(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2007 年12 月21 日 (21.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/145306 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 47/42 (2006.01)	*A61P 9/10* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)	*A61P 11/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)	*A61P 13/12* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)	*A61P 17/02* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)	*A61P 19/02* (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)	*A61P 25/28* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)	*A61P 27/02* (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)	*A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	*A61P 35/00* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)	*A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/062078

(22) 国際出願日: 2007 年6 月15 日 (15.06.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2006-165525 2006 年6 月15 日 (15.06.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目８番地 Hokkaido (JP). 国立大学法人筑波大学 (UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋田 英万 (AKITA, Hidetaka). 畠山 浩人 (HATAKEYAMA, Hiroto). 長崎 幸夫 (NAGASAKI, Yukio) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 大石 基 (OISHI, Motoi) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 菊池 寛 (KIKUCHI, Hiroshi). 小林 英夫 (KOBAYASHI, Hideo). 原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** ELEMENT HAVING LONG BLOOD-CIRCULATING TIME WHICH IS DEGRADABLE SELECTIVELY IN TUMOR TISSUE

(54) 発明の名称: 腫瘍組織で選択的に分解性を示す血中滞留性素子

(57) **Abstract:** A lipid membrane structure comprising: (1) a phospholipid derivative having a residue derived from an alcohol compound, a residue derived from a phospholipid, and a peptide present between the two residues; and (2) a phospholipid derivative which is the same as the above-mentioned phospholipid derivative, except that the peptide is not contained (provided that: (a) the alcohol compound is polyalkylene glycol or the like; (b) the phospholipid is phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine or the like; and (c) the peptide comprises a substrate peptide which can act as a substrate for a matrix metalloproteinase). The lipid membrane structure may be in the form of a liposome carrying an anti-cancer agent therein.

(57) 要約: アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含むリン脂質誘導体(1)、及び該ペプチドの介在のない上記リン脂質誘導体(2)を含む脂質膜構造体（ただし(a)該アルコール化合物はポリアルキレングリコール類などのアルコール化合物であり、(b)該リン脂質はホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、又はホスファチジルセリン類などのリン脂質であり、及び(c)該ペプチドはマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを含むペプチドである）であって、抗腫瘍剤を担持した例えばリポソーム形態である脂質膜構造体。

WO 2007/145306 A1

明 細 書

腫瘍組織で選択的に分解性を示す血中滞留性素子

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチドを介してポリアルキレングリコールなどが結合されており、リポソームなどの脂質膜構造体の構成脂質として有用なリン脂質誘導体、及び該リン脂質誘導体を含み、腫瘍組織等で選択的に分解性を示す血中滞留性素子に関する。

背景技術

[0002] 薬剤を患部に特異的に輸送する手段としてリポソームに薬剤を封入する方法が提案されている。特に、悪性腫瘍の治療分野において抗腫瘍剤を封入したリポソームの有効性が数多く報告されている。また、多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND: Multifunctional envelope-type nano device;以下、本明細書において「MEND」と略す場合がある。)が提案されており、この構造体は、遺伝子などを特定の細胞内に選択的に送達するためのドラッグデリバリーシステムとして用いることができ、例えば、腫瘍の遺伝子治療などに有用であることが知られている。

[0003] もっとも、リポソームや上記のMENDなどの微粒子キャリアーは静脈内に投与した場合に血液中での滞留性が悪く、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織に捕捉され易いという問題を有している。また、これらの微粒子キャリアーでは、封入物の漏出が起きたり、微粒子が凝集するという問題もある。これらの問題は、薬剤を封入したリポソームや遺伝子を封入した上記のMENDを用いて標的臓器や標的細胞に薬剤や遺伝子を送達させるターゲッティング療法を行うに際して大きな障害となっていた。

[0004] 上記の問題を回避するための手段として、リポソームなどの微粒子キャリアーの表面をポリアルキレングリコール(PEG: ポリエチレングリコールなど)で修飾する手段が提案されている(Biochim. Biophys. Acta, 1066, pp.29-36, 1991; FEBS Lett., 268, pp.235-237, 1990; Biochim. Biophys. Acta, 1029, pp.91-97, 1990)。この手段は、PEGによる水和層がリポソームなどの微粒子キャリアを覆うと血清タンパク吸着などオプソニン化が抑制され、その結果、マクロファージによる貪食と細網内皮系組織による取り込みを回避できることに基づく。この目的のために、ポリアルキレングリコールを結

合したリン脂質が提案されており、このリン脂質を用いてリポソームの表面をポリアルキレングリコールで修飾できることが知られている。また、粒子径を100～200 nmに制御したPEG修飾リポソームはEPR(Enhanced Permeability and Retention)効果により固形腫瘍にほぼ選択的に集積し、血中に再び回収されることなく長時間にわたり腫瘍内に維持される(EPR効果についてCancer Res., 46, pp.6387-6392, 1986を参照のこと)。

[0005] しかしながら、リポソームなどの微粒子キャリアーの表面をポリアルキレングリコールで修飾した場合には、血中滞留性は改善するものの、標的細胞の内部に微粒子キャリアーが取り込まれにくくなるという新たな問題が生じることが知られている。この問題は、特に、薬剤封入リポソームや遺伝子封入MENDを用いて標的細胞に特異的に抗腫瘍剤や遺伝子を送達するターゲッティング治療において、期待したほどの治療効果を達成できず、また標的細胞に送達されなかった抗腫瘍剤や遺伝子による副作用も十分に回避できないという深刻な問題を引き起こしている。

[0006] 一方、腫瘍細胞は増殖や浸潤・転移の過程で細胞外マトリックス(ECM)を分解・再構築するが、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が重要な役割を果たしていることが知られている(Cell. 91, pp.439-442, 1997; APMIS, 107, pp.137-143, 1999)。MMPには20以上のファミリーが同定されており、分泌型と細胞膜上に存在する膜型に分類されている。MMPはコラーゲンなどのECMを分解する機能を有しているが、最近の研究でMMPにより特異的に分解・切断されるペプチド配列が明らかとなっている(Nature Biotechnology, 19, pp.661-667, 2001)。

[0007] また、リポソームの構成脂質として利用可能なペプチド結合リン脂質が知られている(特表2003-513009号公報)。上記公報には、このリン脂質のペプチドはPEG(ポリエチレングリコール)などで修飾されていてもよいとの説明がある(上記公報[0016]段落)。このリン脂質のペプチドがペプチダーゼにより開裂されると、この脂質を構成脂質として含むリポソームが不安定化して含有物がその部位で放出されるので、ペプチダーゼ分泌細胞に対して特異的に含有物を送達することができる。また、上記ペプチダーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼを利用でき、腫瘍細胞をターゲットとしてリポソームを利用できることが教示されている(上記公報[0021]段落及び[0042]段落)。

もっとも、このリン脂質を用いたリポソームによる薬剤又は遺伝子の送達効率は十分とは言えない。

非特許文献1:Nature Biotechnology, 19, pp.661, 2001

特許文献1:特表2003-513009号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、表面をポリアルキレングリコールなどで修飾したリポソームやMENDなどの脂質膜構造体を微粒子キャリアーとして用いて、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患(悪性腫瘍、肺気腫、肺線維症、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、歯周炎、角膜潰瘍、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、増殖性硝子体、加齢黄斑変性症、水泡性疾患、慢性皮膚潰瘍、多発性硬化症、糸球体腎炎、ループス腎炎、慢性肝炎、肝硬変、心不全など)の予防・治療に関する手段を提供することにある。より具体的には、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる悪性腫瘍などの疾患部位や新生血管の近傍に抗腫瘍剤などの薬物や悪性腫瘍等の遺伝子治療のための遺伝子を送達し、引いては標的細胞内に送達するにあたり、標的細胞の内部に抗腫瘍剤などの薬物や遺伝子を効率的に取り込ませる手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、ポリアルキレングリコールなどで修飾した特定のリン脂質において、ポリアルキレングリコールなどの修飾部分とリン脂質部分との間にマトリックスメタロプロテアーゼにより加水分解可能なオリゴペプチドを介在させ、その脂質を用いてリポソームやMENDなどの脂質膜構造体を調製して抗腫瘍剤や遺伝子などの微粒子キャリアーとして用いると、血中においてはポリアルキレングリコールなどの修飾部位の存在により該リポソームやMENDの高い血中滞留性が保たれる一方で、標的組織に到達した該リポソームやMENDでは、マトリックスメタロプロテアーゼにより該オリゴペプチド部分が加水分解されてポリアルキレングリコールなどの修飾部位が脱離することになる。その結果、一つは、ポリアルキレングリコールなどの修飾部位が脱離したリポソームやMENDの安定性が低下してその構造を保つことができずに、脂質膜構造体に保持された抗腫瘍剤等を標的細

胞の外部にて放出する方法によって、またもう一つは、ポリアルキレングリコールなどによる修飾が脱離したリポソームやMENDに変化してこれらの脂質膜構造体がそのまま標的細胞に効率的に取り込まれる方法によって、あるいはこれら二つの方法が合わさることによって、高い導入率で抗腫瘍剤や遺伝子を標的細胞内に送達できることを見出した。また、このようにして効率的に抗腫瘍剤や遺伝子を標的細胞に送達することにより、極めて高い抗腫瘍効果を達成できることを見出した(特願2006－049567号明細書)。

[0010] 本発明者らは、さらに研究を重ねるうち、ポリアルキレングリコールなどの修飾部分とリン脂質部分との間にマトリックスメタロプロテアーゼにより加水分解可能なオリゴペプチドを介在させた脂質、及び該オリゴペプチドの介在のないポリアルギレングリコールなどの修飾リン脂質とを組み合わせてMENDなどの脂質膜構造体を調製して抗腫瘍剤や遺伝子を標的細胞として悪性腫瘍細胞に送達すると、極めて高い導入率で送達できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

[0011] すなわち、本発明により、少なくとも下記の2種類のリン脂質誘導体:

(1)アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含むリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質であり、及び

(c)該ペプチドがマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを含むペプチドである(ただし、該基質ペプチドの両端又は片端には1個のアミノ酸又は2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドが結合していてもよい)

リン脂質誘導体、及び

(2)アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含有しないリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質である

リン脂質誘導体

を構成脂質として含む脂質膜構造体が本発明により提供される。

[0012] この発明の好ましい態様によれば、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物や遺伝子治療のための遺伝子を保持した上記脂質膜構造体;及び、リポソームである上記脂質膜構造体が提供される。

さらに好ましい態様によれば、リン脂質誘導体(1)及び(2)において、該アルコール化合物がポリアルキレングリコール類であり、該リン脂質がホスファチジルエタノールアミン類であり、リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドがVal-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Glyを含むペプチドである上記の脂質膜構造体;リン脂質誘導体(1)及び(2)において、該アルコール化合物がポリエチレングリコールであり、該リン脂質がジオレイルホスファチジルエタノールアミン又はジステアロイルホスファチジルエタノールアミンであり、リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドがGly-Gly-Glyをリンカーとして含む上記の脂質膜構造体;及び、リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドがGly-Gly-Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Gly-Gly-Gly-Glyである上記の脂質膜構造体が提供される。特に好ましい態様によれば、リン脂質誘導体(1)とリン脂質誘導体(2)の脂質膜構造体の全脂質量に対する割合が約20モル%である上記の脂質膜構造体が提供される。

