

(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2018-528269

(P2018-528269A)

(43) 公表日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(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	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	4 C 0 8 3
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-528372 (P2018-528372)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月19日 (2016. 8. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月16日 (2018. 4. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/096005
 (87) 国際公開番号 W02017/028811
 (87) 国際公開日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)
 (31) 優先権主張番号 201510509404.8
 (32) 優先日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

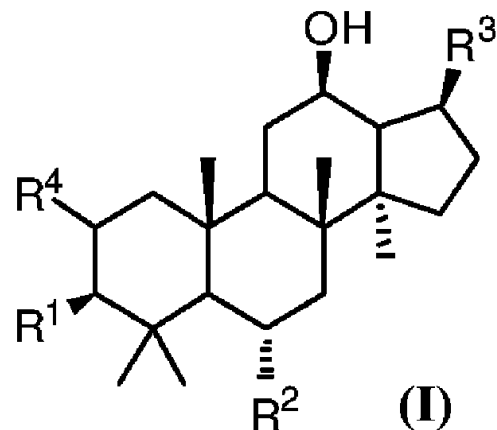
(71) 出願人 518056449
 シャンハイ ギンボサム ファーマテック
 カンパニー リミテッド
 中華人民共和国, シャンハイ, ソンチアン
 ディストリクト, シンチャオ タウン,
 ミンイ ロード, ナンバー201, ビルデ
 イング 20, シックス フロアー
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 リ, チョング
 中華人民共和国, シャンハイ, ソンチアン
 ディストリクト, シンチャオ タウン,
 ミンイ ロード, ナンバー201, ビルデ
 イング 20, シックス フロアー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ギンセノシドを膜材料として有するリポソームならびにその調製および使用

(57) 【要約】

ブランクリポソームは、活性物質（例えば、薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質など）が充填され得る、脂質および式 I のギンセノシドを含む膜を有する。

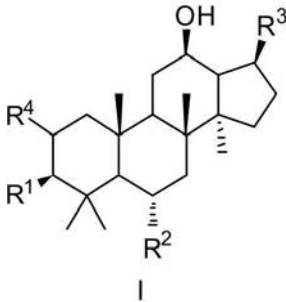


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膜を有するプラנקリポソームであって、前記膜が、脂質と、式 I のギンセノシドとを含む、プラנקリポソーム：

【化 1】

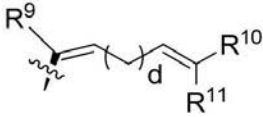


式中、

R^1 および R^2 のそれぞれが独立して、H、OH または R^5 であり、ならびに R^1 および R^2 は同時にともに H ではない；

R^3 は

【化 2】



または

【化 3】



である；

R^4 は、H、OH または R^5 である；

R^5 は、 R^6 、 R^7 または R^8 である；

R^6 は、-O-Glc、-O-Rha、-O-Lyx、-O-Xyl、-O-Ara(p)、-O-Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc、-O-Glc(6-1)Glc、-O-Glc(2-1)Rha、-O-Glc(2-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Rha、-O-Glc(2-1)Ara(p)、-O-Glc(6-1)Ara(p)、-O-Glc(2-1)Ara(f)、-O-Glc(6-1)Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Glc、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Xyl、-O-Glc(2-1)Glc(4-1)Xyl、-O-Glc(2-1)Lyx、-O-Glc(6-1)Lyx、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Rha、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Lyx、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Ara(p)、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Glc、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Rha、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Xyl、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Lyx、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Ara(p)、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Glc、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Rha、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Lyx、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Ara(f)、-O-Glc(6-1)Glc(2-1)Ara(p)、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Glc、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Rha、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Lyx、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Ara(f) または -O-Glc(6-1)Glc(6-1)Ara(p) からなる群から選択される；

10

20

30

40

50

R⁷ は、R⁶ における 1 つまたは複数の OH 基を R⁸ により置換することによって形成された基であり、前記 1 つまたは 2 つ以上の R⁸ 基のそれぞれが独立して、互いに同じまたは異なり得る；

R⁸ は、

I) -mPEG、-Z-mPEG、-mPEO、-Z-PEO、-mPVP、-Z-PVP、-mEPEG または -Z-EPEG (式中、m は、H、アルキルまたはアシルであり、Z は、-CO(CH₂)_aCO-、-NH(CH₂)_aCO-、-NH(CH₂)_bX- または -CO-Ar-CH₂- であり、X は、O、S または NH であり、a は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 であり、b は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 である) である；または

II) C₄₋₂₂ 脂肪族アシル、ホスファート基、コハク酸エステル基、n-ブチル酸エステル基、スルホナート基、リンゴ酸エステル基または硫酸ナトリウム塩である；または

III) Boc-グリシン、Boc-アラニン、Boc-アルギニン、Boc-リシン、Boc-セリン、アセチルフェニルアラニン、アセチル-プロリン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンまたはバリンに含まれるカルボキシルを脱水素化することによって形成された基である；または

IV) -O-PEO、-O-PVP、-O-PEG、-O-MPEG、-O-EPEG、-O-Glc(2-1)Glc(6-1)Mal または -O-Glc(2-1)Glc(6-1)Ac である；

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹² および R¹³ のそれぞれが独立して、C₁₋₃ アルキルである；

d および e のそれぞれが独立して、1、2 または 3 である；ならびに

前記式 I のギンセノシドは必要に応じて、その 1 つまたは複数の OH 基を 1 つまたは複数の R⁸ 基により置換することによって修飾することができ、および前記 R⁸ 置換基 (2 つ以上のとき) のそれぞれは独立して互いに同じまたは異なり得る。

【請求項 2】

前記ギンセノシドが、ギンセノシド Rg5、ギンセノシド Rg6、ギンセノシド Rk1、ギンセノシド Rk2、ギンセノシド Rk3、ギンセノシド Rk4、ギンセノシド Rh3、ギンセノシド Rh4、ギンセノシド F4、ギンセノシド Rs4、ギンセノシド Rs5、ギンセノシド Rs6、ギンセノシド Rs7、ノトギンセノシド T5、ダムリン (damulin) A または ダムリン B を含む、請求項 1 に記載のブランクリポソーム。

【請求項 3】

前記膜における前記脂質がリン脂質を含み、前記リン脂質の前記ギンセノシドに対する質量比率が、0.5 : 1 から 100 : 1 までの範囲、0.5 : 1 から 20 : 1 までの範囲、または 0.5 : 1 から 2 : 1 までの範囲である、請求項 1 または 2 に記載のブランクリポソーム。

【請求項 4】

前記膜における前記脂質がリン脂質を含み、前記膜がさらにコレステロールを含み、前記膜における前記リン脂質の、式 I の前記ギンセノシドに対する質量比率が、1 : 0.01 から 1 : 3 までの範囲、1 : 0.05 から 1 : 0.9 までの範囲、または 1 : 0.1 から 1 : 0.9 までの範囲であり、および、式 I の前記ギンセノシドの、前記コレステロールに対する質量比率が、0.1 : 1 から 100 : 1 までの範囲、0.5 : 1 から 10 : 1 までの範囲、または 1.5 : 1 から 6 : 1 までの範囲である、請求項 1 ~ 3 の少なくとも一項に記載のブランクリポソーム。

【請求項 5】

前記膜における前記式 I のギンセノシドの質量百分率が、0.01% ~ 80%、10% ~ 80%、10% ~ 40%、または 20% ~ 40% の範囲であり、前記膜における前記リ

10

20

30

40

50

ン脂質の質量百分率が、5%～99.9%、10%～70%、30%～70%、または30%～60%の範囲にあり、および、前記膜における前記コレステロールの質量百分率が50%未満である、または0.5%～50%、5%～40%、もしくは5%～30%の範囲である、請求項3または4に記載のブランクリポソーム。

【請求項6】

酸化防止剤、凍結保護剤、またはダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウムをさらに含み、かつ、前記膜内に封入し、前記酸化防止剤のブランクリポソーム中の質量百分率が、25%以下、0.001%～15%の範囲、0.01%～10%の範囲、または0.01%～5%の範囲であり、前記凍結保護剤のブランクリポソーム中の質量百分率が、80%以下であり、または、0.5%～60%、5%～60%、もしくは30%～60%の範囲であり、および、前記ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムのブランクリポソーム中の質量百分率が、1%～90%、15%～80%、20%～70%、20%～30%、または60%～70%の範囲である、請求項3～5の少なくとも一項に記載のブランクリポソーム。

10

【請求項7】

前記リン脂質が、天然のリン脂質、半合成のリン脂質、または全合成のリン脂質を含み、前記天然のリン脂質が、天然のレシチン、ダイズレシチン、卵レシチン、またはセファリンを含み、前記半合成のリン脂質または前記全合成のリン脂質が、ホスファチジルコリンのリン脂質、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミンのリン脂質、ホスファチジルグリセロール、ジセチルホスファート、PEG修飾のリン脂質、コレステロールスクシナートまたは1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンを含み、ホスファチジルコリンの前記リン脂質が、水素化ダイズレシチン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン、単一パルミトイルホスファチジルコリンまたはグリセロールホスファチジルコリンを含み、ホスファチジルエタノールアミンの前記リン脂質が、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジエルコイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンまたはジミリストイルホスファチジルエタノールアミンを含み、前記PEG修飾のリン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン-PEG、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-PEG、C8セラミド-PEG、C16セラミド-PEG、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-スクシニル、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-カルボキシル、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-プロピオンアミドビス-メルカプトピリジン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-シアヌル酸塩化物、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-アミノ、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ビオチン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ホラート、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ホラート、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル、ホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ビオチン、ジステアロイルホスファチジル

20

30

40

50

エタノールアミン - PEG - フルオレセイン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - ヒドロキシル、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - アミノ、ホスファチジルエタノールアミン - PEG - アミノ、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - アミノ、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - アミノ、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - カルボキシル、ホスファチジルエタノールアミン - PEG - カルボキシル、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - カルボキシル、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - カルボキシル、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - チオール、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - シラン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン - PEG - アジド、コレステロール - PEG、メトキシル - PEG - コレステロール、コレステロール - PEG - 活性エステル、コレステロール - PEG - マレイミド、コレステロール - PEG - ビオチン、コレステロール - PEG - フルオレセイン、コレステロール - PEG - カルボキシル、コレステロール - PEG - アミノまたはコレステロール - PEG - チオールを含み、前記酸化防止剤が、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 α -ヒドロキシ酸、フラボノイド、フェニルプロパノイドフェノール系化合物、ビタミンE、ビタミンC、フマル酸、システイン、メチオニン、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、チオジプロピオン酸、亜硫酸塩、ヒドロ亜硫酸塩、ジチオアミノ安息香酸化合物、クエン酸、リンゴ酸、ソルビトール、グリセロール、プロピレングリコール、ヒドロキノン、ヒドロキシクマリン、エタノールアミン、リン酸または亜リン酸を含み、前記凍結保護剤が、糖質、ポリオール、アミノ酸または緩衝剤試薬を含み、前記糖質が、単糖、二糖または多糖を含み、前記単糖が、グルコース、マンニトール、キシリトールまたはソルビトールを含み、前記二糖が、スクロース、ラクトース、マルトースまたはガラクトースを含み、前記多糖がトレハロースを含み、前記ポリオールがプロパンジオールまたはグリセロールを含み、前記アミノ酸が、トレオニン、グリシン、グルタミン酸、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を含み、前記緩衝剤試薬が、pHが3~10の範囲または5~7の範囲である緩衝液を含み、前記緩衝液が、エタノール - 酢酸緩衝液、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液、バルピタール緩衝液、ギ酸ナトリウム緩衝液、フタル酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、クエン酸 - リン酸水素二ナトリウム緩衝液、アンモニア - 塩化アンモニウム緩衝液、ホウ砂 - 塩化カルシウム緩衝液、酢酸塩緩衝液、酢酸 - リチウム塩緩衝液、酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸 - 酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸 - トリエチルアミン緩衝液またはリン酸塩緩衝液を含む、請求項3~6の少なくとも一項に記載のブランクリポソーム。

【請求項8】

界面活性剤、感熱性賦形剤、pH感受性材料またはイオン添加剤をさらに含み、かつ、前記膜内に封入し、前記界面活性剤がポリエチレングリコールおよび/またはポリソルベートを含み、前記ポリエチレングリコールが200~8000の数平均分子量を有し、前記ポリソルベートが、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミタート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレアート、PEG - ホスファチジルエタノールアミン、PEG - ポリ乳酸、ポリリシン - ポリ(乳酸 - グリコール酸共重合体)、ポリエーテルイミド - ポリ乳酸、PEG - ポリカプロラクトン、PEG - ポリ(乳酸 - グリコール酸共重合体)、ポロキサマー188、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エーテルまたはポリオキシエチレンメチルヒマシ油エーテルを含み、前記感熱性賦形剤が、ポリマー、薬物または界面活性剤を含み、かつ、熱感受性を前記リポソームにもたらし、前記ポリマーが、ポリイソブレンアクリルアミド、ポリイソブレンアクリル酸、ポリホスファート、またはポリリン脂質 - アミドコポリマーを含み、前記薬物が、ガジュツウコン油、エレメンまたはニガキモドキ(*brucea javanica*)油を含み、前記イオン添加剤がカチオン性添加剤またはアニオン添加剤を含み、前記カチオン性添

加剤がオクタデシルアミンを含み、前記アニオン添加剤がホスファチジン酸またはホスファチジルセリンを含む、請求項 1 ~ 7 の少なくとも一項に記載のブランクリポソーム。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 の少なくとも一項に記載のブランクリポソームを調製するためのプロセスであって、第 1 の方法または第 2 の方法を含み、前記第 1 の方法または前記第 1 の方法によって調製された前記ブランクリポソームは凍結保護剤を含まず、および、前記第 2 の方法または前記第 2 の方法によって調製された前記ブランクリポソームは凍結保護剤を含み、

前記第 1 の方法が、下記の工程：

(1) 脂質および式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有してもよい水と混合して、水性混合物を得て、前記混合物を、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でろ過して、ブランクリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記ブランクリポソームを得る工程

を含み、

前記第 2 の方法が、下記の工程：

(1) 脂質および式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、前記混合物を、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でろ過して、ブランクリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記ブランクリポソームを得る工程

を含み、

前記脂質、前記式 I のギンセノシド、前記コレステロール、前記酸化防止剤、前記ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、前記凍結保護剤、前記界面活性剤、前記感熱性賦形剤、前記 pH 感受性材料、ならびに前記イオン添加剤は、請求項 1 ~ 8 において定義される通りであり、ならびに、前記有機溶媒は、ニトリル溶媒、 C_{1-4} アルコール溶媒、ケトン溶媒、アルカン溶媒、エーテル溶媒、ハロゲン化炭化水素溶媒、スルホキシド溶媒またはアルデヒド溶媒を含む、プロセス。

【請求項 10】

前記有機溶媒が、 C_{1-4} アルコール溶媒、ニトリル溶媒、エーテル溶媒またはハロゲン化炭化水素溶媒を含み、前記ニトリル溶媒がアセトニトリルを含み、前記 C_{1-4} アルコール溶媒が、メタノール、エタノール、イソプロパノールまたは *n*-ブタノールを含み、前記エーテル溶媒がテトラヒドロフランまたはジエチルエーテルを含み、前記ハロゲン化炭化水素溶媒がクロロホルムまたはジクロロメタンを含み、前記ケトン溶媒がアセトンまたはブタノンを含み、前記アルカン溶媒が石油エーテルを含み、前記第 1 または第 2 の方法の工程 (1) における前記有機溶媒の体積の、前記有機溶媒に溶解された成分の総質量に対する比率が、 $5 \text{ mL/g} \sim 20 \text{ mL/g}$ であり、前記第 1 または第 2 の方法の工程 (1) が、 $0 \sim 80$ 、 $10 \sim 80$ 、または $10 \sim 65$ の温度で行われ、前記第 1 または第 2 の方法の工程 (2) において、工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒の除去が、ロータリーエバポレーターまたは膜エバポレーターを用いて 25

10

20

30

40

50

～ 80 の温度で行われ、

前記第 1 の方法または第 2 の方法の工程 (2) において、前記ろ過が微多孔膜ろ過であり、前記微多孔膜の細孔サイズが好ましくは 0 . 22 ミクロンであり、および

前記第 2 の方法の工程 (2) において、前記凍結保護剤水溶液が 5 % ~ 10 % の質量百分率の前記凍結保護剤を有し、

前記第 1 の方法または第 2 の方法の工程 (2) において、凍結乾燥機が乾燥のために使用される、請求項 9 に記載のプロセス。

【請求項 11】

活性物質を充填するおよび膜内に封入するリポソームを調製することにおける、請求項 1 ~ 8 の少なくとも一項に記載のブランクリポソームの使用であって、前記活性物質が、
10 薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質を含む、使用。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 の少なくとも一項に記載のブランクリポソームと、前記リポソーム膜内に充填されたおよび封入された活性物質とを含む充填型リポソームであって、前記活性物質が、薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質を含み、および、前記リポソームが請求項 1 ~ 8 の少なくとも一項に記載のブランクリポソームである、充填型リポソーム。

【請求項 13】

前記薬物が、抗腫瘍薬、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗生物質、非ステロイド性抗炎症薬、カルシウムイオンアンタゴニスト、免疫抑制剤、麻酔剤、心臓血管薬もしくは血管拡張薬、胃腸薬、抗うつ薬、生物学的作用因子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド (リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含む) を含み、前記抗腫瘍薬が、
20 パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル、イリノテカン塩酸塩、ヒドロキシカンプトテシン、アミノカンプトテシン、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトテシン、トポテカン塩酸塩、ルルトテカン (l u r t o t e c a n) 、トポテカン、ベロテカン (b e l o t e c a n) 、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、ロバプラチン (l o b a p l a t i n) 、サトラプラチン、ミリプラチン、アミル白金 (a m y l p l a t i n u m) 、アロプラチン (a r o p l a t i n) 、カルムスチン、クロラムブシル、メルファラン、ハリングトニン、ホモハリングトニン、トリプトリド (t r i p t o l i d e) 、タクロリムス、ダウノルピシン、ピンヤンマイシン (p i n g y a n g m y c i n) 、塩酸ドキシソルピシン、イダルピシン、フルオロウラシル、シタラビン、メトトレキサート、エトポシドリン酸塩、デスオキシ - ポドフィロトキシン、フ
30 ペルジン (h u p e r z i n e) - A 、ピノレルピン酒石酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、ピンラスチン硫酸塩、ピノレルピン、ピンデシン硫酸塩、テモゾロミド、テガフル、シクロホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、エポチロン A 、エポチロン B 、エポチロン C 、エポチロン D 、エポチロン E 、エポチロン F 、ボルテゾミブ、ゲムシタピン塩酸塩、フルダラビンリン酸塩、カペシタピン、デシタピン、ペメトレキセド二ナトリウム、ソラフェニブ、組換えヒトインターフェロン a 2 b 、シトシンアラビノシド、a l l - t r a n s - レチノイン酸、インターロイキン - 2 、エトポシド、チミジル酸シタラゼ阻害剤、ミトキサントロン、ミノキシジル、アジスロマイシン、エビルピシン塩酸塩、
40 塩酸ドキシソルピシン (アドリアマイシン) 、アムルピシン塩酸塩、5 - アミノレプリリン酸、ゲフィチニブ、イマチニブ、エルロチニブ、スニチニブ、ダサチニブ、ラパチニブ、アキシチニブ、アパチニブ、ニロチニブ、ボスチニブ、バンデタニブ、テラチニブ (t e l a t i n i b) 、ネラチニブ、カルネチニブ、サラカチニブ (s a r a c a t i n i b) 、オクテニジン (o c t e n i d i n e) 、ソラフェニブ、イコチニブ (i c o t i n i b) 、ムブリチニブ (m u b r i t i n i b) 、レスタウルチニブ、タンズチニブ (t a n d u t i n i b) 、ドビチニブ (d o v i t i n i b) 、3 ' , 5 ' - ジバルミトイルシクロシチジンまたはクルクメノール (c u r c u m e n o l) を含み、前記抗真菌薬が、
50 アムホテリシン B 、ゲンタマイシン、インドメタシン、ペニシリン G 、エコナゾール硝酸塩、フルシトシン、フルコナゾール、イトラコナゾール、ポリコナゾール、ボサコナゾ

ール、ラブコナゾール、カスポファンギン、ミカファンギン、アニデュラファンギン、セフピラミドナトリウム、セフォタキシムナトリウム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフジトレンピボキシル、セフォキシチンナトリウム、セファレキシン、セフロキシムナトリウム、セフィキシム、セフポドキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフスロジン、セファゾナム (cefazone)、セフチゾキシム、セフェタメトピボキシル、セフテラムピボキシル、セフチブテン、セフジニル、セファマンドール、セフォチアム、セフォラニド、セフォニシド、セフタジジム、セフラジン、セフプロジル、セファゾリンナトリウム、セファドロキシル、セファロチン、セファチアミジン (cefathiamidine)、セファロリジン、セファセトリル、セフタゾール、セファピリン、セフピロム、セフクリジン (cefclidin)、セフェピム、フシジン酸ナトリウム、フロルフェニコールまたはチゲサイクリンを含み、前記抗ウイルス薬が、リバビリン、アシクロビル、シタラビン、イドクスウリジン、アシクロビルラウラート、アシクロビルバルミタート、ヨードデオキシウリジン、シクロシチジン、ジバルミトイルシクロシチジン、リン酸ホルマート、リン酸アセタート、シメチジン、ジピリダモール、リファンピン、イソニアジド、プラジクワンテル、ドキシサイクリン、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、チプラナビル、BMS 232632、ラミブジン、ジドブジン、ジダノシン、ザルシタビン、スタブジン、アバカビル、アデホビルジピボアイル (adefovirdipivooail)、テノホビ (tenofovi)、フルオロラミブジン、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンス (efavirenz)、インターロイキン - 2、チルミコシンまたはジクラズリルを含み、前記抗生物質が、ペニシリン、ペニシリン V、アモキシシリン、アンピシリン、オキサシリン、クロキサシリン、プロカインペニシリン、ベンザチンペニシリン、ピペラシリン、メズロシリン、チカルシリン、アズロシリン、メズロシリン、カルペニシリン、スルベニシリン、フルブシリン (furbucillin)、ナフシリン、ジクロキサシリン、ピバンピシリン、アパルシリン (apalcillin)、アスポキシシリン、ピブメシリナム、メチシリン、レナンピシリン (lenampicillin)、ホミダシリン (fomidacillin)、フルクロキサシリン、カナマイシン、ナタマイシン (natamycin)、マイトマイシン、アミカシン、チロシン、ベルテポルフイン、セフピラミドナトリウム、ネチルマイシン硫酸塩、アジスロマイシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、ロメフロキサシン、ペフロキサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、モキシフロキサシン、グレバフロキサシン、トロバフロキサシン、ノルフロキサシン、ゲミフロキサシン、ガチフロキサシン、トスフロキサシン、パズフロキサシン、スパルフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、ポリミキシン、トブラマイシン、バンコマイシン、アジスロマイシン、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ミノサイクリン、オーレオマイシン、グアメサイクリン (guamecycline)、デメクロサイクリン、メタサイクリン、エチマイシン (etimicin)、ネチルマイシン、シソマイシン、アミカシン、アルベカシン、ジベカシン、アズトレオナム、メロベネム、イミベネム、チエナマイシン、パニベネム、エルタベネム、ネオマイシン、パロモマイシンまたはスペクチノマイシンを含み、前記カルシウムイオンアンタゴニストが、ニモジピン、ニフェジピン、ニカルジピン、ニトレンジピン、ベラパミル、アムロジピン、ジルチアゼム、フルナリジン、プレンプラミン (prenlamine)、ガロパミルまたはチアパミルを含み、前記非ステロイド性抗炎症薬が、インドメタシン、アスピリン、パラセタモール、ナブロキセン、ジクロフェナク、イブプロフェン、ニメスリド、ロフェコキシブまたはセレコキシブを含み、前記免疫抑制剤が、シクロスポリン (cyclosporin)、アルプロスタジル、シクロスポリン (cyclosporine)、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチルまたはミゾリピンを含み、前記麻酔薬が、ハロタン、セボフルラン、イソフルラン、エンフルラン、プロポフォール、フェンタニル、ウレタン、リドカイン、プロカイン、テトラカイン、プピバカイン、ペルトバルピタラムナトリウム (pelltobarbitalum natrium)、抱水クロラール、ケタミン、モルヒネまたはクロラロースを含

み、前記心臓血管薬または血管拡張薬が、ダビガトランエテキシラート、アログリプチン、多糖類ナトリウム、ギンコライド、イチョウフラボノイド、イチョウエキス、アサロン、オルメサルタンメドキシミ、レバグリニド、リボ酸、ブレビスカピン (breviscapine)、ウラピジル、ナイアシン、カプトプリル、ロサルタン、プエラリン、タンシノン (tanshinone) IIA、サルボグレラート塩酸塩、フルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、メバスタチン、セリバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチンカルシウムまたはロスバスタチンカルシウムを含み、前記胃腸薬が、オメプラゾール、ランソプラゾール、イラプラゾール (ilaprazole)、パントプラゾール、ラベプラゾール、テラゾシン、エソメプラゾール、テナトプラゾール、レミノプラゾール、テナトプラゾール、ジスプラゾール (disuprazole) またはラフチジン (lafutidine) を含み、前記抗うつ薬が、

10

アゴメラチン、フルオキセチン、パロキセチン、デュロキセチン、セルトラリン、フルボキサミン、シタロプラム、エスシタロプラム、ベンラファキシン、ミルタザピン、イミプラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、ドキセピン、レメロン、ベンラファキシム (venlafaxime)、フェネルジン、イソカルボキサジドまたはトラニルシプロミンを含み、

前記ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、遺伝機能を有し、および、A、T、C、GまたはUなどの塩基性基からなるフラグメントを含み、

前記生物学的作用因子が、従来のモノ抗体薬物、インスリン、ガンマグロブリン、抗毒素血清、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、皮膚の活性因子、上皮増殖因子、インフルエンザワクチン、A型肝炎ワクチン、ガンワクチン、組換えヒト酸性線維芽細胞増殖因子または血管内皮増殖因子2モノクローナル抗体を含み、

20

前記美容活性物質が、ウルソル酸、スーパーオキシドジスムターゼ、生物学的タンパク質T4N5、ビタミンD2、ニコチン酸メチル、精製ヘビ油、ヒアルロン酸、精油またはセラミドを含み、

ヘルスケア機能を有する前記物質が、グリチルリチン、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸二ナトリウム、グリチルリチン酸メチル、グリチルリチン酸二アンモニウム、ビタミンE、レスベラトロール、補酵素Q10、シリマリン、アントシアニン、プロアントシアニジン、ルテイン、葉酸、フォリン酸、クルクミン、エモジン、茶ポリフェノール、没食子酸エピガロカテキン、カテキン、ブルーベリー抽出物、グルタチオンまたはオキシマトリンを含む、

30

請求項11に記載の使用または請求項12に記載の充填型リボソーム。

【請求項14】

前記充填型リボソームが、注入、凍結乾燥注入、経口投与または局所投与のために好適である形態である、請求項11に記載の使用または請求項12に記載の充填型リボソーム。

【請求項15】

前記薬物が、パクリタキセル、ドセタキセルまたはイリノテカン塩酸塩を含み、前記リボソームがリン脂質および式Iのギンセノシドを含み、前記ギンセノシドがギンセノシドRg5を含み、および、前記リン脂質の前記ギンセノシドRg5に対する質量比率が、0.5:1から100:1までの範囲、0.5:1から20:1までの範囲、または0.5:1から4:1までの範囲である、請求項12~14の少なくとも一項に記載の充填型リボソーム。

40

【請求項16】

前記リボソームがコレステロールをさらに含み、前記リン脂質のギンセノシドRg5に対する質量比率が、1:0.01から1:3までの範囲、1:0.05から1:0.9までの範囲、または1:0.1から1:0.9までの範囲であり、および、ギンセノシドRg5の前記コレステロールに対する質量比率が、0.1:1から100:1までの範囲、0.5:1から50:1までの範囲、または0.5:1から10:1までの範囲である、請求項15に記載の充填型リボソーム。

50

【請求項 17】

前記ブランクリポソームにおけるギンセノシド R g 5 の質量百分率が、0.01%～80%、10%～80%、10%～40%、または20%～40%の範囲であり、前記ブランクリポソームにおける前記リン脂質の質量百分率が、5%～99.9%、10%～70%、30%～70%、または30%～60%の範囲であり、および、前記ブランクリポソームにおける前記コレステロールの質量百分率が、0%～50%、0.5%～50%、5%～40%、または5%～30%の範囲である、請求項15または16に記載の充填型リポソーム。

【請求項 18】

酸化防止剤、凍結保護剤、またはダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウムをさらに含みならびに前記リポソーム膜内に封入し、前記酸化防止剤（存在するとき）の前記ブランクリポソームにおける質量百分率が25%以下であり、または、0.001%～15%、0.01%～10%、もしくは0.01%～5%の範囲であり、前記凍結保護剤（存在するとき）の前記ブランクリポソームにおける質量百分率が80%以下であり、または、0.5%～60%、5%～60%、もしくは30%～60%の範囲であり、ならびに前記ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム（存在するとき）の前記ブランクリポソームにおける質量百分率が、1%～90%、15%～80%、20%～70%、20%～30%、または60%～70%の範囲である、請求項15～17の少なくとも一項に記載の充填型リポソーム。

【請求項 19】

前記リン脂質が、ダイズレシチン、卵レシチンまたはジミリストイルホスファチジルコリンを含み、前記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ビタミンE、ビタミンCまたはトレオニンを含み、前記凍結保護剤が、グルコース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、トレハロースまたはプロバンジオールを含む、請求項18に記載の充填型リポソーム。

【請求項 20】

請求項12～19の少なくとも一項に記載の充填型リポソームを調製するためのプロセスであって、前記リポソームが凍結保護剤を含むときには、前記充填型リポソームを調製するための前記プロセスは、方法A、方法B、方法Cおよび方法Dのいずれかを含み、前記リポソームが凍結保護剤を含有せずまたは含まない(not contain or include)ときには、前記充填型リポソームを調製するための前記プロセスは、方法A1、方法B1、方法C1および方法D1のいずれか1つを含み、

方法Aが、

(1) 前記脂質、前記式Iのギンセノシド、および前記活性物質と、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、前記混合物を、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でろ過して、前記活性物質が充填された前記リポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法Bが、

(1) 前記脂質および前記式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添

10

20

30

40

50

加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、活性物質ならびに凍結保護剤、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後で充填型リポソームの溶液を得て、透析およびろ過して、前記活性物質が充填された前記リポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法Cが、

(1) 前記脂質および前記式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、硫酸アンモニウムおよび凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、透析し、その後、活性物質と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法Dが、

(1) 前記脂質および前記式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、クエン酸ならびに凍結保護剤、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、前記溶液を、活性物質およびリン酸水素二ナトリウムの水溶液と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法A1が、

(1) 前記脂質、前記式Iのギンセノシド、および活性物質と、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を水と混合して、水性混合物を得て、必要な場合には、前記水性混合物に、親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を加え、前記混合物を、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

10

20

30

40

50

方法 B 1 が、

(1) 前記脂質および前記式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、活性物質ならびに必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後で活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、透析およびろ過して、前記活性物質が充填された前記リポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法 C 1 が、

(1) 前記脂質および前記式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、硫酸アンモニウムならびに必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、透析し、その後、前記溶液を活性物質と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

方法 D 1 が、

(1) 前記脂質および前記式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程 (1) で得られる前記透明な溶液の前記有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、クエン酸ならびに必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、その後、前記ブランクリポソーム溶液を、活性物質およびリン酸水素二ナトリウムの水溶液と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

を含み、

前記方法 A、前記方法 B、前記方法 C、前記方法 D、前記方法 A 1、前記方法 B 1、前記方法 C 1 または前記方法 D 1 において、それぞれの条件またはパラメーターは、請求項 10 または 11 において規定される通りであり、前記活性物質の、式 I の前記ギンセノシドに対する質量比率が、1 : 0.1 ~ 1 : 10、または 1 : 2 ~ 1 : 6 であり、前記脂質、前記式 I のギンセノシド、前記コレステロール、前記酸化防止剤、前記ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、前記凍結保護剤、前記界面活性剤、前記感熱性賦形剤、前記 pH 感受性材料、前記イオン添加剤、ならびに前記活性物質はそれぞれ、請求項 1 ~ 19 において上記で定義される通りである、プロセス。

【請求項 21】

方法 B、方法 C、方法 B 1 または方法 C 1 において、前記透析操作が、ブランクリポソーム溶液または充填型リポソーム溶液をグルコースの水溶液または純水に入れて混合溶液

10

20

30

40

50

を得て、その後、前記混合溶液を5時間～20時間にわたって、または約12時間にわたって透析することを含み、または、方法B、方法C、方法B1または方法C1において、前記透析操作が、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の前に行われ、または、方法Cまたは方法C1において、硫酸アンモニウムおよび前記凍結保護剤の前記水溶液、または、硫酸アンモニウムの前記水溶液における前記硫酸アンモニウムの質量分率が1%～15%の範囲または6.6%の範囲であり、方法Cまたは方法C1において、前記溶液を30～80で5分間～1時間にわたって保つために、ろ過前に保温する操作を含み、方法Dまたは方法D1において、その水溶液におけるクエン酸の質量濃度が1%～15%の範囲であり、または約5.76%であり、その水溶液におけるリン酸水素二ナトリウムの質量濃度が5%～20%の範囲であり、または約7.1%であり、方法Dまたは方法D1において、ろ過前に保温する操作を含み、保温する前記操作が好ましくは30～80で5分間～1時間にわたって保つことを含み、方法A、方法B、方法C、方法D、方法A1、方法B1、方法C1または方法D1において、前記活性物質が、前記活性物質の脂質溶解性または水溶性に基づいてその水溶液または有機溶液の形態で使用され、および前記水溶液または前記有機溶液における前記活性物質の質量体積百分率が1%～20%の範囲である、請求項20に記載のプロセス。

【請求項22】

方法1、方法2、方法3、方法4、方法5または方法6を含む、充填型リポソームを調製するためのプロセスであって、

方法1が、ダイズレシチン、ギンセノシドRg5およびパクリタキセルをアセトニトリルに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記ダイズレシチン、ギンセノシドRg5およびパクリタキセルの質量比率が10:6:3であり、前記アセトニトリルの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を50～60での恒温水浴において除いて、薄膜を形成すること、ならびに、精製水を加えること（前記精製水の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、超音波の操作を、前記リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、前記ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得ることを含み、

