

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6143767号
(P6143767)

(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日 (2017.5.19)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10

請求項の数 23 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-539143 (P2014-539143)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月31日 (2012.10.31)
 (65) 公表番号 特表2014-532665 (P2014-532665A)
 (43) 公表日 平成26年12月8日 (2014.12.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/062635
 (87) 国際公開番号 W02013/066903
 (87) 国際公開日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
 審査請求日 平成27年8月6日 (2015.8.6)
 (31) 優先権主張番号 61/553,786
 (32) 優先日 平成23年10月31日 (2011.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 595181003
 マリンクロッド エルエルシー
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63042,
 ヘイズルウッド, マクドネル プール
 バード 675
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 ヤン, ジュン
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63021,
 ボールウィン, キャッスル パインズ
 ドライブ 734
 (72) 発明者 ウー, スティーブン エイチ.
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63017,
 チェスターフィールド, サマー リッ
 ジ ドライブ 15824

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん治療用組合せリポソーム組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療剤を被験体に送達するための組み合わせ物であって、

a) 治療剤を含むリポソーム; および

b) D - トコフェロールポリエチレングリコールスクシネート (TPGS) である非

イオン性誘発剤を含む脂質ナノ粒子

を含み、
 前記リポソームおよび前記脂質ナノ粒子が前記被験体に投与されることを特徴とし、
 それにより、前記脂質ナノ粒子を投与した後の前記リポソームからの前記治療剤の放出を、
 前記脂質ナノ粒子を投与しない場合の前記リポソームからの前記治療剤の放出と比べて

10

増加させる、組み合わせ物。

【請求項 2】

前記リポソームが、リン脂質、ステロイド、およびカチオン性脂質からなる群より選択
 される 1 つもしくは複数の脂質を含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3】

前記リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、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、ホスファチジルイノシトール、およびホス
 ファチジン酸から選択される、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4】

前記ホスファチジルコリンが DSPC である、請求項 3 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 5】

前記ホスファチジルグリセロールが D S P G である、請求項 3 に記載の組み合わせ物。

【請求項 6】

前記ホスファチジリエタノールアミンが D S P E - P E G (2 0 0 0) である、請求項 3 に記載の組み合わせ物。

【請求項 7】

前記ステロイドがコレステロールである、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 8】

前記脂質ナノ粒子が、第 2 のリポソーム、ミセル、およびこれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 9】

前記脂質ナノ粒子が第 2 のリポソームである、請求項 8 に記載の組み合わせ物。

【請求項 10】

前記第 2 のリポソームが、リン脂質、ステロイド、およびカチオン性脂質からなる群より選択される 1 つもしくは複数の脂質を含む、請求項 9 に記載の組み合わせ物。

【請求項 11】

前記リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンシトール、およびホスファチジン酸から選択される、請求項 10 に記載の組み合わせ物。

【請求項 12】

前記ホスファチジルコリンが D P P C である、請求項 11 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 13】

前記ステロイドがコレステロールである、請求項 10 に記載の組み合わせ物。

【請求項 14】

前記カチオン性脂質が D O T A P である、請求項 10 に記載の組み合わせ物。

【請求項 15】

前記リポソームが、40～80モル%の D S P C、5～50モル%のコレステロール、0～30モル%の D S P G、および0～10モル%の D S P E - P E G (2 0 0 0) を含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 16】

前記脂質ナノ粒子が、40～70モル%の D P P C、5～20モル%のコレステロール、0～20モル%の D O T A P、および20～40モル%の T P G S を含む第 2 のリポソームである、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

30

【請求項 17】

前記治療剤が、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ゲムシタピン、5-フルオロウラシル、ドキシソルビシン、およびタキサンから選択される、請求項 1～16のいずれかに記載の組み合わせ物。

【請求項 18】

前記治療剤が、シスプラチンおよびオキサリプラチンからなる群より選択される、請求項 17 に記載の組み合わせ物。

40

【請求項 19】

腹腔内注射によって、前記第 1 のリポソームおよび前記脂質ナノ粒子が送達される、請求項 1～18のいずれかに記載の組み合わせ物。

【請求項 20】

前記被験体がヒトである、請求項 1～19のいずれかに記載の組み合わせ物。

【請求項 21】

前記リポソームの投与後に、前記脂質ナノ粒子が前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 1～20のいずれかに記載の組み合わせ物。

【請求項 22】

前記リポソームが前記被験体内の標的部位に蓄積した後に、前記脂質ナノ粒子が前記被

50

験体に投与されることを特徴とする、請求項 2_1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 2_3】

治療剤を被験体に送達するためのキットであって、

- a) 治療剤を含有するリポソームを含む第 1 の組成物；および
- b) D - トコフェロールポリエチレングリコールスクシネート (TPGS) である 非イオン性誘発剤を含有する脂質ナノ粒子を含む第 2 の組成物

を含み、

前記被験体への投与前は、前記第 1 および第 2 の組成物が個別に保管されている、キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、2011 年 10 月 31 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 553 , 786 号の優先権を主張し、この米国仮特許出願第 61 / 553 , 786 号の全内容が、本明細書において参考として援用される。

【0002】

(政府支援の研究開発下でなされた発明に対する権利に関する陳述)

適用なし。

【0003】

20

(コンパクトディスクで提出した「配列表」、表、またはコンピュータプログラムリストの付録への参照)

該当なし

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

リポソームは有効な薬物送達ビヒクルとして使用することができ、市販されているリポソーム製品は、癌を含む疾患を処置するために開発されてきた (Barenholz, Y., Curr. Opin. in Colloid & Interface Sci. 6 (1) : 66 - 77 (2001))。リポソームは、外部の水性環境から内部水相を隔てる少なくとも 1 つのリン脂質二重層を含むベシクルである。リポソームは、脂質二重層中の疎水性カーゴおよび / または水性コア中の親水性カーゴの両方を有することができる。リポソームのサイズは、通常、50 ~ 250 nm の範囲内であり、癌組織の血管透過性および滞留性亢進効果 (EPR 効果) によって化学療法剤を固形腫瘍部位に標的化送達するのに特に適切である (Maeda, H.ら、J. Controlled Release. 65 (1 - 2) : 271 (2000))。EPR による腫瘍部位での薬物含有リポソームの選択的蓄積は、薬物を局在化して、薬物の有効性を向上させ、正常な細胞または組織に対する薬物毒性を減少させる手段を提供する。例えば、FDA によって承認されているドキソルビシン含有リポソーム製品である Doxil (商標) は、遊離薬物と比較して減少した毒性を有することが示されている (Martin, F. J.ら、"Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL." Medical Applications of Liposomes. Ed. D. D. Lasic. Amsterdam: Elsevier, 1998, pp 635 - 688)。

30

40

【0005】

しかしながら、リポソーム薬物送達ビヒクルの利点は、リポソームの代謝および体からの排出、ならびに全身への分布および送達による一定レベルの固有毒性および副作用を含む欠点によって制限されている。特に、リポソーム薬物の放出速度の最適化は、in vivo 半減期と放出との間で難しいバランスを取る行為である。一般に、漏れやすいリポソームは封入薬物をより利用可能にするが、遊離薬物と同様に多くの毒性リスクを引き起

50

こす。一方、シスプラチン調製物 (SPI-077) で示されているように (Kim, E. Sら、Lung Cancer. 34 (3): 427-432 (2001))、漏れにくいリポソームは毒性を減少させ得るが、有効性のための所望の薬物放出を提供することができない。したがって、リポソーム薬物製品の開発および投与において有効性および安全性のバランスを取ることは、重要な課題を構成する。

【0006】

したがって、単一リポソーム調製物ベースの治療の制限を克服する製剤化および送達方法を開発することの必要性がある。本発明は、薬物の安全性および有効性を改善する手段を提供して、このおよび他の必要性に対応する。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Barenholz, Y., Curr. Opin. in Colloid & Interface Sci. 6 (1): 66-77 (2001)

【非特許文献2】Maeda, Hら、J. Controlled Release. 65 (1-2): 271 (2000)

【非特許文献3】Martin, F. Jら、"Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL." Medical Applications of Liposomes. Ed. D. D. Lasic. Amsterdam: Elsevier, 1998, pp 635-688

20

【非特許文献4】Kim, E. Sら、Lung Cancer. 34 (3): 427-432 (2001)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の簡単な要旨)

一態様では、本発明は、治療剤を被験体に送達するための方法であって、

a) 治療剤を含むリポソームを前記被験体に投与すること；および

b) 誘発剤を含む脂質ナノ粒子を前記被験体に投与すること

を含み、

30

それにより、前記脂質ナノ粒子を投与した後の前記リポソームからの前記治療剤の放出を、前記脂質ナノ粒子を投与しない場合の前記リポソームからの前記治療剤の放出と比較して増加させる方法を提供する。

【0009】

第2の態様では、本発明は、治療剤を被験体に送達するためのキットであって、

a) 治療剤を含有するリポソームを含む第1の組成物；および

b) 非イオン性誘発剤を含有する脂質ナノ粒子を含む第2の組成物

を含み、

前記被験体への投与前は、前記第1および第2の組成物が個別に保管されているキットを提供する。

40

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

治療剤を被験体に送達するための方法であって、

a) 治療剤を含むリポソームを前記被験体に投与する工程；および

b) 非イオン性誘発剤を含む脂質ナノ粒子を前記被験体に投与する工程

を含み、

それにより、前記脂質ナノ粒子を投与した後の前記リポソームからの前記治療剤の放出を、前記脂質ナノ粒子を投与しない場合の前記リポソームからの前記治療剤の放出と比べて増加させる、方法。

(項目2)

50

前記リポソームが、リン脂質、ステロイド、およびカチオン性脂質からなる群より選択される1つもしくは複数の脂質を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記リン脂質が、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine)、ホスファチジルグリセロール、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、ホスファチジリンイノシトール、およびホスファチジン酸から選択される、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記ホスファチジルコリンがDSPCである、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記ホスファチジルグリセロールがDSPGである、項目3に記載の方法。

(項目6)

前記ホスファチジルエタノールアミンがDSPE-PEG(2000)である、項目3に記載の方法。

(項目7)

前記ステロイドがコレステロールである、項目2に記載の方法。

(項目8)

前記脂質ナノ粒子が、第2のリポソーム、ミセル、およびこれらの混合物からなる群より選択される、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記脂質ナノ粒子が第2のリポソームである、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記第2のリポソームが、リン脂質、ステロイド、およびカチオン性脂質からなる群より選択される1つもしくは複数の脂質を含む、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記リン脂質が、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine)、ホスファチジルグリセロール、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、ホスファチジリンイノシトール、およびホスファチジン酸から選択される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記ホスファチジルコリンがDPPCである、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記ステロイドがコレステロールである、項目10に記載の方法。

(項目14)

前記カチオン性脂質がDOTAPである、項目10に記載の方法。

(項目15)

前記非イオン性誘発剤がTPGSである、項目1に記載の方法。

(項目16)

前記リポソームが、40～80モル%のDSPC、5～50モル%のコレステロール、0～30モル%のDSPG、および0～10モル%のDSPE-PEG(2000)を含む、項目1に記載の方法。

(項目17)

前記脂質ナノ粒子が、40～70モル%のDPPC、5～20モル%のコレステロール、0～20モル%のDOTAP、および20～40モル%のTPGSを含む第2のリポソームである、項目1に記載の方法。

(項目18)

前記治療剤が、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、ドキシソルピシン、およびタキサンから選択される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目19)

10

20

30

40

50

前記治療剤が、シスプラチンおよびオキサリプラチンからなる群より選択される、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

腹腔内注射によって、前記第 1 のリポソームおよび前記脂質ナノ粒子を送達する、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 21)

前記被験体がヒトである、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 22)

前記リポソームの投与後に、前記脂質ナノ粒子を前記被験体に投与する、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 23)

前記リポソームが前記被験体内の標的部位に蓄積した後に、前記脂質ナノ粒子を前記被験体に投与する、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

治療剤を被験体に送達するためのキットであって、

a) 治療剤を含有するリポソームを含む第 1 の組成物；および

b) 非イオン性誘発剤を含有する脂質ナノ粒子を含む第 2 の組成物

を含み、

前記被験体への投与前は、前記第 1 および第 2 の組成物が個別に保管されている、キット

。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】図 1 は、(a) pH = 5.0 および (b) pH = 7.4 における、攻撃リポソーム 4460-075 によって誘発される治療リポソームからのオキサリプラチンの放出を示す。

【0011】

【図 2】図 2 は、(a) pH = 7.4 および (b) pH = 5 における、様々な量の攻撃リポソーム 4460-075 によって誘発される治療リポソームからのシスプラチンの放出を示す。

【0012】

【図 3】図 3 は、pH = 7.4 における、攻撃リポソームパート B (4460-075) を加えることによる治療リポソームパート A (4460-090) からの 5-カルボキシフルオレセイン (5-CF) の放出を示す。

【0013】

【図 4】図 4 は、リポソームパート B (4460-075) と混合することによるリポソームパート A (4460-077) からの 5-CF の放出を示す。

【0014】

【図 5】図 5 は、pH = 7.4 における、リポソームパート B (4460-075) と混合することによるリポソームパート A (4386-143) からの 5-CF の放出を示す。

。

【0015】

【図 6】図 6 は、pH = 7.4 における、リポソームパート B (4460-084) と混合することによるリポソームパート A (4460-090) からの 5-CF の放出を示す。

。

【0016】

【図 7】図 7 は、pH = 7.4 における、リポソームパート B (4460-084) と混合することによるリポソームパート A (4460-077) からの 5-CF の放出を示す。

