

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3545403号

(P3545403)

(45) 発行日 平成16年7月21日(2004.7.21)

(24) 登録日 平成16年4月16日(2004.4.16)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/40

F I

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/40

請求項の数 34 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平6-523593	(73) 特許権者	スカイファルマ インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成6年4月22日(1994.4.22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
(65) 公表番号	特表平8-509230		121 サン ディエゴ サイエンス セ
(43) 公表日	平成8年10月1日(1996.10.1)		ンター ドライブ 10450
(86) 国際出願番号	PCT/US1994/004490	(74) 代理人	弁理士 中村 稔
(87) 国際公開番号	W01994/023697	(74) 代理人	弁理士 大塚 文昭
(87) 国際公開日	平成6年10月27日(1994.10.27)	(74) 代理人	弁理士 穴戸 嘉一
審査請求日	平成12年11月28日(2000.11.28)	(74) 代理人	弁理士 竹内 英人
(31) 優先権主張番号	051,135	(74) 代理人	弁理士 今城 俊夫
(32) 優先日	平成5年4月22日(1993.4.22)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬化合物を被包しているシクロデキストリンリポソーム及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被包された生物学的活性水溶性化合物を含有するリポソーム組成物であって、このリポソーム組成物がさらに、内部に被包されたシクロデキストリンを含み；かつ該生物学的活性化合物が、前記リポソーム組成物から、シクロデキストリンフリーのリポソーム組成物からよりも、より遅い速度で放出されるリポソーム組成物。

【請求項2】

前記リポソーム組成物が、単層膜、多重層及び多胞体リポソームの群から選択された、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項3】

前記生物学的活性化合物の水への溶解度が、シクロデキストリン非存在下で、1 µg/ml以上である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項4】

前記リポソームが、多胞体である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項5】

前記化合物が、抗腫瘍薬、抗感染症薬、抗うつ薬、抗ウイルス薬、抗侵害受容薬、抗不安薬及びホルモンからなる群から選択された、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項6】

前記化合物が、抗腫瘍薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項7】

10

20

前記化合物が、抗感染症薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項8】

前記化合物が、抗ウイルス薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項9】

前記化合物が、抗不安薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項10】

前記化合物が、抗うつ薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項11】

前記化合物が、ホルモンである、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項12】

前記化合物が、抗侵害受容薬である、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項13】

前記シクロデキストリンが、該組成物中に、約10mg/ml～約400mg/mlの量で存在する、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項14】

前記シクロデキストリンが、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、メチルシクロデキストリン、エチルシクロデキストリン、ヒドロキシエチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、分枝したシクロデキストリン、シクロデキストリンポリマー及びモノスクシニルジメチル β -シクロデキストリンからなる群から選択される、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項15】

前記シクロデキストリンが、2-ヒドロキシプロピル β -シクロデキストリンである、請求の範囲第12項記載の組成物。

【請求項16】

前記リポソーム組成物が、さらに、生体臓器内の所望の位置を標的する手段を含む、請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項17】

前記手段が、糖、糖脂質及びタンパク質からなる群から選択された分子の一部との結合によるものである、請求の範囲第16項記載の組成物。

【請求項18】

前記タンパク質が、抗体である、請求の範囲第15項記載の組成物。

【請求項19】

動物に投与されたときに生物学的活性水溶性化合物の延長された半減期を有するリポソームの調製方法であって、
生物学的活性水溶性化合物をリポソーム内に被包する工程であって、該リポソームが更にシクロデキストリンを含んでいる工程
を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】

前記リポソームが、単層膜、多重層及び多胞体リポソームの群から選択される、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項21】

前記生物学的活性化合物の水への溶解度が、該シクロデキストリン非存在下で、1 μ g/ml以上である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項22】

前記シクロデキストリンが、該組成物中に、約10mg/ml～約400mg/mlの量で存在する、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項23】

前記シクロデキストリンが、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、メチルシクロデキストリン、エチルシクロデキストリン、ヒドロキシエチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、分枝したシクロデ

10

20

30

40

50

キストリン、シクロデキストリンポリマー及びモノスクシニルジメチルβ-シクロデキストリンからなる群から選択される、請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項24】

前記シクロデキストリンが、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンである、請求の範囲第23項記載の方法。

【請求項25】

前記化合物が、抗腫瘍薬、抗感染症薬、抗うつ薬、抗ウイルス薬、抗侵害受容薬、抗不安薬及びホルモンからなる群から選択される、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項26】

前記化合物が、抗腫瘍薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

10

【請求項27】

前記化合物が、抗ウイルス薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項28】

前記化合物が、抗感染症薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項29】

前記化合物が、抗不安薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項30】

前記化合物が、抗うつ薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項31】

前記化合物が、ホルモンである、請求の範囲第19項記載の方法。

20

【請求項32】

前記化合物が、抗侵害受容薬である、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項33】

前記シクロデキストリンが、α-シクロデキストリン、β-シクロデキストリン、γ-シクロデキストリン、メチルシクロデキストリン、エチルシクロデキストリン、ヒドロキシエチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、分枝したシクロデキストリン、シクロデキストリンポリマー及びモノスクシニルジメチルβ-シクロデキストリンからなる群から選択される、請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項34】

前記シクロデキストリンが、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンである、請求の範囲第33項記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本出願は、1993年4月22日に出願された、米国特許出願第08/051,135号の一部継続出願である。

1. 発明の属する技術分野

本発明は一般に、リポソーム技術及び薬物療法の分野に関する。さらに詳細に述べると、本発明は、医薬化合物及びシクロデキストリンを被包している新規リポソーム、並びにそれらの使用法に関する。

2. 関連技術

40

リポソーム類は、分子、例えば医薬類を、個体にこのリポソームを投与した後に該医薬を徐放性放出することを意図して、内部に被包することができるような、水性の内室を封入している、人工の脂質又はリン脂質小胞である。近年、リポソームのいくつかの型が明らかになってきている (Lenkの米国特許第4,552,803号、Baldeschielerの米国特許第4,310,506号、Papahadjopoulosの米国特許第4,235,871号、Schneiderの米国特許第4,224,179号、Papahadjopoulosの米国特許第4,078,052号、Taylorの米国特許第4,394,372号、Marchettiの米国特許第4,308,166号、Mezeiの米国特許第4,485,054号、及びRedziniakの米国特許第4,508,703号、Szokaらの論文、Ann.Rev.Biophys.Bioeng,9:465-508 (1980); Liposomes, Marc J.Ostro, Marcel-Dekker社発行、New York, (1983); Poznansky及びJulianoの論文、Pharmacol.Rev.,36:277-236 (1984); Kimらの論文、Biochim.Biophys.Acta,728:339

50

—348 (1983) ;Kimらの論文、Biochim.Biophys.Acta,646:1—10 (1981))。単層膜リポソームは、水性室を封入している、単一の二重層膜を有する (Huangの論文、Biochem,8:334—352 (1969)) のに対し、多重層リポソームは複数の同心円状の膜を有す (Banghamらの論文、J.Mol.Biol.,13:238—262 (1965))。多胞体リポソームは、複数の非同心円状の水性室を有する (Kimらの論文、Biochim.Biophys.Acta,728:339—348 (1983)) 点で、単層膜リポソーム又は多重層リポソームのいずれとも異なる。