方法2が、卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセルおよびトレオニンを経メタノールに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセル、コレステロールおよびトレオニンの質量比率が13:12:4:5:5であり、前記メタノールの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を60～70での恒温水浴において除いて、薄膜を形成させること、ならびに、5%グルコース水溶液を加えること（前記グルコース水溶液の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、超音波の操作を、前記リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、前記ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得ることを含み、

方法3が、卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセル、ダイズ油およびビタミンCをクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセル、ダイズ油およびビタミンCの質量比率が8:6:1.5:4:0.5であり、前記クロロホルムの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を30～60で除いて、薄膜を形成させること、ならびに、10%トレハロース水溶液を加えること（前記トレハロース水溶液の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を、前記リポソームの粒径が0.1～

0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、前記ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得ることを含み、

方法4が、卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセル、ダイズ油、コレステロールおよびビタミンEをクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記卵レシチン、ギンセノシドRg5、パクリタキセル、ダイズ油、コレステロールおよびビタミンEの質量比率が14:12:4:8:0.5:0.1であり、前記クロロホルムの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を30~60で除いて、薄膜を形成させること、ならびに、5%サッカロース水溶液を加えること（前記サッカロース水溶液の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、高圧ホモジナイザーによる均質化を、前記リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、その後、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、その後、保護ガスを導入し、密封して、前記ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得ることを含み、

方法5が、卵レシチン、ギンセノシドRg5、ドセタキセル、ダイズ油、ビタミンCをクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記卵レシチン、ギンセノシドRg5、ドセタキセル、ダイズ油およびビタミンCの質量比率が8:6:3:4:5であり、前記クロロホルムの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を30~60で除いて、薄膜を形成させること、ならびに、10%トレハロース水溶液を加えること（前記トレハロース水溶液の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、超音波の操作を、前記リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、前記ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを得ることを含み、

方法6が、卵レシチン、ギンセノシドRg5、イリノテカン塩酸塩およびダイズ油をクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この際、前記卵レシチン、ギンセノシドRg5、イリノテカン塩酸塩およびダイズ油の質量比率が8:6:2:4:5であり、前記クロロホルムの体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、前記有機溶媒を30~60で除いて、薄膜を形成させること、ならびに、10%トレハロース水溶液を加えること（前記トレハロース水溶液の体積の前記ギンセノシドRg5の質量に対する比率が100mL/3gである）、超音波の操作を、前記リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過して、ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを含有するために前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームを得ることを含む、プロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は中国特許出願第201510509404.8号（2015年8月19日出願）に対する優先権を主張する（その内容はその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

発明の背景

リポソームは、少なくとも1つの脂質二重層を有する球状の小胞である。リポソームは、標的化された薬物キャリアとして使用されてきており、標的化薬物送達システムの新しい配合物に属する。リポソームは、薬物の粉末または溶液を、直径がマイクロレベルまたはナノメートルレベルである粒子の中に取り込むことができ、この粒子は生体膜構造の二重層の微小胞と類似しており、良好な生体適合性を有する。一方で、リポソームが標的化薬物送達システムと呼ばれる理由は、表面非修飾のリポソームがヒト身体内に入った後において、表面非修飾のリポソームは通常の場合、網状内皮系による食作用を受けやすく、それにより、身体自身の免疫機能を活性化し、かつ、取り込まれている薬物のヒト身体における分布を変化させ、これにより、当該薬物が主に肝臓、脾臓ならびに他の組織および器官に蓄積することをもたらすからである。高まった腫瘍浸透性・停留効果（EPR効果）のために、粒径がナノメートルレベルであるリポソームを腫瘍部位に効果的に蓄積することができ、この特性をリポソームの受動的標的と呼ぶことができる。一方、リポソームの表面は共有結合様式または非共有結合様式で特異的なリガンドによって修飾することができる。そのようなリガンドには、抗体、ポリペプチド、アプタマー、グリコシルおよび低分子などが含まれる。このようなリポソームは、手始めの標的と呼ばれるリガンドと受容体との間の相互作用を介して、特定の標的化された細胞によって効率的に吸収され、しばしば「生物学的ミサイル」にたとえられる。リポソームの標的化薬物送達能は薬物の治療指数を増大させることができ、薬物の投薬量および毒性を低下させることができる。

10

20

30

40

50

【0003】

リポソームの構造は、界面活性剤によって組み立てられるミセルとは異なる。後者は単分子層から構成され、一方、リポソームは、親油性薬物または水溶性薬物を取り込むことができる二重層から構成される。リポソームの主成分は脂質（例えば、リン脂質）およびコレステロールである。リン脂質は両親媒性物質であり、リン酸基およびアミノ含有塩基性基（ともに親水性である）と、2つの比較的長い疎水性炭化水素鎖とを含有する。コレステロールは両親媒性物質であり、疎水性基と親水性基との両方を有しており、しかし、その疎水性がその親水性よりも強い。リン脂質がリポソームを形成するときには、2つの疎水性鎖が内部方向を向き、親水性基が膜の内側表面および外側表面の両方に存在する。このようなリン脂質二重層により、水溶液を含有する閉じた区画が構成される。区画内の水溶液はリン脂質二重層によって取り囲まれており、それとは無関係に、リン脂質二重層が小胞を形成し、水性媒体によって隔てられる。コレステロールがリポソーム膜の安定性を増大させており、他の賦形剤が特別な機能的効果を有する。

【0004】

従来型リポソームの主成分が、リポソームの膜を形成するリン脂質およびコレステロールである。Cisconanjinngによって供給されるパクリタキセルリポソーム（これは「Paclitaxel Liposome」として販売されており、本明細書中では単に「パクリタキセル」としてもまた示される）の主成分（タキソール薬物を除く）には、レシチン（第1の主成分）、コレステロール（第2の主成分）、トレオニン（酸化防止剤または緩衝剤試薬として一般に使用されるアミノ酸）およびグルコース（凍結乾燥賦形剤または凍結保護剤として一般に使用される糖質）が含まれる。他の賦形剤もまた、このリポソームの中に加えることができる。例えば、感熱性賦形剤を、感熱性リポソームを調製するために加えることができ、pH感受性賦形剤を、pH感受性リポソームを調製するために加えることができ、カチオンもしくはアニオンを、カチオン性リポソームもしくはアニオン性リポソームを調製するために加えることができ、または、界面活性剤などを加えることができる。異なる目的に応じて、異なる賦形剤が加えられる。一般には、凍結乾燥前のリポソームはリン脂質（一般には50%~95%の割合）およびコレステロール（約5%~50%）を主成分として有しており、しかし、凍結乾燥過程の期間中に、ある特定量の賦形剤が特定の条件に従って加えられるであろう。リポソームの種々の用途に依存して、添加された賦形剤の割合は大きく異なる。いくつかは、賦形剤を凍結乾燥の期間中に加える必要がなく、その一方で、いくつかは、50%の賦形剤を凍結乾燥の期間中

に加えることが必要となることさえある。加えて、市場には現在、多くの修飾されたリン脂質が存在する（例えば、PEGまたはアミノ酸によって修飾されたリン脂質（これは非常に少量の賦形剤を含有する）など）。したがって、相互の参照は、用途が異なるリポソーム、および、タイプが異なるリポソームの間では、具体的な成分およびそれぞれの成分の量が大きく異なっているために大きな意味を有していない（なお、上述の百分率は、リポソームの原材料の総質量に対する各成分の百分率を示す）。

【0005】

様々な異なるタイプの薬物の物理的性質および化学的性質（例えば、構造、溶解性および安定性など）における違いのために、調製のための様々な対応する技術的要件が存在する。同時に、技術、膜材料、パイロットスケール化および他の側面を改善し続けることが必要である。リポソームの品質を評価するために、8つの主要な指標があり、これらには、リポソーム（分散液を含む）の形態および粒径、封入効率、薬物負荷、バーストおよび浸透性、インビトロでの放出、リン脂質の酸化度、有機溶媒の残留、ならびに、インビボおよびインビトロでの機能的評価が含まれる。しかし、全体として、現在のリポソームは、例えば、標的特異的能力をさらに改善する必要がある、封入効率が低い、安定性が不良である、また、調製プロセスが複雑であるなどの短所を依然として有する。

10

【0006】

したがって、高い効率、安全性、安定性、高まった標的化能、良好な均一性、安定かつ信頼できる品質、および簡便な調製プロセスを有するリポソームを研究することが常に、リポソームの重要な点であり、かつ重要な方向である。

20

【0007】

ギンセノシドは、親水性末端におけるグリコシルと、親油性末端における長い末端鎖とによる特殊な両親媒性特性を有する物質である。ギンセノシドは広範囲の薬学的用途を有しており、例えば、ギンセノシドF4およびギンセノシドRg6が、リンパ腫を治療するために使用され、ギンセノシドRg3が、月経困難症および白斑を治療するために使用され、ギンセノシドRh1は、デキサメタゾンを使用することによって誘発されるステロイド抵抗性を改善し、かつ、デキサメタゾンの抗炎症効果を増大させるために使用することができ、また、ギンセノシドRb1は高血圧の予防および治療のために使用することができる（中国特許出願第201310165926号、同第201310165907号、同第201210501652号、同第201310011400号および同第201210486959号を参照のこと）。中国特許出願第201210151597.0号には、ギンセノシドRg3のリポソームおよびその調製方法が開示される。ギンセノシドRg3のリポソームが、薬物のギンセノシドRg3をリポソームに封入することによって得られ、このことにより、ギンセノシドRg3の吸収および生物学的利用能が著しく増大し、かつ、腫瘍組織に対するその標的化能が高まり、したがって、薬物効力が改善される。

30

【0008】

先行技術においては、ギンセノシドが、リポソーム膜材料として、また、その一方では標的化材料および薬物として、ブランクリポソームを調製するために、また、薬物および他の成分を封入するために使用され得ることに関しての報告は何ら見当たらない。

40

【発明の概要】

【0009】

発明の概要

現在のリポソーム技術の欠点（例えば、低い封入効率、不良な安定性、複雑な調製プロセス、および、さらに改善される必要がある標的化能など）を克服するために、本発明はとりわけ、ギンセノシドを膜材料として有するブランクリポソーム、その調製方法、その使用、ならびに、活性物質および本発明のブランクリポソームを含有する充填型リポソームを提供する。本発明のブランクリポソームは、高い効率、安全性、安定性、高まった標的化能、良好な均一性、安定かつ信頼できる品質、および好都合な調製プロセスという利点を有する。本発明のリポソームは、薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質を封入して、活性物質が充填されたリポソームを形成するために使用することがで

50

きる。本発明のブランクリポソームが、そのような活性物質（例えば、抗腫瘍薬物など）を封入するために使用されるとき、そのようにして調製された充填型リポソームは、腫瘍細胞に対する予想外にはるかにより良好な標的化作用、抗多剤耐性効果、相乗作用効果、減弱化効果および薬物相乗作用を示した。具体的には、通常のリポソームと比較したとき、本発明のこのリポソームは、とりわけ、薬物を充填するための候補物としての、また、薬物キャリアとしてのはるかにより優れた指標、すなわち、標的化能、抗多剤耐性、相乗作用および減弱化および薬物相乗作用などを有している。

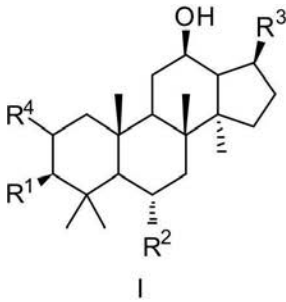
【0010】

いくつかの形態において、本発明は、膜を有するブランクリポソームであって、前記膜が、脂質と、式Iのギンセノシドとを含む、ブランクリポソームを提供する：

10

【0011】

【化1】



20

【0012】

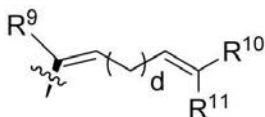
式Iにおいて、

R¹およびR²のそれぞれが独立して、H、OHまたはR⁵であり、ならびに、R¹およびR²は同時にともにHではない；

R³は

【0013】

【化2】



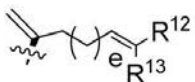
30

【0014】

または

【0015】

【化3】



【0016】

である；

R⁴は、H、OHまたはR⁵である；

40

R⁵は、R⁶、R⁷またはR⁸である；

R⁶は、-O-Glc、-O-Rha、-O-Lyx、-O-Xyl、-O-Ara(p)、-O-Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc、-O-Glc(6-1)Glc、-O-Glc(2-1)Rha、-O-Glc(2-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Rha、-O-Glc(2-1)Ara(p)、-O-Glc(6-1)Ara(p)、-O-Glc(2-1)Ara(f)、-O-Glc(6-1)Ara(f)、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Glc、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Xyl、-O-Glc(6-1)Glc(6-1)Xyl、-O-Glc(2-1)Glc(4-1)Xyl、-O-Glc(2-1)Lyx、-O-Glc(6-1)Lyx、-O-Glc(2-1)Glc(2-1)Rha、

50

- O - G l c (2 1) G l c (2 1) L y x、 - O - G l c (2 1) G l c (2 1) A r a (f)、 - O - G l c (2 1) G l c (2 1) A r a (p)、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) G l c、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) R h a、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) X y l、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) L y x、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) A r a (f)、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) A r a (p)、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) G l c、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) R h a、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) X y l、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) L y x、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) A r a (f)、 - O - G l c (6 1) G l c (2 1) A r a (p)、 - O - G l c (6 1) G l c (6 1) G l c、 - O - G l c (6 1) G l c (6 1) R h a、 - O - G l c (6 1) G l c (6 1) L y x、 - O - G l c (6 1) G l c (6 1) A r a (f) または - O - G l c (6 1) G l c (6 1) A r a (p) からなる群から選択される；

R⁷ は、R⁶ における1つまたは2つ以上のOH基をR⁸ により置換することによって形成された基であり、前記1つまたは2つ以上のR⁸ 基のそれぞれが独立して、互いに同じまたは異なり得る；

R⁸ は、

I) - m P E G、 - Z - m P E G、 - m P E O、 - Z - P E O、 - m P V P、 - Z - P V P、 - m E P E G または - Z - E P E G (式中、m は、H、アルキルまたはアシルであり、Z は、 - C O (C H ₂)_a C O -、 - N H (C H ₂)_a C O -、 - N H (C H ₂)_b X - または - C O - A r - C H ₂ - であり、X は、O、S または N H であり、a は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 であり、b は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 である) である；または

II) C₄₋₂₂ 脂肪族アシル、ホスファート基、コハク酸エステル基、n-ブチル酸エステル基、スルホナート基、リンゴ酸エステル基または硫酸ナトリウム塩である；または

III) B o c - グリシン、B o c - アラニン、B o c - アルギニン、B o c - リシン、B o c - セリン、アセチルフェニルアラニン、アセチル-プロリン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンまたはバリンに含まれるカルボキシルを脱水素化することによって形成された基である；または

IV) - O - P E O、 - O - P V P、 - O - P E G、 - O - M P E G、 - O - E P E G、 - O - G l c (2 1) G l c (6 1) M a l または - O - G l c (2 1) G l c (6 1) A c である；

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹² および R¹³ のそれぞれが独立して、C₁₋₃ アルキルである；

d および e のそれぞれが独立して、1、2 または 3 である；ならびに

前記式 I のギンセノシドは必要に応じて、それにおける1つまたは複数のOH基を1つまたは複数のR⁸ 基により置換することによって修飾することができ、および前記R⁸ 置換基(2つ以上のとき)のそれぞれは独立して互いに同じまたは異なり得る。

【0017】

本明細書中で使用される場合、- O - G l c (2 1) G l c などの基において、数字は炭素位置を示し、矢印は結合関係を示す；G l c はグルコピラノシルを示す；X y l はキシロピラノシルを示す；R h a はラムノピラノシルを示す；A r a (p) はアラビノピラノシルを示す；A r a (f) はアラビノフラノシルを示す；L y x はリキソシルである；A r はアリアルを示す；M a l はマロニルを示す；A c はアセチルを示す；P E G はポリエチレングリコールを示す；P E O はポリオキシエチレンまたはポリエチレンオキシドを示す；M P E G はモノメトキシ末端ポリエチレングリコールを示す；E P E G はエポキシ末端ポリエチレングリコールを示す；P V P はポビドンを示す。

10

20

30

40

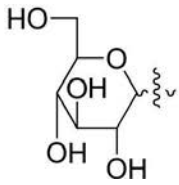
50

【 0 0 1 8 】

- O - G l c - 基において、G l c の構造は、

【 0 0 1 9 】

【 化 4 】



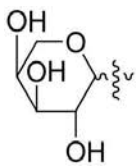
【 0 0 2 0 】

10

である。 - O - A r a (p) 基において、A r a (p) の構造は、

【 0 0 2 1 】

【 化 5 】



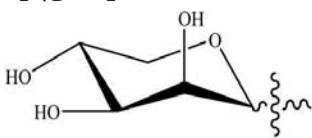
【 0 0 2 2 】

20

である。 - O - L y x 基において、L y x の構造は、

【 0 0 2 3 】

【 化 6 】



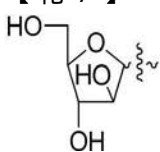
【 0 0 2 4 】

である。 - O - A r a (f) 基において、A r a (f) の構造は、

【 0 0 2 5 】

【 化 7 】

30



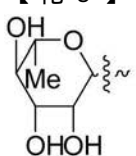
【 0 0 2 6 】

である。 - O - R h a 基において、R h a の構造は、

【 0 0 2 7 】

【 化 8 】

40

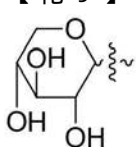


【 0 0 2 8 】

である。 - O - X y l 基において、X y l の構造は、

【 0 0 2 9 】

【 化 9 】



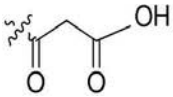
50

【 0 0 3 0 】

である。M a 1 の構造は、

【 0 0 3 1 】

【 化 1 0 】



【 0 0 3 2 】

である。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態において、P E G、P E O、P V PまたはE P E Gの分子量は独立して、2 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0の範囲である。

【 0 0 3 4 】

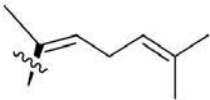
いくつかの実施形態において、上記脂肪族アシル基は、天然の飽和脂肪族酸または不飽和脂肪族酸のアシル、および、人工的に合成された飽和脂肪族酸または不飽和脂肪族酸のアシルであることが可能であり、好ましくはステアシルまたはパルミチルであることが可能である。

【 0 0 3 5 】

R ³ は好ましくは、

【 0 0 3 6 】

【 化 1 1 】

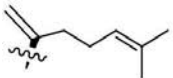


【 0 0 3 7 】

または

【 0 0 3 8 】

【 化 1 2 】



【 0 0 3 9 】

である。

【 0 0 4 0 】

上記ブランクリポソームにおいて、式 I のギンセノシドは、ギンセノシド R g 5、ギンセノシド R g 6、ギンセノシド R k 1、ギンセノシド R k 2、ギンセノシド R k 3、ギンセノシド R k 4、ギンセノシド R h 3、ギンセノシド R h 4、ギンセノシド F 4、ギンセノシド R s 4、ギンセノシド R s 5、ギンセノシド R s 6、ギンセノシド R s 7、ノトギンセノシド T 5、ダムリン (d a m u l i n) A またはダムリン B でありうる。

【 0 0 4 1 】

上述のように、本発明のブランクリポソームに含有される式 I のギンセノシドは、当該ギンセノシドにおける 1 つ以上のヒドロキシル (O H) 基を R ⁸ により置換することによって修飾されることが可能であり、かつ、R ⁸ 基のそれぞれ (2 つ以上のとき) が、相互に同じまたは異なることが可能であり、かつ、R ⁸ は上記で定義される通りである。

【 0 0 4 2 】

本発明のブランクリポソームにおいて、ギンセノシド (上記のように修飾されたものを含む) の H P L C 純度は好ましくは 9 0 % 以上であり、より好ましくは 9 5 % を超える (ただし、百分率は質量百分率である) 。

【 0 0 4 3 】

好ましくは、上記ブランクリポソームにおいて、式 I のギンセノシドはまた、ミセルの

10

20

30

40

50

形態であることが可能である。ギンセノシドのナノミセルは、当該ギンセノシドがミセルの形態であることを示し、具体的には、中国特許出願第201310155639.2号(2013年4月28日出願)およびPCT出願PCT/CN2013/088558(2013年12月4日出願)を参照する(これらは本明細書により、それらの全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0044】

好ましくは、本発明のブランクリポソームにおいて、膜における脂質はリン脂質を含み、かつ、前記リン脂質の、式Iの上記ギンセノシドに対する質量比率が通常の場合には0.5:1から100:1までの範囲であり、好ましくは0.5:1から20:1までの範囲であり、より好ましくは0.5:1から4:1までの範囲である(例えば、0.5:1から2:1までの範囲など)。

10

【0045】

好ましくは、本発明のブランクリポソームにおいて、膜中の脂質はリン脂質を含み、膜はさらにコレステロールを含む。前記リン脂質の、式Iの上記ギンセノシドに対する質量比率が好ましくは1:0.01から1:3までの範囲であり(例えば、1:0.03から1:1までの範囲など)、より好ましくは1:0.05から1:0.9までの範囲であり(例えば、1:0.3から1:0.75までの範囲など)、最も好ましくは1:0.1から1:0.9までの範囲である(例えば、1:0.1から1:0.5までの範囲など)。式Iの上記ギンセノシドの、前記コレステロールに対する質量比率が好ましくは0.1:1から100:1までの範囲であり、好ましくは0.5:1から50:1までの範囲であり、より好ましくは0.5:1から10:1までの範囲である(例えば、1.5:1から6:1または5:1までの範囲など)。

20

【0046】

本発明のブランクリポソームにおいて、膜における式Iのギンセノシドの質量百分率が好ましくは0.01%~80%の範囲であり、膜におけるリン脂質の質量百分率が好ましくは5%~99.9%の範囲であり、膜におけるコレステロールの質量百分率が好ましくは50%未満である:上述の百分率(%)は、膜の総質量に対する各成分の質量の百分率を示す。

【0047】

膜における式Iのギンセノシドの質量百分率は好ましくは10%~80%の範囲であり、より好ましくは10%~40%の範囲であり、最も好ましくは20%~40%の範囲である(例えば、25%~40%の範囲など、好ましくは25%~35%の範囲)。膜におけるリン脂質の質量百分率は好ましくは10%~70%の範囲であり、より好ましくは30%~70%の範囲であり、最も好ましくは30%~60%の範囲である。膜におけるコレステロールの質量百分率は好ましくは0.5%~50%の範囲であり、より好ましくは5%~40%の範囲であり、最も好ましくは5%~30%の範囲である(例えば、10%~20%の範囲など)。

30

【0048】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームはさらに酸化防止剤を含み、かつ、膜内に封入することができる。ブランクリポソームにおける酸化防止剤の質量百分率が通常の場合には25%以下であり、好ましくは0.001%~15%の範囲であり、より好ましくは0.01%~10%の範囲であり、最も好ましくは0.01%~5%の範囲である(例えば、0.1%~1%の範囲など):百分率(%)は、ブランクリポソームの総質量に対する酸化防止剤の質量の百分率を示す。

40

【0049】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームはさらに凍結保護剤を含み、かつ、膜内に封入することができる。ブランクリポソームにおける凍結保護剤の質量百分率が通常の場合には80%以下であり、好ましくは0.5%~60%の範囲であり、より好ましくは5%~60%の範囲であり、最も好ましくは30%~60%の範囲である:百分率(%)は、ブランクリポソームの総質量に対する凍結保護剤の質量の百分率を示

50

す。

【0050】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームはさらにダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムを含み、かつ、膜内に封入することができる。ブランクリポソームにおける「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」の質量百分率が通常の場合には1%~90%の範囲であり、好ましくは15%~80%の範囲であり、より好ましくは20%~70%の範囲であり(例えば、25%または62.5%の範囲など)、最も好ましくは20%~30%、または60%~70%の範囲である:百分率は、ブランクリポソームの総質量に対する「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」の質量の百分率を示す。ブランクリポソームにおける「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」の、リン脂質に対する質量比率が好ましくは1:0.1から1:10までの範囲であり、より好ましくは1:0.5から1:5までの範囲であり、最も好ましくは1:0.5から1:4までの範囲である(例えば、1:1から1:2までの範囲など)。

10

【0051】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは下記の成分を含む:リン脂質および式Iのギンセノシド、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質および酸化防止剤、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質および凍結保護剤、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」ならびにリン脂質、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質ならびに酸化防止剤、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質、酸化防止剤ならびに凍結保護剤、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質、酸化防止剤ならびに凍結保護剤、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質およびコレステロール、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質、コレステロールおよび酸化防止剤、あるいは、式Iのギンセノシド、リン脂質、コレステロールおよび凍結保護剤、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質ならびにコレステロール、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質、コレステロールならびに酸化防止剤、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質、コレステロールならびに凍結保護剤、あるいは、式Iのギンセノシド、「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」、リン脂質、コレステロール、酸化防止剤ならびに凍結保護剤。

20

30

【0052】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは上述の成分からなる。

【0053】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは下記の成分を含む:式Iのギンセノシド、リン脂質、コレステロール、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、酸化防止剤ならびに凍結保護剤。ブランクリポソームにおけるダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムの、コレステロールに対する質量比率が好ましくは1:0.1から1:10までの範囲であり、より好ましくは1:0.5から1:5までの範囲であり、最も好ましくは1:0.5から1:1までの範囲である。膜におけるコレステロールの質量百分率が好ましくは1%~20%の範囲であり、より好ましくは10%~20%の範囲であり、ブランクリポソームにおけるダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムの質量百分率が好ましくは1%~90%の範囲であり、より好ましくは15%~80%の範囲であり、最も好ましくは20%~70%の範囲である(例えば、25%または62.5%、20%~30%、または60%~70%の範囲など)。

40

【0054】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは、リン脂質と、式Iのギンセノシドとからなる。

【0055】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは、式Iのギンセノシド

50

と、リン脂質と、コレステロールとからなる。

【0056】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは、式Iのギンセノシドと、リン脂質と、コレステロールと、酸化防止剤と、凍結保護剤とからなる。

【0057】

本発明の好ましい実施形態において、上記ブランクリポソームは、式Iのギンセノシドと、リン脂質と、コレステロールと、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムと、酸化防止剤と、凍結保護剤とからなる。

【0058】

リン脂質は、この分野における従来のリン脂質であることが可能であり、好ましくは、天然のリン脂質、半合成のリン脂質または全合成のリン脂質を含む。

10

【0059】

天然のリン脂質は典型的には、ダイズ、卵黄、動物の脳または臓器に由来し、好ましくは、天然のレシチン、ダイズレシチン、卵レシチンまたはセファリンを含む。

【0060】

半合成のリン脂質または全合成のリン脂質は、この分野における従来の半合成のリン脂質または全合成のリン脂質であることが可能であり、好ましくは、ホスファチジルコリンのリン脂質、ホスファチジルセリン(P S)、ホスファチジルイノシトール(P I)、ホスファチジルエタノールアミンのリン脂質、ホスファチジルグリセロール(D S P G)、ジセチルホスファート(D C P)、PEG修飾のリン脂質、コレステロールスクシナート(C H S)または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(16:0~18:1のPC、ただし、16:0~18:1はPCの炭素鎖を示す)を含む。半合成または全合成のリン脂質(例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンなど)の感熱性のために、半合成または全合成のリン脂質は熱感性賦形剤として同時に使用することができる。

20

【0061】

ホスファチジルコリンのリン脂質は、この分野における従来のホスファチジルコリンのリン脂質であることが可能であり、好ましくは、水素化ダイズレシチン(H S P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(D P P C)、ジステアロイルホスファチジルコリン(D S P C)、ジミリストイルホスファチジルコリン(D M P C)、ジラウロイルホスファチジルコリン(D L P C)、ジオレオイルホスファチジルコリン(D O P C)、ホスファチジルコリン(S P C)、モノパルミトイルホスファチジルコリン(M P P C)またはグリセロールホスファチジルコリン(G P C)を含む。

30

【0062】

ホスファチジルエタノールアミンのリン脂質は、この分野における従来のホスファチジルコリンのリン脂質であることが可能であり、好ましくは、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(P O P E)、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン(D L P E)、ジエルコイルホスファチジルエタノールアミン(D E P E)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(D O P E)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(D S P E)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(D P P E)またはジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(D M P E)を含む。

40

【0063】

PEG修飾のリン脂質は、この分野における従来のPEG修飾のリン脂質であることが可能であり、好ましくは、ホスファチジルエタノールアミン-PEG(D M P E - P E G)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG(D P P E - P E G)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG(D S P E - P E G)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-PEG(D O P E - P E G)、C8セラミド-PEG(C8セラミド-PEG)、C16セラミド-PEG(C16セラミド-PEG)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-スクシニル(D S P E - P E

50

Gスクシニル)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-カルボキシル(DSPE-PEGカルボン酸)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド(DSPE-PEGマレイミド)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-プロピオンアミドビス-メルカプトピリジン(DSPE-PEG PDP)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-シアヌル酸塩化物(DSPE-PEGシアヌル)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-アミノ(DSPE-PEGアミン)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ビオチン(DSPE-PEGビオチン)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ホラート(DSPE-PEGホラート)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ホラート(DSPE-PEGホラート)、ジ
 ラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG(DLPE-PEG)、ジステアロ
 イルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル(DSPE-PEG-NH
 S)、ホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル(DMPE-PEG-N
 HS)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性エステル(DP
 PE-PEG-NHS)、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-活性
 エステル(DLPE-PEG-NHS)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミ
 ン-PEG-マレイミド(DSPE-PEG-マレイミド)、ホスファチジルエタノール
 アミン-PEG-マレイミド(DMPE-PEG-マレイミド)、ジパルミトイルホスフ
 アチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド(DPPE-PEG-マレイミド)、ジ
 ラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-マレイミド(DLPE-PEG-
 マレイミド)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-ビオチン(D
 SPE-PEG-ビオチン)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG
 -フルオレセイン(DSPE-PEG-FITC)、ジステアロイルホスファチジルエタ
 ノールアミン-PEG-ヒドロキシル(DSPE-PEG-OH)、ジステアロイルホス
 ファチジルエタノールアミン-PEG-アミノ(DSPE-PEG-NH₂)、ホスファ
 チジルエタノールアミン-PEG-アミノ(DMPE-PEG-NH₂)、ジパルミトイ
 ルホスファチジルエタノールアミン-PEG-アミノ(DPPE-PEG-NH₂)、ジ
 ラウロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-アミノ(DLPE-PEG-NH
 2)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-カルボキシル(DSP
 E-PEG-COOH)、ホスファチジルエタノールアミン-PEG-カルボキシル(D
 MPE-PEG-COOH)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG
 -カルボキシル(DPPE-PEG-COOH)、ジラウロイルホスファチジルエタノ
 ールアミン-PEG-カルボキシル(DLPE-PEG-COOH)、ジステアロイルホス
 ファチジルエタノールアミン-PEG-チオール(DSPE-PEG-SH)、ジステア
 ロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-シラン(DSPE-PEG-シラン)
 、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG-アジド(DSPE-PEG
 -N₃)、コレステロール-PEG(コレステロールPEG)、メトキシル-PEG-コ
 レステロール(mPEG-CLS)、コレステロール-PEG-活性エステル(コレステ
 ロールPEG NHSエステル)、コレステロール-PEG-マレイミド(CLS-PE
 G-Ma1)、コレステロール-PEG-ビオチン(コレステロールPEGビオチン)、
 コレステロール-PEG-フルオレセイン(コレステロールPEGフルオレセイン)、コ
 レステロール-PEG-カルボキシル(コレステロールPEG COOH)、コレステロ
 ール-PEG-アミノ(コレステロールPEG NH₂)またはコレステロール-PEG
 -チオール(コレステロールPEG SH)を含む。上記PEGの相対分子量は好ましく
 は300~50000の範囲であり、より好ましくは500~10000の範囲であり、
 例えば、約300、350、500、550、1000、2000、3400、5000
 、10000、20000、30000、40000または50000である。

【0064】

上記DMPE-PEGの数平均分子量は好ましくは、350、550、750、100
 0、2000、3000または5000である。上記DPPE-PEGの数平均分子量は

好ましくは、350、550、750、1000、2000、3000または5000である。上記DSPE-PEGの数平均分子量は好ましくは、350、550、750、1000、2000、3000、5000、10000、20000、30000または40000である。上記DOPE-PEGの数平均分子量は好ましくは、350、550、750、1000、2000、3000または5000である。上記C8セラミド-PEGの数平均分子量は好ましくは、750、2000または5000である。上記DLPE-PEGの数平均分子量は好ましくは、2000または5000である。上記DSPE-PEG-NHSの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、5000、10000、20000、30000または40000である。上記DMPE-PEG-NHSの数平均分子量は好ましくは、3400または5000である。上記DPPE-PEG-NHSの数平均分子量は好ましくは、3400または5000である。上記DLPE-PEG-NHSの数平均分子量は好ましくは、3400または5000である。上記DSPE-PEG-マレイミドの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DMPE-PEG-マレイミドの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DPPE-PEG-マレイミドの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DLPE-PEG-マレイミドの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DSPE-PEG-ビオチンの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DSPE-PEG-FITCの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記DSPE-PEG-OHの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DSPE-PEG-NH₂の数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DMPE-PEG-NH₂の数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DPPE-PEG-NH₂の数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DLPE-PEG-NH₂の数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DSPE-PEG-COOHの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DMPE-PEG-COOHの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DPPE-PEG-COOHの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DLPE-PEG-COOHの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記DSPE-PEG-SHの数平均分子量は好ましくは5000である。上記DSPE-PEG-シランの数平均分子量は好ましくは3400である。上記DSPE-PEG-N₃の数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記mPEG-CLSの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、5000、10000または20000である。上記コレステロールPEG-NHSエステルの数平均分子量は好ましくは、1000、2000、3400、5000または10000である。上記CLS-PEG-Malの数平均分子量は好ましくは、2000、3400、5000または10000である。上記CLS-PEG-ビオチンの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記CLS-PEG-FITCの数平均分子量は好ましくは、2000、3400または5000である。上記コレステロールPEG-COOHの数平均分子量は好ましくは3400である。上記コレステロールPEGアミンの数平均分子量は好ましくは3400である。上記コレステロールPEGチオール/スルフヒドリルの数平均分子量は好ましくは3400である。

10

20

30

40

50

【0065】

酸化防止剤は、この分野における従来の酸化防止剤であることが可能であり、好ましくは、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 α -ヒドロキシル酸、フラボノイド、フェニルプロパノイドフェノール系化合物、ビタミンE、ビタミンC、フマル酸、システイン、メチオニン、ブチル

ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、チオジプロピオン酸、亜硫酸塩（例えば、亜硫酸ナトリウムなど）、ヒドロ亜硫酸塩（例えば、ヒドロ亜硫酸ナトリウムなど）、ジチオアミノ安息香酸化合物、クエン酸、リンゴ酸、ソルビトール、グリセロール、プロピレングリコール、ヒドロキノン、ヒドロキシクマリン、エタノールアミン、リン酸または亜リン酸を含む。

