

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成23年12月22日 (2011.12.22)

【公表番号】特表2011-502134(P2011-502134A)

【公表日】平成23年1月20日 (2011.1.20)

【年通号数】公開・登録公報2011-003

【出願番号】特願2010-531403(P2010-531403)

【国際特許分類】

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/34 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/337 (2006.01)

A 6 1 K 31/282 (2006.01)

A 6 1 K 33/24 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/34

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/337

A 6 1 K 31/282

A 6 1 K 33/24

【誤訳訂正書】

【提出日】平成23年11月4日 (2011.11.4)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】治療薬を含有する新規な温度感受性リボソーム

【背景技術】

【0001】

リボソームは各種治療薬の送達に用いられる。例えば、アクチノマイシン（特許文献 1）、アントラサイクリン（特許文献 2）およびピンカアルカロイド（特許文献 3）等の抗腫瘍薬はリボソームに封入される。より最近では、活性薬剤を含有する温度感受性リボソームが調製され、被験体内の特定の標的に活性薬剤を送達するために用いられている（特許文献 4 および特許文献 5、ならびに非特許文献 1。使用時、温度感受性リボソームは被験体に送達され、当該被験体内の標的領域が加熱される。温度感受性リボソームが加熱された領域に達すると、ゲル - 液相転移が起こり、活性薬剤が放出される。この技術を成功させるためには、被験体内で達成可能な温度範囲のゲル - 液相転移温度を有するリボソームが必要である。

【0002】

当該分野では、被験体内で達成可能な温度でゲル - 液相転移が起こり得る抗腫瘍薬等の治療薬を封入するように処方したリボソームに対する要望が依然として存在する。本発明は、この要望およびその他の要望を満たすものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】米国特許第3,993,754号明細書

【特許文献2】米国特許第4,863,739号明細書

【特許文献3】米国特許第4,952,408号明細書

【特許文献4】米国特許第6,200,598号明細書

【特許文献5】米国特許第6,726,925号明細書

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Yatvinら、Science(1979)204:188

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

1つの実施形態では、本発明は温度感受性リボソームを提供する。本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロールおよび少なくとも1つのリゾ脂質(lysolipid)を含む。本発明の温度感受性リボソームは、一般に、約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する。随意に、本発明の温度感受性リボソームは、1つ以上のさらなる脂質成分を含んでもよく、例えば、PEG化リン脂質を含んでもよい。本発明に係る温度感受性リボソームはまた、1つ以上の活性薬剤、例えば、治療薬、造影剤、診断薬およびそれらの組み合わせを含んでもよい。

【0006】

特定の実施形態では、上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)であり、上記温度感受性リボソームは、PEG化リン脂質、例えば、PEG-2000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)またはPEG-5000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG5000)を含む。本発明の温度感受性リボソームは、ゲル-液相転移温度が約39～約45の範囲内であれば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、リゾ脂質およびPEG化リン脂質を任意の比率で含んでもよい。典型的には、本発明のリボソームは、下記の成分を下記の範囲の重量比で含んでもよい：ホスファチジルコリン60～80：ホスファチジルグリセロール6～12：リゾ脂質6～12：PEG化リン脂質4～15：活性薬剤1～30。例えば、本発明の温度感受性リボソームは、DPPC、DSPG、MSPC、DSPE-PEG2000および活性薬剤を60～80：6～12：6～12：4～15：1～30の重量比で含んでもよい。

【0007】

本発明の温度感受性リボソームは1つ以上の活性薬剤を含んでもよい。当業者に公知の任意の活性薬剤を本発明の温度感受性リボソームと組み合わせて用いて被験体内の選択部位に当該活性薬剤を送達するようにしてもよい。本明細書で用いる被験体は任意の哺乳動物であり、特に、ヒト、ネコまたはイヌである。1つの実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは1つ以上の抗癌剤を含む。適切な抗癌剤の例としては、アルキル化剤、代謝拮抗薬、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性抗腫瘍抗生物質、アントラサイクリン系抗生物質、植物アルカロイド、タキソール誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体もしくはその断片、光増感剤、キナーゼ阻害剤、抗腫瘍酵素および酵素の阻害剤、アポトーシス誘導物質、生物的反応修飾物質(biological response modifier)、抗ホルモンレチノイド、ならびに白金含有化合物が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、タキサン、例えば、ドセタキセルを含んでもよい。他の特定の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、カルボプラチンまたはシスプロアチン(cisplatin)等

の白金化合物を含んでもよい。

【0008】

本発明はまた、活性薬剤を含む本発明の温度感受性リボソームを含む医薬組成物も提供する。そのような医薬組成物では、本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロール、少なくとも1つのリゾ脂質を含み、約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する。本発明の医薬組成物に用いる温度感受性リボソームは、PEG化リン脂質をさらに含んでもよい。

【0009】

本発明の医薬組成物に用いる適切な温度感受性リボソームの一例では、上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)であり、上記温度感受性リボソームは、PEG化リン脂質、例えば、PEG-2000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)を含む。本発明のそのような温度感受性リボソームは、ゲル-液相転移温度が約39～約45の範囲であれば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、リゾ脂質およびPEG化リン脂質を任意の比率で含んでもよい。典型的には、本発明の医薬組成物に用いるリボソームは、下記の成分を下記の範囲の重量比で含んでもよい：ホスファチジルコリン60～80：ホスファチジルグリセロール6～12：リゾ脂質6～12：PEG化リン脂質4～15：活性薬剤1～30。例えば、本発明の温度感受性リボソームは、DPPC、DSPG、MSPC、DSPE-PEG2000および活性薬剤を60～80：6～12：6～12：4～15：1～30の重量比で含んでもよい。

【0010】

任意の活性薬剤(例えば、治療薬および/または造影剤)を本発明の医薬組成物に含んでもよい。1つの実施形態では、活性薬剤は抗癌剤としてもよい。適切な抗癌剤の例としては、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、アントラサイクリン系抗生物質、植物アルカロイド、タキソール誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体、光増感剤、キナーゼ阻害剤および白金含有化合物が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、アントラサイクリン系抗生物質、例えば、ドセタキセルを含んでもよい。特定の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、白金含有化合物、例えば、カルボプラチンまたはシスプラチンを含んでもよい。

【0011】

本発明はまた、本発明の温度感受性リボソームを用いて被験体の疾患を処置する方法も提供する。そのような温度感受性リボソームは、典型的には、当該疾患の処置に使用可能な1つ以上の活性薬剤を含む。本発明に係る処置を必要とする被験体の疾患を処置する方法は、活性薬剤を含む感温性リボソームを含む治療有効量の医薬組成物を上記被験体に投与する工程を含んでもよく、この場合、上記リボソームは、少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロール、少なくとも1つのリゾ脂質を含み、約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する。そして、上記被験体の病変組織の一部または全てを含む部分は、上記リボソームのゲル-液体転移の発生に十分な温度まで加熱されることにより、上記活性薬剤を上記病変組織と近接した位置で放出する。本発明の方法に用いる温度感受性リボソームはまた、PEG化リン脂質、例えば、DSPE-PEG2000またはDSPE-PEG5000を含んでもよい。

【0012】

本発明の方法に用いる温度感受性リボソームの一例では、上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)である。本発明の方法に用いるそのような温度感受性リボソームは、ゲル-液相転移温度が約39～約45の範囲であれ

