

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-527335

(P2018-527335A)

(43) 公表日 平成30年9月20日 (2018.9.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/436 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/436	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	
<b>A 6 1 K 47/24 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/24	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)		

(21) 出願番号 特願2018-506339 (P2018-506339)  
 (86) (22) 出願日 平成27年9月21日 (2015.9.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月22日 (2018.3.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/051206  
 (87) 国際公開番号 W02017/044135  
 (87) 国際公開日 平成29年3月16日 (2017.3.16)  
 (31) 優先権主張番号 14/849,100  
 (32) 優先日 平成27年9月9日 (2015.9.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513055252  
 マンリ インターナショナル リミテッド  
 シンガポール 5 5 8 4 4 5 シンガポ  
 ル チュアン ウォーク 3 9  
 (74) 代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72) 発明者 ユー ティンービン  
 アメリカ合衆国 9 2 6 2 0 カリフォル  
 ニア アーバイン シティ ストロール  
 8 0  
 (72) 発明者 シー ジーウェイ  
 アメリカ合衆国 9 2 6 1 6 カリフォル  
 ニア アーバイン マヨルカ アベニュー  
 1 4 3 7 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療に対するラパマイシン及びラパマイシン誘導体の安定なリポソーム製剤

## (57) 【要約】

癌の治療に対する安定なリポソーム製剤。該製剤は、1以上のPOPC、DMPC及びDOPCを含有するリポソームと、リポソームに封入された1以上の抗癌薬であるシロリムス、ウミロリムス及びエベロリムスとを含む。また、抗癌薬でリポソームを充填するための効率的なリモートフィルムローディング法、及びリポソーム製剤で癌を治療する方法が提供される。

【選択図】 図 1

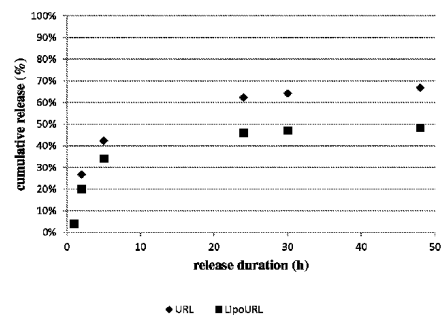


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

癌を治療するための安定なりボソーム製剤であって、該安定な製剤が、  
パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、ジミリストイルホスファチ  
ジルコリン（DMPG）及びジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）からなる群  
から選択されるホスファチジルコリン又はそれらの混合物で形成された少なくとも1つの  
脂質二重層を含有するリボソームと、  
該リボソームに封入された薬物と、  
を含み、  
前記薬物がシロリムス、ウミロリムス又はエベロリムスであり、  
前記リボソームは、直径が50nm～2μmであり、コレステロールを含まない、製剤。

10

## 【請求項 2】

前記薬物と前記ホスファチジルコリンとの重量比が1：5～1：100である、請求項  
1に記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 3】

0.01mg/mL～10mg/mLの前記薬物を含有する、請求項2に記載の安定な  
リボソーム製剤。

## 【請求項 4】

6～8のpHを有する、請求項3に記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 5】

前記少なくとも1つの脂質二重層がポリエチレングリコール（PEG）部分に複合化さ  
れたリン脂質を更に含む、請求項1に記載の安定なりボソーム製剤。

20

## 【請求項 6】

前記リン脂質がジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）であり、  
前記PEG部分が150g/mol～3000g/molの分子量を有する、請求項5に  
記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 7】

前記薬物と前記ホスファチジルコリンとの重量比が1：5～1：100である、請求項  
6に記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 8】

0.01mg/mL～10mg/mLの前記薬物を含有する、請求項7に記載の安定な  
リボソーム製剤。

30

## 【請求項 9】

6～8のpHを有する、請求項8に記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 10】

前記ホスファチジルコリンがPOPCであり、前記薬物がウミロリムスであり、該ウミ  
ロリムスと該ホスファチジルコリンとの重量比が1：20であり、前記製剤が1mg/mL  
の該ウミロリムスを含有する、請求項9に記載の安定なりボソーム製剤。

## 【請求項 11】

リボソームに疎水性薬物を充填する方法であって、該方法が、  
少なくとも1つの脂質二重層を有するコレステロール不含リボソームを得ることと、  
前記少なくとも1つの脂質二重層をわたって実質的に膜電位差が存在しないように、前記  
コレステロール不含リボソームを水溶液に添加して懸濁液を形成することと、  
溶解度向上剤の不在下で疎水性薬物を前記懸濁液に添加して混合物を形成することと、  
前記混合物を室温で4時間～48時間撹拌することと、  
を含み、  
それによって、前記コレステロール不含リボソームに前記添加された疎水性薬物の少なく  
とも80%を充填する、方法。