[0013] 別の観点からは、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物や遺伝

子治療のための遺伝子を保持した上記脂質膜構造体を含むマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物が提供される。

これらに加えて、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患の治療方法であって、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物や遺伝子治療のための遺伝子を保持した上記脂質膜構造体をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が本発明により提供される。

発明の効果

[0014] 本発明の脂質膜構造体は、マトリックスメタロプロテアーゼにより上記のリン脂質誘導体(1)のペプチド部分が切断されてポリアルキレングリコールなどの修飾部位を脱離する一方、リン脂質誘導体(2)に由来するポリアルキレングリコールが脂質膜構造体表面に残留する特性を有している。本発明の脂質膜構造体は、血中においては該修飾部位の存在により安定であり、マトリックスメタロプロテアーゼを分泌する悪性腫瘍細胞や新生血管などの近傍では、該修飾部位が脱離することにより脂質膜構造体の安定性が低下して、その構造を保つことができずに、脂質膜構造体に保持された抗腫瘍剤や遺伝子等を標的細胞の外部で放出し、あるいは脂質膜構造体が標的細胞中に効率的に取り込まれることによって、標的細胞中に薬剤や遺伝子を効率的に導入することができる。さらに、本発明の脂質膜構造体ではポリアルキレングリコールなどの修飾部位の一部が悪性腫瘍細胞や新生血管などの近傍においても残留し、十分な血中滞留性を維持することができるという特徴がある。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]PPD-MENDとPEG-MENDのHEK293細胞における遺伝子発現活性へのMMP-2添加の影響を示した図である。

[図2]各種細胞系におけるPPD-MENDの遺伝子発現活性を示した図である。

[図3]PPD-MENDとPEG-MENDを用いたインビボ実験の結果を示した図である。

[図4]PEG/PPD-MENDを用いたインビボ実験の結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 本発明の脂質膜構造体の製造に用いられるリン脂質誘導体のうち、少なくとも1種のリン脂質誘導体は、アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アル

コール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含むリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質であり、及び

(c)該ペプチドがマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを含むペプチドである(ただし、該基質ペプチドの両端又は片端には1個のアミノ酸又は2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドが結合していてもよい)

ことを特徴としている(本明細書においてリン脂質誘導体(1)と呼ぶ場合がある)。

[0017] また、本発明の脂質膜構造体の製造に用いられるリン脂質誘導体のうち、他の1種のリン脂質誘導体は、アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含有しないリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質である

ことを特徴としている(本明細書においてリン脂質誘導体(2)と呼ぶ場合がある)。

[0018] アルコール化合物としては、ポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールな

どのポリアルキレングリコール類、グリセリン又はグリセリンエステルなどのグリセリン類、あるいはジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン、又はオクタグリセリンなどのポリグリセリン類を用いることができる。これらのうち、ポリアルキレングリコールが好ましく、特に好ましいのはポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールを用いる場合、分子量は特に限定されず、脂質膜構造体に血中滞留性などの所望の特性を付与するために当業者が適宜選択可能である。

[0019] アルコール化合物の残基とは、アルコール化合物又は化学修飾されたアルコール化合物から水素原子などの適宜の原子又は水酸基やハロゲン原子などの適宜の官能基を除いて得られる基を意味しており、好ましくは1価の基を意味している。例えば、アルコール化合物の水酸基から水素原子を除いて得られる残基、アルコール化合物の炭素原子に結合する水素原子を除いて得られる残基、あるいはアルコール化合物の末端にカルボキシル基を含む官能基を導入し、そのカルボキシル基から水酸基又は水素原子を除いて得られる残基などを例示できるが、これらに限定されることはない。

[0020] リン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、またはホスファチジン酸類を用いることができるが、これらのリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されない。例えば、炭素数12～20個程度の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を1個又は2個有するリン脂質を用いることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂肪酸由来のアシル基を1個又は2個有するリン脂質を用いることができる。これらのうち、ホスファチジルエタノールアミン類が好ましく、具体的にはジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)等を挙げることができ、中

でもジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が好ましい。

[0021] リン脂質の残基とは、上記のリン脂質又は化学修飾されたリン脂質から水素原子などの適宜の原子又は水酸基やハロゲン原子などの適宜の官能基を除いて得られる基を意味しており、好ましくは1価の基を意味している。例えば、リン脂質のリン酸部分の水酸基から水素原子を除いて得られる残基、リン脂質のリン酸部分の水酸基を除いて得られる残基、リン脂質の炭素原子に結合する水素原子を除いて得られる残基、あるいはリン脂質のリン酸部分にカルボキシル基を含む官能基を導入し、そのカルボキシル基から水酸基又は水素原子を除いて得られる残基などを例示できるが、これらに限定されることはない。

[0022] アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間に含まれるペプチドは、マトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを少なくとも1個含んでいる。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)には、例えば、MMP-1(間質型コラーゲナーゼ)、MMP-2(ゼラチナーゼA)、MMP-3、MMP-7、MMP-9(ゼラチナーゼB)などの存在が知られており、これらのうちの1種又は2種以上のマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを用いることができる。マトリックスメタロプロテアーゼについては、例えば、鶴尾隆編「癌転移の分子機構」、pp.92-107、メジカルビュー社、1993年発行などを参照することができる。

[0023] マトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドについては、例えば、上記非特許文献1(Nature Biotechnology, 19, pp.661-667, 2001)に特定の種類のマトリックスメタロプロテアーゼと、それに特異的に認識される基質ペプチドが説明されているので、この刊行物を参照することにより、特定の種類のマトリックスメタロプロテアーゼにより特異的に切断される基質ペプチドを選択することが可能である。例えば、MMP-9についてVal-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Glyが特異的基質として知られており、MMP-9の基質となりうる基質ペプチドとして上記のオクタペプチドを用いることが好ましい。上記非特許文献1の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

具体的には、マトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドとして、Gl

y-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln、Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln、Val-Pro-Met-Ser-Met-Arg-Gly-Gly、Ile-Pro-Val-Ser-Leu-Arg-Ser-Gly、Arg-Pro-Phe-Ser-Met-Ile-Met-Gly、Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly、Ile-Pro-Glu-Ser-Leu-Arg-Ala-Gly、Arg-His-Asp、Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys、Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys、Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg、Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg、Gly-Pro-Leu-Gly-Pro、Gly-Pro-Leu-Gly-Pro等を挙げることができる。

[0024] アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間に含まれるペプチドは、基質ペプチドのほか、アルコール化合物の残基及び／又はリン脂質の残基との結合に関与するリンカーとして、1個のアミノ酸からなるリンカー、又は2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドからなるリンカーを含んでいてもよい。リンカーである該アミノ酸又は該オリゴペプチドは、該基質ペプチドの両端に結合していてもよいが、片端のみに結合していてもよい。該基質ペプチドの両端に該リンカーが結合している場合には、2つのリンカーは同一でも異なっていてもよい。リンカーを介さずに、基質ペプチドが直接アルコール化合物の残基及び／又はリン脂質の残基と結合していてもよい。上記のリン脂質誘導体ではリンカーが存在することが好ましく、該基質ペプチドの両端に同一又は異なるリンカーが存在していることがさらに好ましく、該2個のリンカーが2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドからなる同一又は異なるリンカーであることがより好ましい。

[0025] リンカーとして利用可能な1個のアミノ酸の種類、又はリンカーとして利用可能なオリゴペプチドを構成するアミノ酸は特に限定されず、任意の種類の1個のアミノ酸、又は任意の種類の2個ないし8個の同一又は異なるアミノ酸を含む任意のオリゴペプチドを用いることができる。リンカーとして利用可能なオリゴペプチドとしては、例えば、-Leu-Gly-、-Tyr-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Phe-Gly-Gly-Gly-、-Phe-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Phe-、-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-、-Phe-Phe-、-Ala-Gly-、-Pro-Gly-、-Gly-Gly-Gly-Phe-、-Gly-、-D-Phe-Gly-、-Gly-Phe-、-Ser-Gly-、-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Leu-Gly-、-Gly-Gly-Tyr-Gly-、-Gl

y-Gly-Val-Leu-、-Gly-Gly-Leu-Leu-、-Gly-Gly-Phe-Leu-、-Gly-Gly-Tyr-Leu-、-Gly-Gly-Val-Gln-、-Gly-Gly-Leu-Gln-、-Gly-Gly-Ile-Gln-、-Gly-Gly-Phe-Gln-、-Gly-Gly-Tyr-Gln-、-Gly-Gly-Trp-Gln-、-Gly-Gly-Leu-Ser-、-Gly-Gly-Phe-Ser-、-Gly-Gly-Tyr-Ser-、-Gly-Gly-Val-Thr-、-Gly-Gly-Leu-Thr-、-Gly-Gly-Phe-Thr-、-Gly-Gly-Tyr-Thr-、-Gly-Gly-Trp-Thr-、-Gly-Gly-Val-Met-、-Gly-Gly-Leu-Met-、-Gly-Gly-Ile-Met-、-Gly-Gly-Phe-Met-、-Gly-Gly-Tyr-Met-、-Gly-Gly-Val-Cit-、-Gly-Gly-Leu-Cit-、-Gly-Gly-Phe-Cit-、-Gly-Gly-Tyr-Cit-、-Gly-Gly-Trp-Cit-、-Gly-Gly-Gly-Asn-、-Gly-Gly-Ala-Asn-、-Gly-Gly-Val-Asn-、-Gly-Gly-Leu-Asn-、-Gly-Gly-Ile-Asn-、-Gly-Gly-Gln-Asn-、-Gly-Gly-Thr-Asn-、-Gly-Gly-Phe-Asn-、-Gly-Gly-Tyr-Asn-、-Gly-Gly-Met-Asn-、-Gly-Gly-Pro-Asn-、-Gly-Gly-Cit-Asn-、-Gly-Gly-Trp-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Asn-、-Gly-Gly-Pro-Ala-、-Gly-Gly-Pro-Val-、-Gly-Gly-Pro-Leu-、-Gly-Gly-Pro-Ile-、-Gly-Gly-Pro-Gln-、-Gly-Gly-Pro-Ser-、-Gly-Gly-Pro-Tyr-、-Gly-Gly-Pro-Met-、-Gly-Gly-Met-Pro-、-Gly-Gly-Pro-Pro-、-Gly-Gly-Pro-Cit-、-Gly-Gly-Ile-Leu-、-Gly-Gly-Ile-Cit-などを例示することができるが、これらに限定されることはない。これらのうち、-Gly-Gly-又は-Gly-Gly-Gly-がリンカーとして好ましい。

