および感受性腫瘍の処置のための使用法の教示は、引用により本明細書に包含させる。ゲムシタビン塩酸塩の市販製剤は、膵臓の局所進行(切除不能ステージIIまたはステージIII)または転移(ステージIV)腺癌を有する患者の、そしてシスプラチンまたはカルボプラチンと組み合わせて、非小細胞肺癌および膀胱癌を有する患者の第一選択処置として使用されている。
【０１１６】
別の実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与される化学療法剤は、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチンまたはビンデシンなどのビンカアルカロイドである。
【０１１７】
別の実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与される化学療法剤は、ドキソルビシンまたはダウノルビシンなどのアントラサイクリン抗生物質である。これらのアントラサイクリン薬物はヒト癌化学療法において広く使用されている。そして、断片化および一本鎖切断などのＤＮＡ損傷を引き起こす。アントラサイクリンの作用機序は、ＲＮＡおよびＤＮＡ合成の阻害に関与する。ある実施態様において、ドキソルビシンまたはダウノルビシンは、リポソーム封入形態で提供される。ペグ化リポソーム封入ドキソルビシンは、ドキシル(登録商標)、CAELYX(登録商標)およびLIPODOX(登録商標)の商品名で知られ、リポソーム封入ダウノルビシンは商品名DAUNOXOME(登録商標)で知られる。
【０１１８】
別の実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与される化学療法剤はタキサンである。タキサンは、イチイ属(イチイ)の植物により産生され、化学療法剤として広く使用されているジテルペンである。タキサン剤はパクリタキセル(タキソール(登録商標))およびドセタキセル(タキソテール(登録商標))を含む。
【０１１９】
別の実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与

される化学療法剤はフルオロピリミジンである。フルオロピリミジンは、結腸直腸癌および乳癌ならびに気道・消化器の癌を含む癌の処置に広く使用される代謝拮抗薬物である。フルオロピリミジンは、薬物５－フルオロウラシル(５－ＦＵ)および５－ＦＵのプロドラッグ、例えば、カペシタビンおよびテガフールを含む。ある実施態様において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと組み合わせて投与されるフルオロピリミジン化学療法剤は、カペシタビンなどの５－ＦＵのプロドラッグである。カペシタビンは、抗新生物活性を有するフルオロピリミジンカルバメートである。５－フルオロウラシルに変換される、５’－デオキシ－５－フルオロウリジン(５’－ＤＦＵＲ)の経口投与される全身用プロドラッグである。カペシタビンの化学名は５’－デオキシ－５－フルオロ－Ｎ－[(ペンチルオキシ)カルボニル]－シチジンである。米国ではゼローダ(登録商標)(Roche Laboratories)として市販されている。経口経路での転移乳癌および結腸直腸腫瘍を有する患者の処置に適応される。カペシタビンは、米国特許５,４７２,９４９に記載される。

【０１２０】

これら化学療法剤の安全かつ有効な投与のための方法は、当業者に知られる。さらに、その投与は、標準的な文献に記載される。例えば、多くの化学療法剤の投与は、例えば、１９９６年版の"Physicians' Desk Reference" (PDR)(Medical Economics Company, Montvale, N.J.)に記載される。

【０１２１】

リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグを少なくとも１つの他の薬剤と組み合わせて投与するとき、少なくとも１つの他の薬剤を同じ製剤で共投与できる。あるいは、種々の薬剤を、別々の製剤で同時に(一緒に)投与し得る。さらに、これら薬剤を別々の製剤で投与でき、ここで、別々の製剤は同時には投与せず、投与間に僅かに時間を置くかまたは即時に連続的に投与され、または同じ処置期間の間、例えば、１日または１週間の処置期間の間に逐次投与される。

【０１２２】

従って、本発明の方法において、第二の化学療法剤「と組み合わせた」リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの投与は、同時、逐次または交互の投与が意図され得る共投与をいう。同時投与は、本質的に同じ時間にリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグおよび第二の化学療法剤両者を投与することをいう。同時投与は、互いに物理的結合した、有効量のマイトマイシンＣを生じる量のリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグおよび一定量の第二の化学療法剤の両者を含む、単一組み合わせ製剤をいう。単一組み合わせ製剤は、対象に注射し得る、一定量のリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグおよび第二の化学療法剤両者を含む液体混合物からなり得る。対象に別々の個々の製剤から一定量のリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグおよび一定量の第二の化学療法剤を同時に投与するのもまた本方法の範囲内である。例えば、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグは注射により投与され得て、一定量の第二の化学療法剤は経口でまたはリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの注射に使用したのと異なるまたは同じ経路の注射により投与され得る。

