

(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2018-507227

(P2018-507227A)

(43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-546067 (P2017-546067)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月3日 (2016.3.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年10月5日 (2017.10.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/020647
 (87) 国際公開番号 W02016/141161
 (87) 国際公開日 平成28年9月9日 (2016.9.9)
 (31) 優先権主張番号 62/127,479
 (32) 優先日 平成27年3月3日 (2015.3.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515236042
 キュアポート インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
 ースター イノベーション ドライブ 1
 スイート 450
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二薬搭載リポソーム医薬製剤

(57) 【要約】

薬学的組成物は、ドセタキセルおよびドキシソルピシンを含む複数のリポソームを含有し得る。様々な実施態様において、リポソームは、(i)ドセタキセルおよびドキシソルピシンを含む、医薬有効成分(API)；(ii)不飽和リン脂質、コレステロール、カチオン性脂質、および好ましくはPEG化リン脂質を含む、脂質層；ならびに(iii)水性内部；を含むことができ、ドセタキセルは脂質層内にあり、ドキシソルピシンは水性内部で結晶化している。該リポソームは、対象者、例えば癌を有するヒト対象者、を治療するために使用することができる。癌は、例えば、肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC)、結腸癌、乳癌、または肝臓癌であり得る。

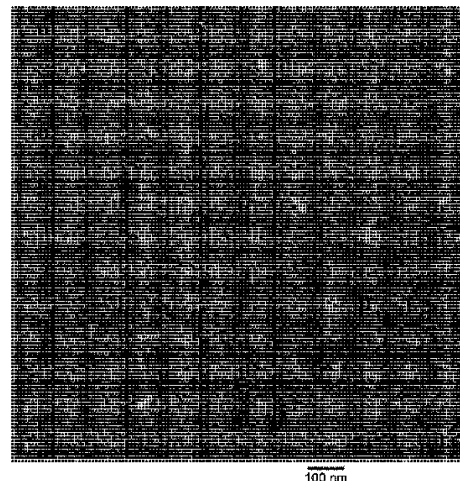


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ドセタキセルおよびドキシソルピシンを含む、医薬有効成分(API)；
不飽和リン脂質、コレステロール、および好ましくはPEG化リン脂質を含む、脂質層；
ならびに
水性内部
を含むリポソームであって、ドセタキセルが該脂質層内にあり、かつドキシソルピシンが該水性内部で結晶化している、リポソーム。

【請求項 2】

前記脂質層が、不飽和リン脂質およびコレステロールから本質的になる、請求項1記載のリポソーム。

10

【請求項 3】

前記脂質層が、不飽和リン脂質、コレステロール、およびPEG化リン脂質から本質的になる、請求項1記載のリポソーム。

【請求項 4】

前記APIが、ドセタキセルおよびドキシソルピシンから本質的になる、請求項1～3のいずれか一項記載のリポソーム。

【請求項 5】

前記脂質層が、
約20～75%、好ましくは約30～60%（モル）の不飽和リン脂質；
約10～60%、好ましくは20～50%（モル）のコレステロール；および
約0～20%、好ましくは1～10%（モル）のPEG化リン脂質
を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のリポソーム。

20

【請求項 6】

脂質層成分：ドキシソルピシンのモル比が、約100：1～約2：1、好ましくは約20：1～約5：1であり、かつ

脂質層成分：ドセタキセルのモル比が、約100：1～約2：1、好ましくは約20：1～約5：1である、

請求項1～5のいずれか一項記載のリポソーム。

【請求項 7】

ドキシソルピシン：ドセタキセルのモル比が、約10：1～1：10、好ましくは約5：1～1：5、より好ましくは約3：1～1：3である、請求項1～6のいずれか一項記載のリポソーム。

30

【請求項 8】

前記不飽和リン脂質が、多価不飽和リン脂質または一価不飽和リン脂質、好ましくはホスファチジルコリン、より好ましくは大豆ホスファチジルコリンもしくは1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DOPC)を含む、請求項1～7のいずれか一項記載のリポソーム。

【請求項 9】

前記コレステロールが、コレステロール誘導体、好ましくはカチオン性コレステロール誘導体、より好ましくはアミノコレステロール誘導体、さらにより好ましくはジメチルアミノエタンカルバモイル-コレステロール(DC-コレステロール)、カチオン性脂質、もしくはカチオン性ポリマーを含み、かつ/または、組成が、対象者の1つ以上の器官を標的とするように適合されている、請求項1～8のいずれか一項記載のリポソーム。

40

【請求項 10】

前記PEG化リン脂質が、ホスホエタノールアミン、好ましくは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(DSPE)を含み、PEG化が、PEG 500～PEG 3000、好ましくはPEG 2000である、請求項1～9のいずれか一項記載のリポソーム。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか一項記載の複数のリポソームを含む、薬学的組成物。

【請求項 12】

50

前記複数のリポソームが静注製剤中に含まれる、請求項11記載の薬学的組成物。

【請求項13】

前記リポソームのZ平均粒子径が、約10～200nm、好ましくは約15～150nm、より好ましくは約20～120nmである、請求項11または12記載の薬学的組成物。

【請求項14】

対象者に静脈内投与した際に、前記組成物の少なくとも約10%が肝臓に送達される、請求項11～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項15】

医薬として使用するための、請求項11～14のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項16】

癌治療薬として使用するための、請求項11～14のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項17】

請求項1～10のいずれか一項記載のリポソームまたは請求項11～16のいずれか一項記載の薬学的組成物を対象者に投与する工程を含む方法。

【請求項18】

対象者を治療する方法であって、有効量の請求項1～10のいずれか一項記載のリポソームまたは請求項11～16のいずれか一項記載の薬学的組成物を該対象者に投与する工程を含み、該対象者が癌を有する、前記方法。

【請求項19】

前記癌が、肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC)；結腸癌；乳癌；胃癌、食道癌、前立腺癌、白血病、頭頸部癌、膵臓癌、多発性骨髄腫、または肝臓癌である、請求項16記載の薬学的組成物または請求項16～18記載の方法。

【請求項20】

以下の工程を含む、請求項1～10のいずれか一項記載のリポソームまたは請求項11～16のいずれか一項記載の薬学的組成物を作製する方法：

エタノール中の、不飽和リン脂質、コレステロール、ドセタキセル、および好ましくはPEG化リン脂質の脂質溶液を、マニホールドの第1のまたは複数の入口ポートを通して該マニホールドの混合チャンバ内へと導入することと、水性溶液を、該マニホールドの第2のまたは複数の入口ポートを通して該マニホールドの該混合チャンバ内へと導入することとを同時に行い、形成されたりポソームを、該マニホールドの1つのまたは複数の出口チャンバを通して該混合チャンバから出し、それによって複数のリポソームが作製される、工程；ならびに

該複数のリポソームをドキソルビシン溶液中でインキュベートする工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、全体としてリポソーム医薬製剤に関し、様々な態様において、より具体的には、二種の成分（例えば、ドセタキセルとドキソルビシンの組み合わせ）を含む医薬有効成分を含有するリポソーム医薬製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

リポソーム技術は、臨床的治療および科学研究において薬物送達のために利用されている。これまでに、少数のリポソーム医薬製剤が米国食品医薬品局(FDA)によって承認されており、いくつかの新しいリポソーム製剤は臨床試験中である。しかしながら、リポソーム製剤の分野はまだ発展段階にあり、それぞれの医薬有効成分(API)は固有の課題を提示する。

【0003】

リポソーム製剤が応用され得る1つの分野は、癌APIにある。例えば、ドキソルビシンの

10

20

30

40

50

リポソーム製剤は現在、Doxil(登録商標)およびMyocet(登録商標)の商品名で入手可能である。Doxil(登録商標)は、もともとはJohnson & Johnsonの子会社であるJanssen Products, LPのために米国のBen Venue Laboratories社によって製造された、ドキソルピシンのPEG化(ポリエチレングリコール被覆)リポソーム封入形態である。Myocet(登録商標)は、ヨーロッパではCephalon社、米国とカナダではSopherion Therapeutics社のためにEnzon Pharmaceuticals社によって製造された、非PEG化リポソームドキソルピシンである。Myocet(登録商標)は、シクロホスファミドと併用して転移性乳癌の治療のためにヨーロッパとカナダで承認されているが、米国での使用についてはFDAがまだ承認していない。

【0004】

少数のリポソーム医薬製剤の承認にもかかわらず、この分野は、それぞれ異なるAPIの固有の課題および予測不能性、ならびに現在利用可能なリポソーム製剤の製造方法(拡張性、低い再現性、および製品の不均質性に関連する様々な問題を提起する)によって、依然として制限される。薬物送達において使用するための改善されたりリポソーム製剤の必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【0005】

様々な局面および実施態様において、本発明は、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)を含む複数のリポソームを含有する薬学的組成物を提供する。様々な実施態様では、リポソームは、(i)第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)を含む、医薬有効成分(API); (ii)不飽和リン脂質、コレステロール、および好ましくはPEG化リン脂質を含む、脂質層; ならびに(iii)水性内部; を含むことができ、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)は脂質層内にあり、第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)は水性内部で結晶化している。該リポソームは、対象者、例えば癌を有するヒト対象者を治療するために使用され得る。癌は、例えば、肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC); 結腸癌; 乳癌; または肝臓癌、好ましくは肝細胞癌(HCC)であり得る。

20

【0006】

本発明は、例えば、(i)第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)の一方または両方がリポソーム製剤中に存在しない他の薬学的組成物および/または(ii)他のリポソーム製剤と比較して、有効性の増加および/または毒性の低下をもたらすことができる。本発明は、例えば肝臓へのまたは肝臓を回避する、標的化送達を提供することができる。本発明は、例えば、薬物搭載量の増加を提供し、それにより一定量の第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)を送達するのに必要なリポソームの量を減少させることによって、望ましくない副作用を軽減することができる。

30

【0007】

本発明は、(i)ドセタキセルおよびドキソルピシンを含む、医薬有効成分(API); (ii)不飽和リン脂質、コレステロール、および好ましくはPEG化リン脂質を含む、脂質層; ならびに(iii)水性内部; を含むリポソームを提供し、ドセタキセルは脂質層内にあり、ドキソルピシンは水性内部で結晶化している。

40

【0008】

本発明はまた、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる複数のリポソームを含有する薬学的組成物を提供する。

【0009】

本発明はまた、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的組成物を、対象者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0010】

本発明はまた、有効量の、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的

50

組成物を、対象者に投与する工程を含む、対象者を治療する方法を提供する。

【0011】

本発明はまた、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的組成物を作製する方法を提供し、該方法は以下の工程を含む：(i)エタノール中の、不飽和リン脂質、コレステロール、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)、および好ましくはPEG化リン脂質の脂質溶液を、マニホールドの第1のまたはそれ以上の入口ポートを通して、ならびに、水性溶液を、該マニホールドの第2のまたはそれ以上の入口ポートを通して、混合チャンパ内へと導入し、形成されたリポソームを、該マニホールドの第3のまたはそれ以上の出口ポートを通して該混合チャンパから出し、それによって複数のリポソームが作製される、工程；ならびに(ii)該複数のリポソームを第2の薬物(例えば、ドキシソルピシン)の溶液中でインキュベートする工程。

10

【0012】

様々な実施態様では、前記脂質層は、不飽和リン脂質およびコレステロールから本質的になる。

【0013】

様々な実施態様では、前記脂質層は、不飽和リン脂質、カチオン性脂質、コレステロール、およびPEG化リン脂質から本質的になる。

【0014】

様々な実施態様では、前記APIは、ドセタキセルおよびドキシソルピシンから本質的になる。

20

【0015】

様々な実施態様では、前記脂質層は、約20~75%、好ましくは約30~60%(モル)の不飽和リン脂質；約10~60%、好ましくは20~50%(モル)のコレステロール；約5~75%、好ましくは約10~60%(モル)のカチオン性脂質；および約0~20%、好ましくは1~10%(モル)のPEG化リン脂質を含む。

