

(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2011-504937

(P2011-504937A)

(43) 公表日 平成23年2月17日(2011.2.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 3	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-536196 (P2010-536196)	(71) 出願人	506356221
(86) (22) 出願日	平成20年11月26日(2008.11.26)		セレーター ファーマスーティカルズ、インク。
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月27日(2010.7.27)		アメリカ合衆国、ニュー ジャージー O
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/085030		8 5 4 O、プリンストン、カレッジ ロー
(87) 国際公開番号	W02009/070761		ド イースト 3 O 3 B
(87) 国際公開日	平成21年6月4日(2009.6.4)	(74) 代理人	100080816
(31) 優先権主張番号	60/990, 907		弁理士 加藤 朝道
(32) 優先日	平成19年11月28日(2007.11.28)	(74) 代理人	100098648
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 内田 潔人
		(72) 発明者	アンセル、スティーブン、エム。
			アメリカ合衆国、ニュー ジャージー O
			8 5 4 O、プリンストン、カレッジ ロー
			ド イースト 3 O 3 B

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良されたタキサン送達システム

(57) 【要約】

【課題】パクリタキセル及びそのアナログを含む組成物のコントロールを容易にする改良を提供する。

【解決手段】グリコール酸(エステル)リンカーを介して疎水性部分にカップル化されたタキサンから形成されるタキサンコンジュゲートプロドラッグの送達のためのナノ粒子製剤が記載される。

【選択図】 無し

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タキサンのプロドラッグから形成されるナノ粒子又はミセルを含む医薬組成物であって、
 当該プロドラッグは、グリコール酸エステルリンカーを介して、疎水性部分にカップル化された前記タキサンのコンジュゲートであり、

前記プロドラッグが、脂質及び/又は両親媒性安定剤と会合される (associated) ことを特徴とする組成物。

【請求項 2】

前記プロドラッグが、脂質及び両親媒性安定剤と会合されることを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記タキサンが、パクリタキセルであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記疎水性部分が、長鎖アルコール、トコフェロール、又はステロイドに由来することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記脂質が、リン脂質又はトコフェロールであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記両親媒性安定剤が、コポリマーであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記コポリマーが、ポリエチレングリコール及びポリスチレンを含むことを特徴とする請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

タキサン組成物の薬物動態を模倣するように製剤化される追加的な抗悪性腫瘍剤を更に含むことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

被検体 (subject) にタキサンを投与方法であって、
 前記被検体に請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項 10】

タキサン組成物の薬物動態を模倣するように製剤化される追加的な抗悪性腫瘍剤を投与することを更に含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組成物を調製する方法であって、
 コントロールされた流速を使用して、限局的な空間 (confined space) において、水と、前記プロドラッグ、脂質及び/又は両親媒性安定剤を含む混和性溶媒とを急速に混合するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本願は、2007年11月28日に提出された米国出願番号60/990,907 (引用によって全体が本願に組み込まれる) の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、薬剤送達分野内に属し、特にコントロールされた薬物動態 (pharmacokinetics) を有するタキサンの成功裏の送達の領域 (area) 内に属す。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

パクリタキセルは、種々の癌を処置するために広範囲に使用される化学治療剤である。該臨床物質 (clinical material) は、Cremophor (登録商標) E L / エタノールに製剤化 (ないしは処方: formulated) され、そして投与の前にバッファーで希釈される。ミセル、リポソーム又はエマルジョンを使用してパクリタキセルの製剤 (ないし製剤化: formulation) を改良する試みを記載する文献において、多数の報告がある (引用文献 1、15、16、17)。しかしながら、ほとんど全てのケースでは、これらの担体 (carriers) はパクリタキセルを製剤化するが、該薬剤が数分のオーダー (order) の半減期 (half lives) を有する担体の外に急速に分離するので、インビボにおいて真の (true) 送達ビヒクルとして働かないことは、報告された薬物動態のデータから明白である。1つの例外が NK 105 として知られる製剤であると思われる (引用文献 2)。NK 105 は、カルボキシル基が 4 - フェニルブタノールでキャップされた (capped) ポリ (エチレングリコール) - ポリ (アスパラギン酸) から成るミセルに製剤化されたパクリタキセルである。

10

【0004】

多くの試みが機能的な親油性パクリタキセルのプロドラッグを生産するために行われ、パクリタキセルの性能を改良するか、又は、該薬剤と関連 (ないし会合) する製剤の問題が取り組まれた。これらは、リン脂質 (引用文献 3、4)、コレステロール (引用文献 5)、プロモ脂肪酸 (引用文献 6、7)、オレイン酸 (引用文献 8、9)、フラーレン (引用文献 10)、及びドコサヘキサエン酸 (docosahexanoic acid) (引用文献 11) とのコンジュゲート (ないし抱合体: conjugates) を含む。これらプロドラッグは、リポソーム (引用文献 3、7、10)、油エマルジョン (oil emulsions) (引用文献 8、9) 又はミセル (引用文献 5、6、11) などの脂質ビヒクルに製剤化された。更に、WO 2006/014626 は、微粒子型で存在することができるパクリタキセル及び他の薬剤と疎水性 (半) 部分 (hydrophobic moieties) とのコンジュゲートを開示する。これらの報告のほとんどは、インビボモデルにおいて、パクリタキセルを上回る改良された有効性を主張するが、しかしながら、ほとんどのケースにおいて、それらは、血漿薬剤排出 (plasma drug elimination) に関する情報を提供しないか、又は、初期の (early) 分布段階 (フェーズ) というよりも末期の (terminal) 薬剤排出段階に着目するデータを提供するかのいずれかである。ミセル及びナノ粒子を含む微粒子担体で観察される透過性及び保持性の増強 (EPR: enhanced permeability and retention) の現象のため、投与後の最初の 24 時間の間の薬剤排出の情報が、腫瘍送達の観点からのもっとも重要な (ないし有意な) 目的の期間の情報である。

20

30

【0005】

本発明は、一連の親油性パクリタキセルのプロドラッグ、そして、会合した (associated) ミセル/ナノ粒子 (micellar/nanoparticle) 製剤によって例示される。脂質アンカー (lipid anchor) の疎水性の度合い及びプロドラッグのクロスリンカーの不安定性の度合いを操作することによって薬剤の放出が調節され、延長した循環半減期 (circulation half lives) を有する微粒子送達ビヒクルが記載される。インビボでのプロドラッグの有効性は、リンケージ (linkage) の性質及び脂質アンカーの相対的な分離速度 (ないし割合: rate) に依存することが示される。

40

【0006】

多くの化学治療的な処置処方 (chemotherapeutic treatment regimes) は、複数 (multiple) の薬剤を含む。細胞ベースの研究において、多数の薬剤の組み合わせは、適切な比率では相乗的に作用するが、他の比率では拮抗的に作用する。これらの知見がインビボの研究に適用される場合には、従来 of 水性ベースのカクテル (aqueous based cocktail) の状態で投与される時の個々の薬剤の異なる薬物動態的な挙動が、投与された比率を変える。PCT 公開 WO 03/028696 に記載されるように、薬剤の送達及び放出をコーディネートする (ないしは調和させる: coordinate) ように設計 (ないしはデザイン) した微粒子送達ビヒクルを使用することによって、この問題は解決された。タキサン組成物の

50

薬物動態を模倣するように1つ以上の追加的な抗悪性腫瘍剤 (antineoplastic agents) を製剤化することができるので、本発明は、パクリタキセル及びそのアナログを含む組成物のコントロールを容易にする改良を提供する。

【発明の概要】

【0007】

[発明の開示]

本発明は、タキサンのプロドラッグと、ミセルもしくはナノ粒子の送達ビヒクルとを採用して、薬物動態のコントロールを容易にする。タキサンをより疎水性にして、結果的に脂質ベースの送達システムとより適合性 (compatible) にすることによって、タキサン組成物の薬物動態をコントロールすることができる。インビボでの効果的な放出速度 (release rates) がタキサンの放出速度に合致するように追加的な抗悪性腫瘍剤を含む製剤の特徴を調節することも可能である。ミセル又は親油性のナノ粒子の担体は、これらのプロドラッグ及び他の薬剤を水性の環境に懸濁することに使用できる。

【0008】

以下に示すように、長期循環ジグリコール酸エステルプロドラッグ (long circulating diglycolate prodrug) のナノ粒子は、最大許容量で、市販の製剤化されたパクリタキセルを上回る顕著に増強された治療活性を提供し、それゆえに、これらのタイプの製剤はそれ自体が有利である。

【0009】

従って、1つの視点において、本発明は、タキサンのプロドラッグから形成されるナノ粒子又はミセルを含む医薬組成物であって、当該プロドラッグは、グリコール酸エステルリンカー (glycolate linker) を介して、疎水性 (半) 部分 (moiety) にカップル化された前記タキサンのコンジュゲートであり、前記プロドラッグが、脂質及び/又は両親媒性安定剤と会合される (associated) ことを特徴とする組成物に向けられる。

【0010】

他の視点において、本発明は、本発明の組成物を使用してタキサンを投与する方法、本発明の組成物と追加的な抗悪性腫瘍剤の製剤とを組み合わせる投与方法、そしてこれら組成物及び製剤を調製する方法に向けられる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1A及び1Bは、HPLCによって測定した場合のテストプロドラッグ1及び2の排出か (図1A)、又は相対的な薬剤保持を示すグラフ (図1B) である。

【0012】

【図2】図2は、POPC/2kPS3kにて製剤化されたプロドラッグ1-9の排出を示す。

【0013】

【図3】図3は、プロドラッグ1-7の類似の製剤における相対的な有効性を示す。

【0014】

【図4】図4は、タキソール (Taxol) (登録商標) との比較における、様々な濃度でのプロドラッグ7の有効性を示す。

【0015】

【図5】図5は、タキソール (登録商標) と同等 (parity) に達するために必要なプロドラッグ7のパクリタキセル当量数 (number of paclitaxel equivalents of 7) の算出を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、グリコール酸エステル (ないしはグリコール酸: glycolate) を介して疎水性 (半) 部分 (moiety) にカップル化される (coupled) プロドラッグとして製剤化 (formulated) されたタキサンに関する改良された送達特徴を示す組成物を提供する。製剤の薬物動態は、疎水性 (半) 部分の性質を操作すること、並びにミセル及びナノ粒子の成分

