

(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2006-508912

(P2006-508912A)

(43) 公表日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 9/127 (2006.01)	A 61 K 9/127	4 C 076
A 61 K 31/4745 (2006.01)	A 61 K 31/4745	4 C 086
A 61 K 47/10 (2006.01)	A 61 K 47/10	4 G 005
A 61 K 47/18 (2006.01)	A 61 K 47/18	
A 61 K 47/24 (2006.01)	A 61 K 47/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-530254 (P2004-530254)	(71) 出願人	504473784 メディゲーネ オンコロギー ゲゼルシャ フト ミット ベシュレンクテル ハフツ ング ドイツ連邦共和国 ブラネック/マルティ ンスリート ロッホハーマー シュトラー セ 11
(86) (22) 出願日	平成15年8月25日 (2003.8.25)	(74) 代理人	100061815 弁理士 矢野 敏雄
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月25日 (2005.4.25)	(74) 代理人	100094798 弁理士 山崎 利臣
(86) 國際出願番号	PCT/EP2003/009398	(74) 代理人	100099483 弁理士 久野 琢也
(87) 國際公開番号	W02004/017943		
(87) 國際公開日	平成16年3月4日 (2004.3.4)		
(31) 優先権主張番号	02018907.2		
(32) 優先日	平成14年8月23日 (2002.8.23)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	PCT/EP03/06760		
(32) 優先日	平成15年6月26日 (2003.6.26)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】非小胞性カチオン脂質調製物

(57) 【要約】

本発明は、水性環境に少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質を有する非小胞性調製物、その製法およびその使用ならびにそれから得られる高い薬物捕捉比 (drug trap ratio) を有するカチオン性リポソーム懸濁液、および薬理学、医学のようなその適用分野、特に活性物質のキャリヤー系としてのその使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

全体の両親媒性物質濃度に対して、約10 mM～約600 mMの濃度で少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質、場合により約60 mol%までの少なくとも1つの更なる両親媒性物質ならびに場合により水相中に約10 mM～約600 mMの濃度で少なくとも1つの安定剤を有している非小胞性調製物において、前記調製物が透明で、等方性であり、かつ実質的に均一であることに特徴づけられる、非小胞性調製物。

【請求項 2】

約25 mM～約500 mMの濃度で、有利には約100 mM～約400 mMの濃度で、最も有利には約200 mM～約300 mMの濃度で、少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質を有する、請求項1に記載の調製物。10

【請求項 3】

約100 mM～約500 mMの濃度、有利には約200 mM～約400 mMの濃度で安定剤を有している、請求項1または2に記載の調製物。

【請求項 4】

カチオン性両親媒性物質は、正の実効電荷を有する脂質、リゾ脂質、ペグ化脂質から選択される、請求項1から3までのいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 5】

カチオン性両親媒性物質は、N-[1-(2,3-ジアシルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチルアミンまたはN-[1-(2,3-ジアシルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムのような少なくとも1個の第三アミノ基または第四アンモニウム基を有するカチオン脂質から選択される、請求項4に記載の調製物。20

【請求項 6】

更なる両親媒性物質は、負または中性の実効電荷を有する、請求項1から5までのいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 7】

更なる両親媒性物質は、コレステロール、リン脂質、リゾ脂質、リゾリン脂質、スフィンゴ脂質またはペグ化脂質のような負または中性の実効電荷を有するステロールまたは脂質から選択される、請求項1から6までのいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 8】

中性の両親媒性物質は、ジアシルホスファチジルコリンである、請求項7に記載の調製物。30

【請求項 9】

安定剤は、トレハロース、マルトース、スクロール、グルコース、ラクトース、デキストラン、マンニトールまたはソルビトールのような糖またはアルコール、またはこれらの組合せから選択される、請求項1から8までのいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 10】

安定剤は、トレハロースまたはグルコースである、請求項9に記載の調製物。

【請求項 11】

さらに、活性化合物を有し、該活性化合物は親水性、疎水性または両親媒性物質であつてよい、請求項1から10までのいずれか1項に記載の調製物。40

【請求項 12】

化合物は、治療薬、有利にはカンプトテシンまたはこれらの誘導体、タキサン、または、エポチロン、ディスコデルモライド、ラウリマライド、イソラウリマライド、エレウテロビン、コルキシンおよび/またはこれらの誘導体、ビノレルビンのようなビンカアルカロイド、オキサリプラチンのような白金錯体、ドキソルビシンのようなアントラサイクリン、またはスタチン(例えば、ロバスタチン)のような微小管と相互作用する他の薬剤、より有利にはカンプトテシンまたはカルボキシレートの形のこれらの誘導体から選択される、請求項11に記載の組成物。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

治療剤は、全体の両親媒性物質の濃度に対して、約0.1mol%～約20mol%の範囲内、有利には約1mol%～約15mol%の範囲内、より有利には約3mol%～約10mol%の範囲内である、請求項12に記載の調製物。

【請求項14】

化合物は、診断薬、有利にはイメージング剤である、請求項11に記載の調製物。

【請求項15】

診断薬は、全体の両親媒性物質の濃度に対して、約0.1mol%～約50mol%の範囲内、有利に約10mol%～約50mol%の範囲内、より有利に約30mol%～約50mol%の範囲内である、請求項14に記載の調製物。

【請求項16】

リポソーム懸濁液を製造するための、請求項1から15までのいずれか1項に記載の調製物の使用。

【請求項17】

請求項1から15までのいずれか1項に記載の調製物から得られるカチオン性リポソーム懸濁液。

【請求項18】

請求項1から15までのいずれか1項に記載の調製物または請求項17に記載の懸濁液を、場合により製剤学的に認容性のキャリヤー、希釈剤および／または補助剤と一緒に有している、製剤学的組成物。

【請求項19】

医薬品または診断調製物を製造するための、請求項1から15までのいずれか1項に記載の調製物、請求項17に記載の懸濁液または請求項18に記載の製剤学的組成物の使用。

【請求項20】

癌、慢性もしくは急性炎症疾患、リウマチ様関節炎、皮膚炎、乾癬または創傷のような症状と関連する血管新生に有効な医薬品を製造するための請求項19に記載の使用。

【請求項21】

次の：

(a) カチオン性両親媒性物質、場合により更なる両親媒性物質、場合により安定剤、場合により活性化合物および水相を用意し、

(b) 工程a)の成分に、等方性で透明で、実質的に均一な調製物が形成されるような条件を課す

工程からなる、請求項1から15までのいずれか1項に記載の非小胞性調製物を製造する方法。

【請求項22】

工程b)は、単相蒸発または高圧ホモジナイゼーション法を含む、請求項21に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水性環境に少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質を有する非小胞性調製物、その製法およびその使用ならびに、それらから得られる高い薬物捕捉比(drug trap ratio)を有するカチオン性リポソーム懸濁液、および薬理学、医学のようなその適用分野、特に活性物質のキャリヤー系としてのその使用に関する。

【0002】

リポソームは、医学的および製剤学的科学においてドラッグ・デリバリー・システムとしての重要な役割がある。一般的な適用では、活性化合物が標的部位に運ばれるようするために、活性化合物が親油性であれば、リポソームの脂質二重膜中に封入され、疎水性であれば、水性コンパートメント中に挿入される。

【0003】

10

20

30

40

50

リポソームの製造に関しては、多様な公知の方法が利用可能である (R.R. C. New(ed.) *Liposomes, A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford 1990)。しかし、水溶性化合物を有し、均一性、小さなリポソームサイズを有する狭い粒度分布ならびに脂質に対する薬物の高い比率の条件を満たすリポソームを得ることは困難である。しかし、脂質に対する薬物の高い比率は、特に医薬品の用途にとって重要である。

【0004】

リポソームを形成するための通常の標準的方法では、水溶性化合物の封入効率が低い。例えば、化合物を周知のフィルム法に基づいて負荷することができる：フラスコの内壁にある脂質の薄層フィルムを、封入すべき化合物を含有している水溶液で戻す。このように形成されたリポソーム中に封鎖された化合物のフラクションは、全体容量に対して封入されたフラクションに相当する。一般的なリポソーム調製物は、100～300 nmの範囲内のリポソーム直径で10～50 mMの範囲内の濃度を有する。このような調製物に関しては、全体容量に対する封入された容量は小さく、よって封入効率が低い。化合物の殆どはフリーな水相に残り、通常は透析により除去される。これは、さらに殆どの貴重な化合物が損失するという欠点を有する。

【0005】

封入されない化合物は除去されてしまう。それというのも、これはリポソーム性キャリア中で保護されない場合に副作用を起こし得るからである。さらに、これはリポソーム薬とは異なる薬物動態学的特徴を有していてもよい。リポソームによる標的輸送の場合には、化合物の非リポソーム性フラクションは不活性である。この理由で、薬物の非リポソーム性フラクションを最小化することが重要である。

【0006】

リポソームの水性コンパートメント中に化合物を封入する、この本質的な問題を克服するための多様な方法が記載されてきていた。このうちの1つは、活性負荷技法 (active loading technique) であり、これは膜透過性、例えば、pH値の関数が異なる化合物に適用できる (R.R.C. New(ed.) *Liposomes, A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford 1990)。この場合には、リポソームの内側からもう一方に向かってpH勾配を適用することにより、化合物を小胞中に閉じ込めることができる。しかし、これらのアプローチは、限られた数の適切な分子にだけ、かつ特別な環境条件にだけに適用可能である。よって、これまでに前記アプローチのいずれも、水溶性化合物のリポソーム調製物にとって一般的な突破口を提供していない。

【0007】

W096/05808とW099/49716には、高压ホモジナイゼーションを使用することにより濃縮された“小胞性リン脂質ゲル”を製造する方法が開示されている。高い脂質含量を有するこれらの半固体リン脂質ペーストもしくはゲルは、殆どが小胞構造から成っている (WO 96/05808, WO 99/49716およびBrandl 2001 (M. Brandl (2001) *Liposomes as drug carriers: a technological approach*, *Biotechnology annual review Volume 759-85*)。WO 96/05808は、小さいサイズと中程度のサイズ (100～300 nm) を有し、少なくとも 20% w/w の高い薬物比を有するユニラメラ小胞からのリポソーム調製物を開示している。しかし、このアプローチは幾つかの欠点と結びついている。すなわち、この調製物は高粘性であり、かつ纖細な材料にとって不利である振動バスミルのような過酷な機械圧の元でしか再分散が最もよく行われない。W099/49716も同じく、少なくとも 20% の活性化合物を有するリポソームゲルに関し、加熱または機械圧により化合物がリポソームゲルに添加され、化合物が均一に小胞の内部と外部に分布している。しかし、これらのリポソームゲルの高い粘度により、かつ小胞のサイズにより、製剤学的調製物の形成の際に重要な工程である無菌濾過が不可能である。

