

(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2004-511510

(P2004-511510A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/136	A 6 1 K 31/136	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C 2 0 6
A 6 1 K 9/19	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 47/22	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/28	A 6 1 K 47/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-535638 (P2002-535638)	(71) 出願人	503140078 ネオファーム、インコーポレイティッド アメリカ合衆国、イリノイ州 60045 、レイク フォーレスト、フィールド ド ライヴ 150、スウィート 195
(86) (22) 出願日	平成13年10月16日 (2001.10.16)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月15日 (2003.4.15)	(72) 発明者	アフマド、イムラン アメリカ合衆国、イリノイ州 60083 、ウォズワース、ウェスト ペブル ビー チ ドライヴ 4731
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/042757	(72) 発明者	ラーマン、アクイラー アメリカ合衆国、メリーランド州 208 54、ポトマック、マホガニー ドライヴ 9810、アパートメント 201 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02002/032400		
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002.4.25)		
(31) 優先権主張番号	60/241,069		
(32) 優先日	平成12年10月16日 (2000.10.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ミトキサントロンのリポソーム製剤

(57) 【要約】

本発明は、ミトキサントロンのリポソーム製剤、並びにその製造方法と使用方法に関する。リポソームが、カルジオリピンなどのミトキサントロンと結合すると考えられる化合物に加え種々の中性又は荷電リポソーム形成物質の任意のものを含む、ミトキサントロンのリポソーム製剤を、本発明の組成物は含む。リポソーム組成物は、他の活性薬剤の中でも抗新生物物質、抗真菌物質、抗生物質を含む、ミトキサントロン以外の第2の治療薬剤と共に有利に使用できる。治療有効量の製剤を、ヒトなどの哺乳動物に投与する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物疾患の治療方法であって、カルジオリピン含有リポソーム製剤中ミトキサントロン治療有効量と、医薬として許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

リポソーム製剤が更にリン脂質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

リポソーム製剤が更にトコフェロールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

リポソーム製剤が更に、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含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

カルジオリピンが、天然カルジオリピン及び合成カルジオリピンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

リポソームが負電荷を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

リポソームが正電荷を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ミトキサントロンの少なくとも 90% がリポソームに結合されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ミトキサントロン濃度が、約 0.5 ~ 約 2 mg/ml の範囲である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ミトキサントロン、及びカルジオリピンを含む脂質成分を含むリポソームを含む治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 12】

ミトキサントロンと脂質成分とのモル比が、約 1 : 10 から約 1 : 20 までの範囲である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約 5 μ m 以下のサイズを有する小胞を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約 1 μ m 以下のサイズを有する小胞を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約 0.5 μ m 以下のサイズを有する小胞を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 16】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約 0.1 μ m 以下のサイズを有する小胞を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 17】

脂質成分が更に、ホスファチジルコリン、コレステロール、 α -トコフェロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン、及びホスファチジルセリンからなる群から選択される化合物を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

カルジオリピンが、天然カルジオリピン及び合成カルジオリピンからなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

リポソームが負電荷を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

リポソームが正電荷を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

リポソームが中性である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

リポソームが、多層膜小胞と単層膜小胞との混合物である、請求項 1 1 に記載の組成物。 10

【請求項 2 3】

ミトキサントロンと脂質成分とのモル比が、約 1 : 1 0 から約 1 : 2 0 までの範囲である、脂質成分とミトキサントロンを含む治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 2 4】

脂質成分がリン脂質を含む、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 2 5】

脂質成分がホスファチジルコリンを含む、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 2 6】

脂質成分が卵ホスファチジルコリンを含む、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。 20

【請求項 2 7】

脂質成分がコレステロールを含む、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 2 8】

脂質成分が更に、リン脂質、コレステロール、カルジオリピン、及びトコフェロールを含む、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 2 9】

ミトキサントロン濃度が、約 0 . 5 ~ 約 2 m g / m l の範囲である、請求項 2 3 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 3 0】

ミトキサントロンの医薬剤形の調製方法であって、ミトキサントロンと結合する成分を含む予め形成されたある量のリポソームを含む容器を得る工程、医薬として許容できる賦形剤中ある量のミトキサントロンを含む容器を得る工程、医薬として許容できる賦形剤中のミトキサントロンの一部と該リポソームとを混合する工程、及びミトキサントロンを該リポソームと結合させて、ミトキサントロンの医薬剤形を得る工程を含む、方法。 30

【請求項 3 1】

予め形成されたリポソームが凍結乾燥されている、請求項 3 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

本発明は、ミトキサントロン (m i t o x a n t r o n e) のリポソーム製剤、並びにその製造方法と使用方法に関する。 40

【0 0 0 2】

(背景の説明)

ミトキサントロン、特にその塩酸塩形態は、癌及び多発性硬化症の治療に有用である治療薬剤である。米国食品医薬品局 (F D A) は、商品名ノバントロン (N o v a n t r o n e) (登録商標)の下、注射用製剤として 1 9 8 7 年に米国での販売に関しミトキサントロン塩酸塩を最初に承認した。ノバントロン (登録商標)は、不活性成分として、塩化ナトリウム (0 . 8 0 % w / v)、酢酸ナトリウム (0 . 0 0 5 % w / v) 及び酢酸 (0 . 0 4 6 % w / v) を有する、 2 m g / m l ミトキサントロン遊離塩基に相当する塩酸塩形 50

態を含む、滅菌され非発熱性物質を含まない濃青色の水溶液として提供される。

コルチコステロイドと組み合わせたノバントロン（登録商標）は、進行性ホルモン不応性前立腺癌に係る疼痛のある患者の治療のための初期化学療法としての使用を承認されている。ノバントロンの推奨投与量は、21日毎に短期静脈内注入（short intravenous infusion）として投与される $12 \sim 14 \text{ mg} / \text{m}^2$ である。

【0003】

ノバントロンはまた、他の承認薬剤（単数又は複数）と組み合わせて、骨髄性、前骨髄球性、単球性、及び赤血球性の急性白血病を含む、急性非リンパ球性白血病（ANLL）の初期療法における使用が承認されている。推奨投与量は、1～7日目に連続24時間注入として投与される7日間のシタラピン $100 \text{ mg} / \text{m}^2$ と一緒に、静脈内注入として投与される1～3日目に毎日のノバントロン $12 \text{ mg} / \text{m}^2$ である。

10

【0004】

ノバントロン（登録商標）はまた、二次性（慢性）進行性、進行性再発性、又は悪化性再発緩解性の多発性硬化症の患者における神経障害及び/又は臨床的再発の頻度の減少における使用が承認されている。ミトキサントロン塩酸塩は、培養中の増殖中及び非増殖中のヒト細胞両方に細胞毒性であるDNA反応性薬剤であると考えられている。

【0005】

ミトキサントロンの毒性は、患者に投与できる薬剤の投与量を限定する。更に、ミトキサントロンに曝された細胞における多剤耐性の発生は、その有効性を限定しうる。その結果、例えば、処置細胞における毒性及び多剤耐性発生を最小化することによってその効力を

20

最大化しつつ、ミトキサントロンを十分に可溶化するミトキサントロン製剤が必要とされる。本発明は、このような組成物と方法を提供する。本発明のこれらの、そして他の利点、並びに更なる発明の特徴は、本明細書で提供される発明の説明から明らかとなる。

【0006】

（発明の要旨）

本発明は、新規ミトキサントロン組成物、その製造方法、及び特に哺乳動物、とりわけヒトにおける癌などの疾患の治療におけるその使用に関する。本方法は、哺乳動物に医薬として許容できる賦形剤中のミトキサントロンの医薬組成物の治療有効量を投与することを含む。リポソームが、種々の中性又は荷電リポソーム形成物質の任意のもの、及びミトキサントロンと結合すると考えられるカルジオリピンなどの化合物を含むことができるミトキサントロンのリポソーム製剤を、本発明の組成物は含む。リポソーム形成物質は、極性溶媒中でリポソームを形成する、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、コレステロールなどのようなリン脂質といった両親媒性分子でありうる。リポソーム中のカルジオリピンは、天然源又は合成由来でありうる。リポソームの組成により、リポソームは、正味の負若しくは正電荷を有しうるか、又は中性でありうる。好適なリポソームはまたトコフェロールを含む。広範囲の濃度のミトキサントロンをこの製剤で使用できるが、最も有用な濃度範囲は、 0.5 から $2 \text{ mg} / \text{ml}$ までである。ミトキサントロンと脂質成分とのモル比はまた非常に広く変わりうるが、最も有用な範囲は、約 $1:10$ から約 $1:20$ までである。リポソームは、所望のように、そのサイズを制御するために、種々のサイズのフィルターを通過させられうる。リポソーム組成物は、他の活性薬剤の中でも抗新生物物質、抗真菌物質、抗生物質を含む、ミトキサントロン以外の第二の治療薬剤と共に有利に使用することができる。本発明のリポソームは、所望のように、多層膜小胞（multilamellar vesicle）、単層膜小胞（unilamellar vesicle）、又はそれらの混合物でありうる。医薬として許容できる賦形剤中の治療有効量の本リポソームを、ヒトなどの哺乳動物に投与する方法が提供される。

30

40

【0007】

剤形の製造の1つの特に好適な方法においては、医薬として許容できる賦形剤中のある量のミトキサントロン（ノバントロン（登録商標）など）を、ミトキサントロンと結合する

50

成分を含む予め形成され凍結乾燥されたりポソームのある量を含む容器に加え、ミトキサントロンをリポソームに結合させ、医薬剤形を提供する。

【0008】

(好適な実施態様の詳細な説明)

本発明は、組成物、及びその製造と哺乳動物宿主への送達の方法を提供する。組成物及び方法は、ミトキサントロンの溶解性問題の回避、高いミトキサントロンとリポソームの安定性、高濃度でポーラス若しくは短期注入としてミトキサントロンを投与する能力、ミトキサントロン毒性の減少、特に心筋におけるミトキサントロン蓄積の減少、ミトキサントロンの治療効力の増大、及び癌細胞における多剤耐性の調節を特徴とする。製剤でのカルジオリピンの使用は、驚くべき程度までミトキサントロン包埋を改善する。

10

【0009】

本発明の組成物は、カルジオリピンを含むミトキサントロンのリポソーム製剤である。一般的には、リポソーム製剤は、公知の技術によって調製できる。例えば、1好適技術では、ミトキサントロンを、カルジオリピンと共に疎水性溶媒に溶解し、カルジオリピンにミトキサントロンとの複合体を形成させる。複合体形成を容易にするために、カルジオリピン/ミトキサントロン含有混合物を蒸発させ、フィルムを形成できる。その後、任意の所望の更なる親油性成分を含む溶液をフィルムに加えることができ、ミトキサントロン/カルジオリピン複合体を、溶液に溶解させるか、徹底的に分散させる。次いで、溶液を蒸発させ、第2の脂質フィルムを形成させることができる。次いで、水性溶媒などの極性溶媒を脂質フィルムに加えることができ、得られた混合物を激しくホモジナイズして、本発明のリポソームを産生できる。

20

【0010】

あるいは、親油性成分の全てを、次に蒸発できる適切な溶媒に溶解し、親油性フィルムを形成できる。次いで、水性溶媒などの極性溶媒を脂質フィルムに加えることができ、得られた混合物を激しくホモジナイズして、本発明のリポソームを産生できる。

【0011】

上記のように、ミトキサントロンを脂質フィルムに溶解させる場合、剤形は便利には、単一バイアルにパッケージングすることができ、これに適切な水溶液を加えて、リポソームを形成できる。あるいは、親油性成分又は予め形成されたりポソームがひとつのバイアルに含まれ、ミトキサントロンを含む水性成分がふたつめのバイアルに提供される2バイアルシステムを調製することができる。水性のミトキサントロン含有成分を、脂質フィルム又は予め形成されたりポソームを含むバイアルに移し変えることができ、ミトキサントロンのリポソーム製剤が、激しい混合、ボルテックス及び/又は音波処理によって形成される。

30

【0012】

望ましくは、リポソームはいったん形成されると、そのサイズを制御するために適切なフィルターを通し濾過される。適切なフィルターには、濾液から所望のサイズ範囲のリポソームを得るために使用できるものが挙げられる。例えば、リポソームを形成し、その後、5ミクロンフィルターを通し濾過して、約5ミクロン以下の直径を有するリポソームを得ることができる。あるいは、1 μm 、500 nm、200 nm、100 nm、又は他のフィルターを用いて、対応するサイズ(size)を有するリポソームを得ることができる。

40

【0013】

ミトキサントロン製剤を調製するために、ミトキサントロンを適切な溶媒に溶解する。適切な溶媒は、ミトキサントロンが可溶で、医薬として許容できない量の医薬として許容できない残渣を残さずに、蒸発可能なものである。例えば、エタノール、メタノール、クロロホルム、アセトン、又は生理食塩水などの非極性、僅かに極性、又は極性の溶媒を使用できる。

任意の適切なカルジオリピンが本発明で使用できる。例えば、テトラミリスチルカルジオリピンなどのカルジオリピンが、天然源から精製、又は化学的に合成できる。カルジオリ

50

ピンが可溶で、医薬として許容できない量の医薬として許容できない残渣を残さずに、蒸発可能な溶媒を含む適切な溶媒中に、カルジオリピンを溶解できる。カルジオリピン溶液は、ミトキサントロンと混合できる。あるいは、カルジオリピンをミトキサントロンで直接溶解できる。リポソームにカルジオリピンを組み込ませることによって、ミトキサントロンのためのリポソームの収容能力は、驚くべき程度まで増大することが見出された。従って、得られたリポソーム製剤が治療用途のために十分安定で、ミトキサントロンのための適切な収容能力を有する限り、適切なカルジオリピン誘導體も、本リポソーム製剤で使用できる。

【0014】

任意の適切なリポソーム形成物質を、本リポソーム製剤で使用できる。適切なリポソーム形成物質には、親水性部分と疎水性部分とを有する、合成、半合成（修飾天然物の）、又は天然の化合物が挙げられる。このような化合物は両親媒性分子であり、正味の正、負、又は中性の荷電を有しうる。リポソーム形成化合物の疎水性部分は、1つ以上の非極性の、脂肪族鎖、例えば、パルミトイル基を含みうる。適切なリポソーム形成化合物の例には、リン脂質、ステロール、脂肪酸などが含まれる。好適なリポソーム形成化合物には、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、及び α -トコフェロールが含まれる。

10

【0015】

リポソーム形成物質は、それが可溶である、クロロホルムなどの低極性溶媒、又は *n*-ヘキサンなどの非極性溶媒でありうる、適切な溶媒に溶解できる。適切な溶媒には、リポソーム形成物質が可溶で、医薬として許容できない量の医薬として許容できない残渣を残さずに、蒸発可能な溶媒のみが含まれる。ミトキサントロンを含む他の成分をこの溶液と混合して、全ての成分が可溶性溶液を形成でき、次いで溶媒を蒸発させて均一な脂質フィルムを産生できる。溶媒蒸発は、ミトキサントロンと他の親油性成分の安定性を保つ任意の適切な手段によってでありうる。

20

【0016】

適切なリポソームは、中性、負又は正荷電でありえ、その荷電は、リポソーム成分の電荷とリポソーム溶液のpHとの関数である。例えば、中性pHで、正荷電リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びステアリルアミンの混合物から形成できる。負荷電リポソームは、例えば、ホスファチジルコリン、コレステロール及びホスファチジルセリンから形成できる。好適な実施態様では、リポソームミトキサントロン製剤は、テトラミリストイルカルジオリピン、コレステロール及び卵ホスファチジルコリンを含む。

30

【0017】

好適なリポソームミトキサントロン製剤は、ミトキサントロンと脂質との適切な相対的モル量を含む。ミトキサントロンと脂質との適切な相対的モル量は、約1:1~50、より好適には約1:2~40、より好適には約1:5~30、更により好適には約1:10~20、最適には約1:15の範囲である。

リポソーム製剤はまた、カルジオリピン、ホスファチジルコリン及びコレステロールの適切な相対的モル量を含む。適切な相対的モル量には、カルジオリピン:ホスファチジルコリン:コレステロールが約0.1~25:1~99:0.1~50が挙げられる。より好適には、相対的モル量は、0.2~10:2~50:1~25の範囲であり、更により好適には0.5~5:4~25:2~15、更により好適には量は0.75~2:5~15:4~10の範囲であり、最も好ましい比は1:10:6.8である。好適なリポソーム製剤はまた、 α -トコフェロール又は他の適切な抗酸化剤などの抗酸化剤の適切な量を含む。適切な量は、約0.001以上から約5重量%以下までの範囲である。

40

【0018】

極性溶液、好ましくは生理食塩溶液などの水溶液を脂質フィルムに加え、激しい混合によってフィルムを分散させることによって、リポソームを形成できる。好ましくは、極性溶液はミトキサントロンを含む。溶液は純水でありうるか、又はそれは、塩、緩衝剤、又は他の可溶性活性剤を含みうる。選択された方法が、脂質フィルムと極性溶媒との間の十分

50

な剪断力を誘導し、混合物を強くホモジナイズし、リポソームを形成するならば、任意の混合方法が使用できる。例えば、混合は、ボルテックス、磁気攪拌及び/又は音波処理によってでありうる。多層膜リポソームは、単に溶液をボルテックスすることによって形成できる。単層膜リポソームが所望の場合、音波処理及び/又は濾過工程がプロセスに含まれうる。

【0019】

リポソームミトキサントロン製剤の好適な製造方法では、凍結乾燥リポソームのバイアルが調製され、ノバントロン（登録商標）を加えて、ミトキサントロンのリポソーム製剤を形成する。凍結乾燥リポソームは、実施例7でより詳細に説明するように、温ブチルアルコールに脂質成分とD-トコフェリル酸を溶解することによって製造する。トレハロース二水和物を有する温水を、溶液が清澄になるまで、この溶液に混合する。溶液は、滅菌バイアルに0.22µmフィルターを通し滅菌濾過し、凍結乾燥する。望ましくは、凍結乾燥製品は、水分含量約12%以下のオフホワイトのケーキ又は粉末であり、約3から約6までのpHを有するリポソームの均一溶液に容易に再構成できるものである。

10

【0020】

ノバントロン（登録商標）バイアルからなどのミトキサントロン溶液（15mg）7.5mlと正常生理食塩水（0.9%NaCl）7.5mlを、凍結乾燥脂質のバイアルに加えることによって、最終剤形を調製する。リポソーム混合物を室温で30分間水和させ、室温で2分間激しくボルテックスする。浴型音波器で10分間最大強度で音波処理しつつ、混合物を水和させる。この最終剤形は、再構成後8時間以内での使用のために、45分かけて、シリンジ又は標準的注入セットに調合されうる。この方法を用いて、加えたミトキサントロンの約70重量%以上が、リポソーム製剤に包埋されうる。より好ましくは、ミトキサントロンの約80重量%以上が包埋される。より好ましくは、ミトキサントロンの約85重量%以上がリポソームに包埋される。更により好ましくは、ミトキサントロンの約90重量%以上又は約95重量%以上でさえもリポソームに包埋される。

