

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-510096

(P2025-510096A)

(43)公表日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
A 6 1 K	31/7048(2006.01)	A 6 1 K	31/7048	4 C 0 7 6
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	11/08 (2006.01)	A 6 1 P	11/08	
A 6 1 K	9/72 (2006.01)	A 6 1 K	9/72	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全83頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2024-556375(P2024-556375)	(71)出願人	513016884
(86)(22)出願日	令和5年3月21日(2023.3.21)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月13日(2024.11.13)		ザ ユニヴァーシティ オブ イリノイ
(86)国際出願番号	PCT/US2023/015762		THE BOARD OF TRUSTE
(87)国際公開番号	WO2023/183297		ES OF THE UNIVERSITY
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		OF ILLINOIS
(31)優先権主張番号	63/321,965		アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1
(32)優先日	令和4年3月21日(2022.3.21)		アーバナ エス ライト ストリート 5 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		6 ヘンリー アドミニストレーション
			ビルディング 3 5 2
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(71)出願人	524350984
	最終頁に続く		システティック メディシズ インコー
			ポレイテッド
			c y s t e t i c M e d i c i n e s ,
			I n c .
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アムホテリシン B の脂質被覆結晶を含むイオンチャネル補欠組成物

(57)【要約】

(i) アムホテリシン B、又はその薬学的に許容される塩若しくは水和物；(i i) コレステロール；(i i i) 水素添加大豆ホスファチジルコリンとジステアロイルホスファチジルグリセロールとを含むリン脂質；及び(i v) 塩化カルシウム (C a C l ₂) を含む医薬組成物を開示する。また、その医薬組成物を、疾患又は障害(嚢胞性線維症など)を処置するため、気道上皮液体のpHを上昇させるため、気道上皮液体への重碳酸塩分泌を増加させるため、及び対象の努力性1秒量を増加させるために使用する方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アムホテリシン B (A m B)、又はその薬学的に許容される塩若しくは水和物；
 (i i) コレステロール (C h o l)；
 (i i i) 水素添加大豆ホスファチジルコリン (H S P C) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) とを含む、リン脂質；及び

(i v) 塩化カルシウム (C a C l ₂)

を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

A m B の量が約 0 . 5 % ~ 約 2 5 w / w % である、請求項 1 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 3】

A m B の量が約 3 % ~ 約 1 6 w / w % である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

A m B の量が約 1 4 w / w % である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

C h o l の量が約 0 . 1 % ~ 約 8 w / w % である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

C h o l の量が約 0 . 3 % ~ 約 6 w / w % である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

C h o l の量が約 0 . 5 % ~ 約 3 w / w % である、請求項 6 に記載の医薬組成物。 20

【請求項 8】

C a C l ₂ の量が約 1 % ~ 約 1 0 w / w % である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

C a C l ₂ の量が約 4 % ~ 約 7 w / w % である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

リン脂質の量が約 6 0 % ~ 約 9 5 w / w % である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

リン脂質の量が約 7 0 % ~ 約 9 0 w / w % である、請求項 10 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 12】

C h o l とリン脂質との重量比が約 0 . 0 0 1 : 1 ~ 約 0 . 1 : 1 である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

C h o l とリン脂質との重量比が約 0 . 0 0 5 : 1 ~ 約 0 . 0 5 : 1 である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

水素添加大豆ホスファチジルコリン (H S P C) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) との重量比が約 2 : 1 ~ 約 1 9 : 1 である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。 40

【請求項 15】

水素添加大豆ホスファチジルコリン (H S P C) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) との重量比が約 7 : 1 ~ 約 1 2 : 1 である、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

C h o l と A m B とのモル比が約 0 . 0 5 : 1 ~ 約 1 . 2 : 1 である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

C h o l と A m B とのモル比が約 0 . 4 : 1 ~ 約 1 . 2 : 1 である、請求項 1 6 に記載 50

の医薬組成物。

【請求項 18】

Chol と AmB とのモル比が約 0.05 : 1 ~ 約 0.4 : 1 である、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

Chol と AmB とのモル比が約 0.4 : 1 である、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

リン脂質と CaCl₂ とのモル比が約 4 : 1 ~ 約 2 : 1 である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

リン脂質と CaCl₂ とのモル比が約 2 : 1 である、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

AmB が約 75% より高い結晶化度を有する、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

AmB が約 85% より高い結晶化度を有する、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

AmB が約 95% より高い結晶化度を有する、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

(i) 約 14.0 w/w% のアムホテリシン B (AmB) ;

(ii) 約 2.3 w/w% のコレステロール (Chol) ;

(iii-a) 約 70.3 w/w% の水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC)

;

(iii-b) 約 7.8 w/w% のジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) ; 及び

(iv) 約 5.52 w/w% の塩化カルシウム (CaCl₂)

を含むか、から本質的になるか、又はからなる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

(i) 約 14.0 w/w% のアムホテリシン B (AmB) ;

(ii) 約 6.81 w/w% のコレステロール (Chol) ;

(iii-a) 約 51.2 w/w% の水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC)

;

(iii-b) 約 22.8 w/w% のジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) ; 及び

(iv) 約 5.2 w/w% の塩化カルシウム (CaCl₂)

を含むか、から本質的になるか、又はからなる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

(i) 約 3.4 w/w% のアムホテリシン B (AmB) ;

(ii) 約 0.57 w/w% のコレステロール (Chol) ;

(iii-a) 約 80.72 w/w% の水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) ;

(iii-b) 約 8.97 w/w% のジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) ; 及び

(iv) 約 6.34 w/w% の塩化カルシウム (CaCl₂)

を含むか、から本質的になるか、又はからなる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

(i) Chol / AmB 比が約 0.4 ~ 1.2 mol/mol である ;

(ii) Chol / PL 比が約 0.05 w/w 未満である ;

(iii) HSPC / DSPG 比が約 2.3 ~ 約 9.0 w/w である ; 及び

(iv) PL / Ca²⁺ 比が約 2 : 1 mol/mol である

10

20

30

40

50

ことを含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

A m B と C h o l は複合体化されておらず、かつ A m B はリポソームに封入されていない、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

A m B が、リン脂質及び C h o l の多孔質シェルによって被覆されている、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

乾燥粉末として製剤化される、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

粉末粒子の質量中央径 X_{50} が約 1.0 ~ 約 4.0 μm である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

粉末粒子の質量中央径 X_{50} が約 1.5 ~ 約 3.5 μm である、請求項 32 に記載の医薬組成物。

【請求項 34】

粉末粒子のタップ密度が約 0.03 ~ 約 0.4 g/mL である、請求項 33 に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

粉末粒子のタップ密度が約 0.06 ~ 約 0.2 g/mL である、請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

粉末粒子の C a r r の流動性指数が約 20 ~ 約 32 である、請求項 31 ~ 35 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

前記シェルの主転移温度 (T_m) が少なくとも 80 である、請求項 31 ~ 36 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

粉末の含水率が約 1.5 ~ 約 6 $\text{w}/\text{w}\%$ である、請求項 31 ~ 37 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

肺投与又は気道投与用に製剤化される、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

エアロゾル投与用に製剤化される、請求項 39 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

粉末粒子の空気力学的質量中央径が約 1.5 μm ~ 約 4.0 μm である、請求項 31 ~ 40 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

粉末粒子の空気力学的質量中央径が約 2.0 μm ~ 約 3.5 μm である、請求項 41 に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

疾患又は障害を処置する方法であって、処置を必要とする対象に、治療有効量の請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することを含み、前記投与は肺投与である、方法。

【請求項 44】

前記疾患又は障害が嚢胞性線維症、非嚢胞性線維症性気管支拡張症、又は慢性閉塞性肺疾患である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記疾患又は障害が嚢胞性線維症である、請求項 44 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 46】

気道表面液体の pH を上昇させる方法であって、気道表面液体の pH の上昇を必要とする対象に、有効量の請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与し、それによって対象の気道表面液体の pH を上昇させることを含み、前記投与は肺投与である、方法。

【請求項 47】

気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させる方法であって、気道表面液体への重炭酸塩分泌の増加を必要とする対象に、有効量の請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与し、それによって対象の気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させることを含み、前記投与は肺投与である、方法。

10

【請求項 48】

努力性 1 秒量 (FEV1) を増加させる方法であって、FEV1 の増加を必要とする対象に、有効量の請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与し、それによって対象の FEV1 を増加させることを含み、前記投与は肺投与である、方法。

【請求項 49】

対象の FEV1 が約 3% ~ 約 20% 増加する、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記対象が嚢胞性線維症、非嚢胞性線維症性気管支拡張症、又は慢性閉塞性肺疾患を有する、請求項 43 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記対象が嚢胞性線維症を有する、請求項 50 に記載の方法。

20

【請求項 52】

前記組成物が対象の気道に投与される、請求項 43 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記組成物がエアロゾルとして投与される、請求項 43 ~ 52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

前記対象が 12 歳未満のヒトである、請求項 43 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記対象が少なくとも 12 歳のヒトである、請求項 43 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 56】

嚢胞性線維症が、アイバカフトール (Ivacaftor) での処置に対して難治性である、請求項 43 ~ 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

嚢胞性線維症が、エレキサカフトール (Elexacaftor)、テザカフトール (Tezacaftor)、及びアイバカフトール (Ivacaftor) の組み合わせでの処置に対して難治性である、請求項 43 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記医薬組成物の公称用量又は定量用量が 0.01 mg ~ 10 mg である、請求項 43 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 59】

前記医薬組成物の公称用量又は定量用量が 0.1 mg、0.5 mg、1.0 mg、2.0 mg、又は 4.0 mg である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記組成物が 1 日 1 回投与される、請求項 43 ~ 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記投与が、初めに負荷用量の前記医薬組成物を送達することと、続いて維持用量の前記医薬組成物を送達することとを含み、負荷用量と維持用量との質量比が約 2 : 1 ~ 約 5

50

: 1である、請求項43～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

負荷用量と維持用量との質量比が約2.5:1～約3:1である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

AmBの絶対的バイオアベイラビリティが約0.1%～約5%である、請求項43～62のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2022年3月21日出願の米国仮特許出願第63/321,965号に対する優先権の利益を主張するものであり、上記仮特許出願の内容は参照により本出願に援用される。

【背景技術】

【0002】

嚢胞性線維症(cystic fibrosis:CF)は、進行性の遺伝性疾患であり、持続的な肺感染症を引き起こし、時間の経過と共に呼吸能力を制限する。CFの症状は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator:CFTR)タンパク質として知られる欠陥タンパク質によって引き起こされる。研究者は、CFTRタンパク質の適切な機能を回復するための、又はその産生プロセスを修正して正常なタンパク質が作成されるようにするための、可能性のある療法を研究している。現行のCFTRモジュレーター及びコレクターは、CF患者の肺の機能をおよそ90%改善するが、患者の約10%はクラスI変異又はその他の変異を有し、これらの変異に効果的な処置はない。

【0003】

Burke及び共同研究者は最近、CFTRタンパク質に対する小分子補欠物の開発という、別の戦略を提案した。これを目的として、彼らは、コレステロール(Chol)と自己集合して1価イオンチャネルを形成する抗真菌剤AmB(AmB)を、別の目的に再利用した。AmBとCholとの複合体を、有機溶媒中の溶液から、水中でのフラッシュナノ沈殿によって製造した(特許文献1;特許文献2)。次に、得られたナノ粒子を凍結乾燥させた。Burkeらは、Chol及びAmB(Chol/AmB=1.0～50.0mol/mol)から形成されたイオンチャネルにより、遺伝子変異とは独立して、CF細胞株(例えばアイオワ大学から入手したCuFi-1細胞株、CuFi-4)における重炭酸塩分泌の回復、気道表面液体(airway surface liquid:ASL)のpHの上昇、及び宿主防御の改善が可能となると主張した。また彼らは、AmBをコレステロールと事前に復号化しておく、AmBがASLのpHの回復に有効となる濃度の範囲が増大することを実証した。即ち、純粋なAmBは低いAmB濃度でしか有効でなかったが、AmB:Chol複合体は、広範囲のAmB濃度にわたって活性を維持した。

【0004】

CFTRを全くもたさないものを含む様々なCFTR変異を有するCF患者からのヒト気道上皮の分化初代培養物において、AmBの上記利点は更に確立された。ASLのpHの上昇は、CFTR-nullブタモデルでも観察された。

【0005】

最後に、市販のAmBの非経口用組成物であるファンギゾン(登録商標)の鼻腔内投与により、現在の療法では処置できない者を含むCF罹患者の、鼻粘膜上皮間電位差を変化させることができた。観察された鼻粘膜上皮間電位差の改善は、アイバカフトール(Ivacaftor)等のモジュレーターを用いて観察されるものに匹敵するものであった。

【0006】

CF患者におけるAmB/Cholイオンチャネルの確立には、これらの物質を気道上

10

20

30

40

50

皮細胞の頂端側に送達すること、即ち経口吸入による投与が必要である。同様の課題は、非嚢胞性線維症性気管支拡張症気管支拡張症（NCFBE）、及び慢性閉塞性肺疾患（COPD）に罹患した対象でも観察される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許出願公開第2019/0083517号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2020/0352970号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0008】

特定の態様では、本明細書において提供されるのは：(i)アムホテリシンB (AmB) 又はその薬学的に許容可能な塩若しくは水和物と；(ii)コレステロール (Chol) と；(iii)水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine: HSPC) 及びジステアロイルホスファチジルグリセロール (distearoyl phosphatidylglycerol: DSPG) を含む、リン脂質 (phospholipid: PL) と；(iv)塩化カルシウム (CaCl_2) とを含む、医薬組成物である。

【0009】

更なる態様では、本明細書において提供されるのは、疾患又は障害を処置する方法であって、処置を必要とする対象に治療有効量の上記医薬組成物を投与することを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

20

【0010】

更なる態様では、本明細書において提供されるのは、気道表面液体のpHを上昇させる方法であって、気道表面液体のpHの上昇を必要とする対象に有効量の上記医薬組成物を投与することによって、上記対象の気道表面液体のpHを上昇させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0011】

更なる態様では、本明細書において提供されるのは、気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させる方法であって、気道表面液体への重炭酸塩分泌の増加を必要とする対象に有効量の上記医薬組成物を投与することによって、上記対象の気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

30

【0012】

更なる態様では、本明細書において提供されるのは、対象の努力性1秒量 (forced expiratory volume in one second: FEV1) を増加させる方法であって、上記対象に有効量の上記医薬組成物を投与することによって、上記対象のFEV1を増加させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】完全に水和したジパルミトイルホスファチジルコリン - コレステロール混合物の状態図を示す。

40

【図2】様々なAmB / 脂質組成物を示す3元系状態図を示す。網掛けの三角形は、最適化されたアムホテリシンBの脂質被覆結晶組成物を表す。

【図3】アムホテリシンB吸入粉末 (ABIP)、ABCI-001、ABCI-002、及びABCI-003の示差走査熱量測定サーモグラムを示す。

【図4】PLCI-001及びPLCI-002中のコレステロール結晶子のエビデンスを示す、粉末X線回折 (X-Ray Powder Diffraction: XRPD) プロットを示す。

【図5】Cholリッチ相のエンタルピーがChol含有率に比例することを示すプロットを示す。

50

【図6】様々なアムホテリシンB (AmB) 及びプラセボ組成物の吸湿等温線 (25) を示す。

【図7A】Chol/AmB比が0.4~1.2 mol/molであり、かつPLの70 w/w%~90 w/w%のHSPCを含む様々な組成物に関する、CuFi-1細胞における気道表面液体(ASL)のpHの上昇を示すプロットを示す。

【図7B】Chol/AmB比が0~0.4 mol/molであり、かつChol又はDSPGを含まない組成物を含む様々な組成物に関する、CuFi-1細胞におけるASLのpHの上昇を示すプロットを示す。

【図7C】CuFi-1細胞におけるASLのpHの改善に対するChol/AmBの比の変動の影響を示すプロットを示す。

【図8】ナンセンス変異を有するものを含む、CFに罹患した個体からの初代培養気道上皮細胞に、ABCI-003を投与した後の、ASLのpHの上昇を示すプロットを示す。

【図9】パーフルオロヘキサン(FC-72)ビヒクル中に懸濁させたAmB濃度の上昇の関数として、ABCI-003に関するCuFi-1におけるASLのpHの上昇を示すプロットを示す。

【図10】ナンセンス変異を有するものを含む、CFに罹患した個体からの初代培養気道上皮細胞に、ABCI-003を投与した後の、ASLの粘度の低下を示すプロットを示す。

【図11】ナンセンス変異を有するものを含む、CFに罹患した個体からの初代培養気道上皮細胞に、ABCI-003を投与した後の、ASLの抗菌活性の上昇を示すプロットを示す。

【図12】図12aは、0~10 mgの公称用量範囲での、バルク粉末について計算された薬剤負荷に対する、噴霧乾燥粉末組成物の公称密度及びタップ密度の影響を示すプロットを示す。図12bは、0~3 mgの公称用量範囲での、バルク粉末について計算された薬剤負荷に対する、噴霧乾燥粉末組成物の公称密度及びタップ密度の影響を示すプロットを示す。

【図13】ABCI-003、ABCI-004、及びPLCI-002のGMP及びGLPバッチの、粉末X線回折パターンの重ね合わせを示す。

【図14-1】ABCI-003、ABCI-004、及びPLCI-002のGMP及びGLPバッチの、DSCサーモグラムを重ね合わせを示す。

【図14-2】図14-1の続き。

【図15】ABCI-003の空気力学的粒子径分布(aerodynamic particle size distribution: APSD)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

驚くべきことに、上でまとめた利益を達成するためにAmBとCholとを複合体化する必要はないことが発見された。実際には、これら2つの成分は、コアシェル粒子内の別個のドメインに相分離させることができる。

【0015】

これもまた驚くべきことに、1.0 mol/molよりはるかに低いChol/AmB比で、重炭酸塩分泌、ASLのpH、ASLの粘度、及び/又はASLの抗菌活性の改善を含む宿主防御の改善を維持できることが発見された。

【0016】

組成物

いくつかの態様では、提供されるのは：

- (i) アムホテリシンB (AmB)、又はその薬学的に許容可能な塩若しくは水和物；
- (ii) コレステロール (Chol)；
- (iii) リン脂質；及び
- (iv) 塩化カルシウム (CaCl₂)

10

20

30

40

50

を含む医薬組成物である。

【0017】

更なる態様では、提供されるのは：

(i) アムホテリシン B (AmB)、又はその薬学的に許容可能な塩若しくは水和物；

(ii) コレステロール (Chol)；

(iii) 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、又はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) と；ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) とを含む、リン脂質；及び

(iv) 塩化カルシウム (CaCl₂)

を含む医薬組成物である。

10

【0018】

更なる態様では、提供されるのは：

(i) アムホテリシン B (AmB)、又はその薬学的に許容可能な塩若しくは水和物；

(ii) コレステロール (Chol)；

(iii) 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) とを含む、リン脂質；及び

(iv) 塩化カルシウム (CaCl₂)

を含む医薬組成物である。

【0019】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 0.5 w/w% ~ 約 25 w/w% の AmB を含む。

20

【0020】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 1 w/w% ~ 約 22 w/w% の AmB を含む。

【0021】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 2 w/w% ~ 約 16 w/w% の AmB を含む。

【0022】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 14 w/w% の AmB を含む。

【0023】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 0.1 w/w% ~ 約 8 w/w% の Chol を含む。

30

【0024】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 0.5 w/w% ~ 約 3 w/w% の Chol を含む。

【0025】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 0.3 w/w% ~ 約 6 w/w% の Chol を含む。

【0026】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 0.5 w/w% ~ 約 3 w/w% の Chol を含む。

40

【0027】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 1 w/w% ~ 約 10 w/w% の CaCl₂ を含む。

【0028】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 4 w/w% ~ 約 7 w/w% の CaCl₂ を含む。

【0029】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約 60 w/w% ~ 約 95 w/w% のリン脂質を含む。

50

【0030】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約70w/w%～約90w/w%のリン脂質を含む。

【0031】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、約75w/w%～約90w/w%のリン脂質を含む。

【0032】

特定の実施形態では、Cholとリン脂質との重量比は、約0.001:1～約0.1:1である。

【0033】

特定の実施形態では、Cholとリン脂質との重量比は、約0.005:1～約0.05:1である。

【0034】

特定の実施形態では、大豆ホスファチジルコリン(HSPC)とジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)との重量比は、約2:1～約19:1である。

【0035】

特定の実施形態では、大豆ホスファチジルコリン(HSPC)とジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)との重量比は、約7:1～約12:1である。

【0036】

特定の実施形態では、大豆ホスファチジルコリン(HSPC)とジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)との重量比は、約1:1～約3:1である。

【0037】

特定の実施形態では、CholとAmBとのモル比は、約0.05:1～約1.2:1である。

【0038】

特定の実施形態では、CholとAmBとのモル比は、約0.4:1～約1.2:1である。

【0039】

特定の実施形態では、CholとAmBとのモル比は、約0.05:1～約0.4:1である。

【0040】

特定の実施形態では、CholとAmBとのモル比は、約0.4:1である。

【0041】

特定の実施形態では、リン脂質とCaCl₂とのモル比は、約4:1～約2:1である。

【0042】

特定の実施形態では、リン脂質とCaCl₂とのモル比は、約2:1である。

【0043】

特定の実施形態では、AmBの結晶化度は約75%より高い。

【0044】

特定の実施形態では、AmBの結晶化度は約85%より高い。

【0045】

特定の実施形態では、AmBの結晶化度は約95%より高い。

【0046】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は：

(i) 約14.0w/w%のアムホテリシンB(AmB)；

(ii) 約2.3w/w%のコレステロール(Chol)；

(iii-a) 約70.3w/w%の水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC)；

；

(iii-b) 約7.8w/w%のジステアロイルホスファチジルグリセロール(DS

10

20

30

40

50

P G) ; 及び

(i v) 約 5 . 5 2 w / w % の塩化カルシウム (C a C l ₂) を含むか、本質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【 0 0 4 7 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は：

(i) 約 1 4 . 0 w / w % のアムホテリシン B (A m B) ;

(i i) 約 6 . 8 1 w / w % のコレステロール (C h o l) ;

(i i i - a) 約 5 1 . 2 w / w % の水素添加大豆ホスファチジルコリン (H S P C)

;

(i i i - b) 約 2 2 . 8 w / w % のジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) ; 及び

(i v) 約 5 . 2 w / w % の塩化カルシウム (C a C l ₂) を含むか、本質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【 0 0 4 8 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は：

(i) 約 3 . 4 w / w % のアムホテリシン B (A m B) ;

(i i) 約 0 . 5 7 w / w % のコレステロール (C h o l) ;

(i i i - a) 約 8 0 . 7 2 w / w % の水素添加大豆ホスファチジルコリン (H S P C) ;

(i i i - b) 約 8 . 9 7 w / w % のジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) ; 及び

(i v) 約 6 . 3 4 w / w % の塩化カルシウム (C a C l ₂) を含むか、本質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【 0 0 4 9 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は：

(i) 約 0 . 4 ~ 1 . 2 m o l / m o l の C h o l / A m B 比 ;

(i i) 約 0 . 0 5 w / w 未満の C h o l / P L 比 ;

(i i i) 約 2 . 3 ~ 約 9 . 0 w / w の H S P C / D S P G 比 ; 及び

(i v) 約 2 : 1 m o l / m o l の P L / C a ²⁺ 比

を有する。

30

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態では、A m B と C h o l とは複合体化されておらず ; A m B はリポソームに封入 (encapsulated) されていない。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、A m B は、リン脂質及び C h o l の多孔質シェルによって被覆されている。

【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は乾燥粉末として製剤化される。

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態では、粉末粒子のタップ密度は約 0 . 0 3 ~ 約 0 . 4 g / m L である。

40

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、上記粉末粒子のタップ密度は約 0 . 0 6 ~ 約 0 . 2 g / m L である。

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態では、上記粉末粒子のカー (C a r r) の流動性指数は約 2 0 ~ 約 3 2 である。

【 0 0 5 6 】

特定の実施形態では、上記シェルの主転移温度 (T_m) は、少なくとも 7 0 、少なくとも 8 0 、又は少なくとも 9 0 である。特定の実施形態では、上記シェルの主転移温度 (T_m) は、約 5 0 ~ 約 1 0 0 、約 7 0 ~ 約 1 0 0 、約 8 0 ~ 約 1 0 0 、

50

又は約 85 ~ 約 95 である。

【0057】

特定の実施形態では、上記粉末の含水率 (water content) は、約 1.5 ~ 約 6 w / w % である。

【0058】

特定の実施形態では、上記組成物は、肺投与又は気道投与用に製剤化される。

【0059】

特定の実施形態では、上記組成物は、エアロゾル投与用に製剤化される。

【0060】

特定の実施形態では、上記組成物は、乾燥粉末としてエアロゾル投与用に製剤化される 10

【0061】

特定の実施形態では、リン脂質 (PL) 及び Chol の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで AmB の結晶化度は、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % である。

【0062】

特定の実施形態では、上記粉末粒子の質量中央径 (mass median diameter) X_{50} は約 0.5 μm ~ 約 5.0 μm 、約 1.0 μm ~ 約 4.0 μm 、又は約 1.5 μm ~ 約 3.5 μm である。 20

【0063】

特定の実施形態では、上記粉末粒子の X_{90} は、約 1.5 μm ~ 約 10.0 μm 、例えば約 2.0 μm ~ 約 8.0 μm である。

【0064】

特定の実施形態では、上記粉末粒子の空気動学的質量中央径 (mass median aerodynamic diameter: MMAD) は、約 1.5 μm ~ 約 4.0 μm である。

【0065】

特定の実施形態では、上記粉末粒子の空気動学的質量中央径 (MMAD) は、約 2.0 μm ~ 約 3.5 μm である。 30

【0066】

特定の実施形態では、AmB、Chol、及び PL の、キャリアを含まない乾燥粉末組成物が提供され、ここで、AmB は脂質中に封入 (encapsulated) されておらず、また AmB 及び脂質は、それぞれ固有のドメインに相分離されている。

【0067】

特定の実施形態では、PL 及び Chol の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、Chol / AmB 比は約 0.05 ~ 約 1.2 mol / mol、例えば約 0.2 ~ 約 0.6 mol / mol である。

【0068】 40

特定の実施形態では、PL 及び Chol の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、Chol / PL は 0.10 w / w 未満、又は 0.05 w / w 未満である。

【0069】

特定の実施形態では、PL 及び Chol を含む多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供される。いくつかの実施形態では、PL は、水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、又はこれらの組み合わせを含む。

【0070】 50

特定の実施形態では、PL及びCholの多孔質シェルによって被覆された複数のAmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、PLは、(1)HSPC又はDSPCと、(2)DSPGとの、約2.3w/w(即ち7/3w/w)及び約19.0w/w(即ち95/5w/w)、例えば約8w/w~約18w/wのw/w比での混合物を含む。

【0071】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数のAmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、PL/Ca比は約2.0mol/mol~約4.0mol/mol、約2.0mol/mol~約3.0mol/mol、又は約2.0mol/molである。PL/Ca比は約2.0mol/mol未満に低下しないものとする。

10

【0072】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数のAmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記組成物中のAmBのパーセンテージは、60w/w%未満、例えば30w/w%未満又は20w/w%未満である。いくつかの実施形態では、薬剤負荷は約0.5w/w%~約25w/w%であり、公称Chol/AmB比は約0.05~約1.2mol/molである。

【0073】

特定の実施形態では、PL及びCholの多孔質シェルで被覆された微結晶質AmB粒子の噴霧乾燥コアシェル粒子(約14.0w/w%)を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され(ABC I-003)、ここで、Chol/AmB比は約0.4mol/molであり、Chol/PL比は約0.03w/wであり、PL/Ca比は約2mol/molであり、PL中のPC/PGの比は約9.0w/wである。

20

【0074】

特定の実施形態では、PL及びCholの多孔質シェルで被覆された微結晶質AmB粒子の噴霧乾燥コアシェル粒子(約3.4w/w%)を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され(ABC I-004)、ここで、Chol/AmB比は約0.4mol/molであり、Chol/PL比は約0.006w/wであり、PL/Ca比は約2mol/molであり、PL中のPC/PGの比は約9.0w/wである。

30

【0075】

特定の実施形態では、PL及びCholの多孔質シェルで被覆された微結晶質AmB粒子の噴霧乾燥コアシェル粒子(約14.0w/w%)を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され(図2)、ここで、Chol/AmB比は約0.4~約1.2mol/molであり、Chol/PL比は0.05w/w未満であり、PL/Ca比は約2mol/molであり、PL中のPC/PGの比は約2.3~約9.0w/wである。

【0076】

特定の実施形態では、最大Chol/AmB比は約1.2mol/molであるが、この高い比は、高度に秩序化されたSo相に脂質が維持される、比較的低い薬剤負荷(例えば10.0w/w%以下)の場合にのみ、許容可能となり得るものである。Chol/AmBを0.4mol/molまで低下させると、So相内でより高い薬剤負荷(例えば22w/w%以下)が可能となる。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、図2の網掛けの三角形を占める。この三角形の2辺は、公称Chol/AmB比0.4mol/mol及び1.2mol/molの線を表し、3つ目の辺は、DSCサーモグラムにおいてCholリッチ相の除去につながり得るChol/PL比(Chol/PL=0.05w/w)(実施例4)を表す。