リポソーム送達システムが、抗生物質、ホルモン及び抗腫瘍薬を含む、各種の医薬活性化合物類のために提案されている (Liposomes, Marc J.Ostro, Marcel—Dekker社発行、New York, (1983))。医薬品を被包するためのリポソームの使用及びリポソーム送達システムの有効性は、その医薬品の水及び脂質への溶解度によって異なる。例えば、多胞体リポソーム内への被包には、親水性物質が良く適している。それとは対照的に、疎水性、水に不溶性の化合物は、脂質二重層に組み込まれやすい。従って、これらの化合物は、リポソーム送達システムの水性内室に被包するには、あまり適していない。化合物類のシクロデキストリン体、特にβ—シクロデキストリンは、水—不溶性疎水性化合物類の可溶化に使用されている (Strattanの論文、Pharm.Tech.1月号、68—74 (1992) ;Strattanの論文、Pharm.Tech.2月号、52—58 (1992) ;Sternの論文、DN&P,2:410—415 (1989) ;Pagingtonの論文、Chem.Brit.,23:455—458 (1987))。

メトトレキサートのような水溶性医薬化合物の、様々な薬物送達システムへの被包が、これまでに報告されている。しかし、メトトレキサートの放出速度は、迅速であることが明らかで、かつこれまでの被包は、薬物動態にいかなる大きな変化ももたらさなかった。Kimelbergらは、髄液中のリポソーム調製メトトレキサートの半減期が、非常に短く (1時間未満)、かつ非被包薬物と顕著な差がない事を報告している。

多くの研究者が、腫瘍への標的医薬品、例えばメトトレキサートのような抗腫瘍薬の、全身毒性を低下し、かつ腫瘍殺傷力を増強することを試みている。一つの手法は、薬物を、直接腫瘍が存在する腔、例えば腹腔又はクモ膜下腔に注入することである。しかし、このような腔内療法は、常に成功するわけではない。その問題点のひとつは、腔内クリアランスが迅速であり、その結果、薬物への暴露期間が短いことである。メトトレキサートのような細胞周期に特異的薬物は、最適の薬効を発揮するためには、持続性の暴露が必要である。

先行技術には、実用的かつ有用であるには迅速すぎるようにリポソームから放出されるような、いくつかの水溶性及び生物学的活性のある化合物の有効なリポソーム送達システムが欠如しているという欠点がある。先行技術はさらに、このような化合物の放出を制御する効果的な方法がないという欠点がある。

発明の要約

本発明のある実施態様において、リポソーム内に被包された水溶性化合物を含有し、このリポソーム組成物が、被包されたシクロデキストリンを含むような、リポソーム組成物を提供する。

本発明の別の態様は、個体にリポソーム組成物を投与することを含む、その個体の病態生理学的状態を治療する方法で、該組成物は、該リポソーム中に被包された水溶性化合物を薬理効果のある量で含み、このリポソーム組成物は被包されたシクロデキストリンを含有するような方法を提供する。

さらに本発明の別の態様は、該化合物を被包しているリポソームの混合物を投与することを含む、動物体内における化合物の半減期を延ばす方法で、該リポソームがシクロデキストリンを被包している方法を提供する。

その他の目的、特徴及び利点が、開示の目的で提供され、かつ付図を用いた本発明の現在の好ましい実施態様の下記の説明によって明らかになるであろう。

好ましい実施態様

本願明細書及び請求の範囲を通じ使用される“多胞体リポソーム”という用語は、交差している脂質二重層膜から成り、複数の非同心円状の水性室を封入し、かつ二重膜の小葉で区切られている中性脂質で特徴づけられる、人工の、顕微鏡的脂質—小胞を意味する。対

10

20

30

40

50

照的に、単層膜リポソームは、単一の水性室を有し、並びに多重層リポソームは、複数の“タマネギの皮様”同心膜を有し、その間には貝状の同心円状の水性隔室が存在する。本願明細書及び請求の範囲を通じ使用される“溶媒小球”という用語は、有機溶媒の顕微鏡的球形の液滴を意味し、その中に複数の水溶液のより小さい液滴がある。この溶媒小球は、第二の水溶液中に、懸濁され、かつ全体的に浸漬されている。

用語“MVL-CD-MTX”は、シクロデキストリン存在下で、多胞体リポソーム中に被包されたメトトレキサートを含有する剤形を意味する。

【図面の簡単な説明】

これらの図面は、目盛りは必要ない。本発明の一つの特徴は、目盛りを強調するか、もしくは明瞭かつ簡潔に興味深い点を図表形式において示すことができることである。

図1は、メトトレキサート及びシクロデキストリンを被包している多胞体リポソーム(MVL-CD-MTX) (黒丸、遊離型; 白四角、合計)、又は非被包メトトレキサート(黒四角)を、 $100\mu\text{g}$ ($0.22\mu\text{mol}$)で槽内注入した後の、髄液(CSF)中のメトトレキサート濃度を示す。各データの点は、3匹のラットの平均及び標準偏差を示す。

図2は、MVL-CD-MTXとしてのメトトレキサート(白丸、CNS内合計; 黒四角、脳槽内合計)又は非被包メトトレキサート(白四角、合計; 黒四角、脳槽内)を、 $100\mu\text{g}$ で槽内注入した後の、中枢神経系(CNS)に残留しているメトトレキサート量を示す。各データの点は、3匹のラットの平均及び標準偏差を表す。

図3は、皮下注射部位から回収された、非被包メトトレキサート(白丸)及びMVL-CD-MTXメトトレキサート(黒丸)の量を表す。

図4は、皮下注射後の、非被包メトトレキサート(白丸)及びMVL-CD-MTX(黒丸)の、血漿メトトレキサート濃度を表す。

図5は、非被包メトトレキサート(白丸)及びMVL-CD-MTX(黒丸)の投与量の対数関数としての、生命延長(ILS)の百分率を表す。

図6は、メトトレキサートの多胞体リポソーム剤形(MVL-CD-MTX)の体積で調節された大きさの分布を表す。粒子の直径は、顕微鏡写真から、 $2\mu\text{m}$ 間隔の群で測定した。各々の大きさ群の粒子数は、各大きさの分類の相対体積を得るために、半径の3乗を掛け、その後全粒子の相対体積の和で割り、各大きさの分類によって表された体積合計の百分率を得た。捕捉された体積は、脂質の $12.9\pm 1.0\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ であった。

図7は、 4°C の0.9%NaCl溶液(黒丸); 37°C の0.9%NaCl溶液(白丸); 及び 37°C のヒト血漿(黒四角)に懸濁されたMVL-CD-MTXからの、メトトレキサートの放出を示す。各点は、3実験の平均及び標準偏差を意味する。縦座標は、対数目盛りである。

図8は、非被包メトトレキサート(白丸)、非被包シクロデキストリン-メトトレキサート複合体(黒三角)又は多胞体リポソームに被包されたメトトレキサート、MVL-CD-MTX(黒丸、遊離型; 白四角、合計)として、メトトレキサート 10mg/kg ($22\mu\text{mol/kg}$)を腹腔内注入後の、腹腔内メトトレキサート濃度を表す。各点は、3匹のマウスの平均及び標準偏差を意味する。

図9は、非被包メトトレキサート(白丸)、非被包シクロデキストリン-メトトレキサート複合体(黒三角)又は多胞体リポソームに被包されたメトトレキサート、MVL-CD-MTX(黒四角)として、メトトレキサート 10mg/kg ($22\mu\text{mol/kg}$)を注入後の、メトトレキサートの腹腔内残留量を表す。各点は、3匹のマウスの平均及び標準偏差を意味する。

図10は、第一日目に、0.9%NaCl溶液(黒三角)、非被包メトトレキサート 2000mg/kg (黒丸)、非被包メトトレキサート 2500mg/kg (白丸)、MVL-CD-MTX 15mg/kg (黒四角)及びMVL-CD-MTX 20mg/kg (白四角)を腹腔内投与されたマウスの生存曲線を表す。

図11は、第一日目に、非被包メトトレキサート(白丸)及びMVL-CD-MTX(黒丸)を投与されたマウスの、生命延長(ILS)対用量(mg/kg)を表す。各データの点は、5匹のマウス群のILS中央値を表す。最適の非被包メトトレキサート用量(2000mg/kg)と、マン・ホイットニーのノンパラメトリック検定で比較した。＊は、 $p<0.02$; ＊＊は、 $p<0.01$ である。