[0026] 上記のリン脂質誘導体(1)の製造方法は特に限定されないが、一般的には、上記リン脂質誘導体の部分構造であるアルコール化合物とペプチド化合物とを結合させ、得られたペプチド結合アルコール化合物のペプチド末端にリン脂質化合物を結合させることにより製造することができる。

アルコール化合物とペプチド化合物との結合は、一般的にはペプチド化合物のペプチド末端のアミノ基又はカルボキシル基とアルコール化合物の反応性官能基(例えば、水酸基、カルボキシル基、エステル基など)とを反応させることにより行なわれる。アルコール化合物にすでに存在する水酸基を反応性官能基として用いてもよいが、例えば、アルコール化合物の水酸基をカルボキシル基に酸化し、あるいはアルコール化合物にカルボキシル基を含む官能基を導入するなどの手法により、アルコール化合物にカルボキシル基を導入し、さらに必要に応じて該カルボキシル基をエステル化するなどの方法により、反応性官能基として用いることができる。

[0027] 典型的には、アルコール化合物のカルボキシル基又はエステル基などの反応性官能基とペプチド化合物のアミノ基とを反応させてアミド結合を形成することにより、ペプチド結合アルコール化合物を製造することができる。この反応として、一般的には、酸ハライド法、活性エステル法、又は酸無水物などの方法を用いることができる。

[0028] 酸ハライド法では、不活性溶媒中でカルボキシル基を有するアルコール化合物をハロゲン化剤で処理して酸ハライドとした後に、得られた酸ハライドとペプチド化合物のアミノ基とを反応させることによって目的物を得ることができる。酸ハライドを生成するための反応で使用される溶媒の種類は特に限定されず、反応を阻害せずに出発物質を溶解するものであればいかなる溶媒を用いてもよい。例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサンのようなエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミドのようなアミド類、ジクロロメタン、クロロホルム、1，2－ジクロロエタンのようなハロゲン化炭化水素類、アセトニトリル、プロピオニトリルのようなニトリル類、ギ酸エチル、酢酸エチルのようなエステル類、又はこれらの混合溶媒が好適である。ハロゲン化剤としては、例えば、チオニルクロリド、チオニルブロミド、チオニルアイオダイドのようなチオニルハライド類、スルフリルクロリド、スルフリルブロミド、スルフリルアイオダイドのようなスルフリルハライド類、三塩化燐、三臭化燐、三沃化燐のような三ハロゲン化燐類、五塩化燐、五臭化燐、五沃化燐のような五ハロゲン化燐類、オキシ塩化燐、オキシ臭化燐、オキシ沃化燐のようなオキシハロゲン化燐類、塩化オキザリル、臭化オキザリルのようなハロゲン化オキザリル類などを挙げることができる。反応温度は、0℃ないし溶媒の還流温度で行うことができ、好適には室温ないし溶媒の還流温度である。

[0029] 得られた酸ハライドとペプチド化合物のアミノ基との反応で使用される溶媒は、反応を阻害せず、出発物質を溶解するものであれば特に限定はないが、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサンのようなエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミドのようなアミド類、ギ酸エチル、酢酸エチルのようなエステル類、ジメチルスルホキシドのようなスルホキシド類、またはそれらの混合溶媒を挙げることができる。酸ハライドとペプチド化合物のアミノ基との反応では、必要に応じてトリエチルアミン、ピリジンのような有機塩基を添加することもできる。

[0030] 活性エステル化法は、溶媒中、アルコール化合物のカルボキシル基を活性エステル化剤と反応させて活性エステルを製造した後、ペプチド化合物のアミノ基と反応させることによって行われる。溶媒としては、例えば、メチレンクロリド、クロロホルムのようなハロゲン化炭化水素類、エーテル、テトラヒドロフランのようなエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドのようなアミド類、ベンゼン、トルエン、キシレンのような芳香族炭化水素類、酢酸エチルのようなエステル類、又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。活性エステル化剤としては、例えば、N-ヒドロキシサクシイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3- ジカルボキシイミドのようなN-ヒドロキシ化合物類;1,1'- オキザリルジイミダゾール、N,N'- カルボニルジイミダゾールのようなジイミダゾール化合物類;2,2'-ジピリジルジサルファイドのようなジサルファイド化合物類;N,N'-ジサクシンイミジルカーボネートのようなコハク酸化合物類;N,N'-ビス(2- オキソ-3- オキサゾリジニル)ホスフィニッククロライドのようなホスフィニッククロライド化合物類;N,N'-ジサクシンイミジルオキザレート(DSO)、N,N'-ジフタルイミドオキザレート(DPO)、N,N'-ビス(ノルボルネニルサクシンイミジル)オキザレート(BNO)、1,1'- ビス(ベンゾトリアゾリル)オキザレート(BBTO)、1,1'- ビス(6- クロロベンゾトリアゾリル)オキザレート(BCTO)、1,1'- ビス(6-トリフルオロメチルベンゾトリアゾリル)オキザレート(BTBO)のようなオキザレート化合物類などを挙げることができる。

[0031] ペプチド化合物のアミノ基と活性エステルとの反応は、例えば、アゾジカルボン酸ジエチル-トリフェニルホスフィンのようなアゾジカルボン酸ジ低級アルキル-トリフェニルホスフィン類、N-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホナートのようなN-低級アルキル-5- アリールイソオキサゾリウム-3'-スルホナート類、ジエチルオキシジフォルメート(DEPC)のようなオキシジフォルメート類、N',N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のようなN',N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、ジ-2-ピリジルジセレニドのようなジヘテロアリールジセレニド類、トリフェニルホスフィンのようなトリアリールホスフィン類、p-ニトロベンゼンスルホニルトリアゾリドのようなアリールスルホニルトリアゾリド類、2-クロル-1- メチルピリジニウム ヨーダイドのような2-ハロ-1- 低級アルキルピリジニウムハライド、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)のようなジアリールホスホリルアジド類、N,N'-カルボジイミダゾール(CDI) のようなイミダゾール誘導体、1-ヒドロ

キシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体、N-ヒドロキシ-5- ノールボルネン-2,3- ジカルボキシイミド(HONB)のようなジカルボキシイミド誘導体、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WSC) のようなカルボジイミド誘導体、1-プロパンホスホン酸環状無水物(T3P)のようなホスホン酸環状無水物などの縮合剤の存在下に好適に行われる。活性エステルの調製のための反応温度は-10℃ないし室温であり、活性エステル化合物とペプチド化合物のアミノ基との反応は室温付近であり、反応時間は両反応共に30分ないし10時間程度である。

[0032] 混合酸無水物法は、アルコール化合物のカルボキシル基の混合酸無水物を製造した後、ペプチド化合物のアミノ基を反応させることにより行われる。混合酸無水物を製造する反応は、不活性溶媒(例えば、エーテル、テトラヒドロフランのようなエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドのようなアミド類)中、クロロ炭酸エチル、クロロ炭酸イソブチルのような炭酸低級アルキルハライド、ジエチルシアノリン酸のようなジ低級アルキルシアノリン酸などを用いて行なうことができる。反応は、好適にはトリエチルアミン、N-メチルモルホリンのような有機アミンの存在下に行われ、反応温度は-10℃ないし室温であり、反応時間は30分ないし5時間程度である。混合酸無水物とペプチド化合物のアミノ基との反応は、好適には不活性溶媒(例えば、エーテル、テトラヒドロフランのようなエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドのようなアミド類)中で前記の有機アミンの存在下に行われ、反応温度は0℃ないし室温であり、反応時間は1時間ないし24時間程度である。また、カルボン酸とアミン化合物とを前記の縮合剤の存在下で直接反応させることによって縮合を行なうこともできる。この反応は前記の活性エステルを製造する反応と同様にして行われる。

[0033] 続いて、得られたペプチド結合アルコール化合物の反応性官能基(例えばカルボキシル基や水酸基など)とリン脂質化合物の反応性官能基(例えば、カルボキシル基やアミノ基など)とを反応させることにより、上記のリン脂質誘導体を得ることができる。例えば、リン脂質化合物としてホスファチジルエタノールアミン類を用いる場合には、該リン脂質化合物のアミノ基と、ペプチド結合アルコール化合物のペプチド末端のカルボキシル基とを反応させることにより、上記のリン脂質誘導体を製造できる。この反応は上記に説明した反応と同様に行なうことができ、例えば、縮合剤の存在下で活

性エステル法などにより行なうことが好ましい。

[0034] 上記の各反応において、保護基を導入することにより目的の反応を効率的に行なうことができる場合がある。保護基の導入については、例えば、「プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス」(P. G. M. Wuts and T. Green, 第3版、1999年、Wiley, John & Sons)などを参照することができる。目的物の単離及び精製は当業界で用いられる通常の方法により行なうことができるが、例えば、高速液体クロマトグラフィーなどによる精製が好適である。なお、上記のリン脂質誘導体には、塩の形態の物質も包含される。塩の種類としては、特に限定されないが、塩酸塩や硫酸塩などの鉱酸塩、シュウ酸塩や酢酸塩などの有機酸塩、ナトリウム塩やカリウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、メチルアミン塩などの有機アミン塩などを例示できる。

[0035] リン脂質誘導体(2)も上記の製造方法に準じて容易に製造することができる。また、以下のものをはじめとして種々市販されており、これらも用いることができる。

1, 2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－350]、1, 2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－350]、1, 2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－350]、1, 2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－350]、1, 2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－550]、1, 2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－550]、1, 2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－550]、1, 2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－550]、1, 2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－750]、1, 2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－750]、1, 2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－750]、1, 2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエ

タノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－750]、1，2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－1000]、1，2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－1000]、1，2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－1000]、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－1000]、1，2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－2000]、1，2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－2000]、1，2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－2000]、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－2000]、1，2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－3000]、1，2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－3000]、1，2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－3000]、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－3000]、1，2－ジミリストイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－5000]、1，2－ジパルミトイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－5000]、1，2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－5000]、および1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスフォエタノールアミン－N－[メトキシ(ポリエチレングリコール)－5000]等のジアシルホスフォエタノールアミンポリエチレングリコール。

[0036] 本発明により提供される脂質膜構造体の種類は特に限定されないが、脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態としては、例えば、一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、O/W型エマルション、W/O/W型エマルション、球状ミセル、ひも状ミセル、不定

型の層状構造物などを挙げることができる。これらのうちリポソームが好ましい。分散した状態の脂質膜構造体の大きさは特に限定されないが、例えば、リポソームやエマルションの場合には粒子径が50 nmから5 μmであり、球状ミセルの場合、粒子径が5 nmから100 nmである。ひも状ミセルや不定型の層状構造物の場合は、その1層あたりの厚みが5 nmから10 nmであり、これらが層を形成しているものが好ましい。