【0008】

最近では、カチオンリポソームが充実性腫瘍の周囲の脈管形成性血管に高い親和性を有することが報告され (Schmitt-Sody M. et al. (2003) *Clin Cancer Res* 9, 2335-41)、このことは、カチオンリポソームを薬物の腫瘍部位へ特異的にターゲッティング (血管タ

10

20

30

40

50

ーゲッティング)することを有効にする。しかし、上記のように、多くの有利な薬物は水相に入り込むことができる。このような化合物のリポソーム調製物に関しては、フリーな水相中に一定のフラクションが存在し、カチオンリポソームのターゲッティング能に関しては不活性である。

【0009】

一般的には、水中で一定の溶解度を有するか、または膜を介して高い透過性を有する化合物にとって、薬物でのリポソームの負荷が問題となり、これまでに十分に解決されてこなかった。現在可能なアプローチでは、化合物の多くのフラクションが封入されない。キャリヤーの特異的なターゲッティングの意味では、活性ではない。これは、透析か同等の技術により除去されるかもしれないが、著しい量が失われてしまう。別の難問は、封入状態が一般には非平衡状態であることである。それというのも、熱力学的平衡では、化合物が均一に分布するからである。従って、化合物の膜透過性に応じて、透析と適用の間に、さらなる材料がリポソームから水相へ放出され得る。

【0010】

本発明の根底を成す課題は、脂質に対する高い薬物比、標的特異性ならびに製剤学的用途に十分な安定性を有する改善されたドラッグ・デリバリーシステムおよび/またはリリースシステムを提供することであった。

【0011】

このように、上記の問題の解決は、請求項に特徴づけられる実施態様を提供することにより、本発明により達成された。

【0012】

本発明は、全体の両親媒性物質濃度に対して、約10 mM～約600 mM、有利に約25 mM～約500 mM、より有利には約100 mM～約400 mM、最も有利には約200 mM～約300 mMの範囲内の少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質、場合により約60 mol%までの範囲内の更なる両親媒性物質ならびに場合により約10 mM～約600 mM、有利に約100 mM～約500 mM、より有利には約200 mM～約400 mMの範囲内の安定剤を有する非小胞性調製物に関する。

【0013】

意外にも、カチオン性両親媒性物質、有利には脂肪を水相中で混合する場合には、実質的に散乱粒子を不含で、リポソームの分散液ではなく、または他の粒子の分散液ではないクリアで透明な相が得られることが見出された。この新たな相は、約<20 mM～約>600 mMの幅広い範囲内の両親媒性物質濃度で得ることができる。濃度の下限がなく、濃度の上限が過剰の水が無い膨潤脂質二分子層の状態に近いように見える。

【0014】

本発明の調製物は、基本的な様々な面で従来のリポソーム懸濁液とは異なる、透明で、等方性で、実質的に均一な相であることにより説明できる(図2)。特性から直に分かるように、リポソーム粒子からの光散乱によりリポソーム懸濁液は白色タンパク光のように見える。これに対して、本発明の調製物は、クリアで透明である。すなわち、実質的に散乱粒子が存在しない。準弾性光散乱測定値の実験(Zetasizer 3000, Malvern, Herrenberg, Germany)は、拡散密度が約180 nmの平均粒度を有するリポソーム懸濁液に対して、少なくとも300倍減少することが示される。通常の条件下では、1 mM濃度のリポソーム懸濁液は、60 kCps.のカウント率を生じる。270 mMでの本発明のDOTAP調製物に関しては、約40 kCpsのカウント率が測定される。事実上、粒度分布が測定されず、>10 nmの粒子に関しては、何も表示が見られない(Malvern Contin analysis)。

【0015】

粒子数を濁度の測定値から推測することもでき、これはUV-vis分光分析法により行うことができる。図5には、30 mM DOTAPリポソーム懸濁液と、270 mMのDOTAPの非小胞性調製物のUVスペクトルが示されている。これから分かるように、非小胞性調製物が約一桁高い濃度を有しているにもかかわらず、リポソーム懸濁液では、吸収(ひいては散乱)が非小胞性調製物と比べてはるかに高い。選択された波長(400 nm)での吸収の比較によ

り、非小胞性調製物のモル散乱がリポソーム懸濁液よりも2%未満であることが示される。

【0016】

さらなる特徴として、本発明の調製物は、むしろ高い脂質濃度(>200mM)よりも、低い顕微鏡学的粘度を示す。すなわち、視覚的検査は、水相の状態に類似した液体を示唆している。それというのも、200nmの孔径の膜を介して容易に押し出しできるからである(通常は滅菌濾過に使用される孔径である)。これは、調製物を実質的に即使用可能な製剤学的組成物として適用できるようにし、また滅菌濾過が必要とされる用途で、特に活性化合物が存在する場合にも適用できる。これと比較して、一定の濃度(>50mM)を上回るリポソーム懸濁液の粘度は、押し出しと滅菌濾過に関しては、しばしば高すぎるので、製剤学的用途には不向きである。

【0017】

本発明の調製物は、前記のいわゆる小胞性リポソームゲル(WO 96/05808およびWO99/49716)とは著しく異なる。というのも、ゲルは、固体のようなコロイド構造であるか、または半固体のコロイド構造であるからである。このリポソームゲルは、高い密閉密度で個々の脂質小胞から成っている。脂質小胞中に成分を挿入させるために、機械的攪拌または高温が必要である(WO 99/49716)。しかし、本発明の調製物は、封入された相またはフリーな水相が区別できない均一な相として記載することができる。水相中の全ての成分は、しばしば全ての容積にわたって自由に動くことができる。さらなる成分を添加する場合には、全相に渡って分布でき、均一な混合物が得られる。

【0018】

本発明の調製物は、水または水溶液で希釈することにより、リポソーム懸濁液に変換することができる。本発明の調製物が低濃度でも製造できるので、この結果は予測不可能であった。事実、“単相法(single phase method)”により、<25mMの濃度でも本発明の調製物は得られ、引き続き更なる溶剤蒸発により、その物理的状態に影響することなく600mM以上まで濃縮することができる(すなわち、クリアで透明な相であり続ける)。よって、本発明の調製物は、凝集の分子状態に影響することなく希釈することができる。その代わりに、希釈により分子会合が変化し、リポソームが形成される。

【0019】

このように形成されるリポソームは、好ましくは、狭い粒度分布で小から中程度のサイズ(30~300nm)の範囲にある(>0.5準弾性光散乱によるサイズ測定値からのPI値)。このことは、前記リポソームを製剤学的用途に利用可能にする。さらに、リポソーム(開示したように調製物の希釈により形成したもの)の水性コンパートメント中の水溶性活性化合物の捕捉は、リポソーム形成時の封入容量/全体容量の関数である。リポソーム形成が最終的なリポソーム濃度(一般には10~25mMの範囲内である)よりも高い濃度、例えば、約100mMの濃度で生じる場合には、結果として得られるリポソームの捕捉率は、低濃度で直接にリポソームを形成する場合に達成可能なよりも高い(例えば、脂質フィルム成分含有の水相で脂質を戻すことにより、図3参照)。

【0020】

まとめると、本発明の調製物は以下の利点を有する:

- 直接的な製剤学的用途に適切である
- 活性化合物を負荷するために適切である
- 高い捕捉率と狭い粒度分布を有するリポソームの製造に適切である。

【0021】

本発明は、その製法により更に明確に特徴づけられる。水中の脂質分散液は、多くの種々の相中に、凝集状態で存在し、これは熱力学的に安定であるか、または準安定性である(D.F. Evans, H. Wennerstroem: The Colloidal Domain: Where Physics Chemistry, Biology and Technology Meet, VHC publishers, Weinheim, 1994)。従って、種々の製法を選択することにより、結果として生じる相中で種々のタイプの分子構成が得られる。相状態が熱力学的に最も好ましくない場合でも、長期間にわたって、特に適用前の製造と貯

10

20

30

40

50

蔵にとって十分な貯蔵安定性を提供できるほど長く安定である。もう一方で、準安定な相は、系に適切な圧力を用いることにより安定な形に変換することができる。

【0022】

一例として、分子組成物にて本発明の調製物を得るための1つの方法があり、このために別の方法を使用することにより、従来のリポソームが得られる：水中のDOTAPの25 mM分散液は、例えば、これが周知のフィルム法または、エタノール注入により製造される場合には、従来のリポソーム分散液として製造することができる。しかし、同じ分子組成物を用いて、下記の“単相蒸発技法”により分散液を製造する場合には、本発明の調製物が得られる。遷移のような高エネルギーバリアにより、熱力学的にあまり好ましくない状態は、より好ましい状態へ変換することが妨げられる。リポソームを形成または分解するために（これは好ましい熱力学的状態である）、脂質二重膜を壊さなくてはならず、そのために著しい量のエネルギーが必要である。

【0023】

一般には、本発明の調製物は、例えば、両親媒性物質が可溶化される水と有機溶剤を混合することにより幾つかの方法により得ることができる。有機溶剤を除去することにより、本発明の調製物が形成される。しかし、化学、物理または機械的方法により、粒子不含の水中の脂質分散液を得ることができると当業者に周知のその他のどの技術も、本発明の調製物を製造するために適切である。他方で、二重膜の破裂と、それに引き続く閉じた小胞への再融合（refusion）が関わる全ての方法、すなわち、周知のフィルム法やエタノール注入法のようなリポソーム製造に一般に適用される方法は、あまり好ましくない。それというのも、これらの方法は、調製物中で安定または準安定性のままである小胞の形成につながるからである。よって、W096/05808に記載されているようなマルチラメラ小胞への脂質フィルムの再構成は、本発明の調製物を得るために避けるべきである。

