

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501955

(P2004-501955A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl.⁷

A61K 9/127
A61K 31/4745
A61K 31/475
A61K 47/24
A61K 47/28

F I

A61K 9/127
A61K 31/4745
A61K 31/475
A61K 47/24
A61K 47/28

テーマコード (参考)

4C076
4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-506699 (P2002-506699)
(86) (22) 出願日 平成13年6月29日 (2001.6.29)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月27日 (2002.12.27)
(86) 国際出願番号 PCT/CA2001/000925
(87) 国際公開番号 W02002/002077
(87) 国際公開日 平成14年1月10日 (2002.1.10)
(31) 優先権主張番号 60/215,556
(32) 優先日 平成12年6月30日 (2000.6.30)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/264,616
(32) 優先日 平成13年1月26日 (2001.1.26)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

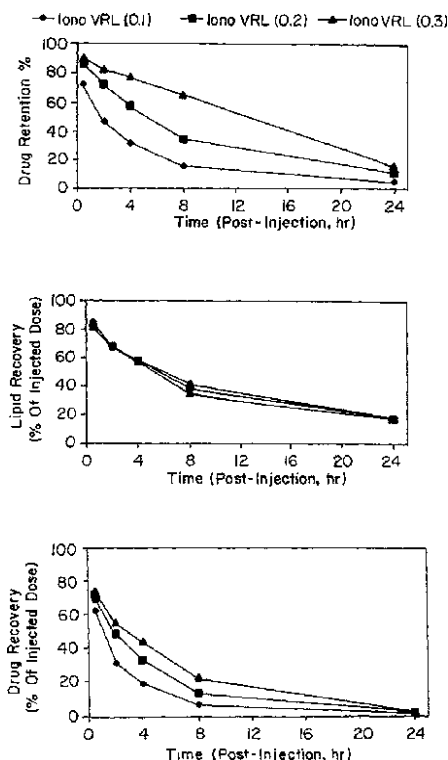
(71) 出願人 500296343
アイネックス ファーマシューティカルズ
コーポレーション
カナダ国 プイ5ジェイ 5ジェイ8 ブ
リティッシュ コロンビア, バーナビー
, グレンリオン ビジネス パーク,
グレンリオン パークウェイ 100-8
900
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポソーム抗新生物薬剤およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、リポソーム抗新生物薬剤組成物に関する。本発明に用いられるリポソーム抗新生物薬剤としては、例えば、カンプトセシンが挙げられる。本発明は、さらに、新生物を処置するために、このような組成物を用いる方法に関する。本発明は、さらに、新脈管形成を阻害するために、このような組成物を用いる方法に関する。このような組成物は、血漿循環における活性な薬剤の半減期を調節するために有用である。このような方法もまた、血漿循環における活性な薬剤の半減期を調節するために有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性薬剤の血漿循環半減期を調節するための方法であって、該方法は、以下：

(a) リポソームを提供する工程であって、該リポソーム中に、遊離の活性薬剤および沈殿した活性薬剤がカプセル化されている、工程；および

(b) 該リポソーム中の沈殿した該活性薬剤の量を変化させる工程、を包含する、方法。

【請求項 2】

前記工程 (b) が、前記活性薬剤 対 脂質の割合を変化させる工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、空のリポソームの添加により変化する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (b) が、前記リポソームのサイズを変化させる工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記工程 (b) が、前記活性薬剤の沈殿を増強する成分を添加する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記成分が、モノアニオン、ジアニオン、トリアニオン、または多価アニオンである、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記工程 (b) が、前記活性薬剤 対 脂質の割合、および前記リポソームのサイズの両方を変化させる工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記活性薬剤が、抗新生物薬物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗新生物薬物が、カンプトセシンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記カンプトセシンが、イリノテカン、トポテカン、9 - アミノカンプトセシン、10, 11 - メチレンジオキシカンプトセシン、9 - ニトロカンプトセシン、TAS 103、7 - (4 - メチル - ピペラジノ - メチレン) - 10, 11 - エチレンジオキシ - 20 (S) - カンプトセシン、および 7 - (2 - N - イソプロピルアミノ) エチル - 20 (S) - カンプトセシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記カンプトセシンが、トポテカンである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記活性抗新生物薬物が、ピンカアルカロイドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ピンカアルカロイドが、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンオレルピン、およびピンデシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記リポソーム中にカプセル化される沈殿した活性薬剤が、該活性薬剤の総量の少なくとも 50 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記リポソーム中にカプセル化される沈殿した活性薬剤が、該活性薬剤の総量の少なくとも 60 % である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記リポソーム中にカプセル化される沈殿した活性薬剤が、該活性薬剤の総量の少なくと

50

も 70% である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記リボソームが、スフィンゴミエリンおよびコレステロールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記リボソームが、55 : 45 の割合でスフィンゴミエリンとコレステロールとを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記活性薬剤の血漿循環半減期が、最適効力に調節される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.005 ~ 1 : 1 (w/w) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.05 ~ 0.9 : 1 (w/w) である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.1 ~ 0.5 : 1 (w/w) である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

活性薬剤の血漿循環半減期を調節するための方法であって、該方法は、以下：

(a) リボソームを提供する工程であって、該リボソーム中に、遊離の活性薬剤および沈殿した活性薬剤がカプセル化されている、工程；および

(b) 該リボソームに非カプセル化活性薬剤を添加する工程、を包含する、方法。

【請求項 24】

活性薬剤を含むリボソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約 1 : 0.5 ~ 1 : 1000 である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

活性薬剤を含むリボソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約 1 : 1 ~ 1 : 100 である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

活性薬剤を含むリボソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約 1 : 2 ~ 1 : 10 である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

活性薬剤を含むリボソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約 1 : 3 ~ 1 : 5 である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記活性薬剤が、抗新生物薬物である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗新生物薬物が、カンプトセシンである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記カンプトセシンが、イリノテカン、トポテカン、9 - アミノカンプトセシン、10, 11 - メチレンジオキシカンプトセシン、9 - ニトロカンプトセシン、TAS 103、7 - (4 - メチル - ピペラジノ - メチレン) - 10, 11 - エチレンジオキシ - 20 (S) - カンプトセシン、および 7 - (2 - N - イソプロピルアミノ) エチル - 20 (S) - カンプトセシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記カンプトセシンが、トポテカンである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

リボソーム処方物であって、該リボソーム処方物は、以下：

10

20

30

40

50

a) 抗新生物薬物；および

b) 遊離の抗新生物薬物および沈殿した抗新生物薬物を有するリボソーム、を含み、ここで、該リボソーム中の沈殿した抗新生物薬物は、抗新生物薬物の総量の少なくとも50%である、処方物。

【請求項33】

前記抗新生物薬物が、カンプトセシンである、請求項32に記載のリボソーム処方物。

【請求項34】

前記カンプトセシンが、イリノテカン、トポテカン、9-アミノカンプトセシン、10, 11-メチレンジオキシカンプトセシン、9-ニトロカンプトセシン、TAS103、7-(4-メチル-ピペラジノ-メチレン)-10, 11-エチレンジオキシ-20(S)-カンプトセシン、および7-(2-N-イソプロピルアミノ)エチル)-20(S)-カンプトセシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項33に記載のリボソーム処方物。 10

【請求項35】

前記カンプトセシンが、トポテカンである、請求項34に記載のリボソーム処方物。

【請求項36】

前記活性抗新生物薬物が、ビンカアルカロイドである、請求項33に記載のリボソーム処方物。

【請求項37】

前記遊離の抗新生物薬物と前記沈殿した抗新生物薬物とが異なる、請求項32に記載のリボソーム処方物。 20

【請求項38】

前記ビンカアルカロイドが、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンオレルピン、およびビンデシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項36に記載のリボソーム処方物。

【請求項39】

前記抗新生物薬物対脂質の割合が、約0.005~1:1(w/w)である、請求項32に記載のリボソーム処方物。

【請求項40】

前記抗新生物薬物対脂質の割合が、約0.05~0.9:1(w/w)である、請求項39に記載のリボソーム処方物。 30

【請求項41】

前記抗新生物薬物対脂質の割合が、約0.1~0.5:1(w/w)である、請求項40に記載のリボソーム処方物。

【請求項42】

前記リボソームが、スフィンゴミエリンおよびコレステロールを含む、請求項32に記載のリボソーム処方物。

【請求項43】

前記リボソームが、55:45の割合でスフィンゴミエリンとコレステロールとを含む、請求項42に記載のリボソーム処方物。 40

【請求項44】

カプセル化された活性薬剤を含まないリボソームをさらに含む、請求項32に記載のリボソーム処方物。

【請求項45】

活性薬剤を含むリボソーム対カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約1:0.5~1:1000である、請求項44に記載のリボソーム処方物。

【請求項46】

活性薬剤を含むリボソーム対カプセル化された薬剤を有さないリボソームの割合が、約1:1~1:100である、請求項45に記載のリボソーム処方物。

【請求項47】

活性薬剤を含むリポソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリポソームの割合が、約 1 : 2 ~ 1 : 10 である、請求項 46 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 48】

活性薬剤を含むリポソーム 対 カプセル化された薬剤を有さないリポソームの割合が、約 1 : 3 ~ 1 : 5 である、請求項 47 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 49】

リポソーム処方物であって、該リポソーム処方物は、以下：

- a) 活性薬剤；
 - b) リポソームであって、該リポソーム中に、遊離の活性薬剤および沈殿した活性薬剤がカプセル化されている、リポソーム；および
 - c) 空のリポソーム、
- を含む、リポソーム処方物。

10

【請求項 50】

前記活性薬剤を含むリポソーム 対 前記空のリポソームの割合が、約 1 : 0.5 ~ 1 : 1000 である、請求項 49 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 51】

前記活性薬剤を含むリポソーム 対 前記空のリポソームの割合が、約 1 : 1 ~ 1 : 100 である、請求項 50 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 52】

前記活性薬剤を含むリポソーム 対 前記空のリポソームの割合が、約 1 : 2 ~ 1 : 100 である、請求項 51 に記載のリポソーム処方物。

20

【請求項 53】

前記活性薬剤を含むリポソーム 対 前記空のリポソームの割合が、約 1 : 3 ~ 1 : 5 である、請求項 52 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 54】

前記活性薬剤が、抗新生物薬物である、請求項 49 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 55】

前記抗新生物薬物が、カンプトセシンである、請求項 54 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 56】

前記カンプトセシンが、イリノテカン、トポテカン、9 - アミノカンプトセシン、10, 11 - メチレンジオキシカンプトセシン、9 - ニトロカンプトセシン、TAS 103、7 - (4 - メチル - ピペラジノ - メチレン) - 10, 11 - エチレンジオキシ - 20 (S) - カンプトセシン、および 7 - (2 - N - イソプロピルアミノ) エチル - 20 (S) - カンプトセシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項 55 に記載のリポソーム処方物。

30

【請求項 57】

前記カンプトセシンが、トポテカンである、請求項 56 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 58】

前記活性抗新生物薬物が、ビンカアルカロイドである、請求項 57 に記載のリポソーム処方物。

40

【請求項 59】

前記ビンカアルカロイドが、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ピンオレルビン、およびビンデシンからなる群より選択されるメンバーである、請求項 58 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 60】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.005 ~ 1 : 1 (w/w) である、請求項 49 に記載のリポソーム処方物。

【請求項 61】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.05 ~ 0.9 : 1 (w/w) である、請求項 60 に記載のリポソーム処方物。

50

【請求項 6 2】

前記活性薬剤 対 脂質の割合が、約 0.1 ~ 0.5 : 1 (w/w) である、請求項 6 1 に記載のリボソーム処方物。

【請求項 6 3】

前記リボソームが、スフィンゴミエリンおよびコレステロールを含む、請求項 4 9 に記載のリボソーム処方物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、「Liposomal Camptothecins and Uses Thereof」と表題された、2000年6月30日出願の米国仮出願第60/215,556号、および「Liposomal Antineoplastic Drugs and Uses Thereof」と表題された、2001年1月26日出願の米国仮出願第60/264,616号に関し、これらの両方が、全ての目的について本明細書中にこれらの全体が参照として援用される。「Liposomal Camptothecins and Uses Thereof」と表題された、2001年6月29日出願の米国特許出願第__号(代理人整理番号016303-008020を有する)は、全ての目的について本明細書中に参照として援用される。

【0002】

(発明の背景)

本発明は、リボソーム組成物、および新生物を処置するためおよび新脈管形成を阻害するためにこのような組成物を使用する方法に関する。

【0003】

多くの抗癌剤または抗新生物薬物が、リボソーム中にカプセル化されている。これらとしては、アルキル化剤、ニトロソウレア、シスプラチン、代謝拮抗剤、およびアントラサイクリンが挙げられる。アントラサイクリン抗生物質を含むリボソームを用いる研究は、遊離薬物を与えられるコントロールと比較して、心毒性および皮膚毒性の減少、ならびに腫瘍を保有する動物の長期の生存を明らかに示した。

【0004】

リボソーム抗癌剤は、それらの遊離薬物対照物と比較して薬物動態学を改変する。リボソーム薬物処方について、薬物動態学は、キャリアが血液から取り除かれる速度、およびその薬物がキャリアから放出される速度によってほぼ決定される。血液からの遅いクリアランスを示すリボソームキャリア組成物を同定するために、かなりの努力がなされており、そして、長循環(long-circulating)キャリアが、多くの科学論文および特許に記載されている。例えば、コントロール放出に対する膜ポテンシャルを使用する、リボソームキャリアからの薬物漏出速度を制御するための努力もまた、なされた。

【0005】

治療カンプトセシン(例えば、トポテカン(9-ジメチルアミノメチル-10-ヒドロキシ-カンプトセシン; HycamtinTM))、およびイリノテカン、カンプトセシンの半合成の水可溶性誘導体であり、シナ蠟 *Camptotheca acuminata* の幹から抽出されるアルカロイドである(Wallら、J. Am. Chem. Soc. 88: 3888-3890 (1966))。カンプトセシンは、トポイソメラーゼインヒビタークラスの抗新生物剤に属し、DNA複製に関連する核酵素トポイソメラーゼIの作用を特異的に阻害する(Hsiangら、Cancer Res. 48: 1722-1726 (1988))。このように、トポテカンは、細胞周期特異的作用機構を示し、S期(DNA複製)の間に作用して、G2細胞周期阻止およびアポトーシスを最終的に導く、DNA中の不可逆的な二本鎖崩壊を生じる。遊離形態において、この薬剤は、腫瘍細胞株およびマウス同種移植片腫瘍モデルおよびヒト異種移植片腫瘍モデルにわたって広範囲の活性を有する(McCabe, F. L. ら、Cancer Invest. 12: 308-313 (1994); Emersonら、Cancer Res. 55: 603-609

(1995); Thompson, Biochim. Biophys. Acta 1400:301-319 (1998); Ormrodら、Drugs 58:533-551 (1999); Hardmanら、Anticancer Res. 19:2269-2274 (1999)。より最近には、トポテカンが、抗腫瘍作用機構に寄与し得る強力な抗血管形成性特性を有するということが示された(O'Learyら、Clin. Cancer Res. 5:181-187 (1999); Clementsら、Cancer Chemother. Pharmacol. 44:411-416 (1999))。これらの処置全てが、用量制限毒性(例えば、貧血(anaemia)、好中球減少症および血小板減少症を導く非蓄積性の骨髄抑制(myelosuppression))、ならびに粘膜症(mucositis)および下痢を含む胃腸関連毒性に関連する。臨床的には、トポテカンは、卵巣癌および小細胞肺癌(SCLC)における第二期治療(second-line therapy)について認可されており、そして現在広範な臨床的評価の焦点である。

10

【0006】

カンプトセシンの脂質処方物は、治療剤として提唱されてきた(米国特許第5,552,156号およびPCT公開WO95/08986を参照のこと)。しかし、脂質処方物の全てが、薬物送達の目的について等しいというのではなく、広範な研究が、薬物の充填および貯蔵、薬物投与、薬学的動態、生物学的分布、漏出速度、腫瘍蓄積、毒性プロファイルなどについて好ましい特性を示す処方物に関して継続中である。カンプトセシンに対して、この分野は、さらに複雑である。なぜなら、ヒトにおける用量制限毒性は、マウスにおけるものより1/10の低さであり得るからである(Erickson-Millerら、Cancer Chemother. Pharmacol. 39:467-472 (1997))。

20

【0007】

抗新生物剤の改善されたりポソーム処方物は、非常に有用であることを証明し得る。新規の臨床的有用性を有する、脂質処方された抗新生物剤を提供することが、本発明の目的である。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、活性薬剤(例えば、トポテカン)の血漿循環半減期を調節するために有用な組成物および方法を提供する。リポソーム処方物は、臨床的効力を増加し、そして付随的な毒性を減少する。さらに、本発明は、新生物の処置および新脈管形成の阻害のための方法およびリポソーム組成物を提供する。

30

【0009】

このように、1つの実施形態において、本発明は、活性薬剤の血漿循環半減期を調節するための方法を提供し、本方法は、以下の工程を包含する:(a)リポソームを提供する工程であって、該リポソーム中に、遊離活性薬剤と沈殿した活性薬剤がカプセル化されている、工程;ならびに(b)このリポソーム中に沈殿した活性薬剤の量を変化させる工程。驚くことに、リポソーム中に沈殿した活性薬剤の量を変化させることによって、血漿中への活性薬剤の放出動態を調節することが可能である。好ましい活性薬剤は、抗新生物薬物(例えば、カンプトセシン(例えば、トポテカン))である。

40

【0010】

別の実施形態において、本発明は、a)抗新生物薬物とb)遊離抗新生物薬物および沈殿された抗新生物薬物を有するリポソーム、とを含むリポソーム処方物を提供し、ここで、このリポソーム中に沈殿した抗新生物薬物は、抗新生物薬物全体の少なくとも50%である。リポソーム中に沈殿した抗新生物薬物の量を調整することによって、この薬物の放出をインビトロおよびインビボの両方で調節し得る。特定の好ましい実施形態において、高いリポソーム内濃度の活性薬剤(例えば、トポテカン)は、多量の沈殿形態を生じる。この局面において、その後のインビボでの薬物の放出速度は、遅い。特定の局面において、遅い放出速度は、速い放出速度と比べて好ましくかつより効果的である。

50

【 0 0 1 1 】

なお別の実施形態において、本発明は、a) 活性薬剤；b) その中にカプセル化された、遊離活性薬剤と沈殿した活性薬剤とを有するリポソーム；ならびに、c) 空のリポソーム、を含む、リポソーム処方物を提供する。

【 0 0 1 2 】

この局面において、リポソームの血清半減期は、空のリポソームを処方物中に含むことによって長くされる。種々の脂質のいずれかを使用して本発明のリポソーム組成物を形成し得ることは、当業者には容易に明らかである。現在好ましい実施形態において、この脂質は、スフィンゴミエリンおよびコレステロールの混合物を含み、好ましくは、約 30 : 70 ~ 約 60 : 40 のスフィンゴミエリン : コレステロール比 (モル比) である。1つの好ましい実施形態において、このリポソームは、55 : 45 比でスフィンゴミエリンおよびコレステロールを含む。

10

【 0 0 1 3 】

さらに別の局面において、本発明は、固形腫瘍を、それを罹患するヒトにおいて処置するための方法を提供し、本方法は、薬学的に受容可能なキャリア中にある有効量の本発明のリポソーム処方物を、このヒトに投与する工程を包含する。種々の固形腫瘍は、本発明の処方物を使用して処置され得る。好ましい実施形態において、処置される固形腫瘍は、肺の固形腫瘍、乳房の固形腫瘍、結腸の固形腫瘍および前立腺の固形腫瘍からなる群より選択される。別の好ましい実施形態において、本発明はさらに、好中球減少症および血小板欠損を処置するために適切な処置または活性薬剤の同時投与を包含する。

20

【 0 0 1 4 】

好ましい実施形態において、リポソームトポテカンを使用して、固形腫瘍を処置する。さらに、種々の脂質のいずれを使用しても本発明のリポソーム組成物を形成し得ることは、当業者には容易に明らかである。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の特性、目的および利点、ならびにその好ましい実施形態は、以下の詳細な説明から明らかになる。

【 0 0 1 6 】

(発明の詳細な説明および好ましい実施形態)

多くの抗癌剤の活性は、その薬物動態的挙動に依存する。この薬物動態的挙動は、薬物濃度、および癌細胞が薬物に暴露される期間を規定する。ほとんどの抗癌剤の場合、より長い暴露時間は、これが癌細胞の増加した死滅を生じるので好ましい。一般に、いくつかのパラメーターを使用して、薬物の薬物動態を記載する。血漿クリアランス半減期および曲線下面積 (area under the curve) (AUC) が、例である。この血漿クリアランス半減期は、投与された薬物の半分が血漿から除去されるために必要とする時間である。AUC は、経時的な血漿薬物レベルの尺度であり、そして全薬物暴露の指標を提供する。一般に、抗癌剤に関する、増加した血漿クリアランス半減期および血漿 AUC は、増加した治療効果に相関する。

30

【 0 0 1 7 】

(I . 活性薬剤放出を調節すること)

40

本発明は、リポソームからの薬物放出を調節するための方法および処方物を提供する。1つの実施形態において、本発明は、活性薬剤の血漿循環半減期を調節するための方法を提供し、本方法は、以下の工程を包含する：(a) リポソームを提供する工程であって、このリポソーム中に、遊離活性薬剤と沈殿した活性薬剤とがカプセル化されている、工程；ならびに (b) このリポソーム中に沈殿した活性薬剤の量を変化させる工程。好ましくは、「遊離活性薬剤」および「沈殿した活性薬剤」は、同一の活性薬剤であるが、本発明は、そのように限定しない。本明細書中で使用される場合、用語「調節すること (工程) 」は、リポソームキャリアから活性薬剤を放出する速度を増加することかまたは減少することか、のいずれかを意味し得る。抗新生物活性薬剤について、調節することは、好ましくは、活性薬剤の放出速度を減少することかまたは遅くすることかである。

50

【 0 0 1 8 】

好ましい局面において、本発明のリポソームは、ともにカプセル化された、遊離活性薬剤および沈殿した活性薬剤を含む。リポソーム中に沈殿した活性薬剤の量は、種々の機構を使用して変化され得る。例えば、活性薬剤対脂質の比を変化させることによって、沈殿した活性薬剤の量は、増加または減少され得る。低い薬物：脂質比での薬物ローディングは、低濃度の活性薬剤（例えば、トポテカン）をリポソーム内部に生じ、従って、薬物全体のうちのほとんど（すべてではないにしても）は溶液中にある（すなわち、沈殿されておらず、すなわち遊離している）。少量の沈殿は、リポソームからの薬物の速い放出速度を生じる。逆に、高い薬物：脂質比は、高いリポソーム内部濃度および高沈殿量を生じる。薬物が沈殿形態の場合、その後の、インビボまたはインビトロでの放出速度は、遅い。抗新生物薬物（例えば、トポテカン）について、遅い放出速度が好ましい。