。

【0017】

【図 8】図 8 は、pH = 7.4 における、リポソームパート B (4384-086) と混

10

20

30

40

50

合することによるリポソームパートA (4 4 6 0 - 0 9 0) からの5 - C F の放出を示す。

【 0 0 1 8 】

【 図 9 】 図 9 は、p H = 7 . 4 における、リポソームパートB (4 3 8 4 - 0 8 6) と混合することによるリポソームパートA (4 4 6 0 - 0 7 7) からの5 - C F の放出を示す。

【 0 0 1 9 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、p H = 5 . 0 における、リポソームパートB (4 4 6 0 - 0 7 5) と混合することによるリポソームパートA (4 4 6 0 - 0 9 0) からの5 - C F の放出を示す。

10

【 0 0 2 0 】

【 図 1 1 】 図 1 1 は、p H = 7 . 4 および p H = 5 . 0 における、攻撃リポソーム 4 4 6 0 - 1 0 4 を加えることによるリポソーム (N L I C O V 0 0 3 F - 0 2) からのオキサリプラチンの放出を示す。

【 0 0 2 1 】

【 図 1 2 】 図 1 2 は、(a) p H = 5 . 0 および (b) p H = 7 . 4 における、攻撃リポソーム (4 4 6 0 - 1 0 4) を加えることによる治療リポソーム (N L I 4 4 8 1 1 0 1) からのシスプラチンの放出を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 2 】

20

(発明の詳細な説明)

I . 概要

本発明は、薬物または他の剤を被験体に送達するための多脂質組成物の使用に関する。本発明の方法は、治療リポソームおよび攻撃剤を含む個別の脂質組成物を投与することを含む。治療リポソームは、治療剤および/または他の剤(例えば、診断剤)を含有するリポソーム成分である。攻撃剤は、治療リポソームからのカーゴの放出を増加させることができる誘発剤を含有する脂質ナノ粒子(リポソーム、ミセル、またはこれらの混合物)である。本文脈では、用語「攻撃剤」および「誘発剤を含有する脂質ナノ粒子」は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、治療リポソームおよび攻撃剤は、まとめて「デュアルソーム(d u a l s o m e)」と称される。2つの成分を個別に保管することができ、治療リポソームのカーゴを制御送達するために、治療リポソームの投与後に攻撃剤を投与することができる。本発明の方法は、2つの工程: 1) 治療リポソームを投与すること、および2) 攻撃剤を投与して、治療リポソームからの薬物の放出を、攻撃剤の非存在下における放出と比べて増加させることを含む。本発明の方法は、治療リポソームが被験体内の標的部位に到達する前に、剤が治療リポソームから早期に放出されるのを防止することができる。前記方法は、単一リポソーム調製物を薬物送達に使用することの現状のジレンマを克服し、したがって、治療有効性および安全性ならびに患者コンプライアンスを改善する。

30

【 0 0 2 3 】

I I . 定義

40

本明細書において使用される場合、用語「送達」および「送達すること」は、本発明の方法を使用して、治療剤を被験体に運搬することを指す。送達は、被験体内の特定の位置、例えば、特定の種類の組織、器官または細胞に局限したものでよい。

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用される場合、用語「治療剤」は、有効量で存在する場合、それを必要とする被験体に所望の治療効果を生じさせる化合物または分子を指す。本発明は、本明細書においてさらに記載されるように、広範囲にわたる治療剤、ならびにリポソーム組成物と併せたこれらの使用を意図する。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用される場合、用語「被験体」は、寿命の任意の段階における任意

50

の哺乳動物、特にヒトを指す。

【0026】

本明細書において使用される場合、用語「投与する」、「投与された」、または「投与すること」は、本発明のリポソーム組成物を投与する方法を指す。本発明のリポソーム組成物は、局所投与、非経口投与、静脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、結腸投与、直腸投与、または腹腔内投与を含む様々な方法で投与することができる。リポソーム組成物は、組成物または製剤の一部として投与することもできる。

【0027】

本明細書において使用される場合、用語「リポソーム」は、脂質二重層によって囲まれた任意の区画を包含する。リポソームという用語は、単一の脂質二重層から構成される単層ベシクルであって、一般に、約20～約400nmの範囲の直径を有する単層ベシクルを含む。リポソームはまた、一般に、1～10μmの範囲内の直径を有する多層的なものでもよい。いくつかの実施形態では、リポソームとしては、多層ベシクル(MLV)、大型単層ベシクル(LUV)、および小型単層ベシクル(SUV)を挙げることができる。

【0028】

本明細書において使用される場合、用語「ミセル」は、脂質などの両親媒性分子が、疎水性内部および親水性外部を有する粒子を形成するようにアセンブルした凝集体を指す。ミセルは、一般に、100nm未満の直径を有する球状のアセンブリであるが、ミセルの直径の範囲および様々なミセルの形状、例えば、円板状ミセルが、当技術分野において公知である。

【0029】

本明細書において使用される場合、用語「非イオン性誘発剤」は、アニオン性官能基およびカチオン性官能基を含む荷電官能基を持たない物質であって、被験体に投与すると、本発明の治療リポソームからの薬物カーゴの放出の増加を引き起こす物質を指す。非イオン性誘発剤の例としては、TPGSおよびステアリン酸ポリオキシエチレン40が挙げられる。

【0030】

本明細書において使用される場合、用語「蓄積した」は、投与後に被験体内の所定の部位に集積したリポソームであって、被験体内で全身循環することを止めたリポソームを指す。いくつかの場合、蓄積は、バイオマーカーを認識するリガンドを含むリポソームによって、特定のバイオマーカーが標的部位に結合することによるものでもよい。いくつかの場合、リポソームの蓄積は、癌組織などのある特定の組織の血管透過性および滞留性亢進特性(the enhanced permeability and retention characteristics)によるものでもよい。試験被験体のコンパートメント解析、または非侵襲技術、例えば、単光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、陽電子放出断層撮影法(PET)または核磁気共鳴イメージング(NMR/MRI)などの任意の適切な手段によって、リポソームの蓄積を評価してもよい。しかしながら、当業者であれば、被験体内における蓄積を直接測定することなく、標的部位における十分な蓄積を可能にするように、リポソームを特定の被験体に投与するタイミングを計画することができる。

【0031】

本明細書において使用される場合、用語「標的部位」は、リポソームの蓄積および活性剤の送達が望まれる位置を指す。いくつかの場合、標的部位は、特定の組織または細胞であり得、特定の病態に関連し得る。

【0032】

本明細書において使用される場合、用語「接触」は、第1のリポソームを不安定化させるか、または、封入された剤を第1のリポソームから別の方法で放出させるために、第1のリポソームと第2のリポソームとを相互作用させることを指す。

【0033】

本明細書において使用される場合、用語「放出」は、リポソーム内の活性剤がリポソーム

10

20

30

40

50

ムコアまたは脂質二重層から外部環境に移動することを指す。

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される場合、用語「脂質」は脂質分子を指し、以下に詳細に記載されるように、脂肪、ワックス、ステロイド、コレステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、カチオン性脂質またはアニオン性脂質、および誘導体化脂質などを挙げることができる。脂質は、ミセル、単層、および二重層膜を形成することができる。脂質は、リポソームに自己アセンブリすることができる。

【 0 0 3 5 】

本明細書において使用される場合、用語「モル百分率」および「mol %」は、リポソームの所定の脂質または界面活性剤成分のモル数を、すべての脂質または界面活性剤成分の総モル数で除したものを指す。特に明記しない限り、リポソームの脂質または界面活性剤成分のmol %を計算する場合、活性剤、希釈剤または他の成分の量は含めない。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される場合、用語「キット」は、本発明の方法を用いるのに必要な2つもしくは2つより多くの構成要素のセットを指す。キットは、限定されないが、本発明のリポソーム、試薬、緩衝剤、容器および/または装置を含むことができる。

【 0 0 3 7 】

本明細書において使用される場合、語句「個別に保管された」は、第1のリポソーム集団が別のリポソーム集団に接触するのを防止するリポソームの保存様式を指す。

20

【 0 0 3 8 】

III. 本発明の実施形態

一態様では、本発明は、治療剤を被験体に送達するための方法を提供する。前記方法は、a) 治療剤を含むリポソームを前記被験体に投与すること；およびb) 非イオン性誘発剤を含む脂質ナノ粒子を前記被験体に投与することを含み、それにより、前記誘発剤を投与した後の前記リポソームからの前記治療剤の放出を、前記誘発剤を投与しない場合の前記リポソームからの前記治療剤の放出と比較して増加させる。治療剤を含むリポソームは、「治療リポソーム」と称される。

【 0 0 3 9 】

本発明のリポソームは、少なくとも1つの脂質二重層によって囲まれた水性区画を含む。親水性頭部基を含む脂質が水中で分散すると、それらは、ラメラと称される二重層膜を自然発生的に形成することができる。ラメラは、脂質分子の2枚の単層シートから構成されており、その非極性（疎水性）表面は互いに向かい合っており、その極性（親水性）表面は水性媒体に面している。リポソームという用語は、単一の脂質二重層から構成される単層ベシクルであって、一般に、約20～約400nm、約50～約300nm、または約100～200nmの範囲内の直径を有する単層ベシクルを含む。リポソームはまた、一般に、あらゆる場所で2～何百もの同一中心の脂質二重層が水相の層と交互に重なった、1～10μmの範囲内の直径を有する多層的なものでよい。いくつかの実施形態では、リポソームとしては、多層ベシクル（MLV）、大型単層ベシクル（LUV）、および小型単層ベシクル（SUV）を挙げることができる。リポソームの脂質は、カチオン性、両イオン性、中性もしくはアニオン性、またはこれらの任意の混合物であり得る。

30

40

【 0 0 4 0 】

脂質ナノ粒子は、本発明の方法では「攻撃剤」を構成する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、またはこれらの混合物から選択される。ナノ粒子は、非イオン性界面活性剤であり得る非イオン性誘発剤を含有する。本発明の方法に使用するのに適切な非界面活性剤（non-surfactants）の例としては、限定されないが、エトキシ化アルキルフェノール、エトキシ化脂肪エステル、ソルピタン誘導体、およびトコフェロール誘導体などが挙げられる。

【 0 0 4 1 】

被験体への攻撃剤の投与は、治療リポソームからの治療剤の放出を増加させるのに十分

50

な任意の時点で行うことができる。いくつかの実施形態では、治療リボソームの投与後に、攻撃剤を被験体に投与する。攻撃剤の投与は、例えば、治療リボソームを投与した数分後または数時間後に行うことができる。いくつかの実施形態では、治療リボソームが被験体内の所望の標的部位に蓄積した後に（典型的には、投与後約72時間以内に）、攻撃剤を被験体に投与する。試験被験体のコンパートメント解析、または非侵襲技術、例えば、単光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）、陽電子放出断層撮影法（PET）または核磁気共鳴イメージング（NMR/MRI）などの任意の適切な手段によって、標的部位におけるリボソームの蓄積を評価してもよい。下記診断剤は、例えば、リボソームの蓄積を評価するために、治療リボソーム内への組み込みについて選択してもよい。しかしながら、当業者であれば、被験体内での蓄積を直接測定することなく、標的部位における治療リボソームの十分な蓄積を可能にするように、特定の被験体への投与のタイミングを決定することができることを認識するであろう。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、治療剤の放出は、攻撃剤が治療リボソームに接触すると誘起される。攻撃剤を任意の量で投与することによって、リボソームから放出される治療剤の量を、攻撃剤の非存在下と比較して増加させることができる。いくつかの実施形態では、攻撃剤の投与は、リボソームからの治療剤の放出を、攻撃剤なしでリボソームを投与するのと比較して少なくとも3倍増加させる。いくつかの実施形態では、攻撃剤の投与は、リボソームからの治療剤の放出を、攻撃剤なしでリボソームを投与するのと比較して少なくとも10倍増加させる。いくつかの実施形態では、攻撃剤の投与は、リボソームからの治療剤の放出を、攻撃剤なしでリボソームを投与するのと比較して少なくとも25倍増加させる。

20

【0043】

本発明では、被験体は、任意の哺乳動物であり得る。いくつかの実施形態では、被験体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、腹腔内注射によって、リボソームおよび脂質ナノ粒子を送達する。当業者であれば、他の投与様式が本発明で有用であり得ることを認識するであろう。

【0044】

リボソームおよび脂質ナノ粒子

本発明のリボソームおよび脂質ナノ粒子は、上記のように、カチオン性脂質、両イオン性脂質、中性脂質、またはアニオン性脂質を含む任意の適切な脂質を含有することができる。適切な脂質としては、脂肪、ワックス、ステロイド、コレステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、カチオン性脂質またはアニオン性脂質、および誘導体化脂質などを挙げることができる。

30

【0045】

適切なリン脂質としては、限定されないが、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジン酸（PA）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルグリセロール（PG）、ホスファチジルセリン（PS）、およびホスファチジイノシトール（PI）、ジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（DMPG）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジミリスチルホスファチジルセリン（DMPS）、ジステアロイルホスファチジルセリン（DSPS）、ジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン（POPE）、およびジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン 4 - （N - マレイミドメチル） - シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート（DOPE - mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミ

40

50

ン(DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン(DSPE)、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(phosphatidylethanolamine)(SOPe)、1,2-ジエライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(phosphoethanolamine)(トランスDOPE)、およびカルジオリピンが挙げられる。脂質抽出物、例えば、卵PC、心臓抽出物、脳抽出物、肝臓抽出物、およびダイズPCも本発明で有用である。いくつかの実施形態では、ダイズPCとしては、ヒドロダイズPC(Hydro Soy PC)(HSPC)を挙げることができる。ある特定の実施形態では、脂質としては、PEG化脂質などの誘導体化脂質を挙げることができる。誘導体化脂質としては、例えば、DSPE-PEG2000、コレステロール-PEG2000、DSPE-ポリグリセロール、または当技術分野において一般に公知の他の誘導体を挙げることができる。