ば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、リゾ脂質およびPEG化リン脂質を任意の比率で含んでもよい。典型的には、本発明の処置法に用いるリボソームは、下記の材料を下記の範囲の重量比で含んでもよい：ホスファチジルコリン60～80：ホスファチジルグリセロール6～12：リゾ脂質6～12：PEG化リン脂質4～15：活性薬剤1～30。例えば、本発明の温度感受性リボソームは、DPPC、DSPG、MSPC、DSPE-PEG2000および活性薬剤を60～80：6～12：6～12：4～15：1～30の重量比で含んでもよい。

【0013】

1つの実施形態では、本発明は、処置を必要とする被験体の癌を処置する方法であって、抗癌剤を含む感温性リボソームを含む治療有効量の医薬組成物を上記被験体に投与する工程を含み、上記リボソームは、少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロール、少なくとも1つのリゾ脂質を含み、約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する。適切な抗癌剤の例としては、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、アントラサイクリン系抗生物質、植物アルカロイド、タキソール誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体、光増感剤、キナーゼ阻害剤および白金含有化合物が挙げられるがこれらに限定されない。1つの実施形態では、上記抗癌剤は、アントラサイクリン系抗生物質、例えば、ドセタキセルであってもよい。特定の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、白金含有化合物、例えば、カルボプラチンまたはシスプラチンを含んでもよい。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロールおよび少なくとも1つのリゾ脂質を含む温度感受性リボソームであって、該リボソームは約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する、温度感受性リボソーム。

(項目2)

PEG化リン脂質をさらに含む、項目1に記載の温度感受性リボソーム。

(項目3)

活性薬剤をさらに含む、項目1に記載の温度感受性リボソーム。

(項目4)

上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)である、項目1に記載の温度感受性リボソーム。

(項目5)

PEG化リン脂質をさらに含む、項目4に記載の温度感受性リボソーム。

(項目6)

上記PEG化脂質はPEG-2000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)である、項目5に記載の温度感受性リボソーム。

(項目7)

DPPC：DSPG：MSPC：DSPE-PEG2000：活性薬剤を重量基準で60～80：6～12：6～12：4～15：1～30の比率で含む、項目1に記載の温度感受性リボソーム。

(項目8)

上記活性薬剤は抗癌剤である、項目7に記載の温度感受性リボソーム。

(項目9)

上記抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体もしくはその断片、光増感剤、キナーゼ阻害剤、抗腫瘍酵素および酵素の阻害剤、アポトーシス誘導物質、生物的反応修飾物質、抗ホルモン、レチノイド、ならびに白金含有化合物からなる群から選択される、項目8に記載の温度感受性リボソーム。

(項目 1 0)

上記抗癌剤はタキサンである、項目 9 に記載の温度感受性リボソーム。

(項目 1 1)

上記抗癌剤はドセタキセルである、項目 9 に記載の温度感受性リボソーム。

(項目 1 2)

上記抗癌剤は白金含有化合物である、項目 9 に記載の温度感受性リボソーム。

(項目 1 3)

上記抗癌剤はカルボプラチンまたはシスプラチンである、項目 9 に記載の温度感受性リボソーム。

(項目 1 4)

活性薬剤を含む温度感受性リボソームを含む医薬組成物であって、該リボソームは、少なくとも 1 つのホスファチジルコリン、少なくとも 1 つのホスファチジルグリセロール、少なくとも 1 つのリゾ脂質を含み、約 3 9 . 0 ~ 約 4 5 のゲル - 液相転移温度を有する、医薬組成物。

(項目 1 5)

上記リボソームは P E G 化リン脂質をさらに含む、項目 1 4 に記載の医薬組成物。

(項目 1 6)

上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C) であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G) であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン (M S P C) である、項目 1 4 に記載の医薬組成物。

(項目 1 7)

上記リボソームは P E G 化リン脂質をさらに含む、項目 1 6 に記載の医薬組成物。

(項目 1 8)

上記 P E G 化脂質は P E G - 2 0 0 0 修飾ジステアロイルホスファチジリエタノールアミン (D S P E - P E G 2 0 0 0) である、項目 1 7 に記載の医薬組成物。

(項目 1 9)

上記リボソームは、D P P C : D S P G : M S P C : D S P E - P E G 2 0 0 0 : 活性薬剤を重量基準で 6 0 ~ 8 0 : 6 ~ 1 2 : 6 ~ 1 2 : 4 ~ 1 5 : 1 ~ 3 0 の比率で含む、項目 1 4 に記載の医薬組成物。

(項目 2 0)

上記活性薬剤は抗癌剤である、項目 1 9 に記載の医薬組成物。

(項目 2 1)

上記抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体もしくはその断片、光増感剤、キナーゼ阻害剤、抗腫瘍酵素および酵素の阻害剤、アポトーシス誘導物質、生物的反応修飾物質、抗ホルモン、レチノイド、ならびに白金含有化合物からなる群から選択される、項目 2 0 に記載の医薬組成物。

(項目 2 2)

上記抗癌剤はタキサンである、項目 2 0 に記載の医薬組成物。

(項目 2 3)

上記抗癌剤はドセタキセルである、項目 2 0 に記載の医薬組成物。

(項目 2 4)

上記抗癌剤は白金含有化合物である、項目 2 0 に記載の医薬組成物。

(項目 2 5)

上記抗癌剤はカルボプラチンまたはシスプラチンである、項目 2 0 に記載の医薬組成物。

(項目 2 6)

処置を必要とする被験体の疾患を処置する方法であって、
活性薬剤を含む感温性リボソームを含む治療有効量の医薬組成物を該被験体に投与する

工程であって、該リボソームは、少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロール、少なくとも1つのリゾ脂質を含み、約39.0～約45のゲル-液相転移温度を有する、工程と、

該疾患の全てまたは一部を含む該被験体の領域を加熱する工程と、
を包含する、方法。

(項目27)

上記リボソームはPEG化リン脂質をさらに含む、項目26に記載の方法。

(項目28)

上記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、上記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、上記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)である、項目26に記載の方法。

(項目29)

上記リボソームはPEG化リン脂質をさらに含む、項目28に記載の方法。

(項目30)

上記PEG化脂質はPEG-2000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)である、項目29に記載の方法。

(項目31)

上記リボソームは、DPPC:DSPG:MSPC:DSPE-PEG2000:活性薬剤を重量基準で60～80:6～12:6～12:4～15:1～30の比率で含む、項目26に記載の方法。

(項目32)

上記疾患は癌であり、上記活性薬剤は抗癌剤である、項目31に記載の方法。

(項目33)

上記抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体もしくはその断片、光増感剤、キナーゼ阻害剤、抗腫瘍酵素および酵素の阻害剤、アポトーシス誘導物質、生物的反応修飾物質、抗ホルモン、レチノイド、ならびに白金含有化合物からなる群から選択される、項目32に記載の方法。

(項目34)

上記抗癌剤はタキサンである、項目32に記載の方法。

(項目35)

上記抗癌剤はドセタキセルである、項目32に記載の方法。

(項目36)

上記抗癌剤は白金含有化合物である、項目32に記載の方法。

(項目37)

上記抗癌剤はカルボプラチンまたはシスプラチンである、項目32に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明の例示的な温度感受性リボソームのゲル-液相転移を示す示差走査熱量測定(DSC)トレースである。

【図2】凍結乾燥したリボソーム調製物中の凍結防止剤の量の関数としての粒度のグラフである。

【図3】凍結乾燥した本発明のリボソームを再水和した際の、凍結の間の様々な温度速度における当該リボソームの含水量の関数としての粒度のグラフである。

【図4】図4Aは、再水和した本発明のリボソームの粒度に対する静置効果のテストに用いたプロトコルの概略図である。図4Bは、再水和した本発明のリボソームの1時間にわたっての粒度分布を示すグラフである。