10

【 0 0 1 9 】

いかなる特定の理論によって束縛されることもないが、本発明のリポソームは、薬物放出を指示する「沈殿 - 溶解機構」（PDM）を受けると考えられている。本発明のPDM機構において、リポソーム内部の沈殿した活性薬剤（例えば、トポテカン）の、リポソームの内部溶液への溶解速度は、リポソーム外部の活性薬剤の、外部への放出速度に比べて遅く、従って律速である。すなわち、リポソーム内部での沈殿した薬物から遊離薬物への溶解速度は、その薬物が血漿中にいかに速く放出されるかを決定する。

【 0 0 2 0 】

特定の実施形態において、活性薬剤対脂質比は、空のリポソームの添加によって変えられ得る。一般に、空のリポソームまたはその中に活性薬剤が含まれているリポソームのいずれもが、細網内皮系（RES）の細胞によってクリアランスされる。代表的に、RESは、一定用量の注射されたリポソームの80～95%を1時間以内に排除し、リポソームの取り込みのための選択された標的部位を効果的に競合的除外（outcompeting）する。リポソームのRES取り込みの速度に影響を与える種々の因子が、報告されており、これらには、リポソームのサイズ、電荷、脂質飽和度、および表面成分が挙げられる。空のリポソーム小胞を含めることによって、RESから活性薬剤を含むリポソームを保護することが可能である。このように、空のリポソーム小胞は、実際に、「おとり」として作用することによってリポソームの血液循環寿命を延長する。延長された循環時間は、しばしば、リポソームが注射部位から標的領域、標的細胞または標的部位に到達するために必要とされる。空のリポソーム小胞は、RESを活発に維持し、結果として、その中に活性薬剤が含まれるリポソームの血清半減期が増加される。

20

30

【 0 0 2 1 】

特定の他の局面において、活性薬剤の沈降を増強する成分が、リポソームに添加される。この局面において、種々の荷電イオンを使用して、小胞内部の沈降された活性薬剤の量を増加し得る。好ましい局面において、二価、三価または多価アニオンが使用される。適切なアニオンとしては、カルボキシレート（ $-\text{CO}_2^-$ ）、スルホネート（ SO_3^- ）、スルフェート（ SO_4^{2-} ）、ヒドロキシド（ $-\text{OH}$ ）、アルコキシド、ホスフェート（ $-\text{PO}_4^{2-}$ ）およびホスホネート（ $-\text{PO}_3^{2-}$ ）が挙げられるが、これらに限定されない。リポソーム内部の沈降された活性薬剤の量を増強する他の成分は、当業者に公知である。

40

【 0 0 2 2 】

さらに、薬物：脂質比は、リポソームのサイズを使用して変えられ得る。使用するリポソーム小胞が大きいほど、薬物：脂質比はより小さい。特定の局面において、活性薬剤対脂質比およびリポソームのサイズの両方を変えて、活性薬剤の効力を最適化する、小胞中に沈降されるカプセル化された活性薬剤の量は、変化し、そしてこれは、活性薬剤自体に幾分依存する。特定の実施形態において、沈降された活性薬剤の量は、総活性薬剤の少なくとも約25%～約95%（例えば、約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%および95%）である。トポテカンについて、リポソーム中にカプセル化される沈降された活性薬

50

剤の量は、総活性薬剤の少なくとも50%である。

【0023】

好ましい局面において、活性薬剤が抗腫瘍薬物である場合、高い薬物：脂質比を使用することが、より多くの量のカプセル化され沈降された薬物を生じる。結果として、インビボでのリポソームからの薬物放出は、より低い薬物：脂質比で調整された同様の組成物よりも、よりゆっくりである。これらのより高い薬物：脂質比のリポソームは、延長された血漿半減期および増加された血漿AUC値を示す。有利には、これらの処方物は、改善された抗腫瘍効力を示す。

【0024】

特定の実施形態において、活性薬剤：脂質の比は、約0.005～1：1（w/w）である。 10

【0025】

好ましくは、活性薬剤：脂質の比は、約0.05～0.9：1（w/w）であり、そしてより好ましくは、活性薬剤：脂質の比は、約0.1～0.5：1（w/w）である。活性薬剤の血漿循環半減期を調節することによって、このようにして、活性薬剤の効力を最大化または最適化することが可能である。

【0026】

（II. リポソーム処方物を作製する組成物および方法）

リポソーム、小胞およびリポソーム小胞は、水性の内部を包囲する脂質含有膜を有する構造を示すことが理解される。これらの構造は、他に示されない限り、1以上の脂質膜を有し得るが、一般に、リポソームは、たった1つの膜を有する。このような単一層のリポソームは、本明細書中で「単層」と呼ばれる。多重層のリポソームは、本明細書中で「多層」と呼ばれる。 20

【0027】

本発明において使用されるリポソームは、好ましくは、合わせられた場合に比較的安定な小胞を形成する脂質から形成される。このようなリポソームを生成するために使用され得る、多くの種々の脂質が、当該分野で公知である。好ましい脂質としては、中性または負に荷電したリン脂質またはスフィンゴ脂質およびステロール（例えば、コレステロール）が挙げられるが、これらに限定されない。脂質の選択は、一般に、例えば、リポソームサイズおよび血流中のリポソームの安定性を考慮して導かれる。 30

【0028】

本発明の使用のために好ましいリポソーム組成物としては、スフィンゴミエリンおよびコレステロールを含有するリポソームが挙げられる。このリポソーム組成物中のスフィンゴミエリン対コレステロールの比は、変化し得るが、一般に、約75/25mol%/mol%のスフィンゴミエリン/コレステロール～約30/50mol%/mol%のスフィンゴミエリン/コレステロールの範囲にあり、より好ましくは、約70/30mol%/mol%のスフィンゴミエリン/コレステロール～約40/45mol%/mol%のスフィンゴミエリン/コレステロール、そしてさらにより好ましくは、約55/45mol%/mol%のスフィンゴミエリン/コレステロールである。他の脂質は、必要であり得る場合（例えば、脂質酸化を妨げるために、またはリポソーム表面上にリガンドを付着するために）、本発明のリポソーム組成物中に含まれ得る。一般に、脂質が含まれる場合、このような脂質の他の含有は、スフィンゴミエリン/コレステロール比の減少を生じる。この型のリポソームは、スフィンゴソームとして公知であり、そして米国特許第5,814,335号（この教示は、本明細書中で参考として援用される）において、より十分に記載される。 40

【0029】

例えば、以下に記載されるような、種々の方法が、リポソームを調製するために利用可能である：Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9：467（1980）；米国特許第4,235,871号；同第4,501,728号；同第4,837,028号、テキストLiposome, Marc J. Ostro編、Marc 50

l Dekker, Inc., New York, 1983, 第1章; および Hopeら、Chem. Phys. Lip. 40: 89 (1986) (これら全てが、本明細書中で参考として援用される)。リポソームを生成するためのプロトコルは、一般に以下の工程を包含し、これらの全ては、当該分野で周知である: 有機溶媒中で脂質成分を混合する工程; 乾燥しそして水性溶媒中でリポソームを再構成する工程; およびリポソームをサイズ化する工程 (例えば、押出しによって)。

【0030】

リポソームを調製する代替的方法もまた、利用可能である。例えば、界面活性剤透析に基づく、脂質粒子の自己アセンブリを含む方法が、Wheelerらに対して発行された米国特許第5,976,567号において開示および権利化され、これは、時間のかかる難しい、比例性の乾燥および再構成工程を回避する。連続フロー水和を使用してリポソームを調製するさらなる方法が、開発中であり、そしてしばしば、最も効果的な大規模製造プロセスを提供し得る。

10

【0031】

活性薬剤 (例えば、カンプトセシン) を有するリポソーム処方物の調製は、リポソームへの薬物の充填を必要とする。充填は、受動的または能動的であり得る。受動充填は、一般に、再構成工程の時点での緩衝液への薬物の添加を必要とする。これは、薬物がリポソーム内部に捕捉されるのを可能にし、ここでは、薬物が脂溶性でない場合および小胞がインタクトなままである場合に、薬物が維持される (このような方法は、例えば、PCT公開番号WO95/08986 (この教示は、本明細書中で参考として援用される) において使用される)。

20

【0032】

能動充填は、多くの点で好ましく、そして広範に種々の治療薬剤が、膜のpH勾配またはイオン勾配を使用することによって、ほぼ100%のカプセル化効率でリポソーム中に充填され得る (Mayerら、Biochim. Biophys. Acta 1025: 143-151 (1990) および Maddenら、Chem. Phys. Lipids 53: 37-46 (1990) を参照のこと)。能動充填の多くの方法が、当業者に公知である。このような全ての方法は、脂質性化合物をリポソームの内部に引き込む、いくつかの形態の勾配の確立を包含し、ここでは、それらが、勾配が維持される限り存在し得る。非常に高い量の所望の薬物が、内部に得られ得、薬物が、内部で沈降し、そして継続した取り込みの勾配を生じる。

30

【0033】

イオノフォア媒介充填は、本発明と共に使用するために特に好ましく、これは、米国特許第5,837,282号 (この教示は、参考として本明細書中に援用される) に開示および権利化されている。イオノフォア媒介充填は、電気的中性のプロセスであり、これは、膜電位の形成を生じない。小胞への水素イオン輸送によって、小胞からの並存するマグネシウムイオン輸送が、2:1比で存在する (すなわち、正味電荷の輸送はない)。トポテカンの場合、その薬剤は、中性状態 (電荷なし) で膜を通過すると考えられる。小胞内への進入時に、トポテカンは、正に荷電される。イオノフォア媒介充填は、電気的中性のプロセスであるので、膜電位は生成されない。

40

【0034】

薬学的目的のリポソームカンプトセシンの重要な特徴は、最終処方物の薬物対脂質比である。先に議論したように、薬物:脂質比は、以下の2つの様式: 1) 同じ薬物:脂質比を各々含有する均質なりポソームを使用するか; または 2) 空のリポソームを高い薬物:脂質比を有するリポソームと混合することによって、適切な平均薬物:脂質比を提供することによって確立され得る。異なる適用のために、異なる薬物:脂質比が、所望され得る。特定の薬物:脂質比を生成するための技術は、当該分野で周知である。薬物:脂質比は、重量に基づいて、モル濃度に基づいてまたは任意の他の指定された基準に基づいて測定され得る。好ましい薬物:脂質比は、約0.005:1の薬物:脂質 (重量) ~ 約0.2:1の薬物:脂質 (重量)、そしてより好ましくは、約0.1:1の薬物:脂質 (重量) ~

50

約 0.3 : 1 の薬物 : 脂質 (重量) の範囲にある。

【0035】

さらなる重要な特徴は、リポソーム粒子のサイズである。本発明における使用のために、約 0.05 ミクロン ~ 約 0.15 ミクロンのサイズを有するリポソームが、好ましい。

【0036】

本発明はまた、キット形態でリポソーム組成物 (例えば、カンプトセシン) を提供する。キットは、既製の処方物または投与前に医薬の混合を必要とする処方物を備え得る。キットは、代表的に、キットの種々のエレメントを保持するための仕切られたコンテナを備える。キットは、可能には水和形態で、本発明の組成物またはその成分を、それらの再水和および投与のための指示書と共に備える。

10

【0037】

例えば、本明細書中に記載される方法によって調製されるリポソーム組成物は、単独でか、または投与経路および標準的な業務に従って選択された生理学的に受容可能なキャリア (例えば、生理学的食塩水またはリン酸緩衝液) との混合物のいずれかで投与され得る。一般に、通常の生理食塩水が、薬理的に受容可能なキャリアとして使用される。他の適切なキャリアとしては、例えば、水、緩衝化水、0.4% 生理食塩水、0.3% グリシンなどが挙げられ、これらは、安定性を増強するための糖タンパク質 (例えば、アルブミン)、リポタンパク質、グロブリンなどを含む。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。得られた水溶液は、使用のためにパッケージされ得るか、または無菌条件下でろ過され、そして凍結乾燥され得、この凍結乾燥調製物が、投与前に滅菌水溶液と合わせられる。これらの組成物はまた、生理学的条件を近似するために必要とされる、薬学的に受容可能な補助物質 (例えば、pH 調整剤および緩衝化剤、張度調整剤など (例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなど)) を含み得る。さらに、この組成物は、脂質保護剤を含み得、これは、保存中のフリーラジカルおよび脂質過酸化損傷に対して脂質を保護する。親油性のフリーラジカル失活剤 (例えば、 α -トコフェロールおよび水溶性のイオン特異的キレート剤 (例えば、フェリオキサミン (ferrioxamine)) が適切である。

20

【0038】

広範に種々の活性薬剤が、本発明のリポソーム組成物および方法に適切である。好ましい局面において、活性薬剤は、抗腫瘍薬物である。現在、約 20 の認められたクラスの承認された抗腫瘍薬物が存在する。この分類は、特定の薬物によって共有される共通の構造に基づいてか、または薬物による作用の共通の機構に基づく総括である。分類した抗腫瘍薬物の一般に公知の商業的に認証された (また開発中の) いくつかの部分的リストは、以下のとおりである：

30

構造に基づく分類：

1. フルオロピリミジン - - 5 - FU、フルオロデオキシウリジン、フトラファール (Ftorafur)、5' - デオキシフルオロウリジン、UFT、S - 1 カペシタピン；
2. ピリミジンヌクレオシド - - デオキシシチジン、シトシンアラビノシド、5 - アザシトシン、ゲンシタピン、5 - アザシトシン - アラビノシド；
3. プリン - - 6 - メルカプトプリン、チオグアニン、アザチオプリン、アロプリノール、クラドリビン (Cladribine)、フルダラビン、ペントスタチン、2 - クロロアデノシン；
4. 白金アナログ - - シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン (Oxaliplatin)、テトラプラチン、白金 - DACH、オルマプラチン (Ormaplatin)、CI - 973、JM - 216；
5. アントラサイクリン / アントラセンジオン - - ドキソルビシン、ダウノルビシン、エビルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン；
6. エピポドフィロトキシン - - エトポシド、テニポシド；
7. カンプトセシン - - イリノテカン、トポテカン、9 - アミノカンプトセシン、10, 11 - メチレンジオキシカンプトセシン、9 - ニトロカンプトセシン、TAS 103、

40

50

7 - (4 - メチル - ピペラジノ - メチレン) - 10, 11 - エチレンジオキシ - 20 (S) - カンプトセシン、7 - (2 - N - イソプロピルアミノ) エチル) - 20 (S) - カンプトセシン；

8 . ホルモンおよびホルモンアナログ - - ジエチルスチルベストロール、タモキシフェン、トレメフィン、トルムデックス (Tolmudex)、チミタック (Thymitaq)、フルタミド、ピカルタミド、フィナスチリド、エストラジオール、トリオキシフェン、ドロキシフェン (Droloxifene)、メドロキシプロゲステロンアセテート、メゲステロールアセテート、アミノグルテチミド、テストラクトンなど；

9 . 酵素、タンパク質および抗体 - - アスパラギナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、ロイプロリド、ペガスパラガーゼ (Pegaspargase) など；

10 . ビンカアルカロイド - - ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン；

11 . タキサン - - パクリタキセル、ドセタキセル。

【0039】

機構ベースのクラス：

1 . 抗ホルモン - ホルモンおよびホルモンアナログの分類を参照のこと、アナストロゾール (Anastrozole)；

2 . 抗葉酸 (Antifolate) - - メトトレキサート、アミノプテリン、トリメトレキサート、トリメトプリム、ピリトレキシム (Pyritrexim)、ピリメタミン、エダトレキサート (Edatrexate)、MDAM；

3 . 抗微小管剤 - - タキサンおよびビンカアルカロイド；

4 . アルキル化剤 (古典的および非古典的) - - ナイトロジェンマスタード (メクロレタミン、クロランブシル、メルファラン、ウラシルマスタード)、オキザホスホリン (イフォスファミド、シクロホスファミド、パーホスファミド (Perfosfamide)、トロホスファミド (Trophosphamide))、アルキルスルフォネート (ブスルファン)、ニトロソ尿素 (カルムスチン、ロムスシン、ストレプトゾシン)、チオテパ、ダカルバジンなど；

5 . 代謝拮抗物質 - - プリン、ピリミジンおよびヌクレオシド (上記)；

6 . 抗生物質 - - アントラサイクリン / アントラセンジオン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、プリカマイシン (Plucamycin)、ペントスタチン、ストレプトゾシン；

7 . トポイソメラーゼインヒビター - - カンプトセシン (Topo I)、エピポドフィロトキシン、m - AMSA, エリブチシン (Topo II)；

8 . 抗ウイルス剤 - - AZT、ザルシタビン (Zalcitabine)、ゲンシタビン (Gemcitabine)、ジダノシンなど；

9 . 種々雑多な細胞傷害剤 - - ヒドロキシ尿素、ミトーテン、融合毒素、PZA、ブリオスタチン (Bryostatine)、レチノイド、ブチル酸および誘導体、ペントサン、フマギリンなど。

【0040】

全ての抗腫瘍薬剤の目的は、癌細胞の排除 (治療) または癌細胞の増殖および伝播の遅延 (寛解) である。上記に列挙した抗腫瘍薬剤の大半は、主要な細胞傷害活性を有し、癌細胞に対して直接的な殺傷をもたらすことによって、この目的を追求する。他の抗腫瘍薬物は、身体の自然の免疫を刺激して、癌細胞の殺傷をもたらす。文献は、上記の薬物の全ての活性および機構についての考察などで充たされる。

【0041】

リボソームカンプトセシン、および特に、リボソームトポテカンの特有的処方物を作製する例示的方法を、以下の実施例において示す。

【0042】

(III. リボソームカンプトセシンを使用する方法)

本発明のリボソーム組成物 (例えば、カンプトセシン) は、動物 (例えば、ヒト) におけ

10

20

30

40

50

る固形腫瘍の処置において使用される。以下の実施例は、薬物：脂質比、投与される活性薬剤および脂質の投薬量、および異なる腫瘍型を処置するための好ましい投与スケジュールの重要なパラメーターを示す。

【0043】

好ましくは、薬学的組成物は、非経口的（すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉）に投与される。より好ましくは、薬学的組成物は、静脈内点滴によって投与されるか、またはボラス注射によって腹腔内投与される。薬学的処方物中のリポソームの濃度は、広範に、すなわち、約0.05重量%未満から、通常、少なくとも約2~5重量%~多くて10~30重量%で変化し得、そして選択される特定の投与様式に従って、流体容量、粘性などによって主に選択される。例えば、濃度を増加して、処置に関連する流体負荷を低下させ得る。あるいは、刺激性脂質から構成されるリポソームを低い濃度に希釈して、投与部位での炎症を小さくし得る。投与されるリポソームの量は、使用される特定のカンプトセシン、処置される疾患状態および主治医の判断に依存するが、一般に、ヒトにおいて、約0.01mg/kg体重と約50mg/kg体重との間、好ましくは、約5mg/kg体重と約40mg/kg体重との間である。より高い脂質用量（例えば、50~120mg/kg）が、マウスに適切である。

10

【0044】

活性薬剤（例えば、カンプトセシン）の投薬量は、患者の年齢、体重および状態、ならびに処置計画に基づいて、投与する医師の意見に依存する。小細胞肺癌における遊離トポテカンの推奨用量は、1用量あたり1.5mg/M²（5日間毎日）であり、3週間ごとに繰り返される。以下の実施例で示された処置における改善が原因で、ヒトにおける活性薬剤（例えば、トポテカン）の用量は、0.015mg/M²/用量程度の低さの範囲で有効であり、投与計画に依存して、15~75mg/M²/用量程度の高さでなお寛容可能である。用量は、単一用量であり得、この用量は、4時間毎、6時間毎、または12時間毎、あるいは、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、7日毎、8日毎、9日毎、10日毎またはそれらの組み合わせで繰り返して投与され得る。好ましい計画は、1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、もしくは6週間毎またはそれらの組み合わせで繰り返される処置サイクルを用い得る。現在好ましい実施形態において、処置は、1週間に1回行われ、この用量は、代表的には、1.5mg/M²未満である。

20

【0045】

特に好ましいトポテカン投薬量および計画は、以下のとおりである：

30

【0046】

【表1A】

投薬量 (mg/M ² /用量)	期間	何週間毎の反復サイクルか
0.15	1dx5d	3週間
0.5	1d	1週間
1.5	1d	1週間
15	1d	3週間
50	1d	3週間

本発明は、具体的実施例により、より詳細に記載される。以下の実施例は、例示目的で提供され、如何様にも本発明を限定することを意図しない。当業者は、重要ではない種々のパラメーターを容易に認識し、これらのパラメーターは、本質的に同じ結果を得るために変更または改変され得る。

40

【0047】

（IV．実施例）

（A．材料および方法）

1．材料 トポテカン（HycamtinTM, SmithKline Beecham）を、British Columbia Cancer Agencyの薬局から購入した。スフィンゴミエリン（SM）を、Avanti Polar Lipidsから購入した。Northern Lipidsのスフィンゴミエリンを初期の研究において用

50

いたが、Avantiバージョンのものより、あまりエタノールに可溶性ではなかった。コレステロール(CH)および二価の陽イオンイオノフォアA23187をSigmaから購入した。 $[^3\text{H}]$ -コレステリルヘキサデシルエーテル(Dupont)を脂質マーカーとして用いた。

【0048】

2. マウス。雌性のICR、BDF-1または無胸腺nu/nu(6-8週齢)を、Harlan-Sprague Dawley(Indianapolis, IN)から購入した。すべての動物を、使用する前に1週間にわたり隔離した。すべての研究を、Canadian Council on Animal Care(CCAC)およびInstitutional Animal Care and User Committee(IACUC)により制定されたガイドラインに沿って行った。

【0049】

3. Mg-A23187法によるトポテカンの処方。トポテカン、米国特許第5,837,282号に従うMg-A23187イオノフォア法を用いて、SM:CH(55:45, mol/mol)リポソーム中にカプセル化した。最初の薬物対脂質比は、0.10(w/w)であり、薬物負荷は、代表的には、95-100%であった。外用緩衝液(external buffer)は、10mM PBS, pH7.5および300mM スクロースからなった。すべての処方物を粒子サイズ、薬物負荷効率、pH、および薬物と脂質の濃度に関して分析した。

【0050】

4. 薬物調製および投薬。トポテカン(HycamtinTM)の各バイアルを、1.0mlの滅菌水で水和し、4.0mg/mlのトポテカン濃度にした。引き続いて、薬物のラクトン種について必要な低pHを維持するために、0.9%滅菌生理食塩水中で希釈した。水保存溶液中の非使用薬物(4.0mg/ml)を、遮光して4℃で保存した。リポソームにカプセル化したトポテカン、0.9%生理食塩水で、投与に必要な濃度に希釈した。すべての薬物投与は、側方尾静脈を介した10ml/kg(200μl/20gマウス)であった。