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

本発明は、メトトレキサートのような水溶性化合物の、シクロデキストリン、好ましくはβ-シクロデキストリンとの包接複合体の形成；並びに制御された放出のための、該包接複合体のリポソームへの被包を明らかにしている。本発明の実際の使用のために、該シクロデキストリンは、水溶性化合物と包接複合体を形成するのが好ましく、該シクロデキストリンの無極性の空洞は、該リポソーム組成物からの放出速度を十分遅くする化合物によって占領、もしくは封鎖されている。この包接複合体の周辺又は外縁は、親水性であり、その結果この包接複合体は水性媒質中の溶体を形成する。さらに、前記シクロデキストリンに複合された水溶性物質は、リポソーム中に被包される。

出願人は、包接複合体の形成が、形成中の前記リポソームの脂質層への水溶性化合物類の組み込みを阻害することに加え、該リポソームからの親水性化合物の放出速度を、該シクロデキストリン非存在下で被包された同じ化合物の放出速度と比較し、遅くすることを発見した。

本発明は、リポソーム中に被包された生物学的活性化合物を医薬として活性がある量含み、このリポソーム組成物がさらに被包されたシクロデキストリンを含有する、リポソーム組成物を提供する。前記生物学的活性化合物は、水溶性であることが好ましい。本発明の実際において、該水溶性化合物は一般に、シクロデキストリン非存在下で水への溶解度が、約1 μg/ml以上、好ましくは約100 μg/ml、最も好ましくは約1mg/ml以上である。

本願明細書において、“薬理学的”又は“薬理学的活性”は、“生物学的”又は“生物学的活性”と入れ換えて使用される。

シクロデキストリン類は、デンプンに、酵素シクロデキストリントランスグリコシダーゼを作用することによって形成される、キラル、ドーナツ形分子である。これらの環状オリゴマー類は、α-(1,4)-結合された、6~12個のグルコース単位を含んでいる。3種の最も小さい同族体である、α-シクロデキストリン、β-シクロデキストリン及びγ-シクロデキストリンが市販されている；大きい同族体は、個々に、産生され、かつ単離されなければならない。第2級の2-及び3-ヒドロキシル基は、シクロデキストリン空洞の開口部に並び、かつずれた配向を有している。第1級の6-ヒドロキシル基は、この分子の逆の末端に位置している。シクロデキストリン空洞内部は、ヒドロキシル基が全てこの分子の外側を向いているため、相対的に疎水性である。

多くの異なる種類のシクロデキストリンが、本発明の組成物及び方法において有用であるということを、特に考察する。例えば、本発明は、天然のα-、β-又はγ-シクロデキストリンを使用することができる。同様に、本発明は、半合成の、置換されたシクロデキストリン類、例えばメチルシクロデキストリン、エチルシクロデキストリン、ヒドロキシエチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、分枝したシクロデキストリン、シクロデキストリンポリマー又はモノスクシニルジメチルβ-シクロデキストリンを使用することができる。本発明の組成物及び方法において最も好ましいのは、2-ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンである。

一般に、本発明のリポソーム類の調製に使用されるシクロデキストリン濃度は、動物の投与後、該リポソームからの薬理学的化合物の放出を遅延するようなものである。好ましくは、該シクロデキストリンは、リポソーム組成物中に、約10mg/ml~約400mg/mlの量で存在する。さらに好ましいのは、リポソーム中のシクロデキストリン量が、約100mg/mlである。

一般に、本発明のリポソームは、被包されたシクロデキストリンと共に製剤された場合に、医薬化合物の徐放型で制御された放出を提供するもののいずれかであることができる。好ましくは、このリポソームは、単層膜、多重層及び多胞体リポソームの群から選択される。このリポソームは、多胞体リポソームが、最も好ましい。

一般に、本発明のリポソーム中に被包された生物学的活性化合物は、シクロデキストリンを被包しているリポソームからのその放出速度が、シクロデキストリンが存在しない場合よりも遅延するような、いずれかの化合物であることができる。治療用生物学的活性化合物類は、抗腫瘍薬、抗感染症薬、抗うつ薬、抗ウイルス薬、抗侵害受容薬、抗不安薬及びホルモンからなる一般的群から選択することができる。

10

20

30

40

50

本発明の組成物及び方法で有用な抗腫瘍薬の典型的な例は、メトトレキサート、タキソール、腫瘍壊死因子、クロラムブシル、インターロイキン、ブレオマイシン、エトポシド、フルオロウラシル及びビンブラスチンである。

本発明の組成物及び方法で有用な抗感染症薬の典型的な例は、ペンタミジン、メトロニダゾール、ペニシリン、セファレキシン、テトラサイクリン及びクロラムフェニコールである。

本発明の組成物及び方法で有用な抗ウイルス薬の典型的な例は、ジデオキシオイチジン、ジドブジン、アシクロビル、インターフェロン、ジデオキシイノシン及びガンシクロビルである。

本発明の組成物及び方法で有用な抗不安薬及び鎮静薬の典型的な例は、ジアゼパムのようなベンゾジアゼピン系、フェノバルビタールのようなバルビタール酸系、並びにブスピロン及びハロペリドールなどの他の化合物類である。 10

本発明の組成物及び方法で有用なホルモンの典型的な例は、エストラジオール、プレドニゾン、インスリン、成長ホルモン、エリトロポエチン及びプロスタグランジンである。

本発明の組成物及び方法で有用な抗うつ薬の典型的な例は、フルオキセチン、トラゾドン、イソプラミン及びドキシセピンである。

本発明の組成物及び方法で有用な抗侵害受容薬の典型的な例は、ヒドロモルヒン、オキシコドン、フェンタニール、モルフィン及びメペリジンである。

前述の治療用生物学的活性化合物のリストは、例として示したのみであって、いずれの形式においても本発明の範囲を限定することを意図するものではない。局所麻酔薬、ビタミン、ワクチン、創傷治癒刺激薬、免疫抑制薬、制吐薬、抗マラリア薬、抗真菌薬、抗精神病薬、解熱薬、血液凝固薬、利尿薬、カルシウムチャネル阻害薬、気管支拡張薬などを含む、他の種類の多くの医薬品が、本発明の組成物及び方法において有用である。 20

さらに本発明は、リポソームがさらにシクロデキストリンを被包しているような、医薬化合物を被包しているリポソーム混合物を投与することを含む、動物において医薬化合物の半減期を延長する方法を提供する。

さらに本発明は、個体にリポソーム組成物を投与して個体の病態生理学的状態を治療する方法で、該組成物が治療に有効な量の該リポソーム内に被包された化合物を含有し、さらに該リポソーム組成物はシクロデキストリンを被包しているような方法を提供する。本発明の組成物について適切である用語“治療に有効な”の意味は、生物学的に活性がある治療薬が、水相中で、該治療薬が意図する特定の医療効果を達成するために十分な濃度で小胞内に存在することである。達成することができる所望の医療効果の限定を意図しない例として、化学療法、抗生物質療法及び代謝の調整がある。正確な用量は、具体的な治療薬及び所望の医療効果のような因子、さらには年齢、性別、全身の状態などの患者の因子に応じて変化するであろう。当業者は、適切でない経験に頼ることなく治療有効濃度を確立するために、これらの因子を考慮し、かつこれらを使用することが容易にできる。 30

しかし一般に、ヒトにおける適切な用量の範囲は、体表面積について $0.1 \sim 6000 \text{ mg/m}^2$ の範囲である。皮下投与のようなある適用において、必要とされる用量は非常に小さいが、腹腔内投与のような別の適用においては、使用が望ましい用量は、非常に大きい。前述の用量の範囲以外の用量が定まったとしても、この範囲は、あらゆる生物学的活性物質を実際に使用する範囲に包含されている。 40

