

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7140418号

(P7140418)

(45)発行日 令和4年9月21日(2022.9.21)

(24)登録日 令和4年9月12日(2022.9.12)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/192 (2006.01)

A 6 1 K 31/192

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/72 (2006.01)

A 6 1 K 9/72

A 6 1 K 47/02 (2006.01)

A 6 1 K 47/02

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/12

請求項の数 17 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-562721(P2020-562721)

(86)(22)出願日 令和1年5月6日(2019.5.6)

(65)公表番号 特表2021-523157(P2021-523157

A)

(43)公表日 令和3年9月2日(2021.9.2)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/030841

(87)国際公開番号 WO2019/217271

(87)国際公開日 令和1年11月14日(2019.11.14)

審査請求日 令和3年3月8日(2021.3.8)

(31)優先権主張番号 62/667,889

(32)優先日 平成30年5月7日(2018.5.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/670,875

(32)優先日 平成30年5月14日(2018.5.14)

最終頁に続く

(73)特許権者 520026478

ファルモサ バイオファーマ インコーポ
レイテッド台湾, タイペイ シティ, ナンガン ディ
ストリクト, サンチョン ロード, ナン
バー 6 6, 3 エフ - 3

(74)代理人 110000671

八田国際特許業務法人

(72)発明者 カン, ベイ

台湾, タイペイ シティ, ナンガン ディ
ストリクト, サンチョン ロード, ナン
バー 6 6, 3 エフ - 3

(72)発明者 リン, イー フォン

台湾, ニュー タイペイ シティ, ヨンヒ
ディストリクト, ジガン ストリート,
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トレプロスチニルの制御放出のための医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外部媒体中に懸濁された 1 つまたは複数のリポソームを含む医薬組成物であって、
前記リポソームは、

(a) 少なくとも 1 つの小胞形成リン脂質を含む外部脂質二重層と、

(b) トレプロスチニルおよび、内部水性媒体と外部媒体との間に pH 勾配を提供する塩
を含む内部水性媒体と、
を含み、

前記塩は、塩基性極性アミノ酸；酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、イソ酪酸塩、吉草酸
塩、イソ吉草酸塩、安息香酸塩およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるカル
ボン酸塩；または重炭酸塩であり、

前記外部媒体の pH はトレプロスチニルの p K a よりも高く、

前記内部水性媒体の pH は、前記外部媒体の pH よりも高く、

トレプロスチニルの前記少なくとも 1 つの小胞形成リン脂質に対する重量比（すなわち
、T / P 比）は、約 0 . 0 3 5 以上 0 . 2 2 5 以下であり、前記トレプロスチニルの約 6
0 % 未満が前記医薬組成物の投与後 2 時間以内に放出され、かつ、前記トレプロスチニル
の 8 0 % 超が、前記医薬組成物の投与後 2 時間超 ~ 約 7 2 時間で放出される、医薬組成物。

【請求項 2】

前記 T / P 比が約 0 . 0 4 1 以上である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

10

20

前記 T / P 比が約 0 . 0 5 2 以上である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記 T / P 比が約 0 . 0 5 6 以上である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記外部脂質二重層が、ステロールをさらに含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記ステロールが、コレステロール、コレステロールヘキササクシネート、エルゴステロール、ラノステロール、またはそれらの組み合わせである、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記酢酸塩が、酢酸ナトリウム、酢酸カルシウムまたはそれらの任意の組み合わせである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8】

前記トレプロスチニルの 8 0 % 超が、前記医薬組成物の投与後 2 時間超 ~ 約 4 8 時間で放出される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記トレプロスチニルの 8 0 % 超が、前記医薬組成物の投与後 2 時間超 ~ 2 4 時間で放出される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】

前記内部水性媒体が実質的に沈殿を含まない、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

前記小胞形成脂質が第 1 のリン脂質と第 2 のリン脂質との混合物、または第 1 のリン脂質と荷電脂質との混合物である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 2】

前記第 1 のリン脂質が、ホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルグリセロール (P G)、ホスファチジルイノシトール (P I)、ホスファチジン酸 (P A)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ホスファチジルセリン (P S)、またはそれらの任意の組み合わせであり、前記第 2 のリン脂質が、P E G 修飾リン脂質、正に帯電した、または負に帯電したリン脂質であり、かつ前記荷電脂質が、正に帯電した、または負に帯電した脂質である、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記第 1 のリン脂質が H S P C、D S P C、D P P C、D M P C またはそれらの任意の組み合わせから選択され、かつ、前記第 2 のリン脂質が D S P G、D P P G、D M P G、P E G - D S P E またはそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 4】

前記第 1 のリン脂質が H S P C、D S P C、D P P C、D M P C またはそれらの任意の組み合わせから選択され、かつ、前記荷電脂質がステアリルアミン、1 , 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (D O T A P)、3 β - [N - (N ' , N ' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル] コレステロール (D C - コレステロール)、N ⁴ - コレステリル - スペルミン (G L 6 7)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (D D A B)、1 , 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D O T M A)、エチルホスホコリン (エチル P C) またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 1 5】

前記医薬組成物が、界面活性剤およびイオノフォアを実質的に含まない、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

1 つまたは複数のリポソームを含む組成物の、呼吸器疾患の治療のための医薬の製造における使用であって、

前記リポソームは、

50

(a) 少なくとも1つの小胞形成リン脂質を含む外部脂質二重層と、
(b) トレプロスチニルおよび、内部水性媒体間にpH勾配を提供する塩を含む内部水性媒体と、
を含み、

前記塩は、塩基性極性アミノ酸；酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、イソ酪酸塩、吉草酸塩、イソ吉草酸塩、安息香酸塩およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるカルボン酸塩；または重炭酸塩であり、

前記外部媒体のpHはトレプロスチニルのpKaよりも高く、

前記内部水性媒体のpHは、前記外部媒体のpHよりも高く、

トレプロスチニルの前記少なくとも1つの小胞形成リン脂質に対する重量比（すなわち、T/P比）は、約0.035以上0.225以下であり、前記トレプロスチニルの約60%未満が、前記組成物の投与後2時間以内に放出され、かつ、前記トレプロスチニルの80%超が、前記組成物の投与後2時間超～約72時間で放出される、使用。

10

【請求項17】

前記医薬が吸入により投与され、かつ前記トレプロスチニルの副作用が上気道で減少する、請求項16に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本特許出願は、その全体の開示が参照により本明細書に援用される、2018年5月7日に出願された、米国仮出願第62/667,889号、および、2018年5月14日に出願された、米国仮出願第62/670,875号に基づく優先権を主張する。

20

【技術分野】

【0002】

本発明は、リポソームにカプセル化されたトレプロスチニルの制御放出医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

リポソーム組成物は、血液循環時間の延長、薬物放出の制御、毒性の低減、および標的化された薬物送達などの薬剤薬物動態を改善するための大きな可能性を提供する。

30

【0004】

制御され、または持続される薬物放出プロファイルは、治療効果を高めるのに好ましい。しかしながら、制御放出プロファイルが異なるリポソーム組成物は、特有の欠点または欠陥を有する。

【0005】

例えば、前記リポソームの内部水性媒体における不溶性薬物沈殿物、結晶またはゲルの形成は、従来のリポソームからのカプセル化された薬物の迅速な放出またはバースト放出の問題を克服することが報告されており、それによって、前記バースト放出はしばしば副作用を引き起こす（Barenholz（2012），Journal of Controlled Release，160：117-134および米国特許公開番号 US 2015/0093434 A1）。しかしながら、そのような不溶性の薬物沈殿物、結晶またはゲルは、適切な薬物放出または望ましい治療効果を提供せず、薬物がリポソームから完全には放出され得ず、非標的組織に薬物が蓄積され、有害な副作用を引き起こし得る。

40

【0006】

潜在的な副作用を低減するためにバースト放出プロファイルを伴わないが、治療効果を維持するために持続放出プロファイルを伴うリポソーム組成物の必要性が未だ存在する。本発明は、これらおよび他の必要性に対処する。

【発明の概要】

【0007】

50

本発明は、外部媒体中に懸濁された１つまたは複数のリポソームを含む医薬組成物を提供し、前記リポソームは、（a）少なくとも１つの小胞形成リン脂質を含む外部脂質二重層と、（b）トレプロスチニルおよび、内部水性媒体と外部媒体との間にpH勾配を提供する塩を含む内部水性媒体とを含み、ここで、トレプロスチニルの前記少なくとも１つの小胞形成リン脂質に対する重量比（すなわち、T/P比）は、約0.035以上であり、トレプロスチニルの約60%未満が医薬組成物の投与後2時間以内に放出され、かつ、トレプロスチニルの80%超が医薬組成物の投与後2時間超から約72時間後に放出される。

【0008】

本発明はまた、本明細書に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、呼吸器疾患の治療方法を開示する。