40

## 【請求項 12】

前記疎水性薬物がシロリムス、ウミロリムス、又はエベロリムスである、請求項11に

50

記載の方法。

【請求項 13】

前記コレステロール不含リボソームが、直径が80nm～2μmであり、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）の1以上を含有する多重層ベシクル（MLV）を形成すること、及び該MLVを押し出し、それによって、直径50nm～2μmのコレステロール不含リボソームを得ることによって得られる、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記MLVが、ポリエチレングリコール複合化ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE-PEG）を更に含有する、請求項13に記載の方法。

10

【請求項 15】

コレステロール不含リボソームに封入された疎水性薬物を作製する方法であって、该方法が、

パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、及びジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）の1以上を水性バッファーに懸濁して脂質懸濁液を形成することと、

前記脂質懸濁液を室温で少なくとも30分間攪拌して多重層ベシクル（MLV）を形成することと、

前記MLVを押し出して50nm～2μmの直径を有する大単層ベシクル（LUV）を形成することと、

20

前記LUVをわたって実質的に膜電位差が存在しないように、該LUVを水溶液に添加して懸濁液を形成することと、

溶解度向上剤の不在下で疎水性薬物を前記懸濁液に添加して混合物を形成することと、

前記混合物を室温で4時間～48時間攪拌して薬物充填リボソーム懸濁液を形成することと、

前記薬物充填リボソーム懸濁液を濾過して、封入されていない疎水性薬物を除去することと、

を含み、

それによって、前記コレステロール不含リボソームに前記添加された疎水性薬物の少なくとも80%を封入する、方法。

30

【請求項 16】

前記疎水性薬物がシロリムス、ウミロリムス、又はエベロリムスである、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

ポリエチレングリコール複合化ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE-PEG）もまた、前記懸濁工程において前記水性バッファー中に懸濁される、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

癌の治療に対する、請求項1～10のいずれか一項に記載の安定なリボソーム製剤の使用。

40

【請求項 19】

前記安定なリボソーム製剤が癌細胞の生育を阻害する、請求項18に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、抗癌薬の分野、特に、疎水性抗癌薬をリボソームに充填する方法、及び該リボソームによる癌の治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

シロリムスとしても知られるラパマイシンは、当初は臓器移植患者に対する免疫抑制剤としての使用に対して開発されたマクロライド抗生物質である。その後、ラパマイシンは、平滑筋細胞増殖を阻害することによって、血管形成術後の再狭窄を軽減するように機能する薬物コーティング剤として冠動脈ステントに使用された。

#### 【0003】

また、シロリムス及びこの薬物の誘導体は、或る特定の癌の治療にも有効であるとわかった。例えば、シロリムスは抗腫瘍活性を有する。特許文献1を参照されたい。シロリムスの40-O-(2-ヒドロキシエチル)誘導体であるエベロリムスは、進行した腎臓癌、進行したホルモン受容体陽性/HER2陰性乳癌、及び腓神経内分泌腫瘍の治療に対して認可されている。

10

#### 【0004】

ウミロリムス、すなわち40-アルコキシアルキル-ラパマイシン、及びウミロリムス充填ポリマーミセルは、いずれも*in vitro*で癌細胞の生育を阻害することができ、また、該ミセルが*in vivo*において実験的腫瘍の生育を遅らせるのに有効であることが実証された。特許文献2を参照されたい。ウミロリムスのポリマーミセル封入は、この薬物の溶解度及び安定性を著しく改善し、その持続した送達をもたらした。

#### 【0005】

シロリムス及びその誘導体の薬物送達を改善するため、ポリマーミセルの代わりにリボソームが採用されている。例えば、シロリムス、エベロリムス及びタクロリムスは、2つの受動的充填方法、すなわち薄膜水和及びエタノール注入を使用して、リボソームに封入されている。しかしながら、これらの薬物の低い溶解度及び疎水性により、封入された薬物の量及び薬物封入効率は特に低く、すなわちそれぞれ0.5mg/mL未満、及び90%未満である。また、受動的充填技術では、リボソームからの薬物漏出も起こる。

20

#### 【0006】

予め形成されたリボソームにシロリムスを捕捉するのに、薬物分解及び溶媒除去の工程を必要とするリモートフィルムローディング(remote film loading)技術が用いられている。この方法は、高い薬物封入効率をもたらすが、充填処置の間、薬物安定性に対して潜在的なリスクがある。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

30

#### 【0007】

【特許文献1】米国特許第4,885,171号

【特許文献2】米国特許出願公開第2014/0154305号

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

したがって、薬物含有量、脂質に対する薬物の比率、及び薬物封入効率を改善するための疎水性薬物に対する新たなリボソーム充填方法の開発が必要とされている。かかる方法によって、特にウミロリムス及び他のラパマイシン誘導体に対して、既存のリボソームと比較してより高い治療指数を有する薬物充填リボソーム(drug-loaded liposomes)が形成されるはずである。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

