(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3667779号
(P3667779)
(45)発行日　平成17年7月6日(2005.7.6)　(24)登録日　平成17年4月15日(2005.4.15)

(51)Int.Cl.[7]　F I
A61K 9/127　A61K 9/127

請求項の数 1　(全 11 頁)

(21)出願番号　特願平5-144344
(22)出願日　平成5年5月25日(1993.5.25)
(65)公開番号　特開平6-329558
(43)公開日　平成6年11月29日(1994.11.29)
審査請求日　平成12年5月23日(2000.5.23)
審判番号　不服2002-8899(P2002-8899/J1)
審判請求日　平成14年3月29日(2002.3.29)

(73)特許権者　000000217
エーザイ株式会社
東京都文京区小石川４丁目６番１０号
(72)発明者　岩本　清
茨城県つくば市松代５－５－２５
(72)発明者　加藤　隆
茨城県つくば市稲荷前９－７
(72)発明者　渡辺　純男
愛知県扶桑町斉藤中由池１４－２
(72)発明者　村上　幸人
北九州市八幡西区西鳴水２丁目８番２９号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】合成脂質リポソーム

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
臓器への脂溶性薬物の移行性を高めたリポソーム製剤であって、
（１）前記リポソームの構成成分が、一般式（I）



(I)

【化１】
（式中Rはメチル基を意味する。Ｘは式－N^+（CH_3）$_3$・Br^-で示される基を意味する。式中ｋは、１～１０の整数を意味する。ｍ、ｎは、１１～２０の整数を意味する。）で表される合成脂質であること
（２）前記脂溶性薬物が、ユビデカレノン、トコフェロール、トコフェリルアセテート、ビタミンK_1及びビタミンK_2の群から選ばれる脂溶性薬物であること
及び
（３）前記臓器が肺臓または心臓であることを特徴とするリポソーム製剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】

本発明は、新規リポソーム及び新規リポソーム製剤に関する。更に詳しくは、安定で、標的臓器への指向性を良好にコントロールすることができるリポソーム及びリポソーム製剤に関する。

【０００２】

【従来技術】

近年、医薬の分野において、リポソームに薬物を保持させて、薬物運搬体として利用しようとする試みが多数なされている（M.J.Ostro,et al,Am.J.Hosp.Pharm.,46 ,1576(1989)）。

【０００３】

しかしリポソームを臨床の場で実用化するには、いくつかの未解決の問題が残されている。すなわち、リポソームの構造的不安定性、標的臓器・標的細胞へのリポソーム指向性を任意にコントロールする技術の未確立、リポソーム製造の際の再現の不確実性などである(M.J.Ostro,"Liposomes as Drug Carriers",ed.byG.Gregoriadis,John Wiley&Sons Ltd., 855(1988))。

【０００４】

構造強化に関しては、特開昭５８－４９３１１号に開示された多糖誘導体により被覆されたリポソームやリン脂質誘導体リポソーム（砂本ら、日本化学会誌、５６９頁、１９８７年）が知られている。薬物運搬体として利用されるリポソームは、イオン性の薬物の封入効率の向上やリポソーム自身の安定化を図るために、通常ホスファチジルコリンにホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸若しくはステアリルアミンなどのカチオン性若しくはアニオン性の荷電物質を少量添加してカチオン性、アニオン性の表面荷電を付与したリポソーム製剤として提供されてきた。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、荷電添加脂質として選択できる脂質は限られており、その上、カチオン性リポソームを与えるステアリルアミンなど、リン脂質との相溶性が悪く多量に添加できず、しかも毒性が強いなど使用しづらいものもあり、新しい脂質の開発がのぞまれていた。多種多様の疾病に対応するさまざまな性質の薬物が開発されるにつれて、疾患のある特定臓器に速やかに移行させることを可能ならしめるにも、これまでとは違う性質を持つリポソームを形成せしめる脂質が渇望されているというのが現状である。

【０００６】

以上のような状況に鑑み本発明者等は、異なる表面電化を有し、これまでのリポソームとは体内動態の異なった、安定なリポソームを形成する脂質を探索すべく研究に着手した。そして、以下に示す一般式（Ｉ）で示される合成脂質に着目するに至った（Y.Murakami et al,J.Am.Chem.Soc.,106,3613(1984)）。更に研究を続けた結果、該合成脂質並びに該合成脂質及びリン脂質より形成されたリポソームに薬物を配合することにより、所期の目的を達成することを見いだし本発明を完成した。