【0009】

上気道における吸入トレプロスチニルの副作用を低減するための、それを必要とする対象に本明細書に記載の有効量の医薬組成物を投与する工程を含む方法も提供される。

【0010】

本特許で使用される「発明」、「その発明」、「この発明」および「本発明」という用語は、本特許の全ての主題および以下の特許請求の範囲を広く指すことを意図している。これらの用語を含む記述は、本書に記載されている主題を制限しないこと、または以下の特許請求の範囲の意味または範囲を制限しないことを理解されるべきである。本特許の対象となる発明の実施形態は、本概要ではなく、以下の特許請求の範囲によって定義される。本概要は、本発明の様々な態様の高レベルの概要であり、以下の詳細な説明のセクションでさらに記載されるいくつかの概念を導入する。本概要は、請求される主題の、重要な、または本質的な特徴を特定することを意図しておらず、請求される主題の範囲を決定するために、単独で使用されることも意図されていない。本主題は、明細書全体、一部またはすべての図面、および各特許請求の範囲の適切な部分を参照することによって理解されるべきである。

【0011】

本発明は、以下の添付の図面および詳細な説明とともに解釈すると、より明らかになるであろう。

【0012】

本発明の例示的な実施形態は、以下の図を参照して以下に詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1Aおよび図1Bは、様々なT/P比の遊離トレプロスチニル溶液およびトレプロスチニル-リポソーム溶液を投与されたラットの平均血漿トレプロスチニル濃度の対数および線形平均血漿トレプロスチニル濃度を示す折れ線グラフである。

【図1B】図1Aおよび図1Bは、様々なT/P比の遊離トレプロスチニル溶液およびトレプロスチニル-リポソーム溶液を投与されたラットの平均血漿トレプロスチニル濃度の対数および線形平均血漿トレプロスチニル濃度を示す折れ線グラフである。

【図2】図2は、時間ゼロから特定の時間（AUC_t）までの血漿濃度-時間曲線下の面積と、時間ゼロから無限大までの血漿濃度-時間曲線下の面積（AUC_{inf}）との比を示す折れ線グラフである。

【図3A】図3A～図3Cは、トレプロスチニル-リポソーム組成物（図3Aおよび図3C）およびメチルプレドニゾロン（MPS）-リポソーム組成物（図3B）の内部水性媒体における沈殿の存在または非存在を示す電子顕微鏡画像である。

【図3B】図3A～図3Cは、トレプロスチニル-リポソーム組成物（図3Aおよび図3C）およびメチルプレドニゾロン（MPS）-リポソーム組成物（図3B）の内部水性媒体における沈殿の存在または非存在を示す電子顕微鏡画像である。

【図3C】図3A～図3Cは、トレプロスチニル-リポソーム組成物（図3Aおよび図3C）およびメチルプレドニゾロン（MPS）-リポソーム組成物（図3B）の内部水性媒体における沈殿の存在または非存在を示す電子顕微鏡画像である。

10

20

30

40

50

【詳細な説明】

【0014】

本明細書で使用される場合、冠詞「a」および「an」は、冠詞の文法的対象の1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）を指す。例として、「an element」は、1つの要素または複数の要素を意味する。全ての数字は「約」という用語に修飾される。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、指定される値の±10%の範囲を指す。

【0015】

「含む」または「含んでいる」という用語は、一般に、1つまたは複数の特徴、原料、または成分の存在を許容することを意味する、含む/含んでいる、という意味で使用される。

10

【0016】

「対象」という用語は、呼吸器疾患を有する脊椎動物、または呼吸器疾患の治療を必要としているとみなされる脊椎動物を指し得る。対象としては、霊長類などの、哺乳動物などの温血動物、およびより好ましくはヒトが挙げられる。人間以外の霊長類も対象である。対象という用語としては、猫、犬などの飼育動物、家畜（例えば、牛、馬、豚、羊、山羊など）、および実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、スナネズミ、モルモットなど）が挙げられる。従って、獣医用の使用および医療用製剤が本明細書で企図される。

【0017】

本明細書で使用される場合、「カプセル化」、「装填」および「捕捉」という用語は、交換可能に使用され得て、リボソームの内部水性媒体中の生物活性剤（例えば、トレプロスチニル）の組み込みまたは会合を指す。

20

【0018】

本開示は、外部媒体中に懸濁された1つまたは複数のリボソームを含む医薬組成物を提供し、前記リボソームは：（a）少なくとも1つの小胞形成リン脂質を含む外部脂質二重層；および（b）トレプロスチニルと、内部水性媒体と外部媒体との間にpH勾配を提供するための塩（以下「pH勾配塩」）を含む内部水性媒体とを含み、ここで、トレプロスチニルの前記少なくとも1つの小胞形成リン脂質との重量比（すなわち、T/P比）は、約0.035以上であり、トレプロスチニルの約60%未満が医薬組成物の投与後2時間以内に放出され、かつ、トレプロスチニルの80%超が医薬組成物の投与後2時間超から約72時間後に放出される。

30

【0019】

例示的な実施形態では、前記リボソームは外部媒体中に懸濁されており、前記外部媒体のpHはトレプロスチニルのpK_aを上回っている。他の例示的な実施形態では、前記内部水性媒体のpHは、前記外部媒体のpHより、少なくとも0.1単位または少なくとも1単位高い。さらに他の実施形態では、トレプロスチニルのカプセル化効率は、約80%、約85%、約90%、または約95%を超えている。

【0020】

一実施形態では、前記トレプロスチニル対リン脂質比は、約0.035以上、約0.036以上、約0.037以上、約0.038以上、約0.039以上、約0.04以上、約0.041以上、約0.042以上、約0.043以上、約0.044以上、約0.045以上、約0.046以上、約0.047以上、約0.048以上、約0.049以上、約0.05以上、約0.051以上、約0.052以上、約0.053以上、約0.054以上、約0.055以上、約0.056以上、約0.057以上、約0.058以上、約0.059以上または約0.06以上である。

40

【0021】

他の実施形態では、前記医薬組成物は、口腔、鼻咽頭、および声帯の上の喉頭などの、上気道におけるトレプロスチニルのバースト放出を減少させる（トレプロスチニルの約60%未満が投与後2時間以内に放出される）。結果として、咳、喉の炎症、喉頭の痛み、鼻血、喀血、喘鳴などの、上気道における前記トレプロスチニルの副作用は、トレプロス

50

チニル対リン脂質比が約 0.035 よりも低い医薬組成物のそれと比較して減少している。さらに他の例示的な実施形態では、前記医薬組成物は、トレプロスチニルの放出を、医薬組成物の投与後 2 時間超から少なくとも 4 時間、少なくとも 6 時間、少なくとも 8 時間、少なくとも 10 時間、少なくとも 12 時間、少なくとも 16 時間、少なくとも 24 時間、少なくとも 48 時間または少なくとも 72 時間延長し（すなわち、トレプロスチニルの 80 % 超が投与後 2 時間超から約 72 時間後に放出される）、投与頻度を減らす。それを必要とする対象に、本明細書に開示される有効量の医薬組成物を投与する工程を含む、呼吸器疾患を治療するための方法もまた、開示され、ここで、医薬組成物のトレプロスチニル対リン脂質比は、約 0.035 以上であり、トレプロスチニルの副作用は、トレプロスチニル対リン脂質比が約 0.035 未満の医薬組成物の副作用と比較して減少している。呼吸器疾患の非限定的な例としては、肺高血圧症および間質性肺疾患が挙げられる。

10

【0022】

本発明はまた、それを必要とする対象に本明細書に開示される有効量の医薬組成物を投与することを含む、上気道における吸入トレプロスチニルの副作用を低減するための方法に関し、ここで、医薬組成物のトレプロスチニル対リン脂質比は、約 0.035 以上である。

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、吸入およびバースト放出によって投与され、トレプロスチニル対リン脂質比が約 0.035 未満の医薬組成物と比較して、トレプロスチニルの副作用が低減される。

20

【0024】

A. リポソーム成分

本明細書で使用される「リポソーム」という用語は、内部水性媒体を封入する 1 つまたは複数の脂質二重層から構成される微視的な小胞または粒子を指す。リポソームを形成するためには、少なくとも 1 つの「小胞形成脂質」の存在が必要であり、これは、脂質二重層を形成するか、または脂質二重層に組み込まれ得る両親媒性脂質である。任意の適切な小胞形成脂質を使用して、前記リポソームを構成する脂質二重層を形成し得る。小胞形成脂質としては、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジイルノシトール (PI)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) またはホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質、および正に帯電した脂質または負に帯電した脂質などの荷電脂質、が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0025】

リポソームの脂質二重層としては、コレステロール、ヘキサコハク酸コレステロール、エルゴステロール、ラノステロール、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、少なくとも 1 つの小胞形成脂質およびステロールが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な実施形態では、前記ステロールはコレステロールである。

【0026】

いくつかの実施形態では、前記小胞形成脂質は、第 1 のリン脂質と第 2 のリン脂質の混合物である。特定の実施形態では、第 1 のリン脂質はホスファチジルコリン (PC) であり、これは、水素化卵ホスファチジルコリン (HGPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアシルホスファチジルコリン (DSPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、大豆ホスファチジルコリン (SPC)、オレオイルパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジベトロセリノイルホスファチジルコリン、パルミトイルエライドイルホスファチジルコリン、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン (D LPC)、ジウンデカノイルホスファチジルコリン、ジデカノイルホスファチジルコリン、ジノナノイルホスファチジルコリン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。他の実施形態では、前記第 2

40

50

のリン脂質は、ポリエチレングリコール修飾リン脂質であり、1, 2 - ジステアロリー - 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] (DSPE - PEG2000)、負に帯電したリン脂質、例えばジステアリルホスファチジルグリセロール(DSPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)またはジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)または(DOPG)などの、約500から約10,000ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコールを含む。例示的な実施形態では、第1のリン脂質：コレステロール：第2のリン脂質のモル百分率は、50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 10、50 - 70 : 20 - 45 : 0.5 - 8または55 - 65 : 25 - 40 : 1 - 6である。