[0037] 本発明により提供される脂質膜構造体は、上記のリン脂質誘導体(1)及び(2)のほか、通常用いられるリン脂質類、コレステロール、コレスタノール等のステロール類、炭素数8～22の飽和又は不飽和のアシル基を有する脂肪酸類、α－トコフェロール等の酸化防止剤を含んでいてもよい。リン脂質類としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、又はホスファチジン酸類等を挙げることができ、これらは1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。これらリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されないが、例えば、炭素数12～20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。また、本発明の脂質膜構造体の調製には、卵黄レシチン、大豆レシチン等の天然物由来のリン脂質を用いることもできる。また、例えば、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1-N,N-ジメチルアミノジオレオイルプロパン(DODAP)、1-オレオイル-2-ヒドロキシ-3-N,N-ジメチルアミノプロパン、1,2-ジアシル-3-N,N-ジメチルアミノプロパン、1,2-ジデカノイル-1-N,N-ジメチルアミノプロパン、3-β-[n-[(N',N'-ジメチルアミノ)エタン]カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)、1,2-ジミリストオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド(DMRIE)、および1,2-ジオールオエオオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド(DORI)などを用いることもできる。

[0038] 本発明の脂質膜構造体において、上記のリン脂質誘導体(1)及び(2)の比率は特に

限定されないが、例えば、リン脂質誘導体(1):リン脂質誘導体(2)のモル比として10:1～1:10の範囲であることが好ましく、4:1～1:4の範囲であることがさらに好ましく、特に好ましくはモル比として1:1程度の場合である。リン脂質誘導体(1)及びリン脂質誘導体(2)(合計量)の脂質膜構造体の全脂質量に対する割合は特に限定されないが、例えば、該割合は5～40モル%程度であり、好ましくは10～30モル%程度であり、より好ましくは約20モル%である。

[0039] 本発明の脂質膜構造体には、膜構成脂質として、例えば、血中滞留性機能、温度変化感受性機能、及びpH感受性機能などを有する脂質誘導体を含有させることができ、それによりこれらの機能のいずれか1つ又は2つ以上を付与することができ、こ(れら)の機能を付加することによって、例えば、薬物及び／又は遺伝子を含む脂質膜構造体の血液中での滞留性を向上させ、肝臓又は脾臓などの細網内皮系組織による捕捉率を低下させることができ、あるいは薬物及び／又は遺伝子の放出性を高めることができる。

[0040] 血中滞留性機能を付与することができる血中滞留性脂質誘導体としては、例えば、グリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトール、ガングリオシドGM3、グルクロン酸誘導体、グルタミン酸誘導体等を挙げることができる。

[0041] 温度変化感受性機能を付与することができる温度変化感受性脂質誘導体としては、例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン等を挙げることができる。また、pH感受性機能を付与することができるpH感受性脂質誘導体としては、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン等を挙げることができる。

[0042] 本発明の脂質膜構造体の形態は特に限定されないが、例えば、脂質膜構造体の膜構成成分であるリン脂質等とともに上記のリン脂質誘導体(1)及び(2)が脂質膜構造体を形成している形態が好ましい。より具体的には、例えば、上記のリン脂質誘導体(1)及び(2)がその他のリン脂質等とともに膜構成成分となって脂質膜構造体、例えばリポソームを形成した形態を挙げることができる。

[0043] 本発明の脂質膜構造体の形態及びその製造方法は特に限定されないが、形態としては、例えば、乾燥した混合物の形態、あるいは水系溶媒に分散された形態又はこれを乾燥させた形態若しくは凍結させた形態等を挙げることができる。以下に、これ

らの形態の脂質膜構造体を製造する方法を説明するが、本発明の脂質膜構造体の形態及びその製造方法は上記の形態又は下記に説明する製造方法に限定されることはない。

[0044] 本発明の脂質膜構造体の製造方法は特に限定されないが、例えば、乾燥した混合物の形態の脂質膜構造体は、例えば、脂質膜構造体の構成成分全てを一旦クロロホルム等の有機溶媒に溶解させ、次いでエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことによって製造することができる。

脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態は、上記の乾燥した混合物を水系溶媒に添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等により乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することができる。脂質膜構造体の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルター等を用いて、高圧下でイクストルージョン(押し出し濾過)を行えばよい。

[0045] 水系溶媒(分散媒)の組成は特に限定されるべきものではなく、例えば、リン酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝化生理食塩液等の緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。これら水系溶媒(分散媒)は脂質膜構造体を安定に分散させることができるが、さらに、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類、ラフィノース、メレジノース等の三糖類、シクロデキストリン等の多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール等の糖アルコールなどの糖(水溶液)や、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール(水溶液)等を加えてもよい。この水系溶媒(分散媒)に分散した脂質膜構造体を安定に長期間保存するには、凝集などの物理的安定性の面から、水系溶媒(分散媒)中の電解質を極力なくすことが望ましい。また、脂質の化学的安定性の面から、水系溶媒(分散媒)のpHを弱酸性から中性付近

(pH3.0から8.0)に設定することや窒素バブリングにより溶存酸素を除去することが望ましい。

[0046] さらに脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態を乾燥又は凍結させた形態は、上記の水系溶媒に分散した脂質膜構造体を通常の凍結乾燥や噴霧乾燥による乾燥又は凍結方法等により製造することができる。水系溶媒に分散した形態の脂質膜構造体を一旦製造した上でさらに乾燥すると、脂質膜構造体の長期保存が可能となるほか、この乾燥した脂質膜構造体に薬効成分含有水溶液を添加すると、効率よく脂質混合物が水和されるために薬効成分を効率よく脂質膜構造体に保持させることができる長所がある。

[0047] 凍結乾燥や噴霧乾燥する場合には、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類、ラフィノース、メレジノース等の三糖類、シクロデキストリン等の多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール等の糖アルコールなどの糖(水溶液)を用いると安定に長期間保存することができる。また、凍結する場合には、例えば、前記した糖(水溶液)やグリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコール等の多価アルコール(水溶液)をそれぞれ用いると安定に長期間保存することができる。糖と多価アルコールとを組み合わせて用いてもよい。脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態における糖又は多価アルコールの濃度は特に限定されないが、脂質膜構造体が水系溶媒に分散した状態において、例えば、糖(水溶液)は、2～20%(W/V)が好ましく、5～10%(W/V)がさらに好ましい。また、多価アルコール(水溶液)は、1～5%(W/V)が好ましく、2～2.5%(W/V)がさらに好ましい。水系溶媒(分散媒)として、緩衝液を用いる場合には、緩衝剤の濃度が5～50 mMが好ましく、10～20 mMがさらに好ましい。水系溶媒(分散媒)における脂質膜構造体の濃度は特に限定されないが、脂質膜構造体における脂質総量の濃度は、0.1 mM～500 mMが好ましく、1 mM～100 mMがさらに好ましい。

[0048] 本発明の脂質膜構造体にはマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子などを保持させることができる。「保持」とは、薬物及び／又は遺伝子が脂質膜構造体の脂質膜の中、表面、内部、脂質層中、及び／又は脂質層の表面に存在することを意味する。脂質膜構造体が、例えばリポソームなどの微粒子である場合には、微粒子内部に薬物及び／又は遺伝子を封入することもできる。脂質膜構造体に保持させるべき薬物及び／又は遺伝子の量は特に限定されず、そ(れら)の薬効を生体(細胞)内で有効に発揮させるのに充分な量であればよい。薬物及び／又は遺伝子の種類も特に限定されず、標的とする組織や疾患の種類、および脂質膜構造体の形態などにより適宜決定すればよい。

[0049] マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患としては、悪性腫瘍、肺気腫、肺線維症、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、歯周炎、角膜潰瘍、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、増殖性硝子体、加齢黄斑変性症、水泡性疾患、慢性皮膚潰瘍、多発性硬化症、糸球体腎炎、ループス腎炎、慢性肝炎、肝硬変、心不全などを挙げることができ、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患が悪性腫瘍の場合、有効な薬物としては抗腫瘍剤を一例として挙げることができる。抗腫瘍剤としては、例えば、塩酸イリノテカン、塩酸ノギテカン、エキサテカン、RFS-2000、Lurtotecan、BNP-1350、Bay-383441、PNU-166148、IDEC-132、BN-80915、DB-38、DB-81、DB-90、DB-91、CKD-620、T-0128、ST-1480、ST-1481、DRF-1042、DE-310等のカンプトテシン誘導体、ドセタキセル水和物、パクリタキセル、IND-5109、BMS-184476、BMS-188797、T-3782、TAX-1011、SB-RA-31012、SBT-1514、DJ-927等のタキサン誘導体、イホスファミド、塩酸ニムスチン、カルボコン、シクロホスファミド、ダカルバジン、チオテパ、ブスルファン、メルファラン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、６－メルカプトプリンリボシド、エノシタビン、塩酸ゲムシタビン、カルモフール、シタラビン、シタラビンオクホスファート、テガフール、ドキシフルリジン、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、リン酸フルダラビン、アクチノマイシンD、塩酸アクラルビシン、塩酸イダルビシン、塩酸エピルビシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸ピラルビシン、塩酸ブレオマイシン、ジノスタチンスチマラマー、ネオカルチノスタチン、マイトマイシンC、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、エトポシ

ド、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチン、塩酸アムルビシン、ゲフィニチブ、エキセメスタン、カペシタビン、TNP-470、TAK-165、KW-2401、KW-2170、KW-2871、KT-5555、KT-8391、TZT-1027、S-3304、CS-682、YM-511、YM-598、TAT-59、TAS-101、TAS-102、TA-106、FK-228、FK-317、E7070、E7389、KRN-700、KRN-5500、J-107088、HMN-214、SM-11355、ZD-0473等を挙げることができる。

[0050] 遺伝子とは、核酸をあらわし、オリゴヌクレオチド、DNA、又はRNAのいずれでもよく、イン・ビボで発現することによりマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な遺伝子であれば、特に限定されるべきものではない。例えば、抗悪性腫瘍作用を有する遺伝子や血管新生抑制作用を有する遺伝子、具体的には、悪性腫瘍・加齢黄斑変性症等の遺伝子治療用の遺伝子等を挙げることができる。上記遺伝子治療用遺伝子としては、悪性腫瘍・加齢黄斑変性症等における血管新生や細胞増殖に関わるアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、shRNA、siRNAや酵素、サイトカイン等の生理活性物質、アンチセンスRNA、shRNA、siRNAをコードする遺伝子等を挙げることができる。

[0051] 脂質膜構造体が遺伝子を含む場合、標的細胞内へ遺伝子を効率的に導入するために、脂質膜構造体の構成成分として遺伝子導入機能を有する化合物を加えることが好ましい。このような化合物としては、O,O'-N-ジドデカノイル-N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、O,O'-N-ジテトラデカノイル-N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、O,O'-N-ジヘキサデカノイル-N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、O,O'-N-ジオクタデセノイル-N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、O,O',O''-トリデカノイル-N-(ω-トリメチルアンモニオデカノイル)アミノメタンブロミド及びのる[α-トリメチルアンモニオアセチル]-ジドデシル-D-グルタメート、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、3-β-[n-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール等を挙

