

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5645954号
(P5645954)

(45) 発行日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)

(24) 登録日 平成26年11月14日 (2014. 11. 14)

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl. | F 1 |
| A 6 1 K 31/4745 (2006. 01) | A 6 1 K 31/4745 |
| A 6 1 K 47/24 (2006. 01) | A 6 1 K 47/24 |
| A 6 1 K 47/28 (2006. 01) | A 6 1 K 47/28 |
| A 6 1 K 9/127 (2006. 01) | A 6 1 K 9/127 |
| A 6 1 K 47/34 (2006. 01) | A 6 1 K 47/34 |

請求項の数 25 (全 24 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2012-541296 (P2012-541296) |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年12月3日 (2009. 12. 3) |
| (65) 公表番号 | 特表2013-512262 (P2013-512262A) |
| (43) 公表日 | 平成25年4月11日 (2013. 4. 11) |
| (86) 国際出願番号 | PCT/CN2009/075298 |
| (87) 国際公開番号 | W02011/066684 |
| (87) 国際公開日 | 平成23年6月9日 (2011. 6. 9) |
| 審査請求日 | 平成24年12月3日 (2012. 12. 3) |

前置審査

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 510166892 |
| | ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ ー リミテッド |
| | J I A N G S U H E N G R U I M E D I C I N E C O . , L T D . |
| | 中華人民共和国 ジェンス 222002 |
| | リエンユンガン エコノミック・アンド ・テクノロジカル・ディベロップメント・ ゾーン クンルンジャン ロード ナンバ ー7 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イリノテカン又はその塩酸塩のリポソーム及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソームであって、当該リポソームがイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩、中性リン脂質及びコレステロールを含有し、コレステロールと中性リン脂質との重量比が1：3～5であり、当該中性リン脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリンであり、

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩に対する中性リン脂質の重量比が下記のとおりであることを特徴とするリポソーム。

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩 1
中性リン脂質 2～5

【請求項 2】

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩に対する中性リン脂質の重量比が下記のとおりであることを特徴とする請求項 1 に記載のリポソーム。

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩 1
中性リン脂質 2.5～4

【請求項 3】

前記コレステロールと中性リン脂質との比が1：3.5～4.5であることを特徴とする請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 4】

前記コレステロールと中性リン脂質との比が1：4であることを特徴とする請求項 1～3

のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 5】

前記リポソームがイオン勾配法により製造されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 6】

前記リポソームがリポソームの内部水相と外部水相との間に緩衝液によって形成されるイオン勾配を有することを特徴とする請求項 5 に記載のリポソーム。

【請求項 7】

緩衝液によって形成されるイオン勾配を有し、前記リポソームの内部水相が外部水相より高いイオン濃度を有することを特徴とする請求項 5 に記載のリポソーム。

10

【請求項 8】

前記リポソームがさらに親水性ポリマー脂質誘導体含有することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 9】

前記リポソームがさらに DSPE-PEG2000 を含有することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 10】

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩に対する親水性ポリマー脂質誘導体の重量比が 0.2 ~ 0.4 であることを特徴とする請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 11】

前記リポソームがさらに荷電リン脂質を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のリポソームであって、前記荷電リン脂質がジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジン酸、ジミリストイルホスファチジン酸、ジステアロイルホスファチジン酸及びこれらの混合物からなる群より選ばれ、荷電リン脂質と中性リン脂質の重量比が 1 : 5 ~ 1 : 100 であることを特徴とするリポソーム。

20

【請求項 12】

前記リポソームが下記の成分重量比から成り、コレステロールと水素添加大豆ホスファチジルコリンとの比が 1 : 4 であることを特徴とする請求項 1 に記載のリポソーム。

30

イリノテカン塩酸塩 1

水素添加大豆ホスファチジルコリン 3.4 ~ 3.8

ポリエチレングリコール 2000 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン
0.34 ~ 0.38

コレステロール 0.8 ~ 0.95

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の前記リポソームの製造方法であって、当該製造方法が下記の工程を含むことを特徴とする方法：

[1] 下記 A ~ D のいずれか 1 種の方法による空リポソームの製造：

40

(A) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールと tert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合し、減圧蒸留によりエタノールを除去した後、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(B) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、クロロホルム又はクロロホルム - メタノール混合溶媒中に溶解し、ロータリーエバポレーターにより脂質フィルムを形成させ、水和させるため緩衝液を添加し、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

50

(C) 所望の処方に応じて、中性リン脂質、コレステロール及び緩衝液を混合した後、高圧ホモジナイザー及び/又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(D) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールとtert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合した後、高圧ホモジナイザー及び/又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

[2] 空リポソームの内部水相と外部水相との間のイオン勾配の形成；

空リポソームの外部水相を置換し、空リポソームの内部水相と外部水相との間にイオン勾配を形成させる；

[3] 薬物積載リポソームの製造；

イリノテカン塩酸塩の水溶液を調製し、当該水溶液を、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した後、当該分散液を加温及び攪拌下恒温放置し、薬物積載リポソームを得る。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の製造方法であって、当該方法が、薬物積載リポソームを製造する工程 [3] の後に下記の工程を含むことを特徴とする方法；

[4] 遊離薬物の除去及び試料の濃縮；

イリノテカン塩酸塩リポソームに緩衝媒体を添加し、接線流装置を使用して非封入薬物を除去して、試料を適当な体積に濃縮する。

【請求項 1 5】

前記緩衝液が、Na⁺、K⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Li⁺、NH₄⁺及びH⁺イオン塩並びにこれらの混合物を含む緩衝液からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の製造方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソームを含むリポソーム注射剤。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のリポソーム注射剤であって、当該注射剤が安定剤を含み、当該安定剤がエチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸 2 カルシウム並びにこれらの混合物からなる群より選ばれ、添加される安定剤の比率は0~0.5% (w/v) であるが、最小量は0%ではないことを特徴とする注射剤。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に記載のリポソーム注射剤であって、当該注射剤が安定剤を含み、当該安定剤がエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムであり、添加される安定剤の比率は0~0.5% (w/v) であるが、最小量は0%ではないことを特徴とする注射剤。

【請求項 1 9】

前記注射剤が液体注射剤又は注射用凍結乾燥粉末であることを特徴とする請求項 1 6 に記載のリポソーム注射剤。

【請求項 2 0】

請求項 1 6 に記載のリポソーム注射剤であって、当該注射剤が浸透圧調整剤を含有し、当該浸透圧調整剤がグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウム、グリセリン、ヒスチジン及びその塩酸塩、グリシン及びその塩酸塩、リジン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、バリン並びにこれらの混合物からなる群より選ばれ、添加される浸透圧調整剤の比率は0~5% (w/v) であるが、最小量は0%ではないことを特徴とする注射剤。

【請求項 2 1】

請求項 1 6 に記載のリポソーム注射剤であって、当該注射剤がさらに抗酸化剤を含有し、当該抗酸化剤が水溶性抗酸化剤及び油溶性抗酸化剤からなる群より選ばれ、前記油溶性抗酸化剤は - トコフェロール、コハク酸 - トコフェロール、酢酸 - トコフェロール