【0016】

様々な実施態様では、脂質層成分：ドキシソルピシンのモル比は、約100:1~約2:1、好ましくは約20:1~約5:1であり、脂質層成分：ドセタキセルのモル比は、約100:1~約2:1、好ましくは約20:1~約5:1である。

30

【0017】

様々な実施態様では、ドキシソルピシン：ドセタキセルのモル比は、約10:1~1:10、好ましくは約5:1~1:5、より好ましくは約2:1~1:2である。

【0018】

様々な実施態様では、不飽和リン脂質は、多価不飽和リン脂質または一価不飽和リン脂質、好ましくはホスファチジルコリン、より好ましくは大豆ホスファチジルコリンもしくは1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DOPC)を含む。

【0019】

様々な実施態様では、コレステロールは、コレステロール誘導体、好ましくはカチオン性コレステロール誘導体、より好ましくはアミノコレステロール誘導体、さらにより好ましくはジメチルアミノエタンカルバモイル-コレステロール(DC-コレステロール)を含む。

40

【0020】

様々な実施態様では、PEG化リン脂質は、ホスホエタノールアミン、好ましくは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(DSPE)を含み、PEG化はPEG 500~PEG 3000、好ましくはPEG 2000である。

【0021】

様々な実施態様では、前記複数のリポソームは、静注製剤中に含まれる。

【0022】

様々な実施態様では、前記リポソームのZ平均粒子径は、約10~200nm、好ましくは約15~150nm、より好ましくは約20~120nmである。

50

【0023】

様々な実施態様では、対象者に静脈内投与した際に、前記組成物の少なくとも約10%は肝臓に送達される。

【0024】

様々な実施態様では、前記薬学的組成物は、医薬として使用するためのものである。

【0025】

様々な実施態様では、前記薬学的組成物は、癌治療薬として使用するためのものである。

【0026】

様々な実施態様では、前記対象者は癌を有する。様々な実施態様では、前記癌は、肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC)；結腸癌；乳癌；または肝臓癌、好ましくは肝細胞癌(HCC)である。

10

【0027】

本技術のこれらのおよび他の利点は、添付の図面および以下の説明を参照する場合に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】リポソーム製剤CPT319Cの低温透過型電子顕微鏡(TEM)画像を示す。

【図2】CPT319Cのネガティブ染色されたTEM画像を示す。

【図3】ドセタキセル/ドキソルピシンのリポソーム製剤(CPT319A、CPT319B、またはCPT319C)または非リポソーム製剤の投与後のNSCLC腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を、対照群と比較して示す。

20

【図4】ドセタキセル/ドキソルピシンのリポソーム製剤(CPT307A、CPT307B、またはCPT307C)または非リポソーム製剤の投与後のNSCLCの腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を、対照群と比較して示す。

【図5】3つの異なる用量のリポソーム製剤(CPT319C)の投与後の結腸癌の腫瘍成長曲線を、対照群と比較して示す。

【図6】3つの異なる用量のリポソーム製剤(CPT307C)の投与後の結腸癌の腫瘍成長曲線を、対照群と比較して示す。

【図7】リポソーム製剤(CPT307CまたはCPT319C)の投与後31日目の乳癌の腫瘍成長曲線を、対照群と比較して示す。

30

【図8】リポソーム製剤(CPT319C)の投与後の肝細胞癌の腫瘍成長曲線を、対照群と比較して示す。

【図9】リポソーム製剤(CPT307A~CまたはCPT319A~C)の投与後のNSCLCの腫瘍成長曲線を、対照群と比較して示す。

【図10】リポソーム製剤(CPT307CまたはCPT219C)の投与後の結腸癌の腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を、対照群と比較して示す。

【図11】リポソーム製剤(CPT319CまたはCPT307C)の投与後のドキソルピシンの血漿濃度曲線を、ドセタキセル/ドキソルピシンの非リポソーム製剤と比較して示す。

【0029】

本発明は、多くの異なる形態の実施態様を含むが、いくつかの特定の形態の実施態様が図面に示され、本明細書で詳細に説明される。本開示は、技術原理の例示として考慮されるべきであり、本発明を例示された実施態様に限定することを意図したものではない、ことが理解される。

40

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

様々な局面および実施態様において、本発明は、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルピシン)を含む複数のリポソームを含有する薬学的組成物を提供する。様々な実施態様では、リポソームは、(i)第1の薬物(例えば、ドセタキセル)お

50

よび第2の薬物(例えば、ドキソルビシン)を含む、医薬有効成分(API); (ii)不飽和リン脂質、コレステロール、および好ましくはPEG化リン脂質を含む、脂質層; ならびに(iii)水性内部; を含むことができ、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)は脂質層内にあり、第2の薬物(例えば、ドキソルビシン)は水性内部で結晶化している。該リポソームは、対象者、例えば癌を有するヒト対象者を治療するために使用され得る。

【0031】

以下の実施例に記載され示されるように、本発明は、例えば、(i)第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルビシン)の一方または両方がリポソーム製剤中に存在しない他の薬学的組成物および/または(ii)他のリポソーム製剤と比較して、有効性の増加および/または毒性の低下をもたらすことができる。本発明は、例えば肝臓へのまたは肝臓を回避する、標的化送達を提供することができる。本発明は、例えば、薬物搭載量の増加を提供し、それにより一定量の第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルビシン)を送達するのに必要なリポソームの量を減少させることによって、望ましくない副作用を軽減することができる。

10

【0032】

そのようなリポソームの様々な特徴、ならびに該リポソームを含有する薬学的組成物および該リポソームの使用および作製方法については、以下で順に説明する。

【0033】

医薬有効成分(API)

様々な局面および実施態様において、前記APIは第1の薬物(例えば、ドセタキセル)と第2の薬物(例えば、ドキソルビシン)を含む。ドセタキセルとドキソルビシンは説明に役立つ例として示されるが、第1の薬物がリポソームの脂質層にあり、第2の薬物がリポソームの水性内部にある(例えば、水性内部で結晶化している)他の実施態様も可能である。様々な実施態様において、当該APIは、二種(またはそれ以上)の抗癌剤、抗炎症剤、抗糖尿病剤、抗真菌剤、および/または抗生物質製剤を含むことができる。

20

【0034】

ドセタキセル(総称として、または商品名Taxotere(登録商標)もしくはDocecad(登録商標)の下で)は、細胞分裂を妨害することによって作用する、臨床的に確立された有糸分裂阻害化学療法薬である。ドセタキセルは、局所進行性または転移性の乳癌、頭頸部癌、胃癌、ホルモン抵抗性前立腺癌および非小細胞肺癌の治療のためにFDAの認可を受けている。ドセタキセルは、特定の癌のタイプおよびステージ(病期)に応じて、単剤として、または示される他の化学療法薬との組み合わせで使用することができる。

30

【0035】

ドセタキセルはタキサン系薬物クラスのメンバーであり、このクラスには化学療法薬パクリタキセルも含まれる。したがって、いくつかの実施態様では、ドセタキセルは、リポソームの脂質層内に配置することができる別のタキサンに置き換えることができる。

【0036】

タキサン類の至適用量投薬スケジュールは未確定のままであるが、大方の研究では、3週間または1週間の投薬スケジュールの後に顕著な死亡率の改善が見られる。いくつかの調査研究は最適な投薬スケジュールとして週1回の投与を提案しているが、公式のドセタキセルの添付文書には3週間ごとの投与が推奨されている。注目すべき重大な毒性には、好中球減少症、発熱性好中球減少症および知覚神経障害が含まれる。このような毒性は、第II相および第III相臨床試験で十分に実証されており、予測とその後の管理が可能である。

40

【0037】

様々な実施態様において、本発明は、ドセタキセルの有効性を増加させ、かつ/またはドセタキセルからの望ましくない副作用を減少させることができる。

【0038】

ドキソルビシン(商品名Adriamycin(登録商標); PEG化リポソーム形態の商品名Doxil(登録商標); 非PEG化リポソーム形態の商品名Myocet(登録商標))は、ヒドロキシダウノルビ

50

シンおよびヒドロキシダウノマイシンとしても知られ、癌化学療法において使用され、細菌種からの化学的半合成によって誘導される薬物である。これは、天然物ダウノマイシンに密接に関連するアントラサイクリン系の抗生物質(注：この文脈では、それが細菌感染症の治療に使用されることを意味しない)であり、全てのアントラサイクリン類と同様に、DNAにインターカレートすることによって作用すると考えられ、最も深刻な有害作用は生命を脅かす心臓障害である。これは一般的に、血液悪性腫瘍(白血病およびリンパ腫のような血液の癌)、多くのタイプの癌腫(固形腫瘍)および軟部組織の肉腫を含めて、広範囲の癌の治療に使用される。これは、様々な化学療法レジメンの成分として併用化学療法において使用されることが多い。いくつかの実施態様では、ドキシソルピシンは、前記リポソームの水性内部に配置することができる別の抗癌剤に置き換えることができる。

10

【0039】

ドキシソルピシンの一般的な有害作用には、脱毛(該薬物で治療した人の大部分に見られる)、骨髄抑制(新しい血球を産生する骨髄の能力が危うくなる)、悪心および嘔吐(該薬物で治療した人の約30~90%に見られる)、口腔粘膜炎、食道炎、下痢、皮膚反応(手足症候群を含む)、ならびに該薬物が送達される静脈に沿った局所的な腫脹および発赤が含まれる。あまり一般的ではないが、重篤な反応には、過敏性反応(アナフィラキシーを含む)、放射線リコール(radiation recall)、心臓障害および肝機能障害が含まれる。

【0040】

この薬物は、塩酸塩として静脈内投与される。これは、Adriamycin(登録商標)PFS、Adriamycin(登録商標)RDF、またはRubex(登録商標)など、いくつかの異なるブランド名で販売されている。ドキシソルピシンは光感受性であり、容器は、多くの場合、光がそれに影響を及ぼすのを防ぐために、アルミパックおよび/またはブラウンワックスペーパーで覆われる。ドキシソルピシンは、Doxil(登録商標)(PEG化形態)、Myocet(登録商標)(非PEG化形態)、およびCaelyx(登録商標)としてリポソーム封入形態でも入手可能であるが、これらの形態も静脈内注射によって投与される必要がある。

20

【0041】

様々な実施態様において、本発明は、ドキシソルピシンの有効性を増加させ、かつ/またはドキシソルピシンからの望ましくない副作用を低減させることができる。

【0042】

いくつかの実施態様では、APIは、ポリヌクレオチド(オリゴヌクレオチドを含む)、タンパク質、または小分子であり得る。

30

【0043】

一実施態様では、APIはポリヌクレオチドである。該ポリヌクレオチドは、ゲノムDNA断片、cDNA、mRNA、ssRNA、dsRNA、microRNA、siRNA、shRNA、sdRNA、DsiRNA、LNA、およびアンチセンスDNAまたはRNAであり得る。

【0044】

あるいは、APIは小分子薬物であり得る。好ましくは、該分子は約1500g/モル~約50g/モルの分子量を有する。

【0045】

APIは、例えば、次の薬剤のうちの二種以上を含むことができる：抗癌剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、または鎮痛剤。

40

【0046】

例示的な抗癌剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アシピシン、アクラルピシン、アコダゾール、アメタントロン、アミノグルテチミド、アントラマイシン、アスパラギナーゼ、アザシチジン、アゼテパ、ビスアントレン、プレオマイシン、ブスルファン、アクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルボプラチン、カルフィルゾミブ、カルムスチン、カルピシン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デザグアニン、ジアジクオン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エピプロピジン、エルロチニブ、エトプシド、エトプリン、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルオロシタ

50

ビン、ヒドロキシウレア、イプロプラチン、酢酸ロイプロリド、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトプリン、ミトクロミン(mitocromin)、ミトギリン、マイトマイシン、ミトスペル、ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オキシスラン(oxisuran)、パクリタキセル、ペリオマイシン、ペンタムスチン、ボルフィロマイシン、プレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、ピラゾプリン、リボプリン、セムスチン、スパルソマイシン、スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトゾシン、タリソマイシン、テガフル、テニボシド、テロキシロン、チアミプリン、チオグアニン、チアゾプリン、リン酸トリシリピン、トリエチレンメラミン、トリメトレキサート、ウラシルマスタード、ウレデバ、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピネピジン、ピンロシジン、ピンゾリジン、ジノスタチンおよびゾルピシン(zorubicin)。

10

【0047】

例示的な抗生物質製剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アミノグリコシド；アミカシン；ゲンタマイシン；カナマイシン；ネオマイシン；ネチルマイシン；ストレプトマイシン；トブラマイシン；アンサマイシン系；ゲルダナマイシン；ハービマイシン；カルバセフェム；ロラカルベフ；カルバペネム；エルタペネム；ドリペネム；イミペネム/シラスタチン；メロペネム；セファロスポリン；セファドロキシル；セファゾリン；セファロチン；セファレキシン；セファクロル；セファマンドール；セフォキシチン；セフプロジル；セフロキシム；セフィキシム；セフジニル；セフジトレン；セフォペラゾン；セフォタキシム；セフポドキシム；セフタジジム；セフチブテン；セフチゾキシム；セフトリアキソン；セフェピム；セフトピブロール；グリコペプチド；テイコブラニン；バンコマイシン；マクロライド系；アジスロマイシン；クラリスロマイシン；ジリスロマイシン；エリスロマイシン；ロキシスロマイシン；トロレアンドマイシン；テリスロマイシン；スペクチノマイシン；モノバクタム；アズトレオナム；ペニシリン系；アモキシシリン；アンピシリン；アズロシリン；カルベニシリン；クロキサシリン；ジクロキサシリン；フルクロキサシリン；メズロシリン；メチシリン；ナフシリン；オキサシリン；ペニシリン；ピペラシリン；チカルシリン；バシトラシン；コリスチン；ポリミキシンB；キノロン；シプロフロキサシン；エノキサシン；ガチフロキサシン；レボフロキサシン；ロメフロキサシン；モキシフロキサシン；ノルフロキサシン；オフロキサシン；トロバフロキサシン；スルホンアミド；マフェナイド；プロントジル(原型(archaic))；スルファセタミド；スルファメチゾール；スファニルイミド(原型)；スルファサラジン；スルフイソキサゾール；トリメトプリム；トリメトプリム-スルファメトキサゾール(コトリモキサゾール)(TMP-SMX)；テトラサイクリン；デメクロサイクリン；ドキシサイクリン；ミノサイクリン；オキシテトラサイクリン；テトラサイクリン；アルスフェナミン；クロラムフェニコール；クリンダマイシン；リンコマイシン；エタンブトール；ホスホマイシン；フシジン酸；フラゾリドン；イソニアジド；リネゾリド；メトロニダゾール；ムピロシン；ニトロフアントイン；プラテンシマイシン；ポリミキシン、ピラジナミド；キヌプリスチン/ダルホプリスチン；リファンピンまたはリファンピシン；およびチニダゾール。

20

30

40

【0048】

特定の実施態様では、抗癌剤は、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、イプロプラチン、酢酸ロイプロリド、カルフィルゾミブおよびメトトレキサートから選択される。

【0049】

例示的な抗ウイルス剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：チオセミカルバゾン；メチサゾン；ヌクレオシドおよび/またはヌクレオチド；アシクロビル；イドクスウリジン；ピダラビン；リバビリン；ガンシクロビル；ファミシクロビル；バラシクロビル；シドフォビル；ペンシクロビル；バルガンシクロビル；プリブジン；リバビ

50

リン、環状アミン類；リマントジン；トロマントジン；ホスホン酸誘導体；ホスカルネット；ホスホネット(fosfonet)；プロテアーゼ阻害剤；サキナビル；インジナビル；リトナビル；ネルフィナビル；アンブレナビル；ロピナビル；ホスアンブレナビル；アタザナビル；チプラナビル；ヌクレオシドおよびヌクレオチド逆転写酵素阻害剤；ジドブジン；ジダノシン；ザルシタピン；スタブジン；ラミブジン；アバカビル；テノホビルジソプロキシル；アデホビルジピボキシル；エムトリシタピン；エンテカビル；非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤；ネビラピン；デラビルジン；エファビレンツ；ノイラミニダーゼ阻害剤；ザナミビル；オセルタミビル；モロキシジン；イノシンブラノベックス；プレコナリル；およびエンフュービルタイド(enfuvirtide)。

【0050】

例示的な抗真菌剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アリルアミン；テルピナフィン；代謝拮抗物質；フルシトシン；アゾール；フルコナゾール；イトラコナゾール；ケトコナゾール；ラブコナゾール；ボサコナゾール；ポリコナゾール；グルカン合成阻害剤；カスポファンギン；ミカファンギン；アニデュラファンジン；ポリエン類；アムホテリシンB；アムホテリシンBコロイド分散剤(ABCD)；およびグリセオフルビン。

【0051】

例示的な鎮痛剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アヘン誘導体、コデイン、メペリジン、メタドン、およびモルヒネ。

【0052】

様々な実施態様では、前記APIは、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)および第2の薬物(例えば、ドキシソルピシン)から本質的になる。

【0053】

様々な実施態様では、脂質層成分：第2の薬物(例えば、ドキシソルピシン)のモル比は、約100：1～約5：1、好ましくは約20：1～約10：1であり、脂質層成分：第1の薬物(例えば、ドセタキセル)のモル比は、約100：1～約5：1、好ましくは約20：1～約10：1である。

【0054】

様々な実施態様では、第2の薬物(例えば、ドキシソルピシン)：第1の薬物(例えば、ドセタキセル)のモル比は、約10：1～1：10、好ましくは約5：1～1：5、より好ましくは約3：1～1：3である。

【0055】

脂質層および水性溶液

本発明は、例えば本発明によるリポソームを作製する際に、脂質溶液および水性溶液を利用する。したがって、脂質溶液および/または水性溶液の組成は、リポソームの最終組成に影響を及ぼし得る。

【0056】

様々な実施態様では、脂質溶液は有機溶媒を含み得る。有機溶媒は水混和性溶媒であってもよい。好ましくは、水混和性溶媒は、エタノール、メタノール、DMSOおよびイソプロパノールからなる群より選択される。最も好ましくは、有機溶媒はエタノールである。

【0057】

本明細書で使用する用語「カチオン性脂質」は、約pH3～pH9で正味の正電荷を有する脂質またはコレステロール誘導体を指す。

【0058】

本明細書で使用する用語「アニオン性脂質」は、約pH3～pH9で正味の負電荷を有する脂質またはコレステロール誘導体を指す。

【0059】

本明細書で使用する用語「PEG化脂質」は、ポリエチレングリコールポリマーとコンジュゲートされた脂質を指す。

【0060】

本明細書で使用する用語「中性脂質」は、約pH3～pH9で正味の電荷を有しない脂質を指す。

10

20

30

40

50

す。

【 0 0 6 1 】

脂質溶液は脂質の混合物を含むことができる。脂質の混合物はコレステロールを含むことが好ましい。

【 0 0 6 2 】

脂質の混合物はまた、カチオン性脂質を含むことができる。カチオン性脂質は、限定するものではないが、以下であり得る：N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTMA」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODMA」)；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(「DDAB」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTAP」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAP」)；3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール(「DC-Chol」)；N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(「DMRIE」)；1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLinDMA)；1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)；1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLenDMA)；2-{4-[(3b)-コレスタ-5-エン-3-イルオキシ]プトキシ}-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]プロパン-アミン(CLinDMA)。

10

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施態様において、脂質の混合物はアニオン性脂質を含むことができる。アニオン性脂質は、限定するものではないが、以下であり得る：ジアシルグリセロールホスファチジン酸(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-リン酸(DSPA)；1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-リン酸(DPPA)；1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-リン酸(DMPA)；1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-リン酸(DLPA)；1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-リン酸(DOPA)；ジアシルグリセロールホスホグリセロール(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DSPG)；1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DPPG)；1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DMPG)；1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DLPG)；1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DOPG))、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、および中性脂質に結合した他のアニオン性修飾基。脂質の混合物はまた、中性脂質を含んでもよい。中性脂質は、限定するものではないが、以下であり得る：ジアシルグリセロールホスホコリン(L- -ホスファチジルコリン、水素添加(大豆)(HSPC)；ジアシルグリセロールホスホコリン(L- -ホスファチジルコリン、(大豆)(Soy PC)；1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)；1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)；1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)；1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DLPC)；1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC))、ジアシルグリセロールホスホエタノールアミン(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(DSPE)；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(DPPE)；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(DMPE)；1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)；1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE))、およびホスファチジルセリン。

20

30

40

【 0 0 6 4 】

脂質の混合物はまた、PEG化脂質を含むことができる。PEG化脂質は、限定するものではないが、以下であり得る：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-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (mPEG-2000-DSPE)；1,2-ジオクタデカノイル-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

50

] (mPEG-2000-DOPE) ; 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(ポリエチレングリコール)-2000] (mPEG-2000-DPPE) ; 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(ポリエチレングリコール)-2000] (mPEG-2000-DMPE) ; 1,2-ジラウロイル-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] (mPEG-2000-DLPE) ; 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-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-5000] (mPEG-5000-DSP E) ; 1,2-ジオクタデカノイル-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] (mPEG-5000-DOPE) ; 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(ポリエチレングリコール)-5000] (mPEG-5000-DPPE) ; 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(ポリエチレングリコール)-5000] (mPEG-5000-DMPE) ; 1,2-ジラウロイル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] (mPEG-5000-DLPE)。

10

【0065】

脂質の混合物はまた、脂質様分子またはリポイド(lipidoid)を含むことができる。脂質の混合物はまた、タンパク質、ペプチドもしくはオリゴヌクレオチドを含む脂質-またはコレステロール-コンジュゲート化分子を含んでもよい。

【0066】

様々な実施態様において、脂質層は、本明細書に開示される脂質成分の1種以上を含む。

【0067】

様々な実施態様において、脂質層は、不飽和リン脂質およびコレステロールから本質的になる。

20

【0068】

様々な実施態様において、脂質層は、不飽和リン脂質、コレステロール、およびPEG化リン脂質から本質的になる。

【0069】

様々な実施態様では、脂質層は、約20~75%、好ましくは約30~60%(モル)の不飽和リン脂質；約10~60%、好ましくは20~50%(モル)のコレステロール；および約0~20%、好ましくは1~10%(モル)のPEG化リン脂質を含む。

【0070】

様々な実施態様では、脂質層成分：ドキソルピシンのモル比は、約100:1~約5:1、好ましくは約20:1~約10:1であり、脂質層成分：ドセタキセルのモル比は、約100:1~約5:1、好ましくは約20:1~約10:1である。

30

【0071】

様々な実施態様では、ドキソルピシン：ドセタキセルのモル比は、約10:1~1:10、好ましくは約5:1~1:5、より好ましくは約3:1~1:3である。

【0072】

様々な実施態様では、不飽和リン脂質は、多価不飽和リン脂質または一価不飽和リン脂質、好ましくはホスファチジルコリン、より好ましくは大豆ホスファチジルコリンもしくは1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DOPC)を含む。

40

【0073】

様々な実施態様では、コレステロールは、コレステロール誘導体、好ましくはカチオン性コレステロール誘導体、より好ましくはアミノコレステロール誘導体、さらにより好ましくはジメチルアミノエタンカルバモイル-コレステロール(DC-コレステロール)を含む。