【０００７】

【課題を解決するための手段】

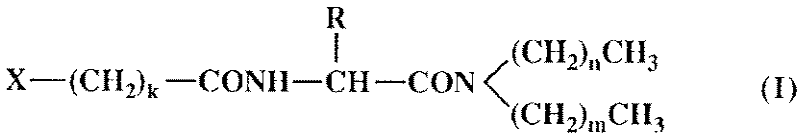
すなわち、本発明は、一般式（Ｉ）で示される合成脂質に薬物を配合し、更に必要に応じて１種または２種以上のリン脂質よりなる薬物含有リポソームである。

【０００８】

本発明にかかるリポソームは、下記一般式（Ｉ）で示される合成脂質に薬物を配合すること、または一般式（Ｉ）で示される合成脂質及びリン脂質を混合したものに薬物を配合することによって得られるものであるが、いずれの場合も、合成脂質及びリン脂質は、１種または２種以上用いることができる。

【０００９】

【化５】



【００１０】
（式中Ｒはメチル基またはカルボキシルメチル基を意味する。Ｘは式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基または式－SO_3^{-}・Na^{+}で示される基を意味する。式中ｋは、１～１０の整数を意味する。ｍ，ｎは、１～２０の整数を意味する。）
【００１１】
上記合成脂質は、例えば、J.Org.Chem.,Vol.47,No.11,(1982) に記載された方法に準じて得ることができる。あるいは、上記合成脂質は、Y.Murakami et al,J.Am.Chem.Soc.,106,3613(1984)に記載された合成脂質を用いることができる。
【００１２】
本発明において、リン脂質は、通常使用し得るものであればあらゆるものを使用できるが、一例を挙げれば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、ホスファチジン酸などを用いることができる。また、必要に応じて脂質総重量の１０～１００重量％のコレステロールを添加することも可能である。
【００１３】
更に、構成するリン脂質と合成脂質の総重量比は、選択するリン脂質および合成脂質の数や種類によって、特に限定されないが、一般にリン脂質／合成脂質＝０．１～５０の範囲が好ましい結果をもたらす。
【００１４】
本発明にかかるリポソームに配合し得る薬物は、脂溶性の薬物でも水溶性の薬物でもよい。一例を挙げれば、脂溶性薬物としては、ユビデカレノン、トコフェロール、ビタミンK_1、ビタミンK_2、プロスタグランディンE_1などのプロスタグランディン類、テプレノン、アイロプロスト、インドメサシン及びその誘導体などを挙げることができ、水溶性薬物としては、塩基長１０～３５のオリゴヌクレオチド、ＤＮＡプラスミドなどのペプタイド薬物をあげることができるが、これらに限定されない。アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、メトトレキセートなどの抗ガン剤なども配合し得るなど、あらゆる薬物を配合することができる。
【００１５】
本発明にかかるリポソームは、従来技術を準用して製造することができる。以下にその一例を挙げる。
製造方法１
脂溶性薬物を配合したリポソーム製剤は、以下の方法で得ることができる。すなわち、一般式（Ｉ）で示される合成脂質を適宜ナス型フラスコにとり、クロロホルムまたはエーテルを加えて溶解させる。脂溶性薬物をこの溶液に加え、溶解させる。次に、溶媒を留去し、生成した薄膜をガラスビーズ及び適当な緩衝液などを加えて剥離する。超音波処理またはマイクロフルイダイザーを用いて処理したあと、セファデックスあるいはセファロースカラムを通すことにより目的としたリポソームの画分を集める。この時、限外ろ過器を用いて目的物であるリポソームの画分を集めてもよい。また、場合によっては、カラム処理や限外ろ過をしなくとも使用し得る。
【００１６】
製造方法２
水溶性薬物を配合したリポソーム製剤は以下の方法で得ることができる。すなわち、一般式（Ｉ）で示される合成脂質または合成脂質とリン脂質を適宜ナス型フラスコにとり、クロロホルムまたはエーテルを加えて溶解させる。次いで溶媒を留去し、生成した薄膜をガラスビーズ及び適当な緩衝液などを加えて剥離する。この時、薬物を添加する。これを超音波処理またはマイクロフルイダイザーを用いて処理したあと、セファデックスあるいは