10

20

30

40

50

及びこれらの混合物からなる群より選ばれ、前記水溶性抗酸化剤はアスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、L-システイン及びこれらの混合物からなる群より選ばれ、添加される抗酸化剤の比率は0~0.5% (w/v) であるが、最小量は0%ではないことを特徴とする注射剤。

【請求項 2 2】

前記注射剤が注射用凍結乾燥粉末であり、当該粉末が凍結乾燥保護剤を含有し、凍結乾燥により製造されることを特徴とする請求項 1 9 に記載のリポソーム注射剤。

【請求項 2 3】

前記注射剤が下記の成分重量比から成り、コレステロールと水素添加大豆ホスファチジルコリンとの比が1:4であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の注射剤。

イリノテカン塩酸塩 1

水素添加大豆ホスファチジルコリン 3.4~3.8

ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン
0.34~0.38

コレステロール 0.8~0.95

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.05~0.09

【請求項 2 4】

請求項 1 3 又は 1 4 に記載の製造方法を含むことを特徴とする請求項 1 5 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のリポソーム注射剤の製造方法。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の製造方法であって、当該製造方法がさらに下記の工程を含むことを特徴とする方法：

体積の計量、滅菌及び小包装：リポソームの薬物濃度を調整し、体積を計量し、濾過滅菌し、バイアル瓶に充填及び密封してリポソーム注射剤を得る；又は、

リポソーム薬物試料に凍結乾燥保護剤を加え、薬物濃度を調整し、体積を計量し、濾過滅菌し、バイアル瓶に充填及び密封した後、凍結乾燥して、注射用凍結乾燥粉末を得る。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イリノテカン又はその塩酸塩のリポソーム及びその製造方法、並びに当該リポソームを含有する注射剤及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イリノテカンはカンプトテシンの半合成誘導体である。カンプトテシンはトポイソメラーゼ I に特異的に結合し、可逆的な DNA 一本鎖切断を誘導した後、DNA 二本鎖構造を巻き戻す。イリノテカン及びその活性代謝物である SN-38 は、トポイソメラーゼ I - DNA 複合体と結合することにより、一本鎖となった断裂部の再結合を妨げる。イリノテカンの細胞傷害性は、レプリカーゼとトポイソメラーゼ I - DNA - イリノテカン (又は SN-38) の三者複合体との相互作用に起因し、これが DNA 合成において DNA 二本鎖を切断するということが示されている。

【0003】

イリノテカン塩酸塩は明らかな薬理作用及び臨床効果という利点を有し、悪性腫瘍の治療に広く使用されている。しかしながら他のカンプトテシン誘導体と同種の問題がある：すなわち、イリノテカン構造中の飽和ラクトン環は pH 依存性であり、生理的条件下で可逆的にカルボン酸型に変換され、抗腫瘍活性が減弱する。イリノテカン塩酸塩の既存市販製剤は液体注射剤及び注射剤用凍結乾燥粉末である。臨床での静脈内投与後、遊離したその薬物は活性を失うが、それは、構造中のラクトン環がアルカリ性の生理環境においてカルボン酸型に加水分解される傾向があることにより間接的に薬効が減少するためである。さらにこれらの製剤には、主に好中球減少及び遅発性の下痢という重篤な副作用がある。

【0004】

10

20

30

40

50

近年リポソームは薬物担体として広く研究されている。リポソームの主な特徴には、封入された薬物の保護、薬物安定性の増大、薬物の生体内分布挙動の変化、及び受動的又は能動的な標的化による疾患領域への薬物輸送が挙げられる。抗癌剤の優れた担体として、リポソームは薬効を高め、また薬物毒性を低減することができる。

【0005】

国際公開第2005/117878号パンフレット（特許文献1）にはイリノテカンのリポソーム製剤及びその製造方法が開示されている。この製剤は、イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩、水素添加大豆ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、レシチン及びカルジオリピンからなる群より選ばれるリン脂質、並びにコレステロールを含有する。同様に、中国特許出願公開第1994279A号明細書（特許文献2）にもイリノテカンのリポソーム製剤及びその製造方法が開示されており、ここではホスファチジルコリンが、実施例5におけるリポソームを製造するリン脂質として使用されている。

10

【0006】

上記特許文献に記載された製剤は優れた効果を達成することができる。しかしながら、これらの製剤がヒトに使用される場合、安定性や粒子径などは依然として不十分である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2005/117878号パンフレット

【特許文献2】中国特許出願公開第1994279A号明細書

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、高い薬物積載量、高い封入効率及び優れた安定性を有し、また製剤への調製に適したイリノテカン又はその塩酸塩のリポソームを提供する。

【0009】

現在までにいくつかの文献（例えば、国際公開第2005/117878号パンフレット及び中国特許出願公開第1994279A号明細書）に、イリノテカンリポソームの組成物及び製造方法が記載されている。これらのある製剤においては、いくつかの指標で良い結果が得られている。しかしながら、安定性及び粒子径の調節に関してはなんら情報がない。リポソームに関してさらに研究した後、本発明者らは驚くべきことに、選ばれた種類の不活性成分と製剤中で使用されるその量がある条件を満たした場合、特にコレステロール量がリポソームの粒子径及び安定性に影響を与えることを見いだした。本発明者らは、中性リン脂質とコレステロールとの間の比率を調節することにより、小粒で均一な粒子径分布を有し、安定性が改善されたりリポソームを製造することに成功した。本発明のリポソームは、他のリポソームと比較してより高い保存安定性を有し、他の指標も著しく改善された。さらに、国際公開第2005/117878号パンフレット及び中国特許出願公開第1994279A号明細書に記載された技術と比較し、本発明のリポソームは塩基性官能基を有する化合物及び陽イオン性脂質を含有しない。また本発明のリポソームは、優れた抗腫瘍活性と単純な製剤であることによる利点、及び高い薬物積載量と優れた保存安定性を有する。

30

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明のリポソームは、イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩、中性リン脂質及びコレステロールを含有し、コレステロールと中性リン脂質との重量比は1:3~5、好ましくは1:3.5~4.5、最も好ましくは1:4である。

【0011】

本発明で使用される中性リン脂質は、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）、卵ホスファチジルコリン（EPC）、大豆ホスファチジルコリン（SPC）などからなる群より選ばれる。中性リン脂質として水素添加大豆ホスファチジルコリンが利用された場合に効果が最大となる。リポソームの薬物積載量は、薬物とリン脂質の重量比がさらに下記のように

50

に調整された場合に大きく改善され得る。

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩 1

中性リン脂質 2~5、好ましくは2.5~4

【0012】

本発明のリポソームは、当技術分野において慣行のリポソーム製造法により、好ましくはイオン勾配法により製造することができる。イオン勾配法を用いた場合、前記リポソームの内部水相と外部水相との間に緩衝液によって形成されるイオン勾配が存在する。前記リポソームの内部水相は、外部水相より高いイオン濃度を有することが好ましく、このことにより、保存期間中のリポソームの粒子径安定性が改善され、より優れた薬効が維持され、リポソームの平均粒子径が小粒で均一に調節され、さらに保存期間中のリポソームの粒子径変化を最小限に抑えることが可能となる。