【0066】

凍結保護剤は、この分野における従来の凍結保護剤であることが可能であり、一般には、糖質、ポリオール、アミノ酸または緩衝剤試薬を含み、この場合、糖質は好ましくは、単糖、二糖または多糖を含む。単糖は好ましくは、グルコース、マンニトール、キシリトールまたはソルビトールを含む。二糖は好ましくは、スクロース、ラクトース、ガラクトースまたはマルトースを含む。多糖は好ましくはトレハロースを含む。ポリオールは好ましくは、マンニトール、ソルビトールまたはグリセロールを含む。アミノ酸は好ましくは、トレオニン、グリシン、グルタミン酸、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を含む。緩衝剤試薬は一般には、緩衝液を示す。緩衝液は、この分野における従来の緩衝液であることが可能であり、pH値が好ましくは3～10の範囲にあり、より好ましくは5～7の範囲にある。緩衝液は好ましくは、エタノール-酢酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、バルビタール緩衝液、ギ酸ナトリウム緩衝液、フタル酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、クエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液、アンモニア-塩化アンモニウム緩衝液、ホウ砂-塩化カルシウム緩衝液、酢酸塩緩衝液、酢酸-リチウム塩緩衝液、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸-トリエチルアミン緩衝液またはリン酸塩緩衝液を含む。

10

20

【0067】

好ましくは、上記ブランクリポソームは他の賦形剤をさらに含み、かつ、膜内に封入することができる。賦形剤は、酸化防止剤および凍結保護剤を除く、この分野においてリポソームを調製するために使用される従来の賦形剤であることが可能であり、例えば、賦形剤は、界面活性剤、感熱性賦形剤、pH感受性材料またはイオン添加剤を含む。

【0068】

上記界面活性剤は好ましくは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリソルベート、Tween界面活性剤またはbrj界面活性剤を含む。この場合、ポリエチレングリコールの数平均分子量は好ましくは、200～8000の範囲である（例えば、約300、350、500、550、1000、2000、3400または5000）。ポリソルベートは好ましくは、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミタート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアラート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレアート、PEG-ホスファチジルエタノールアミン、PEG-ポリ乳酸、ポリリシン-ポリ（乳酸-グリコール酸共重合体）、ポリエーテルイミド-ポリ乳酸、PEG-ポリカプロラクトン、PEG-ポリ（乳酸-グリコール酸共重合体）、ポロキサマー188、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エーテルまたはポリオキシエチレンメチルヒマシ油エーテルを含む。

30

【0069】

上記感熱性賦形剤は一般には、感熱性をリポソームにもたすことができるポリマー、薬物または界面活性剤を含む。前記ポリマーは好ましくは、ポリブレンアクリルアミド、ポリブレンアクリル酸、ポリホスファートまたはポリリン脂質-アミドコポリマーを含む。前記薬物は好ましくは、ガジュツウコン油、エレメンまたはニガキモドキ（bruceajavanica）油を含む。前記界面活性剤は好ましくは、Tween界面活性剤（例えば、Tween-80など）および/またはbrj界面活性剤である。

40

【0070】

上記イオン添加剤は好ましくは、カチオン性添加剤（例えば、オクタデシルアミンなど）および/またはアニオン添加剤（例えば、ホスファチジン酸および/またはホスファチジルセリンなど）を含む。

【0071】

50

上記賦形剤の質量百分率は、この技術分野における通常のリポソームに含有されるそのような種類の賦形剤の質量百分率に従って選択することができる。例えば、上記ブランクリポソームが界面活性剤を含むとき、当該ブランクリポソームにおける界面活性剤の質量百分率は好ましくは、0%～50%の範囲である（ただし、0%は除く）。上記ブランクリポソームがイオン添加剤を含むとき、当該ブランクリポソームにおけるイオン添加剤の質量百分率は好ましくは、0%～10%の範囲である（ただし、0%は除く）。

【0072】

上記ブランクリポソームは、リポソームを調製する従来の様々な方法によって調製することができる。一般には、注入法、逆蒸発法、凍結融解法、二重乳化法、イニシアチブ封入法、前駆体リポソーム調製法、薄膜分散法、凍結乾燥法、硫酸アンモニウム勾配法またはpH勾配法を採用することができ、同様にまた、上記2つの方法のどのような組合せであっても採用することができる。本発明では好ましくは、下記のような第1の方法または第2の方法が採用され、ただし、第1の方法、または第1の方法によって調製されるブランクリポソームは凍結保護剤を含まず、第2の方法、または第2の方法によって調製されるブランクリポソームは凍結保護剤を含む。

10

【0073】

第1の方法は下記の工程を含む：

(1) 脂質および式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

20

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有してもよい水と混合して、水性混合物を得て、前記混合物を、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でろ過して、ブランクリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記ブランクリポソームを得る工程。

【0074】

第2の方法は下記の工程を含む：

(1) 脂質および式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

30

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、前記混合物を、超音波の、高圧均質化のまたはメンブランを押し通す操作の後でろ過して、ブランクリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記ブランクリポソームを得る工程。

【0075】

第1の方法または第2の方法において、脂質、式Iのギンセノシド、コレステロール、酸化防止剤、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、凍結保護剤、界面活性剤、感熱性賦形剤、pH感受性材料、ならびにイオン添加剤は、上記で定義される通りである。

40

【0076】

第1または第2の方法の工程(1)において、有機溶媒は、この技術分野におけるリポソームの調製において使用される従来の有機溶媒であることが可能であり、そのような有機溶媒は好ましくは、ニトリル溶媒、C₁～₄アルコール溶媒、ケトン溶媒、アルカン溶媒、エーテル溶媒、ハロゲン化炭化水素溶媒、スルホキシド溶媒またはアルデヒド溶媒を含み、より好ましくは、C₁～₄アルコール溶媒、ニトリル溶媒、エーテル溶媒またはハ

50

ロゲン化炭化水素溶媒を含む。前記ニトリル溶媒は好ましくは、アセトニトリルを含む。前記C₁~₄アルコール溶媒は好ましくは、メタノール、エタノール、イソプロパノールまたはn-ブタノールを含む。前記エーテル溶媒は好ましくは、テトラヒドロフランまたはジエチルエーテルを含む。前記ハロゲン化炭化水素溶媒は好ましくは、クロロホルムまたはジクロロメタンを含む。前記ケトン溶媒は好ましくは、アセトンまたはブタノンを含む。前記アルカン溶媒は好ましくは、石油エーテルを含む。有機溶媒の量は、この技術分野におけるリポソームの調製において使用される従来の量であることが可能であり、特に限定されないが、その一般的な必要量により、透明な溶液を、上記有機溶媒およびすべての上記成分を混合した後で得ることができる。好ましくは、第1または第2の方法の工程(1)における有機溶媒の体積の、当該有機溶媒に溶解されるすべての成分の総質量に対する比率が、5 mL/g ~ 20 mL/gである。

【0077】

第1または第2の方法の工程(1)は一般には0 ~ 80 の温度で行われ、好ましくは10 ~ 80 の温度で行われ、より好ましくは10 ~ 65 の温度で行われる。この分野における常識に基づいて、場合により、80 に達するために、加熱することが要求される。あるいは、第1または第2の方法によって調製されるブランクリポソームが感熱性材料(例えば、タンパク質材料など)を含むときには、第1または第2の方法の工程(1)は一般には、e0 の温度で行われる。

【0078】

第1または第2の方法の工程(2)において、工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除く操作は、通常ロータリーエバポレーターまたは膜エバポレーターを用いて行われる、この分野における従来操作であることが可能である。有機溶媒が除かれる温度は、除去すべき有機溶媒に応じて選択することができ、一般には25 ~ 80 である。

【0079】

第1または第2の方法の工程(2)において、超音波の、高圧均質化のまたはメンブロンを押し通す操作は、この分野における従来操作であることが可能である。超音波の、高圧均質化のまたはメンブロンを押し通す操作の後において、リポソームの粒径が一般には、0.05ミクロン~0.3ミクロンの範囲である。

【0080】

第1または第2の方法の工程(2)において、ろ過する操作は、この分野におけるリポソームの調製での従来操作であることが可能であり、この場合、その目的は、細菌、固体粒子、および、特に大きいリポソームなどを除くことである(活性物質が充填されたりリポソームを調製する方法においては、封入されなかった遊離薬物もまた除くことができる)。本発明において、ろ過は好ましくは、微孔性メンブロンろ過である。微孔性メンブロン細孔サイズは好ましくは0.22ミクロンである。

【0081】

第2の方法の工程(2)において、凍結保護剤水溶液は、凍結保護剤および水を混合することによって形成される水溶液を示す。凍結保護剤水溶液は好ましくは、凍結保護剤の5%~10%の水溶液であり、百分率は、凍結保護剤の水溶液の総質量に対する凍結保護剤の質量の百分率を示す。凍結保護剤水溶液の量は、ブランクリポソームの形成に対する影響が認められない限り、特に限定されず、好ましくは、工程(1)で使用される有機溶媒の量と同じである。

【0082】

本発明の好ましい実施形態において、第2の方法では、凍結保護剤が緩衝剤試薬であるとき、工程(2)における薄膜形成操作の後で、凍結保護剤が直接に混合される。

【0083】

第1または第2の方法の工程(2)において、乾燥する操作は、この分野における従来操作であることが可能であり、好ましくは、凍結乾燥機を一般には利用する凍結乾燥である。凍結乾燥によって必要とされる温度および時間は、この分野における従来温度および時間であり、特に限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

第1または第2の方法において、容易な貯蔵のために、工程(2)で得られるブランクリポソームを含有する水溶液はバイアルに分注され、乾燥され、保護ガス(アルゴンまたは窒素)で空気が追い出され、密封される。

【 0 0 8 5 】

上記ブランクリポソームは、活性物質が充填され、膜内に封入されたりポソームを調製するために使用することができ、この場合、活性物質は、薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質を含む。したがって、本発明はまた、ブランクリポソームと、リポソーム膜内に充填されたおよび封入された活性物質とを含む充填型リポソームであって、前記活性物質が、薬物、美容活性物質、またはヘルスケア機能を有する物質を含む、充填型リポソームを提供する。

10

【 0 0 8 6 】

充填型リポソームにおいて、活性物質の、式Iのギンセノシドに対する質量比率が、1:0.1から1:10までであり、より好ましくは1:2から1:6までである(例えば、1:3、または1:4など)。

【 0 0 8 7 】

上記薬物は、この技術分野における従来の薬物であることが可能であり、好ましくは、抗腫瘍薬、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗生物質、非ステロイド性抗炎症薬、カルシウムイオンアンタゴニスト、免疫抑制剤、麻酔剤、心臓血管薬および血管拡張薬、胃腸薬、抗うつ薬、生物学的作用因子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド(リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含む)を含む。

20

【 0 0 8 8 】

上記抗腫瘍薬は、この技術分野における従来の抗腫瘍薬であることが可能であり、好ましくは、パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル、イリノテカン塩酸塩、ヒドロキシカンプトテシン、アミノカンプトテシン、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、トポテカン塩酸塩、ルルトテカン(lurtotecan)、トポテカン、ベロテカン(belotecan)、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、ロバプラチン(lobaplatin)、サトラプラチン、ミリプラチン、アミル白金(amlplatinum)、アロプラチン(aroplatin)(L-NDDP)、カルムスチン、クロラムブシル、メルファラン、ハリングトニン、ホモハリングトニン、トリプトリド(triptolide)、タクロリムス、ダウノルピシン、ピンヤンマイシン(pingyangmycin)、ドキシソルピシン塩酸塩、イダルピシン、フルオロウラシル、シタラビン、メトトレキサート、エトポシドリン酸塩、デスオキシ-ポドフィロトキシン、フペルジン(huperzine)-A、ピノレルビン酒石酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、ピンブラスチン硫酸塩、ピノレルビン、ピンデシン硫酸塩、テモゾロミド、テガフル、シクロホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、エポチロンE、エポチロンF、ボルテゾミブ、ゲムシタピン塩酸塩、フルダラビンリン酸塩、カペシタピン、デシタピン、ペメトレキセド二ナトリウム、ソラフェニブ、組換えヒトインターフェロン α 2b、シトシンアラビノシド、all-trans-レチノイン酸、インターロイキン-2、エトポシド、チミジル酸シタターゼ阻害剤、ミトキサントロン、ミノキシジル、アジスロマイシン、エピルピシン塩酸塩、ドキシソルピシン塩酸塩(アドリアマイシン)、アムルピシン塩酸塩、5-アミノレブリン酸(5-ALA)、ゲフィチニブ、イマチニブ、エルロチニブ、スニチニブ、ダサチニブ、ラパチニブ、アキシチニブ、アパチニブ、ニロチニブ、ボスチニブ、バンデタニブ、テラチニブ(telatinib)、ネラチニブ、カルネチニブ、サラカチニブ(saracatinib)、オクテニジン(octenidine)、ソラフェニブ、イコチニブ(icotinib)、ムブリチニブ(mubritinib)、レスタウルチニブ、タンズチニブ(tandutinib)、ドビチニブ(dovitinib)、3',5'-ジパルミトイルシクロシチジンまたはクルクメノール(curcumenol)を含む。

30

40

50

【0089】

上記抗真菌薬は好ましくは、アムホテリシンB、ゲンタマイシン、インドメタシン、ペニシリンG、エコナゾール硝酸塩、フルシトシン、フルコナゾール、イトラコナゾール、ポリコナゾール、ポサコナゾール、ラブコナゾール、カスポファンギン、ミカファンギン、アニデュラファンギン、セフピラミドナトリウム、セフォタキシムナトリウム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフジトレンピボキシル、セフォキシチンナトリウム、セファレキシン、セフロキシムナトリウム、セフィキシム、セフボドキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフスロジン、セファゾナム (c e f a z o n a m)、セフチゾキシム、セフェタメトピボキシル、セフテラムピボキシル、セフチブテン、セフジニル、セファマンドール、セフォチアム、セフォラニド、セフォニシド、セフタジジム、セフラジン、セフプロジル、セファゾリンナトリウム、セファドロキシル、セファロチン、セファチアミジン (c e f a t h i a m i d i n e)、セファロリジン、セファセトリル、セフタゾール、セファピリン、セフピロム、セフクリジン (c e f c l i d i n)、セフェピム、フシジン酸ナトリウム、フロルフエニコールまたはチゲサイクリンを含む。

10

【0090】

上記抗ウイルス薬は好ましくは、リバビリン、アシクロビル、シタラビン、イドクスウリジン、アシクロビルラウラート、アシクロビルバルミタート、ヨードデオキシウリジン、シクロシチジン、ジパルミトイルシクロシチジン、リン酸ホルマート、リン酸アセタート、シメチジン、ジピリダモール、リファンピン、イソニアジド、ブラジクワンテル、ドキシサイクリン、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、チプラナビル、BMS 2 3 2 6 3 2、ラミブジン、ジドブジン、ジダノシン (d d i)、ザルシタピン (d d c)、スタブジン (d 4 t)、アバカビル、アデホビルジビボアイル (a d e f o v i r d i p i v o a i l) (p m e a)、テノホビル (p m p a)、フルオロラミブジン (f t c)、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンス (e f a v i r e n s)、インターロイキン - 2 (i l - 2)、チルミコシンまたはジクラズリルを含む。

20

【0091】

上記抗生物質は好ましくは、ペニシリン、ペニシリンV、アモキシシリン、アンピシリン、オキサシリン、クロキサシリン、プロカインペニシリン、ベンザチンペニシリン、ピペラシリン、メズロシリン、チカルシリン、アズロシリン、メズロシリン、カルベニシリン、スルベニシリン、フルブシリン (f u r b u c i l l i n)、ナフシリン、ジクロキサシリン、ピバンピシリン、アパルシリン (a p a l c i l l i n)、アスポキシシリン、ピブメシリナム、メチシリン、レナンピシリン (l e n a m p i c i l l i n)、ホミダシリン (f o m i d a c i l l i n)、フルクロキサシリン、カナマイシン、ナタマイシン (n a t a m y c i n)、マイトマイシン、アミカシン、チロシン、ベルテボルフィン、セフピラミドナトリウム、ネチルマイシン硫酸塩、アジスロマイシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、ロメフロキサシン、ペフロキサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、モキシフロキサシン、グレバフロキサシン、トロバフロキサシン、ノルフロキサシン、ゲミフロキサシン、ガチフロキサシン、トスフロキサシン、パズフロキサシン、スパルフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、ポリミキシン、トブラマイシン、バンコマイシン、アジスロマイシン、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ミノサイクリン、オーレオマイシン、グアメサイクリン (g u a m e c y c l i n e)、デメクロサイクリン、メタサイクリン、エチマイシン (e t i m i c i n)、ネチルマイシン、シソマイシン、アミカシン、アルベカシン、ジベカシン、アズトレオナム、メロペネム、イミペネム、チエナマイシン、パニペネム、エルタペネム、ネオマイシン、パロモマイシンまたはスペクチノマイシンを含む。

30

40

【0092】

上記カルシウムイオンアンタゴニストは好ましくは、ニモジピン、ニフェジピン、ニカルジピン、ニトレンジピン、ベラパミル、アムロジピン、ジルチアゼム、フルナリジン、

50

プレブラミン (prenlamine)、ガロパミルまたはチアパミルを含む。

【0093】

上記非ステロイド性抗炎症薬は好ましくは、インドメタシン、アスピリン、パラセタモール、ナプロキセン、ジクロフェナク、イブプロフェン、ニメスリド、ロフェコキシブまたはセレコキシブを含む。

【0094】

上記免疫抑制剤は好ましくは、シクロスポリン (cyclosporin)、アルプロスタジル (これは前立腺 E-1 としてもまた知られている)、シクロスポリン (cyclosporine)、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチルまたはミゾリピンを含む。

【0095】

上記麻酔剤は好ましくは、ハロタン、セボフルラン、イソフルラン、エンフルラン、プロポフォール、フェentanil、ウレタン、リドカイン、プロカイン、テトラカイン、ピバカイン、ペルトバルビタラムナトリウム (pelltobarbitalum natrium)、抱水クロラル、ケタミン、クロラロースまたはモルヒネを含む。

【0096】

上記心臓血管薬および血管拡張薬は好ましくは、ダビガトランエテキシラート、アログリプチン、多糖類ナトリウム、ギンコライド、イチョウフラボノイド、イチョウエキス、アサロン、オルメサルタンメドキシミ、レバグリニド、リボ酸、ブレビスカピン (breviscapine)、ウラピジル、ナイアシン、カプトプリル、ロサルタン、プエラリン、タンシノン (tanshinone) IIA、サルボグレラート塩酸塩、フルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、メバスタチン、セリバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチンカルシウムまたはロスバスタチンカルシウムを含む。

【0097】

上記胃腸薬は好ましくは、オメプラゾール、ランソプラゾール、イラプラゾール (ilaprazole)、パントプラゾール、ラベプラゾール、テラゾシン、エソメプラゾール、テナトプラゾール、レミノプラゾール、テナトプラゾール、ジスプラゾール (disuprazole) またはラフチジン (lafutidine) を含む。

【0098】

上記抗うつ薬は好ましくは、アゴメラチン、フルオキセチン、パロキセチン、デュロキセチン、セルトラリン、フルボキサミン、シタロプラム、エスシタロプラム、ベンラファキシン、ミルタザピン、イミプラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、ドキセピン、レメロン、ベンラファキシム (venlafaxime)、フェネルジン、イソカルボキサジドまたはトラニルシプロミンを含む。

【0099】

上記ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは好ましくは、遺伝機能を有し、および、塩基性基 (例えば、A、T、C、G または U など) からなるフラグメント (例えば、SiRNA、アンチセンス核酸の RNAi 配列、またはマイクログリア NLRP3 遺伝子) を含む。

【0100】

上記生物学的作用因子は好ましくは、この分野における従来モノ抗体薬物、インスリン、ガンマグロブリン、抗毒素血清、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、皮膚の活性因子、上皮増殖因子、インフルエンザワクチン、A 型肝炎ワクチン、ガンワクチン、組換えヒト酸性線維芽細胞増殖因子または血管内皮増殖因子 2 モノクローナル抗体 (VEGFR-2 モノクローナル抗体) を含む。

【0101】

上記美容活性物質は一般には、皮膚に栄養を与える機能、皮膚の状態を改善する機能、および、皮膚疾患を予防する機能を有する活性物質を示し、好ましくは、ウルソル酸、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、生物学的タンパク質 T4N5、ビタミン D2、

10

20

30

40

50

ニコチン酸メチル、精製ヘビ油、ヒアルロン酸、精油またはセラミドを含む。

【0102】

ヘルスケア機能を有する上記物質は、この分野における従来のヘルスケア機能を有する物質であることが可能であり、好ましくは、グリチルリチン、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸二ナトリウム、グリチルリチン酸メチル、グリチルリチン酸二アンモニウム、ビタミンE、レスベラトロール、補酵素Q10、シリマリン、アントシアニン、プロアントシアニジン、ルテイン、葉酸、フォリン酸、クルクミン、エモジン、茶ポリフェノール、没食子酸エピガロカテキン(EGCG)、カテキン、ブルーベリー抽出物、グルタチオンまたはオキシマトリンを含む。

【0103】

本発明の好ましい実施形態において、充填型リポソームでは、薬物は、パクリタキセル、ドセタキセルまたはイリノテカン塩酸塩を含み、リポソームはリン脂質および式Iのギンセノシドを含み、前記ギンセノシドはギンセノシドRg5を含み、リン脂質のギンセノシドRg5に対する質量比率が0.5:1から100:1までの範囲であり、好ましくは0.5:1から20:1までの範囲であり、より好ましくは0.5:1から4:1までの範囲である(例えば、0.5:1から2:1までの範囲など)。

【0104】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームはコレステロールをさらに含み、リン脂質のギンセノシドRg5に対する質量比率が1:0.01から1:3までの範囲であり(例えば、1:0.03から1:1までの範囲など)、より好ましくは1:0.05から1:0.9までの範囲であり(例えば、1:0.3から1:0.75までの範囲など)、最も好ましくは1:0.1から1:0.9までの範囲であり(例えば、1:0.1から1:0.5までの範囲など)、ギンセノシドRg5のコレステロールに対する質量比率が0.1:1から100:1までの範囲であり、好ましくは0.5:1から50:1までの範囲であり、より好ましくは0.5:1から10:1までの範囲である(例えば、1.5:1から6:1、または5:1までの範囲など)。

【0105】

本発明の別の好ましい実施形態において、膜におけるギンセノシドRg5の質量百分率が0.01%~80%の範囲であり、好ましくは10%~80%の範囲であり、より好ましくは10%~40%の範囲であり、最も好ましくは20%~40%の範囲であり、膜におけるリン脂質の質量百分率が5%~99.9%の範囲であり、好ましくは10%~70%の範囲であり、より好ましくは30%~70%の範囲であり、最も好ましくは30%~60%の範囲であり、膜におけるコレステロールの質量百分率が0%~50%の範囲であり、好ましくは0.5%~50%の範囲であり、より好ましくは5%~40%の範囲であり、最も好ましくは5%~30%の範囲である(例えば、10%~20%の範囲など)。

【0106】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームは、酸化防止剤をさらに含み、およびリポソーム膜内に封入することができ、ブランクリポソームにおける酸化防止剤の質量百分率が25%以下であり、好ましくは0.001%~15%の範囲であり、より好ましくは0.01%~10%の範囲であり、最も好ましくは0.01%~5%の範囲である。

【0107】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームは、凍結保護剤をさらに含み、およびリポソーム膜内に封入することができ、ブランクリポソームにおける凍結保護剤の質量百分率が80%以下であり、好ましくは0.5%~60%の範囲であり、より好ましくは5%~60%の範囲であり、最も好ましくは30%~60%の範囲である。

【0108】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームは、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムをさらに含み、およびリポソーム膜内に封入することができ、ブランクリポソームにおけるダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウムの質量百分率が通常の

10

20

30

40

50

場合には1%~90%の範囲であり、好ましくは15%~80%の範囲であり、より好ましくは20%~70%の範囲であり(例えば、25%または62.5%の範囲など)、最も好ましくは20%~30%の範囲または60%~70%の範囲であり、百分率は、ブランクリポソームの総質量に対する「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」の質量を示す。ブランクリポソームにおける「ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム」の、リン脂質に対する質量比率が好ましくは1:0.1から1:10までの範囲であり、より好ましくは1:0.5から1:5までの範囲であり、最も好ましくは1:0.5から1:4までの範囲である(例えば、1:1から1:2までの範囲など)。

【0109】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームは、他の賦形剤をさらに含み、およびリポソーム膜内に封入することができる。他の賦形剤および他の賦形剤の量は、ブランクリポソームにおける場合と同じである。

10

【0110】

本発明の好ましい実施形態において、リポソームは、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、ギンセノシド R g 5、ならびにリン脂質を含み、あるいは、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、ギンセノシド R g 5、リン脂質、ならびに凍結保護剤を含み、あるいは、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、ギンセノシド R g 5、リン脂質、凍結保護剤、ならびに酸化防止剤を含む。

【0111】

本発明の別の好ましい実施形態において、上記リポソームは上述の成分からなる。

20

【0112】

本発明の別の好ましい実施形態において、リポソームにおいて、リン脂質は好ましくは、ダイズレシチン、卵レシチンまたはジミリスチルホスファチジルコリンを含み、酸化防止剤は好ましくは、アスコルビン酸、ビタミンE、ビタミンCまたはトレオニンを含み、凍結保護剤は好ましくは、グルコース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、トレハロースまたはプロバンジオールを含む。

【0113】

本発明はまた、上記の充填型リポソームを調製するためのプロセスを提供する。リポソームが凍結保護剤を含むとき、充填型リポソームを調製するためのプロセスは、方法A、方法B、方法Cおよび方法Dのいずれかを含み、リポソームが凍結保護剤を含有せず、または、含まない(not contain or include)ときには、充填型リポソームを調製するためのプロセスは、方法A1、方法B1、方法C1および方法D1のいずれか1つを含む：

30

方法Aは下記の工程を含む：

(1) 脂質、式Iのギンセノシド、および活性物質と、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、前記混合物を、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後で過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

40

【0114】

方法Bは下記の工程を含む：

(1) 脂質および式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを

50

有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、活性物質ならびに凍結保護剤、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後で充填型リポソームの溶液を得て、透析およびろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

【0115】

方法Cは下記の工程を含む：

(1) 脂質および式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、硫酸アンモニウムおよび凍結保護剤と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、透析し、その後、活性物質と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

【0116】

方法Dは下記の工程を含む：

(1) 脂質および式Iのギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、クエン酸ならびに凍結保護剤、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を含有する水溶液と混合して、混合物を得て、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でブランクリポソームの溶液を得て、前記溶液を、活性物質およびリン酸水素二ナトリウムの水溶液と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

【0117】

方法A1は下記の工程を含む：

(1) 脂質、式Iのギンセノシド、および活性物質と、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/もしくはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性のpH感受性材料ならびに/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を水と混合して、水性混合物を得て、必要な場合には、前記水性混合物に、親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性のpH感受性材料および/または親水性のイオン添加剤を加え、前記混合物を、超音波の、前記混合物の高圧均質化の、または前記混合物のメンブランを押し通す操作の後でろ過して、前記活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

【0118】

方法B1は下記の工程を含む：

。

(1) 脂質と、式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料および/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、活性物質と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、活性物質が充填されたりポソームを含有する水溶液を、超音波、高圧均質化またはメンブラン通過の操作の後で得て、透析し、ろ過して、前記活性物質が充填されたりポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程

10

【0119】

方法 C 1 は下記の工程を含む：

(1) 脂質と、式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料および/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、硫酸アンモニウムと、必要な場合には親水性の酸化防止剤、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、ブランクリポソームの溶液を、超音波、高圧均質化またはメンブラン通過の操作の後で得て、透析し、その後、前記溶液を活性物質と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたりポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

20

【0120】

方法 D 1 は下記の工程を含む：

(1) 脂質と、式 I のギンセノシドと、必要な場合にはコレステロール、疎水性の酸化防止剤、疎水性の界面活性剤、疎水性の感熱性賦形剤、疎水性の pH 感受性材料および/または疎水性のイオン添加剤とを有機溶媒中において混合して、透明な溶液を得る工程；ならびに

(2) 工程(1)で得られる透明な溶液の有機溶媒を除き、薄膜を形成させ、前記薄膜を、クエン酸と、必要な場合には親水性の酸化防止剤、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、親水性の界面活性剤、親水性の感熱性賦形剤、親水性の pH 感受性材料および/または親水性のイオン添加剤とを含有する水溶液と混合して、ブランクリポソームの溶液を、超音波、高圧均質化またはメンブラン通過の操作の後で得て、その後、前記ブランクリポソーム溶液を、活性物質と、リン酸水素二ナトリウムの水溶液と混合し、ろ過して、前記活性物質が充填されたりポソームを含有する水溶液を得て、乾燥して、前記充填型リポソームを得る工程。

30

【0121】

方法 A、方法 B、方法 C、方法 D、方法 A 1、方法 B 1、方法 C 1 または方法 D 1 において、それぞれの条件またはパラメータは、ブランクリポソームを調製するための第 1 または第 2 の方法において定義される通りである。式 I のギンセノシドに対する活性物質の質量比(活性物質：式 I のギンセノシド)は、好ましくは 1：0.1 から 1：10 まで、または 1：2 から 1：6 までである。脂質、式 I のギンセノシド、コレステロール、酸化防止剤、ダイズ油および/またはオレイン酸ナトリウム、凍結保護剤、界面活性剤、感熱性賦形剤、pH 感受性材料、イオン添加剤、ならびに活性物質はそれぞれが、上記で定義される通りである。

40

【0122】

方法 A、方法 B、方法 C または方法 D の工程(2)において、乾燥の前、活性物質が充填されたりポソームを含有する水溶液が得られた後に、凍結保護剤を加えることができる

50

。

【0123】

方法B、方法C、方法B1または方法C1において、透析の操作は、この分野においてリポソームを調製するためのプロセスにおける従来の操作を行うことができ、好ましくは、ブランクリポソームの溶液または充填型リポソームの溶液をグルコースの水溶液（例えば、 0.15 mol/L ）または純水に加えて、混合溶液を得ることを含む。透析に要する時間は、この分野においてリポソームを調製するためのプロセスにおける従来のものとすることができ、好ましくは5時間から20時間までであり、より好ましくは12時間である。方法B、方法C、方法B1または方法C1において、超音波、高圧均質化またはメンブラン通過の操作の前に、透析の操作が実施されうる。

10

【0124】

方法Cまたは方法C1において、硫酸アンモニウムと凍結保護剤との水溶液、または硫酸アンモニウムの水溶液中における硫酸アンモニウムの質量分率は、特に限定されず、この分野において硫酸アンモニウム勾配法を用いてリポソームを調製するために使用される、従来の質量分率でありうる。硫酸アンモニウムと凍結保護剤との水溶液、または硫酸アンモニウムの水溶液中における硫酸アンモニウムの質量分率は、好ましくは1%から15%までの範囲であり、より好ましくは6.6%であり、百分率は、上記水溶液の総質量に対する硫酸アンモニウムの質量を示す。

【0125】

方法Cまたは方法C1において、好ましくは、ろ過の前に保温する操作を含む。この保温する操作は、好ましくは、30 から80 まで（例えば、37 など）で、5分から1時間まで（例えば、30分間など）保温することを含む。

20

【0126】

方法Dまたは方法D1において、クエン酸の水溶液の濃度および量は、特に限定されず、この分野においてpH勾配法を用いてリポソームを調製するために使用される従来の濃度および量でありうる。本発明において、その水溶液中におけるクエン酸の質量濃度は、好ましくは1%から15%までの範囲であり、より好ましくは5.76%であり、百分率は、クエン酸の水溶液の総質量に対するクエン酸の質量を示す。リン酸水素二ナトリウム水溶液の濃度および量は、特に限定されず、この分野においてpH勾配法を用いてリポソームを調製するための従来の濃度および量でありうる。本発明において、その水溶液中におけるリン酸水素二ナトリウムの質量濃度は、好ましくは5%から20%までの範囲であり、より好ましくは7.1%である。リン酸水素二ナトリウム水溶液の量は、一般的には、活性物質が充填されたリポソームを含有する水溶液のpHを6.5と7.5との間（例えば、7.3など）で保つことができる。所望のpHにすばやく到達するために、ろ過の前に純水が加えられ、活性物質が充填されたリポソームの水溶液のpHは、6.5と7.5との間（例えば、7.3など）に調節される。

30

【0127】

方法Dまたは方法D1において、好ましくは、ろ過の前に保温する操作を含む。この保温する操作は、好ましくは30 から80 まで（60 など）で、5分から1時間まで（例えば、30分間など）保温することを含む。

40

【0128】

上記のそれぞれの方法において、活性物質の脂質溶解性または水溶性に従って、活性物質はまた、活性物質の水溶液または活性物質の有機溶液の形態で好ましく使用されてもよい。活性物質の水溶液または活性物質の有機溶液の質量濃度は、特に限定されることは要せず、好ましくは、前記水溶液または前記有機溶液の質量体積百分率は1%から20%までの範囲であり、百分率は、活性物質の水溶液または活性物質の有機溶液の総体積（mL）に対する活性物質の質量（g）を示す。活性物質の有機溶液に含有される有機溶媒は、活性物質をよく溶解することができる、この分野における従来の有機溶媒でありうる。本発明において、有機溶媒は好ましくはスルホキシド溶媒であり、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）などである。

50

【 0 1 2 9 】

方法 1、方法 2、方法 3、方法 4、方法 5 または方法 6 を含む、充填型リポソームを製造するためのプロセス、ただし、

方法 1 は、ダイズレシチン、ギンセノシド R g 5 およびパクリタキセルをアセトニトリルに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、ダイズレシチン、ギンセノシド R g 5 およびパクリタキセルの質量比率が 1 0 : 6 : 3 であり、前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記アセトニトリルの体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、5 0 から 6 0 までの恒温水浴において有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、精製水を加えること（前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記精製水の体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、リポソームの粒径が 0 . 1 ミクロンと 0 . 3 ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行うこと、0 . 2 2 ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得ることを含む；

方法 2 は、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセルおよびトレオニンをメタノールに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセル、コレステロールおよびトレオニンの質量比率が 1 3 : 1 2 : 4 : 5 : 5 であり、前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記メタノールの体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、6 0 から 7 0 までの恒温水浴において有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、5 % グルコース水溶液を加えること（前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記グルコース水溶液の体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、リポソームの粒径が 0 . 1 ミクロンと 0 . 3 ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行うこと、0 . 2 2 ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得ることを含む；