セファロースカラムを通すことにより目的物であるリポソームの画分を得ることができる。限外ろ過を行って、目的画分を得てもよい。更に、カラム処理や限外ろ過することなく使用することも可能である。

【００１７】

製造方法３

水溶性薬物の中でも、イオン性の薬物である場合は、以下の方法でも製造することができる。すなわち、製造方法１及び２の方法等に準じて、薬物の配合されていないリポソームを作成し、これに薬物を加える方法である。

【００１８】

上記の方法を例として、通常行われる方法で作られた本発明にかかるリポソーム及びリポソーム製剤は、通常約０．０１μｍ～５μｍの粒径を持つものとなる。

【００１９】

すなわち本発明によって、容易に従来とは異なった体内動態を示し、標的臓器への指向性を良好にコントロールできるリポソームを提供できるものであり、この意味からも本発明の価値は高い。

【００２０】

【作用】

一般式（Ｉ）で示される合成脂質を用いることにより、脂溶性薬物及び水溶性薬物を含む安定なリポソーム製剤を得ることができるようになった。しかも、このリポソーム製剤は、これまでのリポソームとは異なる体内動態を示し、薬物の標的臓器への指向性を良好にコントロールできるものである。また、水溶性薬物を配合したリポソームは、細胞内導入効率を上昇させるという利点もある。以下に本発明の理解を容易にするために、実施例を掲げるが、本発明は、これに限定されないことは言うまでもない。

【００２１】

【実施例】

実施例１

一般式（Ｉ）においてＲがメチル基であり、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基である合成脂質２３㎎（３０マイクロモル）とビタミンK_2 ２．３㎎を３㎖のクロロホルムでナス型フラスコ中で溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下でクロロホルムを除去した。得られた薄膜を減圧デシケーターで一夜乾燥し、クロロホルムを完全に除去した。

【００２２】

ナス型フラスコの底に残った薄膜に３㎖のリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）及びガラスビーズを加え、膜が完全にはがれるまでタッチ・ミキサーで振盪した。

【００２３】

次にこの懸濁液をスクリュー・バイアルに移し、３５～４０℃でプローブ型ソニケーターを用いて１５分間超音波処理を行うと比較的透明度の高い懸濁液が得られた。

【００２４】

実施例２

実施例１と同様にして一般式（Ｉ）において、Ｒがカルボキシルメチル基であり、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基である合成脂質２３㎎（３０マイクロモル）とビタミンK_2 ２．３㎎を含むリポソーム製剤を作成した。超音波処理は４０～４５℃で行った。

【００２５】

実施例３

実施例１と同様にして一般式（Ｉ）において、Ｒがメチル基であり、Ｘが式－SO_3^{-}・Na^{+}で示される基である合成脂質２．３㎎を含むリポソーム製剤を作成した。超音波処理は、３５～４０℃で行った。

【００２６】

実施例４

ジパルミトイルホスファチジルコリン１５．３mg（２０マイクロモル）、コレステロール７．７mg（２０マイクロモル）、一般式（Ｉ）においてRがメチル基、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基である合成脂質１．５mg（２マイクロモル）を３mlのクロロホルムで、ナス型フラスコ中で溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下でクロロホルムを除去した。ナス型フラスコの底に残った薄膜に１２mlのリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）及びガラスビーズを加え、膜が完全にはがれるまで、タッチミキサーで浸透した。次にこの懸濁液をマイクロフルイダイザーを用いて１００００ｐｓｉで１５分間処理し、合成脂質リポソームを含む懸濁液を得た。

【００２７】

実施例５

実施例４と同様にして、ジパルミトイルホスファチジルコリン１５．３mg（２０マイクロモル）、コレステロール７．７mg（２０mmol）、一般式（Ｉ）において、Rがメチル基、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基で表される合成脂質１．５mg（２μＭ）及びユビデカレノン１．５mgを含むリポソーム製剤を作成した。

【００２８】

実施例６

一般式（Ｉ）においてRがメチル基、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基である合成脂質１．５mg（１．９μＭ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン１．５mg（２．０μＭ）をクロロホルム３mlを用いて、ナス型フラスコ中で溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下でクロロホルムを除去した。ナス型フラスコの底に残った薄膜に２０mMＨＥＰＥＳ含有ＨＢＳＳ（ハンクの平衡塩溶液(Hank's Balanced Salt Solutions) ｐＨ７．４）１０mlとガラスビーズを加え、膜が完全にはがれるまで、タッチミキサーで振盪した。