【0078】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、HSPC/DSPG比が約2.3~

50

約 9.0 w/w、PL/Ca²⁺比が約 2.0 mol/mol である。

【0079】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、単一相（即ち、加速貯蔵温度である 40 を超える 50 超の T_mを有するゲル相（So）（実施例 4））に脂質を維持することを目的として行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、広い範囲の AmB 濃度にわたって維持される、ASL の pH の最大限の上昇（実施例 11）を目的として行われる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、HSPC/DSPG < 9.0 の組成物に比べて低下した吸湿性（実施例 5）を目的として行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、製造歩留まりの向上（実施例 9）を目的として行われる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、粉末流動性の改善（実施例 9）を目的として行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、Lo 相を含有する粉末に比べて改善されたエアロゾル性能（実施例 9）を目的として行われる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、CuFi-1 細胞においても、ナンセンス変異を有するものをも含む CF 患者からの初代培養物においても、細胞ベースのアッセイで宿主防御を回復させる優れた能力（実施例 10）を目的として行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の選択は、Chol/AmB のモル比が低くても赤血球溶血が生じないこと（実施例 15）を目的として行われる。

10

【0080】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、公称用量は、約 0.01 mg ~ 約 50 mg、約 0.1 mg ~ 約 10.0 mg、約 0.5 mg、約 1.0 mg、約 2.0 mg、約 4.0 mg、又は約 6.0 mg である。

20

【0081】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粒子の質量中央径（X₅₀）は、約 1.0 ~ 約 5.0 μm、例えば約 1.5 ~ 約 4.0 μm である。

【0082】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粒子の X₉₀ は、約 3 μm ~ 約 10 μm、例えば約 3.5 μm ~ 約 7 μm である。

30

【0083】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粒子のタップ密度は、約 0.03 ~ 約 0.40 g/mL、例えば約 0.06 ~ 約 0.20 g/mL である。

【0084】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粉末の含水率は、約 1.0% ~ 約 10.0%、好ましくは約 2.0% ~ 約 5.0% である。

40

【0085】

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム（CaCl₂）の多孔質シェルによって被覆された複数の AmB 薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、携帯型乾燥粉末吸入器から投与する場合、空気動学的質量中央径（MMAD）は約 1.0 μm ~ 約 6.0 μm、例えば約 2.0 μm ~ 約 4.0 μm である。

【0086】

50

特定の実施形態では、PL、Chol、及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数のAmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、携帯型乾燥粉末吸入器を用いて投与する場合、公称用量のパーセンテージとして表される5 μm未満の微粒子画分は、少なくとも30 w/w%、少なくとも50 w/w%、又は少なくとも60 w/w%である。

【0087】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数の結晶質AmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粉末は、本明細書に記載の脂質の混合物の単層によって安定化された水中油型エマルジョン中に懸濁された微小なAmB結晶を含む液体原料を噴霧乾燥させることによって製造される。

10

【0088】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数の結晶質AmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記脂質の主転移温度(T_m)は、少なくとも80、例えば少なくとも90である。

【0089】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数の結晶質AmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粉末は、脂質の最低T_m未満の出口温度で液体原料を噴霧乾燥させることによって製造される。いくつかの実施形態では、上記出口温度は、少なくとも50、少なくとも60、又は少なくとも70である。

20

【0090】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数の結晶質AmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粉末は、脂質の最低T_m未満の出口温度で液体原料を噴霧乾燥させることによって製造される。いくつかの実施形態では、上記出口温度は、少なくとも60、又は少なくとも70である。

【0091】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆された複数の結晶質AmB薬剤粒子を含む、人工粒子の乾燥粉末組成物が提供され、ここで、上記粉末は、PSD-1スケール噴霧乾燥器での総ガス流量を約70~約100 scfmとして、液体原料を噴霧乾燥させることによって製造される。

30

【0092】

特定の実施形態では、PL、Chol及び塩化カルシウム(CaCl₂)の多孔質シェルによって被覆されたAmB薬剤粒子を含む、人工粒子の上記乾燥粉末組成物は、ドラムフィルターによって充填される。

【0093】

特定の実施形態では、粉末充填質量は、サイズ3又はサイズ2のカプセルにおいて約1.0 mg~約40 mg、例えば約3 mg~約20 mg、又は約10 mg~約15 mgである。

40

【0094】

特定の実施形態では、粉末充填質量は、目標充填質量に対して良好な精度(例えばRSD < 3%)及び正確度を有する。

【0095】

方法

特定の態様では、提供されるのは、疾患又は障害を処置する方法であって、処置を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することを含み、上記投与は肺投与である、方法である。特定の実施形態では、上記疾患又は障害は、嚢胞性線維症、非嚢胞性線維症気管支拡張症(NCFBE)、又は慢

50

性閉塞性肺疾患（COPD）を含む。特定の実施形態では、上記疾患又は障害は嚢胞性線維症である。

【0096】

提供されるのは、ASLの宿主防御特性の回復（例えば重炭酸塩分泌、pH、抗菌活性の上昇、及び/又は粘度の低下）の方法であって、上記方法は、ASLの宿主防御特性の回復を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、肺機能及び生活の質を改善することを含む。

【0097】

また、提供されるのは、気道表面液体のpHを上昇させる方法であって、気道表面液体のpHの上昇を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象の気道表面液体のpHを上昇させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

10

【0098】

また、提供されるのは、気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させる方法であって、気道表面液体への重炭酸塩分泌の増加を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象の気道表面液体への重炭酸塩分泌を増加させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0099】

また、提供されるのは、努力性1秒量（FEV1）を増加させる方法であって、FEV1の増加を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象のFEV1を増加させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、対象のFEV1は、本開示の方法による処置の前又は本開示の方法による処置から離れた時点において測定された同じ対象のFEV1に比べて、測定可能な程度に大きい場合に、「増加している」と言われる。

【0101】

特定の実施形態では、上記対象のFEV1は、約3%～約20%、約5%～約15%、又は約6%～約10%だけ増加する。

【0102】

特定の実施形態では、上記対象はCFに罹患している。

30

【0103】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、上記対象の気道に投与される。

【0104】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、上記対象の気管支気道に投与される。

【0105】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、エアロゾルとして投与される。

【0106】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、乾燥粉末エアロゾルとして投与される。

【0107】

特定の実施形態では、上記対象はヒトである。

40

【0108】

特定の実施形態では、上記対象は成人である。

【0109】

特定の実施形態では、上記対象は12歳未満のヒトである。

【0110】

特定の実施形態では、上記対象は少なくとも12歳のヒトである。

【0111】

特定の実施形態では、上記対象は少なくとも4歳のヒトである。

【0112】

50

特定の実施形態では、上記CFは、アイバカフトール (Ivacaftor)、又はエレキサカフトール (Elxacaftor)、テザカフトール (Tezacaftor)、及びアイバカフトール (Ivacaftor) の組み合わせでの処置に対して難治性である。

【 0 1 1 3 】

特定の実施形態では、CFに罹患した対象は、併用療法を含む現行のモジュレーターでは効果的に処置されない、クラス1又はその他の変異を有する。これは、機能性CFTRタンパク質が産生されないナンセンス変異又は他の変異を含む。

【 0 1 1 4 】

特定の実施形態では、上記対象は、CF嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子 (CFTR) 陰イオンチャンネルに2つの変異を有し、上記2つの変異は、表1に列挙された変異からそれぞれ独立して選択される。

【 0 1 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1. 例示的な CTFR 変異

R75X	663delT	1525-1G->A	1924del7
CFTRdele1	G178R	1525-2A->G	2055del9->A
M1V	675del4	S466X	2105- 2117del13insAGAAA
Q2X	E193X	L467P	2118del4
S4X	711+1G->T	1548delG	2143delT
182delT	711+3A->G	S489X	G673X
CFTRdele2	711+5G->A	S492F	2183AA->G 又は 2183delAA->G
CFTRdele2-4	712-1G->T	1609delCA	2184insA
185+1G->T	H199Y	Q493X	2184delA
CFTRdele2,3	P205S	W496X	2185insC
W19X	L206W	I507del	Q685X
R75X	W216X	F508del	R709X
Q39X	Q220X	1677delTA	K710X
A46D	L227R	V520F	Q715X
296+1G->A	849delG	C524X	2307insA
296+1G->T	852del22	Q525X	L732X
CFTRdele3-10,14b-16	CFTRdup6b-10	CFTRdele11	2347delG
297-1G->A	935delA	1717-1G->A	2372del8
E56K	Y275X	1717-8G->A	R764X
W57X	C276X	G542X	R785X
306insA	991del5	S549R	R792X
306delTAGA	1078delT	S549N	2556insAT
E60X	1119delA	G550X	2585delT
P67L	G330X	1782delA	2594delGT
R75X	R334W	G551S	E822X
365-366insT	1138insG	G551D	2622+1G->A
G85E	I336K	Q552X	E831X
394delTT	T338I	R553X	W846X
L88X	S341P	A559T	Y849X

10

20

30

40

50

CFTRdele4-7	1154insTC	1811+1634A->G 又は 1811+1.6kbA->G	R851X
CFTRdele4-11	1161delC	1811+1G->C	2711delT
CFTR50kdel	R347H	R560K	2721del11
405+1G->A	R347P	R560T	2732insA
405+3A->C	R352Q	1811+1G->A	CFTRdele14b-17b
406-1G->A	1213delT	1811+1643G->T	W882X
E92K	1248+1G->A	1812-1G->A	2789+5G->A
E92X	1249-1G->A	R560S	2790-1G->C
Q98X	1259insA	A561E	Q890X
442delA	1288insTA	V562I	S912X
444delA	W401X	1824delA	2869insG
457TAT->G	1341+1G->A	1833delT	Y913X
D110H	1343delG	Y569D	2896insAG
R117C	Q414X	E585X	L927P
R117H;5T	D443Y	1898+1G->A	2942insT
541delC	1461ins4	1898+1G->C	2957delT
574delA	1471delA	CFTRdele13,14a	S945L
602del14	A455E	1898+3A->G	2991del32
621+1G->T	1497delGG	1898+5G->T	3007delG
3120G->A	3132delTG	H1054D	3028delA
CFTRdele17a,17b	3171delC	G1061R	G970R
CFTRdele17a-18	3171insC	L1065P	CFTRdele16-17b
3120+1G->A	Q1042X	R1066C	L1077P
3121-1G->A	3271delGG	R1066H	W1089X
3121-2A->G	3272-26A->G	3600G->A	Y1092X
3121-977_3499+248del2515	3600G->A	CFTRdele19	W1098X
3349insT	CFTRdele19	CFTRdele19-21	M1101K
3659delC	CFTRdele19-21	3600+2insT	R1102X
3667ins4	3600+2insT	3600+5G->A	E1104X

10

20

30

40

50

S1196X	3600+5G->A	R1158X	3500-2A->G
3737delA	R1158X	R1162X	W1145X
W1204X	R1162X	W1282X	CFTRdele22-24
3791delC	3849G->A	4005+1G->A	CFTRdele22,23
Y122X	3849+4A->G	CFTRdele21	Q1330X
3821delT	3849+40A->G	4005+2T->C	G1349D
I1234V	3849+10kbC->T	4010del4	4209TGTT->AA
4326delTC	3850-1G->A	4015delA	4218insT
Q1411X	3850-3T->G	4016insT	E1371X
Q1412X	G1244E	4022insT	4259del5
4374+1G->T	3876delA	4021dupT	Q1382X
4374+1G->A	3878delG	4040delA	4279insA
4382delA	S1251N	N1303K	S1255P
4428insGA	L1254X	Q1313X	S1255X
3905insT	D259G		

10

20

【0116】

特定の実施形態では、上記2つの変異は、2184delA、F508del、V520F、1717-1G->A、E60X、G551D、R553X、及びD259Gから、それぞれ独立して選択される。

【0117】

特定の実施形態では、上記2つの変異は、F508del/F508del、G551D/F508del、R553X/E60X、F508del/1717-1G->A、F508del/2184delA、及びD259G/V520Fから選択される、1ペアのCFTR変異である。

【0118】

特定の実施形態では、上記2つの変異は、F508del/F508del、R553X/E60X、F508del/1717-1G->A、F508del/2184delA、及びD259G/V520Fから選択される、1ペアのCFTR変異である。

【0119】

特定の実施形態では、上記医薬組成物の公称用量又は計量用量は、0.01mg~10mgである。

【0120】

特定の実施形態では、上記医薬組成物の公称用量又は計量用量は、約0.1mg、約0.5mg、約1.0mg、約2.0mg、又は約4.0mgである。

【0121】

特定の実施形態では、上記組成物は、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回、又は少なくとも1日3回投与される。

【0122】

特定の実施形態では、上記組成物は1日1回投与される。

【0123】

30

40

50

特定の実施形態では、上記組成物は、少なくとも週1回、少なくとも週2回、又は少なくとも週3回投与される。

【0124】

特定の実施形態では、上記投与は、初めに負荷用量の上記医薬組成物を送達することと、続いて維持用量の上記医薬組成物を送達することを含み、上記負荷用量と上記維持用量との質量比は約2:1~約5:1である。特定の実施形態では、上記負荷用量と上記維持用量との質量比は約2.5:1~約3:1である。特定の実施形態では、上記負荷用量は、約1.0mg~約20mg、約3mg~約15mg、又は約6mg~約10mgである。特定の実施形態では、上記維持用量は、約0.1mg~約5mg、約0.5mg~約5mg、約1mg~約4mg、又は約2mgである。特定の実施形態では、上記負荷用量は約1.5mgであり、上記維持用量は約0.5mgである。特定の実施形態では、上記負荷用量は約6mgであり、上記維持用量は約2mgである。特定の実施形態では、上記負荷用量は約10mgであり、上記維持用量は約4mgである。

10

【0125】

負荷用量及び維持用量について上述されている全ての質量は、上記医薬組成物の公称用量又は計量用量（即ち放出用量ではない）の質量を指す。

【0126】

特定の実施形態では、提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している対象を処置する方法であって、本開示で提供されているような、AmB及びCholを含む有効量の脂質被覆結晶組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含み、上記脂質被覆結晶組成物は、肺の気管支気道への経口吸入によって上記対象に投与される、方法である。

20

【0127】

特定の実施形態では、提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している対象を処置する方法であって、本開示で提供されているような、AmB及びCholを含む有効量の脂質被覆結晶組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含み、上記組成物は、約0.2~約1.0pH単位の、ASLのpHの上昇を提供する、方法である。

【0128】

特定の実施形態では、提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している対象を処置する方法であって、本開示で提供されているような、AmB及びCholを含む有効量の脂質被覆結晶組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含み、上記組成物は、プラセボと比較して臨床的に有意な、肺機能(FEV₁)の改善を提供する、方法である。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している個体の気道表面液体の粘度を低減する方法であって、気道表面液体の粘度の低減を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、気道表面液体の水分補給及び高さを増加させながら、上記対象の気道表面液体の粘度を低減することを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している個体の気道表面液体の抗菌活性を上昇させる方法であって、気道表面液体の抗菌活性の上昇を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象の気道表面液体の抗菌活性を上昇させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0131】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している個体の粘膜毛様体クリアランスを向上させる方法であって、粘膜

50

毛様体クリアランスの上昇を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象の粘膜毛様体クリアランスを向上させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0132】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している個体の肺機能を向上させる方法であって、肺機能の向上を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象の肺機能を向上させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

10

【0133】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している個体の健康関連の生活の質(health related quality of life: HRQoL)を向上させる方法であって、HRQoLの向上を必要とする対象に、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる治療有効量の医薬組成物を投与することによって、上記対象のHRQoLを向上させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0134】

特定の実施形態では、提供されるのは、CF、NCFBE、又はCOPDに罹患している対象を処置する方法であって、本開示で提供されているような、AmB及びCholを含む有効量の脂質被覆結晶組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含み、上記脂質被覆結晶組成物は、プラセボと比較して臨床的に有意な、健康関連の生活の質の向上を提供する、方法である。

20

【0135】

特定の実施形態では、本明細書において提供されるのは、肺機能を改善する方法であって、肺機能の向上を必要とする対象に、有効量の本開示の医薬組成物を投与することにより、上記対象の肺機能を改善することを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【0136】

特定の実施形態では、上記対象はCF、NCFBE、又はCOPDに罹患している。

【0137】

特定の実施形態では、上記対象はCFに罹患している。

30

【0138】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は乾燥粉末である。

【0139】

特定の実施形態では、上記乾燥粉末は携帯型乾燥粉末吸入器を用いて投与される。

【0140】

特定の実施形態では、上記乾燥粉末吸入器は、上記対象の吸気流を利用して、上記粉末を流動化して分散させる(即ち、このデバイスはパッシブ型乾燥粉末吸入器である)。

【0141】

特定の実施形態では、中程度以上の気流に対する抵抗を有する上記乾燥粉末吸入器が好ましい(即ち、約0.10~0.30cmH₂O^{0.5}L⁻¹分)。

40

【0142】

特定の実施形態では、上記携帯型乾燥粉末吸入器は、カプセルベースの単位用量DPI、単回使用の使い捨てDPI、又はプリスターベースの複数用量乾燥粉末吸入器を含む。

【0143】

CF患者では1900を超える様々なCFTR変異が見つかり、そのうちの数百種は、少なくとも5種の異なる機能喪失機序を通じて疾患の原因となることが確認されている。近年、CFTRの特定の変異型に結合することでその活性を高める遺伝子型特異性小分子薬剤の開発において、重要な進歩があった。しかしながら、CF患者の約10%は、現行の小分子での処置に回答しないCFTR遺伝子型を有する。上記遺伝子型には、機能性CFTRタンパク質の完全な欠如をもたらす主要な切断や、機能不全の機序の根幹が

50

不明である極めて珍しい変異が含まれる。

【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法はいずれも、I、II、III、IV、V、VI、U、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、CFの変異クラスを処置する。いくつかの実施形態では、上記変異クラスは、I/I、II/II、II/U、及びU/IIIからなる群から選択される。

【0145】

理論によって縛られることを意図するものではないが、本明細書に記載の組成物は、CFTRチャネルの活性を調節、修正、又は変更するものではない。AmBの脂質被覆結晶を含む分子補欠物は、CFTR及び対象の特定の遺伝子変異とは無関係に活性を有する新たなイオンチャネルを作成すると考えられる。

10

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法はいずれも、遺伝子型に依存しない処置法である。

【0147】

本明細書中で使用される場合、句「遺伝子型に依存しない (genotype-independent又はgenotype-agnostic)」は、CFにおけるCFTRの発現の減少又はCFTRの機能の低下のベースとなる遺伝子変異の正確な性質とは無関係の、いずれかの処置を指す。

【0148】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、従来のCF治療剤を用いた処置には通常全く又は最小限しか応答しない様々なCF遺伝子型の処置に有用である。例えば、CFTR変異のD259G/V520Fペアを有する患者のV520F対立遺伝子は、Ivacaftor、又はElexacaftor、Tezacaftor、及びIvacaftorの組み合わせを用いた処置に対して難治性である。

20

【0149】

従って特定の実施形態では、本明細書に記載のCFを処置する方法は、CFの遺伝子型に依存しない。

【0150】

特定の実施形態では、本明細書で開示される方法はいずれも、難治性又は抵抗性CFを処置する。特定の実施形態では、CFは、1つ又は複数のCF処置に対して、難治性又は抵抗性である。

30

【0151】

対象の気道表面液体 (ASL) のpHは、当業者に公知のいずれかの技法を用いて測定できる。例えば、気道のpHは、平面pH感受性プローブを気管表面に置くことによって測定できる。Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113。

【0152】

対象のASLのpHは、未処置の対象のASLのpHに比べて測定可能な程度に高い場合に、「上昇している」と言われる。一実施形態では、対象のASLのpHは、本開示の方法による処置の前又は本開示の方法による処置から離れた時点において測定された同じ対象のASLのpHに比べて、測定可能な程度に大きい場合に、「上昇している」と言われる。

40

【0153】

気道表面液体のpHを上昇させるこのような方法は、実施例1において説明される。注目すべきことに、ASLのpHの回復は、広範囲のAmB：ステロイド濃度にわたって観察される。従って、本明細書に記載のASLのpHを上昇させる方法は、臨床応用に大きな意味を持つ。

【0154】

特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～2.0 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～1.0 pH単位とすること

50

ができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.3 pH単位～1.0 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.3 pH単位～1.0 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.5 pH単位～0.9 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.5 pH単位～0.8 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.6 pH単位～0.8 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、約0.7 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～0.5 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～0.4 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.2 pH単位～0.4 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～0.3 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.2 pH単位～0.3 pH単位とすることができる。特定の実施形態では、pHの上昇は、0.1 pH単位～0.2 pH単位とすることができる。

【0155】

特定の実施形態では、pHの上昇は、本明細書で開示される組成物のうちのいずれか1つを頂端側に添加することによるものである。

【0156】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、従来のCFモジュレーター/コレクター治療剤を用いた処置には通常全く又は最小限しか応答しない様々なCF遺伝子型のいずれか1つを有する患者を含む患者の気道表面液体のpHを、患者の遺伝子型にかかわらず上昇させるために有用である。

【0157】

従って特定の実施形態では、本明細書に記載のASLのpHを上昇させる方法は、CFの遺伝子型に依存しない。

【0158】

特定の実施形態では、本明細書で開示される方法はいずれも、難治性又は抵抗性CFに罹患した患者のASLのpHを上昇させる。いくつかの実施形態では、CFは、Ivacaftor、又はElxacaftor、Tezacaftor、及びIvacaftorの組み合わせといった、1つ又は複数のCF処置に対して、難治性又は抵抗性である。

【0159】

特定の態様では、本明細書において提供されるのは、陰イオン輸送を回復させ、気道表面液体の気道表面液体の水分補給及び高さを増加させることによって、CFに罹患した患者の気道表面液体の粘度を低下させる方法であって、CFに罹患した患者に、治療有効量の本開示の医薬組成物を投与することを含む、方法である。

【0160】

いくつかの実施形態では、陰イオン分泌（例えば重炭酸塩分泌）の回復は、気道表面液体のpHの上昇、気道の水分補給の増加、気道表面液体の高さの増加、気道表面液体の抗菌活性の上昇、又はこれらの組み合わせにつながる。これらのような気道表面液体の特性の改善は、粘膜毛様体クリアランス、肺機能の尺度（例えばFEV1）、患者の健康関連の生活の質（HRQoL）、又はこれらの組み合わせの、臨床的改善をもたらすことができる。

【0161】

特定の実施形態では、HRQoLは、嚢胞性線維症質問票（Cystic Fibrosis Questionnaire: CFQ）を用いて測定される。Henry, B. et al., Qual Life Res. 2003 Feb; 12(1): 63-76。いくつかの実施形態では、HRQoLは、嚢胞性線維症質問票改訂版（Cystic Fibrosis Questionnaire Revised: CFQ-R）を用いて測定される。Wenninger, K. et al., Qual Life Res. 2003 Feb; 12(1): 77-85。特定の実施形態では、本発明の組成物を患者に投与することにより、CFQ又はCFQ-Rで測定した場合に少なくとも0

． 5、少なくとも 0． 8、少なくとも 1、又は少なくとも 2 の、HRQoL ドメインスコアの上昇が提供される。いくつかの実施形態では、対象の HRQoL ドメインスコアは、本開示の方法による処置の前又は本開示の方法による処置から離れた時点において測定された同じ対象の HRQoL ドメインスコアに比べて、測定可能な程度に大きい場合に、「上昇している」と言われる。

【 0 1 6 2 】

CF に罹患した対象は、健康な対象に比べて ASL の高さが減少している場合がある。Muraglia, Katrina A. et al., Nature 2019 Mar; 567(7748):405-408。特定の実施形態では、CF に罹患した対象の ASL の高さは約 3 μm ~ 約 4 μm である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、CF に罹患した対象の ASL の高さを、健康な対象の ASL の高さまで（例えば約 9 μm ~ 約 10 μm の ASL の高さまで）増加させる。

10

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象の ASL の高さを、約 1 μm ~ 約 8 μm 、約 1 μm ~ 約 5 μm 、約 1 μm ~ 約 3 μm 、約 2 μm ~ 約 8 μm 、約 2 μm ~ 約 5 μm 、約 3 μm ~ 約 8 μm 、約 3 μm ~ 約 5 μm 、約 5 μm ~ 約 7 μm 、又は約 6 μm だけ増加させる。いくつかの実施形態では、対象の ASL の高さは、本開示の方法による処置の前又は本開示の方法による処置から離れた時点において測定された、同じ対象の ASL の高さに比べて、測定可能な程度に大きい場合に、「増加している」と言われる。特定の実施形態では、対象の ASL の高さは、未処置の対象の ASL の高さに比べて、測定可能な程度に大きい場合に、「増加している」と言われる。

20

【 0 1 6 4 】

特定の実施形態では、本明細書において提供されるのは、気道表面液体の粘度を低下させる方法であって、気道表面液体の粘度の低下を必要とする対象に、有効量の本開示の医薬組成物を投与することにより、上記対象の気道表面液体の粘度を低下させることを含み、上記投与は肺投与である、方法である。

【 0 1 6 5 】

特定の実施形態では、上記対象は CF、NCFBE、又は COPD に罹患している。

【 0 1 6 6 】

特定の実施形態では、上記対象は CF に罹患している。

30

【 0 1 6 7 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、乾燥粉末エアロゾルによって上記対象の気道に投与される。

【 0 1 6 8 】

特定の実施形態では、上記医薬組成物は、乾燥粉末エアロゾルによって上記対象の気管支気道に投与される。

【 0 1 6 9 】

特定の実施形態では、対象の気道 (airway) とは、いわゆる誘導気道 (conducting airway) 又は気管支気道 (bronchial airway)、即ち以下の肺構造：下気道の気管、気管支、及び気管支梢のいずれか又は全てを指す。

40

【 0 1 7 0 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、従来の CF 治療剤を用いた処置には通常全く又は最小限しか応答しない様々な CF 遺伝子型のいずれか 1 つを有する患者の気道表面液体の粘度を低下させるために有用である。

【 0 1 7 1 】

従って特定の実施形態では、本明細書に記載の ASL の粘度を低下させる方法は、CF の遺伝子型に依存しない。

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法はいずれも、難治性又は抵抗性 CF に罹患した患者の ASL の粘度を低下させる。いくつかの実施形態では、CF は、Iv

50

acafitor、又はElexacafitor、Tezacafitor、及びIvacafitorの組み合わせといった、1つ又は複数のCF処置に対して、難治性又は抵抗性である。

【0173】

以上の各実施形態によると、特定の実施形態では上記患者はヒトである。

【0174】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物を用いた処置の対象となる年齢の範囲は、パッシブ型乾燥粉末吸入器(DPI)を効果的に利用できるかどうかに基づいて判断される。6歳未満の対象は、パッシブ型DPIの使用に関わるステップを適切に実施する認知能力を有していない場合がある。更に、6歳未満の対象は、必要な吸気圧を生成するために必要な呼吸筋の強度が不足している場合がある。それにもかかわらず、一部のパッシブ型DPIは、4歳までの対象について承認されている。同様に、一部の高齢患者もまた、パッシブ型DPIの適切な使用を妨げるような認知能力又は萎縮した筋肉を有する場合がある。吸気圧は年齢と共に上昇して約25歳で最大となる傾向があり、約40歳までは変化せず、それ以降は着実に低下する。男性は女性より高い吸気圧を達成する傾向がある。気道疾患の増加も、パッシブ型DPIを効果的に動作させるために必要な圧力降下(約1.0kPa)を達成する対象の能力に、悪影響を及ぼす場合がある。吸気のための筋肉の強度が弱い対象は、In-Checkダイヤルを用いて1.0kPaの吸気圧を達成できるかどうかに基づいて識別できる。以上の各実施形態によると、特定の実施形態では上記患者は4~80歳である。

10

20

【0175】

特定の実施形態では、上記患者は少なくとも4歳である。特定の実施形態では、上記患者は少なくとも6~約18歳である。いくつかの実施形態では、上記患者は、許容可能な吸気のための筋肉の強度を有する約80歳未満である。特定の実施形態では、上記患者は約60~約70歳である。いくつかの実施形態では、上記患者は約70~約80歳である。

【0176】

特定の実施形態では、本明細書で開示された方法はいずれも、頂端膜を透過性にする。特定の実施形態では、本明細書で開示された方法はいずれも、頂端膜を陽子に対して透過性にする。特定の実施形態では、本明細書で開示された方法はいずれも、頂端膜を重炭酸イオンに対して透過性にする。

30

【0177】

原薬(drug substance)

本明細書に記載の組成物は、吸入用アムホテリシンB囊胞性線維症薬(Amphotericin B Cystetic for Inhalation: ABCI)と呼ばれる場合もあり、これは、陰イオン輸送及び宿主防御を回復させて肺機能及び生活の質を改善するための、イオンチャネル補欠物(ion channel prosthetic)として使用できる。

【0178】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、コレステロールを含む脂質の多孔質層で被覆されたアムホテリシンBの、結晶化度が高い微粒子化された粒子を含む。

40

【0179】

AmBは、トランス位の7個の共役二重結合と、グリコシド結合によって主環に接続された3-アミノ-3,6-ジデオキシマンノース(マイコサミン)とを含む、ヘプタエンマクロライドである。