げることができる。これらの遺伝子導入機能を有する化合物は、脂質膜構造体の膜の中、表面、内部、脂質層中及び／又は脂質層の表面に存在(結合)している形態が好ましい。

[0052] また、脂質膜構造体には、標的細胞やマトリックスメタロプロテアーゼを特異的に認識する抗体を保持させておいてもよい。抗体としてはモノクローナル抗体が好ましい。抗体は、例えば、単一のエピトープに対する1種類のモノクローナル抗体を用いてもよいが、各種のエピトープに対する特異性を持つ2種以上のモノクローナル抗体を組み合わせて用いてもよい。1価抗体又は多価抗体のいずれを用いてもよい。天然型(intact)分子又はそのフラグメント若しくは誘導体を用いてもよい。例えば、$F(ab')_2$、Fab'及びFabなどのフラグメントを用いてもよく、少なくとも二つの抗原又はエピトープ (epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又はクワドローム(quadrome), トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などがされた誘導体を用いることもできる。公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用し、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用し、DNA 組換え技術を用いて調製される抗体、あるいは標的エピトープに関して中和特性を有する抗体や結合特性を有する抗体を用いてもよい。

[0053] マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持する本発明の脂質膜構造体は、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物として用いることができる。本発明の医薬組成物の存在形態及びその製造方法は特に限定されず、上記の脂質膜構造体と同様の形態として調製することが可能である。例えば、形態としては、混合乾燥物形態、水系溶媒に分散した形態、さらにこれを乾燥させた形態や凍結させた形態を挙げることができる。

[0054] 混合乾燥物形態は、例えば、脂質膜構造体の構成成分とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子とを一旦クロロホルム等の有機溶媒で溶解させて混合物を得て、次にこれをエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥に付することにより製造することができる。脂

質膜構造体と薬物及び／又は遺伝子とを含む水系溶媒に分散した形態の医薬組成物の製造方法としてはいくつかの方法が知られており、脂質膜構造体におけるマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の保持様式や混合物の性状などに応じて、下記のように適宜の製造方法を選択することができる。

[0055] 製造方法1

上述の混合乾燥物に水系溶媒を添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等による乳化を行い製造する方法である。大きさ(粒子径)を制御する場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でイクストルージョン(押し出し濾過)を行えばよい。この方法の場合、まず、脂質膜構造体の構成成分とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子との混合乾燥物を作るために、脂質膜構造体、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を有機溶媒に溶解する必要があるが、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子と脂質膜構造体の構成成分との相互作用を最大限に利用できる長所がある。すなわち、脂質膜構造体が層状構造を有する場合にも、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子は多重層の内部にまで入り込むことが可能であり、この製造方法を用いるとマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の脂質膜構造体への保持率を高くできる長所がある。

[0056] 製造方法2

脂質膜構造体の構成成分を有機溶媒で一旦溶解後、有機溶媒を留去した乾燥物に、さらにマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を含む水系溶媒を添加して乳化を行い製造する方法である。大きさ(粒子径)を制御する場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でイクストルージョン(押し出し濾過)を行えばよい。有機溶媒には溶解しにくいが、水系溶媒には溶解し得るマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾

患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子に適用できる。脂質膜構造体がリポソームの場合、内水相部分にもマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持できる長所がある。

[0057] 製造方法3

水系溶媒に既に分散したリポソーム、エマルション、ミセル、又は層状構造物などの脂質膜構造体に、さらにマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を含む水系溶媒を添加して製造する方法である。対象となるマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子としては、水溶性のものを利用できる。既にでき上がっている脂質膜構造体に外部からマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を添加する方法であることから、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子が高分子の場合には、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子は脂質膜構造体の内部には入り込めず、脂質膜構造体の表面に存在（結合）した存在様式をとる可能性がある。脂質膜構造体としてリポソームを用いた場合、この製造方法3を用いると、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子がリポソーム粒子同士の間に挟まったサンドイッチ構造（一般的には複合体あるいはコンプレックスと呼ばれている。）を形成することが知られている。この製造方法では、脂質膜構造体単独の水分散液をあらかじめ製造するため、乳化時におけるマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の分解等を考慮する必要がなく、大きさ（粒子径）の制御もし易い。したがって、製造方法1や製造方法2に比べて比較的容易に製造することができる。

[0058] 製造方法4

水系溶媒に分散した脂質膜構造体を製造して乾燥することにより得られた乾燥物に、さらにマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を含む水系溶媒を添加して製造する方法である。製造方法3と同様に対象となるマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／

又は遺伝子治療のための遺伝子としては、水溶性のものを利用できる。製造方法3との相違点は、脂質膜構造体とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子との存在様式にあり、この製造方法4では、水系溶媒に分散した脂質膜構造体を一旦製造した上でさらに乾燥させた乾燥物を製造することから、この段階で脂質膜構造体は脂質膜の断片として固体状態で存在する。この脂質膜の断片を固体状態に存在させるためには、前記したように水系溶媒に、さらに糖（水溶液）、好ましくはショ糖（水溶液）や乳糖（水溶液）を添加した溶媒を用いることが好ましい。ここで、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を含む水系溶媒を添加すると、固体状態で存在していた脂質膜の断片は水の侵入とともに速やかに水和し始め、脂質膜構造体を再構築することができる。この時、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子が脂質膜構造体内部に保持された形態の構造体が製造できる。

[0059] 製造方法3では、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子が高分子の場合には、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子は脂質膜構造体内部には入り込めず、脂質膜構造体の表面に結合した存在様式をとるが、製造方法4はこの点で大きく異なる。すなわち、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の一部又は全部は脂質膜構造体内部に取り込まれる。この製造方法4は、脂質膜構造体単独の分散液をあらかじめ製造するため、乳化時のマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の分解を考慮する必要がなく、大きさ（粒子径）の制御もし易い。従って、製造方法1や製造方法2に比べて比較的製造が容易である。また、この他に、一旦凍結乾燥又は噴霧乾燥を行うため、製剤（医薬組成物）としての保存安定性を保証し易く、乾燥製剤をマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の水溶液で再水和しても大きさ（粒子径）を元に戻せること、高分子の抗腫瘍剤及び／又は遺伝子であっても、脂質膜構造体内部にマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な

薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持させ易いことなどの長所がある。

[0060] 脂質膜構造体とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した形態を製造するための他の方法としては、リポソームを製造する方法としてよく知られた方法、例えば逆相蒸発法などを採用できる。大きさ(粒子径)を制御する場合には、孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でイクストルージョン(押し出し濾過)を行えばよい。また、上記の脂質膜構造体とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに乾燥させる方法としては、凍結乾燥や噴霧乾燥等を挙げることができる。この時の水系溶媒としては、上述の糖(水溶液)、好ましくはショ糖(水溶液)や乳糖(水溶液)を添加した溶媒を用いることが好ましい。脂質膜構造体とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに凍結させる方法としては、通常の凍結方法が挙げられるが、この場合の水系溶媒としては、糖(水溶液)や多価アルコール(水溶液)を添加した溶媒を用いるのが好ましい。

[0061] 製造方法5

抗体を脂質膜構造体の表面に保持させた脂質膜構造体は、上記の製造方法1～4に準じて、脂質膜の構成成分とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子とを用いて脂質膜構造体を製造し、次いで抗体を添加することで、抗体が脂質膜構造体の膜の表面に存在(結合)する形態の組成物を製造することができる。

[0062] 製造方法6

抗体を脂質膜構造体の表面に保持させた脂質膜構造体は、上記の製造方法1～4に準じて、脂質膜の構成成分とマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子とを用いて脂質膜構造体を製造し、次いで、抗体及び抗体中のメルカプト基と反応し得る脂質誘導体を添加することで、抗体が脂質膜構造体の膜の表面に存在(結合)する形態の組成物を製造することができる。

[0063] 本発明の脂質膜構造体の調製において配合し得る脂質は、使用するマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の種類などに応じて適宜選択すればよいが、例えば、薬物として抗腫瘍剤を用いる場合には、抗腫瘍剤1質量部に対して、総脂質として0.1～1000質量部が好ましく、0.5～200質量部がより好ましい。また、遺伝子を用いる場合には、遺伝子1μgに対して、総脂質として1から500 nmolが好ましく、10から200 nmolがより好ましい。

[0064] マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持した脂質膜構造体を含む本発明の医薬組成物は、マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患の予防及び／又は治療に有用である。本発明の医薬組成物により予防及び／又は治療可能な疾患は限定されるべきものではなく、また疾患が悪性腫瘍の場合、悪性腫瘍としての種類は特に限定されないが、特にマトリックスメタロプロテアーゼの発現が多い悪性腫瘍が好適である。悪性腫瘍細胞としては、例えば、線維肉腫、扁平上皮癌、神経芽細胞腫、乳癌、胃癌、肝細胞癌、膀胱癌、甲状腺腫瘍、尿路上皮癌、グリア芽細胞腫、急性骨髄性白血病、膵管癌及び前立腺癌等の細胞を挙げることができるが、これらの細胞に限定されることはない。また、本発明の医薬組成物をヒト等の動物や実験用細胞に投与すると、腫瘍内部における血管新生先端部位にマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物としての抗腫瘍剤及び／又は遺伝子を効率的に送達することができる。腫瘍内部における血管新生先端部位としては、ruffling edgeの内皮細胞（endothelial cells）などを挙げることができるが、これに限定されることはない。

[0065] いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の医薬組成物をヒトを含む哺乳類動物に投与すると、血中においてはポリアルキレングリコールなどの修飾部位の存在により優れた血中滞留性が得られ、一方、マトリックスメタロプロテアーゼを分泌する悪性腫瘍細胞や新生血管の近傍などで、該修飾部位が脱離することにより、本発明の医薬組成物に含まれるマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子が放出され、あるいは該医薬組成物が標的細胞により取り込まれ易くなることにより、該細胞に対して薬物及び／又は遺伝子の効果を発揮させることができる。また、一部の修飾部位は脱離せずに脂質膜

構造体表面に残留して適度な血中滞留性を与える。

[0066] 本発明の脂質膜構造体を含む医薬組成物の投与方法は特に限定されず、経口投与又は非経口投与のいずれも選択可能である。経口投与の剤形としては、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、カプセル剤、内服液剤等を挙げることができ、非経口投与の剤形としては、例えば、注射剤、点滴剤、点眼剤、軟膏剤、坐剤、懸濁剤、パップ剤、ローション剤、エアゾール剤、プラスター剤等を挙げることができる。これらのうち注射剤又は点滴剤が好ましく、投与方法としては、静脈注射、動脈注射、皮下注射、皮内注射などのほか、標的とする細胞や臓器に対しての局所注射を挙げることができる。本発明の医薬組成物の投与量及び投与期間などは特に限定されず、有効成分として作用するマトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子の種類や保持量、脂質膜構造体の種類、対象疾患の種類や患者の体重、年齢など、種々の条件に応じて適切な投与量及び投与期間を適宜選択可能である。

なお、上記リン脂質誘導体(1)を用いた脂質膜構造体は特願2006－049567号明細書に開示されている。上記明細書の全ての開示を参照により本明細書の開示として含める。