【００２９】

次に、この懸濁液をスクリューバイアルに移し、３５～４０℃でプローブ型ソニケーターを用いて、１５分間超音波処理を行うと比較的透明度の高い懸濁液が得られた。この懸濁液を室温で１時間３０分保存した後に、ミレックスＨＡ（Millex HA)（ポアサイズ０．４５μm、ミリポア社製）メンブレンでろ過し、脂質濃度が１００μｇ／mlになるように２０mMＨＥＰＥＳ含有ＨＢＳＳで希釈した。このリポソーム懸濁液にｐＣＡＴ^{TM}－Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｐｌａｓｍｉｄ（プロメガ コーポレーション（Promega Corporation)社製）を１０μｇ／mlになるように加えた。なお、ろ過、希釈及びプラスミド添加の操作は、クリーンベンチ内で行った。

【００３０】

実施例７

実施例６と同様にして、一般式（Ｉ）においてRがメチル基、Ｘが式－N^{+}（CH_3）$_3$・Br^{-}で示される基である合成脂質１．５mgを用いて、ｐＣＡＴ^{TM}－Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｐｌａｓｍｉｄを含む合成脂質リポソームを作成した。

【００３１】

（実施例８）

実施例１と同様の方法で、実施例１に記載の合成脂質３ｍｇ、トコフェロール０．３ｇを含むリポソーム製剤を作成した。

（実施例９）

実施例４と同様の方法で、実施例４に記載の合成脂質０．３ｍｇ、ジパルミトイルホスファチジルコリン３．１ｍｇ、コレステロール１．５ｍｇ、トコフェリルアセテート０．５ｍｇを含むリポソーム製剤を作成した。

（実施例１０）

実施例４と同様の方法で、実施例４に記載の合成脂質０．３ｍｇ、ジパルミトイルホスファチジルコリン３．１ｍｇ、コレステロール１．５ｍｇ、アイロプロスト０．５ｍｇを含むリポソーム製剤を作成した。

（実施例１１）

実施例４と同様の方法で、実施例４に記載の合成脂質０．３ｍｇ、ジパルミトイルホスファチジルコリン３．１ｍｇ、コレステロール１．５ｍｇ、プロスタグランジン$E_1$０．５ｍｇを含むリポソーム製剤を作成した。

（実施例１２）

実施例４と同様の方法で、実施例４に記載の合成脂質０．３ｍｇ、ジパルミトイルホスファチジルコリン３．１ｍｇ、コレステロール１．５ｍｇ、インドメサシンファルネソールエステル０．５ｍｇを含有するリポソーム製剤を作成した。

【００３２】

【発明の効果】

次に本発明にかかるリポソームの効果を示すために、実験例を掲げる。

【００３３】

実験例１　平均粒子径の測定

１　実験方法

合成脂質リポソーム製剤の平均粒子径をナイコンプサブミクロン粒子アナライザーにより測定した。粒子径の経時変化は、冷蔵庫（４℃）に保存して調べた。試料は、実施例１～実施例１２の合成脂質リポソーム製剤を用いた。

【００３４】

また、比較例として、実施例１と同様の方法で作成したジパルミトイルホスファチジルコリン３．１ｍｇ、ビタミンK$_2$０．３ｍｇを含有するリポソーム製剤を用いた。

【００３５】

２　実験結果

合成脂質リポソーム製剤の平均粒子径を表１に示した。なお、表中で、平均粒子径が複数あるものは、粒子径のピークが複数現れたものである。

【００３６】

【表１】

試料	平均粒子径(nm)	
	調製直後	1か月後
実施例1	149(39.3%) 553(60.7%)	197(33.7%) 560(66.3%)
実施例2	156(23.7%) 565(76.3%)	197(19.0%) 596(81.0%)
実施例3	146(40.8%) 450(59.2%)	150(41.2%) 462(58.8%)
実施例4	455	468
実施例5	566	-
実施例6	354(6.0%) 761(94.0%)	-
実施例7	159(30.5%) 583(69.5%)	-
実施例8	233(22.5%) 583(77.5%)	-
実施例9	505	-
実施例10	428	-
実施例11	488	-
実施例12	462	-
比較例	178(13.0%) 666(87.0%)	152(0.8%) 520(5.2%) 4681(94.0%)