【０１２３】

ここに記載する方法において、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグおよび第二の化学療法剤は、該組み合わせの最大有効性を得るために、一定時間離れて別々の個々の製剤で対象に投与され得る。各薬物の投与は、短期の迅速な投与から、連続点滴の期間の範囲であり得る。一定時間離れるとき、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグと第二の化学療法剤の共投与は逐次的または交互であり得る。逐次的共投与について、これら薬剤の一方を、続いて他方を別に投与する。例えば、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグでの処置の全治療単位が終了し得て、その後、第二の化学療法剤での処置の全治療単位が続き得る。あるいは、逐次的共投与について、第二の化学療法剤での処置の全治療単位が終了し得て、その後、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグでの処置の全治療単位が続き得る。交互共投与について、各薬物の全治療単位が投与されるまで、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグでの処置の一部治療単位が第二の化学療法剤での処

置の一部治療単位と交互であり得る。

【０１２４】

ある実施態様において、リポソームをそれを必要とする患者に投与することは、放射線療法と組み合わせて該リポソームを投与することを含む。放射線療法は、癌細胞を損傷および／または致死させるおよび腫瘍を縮小するための高エネルギー放射線を使用する。該高エネルギー放射線は、ｘ線、ガンマ線または荷電粒子を含み得る。該放射線療法は、体外に位置する機器から送達され得て(外部ビーム放射線療法)または体内の癌細胞近くに設置した放射性物質に由来し得る(内部放射線療法、近接照射療法とも称される)。全身放射線療法は、癌細胞を殺傷するように血中を移動する放射性ヨウ素などの放射性物質を使用する。

【０１２５】

従って、ある実施態様において、放射線療法は、放射線が体外の装置に由来する外部放射線療法を意図する。外部放射線療法は、通常数日または数週間にわたる数回の処置コースとして適用され、処置中、機器は高エネルギー放射線、通常Ｘ線を癌部位およびその周囲の正常組織の小領域に照射する。

【０１２６】

別の実施態様において、放射線療法は、放射線が体内に設置されたインプラントまたは物質(液体、固体、半固体または他の物質)に由来する内部放射線療法を意図する。ある実施態様において、内部放射線療法は、固形放射線源が体腔内に設置されたまたは針が腫瘍に設置された近接照射療法である。別の実施態様において、内部放射線療法は、放射線、一般に放射性核種(放射性同位体または非密封線源)の液体線源を投与することを含む。放射線源は経口投与され得るかまたは静脈に注入され得る。

【０１２７】

IV. 試験例

第一の試験において、マイトマイシンＣのプロドラッグコンジュゲートを、実施例１に記載するリポソーム送達プラットフォームに組み込んだ。リポソームを、種々の比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒混合物にＨＳＣＰ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製した。リポソームサンプルを、ｃｒｙｏ－ＴＥＭを使用して造影した。特に断らない限り、ＨＳＣＰ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣは５５／３０／５／１０のモル比(７５.５ｍｇ／ｍｌ脂質および１２.５ｍｇ／ｍｌプロドラッグ)で使用した。

【０１２８】

図１Ａ～１Ｄは、５０：５０(図１Ｄ)、７５：２５(図１Ｃ)、９０：１０(図１Ａ)または１００：０(図１Ｂ)の比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製したリポソームのｃｒｙｏ－ＴＥＭ画像である。Ｃｒｙｏ－ＴＥＭ画像解析は、第三級ブタノールの含量が高いほど、形成される棒状粒子が多いことを示した。第三級ブタノールが溶媒混合物中５０％であるとき、第三級ブタノールが２５％であるときより多い棒状粒子が形成された。溶媒混合物中に第三級ブタノールが１０％であるとき、実質的に棒状粒子は検出されなかった。

【０１２９】

他の試験において、インビトロＤＴＴ誘導放出／活性化アッセイを、マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグコンジュゲートで実施した。図２Ａ～２Ｂは、５０：５０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒にＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製したリポソームが、１００％(図２Ａ)または９０％エタノール(図２Ｂ)にＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製したリポソームよりＤＴＴ誘導開裂に感受性であったことを示す。