10

【0046】

本発明のリポソームおよび脂質ナノ粒子は、縮合四環式ゴナン環系(fused, tetracyclic gonane ring system)の存在を特徴とするステロイドを含有してもよい。ステロイドの例としては、限定されないが、コレステロール、コール酸、プロゲステロン、コルチゾン、アルドステロン、エストラジオール、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロンが挙げられる。合成ステロイドおよびこの誘導体もまた、本発明で使用することが意図される。

20

【0047】

カチオン性脂質は、生理学的条件下で正荷電官能基を含有する。カチオン性脂質としては、限定されないが、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)、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(DOTAP)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N-[1-(2,3-ジテトラデシルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)、N-[1-(2,3,ジジオレイルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DORIE)、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)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)およびN,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン(DODMA)が挙げられる。

30

【0048】

いくつかの実施形態では、治療リポソームは、リン脂質、ステロイドおよび/またはカチオン性脂質であり得る1つもしくは複数の脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、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、ホスファチジルイノシトール、またはホスファチジン酸である。いくつかの実施形態では、ホスファチジルコリンは、DSPCである。いくつかの実施形態では、ホスファチジルグリセロールは、DSPGである。いくつかの実施形態では、ホスファチジルエタノールアミンは、DSPE-PEG(2000)である。いくつかの実施形態では、ステロイドは、コレステロールである。

40

【0049】

上記のように、「攻撃剤」を構成する脂質ナノ粒子は、第2のリポソーム、ミセル、またはこれらの混合物からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、第2のリポソームである。第2のリポソームは、「攻撃リポソーム」と称される。いくつかの実施形態では、攻撃リポソームは、リン脂質、ステロイドおよびカチオン性脂質からなる群より選択される1つもしくは複数の脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン(phosphatidylcholine)、ホスファチジルグリセロール、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

50

ァチジルイノシトール、またはホスファチジン酸である。いくつかの実施形態では、ホスファチジルコリンは、DPPCである。いくつかの実施形態では、ステロイドは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、DOTAPである。いくつかの実施形態では、非イオン性誘発剤は、TPGSである。

【0050】

脂質の任意の適切な組み合わせを、本発明のリポソームおよび脂質ナノ粒子を提供するのに使用することができる。脂質組成物は、特性、例えば、漏出速度、安定性、粒子サイズ、ゼータ電位、タンパク質結合性、*in vivo* 循環、および/または組織もしくは器官での蓄積に影響を与えるように調整することができる。例えば、DSPCおよび/またはコレステロールは、リポソームからの漏出を減少させるのに使用することができる。DSPGおよび/またはDOTAPなどの負または正に荷電した脂質は、リポソームまたは脂質ナノ粒子の表面電荷に影響を与えるように含めることができる。いくつかの実施形態では、脂質組成物は、約10種類もしくは約10種類未満の脂質、または約5種類もしくは約5種類未満の脂質、または約3種類もしくは約3種類未満の脂質を含むことができる。いくつかの実施形態では、存在する特定の種類の脂質のモル百分率(mol%)は、典型的には、リポソームまたは脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の約0%~約10%、約10%~約30%、約30%~約50%、約50%~約70%、約70%~約90%、約90%~100%を含む。いくつかの実施形態では、治療リポソームは、40~80mol%のDSPC、5~50mol%のコレステロール、0~30mol%のDSPG、および0~10mol%のDSPE-PEG(2000)を含む。いくつかの実施形態では、攻撃リポソームは、40~70mol%のDPPC、5~20mol%のコレステロール、0~20mol%のDOTAP、および20~40mol%のTPGSを含む。

【0051】

本発明の脂質ナノ粒子は、非イオン性界面活性剤を含む界面活性剤を含有することができる。これらのいくつかは誘発剤として作用して、治療リポソームのカーゴの放出を促進することができる。非イオン性界面活性剤の例としては、限定されないが、エトキシ化アルキルフェノール、エトキシ化脂肪エステル、ソルビタン誘導体、およびトコフェロール誘導体が挙げられる。本発明で使用することが意図される界面活性剤としては、D-α-トコフェロールポリエチレングリコールスクシネート(TPGS)が挙げられ、様々なポリエチレングリコールサイズを有するものが利用可能である。いくつかの実施形態では、TPGSのポリエチレングリコールの分子量範囲は、400~5000である。さらに他の実施形態では、TPGSのポリエチレングリコールの分子量範囲は、800~2000である。さらなる他の実施形態では、TPGSのポリエチレングリコールの分子量範囲は、800~1500である。1つの特に有用なTPGSは、D-α-トコフェロールポリエチレングリコールスクシネートの総分子量が約1543であるTPGS(1000)である。本明細書において使用される場合、用語「TPGS」は、異なるサイズ/重量が与えられない限り、TPGS(1000)を指す。他の有用な非イオン性界面活性剤としては、ポリエチレングリコールp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル、ポリオキシエチレン(2)イソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(150)ジノニルフェニルエーテル、ドデカン酸2,3-ジヒドロキシプロピルエステル、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、およびポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエートなどが挙げられる。

【0052】

当業者であれば、所定の用途により必要とされる場合、脂質組成を調整して、リポソームの放出特性または他の特徴を調節してもよいことを認識するであろう。

【0053】

治療剤

本発明の治療リポソームは、ナノ担体中の、ナノ担体上のまたはナノ担体周囲のあらゆる場所に存在する1つもしくは複数の治療剤を含む。例えば、治療剤は、リポソームの脂

10

20

30

40

50

質二重層内に包埋されているか、リポソームの水性コア内に封入されているか、またはリポソームの外部に係留されている。本発明に使用される治療剤（一種または複数種）としては、被験体における状態を処置することを目的とする任意の剤を挙げることができる。一般に、限定されないが、United States Pharmacopeia (U.S.P.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 8th ed., September 21, 2000; Physician's Desk Reference (Thomson Publishing; および/または The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group; または、動物の場合には、The Merck Veterinary Manual, 9th ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005 (これらの文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる) に列挙されている剤を含む、当技術分野において公知の任意の治療剤を使用することができる。

【0054】

治療剤は、処置されることが所望される疾患の種類に応じて選択することができる。例えば、ある特定の種類のがんまたは腫瘍、例えば、癌、肉腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、および中枢神経系がん、ならびに固形腫瘍および混合腫瘍は、同じまたは場合により異なる治療剤の投与を伴い得る。ある特定の実施形態では、被験体におけるがん状態を処置するかまたは該がん状態に影響を与えるように治療剤を送達することができ、治療剤としては、化学療法剤、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および他の抗がん剤を挙げることができる。いくつかの実施形態では、上記剤としては、アンチセンス剤、マイクロRNA剤、siRNA剤および/または shRNA 剤を挙げることができる。

【0055】

治療剤としては、限定されないが、アバスチン、ドキシソルピシン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン (gemcitabine)、またはタキサン、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む抗がん剤または細胞傷害剤を挙げることができる。さらなる抗がん剤としては、限定されないが、20-epi-1, 25ジヒドロキシビタミンD₃, 4-イボメアノール、5-エチニルウラシル、9-ジヒドロタキソール、アビラテロン、アシピシン、アクラルピシン、アコダゾール塩酸塩、アクロニン、アシルフルベン、アデシペノール、アドゼレシン、アルデスロイキン、全ての -tk アンタゴニスト、アルトレタミン、アンバムスチン、アンボマイシン、酢酸アメタントロン、アミドックス (amidox)、アミホスチン、アミノグルテチミド、アミノレブリン酸、アムルピシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホリド、新脈管形成阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス (antarelix)、アントラマイシン、; 抗背側形態形成タンパク質-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1)、抗エストロゲン剤、アンチネオプラストン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アフィディコリングリシネート、アボトーシス遺伝子モジュレーター、アボトーシス制御因子、アプリン酸、ARA-CDP-DL-PTBA、アルギニンデアミナーゼ、アスバラギナーゼ、アスペルリン、アスラクリン、アタメスタン、アトリムスチン、アキシナスタチン1、アキシナスタチン2、アキシナスタチン3、アザシチジン、アザセトロン、アザトキシン、アザチロシン、アゼテバ、アゾトマイシン、バッカチンIII誘導体、パラノール、パチマスタット、ベンゾクロリン、ベンゾデバ、ベンゾイルスタウロスポリン、ベータラクタム誘導体、-アレチン、ベタクラマイシンB、ベツリン酸、BFGF 阻害剤、ピカルタミド、ピサントレン、ピサントレン塩酸塩、ビスアジリジニルス

ペルミン、ビスナフィド、ジメシル酸ビスナフィド、ビストラテンA、ビゼレシン、プレ
 オマイシン、硫酸プレオマイシン、BRC / ABLアンタゴニスト、プレフレート、プレ
 キナルナトリウム、プロピリミン、ブドチタン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシ
 ミン、カクチノマイシン、カルシポトリオール、カルホスチンC、カルステロン、カンブ
 トテシン誘導体、カナリアボックスIL - 2、カペシタビン、カラセミド、カルベチマー
 、カルボプラチン、カルボキサミド - アミノ - トリアゾール、カルボキシアミドトリアゾ
 ール、カレストM3、カルムスチン、cam700、軟骨由来阻害因子、カルピシン塩酸
 塩、カルゼレシン、カゼインキナーゼ阻害剤、カスタノスペルミン、セクロピンB、セデ
 フィンゴール、セトロレリクス、クロラムブシル、クロリン、クロロキノキサリンスルホ
 ンアミド、シカプロスト、シロレマイシン、シスプラチン、cis - ボルフィリン、クラ
 ドリピン、クロミフェン類似体、クロトリマゾール、コリスマイシンA、コリスマイシン
 B、コンブレタスタチンA4、コンブレタスタチン類似体、コナゲニン、クランベシジン
 816 (crambescidin 816)、クリスナトール、メシル酸クリスナトール、クリプトフィ
 シン8、クリプトフィシンA誘導体、キュラシンA、シクロペンタアン
 トラキノン、シクロホスファミド、シクロプラタム、シペマイシン、シタラビン、シタ
 ラビンオクホスフェート、細胞溶解因子、シトスタチン、ダカルバジン、ダクリキシマブ、
 ダクチノマイシン、ダウノルビシン塩酸塩、デシタビン、デヒドロジデムニンB、デスロ
 レリン、デキシホスファミド、デキソルマプラチン、デクスラゾキサン、デクスベラパミ
 ル、デザグアニン、メシル酸デザグアニン、ジアジコン、ジデムニンB、ジドックス、ジ
 エチルノルスペルミン、ジヒドロ - 5 - アザシチジン、ジオキサマイシン、ジフェニルス
 ピロムスチン、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、ドキシフルリジン、ドキシ
 ルビシン、ドキシルビシン塩酸塩、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロ
 ピオン酸ドロモスタノロン、ドロナビノール、ズアゾマイシン (duazomycin)
 、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコムスチン、エダトレキサート、エデルホシ
 ン、エドレコロマブ、エフロミチン、塩酸エフロミチン、エレメン、エルサミトルシン、
 エミテフル、エンロプラチン、エンプロメート、エピプロピジン、エピルビシン、エピ
 ルビシン塩酸塩、エプリステリド、エルプロゾール、赤血球遺伝子療法ベクターシステム
 、塩酸エソルビシン、エストラムスチン、エストラムスチン類似体、リン酸エストラムス
 チンナトリウム、エストロゲンアゴニスト、エストロゲンアンタゴニスト、エタニダゾール
 、エトボシド、リン酸エトボシド、エトプリン、エキセメスタン、ファドロゾール、塩
 酸ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリド
 、フラボピリドール、フレゼラスチン、フロクスウリジン、フルアステロン、フルダラビ
 ン、リン酸フルダラビン、塩酸フルオロダウノルニシン、フルオロウラシル、フルオロシ
 タビン、ホルフェニメクス、フォルメスタン、ホスキドン、ホストリエシン、ホストリエ
 シンナトリウム、ホテムスチン、ガドリニウムテキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタ
 ビン、ガニレリクス、ゼラチナーゼ阻害剤、ゲムシタビン、塩酸ゲムシタビン、グルタチ
 オン阻害剤、ヘプスルファム、ヘレグリン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ヒドロキ
 シウレア、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルビシン、塩酸イダルビシン、イドキシフ
 ェン、イドラマントン、イホスファミド、イルモホシン、イロマスタット、イミダゾアク
 リドン、イミキモド、免疫賦活ペプチド、インスリン様増殖因子 - 1 受容体阻害剤、イン
 ターフェロンアゴニスト、インターフェロンアルファ - 2 A、インターフェロンアルファ
 - 2 B、インターフェロンアルファ - N1、インターフェロンアルファ - N3、インター
 フェロンベータ - I A、インターフェロンガンマ - I B、インターフェロン、インターロ
 イキン、イオベングアン、ヨードドキシルビシン、イプロプラチン、イリノテカン、塩酸
 イリノテカン、イロプラクト、イルソグラジン、イソベンガゾール、イソホモハリコンド
 リンB、イタセトロン、ジャスプラキノリド、カハラリドF、ラメラリン - Nトリアセテ
 ート、ランレオチド、酢酸ランレオチド、レイナマイシン、レノグラスチム、硫酸レンチ
 ナン、レプトルスタチン、レトロゾール、白血病抑制因子、白血球アルファインターフェ
 ロン、酢酸ロイプロリド、ロイプロリド / エストロゲン / プロゲステロン、リユープロレ
 リン、レバミゾール、リアロゾール、塩酸リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油性