【0051】

5. 薬物動態およびインビボ漏出研究。遊離トポテカンおよびリポソームカプセル化トポテカンの薬物動態および薬物漏出を、側方尾静脈を介したi.v.投与後24時間にわたり、ICRマウスにおいて評価した。2つの異なる薬物対脂質比(すなわち、0.10(w/w)および0.02(w/w))を用いて、薬物漏出およびPK挙動に対する薬物対脂質比および脂質用量の影響を試験した。カプセル化されたトポテカン、1mg/kg(10または50mg/kg脂質)および5mg/kgトポテカン(50mg/kg脂質)で投与した。対応して、遊離のトポテカンのPK挙動を、1mg/kgおよび5mg/kgで評価した。血中総トポテカン、血漿タンパク質の沈降後の蛍光アッセイにより決定した。トポテカン、それぞれ、380nmおよび518nmの励起波長(2.5nmスリット幅)および発光波長(2.5nmスリット幅)で分光蛍光器により定量した。血漿中の脂質レベルを、 $[^3\text{H}]$ -CHE標識の液体シンチレーション計測により決定した。

【0052】

6. MTD研究。MTD研究を、各腫瘍モデルに対応する宿主マウス系統において行った。単一用量および複数用量のMTDを、経時的な体重減少をモニターすることにより決定した。MTDを、20%体重減少を生じる用量と規定した。

【0053】

7. 骨髄抑制および好中球減少症研究。トポテカン投与の結果としての末梢血細胞レベルの変化を、4-6週間にわたりICRマウスにおいて評価した。10mg/kgの遊離トポテカンまたはリポソームカプセル化トポテカン、i.v.投与して1日、3日、5日、7日、14日、および21日目に、血液を、EDTA微量チューブ(microtainer tube)に採取した。空の小胞を、コントロールとして投与した。CBCおよび

差示的分析をCentral Labs for Veterinarians (Langley, BC)で行って、細胞レベル、比および形態を定量した。

【0054】

8. 腫瘍モデル。標準的プロトコルで用いられるように、L1210マウス白血病モデルおよびCT-26マウス結腸転移モデルを用いた。ヒトMX-1およびLX-1細胞株をDCTD Tumor Repository in Frederick, MDから得た。これらの細胞株を、腫瘍フラグメントとして回収し、3mm×3mmフラグメントの連続的移植によりNCrヌードマウスにおいて増殖させた。細胞株がヌードマウスにおいて3継代を過ぎ、腫瘍株が継代数が10に達したときに再開始するまで、実験を開始しなかった。

10

【0055】

9. 効力研究。遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの投薬すべてを、側方尾静脈を介した10ml/kgの静脈内経路により投与した。L1210およびCT-26モデルにおいて、投薬を1日目に行った(腫瘍細胞注入=0日目)。MX-1およびLX-1腫瘍モデルについて、腫瘍容積を、腫瘍寸法の垂直測定の繰り返しおよび以下の式を用いることにより決定した：

$$\text{容積 (mm}^3\text{)} = (\text{L} \times \text{W}^2) / 2$$

腫瘍が明らかに増殖を示し、100-300mm³の範囲にある場合に、MX-1モデルおよびLX-1モデルで投薬を開始した。

【0056】

大部分の薬物が生物学的効果と毒性との間で平衡を示すので、これらの属性の両方を組み込むパラメーターを試験することは有用である。最も一般に用いられるパラメーターは、治療指数(therapeutic index)(TI)である。伝統的には、治療指数は、以下のように規定されている：

$$\text{TI} = \text{LD}_{50} / \text{ED}_{50}$$

しかし、LD₅₀研究を行うことはもはや許されないもので、これらの研究についての治療指数を、以下のように規定した：

$$\text{TI} = \text{MTD} / \text{MED}$$

上記の式において、MTDは最大寛容用量であり、動物の群において20%の平均体重減少を引き起こす用量として規定される；そしてMEDは、最小有効用量であり、固形腫瘍モデルにおいて40以下の最適%T/C値を生じる用量または生存モデルにおいて50±10%の%ILSを生じる用量として規定される。

20

30

【0057】

(B. 結果)

1. 薬物動態および薬物漏出。トポテカンの血漿薬物動態および薬物漏出に対するリポソームカプセル化および薬物対脂質比の影響を、ICRマウスにおいて24時間にわたり試験した。トポテカンのリポソームカプセル化(薬物対脂質比、0.11、wt/wt)は、この薬物の薬物動態パラメーターに対して劇的な影響を与えた(図1、上部；および表1を参照のこと)。5mg/kg用量のトポテカンでは、遊離薬物に対するリポソーム薬物について、血漿AUCにおいて164倍の増加、C_{max}において24倍の増加および血漿半減期において24倍の増加が観察された(表1を参照のこと)。歴史的には、リポソーム薬物のAUCおよび血清半減期における大きな改善により、疾患部位(例えば、腫瘍)への薬物の送達(「疾患部位標的化」として公知のプロセス)の増強が得られた。

40

【0058】

この研究において用いた処方物を、Mg-A23187イオノフォア法により調製した。iv投与して最初の10~30分後に、最初に薬物が急激に放出され(図1、下部を参照のこと)、続いてより緩やかな放出相が生じた。Mn-A23187処方物およびMg-A23187処方物についてのt_{1/2放出}は、それぞれ、約3時間および約5~7時間であった；しかし、24時間では、いずれの処方物においても薬物はほとんど存在しなかつた。

50

った。

【0059】

大部分のリポソーム薬物処方物について、カプセル化薬物の薬物動態特性を、脂質組成および用量により制御する。リポソームトポテカン[®]は、非常に低い薬物用量ですら（0.5 mg/kg；薬物対脂質比、0.10、wt/wt）、別格の抗腫瘍活性を示すことが示された。これらの薬物用量および薬物対脂質比において、血漿からのリポソーム排除は、迅速であることが期待される。従って、低用量でのトポテカン[®]の薬物動態が改善され得るか否かを決定するために、トポテカン[®]の低い薬物対脂質比（0.02，wt/wt）処方物を調査した。興味深いことに、この研究において、低い薬物対脂質比の処方物が、より高い薬物対脂質比（0.11，wt/wt）の処方物よりはるかに速く薬物を放出した。この結果は予測外であった。

【0060】

【表1】

表1. 遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの薬物動態パラメーター

処方物	用量 (mg/kg)	AUC (h•μg/ml)	C _{max} (μg/ml)	Cl (ml/h)	α _{1/2} (h)	β _{1/2} (h)
遊離	1	1.97	0.75	13.9	0.14	11.8
	5	2.77	2.17	49.6	0.26	11.4
TCS	1	65.7	16.3	0.417	2.79	
	5	453	51.0	0.302	6.16	

すべてのパラメーターは、WINNONLIN PKモデリングソフトウェアを用いて、1または2区画モデルから導出した。

【0061】

2. 最大寛容用量。単一および複数用量のMTD研究を、腫瘍保有Balb/cマウス、BDF-1マウスおよびNCr nu/nuマウスにおいて行った。個々のマウスの体重を、各研究の間中モニターして、遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの全身的な寛容性を評価し、可能ならば、MTDを確立した（図2を参照のこと）。リポソームトポテカンの最大寛容用量は、単一投与に関して10 mg/kg、q7d x 3スケジュールに関して7.5 mg/kgおよびq3d x 4スケジュールに関して5 mg/mlであった。マウスにおける1回の静脈内注入後の遊離トポテカンの報告されたLD₅₀は、75 mg/M²（約25 mg/kg）であった[HycamtinTM製品小論]；しかし、40 mg/kgまでの用量で体重減少はほとんど観察されなかったが、これは、急性応答に起因したMTDと考えられた。薬物量は、制限されていたので、40 mg/kgより高い用量（5～10分にわたり投与された）については追求しなかった。qd x 5スケジュールに対する遊離トポテカンのLD₁₀は、14 mg/M²/用量（約4.7 mg/kg/用量）であることが以前に示されている（Grochow, et al., Drug Metab. Dispos. 20: 706-713 (1992)）。

【0062】

3. 毒性。ヒトにおいて5日間連続（d x 5）にわたり1.5 mg/M²/用量で毎日投与される遊離トポテカンの主要な用量制限毒性（MTD）は、非累積性の骨髄抑制である。先に言及されたように、ヒトは、マウスよりも、骨髄抑制に対してより感受性であり、マウスにおけるMTDのわずか11%を寛容し得るにすぎない（14 mg/M²に対して1.5 mg/M²）。この点において、イヌは、ヒトにおけるトポテカンの骨髄抑制のはるかに良好な予測者であることが示された（Burris, et al., J. Natl. Cancer Inst. 84: 1816-1820 (1992)）。しかし、マウスは、遊離トポテカンおよびリポソームカプセル化トポテカンの相対的骨髄抑制効果を比較するに適切であるはずである。

【0063】

1つの研究において、末梢WBC数の最大減少が、リポソームトポテカン[®]を投与して3日目に生じた。次いで、末梢血球レベルおよび形態の比較を、遊離トポテカンもしくはリポソームカプセル化トポテカンまたは空の小胞を投与して3日目に行った（表2を参照のこ

と)。この比較に用いた用量は、リポソームカプセル化トポテカンの M T D であった (1 0 m g / k g)。リポソームトポテカンについて遊離トポテカン (約 1 0 倍)、空の小胞 (約 1 0 倍)、またはコントロール動物 (約 2 0 倍) と比べて、循環好中球の有意な減少が観察された。総 W B C レベルおよびリンパ球亜集団は、コントロール動物に対してリポソームトポテカンについて約 2 倍減少した。同用量では、遊離トポテカンについてのこれらのパラメーターにおいて、有意差はまったくなかった。注射して 2 1 日目に、リポソームトポテカンについての総 W B C レベルは、正常動物より約 2 . 5 倍低いままであった ; しかし、好中球レベルは、正常マウスと比較して、2 0 倍 ~ 3 倍の減少まで回復した。リンパ球レベルは、正常マウスより約 2 倍低いままであった。他の有意差は観察されなかった。

10

【 0 0 6 4 】

注射して 3 日後の血清化学パラメーターの分析により、未処置動物に対してわずかな変化が明らかになった (表 3 を参照のこと)。注意すべきわずかな変化は、リポソームトポテカンで処置した動物に関するグロブリンレベルの統計的に有意な増加 (約 2 倍) およびアルブミン / グロブリン比の付随した減少であった。他の有意な変化は観察されなかった。

【 0 0 6 5 】

【 表 2 】

表2. 遊離トポテカンまたはリポソームカプセル化トポテカン10mg/kg iv用量で処置したICRマウスの血液CBCおよび差

処置	注射後 日数	WBC 差									
		WBC ($\times 10^9/L$)	好中球 ($\times 10^9/L$)	リンパ球 ($\times 10^9/L$)	単球 ($\times 10^9/L$)	好酸球 ($\times 10^9/L$)	好塩基球 ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	Hc (L/L)	PLT ($\times 10^9/L$)
コントロール											
		6.47 ± 1.62	0.937 ± 0.201	5.23 ± 1.45	0.180 ± 0.042	0.359 ± 0.059	0.056 ± 0.053	8.67 ± 0.93	142 ± 12	0.438 ± 0.045	717 ± 317
遊離	3	6.70 ± 1.95	0.520 ± 0.200	5.50 ± 1.70	0.177 ± 0.072	0.331 ± 0.021	0.057 ± 0.040	8.47 ± 0.39	136 ± 05	0.444 ± 0.012	879 ± 145
	21	5.16 ± 1.18	0.480 ± 0.122	4.33 ± 0.93	0.247 ± 0.180	0.334 ± 0.016	0.088 ± 0.071	9.81 ± 0.37	154 ± 04	0.493 ± 0.014	907 ± 059
LCs	3	2.82 ± 1.05	0.048 ± 0.018	2.63 ± 0.87	0.109 ± 0.126	0.204 ± 0.001	0.034 ± 0.029	8.93 ± 0.76	141 ± 10	0.463 ± 0.033	564 ± 098
	21	2.54 ± 1.43	0.382 ± 0.167	2.06 ± 1.36	0.133 ± 0.132	0.319 ± 0.011	0.064 ± 0.060	9.41 ± 0.83	154 ± 12	0.486 ± 0.035	1009 ± 161
空	3	4.68 ± 1.13	0.598 ± 0.238	3.66 ± 0.93	0.248 ± 0.168	0.381 ± 0.044	0.064 ± 0.035	7.77 ± 0.30	130 ± 05	0.416 ± 0.014	803 ± 143
	21	5.05 ± 0.64	0.308 ± 0.175	3.78 ± 0.88	0.263 ± 0.163	0.338 ± 0.056	0.072 ± 0.057	9.56 ± 0.67	152 ± 08	0.483 ± 0.033	1386 ± 144

20

30

40

(表 3 . 遊離トポテカンまたはリポソームカプセル化トポテカンの 1 0 m g / k g 静脈内投薬量で処理した I C R マウスの血清化学パネル - 注射後 3 日目 -)

【 0 0 6 6 】

【 表 3 】

処理	BUN (mmol/L)	クレアチニン (μ mol/L)	TP (g/L)	アルブミン (g/L)	グロブリン (g/L)	アルブミン/ グロブリン 比	ビリルビン (μ mol/L)	アルカリ ホスファターゼ (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CPK (U/L)
コントロール	11.3 \pm 3.0	83 \pm 6	46.7 \pm 2.1	31.3 \pm 1.5	15.3 \pm 1.2	2.07 \pm 0.15	4.7 \pm 0.6	86 \pm 12	27 \pm 31	59 \pm 22	87 \pm 107
遊離	9.4 \pm 3.2	82 \pm 18	48.0 \pm 2.1	32.8 \pm 1.3	15.2 \pm 1.1	2.16 \pm 0.15	3.8 \pm 0.8	67 \pm 35	13 \pm 23	55 \pm 10	56 \pm 38
TCS	10.0 \pm 3.9	96 \pm 28	55.8 \pm 11.8	28.8 \pm 2.5	27.0 \pm 10.1	1.18 \pm 0.33	2.5 \pm 0.6	73 \pm 21	23 \pm 17	77 \pm 29	153 \pm 54
空	検出されず	68 \pm 13	49.3 \pm 1.2	33.0 \pm 1.7	16.3 \pm 0.6	2.00 \pm 0.17	4.3 \pm 0.6	70 \pm 10	17 \pm 15	53 \pm 6	56 \pm 26

10

20

30

(C. マウス腫瘍モデルおよびヒト腫瘍モデルにおける効力の研究：単回用量研究)

(1. L1210マウス白血病) 静脈内L1210マウス白血病モデルが、遊離の化学療法剤トリボソームカプセル化化学療法剤との間の差次的活性を評価するために広範に使用されており、そしてこのモデルは、新規な化学療法剤のインビボNCIスクリーニングにおける元々の(1955~1975)モデルのうちの1つであった(Plowmanら、Human tumor xenograft models in NCI drug development、「Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval」(B. Teicher編)、Humana Press Inc., Totowa(1997); Waud、Murine L1210 and P388 leukemias、「Anticancer Drug Development Guide」Preclinical Screening, C

40

50

linical Trials, and Approval」(B. Teicher 編)、Humana Press Inc., Totowa (1997))。このモデルは、迅速であり - 未処置動物の平均生存は代表的には約 7 ~ 8 日である - 、そして投与された腫瘍細胞は、肝臓および骨髄に播種される (seed)。

【0067】

遊離のトポテカンを単回静脈内用量として投与すると、L1210 モデルにおける生存に対して、最小の効果しか有さなかった (図 3 A を参照のこと)。最高用量の遊離のトポテカンでは、生存中央値 13 日 (44% ILS) が観察された。この群において、1 つの長期生存体 (60 日) が存在した。対照的に、5 mg / kg または 10 mg / kg のいずれかのリボソームトポテカンの単回静脈内 (i. e.) 投与は、60 日目で 100% の生存を生じた (図 3 B を参照のこと)。1 mg / kg 用量についての生存中央値は 13 日 (44% ILS) であり、そして生存曲線は、30 mg / kg で投与された遊離トポテカンの生存曲線とほぼ同一であった - 30 倍の効力増強 - 。より高用量 (30 mg / kg) のリボソームトポテカンでは、毒性死が観察された。リボソームトポテカンについての MTD は、単回静脈内投与の後、BDF - 1 マウスにおいて 20 mg / kg であった。

10

【0068】

(2. CT - 26 マウス結腸癌) マウス CT - 26 結腸細胞株は、薬物スクリーニングのために有用である。なぜなら、この細胞株は、皮下固形腫瘍として容易に増殖するか、またはこの細胞株を静脈投与して生存モデルとして使用し得るからである。さらに、この腫瘍細胞を、脾内 (i. s.) 注射により投与し、その後、脾摘出術を行って、この細胞を、肝臓へと播種して実験的転移モデルを生じる。このモデルは、結腸直腸癌の臨床経過によく似ている。このモデルは、広範に使用されており、そして、例えば、他の箇所に詳細に記載される。

20

【0069】

この CT - 26 モデルにおいて、トポテカンの単回用量の投与は、生存に対して穏やかな影響を有し、用量範囲 5 ~ 40 mg / kg にわたって 23 ~ 60% の ILS % を生じた (図 4 を参照のこと)。しかし、リボソームカプセル化トポテカンは、5 mg / kg より大きい用量では非常に活性であり、90 日目で 100% の生存 (8 / 8) を生じた。10 mg / kg では、87.5% の生存 (7 / 8) が 90 日目に観察されたが、死んだ動物の腫瘍負荷は非常に低く、このことは、この動物が、他の要因 (例えば、骨髄抑制に関連する感染) に起因して死んだかもしれないことを示唆する。リボソームトポテカンに関する用量応答が観察され、2 mg / kg 用量は、54% の ILS % を生じた。これは、MED であることが決定され、そしてこれは、40 mg / kg の遊離トポテカンを使用して達成される ILS % (58%) に匹敵した - 20 倍の効力増強 - 。

30

【0070】

(3. MX - 1 ヒト乳癌腫) MX - 1 は、ヒト乳癌の実験モデルであり、そして倍化時間 3.9 日を有することが報告されている。この研究において、倍化時間中央値は、一貫して 3.6 ~ 3.7 日であった。この腫瘍細胞株は、29 年齢の雌の原発性腫瘍に由来し、化学療法を受けた既往歴はなかった。そしてこの腫瘍細胞株は、ヌードマウスにおいて連続継代される腫瘍フラグメントとして DCTD (NCI) 腫瘍貯蔵所 (tumor repository) により提供される。組織学的に、MX - 1 は、ほとんど分化していない乳癌腫であり、腺形成またはムチン産生の形跡はない。MX - 1 は、NCI インビボ腫瘍パネルおよびプレスクリーニング物 (1976 ~ 1986) を含んだ、新規な化学療法剤を評価するための 3 つの異種移植片モデル (MX - 1、LX - 1、CX - 1) のうちの 1 つであった (Plowman ら、Human tumor xenograft models in NCI drug development. 「Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval」(B. Teicher 編)、Humana Press Inc., Totowa (1997))。その後、「化合物指向的」発見から「疾患指向的」発見への NCI の戦略のシフトを反

40

50

映して、MX-1はより大きな乳癌モデル群(計12)へと組み込まれた。

【0071】

進行した(staged)(100~300mm³)MX-1腫瘍において、遊離のトポテカン[®]は、腫瘍増殖の用量依存性阻害を示した(図5;表1を参照のこと)。最高用量(40mg/kg)において、最適T/C% 24%が得られたが、一方、10mg/kgおよび5mg/kgについての最適T/C%は、それぞれ、66%および78%であった。薬物関連死は観察されず、そしてすべての動物は、この研究を通じて体重を増した。トポテカンのリポソームカプセル化は、T/C%に対して顕著な影響を有し、2mg/kg、5mg/kgまたは10mg/kgの薬物の単回投与の後、それぞれ、最適T/C%が8%、-49%および-62%であった。負のT/C%値は、もとの進行した(staged)腫瘍サイズ(100~300mm³)からの腫瘍体積の後退を示す。NCIのガイドラインによると、最適T/C%が<10%であることは、有意な活性と見なされ、一方、<42%の値は、薬物を開発へとさらに前進させるために許容可能な最低限度である(Corbett, T. 編、In vivo methods for screening and preclinical testing, 「Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval」(B. Teicher 編) Humana Press Inc., Totowa (1997))。リポソームカプセル化は、トポテカンの毒性を増加し、遊離トポテカンについてのMIDを、>40mg/kgから10mg/kgへと減少させた。

10

20

【0072】

(4. LX-1ヒト肺癌) LX-1は、ヒト小細胞癌(SCLC)の実験モデルである。この腫瘍細胞株は、48歳の男性において見出された転移病変の外科的外植片に由来し、そしてヌードマウスにおいて連続継代される腫瘍フラグメントとして、DCTD(NCI)腫瘍貯蔵所により提供される。このLX-1モデルは、1976~1986のNCIインビボ腫瘍群の一部であった(Plowman, J.ら、Human tumor xenograft models in NCI drug development, 「Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval」(B. Teicher 編)、Humana Press Inc., Totowa (1997))。現在は頻度を減らしてしか使用されないが、このLX-1モデルは、その迅速な増殖速度が理由で、依然として、遊離薬物とリポソーム薬物との間の比較活性研究についての有用な異種移植片である。

30

【0073】

一般に、このLX-1モデルは、遊離薬物およびリポソームカプセル化薬物の両方について、MX-1モデルよりもトポテカンの効果に対して感受性が低い(図6;表1を参照のこと)。用量30mg/kg、10mg/kg、または5mg/kgの遊離トポテカンについての最適T/C%は、それぞれ、43%、55%、および67%であった。抗腫瘍活性が、カプセル化を介して改善され、用量30mg/kg、10mg/kg、または5mg/kgについてのT/C%が、それぞれ、8%、11%、および13%となった。興味深いことに、このリポソームトポテカン用量のすべてが、類似する活性を示した。これは、初期の研究であり、他のモデルにおけるその後の研究(図4~6を参照のこと)は、用量<5mg/kgで始まる用量応答を示す。このことは、カンプトテシンクラス化合物(およびおそらく他の抗腫瘍性薬剤)が「自己制限的」効力を示し得、それにより臨界閾値用量を超える用量では、さらなる活性の利点が全く観察されないという知見(Thompson, Biochim. Biophys. Acta 1400:301~319 (1998))と、一致する。この状況は、おそらく、その薬物が制限された腫瘍細胞への接近を有する場合かまたはその薬物が腫瘍血管に対して作用して破壊する(すなわち、抗脈管形成活性を有する)場合に、生じ得る。両方の場合において、より高用量の薬物は、ごく少量の利点しか有しないと预期される。

40

50

【 0 0 7 4 】

L 1 2 1 0 研究において観察されるように、トポテカンのカプセル化は、その薬物の毒性を増強し、そしてその M T D を減少した。腫瘍を保有するヌードマウスにおける M T D は、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ (約 16 % の体重損失) であった。 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ では、4 / 6 の薬物関連毒性死が観察され、そして最大体重損失は、約 29 % に達した (27 ~ 34 % 範囲)。