【図5】温度感受性カルボプラチンリボソームの粒度分布の線グラフである。

【図6】温度感受性カルボプラチンリボソームの粒度分布の棒グラフである。

【図 7】 3 7 (白抜きの菱形) および 4 2 (黒塗りの菱形) における時間の関数としての薬物放出の線グラフである。

【図 8】 様々な温度におけるカルボプラチンの放出を 5 分 (青) および 10 分 (マゼンタ) の場合について示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、1つ以上のホスファチジルコリンを含む。本発明の実施に際して使用可能な適切なホスファチジルコリンの例としては、1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DLPC)、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) および 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0016】

本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、1つ以上のホスファチジルグリセロールを含む。適切なホスファチジルグリセロールの例としては、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DMPG)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DPPG)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DSPG) および 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (POPG) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0017】

本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、1つ以上のリゾ脂質を含む。本明細書で用いる「リゾ脂質」とは、グリセロール部分に共有結合したアシル鎖を1つだけ含むホスファチジン酸 (1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - リン酸塩) の任意の誘導体を指す。ホスファチジン酸の誘導体としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールおよびホスファチジルエタノールアミンが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の実施に際しては、当業者に公知の任意のリゾ脂質を用いてもよい。

【0018】

本発明の温度感受性リボソームは、典型的には、1つ以上のPEG化リン脂質を含む。適切なPEG化リン脂質の例としては、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 350] (mPEG350PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 550] (mPEG550PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 750] (mPEG750PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 1000] (mPEG1000PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (mPEG2000PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 3000] (mPEG3000PE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 5000] (mPEG5000PE)、PEG - 2000 修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG2000) および PEG - 5000 修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG5000) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0019】

活性薬剤

本発明の温度感受性リボソームは、1つ以上の活性薬剤を含むように処方してもよい。

本明細書で用いる「活性薬剤」は、被験体内の特定の部位に送達されるべき任意の化合物を含む。本発明の実施に際しては、任意の活性薬剤を用いてもよい。

【0020】

本発明の温度感受性リボソーム中の活性薬剤として抗癌剤を用いてもよい。適切な抗癌剤の例としては以下が挙げられる。

【0021】

アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード類（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、ニトロソウレア類（例えば、カルムスチン、フォテムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン）、白金含有化合物（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、BBR3464）、ブスルファン、ダカルバジン、メクロレタミン、プロカルバジン、テモゾロマイド、チオテパおよびウラムスチン。

【0022】

例えば、葉酸（例えば、アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド）、プリン代謝（例えば、クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン）、ピリミジン代謝（例えば、カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、ゲムシタビン）を標的とする代謝拮抗薬。

【0023】

紡錘体毒植物アルカロイド、例えば、タキサン類（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル）およびビンカ（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）。

【0024】

細胞毒性/抗腫瘍抗生物質、例えば、アントラサイクリン系抗生物質（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、バルルビシン、カリノマイシン（carinomycin）、Nアセチルアドリアマイシン、ルビダゾン（rubicadzone）、5-イミドダウノマイシン、N30アセチルダウノマイシンおよびエピルビシン）、プレオマイシン、マイトマイシンおよびアクチノマイシン。

【0025】

トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、カンプトテシン類（例えば、カンプトテシン、トボテカン、イリノテカン）、ポドフィルム（例えば、エトポシド、テニポシド）。

【0026】

モノクローナル抗体またはその断片、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブおよびトラスツズマブ。

【0027】

光増感剤、例えば、アミノレブリン酸、アミノレブリン酸メチル、ボルフィマーナトリウムおよびベルテポルフィン。

【0028】

キナーゼ阻害剤、例えば、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブおよびバンデタニブ。

【0029】

酵素類、例えば、アスパラギナーゼ、ペガスパルガーゼおよび酵素阻害剤、例えば、ヒドロキシウレア。

【0030】

アポトーシス誘導物質、例えば、三酸化ヒ素、ベルケイド（Velcade）およびジェナセンス（Genasense）。

【0031】

生物的反応修飾物質、例えば、デニロイキンディフティトックス。

【 0 0 3 2 】

抗ホルモン、例えば、酢酸ゴセレリン、酢酸ロイプロリド、トリプトレリンパモ酸塩 (triptorelin pamoate)、酢酸メゲストロール、タモキシフェン (Tamoxifen)、トレミフェン、フルベストラント、テストラクトン、アナストロゾール、エキセメスタンおよびレトロゾール。

【 0 0 3 3 】

レチノイド類、例えば、9 - cis - レチノイン酸およびオールトランスレチノイン酸。

【 0 0 3 4 】

さらなる実施形態では、本発明の温度感受性リボソームは、1つより多くの抗新生物剤を含むようにすることができるか、または本発明の方法において、各々が異なる活性薬剤、例えば、異なる抗癌剤を含む1つより多くの温度感受性リボソームを用いることができる。

【 0 0 3 5 】

本発明の実施に際して使用可能なさらなる活性薬剤としては、抗生物質、抗真菌剤、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗感染症薬、抗ウイルス剤、抗寄生虫剤および駆虫化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 3 6 】

活性薬剤を含む本発明の温度感受性リボソームは、このリボソームが温度感受性を維持するとともに、上記活性薬剤を適切な温度、例えば、39 ~ 45 で放出可能であれば、上記脂質および活性薬剤を任意の比率で含んでもよい。ホスファチジルコリン：ホスファチジルグリセロール：リゾ脂質：PEG化リン脂質：活性薬剤の重量比の適切な範囲は、60 ~ 80 : 6 ~ 12 : 6 ~ 12 : 4 ~ 15 : 1 ~ 30である。ホスファチジルコリン：ホスファチジルグリセロール：リゾ脂質：PEG化リン脂質：活性薬剤の適切な重量比の例としては、

【 0 0 3 7 】

【 化 1 】

70:8:8:8:4, 71:8:8:8:4,

72:8:8:8:4, 73:8:8:8:4, 74:8:8:8:4, 75:8:8:8:4, 70:8:8:6:4, 71:8:8:6:4, 72:8:8:6:4,

73:8:8:6:4, 74:8:8:6:4, 75:8:8:6:4, 70:8:8:4:4, 71:8:8:4:4, 72:8:8:4:4, 73:8:8:4:4,

74:8:8:4:4, 75:8:8:4:4, 70:9:9:8:4, 71:9:9:8:4, 72:9:9:8:4, 73:9:9:8:4, 74:9:9:8:4,

75:9:9:8:4, 70:9:9:6:4, 71:9:9:6:4, 72:9:9:6:4, 73:9:9:6:4, 74:9:9:6:4, 75:9:9:6:4,

70:9:9:4:4, 71:9:9:4:4, 72:9:9:4:4, 73:9:9:4:4, 74:9:9:4:4, および 75:9:9:4:4.