【0024】

本発明の調製物は、正の実効電荷を有する脂質、リゾ脂質またはペグ化脂質から選択されるカチオン性両親媒性物質を有する。脂質は、幾つかの、例えば、必ずしも同じでなくしてよく、C₁2～C₂4個の平均鎖長を有する、分枝または非分枝、飽和または不飽和の2個の炭化水素鎖を有していてもよい。少なくとも1個の第3アミノまたは第4アンモニウム基を有するカチオン脂質が有利である。

【0025】

本発明の有利な脂質には、次のものが含まれる：

DDAB、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド；N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート(DOTAP)；1,2-ジアシルオキシ-3-トリメチルアンモニウムプロパン、（次の中のものに限定されるわけではないが、ジオレオイル、ジミリストイル、ジラウロイル、ジパルミトイールおよびジステアロイルが含まれる；また2個の異なるアシル鎖はグリセロール主鎖に結合することができる）；N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチルアミン(DODAP)；1,2-ジアシルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン、（次の中のものに限定されるわけではないが、ジオレオイル、ジミリストイル、ジラウロイル、ジパルミトイールおよびジステアロイルが含まれる；2個の異なるアシル鎖はグリセロール主鎖に結合することができる）；N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)；1,2-ジアシルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン、（次の中のものに限定されるわけではないが、ジオレオイル、ジミリストイル、ジラウリル、ジパルミチルおよびジステアリルが含まれる；2個の異なるアルキル鎖はグリセロール主鎖に結合することができる）；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)；3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)；2,3-ジオレオイルオキシ-N-(2-(スペルミンカルボキサミド)-エチル)-N,N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート(DOSPA)；-アラニルコレステロール；セチルトリメチルアンモニウムプロミド(CTAB)；diC14-アミジン；N-tert-ブチル-N'-テト

10

20

30

40

50

ラデシル - 3 - テトラデシルアミノプロピオンアミジン ; 14 Dea 2 ; N - (アルファ - ト
リメチルアンモニオアセチル) ジドデシル - D - グルタメートクロリド (TMAG) ; 0,0' -
ジテトラデカノイル - N - (トリメチルアンモニオアセチル) ジエタノールアミンクロリ
ド ; 1 , 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - (6 - カルボキシ - スペルミル) - プロピルアミ
ド (DOSPER) ; N,N,N',N' - テトラメチル - N,N' - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - 2 ,
3 - ジオレオイルオキシ - 1 , 4 - ブタンジアンモニウムヨージド ; Solodin et al. (19
95) Biochem. 43:13537-13544 に記載されているような 1 - [2 - (アシルオキシ) エチ
ル] 2 - アルキル (アルケニル) - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) - イミダゾリニウムク
ロリド誘導体、例えば、1 - [2 - (9 (Z) - オクタデセノイルオキシ) エチル] - 2
- (8 (Z) - ヘプタデセニル - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリ
ド) (DOTIM) 、 1 - [2 - (ヘキサデカノイルオキシ) エチル] - 2 - ペンタデシル -
3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリド (DPTIM) 、 例えれば、Felgner e
t al. [Felgner et al. J. Biol. Chem. 1994, 269, 2550 - 2561] に記載されているような
、第四アミンにヒドロキシアルキル部分を有している 2 , 3 - ジアルキルオキシプロピル
第四アンモニウム化合物誘導体、例えば 1 , 2 - ジオレイル - 3 - ジメチル - ヒドロキシ
エチルアンモニウムプロミド (DORI) 、 1 , 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチ
ル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DORIE) 、 1 , 2 - ジオレオイルオキシプロ
ピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシプロピルアンモニウムプロミド (DORIE-HP) 、 1 , 2
- ジパルミチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシプロチルアンモニウムプロミド
(DORIE-HB) 、 1 , 2 - ジオレオイルオキシプロピル - 3 - ジメチルヒドロキシベンチル
アンモニウムプロミド (DORIE-Hpe) 、 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメ
チル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE) 、 1 , 2 - ジパルミトイルオキ
シプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DPRIE) 、 1 , 2
- ジステリルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DSRIE)
； Santaniello ら . により報告されているアシルカルニチンのカチオンエステル [US
5498633] ； ホスファチジルコリンのカチオントリエステル、すなわち、 1 , 2 - ジアシル
- s n - グリセロール - 3 - エチルホスホコリン、その際、炭化水素鎖は C₁ ~ C₂ ~ C₂ ~ C₄ の
鎖長を有する飽和または不飽和であり、かつ分枝または非分枝であり、 2 個のアシル鎖は
必ずしも同一でなくてもよい。

【 0026 】

10

20

30

30

有利な実施態様では、カチオン性両親媒性物質は N - [1 - (2 , 3 - ジアシルオキシ)
プロピル] - N,N,N - トリメチルアンモニウムのような第四アンモニウム塩から選択され、その際、第四アミノ化合物の製剤学的に認容性の対イオンは、クロリド、プロミド、
フルオリド、ヨージド、ニトレート、スルフェート、メチルスルフェート、ホスフェート、
アセテート、ベンゾエート、シトレイト、グルタメートまたはラクテートから成るグル
ープから選択される。好ましくは、カチオン脂質は室温で液晶状態である。例として、種
々の鎖により、炭化水素鎖が 1 個以上の二重結合を含有する脂質、炭化水素鎖が分枝であ
る脂質、またはその他のパッキング不適合がある脂質がある。さらに、多くの場合には C
14 よりも短い鎖を有する脂質が要求を満たす。

【 0027 】

40

本発明の調製物は、全体の両親媒性物質の濃度に対して、 0 ~ 約 60 mol% 、有利に約 20 mol% ~ 約 50 mol% 、最も有利に約 30 mol% ~ 約 40 mol% の量で、少なくとも 1 つの更なる両親媒性物質を有することができる。

【 0028 】

40

更なる両親媒性物質は、負および / または中性 (アニオンおよび / または中性の両親媒性物質) の実効電荷を有していてよい。これらは、負または中性の実効電荷を有するコレ
ステロール、リン脂質、リゾ脂質、リゾリン脂質、スフィンゴ脂質またはベグ化脂質のよ
うなステロールまたは脂質から選択することができる。それに関して、有効なアニオンお
よび中性脂質には、次のものが含まれる：ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホ
スファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール (特定の糖に限定されるわけ)

50

はない)、脂肪酸、カルボン酸基を含有するステロール、コレステロール、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、次のもに限定されるわけではないが、ジオレオイル(DOPE)、1,2-ジアシル-グリセロ-3-ホスホコリンおよびスフィンゴミエリンが含まれる。グリセロール主鎖に結合する脂肪酸は、特定の長さまたは二重結合の数に限定されない。リン脂質は、2個の異なる脂肪酸を有することもできる。好ましくは、更なる脂質は室温で液晶状態であり、これらは適用される割合で、使用されるカチオン性両親媒性物質と混合可能である(すなわち、均一な相が形成でき、相分離またはドメイン形成が生じない)。

【0029】

有利な実施態様では、中性の両親媒性物質はホスファチジルコリンである。10

【0030】

調製物は、さらに、安定剤を有することができ、これは、例えば、トレハロース、マルトース、スクロース、グルコース、ラクトース、デキストラン、マンニトールまたはソルビトールのような糖または多価アルコールもしくはこれらの組合せから選択される。有利な実施態様では、安定剤はトレハロースまたはグルコースである。

【0031】

調製物は、さらに有機溶剤、特に水溶性の有機溶剤、例えば、エタノールを約5%(v/v)までの量で有することができる。エタノールの代わりに、他のアルコールまたは有機溶剤を同様に使用することができる。製剤学的組成物を製造するために、エタノールではない有機溶剤を除去する必要がある。適切な有機溶剤は、アルコール、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、エチレングリコール、エーテル、例えば、テトラヒドロフランまたはジエチルエーテル、またはハロゲン化炭化水素、例えば、クロロホルムまたはこれらの溶剤の混合物である。20

【0032】

特記されない限り、本明細書中で使用される技術用語と科学的用語は、本発明に関わる通常の当業者により一般に解釈されるものと同じ意味を有すると考えられる。

【0033】

量の値に関する“約”とは、表示された値に対して、最大+/-20%、有利に+/-10%の平均偏差を意味する。例えば、約30mol%のカチオン脂質の量とは、全体の脂質/両親媒性物質のモル濃度に関して、30mol%+/-6mol%、有利に30mol%+/-3mol%のカチオン脂質を意味する。30

【0034】

“両親媒性物質”とは、水溶性(親水性)と油溶性(疎水性)部分から成る分子を意味する。脂質とリン脂質は、両親媒性物質の最も一般的で代表的な物である。本明細書中では、脂質と両親媒性物質は同義語である。

【0035】

“血管新生に関する症状”とは、例えば、種々のタイプの癌、慢性炎症疾患、リウマチ様関節炎、皮膚炎、乾癬、創傷およびその他を意味する。

【0036】

“カンプトテシン”は、20(S)-カンプトテシン(1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H,12H)-ジオン、4-エチル-4-ヒドロキシ-, (S)-)、CAS7689-03-4を意味する。本発明の範囲内の“カンプトテシン”または“カンプトテシン薬”は、薬物のカルボキシレート形を含む。40

【0037】

“カンプトテシン薬”は、カンプトテシン自体またはそれらの誘導体を意味する。カンプトテシン誘導体は、カンプトテシンの化学的誘導化によって得られる(構造参照)。可能性のあるカンプトテシン薬の非限定的リストは、2002年の8月19日から<http://dtp.nci.nih.gov>に挙げられている。分子図のうち、最も頻繁な誘導化部位はR₁～R₅として記載されている。

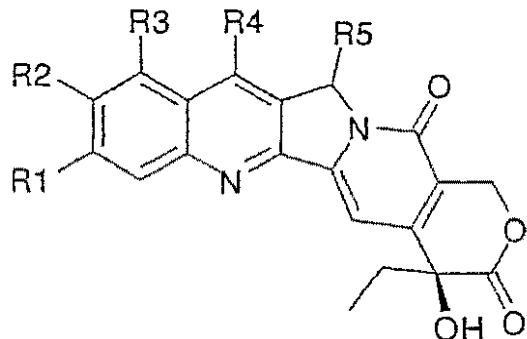
【0038】

5020304050

カンプトテシン薬の構造：

【0039】

【化1】



10

【0040】

以下の表には、種々の部位での誘導化の一般例が記載されている。カンプトテシンは、塩酸塩として存在していてもよい。ラクトン環（E環）は、6員環の代わりに7員環であってもよい（ホモカンプトテシン）。