【００３７】

表１で示されるように、合成脂質リポソーム製剤の平均粒子径は、１００nm以下の微細粒

子であった。また１か月の保存のあとでも平均粒子径に大きな変化は見られなかった。以上の結果より、本発明にかかるリポソームは、安定であることがわかる。

【００３８】

実験例２ ラットによるリポソーム製剤の臓器移行性

【００３９】

１ 実験方法

ＳＤ系ラット（体重３１０～３５０ｇ）の大腿部静脈内に麻酔下で検体試料を２３．０μCi ^{3}Ｈ－ビタミンK_2 ／kg体重（脂質１１．５μmol ／kg体重）注入した。投与後一定時間ごとに頚静脈より約０．１mlを採血した（ｎ＝３）。採取した血中の放射能濃度を以下に記載する方法で測定した。

【００４０】

検体試料は、以下のものを用いた。

試料ＤＰＰＣ： ^{3}Ｈ－ビタミンK_2 を含有するＤＰＰＣリポソーム。

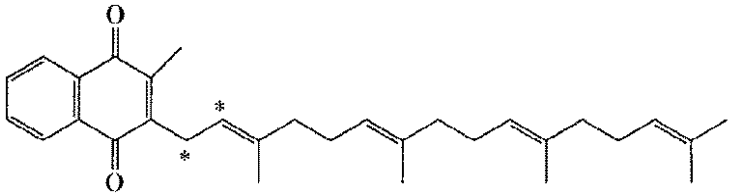
試料Ａ：^{3}Ｈ－ビタミンK_2 を含有する、一般式（Ｉ）においてＲ＝メチル基、Ｘ=式－$N^{+}(CH_3)_3$・Br^{-}で示される合成脂質よりなるリポソーム。

試料Ｂ：^{3}Ｈ－ビタミンK_2 を含有する、一般式（Ｉ）においてＲ＝カルボキシメチル基、Ｘ＝式－$N^{+}(CH_3)_3$・Br^{-}で示される合成脂質よりなるリポソーム。

試料Ｃ： ^{3}Ｈ－ビタミンK_2 を含有する、一般式（Ｉ）においてＲ＝メチル基、Ｘ＝式－SO_3^{-}・Na^{+}で示される合成脂質よりなるリポソーム。なお、^{3}Ｈ－ビタミンK_2 は、下記構造式によって示される放射ラベル化メナキノン４である。

【００４１】

【化６】



【００４２】

血液中放射能の測定

採血した血液の内２０μｌまたは５０μｌの血液を０．７５mlのSoluene 350／イソプロピルアルコール（ｖ／ｖ＝１／１）で可溶化し、数滴の過酸化水素水を加えて、液体シンチレーションカウンターを用い、放射能を測定した。

【００４３】

臓器内放射能の測定

【００４４】

臓器約３０mgを０．５mlのSoluene 350 に加え、室温で約１２時間振盪して可溶化し、５mlのインスタゲル（instagel）／０．５規定塩酸（ｖ／ｖ＝９／１）を加え、液体シンチレーションカウンターを用い放射能を測定した。

【００４５】

２ 実験結果

図１は、検体試料投与後の血中の放射能濃度推移を示す。表２及び表３は、投与後３０分及び２４時間での検体間の臓器移行性を比較して示す。

【００４６】

【表２】

	ＤＰＰＣ	A	B	C
脂肪	0.0200±0.0013	0.0272±0.0010	0.0314±0.0041	0.0324±0.0056
副腎	1.1778±0.0913	1.6074±0.1617	1.3452±0.1406	1.5168±0.1220
心臓	0.1182±0.0109	0.1940±0.0215	0.1384±0.0053	0.1466±0.0132
腎臓	0.2428±0.0038	0.3258±0.0372	0.1982±0.0073	0.2210±0.0137
肺	0.3563±0.0201	0.6569±0.0825	0.4078±0.0046	0.4447±0.0368
脾臓	1.4956±0.2332	1.0949±0.0501	0.5342±0.1391	0.8209±0.1872
肝臓	2.3752±0.0327	2.2491±0.1330	2.0512±0.8915	2.8918±0.0853