この要求を満たすため、癌の治療に対する安定なリボソーム製剤が提供される。該安定な製剤は、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、及びジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)から選択される1以上のホスファチジルコリンで形成される少なくとも1つの脂質二重層を含有するリボソームを含む。該リボソームは直径50nm~2μmであり、コレステロールを含まない。リボソームに封入されるのは、シロリムス、ウミロリムス、及びエベロリムスから選択される抗癌薬である。

50

## 【0010】

また、リポソームに疎水性薬物を充填する方法が提供される。該方法は、(i)少なくとも1つの脂質二重層を有するコレステロール不含リポソームを得る工程と、(ii)脂質二重層を越えて実質的に膜電位差が存在しないように、コレステロール不含リポソームを水溶液に添加して懸濁液を形成する工程と、(iii)溶解度向上剤(solubility enhancer)の不在下で疎水性薬物を該懸濁液に添加して混合物を形成する工程と、(iv)該混合物を室温で4時間～48時間攪拌する工程とを含む。該方法は、リポソームへの疎水性薬物の少なくとも80%の充填をもたらす。或る実施の形態では、該方法はこの段落で述べられた工程からなる。

## 【0011】

さらに、コレステロール不含リポソームに封入された疎水性薬物を作製する方法を開示する。該方法は、(i)POPC、DMPC及びDOPCの1以上を水性バッファーに懸濁して脂質懸濁液を形成すること、(ii)該脂質懸濁液を室温で少なくとも30分間攪拌して多重層ベシクル(MLV: multilamellar vesicles)を形成すること、(iii)該MLVを押し出して直径50nm～2μmの大単層ベシクル(LUV: large unilamellar vesicle)を形成すること、(iv)LUVを越えて実質的に膜電位差が存在しないように、該LUVを水溶液に添加して懸濁液を形成すること、(v)溶解度向上剤の不在下で疎水性薬物を該懸濁液に添加して混合物を形成すること、(vi)該混合物を室温で4時間～48時間攪拌して薬物充填リポソーム懸濁液を形成すること、及び(vii)該薬物充填リポソーム懸濁液を濾過して封入されていない疎水性薬物を除去することによって行われる。該方法は、添加された疎水性薬物の少なくとも80%の封入を可能とする。別の実施の形態では、該方法はこの段落に述べられた工程からなる。

## 【0012】

また、癌を治療する方法が開示される。該方法は、有効量の上に記載される安定なりポソーム製剤を、それを必要とする被験体に投与する工程を必要とする。該有効量は被験体の癌細胞の生育を阻害するのに十分である。

## 【0013】

本発明の1以上の実施形態の詳細が明細書、図面及び下記の実施例に記載されている。本発明の他の特徴、目的及び利点は、詳細な説明、図面、及び更には特許請求の範囲から明らかとなる。本明細書で言及される全ての刊行物及び特許文献はその全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

## 【0014】

以下に記載される発明は、添付の図面を参照する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0015】

【図1】ウミロリムス(URL)及びリポソームウミロリムス(LipoURL)のin vitro薬物放出プロファイルのプロットである。

【図2】エベロリムス(ERL)及びリポソームエベロリムス(LipoERL)のin vitro薬物放出プロファイルのプロットである。

【図3】シロリムス(SRL)及びリポソームシロリムス(LipoSRL)のin vitro薬物放出プロファイルのプロットである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

上に言及されるように、癌の治療に関する安定なりポソーム製剤を開示する。上記製剤においてリポソームは、POPC、DMPC及びDOPCから選択されるホスファチジルコリン、又はこれら3つのホスファチジルコリンの混合物で形成された少なくとも1つの脂質二重層を含有し、コレステロールを含まない。特定の態様では、上記リポソームは1つの脂質二重層を含む。別の態様では、上記リポソームはPOPC、DMPC、又はDOPCのみを含有する。好ましい実施形態では、上記リポソームはPOPCのみを含有する。

## 【0017】

代替的には、リボソームの脂質二重層は、ポリエチレングリコール（PEG）部分に複合化されたリン脂質と共に、ホスファチジルコリンを含む。PEG複合化リン脂質は、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [ アミノ（PEG） ]（DSPE - PEG）；1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [ メトキシ（PEG） ]（DOPE - PEG）；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [ メトキシ（PEG） ]（DPPPE - PEG）；1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [ メトキシ（PEG） ]（DMPE - PEG）；又はそれらの混合物であってもよい。特定の実施形態では、PEG複合化リン脂質はDSPE - PEGである。

10

## 【0018】

リボソームがホスファチジルコリンとPEG複合化リン脂質との両方を含む場合、それらの間の重量比は5 : 1 ~ 100 : 1、例えば5 : 1、7.5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1及び100 : 1であってもよい。好ましい比率は10 : 1である。

## 【0019】

リン脂質に複合化されるPEG部分の分子量は、150 g/mol ~ 3000 g/mol、例えば150 g/mol、200 g/mol、250 g/mol、300 g/mol、350 g/mol、500 g/mol、750 g/mol、1000 g/mol、1250 g/mol、1500 g/mol、1750 g/mol、2000 g/mol、2250 g/mol、2500 g/mol、2750 g/mol、3000 g/molであってもよい。好ましい実施形態では、PEG部分の分子量は2000 g/molである。

