

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年12月29日 (29.12.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/123078 A1

(51)国際特許分類⁷: A61K 31/4745,
9/127, 47/12, 47/24, 47/28, A61P 35/00

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/011158

(22)国際出願日: 2005年6月17日 (17.06.2005)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2004-181408 2004年6月18日 (18.06.2004) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): テルモ株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号 Tokyo (JP). 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 吉野 敬亮 (YOSHINO, Keisuke) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 野沢 滋典 (NOZAWA, Shigenori) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 緒方嘉貴 (OGATA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 黒崎 靖夫 (KUROSAKI, Yasuo) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 澤田 誠吾 (SAWADA, Seigo) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本

社内 Tokyo (JP). 加藤 幾雄 (KATO, Ikuo) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 松崎 健 (MATSUZAKI, Takeshi) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

(74)代理人: 渡辺 望穂, 外 (WATANABE, Mochitoshi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドンスノート」を参照。

(54)Title: LIPOSOME PREPARATION CONTAINING SLIGHTLY WATER-SOLUBLE CAMPTOTHECIN

(54)発明の名称: 水難溶性カンプトテシン含有リポソーム製剤

(57)Abstract: The invention aims at providing a slightly water-soluble camptothecin liposome preparation which permits long-term stable retention of a slightly water-soluble camptothecin therein to thereby inhibit the α -hydroxylactone ring from hydrolysis in blood and keep the camptothecin in the cyclic state contributing to the antitumor activity and which is improved in the releasability of the camptothecin from liposome and is therefore so excellent in the residence of the camptothecin in blood that the concentration of the camptothecin in plasma can be kept for a long time after administration. This aim is attained by a liposome preparation which contains a fatty acid and a phospholipid as the lipid components constituting the membrane and a slightly water-soluble camptothecin as the drug.

(57)要約: 本発明の目的は、水難溶性カンプトテシン化合物を長期間安定的に保持することができ、これにより血中での α -ヒドロキシラクトン環の加水分解が抑制され、水難溶性カンプトテシン化合物が抗腫瘍活性の薬剤として有効な開環しない構造に保たれるとともに、該薬剤のリポソームからの易離脱性が改善され、投与後の血漿中薬剤濃度を長時間維持することができる血中滞留性に優れた水難溶性カンプトテシンリポソーム製剤を提供することにある。下記に記載のリポソーム製剤により上記目的が達成される。本発明に係るリポソーム製剤は、膜を形成する脂質成分としてリン脂質とともに脂肪酸を含み、かつ薬剤として水難溶性カンプトテシン化合物を含有するリポソーム製剤である。

WO 2005/123078 A1

明細書

水難溶性カンプトテシン含有リポソーム製剤

技術分野

[0001] 本発明は、薬剤として特に水難溶性カンプトテシン化合物を含有するリポソーム製剤に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、薬剤を安全にかつ効率よく目的病巣部位に送達・分布させるドラッグデリバリーシステム(DDS)が盛んに研究されており、その方法のひとつとして、リポソームを薬剤の運搬ツール(担体)として利用することが検討されている。リポソームはリン脂質の脂質二重層(lipid bilayer)膜で形成される閉鎖小胞の水性分散液であり、小胞の中心室内は水性環境(内水相)である。これまでに様々な薬剤のリポソーム化が研究されている。薬剤のリポソーム化において、水溶性薬剤は主として水性環境の中心室内に保持され、一方、水難溶性薬剤は主として油性環境である脂質膜層に担持され、保持される。リポソーム膜の研究も行われており、たとえばリポソーム小胞内に封入したウロキナーゼなどの水溶性薬剤の保持率を改善するために膜成分として高級脂肪酸、好ましくはオレイン酸を含ませることが提案されている(特許文献1参照)。

[0003] ところで、癌治療に用いられる医薬品のカテゴリーの一つに、トポイソメラーゼ阻害剤があり、その例に、カンプトテシン(camptothecin)がある。カンプトテシンは、1966年に米国のWallらによって中国原産の植物:喜樹(Camptotheca acuminata)から抽出・単離された5環状アルカロイドであり、高い抗腫瘍活性と広い抗腫瘍スペクトルを有することが見出された(非特許文献1参照)。従来の癌化学療法剤がII型トポイソメラーゼ阻害により抗腫瘍活性を発現するのに対し、カンプトテシンは、I型トポイソメラーゼを阻害することにより、DNAの複製、修復、遺伝子組換えおよび転写で役割を演じるトポイソメラーゼ酵素の作用を阻害する。

[0004] 抗腫瘍活性を有するカンプトテシン類縁化合物もいくつか知られており、たとえばカンプトテシン(後述の化学式(1)参照)の7-位に置換基を有するカンプトテシン誘導体たとえば7-(β -トリメチルシリル)エチルカンプトテシン(特許文献2参照)、7-(t-ブ

トキシ)イミノメチルカンプトテシン(特許文献3参照)、さらにはイリノテカン(CPT-11)のカルボキシエステラーゼによる活性代謝物(活性本体)である7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)が知られている。そのものが抗腫瘍活性種であるこれらカンプトテシン類縁化合物は、水溶性プロドラッグのイリノテカンと異なって、水不溶性もしくは水難溶性である。しかし、これらが分子内にもつ α -ヒドロキシラクトン環は、水性環境に感受性があり、血液中などのpHの高い水性環境では加水分解を受けて開環する。カンプトテシンおよびその類縁化合物は、 α -ヒドロキシラクトン環が開環すると、本来の抗腫瘍活性を示さない(非特許文献2参照)。

[0005] このような課題を解決し、カンプトテシンまたは水不溶または難溶性の類縁化合物(以下、これらを水難溶性カンプトテシン化合物と総称することもある)を安定的にかつ効率よく病巣部位に送達し、目的病巣部位において抗腫瘍活性を発現させるための一つのアプローチとして、上記リポソーム化が考えられる。

カンプトテシンのリポソーム化もいくつか報告されており、カンプトテシンをリポソームに含有させることで α -ヒドロキシラクトン環の加水分解を抑えることが報告されている(非特許文献3~4、特許文献4など参照)。

[0006] カンプトテシンのリポソーム化では、水性環境に親和性のない水難溶性カンプトテシン化合物は、上記したように脂質膜層に担持されると考えられている。しかしながら抗腫瘍活性種のカンプトテシン化合物は、親油性あるいは脂溶性とされているにも拘らず、脂質膜への親和性に乏しく、膜中に安定化することが困難であることが知られており、このため、そのリポソーム製剤は薬剤の保持性に劣り、血中滞留性に劣るという課題がある。このようなリポソーム製剤を血中投与すると、水難溶性カンプトテシン化合物は、リポソームから速やかに離脱して血流中に放出されるだけでなく、血管壁に付着するなどにより血中から速やかに消失してしまうことから、血漿中濃度を長時間維持することが困難となる。

[0007] カンプトテシンのリポソーム化例として、N-グルタルフォスファチジルエタノールアミン(N-glutaryl phosphatidyl ethanolamine)を添加してリピッドコンプレックス化することが提案されており(特許文献5、非特許文献5参照)、それによれば、脂質膜への親和性に乏しいカンプトテシンを高担持化しうることが示されているが、そこに示される

該リピッドコンプレックスのマウスへの投与による血中からの消失速度は速い。

- [0008] またイリノテカンの活性本体である上記SN-38のリポソーム化剤についての血中滞留性が報告されている。マウスの例として、SN-38リポソーム投与直後から血中でのSN-38濃度は急激に減少し、血漿中SN-38濃度を維持することが困難であったとの報告がある(非特許文献6参照)。

高速液体クロマトグラフィを用いたSN-38の血漿中濃度の定量分析により、又についてSN-38の血漿中濃度を維持することは困難であったことを報告する例もある(非特許文献7参照)。