【0074】

様々な実施態様では、PEG化リン脂質は、ホスホエタノールアミン、好ましくは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(DSPE)を含み、PEG化はPEG 500~PEG 5000、好ましくはPEG 2000である。

【0075】

様々な実施態様では、脂質層の組成は、第1の薬物の所望の搭載を達成するように調整

50

される。第1の薬物の少なくとも一部は脂質層にあるが、当業者であれば、第1の薬物が脂質層と水性内部との間にある分配係数を有することを理解するであろう。いくつかの実施態様では、第1の薬物の本質的に全てが脂質層に存在する。

【0076】

前記プロセスの水性溶液は、好ましくは、水および緩衝液を含む。緩衝液は、リン酸塩、ヒスチジン、HEPES、Tris、酢酸塩、炭酸塩、およびクエン酸塩の緩衝液であり得るが、これらに限定されない。様々な実施態様では、水性溶液の組成は、第2の薬物の所望の搭載(および/または結晶化)を達成するように調整される。第2の薬物の少なくとも一部はリポソームの水性内部にあるが、当業者であれば、第2の薬物が脂質層と水性内部との間にある分配係数を有することを理解するであろう。いくつかの実施態様では、第2の薬物の本質的に全てが水性内部に存在する。

10

【0077】

リポソームの作製方法

本発明のリポソームを作製するために適合させることができる装置および方法の例は、例えば、米国特許出願第14/209,187号(US20140348900として公開)に見出すことができ、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明によるリポソームを作製するためのいくつかの異なる作製方法の説明は、以下の実施例に提示される。

【0078】

本発明は、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的組成物を作製する方法を提供し、該方法は以下の工程を含む：(i)エタノール中の、不飽和リン脂質、コレステロール、第1の薬物(例えば、ドセタキセル)、および好ましくはPEG化リン脂質の脂質溶液を、第1のポートを通して混合チャンパ内へと導入し、水性溶液を第2のポートを通して該混合チャンパ内へと導入し、それによって複数のリポソームが作製される、工程；および(ii)該複数のリポソームを第2の薬物(例えば、ドキシソルピシン)の溶液中でインキュベートする工程。

20

【0079】

様々な実施態様において、少なくとも1つの脂質溶液と少なくとも1つの水性溶液の入口ポート間の角度は、 180° または実質的に同様の角度ではない。いくつかの局面では、脂質溶液の少なくとも1つの流れおよび水性溶液の少なくとも1つの流れは、約 180° 未満の角度でぶつかる。したがって、いくつかの局面では、前記方法はTコネクタを含まない。

30

【0080】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの脂質溶液と少なくとも1つの水性溶液の入口ポート間の角度は、約 120° 以下、例えば 115° 以下、 100° 以下、 90° 以下、 80° 以下、 72° 以下、 60° 以下、 45° 以下、 30° 以下、 18° 以下である。

【0081】

いくつかの実施態様では、工程(ii)における水性溶液は、少なくとも2つの入口ポート、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上の入口ポートから導入される。いくつかの実施態様では、工程(ii)における水性溶液は、少なくとも3個以上で11個以下の入口ポート、例えば、少なくとも3個以上7個以下、少なくとも3個以上5個以下、少なくとも4個以上11個以下、少なくとも5個以上11個以下、少なくとも6個以上11個以下の入口ポートから導入される。

40

【0082】

いくつかの実施態様では、少なくとも2個(例えば、3、4、5、6、7個など)の水性溶液入口ポートおよび少なくとも1個(例えば、2、3、4、5個など)の脂質溶液入口ポートは、同一平面内にある。

【0083】

いくつかの実施態様において、少なくとも1個(例えば、2個)の出口ポートは、入口ポートの平面に対して実質的に垂直である。他の実施態様では、少なくとも1個(例えば、2、3、4、5個など)の出口ポートは、入口ポートの平面に対して実質的に垂直ではない。

50

【0084】

いくつかの実施態様では、少なくとも2個(例えば、3、4、5、6、7個など)の水性溶液入口ポートおよび少なくとも1個(例えば、2、3、4、5個など)の脂質溶液入口ポートは、同一平面にはない。

【0085】

脂質溶液の調製

脂質溶液は、一緒に混合される個々の脂質のストック溶液から調製することができる。脂質は、有機溶媒に溶解して脂質溶液とすることが好ましい。脂質溶液を作製するために使用される有機溶媒は、水と混和性であり得る。好ましくは、該溶媒はエタノール、メタノール、DMSO、プロパノール、DMF、THF、アセトン、ジオキサン、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、およびイソプロパノールとすることができる。より好ましくは、該溶媒はポリエチレングリコール、イソプロパノール、およびエタノールである。好ましくは、該溶媒は10%未満の水を含む。ある場合には、脂質溶液は脂質の混合物から調製され、その際には該混合物を有機溶媒に溶解させる。該溶液中の総脂質の濃度は、約1mg/mL ~ 約200mg/mL、例えば、約1mg/mL ~ 約100mg/mLの範囲であり得る。より好ましくは、該溶液中の総脂質の濃度は、約5mg/mL ~ 約100mg/mLまたは約10mg/mL ~ 約100mg/mLの範囲であり得る。いくつかの実施態様では、有機溶媒は約70%以上(例えば、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、100%)の濃度のエタノールである。

10

【0086】

脂質の混合物は、APIの最適な送達のために必要に応じて最適化され、慣用の実験法を用いて当業者により容易に最適化される。

20

【0087】

特定の実施態様において、水不溶性のAPIは脂質溶液に溶解することができる。脂質溶液中のAPIの濃度は、その薬剤の有効性に依存し、当業者によって容易に決定され得る。脂質/API比は、そのAPIについてのリポソームの封入能によって決まる。

【0088】

水性溶液の調製

水溶性のAPI成分は、第1の水性溶液(S1)に溶解することができる。該溶液のpHおよび塩分濃度は、リポソームを形成するためにAPI成分と脂質との相互作用の要件に合わせるように最適化され得る。こうした条件は、当業者が容易に決定することができる。サンプルは以下の実施例において提供される。当業者には容易に明らかであるように、(S2)と呼ばれる、APIを欠く水性溶液は、該薬剤を有する溶液と類似していてもよい。あるいは、S1とS2は異なってもよい。

30

【0089】

リポソームの調製、前記溶液の混合

脂質溶液および水性溶液は、好ましくは、それぞれ約1mL/分 ~ 約6000mL/分の流量で、異なるポートからマニホールドに入る。好ましくは、流量は約5mL/分 ~ 約1000mL/分であり得る。より好ましくは、流量は約20mL/分 ~ 約600mL/分であり得る。いくつかの実施態様では、流量は、所望のリポソームサイズ、形態、PDI、および製造規模とするために、入口ポートのサイズに基づいて調整される。

40

【0090】

いくつかの実施態様では、脂質溶液および/または水性溶液は、約1mL/分 ~ 約2,500mL/分の流量で、0.1 ~ 5.0mmのポートサイズによって導入される。

【0091】

いくつかの実施態様では、脂質溶液および/または水性溶液の流速は、約0.02m/秒 ~ 約40m/秒、例えば、0.1m/秒 ~ 30m/秒、0.2m/秒 ~ 20m/秒である。流速は、所望のリポソームサイズ、形態、PDI、および製造規模とするために、入口ポートのサイズに基づいて調整される。

【0092】

リポソーム内へのAPIの搭載

50

混合チャンバにおいて、脂質は瞬間的にリポソーム粒子に集合すると考えられる。薬物APIが脂質溶液または水性溶液によって担持される場合、それは、APIと脂質の間の親油性もしくは静電的相互作用、またはその両方によってリポソームに封入され得る。

【0093】

本発明はまた、APIを含有しないリポソーム(いわゆる「空の」リポソーム)の作製方法を提供する。このような実施態様では、APIは、マニホールド内で混合される脂質溶液と水性溶液の両方に存在しない。APIを、拡散プロセスまたは別のプロセスによってリポソームに搭載し得る。例えば、ドキシソルピシンは、pH勾配を用いてリポソームに搭載することができる。米国特許出願第10/019,200号、PCT公開番号WO 2001/005373、米国特許第5,785,987号、第5,380,531号、第5,316,771号、および第5,192,549号を参照されたい；これらの全ては参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0094】

好ましくは、APIを拡散によってリポソームに取り込ませるために、APIはリポソーム溶液と混合される。一局面では、APIを水性溶液に溶解し、その溶液を空のリポソームと混合する。別の局面では、APIが空のリポソームの溶液に易溶性であり、そのため、APIを空のリポソームの溶液と直接混合することができる。

【0095】

APIの溶液とAPIの空のリポソーム溶液の容量比は、好ましくは、約1:50~約1:1の範囲である。該溶液の容量は少ない方が好ましいが、それは、最終リポソーム溶液の大幅な希釈が回避されるからである。

20

【0096】

薬物封入効率は70%を超えることが好ましい。該効率は80%を超えることがより好ましい。該効率は90%を超えることが最も好ましい。

【0097】

リポソーム濃度の調整

タンジェントフローろ過(tangent flow filtration)を用いて、リポソーム溶液を濃縮することが可能である。

【0098】

緩衝液の交換

リポソーム溶液中の残留有機溶媒は、緩衝液の交換によって除去することができる。好ましくは、緩衝液の交換はタンジェントフローろ過により行われる。別の実施態様では、緩衝液の交換は透析によって行うことができる。

30

【0099】

滅菌ろ過

リポソーム溶液は、例えば、該溶液を0.22ミクロンの滅菌フィルターに通すことによって、滅菌することができる。

【0100】

リポソーム

様々な実施態様において、前記リポソームのZ平均粒子径は、約10~200nm、好ましくは約15~150nm、より好ましくは約20~120nmである。

40

【0101】

好ましくは、APIの70%超がリポソームに封入される。より好ましくは、APIの80%超がリポソームに封入され、最も好ましくは、APIの90%超がリポソームに封入される。

【0102】

任意で、リポソームは単一ラメラ(unilamellar)であり得る。あるいは、リポソームは多重ラメラ(multilamellar)であるか、または逆ヘキサゴナルもしくはキュービック形態、または脂質ディスク、または中空リポソームであり得る。

【0103】

いくつかの実施態様では、前記リポソームの平均粒子径は、約10nm~約2,000nm、好ましくは300nm未満であり、より好ましくは、平均粒子径は約10~300nmまたは約20~約300nm

50

mであり得る。最も好ましくは、平均粒子径は約20~120nmである。いくつかの実施態様では、該リポソームは、約0.005~約0.8、例えば、0.005~約0.5、0.01~約0.5、0.01~約0.4、0.01~約0.2の多分散指数を有する。

【0104】

薬学的組成物

様々な実施態様において、薬学的組成物は、医薬として使用するためのものである。様々な実施態様では、薬学的組成物は、癌治療薬として使用するためのものである。様々な実施態様では、薬学的組成物は、1種以上の抗生物質、抗ウイルス剤、抗糖尿病剤、抗高血圧剤、抗真菌剤、または鎮痛剤を含むことができる。

【0105】

様々な実施態様において、複数のリポソームは、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、くも膜下腔内または腹腔内注射による、注射製剤中に含まれる。注射製剤は、好ましくは、ハンス液、リンガー液、または生理食塩水緩衝液のような生理学的に適合性の緩衝液中の、水性溶液であり得る。注射製剤は、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤のような処方剤を含有することができる。あるいは、リポソームは、使用前に適切なビヒクル、例えば発熱性物質フリーの滅菌水、を用いて調製するための乾燥形態または粉末形態であり得る。

【0106】

治療および投与

本発明は、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的組成物を、対象者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0107】