本発明のリポソームは、いずれか所望の経路で投与することができる。例えば、クモ膜下、腹腔内、皮下、筋肉内、静脈内、リンパ内、経口及び粘膜下への投与である。さらに、気管支上皮、胃腸管上皮、尿生殖器上皮を含む様々な種類の上皮、及び体内の様々な粘膜に投与することもできる。当業者が理解するように、最適の投与経路は、選択された生物学的活性化合物によって決まる。例えば、メトトレキサートは経口投与されるが、腹腔内投与の方が利点がある。経口投与後のメトトレキサートの吸収経路は、患者によって非常に異なり、飽和状態が出現する。これとは対照的に、該薬物の筋肉内又は皮下投与は、より予測可能でありかつ完全であり、その結果経口投与後よりも、より高い血清濃度を生じる。

シクロデキストリン含有リポソーム類は、いくつかの理由により、皮下投与された医薬品の持続放出性薬物送達において有用である。これらは、保存時に非常に安定である。さらに、該薬物は、*in vitro*及び*in vivo*の双方において、延長された時間放出される。それらのスポンジ様の内部構造は、水性内室への有効な被包、保存安定性、及び*in vivo*での持続性放出をもたらす。例えば、血漿メトトレキサートの半減期は、遊離メトトレキサートの206倍にも達し、かつ最高血漿濃度は、非被包のメトトレキサートと比べ、1/126と低かった。シクロデキストリン存在下で該リポソームに封入された薬物の被包によってもたらされた薬物動態の顕著な修飾の結果、薬効を、100倍以上に増強することができる。例えばメトトレキサートの効能は、本発明の内容に従って投与する場合、130倍に増強し、かつLD₅₀は、1/110にも減少する。効能及びLD₅₀のこれらの変化は、該生物学的活性化化合物の被包時の該リポソームへの導入のために、治療指数に有意の変化がないことを示している。

10

本発明のリポソーム組成物は、臓器又は細胞を標的とする特異性を持たせるために修飾することができる。これらの修飾は、毒性が高い、もしくは重篤な副作用を生じるような医薬品を投与するために、本発明のリポソーム組成物を用いる場合に、特に意義がある。

リポソームの標的指向は、解剖学的及び機械的因子を基に分類されている。解剖学的分類は、選択性の程度、例えば臓器特異性、細胞特異性又はオルガネラ特異性を基にしている。機械的標的指向は、それが受動的であるか又は能動的であるかによって区別することができる。受動的標的指向は、洞様毛細血管を有す臓器の細胞内皮系の細胞への分布に、リポソームの自然の性質を利用する。一方能動的標的指向は、自然に局在している部位よりも、臓器及び細胞の型に標的をあわせるために、リポソームを、例えばモノクローナル抗体、糖類、糖脂質、タンパク質などの特定のリガンドとの組み合わせること、もしくは該組成物又はリポソームの大きさを变化することに起因する、該リポソームの変化に関連している。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Gannaro, A.R., Mack Publishing 発行、18版、16911-1693)を参照。例えば、MVL-CD-MTX粒子は、体腔又は皮下空間のような組織空間への注射後の、それらのリンパ及び体循環への取り込みを減少するために、大きい平均粒度で合成することができる。それらの大きい粒度は、さらにマクロファージへの取り込みも阻害する。

20

標的とされた送達システムの表面を、様々な方法で修飾することができる。本発明のリポソーム組成物の場合、脂質群は、該リポソーム二重層と安定に連結し標的リガンドを維持するために、このリポソームの脂質二重層に取り込まれる。脂質鎖を標的リガンドに結合するために、様々な結合基を使用することができる。標的とされた送達システムの表面に結合する化合物は、分子量約125-200の小さいハプテンから、分子量が少なくとも6000であるより大きい抗原まで、様々なことができるが、一般に分子量は1,000,000よりも小さい。

30

下記の実施例を、本発明の方法の様々な実施態様を詳細に説明するために記載するが、いかなる形においても、限定を意図するものではない。

実施例 1

多胞体リポソーム-メトトレキサート-β-シクロデキストリン製剤、MVL-CD-MTXの合成

40

シクロデキストリン存在下でメトトレキサートを被包している多胞体リポソーム (MVL-CD-MTX) は、Kimらの方法 (Cancer Treat.Rep.71:705 (1987)) に記載された方法を、少し変法して用いた。簡単に述べると、MVL-CD-MTXの各バッチにおいて、不連続水相は、2-ヒドロキシ-β-シクロデキストリン溶液 (100mg/ml)、HCl (0.1N) 及びメトトレキサート (10mg/ml) から成る。この不連続水相1mlを、ジオレオイルレシチン13.9μmol、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール3.15μmol、コレステロール22.5μmol、トリオレイン2.7μmol及びクロロホルム1mlを含む1個の1-ドラムバイアルに加えた。このバイアルを、ボルテックスミキサーの上部に水平に装着し、最高速度で6分間振盪した。得られた“油中水型”乳剤の半量を、先端が細いパストゥールピペットを用い、各々水2.5ml、グルコース (32mg/ml) 及び遊離塩基リジン (40μM) を含む、2個の1-ドラムバ

50

リアルに、迅速に移した。その後、各バイアルをボルテックスミキサーを用い、最高速度で5秒間振盪し、クロロホルム小球を形成した。この2個のバイアル内のクロロホルム小球懸濁液を、水5ml、グルコース(32mg/ml)及び遊離塩基リジン(40mM)を含む、250mlの三角フラスコに移した。流量7リットル/分の窒素ガスを用い、前記クロロホルムを、37°Cで10~15分間かけて蒸発させた。その後MVL-CD-MTX粒子を、600×gで5分間の遠心分離によって、分離し、0.9%NaCl溶液を用い、3回洗浄した。

実施例 2

クモ膜下の薬物動態研究

ラットは、塩酸ケタミン(90mg/kg)及びアセトプロマジンマレエート(2.2mg/kg、筋注)で麻酔し、便利な定位フレームに固定した。15番のブレードを用い、後頭稜から耳の真後ろまで、長さ約1cmの正中線皮膚切開を行った。頭蓋の後頭稜に沿って筋肉靱帯を、正中線両側に4mm、メスで剥離した。骨膜起子の鋭及び鈍の両端を用い、後頭骨から筋肉を分離し、環椎後頭骨膜を外した。切開部に牽引子を配置し、筋肉をわきに引っ張り、環椎後頭骨膜が良く見えるようにした。0.9%NaClを溶媒とし、メトトレキサート100μg(0.22μmol)を含有する、非被包メトトレキサート20μl又はMVL-CD-MTX20μlのいずれかを、前述の膜を介して、30-ゲージ針を用い20秒間注入した。この針を抜き取り、皮膚を3-0絹糸で縫合し、その動物に、水和作用のために、乳酸を添加したリンガー液10mlを、皮下投与した。

注入後適当な時点で、麻酔下で環椎後頭骨膜を再度露呈し、髄液を、19-ゲージ針で30~60μl採取した。髄液試料は、各回とも、3匹のラットから得た：非被包メトトレキサート群は、注入後、1分、4、24及び48時間で、Depo-メトトレキサート群は、注入後、1分後、1、3、7、14及び21日後に採取した。MVL-CD-MTXの髄液試料は、0.9%NaCl溶液70μlで希釈し、その後エッペンルフ微量遠心分離1分間で、放出された遊離メトトレキサートを含む上清を、被包されたメトトレキサートを含む沈殿から、分離した。次に、この沈殿に、メタノール50μl及び滅菌推50μlを順に添加し、攪拌し、MVL-CD-MTX粒子を破壊した。前述の髄液試料は、下記的高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を行うまで、-20°Cで凍結した。