【0041】

【表1】

20

名称	R1	R2	R3	R4	R5
カンプトテシン	H	H	H	H	H
9-ニトロ-カンプトテシン	H	H	NO ₂	H	H
9-アミノ-カンプトテシン	H	H	NH ₂	H	H
10-ヒドロキシ-カンプトテシン	H	OH	H	H	H
トボテカン	H	OH	-CH ₂ -N-(CH ₃) ₂	H	H
SN38	H	OH	H	CH ₂ -CH ₃	H
Camptosar [®] (Irinotecan)	H		H	CH ₂ -CH ₃	H
Lurtotecan [®] O-CH ₂ -CH ₂ -O	R1 と R2 は: O-CH ₂ -CH ₂ -O		H	H	H
DX-8951f	F	CH ₃	R3 と R4 は -CH ₂ -		H

30

40

【0042】

誘導化は、CPTの特性に影響し、分子をより親水性または親油性にすることができ、またはラクトンカルボキシレートの平衡に影響することができる。CPTを抗癌剤として適用することに関して、誘導化には活性を保持または増大する意図がある。

【0043】

“癌”とは、癌のより一般的な形、例えば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭部癌、頸部癌、白血病、肺癌、リンパ腫、黒色腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌お

50

および小児癌、例えば、脳幹グリオーム、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、上衣細胞腫、ヨーイング肉腫／腫瘍ファミリー、胚細胞腫瘍、頭蓋外疾患、ホジキン疾患、白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髓性癌、肝臓癌、髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、骨の骨肉腫／悪性纖維性組織球腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、軟部組織肉腫、テント上原始神経外胚芽腫瘍および松果体部腫瘍、異常小児癌、視覚路および視床下部グリオーム、ウィルムス腫瘍およびその他の小児腎臓腫瘍ならびに急性リンパ球性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、脳腫瘍、子宮頸癌、小児癌、小児肉腫、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性白血病、食道癌、ヘアリー・セル白血病、腎癌、肝臓癌、多発性骨髓腫、神経芽細胞腫、口腔癌、すい臓癌、原発性中枢神経系白血病、皮膚癌、小細胞肺癌を含む一般的ではない癌を意味する。

10

【0044】

“キャリヤー”とは、診断薬または治療薬と投与するために適切である希釈剤、補助剤、付形剤またはベヒクルを意味する。この用語は、複合体を含む製剤学的に認容性の成分も意味し、さらには薬剤と会合して意図する標的部位に、このような薬剤の輸送を促進する。キャリヤーには、当業者に周知のようなリポソーム、ポリマー、脂質複合体、血清アルブミン、抗体、シクロデキストリンおよびデキストラン、キレートならびに他の超分子集成体が含まれる。

【0045】

“カチオン”とは、各環境下で生理学的pHで正の実効電荷または正のゼータ電位を有する薬剤を意味する。本発明では、これはpHが3～9、有利に5～8の範囲内である環境を意味する。

20

【0046】

本明細書中で使用される“カチオン性両親媒性物質”とは、定義付けしたようなカチオン脂質を意味する。

【0047】

“カチオンリポソーム”とは、正の実効電荷を有するリポソームを意味する。本発明では、これはpHが3～9、有利に5～8の間である環境を意味する。カチオンリポソームは、カチオン脂質または両親媒性物質自体から製造されるか、または他の両親媒性物質との、特に中性もしくはアニオン性脂質との混合物の形である。

30

【0048】

“誘導体”とは、その一般的な構造特性を保持しながら、ある他の化合物から誘導される化合物を意味する。誘導体は、例えば化学的官能化または誘導化により得ることもできる。

【0049】

本明細書中で使用される“薬物”とは、製剤学的に認容性の薬理学的活性物質、生理学的活性物質および／または診断用途用の物質を意味する。

【0050】

“封入効率”とは、所定の方法により、リポソーム懸濁液のリポソームへ封入される化合物のフラクションを意味する。

40

【0051】

“ホモジナイゼーション”とは、幾つかの成分の間で均一な分布を達成する物理的プロセスを意味する。一例は、高压ホモジナイゼーションである。

【0052】

“脂質”は、その通常の意味で、脂肪、脂質、原形質のアルコール・エーテル溶解性成分を包含する一般用語として使用され、これらは水に不溶である。脂質は、脂肪酸、ステロイド、ステロール、リン脂質、糖脂質、スルホリピド、アミノリピド、色素類脂肪のような両親媒性分子である。この用語は、天然に存在する脂質と合成脂質の両方を含む。より一般的な意味で、脂質は、両親媒性物質として特徴づけられる。すなわち、これらは親油性ならびに親水性部分から成る分子である。本発明と関連する有利な脂質は、少なくとも12個の炭素鎖を有する少なくとも2個のアルキル鎖を有し、次のものである：ステロ

50

イドとステロール、特にコレステロール、ホスファチジルおよびホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン、およびスフィンゴミエリンを含むリン脂質。脂肪酸は、6個までの二重結合を含有する約12～24個の炭素鎖の長さであり、主鎖に結合していることができる。炭化水素鎖は、異なっている（非対称）か、または1個だけの脂肪酸鎖、例えば、リゾレシチンが存在してもよい。特に非カチオン脂質が天然源、例えば、卵黄、ウシの心臓、脳もしくは肝臓または大豆から精製されるレシチン（ホスファチジルコリン）から由来する場合には、混合調製物も可能である。

【0053】

“リポソーム”は、研究室で人工的に作られた顕微的球状の膜に封入された小胞（約50～2000nmの直径）を意味する。“リポソーム”という用語には、脂質二分子層により封入されたいずれかのコンパートメントも含まれる。リポソームは、脂質小胞ともいわれる。

【0054】

“リゾ脂質”とは、1個の脂肪酸エステルが切断されて1個の遊離ヒドロキシ基を有するグリセロー主鎖を生じる脂質を意味する。

【0055】

“リゾリン脂質”とは、1個の脂肪酸エステルが切断されて1個の遊離ヒドロキシ基を有するグリセロール主鎖を生じるリン脂質を意味する。

【0056】

“負に帯電した脂質”とは、負の実効電荷を有する脂質を意味する。本発明では、これはpHが3～9、有利に5～8の範囲内である環境を意味する。例としては、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール（特定の糖に限定されることはない）、脂肪酸、ステロールがある。

【0057】

“中性脂質”とは、中性の実効電荷を有する脂質、例えば、コレステロール、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、次のものに限定されるわけではないが、ジオレオイル（DOPE）、1,2-ジアシル-グリセロ-3-ホスホコリン、スフィンゴミエリンを意味する。本発明では、これはpHが3～9、有利に5～8の範囲内である環境を意味する。

【0058】

本明細書中で使用されているような“非小胞性カチオン性調製物”とは、水性環境中に少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質を有する組成物を意味する。さらにアニオンまたは中性の両親媒性物質が存在する場合は、両親媒性物質の全体の実効電荷は正である。

【0059】

“粒子直径”とは、粒子のサイズを意味する。実験により粒子直径を測定するために、Malvern Zetasizer 1000または3000（Malvern, Herrenberg, ドイツ）を用いて、動的光散乱（DLS）測定を行った。定量的データ分析のために、Z（平均）とP1の測定を行うか、または付加的に“Contin”フォルマリズムを用いてデータ分析を行った。

【0060】

“ペグ化脂質”とは、1個以上のポリエチレングリコール残基を有する脂質を意味する。

【0061】

“製剤学的組成物”は、どちらか一方の成分が有するよりも優れた製剤学的特性を有する2種以上の異なる材料の組合せを意味する。

【0062】

“リン脂質”とは、グリセロール主鎖、ホスフェート基と、前記グリセロール主鎖にエステル結合により結合した1個以上の脂肪酸から成る脂質を意味する。

【0063】

“正に帯電した脂質”とは、カチオン脂質と同義語である（定義に関しては、“カチオン脂質”的定義参照）。本発明では、これはpHが3～9、有利に5～8の範囲内である

10

20

30

40

50

環境を意味する。

【0064】

本明細書中で使用される“安定剤”とは、水溶性であり、本発明の調製物の安定性に好ましい化合物を意味する。

【0065】

“ステロール”とは、ステロイドアルコールを意味する。ステロイドは、シプロペンタノペルヒドロフェナントレンと呼ばれる化合物から誘導される。ステロールの周知の例には、コレステロール、ラノステロールおよびフィトステロールが含まれる。

【0066】

“治療薬”とは、癌のような疾患の病理の程度を減少させる化学種を意味する。このような化合物は、例えば、原発腫瘍成長、有利には癌の転移の可能性を減少させることができる。二者択一的に、このような化合物は、例えば、微細血管のサイズまたは数を減らすことによるか、または血管密度の割合を減少させることにより腫瘍の血管分布を減少させることができる。

【0067】

化学種を“実質的に不含”とは、HPTLCにより検出不可能であるものと定義される。“リポソームを実質的に不含”とは、光散乱のような所定の方法からのシグナル（リポソーム濃度に比例する）が、同じ分子組成物を有するが、リポソームから成る系で得られるような値の5%未満である状態を意味する。

【0068】

本発明の調製物は、少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質、場合により少なくとも1つの更なる両親媒性物質、場合により安定剤ならびに場合により活性化合物を有する、実質的に均一な相である。よって、活性化合物は、親水性、親油性または両親媒性化合物であるか、または化合物の混合物であることができ、有利には治療薬または診断薬から選択することができる。

【0069】

好ましくは、治療薬は、全体の両親媒性物質濃度に対して、約0.1mol%～約20mol%の範囲内、有利に約1mol%～約15mol%の範囲内、より有利に約3mol%～約10mol%の範囲内で存在する。

【0070】

治療学的活性剤は、抗炎症剤、抗癌剤、酵素薬、抗生物質、抗酸化剤、ホルモン剤、血管形成阻害剤、平滑筋細胞増殖／遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、化学伝達物質用放出阻害剤、血管内皮用の増殖／遊走阻害剤のような薬剤から選択することができる。特殊な例は、タキサン、微小管と相互作用する他の薬剤、例えば、エポチロン、ディスコデルモライド、ラウリマライド、イソラウリマライド、エレウテロビン、コルキシンならびにこれらの誘導体、ビンカアルカロイド、例えば、ビノレルビン、白金錯体、例えば、オキサリプラチン、カンプトテシン、アントラサイクリン、例えばドキソルビシンまたはスタチン（例えば、ロバスタチン）から選択される。