【 0 0 7 5 】

(D . マウス腫瘍モデルおよびヒト腫瘍モデルにおける効力研究 : 多数回用量研究)
 (1 . M X - 1 ヒト乳癌腫) 複数回投与および薬物に対する腫瘍の長期曝露の効果を調べるために、2 つの複数用量プロトコル ($q 3 \text{ d} \times 4$ スケジュールおよび $q 7 \text{ d} \times 3$ スケジュール) を、M X - 1 異種移植片において調べた。 $q 4 \text{ d} \times 3$ スケジュールにおいて、遊離トポテカンは、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量では中程度の活性を示し、 $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量では、最小の活性を示した (図 7 ; 表 I I を参照のこと)。この投与スケジュールに関する遊離トポテカンの最適 T / C % 値は、 $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量について、それぞれ、55 %、30 %、および 27 % であった。同じ投与スケジュールで投与されたカプセル化トポテカンについて、最適 T / C % 値は、 $0.5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量、 $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量および $5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量について、それぞれ、15 %、100 %、100 %、および 100 % であった。後退したすべての腫瘍を、60 日間モニターした。 $> 1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量のリポソームトポテカンで処理したすべての動物は、この期間の終わりに、腫瘍を有さないと見なされた。

【 0 0 7 6 】

$q 7 \text{ d} \times 3$ 投与スケジュールにおいて、 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量または $10 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量のいずれの遊離トポテカンを用いても、ほとんど活性は観察されなかった (図 8 ; 表 I I を参照のこと)。同じ用量で、リポソームトポテカンは、進行した (s t a g e d) 腫瘍の完全な後退を誘導した。しかし、この投与スケジュールにおいて、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量は毒性があり過ぎた。そして、6 / 6 毒性死 (または安楽死) が 24 日目に観察されたので、この研究のこの部分は停止した。

【 0 0 7 7 】

(2 . L X - 1 ヒト肺癌) L X - 1 モデルにおける最初の研究 (単回用量) は、遊離トポテカンが評価用量 $< 30 \text{ mg} / \text{kg}$ では不活性であり、そしてリポソームトポテカンは腫瘍増殖を阻害するが後退は誘導しないことを示した。この活性を改善するために、複数回 ($q 7 \text{ d} \times 3$) スケジュールを、遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの両方について試験した。この場合、単回用量研究と比較して、かなり大きな活性が遊離トポテカンについて観察され、 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量について、それぞれ、最適 T / C % 値 5 および 40 が得られた。リポソームトポテカンもまた、有意に改善した活性を示し、 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 用量で完全な後退 (およびその後の再増殖) を生じた。このモデルにおけるリポソームトポテカンについての最適 T / C % 値は、 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 日、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ / 日、 $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ / 日について、それぞれ、55、3 および 16 であった。

【 0 0 7 8 】

(3 . 治療指数 (T I) の比較) 遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの治療指数を、いくつかの異なる投与スケジュールで 4 つの異なる腫瘍モデルにおいて評価した (表 4 を参照のこと)。これらの数を作製するために使用した仮定および定義が、表 I I I に見出される。いくつかの場合、真の M E D も真の M T D も観察されなかった。従って、真の M E D も真の M T D を、用量応答トレンドに基づいて数学的評価した。例えば、急性 M T D $40 \text{ mg} / \text{kg}$ が、単回ボラス注射として投与された遊離トポテカンについて観察されたが、真の M T D (重量損失に基づく) は、その薬物が 5 ~ 10 分間にわたって注入された場合には $60 \text{ mg} / \text{kg}$ により近づくようである。また、この分析をいくらか複雑にしたのは、リポソーム処方物の効力のレベルであった。低薬物用量にて、有意な抗

腫瘍活性が達成され、M E D が、特定の研究において評価されなければならなかった。これらの場合、表 4 において注釈をつけた。

【 0 0 7 9 】

一般に、リポソームトポテカンについての治療指数の増加は、単回用量投与について比較的大きく（モデルに依存して、5 倍、10 倍、15 倍および 18 倍）、そして投薬頻度が増加するにつれて減少した。このことが表 4 に示され、q 7 d x 3 スケジュールおよび q 3 d x 4 スケジュールについて、それぞれ、 TI_{TCS} / TI_{Free} 比は、4.7 ~ 7.5 および 3.3 であった。投与がより頻繁になるにつれてこの TI_{TCS} / TI_{Free} 比が減少することは、遊離トポテカンの効力および毒性がスケジュール依存性であることを示す前臨床研究および臨床研究と一致する。

10

【 0 0 8 0 】

（表 4 . マウス腫瘍モデルおよびヒト腫瘍モデルにおける遊離トポテカンおよびリポソームトポテカンの相対的治療指数^a）

【 0 0 8 1 】

【表 4】

腫瘍モデル	接種経路	投薬 スケジュール	TI_{Free}	TI_{TCS}	TI_{TCS} / TI_{Free}
L1210 (マウス白血病)	静脈内	単回	1.3 (2.0) ^b	20	15.4 (10) ^b
CT-26 (マウス結腸癌)	脾内	単回	1.0 (1.5) ^b	5.0	5 (3.3) ^b
MX-1 (ヒト乳癌)	皮下	単回	1.4 (2.1) ^b	25	17.9 (11.9) ^b
		q3dx4	15	50 ^c	3.3
		q7dx3	2.0	15.0 ^c	7.5
LX-1 (ヒト肺癌)	皮下	単回	1.3 (2.0) ^b	13.3	10.2 (6.7) ^b
		q7dx3	4.0	18.8	4.7

20

a 表 I I および表 I I I のデータ；表 I V における式および定義に基づく

b 急性 M T D 40 m g / k g を使用して得た；第 2 の値は、推定 M T D (体重) に基づく

c 約 2 倍大きくあり得る控えめな推定値；低用量での高い活性に起因して、この M E D を評価することは困難である。

【 0 0 8 2 】

（ E . 考察 ）

トポテカンは、リポソームカプセル化のための優れた候補である。簡単に述べると、トポテカンは、細胞周期（S 期）特異的であり、そして長期の曝露とともに活性が大いに増強され、トポテカンは、迅速な血漿薬物動態を示し、そしてこの薬物は、生物学的活性を保持するために p H 6 . 0 より下で維持される必要がある。これは、酸性水性コアを有する比較的非漏出性のリポソーム処方物（例えば、S M : C H、55 : 45）を使用するための理想的シナリオである。必要な酸性内部は、例えば、p H ローディング法またはイオノフォアローディング法によって、作製され得る。ここで、M g - A 23187 法による S M / C H リポソーム中へのトポテカンのカプセル化は、抗腫瘍効力の劇的な増強を生じることを示した。毒性の中程度の増強もまた、リポソームトポテカンについて観察されるが、これは、遊離薬物に対して匹敵する効力（および多くの場合はより優れた効力）を達成する、実質的用量の減少によって、大きく相殺された。

【 0 0 8 3 】

治療指数（T I）は、薬物活性の有用なパラメーターである。なぜなら、それは、生物学的活性（ユーザーが規定する指標、すなわち、M E D、E D₅₀ または E D₈₀）に対す

30

40

50

る毒性 (MTD) の比の尺度であるからである。一般に、TI が低い程、毒性の危険が高い。なぜなら、生物学的効果を惹起するために必要な薬物の容量は、MTD に近づくからである。治療指数は、リポソーム薬物の評価のために特に有用である。なぜなら、TI の相対的变化は、カプセル化の利点 (またはその欠如) を規定するために使用され得るからである。本明細書中に示されるように、TI は、3 倍から 18 倍に改善され、それは、使用されるモデルおよび投与スケジュールに依存する。従って、トポテカンのリポソームカプセル化後に観察される生物学的活性の改善は、いかなる毒性の増加も補償するにとどまらない。

【0084】

いかなる理論によっても拘束されることを意図しないが、抗腫瘍活性の有意な改善およびリポソーム形態の薬物の毒性増加は、薬物動態の改善および活性ラクトン形態での薬物の維持から生じると考えられる。これらの研究において、24 時間後には、84 % のトポテカンが、血漿中にラクトン種として存在したのに対して、たった 5 分後には遊離トポテカンについて 48 % のラクトンが存在した。さらに、同じ用量 (10 mg / kg) の遊離トポテカンおよびリポソームトポテカン、マウスに静脈投与した場合、ラクトン濃度は、< 1 時間の時点で、約 40 倍高かった。24 時間にて、リポソーム薬物についてのラクトン血漿濃度は、5.4 μ g / ml であったのに対して、遊離の薬物について 5 分で 1.5 μ g / mg であり、遊離トポテカンについてのピークラクトン濃度よりなお 3.5 倍高かった。

10

【0085】

20

(表 I)

(単回用量抗腫瘍活性および毒性パラメーターの要旨)

【0086】

【表 5】

モデル	用量	抗腫瘍活性					毒性	
		%T/C ^a	T-C ^b	%ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g
L1210	遊離 5			11		0/8	0/8	+
(静脈内)	遊離 10			22		0/8	0/8	+
NCTEF-005	遊離 20			33		0/8	0/8	+
	遊離 30			44		0/8	0/8	+
	遊離 40			55		0/8	0/8	+
	TCS 1			44		0/8	0/8	+
	TCS 5			**		8/8	0/8	+
	TCS 10			**		8/8	0/8	-9.7
	TCS 20			**		7/7	1/8	-14.8
	TCS 30			**		3/3	5/8	-23.4
CT-26	遊離 5			31		0/8	0/8	+
(脾内)	遊離 10			23		0/8	0/8	+
NCTEF-005	遊離 40			58		1/8	0/8	-0.4
	TCS 2			54		0/8	0/8	+
	TCS 5			**		8/8	0/8	-6.8
	TCS 10			**		7/8	0/8	-19.1
MX-1	遊離 5	78	0.2	0	0.02	0/6	0/6	+
(皮下)	遊離 10	66	1.4	13	0.12	0/6	0/6	+
NCTEF-004	遊離 40	24	4.2	35	0.35	0/6	0/6	+
	TCS 2	8	7.4	65	0.62	0/6	0/6	+
	TCS 5	-49	10.2	74	0.85	0/6	0/6	-0.4
	TCS 10	-62	14.2	83	1.19	1/6	0/6	-18.3
LX-1	遊離 5	67	1.4	0	0.13	0/6	0/6	+
(皮下)	遊離 10	55	1.9	0	0.18	0/6	0/6	+
NCTEF-003	遊離 30	43	2.9	7	0.27	0/6	0/6	-1.3
	TCS 5	13	7.9	30	0.74	0/6	0/6	-1.7
	TCS 10	11	8.7	22	0.82	0/6	0/6	-15.6
	TCS 30	8	9.9	22	0.93	0/6	4/6	-29.0

10

20

30

a 最終処理後の最適 T / C %。負の値は、腫瘍後退を示す。

b 腫瘍増殖遅延（処理した腫瘍およびコントロール腫瘍が 500 mm^3 に達するための時間の差異）

c 未処理腫瘍に対する寿命の増加（%として表す）

d \log （細胞殺傷）（量）

e 研究終了時に腫瘍を有さない動物（すなわち、可視的腫瘍がないか、または長期生存体） 40

f 薬物関連死

g 処理群当たりの最大平均重量損失

h 正の重量変化（すなわち、処理前の重量を下回る重量低下が、どの時点でもなかった）

* * 長期生存体

（表 I I）

（複数回用量抗腫瘍活性および毒性パラメーターの要旨）

【0087】

【表6】

50

		抗腫瘍活性						毒性	
モデル	用量	%T/C ^a	T-C ^b	%ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g	
MX-1	遊離	1.25	55	2.0	20	0.17	0/6	+ ^h	
(q3dx4)	遊離	2.5	30	5.0	55	0.42	0/6	+	
NCTEF-006	遊離	10	27	2.5	52	0.21	1/6	+	
	TCS	0.5	-15	23.5	157	1.96	1.6	0/6	-0.3
	TCS	1.25	-100	**	**		6/6	0/6	-1.0
	TCS	2.5	-100	**	**		6/6	0/6	-11.5
	TCS	5	-100	**	**		6/6	0/6	-20.0
MX-1	遊離	5	58	1.8	27	0.15	0/6	0/6	+
(q7dx3)	遊離	10	61	2.0	検出されず ⁱ		0/6	0/6	-0.8
NCTEF-009	TCS	5	-100	**	**		6/6	0/6	-7.6
	TCS	10	-100	検出されず ⁱ	検出されず ⁱ		6/6	6/6	-29.0
LX-1	遊離	10	40	2.0	21	0.14	0/6	0/6	-6.2
(q7dx3)	遊離	30	5	20.9	58	1.53	0/6	0/6	-8.8
NCTEF-007	TCS	1.25	16	10.8	54	0.79	0/6	0/6	-7.7
	TCS	2.5	3	23.2	79	1.70	0/6	0/6	-7.3
	TCS	5	-55	30.2	100	2.22	0/6	0/6	-10.5
LX-1	遊離	10	28	4.4	41		0/6	0/6	-3.6
(q7dx3)	遊離	30	9	25	72		0/6	2/6	-16.4
NCTEF-011	TCS	7.5	検出されず ⁱ	検出されず ⁱ	検出されず ⁱ		0/6	6/6	>-30
	TCS	0.75	27	11.2	50		0/6	0/6	-1.3

10

20

a 最終処理後の最適 T / C %。負の値は、腫瘍後退を示す。

b 腫瘍増殖遅延（処理した腫瘍およびコントロール腫瘍が 5 0 0 m m ³ に達するための時間の差異）

c 未処理腫瘍に対する寿命の増加（%として表す）

d l o g（細胞殺傷）（量）

e 研究終了時に腫瘍を有さない動物（すなわち、可視的腫瘍がないか、または長期生存体）

f 薬物関連死

g 処理群当たりの最大平均重量損失

h 正の重量変化（すなわち、処理前の重量を下回る重量低下が、どの時点でもなかった）

i 測定せず；リポソームカプセル化群における毒性死

* * 長期生存体；60日目まで可視的腫瘍が存在しない。

【0088】

表 I I I .

毒性および抗腫瘍活性パラメーターについての規定および式

DRD 薬物関連死亡。動物が死亡するか、または薬物 A N D での最終処置後 15 日以内に安楽死させたか、その腫瘍重量がコントロールマウスに対する致死性負荷より小さいか、またはその体重減少が、コントロール動物の体重減少より 20 % を超えた場合に、死亡が薬物に関連するとみなした。

【0089】

G I ₅₀ インビトロでの細胞の集団において 50 % 増殖阻害を引き起こす薬物の濃度。

N C I は、時間 0 の時点で細胞数についての補正を強調するために I C ₅₀ パラメーターを改名した。従って、式は、以下のとおりである：

$$G I_{50} = (T - T_0) / (C - T_0) \times 100 = 50$$

30

40

50

TおよびT₀は、それぞれ、48時間および0時間での光学密度である；Cは0時間でのコントロール（細胞数）光学密度である。

【0090】

%ILS 寿命の増加（%）。生存モデルについて、処置動物（T_{処置}）および未処置動物（T_{コントロール}）についてメジアン生存時間を用いて、以下に従って、これを計算した：

$$(T_{\text{処置}} - T_{\text{コントロール}}) / T_{\text{コントロール}} \times 100$$

固形腫瘍モデルについては、腫瘍が2000mm³（体重の約10%）に達するまでの時間を、メジアン生存の代わりに倫理的カットオフとして用いた。

【0091】

LCK 細胞殺傷の対数（総数）。このパラメーターは、処置の最後に殺傷された細胞のlog₁₀単位の数以下に以下の式に従って推定する：

$$(T - C) \times 0.301 / \text{メジアン倍化時間}$$

正味の細胞殺傷の対数は、以下のように、腫瘍増殖遅延（T - C）パラメーターから処置の持続時間を差し引きすることにより計算され得る：

$$[(T - C) - \text{処置の持続時間}] \times 0.301 / \text{メジアン倍化時間}$$

0の細胞殺傷の対数は、処置の最後における細胞集団が、処置の開始における細胞集団と同じであることを示す。しかし、例えば、4の細胞殺傷の対数は、開始細胞集団における99.99%減少を示す。

【0092】

MBWL 最大体重減少（%）。動物を、最初の薬物投与の前（W_i）および研究の間の種々の日（W_d）に体重測定した。体重の%変化は、以下により計算される：

$$MBWL = (W_d - W_i) / W_i \times 100$$

MED 最小有効用量。これは、いくらか任意のパラメーターである。これらの研究について、本発明者らは、40以下の最適%T/C（固形腫瘍モデルについて）または40～60%の%ILS（生存モデルについて）を達成する最低用量としてMEDを規定した。

【0093】

MTD 最大寛容用量。20%以下のMBWLを生じる薬物用量。

【0094】

%T/C 処置の最初の過程後に得られたコントロール腫瘍に対する処置腫瘍の最適比。これらの値は、以下の式に従って、各観察日での腫瘍重量から、処置の初日でのメジアン腫瘍重量（T_iまたはC_i）を差し引きすることにより得られる：

$$\%T/C = (T/C) \times 100 \quad (\text{ここで、} T > 0) \text{ または}$$

$$\%T/C = (T/T_i) \times 100 \quad (\text{ここで、} T < 0)$$

NCI活性基準に従って、以下のスコア付けシステム（Plowman, et al, Human tumor xenograft models in NCI drug development, 「Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval」(B. Teicher, Ed.), Human Press Inc., Totowa (1997) [22])を適用する：

0 = 不活性、%T/C > 40

1 = 腫瘍阻害、%T/C範囲は1～40

2 = 腫瘍静止、%T/C範囲は0～-40

3 = 腫瘍退行、%T/C範囲は-50～-100

4 = %T/C範囲は-50～-100および>30%（腫瘍なしマウス）。

【0095】

TGD 腫瘍増殖遅延（T - Cともあらわされる）。このパラメーターは、任意のサイズ（代表的には、500または1000mm³）を得るために処置腫瘍および未処置腫瘍についての時間差（日数で）をあらわす。

【0096】

10

20

30

40

50

ＴＩ 治療指数。治療指数は、毒性パラメーター（すなわち、 LD_{50} 、 LD_{10} 、 MTD ）および生物学的活性パラメーター（すなわち、 ED_{50} - 処置群の 50%において、規定された生物学的応答を生じる用量）の比である。一般に、ＴＩは、薬物についての安全性の限界を示す。動物モデル研究について、これは、伝統的には、以下の式によって記載される：

$$TI = LD_{50} / ED_{50}$$

しかし、 LD_{50} 研究を行うことは、もはや倫理的に許されないもので、本発明者らは、これらの研究のために、以下のように治療指数を規定した：

$$TI = MTD / MED.$$

【 0 0 9 7 】

上記の説明は、例示であって、制限するものでないことを意図することが理解されるべきである。多くの実施形態は、上記の説明を読めば当業者に明らかである。従って、本発明の範囲は、上記の説明を参照して決定されるのではなく、添付の特許請求の範囲を参照してこのような特許請求の範囲により権利が与えられる等価物の全範囲とともに決定されるべきである。全ての学術文献および参考文献（特許出願および刊行物を含む）の開示は、全ての目的のために、本明細書中に参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、ピノレルビンのリポソーム処方物の薬物動態学的挙動を示す。パネル A は、異なる薬物：脂質比（0.1 : 1、0.2 : 1、0.3 : 1）の 3 つの処方物について、循環するキャリアからの薬物漏出速度を示す。薬物放出は、薬物：脂質比に依存し、最小の放出速度が最高の比（0.3 : 1）について見られる。パネル B は、血液中での脂質回復を示す。パネル C は、キャリアからの薬物放出速度の調節がピノレルビンについての血液クリアランス半減期に対する変化を生じることを示す。

【図 2】図 2 は、血漿薬物レベルが薬物動態に従って使用される場合の、対応する挙動を示す。パネル A は、薬物貯留 対 時間を示す。パネル B は、脂質回復 対 時間を示す。パネル C は、薬物回復 対 時間を示す。

【図 3】図 3 は、薬物：脂質比の関数として、リポソームピンブラスチンの処方物の薬物動態学的挙動（血液 PK）を示す。リポソームキャリアからの薬物漏出は、最初の薬物：脂質比によって決定され、より高い薬物比の処方物について、より遅い放出を伴う。パネル A は、薬物貯留 対 時間を示す。パネル B は、脂質回復 対 時間を示す。パネル C は、薬物放出速度が血液からの薬物クリアランス半減期に対する変化と相関することを示す。

【図 4】図 4 は、薬物：脂質比の関数として、リポソームピンブラスチンの処方物の薬物動態学的挙動（血漿 PK）を示す。パネル A は、薬物貯留 対 時間を示す。パネル B は、脂質回復 対 時間を示す。パネル C は、薬物放出速度が血漿からの薬物クリアランス半減期に対する変化と相関することを示す。

【図 5】図 5 は、脂質用量の、PK 挙動（血液 PK）に対する影響を示す。ここに例示されるように、類似する薬物放出速度（A）、脂質クリアランス速度（B）および薬物クリアランス速度（C）が、16.6 mg/kg ~ 50 mg/kg の脂質用量範囲にわたって薬物：脂質比が 0.3 : 1 であるリポソームピンブラスチン処方物について見られる。

【図 6】図 6 は、脂質用量の、PK の動きに対する影響を示す（血漿 PK）。ここに例示されるように、類似する薬物放出速度（A）、脂質クリアランス速度（B）および薬物クリアランス速度（C）が、16.6 mg/kg ~ 50 mg/kg の用量範囲にわたって薬物：脂質比が 0.3 : 1 であるリポソームピンブラスチン処方物について見られる。

【図 7】図 7 は、異なる薬物：脂質比のリポソームトポテカンの 2 つの処方物の薬物動態学的挙動を示す。トポテカンが薬物：脂質比 0.11 : 1 でロードされる場合、より低い薬物：脂質比 0.02 : 1 の処方物を有するパネル B と比較して、より長い血漿クリアランス速度を生じる、よりかなり遅い薬物放出速度が見られること、パネル A は示す。

10

20

30

40

【図 1】

イオノフォアロードされたビノレルビンのPK/放出(Payout) [Vinca 03]

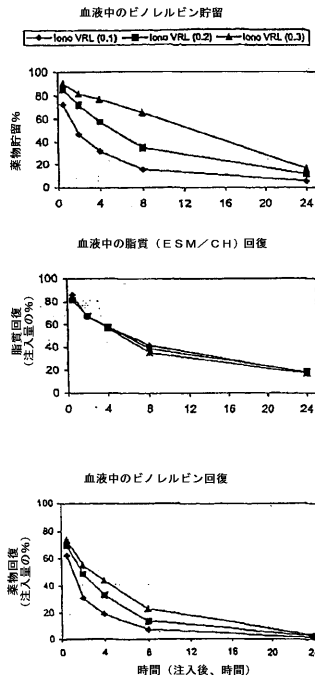


Fig. 1A

Fig. 1B

Fig. 1C

【図 2】

イオノフォアロードされたビノレルビンのPK/放出(Payout) [Vinca 03]

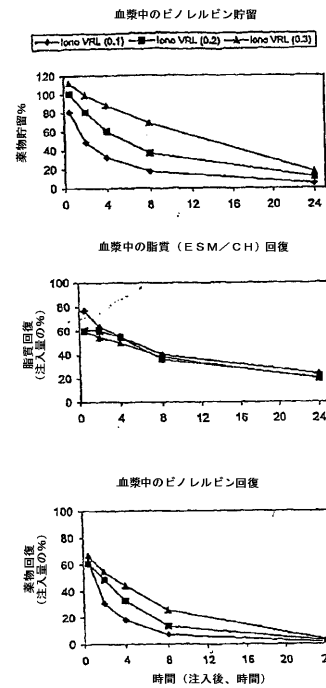


Fig. 2A

Fig. 2B

Fig. 2C

【図 3】

イオノフォアロードされたビンブラスチンのPK/放出(Payout) [Vinca 04]