(ないしは構成：components)を操作することによってコントロールできるので、所望の薬剤送達の特徴を達成することができる。これら薬物動態は他の抗悪性腫瘍剤 (antineoplastic agents) を含む製剤 (formulations) の薬物動態に適合させることができ、薬剤送達をコーディネートし(ないしは調和させ)、それによって、腫瘍に送達される抗悪性腫瘍剤及びタキサン薬剤の比率が実質的に投与された比率のままの改良されたシステムに関する機会を提供する。それゆえに、1つ以上の追加的な抗悪性腫瘍剤の適合性製剤 (compatible formulation) と組み合わせて改良されたタキサン製剤を使用するとき、インピトロで決定される相乗的な比率を1.5又は2などの小さな因数 (factor) の範囲内で維持することができる。もちろん、これらの製剤は、癌及び他の過剰増殖性 (hyperproliferative) の兆候の処置に有用である。経時的に (over time) 血液又は血漿中の薬剤のレベルを決定(ないし測定)することによって、この比率の維持を容易に測定することができる。コーディネートされた組成物は、少なくとも1時間又は4時間にわたって、あるいは24時間でさえ、血液又は血漿において測定される場合の投与された比率を前述の限度内に維持する。

10

【0017】

上述のように、タキサンプログラムを担持(ないしは輸送：carry)する本発明の組成物におけるナノ粒子又はミセルの成分は、脂質及び/又は両親媒性安定剤 (amphiphilic stabilizer) から構成される。

【0018】

本願で使用される場合に、「タキサン」とは、パクリタキセル及びそのアナログから成る薬剤のクラス (class) を意味する。パクリタキセルは、当初、イチイ (木) (Yew tree) から導出されたものであり、そして、そのアナログは、ドセタキセル (docetaxel) 及び類似の構造の他の化合物を含む。タキソール (Taxol) (登録商標) は、Cremophor (登録商標) と一緒に製剤化されたパクリタキセルの商業的に入手可能な形態である。

20

【0019】

プロドラッグの一部 (a part) を形成する「疎水性 (半) 部分」 (moiety) は、一般的には、高分子量のアルコールであり、それゆえに、グリコール酸 (エステル) リンケージ (glycolate linkage) を介してタキサンにカップル化することができる。該アルコールは、6個以上の炭素 (一般的には6 - 30個の炭素、あるいは、いくつかの実施形態では6 - 20個の炭素) の直鎖状 (straight) の鎖、分枝状の鎖、又は、環状アルコール (cyclic alcohol) であり得る。コレステロールのようなステロイド、又はビタミンE及び関連する (半) 部分 (moieties) のようなトコフェロールでもあり得る。

30

【0020】

本発明のナノ粒子組成物のプロドラッグと会合される (associated) 脂質は、典型的には、ジステアロイルホスファチジルコリン (distearoyl phosphatidylcholine)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoyl phosphatidylcholine)、ジミリストイルホスホコリン (dimyristoyl phosphocholine) そして対応するホスファチジルエタノール (phosphatidyl ethanols)、ホスファチジルイノシトール (phosphatidyl inositols)、ホスファチジルグリセロール (phosphatidyl glycerols) 及び同様のものなどのリン脂質である。脂肪酸の鎖は、不飽和であってもよく、そして、例えば、オレイン酸及びリノール酸を含むことができる。これらの脂肪酸は同一である必要がない。更に、脂質部分は、スフィンゴミエリン (sphingomyelin) などのスフィンゴシン (sphingosine) であることができ、もしくは、それ自体がビタミンEコハク酸 (エステル) (vitamin E succinate) 又は、それ自体がビタミンEアジピン酸塩 (vitamin E adipate) のようなトコフェロールエステルであってもよい。

40

【0021】

両親媒性安定剤は、親水性部位 (portion) 及び疎水性部位を含むポリマー状の化合物である。典型的な疎水性ポリマーは、ポリスチレン及びポリメタクリレートの疎水性誘導体、並びにポリビニル誘導体を含む。典型的な親水性の構成要素は、ポリエチレングリコール及び疎水性ポリマーの親水性誘導体、並びに、デキストラン (dextran) 及びデキスト

50

ラン誘導体、そしてポリアミノ酸を含む。該リストは、例示的であるものとし、網羅的ではない。一般的には、両親媒性安定剤は、およそ500を上回る分子量を有するが、1000 - 50000 g/molのより高い分子量を有することもできる。

【0022】

以下の実施例において、親油性ナノ粒子の製剤のためにデザインされた一連のパクリタキセルプロドラッグが記載される。コハク酸（エステル）又はジグリコール酸（エステル）クロスリンカーを使用して、疎水性が増加する一連の脂質アンカーを薬剤にコンジュゲートすることによって、パクリタキセルの疎水性を増加させた。パクリタキセル自体は水にほぼ不溶性であるが、脂質ベースの送達システムの外へ急速に分離され得るという十分な水への溶解性（典型的には、数分のオーダー（order）の半減期）を有する。本発明は、有効性を最大化しつつ、製剤化された薬剤の薬物動態をインビボにおいてコントロールする。プロドラッグを、良く（well）定義されたブロックコポリマー安定化ナノ粒子（block copolymer stabilized nanoparticles）に製剤化した。これらのナノ粒子は、インビボにおいて、およそ24時間の排出半減期を有することが示された。プロドラッグがナノ粒子から放出される速度は、脂質アンカーの疎水性を調節することによってコントロールすることができ、結果として放出速度が1から24時間までの範囲にわたった。

10

【0023】

ナノ粒子製剤は、4 で、数ヶ月（several）月間安定的に保存することができた。

【0024】

様々なパクリタキセルのプロドラッグの治療上の活性を評価するために、ナノ粒子製剤を、HT29ヒト結腸異種移植腫瘍（HT29 human colon xenograph tumors）を保有するマウスに静脈内に投与した。血漿半減期及びプロドラッグの曲線下面積（area under the curve）が増加した場合に、HT29腫瘍に対する活性もまた増加した。両方の処置がタキソール（登録商標）の最適処置処方を使用して最大許容投与量（MTD）で投与されたときに、パクリタキセルプロドラッグナノ粒子は、HT29腫瘍が400mgに到達するまでの時間を、タキソール（登録商標）に比べて2倍以上にした。

20

【0025】

インビボにおいて単一ポリマ鎖が経時的に粒子の外に分離することの結果として、該タイプのナノ粒子製剤は、おそらく、ほとんどクリアされるであろう。安定剤の構成要素の段階的な消失（Gradual loss）は、粒子を不安定化し、そして、まだ外に分離していないペイロード（payload）を排出するという結果になるだろう。比較的少量のポリマの消失が、粒子のコアを潜在的なタンパク質相互作用に曝すため、高い薬剤/安定剤の比率を有する粒子は、急速にクリアされる。低い薬剤/安定剤の比率を有する粒子は、ポリマーの消失に対してより強力な耐性（tolerance）を有し、そして、インビボにおける他のメカニズムを介してクリアされるのに十分な程度に長く残存する。従って、理想的な送達システムは、比較的低い（low）薬剤/ポリマーの比率で、好ましくは、低い（low）分離速度を有する安定剤で、ミセルのサイズを適合（approach）させるべきである。

30

【0026】

異なる疎水性の脂質アンカを有するプロドラッグは、同一の粒子組成物からの異なる分離速度を示す。これらのナノ粒子において、薬剤の物理化学的な特徴は、担体自体の分解よりも、むしろ、担体からの薬剤の放出を主に規定する（dictate）。この挙動は、例えば、タキソール（登録商標）とナノ粒子におけるパクリタキセルプロドラッグとの間の顕著な差に導く。パクリタキセルは、注射の際に、Cremophorのミセルの外に急速に分離し、そして、それが血液区画（blood compartment）において遭遇する親油性のシンク（部分）（sinks）に広範囲に分布する。薬剤は排出される前に、経時的に血液分画に再分布する（redistributes back）。プロドラッグナノ粒子は、この初期の分布フェーズを示さず、むしろ経時的に薬剤を継続的に放出し、その速度は、プロドラッグの構成要素の分離速度に依存する。プロドラッグ分離速度が有効性と直接的に相関することが以下に示され、そしてこの速度は、プロドラッグの脂質アンカ（そして、それ故に、疎水性）を変更することによって容易に調整可能であった。

40

50

【 0 0 2 7 】

分離速度への有効性の依存性は、腫瘍におけるナノ粒子の蓄積の後に、プロドラッグが徐々に放出されるという点で合理的に説明することができる。ペイロードを急速に放出するか、或いは循環系から急速にクリアされるナノ粒子は、腫瘍サイトに薬剤をわずかしが (less) 送達しないだろうし、結果的には減少した有効性を示すことが予測できる。

【 0 0 2 8 】

本発明の組成物は、追加的な抗悪性腫瘍剤を更に含むことができる。本発明の組成物において、タキサンプロドラッグの薬物動態が容易にコントロールされるので、類似の組成物又は他の (alternative) 製剤のいずれかの追加的な抗悪性腫瘍剤に、類似の薬物動態を提供することができ、そして、本発明の組成物と混合すること、あるいは被検体に同時に投与することができる。従って、追加的な抗悪性腫瘍剤は、リポソーム、ミセル、他の (alternative) ナノ粒子又はタキサンの薬物動態を模倣するようにデザインされた他の (other) 組成物に製剤化することができる。適切な抗悪性腫瘍剤は多種多様であり、かつ本発明の分野においてよく知られており、例えば、ダウノルビシン (daunorubicin) 及びドキソルビシン (doxorubicin) などのアントラサイクリン (anthracyclines)、カルボプラチン (carboplatin) 及びシスプラチン (cisplatin) などのプラチナ含有薬剤、イリノテカン (irinotecan) 及びそのアナログを含むファミリー (family)、フルオロピリミジン (fluoropyrimidines)、及びメトトレキサート (methotrexate) のなどの種々の他の一般的に採用される薬剤を含む。タキサン製剤の薬物動態を模倣するようにデザインされた、追加的な抗悪性腫瘍剤 (1つ以上) の製剤は、上記のようなタキサン製剤と混合することか、又は個別の組成物として実質的に同時に投与することができる。

10

20

【 0 0 2 9 】

一つの実施形態において、タキサンプロドラッグは、ドキソルビシンなどの水溶性の薬剤の疎水性プロドラッグアナログと共製剤化 (co-formulated) することができ、そして、2重薬剤ナノ粒子 (dual-drug nanoparticles) は、注射後の延長された期間、血漿中で、注射された [時の] 薬剤：薬剤の比率で2つの薬剤を維持する。ナノ粒子に疎水性プロドラッグを製剤化することは、広範囲に異なる物理化学的な特徴を有する抗癌剤の組み合わせを共送達 (co-deliver) すること、及びインビボで適切な薬剤：薬剤比率を維持することへの新たなアプローチを提供する。

30

【 0 0 3 0 】

本発明の組成物は、任意の適切なルートによって投与することができ、非経口的な投与が好ましい。処置されるべき被検体は、ヒト、他の高等動物、及びネズミ及びラットなどの研究モデルを含む。

【 0 0 3 1 】

以下の実施例は、本発明を説明するものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【 0 0 3 2 】

略称

V E S、ビタミンEコハク酸 (ないしビタミンEコハク酸エステル) (Vitamin E succinate) ;

40

P O P C、1 パルミトイル 2 オレオイル sn グリセロ 3 - ホスフォコリン (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) ;