【0071】

より好ましくは、本発明の調製物は、カンプトテシン、カンプトテシン薬またはこれらの誘導体を全体の両親媒性物質濃度に対して、約0.1mol%～約20mol%の範囲内、有利に約1mol%～約15mol%の範囲内、より有利には約3mol%～約10mol%の範囲内で有する。

【0072】

さらなる実施態様において、活性化合物は、イメージング剤のような診断薬、例えば、磁気共鳴イメージング剤（ガドリニウム錯体、例えば、Magnevist, Omniscanおよびその他）、X線造影剤およびコンピュータ断層撮影造影剤（多量の電子を有する重元素を有する化合物、例えば、ヨード、バリウム、ジスプロシウムおよびその他；例として、イオン化安息香酸誘導体のイオン化および非イオン化誘導体、例えば、イオパミドール、イオジキサノール、硫酸バリウムおよびその他が含まれる）ならびにその他の造影理学療法で

10

20

30

40

50

使用されるその他の薬剤（超音波、蛍光、近赤外およびその他）から選択される。

【0073】

好ましくは、イメージング剤のような診断薬は、全体の両親媒性濃度に対して、約0.1 mol%～約50 mol%の範囲内、有利に約10 mol%～約50 mol%の範囲内、より有利には約30 mol%～約50 mol%の範囲内で存在する。

【0074】

上記に開示したように、意外にも水溶液で希釈した後にも、本発明の調製物からリポソームの懸濁液が得られる。このように、本発明のもう1つの面は、非小胞性調製物から得られるカチオンリポソーム懸濁液に関する。

【0075】

意外にも、このように形成されたリポソームは、厳密な粒度分布に特徴づけられる。例えば、約280 mM DOTAPと2.5 mM CPTを有する調製物の希釈後に、準弾性光散乱によるサイズ測定値は、70 nmのZ平均と0.4のP1を示す。図4には、分析的超遠心測定値からの結果が示されている。極めて狭い粒度分布が得られた。

【0076】

有利な実施態様では、本発明のカチオンリポソーム懸濁液は、約50 nm～約1000 nmの範囲内の粒度分布のリポソームを有し、さらに有利な実施態様では、約50 nm～約500 nm、好ましくは約50 nm～約300 nmの粒度分布を有するリポソームを有する。明確な粒度分布を有する小さなリポソームサイズは、懸濁液を特にダイレクトな製剤学的投与に適切なものにする。

【0077】

さらに、リポソーム懸濁液は、最新の方法で得られるようなリポソームにより負荷された化合物を多量に有することができる。すなわち、リポソームを化合物で“オーバーロード（over load）”する。リポソームは、希釈により本発明の調製物から製造される。理論的に入手可能な最大の增量は、簡単な計算に基づいて算定することができる：調製物が100 mMの全体の両親媒性物質濃度で形成される場合には、最終的なリポソーム濃度は10 mMであり、遊離活性化合物のフラクションは、脂質フィルム法またはエタノール注入法のような従来の技術により製造されるリポソーム調製物と比較して約10倍少ない。

【0078】

本発明は、製剤学的用途に適切である。従って、本発明は、上記で開示したような本発明の調製物またはカチオンリポソーム懸濁液を、場合により製剤学的に認容性のキャリヤー、希釈剤および／または補助剤と一緒に有する、製剤学的組成物を提供する。

【0079】

単に水溶性活性剤が希釈の時点で存在する場合には、あたかもリポソームが従来技術により形成されているかのように、高い割合まで活性化合物がリポソームの水性コンパートメント中に封入される。水溶性化合物が膜二重層中に入り込むことができる場合には、希釈後の膜中のその捕捉率は、同じ濃度でのその平衡状態よりも高くなるであろう。意外にも、膜からフリーな水相中への、このような化合物の放出は、薬理学的投与が可能であるほどゆっくり生じることができる。よって、上記の血管性ターゲッティング効果は、従来技術で開示されたリポソーム調製物よりも高い効率で達成できる。

【0080】

多くのリポソーム調製物において、親水性化合物は一定の時間間隔でリポソームから放出される。これは、特に化合物の膜透過性が高い場合である。多くの場合に、放出が速すぎて製造できず、投与前に十分な貯蔵安定性で貯蔵することができない。リポソーム懸濁液、またはこれから得られる製剤学的組成物を使用の直前に提供できることは、本発明の利点である。既に活性化合物を有する本発明の調製物が濃縮状態で貯蔵される場合には、極めて低いフラクションだけがフリーな水相へ放出される。それというのも、水相の相対量が小さいからである。十分な貯蔵安定性を有さないとしても、本発明の調製物と活性化合物は別々に貯蔵することができ、使用の直前に混合および希釈することができる。このように、一般に極めて短い寿命を有する調製物を製剤学的用途に使用することができる。

10

20

30

40

50

例えば、数日もしくは数時間という時間のスケールで封入された水溶性化合物がリポソームから放出される場合には、適用前に貯蔵することができる。このような調製物が従来の方法により、使用直前に製造されたとしても、未封入のフラクションを時間のかかる方法で除去しなくてはならない。本発明のアプローチでは、化合物と、濃縮された非小胞性調製物を混合し、場合により滅菌濾過し、製剤学的適用の直前に、高い封入率でリポソーム懸濁液に戻し、このリポソーム懸濁液を希釈の直後に使用することができる。よって、短い寿命を有する負荷リポソーム懸濁液であっても通常のベースに基づいて適用することができる。

【0081】

従って、本発明の他の面は、本発明の調製物と、開示したような活性化合物の水溶液を有するキットに関する。 10

【0082】

カンプトテシンカルボキシレートは、水溶性であるが、カチオン脂質との有効な相互作用によりカチオン脂質膜中に挿入することができる化合物である。リポソームフラクションを最大化するために、脂質濃度を最大化するのが望ましい。しかし、実際の適用では、高すぎるリポソーム濃度は、例えば高い粘度ゆえに欠点である。

【0083】

カチオン性両親媒性物質、有利には脂質とカンプトテシンを有する濃縮された非小胞性調製物を使用することにより、リポソームを形成することができ、その際、希釈直後にリポソームフラクションは濃縮状態に相当する。すなわち、これは一時的に希釈後に平衡状態よりも高くなる。平衡は、ほんの数時間後に達成できるため、リポソームを本発明の非小胞性調製物から製造し、希釈直後に適用する場合には、これらはリポソーム性カンプトテシンの高いフラクションを有し、よって平衡状態のリポソームよりも高い効率を有することになるであろう。 20

【0084】

説明として、図4では本発明の調製物から得られるリポソーム懸濁液と、エタノール注入法と押出しにより製造される従来のリポソーム懸濁液が比較されている。両方のリポソーム懸濁液は、22.5 mM DOTAPと2.5 mM カンプトテシンを有する。本発明の調製物を使用して、450 mM DOTAPと50 mM カンプトテシンを有する非小胞相を希釈して、22.5 mM DOTAPの濃度にした。次に、両方の懸濁液10 mLを1:10に希釈し、得られた100 mLから遊離カンプトテシンをクロスフロー濾過により除去した。濾過の過程で、分子的に溶解された全ての化合物を有する水相が膜を通ることができる。濾液は5 mLの容量で分取し、遊離CPTの量をUV-vis分光分析法により測定した。図4では、濾液の吸収は、希釈直後に本発明の調製物から得られたリポソームと、2日後の同じものに関して記載されており、通常のリポソーム懸濁液の結果と比較している。このことから分かるように、希釈直後に遊離CPTのフラクションは、2日後よりも約2倍低い。2日後の遊離カンプトテシンの値は、従来の方法で製造されたリポソームよりも僅かに低かった。このことは平衡がまだ達成されていないことを示している。一般的には、DOTAP / カンプトテシン系では、平衡は数時間後に達成される。 30

【0085】

本発明の非小胞性調製物は、実験の説明で概説されているような種々の方法により製造することができる。 40

【0086】

さらなる態様では、本発明は開示したようなカチオン性両親媒性物質を有する非小胞性調製物の製法に関する。概説したように、調製物の形式は、本発明の調製物を得るために重要である。1つの同じ分子組成物でも、いくつかの準安定性の相と凝集状態を生じることができる。これらの状態は、熱力学的に準安定性であるにもかかわらず、これらは一定の時間スケールで安定であり、製剤学的用途にとって十分な貯蔵安定性で製造し、貯蔵される。外部応力（成分を添加することにより可能である）、pHの変化、機械応力、加熱または他の環境条件を用いることにより、1つの相を熱力学的により好ましい別の相に変換 50

することができる。他方で、一定の準安定性相で系を保持するために、このような応力を回避するのが好ましい。

【0087】

これに限定されるわけではないが、好ましくは低い脂質濃度（<100 mM）で本発明の調製物を製造するために、例えば、エタノールと水の混合物のような均一な脂質溶液の状態を通るのが好ましい。このような調製物は、例えば、エタノール性脂質溶液（約1 mM～約100 mM未満）と水または場合により他の成分を含有する水溶液と簡単に混合することにより得ることができる。エタノールと場合により水は、引き続き蒸発により除去することができ、水相中でクリアな脂質の分散液が得られる（“単相蒸発法”）。過剰の水が調製物中に残されている限り、蒸発は初期値に対して、どのような値まででも生じることができる。10

【0088】

より詳しくは、カチオン性脂質濃度、有利にはエタノール中のDOTAPの濃度は、約0.5 mM～50 mM、より有利には約1 mM～約25 mMであることができる。エタノール対水の割合は、約1：20～約20：1、有利には約1：10～約10：1、より有利には約1：5～約5：1の範囲であることができる。最終的な濃度は、過剰の水がない膨潤脂質二分子層を下回る濃度、有利には約100 mM～約600 mM、より有利には約200 mM～約400 mMであることができる。

【0089】

脂質の代わりに、定義したような両親媒性物質を使用してもよく、エタノールの代わりに、水中で混合可能な適切な有機溶剤、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、エチレングリコール、テトラヒドロフラン、クロロホルムまたはジエチルエーテルもしくはこれらの混合物を使用してもよい。20