方法 3 は、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセル、ダイズ油およびビタミン C をクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセル、ダイズ油およびビタミン C の質量比率が 8 : 6 : 1 . 5 : 4 : 0 . 5 であり、前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記クロロホルムの体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、3 0 から 6 0 までで有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、1 0 % トレハロース水溶液を加えること（前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記トレハロース水溶液の体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、リポソームの粒径が 0 . 1 ミクロンと 0 . 3 ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行うこと、0 . 2 2 ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得ることを含む；

方法 4 は、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセル、ダイズ油、コレステロールおよびビタミン E をクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、パクリタキセル、ダイズ油、コレステロールおよびビタミン E の質量比率が 1 4 : 1 2 : 4 : 8 : 0 . 5 : 0 . 1 であり、前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記クロロホルムの体積の比が 1 0 0 m L / 3 g である）、3 0 から 6 0 までで有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、5 % サッカロース水溶液を加えること（前記ギンセノシド R g 5 の質量に対する前記サッカロース水溶液の体積の比率が 1 0 0 m L / 3 g である）、リポソームの粒径が 0 . 1 ミクロンと 0 . 3 ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化を行うこと、0 . 2 2 ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、その後、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、その後、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリ

10

20

30

40

50

タキセルリポソームを得ることを含む；

方法5は、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、ドセタキセル、ダイズ油、ビタミンCをクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、ドセタキセル、ダイズ油およびビタミンCの質量比率が8：6：3：4：5であり、前記ギンセノシド R g 5の質量に対する前記クロロホルムの体積の比が100 mL / 3 gである）、30 から60 までで有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、10%トレハロース水溶液を加えること（前記ギンセノシド R g 5の質量に対する前記トレハロース水溶液の体積の比が100 mL / 3 gである）、リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを含有する前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを得ることを含む；

10

方法6は、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、イリノテカン塩酸塩およびダイズ油をクロロホルムに加え、攪拌して、透明な溶液を形成すること（この場合、卵レシチン、ギンセノシド R g 5、イリノテカン塩酸塩およびダイズ油の質量比率が8：6：2：4：5であり、前記ギンセノシド R g 5の質量に対する前記クロロホルムの体積の比が100 mL / 3 gである）、30 から60 までで有機溶媒を除いて、薄膜を形成すること、10%トレハロース水溶液を加えること（前記ギンセノシド R g 5の質量に対する前記トレハロース水溶液の体積の比が100 mL / 3 gである）、リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行うこと、0.22ミクロンの微多孔膜でろ過して、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを含有する水溶液を得て、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを含有するために前記水溶液を凍結乾燥し、保護ガスを導入し、密封して、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリポソームを得ることを含む。

20

【0130】

充填型リポソームを調製するための上記プロセスにおいて、活性物質の質量比率は、この分野における従来の質量比率であ、好ましくは、式Iのギンセノシドに対する活性物質の質量比（活性物質：式Iのギンセノシド）は1：0.1から1：10までであり、より好ましくは1：2から1：6までである（例えば、1：3、または1：4など）。

30

【0131】

上記ブランクリポソームまたは上記充填型リポソームの粒径は、この分野における従来の粒径であることが可能であり、好ましくは30 nmから2000 nmまでの範囲であり、より好ましくは30 nmから300 nmまでの範囲であり、最も好ましくは50 nmから300 nmまでの範囲である。上記充填型リポソームの封入効率は好ましくは80%以上であり、より好ましくは90%以上であり、最も好ましくは95%以上である。

【0132】

上記充填型リポソームの活性物質が、薬物、またはヘルスケア機能を有する物質であるとき、上記充填型リポソームの投与は、この分野における従来の投与でありえて、好ましくは、疾患の処置および/または医療ヘルスケアのために使用される注入投与、経口投与または皮膚浸透である。したがって、上記充填型リポソームは、一般的には、注入、凍結乾燥注入、経口投与または局所投与のために好適である形態で調製される。注入投与は、好ましくは、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射または皮下注射が含まれる。一般的に、上記充填型リポソームは、生理食塩水、リン酸塩緩衝液または5%グルコース水溶液に加えられ、注射のための注射液が調製される。

40

【0133】

上記充填型リポソームにおいて、活性物質が抗腫瘍薬であるとき、上記充填型リポソームは、一般的に、腫瘍細胞に対する標的化効果、抗多剤耐性効果、相乗効果および減衰効果、ならびに薬物の相乗作用を有する。

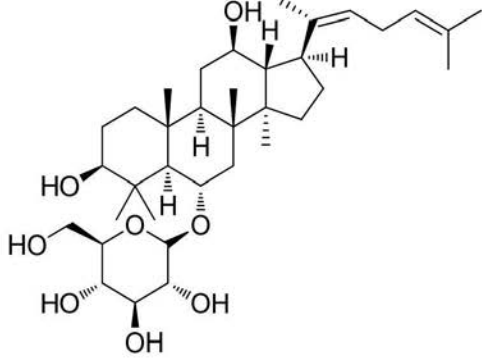
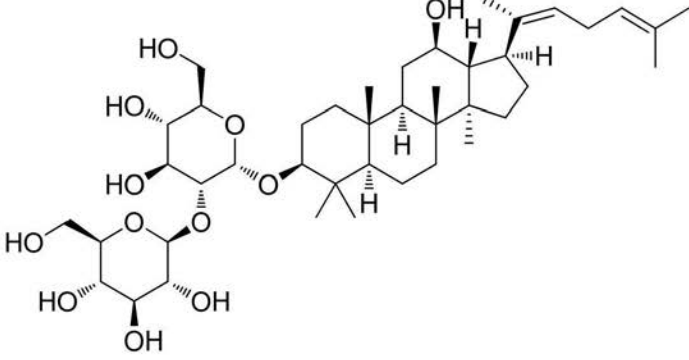
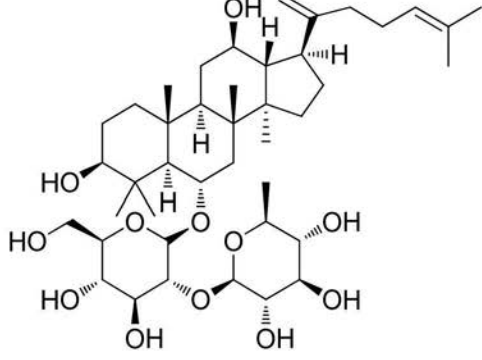
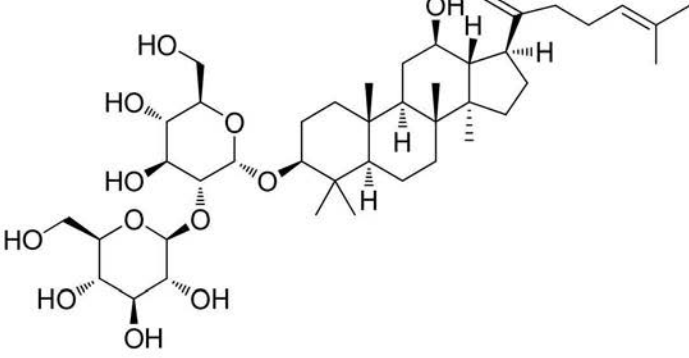
【0134】

50

下記の表には、予防発明のために特に好適である例示的なギンセノシドの構造が示される：

【 0 1 3 5 】

【 表 1 - 1 】

名称	構造
ギンセノシドRg4	
ギンセノシドRg5	
ギンセノシドRg6	
ギンセノシドRk1	

10

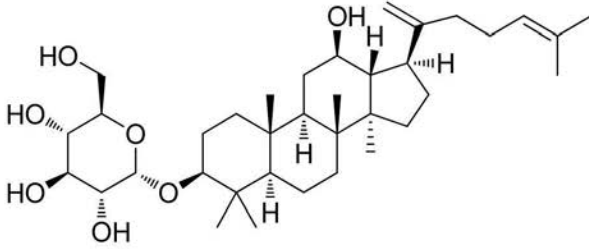
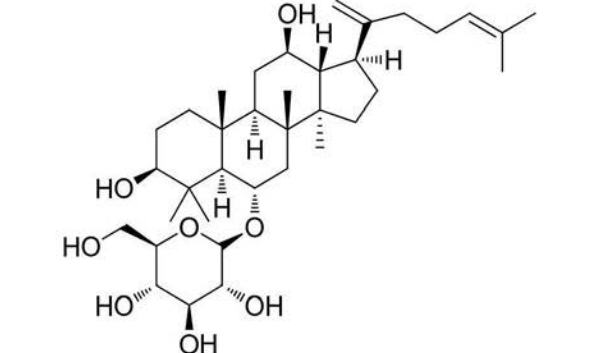
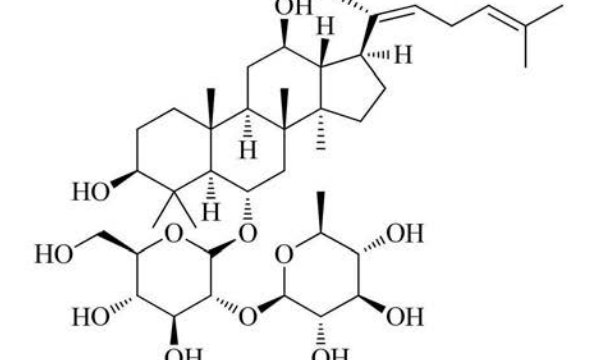
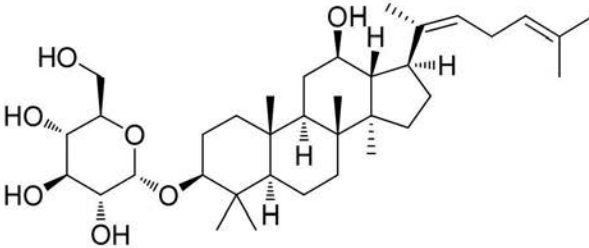
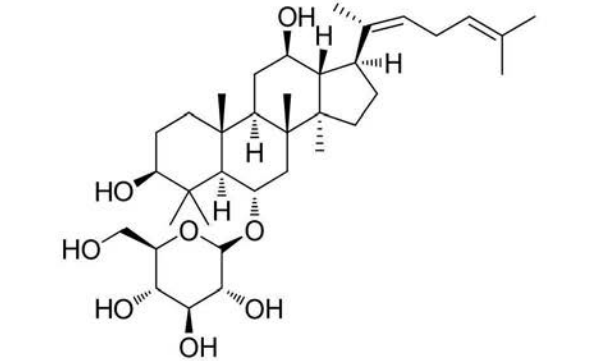
20

30

40

【 0 1 3 6 】

【表 1 - 2】

名称	構造
ギンセノシドRk2	
ギンセノシドRk3	
ギンセノシドRk4	
ギンセノシドRh3	
ギンセノシドRh4 (20E)	

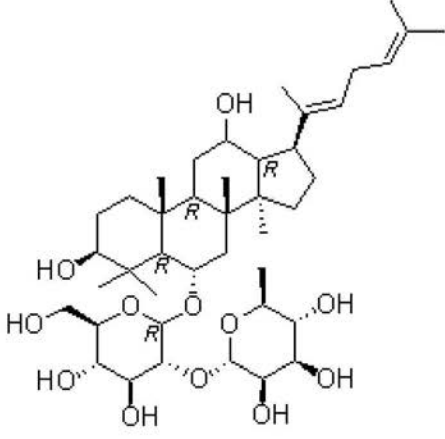
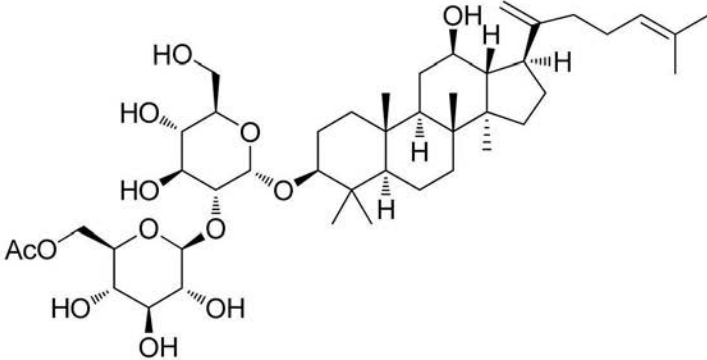
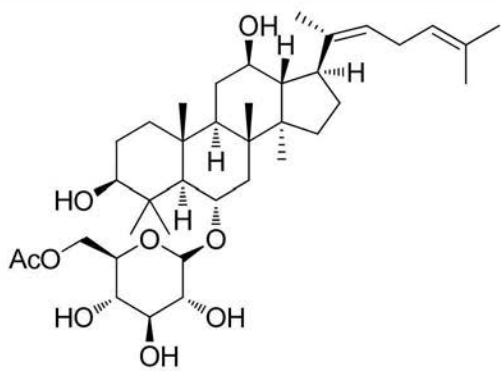
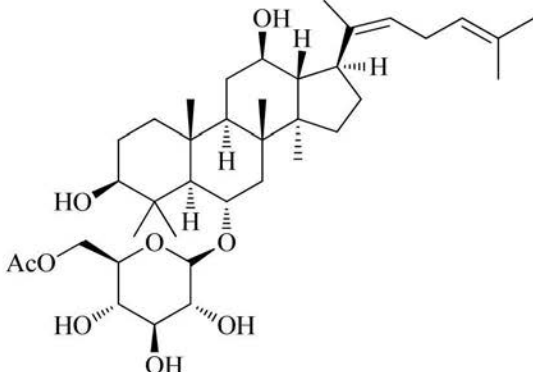
10

20

30

40

【表 1 - 3】

名称	構造
ギンセノシドF4(20E)	
ギンセノシドRs5	
ギンセノシドRs6	
ギンセノシドRs7	

10

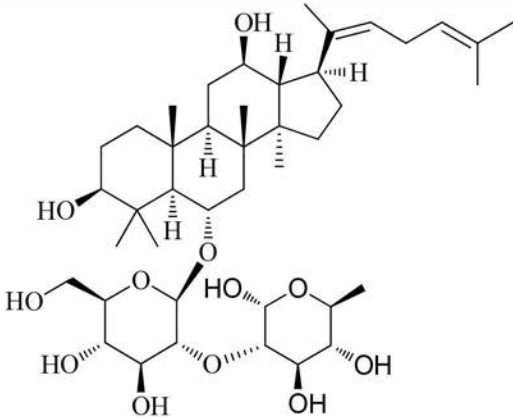
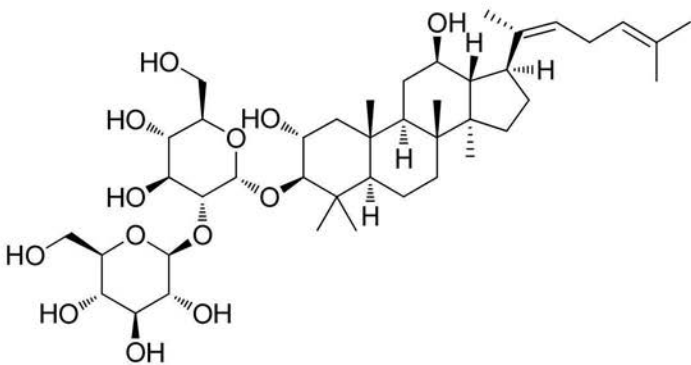
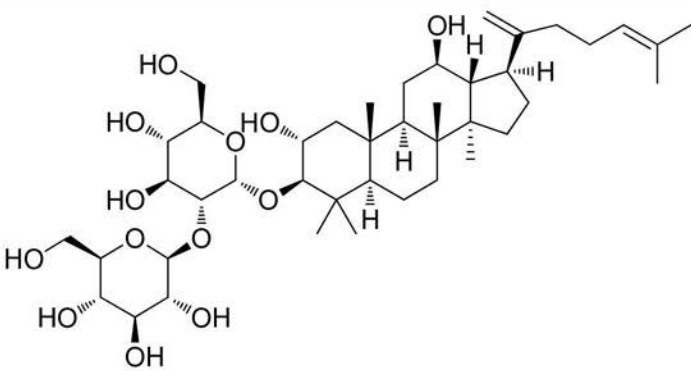
20

30

40

【 0 1 3 8 】

【表 1 - 4】

名称	構造
ノギンセノシドT5	
ダムリンA	
ダムリンB	

10

20

30

【0139】

本発明において、言及された最適化条件は、必要な場合にはこの分野における常識に基づいて組み合わせて、好ましい実施形態を得ることができる。

【0140】

本発明において、室温は10 から30 までを示す。

【0141】

本発明において、凍結保護剤の水溶液または活性物質の水溶液の密度は1 g / mL (すなわち、水の密度) であり、したがって、凍結保護剤の水溶液または活性物質の水溶液の総質量は、 $m = \rho \cdot V$ によって計算される。

40

【0142】

本発明において、活性物質の有機溶液の密度は有機溶媒の種類に依存する。例えば、有機溶媒がDMSOであるとき、活性物質の有機溶液の密度は1.1 g / mLである。

【0143】

本発明において、試薬および原料は市販されている。

【0144】

本発明の有益な効果は下記の通りである：

50

本発明のブランクリボソームは、高い効率、良好な安全性、良好な安定性、高まった標的化能、良好な均一性、安定かつ信頼できる品質、および簡便な調製プロセスという利点を有する。活性物質が抗腫瘍薬であるとき、充填型リボソームは一般的に、腫瘍細胞に対する標的化効果、抗多剤耐性効果、相乗効果および減衰効果、ならびに薬物の相乗作用を有する。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】実施形態1によって調製されるギンセノシド R g 5 ブランクリボソームの粒径分布図である。

【図2】実施形態2によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図3】実施形態3によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図4】実施形態4によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図5】実施形態5によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図6】実施形態6によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図7】実施形態7によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図8】実施形態8によって調製されるギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図9】実施形態9によって調製されるギンセノシド R g 5 ドセタキセルリボソームの粒径分布図である。

【図10】実施形態10によって調製されるギンセノシド R g 5 イリノテカン塩酸リボソームの粒径分布図である。

【図11】実施形態11によって調製されるギンセノシド R g 5 ヒドロキシカンブトテシンリボソームの粒径分布図である。

【図12】実施形態12によって調製されるギンセノシド R g 5 塩酸ドキシソルピシンリボソームの粒径分布図である。

【図13】実施形態13によって調製されるギンセノシド R g 5 アムホテリシン B リボソームの粒径分布図である。

【図14】実施形態14によって調製されるギンセノシド R g 5 塩酸ドキシソルピシンリボソームの粒径分布図である。

【図15】実施形態15によって調製されるギンセノシド R g 5 ピンクリスチン硫酸塩リボソームの粒径分布図である。

【図16】実施形態16によって調製されるギンセノシド R g 5 オキサリプラチンリボソームの粒径分布図である。

【図17】実施形態17によって調製されるギンセノシド R g 5 シスプラチンリボソームの粒径分布図である。

【図18】実施形態18によって調製されるギンセノシド R g 5 フルオロウラシルリボソームの粒径分布図である。

【図19】実施形態19によって調製されるギンセノシド R g 5 従来型 S i R N A リボソームの粒径分布図である。

【図20】実施形態21によって調製されるギンセノシド R g 5 塩酸ドキシソルピシンリボソームの粒径分布図である。

【図21】実施形態22によって調製されるギンセノシド R g 5 アムホテリシン B リボソームの粒径分布図である。

【図22】実施形態23によって調製されるギンセノシド R g 5 エピルピシン塩酸塩リボ

10

20

30

40

50

ソームの粒径分布図である。

【図23】実施形態24によって調製されるギンセノシド R g 5 ピンクリスチン硫酸塩リポソームの粒径分布図である。

【図24】実施形態25によって調製されるギンセノシド R g 5 オキサリプラチンリポソームの粒径分布図である。

【図25】実施形態26によって調製されるギンセノシド R g 5 シスプラチンリポソームの粒径分布図である。

【図26】実施形態27によって調製されるギンセノシド R g 5 フルオロウラシルリポソームの粒径分布図である。

【図27】実施形態28によって調製されるギンセノシド R g 5 従来型 S i R N A リポソームの粒径分布図である。

【図28】ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9) に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール + R g 5 の細胞生存率グラフである。

【図29】パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール + R g 5 の細胞生存率グラフである。

【図30】腫瘍細胞取り込みの蛍光倒立顕微鏡観察図であり、図30 - A、図30 - B、図30 - Cはそれぞれ、パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対する N i l、N i l - l i p、R g 5 - N i l - l i p の蛍光倒立顕微鏡観察図である。

【図31】ライブ撮像装置によって記録される I R 7 8 3 蛍光のインビボ分布図であり、図31 - A、図31 - Bおよび図31 - Cはそれぞれ、ライブ撮像装置によって記録される2時間目、6時間目および10時間目でのコントロール群の I R 7 8 3 蛍光のインビボ分布図であり、図31 - D、図31 - Eおよび図31 - Fはそれぞれ、ライブ撮像装置によって記録される2時間目、6時間目および10時間目での実験群の I R 7 8 3 蛍光のインビボ分布図であり、図31 - Gは蛍光物差しであり、この場合、蛍光強度に従って、色が順に、赤色、黄色、緑色および青色であり、赤色が最も強い蛍光を示し、青色が弱い蛍光を示す。

【図32】コントロール群マウスおよび実験群マウスの単離された内臓の蛍光図であり、図32 - Aおよび図32 - Bはそれぞれ、コントロール群マウスおよび実験群マウスの単離された内臓の蛍光図であり、図32 - Cは蛍光物差しであり、この場合、蛍光強度に従って、色が、赤色、黄色、緑色および青色であり、赤色が最も強い蛍光を示し、青色が弱い蛍光を示す。

【図33】ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9) に対するコントロール群、タキソール + R g 5 群、およびアブラキサン (A b r a x a n e) 群の抗腫瘍グラフである。

【図34】パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対するコントロール群、タキソール + R g 5 群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【図35】ヘマトキシリン - エオシンによって染色された後の正常マウス、コントロール群マウス、およびタキソール + R g 5 群マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図であり、図35 - A、図35 - Dおよび図35 - Gはそれぞれ、ヘマトキシリン - エオシンによって染色された後の正常マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図であり、図35 - B、図35 - Eおよび図35 - Hはそれぞれ、ヘマトキシリン - エオシンによって染色された後のコントロール群の腫瘍保有マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図であり、図35 - C、図35 - Fおよび図35 - Iはそれぞれ、ヘマトキシリン - エオシンによって染色された後の実験群マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図である。

【図36】ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7) に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール + R g 5 の細胞生存率グラフである。

【図37】タパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7 / T) に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール + R g 5 の細胞生存率グラフである。

【図38】ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7) に対するコントロール群、タキソール + R g

10

20

30

40

50

5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【図39】パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【図40】ヒト卵巣ガン細胞系(A2780)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフである。

【図41】パクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフである。

【図42】ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフである。

【図43】パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフである。

【図44】ヒト膵臓ガン細胞系(BxPC-3)に対するタキソール、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図45】タパクリタキセル耐性ヒト膵臓ガン細胞系(BxPC-3/T)に対するタキソール、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図46】ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するDoc、ブランクRg5、およびDoc+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図47】タパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するDoc、ブランクRg5、およびDoc+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図48】ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【図49】パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【図50】ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図51】パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図52】フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するFU+Rg5、ブランクRg5およびFUの細胞生存率グラフである。

【図53】フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するブランクRg5、FU、およびFU+Rg5の抗腫瘍グラフである。

【図54】シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)に対するブランクRg5、DDP、およびDDP+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図55】シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)に対するブランクRg5、DDP、およびDDP+Rg5の抗腫瘍グラフである。

【図56】ビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するブランクRg5、V、およびV+Rg5の細胞生存率グラフである。

【図57】ビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するブランクRg5、V、およびV+Rg5の抗腫瘍グラフである。

【図58】ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対するブランクRg5、タキソール、およびRg5+タキソールの細胞生存率グラフである。

【図59】パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)に対するブランクRg5、タキソール、およびRg5+タキソールの細胞生存率グラフである。

【図60】ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対するコントロール群、アブラキサン群、およびRg5+タキソール群の抗腫瘍グラフである。

【図61】パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)に対するコントロール群、アブラキサン群、およびRg5+タキソール群の抗腫瘍グラフである。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0146】

本発明が下記の実施形態によってさらに説明されるが、本発明は下記の実施形態によって限定されない。下記の実施形態において、具体的な条件を与えることを伴わない実験方法は、従来の様式および条件または商品仕様に従って実施される。

【0147】

1. 実験薬物：ギンセノシド R g 5、ギンセノシド R h 2、ギンセノシド R g 3、ギンセノシド R k 1、パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル、シスプラチン、オキサリプラチン、イリノテカン塩酸塩、ヒドロキシカンプトテシン、塩酸ドキシソルピシン、アムホテリシン B、エピルピシン塩酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、フルオロウラシルは、この分野では市販されており、例えば、これらは、Shanghai Ginposome Pharma Tech Co., Ltd. によって供給される。

10

【0148】

従来型 SiRNA は Ribobio によって供給される。

【0149】

従来のブランクリポソームを調製するためのプロセス：1gのダイズレシチン、0.6gのコレステロール、0.1gのダイズ油を20mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。40 から50 までの恒温水浴における回転蒸発によって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、20mLの5%グルコース水溶液（百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行い、0.22ミクロンの微多孔膜で過して、従来のブランクリポソームを含有する水溶液を得て、その後、バイアルに分注した：各バイアルが180mgのリポソームを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、前記従来のブランクリポソームを得た。

20

【0150】

2. 下記の実施形態および応用実施形態において使用される機器は、College of Pharmacy of Southwest University によって自己所有されており、これらの機器の型式および供給元情報は下記の通りである：

高速液体クロマトグラフィー (Agilent 1100)

電子天秤 (TB-215、Denver Instrument、米国)

30

超音波洗浄機 (SB3200DT、Ningbo new MacBook Biotechnology Co., Ltd.)

Termovap サンプル濃縮器 (HGC-12A、Tianjin Hengao Technology Development Co., Ltd.)

ロータリーエバポレーター (RE-2000A、Shanghai Yarong Biochemical Instrument Factory)

超純水製造システム (ULUP-IV-10T、Sichuan U & P Ultra Technology Co., Ltd.)

温度自動調節振動器 (SHA-C、Changzhou Aohua Instrument Co., Ltd.)

40

超音波細胞破碎器 (JY92-II、Ningbo new MacBook Biotechnology Co., Ltd.)

高圧ホモジナイザー (B15、AVESTIN、カナダ)

レーザー粒径分析装置 (Nano ZS、Malvern instruments Ltd.、英国)

小型押し機 (Mini-extruder、Avanti Polar Lipids Inc)

光電子顕微鏡 (XDS-1B、Chongqing Optical Instrument Co., Ltd.)

クリーンベンチ (SW-CJ-1FD、Suzhou Aetna air Tech

50

nology Co., Ltd.)

細胞インキュベーター (CCL-170B-8、ESCO、シンガポール)

蛍光倒立顕微鏡 (IX-73、オリンパス、日本)

インビボ小動物画像化システム (FX PRO、Bruker Corporation、米国)

3. 実験細胞系:

A549ヒト肺ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

A549/Tパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

MCF-7ヒト乳ガン細胞系 (南京KeyGEN Bio)

10

A2780ヒト卵巣ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

A2780/Tパクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

PC-3ヒト前立腺ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

BxPC-3ヒト膵臓ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

Bel/FUフルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

SGC-7901ヒト胃ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

SGC-7901/DDPシスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

20

HCT-8/Vピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (Nanjing KeyGEN Bio)

SGC-7901/Tパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系を確立するためのプロセス:

低濃度量増加連続誘導法を適用して、元となるSGC-7901細胞からの誘導を、薬物耐性ヒト胃ガン細胞系SGC-7901/パクリタキセルを確立するために行った。新しい回収SGC-7901細胞を、従来の条件のもとで2世代または3世代にわたって培養して、細胞を安定に成長させた。培養培地を、消化期間を通して細胞を継代培養した翌日に取り替えたとき、元となるSGC-7901に、 IC_{50} の1/10の初期濃度で、パクリタキセルを加えた。培養培地を、薬剤が加えられた翌日に取り替え、従来の継代培養が行われている間、パクリタキセルの濃度を維持した。パクリタキセルの各濃度のもとで細胞が安定に成長することができた後で、薬物の濃度を増大させた。2.5 mg/Lのパクリタキセルを含有する培養培地において、細胞が安定に成長することができるまで培養し続けた。この期間が12ヶ月続いた。

30

【0151】

MCF-7/Tパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系を確立するためのプロセス:

低濃度量増加連続誘導法を適用して、元となるMCF-7細胞からの誘導を、薬物耐性ヒト乳ガン細胞系MCF-7/パクリタキセルを確立するために行った。新しい回収MCF-7細胞を、従来の条件のもとで2世代または3世代にわたって培養して、細胞を安定に成長させた。培養培地を、消化期間を通して細胞を継代培養した翌日に取り替えたとき、元となるMCF-7に、 IC_{50} の1/10の初期濃度で、パクリタキセルを加えた。培養培地を、薬剤が加えられた翌日に取り替え、従来の継代培養が行われている間、パクリタキセルの濃度を維持した。パクリタキセルの各濃度のもとで細胞が安定に成長することができた後で、薬物の濃度を増大させた。2.5 mg/Lのパクリタキセルを含有する培養培地において、細胞が安定に成長することができるまで培養し続けた。この期間が12ヶ月続いた。

40

【0152】

PC-3/Tパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系を確立するためのプロセス:

低濃度量増加連続誘導法を適用して、元となるPC-3細胞からの誘導を、薬物耐性ヒト前立腺ガン細胞系PC-3/パクリタキセルを確立するために行った。新しい回収PC

50

- 3細胞を、従来の条件のもとで2世代または3世代にわたって培養して細胞を安定に成長させた。培養培地を、消化期間を通して細胞を継代培養した翌日に取り替えたとき、元となるPC-3に、 IC_{50} の1/10の初期濃度で、パクリタキセルを加えた。培養培地を、薬剤が加えられた翌日に取り替え、従来の継代培養が行われている間、パクリタキセルの濃度を維持した。パクリタキセルの各濃度のもとで細胞が安定に成長することができた後で、薬物の濃度を増大させた。0.5 mg/Lのパクリタキセルを含有する培養培地において、細胞が安定に成長することができるまで培養し続けた。この期間が10ヶ月間続いた。

【0153】

BxPC-3/Tパクリタキセル耐性ヒト膵臓ガン細胞系を確立するためのプロセス：
低濃度量増加連続誘導法を適用して、元となるBxPC-3細胞からの誘導を、薬物耐性ヒト膵臓ガン細胞系BxPC-3/パクリタキセルを確立するために行った。新しい回収BxPC-3細胞を、従来の条件のもとで2世代または3世代にわたって培養して細胞を安定に成長させた。培養培地を、消化期間を通して細胞を継代培養した翌日に取り替えたとき、元となるBxPC-3に、 IC_{50} の1/10の初期濃度で、パクリタキセルを加えた。培養培地を、薬剤が加えられた翌日に取り替え、従来の継代培養が行われている間、パクリタキセルの濃度を維持した。パクリタキセルの各濃度のもとで細胞が安定に成長することができた後で、薬物の濃度を増大させた。3 mg/Lのパクリタキセルを含有する培養培地において、細胞が安定に成長することができるまで培養し続けた。この期間が12ヶ月続いた。

10

20

【0154】

4. 実験動物：Kunmingマウス（または指定の正常マウス）（Third Military Medical Universityの動物センターから購入）、BALB/C-nu/nuマウス（または指定のヌードマウス）（Shanghai Slack Laboratory Animal Co., Ltd.から購入）
5. 細胞培養法：関連する細胞系を、5%のCO₂を含有する37℃のインキュベーターに入れ、（10%のウシ胎児血清、100 U/mLのペニシリン、100 µg/mLのストレプトマイシンを含有する）DMEMまたはRPMI 1640の完全培養培地によって培養し、0.25%トリプシン-EDTAを使用して、週に2~3回、消化し、継代培養した。

30

【0155】

6. 投与：陰性コントロール群、陽性コントロール群（例えば、ギンセノシド-ブランクリボソームコントロール群、パクリタキセルコントロール群、従来型リボソーム-パクリタキセルコントロール群、またはアルブミン-パクリタキセルコントロール群）、および薬物負荷ギンセノシドリボソーム群が、それぞれの実験のために設定される。少なくとも6点の濃度の勾配が設定される（2分の1の希釈、または5倍希釈、それぞれの濃度について3つのウエル）。

【0156】

7. 腫瘍細胞の阻害濃度 IC_{50} のアッセイ：対数増殖期の腫瘍細胞をトリプシンにより消化し、それにより、ある特定の濃度の細胞液を得て、その後、5000細胞/ウエルの密度（それぞれのウエルについて100 µl）により96ウエルプレートに播種した。異なる濃度のサンプルを含有する新鮮な培養培地と、対応する溶媒コントロールとを、それぞれのウエルについて100 µl加えた（DMSOの最終濃度：0.5%未満）。それぞれのサンプルでは10点の用量の群を設定し、それぞれの群では3つの並列ウエルを設定し、上清を37℃でのインキュベーターにおける72時間の培養の後で除いた。100 µlのPBSおよび10 µlのCCK-8をそれぞれのウエルに加え、マイクロ振動器によって振とうして均一にし、3時間にわたって培養し続けた。光学密度（OD）を、630 nmの参照波長および450 nmの検出波長においてマイクロプレートリーダーによって求める。溶媒により処理される腫瘍細胞をコントロール群とし、 IC_{50} をメジアン効果の式に従って計算した。

40

50

【0157】

8. インビトロ細胞実験のアッセイ：対数増殖期の腫瘍細胞を集め、(10%のウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、100 μg/mlのストレプトマイシンを含有する) DMEM完全培養培地に再懸濁し、最終濃度が 4×10^4 細胞/mlであった。96ウェル細胞培養プレートにおいて、200 μlの上記細胞懸濁物をそれぞれのウェルに加え(8×10^3 細胞/ウェル)、5%のCO₂で満たされる37℃での細胞インキュベーターにおいて48時間培養した。DMEM完全培養培地を、異なる濃度を有する200 μlの抗腫瘍薬によりそれぞれ置き換えた。薬物の最終濃度を、少なくとも6つの群に設定した。DMEM完全培養培地を陰性コントロール群とした。それぞれの濃度が4つのウェルで設定され、実験を3回繰り返した。細胞を5%のCO₂で満たされる37℃での細胞インキュベーターにおいて72時間培養した後、20 μlの、5 mg/mlのMTT溶液をそれぞれのウェルに加えた。細胞インキュベーターにおいてさらに4時間培養した後、上清を捨てた。150 μlのDMSOをそれぞれのウェルに加え、10分間振とうした。ODを連続スペクトル多機能マイクロプレートリーダー(Tecan infinite M200 TECAN、スイス)によって490 nmで求めた。細胞生存率を下記の式によって算出した：(細胞生存率(%)) = $OD_{\text{薬物}} / OD_{\text{コントロール}} \times 100\%$ 。