10

【0013】

本発明において保存期間中のリポソームの粒子径変化は、製剤中に親水性ポリマー脂質誘導体を添加することにより最小限に抑えることができる。また生体内でのリポソームの循環時間は、製剤中にポリエチレングリコール誘導体を添加することにより延長することができる。ポリエチレングリコール誘導体は、ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG2000)、ポリエチレングリコール5000 - ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ポリエチレングリコール2000 - ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン及びポリエチレングリコール5000 - ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンからなる群より選ばれる。薬物の長期有効性を向上させるため、本発明のリポソームに親水性ポリマー脂質誘導体を添加することが好ましい。この処方比率に基づき、DSPE - PEG2000が最も明確な効果を有する。イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩に対する脂質誘導体の重量比は、0.2~0.4が好ましい。

20

【0014】

このリポソームはさらに、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジン酸、ジミリストイルホスファチジン酸、ジステアロイルホスファチジン酸及びこれらの混合物からなる群より選ばれる荷電リン脂質を含有してもよく、荷電リン脂質と中性脂質の重量比は1:5~1:100である。

30

【0015】

好ましくは、本発明のリポソームは下記の成分重量比から成る：

| | |
|--|-----------|
| イリノテカン塩酸塩 | 1 |
| 水素添加大豆ホスファチジルコリン | 3.4~3.8 |
| ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン | 0.34~0.38 |
| コレステロール | 0.8~0.95 |

また、コレステロールと水素添加大豆ホスファチジルコリンとの重量比は1:4である。

【0016】

また本発明は、イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソームの製造方法を提供する。本発明のリポソームは、慣用のリポソーム製造方法により製造することができる。当業者であれば、本発明により提供される製剤に応じて種々のリポソーム製造方法を選択することができる。本発明のリポソーム製剤に対してイオン勾配製造方法が好ましく選択される。この製造方法には下記の工程が含まれる：

40

【0017】

〔1〕下記A~Dのいずれか1種の方法による空リポソームの製造：

(A) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールとtert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合し、減圧蒸留によりエタノールを除去した後、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造

50

する；

(B) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、クロロホルム又はクロロホルム - メタノール混合溶媒中に溶解し、ロータリーエバポレーターにより脂質フィルムを形成させ、水和させるため緩衝液を添加し、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(C) 所望の処方に応じて、中性リン脂質、コレステロール及び緩衝液を混合した後、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(D) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールとtert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合した後、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

【0018】

[2] 空リポソームの内部水相と外部水相との間のイオン勾配の形成：

空リポソームの外部水相を置換し、空リポソームの内部水相と外部水相との間のイオン勾配を形成させる；

【0019】

[3] 薬物積載リポソームの製造：

イリノテカン塩酸塩の水溶液を調製し、そこへイオン勾配を有する空リポソームの分散液を添加した後、この分散液を加温及び攪拌下恒温放置し、薬物積載リポソームを得る。

【0020】

薬物積載リポソームを製造する前記工程[3]の後、前記方法は下記の工程を含んでもよい：

【0021】

[4] 遊離薬物の除去及び試料の濃縮：

イリノテカン塩酸塩リポソームに緩衝媒体を添加し、接線流装置を使用して非封入薬物を除去して、試料を適当な体積に濃縮する。

【0022】

また本発明は、上記リポソームを含有するリポソーム注射剤を提供する。リポソームをヒトへの使用に適した注射剤に調製する場合、安定剤の添加が有益である。本発明に使用される安定剤は、ビタミンE、エチレンジアミン四酢酸などの慣用の安定剤であってもよい。安定剤は製剤の安定性に有用である。安定剤に関する研究で、上記の製剤に対しては、エチレンジアミン四酢酸又はその塩が他の安定剤に比較して最良の効果を有することが示された。これらはリポソームの安定性の向上に有益である。従って、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸2カルシウム又はこれらの混合物とすることができる。添加される安定剤の比率は0~0.5% (w/v) であるが、最小量は0%ではない。

【0023】

本発明の組成物は、好ましくは、水溶性抗酸化剤及び油溶性抗酸化剤からなる群より選ばれる抗酸化剤を含有し、前記油溶性抗酸化剤は - トコフェロール、コハク酸 - トコフェロール、酢酸 - トコフェロール及びこれらの混合物からなる群より選ばれ、前記水溶性抗酸化剤はアスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、L - システイン及びこれらの混合物からなる群より選ばれる。添加される抗酸化剤の比率は0~0.5% (w/v) であるが、最小量は0%ではない。

【0024】

注射剤は、注射用液体又は凍結乾燥粉末の形態とすることができる。この製剤はグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウム、グリセリン、ヒスチジン及びその塩酸塩、グリシン及びその塩酸塩、リジン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、バリン並びにこれらの混合物からなる群より選ばれる浸透圧調整剤を含有してもよ

10

20

30

40

50

い。添加される浸透圧調整剤の比率は0～5% (w/v) であるが、最小量は0%ではない。

【0025】

注射用凍結乾燥粉末の形態にある製剤については、注射剤はさらに凍結乾燥保護剤を含有し、次に注射剤は凍結乾燥後、注射用凍結乾燥粉末に調製される。凍結乾燥保護剤はグルコース、スクロース、トレハロース、マンニトール、デキストラン、ラクトース及びこれらの混合物からなる群より選ばれる。

【0026】

本発明の好ましいリポソーム注射剤は記の成分重量比から成る：

| | | | |
|--|----------|-----------|----|
| イリノテカン塩酸塩 | 1 | | |
| 水素添加大豆ホスファチジルコリン | | 3.4～3.8 | 10 |
| ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン | | 0.34～0.38 | |
| コレステロール | 0.8～0.95 | | |
| エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム | | 0.05～0.09 | |

また、コレステロールと水素添加大豆ホスファチジルコリンとの重量比は1：4である。

【0027】

上記注射剤の製造方法には下記の工程が含まれる：

【0028】

[1] 下記A～Dのいずれか1種の方法による空リポソームの製造：

(A) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールとtert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合し、減圧蒸留によりエタノールを除去した後、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(B) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、クロロホルム又はクロロホルム - メタノール混合溶媒中に溶解し、ロータリーエバポレーターにより脂質フィルムを形成させ、水和させるため緩衝液を添加し、粗空リポソームを得て、次に、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(C) 所望の処方に応じて、中性リン脂質、コレステロール及び緩衝液を混合した後、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

(D) 中性リン脂質及びコレステロールを、所望の処方に応じて、無水エタノール又は無水エタノールとtert - ブチルアルコールとの混合溶媒中に溶解し、この混合物を緩衝液と混合した後、高圧ホモジナイザー及びノ又は射出装置を使用して所望の粒子径を有する空リポソームを製造する；

【0029】

[2] 空リポソームの内部水相と外部水相との間のイオン勾配の形成：

空リポソームの外部水相を置換し、空リポソームの内部水相と外部水相との間にイオン勾配を形成させる；

【0030】

[3] 薬物積載リポソームの製造：

イリノテカン塩酸塩の水溶液を調製し、当該水溶液を、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した後、この分散液を加温及び攪拌下恒温放置し、薬物積載リポソームを得る。

