



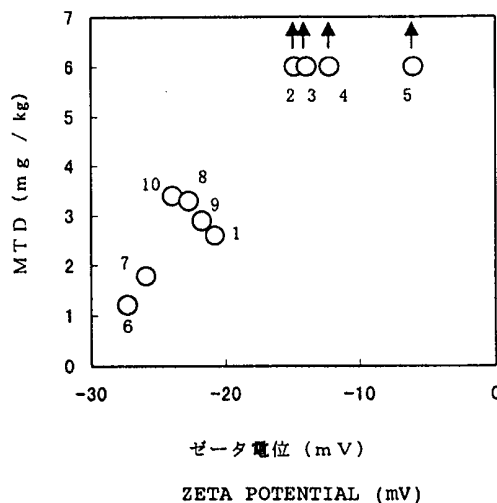
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 9/127, 47/24, 47/34</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/25747</p> <p>(43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05976</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/308647 1998年10月29日(29.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三共株式会社(SANKYO COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 粕谷裕司(KASUYA, Yuji)[JP/JP] 岡田純一(OKADA, Junichi)[JP/JP] 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.) 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: LIPOSOME WITH LOWERED TOXICITY

(54) 発明の名称 毒性の低減されたリポソーム



(57) Abstract

Object: a liposome having a lowered toxicity while sustaining the capability of being retained in the blood. Means for solution: a liposome having a lowered toxicity while sustaining the capability of being retained in the blood, wherein a positively charged compound is employed as a constituent of a liposome modified with a negatively charged nonionic water-soluble polymer to thereby lessen the negatively charged state.

(57)要約

[課題]

血中滞留性を維持したまま毒性を軽減せたりポソーム。

[解決手段]

正荷電化合物を、負に帯電した非イオン性水溶性高分子で修飾せたりポソームの構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくすることにより、血中滞留性を維持したまま毒性が軽減せたりポソーム。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

毒性の低減されたりポソーム

[技術分野]

生理的 pH の水性媒体中において、負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに対し、さらに正荷電化合物を構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくするかまたは無帯電にすることにより毒性が軽減された、非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに関する。

[背景技術]

生体内での薬物濃度の維持や薬物の血中滞留性を確保するため、あるいは疾患部位への薬物のターゲティングを目的として、しばしばりポソーム等の微粒子の薬物運搬体が利用されている。

りポソームの血中滞留性は、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol。以下、PEGとする。) 等の非イオン性水溶性高分子での修飾により微粒子表面に水和構造を付与することによって高めることができる (K.Maruyamaら、Biochim. Biophys. Acta、44-49 (1992) 参照)。従って、非イオン性水溶性高分子によって修飾されたりポソームを薬物運搬体とすることによって薬物の血中滞留性を向上させることが行われている。

このように、非イオン性水溶性高分子によって修飾された血中滞留性の高いりポソームは生医学分野において有用性が広く認められている (A.Rolland編、「Pharmaceutical particulate carriers: therapeutic applications」、Marcel Dekker Inc. (1993) / D.LasicとF.Martin (編)、「Stealth liposomes」、CRC Press (1995) 参照。)

しかしながら、修飾に利用される非イオン性水溶性高分子は溶血等の毒性がある (特開平7-173079公報参照。) にもかかわらず、該高分子を構成成分とするりポソームの毒性に関しては知られていない (D.D.Lasic、「Liposomes: from physics to applications」、Elsevier Science Publishers, pp.305-307 (1993)

参照。)

更に、非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質、正荷電脂質、中性脂質から構成されるリポソームはすでに開示されている（特表平10-506395号公報参照）。しかしそのリポソームの帯電状態及び毒性については明らかにされていない。

[発明の開示]

(発明が解決しようとする課題)

本発明者らは、非イオン性水溶性高分子によって修飾されたりポソーム自体に毒性が存在することを見出した。そこで、その毒性の軽減を図ることで該リポソームの有用性が增大すると考え、リポソームの毒性の低減について鋭意検討した。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、生理的 pH の水性媒体中において、負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに対し、さらに正荷電化合物を構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくするかまたは無帯電とすることにより、毒性が軽減されることを見出し、上記課題を解決した。

すなわち、本発明は生理的 pH の水性媒体中において負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに対し、さらに正電荷化合物を構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくするかまたは無帯電としたリポソームに関する。