実施例

[0067] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1

NHSは和光純薬より購入した。DCCは関東化学より購入した。GPCはTosoh8120（東ソー株式会社）、検出器Tosoh HLC-8120(RI)、カラムTSK-Gel SuperHZ3000,2500を使用し、キャリアをTHF、流速を0.35 mL/min、温度を40℃に設定した。^{1}H-NMR はJEOL EX-400（400MHz）使用し測定した。TOF-MSはBruker MALDI-TOF-MS Reflex IIを使用し測定した。透析膜Spectra/Por Membren MWCO:1,000はSpectrumより購入した。ペプチドはグライナージャパンより購入した。配列はGly-Gly-Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Gly-Gly-Gly-Glyであり分子量は1178.9であった。

[0068] (1) ポリエチレングリコール(PEG)の合成

アルゴン下、ナスフラスコにテトラヒドロフラン(THF、20mL)を添加し、スターラーで撹拌しながら、重合開始剤として2-メトキシエタノールを80μL添加した。続いてカリウムナフタレニド(0.342 mol/L)を2.9 mL添加した。次にエチレンオキサイド(EO)を2.3 mL(45 mmol)を添加した。常圧下、常温で撹拌しながら48時間反応した。48時間後、反応溶液の一部(約2 mL)を取りゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により分子量を測定した。数平均分子量(Mn)は1,678であり、重量平均分子量(Mw)は1,825であった。また、Mw/Mnで求められる多分散度は1.078と小さく、GPCで単分散のピークが得られたことから、PEGの重合が十分に進んでいると判断した。

[0069] (2) PEG末端のカルボキシル化

上記(1)で得た反応液のうち半量の12.5 mLをアルゴン下でナスフラスコに添加し、無水コハク酸(0.727 mol/L)を3.5 mL添加し、常温で24時間、スターラーで撹拌しながらPEG重合の停止反応を行なった。24時間後、反応液をジエチルエーテル(1 L)で沈殿させた。沈殿物を濾取してビーカーに取り、メタノールで溶解した。再びジエチルエーテル(1 L)で沈殿させ、沈殿物を濾取してメタノールに溶解し、蒸留水で透析した。透析後、ナスフラスコに移して凍結乾燥を行ない、淡黄色の粉末(0.904 g)を得た。GPCにより分子量を測定したところ、Mnは1,773、Mwは1,903であった。多分散度は1.073であり、単分散のピークが得られたことから、副反応なく反応が進行していることが確認できた。また、^{1}H-NMRスペクトルを測定したところ、3.4 ppm付近のメトキシ基(OMe)由来のピークと2.6 ppm付近の -CO-CH_2CH_2-CO-由来のピークの積分比はほぼ1:1であり、末端にカルボン酸を導入したことが確認された。

^{1}H-NMR($CDCl_3$):δ(ppm) 2.62 (s, $COCH_2CH_2CO$, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.65 (s, 176 H), 4.26 (t, 2H).

[0070] (3) PEG末端のカルボキシル基の活性エステル化(MeO-PEG-NHSの合成)

上記(2)で得た化合物 0.2 gを50 mL用スクリュー管に添加した。NHS 57.6 mg、DCC 41.26 mg、及びクロロホルム 10 mLをスクリュー管に添加し、スターラーで撹拌しながら常温で24時間反応した。反応終了後、固体を除くためにろ過を行ない、ろ液を300 mLのジエチルエーテルで沈殿させた。沈殿物を濾取して乾燥し、得られた固体をビーカーに取り、クロロホルムに溶解した。ジエチルエーテルでの沈殿及び濾取を2度

繰り返し、得られた固体をクロロホルムに溶解して100 mLナスフラスコに入れ、溶媒を留去した後にベンゼンを添加して凍結乾燥し、淡褐色粉末(104 mg)を得た。TOF-MSによるMnは2192.12であり多分散度は1.02であった。

[0071] TOF-MSスペクトルから各ピークの間隔は44でありこれはPEGのそれぞれのユニットの分子量であることが確認できた。TOF-MSスペクトルでの各ピークの測定値と理論値を比較することにより、末端に目的の官能基が導入できたかを確認することができる。表1に各n数に対する分子量の理論値と測定値を示した。各nに対する測定誤差は2mass以内であり、目的とする化合物が得られたことを示している。また、^{1}H-NMRスペクトルを測定したところ、NHS基の導入率(3.37 ppmのメトキシ基に由来するピークと2.84 ppmの NHS基に由来するピークの積分比)は97.3%であり、ほぼ100%の割合でNHS基が導入されたことが確認できた。

^{1}H-NMR($CDCl_3$) : δ (ppm) 2.78 (t, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.95 (t, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.64 (s, 176H), 4.26 (t, 2H)

[0072] [表1]

n数	理論値	測定値	誤差
36	1926.16	1927.35	1.19
37	1970.21	1971.73	1.52
38	2014.27	2015.71	1.44
39	2058.32	2060.20	1.88
40	2102.37	2103.94	1.57
41	2146.42	2148.02	1.60

[0073] (4) PEG-ペプチドの合成

ペプチド 24.6 mgにジメチルスルホキシド(DMSO) 1 mL、上記(3)で得た化合物 41.17 mg、及びトリエチルアミン 5μLを添加し、常温で3時間振とうして反応させた。HPLCにより反応終了を確認し、凍結乾燥して白色粉末(66.76 mg)を得た。TOF-MSを測定したところMnは3223.82であり、理論値のである3255.93とは32mass違っていたが、分子量の分布をもっていることからPEG 由来の化合物であり、PEG-ペプチドであると推定された。また、多分散度は1.01で、単分散のピークであることから反応は定量的に進行していることを確認した。^{1}H-NMRスペクトルを測定したところ、6.6-7.4 ppmにペプチド中のチロシンのベンゼン環由来のピークを確認した。3.38 ppm付近のメトキ

シ基に由来するピークとチロシンのベンゼン環由来のピークの積分比がモル比で1:1であることから、PEG末端へペプチドが100%導入されていることが確認できた。

[0074] (5) PEG-ペプチド-DOPEの合成

例(4)で得たPEG-ペプチド 54.7 mgをクロロホルム 4 mLに溶解し、DOPE 24.7 mg、DCC 6.85 mg 、NHS 3.82 mg、及びトリエチルアミン 4.63 μlを添加し、常温で48時間振とう反応させた。反応終了後、デシケーターによりクロロホルムを除き、再びクロロホルム 1.5 mLに溶解した。スターラーで撹拌しながらジエチルエーテル 100 mLに上記のクロロホルム溶液をゆっくり滴下し、PEG由来化合物を析出させた。常温で個体が沈殿するまで静置し、上清を除いた。ジエチルエーテル 50 mLを添加しスターラーで撹拌後、沈殿するまで静置して上清を取り除いた。沈殿物を水で溶解し、HPLCにて分離精製し、分取した画分を透析して凍結乾燥した。TOF-MSより求められたMnは3955.15、多分散度は1.00であった。ピークが分子量分布をもっていることからPEG由来のものであり、理論値3949.86との誤差は5.3massと近いことからPEG-ペプチド-DOPEであることが示された。^{1}H-NMRスペクトルを測定したところ、3.35ppmのPEG末端メトキシ基由来のピークと、6.6-7.1ppmのペプチドのチロシンのベンゼン環由来のピークとの積分比は3:4.3とモル比がほぼ1:1であり、PEG-ペプチドと比較して大きな変化はなかった。

[0075] 例2

(1)方法

(a)MENDの調製

PEG修飾脂質(PEG-DSPE)及びPEG-ペプチド-DOPE(PPD)を用いてPEGのみで修飾されたMEND(PEG-MEND)、PEG-ペプチドのみで修飾されたMEND(PPD-MEND)、並びにPEG及びPEG-ペプチドで修飾されたMEND(PEG/PPD-MEND)をそれぞれ調製した。コンパクション体をルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNAとプロタミンのN/Pを1としてHEPES buffered glucose (10mM HEPES, pH7.4, 5% glucose;HBG)中で調製した。脂質膜の脂質組成は1 mMのエタノール溶液DOTAP、DOPE、Cholesterolをそれぞれ3:4:3の割合でガラス試験管に添加しこれを100%とした。PEG及びPEG-ペプチドの修飾を1:1の割合で行うために1 mMのエタノール溶液としてPEG-DS

PE及びPPDを全修飾濃度が5、15、又は20 mol%となるように半量ずつ添加した。その後、クロロホルムをエタノール溶液と等量添加し、ボルテックスで攪拌混合した後、デシケーターで溶媒を留去して脂質膜を調製した。[^{3}H]標識する場合は脂質膜溶液中に[^{3}H]- Cholesteryl hexadecyl ether (CHE)を添加した。MENDはコンパクション体を脂質膜に添加し、ソニケーション処理することにより調製した。調製したMENDの粒子径はdynamic light scattering (DLS)によって測定した。

[0076] (b)インビトロ実験

HT1080(ヒト繊維芽肉腫由来)を播種し、24時間後に24 well-plate(4×10^4 cells/500 ul DMEM/well)の各wellからDMEMを回収し、細胞などを除くため1000rpm、4℃で5分間遠心し、上清をConditioned mediumとして実験に用いた。0.4 μg DNA MEND/250 μL in conditioned medium/wellでMENDをHEK293(ヒト腎臓内皮様由来)(4×10^4 cells/well)に添加して3時間インキュベーション後、Fresh DMEM とconditioned mediumを1:1で750 μL/well追加して45時間インキュベーションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

MMP-2を14 nMの濃度で含むDMEMでMENDを0.4 μg DNA /250 μLに調整し、HEK293細胞(4×10^4 cells/well)に対して0.4 μg/wellでMENDを添加し、3時間後にfresh DMEMを250 μl/wellの割合で添加して45時間インキュベーションした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

また、他の細胞系MG-63(ヒト骨肉種由来)、HOS(ヒト骨肉種由来)、PC-3(ヒト前立腺がん由来)におけるトランスフェクション実験は、トランスフェクション実験前日に各細胞を24wellプレートに4×10^4cells/wellで培地 0.5 mL中に播種した。0.4μg DNA相当に調製したサンプルを無血清培地の場合にはFBS・抗生物質非含有D'MEM(以下、「D'MEM(-)」と略記する。)で250μLとなるように希釈し、血清含有培地の場合はD'MEMで同様に希釈した。各wellをPBSで洗い、250μL/wellの割合でサンプルを添加し、5%CO_2下に37℃で3時間インキュベートした後、D'MEMを0.75 mL/well添加し、5%CO_2下に37℃で45時間インキュベートした。45時間後、各wellの培地を除去してPBSで洗浄した後、Reporter Lysis Buffer(75μL/well)を添加して-80℃で凍結した。30分後、凍結したプレートを室温で融解させ、氷上にてCELL SCRAPERを用いて細胞

を剥がしとり、Lysis溶液を回収した後、遠心(4℃、15,000rpm、5分)して上清を回収した。上清20μLあたりのルシフェラーゼ活性(RLU)を測定し、上清をDDWで5倍希釈してBCA法によりタンパク定量を行い、RLU/mg proteinを算出した。