髄液の採取後、それらの動物は、過量のケタミン(90mg/kg)及びアセトプロマジン(20mg/kg)を腹腔内投与し、死に至らしめた。心穿刺で、血液標本を得、かつ放血を行った。血漿を分離し、COBAS Fara装置(Roche Diagnostic Systems社)を用いたEmitメトトレキサートアッセイで測定するまで、-20°Cで凍結した。次に、頭蓋冠を露出し、注意深く骨鉗子で取り外す。脳槽の中身全体を、露呈した脳から、スパーテルでかき集め、蒸留水で頭蓋全体を洗浄した。その後、脊椎の内容物を別に収集し；尾のつけ根に対し、2.5cm突き出た地点で、低位の腰椎孔へ、19-ゲージ針を挿入し、迅速に蒸留水を注入することによって、脊髄を、頭蓋へと押し出した。空の脊柱管を蒸留水で完全に洗浄し、脊柱管のメトトレキサートを完全に回収した。脳槽試料は、脊柱管試料とは別に分析した。両方の組織試料は、ポリトロンホモジナイザーを用い、水でホモジナイズした。

実施例 3

メトトレキサートの測定

脊髄内のメトトレキサート量は、大槽の髄液中のメトトレキサート量を加えて算出した。脳及び脊髄のホモジナイズした試料は、Alkayalらの方法(Ther. Drug Monit., 12:191(1990))で抽出した後、HPLCで分析した。簡略に述べると、ガラス遠心管中に、ホモジネートしたアリコート500μl、テオフィリン水溶液100μl(内部標準、2.0mg/ml)、トリクロロ酢酸250μl(10%水溶液)、及び氷酢酸250μlを入れ、混合した。その後、メトトレキサートの遊離酸を、酢酸エチル5mlで抽出した。酢酸エチル有機相は、デカントし、60°Cの窒素下で蒸発した。抽出された残渣を、移動相200μl及び得られた液体100μlを、HPLCに注入した。H₃PO₄(10mM)：メタノールの比180:540:280から成る移動相は、Watersモデル510ポンプを用い、Beckman超球形(ultrasphere)オクタデシルシラン(ODS)の5μm×4.6mm×25cmのカラム(Beckman社、カールスバート、CA)上を、1ml/分の流速で流した。メトトレキサートは、Watersモデル490プログラム可能な多波長検出器(Water

10

20

30

40

50

s Assoc., ミルフォード、MA) を用い、303nmで検出した。テオフィリン及びメトトレキサートの保持時間は、それぞれ5.2分及び7.2分であった。検出限界は、注入されたメトトレキサート5pmolであった。

実施例 4

薬物動態の分析

RSTRIPコンピュータープログラム (MicroMath Scientific Software社、ソルトレーク、UT) を用い、薬物動態を分析した。血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、最終測定濃度まで、線形の台形公式によって決定し、かつ無限大まで外挿した。

実施例 5

MVL-CD-MTXの特徴

MVL-CD-MTXの平均体積負荷直径は、 14.1 ± 3.4 (±標準偏差、SD) であった。被包の有効性は、 $64.5 \pm 6\%$ ($n=6$)、かつ捕捉された体積は、脂質の $12.9 \pm 1.0 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$ であった。MVL-CD-MTXを0.9% NaCl溶液中で、4℃で保存した場合の、4カ月後のメトトレキサート放出の低下は5%であった。

実施例 6

CNS薬物動態

図1及び2は、MVL-CD-MTX及び非被包されたメトトレキサートの、中枢神経系 (CNS) の薬物動態を比較した (CSF濃度及びCNS総量に関して)。遊離メトトレキサートのCSF濃度は、第一日目に最大値に達し、その後2指数関数的 (biexponential) に減少し、最初及び最終半減期は、それぞれ0.41及び5.4日であった。最終半減期は、非被包されたメト

トレキサートよりも、18倍長かった。CNS内の総薬物量は、MVL-CD-MTX注入後9日の半減期で減少したのに対し、非被包メトトレキサートの半減期は0.03日であった。21日目には、メトトレキサートの18%が、MVL-CD-MTX注入後のCNSに残留していた。

CNS内でのメトトレキサート及びMVL-CD-MTXの薬物動態パラメーターを、表1にまとめた。MVL-CD-MTX投与後の遊離メトトレキサートの最高濃度は、非被包メトトレキサート投与後のその約1/70であった。脳槽内の総合メトトレキサート量の割合は、MVL-CD-MTX注入後、1分、7、14及び21日でそれぞれ、 $12 \pm 8\%$ 、 $65 \pm 11\%$ 、 $51 \pm 40\%$ 、及び $65 \pm 36\%$ で、非被包メトトレキサート注入後、1分、4時間後でそれぞれ、 $4 \pm 1\%$ 、及び $23 \pm 1\%$ であった。

表1

100 μg 注入後のCNS のメトトレキサート薬物動態パラメーター

	非被包メトトレキサート	MVL-CD-MTX	
		遊離	合計
C_{MAX} (μM)	1751 ± 302	23.7 ± 11.7	1133 ± 631
濃度 $t_{1/2\alpha}$ (日)	0.024	0.41	0.18
濃度 $t_{1/2\beta}$ (日)	0.30	5.4	4.0
AUC ($\mu\text{M} \times \text{日}$)	154.3	50.5	624.2
総 $t_{1/2}$ (日)	0.03	NA	9.0

C_{MAX} 、最高CSF濃度； $t_{1/2}$ 、半減期；AUC、曲線下面積；NA、不適

血漿濃度の分析は、非被包メトトレキサート投与後の1点を除き (槽内注入後4時間： $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$)、メトトレキサートの検出不能濃度を示した (検出限界は、 $0.02 \mu\text{M}$)。

実施例 7

毒性

MVL-CD-MTXを注入したラットの行動に、異常は認められなかった。MVL-CD-MTXを注入した3匹のラットは、3週間かけて、 343 ± 5 から 383 ± 19 gに体重増加した。一方、いずれの注入も外科的処置も施さなかった対照ラットは、 340 ± 1 から 400 ± 12 gまで増加した。

多胞体リボソーム内のメトトレキサートの被包は、髄液からの遊離メトトレキサートの最終半減期を18倍増加した。遊離メトトレキサート濃度は、約 $0.5 \mu\text{M}$ 以上であり、これはMVL-CD-MTX単回注入後7~14日で、*in vitro*の試験より、推定された細胞毒性を示す最低濃度と考えられる。対照的に、非被包薬物のこの期間は、約1日であった。

MVL-CD-MTX群の遊離濃度の曲線下面積は、非被包群のその1/3であった。このことは、非被包群中に高い遊離メトトレキサート濃度が生じる場合の、メトトレキサート髄液クリアランス機構が飽和したことに起因するであろう。第二の可能性は、遊離メトトレキサートのより多い分画が、拡大した暴露によって、脳及び脊髄実質へと浸透し、その結果、より少ない分画が髄液中に残ることである。しかし別の可能性は、MVL-CD-MTXの曲線下面積が、試料採取スケジュールによって、不十分であったことである。

メトトレキサートの総量及び脳槽内の量の比較(図2)は、MVL-CD-MTXの槽内注入後の脊髄及び脳槽への、良い分布を示した。例えば、21日目の脳槽内のメトトレキサート量は、総量(脳+脊髄)のわずかに $65 \pm 36\%$ であった。しかし、槽試料のメトトレキサートの高い分画は、MVL-CD-MTX注入第一日目以降、遊離の薬物の形態であった。髄液に対して高密度のMVL-CD-MTX粒子は、槽内髄液から、重力によってMVL-CD-MTX粒子の沈殿を生じることがあるのに対し、放出された遊離メトトレキサートは、拡散するよう遊離する。*in vitro*及び*in vivo*双方の、MVL-CD-MTXからメトトレキサートの延長された放出は、多胞体リボソームが、メトトレキサートの薬物貯蔵庫として有用であることを示している。