【0180】

AmBは、Streptomyces nodosus株の発酵産物として生成される。静脈内投与用のAmBは、認可された唯一の殺真菌化合物であり、全身性真菌感染症の処置に現在使用されている。吸入による投与には認可されていないが、吸入AmBは、侵襲性肺アスペルギルス症の処置のために広く研究されてきた。

50

【0181】

実際、500,000用量を超える吸入AmBが投与されているものの、深刻又は重篤な副作用は報告されていない。公開されている研究の大半で、吸入AmBの忍容性は良好であると説明されている。報告された有害事象(adverse event: AE)は、主に呼吸器の刺激(例えば咳、気管支痙攣、呼吸困難、喘鳴)に関連していた。他のAEには、不快な味覚(味覚障害)、吐き気、及び嘔吐が含まれていた。薬剤を肺からゆっくりと吸収することにより、全身の薬剤レベルは極めて低くなり、多くの場合、定量限界に近いかそれを下回る。腎機能のバイオマーカーである血清クレアチニンの濃度は一般に、エアロゾルAmB投与によって変化しない。従って、呼吸器をAmBの標的とすることで、AmBの全身忍容性が劇的に向上する。

10

【0182】

中性pHでは、AmBは両性イオン性であり、カルボキシル基(pKa = 5.7)は脱プロトン化され、マイコサミン環のアミン基(pKa = 10.0)はプロトン化される。結晶化度が高い両性イオン性形態のAmBは、水溶液には実質的に不溶性であり、37での水、ギャンブル液、及び希釈Alveofact(登録商標)中での溶解度はそれぞれ0.5、0.2、及び0.2 µg/mLである。

【0183】

投与量数(Do)は、ある化合物が肺から適切に吸収されるかどうかを、意図された臨床用量におけるその溶解度に基づいて予測するために使用される、簡単な指標(metric)である。

20

【数1】

$$D_o = \frac{M_o(\mu\text{g})/V_{ASL}(\text{mL})}{S_{ASL}(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}$$

【0184】

ここでM_oは、ASLにおけるAmB用量であり、V_{ASL}はASL液体の体積であり、S_{ASL}はASL液体中でのAmBの溶解度である。1.0を超えるDoの値は、肺からの吸収の溶解度律速(dissolution-limited absorption)と一致している。S_{ASL} = 0.2 µg/mL及びV_{ASL} = 25 mLでは、吸収の溶解度律速はM_o > 5 µgで生じる。AmBの治療用量は、約1.0 mgを超えると予想される。このシナリオでは、AmBの吸収の溶解度律速が生じる。

30

【0185】

本開示の組成物の溶解が遅いことは、血漿中にAmBがゆっくりと現れること(例えばt_{max} = 4 ~ 8時間)、及びAmBの静脈内組成物と比べて全身の曝露が劇的に減少していることによって実証されている。本明細書に記載の吸入組成物の全身曝露は、同等のAmB用量の静脈内投与後に測定されるものに比べて、100 ~ 1000倍低い。

【0186】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法におけるAmBの絶対的バイオアベイラビリティは、約0.1% ~ 約20%、約0.1% ~ 約10%、約0.1% ~ 約5%、約0.1% ~ 約2%、又は約0.1% ~ 約1%である。いくつかの実施形態では、血漿からのAmBのクリアランスは2相性であり、ASLに溶解したAmBの初期半減期は5 ~ 20時間程度であり、その後、肺組織からの薬剤の再分布によって生じる極めてゆっくりとした終末クリアランス(t_{1/2}約20日)が続く。同様の2相性クリアランスプロセスは、微粒子の静脈内投与後のAmBについても観察され、上記微粒子は、細網内皮系の細胞による初期クリアランスの後、血漿中に再分布される。

40

【0187】

AmBの公称用量、粒子径、及び物理的形狀は、ラットにおける経口吸入後のAmBの

50

毒性に影響を及ぼす可能性がある（米国特許出願公開第2012/0128728号）。50%のAmBと50%のモル比2:1のDSPC/塩化カルシウム（即ち、ABI P、Nektar Therapeutics）とを含む脂質被覆結晶として製剤化された非晶質度が高いAmBを投与されたラット（米国特許第7,326,691号；米国特許第8,404,217号；米国特許出願公開第2012/0128728号）は、呼吸困難、気管及び気管支の肥大、気管の炎症、気管支粘膜細胞の浸潤、並びに気管及び気管支の管腔滲出液のエビデンスという臨床的兆候を示した。これらの影響の発生率は、粒子径が小さく結晶化度が高いAmB（ABI P中の結晶化度76%）を投与されたラットでは、顕著に低下した。

【0188】

適切な用量及びレジメンで投与された、結晶化度が高いAmBを含むABI P組成物は、非臨床毒性試験において良好な忍容性を示した。上記組成物は、健康な参加者における単回用量及び複数用量試験においても良好な忍容性を示した（Kugler et al.: Amphotericin B inhalation powder (ABI P) achieves significant pulmonary and low systemic amphotericin B concentrations. 16th Congress of the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM), Paris, France, Abstract O-0011, 26-Jun-2006; Lee J.D., et al.: Amphotericin B inhalation powder (ABI P) is well tolerated with low systemic amphotericin B exposure in healthy subjects. In: Program and Abstracts of the 2nd Meeting of Advances Against Aspergillosis (AAA), Abstract P-118, pp. 214-215, Athens, Greece, 2006)。

【0189】

非晶質の含有率の上昇は、原薬の粉碎性の低下をもたらす可能性もあり、これは粒子径の増大をもたらす可能性がある。この観察結果は、実施例3の湿式粉碎プロセスで示されている。これらのような結晶サイズの増大は、空気力学的粒子径分布に関連する重要な品質属性に悪影響を及ぼす可能性がある。

【0190】

AmBの結晶化度が96%から75%に低下すると、水中での湿式粉碎の後、 X_{50} が $1.06\ \mu\text{m}$ から $2.16\ \mu\text{m}$ に上昇し、 X_{90} が $2.14\ \mu\text{m}$ から $5.99\ \mu\text{m}$ に上昇した（実施例3）。AmB結晶サイズの増大は、製剤化されたABC I - 002薬剤製品の物理化学的特性及びエアロゾル性能に有意な影響を与えなかった。MMADは $2.9\ \mu\text{m}$ から $3.1\ \mu\text{m}$ に増大したが、 $\text{FPF} < 5\ \mu\text{m}$ は61%から63%に上昇した。

【0191】

いくつかの実施形態では、原薬の結晶化度は、少なくとも75%、少なくとも90%、又は少なくとも95%である。

【0192】

特定の実施形態では、微粒子化された薬剤粒子の一次粒子径分布が小さいため、肺への薬剤製品の効率的な送達を提供できる。AmB結晶の、レーザー回折で決定される X_{50} は、約 $0.5\ \mu\text{m}$ ～約 $4\ \mu\text{m}$ 、例えば約 $1\ \mu\text{m}$ ～約 $3\ \mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態では、AmB結晶の X_{90} は、約 $1.5\ \mu\text{m}$ ～約 $10\ \mu\text{m}$ 、例えば約 $2.0\ \mu\text{m}$ ～約 $8.0\ \mu\text{m}$ である。

【0193】

賦形剤

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、2つのリン脂質（HSPC及びDSPG）、コレステロール、並びに塩化カルシウムを含む多孔質層で被覆された、結晶化度が高いAmB粒子を含む。これらの材料は、上記組成物の物理化学的特性及びエアロゾル性能に直接影響する、複雑な相挙動を示す可能性がある。そしてこれは、製剤化された薬剤製品の有効性、安全性、及び忍容性に影響を及ぼす可能性がある。

【0194】

リン脂質は、1つ又は複数の脂肪酸と、アルコールが結合したリン酸基とが結合したグ

10

20

30

40

50

リセロール又はスフィンゴシン骨格を含む、脂質の一種である。リン酸基は、コリン、エタノールアミン、又はセリンといった単純な有機分子で修飾できる。リン脂質は両親媒性分子であり、2つの脂肪酸アシル鎖が親油性であり、修飾されたリン酸基が親水性である。リン脂質は水中で自己集合して膜構造を形成する。リン脂質は哺乳水細胞膜中に偏在している。

【0195】

水和リン脂質二重層は、サーモトロピックな相挙動を示す。温度の上昇と共に、アシル鎖は、アシル鎖が高度に秩序化された固体のような全トランス構成で存在する「ゲル相」(So)から、アシル鎖のゴーシュ配座異性体の増加によって無秩序な液体状のパッキングがもたらされる、無秩序な「液晶相」(Ld)へと、相転移する。ゲルから液晶への相転移の温度は、主転移温度、即ち T_m と呼ばれる場合もある。

10

【0196】

リン脂質の T_m は、アシル鎖の長さ及び飽和度に大きく依存し、またそれらより程度は低いものの、ヘッドグループの性質にも依存する。表2は、様々な水和リン脂質の T_m 値の比較を提供する。

【0197】

【表2】

表2. 様々なリン脂質の、水和ゲルから液晶への主転移温度

リン脂質略語	一般名称	アシル鎖	T_m (°C)
DLPC	ジラウロイルホスファチジルコリン	12:0/12:0	-2
DMPC	ジミリストイルホスファチジルコリン	14:0/14:0	24
DPPC	ジパルミトイルホスファチジルコリン	16:0/16:0	41
DSPC	ジステアロイルホスファチジルコリン	18:0/18:0	55
HSPC	水素添加大豆ホスファチジルコリン	~89% 18:0/18:0; 11% 16:0/16:0	53.6
DOPC	ジオレイルホスファチジルコリン	18:1/18:1	-19
DLPC	ジリノレイルホスファチジルコリン	18:2/18:2	-57
DSPG	ジステアロイルホスファチジルグリセロール	18:0/18:0	55
DSPS	ジステアロイルホスファチジルセリン	18:0/18:0	68
DSPE	ジステアロイルホスファチジリエタノールアミン	18:0/18:0	74

20

30

【0198】

ホスファチジルコリンについて、アシル鎖の長さが12から18に増大すると、水和 T_m は-2から55に上昇する。アシル鎖に不飽和を導入することにより、 T_m 値は0未満へと劇的に低下する。ヘッドグループの性質の変化もまた T_m の違いにつながり、 T_m は、ホスファチジリエタノールアミン(PE) > ホスファチジルセリン(PS) > ホスファチジルグリセロール(PG) ~ ホスファチジルコリン(PC)となる。HSPC及びDSPGの T_m 値は、それぞれ53.6及び55である。

【0199】

細胞膜は本質的に、様々な脂質種及びタンパク質種を含む多成分系である。細胞膜の物理的特性及び生物学的機能は、リン脂質二重層内でのリン脂質の配置及び分布に密接に結

40

50

びついている。実際、脂質は、その組成に応じて、二重層内で様々なドメインに相分離する場合がある。Cholは細胞膜中に豊富に存在し、構造的完全性の維持、及び膜流動性の調節において、重要な役割を果たしている。

【0200】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物はCholを含む。Cholは、製剤化された薬剤製品の安全性及びイオンチャネル活性に寄与し得る。飽和PLにCholを加えることにより、細胞膜中でも噴霧乾燥粒子中でも、PLの相挙動に有意な影響を及ぼすことができる。

【0201】

図1は、水和DPPC-Chol混合物の状態図を示す(Ipsen JH, Karlstroem G, Mouritsen OG, et al. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. Biochim Biophys Acta. 1987; 905: 162-172)。

【0202】

図1に示されているように、Cholを加えると、秩序液相(L_o)と呼ばれる新たな相が形成される。CholをS_oに約6mol%未満だけ組み込むことによって、DSCサーモグラムのT_m相転移が広がり、アシル鎖のパッキングの無秩序性が上昇する。対照的に、T_mを超える無秩序L_d相に存在するリン脂質アシル鎖は、Cholを加えることで秩序性が増す。約6~20mol%のChol濃度では、2つの相が共存する。T_mを超えると、無秩序液相及び秩序液相が共存する(L_d-L_o)。T_m未満では、秩序固相が秩序液相と共存する(S_o-L_o)。Chol濃度が高い(20~25mol%)と、協調的なT_m相転移が失われ、L_o相のみが存在する。HSPC(アシル鎖が更に長い)については、図1の縦軸の温度が約13℃だけ上方にシフトした、同様の図が予想される。

【0203】

上述の完全に水和したPLとは対照的に、本明細書に記載の実施形態による組成物は、部分的に脱水したPLを含む。ここで提案されている、イオンチャネル補欠物としての使用のために、本明細書に記載の組成物中の脂質を噴霧乾燥して、含水率が低い吸入可能な乾燥粉末を形成できる。

【0204】

水が存在しないと、リン脂質ヘッドグループ間の間隔が減少することにより、脂質アシル鎖間のファンデルワールス力が増大し、またT_mが上昇する。例えば、DPPCのT_m値は、凍結乾燥時に、約41℃(完全水和)から105℃に上昇する(Ohtake S, Schebor C, Palacek SP, de Pablo JJ: Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. Biochim Biophys Acta. 2005, 1713: 57-64)。

【0205】

噴霧乾燥DSPC粉末について、T_mは、55℃(完全水和)から、75%RHでの71℃、11%RHでの85℃、<3RHでの102℃まで上昇する(Pikal-Cleland K A, Zhang J, Lechuga-Ballesteros D, Tarara TE, Weers JG: The impact of Ca²⁺ binding on the packing structure of dry phospholipids. Presented at CRS Annual Meeting, Seoul, Korea, 2002)。

【0206】

現在市販されている、PLを含む噴霧乾燥組成物(例えばTOBI(登録商標)Podhaler(商標)、Bevespi(登録商標)Aerosphere、Breztri(登録商標)Aerosphere、及びInbrija(登録商標))に関して、目標は、粒子形成中、噴霧乾燥中の収集器内、及び製品の貯蔵寿命にわたる保管中に、PLをS_o相に維持することであった。その結果、これらの製品は長鎖飽和ホスファチジルコリン、例えばDPPC及びDSPCを、主なシェル形成賦形剤として利用している。

【0207】

水性原料の噴霧乾燥中、霧化された液滴の気化冷却により、液滴の温度は室温よりわず

かに上、かつPLの水和 T_m よりはるかに下(41~55)に維持される。噴霧乾燥機の入口温度が T_m を超える場合であっても、そのようになる。粒子形成後、噴霧乾燥機の出口温度及び収集器ジャケット温度は、脱水状態の T_m 未満に維持される。このようにして、製造プロセス全体を通じて、また保管中も、アシル鎖は S_o 相に維持される。

【0208】

DPPC又はDSPCを含む液体原料の場合、 S_o 相の噴霧乾燥により、粒子の表面組成、表面形態、粒子径、密度、及び多孔性を全て効果的に制御できる、個別化された噴霧乾燥粒子の形成が可能となる。更に、長鎖飽和PLは、内因性肺サーファクタント中、及び肺からの迅速なクリアランス経路内に存在するものであるため、肺において生体適合性を有すると考えられている。

10

【0209】

対照的に、 T_m 値が0未満の不飽和PLの液体原料を噴霧乾燥するには、大きな問題がある。噴霧乾燥中に水が蒸発するため、 T_m よりも大幅に高い出口温度が必要になり得る。このシナリオでは、PLのアシル鎖は、粒子形成中に L_d 相で存在するため、乾燥プロセスによって、融合した粒子の大きな凝集体が生じる可能性がある。これにより、製造歩留まりが低くなり、また空気力学的粒子径分布が、乾燥粉末エアロゾルとしての吸入に適さないものとなる可能性がある。

【0210】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、比較的長いアシル鎖(例えば16:0/16:0又は18:0/18:0)を有する飽和リン脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、DPPC、DSPC、HSPC、DSPG、又はこれらの組み合わせを含む。

20

【0211】

カルシウムイオンは、リン脂質中のリン酸基と結合して、水分子を置換し、PL分子間のパッキングを密にすることができる。噴霧乾燥DSPC粉末について、 Ca^{2+} イオンの添加により、特に、典型的には毛細管力の大幅な上昇をもたらすRH値(例えば75%RH)における、脱水粉末の環境堅牢性(T、RH)を改善できる。いくつかの実施形態では、PL/Caの比は4.0mol/mol未満、3.0mol/mol未満、又は約2.0mol/molである(米国特許第8,709,484号;米国特許第7,442,388号;参照により本出願に援用される)。いくつかの実施形態では、PL/Ca比を化学量論比2.0mol/mol未満に低下させるのは望ましくない場合がある。というのは、これ未満の比での過剰な塩化カルシウムが、粉末の吸湿性を上昇させる恐れがあるためである。

30

【0212】

L_d 相又は L_o 相で T_m を超えると、噴霧乾燥粉末は「粘着性のある(sticky)」粘性液体となり得る。このような凝集性の粉末は、粉末の流動性及びエアロゾル性能に悪影響を及ぼす傾向がある。この観察結果は、ガラス転移温度 T_g を超えた、無秩序性が高い非晶質固体において生じる事態と類似したものであり得る。 S_o ドメインと L_o ドメインとが相分離した噴霧乾燥粉末では、粉末の特性が悪くなる傾向がある。従って、脂質を S_o 相に維持することが望ましくなり得る。

40

【0213】

乾燥粉末製剤中のPLの相挙動に対する、添加されたCholの影響は、よく分かっていない。本明細書に記載の実施形態による組成物の示差走査熱量測定サーモグラムはChol/PL比約0.05w/w未満(9.4mol%のChol)において、 L_o 相が完全に可溶化されて S_o 相となることを示唆している(実施例4)。従って、脱水状態では、 S_o 相は水和DPPC-Chol混合物で観察されたものよりも高いパーセンテージのCholを可溶化させることができる(図1)。 S_o 相を維持することにより、90より高い T_m 値が得られる。

【0214】

ABC I粉末中のDSPG含有率を、AmBisome(登録商標)及び一部の肺サー

50

ファクタント調製物で利用されるようなHSPC/DSPG比2.3mol/mol(約7/3mol/mol)から、HSPC/DSPG比9.0w/w以上まで低減することによっても、噴霧乾燥AmB/Chol粉末の物理化学的特性及びエアロゾル特性を改善できる(実施例12)。

【0215】

いくつかの実施形態では、HSPC/DSPG比を増大させると、高い相対湿度(RH)において、本明細書に記載の組成物の吸湿性が低下する(実施例5)。DSPGは、ナトリウム塩として提供できる陰イオン性リン脂質である。カルシウムイオンを加えることでナトリウムイオンを置換でき、このナトリウムイオンは、塩化カルシウム由来の塩素イオンと結合して、噴霧乾燥粒子中の吸湿性塩化ナトリウムドメインを形成できる。高RHにおいて、NaClは潮解する(即ち空気から水分を吸収して、その水分中に溶解する)。これは、高RHにおける本明細書に記載の実施形態による組成物の粘着性に寄与し得る。

10

【0216】

他のPLは、ASLのpHの改善と、許容可能な粉末及びエアロゾル特性とを提供できる。それらの有用性は、実施例のセクションで説明されている特性決定方法を用いて、決定できる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン(PS)、又はこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、鎖長がより長い飽和アシル鎖を有するリン脂質(例えばn16)を含む。

20

【0217】

薬剤製品組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、固有の結晶質ドメイン中で脂質賦形剤から相分離された薬剤粒子を含む。即ち、特許文献1、特許文献2の場合のように、AmB及びCholは非晶質ナノ粒子中で複合体化されていない。また同様に、AmBisome(登録商標)(米国特許第5,965,156号)の場合のように、AmBはリボソームに封入されていない。

【0218】

本明細書に記載の組成物中にCholが存在することは、有効性及び安全性の両方の観点から重要であり得る。

30

【0219】

有効性の観点からは、Cholの存在により、AmB濃度が低い場合と高い場合との両方において、イオンチャネル活性を維持できる。そのメカニズムははっきりと分かっていないが、Cholの不在下では、イオンチャネル活性は、AmB濃度が高いと低下する傾向がある(実施例10)。この傾向は、純粋なAmB、及びCholを含有しないABI Pの両方について観察された。

【0220】

特許文献1では、Burkeらは、CF肺上皮の気道表面の生理機能の回復のための、AmB及びCholの組成物を開示しており、Chol/AmBのモル比は、2.6~50mol/molの範囲内となるように請求されている。特許文献2では、Burkeらは、小分子重炭酸塩チャネルでCFを処置する方法を開示している。この場合、Chol/AmB比は1.0~12.0mol/molである。本開示では驚くべきことに、1.0mol/molよりも大幅に低いChol/AmB比においてイオンチャネル活性が維持されることが発見された(実施例10)。いくつかの実施形態では、Chol/AmB比の公称比は0.4~1.2mol/molである。いくつかの実施形態では、噴霧乾燥プロセスにおける原薬の富化により、最終的な噴霧乾燥粉末のChol/AmB比は、約0.33~約1.0mol/molとなる。特定の実施形態では、AmB:Chol複合体で達成されるものに匹敵するASLのpHの大幅な改善(即ち>0.1pH単位)が、公称Chol/AmB比0.05mol/molまで維持される。

40

【0221】

50

PLを含む噴霧乾燥粉末において、より低いChol / Amb比でイオンチャンネルが維持されることにより、粉末特性への悪影響によるCholに富むLo相の相分離を最小限に抑えることができる。

【0222】

特許文献1及び特許文献2で開示されているAmb : Chol複合体は、CuFi-1及びCuFi-4上皮のASLのpHの、約0.1~0.2pH単位の改善を達成する。ASLのpHは、わずかに酸性のままである(pH約6.90~6.95)。CuFi-4細胞では、CFTRモジュレーターであるIvacaftorにより、Amb : Chol複合体と同等のASLのpHの改善が達成される。対照的に、本明細書に記載の実施形態による組成物で観察される、CuFi-1細胞のASLのpHの改善は、約0.4~0.5pH単位であり、即ちAmb : Chol複合体及びIvacaftorで観察されるものより約2倍~5倍大きい。いくつかの実施形態では、ASLのpHは、Amb : Chol複合体での弱酸性から、本明細書に記載の組成物での弱塩基性(pH約7.2)まで上昇する。わずかに塩基性のpHが達成されることにより、宿主防御に關与する多くの陽イオン性ペプチド(例えばディフェンシン)の活性を改善できる。

10

【0223】

安全性の観点からは、本明細書に記載の実施形態による組成物中にCholが存在することにより、哺乳類細胞膜から膜外ステロールスポンジ相へのステロールの抽出が防止されることが分かっている。これは、AmbのChol非含有組成物の毒性の主なメカニズムであることが実証されている。この保護効果は、Chol / Amb比1.0mol / molまでは維持されることが示唆されていた(特許文献1、特許文献2)。驚くべきことに、赤血球細胞膜について、この保護効果は、Chol / Amb比0.4mol / mol以下まで維持されることが発見された(実施例15)。

20

【0224】

図2は、様々なAmb / 脂質組成物の組成を詳細に示す三元系状態図である。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、網掛けの三角形によって定義される。この三角形の2つの辺は、Chol / Ambモル比の範囲(例えば1.2mol / mol及び0.4mol / mol)によって定義される。上記三角形の3つ目の片は、Lo相の相分離を排除するChol / PLの比(0.05w / w)によって定義される。状態図及び様々な組成物については、実施例1で更に詳細に説明される。

30

【0225】

いくつかの実施形態では、CFに罹患した患者のASLのpHの回復のためのAmbの公称1日用量は、約0.1~約10mg、又は約0.2mg~約6mgである。

【0226】

いくつかの実施形態では、粉末の公称用量及びタップ密度に基づく薬剤負荷の推定値が、実施例16に示されている。特定の実施形態では、薬剤負荷は約0.1w / w%~約50w / w%、例えば約0.5w / w%~約20w / w%である。

【0227】

物理化学的特性

本明細書に記載の組成物の物理化学的特性は、原料組成物(例えば固形分含有量、PFOB含有量)、及び噴霧乾燥器での乾燥条件に左右され得る。以下に記載の範囲は、実施例で示されている組成物のバッチについての結果に基づくものである。

40

【0228】

いくつかの実施形態では、小さな多孔質粒子は比較的低い密度を有するが、溶液ベースの液体原料から噴霧乾燥された組成物ほど低くはない。いくつかの実施形態では、注入かさ密度は約0.04~約0.12g / cm³であり、タップ密度は約0.08~約0.20g / cm³である。

【0229】

Carrierの流動性指数は、バルク粉末の流動特性の尺度を提供する(表3)。本明細書に記載の実施形態による粒子等の、幾何学的サイズが5µm未満の微粒子は、凝集性が高

50

く、粉末流動特性が極めて悪い。

【 0 2 3 0 】

【 表 3 】

表3. Carr の流動性指数とバルク粉末の流動特性との間の関係

Carr の流動性指数	粉末の流動性の説明
≤ 10	最良、粉末は自由に流動する
11-15	良好、粉末は自由に流動する
16-20	まずまずの粉末流動性
21-25	許容可能な粉末流動性
26-31	凝集性、粉末の流動性は悪い
32-37	高凝集性、粉末の流動性は非常に悪い
>38	粉末はほぼ流動しない

10

【 0 2 3 1 】

それでも、ドラムフィルター（例えば Harro Hoefliger 製の機械）を用いて、凝集性の微粉末を正確かつ精密に充填することで、わずか約 1.0 mg の充填質量でも、約 3 % 未満の相対標準偏差を達成できる。

20

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の粉末の Carr の流動性指数は、約 20 ~ 約 50、例えば約 24 ~ 約 30 である。Carr の流動性指数の値が低い粉末は、著しく改善された粉末流動特性、粒子径及び密度の測定値のばらつきの低減、並びに生産歩留まりの向上を達成できる。噴霧乾燥粉末にロドメインを有する組成物の Carr の流動性指数は約 40 であり、これは、低い歩留まりや、粉末の取り扱い（例えば充填及び流動化）の困難さにつながる傾向がある。

【 0 2 3 3 】

特定の実施形態では、比較的高い Carr の流動性指数の値（良好でない凝集性の流動を示唆するもの、即ち 20 ~ 32 の Carr の流動性指数の値）が観察されることは、携帯型乾燥粉末吸入器の開発にとって重要な流動特性に悪影響を及ぼさない。

30

【 0 2 3 4 】

一次粒子径分布は、レーザー回折によって決定できる（例えば以下の「特性決定方法」を参照）。特定の実施形態では、本明細書に記載の粉末は、 X_{10} が約 0.40 ~ 約 1.2 μm 、 X_{50} が約 1.5 ~ 約 3.5 μm 、 X_{90} が約 4.0 ~ 約 8.0 μm である。

【 0 2 3 5 】

含水率は、カールフィッシャー電量滴定法で決定できる。特定の実施形態では、本明細書に記載の粉末の含水率は、約 1.5 w/w % ~ 約 6 w/w % である。

【 0 2 3 6 】

特定の実施形態では、上記粉末の物理化学的特性は、製造プロセスパラメーターの変更によって、上述の範囲全体にわたって調節できる。

40

【 0 2 3 7 】

エアロゾル性能

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、気管支気道を標的とする。この点で、口及び喉並びに肺胞における胸腔外薬剤沈着を最小限に抑えながら、肺内の大気道及び小気道における沈着を最大化することが、有益となる傾向がある。

【 0 2 3 8 】

インピトロでのエアロゾル性能の測定基準の文脈において、本明細書に記載の実施形態による組成物は、圧力降下 4 kPa、吸入体積 4 L における、携帯型乾燥粉末吸入器から

50

の放出用量が、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、FDAドラフトガイダンス：“Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Products- Quality Considerations (April, 2018)”に規定されている送達量均一性 (delivered dose uniformity: DDU) 規制要件に、平均ED値の標準偏差が6%以下で合格するように、処方される。

【0239】

特定の実施形態では、圧力降下4kPa、吸入体積4Lで動作する次世代インパクター (Next Generation Impactor: NGI) において、本明細書に記載の組成物の空気力学的質量中央径 (MMAD) は約1.5~約4.0 μm 、例えば約2.0~約3.5 μm である。 10

【0240】

NGI内での沈着のパターンが重要となり得る。上で詳述した望ましい局所的沈着パターンに従えば、USPの喉及びインパクターステージ1及び2(「粗画分 (coarse fraction)」と呼ばれる)での沈着、並びにステージ6~フィルターの「超微細画分 (extrafine fraction)」での沈着を最小限に抑えながら、ステージ3、4、及び5(「気道画分 (airways fraction)」と呼ばれる)での沈着を最大化することが有益である。特定の実施形態では、粗画分での沈着は、公称用量の30w/w%未満、20w/w%未満、又は10w/w%未満である。いくつかの実施形態では、超微細画分での沈着は、公称用量の16%未満、12%未満、又は8%未満である。特定の実施形態では、気道画分での沈着は、公称用量の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、又は少なくとも70%である。 20

【0241】

特定の実施形態では、放出用量のパーセンテージで表される、5 μm 未満の微粒子画分 (FPF < 5 μm) は、少なくとも40w/w%、少なくとも50w/w%、少なくとも70w/w%、又は少なくとも90w/w%である。

【0242】

特定の実施形態では、1.0~6.0kPaの圧力降下での、アルバータ理想化喉 (Alberta Idealized Throat: AIT) モデルにおける合計肺用量 (total lung dose: TLD) の流量依存度は、40%未満、又は15%未満である。 30