【0031】

前記方法は、薬物積載リポソームを製造する前記工程[3]の後に下記の工程を含んでもよい：

【0032】

[4] 遊離薬物の除去及び試料の濃縮：

イリノテカン塩酸塩リポソームに緩衝媒体を添加し、接線流装置を使用して非封入薬物を除去して、試料を適当な体積に濃縮する。

【0033】

リポソームが製造された後、計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整する；リポソームは濾過滅菌した後、充填及び密封してリポソーム注射剤を得る。又は、リポソーム薬物試料に凍結乾燥保護剤を加えた後、計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整し、リポソームを濾過滅菌した後、充填、密封及び凍結乾燥して、注射用リポソーム凍結乾燥粉末を得る。

【発明の効果】

【0034】

本発明の有益な効果：

イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム製剤は、既存製品及び技術の多くの欠陥を克服した。薬物安定性は、薬物をリポソームの内部水相に封入することにより向上させることができる。この薬物は生体内でラクトン環の形態にあるので、血漿中で活性代謝物であるSN-38の濃度は長時間維持される。一般的に言えば、イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム製剤は、製剤の有効性を増大させ、また薬物の副作用を低減することができる。

【0035】

本発明のイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム製剤は、薬物、リン脂質及びコレステロール間の固有の比率を調節することにより、リポソーム中における低い薬物積載量の問題を解決した。リポソーム中において液体に対する薬物の比率は0.25 (w/w) 以上であり、封入効率は90%以上、好ましくは95%以上である。本発明により製造されたリポソームは、コレステロールとリン脂質の用量を最適化することにより、より小さな粒子径を有し、また安定性が向上した。安定剤を選別することにより一定割合のエチレンジアミン四酢酸塩を製剤に添加することが好ましく、その添加によりリポソームの安定性が著しく向上し、またリポソームの粒子径分布が10 nm ~ 220 nmの範囲で均一となる。イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤に関する影響因子実験の結果により、40、10日間放置した場合であっても試料の粒子径及び封入効率には明確な変化がなく、また指標はすべて必要条件を満たすことが示される。市販製剤と比較して、イリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤は癌抑制率が顕著に増加し、また毒性が顕著に低下した。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】本発明によるイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤の粒子径分布を示す図である。

【図2】本発明によるイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤の形態を示す図である。

【図3】本発明によるイリノテカン又はイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤の生体内における抗腫瘍効果試験の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

下記の実施例は本発明をさらに説明しようとするものであり、本発明の範囲をなんら限定しようとするものではない。

【実施例1】

【0038】

10

20

30

40

【表 1】

処方：

| | | | | | |
|--------------------------|----------|--------|--------|--------|---------|
| イリノテカン塩酸塩 | 0.28 g | 0.28 g | 0.28 g | 0.28 g | 0.28 g |
| 水素添加大豆 ホスファチジルコリン | 1 g | 1 g | 1 g | 1 g | 1 g |
| コレステロール | 0.4 g | 0.33 g | 0.25 g | 0.2 g | 0.167 g |
| DSPE-PEG ₂₀₀₀ | 0.1 g | 0.1 g | 0.1 g | 0.1 g | 0.1 g |
| 硫酸アンモニウム | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g |
| 塩化ナトリウム | 0.45 g | 0.45 g | 0.45 g | 0.45 g | 0.45 g |
| コレステロール：リン脂質 | 1：2.5 | 1：3 | 1：4 | 1：5 | 1：6 |
| 注射用水 | 必要量に至るまで | | | | |

10

【0039】

製造方法：

処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）及びコレステロール（CHOL）を適当量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸アンモニウム溶液（100 mL）と混合して、減圧蒸留によりエタノールを除去し、粗空リポソームを得た。リポソームの粒子径は、高圧ホモジナイザー（1000パール）で5回循環させた後、射出装置でリポソームを射出（2枚の0.1 μm射出膜、5回射出）することにより調節し、次にDSPE-PEG2000水溶液を添加した。この混合物を攪拌しながら20分間恒温放置した。この空リポソームを、途中で注射用水を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、最終的に空リポソームを得た。

20

【0040】

イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イリノテカン塩酸塩とHSPCとの重量比が1：3.5であることに応じて、上記イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60℃に加熱し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去した。試料を約50 mLに濃縮した後、0.45 gの塩化ナトリウムを添加し浸透圧を調整した。計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。

30

【0041】

各製剤の粒子径の変化を表2に示した。この結果より、リン脂質とコレステロールとの比率が4：1である場合、試料の粒子径が最小となることが示された。

【0042】

【表 2】

| HSPC : CHOL | 製造方法 | 平均粒子径 |
|-------------|-------------------------|-------|
| 6 : 1 | 均質化後 | 138.7 |
| | 0.1 μm 5 回射出 | 92.26 |
| 5 : 1 | 均質化後 | 136.2 |
| | 0.1 μm 5 回射出 | 89.5 |
| 4 : 1 | 均質化後 | 123.4 |
| | 0.1 μm 5 回射出 | 87.26 |
| 3 : 1 | 均質化後 | 145.1 |
| | 0.1 μm 5 回射出 | 93.4 |
| 2.5 : 1 | 均質化後 | 142 |
| | 0.1 μm 5 回射出 | 98.56 |

10

【 0 0 4 3 】

製造された試料の安定性は、リン脂質とコレステロールとの種々の比率について25 で調べた。結果を表 3 に示した。リン脂質とコレステロールとの重量比が4 : 1である場合、25 で60日間保管した後において試料の粒子径及び封入効率に明確な変化はなかった。しかしながらリン脂質とコレステロールとの重量比が他のものである試料については、試料の大きさが増大し、また封入効率が低下した。したがってリン脂質とコレステロールとの重量比が4 : 1である場合、試料の安定性はより良いものとなる。

20

【 0 0 4 4 】

【表 3】

| HSPC: CHOL | 保存 時間 (25℃ 、日) | 外観 | 封入効 率% | 粒子径 (z-v) nm | 電位 (mV) | 含有量 (mg/mL) | 総不純 物 (%) | リン脂 質 (mg/mL) |
|---------------|-------------------------|------------|-----------|--------------------|------------|----------------|-----------------|-------------------------|
| 6 : 1 | 0 | 灰白色 懸濁液 | 98.86 | 92.3 | -30.5 | 5.05 | 0.58 | 0.39 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 98.56 | 94.3 | -26.8 | 5.04 | 0.75 | 0.56 |
| | 60 | 灰白色 懸濁液 | 98.20 | 95.9 | -24.9 | 5.06 | 0.85 | 0.66 |
| 4 : 1 | 0 | 灰白色 懸濁液 | 99.37 | 87.3 | -32.1 | 5.10 | 0.55 | 0.40 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 99.25 | 87.5 | -30.9 | 5.11 | 0.64 | 0.50 |
| | 60 | 灰白色 懸濁液 | 99.18 | 87.8 | -28.6 | 5.09 | 0.70 | 0.62 |
| 2.5 : 1 | 0 | 灰白色 懸濁液 | 99.27 | 98.5 | -35.8 | 5.12 | 0.60 | 0.38 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 98.75 | 100.2 | -28.6 | 5.09 | 0.73 | 0.51 |
| | 60 | 灰白色 懸濁液 | 98.19 | 101.7 | -25.3 | 5.07 | 0.84 | 0.67 |