10

20

30

40

50

二糖ペプチド、親油性白金化合物、リッソクリナミド7 (l i s s o c l i n a m i d e 7)、ロバプラチン、ロンブリシン (l o m b r i c i n e)、ロメトレキソール、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、ロニダミン、ロソキサントロン、塩酸ロソキサントロン、ロバスタチン、ロキソリピン、ルルトテカン (l u r t o t e c a n)、ルテチウムテキサフィリン、リソフィリン、溶解性ペプチド、メイタンシン (m a i t a n s i n e)、マンノスタチンA、マリマスタット、マソプロコール、マスピン、マトリライシン阻害剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルバロン、メルカプトプリン、メテレリン、メチオニナーゼ、メトトレキセート、メトトレキセートナトリウム、メトクロブラミド、メトプリン、メツレデバ、微細藻類プロテインキナーゼC阻害剤、M I F阻害剤、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマッチ二本鎖RNA、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリリン、ミトグアゾン、ミトラクトール、ミトマルシン、マイトマイシン、マイトマイシン類似体、ミトナフィド、ミトスベル、ミトタン、マイトトキシシン線維芽細胞増殖因子 - サボリン、ミトキサントロン、塩酸ミトキサントロン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、モノホスホリル脂質a / ミオバクテリウム細胞壁SK、モビダモール、多剤耐性遺伝子阻害剤、多発性腫瘍抑制因子1に基づく療法、マスタード抗がん剤、ミカペルオキシドB、マイコバクテリア細胞壁抽出物、ミコフェノール酸、ミリアボロン、n - アセチルジナリン、ナファレリン、ナグレスチブ、ナロキソン / ペンタゾシン、ナパピン、ナフテルピン、ナルトグラスチム、ネダブラチン、ネモルピシン、ネリドロロン酸、中性エンドペプチダーゼ、ニルタミド、ニサマイシン、一酸化窒素モジュレーター、窒素酸化物抗酸化剤、ニトルリン、ノコダゾール、ノガラマイシン、n - 置換ベンズアミド、06 - ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オンダンセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘導物質、オルマブラチン、オサテロン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン、オキシスラン、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導体、バラウアミン、パルミトイルリゾキシシン、パミドロロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン、パゼリプチン、ペグアスパラガーゼ、ペルデシン、ペリオマイシン、ペントムスチン、ペントサンボリサルフェートナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール、硫酸ペプロマイシン、ペルフルブロン、ペルホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン、フェニルアセテート、ホスファターゼ阻害剤、ピシバニール、塩酸ピロカルピン、ピボプロマン、ピボスルファン、ピラルピシン、ピリトレキシム、塩酸ピロキサントロン、プラセチンA、プラセチンB、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター、白金錯体、白金化合物、白金 - トリアミン錯体、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、プロピルビス - アクリドン、プロスタグランジンJ2、前立腺癌抗アンドロゲン剤、プロテアソーム阻害剤、プロテインAに基づく免疫モジュレーター、プロテインキナーゼC阻害剤、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、プルプリン、ピラゾフリリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート、RAFアンタゴニスト、ラルチトレキセド、ラモセトロン、RASファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、RAS阻害剤、RAS - GAP阻害剤、脱メチル化レチリプチン、レニウムRE186エチドロネート、リゾキシシン、リボプリン、リボザイム、RIIレチナミド、RNAi、ログレチミド、ロヒツキン、ロムルチド、ロキニメクス、ルビギノンB1、ルボキシル、サフィンゴール、塩酸サフィンゴール、サイントピン、s a r c n u、サルコフィトールA、サルグラモスチム、SDI1模倣体、セムスチン、老化由来阻害因子1 (s e n e s c e n c e d e r i v e d i n h i b i t o r 1)、センスオリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、シムトラゼン、単鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン (s i z o f u r a n)、ソブゾキサン、ボロカプテイトナトリウム、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール、ソマトメジン結合タンパク質、ソネル

10

20

30

40

50

ミン、スパルホス酸ナトリウム、スパルホス酸、スパルソマイシン、スピカマイシンD、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、スプレノペンチン、スポンギスタチン1、スクアラミン、幹細胞阻害剤、幹細胞分裂阻害剤、スチピアミド、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ストロメライシン阻害剤、スルフィノシン、スロフェヌル、超活性血管作用性腸ペプチドアンタゴニスト、スラジスタ、スラミン、スワインソニン、合成グリコサミノグリカン、タリソマイシン、タリムスチン、タモキシフェンメチオ

ジド、タウロムスチン、タザロテン、テコガランナトリウム、テガフル、テルラピリリウム、テロメラーゼ阻害剤、塩酸テロキサントロン、テモボルフィン、テモゾロミド、テニボシド、テロキシロン、テストラクトン、テトラクロロデカオキシド、テトラゾミン、タリブラスチン、サリドマイド、チアミプリン、チオコラリン、チオグアニン、チオテバ、トロンボボエチン、トロンボボエチン模倣体、チマルファシン、サイモボエチン受容体アゴニスト、チモトリナン、甲状腺刺激ホルモン、チアゾフリン、スズエチルエチオブルプリン、チラパザミン、二塩化チタノセン、塩酸トボテカン、トブセンチン、トレミフェン、クエン酸トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、酢酸トレストロン、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリピン、リン酸トリシリピン、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメトレキセート、トリプトレリン、トロピセトロン、塩酸ツプロゾール、ツロステリド、チロシンキナーゼ阻害剤、チロホスチン (tyrphostin)、UBC阻害剤、ウベニメクス、ウラシルマスタード、ウレデパ、尿生殖洞由来増殖阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、パブレオチド、パリオリンB、ベラレソール、ベラミン、ベルジン、ベルテボルフィン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ピネピジン、硫酸ピングリシネート、硫酸ピンロイロシン、ピノレルピン、酒石酸ピノレルピン、硫酸ピンロシジン、ピンキサルチン、硫酸ピンゾリジン、ピタキシン、ボロゾール、ザノテロン、ゼニプラチン、ジラスコルブ、ジノスタチン、ジノスタチンスチマラマー、またはゾルピシン塩酸塩を挙げることができる。

【0056】

いくつかの実施形態では、治療剤は、2つもしくは2つより多くの治療剤の投与を含む剤カクテルの一部であり得る。例えば、シスプラチンおよびオキサリプラチンの両方を有するリポソームを投与することができる。加えて、治療剤は、免疫刺激アジュバント、例えば、アルミニウムゲルもしくはアルミニウム塩のアジュバント（例えば、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）、リン酸カルシウム、エンドトキシン、およびトール様受容体アジュバントなどの前、それらの後、またはそれらとともに送達することができる。

【0057】

本発明の治療剤は、治療用途に使用するための放射性核種も含むことができる。例えば、 ^{111}In などのオージェ電子のエミッターを、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) または 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロデカン - 1, 4, 7, 10 - 四酢酸 (DOTA) などのキレートと結合させて、処置に使用するべきリポソームに含めることができる。他の適切な放射性核種および/または放射性核種 - キレートの結合としては、限定されないが、ベータ放射性核種 (^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 $^{88/90}\text{Y}$) と DOTA、 ^{64}Cu - TETA、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ - IDA; $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})$ トリアミン (環状または直鎖状)、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ - Enpy 2、および $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ - DTPA を挙げることができる。

【0058】

本発明のいくつかの実施形態では、治療剤は、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ゲムシタピン、5 - フルオロウラシル、ドキソルピシン、およびタキサンであり得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、シスプラチンまたはオキサリプラチンである。

【0059】

10

20

30

40

50

治療剤の充填は、例えば、以下の参考文献：de Villiers, M. Mら、Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes, CRC Press (2006)に開示されている当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の治療剤をリポソームに充填することができる。リポソームの充填は、例えば、能動的または受動的に行うことができる。例えば、治療剤がリポソーム内に封入されるように、溶液中でのリポソームの自己組織化プロセスの間に治療剤を含めることができる。ある特定の実施形態では、治療剤は、リポソーム二重層に、または多重膜リポソームの複数の層内に包埋することもできる。代替の実施形態では、治療剤は、リポソームに能動的に充填することができる。例えば、治療剤を含有する溶液に対して二重層膜を透過性にするような条件（例えば、エレクトロポレーション）にリポソームを曝露し、それにより、治療剤がリポソームの内部体積に入ることを可能にすることができる。

10

【0060】

診断剤

本発明の治療リポソームはまた、診断剤を含んでもよい。本発明に使用される診断剤は、例えば、以下の参考文献：Armstrongら、Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing (2004); Torchilin, V. P., Ed., Targeted Delivery of Imaging Agents, CRC Press (1995); Vallabhajosula, S., Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, Springer (2009)に示されている当技術分野において公知の任意の診断剤を挙げることができる。診断剤は、限定されないが、放射シグナル、放射性シグナル、エコー源性シグナル、光学シグナル、蛍光シグナル、吸収シグナル、磁気シグナル、または断層撮影シグナルを含む検出可能なシグナルを提供および/または増強する剤を含む様々な方法によって検出することができる。診断剤をイメージングするための技術としては、限定されないが、単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）、磁気共鳴イメージング（MRI）、光学的イメージング、ポジトロン放出断層撮影（PET）、コンピュータ断層撮影（CT）、X線イメージング、および線イメージングなどを挙げることができる。

20

30

【0061】

いくつかの実施形態では、診断剤は、様々な画像診断技術に使用される金属イオンに結合するキレーターを含むことができる。例示的なキレーターとしては、限定されないが、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、[4-（1,4,8,11-テトラアザシクロデカ-1-イル）メチル]安息香酸（CPTA）、シクロヘキサンジアミン四酢酸（CDTA）、エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）四酢酸（EGTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、クエン酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸（HEDTA）、イミノ二酢酸（IDA）、トリエチレントetraアミン六酢酸（TTHA）、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ（メチレンホスホン酸）（DOTP）、1,4,8,11-テトラアザシクロドデカン-1,4,8,11-四酢酸（TETA）、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）、およびこれらの誘導体が挙げられる。

40

【0062】

放射性同位体は、本明細書において記載される診断剤のいくつかに組み込むことができ、放射性同位体としては、線、ポジトロン、粒子および粒子、ならびにX線を放出する放射性核種を挙げることができる。適切な放射性核種としては、限定されないが、²²⁵Ac、⁷²As、²¹¹At、¹¹B、¹²⁸Ba、²¹²Bi、⁷⁵Br、⁷⁷Br、¹⁴C、¹⁰⁹Cd、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁸F、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga

50

、³H、¹²³I、¹²⁵I、¹³⁰I、¹³¹I、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹³N、¹⁵O、³²P、³³P、²¹²Pb、¹⁰³Pd、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁴⁷Sc、¹⁵³Sm、⁸⁹Sr、^{99m}Tc、⁸⁸Yおよび⁹⁰Yが挙げられる。ある特定の実施形態では、放射性作用物質としては、¹¹¹In-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-ENPy2、⁶²/⁶⁴/⁶⁷Cu-TETA、^{99m}Tc(CO)₃-IDA、および^{99m}Tc(CO)₃トリアミン(環状または直鎖状)を挙げることができる。他の実施形態では、作用物質としては、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁵³Sm、⁸⁸/⁹⁰Y、⁶²/⁶⁴/⁶⁷Cu、または⁶⁷/⁶⁸Gaを含むDOTAおよびその種々の類似体を挙げることができる。いくつかの実施形態では、リポソームは、例えば、以下の参考文献：Phillipsら、Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(1): 69-83 (2008); Torchilin, V. P. & Weissig, V., Eds. Liposomes 2nd Ed.: Oxford Univ. Press (2003); Elbayoumi, T. A. & Torchilin, V. P., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33: 1196-1205 (2006); Mougín-Degraef, Mら、Int'l J. Pharmaceutics 344: 110-117 (2007)に示されているようなキレートに結合した脂質、例えばDTPA-脂質を組み込むことによって放射標識することができる。

【0063】

他の実施形態では、診断剤としては、光学剤、例えば、蛍光剤、リン光剤、および化学発光剤などを挙げることができる。多数の剤(例えば、色素、プローブ、標識、または指示薬)が当技術分野において公知であり、本発明に使用することができる。(例えば、Invitrogen, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition (2005)を参照のこと)。蛍光剤としては、様々な有機および/もしくは無機の低分子、または様々な蛍光タンパク質、およびこれらの誘導体を挙げることができる。例えば、蛍光剤としては、限定されないが、シアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、インドシアニン、ローダミン、フェノキサジン、フェニルキサンテン、フェノチアジン、フェノセレンジン、フルオレセイン、ベンゾポルフィリン、スクアライン、ジピロロピリミドン、テトラセン、キノリン、ピラジン、コリン、クロコニウム、アクリドン、フェナントリジン、ローダミン、アクリジン、アントラキノ、カルコゲノピリリウム類似体、クロリン、ナフタロシアニン、メチン色素、インドレニウム色素、アゾ化合物、アズレン、アザアズレン、トリフェニルメタン色素、インドール、ベンゾインドール、インドカルボシアニン、ベンゾインドカルボシアニン、および4,4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンの一般構造を有するBODIPY(商標)誘導体、ならびに/またはこれらの任意のコンジュゲートおよび/もしくは誘導体を挙げることができる。使用され得る他の剤としては、限定されないが、例えば、フルオレセイン、フルオレセイン-ポリアスパラギン酸コンジュゲート、フルオレセイン-ポリグルタミン酸コンジュゲート、フルオレセイン-ポリアルギニンコンジュゲート、インドシアニングリーン、インドシアニン-ドデカアスパラギン酸コンジュゲート、インドシアニン-ポリアスパラギン酸コンジュゲート、イソスルファンブルー、インドールジスルホネート、ベンゾインドールジスルホネート、ビス(エチルカルボキシメチル)インドシアニン、ビス(ペンチルカルボキシメチル)インドシアニン、ポリヒドロキシインドールスルホネート、ポリヒドロキシベンゾインドールスルホネート、リジッドヘテロ原子インドールスルホネート(rigid heteroatomic indole sulfonate)、インドシアニンビスプロパン酸、インドシアニンビスヘキサ酸、3,6-ジシアノ-2,5-[(N,N,N',N'-テトラキス(カルボキシメチル)アミノ)ピラジン、3,6-[(N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシエチル)アミノ)ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス(N-アザテジノ)ピラジン-2,