20

【0021】

ミトキサントロン包埋の効率は、リポソーム製剤のアリコート、水溶液中で一晩透析し、その後、メタノールにリポソームを溶解し、高圧逆相液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いる標準的方法によってサンプルを分析することによって決定できる。あるいは、リポソームを、50,000×gで1時間遠心後、集めることができ、その後、HPLC分析のためにメタノールにそれを溶解することができる。一般的に、リポソーム中のミトキサントロンのカプセル化効率は、最初の投入用量の80%超であろう。

30

【0022】

より一般的には、リポソームミトキサントロンが得られる限り、リポソーム形成の任意の適切な方法が使用できる。従って、乾燥脂質フィルム形成を含まない溶媒蒸発方法が使用できる。例えば、水・有機相中でエマルジョンを形成させ、有機溶媒を蒸発させることによって、リポソームは製造できる。本発明は、どのようにして製造されたミトキサントロンのリポソーム製剤でも包含することを意図している。

【0023】

本発明は、非毒性、不活性な医薬として適切な賦形剤に加え、リポソームミトキサントロン製剤を含む医薬製剤、及びこれらの製剤の製造プロセスを含む。医薬として適切な賦形剤によって、固体、半固体、又は液体の希釈剤、充填剤、及び全ての種類の製剤補助剤が理解されるべきである。本発明はまた、投与単位の医薬製剤を含む。このことは、以下のことを意味する：製剤は、個々の部分の形態、例えば、バイアル、シリンジ、カプセル、ピル、座薬、又はアンプルの形態であり、その、リポソームに包埋されたミトキサントロン含量は、個々の用量の分数又は倍量に相当する。投与量単位は、例えば、1、2、3又は4個々投与量、又は1/2、1/3、又は1/4個々投与量を含みうる。個々の用量は好ましくは、1回の投与で与えられ、1日投与量の全部、半分、又は1/3又は1/4に通常対応するミトキサントロン量を含む。

40

【0024】

50

錠剤、糖衣錠、カプセル、ピル、顆粒、座薬、溶液、懸濁液及びエマルジョン、ペースト、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、粉末及びスプレーは、適切な医薬製剤でありうる。座薬は、リポソームミトキサントロンに加え、適切な水溶性又は水不溶性賦形剤を含みうる。適切な賦形剤は、本発明のリポソームミトキサントロンが、治療用途を考慮して十分に安定なもの、例えば、ポリエチレングリコール、特定の脂肪、及びこれらの物質のエステル又は混合物である。軟膏、ペースト、クリーム及びゲルはまた、リポソームミトキサントロンが安定である適切な賦形剤を含みうる。

好ましくは、ミトキサントロン製剤は、全乾燥製剤の約0.1~50重量%、好ましくは、約0.5~25重量%の濃度で上記医薬製剤に存在すべきである。

上記医薬製剤は、公知の方法に基づき、例えば、リポソームミトキサントロンを一つ又は複数の賦形剤と混合することによって、通常様式で製造される。 10

【0025】

活性化合物、及び活性化合物を含む医薬製剤は、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ又はネコなどの任意の哺乳動物で、疾患、特に癌などの細胞増殖によって引き起こされる疾患の予防、軽減及び/又は治療のためのヒト用及び獣医学用医薬で使用される。例えば、イヌのリンパ腫は、本ミトキサントロン製剤によって有効に治療できる。しかし、本製剤は、ヒト患者の治療での使用、特に癌や細胞増殖によって引き起こされる他の疾患のために、特に好適である。本発明の組成物は、ヒトの多発性硬化症、リンパ腫、並びに前立腺、肝臓、卵巣、乳、肺及び結腸の癌の治療で特に使用される。

【0026】

活性化合物又はその医薬製剤は、局所、経口、非経口、腹腔内、及び/又は直腸に、好ましくは非経口で投与できるが、静脈内投与が好適である。

体重約70kgのヒトでは、例えば、ミトキサントロン約0.5~100mg/m²が投与される。好ましくは、ミトキサントロン約5.0mg/m²以上から50mg/m²まで、又はより好ましくは約10mg/m²以上から約45mg/m²までが投与される。更により好ましくは、ミトキサントロン約20mg/m²以上~約40mg/m²、更により好ましくは、ミトキサントロン約25mg/m²以上~約40mg/m²が投与できる。しかし、記載した投与量から逸脱することも必要でありえ、そして特に、治療すべき患者の性質や体重、疾患の性質や重篤度、製剤の性質、医薬の投与、投与する時間又は間隔、の関数としてそうすることが必要でありうる。従って、ある場合には、上記量未満の 30
活性化合物で扱うことが十分でありえ、他の場合には、活性化合物の上記量を超えうる。適切な量は、経験的及びケースバイケース研究で決定されるように、過剰毒性を有しない治療有効量である。

【0027】

本組成物の1つの利点は、それが、ミトキサントロン処置の対象となる癌細胞における多剤耐性を調節する方法を提供することである。特に、本リポソーム製剤は、ミトキサントロンによる化学療法を受けた癌細胞がそれへの耐性を発生させる傾向を減少させ、処理細胞が、例えば、カンプトテシン、タキソール、又はドキソルビシンなどの他の治療薬剤への耐性を発生させる傾向を減少させる。従って、他の薬剤は、ミトキサントロンと活性な組合せの形態又は別の投与のいずれかによって、本治療と共に有利に使用できる。 40

【0028】

ミトキサントロン投与が、リポソーム製剤への包含によって減少しない哺乳動物腫瘍に対する薬理効力を産生することを実施例は示す。更に、リポソーム製剤として投与するとき、動物はミトキサントロンのより高投与量に耐えることができ、そして、従来のミトキサントロンを与えられた動物よりも、生存時間中央値又は腫瘍体積の減少によって測定されるように良好な結果を動物は有する。マウスとイヌでのより高い血漿濃度、及びマウスでの化合物のより長い消失半減期が示されている。ピーク血漿濃度は、同程度の投与量でマウスで約50倍高く、イヌで9倍高かった。従来のミトキサントロンのマウス組織濃度は、従来のミトキサントロンと比較して、リポソームミトキサントロンの投与後、心臓、肺、及び腎臓でより低く、肝臓と脾臓でより高かった。従来のミトキサントロン単独と比較 50

して、リポソームミトキサントロンのより高い投与量が投与されるまで、毒性は起こらなかったが、毒性プロフィールは同様であるようである。以前にミトキサントロン単独では観察されなかった毒性はリポソーム製剤で起こらなかった。動物では、リポソームミトキサントロンのより高投与量は、現行の従来の（非リポソーム）製剤での従来のミトキサントロンより、より良好に耐えられ、より有効である。

本発明を説明してきたが、ここで、例示の目的のためにのみ提供され、限定的であることを意図されない特定の実施例に言及する。

【0029】

実施例 1

本実施例は、リポソームミトキサントロンの 1 製剤を示す。ミトキサントロン（3 μ モル）を、クロロホルム中にカルジオリピン（3 μ モル）と共に溶解する。ヘキサンに溶解したホスファチジルコリン（14 μ モル）及びクロロホルム中の 10 μ モルのコレステロールを、攪拌しながらミトキサントロン混合物に加える。約 30 以下で溶媒を真空下蒸発させ、脂質と薬剤の薄い乾燥フィルムを形成させる。生理食塩水溶液 2.5 ml を加え、成分を、ボルテックスによるように、激しく混合することによって、リポソームを形成する。次いで、フラスコをボルテックスして多層膜リポソームを提供しうるか、又は音波処理して、小さな単層膜リポソームを提供しうる。

10

【0030】

実施例 2

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤の調製を示す。約 6 μ M ミトキサントロン、6 μ M カルジオリピン、28 μ M ホスファチジルコリン及び 20 μ M コレステロールの溶液を、適当な溶媒中に調製し、次いで蒸発させる。乾燥脂質/薬剤フィルムを、7%トレハロース-生理食塩水溶液に分散する。混合物をボルテックスし、音波処理する。次いで、所望のように、リポソームを透析しうる。HPLC でアッセイすると、ミトキサントロンカプセル化は、80%以上である。

20

【0031】

実施例 3

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤の調製を示す。容積 2.5 ml 中、薬剤 3 μ M、ジパルミトイルホスファチジルコリン 15 μ M、カルジオリピン 1 μ M、コレステロール 9 μ M を使用することによって、ミトキサントロンをリポソームに包埋できる。薬剤と脂質の混合物を真空下蒸発でき、等容積の生理食塩水に再懸濁できる。リポソームを実施例 1 で記載したように調製する。このシステムでは、ミトキサントロンカプセル化効率 80% 超である。

30

【0032】

実施例 4

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤の調製を示す。リポソームのこの調製では、2 μ M ミトキサントロン、2 μ M ホスファチジルセリン、11 μ M ホスファチジルコリン、2 μ M カルジオリピン、及び 7 μ M コレステロールを、溶液に溶解する。リポソームを実施例 1 のように調製する。ミトキサントロンカプセル化効率 80% 超が期待できる。

40

【0033】

実施例 5

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤を示す。3 μ モルのカルジオリピンを含むクロロホルムに、ミトキサントロン（3 μ モル）を溶解でき、混合物に複合体を形成させることができる。複合体形成を容易にするために、クロロホルム溶媒を蒸発除去する。ヘキサンに溶解したホスファチジルコリン（14 μ モル）とクロロホルム中 10 μ モルのコレステロールを乾燥フィルムに加えることができる。混合物を穏やかに攪拌し、30 未満で溶媒を真空下蒸発させ、脂質と薬剤の薄い乾燥フィルムを形成させる。次いで、生理食塩水溶液 2.5 ml を加え、ボルテックスによって成分を激しく混合することによって、リポソームを形成する。次いで、フラスコをボルテックスして、多層膜リポソーム

50

ムを提供でき、そして場合によっては、音波器で音波処理して、小さな単層膜リポソームを提供できる。

【0034】

実施例 6

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤を示す。一般的に、本方法は、ミトキサントロン溶液を得る工程、予め形成したリポソームにミトキサントロン溶液を加える工程、リポソームミトキサントロンが形成するように混合物を平衡化させる工程を含む。ノバントロン（登録商標）の各バイアルは、2 mg/ml ミトキサントロン遊離塩基に相当するミトキサントロン塩酸塩、塩化ナトリウム（0.8% w/v）、酢酸ナトリウム（0.005% w/v）、酢酸（0.046% w/v）を含む。ノバントロン（登録商標）溶液は3.0～4.5のpHを有し、1 ml 当たりナトリウム0.14 meqを含む。

10

【0035】

約35～40℃まで温めたt-ブチルアルコール約10 kgにD-α-トコフェロール酸スクシネート約2 gを加えることによって、予め形成したリポソームを調製する。トコフェロールが溶解するまで、約5分間溶液を混合する。テトラミリストイルカルジオリピン約60 gを溶液に加え、溶液を約5分間混合する。コレステロール約100 gを溶液に加え、溶液を約5分超混合し、次いで、卵ホスファチジルコリン約300 gを加え、更に5分混合する。約35～40℃の水2,000 gを含む第2の水溶液とトレハロース二水和物約120 gを、混合物が清澄になるまで、脂質溶液中に混合する。0.22ミクロンのポアサイズのDurapore（登録商標）Millipak 200フィルターを通し、混合物を滅菌濾過し、約11 gを滅菌バイアルに充填し、凍結乾燥する。このようにして調製したリポソームは、オフホワイトのケーキ又は粉末の形態で、容易に再構成される。凍結乾燥リポソームの水分含量は約12%以下である。使用前、凍結乾燥製品を4℃に保存する。

20

【0036】

リポソームミトキサントロンを調製するために、ノバントロン（登録商標）バイアルからの7.5 ml ミトキサントロン溶液（15 mg）を、正常生理食塩水（0.9% NaCl）7.5 mlと一緒に凍結乾燥脂質のバイアルに加える。バイアルを穏やかに回転させ、室温で30分間水和させ、2分間激しくボルテックスし、浴型音波器で最大強度で10分間音波処理する。次いで、使用のために、投与量がバイアルから取り出されうる。製品は、45分かけて、シリンジ又は標準的注入セットのいずれかに分注されうる。望ましくは、リポソームミトキサントロンは、使用まで室温で維持され、再構成8時間以内に使用される。

30

【0037】

実施例 7

本実施例は、リポソームミトキサントロンの別の製剤を示す。モル比1:10:6.8でカルジオリピン:ホスファチジルコリン:コレステロールを含む凍結乾燥脂質組成物を調製した。ミトキサントロンと脂質とのモル比、水和時間、音波処理時間を変えながら、29回試行を行った。正常生理食塩水に対し一晩製剤を透析し、各製剤中に保持されたミトキサントロンの量を測定した。

40

【0038】

この研究は以下のことを示した：ミトキサントロンと脂質とのモル比1:15（ミトキサントロン1 mg 当たり、1, 1, 2, 2テトラミリストイルカルジオリピン2 mg、ホスファチジルコリン12 mg、コレステロール約4 mg）、水和2時間、音波処理10分間によって、1 mg/ml ミトキサントロン溶液に関し94±3%リポソームミトキサントロン、2 mg/ml ミトキサントロン溶液に関し95±6%リポソームミトキサントロン、1.5 mg/ml ミトキサントロン溶液に関し97%ミトキサントロンの保持が生じた。30分まで水和時間を減少させても、1 mg/ml ミトキサントロン濃度では、製剤中に保持されたミトキサントロン量には有意に影響を及ぼさないようであった。特に記載が無い限り、以下の実施例では、1 mg/ml ミトキサントロン製剤を、ミトキサントロン

50

と脂質とのモル比 1 : 15、水和時間 2 時間、音波処理時間 10 分で調製した。

【0039】

実施例 8

上記リポソーム製剤中のミトキサントロンは、同一濃度の非リポソーム（従来の）ミトキサントロンと比較して、より低い毒性を有し、リポソーム製剤で投与したミトキサントロン少なくとも 15 mg / kg は、マウスに毒性ではないことを以下の実施例は示す。20 ~ 22 g の体重の 80 匹のオス CD2F1 マウスを、1 週間馴化させ、1 ケージ当たり 5 匹で、各 10 匹の動物の 8 群に無作為に分けた。0 日に、全ての群の動物に、薬剤又はビヒクルコントロールを尾静脈に静脈内注射した。投与した容量は、個々の動物体重に基づき変えた。注射後 1 日おきに、マウス体重を各マウスにつき記録し、臨床的疾患の観察を少なくとも毎日記録した。注射は表 1 に示すとおりであった。

10

【0040】

【表 1】

群	薬剤製剤	投与量
1	従来のミトキサントロン	15 mg / kg
2	従来のミトキサントロン	10 mg / kg
3	従来のミトキサントロン	5 mg / kg
4	リポソームミトキサントロン	15 mg / kg
5	リポソームミトキサントロン	10 mg / kg
6	リポソームミトキサントロン	5 mg / kg
7	ブランクリポソーム	15 mg / kg
8	正常生理食塩水溶液	

20

【0041】

最初の 5 日で、動物のいずれにも有害な臨床副作用は現れなかった。6 ~ 10 日の間で、群 1 の動物全てが瀕死になった。このような動物の 1 匹は 9 日目に死亡し、残りの群 1 の動物は 10 日目に殺した。群 4、7、8 から各々 4 匹の動物を意図的に殺し、血液学と臨床化学を研究した。主要器官をまた、緩衝化 10% ホルマリンに固定し、研究した。群 1 以外のどの群でも毒性の臨床兆候は出現しなかった。研究後、残りの全ての動物を殺し、血液学と臨床化学を研究し、主要器官を緩衝化 10% ホルマリンに固定し、研究した。

30

【0042】

種々の群で見られた体重の比較は、群 1、即ち従来のミトキサントロン（15 mg / kg 投与量）を除いて、全ての群で臨床的に僅かな変化を示すか、又は明白な変化はなかった。群 1 の動物は、9 / 10 日目までに最大約 35% までの体重を徐々に失った。群 2 の動物は、最初に 10 日目までに 20% の有意な体重喪失を示したが、研究の残りを通じて徐々に回復した。残りの群の全ては、研究を通じて着実に体重が増加した。

40

【0043】

本実施例及び以下の実施例で、ビリルビン、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球カウント、赤血球カウント、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、血小板、好中球、桿状核好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球について、血液を分析した。ALT の臨床的に有意な上昇が、群 1 のマウスの大部分と、群 7 のマウスの 1 匹で 10 日目に注目された。同様の AST 上昇も観察された。群 1 の 2 匹のマウスが BUN の僅かな上昇も示したが、クレアチニンはそうではなく、このことは、恐らく脱水又は血液濃縮によって引き起こされる腎前性の効果を

50

示唆している。他の薬剤関連効果は、これらの研究では観察されなかった。

【0044】

組織病理学は、従来のミトキサントロンとリポソームミトキサントロンで処置したマウスで、脾臓と骨髄の造血組織とリンパ系組織に対する化合物効果を示した。リポソームミトキサントロン処理動物で、全ての投与量レベルで67日目に完全な回復が見られ、これはリポソームミトキサントロンは細胞毒性がより小さいことを示唆する。

【0045】

結論として、コントロール、又は最大15mg/kgのミトキサントロンのリポソーム製剤のいずれを用いた研究でも、罹患率又は死亡率が見られなかった一方、従来のミトキサントロンHClの15mg/kg投与量では100%の罹患率が観察された。

10

【0046】

実施例9

実施例7で記載したリポソーム製剤中のミトキサントロンは、従来のミトキサントロンHClの同一濃度と比較してより低い毒性を有し、ミトキサントロン35mg/kgまでは、明白な毒性無くしてリポソーム製剤でマウスに投与できることを以下の実施例は示す。20~22gの体重の20匹の雄性CD2F1マウスを、1週間馴化し、1ケージ当たり5匹で、各5匹の動物の4群に無作為に分けた。0日に、全ての群の動物に、薬剤又はビヒクルコントロールを尾静脈に静脈内注射した。投与した容量は、個々の動物体重に基づき変えた。注射後1日おきに、マウス体重を各マウスにつき記録し、臨床的疾患の観察を少なくとも毎日記録した。注射は表2に示すとおりであった。

20

【0047】

【表2】

表2

群	薬剤製剤	投与量
1	リポソームミトキサントロン	35mg/kg
2	リポソームミトキサントロン	25mg/kg
3	従来のミトキサントロン	25mg/kg
4	ブランクリポソーム	35mg/kg

30

【0048】

最初の5日では、動物のいずれにも有害な臨床副作用は現れなかった。6~7日目の間で群3の動物全てが瀕死になった。このような動物の1匹は6日目に死亡し、残りの群3の動物を7日目に殺した。他のどの群にも毒性の臨床兆候は現れなかった。研究後、残りの全ての動物を殺し、血液学と臨床化学を実施例8のように研究した。主要器官を緩衝化10%ホルマリンに固定し、全ての死亡動物で研究した。

【0049】

種々の群で見られた体重の比較は、従来のミトキサントロンの25mg/kg投与量を受けた群3を除いて、全ての群で臨床的に僅かの変化を示すか、又は明白な変化はなかった。群3の動物は、7日目までに最大約30%までの体重を徐々に失った。群1の動物は、最初に10日目までに20%の有意な体重減少を示したが、研究の残りを通じて徐々に回復した。残りの群の全ては、研究を通じて着実に体重が増加した。

40

【0050】

結論として、ビヒクルコントロール、又はミトキサントロンのリポソーム製剤を用いた研究では、罹患率又は死亡率が見られなかった一方、従来のミトキサントロンの25mg/kg投与量で100%の罹患率が観察された。