本発明はまた、有効量の、本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによるリポソーム、あるいは本明細書に開示される局面または実施態様のいずれかによる薬学的組成物を、対象者に投与する工程を含む、対象者を治療する方法を提供する。

【0108】

したがって、本発明は、ヒト対象者の癌細胞および/または組織を含めて、癌細胞および/または組織を治療するための方法を提供する。癌は、臓器不全をもたらす細胞および組織の異常な増殖・成長によって形成される悪性腫瘍が原因であり得る。

【0109】

固形腫瘍は、血液、骨髄またはリンパ細胞以外の体組織細胞の異常な増殖によって形成される新生物(細胞の新たな増殖)または病変(解剖学的構造の損傷または生理学的機能の障害)であり得る。固形腫瘍は、肝臓、結腸、乳房、または肺などの異なる組織型から発生し、その細胞起源の臓器で最初に増殖する、異常な細胞塊からなる。しかし、このような癌は、進行した疾患段階では転移性の腫瘍増殖を介して他の臓器に広がる可能性がある。

【0110】

治療される対象者は、癌と診断された者であり得る。対象者は、局所的に進行した、切除不能な、または転移性の癌があり、かつ/または事前の第1選択療法(first-line therapy)に失敗してよい。様々な実施態様では、癌は肝臓癌(例えば、肝細胞癌、HCC)である。様々な実施態様では、肝臓癌(例えば、HCC)は、中間期、進行期、または末期の段階であり得る。肝臓癌(例えば、HCC)は、転移性でも非転移性でもよい。肝臓癌は、非肝臓癌の肝臓への転移から生じる肝腫瘍を含むことができる。肝臓癌(例えば、HCC)は、切除可能または切除不能であり得る。肝臓癌(例えば、HCC)は、単一の腫瘍、複数の腫瘍、または(門静脈または肝静脈への)浸潤性増殖パターンを有する境界のはっきりしない腫瘍を含むことができる。肝臓癌(例えば、HCC)は、線維層板型(fibrolamellar)、偽腺性(アデノイド)、多形性(巨細胞)、または明細胞性のパターンを含むことができる。肝臓癌(例えば、HCC)は高分化型を含むことができ、腫瘍細胞は肝細胞に似ており、小柱(trabecula)、索状物(cord)および巣状物(nest)を形成し、かつ/または細胞質に胆汁色素を含む。肝

10

20

30

40

50

臓癌(例えば、HCC)は低分化型を含むことができ、悪性上皮細胞は非接着性(discohesive)、多形性、退形成性(anaplastic)、かつ/または巨大である。いくつかの実施態様では、肝臓癌(例えば、HCC)は、B型肝炎、C型肝炎、肝硬変、または2型糖尿病に関連する。

【0111】

様々な実施態様において、前記癌は肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC)；結腸癌；乳癌；または肝臓癌、好ましくは肝細胞癌(HCC)である。

【0112】

様々な実施態様において、ドセタキセルは、10、20、30、40、50、75、80、100、125、150、または160mg/mLの濃度であり得る。用量は約10mg/m² ~ 150mg/m² (例えば、10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、100、110、120、125、130、140、または150mg/m²)であり得る。例えば、用量は75mg/m²であり得る。用量は、3週間ごとに1、2、3、4、5または6サイクル投与することができる。当業者には理解されるように、ドセタキセルのための投薬ガイドラインは、当技術分野において知られており、癌のタイプ、癌のステージ、投薬レジメン、ドキシソルピシンの用量、および/または本発明の医薬製剤の有効性を含むがこれらに限定されない、諸要因に基づいて適合させることができる。

【0113】

様々な実施態様において、ドキシソルピシンは、0.1、0.5、1、1.5、2、3、4、または5mg/mLの濃度であり得る。用量は約1mg/m² ~ 100mg/m² (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、または100mg/m²)であり得る。例えば、用量は30mg/m²であり得る。用量は、3週間ごとに1、2、3、4、5または6サイクル投与することができる。当業者には理解されるように、ドセタキセルのための投薬ガイドラインは、当技術分野において知られており、癌のタイプ、癌のステージ、投薬レジメン、ドキシソルピシンの用量、および/または本発明の医薬製剤の有効性を含むがこれらに限定されない、諸要因に基づいて適合させることができる。

【0114】

以下の実施例は例示的であり、限定的ではない。本開示を検討する際に、この技術の多くの変形が当業者には明らかになるであろう。したがって、この技術の範囲は、実施例を参照して決定されるべきではなく、添付した特許請求の範囲を参照することで、その均等物の全範囲と併せて、決定されるべきである。

【実施例】

【0115】

実施例1：リポソーム製剤CPT307Cの調製

CPT307は、不飽和脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DOPC)、コレステロール、および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-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (mPEG2000-DSPE)を含む。この不飽和脂質は、飽和脂質と比較して、ドセタキセルを封入する能力が大きいことが見出された。最初に2100mgのDOPC、280mgのコレステロール、700mgのmPEG2000-DSPE、および175mgのドセタキセル(DOCE)を70mLの無水エタノール中に溶解することによってリポソーム製剤CPT307Bを調製した。CPT307B脂質溶液の組成(モル%)を表1に示す。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々20mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンパに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。タンジェントフローろ過によりリポソームを濃縮した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)にタンジェントフローろ過により交換した。その後、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。Z平均粒子径は32.9nmであった。

【0116】

CPT307Cは、CPT307Bにドキシソルピシン(DXR)を搭載することによって調製した。36mg/mLのDOCEを含有する14mLのCPT307Bを、ヒスチジン/スクロース緩衝液に予め溶解しておいた

24mgのDXRと混合し、42℃で3時間インキュベートした。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソーム(二薬搭載リポソーム)を、0.22μmフィルターに通してろ過することによって滅菌した。CPT307C脂質溶液の組成(モル%)を表1に示した。DXRの99.6%が封入された。DOCE:DXRのモル比は1:1であった。

【0117】

(表1) 実施例1の脂質組成

成分	CPT307B % (モル)*	CPT307C % (モル)*
DOPC	73.6	73.6
コレステロール	20	20
mPEG2000-DSPE	6.4	6.4
DOCE	6.0	6.0
DXR	0	6.0

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0118】

実施例2: リポソーム製剤CPT308Cの調製

実施例1のCPT307Cとは異なり、CPT308Cは、DOCEを封入する能力が高い多価不飽和脂質L-α-ホスファチジルコリン(Soy PC)を含有する。30mgのSoy PC、10mgのコレステロール、10mgのmPEG2000-DSPE、および6mgのDOCEを無水エタノールに溶解することによって2mLの脂質/DOCE溶液を調製した。リポソーム製剤CPT308Cの脂質溶液の組成(モル%)を表2に示す。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々2mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)に透析により交換した。その後、この製剤を、0.22μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。

【0119】

次いで、DOCE搭載リポソームを、ヒスチジン/スクロース緩衝液に予め溶解しておいたDXRと、ドキシルピシン/脂質比(w/w) 1:10で混合し、42℃で2時間インキュベートしたところ、DXRの97%が封入された。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT308Cについて38.2nmであった。

【0120】

(表2) 実施例2の脂質組成

成分	CPT308C % (モル)*
Soy PC	56.8
コレステロール	38.0
mPEG2000-DSPE	5.2
DOCE	13.5
DXR	10.9*

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0121】

実施例3：リポソーム製剤CPT309Cの調製

CPT309Cは、実施例2のCPT308Cよりも高いモル比で多価不飽和脂質Soy PCを含有し、したがって、DOCEを封入する能力がより高いことを示した。30mgのL- -ホスファチジルコリン(Soy PC)、4mgのコレステロール、10mgのmPEG2000-DSPE、および6mgのDOCEを無水エタノールに溶解することによって2mLの脂質/DOCE溶液を調製した。リポソーム製剤CPT309Cの脂質溶液の組成(モル%)を表3に示す。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々2mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)に透析により交換した。その後、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。

10

【0122】

次いで、DOCE搭載リポソームを、ヒスチジン/スクロース緩衝液に予め溶解しておいたDXRと、ドキシソルピシン/脂質比(w/w) 1:10で混合し、42 で2時間インキュベートしたところ、DXRの98.8%が封入された。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT309Cについて38.6nmであった。

【0123】

(表3) 実施例3の脂質組成

20

成分	CPT309C % (モル)*
Soy PC	73.6
コレステロール	19.7
mPEG2000-DSPE	6.8
DOCE: 脂質	17.5
DXR: 脂質	14.1

30

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0124】

実施例4：リポソーム製剤CPT311Cの調製

CPT311Cは、コレステロールのカチオン性誘導体(DC-コレステロール)を含有するので、カチオン性のリポソームである。カチオン性脂質は、リポソーム内の治療薬の肝臓への標的化送達および抗腫瘍効果を高めることが見出された。15mg/mLのDOPC、9.3mg/mLの3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩(DC-コレステロール)、5mg/mLのmPEG2000-DSPE、および2.0mg/mLのDOCEの濃度となるように無水エタノール中に2mLの脂質/DOCE溶液(リポソーム製剤CPT311B)を調製した。CPT311B脂質溶液の組成(モル%)を表4に示す。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々2mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)に透析により交換した。その後、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。Z平均粒子径は34.5nmであった。

40

【0125】

CPT311Bにドキシソルピシン(DXR)を搭載することによってリポソーム製剤CPT311Cを調製

50

した。2mLのCPT311Bを、10mg/mLでヒスチジン/スクロース緩衝液に予め溶解しておいた0.5mgのDXRと混合し、42℃で2時間インキュベートしたところ、DXRの94.5%が封入された。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22µmフィルターを通してろ過することにより滅菌した。CPT311Cの組成(モル%)を表4に示す。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT311Cについて34.9nmであった。

【0126】

(表4) 実施例4の脂質組成

成分	CPT311B % (モル)*	CPT311C % (モル)*
DOPC	50	50
DC-コレステロール	45	45
mPEG2000-DSPE	5	5
DOCE	6.5	6.5
DXR	0	4.8

10

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0127】

リポソームのカチオン性表面電荷は肝臓へのリポソームの送達を促進することが見出された。リポソーム中のカチオン性脂質、例えばDC-コレステロール、のモル比を変えることで、リポソームの肝臓送達および血液からのクリアランス速度が制御される。以下の実施例(実施例5～実施例7)は、DOCE、コレステロール、DC-コレステロール、およびmPEG2000-DSPEを含み、DOPCおよびmPEG2000-DSPEのモル比は変化しないままであるか、またはわずかに変化させる一方で、DC-コレステロールのモル比を増加させ(3.9%から15.4%に増加)、かつコレステロールのモル比を低下させた(34.4%から17.8%に低下)。

20

【0128】

実施例5：リポソーム製剤CPT315Cの調製

37.5mgのDOPC、11.3mgのコレステロール、1.4mgの3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩(DC-コレステロール)、12.5mgのmPEG2000-DSPE、および4mgのDOCEを2.5mLの無水エタノール中に溶解することによって2.5mLの脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々2.5mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)に透析により交換した。

30

【0129】

次いで、DOCE搭載リポソームを、ヒスチジン/スクロース緩衝液に予め溶解しておいたDXRと、ドキシソルピシン/脂質比(w/w) 1:16で混合し、42℃で2時間インキュベートしたところ、DXRの96.9%が封入された。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22µmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。二薬搭載CPT315CのZ平均粒子径は35.1nmであった。

40

【0130】

(表5) 実施例5の脂質組成

成分	CPT315C % (モル)*
DOPC	56.4
コレステロール	34.4
DC-コレステロール	3.9
mPEG2000-DSPE	5.3
DOCE	7.2
DXR	7.3