MVL-CD-MTXの神経毒性は、多胞体リボソーム内のメトトレキサートの初期のポーラスのほとんどを保持することによって、低減することができるが、腫瘍殺傷力は、延長された時間、最低細胞毒性濃度よりもわずかに多い遊離メトトレキサートを維持することによって増強される。本発明は、メトトレキサートのような、生物学的活性物質の徐放性薬物送達システムとしての、シクロデキストリンリボソームの有用性を明らかにしている。本発明は、ヒトにおける軟膜白血病又は癌腫症の予防及び治療に関し、回数が少ないCSF内投与の有用性を明らかにしている。

実施例 8

MVL-CD-MTXの皮下投与

BDF1及びDBA/2Jマウスは、Simonsen Laboratories社(ギルロイ、CA)から入手した。L1210白血病は、雌のDBA/2Jマウスの、一連の腹腔内への継代接種によって維持した。MVL-CD-MTXは、実施例1に記載されたように調製した。

皮下(sc)薬物動態試験を、雌のBDF1マウス、体重20~25gを用いて行った。マウスに、 $0.9\% \text{NaCl } 200 \mu\text{l}$ を溶媒とする、非被包標準メトトレキサート又はMVL-CD-MTXの 10mg/kg ($22 \mu\text{mol/kg}$)を腹部皮膚の中央に、30-ゲージ皮下注射器を用いて皮下注射した。血液試料は、非被包メトトレキサート群は、0、0.25、1及び4時間の時点で、MVL-CD-MTX群は、0、1、3、7、14及び21日の時点で、麻酔下で、頸静脈から採取した。各時点で、3匹の動物を使用した。血漿は分離し、COBAS Fara装着(Rochdiagnostic Systems社、モントクレア、NJ)で、Emit[®]メトトレキサートアッセイで分析するまで、 -20°C で凍結保存した。

次に、皮膚全体及びその下側に位置する腹膜を含む、腹壁組織の全体の厚さを、肋骨縁から鼠蹊部へ、並びに一方の側腹部から他方へと切開した。この全部の組織標本に、蒸留水を20ml以上加えた後、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。このホモジネートを、バイオソニックIVプローブ超音波処理器で、最大に調節し、60秒間超音波処理し、かつYMT限外ろ過膜(Amicon社、製品番号4104)で、ろ過した。全ての試料はHPLCで分析するまで、 -20°C で保存した。RSTRIPプログラムを用い、曲線をあてはめた。AUCは、線形台形公式で、最終測定濃度まで引き、かつ無限大まで外挿した。

実施例 9

HPLCアッセイ

H₃PO₄ (10mM) :KH₂PO₄ (10mM) :メタノールの比が、162:488:350 (pH= 3) から成る移動相を、Watersモデル510ポンプを用い、Beckman超球形ODS 5μ l ×4.6mm×25cmのカラム上を、1ml/分の流速で流した。メトトレキサートは、UV Watersモデル490プログラム可能な多波長検出器を用い、303nmで検出した。メトトレキサートの保持時間は、5分であり、検出限界は、注入されたメトトレキサート5pmolであった。

実施例10

毒性及び有効性試験

第0日目に、BDF1マウスの腹腔に、10⁶のL1210細胞を注入し、かつ第1日目に、0.9%NaCl 10
1溶液に懸濁された被包メトトレキサート又はMVL-CD-MTXを、皮下注射で、単回投与処理した。各群は、動物5匹で、対照群(0.9%NaCl単独投与)は、10匹を使用した。各動物の生存を観察した。生存期間の中央値を使用し、下記式に従い、“生命延長”(ILS)を算出した：

$$ILS = (T/C) / C \times 100\%$$

(式中、Tは、処理群の生存期間の中央値、及びCは、対照群の生存期間の中央値である)。

実施例11

MVL-CD-MTX薬物動態

薬物動態のパラメーターを、表2にまとめた。皮下注射後、皮膚中のメトトレキサートの 20
総量は、指数関数的に減少し、半減期は、非被包メトトレキサートでは0.16時間で、MVL-CD-MTXでは50.4時間であった(図3)。血漿中の半減期は、被包メトトレキサートは0.53時間で、MVL-CD-MTXは109時間であった。最高血漿濃度は、被包メトトレキサートでは、15分後に17.4±5.2μM (SD) で、MVL-CD-MTXは、3日目に0.138±0.061μM (SD) であった(図4)。

表2

薬物動態パラメーター

皮下		
総量のt _{1/2} *(時)	0.16	50.4
血漿		
C _{MAX} ±SD(μM)	17.4±5.2	0.138±0.061
濃度のt _{1/2} (時)	0.53	109
AUC(μM ×時)	17.3	24.5

実施例12

SC MVL-CD-MTXの有効性

図5は、マウスのL1210モデルのILS曲線を示す。最大効能(最大ILS)は、非被包メトトレキサートは183%、MVL-CD-MTXは217%であった(マン・ホイットニーのノンパラメトリック検定により、=0.5)。非被包メトトレキサートに対するMVL-CD-MTXの単回投与の相対効能は、130 (PHARM/PCSプログラム、MicroComputer Specialists社、フィラデルフィア、PA)であった。LD₅₀は、プロビット変換後に計算した。このLD₅₀は、非被包メトトレキサート単回投与では2650mg/kgであり、MVL-CD-MTXでは24mg/kgであり、それらの比は110であった。

非被包メトトレキサートと比較して、血漿の半減期は、206倍延長し、かつ血漿濃度は1/126に減少したが、曲線下面積は変化がなかった。この薬物動態の顕著な変化の結果、薬物の効能は130倍増強され、LD₅₀値は、治療指数に顕著な変化がないことを示した。

30

40

50

実施例13

腹腔内投与のin vitroの薬物放出試験の薬物動態

メトトレキサート放出試験は、最大40倍量の0.9%NaCl溶液又は血液銀行から入手したヒト血漿を添加して行い、MVL-CD-MTX沈殿を洗浄し、かつ4℃又は37℃で保存した。37℃のインキュベーションでは、0.01%アジ化ナトリウムを添加し、微生物の増殖を阻害した。適当な時点で、攪拌後アリコートを取り出し、5倍量の0.9%NaCl溶液で希釈し、エッペンドルフ遠心分離で1分間遠心した。上清を除去後、この沈殿にメタノール200μlを添加し、MVL-CD-MTX粒子を破壊し、かつ得られた混合物を分析まで-20℃で保存した。この沈殿中のメトトレキサート量は、HPLCで分析し、MVL-CD-MTX残留物の初期量に対する百分率で表現した。メトトレキサートは、実施例9に記載されたように、HPLCで測定した。

10

実施例14

薬物動態試験、

雄BDF1マウス、体重18~25gを用い、in vivo試験を行った。マウス群に、非被包メトトレキサート対照、シクロデキストリン-メトトレキサート対照（メトトレキサート20mg/ml; 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン2mg/ml; グルコース6.4mg/ml; 遊離塩基リジン8mM; 及びHCl 2mM）、又はMVL-CD-MTXとして、0.9%NaCl 1ml中のメトトレキサート10mg/kg量を、静脈注射した。非被包メトトレキサート又はシクロデキストリン-メトトレキサート複合体注射後、0（注射直後）、1、4時間後に：並びに、MVL-CD-MTX注射後1、5、10、20日目に、3匹のマウスを死にいたらしめ、血液試料を頸静脈から採集し、ヘパリン処理した試験管に入れた。これらの血漿を分離し、COBAS Fara装置でEmit^Rメトトレキサートアッセイによって分析するまで、-20℃で保存した。Emit^Rアッセイとは、試料中に存在する薬物、及び抗体結合部位に関する酵素グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼで標識した薬物の競合を基にした、同族体酵素のイムノアッセイ法である。感度限界は、0.02μMであった。