【 0 0 4 5 】

結論：

すべての指標を考慮すると、コレステロールとリン脂質との比率が1 : 3~5、好ましくは1 : 4であった場合により優れた結果が得られた。

【実施例 2】

【 0 0 4 6 】

処方：

イリノテカン塩酸塩 0.28 g
 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) 1 g
 ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル -
 ホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG2000) 0.1 g
 コレステロール 0.25 g
 硫酸アンモニウム 5 g
 エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.02 g
 塩化ナトリウム 0.45 g
 注射用水 必要量に至るまで

【 0 0 4 7 】

製造方法：

処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン及びコレステロール (CHOL) を適当量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸アンモニウム溶液 (100 mL) と混合して

、減圧蒸留により無水エタノールを除去し、粗空リポソームを得た。リポソームの粒子径は、高圧ホモジナイザー（1000バール）で5回循環させた後、射出装置でリポソームを射出（射出装置上の2枚の0.1 μm射出膜、5回射出）することにより調節し、次にDSPE-PEG2000水溶液を添加した。この混合物を攪拌しながら20分間恒温放置した。空リポソームを、途中で注射用水を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、最終的に空リポソームを得た。

【0048】

イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イリノテカン塩酸塩とHSPCとの重量比が1：3.5であることに応じて、上記イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60 に加温し、20分間恒温放置して薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去した。試料を約50 mLに濃縮した後、0.45 gの塩化ナトリウムを添加し、浸透圧を調整した。一定の体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。

10

【実施例3】

【0049】

処方及び空リポソームの製造方法は、リポソームの製造過程においてイリノテカン塩酸塩（CPT-11）とHSPCとの重量比が1：1.5、1：2、1：3.5、1：4及び1：5であることを除いて実施例2と同一であった。イリノテカン塩酸塩のリポソーム試料の封入効率及び粒子径を表4に示した。

20

【0050】

【表4】

| CPT-11 : HSPC | 封入効率 (%) | 薬物積載量 (mg/ml) | 粒子径 (nm) |
|---------------|----------|---------------|----------|
| 1 : 1.5 | 83.2 | 5.11 | 87.1 |
| 1 : 2 | 90.8 | 5.15 | 86.5 |
| 1 : 3.5 | 99.4 | 5.08 | 85.9 |
| 1 : 4 | 99.1 | 4.81 | 85.4 |
| 1 : 5 | 99.4 | 4.25 | 86.7 |

30

【0051】

イリノテカン塩酸塩とHSPCとの重量比が1：1.5である場合、封入効率は著しく低下し、また、その比が1：5である場合、薬物積載量は著しく減少した。臨床応用において、この両方の条件とも臨床応用のための製剤の製造には適切ではない。重量比が1：2～1：4である場合、封入効率及び薬物積載量は、より高くなった。

【実施例4】

【0052】

処方及び空リポソームの製造方法並びに薬物積載リポソームは、処方中のHSPCが個々に高純度卵ホスファチジルコリン（EPC）又は高純度大豆ホスファチジルコリン（SPC）に置換されていることを除いて実施例2と同一であった。得られたリポソーム試料の安定性は25 で調べ、結果を表5に示した。試験結果より、HSPCで製造したリポソーム試料の安定性が最高であり、25 で2ヵ月間保存した場合でも主要な指標はほとんど変化しなかったことが示された。

40

【0053】

【表 5】

| 期間 | PC 成分 | 封入効率 (%) | 薬物積載量 (mg/ml) | 粒子径 (nm) |
|------|-------|----------|---------------|----------|
| 0 ヲ月 | HSPC | 99.4 | 5.08 | 85.9 |
| | EPC | 99.5 | 5.10 | 87.5 |
| | SPC | 99.2 | 5.01 | 86.9 |
| 1 ヲ月 | HSPC | 99.5 | 5.10 | 85.5 |
| | EPC | 92.4 | 5.07 | 88.2 |
| | SPC | 93.9 | 5.05 | 87.3 |
| 2 ヲ月 | HSPC | 98.7 | 5.07 | 86.5 |
| | EPC | 85.8 | 5.06 | 93.2 |
| | SPC | 89.6 | 5.02 | 91.5 |

10

【実施例 5】

【0054】

処方：

イリノテカン塩酸塩 0.28 g
 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) 1 g
 ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル -
 ホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG2000) 0.1 g
 コレステロール 0.25 g
 生理食塩水 50 mL
 注射用水 必要量に至るまで

20

【0055】

製造方法 (1)：

エタノール注入法：処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン、DSPE - PEG2000及びコレステロールを適当量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液をイリノテカン塩酸塩の生理食塩水中に注入した。エタノールを減圧蒸留により除去し、粗空リポソームを得た。リポソームの粒子径は、高圧ホモジナイザー (1000パール) で5回循環させた後、射出装置でリポソームを射出 (射出装置上の2枚の0.1 μm射出膜、5回射出) することにより調節した。計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整し、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌して、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。

30

【0056】

製造方法 (2)：

フィルム分散法：処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン、DSPE - PEG2000及びコレステロールを適当量のクロロホルムに溶解し、得られた脂質溶液をロータリーエバポレーターによりフィルムに調製してクロロホルムを除去した。そこへイリノテカン塩酸塩の生理食塩水溶液を添加し、混合物を1時間恒温放置した。リポソームの粒子径は、高圧ホモジナイザー (1000パール) で5回循環させた後、射出装置でリポソームを射出 (射出装置上の2枚の0.1 μm射出膜、5回射出) することにより調節した。計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整し、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌して、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。

40

【0057】

製造方法 (1)、製造方法 (2) 及び実施例 2 において製造されたイリノテカン塩酸塩のリポソームの封入効率及び粒子径を測定した。

50

【 0 0 5 8 】

【表 6】

| 試料 | 封入効率 (%) | 粒子径 (nm) |
|----------|----------|----------|
| 実施例 2 | 99.4 | 85.9 |
| 製造方法 (1) | 15.3 | 87.9 |
| 製造方法 (2) | 17.8 | 90.2 |

【 0 0 5 9 】

10

イリノテカン塩酸塩のリポソームを製造する場合、目標産物は、エタノール注入法やフィルム分散法などの受動的薬物積載方法により製造することができるということが示された。しかしながらこれらの方法で製造されたリポソームの封入効率は低く、少量の薬物をリポソーム中に積載することができるのみである。対照的に、能動的薬物積載方法（実施例 2）により製造された試料は、高い封入効率及び薬物積載量を有した。さらに能動的薬物積載方法により製造された試料は、小粒で均一な粒子径を有した。本発明ではこのように、能動的薬物積載方法をリポソームの製造のために使用した。イリノテカン塩酸塩のリポソームをイオン勾配法により製造すると、極めて良い結果が得られた。

【実施例 6】

【 0 0 6 0 】

20

【表 7】

| 処方 | 処方 1 | 処方 2 | 処方 3 | 処方 4 |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| HSPC | 1 g | 1 g | 1 g | 1 g |
| コレステロール | 250 mg | 250 mg | 250 mg | 250 mg |
| DSPE-PEG ₂₀₀₀ | 0.1 g | 0.1 g | 0.1 g | 0.1 g |
| ビタミン E | / | 0.02 g | / | 0.02 g |
| EDTA-2Na | / | / | 0.02 g | 0.02 g |
| 硫酸アンモニウム溶液 (300 mM) | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| イリノテカン塩酸塩 | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g |