20

## 【0020】

リボソームは、50 nm ~ 2 μm（例えば50 nm、100 nm、150 nm、200 nm、250 nm、500 nm、1 μm、1.5 μm及び2 μm）の直径を有してもよい。或る実施形態では、リボソームは50 nm ~ 500 nmの直径を有する。好ましい実施形態では、直径は100 nmである。

## 【0021】

安定なリボソーム製剤中のリボソームは、癌の治療に対する疎水性薬物を封入する。疎水性薬物は、抗増殖薬、例えばシロリムス、ウミロリムス、又はエベロリムスであってもよい。特定の実施形態では、疎水性薬物はウミロリムスである。

30

## 【0022】

リボソーム中の疎水性薬物とホスファチジルコリン成分との重量比は、1 : 5 ~ 1 : 100（例えば1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 75及び1 : 100）であってもよい。或る実施形態では、ホスファチジルコリンに対する薬物の重量比は1 : 10である。別の特定の実施形態では、重量比は1 : 20である。

## 【0023】

安定なリボソーム製剤中の疎水性薬物の濃度は、0.01 mg/mL ~ 10 mg/mLであってもよい。例えば、上記製剤中の薬物濃度は、0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL、5.0 mg/mL及び10 mg/mLであってもよい。特定の実施形態では、薬物濃度は1 mg/mLである。

40

## 【0024】

さらに、安定なリボソーム製剤は6.0 ~ 8.0のpHを有してもよい。好ましい実施形態では、pHは7.4である。

## 【0025】

特定の態様では、癌の治療に対する安定なリボソーム製剤は、POPC及びDSPE - PEG 2000のみで形成されたリボソームを含み、該リボソームにはウミロリムスが封入されている。リボソームはコレステロールを含まず、約100 nmの直径を有し、ウミ

50

ロリムスとPOPCとの重量比は1:20である。この特定の製剤は、1mg/mLのウミロリムスを含み、pH7.4である。

【0026】

また、安定なリポソーム製剤は、溶液中で疎水性薬物の安定性を改善する。例えば、上記製剤中の疎水性薬物は、水性懸濁液中の薬物と比較して、5で保存した場合、7日間~14日間にわたって安定となり得る。ここでは、安定性は、製剤中の薬物の開始量の5%以下の喪失として定義される。

【0027】

有利には、投与後、長期にわたって上記製剤中のリポソームから疎水性薬物を放出することができる。すなわち、該製剤は持続放出製剤である。例えば、該製剤の投与後、最長3ヶ月、例えば7日間、14日間、21日間、並びに1ヶ月、2ヶ月、及び3ヶ月の期間に亘って継続して疎水性薬物をリポソームから放出することができる。

10

【0028】

上に言及されるように、リポソームに疎水性薬物を充填する方法が提供される。該方法は、最初にリポソームを得て、その後に疎水性薬物をリポソームに充填する、改善されたリモートフィルムローディング技術である。

【0029】

上記充填方法に使用されるリポソームは、コレステロールを含まず、POPC、DMPC及びDOPCの1以上を含有する少なくとも1つの脂質二重層を有し、50nm~2μmの直径を有する。或る実施形態では、リポソームはPOPCのみを含有する。

20

【0030】

代替的には、コレステロール不含リポソームは、POPC、DMPC及びDOPCの1以上を含有し、またDSPE-PEG、DOPE-PEG、DPPE-PEG及びDMPE-PEGから選択されるPEG複合化リン脂質を含有する少なくとも1つの脂質二重層を有する。

【0031】

リン脂質に複合化されるPEG部分の分子量は、150g/mol~3000g/mol、例えば150g/mol、200g/mol、250g/mol、300g/mol、350g/mol、500g/mol、750g/mol、1000g/mol、1250g/mol、1500g/mol、1750g/mol、2000g/mol、2250g/mol、2500g/mol、2750g/mol、3000g/molであってもよい。好ましい実施形態では、PEG部分の分子量は2000g/molである。

30

【0032】

特定の態様では、リポソームはPOPCのみを含有する。別の実施形態では、リポソームはPOPC及びDSPE-PEG2000のみを含有する。

【0033】

リポソームは、1以上のPOPC、DMPC、DOPC、及び任意にDSPE-PEG2000を含有するMLVを形成すること、及び該MLVを押し出して直径50nm~2μmのコレステロール不含リポソームを得ることによって得ることができる。より具体的には、1以上のPOPC、DMPC、DOPC及び任意にDSPE-PEG2000を水性バッファに懸濁して脂質懸濁液を形成し、該懸濁液を室温で少なくとも30分間攪拌してMLVを形成する。

40

【0034】

MLVを押し出しプロセスによって大単層ベシクル(LUV)に変換する。例えば、MLVを3回~20回、3層ポリカーボネートフィルタを通して押し出すことができる。好ましい押し出しプロセスでは、MLVを10回押し出す。