が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

使用法

本発明の温度感受性リボソームは、任意の適切な経路、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下、皮内関節内、クモ膜下脳室内、鼻内噴霧、肺吸入、経口投与 (oral administration) および当業者に公知の他の適切な投与経路を用いて被験体に投与することができる。本発明の方法を用いて処置可能な組織としては、鼻、肺、肝臓、腎臓、骨、軟組織、筋肉、副腎組織および胸部が挙げられるがこれらに限定されない。処置可能な組織には、癌組織または病変もしくは損傷組織と、所望であれば、健常組織の両方が含まれる。39 . 5 よりも高い温度まで加熱可能な任意の組織または体液を本発明のリボソームを用いて処置してもよい。

【 0 0 3 9 】

本発明の温度感受性リボソームを用いて被験体に投与する活性薬剤の用量は、当業者であれば容易に決定でき、長時間にわたって、例えば、約1分~数時間、例えば、2、3、

4、6、24時間またはそれ以上にわたって適切に静脈内投与される。本明細書で用いる「約」は、数値の修飾に用いる場合、10%の可変性を示す。

【0040】

活性薬剤の用量は、当該分野で公知のように、担体に含む活性薬剤に応じて調節してもよい。

【0041】

被験体の標的組織は、本発明の温度感受性リボソームの投与前および/または投与中および/または投与後に加熱してもよい。1つの実施形態では、上記標的組織がまず加熱され（例えば、10～30分）、本発明のリボソームは、その加熱後できるだけすぐに被験体内に送達される。他の実施形態では、本発明の温度感受性リボソームが被験体に送達され、上記標的組織は、その投与後できるだけすぐに加熱される。

【0042】

上記標的組織を加熱する任意の適切な手段を用いてもよく、例えば、高周波照射の適用、超音波（高強度集束超音波であってもよい）の適用、マイクロ波放射の適用、温水槽等の赤外線、光、ならびに放射性同位体、電場および磁場および/または上記の組み合わせにより発生されるもの等外部もしくは内部から適用される放射を発生する任意の発生源が挙げられる。

【0043】

本発明またはその任意の実施形態の範囲から逸脱することなく本明細書に記載の方法および用途に対して他の適切な修正および適合を実施可能であることは、当業者には容易に理解できる。本発明を詳述したが、その内容は、例示のみを目的とし、本発明の限定を目的としない以下の実施例を参照することにより、さらに明確に理解できる。

【実施例】

【0044】

（実施例1）

温度感受性タキソテールリボソームの調製および特徴づけ

下記の材料を用いて本発明のリボソームを調製した：ジバ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）、モノステアロイルホスファチジルコリン（MSPC）、PEG化ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE-mPEG2000）、NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、ラクトース、 CHCl_3 、メタノール、エタノールおよび蒸留水。

【0045】

以下の器具を用いて本発明のリボソームを調製した：水槽、ロータリーエバポレーター、ホモジナイザー-押出機、凍結乾燥機、レーザー光散乱粒度分析器（laser light scattering particle sizer）（Smypattec Nanophox）および温度計。

【0046】

20mlバッチのドセタキセルを含むリボソームの調製法

以下の成分を指定量だけ量り分ける。

【0047】

【表1】

成分	DPPC	DSPG	MSPC	DSPE-PEG2000	タキソテール
量	669mg	75mg	75mg	75mg	37.5mg

上記材料を、 CHCl_3 /メタノール（3：1）を用いて55℃で溶解する。次いで、有機溶剤をロータリーエバポレーターで取り除く。これは、55℃で1時間回転蒸発を実施することにより行うことができる。乾燥後、乾燥させた材料に適切な時間、例えば、5分間、窒素ブローを行ってもよい。

【0048】

次いで、乾燥させた材料を再水和する。適切な再水和液は、ラクトースまたは他の安定化材料（例えば、糖類）を添加可能なリン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。適切な再水和プロトコルは、20mlのPBS-5%ラクトース溶液（pH7.3±0.2）を加え、ロータリーエバポレーターにおいて、大気圧で1時間、50 で回転させることである。再水和後、上記溶液を減圧しながら脱気して気泡を取り除くことができる。

【0049】

水和後、上記リボソームの粒度を所望の範囲、例えば、 100 ± 15 nmに調節してもよい。適切な押出プロトコルでは、200 nmフィルタを備えたホモジナイザー/押出機を用いて押し出しを3回行う。100 nmフィルタに交換し、押し出しを3回行う。最後に、80 nmフィルタに交換し、押し出しを3回行う。上記リボソームの粒度分布は、任意の適切な技術を用いて、例えば、光子相互相関分光法（PCCS）およびNanophoxセンサー（Sympatec GmbH）を用いて測定することができる。押出後、上記リボソーム溶液は、 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径膜フィルタ（Millipore）でろ過することにより滅菌することができる。

【0050】

滅菌後、上記リボソームをバイアルに入れ、凍結乾燥する。凍結乾燥プログラムは以下の通りである：-50 で2時間、-45 で1時間、-35 で10時間、-15 で5時間、0 で2時間、10 で2時間、20 で6時間。

【0051】

本発明のリボソームの他の適切な調製法は以下の通りである。

【0052】

上記と同じ成分を CHCl_3 /メタノール（3：1）中において55 で溶解する。上記のように有機溶剤をロータリーエバポレーターで取り除く。上記のように20mlのPBS-5%ラクトース溶液を用いて50 で再水和する。再水和した材料をホモジナイザーに入れ、15,000 psiで5分間処理して粒度を小さくする。均質化した材料を取り出し、100 nmフィルタを備えた押出機を用いて、押出を6回行って粒度を 100 ± 15 nm（ $100 \text{ nm} \times 6$ ）まで小さくした後、 $0.22 \mu\text{m}$ ろ過で滅菌する。滅菌後、上記リボソームをバイアルに入れ、凍結乾燥する。

【0053】

分析法

上記リボソームの形態分析は電子顕微鏡法により行うことができる。リボソームをリンタングステン酸でネガティブ染色し、銅メッシュに移した。水分を蒸発させ、試料を電子顕微鏡で観察した。本発明の方法で調製したリボソームを電子顕微鏡で見ると均質であった。

【0054】

上記のように調製したリボソームについて、封入された薬物のパーセンテージ（封入%）を測定した。封入% = 封入薬物 / 全薬物 $\times 100\%$ 。封入%は以下のように決定した：上記リボソーム1mlを6000 rpmで5分間遠心分離機にかけた。上清のドセタキセルをHPLCで測定した。上記リボソームのドセタキセル含有量は、リボソームからドセタキセルを抽出し、抽出したドセタキセルをHPLCで測定して決定した。抽出のために、0.1mlのリボソームを水：アセトニトリル（45：55）で0.5mlに希釈した。4mlのtert-ブチルメチルエーテルを加え、30秒間混合した。その混合物を300 gで、15分間遠心分離機にかけた。その有機層3mlを回転蒸発により除去乾燥させた。乾燥させた材料を200 μl 水：アセトニトリル（45：55）中で再懸濁し、5~10 μl を分析のためにHPLCに注入した。

【0055】

HPLC分析を以下の条件で行った：Venusil C18カラム（逆相C18カラム）を1ml/分の水：アセトニトリル（45：55）の移動相とともに用いた。カラム温度は30 とした。UV検出を230 nmに設定した。この条件下では、薬物検出限界

は 20 ~ 800 ng である。

【0056】

上記プロトコルの試料中のドセタキセルを回収する能力を決定した。上記のように調製した 0.1 ml のリボソームに、0.1 ml のドセタキセル標準溶液を加えた。この試料を水：アセトニトリル（45：55）で 0.5 ml に希釈した。4 ml の tert - ブチルメチルエーテルを加え、試料を 30 秒間混合した。次いで、この試料を、300 g で 15 分間遠心分離機にかけた。この有機層 3 ml を回転蒸発により乾燥させた。200 µl の水：アセトニトリル（45：55）を残留物に加えた後、5 ~ 10 µl を HPLC に注入する。下記表は各種濃度のドセタキセルにおける回収率を示す。