【０１３０】
他の試験において、マウスでの薬物動態試験を実施した。この試験は、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製したリポソームをマウスに静脈内投与することによる、パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣの血漿レベルの測定を目的とした。図３Ａ～３Ｃは、マイトマイシンＣプロドラッグの血漿レベルが、注射３時間後同等であったが、２４時間後、低含量の第三級ブタノールを使用して調製したバッチに有利に差が開き(＞３倍)、低含量の第三級ブタノールを使用してまたは第三級ブタノールを含まず調製したリポソームにより送達されるマイトマイシンＣプロドラッグの高い血漿レベルおよび長い循環時間が示された。

【０１３１】
図４は、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒にＨＳＰＣ／コレステロール／ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥ／パラ－ジステアロイル－ＤＴＢ－マイトマイシンＣを溶解することを含む方法により調製したリポソームをマウスに静脈内投与後の、静脈内投与２４時間後の該マウスにおけるリポソーム化マイトマイシンＣ(ＭＬＰ)プロドラッグの、Ｃｍａｘ(Ｃｍａｘは、通常、ＭＬＰを含むリポソーム製剤の静脈内注射後最初の１時間以内に達成される)のパーセンテージとしての血漿レベルを示す棒グラフである。９０：１０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒から調製したリポソームは、２４時間でＣｍａｘの最高のパーセンテージを示した。

【０１３２】
図５Ａおよび５Ｂは、５０：５０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒(図５Ａ)または９０：１０(図５Ｂ)にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの製剤のインビトロ血漿安定性を示すグラフである。このインビトロ血漿安定性アッセイは、ｔＢｕＯＨ－ｈｉｇｈとｔＢｕＯＨ－ｌｏｗ間で差がなく、棒状脂質ナノ粒子の存在は、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの血漿安定性に影響しないことが示される。

【０１３３】
図６は、９０／１０または５０／５０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒にリポソーム成分を溶解することを含む方法により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのＩＶ注射２４時間後の時点の、各腫瘍におけるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ(ＭＬＰ)の濃度(ＭＬＰのμｇ／腫瘍のｇ)を示す。リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの調製に使用したエタノール／ｔ－ブタノール(ｖ／ｖ)比は、腫瘍へのリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグの組み込みに影響し得る。９０／１０または５０／５０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒の使用により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのＩＶ注射２４時間後、腫瘍におけるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ濃度は、９０／１０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒の使用により調製したリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグが統計的に有意に高い。５０：５０比のエタノール／第三級ブタノールで調製したリポソームについて、ＭＬＰの中央濃度は１.６３μｇ／ｇ腫瘍であり、１.２０～９.７６μｇ／ｇ腫瘍の範囲であった。９０：１０比のエタノール／第三級ブタノールで調製したリポソームについて、ＭＬＰの中央濃度は６.５１μｇ／ｇ腫瘍であり、４.２３～９.７１μｇ／ｇ腫瘍の範囲であった。故に、棒状脂質ナノ粒子の集団が減少したリポソーム組成物の投与後、腫瘍におけるＭＬＰ濃度は高かった。

【０１３４】
棒状リポソームがインビトロでの開裂への高い感受性およびインビボでの速いクリアランスに寄与することを証明するために他の試験を実施した。この試験で、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ(ＭＬＰ)の２種の組成物を調製した。２種の組成物は、一方の組成物が５％ＰＥＧ－脂質ではなく、２０％ＰＥＧ－脂質を有した以外、等しく調製した

。ＰＥＧ－脂質量の増加は、円盤状ミセルおよび棒状ミセルの形成を促進する(Sandstrom, M.C. et al., Langmuir, 23(8):4192 (2007); Zhang, W. et al., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 125:74-85 (2018))。２種の組成物のＴＥＭ検査は、２５％ＰＥＧ－脂質を有する組成物が棒状リポソームに富むことを確認した。２種の組成物を実施例２に記載する放出アッセイを使用して、インビトロで試験した。棒状リポソームを相当割合有する組成物(すなわち、２５％ＰＥＧ－脂質の組成物)が、ジチオトレイトールでの開裂により感受性であった。２種の組成物を、実施例３の方法により、血漿クリアランスを評価するため、インビボで試験した。棒状リポソームを相当割合有する組成物(すなわち、２５％ＰＥＧ－脂質の組成物)は、ここに記載する方法で棒状リポソームの割合が小さい(例えば、約１５％未満)ように調製されたリポソームよりも迅速に循環から除去された。

