

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7364561号

(P7364561)

(45)発行日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(24)登録日 令和5年10月10日(2023.10.10)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7068(2006.01)	A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

請求項の数 4 (全37頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-525794(P2020-525794)
 (86)(22)出願日 令和1年6月20日(2019.6.20)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2019/024499
 (87)国際公開番号 WO2019/244978
 (87)国際公開日 令和1年12月26日(2019.12.26)
 審査請求日 令和2年11月13日(2020.11.13)
 審判番号 不服2022-8460(P2022-8460/J1)
 審判請求日 令和4年6月3日(2022.6.3)
 (31)優先権主張番号 特願2018-116706(P2018-116706)
 (32)優先日 平成30年6月20日(2018.6.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2018-211290(P2018-211290)
 (32)優先日 平成30年11月9日(2018.11.9)
 (33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 306037311
 富士フイルム株式会社
 東京都港区西麻布2丁目26番30号
 (74)代理人 110000109
 弁理士法人特許事務所サイクス
 (72)発明者 小森 隆司
 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地
 富士フイルム株式会社内
 (72)発明者 五百蔵 忠明
 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地
 富士フイルム株式会社内
 (72)発明者 松本 健
 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地
 富士フイルム株式会社内
 (72)発明者 泉 泰之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および免疫チェックポイント阻害剤を含む組合せ医薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A) (i) 内水相を有するリポソームと、(ii) 前記内水相を有するリポソームを分散する外水相を構成する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および

(B) 免疫チェックポイント阻害剤

を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される、抗腫瘍のための医薬であって、前記のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物と、前記免疫チェックポイント阻害剤とが、別個の組成物中に含有されており、前記リポソーム組成物および前記免疫チェックポイント阻害剤がそれぞれ、水性媒体中の組成物として投与され、前記免疫チェックポイント阻害剤が腹腔内投与または静脈内投与され、前記リポソーム組成物が、リポソーム組成物の脂質成分の合計量に対して、コレステロール類の含有率が10mol%以上35mol%以下であり、ポリエチレングリコール修飾脂質を全脂質量に対して0.3～50質量%含有し、リポソームの内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であり、リポソームの平均粒子径が2～200nmである、
 医薬。

【請求項2】

前記リポソーム組成物が、リポソームからのゲムシタピンのリリース速度が、ヒト血漿

中37℃において10質量%/24hr以上70質量%/24hr以下であるリポソーム組成物である請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1、PD-L2およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む請求項1又は請求項2に記載の医薬。

【請求項4】

前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む請求項3に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤およびゲムシタビンを内包するリポソーム組成物を組み合わせて同時にまたは逐次に投与される医薬に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、がんが免疫監視機構を回避するシステムを利用していることが知られるようになってきた。がん免疫療法は、がん患者がもつ免疫監視機構に作用して、がんに対する免疫力を強化することによって、がんの進行を抑制またはがんを治療する療法である。そのような回避システムに利用される分子として、CTLA-4、PD-1またはそのリガンドであるPD-L1等の、免疫チェックポイント分子が知られている（特許文献1および2）。

20

【0003】

また、ヒト抗PD-1またはその抗原結合部分と化学療法剤との共投与は、異なるメカニズムで作用する二種の抗がん剤が付与され、それらはヒト腫瘍細胞に対して細胞毒性効果をもたらすと記載がある（特許文献1および2）。しかし、特許文献1および2には、ヒト抗PD-1またはその抗原結合部分と化学療法剤との共投与において、リポソームを使った抗がん剤について記載はない。

【0004】

また、オプジーボQ&Aのサイトにおいて、化学療法剤と併用していいですかとの問いに対して、がん化学療法剤との併用における有効性と安全性は確立していないため、併用できませんと開示がある（非特許文献1）。

30

【0005】

一方、化学療法において、がん細胞への攻撃が薬物の曝露時間に大きく影響されるものがある。例えば、DNA合成を阻害する代謝拮抗剤のような薬物は、DNA合成期にある一部の細胞だけを攻撃するため、曝露時間が短いと効果的な殺細胞性が得られない。そのような薬物において、投与後の体内代謝が速いと、腫瘍での十分な曝露時間を得ることができず、期待される薬効が得られない場合が多い（特許文献3および4）。

【0006】

薬物をリポソームの内水相に溶解状態で内包し、リポソーム組成物を高張の条件にすることで、リポソーム組成物からの薬物の放出を促進し、より適したドラッグデリバリーが実現できることが知られている（特許文献3および4）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第2006/121168号

特開2006-340714号公報

国際公開第2015/166985号

国際公開第2015/166986号

【非特許文献】

【0008】

50

【文献】“ONO ONCOLOGY オブジーボQ&A 化学療法剤と併用していいですか?”、[online]、掲載年月日不明、小野薬品工業株式会社、[2018年5月2日検索]、インターネット〈URL: https://www.ono-oncology.jp/contents/patient/opdivo_faq/11.html〉

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、免疫チェックポイント阻害剤と、抗がん剤を内包するリポソーム組成物とを組み合わせ得られる組合せ医薬およびその投与方法を提供することである。また、本発明の課題は、免疫チェックポイント阻害剤と、抗がん剤を内包するリポソーム組成物とを組み合わせ得られる組合せ医薬およびそれを用いた治療方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、

(A) 内水相を有するリポソームと、外水相を構成するリポソームを分散する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および

(B) 免疫チェックポイント阻害剤

を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される医薬が上記課題を解決することを見出して、本発明を完成した。

20

【0011】

本発明は、下記を提供する。

〔1〕 (A) 内水相を有するリポソームと、外水相を構成するリポソームを分散する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および

(B) 免疫チェックポイント阻害剤

を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される医薬。

〔2〕 前記リポソーム組成物が、リポソームの内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であり、リポソームからのゲムシタピンのリリース速度が、ヒト血漿中37℃において10質量%/24hr以上70質量%/24hr以下であるリポソーム組成物である前記〔1〕に記載の医薬。

30

〔3〕 前記リポソーム組成物が、リポソーム組成物の脂質成分の合計量に対して、コレステロール類の含有率が10mol%以上35mol%以下であり、内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であるリポソーム組成物である前記〔1〕に記載の医薬。

〔4〕 前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1、PD-L2およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む前記〔1〕から〔3〕のいずれか1項に記載の医薬。

〔5〕 前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む前記〔4〕に記載の医薬。

40

〔6〕 前記投与が治療的に相乗作用を示す有効投与量および投与期間である前記〔1〕から前記〔5〕のいずれか1項に記載の医薬。

〔7〕 前記投与の対象がゲムシタピンに対して耐性を持つ前記〔1〕から前記〔6〕のいずれか1項に記載の医薬。

【0012】

〔8〕 癌に罹患している対象の治療方法であって、対象が治療的に相乗作用を示す有効投与量および投与期間において、

(A) 内水相を有するリポソームと、外水相を構成するリポソームを分散する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および

50

(B) 免疫チェックポイント阻害剤

を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される治療方法。

〔9〕前記リポソーム組成物が、リポソームの内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であり、リポソームからのゲムシタビンのリリース速度が、ヒト血漿中37℃において10質量%/24hr以上70質量%/24hr以下であるリポソーム組成物である前記〔8〕に記載の治療方法。

〔10〕前記リポソーム組成物が、リポソーム組成物の脂質成分の合計量に対して、コレステロール類の含有率が10mol%以上35mol%以下であり、内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であるリポソーム組成物である前記〔8〕に記載の治療方法。

〔11〕前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1、PD-L2およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む前記〔8〕から〔10〕のいずれか1項に記載の治療方法。

〔12〕前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1およびCTLA-4の阻害剤から選ばれる少なくとも一種を含む前記〔11〕に記載の治療方法。

〔13〕前記投与の対象がゲムシタビンに対して耐性を持つ前記〔8〕から前記〔12〕のいずれか1項に記載の治療方法。

〔14〕前記〔8〕から前記〔12〕のいずれか1項に記載の治療方法に使用するための医薬であって、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせると同時にまたは逐次に投与するための、内水相を有するリポソームと、外水相を構成するリポソームを分散する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタビンを内包するリポソーム組成物を含む医薬。

【発明の効果】

【0013】

本発明の医薬は、リポソームが溶解状態のゲムシタビンを内包するリポソーム組成物および免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される医薬として、がんに対する治療または予防の少なくとも1つの効果を有する。

また、本発明の医薬は、溶解状態のゲムシタビンを内包するリポソーム組成物が持つ長い血中半減期と、少量でも強い抗腫瘍活性を有するという優れた性質が維持され、かつ免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせると同時にまたは逐次に投与されることによって、リポソームが溶解状態のゲムシタビンを内包するリポソーム組成物または免疫チェックポイント阻害剤での単剤による効果よりも上回るという顕著で予想外な腫瘍増殖抑制効果を持つ。

さらに、本発明の医薬は、低投与量であっても腫瘍増殖抑制効果を持つことから、患者を含む対象にとって、安全性が高く、身体的負担が少なく利便性も高いという、望ましい治療ができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における体重の推移を示す。

【図2】図2は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における腫瘍体積の推移を示す。

【図3】図3は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図4】図4は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図5】図5は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図6】図6は、EMT6皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 7】図 7 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 8】図 8 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 9】図 9 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 10】図 10 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 11】図 11 は、腫瘍体積が体重の 10% を超える検体を安楽死させた時の生存率 (Tumor Free Survival %) および Kaplan-Meier 法による生存曲線の結果を示す。

10

【図 12】図 12 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における腫瘍体積の推移を示す。

【図 13】図 13 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 14】図 14 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 15】図 15 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 16】図 16 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

20

【図 17】図 17 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 18】図 18 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 19】図 19 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 20】図 20 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 21】図 21 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

30

【図 22】図 22 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 23】図 23 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 24】図 24 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 25】図 25 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 26】図 26 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

40

【図 27】図 27 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 28】図 28 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 29】図 29 は、腫瘍体積が体重の 10% を超える検体を安楽死させた時の生存率 (Tumor Free Survival %) および Kaplan-Meier 法による生存曲線の結果を示す。

【図 30】図 30 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における各群の CD8 陽性 T 細胞の割合の平均値を示す。

【図 31】図 31 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における各群の M1 細胞の割合の平均値を示す。

50

【図 3 2】図 3 2 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた薬効試験における各群の M2 細胞の割合の平均値を示す。

【図 3 3】図 3 3 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた CD8 陽性 T 細胞への影響検証試験における対照群の個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 3 4】図 3 4 は、EMT6 皮下移植担癌モデルマウスを用いた CD8 陽性 T 細胞への影響検証試験における抗 CD8 抗体投与群の個体別の腫瘍体積の推移を示す。

【図 3 5】図 3 5 は、ヒトでの循環血中及び腫瘍中の免疫細胞構成変化検証試験における循環血中の被験物質投与前からの CD8 陽性 T 細胞中の Ki67 陽性細胞の割合変化を示す。

【図 3 6】図 3 6 は、ヒトでの循環血中及び腫瘍中の免疫細胞構成変化検証試験における循環血中の被験物質投与前からの Treg 中の Ki67 陽性 Treg 割合変化を示す。

10

【図 3 7】図 3 7 は、ヒトでの循環血中及び腫瘍中の免疫細胞構成変化検証試験における循環血中の被験物質投与前からの Total MDSC 中の M-MDSC の割合変化を示す。

【図 3 8】図 3 8 は、ヒトでの循環血中及び腫瘍中の免疫細胞構成変化検証試験における腫瘍中の Total MDSC 中の M-MDSC 細胞の割合を被験物質投与前と 2 回目投与 15 日後の間で比較した値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、特にことわらない限り、% は質量百分率を意味する。本明細書において組成物中の各成分の量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

20

【0016】

本明細書において、特にことわらない限り、各用語は、次の意味を有する。

【0017】

「～」は、その前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示すものとする。

【0018】

対象は、ヒトおよびヒト以外の哺乳動物を含む。ヒト以外の哺乳動物として、例えば、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、マウス、ラット等が挙げられる。

【0019】

処置は、所望の治療効果、例えば、状態の進行の阻害または遅延が実現される任意の処置および療法であってよく、進行の速度の低下、進行の速度の休止、状態の好転、状態の治癒もしくは寛解（部分的なものであるか完全なものであるかにかかわらず）、状態の 1 つもしくは複数の症状および／もしくは徴候の予防、遅延、軽減もしくは停止、または対象もしくは対象の生存が処置の不在下で予測されるものよりも延長されることを含む。

30

【0020】

処置は予防も含む。例えば、がんが発症または再発症しやすいまたはそのリスクがある対象を処置することにより、対象におけるがんの発症または再発症が予防され得るまたは遅延し得る。

【0021】

処置は、完全ながんの寛解を含めたがんの成長の阻害、および／またはがん転移の阻害を含む。がんの成長とは、がんがより発達した形態に変化したことを指す。がんの成長の阻害を測定するための指標として、がん細胞の生存の減少、腫瘍体積または形態の低下（例えば、コンピュータ断層撮影（CT）、超音波検査、または他の画像診断方法を使用して決定される）、腫瘍の成長の遅延、腫瘍脈管構造の破壊、遅延型過敏症皮膚試験の成績の改善、細胞溶解性 T-リンパ球の活性の増加、および腫瘍特異的抗原のレベルの低下等が挙げられる。