【0051】

実施例10

実施例7で記載したリポソーム製剤中のミトキサントロンは、従来のミトキサントロンH

50

C 1 の同一濃度と比較してより低い毒性を有し、リポソーム製剤で投与したミトキサントロン少なくとも 35 mg / kg は、マウスに毒性がないことを以下の実施例は示す。20 ~ 22 g の体重の 70 匹の雄性 CD 2 F 1 マウスを、1 週間馴化し、1 ケージ当たり 5 匹で、各 10 匹の動物の 7 群に無作為に分けた。0 日に、全ての群の動物に、薬剤又はビヒクルコントロールを尾静脈に静脈内注射した。投与した容量は、個々の動物体重に基づき変えた。注射後 1 日おきに、マウス体重を各マウスにつき記録し、臨床的疾患の観察を少なくとも毎日記録した。注射は表 3 に示すとおりであった。

【 0 0 5 2 】

【 表 3 】

群	薬剤製剤	投与量
1	従来のミトキサントロン	10 mg / kg
2	従来のミトキサントロン	25 mg / kg
3	リポソームミトキサントロン	10 mg / kg
4	リポソームミトキサントロン	25 mg / kg
5	リポソームミトキサントロン	35 mg / kg
6	ブランクリポソーム	35 mg / kg
7	正常生理食塩水溶液	

10

20

【 0 0 5 3 】

最初の 2 日で、動物のいずれにも有害な臨床副作用は現れなかった。3 日目の間で群 2 の動物全てが瀕死になり、3 匹を殺した。群 1、3、4、5、6、7 から各々 3 匹の動物をまた 3 日目に意図的に殺し、血液学と臨床化学を研究した。群 2 からの 3 匹の更なる動物は 7 日で瀕死の犠牲となり、群 1、3、4、5、6、7 から 3 匹の更なる動物をまた殺した。10 日目に残りの群 2 の動物が死亡した。毒性の他の臨床兆候は 60 日目まで観察されなかった。群 2 以外のどの群でも、毒性の臨床兆候は明白ではなかった。研究後、残りの全ての動物を殺し、実施例 8 に記載したように、血液学と臨床化学試験を行った。主要器官を緩衝化 10 % ホルマリンに固定し、全ての死亡動物で研究した。

30

【 0 0 5 4 】

種々の群で見られた体重の比較は、従来のミトキサントロンの 25 mg / kg 投与量を受けた群 2 を除いて、全ての群で臨床的に僅かの変化を示すか、又は明白な変化はなかった。群 2 の動物は、7 日目までに最大約 27 % までの体重を徐々に失った。群 1 及び群 5 の動物は、最初に有意な体重減少を示したが（それぞれ 13 %、8 %）、研究の残りを通じて徐々に回復した。残りの群の全ては、研究を通じて着実に体重が増加した。

【 0 0 5 5 】

25 mg / kg 従来のミトキサントロンを投与した 1 匹のマウス（群 2）及び 35 mg / kg リポソームミトキサントロンを投与した 1 匹のマウス（群 5）は、ALT 活性で僅かな増加を有したが、3 日目に、臨床化学データで、一貫した化合物効果は注目されなかった。白血球細胞に対する細胞毒性効果は、ミトキサントロンを投与した大部分のマウスで注目されたが、ブランクリポソーム投与マウスではそうではなかった。

40

【 0 0 5 6 】

AST と ALT 活性は、より広く変動し、より高レベルに上昇する傾向がある（いくらかの動物でのいくらかの肝障害と一致している）が、7 日目では臨床化学データは結論に達しなかった。6 7 日目、マウスは、ブランクリポソームで処置したマウス（群 6）の幾匹かが示したのと同様の非一貫性の増加を示した。

【 0 0 5 7 】

結論として、コントロール、又はミトキサントロンのリポソーム製剤のいずれによる研究でも、罹患率又は死亡率は見られなかった一方、従来のミトキサントロンの 25 mg / k

50

g を受けた群 2 の動物では 100% の罹患率が観察された。

【0058】

実施例 11

実施例 7 で調製したミトキサントロンの多回投与は、従来のミトキサントロン HCl の同一の濃度と比較して、リポソーム製剤が与えられるとき、より良好に耐えられ、5 連続日で繰返し投与されたりポソームミトキサントロン少なくとも 10 mg / kg は、マウスに毒性ではないことを以下の実施例は示す。20 ~ 22 g の体重の 40 匹の雄性 CD2F1 マウスを、1 週間馴化し、1 ケージ当たり 5 匹で、各 5 匹の動物の 8 群に無作為に分けた。0 日に、全ての群の動物に、薬剤又はビヒクルコントロールを尾静脈に静脈内注射し、その後 1 日 1 回 5 日間注射した。投与した容量は、個々の動物体重に基づき変えた。注射後 1 日おきに、マウス体重を各マウスにつき記録し、臨床的疾患の観察を少なくとも毎日記録した。注射は表 4 に示すとおりであった。

【0059】

【表 4】

表 4

群	薬剤製剤	投与量
1	従来のミトキサントロン	2. 5 mg / kg
2	従来のミトキサントロン	5. 0 mg / kg
3	従来のミトキサントロン	7. 5 mg / kg
4	リポソームミトキサントロン	2. 5 mg / kg
5	リポソームミトキサントロン	5. 0 mg / kg
6	リポソームミトキサントロン	7. 5 mg / kg
7	ブランクリポソーム	7. 5 mg / kg
8	正常生理食塩水溶液	

【0060】

最初の 5 日で、マウスのいずれにも有害な臨床作用は観察されなかった。6 日目に、群 1、2、3、6 の動物は、毛の逆立ちを示し、背を弓なりに曲げる動作を示した。群 2 と群 3 の 2 匹の動物は瀕死の犠牲となった。残りの群の各々から 2 匹の動物を分析のために殺した。7 日目に、合計して群 2 から 3 匹の動物と群 3 から 2 匹の動物が瀕死の犠牲となり、群 3 からの更なる 1 匹が死亡したと分かり、群 6、7、8 から 1 匹の動物を血液学的及び臨床化学的分析のために殺した。60 日目まで残りの動物のいずれでも観察される臨床毒性の兆候は無かった。60 日目で全ての動物を殺した。実施例 8 で記載したように、血液学的及び臨床化学的試験のために、血液サンプルを集め、主要器官を緩衝化 10% ホルマリンに固定した。

【0061】

種々の群における動物質量の比較は、群 2 (5 mg / kg 従来のミトキサントロン) と群 3 (7.5 mg / kg 従来のミトキサントロン) を除いて、僅か、温和又は非明白であると判断された。これらの動物は、7 日目までに約 25% の進行的体重減少を示した。群 1 (2.5 mg / kg 従来のミトキサントロン) と群 6 (7.5 mg / kg リポソームミトキサントロン) の動物は最初にその質量の約 28% を失ったが、研究の終わりまで徐々に回復した。他の処理群は、研究中質量変化を示さなかった。

【0062】

7 日目に、群 6、7、8 から殺したマウスは各々僅かな AST 上昇を示した。群 8 からのマウスはまた、増大したアルカリホスファターゼ活性を有し、群 6 と群 7 からのマウスは、減少したクレアチニンとアルカリホスファターゼを有した。群 2、3、6 からの瀕死の犠牲マウスは、好中球とリンパ球のカウントの減少、及び血小板カウントの僅かな減少を有する、顕著な、臨床的に有意の、化合物関連白血球減少症を示した。群 1、4、6、7

からのマウスは、64日目に分析され、アルカリホスファターゼとASTの僅かな上昇を示したが、他の点では正常であった。

【0063】

処理群全てで、脾臓と骨髄の造血とリンパ系の枯渇、及び腸の絨毛及びノ又は陰窩萎縮を組織病理学的検査は示した。リポソームミトキサントロンは、従来のミトキサントロンよりも脾臓に関し細胞毒性が少なく、腸上皮細胞に関しずっと細胞毒性が少ないように思われた。5又は7.5mg/kgで従来のミトキサントロンを投与した幾匹かのマウスの肝臓でいくらかの肝細胞空胞変性が見られた。対照的に、最小の肝細胞空胞変性が、5mg/kgリポソームミトキサントロンを与えた1匹のマウスで見られ、7.5mg/kgリポソームミトキサントロンを与えたマウスでは見られなかった。従来のミトキサントロンとリポソームミトキサントロン投与の両方が、多くのマウスで長軸の骨成長を害するのに十分な骨芽細胞と破骨細胞の枯渇を導いた。従来のミトキサントロンを与えられた全ての生存マウスと2.5mg/kgでリポソームミトキサントロンを与えられたマウスで、64日目までに全ての影響の有意な回復が観察された。7.5mg/kgリポソームミトキサントロンのマウスは、64日目で造血組織とリンパ系組織で最小の組織学的影響を依然有していた。

10

【0064】

リポソームミトキサントロンは、ミトキサントロンの大きく増大した組織濃度を示す組織分布の知見にかかわらず、従来のミトキサントロンよりも、脾臓に関しては細胞毒性が僅かに小さく、腸上皮細胞では細胞毒性がずっと小さいようであった。5又は7.5mg/kgで従来のミトキサントロンを投与した幾匹かのマウスの肝臓でいくらかの肝細胞空胞変性が見られた。最小の肝細胞空胞変性が、5mg/kgリポソームミトキサントロンの1匹のマウスだけで見られ、7.5mg/kgのマウスでは見られなかった。

20

【0065】

要約すると、リポソームミトキサントロンを受けたどの群でも、又は2.5mg/kgの従来のミトキサントロンを受けた群でも、罹患率又は死亡率は見られなかった。対照的に、群2(5mg/kg従来のミトキサントロン)と群3(7.5mg/kg従来のミトキサントロン)の動物は全て死亡した。

【0066】

実施例12

実施例7で記載したリポソーム製剤中のミトキサントロンは、従来のミトキサントロンHC1の同一濃度と比較してより低い毒性を有し、リポソーム製剤で投与したミトキサントロン少なくとも35mg/kgは、マウスに毒性がないことを以下の実施例は示す。20~22gの体重の30匹の雄性CD2F1マウスを、1週間馴化し、1ケージ当たり5匹で、各5匹の動物の6群に無作為に分けた。0日に、全ての群の動物に、薬剤又はビヒクルコントロールを尾静脈に静脈内注射し、その後1日1回5日間注射した。投与した容量は、個々の動物体重に基づき変えた。注射後1日おきに、マウス体重を各マウスにつき測定し、臨床的疾患の観察を少なくとも毎日記録した。注射は表5に示すとおりであった。

30

【0067】

【表5】

40

表5

群	薬剤製剤	投与量
1	従来のミトキサントロン	2. 5 mg / kg
2	従来のミトキサントロン	5. 0 mg / kg
3	リポソームミトキサントロン	5 mg / kg
4	リポソームミトキサントロン	7. 5 mg / kg
5	リポソームミトキサントロン	10 mg / kg
6	正常生理食塩水溶液	

10

【0068】

最初の5日で、マウスのいずれにも有害な臨床作用は観察されなかった。群1、2、5の動物は、毛の逆立ちを示し、背を弓なりに曲げる動作を示した。8日目に、群2と群5の3匹の動物は瀕死の犠牲となり、群5からの1匹の動物は死亡した。8日目に、群6からの3匹の動物を、血液学と臨床化学のために殺した。10日目に、群2からの1匹の動物が瀕死の犠牲となり、1匹の動物が死亡した。10日目に群5からの1匹の動物が瀕死の犠牲となった。群1の3匹の動物が12日までに死亡した。群4の1匹の動物は、18日目に死亡した。60日目まで残りの動物のいずれでも、観察される臨床毒性の兆候は無かった。60日目に全ての動物を殺した。実施例8で記載したように、血液学的及び臨床化学的試験のために、血液サンプルを集め、主要器官を緩衝化10%ホルマリンに固定した。

20

【0069】

種々の群における動物体重の変動は、群2(5 mg / kg 従来のミトキサントロン)と群5(10 mg / kg リポソームミトキサントロン)を除いて、僅か、温和又は非明白であった。これらの動物は、9日目までに、それぞれ約35%、約25%の進行的体重減少を示した。13日目までに、群1(2.5 mg / kg 従来のミトキサントロン)、群3(5 mg / kg リポソームミトキサントロン)、群4(7.5 mg / kg リポソームミトキサントロン)の動物は、最初に、それぞれその体重の約30%、7%、30%を失った。その体重は、研究中徐々に回復した。他の処置群は、研究中質量変化を示さなかった。

30

【0070】

ビヒクルコントロール群、又はリポソームミトキサントロン最大5 mg / kg まで(5連続日で1回)を受けた群では、罹患率又は死亡率は見られなかった。従来のミトキサントロン2.5 mg / kg で処置した動物で、罹患率60%が観察された。リポソームミトキサントロン7.5 mg / kg で処置した動物で、罹患率20%が観察された。リポソームミトキサントロン10 mg / kg 又は従来のミトキサントロン5 mg / kg による処置は、試験したマウス100%に対し致死的であった。

【0071】

群2(5 mg / kg 従来のミトキサントロン)と群5(10 mg / kg リポソームミトキサントロン)からの瀕死の犠牲となった動物は、ASTとALTで顕著な上昇を示した。更に、試験した群2のマウスの4匹のうち3匹、及び群5のマウスの4匹のうち1匹のビリルビン濃度は、コントロールマウスより高かった。瀕死の動物は、好中球とリンパ球の減少を有する顕著な白血球減少症を示した。血小板カウントの僅かな変動性減少も観察された。赤血球カウントの最小の増加も観察された。他のパラメータは、有意に影響を受けなかった。70日目で殺したマウスは、正常の臨床化学を示したが、低い白血球カウントを有した。これらのマウスではリンパ球と好中球は少なかった。他のパラメータは正常であった。

40

【0072】

実施例8の単回投与実験では、リポソームミトキサントロンではなく、従来のミトキサントロン15 mg / kg 投与量は、急性肝障害を意味するALTの有意な上昇を誘導したが

50

、実施例10のより高い投与量ではそうではなかった。多回投与データを考慮すれば、従来のミトキサントロンは、重大な肝障害を引き起こす可能性を有することは明白である。最終屠殺からのデータは、有意な回復は起こる（毒性も細胞毒性の証拠も殆ど無いが）ことを示唆する。

より高い投与量群からのマウスは、好中球とリンパ球の明瞭な減少と、血小板の僅かの減少を伴う、白血球と血小板に対する細胞毒性効果を示した。より低い投与量群では、効果はずっと顕著でなかった。5 mg / kg / 日の従来のミトキサントロンと10 mg / kg / 日のリポソームミトキサントロンは、8日目までにALT、AST、ビリルビンの増大による証拠のように、大雑把に言って等価の急性肝障害を引き起こしたことをデータは示す。

10

【0073】

要約すると、10 mg / kg / 日で投与したリポソームミトキサントロンは、5 mg / kg / 日で投与されたときの従来のミトキサントロンと毒性が同等以下であり、毒性及び細胞毒性効果からの有意な回復が明白であったことを、これらの研究からの臨床病理データは示す。リポソームミトキサントロンは、従来のミトキサントロンで安全であると考えられる2倍超である量を安全に投与できることをデータは示す。

【0074】

実施例13

実施例7に記載したリポソームミトキサントロン製剤は、従来の製剤で投与したミトキサントロンよりも、哺乳動物血液中で、より高い血漿濃度に達し、より長い半減期を有し、より遅いクリアランス速度を有することを以下の実施例は示す。5 mg / kg で従来のミトキサントロン製剤とリポソームミトキサントロン製剤の単回静脈内投与後、雄性CD2F1で薬物動態学的評価を行った。投与後、5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、24時間、48時間で4匹のマウスの群を殺し、血液と器官を集め、ミトキサントロン含量を分析した。

20

【0075】

逆相HPLCで、血漿及び組織サンプルをミトキサントロンにつき分析した。血漿サンプル(0.25 ml)を、0.01 mg / mlヘキサンスルホン酸、0.5 mg / mlアスコルビン酸、内部標準として0.25 µg アメタントロンの溶液0.5 mlと混合した。30秒間ボルテックス後、0.1 Mホウ酸緩衝液(pH 9.5) 0.5 mlと1 M水酸化ナトリウム150 µlを加え、溶液を30秒間再度ボルテックスした。サンプルを、水平振盪器上1時間、ジクロロメタン10 mlで抽出し、3,000 rpmで15分間遠心した。有機層(9 ml)を分離し、窒素下蒸発させた。HPLC分析前に、移動相10 µlでサンプルを再構成した。組織サンプルを、pH 3.0の0.1 Mクエン酸緩衝液中20%アスコルビン酸を含む1 ml溶液でホモジナイズし、上記のようにして抽出した。流速1 ml / 分で送られる33%アセトニトリル、67% 0.16 Mギ酸アンモニウム緩衝液の移動相を用いる逆相クロマトグラフィー(Waters µBondapak (登録商標) C-18)によって、ミトキサントロンを分離した。ミトキサントロンは600 nmで検出した。感度限界は10 ng / mlであった。

30

【0076】

標準的方法で、血漿薬物動力学パラメータを評価した。血漿濃度 - 時間曲線の線形回帰分析から、除去速度定数(K)を計算した。終末相の無限への外挿(C_{last} / K)を有する線形台形方法を用いて、曲線下面積(

40

【0077】

【外1】

$$AUC_{0 \rightarrow \infty}$$

【0078】

)を計算した(但し、 C_{last} は最後の測定濃度である)。計算した他のパラメータは

50

、投与量 / AUCとして総全身クリアランス (Cl) ; 分布容積 (V_{area}) = Cl / K ; 消失半減期 (t_{1/2}) = 0.693 / K_{area}である。

【0079】

要約すると、静脈内投与後、リポソームミトキサントロンは、従来のミトキサントロンと比べて、有意に高いピーク血漿濃度 (50倍) を産生した。血漿濃度の減少は、従来の製剤とリポソーム製剤に関し、それぞれ6.6分と1時間の消失半減期を有する1次キネティクスに従った。AUC値及び最終消失半減期。従来のミトキサントロン後のC_{max}, AUC及びt_{1/2}値は、それぞれ、0.41 µg/ml, 0.14 µg・時間/ml 及び0.11時間であり、リポソームミトキサントロン投与後のこれらの同じパラメータに関し、これらの値は約21 µg/ml, 28 µg・時間/ml, 及び1時間であった。これらの増加は、化合物のクリアランスと分布容積の両方の減少によって説明できよう。計算された全ミトキサントロンクリアランスは、従来のミトキサントロン (600 ml / 分/kg) と比較してリポソームミトキサントロン (3 ml / 分/kg) では実質的に減少した。計算した分布容積はまた、従来のミトキサントロン (5.5 l/kg) に対しリポソームミトキサントロン (0.3 l/kg) では、顕著に減少した。