C V I J、限局的な体積衝突噴流 (confined volume impinging jets) ;

2 k P S 3 k、ポリ (エチレングリコール)₂₀₀₀ b ポリスチレン₃₀₀₀ (poly(ethylene glycol)₂₀₀₀-b-polystyrene₃₀₀₀) ;

2 . 5 k P S 3 k、ポリ (エチレングリコール)₂₅₀₀ b ポリスチレン₃₀₀₀ (poly(ethylene glycol)₂₅₀₀-b-polystyrene₃₀₀₀) ;

³ H C H E、トリチウム化コレステロールヘキサデシルエーテル (tritiated cholesterol hexadecyl ether) ;

T L C、薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography) ;

50

D I P C、ジイソプロピルカルボジイミド (diisopropylcarbodiimide) ;

D M A P、N , N 4 ジメチルアミノピリジン (N,N 4 dimethylaminopyridine)

【 0 0 3 3 】

材料

全ての試薬は、別途特定されない限り、Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ONから購入した。溶媒は、VWR International, Mississauga, ONから得た。パクリタキセルは、Indena S.p.A., Milan, Italyから購入した。³H C H E は、Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, MAから得た。P O P C は、Northern Lipids, Burnaby, BCから得た。¹H N M R スペクトル (spectra) は、Bruker Advance 400で、C D C l₃で記録した。H T - 2 9 ヒト結腸直腸腺癌細胞 (HT-29 Human colorectal adenocarcinoma cells) は、ATCC, Manassas, VAから得た。F o x n 1ⁿ マウスは、Harlan, Indianapolis, INから得た。限局的な体積衝突噴流ミキサーは、Princeton Universityにおいてカスタム構築 (custom built) した。全ての動物実験は、University of British Columbia's Animal Care Committeeによって認証されたプロトコルに従い、そして、Canadian Council of Animal Careによって確立された最新のガイドラインに従って実行した。

10

[実施例 1]

プロドラッグの合成

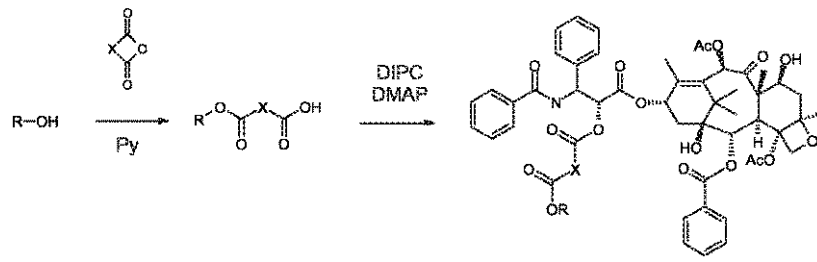
【 0 0 3 4 】

一般的に入手可能な範囲の脂質アルコールをアンカーの構成要素 (スキーム 1) として使用した。該脂質アルコールは、トコフェロール (tocopherol) (プロドラッグ 1 及び 3)、オレイルアルコール (oleyl alcohol) (プロドラッグ 2 及び 4)、オクタデカノール (octadecanol) (プロドラッグ 5)、コサノール (cosanol) (プロドラッグ 6)、ドコサノール (docosanol) (プロドラッグ 7)、コレステロール (cholesterol) (プロドラッグ 8)、及び 1, 2 ジミリストイル sn グリセロール (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol) (プロドラッグ 9) を含む。対応する環状無水物を用いる処理によって脂質をクロスリンカーとコンジュゲートさせ、次に、ジイソプロピルカルボジイミド (D I P C) を使用して、アンカーリンカーの生成物とパクリタキセルとを N, N 4 ジメチルアミノピリジン (D M A P) の存在下で縮合した。コハク酸 (Succinic acid) (プロドラッグ 1 2)、及びジグリコール酸 (diglycolic acid) (プロドラッグ 3 9) を、クロスリンカーとして使用した。後者の 3 オキサ部分は、コハク酸 (ないしコハク酸エステル: succinate) アナログに関連する加水分解に対するクロスリンカーの 2' アシル基の感受性を増加させるものであった。

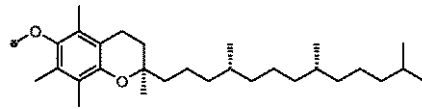
20

30

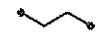
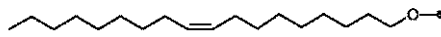
スキーム 1 親油性パクリタキセルプロドラッグの合成



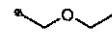
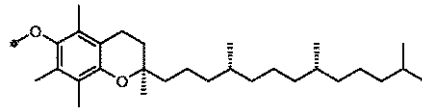
10

R**X**

プロドラッグ 1

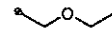


プロドラッグ 2

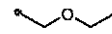
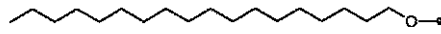


プロドラッグ 3

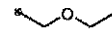
20



プロドラッグ 4

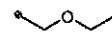


プロドラッグ 5

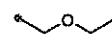
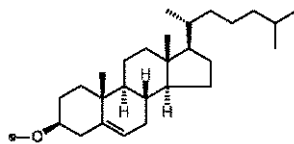


プロドラッグ 6

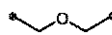
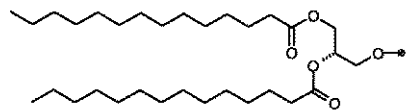
30



プロドラッグ 7



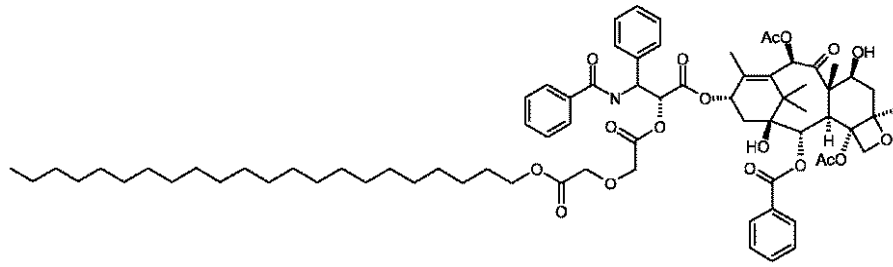
プロドラッグ 8



プロドラッグ 9

40

SYNOPSIS TOC



【 0 0 3 5 】

10

2' アシルパクリタキセル誘導体を、パクリタキセルの2' ヒドロキシル基及び7' ヒドロキシル基の間の反応速度 (reaction rates) の差を利用することによって、選択的に調製した。ここで使用された反応条件下では、TLCによってモニターした場合に、顕著なレベルの2', 7' ジアシル生成物が生産される前に、パクリタキセルの大部分は消費された。未精製の (crude) 反応混合物における反応しなかったパクリタキセル、2', 7' ジアシル生成物及びその他の不純物を除去するために、カラムクロマトグラフィーを使用した。最終生成物の純度及び同一性 (identity) を、HPLC及びNMR解析によってそれぞれ確認した。

【 0 0 3 6 】

20

脂質アンカーの合成については、脂質アルコールのピリジン溶液を、3当量のコハク酸無水物 (succinic anhydride) 又はジグリコール酸無水物 (diglycolic anhydride) で、室温で、オーバーナイトで処理した。溶媒をロトバップ (roto-vap) で除去し、残渣を希釈塩酸から塩化メチレンで抽出した。有機分画を無水硫酸マグネシウムで乾燥してろ過し、溶媒を除去した。適切な酸への転換をTLCによってモニターしたところ、ほとんどのケースにおいて100%であった。結果として得られた生成物を、真空下で乾燥させるか、又はベンゼンから凍結乾燥させた。該リピッドアシッド (lipid acids) を更なる精製なしで次のステップにおいて使用した。

【 0 0 3 7 】

30

パクリタキセルコンジュゲートの合成については、パクリタキセル (1当量)、リピッドアシッド (2当量)、及びN, N-4-ジメチルアミノピリジン (3当量) をアルコールフリーのクロロホルムに溶解した。次に、ジイソプロピルカルボジイミド (1.3当量) を加え、そして、溶液を室温で撹拌した。ほとんどのパクリタキセルが消費されるまで (典型的には2-4時間)、TLCによって反応をモニターした。次に、反応混合物を希釈塩酸で洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒の除去の後、未精製の生成物を、メタノール/塩化メチレン勾配を使用してシリカゲルカラムに通した。精製したプロドラッグを、ベンゼンから凍結乾燥し、そして、室温で保存した。

【 0 0 3 8 】

調製した化合物は、以下のプロドラッグ1-9である。

【 0 0 3 9 】

40

2'-O-(4'-O-トコフェロールサクキノイル)-パクリタキセル (2'-O-(4'-O-tocopherylsuccinoyl)-paclitaxel) (プロドラッグ1)

パクリタキセル及びトコフェロールコハク酸から合成した。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 3.83 (1H, d, J = 7.25 Hz); 4.22 (1H, d, J = 8.60 Hz); 4.33 (1H, d, J = 8.60 Hz); 4.46 (1H, dd, J = 10.88 Hz, J' = 6.58 Hz); 4.99 (1H, d, J = 9.54 Hz); 5.52 (1H, d; J = 3.22 Hz); 5.70 (1H, d, J = 6.98 Hz); 5.98 (1H, dd, J = 9.13 Hz, J' = 3.22 Hz); 6.27 (1H, t, J = 8.6 Hz); 6.97 (1H, d, J = 8.87 Hz)。

【 0 0 4 0 】

2'-O-(4'-O-オレイルサクキノイル)-パクリタキセル (2'-O-(4'-O-oleylsuccinoyl)-paclitaxel) (プロドラッグ2)

50

パクリタキセル及びオレイルコハク酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.82 (1H, d, $J = 7.0$ Hz); 3.96 (2H, t, $J = 6.81$ Hz); 4.21 (1H, d, $J = 8.38$ Hz); 4.33 (1H, d, $J = 8.38$ Hz); 4.46 (1H, br. s); 4.98 (1H, d, $J = 8.45$ Hz); 5.36 (2H, m); 5.50 (1H, d, $J = 2.89$ Hz); 5.69 (1H, d, $J = 7.00$ Hz); 6.00 (1H, dd, $J = 9.04$ Hz, $J' = 2.74$ Hz); 6.26 (1H, t, $J = 8.91$ Hz); 7.08 (1H, d, $J = 9.06$ Hz)。

【 0 0 4 1 】

2' - O - (5'' - O - トコフェロールジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-tocopheryldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 3)

パクリタキセル及びトコフェロールジグリコール酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.84 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 4.22 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 4.34 (1H, d, $J = 8.6$ Hz); 4.99 (1H, d, $J = 7.79$ Hz); 5.64 (1H, d, $J = 2.96$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 6.06 (1H, dd, $J = 9.27$ Hz, $J' = 2.82$ Hz); 6.30 (1H, t); 6.97 (1H, d, $J = 9.13$ Hz)。