【0243】

特定の実施形態では、標的充填質量は約5~約40mg、例えば約10~約20mgである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、携帯型カプセルベース乾燥粉末吸入器 (DPI) を用いて、対象に投与される。特定の実施形態では、DPIは、容積が約0.30 cm^3 (サイズ3のカプセル) ~約0.37 cm^3 (サイズ2のカプセル) の容器を有する。

【0244】

特定の実施形態では、DPIは、RS01 DPI (Plastiapae (イタリア、オズナーゴ)) の変形形態である。RS01の変形形態は、収容するカプセルのサイズ (サイズ3~サイズ0)、及び空気流に対する抵抗 ($R = 0.06 \sim 0.16 \text{ cm H}_2\text{O}^{0.5} \text{ L}^{-1} \text{ 分}$) が異なっている。いくつかの実施形態では、DPIは、抵抗が中程度以上である (例えばRが約0.10~約0.30 $\text{cm H}_2\text{O}^{0.5} \text{ L}^{-1} \text{ 分}$ である)。特定の実施形態では、DPIは、抵抗が約0.14 $\text{cm H}_2\text{O}^{0.5} \text{ L}^{-1} \text{ 分}$ である、RS01 DPIの変形形態である。特定の実施形態では、抵抗が中程度以上のDPIは、胸腔外沈着を制限しながら、吸入後の咳の可能性も制限する。 40

【0245】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、Handihaler (Boehringer Ingelheim)、RS00 (Plastiapae)、又はAerolizer (登録商標) (Novartis) (米国特許第3,991,761号; 参 50

照により本出願に援用される)、Breezhaler(登録商標)(米国特許出願公開第2007/0295332号;参照により本出願に援用される)(Novartis)を用いて投与される。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、TurboSpin(PH&T)若しくは米国特許第8,069,851号及び米国特許第7,559,325号(いずれも参照により本出願に援用される)に記載されているような、T-326(Podhaler(商標))(Novartis)等のその変形形態、又はAIR吸入器(Acorda Therapeutics)を用いて投与される。

【0246】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、単回使用の使い捨て吸入器を用いて投与される。いくつかの実施形態では、単回使用の使い捨て吸入器は、TwinCaps(Hovione)、Dose1(登録商標)(Micro Engineering Solutions)、ICOone(商標)(Iconovo)、又はCyclops(登録商標)(Pure IMS)である。

【0247】

いくつかの実施形態では、本開示の乾燥粉末組成物を鼻腔内投与することにより、鼻内のASLのpHを上昇させ、鼻粘膜上皮間電位差を増大させる。考えられるデバイスとしては、Aptar社のUnidoseシステムが挙げられる。

【0248】

製造

コレステロールとリン脂質との混合物は、有機溶媒中での溶解によって調製できる。特定の実施形態では、HSPC/DSPG/Cholを54/24/22のw/w/w比で含む脂質混合物を調製する。所望の組成物に応じて、脂質混合物に追加のPL及び塩化カルシウムを補充してもよい。

【0249】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物を調製する方法は、脂質混合物を水中に分散させて、多重膜リポソームを形成するステップを含む。特定の実施形態では、このステップは、脂質の水和 T_m より高い温度の温水に脂質を加えることを含む。いくつかの実施形態では、水の温度は65 ~ 90 である。いくつかの実施形態では、分散は、UltraTurax(登録商標)T-50等の高せん断ミキサーを用いて達成される。

【0250】

いくつかの実施形態では、上記方法は更に、フッ素化(FC)発泡剤(例えばパーフルオロオクチルプロミド(PFOB、パーフルブロン)、パーフルオロオクチルエタン(PFOE)、又はパーフルオロデカリン(PFD))を混合しながら加えることによって、ミクロンサイズのエマルジョン液滴で構成された水中粗FC型エマルジョンを形成するステップを含む。特定の実施形態では、上記粗エマルジョンを、高圧下でMicroFluidizer(登録商標)又はピストンギャップホモジナイザー(例えばAvestin Emulsiflex(登録商標))を用いて均質化し、サブミクロンエマルジョンを形成する。いくつかの実施形態では、均質化中の圧力は約10,000~約20,000psiであり、均質化は、(バッチサイズに応じて)設定された期間にわたって、又は指定された回数(例えば100回)の個別パスにわたって、実施される。いくつかの実施形態では、全ての液滴が少なくとも1回はホモジナイザーを確実に通過するように、設定された期間のプロセスの終わりに、1回の個別パスを実施する。

【0251】

いくつかの実施形態では、上記方法は更に、混合しながら、上記サブミクロンエマルジョンに原薬を添加するステップを含む。特定の実施形態では、この添加はワンポットプロセスで実施される。いくつかの実施形態では、結果として得られる、エマルジョン液滴と懸濁された薬剤粒子との複合分散液を、高せん断ミキサーで混合するか、又はホモジナイザーに通す。

【0252】

いくつかの実施形態では、エマルジョンの調製及び薬剤の湿式粉碎は、2ポットプロセスにおいて別個のタンクで実施される。特定の実施形態では、これにより、微小化された薬剤粒子の、レーザー回折又は動的光散乱によるプロセス内サイズ測定が可能となる。いくつかの実施形態では、その後、混合しながらこれら2つのポットを1つにまとめる。

【0253】

特定の実施形態では、エマルジョン調製ステップ及び湿式粉碎ステップは、ホモジナイザーによって処理される液体の量を限定するために、濃縮エマルジョン/懸濁液を用いて実施される。いくつかの実施形態では、最終ステップで水を加えることで、最終的な液体原料において、目標固形分含有率及びPFOB体積分率を達成する。

【0254】

いくつかの実施形態では、原料は温かい濾過空気の流れの中へと噴霧され、この濾過空気の流れは溶媒を蒸発させ、乾燥した生成物をサイクロン分離器又はバグハウスに搬送する。

特定の実施形態では、その後、使用済みの空気を、気化した溶媒と共に排出する。いくつかの実施形態では、入口及び出口温度、供給速度、霧化圧力、乾燥用空気の流量、並びにノズル構成といった、噴霧乾燥器の動作条件を調整することにより、結果として得られる乾燥粒子について、所望の粒子径、含水率、及び生産歩留まりを得ることができる。特定の実施形態では、上記方法は更に、Niro PSD-1スケール噴霧乾燥器を、入口空気温度が80 ~ 200、出口空気温度が約40 ~ 120、液体供給速度が30 g / 分 ~ 120 g / 分、総空気流量が50 scfm ~ 230 scfm、霧化空気流量が30 ~ 90 scfmとなるように設定するステップを含む。噴霧乾燥原料の固形分含有量は、典型的には0.5 w / v % ~ 10 w / v %となり、発泡剤の濃度は典型的には3 v / v % ~ 30 v / v %となる。いくつかの実施形態では、所望の設定は、少なくとも部分的に、使用される設備のスケール及びタイプに左右される。

【0255】

霧状液滴中の水が蒸発すると、水性の霧状液滴の直径が縮小され、ゆっくりと拡散するエマルジョン液滴とAmB結晶とが空気/水の界面に集中し、中空の液滴コアが現れる。高沸点油相が蒸発すると、噴霧乾燥粒子に細孔が残る。最終的な粒子の形態は、薬剤粒子が埋め込まれた多孔質脂質粒子で構成される。

【0256】

特定の実施形態では、出口温度と、(収集器内のRHの制御に利用される場合には)収集器ジャケット温度とを、最も低い脂質主転移温度未満とする必要がある。Chol / PL比が0.05 w / w未満である特定の実施形態では、最も低い脂質主転移温度は80超であり、出口温度及び収集器ジャケット温度は70以上となる。Chol / PL比の低下及びHSPC / DSPG比の増大(実施例9及び12)により、Cholリッチ相を排除でき、これによって、更に高い出口温度、生産速度の向上、及び噴霧乾燥粉末中の残留溶媒の低減をもたらすことができる。

【0257】

霧化液滴があまりに迅速に乾燥してしまうと、微細なエマルジョンの液滴の利点が失われる可能性がある。従って、乾燥速度を制御することが有益となり得る。

【0258】

定義

本明細書中で使用される場合、用語「処置する(treat, treating)」は、以下をもたらす介入を実施することを指す：(a)ある状態若しくは疾患を発症するリスクを有する可能性、又は該状態若しくは疾患の素因を有する可能性があるものの、該状態又は疾患を有するとはまだ診断されていない対象において、該状態又は疾患の発生を予防すること；(b)状態又は疾患を阻止すること、例えばその発症を遅延又は停止させること；あるいは(c)状態又は疾患を軽減又は緩和すること、例えば状態又は疾患の退行を引き起こすこと。一実施形態では、用語「処置する(treat, treating)」は、以下をもたらす介入を実施することを指す：(a)状態又は疾患を阻止すること、

10

20

30

40

50

例えばその発症を遅延又は停止させること；あるいは（b）状態又は疾患を軽減又は緩和すること、例えば状態又は疾患の退行を引き起こすこと。

【0259】

本明細書中で使用される場合、「対象（subject）」又は「患者（patient）」は、生きている哺乳類を指す。様々な実施形態において、患者は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウマ、ウシ、又は非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない、非ヒト哺乳類である。特定の実施形態では、患者はヒトである。

【0260】

本明細書中で使用される場合、「有効量（effective amount）」は、10
所望の生物学的効果を達成するために十分な任意の量を指す。

【0261】

本明細書中で使用される場合、「治療有効量（therapeutically effective amount）」は、所望の治療効果、例えばCFの処置を達成するために十分な任意の量を指す。

【0262】

本明細書中で使用される場合、「有効成分（active ingredient）」、「治療有効成分（therapeutically active ingredient）」、「活性剤（active agent）」、「薬剤（drug）」、又は「原薬（drug substance）」は、医薬品の有効成分を指し、これは「医薬品有効成分（active pharmaceutical ingredient：API）」としても知られている。20

【0263】

本明細書中で使用される場合、「非晶質（amorphous）」は、物質が分子レベルで長距離秩序を欠き、温度に応じて固体又は液体の物理的特性を呈し得る状態を指す。典型的には、このような物質は、明確なX線回折パターンを示さず、固体の特性を呈しながらも、より正式には液体として説明される。加熱すると、固体のような特性から液体のような特性への変化が、典型的には二次相転移として定義される「ガラス転移（glass transition）」で生じる。

【0264】

本明細書中で使用される場合、「結晶質（crystalline）」は、物質が分子レベルで規則的な秩序を有する内部構造を有し、明確なピークを有する特有のX線回折パターンを呈する、固相を指す。このような材料は、十分に加熱すると液体の特性も示すが、固体から液体へのこの変化は、相変化、典型的には一次相転移（「融点（melting point）」）によって特徴付けられる。本開示の文脈では、結晶質有効成分とは、結晶化度が75%を超える有効成分を意味する。特定の実施形態では、結晶化度は好適には90%を超える。他の実施形態では、結晶化度は95%を超える。他の実施形態では、結晶化度は10%未満、又は5%未満である。30

【0265】

本明細書中で使用される場合、「薬剤負荷（drug loading）」は、組成物の合計質量中の、質量ベースでの1つ又は複数の有効成分のパーセンテージを指す。40

【0266】

本明細書中で使用される場合、「質量中央径（mass median diameter）」若しくは「MMD」、又は「X₅₀」は、典型的には多分散粒子集団、即ちある範囲の粒子径からなる粒子集団内の、複数の粒子の中央径を意味する本明細書で報告される。X₅₀値は、文脈が別途示していない限り、レーザー回折（Sympatec Helios（ドイツ、クラウスタール＝ツェラーフェルト））によって決定されている。

【0267】

本明細書中で使用される場合、「タップ密度（Tapped density）」又は「tapped」は、USP 616 Bulk Density and Tapped Density of Powd 50

ersに記載されている方法Iと同様の様式で測定されたものである。タップ密度は、注入かさ密度よりも粒子密度に近い近似値を表し、測定値は実際の粒子密度よりもおよそ20%低くなる。

【0268】

本明細書中で使用される場合、「空気動学的質量中央径(mass median aerodynamic diameter)」又は「MMAD」は、典型的には多分散集団中の複数の粒子の、平均空気力学的サイズを指す。「空気動学的径(aerodynamic diameter)」とは、一般には空気中において粉末と同一の沈降速度を有する単位密度球の直径であり、従って、エアロゾル化された粉末又はその他の分散粒子若しくは粒子組成物をその沈降挙動について特性決定するために有用な方法である。空気力学的粒子径分布(PSD)及びMMADは、本明細書では、NEXT GENERATION IMPACTOR(商標)(Copley Scientific)を用いたカスケード衝突によって決定される。一般に、粒子が空気力学的に大きすぎると、肺の特定の領域に到達する粒子が少なくなる。粒子が小さすぎると、粒子のうち、より大きなパーセンテージが吐き出されてしまう可能性がある。対照的に、 d_a は、単一の粒子の空気動学的径を表す。

10

【0269】

本明細書中で使用される場合、「公称用量(nominal dose)」又は「ND」は、非リザーバーベースの乾燥粉末吸入器内の容器(例えばカプセル又はプリスター)に装入された薬剤の質量を指す。NDは、計量用量と呼ばれる場合もある。

20

【0270】

本明細書中で使用される場合、「放出用量(emitted dose)」又は「ED」は、粉末ユニットからの作動又は分散イベント後の、吸入器デバイスからの乾燥粉末の送達の指標を指す。EDは、公称又は計量用量に対する、吸入器によって送達された用量の比率として定義される。EDは実験によって決定されるパラメーターであり、患者の投薬を模倣したインピトデバイスセットアップを用いて決定できる。EDは、送達用量(DD)と呼ばれる場合もある。

【0271】

本明細書中で使用される場合、「微粒子画分(fine particle fraction:FPF)」は、空気力学的サイズが $5\mu\text{m}$ 未満の、放出用量中の有効成分のパーセンテージを指す。空気力学的粒子径分布(PSD)は、本明細書では、NEXT GENERATION IMPACTOR(商標)を用いたカスケード衝突によって決定される。

30

【0272】

本明細書中で使用される場合、「固体含有率(Solids Content)」は、噴霧乾燥されることになる液体溶液又は分散液中に溶解又は分散した、1つ又は複数の有効成分及び賦形剤の濃度を指す。

【0273】

本明細書中で使用される場合、「対象の気道(airway of a subject)」は、以下の肺構造：下気道の気管、気管支、及び気管支梢のいずれか又は全てを指す。

40

【0274】

用語「約(about)」は、呼吸用組成物の分野の当業者が通常遭遇する数値のばらつきを指し、本明細書に記載の数値のプラス又はマイナス0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、又は10%のばらつきを含む。

【0275】

本明細書全体を通して、また以下の特許請求の範囲において、文脈が別途示していない限り、単語「...を含む、備える(comprise)」又は「comprises」若しくは「comprising」等の変化形は、言及されている整数若しくはステップ、又は複数の整数若しくはステップの群が含まれることを意味するものと理解されるべきもの

50

であり、他の任意の整数若しくはステップ、又は複数の整数若しくはステップの群が排除されることを意味するものと理解してはならない。

【0276】

特に明記されていない限り、また文脈から明らかでない限り、数値範囲は、両端点及びその間の任意の値を含む。

【実施例】

【0277】

本開示の様々な態様及び実施形態は、以下の実施例を参照することで更に明らかになる。実施例は例示的な性質のものであり、本開示の主題を限定するものと理解してはならない。

10

【0278】

特性決定方法

アムホテリシンB (AmB) 含有率及び純度。製剤化されたバルク粉末又は空気力学的粒子径分布 (APSD) サンプルのAmB含有率及び純度は、383 nmで検出を行う逆相高速液体クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography: RP-HPLC) で決定された。サンプルは、Agilent 1260 Infinity II HPLCシステム (Wilmington (米国デラウェア州)) を用いて分析された。分離は、グラジエント溶離法 (溶媒A = 10 mMの酢酸塩緩衝液、pH 4.2; 溶媒B = アセトニトリル/メタノール、1.0 v/v) を用いて、Agilent Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18、3.0 x 150 mm、(2.7 µm) カラムで達成された。AmBは、USPで認定された参照標準を用いた1点較正を用いて定量された。

20

【0279】

コレステロール含有率。コレステロール含有率は、210 nmで検出を行うRP-HPLCで決定された。サンプルは、Agilent 1260 Infinity II HPLCシステム (Wilmington (米国デラウェア州)) を用いて分析された。分離は、イソクラティック溶離法 (アセトニトリル/イソプロパノール、1.0 v/v) を用いて、Haisil Clipseus (商標) C18カラム (5 µm) で達成された。コレステロールは、コレステロールHP、Ph.Eur/USP-NF原材料 (Carbogen Amcis (フランス、パーヴリー=ラ=フォレ)) を用いた1点較正を用いて定量された。

30

【0280】

一次粒子径分布。一次粒子径分布は、レーザー回折 (Sympatec GmbH (ドイツ、クラウスタール=ツェラーフェルト)) によって決定された。Sympatec H3296ユニットは、R2レンズ、ASPIROS微量投薬ユニット、及びRODOS/M乾燥粉末分散ユニットを備えていた。およそ2 mg ~ 5 mgの粉末をASPIROSチューブに充填し、4 barの分散圧力及び65 mbarの真空で動作するRODOSに5 mm/秒で供給された。粉末は、およそ1% ~ 5%の光学濃度で導入され、最長15秒の測定期間にわたってデータが収集された。粒子径分布は、フラウンホーファーモデルを用いて、機器ソフトウェアによって計算された。報告されている値は、各収集器について3回の独立した測定の平均を表す。

40

【0281】

タップ密度。タップ密度 (tapped) は、既知の容積 (0.593 cm³) を有する円筒状のキャピティを用いて決定された。マイクロスパチュラを用いて、粉末をこのサンプルホルダーに充填した。続いてサンプルセルを台の上で軽くタッピングした。サンプルの体積が減少したら、セルに更なる粉末を加えた。キャピティが充填されて、更にタッピングしても粉末ベッドがそれ以上固まらなくなるまで、タッピングステップと粉末追加ステップとを繰り返した。タップ密度は、このタッピングされた粉末のベッドの質量を、キャピティの容積で除算したものと定義される。

50

【0282】

バルク密度。バルク密度 (*bulk*) は、タッピングせずに必要な体積までサンプルホルダーに装入された粉末の質量を表す。

【0283】

Carr の流動性指数。*Carr* の流動性指数 *C* は、粉末の圧縮率の指標を提供する。これは以下の式によって表される：

【0284】

【数2】

$$C = \frac{\rho_{tapped} - \rho_{bulk}}{\rho_{tapped}} \times 100$$

10

【0285】

Carr の流動性指数が増加するにつれて、粉末の流動性は低下すると考えられる。10%未満の値は、最良の自由流動性を有する粉末の指標であり、11~15%の値は、良好な自由流動性を有する粉末、16~20%の値はまずまずの粉末流動性、21~25%の値は許容可能な粉末流動性、26~31%の値は低い粉末流動性、32~37%の値は極めて低い流動性、そして38%以上の値は流動性がほぼ無い状態に関連付けられる。

20

【0286】

含水率。含水率は、フリットレスカソードを備えた日東精工アナリティック製水分測定装置 *CA-310* と、気化装置モデル *VA-300* とを用いて、カールフィッシャー電量測定法で決定された。

【0287】

動的蒸気吸着。25 における吸湿等温線は、*Surface Measurement Systems* (英国) 製の動的蒸気吸着 (*dynamic vapor sorption: DVS*) 機器を用いて測定された。この機器は、物質による水蒸気の取り込み及び損失を重量測定によって測定する。上記 *DVS* システムは、分解能が $\pm 0.1 \mu\text{g}$ 、1日あたりのドリフトがおよそ $\pm 1 \mu\text{g}$ の、記録用マイクロバランスを備える。実験の実行の最初のステップでは、サンプルを 25、0% *RH* で 24 時間にわたって乾燥させて、サンプルを一定の質量とした。次に機器を 0~2% *RH* から 5% *RH* にプログラムし、その後、*RH* を 5% *RH* ずつ 90% *RH* まで上昇させ、5% *RH* ずつ 90% から 0% *RH* まで低下させた。次の *RH* ステップへと自動的に進む前に上記システムが各 *RH* ステップで達成する平衡基準として、 $dm/dt = 0.005\%$ / 分を選択した。この研究で使用されたサンプルの質量は、10~15 *mg* であった。

30

【0288】

示差走査熱量測定。所与のサンプルの *DSC* サーモグラムは、冷蔵冷却システムを備えた *TA Instruments* 製モデル *Q2000* 示差走査熱量計 (デラウェア州ニューカッスル) を用いて測定された。サンプルセルは、流量 50 cm^3 / 分の乾燥窒素でパージされ、冷蔵制御システム (*Refrigerated Control System: RCS*) は流量 110 cm^3 / 分で窒素を使用した。約 5~10 *mg* の粉末が入った *Tzero* アルミニウムパンを、サンプルカプセル化プレスを用いて密封した。サンプルは -40 で平衡化され、その後 5 / 分で 200 まで加熱された。

40

【0289】

空気力学的粒子径分布。空気力学的粒子径分布 (*APSD*) は、*RS01* 乾燥粉末吸入器 (*Mod. 7* 超高抵抗 2 モデル)、*USP* 誘導ポート (*induction port: IP*)、及び *Next Generation Impactor* (商標) 又は *NGI* (商標) を用いて決定され、*USP <601>* 及び *Ph. Eur. 2.9.18* に準拠する。流れ制御装置は、圧力降下 4 *kPa*、吸入器を通過する合計体積 4 *L* で動作するよう

50

に調整された。使用されたRS01 DPIの変形形態の抵抗は、 $0.143 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot 0.5 \text{ L}^{-1} \text{分}$ ($0.045 \text{ kPa} \cdot 0.5 \text{ L}^{-1} \text{分}$)である。これは、圧力降下 4 kPa における 44.2 L分^{-1} の流量に対応する。およそ 10 mg を、サイズ#3の吸入グレードHPLCカプセル(VCaps、Qualicaps)に手で充填した。吸入器から放出されたエアロゾル粉末は、USPIPを通して吸引され、NGIでサイズ分けされた。NGIの各ステージにおいて、空になったカプセル及びデバイスが、メタノールを含むサンプル溶解溶液で抽出された。検出範囲の直線性の範囲内でAmB濃度を低減するために、更なる希釈が実施された。各ステージにおけるAmBの質量は、上述のHPLC法を用いて決定され、 $5 \mu\text{m}$ 未満の微粒子用量($\text{FPD} < 5 \mu\text{m}$)と、空気動学的質量中央径(MMAD)とが計算された。

10

【0290】

細胞株、及び成長条件。NuLi細胞、CuFi-1細胞、及びCuFi-4細胞(Welsh研究室、アイオワ大学)を、Thermo Scientific製BioLite細胞培養処理済み 75 cm^2 フラスコで、冷凍ストックから成長させた。これらのフラスコは、播種の前に、事前に 4 mL の $60 \mu\text{g/mL}$ ヒト胎盤コラーゲンIV型(Sigma-Aldrich)で、 37°C で最低1時間にわたってコーティングし、PBSで2回すすいだ後で乾燥させた。細胞は、基本培地と、8種のSingleQuotsのサプリメント(ウシ下垂体抽出物(bovine pituitary extract: BPE)、 2 mL ; ヒドロコルチゾン、 0.5 mL ; hEGF、 0.5 mL ; アドレナリン、 0.5 mL ; トランスフェリン、 0.5 mL ; インスリン、 0.5 mL ; レチノイン酸、 0.5 mL ; トリヨードチロニン、 0.5 mL)とを含む、 12 mL の気管支上皮細胞成長培地(Bronchial Epithelial Cell Growth Medium: BEGM) BulletKit (Lonza CC-3170)を用いて培養された。ゲンタマイシン-AmBアリコートは廃棄され、その代わりに培地には、 $50 \mu\text{g/mL}$ のペニシリン-ストレプトマイシン(Corning Cellgro)、 $50 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシン(Sigma-Aldrich G1397)、及び $2 \mu\text{g/mL}$ のフルコナゾール(Sigma-Aldrich)が補充された。オリジナルのCF移植ドナーは、Integrated Geneticsによって遺伝子型が決定された。細胞株は、正しい遺伝子型を有し、かつマイコプラズマに汚染されていないことが、ATCCリポソリによって二次的に確認された。MycAlertマイコプラズマ検出キット(Lonza LT07-418)を用いて、広範囲のマイコプラズマに共通するあらゆるRNA転写産物を検出した。細胞株は、マイコプラズマを含まないことが確認された。細胞を、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で 90% を超えるコンフルエンスまで成長させた後、 1 mM のEDTAを含有する 4 mL の 0.25% トリプシン(Gibco 25200-056)でトリプシン処理した。トリプシンは、 1% のウシ胎児血清を含む 10 mL のHEPES緩衝食塩水(Lonza CC-5024)で不活化された。細胞を、Eppendorf製遠心分離機5430R内で、室温で5分間にわたり、 $1,500 \text{ rpm}$ で遠心分離し、継代用にBEGM培地中に再懸濁させた。分化用膜支持体上での培養のために、遠心分離後に細胞をUltroser G培地中に再懸濁させた。これは、 $4 \text{ v/v}\%$ のUltroser G(Crescent Chemical)と、 $50 \mu\text{g/mL}$ のペニシリン-ストレプトマイシン(Corning Cellgro)、 $50 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシン(Sigma-Aldrich G1397)、及び $2 \mu\text{g/mL}$ のフルコナゾール(Sigma-Aldrich)とが補充された、 $1:1$ のDMEM:Ham's F-12で構成されていた。全ての研究について、使用された膜支持体は、Corning Costarの $0.4 \mu\text{m} \cdot 24$ ウェルプレート、Transwell透明ポリエステル膜インサート(0.33 cm^2)(Corning 3470)であった。これらの膜は、 100 mL のコラーゲンを用い、PBSで1回しかすすがないことを除けば、上で詳述したフラスコと同一の方法で、コラーゲンでコーティングされた。これらのインサートに、それぞれ $115,000$ 個の細胞を播種した。これらの膜を、完全な分化に達するまで最低14日間にわたって空気-液体界面で成熟させ、Ultroser

20

30

40

50

G培地は必要に応じて1週間に1回以上交換した。成熟後は、培地は7日ごとに交換された。共変量対照のために、実験で使用された膜は、年齢及び成熟度が可能な限りものとした。

【0291】

初代培養気道上皮細胞について、胚細胞は、胚移植又は臓器提供を受けている、CFに罹患した個体から得た。組織を分離させ、分離した細胞をトランズウェルフィルター上に直接播種し、空気-液体界面で培養した。培養物は、播種から3週間以上経過した時点で、上皮細胞が気道の典型的な複数の細胞型に分化し、細胞の電気的特性が、切除された組織を反映したときに使用された。

【0292】

気道表面液体のpHの測定のための、蛍光顕微鏡アッセイ。およそ2mgのABC Iをおよそ100 μ Lのパーフルオロヘキサン、PFH (FC-72、Sigma-Aldrich)中に分散させて、およそ1mMという最終的なAmB濃度に到達させることによって、ABC Iの新鮮な懸濁液を各実験のために調製した。メタノールに溶解させた後、ストック懸濁液中のAmB濃度を、吸光度分光法で3重に測定した。濃度は、406nmにおける吸光度 ($406 = 164,000 M^{-1} cm^{-1}$) から、ベールの法則を用いて計算された。次に、ストック懸濁液をPFHで希釈して、懸濁液のAmB濃度を約0.5~50 μ Mとした。

【0293】

ASLのpHの測定には、小径のNuLi細胞及びCuFi細胞が使用された。比例的pH指示薬であるSNARF結合デキストラン (Molecular Probes) を用いて、ASLのpHを測定した。SNARF粉末を超音波処理によってPFH中に懸濁させて、細胞の頂端表面に拡散した。2時間後、ASLのpHを測定した。SNARFを514nmで励起し、倍率40倍の細胞株培養物用水浸レンズを備えたZeiss LSM 800顕微鏡を用いて、580nm及び640nmで発光を記録した。pHの決定について標準曲線を作成するために、SNARFを無色のpH標準に溶解させ、蛍光比をpHに変換した。このアッセイで試験された粉末は、適切な体積のPFH中に懸濁され、これらは懸濁を補助するために1分間にわたって超音波処理された。AmBisomeをボルテックスによってPFH中に懸濁させた。その後、20 μ Lの懸濁液を、培養された気道上皮の表面 ($A = 0.33 cm^2$) に、0.5~50 μ Mの濃度で投与した。全ての実験において、化合物で処理された上皮のASLのpHを測定し、ピヒクルで処理された上皮から得られた結果と比較した。頂端への化合物の投与については、培養された気道上皮を37 $^{\circ}$ Cで約22時間にわたってインキュベートした後、ASLのpHを測定した。

【0294】

赤血球ストック懸濁液の調製。1mLのヒト全血 (Na-ヘパリン調製物; BioIVT (ニューヨーク州ウエストベリー)) を、室温で2分間、10,000 \times gで遠心分離した。上清を取り出し、ペレットを1mLの0.9% (m/v) 生理食塩水中に、静かに反転させながら再懸濁させた (赤血球はピペティング及びボルテックスによって溶解する)。得られた懸濁液を、2分間にわたって10,000gで遠心分離した。その後、上清を取り出し、生理食塩水洗浄を2回繰り返した。最後の洗浄の後、上清を取り出し、赤血球ペレットを1mLの再懸濁緩衝液 (10mMの $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 、10mMの $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 、150mMの $NaCl$ 、1mMの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、pH 7.4) 中に再懸濁させて、赤血球ストック懸濁液を作成した。