10

20

30

40

50

5 - ジカルボン酸、3, 6 - ビス (N - モルホリノ) ピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸、3, 6 - ビス (N - ピペラジノ) ピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸、3, 6 - ビス (N - チオモルホリノ) ピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸、3, 6 - ビス (N - チオモルホリノ) ピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸 S - オキシド、2, 5 - ジシアノ - 3, 6 - ビス (N - チオモルホリノ) ピラジン S, S - ジオキシド、インドカルボシアニンテトラスルホネート、クロロインドカルボシアニン、および 3, 6 - ジアミノピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸が挙げられる。

【0064】

当業者であれば、使用される特定の光学剤が、励起に使用される波長、皮膚組織下の深さ、当技術分野において一般に周知の他の要因に依存し得ることを認識する。例えば、光学剤についての最適な吸収極大または、励起極大は、使用される剤に応じて変化し得るが、一般に、本発明の光学剤は、電磁スペクトルの紫外 (UV)、可視、または赤外 (IR) 範囲の光を吸収するか、またはこれらの光によって励起される。イメージングについては、近 IR で吸収および放出する色素 (約 700 ~ 900 nm、例えば、インドシアニン) が好ましい。内視鏡的方法を使用する局所視覚化については、可視範囲で吸収する任意の色素が適切である。

【0065】

いくつかの実施形態では、本発明のプロセスにおいて使用される非イオン化放射線は、約 350 nm ~ 約 1200 nm の波長の範囲であり得る。例示的な一実施形態では、蛍光剤は、電磁スペクトルの可視部分の青色範囲の波長 (約 430 nm ~ 約 500 nm) を有する光によって励起することができ、電磁スペクトルの可視部分の緑色範囲の波長 (約 520 nm ~ 約 565 nm) で発光する。例えば、フルオレセイン色素は、約 488 nm の波長を有する光で励起することができ、約 520 nm の発光波長を有する。別の例として、3, 6 - ジアミノピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸は、約 470 nm の波長を有する光で励起することができ、約 532 nm の波長で蛍光を発する。別の実施形態では、光学剤の励起波長および発光波長は、電磁スペクトルの近赤外範囲に入り得る。例えば、インドシアニングリーンなどのインドシアニン色素は、約 780 nm の波長を有する光で励起することができ、約 830 nm の発光波長を有する。

【0066】

さらに他の実施形態では、診断剤は、限定されないが、例えば、ヨウ素に基づく X 線造影剤、超常磁性酸化鉄 (SPIO)、およびガドリニウムまたはマンガンの錯体などを含む当技術分野において一般に周知の磁気共鳴 (MR) 造影剤および X 線造影剤を含むことができる。(例えば、Armstrongら、Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing (2004) を参照のこと)。いくつかの実施形態では、診断剤は、磁気共鳴 (MR) イメージング剤を含むことができる。例示的な磁気共鳴剤としては、限定されないが、常磁性剤、および超常磁性剤などが挙げられる。例示的な常磁性剤としては、限定されないが、ガドペンテト酸、ガドテル酸、ガドジアミド、ガドリニウム、ガドテリドール、マンガホジビル、ガドベルセタミド、クエン酸第二鉄アンモニウム、ガドペン酸、ガドブトロール、またはガドキセト酸を挙げることができる。超常磁性剤としては、限定されないが、超常磁性酸化鉄およびフェリステンを挙げることができる。ある特定の実施形態では、診断剤は、例えば、以下の参考文献: H. S. Thomsen, R. N. Muller and R. F. Mattrey, Eds., Trends in Contrast Media, (Berlin: Springer-Verlag, 1999); P. Dawson, D. Cosgrove and R. Grainger, Eds., Textbook of Contrast Media (ISIS Medical Media 1999); Torchilin, V. P., Curr. Pharm. Biotech. 1: 183 - 215 (2000); Bogdanov, A. A., Adv. Drug Del. Rev. 37: 279 - 293 (1999); Sachse, A., Investigative Radiology 32 (1): 44 - 50 (1997) に提供されている X 線造影剤を挙げる

10

20

30

40

50

ことができる。X線造影剤の例としては、限定されないが、イオパミドール、イオメブロール、イオヘキソール、イオペンツール、イオプロミド、イオシミド、イオベルソール、イオトロラン、イオタスル、イオジキサノール、イオデシモール、イオグルカミド、イオグルニド、イオグラミド、イオサルコール、イオキシラン、イオパミロン、メトリザミド、イオビトリドール、およびイオシメノールが挙げられる。ある特定の実施形態では、X線造影剤としては、イオパミドール、イオメブロール、イオプロミド、イオヘキソール、イオペンツール、イオベルソール、イオビトリドール、イオジキサノール、イオトロラン、およびイオシメノールを挙げることができる。

【0067】

上記治療剤と同じように、診断剤は、例えば、リポソーム内に包埋または封入されることを含む様々な方法で治療リポソームに付随させることができる。同様に、診断剤の充填を、例えば、以下の参考文献：de Villiers, M. M^a, Eds., *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., *Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes*, CRC Press (2006)に開示されている当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。

【0068】

製剤化および投与

いくつかの実施形態では、本発明は、リポソーム組成物および生理学的に（すなわち、薬学的に）許容され得る担体を含むことができる。本明細書において使用される場合、用語「担体」は、治療剤などの薬物用の希釈剤またはビヒクルとして使用される典型的には不活性の物質を指す。この用語は、組成物に凝集性の品質を付与する典型的には不活性の物質も包含する。典型的には、生理学的に許容され得る担体は、液体形態で存在する。液体担体の例としては、生理食塩水、リン酸塩緩衝液、規定緩衝食塩水（135～150 mMのNaCl）、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン、および安定性の増強を提供する糖タンパク質（例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど）などが挙げられる。生理学的に許容され得る担体は、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法によって部分的には決定されるので、本発明の医薬組成物の多種多様な適切な製剤が存在する（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照のこと）。

【0069】

本発明の組成物は、慣例的な周知の滅菌技術によって滅菌してもよい、あるいは、滅菌条件下で生産されてもよい。水溶液は、使用のためにパッケージに入れられてもよく、無菌条件下でろ過され、凍結乾燥されてもよく、その凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌水溶液と合わされる。組成物は、生理的条件に近づくために、必要に応じて薬学的に許容され得る補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、張性調整剤、および湿潤剤など、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、モノラウリン酸ソルビタン、およびオレイン酸トリエタノールアミンを含有することができる。凍結乾燥リポソーム組成物用の安定剤などの糖も、組成物を安定化させるために含めることができる。

【0070】

選択されたりリポソーム組成物は、単独でまたは他の適切な成分と組み合わせて、吸入によって投与されるエアロゾル製剤（すなわち、これらは、「噴霧する」ことができる）にすることができる。エアロゾル製剤は、加圧された許容され得る噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、および窒素などの中に入れることができる。

【0071】

直腸投与に適切な製剤としては、例えば、坐剤基剤とともに有効量の、パッケージに入れられたリポソーム組成物を含む坐剤が挙げられる。適切な坐剤基剤としては、天然また

10

20

30

40

50

は合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が挙げられる。加えて、選択されたりリポソーム組成物と、例えば、液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、およびパラフィン炭化水素を含む基剤との組み合わせを含有するゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。

【0072】

例えば、関節内（関節中）経路、静脈内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路、腹腔内経路、ならびに皮下経路などによる非経口投与に適切な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および意図されたレシピエントの血液と製剤とを等浸透圧にする溶質を含有することができる水性および非水性の等張性滅菌注射液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性および非水性滅菌懸濁液を包含する。注射液剤および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤からも調製することができる。本発明の実施において、組成物は、例えば、静脈内注入によって、局所投与、腹腔内投与、嚢内投与、または髄腔内投与とすることができる。非経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である。リポソーム組成物の製剤は、単位用量または複数回用量の密閉容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提供され得る。

10

【0073】

医薬調製物は、好ましくは、単位剤形である。このような形態では、調製物は、適切な量の活性成分、例えば、リポソーム組成物を含有する単位用量にさらに小分けされる。単位剤形は、パッケージに入れられた調製物であってよく、パッケージは、別個の量の調製物を含有する。組成物は、所望により、他の適合性治療剤も含有することができる。

20

【0074】

癌を処置するための治療用途において、本発明の医薬組成物に用いられる治療剤および/または診断剤を含むリポソーム組成物は、一日当たり約0.001mg/kg～約1000mg/kgの初期投与量で投与することができる。約0.01mg/kg～約500mg/kg、または約0.1mg/kg～約200mg/kg、または約1mg/kg～約100mg/kg、または約10mg/kg～約50mg/kgの一日量範囲を使用することができる。しかしながら、投与量は、患者の要求事項、処置される状態の重症度、および使用されるリポソーム組成物に応じて変更することができる。例えば、投与量は、特定の患者において診断された癌の種類および期を考慮して経験的に決定することができる。患者に投与される用量は、本発明との関連において、経時的に患者における有益な治療応答に影響を与えるのに十分であるべきである。用量のサイズはまた、特定の患者における特定のリポソーム組成物の投与に付随する、あらゆる有害な副作用の存在、性質、および程度によって決定される。特定の状況に対して適切な投与量を決定することは、従事者の技量の範囲内である。一般に、処置は、リポソーム組成物の最適用量未満のより少ない投与量で開始される。その後、投与量を、状況下で最適の効果に到達するまで、少しずつ増加させる。便宜上、所望により、総一日投与量を分割して、1日の間に一部ずつ投与することができる。

30

【0075】

標的化剤

いくつかの場合、標的部位におけるリポソームの蓄積は、癌組織などのある特定の組織の血管透過性および滞留性亢進特性によるものでもよい。このような形での蓄積は、部分的には、リポソームのサイズに起因することが多く、特別な標的化官能基を必要としなくてもよい。他の場合、本発明のリポソームはまた、標的化剤を含むことができる。一般に、本発明の標的化剤は、器官、組織、細胞、細胞外マトリックス、または細胞内領域に関連する標的などの、対象とする任意の標的と結合することができる。ある特定の実施形態では、標的は、癌状態などの特定の病態に関連し得る。いくつかの実施形態では、標的化成分は、受容体などの唯一の標的に特異的であり得る。適切な標的としては、限定されないが、DNA、RNAなどの核酸、またはこれらの修飾誘導体を挙げることができる。適切な標的としては、限定されないが、タンパク質、例えば、細胞外タンパク質、受容体、細胞表面受容体、腫瘍マーカー、膜貫通タンパク質、酵素、または抗体も挙げることがで

40

50

きる。適切な標的としては、例えば、細胞表面に存在し得る単糖、二糖、または多糖などの炭水化物を挙げることができる。

【0076】

ある特定の実施形態では、標的化剤としては、標的リガンド（例えば、RGD含有ペプチド）、標的リガンドの低分子模倣体（例えば、ペプチド模倣リガンド）、または特定の標的に特異的な抗体もしくは抗体断片を挙げることができる。いくつかの実施形態では、標的化剤としては、葉酸誘導体、B-12誘導体、インテグリンRGDペプチド、NGR誘導体、および、ソマトスタチン誘導体またはソマトスタチン受容体に結合するペプチド（例えば、オクトレオチドおよびオクトレオテート）などをさらに挙げることができる。本発明の標的化剤としては、アプタマーも挙げることができる。アプタマーは、対象とする標的と会合または結合するように設計され得る。アプタマーは、例えば、DNA、RNA、および/またはペプチドから構成され得、アプタマーの特定の側面は、当技術分野において周知である。（例えば、Kl us s m a n , S . , E d . , T h e A p t a m e r H a n d b o o k , W i l e y - V C H (2 0 0 6) ; N i s s e n b a u m , E . T . , T r e n d s i n B i o t e c h . 2 6 (8) : 4 4 2 - 4 4 9 (2 0 0 8) を参照のこと）。

10

【0077】

活性剤を投与するためのキット

別の態様では、本発明はまた、病態を処置するために、リポソームおよび脂質ナノ粒子を被験体に投与するためのキットを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、治療剤を被験体に送達するためのキットであって、a) 治療剤を含有するリポソームを含む第1の組成物；およびb) 非イオン性誘発剤を含有する脂質ナノ粒子を含む第2の組成物を含み、前記被験体への投与前は前記第1および第2の組成物が個別に保管されているキットを提供する。

20

【0078】

このようなキットは、典型的には、癌状態などの病態を処置するのに必要な2つもしくは2つより多くの構成要素を含む。構成要素としては、本発明の脂質組成物、試薬、緩衝剤、容器、および/または装置を挙げることができる。リポソームおよび脂質ナノ粒子を凍結乾燥形態にして、次いで投与前に再構成することができる。ある特定の実施形態では、本発明のキットは、患者の病態を処置するのに使用される1つもしくは複数の構成要素を含むことができるパッケージングアセンブリを含むことができる。例えば、パッケージングアセンブリは、本明細書において記載される治療リポソームおよび攻撃剤を収容する個別の容器を含むことができる。個別の容器は、患者への投与前に組成物と混合することができる他の賦形剤または剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、医師は、特定の患者に必要な処置または診断に応じて、ある特定の構成要素および/またはパッケージングアセンブリを選択および適合させることができる。