10

【0158】

細胞生存率(%)) = $OD_{490}(\text{サンプル}) / OD_{490}(\text{コントロール}) \times 100\%$;

式中、 $OD_{490}(\text{サンプル})$ は実験群のODであり、 $OD_{490}(\text{コントロール})$ はブランクコントロール群のODである。

20

【0159】

9. インビボ薬理的有効性実験のアッセイ： 1×10^7 細胞/ml ~ 10×10^7 細胞/mlの対数増殖期の腫瘍細胞を18 g ~ 20 gのヌードマウスの右側の脇の下に1 mlのシリンジによってゆっくり皮下注入した。それぞれのヌードマウスに100 μlを注入した。腫瘍の成長を、腫瘍の体積が約100 mm³になるまで観察した。動物を無作為に群に分け、投与を行った。2日毎に、マウスを重量測定し、腫瘍の体積を測定した。ノギスにより腫瘍の最大直径および最小直径を測定した。ヌードマウスを屠殺し、腫瘍の体積を測定した。統計学分析のために相対腫瘍体積(RTV)、相対腫瘍増殖比(T/C)および腫瘍抑制率を計算した。

30

【0160】

腫瘍体積の計算式： $V = abh / 2$ 、式中、aは腫瘍の直径であり、bは腫瘍の横方向直径であり、hは腫瘍の高さである。

【0161】

相対腫瘍体積の計算式： $RTV = V_t / V_0$ 、式中、 V_t は、ある特定の時間における腫瘍の体積であり、 V_0 は投与時の腫瘍の体積である。

【0162】

相対腫瘍増殖比の計算式： $T/C(\%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ 、式中、TRTVは処置群のRTVであり、CRTVは溶媒コントロール群のRTVである。

40

【0163】

腫瘍抑制率の計算式：腫瘍抑制率 = (溶媒コントロール群の腫瘍重量 - 薬物投与群の腫瘍重量) / 溶媒コントロール群の腫瘍重量 $\times 100\%$ 。

【0164】

治療効果の評価基準： $T/C(\%) > 60$ は、効果がないことを示している； $T/C(\%) \leq 60$ 、かつ、溶媒コントロール群と比較して、 $P < 0.05$ (腫瘍体積が統計学により処理されたとき)は、効果があることを示している。

【0165】

下記の実施形態において、操作のための温度および圧力は、別途指定される場合を除き、一般には室温および常圧を示し、ただし、室温は10 ~ 30℃を示し、常圧は標準大気圧を示す。

50

【0166】

実施形態1 ギンセノシドRg5ブランクリポソームの調製

1gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5および0.1gのダイズ油を20mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。40から50までの恒温水浴において回転蒸発によって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、20mLの5%グルコース水溶液（百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5ブランクリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが180mgのリポソームを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5ブランクリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が57.43nmであった（表1および図1を参照のこと）。

10

【0167】

【表2】

表1 ギンセノシドRg5ブランクリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	76.02	97.6	38.63
ピーク2	4227	2.4	994.4
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	57.43		
多分散性指数(PdI)	0.273		
切片	0.934		
結果品質	良好		

20

【0168】

実施形態2 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

1gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5および0.3gのパクリタキセルをアセトニトリル20mLに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。50から60までの恒温水浴において回転蒸発によって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、20mLの精製水を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が113.6nmであった（表2および図2を参照のこと）。封入効率が90%超であった。

30

【0169】

【表3】

表2 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	131.2	97.4	58.95
ピーク2	4514	2.6	871.1
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	113.6		
多分散性指数(PdI)	0.210		
切片	0.940		
結果品質	良好		

40

【0170】

50

実施形態3 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

0.75gの卵レシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのパクリタキセル、0.25gのコレステロールおよび0.25gのトレオニンを20mLのメタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。60 から70 までの恒温水浴において回転蒸発によって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、20mLの5%グルコース水溶液（百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで超音波の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が132.6nmであった（表3および図3を参照のこと）。封入効率が90%超であった。

10

【0171】

【表4】

表3 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	156.9	95.5	78.12
ピーク2	3983	4.5	1088
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	132.6		
多分散性指数(PdI)	0.253		
切片	0.922		
結果品質	良好		

20

【0172】

実施形態4 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

8gのダイズレシチン、6gのギンセノシドRg5、1gのパクリタキセル、4gのダイズ油および2.5gのビタミンCを200mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。60 から70 までで薄膜エバポレーターによって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、200mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が116.4nmであった（表4および図4を参照のこと）。封入効率が90%超であった。

30

40

【0173】

【表 5】

表4 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	125.7	96.7	47.69
ピーク2	4749	3.3	749.0
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均, nm)	116.4		
多分散性指数 (PdI)	0.212		
切片	0.943		
結果品質	良好		

10

【0174】

実施形態 5 ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームの調製

7 g のダイズレシチン、6 g のギンセノシド R g 5、2 g のパクリタキセル、4 g のダイズ油、2.5 g のコレステロールおよび 0.5 g のビタミン E を 200 mL のジエチルエーテルに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。30 から 40 までで薄膜エバポレーターによって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、200 mL の 5 % サッカロース水溶液（百分率はサッカロース水溶液の総質量に対するサッカロースの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が 0.1 ミクロンと 0.3 ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 30 mg のパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 109.8 nm であった（表 5 および図 5 を参照のこと）。封入効率が 90 % 超であった。

20

【0175】

【表 6】

表5. ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	119.9	97.3	46.33
ピーク2	4752	2.7	747.0
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均, nm)	109.8		
多分散性指数 (PdI)	0.201		
切片	0.967		
結果品質	良好		

30

【0176】

実施形態 6 ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームの調製

8 g の H S P C、6 g のギンセノシド R g 5、2 g のパクリタキセル、4 g のダイズ油および 0.5 g のビタミン E を 200 mL のクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。35 ~ 45 で薄膜エバポレーターによって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、200 mL の 5 % マンニトール水溶液（百分率はマンニトール水溶液の総質量に対するマンニトールの質量を示す）を加えた。リポソームの粒径が 0.1 ミクロンと 0.3 ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 30 mg のパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 186.7 nm であった（表 6 および図 6 を参照のこと）。封入効

40

50

率が90%超であった。

【0177】

【表7】

表6 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	209.8	98.6	87.28
ピーク2	5015	1.4	600.9
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均, nm)	186.7		
多分散性指数(PdI)	0.176		
切片	0.950		
結果品質	良好		

10

【0178】

実施形態7 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

8gのDMPC、6gのギンセノシドRg5、1gのパクリタキセル、4gのダイズ油および0.1gのアスコルビン酸を200mLのエタノールに加え、55から65までで攪拌して、透明な溶液を形成した。60から70までで薄膜エバポレーターによって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、200mLの5%キシリトール水溶液(百分率はキシリトール水溶液の総質量に対するキシリトールの質量を示す)を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が146.7nmであった(表7および図7を参照のこと)。封入効率が90%超であった。

20

【0179】

【表8】

表7 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	163.3	100.0	45.93
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均, nm)	146.7		
多分散性指数(PdI)	0.101		
切片	0.947		
結果品質	良好		

30

【0180】

実施形態8 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

8gのDSPE-PEG(2000)、6gのギンセノシドRg5、2gのパクリタキセル、4gのオレイン酸ナトリウムおよび0.1gのプロピレングリコールを200mLのクロロホルムに加え、10~20で攪拌して、透明な溶液を形成した。40から50までで薄膜エバポレーターによって有機溶媒を除いて、薄膜を形成し、200mLの5%ラクトース水溶液(百分率はラクトース水溶液の総質量に対するラクトースの質量を示す)を加えた。リポソームの粒径が0.1ミクロンと0.3ミクロンとの間になるまで、高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結

40

50

乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 217.2 nm であった（表 8 および図 8 を参照のこと）。封入効率が 90% 超であった。

【0181】

【表 9】

表 8 ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	237.4	100.0	73.02
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	217.2		
多分散性指数 (PdI)	0.219		
切片	0.975		
結果品質	良好		

10

【0182】

実施形態 9 ギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5、0.2 g のドセタキセル、0.4 g のダイズ油および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mL の 10% トレハロース水溶液を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 20 mg のドセタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 158 nm であった（表 9 および図 9 を参照のこと）。封入効率が 90% 超であった。

20

【0183】

【表 10】

表 9 ギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	176.2	100.0	67.84
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	158.0		
多分散性指数 (PdI)	0.172		
切片	0.946		
結果品質	良好		

30

【0184】

実施形態 10 ギンセノシド R g 5 イリノテカン塩酸リポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5、0.2 g のイリノテカン塩酸、0.4 g のダイズ油および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mL の 10% トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 イリノテカン塩酸リポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 100 mg のイリノテカン塩酸を含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて

40

50

、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5イリノテカン塩酸リポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が121.6nmであった（表10および図10を参照のこと）。

【0185】

【表11】

表10 ギンセノシドRg5イリノテカン塩酸リポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	175.4	97.6	102.0
ピーク2	4611	2.4	824.5
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	121.6		
多分散性指数(PdI)	0.319		
切片	0.940		
結果品質	良好		

10

【0186】

実施形態11 ギンセノシドRg5 HCPTリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのHCPT、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5 HCPTリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが10mgのHCPTを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5 HCPTリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が177.9nmであった（表11および図11を参照のこと）。

20

【0187】

【表12】

表11 ギンセノシドRg5 HCPTリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	201.2	97.7	86.15
ピーク2	4630	2.3	815.1
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	177.9		
多分散性指数(PdI)	0.195		
切片	0.966		
結果品質	良好		

30

【0188】

実施形態12 ギンセノシドRg5塩酸ドキシソルピシンリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gの塩酸ドキシソルピシン、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5塩酸ドキシソルピシンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが10mgの塩酸ドキシソルピシンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入

40

50

れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5塩酸ドキソルピシンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が144.5nmであった（表12および図12を参照のこと）。

【0189】

【表13】

表12 ギンセノシドRg5塩酸ドキソルピシンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	150.4	100.0	46.83
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	144.5		
多分散性指数(PdI)	0.194		
切片	0.970		
結果品質	良好		

10

【0190】

実施形態13 ギンセノシドRg5アムホテリシンBリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのアムホテリシンB、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5アムホテリシンBリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが10mgのアムホテリシンBを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5アムホテリシンBリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が119.2nmであった（表13および図13を参照のこと）。

20

【0191】

【表14】

表13 ギンセノシドRg5アムホテリシンBリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	147.4	100.0	50.35
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	119.2		
多分散性指数(PdI)	0.199		
切片	0.947		
結果品質	良好		

30

【0192】

実施形態14 ギンセノシドRg5塩酸ドキソルピシンリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gの塩酸ドキソルピシン、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70で回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5塩酸ドキソルピシンリポソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが10mgの塩酸ドキソルピシンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間

40

50

にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 158.2 nm であった（表 14 および図 14 を参照のこと）。

【0193】

【表 15】

表 14 ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	191.7	100.0	88.33
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	158.2		
多分散性指数 (PdI)	0.159		
切片	0.965		
結果品質	良好		

10

【0194】

実施形態 15 ギンセノシド R g 5 硫酸ピンクリスチンリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5、0.2 g の硫酸ピンクリスチン、0.4 g のダイズ油および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mL の 10% トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用している過し、それにより、ギンセノシド R g 5 硫酸ピンクリスチンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 1 mg の硫酸ピンクリスチンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 硫酸ピンクリスチンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 177.9 nm であった（表 15 および図 15 を参照のこと）。

20

【0195】

【表 16】

表 15 ギンセノシド R g 5 硫酸ピンクリスチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	201.2	97.7	86.15
ピーク2	4630	2.3	815.1
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	177.9		
多分散性指数 (PdI)	0.195		
切片	0.966		
結果品質	良好		

30

【0196】

実施形態 16 ギンセノシド R g 5 オキサリプラチンリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5、0.2 g のオキサリプラチン、0.4 g のダイズ油および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mL の 10% トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用している過し、それにより、ギンセノシド R g 5 オキサリプラチンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 50 mg のオキサリプラチンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて

40

50

、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5オキサリプラチンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が122.7nmであった（表16および図16を参照のこと）。

【0197】

【表17】

表16 ギンセノシドRg5オキサリプラチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	171.3	100.0	108.6
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	122.7		
多分散性指数(PdI)	0.261		
切片	0.923		
結果品質	良好		

10

【0198】

実施形態17 ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのシスプラチン、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのシスプラチンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が124.3nmであった（表17および図17を参照のこと）。

20

【0199】

【表18】

表17 ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	137.8	98.7	53.70
ピーク2	5042	1.3	585.3
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	124.3		
多分散性指数(PdI)	0.175		
切片	0.956		
結果品質	良好		

30

【0200】

実施形態18 ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのフルオロウラシル、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが250mgのフルオロウラシルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れ

40

50

て、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が140.3nmであった（表18および図18を参照のこと）。

【0201】

【表19】

表18 ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	182.1	98.3	103.6
ピーク2	4846	1.7	703.6
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	140.3		
多分散性指数(PdI)	0.261		
切片	0.945		
結果品質	良好		

10

【0202】

実施形態19 ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gの従来型SiRNA、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが20mgの従来型SiRNAを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が84.58nmであった（表19および図19を参照のこと）。

20

【0203】

【表20】

表19 ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	101.7	98.1	49.29
ピーク2	4577	1.9	836.5
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	84.58		
多分散性指数(PdI)	0.219		
切片	0.932		
結果品質	良好		

30

【0204】

実施形態20 ギンセノシドRg5カバジタキセルリポソーム

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.2gのカバジタキセル、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60～70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5カバジタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが250mgのカバジタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72

40

50

時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 カバジタキセルリポソームを得た。

【 0 2 0 5 】

実施形態 2 1 ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5 および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 35 ~ 40 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mL の 6.6 % 硫酸アンモニウム水溶液（百分率は硫酸アンモニウム水溶液の総質量に対する硫酸アンモニウムの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、ブランクリポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行い、それにより、ブランクリポソームの溶液を得た。前記ブランクリポソームの溶液を 0.15 M (0.15 mol / L) のグルコース溶液において 12 時間にわたって透析した後、対応する質量のトレハロースを、ブランクリポソームの溶液におけるトレハロースの質量分率が 10 % に達するように、透析後のブランクリポソームの溶液の体積に応じて加えた：百分率はブランクリポソームの溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す。20 % の質量分率の塩酸ドキソルピシン水溶液 1 mL (0.2 g の塩酸ドキソルピシン) を加え、37 で水浴において 30 分間保った。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 10 mg の塩酸ドキソルピシンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が 180.8 nm であった（表 20 および図 20 を参照のこと）。

10

20

【 0 2 0 6 】

【表 2 1】

表 20 ギンセノシド R g 5 塩酸ドキソルピシンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	195.4	100.0	63.16
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	180.8		
多分散性指数 (PdI)	0.180		
切片	0.879		
結果品質	良好		

30

【 0 2 0 7 】

実施形態 2 2 ギンセノシド R g 5 アムホテリシン B リポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド R g 5 および 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 35 ~ 40 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 % の質量分率のアムホテリシン B の DMSO 溶液 1 mL (アムホテリシン B の質量が 0.22 g であった) と、10 % の質量分率のトレハロース水溶液 20 mL (2 g のトレハロース) とを加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行い、それにより、活性物質が充填される (loaded with) リポソームの溶液を得た。この活性物質が充填されたリポソームの溶液を透析バッグの中に注ぎ、体積が前記溶液の体積の 100 倍である純水において室温で 12 時間にわたって透析した。0.22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 アムホテリシン B リポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 10 mg のアムホテリシン B を含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5 アムホテリシン B リポソームを得た。試験によって、リポソームの平均

40

50

粒径が216.4 nmであった(表2.1および図2.1を参照のこと)。

【0208】

【表2.2】

表2.1 ギンセノシドRg5アムホテリシンBリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	249.6	100.0	92.14
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均, nm)	216.4		
多分散性指数(PdI)	0.165		
切片	0.951		
結果品質	良好		

10

【0209】

実施形態2.3 ギンセノシドRg5エピルピシンリポソームの調製

0.8 gのダイズレシチン、0.6 gのギンセノシドRg5および0.5 gのビタミンCを20 mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を35 ~ 40 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、20 mLの、6.6%の質量分率の硫酸アンモニウム水溶液を加えた。超音波の操作を、ブランクリポソームの粒径が0.1 ~ 0.3ミクロンの間になるまで行い、それにより、ブランクリポソームの溶液を得た。このブランクリポソームの溶液を0.15 Mのグルコース溶液において12時間にわたって透析した後、対応する質量のトレハロースを、ブランクリポソームの溶液におけるトレハロースの質量分率が10%に達するように、透析後のブランクリポソームの溶液の体積に応じて加えた：百分率はブランクリポソームの溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す。20%の質量分率のエピルピシン水溶液1 mL(0.2 gのエピルピシン)を加え、37 で水浴において30分間保った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用する過し、それにより、ギンセノシドRg5エピルピシンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが10 mgのエピルピシンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5エピルピシンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が187.6 nmであった(表2.2および図2.2を参照のこと)。

20

30

【0210】

【表2.3】

表2.2 ギンセノシドRg5エピルピシンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	203.7	100.0	64.72
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均, nm)	187.6		
多分散性指数(PdI)	0.142		
切片	0.922		
結果品質	良好		

40

【0211】

実施形態2.3 ギンセノシドRg5硫酸ピクリスチンリポソームの調製

0.8 gのダイズレシチン、0.6 gのギンセノシドRg5および0.5 gのビタミンCを20 mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、10%の質量分率のトレハロースおよび5.76%の質量分率のクエン酸の混合水溶液20 mLを加えた。超音波の操作を、ブランクリポソームの粒径が0.1 ~ 0.3ミクロンの間になるまで行い、それにより、ブランクリポソームの溶液を得た。20%の質量分率の硫酸ピ

50

クリスチン水溶液 1 mL (0.2 g の硫酸ピンクリスチン) と、7.1% の質量分率のリ
ン酸水素二ナトリウム水溶液 6 mL とを加え、純水を加えて、外水層の pH が 7.30 に
達するように調節し、60 で水浴において 30 分間保った。0.22 ミクロンの微多孔
膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド Rg5 硫酸ピンクリスチンリポソームを
含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが 1
mg の硫酸ピンクリスチン含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72 時間にわ
たって凍結乾燥した後、保護ガス (アルゴンまたは窒素) を導入し、密封して、ギンセノ
シド Rg5 硫酸ピンクリスチンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径
が 188.3 nm であった (表 23 および図 23 を参照のこと)。

【0212】

【表 24】

表 23 ギンセノシド Rg5 硫酸ピンクリスチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	211.7	100.0	86.37
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	188.3		
多分散性指数 (PdI)	0.199		
切片	0.919		
結果品質	良好		

【0213】

実施形態 25 ギンセノシド Rg5 オキサリプラチンリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド Rg5、0.4 g のダイズ油およ
び 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を
形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜
を形成し、1% の質量分率のオキサリプラチンおよび 10% の質量分率のトレハロースの
混合水溶液 20 mL (0.2 g のオキサリプラチン、2 g のトレハロース) を加えた。超
音波の操作を、リポソームの粒径が 0.1 ~ 0.3 ミクロンの間になるまで行った。0.
22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド Rg5 オキサリプ
ラチンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それ
ぞれのバイアルが 50 mg のオキサリプラチン含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入
れて、72 時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス (アルゴンまたは窒素) を導入し、
密封して、ギンセノシド Rg5 オキサリプラチンリポソームを得た。試験によって、リポ
ソームの平均粒径が 180.8 nm であった (表 24 および図 24 を参照のこと)。

【0214】

【表 25】

表 24 ギンセノシド Rg5 オキサリプラチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径 (d. nm)	強度 (%)	幅 (d. nm)
ピーク1	195.4	100.0	63.16
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径 (Z-平均. nm)	180.8		
多分散性指数 (PdI)	0.180		
切片	0.879		
結果品質	良好		

【0215】

実施形態 26 ギンセノシド Rg5 シスプラチンリポソームの調製

0.8 g のダイズレシチン、0.6 g のギンセノシド Rg5、0.4 g のダイズ油およ
び 0.5 g のビタミン C を 20 mL のエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を
形成した。有機溶媒を 60 ~ 70 のロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜

10

20

30

40

50

を形成し、1%の質量分率のシスプラチンおよび10%の質量分率のトレハロースの混合水溶液20mL(0.2gのシスプラチン、2gのトレハロース)を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのシスプラチンを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が143.6nmであった(表25および図25を参照のこと)。

【0216】

【表26】

表25 ギンセノシドRg5シスプラチンリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	195.6	100	89.8
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	143.6		
多分散性指数(PdI)	0.266		
切片	-0.937		
結果品質	良好		

【0217】

実施形態27 ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームの調製

0.8gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60~70でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、1%の質量分率のフルオロウラシルおよび10%の質量分率のトレハロースの混合水溶液20mL(0.2gのフルオロウラシル、2gのトレハロース)を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用して、ろ過し、それにより、ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが250mgのフルオロウラシルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が145.6nmであった(表26および図26を参照のこと)。

【0218】

【表27】

表26 ギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	195.5	100	90.68
ピーク2	0.000	0.0	0.000
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	145.6		
多分散性指数(PdI)	0.258		
切片	0.934		
結果品質	良好		

【0219】

実施形態28 ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームの調製

0.5gのDOTAP、0.3gのダイズレシチン、0.6gのギンセノシドRg5、0.4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを20mLのエタノールに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を60~70のロータリーエバポレータ

10

20

30

40

50

ーによって除いて、薄膜を形成し、1%の質量分率の従来型SiRNAおよび10%の質量分率のトレハロースの混合水溶液20mL(0.2gのSiRNA、2gのトレハロース)を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが20mgの従来型SiRNAを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームを得た。試験によって、リポソームの平均粒径が215.0nmであった(表27および図27を参照のこと)。

10

【0220】

【表28】

表27 ギンセノシドRg5従来型SiRNAリポソームの粒径、粒径分布、強度および幅

／	粒径(d. nm)	強度(%)	幅(d. nm)
ピーク1	219.3	97.1	74.35
ピーク2	5181	2.9	485.0
ピーク3	0.000	0.0	0.000
平均粒径(Z-平均. nm)	215.0		
多分散性指数(PdI)	0.237		
切片	0.946		
結果品質	良好		

20

【0221】

実施形態29 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

8gの卵レシチン、6gのギンセノシドRg5、1.5gのパクリタキセル、4gのダイズ油および0.5gのビタミンCを200mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を35~45で薄膜エバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、200mLの10%トレハロース水溶液(百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す)を加えた。高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。

30

【0222】

実施形態30 ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの調製

14gの卵レシチン、12gのギンセノシドRg5、4gのパクリタキセル、8gのダイズ油、0.5gのコレステロールおよび0.5gのビタミンEを400mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を35~45でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、400mLの5%サッカロース水溶液(百分率はサッカロース水溶液の総質量に対するサッカロースの質量を示す)を加えた。高圧ホモジナイザーによる均質化の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用してる過し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが30mgのパクリタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥し、その後、保護ガス(アルゴンまたは窒素)を導入し、密封して、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを得た。

40

【0223】

実施形態31 ギンセノシドRg5ドセタキセルリポソームの調製

50

8 gの卵レシチン、6 gのギンセノシド R g 5、3 gのドセタキセル、4 gのダイズ油および0.5 gのビタミンCを200 mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を35 ~ 45 で膜エバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、200 mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リボソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用する過し、それにより、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリボソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが20 mgのドセタキセルを含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5ドセタキセルリボソームを得た。

10

【0224】

実施形態32 ギンセノシド R g 5イリノテカン塩酸リボソームの調製

8 gの卵レシチン、6 gのギンセノシド R g 5、2 gのイリノテカン塩酸および4 gのダイズ油を200 mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を35 ~ 45 でロータリーエバポレーターによって除いて、薄膜を形成し、200 mLの10%トレハロース水溶液（百分率はトレハロース水溶液の総質量に対するトレハロースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リボソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用する過し、それにより、ギンセノシド R g 5イリノテカン塩酸リボソームを含有する水溶液を得た。その後、前記水溶液をバイアルに分注し、それぞれのバイアルが100 mgのイリノテカン塩酸を含有した。前記水溶液を凍結乾燥機に入れて、72時間にわたって凍結乾燥した後、保護ガス（アルゴンまたは窒素）を導入し、密封して、ギンセノシド R g 5イリノテカン塩酸リボソームを得た。

20

【0225】

応用実施形態

下記の応用実施形態において、C (μM)は濃度を意味し、ただし、タキソール + R g 5の濃度は、ギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソームにおけるパクリタキセルおよびギンセノシド R g 5の濃度を示し、例えば、5 + 30は、ギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソームにおいて、パクリタキセルの濃度が5 μM であり、ギンセノシド R g 5の濃度が30 μM であることを意味する。時間 (d) は時間 (日) を意味する。

30

【0226】

下記の応用実施形態において、特記しない限り、ギンセノシド R g 5ブランクリボソームは、実施形態1に従って調製されるギンセノシド R g 5ブランクリボソーム（これはR g 5ブランクと略記される）を示す；特記しない限り、ギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソームは、実施形態4に従って調製されるギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソームを示す（これは、タキソール + R g 5と略記される）；従来のパクリタキセル注射剤（タキソール）は市販されている（これはタキソールと略記される）。

【0227】

応用実施形態1：ヒト肺ガン細胞系（A549）/パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系（A549/T）に対するギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験

40

1. インビトロ細胞実験

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト肺ガン細胞系（A549）またはパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系（A549/T）の細胞生存率を、それぞれ、従来のパクリタキセル注射剤（タキソール）、ギンセノシド R g 5ブランクリボソーム（ブランク R g 5）およびギンセノシド R g 5パクリタキセルリボソーム（タキソール + R g 5）に關して求めた。10点の異なる薬物濃度を表28および表29に示されるように設定した。具体的な実験データが、表28、表29、ならびに図28、図29に示される。図28は、ヒト肺ガン細胞系（A549）に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール

50

ル + R g 5 の細胞生存率のグラフである ; 図 2 9 は、パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系系 (A 5 4 9 / T) に対するタキソール、ブランク R g 5、およびタキソール + R g 5 の細胞生存率のグラフである。

【 0 2 2 8 】

【表 2 9】

表 28 ヒト肺ガン細胞系 (A549) に対するタキソール、ブランク Rg5 およびタキソール + Rg5 の細胞生存率

C (μ M)			細胞生存率		
タキソール + Rg5	タキソール	ブランク Rg5	タキソール + Rg5	タキソール	ブランク Rg5
5 + 30	5	30	0.084	0.093	0.669
2.5 + 15	2.5	15	0.092	0.112	0.698
1.25 + 7.5	1.25	7.5	0.103	0.124	0.762
0.625 + 3.75	0.625	3.75	0.117	0.131	0.783
0.3125 + 1.875	0.3125	1.875	0.131	0.167	0.776
0.15625 + 0.9375	0.15625	0.9375	0.206	0.257	0.802
0.078125 + 0.46875	0.078125	0.46875	0.379	0.409	0.819
0.039063 + 0.23437	0.039063	0.234375	0.557	0.583	0.839
0.019531 + 0.117188	0.019531	0.117188	0.747	0.761	0.861
0.009766 + 0.058594	0.009766	0.058594	0.851	0.862	0.867

10

【 0 2 2 9 】

表 2 8 および図 2 8 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソームの活性がヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9) に対して比較的弱く、タキソール + R g 5 の活性が従来のパクリタキセル注射剤と比較してわずかに改善されたことが示される。

20

【 0 2 3 0 】

【表 3 0】

表 29 パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A549/T) に対するタキソール、ブランク Rg5 およびタキソール + Rg5 の細胞生存率

C (μ M)			細胞生存率		
タキソール + Rg5	タキソール	ブランク Rg5	タキソール + Rg5	タキソール	ブランク Rg5
400 + 2400	400	2400	0.074	0.101	0.079
200 + 1200	200	1200	0.083	0.132	0.098
100 + 600	100	600	0.09	0.32	0.152
50 + 300	50	300	0.097	0.483	0.231
25 + 150	25	150	0.101	0.605	0.419
12.5 + 75	12.5	75	0.136	0.708	0.632
6.25 + 37.5	6.25	37.5	0.279	0.806	0.769
3.125 + 18.75	3.125	18.75	0.527	0.832	0.849
1.5625 + 9.375	1.5625	9.375	0.739	0.874	0.881
0.78125 + 4.6875	0.78125	4.6875	0.868	0.901	0.896

30

【 0 2 3 1 】

表 2 9 および図 2 9 から、低い用量ではとりわけ、より低い細胞生存率を示した従来のパクリタキセル注射剤と比較して、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソームがパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対してより良好な活性を有し、タキソール + R g 5 がパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対して活性が向上したことが示される。

40

【 0 2 3 2 】

2 . I C ₅₀ のアッセイに従って、ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9) およびパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対するブランク R g 5、タキソール、およびタキソール + R g 5 の I C ₅₀ をそれぞれ調べた。実験データが表 3 0 に示される。

【 0 2 3 3 】

50

【表 3 1】

表 30

細胞系	ブランクRg5	タキソール	タキソール+Rg5
A549/T	106.05 μ M	29.99 μ M	4.357 μ M (26.14 μ M)
A549	10.68 μ M	77.46 nM	65.73 nM (0.3944 μ M)

注：タキソール+Rg5の対応するIC₅₀値の4.357 μ M (26.14 μ M)において、4.357 μ MはタキソールのIC₅₀値を意味し、26.14 μ MはブランクRg5のIC₅₀値を意味する。

【 0 2 3 4 】

10

表 3 0 から、タキソール + R g 5 の活性がヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9) に対して、従来のタキソール注射剤の活性の 1 . 1 倍 ~ 1 . 2 倍向上し、タキソール + R g 5 の活性がタキソール耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) に対して、従来のパクリタキセル注射剤の活性の 6 倍 ~ 8 倍向上することが示された。

【 0 2 3 5 】

3 . インビトロ細胞取り込み実験

D A P I は、細胞膜に浸入し、細胞の核内の二本鎖 D N A と結合して、標識機能を有し、D A P I 自体の 2 0 倍の蛍光を生じさせ得るであろう蛍光色素の一種である。E B と比較して、二本鎖 D N A を染色する感度が数倍強化される。青色蛍光を有する細胞を顕微鏡により観察でき、高い細胞標識化効率が蛍光顕微鏡によって認められる (ほぼ 1 0 0 %) 。 D A P I は、特定の場において、正常な細胞の核染色および二本鎖 D N A の染色のためにしばしば使用される。細胞を、熱ショック処理後、D A P I により 3 分間染色すると、細胞の核の形態学的変化を蛍光顕微鏡により観察できるであろう。D A P I による染色の後、青色蛍光を有する細胞の核が蛍光顕微鏡により観察され得るであろう。特定の条件のもとでは、D I P A によって染色された細胞をナイルレッド (Nile red) 培養培地に入れると、細胞がナイルレッドを吸収することができる。赤色蛍光と青色蛍光とを重ね合わせた後で、青紫色の蛍光が生じ得るであろう。ナイルレッドの取り込み量を青紫色蛍光の強度に従って求め得るであろう。

20

【 0 2 3 6 】

パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) を 2 4 ウエルプレートに播種し、一晚培養した。N i l (遊離のナイルレッド) 、 N i l - L i p および R g 5 - N i l - L i p を使用して、等量の N i l (1 0 μ g \cdot m L ⁻¹) を無血清培地とともに含有する培養培地を調製し、遮光しながらそれぞれのウエルに加えた。それぞれの群を 8 つのウエルとした。培養培地を、細胞を遮光しながら 2 時間培養した後で捨て、その後、P B S によって 3 回洗浄した。それぞれの群における最初の 4 つのウエルを、3 7 で 3 0 分間、4 % パラホルムアルデヒドにより固定処理し、その後、P B S により 3 回洗浄し、D A P I (4 , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール) により染色し、P B S (リン酸緩衝液) により 3 回洗浄し、蛍光倒立顕微鏡を用いて観察した (図 3 0 を参照のこと) 。 図 3 0 - A 、 図 3 0 - B 、 図 3 0 - C は、それぞれ、N i l 、 N i l - l i p 、 R g 5 - N i l - l i p の蛍光倒立顕微鏡観察図であった。N i l = 遊離のナイルレッド ; N i l - l i p = ナイルレッドリポソーム (すなわち、従来のブランクリポソームによって封入されるナイルレッド) ; R g 5 - N i l - l i p = ナイルレッド R g 5 リポソーム (すなわち、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソームによって封入されるナイルレッド、詳しくは実施形態 4 を参照のこと、ただし、この場合、パクリタキセルの代わりにナイルレッドを使用した) 。

30

40

【 0 2 3 7 】

図 3 0 - A は青色蛍光を示し、図 3 0 - B はわずかに赤紫色の蛍光を示し、図 3 0 - C はほぼ赤紫色の蛍光を示す。パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系 (A 5 4 9 / T) によるギンセノシド R g 5 リポソームの取り込みが有意に増大したことを認めることができる。

50

【0238】

4. インビボ小動物画像化システム

出血性壊死を伴わない左前肢に100mm³の均一サイズの腫瘍を有するBALB/C-nu/nuマウスの尾に、10%の近赤外蛍光プローブ(IR783)を含有するギンセノシドRg5リポソーム(以降、実験群と略記され、近赤外蛍光プローブ(IR783)をギンセノシドRg5ブランクリポソームに封入することによって得られたものである(詳しくは実施形態4を参照のこと、ただし、この場合、パクリタキセルの代わりに近赤外蛍光プローブ(IR783)を使用した))、および、近赤外蛍光プローブ(IR783)を含有する従来のブランクリポソーム(以降、コントロール群と略記され、近赤外蛍光プローブ(IR783)を従来のブランクリポソームに封入することによって得られたものである(そのプロセスは、近赤外蛍光プローブ(IR783)を充填するリポソームを調製するための当該分野において公知のプロセスであった))を、それぞれ、静脈内注射した。IR783蛍光のインビボ分布を、2時間目、6時間目および10時間目にライブ撮像装置(live imager)によって記録した(図31および図32を参照のこと)。図31-A、図31-Bおよび図31-Cは、それぞれ、2時間目、6時間目および10時間目にライブ撮像装置によって記録されるコントロール群のIR783蛍光のインビボ分布の図であった。図31-Gは蛍光物差しであり、この場合、蛍光強度に従って、色が順に、赤色、黄色、緑色および青色であり、赤色が最も強い蛍光を示し、青色が弱い蛍光を示す。図31-D、図31-Eおよび図31-Fは、それぞれ、2時間目、6時間目および10時間目にライブ撮像装置によって記録される実験群のIR783蛍光のインビボ分布の図であった。図31から、コントロール群におけるマウスの左前肢は蛍光を全く有さず、その一方で、実験群におけるマウスの左前肢は強い蛍光を有したことを認めることができ、このことは、ギンセノシドRg5ブランクリポソームが腫瘍細胞に対する非常に強い標的化能を有することを示した。