【0090】

この方法では、リポソームが形成されない。リポソーム懸濁液が熱力学的に好ましいにもかかわらず、究極のリポソームの形成は回避される。それというのも、十分な機械的、熱的または他の応力を用いないと、閉じた二分子層小胞を形成するエネルギー・バリアが高すぎるからである。

【0091】

ところが、標準的なリポソーム調製法では、十分なエネルギーを提供して、二分子膜を破断し、閉じた小胞を形成するために、機械応力、化学応力または他の応力を系に適用する工程がある。例えば、フィルム法では、これは膨潤脂質二分子層の薄層フィルムを水で振とうすることにより、かつエタノール注入法において、迅速に水中の高濃縮エタノール溶液を希釈することにより行われる。30

【0092】

本発明の調製物を特に高濃度（>100 mM）で形成するための他の可能性は、高圧ホモジナイゼーションである。乾いた両親媒性物質、有利には脂質と水相を更に処理せずにホモジナイザーに加える。W099/49716とW096/05808に開示されているように、特に多重ラメラリポソーム懸濁液の工程を通る必要はなく、望ましくない。よって、リポソームの形成を避けるために、はじめにあらゆる種類の応力を回避する必要がある。40

【0093】

本発明のもう1つの対象は、少なくとも1つのカチオン性両親媒性物質を有する非小胞性調製物を製造する方法であり、前記方法は次の：

(a) カチオン性両親媒性物質、場合によりもう1つの両親媒性物質、場合により安定剤、場合により活性化合物および水相を用意し、

(b) 工程(a)の成分に、等方性で透明で、実質的に均一な調製物が形成されるような条件を課す

工程からなる。

【0094】

工程(b)は、“単相蒸発”または高圧ホモジナイゼーション法を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0095】

好ましくは、有機溶剤中の両親媒性物質の溶液を水相と混合し、続いて有機溶剤と場合により水を除去して、所望の最終濃度にすることにより非小胞性調製物が製造される(図1)。このように、膨潤脂質二分子層の限界までの濃度で、すなわち、脂質のヘッド基に結合する水以外の付加的な水が存在しない場合に本発明の調製物が得られる。

【0096】

しかし、均一な粒子不含の状態を形成するために適切な他の技法も本発明の調製物を製造するために使用でき、これらは例えば、以下に記載されている(D.F. Evans, H.Wennerstroem: *The Colloidal Domain: Where Physics Chemistry, Biology and Technology Meet*, VHC publishers, Weinheim, 1994)。

10

【0097】

上記に開示したように、本発明の調製物はさらに活性化合物を有していてもよい。有利には、活性化合物が親水性である場合に、本発明の調製物を製造するための両親媒性物質と簡単に混合することができ、また活性化合物が水溶性である場合には水相中にあることができる。二者択一的に、活性化合物を既に形成された調製物中に添加することができる。水中に溶解した活性化合物を既に形成された本発明の調製物中に添加する場合には、全体の相を介して自由に分布していてもよい。親水性化合物を乾燥した形で添加してもよく、さらに脂質相中での均一な分布のために、高圧ホモジナイゼーションサイクルを利用してもよい。

【0098】

本発明の調製物が定義付けられた閉じた小胞中で作成されないので、添加化合物の均一な分布が大きく促進される。各々の添加化合物は、全体の相中で均一に分布することができ、希釈後に活性化合物が最終的にはリポソーム膜中に封入されるか、または挿入される。従って、リポソーム中に負荷される活性化合物のフラクションは、上記に概説したような通常のリポソーム形成技術によって、あたかも調製物が低い脂質濃度で直に製造されたかのように高い。従って、活性化合物を有するリポソーム調製物を製造でき、その際、水溶性活性化合物のリポソーム封入フラクションは、平衡状態に比例して増大する。

20

【0099】

カチオン脂質と活性化合物を有する本発明の調製物は、さらに希釈することなく、すぐに使用できる製剤学的調製物として使用できる。高濃度までのその低い粘度は、滅菌濾過を可能にするか、または100nmもしくは200nmのような定義付けられた孔径を有する膜を介する押し出しを可能にする。これはin vivoでの適用にとって前提条件である。

30

【0100】

上記に開示したように、本発明は医薬品または診断調製物の製造に適切である。従って、本発明のもう1つの対象は、開示したような調製物、懸濁液または製剤学的組成物を医薬品または診断調製物の製造、特に血管新生に関連する疾患のような血管新生に有効な医薬品または診断調製物の製造に使用できることである。

【0101】

血管新生と関連する疾患は血液供給に依存している。血管系の局所的阻害は多大な細胞死を引き起す。血管内皮は血管と直接に接触している。種々の疾患が前記の方法と組成物で予防かつ治療できると考えられている。有利な実施態様では、本発明により提供されるような調製物、リポソーム懸濁液または製剤学的組成物は、癌、種々の炎症疾患、糖尿病性網膜症、リウマチ様動脈炎、炎症、皮膚炎、乾癬、胃潰瘍、筋肉退化、血行性腫瘍および充実性腫瘍のような疾患の予防および/または治療に有効である。さらに有利な実施態様では、本発明の調製物と組成物は、膀胱、脳、乳、頸部、直腸結腸、子宮内膜、頭および首、または腎臓癌、白血病、肝臓または肺癌、リンパ腫、黒色腫、非小細胞肺癌、子宮癌、すい臓癌または前立腺癌のような充実性腫瘍およびそれらの転移を予防および/または治療するための医薬品を製造するために利用できる。

40

【0102】

本発明の調製物は、注射(例えば、皮下、筋肉内、腹腔内)による希釈の直後または移

50

植の後に適用してもよい。これを血管腔に置くか、または局所的に粘膜上、角膜、または皮膚の部分に適用することもできる。このように調製物は活性化合物のキャリヤーとして役立ち、活性化合物の変性またはコントロールされた放出にとって重要である。この懸濁液を注射（例えば、皮下、筋肉内、腹腔内）により、または移植により直に適用してもよい。リポソームの封入は、リポソームにより運ばれる活性化合物を体内で分布させることにつながり、この分布は標的部位（活性化された内皮細胞）で活性化合物が長続きする濃度に選択的に影響する。よって、効果の改善または効果と副作用の割合の改善、または治療もしくは診断指標の改善にも影響する。

図の説明文：

図1 単相溶剤蒸発 (single phase solvent evaporation) による本発明の調製物を製造するためのスキーム：（カチオン）両親媒性物質、有利には脂質の希釈溶液および他の成分（場合により活性化合物）を有する溶液を混合し、均一な相を製造する。有機溶剤を、有利にはエタノールと、場合には水溶液の部分を所望の濃度が達成されるまで蒸発する。調製物はクリアで透明な非小胞性相として残った。濃縮調製物を希釈した後にリポソームが形成された。

10

図2 約 250 mg / g (w/w) の濃度での、水中のDOTAP含有の濃縮調製物。調製物は透明であり、液体のようであった。

図3 種々のリポソーム調製物中の遊離カンプトテシン (CPT) の測定値。450 mM DOTAP と 50 mM CPT の非小胞性調製物を希釈して、23.5 mM DOTAP と 2.5 mM CPT リポソーム懸濁液にした。リポソームが形成された直後に、懸濁液 10 mL をさらに 1:10 に希釈し、クロスフロー濾過を行った。濾液の 5 mL アリコートを取り、UV-vis 測定値を前形成して、遊離 CPT を測定した。グラフ中、369 nm での吸収が示されている。同じ 23.5 mM DOTAP リポソーム懸濁液を形成し、系が平衡になったと予想された時に、さらに 10 mL を 2 日後に希釈した。このことから分かるように、この場合に、放出は希釈直後に約 2 倍であった。比較のために、23.5 mM DOTAP と 2.5 mM CPT リポソーム懸濁液をエタノール注入により直に製造した。押し出した (200 nm) リポソーム調製物の 10 mL を 1:10 に希釈し、同様に試験した。このことから分かるように、遊離 CPT の値は、2 日後に非小胞性調製物を希釈した懸濁液と同じ範囲であった。

20

図4 リポソーム調製物中の粒度分布を測定するための超遠心分離の分析測定値。測定は、2.5 mM DOTAP と 0.25 mM CPT でそれぞれ行った。上のグラフでは、エタノール注入法と押し出し (UF60) により 25 mM の全体濃度にした、従来のリポソーム調製物の測定結果が示されている。測定のために、試料を 1:10 に希釈した。下のグラフには、1:200 に希釈後に、500 mM (UF62) の全体濃度で非小胞性調製物から得られたようなリポソームの測定結果が示されている。非小胞性調製物を希釈して得られる試料の粒度分布は、むしろ狭く、押し出したリポソームのうちの 1つよりも良好である。

30

図5 リポソーム懸濁液と本発明の非小胞性調製物の濁度を比較するUV-vis 分光分析法による測定値。30 mM DOTAP リポソーム (200 nm で押し出し) と 270 mM DOTAP の非小胞性調製物を測定した。リポソーム懸濁液からの吸収は、非小胞性調製物よりもはるかに高かった。但し、後者は、ほとんど 10 倍濃縮されている。定量分析 (400 nm) は、リポソーム懸濁液のモル吸収（散乱による）が非小胞性調製物のモル吸収よりも 50 倍以上高いことを示している。

40

【0103】

以下の実施例は、本発明の範囲を限定することなく、実例としてのみあるべきである。他の当業者から明らかであろう。

実施例

例 1

A : 高濃度での水中のDOTAP非小胞性調製物 (single phase evaporation)

DOTAPエタノール性溶液 33 mL (濃度 = 6 mM) とトレハロース 0.5% 水溶液 10 mL を丸底フラスコ中で混合した。クリアな溶液が得られた。フラスコ中の溶液の重さが 690 mg になるまで溶剤を 40°、圧力 100 mbar で蒸発させた。散乱粒子が存在する兆候

50

がなく、濃縮物はクリアで均一な相であった。調製物の濃度は、約 1 g / m l であり、得られた DOTAP 濃度は約 290 mM であり、得られたトレハロース濃度は約 7 % であった。