特許文献1:特開昭60-155109号公報

特許文献2:特表2001-511807号公報

特許文献3:特表2002-539128号公報

特許文献4:特表平9-504517号公報

特許文献5:米国特許第5834012号明細書

非特許文献1:Hans-Georg Lerchen, Drugs Fut, 27(9), 2002, 869-878

非特許文献2:Am.Chem.Soc.,94, 1966, 388

非特許文献3:Tomas G. Burkeら、J.Am.Chem.Soc. 114, 1992,8318-8319

非特許文献4:Tomas G. Burkeら、Biochemistry, 32, 1993, 5352-5364

非特許文献5:Cancer Chem. Pharm. 37, 1996, 531-538

非特許文献6:Joshua Williamsら、Journal of Controlled Release 91, 2003, 167-172

非特許文献7:W.Guoら、Journal of Chromatography B,791, 2003, 85-92

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 水難溶性カンプトテシン化合物を長期間安定的に保持することができ、これにより血中での α -ヒドロキシラクトン環の加水分解が抑制され、水難溶性カンプトテシン化合物が抗腫瘍活性の薬剤として有効な閉環しない構造に保たれるとともに、該薬剤のリポソームからの易離脱性が改善され、投与後の血漿中薬剤濃度を長時間維持することができる血中滞留性に優れたリポソーム製剤が望まれている。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者は、薬剤として特に水難溶性カンプトテシン化合物を含むリポソーム製剤の薬剤保持性および血中滞留性について検討するうちに、リポソームに脂肪酸を含ませることにより、水難溶性カンプトテシン化合物の保持性を大きく改善することができ、薬剤の徐放性が改善されることを見出した。このことは、この脂肪酸が、血中ににおいて、血中タンパク質による引き抜き作用を受けることにより、同様のメカニズムによる水難溶性カンプトテシン化合物の引き抜きを競合阻害する結果として、水難溶性カンプトテシン化合物の保持性が大きく改善されると考えられる。リポソーム製剤中の上記脂肪酸量が薬剤よりも多量であると、競合阻害効果はより顕著である。また、脂肪酸を含有することにより膜に柔軟性が付与されたためと推定され、これにより、本来、脂質膜への安定性に劣る水難溶性カンプトテシン化合物の膜への安定化が達成され、保持性が向上したとも推定される。
- [0011] さらに、このリポソーム製剤において、親水性高分子鎖とりわけポリエチレングリコールによる膜表面の修飾は、血中滞留性の向上に寄与するという知見も得られた。なお、従来リポソームの血中動態を改善し、血中滞留性を向上させる方法として、親水性高分子鎖による膜表面の修飾が、特にリポソームに含有させる薬剤が本質的に小胞内に保持される水溶性薬剤において知られている。水難溶性薬剤についても、脂質膜との親和性があり、血中でも薬剤がリポソームに保持されている薬剤であれば、血中滞留性向上効果が得られることは、たとえば水難溶性薬剤Paclitaxelのリポソーム製剤について、ポリエチレングリコール-フォスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)の膜修飾により、血中滞留性が飛躍的(約5倍)に向上したとする報告がある(J. of Controlled Release 63, 2000, 19-30)。しかしながら、水難溶性カンプトテシン化合物のリポソーム化において、脂肪酸を含ませない通常の膜からなるリポソームにおけるPEG-PE膜修飾による血中滞留性の向上は、比較例として後述するように顕著なものでなく、それだけでは、製剤実施化上、充分といえるような効果は得られないことが確かめられている。
- [0012] また水難溶性カンプトテシン化合物を含むリポソーム製剤を小径化する場合、リポソーム整粒方法として一般的な膜通過法を適用すると、担持させた薬剤が膜通過時に脂質膜から離脱しやすく、特にエクストルーダーの孔径が300nm程度以下の小径で

は、整粒時に薬剤が脱離する傾向にあることがわかった。この知見に基づいてさらに検討し、薬剤が特に水難溶性カンプトテシン化合物であるリポソーム製剤の場合には、高压ジェット流化したリポソーム製剤(分散液)同士の液-液衝突(剪断)によるなど、高い乳化エネルギーを印加できる整粒化法が、薬剤を安定的に保持した小粒径のリポソーム製剤を得るのに好適であることを見出した。これらから、上記課題を解決するものとして、以下のような本発明が提供される。

- [0013] (1) 膜を形成する脂質成分としてリン脂質とともに脂肪酸を含み、かつ薬剤として水難溶性カンプトテシン化合物を含有するリポソーム製剤。

上記水難溶性カンプトテシン化合物は、20(S)-カンプトテシンまたはその7-位に置換基を有する水難溶性誘導体である。具体的に下記(2)に例示される。

(2) 上記水難溶性カンプトテシン化合物は、20(S)-カンプトテシン、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)、7-(β -トリメチルシリル)エチルカンプトテシンまたは7-(t-ブトキシ)イミノメチルカンプトテシンである上記(1)のリポソーム製剤。

- [0014] (3) 上記脂肪酸が飽和脂肪酸である上記(1)または(2)のリポソーム製剤。

(4) 上記飽和脂肪酸のアルキル鎖長が14~18である上記(3)のリポソーム製剤。

本発明において、特に好ましい脂肪酸はステアリン酸である。

- [0015] (5) 上記リン脂質が水素添加リン脂質である上記(1)~(4)のいずれかのリポソーム製剤。

上記リン脂質としてスフィンゴリン脂質も好ましく挙げられる。

- [0016] (6) 上記脂質成分として、リン脂質および脂肪酸とともに、少なくとも1の他の脂質をさらに含む上記(1)~(5)のいずれかのリポソーム製剤。

(7) 上記他の脂質がコレステロールである上記(6)のリポソーム製剤。

- [0017] 本発明において膜を構成する脂質成分の好ましい組成例として、リン脂質が水素添加リン脂質であって、該水素添加リン脂質および脂肪酸とともに、さらにコレステロールを含む態様が好ましく挙げられる。

- [0018] (8) 上記膜が修飾基を有する上記(1)~(7)のいずれかのリポソーム製剤。

(9) 上記修飾基が、親水性高分子鎖および/またはカルボン酸である上記(8)に記載のリポソーム製剤。

(10) 上記親水性高分子鎖が、ポリエチレングリコール鎖である上記(9)に記載のリポソーム製剤。

上記ポリエチレングリコール(PEG)鎖は、通常、500～10000ダルトン程度である。

[0019] 親水性修飾基の導入された脂質誘導体の具体例としては、ポリエチレングリコールを連結したフォスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)、ポリエチレングリコールを連結したコレステロール(Chol-PEG)などが挙げられる。

[0020] 本発明に係るリポソーム製剤では、特に薬剤と膜を構成する脂質成分との量比、脂質成分中の脂肪酸の量比は以下が好ましい。

(11) 上記リポソーム製剤の薬剤／脂質mol比が0.001～0.1以下である上記(1)～(10)のいずれかのリポソーム製剤。

(12) 上記脂肪酸を、上記脂質成分の合計mol中、1～30mol%含有する上記(1)～(11)のいずれかのリポソーム製剤。

上記脂肪酸の含有量は、好ましくは5mol%以上であり、より好ましくは10mol%以上、さらに好ましくは12mol%以上である。またその上限は、26mol%以下とすることが好ましい。

[0021] (13) 上記(1)～(12)のいずれかのリポソーム製剤の平均粒子径は、好ましくは50～300nmであり、より好ましくは70～200nm、さらに好ましくは90～150nmである。特に平均粒子径は140nm以下であることが好ましい。

[0022] (14) 上記リポソーム製剤が、グリセリン存在下の凍結による透過型電子顕微鏡観察において、非球形の異形粒子である上記(1)～(13)のいずれかのリポソーム製剤。

[0023] (15) 上記リポソーム製剤が、上記脂質成分と、上記水難溶性カンプトテシン化合物とを攪拌して調製したリポソーム分散液に、高压液流化した該リポソーム分散液同士で衝突することにより整粒化処理が施されたものである上記(1)～(14)のいずれかのリポソーム製剤。