【0295】

最小溶血濃度アッセイ (minimum hemolytic concentration: MHC)。試験対象の化合物を、各濃度が最終濃度の25.63倍となるような希釈系列で、DMSO (D6-99.9%; Cambridge Isotope Laboratories) 中の溶液として調製した。0.2mLマイクロ遠心管中で合計100 μ Lとなるように、化合物の希釈系列を懸濁緩衝液中で1:25に希釈し、ボルテックスで溶液を混合した。陰性対照 (0%溶解) では、懸濁緩衝液のみの中にDMSOが含

10

20

30

40

50

まれ、陽性対照（100%溶解）では、水のみの中にDMSOが含まれていた。これは、後者では浸透圧によって赤血球が完全に溶解するためである。2.52 μ Lの体積の赤血球懸濁液を（対照を含む）各管に加え、各管を静かに反転させることによって混合し、37で2時間、静置してインキュベートした。インキュベーションの後、各サンプルを、静かに反転させることによって再び混合し、6分間にわたって3,214 \times gで遠心分離した。遠心分離後、60 μ Lの上清を取り出して96ウェルプレートに加え、540 nmで吸光度を読み取った。データを陰性対照に対して正規化し、陽性対照に対する%総溶血として処理した。

【0296】

実施例1：脂質被覆AmB（ABCI-001、ABCI-002、ABCI-003、ABCI-004） 10

脂質被覆AmBの4つの組成物（ABCI-001、ABCI-002、ABCI-003、ABCI-004）の、公称の無水組成を、表4に示す。以下の3つの対照も示されている：AmBisome（登録商標）（即ち、リポソームアムホテリシンB、L-AMB）；Burkeらによって調製された凍結乾燥AmB/Chol複合体（特許文献1；特許文献2）；及び侵襲性肺アスペルギルス症の処置のためにNektar Therapeuticsが開発したAmBの乾燥粉末組成物であるアムホテリシンB吸入粉末（ABIP）（米国特許第7,326,691号；米国特許第8,404,217号；米国特許出願公開第2012/0128728号）。

【0297】

【表4】

20

表4. 理論上の無水吸入用AmB組成物

組成物	AmB (%w/w)	Chol (%w/w)	HSPC (%w/w)	DSPG (%w/w)	CaCl ₂ (%w/w)	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/ DSPG (w/w)	Chol/PL (w/w)
ABCI-001	30.0	14.6	35.8	15.9	3.70	1.16	2.3	0.29
ABCI-002	14.0	6.81	51.2	22.8	5.20	1.16	2.3	0.09
ABCI-003	14.0	2.36	70.3	7.8	5.52	0.40	9.0	0.03
ABCI-004	3.4	0.57	80.72	8.97	6.34	0.40	9.0	0.006
AmBisome ^a (L-AMB)	3.8	3.9	16.1	6.3	---	2.45	2.6	0.18
AmB/Chol 複合体	32.3	67.7	---	---	---	5.00	---	---
ABIP	50.0	0.0	47.0 ^b	0.0	3.0	0.0	n.a.	0.0

^a 脂質及びAmBに加えて、AmBisomeは、67.8%のスクロース、2.0%のコハク酸二ナトリウム六水和物、及び0.2%のトコフェロールを含む。

^b ABIPは、HSPCの代わりに合成DSPCを用いる。

30

40

【0298】

表4に詳述されているAmB/脂質組成物を、図2の擬似三元系状態図にプロットした。三元系状態図の頂点のPL成分は、様々なPL成分（例えばHSPC、DSPC、DSPG）の質量の合計を表す。

【0299】

市販のL-AMBは、ABCI組成物と同じ脂質成分（即ち、HSPC、DSPG、C 50

h o l) を含むが、これらは異なる比率で存在する。更に、L - A M B では A B C I 組成物と比較して、薬剤及び脂質が異なる構成となっている。L - A M B 中の原薬は、小さな単層小胞 (リポソーム) に封入されている。組成物の C h o l / A m B 比は 2.5 mol / mol 、H S P C / D S P G 比は 2.3 (即ち $7 / 3 \text{ w / w}$) である。脂質粒子は、凍結乾燥中にリポソームの完全性を維持するための凍結保護剤として機能する高いパーセンテージのスクロースの存在下で、凍結乾燥されて乾燥粉末となる。4 頭の C F T R - / - ブタの 1 cm^2 の気道上皮細胞の頂端側に、気管窓を介して、再構成された 60 mg の L - A M B を投与すると、A S L の p H は、p H 6.8 から p H 7.0 へと約 0.2 pH 単位だけ上昇した (特許文献 2) 。

【 0 3 0 0 】

B u r k e r によって研究された凍結乾燥 A m B : C h o l 複合体 (特許文献 1 ; 特許文献 2) は、 5.0 mol / mol という更に高い C h o l / A m B 比を有しているが、P L は添加されていない。上記 A m B : C h o l 複合体は、ジメチルスルホキシド / クロロホルム中の材料の溶液を、非溶媒 (水) 中に急速に注入すると、上記溶液からフラッシュノ沈殿によって形成される。得られた懸濁液を凍結乾燥して、乾燥粉末を形成する。上記 A m B : C h o l 複合体は、C u F i - 1 細胞において、重炭酸塩分泌の大幅な増加、及び A S L の p H の大幅な上昇 (約 $0.1 \sim 0.2 \text{ pH}$ 単位) を示した。

【 0 3 0 1 】

A B I P は、モル比 $2 : 1$ の D S P C 及び塩化カルシウムで被覆された湿式粉碎 A m B 結晶を含む、噴霧乾燥組成物である。この組成物はコレステロールを含まない (即ち C h o l / A m B = 0 mol / mol である) 。またこれは飽和ホスファチジルコリン (D S P C) のみを含み、D S P G は添加されていない。A B I P は、C u F i - 1 細胞の A S L の p H 改善を低用量 (F C - 7 0 で $2 \mu \text{ M}$) で示すが、高用量 ($50 \mu \text{ M}$) ではこれを示さない (実施例 1 0 及び 1 2) 。この結果は、純粋な A m B を用いた過去の研究と一致しており、広範な A m B 濃度にわたって、イオンチャネル活性の維持のためにある程度の C h o l が必要であることを示唆している。結晶化度が高い原薬を含む A B I P 組成物は、初期の臨床開発において良好な忍容性を示した。

【 0 3 0 2 】

非臨床毒物学的研究で使用した 3 つの A B C I 組成物 (A B C I - 0 0 1、A B C I - 0 0 2、及び A B C I - 0 0 3) についても、組成が示されている。これらの粉末の C h o l / A m B 比は、 $0.4 \sim 1.2 \text{ mol / mol}$ である。理論に縛られることを意図するものではないが、L - A M B 及び A m B : C h o l 複合体で使用される高い C h o l / A m B 比は、P L を含む乾燥粉末組成物には適していない可能性がある。というのは、多量の C h o l が存在すると、P L アシル鎖のパッキングの秩序が乱れ、粒子間の凝集力が許容できないほど上昇して、「粘着性の」粉末となる可能性があるためである。A B C I - 0 0 3 及び A B C I - 0 0 4 はいずれも、図 2 の網掛けの三角形内に包含されるが、A B C I - 0 0 1 及び A B C I - 0 0 2 は包含されない。

【 0 3 0 3 】

上述のように、A B C I - 0 0 1 及び A B C I - 0 0 2 は図 2 の網掛けの三角形の外側にあるが、これは、これらの組成物中の脂質が S o + L o の 2 相領域にあるためである。対照的に、A B C I - 0 0 3 及び A B C I - 0 0 4 は S o 相内にある。現在までに研究されている他の吸入用 A m B 組成物 (即ち、A B I P、L - A M B (A m B i s o m e)、及び A m B : C h o l 複合体) の組成は、図 2 の網掛けの三角形から大きく外側にある。

【 0 3 0 4 】

A B C I - 0 0 1 ($30 \text{ w / w} \% \text{ A m B}$ 、C h o l / A m B = 1.2 mol / mol) の D S C サーマグラムは、相当な割合の C h o l リッチ L o 相を含む (実施例 4) 。A B C I - 0 0 2 については、薬剤含有率は $14 \text{ w / w} \%$ まで低下する一方で、C h o l / A m B モル比は一定に維持されており、これは、 0.29 w / w から 0.09 w / w への C h o l / P L 比の低下をもたらす。それでもなお、少ない比率の C h o l リッチ L o 相が依然として残っている。相分離した L o 相が存在する乾燥粉末は、高い相対湿度において

10

20

30

40

50

、高い粒子間凝集力と、吸湿性及び潮解性の上昇とを示す可能性がある（実施例 5）。これらの特徴は、噴霧乾燥中の粉末収率に悪影響を与える可能性があり、また、比較的大きな空気動学的質量中央径（MMA D = 約 4 μ m）をもたらす可能性がある（実施例 9）。

【0305】

ABC I - 003 は、ABC I - 002 の 14 w / w % の薬剤負荷を維持しているが、公称 Chol / AmB 比は 0.4 mol / mol に低下している。全体として、Chol 含有率は ABC I - 001 の 14.6 % から ABC I - 003 の 2.4 % に低下し、Chol / PL 比は 0.03 w / w に低下する。この Chol / PL 比では、Lo 相が So 相に可溶化される（実施例 4）。また ABC I - 003 では、HSPC / DSPG 比が 2.3 w / w から 9.0 w / w に上昇し、これにより、PL 相での Chol の可溶性が向上し、NaCl の形成が減少し、粉末の吸湿性が低下する（実施例 5）。

10

【0306】

ABIP と違って、添加された Chol を含む全ての ABC I 組成物は、AmB 濃度が低い場合及び高い場合の両方において、ASL の pH の大幅な改善を示す（実施例 10）。更に、DSPG の存在が、観察される ASL の pH の改善の程度を高めることが示されている（実施例 12）。

【0307】

Chol / AmB 比、Chol / PL 比、及び HSPC / DSPG 比に関する制約の多くは、吸入用の乾燥粉末組成物の開発に特有のものであり、吸入用 L - AMB 等の液体ベースのエアロゾルには適用できない場合がある。同様に、PL を含まない組成物にも直接適用できない場合がある。

20

【0308】

実施例 2：噴霧乾燥による ABC I - 001 の製造

原料の調製。まず、高せん断ミキサー（UltraTurrax T - 50）を用いて、脂質及び塩化カルシウムを温水中に分散させ、多重膜小胞（multilamellar vesicle：MLV）を形成する。MLV の形成を促進するためには、水性相を脂質の主転移温度（ T_m ）より高温にする必要がある（ $T > 65$ ）。MLV 分散液を冷却し（ $T < 30$ ）、パーフルオロオクチルプロミド（PF OB）を濾過し、混合しながら Watson - Marlow 製蠕動ポンプを用いて加えて、脂質の単層によって安定化された水中粗 PF OB 型エマルジョン液滴を形成した。上記エマルジョン液滴は、結晶質薬剤粒子上に多孔質のコーティングを形成するための細孔形成剤として機能する。この粗エマルジョンを、Model M - 100 マイクロフルイダイザーで、高圧下の 1 回の個別のパスで均質化することにより、ナノエマルジョン液滴（直径約 200 ~ 500 nm）を形成した。続いて、高せん断混合下で原薬を上記ナノエマルジョンに加えた。懸濁された薬剤及びナノエマルジョン液滴で構成された複分散液を、更に 2 回の個別のパスだけ、ホモジナイザーに通した。均質化プロセスは、AmB 粒子を肺送達に適したサイズに湿式粉碎する。個数ベースでは、湿式粉碎された AmB 結晶のほとんどが 1000 nm 未満の直径を有する。一実施形態では、最終的な原料組成物は、固体含有率が 3.0 w / w %、PF OB 含有率が 20 v / v %、理論上のバッチサイズが 318 g（原料 9 リットル）又は 424.2 g（原料 12 リットル）であった。

30

40

【0309】

噴霧乾燥による乾燥粉末の生産。噴霧乾燥は、Schlick 970 / 02 流体アトマイザー（内径 0.8 mm）と、DorrClone サイクロンと、直管及び Brewer バルブを備えた下端ジオメトリとが設けられた、パイロットスケール噴霧乾燥器（Niro Mobile Minor（デンマーク、コペンハーゲン））を用いて実施された。上記 Brewer バルブの下方に取り付けられた 1 L の Eagle 収集器にはジャケットが取り付けられ、50 に維持された。

【0310】

液体供給物は、Watson - Marlow 蠕動ポンプによって噴霧乾燥器に送り込ま

50

れた。アトマイザーは、ガス流量 $7.0 \pm 0.6 \text{ s c f m}$ 、入口温度 104 ± 5 で動作させた。液体供給物を調整して、乾燥器の出口温度を 55 ± 3 に維持した。合計ガス流量は約 $140 \text{ N m}^3 / \text{時間}$ (約 85 s c f m) であった。

【0311】

懸濁液ベースの供給物では、霧化された各液滴 (質量中央径 = 約 $10 \mu\text{m}$) は、分散された薬剤結晶と、およそ 1000 個のサブミクロン範囲のエマルジョン液滴とを含む。乾燥プロセスの最初の時点では、揮発性が比較的高い水性相が蒸発し始める。霧化液滴界面の急速な後退により、ゆっくりと拡散される薬剤及びエマルジョン粒子が上記界面に豊富になる。これにより、乾燥される液滴の中心に空隙が形成される。乾燥プロセスを続けると、エマルジョン液滴中の、揮発性が比較的低い油相が蒸発するため、上記油相の場所に中空の細孔が形成される。全体として、結果として得られる中空の噴霧乾燥複合粒子は、多孔質脂質マトリックスの界面相に埋め込まれた薬剤結晶を含む。

10

【0312】

ABC I - 002、ABC I - 003、及びABC I - 004は、全体として同じプロセスを用いて製造されたが、液体供給物の組成が異なっていた。

【0313】

実施例3：AmBの湿式粉碎、及びABC I - 002の特性への影響

AmBの物理的形態 (結晶質であるか非晶質であるか) は、その湿式粉碎挙動に影響を及ぼす可能性がある。この研究のために、AmBの2つのバッチをNorth China Pharmaceutical Group Corp (中国河北省) から入手した。上記2つのバッチは結晶化度が異なっており、バッチ '202及び'203の結晶化度は、それぞれ77及び96% (定量的XRPDで決定) であった。

20

【0314】

実際には、バッチ '202の低い結晶化度は湿式粉碎プロセスに悪影響を及ぼし、湿式粉碎された薬剤の X_{50} 及び X_{90} (薬剤の懸濁液についてMalvern製マスターサイザーを用いたレーザー回折によって決定) が有意に上昇した (表5)。

【0315】

【表5】

表5. 湿式粉碎中の一次粒子径分布に対するAmB結晶化度の影響

30

AmB バッチ	結晶化度	プロセス	一次粒子径	
			$X_{50} (\mu\text{m})$	$X_{90} (\mu\text{m})$
'202	77	1回のパス (15 kpsi)	3.01	6.93
		3回のパス(15,15,20 kpsi)	2.16	5.99
'203	96	1回のパス (15 kpsi)	1.14	2.46
		3回のパス(15,15,20 kpsi)	1.06	2.14

40

【0316】

実施例2で説明したプロセスを使用し、AmBバッチ '202 (ABC I - 002バッチFP21060) 及び'203 (ABC I - 002バッチFP21059) を用いて、ABC I - 002の複数のバッチをNiro Mobile Minorで製造した。液体原料中の合計固体含有率及び% PFOBは、それぞれ $2 \text{ w/w} \%$ 及び $10 \text{ v/v} \%$ であった。液体供給速度は約 44.5 g/分 であった。アトマイザーは、ガス流量 $11.5 \pm 1.0 \text{ N m}^3 / \text{時間}$ (7.0 s c f m)、入口温度 104 ± 5 で動作させた。これは、約 44.5 g/分 に相当していた。合計ガス流量は約 $140 \text{ N m}^3 / \text{時間}$ (約 85 s c f m) であった。目標バッチサイズは 40 g であった。

50

【 0 3 1 7 】

これら2つのバッチの物理化学的特性及びエアロゾル性能を、表6に詳述する。粉末の特性及びエアロゾル性能には有意な差は観察されず、これは、結晶化度が77%という低さであっても、ABC I - 002組成物の調製には適したままであることを示唆している。

【 0 3 1 8 】

【表6】

表6. 異なる結晶化度を有する AmB バッチから調製された ABCI-002 バッチの物理化学的特性及びエアロゾル性能の比較

バッチ	AmB 結晶化度 (%)	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)
FP21059	96	81	66	162
FP21060	77	80	66	152

バッチ	バルク密度 (g/cm ³)	タップ密度 (g/cm ³)	Carr の 流動性指 数 (%)	一次粒子径		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21059	0.078	0.130	39.7	0.63 ±0.02	2.61 ±0.15	5.70 ± 0.27
FP21060	0.063	0.096	34.5	0.64 ±0.03	2.60 ±0.07	5.62 ± 0.06

バッチ	ED (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	MMAD (μm)
FP21059	85	61	2.9
FP21060	89	63	3.1

【 0 3 1 9 】

実施例4: AmBの脂質被覆結晶組成物の相挙動に対する、脂質の影響

ABC I - 001、ABC I - 002、ABC I - 003、及びABI Pに関するDSCサーモグラムの比較を、図3に示す。

【 0 3 2 0 】

ABI Pは、単一の急峻で協調的なT_mを有するサーモグラムを有し、外挿された開始温度は96.2である。Chol及びDSPGをABC I組成物に加えると、転移の幅が広く複数のピークが存在する、より複雑なサーモグラムがもたらされる。

【 0 3 2 1 】

Chol/PL比が0.29w/wの場合(ABC I - 001)、2つの相分離ドメイン、即ち開始温度62.5のCholリッチLo相と、開始温度83.9の幅広いPLリッチSo相とが観察される。水和DPPC二重層で実証されているように(図1)、CholをSo相に加えると無秩序性が高まり、最終的には、共存するLo相との相分離が発生する。

【 0 3 2 2 】

Cholリッチ相転移は非常に幅広であり、重複する特徴を含む。Lo相にChol結

10

20

30

40

50

晶子が存在することは、粉末X線回折(XRPD)パターンによって裏付けられ、XRPDパターンは、ABC Iパリアントでは約 $5.2^{\circ}2\theta$ で回折ピークを示す。コレステロール結晶子の相分離は、PLCI-001ではより容易に区別される(即ち、同じ領域の回折ピークが少なく、アムホテリシンBのピークからの干渉がない)(図4)。PLCI組成物は、AmBを含まないがABC I組成物の他の成分は含む、プラセボ組成物である。

【0323】

粉末組成物のChol含有率が上昇すると、Cholリッチ相転移のエンタルピーの直線状の増加が観察される(図5)。Chol/(Chol+PL) >10 w/w%のデータ点に対して線形回帰を実施した。データは、Chol/(Chol+PL)重量比が約4.9 w/w%の点でx軸に外挿される。これは、0.05 w/wのChol/PL比、又は約9.4 mol%のCholに相当する。よって、Cholが約9.4 mol%未満の組成物は、検出できない低温ピークを有すると予想できる。

10

【0324】

脱水された状態では、So-Lo2相領域の開始は、(即ち図1の水和状態に対して)はるかに高いChol濃度で生じる傾向がある。従って、ABC I組成物の秩序立ったSo相は、はるかに高いChol含有率(水和DPPC二重層の場合の6 mol%に対して、約9.4 mol%)に維持される。また、So相は、Cholが約20 mol%を超える水和DPPC/Chol混合物では排除される(図1)が、脱水されたABC I-001では、So-Lo2相領域が、36.5 mol% Cholを超えて拡張される。従って、図1の水和DPPC-Chol混合物の状態図と比較して、ABC I-001の状態図は、より高い T_m 値まで上方に、及びより高いコレステロール含有率まで右に、シフトする。

20

【0325】

ABC I-001の高 T_m ピークもまた非常に幅広であり、重複する特徴を含む。上記高 T_m ピークのエンタルピーは、PL含有率の上昇と共に増加する傾向があり、またChol含有率の上昇と共に減少する傾向があるが、これは、 T_m 未満のこのピークがSo相に関連していることを示唆している。

【0326】

20% AmB組成物(Cholなし)のHSPC/DSPGの2成分混合物は、同様の重複した特徴を示し、これは、混和しないSo相が共存していることを示唆している。カルシウムイオンの存在下でのPCドメインとPGドメインとの相分離は、他の研究における観察結果と一致している。ABC I-001の高 T_m ピークに関する開始温度及びエンタルピーは、それぞれ83.9、及び19.74 J/gである。

30

【0327】

ABC I-001からABC I-002への転移によって、薬剤負荷は30 w/w%から14 w/w%に減少したが、Chol/AmB比は1.2 mol/molに維持された。AmB及びCholの減少は、PL含有率の上昇、及びChol/PL比の0.28 w/wから0.092 w/wへの低下につながる。少量の低 T_m ピークがABC I-002で確認できるままである場合、 T_m は、Cholリッチドメインについて62.5 から64.6まで上昇するが、Hは7.73 J/gから1.93 J/gに減少した(図3)。高 T_m ピークは、重複した特徴を有する幅広のもののみである。ABC I-001と比較して、開始温度は83.9 から88.5に上昇し、これは、Chol含有率の上昇に従ってアシル鎖の秩序が高まったことを示唆している。

40

【0328】

ABC I-003では、薬剤負荷は14 w/w%のままであるが、Chol/AmB比は1.2 mol/molから0.4 mol/molに低下する。これにより、ABC I-002と比較して、Chol/PL比を0.092 w/wから0.030 w/wに低下させることができる。ABC I-003サーモグラムの低 T_m ピーク領域の拡大(図3)は、Cholリッチピークが排除されたことを示す。高 T_m ピークもはるかに急峻であり、

50

開始温度は A B C I - 0 0 1 と比較して 7 . 2 上昇して 9 1 . 1 となっている。

【 0 3 2 9 】

非晶質固体の長期安定性のためには、ガラス転移温度 T_g が保存温度 T_s より少なくとも 5 0 高いことが有益となり得る。類推によると、P L の T_m は秩序 - 無秩序転移を表す。A B C I - 0 0 3 の T_m が 9 1 . 1 であることは、加速 T_s である 4 0 を T_m が 5 0 上回ることを意味する。

【 0 3 3 0 】

上述のように、C h o l / P L 比の低下は粉末の特性に大きな影響を及ぼし、製造歩留まりを 7 4 . 5 % から 8 2 . 4 % に上昇させ、C a r r の流動性指数を 4 1 . 4 から 2 7 . 0 に低下させ、また、M M A D が約 1 / 2 に減少することから分かるように、粒子間凝集力を劇的に低下させる。

10

【 0 3 3 1 】

L o 相転移のエンタルピーの直線的な減少が、粉末組成物の C h o l 含有率の上昇と共に観察される (図 5) 。複数の点への回帰により、x 切片 (即ちエンタルピーがゼロになる点) が、C h o l / P L 比が 0 . 0 5 w / w のときに発生することが示唆される。この比を、図 2 の網掛け領域の定義に使用する。

【 0 3 3 2 】

実施例 5 : 高相対湿度での A m B 組成物の吸湿性に対する、脂質組成物の影響

図 6 は、様々な組成物に関する、動的水蒸気吸着特性を示す。A B I P と比較して、C h o l 及び D S P G を含む組成物について、水分吸着の大幅な増加が観察される。理論に縛られることを意図するものではないが、水分吸着の増加は、D S P G と塩化カルシウムとの相互作用によって生じる、組成物中の N a C l の存在によるものと考えられる。2 価カルシウムイオンは、陰イオン性 D S P G N a に強く結合して、ナトリウムイオンの置換を発生させることができ、このナトリウムイオンはその後、C a C l ₂ からの塩化物イオンと相互作用して N a C l を形成できる。高 R H では、D S P G / C a C l ₂ を含む組成物は潮解し、水分吸着及び潮解の程度は、形成される N a C l の量に正比例する。

20

【 0 3 3 3 】

P L 成分の H S P C / D S P G 比が 9 . 0 w / w である A B C I - 0 0 3 は、H S P C / D S P G 比が 2 . 3 (即ち、7 / 3) w / w である A B C I - 0 0 1 及び A B C I - 0 0 2 に比べて、吸湿性が大幅に低い。

30

【 0 3 3 4 】

実施例 6 : A B C I - 0 0 1 の物理化学的特性

実施例 2 で説明されているように、A B C I - 0 0 1 の噴霧乾燥粉末を N i r o M o b i l e M i n o r 噴霧乾燥器で製造した。この小さな多孔質粒子の物理化学的特性 (例えば A m B 含有率、A m B 純度、C h o l 含有率、一次粒子径分布、バルク密度、タップ密度、C a r r の流動性指数、及び含水率) を、表 7 に詳述する。

【 0 3 3 5 】

薬剤の懸濁液からの粉末噴霧乾燥の特徴として、A B C I - 0 0 1 粉末は、公称薬剤含有率の約 1 0 % だけ、A m B が富化されている。この富化により、C h o l / A m B モル比が 1 . 0 m o l / m o l に低下する。この富化にもかかわらず、A m B 及び C h o l のアッセイ値は、5 つのバッチ全体で一貫しており、相対標準偏差 (R S D) はそれぞれ 5 % 及び 1 % であった。投入された A m B 原薬の純度は 9 6 . 7 % であった。A m B の純度は製造プロセスを通して維持され、5 つの A B C I - 0 0 1 のロットの平均純度は 9 7 . 2 ± 0 . 5 % であった。更に、R P - H P L C クロマトグラムでは、新たな分解物ピークは観察されなかった。

40

【 0 3 3 6 】

【表 7】

表7. ABCI-001 バルク粉末バッチの物理化学的特性

ロット	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)	AmB 純度 (%)	含水率 (% w/w)
FP21040	82	141 ± 1	338 ± 0	97.7 ± 0.2	3.09 ± 0.14
FP21041	74	142 ± 1	338 ± 1	97.7 ± 0.1	3.48 ± 0.09
FP21045	74	144 ± 0	334 ± 2	96.7 ± 0.2	3.44 ± 0.10
FP21046	74	144 ± 1	356 ± 2	97.6 ± 0.2	2.94 ± 0.08
FP21047	68	144 ± 1	360 ± 5	97.2 ± 0.2	3.14 ± 0.14
平均 ± SD	74.5 ± 4.9	143 ± 1	345 ± 12	97.2 ± 0.5	3.22 ± 0.23
RSD (%)	6.6	1.0	3.4	0.5	7.2

ロット	バルク密度 (g/cm ³)	タップ密度 (g/cm ³)	Carr の流動性指数 (%)	一次粒子径		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21040	0.066 ± 0.006	0.114 ± 0.008	42.3 ± 2.2	0.63 ± 0.02	2.11 ± 0.07	5.25 ± 0.28
FP21041	0.081 ± 0.007	0.143 ± 0.007	43.3 ± 4.2	0.49 ± 0.05	1.90 ± 0.09	5.21 ± 0.15
FP21045	0.077 ± 0.007	0.126 ± 0.009	39.3 ± 1.8	0.63 ± 0.06	1.90 ± 0.04	4.51 ± 0.18
FP21046	0.061 ± 0.006	0.101 ± 0.007	39.3 ± 4.0	0.57 ± 0.02	1.84 ± 0.11	4.13 ± 0.42
FP21047	0.069 ± 0.006	0.121 ± 0.011	43.1 ± 3.7	0.61 ± 0.04	1.85 ± 0.07	4.53 ± 0.33
平均 ± SD	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48
RSD (%)	11.2	12.6	4.8	10.0	5.8	10.2

【0337】

レーザー回折によって得られる一次粒子径分布は、エマルジョンベースの原料からの噴霧乾燥微粒子に典型的なものであり、5つのバッチの平均X₅₀値は1.9 ± 0.1 μmであり、平均X₉₀は4.7 ± 0.5 μmである。バッチ内では、X₅₀のRSDは4.7%から9.6%までの間で変動し、この変動の大半は、噴霧乾燥器で平衡が確立される前の最初の収集器に由来するものであった。

【0338】

観察された低いバルク密度(0.071 ± 0.008 g/cm³)及びタップ密度(0.121 ± 0.015 g/cm³)もまた、エマルジョンベースの液体原料から製造された粉末に特徴的なものである(表7)。微細な低密度の粒子の高い圧縮性は、Carrの流動性指数の平均値41.5 ± 2.0%によって実証された。この値は、ABCI-001粉末が流動性をほとんど又は全く有しないことを示唆している。粉末の平均残留含水率は、3.2 ± 0.2%であった。

【0339】

10

20

30

40

50

実施例 7 : A B C I - 0 0 2 の物理化学的特性

A B C I - 0 0 2 の物理化学的特性を表 8 に示す。これらの結果は、A B C I - 0 0 1 について示されたものとある程度類似している。A B C I - 0 0 2 (1 4 w / w % の A m B) が、1 . 1 6 m o l / m o l という一定の C h o l / A m B 比を維持したまま追加の P L で希釈された A B C I - 0 0 1 (3 0 w / w % の A m B) を表していることを考慮すれば、これは驚くべきことではない。