40

【0022】

本発明において、腫瘍、悪性腫瘍、がん、悪性新生物、がん腫、肉腫等を総称して、「腫瘍」または「がん」と表現する。また、「腫瘍」または「がん」は、がんの治療後に再

50

発したものを含む。「腫瘍」は、悪性または良性の全ての新生物細胞成長および増殖、ならびに前癌性および癌性の細胞および組織を含む。

【0023】

「有効量」は、所望の治療的または予防的な結果を達成するために、必要な投与量であって、投与する期間、量を含む。本発明の医薬の「有効量」は、対象（または個体）の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに対象（または個体）において所望の応答を引き出す医薬の能力等に従って変動し得る。

【0024】

「同時投与」は、組合せ療法における第1の療法と第2の療法とを、約10分間、約5分間、または約1分間以内のうちのいずれかなど、約15分間以内の時間間隔で投与することを意味する。第1の療法と第2の療法とを同時に投与する場合、第1の療法および第2の療法を同じ組成物（例えば、第1の療法および第2の療法の両方を含む組成物）中に含有させることもでき、別個の組成物中に含有させる（例えば、第1の療法を1つの組成物中に含有させ、第2の療法を別の組成物中に含有させる）こともできる。

【0025】

「逐次投与」という用語は、組合せ療法における第1の療法および第2の療法を、約20分間、約30分間、約40分間、約50分間、約60分間またはそれより長い時間（1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間等）のうちのいずれかなど、約15分間を超える時間間隔で投与することを意味する。本発明において、逐次投与は、第1の療法をまず投与することもでき、第2の療法をまず投与することも含まれる。また、本発明において、逐次投与は、第1の療法の実施後（所定の時間後（例えば、1週間後））に、第2の療法を実施することも含まれる。第1の療法と第2の療法とを別個の組成物中に含有させ、これらを同じパッケージまたはキットに含有させることもでき、異なるパッケージまたはキットに含有させることもできる。

【0026】

（本発明の医薬）

本発明の医薬は、

（A）内水相を有するリポソームと、外水相を構成するリポソームを分散する水溶液とを有するリポソーム組成物であって、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物

（B）免疫チェックポイント阻害剤および
を組み合わせると同時にまたは逐次に投与される医薬である。

【0027】

（（A）リポソーム組成物）

リポソームとは、脂質を用いた脂質二重膜で形成される閉鎖小胞体であり、その閉鎖小胞の空間内に水相（内水相）を有する。内水相には、水等が含まれる。リポソームは通常、閉鎖小胞体外の水溶液（外水相）に分散した状態で存在する。本発明では、リポソーム組成物は、リポソームおよびリポソーム外に含まれる水溶液、成分等を含む組成物を指す。リポソームは、シングルラメラ（単層ラメラ又はユニラメラとも呼ばれ、二重層膜が一重の構造である。）であっても、多層ラメラ（マルチラメラとも呼ばれ、タマネギ状の形状の多数の二重層膜の構造であり、個々の層は水様の層で仕切られている。）であってもよいが、本発明では、医薬用途での安全性及び安定性の観点から、シングルラメラのリポソームであることが好ましい。「内包」とは、リポソームに対して薬物が内水相に含まれる形態をとることを意味する。

【0028】

リポソームの大きさ（平均粒子径）は特に限定されないが、2～200nmであり、好ましくは5～150nm、より好ましくは5～120nmであり、さらに好ましくは5～100nmである。

リポソームの大きさ（平均粒子径）は、以下に述べる、EPR（Enhanced permeation and retention effect）効果を期待する場合、実質的に直径が50～200nmであるこ

とが好ましく、実質的に直径が50～150nmであることがより好ましく、実質的に直径が50～100nmであることがさらに好ましい。「実質的に」という用語は、リポソームの個数の少なくとも75%が指定された直径の範囲内にあることを意味する好ましい。前記少なくとも75%は、少なくとも80%であることがより好ましく、少なくとも90%であることがさらに好ましい。

なお、本発明において、「平均粒子径」とは、特に指定しない限り動的光散乱法を用いて測定される平均粒子径（好ましくはキュムラント平均粒子径）を意味する。「平均粒子径」は光散乱法により平均粒子径を測定できる装置を用いることで測定できる。

【0029】

リポソームの脂質二重層を構成する成分（膜成分）として脂質を含む。脂質として、水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合溶媒に溶解するものを任意に使用することができる。脂質として、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類及びそれらの誘導体等が挙げられる。これらの成分は、単一種又は複数種の成分から構成されてよい。

【0030】

リン脂質として、ホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール、スフィンゴミエリン、カルジオリピン等の天然あるいは合成のリン脂質、又はこれらに水素添加したもの（例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC））等が挙げられる。これらのなかでも、リン脂質は、水素添加大豆ホスファチジルコリンなどの水素添加されたリン脂質、スフィンゴミエリン等が好ましく、水素添加大豆ホスファチジルコリンがより好ましい。なお、本発明において、「リン脂質」とはリン脂質に修飾を加えたリン脂質誘導体も包含する。

【0031】

リン脂質以外の脂質としては、リン酸を含まない脂質が挙げられ、限定されないがリン酸部分をその分子内に有しないグリセロ脂質、リン酸部分をその分子内に有しないスフィンゴ脂質等が挙げられる。なお、本発明において、「リン脂質以外の脂質」とはリン脂質以外の脂質に修飾を加えたリン脂質以外の脂質の誘導体も包含する。

【0032】

リン脂質以外の脂質が塩基性官能基を含む場合、例えば、脂質に塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合、脂質はカチオン化脂質と呼ばれる。カチオン化脂質は、例えば、リポソームの膜を修飾することが可能となり、標的部位である細胞との接着性等を高めることができる。

【0033】

コレステロール類として、コレステロールを上げることができる。脂質による膜のひずみを埋めるためにコレステロール等を添加することが有効である。リポソーム組成物においてコレステロール類の添加は、リポソームの膜のすきまを埋めるなどして、リポソームの膜の流動性を下げる作用をすると期待される。

本発明では、リポソーム組成物の高い浸透圧条件において、コレステロール類の量を最適な範囲に制御することにより、哺乳動物における薬物放出率を調節できるという予想外の効果を見出した。

本発明では、リポソーム組成物の脂質成分の合計（リポソーム組成物に含まれる総脂質）mol中、コレステロール類の含有率は10～35mol%であり、好ましくは15～25mol%、より好ましくは17～21mol%である。

【0034】

リポソームは、上記の成分の他に、血中滞留性の改善のために親水性高分子等、膜構造の安定剤として脂肪酸、ジアセチルホスフェート等、抗酸化剤として α -トコフェロール等を加えてもよい。なお、本発明では、医薬用途において静脈注射用途での使用が認められていない分散助剤などの添加剤、例えば界面活性剤等を含まないことが好ましい。

【0035】

本発明のリポソームには、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類及びそれ

10

20

30

40

50

らの誘導体として、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類を親水性高分子で修飾することが含有することが好ましい。

【0036】

親水性高分子としては、特に限定されないがポリエチレングリコール類、ポリグリセリン類、ポリプロピレングリコール類、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。上記の親水性高分子は、それぞれ単独でまたは2種以上を組み合わせ使用することができる。これらの中でも、製剤の血中滞留性の観点から、ポリエチレングリコール類、ポリグリセリン類、ポリプロピレングリコール類が好ましく、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリグリセリン（PG）、ポリプロピレングリコール（PPG）がより好ましく、ポリエチレングリコール（PEG）は汎用であり、血中滞留性を向上させる効果があり、好ましい。

10

【0037】

PEGの分子量は、特に限定されないが、PEGの分子量は500～10,000ダルトンであり、好ましくは1,000～7,000ダルトン、より好ましくは2,000～5,000ダルトンである。

【0038】

本発明のリポソームでは、リポソームに含まれる主たる脂質とともに、PEGによって修飾された脂質（PEG修飾脂質）を用いることが好ましい。

【0039】

PEG修飾脂質としては、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG2000（日本油脂社製）、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG5000（日本油脂社製）及びジステアロイルグリセロール-PEG2000（日本油脂社製）等の1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-ポリエチレングリコールが挙げられる。

20

【0040】

これらのPEG修飾脂質は、全脂質量に対して0.3～50質量%、好ましくは0.5～30質量%、より好ましくは1～20質量%含有するように添加すればよい。

【0041】

本発明のリポソームでは、水素添加大豆ホスファチジルコリン（リポソームに含まれる主たる脂質）、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-ポリエチレングリコール（主たる脂質と併用する脂質）、及びコレステロールの脂質の組合せが好ましい。

30

【0042】

本発明のリポソーム組成物では、アニオンポリマー（ポリアニオン）を含まないことが好ましい。

【0043】

本発明の医薬に適用されるゲムシタビンについて説明する。ゲムシタビンは、化学名が（+）-2'-デオキシ-2',2'-ジフルオロシチジンであり、代謝拮抗作用を有する抗がん剤である。本発明においてゲムシタビンはゲムシタビンそのものであっても、医薬品として容認される塩であっても良く、生体内でゲムシタビンを遊離するプロドラッグであっても良い。本発明では、ゲムシタビン塩酸塩を用いることが好ましい。

40

【0044】

本発明のリポソームに内包したゲムシタビンは、リポソームの内水相に溶解状態で存在している。ここで、溶解状態とは、リポソームの体積に対して充填した薬物の量が、その内水相の組成液での薬物の飽和溶解度以下の場合、溶解状態で内包されたものとみなす。

また、飽和溶解度以上においても、CRYO-TEMで薬物結晶が観察されない、XRD測定で結晶格子に起因する回折パターンが観察されない場合、ゲムシタビンが溶解状態で内包されたものとみなす。

【0045】

（リポソーム組成物の製造方法）

50

本発明のリポソームの製造方法は、リポソームが溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物を製造できる方法であれば、特に限定されない。以下に詳述するリポソーム組成物の製造方法の各工程は、例えば、国際公開第2015/166985号、国際公開第2015/166986号を参考にして実施できる。

【0046】

本発明では、乾燥固化工程を経ずに、有機溶媒に溶解した脂質を乳化してリポソームを形成する乳化工程、乳化工程で得られたリポソームに水溶性薬物を内包させる薬物ローディング工程、及びリポソームの内水相の浸透圧を外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下に調整する薬物ローディング工程を有するリポソーム組成物の製造方法であることが好ましい。

10

リポソーム組成物の製造方法は、必要に応じて、乳化工程で用いた有機溶媒を蒸発させる蒸発工程等、他の工程を含んでよい。

【0047】

乾燥固化工程を経ずに、有機溶媒に溶解した脂質を乳化することでリポソームを形成する乳化工程では、乳化する工程であれば限定されることはないが、好ましくは高せん断をかけ、有機溶剤を含む乳化工程で微粒子化する工程である。必要に応じて、乳化工程で用いた有機溶媒を蒸発させる（脱溶媒する）ことでリポソームを形成することができる。

【0048】

（乳化工程）

乳化工程では、少なくとも1種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを混合して脂質を含む水溶液を攪拌して乳化する。脂質が有機溶媒に溶解している油相及び水相を混合し攪拌し、乳化することで、油相及び水相がO/W型に乳化した乳化液が調製される。混合後、油相由来の有機溶媒の一部または全部を後述する蒸発工程によって除去することにより、リポソームが形成される。または、油相中の有機溶媒の一部又は全部が攪拌・乳化の過程で蒸発して、リポソームが形成される。

20

【0049】

攪拌する方法としては、粒子微細化のために、超音波又は機械的せん断力が用いられる。また、粒子径の均一化のためには、一定の孔径のフィルターを通すエクストルーダー処理又はマイクロフルイザイザー処理を行うことができる。エクストルーダー等を用いれば、副次的に形成された多胞リポソームをばらして単胞リポソームにすることができる。

30

【0050】

本発明では、薬物をローディングしない状態のリポソームを、エクストリュージョン処理せずに次の工程に用いることが、製造工程の簡略化の観点から好ましい。

【0051】

（油相）

油相として用いられる有機溶媒として、水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合溶媒を用いる。本発明では、有機溶媒として、クロロホルム、塩化メチレン、ヘキサン、又はシクロヘキサンといった有機溶剤を実質的に用いないことが好ましく、これらの有機溶剤をまったく用いないことがより好ましい。

【0052】

水溶性有機溶媒は、特に限定されないが、水と任意に混じりあう性質をもつ有機溶媒であることが好ましい。水溶性有機溶媒は、具体的には、メタノール、エタノール、n-ブロパノール、イソブロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノールなどのアルコール類、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール類などが挙げられる。これらのなかでも、アルコール類が好ましい。

40

【0053】

エステル系有機溶媒は、特に限定されないが、有機酸及びアルコールの反応から得られるエステルであることが好ましい。エステル系有機溶媒は、具体的には、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸イソプロピル、酢酸t-ブチル、及びプロピオン酸メチルから選ばれる少

50

なくとも1種であることが好ましい。

【0054】

脂質の濃度は、特に限定されず、適宜調整することが可能であるが、水溶性有機溶媒とエステル系有機溶媒の混合液を溶媒とする溶液として、 $40\text{ g/L} \sim 250\text{ g/L}$ 、好ましくは $100\text{ g/L} \sim 200\text{ g/L}$ であればよい。

【0055】

(水相)