【0035】

ポリカーボネートフィルタは50nm~200nmの範囲の孔径を有してもよい。特定の実施形態では、孔径は100nmである。ここでも、得られるLUV、すなわちリポソームは50nm~2μmの直径を有してもよい。

50

## 【 0 0 3 6 】

その後、上に記載されるコレステロール不含リボソームを水溶液に添加して懸濁液を形成する。重要なことは、使用される水溶液は、リボソームの脂質二重層を越えて実質的に膜電位差が存在しないように、コレステロール不含リボソームを産生するために使用されるものと同じ溶液であるか、それに類似しなければならない。例えば、イオン勾配、pH勾配又は浸透勾配がリボソーム膜を越えて存在しないように、イオン強度、pH及びモル浸透圧濃度は厳密に一致させなければならない。これは、例えば、PBSを使用してコレステロール不含リボソームを形成し、またリボソームをPBS中に希釈して懸濁液を形成することにより保証され得る。

## 【 0 0 3 7 】

これに関連して「実質的に膜電位差が存在しない」の文言は、そのレベルを下回ると薬物がリボソームに積極的に充填されない膜電位差のレベルを意味する。例えば、Akbarzadeh et al., Nanoscale Research Letters 2013, 8:102を参照されたい。

10

## 【 0 0 3 8 】

疎水性薬物を水溶液中のリボソームの懸濁液に添加して混合物を形成する。疎水性薬物は、シロリムス、ウミロリムス、又はエベロリムスであってもよい。特定の方法では、薬物はウミロリムスである。この段階で充填方法は、水溶液中の疎水性薬物を可溶化するために溶解度向上剤、例えばシクロデキストリンの使用を必要としない。実際、これは必要ではないか、又は望ましくない。

## 【 0 0 3 9 】

理論に束縛されるものではないが、水溶液に懸濁されたりリボソームに添加されることから、疎水性薬物は、該薬物の疎水性の性質によりリボソームの脂質尾部と強く相互作用し、リボソームの脂質二重層内部での封入をもたらすと考えられる。

20

## 【 0 0 4 0 】

リボソームと疎水性薬物との混合物を室温で4時間～48時間攪拌し、コレステロール不含リボソームへの添加された疎水性薬物の少なくとも80%（例えば、80%、85%、90%、95%及び100%）の充填をもたらす。

## 【 0 0 4 1 】

また、上に記載される安定なりボソーム製剤を使用して癌を治療する方法も、本出願の範囲に含まれる。該方法は、シロリムス、ウミロリムス又はエベロリムスから選択される抗癌薬を含有する安定なりボソーム製剤を有効量、癌患者に投与することを必要とする。該有効量とは、患者において癌細胞の生育を阻害するものである。

30

## 【 0 0 4 2 】

当業者は、癌患者に投与されるべき安定なりボソーム製剤の有効量を容易に決定することができる。例えば、MRI又はCTスキャンによって腫瘍サイズを測定することにより経時的な薬物用量に対する反応を追跡することができる。

## 【 0 0 4 3 】

安定なりボソーム製剤を任意の従来の方法によって癌患者に投与することができ、任意の従来の方法としては、限定されないが、腹腔内注射、静脈内注射、腫瘍への直接注入、腫瘍上流の動脈循環への注入、及び鼻腔吸入が挙げられる。また、上に記載される安定なりボソーム製剤を経口投与用の丸剤又はカプセル剤に形成してもよい。

40

## 【 0 0 4 4 】

上記の安定なりボソーム製剤を投与することによって治療可能な癌の種類として、限定されないが、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎癌、成人軟部肉腫、肛門癌、再生不良性貧血、基底細胞及び扁平上皮細胞の癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳/CNS腫瘍、乳癌、男性における乳癌、小児癌、原発不明癌、キャスルマン病、子宮頸癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング腫瘍、眼の癌、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド、胃腸間質性腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カボジ肉腫、腎臓癌、喉頭及び下咽頭の癌、小児白血病、肝臓癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺カルチノイド腫瘍、悪性中皮腫、黒色腫皮膚

50



癌、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔及び口咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、腎細胞癌腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、皮膚リンパ腫、小腸癌、胃癌、精巣癌、胸腺の癌、甲状腺癌、子宮肉腫、陰癌、外陰癌、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、及びウィルムス腫瘍が挙げられる。

【0045】

更に精緻化することなく、当業者であれば、本明細書の開示に基づき、本発明を最大限利用できると考えられる。そのため下記の特定の実施例は単に説明するものであり、いかなる場合も本開示の他の記載を限定するものとしては解釈されない。