30

【実施例】

【0079】

IV. 実施例

表Aの実施例によって本発明の実施を例示するが、これらによって限定されることを意図するものではない。これらの実施例により、別の方法では放出特性が低い治療リポソームからのカーゴの放出を誘発するために攻撃リポソームを使用することができることが、*in vitro*ではっきりと実証されている。実施例1、2および11~12では、治療リポソームは、シスプラチンまたはオキサリプラチンを含む細胞毒性剤を含有する。実施例3~10では、治療リポソーム組成物中のマーカーとして、5-カルボキシフルオレセイン(5-CF)を使用する。これらのサンプルの特徴を以下の表Aに要約する。実施例1~5および10は、ステルス官能基を有するかまたは有さない様々な治療リポソーム組成物(パートA)の放出を誘発および/または増強するために、同じ攻撃リポソーム(パートB)を使用することを示す。実施例6~9は、攻撃リポソームにおける誘発剤の重要な役割を示す。実施例8および9では、攻撃リポソームの表面電荷は、本質的には中性

40

50

である。

【表 A】

表A. 治療リポソームおよび攻撃リポソームの実施例

実施例	封入カーゴ	治療リポソーム パート A	攻撃リポソーム パート B
1	オキサリ プラチン	NLICOV003F-02 - 非ステルス DSPC/DSPG/Chol (70/20/10)	4460-075 - 荷電(+)/TPGS DPPC/Chol/TPGS/DOTAP (42/10/32/16)
2	シス プラチン	NLICOV00AR-02 - 非ステルス DSPC/DSPG/Chol (70/20/10)	4460-075 - 荷電(+)/TPGS
3	5-CF	4460-090 - 非ステルス DSPC/DSPG/Chol (48/12/40)	4460-075 - 荷電(+)/TPGS
4	5-CF	4460-077 - 非ステルス DSPC/DSPG/Chol (70/20/10)	4460-075 - 荷電(+)/TPGS
5	5-CF	4386-143 - ステルス DSPC/Chol/DSPE-PEG(2000) (55/40/5)	4460-075 - 荷電(+)/TPGS
6	5-CF	4460-090 - 非ステルス	4460-084 - 荷電 (+) DPPC/Chol/DOTAP (73/11/16)
7	5-CF	4460-077 - 非ステルス	4460-084 - 荷電 (+)
8	5-CF	4460-090 - 非ステルス	4384-086 - 荷電(0)/TPGS DPPC/Chol/TPGS (60/10/30)
9	5-CF	4460-077 - 非ステルス	4384-086 - 荷電(0)/TPGS
10	5-CF	4460-090 - 非ステルス	4460-075 - 荷電(+)/TPGS
11	オキサリ プラチン	NLI COV003F-02 - 非ステルス	4460-104 - 荷電(+)/TPGS DPPC/Chol/TPGS/DOTAP (42/10/32/16)
12	シス プラチン	NLI 4481101 - ステルス HSPC/Chol/DSPE-PEG(2000) (55/40/5)	4460-104 - 荷電(+)/TPGS

【 0 0 8 0 】

実施例 1

オキサリプラチンを含有する治療リポソーム (NLICOV003F-02) および攻撃リポソーム (4460-075 DPPC/Chol/DOTAP/TPGS) の組成を表 1 に示す。治療リポソーム (Northern Lipid Inc.) は、2.9 mg/mL のオキサリプラチンおよび 71.8 mg/mL の総脂質を含有していた。攻撃リポソームは、以下の工程によって調製した。

1. すべての脂質を計量して丸底フラスコに入れた。
2. 3 : 1 (v/v) クロロホルム/メタノールをフラスコに加えて、すべての脂質を溶解させた；脂質濃度は、約 2.5 重量%であった。
3. 40 でロータリーエバポレータを使用して脂質混合物から溶媒を除去し、ロータリーエバポレータによって 40 で 0.5 時間真空にして、残った溶媒を除去した。
4. ハウスバキューム下、室温で一晩乾燥し続けて、微量溶媒を除去した。

5. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 × 溶液 (0.0067 M) をフラスコ底部周辺の乾燥脂質薄膜に添加し、分散物を 70 で 1 時間撹拌した。

6. 約 200 psi の圧力下、10 mL エクストルーダにて、70 で、二重パックした 200 nm ポリカーボネート膜に通して、脂質分散物 (多層ベシクル分散物) を 5 回押し出した。

7. 約 300 psi の圧力下、70 で、二重パックした 100 nm ポリカーボネート膜に通して、押し出しを 10 回継続した。

8. 押し出したリポソームサンプルを収集し、Malvern Zetasizer Nano ZS を使用して粒径およびゼータ電位を測定した。

【0081】

PBS 1 × (pH = 7.4 および 5.0) 溶液中で、一定分量の攻撃リポソームを治療リポソームと混合することによって、in vitro における NLI COV003F-02 からのオキサリプラチンの放出を行った。第 1 のサンプルを室温で直ぐに (3 分未満以内に) 収集し、オキサリプラチンの放出を測定するために調製した。サンプルを 16500 rpm で 5 分間、Amicon 50K MWC O 遠心フィルタに通してろ過することによって、放出を測定した。リポソームを含まない水相中に放出されたオキサリプラチンを ICP-OES によって分析した。即時のサンプルを採取した後、続いて、混合物を 37 で 4 8 時間インキュベートした。続いて、オキサリプラチンの放出を分析するために、1 時間、6 時間、24 時間および 48 時間の時点で、サンプルを収集した。結果を表 1 および 2 に示す。表 2 に示されており、図 1 にプロットされているデータは、等量の攻撃リポソーム (4460-075) を加えることによって、治療リポソーム (NLI COV003F-02) の全放出が、0 時間の時点の約 5 % から 6 時間で約 40 % に増加したことを示している。この結果はまた、両方の pH 条件において、一定量の攻撃リポソームによって、治療リポソーム内容物の全放出が増加することを示している。治療リポソームは、10 mol % のコレステロールを含有する非ステルス荷電リポソームである。攻撃リポソームは逆帯電しており、32 mol % の TPGS を含有する。

【表 1】

表1. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	NLI COV003F-02	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	83.6	-22.6
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

【表 2】

表2. PBS1× (pH=7.4およびpH=5.0)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (NLICOV003F -02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入治 療薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における放出	6 時間 の時点 における放出	24 時間 の時点 における放出	48 時間 の時点 における放出
0.5	0.0	4.5	オキサリ プラチン	3.74%	4.17%	4.32%	4.58%	4.53%
0.5	0.1	4.4	オキサリ プラチン	14.76%	26.17%	28.46%	32.52%	21.38%
0.5	0.2	4.3	オキサリ プラチン	18.61%	33.07%	36.55%	26.48%	22.33%
0.5	0.5	4.0	オキサリ プラチン	24.69%	42.65%	43.21%	29.22%	24.33%

10

治療 リポソーム (NLICOV003F -02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=5.0) (mL)	封入治 療薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における放出	6 時間 の時点 における放出	24 時間 の時点 における放出	48 時間 の時点 における放出
0.5	0.0	4.5	オキサリ プラチン	3.90%	4.37%	4.54%	4.82%	5.14%
0.5	0.1	4.4	オキサリ プラチン	15.46%	26.44%	28.95%	28.86%	21.47%
0.5	0.2	4.3	オキサリ プラチン	21.11%	34.39%	37.16%	28.30%	24.74%
0.5	0.5	4.0	オキサリ プラチン	26.06%	41.75%	45.62%	30.94%	28.13%

20

【0082】

実施例 2

この実施例では、異なる量の攻撃リポソームを加えると、治療リポソームからのシスプラチンが増強することを例示する。2.5 mg/mL のシスプラチンおよび 77.5 mg/mL の総脂質 (NLICOV00AR-02, Northern Lipids Inc.) を含有する治療リポソームを、受動的なローディング手順によって調製した。DPPC、コレステロール、DOTAP、およびTPGS (4460-075) からなる攻撃リポソームは、実施例 1 に記載したように調製した。

30

【0083】

PBS1× (pH=7.4および5.0) 溶液中で、一定分量の攻撃リポソーム (4460-075) を治療リポソームに加えることによって、in vitroにおけるNLICOV00AR-02からのシスプラチンの放出を行った。サンプルを室温で直ぐに、ならびに37℃でインキュベートした1時間後、6時間後、24時間後および48時間後に収集した。サンプルを16500 rpmで5分間、Amicon 50K MWCO遠心フィルタに通してろ過した。リポソームを含まない水相中に放出されたシスプラチンをICP-OESによって分析した。結果を表3および4に示す。表4に示されているデータをプロットし、図2に示した。この結果は、等量の攻撃リポソームによって、48時間の時点における治療リポソーム (NLICOV00AR-02) の全放出が、攻撃リポソームなしの場合の約1%から約27%に増加したことを示している。この結果はまた、両方のpH条件において、攻撃リポソームの量が増加するにつれて、治療リポソームの全放出が増加したことを示している。この実施例では、治療リポソームは、10 mol%のコレステロールを含有する非ステルス荷電リポソームであった。攻撃リポソームは逆帯電しており、32 mol%のTPGSを含有していた。

40

50

【表 3】

表3. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径(容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	NLI COV00AR-02	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	96.3	-22.4
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

【表 4】

表4. PBS1×(pH=7.4およびpH=5.0)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (NLICOV00AR -02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	4.5	シスプ ラチン	0.97%	1.05%	1.05%	1.13%	1.11%
0.5	0.1	4.4	シスプ ラチン	4.90%	7.84%	9.25%	10.65%	11.88%
0.5	0.2	4.3	シスプ ラチン	5.68%	10.63%	12.47%	15.45%	17.55%
0.5	0.5	4.0	シスプ ラチン	7.20%	14.60%	17.62%	21.84%	26.73%

治療 リポソーム (NLICOV00AR -02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 5× (pH=5.0) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	4.5	シスプ ラチン	1.01%	1.02%	1.05%	1.16%	1.20%
0.5	0.1	4.4	シスプ ラチン	5.65%	7.88%	9.25%	11.66%	13.96%

【0084】

実施例 3

この実施例では、攻撃リポソーム（パートB、4460-075）は、表5に示されているように、DPPC、コレステロール、DOTAP、およびTPGSから構成されていた；調製方法は、実施例1に記載したのと同じであった。治療リポソーム（パートA、4460-090）は、マーカーとして5-カルボキシフルオレセイン（5-CF）を含有していた。5-CFを含有するリポソームは、下記のように、受動的なローディング手順によって作製した。

1. 脂質成分を計量して丸底フラスコに入れた。
2. 3:1(v/v)クロロホルム/メタノールを加えて、すべての脂質を溶解させた；濃度は、約2.5重量%であった。
3. 40℃でロータリーエバポレータを使用して脂質混合物から溶媒を除去し、ロータリーエバポレータによって40℃で0.5時間真空にして、残った溶媒を除去した。
4. ハウスバキューム(house vacuum)を使用して、室温で一晩乾燥し続けて、微量溶媒を除去した。
5. リン酸緩衝生理食塩水(PBS)1×溶液(0.0067M)をフラスコ底部周辺の乾燥脂質薄膜に添加し、得られた分散物を70℃で1時間攪拌した。この工程では、5-

10

20

30

40

50

カルボキシフルオレセイン (5 - C F) を 2 . 0 m g / m L の濃度で P B S に添加した。分散物の p H 値を 7 . 1 に調整した。

6 . 約 2 0 0 p s i の圧力下、1 0 m L エクストルーダによって、7 0 で、二重バックした 2 0 0 n m ポリカーボネート膜に通して、脂質ベシクル分散物を 5 回押し出した。

7 . 約 3 0 0 p s i の圧力下、7 0 で、二重バックした 1 0 0 n m ポリカーボネート膜に通して、押し出しを 1 0 回継続した。

8 . 最終リポソーム調製物を透析用の 3 . 0 ~ 1 2 . 0 m L の 2 0 , 0 0 0 M W C O カセットに注入した。

9 . 1 0 0 0 m L の P B S 1 × 溶液に対して、リポソーム調製物を 2 4 時間透析した。

1 0 . 1 0 0 0 m L の新鮮な P B S 1 × 緩衝液を用いて、透析をさらに 2 回繰り返した。

1 1 . 透析したリポソームを収集し、M a l v e r n Z e t a s i z e r N a n o Z S を使用して粒径およびゼータ電位を測定した。

【 0 0 8 5 】

リポソームパート A をパート B と混合し、W a t e r s 2 4 7 5 多波長蛍光検出器 (S / N 6 0 8 9 7 5 4 0 6 M) を備える A g i l e n t 1 2 0 0 H P L C によって、リポソームを含まない水相への 5 - C F の放出を測定した。カラムは、B D S H y p e r s i l C 1 8 カラム (1 5 0 m m × 3 . 0 μ m , T h e r m o S c i e n t i f i c , S / N : 0 9 0 8 3 8 9 T , L o t # 1 0 7 7 0) であった。移動相は、5 0 m M 酢酸アンモニウムを含む 5 % (w t) の I P A / 5 % (w t) の A C N / 9 0 % (w t) の水からなった。勾配は、適用しなかった。流量は、4 0 で 0 . 8 m L / 分であった。注入量は、5 . 0 μ L であった。実行時間を 5 分間に設定し、C F - 5 を約 1 . 0 分の時点で溶出した。蛍光検出については、励起波長 4 9 2 n m および発光波長 5 1 4 n m を使用した。検出器において、E U F S を 5 0 , 0 0 0 に設定し、ゲインを 1 . 0 に設定した。P B S 1 × 中の C F - 5 の外部標準を較正に使用した。直線較正範囲は 0 . 0 5 μ g / m L ~ 2 . 0 μ g / m L であり、その結果、R ² 値は 0 . 9 9 よりも大きかった。