10

20

【0239】

図32は、コントロール群マウスおよび実験群マウスの単離された内臓の蛍光図であった。インビボ画像化実験の後、主要な内臓および腫瘍をコントロール群および実験群のマウスから取り出して、インビトロでのさらなる蛍光検出を行った。図32-Aおよび図32-Bは、それぞれ、コントロール群マウスおよび実験群マウスの単離された内臓の蛍光図であった。図32-Cは蛍光物差しであり、この場合、蛍光強度に従って、色が順に、赤色、黄色、緑色および青色であり、赤色が最も強い蛍光を示し、青色が弱い蛍光を示す。図32-Bにおける腫瘍の蛍光は強く、このことは、ギンセノシドRg5ブランクリポソームが腫瘍細胞に対する強い標的化能を有することを示唆した。

30

【0240】

図31および図32から、A549肺ガンに対するギンセノシドRg5ブランクリポソームの標的化能が促進したことが示された。

【0241】

5. インビボ薬理学的有効性実験

インビボ薬理学的有効性実験のアッセイに従って、皮下に腫瘍を有する27匹のヌードマウスを無作為に下記の3つの群に分けた(それぞれの群において9匹): コントロール群(コントロール群、0.9%NaCl)、タキソール+Rg5群(ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソーム)およびアブラキサン群(アルブミン-タキソール群、これはAbrと略される)。対応する製剤を、尾静脈を介して注射した(25mg・kg⁻¹の用量)。それぞれの群におけるマウスの体重の変化を2日毎に記録し、腫瘍の最大直径および最小直径をノギスにより測定した。腫瘍体積が下記の式によって計算される: $V = (d_{max} \times d_{min}^2) / 2$ 、式中、 d_{min} および d_{max} は、それぞれ、腫瘍の最小直径および最大直径(mm)である; 相対腫瘍体積(RTV)が測定結果に従って計算され、前記計算式が、 $RTV = V_t / V_0$ である。式において、 V_0 は、マウスに投与が開始されたときに測定された腫瘍体積であり、 V_t は、2日毎に測定された腫瘍体積であった。

40

50

【0242】

5.1 ヒト肺ガン細胞系(A549)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表31および図33に示した。図33は、ヒト肺ガン細胞系(A549)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフであった。

【0243】

【表32】

表31 ヒト肺ガン細胞系(A549)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

A549 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.171	1	0.247	1	0.159
3	2.136	0.308	1.307	0.372	1.308	0.406
6	2.752	1.029	1.581	0.341	1.804	0.454
9	4.478	0.453	1.805	0.315	2.473	0.367
12	5.289	0.768	2.217	0.353	2.853	0.454
15	7.043	1.089	2.33	0.519	3.273	0.607
18	9.675	1.385	2.505	0.604	3.704	0.595
21	12.274	1.734	2.77	0.852	4.198	0.783

10

【0244】

表31および図33から、同じ期間の後において、コントロール群における腫瘍の体積が最大であり、その一方で、タキソール+Rg5群では最小であることが示された。時間遅延とともに、コントロール群における腫瘍の体積が12.274に達し、その一方で、タキソール+Rg5群は2.77に達しただけであり、アブラキサン群は21日目において4.198であった。このことは、タキソール+Rg5の薬理的有効性が、ヒト肺ガンA549腫瘍保有マウスについてはアブラキサンよりもわずかに強いことを示唆した。

20

【0245】

5.2. パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系(A549/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表32および図34に示した。図34は、パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系(A549/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフであった。

30

【0246】

【表33】

表32 パクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系(A549/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

A549/T 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.271	1	0.247	1	0.259
4	3.166	0.308	2.107	0.272	2.308	0.306
7	4.752	1.029	2.381	0.441	3.604	0.454
11	7.978	0.453	3.605	0.315	4.773	0.567
14	11.289	0.768	4.217	0.553	6.273	0.454
18	16.543	1.789	4.383	0.619	8.533	0.807
21	20.975	2.485	4.825	0.804	11.504	1.165

40

【0247】

表32および図34から、同じ期間の後において、コントロール群における腫瘍の体積が最大であり、その一方で、タキソール+Rg5群では最小であることが示された。時間遅延とともに、コントロール群における腫瘍の体積が20.975に達し、その一方で、タキソール+Rg5群は4.825に達しただけであり、アブラキサン群は21日目にお

50

いて11.504であった。このことは、パクリタキセル耐性ヒト肺ガンA549/T腫瘍保有マウスに対するタキソール+Rg5の薬理的有効性が、アブラキサンと比較して有意に改善されることを示唆した。

【0248】

6. ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームの抗腫瘍転移実験(A549/T)インビボ薬理実験でのコントロール群およびタキソール+Rg5群におけるパクリタキセル耐性ヒト肺ガン細胞系(A549/T)保有マウスおよび正常マウスを屠殺した後、対応する内臓組織または腫瘍組織をパラフィン切片のために採取し、ヘマトキシリン-エオシンによって染色し、光学顕微鏡で観察した(図35を参照のこと)。図35-A、図35-Dおよび図35-Gは、それぞれ、ヘマトキシリン-エオシンによって染色された後の正常マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図であった。図35-B、図35-Eおよび図35-Hは、それぞれ、ヘマトキシリン-エオシンによって染色された後のコントロール群における腫瘍保有マウスの肺組織、肝臓組織および腫瘍組織のパラフィン切片の顕微鏡観察図であった。図35-C、図35-Fおよび図35-Iは、それぞれ、ヘマトキシリン-エオシンによって染色された後における(ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームによる処置の後の)実験群におけるマウスのパラフィン切片の肺組織、肝臓組織および腫瘍組織の顕微鏡観察図であった。

10

【0249】

図35-A、図35-Bおよび図35-Cから、実験群におけるマウスの肺組織のパラフィン切片をヘマトキシリン-エオシンによって染色した後において、色分布が正常マウスの色分布と同じであることが示されたことから、腫瘍転移が実験群マウスにはないことが示唆された。しかしながら、コントロール群におけるマウスのパラフィン切片をヘマトキシリン-エオシンによって染色した後では、色分布が均一ではなかったことから、腫瘍転移がコントロール群マウスにはあることが示唆された。

20

【0250】

図35から、タキソール+Rg5がA549/Tの肺腫瘍転移に対してより良好な阻害効果を有することを示された。

【0251】

応用実施形態2:

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)およびパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するタキソール、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の効果を、インビトロ細胞実験およびインビボ動物実験において調べた。

30

【0252】

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、9点の異なる濃度を表33および表32に示されるように設定した。比生存率のデータおよびグラフを表33~図34および図36~図37に示した。図36は、それぞれ、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するタキソール、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率グラフであった。図37は、それぞれ、パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するタキソール、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率グラフであった。

40

【0253】

【表 3 4】

表33 ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するタキソール、ブランクRg5、および
タキソール+Rg5の細胞生存率

C(μM)			細胞生存率		
タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5
1+6	1	6	0.109	0.112	0.751
0.5+3	0.5	3	0.115	0.132	0.785
0.25+1.5	0.25	1.5	0.198	0.205	0.807
0.125+0.75	0.125	0.75	0.302	0.331	0.813
0.0625+0.375	0.0625	0.375	0.503	0.529	0.821
0.03125+0.1875	0.03125	0.1875	0.614	0.637	0.846
0.015625+0.09375	0.015625	0.09375	0.721	0.744	0.853
0.007813+0.046875	0.007813	0.046875	0.828	0.849	0.879
0.003906+0.023438	0.003906	0.023438	0.863	0.878	0.8583

10

【0254】

表33および図36から、ギンセノシドRg5ブランクリポソームの活性がMCF-7に対して比較的弱く、腫瘍細胞は高い生存率を有し、その一方で、タキソール+Rg5の活性がインビトロではMCF-7生細胞に対して、従来のパクリタキセル注射剤よりもわずかに強く、腫瘍細胞は低い生存率を有することが示された。

【0255】

【表35】

表34 パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するタキソール、
ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率

C(μM)			細胞生存率		
タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5
400+2400	400	2400	0.09	0.109	0.091
200+1200	200	1200	0.093	0.1222	0.105
100+600	100	600	0.095	0.157	0.117
50+300	50	300	0.104	0.237	0.203
25+150	25	150	0.164	0.419	0.361
12.5+75	12.5	75	0.227	0.584	0.5256
6.25+37.5	6.25	37.5	0.431	0.709	0.6553
3.125+18.75	3.125	18.75	0.762	0.856	0.7979
1.5625+9.375	1.5625	9.375	0.865	0.893	0.8583

30

【0256】

表34および図37から、とりわけ低用量で、ギンセノシドRg5ブランクリポソームがタキソール耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対してより良好な活性を有し、タキソール+Rg5がパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞(MCF-7/T)に対して従来のパクリタキセル注射剤よりも強い活性を有し、その細胞生存率がより低いことが示された。

【0257】

2. IC₅₀のアッセイに従って、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)およびパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するブランクRg5、タキソール、およびタキソール+Rg5のIC₅₀を調べた。実験データを表35に示した。

40

【0258】

【表36】

表35

細胞系	ブランクRg5	タキソール	タキソール+Rg5
MCF-7/T	86.24 μM	18.77 μM	7.800 μM(46.80 μM)
MCF-7	11.29 μM	58.90 nM	52.41 nM(0.3145 μM)

50

【0259】

表35から、タキソール+Rg5の活性がヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対して従来のタキソール注射剤の活性の1.1倍~1.2倍高まり、タキソール+Rg5の活性がパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対して従来のパクリタキセル注射剤の活性の2倍~3倍高まることが示された。

【0260】

3. インビボ薬理的有効性実験

27匹の皮下腫瘍保有マウスを無作為に下記の3つの群に分けた(それぞれの群において9匹): コントロール群(コントロール群、0.9%NaCl)、タキソール+Rg5群(ギンセノシドRg5パクリタキセルリボソーム)およびアブラキサン群(アルブミン-タキソール群、これはAbrと略される)。対応する製剤を、尾静脈を介して注射した(25mg・kg⁻¹の用量)。それぞれの群におけるマウスの体重の変化を2日毎に記録し、腫瘍の最大直径および最小直径をノギスにより測定した。腫瘍体積が下記の式によって計算される: $V = (d_{max} \times d_{min}^2) / 2$ 、式中、 d_{min} および d_{max} は、それぞれ、腫瘍の最小直径および最大直径(mm)である; 相対腫瘍体積(RTV)が測定結果に従って計算され、計算式が、 $RTV = V_t / V_0$ であり、式中、 V_0 は、マウスに投与が開始されたときに測定された腫瘍体積であり、 V_t は、2日毎に測定された腫瘍体積であった。

10

【0261】

3.1 ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表36および図38に示した。図38は、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフを示した。

20

【0262】

【表37】

表36 ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

MCF-7 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.592	1	0.247	1	0.269
4	1.736	0.651	1.251	0.27	1.34	0.173
7	3.358	0.824	1.32	0.327	1.58	0.248
11	6.127	0.833	1.76	0.292	2.19	0.28
14	6.783	1.163	1.82	0.25	2.61	0.317
18	7.472	1.056	2.17	0.231	2.99	0.282
21	8.214	1.403	2.64	0.243	3.51	0.293

30

【0263】

表36および図38から、同じ期間の後において、コントロール群における腫瘍の体積が最大であり、その一方で、タキソール+Rg5群では最小であることが示された。時間遅延とともに、コントロール群における腫瘍の体積が8.214に達し、その一方で、タキソール+Rg5群は2.64に達しただけであり、アブラキサン群は21日目において3.51であった。このことは、タキソール+Rg5の薬理的有効性が、ヒト乳ガンMCF-7腫瘍保有マウスについてはアブラキサンよりもわずかに強いことを示唆した。

40

【0264】

3.2 パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表37および図39に示した。図39は、パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフであった。

50

【 0 2 6 5 】

【 表 3 8 】

表37 パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、タキソール+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

MCF-7/T 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサ ン	SD
0	1	0.592	1	0.336	1	0.375
2	2.136	0.65	1.35	0.54	1.34	0.286
4	3.758	0.824	1.42	0.367	2.58	0.357
6	5.127	0.833	2.16	0.492	3.19	0.54
8	7.783	1.163	2.32	0.45	4.64	0.847
10	10.072	1.956	2.87	0.831	5.79	1.582
12	15.214	1.603	3.64	0.853	6.81	1.293
14	22.157	2.429	4.32	1.358	8.78	1.685

10

【 0 2 6 6 】

表37および図39から、同じ期間の後において、コントロール群における腫瘍の体積が最大であり、その一方で、タキソール+Rg5群では最小であることが示された。時間遅延とともに、コントロール群における腫瘍の体積が22.157に達し、その一方で、タキソール+Rg5群は4.32に達しただけであり、アブラキサン群は14日目において8.78であった。このことは、パクリタキセル耐性ヒト乳ガンMCF-7/T腫瘍保有マウスに対するタキソール+Rg5の薬理的有効性が、アブラキサンと比較して有意に改善されることを示唆した。

20

【 0 2 6 7 】

応用実施形態3：ヒト卵巣ガン細胞系(A2780)/パクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対するギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト卵巣ガン細胞系(A2780)/パクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの生存率をそれぞれ調べた。10点の異なる薬物濃度を表30および表31に示されるように設定した。詳細な生存率データおよびグラフを、表38および表39、図40および図41に示した。図40は、それぞれ、ヒト卵巣ガン細胞系(A2780)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフであった。図41は、それぞれ、パクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフであった。

30

【 0 2 6 8 】

【表 3 9】
 表38 卵巣ガン細胞系 (A2780) に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサン
 の細胞生存率

C (μM)	細胞生存率						
	タキソール	ブランクRg5	アブラキサン	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	アブラキサン
1+6	1	6	1	0.128	0.133	0.834	0.148
0.5+3	0.5	3	0.5	0.174	0.185	0.847	0.184
0.25+1.5	0.25	1.5	0.25	0.198	0.204	0.824	0.228
0.125+0.75	0.125	0.75	0.125	0.274	0.282	0.844	0.314
0.0625+0.375	0.0625	0.375	0.0625	0.304	0.324	0.853	0.374
0.03125+0.1875	0.03125	0.1875	0.03125	0.413	0.443	0.848	0.463
0.015625+0.09375	0.015625	0.09375	0.015625	0.634	0.673	0.846	0.724
0.007813+0.046875	0.007813	0.046875	0.007813	0.806	0.818	0.868	0.836
0.003906+0.02343	0.003906	0.023438	0.003906	0.827	0.847	0.871	0.866
0.001953+0.011719	0.001953	0.011719	0.001953	0.853	0.866	0.882	0.874

【 0 2 6 9 】

表 3 8 および 図 4 0 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリボソームの活性がヒト卵巣ガン細胞系 (A 2 7 8 0) に対して比較的弱く、タキソール + R g 5 の活性がインビトロで

はヒト卵巣ガン細胞系 (A2780) に対して従来のパクリタキセル注射剤およびアブラキサンよりもわずかに強いことが示された。

【0270】

【表40】

表39 パクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系 (A2780/T) に対するタキソール、ブラシクRg5、タキソール+Rg5およびアブラキサンの細胞生存率

C (μM)	細胞生存率					
	タキソール	ブラシクRg5	アブラキサン	タキソール+Rg5	タキソール	アブラキサン
400+2400	400	2400	400	0.086	0.139	0.094
200+1200	200	1200	200	0.091	0.174	0.097
100+600	100	600	100	0.095	0.198	0.124
50+300	50	300	50	0.099	0.274	0.168
25+150	25	150	25	0.108	0.304	0.203
12.5+75	12.5	75	12.5	0.121	0.393	0.288
6.25+37.5	6.25	37.5	6.25	0.17	0.654	0.436
3.125+18.75	3.125	18.75	3.125	0.436	0.806	0.648
1.5625+9.375	1.5625	9.375	1.5625	0.733	0.856	0.811
0.78125+4.6875	0.78125	4.6875	0.78125	0.846	0.874	0.882

10

20

30

40

50

【0271】

表39および図41から、ギンセノシドRg5ブランクリポソームがパクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対してより良好な活性を有し、タキソール+Rg5の活性がパクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対して従来のパクリタキセル注射剤およびアブラキサンの活性よりも強いことが示された。

【0272】

2. IC₅₀のアッセイに従って、ヒト卵巣ガン細胞系(A2780)およびパクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対するブランクRg5、タキソール、タキソール+Rg5、およびアブラキサンのIC₅₀を調べた。実験データを表40に示した。

10

【0273】

【表41】

表40

細胞系	ブランクRg5	タキソール	タキソール+Rg5	アブラキサン
A2780/T	44.44 μM	14.11 μM	3.764 μM(22.59 μM)	17.88 μM
A2780	40.79 μM	37.81 nM	33.64 nM(0.2018 μM)	48.44 nM

【0274】

表40から、タキソール+Rg5の活性がヒト卵巣ガン細胞系(A2780)に対してパクリタキセルおよびアブラキサン注射剤の活性の1.1倍~1.5倍高まり、タキソール+Rg5の活性がパクリタキセル耐性ヒト卵巣ガン細胞系(A2780/T)に対してパクリタキセルおよびアブラキサン注射剤の活性の3倍~5倍高まることが示された。

20

【0275】

応用実施形態4 ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)/パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)/パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの生存率をそれぞれ調べた。10点の異なる薬物濃度を表41および表42に示されるように設定した。詳細な生存率データおよびグラフを、表41、表42、ならびに図42、図43に示した。図42は、それぞれ、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフであった。図43は、それぞれ、パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するタキソール、ブランクRg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率グラフであった。

30

【0276】

【表 4 2】

表 4 1 ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3) に対するタキソール、Rg5、タキソール+Rg5、およびアブラキサンの細胞生存率

C (μM)	細胞生存率							
	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	アブラキサン	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	アブラキサン
15+90		15	90	15	0.108	0.113	0.133	0.123
7.5+45		7.5	45	7.5	0.109	0.116	0.284	0.125
3.75+22.5		3.75	22.5	3.75	0.113	0.125	0.55	0.134
1.875+11.25		1.875	11.25	1.875	0.131	0.143	0.714	0.158
0.9375+5.625		0.9375	5.625	0.9375	0.171	0.187	0.803	0.197
0.46875+2.8125		0.46875	2.8125	0.46875	0.213	0.223	0.826	0.261
0.234375+1.40625		0.234375	1.40625	0.234375	0.311	0.307	0.838	0.381
0.117188+0.703125		0.117188	0.703125	0.117188	0.422	0.389	0.843	0.469
0.058594+0.351563		0.058594	0.351563	0.058594	0.607	0.593	0.844	0.633
0.029297+0.175781		0.029297	0.175781	0.029297	0.793	0.813	0.845	0.837

【0 2 7 7】

表 4 1 および図 4 2 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリボソームの活性が低用量ではヒト前立腺ガン細胞系 (P C - 3) に対して比較的弱い、高用量ではより強いことが示

10

20

30

40

50

された。タキソール + R g 5 の活性は、ヒト前立腺ガン細胞系 (P C - 3) に対しては従来のパクリタキセル注射剤およびアブラキサン注射剤の活性との有意差がなかった。

【 0 2 7 8 】

【 表 4 3 】

表 4 2 パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系 (P C - 3 / T) に対するタキソール、ブランク R g 5、タキソール + R g 5 およびアブラキサンの細胞生存率

タキソール + z R g 5	C (μ M)				細胞生存率			
	タキソール	ブランク R g 5	アブラキサン	タキソール + R g 5	タキソール	ブランク R g 5	アブラキサン	アブラキサン
50 + 300	50	300	50	0.108	0.484	0.107	0.464	
25 + 150	25	150	25	0.146	0.563	0.128	0.513	
12.5 + 75	12.5	75	12.5	0.143	0.713	0.235	0.673	
6.25 + 37.5	6.25	37.5	6.25	0.181	0.807	0.55	0.787	
3.125 + 18.75	3.125	18.75	3.125	0.191	0.843	0.749	0.833	
1.5625 + 9.375	1.5625	9.375	1.5625	0.293	0.853	0.853	0.843	
0.78125 + 4.6875	0.78125	4.6875	0.78125	0.441	0.868	0.865	0.848	
0.390625 + 2.34375	0.390625	2.34375	0.390625	0.522	0.882	0.878	0.892	
0.195313 + 1.171875	0.195313	1.171875	0.195313	0.607	0.881	0.883	0.871	
0.097656 + 0.585938	0.097656	0.585938	0.097656	0.693	0.887	0.884	0.857	

10

20

30

40

50

【0279】

表42および図43から、ギンセノシド Rg5 ブランクリポソームの活性が高用量ではタキソール耐性ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3/T) に対して比較的強いことが示された。タキソール + Rg5 の活性は、パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3/T) に対して、従来のパクリタキセル注射剤およびアブラキサン注射剤の活性と比較して明白な利点を有した。

【0280】

2. IC₅₀ のアッセイに従って、ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3) およびパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3/T) に対する空白 Rg5、タキソール、タキソール + Rg5、およびアブラキサンの IC₅₀ をそれぞれ調べた。実験データを表43に示した。

10

【0281】

【表44】

表43

細胞系	空白Rg5	タキソール	タキソール+Rg5	アブラキサン
PC-3/T	29.01 μM	16.20 μM	0.6685 μM (4.011 μM)	13.98 μM
PC-3	12.70 μM	164.6 nM	160.4 nM (0.9627 μM)	205.2 nM

【0282】

表43から、タキソール + Rg5 の活性がヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3) に対してパクリタキセル注射剤およびアブラキサン注射剤の活性の1.0倍~1.5倍高まり、タキソール + Rg5 の活性がパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系 (PC-3/T) に対してはパクリタキセル注射剤およびアブラキサン注射剤の活性の20倍~30倍高まることが示された。

20

【0283】

応用実施形態5 ヒト上皮内膵臓ガン細胞系 (BxPC-3) / パクリタキセル耐性膵臓ガン細胞系 (BxPC-3/T) に対するギンセノシド Rg5 パクリタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト膵臓ガン細胞系 (BxPC-3) / パクリタキセル耐性ヒト膵臓ガン細胞系 (BxPC-3/T) に対するタキソール、空白 Rg5、およびタキソール + Rg5 の生存率をそれぞれ調べた。9点の異なる薬物濃度を表44および表45に示されるように設定した。詳細な生存率データおよびグラフを、表44および表45、図44および図45に示した。図44は、ヒト膵臓ガン細胞系 (BxPC-3) に対するタキソール、空白 Rg5、およびタキソール + Rg5 の細胞生存率グラフであった。図45は、パクリタキセル耐性ヒト膵臓ガン細胞系 (BxPC-3/T) に対するタキソール、空白 Rg5、およびタキソール + Rg5 の細胞生存率グラフであった。

30

【0284】

【表 4 5】

表 44 ヒト膀胱ガン細胞系 (BxPC-3) に対するタキソール、ブランクRg5、および
タキソール+Rg5の細胞生存率

C (μM)			細胞生存率		
タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5
400+2400	400	2400	0.096	0.097	0.132
200+1200	200	1200	0.115	0.149	0.166
100+600	100	600	0.132	0.166	0.228
50+300	50	300	0.135	0.202	0.281
25+150	25	150	0.242	0.254	0.341
12.5+75	12.5	75	0.297	0.339	0.434
6.25+37.5	6.25	37.5	0.387	0.426	0.632
3.125+18.75	3.125	18.75	0.588	0.632	0.749
1.5625+9.375	1.5625	9.375	0.85	0.85	0.822

10

【0285】

表 4 4 および図 4 4 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリボソームの活性がヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3) に対して比較的強いことが示された。タキソール + R g 5 の活性は、ヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3) に対して従来のパクリタキセル注射剤の活性よりも強かった。

20

【0286】

【表 4 6】

表 45 パクリタキセル耐性ヒト膀胱ガン細胞系 (BxPC-3/T) に対するタキソール、
ブランクRg5、およびタキソール+Rg5の細胞生存率

C (μM)			細胞生存率		
タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5	タキソール+Rg5	タキソール	ブランクRg5
400+2400	400	2400	0.096	0.134	0.12
200+1200	200	1200	0.115	0.15	0.161
100+600	100	600	0.132	0.166	0.178
50+300	50	300	0.135	0.272	0.231
25+150	25	150	0.242	0.454	0.321
12.5+75	12.5	75	0.297	0.639	0.504
6.25+37.5	6.25	37.5	0.388	0.756	0.702
3.125+18.75	3.125	18.75	0.588	0.832	0.789
1.5625+9.375	1.5625	9.375	0.85	0.85	0.802

30

【0287】

表 4 5 および図 4 5 から、ギンセノシド R g 5 の活性がパクリタキセル耐性ヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3 / T) に対して比較的強いことが示された。ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリボソームの活性は、パクリタキセル耐性ヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3 / T) に対して従来のタキソール注射剤の活性よりも強かった。

40

【0288】

2. IC₅₀ のアッセイに従って、ヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3) およびパクリタキセル耐性ヒト膀胱ガン細胞系 (B x P C - 3 / T) に対するブランク R g 5、タキソール、およびタキソール + R g 5 の IC₅₀ をそれぞれ調べた。実験データを表 4 6 に示した。

【0289】

【表 4 7】

表 46

細胞系	ブランクRg5	タキソール	タキソール+Rg5
BxPC-3/T	91.60 μ M	20.98 μ M	7.850 μ M(47.10 μ M)
BxPC-3	90.66 μ M	9.483 μ M	7.850 μ M(47.10 μ M)

【0290】

表 4 6 から、タキソール + R g 5 の活性がヒト膵臓ガン細胞系 (B x P C - 3) に対して従来のパクリタキセルの活性の 1 . 1 倍 ~ 1 . 5 倍高まり、タキソール + R g 5 の活性がパクリタキセル耐性ヒト膵臓ガン細胞系 (B x P C - 3 / T) に対してパクリタキセル注射剤の活性の 2 倍 ~ 3 倍高まることが示された。

10

【0291】

応用実施形態 6

乳ガン細胞系 (M C F - 7) / パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7 / T) に対するギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7) / パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7 / T) に対する従来のドセタキセル注射剤 (D o c)、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソーム (ブランク R g 5)、ギンセノシド R g 5 ドセタキセルリポソーム (D o c + R g 5、実施形態 9 に従って調製されたもの) の生存率を調べた。9 点の異なる薬物濃度を表 4 7 および表 4 8 に示されるように設定した。詳細な細胞生存率データおよびグラフを、表 4 7 および表 4 8、図 4 6 および図 4 7 に示した。図 4 6 は、ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7) に対する D o c、ブランク R g 5、および D o c + R g 5 の細胞生存率グラフであった；図 4 7 は、パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (M C F - 7 / T) に対する D o c、ブランク R g 5、および D o c + R g 5 の細胞生存率グラフであった。

20

【0292】

【表 4 8】

表 47 ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7) に対するDoc、ブランクRg5およびDoc+Rg5の細胞生存率

C (μ M)			細胞生存率		
Doc+Rg5	Doc	ブランクRg5	Doc+Rg5	Doc	ブランクRg5
1+6	1	6	0.101	0.107	0.751
0.5+3	0.5	3	0.111	0.122	0.785
0.25+1.5	0.25	1.5	0.178	0.238	0.807
0.125+0.75	0.125	0.75	0.282	0.317	0.813
0.0625+0.375	0.0625	0.375	0.463	0.521	0.821
0.03125+0.1875	0.03125	0.1875	0.584	0.636	0.846
0.015625+0.09375	0.015625	0.09375	0.671	0.758	0.853
0.007813+0.046875	0.007813	0.046875	0.801	0.832	0.879
0.003906+0.023438	0.003906	0.023438	0.859	0.866	0.8583

30

40

【0293】

表 4 7 および図 4 6 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソームの活性が乳ガン細胞系 (M C F - 7) に対して比較的弱く、D o c + R g 5 の活性が乳ガン細胞系 (M C F - 7) に対して従来の D o c 注射剤の活性よりもわずかに強いことが示された。

【0294】

【表 4 9】

表 48 パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7/T) に対する Doc、ブランク Rg5、および Doc+Rg5 の細胞生存率

C (μM)			細胞生存率		
Doc+Rg5	Doc	ブランクRg5	Doc+Rg5	Doc	ブランクRg5
400+2400	400	2400	0.072	0.099	0.091
200+1200	200	1200	0.088	0.102	0.105
100+600	100	600	0.091	0.107	0.117
50+300	50	300	0.101	0.137	0.203
25+150	25	150	0.144	0.319	0.361
12.5+75	12.5	75	0.217	0.484	0.5256
6.25+37.5	6.25	37.5	0.401	0.609	0.6553
3.125+18.75	3.125	18.75	0.562	0.756	0.7979
1.5625+9.375	1.5625	9.375	0.845	0.853	0.8583

10

【0295】

表 4 8 および図 4 7 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリボソームの活性がパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7/T) に対して比較的強く、Doc+Rg5 の活性がパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7/T) に対して従来の Doc 注射剤の活性よりも強いことが示された。

20

【0296】

2. IC₅₀ のアッセイに従って、ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7) およびパクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7/T) に対する Doc、ブランク R g 5、および Doc+Rg5 の IC₅₀ を調べた。実験データを表 4 9 に示した。

【0297】

【表 5 0】

表 49

細胞系	ブランクRg5	Doc	Doc+Rg5
MCF-7/T	86.24 μM	12.11 μM	6.251 μM (37.51 μM)
MCF-7	11.29 μM	57.92 nM	45.44 nM (0.2726 μM)

30

【0298】

表 4 9 から、Doc+Rg5 の活性がヒト乳ガン細胞系 (MCF-7) に対して従来のドセタキセルの活性の 1.2 倍 ~ 1.5 倍高まり、Doc+Rg5 の活性がパクリタキセル耐性乳ガン細胞系 (MCF-7/T) に対してドセタキセルの活性の 1.5 倍 ~ 2 倍高まることが示された。

【0299】

3. インビボ薬理学的有効性実験

27 匹の皮下腫瘍保有マウスを無作為に下記の 3 つの群に分けた (それぞれの群において 9 匹) : コントロール群 (コントロール群、0.9% NaCl)、Doc+Rg5 群、およびアブラキサン群。対応する製剤を、尾静脈を介して注射した (25 mg · kg⁻¹ の用量)。それぞれの群におけるマウスの体重の変化を 2 日毎に記録し、腫瘍の最大直径および最小直径をノギスにより測定した。腫瘍体積が下記の式によって計算される : $V = (d_{max} \times d_{min}^2) / 2$ 、式中、d_{min} および d_{max} は、それぞれ、腫瘍の最小直径および最大直径 (mm) である ; 相対腫瘍体積 (RTV) が測定結果に従って計算され、計算式が、 $RTV = V_t / V_0$ であり、式中、V₀ は、マウスに投与が開始されたときに測定された体積であり、V_t は、2 日毎に測定された腫瘍体積であった。

40

【0300】

3.1 ヒト乳ガン細胞系 (MCF-7) に対するコントロール群、Doc+Rg5 群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果 (薬理学的有効性) を比較する。詳細な実験データ

50

を表50および図48に示した。図48は、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフである。

【0301】

【表51】

表50 ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)に対するコントロール群、
Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

MCF-7 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.592	1	0.247	1	0.269
4	1.736	0.65	1.251	0.27	1.34	0.173
7	3.358	0.824	1.32	0.327	1.58	0.248
11	6.127	0.833	1.66	0.292	2.19	0.28
14	6.783	1.163	1.72	0.25	2.6	0.317
18	7.472	1.056	2.07	0.231	2.99	0.282
21	8.214	1.403	2.14	0.243	3.51	0.293

10

【0302】

表50および図48から、Doc+Rg5の薬理的有効性が、ヒト乳ガン細胞系(MCF-7)の腫瘍保有マウスを処置することにおいてアブラキサン注射剤の薬理的有効性よりもわずかに強いことが示された。

【0303】

3.2 タキソール耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表51および図49に示した。図49は、パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍グラフであった。

20

【0304】

【表52】

表51 パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)に対するコントロール群、
Doc+Rg5群、およびアブラキサン群の抗腫瘍効果

MCF-7/T 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.592	1	0.336	1	0.375
2	2.136	0.65	1.251	0.24	1.34	0.286
4	3.758	0.824	1.62	0.367	2.58	0.357
6	5.127	0.833	2.16	0.392	3.19	0.54
8	7.783	1.163	2.92	0.45	4.64	0.847
10	10.072	1.956	2.85	0.531	5.79	1.582
12	15.214	1.603	3.64	0.753	6.81	1.293

30

【0305】

表51および図49から、Doc+Rg5の薬理的有効性が、パクリタキセル耐性ヒト乳ガン細胞系(MCF-7/T)の腫瘍保有マウスを処置することにおいてアブラキサン注射剤と比較して明白な利点を有することが示された。

40

【0306】

応用実施形態7

ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)/パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するギンセノシドRg5カバジタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)/パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対する従来のカバジタキセル注射剤(Cab)、ギンセノシドRg5ブランクリポソーム(ブランクRg5)およびギンセノシドRg5カバジタキセルリポソーム(Cab+Rg5、実施形態20に従って調製さ

50

れたもの)の生存率をそれぞれ調べた。10点の異なる薬物濃度を表44および表45に示されるように設定した。詳細な生存率データおよびグラフを、表52、表53、ならびに図50、図51に示した。図50は、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率グラフであった。図51は、パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率グラフであった。

【0307】

【表53】

表52 ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率

C(μM)			細胞生存率		
Cab+Rg5	Cab	ブランクRg5	Cab+Rg5	Cab	ブランクRg5
15+90	15	90	0.063	0.084	0.133
7.5+45	7.5	45	0.072	0.091	0.284
3.75+22.5	3.75	22.5	0.087	0.094	0.55
1.875+11.25	1.875	11.25	0.091	0.101	0.714
0.9375+5.625	0.9375	5.625	0.101	0.113	0.803
0.46875+2.8125	0.46875	2.8125	0.123	0.137	0.826
0.234375+1.40625	0.234375	1.40625	0.151	0.187	0.838
0.117188+0.703125	0.117188	0.703125	0.172	0.212	0.843
0.058594+0.351563	0.058594	0.351563	0.267	0.313	0.844
0.029297+0.175781	0.029297	0.175781	0.493	0.569	0.845

10

20

【0308】

表52および図50から、ギンセノシドRg5ブランクリボソームの活性がヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対して低用量では比較的弱い、高用量では強いことが示された。Cab+Rg5の活性は、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対して、従来のカバジタキセル注射剤の活性よりもわずかに強かった。