30

【 0 0 6 1 】

製造方法：

空リポソーム：脂質エタノール溶液を注入し、この溶液を1000パールで6回ホモジナイズした；200 nmで3回及び100 nmで5回射出した；DSPE-PEG2000を添加し、混合物を60で30分間恒温放置した。次にこの混合物を、ビタミン E (VE) をリン脂質有機溶媒に添加し、またEDTAを硫酸アンモニウム溶液に添加して、接線流装置を用いて毎回50 mLで3

40

【 0 0 6 2 】

薬物積載リポソーム：約10 mg/mLのイリノテカン塩酸塩水溶液を調製し、空リポソームに添加した後、この混合物を60で15分間恒温放置した。試料は接線流装置を用いて約50 mLに濃縮し、5 mg/mLの試料を得た。

【 0 0 6 3 】

表 8 に安定性の結果を示した。EDTAを単独で添加した場合、試料のすべての指標はほとんど変化しなかった。EDTAはリポソームの安定性を著しく改善した。しかしながら他の安定剤は、リポソームの安定性をほとんど改善しなかった。

【 0 0 6 4 】

50

【表 8】

| 試料 | 保存時間 (25℃、 日) | 外観 | 封入効 率% | 粒子径 (z-v) nm | 含有量 (mg/mL) | 総不純物 (%) | リン リン脂質 (mg/mL) |
|----------------------|---------------------|------------|-----------|--------------------|----------------|-------------|-----------------------|
| HSPC | 0 | 灰白色 懸濁液 | 99.70 | 85.6 | 5.42 | 0.65 | 0.40 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 91.51 | 87.7 | 5.40 | 0.74 | 0.65 |
| HSPC +VE | 0 | 灰白色 懸濁液 | 97.10 | 89.0 | 5.01 | 0.48 | 0.35 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 93.49 | 93.4 | 5.03 | 0.56 | 0.43 |
| HSPC +EDTA | 0 | 灰白色 懸濁液 | 95.67 | 87.2 | 4.94 | 0.56 | 0.38 |
| | 30 | 灰白色 懸濁液 | 95.67 | 86.5 | 4.98 | 0.60 | 0.40 |
| HSPC +VE +EDTA | 0 | 灰白色 懸濁液 | 98.92 | 89.2 | 5.55 | 0.61 | 0.39 |
| | 30 | 粒子降 下 | 87.31 | 99.7 | 5.51 | 0.61 | 0.47 |

【実施例 7】

【0065】

処方(1):

イリノテカン塩酸塩 0.5 g

水素添加大豆ホスファチジルコリン 1.5 g

コレステロール 0.4 g

硫酸マンガン 10 g

マンニトール 2.5 g

注射用水 必要量に至るまで

【0066】

製造方法:

処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン及びコレステロールを適量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸マンガン溶液(100 mL)と混合した。減圧蒸留により無水エタノールを除去した後、粗空リポソームを得た。リポソームの粒子径は、射出装置でリポソームを射出(射出装置上の2枚の0.1 μm射出膜、5回射出)することにより調節した。空リポソームは、途中で注射用水を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら50に加熱し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、次に、2.5 gのマンニトールを添加し浸透圧を調整した。一定の体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。このリポソームの粒子径(89.3 nm)はナノ粒子サイズ分析器により測定し、また封入効率は97.5%であった。

【0067】

10

20

30

40

50

処方(2) :

| | | |
|------------------------|----------|--------|
| イリノテカン塩酸塩 | 1 g | |
| 水素添加卵ホスファチジルコリン (HEPC) | | 3.45 g |
| コレステロール | 0.8 g | |
| 硫酸マンガン | 10 g | |
| ヒスチジン | 2.5 g | |
| 注射用水 | 必要量に至るまで | |

【0068】

製造方法 :

処方量の水素添加卵ホスファチジルコリン及びコレステロールを適量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸マンガン溶液(100 mL)と混合した。リポソームの粒子径は、射出装置でリポソームを射出(射出装置上の2枚の0.1 μm射出膜、5回射出)することにより調節した。空リポソームは、途中で注射用水を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら50 に加温し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、試料は約50 mLに濃縮した。次に、2.5 gのヒスチジンを添加し浸透圧を調整した。計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。このリポソームの粒子径(87.6 nm)はナノ粒子サイズ分析器により測定し、また封入効率は98.1%であった。

10

20

【0069】

処方(3) :

| | | |
|---|----------|--------|
| イリノテカン塩酸塩 | 0.3 g | |
| 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) | | 1 g |
| ポリエチレングリコール2000 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG2000) | | 0.05 g |
| コレステロール | 0.25 g | |
| 硫酸アンモニウム | 5 g | |
| 塩化ナトリウム | 0.45 g | |
| 注射用水 | 必要量に至るまで | |

30

【0070】

製造方法 :

処方量の大豆ホスファチジルコリン及びコレステロールを適量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸アンモニウム溶液(100 mL)と混合した。無水エタノールを減圧蒸留により除去し、粗空リポソームを得た。高圧ホモジナイザー(1000バール)で5回循環させた後、DSPE - PEG2000水溶液を添加した。この混合物を攪拌しながら20分間恒温放置した。空リポソームは、途中で注射用水を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60 に加温し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、試料は約50 mLに濃縮した。次に、0.45 gの塩化ナトリウムを添加し浸透圧を調整した。計量された体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。このリポソームの粒子径(87.3 nm)はナノ粒子サイズ分析器により測定し、また封入効率は99.2%であった。

40

【実施例8】

【0071】

処方 :

50

| | | |
|--|----------|-------|
| イリノテカン塩酸塩 | 0.5 g | |
| 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) | | 1 g |
| 心筋リン脂質 (CL) | 0.5 g | |
| ポリエチレングリコール5000 - ジステアロイル - ホスファチジエタノールアミン (DSPE - PEG5000) | | 0.5 g |
| - トコフェロール | 0.05 g | |
| コレステロール | 0.35 g | |
| クエン酸 | 5.76 g | |
| 塩化ナトリウム | 約3.6 g | |
| 注射用水 | 必要量に至るまで | |

10

【0072】

製造方法：

処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン、心筋リン脂質、DSPE - PEG5000、コレステロール及び - トコフェロールを適当量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液をクエン酸溶液 (100 mL) と混合した。無水エタノールを減圧蒸留により除去し、粗空リポソームを得た。高圧ホモジナイザー (1000バール) で5回循環させた後、空リポソームは、途中で塩化ナトリウム溶液 (0.9%、400 mL) を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60 に加温し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、試料は約50 mLに濃縮した。一定の体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。このリポソームの粒子径 (85.8 nm) はナノ粒子サイズ分析器により測定し、また封入効率は98.6%であった。

20

【実施例9】

【0073】

処方：

| | | |
|-----------------------------|----------|-------|
| イリノテカン塩酸塩 | 0.8 g | |
| ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) | | 2 g |
| ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) | | 0.2 g |
| コレステロール | 0.5 g | |
| アスコルビン酸 | 0.05 g | |
| エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム | 0.05 g | |
| 硫酸アンモニウム | 5 g | |
| 塩化ナトリウム | 約3.6 g | |
| 注射用水 | 必要量に至るまで | |