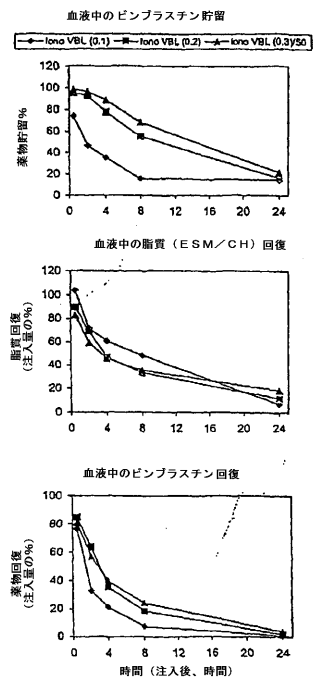


Fig. 3A

Fig. 3B

Fig. 3C

【図 4】

イオノフォアロードされたビンブラスチンのPK/放出(Payout) [Vinca 04]

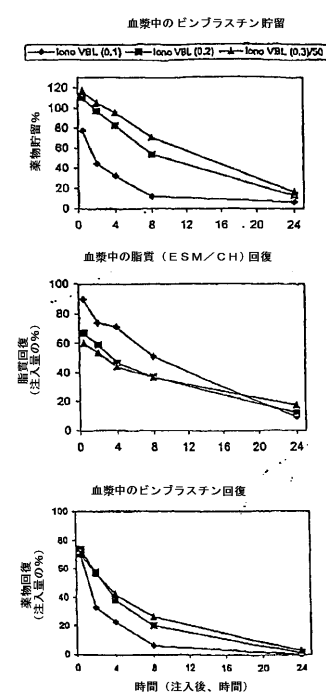


Fig. 4A

Fig. 4B

Fig. 4C

【図 5】

イオノフォアロードされたビンブラスチンのPK/放出(Payout) [Vinea 04]

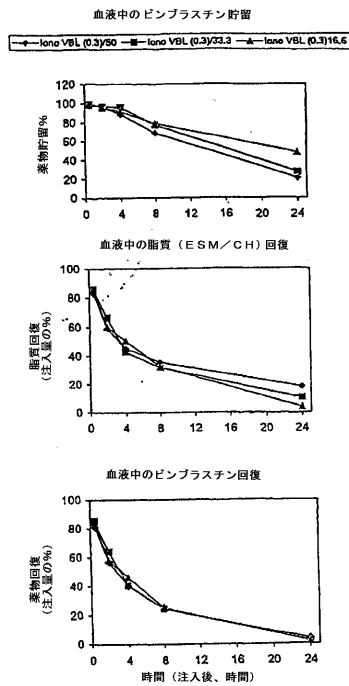


Fig. 5A

Fig. 5B

Fig. 5C

【図 6】

イオノフォアロードされたビンブラスチンのPK/放出(Payout) [Vinea 04]

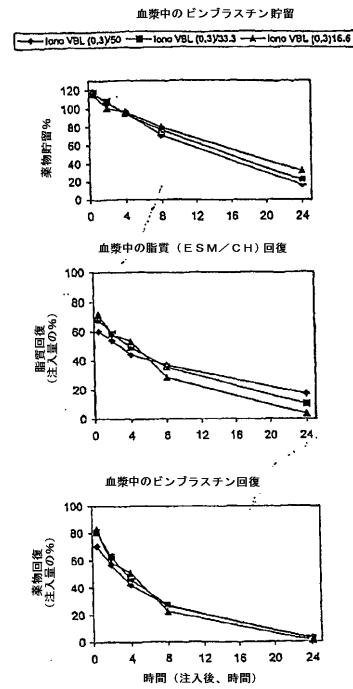


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

【図 7】

イオノフォアロードされたトポテカンのPK/放出(Payout)

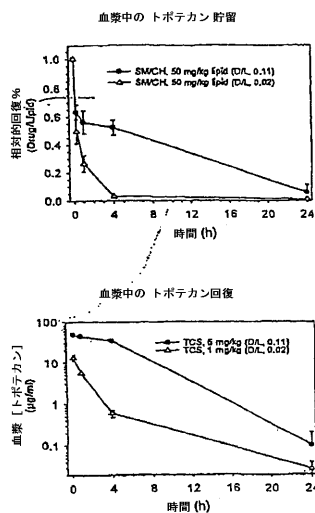


Fig. 7A

Fig. 7B

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02077 A2(51) International Patent Classification: A61K 9/127,
31/47

(21) International Application Number: PCT/CA01/00925

(22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)

(25) Filing Language: English

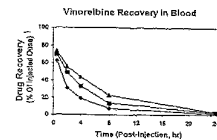
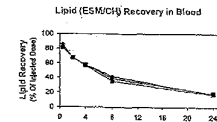
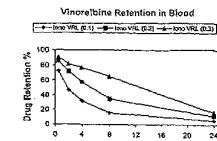
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/215,556 30 June 2000 (30.06.2000) US
60/264,616 26 January 2001 (26.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): INEX
PHARMACEUTICALS CORPORATION [CA/CA];
100 - 8900 Glenlyon Parkway, Glenlyon Business Park,
Burnaby, British Columbia V6K 3S4 (CA).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MADDEN,
Thomas, D. [CA/CA]; 2714 West 31st Avenue, Van-
couver, British Columbia V6L 2A1 (CA). SEMPLE, Sean,
C. [CA/CA]; 301 - 2880 Oak Street, Vancouver, British
Columbia V6H 2K5 (CA). AHKONG, Quet, F. [CA/CA];
8588 - 143rd Street, Surrey, British Columbia V3W 0N9
(CA).(74) Agents: FETHERSTONHAUGH & CO. et al.; Box
11560, Vancouver Centre, 650 West Georgia Street, Suite
2200, Vancouver, British Columbia V6B 4N8 (CA).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: LIPOSOMAL ANTINEOPLASTIC DRUGS AND USES THEREOF

PK/Payout of liposome loaded Vinorelbine [Vince 03]



(57) Abstract: This invention relates to liposomal antineoplastic agents (e.g., camptothecin) compositions and methods of using such compositions for treating neoplasia and for inhibiting angiogenesis. The compositions and methods are useful for modulating the plasma circulation half-life of an active agent.

WO 02/02077 A2

WO 02/02077 A2



SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

LIPOSOMAL ANTINEOPLASTIC DRUGS AND USES THEREOF

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[01] This application is related to U.S. Provisional Application No. 60/215,556, filed June 30, 2000, entitled "Liposomal Camptothecins and Uses Thereof," and U.S. Provisional Application No. 60/264,616, filed January 26, 2001, entitled "Liposomal Antineoplastic Drugs and Uses Thereof," both of which are incorporated herein by reference in their entireties for all purposes. U.S. Patent Application No. ___, bearing Attorney Document No. 016303-008020, filed June 29, 2001, entitled "Liposomal Camptothecins and Uses Thereof," is hereby incorporated by reference for all purposes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 [02] This invention relates to liposomal compositions and methods of using such compositions for treating neoplasia and for inhibiting angiogenesis.

[03] Many anticancer or antineoplastic drugs have been encapsulated in liposomes. These include alkylating agents, nitrosoureas, cisplatin, antimetabolites, and anthracyclines. Studies with liposomes containing anthracycline antibiotics have clearly
15 shown reduction of cardiotoxicity and dermal toxicity and prolonged survival of tumor bearing animals compared to controls receiving free drug.

[04] Liposomal anticancer drugs modify drug pharmacokinetics as compared to their free drug counterpart. For a liposomal drug formulation, drug pharmacokinetics will be largely determined by the rate at which the carrier is cleared from
20 the blood and the rate at which the drug is released from the carrier. Considerable efforts have been made to identify liposomal carrier compositions that show slow clearance from the blood and long-circulating carriers have been described in numerous scientific publications and patents. Efforts have also been made to control drug leakage rates from liposomal carriers, using for example, transmembrane potential to control release.

25 [05] Therapeutic camptothecins, such as Topotecan (9-dimethylaminomethyl-10-hydroxy-camptothecin; Hycamtin™), and Irinotecan, are a semi-synthetic, water soluble derivative of camptothecin, an alkaloid extracted from the stem wood of the Chinese tree *Camptotheca acuminata* (Wall, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **88**:3888-3890

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

(1966)). Camptothecins belong to the topoisomerase inhibitor class of antineoplastic agents, specifically inhibiting the action of the nuclear enzyme topoisomerase I which is involved in DNA replication (Hsiang, *et al.*, *Cancer Res.* **48**:1722-1726 (1988)). As such, topotecan exhibits a cell cycle-specific mechanism of action, acting during S-phase (DNA replication) to cause irreversible double strand breaks in DNA that ultimately lead to G2 cell cycle arrest and apoptosis. In the free form, the drug has a broad spectrum of activity against a range of tumor cell lines and murine allograft and human xenograft tumor models (McCabe, F. L. *et al.*, *Cancer Invest* **12**:308-313 (1994); Emerson, *et al.*, *Cancer Res.* **55**:603-609 (1995); Thompson, *Biochim. Biophys. Acta* **1400**:301-319 (1998); Ormrod, *et al.*, *Drugs* **58**:533-551 (1999); Hardman, *et al.*, *Anticancer Res.* **19**:2269-2274 (1999)). More recently, evidence has emerged that topotecan has strong anti-angiogenic properties that may contribute to its anti-tumor mechanism of action (O'Leary, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **5**:181-187 (1999); Clements, *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**:411-416 (1999)). All these treatments are associated with dose-limiting toxicity such as non-cumulative myelosuppression leading to anaemia, neutropenia and thrombocytopenia, and gastrointestinal-related toxicity, including mucositis and diarrhea. Clinically, topotecan has been approved for second-line therapy in ovarian and small cell lung cancer (SCLC) and is currently the focus of extensive clinical evaluation.

[06] Lipid formulations of camptothecins have been proposed as therapeutic agents (*see*, U.S. Patent No. 5,552,156 and PCT Publication No. WO 95/08986. However, not all lipid formulations are equal for drug delivery purposes and extensive research continues into formulations which demonstrate preferred characteristics for drug loading and storage, drug administration, pharmacokinetics, biodistribution, leakage rates, tumor accumulation, toxicity profile, and the like. With camptothecins, the field is further complicated because dose limiting toxicities in humans may be 10-fold lower than in mice (Erickson-Miller, *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **39**:467-472 (1997)).

[07] Improved liposomal formulations of antineoplastic agents could prove very useful. It is an object of the instant invention to provide lipid formulated antineoplastic agents having novel clinical utility.

SUMMARY OF THE INVENTION

[08] The present invention provides compositions and methods useful for modulating the plasma circulation half-life of an active agent (*e.g.*, topotecan). The

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

liposomal formulations have increased clinical efficacy and decreased collateral toxicity. In addition, the present invention provides methods and liposomal compositions for treating neoplasia and inhibiting angiogenesis.

[09] As such, in one embodiment, the present invention provides a method
5 for modulating the plasma circulation half-life of an active agent, comprising: (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and (b) varying the amount of the active agent that is precipitated in the liposome. Surprisingly, by varying the amount of active agent that is precipitated in the liposome, it is possible to modulate the release kinetics of the active agent into the plasma. Preferred active agents are
10 antineoplastic drugs, such as a camptothecin (*e.g.*, topotecan).

[10] In another embodiment, the present invention provides a liposomal formulation, comprising: a) an antineoplastic drug; and b) a liposome having free antineoplastic drug and precipitated antineoplastic drug, wherein the precipitated antineoplastic drug in the liposome is at least 50% of the total antineoplastic drug. By
15 tailoring the amount of precipitated antineoplastic drug in the liposome, it is possible to control the release of the drug, both *in vitro* and *in vivo*. In certain preferred embodiments, high intraliposomal concentrations of the active agent (*e.g.*, topotecan) results in a high amount of precipitated form. In this aspect, subsequent release rates of the drug *in vivo* are slow. In certain aspects, a slow release rate is preferable and more efficacious compared to a
20 fast release rate.

[11] In yet another embodiment, the present invention provides a liposomal formulation, comprising: a) an active agent; b) a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and c) an empty liposome.

[12] In this aspect, the serum half-life of the liposome is prolonged by
25 including empty liposomes in the formulation. It will be readily apparent to those of skill in the art that any of a variety of lipids can be used to form the liposomal compositions of the present invention. In a presently preferred embodiment, the lipid comprises a mixture of sphingomyelin and cholesterol, preferably at a sphingomyelin:cholesterol ratio (molar ratio) of about 30:70 to about 60:40. In one preferred embodiment, the liposome comprises
30 sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.

[13] In still another aspect, the present invention provides a method of treating a solid tumor in a human afflicted therewith, the method comprising administering to the human an effective amount of a liposomal formulation of the present invention in a

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

pharmaceutically acceptable carrier. A variety of solid tumors can be treated using the compositions of the present invention. In a preferred embodiment, the solid tumor to be treated is selected from the group consisting of solid tumors of the lung, mammary, colon and prostate. In another preferred embodiment, the method further comprises co-administration of a treatment or active agent suitable for treating neutropenia or platelet deficiency.

[14] In a preferred embodiment, a liposomal topotecan is used to treat the solid tumors. In addition, it will be readily apparent to those of skill in the art that any of a variety of lipids can be used to form the liposomal compositions of the present invention.

[15] Other features, objects and advantages of the invention and its preferred embodiments will become apparent from the detailed description which follows.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[16] **Figure 1 A-C** shows the pharmacokinetic behavior of a liposomal formulation of vinorelbine. **Panel A** shows the rates of drug leakage from circulating carriers for three formulations of differing drug:lipid ratio (0.1:1, 0.2:1, 0.3:1). Drug release is dependent upon drug:lipid ratio with the slowest rate of release seen for the highest ratio (0.3:1). **Panel B** shows lipid recovery in the blood. **Panel C** shows that modulation in drug release rates from the carrier results in changes to the blood clearance half-life for vinorelbine.

[17] **Figure 2 A-C** shows a corresponding behavior when plasma drug levels are used to follow pharmacokinetics. **Panel A** shows drug retention versus time. **Panel B** shows lipid recovery versus time. **Panel C** shows drug recovery versus time.

[18] **Figure 3 A-C** shows the pharmacokinetic behavior of formulations of liposomal vinblastine as a function of drug:lipid ratio (blood PK). Drug leakage from the liposomal carrier is determined by the initial drug:lipid ratio with slower release for formulations of higher drug ratio. **Panel A** shows drug retention versus time. **Panel B** shows lipid recovery versus time. **Panel C** shows drug release rates correlate with changes to drug clearance half-life from the blood.

[19] **Figure 4 A-C** shows the pharmacokinetic behavior of formulations of liposomal vinblastine as a function of drug:lipid ratio (plasma PK). **Panel A** shows drug retention versus time. **Panel B** shows lipid recovery versus time. **Panel C** shows drug release rates correlate with changes to drug clearance half-life from the plasma.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

[20] Figure 5 A-C shows the influence of lipid dose on PK behavior (blood PK). As illustrated therein, similar rates of drug release (A), lipid clearance (B) and drug clearance (C) are seen for a liposomal vinblastine formulation of drug:lipid ratio 0.3:1 over a lipid dose range of 16.6 mg/kg to 50 mg/kg.

5 [21] Figure 6 A-C shows the influence of lipid dose on PK behavior (plasma PK). As illustrated therein, similar rates of drug release (A), lipid clearance (B) and drug clearance (C) are seen for a liposomal vinblastine formulation of drug:lipid ratio 0.3:1 over a lipid dose range of 16.6 mg/kg to 50 mg/kg.

10 [22] Figure 7 A-B shows the pharmacokinetic behavior of two formulations of liposomal topotecan of differing drug:lipid ratios. Panel A shows that when topotecan is loaded to a drug:lipid ratio of 0.11:1, a much slower drug release rate is seen resulting in a much longer plasma clearance rate compared to Panel B having a formulation of lower drug:lipid ratio of 0.02:1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION AND PREFERRED EMBODIMENTS

15 [23] The activity of many anticancer drugs is dependent on their pharmacokinetic behavior. This pharmacokinetic behavior defines the drug concentrations and period of time over which cancer cells are exposed to the drug. In the case of most anticancer drugs, longer exposure times are preferred as this results in increased killing of the cancer cells. In general, several parameters are used to describe drug pharmacokinetics. Plasma clearance half-time and area under the curve (AUC) are examples. The plasma clearance half-time is the time required for half of the administered drug to be removed from the plasma. The AUC is a measure of plasma drug levels over time and provides an indication of the total drug exposure. Generally, increased plasma clearance half-life and plasma AUC for an anticancer drug correlate with increased therapeutic efficacy.

I. MODULATING ACTIVE AGENT RELEASE

20 [24] The present invention describes methods and formulations for modulating drug release from liposomes. In one embodiment, the present invention provides a method for modulating the plasma circulation half-life of an active agent, comprising: (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and (b) varying the amount of the active agent that is precipitated in the liposome.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Preferably, the “free active agent” and the “precipitate active agent” are the same active agent, however the present invention is not so limited. As used herein, the term “modulating” can mean either increasing or decreasing the release rate of the active agent from the liposomal carrier. For antineoplastic active agents, modulating is preferably decreasing or
5 slowing the release rate of the active agent.

[25] In preferred aspects, the liposomes of the present invention contain both encapsulated free active agent and precipitated active agent. The amount of active agent that is precipitated within the liposome can be varied using a variety of mechanisms. For example, by varying the active agent to lipid ratio the amount of active agent that is
10 precipitated can be increased or decreased. Drug loading at low drug:lipid ratios, results in low concentrations of active agent (*e.g.*, topotecan) in the liposome interior and hence most, if not all of the entire drug is in solution *i.e.*, not precipitated or free. Low precipitation amounts result in a fast release rate of the drug from the liposome. Conversely, a high drug:lipid ratio results in high intraliposomal concentrations and high precipitation amounts.
15 When the drug is in a precipitated form, subsequent release rates *in vivo* or *in vitro* are slow. For antineoplastic drugs (*e.g.*, topotecan), slow release rates are preferable.

[26] Without being bound by any particular theory, it is believed that the liposomes of the present invention undergo a “precipitation-dissolution mechanism” (PDM), which dictates drug release. In the PDM mechanism of the present invention, the dissolution
20 rate of precipitated active agent (*e.g.*, topotecan) within the liposome’s interior into the internal solution of the liposome is slow, compared to the rate of release of active agent out of the liposome to the exterior and is thus rate determining. That is, the rate of dissolution of the precipitated drug to free drug in the liposome’s interior determines how fast the drug will be released into the plasma.

[27] In certain embodiments, the active agent to lipid ratio can be varied by
25 the addition of empty liposomes. In general, liposomes whether empty or those having active agents contained therein are cleared by cells of the reticuloendothelial system (RES). Typically, the RES will remove 80-95% of a dose of injected liposomes within one hour, effectively out-competing the selected target site for uptake of the liposomes. A variety of
30 factors which influence the rate of RES uptake of liposomes have been reported including, liposome size, charge, degree of lipid saturation, and surface moieties. By including empty liposome vesicles, it is possible to shield the liposomes containing active agent from the RES. Thus, empty liposome vesicles actually extend the blood circulation lifetime of the liposomes

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

by acting as "decoys". An extended circulation time is often needed for liposomes to reach the target region, cell or site from the site of injection. The empty liposomal vesicles keep the RES busy and as a result, the serum half-life of the liposomes having active agent contained therein is increased.

5 [28] In certain other aspects, a component(s) is added to the liposome that will enhance the precipitation of the active agent. In this aspect, a variety of charged ions can be used to increase the amount of precipitated active agent in the vesicle's interior. In preferred aspects, divalent, trivalent or polyvalent anions are used. Suitable anions include, but are not limited to, carboxylate ($-\text{CO}_2^-$), sulfonate (SO_3^-), sulfate (SO_4^{2-}), hydroxide ($-\text{OH}$),
10 alkoxides, phosphate ($-\text{PO}_4^{2-}$), and phosphonate ($-\text{PO}_3^{2-}$). Those of skill in the art will know of other components, which will enhance the amount of precipitated active agent in the liposome's interior.

[29] Moreover, the drug:lipid ratios can be varied using the size of the liposome. The larger the liposome vesicle used, the smaller the drug:lipid ratio. In certain
15 aspects, both the active agent to lipid ratio and the size of the liposome are varied to optimize the efficacy of the active agent.

[30] The amount of encapsulated active agent that is precipitated in vesicle will vary and is somewhat dependent on the active agent itself. In certain embodiments, the amount of precipitated active agent is at least about 25% to about 95% (such as about 25%,
20 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% and 95%) of total active agent. For topotecan, the amount of the precipitated active agent encapsulated in the liposome is at least 50% of the total active agent.

[31] In preferred aspects, when the active agent is an antineoplastic drug, using higher drug:lipid ratios results in higher amounts of encapsulated precipitated drug. As
25 a result, drug release from the liposomes *in vivo* is slower than for similar compositions prepared at lower drug:lipid ratio. These higher drug:lipid ratio liposomes exhibit extended plasma half-life and increased plasma AUC values. Advantageously, these formulations exhibit improved antitumor efficacy.

[32] In certain embodiments, the ratio of active agent: lipid is about 0.005-
30 1:1 (w/w).

[33] Preferably, the ratio of active agent: lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w) and more preferably, the ratio of active agent:lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w). By modulating the

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

plasma circulation half-life of the active agent, it is thus possible to maximize or optimize efficacy of the active agent.

II. COMPOSITIONS AND METHODS OF MAKING LIPOSOMAL FORMULATIONS

- 5 [34] Liposome, vesicle and liposome vesicle will be understood to indicate structures having lipid-containing membranes enclosing an aqueous interior. The structures can have one or more lipid membranes unless otherwise indicated, although generally the liposomes will have only one membrane. Such single-layered liposomes are referred to herein as "unilamellar." Multilayer liposomes are referred to herein as "multilamellar."
- 10 [35] The liposomes that are used in the present invention are preferably formed from lipids which when combined form relatively stable vesicles. An enormous variety of lipids are known in the art, which can be used to generate such liposomes. Preferred lipids include, but are not limited to, neutral and negatively charged phospholipids or sphingolipids and sterols, such as cholesterol. The selection of lipids is generally guided
- 15 by consideration of, *e.g.*, liposome size and stability of the liposomes in the bloodstream.
- [36] Preferred liposome compositions for use in the present invention include those comprising sphingomyelin and cholesterol. The ratio of sphingomyelin to cholesterol in the liposome composition can vary, but generally is in the range of from about 75/25 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol to about 30/50 mol %/mol %
- 20 sphingomyelin/cholesterol, more preferably about 70/30 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol to about 40/45 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol, and even more preferably about 55/45 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol. Other lipids can be included in the liposome compositions of the present invention as may be necessary, such as to prevent lipid oxidation or to attach ligands onto the liposome surface. Generally, if lipids
- 25 are included, the other inclusion of such lipids will result in a decrease in the sphingomyelin/cholesterol ratio. Liposomes of this type are known as sphingosomes and are more fully described in U.S. Patent No. 5,814,335, the teachings of which are incorporated herein by reference.
- [37] A variety of methods are available for preparing liposomes as
- 30 described in, *e.g.*, Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980); U.S. Patent Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028, the text *Liposomes*, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1; and Hope, *et al.*, *Chem. Phys. Lip.* 40:89 (1986), all of

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

which are incorporated herein by reference. The protocol for generating liposomes generally includes: mixing of lipid components in an organic solvent; drying and reconstituting liposomes in aqueous solvent; and sizing of liposomes (such as by extrusion), all of which are well known in the art.