【実施例】

【０１３５】

Ｖ．実施例

次の実施例は、本来説明的であり、決して限定を意図しない。

【０１３６】

実施例１

リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ調製

親油性部分、パラ－ジアシルジグリセロールジチオベンジル－マイトマイシンＣに放出可能に結合したマイトマイシンＣのプロドラッグコンジュゲートを、引用により本明細書に包含させる米国特許６,３６５,１７９の実施例２に記載する方法により調製した。

【０１３７】

それぞれ５５：３０：５：１０モル比のＨＳＰＣ、コレステロール、ｍＰＥＧ２０００－ＤＳＰＥおよびパラ－ジアシルジグリセロールジチオベンジル－マイトマイシンＣの混合物をエタノール／第三級ブタノール(５０：５０、７５：２５、９０：１０または１００：０)に溶解し、５％デキストロース／リン酸ナトリウム緩衝液２０ｍＭ、ｐＨ７.０と、２０：８０ｖ／ｖ比で混合した。リポソーム懸濁液を、０.０８μｍまたは０.１０μｍ孔径の積層ポリカーボネート膜を、６５℃で高圧下に篩過させて押出成型した。有機溶媒を、該緩衝液に対する透析またはダイアフィルトレーションにより除去した。該リポソーム製剤を、５ｍｇ／ｍＬの最終プロドラッグ濃度に調製し、０.２２μｍ膜を通して滅菌濾過した。

【０１３８】

ｃｒｙｏ－ＴＥＭを使用して、リポソームの画像を得た。(図１Ｂ)は、５０：５０(図１Ｄ)、７５：２５(図１Ｃ)、９０：１０(図１Ａ)または１００：０(図１Ｂ)のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒を使用して調製したリポソームのｃｒｙｏ－ＴＥＭ画像である。

【０１３９】

実施例２

リポソームからのマイトマイシンＣのＤＴＴ誘導開裂

リポソーム製剤からの活性マイトマイシンＣ(ＭＭＣ)の放出は、ＭＬＰ(マイトマイシンＣのリポソーム化プロドラッグ)の還元を介して起こる。ＭＬＰのバッチ(１００％、９０％または５０％ＥｔＯＨを使用して調製)で、強力な還元剤であるジチオトレイトール(ＤＴＴ)での処理により試験し、ＭＬＰの残存量および放出された遊離マイトマイシンＣを測定した。

【０１４０】

ＤＴＴとのインキュベーションによるＭＬＰからのＭＭＣの放出を示すアッセイは、プロドラッグからの一貫した薬物放出を確認するために開発された。５００μｇのＭＬＰ(０.１ｍｌ)を、種々の濃度のＤＴＴと、３７℃で１時間振盪しながらインキュベートした。イソプロパノール(１：１０)での希釈および薬物抽出により反応を停止させた。ＭＬＰおよびＭＭＣをＨＰＬＣで定量した。薬物抽出後、上清を濾過し、Phenomenex Hypersil

BDS C18カラム；１３０Å　１５０×４.６０mm　５μmのLaChrom Merck Hitachi HPLCシステムで、メタノール：イソプロパノール７０／３０からなる移動相で、１ml／分の流速で流し、３６０nmでＵＶ検出した。これら条件下のＭＬＰ保持時間は５.５分であった。ＭＭＣ保持時間は１.５分で先端に近かった。ピーク面積を定量し、ＭＬＰの標準曲線と比較した。

【０１４１】

図２Ａおよび２Ｂは、５０：５０、９０：１０および１００：０のエタノール／第三級ブタノール比(ｖ／ｖ)の溶媒を使用して調製したリポソームからのマイトマイシンＣのＤＴＴ誘導開裂を示す。