【0057】

【表 2】

薬物濃度	回収%	回収%	回収%	平均
80 µg/ml	100.34	99.97	99.41	99.91
100 µg/ml	99.15	96.63	98.08	97.95
120 µg/ml	97.68	99.01	99.41	98.70

本発明に従って調製したリボソームの相転移温度を決定した。Q100 (TA Instruments, Inc. New Castle DE) を用い、空の密封アルミパンを参照用として示差走査熱量 (DSC) 測定を行った。脂質濃度を 20 mg/ml とし、10 µl のリボソーム懸濁液を注意深く密封アルミパン内に入れ密封した。走査速度を 2 / 分に設定した。図 1 は、本発明のリボソームで得られた DSC トレースを示す。DSC スペクトルは、タキソテール温度感受性リボソーム相転移温度が約 42 であることを示す。

【0058】

上記方法により調製したリボソームの安定性を、保存中に定期的に粒度を測定して評価した。下記表の結果は、上記のように調製したリボソームは少なくとも 3 ヶ月間安定であることを示す。

【0059】

【表 3】

時期	凍結乾燥前	凍結乾燥後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
粒度	97nm	101nm	107nm	106nm	106nm

薬物含有量についても監視した。その結果、凍結乾燥後、リボソームは 2 ~ 8 で、少なくとも 3 ヶ月間安定であることが分かった。

【0060】

リボソームの薬物含有量

【0061】

【表 4】

時期	凍結乾燥後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
タキソテール (mg/ml)	1.132	1.131	1.132	1.130

薬物封入率についても同様に監視した。その結果、凍結乾燥後、リボソームによって封入された薬物の量は 2 ~ 8 で、少なくとも 3 ヶ月間安定であることが分かった。

【0062】

薬物封入

【0063】

【表 5】

時期	凍結乾燥後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
封入%	99.0	98.6	98.1	98.3

異なる凍結防止剤に対して、凍結乾燥時の粒度に対するそれらの影響についてテストした。ラクトース、トレハロース、スクロースおよびマンニトールをテストした。その結果、ラクトースおよびスクロースは、マンニトールおよびトレハロースよりも効果的であることが分かった。図 2 は、凍結乾燥した溶液中に存在する凍結防止剤の重量%の関数としての粒度のグラフを示す。

【0064】

凍結乾燥のためにリボソームを凍結させる速度およびリボソームの含水量は粒度に影響を与える。図 3 は、3つの異なる凍結速度におけるリボソームの含水量の関数としての粒度のグラフを示す。粒度に影響を与える。

【0065】

再水和媒体もまたリボソーム粒度に影響を及ぼす。水、5%ブドウ糖液(D5W)および0.9%NaClをテストした。0.9%NaClおよび5%ブドウ糖液はリボソーム粒度を維持した。下記表は、3回の独立した測定における2つの異なるリボソーム形成の結果を示す。リボソームの平均直径はナノメートル(nm)で示す。処方F4-1は、以下の成分：DPPC：DSPG：DSPE-PEG：MSPC：ドセタキセルを以下の重量%：71.56：8.15：8.24：8.02：4.00で有し、F4-2は同じ成分を71.78：8.06：8.10：8.07：3.98重量%で有した。

【0066】

【表 6】

再水和媒体	処方	1 (nm)	2 (nm)	3 (nm)
水	F4-1	136	133	139
	F4-2	132	128	141
D5W	F4-1	97	101	103
	F4-2	102	104	105
0.9% NaCl	F4-1	101	105	102
	F4-2	106	103	101

再水和後のリボソームの安定性を調べた。凍結乾燥したリボソームを0.9%NaClで再水和し、図4Aに概略的に示すようにテストした。粒度分布を動的光散乱装置で1時間かけて繰り返し走査して監視した。その結果、再水和したリボソームの粒子分布は1時間安定であることが分かった(図4B)。

【0067】

凍結乾燥したリボソームを各種の温度で9ヶ月間保存した。リボソームの封入%を0、1、3、6および9ヶ月目にテストし、平均粒度を調べた。下記表内の結果は、リボソームが最大9ヶ月間、4で安定であったことを示す。

【0068】

【表 7】

保存期間(月)	保存温度 -20°C	保存温度 4°C	保存温度 20°C
0	92.1%(98nm)	92.1%(98nm)	92.1%(98nm)
1	91.8%(101nm)	91.5%(103nm)	91.7%(107nm)
2	91.6%(102nm)	91.4%(105nm)	91.1%(106nm)
3	91.5%(105nm)	91.2%(106nm)	90.8%(109nm)
6	91.4%(108nm)	91.3%(107nm)	90.9%(111nm)
9	90.8%(112nm)	90.5%(110nm)	90.2%(116nm)

(実施例 2)

本発明のリポソームを用いて得られた *in vivo* 薬物分布と遊離ドセタキセルを用いて得られた *in vivo* 薬物分布を比較した。

【0069】

6匹の雌BALB/cマウス(20±2g)を無作為に3つの群に分けた。それらのマウスを麻酔にかけ、穴を開けた発泡スチロール板に載せた。マウスの一方の脚を穴に通し、板の反対側に引っ張り出した。その板を水槽内に浮かべ、43.5±0.5で15分間脚を加熱した。次いで、マウスに対して1用量10mg/kgのリポソームまたは同用量のタキソテル(対照：製造者の仕様書に従って調製)を尾静脈注射した。次いで、各マウスの上記一方の脚を注射後30分間加熱した後、殺処分した。加熱した脚および非加熱の脚の筋肉を切除した。上記の抽出法を用いて固定重量の筋肉組織から薬物を抽出した。抽出した薬物をHPLCにより分析した。その結果を下記表に示す。

【0070】

【表 8】

	ドセタキセル リポソーム		ドセタキセル	
	A _{薬物} /A _{参照} % (加熱した脚)	A _{薬物} /A _{参照} % (非加熱の脚)	A _{薬物} /A _{参照} % (加熱した脚)	A _{薬物} /A _{参照} % (非加熱の脚)
群1	13.3	4.9	5.46	5.48
群2	14.3	5.60	6.53	6.29
群3	11.1	5.69	5.48	5.32

このデータは、感温性リポソームによって、加熱した脚に対して非加熱の脚の2倍以上のドセタキセルが送達されたことを示す。

【0071】

(実施例 3)

本発明のリポソームを用いて得られた *in vivo* 薬物分布と非温度感受性ドセタキセル含有リポソームを用いて得られた *in vivo* 薬物分布を比較した。

【0072】

温度感受性リポソームおよび非温度感受性リポソームは、下記表に示す処方に従って作製した。

【0073】

【表 9】

組成	ドセタキセル	DPPC	DSPG	PEG-DSPE	MSPC
温度感受性	25mg	450mg	50mg	50mg	50mg
非温度感受性	25mg	450mg	50mg	50mg	0

6匹の雌BALB/cマウス(20±2g)を無作為に3つの群に分けた。それらのマウスを麻酔にかけ、穴を開けた発泡スチロール板に載せた。マウスの一方の脚を穴に通し

、板の反対側に引っ張り出した。その板を水槽内に浮かべ、 43.5 ± 0.5 で15分間脚を加熱した。次いで、マウスに対して1用量 10 mg/kg のリボソームまたは同用量のタキソテル（対照：製造者の仕様書に従って調製）を尾静脈注射した。次いで、各マウスの上記一方の脚を注射後30分間加熱した後、殺処分した。加熱した脚および非加熱の脚の筋肉を切除した。上記の抽出法を用いて固定重量の筋肉組織から薬物を抽出した。抽出した薬物をHPLCにより分析した。その結果を下記表に示す。