【0027】

他の実施形態では、前記小胞形成脂質は、第1のリン脂質と荷電脂質との混合物である。例示的な実施形態では、小胞形成脂質は、第1のリン脂質、第2のリン脂質、および荷電脂質の混合物である。荷電脂質としては、ステアリルアミン、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン(DOTAP)、3β - [N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル]コレステロール(DC - コレステロール)、N⁴ - コレステロール - スペルミン(GL67)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)、1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン(DOTMA)、エチルホスホコリン(エチルPC)またはそれらの組み合わせが挙げられる。他の例示的な実施形態では、前記第1のリン脂質：コレステロール：荷電脂質のモル百分率は50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 10、50 - 70 : 20 - 45 : 0.5 - 8または55 - 65 : 25 - 40 : 1 - 6である。

【0028】

一実施形態では、脂質二重層中のHSPC、コレステロール、およびDSPGのモル%は50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 10、50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 5または55 - 65 : 25 - 40 : 0.5 - 8である。他の実施形態では、脂質二重層中のHSPC、コレステロール、DSPE - PEG2000のモル%は50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 10、50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 5または55 - 65 : 25 - 40 : 0.5 - 8である。他の実施形態では、脂質二重層中のDPPC : Chol : DSPE - PEG2000のモル%は50 - 70 : 20 - 45 : 0.5 - 8、50 - 70 : 20 - 45 : 0.1 - 5または55 - 65 : 25 - 40 : 1 - 6である。

【0029】

一実施形態では、前記リボソームの脂質二重層としてはまた、少なくとも1つの小胞形成脂質および界面活性剤が挙げられ、これは、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤または両性イオン性界面活性剤であり得る。非イオン性界面活性剤は、その頭部に形式的に帯電した基を有していない。カチオン性界面活性剤は、その頭部に正味の正電荷を帯びている。両性イオン性界面活性剤は電氣的に中性であるが、異なる原子上に形式的な正電荷と負電荷を帯びている。

【0030】

非イオン性界面活性剤の非限定的な例としては、非イオン性水溶性モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリド；ポリエチレングリコールの非イオン性水溶性一脂肪酸および二脂肪酸エステル；非イオン性水溶性ソルビタン脂肪酸エステル(例えば、TWEEEN(登録商標) 20(ポリオキシエチレン20ソルビタンモノオレート)、SPAN(登録商標) 80)；非イオン性水溶性トリブロックコポリマー(例えば、POLOXAMER(登録商標) 406(PLURONIC(登録商標) F - 127)などのポリ(エチレンオキシド)/ポリ-(プロピレンオキシド)/ポリ(エチレンオキシド)トリブロックコポリマー、またはその誘導体が挙げられる。

【0031】

カチオン性界面活性剤の非限定的な例としては、ジメチルジアルキルアンモニウムブロミドまたはドデシルトリメチルアンモニウムブロミドが挙げられる。

【0032】

10

20

30

40

50

双性イオン性界面活性剤の非限定的な例としては、3 - (N , N - ジメチルパルミチラムモニオ) - プロパンスルホネートが挙げられる。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、前記リポソームは、リポソーム膜を通過する H^+ または OH^- の輸送を促進し得る化合物である界面活性剤またはイオノフォアを実質的に含まない。

【 0 0 3 4 】

リポソームを調製するための小胞形成脂質を溶解するための溶媒、例えば、メタノール、エタノール、エーテル、およびそれらの組み合わせが使用され得る。任意に、前記溶媒は、後に超臨界流体によって除去され得て、有機溶媒除去工程を実行するための時間を短縮するために、好ましくは最小量で使用される。

10

【 0 0 3 5 】

本発明によれば、前記リポソームは、前記リポソームの内部水性媒体と外部媒体との間に pH 勾配を提供するための塩（以下、「pH 勾配塩」）を含む媒体中で調製される。小胞形成脂質が pH 勾配塩を含む培地と接触すると、リポソーム懸濁液が形成される。

【 0 0 3 6 】

懸濁液中のリポソームはサイズ縮小を受ける。リポソームのサイズは、通常、その直径を指す。リポソームサイズの縮小は、押し出し、超音波処理、均質化技術または粉碎技術などの、当技術分野の当業者によく知られており実行され得る、多くの方法によって達成され得る。押し出しとしては、定義された細孔サイズを有するフィルターに、圧力下でリポソームを 1 回または複数回通過させることが挙げられる。前記フィルターは、通常、ポリカーボネート製であるが、リポソームと相互作用せず、十分な圧力下で押し出すのに十分な強度のある耐久性のある、任意の材料でも作製され得る。前記リポソームのサイズは、超音波処理によって縮小され得て、ここで超音波処理は、音波エネルギーを使用してリポソームを破壊または切断し、自発的に小さなリポソームに再形成する。例えば、超音波処理は、リポソーム懸濁液を含むガラス管を、浴型ソニケーターで生成された音波震源地に浸漬することによって実行され得て、または、リポソーム懸濁液と直接接触しているチタンプローブの振動によって、音波エネルギーを生成するプローブタイプの超音波処理装置が使用され得る。本発明において、前記リポソームは、通常、約 50 nm ~ 500 nm、例えば、約 500 nm 以下、約 400 nm 以下、約 300 nm 以下、約 200 nm 以下、または約 100 nm 以下の直径を有する。

20

30

【 0 0 3 7 】

サイジング後、外部媒体中の pH 勾配塩の濃度を調整して、内部水性媒体と外部媒体の間に pH 勾配を提供し、これは、いくつかの方法で、例えば、ダイアフィルトレーション、透析、限外ろ過、またはタンジェンシャルフローろ過などの方法により、クエン酸緩衝液 ($H_3C_6H_5O$) やリン酸緩衝液 (H_3PO_4) などの pH 勾配塩を欠く適切な緩衝液と、前記外部媒体を交換することにより実行され得る。

【 0 0 3 8 】

前記 pH 勾配塩は、リポソームの外部媒体と内部水性媒体との間に、より低い外側およびより高い内側の pH 勾配を提供する。一実施形態では、前記内部水性媒体の pH は、前記外部媒体の pH よりも少なくとも 0.1 単位高い。他の実施形態では、前記内部水性媒体の pH は、前記外部媒体の pH よりも少なくとも 1 単位高い。さらに他の実施形態では、前記内部水性媒体の pH は約 7、8、9 または 10 であり、前記外部媒体の pH は 7 未満、6 未満、5 未満、4 未満、3 未満、約 3 ~ 7、約 3.5 ~ 6.5、または約 4 ~ 6 である。さらに他の例示的な実施形態では、前記外部媒体の pH は、トレプロスチニルの pK_a を超える。

40

【 0 0 3 9 】

前記調製されたリポソームは、トレプロスチニルを装填して対象に投与する前に、相当の期間保存され得る。例えば、リポソームは、トレプロスチニルを装填する前に、相当の期間、冷蔵条件で保存され得る。あるいは、リポソームは、投与前に、脱水され、保存され、その後、再水和され、トレプロスチニルを装填され得る。リポソームは、トレプロス

50

チニルを装填した後に脱水もされ得る。脱水は、実行可能な、当技術分野で知られている多くの方法によって実施され得る。いくつかの実施形態では、リポソームは、標準的な凍結乾燥装置、すなわち低圧条件下での脱水を使用して脱水される。また、リポソームは、例えば液体窒素を使用して、凍結され得る。糖質は、脱水中のリポソームの安定性および完全性を確実にするために、脱水の前に、リポソーム環境、例えば、リポソームを含む緩衝液に添加され得る。糖類の例としては、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

上記のように約0.035以上のT/P比を有するリポソーム懸濁液は、トレプロスチニルをすぐに内包し得る。通常、トレプロスチニルは前記リポソームの外部媒体に添加され、得られた懸濁液をインキュベートし、トレプロスチニルをリポソームの内部水性媒体に、望ましい装填濃度まで拡散させ、カプセル化効率（組成物中のトレプロスチニルの総量に対するトレプロスチニルの内部の量/カプセル化された量の割合）が達成される。

【0041】

B. 両親媒性トレプロスチニル

本明細書で使用される場合、「両親媒性トレプロスチニル」および「トレプロスチニル」という用語は、交換可能に使用され、両方が、リポソームに内包されることを目的とした生物学的に活性なトレプロスチニルを指し、かつ、不溶性の結晶、沈殿物、またはゲルを形成することなくほとんど溶解し、アルカリ性溶液中で安定である、カルボキシル基（ $-COOH$ ）およびヒドロキシル基（ $-OH$ ）からなる群から選択される少なくとも1つの官能基をも含む。トレプロスチニルはまた、カルボン酸官能基に加えて1つまたは複数の官能基を含み得るが、そのような官能基の存在は、トレプロスチニルの酸性度をその非官能化相当物の酸性度から有意に変化させてはならない。

【0042】

本開示によれば、前記両親媒性トレプロスチニルは、そのプロトン化形態またはその任意の塩形態で生物学的に活性であり得る。両親媒性トレプロスチニルの塩は、水溶性の形態である任意の薬学的に許容される対イオンを伴い得る。