[0024] (16) 上記(1)～(15)のいずれかのリポソーム製剤を含有する医薬組成物。

[0025] (17) 予防および／または治療有効量の(1)～(15)のいずれかのリポソーム製剤を宿主に投与することからなる、疾患の予防および／または治療方法。

(18) (1)～(15)のいずれかのリポソーム製剤を宿主に投与することからなる、有効量の薬剤および／またはその塩を宿主内で放出する方法。

(19) (1)～(15)のいずれかのリポソーム製剤を宿主に投与することからなる、有効量の薬剤および／またはその塩を標的部位に暴露する方法。

発明の効果

[0026] 上記のような本発明に係るリポソーム製剤は、そこに含有させた活性種形態の薬剤（抗腫瘍活性剤）である水難溶性カンプトテシン化合物を安定的に保持性することができ、かつ該リポソーム製剤は血中滞留性に優れている。したがって薬剤の徐放性に優れ、投与後に、 α -ヒドロキシラクトン環の加水分解を抑え、すなわち薬剤活性のある構造状態で血液中に長期間存在させることができ、投与後に長時間血漿中薬剤濃度を維持することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明のSN-38含有リポソーム(HSPC:Chol:SA=7:7:5)を、凍結割断レプリカ法を用いた電子顕微鏡観察による撮像を示す図である。

[図2]比較例1で調製されたSN-38含有リポソーム(HSPC:Chol:SA=7:7:0)を、凍結割断レプリカ法を用いた電子顕微鏡観察による撮像を示す図である。

[図3]マウスにおけるSN-38含有リポソームの静脈注射後の経過時間と血漿中のSN-38濃度の関係を示す図である。

[図4]本発明のSN-38含有リポソーム(HSPC:Chol:SA=7:7:5)について、2週間の製剤加速安定性試験の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0028] 以下、本発明をより詳細に説明する。

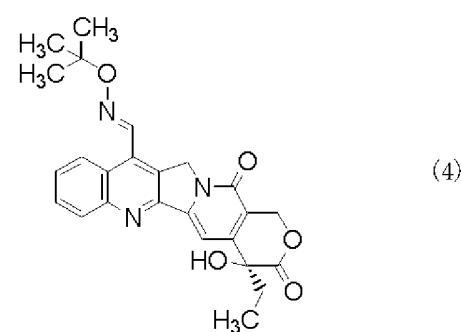
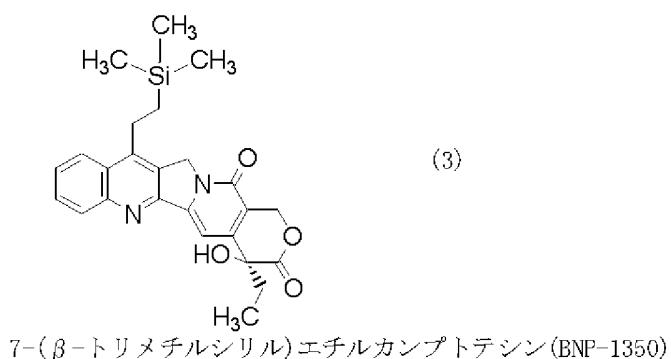
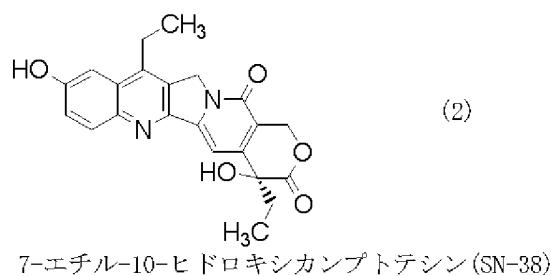
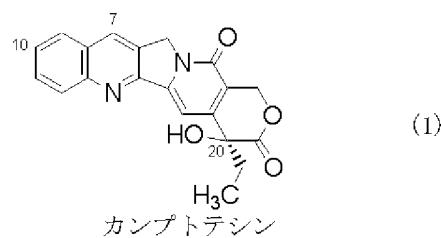
本発明のリポソーム製剤は、膜を形成する脂質成分としてリン脂質とともに脂肪酸を含み、かつ薬剤として水難溶性カンプトテシン化合物を含有するリポソーム製剤である。

リポソームは、リン脂質二重膜からなり、脂質の疎水性基と親水性基との極性に基づいて生ずる膜により外界から隔てられた空間を形成する構造を有する閉鎖小胞の水性分散液である。膜を隔てて閉鎖小胞内外の水相は、それぞれ内水相、外水相と

称される。リポソーム製剤は、リポソームを担体とし、これに薬剤を担持させたものをいう。本発明では、このリポソームに、薬剤として水難溶性カンプトテシン化合物を担持させる。なお、本発明におけるリポソームの構造は、様々な形態をとることができ、その構造は特に限定されない。

- [0029] 本発明において、「水難溶性カンプトテシン化合物」は、水に不溶もしくは難溶のカンプトテシン骨格を有する化合物の総称である。具体的には、下記式(1)で示される20(S)-カンプトテシンまたはその7-位に置換基を有する水難溶性の誘導体、なかでも親油性もしくは脂溶性を示す誘導体が挙げられる。このような誘導体としては、たとえば下記式(2)で示される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(7-ethyl-10-hydroxy camptothecin) (SN-38と称される)、下記式(3)で示される7-(β -トリメチルシリル)エチルカンプトテシン(BNP-1350と称されることもある)、下記式(4)で示される7-(t-ブトキシ)イミノメチルカンプトテシン(GimatecanまたはST-1481と称されることもある)などが挙げられる。

- [0030] [化1]



[0031] これら化合物は、それ自体が抗腫瘍活性を示す薬剤として知られている。また、たとえば前記特許文献2～3および非特許文献2などに記載された親油性または脂溶性のカンプトテシン誘導体を、本発明の薬剤として挙げることもできる。

各化合物そのものは、上記特許文献の記載を参照して製造することができ、市販品として入手可能なものもある。

これらのうちでも7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)が好ましい。SN-

38は、ヤクルト本社(株)から入手することができる。以下、水難溶性カンプトテシン化合物を薬剤と代称することがある。

- [0032] 上記薬剤を担持するリポソームの膜基材であるリン脂質は、生体膜の主要構成成分であり、分子内に長鎖アルキル基より構成される疎水性基とリン酸基より構成される親水性基のグループを持つ両親媒性物質である。リン脂質としては、fosfathiglycerin(レシチンと称するときもある)、fosfatidylglycerol、fosfatidylcholine、fosfatidylethanolamine、fosfatidylserine、fosfatidylglycerol等の天然あるいは合成のリン脂質もしくはこれらの誘導体、糖類を結合させた誘導体(糖脂質)およびこれらを常法にしたがって水素添加した水素添加リン脂質などを挙げることができる。

これらのうちでも、水素添加大豆fosfatidylcholine(HSPC)などの水素添加リン脂質、Sphingomyelin(SM)等が好ましい。

膜基材として、單一種のリン脂質を含んでいてもよく、複数種のリン脂質を含んでいてもよい。

- [0033] 本発明におけるリポソームは、膜脂質成分として上記リン脂質とともに、特に脂肪酸を必須成分として含む。この脂肪酸は、炭素数10～20の高級脂肪酸であることが好ましく、具体的にはカプリン酸、ラウリン酸、ミリストン酸、ペントデシル酸、パルミチン酸、ヘptaデシル酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などが挙げられる。これらのうちでも飽和脂肪酸が好ましく挙げられる。特にアルキル鎖長が14～18である飽和脂肪酸が好ましい。特にステアリン酸が好ましい。脂肪酸は、單一種でも、または2以上でもよい。なお、炭素数が28を超えると生体への適合性低下が危惧されることから、脂肪酸の炭素数は28個以下が望ましい。

- [0034] 上記脂肪酸の含有率は、脂質成分の合計(総脂質)mol中、通常、1～30mol%である。水難溶性カンプトテシン化合物の膜中への安定化保持効果をより確実にするために、脂肪酸の含有率は、好ましくは5mol%以上であり、より好ましくは10mol%以上、さらに好ましくは12mol%以上である。リポソーム膜の安定性の面から、含有率の上限は26mol%以下が望ましい。