【 0 0 4 2 】

2' - O - (5'' - O - オレイルジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-oleyldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 4)

パクリタキセル及びオレイルジグリコール酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.83 (1H, d, $J = 7.0$ Hz); 4.46 (1H, t, $J = 7.96$ Hz); 4.99 (1H, d, $J = 8.45$ Hz); 5.35 (2H, m); 5.60 (1H, d, $J = 2.74$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 7.08$ Hz); 6.05 (1H, dd, $J = 9.25$ Hz, $J' = 2.55$ Hz); 6.28 (1H, t, $J = 8.9$ Hz); 7.04 (1H, d, $J = 9.29$ Hz)。

【 0 0 4 3 】

2' - O - (5'' - O - オクタデシルジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-ctadecyldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 5)

パクリタキセル及びオクタデシルジグリコール酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.83 (1H, d, $J = 7.0$ Hz); 4.46 (1H, dd, $J = 10.74$ Hz, $J' = 6.70$ Hz); 4.99 (1H, d, $J = 8.45$ Hz); 5.60 (1H, d, $J = 2.82$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 7.00$ Hz); 6.05 (1H, dd, $J = 9.25$ Hz, $J' = 2.55$ Hz); 6.28 (1H, t, $J = 8.9$ Hz); 7.05 (1H, d, $J = 9.29$ Hz)。

【 0 0 4 4 】

2' - O - (5'' - O - コサニルジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-cosanyldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 6)

パクリタキセル及びコサニルジグリコール酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.83 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.46 (1H, dd, $J = 10.75$ Hz, $J' = 6.72$); 4.99 (1H, d, $J = 9.40$ Hz); 5.60 (1H, d, $J = 2.96$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 7.25$ Hz); 6.05 (1H, dd, $J = 9.27$ Hz, $J' = 2.82$); 6.29 (1H, t, $J = 8.3$ Hz); 7.05 (1H, d, $J = 9.13$ Hz)。

【 0 0 4 5 】

2' - O - (5'' - O - ドコサニルジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-docosanyldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 7)

パクリタキセル及びドコサニルジグリコール酸から合成した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 3.83 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.46 (1H, dd, $J = 10.75$ Hz, $J' = 6.72$ Hz); 4.99 (1H, dd, $J = 9.40$ Hz, $J' = 1.61$ Hz); 5.60 (1H, d, $J = 2.96$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 6.05 (1H, dd, $J = 9.40$ Hz, $J' = 2.95$ Hz); 6.28 (1H, t, $J = 8.3$ Hz); 7.05 (1H, d, $J = 9.40$ Hz)。

【 0 0 4 6 】

2' - O - (5'' - O - コレステリルジグリコロイル) - パクリタキセル (2'-O-(5''-O-cholesteryldiglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラック 8)

パクリタキセル及びコレステリルジグリコール酸から合成した。

10

20

30

40

50

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 3.83 (1H, d, $J = x$ Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.47 (1H, dd, $J = 10.6$ Hz, $J' = 6.8$ Hz); 4.63 (1H, m); 4.99 (1H, d, $J = 7.79$ Hz); 5.38 (1H, d, $J = 3.76$ Hz); 5.61 (1H, d, $J = 2.69$ Hz); 5.70 (1H, d, $J = 7.25$ Hz); 6.06 (1H, d, $J = 9.13$ Hz, $J' = 2.69$ Hz); 6.28 (1H, t, $J = 8.3$ Hz); 7.09 (1H, d, $J = 9.40$ Hz).

【0047】

2'-O-(5'-O-(1'',2''ジミリストイル sn グリセロ)ジグリコイル)-パクリタキセル(2'-O-(5'-O-(1'',2''-dimyristoyl-sn-glycerol)diglycoloyl)-paclitaxel) (プロドラッグ9)

パクリタキセル及び3-(1,2ジミリストイル sn グリセロール)ジグリコール酸から合成した。 10

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 3.84 (1H, d, $J = 6.98$ Hz); 4.47 (1H, dd, $J = 10.6$ Hz, $J' = 6.8$ Hz); 4.99 (1H, dd, $J = 9.54$ Hz, $J' = 1.75$ Hz); 5.20 (1H, m); 5.61 (1H, d, $J = 2.96$ Hz); 5.71 (1H, d, $J = 7.25$ Hz); 6.07 (1H, d, $J = 9.27$ Hz, $J' = 2.82$ Hz); 6.31 (1H, t); 7.11 (1H, d, $J = 9.40$ Hz).

[実施例2]

【0048】

ナノ粒子製剤

プロドラッグ、共脂質 (co-lipid) 及び安定剤ポリマー (stabilizer polymers) (典型的には、1:1:2 w/wに基づく) を、エタノール/THF (4:1) に、40 mg/ml の濃度で溶解した。12/12/53/53 ml/分 (溶媒/水/水/水) に設定した流量 (flow rates) で4ポートCVIJミキサー (引用文献13、14) を使用して、溶媒を急速に水で希釈した。流量は、ハーバードアパラタスPHD2000シリンジポンプ (Harvard Apparatus PHD2000 syringe pumps) を使用してコントロールした。次に、結果として得られた溶液を水に対して透析して、残りの溶媒を除去した。最終的な薬剤濃度は、典型的には、およそ0.7 mg/mlであった。より高い濃度のものが必要なときには、透析した溶液を等量の600 mMのショ糖で希釈し、そして次に、100 kD、内径 (lumen) 0.5 mm、経路長60 cmのミッドギーフカートリッジ (MidGee hop cartridge) (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) を使用して蠕動ポンプで濃縮した。粒子径は、マルバーンゼータサイザーナノ ZSパーティクルサイザー (Malvern Zetasizer Nano-ZS particle sizer) を用いて決定し、容積重量データとして報告した。 20 30

【0049】

製剤は、溶媒1 mL当り40 mgの濃度で、それぞれ1:1:2の重量比のプロドラッグ、共脂質及び両親媒性安定剤からなった。より高い初期濃度のもの (> 40 mg/mL) の使用は、しばしば、下流の調製の操作を邪魔する大型の (large) 粒子の生産に導いた。共脂質は、トコフェロール コハク酸 (エステル) (VES) 又はプロセッシングを容易にするPOPCのどちらかであった。VESは、4での長期保存の際に沈殿したため、後半の製剤化では、VESをPOPCによって置き換えた。ポリ(エチレングリコール) b ポリスチレン (2 kPS 3 k又は2.5 kPS 3 k) を両親媒性安定剤として用いた。他の安定剤も使用することができる。瞬間 (フラッシュ) 沈殿法を使用して、平均的な粒子径を、プロドラッグ/VES/2 kPS 3 kナノ粒子については10から20 nmの範囲にし、そして、プロドラッグ/POPC/2 kPS 3 kナノ粒子については20から30 nmの範囲にした。 40

【0050】

4での長期保存の後に、ナノ粒子製剤の安定性を、HPLCによってモニターした。

【0051】

ナノ粒子を含有するサンプル (50 μL) を、150 μL の希釈剤 (メタノール:アセトニトリル、2:1 v/v) と、激しいボルテックス処理 (vigorous vortexing) によ 50

って混合し、次に $10000 \times g$ で 10 分間遠心分離した。227 nm での UV 検出によってモニターしたフェノメネクス Synergi Fusion 逆相解析カラム (Phenomenex Synergi Fusion reverse phase analytical column) を用いた定量のために、上清 ($20 \mu L$) をウォーターズ HPLC (Waters HPLC) の中に注入した。メタノールと 10 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.6) との移動相が、それぞれ、最初の溶媒混合液の 70 : 30 から 100 : 0 までの、1 mL / 分の勾配溶出で、クロマトグラフィーを実行した。カラムの温度を 30 に設定した。サンプルは、HPLC 解析の前に、オートサンプラーの区画中で 4 で維持した。

【0052】

POPC / 2 k P S 3 k で製剤化されたプロドラッグ 4、5、及び 6 (プロドラッグ : POPC : 2 k P S 3 k = 1 : 1 : 2) の緩衝化していない 300 mM ショ糖溶液の解析は、11 週間の保存後に、5% 未満のフリーのパクリタキセルの存在を示した。このレベルのフリーの薬剤は、コントロールの有効性実験において、抗腫瘍活性を有さないことを示した (データは示さない)。従って、安定性は、これらの研究において実施されたインビボ実験に十分であると考えられた。

【0053】

1 - 2 週間の保存の後にいくつかの製剤組成物で沈殿物を形成したプロドラッグ 8 を除いて、ショ糖溶液又は水のいずれかの中で 4 で保存されたナノ粒子製剤は、3 ヶ月間、物理的に安定であることが視覚的な検査によってわかった。また、VES を共脂質として使用する製剤は、コロイド状又は結晶状の沈殿物の緩やかな (slow) 形成も導いた (VES が水相に分離し、その後続いてナノ粒子の外へ沈殿することに起因すると思われる)。従って、VES 製剤は、短時間の実験のみに適し、有効性の評価などの長期間の実験には適していなかった。

【0054】

水、150 mM 生理食塩水又は 300 mM のショ糖の中において、プロドラッグ / 共脂質 / 2.5 k P S 3 k (1 : 1 : 2) のナノ粒子をボルテックス処理した後の粒子サイズの変化を検査することによって、製剤の物理的な安定性を研究した (表 1)。これら製剤は、20 と 30 nm との間の直径を有するナノ粒子を主に含んだ。力学的なストレスに対して感受性の粒子は、これらの条件に供したときには、凝集又は相分離を起こし、結果としてサンプル中において、より大型の (larger) 粒子が形成された。動的な光散乱 (dynamic light scattering) を使用して、粒子サイズの増加をモニターし、激しいボルテックス処理の前及び後のサンプルの Z 平均値 (粒度分布の強度加重平均サイズ (intensity weighted mean size)) を測定した。力学的な不安定性に起因する凝集物又は沈殿物の形成については、Z 平均値の変化を代用の読取り値 (surrogate readout) として用いた、ここで、Z 平均値についてのより高い値は、より高いレベルの凝集又は沈殿を示した (表 1)。POPC を共脂質として用いたナノ粒子は、塩存在下では、VES を用いて調製されたナノ粒子、又は共脂質の不在下で調製されたナノ粒子よりも顕著に安定的であることがわかった (プロドラッグ 5 の製剤に関するそれぞれの Z 平均 = 24、372、774 nm)。ほとんどのケースにおいて、力学的な安定性は、水と比較して、300 mM のショ糖存在下において顕著に改善された。Z 平均が 0 - 40 nm の範囲内であるショ糖サンプルは、ミクロンサイズの物質をほんの少ししか有さないか、又は、全く有さなかった (< サンプルの 2%)。これらの条件下 (Z 平均 = 100 - 200 nm) で、水および生理食塩水の中において高いレベルの凝集物を生産したいいくつかのプロドラッグ製剤 (プロドラッグ 3 及び 9) は、ショ糖中では安定であった (Z 平均 = 0 - 40 nm)。この研究の結論は、もっとも良い (best) 安定性が POPC 共脂質を使用して、300 mM のショ糖溶液に製剤化されたナノ粒子の状態で得られたということであった。