【0043】

一実施形態では、前記両親媒性トレプロスチニルはトレプロスチニルである。

【0044】

C. トレプロスチニルとリン脂質の比率と制御放出プロファイルとの関連

本開示によれば、pH勾配塩を使用して、リポソーム内区画とリポソーム外区画との間にpH勾配を提供し、前記内部水性媒体へのトレプロスチニルの装填を可能にし、リポソーム膜内に取り込まれないか、あるいは脂質二重層の外面に結合されないようにする。

【0045】

pH勾配塩の非限定的な例としては、弱酸性塩（カルボン酸塩または重炭酸塩など）またはアミノ酸（極性アミノ酸など）が挙げられる。

【0046】

本明細書で使用される「重炭酸塩」は、重炭酸陰イオンおよび陽イオン成分などの薬学的に許容される塩化合物を指す。一実施形態では、塩化合物のカチオン性成分は金属である。金属の非限定的な例としては、カリウム（K）、ナトリウム（Na）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）、セシウム（Cs）、およびリチウム（Li）などのIA族またはIIA族の金属、または鉄（Fe）やニッケル（Ni）などのIA族またはIIA族の金属以外の金属が挙げられる。重炭酸塩の例としては、重炭酸カリウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カルシウム、重炭酸マグネシウム、重炭酸セシウム、重炭酸リチウム、重炭酸ニッケル、重炭酸第一鉄またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0047】

本明細書で使用される「カルボン酸塩」としては、ギ酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、

10

20

30

40

50

酪酸塩、イソ酪酸塩、吉草酸塩、イソ吉草酸塩、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な一実施形態では、酢酸塩は、酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム、またはそれらの組み合わせである。

【 0 0 4 8 】

【表 1】

無極性		グリシン	イソロイシン	フェニルアラニン
		アラニン	バリン	メチオニン
		ロイシン	プロリン	トリプトファン
極性	酸性	アスパラギン酸		グルタミン酸
	中性	チロシン	セリン	アスパラギン
		グルタミン	スレオニン	システイン
	塩基性	ヒスチジン	リシン	アルギニン

10

【 0 0 4 9 】

表 1 は、20 個のアミノ酸の分類を示している。20 個のアミノ酸は J u a n g R H (2 0 0 7) B i o c h e m i s t r y に従って分類されている。一実施形態では、前記 pH 勾配塩は、中性極性アミノ酸（チロシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン）、塩基性極性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性極性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）またはそれらの組み合わせ、などの、極性アミノ酸である。

20

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態では、前記 pH 勾配塩はリン酸塩ではない。例示的な実施形態では、前記 pH 勾配塩は重炭酸塩である。他の例示的な実施形態では、pH 勾配塩は酢酸塩である。

【 0 0 5 1 】

対イオンは、安定した pH 勾配を維持するために pH 勾配塩を伴うように選択され、対イオンと pH 勾配塩との間の相互作用が一緒になって、pH 勾配塩の最適な効果、すなわち、リポソームの内部水性媒体中の高濃度のトレプロスチニルをカプセル化すること、および/またはリポソームからのトレプロスチニルの放出速度を高めること、を達成する。pH 勾配が達成された後、リポソーム内の過剰な対イオンが豊富な水酸化物を提供し、これらの対イオンのみが膜不透過性であることが理解されよう。中性型のトレプロスチニルは、リポソーム装填中のインキュベーション条件下で脂質二重層に浸透し、対イオンにตอบสนองして脱プロトン化し得る。脱プロトン化されたトレプロスチニルは、リポソーム二重層を容易に透過しない。特定の実施形態において、前記対イオンは、アルカリ金属のイオンであり得る。

30

【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、内部水性媒体は、沈殿物、結晶、またはゲルを実質的に含まない。前記内部水性媒体は、少なくとも 5 0 0 0 倍、8 0 0 0 倍、1 0 0 0 0 倍、1 2 0 0 0 倍、1 5 0 0 0 倍、または 2 0 0 0 0 倍の倍率の電子顕微鏡でそのような沈殿物、結晶またはゲルが視認されない場合、沈殿物、結晶またはゲルを実質的に含まないとみなされる。

40

【 0 0 5 3 】

トレプロスチニル対リン脂質比の特定の範囲を有する本発明の医薬組成物は、カプセル化されたトレプロスチニルのバースト放出を低減し、したがって、トレプロスチニルの副作用を低減する。さらに、望ましい治療効果のために十分な量のトレプロスチニルが医薬組成物から放出され、その放出プロファイルは、トレプロスチニル対リン脂質比が本開示の特定の範囲外にある医薬組成物のそれと比較して拡張されている。この特許請求されたトレプロスチニル対リン脂質比は、本明細書に記載の放出プロファイルのための界面活性剤またはイオノフォア（カルシウムイオノフォアなど）を使用せずに、トレプロスチニルの副作用を低減しながら、リポソーム組成物からの捕捉されたトレプロスチニルの放出を

50

予想外に拡大する。

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、「バースト放出」という用語は、医薬組成物の投与後 2 時間以内の医薬組成物からの > 6 0 % のトレプロスチニルの、迅速なおよび / またはやや制御されない放出を指す。特定の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物のトレプロスチニルのバースト放出は減少し、したがって、カプセル化されたトレプロスチニルの約 6 2 % 未満、約 6 1 % 未満、約 6 0 % 未満、約 5 9 % 未満、約 5 8 % 未満、約 5 7 % 未満、約 5 6 % 未満、約 5 5 % 未満、約 5 4 % 未満、約 5 3 % 未満、約 5 2 % 未満、約 5 1 % 未満、約 5 0 % 未満、約 4 9 % 未満、約 4 8 % 未満、約 4 7 % 未満、約 4 6 % 未満、約 4 5 % 未満、約 4 4 % 未満、約 4 3 % 未満、約 4 2 % 未満、約 4 1 % 未満、約 4 0 % 未満、約 3 9 % 未満または約 3 8 % 未満は、薬物投与後約 2 時間以内に放出される。

10

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用される場合、「持続放出」という用語は、「制御放出」、「遅延放出」、「改変放出」、「延長放出」、「プログラム放出」、「時間放出」、「速度制御」または「徐放」と交換可能に使用され得て、かつ、医薬組成物の投与後 2 時間超から約 7 2 時間の期間中の 8 0 % を超えるトレプロスチニルの放出を指す。

【 0 0 5 6 】

一実施形態では、医薬組成物の徐放プロファイルは、インビトロ放出 (I V R) アッセイおよび / または捕捉されたトレプロスチニルのインビボ薬物動態研究に基づく。

【 0 0 5 7 】

特定の実施形態では、インビトロ放出 (I V R) アッセイおよび / またはインビボ薬物動態研究に基づいて、前記医薬組成物は、放出プロファイルを有し、ここで捕捉されたトレプロスチニルの約 6 0 重量 % 未満、約 5 5 重量 % 未満、約 5 0 重量 % 未満、約 4 5 重量 % 未満、約 4 0 重量 % 未満または約 3 5 重量 % 未満は、薬物投与時から 2 時間以内に放出される。

20

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態では、インビトロ放出 (I V R) アッセイおよび / またはインビボ薬物動態研究に基づいて、前記医薬組成物は、放出プロファイルを有し、ここで、捕捉されたトレプロスチニルの約 9 0 重量 % 超、約 8 5 重量 % 超、約 8 0 重量 % 超、約 7 5 重量 % 超、約 7 0 重量 % 超、約 6 5 重量 % 超、約 6 0 重量 % 超、または約 5 5 重量 % 超が、薬剤投与時から 2 時間超、4 時間、8 時間、1 2 時間、2 4 時間、4 8 時間、または 7 2 時間までにリボソームから放出される。

30

【 0 0 5 9 】

D . 管理

本発明の医薬組成物は、血流と直接接触していない対象の空洞に投与され得る。投与経路の例としては、吸入、気管内注射、皮下注射、関節内注射、筋肉内注射、硝子体内注射および髄腔内注射が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

特定の実施形態では、前記医薬組成物は、気管内注射を介して投与され得る。いくつかの実施形態では、前記医薬組成物は、皮下注射を介して投与され得る。

40

【 0 0 6 1 】

本発明の医薬組成物はまた、対象の血流に直接投与され得る。

【 0 0 6 2 】

この開示によれば、前記医薬組成物は、1 日 1 回 ~ 3 回、2 日に 1 回、または 3 日に 1 回投与され得る。

【 0 0 6 3 】

本開示は、以下の実施例においてさらに説明される。しかしながら、以下の例は、例示のみを目的としており、実際に本開示を限定するものとして解釈されるべきではないことを理解されたい。

【 実施例 】

50

【0064】

一般的な実験手順：

1. トレプロスチニルリボソーム組成物の調製

リボソームコロイド懸濁液は、エタノール注入技術を使用して調製された。具体的には、第1のリン脂質（すなわち、HSPC）、コレステロール、および第2のリン脂質（すなわち、DSPE-PEG2000）をモル比3：2：0.075で含むすべての脂質成分を、約60 で2.86 mLのエタノール溶液に溶解させた。次に、得られた脂質溶液を17.14 mLの重炭酸ナトリウム溶液（400 mM；pH 8.5）に注入し、リボソームの水和のために60 で撹拌した。混合物を特定の細孔サイズ（それぞれ0.2 μm および/または0.1 μm）のポリカーボネート膜を通して6～10回押し出し、約100 nm～200 nmの平均粒子サイズおよび<0.2の多分散性指数（PdI）を有するリボソームの懸濁液を得た。続いて、リボソームの懸濁液を、50 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に対してタンジェンシャルフロー濾過システムで透析し、リボソームの内部水性媒体と外部媒体との間に膜貫通pH勾配（すなわち、より高い内側およびより低い外側のpH勾配）を形成した。膜貫通pH勾配を有するリボソームの懸濁液は、薬物装填プロセスの前に4 で保存された。