【 0 0 8 6 】

表 6 に示されており、図 3 にプロットされている結果は、p H 7 . 4 の P B S 1 × 中で、等量の攻撃リポソーム (4 4 6 0 - 0 7 5) を加えることによって、4 8 時間の時点における治療リポソーム (4 4 6 0 - 0 9 0) の全放出が、約 4 % から約 1 6 % に増加したことを示している。この結果はまた、攻撃リポソームの初期量を増加させることによって、治療リポソームの放出が増加したことを示唆している。この実施例では、リポソームパート A は、4 0 m o l % のコレステロールを含有する非ステルス荷電リポソームであった。攻撃リポソームパート B は逆帯電しており、T P G S を含有していた。

【表 5】

表 5. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-090	DSPC/DSPG/Chol =48/12/40	109.2	-17.4
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

【表 6】

表6. PBS1×(pH=7.4)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-090) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	0.60%	0.85%	1.50%	2.98%	4.07%
0.5	0.1	9.4	5-CF	5.78%	5.87%	7.23%	8.92%	8.08%
0.5	0.5	4.0	5-CF	8.25%	15.56%	18.04%	17.66%	16.33%

10

【0087】

実施例 4

この実施例では、治療リポソームパート A (4460-077) は、マーカーとして 5-CF (5-カルボキシフルオレセイン) を含有しており、脂質組成は、実施例 1 および 2 の治療リポソーム組成物と同じであった。攻撃リポソームであるパート B の組成は、実施例 1 および 2 と同じであった (表 7 を参照のこと)。

【0088】

表 8 に示されており、図 4 にプロットされている結果は、pH 7.4 の PBS 1×中で、等量の攻撃リポソームパート B (4460-075) を加えることによって、48 時間の時点におけるリポソームパート A (4460-077) からの 5-CF の全放出が、約 5% から約 32% に増加したことを示している。この結果はまた、リポソームパート B の初期量が増加するにつれて、リポソームパート A からの 5-CF の放出が増加したことを示している。これらの結果は、実施例 1 および 2 に記載した知見と一致している。この実施例では、リポソームパート A は、10mol% のコレステロールを含有する非ステルス荷電リポソームであった。攻撃リポソームパート B は逆帯電しており、TPGS を含有していた。

20

【表 7】

表7. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-077	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	88.1	-20.5
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

30

【表 8】

表8. PBS1×(pH=7.4)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-077) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	2.69%	3.04%	3.42%	4.25%	5.34%
0.5	0.1	9.4	5-CF	16.58%	24.75%	26.48%	30.84%	29.36%
0.5	0.5	4.0	5-CF	13.08%	24.96%	26.08%	30.36%	32.48%

40

【0089】

実施例 5

この実施例では、実施例 3 および 4 のように、リポソームパート A (4386-143

50

）を 5 - カルボキシフルオレセイン（ 5 - C F ）と共に内部水相にロードした。リポソームパート A および B（ 4 4 6 0 - 0 7 5 ）の組成を表 9 に示す。

【 0 0 9 0 】

表 1 0 に示されており、図 5 にプロットされている結果は、pH 7. 4 の P B S 1 × 中で、等量の攻撃リポソームパート B（ 4 4 6 0 - 0 7 5 ）を加えることによって、48 時間の時点におけるリポソームパート A（ 4 3 8 6 - 1 4 3 ）からの 5 - C F の全放出が、約 2 % から約 2 0 % に増加したことを示している。この結果はまた、攻撃リポソームパート B の初期量が増加するにつれて、リポソームパート A の放出が増加したことを示している。この実施例では、治療リポソームは、40 mol % のコレステロールを含有するステルスリポソームであった。攻撃リポソームは逆帯電しており、T P G S を含有していた。

10

【表 9】

表9. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4386-143	DSPC/Chol/DSPE-PEG(2000) =55/40/5	91.1	-0.87
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

【表 1 0】

20

表10. PBS1× (pH=7. 4) 中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4386-143) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	混合 後の 即時 放出	1 時間の 時点にお ける放出	6 時間の 時点にお ける放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出	混合後 の即時 放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	0.92%	1.10%	1.07%	1.58%	2.04%
0.5	0.1	9.4	5-CF	5.40%	8.32%	10.26%	13.52%	13.25%
0.5	0.5	4.0	5-CF	9.50%	12.82%	18.30%	20.80%	19.72%

【 0 0 9 1 】

30

実施例 6

この実施例では、リポソームパート A および B の組成を表 1 1 に示す。治療リポソームパート A（ 4 4 6 0 - 0 9 0 ）は、5 - C F を含有していた。攻撃リポソームであるパート B（ 4 4 6 0 - 0 8 4 ）は、誘発剤 T P G S をその組成に含んでいなかったことに留意するべきである。表 1 2 に示されており、図 6 にプロットされている結果は、pH 7. 4 の P B S 1 × 中で、攻撃リポソームパート B（ 4 4 6 0 - 0 8 4 ）を加えることによって、リポソームパート A（ 4 4 6 0 - 0 9 0 ）の全放出が、影響を受けなかったことを示している。この実施例では、治療リポソームは、40 mol % のコレステロールを含有する非ステルスリポソームであった。攻撃リポソームは逆帯電していたが、T P G S を含んでいなかった。

40

【 0 0 9 2 】

この実施例は、リポソームパート A の放出を誘発するために、T P G S のような誘発剤が攻撃リポソームの組成に必要であることを明らかに例証している。T P G S がいない場合、本質的には、この実施例に示されているような放出の増強は観察されなかった。

【表 1 1】

表11. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-090	DSPC/DSPG/Chol =48/12/40	109.2	-17.4
攻撃リポソーム	4460-084	DPPC/Chol/DOTAP =73/11/16	91.56	23.0

【表 1 2】

表12. PBS1 × (pH=7.4) 中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-090) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-084) の量 (mL)	加えた PBS 1 × (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における放出	6 時間 の時点 における放出	24 時間 の時点 における放出	48 時間 の時点 における放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	0.60%	0.85%	1.50%	2.98%	4.07%
0.5	0.1	9.4	5-CF	0.60%	1.51%	2.08%	3.34%	4.67%
0.5	0.5	4.0	5-CF	0.83%	1.60%	2.45%	4.45%	4.19%

【0093】

実施例 7

この実施例では、リポソームパート A および B の組成を表 1 3 に示す。治療リポソームパート A (4460-077) は、5-CF を含有していた。攻撃リポソームであるパート B (4460-084) は、誘発剤 TPGS をその組成に含有していなかったことに留意すべきである。表 1 4 に示されており、図 7 にプロットされている結果は、pH 7.4 の PBS 1 × 中で、攻撃リポソームパート B (4460-084) を加えることによって、リポソームパート A (4460-077) の全放出が、影響を受けなかったことを示している。この実施例では、治療リポソームは、10 mol % のコレステロールを含有する非ステルスリポソームであった。攻撃リポソームは逆帯電していたが、TPGS を含んでいなかった。この実施例に示されているように、TPGS がパート B に含まれていない場合には、パート A の放出の増強は観察されなかった。

【表 1 3】

表13. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-077	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	88.1	-20.5
攻撃リポソーム	4460-084	DPPC/Chol/DOTAP =73/11/16	91.56	23.0

【表 1 4】

表14. PBS1×(pH=7.4)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-077) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-084) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合 後の 即時 放出	1 時間 の時点 におけ る放出	6 時間 の時点 におけ る放出	24 時間 の時点 におけ る放出	48 時間 の時点 におけ る放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	2.69%	3.04%	3.42%	4.25%	5.34%
0.5	0.1	9.4	5-CF	2.23%	2.86%	3.18%	4.53%	5.47%
0.5	0.5	4.0	5-CF	1.94%	2.51%	3.04%	4.99%	6.34%

10

【0094】

実施例 8

この実施例では、リポソームパートAおよびBの組成を表15に示す。治療リポソームパートA(4460-090)は、実施例6と同じ5-CFを含有していた。攻撃リポソーム(4384-086)は正に荷電した脂質DOTAPを含有していなかったが、30mol%のTPGSを含有していた。表16に示されており、図8にプロットされている結果は、pH7.4のPBS1×中で、等量の攻撃リポソームを加えることによって、48時間の時点におけるリポソームパートA(4460-090)からの5-CFの全放出が、約4%から約20%に増加したことを示している。この結果はまた、攻撃リポソームの初期量を増加させることによって、治療リポソームからの5-CFの放出が増加したことを示している。治療リポソームは、40mol%のコレステロールレベルを含有するステルスリポソームであった。

20

【表 1 5】

表15. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-090	DSPC/DSPG/Chol =48/12/40	109.2	-17.4
攻撃リポソーム	4384-086	DPPC/Chol/TPGS =60/10/30	92.67	5.51

30

【表 1 6】

表16. PBS1×(pH=7.4)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-090) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4384-086) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 におけ る放出	6 時間 の時点 におけ る放出	24 時間 の時点 におけ る放出	48 時間 の時点 におけ る放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	0.60%	0.85%	1.50%	2.98%	4.07%
0.5	0.1	9.4	5-CF	6.77%	7.53%	8.07%	8.99%	9.34%
0.5	0.5	4.0	5-CF	15.44%	16.20%	18.87%	19.64%	19.74%

40

【0095】

実施例 9

この実施例では、リポソームパートAおよびBの組成を表17に示す。治療リポソームパートA(4460-077)は、実施例4と同じ5-CFを含有していた。治療リポソームは、10mol%のコレステロールを含有するステルスリポソームであった。攻撃リポソームパートB(4460-086)は、実施例5のように、30mol%のTPGSをその組成に含有しており、荷電脂質DOTAPを含有していなかった。表18に示されており、図9にプロットされている結果は、pH7.4のPBS1×中で、等量の攻撃リポ

50

ソーム（４３８４－０８６）を加えることによって、４８時間の時点におけるリポソーム（４４６０－０７７）からの５－ＣＦの全放出が、約５％から約３４％に増加したことを示している。この結果はまた、攻撃リポソームの初期量を増加させることによって、リポソーム（４４６０－０７７）からの５－ＣＦの放出が増加したことを示している

【表１７】

表17. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-077	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	88.1	-20.5
攻撃リポソーム	4384-086	DPPC/Chol/TPGS =60/10/30	92.67	5.51

10

【表１８】

表18. PBS1×(pH=7.4)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-077) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4384-086) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	2.69%	3.04%	3.42%	4.25%	5.34%
0.5	0.1	9.4	5-CF	19.30%	28.36%	30.29%	30.94%	31.05%
0.5	0.5	4.0	5-CF	23.40%	33.00%	34.29%	33.81%	33.55%

20

【００９６】

実施例１０

この実施例では、リポソームパートＡおよびＢの組成を表１９に示す。治療リポソームパートＡ（４４６０－０９０）は、実施例６のように５－ＣＦを含有していた。治療リポソームは、４０ｍｏｌ％のコレステロールを含有する非ステルスリポソームであった。攻撃リポソームパートＢ（４４６０－０７５）は、３２モル％のＴＰＧＳ、および攻撃リポソームに正電荷を与える１６モル％のＤＯＴＡＰを含有していた。表２０に示されており、図１０にプロットされている結果は、ｐＨ値を７．４から５．０に変化させた場合でさえも、攻撃リポソーム（４４６０－０７５）を加えることによって、治療リポソーム（４４６０－０９０）からの５－ＣＦの全放出が、約５％から約２６％に増加したことを示している。この結果は、攻撃リポソームの初期量を増加させることによって、リポソーム（４４６０－０９０）の全放出が増加したことを明確に示している。

30

【表１９】

表19. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	4460-090	DSPC/DSPG/Chol =48/12/40	109.2	-17.4
攻撃リポソーム	4460-075	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	80.3	11.4

40

【表 20】

表20. PBS1×(pH=5.0)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (4460-090) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=5.0) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	9.5	5-CF	0	0	1.18%	9.72%	25.60%
0.5	0.1	9.4	5-CF	3.61%	4.94%	5.40%	13.35%	23.37%
0.5	0.5	4.0	5-CF	11.88%	13.87%	14.89%	21.92%	29.02%

10

【0097】

実施例 11

この実施例では、リポソームパートAおよびBの組成を表21に示す。治療リポソーム(NLICOV003F-02)は、実施例1のようにオキサリプラチンを含有していた。治療リポソームは、10mol%のコレステロールを含有する非ステルスリポソームであった。攻撃リポソーム(4460-104)は、32mol%のTPGS、および攻撃リポソームに正電荷を与える16mol%のDOTAPを含有していた。表22に示されており、図11にプロットされている結果は、pH7.4およびpH5.0の両方でのPBS1×中で、20%の攻撃リポソーム(4460-104)を加えることによって、48時間の時点における治療リポソーム(COV003F-02)の全放出が、約5%から約25%に増加したことを示している。

20

【表 21】

表21. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	NLICOV003F-02	DSPC/DSPG/Chol =70/20/10	83.6	-22.6
攻撃リポソーム	4460-104	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	76.5	5.89

30

【表 22】

表22. PBS1×(pH=5.0)中でのデュアルソームのin-vitro放出

治療 リポソーム (COV003F-02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-104) の量 (mL)	加えた PBS 1× (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1 時間 の時点 における 放出	6 時間 の時点 における 放出	24 時間 の時点 における 放出	48 時間 の時点 における 放出
0.5	0.1	4.4, pH=7.4	オキサリプラチン	13.59%	27.78%	28.95%	31.12%	23.45%
0.5	0.1	4.4, pH=5.0	オキサリプラチン	12.93%	29.32%	28.37%	25.97%	26.78%