【0309】

【表54】

表53 パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するCab、ブランクRg5、およびCab+Rg5の細胞生存率

C(μM)			細胞生存率		
Cab+Rg5	Cab	Rg5	Cab+Rg5	Cab	Rg5
50+300	50	300	0.088	0.134	0.107
25+150	25	150	0.096	0.143	0.128
12.5+75	12.5	75	0.103	0.213	0.235
6.25+37.5	6.25	37.5	0.121	0.307	0.55
3.125+18.75	3.125	18.75	0.141	0.503	0.749
1.5625+9.375	1.5625	9.375	0.153	0.653	0.853
0.78125+4.6875	0.78125	4.6875	0.161	0.768	0.865
0.390625+2.34375	0.390625	2.34375	0.202	0.852	0.878
0.195313+1.171875	0.195313	1.171875	0.307	0.881	0.883
0.097656+0.585938	0.097656	0.585938	0.623	0.887	0.884

30

40

【0310】

表53および図51から、ギンセノシドRg5ブランクリボソームの活性がパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対して低用量では比較的弱い、高用量では強いことが示された。Cab+Rg5の活性は、パクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対して従来のカバジタキセル注射剤の活性よりもわずかに強かった。

50

【0311】

2. IC₅₀のアッセイに従って、ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)およびパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対するCab、ブランクRg5、およびタキソール+Rg5のIC₅₀をそれぞれ調べた。実験データを表54に示した。

【0312】

【表55】

表54

細胞系	ブランクRg5	Cab	Cab+Rg5
PC-3/T	29.01 μM	2.809 μM	0.2618 μM(1.571 μM)
PC-3	12.70 μM	72.85nM	58.96nM(0.3538 μM)

10

【0313】

表54から、Cab+Rg5の活性がヒト前立腺ガン細胞系(PC-3)に対して従来のカバジタキセル注射剤の活性の1.1倍~1.5倍高まり、Cab+Rg5の活性がパクリタキセル耐性ヒト前立腺ガン細胞系(PC-3/T)に対して従来のカバジタキセル注射剤の活性の10倍~20倍高まることが示された。

【0314】

応用実施形態8

フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験

20

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するギンセノシドRg5ブランクリポソーム(ブランクRg5)、従来のフルオロウラシルリポソーム(FU)およびギンセノシドRg5フルオロウラシルリポソーム(FU+Rg5、実施形態18に従って調製されたもの)の細胞生存率および細胞阻害率を調べた。10点の異なる薬物濃度を表55に示されるように設定し、詳細な細胞生存率データおよび細胞阻害率データを表55および図52に示した。図52は、フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するFU+Rg5、ブランクRg5およびFUの細胞生存率グラフであった。

【0315】

30

【表56】

表55 フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するFU+Rg5、ブランクRg5およびFUの細胞生存率および細胞阻害率

FU	フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)						
	／	／	細胞生存率		細胞阻害率		
C	LogC	FU+Rg5	ブランクRg5	FU	FU+RG5	ブランクRg5	FU
100	2	0.002	0.90091	0.009	0.998	0.09909	0.991
50	1.69897	0.0092	0.91284	0.0708	0.9908	0.08716	0.9292
25	1.39794	0.03	0.9395	0.217	0.97	0.0605	0.783
12.5	1.09691	0.1026	0.9193	0.327	0.8974	0.0807	0.673
6.25	0.79588	0.241	0.9092	0.458	0.759	0.0908	0.542
3.125	0.49485	0.397	0.9387	0.652	0.603	0.0613	0.348
1.5625	0.19382	0.5198	0.9179	0.74673	0.4802	0.0821	0.25327
0.78125	-0.10721	0.679	0.9061	0.7981	0.321	0.0939	0.2019
0.39063	-0.40824	0.75866	0.9273	0.8684	0.24134	0.0727	0.1316
0.19531	-0.70927	0.8596	0.9193	0.899	0.1404	0.0807	0.101
0.09766	-1.0103	0.9093	0.9093	0.9096	0.0907	0.0907	0.0904

40

【0316】

2. IC₅₀のアッセイに従って、フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系(Bel/FU)に対するFU+Rg5、ブランクRg5およびFUのIC₅₀をそれぞれ調べた。実験データを表56に示した。

50

【 0 3 1 7 】

【 表 5 7 】

表 56

細胞系	ブランクRg5	FU	FU+Rg5
Bel/FU	114.3 μM	32.49 μM	11.89 μM(2.017 μM)

【 0 3 1 8 】

表 5 5、表 5 6 および図 5 2 から、ギンセノシド R g 5 ブランクリポソームの活性がフルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対して比較的弱く、 F U + R g 5 の活性がフルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対して従来のフルオロウラシルリポソームの活性と比較して明白に利点を有することが示された。 F U + R g 5 の活性がフルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対して従来のフルオロウラシルリポソームの活性の 3 倍高まった。

10

【 0 3 1 9 】

3 . インビボ薬理的有効性実験 : ヌードマウスに皮下移植された腫瘍の直径をノギスにより測定した。腫瘍が約 1 0 0 m m ³ の平均体積にまで成長したとき、動物を無作為に群に分けた。従来のフルオロウラシルリポソーム (F U) の単回使用群についての用量が 5 m g / k g であり、マウスに、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。ギンセノシド R g 5 ブランクリポソーム (ブランク R g 5) の単回使用群についての用量が 1 5 0 m g / k g であり、マウスに、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。ギンセノシド R g 5 フルオロウラシルリポソーム (F U + R g 5) 群の用量が 5 + 1 5 0 m g / k g であり、これもまた、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。溶媒コントロール群には等量の生理食塩水を注射した。この実験の期間中、移植した腫瘍の直径を 2 日毎に測定した。腫瘍体積 (T V) を計算するための式が、 $T V = 1 / 2 \times a \times b^2$ であり、式中、「 a 」および「 b 」は長さおよび幅をそれぞれ表す。相対腫瘍体積 (R T V) が測定結果に従って計算され、計算式が、 $R T V = V t / V 0$ であり、式中、 V 0 は、マウスを群に分けたとき (すなわち d 0) に測定された腫瘍体積であり、 V t は、毎回測定される腫瘍体積である。

20

【 0 3 2 0 】

フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対するブランク R g 5 、 F U 、および F U + R g 5 の抗腫瘍効果 (薬理的有効性) を比較する。詳細な実験データを表 5 7 および図 5 3 に示した。図 5 3 は、フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対するブランク R g 5 、 F U 、および F U + R g 5 の抗腫瘍グラフであった。

30

【 0 3 2 1 】

【 表 5 8 】

表 57 フルオロウラシル耐性ヒト肝臓ガン細胞系 (B e l / F U) に対するブランク R g 5 、 F U + R g 5 、および F U の抗腫瘍効果

Bel-FU 時間/d	相対腫瘍体積					
	ブランクRg5	SD	FU	SD	FU+Rg5	SD
0	1	0.5212	1	0.5212	1	0.512
2	2.3	0.5215	1.9	0.522	1.4	0.513
4	2.6	0.5321	2.1	0.529	1.3	0.512
6	4.1	0.542	2.3	0.534	1.6	0.515
8	6.8	0.945	4.1	0.639	1.9	0.516
10	8.9	0.93	4.3	0.843	2.1	0.518
12	14.3	0.86	5.8	0.746	2.5	0.514
14	16.6	0.967	6.2	0.9237	3.3	0.519

40

【 0 3 2 2 】

表 5 7 および図 5 3 から、 F U + R g 5 の薬理的有効性が、フルオロウラシル耐性ヒ

50

ト肝臓ガン細胞系 (Bel / FU) の腫瘍保有マウスを処置することにおいて従来のフルオロウラシルの薬理的有効性と比較して明白な利点を有することが示された。

【0323】

応用実施形態 9

シスプラチン抵抗性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対するギンセノシド Rg5 シスプラチンリポソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験

1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対するギンセノシド Rg5 ブランクリポソーム (空白 Rg5)、従来のシスプラチンリポソーム (DDP) およびギンセノシド Rg5 シスプラチンリポソーム (DDP + Rg5、実施形態 17 に従って調製されたもの) の細胞生存率および細胞阻害率を調べた。11 点の異なる薬物濃度を表 58 に示されるように設定し、詳細な細胞生存率データおよび細胞阻害率データを表 58 および図 54 に示した。図 54 は、シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対する空白 Rg5、DDP、および DDP + Rg5 の細胞生存率グラフであった。

【0324】

【表 59】

表 58 シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対する空白 Rg5、DDP、および DDP + Rg5 の細胞生存率および細胞阻害率

LogC	シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP)						
	C	細胞生存率			細胞阻害率		
		DDP+Rg5	Rg5	DDP	DDP+Rg5	Rg5	DDP
2	100	0.002	1.001	0.008	0.998	-0.001	0.992
1.69897	50	0.006	1.009	0.012	0.994	-0.009	0.988
1.39794	25	0.004	0.993	0.247	0.996	0.007	0.753
1.09691	12.5	0.019	0.991	0.429	0.981	0.009	0.571
0.79588	6.25	0.157	0.997	0.621	0.843	0.003	0.379
0.49485	3.125	0.328	0.982	0.773	0.672	0.018	0.227
0.19382	1.5625	0.589	0.973	0.874	0.411	0.027	0.126
-0.10721	0.78125	0.793	0.965	0.926	0.207	0.035	0.074
-0.40823	0.39063	0.854	0.994	0.987	0.146	0.006	0.013
-0.70928	0.19531	0.925	0.999	0.994	0.075	0.001	0.006
-1.01028	0.09766	0.991	1.003	1.002	0.009	-0.003	-0.002

【0325】

2. IC₅₀ のアッセイに従って、シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対する空白 Rg5、DDP、および DDP + Rg5 の IC₅₀ を調べた。実験データを表 59 に示した。

【0326】

【表 60】

表 59

細胞系	空白 Rg5	DDP	DDP + Rg5
SGC-7901 / DDP	204.7 μM	27.02 μM	5.839 μM (2.285 μM)

【0327】

表 58、表 59 および図 54 から、ギンセノシド Rg5 の薬理活性がシスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対して比較的弱く、DDP + Rg5 の活性がシスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対して従来のシスプラチンリポソームの活性と比較して明白な利点を有することが示された。DDP + Rg5 の活性がシスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901 / DDP) に対して従来のシスプラチンリポソームの活性の 5 倍高まった。

【0328】

3. インビボ薬理的有効性実験：ヌードマウスにおいて皮下移植された腫瘍の直径をノギスにより測定した。腫瘍が約100mm³の平均体積にまで成長したとき、動物を無作為に群に分けた。従来のシスプラチンリポソーム(DDP)の単回使用群についての用量が6mg/kgであり、マウスに、3週間にわたって週に1回、静脈内注射した。ギンセノシドRg5ブランクリポソーム(ブランクRg5)の単回使用群についての用量が150mg/kgであり、マウスに、3週間にわたって週に1回、静脈内注射した。ギンセノシドRg5シスプラチンリポソーム(DDP+Rg5)群の用量が6+150mg/kgであり、これもまた、マウスに、3週間にわたって週に1回、静脈内注射した。溶媒コントロール群には等量の生理食塩水を注射した。この実験の期間中を通して、腫瘍の直径を2日毎に測定した。腫瘍体積(TV)を計算するための式が、 $TV = 1/2 \times a \times b^2$ であり、式中、「a」および「b」は長さおよび幅をそれぞれ表す。相対腫瘍体積(RTV)が測定結果に従って計算され、計算式が、 $RTV = V_t / V_0$ であり、式中、V₀は、マウスを群に分けたときに測定された腫瘍体積であり、V_tは、毎回測定された腫瘍体積であった。

10

【0329】

シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)に対するブランクRg5、DDP、およびDDP+Rg5の抗腫瘍効果(薬理的有効性)を比較する。詳細な実験データを表60および図55に示した。図55は、シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)に対するブランクRg5、DDP、およびDDP+Rg5の抗腫瘍グラフであった。

20

【0330】

【表61】

表60 シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)に対する
ブランクRg5、DDP、およびDDP+Rg5の抗腫瘍効果

SGC-7901/DDP 時間/d	相対腫瘍体積					
	Rg5	SD	DDP	SD	DDP+Rg5	SD
0	1	0.212	1	0.212	1	0.212
2	1.4	0.215	1.3	0.22	1.2	0.213
4	1.8	0.321	1.6	0.29	1.35	0.212
6	2.1	0.42	1.9	0.34	1.5	0.215
8	3.2	0.45	2.4	0.39	1.6	0.216
10	4.9	0.63	3.6	0.43	2.3	0.218
12	6.3	0.86	4.3	0.46	2.5	0.314
14	9.1	0.967	5.5	0.59237	3.2	0.419

30

【0331】

表60および図55から、DDP+Rg5の薬理的有効性が、シスプラチン耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/DDP)の腫瘍保有マウスを処置することにおいて従来のシスプラチンの薬理的有効性と比較して明白な利点を有することが示された。

【0332】

40

応用実施形態10

ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するギンセノシドRg5硫酸ピンクリスチンリポソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験
1. インビトロ薬理的有効性実験アッセイ

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するギンセノシドRg5ブランクリポソーム(ブランクRg5)、従来のピンクリスチンリポソーム(V)およびギンセノシドRg5硫酸ピンクリスチンリポソーム(V+Rg5、実施形態15に従って調製されたもの)の細胞生存率および細胞阻害率を調べた。11点の異なる薬物濃度を表61に示されるように設定し、詳細な細胞生存率データおよび細胞阻害率データを表61および図56に示した。図56は、ピンクリ

50

スチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (HCT-8/V) に対するブランク Rg5、V、および V + Rg5 の細胞生存率グラフであった。

【0333】

【表62】

表61 ビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するブランクRg5、V、およびV+Rg5の細胞生存率および細胞阻害率

V	ビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)						
	LogC	細胞生存率			細胞阻害率		
C	LogC	V+Rg5	ブランクRg5	V	V+Rg5	ブランクRg5	V
32	1.50515	0.009	1.002	0.021	0.991	-0.002	0.979
16	1.20412	0.012	1.01	0.037	0.988	-0.01	0.963
8	0.90309	0.037	0.983	0.094	0.963	0.017	0.906
4	0.60206	0.127	0.989	0.236	0.873	0.011	0.764
2	0.30103	0.239	0.996	0.45283	0.761	0.004	0.54717
1	0	0.427	0.992	0.6135	0.573	0.008	0.3865
0.5	-0.30103	0.5672	0.969	0.734	0.4328	0.031	0.266
0.25	-0.60206	0.763	0.984	0.843	0.237	0.016	0.157
0.125	-0.90309	0.864	1.007	0.946	0.136	-0.007	0.054
0.0625	-1.20412	0.951	0.979	0.986	0.049	0.021	0.014
0.03125	-1.50515	0.984	1.005	0.997	0.016	-0.005	0.003

10

【0334】

2. IC₅₀ のアッセイに従って、ビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (HCT-8/V) に対するブランク Rg5、V、および V + Rg5 の IC₅₀ 値を調べた。実験データを表 6 2 に示した。

20

【0335】

【表63】

表62

細胞系	ブランクRg5	V	V+Rg5
HCT-8/V	65.94 μM	1.673 μM	0.8444 μM(0.9082 μM)

【0336】

表 6 1、表 6 2 および図 5 6 から、ギンセノシド Rg5 ブランクリポソームの活性がビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (HCT-8/V) に対して比較的弱く、V + Rg5 の活性がビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (HCT-8/V) に対して従来のビンクリスチンの活性と比較して明白な利点を有することが示された。V + Rg5 の活性がビンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系 (HCT-8/V) に対して従来のビンクリスチンリポソームの活性の 2 倍高まった。

30

【0337】

3. インビボ薬理的有効性実験

ヌードマウスにおける皮下移植された腫瘍の直径をノギスにより測定した。腫瘍が約 100 mm³ の平均体積にまで成長したとき、動物を無作為に群に分けた。従来のビンクリスチンリポソーム (V) の単回使用群の用量が 0.5 mg / kg であり、マウスに、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。ギンセノシド Rg5 ブランクリポソーム (ブランク Rg5) の単回使用群の用量が 150 mg / kg であり、マウスに、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。ギンセノシド Rg5 ビンクリスチンリポソーム (V + Rg5) の用量が 0.5 + 150 mg / kg であり、これもまた、マウスに、3 週間にわたって週に 1 回、静脈内注射した。溶媒コントロール群には等量の生理食塩水を注射した。この実験の期間中を通して、腫瘍の直径を 2 日毎に測定した。腫瘍体積 (TV) を計算するための式が、TV = 1 / 2 x a x b² であり、式中、「a」および「b」は長さおよび幅をそれぞれ表す。相対腫瘍体積 (RTV) が測定結果に従って計算され、計算式が、RTV = Vt / V0 であり、式中、V0 は、マウスを群に分けたとき (すなわち d0) に測定された腫瘍体積であり、Vt は、毎回測定される腫瘍体積である。

40

【0338】

50

ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系（HCT-8/V）に対するblank Rg5、V、およびV+Rg5の抗腫瘍効果（薬理的有効性）を比較する。詳細な実験データを表63および図57に示した。図57は、ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系（HCT-8/V）に対するblank Rg5、V、およびV+Rg5の抗腫瘍グラフであった。

【0339】

【表64】

表63 ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系(HCT-8/V)に対するblank Rg5、V、およびV+Rg5の抗腫瘍効果

HCT-8/V 時間/d	相対腫瘍体積					
	blank Rg5	SD	V	SD	V+Rg5	SD
0	1	0.212	1	0.212	1	0.212
2	1.4	0.215	1.3	0.22	1.1	0.213
4	1.8	0.321	1.6	0.29	1.3	0.32
6	2.7	0.42	1.9	0.34	1.6	0.315
8	4.3	0.45	3.5	0.39	2.3	0.516
10	7.9	0.63	5.2	0.743	2.5	0.618
12	9.6	0.86	6.8	0.6	3.6	0.714
14	13.1	0.967	9.7	0.9237	4.3	0.819

10

【0340】

表63および図57から、V+Rg5の薬理的有効性が、ピンクリスチン耐性ヒト結腸ガン細胞系（HCT-8/V）の腫瘍保有マウスを処置することにおいて従来のピンクリスチンリポソームの薬理的有効性と比較して明白な利点を有することが示された。

20

【0341】

応用実施形態11

胃ガン細胞系（SGC-7901）/パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系（SGC-7901/T）に対するギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームについてのインビトロ細胞実験およびインビボ動物実験（経口投与）

1. インビトロ薬理的有効性実験

インビトロ細胞実験のアッセイに従って、ヒト胃ガン（SGC-7901）細胞系およびパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系（SGC-7901/T）に対するギンセノシドRg5 blankリポソーム（blank Rg5）、従来のパクリタキセル注射剤（タキソール）およびギンセノシドRg5パクリタキセルリポソーム（タキソール+Rg5）の細胞生存率をそれぞれ調べた。10点の異なる薬物濃度を表64および66に示されるように設定し、詳細な細胞生存率データおよびグラフを、表64および表66、図58および図59に示した。

30

【0342】

【表 6 5】

表 64 ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対するblank Rg5、タキソール、およびRg5+タキソールの細胞生存率

C	ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)						
	LOGC(ug/ml)	細胞生存率					
		Rg5	SD	タキソール	SD	Rg5+タキソール	SD
50	1.69897	1.011	0.016	0.006	0.017	0.006	0.002
25	1.39794	0.979	0.021	0.004	0.019	0.004	0.004
12.5	1.09691	0.978	0.037	0.019	0.019	0.019	0.017
6.25	0.79588	0.971	0.042	0.157	0.016	0.077	0.019
3.125	0.49485	0.977	0.024	0.308	0.021	0.168	0.029
1.5625	0.19382	0.996	0.027	0.419	0.017	0.279	0.016
0.78125	-0.10721	0.983	0.047	0.638	0.022	0.428	0.021
0.39063	-0.40823	0.985	0.029	0.864	0.034	0.664	0.037
0.19531	-0.70928	0.984	0.029	0.925	0.047	0.825	0.043
0.09766	-1.01028	0.979	0.036	0.991	0.049	0.991	0.035

10

【0343】

2. IC₅₀のアッセイに従って、ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対するblank Rg5、タキソール、およびRg5+タキソールのIC₅₀を調べた。実験データを表65に示した。

20

【0344】

【表 6 6】

表 65

	blank Rg5	タキソール	Rg5+タキソール
IC ₅₀ (μM)	77.4	1.51	0.523(3.50)

【0345】

表64、表65および図58から、ギンセノシド Rg5 blank リポソームの活性がヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対して比較的弱く、Rg5+タキソールの活性がヒト胃ガン細胞系(SGC-7901)に対して従来のパクリタキセル注射剤の活性よりも強いことが示された。

30

【0346】

【表 6 7】

表 66 パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)に対するblank Rg5、タキソール、およびRg5+タキソールの細胞生存率

TAX	パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)						
	LOGC(ug/ml)	細胞生存率					
C		Rg5	SD	タキソール	SD	Rg5+タキソール	SD
100	2	1.011	0.016	0.015	0.017	0.002	0.002
50	1.69897	0.979	0.021	0.028	0.019	0.006	0.004
25	1.39794	0.983	0.007	0.217	0.019	0.004	0.017
12.5	1.09691	0.971	0.012	0.339	0.016	0.019	0.019
6.25	0.79588	0.987	0.024	0.531	0.021	0.157	0.009
3.125	0.49485	0.993	0.027	0.713	0.017	0.328	0.016
1.5625	0.19382	0.983	0.017	0.844	0.022	0.499	0.021
0.78125	-0.10721	0.985	0.029	0.894	0.034	0.738	0.037
0.39063	-0.40823	0.994	0.029	0.942	0.017	0.864	0.023
0.19531	-0.70928	0.979	0.016	0.984	0.019	0.925	0.025
0.09766	-1.01028	0.99	0.035	1.012	0.009	0.991	0.038

40

50

【0347】

3. IC₅₀のアッセイに従って、パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901/T) に対する blanks Rg5、タキソール、および Rg5 + タキソールの IC₅₀ を調べた。実験データを表67に示した。

【0348】

【表68】

表67

／	blank Rg5	タキソール	Rg5+タキソール
IC ₅₀ (μM)	127.4	9.735	2.0(15.65)

10

【0349】

表66、表67および図59から、ギンセノシド Rg5 blank リポソームの活性がパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901/T) に対して比較的弱く、Rg5 + タキソールの活性がパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901/T) に対して従来のパクリタキセル注射剤の活性と比較して明白な利点を有することが示された。

【0350】

4. インビボ実験

27匹の皮下腫瘍保有マウスを無作為に下記の3つの群に分けた (それぞれの群において9匹) : コントロール群 (コントロール群、0.9% NaCl)、タキソール + Rg5群、およびアブラキサン群。対応する製剤を経口投与した (50 mg · kg⁻¹ の用量)。マウスの体重の変化を2日毎に記録し、腫瘍の最大直径および最小直径をノギスにより測定した。腫瘍体積を以下の式によって計算した : $V = (d_{max} \times d_{min}^2) / 2$ 、式中、 d_{min} および d_{max} は、それぞれ、腫瘍の最小直径および最大直径 (mm) であった ; 相対腫瘍体積 (RTV) が測定結果に従って計算され、計算式が、 $RTV = V_t / V_0$ であり、式中、 V_0 は、マウスに投与が開始されたときに測定された腫瘍体積であり、 V_t は、2日毎に測定された腫瘍体積であった。

20

【0351】

ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901) およびパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901/T) に対するアブラキサンおよびタキソール + Rg5 の抗腫瘍効果 (薬理的有効性) を比較する。詳細な実験データを、表68ならびに表69、図60および図61に示した。図60および図61は、ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901) およびパクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901/T) に対するコントロール群、アブラキサン群、およびタキソール + Rg5 群の抗腫瘍グラフであった。

30

【0352】

【表69】

表68 ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901) に対するコントロール群、アブラキサン群、およびタキソール + Rg5 群の抗腫瘍効果

SGC-7901 時間 (d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール + Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.592	1	0.346	1	0.375
2	2.136	0.465	1.35	0.454	1.64	0.286
4	3.758	0.624	1.51	0.457	2.08	0.357
6	4.127	0.703	2.21	0.392	2.59	0.454
8	5.783	1.049	2.32	0.345	3.04	0.647
10	7.072	1.856	2.87	0.931	3.79	1.082
12	10.814	1.583	3.04	0.853	3.91	0.93
14	14.157	2.289	3.32	1.048	4.58	1.185

40

【0353】

表68および図60から、タキソール + Rg5 の薬理的有効性が、ヒト胃ガン細胞系 (SGC-7901) の腫瘍保有マウスを処置することにおいて従来のパクリタキセル注

50

射剤の薬理的有効性と比較して明白な利点を有することが示された。

【0354】

【表70】

表69 パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)に対するコントロール群、アブラキサン群、およびRg5+タキソール群の抗腫瘍効果

SGC-7901/T 時間(d)	相対腫瘍体積					
	コントロール	SD	タキソール+Rg5	SD	アブラキサン	SD
0	1	0.392	1	0.346	1	0.375
2	1.936	0.375	1.235	0.254	1.64	0.386
4	2.758	0.424	1.63	0.353	2.08	0.457
6	4.527	0.603	2.01	0.392	2.79	0.354
8	5.383	1.049	2.32	0.345	3.54	0.543
10	6.772	0.856	2.59	0.631	4.09	0.812
12	8.914	1.083	3.27	0.753	5.21	0.743
14	10.157	1.489	3.12	0.748	6.48	1.085

10

【0355】

表69および図61から、タキソール+Rg5の薬理的有効性が、パクリタキセル耐性ヒト胃ガン細胞系(SGC-7901/T)の腫瘍保有マウスを処置することにおいて従来のパクリタキセル注射剤の薬理的有効性と比較して明白な利点を有することが示された。

【0356】

20

効果実施形態

1. ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソーム

30mgの卵レシチン、ギンセノシドRg5、3mgのパクリタキセルおよび15mgのダイズ油を2mLのアセトニトリルに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を40～50での恒温水浴において回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、20mLの5%グルコース水溶液(百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す)を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を使用し、それにより、ギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注した。調製されたギンセノシドRg5パクリタキセルリポソームのギンセノシドRg5の用量、外観、パクリタキセルの封入効率、平均粒径および安定性のデータを下記の表に示す。

30

【0357】

【表 7 1】

Rg5の用量	外観	封入効率 (%)	平均粒径 (nm)	安定性
3mg	明るい	≥95%	68.0	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
6mg	明るい	≥95%	90.78	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
9mg	比較的明るい	≥98%	91.96	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥95%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥95%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
12mg	比較的明るい	≥98%	102.6	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥95%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥95%； 3)30日間置いたとき、安定、封入効率≥90%
15mg	明るい	≥95%	103.7	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
18mg	明るい	≥95%	115.6	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
21mg	明るい	≥90%	135.7	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
24mg	明るい	≥90%	205.2	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%

10

20

30

40

【0358】

2. ギンセノシド Rg5 パクリタキセルリボソーム

30mgの卵レシチン、ギンセノシド Rg5、3mgのパクリタキセル、15mgのダイズ油および7.5mgのコレステロールを2mLのアセトニトリルに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を40～50での恒温水浴において回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、20mLの5%グルコース水溶液（百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す）を加えた。超音波の操作を、リボソームの粒径が0.1～0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜

50

を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注した。調製されたギンセノシド R g 5 パクリタキセルリポソームのギンセノシド R g 5 の用量、外観、パクリタキセルの封入効率、平均粒径および安定性のデータを下記の表に示す。

【 0 3 5 9 】

【 表 7 2 】

Rg5の用量	外観	封入効率 (%)	平均粒径 (nm)	安定性
3mg	明るい	≥95%	92.43	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
6mg	明るい	≥95%	103.5	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
9mg	比較的明るい	≥98%	115.1	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥95%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%。
12mg	明るい	≥98%	133.5	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
15mg	明るい	≥90%	138.7	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、安定、封入効率≥80%； 3)30日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
18mg	明るい	≥90%	193.9	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
21mg	明るい	≥90%	265.7	1)7日間置いたとき、安定、封入効率≥90%； 2)15日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%
24mg	明るい	≥90%	389.1	1)7日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率≤80%

【 0 3 6 0 】

3. ギンセノシド R g 3 ブランクリポソームまたはギンセノシド R h 2 ブランクリポソーム

中国特許出願第 2 0 1 2 1 0 1 5 1 5 9 7 . 0 号に開示されるリポソームの原料はコレステロールを含有しなければならない、すなわち、ギンセノシド R g 3 : コレステロール = 1 : 2 . 5、ギンセノシド R g 3 : リン脂質 = 1 : 1 0 ~ 1 : 2 0。しかしながら、ギ

10

20

30

40

50

ンセノシド R g 3 の質量が卵レシチンの質量に対して 10 % であると、封入効率が 80 % 未満であったが、このことは医療基準を満たすことができない。

【 0 3 6 1 】

下記の調製方法におけるギンセノシド R g 3 およびギンセノシド R h 2 は R 立体配置であった。

【 0 3 6 2 】

3 . 1 . 調製方法 :

30 mg の卵レシチン、ギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2 、および 15 mg のダイズ油を 2 mL のクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 40 ~ 50 での恒温水浴において回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、2 mL の 5 % グルコース水溶液 (百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す) を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0 . 1 ~ 0 . 3 ミクロンの間になるまで行った。0 . 22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 3 ブランクリポソームを含有する水溶液またはギンセノシド R h 2 ブランクリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注した。調製されたギンセノシド R g 3 ブランクリポソームまたはギンセノシド R h 2 ブランクリポソームのギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2 の用量、外観、平均粒径および安定性のデータを下記の表に示す。

10

【 0 3 6 3 】

【 表 7 3 】

20

R-Rg3またはR-Rh2の用量	外観	平均粒径 (nm)	安定性
0.9mg	相対的に最も明るい	356.4	1)7日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率 ≤ 80%。
1.5mg	あまり明るくない	823.1	1)7日間置いたとき、多量の沈殿
2.4mg-18mg	くすんでいる	/	/

【 0 3 6 4 】

3 . 2 . 調製方法

30 mg の卵レシチン、ギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2 、15 mg のダイズ油および 7 . 5 mg のコレステロールを 2 mL のクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を 40 ~ 50 での恒温水浴において回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、2 mL の 5 % グルコース水溶液 (百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す) を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が 0 . 1 ~ 0 . 3 ミクロンの間になるまで行った。0 . 22 ミクロンの微多孔膜を使用してろ過し、それにより、ギンセノシド R g 3 ブランクリポソームを含有する水溶液またはギンセノシド R h 2 ブランクリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注した。調製されたギンセノシド R g 3 ブランクリポソームまたはギンセノシド R h 2 ブランクリポソームのギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2 の用量、外観、平均粒径および安定性のデータを下記の表に示す。

30

【 0 3 6 5 】

40

【表 7 4】

R-Rg3またはR-Rh2の用量	外観	平均粒径 (nm)	安定性
0.9mg	相対的に最も明るい	105.2	1)7日間置いたとき、安定、封入効率 $\geq 80\%$; 2)15日間置いたとき、明るくなり、沈殿がほとんどない、封入効率 $\leq 80\%$
1.5mg	明るい	268.3	1)7日間置いたとき、安定、封入効率 $\geq 90\%$; 2)15日間置いたとき、明るくなり、沈殿がほとんどない、封入効率 $\leq 80\%$
2.4mg	明るい	635.4	1)7日間置いたとき、安定、封入効率 $\geq 90\%$; 2)15日間置いたとき、明るくなり、沈殿がほとんどない、封入効率 $\leq 80\%$
3mg	あまり明るくない	$\geq 1\mu\text{m}$	1)7日間置いたとき、明るくなり、沈殿がほとんどない、封入効率 $\leq 80\%$
6mg	明るくない	$\geq 1\mu\text{m}$	1)7日間置いたとき、多量の沈殿
9mg-18mg	くすんでいる	/	/

10

20

【0366】

4. ギンセノシド R g 3 パクリタキセルリポソームまたはギンセノシド R h 2 パクリタキセルリポソーム

調製方法:

30mgの卵レシチン、ギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2、3mgのパクリタキセル、15mgのダイズ油および7.5mgのコレステロールを2mLのクロロホルムに加え、室温で攪拌して、透明な溶液を形成した。有機溶媒を40~50での恒温水浴において回転蒸発によって除いて、薄膜を形成し、2mLの5%グルコース水溶液(百分率はグルコース水溶液の総質量に対するグルコースの質量を示す)を加えた。超音波の操作を、リポソームの粒径が0.1~0.3ミクロンの間になるまで行った。0.22ミクロンの微多孔膜を用いてろ過し、それにより、ギンセノシド R g 3 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液またはギンセノシド R h 2 パクリタキセルリポソームを含有する水溶液を得た。次に、前記水溶液をバイアルに分注した。調製されたギンセノシド R g 3 パクリタキセルリポソームまたはギンセノシド R h 2 パクリタキセルリポソームのギンセノシド R g 3 またはギンセノシド R h 2 の用量、外観、パクリタキセルの封入効率、平均粒径および安定性のデータを下記の表に示す。

30

【0367】

【表 7 5】

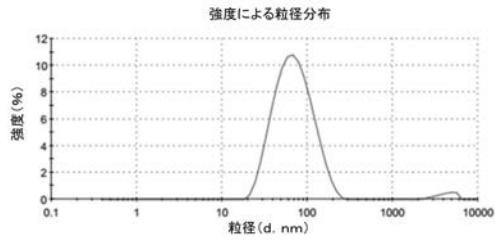
R-Rg3またはR-Rh2の用量	外観	封入効率 (%)	平均粒径 (nm)	安定性
0.9mg	相対的に最も明るい	$\geq 80\%$	$\geq 1\mu\text{m}$	1)7日間置いたとき、沈殿がほとんどない、封入効率 $\leq 80\%$
1.5mg	あまり明るくない	$\leq 80\%$	$\geq 1\mu\text{m}$	1)7日間置いたとき、多量の沈殿
2.4mg-18mg	くすんでいる	/	/	/

40

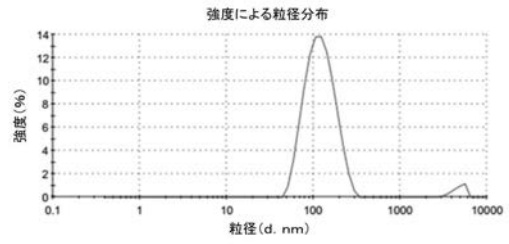
【0368】

本発明の具体的な様々な実施形態が上記に記載されるが、当業者は、これらは単に例示にすぎず、本発明の原則および精神から逸脱しないという条件で、様々な変更または改変がこれらの実施形態に対してなされ得ることを理解しなければならない。したがって、本発明の保護の範囲は添付の請求項によって規定される。