メディウム中のMMP-2発現量の測定から、MG-63(68.7 ± 2.85 ng/ml)、HOS(28.7 ± 4.52 ng/ml)をMMP-2高発現細胞、PC-3(7.09 ± 3.06 ng/ml)をMMP-2低発現細胞とした。メディウム中のMMP-2発現量に関しては、Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Human, Biotrak ELISA System (Amersham Bioscience)を用いて測定した。サンプルの調製はキットのプロトコルに従って行なった。

[0077] (c)動物実験

血中濃度の経時変化の測定はDDYマウス(雄性:5週齢)を用いて行なった。腫瘍移行量の測定及び腫瘍における発現量の測定には、HT1080細胞(1×10^6 cells)をBALB/cヌードマウス(雄性:5週齢)の背部皮下に移植し腫瘍サイズ(長径)が12-18 mmとなった担癌マウスを用いた。

MENDの動態実験では[^{3}H]標識MENDを(7.5 μg pDNA/125 μL in HBG、0.5 mM lipid)を尾静脈より投与し、タイムコースにおける血液や腫瘍組織を回収し、それぞれ^{3}Hカウントを測定し、血中濃度および腫瘍移行量を%ID/mlおよび%ID/g tumorとして算出した。

遺伝子発現実験ではMEND(25 μg pDNA/420 μL in HBG、0.5 mM lipid)を尾静脈より投与し、48時間後に腫瘍組織を採取し重量を測定した。腫瘍組織をLysis buffer(0.1% Triton X-100, 2mM EDTA, 0.1M Tris-HCl, pH7.8)中でホモジュナイズし、4℃、15,000 rpmで10分間遠心し、上清についてルシフェラーゼ活性を測定し、遺伝子発現量をRLU/g tumorとして算出した。

[0078] (2)結果

(a)インビトロ実験

・PPD-MENDのHEK293細胞における遺伝子発現活性へのMMP-2添加の影響

MMP-2低発現細胞であるHEK293において、5% PPD-MENDの発現活性は5% PEG-MENDと比較して4～5倍高い程度であった(図1、白色バー)。一方、Conditioned mediumを用いた際の5% PPD-MENDの発現活性は5% PEG-MENDと比較して14.3倍で

あり(灰色バー)、MMP-2を含むメディウムを用いた際は24.8倍(黒色バー)の発現活性を示し、いずれの場合も、通常の場合と比べて優位に高い値を示していた。これらの条件下において、PEG未修飾群での発現活性には変化が認められなかった。以上の結果より、5% PPD-MENDの発現活性は、MMPを含むメディウム中でPEGの切断を受けて上昇したものと考えられる。

・他の細胞系におけるPPD-MENDの遺伝子発現活性

MG-63、HOS、及びPC-3細胞において、5% PPD-MENDの発現活性は5% PEG-MENDと比較してそれぞれ20.9倍、12.7倍、5.21倍上昇していた。これらの発現活性の上昇はMMP-2発現量に依存しており、PPD-MENDの発現活性上昇はMMPによるPEGの切断の結果であることが示唆された(図2)。

[0079] (b)インビボ実験(1)

・血中濃度推移

PPD-MENDの血中濃度推移はPEG-MENDと比較して劣るものの、MENDと比較して有意に高く、PPDの修飾によって血中滞留性がある程度得られることが示唆された(図3(a))。

・腫瘍移行量

血中濃度依存的な腫瘍への移行が認められた(図3(b))。

・腫瘍遺伝子発現(c,d)

腫瘍における発現量はMENDおよび5% PPD-MENDでは見られなかった。また、同等の腫瘍移行量を示した5% PEG-MENDと15% PPD-MENDを比較すると遺伝子発現活性は15% PPD-MENDにおいて55倍上昇していた。この結果はPPD-MENDの腫瘍到達後にMMPによりPEGが切断され、その結果、発現活性が上昇したものと考えられる。また15% PEG-MENDと15% PPD-MENDは同等の発現活性を示していた(図3(c))。発現量(RLU/g tumor)を移行量(%ID/g tumor)で除したspecific activity of particlesを算出すると、PPD-MENDはPEG-MENDと比較して約3倍高かった。以上の結果は、腫瘍到達後にMMPによるPEGが切断され、PPD-MENDがPEG-MENDと比較して標的細胞への移行や発現活性が促進されていることを示唆している(図3(d))。

[0080] (c)インビボ実験(2)

以上の結果から、PPDを用いたPEG-ペプチドによる修飾は血中滞留性及び腫瘍移行量を上昇させることが明らかになった。PEG-ペプチドによる修飾を利用してさらに高い血中滞留性及び腫瘍移行量を達成すべく、PEG-ペプチドとPEGとを組み合わせた修飾の効果を判定した。PEG-ペプチドとPEGとの組み合わせの比率は1:1として試験を行なった。表2は各濃度におけるPEG/PPD-MENDの粒子径を示す(単位はnm)。

[表2]

	5%	15%	20%
PEG-MEND	156	137	112
PEG/PPD-MEND	174	139	121

[0081] 血中滞留性はPEG-MENDでは15%で一番高い値を示し(図4(a)、白色バー)、腫瘍移行量も同様の傾向を示した(図4(b)、白色バー)。一方、PEG/PPD-MENDでは血中濃度はTotal PEG濃度20%まで上昇しており(図4(a)、黒色バー)、腫瘍移行量も同様の傾向であった(図4(b)、黒色バー)。PEG濃度20%では、PEG-MENDとPEG/PPD-MENDの腫瘍移行量はほぼ同等であった。PEG-MEND及びPPD-MENDの腫瘍における遺伝子発現活性は、腫瘍移行量と同様な上昇・減少傾向を示したが、20% PEG-MENDと20% PEG/PPD-MENDにおける発現量には60倍以上の大きな差が見られた(図4(c))。さらに、発現量を移行量で除した単位移行量あたりの発現活性では90倍以上の上昇が見られた。この結果は、PEG濃度20%においてPEG:PEG-ペプチド修飾の比率が1:1のときに腫瘍への移行性の上昇とペプチド切断によるMEND活性化上昇の組み合わせ効果が相乗的に発揮されたものと考えられる。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明の脂質膜構造体は、血中においてはポリアルキレングリコールなどの修飾部位の存在により優れた血中滞留性を示し、一方、マトリックスメタロプロテアーゼを分泌する悪性腫瘍細胞や新生血管の近傍などで、該修飾部位が脱離することにより薬物などを放出することができ、あるいは標的細胞により取り込まれ易くなることにより、該細胞に対して薬物などによる効果を発揮させることができる。

請求の範囲

[1] 少なくとも下記の2種類のリン脂質誘導体:

(1)アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含むリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質であり、及び

(c)該ペプチドがマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを含むペプチドである(ただし、該基質ペプチドの両端又は片端には1個のアミノ酸又は2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドが結合していてもよい)

リン脂質誘導体、及び

(2)アルコール化合物の残基とリン脂質類の残基とを含み、該アルコール化合物の残基とリン脂質の残基との間にペプチドを含有しないリン脂質誘導体であって、

(a)該アルコール化合物が、ポリアルキレングリコール類、グリセリン類、及びポリグリセリン類からなる群から選ばれるアルコール化合物であり、

(b)該リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、及びホスファチジン酸類からなる群から選ばれるリン脂質である

リン脂質誘導体

を構成脂質として含む脂質膜構造体。

[2] マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持した請求項1に記載の脂質膜構造体。

[3] リポソームである請求項1又は2に記載の脂質膜構造体。

[4] リン脂質誘導体(1)及び(2)において、該アルコール化合物がポリアルキレングリコール類であり、該リン脂質がホスファチジルエタノールアミン類であり、リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドがVal-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Glyを含むペプチドである請求項1ないし3のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。

[5] リン脂質誘導体(1)及び(2)において、該アルコール化合物がポリエチレングリコールであり、該リン脂質がジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはジステアロイルホスファチジルエタノールアミンであり、リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドがGly-Gly-Glyをリンカーとして含む請求項1ないし3のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。

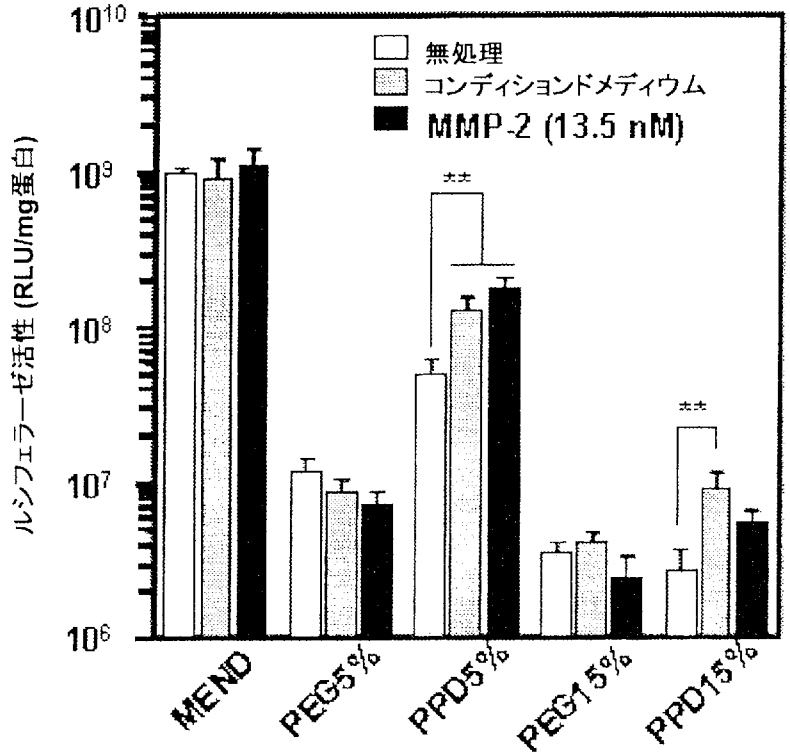
[6] リン脂質誘導体(1)において、該ペプチドが
Gly-Gly-Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly
である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。

[7] リン脂質誘導体(1)とリン脂質誘導体(2)との比がモル比として、10:1～1:10である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。