【０１４２】

実施例３

インビボ薬物動態試験

５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒を使用して調製したＭＬＰリポソームの薬物動態を試験した。３～４匹のＳａｂｒａマウス(図３Ａ～３Ｃ)またはＢａｌｂＣマウス(図４)に、これらバッチの各々の３５mg／kgリポソームＭＬＰをＩＶ注射した。リポソーム注射３時間または２４時間後、マウスをイソフルランで麻酔し、後眼窩静脈洞からヘパリン含有チューブに採血し、その後殺した。３０００rpmで１５分間の遠心分離により血漿を単離し、ＩＰＡ中１：１０で単離し、その後遠心分離してタンパク質を除去した。上清を、上記のとおりＨＰＬＣによりＭＬＰ含量について分析した。

【０１４３】

図３Ａ～３Ｄは、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒を使用して調製したリポソームの静脈内投与後の時間の関数として、マウスにおけるマイトマイシンＣプロドラッグの血漿レベルを示す。

【０１４４】

図４は、５０：５０、９０：１０または１００：０比(ｖ／ｖ)のエタノール／第三級ブタノールの溶媒を使用して調製したリポソームのマウスへの静脈内投与２４時間後のＣｍａｘのパーセンテージとして、マイトマイシンＣプロドラッグのマウス血漿レベルを示す。

【０１４５】

実施例４

インビトロ血漿安定性

エタノール／ｔ－ブタノール(９０／１０、ｖ／ｖ)で調製したバッチのインキュベーションは、リポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグ(「ＭＬＰ」)の血漿安定性プロファイルに影響しなかった。ＭＬＰのＨＰＬＣ測定は、両バッチにおいて、２４時間、３７℃で８０％ヒト血漿に暴露中、約１００％インタクトで残ることを確認する。３７℃で２４時間、血漿中でインキュベートしたＭＬＰの両バッチのゲルクロマトグラフィー溶出プロファイル。リポソームはフラクション５～７に溶出する；血漿タンパク質は大部分フラクション８～１３に溶出する。タンパク質および低分子量フラクションに対するＭＬＰの顕著な漏出は、いずれの製剤でも見られなかった。図５Ａおよび図５Ｂ参照。

【０１４６】

実施例５

腫瘍におけるリポソーム化マイトマイシンＣプロドラッグのインビボ取り込み

ＭＬＰ含有リポソームの２種の製剤を、脂質(ＨＳＰＣおよびＭＬＰ(ＨＳＰＣ：コレステロール：ｍＰＥＧ－ＤＳＰＥ：ＭＬＰ、モル比５５：３０：５１０))で、エタノール／第三級ブタノール５０：５０ｖ／ｖ比またはエタノール／第三級ブタノール９０：１０ｖ／ｖ比の溶媒混合物に溶解することにより調製した。次いで、これら製剤を処理して、５mg／mL濃度のＭＬＰを有するリポソーム懸濁液を産生した。

【０１４７】

８～１０週齢ＢＡＬＢ／ｃ雌マウスに、Ｍ１０９腫瘍細胞(１００万細胞／マウス)を皮下接種した。腫瘍接種２０日後、触知可能腫瘍を担持するマウスを２群に分け、各群、リポ

ソーム組成物(エタノール／第三級ブタノール５０：５０およびエタノール／第三級ブタノール９０：１０)の３０mg／kgリポソームＭＬＰをＩＶ注射した。リポソーム注射２４時間後、マウスを　　殺した。ＭＬＰの組織抽出のために、約１４０～２００mg重量の組織サンプル(腫瘍を含む)を０.５mL(最終体積)のイソプロパノール中で均質化し、３０００rpmで１５分間遠心分離した。上清を濾過し、ＨＰＬＣ系で流して、各腫瘍におけるＭＬＰ濃度(ＭＬＰのμg／腫瘍のｇ)を測定した。結果を図６に示す。

【０１４８】

いくつかの例示的態様および実施態様が上に記載されているが、そのある種の修飾、変形、付加および下位の組み合わせを当業者は認識する。それ故に、次に添付する特許請求の範囲および今後導入される請求項は、全てのこのような修飾、変形、付加および下位の組み合わせを、真の精神および範囲の範囲内であるとして、含むと解釈される。