【0074】

【表10】

群	温度感受性リボソーム		非温度感受性リボソーム	
	加熱	非加熱	加熱	非加熱
A _{薬物} /A _{参照} %	0.704	0.428	0.443	0.444

温度感受性リボソーム群では、加熱組織中の薬物濃度は非加熱組織よりも約2倍高い。ドセタキセル注射（実施例2）および非温度感受性リボソーム群では、加熱組織および非加熱組織の薬物濃度は同じであった。これらの結果により、上記実験条件下で温度感受性リボソームが薬物を組織内に放出したことが分かった。

【0075】

（実施例4）

ルイス肺腫瘍を持つマウスにおいて、本発明のリボソームを用いたドセタキセル送達のin vivo有効性と遊離ドセタキセルのin vivo有効性を比較した。

【0076】

7～9週齢で体重が $20 \pm 2 \text{ g}$ の12匹の雌昆明マウスを用いた。ルイス肺癌細胞（ 0.1 ml のPBS中に 3×10^6 個の細胞）を各マウスの右下肢に皮下移植した。処置開始前に腫瘍を直径4～6mmに成長させた。

【0077】

上記12匹のマウスを腫瘍容積により階層化し、3つの処置群：生理食塩水、遊離ドセタキセルおよび本発明の温度感受性リボソームに無作為に分けた。

【0078】

【表11】

群	動物/群	処置	用量 (mg/m^2)	加熱時間 (分)
1	2	生理食塩水	0	30
2	4	ドセタキセル注射	75	30
3	6	ドセタキセル 温度感受性リボソーム	75	30

本発明のドセタキセル含有温度感受性リボソームを上記の通り調製し、使用するまで2～8で保存した。処置動物に 75 mg/m^2 のドセタキセルを本発明の温度感受性リボソームに含めるかまたは製造者の仕様書に従って調製した非リボソームタキソテルとして注射した。

【0079】

腫瘍移植後8日目に処置を開始し、12日目および16日目に処置を繰り返した。ペントバルビタール（ 80 mg/kg ）のIP注射により全ての処置群のマウスを麻酔にかけ、容量 0.2 ml で尾静脈注射により処置を施した。この麻酔投与により、1時間の処置期間の間、適切な固定を提供した。

【0080】

生理食塩水群を除く全ての処置群に1用量 75 mg/m^2 のドセタキセルが同等に与えられた。注射直後、分離した脚の腫瘍を水槽内に30分間入れることができるように特別に設計した保持器にマウスを配置した。水槽温度は 43 に設定した。この水槽温度は腫瘍温度を 42 にするように予め較正されている。18日目に全てのマウスを殺処分した。

。腫瘍を外科的に切除し、腫瘍重量を記録した。腫瘍増殖抑制を以下のように計算した。

【 0 0 8 1 】

$$\text{腫瘍抑制率} = (V_s - V_x) / V_s$$

ここで、 V_s は生理食塩水群の腫瘍容積であり、 V_x は処置群の腫瘍容積である。

【 0 0 8 2 】

結果を下記表に示す。

【 0 0 8 3 】

【表 1 2】

群	マウス番号	腫瘍重量	平均	抑制%
生理食塩水	1	5.874	4.537	0
	2	3.199		
ドセタキセル注射	3	0.500	1.002	77.91
	4	0.118		
	5	1.380		
	6	2.010		
ドセタキセル 温度感受性リポソーム	7	0.031	0.0785	98.27
	8	0.009		
	9	0.078		
	10	0.152		
	11	0.151		
	12	0.050		

温度感受性リポソーム製剤中のドセタキセルの送達および腫瘍の局部加熱の結果、ドセタキセルを単独で送達した場合よりも腫瘍が抑制された。温度感受性リポソームで処置した 2 匹のマウスでは、腫瘍はほぼ消失した。

【 0 0 8 4 】

(実施例 5)

カルボプラチンを含む温度感受性リポソームの調製

当業者に公知の任意の技術を用いてリポソームを調製してもよい。1つの適切な技術は以下の通りである。

【 0 0 8 5 】

下記表に示す脂質を用いてリポソームを作製した。

【 0 0 8 6 】

【表 1 3】

脂質	重量 (mg)
DPPC	2000
MSPC	150
DSPG	250
DSPE-mPEG	250

脂質を 3 ml のクロロホルム中に溶解する。クロロホルムを 60 で減圧しながら回転蒸発させて薄膜を形成する。40 分間継続して加熱し、有機溶媒を取り除く。25 ml の水を加え、乾燥させた脂質膜を 60 で 10 分間かけて水和させる。室温で減圧して 10 分間かけて気泡を取り除く。さらに 10 分間 60 で加熱する。脂質懸濁液を 200 nm の膜を介して 10 回押し出す。100 nm の膜を介して 4 回押し出す。このようにして調製したリポソームを 4 で保存するようにしてもよい。

【 0 0 8 7 】

次いで、当業者に公知の任意の適切な技術を用いて、リポソームに活性薬剤、例えば、カルボプラチンを充填する。1つの適切な技術は以下の通りである。

【 0 0 8 8 】

800 mg のカルボプラチンおよび1000 mg のラクトースを20 ml の空のリボソームに対して106 mg リボソーム / ml で加える。その混合物を水槽内で60 で加熱し、300 r / 分で30分間攪拌する。充填したリボソームを4 で保存するようにしてもよい。

【0089】

当該分野で公知の任意の技術、例えば、サイズ排除クロマトグラフィまたは透析を用いて、充填したリボソームから余分な薬物を取り除いてもよい。1つの適切な技術以下の通りである。

【0090】

充填したリボソーム溶液を透析袋（分子カットオフ：8000～14000）に入れてもよい。このリボソーム溶液を、200 ml の5%ラクトース溶液を用いて4 で2時間透析してもよい。透析溶液を新鮮な200 ml の5%ラクトース溶液と取り換え、さらに2時間、4 で透析を行う。充填したリボソームを透析袋から取り出して、4 で保存してもよい。充填したリボソームは、光に曝さないように保護する必要がある。

【0091】

（実施例6）

カルボプラチン含有リボソームの物理的特徴づけ

薬物充填リボソームを遊離薬物から分離した後、そのリボソームは、下記表に見られるように、0.04の薬物 / 脂質比を有し、95 nm の平均粒度を有する（図5および図6）。脂質濃度は106 mg / ml である。

【0092】

【表14】

リボソーム粒度	全薬物	遊離薬物	封入%	薬物/脂質
100 nm	4.63 mg/ml	0.0 mg/ml	100 %	0.04

カルボプラチンリボソームは医療用途においては希釈する必要があるため、本発明のカルボプラチン含有リボソームの安定性は、5%グルコース溶液および水を希釈剤として用いてテストした。これらの希釈剤におけるリボソーム安定性は、リボソーム10 μ l を希釈剤990 μ l により室温で6時間かけて希釈してテストした。希釈後の薬物漏れを希釈前後の薬物封入を比較して分析した。下記表は、得られた結果を示す。このデータは、カルボプラチンリボソームが水または5%グルコースと適合性であることを示した。