10

【0080】

肺と腎臓においてそれぞれ約20 µg/gと40 µg/gの従来のミトキサントロン組織濃度を用いて、及びリポソームミトキサントロン投与後これらの同じ組織で13 µg/gと16 µg/gの組織濃度を用いて、肺と腎臓に関し、組織からのクリアランスの同様のパターンが観察された。肝臓で、従来のミトキサントロン投与後、ミトキサントロン濃度は、約19 µg/gから2 µg/gへと徐々に減少し、一方、リポソームミトキサントロンの投与後4時間で、肝臓濃度は、約25 µg/gから37 µg/gへと増加し、次いで、48時間で30 µg/gへと非常に徐々に下がった。投与後5分で、従来のミトキサントロン (11 µg/g組織) に対し、リポソーム製剤で (5.6 µg/g組織)、ミトキサントロンのより低いピーク濃度が心臓にて検出された。差異は、投与後48時間まで、少なくとも2倍のままであった。

20

【0081】

試験した全ての時点で、リポソームミトキサントロン処置マウスよりも、従来のミトキサントロン処置マウスに関し、従来のミトキサントロンの心臓、肺、腎臓濃度は高かった。試験した全ての時点で、脾臓及び肝臓濃度は、従来のミトキサントロン処置動物よりもリポソームミトキサントロン処置マウスにおいて高く、このことは、リポソーム製剤は、化合物の分布をシフトすることを示している。従来のミトキサントロン投与では、化合物投与後5分と15分で約10 µg/gの心臓組織濃度に至り、24時間と48時間で、濃度は5~6 µg/gへと徐々に減少した。リポソームミトキサントロン投与後、心臓ミトキサントロン濃度は、5分で約6 µg/gであり、24~48時間で約2 µg/gへ徐々に減少した。これらのデータは、リポソームミトキサントロンに関し心臓毒性減少の可能性を示唆する。

30

【0082】

実施例 14

本実施例は、ヒト白血病細胞に対する、実施例7で製造したリポソームミトキサントロンの効力を示し、従来のミトキサントロン製剤と比較してリポソーム製剤の効力の増加を示す。3回の連続的伝播 (腹腔内) によって、CD2F1マウスの腹膜で、マウス白血病細胞であるL1210白血病細胞を増殖させた。最後の接種の8日以内に生じた腹水を、以下の実験で用いた。L1210腹水白血病に対するミトキサントロンのリポソーム製剤と従来の製剤の細胞増殖抑制活性を測定した。動物群の体重を1週間に3回測定し、臨床的瀕死の動物を人道的に殺した。生存マウスを60日間毎日観察した。薬剤の単回又は多回投与による静脈内注射処置後の群生存時間は、リポソームミトキサントロンと従来のミトキサントロンの相対的抗腫瘍力価の指標であった。

40

【0083】

雌性CD2F1マウスを、10匹の動物の8つの群に分け、10,000個のL1210

50

細胞を静脈内注射で接種した。24時間後、薬剤を投与した。投与量5 mg/kgと10 mg/kgで、従来のミトキサントロンを投与した。リポソームミトキサントロンは、5、10、20、又は35 mg/kgの投与量で、単回注射として静脈内投与し、各群の生存時間中央値を測定した。実験60日で、生存動物を殺した。35 mg/kg投与量と等価なブランクリポソームと正常生理食塩水もコントロールとして投与した。

【0084】

未処置動物の生存時間中央値は7日であった。5 mg/kgの従来のミトキサントロンとリポソームミトキサントロンで処置した動物は、それぞれ12日、13日の生存中央値を有した。10 mg/kg従来のミトキサントロンを与えた動物の生存時間中央値は、20日であり、2/10の動物が60日目に生きていた。10 mg/kgリポソームミトキサントロンで処置した動物の生存時間中央値は27日で、4/10のマウスが60日目まで生存した。20 mg/kgでのリポソームミトキサントロンで処理した全ての動物は60日目まで生存した。試験したリポソームミトキサントロンの最高投与量35 mg/kgで、9/10の動物が60日目まで生存し、1匹の動物は、恐らく化合物毒性のために、18日目に死んだのが見出された。

10

【0085】

これらの単回投与研究は、リポソームミトキサントロンは、従来のミトキサントロンより高投与量で投与でき、臨床結果が改善されることを示唆している。白血病のマウスモデルで、リポソームミトキサントロンは、同等の投与量で、従来のミトキサントロンと比べて、動物生存中央値を改良し、同じ及びより高い投与量の両方で化合物関連死亡率を減少させた。これらの結果は、以下を示唆する：毒性の危険性の増大無く、リポソームミトキサントロン製剤でのミトキサントロンのより高い投与量を投与することが可能でありうる。マウスは、20 mg/kg (60 mg/m²)までのリポソームミトキサントロン投与量に耐え、リポソームミトキサントロン投与量35 mg/kg (105 mg/m²)まで、有意な毒性を示さなかった。

20

【0086】

実施例 1 5

多回投与で投与したときの実施例7で調製したリポソームミトキサントロンの効力を、本実施例は示す。40匹の雌性CD2F1マウスを、10匹の動物の4つの群に分け、実施例14に記載のように、L1210細胞を接種した。接種後24時間から始め、4日間24時間毎に、2.5 mg/kg従来のミトキサントロン又は2.5若しくは5 mg/kgリポソームミトキサントロンでマウスを処置した。

30

【0087】

2.5 mg/kgの従来のミトキサントロンとリポソームミトキサントロンで処置したマウスの生存時間中央値は、それぞれ13日と14日であった。この生存時間は、実施例14の単回投与研究で同一濃度で記載されたものと同様であった。これらの処置群で、この投与量レベルで60日目まで生存した動物はいなかった。5 mg/kgのリポソームミトキサントロンで処置したマウスは、37日の生存時間中央値を有し、4/10の動物は60日目まで生存した。これらのデータは、多回投与で薬剤を投与したとき、従来のミトキサントロンに対するリポソームミトキサントロンの臨床的利益の可能性を示唆する。

40

【0088】

実施例 1 6

本実施例は以下を示す：異種移植ヒト前立腺癌細胞担持マウスで、従来のミトキサントロン処置動物と比べて、実施例7のようなリポソームミトキサントロンの単回投与後、生存を増大し、リポソームミトキサントロンの多回投与後、平均腫瘍容積は減少した。雄性Balb/c, nu/nu, 6~8週齢マウスに5×10⁶個のヒトホルモン不応性前立腺腫瘍細胞(PC-3)を接種した。腫瘍容積が60~100 mm²の範囲になるまで、腫瘍増殖を1週間に2度モニタリングした。次いで、動物を群に分け、4日間1日おきに1回、0.625、1.25、2.5、5 mg/kgの投与量で、従来のミトキサントロンを尾静脈を通し静脈内注射で処置した。リポソームに製剤化したミトキサントロンの投与

50

量は、2.5、5、7.5、10 mg/kgであった。コントロール動物は、正常生理食塩水又はブランクリポソームを受けた。生存時間中央値を計算し、生存動物全てを34日目に殺した。

【0089】

0.625、1.25 mg/kgの従来のミトキサントロンで処置した動物は、34日目までに100%の生存を示したが、2.5及び5 mg/kgで処置した動物はどれも生存しなかった。リポソームミトキサントロンの生存率は、2.5 mg/kg投与量で100%、5 mg/kg投与量で91%、7.5 mg/kg投与量で43%、10 mg/kg投与量で0%であった。

0.625と1.25 mg/kg投与量の従来のミトキサントロン、2.5と5 mg/kgのリポソームミトキサントロンによる処理は、同一投与レジメンに従って、実験を繰り返した。これらの実験では、三主軸を測定することによって、1週に1度又は2度腫瘍容積を測定した。

10

【0090】

両方の投与量のリポソームミトキサントロンによる処置は、コントロール群及び従来のミトキサントロン処置と比べて、腫瘍容積の有意な減少を引き起こした。腫瘍増殖の有意な遅延は、PC-3異種移植に関し注目された。従来のミトキサントロンのより高投与量での重大な毒性は、その臨床的有用性を制限していた。リポソームミトキサントロンは、従来のミトキサントロンと比べて、より安全な、より有効な抗腫瘍剤であるようである。

【0091】

20

実施例 17

本実施例は、リポソームミトキサントロン製剤は、イヌへの投与後、従来のミトキサントロンよりも、血漿でより高濃度、より遅いクリアランスを有することを示す。0.13若しくは0.26 mg/kgで従来のミトキサントロンを静脈注射するか、又は0.26、0.58、若しくは0.87 mg/kgでリポソームミトキサントロンを静脈注射した、イヌ(3/性/群)からの血漿サンプルを、内部標準としてアメタントロンを用いる逆相HPLCによって、ミトキサントロンレベルにつき分析した。分析時点は、単回投与後、0、5、30分、1、2、4、8、24時間であった。

【0092】

従来のミトキサントロンを受ける動物の血漿濃度は、低投与量で5分時点で、高投与量で30分時点で測定できなかった。0.258 mg/kgを受けた1匹のオスは、1時間時点で測定可能であった。対照的に、リポソームミトキサントロンを受けた動物の大部分は、低投与量では2時間までの、中及び高投与量では4時間までのミトキサントロン血漿濃度を有した。

30

C_{max} 及びAUC値の両方に反映されるように、リポソームミトキサントロンを投与したときと比べて、従来のミトキサントロンを投与したとき、ミトキサントロンの濃度はかなり低かった(表6)。更に、リポソームミトキサントロンと比べて、従来のミトキサントロンでは、クリアランスは高かった。 C_{max} 及びAUC値の両方は、リポソームミトキサントロン投与量の増大と共に増大し、一方、クリアランス、分布容積及び消失半減期は、投与量に対し一定であった。性間でこれらのパラメータの差異は無かった。結果を下記の表6に要約する。表6は各パラメータの平均を記載する。表に示す他のパラメータは、ミトキサントロン半減期($t_{1/2}$)、分布容積(V)、クリアランス速度(Cl)を含む。

40

【0093】

【表6】

表6

ミトキサントロン 製剤	投与量 (mg/kg)	C _{max} (μ g/ml)	AUC _{0-∞} (μ g時間/ml)	t _{1/2} (時間)	Cl (ml/分/kg)	V (L/kg)
従来-M ^a	0.13	0.027	NC ^b	NC	NC	NC
従来-F	0.13	0.016	NC	NC	NC	NC
従来-M	0.26	0.084	0.05 ^c	0.36	89	2.8
従来-F	0.26	0.06	NC	NC	NC	NC
リポソーム-M	0.26	0.43	0.32	NC	17	1.2
リポソーム-F	0.26	0.77	0.42	0.25	15	0.9
リポソーム-M	0.58	1.5	0.84	0.3	13	0.6
リポソーム-F	0.58	1.9	1.7	NC	6.8	0.6
リポソーム-M	0.87	2.41	1.84	NC	9	0.8
リポソーム-F	0.87	2.33	1.77	NC	11	1

^a M = オス; F = メス

^b NC = 計算せず

^c 従来のみトキサントロンは、30分サンプリング時までのみ検出された

10

20

【0094】

本実施例は以下を示す：イヌにおいて、従来のみトキサントロンの同一投与量と比べて、リポソームのみトキサントロンの投与は、ピーク血漿のみトキサントロン濃度で約9倍増加を生じた。リポソーム製剤はまた、AUC値増加及びクリアランス速度減少を示した。C_{max}及びAUC値の両方は、投与量増加と共に直線的に増加した。C_{max}値は、0.26、0.58、0.87 mg/kg (5、12、17 mg/m²)で約0.5、1.7、2.4 μ g/mlであった。

【0095】

実施例18

本実施例は以下を示す：薬剤がリポソームに製剤化されるとき、のみトキサントロンの従来の製剤と比べて、イヌは、より高投与量のみトキサントロンに耐えることができる。1、23、43、65日目に、0 (生理食塩水)、0.129、又は0.258 mg/kg (2.6又は5 mg/m²)の静脈内投与量で、従来ののみトキサントロンをビーグル犬 (3/性/群) に投与した。これらの同一日に、0 (ブランクリポソーム)、0.258、0.580、又は0.869 mg/kg (5、12、又は17 mg/m²)のリポソームのみトキサントロンをビーグル犬 (3/性/群) は受けた。化合物関連効果の評価は、臨床観察、体重、食物消費、眼科的及びECG検査、臨床病理、血漿薬剤濃度、器官重量、並びに全体的及び顕微鏡的解剖検査に基づいた。

30

【0096】

リポソームのみトキサントロンの1回投与量の投与後、0.869 mg/kgリポソームのみトキサントロン群の1匹のオスイヌは、病変、並びに左肢の膨潤、自発運動低下、血色の悪さ、脱水、及び下痢のため、12日目に殺した。

40

1匹のブランクリポソームのみトキサントロン処置メスイヌは脱毛症を有し、2匹目は、研究の最初の29日を通し過剰の唾液分泌を有した。0.869リポソームのみトキサントロン群からの1匹のメスイヌは、31、32、36、52日目に左側を跛行していたが、その時、そのイヌは、左後肢に腫れ物又は潰瘍と共にその肢の炎症及び膨潤を示した。

【0097】

体重減少した0.258従来ののみトキサントロン群のオスを除いて、研究中、動物体重はいずれも影響されなかった。どの群でも食物消費に変化は無かった。

どの検査時点でもECGパラメータの変化は無かった。

50

0.129及び0.258従来のミトキサントロンを投与された動物は、各投与サイクル後4～10日で、白血球減少症と血小板減少症を有し、重篤度は投与量に関連した。3週投与サイクルの後半の間、白血球カウントは、正常値にリバウンドする傾向があった。差別的白血球データは、各投与後10日目に最も重篤である好中球カウントの投与量連関減少を示した。投与量連関リンパ球減少症はまた、各投与サイクルで起こり、各連続的投与で悪化するようであった。貧血は、従来のミトキサントロン動物で起こらなかったが、網状赤血球カウントの減少を証拠とする赤血球毒性の証拠が観察された。網状赤血球カウントは、10、32、46日目に、正常、又は正常値より僅かに高くへ急速にリバウンドした。

【0098】

リポソームミトキサントロンを与えた動物は、従来のミトキサントロン処置動物で観察されたものと同様の血液学パラメータの変化を有した。研究中殺した動物(0.869mg/kgリポソームミトキサントロン)は、白血球減少症、血小板減少症、及び貧血を有したのは例外である。オスとメスのイヌ両方での網状赤血球カウントの減少とともに、メスイヌで僅かの貧血が見られた。網状赤血球カウントのリバウンドは、オスイヌほど、メスでは速くなかった。

どの投与群の動物でも、凝血又は臨床化学的パラメータの変化は観察されなかった。

【0099】

検死で、リポソームミトキサントロン0.869mg/kg群の1匹のオスは、液体充満の胸膜腔と肥厚心臓及び消化管障害を有した。これらの知見は化合物に関連するようである。この投与量で、1匹の動物は、種々のリンパ節の脱色を有した。リポソームミトキサントロン0.580と0.869群の合計3匹の動物は、注射部位に青色着色を有した。他の知見は、化合物投与のためではなかった。

【0100】

要約すると、リポソームを単独投与した6匹のイヌのうち1匹、及びリポソームミトキサントロンを投与した18匹の動物のうち1匹は、跛行を伴う肢の腫れ物を有したが、それは、リポソームそれ自体の投与によるらしい。薬剤がリポソームに製剤化されるとき、イヌはより高投与量のミトキサントロンに耐えることができることを、本研究は示す。

【0101】

実施例19

本実施例は、癌を有する患者へのリポソームミトキサントロンの投与方法、及びリポソームミトキサントロン製剤の安全かつ有効な量の決定方法を示す。組織学的に実証された固形腫瘍を有する患者を治療のために選択する。本研究で、最大耐性投与量(MTD)、投与量を限定する毒性、及び静脈内投与後ミトキサントロンの血液の薬物動態学を測定できる。リポソームミトキサントロンの抗腫瘍効果も観察された。疾患進行、又は初期処置終了を要求する毒性の発現が観察されるまで、3週間毎に、リポソームミトキサントロンの静脈内投与で、患者を処置する。処置の安全性及び耐性も測定される。薬物動態学的パラメータは、治療の最初の過程で評価される。心臓状態は、1過程おきに評価する。疾患状態は、適当な手段によって1過程おき後に評価する。6つの投与量レベルを評価する。市販のノバントロン(登録商標)を本研究で用いる。ミトキサントロンのリポソーム製剤は、実施例7に記載のように調製した。リポソームミトキサントロンを、表7に下記する投与量で、45分かけて静脈内投与する。

【0102】

【表7】

10

20

30

40

表7
リポソームミトキサントロン

投与量レベル	(mg/m ²)
1	9
2	12
3	15
4	20
5	25
6	30

10

【0103】

各投与量レベルで3人の患者を研究する。疾患の進行又は非許容毒性の非存在下、3週毎に、薬剤投与を繰り返す。

NCI/CTC基準に従い、有害事象を格付けする。投与量限定毒性(DLT)は、悪心/嘔吐若しくは脱毛症以外の、過感受性反応を含むグレード3若しくは4の非血液学的毒性として、又は好中球減少症以外のグレード4血液学的毒性として、又は3日超続くグレード4好中球減少症として、又は38.5超の温度を有するグレード3若しくは4好中球減少症として定義される発熱性好中球減少症として、又はグレード4嘔吐として、又はグレード4肝トランスアミナーゼ(AST又はALT)上昇として、又はMUGAスキャン後LVEFのグレード2(又はそれ以上)減少として定義される、非許容毒性の第1過程の治療内(即ち、21日)の出現として定義される。

20

【0104】

最大耐性投与量(MTD)は、そのレベルで治療した6人の患者のうち1人だけでDLTを引き起こす最高投与量レベルとして定義される。所定の投与量レベルで治療される最初の3人の患者のだれも、投与量限定毒性(DLT)を発症しなければ、投与量上昇を続ける。最初の3人の治療患者の1人がDLTを発症するならば、3人の更なる患者が同一投与量レベルに入れる。3人の更なる患者のだれもDLTを発症しないならば、投与量上昇を続ける。ある投与量レベルで治療される更なる3人の患者の1人以上がDLTを発症すれば、投与量上昇を止める。ある投与量レベルで治療される最初の3人の患者のうち2人又は3人がDLTを発症するならば、投与量上昇を止める。その投与量レベルをMTDと宣言する前に基準が満たされるのを確実にするために、6人の患者が可能なMTDで治療されよう。

30

【0105】

先のリポソームミトキサントロン投与後21日以上で治療の次の過程を投与できえ、そして、絶対的好中球カウント(ANC)が $1,500\text{ m}^3$ 以上、血小板カウントが $100,000/\text{mm}^3$ 、任意の他の治療関連毒性(脱毛症を除く)からの回復が、ベースライングレード又はグレード1未満であるとき、どれも制限的であることはより少ない。

【0106】

毒性の解決のためには、治療を1週間遅らせる。毒性が1週間遅延の後、解決されなければ、もう1週間治療を遅延させ、1週間遅延後行ったであろう同一投与量減少を行う。治療が2週間超保留される必要があるならば、患者は研究から除外される。

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/32400 A1

(51) International Patent Classification: A61K 9/127, 9/133

(21) International Application Number: PCT/US01/42757

(22) International Filing Date: 16 October 2001 (16.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/241,969 16 October 2000 (16.10.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): NEOPHARM, INC. [US/US]; Suite 195, 150 Field Drive, Lake Forest, IL 60045 (US).

(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): AHMAD, Inram [US/US]; 4751 West Pebble Beach Drive, Wadsworth, IL 60083 (US); RAHMAN, Aquilar [US/US]; Apt. 201, 5810 Highbury Drive, Potomac, MD 20854 (US).