【図面】

【図１】

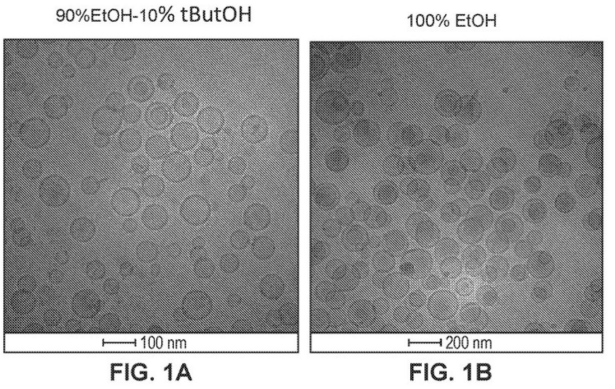


FIG. 1A　FIG. 1B

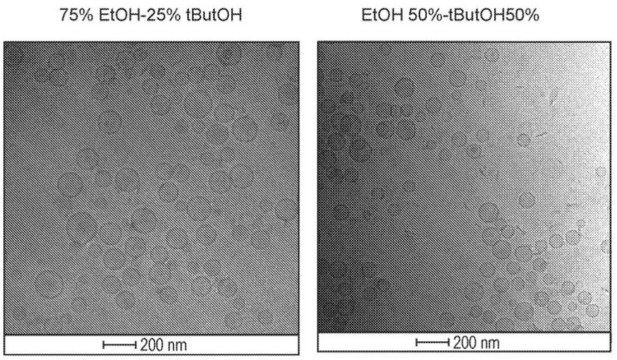


FIG. 1C　FIG. 1D

【図２】

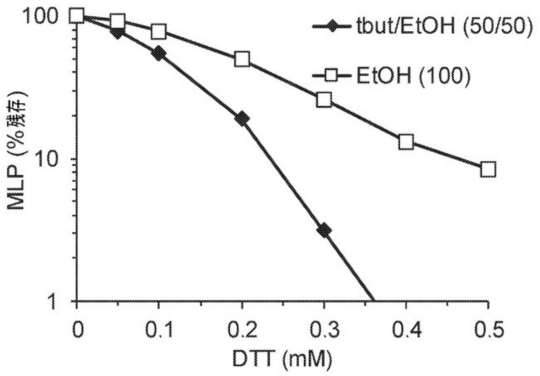


FIG. 2A

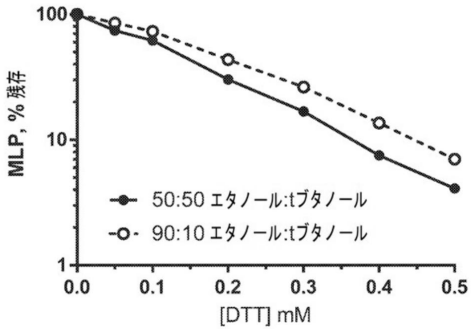


FIG. 2B

【図３－１】

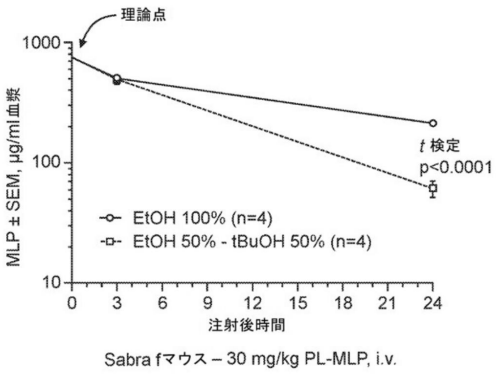


FIG. 3A

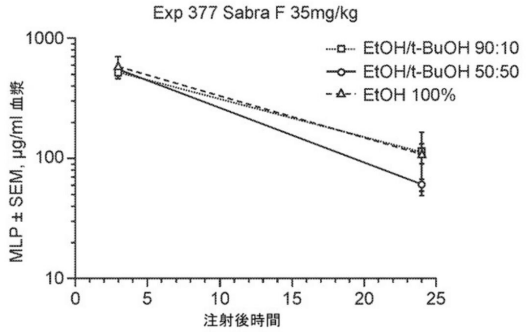


FIG. 3B

【図３－２】

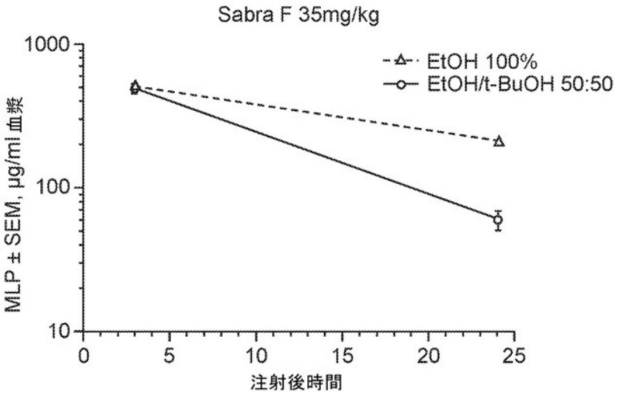