【００４７】
【表３】

	ＤＰＰＣ	A	B	C
脂肪	0.0291±0.0005	0.0360±0.0029	0.0305±0.0044	0.0355±0.0053
副腎	0.0977±0.0071	0.1325±0.0048	0.0917±0.0010	0.1245±0.0068
心臓	0.0647±0.0042	0.0883±0.0012	0.0665±0.0034	0.0844±0.0069
腎臓	0.0363±0.0011	0.0518±0.0033	0.0373±0.0029	0.0478±0.0017
肺	0.0481±0.0058	0.0746±0.0002	0.0393±0.0053	0.0578±0.0016
脾臓	0.0820±0.0067	0.0590±0.0024	0.0369±0.0023	0.0448±0.0021
肝臓	0.0578±0.0048	0.0779±0.0062	0.0556±0.0001	0.0546±0.0012

【００４８】
図１より、本発明にかかるリポソーム製剤は、良好に血中より消失していることがわかる。また、表２、表３より、本発明にかかるリポソームは、従来のものより心臓や肺臓への移行性が良く、脾臓への移行性が低下していることがわかる。
【００４９】
実験例３
１　実験方法
細胞の調製とトランスフェクション
ＡＴＣＣより購入したアフリカミドリザル腎由来細胞ＣＶ－１を猿腎臓細胞株４０（simian kidney cell line 40）の複製開始点欠損変異株でトランスフォームさせた細胞株（以下ＣＯＳ－７と記す）を１０％牛血清を含むＤＭＥＭ培地（Dulbecco's modified Eagle's medium：以下ＤＭＥＭと記す）を用いて、１０％二酸化炭素、３７℃インキュベーター中で継代培養した。
【００５０】
上記方法で継代培養したＣＯＳ－７（２×１０^5 cells)を、６wellマルチウエルプレート（９．４cm^2/well）で一晩培養、２mlのｐＣＡＴ^{TM}－コントロールプラスミド１０μｇ／mlを含む２０mMＨＥＰＥＳ含有ＨＢＳＳ溶液で洗った。これに、１mlの実施例６で調製したｐＣＰＡＴ^{TM}－コントロールプラスミドを１０μｇ／ml含むリポソームを添加したものを試料ａとし、ｐＣＡＴ^{TM}－コントロールプラスミドを１０μｇ／ml含む２０mMＨＥＰＥＳ含有ＨＢＳＳ溶液を試料ｂとして、実験に用いた。１０％二酸化炭素、３７℃で２時間インキュベートした後、反応溶液を除き２回洗浄し、２ml１０％牛血清含有ＤＭＥＭを添加して２日間ＣＯ2 インキュベーターで培養した。培養した細胞をセルスクレーパーで剥離し、ＨＢＳＳで２回洗浄後、細胞凍結－溶解を３回繰り返し、最後に遠心分離（１５０００rpm,１０分）により細胞抽出溶液を得た。
【００５１】

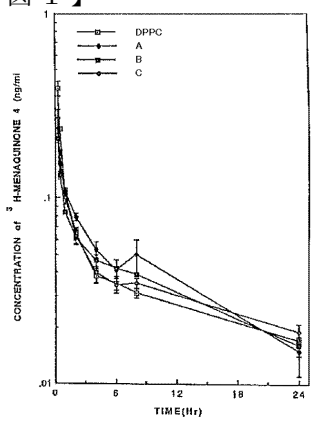
ＣＡＴ（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）活性の測定
ＤＮＡの細胞内への導入（ＣＡＴの発現）をＣＡＴ活性を測定することにより評価した。細胞抽出液５０μｌに２０μｌアセチルＣｏＡ（３．５mg／ml）、４μｌ^{14}Ｃ－クロラムフェニコール（０．１μCi）、６μｌH_2O、５０μｌ１モルTris- 塩酸緩衝液（ｐＨ７．８）を加え、３７℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、１ml酢酸エチルを添加して、タッチミキサーで３回混和後、遠心分離（１２０００rpm，５分）し、上層の酢酸エチル層０．９mlをエッペンドルフチューブ内にとり、エバポレートした。その後、４０μｌの酢酸エチルで溶解し、薄層板にスポットした。クロロホルム－エタノール（１０：１）で展開した薄層板を乾燥後、Ｘ線フィルムを用いて、ジアセチル^{14}Ｃ－クロラムフェニコールを測定した。