5 [38] Alternative methods of preparing liposomes are also available. For instance, a method involving detergent dialysis based self-assembly of lipid particles is disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,976,567 issued to Wheeler, *et al.*, which avoids the time-consuming and difficult to-scale drying and reconstitution steps. Further methods of preparing liposomes using continuous flow hydration are under development and can often
10 provide the most effective large scale manufacturing process.

[39] Preparation of liposomal formulations having active agents (*e.g.*, camptothecins) requires loading of the drug into the liposomes. Loading can be either passive or active. Passive loading generally requires addition of the drug to the buffer at the time of the reconstitution step. This allows the drug to be trapped within the liposome
15 interior, where it will remain if it is not lipid soluble, and if the vesicle remains intact (such methods are employed, for example, in PCT Publication No. WO 95/08986, the teachings of which are incorporated herein by reference).

[40] Active loading is in many ways preferable, and a wide variety of therapeutic agents can be loaded into liposomes with encapsulation efficiencies approaching
20 100% by using a transmembrane pH or ion gradient (*see*, Mayer, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1025**:143-151 (1990) and Madden, *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **53**:37-46 (1990)). Numerous ways of active loading are known to those of skill in the art. All such methods involve the establishment of some form of gradient that draws lipophilic compounds into the interior of liposomes where they can reside for as long as the gradient is maintained. Very
25 high quantities of the desired drug can be obtained in the interior, so much that the drug may precipitate out on the interior and generate a continuing uptake gradient.

[41] Particularly preferred for use with the instant invention is ionophore-mediated loading as disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,837,282, the teachings of which are incorporated by reference herein. The ionophore-mediated loading is an
30 electroneutral process and does not result in formation of a transmembrane potential. With hydrogen ion transport into the vesicle there is concomitant magnesium ion transport out of the vesicle in a 2:1 ratio (*i.e.* no net charge transfer). In the case of topotecan, it is thought that the agent crosses the membrane in a neutral state (no charge). Upon entry into the

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

vesicle, topotecan becomes positively charged. As ionophore-mediated loading is an electroneutral process, there is no transmembrane potential generated.

[42] An important characteristic of liposomal camptothecins for pharmaceutical purposes is the drug to lipid ratio of the final formulation. As discussed earlier, drug:lipid ratios can be established in two ways: 1) using homogenous liposomes each containing the same drug:lipid ratio; or 2) by mixing empty liposomes with liposomes having a high drug:lipid ratio to provide a suitable average drug:lipid ratio. For different applications, different drug:lipid ratios may be desired. Techniques for generating specific drug:lipid ratios are well known in the art. Drug:lipid ratios can be measured on a weight to weight basis, a mole to mole basis or any other designated basis. Preferred drug:lipid ratios range from about .005:1 drug:lipid (by weight) to about 0.2:1 drug:lipid (by weight) and, more preferably, from about 0.1:1 drug:lipid (by weight) to about 0.3:1 drug:lipid (by weight).

[43] A further important characteristic is the size of the liposome particles. For use in the present inventions, liposomes having a size of from about 0.05 microns to about 0.15 microns are preferred.

[44] The present invention also provides liposomal compositions (*e.g.*, camptothecin) in kit form. The kit can comprise a ready-made formulation, or a formulation, which requires mixing of the medicament before administration. The kit will typically comprise a container that is compartmentalized for holding the various elements of the kit. The kit will contain the liposomal compositions of the present invention or the components thereof, possibly in dehydrated form, with instructions for their rehydration and administration.

[45] The liposome compositions prepared, for example, by the methods described herein can be administered either alone or in a mixture with a physiologically acceptable carrier (such as physiological saline or phosphate buffer) selected in accordance with the route of administration and standard pharmaceutical practice. Generally, normal saline will be employed as the pharmaceutically acceptable carrier. Other suitable carriers include, *e.g.*, water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, and the like, including glycoproteins for enhanced stability, such as albumin, lipoprotein, globulin, *etc.* These compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques. The resulting aqueous solutions may be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile aqueous solution prior

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

to administration. The compositions may also contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, *etc.* Additionally, the composition may include lipid-protective agents, which protect lipids against free-radical and lipid-peroxidative damages on storage. Lipophilic free-radical quenchers, such as α -tocopherol and water-soluble iron-specific chelators, such as ferrioxamine, are suitable.

[46] A wide variety of active agents are suitable for the liposomal compositions and methods of the present invention. In a preferred aspect, the active agents are antineoplastic drugs. Currently, there are approximately twenty recognized classes of approved antineoplastic drugs. The classifications are generalizations based on either a common structure shared by particular drugs, or are based on a common mechanism of action by the drugs. A partial listing of some of the commonly known commercially approved (or in active development) antineoplastic agents by classification is as follows:

- [47] Structure-Based Classes:
1. Fluoropyrimidines--5-FU, Fluorodeoxyuridine, Fltorafur, 5'-deoxyfluorouridine, UFT, S-1 Capecitabine;
 2. Pyrimidine Nucleosides--Deoxycytidine, Cytosine Arabinoside, 5-Azacytosine, Gemcitabine, 5-Azacytosine-Arabinoside;
 3. Purines--6-Mercaptopurine, Thioguanine, Azathioprine, Allopurinol, Cladribine, Fludarabine, Pentostatin, 2-Chloro Adenosine;
 4. Platinum Analogues--Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin, Tetraplatin, Platinum-DACH, Ormaplatin, CI-973, JM-216;
 5. Anthracyclines/Anthracenediones--Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantrone;
 6. Epipodophyllotoxins--Etoposide, Teniposide;
 7. Camptothecins--Irinotecan, Topotecan, 9-Amino Camptothecin, 10,11-Methylenedioxy Camptothecin, 9-Nitro Camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin, 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin;
 8. Hormones and Hormonal Analogues--Diethylstilbestrol, Tamoxifen, Toremefine, Tolmudex, Thymitaq, Flutamide, Bicalutamide, Finasteride, Estradiol,

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Trioxifene, Droloxifene, Medroxyprogesterone Acetate, Megesterol Acetate, Aminoglutethimide, Testolactone and others;

9. Enzymes, Proteins and Antibodies--Asparaginase, Interleukins, Interferons, Leuprolide, Pegaspargase, and others;

5 10. Vinca Alkaloids--Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine, Vindesine;

11. Taxanes--Paclitaxel, Docetaxel.

[48] Mechanism-Based Classes:

1. Antihormonals--See classification for Hormones and Hormonal Analogues, Anastrozole;

10 2. Antifolates--Methotrexate, Aminopterin, Trimetrexate, Trimethoprim, Pyritrexim, Pyrimethamine, Edatrexate, MDAM;

3. Antimicrotubule Agents--Taxanes and Vinca Alkaloids;

4. Alkylating Agents (Classical and Non-Classical)--Nitrogen Mustards (Mechlorethamine, Chlorambucil, Melphalan, Uracil Mustard), Oxazaphosphorines

15 (Ifosfamide, Cyclophosphamide, Perfosfamide, Trophosphamide), Alkylsulfonates (Busulfan), Nitrosoureas (Carmustine, Lomustine, Streptozocin), Thiotepa, Dacarbazine and others;

5. Antimetabolites--Purines, pyrimidines and nucleosides, listed above;

6. Antibiotics--Anthracyclines/Anthracenediones, Bleomycin, Dactinomycin,

20 Mitomycin, Plicamycin, Pentostatin, Streptozocin;

7. Topoisomerase Inhibitors--Camptothecins (Topo I), Etoposide, Podophyllotoxins, m-AMSA, Ellipticines (Topo II);

8. Antivirals--AZT, Zalcitabine, Gemcitabine, Didanosine, and others;

9. Miscellaneous Cytotoxic Agents--Hydroxyurea, Mitotane, Fusion Toxins,

25 PZA, Bryostatins, Retinoids, Butyric Acid and derivatives, Pentosan, Fumagillin, and others.

[49] The objective of all antineoplastic drugs is to eliminate (cure) or to retard the growth and spread (remission) of the cancer cells. The majority of the above listed antineoplastic agents pursue this objective by possessing primary cytotoxic activity, effecting a direct kill on the cancer cells. Other antineoplastic drugs stimulate the body's natural immunity to effect cancer cell kill. The literature is replete with discussions on the activity and mechanisms of all of the above drugs, and many others.

30

[50] Exemplary methods of making specific formulations of liposomal camptothecins and, in particular, liposomal topotecan are set out in the examples below.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

III. METHODS OF USING LIPOSOMAL CAMPTOTHECINS

- [51] The liposomal compositions (*e.g.*, camptothecins) of the present invention are used, in the treatment of solid tumors in an animal, such as a human. The examples below set out key parameters of the drug:lipid ratios, dosages of active agent and lipid to be administered, and preferred dose scheduling to treat different tumor types.
- [52] Preferably, the pharmaceutical compositions are administered parenterally, *i.e.*, intraarticularly, intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or intramuscularly. More preferably, the pharmaceutical compositions are administered by intravenous drip or intraperitoneally by a bolus injection. The concentration of liposomes in the pharmaceutical formulations can vary widely, *i.e.*, from less than about 0.05%, usually at or at least about 2-5% to as much as 10 to 30% by weight and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, *etc.*, in accordance with the particular mode of administration selected. For example, the concentration can be increased to lower the fluid load associated with treatment. Alternatively, liposomes composed of irritating lipids can be diluted to low concentrations to lessen inflammation at the site of administration. The amount of liposomes administered will depend upon the particular camptothecin used, the disease state being treated and the judgement of the clinician, but will generally, in a human, be between about 0.01 and about 50 mg per kilogram of body weight, preferably between about 5 and about 40 mg/kg of body weight. Higher lipid doses are suitable for mice, for example, 50 – 120 mg/kg.
- [53] Dosage for the active agent (*e.g.*, camptothecin) will depend on the administering physician's opinion based on age, weight, and condition of the patient, and the treatment schedule. A recommended dose for free topotecan in Small Cell Lung Cancer is 1.5 mg/M² per dose, every day for 5 days, repeated every three weeks. Because of the improvements in treatment now demonstrated in the examples, below, doses of active agent (*e.g.*, topotecan) in humans will be effective at ranges as low as from 0.015 mg/M²/dose and will still be tolerable at doses as high as 15 to 75 mg/M²/dose, depending on dose scheduling. Doses may be single doses or they may be administered repeatedly every 4h, 6h, or 12h or every 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d, 9d, 10d or combination thereof. Preferred scheduling may employ a cycle of treatment that is repeated every week, 2 weeks, three weeks, four weeks, five weeks or six weeks or combination thereof. In a presently preferred embodiment, treatment is given once a week, with the dose typically being less than 1.5 mg/M².
- [54] Particularly preferred topotecan dosages and scheduling are as follows:

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Dosage (mg/M ² /dose)	Period	Repeat Cycle every:
0.15	1dx5d	3 weeks
0.5	1d	1 week
1.5	1d	1 week
15	1d	3 weeks
50	1d	3 weeks

[55] The invention will be described in greater detail by way of specific examples. The following examples are offered for illustrative purposes, and are not intended to limit the invention in any manner. Those of skill in the art will readily recognize a variety of non-critical parameters, which can be changed or modified to yield essentially the same results.

IV. EXAMPLES

A. **Materials and Methods**

[56] 1. **Materials.** Topotecan (Hycamtin™, SmithKline Beecham) was purchased from the pharmacy at the British Columbia Cancer Agency. Sphingomyelin (SM) was purchased from Avanti Polar Lipids. Sphingomyelin from Northern Lipids was used in an early study, but was less soluble in ethanol than the Avanti version. Cholesterol (CH) and the divalent cation ionophore A23187 were purchased from Sigma. [³H]-cholesterylhexadecylether (Dupont) was used as a lipid marker.

[57] 2. **Mice.** Female, ICR, BDF-1 or athymic *nu/nu* (6 - 8 weeks) were purchased from Harlan-Sprague Dawley (Indianapolis, IN). All animals were quarantined for one week prior to use. All studies were conducted in accordance with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the Institutional Animal Care and User Committee (IACUC).

[58] 3. **Formulation of topotecan by the Mg-A23187 method.** Topotecan was encapsulated in SM:CH (55:45, mol/mol) liposomes using the Mg-A23187 ionophore method according to U.S. Patent No. 5,837,282. The initial drug-to-lipid ratio was 0.10 (w/w) and drug loading was typically 95-100%. The external buffer consisted of 10 mM PBS, pH 7.5 and 300 mM sucrose. All formulations were analyzed with respect to particle size, drug loading efficiency, pH, and drug and lipid concentration.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- [59] 4. **Drug preparation and dosing.** Each vial of topotecan (Hycamtin™) was hydrated in 1.0 ml of sterile water, giving a topotecan concentration of 4.0 mg/ml. Subsequent dilutions were μ l made in 0.9% sterile saline to maintain the low pH required for the lactone species of the drug. Unused drug in the water stock solution (4.0 mg/ml) was stored at 4°C in the absence of light. Liposome encapsulated topotecan was diluted in 0.9% saline to the required concentration for administration. All drug administrations were at 10 ml/kg (200 μ l/20 g mouse) via the lateral tail vein.
- [60] 5. **Pharmacokinetic and in vivo leakage studies.** The pharmacokinetics and drug leakage of free and liposome encapsulated topotecan were evaluated in ICR mice over 24 h following i.v. administration via the lateral tail vein. Two different drug-to-lipid ratios, *i.e.*, 0.10 (w/w) and 0.02 (w/w), were used to examine the influence of drug-to-lipid ratio and lipid dose on drug leakage and PK behavior. Encapsulated topotecan was administered at 1 mg/kg (10 or 50 mg/kg lipid) and 5 mg/kg topotecan (50 mg/kg lipid). Correspondingly, the PK behavior of free topotecan was evaluated at 1 and 5 mg/kg. Total topotecan in blood was determined by a fluorescence assay preceded by precipitation of plasma proteins. Topotecan was quantified by spectrofluorimetry at an excitation (2.5 nm slit width) and emission wavelength (2.5 nm slit width) of 380 and 518 nm, respectively. Lipid levels in plasma were determined by liquid scintillation counting of the [³H]-CHE label.
- [61] 6. **MTD studies.** MTD studies were performed in the host mouse strain corresponding to each tumor model. Single dose and multidose MTD were determined by monitoring weight loss over time. The MTD was defined as the dose that resulted in 20% weight loss.
- [62] 7. **Myelosuppression and neutropenia studies.** Alteration in peripheral blood cell levels as a consequence of topotecan administration was assessed over 4-6 weeks in ICR mice. Blood was collected into EDTA microtainer tubes at Day 1, 3, 5, 7, 14, and 21 following i.v. administration of free or liposome encapsulated topotecan at 10 mg/kg. Empty vesicles were administered as a control. CBC and differential analysis was performed at Central Labs for Veterinarians (Langley, BC) to quantify cellular levels, ratios and morphology.
- [63] 8. **Tumor Models.** The L1210 murine leukemia model and the CT-26 murine colon metastases model were employed as in standard protocols. Human MX-

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

1 and LX-1 cell lines were obtained from the DCTD Tumor Repository in Frederick, MD. These cell lines were received as tumor fragments and were propagated in NCr nude mice by serial transplantation of 3 x 3 mm fragments. Experiments were not initiated until the cell lines had been through 3 passages in nude mice and the tumor lines were restarted when the passage number reached 10.

[64] 9. **Efficacy Studies.** All dosing of free and liposomal topotecan was administered by the intravenous route at 10 ml/kg via the lateral tail vein. In the L1210 and CT-26 models, dosing occurred on day 1 (tumor cell injection = day 0). For the MX-1 and LX-1 tumor models, tumor volume was determined by repeated perpendicular measurements of tumor dimensions and using the formula:

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = (L \times W^2)/2$$

[65] Dosing was initiated in the MX-1 and LX-1 models when tumors had clearly demonstrated growth and were in the range 100-300 mm³.

[66] Since most drugs exhibit a balance between a biological effect and toxicity, it is useful to examine a parameter that incorporates both of these attributes. The most commonly employed parameter is therapeutic index (TI). Traditionally, therapeutic index is defined as:

$$TI = LD_{50}/ED_{50}$$

[67] However, since it is no longer permissible to perform LD50 studies, therapeutic index for these studies has been defined as follows:

$$TI = MTD/MED.$$

[68] In the above formula, MTD is the maximum tolerated dose, defined as that dose that causes a mean weight loss of 20% in a group of animals; and MED is the minimal effective dose, defined as the dose that produces an optimal %T/C value of ≤ 40 in the solid tumor models or an %ILS of $50 \pm 10\%$ in the survival models.

B. Results

[69] 1. **Pharmacokinetics and drug leakage.** The influence of liposome encapsulation and drug-to-lipid ratio on plasma pharmacokinetics and drug leakage of topotecan was examined over 24 h in ICR mice. Liposome encapsulation of topotecan (drug-to-lipid ratio, 0.11, wt/wt) had a dramatic influence on the pharmacokinetics parameters of the drug (*see*, Figure 1, top; and Table 1). At a 5 mg/kg dose of topotecan, a 164-fold increase in plasma AUC, a 24-fold increase in C_{max} and a 24-fold increase in the

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

plasma α half-life were observed for the liposomal drug relative to the free drug (*see*, Table 1). Historically, large improvements in AUC and plasma half-lives of liposomal drugs have resulted in enhanced delivery of the drug to disease-sites (such as tumors), a process known as "disease-site targeting".

5 [70] The formulations used in this study were prepared by the Mg-A23187 ionophore method. There was an initial rapid release of drug in the first 10-30 minutes after iv administration (*see*, Figure 1, bottom), followed by a more gradual release phase. The $t_{1/2\text{release}}$ for the Mn-A23187 and Mg-A23187 formulations were ~ 3 h and $\sim 5-7$ h, respectively; however, very little drug was present in either formulation at 24 h.

10 [71] For most liposomal drug formulations, the pharmacokinetic properties of the encapsulated drug are controlled by the lipid composition and dose. Liposomal topotecan has been shown to exhibit exceptional anti-tumor activity, even at very low drug doses (0.5 mg/kg; drug-to-lipid ratio, 0.10, wt/wt). At these drug doses and drug-to-lipid ratio, liposome elimination from the plasma is expected to be rapid. Therefore, to determine
15 whether the pharmacokinetics of topotecan at low doses could be improved, a low drug-to-lipid ratio (0.02, wt/wt) formulation of topotecan was investigated. Interestingly, in this study, the low drug-to-lipid ratio formulation released the drug much faster than the higher drug-to-lipid ratio (0.11, wt/wt) formulation. This result was unexpected.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of free and liposomal topotecan.

Formulation	Dose (mg/kg)	AUC (h•µg/ml)	C _{max} (µg/ml)	Cl (ml/h)	α _{1/2} (h)	β _{1/2} (h)
Free	1	1.97	0.75	13.9	0.14	11.8
	5	2.77	2.17	49.6	0.26	11.4
TCS	1	65.7	16.3	0.417	2.79	
	5	453	51.0	0.302	6.16	

All parameters were derived from one or two-compartment models using WINNONLIN PK modeling software.

[72] 2. **Maximum tolerated doses.** Single and multidose MTD studies were performed in tumor bearing Balb/c, BDF-1 and NCx *nu/nu* mice. Body weights of individual mice were monitored throughout each study to evaluate the general tolerability of free and liposomal topotecan and, where possible, to establish an MTD (*see*, Figure 2). The maximum tolerated dose of liposomal topotecan was 10 mg/kg on a single administration, 7.5 mg/kg on a q7dx3 schedule and 5 mg/kg on a q3dx4 schedule. The reported LD₁₀ of free topotecan following a single intravenous infusion in mice is 75 mg/M² (~ 25 mg/kg) [Hycamtin™ product monograph]; however, very little weight loss was observed at doses up to 40 mg/kg, although this was considered the MTD due to acute responses. Drug quantities were limited so doses higher than 40 mg/kg (administered over 5-10 minutes) were not pursued. It has previously been indicated that the LD₁₀ of free topotecan on a qdx5 schedule is 14 mg/M²/dose (~ 4.7 mg/kg/dose) (Grochow, *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* **20**:706-713 (1992)).

[73] 3. **Toxicity.** The major dose-limiting toxicity of free topotecan administered daily in humans for 5 consecutive days (dx5) at 1.5 mg/M²/dose, the MTD, is non-cumulative myelosuppression. As mentioned earlier, humans are more sensitive than mice to myelosuppression and can only tolerate 11% of the MTD in mice (1.5 vs 14 mg/M²). In this regard, dogs have been shown to be a much better predictor of topotecan myelosuppression in humans (Burris, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* **84**:1816-1820 (1992)). However, mice should be suitable for comparing the relative myelosuppressive effects of free and liposome encapsulated topotecan.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- [74] In a study, the maximal reduction in peripheral WBC counts occurred at day 3 post-injection following administration of liposomal topotecan. A comparison of peripheral blood cell levels and morphology was then made at day 3 following administration of free or liposome encapsulated topotecan or empty vesicles (*see*, Table 2). The dose used for this comparison was the MTD of liposome-encapsulated topotecan (10 mg/kg). A significant reduction in circulating neutrophils was observed for liposomal topotecan relative to free topotecan (~10-fold), empty vesicles (~10-fold) or control animals (~20-fold). Total WBC levels and the lymphocyte sub-population were reduced approximately 2-fold for liposomal topotecan relative to control animals. No significant differences were observed in these parameters for free topotecan at the same dose. At day 21 post-injection total, WBC levels for liposomal topotecan remained approximately 2.5-fold lower than normal animals; however, neutrophils levels had recovered from a 20-fold decrease to a 3-fold decrease relative to normal mice. Lymphocyte levels remained ~2-fold lower than normal mice. No other significant differences were observed.
- [75] Analysis of serum chemistry parameters at day 3 post-injection revealed very few changes relative to untreated animals (*see*, Table 3). The only change of note was a statistically significant increase (~2-fold) in globulin levels and a concomitant decrease in the albumin/globulin ratio for animals treated with liposomal topotecan. No other significant changes were observed.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Table 2. Blood CBC and differential of ICR mice treated with a 10 mg/kg i.v. dose of free or liposome encapsulated topotecan.