10

【0065】

トレプロスチニル（Cayman Chemical、USAから購入）を50 mMのクエン酸ナトリウム水溶液に溶解させ、次にリボソームの懸濁液に所定のトレプロスチニル対リン脂質の比率で添加し、40 で30分間インキュベートした。得られた混合物をクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で調整して、pH 5.5およびリン脂質濃度8.59 mg/mLを有するトレプロスチニルリボソーム組成物を得た。

20

【0066】

一般的な分析方法：

1. トレプロスチニルリボソーム組成の定量的特性化

a. カプセル化された遊離トレプロスチニルの濃度：

トレプロスチニルリボソーム組成物をPD Mini TrapTM G-25カラム（GE Healthcare）に注ぎ、トレプロスチニルを装填したリボソーム（すなわち、リボソーム内にカプセル化されたトレプロスチニル）を遊離トレプロスチニル（すなわち、リボソーム外）から分離した。

30

【0067】

トレプロスチニル-リボソーム組成物は、メタノール（90%メタノールおよび10%リボソーム懸濁液）を使用して損傷を受け、上記の試験サンプル溶液（20 μL）をフォトダイオードアレイ（PDA）検出器を備えたWaters Acquity HPLCシステムに注入することにより、カプセル化されたトレプロスチニルの濃度および遊離トレプロスチニル（リボソーム外）の濃度をそれぞれ定量的に分析した。移動相はアセトニトリルとリン酸緩衝液（pH 2.5）（50：50、v/v）の混合物であり、移動相の流速は1.0 mL/minである。分離は、4.6 mm x 15 cm、5 μmの寸法のC18カラムを使用して、45で行い、220 nmで吸光度のピークを検出した。

【0068】

内部水性媒体中のカプセル化トレプロスチニル（L）および外部媒体中の遊離トレプロスチニル（F）などの、トレプロスチニルリボソーム組成物中のトレプロスチニルの総量の濃度は、[TRE]で表される。

40

【0069】

b. カプセル化効率（EE）およびトレプロスチニル対リン脂質（T/P）比：

カプセル化効率（EE）は、トレプロスチニル[TRE]の総量（すなわち、カプセル化されたトレプロスチニル（L）と遊離の（カプセル化されていない）外部媒体中のトレプロスチニル（F）の合計）に対するリボソームの内部水性媒体中のカプセル化されたトレプロスチニル（L）の割合として計算された。つまり、前記EEは次の式を使用して計算された。

50

【 0 0 7 0 】

【 数 1 】

$$EE(\%) = [L / (L + F)] \times 100$$

【 0 0 7 1 】

トレプロスチニルリポソーム組成物の T / P 比は、以下の式を使用して計算された：

【 0 0 7 2 】

【 数 2 】

$$T/P \text{ ratio} = (B \times C) / D$$

B = トレプロスチニルの総量の濃度 (L + F) = [TRE] (mg / mL)

C = カプセル化効率 (EE)

D = リン脂質濃度。

10

【 0 0 7 3 】

c . 平均粒子サイズと多分散性指数 (P d I) :

リポソームの平均粒子サイズは、動的光散乱によって評価された。リポソームのサイズ分布を示す値である多分散性指数 (P d I) は、Beckman Coulter DelsaTM Nano C 粒子アナライザーを使用して、平均粒子サイズと同じ評価手法を使用して決定された。

【 0 0 7 4 】

実施例 1 . トレプロスチニル対リン脂質 (T / P) 比が異なる重炭酸塩を使用したトレプロスチニルリポソーム組成物のインビトロ放出 (I V R) プロファイルおよびインビボ薬物動態 (P K) プロファイル

実験手順：

A . In vitro 放出 (I V R) アッセイ

カプセル化されたトレプロスチニルの放出に対するトレプロスチニル対リン脂質比の影響を研究するために、表 2 に示される特定のトレプロスチニル対リン脂質比を有する H S P C、コレステロールおよび D S P E - P E G 2 0 0 0 で処方されたトレプロスチニルリポソーム組成物は、前のセクションに記載された、一般的な実験手順の「 1 . トレプロスチニルリポソーム組成物の調製」と題された、手順に従い調製された。リポソームの平均粒子サイズは 1 0 0 ~ 2 0 0 nm であり、P d I は 0 . 2 0 未満であった。

【 0 0 7 5 】

カプセル化されたトレプロスチニルおよび遊離トレプロスチニルの濃度などの、トレプロスチニルリポソーム組成物の定量的特性評価、カプセル化効率、トレプロスチニル対リン脂質比、平均粒子サイズ、および P d I は、前のセクションに記載され、一般分析法の「 1 . トレプロスチニルリポソーム組成の定量的特性化」と題された、手順に従い実行された。

【 0 0 7 6 】

さまざまな I V R アッセイを使用して、I V R プロファイル进行评估し得る。実際の I V R アッセイは、請求されたリポソーム組成物中のトレプロスチニルによって、当業者に知られているか、または明らかになるであろう。前記トレプロスチニルの I V R プロファイルは、M . R . C . Marques ら (2 0 1 1) , Dissolution Technologies , 1 8 : 1 5 - 2 8 に従い、I V R アッセイによって評価された。簡潔に言うと、0 . 5 mL の放出媒体を M . R . C . Marques ら (2 0 1 1) に従って調製し、2 0 k D a のセルロースエステル膜透析チューブ (カタログ番号 8 8 4 0 5、Thermo Fisher Scientific) に添加し、次に、セルロースエステル膜透析チューブを、1 4 mL の放出媒体を含む 1 5 mL スクリューキャップコニカルチューブに入れた。放出媒体の非限定的な例としては、シミュレートされた肺液 (S L F) が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

20

30

40

50

適切な量のトレプロスチニルリポソーム組成物をコニカルチューブに加えて、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のトレプロスチニルの最終濃度を得た後、 37 および 100 rpm で透析した。所定の時点（すなわち、透析後 0 、 2 、 4 、 8 、 12 、 24 、 48 および 72 時間）において、前のセクションで説明した手順に従って HPLC を使用して、リポソームから透析チューブに放出されたトレプロスチニルの濃度を測定するために、透析チューブ内の混合物の約 0.5 mL を取り出した。

【0078】

SLF から放出されるカプセル化されたトレプロスチニルの割合は、式 1 を使用して計算され、

【0079】

【数 3】

$$\begin{aligned} \text{Release } (\%)_{\text{at } t} &= \frac{C_{\text{Release at } t}}{C_{\text{Encap at } t_0}} = \frac{C_{\text{Non-encap at } t} - C_{\text{Non-encap at } t_0}}{C_{\text{Encap at } t_0}} \\ &= \frac{(C_{\text{Non-encap at } t})_{\text{diffuse at } t} - (C_{\text{Non-encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}}{(C_{\text{Encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}} \dots \dots \text{式 1} \end{aligned}$$

【0080】

ここで、

・ $C_{\text{Release at } t} (\mu\text{g} / \text{mL})$: 特定の時間 (t 、秒) でリポソーム組成物から放出されたトレプロスチニルの濃度

・ $C_{\text{Encap at } t_0} (\mu\text{g} / \text{mL})$: リポソーム組成のカプセル化されたトレプロスチニルの初期 (t_0) 濃度

・ $C_{\text{Non-encap at } t_0} (\mu\text{g} / \text{mL})$: リポソーム組成のカプセル化されていないトレプロスチニルの初期 (t_0) 濃度

・ $C_{\text{Non-encap at } t} (\mu\text{g} / \text{mL})$: 特定の時間 (t 、秒) でのリポソーム組成のカプセル化されていないトレプロスチニルの濃度

・ $(C_{\text{Non-encap at } t})_{\text{diffuse at } t}$: 特定の時間 (t 、秒) に透析膜を通して拡散するリポソーム組成物のカプセル化されていないトレプロスチニルの測定された濃度

・ $(C_{\text{Non-encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}$: 特定の時間 (t 、秒) に透析膜を通して拡散するリポソーム組成物のカプセル化されていないトレプロスチニルの推定初期 (t_0) 濃度

・ $(C_{\text{Encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}$: 特定の時間 (t 、秒) に透析膜を通して拡散するカプセル化されたトレプロスチニルの推定初期 (t_0) 濃度。

【0081】

ここで、以下のように、 $(C_{\text{Non-encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}$ は、式 1 - (1) および 1 - (2) を使用して計算され、かつ $(C_{\text{Encap at } t_0})_{\text{diffuse at } t}$ は、式 1 - (3) および 1 - (4) を使用して計算された：