[表 1]

プロドラッグ製剤の物理的な安定性。全ての製剤を、プロドラッグ / 共脂質 / 2.5 k P S 3 k (1 : 1 : 2) ナノ粒子の水溶液として調製した。粒子の直径は、マルバーンナノ-Z

10

20

30

40

50

S パーティクルサイザー (Malvern Nano-ZS particle sizer) を用いて決定した容量重量平均 (volume weighted average) である。30 秒間ボルテックス処理の後、等容量の水、300 mM の生理食塩水又は 600 mM のショ糖で希釈したサンプルの Z 平均 (Z 平均) の変化を測定することによって安定性を評価した。

プロドラッグ	共脂質	直径 (nm)	$\Delta Z_{平均}$ (nm) 水	$\Delta Z_{平均}$ (nm) 150 mM 生理食塩水	$\Delta Z_{平均}$ (nm) 300 mM ショ糖
2	POPC	26	20	43	10
3	POPC	24	125	55	42
4	POPC	22	15	25	5
5	POPC	21	20	24	7
6	POPC	23	21	26	36
7	POPC	23	18	24	0
8	POPC	23	47	42	41
9	POPC	23	167	171	0
5	VES	7	3	372	10
5	-	28	109	774	71

10

20

【0055】

大型の (large) サンプル調製に必要な通常のプロセッシングステップにサンプルを供した時に、類似の結果が得られた。力学的なストレスに曝されたときに、水に製剤化されたナノ粒子、あるいは VES で製剤化されたナノ粒子、又は共脂質なしで製剤化されたナノ粒子は安定ではなく、膜分離法 (diafiltration) を使用する濃縮ステップの間に著しい沈殿物の形成を示した。濃縮の前に終濃度が 300 mM のショ糖でナノ粒子溶液を希釈することによって、製剤の濃縮する間の安定性を改善することができた。共脂質としての POPC の使用は、保存及び形成後プロセッシング (post-formation processing) の間の物理的安定性の更なる改善を提供し、上述の安定性の研究の結果と符合する。その後、この実験で使用した全ての濃縮サンプルは、共脂質としての POPC を基にし、300 mM のショ糖に調製した。これらの条件下において、沈殿物の形成は、8 mg/mL の薬剤の濃度までは無視することができた。

30

【0056】

エステルリンケージの相対的な不安定性に基づいて予測することができるように、ジグリコール酸 (エステル) リンケージは、コハク酸 (エステル) リンケージよりも加水分解に対してより感受性になることわかった。ジグリコール酸 (エステル) リンケージの増加した活性は、生物学的製剤サンプルのプロドラッグの正確な解析についての更なる問題 (difficulty) を提起した。1:4 (v:v) のメタノール:アセトニトリルは、ほぼ完全な血漿タンパク質の沈殿及びナノ粒子からのプロドラッグの遊離に有効であった。しかしながら、血漿サンプルをプロセッシングした後に、時の経過と共にフリーのパクリタキセルの定常的な (steady) 増加が観察され、このことは基質の精密解析 (matrix workup) 及び HPLC 解析の間における加水分解 (の進行) を意味した。ジグリコール酸 (エステル) プロドラッグ 6 は、9 時間後に完全に加水分解されたが、一方では、コハク酸 (エステル) プロドラッグ 2 は、68 時間後におよそ 25% まで減少した。酢酸塩で pH 4 にサンプルを緩衝化した時には、加水分解は観察されなかった。血漿不在下のプロドラッグ 6 / POPC / 2 k P S 3 k の緩衝化していないサンプルは、この加水分解を示さず、これら製剤におけるプロドラッグの時間依存的な加水分解は沈殿しない血漿構成要素の存在に起因する可能性が最も高いことを意味した。この結果は、プロドラッグは、粒子内にある

40

50

時は安定であり、そして、生体培地における加水分解はプロドラッグの放出後に行われることを示唆する。

[実施例 3]

インビトロ活性

【 0 0 5 7 】

M C F 7 ヒト腫瘍細胞系列 (cell line) は、American Type culture Collection (Manassas, VA) から購入した。A 2 7 8 0 ヒト腫瘍細胞系列は、European Collection of Cell culture (UK) から購入した。

【 0 0 5 8 】

細胞を 1 6 段階の濃度で、7 2 時間、段階希釈したプロドラッグ / P O P C / 2 . 5 k P S 3 k (1 : 1 : 2) ナノ粒子製剤に 3 回曝した。D M S O 添加の後、5 7 0 n m で、標準の 3 (4 , 5 ジメチルチアゾール 2 イル) 2 , 5 ジフェニルテトラゾリウムプロマイド (M T T) 検出法を使用して、生存可能な細胞を定量した。処理後の生存率は、未処理コントロールウェルに対する平均 (mean) パーセントとして表現される。

【 0 0 5 9 】

蒸留水に調製したプロドラッグ / P O P C / 2 . 5 k P S 3 k (1 : 1 : 2) で処理した A 2 7 8 0 及び M C F 7 ヒト腫瘍細胞を使用して、プロドラッグの細胞毒性の評価を実行した (表 2) 。プロドラッグを含まないコントロール製剤は、他のナノ粒子構成要素が細胞の成長阻害に寄与しないことが確認された。更に、いくつかの異なるナノ粒子製剤 (プロドラッグ 1 / V E S / 2 k P S 3 k ; プロドラッグ 1 / 2 k P S 3 k 、及びプロドラッグ 1 / Cremophor) を使用してプロドラッグ 1 を評価し、観察された活性が、使用される製剤のタイプと独立的事であったことを示した。

[表 2]

プロドラッグ / P O P C / 2 k P S 3 k (1 : 1 : 2) 製剤を用いたヒト腫瘍細胞系列の阻害

化合物	I C ₅₀ 値 (n M ± S D)	
	A 2 7 8 0	M C F - 7
パクリタキセル	2 . 4 ± 0 . 3	3 . 8 ± 0 . 6
プロドラッグ 1	1 9 2 ± 1 8	1 5 8 ± 7 2
プロドラッグ 2	7 5 . 1 ± 3 . 9	6 7 . 0 ± 5 . 9
プロドラッグ 3	2 5 . 3 ± 1 . 3	1 3 . 4 ± 2 . 4
プロドラッグ 4	2 8 . 4 ± 1 . 4	1 5 . 9 ± 0 . 7
プロドラッグ 5	2 0 . 9 ± 1 0 . 9	1 . 1 ± 1 . 5
プロドラッグ 6	2 9 . 0 ± 1 . 3	1 6 . 6 ± 4 . 5
プロドラッグ 7	2 9 . 5 ± 5 . 2	2 3 . 5 ± 1 . 3
プロドラッグ 8	2 7 . 0 ± 1 . 1	2 4 . 1 ± 0 . 6
プロドラッグ 9	3 4 . 7 ± 1 . 3	3 2 . 2 ± 1 . 3

【 0 0 6 0 】

A 2 7 8 0 及び M C F 7 細胞に対して、コハク酸 (エステル) とリンクした (succinate-linked) プロドラッグ (1 及び 2) は、フリーのパクリタキセルよりも ~ 1 2 桁 (オーダー) の大きさで弱い (less potent) ことがわかった。この傾向は、テストしたほとんどの細胞系列で観察された。観察された活性の減少は、コハク酸 (エステル) 基の加水分解に対する抵抗性の結果である可能性があった。それらに続くプロドラッグ (3 から 9) は、3 オキサ基の存在に起因して加水分解に対してより感受性になることが予測さ

れたジグリコール酸（エステル）リンカー部分で調製した。ジグリコール酸（エステル）プロドラッグは、全て、成長障害アッセイ（ $\sim 20 \text{ nM}$ ）において類似の効力（potency）を示し、そしてパクリタキセルのポジティブコントロールよりも、1桁の大ききだけ弱かった。コハク酸（エステル）アナログは、対応するジグリコール酸（エステル）プロドラッグよりも常に弱かった。例えば、A2780細胞系列において、パクリタキセルの 2.4 nM （ IC_{50} 値）に比べて、コハク酸（エステル）プロドラッグ1及びジグリコール酸（エステル）プロドラッグ3の IC_{50} 値は、それぞれ 192 nM 及び 25.3 nM であった。同様に、コハク酸（エステル）プロドラッグ2及びジグリコール酸（エステル）プロドラッグ4は、それぞれ、 75.1 、及び 28.4 の IC_{50} 値を有した。これら結果は、パクリタキセル、 $2'$ - O -ヘキサデカノイルパクリタキセル（ $2'$ - O hexadecanoylpaclitaxel）、及び $2'$ -（ $2''$ -プロモヘキサデカノイル）パクリタキセル（ $2'$ -（ $2''$ -bromohexadecanoyl）paclitaxel）に関するMCF-7乳癌細胞系列（MCF-7 breast carcinoma cell line）の IC_{50} 値が、それぞれ、 < 1 、 8600 、及び 70 nM として報告された、関連化合物の文献報告と一貫する（引用文献7）。

[実施例 4]

インビボにおけるナノ粒子の血漿排出

【 0061 】

胸腺欠損ヌードマウス（athymic nude mice）（ $n = 3$ / 時点）に、テストサンプル（ $10 \mu\text{l} / \text{g}$ 体重、最大量 $250 \mu\text{l}$ まで）を静脈注射した。指定した時点において、心臓への穿刺（cardiac puncture）によって血液を採取し、そしてEDTAでコートされたマイクロチューブ（BD Biosciences）に移した。チューブを 2800 rpm で10分間遠心分離した。血漿を回収し、そして $50 \mu\text{l}$ アリコット（aliquots）を試薬含有（量）に関してHPLCによって解析した。 ^3H -CHE含有サンプル（ $50 \mu\text{l}$ ）をピコフルオロ40（登録商標）シンチレーション液（PicoFluor40TM scintillation fluid）（Packard）で希釈し、そしてベックマン-コールターLS6500マルチパーパスシンチレーションカウンター（Beckman Coulter LS 6500 Multipurpose scintillation counter）でカウントした。体重グラム当りに 0.04125 ml の容量の血漿があると仮定して、血液区画におけるマウス当りの試薬の総量（カウント）を算出した。