水相とは、外水相及び内水相を意味する。本発明における外水相とは、リポソームを分散する水溶液を意味する。例えば、注射剤の場合においては、バイアル瓶やプレフィルドシリンジ包装されて保管されたリポソームの分散液のリポソームの外側を占める溶液が外水相となる。また、添付された分散用液やその他溶解液により投与時に用時分散した液についても同様に、リポソームの分散液のリポソームの外側を占める溶液が外水相となる。

本発明における内水相とは、脂質二重膜を隔てた閉鎖小胞内の水相を意味する。リポソームを製造する際に、リポソームを分散する水溶液（外水相）としては、水（蒸留水、注射用水等）、生理食塩水、各種緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合物（水性溶媒）が好ましく用いられる。

【0056】

緩衝液としては、有機系、無機系に限定されることはないが、体液に近い水素イオン濃度付近に緩衝作用を有する緩衝液が好適に用いられ、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グッドバッファなどがあげられる。水相のpHは特に限定されないが、 $5 \sim 9$ 、好ましくは $7 \sim 8$ であればよい。例えば、リン酸緩衝液（例えば、 $\text{pH} = 7.4$ ）を用いることが好ましい。リポソームの内水相は、リポソームを製造する際に、リポソームを分散する水溶液であってもよいし、新たに添加される、水、生理食塩水、各種緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合物であってもよい。外水相または内水相として用いる水は、不純物（埃、化学物質等）を含まないことが好ましい。生理食塩水とは、人体と等張になるように調整された無機塩溶液を意味し、さらに緩衝機能を持ってもよい。生理食塩水としては、塩化ナトリウムを $0.9\text{ w/v} \%$ 含有する食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（以下、PBSともいう）及びトリス緩衝生理食塩水などが挙げられる。

【0057】

(蒸発工程)

本発明では、必要に応じて蒸発工程を設けてもよい。蒸発工程では、乳化工程で得られたリポソームを含む水溶液から有機溶媒を蒸発させる。蒸発工程とは、油相由来の有機溶媒の一部または全部を蒸発工程として強制的に除去する工程、及び油相中の有機溶媒の一部または全部が攪拌・乳化の過程で自然に蒸発する工程の少なくとも一つを含む。

【0058】

乳化工程を経て調製されたリポソームを含む水溶液は、リポソームに含まれなかった成分の除去、又は濃度や浸透圧の調整のために、遠心分離、限外ろ過、透析、ゲルろ過、凍結乾燥等の方法で後処理をしてもよい。得られたリポソームは、透析法、濾過法、エクストリュージョン処理等を用いて粒径を均一にすることができる。本発明のリポソーム組成物の製造方法では、薬物をローディングしない状態の空のリポソームを、エクストリュージョン処理をせずに調製することが好ましい。

【0059】

(エクストリュージョン処理)

エクストリュージョン処理とは、細孔を有するフィルターにリポソームを通過させることで、物理的なせん断力を施し、微粒化する工程を意味する。リポソームを通過させる際、リポソーム分散液及びフィルターを、リポソームを構成する膜の相転移温度以上の温度に保温することで、速やかに微粒化することができる。

【0060】

(薬物ローディング工程)

本発明の薬物ローディング工程では、リポソームに水溶性薬物を封入させる場合、水和

10

20

30

40

50

・膨潤させる水性媒体に薬物を溶解し、相転移温度以上の加熱、超音波処理又はエクストルージョン等の方法により薬物をリポソームの内水相に内包させることができる。また、脂質乳化時の水相に薬物を溶解させ内水相に内包させることもできる。

【0061】

（浸透圧調整工程）

本発明では、浸透圧調整工程によって、リポソームの内水相を高張にすること（圧力差）によって、薬物が放出しやすくなる。浸透圧を設定することにより、リリース速度が制御できる。浸透圧調整工程として、特に限定されないが、薬物ローディング工程の後に透析などの方法が採用できる。浸透圧調整工程は、国際公開第2015/166985号または国際公開第2015/166986号を参考にできる。

10

【0062】

本発明では、放出（リリース）の制御をすることにより、例えば、ドラッグデリバリーシステムとして本発明のリポソーム組成物を用いた場合、ターゲットとする患部において、必要とする薬物を必要な量を放出することができる。ただし、高張のリポソームは、薬物を放出し易いという反面、保管時にも漏出し易くなるという、保管安定性との両立が困難である。本発明のリポソーム組成物によれば、乳化された脂質から得られる、内水相を有するリポソームに対して、内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であるように設定することで、薬物の放出し易さと保管安定性とを両立できるという予想外の効果を有する。

【0063】

本発明のリポソーム組成物では、内水相の浸透圧が外水相の浸透圧に対して2倍以上8倍以下であり、好ましくは2.5倍～6倍であり、より好ましくは3倍～5倍である。2倍以上にすることによって、リポソームの脂質二重膜は、二重膜構造又は指組み構造などの構造を示すことが一般的に知られている。内水相の浸透圧が外水相に対して2倍以上になると、リポソームは二重膜構造から指組み構造になり始める。本発明では、好適な指組み構造をとるために、各種脂質の条件を設定すればよいが、コレステロール比率の調整により制御することが好ましい。その結果、薬物の放出し易さと保管安定性とを両立できるリポソーム組成物を得ることができる。

20

【0064】

最終的な薬物ローディング工程後に得られた液は、外水相と内水相の溶質が均一化されており、そのときの浸透圧を、完成するリポソーム組成物の内水相の浸透圧と定義できる。ただし、その後の外水相の透析による置換・浸透圧調整工程において、加熱操作は脂質の相転移以下に抑えるなど、内水相の溶質が十分に保持されている場合に限る。また外水相の浸透圧は、最終的な透析工程に用いる透析液の浸透圧で定義できる。ただし、透析液にて十分に置換できた場合に限る。また、リポソーム組成物の完成液について、遠心分離や限外ろ過を利用し、外水相の溶質の組成濃度と内水相の溶質の組成濃度を定量し、その組成液の浸透圧を計測することでも、内水相及び外水相の浸透圧を得ることができる。

30

【0065】

浸透圧の計測は第十六改正日本薬局方記載の浸透圧測定法にしたがえばよい。具体的には水の凝固点（氷点）降下度測定により、オスモル濃度を求めることができる。また、水の凝固点降下度は溶質モル濃度で定義されるものであり、溶質モル濃度からもオスモル濃度を求めることができる。

40

【0066】

本発明における外水相の持つ浸透圧は、投与に際して重要な影響を生体に及ぼす。体液の浸透圧から大きく離れる場合は、各組織での水分の移動を原因とした溶血や痛みが発生する。したがって、本発明における外水相の浸透圧は、好ましくは200～400 mOsmol/Lであり、より好ましくは250～350 mOsmol/Lであり、もっとも好ましくは体液と等張である。

【0067】

（無菌ろ過）

50

本発明のリボソーム組成物の製造方法によって得られた、リボソームを含む水溶液は、無菌ろ過を行うことが好ましい。ろ過の方法としては、中空糸膜、逆浸透膜、メンブレンフィルター（好ましくは $0.2\ \mu\text{m}$ のろ過滅菌フィルター）等を用いて、リボソームを含む水溶液から不要な物を除去することができる。

【0068】

（本発明のリボソーム組成物の添加剤等）

本発明のリボソーム組成物は、対象に投与するために、薬学的に許容される水溶液などの媒体、塩、保存剤、緩衝剤などを含めた添加剤を添加することで作成できる。水性担体としては、水、アルコール／水溶液、生理食塩水、非経口媒体、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が挙げられる。静脈内媒体として、水分および栄養補充液が挙げられる。保存剤としては抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスが挙げられる。リボソーム組成物のpHおよび様々な成分の濃度は、所望の値に調整することができる。

【0069】

本発明のリボソーム組成物の投与方法は、非経口的投与が好ましい。例えば、点滴などの静脈内注射（静注）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、眼内注射、髄腔内注射を選択することができる。リボソーム組成物の具体的な投与方法としては、シリンジ、点滴による投与が挙げられる。本発明のリボソーム組成物は、本発明の免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて同時にまたは逐次に投与される場合、治療的に相乗作用を示すように有効投与量および投与期間を選択することができる。しかし、本発明では、これらの投与量に制限されるものではない。

【0070】

（本発明のリボソーム組成物の容器）

本発明のリボソーム組成物の容器は、特に限定されないが、酸素透過性が低い材質であることが好ましい。例えば、プラスチック容器、ガラス容器、アルミニウム箔、アルミ蒸着フィルム、酸化アルミ蒸着フィルム、酸化珪素蒸着フィルム、ポリビニルアルコール、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリ塩化ビニリデン、等をガスバリア層として有するラミネートフィルムによるバック等が挙げられ、必要に応じて、着色ガラス、アルミニウム箔やアルミ蒸着フィルム等を使用したバック等を採用することで遮光することもできる。容器内の空間部に存在する酸素による酸化を防ぐために、容器空間部及び薬液中のガスを窒素などの不活性ガスで置換することが好ましい。例えば、注射液を窒素バブリングし、容器への充填を窒素雰囲気下行うことが挙げられる。

【0071】

（リリース速度）

リリース速度とは、単位時間あたりにリボソームの外部へ出る薬剤量（ここでは、ゲムシタピン）を意味する。本発明において、リリース速度は、血漿中 37°C において、 $10\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以上 $70\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以下が好ましく、 $20\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以上 $60\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以下がより好ましく、 $20\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以上 $50\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 以下がさらに好ましい。

リリース速度は、温度に依存するため、定温条件で測定することが好ましい。例えば、ヒトの場合、温度は特に限定されることはないが、体温（ 35°C 以上 38°C 以下）の範囲内で測定することが好ましい。

【0072】

リリース速度が $10\text{質量}\% / 24\text{hr}$ 未満であると、抗がん剤として十分な体内での曝露時間を得ることができず、期待される薬効が得られない場合が多く、また、場合によっては抗がん剤を含むリボソームが不要に長い時間体内に残留することで、皮膚などの本来分布しにくい組織に集積することで予想外の毒性が発現する場合がある。また $70\text{質量}\% / 24\text{hr}$ より大きいと、単位時間あたりの曝露する薬物量が多くなるため、最高血中濃度が高くなることで毒性が大きくなり、また、漏出した薬剤が腫瘍部以外の組織に分布あるいは速やかな代謝を受け血中滞留性が低下するために好ましくない。

【0073】

(腫瘍体積)

本発明では、腫瘍体積を測定するために、モデルとなる動物（好ましくはマウスもしくはラット）に対して腫瘍を移植できる。腫瘍の体積の増殖抑制は、使用される薬物、リポソームを構成する脂質等の組合せ、及び有効量に依存する。腫瘍体積の増殖抑制とは、腫瘍成長を抑制し得るか、腫瘍静止を達成し得るか、及び実質的若しくは完全な腫瘍退縮の少なくとも1つを意味する。

【0074】

本発明のリポソーム組成物を哺乳動物等の対象に投与する場合、モデル動物に対して、処置グループ及びコントロールグループに分配して、腫瘍細胞が定着するよう、腫瘍細胞移植の例えば、腫瘍細胞が100～1000mmに成長した後、開始できる。

10

【0075】

例えば、モデル動物がマウスの場合、本発明のリポソーム組成物の評価として、各グループのマウスを最低体重に達するまで毎日全体として体重を測定できる。サンプリング時のための最終 殺まで、腫瘍が2000mm³に達するまで又は動物が死亡するまでノギス等で腫瘍を測定できる。哺乳動物の対象の中の腫瘍体積は、任意の当分野で認められている方法を用いて測定され得る。例えば、ノギスの測定を用いて、式： $(a \times b^2) \times 0.5$ （式中、“a”は最大直径であって、“b”は短径の長さである）を用いて腫瘍体積を評価できる。また、ヒトでは、コンピュータ断層撮影法（CT）走査、磁気共鳴映像（MRI）走査のような画像診断等の手法により腫瘍体積を測定することができる。

20

【0076】

本発明の医薬に適用される腫瘍は、特に限定されるものではなく、乳癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、直腸結腸癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、腎細胞癌、前立腺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭部および頸部の癌、メラノーマ、卵巣癌、胆管癌、中皮腫、および多発性骨髄腫、等広く一般の癌治療に適用することができる。本発明の医薬は、ゲムシタピンを用いる療法が有効である腫瘍疾患の治療に用いることが好ましく、ゲムシタピンに対して耐性を持つ腫瘍疾患の治療に用いることがより好ましい。

【0077】

耐性は、がん細胞が抗がん剤に抵抗性(耐性)を示すことであり、これには治療の始めから抗がん剤が効かない自然耐性と、治療を続けていくうちに最初は有効であった抗がん剤が、効果がみられないまたは効果が減弱する状態を指す。具体的には、初期には抗がん剤に反応したが、その後治療中に応答性の低下を示すか、または細胞が抗がん剤を用いた治療の過程で増殖し続けているという点で抗がん剤に対する適切な応答を示さなかった性質を示す。

30

【0078】

(B) 免疫チェックポイント阻害剤)

「免疫チェックポイント阻害剤」は、免疫チェックポイントとそのリガンドとの結合を阻害することにより、当該免疫チェックポイントによるシグナル伝達を阻害する薬剤をいう。免疫チェックポイント阻害剤として、例えば、T細胞の表面に提示される、免疫チェックポイントおよびそのリガンドが挙げられ、具体的には、PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、PD-L1、PD-L2、BTLN2、B7-H3、B7-H4、CD48、CD80、2B4、BTLA、CD160、CD60、CD86、またはVISTA等の分子が含まれるが、本発明はこれらに限定されない。本発明において、免疫チェックポイント阻害剤は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）またはそれに対するリガンドであるPD-L1、PD-L2等、および細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）から選択される少なくとも一つを阻害する剤であることが好ましい。PD-1（Programmed death-1、CD279）は、リンパ球の活性化シグナルの亢進および／または抑制に働くCD28/CTLA-4ファミリーに属する50～55 kDaのI型膜タンパク質である。また、PD-L1（別名：B7-H1、CD274）およびPD-L2（別名：B7-DC、CD273）