【0082】

【数 4】

10

20

30

40

$$(C_{Non-encap\ at\ t_0})_{diffuse\ at\ t} = C_{max} - (C_{max} - C_0) \cdot e^{-D \cdot (t-t_0)} \dots \text{式1-(1)}$$

$$C_{max} = \frac{(C_{Release\ medium} \times (1 - EE\%)) \times 14\ [mL]}{14.5\ [mL]} \dots \dots \dots \text{式1-(2)}$$

$$(C_{Encap\ at\ t_0})_{diffuse\ at\ t} = C_{max} - (C_{max} - C_0) \cdot e^{-D \cdot (t-t_0)} \dots \dots \dots \text{式1-(3)}$$

$$C_{max} = \frac{(C_{Release\ medium} \times EE\%) \times 14\ [mL]}{14.5\ [mL]} \dots \dots \dots \text{式1-(4)}$$

10

【 0 0 8 3 】

ここで、

 $C_{release\ medium}$ ($\mu g / mL$) : 放出媒体中のトレプロスチニルの初期濃度

EE (%) : リポソームへのトレプロスチニルのカプセル化効率。

【 0 0 8 4 】

透析膜を通して拡散するトレプロスチニルの拡散係数 (D) は、主に放出媒体に溶解している遊離型のトレプロスチニルによって評価された。トレプロスチニルの拡散がフィックの法則 (式 1) に従うと仮定すると、透析膜を横切る拡散トレプロスチニルの濃度は、特定の期間内に指数関数的に増加し、式 2 を使用して計算され得る。

【 0 0 8 5 】

20

【 数 5 】

$$C_t = C_{max} - (C_{max} - C_0) \cdot e^{-D \cdot (t-t_0)}$$

$$\ln \frac{(C_{max} - C_t)}{(C_{max} - C_0)} = -D \times (t - t_0) \dots \dots \dots \text{式2}$$

30

【 0 0 8 6 】

ここで、

 C_t ($\mu g / mL$) : 特定の時間 (t 、 秒) に透析膜を通過して拡散するトレプロスチニルの濃度 C_{max} ($\mu g / mL$) : 平衡状態で透析膜全体に拡散するトレプロスチニルの濃度 C_0 ($\mu g / mL$) : 透析膜中のトレプロスチニルの初期 (t_0) 濃度 ($5\ \mu g / mL$) 。

【 0 0 8 7 】

結果

異なる T / P 比のトレプロスチニルリポソーム組成物の物理化学的特性と I V R プロファイルを表 2 に示す。

40

【 0 0 8 8 】

50

【表 2】

組成	[TRE] (mg/mL)	EE (%)	T/P比	SLF(逆透析)での放出(%)					
				0h	2h	4h	8h	12h	24h
LB00300	0.29	96.2	0.032- 0.033	0	63.8	79.9	93.9	N.A.	N.A.
LB00400	0.40	99.9	0.047	0	46.3	72.7	94.3	N.A.	N.A.
LB00500	0.53	91.2	0.056	0	37.0	54.6	84.5	N.A.	N.A.
LB01000	0.99	97.6	0.112	0	26.3	47.4	72.2	82.8	N.A.
LB01500	1.57	96.7	0.177	0	20.5	40.0	64.5	74.6	94.1
LB02000b	2.12	91.0	0.225	0	14.1	33.0	51.2	62.8	81.3 ^a

^aデータはネイチャーログフィッティングによって計算された(放出(%))=21.041xLn(time, hr)-4.639)

^bリボソームの平均粒子サイズ:180-200nm,PdI<0.20

【0089】

表2は、重炭酸ナトリウム塩で90%を超えるEEが達成されたことを示している。0.035より高いT/P比を有する表2のトレプロスチニルリボソーム組成物(すなわち、LB00400、LB00500、LB01000、LB01500およびLB02000)は、以下の特性の制御されたインビトロ放出を示す:T/P比が0.035未満の組成物(すなわちLB00300)と比較する場合、トレプロスチニルの60%未満が投与時から2時間以内に放出され、かつ、トレプロスチニルの80%超が投与時(すなわち8時間、12時間または24時間)から、2時間超24時間以内に放出される。

【0090】

B.トレプロスチニルリボソーム組成物のin vivo薬物動態(PK)研究

実験手順:

このin vivo PK研究では、Sprague-Dawleyラット(BioLASCOTaiwanCo.,Ltd.から購入)をイソフルランで麻酔し、上顎切歯に引っ掛けたリボンを用いて、45°から50°の平面で背側の位置にあるアーチ型のプラットフォームに背中をしっかりと配置した。マイクロスプレーエアロゾルチップ(Microsprayer、PennCentury、フィラデルフィア、米国)を各ラットの気管分岐部に挿入し、マイクロスプレーエアロゾル装置に取り付けられた高圧注射器を使用して、試験サンプル(すなわち、表2の組成物または遊離トレプロスチニル溶液)を各ラットに所定の用量で気管内投与した。遊離トレプロスチニル溶液は、6mgのトレプロスチニルを50mMのクエン酸ナトリウム水溶液に溶解し、0.9%生理食塩水で10mLにすることによって調製した。

【0091】

所定の時点(すなわち、投与後0、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、8、10および12時間)で、各ラットの血液サンプルを含ヘパリンチューブに収集し、湿った氷上で貯蔵される。次に、血液サンプルを約2500×gで15分間、採取後1時間以内に4±2で遠心分離し、血漿を血球から分離した。各ラットから得られた血漿サンプル約0.1mLを新しい貯蔵管に加え、-70±2に維持された温度で冷凍庫に貯蔵した。

【0092】

トレプロスチニル濃度を定量化するために、各ラットの血漿サンプル50μLを96ウェルプレートのウェルに移し、続いて硝酸アセトン150μLを各ウェルに添加した。得られた混合物を1分間ボルテックスして、血漿タンパク質のトレプロスチニルへの結合を破壊し、続いて3000rpmで5分間遠心分離した。得られた上清(150μL)を等量のH₂Oと混合し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)で

分析して、ラットの血漿サンプル中のトレプロスチニル濃度を測定した。

【 0 0 9 3 】

様々な試験サンプルを所与の用量で投与したラットの血漿サンプル中の平均トレプロスチニル濃度の対数対最大 1 2 時間の投与時間を、それぞれ図 1 A および図 1 B に示すようにプロットした。

【 0 0 9 4 】

ある期間にわたるトレプロスチニルの総曝露量を決定するため、および各試験サンプルで使用されるトレプロスチニルの異なる投与量を正規化するために、時間ゼロから特定の時間 (AUC_t) までの血漿濃度 - 時間曲線下の面積と、時間ゼロから無限大までの血漿濃度 - 時間曲線下の面積 (AUC_{inf}) との比を図 2 に示す。

10

【 0 0 9 5 】

結果：

図 1 A および図 1 B に示されるように、血漿トレプロスチニル濃度は、遊離トレプロスチニル投与の最初の 5 分以内にピークに達した。トレプロスチニルリポソーム組成物 (すなわち、LB00300、LB01000、LB01500、およびLB02000) の投与後に有意なピークは認められなかった。図 2 に示すように、トレプロスチニルの 60 % 以上 (AUC_t / AUC_{inf}) が 2 時間以内に遊離トレプロスチニルで放出され、LB00300 ($T / P < 0.035$) の投与はバースト放出を示している。

【 0 0 9 6 】

前記 LB01000、LB01500、およびLB02000 トレスプロスチニル-リポソーム組成物はすべて 0.035 を超える T / P 比を持ち、持続放出プロファイル ($> 80\% AUC_t / AUC_{inf}$ は、投与後 2 時間超から約 72 時間後に発生した) を、バースト放出なしで (すなわち、投与後 2 時間以内において $AUC_t / AUC_{inf} < 60\%$) 示した。

20

【 0 0 9 7 】

この研究は、 T / P 比が 0.035 以上のトレプロスチニル - リポソーム組成物が以下の特徴を有することを示している：

(a) トレプロスチニルのバースト放出がなく、副作用の軽減；

(b) 安定した治療域を達成するための、変動がほとんどなく一定のままであるトレプロスチニルの血漿レベル；および

30

(c) 長期間における持続放出。

【 0 0 9 8 】

実施例 2 . 異なる小胞形成リン脂質を有するトレプロスチニルリポソーム組成物の I V R プロファイル

実験手順：

トレプロスチニルの放出プロファイルに対するリポソームリン脂質の効果を調査するために、インビトロ研究を実施した。この研究におけるトレプロスチニルリポソーム組成物は、「1. トレプロスチニルリポソーム組成物の調製」と題された、前のセクションに記載された手順に従って調製され、「1. トレプロスチニルリポソーム組成物の定量的特性化」と題された、前のセクションに記載された手順に従って分析された。トレプロスチニルリポソーム組成物の I V R プロファイルは、実験手順の「A. インビトロ放出 (I V R) アッセイ」と題された、実施例 1 に記載されている手順に従って決定された。

40

【 0 0 9 9 】

結果：

さまざまなトレプロスチニルリポソーム組成物の物理化学的特性と I V R プロファイルを表 3 に示す。

【 0 1 0 0 】

50

【表 3】

組成	2番目の リン脂質	[TRE] (mg/mL)	EE (%)	T/P比	SLF(逆透析)での放出(%)					
					0h	2h	4h	8h	12h	24h
LB01000	DSPE-	0.99	97.6	0.112	0	26.3	47.4	72.2	82.8	N.A.
LB01500	PEG2000	1.57	96.7	0.177	0	20.5	40.0	64.5	74.6	94.1
LB11000	DSPG	1.04	95.7	0.123	0	29.3	47.8	76.8	85.2	N.A.
LB11500		1.56	95.1	0.183	0	23.0	43.5	68.6	79.5	93.9