なお本明細書において、「総脂質」とは、リポソームが、以下に示す他の脂質を含む場合には、これらもその中に含まれる。

- [0035] 本発明では、本発明の目的を損なわない範囲で他の成分を含むことができる。たとえば上記リン脂質および脂肪酸とともに、上記膜構造を保持しうるものであって、リポソームに含むことができる他の膜成分を含むことができる。他の膜成分としては、特に限定されないが、分子内に長鎖アルキル基等より構成される疎水性基を有し、リン酸基を分子内に含まない脂質、たとえばグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質およびコレステロールまたはその誘導体およびこれらの水素添加誘導体などを挙げることができる。他の膜成分は、一種でも、複数種含んでいてもよい。

コレステロール誘導体は、シクロペンタノヒドロフェナントレン環を有するステロール類であり、たとえば、コレスタン醇が挙げられる。

これらのうちでも、コレステロールは、膜安定化効果があり、コレステロール量によりリポソーム製剤の血漿中での薬剤放出率を調節しうる効果が期待される。このため、コレステロールを含むことが好ましく、脂質成分の合計(総脂質)mol中、通常50mol%程度までの量で含むことが望ましい。コレステロール含有率は、好ましくは20~50mol%、より好ましくは30~50mol%、さらに好ましくは35~50mol%である。

- [0036] また、膜を構成する脂質の物性を変化させ、膜に所望の特性を付与するため、膜が修飾されていてもよい。具体的には、脂質膜に親和性のある疎水性本体に修飾基が連結された誘導体を膜中に含むことができ、疎水性本体は、通常、脂質である。この脂質部分は、リン脂質またはリン脂質以外の脂質のいずれか、またはどちらもあつてよく特に限定されない。たとえばリン脂質、長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキル、またはグリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。

修飾基としては、特に限定されないが、親水性高分子鎖、荷電性基、水溶性多糖類などの親水性基が挙げられ、これらの1種または2種以上の組合せでもよい。

- [0037] 親水性高分子としては、特に限定されないがポリエチレングリコール、フィコール、ポリビニルアルコール、ステレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニル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アクリラミド、ポリメタアクリラミド、ポリジメチルアクリラミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、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、ポリアスパルトアミド、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。

これらの中でも、ポリエチレングリコール(PEG)は、血中滞留性を向上させる効果があり、好ましい。PEGの分子量は、特に限定されないが、通常、500～10,000ダルトン、好ましくは1,000～7,000ダルトン、より好ましくは2,000～5,000ダルトンである。

[0038] なお本発明において、「血中滞留性」とは、薬剤が担持されたリポソーム製剤を投与した宿主において、該リポソーム製剤に担持された薬剤が血液中に存在する性質を意味する。薬剤がリポソームから放出されると速やかに血中から消失し、薬剤が暴露した部位へ作用する。血中滞留性が良いと、より少ない量の薬剤を投与することが可能となる。

上記親水性高分子の膜修飾により生体内におけるリポソームの問題、つまり血液中のオプソニン蛋白質または血漿蛋白質との相互作用(吸着)による凝集、あるいは肝臓、脾臓等の細網内皮系組織(RES)での捕捉を回避することが可能となり、血中安定性を高め、標的とする組織や細胞への選択性の高い送達が可能になる。すなわち、高い血中滞留性が得られる。これにより、腫瘍組織の血管透過性が亢進した組織に受動的に集積させることが可能となる。

[0039] 上記のようなPEGによる膜修飾は、PEGを含む修飾剤の使用、あるいは官能基を持たせた膜構成脂質とPEGとの反応による付加などにより行うことができ、特に制限されないが、PEGを含む修飾剤たとえばPEGのリン脂質誘導体および／またはコレステロール誘導体の使用による導入が好ましい。

具体的には、ポリエチレングリコールを連結したフォスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)、ポリエチレングリコールを連結したコレステロール(Chol-PEG)などが挙げられる。また、脂質部分がリン脂質であるときは、リン脂質のアシル鎖は、飽和脂肪酸であることが望ましく、またアシル鎖の鎖長はC₁₄～C₂₀、さらにはC₁₆～C₁₈であることが望ましい。具体的には、ジパルミトイル、ジステアロイルあるいはパルミトイ尔斯テ

アロイルである。

これらのうちでも、PEG-PEは汎用化合物であり、入手容易である。

上記親水性高分子鎖による膜修飾率は、該親水性高分子鎖を含まない総脂質に対する比率で、通常0.1～20mol%とすることができ、好ましくは0.1～5mol%、より好ましくは0.5～5mol%である。

- [0040] 荷電性基は、特に限定されないが、アミノ基、アミジノ基、グアジニノ基などの塩基性官能基、酸性官能基などが挙げられ、これら基を含む荷電物質で導入することができる。

塩基性官能基を有する荷電物質としては、特開昭61-161246号公報に開示されたDOTMA、特表平5-508626号公報に開示されたDOTAP、特開平2-292246号公報に開示されたトランスフェクタム(Transfectam)、特開平4-108391号公報に開示されたTMAG、国際公開第97/42166号パンフレットに開示された3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩、DOSPA、TfxTM-50、DDAB、DC-C HOL、DMRIEなどが挙げられる。

酸性官能基を有する荷電物質としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGM3等のシアル酸を有するガングリオシド類、N-アシル-L-グルタミン等の酸性アミノ酸系界面活性剤などが挙げられる。

- [0041] 上記荷電物質が、脂質に、塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合には、カチオン化脂質と称される。カチオン化脂質の脂質部分はリポソームの脂質二重膜中に安定化され、塩基性官能基部分は担体の脂質二重層の膜表面上(外膜表面上および/または内膜表面上)に存在することができる。カチオン化脂質で膜を修飾することにより、リポソーム膜と細胞との接着性等を高めることができる。

- [0042] 水溶性多糖類としては、特に限定されないが、たとえばグルクロン酸、シアル酸、デキストラン、プルラン、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどの水溶性多糖類などが挙げられる。水溶性多糖類の誘導体は、糖脂質などが挙げられる。

上記荷電物質、水溶性多糖類による膜修飾率は、必要に応じて適宜設定することができる。

[0043] 本発明において、上記のようなリポソームへの水難溶性カンプトテシン化合物の担持量、すなわちリポソーム製剤の薬剤／脂質mol比は、水難溶性カンプトテシン化合物がリポソーム膜に含有されることから、リポソームの安定性および封入効率の観点上、通常、0.1以下であり、好ましくは0.001～0.03である。また水難溶性カンプトテシン化合物／脂肪酸mol比は、1.0より少ないものであると、前述した血中タンパク質による引き抜き作用に基づく競合阻害の効果がより明確となる。

このリポソームへの薬剤担持あるいはリポソーム製剤の薬剤含有とは、リポソーム製剤(分散液)中、薬剤がリポソームに担持され、保持されて存在する状態を意味し、リポソームに保持されてない薬剤、すなわち分散液の外水相部分には、リポソームとは関係なく自由に存在する薬剤は本質的に含まないことを意味する。水難溶性カンプトテシン化合物を薬剤とする本発明のリポソーム製剤では、実質的に、薬剤の少なくとも一部が脂質膜内に含まれるなどして膜に担持されていると考えられるが、本発明のリポソーム製剤は、外水相部分に自由な薬剤が存在しなければよく、薬剤の担持状態は限定されない。たとえば薬剤を、膜と関係なく内水相に内包していてもよく、また膜による担持／内包の両方によるであってもよい。

[0044] 本発明に係るリポソーム製剤は、グリセリン存在下で凍結して透過型電子顕微鏡で観察した場合、非球形の異形粒子として観察されることが特徴的である。なお脂肪酸を含まないリポソーム(製剤)は、同方法により、そのままの球形で観察される。

リポソームの脂質二重膜構造は、ユニラメラ小胞(Small Unilamellar Vesicle,SUV、Large Unilamellar Vesicle,LUV)および複数枚からなる多重ラメラ小胞(Multilamellar Vesicle, MLV)の膜構造のいずれでもよいが、MLVが好ましい。