40

【0098】

実施例 12

この実施例では、リポソームパートAおよびBの組成を表23に示す。治療リポソーム(NLI4481101)は、シスプラチンを含有していた。治療リポソームは、40mol%のコレステロールを含むステルスリポソームであった。攻撃リポソーム(4460

50

- 104) は、32mol%のTPGS、および攻撃リポソームに正電荷を与える16mol%のDOTAPを含有していた。表23に示されており、図12にプロットされている結果は、pH7.4およびpH5.0の両方でのPBS1×中で、攻撃リポソーム(4460-104)を加えることによって、48時間後における治療リポソーム(NLI4481101)の放出が、約1%から約5%に増加したことを示している。この結果はまた、攻撃リポソームの量を増加させることによって、治療リポソームからのシスプラチンの放出が増加したことを示している。治療リポソームは、40mol%のコレステロールを含有するステルスリポソームであった。攻撃リポソームは逆帯電しており、32mol%のTPGSを含有していた。

【表23】

10

表23. デュアルソームの成分

デュアルソーム	名称	組成 (mol%)	粒径 (容積 nm)	ゼータ電位 (mV)
治療リポソーム	NLI 4481101	HSPC/Chol/DSPE-PEG(2000) =55/40/5	107.1	-0.99
攻撃リポソーム	4460-104	DPPC/Chol/TPGS/DOTAP =42/10/32/16	76.5	5.89

【表24】

表24. PBS1×(pH=7.4およびpH=5.0)におけるデュアルソームのin-vitro放出

20

治療 リポソーム (NLI4481101) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-104) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=7.4) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1時間 の時点 における 放出	6時間 の時点 における 放出	24時間 の時点 における 放出	48時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	4.5	シスプラチン	0	0	0	0	1.39%
0.5	0.1	4.4	シスプラチン	1.55%	0	1.39%	1.98%	2.34%
0.5	0.5	4.0	シスプラチン	2.61%	2.67%	3.32%	4.17%	4.70%

30

治療 リポソーム (NLICOV003F-02) の量 (mL)	攻撃 リポソーム (4460-075) の量 (mL)	加えた PBS 1× (pH=5.0) (mL)	封入 治療 薬	混合後 の即時 放出	1時間 の時点 における 放出	6時間 の時点 における 放出	24時間 の時点 における 放出	48時間 の時点 における 放出
0.5	0.0	4.5	シスプラチン	0	0	0	0	1.56%
0.5	0.1	4.4	シスプラチン	1.64%	0	0	1.79%	2.56%
0.5	0.5	4.0	シスプラチン	2.68%	2.83%	3.18%	4.35%	5.50%

40

【0099】

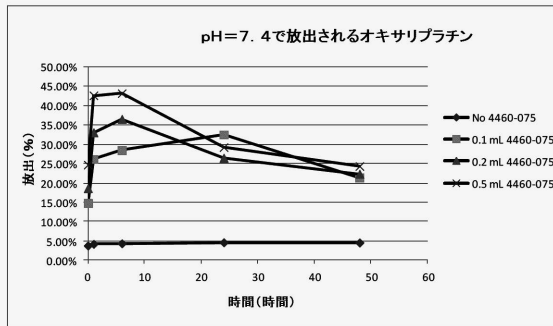
理解を明確にする目的で、例示および実施例によって上記本発明をいくらか詳細に説明したが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲の範囲内で、ある特定の変更および修正を行ってもよいことを認識するであろう。加えて、本明細書において提供されている各参考文献は、各参考文献が参考として個々に組み込まれるのと同程度に、その全体が参考として援用される。本出願と本明細書において示されている参考文献との間に矛盾が存在する場合、本出願を優先するものとする。

50

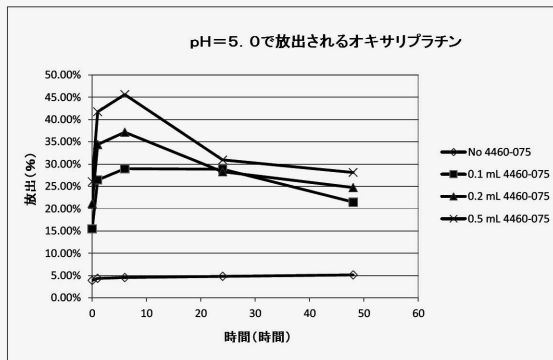
【図 1】

Figure 1

A



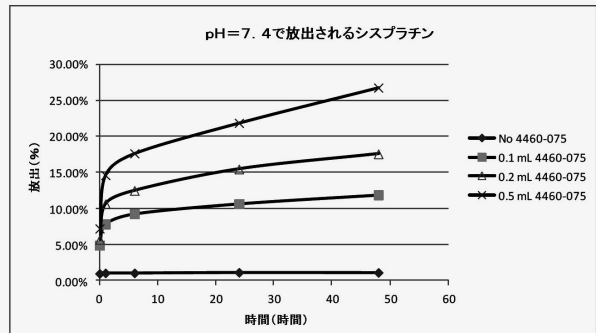
B



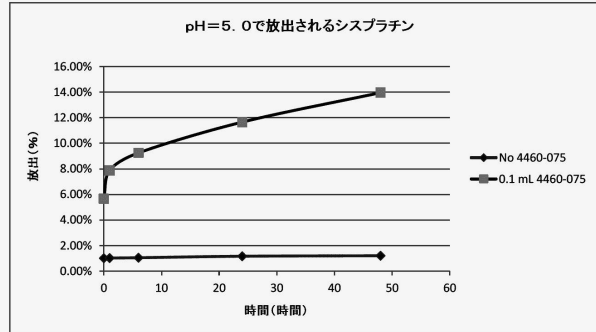
【図 2】

Figure 2

A

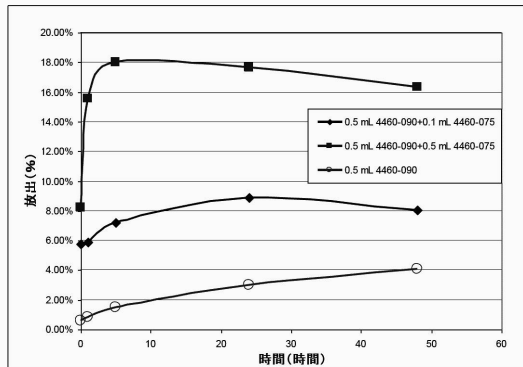


B



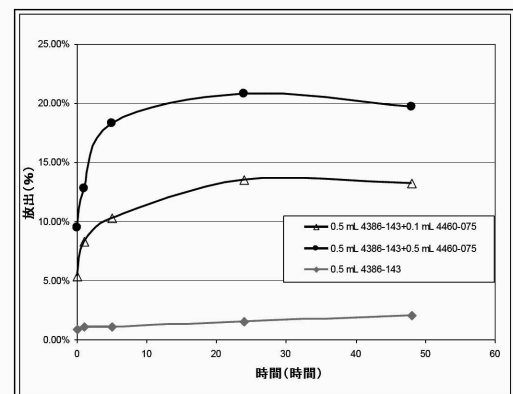
【図 3】

Figure 3



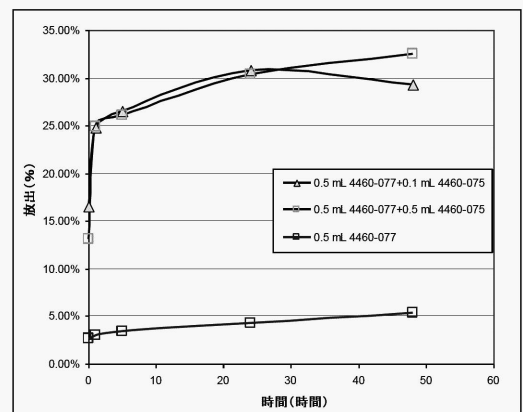
【図 5】

Figure 5



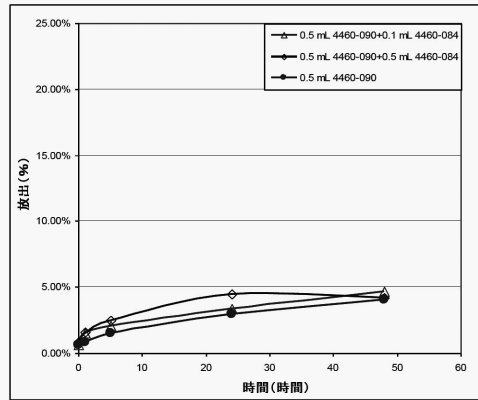
【図 4】

Figure 4



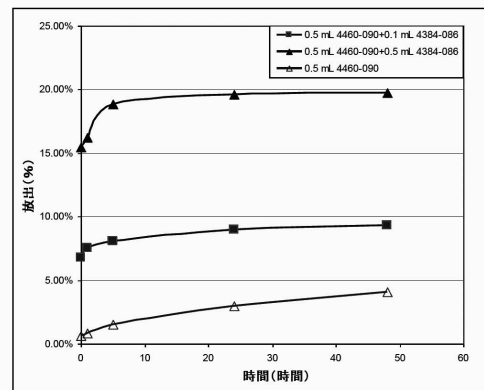
【図 6】

Figure 6



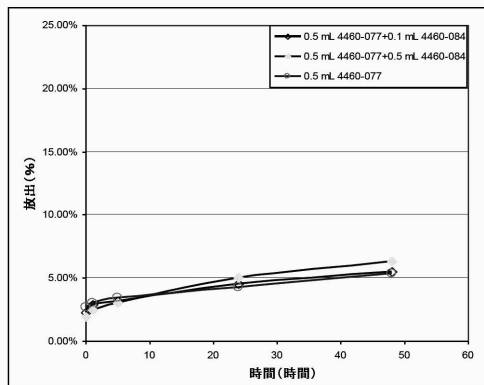
【図 8】

Figure 8



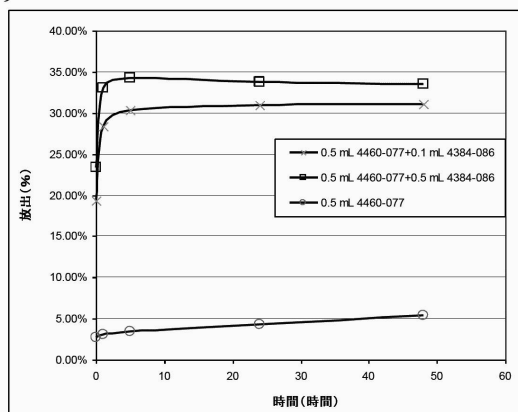
【図 7】

Figure 7



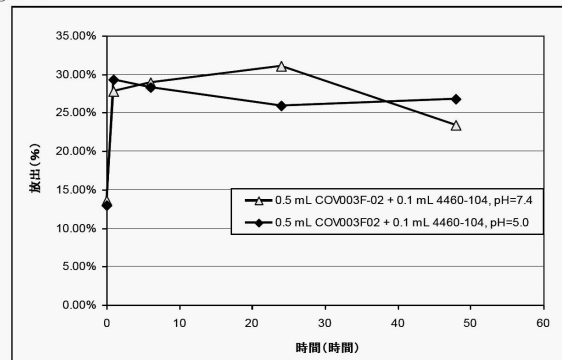
【図 9】

Figure 9



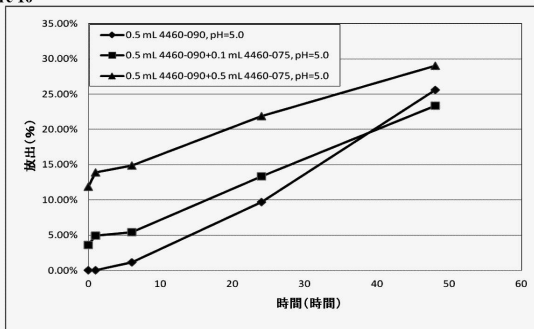
【図 11】

Figure 11



【図 10】

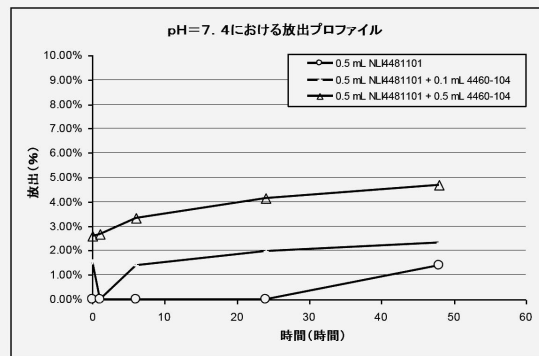
Figure 10



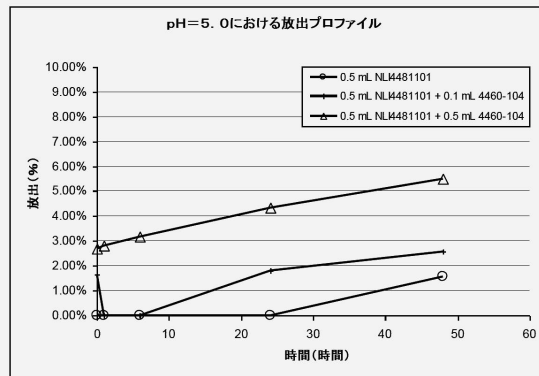
【図 12】

Figure 12

A



B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I
A 6 1 K	33/24	(2006.01)	A 6 1 K 33/24
A 6 1 K	31/282	(2006.01)	A 6 1 K 31/282
A 6 1 K	31/7068	(2006.01)	A 6 1 K 31/7068
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K 31/513
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K 31/337
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ハーマン, クリフ ジェイ.
アメリカ合衆国 ミズーリ 63119, セント ルイス, ポートランド テラス 216

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 米国特許第07273620(US, B1)
国際公開第2007/049279(WO, A1)
米国特許出願公開第2008/0166403(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9