【実施例】

10

【0046】

実施例1：ウミロリムス充填リボソームの作製

種々のホスファチジルコリン、すなわちEGPC、POPC、DMPC、又はDOPCを各々含有する、4つの200mLのバッチのリボソームを作製した。簡潔には、6000mgの各ホスファチジルコリンを別々の500mL容の脱パイロジェンガラス瓶内の200mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に添加した。混合物を室温で少なくとも30分間攪拌して多重層ベシクル(MLV)を形成した。ベンチトップ押し出し成形機(カナダのNorthern Lipids Inc.)を使用して、3重(3-stack)ポリカーボネートフィルタ膜(孔径100nm)を通した押し出しによってMLVのサイズを減少した。10回の押し出し通過の後、約100nmの平均サイズを有する大単層ベシクル(LUV)が得られた。

20

【0047】

LUVにウミロリムスを充填するため、4本の50mL容の脱パイロジェンガラス瓶の各々に、1本の瓶当たり10mLの4つのLUV調合剤のうちの1つと共に、50mgの薬物を添加した。ガラス瓶に蓋をし、温度25℃の水浴に入れた。混合物を24時間攪拌した。封入されていないウミロリムスを除去するため、得られたウミロリムス充填リボソームの溶液を、0.2µmの孔径を有するポリフッ化ビニリデン(PVDF)シリンジフィルタを通して濾過した。

【0048】

充填後のリボソーム溶液のウミロリムス含有量を逆相HPLCによって特定した。50µLの各リボソーム溶液の試料と1.0mLのアセトニトリルとを混合することによってリボソームを破壊した。ウミロリムスの標準溶液をメタノール中0.05mg/mLで作製した。試料をHPLCによって分析し、標準溶液と比較し、リボソーム中のウミロリムスの量を定量した。

30

【0049】

Zetasizer Nano装置(英国のMalvern Instruments)を使用する動的光散乱(DLS)によってリボソームの強度平均径(intensity mean diameter)及び分布の多分散性指数(PDI)を特定した。検査した試料をそれぞれ0.9%塩化ナトリウム溶液中1:25に希釈した。次のパラメーター:粘度=1.0183cP、屈折率=1.332、温度=23℃により、少なくとも5分間のスキャンを使用して、172度の散乱角での粒子径測定を行った。ウミロリムス充填の前及び後にリボソームのサイズを測定し、記録した。薬物充填の結果を下記表1に要約する。

40

【0050】

【表 1】

表 1. リポソームへのウミロリムスの充填

脂質の種類	E g g P C	P O P C	D O P C	D M P C
薬物充填前のベシクルサイズ (nm)	98.0	96.6	97.6	88.6
薬物充填前のPDI	0.070	0.039	0.059	0.072
ウミロリムス含有量 (mg/mL)	1.71	2.76	2.72	2.98
薬物充填終了時のベシクルサイズ (nm)	102.0	99.0	99.0	91.8
薬物充填終了時のPDI	0.031	0.049	0.038	0.048
薬物：脂質の比率 (w/w)	1：17.5	1：10.9	1：11.0	1：10.1

10

## 【0051】

D M P C、P O P C 及び D O P C で形成されるリポソームに充填されたウミロリムスの量は、2.7 mg/mL を超えていた。予想外に、これら3つのリポソームに充填されたウミロリムスの量は E g g P C で形成されたりリポソームに充填したものより多かった。

20

## 【0052】

実施例 2：ポリエチレングリコール複合化リン脂質を含有するウミロリムス充填リポソームの作製

500 mL 容の脱ピロジェンガラス瓶内の 200 mL の P B S 中で 1800 mg の P O P C と 200 mg の D S P E - P E G - 2000 とを合わせることにより、ポリエチレングリコール複合化 (P E G 化) リン脂質を含有するリポソームを作製した。混合物を室温で少なくとも 30 分間攪拌して M L V を形成した。ベンチトップ押し出し成形機 (カナダの Northern Lipids Inc.) を使用して、3 重ポリカーボネートフィルタ膜 (孔径 100 nm) を通した押し出しによって M L V のサイズを減少した。10 回の押し出し通過の後、およそ 100 nm の平均サイズを有する P E G 化 L U V が得られた。

30

## 【0053】

P E G 化 L U V にウミロリムスを充填するため、50 mg の薬物を 50 mL の L U V と共に 500 mL 容の脱ピロジェンガラス瓶に添加した。ガラス瓶に蓋をし、温度 25 の水浴に入れた。混合物を最長 24 時間攪拌した。1 mL の試料を攪拌の開始から 1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後、5 時間後、6 時間後及び 24 時間後に収集して P E G 化リポソームへのウミロリムスの充填を評価した。封入されていないウミロリムスを除去するため、各試料を、0.2 μm の孔径を有するポリフッ化ビニリデン (P V D F) シリンジフィルタを通して濾過した。各試料のウミロリムス含有量を上記実施例 1 に記載されるように H P L C によって評価した。