【 0 3 4 0 】

【 表 8 】

表8. ABCI-002 バルク粉末バッチの物理化学的特性

10

ロット	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)	AmB 純度 (%)
FP21062	79	67	149 ± 3	97.7 ± 0.2
FP21063	75	67	154 ± 1	97.7 ± 0.1
FP21064	76	67	158 ± 0	96.6 ± 0.1
平均 ± SD	76.7 ± 1.7	67 ± 0	154 ± 4	97.3 ± 0.3
RSD (%)	2.2	0.0	2.6	0.3

20

ロット	バルク密度 (g/cm ³)	タップ密度 (g/cm ³)	Carr の流動性指数 (%)	一次粒子径		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21062	0.069 ± 0.004	0.108 ± 0.005	36.4 ± 2.1	0.57 ± 0.00	2.07 ± 0.03	5.20 ± 0.10
FP21063	0.062 ± 0.005	0.097 ± 0.007	35.5 ± 3.9	0.59 ± 0.01	2.21 ± 0.10	5.39 ± 0.21
FP21064	0.077 ± 0.005	0.128 ± 0.007	39.7 ± 4.0	0.60 ± 0.01	2.12 ± 0.03	5.58 ± 0.26
平均 ± SD	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16
RSD	8.7%	11.7%	4.8%	1.7%	2.8%	1.3%

30

【 0 3 4 1 】

実施例 8 : A B C I - 0 0 3 の物理化学的特性

A B C I - 0 0 3 の物理化学的特性を表 9 に詳述する。A B C I - 0 0 1 と比較して、薬剤負荷は 3 0 w / w % から 1 4 w / w % に減少し、公称 C h o l / A m B 比は 1 . 2 m o l / m o l から 0 . 4 m o l / m o l に低下した。

40

【 0 3 4 2 】

50

【表 9】

表9. ABCI-003 バルク粉末バッチの物理化学的特性

ロット	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)	AmB 純度 (%)	含水率 (%)
FP22002	79.3	22 ± 0	163 ± 1	97.9 ± 0.0	3.82 ± 0.30
FP22003	82.7	22 ± 0	168 ± 2	98.2 ± 0.5	3.71 ± 0.17
FP22005	85.1	22 ± 0	168 ± 2	99.1 ± 0.0	3.72 ± 0.11
平均 ± SD	82.4 ± 2.9	22 ± 0	166 ± 3	98.4 ± 0.6	3.75 ± 0.06
RSD (%)	3.5	0.0	1.7	0.7	1.6

10

ロット	バルク密度 (g/cm ³)	タップ密度 (g/cm ³)	Carr の 流動性指数 (%)	一次粒子径		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP22002	0.071 ± 0.004	0.098 ± 0.003	28.0 ± 2.5	0.99 ± 0.21	2.73 ± 0.11	5.97 ± 0.20
FP22003	0.078 ± 0.005	0.110 ± 0.010	28.8 ± 4.5	1.02 ± 0.20	2.70 ± 0.14	5.99 ± 0.36
FP20005	0.069 ± 0.004	0.091 ± 0.006	24.2 ± 2.5	0.92 ± 0.01	3.11 ± 0.05	6.91 ± 0.15
平均 ± SD	0.073 ± 0.004	0.100 ± 0.008	27.0 ± 2.0	0.98 ± 0.05	2.85 ± 0.23	6.29 ± 0.54
RSD (%)	5.5	8.0	7.4	5.3	8.0	8.5

20

30

【 0 3 4 3 】

実施例 9 : 3 つの A B C I 組成物の比較

3 つの A B C I 組成物の物理化学的特性及びエアロゾル性能の比較を、表 1 0 に示す。

【 0 3 4 4 】

40

50

【表 10】

表10. ABCI-001、ABCI-002、及び ABCI-003 の物理化学的特性及びエアロゾル性能の比較

組成物	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)	Chol/AmB (mol/mol)	AmB 純度 (%)
ABCI-001	74.5 ± 4.9	143 ± 1	345 ± 12	1.0	97.2 ± 0.5
ABCI-002	76.7 ± 1.7	67 ± 0	154 ± 4	1.0	97.3 ± 0.3
ABCI-003	82.4 ± 2.9	22 ± 0	166 ± 3	0.32	98.7 ± 0.6

10

組成物	バルク密度 (g/cm ³)	タップ密度 (g/cm ³)	Carr の流動性指数 (%)	一次粒子径		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
ABCI-001	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48
ABCI-002	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16
ABCI-003	0.073 ± 0.004	0.100 ± 0.008	27.0 ± 2.0	0.98 ± 0.05	2.85 ± 0.23	6.29 ± 0.54

20

組成物	ED (%)	粗画分 [T-S2] (%)	気道画分 [S3-S5] (%)	超微細画分 [S6-F] (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	FPF _{<5μm} (% ED)	MMAD (μm)
ABCI-001	89	36.0	49.3	3.4	50	56	3.9
ABCI-002	92	21.0	60.3	10.5	70	76	2.6
ABCI-003 (R21058)	88	6.1	71.8	10.6	81	92	2.1

30

【0345】

PL/Chol が 3.5 w/w から 10.9 w/w、そして 33.1 w/w へ (ABCI-001 から ABCI-003 へ) 上昇する際に、いくつかの明らかな傾向が存在する。まず、歩留まりが 74.5% から 82.4% に上昇する (+10.6%)。次に、Carr の流動性指数が 41.4 から 27.0 に低下しており、これは、粉末の流動性の顕著な改善を示している。

【0346】

エアロゾル性能にも大きな変化がある。これは、Chol 含有率が低下するにつれて、粒子間凝集力が大幅に低下し、粉末の分散性が上昇したことを反映している可能性がある。粗画分の薬剤のパーセンテージは、36.0% から 6.1% に低下し、気道画分のパーセンテージは 49.3% から 71.8% に上昇している。FPF_{<5μm} は、ED の 56% から 92% に上昇し、MMAD は 3.9 μm から 2.1 μm に減少している。MMAD の大幅な減少により、鼻のみにエアロゾルを送達する際の、げっ歯類の鼻腔内での沈着も、減少させることができる。

40

【0347】

実施例 10: AmB の様々な組成物に関する、培養された気道上皮細胞への頂端投与後の ASL の pH の改善

細胞ベースのアッセイを用いて、AmB の様々な脂質被覆結晶組成物の効力を調査した

50

。正常な肺上皮細胞 (NuLi) で観察される ASL の pH は、約 7.6 である。対照的に、CuFi-1 細胞 (F508 / F508 CF 変異) で観察される ASL の pH は、約 6.85 である。ASL の pH の低下は、CF 肺の宿主防御に大きな影響を与える。ASL の pH 値が 7.0 より高いと、宿主防御に重要な肺内の抗菌活性を有するペプチドであるディフェンシンの有効性が向上する。従って、ASL の pH の測定値は、様々な吸入用 AmB 組成物の有効性を評価するための有用な代替手段となる。

【0348】

表 11 は、不死化された初代培養気道上皮細胞を用いて、様々な AmB 組成物について観察された、ASL の pH の改善を比較したものである。アイオワ大学で開発された正常な不死化気道上皮細胞株 (NuLi) で観察された ASL の pH は、約 pH 7.5 である。以下の 2 つの不死化 CF 気道上皮細胞株を研究した：ホモ接合性 F508 / F508 変異を有する CuFi-1 細胞、及びヘテロ接合性 G551D / F508 変異を有する CuFi-4 細胞。これらの細胞において測定された ASL の pH は、様々な研究で、約 pH 6.7 ~ pH 7.0 で変化した。ナンセンス変異を有するものを含む、CF に罹患した個体由来の気道上皮細胞の初代細胞培養物も、研究した。CF に罹患していない対照対象由来の初代気道上皮細胞で測定された ASL の pH は、pH が約 6.9 であった (S hah et al. Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. Science 2016, 351: 503-507)。

【0349】

これらの研究からの知見は、以下を含む：Chol が追加されていない AmB 組成物 (例えば純粋な AmB、ABCI) は、パーフルオロヘキサニルピヒクル中において 2 μM の濃度で有効であるが、50 μM の AmB 濃度では有効でない (図 7b)；AmB / Chol 複合体は、2 μM 及び 50 μM の AmB 濃度において、ピヒクル対照に比べて約 0.1 pH 単位の改善を示す (表 11)；2 μM の AmB を、CF に罹患した対象からの初代培養気道上皮細胞の頂端側に投与した後、CFTR 遺伝子型にかかわらず、0.1 ~ 0.2 pH 単位の ASL の pH の改善が観察される (表 11)；PL (HSPC / DSPG = 7 / 3 w / w) が添加された L-AMB は、約 0.4 pH 単位の ASL の pH の改善を示し、これは 2 μM 及び 50 μM の AmB において維持される (表 11)；Ivacaf to r は、CuFi-4 細胞では ASL の pH を約 0.2 pH 単位だけ上昇させるものの、予想された通り、ホモ接合性 F508 変異を有する CuFi-1 細胞では、ASL の pH を最小限しか上昇させない (表 11)；Trikaft a は、CuFi-1 細胞において、ABCI-003 と同様の ASL の pH の上昇をもたらす (表 11)；Chol / AmB 比が 0.4 mol / mol 以上である ABCI 組成物は、2 μM 及び 50 μM の両方の AmB 濃度において、約 0.4 ~ 0.5 pH 単位の、CuFi-1 細胞での ASL の pH の最大限の改善を示すものの、0.4 mol / mol 未満の Chol / AmB 比では、ASL の pH の改善の程度は低下する (図 7a；図 7c)；0.05 mol / mol もの低い Chol / AmB 比について、0.2 pH 単位以上の改善が観察される (図 7b；図 7c)；ASL の pH の改善は、組成物中に DSPG が存在することによって、HSPC のみに比べて強化される (図 7b；図 7c)；ABCI-001、ABCI-002、及び ABCI-003 の投与後、ASL の pH には有意差は観察されなかった (図 7a)；CF に罹患した個体からの初代培養気道上皮における ASL の pH の改善の平均は、pH 6.3 から pH 7.0 への約 0.7 pH 単位であった；CF に罹患した個体からの 7 つの初代培養気道上皮サンプルのうち 6 つは、6.9 以上の pH (即ち、健康な参加者と比較した場合の ASL の pH の完全な回復) を達成し、上記サンプルは、ナンセンス変異を有する個体由来の 2 つの細胞培養物を含んでいた (図 8)。これらの結果に基づくと、ABCI 組成物の最適な Chol / AmB 比は、0.4 ~ 1.2 mol / mol となり得る (図 2)。

【0350】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表11. AmB 組成物の投与後の CF 患者からの CuFi-1 細胞、CuFi-4 細胞、及び初代上皮細胞における ASL の pH の改善

バッチ	説明	細胞	[AmB] (μ M)	pH	Δ pH	参考 文献
	ビヒクル対照	NuLi	---	7.51	n.a.	[1]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.88	n.a.	[1]
	AmB	CuFi-1	2	7.06	+0.18	[1]
	AmB	CuFi-1	50	6.80	+0.02	[1]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.75	n.a.	[1]
	AmB:Chol (1:5) 複合体	CuFi-1	2	6.84	+0.09	[1]
	AmB:Chol (1:5) 複合体	CuFi-1	50	6.86	+0.11	[1]
	L-AMB	CuFi-1	2	7.18	+0.43	[1]
	L-AMB	CuFi-1	50	7.15	+0.40	[1]
	Ivacaftor	CuFi-1	2	6.82	+0.07	[1]
	ビヒクル対照	CuFi-4	---	6.75	n.a.	[1]
	Ivacaftor	CuFi-4	2	6.92	+0.17	[1]
	AmB:Chol (1:5) 複合体	CuFi-4	2	6.98	+0.23	[1]
	ビヒクル対照	初代ヒト CF	---	6.76	n.a.	[1]
	AmB	初代ヒト CF	2	6.97	+0.21	[1]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.95	n.a.	[2]
R20047	ABIP	CuFi-1	50	7.01	+0.06	[2]
FP22001	PLCI-002(ABCI-003 の マッチングプラセボ)	CuFi-1	50	6.85	-0.10	[2]
FP20002	ABCI-003	CuFi-1	50	7.26	+0.31	[2]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.82	n.a.	[2]
R21058	ABCI-003	CuFi-1	2	7.29	+0.47	[2]

10

20

30

40

50

R21058	ABCI-003	CuFi-1	50	7.25	+0.42	[2]
R21052	ABCI-001	CuFi-1	50	7.19	+0.37	[2]
R21061	ABCI-002	CuFi-1	50	7.25	+0.43	[2]
R21057	ABCI (Chol/AmB = 0.4, % HSPC = 70%)	CuFi-1	50	7.32	+0.50	[2]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.72	n.a.	[2]
CM22001	ABCI (Chol/AmB = 0.2, DSPG = 10%)	CuFi-1	50	7.09	+0.37	[2]
CM22002	ABCI (Chol/AmB = 0.1, DSPG = 10%)	CuFi-1	50	7.04	+0.32	[2]
CM22003	ABCI (Chol/AmB = 0.05, DSPG = 10%)	CuFi-1	50	6.95	+0.23	[2]
CM22004	ABCI (Chol/AmB = 0, DSPG = 10%)	CuFi-1	50	6.70	-0.02	[2]
CM22005	ABCI (Chol/AmB = 0.4, DSPG = 0%)	CuFi-1	50	7.12	+0.40	[2]
CM22006	ABCI (Chol/AmB = 0, DSPG = 0%)	CuFi-1	50	6.71	-0.01	[2]
	ビヒクル対照	CuFi-1	---	6.92	n.a.	[2]
	Trikafta (ETI)	CuFi-1	E (1) T (1) I (0.33)	7.38	+0.46	[2]
FP22005	ABCI-003	CuFi-1	2	7.38	+0.46	[2]
	ビヒクル対照	初代ヒト CF	---	6.30	n.a.	[2]
	ビヒクル対照	初代ヒト HV	---	6.90	+0.60	[3]
FP22005	ABCI-003	初代ヒト CF	2	6.98	+0.68	[2]
FP22005	ABCI-003	初代ヒト CF	50	7.00	+0.70	[2]

¹ US 2019/0083517; US 2020/0352970; ² 本開示; ³Shah, 2016

10

20

30

40

【 0 3 5 1 】

実施例 1 1 : A B C I - 0 0 1 で 観 察 さ れ る 用 量 応 答

A B C I - 0 0 3 に 関 す る、A S L の p H の 改 善 の 用 量 依 存 性 を、図 9 に 示 す。横 軸 の 濃 度 は、C u F i - 1 細 胞 へ の 投 与 の た め に パ ー フ ル オ ロ ヘ キ サ ン ビ ヒ ク ル 中 に 懸 濁 し た A m B の 濃 度 を 表 し、実 際 の A S L 濃 度 で は な い。パ ー フ ル オ ロ ヘ キ サ ン 濃 度 に 基 づ く E C₅₀ 及 び E C₉₀ は、そ れ ぞ れ 約 0 . 5 μ M 及 び 2 . 0 μ M で あ っ た。

【 0 3 5 2 】

実施例 1 2 : 様 々 な C h o l / A m B 比 及 び D S P G 含 有 率 を 有 す る A B C I 組 成 物

B u r k e ら は、C h o l / A m B 比 が 5 . 0 m o l / m o l の A m B : C h o l 複 合

50

体が、パーフルオロヘキサン中での $2 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ の範囲の懸濁濃度にわたって、C u F i - 1 細胞における A S L の p H の改善を維持することを実証した（特許文献 1 ；特許文献 2 ；これらの文献はいずれも、参照により本出願に援用される）。

【 0 3 5 3 】

本開示の脂質被覆 A m B 組成物でも、C h o l が添加されることを条件として、同様の結果が観察されている。 $50 \mu\text{M}$ の A m B 濃度では、A B I P（C h o l が添加されていない）は A S L の p H の改善を示さなかった。

【 0 3 5 4 】

対照的に、理論上の C h o l / A m B 比が約 1 . 2 である A B C I 組成物（例えば A B C I - 0 0 1、A B C I - 0 0 2）は、 $50 \mu\text{M}$ において、A S L の p H の強力な改善（例えば 0 . 3 5 ~ 0 . 4 5 p H 単位）を示す。 10

【 0 3 5 5 】

過去の研究では、C h o l の添加によって達成される利益が、 $1 . 0 \text{ mol} / \text{mol}$ 未満の C h o l / A m B 比では失われる可能性があることが示唆されていた（特許文献 1 ；特許文献 2）。驚くべきことに、理論上の C h o l / A m B 比が $0 . 4 \text{ mol} / \text{mol}$ （粉末中での公称測定比 = $0 . 3 2 \text{ mol} / \text{mol}$ ）である A B C I 組成物について、 $50 \mu\text{M}$ の A m B 濃度で A S L の p H の改善を維持できることが発見された。

【 0 3 5 6 】

従って、幅広い送達用量にわたって A S L の p H の効果的な改善を維持するためには C h o l が必要となり得るものの、 $0 . 4 \text{ mol} / \text{mol}$ という低い C h o l / A m B 比でさえも、依然として有効である。この低い C h o l / A m B 比について観察された有効性は、小規模な実験計画（design of experiments : D o E）での研究で確率された（図 7 A）。この研究では、組成物中の D S P G の濃度を低減することの影響も調査した。B u c h i B - 1 9 1 噴霧乾燥基で製造した噴霧乾燥粉末の、理論上の無水組成を、表 1 2 に詳述する。A B C I バリエーションの物理化学的特性を表 1 3 に示す。選択された A B C I バリエーションのエアロゾル性能を表 1 4 に示す。 20

【 0 3 5 7 】

30

40

50

【表 1 2】

表12. 低い Chol/AmB 比及び低減された DSPG 含有率を有する ABCI バリエーションの公称無水組成

バッチ 番号	AmB (%w/w)	Chol (%w/w)	HSPC (%w/w)	CaCl ₂ ^b (%w/w)	DSPG (%w/w)	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/DSPG (w/w)	PL/Chol (w/w)
R21057	14.0	2.34	54.1	5.51	24.1	0.40	2.2	32.6
R21058 (ABCI-003)	14.0	2.36	70.3	5.52	7.8	0.40	9.0	33.1
R21059	14.0	4.58	60.5	5.37	15.5	0.78	3.9	16.6
R21060	14.0	6.81	66.5	5.22	7.4	1.16	9.0	10.9
R21061 (ABCI-002)	14.0	6.81	51.2	5.20	22.8	1.16	2.3	10.9
R21062 (ABCI-002)	14.0 ^a	6.81	51.2	5.22	22.8	1.16	2.3	10.9
ABCI-001	30.0	14.6	35.8	3.70	15.9	1.16	2.3	3.5

^a バッチ R21062 は非晶質 AmB 粒子を含む

^b PL/CaCl₂ 比は 2.0mol/mol である

【 0 3 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表13. 様々な Chol/AmB 比及び DSPG のパーセンテージを有する 14w/w%の ABCI バリエーションの物理化学的特性

バッチ	バルク 密度 (g/cm ³)	タップ 密度 (g/cm ³)	Carr の 流動性指 数(%)	一次粒子径分布		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
R21057	0.085	0.125	32.0	0.64 ± 0.01	1.86 ± 0.01	3.71 ± 0.02
R21058 (ABCI-003)	0.060	0.081	26.0	0.77 ± 0.02	2.01 ± 0.02	3.77 ± 0.07
R21059	0.059	0.089	33.3	0.76 ± 0.01	2.03 ± 0.03	4.02 ± 0.17
R21060	0.049	0.070	29.9	0.79 ± 0.01	2.16 ± 0.02	4.10 ± 0.08
R21061	0.048	0.065	26.1	0.71 ± 0.00	2.00 ± 0.01	3.91 ± 0.01
R21062	0.051	0.078	34.3	0.70 ± 0.03	2.07 ± 0.02	4.06 ± 0.09
ABCI-002	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16
ABCI-001	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48

10

20

バッチ	理論上			公称			
	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/DSPG (mol/mol)	PC/Chol (w/w)	収率 (%)	Chol アッセイ (mg/g)	AmB アッセイ (mg/g)	Chol/AmB (mol/mol)
R21057	0.40	2.2	32.6	70	22	163	0.33
R21058 (ABCI-003)	0.40	9.0	33.1	67	23	167	0.33
R21059	0.78	3.9	16.6	69	43	163	0.64
R21060	1.16	9.0	10.9	71	65	151	1.04
R21061	1.16	2.3	10.9	64	65	161	0.98
R21062	1.16	2.3	10.9	70	66	83	1.93
ABCI-002	1.16	2.3	10.9	77	67	154	1.06
ABCI-001	1.16	2.3	3.5	75	143	345	1.01

30

40

【 0 3 5 9】

50

【表 1 4】

表14. ABCI バリエーションのエアロゾル性能に関する指標

バッチ	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/DSPG (w/w)	ED (%)	粗画分 [T-S2] (%)	気道 画分 [S3-S5] (%)	超微細 画分 [S6-F] (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	MMAD (μm)
R21058 (ABCI-003)	0.40	9.0	88	6.1	71.8	10.6	81	2.1
R21059	0.78	3.9	89	11.8	64.2	13.0	75	2.1
R21061 (ABCI-002)	1.16	2.3	86	10.3	70.6	5.2	73	2.7
FP21062 (ABCI-002)	1.16	2.3	92	21.0	60.3	10.5	70	2.6
FP21040 (ABCI-001)	1.16	2.3	89	36.0	49.3	3.4	50	3.9

10

20

【0360】

粉末中の Chol 及び DSPG 含有率が低下するにつれて、粒子間凝集力は減少する傾向がある。これは、USP の喉及びインパクターのステージ 1 及びステージ 2 での沈着によって示される、粗粒子画分の劇的な減少に反映されている。粗粒子画分は、ABCI-001 での 35.9% から ABCI-002 での 21.1~21.8% まで、そしてバッチ R21058 (ABCI-003) でのわずか 6.2% まで低下する。これは、ステージ沈着のパターンの変化に更に反映される。ABCI-001 の APSD は、ステージ 2 及び 3 を中心としており、MMAD は 3.9 μm である。ABCI-002 は、ステージ 3 及び 4 において主な沈着を示し、MMAD は 2.6~2.7 μm に低下した。最後に、バッチ R21058 については、Chol/AmB 比は 0.4 mol/mol まで低下し、PL 中の HSPC 含有率は 90 w/w% まで上昇した。ここで主な沈着はインパクターのステージ 4 及び 5 でピークに達し、MMAD は 2.1 μm である。

30

【0361】

バッチ R21058 のデータを放出用量のパーセンテージとして表すと、FPF_{<5 μm} は 93% である。バッチ R21058 の放出用量の 98% がインパクターの複数のステージで沈着する（即ち誘導ポート又は USP 喉には 2% しか沈着しない）ことを考えると、全体の単峰性粒子径分布のインパクションパラメーター

40

【数 3】

(即ち、 $d_a^2 Q$)

を計算できる。195 μm² L/分という値を用いて、上気道 (upper respiratory tract: URT) への粒子の沈着と、合計肺用量 (total lung dose: TLD) とを予測できる。インパクションパラメーターの結果は、放出用量の約 90% が肺内に沈着し、URT には約 10% しか沈着しないと予測されることを

50

示唆している。TLDの大部分は肺内の大気道及び小気道に沈着できる。これは、用量の大半がステージ3～5の気道画分で沈着すること、及びステージ6～フィルターの超微細画分の粒子のパーセンテージが比較的低いことから明らかである。

【0362】

MMADの大幅な低下により、ヒトのURTでの沈着を減少させるだけでなく、非臨床試験におけるラットの鼻咽頭沈着も減少させることができる。様々なABC Iバリエーションで達成されたASLのpHの改善が、図7にプロットされている。データは、22時間のインキュベーション後に、フルオロカーボンビヒクル中で50 μMのAmB濃度において収集された(組成物1つあたりN=12反復)。バッチR21058については2 μMでもデータを収集した(N=6反復)。CuFi-1細胞を用いたABC Iバリエーションに関するASLのpHは、約7.25～7.35(pH=約0.4～0.5)であった。従って、全てのバッチはASLのpHの大幅な上昇を示した(CuFi-1対照と比較して $p < 0.0001$)。脂質被覆結晶組成物で観察されたpHの改善の程度は、Burkeらが使用したAmB:Chol複合体で観察された約0.15～0.2 pH単位の改善(特許文献1;特許文献2)より大幅に大きい。

10

【0363】

実施例13: ABC I-003の投与後の、CFに罹患したヒトからの初代培養上皮細胞におけるASL流体の相対粘度の評価

CFTRタンパク質の不在又は機能不全は、イオン輸送の欠陥につながる。これは、ASLの枯渇(即ちASLの厚さの増大)、ASLの粘度の上昇、及び粘膜毛様体クリアランスの不全を引き起こす根本的な欠陥である。

20

【0364】

FC-72送達ビヒクル単独の場合と比較して、ABC Iの、CF気道上皮細胞の初代培養物のASL流体の粘度を低減する能力を評価した。CF気道上皮の初代培養物の頂端側にABC Iを加えることにより、平均ASL粘度($ASL / saline$)の値は、生理食塩水の3.3倍から約1.9～2.2倍に低下し、CFTR遺伝子型にかかわらず同様の活性が観察された(図10)。

【0365】

非CF気道上皮のASLの相対粘度は、生理食塩水の2.5倍である。従ってこれらのデータは、ABC IがCF気道上皮のASLの相対粘度を、CFに罹患していない個体からの気道上皮細胞で観察されるレベルまで低減できることを示している。ASLの粘度の上昇は、CFに罹患した対象における粘膜毛様体クリアランスの不全、及び感染症/炎症のリスクの上昇に関連付けられるため、これらのデータは、本明細書に記載の実施形態による組成物が、気道におけるCFの最も深刻な後遺症のうちの1つを軽減する可能性を示唆している。

30

【0366】

実施例14: ABC Iの投与後の、CFに罹患したヒトからの初代培養上皮細胞におけるASL流体の抗菌殺菌活性

分泌ムチンのレオロジー特性、粘膜毛様体クリアランス、プロテアーゼの活性、及び抗菌性ペプチド(例えばディフェンシン)の活性を含む、気道の生得的な宿主防御システムの多くの側面は、pH感受性である。コーティング済み金グリッド内での黄色ブドウ球菌に対するASLの抗菌活性は、CFに罹患していない対象由来の初代気道上皮においておよそ50%だけ低下する。

40

【0367】

異なるCFTR変異を有するCFに罹患した6人の対象に由来する初代培養気道上皮細胞において、FC-72送達ビヒクル単独の場合と比較して、ABC I-003の頂端側投与のASL抗菌活性に対する影響を評価した。CF由来気道上皮細胞をABC I-003に曝露すると、殺滅された黄色ブドウ球菌のパーセンテージが、ビヒクル対照における約22%から、高用量ABC I-003群における約40%まで上昇した(即ちASLの抗菌活性が略2倍されて、非CF細胞で測定されるものと同様のレベルとなった)(図1

50

1)。

【0368】

細胞を採取した、CFに罹患した対象の、CFTR変異状態を、図11に示す。注目すべきは、2つのナンセンス変異を有する2人の個体(モジュレーター薬剤が効かない)からの細胞における応答が、モジュレーター療法の候補である、より一般的なF508変異を有する個体と少なくとも同程度に高かったことである。更に、50 μ MのABCI-003用量についてのASLの殺菌の改善は、非CF対照と同様であった。

【0369】

実施例15：脂質組成及びAmB結晶化度の、溶血に対する影響

AmBの毒性。ファンギゾンの静脈内投与は、発熱、震え、悪寒、低血圧、高血圧、食欲不振、吐き気、嘔吐、頭痛、及び頻呼吸を含む、多数の急性全身反応をもたらし、これが「amphotericin B」というニックネームにつながっている。その主な慢性副作用は、腎毒性である。脂質ベースの組成物(例えばL-AMB)はこれらの急性の全身的な影響を低減するものの、腎毒性は、用量の制限となる毒性として残る。

【0370】

Burkeの研究室での最近の研究では、哺乳類細胞におけるAmBの毒性効果が、これまで想定されていたイオンチャネルの形成の結果ではなく、細胞膜から膜外ステロールスポンジ相へのコレステロールの抽出によるものであることが示唆されている(Anderson et al. Nature Chem Biol. 2014; 10:400-406; Gray et al. PNAS. 2012; 109:2234-2239)。Chol抽出による毒性は、ステロール：AmBの比が約1.0 mol/mol未満である場合にしか発生しないと考えられていた。

【0371】

APIの物理的形態(即ち非晶質であるか結晶質であるか)、及び粒子のサイズは、水中でのAmBの「見かけの」可溶性に影響を及ぼす可能性がある。そしてこれは、非経口投与後(Ghielmetti et al. J Pharm Sci. 1976; 65:905-907; Bennett et al. Antimicrob Agents Chemother. 1963; 161:745-752)、及び経口吸入後(米国特許出願公開第2012/0128728号)の、薬剤の安全性プロファイルに、影響を及ぼす可能性がある。本開示の文脈では、溶血アッセイを用いて、APIの物理的形態及び組成属性の、赤血球膜からのChol抽出に対する影響を評価した。

【0372】

表15では、AmBを含む様々な組成物の投与後の溶血を比較している。Cholを含まないデオキシコール酸ナトリウム中に可溶化されたAmBのミセル組成物であるファンギゾン(登録商標)が、陽性対照として機能し、L-AMBが陰性対照として機能する。ABCI-001、ABCI-002、及びABCI-003は全て、結晶化度が高いAmBとCholとを含むが、これらは陰性対照と同様の溶血を示す。驚くべきことに、Chol/AmB比が1.0より大幅に小さい場合であっても同様である。例えば、理論上のChol/AmB比がわずかに0.4 mol/mol(実際の値=0.33 mol/mol)であるABCI-003は、L-AMBに匹敵する溶血を示す。