20

腹水試料5μlを、ガラス毛管ピペットに採取し、0.9%NaCl 140μMで希釈した。MVL-CD-MTXを注射した動物は、この試料をエッペンドルフ遠心分離機で1分間回転し、上清（遊離メトトレキサート）及び沈殿（被包されたメトトレキサート）に分離した。この沈殿に、メタノール50μlを添加し、攪拌し、多胞体粒子を破壊した。この後腹腔を、0.9%NaCl溶液、2~3mlで3回洗浄した。全試料をHPLCで分析するまで、-20℃で保存した。これらの試料の抽出の必要はなく、内部標準を使用せず、かつ妨害ピークは存在しなかった。RSTRIPコンピュータープログラムを用い、薬物動態データを分析した。曲線下面積は、線形台形公式で、最終測定濃度まで引き、かつ無限大まで外挿した。

30

実施例15

有効性及び毒性試験

第0日目に、BDF1マウスの腹腔内に、10⁶のL1210細胞を接種し、かつ第1日目に、0.9%NaCl溶液1mlを溶媒とする、非被包メトトレキサート、MVL-CD-MTX又は空の多胞体リポソームを、単回腹腔内注射し、処理した。各群は動物5匹で、未処理対照群（0.9%NaCl溶液1ml投与）は、15匹を使用した。結果は、生存延長で表した。

実施例16

40

in vitro放出試験

得られた多胞体リポソーム粒子は、体積負荷した平均直径（±SD）が11.3±3.3μM（図6及び7）、並びに捕捉された割合は、64.5±6.0%（n=6）であった。4℃の0.9%NaCl溶液中のMVL-CD-MTXの保存は、4カ月で5%の漏出を起こした。37℃の0.9%NaCl溶液中では、3.5カ月で、多胞体リポソーム粒子の内部のメトトレキサート初期量の63±12%（平均±SD）であった。37℃のヒト血漿では、薬物放出の半減期は、40日であった（図8）。

実施例17

薬物動態

腹腔内投与の薬物動態のパラメーターを、表3にまとめた。MVL-CD-MTX注射後、腹腔内

50

のメトトレキサート総濃度は、5日間で、5倍に増加した（図8）。この間、腹水量は顕著に減少した。第1日目以降、総濃度は減少し、半減期は1.9日であった（図9）。

表3

腹腔内投与後のメトトレキサートの薬物動態パラメーター

腹腔				
	非被包MTX	CD-MTX	MVL-CD-MTX	
			遊離	総合
濃度の $t_{1/2}^b$ (時)	0.54	0.46	39.6	45.6
総量の $t_{1/2}$ (時)	0.45	0.41	NA ^d	64.2
$C_{MAX}^c \pm SD$ (μM)	430 $\pm$ 13	379 $\pm$ 10	66.7 $\pm$ 18.3	1863 $\pm$ 168
AUC ($\mu M \cdot$ 時)	233	316	12260	273800
血漿				
濃度の $t_{1/2}^b$ (時)	0.9	0.6	240	NA
$C_{MAX}^c \pm SD$ (μM)	3.3 $\pm$ 0.03	3.3 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.05	NA
AUC ($\mu M \cdot$ 時)	11.2	12.2	18.4	NA

^a シクロデキストリン-メトトレキサート；^b 半減期；^c 最高濃度；^d 不適

実施例18

有効性試験

マウスのL1210モデルについて、図10は、生存曲線を、図11は、ILS曲線を示す。等能用量（EPD）は、MVL-CD-MTXは6mg/kgで、非被包メトトレキサート適用量として算出された非被包メトトレキサートは2000mg/kgであった。従って、MVL-CD-MTXは、メトトレキサート単回投与の効能を334倍増強した。最大有効性（最大ILS）は、非被包メトトレキサートの100% ILSから、MVL-CD-MTXの217% ILSに、2倍以上増加した（マン・ホイットニーのノンパラメトリック検定で、 $p < 0.01$ ）。

LD₅₀値は、プロビット変換後PHARM/PCSプログラム（MicroComputer Specialists社、フィラデルフィア、PA）で計算した。LD₅₀値は、非被包メトトレキサートの単回投与で2755mg/kgであり、MVL-CD-MTXでは17.5であった。単回腹腔内投与用量の治療指数（TI）は、下記式で算出した：

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

TIは、非被包メトトレキサートが1.4で、MVL-CD-MTXが2.9であった。グルコースを含むがメトトレキサートを含まない、空の多胞体リポソームは、腫瘍を伴わない5匹のマウス群では、毒性がなかった。

MVL-CD-MTXは、4℃で保存した場合、非常に安定であった。その薬物動態試験は、多胞体リポソーム内被包によって、薬物作用が持続することを示した。MVL-CD-MTX投与後の、腹腔内の遊離メトトレキサート濃度の半減期は、非被包メトトレキサート投与後よりも73倍延長した（39.6時間対0.54時間）。

MVL-CD-MTX投与後の腹腔内のメトトレキサート総濃度は、第1日目に実質的に増加し、1週間の間は、元来の濃度よりも高い状態を保った。この初期の濃度上昇は、懸濁媒質に対する多胞体リポソーム粒子のクリアランスの相違によるものであろう。

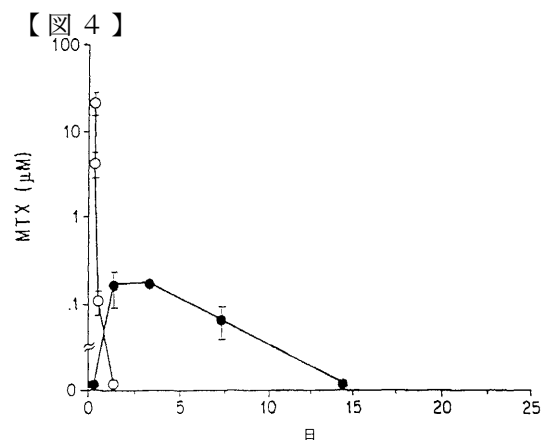
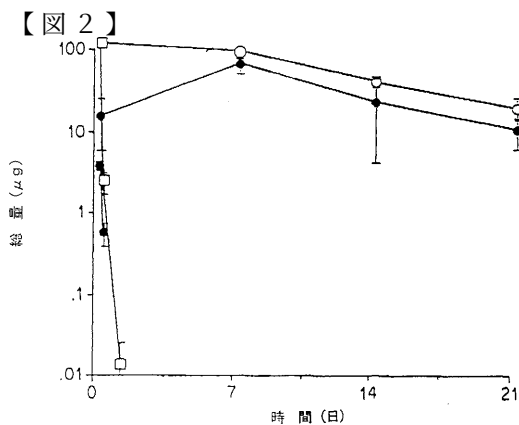
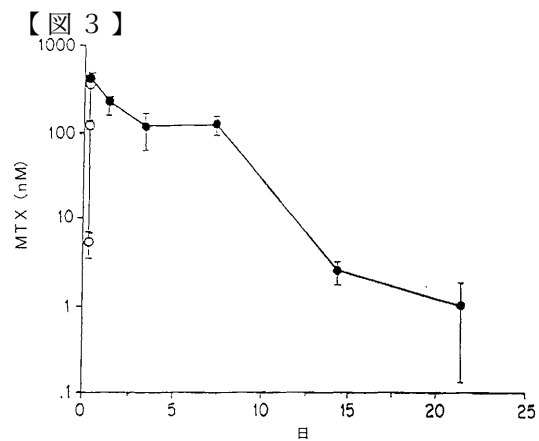
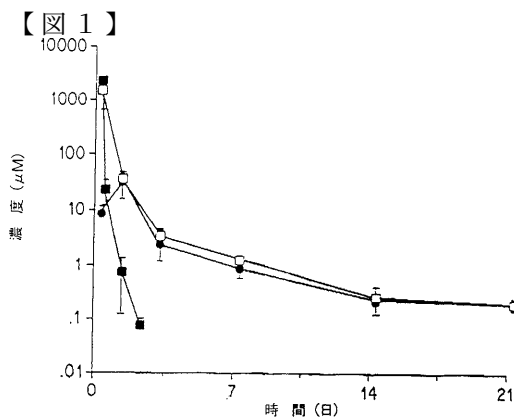
MVL-CD-MTX注射後の血漿AUCは、非被包メトトレキサート注射後のそれに類似していた（それぞれ、18.4及び11.2 μM /時）。このことは、MVL-CD-MTX由来のメトトレキサート