【００５２】
２ 実験結果
図２及び図３にそれぞれＸ線フィルム及びバイオイメージアナライザーによって測定した結果を示す。精製したジアセチル^{14}Ｃ－クロラムフェニコールを測定した結果、試料ａの方が高い生成量、すなわち高いＣＡＴ活性を示した。これは、ｐＣＡＴ^{TM}－コントロールプラスミドの細胞内導入を合成脂質リポソームが増強していることを示している。

【００５３】
上述した実験１、２および３の結果より、本発明にかかるリポソームは１００nm以下の微細粒子であり、長期保存により安定であることが明らかとなった。また、本発明にかかるリポソームは、従来のものより、心臓、肺臓への移行に優れ、薬物の細胞導入を増強していることも明らかとなった。

【００５４】
【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、本発明にかかるリポソーム製剤投与後の血中の放射能濃度推移を示す。
【図２】図２は、生成したジアセチル１４Ｃ－クロラムフェニコールをＸ線フィルムによって測定した結果を示す。
【図３】図３は、生成したジアセチル１４Ｃ－クロラムフェニコールをバイオイメージアナライザーによって測定した結果を示す。

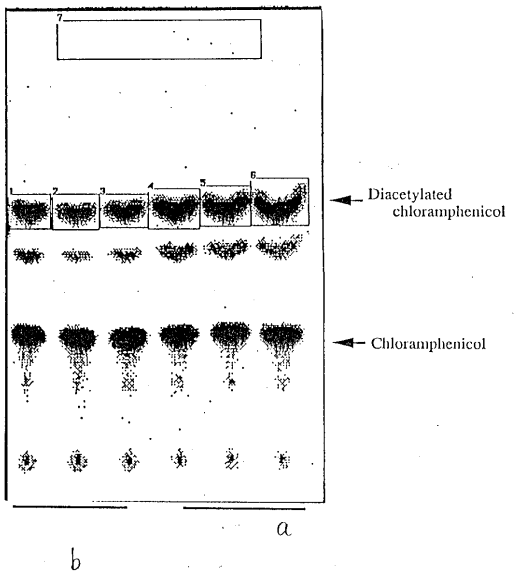
【図１】



Blood Concentration of ^{3}H-Menaquinone 4 Encapsulated in Various Vesicles

【図２】

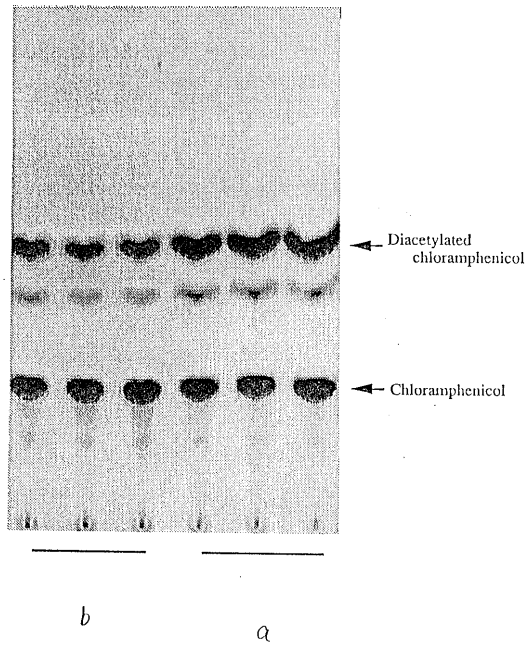
イメージアナライザーによるCAT活性の測定



添加	Radioactivity (PSL)
DNA 単独	8677.5±1738.9
DNA +合成脂質ベシクル	18646.5±335.6

【図３】

X-線フィルムによるCAT活性の測定



フロントページの続き

合議体
審判長　森田　ひとみ
審判官　弘實　謙二
審判官　横尾　俊一

(56)参考文献　特開平2－135092（JP, A）
J. Org. Chem., Vol. 47, 2137－2144（1982）
Bull. Chem. Soc. Jpn., Vol. 59, 3145－3151（1986）
Chem. Pharm. Bull., Vol. 37, No. 5, 1351－1354（1989）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], DB名)
A61K47/24,A61K9/127