40

50

は抗原提示細胞の表面上に発現しているPD-1のリガンドである。

【0079】

免疫チェックポイント阻害剤は、T細胞の表面に提示される、免疫チェックポイントおよびそのリガンドに結合できる物質であればよく、公知の、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、および抗CTLA-4抗体等の少なくとも一種を用いることができる。抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体等はBio X Cell社等から購入することができる。免疫チェックポイント阻害剤は、具体的には、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、トレメリムマブ、アバタセプト等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、免疫チェックポイント阻害剤として、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および抗PD-L2抗体の少なくとも一つと、抗CTLA-4抗体とを併用することも可能である。

10

【0080】

本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、経口または非経口投与によって対象に投与することができるが、好ましくは非経口投与である。投与方法は、具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。また、対象の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき対象の体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量が選択できる。または、患者あたり0.001 mg/bodyから100000 mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、本発明のリポソーム組成物と組み合わせて同時にまたは逐次に投与される場合、治療的に相乗作用を示すように有効投与量および投与期間を選択することができる。しかし、本発明では、これらの投与量に制限されるものではない。

20

【0081】

(免疫チェックポイント阻害剤の添加剤等)

本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、対象に投与するために、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体等の他に、薬学的に許容される水溶液などの媒体、塩、保存剤、緩衝剤などを含めた添加剤を添加することで作成できる。詳細には、上記した本発明のリポソーム組成物の添加剤等が同様に適用できる。

【0082】

本発明の医薬は、免疫チェックポイント阻害剤による治療に対して不応性のがんを有する対象を治療するために用いられることができる。例えば、免疫チェックポイント阻害剤の投与により所望の薬効が認められなかった対象に対して、本発明の医薬による治療をすることができる。

30

【0083】

本発明の医薬の作用機構は不明であるが、以下のように推測されるが本発明はこれに限定されるものではない。溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソームが、腫瘍の周囲に存在する新生血管を構成する内皮細胞の隙間を透過し、腫瘍組織に集まり、滞留するEPR効果(Enhanced permeation and retention effect)によって、腫瘍細胞に対し、優れた増殖抑制効果を有するものと推測される。

また、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1またはそのリガンドであるPD-L1、CTLA-4等の免疫チェックポイント分子との相互作用を阻害することで、がんに対する免疫力を強化することによって、がんの進行を抑制またはがんを治療できるものと推測される。

40

さらに、本発明の医薬は、溶解状態のゲムシタピンを内包するリポソーム組成物および免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせて同時にまたは逐次に投与されることによって、ゲムシタピンが少量でも強い抗腫瘍活性を有する。また、リポソーム組成物または免疫チェックポイント阻害剤の単剤の治療よりも、腫瘍増殖抑制効果が上回るか、実施例で示されるようにマウスへの適用例において8例中2例が完全寛解に至ったという顕著で予想外な効果を持つ。

【実施例】

50

【0084】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。本発明は当業者により種々の変更や修飾が可能であろうことは理解される。そのような変更や修飾が本発明の範囲を逸脱するものでない限り、それらは本発明に包含される。実施例で用いた各種試薬は、特に記載の無い限り市販品を使用した。

【0085】

(ゲムシタピン内包リポソーム組成物 (以下、本発明のリポソーム組成物、またはLipoともいう) の組成)

ゲムシタピン塩酸塩 0.57 mg/mL

HSPC (注1) 11.3 mg/mL

MPEG-DSPE (注2) 2.91 mg/mL

コレステロール 1.39 mg/mL

スクロース 94 mg/mL

L-ヒスチジン 1.55 mg/mL

塩化ナトリウム 0.188 mg/mL

pH調整剤 適量

(注1) Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine (水素添加大豆ホスファチジルコリン)

(注2) N (- Carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000) -1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine sodium salt

【0086】

ゲムシタピン塩酸塩はテバエーピーアイ株式会社より入手した。HSPCおよびMPEG-DSPEは日油株式会社より入手した。その他の試薬は米国薬局方準拠の市販品を使用した。

【0087】

(ゲムシタピン内包リポソーム組成物の物性値)

リポソームの内水相の浸透圧は外水相の浸透圧に対して3.8倍であった。

リポソームからのゲムシタピンのリリース速度は、ヒト血漿中37℃において25%/24hrであり、リポソーム組成物の脂質成分の合計量に対して、コレステロール類の含有率が18.9mol%であり、平均粒子径77nmであった。

【0088】

抗PD-1抗体は、(Bio X Cell社、BE0146)を使用した。抗PD-L1抗体は、(Bio X Cell社、BE0101)を使用した。Isotype control抗体は、(Bio X Cell社、BE0090)を使用した。5%グルコース注射液 (5% Glu) は、ブドウ糖 5 g/100 mLである水溶液である。EMT6腫瘍細胞 (ATCC社、CRL-2755) は、由来はマウス乳腺で、ゲムシタピン耐性を持つ腫瘍細胞である。

【0089】

(実施例1)

EMT6皮下移植担癌モデルマウスでのPD-L1併用による薬効試験

被検物質として、抗PD-L1抗体 (以下PD-L1ともいう)、ゲムシタピン (以下、Gemともいう)、およびゲムシタピン内包リポソーム組成物 (以下、本発明のリポソーム組成物) を用いた。Gemはゲムシタピン塩酸塩 (TEVA社製) を生理食塩水に溶解させたものを用いた。本発明のリポソーム組成物は5%グルコース注射液 (以下、5% Glu; 0.05 g/mL) に希釈した物を用いた。

【0090】

マウス乳癌細胞株であるEMT6細胞 3×10^6 個を雌性Balbマウスの脇腹部皮下に移植し皮下腫瘍を形成させた。腫瘍体積を指標としてPD-L1およびGemの併用投与、PD-L1および本発明のリポソーム組成物の併用投与における皮下腫瘍の抑制効果を評価した。

【0091】

PD-L1およびそのIsotype control抗体 (以下、Iso抗体ともいう) は、週2回、計3週間、腹腔内投与し、Gem、本発明のリポソーム組成物およびその溶媒 (5% Glu) に関し

10

20

30

40

50

ては週1回、計3週間、尾静脈投与した。

【0092】

3週間の投与が終了した後は休薬状態とし、2週間腫瘍体積の測定を継続した。腫瘍体積が体重の10%を超える検体は試験途中で安楽死させ、生存率（Tumor Free Survival %）から薬効解析した。

【0093】

群構成として、群1は5% GluとIso抗体（10 mg/kg）の併用、群2は5% GluとPD-L1（10 mg/kg）の併用、群3はGem（240 mg/kg）とIso抗体（10 mg/kg）の併用、群4はGem（240 mg/kg）とPD-L1（10 mg/kg）の併用、群5は本発明のリポソーム組成物（1 mg/kg）とIso抗体（10 mg/kg）の併用、群6は本発明のリポソーム組成物（1 mg/kg）とPD-L1（10 mg/kg）の併用、群7は本発明のリポソーム組成物（4 mg/kg）とIso抗体（10 mg/kg）の併用、群8は本発明のリポソーム組成物（4 mg/kg）とPD-L1（10 mg/kg）の併用とした。

【0094】

群1～5、7が比較例、群6、8が実施例である。なお、各薬剤の投与量上限は、体重減少率が20%を超えない量をMTD（最大耐用量）と推定し、最低体重に達しない用量として設定した。群構成および投与量を表1に示す。表1において、投与量は活性体であるゲムシタビンとしての量、2回/3Wは週2回を3週間の投与、1回/3Wは週1回を3週間の投与、腹は腹腔内投与、尾は尾静脈投与、Lipoは本発明のリポソーム組成物をそれぞれ意味する。また、Lipo（1）、Lipo（4）は、本発明のリポソーム組成物を1 mg/kg、4 mg/kgで対象に投与したことを意味する。

【0095】

【表1】

群	被検物質	投与量 (mg/kg/回)		PD-L1 および Iso 抗体		Gem、リポソーム組成物および5% Glu		投与容量 (mL/kg)
		PD-L1	ゲムシタビン	投与経路	投与スケジュール	投与経路	投与スケジュール	
1	5% Glu+Iso 抗体	0	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
2	5% Glu+PD-L1	10	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
3	Gem + Iso 抗体	0	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
4	Gem + PD-L1	10	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
5	Lipo（1）+ Iso 抗体	0	1	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
6	Lipo（1）+ PD-L1	10	1	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
7	Lipo（4）+ Iso 抗体	0	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
8	Lipo（4）+ PD-L1	10	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10

【0096】

体重の推移を図1に示す。腫瘍体積の推移を図2（平均値）、および図3～10（個体別）に示す。移植後41日目までに完全寛解した検体数（腫瘍体積が0になった検体）、群内の検体数、完全寛解率（%）を表2に示す。

【0097】

10

20

30

40

50

【表 2】

群	完全寛解検体数	群個体数	完全寛解率 (%)
1	0	8	0
2	0	8	0
3	0	8	0
4	0	8	0
5	0	8	0
6	0	8	0
7	0	8	0
8	2	8	25

10

【0098】

群1、群2、群3、群4、群5、および群6では、投薬期間中に腫瘍の増大を止めることができず、移植後41日目の試験終了日までに全検体が安楽死の対象となった。群7では優れた増殖抑制効果を示したが、休薬後は再増大により全検体が安楽死の対象となった。群8では、優れた増殖抑制効果を示し、休薬後も腫瘍増大抑止作用が確認でき、8例中2例が完全寛解に至った。

【0099】

20

腫瘍体積が体重の10%を超える検体を安楽死させた時の生存率（Tumor Free Survival %）を求め、カプラン-マイヤー法による生存曲線の結果を図11に示す。図11において、数字は群1～群8を意味する。生存期間延長効果の統計学的解析として、ログランク検定（Log-rank Test）を実施し、群間でP値5%未満を統計学的有意差ありと判定した。カプラン-マイヤー法による生存曲線から求められる生存期間の中央値（Median survival）の算出や統計学的解析処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。カプラン-マイヤー法による生存曲線の解析結果を表3に示す。

表3のLog-rank Testにおいて、aは $P < 0.05$ であったものを、bは $P < 0.01$ であったものを、cは $P < 0.0001$ であったものを示し、nsは有意差なかったものを示す。Undefinedは、Median survival解析において生存率が50%を下回らず解析不能であったものを示す。

30

【0100】

【表 3】

対照群		2	3	5	7	4	6	8
比較群		1				3	5	7
Log-rank Test	P 値	0.1255	0.1562	0.0346	< 0.0001	0.2223	0.0109	0.0074
	判定	ns	ns	a	C	ns	a	B
Median survival	対 照 群	20	20	20	34	21.5	23	Undefined
	比 較 群	16	16	16	16	20	20	34
	比 率 (%)	1.25	1.25	1.25	2.125	1.075	1.15	—

40

【0101】

群2または群3では群1に比べて有意な生存期間の延長が認められず、PD-L1またはGemが効果を示すことができなかった。一方、群5または群7では群1に対して統計学的に有意な生存期間延長効果が認められた。併用効果の検証では、群4は群3に比べて有意な生存期間延長効果の変化が確認できず、群6では群5に対して有意に生存期間延長効果を増強させ

50

た。さらに、群8は群7に比べて有意な生存期間延長効果の増強を示し、移植後41日目の試験終了日まで8例中7例が生存した。

【0102】

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物はPD-L1との併用において、GemまたはPD-L1の効果に対して抵抗性のあるEMT6腫瘍細胞に対し、優れた増殖抑制効果を有し、その増殖抑制効果はGemとPD-L1との併用よりも上回ることが示された。

【0103】

(実施例2)

EMT6皮下移植担癌モデルマウスでのPD-1併用による薬効試験

被検物質は実施例1と同様の物を用いた。マウス乳癌細胞株であるEMT6細胞 3×10^6 個を雌性Balbマウスの脇腹部皮下に移植し皮下腫瘍を形成させた。腫瘍体積を指標としてPD-1およびGemの併用投与、PD-1およびLipoの併用投与における皮下腫瘍の抑制効果を評価した。被検物質は、PD-1、およびその溶媒（PBS; リン酸緩衝生理食塩水）に関しては週2回、計3週間、腹腔内投与し、Gem、本発明のリポソーム組成物、およびその溶媒（5% Glu）に関しては週1回、計3週間、尾静脈投与した。3週間の投与が終了した後は休薬状態とし、2週間腫瘍体積の測定を継続した。