N.A.: 利用不可

10

【0101】

表3に示すように、DSPGリン脂質（すなわち、LB11000およびLB11500）またはDSPE-PEG2000リン脂質（すなわち、LB01000およびLB01500）を含むトレプロスチニルリポソーム組成物は、同様のIVRプロファイル（トレプロスチニルの60%未満が投与時から2時間以内に放出され、トレプロスチニルの80%超が投与時から2時間超から72時間以内（すなわち12時間または24時間）に放出される）を示す。

【0102】

実施例3．異なる塩溶液を含むトレプロスチニルリポソーム組成物のIVRプロファイル
実験手順：

20

トレプロスチニルリポソーム組成物のIVRプロファイルに対する異なる塩の影響を研究するために、インビトロ研究を実施した。この研究のリポソーム組成物を調製し、IVRプロファイルを実施例1に概説した手順に従って分析した。

【0103】

この例では、3つの弱酸性塩溶液を使用してトレプロスチニルを装填した：
重炭酸ナトリウム溶液（400mM；pH8.5）、酢酸ナトリウム溶液（400mM；pH8.5）およびリン酸ナトリウム溶液（400mM；pH8.5）。

【0104】

結果：

30

さまざまな塩を使用したトレプロスチニルリポソーム組成物の物理化学的特性とIVRプロファイルを表4に示す。

【0105】

【表 4】

組成	緩衝塩 溶液	[TRE] (mg/mL)	EE (%)	D/L比	SLF(逆透析)での放出(%)					
					0h	2h	4h	6h	8h	12h
LB01000	重炭酸塩	0.99	97.6	0.112	0	26.3	47.4	N.A.	72.2	82.8
LA01000	酢酸塩	1.01	91.0	0.107	0	31.1	46.7	N.A.	75.8	87.3
LP00100	リン酸塩	0.10	94.5	0.011	0	73.4	75.7	83.6	N.A.	90.6

40

【0106】

表4は、バースト放出がないこと（トレプロスチニルの60%未満が投与時から2時間以内に放出される）および拡張IVRプロファイル（トレプロスチニルの80%超が投与時から2時間超から72時間以内（すなわち12時間）に放出される）は、重炭酸塩と酢酸塩で達成されたが、リン酸塩では達成されなかったことを示している。特定の理論に縛られることなく、重炭酸イオンと酢酸イオンは脂質二重層を透過して、トレプロスチニルを装填するための内部水性媒体とリポソームの外部との間で適切な膜貫通pH勾配を達成できるが、リン酸イオンは十分な膜貫通pH勾配を生成できず（リン酸塩は脂質二重層全体に不浸透性であるため）、したがって、T/P比は0.035未満であり、トレプロス

50

チニルの装填が制限されたと考えられる。上記の結果は、重炭酸塩および酢酸塩（リン酸塩ではない）によって生成されたりポソームの膜貫通 pH 勾配が、0.035 以上の T/P 比を達成し、バースト放出を低減し、IVR プロファイルを制御または拡張するために重要であることを示唆している。

【0107】

実施例 4．吸入トレプロスチニルリポソーム組成物の安全性評価

実験手順：

この研究では、8 匹のオスの Sprague Dawley ラット（BioLASCO Taiwan Co., Ltd. から購入）を、対照グループ（n = 2）、比較グループ（n = 3）、実験グループ（n = 3）の 3 つのグループに分けた。実験群ラットおよび比較群ラットを拘束管に入れ、それぞれ実施例 2 からの噴霧トレプロスチニルリポソーム組成物 LB11500 および遊離トレプロスチニル溶液を、20 ポートの鼻のみの Buxco 吸入暴露システム（DSI、米国）を介して、6 µg / kg / 日の投与量で 10 日間与えた。メッシュ振動ネブライザーによって生成された気流によって運ばれるエアロゾルが、ラットが入れているシステムタワーに 10 L / 分の速度で提供された。対照グループのラットは薬物への曝露を受けなかった。

【0108】

研究中、吸入された噴霧トレプロスチニルリポソーム組成物または遊離トレプロスチニル溶液による上気道刺激の発生を記録するために、単一の観察者によって各ラットに対してケージ側の臨床観察が行われた。上気道の炎症の症状としては、緊張、くしゃみ、紅斑性ピンネ、振戦、腰の曲がった姿勢、立毛、頻呼吸、呼吸困難、過呼吸、鼻血などが挙げられる。

【0109】

結果：

表 5 は、ラットの各グループで記録された上気道刺激の発生率を示している。

【0110】

【表 5】

グループ	上気道刺激の発生率 ¹
対照グループ（n = 2）	0
実験グループ／トレプロスチニルリポソーム組成物 LB11500（n = 3）	5
比較グループ／遊離トレプロスチニル溶液（n = 3）	17

1: 発生率は、10 回の吸入における臨床徴候の頻度で示される。

【0111】

この研究は、本発明のトレプロスチニルリポソーム組成物の例示的な実施形態が、遊離トレプロスチニル溶液のそれよりも上気道刺激の誘発が少ないことを実証している。

【0112】

実施例 5．異なる薬物および異なる弱酸性塩を含むトレプロスチニルリポソーム組成物の IVR プロファイルおよび沈殿状態

3 : 2 : 0.075 のモル比で HSPC : コレステロール : PEG2000 - DSPC を含むリポソーム組成物を、実施例 1 に概説された手順に従って調製した。リポソームの平均粒子サイズは 100 ~ 140 nm で、PdI は 0.20 未満であった。トレプロスチニル（TRE）、MRE-269、またはイロprost を、酢酸カルシウム（Ca(AC)₂）、酢酸ナトリウム（NaAC）、または重炭酸ナトリウム（NaBic）を使用し

てリポソーム組成物に装填した。メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウム (MPS) リポソーム組成物を Barenholzら (2012), Journal of Controlled Release, 160:117-134 内の手順に従って調製した。

【0113】

リポソーム組成物の IVR プロファイルは、実施例 1 に記載された手順を使用して評価された。リポソームの内部水性媒体中の沈殿物の存在は、CCD Gatan 832 (4k × 2k) カメラを備えた 200 keV で動作する JEOL JEM-2100 電子顕微鏡を使用して低温透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) によって評価された。ガラス質氷グリッドは、グリッドを -170 未満の温度に維持するクライオステージを使用して電子顕微鏡に移された。前記 Cryo-TEM 画像は、低線量モデルで取得され、20000 × (0.30 nm / ピクセル) の倍率を提供した。

10

【0114】

結果：

表 6 は、物理化学的特性、IVR プロファイル、およびさまざまなリポソーム組成物の沈殿の有無を示している。

【0115】

【表 6】

薬剤	内部塩	L+F (mg/ mL)	EE (%)	T/P 比 (w/w)	沈殿物	SLF(逆透析)での放出(%)							
						0h	2h	4h	8h	12h	24h	48h	72h
TRE	200mM Ca(AC) ₂	1.10	93.4	0.120	なし (図3A)	0	28.6	48.6	79.9	83.0	92.0	N.A.	N.A.
	400mM NaAC	1.01	91.0	0.107	なし (図3C)	0	31.1	46.7	75.8	87.3	N.A.	N.A.	N.A.
	400mM NaBic	0.99	97.6	0.112	なし	0	26.3	47.4	72.2	82.8	N.A.	N.A.	N.A.
MRE- 269	200mM Ca(AC) ₂	1.09	99.4	0.126	---	0	85.9	82.4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	400mM NaAc	1.54	94.8	0.170	---	0	79.6	83.4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	400mM NaBic	1.12	92.1	0.120	---	0	100.0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Iloprost	400mM NaAC	0.94	82.5	0.090	---	0	86.9	87.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
		1.32	82.3	0.126	---	0	86.0	87.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	200mM Ca(AC) ₂	0.93	94.2	0.102	---	0	88.8	93.0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
		1.39	93.2	0.151	---	0	79.7	85.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
		1.50	92.6	0.162	---	0	90.6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
MPS	200mM Ca(AC) ₂	0.75	92.1	0.070	あり (図3B ^b)	0	1.6	N.A.	N.A.	N.A.	19.7	25.7	28.4 ^a

20

30

40

^aデータは自然対数フィッティングによって計算された*放出(%)=7.5037×Ln(time, hr)-3.699

^b図3Bは、Y. Avnirら, Fabrication Principles and Their Contribution to the Superior In Vivo Therapeutic Efficacy of Nano-Liposomes Remote Loaded with Glucocorticoids, October 2011 | Volume 6 | Issue 10から抜粋したものである。

【0116】

表 6 は、薬物装填に使用される弱酸性塩の種類に関係なく、トレプロスチニル - 、MRE-269 - 、イロプロスト - 、および MPS - リポソーム組成の EE が 80 % を超えることを示している。しかしながら、トレプロスチニル - リポソーム組成物のみがバースト放出の減少 (投与後 2 時間以内にトレプロスチニルの 60 % 未満が放出される) および I