[0045] 本発明のリポソーム製剤は、25%グリセリン存在下における凍結割断レプリカ法による電子顕微鏡写真による観察では非球形を示すものであるが、その大きさは、光散乱回折式粒度分布計により全粒子の平均粒子径として測定することができる。この平均粒子径は、好ましくは50～300nmであり、より好ましくは70～200nm、さらに好ましくは90～150nmである。特に抗腫瘍活性を細胞内で発現させるために細胞内への薬剤導入効率を考慮すれば、平均粒子径は140nm以下であることが望ましい。

[0046] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される安定化剤および

／または酸化防止剤をさらに含むものであってもよい。安定化剤としては、特に限定されないがグリセロールまたはスクロースなどの糖類が挙げられる。酸化防止剤としては、特に限定されないがアスコルビン酸、尿酸あるいはトコフェロール同族体例えばビタミンEなどが挙げられる。トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが本発明においてはいずれも使用できる。

[0047] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される添加物をさらに含むものであってもよい。このような添加物の例として、水、生理食塩水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、PBS、生体内分解性ポリマー、無血清培地、医薬添加物として許容される界面活性剤あるいは生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0048] 本発明では、これら添加物を含む態様のリポソーム製剤を、医薬組成物として供することができる。本発明の医薬組成物は、通常の方法、たとえば0～8°Cでの冷蔵あるいは1～30°Cの室温で保存することができる。

[0049] 上記のようなリポソーム製剤は、薬剤を安定的に担持することができる範囲において、公知のリポソーム製剤化方法を広く用いることができる。なお以下に説明する分散、整粒の各工程はいずれも膜形成脂質の相転移温度以上で行われることが好ましい。

本発明では、リポソーム製剤(分散液)の調製方法は、特に制限されないが、予め薬剤と脂質との混合材料を調製して、リポソーム分散液を調製することが好ましい。この分散液は、混合材料の超音波分散物、機械的攪拌物などでもよい。さらに、製品名：クレアミックスsingleなどのホモジナイザーを用いたジェット流分散物でもよい。

[0050] 本発明では、平均粒子径の小径化、あるいは粒子径の均質化が望まれる場合には、前記したリポソーム分散液の調製(以下、予備分散ということがある)に引き続いて、該リポソーム製剤(分散液)を、高圧ホモジナイザーにより液一液剪断をかけながら整粒化する方法を採用することができる。具体的に、リポソーム分散液を高圧吐出して、高圧流同士の衝突により、湿式粉碎する高圧吐出型乳化法(寺田、吉村ら「ライフサイエンスにおけるリポソーム」シュプリンガー・フェアラーク東京、1992:ここにある説明を引用して本明細書に記載された説明とすることができる)である。高圧吐出型乳化機、たとえば製品名マイクロフルイダイザー(マイクロフルイデックス社)を使用することができる。また高圧吐出型乳化機の他には、ジェット流乳化機、たとえば製品名クレアミックスDouble motion(エムテクニック社製)などの高圧ホモジナイザーを用いることができる。

平均粒子径の所望値が、300nm以下、さらには200nm以下、特には150nm以下の小径となるほど、上記高圧ホモジナイザーによる整粒化が望ましい。

[0051] リポソーム分散液の整粒化にあたって高圧ホモジナイザーを用いる際には次の点に留意する必要がある。水難溶性カンプトテシン化合物は、本質的に脂質膜との相互作用が弱いため、これを確実に脂質膜に封じ込め、保持させるには、高い乳化エネルギーを必要とする。高いエネルギーを印加できない乳化法、たとえばリポソームの整粒化方法として一般的なエクストルーダーなどを用いる膜乳化法、エーテル注入法、逆相蒸発法では、乳化時に薬剤が沈殿するなど、効率よく脂質膜に保持することが困難な傾向にある。またリポソーム製剤は、通常、整粒化処理された製品であることが望まれるが、特に小径化あるいは均質化した粒子径のリポソーム製剤を得る場合には、高い乳化エネルギーが必要である。乳化エネルギーの高い方法としては、高圧吐出型乳化法、ジェット流乳化法が挙げられ、特に高い剪断力を印加できる乳化・整粒化方法が好適である。

[0052] 本発明のリポソーム製剤は、その薬剤性能から、リポソームに担持されない薬剤を外水相に含まない製品であることが望まれる。このため、通常、リポソームに担持されなかった薬剤をリポソーム製剤から除去するための工程を経て供され、この工程は、通常整粒化処理後に実施される。具体的には、調製したリポソーム製剤を、ゲルろ過

、透析、膜分離および遠心分離などの精製方法により、リポソーム製剤に担持されなかつた薬剤を除去することができる。

- [0053] 本発明のリポソーム製剤は、薬剤を含む状態で標的部位まで到達し、その結果それが含む薬剤を標的部位まで送達する。薬剤の標的部位への送達は、リポソーム製剤に含まれる薬剤を標的部位へ取り込ませることであってもよいし、標的部位に取り込まれずとも薬剤の影響を標的部位またはその近傍へ及ぼすことであってもよい。
- 本発明において、「標的部位」とはリポソーム製剤が含有する薬剤が放出されて作用する特定の部位であり、部位ごとに特定された細胞、組織、器官または臓器およびそれらの内部を意味する。細胞、組織、器官または臓器およびそれらの内部などの標的部位は薬剤による治療の対象となる部位ができる、放出された薬剤が暴露することにより、その効果を発揮する。標的部位としては、特に限定されないが腫瘍が挙げられる。
- [0054] 治療の対象となる腫瘍としては、特に限定されないが固形腫瘍であり、具体的には食道癌、胃癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、胰臓癌、肝臓癌、喉頭癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、子宮癌または卵巣癌が挙げられる。標的部位は、腫瘍の細胞、組織、器官または臓器およびそれらの内部などである。したがって、本発明において、疾患とは前記の腫瘍を意味し、薬剤はそれらに対し抗腫瘍効果を示すことが期待される。
- [0055] 本発明において、「暴露」とは、リポソームの外部へ放出された薬剤が外部環境へ作用を及ぼすことを意味する。具体的には、放出された薬剤は標的部位に近接し、接触することによりその作用である抗腫瘍効果を発揮する。薬剤が標的部位に作用することにより、標的部位のDNA合成が行われている細胞周期にある細胞に局所的に作用し、期待された効果を示す。このような効果を示すために、リポソーム製剤からの薬剤の放出率とリポソーム製剤の血中滞留性との均衡を保つ必要がある。
- [0056] 本発明において、「放出」とは、リポソーム製剤に含まれる薬剤がリポソームの脂質膜を通過することにより、または脂質膜の一部の構造が変わることによりリポソームから離脱することを意味する。

本発明のリポソーム製剤中に含まれる薬剤は、血漿中において、長時間高濃度で

標的部位に暴露されることで強い抗腫瘍活性を示すことから放出を制御することが重要となる。

「放出率」とは、薬剤を担持したリポソームから離脱する薬剤と、リポソームに担持されたままの薬剤との比率(重量比またはmol比)をいう。「放出率が低い」とは単位時間あたりにリポソームから離脱した薬剤量が少ないことを意味する。

放出率は、本発明の担体を遠心にて沈降させ、上清(血漿)に存在する薬剤の量と担体を測定することにより計算することができる。

後述の実施例に示されるように、本発明のリポソーム製剤は、所定時間内での薬剤放出率が低いことが認められた。

[0057] 本発明のリポソーム製剤は、血漿中の薬剤濃度を高濃度で維持することができる。従来のリポソーム製剤は、血液中から速やかに消失するため、標的部位での暴露時間が短く、充分な効果を期待することは困難である。また、血液中からの速やかな消失は代謝器官である肝臓、脾臓などの臓器に対して薬剤を高濃度で暴露することになり、当該部位での副作用につながるため好ましくない。本発明のリポソーム製剤は、血漿中の薬剤濃度を高濃度で維持することができ、それに伴い、薬剤投与量を減らし、薬剤を標的部位に長時間暴露することができ、副作用を軽減することができるところから好適である。

本発明において、投与後1時間における血漿中の薬剤濃度は、初期値の10%以上であり、好ましくは15%以上である。この「初期値」とは、本発明のリポソーム製剤を投与した直後の理論濃度であり、一般的に、宿主の体重から算出した全血漿量を用いて、投与液量で希釈されたと仮定して算出される。また、各時点の血漿中濃度は、初期値に対する比率として示すことができ、一般的に「% of dose」として表記される。