【0104】

群構成として、群1は5% GluとPBSの併用、群2は5% GluとPD-L1（10 mg/kg）の併用、群3はGem（240 mg/kg）とIso抗体（10 mg/kg）の併用、群4はGem（240 mg/kg）とPD-1（10 mg/kg）の併用、群5はLipo（2 mg/kg）とPBSの併用、群6はLipo（2 mg/kg）とPD-1（10 mg/kg）の併用、群7はLipo（4 mg/kg）とPBSの併用、群8はLipo（4 mg/kg）とPD-1（10 mg/kg）の併用とした。群1～5、7が比較例、群6、8が実施例である。なお、各薬剤の投与量上限は、体重減少率が20%を超えない量をMTD（最大耐用量）とし、最低体重に達しない用量として設定した。群構成および投与量を表4に示す。表4において、投与量は活性体であるゲムシタビンとしての量、2回/3Wは週2回を3週間の投与、1回/3Wは週1回を3週間の投与、腹は腹腔内投与、尾は尾静脈投与、Lipoは本発明のリポソーム組成物をそれぞれ意味する。また、Lipo（2）、Lipo（4）は、本発明のリポソーム組成物を2mg/kg、4mg/kgで対象に投与したことを意味する。

【0105】

【表4】

群	被検物質	投 与 量 (mg/kg/ 回)		PD-L1 および PBS		Gem、Lipo、お よび 5% Glu		投与 容量 (mL/ kg)
		PD-1	ゲム シタ ビン	投 与 経路	投与スケ ジュール	投 与 経路	投 与 ス ケ ジ ュ ール	
1	5% Glu+PBS	0	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
2	5% Glu+PD-1	10	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
3	Gem + PBS	0	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
4	Gem + PD-1	10	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
5	Lipo (2) + PBS	0	2	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
6	Lipo (2) + PD-1	10	2	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
7	Lipo (4) + PBS	0	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
8	Lipo (4) + PD-1	10	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10

【0106】

腫瘍体積の推移を図12（平均値）、および図13～20（個体別）に示す。移植後41日目までに完全寛解（腫瘍体積が0）した検体数、群内の検体数、完全寛解率（%）、移植後各日目の腫瘍体積平均値を表5に、移植後各日目の腫瘍体積標準誤差を表6にそれぞれ

示す。表 5 および表 6 において、完全寛解検体数とは、腫瘍体積 0 となった場合を意味する。なお、併用効果に対する統計学的解析として、ボンフェローニの多重比較検定 (Bonferroni multiple comparisons test) を実施し、各移植後経時日数に対して群間で P 値 5 % 未満を統計学的有意差ありと判定した。データの処理には Graphpad Prism version 5.03 を用いた。

【 0 1 0 7 】

【表 5】

群	完全寛 解検体 数	群個体 数	完全 寛 解 率 (%)	腫瘍体積平均値 (mm ³)					
				移植後日数					
				6	9	13	16	20	23
1	0	8	0	445	1095	1798	2781	—	—
2	0	8	0	446	1040	1784	2514	—	—
3	0	8	0	432	473	1129	1228	2265	3521
4	0	8	0	375	432	1227	1395	2305	3112
5	0	8	0	365	644	991	1117	1743	2271
6	1	8	12.5	524	739	946	849	1212	1327
7	0	8	0	486	672	969	1074	1590	1728
8	1	8	12.5	504	582	753	684	1000	963

10

20

【 0 1 0 8 】

【表 6】

群	完全寛 解検体 数	群個体 数	完全 寛 解 率 (%)	腫瘍体積標準誤差 (±mm ³)					
				移植後日数					
				6	9	13	16	20	23
1	0	8	0	67	121	143	206	—	—
2	0	8	0	61	85	147	327	—	—
3	0	8	0	60	63	110	119	210	299
4	0	8	0	38	58	139	157	258	393
5	0	8	0	56	107	134	151	215	243
6	1	8	12.5	92	85	102	143	278	365
7	0	8	0	51	85	130	149	235	302
8	1	8	12.5	44	59	93	106	211	230

30

【 0 1 0 9 】

表 7 において a は P < 0.05 であったものを、b は P < 0.0001 であったものを示し、ns は有意差なかったものを示す。

40

【 0 1 1 0 】

50

【表 7】

対照群	4		6		8	
比較群	3		5		7	
移植後日数	P 値範囲	判定	P 値範囲	判定	P 値範囲	判定
6	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns
9	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns
13	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns
16	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns	$P > 0.05$	ns
20	$P > 0.05$	ns	$P < 0.05$	a	$P > 0.05$	ns
23	$P > 0.05$	ns	$P < 0.0001$	b	$P < 0.05$	a

【0111】

群1、群2、群3、群4、および群5においては、投薬期間中に腫瘍の増大を止めることができず、移植後41日目の試験終了日までに全匹安楽死の対象となった。群7では優れた増殖抑制効果を示したが、休薬後は再増大により全匹安楽死の対象となった。群6または群8では優れた増殖抑制効果を示しただけでなく、休薬後も腫瘍増大抑止作用が確認でき、8例中1例が完全寛解に至った。

【0112】

併用効果の検証において、群4では群3に対してPD-1併用による作用の増強は示すことはできなかった。一方、群6または群8においては、移植後23日目において併用による有意な作用の増強を示すことができた。

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物はPD-1との併用において、GemまたはPD-1の効果に対して抵抗性のあるEMT6腫瘍細胞に対し、優れた増殖抑制効果を有し、その増殖抑制効果はGemとPD-1との併用よりも上回る顕著で予想外な効果を示すことが分かった。

【0113】

(実施例3)

EMT6皮下移植担癌モデルマウスでの抗CTLA-4抗体併用による薬効試験

被検物質として、抗CTLA-4抗体（以下CTLA-4ともいう）、Gem、および本発明のリポソーム組成物を用いた。Gemはゲムシタビン塩酸塩（TEVA社製）を生理食塩水に溶解させたものを用いた。本発明のリポソーム組成物は5% Gluに希釈した物を用いた。

【0114】

マウス乳癌細胞株であるEMT6細胞 1.7×10^6 個を雌性Balb/cマウスの側腹部皮下に移植し皮下腫瘍を形成させた。腫瘍体積を指標としてCTLA-4およびGemの併用投与、CTLA-4および本発明のリポソーム組成物の併用投与における皮下腫瘍の抑制効果を評価した。

【0115】

CTLA-4およびその溶媒(PBS)は、週2回、計3週間、腹腔内投与し、Gem、本発明のリポソーム組成物およびその溶媒（5% Glu）に関しては週1回、計3週間、尾静脈投与した。

【0116】

3週間の投与が終了した後は休薬状態とし、4週間腫瘍体積の測定を継続した。腫瘍体積が体重の10%を超える検体は試験途中で安楽死させ、生存率（Tumor Free Survival %）から薬効解析した。

【0117】

群構成として、群1は5% GluとPBSの併用、群2は5% GluとCTLA-4（10 mg/kg）の併用、群3はGem（240 mg/kg）とPBSの併用、群4はGem（240 mg/kg）とCTLA-4（10 mg/kg）の併用、群5は本発明のリポソーム組成物（1 mg/kg）とPBSの併用、群6は本発明のリポソーム組成物（1 mg/kg）とCTLA-4（10 mg/kg）の併用、群7は本発明のリポソーム組成物（4 mg/kg）とPBSの併用、群8は本発明のリポソーム組成物（4 mg

/kg) とCTLA-4 (10 mg/kg) の併用とした。

【0118】

群1～5、7が比較例、群6、8が実施例である。群構成および投与量を表8に示す。表1において、投与量は活性体であるゲムシタピンとしての量、2回/3Wは週2回を3週間の投与、1回/3Wは週1回を3週間の投与、腹は腹腔内投与、尾は尾静脈投与、Lipoは本発明のリポソーム組成物をそれぞれ意味する。また、Lipo (1)、Lipo (4)は、本発明のリポソーム組成物を1 mg/kg、4 mg/kgで対象に投与したことを意味する。

【0119】

【表8】

群	被検物質	投与量 (mg/kg/回)		CTLA-4 および PBS		Gem、リポソーム組成物および 5% Glu		投与 容量 (mL/kg)
		CTLA-4	Gem および Lipo	投 与 経 路	投 与 ス ケ ジ ュ ー ル	投 与 経 路	投 与 ス ケ ジ ュ ー ル	
1	5% Glu+PBS	0	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
2	5% Glu+CTLA-4	10	0	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
3	Gem + PBS	0	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
4	Gem + CTLA-4	10	240	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
5	Lipo (1) + PBS	0	1	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
6	Lipo (1) + CTLA-4	10	1	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
7	Lipo (4) + PBS	0	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10
8	Lipo (4) + CTLA-4	10	4	腹	2回/3W	尾	1回/3W	10

【0120】

各群における個体ごとの腫瘍体積の推移を図21～28に示す。移植後52日目までに完全寛解した検体数（腫瘍体積が0になった検体）、群内の検体数、完全寛解率（%）を表9に示す。

【0121】

【表9】

群	完全寛解検体数	群個体数	完全寛解率 (%)
1	0	8	0
2	1	8	12.5
3	0	8	0
4	1	8	12.5
5	0	8	0
6	1	8	12.5
7	0	8	0
8	7	8	87.5

【0122】

群1、群2、群3、群4、群5、および群6では、投薬期間中に腫瘍の増大を止めることができず、移植後52日目の試験終了日までに群1、群3、群5では全検体が、群2、群4、群6では8例中7例が安楽死の対象となった。群7では優れた増殖抑制効果を示したが、投薬期間後は腫瘍の増大がみられ、全検体が安楽死の対象となった。群8では、優れた増殖抑制効果を示し、投薬期間後も腫瘍増大抑止作用が確認でき、8例中7例が完全寛解に至った。

【0123】

腫瘍体積が体重の10%を超える検体を安楽死させた時の生存率（Tumor Free Survival %）を求め、カプラン-マイヤー法による生存曲線の結果を図29に示す。図29において、Group 1～Group 8は群1～群8を意味する。生存期間延長効果の統計学的解析として、ログランク検定（Log-rank Test）を実施し、群間でP値5%未満を統計学的有意差ありと判定した。カプラン-マイヤー法による生存曲線から求められる生存期間の中央値（Median survival）の算出や統計学的解析処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。カプラン-マイヤー法による生存曲線の解析結果を表10に示す。

表10のLog-rank Testにおいて、aは $P < 0.05$ であったものを、bは $P < 0.001$ であったものを、cは $P < 0.0001$ であったものを示し、nsは有意差なかったものを示す。Undefinedは、Median survival解析において生存率が50%を下回らず解析不能であったものを示す。

【0124】

【表10】

対照群		2	3	5	7	4	6	8
比較群		1				3	5	7
Log-rank Test	P 値	0.7161	0.001	0.0773	< 0.0001	0.1089	0.0134	< 0.0001
	判定	ns	b	ns	C	ns	a	c
Median survival	対 照 群	21	29.5	22.5	33	35	29.5	Undefined
	比 較 群	21	21	21	21	29.5	22.5	33
	比率	1.00	1.40	1.07	1.57	1.19	1.31	—

【0125】

群2または群5では群1に比べて有意な生存期間の延長が認められず、群3または群7では群1に対して統計学的に有意な生存期間延長効果が認められた。併用効果の検証では、群4は群3に比べて有意な生存期間延長効果の変化が確認できず、群6では群5に対して有意に生存期間延長効果を増強させた。さらに、群8は群7に比べて有意な生存期間延長効果の増強を示し、移植後52日目の試験終了日まで8例中7例が生存した。

【0126】

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物はCTLA-4との併用において、GemまたはCTLA-4の効果に対して抵抗性のあるEMT6腫瘍細胞に対し、優れた増殖抑制効果を有し、その増殖抑制効果はGemとCTLA-4との併用よりも上回ることが示された。

【0127】

（実施例4）

EMT6皮下移植担癌モデルマウスでの腫瘍内免疫細胞構成変化

腫瘍内には様々な免疫細胞が浸潤しており、腫瘍増殖に影響を及ぼしている。それら免疫細胞は、抗腫瘍活性の中心を担う細胞傷害性CD8陽性T細胞、NK細胞やM1型マクロファージを中心とした抗腫瘍型の免疫細胞と、それらの免疫細胞を抑制する制御性T細胞（Treg）やM2型マクロファージを中心とした腫瘍増殖型の免疫細胞が混在する。

【0128】

マクロファージには2種類のサブセット（M1、M2）が存在する。M1型マクロファージは、抗菌または抗ウイルス、抗腫瘍活性を示す。M2型マクロファージは、組織修復、血管新生、腫瘍増殖の促進、免疫抑制の作用を示す。腫瘍の進展に伴い腫瘍組織に浸潤しているマクロファージ（Tumor-associated macrophages, TAM; 腫瘍随伴マクロファージ）はM1型マクロファージからM2型マクロファージへシフトすると考えられている。このことから、M1型マクロファージが優位であることが抗腫瘍作用に重要であると考えられており、M1型マクロファージおよびM2型マクロファージのバランスを変えることが新た

な治療法となる可能性がある。

【0129】

腫瘍免疫の主役を担う細胞傷害性CD8陽性T細胞は、未感作のCD8陽性T細胞が抗原刺激などにより感作されることで分化・増殖したものであり、ウイルス感染細胞や癌細胞などを除去する役割を担う。CD8陽性T細胞によって非自己とみなされたがん細胞は細胞死へと誘導される。一方で、がん細胞はTregやM2型マクロファージといった免疫抑制性の細胞を周辺に呼び込むことによって、CD8陽性T細胞からの攻撃を抑制し、免疫監視機構からの逃避していることが知られている(参考文献: Immunology. 2013; 138(2): 105-115.)。