Treatment	Day Post-Injection	WBC Differential										PLT ($\times 10^9/L$)
		WBC ($\times 10^9/L$)	Neutro ($\times 10^9/L$)	Lympho ($\times 10^9/L$)	Mono ($\times 10^9/L$)	Eosino ($\times 10^9/L$)	Baso ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	Hc (L/L)		
Control												
	3	6.47 \pm 1.62	0.937 \pm 0.201	5.23 \pm 1.45	0.180 \pm 0.042	0.059 \pm 0.039	0.056 \pm 0.053	8.67 \pm 0.93	142 \pm 12	0.438 \pm 0.045	717 \pm 317	
Free												
	3	6.70 \pm 1.95	0.520 \pm 0.200	5.90 \pm 1.70	0.177 \pm 0.072	0.031 \pm 0.021	0.057 \pm 0.040	8.47 \pm 0.39	136 \pm 05	0.444 \pm 0.012	879 \pm 145	
	21	5.16 \pm 1.18	0.480 \pm 0.122	4.33 \pm 0.93	0.247 \pm 0.180	0.034 \pm 0.016	0.088 \pm 0.071	9.81 \pm 0.37	154 \pm 04	0.493 \pm 0.014	907 \pm 059	
TCS												
	3	2.82 \pm 1.05	0.048 \pm 0.018	2.63 \pm 0.87	0.109 \pm 0.126	0.001 \pm 0.001	0.034 \pm 0.029	8.93 \pm 0.76	141 \pm 10	0.463 \pm 0.033	564 \pm 098	
	21	2.54 \pm 1.43	0.282 \pm 0.167	2.06 \pm 1.36	0.133 \pm 0.142	0.019 \pm 0.011	0.064 \pm 0.060	9.41 \pm 0.83	154 \pm 12	0.486 \pm 0.035	1009 \pm 161	
Empty												
	3	4.68 \pm 1.13	0.598 \pm 0.238	3.66 \pm 0.93	0.248 \pm 0.168	0.081 \pm 0.044	0.064 \pm 0.055	7.77 \pm 0.30	130 \pm 05	0.416 \pm 0.014	863 \pm 143	
	21	5.05 \pm 0.64	0.898 \pm 0.575	3.78 \pm 0.88	0.263 \pm 0.163	0.038 \pm 0.036	0.072 \pm 0.057	9.36 \pm 0.67	152 \pm 08	0.483 \pm 0.033	1366 \pm 144	

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Table 3. Serum chemistry panel of ICR mice treated with a 10 mg/kg i.v. dose of free or liposome encapsulated topotecan - day 3 post-injection.

Treatment	BUN (mmol/L)	Creatinine (μ mol/L)	TP (g/L)	Albumin (g/L)	Globulin (g/L)	Alb/Glob Ratio	Bilirubin (μ mol/L)	Alk Phos (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	CPK (IU/L)
Control	11.3 \pm 3.0	83 \pm 6	46.7 \pm 2.1	31.3 \pm 1.5	15.3 \pm 1.2	2.07 \pm 0.15	4.7 \pm 0.6	86 \pm 12	27 \pm 31	59 \pm 22	87 \pm 107
Free	9.4 \pm 3.2	82 \pm 18	48.0 \pm 2.1	32.8 \pm 1.3	15.2 \pm 1.1	2.16 \pm 0.15	3.8 \pm 0.8	67 \pm 35	13 \pm 23	55 \pm 10	56 \pm 38
TCS	10.0 \pm 3.9	96 \pm 28	55.8 \pm 11.8	28.8 \pm 2.5	27.0 \pm 10.1	1.18 \pm 0.33	2.5 \pm 0.6	73 \pm 21	23 \pm 17	77 \pm 29	155 \pm 54
Empty	ND	68 \pm 13	49.3 \pm 1.2	33.0 \pm 1.7	16.3 \pm 0.6	2.00 \pm 0.17	4.3 \pm 0.6	79 \pm 10	17 \pm 15	53 \pm 6	56 \pm 26

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

C. **Efficacy Studies in Murine and Human Tumor Models: Single Dose Studies**

- [76] 1. **L1210 Murine Leukemia.** The intravenous L1210 murine leukemia model has been used extensively to evaluate differential activity between free and liposome encapsulated chemotherapeutic agents and was one of the original (1955-1975) models in the *in vivo* NCI screen of novel chemotherapeutic agents (Plowman, *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997); Waud, *Murine L1210 and P388 leukemias. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). The model is rapid – the mean survival of untreated animals is typically ~ 7-8 days – and the administered tumor cells seed in the liver and bone marrow.
- [77] Administration of free topotecan as a single intravenous dose had minimal effect on survival in the L1210 model (*see*, Figure 3A). At the highest dose of free topotecan, a median survival of 13 days (44% ILS) was observed. There was one long-term survivor (day 60) in this group. In contrast, a single i.v. administration of liposomal topotecan at either 5 or 10 mg/kg resulted in 100% survival at day 60 (*see*, Figure 3B). Median survival for a 1 mg/kg dose was 13 days (44% ILS) and the survival curve was nearly identical to that of the free topotecan administered at 30 mg/kg – a 30-fold improvement in potency. At higher doses (30 mg/kg) of the liposomal topotecan, toxic deaths were observed. The MTD for liposomal topotecan was 20 mg/kg in BDF-1 mice after a single i.v. administration.
- [78] 2. **CT-26 Murine Colon Carcinoma.** The murine CT-26 colon cell line is useful for drug screening since it readily grows as subcutaneous solid tumors or can be administered intravenously and used as a survival model. In addition, when the tumor cells are administered by intrasplenic injection, followed by splenectomy, the cells seed to the liver and give rise to an experimental metastases model that more closely resembles the clinical progression of colorectal cancer. The model has been used extensively and is described, for example, in detail elsewhere.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

[79] In the CT-26 model, administration of a single dose of topotecan had a modest impact on survival resulting in %ILS of 23-60% over the dose range 5-40 mg/kg (see, Figure 4). Liposome encapsulated topotecan, however, was highly active at doses greater than 5 mg/kg, resulting in 100% survival (8/8) at day 90. At 10 mg/kg, 87.5% survival (7/8) was observed at day 90; however, the tumor burden in dead animal was very low suggesting that this animal may have died due to other factors, such as infection related to myelosuppression. A dose response was observed for liposomal topotecan, with the 2 mg/kg dose giving an %ILS of 54%. This was determined to be the MED and was comparable to the %ILS (58%) achieved using free topotecan at 40 mg/kg - a 20-fold increase in potency.

[80] 3. **MX-1 Human Breast Carcinoma.** MX-1 is an experimental model of human breast cancer and has a reported doubling time of 3.9 days (NCI); in this study, the median doubling time was consistently 3.6-3.7 days. The tumor cell line was derived from the primary tumor of a 29-year-old female with no previous history of chemotherapy and is provided by the DCTD (NCI) tumor repository as a tumor fragment that is serially passaged in nude mice. Histologically, MX-1 is a poorly differentiated mammary carcinoma with no evidence of gland formation or mucin production. MX-1 was one of 3 xenograft models (MX-1, LX-1, CX-1) that comprised the NCI *in vivo* tumor panel and prescreen (1976-1986) for evaluating novel chemotherapeutic agents (Plowman, *et al.*, Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Since then, MX-1 has been incorporated into a larger panel of breast tumor models (12 in total) to reflect a shift in NCI strategy from "compound-oriented" discovery to "disease-oriented" discovery.

[81] In staged (100-300 mm³) MX-1 tumors, free topotecan exhibited dose-dependent inhibition of tumor growth (see, Figure 5; Table I). At the highest dose (40 mg/kg), an optimal % T/C of 24% was obtained; while optimal % T/C values for 10 and 5 mg/kg were 66% and 78%, respectively. No drug-related deaths were observed and all animals gained weight throughout the study. Liposome encapsulation of topotecan had a marked impact on %T/C, with optimal %T/C values of 8%, -49% and -62% following a single administration of the drug at 2, 5 or 10 mg/kg, respectively. A negative % T/C value is indicative of tumor volume regression from the original staged tumor size (100-300 mm³).

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

According to NCI guidelines, an optimal % T/C < 10% is considered significant activity, while values < 42% are the minimum acceptable limits for advancing a drug further in development (Corbett, T. *et al.*, *In vivo methods for screening and preclinical testing*. In *"Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"*

5 (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Liposome encapsulation increased the toxicity of topotecan, reducing the MTD to 10 mg/kg from > 40 mg/kg for free topotecan.

[82] 4. **LX-1 Human Lung Carcinoma.** LX-1 is an experimental model of human small cell lung cancer (SCLC). The tumor cell line was derived from the surgical explant of a metastatic lesion found in a 48 year old male and is provided by the DCTD (NCI) tumor repository as a tumor fragment that is serially passaged in nude mice. The LX-1 model was part of the NCI *in vivo* tumor panel from 1976-1986 (Plowman, J. *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development*. In *"Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)) and, although used less frequently now, remains a useful xenograft model for comparative activity studies between free and liposomal drugs because of its rapid growth rate.

[83] In general, the LX-1 model was less sensitive to the effects of topotecan than the MX-1 model, for both free and liposome-encapsulated drug (*see*, Figure 6; Table I). Optimal % T/C values for free topotecan were 43%, 55% and 67% for doses of 30, 10 or 5 mg/kg, respectively. Anti-tumor activity was improved through encapsulation, resulting in %T/C values of 8%, 11% and 13% for doses of 30, 10, or 5 mg/kg, respectively. Interestingly, all of the liposomal topotecan doses exhibited similar activity. This was an early study and subsequent studies in other models (*see*, Figures 4-6) indicate dose response beginning at doses < 5 mg/kg. This is consistent with the observation that camptothecin-class compounds (and presumably other antineoplastic agents) can exhibit "self-limiting" efficacy whereby, at doses above a critical threshold dose, no further activity benefits are observed (Thompson, *Biochim. Biophys. Acta* **1400**:301-319 (1998)). This situation could conceivably occur if the drug has limited tumor cell access or if the drug is acting on, and destroying, the tumor vasculature (*i.e.*, has anti-angiogenic activity). In both instances, a higher dose of drug would be expected to have negligible benefit.

[84] As observed in the L1210 study, encapsulation of topotecan enhanced the toxicity of the drug and reduced the MTD. The MTD in tumor-bearing nude mice was 10

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

mg/kg (~16% weight loss). At 30 mg/kg, 4/6 drug-related toxic deaths were observed and maximum weight loss reached ~29% (27-34% range).

D. Efficacy Studies in Murine and Human Tumor Models: Multiple Dose Studies

- 5 **[85] 1. MX-1 Human Breast Carcinoma.** To address the effectiveness of multiple administration and prolonged exposure of the tumors to drug, two multiple dose protocols were examined in MX-1 xenografts – q3dx4 and q7dx3 schedules. On the q4dx3 schedule, free topotecan exhibited moderate activity at 2.5 and 10 mg/kg/dose and minimal activity at 1.25 mg/kg/dose (*see*, Figure 7; Table II). Optimal % T/C values for
10 free topotecan on this dosing schedule were 55%, 30% and 27% for 1.25, 2.5 and 10 mg/kg/dose, respectively. For the encapsulated topotecan administered on the same dosing schedule, optimal % T/C values were –15%, –100%, –100%, and –100% for 0.5, 1.25, 2.5 and 5 mg/kg/dose, respectively. All regressed tumors were monitored for 60 days. At the end of this period, all animals treated with ≥1.25 mg/kg/dose of liposomal topotecan were
15 considered tumor free.
- [86]** On a q7dx3 dosing schedule, little activity was observed with the free topotecan, either a 5 or 10 mg/kg/dose (*see*, Figure 8; Table II). At the same doses, liposomal topotecan induced complete regression of the staged tumors. However, on this dosing schedule, 10 mg/kg/dose was too toxic and this portion of the study was halted as 6/6 toxic
20 deaths (or euthanasia's) were observed by day 24.
- [87] 2. LX-1 Human Lung Carcinoma.** Initial studies (single dose) in the LX-1 model indicated that free topotecan was inactive at evaluated doses <30 mg/kg and liposomal topotecan inhibited tumor growth, but did not induce regression. To improve this activity, a multiple (q7dx3) schedule was examined for both free and liposomal
25 topotecan. In this instance, considerably greater activity was observed for free topotecan compared to the single dose study and optimal %T/C values of 5 and 40 were obtained for 30 and 10 mg/kg/dose, respectively. Liposomal topotecan also exhibited significantly improved activity, resulting in complete regression (with subsequent re-growth) at 5 mg/kg/dose. Optimal % T/C values for liposomal topotecan in this model and dosing schedule were –55,
30 3 and 16 for 5, 2.5, 1.25 mg/kg/day, respectively.
- [88] 3. Therapeutic Index (TI) Comparisons.** The therapeutic index of free and liposomal topotecan was assessed in 4 different tumor models on several different
25

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

dosing schedules (*see*, Table 4). The assumptions and definitions used to generate these numbers are found in Table III. In some instances, a true MED or MTD was not observed and was therefore estimated mathematically based on dose response trends. For instance, an acute MTD of 40 mg/kg was observed for free topotecan administered as a single bolus injection, but the true MTD (based on weight loss) would likely be closer to 60 mg/kg if the drug was infused over 5–10 minutes. Also, complicating the analysis somewhat was the level of potency of the liposomal formulation. Significant anti-tumor activity was achieved at low drug doses and the MED had to be estimated in certain studies. In these instances, a notation was made in Table 4.

[89] In general, the increase in therapeutic index for liposomal topotecan was relatively large for single dose administration (5, 10, 15 and 18-fold, depending on the model) and decreased with increasing dosing frequency. This is illustrated in Table 4, where the TI_{TCS} / TI_{Free} ratio was 4.7–7.5 for q7dx3 and q3dx4 schedules, respectively. The decrease in the TI_{TCS} / TI_{Free} ratio with more frequent dosing is consistent with preclinical and clinical studies indicating that the efficacy and toxicity of free topotecan is schedule-dependent.

Table 4. Relative Therapeutic Indices of Free and Liposomal Topotecan in Murine and Human Tumor Models.^a

Tumor Model	Route of Inoculation	Dosing Schedule	TI_{Free}	TI_{TCS}	TI_{TCS} / TI_{Free}
L1210 (murine leukemia)	i.v.	single	1.3 (2.0) ^b	20	15.4 (10) ^b
CT-26 (murine colon)	i.s.	single	1.0 (1.5) ^b	5.0	5 (3.3) ^b
MX-1 (human breast)	s.c.	single	1.4 (2.1) ^b	25	17.9 (11.9) ^b
		q3dx4	15	50 ^c	3.3
		q7dx3	2.0	15.0 ^c	7.5
LX-1 (human lung)	s.c.	single	1.3 (2.0) ^b	13.3	10.2 (6.7) ^b
		q7dx3	4.0	18.8	4.7

^a based on data in Table II and III; formulas and definitions in Table IV.

^b obtained using an acute MTD of 40 mg/kg; second value is based on an estimated MTD (body weight)

^c a conservative estimate that may be ~2-fold greater; difficult to assess the MED due to high activity at low doses.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

E. Discussion

[90] Topotecan is an excellent candidate for liposome encapsulation.

Briefly, topotecan is cell-cycle specific (S-phase) and activity is greatly enhanced with prolonged exposure, topotecan exhibits rapid plasma pharmacokinetics and the drug needs to be maintained below pH 6.0 to retain biological activity. This is an ideal scenario for using a relatively non-leaky liposome formulation (such as SM:CH, 55:45) that has an acidic aqueous core. The required acidic interior can be produced, for example, by pH-loading or ionophore loading methodology. Here, it has been demonstrated that encapsulation of topotecan in SM/CH liposomes by the Mg-A23187 method results in dramatic enhancements in anti-tumor efficacy. Modest enhancement of toxicity was also observed for liposomal topotecan, but this was largely offset by substantial dose reductions that achieved comparable and, in most instances, superior efficacy relative to the free drug.

[91] Therapeutic index (TI) is a useful parameter of drug activity, as it is measure of the ratio of toxicity (MTD) to biological activity (user defined endpoint, *i.e.*, MED, ED₅₀, or ED₈₀). In general, the lower the TI, the greater the risk of toxicity since the dose of drug required to elicit a biological effect approaches the MTD. Therapeutic index is particularly useful for the evaluation of liposomal drugs since the relative change in TI can be used to define the benefit (or lack thereof) of encapsulation. As demonstrated herein, the TI improved from 3-18 fold depending on the model and dose schedule used. Therefore, the improvement in biological activity observed following liposome encapsulation of topotecan more than compensates for any increases in toxicity.

[92] Without intending to be bound by any theory, it is thought that the significant improvements in anti-tumor activity and the increased toxicity of the liposomal form of the drug result from improved pharmacokinetics and the maintenance of the drug in the active lactone form. In these studies, 84% of topotecan was present in plasma as the lactone species after 24 h compared to 48% lactone for free topotecan after only 5 minutes. Moreover, when the same dose (10 mg/kg) of free and liposomal topotecan was administered intravenously in mice, the concentration of lactone was ~ 40-fold higher at times < 1 h. At 24 h, the lactone plasma concentration for liposomal drug was 5.4 µg/ml compared to 1.5 µg/ml at 5 minutes for free drug - still 3.5-fold greater than the peak lactone concentration for free topotecan.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Table I

Summary of Single Dose Anti-Tumor Activity and Toxicity Parameters

Model	Dose	Anti-Tumor Activity					Toxicity	
		%T/C ^a	T-C ^b	%ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g
L1210	Free	5		11		0/8	0/8	+
(i.v.)	Free	10		22		0/8	0/8	+
NCTEF-005	Free	20		33		0/8	0/8	+
	Free	30		44		0/8	0/8	+
	Free	40		55		0/8	0/8	+
	TCS	1		44		0/8	0/8	+
	TCS	5		**		8/8	0/8	+
	TCS	10		**		8/8	0/8	-9.7
	TCS	20		**		7/7	1/8	-14.8
	TCS	30		**		3/3	5/8	-23.4
CT-26	Free	5		31		0/8	0/8	+
	(i.s.)	Free	10		23		0/8	+
NCTEF-005	Free	40		58		1/8	0/8	-0.4
	TCS	2		54		0/8	0/8	+
	TCS	5		**		8/8	0/8	-6.8
	TCS	10		**		7/8	0/8	-19.1
MX-1	Free	5	78	0.2	0	0.02	0/6	+
	(s.c.)	Free	10	66	1.4	0.12	0/6	+
NCTEF-004	Free	40	24	4.2	35	0.35	0/6	+
	TCS	2	8	7.4	65	0.62	0/6	+
	TCS	5	-49	10.2	74	0.85	0/6	-0.4
	TCS	10	-62	14.2	83	1.19	1/6	-18.3
LX-1	Free	5	67	1.4	0	0.13	0/6	+
	(s.c.)	Free	10	55	1.9	0	0.18	0/6
NCTEF-003	Free	30	43	2.9	7	0.27	0/6	-1.3
	TCS	5	13	7.9	30	0.74	0/6	-1.7
	TCS	10	11	8.7	22	0.82	0/6	-15.6
	TCS	30	8	9.9	22	0.93	0/6	-29.0

^a optimal % T/C following final treatment. Negative value indicates tumor regression.^b tumor growth delay (difference in time for treated and control tumors to reach 500 mm³).^c increase in lifespan relative to untreated animals (expressed as %).^d log cell kill (gross).^e tumor free animals at the end of study (i.e. no visible tumors or long term survivors).^f drug related deaths.^g maximum mean weight loss per treatment group.^h positive weight change (i.e. at no time did weight decrease below pre-treatment weight).ⁱ long term survivors

5

10

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Table II

Summary of Multiple Dose Anti-Tumor Activity and Toxicity Parameters

Model	Dose	Anti-Tumor Activity					Toxicity		
		%T/C ^a	T-C ^b	%ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g	
MX-1	Free	1.25	55	2.0	20	0.17	0/6	0/6	+ ^h
(q3dx4)	Free	2.5	30	5.0	55	0.42	0/6	0/6	+
NCTEF-006	Free	10	27	2.5	52	0.21	1/6	0/6	+
	TCS	0.5	−15	23.5	157	1.96	1.6	0/6	−0.3
	TCS	1.25	−100	**	**		6/6	0/6	−1.0
	TCS	2.5	<u>−100</u>	**	**		6/6	0/6	−11.5
	TCS	5	−100	**	**		6/6	0/6	−20.0
MX-1	Free	5	58	1.8	27	0.15	0/6	0/6	+
(q7dx3)	Free	10	61	2.0	ND ⁱ		0/6	0/6	−0.8
NCTEF-009	TCS	5	−100	**	**		6/6	0/6	−7.6
	TCS	10	−100	ND ⁱ	ND ⁱ		6/6	6/6	−29.0
LX-1	Free	10	40	2.0	21	0.14	0/6	0/6	−6.2
(q7dx3)	Free	30	5	20.9	58	1.53	0/6	0/6	−8.8
NCTEF-007	TCS	1.25	16	10.8	54	0.79	0/6	0/6	−7.7
	TCS	2.5	3	23.2	79	1.70	0/6	0/6	−7.3
	TCS	5	−55	30.2	100	2.22	0/6	0/6	−10.5
LX-1	Free	10	28	4.4	41		0/6	0/6	−3.6
(q7dx3)	Free	30	9	25	72		0/6	2/6	−16.4
NCTEF-011	TCS	7.5	ND ⁱ	ND ⁱ	ND ⁱ		0/6	6/6	>−30
	TCS	0.75	27	11.2	50		0/6	0/6	−1.3

a optimal % T/C following final treatment. Negative value indicates tumor regression.

b tumor growth delay (difference in time for treated and control tumors to reach 500 mm³).

5 c increase in lifespan relative to untreated animals (expressed as %).

c log cell kill (gross).

e tumor free animals at the end of study (i.e. no visible tumors or long term survivors).

f drug related deaths.

g maximum mean weight loss per treatment group.

10 h positive weight change (i.e. at no time did weight decrease below pre-treatment weight).

i not determined; toxic deaths in the liposome-encapsulated group.