10

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0131】

実施例6：リポソーム製剤CPT317Cの調製

600mgのDOPC、140mgのコレステロール、84mgのDC-コレステロール、200mgのmPEG2000-D SPE、および50mgのDOCEを無水エタノール中に溶解することによって20mLの脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々20mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスボトル内に回収し、その後タンジェントフローろ過により濃縮した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)にタンジェントフローろ過により交換した。次に、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。DOCEを搭載したリポソーム製剤CPT317Bを得た。CPT317BのZ平均粒子径は37.5nmであった。

20

【0132】

リポソーム製剤CPT317Cは、ドキシソルピシン(DXR)をCPT317Bに搭載することによって調製した。5mLのCPT317Bを5.2mgのDXRと混合して、42 で3時間インキュベートした。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。CPT317C脂質溶液の組成(モル%)を表6に示す。DXRの99.8%が封入された。

30

【0133】

(表6) 実施例6の脂質組成

成分	CPT317C % (モル)*
DOPC	56.4
コレステロール	26.7
DC-コレステロール	11.6
mPEG2000-DSPE	5.3
DOCE	4.5
DXR	4.5

40

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0134】

実施例7：リポソーム製剤CPT319Cの調製

1848mgのDOPC、303mgのコレステロール、423mgのDC-コレステロール、605mgのmPEG2000

50

-DSPE、および154mgのDOCEを61.5mLの無水エタノール中に溶解することによって脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々20mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスボトル内に回収し、その後タンジェントフローろ過により濃縮した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)にタンジェントフローろ過により交換した。次に、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌し、DOCEを搭載したリポソーム製剤CPT319Bを得た。

【0135】

リポソーム製剤CPT319Cは、ドキソルピシン(DXR)をCPT319Bに搭載することによって調製した。ガラスボトル内で、31.4mgのDXRを30mLのCPT319Bに溶解した。この混合物を42で4時間インキュベートすると、ドキソルピシンの99.8%が封入された。次に、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。CPT317C脂質溶液の最終組成(モル%)を表7に示す。CPT319CについてのZ平均粒子径は40.7nmであり、DOCE:DXRのモル比は1:1であった。CPT319CのCryo-TEM画像を図1に示す。これらの画像から、リポソーム内部で形成されたDXR結晶を見ることができる。CPT319Cのネガティブ染色されたTEM画像を図2に示すが、これは粒子サイズおよび均質性を示している。

【0136】

(表7) 実施例7の脂質組成

成分	CPT319C % (モル)*
DOPC	62.8
コレステロール	17.8
DC-コレステロール	15.4
mPEG2000-DSPE	4.6
DOCE	3.5
DXR	3.5

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0137】

実施例8: リポソーム製剤CPT323Cの調製

CPT323CはPEG化脂質の非存在下で調製されたので、PEG化脂質は該製剤にとって任意である。300mgのDOPC、50mgのコレステロール、70mgのDC-コレステロール、および25mgのDOCEを10mLの無水エタノール中に溶解することによって脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々10mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスボトル内に回収し、その後タンジェントフローろ過により濃縮した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)にタンジェントフローろ過により交換した。次に、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。

【0138】

次いで、3mLのDOCE搭載リポソームを、7mg/mLでヒスチジン/スクロース緩衝液中に予め溶解しておいた3mgのDXRと混合し、42で6時間インキュベートしたところ、DXRの96.3%

が封入された。その後、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22 μmフィルターを通してろ過することにより滅菌して、CPT323Cを得た。リポソーム製剤CPT323Cの脂質溶液の組成(モル%)を表8に示す。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT323Cについて49.0nmであった。

【0139】

(表8) 実施例8の脂質組成

成分	CPT323C % (モル)*
DOPC	59.5
コレステロール	20.1
DC-コレステロール	20.3
DOCE	4.8
DXR	4.8

10

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0140】

実施例9：リポソーム製剤CPT324Cの調製

20

他の例示的な製剤とは異なり、CPT324Cは、多価不飽和脂質Soy PCと、DC-コレステロール以外のカチオン性脂質DOTAPとを含有する。60mgのSoy PC、40mgのコレステロール、60mgの1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(塩化物塩)(DOTAP)、40mgのmPEG2000-DSPE、および25mgのDOCEを10mLの無水エタノール中に溶解することによって脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々10mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンパに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスボトル内に回収し、その後タンジェントフローろ過により濃縮した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)にタンジェントフローろ過により交換した。次に、この製剤を、0.22 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌した。

30

【0141】

次いで、3mLのDOCE搭載リポソーム、7mg/mLでヒスチジン/スクロース緩衝液中に予め溶解しておいた0.95mgのDXRと混合し、42℃で6時間インキュベートした。その後、DOCEおよびDXRの二薬を搭載したリポソームを、0.22 μmフィルターを通してろ過することにより滅菌して、リポソーム製剤CPT324Cを得た。CPT324C脂質溶液の組成(モル%)を表9に示す。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT324Cについて56nmであった。

【0142】

(表9) 実施例9の脂質組成

40

成分	CPT324C % (モル)*
Soy PC	27.6
コレステロール	36.9
mPEG2000-DSPE	4.8
DOTAP	30.7
DOCE	11.0
DXR	11.0

50

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0143】

実施例10：リポソーム製剤CPT313Cの調製

CPT313Cは、DC-コレステロールの存在下およびコレステロールの非存在下で調製した。33mgのSoy PC、20.5mgのDC-コレステロール、11mgのmPEG2000-DSPE、および4.4mgのDOCEを2.2mLの無水エタノール中に溶解することによって脂質/DOCE溶液を調製した。さらに、250mM硫酸アンモニウムの3つの水溶液(pH6.5)を使用した。上記4つの溶液の各々2.2mLを20mLシリンジに投入した。各シリンジを、チューブによって5ポートマニホールドの入口ポートに接続した。チューブを通して、シリンジ内の溶液を、シリンジポンプによってマニホールドの混合チャンバに送った。リポソーム溶液を出口ポートから出して、ガラスバイアル内に回収した。緩衝液をヒスチジン/スクロース緩衝液(10mMヒスチジン、9.2%スクロース、pH6.5)に透析により交換した。次に、この製剤を、0.22 μ mフィルターを通してろ過することによって滅菌した。

10

【0144】

次いで、2mLのDOCE搭載リポソームを、10mg/mLでヒスチジン/スクロース緩衝液中に予め溶解しておいた0.5mgのDXRと混合し、42 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートしたところ、DXRの90.6%が封入された。その後、封入されたリポソームを、0.22 μ mフィルターを通してろ過することにより滅菌して、リポソーム製剤CPT313Cを得た。CPT313C脂質溶液の組成(モル%)を表10に示す。二薬搭載リポソームのZ平均粒子径は、CPT313Cについて38.7nmであった。

20

【0145】

(表10) 実施例10の脂質組成

成分	CPT313C % (モル)*
Soy PC	50.4
mPEG2000-DSPE	4.4
DC-コレステロール	45.2
DOCE	6.5
DXR	6.5

30

*この値は総脂質に対する各成分のモル%を表す。

【0146】

実施例11：二薬搭載リポソームCPT319Cは非小細胞肺癌(NSCLC)に対する効力を増強させる

6~8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)緩衝液中のNSCLC細胞株A549腫瘍細胞(1×10^7 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後16日目に(腫瘍サイズはおよそ117mm³であった)、5mg/kgドキシソルピシンのCPT319A、7.5mg/kgドセタキセルでのCPT319B、5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルでのCPT319C、または5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルの非リポソーム複合製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。3回の追加治療を20日目、27日目、および34日目に行った。この試験を45日目に終了させた。PBS対照群と比較して、これらの製剤の45日目の腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を図3に示す。

40

【0147】

まとめると、図3は、二薬搭載リポソームCPT319Cが、NSCLC異種移植マウスモデルにおいて該製剤の抗腫瘍活性を増強させることを示す。リポソーム製剤の全てが非リポソームDOCE/DXR複合製剤よりも効果的であった。さらに、二薬搭載リポソームであるCPT319Cは、この実施例において最も効果の高い製剤であった。PBS対照群と比較して、CPT319Cは腫瘍重量の76%を減少させ、DOCEリポソームCPT319Bの51%、DXRリポソームCPT319Aの27%、および非リポソームDOCE/DXR複合製剤の17%よりも著しく効果的であった。

50

【 0 1 4 8 】

実施例12：二薬搭載リポソームCPT307Cは非小細胞肺癌(NSCLC)に対する効力を増強させる

6～8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のNSCLC細胞株A549腫瘍細胞(1×10^7 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後16日目に(腫瘍サイズはおよそ 117mm^3 であった)、5mg/kgドキソルビシンでのCPT307A、7.5mg/kgドセタキセルでのCPT307B、5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセルでのCPT307C、または5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセルの非リポソーム複合製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。3回の追加治療を20日目、27日目、および34日目に行った。この試験を45日目に終了させた。PBS対照群と比較して、これらの製剤の45日目の腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を図4に示す。

10

【 0 1 4 9 】

まとめると、図4は、二薬搭載リポソームCPT307Cが、非小細胞肺癌(NSCLC)に対する効力を増強させることを示す。リポソーム製剤の全てが非リポソームDOCE/DXR複合製剤よりも効果的であった。さらに、二薬搭載リポソームであるCPT307Cは、この実施例において最も効果が高かった。PBS対照群と比較して、二薬搭載リポソームCPT307Cは腫瘍重量の57%を減少させ、DOCEリポソームCPT307Bの44%、DXRリポソームCPT307Aの11%、および非リポソームDOCE/DXR複合製剤の17%よりも著しく効果的であった。

【 0 1 5 0 】

実施例13：異種移植マウスモデルにおけるヒト結腸癌に対する二薬搭載リポソームCPT319Cの抗腫瘍活性

20

6～8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のヒト結腸癌細胞株HCT-116腫瘍細胞(5×10^6 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後9日目に(腫瘍サイズはおよそ 141mm^3 であった)、CPT319Cの製剤を3つの異なる用量：5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセル、2.5mg/kgドキソルビシン/3.75mg/kgドセタキセル、または1.25mg/kgドキソルビシン/1.875mg/kgドセタキセルで用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。2回の追加治療を16日目と23日目に行った。この試験を37日目に終了させた。図5に示した腫瘍成長曲線は、HCT-116ヒト結腸癌異種移植モデルにおける該リポソーム製剤の用量応答を示す。PBS対照群と比較して、二薬搭載リポソームCPT319Cは、37日目のHCT-116腫瘍サイズを、5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセル群では77%、2.5mg/kgドキソルビシン/3.75mg/kgドセタキセル治療群では49%、1.25mg/kgドキソルビシン/1.875mg/kgドセタキセル治療群では29%縮小させた。

30

【 0 1 5 1 】

実施例14：異種移植マウスモデルにおけるヒト結腸癌に対する二薬搭載リポソームCPT307Cの抗腫瘍活性

6～8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のヒト結腸癌細胞株HCT-116腫瘍細胞(5×10^6 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後9日目に(腫瘍サイズはおよそ 141mm^3 であった)、CPT307Cの製剤を3つの異なる用量：5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセル、2.5mg/kgドキソルビシン/3.75mg/kgドセタキセル、または1.25mg/kgドキソルビシン/1.875mg/kgドセタキセルで用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。2回の追加治療を16日目と23日目に行った。この試験を37日目に終了させた。図6に示した腫瘍成長曲線は、HCT-116ヒト結腸癌異種移植モデルにおける該リポソーム製剤の用量応答を示す。PBS対照群と比較して、二薬搭載リポソームCPT307Cは、37日目のHCT-116腫瘍サイズを、5mg/kgドキソルビシン/7.5mg/kgドセタキセル群では67%、2.5mg/kgドキソルビシン/3.75mg/kgドセタキセル治療群では61%、1.25mg/kgドキソルビシン/1.875mg/kgドセタキセル治療群では45%縮小させた。