(74) Agents: GOULD, Robert, M. et al.; Leydig, Voit & Mayer, Ltd., Two Prudential Plaza, Suite 4000, 180 North Station, Chicago, IL 60601-6780 (US).

(81) Designated States (national): AB, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/32400 A1

(54) Title: LIPOSOMAL FORMULATION OF MITOXANTHRONE

(57) Abstract: This invention pertains to liposomal formulations of mitoxantrone and methods for their manufacture and use. The compositions of the present invention include liposomal formulations of mitoxantrone in which the liposome contains any of a variety of neutral or charged liposome-forming materials in addition to a compound that is thought to bind mitoxantrone, such as cardiolipin. The liposomal compositions can be used advantageously in conjunction with secondary therapeutic agents other than mitoxantrone, including antineoplastic, antifungal, antibiotic among other active agents. Methods are provided in which a therapeutically effective amount of the formulation is administered to a mammal, such as a human.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

1

LIPOSOMAL FORMULATION OF MITOXANTRONE**DESCRIPTION****BACKGROUND OF THE INVENTION**

5 This invention pertains to liposomal formulations of mitoxantrone and methods for their manufacture and use.

DESCRIPTION OF THE BACKGROUND

10 Mitoxantrone, especially its hydrochloride salt form, is a therapeutic agent which is useful for the treatment of cancer and multiple sclerosis. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) first approved mitoxantrone hydrochloride for sale in the United States in 1987 as an injectable formulation under the tradename Novantrone®. Novantrone® is provided as a sterile, nonpyrogenic, dark blue aqueous solution containing an amount of the hydrochloride salt form equivalent to 2 mg/ml
15 mitoxantrone free base, with sodium chloride (0.80% w/v), sodium acetate (0.005% w/v), and acetic acid (0.046% w/v) as inactive ingredients.

Novantrone® in combination with corticosteroids is approved for use as initial chemotherapy for the treatment of patients with pain related to advanced hormone-refractory prostate cancer. The recommended dosage of Novantrone is 12 to 14 mg/m²
20 given as a short intravenous infusion every 21 days.

Novantrone is also approved for use, in combination with other approved drug(s), in the initial therapy of acute nonlymphocytic leukemia (ANLL), including myelogenous, promyelocytic, monocytic, and erythroid acute leukemias. The recommended dosage is 12 mg/m² of Novantrone daily on days 1-3 given as an
25 intravenous infusion along with 100 mg/m² of cytarabine for 7 days given as a continuous 24-hour infusion on days 1-7.

Novantrone® is also approved for use in reducing neurologic disability and/or the frequency of clinical relapses in patients with secondary (chronic) progressive, progressive relapsing, or worsening relapsing-remitting multiple sclerosis.
30 Mitoxantrone hydrochloride is thought to be a DNA-reactive agent that is cytotoxic to both proliferating and non-proliferating human cells in culture.

The toxicity of mitoxantrone limits the dosage of drug that can be administered to patients. Moreover, the development of multidrug resistance in cells exposed to mitoxantrone can limit its effectiveness. Consequently, formulations of mitoxantrone
35 are needed that sufficiently solubilize mitoxantrone while maximizing its efficacy for example, by minimizing toxicity and the development of multidrug resistance in treated cells.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

2

The present invention provides such a composition and methods. These and other advantages of the present invention, as well as additional inventive features, will be apparent from the description of the invention provided herein.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is for novel mitoxantrone compositions, their preparation methods, and their use in treating diseases such as cancer, particularly in mammals, especially humans. The method involves administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of mitoxantrone in a pharmaceutically acceptable excipient to a mammal. The compositions of the present invention include liposomal formulations of mitoxantrone in which the liposome can contain any of a variety of neutral or charged liposome-forming materials and a compound such as cardiolipin that is thought to bind mitoxantrone. The liposome-forming material can be an amphiphilic molecule such as a phospholipid like phosphatidyl choline, dipalmitoyl phosphatidyl choline, phosphatidyl serine, cholesterol, and the like that form liposomes in polar solvents. The cardiolipin in the liposomes can be derived from natural sources or synthetic. Depending on the composition of the liposomes, the liposomes can carry net negative or positive charges or can be neutral. Preferred liposomes also contain tocopherol. Although a wide range of concentrations of mitoxantrone can be used in this formulation, the most useful concentrations range from 0.5 to 2 mg/ml. The molar ratio of the mitoxantrone to lipid component can also vary widely but the most useful range is from about 1:10 to about 1:20. The liposomes can be passed through filters of various sizes to control their size, as desired. The liposomal compositions can be used advantageously in conjunction with secondary therapeutic agents other than mitoxantrone, including antineoplastic, antifungal, antibiotic among other active agents. The liposomes of the present invention can be multilamellar vesicles, unilamellar vesicles, or their mixtures, as desired. Methods are provided in which a therapeutically effective amount of the present liposomes in a pharmaceutically acceptable excipient are administered to a mammal, such as a human.

10

In one particularly preferred method of manufacturing the dosage form, a quantity of mitoxantrone in a pharmaceutically acceptable excipient (such as Novantrone®) is added to a vessel containing a quantity of preformed lyophilized liposomes that contain a mitoxantrone-binding component, and the mitoxantrone is allowed to bind to the liposomes to provide the pharmaceutical dosage form.

15

20

25

30

35

WO 02/32400

PCT/US01/42757

3

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides a composition and methods for its manufacture and delivery to a mammalian host. The composition and method are characterized by avoidance of solubility problems of mitoxantrone, high mitoxantrone and liposome stability, ability to administer mitoxantrone as a bolus or short infusion in a high concentration, reduced mitoxantrone toxicity, particularly reducing mitoxantrone accumulation in cardiac muscle, increased therapeutic efficacy of mitoxantrone, and modulation of multi-drug resistance in cancer cells. The use of cardiolipin in the formulation improves mitoxantrone entrapment to a surprising extent.

10 The inventive composition is a liposomal formulation of mitoxantrone which contains cardiolipin. Generally, the liposomal formulation can be prepared by known techniques. For example, in one preferred technique mitoxantrone is dissolved in a hydrophobic solvent with cardiolipin and the cardiolipin allowed to form complexes with mitoxantrone. The cardiolipin/mitoxantrone-containing mixture can be
15 evaporated to form a film in order to facilitate complex formation. Thereafter, solutions containing any desired additional lipophilic ingredients can be added to the film and the mitoxantrone/cardiolipin complexes dissolved or thoroughly dispersed in the solution. The solution can then be evaporated to form a second lipid film. A polar solvent, such as an aqueous solvent, can then be added to the lipid film and the
20 resulting mixture vigorously homogenized to produce the present inventive liposomes.

Alternatively, all of the lipophilic ingredients can be dissolved in a suitable solvent that can then be evaporated to form a lipophilic film. A polar solvent such as an aqueous solvent can then be added to the lipid film and the resulting mixture vigorously homogenized to produce the present inventive liposomes.

25 Where the mitoxantrone is dissolved in the lipid film, as described above, the dosage form can be conveniently packaged in a single vial to which a suitable aqueous solution can be added to form the liposomes. Alternatively, a two vial system can be prepared in which the lipophilic ingredients or preformed liposomes are contained in one vial and aqueous ingredients containing mitoxantrone are provided in a second
30 vial. The aqueous mitoxantrone-containing ingredients can be transferred to the vial containing the lipid film or preformed liposomes and the liposomal formulation of mitoxantrone formed by vigorous mixing, vortexing and/or sonicating.

Desirably, the liposomes, once formed, are filtered through suitable filters to control their size. Suitable filters include those that can be used to obtain the desired
35 size range of liposomes from a filtrate. For example, the liposomes can be formed and thereafter filtered through a 5 micron filter to obtain liposomes having a diameter of about 5 microns or less. Alternatively, 1 μm , 500 nm, 200 nm, 100 nm, or other filters

WO 02/32400

PCT/US01/42757

4

can be used to obtain liposomes having corresponding sizes.

To prepare the mitoxantrone formulation mitoxantrone is dissolved in a suitable solvent. Suitable solvents are those in which mitoxantrone is soluble and which can be evaporated without leaving pharmaceutically unacceptable amounts of pharmaceutically unacceptable residue. For example, non-polar, slightly polar, or polar solvents can be used, such as ethanol, methanol, chloroform, acetone, or saline, and the like.

Any suitable cardiolipin can be used in the present invention. For example, cardiolipin can be purified from natural sources or can be chemically synthesized, such as tetramyristylcardiolipin. Cardiolipin can be dissolved in a suitable solvent, which include solvents in which cardiolipin is soluble and which can be evaporated without leaving pharmaceutically unacceptable amounts of pharmaceutically unacceptable residues. The cardiolipin solution can be mixed with the mitoxantrone. Alternatively, cardiolipin can be dissolved directly with mitoxantrone. It has been found that by incorporating cardiolipin in liposomes, the liposomes capacity for mitoxantrone is increased to a surprising extent. Thus, suitable cardiolipin derivatives can also be used in the present liposome formulation so long as the resulting liposome formulation is sufficiently stable for therapeutic use and has a suitable capacity for mitoxantrone.

Any suitable liposome-forming material can be used in the present liposomal formulation. Suitable liposome-forming materials include synthetic, semi-synthetic (modified natural) or naturally occurring compounds having a hydrophilic portion and a hydrophobic portion. Such compounds are amphiphilic molecules and can have net positive, negative, or neutral charges. The hydrophobic portion of liposome forming compounds can include one or more nonpolar, aliphatic chains, for example, palmitoyl groups. Examples of suitable liposome-forming compounds include phospholipids, sterols, fatty acids, and the like. Preferred liposome-forming compounds include cardiolipin, phosphatidyl choline, cholesterol, dipalmitoyl phosphatidyl choline, phosphatidyl serine, and α -tocopherol.

The liposome-forming material can be dissolved in a suitable solvent, which can be a low polarity solvent such as chloroform, or a non-polar solvent, such as n-hexane, in which it is soluble. Suitable solvents only include solvents in which the liposome-forming material is soluble and which can be evaporated without leaving pharmaceutically unacceptable amounts of pharmaceutically unacceptable residues. Other components can be mixed in with this solution, including mitoxantrone, to form a solution in which all ingredients are soluble and the solvent can then be evaporated to produce a homogeneous lipid film. Solvent evaporation can be by any suitable means that preserves the stability of mitoxantrone and other lipophilic ingredients.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

5

Suitable liposomes can be neutral, negatively, or positively charged, the charge being a function of the charge of the liposome components and pH of the liposome solution. For example, at neutral pH, positively charged liposomes can be formed from a mixture of phosphatidyl choline, cholesterol, and stearyl amine. Negatively charged liposomes can be formed, for example, from phosphatidyl choline, cholesterol, and phosphatidyl serine. In a preferred embodiment, the liposomal mitoxantrone formulation contains tetramyristoyl cardiolipin, cholesterol, and egg phosphatidylcholine.

The preferred liposomal mitoxantrone formulation contains suitable relative molar amounts of mitoxantrone to lipid. Suitable relative molar amounts of mitoxantrone to lipid range of about 1:1-50, more preferably, about 1:2-40, more preferably about 1:5-30, still more preferably about 1:10-20, and most preferably about 1:15.

The liposomal formulation also contains suitable relative molar amounts of cardiolipin, phosphatidylcholine, and cholesterol. Suitable relative molar amounts include about 0.1-25:1-99:0.1-50 of cardiolipin:phosphatidylcholine:cholesterol. More preferably, relative molar amounts range from 0.2-10:2-50:1-25, still more preferably 0.5-5:4-25:2-15, and still more preferably the amounts range from 0.75-2.5-1.5:4-10, the most preferred ratio being 1:10:6.8. Preferred liposomal formulations also contain suitable amounts of antioxidants such as α -tocopherol or other suitable antioxidants. Suitable amounts range from about 0.001 or more to about 5 wt.% or less.

Liposomes can be formed by adding a polar solution preferably an aqueous solution, such as a saline solution, to the lipid film and dispersing the film with vigorous mixing. Preferably, the polar solution contains mitoxantrone. The solution can be pure water or it can contain salts, buffers, or other soluble active agents. Any method of mixing can be used provided that the chosen method induces sufficient shearing forces between the lipid film and polar solvent to strongly homogenize the mixture and form liposomes. For example, mixing can be by vortexing, magnetic stirring, and/or sonicating. Multilamellar liposomes can be formed simply by vortexing the solution. Where unilamellar liposomes are desired a sonication and/or filtration step can be included in the process.

In the preferred method of manufacturing the liposomal mitoxantrone formulation, a vial of lyophilized liposomes is prepared and Novantrone® is added to form the liposomal formulation of the mitoxantrone. The lyophilized liposomes are manufactured by dissolving the lipid ingredients and D- α -tocopheryl acid in warm butyl alcohol as described in more detail in Example 7. Warm water with trehalose dihydrate is mixed into this solution until the solution is clear. The solution is sterile

WO 02/32400

PCT/US01/42757

6

filtered through a 0.22 μm filter into sterile vials and lyophilized. Desirably, the lyophilized product is an off-white cake or powder having a moisture content of about 12% or less and that can easily be reconstituted into a uniform solution of liposomes having a pH of from about 3 to about 6.

5 The final dosage form is prepared by adding 7.5 ml of a mitoxantrone solution (15 mg) such as from a Novantrone® vial and 7.5 ml of normal saline (0.9% NaCl) to a vial of the lyophilized lipids. The liposome mixture hydrates at room temperature for 30 minutes and is vortexed vigorously for 2 minutes at room temperature. The mixture is allowed to hydrate while being sonicated at maximum intensity for 10 minutes in a bath-
10 type sonicator. This final dosage form may be dispensed in either a syringe or standard infusion set over 45 minutes for use within 8 hours after reconstitution. Using this method about 70 wt.% or more of the added mitoxantrone can be entrapped in the liposomal formulation. More preferably, about 80 wt.% or more of the mitoxantrone is entrapped. More preferable, about 85 wt.% or more of the mitoxantrone is entrapped in
15 liposomes. Still more preferably, about 90 wt.% or more or even about 95 wt.% or more of mitoxantrone is entrapped in the liposomes.

The efficiency of mitoxantrone entrapment can be determined by dialysis of an aliquot of the liposomal preparation overnight in an aqueous solution and thereafter dissolving the liposomes in methanol and analyzing the sample by standard methods
20 using high pressure reverse phase liquid chromatography (HPLC). Alternatively, liposomes can be collected after centrifugation at 50,000 $\times g$ for 1 hour prior to dissolving them in methanol for HPLC analysis. Generally the encapsulation efficiency of mitoxantrone in liposomes will be more than 80% of the initial input dose.

25 More generally, any suitable method of forming liposomes can be used so long as it results in liposomal mitoxantrone. Thus, solvent evaporation methods that do not involve formation of a dry lipid film can be used. For example, liposomes can be prepared by forming an emulsion in an aqueous and organic phase and evaporating the organic solvent. The present invention is intended to encompass liposomal
30 formulations of mitoxantrone however made.

The invention includes pharmaceutical preparations which in addition to non-toxic, inert pharmaceutically suitable excipients contain the liposomal mitoxantrone formulation and processes for production of these preparations. By pharmaceutically suitable excipients there are to be understood solid, semi-solid or liquid diluents, fillers
35 and formulation auxiliaries of all kinds. The invention also includes pharmaceutical preparations in dosage units. This means that the preparations are in the form of individual parts, for example vials, syringes, capsules, pills, suppositories, or

WO 02/32400

PCT/US01/42757

7

ampoules, of which the content of liposomal entrapped mitoxantrone corresponds to a fraction or a multiple of an individual dose. The dosage units can contain, for example, 1, 2, 3 or 4 individual doses or 1/2, 1/3 or 1/4 of an individual dose. An individual dose preferably contains the amount of mitoxantrone which is given in one administration and which usually corresponds to a whole, a half or a third or a quarter of a daily dose.

Tablets, dragees, capsules, pills, granules, suppositories, solutions, suspensions and emulsions, pastes, ointments, gels, creams, lotions, powders and sprays can be suitable pharmaceutical preparations. Suppositories can contain, in addition to the liposomal mitoxantrone, suitable water-soluble or water-insoluble excipients. Suitable excipients are those in which the inventive liposomal mitoxantrone is sufficiently stable to allow for therapeutic use, for example polyethylene glycols, certain fats, and esters or mixtures of these substances. Ointments, pastes, creams and gels can also contain suitable excipients in which the liposomal mitoxantrone is stable.

The mitoxantrone formulation should preferably be present in the abovementioned pharmaceutical preparations in a concentration of about 0.1 to 50, preferably of about 0.5 to 25, wt% of the total dry formulation.

The abovementioned pharmaceutical preparations are manufactured in the usual manner according to methods as are known, for example, by mixing the liposomal mitoxantrone with the excipient or excipients.

The active compound and pharmaceutical preparations containing the active compound are used in human and veterinary medicine for the prevention, amelioration and/or cure of diseases, in particular those diseases caused by cellular proliferation, such as cancer, in any mammal, such as a cow, horse, pig, dog or cat. For example, dog lymphoma can be treated effectively with the present mitoxantrone formulation. However, the present formulation is particularly preferred for use in the treatment of human patients, particularly for cancer and other diseases caused by cellular proliferation. The inventive compositions have particular use in treating human multiple sclerosis, lymphoma, and prostate, liver, ovarian, breast, lung and colon cancers.

The active compound or its pharmaceutical preparations can be administered locally, orally, parenterally, intraperitoneally and/or rectally, preferably parenterally, however intravenous administration is preferred.

In a human of about 70 kg body weight, for example, from about 0.5-100 mg/m² mitoxantrone is administered. Preferably, from about 5.0 or more to 50 mg/m² of mitoxantrone or more preferably from about 10 or more to about 45 mg/m² is administered. Still more preferably about 20 or more to about 40 mg/m² and still more

WO 02/32400

PCT/US01/42757

8

preferably about 25 or more to about 40 mg/m² of mitoxantrone can be administered. However, it can be necessary to deviate from the dosages mentioned and, in particular, to do so as a function of the nature and body weight of the subject to be treated, the nature and the severity of the illness, the nature of the preparation and if the administration of the medicine, and the time or interval over which the administration takes place. Thus, it can suffice in some cases to manage with less than the abovementioned amount of active compound while in other cases the abovementioned amount of active compound can be exceeded. Suitable amounts are therapeutically effective amounts that do not have excessive toxicity, as determined in empirical and case-by-case studies.

One advantage of the present composition is that it provides a method of modulating multidrug resistance in cancer cells that are subjected to mitoxantrone treatment. In particular, the present liposomal formulations reduce the tendency of cancer cells subjected to chemotherapy with mitoxantrone to develop resistance thereto, and reduces the tendency of treated cells of developing resistance to other therapeutic agents, such as camptothecin, taxol, or doxorubicin, for example. Thus, other agents can be advantageously employed with the present treatment either in the form of a combination active with mitoxantrone or by separate administration.