[0058] 本発明では、薬剤が所望の標的部位に長時間暴露するために使用される。したがって、本発明において、宿主の疾患の予防および／または治療のため、有効量の薬剤を担持するリポソーム製剤を宿主に投与することにより、宿主内で有効量の薬剤を放出し、標的部位に長時間高濃度で暴露するために、宿主(患者)に非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。投与対象の宿主としては、哺乳動物、好ましくはヒト、サル、ネズミ、家畜等が挙げられる。

[0059] 非経口的投与の経路としては、例えば点滴などの静脈内注射(静注)、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本発明の担体は、病気に既に悩まされる患者に、疾患の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。例えば、担体に封入される薬剤の有効投与量は、一日につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。しかしながら、本発明の担体はこれらの投与量に制限されるものではない。投与時期は、疾患が生じてから投与してもよいし、あるいは疾患の発症が予測される時に発症時の症状緩和のために予防的に投与してもよい。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

具体的な投与方法としては、医薬組成物をシリンジや点滴によって投与することができる。また、カテーテルを患者または宿主の体内、例えば管腔内、例えば血管内に挿入して、その先端を標的部位付近に導き、当該カテーテルを通して、所望の標的部位またはその近傍あるいは標的部位への血流が期待される部位から投与することも可能である。

実施例

[0060] 次に本発明を実施例により具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。
(実施例1～3)

(1) 混合材料の調製

水素添加大豆フォスファチジルコリン(Lipoid社)(以下、HSPC)、コレステロール(Solvay社)(以下、Chol)ステアリン酸(日本油脂社)(以下、SA)および7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38、ヤクルト本社)(以下、SN-38)を表1に示す所定モル比となるように秤量し、60°Cに加温したt-ブタノール(関東化学)200mLに溶解した後、氷冷し、凍結乾燥した。

[0061] (2) 分散

上記で得られた乾燥物に、生理食塩水を200mL加え、68°Cで加温しながら、クレアミックスsingle(エムテクニック社製)を用いて予備分散させた後、マイクロフルイダイザー(マイクロフルイデックス社製)を用いて粒子径制御を行った。

[0062] (3) PEG-PE導入

得られたリポソーム分散液50mLに、ポリエチレングリコール(分子量5000)－フォスファチジルエタノールアミン(Genzyme社)(以下、PEG-PE)の36.74mg／mL生理食塩水溶液を、総脂質に対するPEG-PE導入率が約2mol%となる11.32mL加え、60°Cで30分加温した後、氷冷した。PEG-PE導入後のリポソーム分散液を、生理食塩水で充分置換したゲルカラムで外水相置換することにより、未封入薬剤を除去した。

[0063] 上記で得られたSN-38リポソーム製剤の膜組成、薬剤担持量(薬剤／脂質比、薬剤濃度)、粒子径を表1に示す。

また実施例3で得られたリポソーム製剤について、25%グリセリン存在下における凍結割断レプリカ法による電子顕微鏡写真を図1に示す。リポソーム製剤が非球形で異形であることが確認された。

[0064] (比較例1)

上記工程(1)において、ステアリン酸(SA)を使用しなかった以外は、実施例1と同様にしてリポソーム製剤を調製した。すなわち、表1に示す秤量値のHSPC、CholおよびSN-38を、60°Cのt-ブタノール(関東化学)200mLに溶解した後、氷冷し、凍結乾燥した。次いで、生理食塩水を200mL加え、68°Cで加温しながら、クレアミックスで予備分散させた後、マイクロフライダイザーを用いて粒子径制御を行った。

得られたリポソーム分散液50mLに、PEG-PEの36.74mg／mL生理食塩水溶液を11.32mL加え、60°Cで30分加温した後、氷冷した。PEG-PE導入後のリポソーム分散液を、生理食塩水で充分置換したゲルカラムで外水相置換することにより未封入薬剤を除去した。

上記で得られたSN-38リポソーム製剤の膜組成、薬剤担持量(薬剤／脂質mol比、薬剤濃度)、粒子径を表1に示す。

比較例1で得られたリポソーム製剤の25%グリセリン存在下における凍結割断レプリカ法による電子顕微鏡写真を図2に示す。リポソーム製剤が球形であることが確認された。

[0065] (比較例2～3)

比較例1と同様にステアリン酸(SA)を使用せず、膜組成(脂質比およびPEG-PE導入率)および薬剤担持量の異なるリポソーム製剤を調製した。すなわち、表1に示す秤量値のHSPC、CholおよびSN-38を、60°Cのt-ブタノール(関東化学)200mLに溶解した後、氷冷し、凍結乾燥した。次いで、生理食塩水を300mL加え、68°Cで加温しながら、クレアミックスで予備分散させた後、マイクロフライダイザーを用いて粒子径制御を行った。

得られたりポソーム分散液50mLに、PEG-PEの36.74mg/mL生理食塩水溶液を、2.916mL(PEG-PE導入率:約0.75mol%)または7.776mL(PEG-PE導入率:約2mol%)加え、60°Cで30分加温した後、氷冷した。PEG-PE導入後のリポソーム分散液を、生理食塩水で充分置換したゲルカラムで外水相置換することにより、未封入薬剤を除去した。

上記で得られたSN-38リポソーム製剤の膜組成、薬剤担持量(薬剤/脂質比、薬剤濃度)、粒子径を表1に示す。

[0066] [表1]

表 1

		実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2	比較例3		
秤量値/g	HSPC	4.835	4.557	4.078	5.534	6.000			
	Chol	2.366	2.231	1.996	2.708	2.504			
	SA	0.504	0.703	1.049	—				
	SN-38	0.040							
膜	HSPC:Chol:SA mol比	7:7:2	7:7:3	7:7:5	7:7:0	54:46:0			
	SA含有率mol%	12.25	17.25	25.78	0	0	0		
	PEG-PE導入率mol%	1.96				0.744			
製剤	薬剤*／脂質mol比	0.0069			0.0098	0.0099			
	薬剤*濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	84	85	73	68	68	72		
	粒子径 nm	87.4	100	122	114	91.6	93.7		
血漿中薬剤*濃度ng/mL									
投与後 1時間		1994	2278	2222	669	535	439		
6時間		1152	1133	988	390	265	113		
24時間		214	185	155	81	66	10		
% of dose									
投与後 1時間		19.17	21.90	21.37	6.43	5.14	4.22		
6時間		11.08	10.89	9.50	3.75	2.55	1.09		
24時間		2.06	1.78	1.49	0.78	0.63	0.10		

*薬剤:SN-38

[0067] 表中、「脂質」は、SAおよびPEG-PEのPE部分も含めた混合脂質(HSPC+Chol+SA+PE)をいう。

SA含有率は、混合脂質の合計(総脂質)量中SA量をmol%で示す。

PEG-PE導入率は、混合脂質合計量に対するPEG-PE量の比率をmol%で示す

。

製剤の薬剤担持量:薬剤/脂質mol比は、SN-38:混合脂質のモル比であり、薬剤

濃度は、リポソーム製剤／mLあたりのSN-38／ μ g量である。

製剤中または血漿中の薬剤濃度は、分光蛍光光度計を用いて、SN-38の蛍光強度を測定して求めた。具体的には、サンプルをメタノールで10倍希釈し、この希釈液20 μ Lにメタノール2mLを加えた溶液について、励起波長：380nm、蛍光波長：430nmでの蛍光を測定して求めた。

粒子径は、リポソーム製剤を光散乱回折式粒度分布計(Coulter LS230、Beckman Coulter)で測定した値であり、平均粒子径を意味する。

[0068] (試験例1) 血中滞留性

上記で調製されたSN-38リポソーム製剤を、SN-38量として0.4mg/kg量で、各マウス(BALB/c、♀、5週齢、日本クレア)に、尾静脈注射した。注射後、1, 6, 24時間経過時に採血し、遠心分離(3,000 rpm, 10分、4°C)して血漿を採取した。血漿は次の蛍光強度測定時まで冷凍庫で保管した。