本発明において正荷電化合物とは、生理的 pH、すなわち約 pH 6.5 乃至 7.5 の水性媒体中において負荷電より多くの正荷電を有する化合物である。

本発明において使用される正荷電化合物としては正荷電脂質、カチオン性界面活性剤またはカチオン性水溶性高分子を挙げることができる。また、これらは1種または2種以上を用いることができる。

ここに正荷電脂質としては、例えば

- ① ステアリルアミンのようなアルキルアミン類；
 - ② $3-\beta-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]$ コレステロールのようなコレステロールのアミン誘導体；
 - ③ $N-\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチルジドデシル-D-グルタメートクロライドのような $N-\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチルジ（炭素数10乃至20のアルキルまたはアルケニル）-D-グルタメートクロライド類；
 - ④ $N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N$ -トリメチルアンモニウムクロライドのような $N-[1-(2, 3-ジ(炭素数10乃至20のアルキルまたはアルケニル)オキシ)プロピル]-N, N, N$ -トリメチルアンモニウムクロライド類；
- のような正荷電脂質が挙げられる。

ここに、上記アルキル基としては例えば、ペンチル、ヘキシル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、ヘキサコシル、オクタコシル、トリアコンタシル基等が挙げられる。

これらのアルキル基は、好適には炭素数5乃至30のアルキル基であり、より好適には炭素数10乃至20のアルキル基である。

上記「炭素数10乃至20のアルキルまたはアルケニル」基としては、例えば、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、デセニル、デシニル、ウンデシニル、ドデシニルまたはトリデシニル基等が挙げられる。

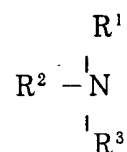
これらの正荷電脂質のうち、好適にはアルキルアミン、 $N-\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチルジ（炭素数10乃至20のアルキルまたはアルケニル）-D-グルタメートクロライドが挙げられ、さらに好適には $N-\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチルジドデシル-D-グルタメートクロライドが挙げられる。

本発明においては、特にカチオン性界面活性剤およびカチオン性水溶性高分子も正荷電化合物として使用できる。

ここにカチオン性界面活性剤としては、当業者周知（M. J. Rosen（著）、坪根および坂本（監訳）「界面活性剤と界面現象」、pp.16-20、フレグランスジャーナル社（1995）参照。）の界面活性剤を挙げることができる。

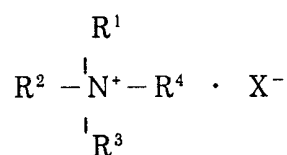
このようなカチオン性界面活性剤としては、例えば

- ① 下記式で示される長鎖アルキルアミンまたはその塩



[式中、 R^1 乃至 R^3 の少なくともひとつがアルキル基を示し、他は有機基を示す。] であり、例えばステアリルアミンまたはジメチルステアリルアミン等；

- ② 下記式で示される長鎖アルキルまたは長鎖アラルキル第4級アンモニウム塩

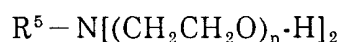


[式中、 R^1 乃至 R^4 の少なくともひとつがアルキル基またはアラルキル基を示し、他は有機基を示す。 X^- は1価の負イオンを示す。] であり、例えばトリメチルステアリルアンモニウムクロライド、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウム等；

- ③ N-長鎖アルキル含窒素芳香族第4級アンモニウム塩

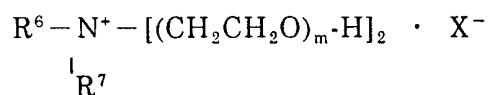
[ここに、N-長鎖アルキルとは、芳香環に含まれる窒素原子にアルキル基が結合してアンモニウムイオンとなっており、1価の負イオンと対を形成している。] であり、例えばN-ステアリルピリジニウムクロライド等；

- ④ 下記式で示されるポリオキシエチレン付加長鎖アルキルアミンまたはその塩



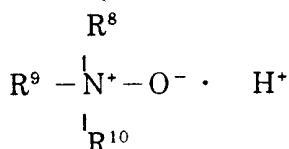
[式中、 R^5 はアルキル基、 n は1乃至20の整数を示す。] であり、例えばN、N-ジポリオキシエチレンステアリルアミン等；

- ⑤ 下記式で表されるポリキシエチレン付加長鎖アルキル第4級アンモニウム塩



[式中、R⁶およびR⁷のうち、少なくともひとつがアルキル基を示し、他は有機基を示す。X⁻は1価の負イオンを示す。]であり、例えばN、N-ジポリオキシエチレン-N-メチルステアリルアミンクロライド等；