** "cures"; no visible tumors by day 60.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

Table III

Definitions and Formulas for Toxicity and Anti-Tumor Activity Parameters

5	DRD	Drug-related death. A death was considered drug-related if the animal died or was euthanized within 15 days following the final treatment with drug AND its tumor weight was less than the lethal burden on control mice, or its weight loss was greater than 20% that of the control animals.
10	GI₅₀	<p>The concentration of drug that causes 50% growth inhibition in a population of cells in vitro. The NCI renamed the IC₅₀ parameter to emphasize the correction for cell count at time zero. Therefore, the formula is:</p> $GI_{50} = (T - T_0) / (C - T_0) \times 100 = 50$ <p>T and T₀ are the optical densities at 48 and 0 h, respectively; C is the control (cell count) optical density at 0 h.</p> <p>% ILS Increase in lifespan (in percent). For survival models this is calculated using the median survival times for the treated (T_{treat}) and control (T_{cont}) animals, according to:</p> $(T_{treat} - T_{cont}) / T_{cont} \times 100$ <p>For the solid tumor models, the time for tumors to reach 2000 mm³ (~10% of body weight) was used as an ethical cutoff instead of median survival.</p>
20	LCK	<p>Log cell kill (gross). This parameter estimates the number of log₁₀ units of cells killed at the end of treatment, according to the formula:</p> $(T - C) \times 0.301 / \text{median doubling time}$ <p>Net log cell kill can be calculated by subtracting the duration of treatment from the tumor growth delay (T - C) parameter as follows:</p> $[(T - C) - \text{duration of treatment}] \times 0.301 / \text{median doubling time}$
25		A log cell kill of 0 indicates that the cell population at the end of treatment is the same as it was at the onset of treatment. However, a log cell kill of 4, for example, indicates a 99.99% reduction in the initial cell population.
30	MBWL	<p>Maximum body weight loss (in percent). The animals are weighed prior to the first administration of the drug (W_i) and on various days during the study (W_d). The percent change in body weight is calculated by:</p> $MBWL = (W_d - W_i) / W_i \times 100$
	MED	Minimum effective dose. This is a somewhat arbitrary parameter. For these studies we have defined the MED as the lowest dose achieving an optimal % T/C ≤ 40 (for solid tumor models) or a % ILS of 40 – 60 % (for survival models).
35	MTD	Maximum tolerated dose. Dose of drug that results in a MBWL of ≤ 20%.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- % T/C** Optimal ratio of treated vs control tumors obtained following the first course of treatment. These values are obtained by subtracting the median tumor weight on the first day of treatments (T_i or C_i) from the tumor weights on each observation day according to the following formula:
- 5 $\% T/C = (\Delta T / \Delta C) \times 100$, where $\Delta T > 0$, or
 $\% T/C = (\Delta T / T_i) \times 100$, where $\Delta T < 0$
- According to NCI activity criteria, the following scoring system applies
(Plowman, *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development. In*
"Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials,
10 *and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)[22]:
- 0 = inactive, $\% T/C > 40$
1 = tumor inhibition, $\% T/C$ range 1 – 40
2 = tumor stasis, $\% T/C$ range 0 to –40
3 = tumor regression, $\% T/C$ range –50 to –100
15 4 = $\% T/C$ range –50 to –100 and $> 30\%$ tumor-free mice
- TGD** Tumor growth delay (also represented as $T - C$). This parameter expresses the difference in time (in days) for treated and control tumors to attain an arbitrary size (typically 500 or 1000 mm³).
- TI** Therapeutic index. Therapeutic index is the ratio of a toxicity parameter (*i.e.* LD₅₀, LD₁₀, MTD) and a biological activity parameter (*i.e.* ED₅₀ – the dose that causes a defined biological response in 50% of the treatment group). In general, TI describes the margin of safety for a drug. For animal model studies this is traditionally described by the formula:
- 20 $TI = LD_{50}/ED_{50}$
- 25 However, since it is no longer ethically permissible to perform LD₅₀ studies, we have defined therapeutic index for these studies as:
- $TI = MTD/MED$
- [93] It is to be understood that the above description is intended to be illustrative and not restrictive. Many embodiments will be apparent to those of skill in the art upon reading the above description. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but should instead be determined with reference to the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such
- 30

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

claims are entitled. The disclosures of all articles and references, including patent applications and publications, are incorporated herein by reference for all purposes.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A method for modulating the plasma circulation half-life of an active
2 agent, said method comprising:
3 (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent
4 encapsulated therein; and
5 (b) varying the amount of said active agent that is precipitated in said
6 liposome.
- 1 2. The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying said active
2 agent to lipid ratio.
- 1 3. The method of claim 2, wherein said active agent to lipid ratio is varied
2 by the addition of an empty liposome.
- 1 4. The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying the size of
2 said liposome.
- 1 5. The method of claim 1, wherein step (b) comprises adding a
2 component that enhances precipitation of said active agent.
- 1 6. The method of claim 5, wherein said component is a mono-, di-, tri-, or
2 polyvalent anion.
- 1 7. The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying both said
2 active agent to lipid ratio and the size of the liposome.
- 1 8. The method of claim 1, wherein said active agent is an antineoplastic
2 drug.
- 1 9. The method of claim 8, wherein said antineoplastic drug is a
2 camptothecin.
- 1 10. The method of claim 9, wherein said camptothecin is a member
2 selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin, 10,11-
3 methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- 4 methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-
5 20(S)-camptothecin.
- 1 11. The method of claim 10, wherein said camptothecin is topotecan.
- 1 12. The method of claim 1, wherein said active antineoplastic drug is a
2 vinca alkaloid.
- 1 13. The method of claim 12, wherein said vinca alkaloid is a member
2 selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and vindesine.
- 1 14. The method of claim 1, wherein the precipitated active agent
2 encapsulated in said liposome is at least 50% of said total active agent.
- 1 15. The method of claim 14, wherein the precipitated active agent
2 encapsulated in said liposome is at least 60% of said total active agent.
- 1 16. The method of claim 15, wherein the precipitated active agent
2 encapsulated in said liposome is at least 70% of said total active agent.
- 1 17. The method of claim 1, wherein said liposome comprises
2 sphingomyelin and cholesterol.
- 1 18. The method of claim 17, wherein said liposome comprises
2 sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.
- 1 19. The method of claim 1, wherein the plasma circulation half-life of said
2 active agent is modulated for optimum efficacy.
- 1 20. The method of claim 1, wherein the ratio of said active agent to lipid is
2 about 0.005-1:1 (w/w).
- 1 21. The method of claim 20, wherein the ratio of said active agent to lipid
2 is about 0.05-0.9:1 (w/w).
- 1 22. The method of claim 21, wherein the ratio of said active agent to lipid
2 is about 0.1-0.5:1 (w/w).

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- 1 23. A method for modulating the plasma circulation half-life of an active
2 agent, said method comprising:
3 (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent
4 encapsulated therein; and
5 (b) adding a liposome with no encapsulated active agent.
- 1 24. The method of claim 23, wherein the ratio of liposomes containing
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:0.5 to 1:1000.
- 1 25. The method of claim 24, wherein the ratio of liposomes containing
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:1 to 1:100.
- 1 26. The method of claim 25, wherein the ratio of liposomes containing
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:2 to 1:10.
- 1 27. The method of claim 26, wherein the ratio of liposomes containing
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:3 to 1:5.
- 1 28. The method of claim 23, wherein said active agent is an antineoplastic
2 drug.
- 1 29. The method of claim 28, wherein said antineoplastic drug is a
2 camptothecin.
- 1 30. The method of claim 29, wherein said camptothecin is a member
2 selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin, 10,11-
3 methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-
4 methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-
5 20(S)-camptothecin.
- 1 31. The method of claim 30, wherein said camptothecin is topotecan.
- 1 32. A liposomal formulation, said liposomal formulation comprising:
2 a) an antineoplastic drug; and

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

3 b) a liposome having free antineoplastic drug and precipitated
4 antineoplastic drug, wherein the precipitated antineoplastic drug in said liposome is at least
5 50% of the total antineoplastic drug.

1 33. The liposomal formulation of claim 32, wherein said antineoplastic
2 drug is a camptothecin.

1 34. The liposomal formulation of claim 33, wherein said camptothecin is a
2 member selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin,
3 10,11-methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-
4 piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-
5 isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin.

1 35. The liposomal formulation of claim 34, wherein said camptothecin is
2 topotecan.

1 36. The liposomal formulation of claim 33, wherein said antineoplastic
2 drug is a vinca alkaloid.

1 37. The liposomal formulation of claim 32, wherein the free antineoplastic
2 drug and the precipitated antineoplastic drug are different.

1 38. The liposomal formulation of claim 36, wherein said vinca alkaloid is a
2 member selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and
3 vindesine.

1 39. The liposomal formulation of claim 32, wherein the ratio of said
2 antineoplastic drug to lipid is about 0.005-1:1 (w/w).

1 40. The liposomal formulation of claim 39, wherein the ratio of said
2 antineoplastic drug: said lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w).

1 41. The liposomal formulation of claim 40, wherein the
2 ratio of said antineoplastic drug: said lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w).

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

- 1 42. The liposomal formulation of claim 32, wherein said liposome
2 comprises sphingomyelin and cholesterol.
- 1 43. The liposomal formulation of claim 42, wherein said liposome
2 comprises sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.
- 1 44. The liposomal formulation of claim 32, further comprising a liposome
2 with no encapsulated active agent.
- 1 45. The liposomal formulation of claim 44, wherein the ratio of liposomes
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:0.5 to
3 1:1000.
- 1 46. The liposomal formulation of claim 45, wherein the ratio of liposomes
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:1 to 1:100.
- 1 47. The liposomal formulation of claim 46, wherein the ratio of liposomes
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:2 to 1:10.
- 1 48. The liposomal formulation of claim 47, wherein the ratio of liposomes
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:3 to 1:5.
- 1 49. A liposomal formulation, said liposomal formulation comprising:
2 a) an active agent;
3 b) a liposome having free active agent and precipitated active agent
4 encapsulated therein; and
5 c) an empty liposome.
- 1 50. The liposomal formulation of claim 49, wherein the ratio of liposomes
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:0.5 to 1:1000.
- 1 51. The liposomal formulation of claim 50, wherein the ratio of liposomes
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:1 to 1:100.
- 1 52. The liposomal formulation of claim 51, wherein the ratio of liposomes
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:2 to 1:10.

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

1 53. The liposomal formulation of claim 52, wherein the ratio of liposomes
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:3 to 1:5.

1 54. The liposomal formulation of claim 49, wherein said active agent is an
2 antineoplastic drug.

1 55. The liposomal formulation of claim 54, wherein said antineoplastic
2 drug is a camptothecin.

1 56. The liposomal formulation of claim 55, wherein said camptothecin is a
2 member selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin,
3 10,11-methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-
4 piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-
5 isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin.

1 57. The liposomal formulation of claim 56, wherein said camptothecin is
2 topotecan.

1 58. The liposomal formulation of claim 57, wherein said antineoplastic
2 drug is a vinca alkaloid.

1 59. The liposomal formulation of claim 58, wherein said vinca alkaloid is a
2 member selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and
3 vindesine.

1 60. The liposomal formulation of claim 49, wherein the ratio of said active
2 agent to lipid is about 0.005-1:1 (w/w).

1 61. The liposomal formulation of claim 60, wherein the ratio of said active
2 agent to lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w).

1 62. The liposomal formulation of claim 61, wherein the ratio of said active
2 agent to lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w).

1 63. The liposomal formulation of claim 49, wherein said liposome
2 comprises sphingomyelin and cholesterol.

PK/Payout of Ionophore loaded Vinorelbine [Vinca 03]

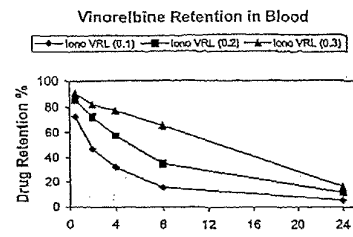


Fig. 1A

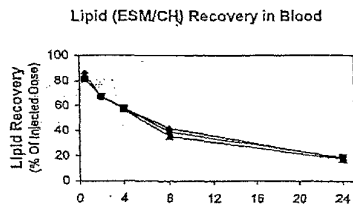


Fig. 1B

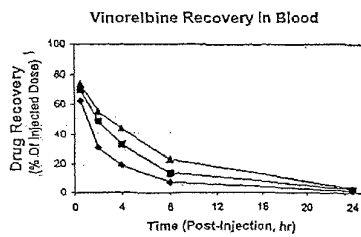


Fig. 1C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinorelbine [Vinca 03]

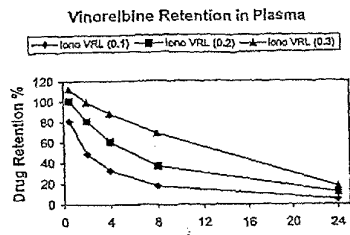


Fig. 2A

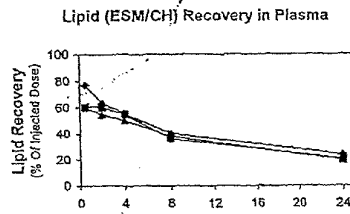


Fig. 2B

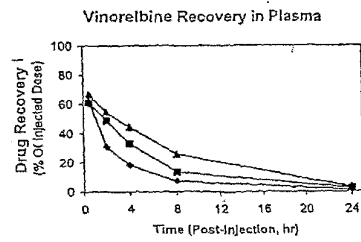


Fig. 2C

PK/Payout of Ionephora loaded Vinblastine [Vinca 04]

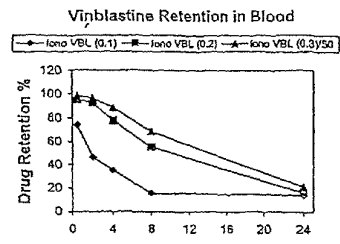


Fig. 3A

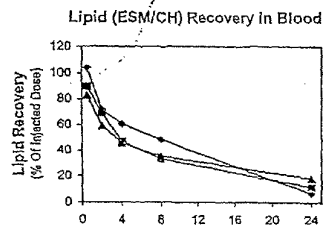


Fig. 3B

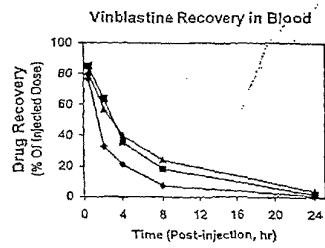


Fig. 3C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Plasma

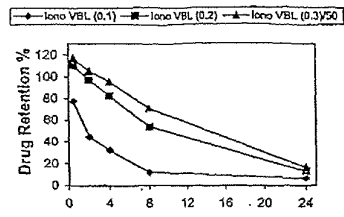


Fig. 4A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Plasma

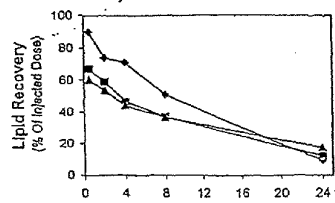


Fig. 4B

Vinblastine Recovery in Plasma

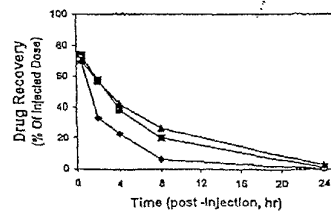


Fig. 4C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Blood

—●— Iono VBL (0.3)/50 —■— Iono VBL (0.3)/33.3 —▲— Iono VBL (0.3)/16.6

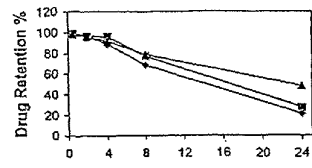


Fig. 5A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Blood

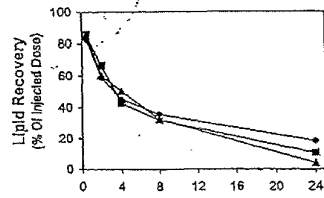


Fig. 5B

Vinblastine Recovery in Blood

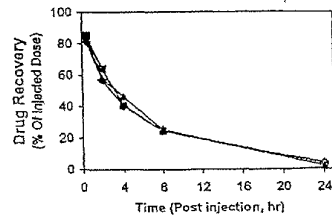


Fig. 5C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Plasma

◆ Iono VBL (0.3)/50 ■ Iono VBL (0.3)/33.3 ▲ Iono VBL (0.3)/16.6

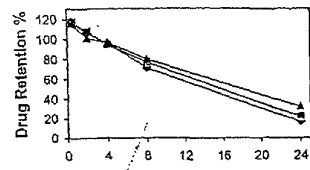


Fig. 6A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Plasma

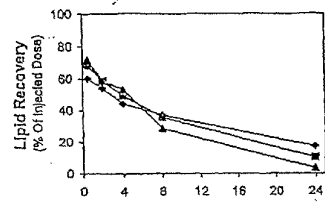


Fig. 6B

Vinblastine Recovery in Plasma

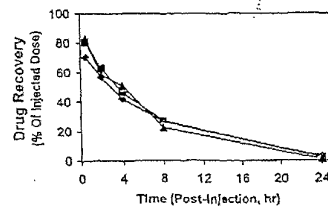


Fig. 6C

WO 02/02077

PCT/CA01/00925

PK/Payout of Ionophore loaded Topotecan

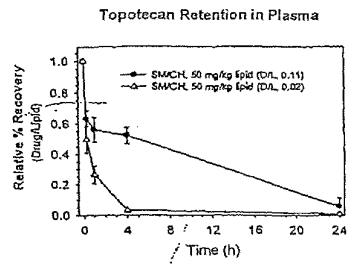


Fig. 7A

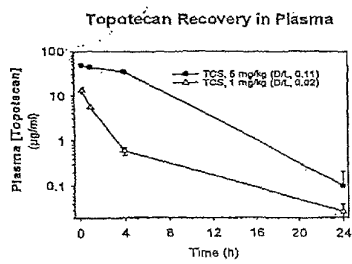


Fig. 7B

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

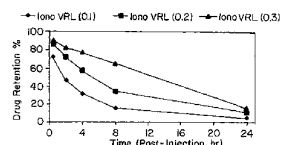
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002077 A3

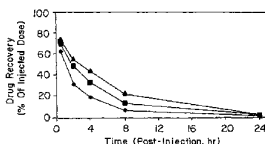
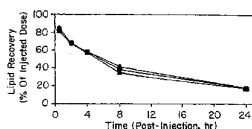
- (51) International Patent Classification: A61K 9/127, 31/4745 (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MADDEN, Thomas, D. [CA/CA]; 2714 West 31st Avenue, Vancouver, British Columbia V6L 2A1 (CA). SEMPLE, Sean, C. [CA/CA]; 301 - 2880 Oak Street, Vancouver, British Columbia V6H 2K5 (CA). AHKONG, Quet, F. [CA/CA]; 8588 - 143rd Street, Surrey, British Columbia V3W 0N9 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA01/00925
- (22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/215,556 30 June 2000 (30.06.2000) US
60/264,616 26 January 2001 (26.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): INEX PHARMACEUTICALS CORPORATION [CA/CA]; 100 - 8900 Glenlyon Parkway, Glenlyon Business Park, Burnaby, British Columbia V6K 3S4 (CA).
- (74) Agents: FETHERSTONHAUGH & CO. et al.; Box 11560, Vancouver Centre, 650 West Georgia Street, Suite 2200, Vancouver, British Columbia V6B 4N8 (CA).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: LIPOSOMAL ANTINEOPLASTIC DRUGS AND USES THEREOF



(57) Abstract: This invention relates to liposomal antineoplastic agents (e.g., camptothecin) compositions and methods of using such compositions for treating neoplasia and for inhibiting angiogenesis. The compositions and methods are useful for modulating the plasma circulation half-life of an active agent.



WO 02/002077 A3

WO 02/002077 A3



SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:
— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
12 December 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT IPC/CA 01/00925	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/127 A61K31/4745	
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) IPC 7 A61K	
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	WO 99 13816 A (EMERSON DAVID LLOYD NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC (US); HU NING (US) 25 March 1999 (1999-03-25) page 4, line 20 - page 5, line 6 page 8, line 4 - line 23 page 10, line 4 - line 11 page 11, line 21 - page 13, line 2 page 14, line 8 - page 15, line 12 page 23 - page 25; examples 3, 4 page 29, line 10 - line 13 page 23 - page 24; example 4 page 23 - page 24; example 4 --- --/--
Y Y	1, 2, 5, 6, 8-11, 14-16, 19-22, 32-35, 39-41 1, 5, 6 3, 23, 49
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Further documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in 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 document 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 after 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 "S" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 August 2002	Date of mailing of the international search report 29/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer VON EGGLKRAUT, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/00925

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 51202 A (GITTELMAN JOSH ; GUO LUKE S S (US); ZALIPSKY SAMUEL (US); MARTIN FR) 14 October 1999 (1999-10-14) page 7, line 2 - line 5 page 7, line 21 - line 23 page 8, line 33 page 9, line 10 - line 12 page 12, line 14 -page 13, line 13	1,5,6
X	WO 00 23052 A (ALZA CORP) 27 April 2000 (2000-04-27) page 23, line 10 - line 26 page 24, line 3 - line 4; claims 7-9	1,5,6, 8-11, 19-22, 32-35, 39-41
X	WO 98 17256 A (KIRPOTIN DMITRI) 30 April 1998 (1998-04-30) page 11, line 16 - line 17 page 15, line 24 - line 28 page 17, line 1 - line 12 page 20, line 21 -page 22, line 30	1,2,5,6, 8,12,13, 32,36,38
X	US 5 837 282 A (LEENHOUTS JOHANNA M ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) cited in the application column 7, line 56 -column 9, line 4 column 20; table 4	1,2,4-8, 12-22, 32,35, 38-43
Y	US 5 023 087 A (YAU-YOUNG ANNIE) 11 June 1991 (1991-06-11) column 4, line 62 - line 68 column 24 -column 25; example 8 claims 1,2	3,23,49

Form PCTISA/Z10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA 01/00925
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 01/00925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913816 A	25-03-1999	AU 9387798 A	05-04-1999
		BR 9812316 A	20-03-2001
		CA 2303366 A1	25-03-1999
		EP 1037610 A1	27-09-2000
		WO 9913816 A2	25-03-1999
WO 9951202 A	14-10-1999	US 5972379 A	26-10-1999
		AU 3453399 A	25-10-1999
		CA 2326497 A1	14-10-1999
		CN 1295465 T	16-05-2001
		EP 1083881 A2	21-03-2001
		JP 2002510611 T	09-04-2002
		WO 9951202 A2	14-10-1999
WO 0023052 A	27-04-2000	AU 1118900 A	08-05-2000
		BR 9914601 A	23-10-2001
		CN 1323199 T	21-11-2001
		EP 1121102 A1	08-08-2001
		NO 20011844 A	10-04-2001
		WO 0023052 A1	27-04-2000
		US 6355268 B1	12-03-2002
WO 9817256 A	30-04-1998	AU 4990397 A	15-05-1998
		EP 0949906 A1	20-10-1999
		WO 9817256 A1	30-04-1998
		US 6110491 A	29-08-2000
US 5837282 A	17-11-1998	AT 219661 T	15-07-2002
		AU 718460 B2	13-04-2000
		AU 4859497 A	22-05-1998
		WO 9818450 A1	07-05-1998
		DE 69713615 D1	01-08-2002
		EP 0941065 A1	15-09-1999
		JP 2001510451 T	31-07-2001
US 5023087 A	11-06-1991	AU 7128887 A	25-08-1987
		EP 0256119 A1	24-02-1988
		JP 63502117 T	18-08-1988
		WO 8704592 A1	13-08-1987

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
 A 6 1 P 35/00 A 6 1 P 35/00

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 マデン, トーマス ディー .
 カナダ国 ブイ 6 エル 2 エイ 1 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト
 3 1 エスティー アベニュー 2 7 1 4

(72) 発明者 センプル, シーン シー .
 カナダ国 ブイ 6 エイチ 2 ケイ 5 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, オーク
 ストリート 3 0 1 - 2 8 8 0

(72) 発明者 アーコン, クエト エフ .
 カナダ国 ブイ 3 ダブリュー 0 エヌ 9 ブリティッシュ コロンビア, サリー, 1 4 3 アー
 ルディー ストリート - 8 5 8 8

F ターム (参考) 4C076 AA19 BB11 BB13 BB15 BB16 CC27 DD63H DD70H FF31
 4C086 AA01 AA02 CB21 CB22 MA01 MA02 MA03 MA04 MA24 NA12
 ZB26 ZB27