【0093】

【表15】

希釈剤	薬物漏れ	平均
5%グルコース	0.23%	0.19%
	0.23%	
	0.12%	
水	-0.35%	-0.08%
	0.00%	
	0.12%	

（実施例7）

カルボプラチン含有リボソームの薬物放出プロファイルの特徴づけ

カルボプラチン薬物放出プロファイルを37 および42 で分析した。詳細な方法は以下の通りである。

【0094】

水槽をそれぞれ38 および43 に平衡化した（テスト試料温度は水槽よりも1度低い）。リボソームの1.0 ml アリコートに9.0 ml の5%グルコース溶液に希釈した

。その希釈液 5 ml を 38 の水槽内で加熱した。希釈液の残りの 5 ml を 43 の水槽内で加熱した。加熱開始後の各時点で、各温度の 200 μ l 試料を採取した。試料は、42 の試料については 0、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64 および 128 分に採取し、37 の試料については 0、2、8、32 および 128 分に採取した。これらの試料を採取直後に氷水で冷却した。

【0095】

これらの試料を全薬物および遊離薬物濃度について分析した。放出された薬物を下記式により計算した。

【0096】

薬物放出 = $C_{\text{遊離}} / C_{\text{全}} \times 100\%$

下記表および図 7 は得られた結果を示す。

【0097】

【表 16】

時間 (分)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
42°C (%)	0.9	18.5	69.3	83.2	95.3	95.3	95.3	95.8	97.0	99.5	99.0
37°C (%)	0.9				0.8		0.9		1.0		1.9

これらのデータは、本発明のリボソームが加熱後に薬物を迅速に放出することを示す。

【0098】

本発明のリボソームの薬物放出プロファイルをさらに特徴づけるために、カルボプラチン含有リボソームの薬物放出についても 37 ~ 43 までの各種温度で 5 分および 10 分間加熱してテストした。下記表および図 8 は、放出された薬物のパーセンテージを示す。37 では、薬物の放出はほとんどないが、40 で開始すると、迅速に薬物が放出される。

【0099】

【表 17】

温度(°C)	37	38	39	40	41	42	43
5分	0.9%	2.6%	5.6%	17.4%	78.5%	98.2%	95.4%
10分	0.9%	4.6%	21.8%	48.7%	85.5%	96.6%	95.8%

(実施例 8)

カルボプラチン含有リボソームの安定性の特徴づけ

異なる温度での保存時の薬物漏れを評価した。

【0100】

リボソームを -20、4 および 25 で 5 日または 10 日間保存した。薬物の封入 % を分析した。下記表に示す結果は、本発明のリボソームが 4 で 10 日間安定することを示す。

【0101】

【表 18】

温度	4°C		25°C	
時間(日)	5	10	5	10
漏れ	0.01%	0.01%	1.55%	2.52%

本発明のリボソームがろ過により滅菌可能かどうかを決定するために、それらのろ過に対する安定性を分析した。リボソームの 2 ml アリコートに 0.22 μ m フィルタでろ過した。ろ過前後の封入された薬物のパーセンテージを分析した。下記表のデータは、リボソームが少容量でろ過可能であることを示す。

【 0 1 0 2 】

【表 1 9】

	ろ過前	ろ過後
漏れ (%)	0 %	0.62 %

リポソームの長期安定性をリポソームを4 で保存して評価した。薬物漏れを0、1および2ヶ月で評価した。下記表に示すように、本発明のリポソームは4 で少なくとも6ヶ月間安定である。

【 0 1 0 3 】

【表 2 0】

時間(月)	薬物含有量	漏れ	粒度
0	4.63mg/mL	0.00%	99.79nm
1	4.60mg/mL	0.03%	106.01nm
2	4.62mg/mL	0.09%	99.24nm
3	4.59mg/mL	0.14%	101.78nm
6	4.60mg/mL	0.24%	100.09nm

本明細書において言及した全ての文献、特許および特許出願は、本発明に関連する当業者の水準を示すものであり、本明細書においては、各個別の文献、特許または特許出願が参考として援用されるものとして具体的かつ個別に示された場合と同じ範囲を参考として援用する。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つのホスファチジルコリン、少なくとも1つのホスファチジルグリセロール、少なくとも1つのリゾ脂質および活性薬剤を含む温度感受性リポソームであって、該リポソームは約39.0 ~ 約45 のゲル-液相転移温度を有する、温度感受性リポソーム。

【請求項 2】

前記ホスファチジルコリンはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)であり、前記ホスファチジルグリセロールはジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)であり、前記リゾ脂質はモノステアロイルホスファチジルコリン(MSPC)である、請求項1に記載の温度感受性リポソーム。

【請求項 3】

PEG化リン脂質をさらに含む、請求項1または2に記載の温度感受性リポソーム。

【請求項 4】

前記PEG化脂質はPEG-2000修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)である、請求項3に記載の温度感受性リポソーム。

【請求項 5】

DPPC : DSPG : MSPC : DSPE-PEG2000 : 活性薬剤を重量基準で60 ~ 80 : 6 ~ 12 : 6 ~ 12 : 4 ~ 15 : 1 ~ 30の比率で含む、請求項4に記載の温度感受性リポソーム。

【請求項 6】

前記活性薬剤は抗癌剤である、請求項1 ~ 5のいずれか一項に記載の温度感受性リポソーム。

【請求項 7】

前記抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体もしくはその断片、光増感剤、キナーゼ阻害剤、抗腫瘍酵素および酵素の阻害剤、アポトーシス誘導物質、生物的反応修飾物質、抗ホルモン、レチノイド、ヌクレオシド類似体ならびに白金含有化合物からなる群から選択される、請求項 6 に記載の温度感受性リボソーム。

【請求項 8】

前記抗癌剤は、ドセタキセルまたはパクリタキセルのようなタキサンである、請求項 7 に記載の温度感受性リボソーム。

【請求項 9】

前記抗癌剤は、カルボプラチンまたはシスプラチンのような白金含有化合物である、請求項 7 に記載の温度感受性リボソーム。

【請求項 10】

前記抗癌剤は、ゲムシタピンのようなヌクレオシド類似体である、請求項 7 に記載の温度感受性リボソーム。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の温度感受性リボソームを含む医薬組成物。

【請求項 12】

前記活性薬剤はドセタキセルであり、前記組成物が、2 ～ 8 で 1 ヶ月～9 ヶ月保存された場合に、前記リボソームの粒度および該リボソーム内に保持されたドセタキセルの量の両方は、実質的に安定なままである、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記活性薬剤はカルボプラチンであり、前記組成物が、4 で 1 ヶ月～6 ヶ月保存された場合に、前記リボソーム内に保持されたカルボプラチンの量は、実質的に安定なままである、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記活性薬剤はカルボプラチンであり、前記リボソームが、42 で 1 分～128 分加熱された場合に、該リボソームから該カルボプラチンの少なくとも 83.2 % が放出される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

処置を必要とする被験体の疾患を処置するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の温度感受性リボソームを含み、該疾患を処置するための該医薬組成物は、該疾患の全てまたは一部を含む該被験体の領域への熱の適用と組み合わせて投与されることを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 16】

前記疾患は癌であり、前記活性薬剤は抗癌剤である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

抗癌剤含有温度感受性リボソームの製剤を形成するための方法であって、該方法は：
DPPC、DSPG、MSPC、DSPE-PEG2000 および抗癌剤を有機溶媒に溶解させて、脂質溶液を形成させる工程；
該脂質溶液から該有機溶媒を除去して、乾燥させた材料を形成する工程；
該乾燥させた材料をPBSおよびラクトースの水溶液で水和する工程；
リボソームを含む分散物を形成して、分散物中の該リボソームの粒度を調整する工程；
ならびに
該リボソームの分散物を滅菌する工程、
を包含する、方法。