40

【 0 1 5 2 】

実施例15：異種移植マウスモデルにおけるヒト乳癌に対する二薬搭載リポソームCPT319CおよびCPT307Cの抗腫瘍活性

6～8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231腫瘍細胞(7×10^6 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接

50

種後7日目に(腫瘍サイズはおよそ174mm³であった)、5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルでのCPT319CまたはCPT307Cの製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。2回の追加治療を14日目と21日目に行った。この試験を31日目に終了させた。腫瘍成長曲線を図7に示す。

【0153】

まとめると、図7は、ヒト乳癌異種移植モデルにおけるCPT319CおよびCPT307Cの抗腫瘍活性を示す。PBS対照群と比較して、腫瘍サイズは、CPT319CおよびCPT307Cで治療した群において、それぞれ38%および32%縮小した。

【0154】

実施例16：異種移植マウスモデルにおけるヒト原発性肝細胞癌に対する二薬搭載リポソームCPT319Cの抗腫瘍活性

6~8週齢の雌Balb/cヌードマウスを3群に分けた。各マウスに、腫瘍発生のため、ヒト原発性肝細胞癌腫瘍細胞(P3 WP HCC)の断片を右脇腹に皮下接種した。腫瘍接種後32日目に(腫瘍サイズはおよそ143mm³であった)、5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルでのCPT319Cの製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。2回の追加治療を39日目と46日目に行った。この試験を63日目に終了させた。腫瘍成長曲線を図8に示す。

【0155】

まとめると、図8は、ヒト原発性HCC異種移植モデルにおけるCPT319Cの抗腫瘍活性を示す。腫瘍成長はCPT319Cによってほぼ完全に抑制された。具体的には、CPT319Cは、この試験を63日目に終了させたときに、ビヒクル対照群と比較して腫瘍の成長を88%抑制した。

【0156】

実施例17：カチオン性脂質DC-コレステロールはNSCLCに対するリポソームの抗腫瘍活性を高める

6~8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のNSCLC細胞株A549腫瘍細胞(1×10⁷細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後16日目に(腫瘍サイズはおよそ117mm³であった)、5mg/kgドキシソルピシンでのCPT307AまたはCPT319Aの製剤、7.5mg/kgドセタキセルでのCPT307BまたはCPT319Bの製剤、5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルでのCPT307CまたはCPT319Cの製剤、あるいは5mg/kgドキシソルピシン/7.5mg/kgドセタキセルの非リポソーム複合製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。3回の追加治療を20日目、27日目、および34日目に行った。この試験を45日目に終了させた。CPT307(DC-コレステロール不含)製剤およびCPT319(DC-コレステロール含有)製剤の脂質組成を表11に示す。腫瘍成長曲線を図9に示す。

【0157】

まとめると、図9は、カチオン性脂質DC-コレステロールがNSCLCに対するリポソームの抗腫瘍活性を高めることができることを示す。腫瘍抑制順位(低から高へ)は次のとおりであった：

PBS < CPT307A < CPT319A < CPT307B < CPT319B < CPT307C < CPT319C。それぞれの場合に、CPT319(DC-コレステロール含有)は、CPT307(DC-コレステロール不含)よりも例外なしに効果があり、カチオン性脂質DC-コレステロールの配合はリポソーム製剤の抗腫瘍効力を高めることが示された。

【0158】

(表11) 実施例17の脂質組成

製剤	DC-コレステロール	コレステロール	mPEG-DSPE	DOPC
CPT319	15	18	5	62
CPT307	0	24	6	70

【0159】

実施例18：カチオン性脂質DC-コレステロールは結腸癌に対するリポソームの抗腫瘍活性

10

20

30

40

50

を高める

6~8週齢の雌Balb/cヌードマウスに、腫瘍発生のため、0.1mLのPBS緩衝液中のヒト結腸癌細胞株HCT-116腫瘍細胞(5×10^6 細胞/マウス)を右脇腹に皮下接種した。腫瘍細胞の接種後9日目に(腫瘍サイズはおよそ141mm³であった)、5mg/kg DXR/7.5mg/kg DOCEでのCPT319C(DC-コレステロール含有)またはCPT307C(DC-コレステロール不含)の製剤を用いて、尾静脈への静脈内(IV)注射により治療を開始した。2回の追加治療を16日目および23日目に行った。この試験を37日目に終了させた。ビヒクル対照群と比較して、これらの製剤の37日目における腫瘍成長曲線および腫瘍重量抑制率(TW抑制%)を図10に示す。

【0160】

まとめると、図10は、カチオン性脂質DC-コレステロールが結腸癌に対するリポソームの抗腫瘍活性を高めることができることを示す。CPT319C(DC-コレステロール含有)は、CPT307C(DC-コレステロール不含)よりも効果があり、カチオン性脂質DC-コレステロールの配合はリポソーム製剤の抗腫瘍効力を高めることが示された。

10

【0161】

実施例19：リポソームは薬物動態(PK)を改善し、カチオン性脂質DC-コレステロールはDXRの半減期($t_{1/2}$)を増加させる

体重20~25gの雄CD-1マウスを3群に分けた。各マウスに、5mg/kg DXR/7.5mg/kg DOCEでのCPT319CまたはCPT307Cの1回量を、尾静脈への静脈内(IV)注射によって投与した。DXR/DOCEの非リポソーム複合製剤を対照として使用した。注射の0.167、1、3、8、24および48時間後に血液サンプルを採取した。DXR血漿濃度を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によって測定した。DXRの血漿濃度曲線を図11に示す。

20

【0162】

まとめると、図11は、リポソームが薬物動態を改善でき、かつカチオン性脂質DC-コレステロールがDXRの半減期($t_{1/2}$)を増加させることを示す。BLOQ = 定量下限未満(Below Limit of Quantitation)。 $t_{1/2}$ および血漿濃度時間曲線下面積(AUC)を以下の表に示す。非リポソームDXRは血液から速やかに除去されて、非常に低いAUC(688時間×ng/mL)をもたらしたが、CPT319CおよびCPT307Cはそれぞれ、AUCを143倍および204倍増加させた。さらに、CPT307Cの $t_{1/2}$ が1時間であるのに対して、CPT319Cは5.9時間の $t_{1/2}$ を示し、CPT319C中のカチオン性脂質DC-コレステロールは、血液中の循環時間を増加させることによって該製剤のPKを改善することが示された。

30

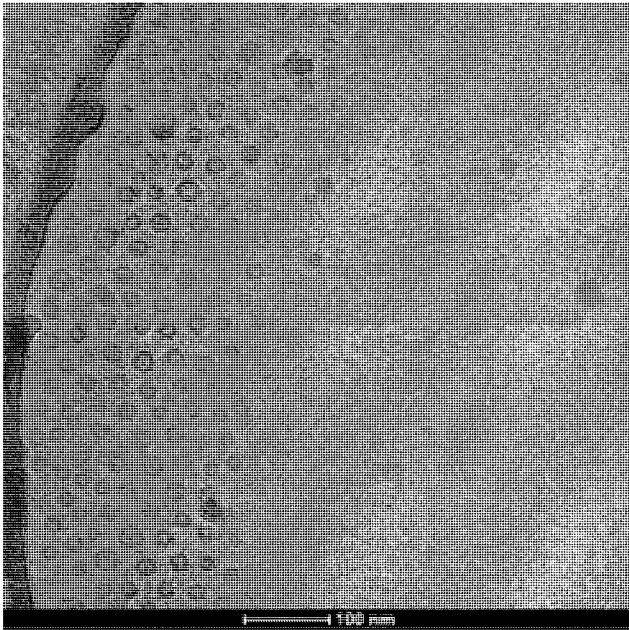
【0163】

(表12) CD-1マウスにおけるDXRの $t_{1/2}$ およびAUC

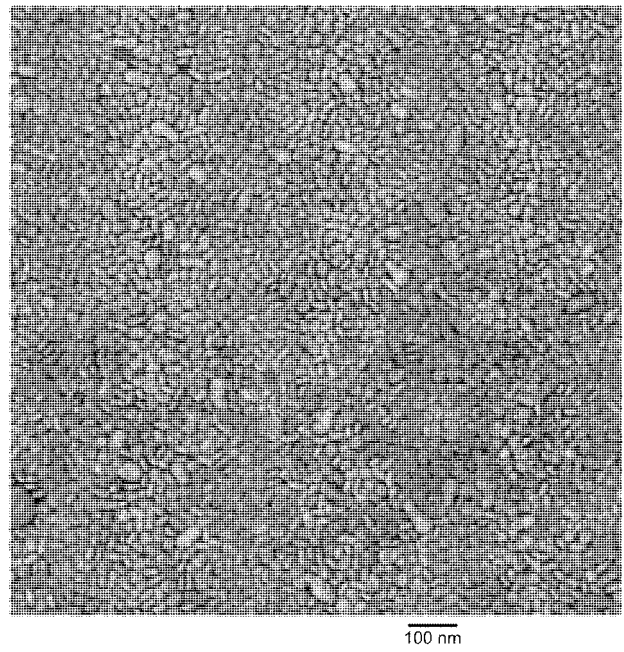
製剤	$t_{1/2}$ (h)	AUC (h*ng/mL)
CPT309C	5.9	98628
CPT307C	1.0	140398
裸のドキソルビシン		688