⑥ 下記式で示される長鎖アルキルアミンオキシド



[式中、R⁸乃至R¹⁰のうち少なくともひとつはアルキル基を示し、他は有機基を示す。]であり、例えばN、N-ジメチルステアリルアミンオキシド等；
などが挙げられる。

上記①乃至⑥のアルキル基としては例えば、ペンチル、ヘキシル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、ヘキサコシル、オクタコシル、トリアコンタシル基等が挙げられる。

これらのアルキル基は、好適には炭素数5乃至30のアルキル基であり、より好適には炭素数10乃至20のアルキル基である。

上記アラルキル基としては、例えばベンジル、フェネチル基等が挙げられ、好適にはベンジル基である。

これらのアラルキル基のアルキル部分は、好適には炭素数1乃至10のアルキル基であり、より好適には炭素数1乃至5のアルキル基である。

上記1価の負イオンとしては、例えばハロゲンイオンが挙げられ、好適には塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオンであり、さらに好適には塩素イオンである。

これらのカチオン性界面活性剤のうち好適には、長鎖アルキルアミンまたはその塩、長鎖アルキルまたは長鎖アラルキル第4級アンモニウム塩、ポリオキシエチレン付加長鎖アルキルアミンまたはその塩、ポリオキシエチレン付加長鎖アルキル第4級アンモニウム塩および長鎖アルキルアミンオキシドが挙げられ、さらに好適には長鎖アルキルアミンまたはその塩、長鎖アルキルまたは長鎖アルケニ

ル第4級アンモニウム塩およびポリオキシエチレン付加長鎖アルキルアミンまたはその塩が挙げられ、特に好適には長鎖アルキルアミンまたはその塩が挙げられる。

これらのカチオン性界面活性剤は高濃度においてリポソームを崩壊させるが、少量であればリポソームに包含され構成成分とすることができる (Urbanejaら、Biochem. J. 270、305-308 (1990) 参照。)。従って、リポソームの形成を阻害しない量のカチオン性界面活性剤を配合するか、または形成されたりリポソームを崩壊させない量のカチオン性界面活性剤を配合するか、あらかじめ製造されたりリポソームの分散液中にカチオン性界面活性剤を添加しリポソーム表面に吸着させることによって、該リポソームの構成成分のひとつとし、高分子修飾リポソームの負の帯電状態を小さくすることができるのである。

さらに、本発明において使用されるカチオン性水溶性高分子としては、当業者周知 (G.Allenら (編)、「Comprehensive polymer science」vol.6、Pergamon Press (1989) 参照。) の、カチオン性水溶性高分子を挙げることができる。

このようなカチオン性水溶性高分子としては、例えば

① ポリビニルアミン、ポリアリルアミン等のポリアミン類、ポリ-N、N-ジメチルアミノエチルアクリレート、ポリ-N、N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリ-N、N-ジエチルアミノエチルアクリレート、ポリ-N、N-ジメチルアミノエチルメタクリレート等のポリアクリレート類、等のカチオン性モノマー単位と、

ビニルアルコール、メチルビニルエーテル、ビニルピロリドン、ビニルオキサゾリドン、ビニルメチルオキサゾリドン、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、N-ビニルサクシンイミド、N-ビニルホルムアミド、N-ビニル-N-メチルホルムアミド、N-ビニルアセトアミド、N-ビニル-N-メチルアセトアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-iso-プロピルアクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド、メチロールアクリルアミド、アクリロイルモルホリン、アクリロイルピロリジン、ア

クリロイルピペリジン、スチレン、クロロメチルスチレン、ブromoメチルスチレン、酢酸ビニル、メチルメタクリレート、ブチルアクリレート、メチルシアノアクリレート、エチルシアノアクリレート、*n*-プロピルシアノアクリレート、*iso*-プロピルシアノアクリレート、*n*-ブチルシアノアクリレート、*iso*-ブチルシアノアクリレート、*tert*-ブチルシアノアクリレート、グリシジルメタクリレート、エチルビニルエーテル、*n*-プロピルビニルエーテル、*iso*-プロピルビニルエーテル、*n*-ブチルビニルエーテル、*iso*-ブチルビニルエーテル、*tert*-ブチルビニルエーテル等の2重結合をもつ非イオン性化合物、から選択される少なくとも一つの非イオン性モノマー単位とから構成されるカチオン性水溶性ビニル系合成高分子；