【0130】

腫瘍内のCD8陽性T細胞の割合が高く、M2型マクロファージに比べてM1型マクロファージの比が高いと抗腫瘍環境となると言われている(参考文献: J Clin Invest. 2012; 122(3): 787-95)。そこで、抗CTLA-4抗体およびGemの併用投与、抗CTLA-4抗体および本発明のリポソーム組成物の併用投与における腫瘍内免疫細胞の状態をCD8陽性T細胞の割合および抗腫瘍活性を示すM1型マクロファージ、腫瘍増殖促進活性を示すM2型マクロファージの割合を指標に抗腫瘍環境であるか、腫瘍増殖環境であるかを評価した。

【0131】

マウス乳癌細胞株であるEMT6細胞 3.0×10^6 個を雌性Balb/cマウスの側腹部皮下に移植し皮下腫瘍を形成させた。

【0132】

被検物質として、抗CTLA-4抗体(以下CTLA-4ともいう)、Gem、および本発明のリポソーム組成物を用いた。Gemはゲムシタビン塩酸塩(TEVA社製)を生理食塩水に溶解させたものを用いた。本発明のリポソーム組成物は5% Gluに希釈した物を用いた。CTLA-4およびその溶媒(PBS)は、週2回、計5回、腹腔内投与し、Gem、本発明のリポソーム組成物およびその溶媒(5% Glu)に関しては週1回、計3回、尾静脈投与した個体を用いた。投与開始16、17日目にて腫瘍を摘出し、腫瘍内免疫細胞の解析に用いた。

【0133】

摘出された腫瘍をTumor Dissociation Kit, mouse (カタログ番号130-096-730、Miltenyi Biotec 社製)を用いて細胞分散状態とし、CD45 (TIL) MicroBeads (カタログ番号130-110-618、Miltenyi Biotec 社製)により腫瘍内の免疫細胞を単離した。LIVE/DEAD (商標) Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (カタログ番号L34968、Invitrogen 社製)により死細胞を染色し、以下の蛍光標識抗体を用いて各種免疫細胞マーカーを染色した。CD3はCD3 Antibody, Alexa Fluor (登録商標) 700 (カタログ番号56-0032-82、eBioscience 社製)、CD8はCD8a-PE-Vio770, mouse (カタログ番号130-102-358、Miltenyi Biotec 社製)、CD11bはCD11b Monoclonal Antibody (M1/70), eFluor 450 (カタログ番号48-0112-82、eBioscience 社製)、F4/80はF4/80-APC, mouse (カタログ番号130-102-379、Miltenyi Biotec 社製)、MHC Class IIはMHC Class II -APC-Vio770, mouse (カタログ番号130-112-233、Miltenyi Biotec 社製)、CD206はPE/Cy7 anti-mouse CD206 (MMR) Antibody (カタログ番号141720、Biolegend 社製)を用いた。サンプルはフローサイトメーター(Attune NxT, Invitrogen 社製)を用いて解析した。CD8陽性T細胞(CD3陽性、CD8陽性)、M1型マクロファージ(CD11b陽性、F4/80陽性、MHC Class II陽性、CD206陰性)およびM2型マクロファージ(CD11b陽性、F4/80陽性、MHC Class II陰性、CD206陽性)を同定し、各細胞の割合を算出した。

【0134】

群構成として、群1は5% GluとPBSの併用、群2はGem (240 mg/kg)とPBSの併用、群3は本発明のリポソーム組成物(4 mg/kg)とPBSの併用、群4はGem (240 mg/kg)とCTLA-4 (10 mg/kg)の併用、群5は本発明のリポソーム組成物(4 mg/kg)とCTLA-4 (10 mg/kg)の併用とした。

【0135】

群1、2および4が比較例、群3、5が実施例である。群構成および投与量を表11に示す。

表11において、投与量は活性体であるゲムシタビンとしての量、5回は週2回で計5回の投与、3回は週1回の投与で計3回の投与、腹は腹腔内投与、尾は尾静脈投与、Lipoは本発明のリポソーム組成物をそれぞれ意味する。また、Lipo (4)は本発明のリポソーム組成物を4 mg/kgで対象に投与したことを意味する。

【0136】

【表11】

群	被検物質	投与量 (mg/kg/回)		CTLA-4 および PBS		Gem、リポソーム 組成物および 5% Glu		投与 容量 (mL/kg)
		CTLA- 4	Gem および Lipo	投 与 経 路	投 与 ス ケ ジ ュ ー ル	投 与 経 路	投 与 ス ケ ジ ュ ー ル	
1	5% Glu + PBS	0	0	腹	5 回	尾	3 回	10
2	Gem + PBS	0	240	腹	5 回	尾	3 回	10
3	Lipo (4) + PBS	0	4	腹	5 回	尾	3 回	10
4	Gem + CTLA-4	10	240	腹	5 回	尾	3 回	10
5	Lipo (4) + CTLA-4	10	4	腹	5 回	尾	3 回	10

【0137】

各群における各個体の割合および各群の平均値を図30 (CD8 陽性T細胞)、図31 (M1型マクロファージ)、および図32 (M2型マクロファージ) に示す。

【0138】

群1、群2、群3および群4で、腫瘍内のCD8 T細胞の割合は変化しなかったが、群5において顕著にCD8陽性 T細胞の浸潤を増加した。また、M1型マクロファージ、M2型マクロファージの割合を比較すると、群5において顕著にM1型マクロファージが増加し、M2型マクロファージが減少した。

【0139】

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物はCTLA-4との併用において、腫瘍内のM1型マクロファージとM2型マクロファージのバランスを炎症状態に傾かせ、CD8 陽性T細胞の浸潤を誘導することで抗腫瘍効果につながることを示唆された。

【0140】

(実施例5)

EMT6皮下移植担癌モデルマウスでの抗CTLA-4抗体併用効果に対するCD8陽性T細胞の影響検証

被検物質として、抗CTLA-4抗体（以下CTLA-4ともいう）、抗CD8抗体、および本発明のリポソーム組成物を用いた。本発明のリポソーム組成物は5% Gluに希釈した物を用いた。

【0141】

マウス乳癌細胞株であるEMT6細胞 0.5×10^6 個を雌性Balb/cマウスの側腹部皮下に移植し、皮下腫瘍を形成させた。腫瘍体積を指標に、抗CD8抗体によってCD8陽性T細胞を除去することでCTLA-4および本発明のリポソーム組成物の併用投与における抗腫瘍効果への影響を評価した。

【0142】

抗CD8抗体、CTLA-4およびその溶媒(PBS)は、週2回、計6回、腹腔内投与し、本発明のリポソーム組成物およびその溶媒 (5% Glu) に関しては週1回、計3回、尾静脈投与した。

【0143】

群構成として、群1はCTLA-4および本発明のリポソーム組成物の併用投与、群2は抗CD8抗体、CTLA-4および本発明のリポソーム組成物の併用とした。

【0144】

各群における各個体の腫瘍体積を図33（群1）、図34（群2）に示す。

【0145】

群1において観察されていた抗腫瘍効果は群2においてCD8 T細胞を除去することで完全に消失した。

【0146】

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物とCTLA-4との併用効果において、腫瘍内のCD8陽性T細胞の浸潤が抗腫瘍効果の本態として作用することが示唆された。

【0147】

（参考例）

ヒトでの循環血中及び腫瘍中の免疫細胞構成変化

癌患者の末梢血中では、Tregや免疫抑制性の骨髄由来抑制細胞（MDSC; Myeloid-derived suppressor cells）が増加しており、悪性度などに関連していることが報告されている。制御性T細胞（Treg）は、自己に対する免疫応答を回避する「免疫寛容」に重要な役割を果たす一方で、がん細胞の「免疫逃避」にも関与し抗腫瘍免疫応答を抑制する（参考文献：J Transl Med. 2016; 14; 282）。MDSCは、顆粒球、樹状細胞、マクロファージなどの前駆細胞であり、サイトカインなどの腫瘍産生因子に反応して誘導され、分化度も様々な非常に多様な細胞集団である。最も重要な機能は免疫応答の抑制であり、その抑制機構もまた非常に多様であることが知られている。これらのことから、MDSCは制御性T細胞と並んで癌患者の免疫抑制状態に重要な役割を演じている細胞であり、がん免疫療法の妨げとなっている細胞として近年注目されている（参考文献：耳鼻免疫アレルギー（JJIAO）2013; 30（4）：271－278。）。

そこで、本発明のリポソーム組成物の第1相試験において、本発明のリポソーム組成物を投与したがん患者における循環血中のCD8陽性T細胞、免疫抑制性のTreg、MDSC、さらには、腫瘍中のMDSC細胞の変化を評価した。

【0148】

被検物質として、本発明のリポソーム組成物を用いた。投与量およびスケジュールは表12のとおりである。

【0149】

【表12】

Cohort	被検物質	患者数	投与量 (mg/m ²)	投与スケジュール ()
1	リポソーム組成物	3	1.2 mg/m ²	2週間に1回
2	リポソーム組成物	4	2.4 mg/m ²	2週間に1回
3	リポソーム組成物	3	4.8 mg/m ²	2週間に1回

【0150】

末梢血中の免疫細胞の解析は、被験物質投与前（C1D1）、1回目投与7日後（C1D8）、1回目投与14日後（C1D15）、2回目投与14日後（C2D1）、1細胞解析は、被験物質投与前（pre-dose）、2回目投与15日後（C2D2）において測定した。

【0151】

患者の循環血中Total CD8陽性T細胞（CD3陽性、CD8陽性）に対する増殖の指標であるKi67陽性 CD8陽性T細胞の割合を C1D1からの変化を図35に示す。循環血中Total Treg（CD3陽性、CD25陽性、CD127陰性、foxp3陽性）に対するKi67陽性Treg をC1D1からの変化を図36に示す。循環血中Total MDSC（CD3陰性、CD19陰性、CD56陰性、HLA-DR陰性、CD11b陽性、CD33陽性）に対するM-MDSC（CD14陽性、CD15陰性のMDSC）をC1D1からの変化を図37に示す。Cohort1-3のうち腫瘍サンプルが得られた5例の患者における腫瘍中Total MDSC に対するM-MDSC 細胞を投与前とC2D2間で比較した値を図38に示す。

【0152】

図35においてCohort 3の群で Ki67陽性CD8 T細胞の増加がみられた。

図36においてCohort 3の群でKi67陽性Tregの低下がみられた。

図37においてCohort 3の群でM-MDSC細胞の割合の低下がみられた。

図38においてCohort 3の群でM-MDSC細胞の割合の低下がみられた。

【0153】

以上の結果から、本発明のリポソーム組成物は、免疫抑制性のKi67陽性Treg及びM-MDSC細胞の低下作用を有し、抗腫瘍効果を有するKi67陽性 CD8 T細胞の増加作用を有することが示唆された。これらの作用により、単剤及び免疫チェックポイント阻害剤との併用によって、免疫活性化作用を介した新規治療法となりうる。

【産業上の利用可能性】

【0154】

本発明の医薬は、がんに対する予防または治療するための医薬として有用である。本発明の投与方法は、がんに対する予防または治療するための医薬の投与方法として有用である。さらに本発明の治療方法は、がんに対する予防または治療するための治療方法として有用である。