【請求項 18】

抗癌剤含有温度感受性リボソームの製剤を形成するための方法であって、該方法は：
有機溶媒にDPPC、DSPG、MSPCおよびDSPE-PEG2000を溶解させる

工程；

該有機溶媒を除去して、乾燥させた材料を形成する工程；

該乾燥させた材料を水溶液で水和して、水和した脂質材料を形成する工程；

該水和した脂質材料を押し出して、リボソームを含む分散物を形成する工程；

加熱および混合しながら、抗癌剤を該分散物に添加し、抗癌剤を充填したリボソームの分散物を形成する工程；ならびに

該抗癌剤を充填したリボソームに取り込まれなかった過剰な抗癌剤を除去する工程、を包含する、方法。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 に記載の方法によって形成された製品。

【誤訳訂正 3】

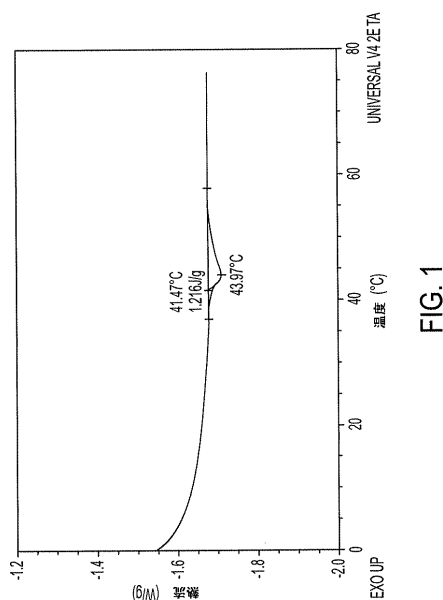
【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】全図

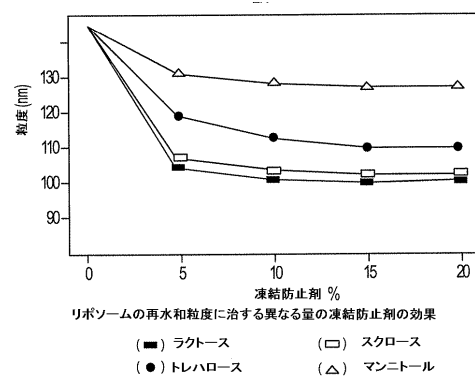
【訂正方法】変更

【訂正の内容】

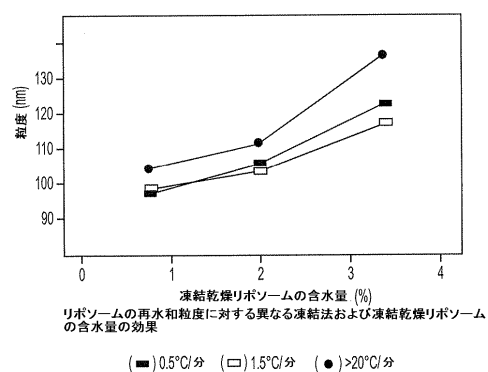
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4 A】

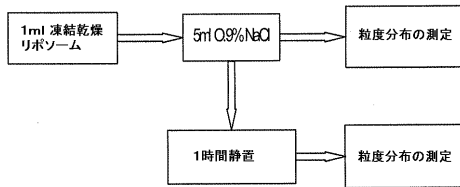


FIG. 4A

【図 4 B】

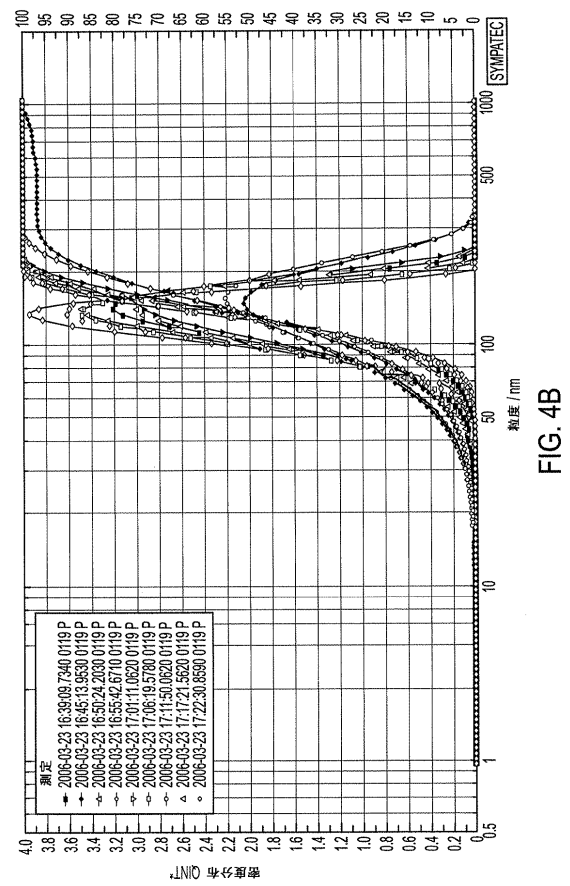


FIG. 4B

【図 5】

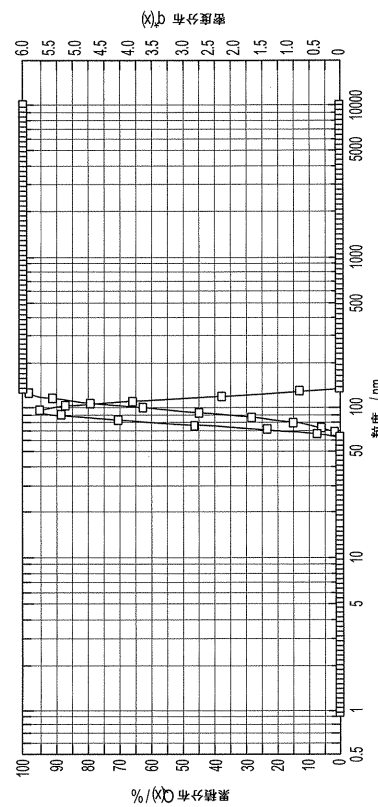


FIG. 5

【図 6】

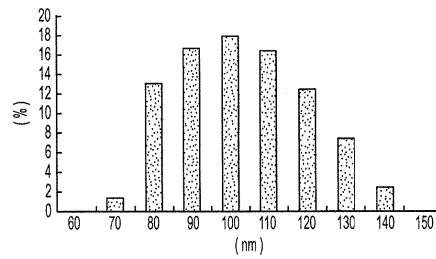


FIG. 6

【図 7】

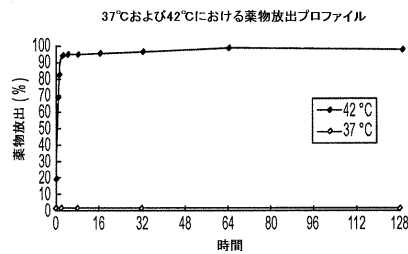


FIG. 7

【 図 8 】

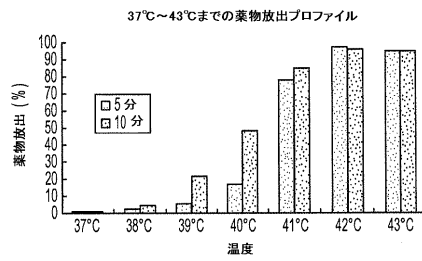


FIG. 8