40

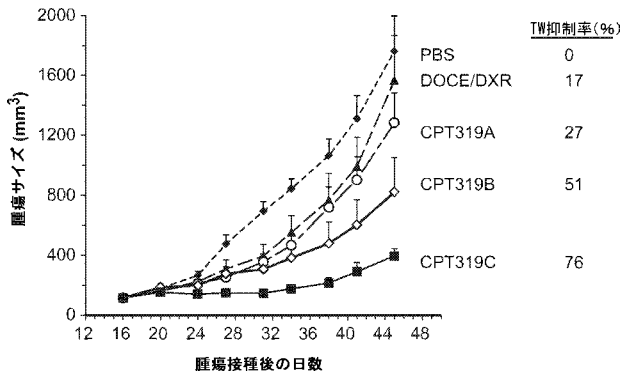
【 図 1 】



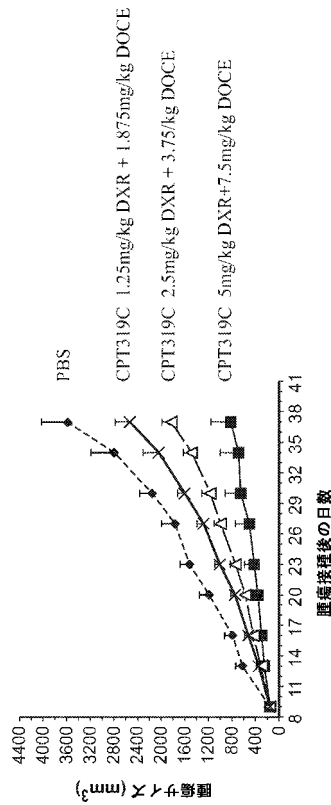
【 図 2 】



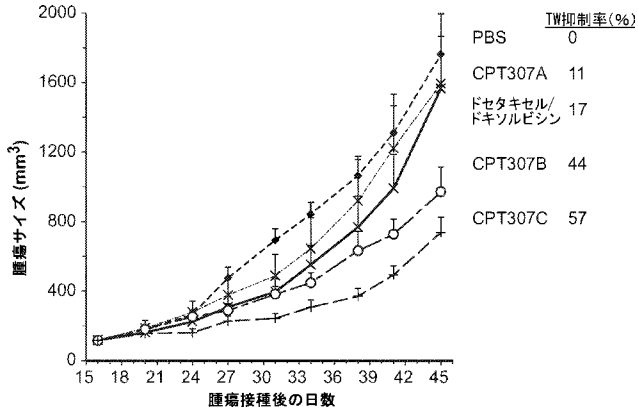
【 図 3 】



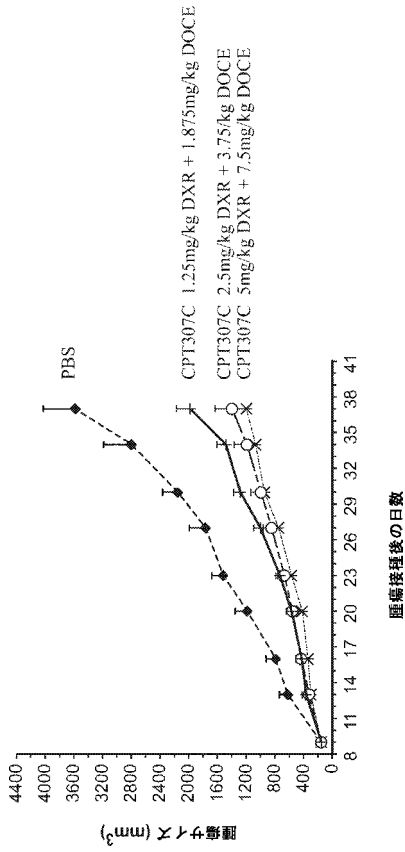
【 図 5 】



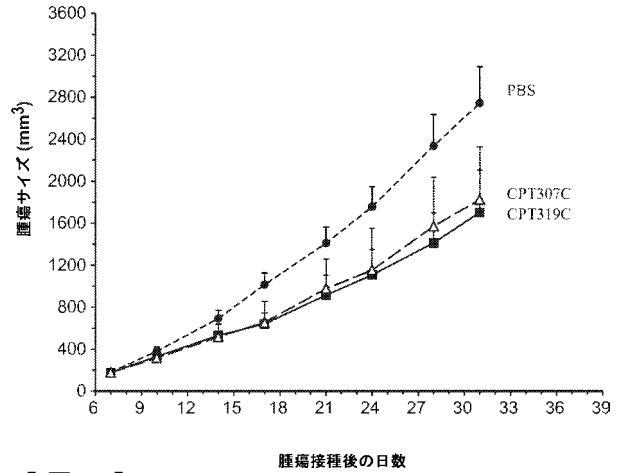
【 図 4 】



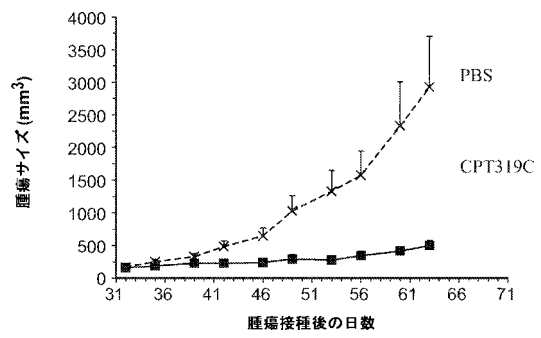
【 図 6 】



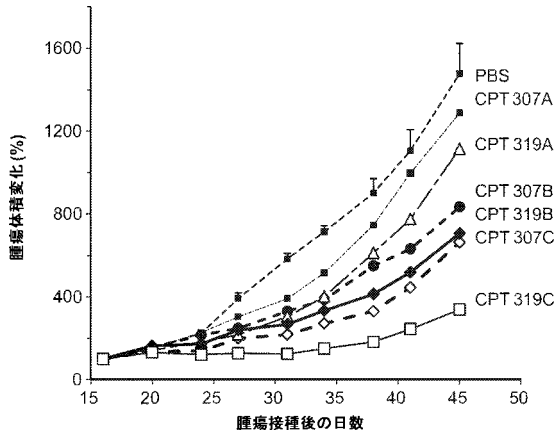
【 図 7 】



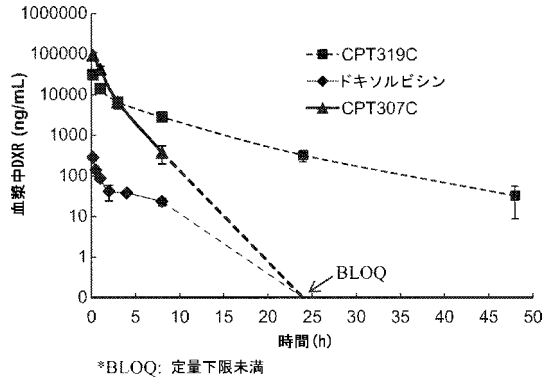
【 図 8 】



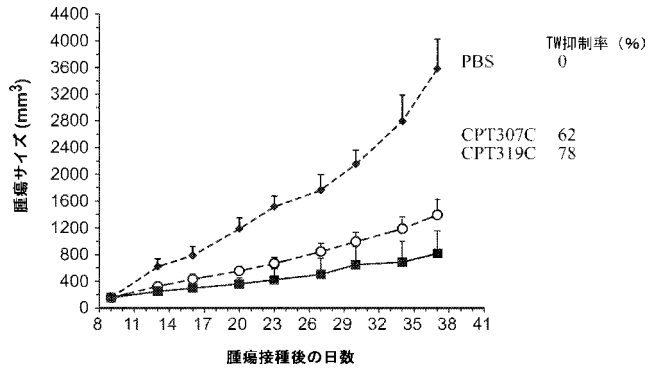
【 図 9 】



【 図 11 】



【 図 10 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US16/20647									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/26, 9/127, 49/18 (2016.01) CPC - A61K 9/127, 49/18 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) IPC(8): A61K 9/26, 9/127, 49/18; A61P 35/00, 35/04 (2016.01) CPC: A61K 9/127, 47/48815, 49/18, 51/1234 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; PubMed; EBSCO; SureChEMBL; Cureport, Zhu, Chen, liposome, pharmaceutical ingredient, API, drug, medication, docetaxel, doxorubicin, lipid, layer, unsaturated phospholipid, cholesterol, pegylated phospholipid, PEG, aqueous interior, water, crystal, precipitate											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2009/0098212 A1 (FOSSHEIM, S et al) 16 April 2009; paragraphs [0001], [0006], [0034]-[0035], [0039], [0041], [0050], [0059], [0071]-[0072]</td> <td style="text-align: center;">1-3, 4/1-3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2011/0070284 A1 (JAVERI, I et al) 24 March 2011; paragraphs [0025], [0084], [0109]</td> <td style="text-align: center;">1-3, 4/1-3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2009/0098212 A1 (FOSSHEIM, S et al) 16 April 2009; paragraphs [0001], [0006], [0034]-[0035], [0039], [0041], [0050], [0059], [0071]-[0072]	1-3, 4/1-3	Y	US 2011/0070284 A1 (JAVERI, I et al) 24 March 2011; paragraphs [0025], [0084], [0109]	1-3, 4/1-3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	US 2009/0098212 A1 (FOSSHEIM, S et al) 16 April 2009; paragraphs [0001], [0006], [0034]-[0035], [0039], [0041], [0050], [0059], [0071]-[0072]	1-3, 4/1-3									
Y	US 2011/0070284 A1 (JAVERI, I et al) 24 March 2011; paragraphs [0025], [0084], [0109]	1-3, 4/1-3									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.											
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> * 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "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 </td> </tr> </table>			* 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							
* 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 22 April 2016 (22.04.2016)		Date of mailing of the international search report <div style="font-size: 1.5em; font-weight: bold; text-align: center;">05 MAY 2016</div>									
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 <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Shane Thomas</div> PCT Helpline: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/20647

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. 5-20
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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.:

- 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.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	

(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

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

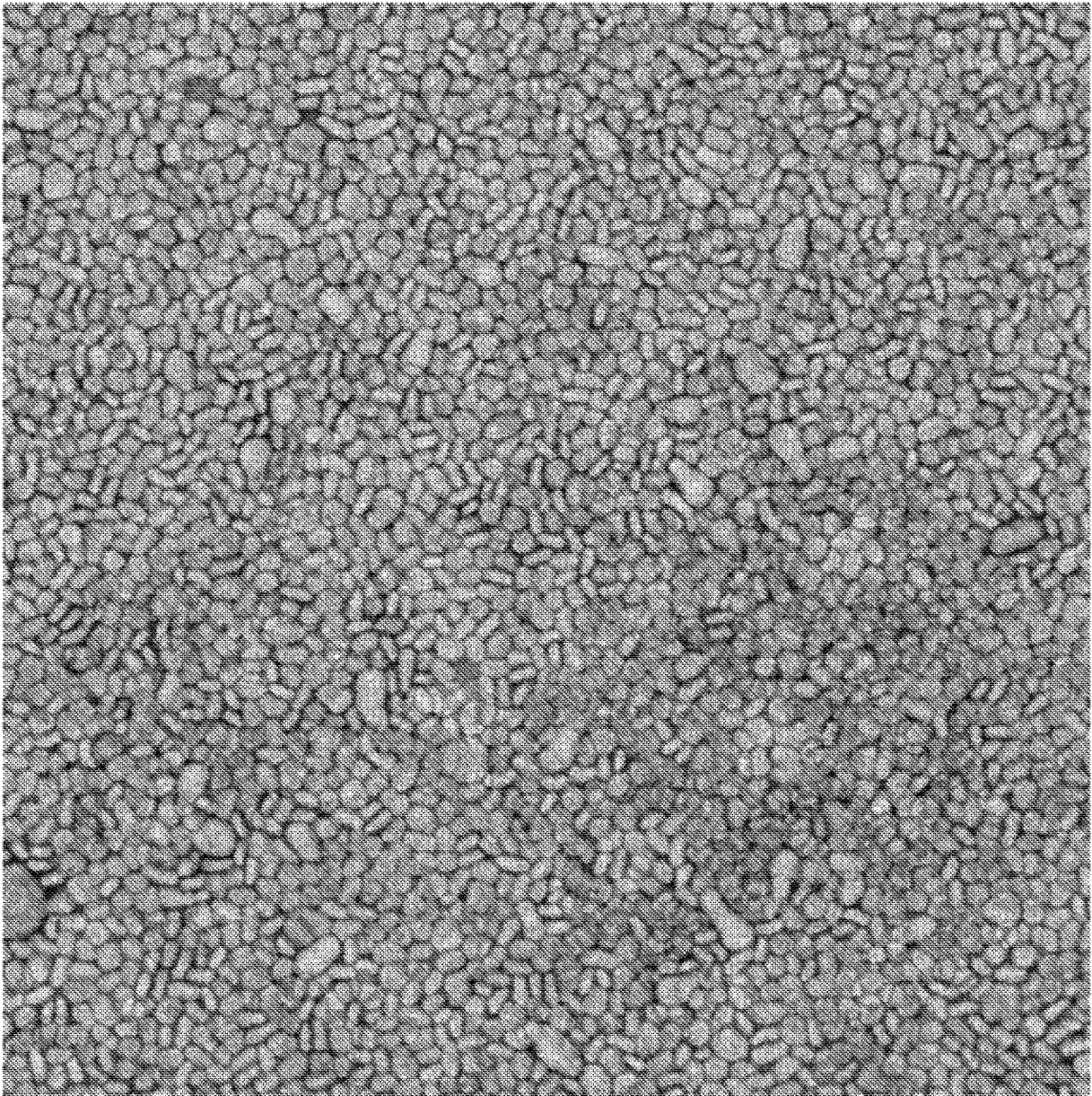
(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ジュ デ - ミン
アメリカ合衆国 0 1 5 8 1 マサチューセッツ州 ウェストボロー ケンドール ドライブ 2
3

(72) 発明者 チェン グオチャン
アメリカ合衆国 0 1 5 4 5 マサチューセッツ州 シュルースベリー ストーニー ヒル ロード 5 7

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB13 CC27 CC47 DD63 DD70 EE23 FF67 FF68
FF70 GG50
4C086 BA02 EA10 MA24 MA65 MA66 NA05 NA06 NA10 NA13 ZB26
ZB27 ZC75

【要約の続き】



100 nm