10

20

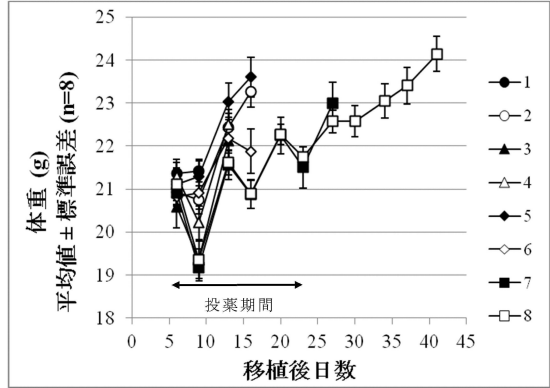
30

40

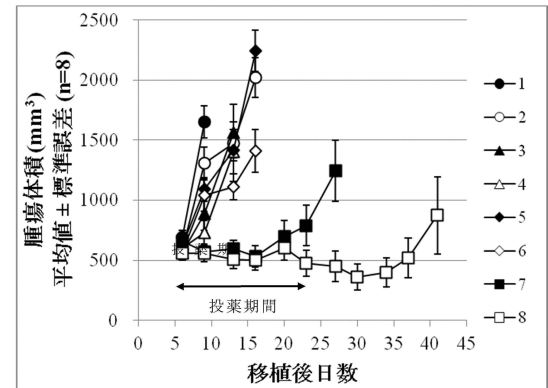
50

【図面】

【図 1】

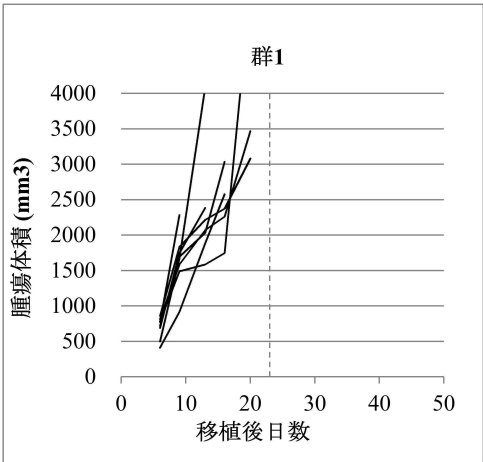


【図 2】

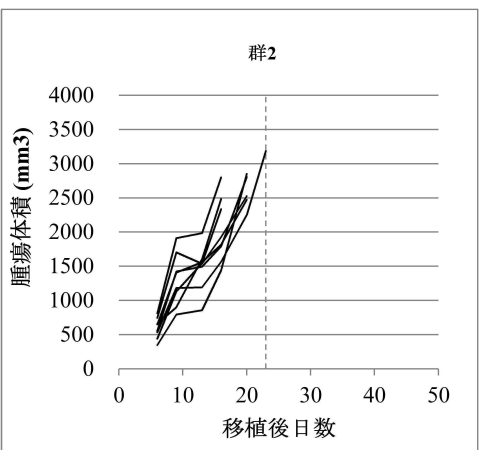


10

【図 3】



【図 4】



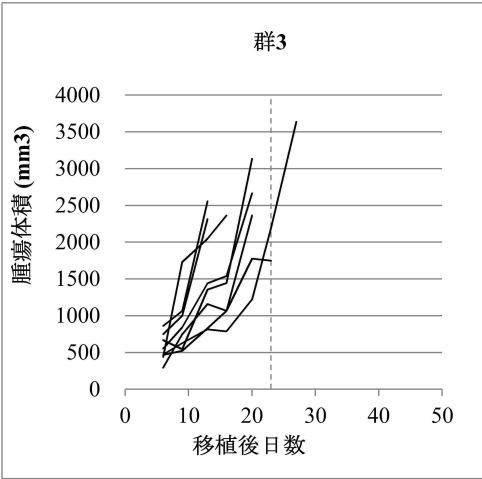
20

30

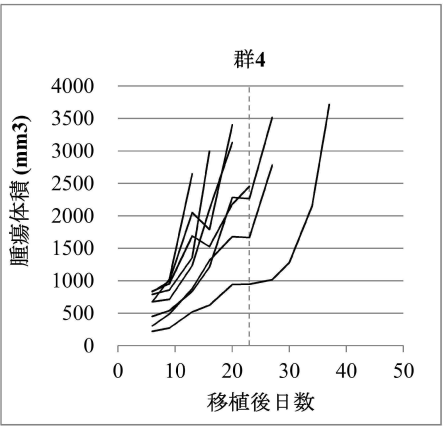
40

50

【図 5】

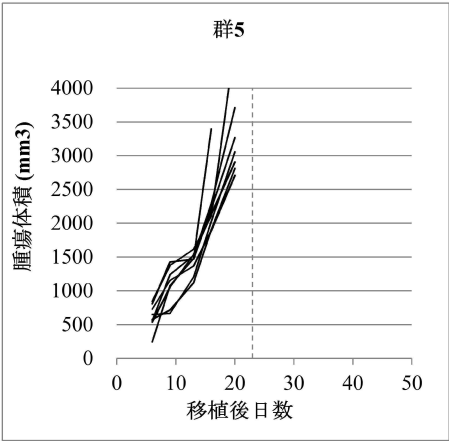


【図 6】

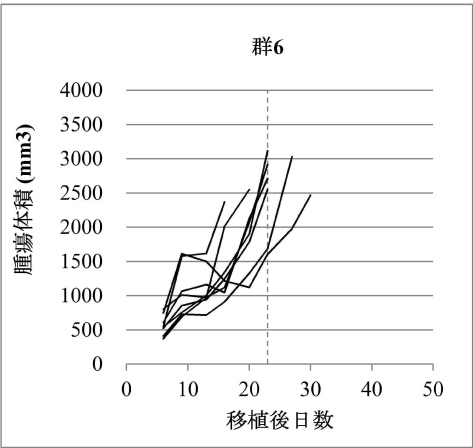


10

【図 7】



【図 8】



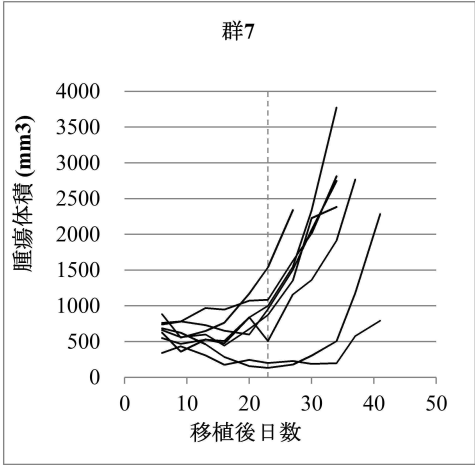
20

30

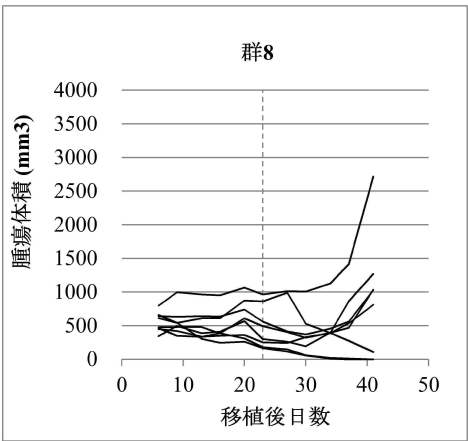
40

50

【図 9】

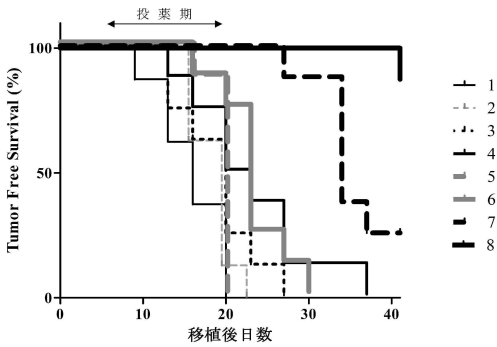


【図 10】

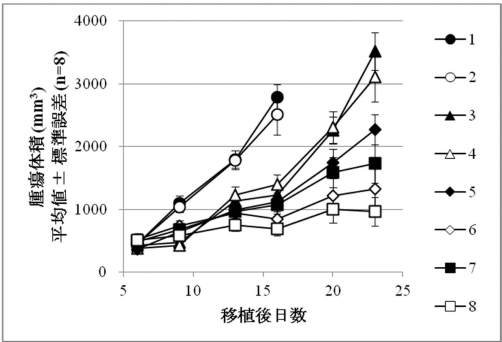


10

【図 11】



【図 12】



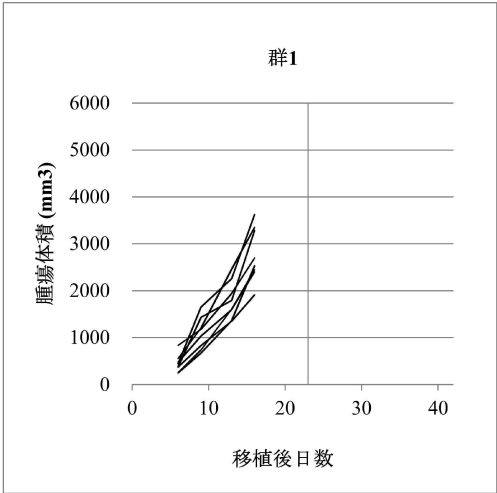
20

30

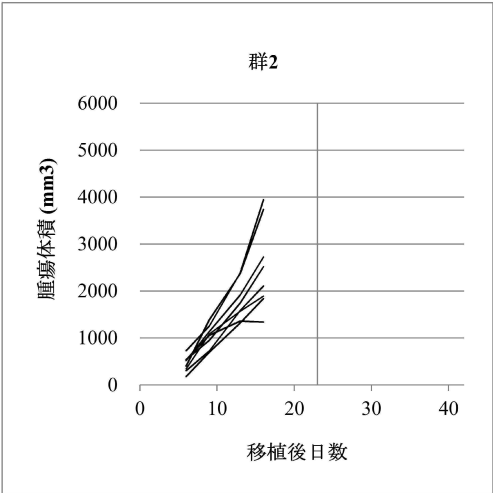
40

50

【図 1 3】

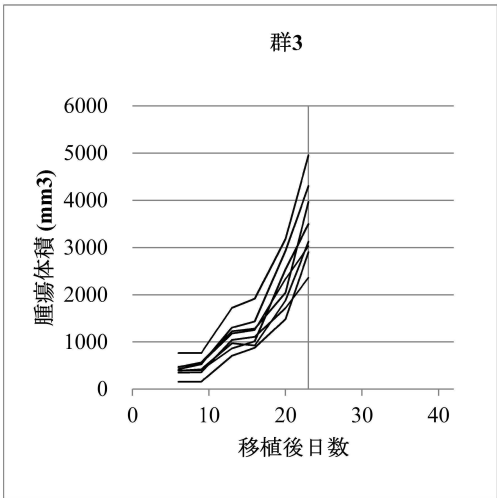


【図 1 4】

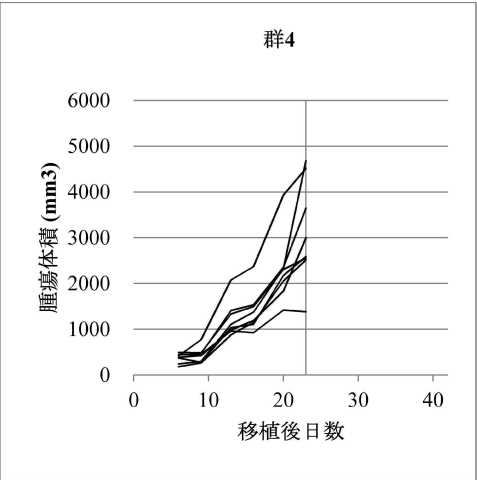


10

【図 1 5】



【図 1 6】



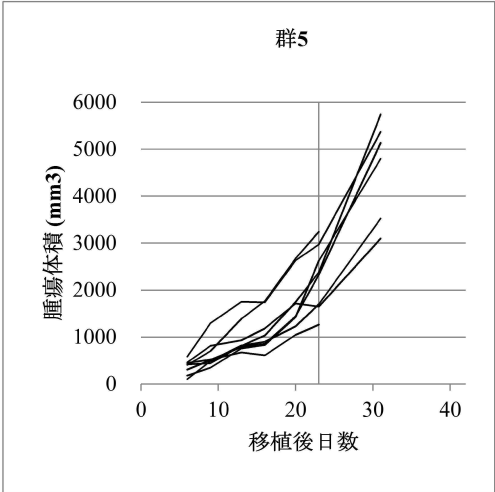
20

30

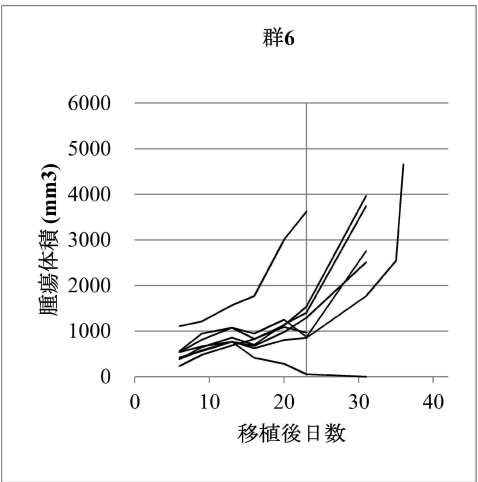
40

50

【図 1 7】

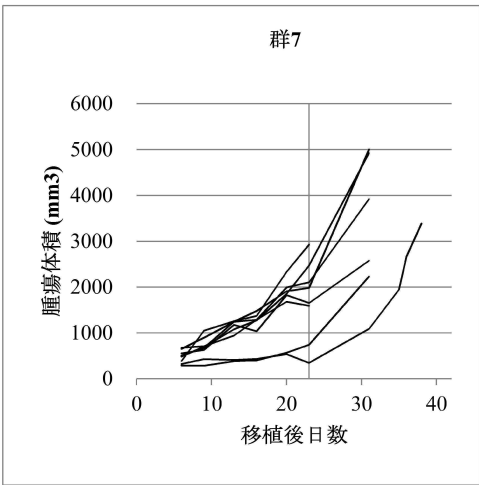


【図 1 8】

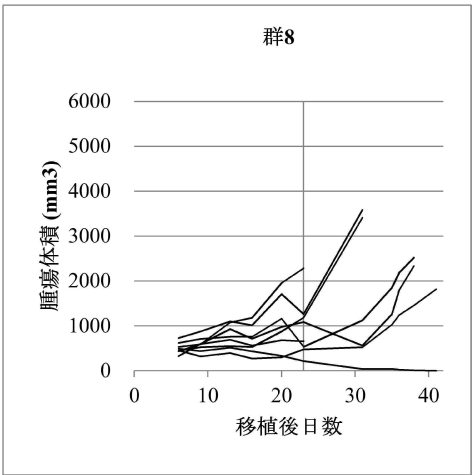


10

【図 1 9】



【図 2 0】



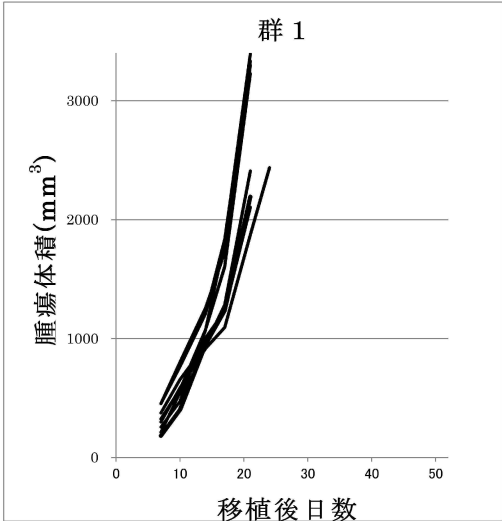
20

30

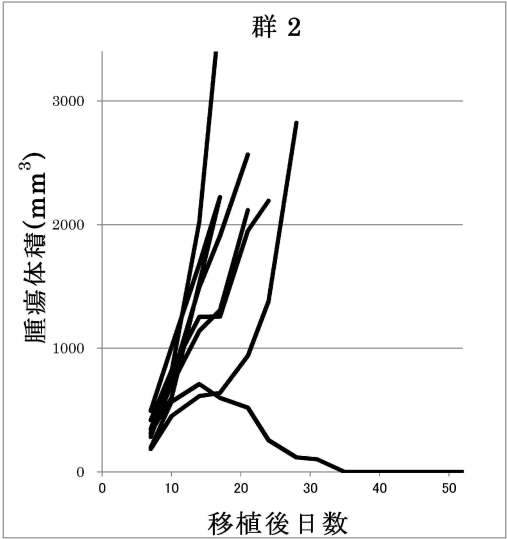
40

50

【図 2 1】

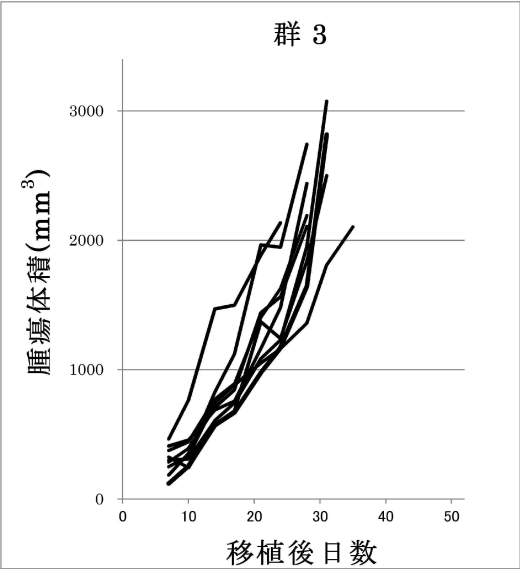


【図 2 2】

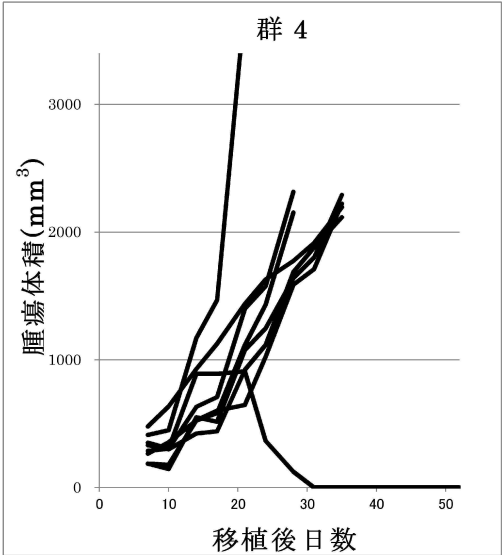