40

## 【0054】

結果は、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、及び 24 時間の攪拌後に P E G 化リポソームに組み込まれたウミロリムスのパーセンテージが、充填に使用したウミロリムスの初期量基準で、それぞれ 59%、67%、77%、82%、87%、91%、及び 102% であったことを示した。上記充填方法を行うことは、予想外にも、24 時間以内の P E G 化リポソームへの本質的に全てのウミロリムスの充填をもたらした。

## 【0055】

ウミロリムス充填 P E G 化リポソーム製剤の安定性を 5 ± 3 での透明ガラスバイアル内での保存中に評価した。一定温度条件を保証するため継続的に試料温度をモニターし

50

、記録した。2週間、3週間、4週間、6週間、及び8週間の保存の後、上記実施例1に記載されるように、溶液をウミロリムス含有量、ベシクルサイズ、及びPDIについて分析した。安定性の結果を下記表2に示す。

【0056】

【表2】

表2. ウミロリムス充填PEG化リポソーム製剤の安定性

時間点	0週目 (薬物充填終了時)	2週間	3週間	4週間	6週間	8週間
ウミロリムス含有量 (mg/mL)	0.99	1.00	1.00	0.96	1.0	1.0
ベシクルサイズ (nm)	99.9	97.1	97.5	97.5	97.7	98.3
PDI	0.062	0.048	0.058	0.053	0.050	0.048

10

【0057】

結果は、5 で保存した場合、ウミロリムス充填PEG化リポソームの溶液は少なくとも8週間安定していることを示す。

【0058】

20

実施例3：ウミロリムス充填リポソーム製剤の薬物封入効率の測定

リポソーム溶液から遊離薬物を除去するためのゲル濾過技術を使用し、リポソームによってウミロリムスの封入効率を特性評価するためアッセイを開発した。以下の等式を使用して、PD-10架橋デキストランゲル(SEPHADEX(商標)G-25)脱塩カラムにリポソーム製剤を流す前及び後にリポソーム製剤の脂質に対する薬物の比率を特定した。

薬物封入% = 薬物：脂質の最終比率(PD-10カラムを通過させた試料) / 薬物：脂質の初期比率(PD-10分離前の試料) × 100%

【0059】

上記実施例1及び実施例2にそれぞれ記載されるようにウミロリムス充填POPCリポソーム及びウミロリムス充填POPC PEG化リポソームを作製した。薬物封入効率を下記表3に示す。

30

【0060】

【表3】

表3. ウミロリムス薬物封入効率

製剤	カラム分離前の薬物 ：脂質の比率	カラム分離後の薬物 ：脂質の比率	薬物封入効率(%)
実施例1による薬物充填POPCリポソーム (薬物：脂質=1：10)	0.130	0.125	95.9
実施例2による薬物充填PEG化DSPE/ POPCリポソーム(薬物：脂質=1：20)	0.052	0.050	97.5

40

【0061】

驚いたことに、ウミロリムス充填POPCリポソーム及びウミロリムス充填POPC PEG化リポソームのいずれの封入効率も95%を超えていた。

【0062】

実施例4：シロリムス及びエベロリムス充填リポソームの作製

POPC LUVを上記実施例1に記載されるように作製した。50mgのシロリムス又はエベロリムスを10mLのPOPC LUVと共に50mL容の脱バイロジェンガラ

50

ス瓶に添加した。ガラス瓶に蓋をし、温度 25 の水浴に入れた。混合物を室温で 24 時間攪拌した。薬物充填リポソーム溶液を 0.2  $\mu\text{m}$  の P V D F シリンジフィルタを通して濾過し、封入されていない薬物を除去した。

【0063】

両方のリポソーム製剤について、封入後の薬物含有量、リポソームの強度平均径、及び P D I を上記実施例 1 に記載されるように特定した。結果を下記表 4 に示す。

【0064】

【表 4】

表 4. P O P C リポソームへのシロリムス及びエベロリムスの薬物充填

薬物	シロリムス	エベロリムス
薬物充填前のベシクルサイズ (nm)	96.6	96.6
薬物充填前の P D I	0.039	0.039
薬物含有量 (mg/mL)	1.85	4.65
薬物：脂質の比率 (w/w)	1:16	1:6.5
薬物充填終了時のベシクルサイズ (nm)	96.1	99.5
薬物充填終了時の P D I	0.048	0.087
薬物封入効率 (%)	95.7	98.7

10

20

【0065】

上記結果は、シロリムス及びエベロリムスが高い効率で P O P C リポソームへの封入に成功したことを示した。

【0066】

実施例 5: *in vitro* 薬物放出研究

*in vitro* 薬物放出アッセイを使用してウミロリムス、シロリムス及びエベロリムスの放出プロファイルを決定した。ウミロリムス充填リポソームを上記実施例 1 に記載されるように作製し、シロリムス充填及びエベロリムス充填のリポソームを上記実施例 4 に記載されるように作製した。

30

【0067】

各薬物に対して、15%アセトニトリル及び85%水を含む溶液 5 mL 中に 1.0 mg の薬物を含む対照製剤を作製した。5 mL の対照製剤及び各薬物に対するリポソーム製剤を、50 k D a l の分子量カットオフを有する別々の透析チューブに充填した。