【0373】

10

20

30

40

50

【表 15】

表15. AmBを含む組成物の溶血性

バッチ	説明	100 mM AmB 濃度での溶血 (%)
	ファンギゾン; (陽性対照)	90
	AmBisome (L-AMB); (陰性対照)	< 5
	AmB (100% 結晶質)	<5
	AmB (100% 非晶質)	100
R20047	ABIP (結晶質 AmB); Cholなし	< 5
R20048	ABIP (非晶質 AmB); Cholなし	40
R21052	ABCI-001	< 5
R21061	ABCI-002	< 5
R21058	ABCI-003	< 5

10

20

【0374】

ABIP組成物の事例は参考になるものである。完全に非晶質のAmBを用いて製剤化されたABIPは溶血性が極めて高いが、結晶質の薬剤を用いて製剤化されたABIPはそうではなく、このことは、非晶質相の物理的形態又は「見かけの可溶性」が、上記効果を増強できることを示している。

【0375】

実施例16：乾燥粉末組成物の薬剤負荷及び標的密度

30

公称用量 (ND)、タップ密度 (ρ_{tapped})、及び乾燥粉末吸入器の容器容積 (V_r) を用いて、以下の式に従って薬剤負荷を計算できる：

【数4】

$$\%AmB = \frac{0.2 \times ND(mg)}{V_r(mL) \times \rho_{tapped} \left(\frac{g}{cm^3}\right)}$$

40

【0376】

この式では、容器容積の50%が充填されていると仮定している。カプセルの最適なパフォーマンスは、充填体積がカプセル容積の25%~75%である場合に生じ得るが、約10%もの低充填体積、及び90%もの高充填体積を使用してもよい。充填体積が低すぎると、エアロゾル投与中のカプセル及びデバイスの損失は固定されているため、放出用量(ED)の値が低下し得る。

【0377】

タップ密度が0.1g/mL(サイズ3のカプセル)の粉末で2mgの公称用量(ND)を得るためには、%AmBは、カプセルを半分充填する場合に約13.4w/w%であり、充填体積の25%~75%で6.7w/w%~20.1w/w%の範囲となる。従っ

50

て、タップ密度が 0.11 g/mL の ABCI - 003 粉末は、標的である 2 mg の用量の達成に適した設計となり得る。

【0378】

タップ密度が 0.1 g/mL で 0.67 mg の ND を得るためには、% AmB は 4.5% であり、充填されるサイズ 3 のカプセルの容積の $25\% \sim 75\%$ で $2.25 \sim 6.75 \text{ w/w}\%$ の範囲となる。

【0379】

0.1 mg の公称用量を得るためには、 50% の充填体積を達成するために必要な薬剤負荷は約 0.7% (タップ密度 = 0.1 g/mL) である。

【0380】

図 12 は、公称用量及び粉末のタップ密度に基づく薬剤負荷要件の推定値を提供する。

【0381】

全体として、公称用量が約 10 mg 未満の場合、% AmB は 0.1% から 50% まで、例えば 0.5% から 20% まで変動する。公称用量が 10 mg 程度の場合、タップ密度を 0.2 g/cm^3 程度となるように調整すると有利となり得るが、より低い 3 mg 未満の用量の場合、 0.1 g/cm^3 程度の、より低いタップ密度を用いると有利である。噴霧乾燥粉末内のタップ密度は、噴霧乾燥条件の変動、固体含有率の変動、及び細孔形成プロセス助剤 PFOB の濃度の変動によって、組成物内で制御できる。

【0382】

実施例 17：気道表面液体からの組成物のクリアランス

本開示による組成物の経口吸入による投与は、上皮細胞膜でのイオンチャネル形成が起こる気道上皮細胞の頂端側の ASL に AmB を沈着させる。ASL に溶解する薬剤のみがイオンチャネル形成に寄与できることを考えると、ASL 中の AmB の平衡溶解度よりも十分に高い (即ち $0.2 \mu\text{g/mL}$ を超える) トラフ ASL 濃度が維持される、用量及びレジメンを選択することが望ましい。

【0383】

吸入 (inhalation: IH) 投与後に気道腔内に沈着した薬剤粒子は、複数のクリアランス経路によって、ASL から他の区画に分配される。上記クリアランス経路としては：(1) 溶解した AmB の、ASL から全身循環への吸収；(2) 粘膜纖毛エスカレーターでの、又は咳によるクリアランスによる、微粒子のクリアランス；(3) 循環及び組織常在肺胞マクロファージによる、粒子の貪食；並びに (4) AmB と肺の問題との結合又は関連付けが挙げられる。

【0384】

AmB の溶解度が低いため、全身吸収は溶解によって制限され、粘膜纖毛エスカレーターでクリアランスされなかった薬剤の大半は肺組織に分配され、肺組織はクリアランスが遅いため、時間の経過と共に AmB が肺組織に蓄積される。静脈内投与と同様に、AmB の IH 投与では、肺組織からの薬剤の再分配が遅いため、ASL 及び血漿からの 2 相性の排出動態がもたらされる。

【0385】

ASL からの ABCI - 001 のクリアランスを、IT 投与 (研究 FY21 - 211A) 及び IH 投与 (研究 FY21 - 211B) の両方の後に Sprague - Dawley ラットから得られた気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) サンプルで評価した。FY21 - 211A 及び FY21 - 211B はいずれも、非 GLP 単回用量研究であった。研究 FY21 - 211A では、ABCI - 001 及び ABIP の IT 投与を、送達用量 5 mg/kg で評価した。研究 FY21 - 211B は、鼻のみでの吸入による ABCI - 001 の 3 つの送達用量 (6.8 、 13.6 及び 23 mg/kg) を評価した。両方の研究において、BALF 収集物を 6 つの時点 (投与後 0.5 時間、 1 時間、 2 時間、 4 時間、 8 時間、及び 16 時間) において評価した。気管支肺胞洗浄手順は、ASL 中の AmB の濃度を大幅に希釈する。尿素は体内で急速に拡散して、血漿中と ASL 中とで同一濃度となるため、尿素は ASL 希釈の内因性マ

10

20

30

40

50

ーカーとして使用できる。これにより、BALFサンプル中のASLの体積を、簡単な希釈原理から計算できる。ASL中のAmB濃度は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法を用いて定量し、ASL及び血漿中の尿素濃度は、比色血中尿素窒素アッセイを用いて定量した。

【0386】

FY21-211B中で投与されたABC I-001の3つの送達用量(6.8、13.6、及び23.0 mg/kg)に関する、時間プロファイルに対するASLのAmB濃度を、研究FY21-211Aにおいて5 mg/kgの用量のABC I-001及びABIPの気管内投与後に得られた結果と、1つのグラフ上で組み合わせた。これを実施するために、ASL濃度を12 mg/kgの用量レベルに対して正規化した。5つの処置のそれぞれについて、時間プロファイルに対する用量正規化済みのASL濃度は、大きく重複しており、同様の減少率を共有しているように見えたため、プールされたデータを単一指関数的減少の式に当てはめて、ラットにおけるこのASLクリアランスの初期速度を推定した。その結果は、ASLへの曝露、及びASL中のAmBの初期沈着は、投与されたABC I-001用量とは本質的に無関係であり、ABIPと同等であることを示している。更に、ABC I-001及びABIPをラットに投与した後の、ASL中のAmBの初期減少の半減期は、約16時間であった。このようなASLからのAmBのクリアランス速度は、本明細書に記載の実施形態による組成物の毎日1回の投薬をサポートできるものである。

10

【0387】

実施例18：組成物のIH投与後のラット及びイヌにおけるAmBの肺組織分布及びクリアランス

IH投与後、ASL中に存在するAmBのうちの相当な割合が、肺組織に分配される。28日間のGLP毒物学的研究で、Sprague-DawleyラットでABC I-001を用いて(研究FY21-235)、ラットでABC I-003を用いて(研究FY22-071)、及びビーグル犬でABC I-003を用いて(研究FY21-234)、肺組織濃度を測定した。また、ラットでの、単回用量のABC I-001の投与後(研究FY21-211B)、及び複数用量のABC I-003の投与後(研究FY22-070)の非GLP研究でも、肺組織濃度を測定した。剖検時の平均肺組織濃度を表16に詳述する。

20

30

【0388】

40

50

【表 16】

表16. 組成物の IH 投与後のラット及びイヌにおける AmB の肺組織濃度

研究	種	組成物	DD (mg/kg)	頻度	日目	肺負荷 (mg/g)	マクロファージ 応答
FY21-211B	ラット	ABCI-001	6.8	QD	1	0.010 ± 0.005	適応
			13.6	QD	1	0.014 ± 0.006	適応
			23.0	QD	1	0.016 ± 0.006	適応
FY21-235	ラット	ABCI-001	4.7	QD	28	1.42 ± 0.29	有害
			9.3	QD	28	1.93 ± 0.27	有害
			17.3	QD	28	2.94 ± 0.52	有害
FY22-070	ラット	ABCI-003	4.8	QD	14	1.70 ± 0.44	有害
FY22-071	ラット	ABCI-003	1.1/0.2	QW	29	0.019 ± 0.004	適応
			2.6/0.4	QW	29	0.050 ± 0.014	適応
			5.7/1.1	QW	29	0.088 ± 0.031	適応
FY21-234	イヌ	ABCI-003	0.5	QD	28	0.25 ± 0.08	適応
			1.8	QD	28	1.38 ± 0.61	適応
			4.9	QD	28	3.54 ± 0.65	適応
第 1 相	ヒト	ABCI-003	10/4	QD	28	0.08 (概算)	

SD=標準偏差;QW=週1回

¹ 42 日目及び 57 日目の測定値を除いて、全ての肺組織濃度は最後の投与の 24 時間後に定量された。

² 研究 FY22-071 では、投薬は負荷/維持用量で週 1 回(QW)であった。

【 0 3 8 9 】

14 又は 28 日間にわたる 1.8 mg/kg/日の送達用量の反復の後、AmB の平均肺濃度は全体として、ラット及びイヌの両方で 1.0 mg/g を超えた。両種での肺濃度は、用量の増加と共に上昇したが、用量に比例するほどではなかった。反復投薬の終了時の、両種での ABCI-001 及び ABCI-003 からの AmB の平均肺組織濃度は、リポソーム AmB の反復 IV 投与後の肺組織内の AmB について報告されたもののおよそ 80 ~ 100 倍高かった。ABCI-001 及び ABCI-003 で観察された肺組織濃度は、IV 投与後に肝臓及び脾臓で L-AMB に関して測定されたもの (1 ~ 10 mg/g) に匹敵する。ABCI-001 及び ABCI-003 の反復投薬で観察された肺組織濃度 (1.0 mg/g 超) は、ABCI-001 及び ABCI-003 の単回用量の投与

10

20

30

40

50

後に決定された肺組織濃度（ 0.1 mg/g 未満）よりもはるかに高く、単回用量が 23.0 mg/kg もの高用量である場合（研究FY21-211B）であってもそうであった。反復投薬による肺組織レベルの大幅な上昇は、肺内に、実質的に不溶性の原薬が蓄積されたことによるものである。蓄積率ARは、投薬間隔と、定常状態での薬剤の消失速度との間の関係を表しており、即ち： $AR = 1 / (1 - e^{-k \tau})$ であり、ここでkは終末期消失速度定数であり、 τ は投与間隔である。

【0390】

イヌでのFY21-234において肺組織でABC I-003について測定された $t_{1/2}$ は、約10日であった。ラットでのABC I-003のウォッシュアウト中に測定された肺組織 $t_{1/2}$ （研究FY22-071）は、中用量及び高用量群において20～25日であった。イヌでの14日間のGLP試験でも、ABIPについて、肺組織内での相当な蓄積が観察された。投薬中止後、肺組織からのAmBの再分配に関する $t_{1/2}$ は、19日であった。対応するラットでの14日間のGLP研究では、肺組織からのAmBの再分配に関する $t_{1/2}$ は、送達用量 1.1 mg/kg 及び 12.4 mg/kg に対して、それぞれ22日及び34日であった。これらの結果は、IV投与後の肝臓からのAmBのクリアランスに関して測定された1～4週の $t_{1/2}$ と一致している。肺組織からの薬剤の再分配が遅いため、薬剤がASL又は血漿コンパートメントに入る速度がその吸収又は排出速度よりも遅いフリップフロップPKによって、ASL及び血漿からの薬剤の2相性クリアランスが発生する。

【0391】

AmBの終末期 $t_{1/2}$ を約20日と仮定すると、kは約 0.035 日^{-1} である。1日1回の投与の場合、ARは29.4に等しく、これは、毎日のAmB用量が定常状態で肺組織に最大30倍蓄積されることを示している。蓄積の程度は、ABIP、ABC I-001、及びABC I-003についてラット及びイヌで測定された高い肺組織濃度に反映されている。

【0392】

FY22-071研究で観察された肺組織のAmB曝露の低さは、送達用量の低さ、及び週1回の投薬レジメンによるものである。ABC I-003の週1回の投薬の場合、ARは4.6に等しい。維持用量の5倍高い負荷用量を用いれば、投薬の期間にわたって、一定の肺組織濃度を維持できる。本発明者らの治療標的がASLであることを考えると、肺組織内でAmBの平衡濃度を迅速に達成することは、ASLにおいてこれを行うことほど重要ではない。

【0393】

ASLにおいて $0.2 \mu\text{g/mL}$ を超えるトラフ濃度を維持することは、本明細書に記載の組成物の有効性にとって重要となり得る。上述のように、ASL中でのAmBの測定された $t_{1/2}$ は、約16時間である。これにより、定常状態でのARは約2となる。従って、維持用量の2.5～3倍高い負荷用量により、本明細書に記載の組成物の投薬期間にわたって、一貫したASLピーク及びトラフAmB濃度を可能とすることができる。

【0394】

実施例19：IH投与後のラット及びイヌにおけるAmBの血漿毒性動態

28日間のGLP毒物学的研究（研究FY21-235）において、単回用量又は反復用量のABC I-001の吸入後の、オス及びメスのSprague-Dawleyラットについて、血漿からのAmBの排出を評価した。この研究には3つの処置群が含まれており、達成された送達用量の群平均は： 4.7 mg/kg （低用量）、 9.3 mg/kg （中用量）、及び 17.3 mg/kg （高用量）であった。血漿サンプルを、投薬前と、投与の0.25時間後、0.5時間後、1.0時間後、2.0時間後、4.0時間後、8.0時間後、16.0時間後、及び24.0時間後とに回収し、定量の下限が 1 ng/mL である検証済みLC-MS/MS法を用いて、血漿AmB濃度を定量した。毒性動態パラメーターは、Phoenix WinNonlinバージョン8.3ソフトウェアを用いて決定された。

10

20

30

40

50

【0395】

メスは一貫してオスより高い曝露を示したが、性別による差異のエビデンスは限定的であった。従って、オスとメスとを合わせた平均を表17に示す。AmBの溶解度が低いため、AmBの全身吸収は、単回又は反復吸入後にゆっくりと行われ、最大濃度までの時間の中央値(t_{max})は、用量、動物の性別、及び投与日とは無関係に、一般に4~8時間であることが観察された。28日間の投薬期間にわたって、血漿中のAmBの最小限の蓄積が観察され、用量正規化時間濃度曲線下面積の、最後の測定可能な濃度(AUC_{last})及び最高濃度(C_{max})に対する平均蓄積比は、0.699~1.51であった。1日目、低、中、及び高用量のオスは、報告基準を満たしていたため、これらの血漿ABC I - 001排出 $t_{1/2}$ は、5.28~8.55時間の範囲の値で推定できた。28日目、低及び中用量のメスの排出 $t_{1/2}$ は、7.16~9.33時間であった。これらの値は、24時間のサンプリング期間でラットにおいてAmBisomeの4mg/kgのIV用量について報告された、8時間の $t_{1/2}$ 値と一致している。

10

【0396】

【表17】

表17. 低、中、及び高用量について、1日目におけるABC I - 001を投薬した後、又は28日目における28日連続して1日1回投薬した後のラットの血漿の平均TKパラメーターの概要(研究FY21-235)

指標	低用量 (4.7 mg/kg)		中用量 (9.3 mg/kg)		高用量 (17.3 mg/kg)	
	1日目	28日目	1日目	28日目	1日目	28日目
C_{max} (ng/mL)	52.7 ± 15.0	36.9 ± 10.6	48.7 ± 9.7	46.1 ± 20.0	53.6 ± 8.4	54.5 ± 21.3
AUC _{0-24 h} (hr ng/mL)	701 ± 200	557 ± 130	747 ± 245	682 ± 230	794 ± 68	1010 ± 364
$t_{1/2}$ (h)	5.56	7.16	5.28	9.33	8.55	N.A.

20

AUC_{0-24hr}=0~24時間の時間濃度曲線下面積; C_{max} =最高濃度; $t_{1/2}$ =半減期

30

【0397】

ラットの平均血漿 C_{max} 値は、同等の用量のIH ABC I - 001と比較して、IVリポソームAmB (AmBisome)では約2桁高く(表18)、一方で肺組織 C_{max} 値は83倍低かった。1日目に24時間にわたって全身に吸収されたABC Iの絶対的バイオアベイラビリティは、ラットの肺沈着画分を0.1と仮定すると、約3%である。これは、薬剤が組織内に高度に分配されていることの更なるエビデンスである。

【0398】

IH投与は、肺に対する薬剤の著しい標的化を提供し、IV投与後に達成されるもの比べて、肺組織濃度は2桁近く高くなり、血漿濃度は2桁低くなる。

40

【0399】

50

【表 18】

表18. Sprague-Dawley ラットでの同等の用量の IH ABCI-001 と IV AmBisome の血漿及び肺組織の曝露の比較

製品	経路	用量 (mg/kg)	日目	血漿 C _{max} (ng/mL)	C _{max} (IV) / C _{max} (IH) (血漿)	肺 C _{max} (mg/g)	C _{max} IH / C _{max} (IV) (肺)
AmBisome	IV	4	1	14200 ± 2450	269	14.5	
ABCI-001	IH	4.7	1	52.7 ± 15.0		1200	83

10

【0400】

28日間のGLP毒物学的研究(Study FY21-234)において、単回又は複数用量のABCI-003の吸入後の、オス及びメスのビーグル犬について、血漿TKも評価した。この研究には、平均送達用量が：0.51 mg/kg(低用量)、1.8 mg/kg(中用量)、及び4.9 mg/kg(高用量)の、3つの処置群が含まれていた。サンプル回収時点、AmBの定量、及び非コンパートメントデータ分析は、ラットに関して上述したものと同一方法で実施した。

20

【0401】

性別による差異のエビデンスは限定的であったため、オスとメスとを合わせた平均を表19に示す。ラットの場合と同様、血漿曝露は、1日目及び28日目において、用量に比例するほどではない増加を示し、特に中及び高用量群について、AmB濃度は、24時間時点まではC_{max}のレベル又はその付近まで上昇したままであった。28日目の剖検時、及び42日目の吸入からの14日間の回復の後、全ての動物において濃度は依然として定量可能であった。

【0402】

【表 19】

30

表19. 1日目又は28日目における単回投与後のイヌの血漿の ABCI 平均 TK パラメーター(±SD)の概要(研究 FY21-234)

指標	低用量 (0.51 mg/kg)		中用量 (1.8 mg/kg)		高用量 (4.9 mg/kg)	
	1日目	28日目	1日目	28日目	1日目	28日目
C _{max} (ng/mL)	3.02 ± 0.79	9.56 ± 4.25	6.44 ± 2.43	13.9 ± 4.4	15.0 ± 5.1	33.8 ± 9.2
AUC _{0-24h} (hr ng/mL)	53.6 ± 10.3	166 ± 52	115 ± 42	265 ± 71	263 ± 86	655 ± 183

40

【0403】

ラットとは対照的に、イヌでは28日の投薬期間にわたる血漿AmB蓄積の一貫したエビデンスが存在し、0~24時間の用量正規化時間濃度曲線下面積(AUC_{0-24hr})に対する平均蓄積率、及びC_{max}値は、1.54~3.58であった。このような薬剤の沈着の差は、これら2種の間、肺の解剖学的構造及び生理学的構造の違いを反映している可能性がある。ABCI-003を用いて測定された血漿濃度及び観察された蓄積

50

の大きさは、A B I Pを用いた以前の研究と一致していた。

【 0 4 0 4 】

血漿 A B C I - 0 0 3 排出 t 1 / 2 は、回復研究の 2 頭の高用量メス動物に関してのみ、推定可能であり、また報告基準を満たすことができ、値は 1 0 3 時間及び 1 0 5 時間であった。I V 組成物に関して上述したように、組織からの再分配による血漿からの A m B のクリアランスが遅いため、非コンパートメント法を用いて測定された t 1 / 2 は、サンプリング時間に強く影響される。ラットと比較してイヌでより長い t 1 / 2 (5 ~ 1 0 時間に対して約 1 0 0 時間) が観察されたのは、単にサンプリング期間が長い (即ち回復動物では 4 2 日目まで) ことを反映しているだけである。

【 0 4 0 5 】

イヌにおける平均血漿 C m a x 値は、同等の用量の I H A B C I - 0 0 3 と比較して、I V A m B デオキシコール酸塩 (ファンギゾン (登録商標)) の場合に約 2 桁大きく、また I V リボソーム A m B (A m B i s o m e (登録商標)) の場合に約 3 桁大きかった (表 2 0) 。肺組織濃度は、A B C I - 0 0 3 の方が 1 9 ~ 1 0 0 倍高い。2 4 時間にわたる絶対的バイオアベイラビリティは、イヌの沈着 f r a c t i o n を 0 . 2 5 と仮定すると、0 . 6 % であった。ラット及びイヌで観察されたバイオアベイラビリティの低さは、ファンギゾン (登録商標) 及び A m B i s o m e (登録商標) の I H 投与で観察され、かつ本明細書に記載の実施形態による組成物の I H で予想される、全身毒性の低さと一致している。

【 0 4 0 6 】

【 表 2 0 】

表20. ビーグル犬における IH ABCI と同等の用量の IV ファンギゾン及び IV AmBisome との血漿及び肺組織曝露の比較

製品	経路	用量 (mg/kg)	日目	血漿 C _{max} (ng/mL)	C _{max} (IV) / C _{max} (IH) (血漿)	肺 C _{max} (mg/g)	C _{max} IH / C _{max} (IV) (肺)
ファンギゾン	IV	0.6	1	232	77		
			14	1323	138	15.4	
ABCI-003	IH	0.5	1	3			
			28	9.6		300	19
AmBisome	IV	4	1	20000	1333		
			30	100000	2954	31	
ABCI-003	IH	4.9	1	15			
			28	33.8		3100	100

【 0 4 0 7 】

実施例 2 0 : ラット及びイヌでの毒物学的研究

研究 F Y 2 1 - 2 1 1 B (ラットでの単回用量研究) で観察された毒性。研究 F Y 2 1 - 2 1 1 B では、非 G L P 研究で、単回用量 6 . 8、1 3 . 6、及び 2 3 . 0 m g / k g の A B C I - 0 0 1 を、鼻のみでの吸入によって 5 4 頭の S p r a g u e - D a w l e y ラットに投与した。A B C I - 0 0 1 組成物は 3 0 w / w % の A m B を含み、C h o l / A m B 比は 1 . 2 m o l / m o l であった。A B C I - 0 0 1 は忍容性が良好であり、異常な臨床所見又は剖検時の肉眼所見は存在しなかった。血漿、A S L、及び肺での A m B

曝露は、用量の増加と共に増加する傾向があったが、用量に比例するほどではなかった。測定された肺組織濃度は、それぞれ0.010、0.014、及び0.016 mg/gであった。肺泡マクロファージの用量依存的増加が観察されたが、組織病理学で注目される有害な変化（例えば炎症細胞の増加）は存在しなかった。マクロファージの増加は、吸入乾燥粉末の正常な微粒子クリアランスによるものであった。非GLP研究ではあるが、23.0 mg/kgの用量は、ヒトのABC Iの比例用量である約46 mgを、10倍の安全マージンでサポートする。

【0408】

研究FY21-235（ラットでの28日間のGLP研究）で観察された毒性。単回用量研究の成功に続いて、14日間の回復を伴う28日間のGLP反復用量毒物学的研究を、ABC I-001を用いてラットで実施した（研究FY21-235）。実質的に不溶性のAmB原薬のクリアランスが遅いことにより、4.7、9.3、17.3 mg/kg/日の1日量の投与後に、肺組織内にAmBが著しく蓄積した。低、中、及び高用量群のAmBの肺組織濃度は、それぞれ1.2、2.0、及び2.9 mg/gであった。

10

【0409】

ピーク血漿薬剤濃度は55 ng/mL未満のままであったが、同等の濃度のAmBの静脈内投与後に観察されるものより2~3桁小さく、また全身毒性の閾値1000 ng/mLより大幅に低かった。

【0410】

低、中、及び高用量群において、早期の死亡はそれぞれ4/38、3/38、及び13/47の動物で発生した。これは、粘液物質の過剰分泌による大気道の閉塞が原因であると推定された。ABC I-001処置群の動物の一部は、投薬段階中に呼吸器関連症状（喘鳴、知覚可能な水泡音、速い呼吸）を断続的に示した。最初の症状は、高用量群で4日目に現れ、曝露を継続するとより頻繁に現れた。しかしながら、臨床兆候と死亡率との相関関係は乏しかった。

20

【0411】

体重、摂食量、血液学的特徴、臨床化学的特徴、及び凝固には、重要な差異は観察されなかった。

【0412】

組織病理学的評価により、全ての用量群のオス及びメスの喉頭、気管、及び肺の病変が明らかになった。所見は：黄色/金色に着色されたマクロファージの、最小~中程度の増加；喉頭、気管、及び肺における最小~中程度の混合細胞炎症；粘液物質の最小~中程度の蓄積；並びに呼吸器上皮細胞過形成の最小~中程度の増加からなっていた。研究FY21-235では、相当な罹患率及び死亡率が観察されたため、無毒性量（no observable adverse effect level：NOAEL）を確立できなかった。最小毒性量（lowest adverse effect level：LOAEL）は、研究の対象とした最低用量（4.7 mg/kg）であった。

30

【0413】

研究FY22-071（ラットでの28日間のGLP研究）。14日間の回復を伴う2回目の28日間のGLP研究を、Sprague-Dawleyラットで実施した（研究FY22-071）。この研究ではABC I-003を使用し、肺組織でのAmB負荷が大幅に低減された。ABC I-003組成物は14 w/w%のAmBを含み、Chol/AmB比は0.4 mol/molであった。ABC I-001と比較すると、ABC I-003では、高度に秩序化されたSo相に脂質が維持されることにより、粒子間凝集力を低下させることができた。3つの用量群は、負荷用量と、それに続く週1回の維持用量とを用いた。低、中、高用量の用量は、それぞれ：1.08/0.17 mg/kg、2.54/0.41 mg/kg、及び5.74/1.06 mg/kgであった。肺組織濃度は、低、中、高用量についてそれぞれ0.019 mg/g、0.050 mg/g、及び0.088 mg/gであった。

40

【0414】

50

研究 F Y 2 1 - 2 3 5 とは対照的に、研究 F Y 2 2 - 0 7 1 の生存部分は、罹患率又は死亡率のエビデンスを示さなかった。肉眼での病理学的結果も顕著ではなかった。マクロファージの最小限の増加は観察されたものの、これらの所見は、研究 F Y 2 1 - 2 3 5 で確認された有害な所見（粘液物質、上皮の過形成、又は炎症）を伴っていなかった。体重、摂食量、血液学的特徴、臨床化学的特徴、及び凝集には重要な差異は観察されなかった。NOAEL は、投与された最大用量、即ち $5.74 / 1.06 \text{ mg / kg}$ であった。

【0415】

研究 F Y 2 1 - 2 3 4（イヌでの 28 日間の GLP 研究）。研究 F Y 2 1 - 2 3 4 では、 0.5 、 1.8 、及び 4.9 mg / kg の 1 日用量で、ABC I - 003 をビーグル犬に投与した。イヌにおけるこの高用量は、NOAEL が確立されなかったラットでの研究 F Y 2 1 - 2 3 5 における低用量と同等であった。更に、肺組織の曝露はラットと同様に高かった（ 0.25 、 1.38 、及び 3.54 mg / g ）。しかしながら、ラットでの研究とは対照的に、イヌではどの用量でも、罹患率又は死亡率は観察されなかった。臨床兆候、体重、摂食量、臨床病理学的特徴（血液学的特徴、凝集、尿検査）、眼科学的特徴、ECG パラメーターはどれも、ABC I - 003 を用いた処置の影響を受けなかった。低用量に関する 29 日目の臨床病理学的特徴は、影響が全くないことを示していた。残念なことに、臨床化学分析装置の故障により、29 日目の中及び高用量群、並びに回復群（空気、プラセボ対照、及び高用量）のデータは評価できなかった。桁違いに大きい血漿曝露での全身 AmB 投与の、臨床化学的特徴に対する影響の既知の臨床プロファイルと、この組成物及び AmB 関連組成物（例えば ABIP）の他のいずれの吸入毒物学的試験においても臨床化学的特徴の所見が全く観察されなかったこととを考慮すると、臨床病理学的所見の見落としが生じる可能性は低い。