② ポリリジン、ポリアルギニン等のカチオン性水溶性ポリアミノ酸；

③ リジン、アルギニン等のカチオン性アミノ酸のモノマー単位から選択される異なるモノマー単位から構成されるカチオン性水溶性合成ポリペプチド；

④ リジン、アルギニン等のカチオン性アミノ酸のモノマー単位とグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン等の非イオン性アミノ酸のモノマー単位から選択される少なくとも一つのモノマー単位から構成されるカチオン性水溶性合成ポリペプチド；

⑤ キトサン等の多糖類、アグルチニン、アコニターゼ、亜硝酸レダクターゼ、アスパラギナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、アルブミン、インスリン、エラスターゼ、エラスチン α 、カルシトニン、グルカゴン、コンカナバリンA、シトクロム c 、DNAポリメラーゼ、トランスフェリン、トロポニン、ヘモグロビン、ラクトフェリン、リゾチーム、免疫グロブリンG等のタンパク、などのカチオン性水溶性天然高分子；

⑥ ジエチルアミノエチルデキストラン等のカチオン性水溶性改変天然高分子；

⑦ ①乃至⑥のカチオン性水溶性高分子から選択される高分子と、該高分子とは異なる上述のカチオン性水溶性高分子から選択される高分子とを構成単位とするカチオン性水溶性高分子；

⑧ ①乃至⑦のカチオン性水溶性高分子から選択される高分子と、後述する非イ

オン性水溶性高分子とを構成単位とするブロック共重合体またはグラフト共重合体；

⑨ ①乃至⑦のカチオン性水溶性高分子から選択される高分子と、例えばエチレン、プロピレンまたはジメチルシロキサンなどの非水溶性高分子の構成単位であるモノマー単位とから構成されるブロック共重合体またはグラフト共重合体（ここに、該共重合体が水溶性または非水溶性のいずれになるかは該高分子中の各々のモノマー単位の比率および／または配列によって変化するが、本発明で使用可能なカチオン性高分子は、水溶性となる比率および／または配列のものである。）；

などが挙げられる。

これらのカチオン性水溶性高分子のうち、好適にはカチオン性水溶性ビニル系合成高分子、カチオン性水溶性ポリアミノ酸、カチオン性水溶性合成ポリペプチド、カチオン性水溶性天然高分子またはカチオン性水溶性改変天然高分子が挙げられ、さらに好適にはカチオン性水溶性ビニル系合成高分子、カチオン性水溶性ポリアミノ酸またはカチオン性水溶性合成ポリペプチドが挙げられ、特に好適にはカチオン性水溶性ビニル系合成高分子が挙げられる。

これらカチオン性水溶性高分子の吸着は、低分子化合物の吸着とは異なり、高分子の固体表面への吸着は安定であり不可逆である（G.Allenら（編）、「Comprehensive polymer science」vol. 2, pp.733-754、Pergamon Press (1989) 参照。）。従って、カチオン性水溶性高分子は負に帯電したリポソームに吸着することによって該リポソームの負の帯電状態を小さくすることができるのである。

本発明の目的のリポソームにおいては、上記の正荷電化合物を生理的 pH の水性媒体中において負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに配合し、生理的 pH の水性媒体中において負の帯電状態を小さくするかまたは無帯電としたりポソームである。

ここに水性媒体とは、

- i) 水、
 - ii) 緩衝液、
 - iii) 水および／または緩衝液を50重量%以上含み、エタノール、ジメチルアセトアミド等の水溶性有機溶媒を他の成分とする媒体、
 - iv) i)乃至iii)のいずれかの媒体に電解質および／または糖類などの水溶性物質を溶解した媒体、
- のいずれかを意味する。

また、正に帯電および正荷電とは、表面のゼータ電位が正であることを意味し、負に帯電および負荷電とは、表面のゼータ電位が負であることを意味し、無帯電とは、表面のゼータ電位が0であることを意味する。

本発明における非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームとは、

A) 脂質

および、

B) 非イオン性水溶性高分子が $-CO(CH_2)_2CO-$ 基または $-CO-$ 基などを介するか、または直接脱水縮合反応等により結合した(以下、「修飾」という。)

脂質

が、膜状に集合したものならびに内部の水相から構成される閉鎖小胞のことである(.Rolland 編、「Pharmaceutical particulate carriers: therapeutic applications」、Marcel Dekker Inc. (1993) / D.LasicとF.Martin (編)、「Stealth liposomes」、CRC Press (1995) 参照。)