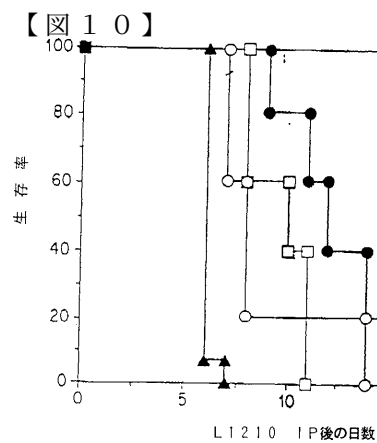
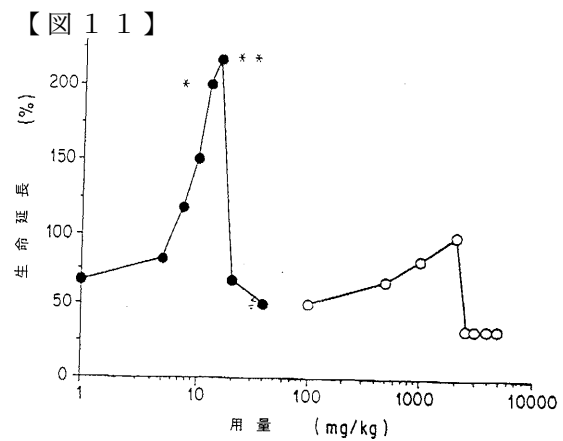
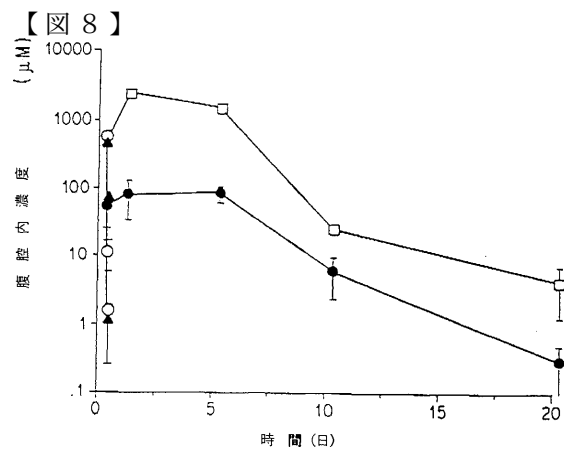
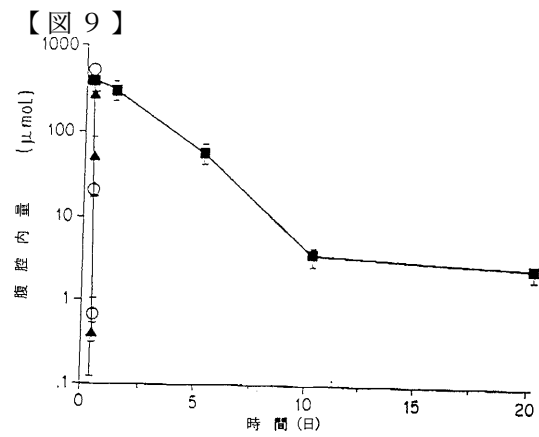
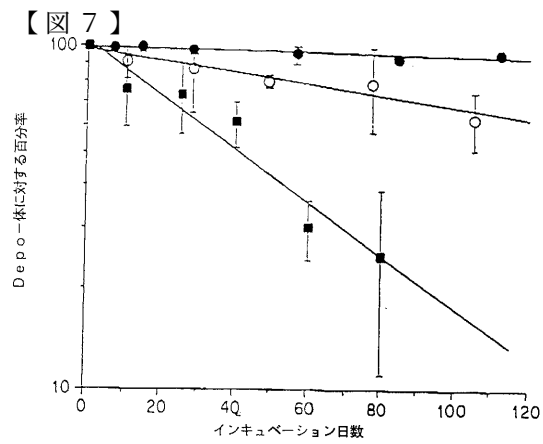
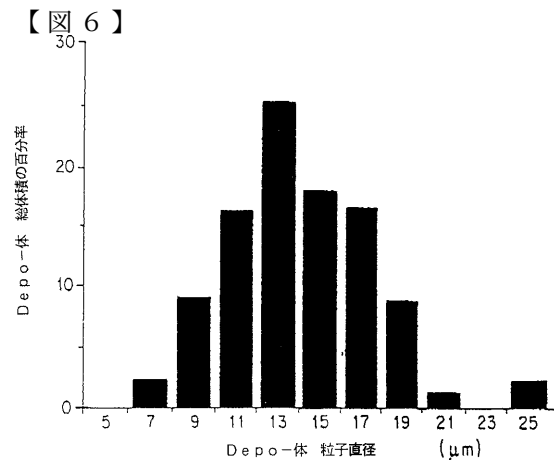
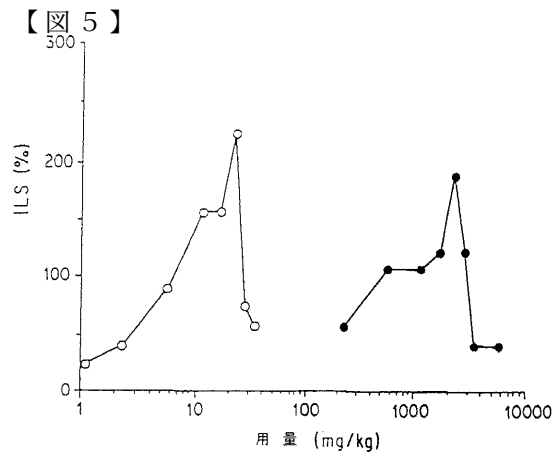
は全て体循環へと生物学的に利用されたことを示している。

本願明細書中に記載された全ての特許及び論文は、本発明が関連する業者の水準を示すものである。全ての特許及び論文は、各論文が具体的かつ個別に内容として引用されるのと同様に、本願明細書中に内容として引用される。

当業者は、本発明は、それら固有のものに加え、目的を実行し、かつ言及された結果及び利点を得ることに適合していることを、容易に理解するであろう。本願明細書中に記載された方法、操作、処理、分子及び具体的な化合物に沿った本発明の実施態様は、現在の好ましい実施態様の代表的、典型的なものであり、かつ本発明の範囲を限定することを意図したものではない。それらの変更及び別の使用は、請求の範囲によって定義された本発明の思想の範囲内で含有されたものであることは、当業者には、明らかである。

10





フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人

弁理士 浅井 賢治

(72)発明者 キム シニル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92075 ソラナ ビーチ フォード アベニュー 54
8

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 特開平01-501550 (JP, A)

特開平02-295927 (JP, A)

特開昭63-106544 (JP, A)

特開昭64-003115 (JP, A)

特開昭64-003114 (JP, A)

特表平04-504404 (JP, A)

特表平07-501813 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K 9/00

A61K 47/00