30

【0074】

製造方法：

処方量のDPPC、DPPG及びコレステロールを適当量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸アンモニウム溶液 (100 mL、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む) と混合した。エタノールを減圧蒸留により除去し、粗空リポソームを得た。高圧ホモジナイザー (1000バール) で5回循環させた後、空リポソームは、途中で塩化ナトリウム溶液 (0.9%、400 mL) を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60 に加温し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、試料は約50 mLに濃縮した。一定の体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、窒素保護下でバイアル瓶に充填し密封した。最終的にイリノテカン塩酸塩のリポソーム注射剤を得た。このリポソームの粒子

40

50

径 (89.4 nm) はナノ粒子サイズ分析器により測定し、また封入効率は97.2%であった。

【実施例 10】

【0075】

処方：

| | | |
|----------------------------------|--------|----------|
| イリノテカン塩酸塩 | 0.5 g | |
| 水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) | | 1 g |
| ポリエチレングリコール5000 - ジステアロイル - | | |
| ホスファチジルエタノールアミン (DSPE - PEG5000) | | 0.1 g |
| - トコフェロール | 0.05 g | |
| コレステロール | 0.3 g | 10 |
| 硫酸アンモニウム | 5 g | |
| 塩化ナトリウム | | 約3.6 g |
| スクロース | 2 g | |
| マンニトール | 1 g | |
| 注射用水 | | 必要量に至るまで |

【0076】

製造方法：

処方量の水素添加大豆ホスファチジルコリン、コレステロール及び - トコフェロールを適量の無水エタノールに溶解し、得られた脂質溶液を硫酸アンモニウム溶液 (100 mL) と混合した。エタノールを減圧蒸留により除去し、粗空リポソームを得た。高圧ホモジナイザー (1000パール) で5回循環させた後、射出装置でリポソームを射出した (射出装置上の5枚の100 nm射出膜、5回射出)。次にDSPE - PEG5000水溶液を添加し、この混合物を攪拌しながら20分間恒温放置した。空リポソームは、途中で塩化ナトリウム溶液 (0.9 %、400 mL) を連続的に補充しながら接線流限外濾過装置を用いて透析して、空リポソームを得た。イリノテカン塩酸塩水溶液は注射用水で調製し、イオン勾配を有する空リポソームの分散液に添加した。この混合物を攪拌しながら60 に加温し、20分間恒温放置して、薬物積載リポソームを得た。非封入薬物は接線流限外濾過装置を用いて除去し、試料は約50 mLに濃縮した。次に、この混合物にスクロース及びマンニトールを添加し、均一に混合した。一定の体積に希釈することにより薬物濃度を調整した後、リポソームを0.22 μmフィルターで濾過して滅菌し、ペニシリン瓶に充填して凍結乾燥した。最終的に、イリノテカン塩酸塩の注射用リポソーム凍結乾燥粉末を得た。このリポソームの粒子径 (90 .8 nm) は、注射用凍結乾燥粉末を水和させた後測定した。封入効率は97.5%であった。

【試験例 1】

【0077】

本発明により得られた製造物の物理化学的特性を調べる例として、実施例 2 の製造物を使用した。

【0078】

[粒子径分布]

適量の試料を水で希釈した後、動的光散乱 (DLS) 法により測定した。検出波長：= 633 nm、検出確度：173°、検出温度：25 。粒子径は強度で表わした。粒子径分布を 図 1 に示した。平均粒子径は85.9 nmであった。

【0079】

[形態]

適量の希釈した試料を取り、また銅線メッシュを清浄な濾紙上に置き、その試料をその銅線メッシュ上に滴下し、リンタングステン酸で乾燥させ、乾燥後、透過型電子顕微鏡 (TEM、JEM2010、日本電子株式会社) で観察した。形態を 図 2 に示した。イリノテカン塩酸塩リポソームの外観は典型的な二層構造であり、粒子径の大部分は200 nm未満であった。これは動的光散乱法により測定された結果と一致する。

【0080】

[封入効率]

10

20

30

40

50

薬物含有量の測定方法：カラム：アジレントZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm、5 μm)；移動相：アセトニトリル - 0.05 M KH₂PO₄緩衝液 (pH値を4に調整、1%のトリエチルアミンを含む) = 20 : 80；カラム温度：40；注入量：20 μL；流速：1.0 mL / 分。

【0081】

封入効率の検出方法：1 mLの試料溶液をピペットで10 mLの容量フラスコに取り、標線まで水で希釈した。次にフラスコを均一に振盪し、8010限外濾過装置 (ミリポア社) により限外濾過した。最初の濾液を捨て、それに続く濾液を試料溶液として確保した。試料及び対照の20 μL溶液をピペットで液体クロマトグラフィーに移し、クロマトグラムを測定した。製剤の遊離薬物含有量は外部標準法により算出し、Wとして記録した。この製造物中の薬物の総量は、含有量測定方法により算出し、W₀として記録した。封入効率は下記式により算出した：

$$\text{封入効率} = (W_0 - W) / W_0 \times 100\%$$

測定結果：製造物の封入効率は99.4%であった。

【0082】

[影響因子試験] 製造物を異なる条件下に置くことにより、影響因子を調べた。結果を表9に示した。

【0083】

【表9】

| 条件 | 保存時間 (日) | 外観 | pH | 粒子径 (nm) | 含有量 (%) | 封入効率 (%) | 総不純物 (%) | リゾリン脂質 (mg/mL) |
|------------------------------------|----------|------------|------|----------|---------|----------|----------|----------------|
| 照射 4500 lx ± 500 lx | 0 | 灰白色 懸濁液 | 6.39 | 85.9 | 98.14 | 99.40 | 0.43 | 0.19 |
| | 5 | 黄色土 懸濁液 | 6.30 | 86.3 | 78.99 | 99.11 | 14.4 | 0.23 |
| | 10 | 黄色土 懸濁液 | 6.40 | 86.5 | 76.39 | 99.20 | 19.5 | 0.30 |
| 40℃ | 0 | 灰白色 懸濁液 | 6.39 | 85.9 | 98.14 | 99.40 | 0.43 | 0.19 |
| | 5 | 灰白色 懸濁液 | 6.35 | 87.1 | 98.77 | 99.29 | 0.45 | 0.29 |
| | 10 | 灰白色 懸濁液 | 6.47 | 88.7 | 98.86 | 96.82 | 0.55 | 0.44 |
| 低温 | 3 サイクル | 灰白色 懸濁液 | 6.41 | 89.1 | 100.07 | 99.16 | 0.44 | 0.38 |
| 凍結 融解 | 3 サイクル | 白色 懸濁液 | 6.38 | 110.5 | 95.22 | 99.28 | 0.46 | 0.23 |

【0084】

結果より試料は光感受性であることが示された。明るい光の下では、試料の外観は黄色に変化し、含有量は低下し、また類縁物質は著しく増加した。試料の封入効率及び粒子径は40℃ではほとんど変化しなかったが、類縁物質は少量増加した。低温又は凍結融解条件下では大型の粒子が試料中に生成した。高温でのリン脂質の不安定性及び影響因子試験の試験結果を考慮すれば、生成物は低温及び暗状態下で保存すべきである。