The examples demonstrate that mitoxantrone administration produces pharmacological efficacy against mammalian tumors that is not diminished by inclusion in a liposomal formulation. Further, animals could tolerate higher doses of mitoxantrone when it is administered as a liposomal formulation and they have better outcomes as measured by median survival times or reduced tumor volumes than animals given conventional mitoxantrone. Higher plasma concentrations in mice and dogs and a longer elimination half-life of compound in mice is demonstrated. Peak plasma concentrations were approximately 50-fold higher in the mouse and 9-fold higher in the dog at comparable dosages. Mouse tissue concentrations of conventional mitoxantrone were lower in heart, lung and kidneys and higher in liver and spleen after administration of liposomal mitoxantrone as compared to conventional mitoxantrone. Toxicity did not occur until higher doses of liposomal mitoxantrone were administered as compared to conventional mitoxantrone alone, however, toxicity profiles appear similar. No toxicity occurred in the liposomal formulation that has not been observed previously with mitoxantrone alone. In animals, higher doses of liposomal mitoxantrone are better tolerated and more effective than conventional mitoxantrone in its current conventional (non-liposomal) formulation.

Having described the present invention, reference will now be made to certain examples which are provided solely for purposes of illustration and which are not

WO 02/32400

PCT/US01/42757

9

intended to be limiting.

EXAMPLE 1

This example shows one formulation of liposomal mitoxantrone. Mitoxantrone
5 (3 μ moles) is dissolved with cardiolipin in (3 μ moles) in chloroform. Phosphatidyl
choline (14 μ moles) dissolved in hexane and 10 μ moles cholesterol in chloroform is
added to the mitoxantrone mixture with stirring. The solvents are evaporated under
vacuum at about 30° C. or below to form a thin dry film of lipid and drug. Liposomes
10 are formed by adding 2.5 ml of saline solution and aggressively mixing the
components, as by vortexing. The flasks can then be vortexed to provide multilamellar
liposomes or sonicated to provide small unilamellar liposomes.

EXAMPLE 2

This example demonstrates the preparation of another formulation of liposomal
15 mitoxantrone. A solution of about 6 μ M mitoxantrone, 6 μ M cardiolipin, 28 μ M
phosphatidyl choline and 20 μ M cholesterol is prepared in a suitable solvent which is
then evaporated. The dried lipid/drug film is dispersed in a 7% aqueous trehalose-
saline solution. The mixture is vortexed and sonicated. The liposomes can then be
20 dialyzed, as desired. Mitoxantrone encapsulation is 80% or more as assayed by HPLC.

EXAMPLE 3

This example demonstrates the preparation of another formulation of liposomal
mitoxantrone. Mitoxantrone can be entrapped in liposomes by using 3 μ M of the drug,
15 15 μ M of dipalmitoyl phosphatidyl choline, 1 μ M cardiolipin, and 9 μ M cholesterol in
a volume of 2.5 ml. The drug and lipid mixture can be evaporated under vacuum and
resuspended in an equal volume of saline solution. Liposomes are prepared as
described in Example 1. The mitoxantrone encapsulation efficiency is higher than
25 80% in this system.

EXAMPLE 4

This example demonstrates the preparation of another formulation of liposomal
mitoxantrone. In this preparation of liposomes 2 μ M mitoxantrone, 2 μ M of
phosphatidyl serine, 11 μ M phosphatidyl choline, 2 μ M cardiolipin, and 7 μ M
cholesterol are dissolved in a solution. Liposomes are prepared as in Example 1.
35 Greater than 80% mitoxantrone encapsulation efficiency can be expected.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

10

EXAMPLE 5

This example demonstrates another formulation of liposomal mitoxantrone. Mitoxantrone (3 μ moles) can be dissolved in chloroform containing 3 μ moles cardiolipin and the mixture allowed to form complexes. To facilitate complex formation the chloroform solvent is removed by evaporation. Phosphatidyl choline (14 μ moles) dissolved in hexane and 10 μ moles cholesterol in chloroform can be added to the dry film. The mixture is stirred gently and the solvents evaporated under vacuum at below 30° C to form a thin dry film of lipid and drug. Liposomes are then formed by adding 2.5 ml of saline solution and aggressively mixing the components by vortexing. The flasks can then be vortexed to provide multilamellar liposomes and optionally sonicated in a sonicator to provide small unilamellar liposomes.

EXAMPLE 6

This example demonstrates another formulation of liposomal mitoxantrone. Generally this method involves the steps of obtaining a mitoxantrone solution, adding the mitoxantrone solution to preformed liposomes and allowing the mixture to equilibrate such that liposomal mitoxantrone forms. Each vial of Novantrone® contains mitoxantrone hydrochloride equivalent to 2 mg/ml mitoxantrone free base, sodium chloride (0.8% w/v), sodium acetate (0.005%w/v) and acetic acid (0.046% w/v). The Novantrone® solution has a pH of 3.0 to 4.5 and contains 0.14 mEq of sodium per ml.

Preformed liposomes are prepared by adding about 2 g of D- α -tocopherol acid succinate to about 10 kg of t-butyl alcohol which is warmed to about 35-40° C. The solution is mixed for about 5 minutes until the tocopherol is dissolved. About 60 g of tetramyristoyl cardiolipin is added to the solution and the solution is mixed for about 5 minutes. About 100 g of cholesterol is added to the solution and the solution is mixed for about 5 more minutes then about 300 g of egg phosphatidyl choline is added and mixed for another 5 min. A second aqueous solution containing 2,000 g of water at about 35° C - 40° C and about 120 g of trehalose dihydrate is mixed into the lipid solution until the mixture is clear. The mixture is sterile filtered through a 0.22 micron pore size Durapore® Millipak 200 filter and about 11 g is filled into sterile vials and lyophilized. Liposomes prepared in this manner are in the form of an off-white cake or powder and are easily reconstituted. The moisture content of the lyophilized liposomes is about 12% or less. The lyophilized product is stored at 4° C prior to use.

To prepare liposomal mitoxantrone 7.5 ml mitoxantrone solution (15 mg) from a Novantrone® vial is added to a vial of lyophilized lipids along with 7.5 ml of normal

WO 02/32400

PCT/US01/42757

11

saline (0.9% NaCl). The vial is swirled gently, allowed to hydrate at room temperature for 30 minutes, vortexed vigorously for 2 min, and sonicated for 10 min in a bath-type sonicator at maximum intensity. Doses can then be withdrawn from the vial for use.

The product may be dispensed in either a syringe or standard infusion set over 45 min.

- 5 Desirably, the liposomal mitoxantrone is maintained at room temperature until use, and is used within 8 h of reconstitution.

Example 7

- 10 This example demonstrates another formulation of liposomal mitoxantrone. A lyophilized lipid composition containing cardiolipin:phosphatidylcholine:cholesterol in a 1:10:6.8 molar ratio was prepared. Twenty-nine trials were conducted varying the mitoxantrone to lipid molar ratios, hydration and sonication times. Formulations were dialyzed against normal saline overnight and the amount of mitoxantrone retained in each formulation was determined.

- 15 The study demonstrated that a mitoxantrone to lipid molar ratio of 1:15 (2 mg of 1,1,2,2-tetramyristoyl cardiolipin, 12 mg phosphatidylcholine, and about 4 mg cholesterol per mg of mitoxantrone) with hydration for 2 h and sonication for 10 min produced retained $94 \pm 3\%$ liposomal mitoxantrone for a 1 mg/ml mitoxantrone solution, $95 \pm 6\%$ liposomal mitoxantrone for a 2 mg/ml mitoxantrone solution, and
- 20 97% mitoxantrone for a 1.5 mg/ml mitoxantrone solution. Reduction of the hydration time to 30 min did not appear to significantly affect the amount of mitoxantrone retained in the formulation at the 1 mg/ml mitoxantrone concentration.

- Unless noted otherwise, in the following examples a 1 mg/ml mitoxantrone formulation was prepared with a 1:15 mitoxantrone to lipid molar ratio, a hydration time of 2 h, and a sonication time of 10 min.
- 25

Example 8

- The following example demonstrates that mitoxantrone in the liposomal formulation described above has a lower toxicity as compared to identical
- 30 concentrations of nonliposomal (conventional) mitoxantrone and that at least 15 mg/kg of mitoxantrone administered in a liposomal formulation is not toxic to mice. Eighty male CD2F1 mice weighing 20-22 g were acclimated for 1 week and randomly separated into 8 groups of ten animals each with 5 animals per cage. On day 0 all groups of animals were injected i.v. in the tail vein with the drug or vehicle control.
- 35 The volumes administered were varied based on individual animal weights. Mouse weights were recorded for each mouse on alternate days following injection and observation for clinical illness were recorded at least daily. The injections were as

WO 02/32400

PCT/US01/42757

12

shown in Table 1.

Table 1

Group	Drug formulation	Dose
1	Conventional Mitoxantrone	15 mg/kg
2	Conventional Mitoxantrone	10 mg/kg
3	Conventional Mitoxantrone	5 mg/kg
4	Liposomal mitoxantrone	15 mg/kg
5	Liposomal mitoxantrone	10 mg/kg
6	Liposomal mitoxantrone	5 mg/kg
7	Blank liposomes	15 mg/kg
8	Normal saline solution	

5 In the first 5 days no adverse clinical side effects were manifested for any of the animals. During days 6-10 all group 1 animals became moribund. One such animal died on day 9 and the remaining group 1 animals were sacrificed on day 10. Four animals each from groups 4, 7, and 8 were sacrificed intentionally and blood hematology and clinical chemistry were studied. The major organs were also fixed in buffered 10% formalin and studied. No clinical signs of toxicity were apparent in any group other than group 1. Following the study all remaining animals were sacrificed and blood hematology and clinical chemistry were studied and the major organs were fixed in buffered 10% formalin and studied.

10 A comparison of weights seen in the various groups showed clinically moderate or unapparent changes for all groups except group 1, (15 mg/kg dose) of conventional mitoxantrone. The group 1 animals progressively lost weight up to about 35% by day 9/10. Group 2 animals initially showed significant weight loss of 20% by day 10 but gradually recovered throughout the remainder of the study. The remaining groups all gained weight steadily throughout the study.

20 In this and the following examples blood was analyzed for bilirubin, blood urine nitrogen (BUN), creatinine, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), hemoglobin, hematocrit, white blood cell count, red blood cell count, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets, neutrophils, band neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils.

25 Clinically significant elevations in ALT were noted in most of the group 1 mice and one of the group 7 mice at day 10. Similar AST elevations were also observed. Two group 1 mice also exhibited modest elevations in BUN but not creatinine, suggesting a

WO 02/32400

PCT/US01/42757

13

prerenal effect, possibly caused by dehydration or hemoconcentration. No other drug related effects were observed in these studies.

Histopathology demonstrated compound effects on hematopoietic and lymphoid tissues of the spleen and bone marrow in mice treated with conventional mitoxantrone and liposomal mitoxantrone. Full recovery was seen on Day 67 in the liposomal mitoxantrone treated animals at all dose levels suggesting liposomal mitoxantrone was less cytotoxic.

In conclusion, no morbidity or mortality was seen in the study with any of the controls or the liposomal formulation of up to 15 mg/kg mitoxantrone whereas 100% morbidity was observed in the 15 mg/kg dose of conventional mitoxantrone HCl.

Example 9

The following example demonstrates that mitoxantrone in the liposomal formulation described in Example 7 has a lower toxicity as compared to identical concentrations of conventional mitoxantrone HCl and that up to 35 mg/kg of mitoxantrone can be administered to mice in a liposomal formulation without apparent toxicity. Twenty male CD2F1 mice weighing 20-22 g were acclimated for 1 week and randomly separated into 4 groups of five animals each with 5 animals per cage. On day 0 all groups of animals were injected i.v. in the tail vein with the drug or vehicle control. The volumes administered were varied based on individual animal weights. Mouse weights were recorded for each mouse on alternate days following injection and observation for clinical illness were recorded at least daily. The injections were as shown in Table 2.

Table 2

<u>Group</u>	<u>Drug formulation</u>	<u>Dose</u>
1	Liposomal mitoxantrone	35 mg/kg
2	Liposomal mitoxantrone	25 mg/kg
3	Conventional Mitoxantrone	25 mg/kg
4	Blank liposomes	35 mg/kg

In the first 5 days no adverse clinical side effects were manifested for any of the animals. During days 6-7 all group 3 animals became moribund. One such animal died on day 6 and the remaining group 3 animals were sacrificed on day 7. No clinical signs of toxicity were apparent in any other group. Following the study all remaining animals were sacrificed and blood hematology and clinical chemistry were studied as in Example 8. The major organs were fixed in buffered 10% formalin and studied in

WO 02/32400

PCT/US01/42757

14

all deceased animals.

A comparison of weights seen in the various groups showed clinically moderate or unapparent changes for all groups except group 3 which received the 25 mg/kg dose of conventional mitoxantrone. The group 3 animals progressively lost weight up to about 30% by day 7. Group 1 animals initially showed significant weight loss of 20% by day 10 but gradually recovered throughout the remainder of the study. The remaining groups all gained weight steadily throughout the study.

In conclusion, no morbidity or mortality was seen in the study with the vehicle control or the liposomal formulation of mitoxantrone whereas 100% morbidity was observed in the 25 mg/kg dose of conventional mitoxantrone.

Example 10

The following example demonstrates that mitoxantrone in the liposomal formulation described in Example 7 has a lower toxicity as compared to identical concentrations of conventional mitoxantrone HCl and that at least 35 mg/kg of mitoxantrone administered in a liposomal formulation is not toxic to mice. Seventy male CD2F1 mice weighing 20-22 g were acclimated for 1 week and randomly separated into 7 groups of ten animals each with 5 animals per cage. On day 0 all groups of animals were injected i.v. in the tail vein with the drug or vehicle control. The volumes administered were varied based on individual animal weights. Mouse weights were recorded for each mouse on alternate days following injection and observation for clinical illness were recorded at least daily. The injections were as shown in Table 3.

25 Table 3

<u>Group</u>	<u>Drug formulation</u>	<u>Dose</u>
1	Conventional Mitoxantrone	10 mg/kg
2	Conventional Mitoxantrone	25 mg/kg
3	Liposomal mitoxantrone	10 mg/kg
4	Liposomal mitoxantrone	25 mg/kg
5	Liposomal mitoxantrone	35 mg/kg
6	Blank liposomes	35 mg/kg
7	Normal saline solution	

In the first 2 days no adverse clinical side effects were manifested for any of the animals. During day 3 all group 2 animals became moribund and 3 were sacrificed. Three animals each from groups 1, 3, 4, 5, 6, and 7 were also sacrificed intentionally

WO 02/32400

PCT/US01/42757

15

on day 3 and blood hematology and clinical chemistry were studied. Three additional animals from group 2 were moribund sacrifices at day 7 and 3 additional animals from groups 1, 3, 4, 5, 6, and 7 were also sacrificed. On day 10 the remaining group 2 animals had died. No other clinical signs of toxicity were observed through day 60.

5 No clinical signs of toxicity were apparent in any group other than in group 2. Following the study all remaining animals were sacrificed and blood hematology and clinical chemistry testing, as described in Example 8 was undertaken. The major organs were fixed in buffered 10% formalin and studied in all deceased animals.

10 A comparison of weights seen in the various groups showed clinically moderate or unapparent changes for all groups except group 2 which received the 25 mg/kg dose of conventional mitoxantrone. The group 2 animals progressively lost weight up to about 27% by day 7. Group 1 and group 5 animals initially showed significant weight loss (13% and 8%, respectively) but gradually recovered throughout the remainder of the study. The remaining groups all gained weight steadily throughout the study.

15 On day 3 no consistent compound effects were noted in the clinical chemistry data, although one mouse dosed with 25 mg/kg conventional mitoxantrone (Group 2) and one mouse dosed with 35 mg/kg liposomal mitoxantrone (Group 5) had modest increases in ALT activities. Cytotoxic effects on white blood cells were noted with most mice dosed with mitoxantrone but not in blank liposome-dosed mice.

20 On day 7 clinical chemistry data were inconclusive, although AST and ALT activities varied more widely and trended toward higher levels, consistent with some liver injury in some animals. Day 67 mice showed similar inconsistent increases, as did several of the mice treated with blank liposomes (group 6).

25 In conclusion, no morbidity or mortality was seen in the study with any of the controls or the liposomal formulation of mitoxantrone whereas 100% morbidity was observed in group 2 animals, which received 25 mg/kg of conventional mitoxantrone.

Example 11

30 The following example demonstrates that the administration of multiple doses of mitoxantrone, as prepared in Example 7, is better tolerated when a liposomal formulation is given as compared to identical concentrations of conventional mitoxantrone HCl and that at least 10 mg/kg of liposomal mitoxantrone administered repeatedly on 5 consecutive days is not toxic to mice. Forty male CD2F1 mice weighing 20-22 g were acclimated for 1 week and randomly separated into 8 groups of 5 animals each with 5 animals per cage. On day 0 all groups of animals were 35 injected i.v. in the tail vein with the drug or vehicle control and once daily thereafter for a period of 5 days. The volumes administered were varied based on individual

WO 02/32400

PCT/US01/42757

16

animal weights. Mouse weights were recorded for each mouse on alternate days following injection and observations of clinical illness were recorded at least daily. The injections were as shown in Table 4.

5 Table 4

Group	Drug formulation	Dose
1	Conventional Mitoxantrone	2.5 mg/kg
2	Conventional Mitoxantrone	5.0 mg/kg
3	Conventional Mitoxantrone	7.5 mg/kg
4	Liposomal mitoxantrone	2.5 mg/kg
5	Liposomal mitoxantrone	5.0 mg/kg
6	Liposomal mitoxantrone	7.5 mg/kg
7	Blank liposomes	7.5 mg/kg
8	Normal saline solution	

No adverse clinical effects were observed in any of the mice in the first 5 days. On day 6 animals in groups 1, 2, 3, and 6 exhibited ruffled fur and hunching behavior. Two animals in groups 2 and 3 were moribund sacrifices. Two animals from each of the remaining groups were sacrificed for analysis. On day 7 a total of 3 animals from group 2 and 2 animals from group 3 became moribund sacrifices, one additional animal from group 3 was found deceased, and one animal from groups 6, 7, and 8 was sacrificed for hematological and clinical chemistry analysis. There was no indication of clinical toxicity observed in any of the remaining animals through day 60 at which time all animals were sacrificed. Blood samples were collected for hematological and clinical chemistry testing as described in Example 8, and major organs were fixed in buffered 10% formalin.

Comparison of the animal masses in various groups was interpreted as moderate, mild or unapparent except in groups 2 (5 mg/kg conventional mitoxantrone) and 3 (7.5 mg/kg conventional mitoxantrone). These animals showed progressive weight loss of about 25 % by day 7. Group 1 (2.5 mg/kg conventional mitoxantrone) and group 6 (7.5 mg/kg liposomal mitoxantrone) animals initially lost about 28% of their mass but gradually recovered through the end of the study. Other treatment groups exhibited no change in mass during the study.

On day 7 the mice sacrificed from groups 6, 7, and 8 each exhibited a modest AST elevation. The mouse from group 8 also had increased alkaline phosphatase activity and the mice from groups 6 and 7 had reduced creatinine and alkaline phosphatase. Moribund-sacrificed mice from groups 2, 3, and 6 exhibited marked,

WO 02/32400

PCT/US01/42757

17

clinically significant, compound related leukopenia with decreased neutrophils and lymphocyte counts, and a modest decrease in platelet count. Mice from groups 1, 4, 6, and 7 were analyzed at day 64 and exhibited moderate elevations in alkaline phosphatase and AST but were otherwise normal.