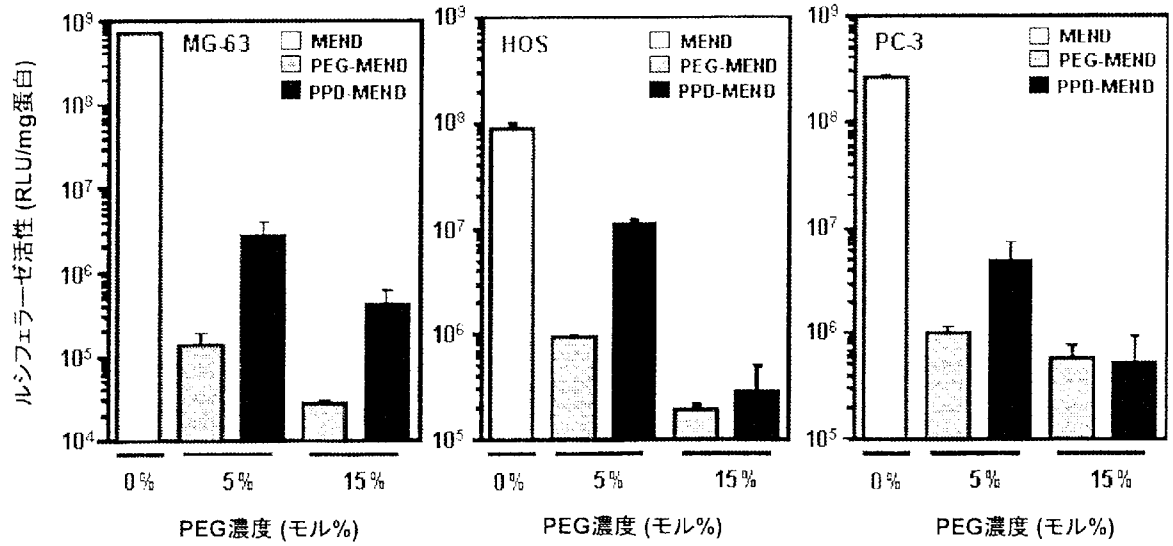
[8] リン脂質誘導体(1)及びリン脂質誘導体(2)の脂質膜構造体の全脂質量に対する割合が5～40モル%である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。

[9] マトリックスメタロプロテアーゼの関わる疾患に有効な薬物及び／又は遺伝子治療のための遺伝子を保持した請求項2ないし8のいずれか1項に記載の脂質膜構造体を含む医薬組成物。

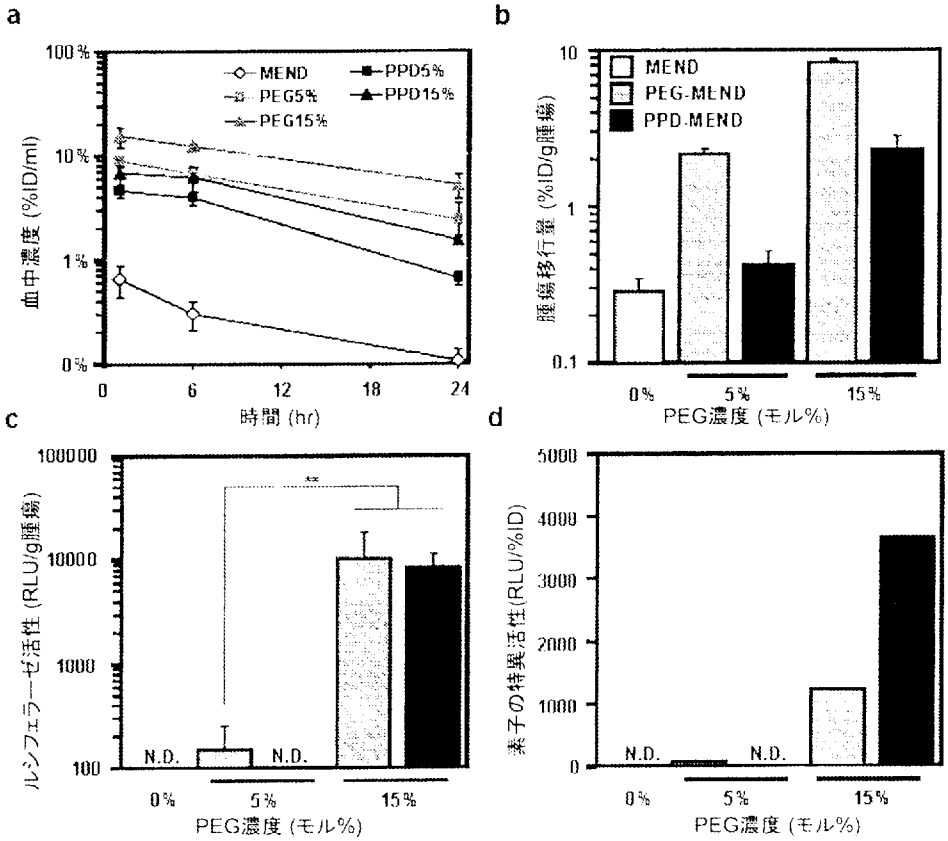
[図1]


無処理
コンディショニングメディウム
MMP-2 (13.5 nM)
ルシフェラーゼ活性 (RLU/mg蛋白)
**
**
MEND
PEG5%
PPD5%
PEG15%
PPD15%

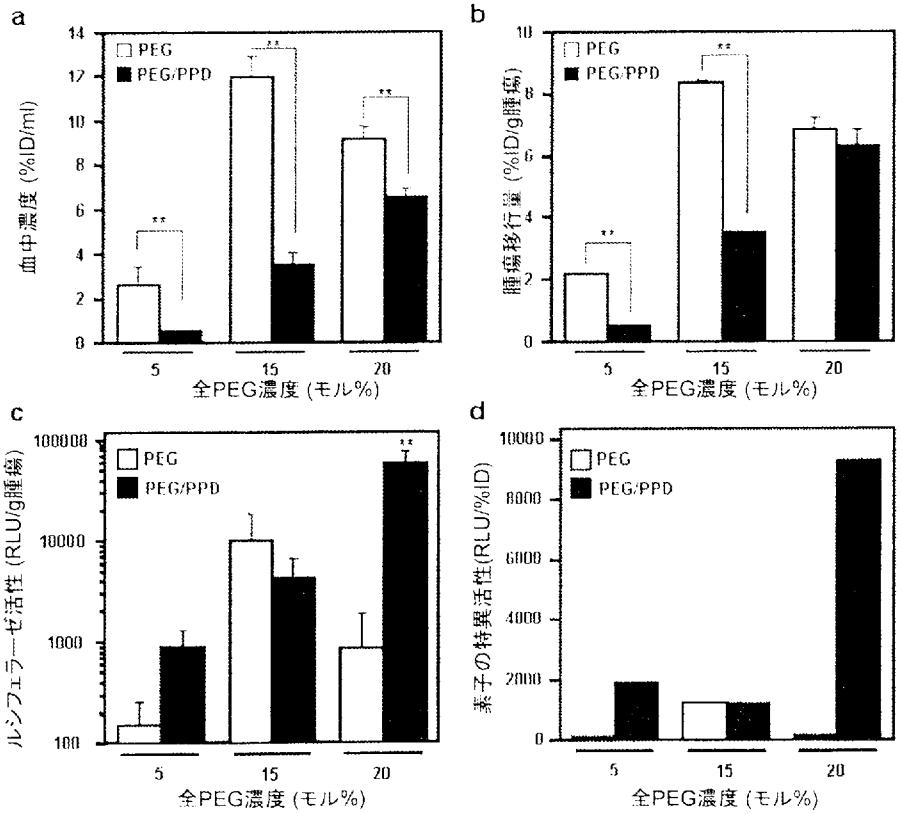
[図2]


MG-63
HOS
PC-3
MEND
PEG-MEND
PPD-MEND
ルシフェラーゼ活性 (RLU/mg蛋白)
0%
5%
15%
PEG濃度 (モル%)

[図3]


a
b
c
d
MEND
PPD5%
PEG5%
PPD15%
PEG15%
血中濃度 (%ID/ml)
時間 (hr)
MEND
PEG-MEND
PPD-MEND
腫瘍移行量 (%ID/g腫瘍)
PEG濃度 (モル%)
ルシフェラーゼ活性 (RLU/g腫瘍)
N.D.
N.D.
PEG濃度 (モル%)
遺子の特異活性(RLU/%ID)
N.D.
N.D.
PEG濃度 (モル%)

[図4]


a
b
c
d
PEG
PEG/PPD
血中濃度 (%ID/ml)
全PEG濃度 (モル%)
腫瘍移行量 (%ID/g腫瘍)
全PEG濃度 (モル%)
ルシフェラーゼ活性 (RLU/g腫瘍)
全PEG濃度 (モル%)
遺子の特異活性(RLU/%ID)
全PEG濃度 (モル%)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/062078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K47/42(2006.01)i, *A61K9/127*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K47/10*(2006.01)i, *A61K47/24*(2006.01)i, *A61K47/34*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P1/02*(2006.01)i, *A61P1/16*(2006.01)i, *A61P9/04*(2006.01)i,

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K47/42, A61K9/127, A61K45/00, A61K47/10, A61K47/24, A61K47/34, A61K48/00, A61P1/02, A61P1/16, A61P9/04, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, A61P17/02, A61P19/02, A61P25/28, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/063216 A1 (ASTELLAS PHARMA INC, JP), 29 July, 2004 (29.07.04), Full text; particularly, Claims 1 to 8, 13, 14, 16; page 26, lines 2 to 37; page 5, lines 13 to 40; page 4, lines 10 to 15; page 18, lines 4 to 38 & US 2005/054026 A1 & EP 1591450 A1 & US 7169892 B2	1-9
X	TERADA, T. et al, Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting, Journal of Controlled Release, 2006, Vol.111, No.3, p.333-342, full text, particularly, Introduction, Materials and methods	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 July, 2007 (11.07.07)	24 July, 2007 (24.07.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/062078

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/090813 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT CORP, JP), 31 August, 2006 (31.08.06), Full text; particularly, Claims 1 to 11; Par. No. [0033]; examples 3, 4 (Family: none)	1-9
P,X	JP 2007-099750 A (UNIV HOKKAIDO NAT CORP, JP), 19 April, 2007 (19.04.07), Full text; particularly, Claims 1 to 11; Par. No. [0033]; examples 3, 4 (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/062078

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P9/10(2006.01)i, *A61P11/00*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P17/02*(2006.01)i, *A61P19/02*(2006.01)i, *A61P25/28*(2006.01)i, *A61P27/02*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P43/00

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６２０７８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K47/42, A61K9/127, A61K45/00, A61K47/10, A61K47/24, A61K47/34, A61K48/00, A61P1/02, A61P1/16, A61P9/04, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, A61P17/02, A61P19/02, A61P25/28, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 2004/063216 A1 (ASTELLAS PHARMA INC,JP) 2004.07.29, 全文、特に、請求項1-8,13,14,16、第26頁2-37行、第5頁13-40行、第4頁10-15行、第18頁4-38行 & US 2005/054026 A1 & EP 1591450 A1 & US 7169892 B2	1-9

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １１．０７．２００７	国際調査報告の発送日 ２４．０７．２００７
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３８４２ 榎本　佳予子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	TERADA,T. et al, Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting, Journal of Controlled Release, 2006, Vol.111, No.3, p.333-342 全文、特に、Introduction、Materials and methods	1-9
Ｐ，Ｘ	WO 2006/090813 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT CORP,JP) 2006.08.31, 全文、特に、請求項1-11、段落【0033】、例3,4 (ファミリーなし)	1-9
Ｐ，Ｘ	JP 2007-099750 A (UNIV HOKKAIDO NAT CORP,JP) 2007.04.19, 全文、特に、請求項1-11、段落【0033】、例3,4 (ファミリーなし)	1-9

発明の属する分野の分類
A61K47/42(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/10(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i