各血漿中のSN-38濃度を測定した。結果を表1および図3に示す。

図3に示されるように、膜成分中にSAを含む本発明のリポソーム製剤は、SAを含まないリポソーム製剤に比べて、血漿中のSN-38濃度が1時間で約3～4倍に、24時間で約2～3倍の値となった。また、「% of dose」で表記すると、SAを含む本発明のリポソーム製剤は、血漿中SN-38濃度が1時間で約19～21%であるのに対して、SAを含まないリポソーム製剤はおよそ約4～6%であり、SAを含む本発明のリポソーム製剤は、血漿中SN-38濃度を長時間高濃度で維持することが可能であることが確認できた。

またSN-38を含有するリポソーム製剤において、PEG-PEの導入率の増加により血中滞留性の改善が見られるが、PEG-PEの導入だけでは血中滞留性は依然低かった。

[0069] (実施例4)

実施例3の別ロットとして実施例3を繰り返した。秤量値、得られたSN-38リポソーム製剤の膜組成、薬剤担持量(薬剤／脂質mol比、薬剤濃度)、粒子径を表2に示す。

[表2]

表 2

	秤量値/g				脂質混合比 HSPC : Chol : SN-38	PEG-PE 導入率 mol%	SN-38/脂質 mol比	SN-38濃度 μg/mL	粒子径 nm
	HSPC	Chol	SA	SN-38					
実施例 4	4.078	1.996	1.049	0.040	7 : 7 : 5	1.96	0.0069	33.6	99.7

[0070] (試験例2)保存安定性

上記で調製されたSN-38リポソーム製剤(HSPC:Chol:SA=7:7:5)について、25℃において製剤加速安定性試験を行い、製剤中のSN-38の含量を分光蛍光光度計で測定した。結果を図4に示す。

図4に示されるとおり、SN-38の含量は2週間低下せず、本発明のSN-38リポソーム製剤は製剤安定性に優れていることが確認された。

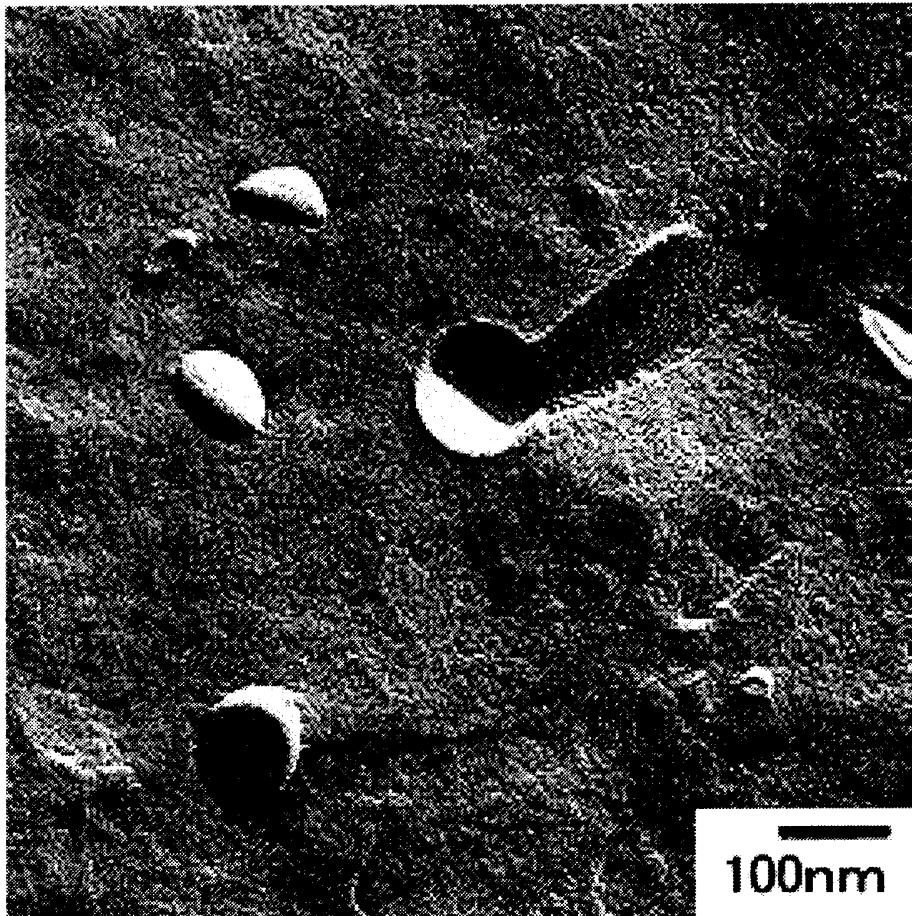
請求の範囲

- [1] 膜を形成する脂質成分としてリン脂質とともに脂肪酸を含み、かつ薬剤として水難溶性カンプトテシン化合物を含有するリポソーム製剤。
- [2] 前記水難溶性カンプトテシン化合物が、20(S)-カンプトテシン、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)、7-(β -トリメチルシリル)エチルカンプトテシンまたは7-(t-ブトキシ)イミノメチルカンプトテシンである請求項1に記載のリポソーム製剤。
- [3] 前記脂肪酸が飽和脂肪酸である請求項1または2に記載のリポソーム製剤。
- [4] 前記飽和脂肪酸のアルキル鎖長が14~18である請求項3に記載のリポソーム製剤。
- [5] 前記リン脂質が水素添加リン脂質である請求項1ないし4のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [6] 前記脂質成分として、前記リン脂質および脂肪酸とともに、少なくとも1の他の脂質をさらに含む請求項1ないし5のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [7] 前記他の脂質がコレステロールである請求項6に記載のリポソーム製剤。
- [8] 前記膜が修飾基を有する請求項1ないし7のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [9] 前記修飾基が、親水性高分子鎖である請求項8に記載のリポソーム製剤。
- [10] 前記親水性高分子鎖が、ポリエチレングリコール鎖である請求項9に記載のリポソーム製剤。
- [11] 前記リポソーム製剤の薬剤／脂質mol比が0.001~0.1である請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [12] 前記脂肪酸を、前記脂質成分の合計mol中、1~30mol%含有する請求項1ないし11のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [13] 前記リポソーム製剤の平均粒子径が50~300nmである請求項1ないし12のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [14] 前記リポソーム製剤が、前記脂質成分と、前記水難溶性カンプトテシン化合物とを攪拌して調製したリポソーム分散液に、高速液流化した該リポソーム分散液同士の衝突による整粒化処理が施されたものである請求項1ないし13のいずれかに記載のリポソーム製剤。