B . 希釈によるリポソーム懸濁液の形成

パート A の濃縮調製物を 10 % トレハロース水溶液約 7 m l で希釈し、約 25 mM DOTAP の最終濃度にした。希釈後に、クリアな相がタンパク光のリポソーム懸濁液になった。リポソームの大きさは、準弾性光散乱測定の実験 (Zetasizer 300, Malvern, Herrenberg, Germany) により測定した。

例 2

25 mM ~ 400 mM の範囲内の種々の濃度での、DOTAP の非小胞性調製物 (単相蒸発)

全ての調製物は、エタノール中の DOTAP (DOTAP-Cl) 、濃度 = 25 mM の溶液と水中の 10 % トレハロース溶液を用いて形成した。濃度 = 25 mM、100 mM、200 mM、300 mM および 400 mM (所望の最終濃度を得るために必要である等量容積) を有する DOTAP 調製物を製造するために、表に挙げられているようなトレハロース水溶液と水を混合した。

【0104】

約 0.5 m l の最終容積が得られるまで、この溶液から溶剤を蒸発させた。全ての濃縮物は、透明な相として存在した。

【0105】

【表 2】

C (mM)	V _{Dotap.} (mL)	V _{トレハロース} (mL)	V _{H2O} (μL)
25	0.5	0.5	22
100	2.0	0.5	88
200	4.0	0.5	176
300	6.0	0.5	264
400	8.0	0.5	352

例 3

高濃度 (高压ホモジナイゼーション) での水中の DOTAP 非小胞性調製物

DOTAP 硫酸メチル 8.13 g に、水 35 m l を添加した。この混合物を高压ホモジナイザーの圧力室に移した。750 bar、室温で、懸濁液を 10 回ホモジナイズして 300 mM の透明なゲル様調製物約 40 m l が得られた。

例 4

高濃度 (高压ホモジナイゼーション) での DOTAP と水中の Gd 錨体の非小胞性調製物

高压ホモジナイザー (Gaulin Micron LAB 40) を試料容積 40 m l に保持した。0.5 M Gd 錨体 (Omniscan) の 36 m l と DOTAP 硫酸メチル 4.65 g の試料を、圧力室に懸濁させた。ホモジナイゼーション法 (室温、750 bar) を 10 回繰り返した結果、個々の材料が得られた。実験は 150 mM と 300 mM の 2 つの DOTAP 濃縮物を用いて行った。

【0106】

10

20

30

40

【表3】

DOTAP [mM]	ホモジネートの外観	安定性	Gd [mM]	容積の増大
150	均一な液体	室温で沈殿なし	9	3.4
300	均一な液体	室温で沈殿無し、透析後に粘着性	17	2.3

10

【0107】

ホモジナイゼーション後、均一な液体調製物が得られ、200 nm孔径を有するポリカーボネート膜を通して押出した。得られた調製物を5%グルコースに対して4回透析し、封入されていない造影剤Omniscanを取り除いた。透析の間、透析管中の溶液の容積は、2.3~3.4倍に増大した。この増大は、ラベリング効率が確立していることを考慮に入れることができる。この透析の間に300 mM溶液は粘性の非小胞性相に変わった。透析後に封入効率は150 mM DOTAPについては6.1%であり、300 mM DOTAPについては7.8%であった。

20

例5

A：非小胞性DOTAP/CPT濃縮調製物：DOTAP500mM、CPT50mM (single phase evaporation)

DOTAP(6 mM)のエタノール性溶液を、1%トリス/HCl-緩衝液含有(pH 7.5)の0.5%トレハロース中のCPT-カルボキシレート(濃度=2 mM)の水溶液に添加した。溶剤を蒸発させ(30および25 mbar)て500 mM DOTAPと50 mMカンプトテシンの全體濃度にした。

30

【0108】

B：希釈によるDOTAP/CPTリポソーム懸濁液の形成と希釈直後のオーバーローディングの測定

クリアなパートAの濃縮調製物を希釈して1 mM(1:500)の濃度のDOTAPにした。希釈後に、タンパク光リポソーム懸濁液が形成された。

30

【0109】

非リポソーム性の遊離CPTは、50 kDa MWCOの膜を通して“クロスフロー濾過”により測定した。遊離CPTを希釈の直後と2日後に測定した。希釈後に、遊離CPTのフラクションは10%であり、2日後に20%であった。2日後の状態が平衡状態であることが考えられる。このことは、遊離CPTのフラクションが希釈直後に2倍減少していることを示している。

例6

予備形成した非小胞性DOTAP濃縮調製物へのCPTの添加

40

高圧ホモジナイゼーションにより得られた水中のDOTAPの280 mM非小胞性調製物5 mL(例3参照)に、水中のCPTカルボキシレート14 mM溶液の5 mL溶液を添加した。クリアな、わずかに黄色い相が得られた。

【0110】

調製物1 mLを10 mMトリス/HCl緩衝液(pH 7.5)で希釈して、最終濃度15 mMにした。

例7

非小胞性DOTAP/CP調製物から得られたリポソームのマウスにおける許容性
非小胞性調製物、DOTAP450mM、カンプトテシン25 mMを10%トレハロース水溶液で戻し、約25 mM(希釈1:20)のリポソーム懸濁液にした。希釈直後、マウスを5 μmol

50

/ g の 1 回注射で処置した。注射は許容可能であり、副作用は何も見られなかった。

例 8

ヒトの治療プロトコール

この例は、開示した調製物と懸濁液を用いるヒトの治療プロトコールに関する。治療は、増強した血管新生活性と関連する様々なヒトの症状と疾患を診断および / または治療するために使用される。抗腫瘍治療、例えば、充実性腫瘍および血液学的悪性疾患を患った患者の治療において、または乾癬のような様々な慢性炎症疾患の治療において特に有効であると考えられる。

【 0 1 1 1 】

本発明の特徴は、異常のある組織を直接に治療することなく、多くのクラスの疾患および / または異常を治療することである。例えば、血管新生を阻害することにより、腫瘍への血液供給を遮断し、その腫瘍は腫瘍細胞を直接に治療することなく、いずれかの方法で死滅する。

【 0 1 1 2 】

このような脂質・薬物複合体を使用する患者の治療法は、すでに開発されている。このような方法は、本明細書中に記載されている方法を用いて簡単に使用できると予想されている。すでに述べたように、他の治療薬も同時にまたは別の時点で投与できると考えられる。よって、プレミックスされた薬理学的組成物または治療薬の“カクテル”を使用するか、または二者択一的に、別々の容器からの薬物の一定量を使用することもできる。

【 0 1 1 3 】

患者の治療とモニタリングを含む臨床的試みを行う種々の要素は、本発明の開示に照らし合わせながら当業者にとって明らかであろう。

【 0 1 1 4 】

規制上の承認を目的に、実験用に選択された患者が、通常の治療の少なくとも 1 過程に反応することに失敗し、身体検査、実験手法または放射線法により測定されるような客観的に測定可能な疾患を患うことが考えられる。心疾患や腎疾患の経歴も無いと思われるこのような患者は、実験に入る前の少なくとも 2 週間には化学療法を中止すべきである。

【 0 1 1 5 】

必要な適用量は、患者の体重と薬用量計画から計算される。適用前に、調製物が凍結乾燥している場合には、調製物を水溶液中で戻すことができる。また、必要な適用量は患者の体重と薬用量計画から計算される。

【 0 1 1 6 】

開示された調製物は短い注入時間で投与される。いずれかの用量レベルで投与される注射は、それぞれの後に到達する毒性に応じるべきである。よって、グレード II の毒性が 1 回注射の後、または一定量注射について特定の期間で達成された場合には、毒性が改善されないのであれば、さらなる投薬を留めておくか、または一定量注射を中止するのがよい。約 60 % の患者が、いずれかのカテゴリーで容認できないグレード III または IV の毒性を示すまで、用量を増加させて患者グループに投与すべきである。この値の 2 / 3 である用量は、安全な用量として定義される。

【 0 1 1 7 】

身体実験、腫瘍測定および実験室試験は、当然ながら治療前と、約 3 ~ 4 週間の間隔をあけた後に行うべきである。実験室試験は完全血球計算、血清クレアチニン、クレアチニンキナーゼ、電解質、尿素、窒素、SGOT、ビリルビン、アルブミンおよび全血清タンパク質を含むべきである。

【 0 1 1 8 】

臨床反応は、実験室の数値で認容できる尺度または変化、例えば、腫瘍マーカーにより定義してもよい。例えば、完全な反応は、測定可能な全ての疾患が少なくとも 1 ヶ月間消失することにより定義される。それに対して、局所反応は 50 % またはそれ以上の減少により定義してもよい。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

本明細書中に開示され、請求されている全ての組成物と方法は、本発明の開示を鑑みて、必要以上の実験を行うことなく製造かつ実施することができる。本発明の組成物と方法を有利な実施態様の点から記載してきたが、本発明のコンセプト、意図および範囲から離れることなく、本明細書に記載されている組成物、方法および工程または方法の工程の順序に対して、バリエーションが適用できることが当業者には明らかである。さらには、化学および生理学的に関連する特定の薬物を、同様または類似した結果が得られる限りにおいて本明細書中に記載されている薬物の代わりに用いることができることも明らかとなるであろう。当業者に明らかなこのようないくつかの類似した置き換えと変性は従属請求項に定義されているような本発明の意図、範囲およびコンセプトの範囲内であると考えられる。

【0120】

10

用量におけるバリエーションは、治療される対象の症状に応じて必然的に生じるであろう。投与の責任を負う人物は、少なくとも各対象に対して適切な用量を測定するであろう。さらに、ヒトの投与については、調製物がFDAから要求されているような生物学的基準の無菌状態、発熱性、一般的な安全性および純度基準を満たしているべきである。

【0121】

投与と用量

本発明は、製剤学的に有効量の本発明の調製物または活性化合物を有しているリポソーム懸濁液を、これを必要とする対象の血管新生の血管標的部位に輸送する方法を包含する。“これを必要とする対象”とは、この場合にホルモン類、例えば、ヒトを意味する。