5 Histopathologic examination demonstrated hematopoietic and lymphoid depletion of spleen and bone marrow and villous and/or crypt atrophy in the intestines in all treatment groups. Liposomal mitoxantrone appeared to be less cytotoxic than conventional mitoxantrone for the spleen and much less cytotoxic for the intestinal epithelium. Some hepatocellular vacuolar degeneration was seen
10 in the livers of several mice administered conventional mitoxantrone at 5 or 7.5 mg/kg. In contrast, minimal hepatocellular vacuolar degeneration was seen in one mouse given 5 mg/kg liposomal mitoxantrone and none of the mice given 7.5 mg/kg liposomal mitoxantrone. Both conventional mitoxantrone and liposomal mitoxantrone administration led to a depletion of osteoblasts and osteoclasts
15 sufficient to impair longitudinal bone growth in many mice. Significant recovery of all effects was observed by day 64 in all the surviving mice given conventional mitoxantrone and in the mice given liposomal mitoxantrone at 2.5 mg/kg. Mice at 7.5 mg/kg liposomal mitoxantrone still had minimal histologic effects in the hematopoietic and lymphoid tissues on day 64.

20 Liposomal mitoxantrone appeared slightly less cytotoxic than conventional mitoxantrone for the spleen and much less cytotoxic for intestinal epithelium in spite of the tissue distribution findings that indicated greatly enhanced tissue concentrations of mitoxantrone. Some hepatocellular vacuolar degeneration was seen in the livers of several mice administered conventional mitoxantrone at 5 or
25 7.5 mg/kg. Minimal hepatocellular vacuolar degeneration was seen in only 1 mouse at 5 mg/kg liposomal mitoxantrone and none of the mice at 7.5 mg/kg.

In summary, no morbidity or mortality was seen in any group that received liposomal mitoxantrone or in the group that received 2.5 mg/kg of conventional mitoxantrone. In contrast, all of the animals in groups 2 (5 mg/kg conventional
30 mitoxantrone) and 3 (7.5 mg/kg conventional mitoxantrone) died.

Example 12

The following example demonstrates that mitoxantrone in the liposomal formulation described in Example 7 has a lower toxicity as compared to identical
35 concentrations of conventional mitoxantrone HCl and that at least 35 mg/kg of mitoxantrone administered in a liposomal formulation is not toxic to mice. Thirty male CD2F1 mice weighing 20-22 g were acclimated for 1 week and randomly

WO 02/32400

PCT/US01/42757

18

separated into 6 groups of five animals each with 5 animals per cage. On day 0 all groups of animals were injected i.v. in the tail vein with the drug or vehicle control and once daily thereafter for a period of 5 days. The volumes administered were varied based on individual animal weights. Mouse weights were determined for each mouse on alternate days following injection and observation for clinical illness were recorded at least daily. The injections were as shown in Table 5.

Table 5

Group	Drug formulation	Dose
1	Conventional Mitoxantrone	2.5 mg/kg
2	Conventional Mitoxantrone	5.0 mg/kg
3	Liposomal mitoxantrone	5 mg/kg
4	Liposomal mitoxantrone	7.5 mg/kg
5	Liposomal mitoxantrone	10 mg/kg
6	Normal saline solution	

No adverse clinical effects were observed in any of the mice in the first 5 days. Animals in groups 1, 2, and 5 exhibited ruffled fur and hunching behavior. On day 8, 3 animals from groups 2 and 5 were moribund sacrifices and 1 animal from group 5 was deceased. On day 8, 3 animals from group 6 were sacrificed for hematology and clinical chemistry. On day 10, 1 animal from group 2 was a moribund sacrifice and 1 animal was deceased. One animal from group 5 was a moribund sacrifice on day 10. Three animals in group 1 were deceased by day 12. One animal in group 4 was deceased on day 18. There was no indication of clinical toxicity observed in any of the remaining animals through day 60 at which time all animals were sacrificed. Blood samples were collected for hematological and clinical chemistry testing as described in Example 8, and major organs were fixed in buffered 10% formalin.

The variation in animal weight in various groups was moderate, mild or unapparent except in groups 2 (5 mg/kg conventional mitoxantrone) and 5 (10 mg/kg liposomal mitoxantrone). These animals showed progressive weight loss of about 35% and 25%, respectively, by day 9. By day 13, group 1 (2.5 mg/kg conventional mitoxantrone), group 3 (5 mg/kg liposomal mitoxantrone), and group 4 (7.5 mg/kg liposomal mitoxantrone) animals initially lost about 30%, 7%, and 30% of their weight, respectively. Their weight gradually returned during the study. Other treatment groups exhibited no change in mass during the study.

No morbidity or mortality was seen in the vehicle control group or groups receiving up to 5 mg/kg (1 time on 5 consecutive days) of liposomal mitoxantrone.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

19

Morbidity of 60% was observed for animals treated with 2.5 mg/kg of conventional mitoxantrone. Morbidity of 20% was observed with animals treated with 7.5 mg/kg of liposomal mitoxantrone. Treatment with 10 mg/kg of liposomal mitoxantrone or 5 mg/kg of conventional mitoxantrone was lethal to 100% of the mice tested.

5 Moribund sacrificed animals from groups 2 (5 mg/kg conventional mitoxantrone) and 5 (10 mg/kg liposomal mitoxantrone) exhibited marked elevations in AST and ALT. In addition, bilirubin concentration in 3 of the 4 group 2 mice tested and 1 of the 4 group 5 mice was greater than in control mice. The moribund animals exhibited marked leukopenia with reduced neutrophils and lymphocytes. Modest
10 variable decreases in platelet counts were also observed. Minimal increases in red blood cell count were also observed. Other parameters were not significantly affected. Mouse sacrificed at day 70 exhibited normal clinical chemistry but had low white blood cell counts. Lymphocytes and neutrophils were low in these mice. Other parameters were normal.

15 In the single-dose experiment in Example 8, a 15 mg/kg dose of conventional mitoxantrone but not liposomal mitoxantrone induced significant increases in ALT signifying acute liver injury, but a higher dose in Example 10 did not. Taking the multiple dose data into account, it is clear that conventional mitoxantrone has the potential to cause significant liver injury. Data from the terminal sacrifices suggest
20 that significant recovery takes place, with little evidence of either toxicity or cytotoxicity.

Mice from the higher dose groups exhibited cytotoxic effects on white blood cells and platelets, with clear decreases in neutrophils and lymphocytes and modest decreases in platelets. In the lower dose groups the effects were much less marked.
25 The data show that conventional mitoxantrone at 5 mg/kg/day and liposomal mitoxantrone at 10 mg/kg/day induced roughly equivalent acute liver injury, as evidenced by increased ALT, AST and bilirubin by day 8.

In summary, clinical pathology data from these studies show that liposomal mitoxantrone administered at 10 mg/kg/day is no more toxic than conventional
30 mitoxantrone when administered at 5 mg/kg/day and significant recovery from toxic and cytotoxic effects was evident. The data show that liposomal mitoxantrone can safely be administered at amounts that are more than twice that considered safe for conventional mitoxantrone.

35 Example 13

The following example demonstrates that the liposomal mitoxantrone formulation described in Example 7 reaches higher plasma concentrations, has a longer

WO 02/32400

PCT/US01/42757

20

half-life, and a slower clearance rate in mammalian blood than does mitoxantrone administered in a conventional formulation. Pharmacokinetic evaluation was performed in male CD2F1 mice, after single dose i.v. administration of conventional and liposomal mitoxantrone formulations at 5 mg/kg. Groups of four mice were sacrificed at 5 min., 15 min., 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h and 48 h after dosing and their blood and organs were collected and analyzed for mitoxantrone content.

Plasma and tissue samples were analyzed for mitoxantrone by reverse phase HPLC. Plasma samples (0.25 ml) were mixed with 0.5 ml of solution of 0.01 mg/ml hexanesulfonic acid, 0.5 mg/ml ascorbic acid, and 0.25 µg ametantrone as internal standard. After vortexing for 30 sec., 0.5 ml of 0.1 M borate buffer (pH 9.5) and 150 µl of 1 M sodium hydroxide was added and the solution vortexed again for 30 sec. The samples were extracted with 10 ml of dichloromethane on a horizontal shaker for 1 h and centrifuged for 15 min. at 3,000 rpm. The organic layer (9 ml) was separated and evaporated under nitrogen. Samples were reconstituted with 10 µl of mobile phase prior to HPLC analysis. Tissue samples were homogenized in 1 ml of solution containing 20% ascorbic acid in 0.1 M citrate buffer, pH 3.0, and extracted as described above. Mitoxantrone was separated by reverse-phase chromatography (Waters µBondapak® C-18) using a mobile phase of 33% acetonitrile, and 67% 0.16 M ammonium formate buffer, pH 2.7 delivered at a flow rate of 1 ml/min. Mitoxantrone was detected at 600 nm. The limit of sensitivity was 10 ng/ml.

Plasma Pharmacokinetic parameters were assessed by standard methods. The elimination rate constant (K) was calculated from the linear regression analysis of plasma concentration-time curve. The area under the curve ($AUC_{0-\infty}$) was calculated using the linear trapezoidal method with extrapolation of the terminal phase to infinity (C_{last}/K), where C_{last} is the last measured concentration. Other parameters calculated were total body clearance (Cl) as Dose/AUC; volume of distribution (V_{area}) = Cl/K; elimination half-life ($t_{1/2}$) = $0.693/K_{el}$.

In summary, following i.v. administration, liposomal mitoxantrone produced a significantly higher peak plasma concentration (50-fold) as compared to conventional mitoxantrone. The decrease in plasma concentration followed first-order kinetics with elimination half-life of 6.6 min. and 1 h for conventional and liposomal formulations, respectively. The AUC values and terminal elimination half-lives were C_{max} , AUC and $t_{1/2}$ values after conventional mitoxantrone were 0.41 µg/ml, 0.14 µg·hr/ml and 0.11 hr, respectively, while these values were approximately 21 µg/ml, 28 µg·hr/ml, and 1 hr, for these same parameters after liposomal mitoxantrone administration. These increases could be explained by the decrease in both the clearance and the volume of distribution of the compound. The calculated total mitoxantrone clearance was

WO 02/32400

PCT/US01/42757

21

substantially reduced with liposomal mitoxantrone (3 ml/min/kg) as compared to conventional mitoxantrone (600 ml/min/kg). The calculated volume of distribution was also markedly reduced for liposomal mitoxantrone (0.3 l/kg) versus conventional mitoxantrone (5.5 l/kg).

5 A similar pattern of clearance from the tissues was observed for the lungs and kidneys with conventional mitoxantrone tissue concentrations of approximately 20 and 40 µg/g in the lungs and kidneys, respectively and 13 and 16 µg/g in these same tissues after liposomal mitoxantrone administration. In the liver, mitoxantrone concentrations decreased gradually from approximately 19 to 2 µg/g after administration of
10 conventional mitoxantrone while liver concentrations increased from approximately 25 to 37 µg/g at 4 hours after administration of liposomal mitoxantrone before declining very gradually to 30 µg/g at 48 hours. Lower peak concentrations of mitoxantrone were detected in the heart for the liposomal formulation (5.6 µg/g tissue) versus conventional mitoxantrone (11 µg/g tissue) 5 minutes after administration. The
15 difference remained at least 2-fold for up to 48 hours after administration.

At all time points examined, heart, lung, and kidney concentrations of conventional mitoxantrone were higher for the conventional mitoxantrone-treated mice than for the liposomal mitoxantrone-treated mice. At all time points examined, spleen
20 and liver concentrations were higher for the liposomal mitoxantrone-treated mice than for the conventional mitoxantrone-treated animals, demonstrating that the liposomal formulation shifts the distribution of the compound. Administration of conventional mitoxantrone lead to heart tissue concentrations of approximately 10 µg/g at 5 and 15 minutes after compound administration with the concentrations decreasing gradually to 5
25 to 6 µg/g at 24 and 48 hours. After liposomal mitoxantrone administration, heart mitoxantrone concentrations were about 6 µg/g at 5 minutes and the concentration decreased gradually to approximately 2 µg/g at 24 to 48 hours. These data suggest the potential for decreased cardiac toxicity for liposomal mitoxantrone.

30

Example 14

This example demonstrates the efficacy of liposomal mitoxantrone, as prepared in Example 7, against human leukemia cells and demonstrates the increased efficacy of the liposomal formulation as compared to a conventional mitoxantrone formulation.
35 Murine leukemia cells, L1210 leukemia cells were grown in the peritoneum of CD2F1 mice by three serial propagations (i.p.). Ascites developed within eight days of the last inoculation were used in the following experiments. Cytostatic activities of liposomal

WO 02/32400

PCT/US01/42757

22

and conventional formulations of mitoxantrone against L1210 ascitic leukemia was determined. Animal group weights were determined three times a week and clinically morbid animals were humanely sacrificed. The surviving mice were observed daily for 60 days. Group survival times post i.v. treatment with single or multiple doses of the drug was indicative of the relative anti-tumor potencies of liposomal and conventional mitoxantrone.

Female CD2F1 mice were divided into eight groups of 10 animals and inoculated i.v. with 10,000 L1210 cells. Drug was administered twenty-four hours later. Conventional mitoxantrone was administered at doses of 5 and 10 mg/kg. Liposomal mitoxantrone was administered i.v. at 5, 10, 20 or 35 mg/kg doses as a single injection and the median survival time for each group was determined. Surviving animals were sacrificed on day 60 of the experiment. Blank liposomes equivalent to the 35 mg/kg dose and normal saline was also administered as controls.

The median survival time for untreated animals was 7 days. Animals treated with 5 mg/kg conventional mitoxantrone and liposomal mitoxantrone had median survivals of 12 and 13 days, respectively. The median survival time for animals given 10 mg/kg conventional mitoxantrone was 20 days, with 2/10 animals alive at day 60. The median survival time for animals treated with 10 mg/kg liposomal mitoxantrone was 27 days with 4/10 mice surviving to day 60. All animals treated with liposomal mitoxantrone at 20 mg/kg survived to day 60. At the highest dose of liposomal mitoxantrone tested, 35 mg/kg, 9/10 animals survived to Day 60, with one animal found dead on day 18, probably due to compound toxicity.

These single dose studies suggest liposomal mitoxantrone can be administered at higher doses than conventional mitoxantrone with an improved clinical outcome. In a murine model of leukemia, liposomal mitoxantrone improved the median survival of animals as compared to conventional mitoxantrone at comparable dosages and decreased compound-related mortality at both the same and higher dosages. These results suggest that it may be possible to administer higher dosages of mitoxantrone in the liposomal mitoxantrone formulation without enhancing the risk of toxicity. Mice tolerated liposomal mitoxantrone dosages of up to 20 mg/kg (60 mg/m²), and did not exhibit significant toxicity until liposomal mitoxantrone dosages of 35 mg/kg (105 mg/m²).

Example 15

This example demonstrates the efficacy of liposomal mitoxantrone, as prepared in Example 7, when administered in multiple doses. Forty female CD2F1 mice were separated into 4 groups of ten animals and inoculated with L1210 cells as described in

WO 02/32400

PCT/US01/42757

23

Example 14. The mice were treated with conventional mitoxantrone at 2.5 mg/kg or liposomal mitoxantrone at 2.5 or 5 mg/kg every 24 hours for 4 days starting 24 hours after inoculation.

5 The median survival time for mice treated with conventional mitoxantrone and liposomal mitoxantrone at 2.5 mg/kg was 13 and 14 days, respectively. This survival time was similar to that described at the same concentration in the single dose study of Example 14. No animals survived to day 60 at this dose level in these treatment groups. Mice treated with liposomal mitoxantrone at 5 mg/kg had a median survival time of 37 days with 4/10 animals surviving to day 60. These data suggest a potential
10 clinical benefit of liposomal mitoxantrone over conventional mitoxantrone when the drug is administered in multiple doses.

Example 16

This example demonstrates that in mice bearing xenografted human prostate cancer cells, survival was increased after single dose administration of liposomal mitoxantrone, as in Example 7, and mean tumor volume was reduced after multiple
15 dose administration of liposomal mitoxantrone as compared to conventional mitoxantrone-treated animals. Male Balb/c, nu/nu, 6-8 week old mice were inoculated with 5×10^6 of human hormone-refractory prostate tumor cells (PC-3). Tumor growth was monitored twice a week until the tumor volumes were in the range
20 of 60-100 mm³. Animals were then divided into groups and were treated by i.v. injection via the tail vein with conventional mitoxantrone at doses of 0.625, 1.25, 2.5, and 5 mg/kg once every other day for four days. Doses of mitoxantrone formulated in liposomes were 2.5, 5, 7.5, and 10 mg/kg. Control animals received either normal
25 saline or blank liposomes. The median survival time was calculated and all surviving animals were sacrificed on Day 34.

Animals treated with conventional mitoxantrone at 0.625 and 1.25 mg/kg demonstrated 100% survival by day 34; however, no animals treated with 2.5 and 5 mg/kg survived. Survival rates for liposomal mitoxantrone were 100% for the 2.5
30 mg/kg dose, 91% for the 5 mg/kg dose, 43% for the 7.5 mg/ml dose, and 0% for 10 mg/kg dose.

The experiments were repeated for the treatments with conventional mitoxantrone at doses of 0.625 and 1.25 mg/kg and liposomal mitoxantrone at 2.5 and 5 mg/kg following the same dosing regimen. In these experiments tumor volumes
35 were measured once or twice a week by measuring the three major axes.

Treatment with liposomal mitoxantrone at both dosages caused a significant reduction in tumor volume compared to control groups and treatment with

WO 02/32400

PCT/US01/42757

24

conventional mitoxantrone. Significant delays in tumor growth were noted with PC-3 xenografts. Severe toxicity at the higher doses of conventional mitoxantrone limited its clinical usefulness. Liposomal mitoxantrone appears to be a safer more effective antitumor agent as compared to conventional mitoxantrone.

5

Example 17

This example demonstrates that the liposomal mitoxantrone formulation has a higher concentration in blood plasma, a slower clearance than conventional mitoxantrone following administration to dogs. Plasma samples from dogs (3/sex/group) administered conventional mitoxantrone i.v. at 0.13 or 0.26 mg/kg or liposomal mitoxantrone i.v. at 0.26, 0.58 or 0.87 mg/kg were analyzed for mitoxantrone levels by reverse phase HPLC using ametantrone as the internal standard. Time points analyzed were 0, 5 and 30 min and 1, 2, 4, 8 and 24 h after a single dose administration.

Plasma concentrations in animals receiving conventional mitoxantrone could not be measured at the 5 min time point for the low dose and 30 min for the high dose. One male that received 0.258 mg/kg was measurable at the 1 h time point. In contrast, most animals that received liposomal mitoxantrone had mitoxantrone plasma concentrations for up to 2 h for the low dose and 4 h for the mid and high doses.

Concentrations of mitoxantrone were much lower when conventional mitoxantrone was administered as compared to when liposomal mitoxantrone was administered as reflected in both C_{max} and AUC values (Table 6). Additionally, clearance was higher for conventional mitoxantrone as compared to liposomal mitoxantrone. Both C_{max} and AUC values increased with increasing liposomal mitoxantrone dosages while clearance, volume of distribution and elimination half-life were constant over the dosages. There were no differences in these parameters between the sexes. The results are summarized below in Table 6, which sets out the mean for each parameter. Other parameters shown in the table include the mitoxantrone half-life ($t_{1/2}$), the volume of distribution (V), and clearance rate (Cl).