【 0062 】

脂質ベースの粒子製剤からの親油性薬剤の分離速度は、一般的に、大量の（bulk）水性相（phase）に対する薬剤担体システムの透析によって決定される。これら環境下における薬剤の低い（low）水性の溶解度は、透析膜を通して溶出するよりはむしろ、薬剤が担体システムに戻る可能性が高いという結果となり、結果として不自然に低い（low）見かけ上の分離速度になる。このような実験は、インビボにおける疎水性薬剤に関して観察される挙動を正確に反映せず、インビボでは、フリーな薬剤は、送達ビヒクルに戻るよりはむしろ、存在する巨大な疎水性のリザーバー（large hydrophobic reservoir）（例えば、細胞膜又は親油性タンパク質）に急速に分離することができる。従って、透析実験は、これらの製剤の真の（true）送達能力を誤って示す。インビボにおける真の分離速度を決定するもっとも正確な手段は、交換不可能なマーカーを使用して薬剤及び粒子の両方を追跡することである。従って、そのようなマーカーを確認（ないし同定）すること、及びそれが粒子の薬物動態を反映することを確認することが必要不可欠であった。

【 0063 】

プロドラッグ及び粒子の両方を追跡する排出実験を実行して、インビボにおけるプロドラッグの分離する挙動のより正確な記載を得た（図1）。プロドラッグの排出は、HPLCによってフォローしたが、粒子排出速度は、ナノ粒子をトリチウム化コレステリルヘキサデシルエーテル（tritiated cholesterylhexadecyl ether）（ ^3H -CHE）でラベルすることによって決定した。このラベルは、これらシステムにおいて交換不可能であり、代謝不可能な脂質マーカーとみなされるので、インビボにおいて、リポソームを追跡することに広範囲に使用される。この粒子の完全性（integrity）が維持される場合には、こ

の分子の疎水性及び低いレベルの水和が、この実験で用いたナノ粒子からの低い分離速度に結果としてなるので、粒子の運命の評価を提供することが予測される。

【0064】

いくつかの実験を実行して、上述の仮説の妥当性及びおよその粒子の血漿排出速度を決定した。プロドラッグ1 / V E S / 2 k P S 3 k (1 : 1 : 2)、及びプロドラッグ2 / V E S / 2 k P S 3 k (1 : 1 : 2) の製剤を微量の (trace) ^3H -C H E でラベルし、そして、Foxn1^{nu}マウスにおいて、ラベル及びプロドラッグの両方の、血漿でのレベルをモニターした (図1、パネルA)。 ^3H C H E ラベルは、両方の群において、同様の速度でクリアされ (ないし除去され : cleared)、およそ24時間の半減期を有した。このシステムにおいて、プロドラッグ1は、 ^3H C H E とおよそ同一の速度でクリアされたが、これに対してプロドラッグ2は、顕著により早くクリアされた。プロドラッグ / ^3H C H E の比率の比較 (図1、パネルB) は、プロドラッグ1の粒子ラベルに対する比率が実験の過程にわたって実質的に変化しなかったことを実証し、分離半減期が実験期間よりも顕著に長いことを示唆した。およそ4時間の分離半減期と符合する速度で、 ^3H C H E と相対的に、プロドラッグ2は減少した。実験のデータは、4つのパラメーターの2重指数関数的な衰退に適合させることができ、おそらく、薬剤が個々の粒子の外へ分離した場合の局所的な環境の変化に対する応答において、分離速度が経時的にコンスタントに変化したことを暗示した。

10

【0065】

インビボにおけるプロドラッグ1 / 2 k P S 3 k、プロドラッグ1 / P O P C / 2 k P S 3 k 1 及び、 ^3H C H E でラベルされたプロドラッグ1 / V E S / 2 k P S 3 k (1 : 1 : 2) の製剤を用いてプロドラッグ1及び ^3H C H E の血漿排出を比較することによって、排出に対する製剤組成の影響を決定した (データは示さない)。3つの製剤全てについて、ラベルとプロドラッグの両方の排出速度は、図1においてプロドラッグ1に関して観察されたものと類似であることがわかり、これらの製剤において、プロドラッグ1の排出速度に対する共脂質の役割がほんの少ししかない (little) ことを示した。どちらもプロドラッグを含んでいない ^3H C H E でラベルされた2 k P S 3 k ミセル、及び P O P C / 2 k P S 3 k (1 : 2) のナノ粒子を使用して、更なる排出の実験を行った (データは示さない)。両方のケースにおいて、 ^3H C H E ラベルは、図1のプロドラッグ1について観察された速度と、およそ同一の速度でクリアされた。最後に、プロドラッグ1 / V E S / 3 k P S 3 k 及びプロドラッグ1 / V E S / 2 . 5 k P S 1 . 6 k の製剤を使用した実験は、安定剤であるポリ (エチレングリコール) / ポリスチレン (poly (ethylene glycol) / polystyrene) の比率の適度なバリエーションが、図1に見られる排出に対比してのプロドラッグ1の排出に関してほんの少しの影響しか有さないことを示した (データは示さない)。

20

30

【0066】

これらの製剤におけるプロドラッグ1の排出は、共脂質及び安定剤の組成と独立的であることがわかり、そして、経時的な ^3H C H E マーカーの喪失 (loss) に対応した。これらの結果は、 ^3H C H E ラベルが、薬物動態実験を通して粒子と一緒に残り、粒子の組成における変化とは独立的であることを示唆する。これらの粒子の循環半減期は、著しく長く (およそ24時間)、これら濃度で他のポリマーを使用して調製されたミセルに関して報告されている [循環半減期] よりも1桁の大きさだけ (an order of magnitude) より長く、そして、長期間循環を有する (long-circulating) リボソームで観察される循環半減期に匹敵した。

40

【0067】

血漿の薬剤排出に対するプロドラッグの分離の影響を決定した。プロドラッグのパネル (prodrug panel) は、Foxn1^{nu}マウスにおいて、プロドラッグ / P O P C / 2 k P S 3 k (1 : 1 : 2) ナノ粒子を使用してスクリーンし (screened)、異なるプロドラッグのコンジュゲートの排出速度を決定した (図2)。プロドラッグの循環レベルは、主にプロドラッグの分離速度に依存的であると思われ、そして、粒子は実験の過程にわたって完全な

50

まま (intact) 残るためには十分に安定であるので、結果的には、この速度を間接的に反映した。コンジュゲートは、0.7 mg/mL の濃度で製剤化した。プロドラッグ 1 / VES / 2.5 kPS 1.6 k (1:1:2) の血漿排出は、3 - 25 mg/kg の範囲にわたる投与量とはほとんど (largely) 独立的であるため、濃度のバリエーションが粒子の排出速度に影響を与えるようには思えなかった (データは示さない)。

【0068】

各プロドラッグの分離半減期の評価をするために、プロドラッグ 1 が上述の議論された結果に基づく粒子排出速度を追従する (track) ものと推定 (assumed) した。次に、全ての他のプロドラッグの排出を、4つのパラメーターの二重指数関数的な減衰曲線 (four parameter double exponential decay curves) に適合させ、そしてプロドラッグ 1 に対して規格化した。製剤におけるプロドラッグの存在又は不在は、粒子の排出挙動に顕著に影響を与えず、薬剤を排出した場合の組成の経時的な変化が、粒子排出速度に影響を及ぼさなかったことを暗示する。従って、プロドラッグ 1 に対して規格化されたプロドラッグの排出は、これらの製剤におけるプロドラッグの相対的な分離半減期の合理的な近似値 (approximation) を生じた。

10

【0069】

プロドラッグ 1 は、24 時間に亘って (over)、無視することが可能な程度の (negligible) 分離速度を有したが、これに対して、この組成のプロドラッグ 2 は、およそ 1.7 時間の半減期で外に分離した。これらのプロドラッグの両方は、コハク酸 (エステル) クロスリンカーを使用しており、インビトロにおいてパクリタキセルよりも活性が著しく少なかった (less)。これらの化合物のジグリコール酸 (エステル) のバージョン (それぞれプロドラッグ 3 及び 4) は、それらのコハク酸 (エステル) 母体 (succinate parents) に対して加速された排出を示し、それぞれおよそ 1.3 時間及び 1 時間の分離半減期を有した。このことは、ジグリコール酸 (エステル) リンケージの 3 オキサ基の存在に起因する水性相への分離の際の増加した水和のレベルと符合する。

20

【0070】

それぞれ、オレイル (C18)、ステアリル (C18)、コサニル (C20) 及びコサニル (C22) 部分 (moiety) を有するシリーズであるプロドラッグ 4、5、6 及び 7 を使用して、脂質アンカーのサイズの小さな変化の影響を決定した。図 2 の結果に基づいて、本願発明者らは、これらのプロドラッグの分離半減期がそれぞれ、およそ 1 時間、1.7 時間、6.5 時間、そして 10 時間になることを評価した (estimated)。これらの結果は、ナノ粒子からのプロドラッグの放出を、使用されるアルキルアンカーの長さを調節することによって制御することができることを示す。

30

【0071】

また、分離キネティクス (partitioning kinetics) に対する他の一般的な脂質のタイプの影響も調査した。コレステリルジグリコール酸 (エステル) (cholesteryl diglycolate) コンジュゲート (プロドラッグ 8) は、直鎖脂肪族種よりもかなり長く保持され、およそ 21 時間の見積もられた分離半減期を有した。残念なことに、プロドラッグ 8 は、保存の際にナノ粒子からの相分離を受け易く、そして、この研究における後の有効性実験において、十分に (fully) 評価されなかった。1、2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - コハク酸 (エステル) 誘導体 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-succinate derivative) (プロドラッグ 9) は、それが 2 つの C14 アンカーを有するので、プロドラッグ 7 よりも良く (better) 保持されるであろうという予測 (anticipation) の下に評価したが、しかしながら、それはより早く外に分離され、8.5 時間の半減期を有した。より高い分離速度は、ナノ粒子の外への交換の間のグリセロールバックボーン (glycerol backbone) 上の増加したレベルの水和に起因するようには思われた。

40

[実施例 5]
インビボ効果

【0072】

50

メスの胸腺欠損ヌードマウス（7 - 8週齢）に、100 μ l のHT29ヒト結腸癌細胞（ 2×10^6 細胞）を26ゲージの針を使用して皮下に接種した。最初の処置の前に、80及び120mgの間の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為にグループ分けした（ $n = 6$ /グループ）（200mgを超えた腫瘍、及び30mgより小さい腫瘍[の個体]は除いた）。テストサンプルを、10 μ l 薬剤 / g 体重の容量（最大250 μ l まで）で注射した。その後の注射は、指定されたスケジュールに従って実行した。腫瘍の長さ（length）及び幅（width）の測定値、体重、そして、生存確認（life observations）は、週当たり2 - 3回記録した。腫瘍の重さは、式（ $L \times W^2$ ） / 2に従って算出した。