【0122】

20

投与の経路は、腹膜、非経口または局所適用を含み、調製物は溶液注入剤、薬物放出力プロセルなどの種々の剤形で容易に投与される。

【0123】

30

本発明で使用されている、これを必要とする対象（血管新生を受けている内皮細胞のある循環器系を有するいすれかの動物）に投与される化合物の“薬理学的に有効量”という用語は、広い範囲のファクターに依存して変化する。例えば、小動物よりもヒトには実質的に多い用量を提供する必要があるであろう。化合物の量は、患者の大きさ、年齢、性別、体重および症状ならびに投与された物質の効力に依存する。用量に関して相当の多様性があることを記載してきたが、当業者は本発明の開示を使用して、はじめに極めて少量の用量を投与し、所望の結果が得られるまで徐々に増大させることによって適切な用量を容易に決定することができると考えられる。用量が上記のファクターに基づいて大きく変化するにもかかわらず、周囲の組織を標的とする、例えば、腫瘍細胞自体を標的とするデリバリーシステムと比較して、本発明は事実上少量の物質の投与を可能にする。

【0124】

本明細書中に開示されている治療薬の製剤学的に有効量とは、薬物作用の種類とタイプに左右される。ここで述べる例として、ヒトでは約0.1～約20mg/kgの範囲内である。パクリタキセル誘導体ならびにカンプトテシンに関しては、通常5mg/kgのオーダーの用量が適用される。

【0125】

40

本明細書中で開示されているような診断薬の製剤学的に有効量とは、診断薬のタイプに左右される。正確な用量は化合物の分子量、検出されるシグナルのタイプと強度に応じる。例えば、ここで挙げられる例として、（蛍光染料としてのフルオロセイン、MRIマーカーとしてのガドリニウム錯体）、適用される用量は、約0.1～20mg/kgの範囲内であってよい。最も頻度の高い用量は、約5mg/kgのオーダーである。

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】図1は、単相溶剤蒸発による本発明の調製物を製造するためのスキームを表す図である。

【図2】図2は、約250mg/g(w/w)の濃度での、水中のDOTAP含有の濃縮調製物を表す図である。

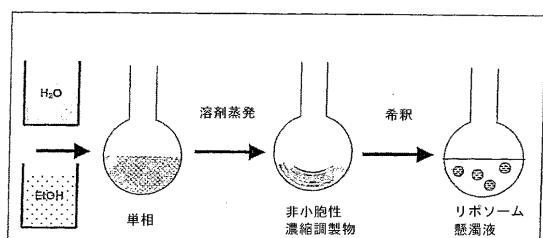
50

【図3】図3は、種々のリポソーム調製物中の遊離カンプトテシン(CPT)の測定値を表す図である。

【図4】図4は、リポソーム調製物中の粒度分布を測定するための超遠心分離の分析測定値を表す図である。

【図5】図5は、リポソーム懸濁液と本発明の非小胞性調製物の濁度を比較するUV-vis分光分析法による測定値を表す図である。

【図1】

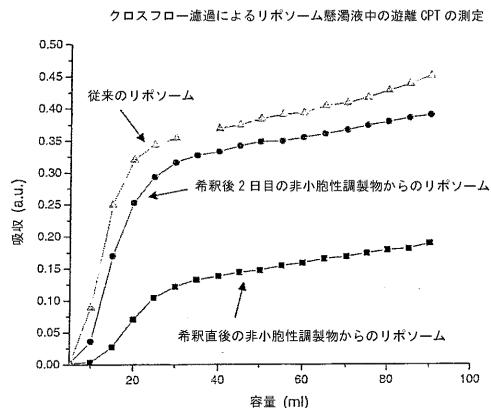


【図2】

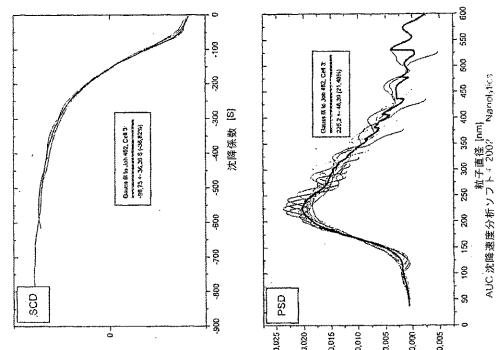


Fig. 2

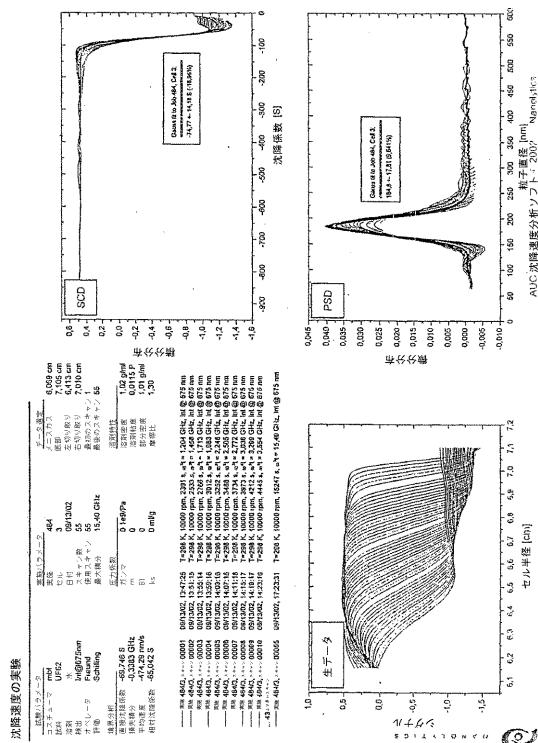
【図3】



【図4-1】

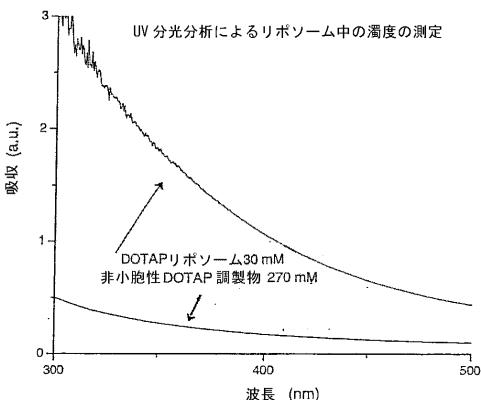


沈降速度の実験



【図4-2】

沈降速度の実験



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/09398
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/127 A61K47/18 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, PAJ, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 93836 A (BOULIKAS TENI) 13 December 2001 (2001-12-13) page 9, line 10 -page 10, line 11 page 12, line 19-26 page 16, line 19 -page 17, line 9 page 18, line 6-28 page 22, line 24 -page 23, line 9 page 29, line 10-31; table 1 page 31, line 29 -page 32, line 16 page 43, line 22 -page 47, line 27 page 49, line 4-24; claims 1,2,10,26-28,31,40-42 ---	1~21
Y		22
X	US 2001/038851 A1 (ALLEN THERESA M ET AL) 8 November 2001 (2001-11-08) paragraphs '0055!, '0056!, '0072!, '0073!; table 2 ---	17 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 January 2004		Date of mailing of the international search report 30/01/2004
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 Greif, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09398

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/065329 A1 (KAGAWA KAZUHIRO ET AL) 30 May 2002 (2002-05-30) paragraphs '0007!, '0008!, '0013!-'0024!, '0028!; table 1 --	1-4, 18, 21
Y	US 6 090 955 A (BRANDL MARTIN ET AL) 18 July 2000 (2000-07-18) column 3, line 7-37; example 1 --	22
A	US 5 834 012 A (PEREZ-SOLER ROMAN ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) the whole document --	1-22
A	US 4 830 858 A (SALMON J ROGER ET AL) 16 May 1989 (1989-05-16) the whole document --	1-22
A	PERRET S ET AL: "A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, LONDON, GB, vol. 43, no. 3, 1991, pages 154-161, XP002098317 ISSN: 0022-3573 page 160, right-hand column, paragraph 4 --	1-22
A	STOYE I ET AL: "Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles - physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 2, September 1998 (1998-09), pages 191-200, XP004257041 ISSN: 0939-6411 abstract page 195, right-hand column, paragraph 3 -page 198, right-hand column, paragraph 3; figure 3 --	1-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09398

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0193836	A	13-12-2001		AU 7542301 A CA 2411542 A1 CN 1444472 T EP 1292284 A2 JP 2003535832 T WO 0193836 A2 US 2003072794 A1		17-12-2001 13-12-2001 24-09-2003 19-03-2003 02-12-2003 13-12-2001 17-04-2003
US 2001038851	A1	08-11-2001		US 6316024 B1 US 6056973 A US 5891468 A US 2002172711 A1 US 2003215490 A1 US 6224903 B1 AT 232086 T AU 715063 B2 AU 4987897 A BR 9712230 A CA 2267904 A1 DE 69718924 D1 DE 69718924 T2 DK 932391 T3 EP 1214935 A2 EP 0932391 A2 ES 2191833 T3 JP 2001504093 T PT 932391 T TW 520297 B WO 9816202 A2		13-11-2001 02-05-2000 06-04-1999 21-11-2002 20-11-2003 01-05-2001 15-02-2003 13-01-2000 11-05-1998 25-01-2000 23-04-1998 13-03-2003 04-12-2003 26-05-2003 19-06-2002 04-08-1999 16-09-2003 27-03-2001 30-06-2003 11-02-2003 23-04-1998
US 2002065329	A1	30-05-2002	JP	2002085957 A		26-03-2002
US 6090955	A	18-07-2000		DE 4430593 A1 AT 192924 T DE 4447770 C2 WO 9605821 A1 DE 59508360 D1 DK 776202 T3 EP 0776202 A1 GR 3034162 T3		22-02-1996 15-06-2000 19-12-2002 29-02-1996 21-06-2000 13-11-2000 04-06-1997 30-11-2000
US 5834012	A	10-11-1998		NONE		
US 4830858	A	16-05-1989		NONE		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
B 0 1 J 13/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
	B 0 1 J 13/02	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,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,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス=ラインハルト

(74)代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72)発明者 ハンリッヒ ハース

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アインシュタインシュトラーセ 1 0 4

(72)発明者 トーラフ ペイマン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン フュルステンリーダーシュトラーセ 2 3 3

(72)発明者 ウアズラ ファットラー

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン オットー-コールホーファー-ヴェーク 3

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB11 CC27 DD15 DD19 DD37 DD38 DD63 DD67

DD70 FF15 FF43 FF68 GG41

4C086 AA01 AA02 CB22 MA03 MA05 MA24 NA02 NA05 NA11 NA13

ZB21 ZB26 ZB27

4G005 AA07 BA20 DB22X DC41Z DC61Z DE05Z EA03