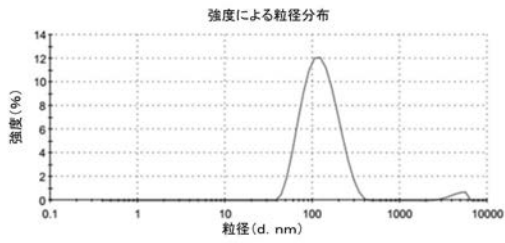
【 図 1 】



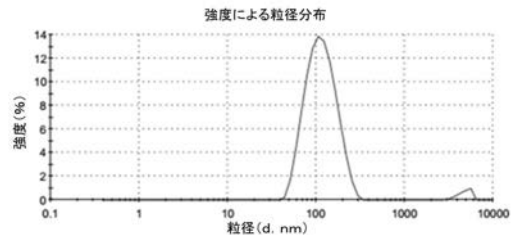
【 図 4 】



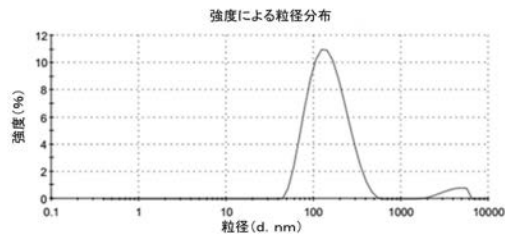
【 図 2 】



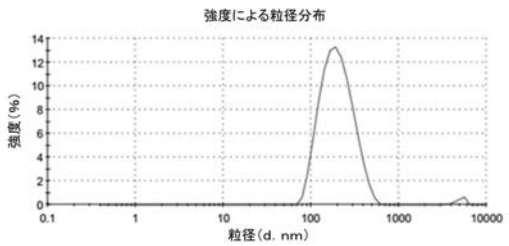
【 図 5 】



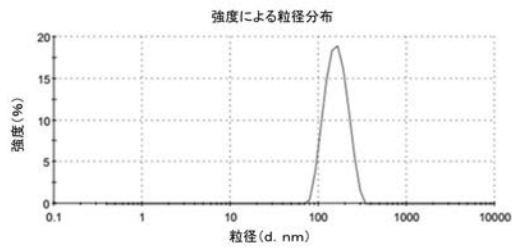
【 図 3 】



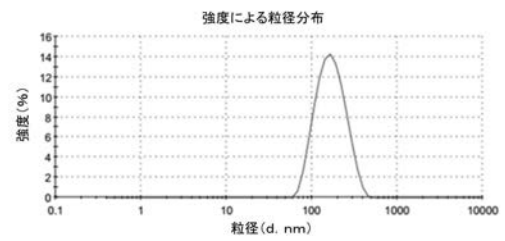
【 図 6 】



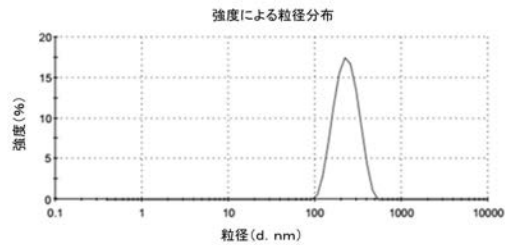
【 図 7 】



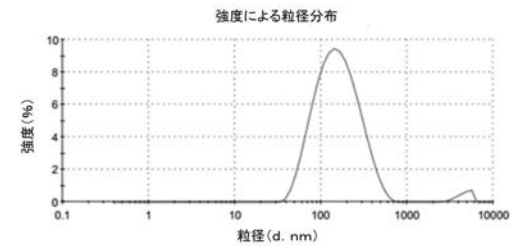
【 図 9 】



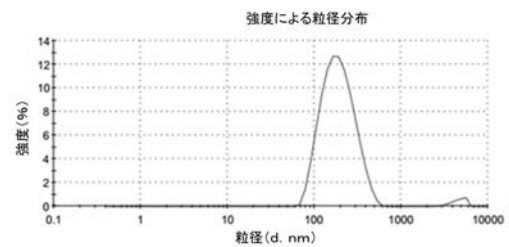
【 図 8 】



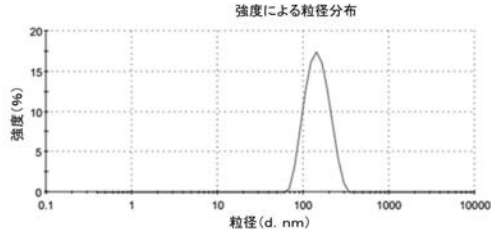
【 図 10 】



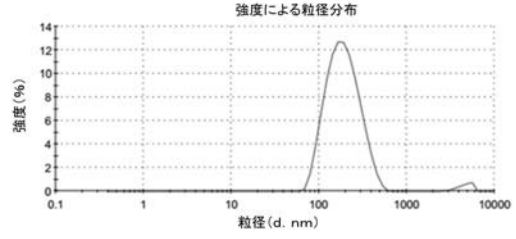
【 図 11 】



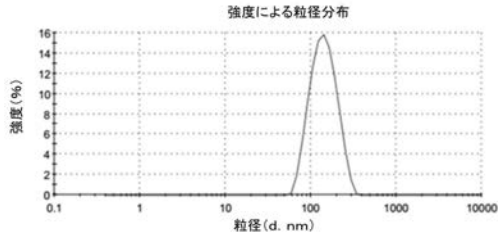
【 図 1 2 】



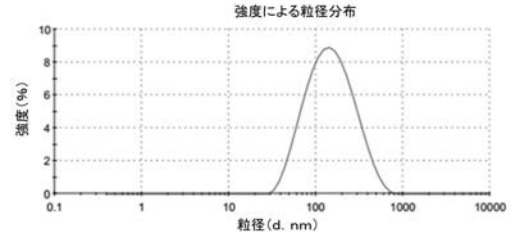
【 図 1 5 】



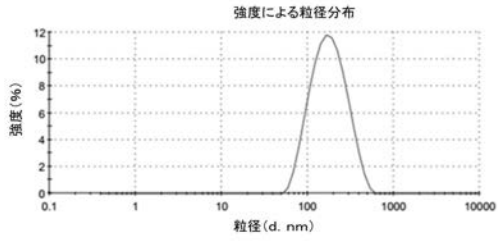
【 図 1 3 】



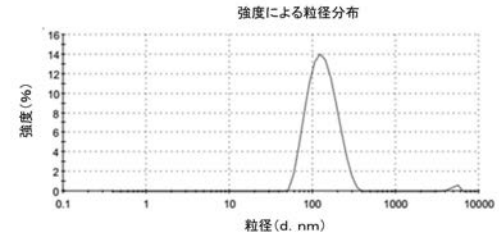
【 図 1 6 】



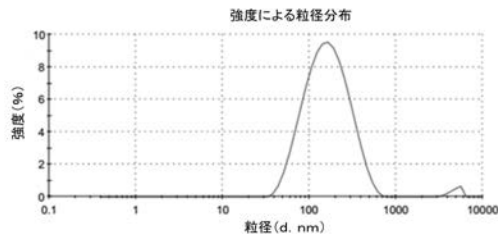
【 図 1 4 】



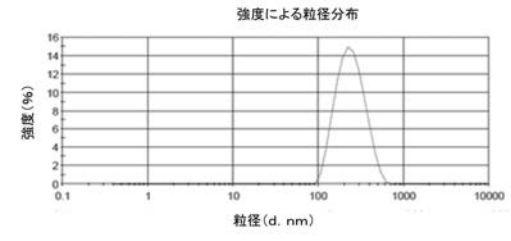
【 図 1 7 】



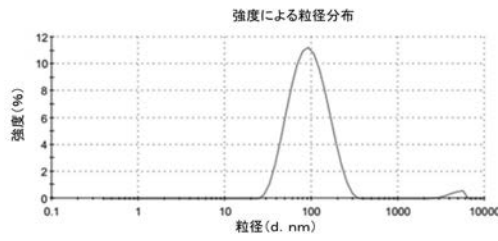
【 図 1 8 】



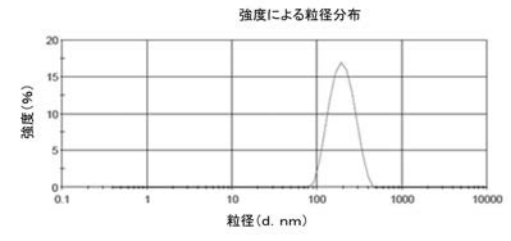
【 図 2 1 】



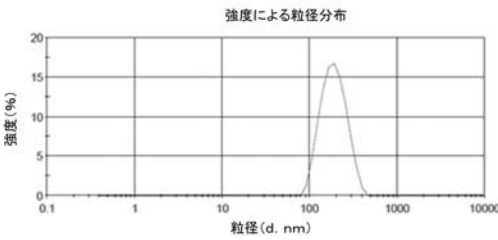
【 図 1 9 】



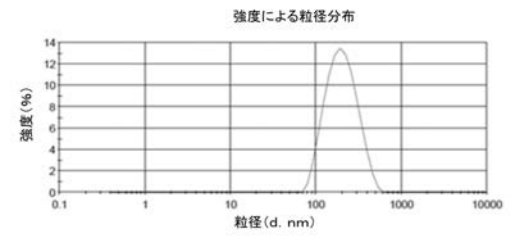
【 図 2 2 】



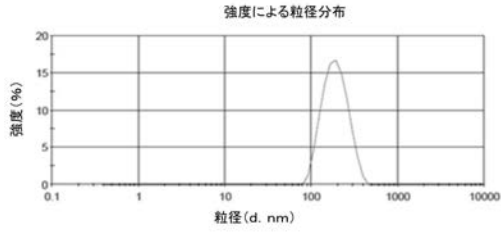
【 図 2 0 】



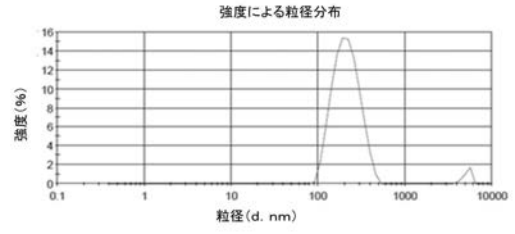
【 図 2 3 】



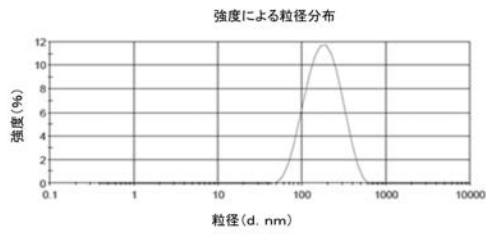
【 図 2 4 】



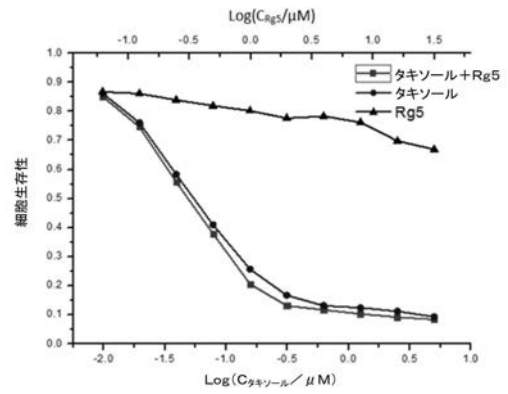
【 図 2 7 】



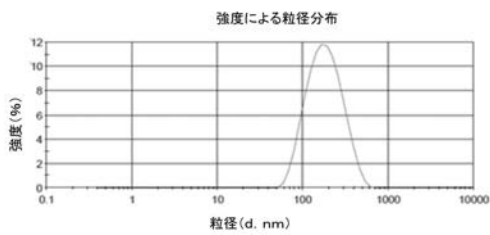
【 図 2 5 】



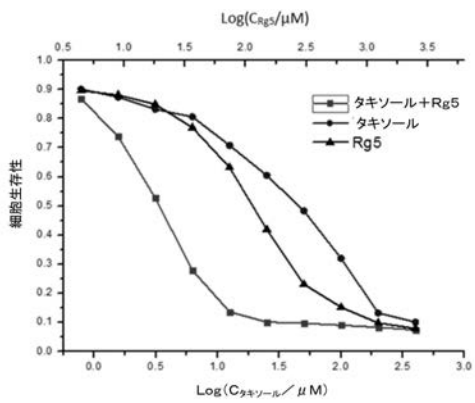
【 図 2 8 】



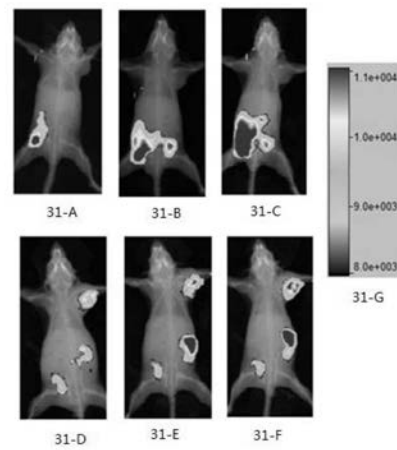
【 図 2 6 】



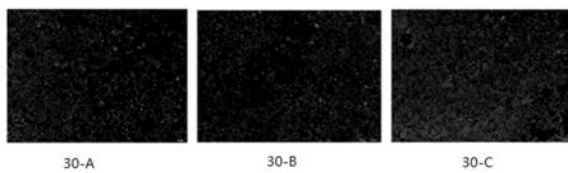
【 図 2 9 】



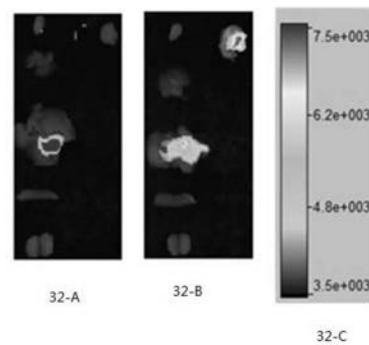
【 図 3 1 】



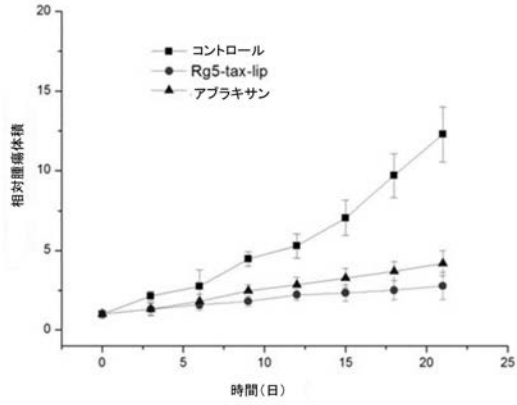
【 図 3 0 】



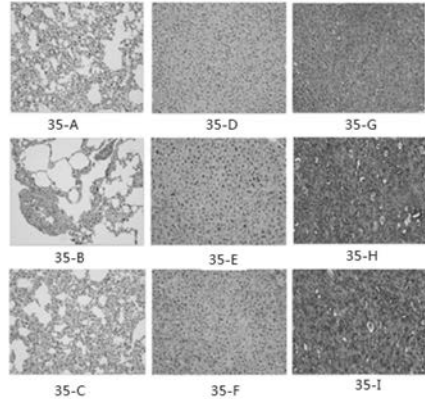
【 図 3 2 】



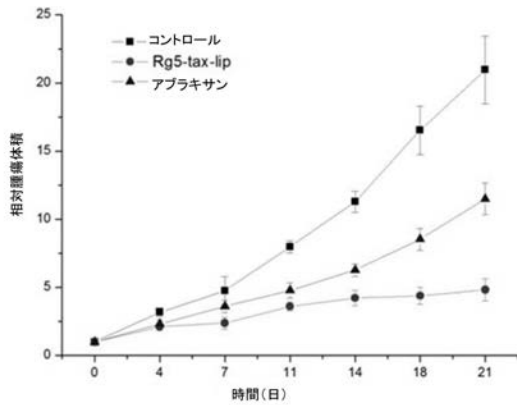
【 図 3 3 】



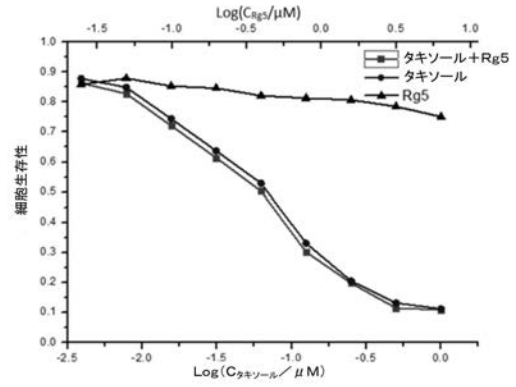
【 図 3 5 】



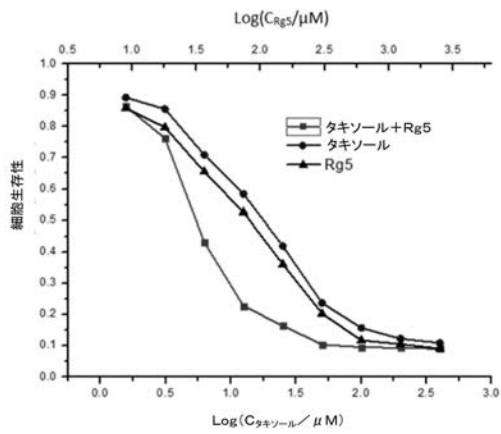
【 図 3 4 】



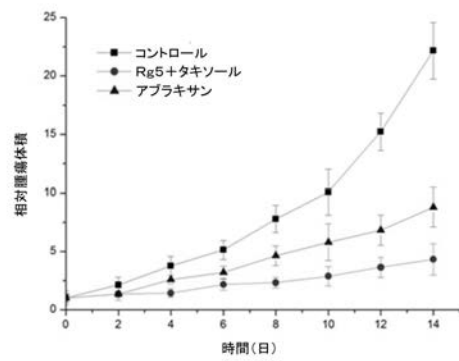
【 図 3 6 】



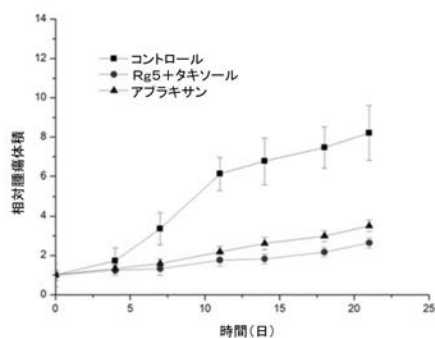
【 図 3 7 】



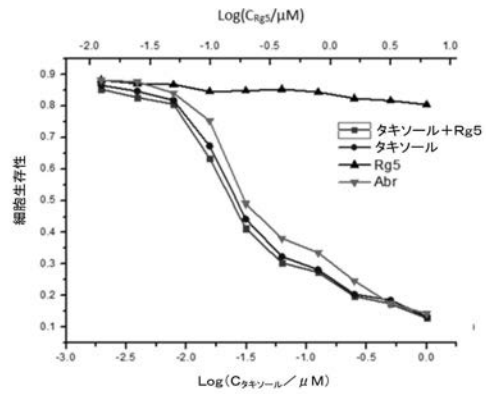
【 図 3 9 】



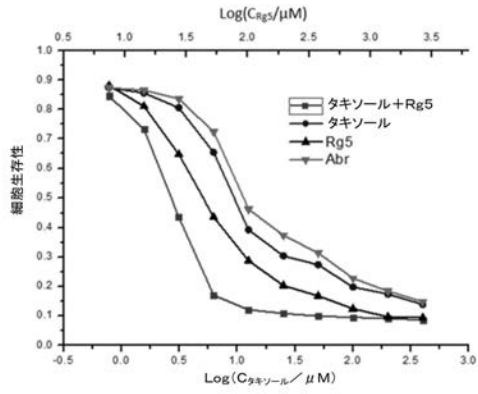
【 図 3 8 】



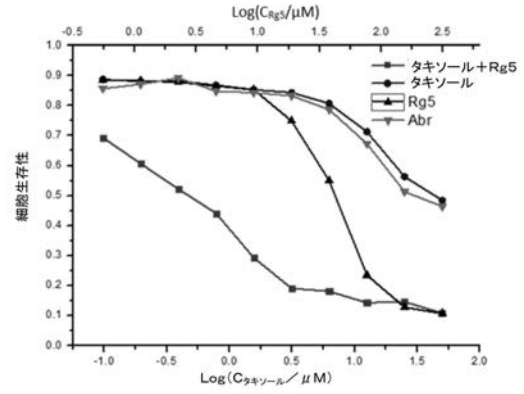
【 図 4 0 】



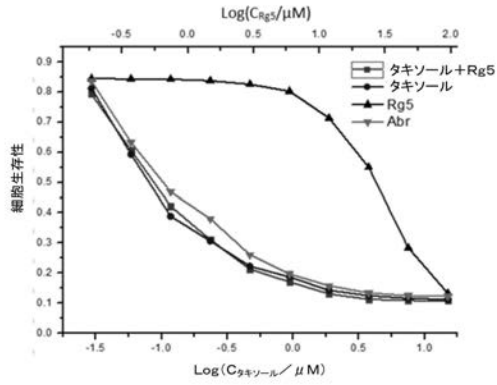
【 図 4 1 】



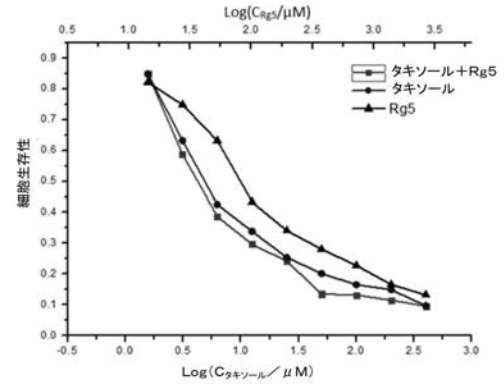
【 図 4 3 】



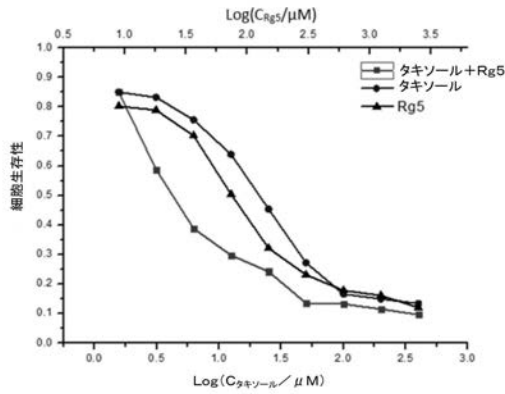
【 図 4 2 】



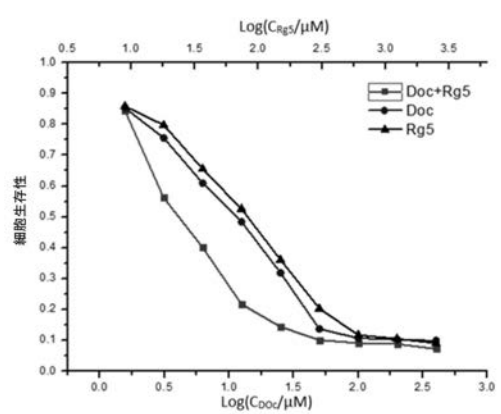
【 図 4 4 】



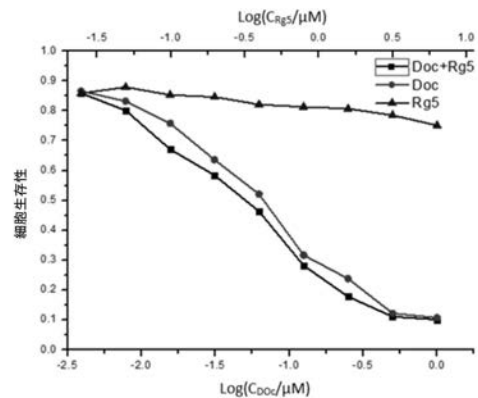
【 図 4 5 】



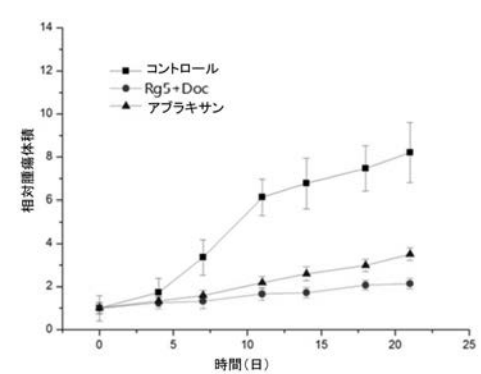
【 図 4 7 】



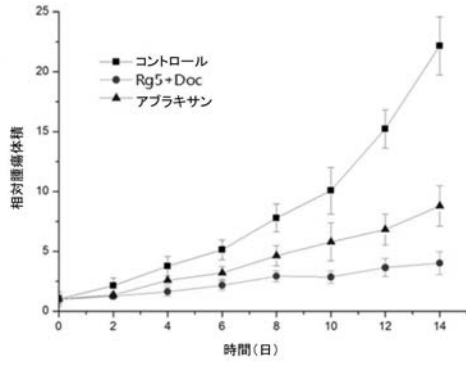
【 図 4 6 】



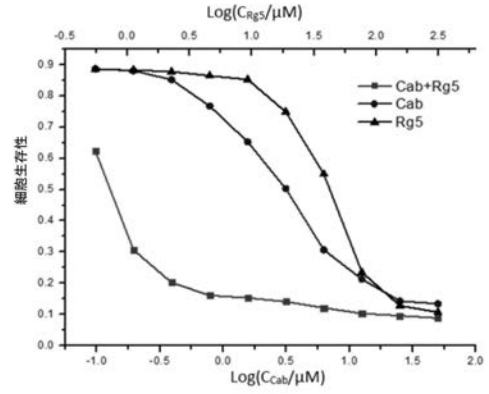
【 図 4 8 】



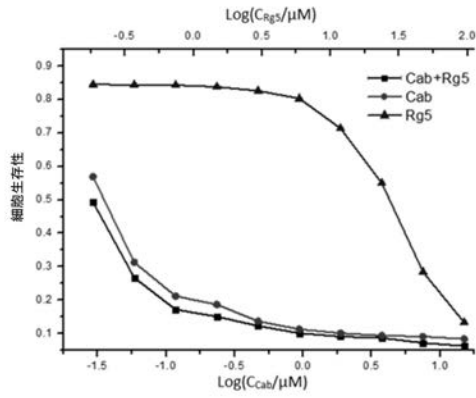
【 図 4 9 】



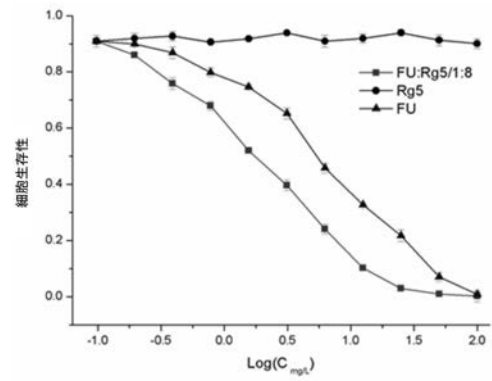
【 図 5 1 】



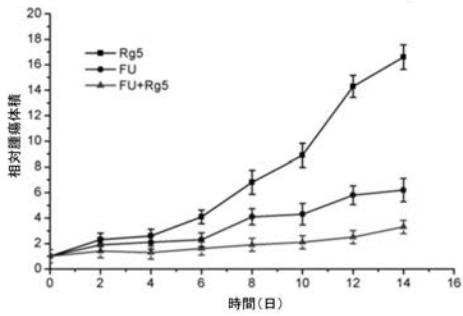
【 図 5 0 】



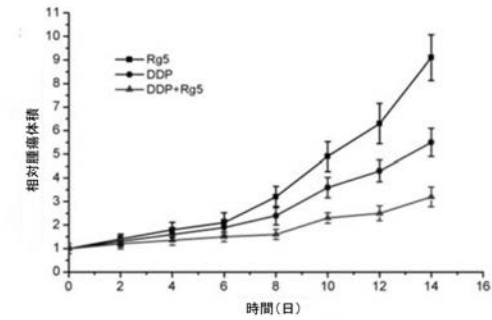
【 図 5 2 】



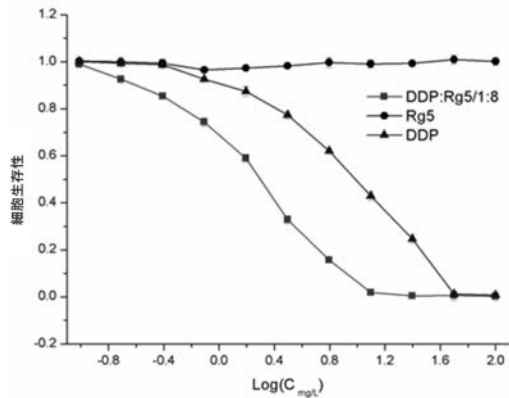
【 図 5 3 】



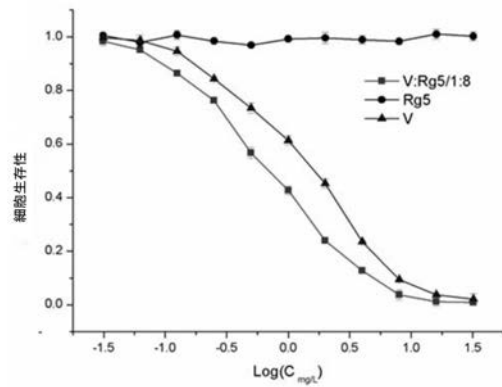
【 図 5 5 】



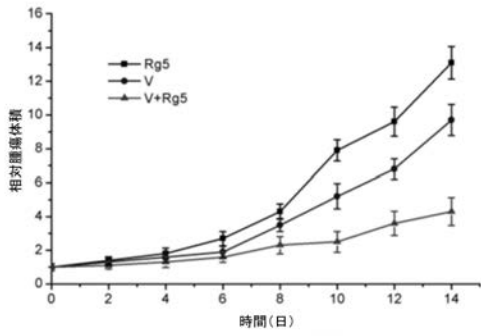
【 図 5 4 】



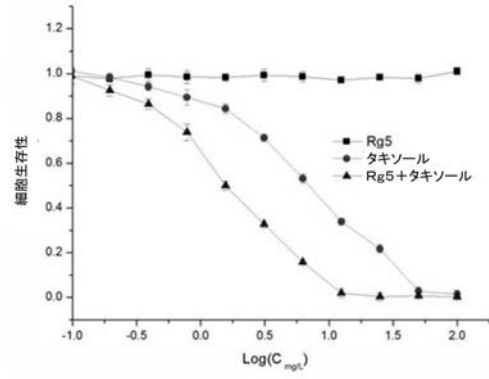
【 図 5 6 】



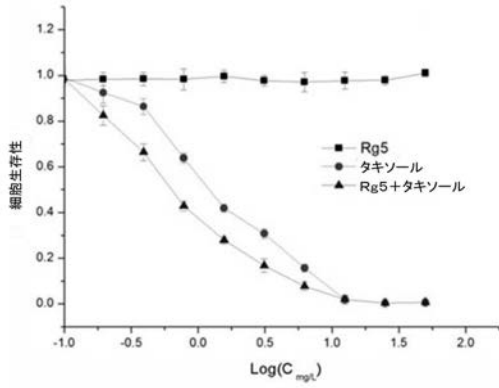
【 図 5 7 】



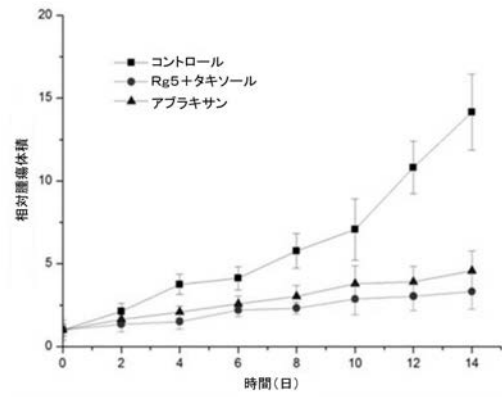
【 図 5 9 】



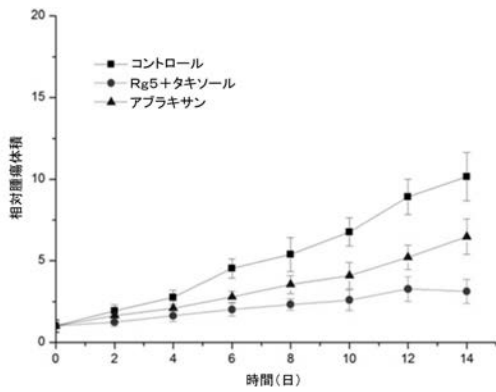
【 図 5 8 】



【 図 6 0 】



【 図 6 1 】



【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/096005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 9/127(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i 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) A61K A61P 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) CPRSABS,EPODOC,WPI,CNKI,CA,MEDLINE,CHINA TCM PATENT DATABASE:blank liposome,ginsenoside,lipid, cholesterol		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101091714 A (UNIV CHINA PHARM) 26 December 2007 (2007-12-26) the whole document	1-22
A	CN 103417479 A (UNIV JILIN) 04 December 2013 (2013-12-04) the whole document	1-22
A	Zhao Haixia etc. "liposome preparation methods" SHANDONG CHINESE MEDICINE MAGZINE, Vol. 19, No. 7, 31 July 2000 (2000-07-31), the whole document	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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 08 November 2016	Date of mailing of the international search report 18 November 2016	
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer LOU,Dujuan Telephone No. (86-10)62411137	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/096005

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	101091714	A	26 December 2007	无	
CN	103417479	A	04 December 2013	无	

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	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	31/4745 (2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	8/14 (2006.01)	A 6 1 K	8/14	
A 6 1 K	8/55 (2006.01)	A 6 1 K	8/55	
A 6 1 K	8/63 (2006.01)	A 6 1 K	8/63	
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	25/24 (2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	25/20 (2006.01)	A 6 1 P	25/20	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	

(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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. b r i j

(72) 発明者 ワン, ヤファ

中華人民共和国, シャンハイ, ソンチアン ディストリクト, シンチャオ タウン, ミンイ ロード, ナンバー 2 0 1, ビルディング 2 0, シックス フロアー

(72) 発明者 チャン, ファシン

中華人民共和国, シャンハイ, ソンチアン ディストリクト, シンチャオ タウン, ミンイ ロード, ナンバー 2 0 1, ビルディング 2 0, シックス フロアー

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB01 BB11 CC27 DD63 DD70 EE23 EE24 GG41
 4C083 AC901 AD491 CC03 DD45 EE12 EE13
 4C084 AA17 MA05 MA52 MA66 NA13
 4C086 AA01 AA02 BA02 CB22 MA03 MA05 MA24 NA13 ZB26