【0073】

プロドラッグ1、2、4、5、6及び7のナノ粒子製剤の相対的な有効性を、Q4D x 6 [4日ごとに6回]のスケジュールで、36 μ mol / kgの投与量を使用して、HT29モデルにおいて決定した（図3）。生理食塩水をネガティブコントロールとして用いた。サブ最大投与量（sub-maximal dose）で実行した初期の実験は、この投与量がポジティブ及びネガティブコントロール群の挙動をひとまとめにする（bracketing）応答の範囲に結果としてなること、そして、この仕方において、個々のプロドラッグ種の相対的な治療の効力（potencies）の識別が可能であることを示唆した。プロドラッグ8は、保存の際の製剤からの薬剤の沈殿のため、この実験に含まなかった。プロドラッグ3及び9は、それらの分離半減期がプロドラッグ6及び7に類似したので、同様に除いた。

【0074】

コハク酸（エステル）が連結した2つのプロドラッグ（プロドラッグ1及び2）は、34 μ mol / kgの投与量では、いずれの治療的活性の証明も示さなかった。その結果は、インビトロ細胞成長阻害アッセイにおいて、これらのプロドラッグがバクリタキセルよりも効き目が1 - 2桁の大きさで（1-2 order of magnitude）弱かった（less potent）という観察結果（observation）と関連した（表2）。プロドラッグ2及び1の分離半減期は大幅に異なり、プロドラッグ2が有する1.7時間から、プロドラッグ1が有する効率的には交換不可能（non-exchangeable）（実験的な時間枠内では）の範囲にわたった。これらの結果は、コハク酸（エステル）が連結した種2（species 2）が細胞に対して作用可能（available）にされても、より低い（lower）加水分解速度及び[該加水分解に]付随する（concomitant）バクリタキセルの放出が有意義な治療的応答を提供することには十分でないということを示す。

【0075】

予備のインビボでの粒子分布の実験は、腫瘍の蓄積レベルが腫瘍組織のg当りの注射された投与量の~3%でのプラトー（plateau）を示し、蓄積の大部分が最初の8時間以内に発生した。類似の結果は、文献において報告されている。分離半減期が、それぞれ、およそ1及び1.7時間であるプロドラッグ4及び5のようなプロドラッグのケースにおいて、腫瘍に送達される薬剤のレベルが著しくより低い（lower）ことが予測され、これらの種で観察される減少した有効性におそらく関連する。プロドラッグ6及び7は、より緩やかな（slower）速度で薬剤を放出し、それぞれおよそ6.5及び10時間の分離半減期を有する。腫瘍における粒子の蓄積は、全てのケースで類似となることが予測されるので、これらのプロドラッグを有する製剤は、より多くの（more）薬剤を腫瘍に送達することができる。

【0076】

ジグリコール酸（エステル）が結合した4つの種（プロドラッグ4、5、6及び7）は、全て、腫瘍成長の阻害の度合いが変わるという結果となった。これらのプロドラッグのインビトロでの成長阻害の実験は、ジグリコール酸（エステル）連結プロドラッグの細胞毒性が、それらのコハク酸（エステル）アナログよりも大きかったことを実証した（表2）。これらの製剤の排出データは、脂肪族の鎖の長さがプロドラッグの分離半減期と関連したことを示し、それぞれ、1時間、1.7時間、6.5時間、及び10時間であった。このことは、観察された有効性の傾向と良く（well）相関し、最高の抗腫瘍応答は、もっとも長い分離半減期をもつプロドラッグ、すなわち、ドコサニルコンジュゲート7（プロ

10

20

30

40

50

ドラッグ7)で観察される。平均の腫瘍サイズが 500 mm^3 に到達することに遅延を誘導させる処理を用いて、相対的な有効性を決定し、それぞれ3、4、15、及び17日の値を得た。これらの結果に基づいて、使用するプロドラッグ7のナノ粒子製剤の投与量及びスケジュールを最適化する更なる研究を実行した。

[実施例6]

プロドラッグ7の有効性に対する投与量の影響

【0077】

HT29腫瘍モデルにおいて、パクリタキセルの0.25から3モル当量までの範囲にわたる投与量の有効性を、比較することによって、パクリタキセルに対比してのPOPC/2.5kPS3kナノ粒子製剤のプロドラッグ7の活性を決定した(図4)。Q2D×5スケジュールで、 $23\text{ }\mu\text{mol/kg}$ で投与されたタキソール(登録商標)をポジティブコントロールとして用いた。プロドラッグ7に関する最大の(greatest)有効性がQ2Dスケジュールにおいて観察され(タキソール(登録商標)にもまた最適であった)、かつ、このタキソール(登録商標)投与量での最大許容処置単位(maximum tolerated treatment course)は、5回の注射であったので、該投与処方を選択した。このスケジュールでのプロドラッグ7の最大許容投与量(maximum tolerate dose: MTD)は、およそ3[倍]パクリタキセル当量であった($69\text{ }\mu\text{mol/kg}$)。

10

【0078】

2つの方法によって腫瘍成長データを解析し、どれほどのプロドラッグ7の投与量がタキソール(登録商標)ポジティブコントロールと同等であるかを決定した。第1の方法では、腫瘍退縮という結果になった処理群のみを考察した。腫瘍サイズが 125 mg に到達することにおける遅延は、処置の開始から測定し、次に、タキソール(登録商標)群で観察された遅延に対して規格化した。相対的な遅延を、プロドラッグ7のパクリタキセル投与当量に対してプロットし、プロドラッグ7のMTDまでの線形の(linear)投与量応答を示したデータセットを得た。適合曲線(fitted curve)は、プロドラッグ7が、パクリタキセルの1.75投与当量の投与量において、タキソール(登録商標)と同等(parity)を達成することを示した。第2の方法では、腫瘍サイズが 300 mg に到達することにおける遅延を生理食塩水のネガティブコントロールと相対的に測定し、そして次に、タキソール(登録商標)群で観察された遅延に対して規格化した。プロドラッグ7のパクリタキセル投与当量に対する相対的な遅延をプロットすることは、再び線形の投与量応答を生じ、タキソール(登録商標)群との同等性(parity)がプロドラッグ7の1.65パクリタキセル当量で達成されたことを示した。重要なこととして、プロドラッグ7のナノ粒子製剤(MTDは $69\text{ }\mu\text{mol/kg}$)が、2モル[sic, 3 molar]パクリタキセル当量($69\text{ }\mu\text{mol/kg}$)で投与されたときには、抗腫瘍活性は、MTDで投与されたタキソールを用いて達成された活性よりも著しく高かった(greater)。特に、MTDのタキソール(登録商標)で処理した腫瘍が 300 mg 近くまで成長したと対照的に、MTDのプロドラッグ7のナノ粒子製剤で処理された腫瘍は、60日目において 50 mg 未満のままであった(図4)。

20

30

【0079】

図5は、タキソール(登録商標)と同等に達するプロドラッグ7のパクリタキセル当量数の算出を示す。

40

【0080】

プロドラッグ7のナノ粒子の有効性に対する投与量の影響は、タキソール(登録商標)と対比して評価した。最適な治療応答は、HT29固形腫瘍モデルにおいて、Q2Dの投与(ないしドージング:dosing)で観察された。プロドラッグ7の製剤化に使用したナノ粒子はおよそ24-36時間の排出半減期を有するが、その一方では、プロドラッグ7自体はおよそ10時間の分離半減期を有する。これらの値は、投与後およそ2日の期間にわたる(over)腫瘍サイトにおける効果的なプロドラッグの放出と符号し、Q2Dスケジュールと合致する。MTDでのタキソールと比較した、0.25から3倍パクリタキセル当量までの薬剤投与量の変化(titration)は、プロドラッグ7が、およそ1.7パクリタ

50

キセル当量で、同等の有効性を達成したことを示した。プロドラッグ7の容量応答は、MTDまで線形上昇型 (linear up) であるため、より高い (higher) 投与量のプロドラッグ7を使用して、有効性を最大許容投与量のタキソール (登録商標) を上回って有意に改良することが可能である。ナノ粒子にプロドラッグ7よりもより良く (better) 保持されるプロドラッグは、プロドラッグ7で観察された投与量よりも低い投与量ですら同等性を達成するだろう。

【 0 0 8 1 】

[引用文献]

- (1) Hennenfent, K.L.; Govindan, R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?, *Ann. Oncol.* 2006, 17, 734-749 10
- (2) Hamaguchi, T.; Matsumura, Y.; Suzuki, M.; Shimizu, K.; Goda, R.; Nakamura, I.; Yokoyama, M.; Kataoka, K.; Kakizoe, T. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel, *Br. J. Cancer* 2005, 92, 1240-1246
- (3) Ansell, S. Lipophilic drug derivatives for use in liposomes. U.S.特許 5,534,499 (1996)
- (4) Hostetler, K. Y.; Sridhar, N.C. Prodrugs for oral administration containing Taxol covalently bound to a phospholipid. U.S.特許 5,484,809 (1996)
- (5) Stevens, P.J.; Sekido, M.; Lee, R.J. A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm. Res.* 2004, 21, 2153-2157 20
- (6) Perkins, W.R.; Ahmad, I.; Li, X.; Hirsh, D.J.; Masters, G.R.; Fecko, C.J.; Lee, J.K.; Ali, S.; Nguyen, J.; Schupsky, J.; Herbert, C.; Janoff, A.S.; Mayhew, E. Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int. J. Pharm.* 2000, 200, 27-39
- (7) Ali, S.; Ahmad, I.; Peters, A.; Masters, G.; Minchey, S.; Janoff, A.S.; Mayhew, E. Hydrolyzable hydrophobic taxanes: synthesis and anti-cancer activities. *Anticancer Drugs* 2001, 12, 117-128
- (8) Lundberg, B. B.; Risovic, V.; Ramaswamy, M.; Wasan, K.M. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J. Control. Release* 2003, 86, 93-100 30
- (9) Rodrigues, D.C.; Maria, D.A.; Fernandes, D.C.; Valduga, C.J.; Couto, R.D.; Ibanez, O.C.M.; Maranhao, R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2005, 55, 565-576
- (10) Zakharian, T.Y.; Seryshev, A.; Sitharaman, B.; Gilbert, B.E.; Knight, V.; Wilson, L.J. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization and study of biological activity in tissue culture. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12508-12509
- (11) Bradley, M.O.; Webb, N.L.; Anthony, F.H.; Devanesan, P.; Witman, P.A.; Hemamalini, S.; Chander, M.C.; Baker, S.D.; He, L.; Horwits, S.B.; Swindell, C.S. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7, 3229-3238 40
- (12) Deutsch, H.M.; Glinski, J.A.; Hernandez, M.; Haugwitz, R.D.; Narayanan, V.L.; Suffness, M.; Zalkow, L.H. Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 788-792
- (13) Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Flash nanoprecipitation of organic actives and block copolymers using a confined impinging jets mixer. *Aust. J. Chem.* 2003, 56, 1021-1024 50