10

【図 2 3】



【図 2 4】



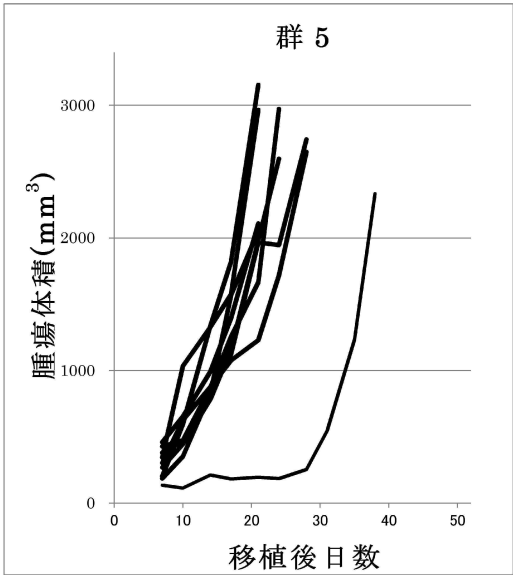
20

30

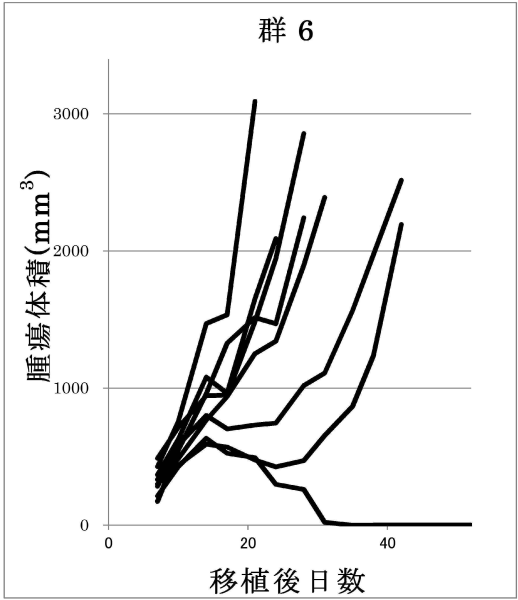
40

50

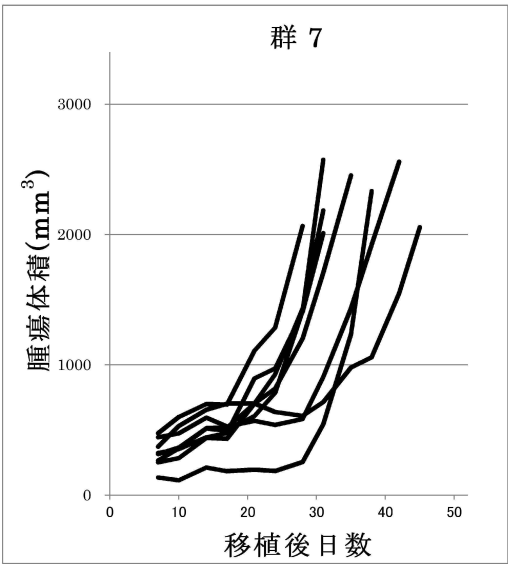
【図 2 5】



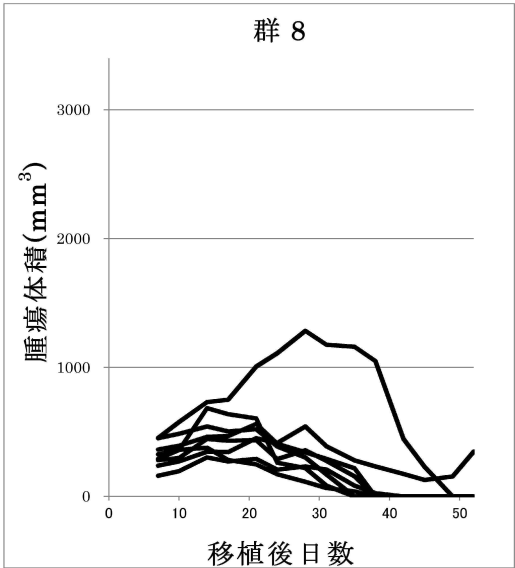
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

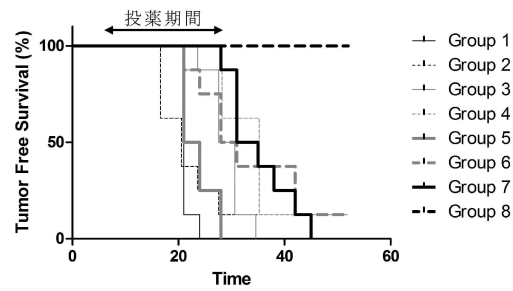
20

30

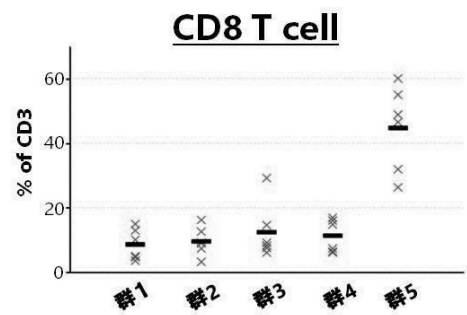
40

50

【図 2 9】

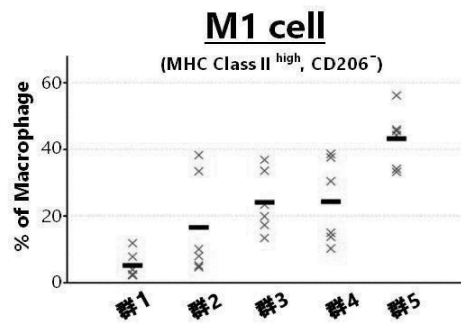


【図 3 0】

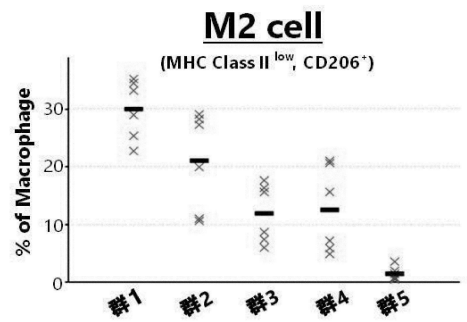


10

【図 3 1】

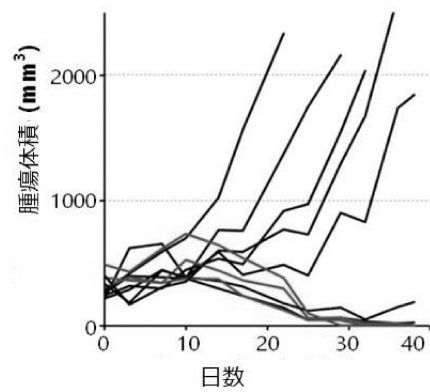


【図 3 2】

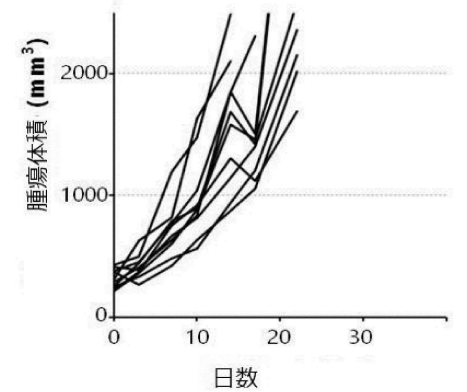


20

【図 3 3】



【図 3 4】

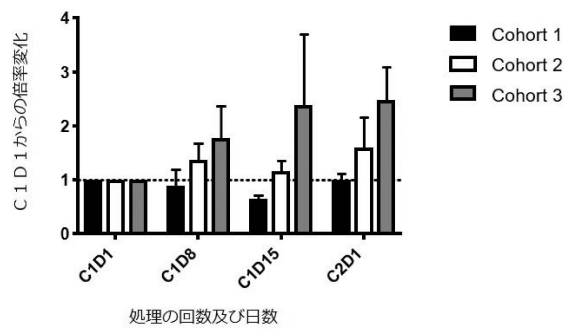


30

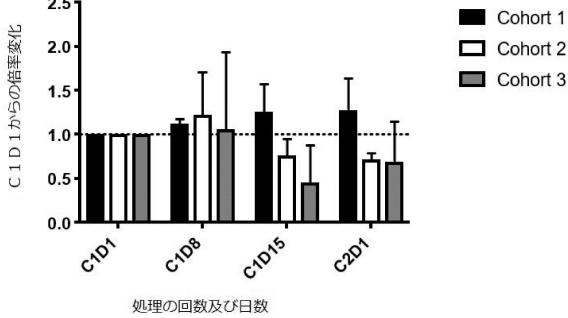
40

50

【図 3 5】

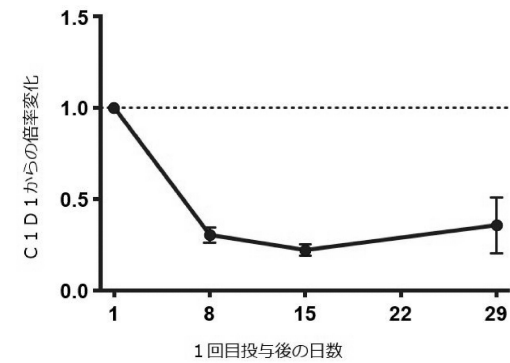


【図 3 6】

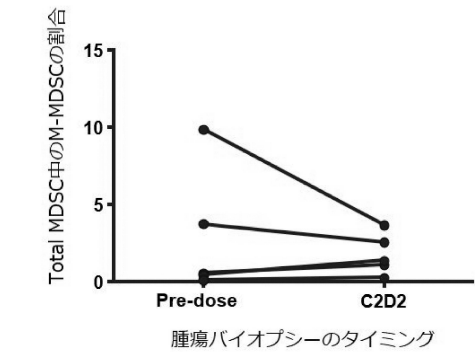


10

【図 3 7】



【図 3 8】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2019-92245(P2019-92245)

(32)優先日 令和1年5月15日(2019.5.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内

合議体

審判長 杉江 渉

審判官 中西 聡

審判官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第2017/078008号(WO, A1)
Science Translational Medicine, 2018年2月, Vol. 10, eaan3682
Journal of Clinical Oncology, 2018年2月, Vol. 36, No. 6_suppl 525

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 9/00-33/44,38/00-51/12

A61P1/00-43/00,171