【0068】

充填した透析チューブを、それぞれ 40 mL の放出媒質 (15%アセトニトリル及び 0.5% S D S ) の入った個別の 50 mL 容のチューブに入れた。各チューブ内の放出媒質を 1 時間後、2 時間後、5 時間後、7 時間後、24 時間後、30 時間後、及び 48 時間後にサンプリングし、放出媒質中の薬物濃度を上記実施例 1 に記載されるように H P L C によって特定した。累積薬物放出パーセンテージ対放出時間を全ての試料に対してプロットした。結果をウミロリムス、エベロリムス及びシロリムスについて図 1、図 2 及び図 3 にそれぞれ示す。

40

【0069】

上記結果は、ウミロリムス、エベロリムス、及びシロリムスの開始量の 67%、100%、及び 84% がそれぞれ 48 時間以内に透析チューブから拡散したことを示した。

【0070】

対照的には、リポソーム封入薬物は、より遅い速度で透析チューブから拡散した。封入されたウミロリムス、エベロリムス、及びシロリムスの 48 時間後の累積放出は、それぞれ薬物の開始量の 67%、59%、及び 54% であった。

【0071】

50

上記結果は、ウミロリムス、エベロリムス及びシロリムスのリボソーム製剤が持続した薬物送達に有効であることを示した。

【図 1】

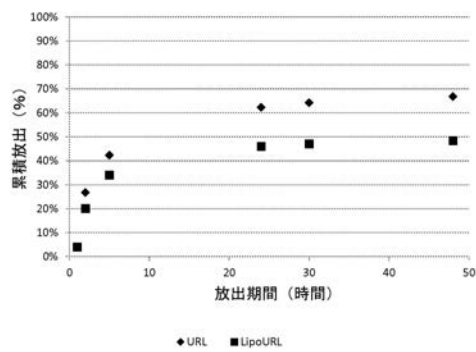


FIG. 1

【図 2】

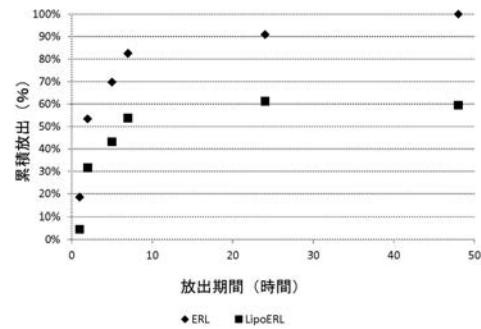


FIG. 2

【図 3】

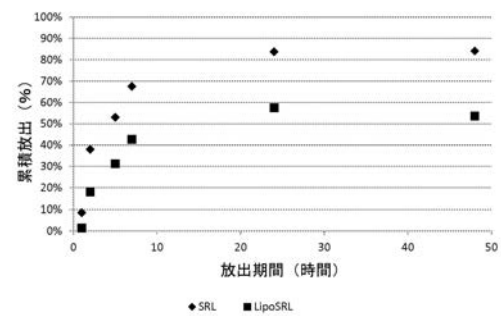


FIG. 3

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/051206

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 9/127 (2015.01) CPC - A61K 9/1271 (2015.11) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 9/127, 31/436, 47/48; A61P 35/00 (2015.01) CPC - A61K 9/1271, 9/1277, 31/436, 47/48815 (2015.11)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 9/1271, 9/1277, 31/436, 47/48815 (2015.10) (keyword delimited) USPC - 424/450, /400; 514/1, /291		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed. Search terms used: liposome, multilamellar vesicle, lipid particle, sirolimus, umirolimus, everolimus, drug loading, lipophilic, hydrophilic		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0154305 A1 (MANLI INTERNATIONAL LTD) 05 June 2014 (05.06.2014) entire document	1, 2, 5-7, 18, 19
Y		3, 4, 8, 9, 11-14
Y	WO 2012/118376 A1 (TO-BBB HOLDING BV et al) 07 September 2012 (07.09.2012) entire document	3, 4, 8, 9
Y	WO 2014/121211 A2 (ZONEONE PHARMA, INC) 07 August 2014 (07.08.2014) entire document	11-14
A	US 2013/0337051 A1 (GAILLARD et al) 19 December 2013 (19.12.2013) entire document	1-19
A	US 2011/0244028 A1 (LEIGH et al) 06 October 2011 (06.10.2011) entire document	1-19
<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 "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 12 November 2015		Date of mailing of the international search report 14 DEC 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, 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, MC, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 スー シー - ホン

アメリカ合衆国 9 2 6 0 6 カリフォルニア アーバイン アビリア ストリート 1 2 2 1

Fターム(参考) 4C076 AA19 BB11 BB13 BB25 CC27 DD63F FF16 FF36 FF43 FF63

4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA05 MA24 MA59 MA66 NA03 NA05

ZB26 ZB27