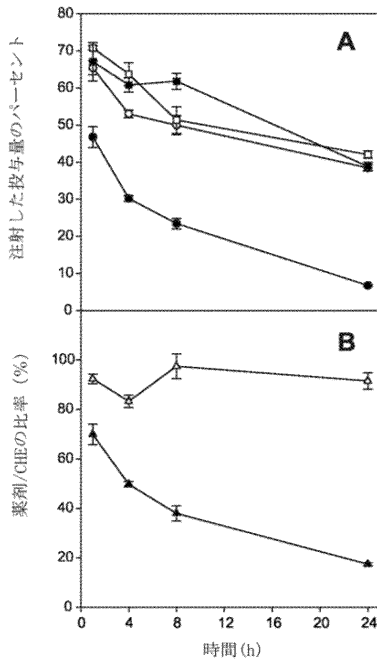
- (14) Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* 2003, 91, 118302
- (15) Fetterly, G.J.; Straubinger, R.M. Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats, *AAPS PharmSci* 2003, 5, 1-11
- (16) Sparreboom, A.; Scripture, C.D.; Trieu, V.; Williams, P.J.; De, T.; Yang, A.; Beals, B.; Figg, M.; Hawkins, W.D.; Desai, N. Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in cremophor (Taxol). *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 4136-4143
- (17) Sparreboom, A.; van Zuylen, L.; Brouwer, E.; Loos, W.J.; de Bruijn, P.; Gelderblom, H.; Pillay, M; Nooter, K.; Stoter, G.; Verweij, J. Cremophor EL-mediate d alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res.* 1999, 59, 1454-1457

10

【 図 1 】

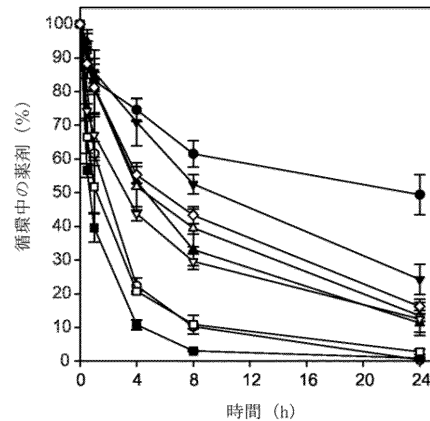
パネルA: 35mg薬剤/kg投与量で投与した胸腺欠損ヌードマウスFoxn1における、³H-CHE(それぞれ□及び■)ラベルした、プロドラッグ/VES/2kPSS3k(1:1:2;w/w)の製剤のプロドラッグ1(O)及びプロドラッグ2(●)の排出(n=3/時点)。薬剤濃度は、様々な時点で回収した血漿のHPLC解析によって決定した。

パネルB: 相対的な薬剤の保持力は、プロドラッグ1及びプロドラッグ2のシステム(それぞれ△及び▲)について、個々のマウスにおける薬剤/³H-CHEの比率を使用して決定した。相対的な薬剤の保持力を決定した。エラーバーは、標準偏差を示す(n=3)。



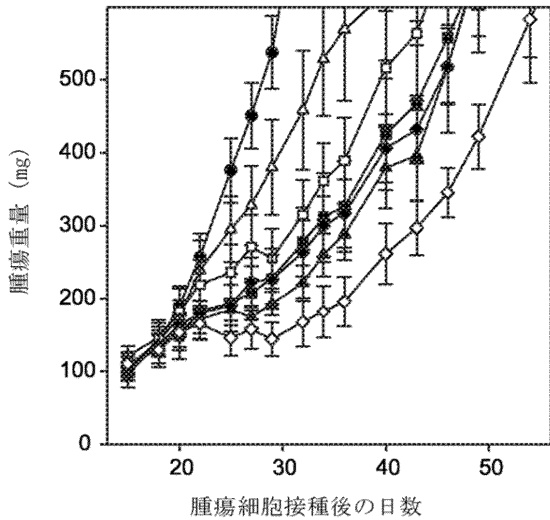
【 図 2 】

プロドラッグ/POPC/2kPSS3k(1:1:2;w/w)製剤として製剤化され、7mg/kgの投与量で胸腺欠損ヌードマウスFoxn1へ静脈内に投与されたプロドラッグの排出(n=3/時点)。薬剤濃度は、様々な時点で単離した血漿のHPLC解析によって決定した。使用したプロドラッグは、1(●);2(O);3(◇);4(■);5(□);6(▲);7(△);8(▼);及び、9(▽)であった。エラーバーは、標準偏差を示す(n=3)。



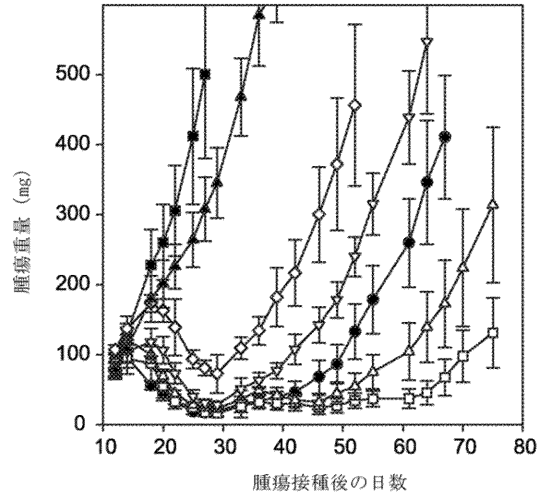
【 図 3 】

HT29ヒト結腸癌異種移植を受けた胸腺欠損ヌードマウスに投与したときの、プロドラッグ/POPC/2kPS3k(1:1:2;w/w)ナノ粒子として製剤化されたプロドラッグの相対的影響。Q4Dx6のスケジュールを使用して36μmol/kgの投与量で薬物を投与した。プロドラッグ及びコントロールは、生理食塩水(●)、1(□)、2(▲)、4(▽)、5(◆)、6(O)、7(■)である。エラーバーは、標準偏差を示す(n=6)。



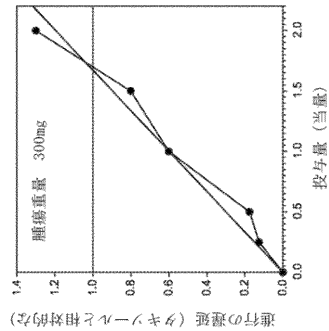
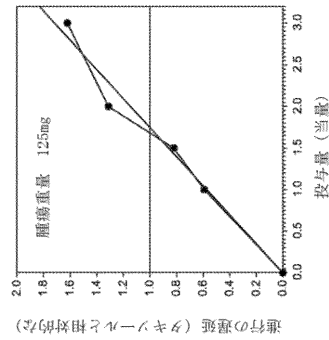
【 図 4 】

HT29ヒト結腸癌モデルにおける、プロドラッグ7/POPC/2kPS3kナノ粒子の有効性に対する投与量の影響。胸腺欠損ヌードマウスに腫瘍細胞接種の14日後に製剤を静脈内に注射した。プロドラッグ7/POPC/2kPS3k(1:1:2)を69μmol/kg(3xバクリタキセル当量、□)、46μmol/kg(2xバクリタキセル当量、△)、34μmol/kg(1.5xバクリタキセル当量、▽)、23μmol/kg(1xバクリタキセル当量、◇)及び、5.7μmol/kg(0.25xバクリタキセル当量、▼)で、Q2Dx5スケジュールを使用して投与した。生理食塩水(Q2Dx5、■)をネガティブコントロールとして使用した。タキソール(登録商標)を、23μmol/kgでQ2Dx5(●)の投与スケジュールを使用して投与した。エラーバーは、標準偏差を示す(n=6)。

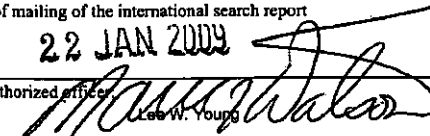


【 図 5 】

タキソール(登録商標)と同等に達するために必要なプロドラッグ7のバクリタキセル当量濃度の算出。腫瘍成長データを2つの方法によって解析し、どれほどのプロドラッグ7の投与量がタキソール(登録商標)ポジティブコントロールと同等であるかを決定した。腫瘍サイズが300mgに到達することにおける遅延を生理食塩水のネガティブコントロールと相対的に測定し、そして次に、タキソール(登録商標)群で観察された遅延に対して規格化した。プロドラッグ7のバクリタキセル投与当量に対する相対的な遅延をプロットすることは、線形の投与量応答を生じ、タキソール(登録商標)群との同等性がプロドラッグ7の1.65バクリタキセル当量で達成されたことを示した。腫瘍サイズが125mgに到達することにおける遅延は、処置の開始から測定し、次に、タキソール(登録商標)群で観察された遅延に対して規格化した。相対的な遅延を、プロドラッグ7のバクリタキセル投与当量に対してプロットし、プロドラッグ7のMTDまでの線形の(linear)投与量応答を示したデータセットを得た。適合曲線は、プロドラッグ7がバクリタキセルの1.75投与当量の投与量において、タキソール(登録商標)と同等を達成することを示した。



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/85030
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/127 (2009.01) USPC - 424/450 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) USPC: 424/450 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/449,510 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) US WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar, Dialog PRO(Engineering) pacitaxel, taxol, formulation, composition, prodrug, conjugate, linker, glycolate, micelles, nanoparticles		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0191179 A1 (JOSHI-HANGAL et al.) 09 October 2003 (09.10.2003) para [0031]-[0034], [0037], [0077], [0106]-[0110].	1-3,11
Y	US 6,291,690 B1 (MAYHEW et al.) 18 September 2001 (18.09.2001) col 1, ln 9-14; col 1, ln 63 to col 2, ln 3; col 2, ln 10-25, ln 32-40; col 2, ln 66 to col 3, ln 12.	1-3,11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2009 (12.01.2009)		Date of mailing of the international search report 22 JAN 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer  Lisa W. Young PCT Helpdesk: 671-272-4300 PCT OSF: 671-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/85030

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/34 (2006.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	9/127 (2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	47/32 (2006.01)	A 6 1 K	47/32

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 ジョンストン、シャロン
 アメリカ合衆国、ニュー ジャージー 0 8 5 4 0、プリンストン、カレッジ ロード イースト 3 0 3 B
- (72)発明者 タルディ、ポール
 アメリカ合衆国、ニュー ジャージー 0 8 5 4 0、プリンストン、カレッジ ロード イースト 3 0 3 B
- (72)発明者 メイヤー、ローレンス
 アメリカ合衆国、ニュー ジャージー 0 8 5 4 0、プリンストン、カレッジ ロード イースト 3 0 3 B

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA30 AA95 BB11 CC27 CC42 DD15F DD37A DD43A DD44A
 DD59A DD70A EE03Q EE23Q EE48Q EE59A FF01 FF11 FF16 FF31
 FF36
 4C084 AA19 MA24 MA43 NA05 NA12 NA13 NA15 ZB261
 4C086 AA01 AA02 BA02 MA02 MA03 MA04 MA05 MA07 MA08 MA09
 MA24 MA43 NA05 NA12 NA13 NA15 ZB26