FIG. 3C

【図４】

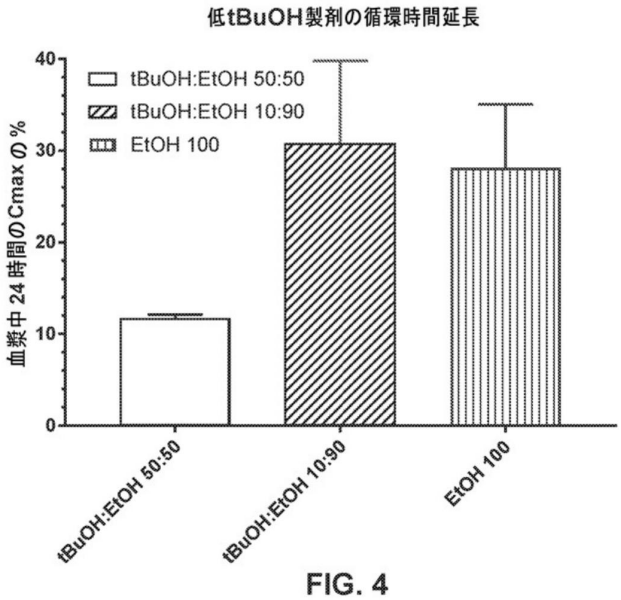


FIG. 4

【図５】

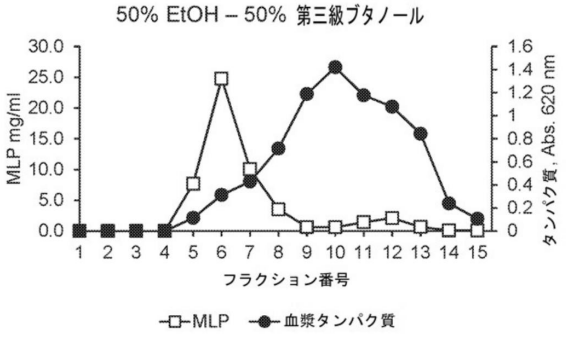


FIG. 5A

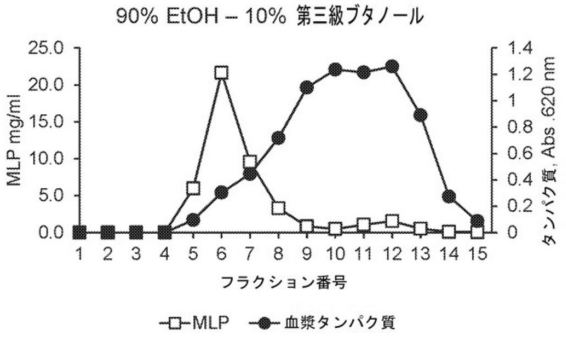


FIG. 5B

【図６】

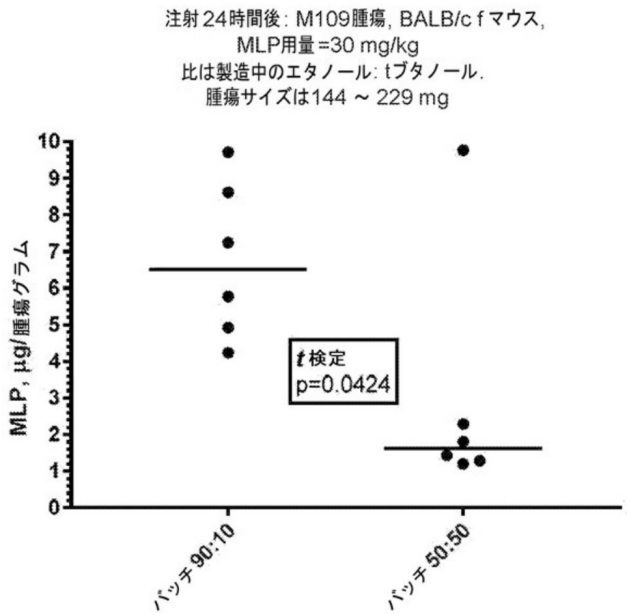

注射24時間後：M109腫瘍，BALB/c f マウス，
MLP用量=30 mg/kg
比は製造中のエタノール：tブタノール．
腫瘍サイズは144 ～ 229 mg
MLP，μg/腫瘍グラム
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
t検定
p=0.0424
バッチ90:10
バッチ50:50

FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/050205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/127 A61K31/00 A61K47/10 A61P35/00
ADD.

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)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. A. GABIZON: "Reduced Toxicity and Superior Therapeutic Activity of a Mitomycin C Lipid-Based Prodrug Incorporated in Pegylated Liposomes", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 12, no. 6, 15 March 2006 (2006-03-15), pages 1913-1920, XP055207106, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1547	1-3
Y	the whole document	4-7, 9-22, 24-33
A		8,23
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 April 2020	08/05/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Raposo, Antonio

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/050205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 365 179 B1 (ZALIPSKY SAMUEL [US] ET AL) 2 April 2002 (2002-04-02)	4-7, 9-22, 24-33
A	column 1, lines 9-16 columns 17-18; example 4	8,23
Y	WO 2016/149516 A1 (LIPOMEDIX PHARMACEUTICALS LTD [IL]; GABIZON ALBERTO [IL] ET AL.) 22 September 2016 (2016-09-22)	4-7, 9-22, 24-33
A	page 1, paragraph 2 page 13, paragraph 57 page 16; claim 1	8,23

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2020/050205

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6365179 B1	02-04-2002	AT 340592 T	15-10-2006
		AU 769425 B2	29-01-2004
		CA 2369595 A1	02-11-2000
		CN 1355713 A	26-06-2002
		CN 1399561 A	26-02-2003
		DE 60030965 T2	24-05-2007
		DK 1173222 T3	29-01-2007
		EP 1173222 A2	23-01-2002
		EP 1579874 A2	28-09-2005
		EP 1880736 A1	23-01-2008
		ES 2272280 T3	01-05-2007
		HK 1041820 A1	30-03-2007
		HU 0200797 A2	29-07-2002
		HU 0201425 A2	28-12-2002
		IL 146055 A	31-12-2006
		JP 4558952 B2	06-10-2010
		JP 2002542302 A	10-12-2002
		KR 20010114247 A	31-12-2001
		KR 20020005006 A	16-01-2002
		MX PA01010750 A	20-08-2003
		MX PA01010751 A	14-05-2002
		US 6342244 B1	29-01-2002
		US 6365179 B1	02-04-2002
		US 2002128195 A1	12-09-2002
		US 2003054028 A1	20-03-2003
		US 2003211079 A1	13-11-2003
		US 2005123597 A1	09-06-2005
		US 2005271715 A1	08-12-2005
		US 2008152702 A1	26-06-2008
		WO 0064484 A2	02-11-2000
		ZA 200108724 B	23-10-2002
		ZA 200108726 B	05-03-2003
WO 2016149516 A1	22-09-2016	AU 2016233143 A1	19-10-2017
		CA 2985330 A1	22-09-2016
		EP 3270898 A1	24-01-2018
		JP 2018508589 A	29-03-2018
		US 2018071253 A1	15-03-2018
		WO 2016149516 A1	22-09-2016

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

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	*47/34*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	*47/51*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/51	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,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

弁理士　山尾 憲人

(74)代理人　100156144

弁理士　落合 康

(72)発明者　ガビゾン，アルベルト

イスラエル９６４０８０４エルサレム、コリッツ・ロード４、アパートメント７７

(72)発明者　オハナ，パトリシア

イスラエル９６９２０エルサレム、ペレツ・バーンスタイン６／１４

(72)発明者　シュミーダ，ヒラリー

イスラエル９０９１７ギバット・ゼブ、ハマカビム７３

Ｆターム（参考）　4C076　AA19 BB11 CC27 CC42 DD37 DD63 DD70 EE23 EE59 FF16 FF31

4C086　AA01 AA02 CB03 MA03 MA05 MA24 MA55 NA12 NA15 ZB26