【 0 0 8 5 】

[抗腫瘍治療効果]

薬物名：イリノテカン塩酸塩リポソーム（CPT-11リポソーム）（実施例2に従って製造）は、シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティカル カンパニー リミテッド（Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., LTD.）から提供された。イリノテカン塩酸塩（CPT-11）注射剤はジエンス ヘンルイ メディシン カンパニー リミテッド（Jiangsu Hengrui Medicine Co., LTD.）から提供された。

製造方法：薬物は生理食塩水で希釈し、所要の濃度とした。

実験動物：6~7週齢の雌性BALB/cA-ヌードマウスは、シャンハイ スラック ラボラトリー アニマル カンパニー リミテッド（Shanghai Slac Laboratory Animal Co., LTD.）から購入した。証明書番号：SCXK（シャンハイ）2007-0005。環境：SPFレベル。

【 0 0 8 6 】

実験手順：ヌードマウスの皮下にLs-174tヒト結腸癌細胞を接種した。腫瘍が150~300 mm³に生育した後、マウスを無作為に群分けした（d0）。投与量及び投与方法は表10に示した。腫瘍体積及び重量は週に2~3回測定し、記録した。腫瘍体積（V）は下記式により算出した：

$$V = 1/2 \times a \times b^2 \quad \text{ここで} a \text{ 及び } b \text{ はそれぞれ腫瘍の長さ及び幅である。}$$

【 0 0 8 7 】

【表10】

| 薬物 | 投与 | 経路 | 平均腫瘍体積 (mm ³) D0 | SD | 平均腫瘍体積 (mm ³) D12 | SD | RT V D12 | SD | % T/C D1 2 | 腫瘍抑制率 (%) D12 | P 値 D12 | 部分消失 | 動物数 |
|---------------------------------|----------|----|---------------------------------|-----------|----------------------------------|------------|----------------|----------|---------------------|------------------|------------|------|-----|
| 媒体 | D0, 3 | IV | 219.8 | ± 37.2 | 2013.7 | ± 303.1 | 9.4 | ± 2.3 | 100 | 0 | — | 0 | 8 |
| CPT-11 リポソーム 1.0 mg/kg | D0, 3 | IV | 212.2 | ± 42.1 | 732.2 | ± 162.6 | 3.5 | ± 0.7 | 38 | 62 | 0.000 | 0 | 13 |
| CPT-11 リポソーム 3.0 mg/kg | D0, 3 | IV | 205.0 | ± 49.0 | 265.1 | ± 122.9 | 1.3 | ± 0.4 | 13 | 87 | 0.000 | 4 | 13 |
| CPT-11 10 mg/kg | D0, 3 | IV | 204.6 | ± 44.7 | 844.4 | ± 197.5 | 4.2 | ± 0.9 | 45 | 55 | 0.000 | 0 | 14 |

D0：最初の投与時間；RTV：相対腫瘍体積；P 値は対照群との比較を意味する。対照群 n = 12、治療群 n = 6

【 0 0 8 8 】

結果：CPT-11リポソーム及びCPT-11の両方ともヌードマウスのLs-174tヒト結腸癌の増殖を顕著に抑制した。CPT-11リポソームはLs-174tの増殖を用量依存的に抑制した。CP

10

20

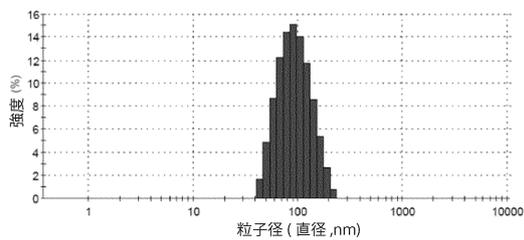
30

40

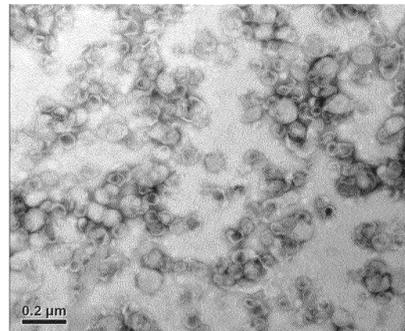
50

T - 11リポソームを高用量（3 mg / kg）で投与した場合、4 / 14で腫瘍が部分的に消失した。CPT - 11リポソームを低用量（1 mg / kg）で投与した場合、CPT - 11リポソームの治療効果はCPT - 11（10 mg / kg）と同等であった。CPT - 11リポソームの治療効果は、CPT - 11注射剤より少なくとも10倍促進された可能性がある。詳細な結果は図3に示した。

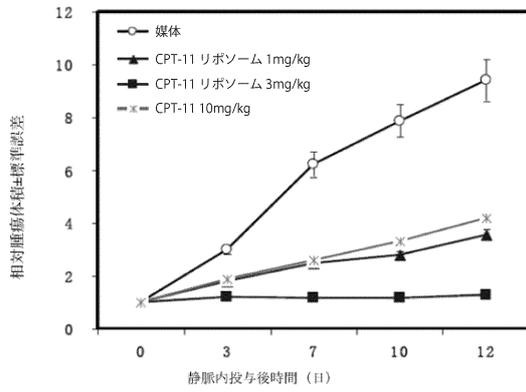
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I |
|-------------------------|---------------|
| A 6 1 K 9/10 (2006.01) | A 6 1 K 9/10 |
| A 6 1 K 47/18 (2006.01) | A 6 1 K 47/18 |
| A 6 1 K 47/26 (2006.01) | A 6 1 K 47/26 |
| A 6 1 K 47/10 (2006.01) | A 6 1 K 47/10 |
| A 6 1 K 47/02 (2006.01) | A 6 1 K 47/02 |
| A 6 1 K 47/22 (2006.01) | A 6 1 K 47/22 |
| A 6 1 K 47/20 (2006.01) | A 6 1 K 47/20 |
| A 6 1 K 9/19 (2006.01) | A 6 1 K 9/19 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |

(73)特許権者 508209602

シャanghai ヘンルイ ファーマスーティカル カンパニー リミテッド
 SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 中華人民共和国 シャanghai, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人 100153394

弁理士 謝 卓峰

(72)発明者 トン・シンヨン

中華人民共和国シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロードNo. 279

(72)発明者 レイ・グオフォン

中華人民共和国シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロードNo. 279

(72)発明者 ユ・チョンシャ

中華人民共和国シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロードNo. 279

(72)発明者 チェン・リアン

中華人民共和国シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロードNo. 279

審査官 高岡 裕美

(56)参考文献 中国特許出願公開第1994279(CN, A)

QIU Young-Hong et al, Journal of Jiangsu University, 2009年 7月, Vol.19, No.4, p.314-319

YANG Jian-kun et al, Chinese journal of New Drugs, 2007年, Vol.16, No.23, p.1962-1964

TZUNG-HAN CHOU et al, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003年, Vol.95, No.4, p.405-408

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/00 - 31/80

A 6 1 K 9/00 - 9/72

A 6 1 K 47/00 - 47/48

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)