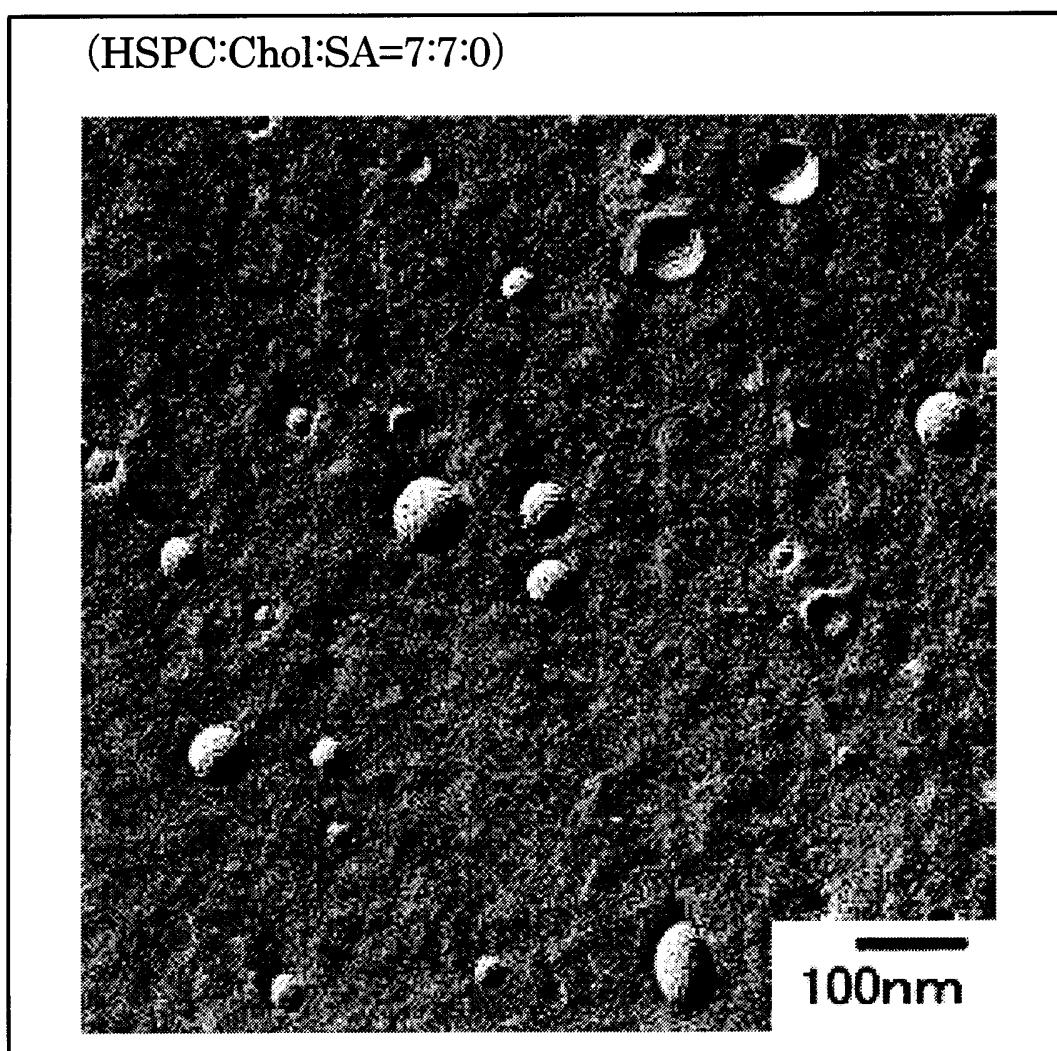
[15] 請求項1ないし14のいずれかに記載のリポソーム製剤を含有する医薬組成物。

[図1]

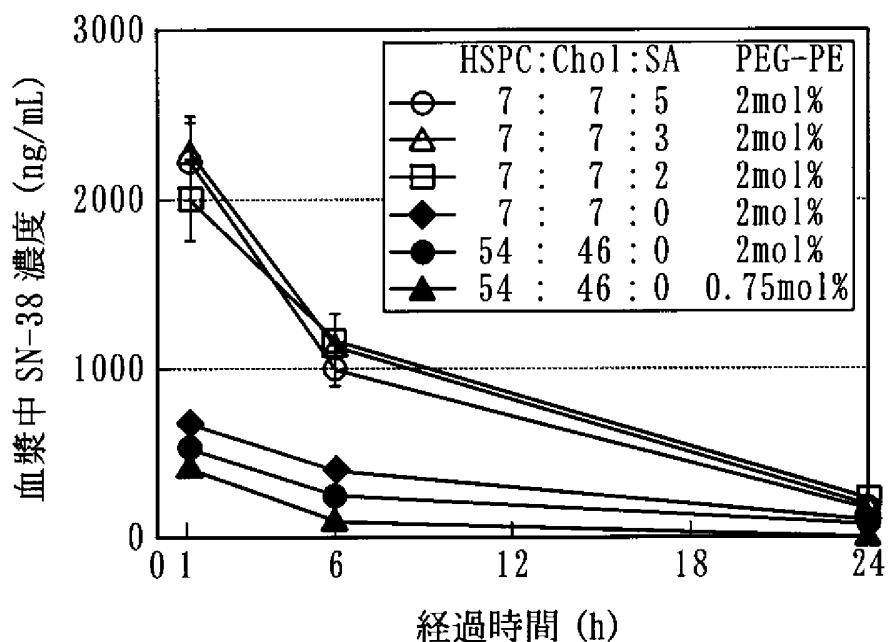
(HSPC:Chol:SA=7:7:5)



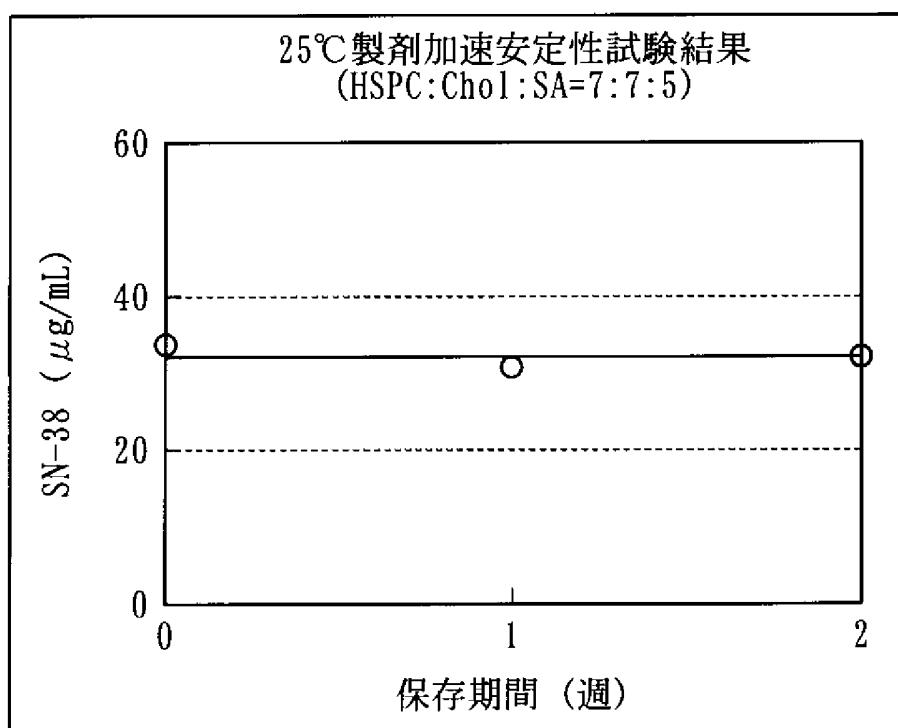
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/011158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/4745, 9/127, 47/12, 47/24, 47/28, A61P35/00

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)

Int.Cl⁷ A61K31/4745, 9/127, 47/12, 47/24, 47/28, A61P35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/058622 A2 (NEOPHARM. INC.), 01 August, 2002 (01.08.02), Full text & JP 2004-529086 A & US 2003/0215492 A1 & EP 1355634 A2	1-15
Y	JP 9-504517 A (SmithKline Beecham Corp.), 06 May, 1997 (06.05.97), Full text & WO 1995/008986 A1 & EP 721328 A1	1-15
Y	JP 60-155109 A (Terumo Corp.), 15 August, 1985 (15.08.85), Full text; particularly, page 3, upper left column (Family: none)	1-15

 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
- "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
19 August, 2005 (19.08.05)Date of mailing of the international search report
13 September, 2005 (13.09.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/011158

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	CROSASSO, P., et al., Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes, J.Control Release, 2000, Vol.63, Nos.1-2, pages 19 to 30	8-10 1-7, 11-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A61K31/4745, 9/127, 47/12, 47/24, 47/28, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A61K31/4745, 9/127, 47/12, 47/24, 47/28, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/058622 A2 (NEOPHARM, INC.) 2002.08.01, 文献全体 & JP 2004-529086 A & US 2003/0215492 A1 & EP 1355634 A2	1-15
Y	JP 9-504517 A (スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション) 1997.05.06, 文献全体 & WO 1995/008986 A1 & EP 721328 A1	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.08.2005

国際調査報告の発送日

13.9.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

4C 3336

渕野 留香

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 60-155109 A (テルモ株式会社) 1985.08.15, 文献全体、特に第3頁左上欄 ファミリーなし	1-15
Y A	CROSASSO, P., et al., Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes, J Control Release, 2000, Vol. 63, No. 1-2, p. 19-30	8-10 1-7, 11-15