10

20

【0416】

更に、着色されたマクロファージの個数の増加が観察されたものの、炎症、粘液過剰分泌、又は上皮細胞過形成の増加の兆候は見られなかった。組織病理学的所見は有害ではなく、肺からの正常な微粒子クリアランスと一致していると考えられた。NOAEL は、高用量群、即ち 4.9 mg / kg / 日 であった。

【0417】

要約。理論に縛られることを意図するものではないが、肺組織からの AmB のクリアランスが遅いことにより、毎日の投薬によって薬剤の著しい蓄積が生じると考えられる。溶解していない任意の種類 of 微粒子材料が肺内に大量に存在すると、呼吸器内に存在する異物の物理的負荷に直結する、適応的な、そして最終的には有害な、肺の変化が生じる可能性がある。これらの変化は、薬剤の化学的な又は薬理学的に仲介される毒性とは無関係であり得る。

30

【0418】

不溶性物質の量が増加すると、マクロファージの個数が増加し、過剰なマクロファージ刺激によって他の炎症細胞が動員され、最終的には二次的な組織損傷が生成される可能性がある。この応答は「肺オーバーロード (lung overload)」と呼ばれることが多い。低毒性微粒子の容積的なオーバーロードによるマクロファージ肺クリアランスの低下によるこの肺オーバーロードを、マクロファージを殺滅するか又はその機能を損なう可能性がある結晶石英のような化合物からの直接的なマクロファージ毒性と区別することが重要である。

40

【0419】

肺オーバーロードに関連する有害な観察結果は、肺組織内における溶解度が低い粒子（例えば二酸化チタン、カーボンブラック）の濃度が約 1 mg / g を超えた場合に生じる。適応性応答 (adaptive response)（即ち炎症応答を伴わないマクロファージの増加）は、典型的には、約 0.1 mg / g 未満の濃度で観察される。

【0420】

研究 F Y 2 1 - 2 3 5 では、低、中、及び高用量群における AmB の肺濃度は、それぞれ 1.2 、 2.0 、及び 2.9 mg / g であった。これらはラットにおける肺オーバーロ

50

ードの閾値濃度を超えている。肺オーバーロード現象と一致することであるが、これらの肺負荷は、全ての用量群において相当な罹患率及び死亡率をもたらした。これは、ラットのマクロファージがオーバーロードに特に敏感であることを実証した他の研究と一致している。

【0421】

研究FY22-071では、用量及びレジメンを調整して、AmB肺組織濃度を0.1 mg/gの閾値未満に維持した。この閾値未満では、適応性マクロファージ応答のみが予想される。実際に、マクロファージの増加は最小限しか観察されず、肺オーバーロードに関連付けられる毒性のエビデンスは存在しなかった。

【0422】

また、ABC I-001の23 mg/kgという高い単回用量（研究FY21-211 B）でも、ラットにおいて低い肺負荷（0.016 mg/g）及び適応性マクロファージ応答をもたらされたことも、注目に値する。これは、有害な影響が、投薬後の肺上皮における高いAmB濃度に対する急性の応答ではなく、時間の経過と共に薬剤が肺内に蓄積されることによるものである可能性があることを示唆している。

【0423】

1.0 mg/gより高い濃度及び0.1 mg/g未満の濃度で、ラットにおいて上記組成物を用いて観察される、適応性応答及び有害な応答は、二酸化チタン及びカーボンブラック等の不溶性化合物に関して報告されているものと一致している。これらの観察結果は、研究FY21-235においてABC I-001を用いて観察された毒性が、化学的又は薬理的に仲介された薬剤効果ではなく、実質的に不溶性の粒子の肺オーバーロードに関連するマクロファージ応答によるものであるという主張を裏付けるものである。

【0424】

一般に、同様の投薬条件下において、ラットは他の種に比べて肺オーバーロードの影響に対する感受性が高い。これはABC I-003の場合に明白であり、この場合、イヌでは1.23 mg/kgの沈着用量でNOAELが確立されたにもかかわらず、ラットではその約3倍低い沈着用量（0.47 mg/kg）でも依然として肺オーバーロードが観察された。Forbes及びその同僚は、マクロファージのオーバーロードに関連する種の違いをまとめ、ラットはマウス又はハムスターに比べてこの現象に対する感受性が高いことを報告している（Forbes et al. Adv Drug Deliv Rev. 2014, 71, 15-33）。より高い分画が沈着する、溶解度が低い粒子（例えば二酸化チタン、石灰粉塵、シリカ）のクリアランス速度が遅いにもかかわらず、肺オーバーロードはヒトでは一般的でない。感受性の低下は、解剖学的差異（即ちラットには気管支梢がないこと）並びに生理学的差異（即ち間質マクロファージによる粒子の取り込み及びリンパ管への輸送が多いこと）に関連していると思われる。従って、ラットで観察された毒性は、ヒトにおける毒性を予測させるものではなく、イヌが、ヒトにおけるリスクの評価に最も適した種であると考えられる。

【0425】

ラットは感受性の高い種であるが、ヒトにおけるリスクの評価にはイヌがより妥当な種であると考えられる。イヌのNOAEL（4.9 mg/kg）は、健康な参加者での第I相単回漸増用量臨床研究において提案された最大公称用量（即ち10 mg）と比較して、12.6倍の安全マージンを提供する。健康な参加者の第I相複数用量研究において提案された最大1日用量では、マージンは31.5倍に増大する。

【0426】

安全マージンを推定する別の方法を、肺組織でのAmB曝露に基づいて以下に詳述する。4 mgの1日維持用量の後で10 mgの負荷用量を28日間投与した後のヒト対象における、予想される肺組織濃度は、0.08 mg/gである。これは、肺オーバーロードを引き起こすことが分かっているラットでの肺組織濃度より12.5倍低い。更にこれは、それ未満だとラットでは適応性応答しか観察されない肺組織濃度である0.1 mg/gよりも低い。

10

20

30

40

50

【0427】

実施例21：PLCI-002、ABCI-003、及びABCI-004の開発バッチと、初期臨床開発のためのGMPバッチとの、固体状態特性の比較

GLP毒物学的研究で使用した開発バッチ、及び初期臨床開発に使用したGMPバッチに関して、比較可能なXRPD回折パターン(図13)と、示差走査熱量測定によって決定される主転移温度(図14)とを観察した。その結果は、湿式粉碎されたアムホテリシンB結晶は、脱水された粉末の主転移温度(即ちゲルから液晶への相転移温度)が90を超えるリン脂質とコレステロールとの混合物を含むシェル内に埋め込まれている間にも、結晶化度を保持することを示唆している。

【0428】

実施例22：ABCI-003のGMPバッチのエアロゾル性能

ドラム充填プロセス(Harro Hoefliger)を用いて、噴霧乾燥ABCI-003粉末をサイズ3のHPMCカプセルに、良好な精度(RSD<3%)及び正確度(2mg用量)で充填した。

【0429】

カプセルの保持、デバイスの保持、及びRS01乾燥粉末吸入器からのAmBの送達用量を、圧力降下4kPa、吸入体積4Lで決定した。平均送達用量は $83.1 \pm 2.4\%$ であり、カプセル及びデバイスの保持はそれぞれ $6.3 \pm 0.27\%$ 及び $7.0 \pm 2.0\%$ (N=5)であった。薬剤濃度をRP-HPLC法で定量した。

【0430】

ABCI-003の空気力学的粒子径分布(APSD)を、上で詳述したものと同一の条件下で動作するNext Generation Impactorで決定した(図15)。バッチMSV-ENG-129は、第I相で使用することを目的としたGMP噴霧乾燥バッチを用いた、充填開発の実施を表している。このバッチに関する結果を、冷蔵条件下で1か月間安定させた後の開発ロットと比較する。

【0431】

APSDの重要な特徴としては、USP喉、及びインpakターのステージ1での、5%未満の沈着が挙げられる。単峰性粒子径分布はステージ4でピークに達し、ステージ3及び5で著しい沈着が見られる。開発バッチのMMADは $2.5 \mu\text{m}$ であり、臨床材料を用いた2回の実施ではMMADは $2.8 \mu\text{m}$ であった。5 μm 未満の微粒子用量は、開発バッチでは公称用量の69.6%、臨床バッチでは公称用量の66.8%であった。合計肺用量の代替となるものである、ステージ3~フィルターでの微粒子用量は、開発バッチでは公称用量の71.4%、臨床バッチでは公称用量の70.6%であった。開発バッチでは、デバイス及びカプセルでの沈着が多くなっていた。全体として、臨床バッチは、公称用量の60~70%の、そして送達用量の75~85%を超える、合計肺用量を達成すると期待できる。

【0432】

参照による援用

以上の説明で言及されている全ての特許及び公開特許は、参照によりその全体が本出願に援用される。

【0433】

均等物

明確な理解を目的とした説明及び例示として、本発明をある程度詳細に説明したが、本発明又はそのいずれの具体的実施形態の範囲にも影響を及ぼすことなく、幅広い同等の条件、処方、及び他のパラメーターの範囲内で本発明を修正又は変更することによって、本発明を実施できること、並びに上述のような修正又は変更は、添付の特許請求の範囲に包含されることが意図されていることは、当業者には明らかであろう。

10

20

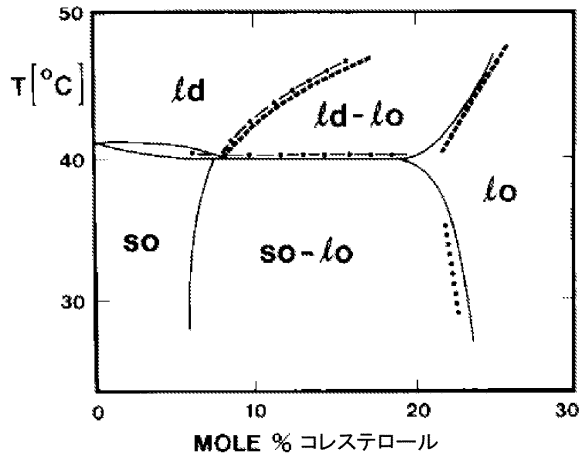
30

40

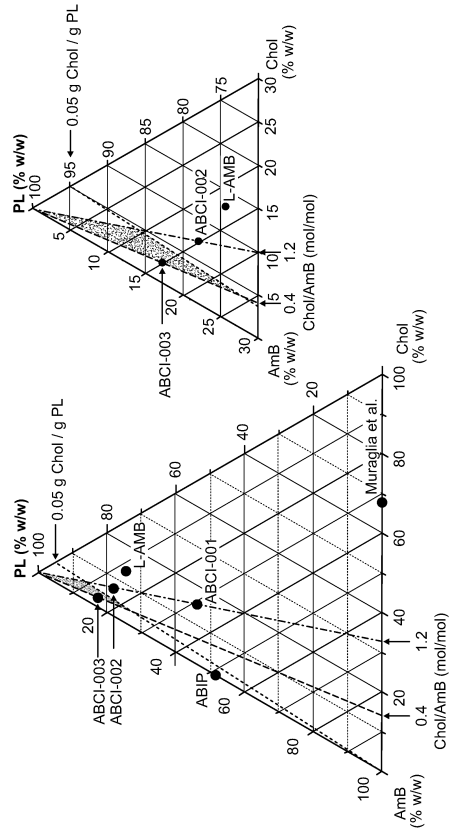
50

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

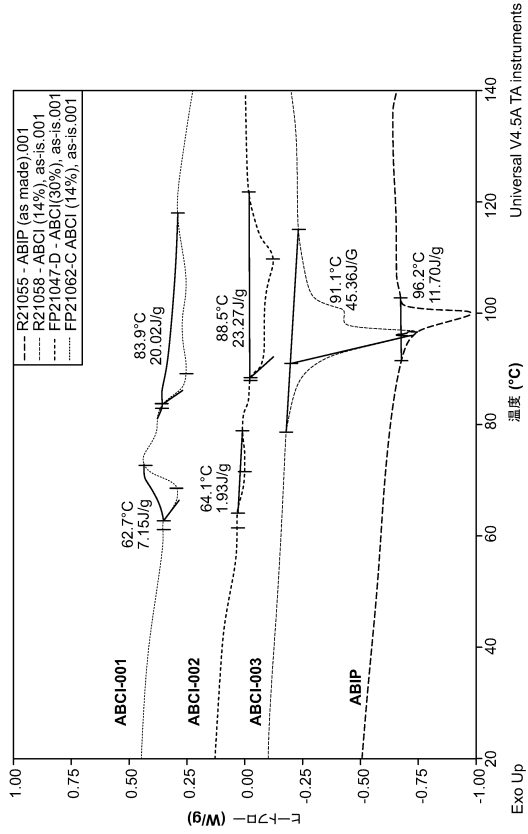
20

30

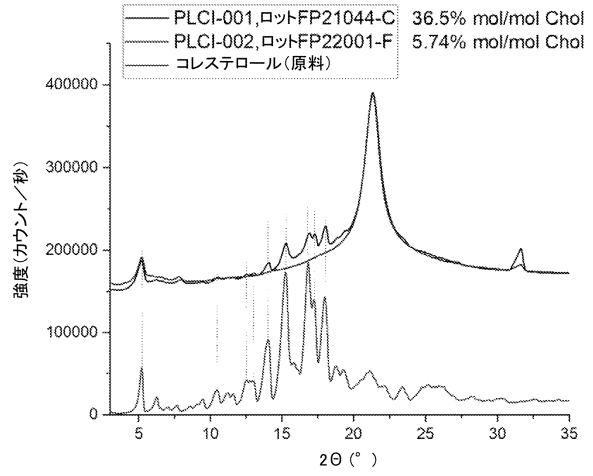
40

50

【 図 3 】



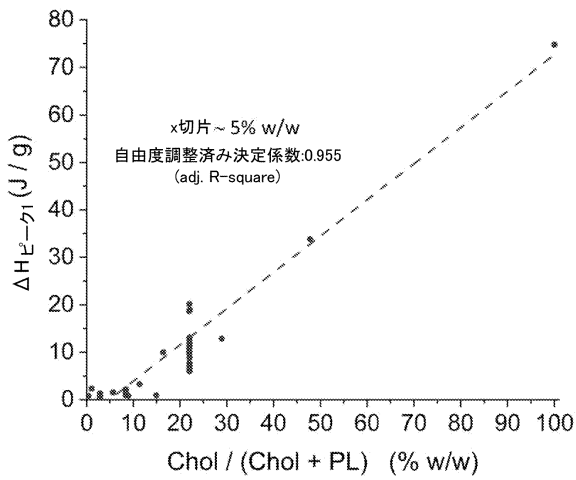
【 図 4 】



10

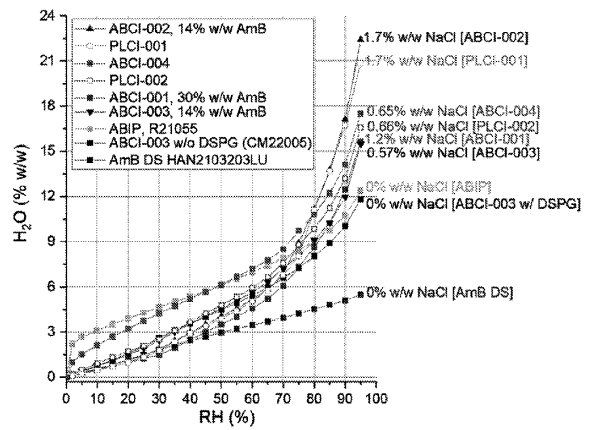
20

【 図 5 】



【 図 6 】

FIG. 6

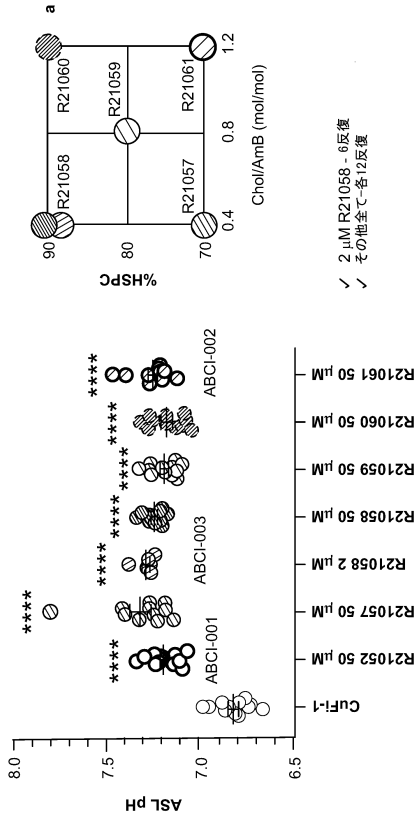


30

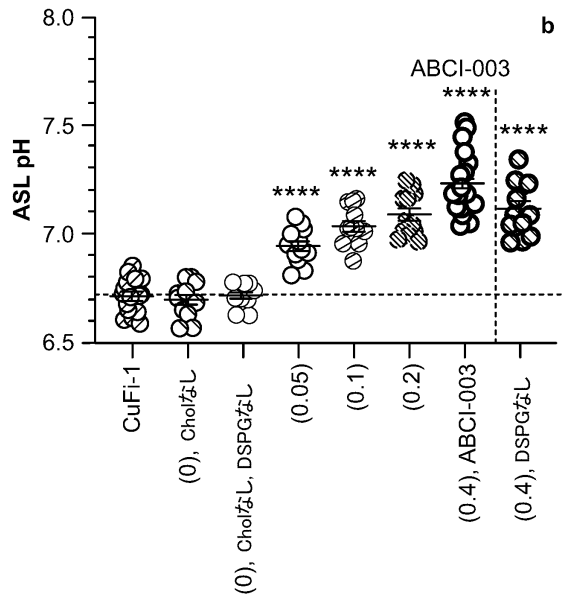
40

50

【 7 A 】



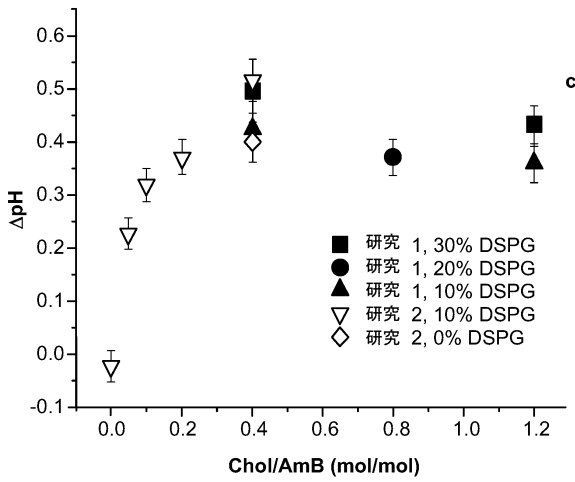
【 7 B 】



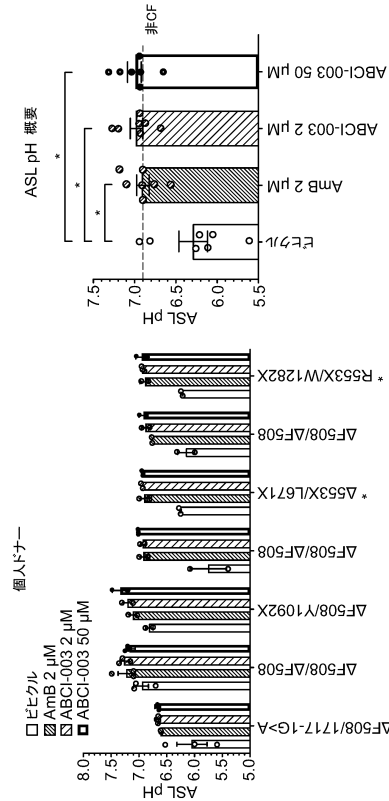
10

20

【 7 C 】



【 8 】

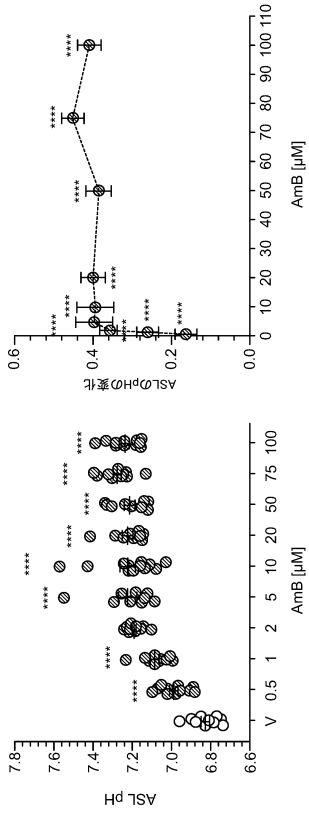


30

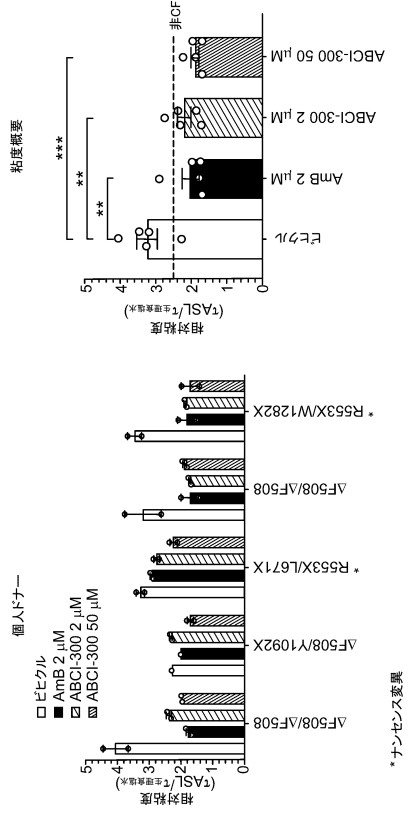
40

50

【 図 9 】



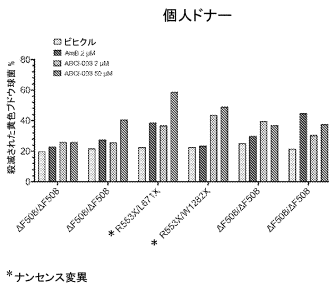
【 図 10 】



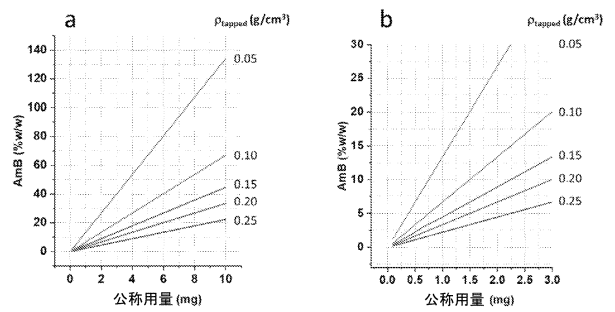
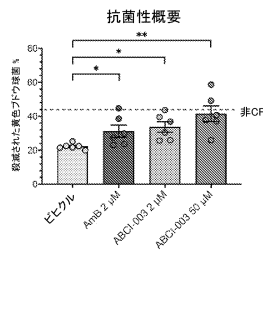
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

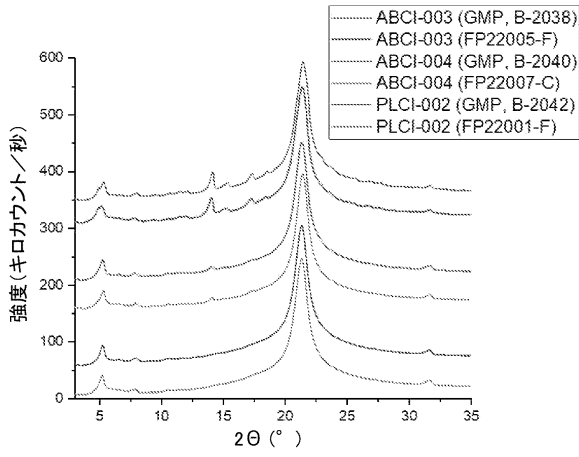


30

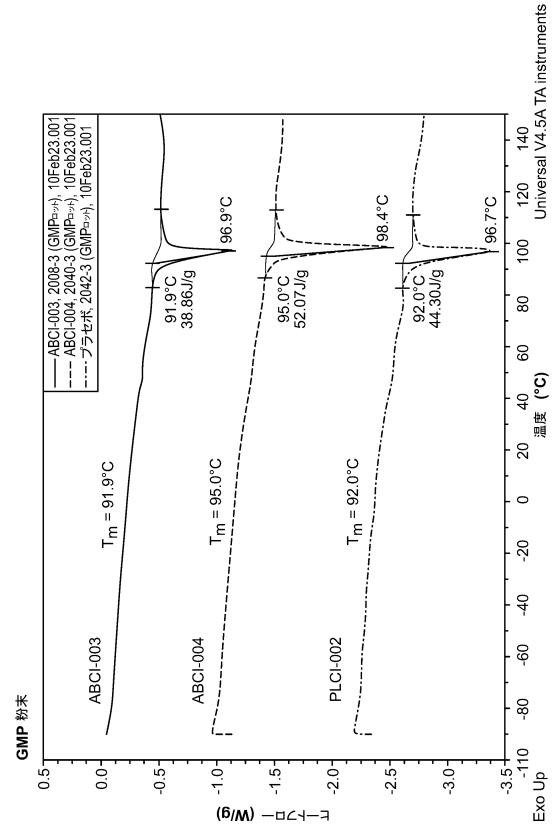
40

50

【 図 1 3 】

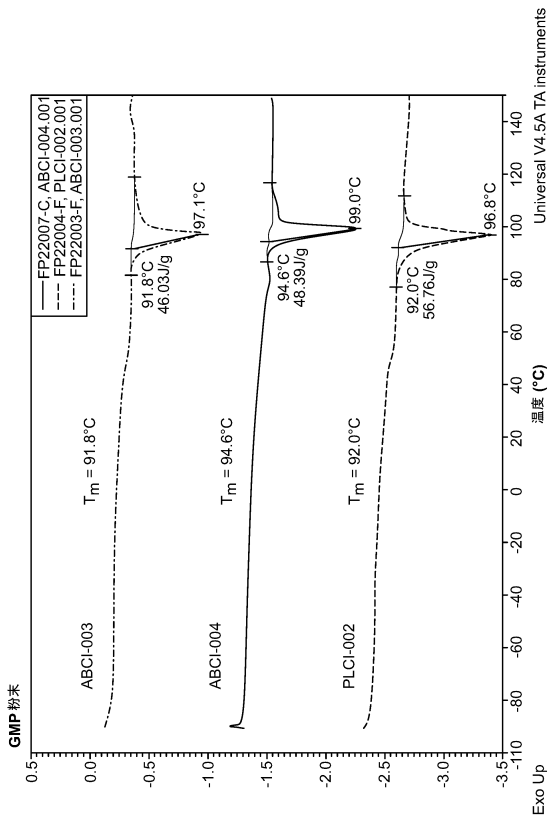


【 図 1 4 - 1 】



10
20

【 図 1 4 - 2 】



【 図 1 5 】



30
40
50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 23/15762
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 47/28, A61K 31/575, A61K 47/02, A61K 51/04 (2023.01) ADD. A61K 31/56, A61K 31/7048 (2023.01) CPC - INV. A61K 47/28, A61K 31/575, A61K 47/02, A61K 51/0408 ADD. A61K 31/56, A61K 31/7048 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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0064794 A1 (Deng et al.) 17 March 2011 (17.03.2011) entire document especially Para [0153]	1-7 and 25-28
Y	US 2015/0297725 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 22 October 2015 (22.10.2015) entire document especially Para [0056]	1-7 and 25-28
A	US 2016/0317564 A1 (Insmed Incorporated) 03 November 2016 (03.11.2016) entire document	1-7 and 25-28
A	US 2017/0014342 A1 (Insmed, Inc.) 19 January 2017 (19.01.2017) entire document	1-7 and 25-28
A	US 2010/0210575 A1 (Kwon et al.) 19 August 2010 (19.08.2010) entire document	1-7 and 25-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May 2023 (11.05.2023)		Date of mailing of the international search report JUN 21 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/15762

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 8-24, 29-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
(74)代理人	100139723	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 7 0 サン カルロス インダストリアル ロード 1 5 4 9
	弁理士 樋口 洋	
(74)代理人	100116540	
	弁理士 河野 香	
(72)発明者	バーク, マーティン ディー	
	アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 1	シャンペーン オールド ファーム ロード 1 4 0 3
(72)発明者	レヴァンドフスカ, アグニツカ	
	アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 7 4	サヴォイ プレストン ストリート 3 1 0
(72)発明者	スター, コリン	
	アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1	アーバナ ダブリュー メイン ストリート 5 0 2 アパ ートメント 3 1 3
(72)発明者	ウィアーズ, ジェフリー ジー	
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 9	ハーフ ムーン ベイ ベルヴィル ブールヴァード 4 1 4
(72)発明者	タララ, トーマス	
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 0	バーリンゲーム パロマ アヴェニュー 1 2 3 3
(72)発明者	ミラー, ダンフォース ピー	
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 7 0	サン カルロス アルマ ストリート 2 0 7 9
F ターム (参考)	4C076 AA93 BB27 CC15 DD21 DD63 DD70	
	4C086 AA01 AA02 EA15 MA03 MA05 MA13 MA56 NA14 ZA59	