30

TABLE 6

Mitoxantrone Formulation	Dose (mg/kg)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$)	$t_{1/2}$ (hr)	Cl ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$)	V (L/kg)
Conventional-M ^a	0.13	0.027	NC ^b	NC	NC	NC
Conventional-F	0.13	0.016	NC	NC	NC	NC
Conventional-M	0.26	0.084	0.05 ^c	0.36	89	2.8

WO 02/32400

PCT/US01/42757

25

Conventional-F	0.26	0.06	NC	NC	NC	NC
Liposomal-M	0.26	0.43	0.32	NC	17	1.2
Liposomal-F	0.26	0.77	0.42	0.25	15	0.9
Liposomal-M	0.58	1.5	0.84	0.3	13	0.6
Liposomal-F	0.58	1.9	1.7	NC	6.8	0.6
Liposomal-M	0.87	2.41	1.84	NC	9	0.8
Liposomal-F	0.87	2.33	1.77	NC	11	1

^a M = Male; F = Female

^b NC = Not Calculated

^c conventional mitoxantrone was detected only until the 30 minute sampling time

5 This example shows that in the dog, administration of liposomal mitoxantrone produced about a 9-fold increase in peak plasma mitoxantrone concentration as compared to identical doses of conventional mitoxantrone. The liposome formulation also exhibited increased AUC values as well as a decreased clearance rate. Both C_{max} and AUC values increased linearly with increasing
10 dosage. The C_{max} values were approximately 0.5, 1.7 and 2.4 $\mu\text{g/ml}$ at 0.26, 0.58 and 0.87 mg/kg (5, 12 and 17 mg/m^2).

Example 18

15 This example demonstrates that dogs can tolerate higher doses of mitoxantrone when the drug is formulated in liposomes as compared to a conventional formulation of mitoxantrone. Conventional mitoxantrone was administered to beagle dogs (3/sex/group) at i.v. dosages of 0 (saline), 0.129 or 0.258 mg/kg (2.6 or 5 mg/m^2) on Days 1, 23, 43 and 65. On these same days, beagle dogs (3/sex/group) received liposomal mitoxantrone at 0 (blank
20 liposomes), 0.258, 0.580 or 0.869 mg/kg (5, 12 or 17 mg/m^2). Evaluations for compound-related effects were based on clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmologic and ECG examination, clinical pathology, plasma drug concentrations, organ weights and gross and microscopic postmortem examinations.

25 One male dog in the 0.869 mg/kg liposomal mitoxantrone group was sacrificed on Day 12 after one dose of liposomal mitoxantrone was administered due to lesions and swelling of the left limbs, hypoactivity, pallor, dehydration, and diarrhea.

30 One blank liposomal mitoxantrone treated female dog had alopecia while a second had excessive salivation through the first 29 days of the study. One female

WO 02/32400

PCT/US01/42757

26

dog from the 0.869 liposomal mitoxantrone group was limping on its left side on Days 31, 32 and 36 and on Day 52, when it exhibited inflammation and swelling of the left hind foot along with a sore or ulcer on that foot.

5 None of the animals weight was affected during the study except for males in the 0.258 conventional mitoxantrone group who lost weight. There were no changes in food consumption in any groups.

There were no changes in ECG parameters at any examination time.

10 Animals administered 0.129 and 0.258 conventional mitoxantrone had leukopenia and thrombocytopenia 4 to 10 days following each dose cycle and the severity was dose related. White blood counts tended to rebound towards normal values during the latter half of the 3-week dosing cycle. The differential white blood cell data revealed a dose-related decline in neutrophil counts that was most severe on the 10th day after each dose administration. Dose-related lymphopenia also occurred with each dosing cycle and appeared to worsen with each successive
15 dose. Anemia did not occur in the conventional mitoxantrone animals but evidence of erythroid toxicity as evidenced by decreased reticulocyte counts was observed. Reticulocyte counts rebounded rapidly to normal or slightly higher than normal values on Days 10, 32, and 46.

20 Animals given liposomal mitoxantrone had changes in hematology parameters similar to those observed in the conventional mitoxantrone-treated animals with the exception that the animal sacrificed during the study (0.869 mg/kg liposomal mitoxantrone) had leukopenia, thrombocytopenia and anemia. A slight anemia was seen in the female dogs along with decreases in reticulocyte counts in both male and female dogs. Rebound of reticulocyte counts was not as fast in females as in
25 male dogs.

No changes in coagulation or clinical chemistry parameters were observed for animals in any of the dosage groups.

30 At necropsy, 1 male in the liposomal mitoxantrone 0.869 mg/kg group had a fluid-filled pleural cavity and a thickened heart as well as gastrointestinal lesions. These findings appear to be compound-related. At this dosage one animal had discoloration of various lymph nodes. Three animals total in the liposomal mitoxantrone 0.580 and 0.869 groups had blue coloration at injection sites. No other findings were attributed to administration of compound.

35 In summary 1 of six dogs administered liposomes alone and 1 of 18 animals administered liposomal mitoxantrone had limb sores accompanied by limping, which is likely due to administration of the liposomes themselves. This study demonstrates that dogs can tolerate higher doses of mitoxantrone when the drug is

WO 02/32400

PCT/US01/42757

27

formulated in liposomes.

Example 19

This example demonstrates a method for administering liposomal mitoxantrone to patients having cancer and a method for determining a safe and effective amount of a liposomal mitoxantrone formulation. Patients with histologically documented solid tumors are selected for treatment. In this study the maximum tolerated dose (MTD), dose limiting toxicity, and the blood pharmacokinetics of mitoxantrone following i.v. administration can be determined. Anti-tumor effects of liposomal mitoxantrone were also observed. Patients are treated with i.v. administration of liposomal mitoxantrone every three weeks until disease progression or occurrence of toxicity requiring early treatment termination was observed. The safety and tolerability of treatments are also determined. Pharmacokinetic parameters are assessed in the first course of therapy. Cardiac status is evaluated every second course. Disease status is assessed after every second course by appropriate means. Six dose levels are evaluated.

Commercial Novantrone® is used in this study. The liposomal formulation of mitoxantrone was prepared as described in Example 7. Liposomal mitoxantrone is administered i.v. over 45 min. at the doses shown below in Table 7.

Table 7

Dose Level	Liposomal Mitoxantrone (mg/m ²)
1	9
2	12
3	15
4	20
5	25
6	30

Three patients are studied at each dose level. Drug administration is repeated every three weeks in the absence of progressive disease or unacceptable toxicity.

Adverse events are graded according to NCI/CTC criteria. Dose-limiting toxicity (DLT) is defined as occurrence within the first course of therapy (i.e. 21 days) of unacceptable toxicity, defined as a grade 3 or 4 nonhematologic toxicity including hypersensitivity reactions, other than nausea/vomiting or alopecia or a grade 4 hematologic toxicity other than neutropenia, or a grade 4 neutropenia which persists for more than 3 days or febrile neutropenia defined as grade 3 or 4 neutropenia with a

WO 02/32400

PCT/US01/42757

28

temperature of greater than 38.5° C, or grade 4 vomiting or grade 4 elevation of hepatic transaminases (AST or ALT), or grade 2 (or higher) decline of LVEF following a MUGA scan.

5 The Maximum Tolerated Dose (MTD) is defined as the highest dose level that causes DLT in no more than one of six patients treated at that level. If none of the initial three patients treated at a given dose level develops dose-limiting toxicity (DLT), dose escalation will continue. If one of the initial three patients treated develops DLT, then three additional patients will be entered on the same dose level. If 10 none of the three additional patients develops DLT, dose escalation will continue. If one or more of the additional three patients treated at a dose level develops DLT, dose escalation will cease. If two or three of the initial three patients treated at a dose level develop DLT, dose escalation will cease. Six patients will be treated at a possible MTD to ensure that criteria are met before declaring that dose level the MTD.

15 A subsequent course of treatment may be administered 21 or more days after prior liposomal mitoxantrone dose, and when absolute neutrophil count (ANC) is 1,500 m^3 or more and the platelet count is 100,000 $/mm^3$, and recovery from any other treatment-related toxicity (except alopecia) is to baseline grade or less than grade 1, whichever is less restrictive.

20 Treatment is delayed for one week for resolution of toxicities. If toxicities are not resolved after a one-week delay, treatment will be delayed for one additional week, with the same dose reductions as would have occurred after the one-week delay. If treatment must be held for more than two weeks, then the patient will be removed from the study.

25

WO 02/32400

PCT/US01/42757

29

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of treating a mammalian disease comprising: administering to a mammal a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of mitoxantrone in a liposomal formulation comprising cardiolipin, and a pharmaceutically acceptable excipient.
5
2. The method of claim 1, wherein the mammal is a human.
3. The method of claim 1, wherein the liposomal formulation further comprises a phospholipid.
10
4. The method of claim 1, wherein the liposomal formulation further comprises tocopherol.
15
5. The method of claim 1, wherein the liposomal formulation further comprises phosphatidylcholine, cholesterol, and a tocopherol.
6. The method of claim 1, wherein the cardiolipin is selected from the group consisting of natural cardiolipin and synthetic cardiolipin.
20
7. The method of claim 1, wherein the liposome bears a negative charge.
8. The method of claim 1, wherein the liposome bears a positive charge.
25
9. The method of claim 1, wherein at least 90% of the mitoxantrone is bound to liposomes.
10. The method of claim 1, wherein the mitoxantrone concentration is in the range of about 0.5 to about 2 mg/ml.
30
11. A therapeutic mitoxantrone composition comprising a liposome comprising mitoxantrone and a lipid component that contains cardiolipin.
12. The composition of claim 11, wherein the molar ratio of the mitoxantrone to lipid component is in the range of from about 1:10 to about 1:20.
35

WO 02/32400

PCT/US01/42757

30

13. The composition of claim 11 wherein the liposome entrapped mitoxantrone comprises vesicles having a size of about 5 μm or less.
14. The composition of claim 11 wherein said liposome entrapped mitoxantrone comprises vesicles having a size of about 1 μm or less.
15. The composition of claim 11 wherein said liposome entrapped mitoxantrone comprises vesicles having a size of about 0.5 μm or less.
16. The composition of claim 11 wherein said liposome entrapped mitoxantrone comprises vesicles having a size of about 0.1 μm or less.
17. The composition of claim 11, wherein the lipid component further comprises a compound selected from the group consisting of phosphatidyl choline, cholesterol, α -tocopherol, dipalmitoyl phosphatidyl choline and phosphatidyl serine.
18. The composition of claim 11, wherein said cardiolipin is selected from the group consisting of natural cardiolipin and synthetic cardiolipin.
19. The composition of claim 11, wherein said liposome bears a negative charge.
20. The composition of claim 11, wherein said liposome bears a positive charge.
21. The composition of claim 11, wherein said liposome is neutral.
22. The composition of claim 11, wherein said liposome is a mixture of multilamellar vesicles and unilamellar vesicles.
23. A therapeutic mitoxantrone composition comprising a lipid component and mitoxantrone wherein the molar ratio of the mitoxantrone to lipid component is in the range of from about 1:10 to about 1:20.
24. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the lipid component comprises a phospholipid.

WO 02/32400

PCT/US01/42757

31

25. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the lipid component comprises phosphatidylcholine.
26. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the lipid component comprises egg phosphatidylcholine.
27. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the lipid component comprises cholesterol.
28. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the lipid component further comprises a phospholipid, cholesterol, cardiolipin, and tocopherol.
29. The therapeutic mitoxantrone composition of claim 23 wherein the mitoxantrone concentration is in the range of about 0.5 to about 2 mg/ml.
30. A method for preparing a pharmaceutical dosage form of mitoxantrone comprising the steps of obtaining a vessel containing a quantity of preformed liposomes that comprise a component that binds mitoxantrone, obtaining a vessel comprising a quantity of mitoxantrone in a pharmaceutically acceptable excipient, mixing a portion of the mitoxantrone in the pharmaceutically acceptable excipient with the liposomes, and allowing the mitoxantrone to bind to the liposomes to obtain a pharmaceutical dosage form of mitoxantrone.
31. The method of claim 30 wherein the preformed liposomes are lyophilized.

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月5日(2002.11.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物疾患の治療方法であって、カルジオリピン含有リポソーム製剤中ミトキサントロン治療有効量と、医薬として許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法。

【請求項2】

哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

リポソーム製剤が更にリン脂質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

リポソーム製剤が更にトコフェロールを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

リポソーム製剤が更に、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含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

カルジオリピンが、天然カルジオリピン及び合成カルジオリピンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

リポソームが負電荷を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

リポソームが正電荷を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

ミトキサントロンの少なくとも90%がリポソームに結合されている、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

ミトキサントロン濃度が、約0.5~約2mg/mlの範囲である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

ミトキサントロン、及びカルジオリピンを含む脂質成分を含むリポソームを含む治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項12】

ミトキサントロンと脂質成分とのモル比が、約1:10から約1:20までの範囲である、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約5µm以下のサイズを有する小胞を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項14】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約1µm以下のサイズを有する小胞を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項15】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約0.5µm以下のサイズを有する小胞を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項16】

ミトキサントロン包埋リポソームが、約 0.1 μm 以下のサイズを有する小胞を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 17】

脂質成分が更に、ホスファチジルコリン、コレステロール、 α -トコフェロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン、及びホスファチジルセリンからなる群から選択される化合物を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 18】

カルジオリピンが、天然カルジオリピン及び合成カルジオリピンからなる群から選択される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 19】

リポソームが負電荷を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 20】

リポソームが正電荷を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 21】

リポソームが中性である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 22】

リポソームが、多層膜小胞と単層膜小胞との混合物である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 23】

ミトキサントロンと脂質成分とのモル比が、約 1 : 10 から約 1 : 20 までの範囲である、脂質成分とミトキサントロンを含む治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 24】

脂質成分がリン脂質を含む、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 25】

脂質成分がホスファチジルコリンを含む、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 26】

脂質成分が卵ホスファチジルコリンを含む、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 27】

脂質成分がコレステロールを含む、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 28】

脂質成分が更に、リン脂質、コレステロール、カルジオリピン、及びトコフェロールを含む、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 29】

ミトキサントロン濃度が、約 0.5 ~ 約 2 mg / ml の範囲である、請求項 23 に記載の治療用ミトキサントロン組成物。

【請求項 30】

ミトキサントロンの医薬剤形の調製方法であって、ミトキサントロンと結合する成分を含む予め形成されたある量のリポソームを含む容器を得る工程、医薬として許容できる賦形剤中のある量のミトキサントロンを含む容器を得る工程、医薬として許容できる賦形剤中のミトキサントロンの一部と該リポソームとを混合する工程、及びミトキサントロンを該リポソームと結合させて、ミトキサントロンの医薬剤形を得る工程を含む、方法。

【請求項 31】

予め形成されたリポソームが凍結乾燥されている、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

ミトキサントロンと 1 つ以上の脂質を含む脂質製剤であって、少なくとも 1 つの脂質はカルジオリピンである、脂質製剤。

【請求項 33】

ミトキサントロンがカルジオリピンと複合体を形成する、請求項 32 に記載の脂質製剤。

【請求項 34】

少なくとも約 1 : 50 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 3 5】

少なくとも約 1 : 40 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 3 6】

少なくとも約 1 : 30 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 3 7】

少なくとも約 1 : 20 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 3 8】

少なくとも約 1 : 15 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 3 9】

少なくとも約 1 : 10 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 0】

少なくとも約 1 : 5 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 1】

少なくとも約 1 : 1 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 2】

約 1 : 1 のミトキサントロンと脂質との相対的モル量を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 3】

更にホスファチジルコリン又はコレステロールを含む、請求項 3 2 ~ 4 2 のいずれかに記載の脂質製剤。

【請求項 4 4】

約 0.1 ~ 25 : 1 ~ 99 : 0.1 ~ 50 カルジオリピン : ホスファチジルコリン : コレステロールの範囲内の、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロールの相対的モル量を含む、請求項 4 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 5】

約 0.2 ~ 10 : 2 ~ 50 : 1 ~ 25 カルジオリピン : ホスファチジルコリン : コレステロールの範囲内の、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロールの相対的モル量を含む、請求項 4 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 6】

約 0.5 ~ 5 : 4 ~ 25 : 2 ~ 15 カルジオリピン : ホスファチジルコリン : コレステロールの範囲内の、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロールの相対的モル量を含む、請求項 4 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 7】

約 0.75 ~ 2 : 5 ~ 15 : 4 ~ 10 カルジオリピン : ホスファチジルコリン : コレステロールの範囲内の、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロールの相対的モル量を含む、請求項 4 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 8】

約 1 : 10 : 6.8 カルジオリピン : ホスファチジルコリン : コレステロールの、カルジオリピン、ホスファチジルコリン、コレステロールの相対的モル量を含む、請求項 4 3 に記載の脂質製剤。

【請求項 4 9】

更に抗酸化剤を含む、請求項 3 2 ~ 4 8 のいずれかに記載の脂質製剤。

【請求項 5 0】

凍結乾燥されている、請求項 3 2 ~ 4 9 のいずれかに記載の脂質製剤。

【請求項 5 1】

リポソームの形態である、請求項 3 2 ~ 5 0 のいずれかに記載の脂質製剤。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/09747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC Class. According to International Patent Classification (IPC):
G06F 17/30

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G06 17/30
Examination conducted other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Electronic database consulted during the international search phase of this case and, where practicable, search terms used
WOST
Search terms (keywords, field(s), substructure)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,858,397 A (LIM et al) 12 January 1999, abstract, Examples and claims.	1-31
Y	US 5,860,923 A (RAHMAN et al) 01 October 1996, columns 1-4, Examples and claims.	1-31

Further documents are listed in the continuation of Box C See patent family notes

Special categories of prior documents

76	Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	77	Document published after the international filing date of priority but which is relevant to the application but does not constitute the general state of the art
78	Document published on or after the international filing date	79	Document of primary relevance, the claimed invention cannot be considered novel, as claimed by the applicant or as a matter of course, over the document of primary relevance
80	Document which may have priority status or which is cited in abstract, the publication of which is not required	81	Document of particular relevance for claimed invention cannot be considered to constitute prior art over the document of primary relevance, but which may be relevant to the invention as claimed with one or more other prior documents, such combination being claimed by a person skilled in the art
82	Document published prior to the international filing date but later than the priority date	83	Document of relevance to the state of the art

Date of the actual completion of the international search: _____ Date of reading of the international search report: **13 FEB 2002**

CLASSIFIED BY: _____
Name and mailing address of the ISA/US
Communications Section and Telephone
Box 352
Washington, DC 20541
USA
Telephone No. (301) 491-2991

Authorized officer: *Mella Collins*
MELLA COLLINS
Telephone No. (301) 491-2991

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/44	A 6 1 K 47/44	
// A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA31 BB13 CC27 DD63H DD70H EE51H FF67 FF68 GG06
GG16
4C206 AA01 CB29 FA31 MA05 MA44 MA64 MA86 NA06 NA10 ZA01
ZB26