50

V R プロファイルの延長（トレプロスチニルの 80 % 超が投与後 2 時間超 72 時間以内（すなわち 12 時間）放出される）を示す。図 3 B は、M P S - リポソーム組成物の内部水性媒体中の沈殿物の存在を示し、一方で、トレプロスチニル - リポソーム組成物の内部水性媒体は、実質的に沈殿がない（図 3 A および図 3 C）。特定の理論に縛られることなく、M P S - リポソーム組成物からの薬物放出は、内部水性媒体中の M P S とカルシウムとの間の沈殿がより長期間存在するために延長または拡張されと考えられている。したがって、治療効果を達成するために、M P S を沈殿物から完全に放出し得なかった。

【0117】

実施例 6 . 異なる T / P 比のトレプロスチニルリポソーム組成物の I V R プロファイル 3 : 2 : 0 . 075 のモル比（8 . 59 mg / mL のリン脂質）で H S P C : コレス テロール : P E G 2000 - D S P E を含むリポソーム組成物を、実施例 1 に概説された 手順に従って調製した。リポソームの平均粒子サイズは 100 ~ 140 nm または 180 ~ 200 nm（** でマーク）であり、P d I は 0 . 20 未満であった。トレプロスチニル（T R E）は、酢酸カルシウム（C a（A C）₂）、酢酸ナトリウム（N a A C）、重炭酸ナトリウム（N a B i c）、またはリジンを使用してリポソーム組成物に装填された。

10

【0118】

トレプロスチニル-リポソーム組成物の I V R プロファイルは、実施例 1 に記載の手順を使用して評価した。

【0119】

結果：

20

表 7 は、さまざまな T / P 比のトレプロスチニルリポソーム組成物の物理化学的特性と I V R プロファイルを示している。

【0120】

30

40

50

【表 7】

内部塩	[TRE]	EE (%)	T/P比 (w/w)	SLF(逆透析)での放出(%)					
	(mg/mL)			0h	2h	4h	8h	12h	24h
400mM NaAC	0.36	96.8	0.041	0	36.0	73.0	83.0	N.A.	N.A.
	0.58	94.3	0.064	0	24.0	63.0	81.0	N.A.	N.A.
	1.06	89.1	0.110	0	20.8	39.9	69.0	85.5	89.6
	1.01	91.0	0.107	0	31.1	46.7	75.8	87.3	N.A.
200mM Ca(Ac) ₂	0.59	99.8	0.069	0	30.2	67.0	76.2	77.0	89.0
	1.10	93.4	0.120	0	28.6	48.6	79.9	83.0	92.0
	1.63	91.8	0.174	0	15.7	43.9	78.9	64.3	90.6
	1.66	94.5	0.183	0	13.0	33.2	61.5	63.9	97.8
400mM NaBic	0.40	99.9	0.047	0	46.3	72.7	94.3	N.A.	N.A.
	0.53	91.2	0.056	0	37.0	54.6	84.5	N.A.	N.A.
	0.99	97.6	0.112	0	26.3	47.4	72.2	82.8	N.A.
	1.57	96.7	0.177	0	20.5	40.0	64.5	74.6	94.1
	2.12**	91.0	0.225	0	14.1	33.0	51.2	62.8	81.3*
400mM lysine	0.49	100.0	0.057	0	28.5	N.A.	93.5	N.A.	N.A.
	1.03	100.0	0.120	0	6.8	N.A.	84.5	N.A.	89.6

*データはネイチャーログ[®]フィッティング[®]によって計算された(放出(%))=21.04×Ln(time, hr)-4.639)

【0121】

表7はトレプロスチニル-リボソーム組成物(酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム、重炭酸ナトリウム、またはリジンを使用してpH勾配を達成する)は、T/P比が0.035以上の場合、バースト放出の減少(トレプロスチニルの60%未満が投与時から2時間以内に放出される)とIVRプロファイルの拡張(トレプロスチニルの80%超が投与後2時間超72時間以内(すなわち8、12、24時間)に放出される)を示すことを示唆している。

【0122】

上記の説明では、説明の目的で、実施形態の完全な理解を提供するために、多数の特定の詳細が示されている。しかしながら、当業者には、1つまたは複数の他の実施形態が、これらの特定の詳細のいくつかなしで実施され得ることが明らかであろう。本明細書全体を通して、「一つの実施形態」、「一実施形態」、序数などを示す実施形態への言及は、特定の特徵、構造、または特徴が、以下の本開示の実施に含まれ得ることを意味することも理解されたい。本記載において、本開示を合理化し、様々な発明的側面の理解を助ける目的で、様々な特徴が、単一の実施形態、図、またはその説明において一緒にグループ化されることがあること、および本開示の実施において、適切な場合、一実施形態からの1つまたは複数の特徴または特定の詳細は、他の実施形態からの1つまたは複数の特徴または特定の詳細と一緒に実施され得ること、をさらに理解されたい。

10

20

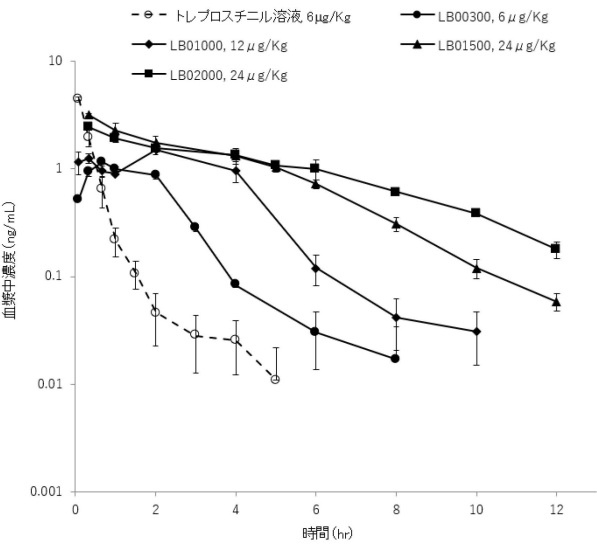
30

40

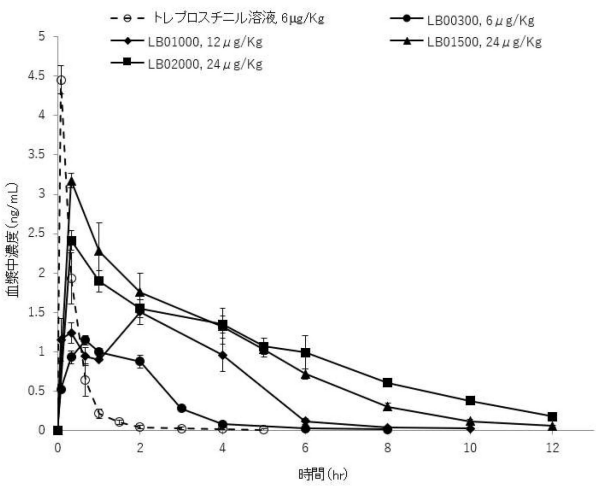
50

【図面】

【図 1 A】



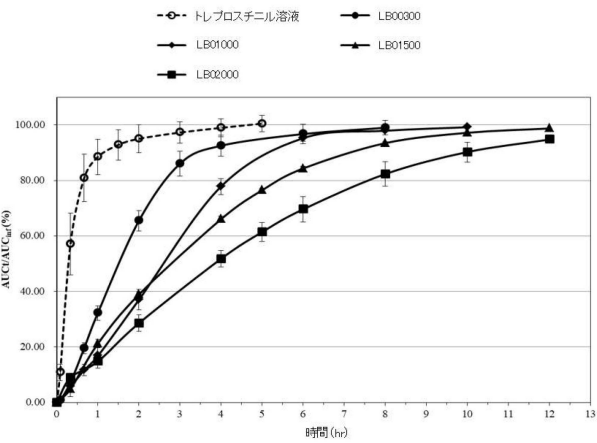
【図 1 B】



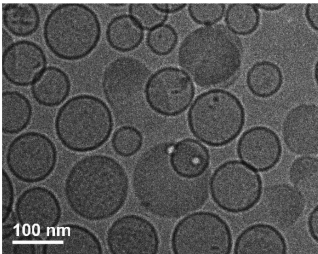
10

20

【図 2】



【図 3 A】

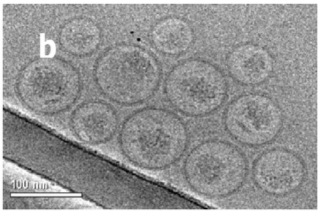


30

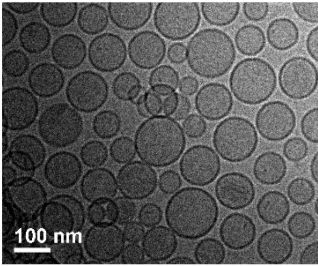
40

50

【 図 3 B 】



【 図 3 C 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

レーン 1 0 5 , ナンバー 3 , 4 エフ

(72)発明者 チェン, コ チェー

台湾, タイペイ シティ, ナンガン ディストリクト, サンチョン ロード, ナンバー 6 6 , 3 エフ
- 3

審査官 竈島 福太郎

(56)参考文献

特表 2 0 0 9 - 5 1 3 6 2 1 (J P , A)

国際公開第 1 9 9 6 / 0 2 5 1 4 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 2 3 0 9 2 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 1 9 2

A 6 1 K 9 / 1 2 7

A 6 1 K 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 2

A 6 1 K 4 7 / 1 2

A 6 1 K 4 7 / 1 8

A 6 1 K 4 7 / 2 4

A 6 1 K 4 7 / 2 8

A 6 1 P 1 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)