上記脂質としては、一般にリポソームの構成成分として使用される中性脂質および負荷電脂質が挙げられる。

ここに中性脂質とは、生理的pHの水性媒体中において等しい正電荷数と負電荷数を有する脂質を意味し、例えば

- ① ジパルミトイル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などのホスファチド酸誘導体；
- ② ジガラクトシルグリセリド、ガラクトシルグリセリドなどの糖脂質；

- ③ スフィンゴミエリンなどのスフィンゴシン誘導体；
- ④ コレステロール、エルゴステロール、ラノステロールなどのステロール類；
が挙げられる。

これらの中性脂質のうち、好適にはホスファチド酸誘導体、糖脂質またはステロール類であり、

さらに好適にはホスファチド酸誘導体、ステロール類であり、

さらにより好適にはホスファチド酸誘導体であり、

特に好適にはジ（炭素数 10 乃至 22 のアルカノイルまたはアルケノイル）ホスファチジルコリンであり、

最適にはジパルミトイルホスファチジルコリンである。

ここに、「炭素数 10 乃至 22 のアルカノイルまたはアルケノイル」基としては、例えばデシリル、ウンデシリル、ドデシル、トリデシリル、テトラデシリル、ペンタデシリル、ヘキサデシリル、ヘプタデシリル、オクタデシリル、ノナデシリル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、デセニル、ドデセニル、テトラデセニル、ヘキサデセニル、オクタデセニル、イコセニルまたはドコセニル基等が挙げられる。

また、ジ（炭素数 10 乃至 22 のアルカノイルまたはアルケノイル）とは、ホスファチジルコリンの 2 つの水酸基に、それぞれ炭素数 10 乃至 22 のアルキル基および／またはアルケニル基を有するカルボン酸がエステル結合していることを意味する。

コレステロール等のステロール類はそれ自体リポソームの構成成分として使用されるが、他の中性脂質に加えて必要に応じて使用することができる。

負荷電脂質とは、生理的 pH の水性媒体中において正荷電より多くの負荷電を有する脂質を意味し、例えば

- ① ジパルミトイルホスファチジルグリセロール等のホスファチジルグリセロール類；
- ② ジパルミトイルホスファチジルセリン等のホスファチジルセリン類；
- ③ ジパルミトイルホスファチジルイノシトール等のホスファチジルイノシトール類；

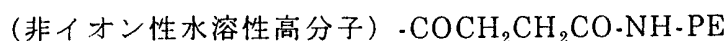
ル類；

等の負荷電脂質が挙げられる。

これらの負荷電脂質のうち、好適にはホスファチジルグリセロール類であり、特に好適にはジパルミトイルホスファチジルグリセロールである。

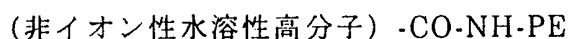
上記非イオン性水溶性高分子で修飾された脂質としては、例えば

① i) 下記式で表されるN-（非イオン性水溶性高分子）サクシニルホスファチジルエタノールアミン



[式中、 $-\text{NH} \cdot \text{PE}$ はホスファチジルエタノールアミンの窒素原子から水素原子1個が脱離した原子団を表す。]であり、例えばN-モノメトキシポリエチレングリコールサクシニルホスファチジルエタノールアミン、

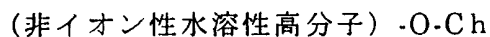
ii) 下記式で表されるN-（非イオン性水溶性高分子）カルボニルホスファチジルエタノールアミン



[式中、 $-\text{NH} \cdot \text{PE}$ はホスファチジルエタノールアミンの窒素原子から水素原子1個が脱離した原子団を表す。]であり、例えばN-モノメトキシポリエチレングリコールカルボニルホスファチジルエタノールアミン、

等の非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質；

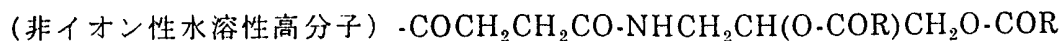
② 下記式で表される（非イオン性水溶性高分子）コレステリルエーテル



[式中、 $\cdot \text{O} \cdot \text{Ch}$ はコレステロールの水酸基と非イオン性水溶性高分子がエーテル結合していることを表す。]であり、例えばポリオキシエチレンコレステリルエーテル (H.Ishiwataら、Chem. Pharm. Bull. 43、1005-1011 (1995) 参照。)

等の非イオン性水溶性高分子で修飾された中性脂質；

③ 下記式で示されるN-（非イオン性水溶性高分子）サクシニル-2, 3-ジアルカノイルオキシプロピルアミン



[式中、Rは炭素数10乃至20のアルキル基を表す。]であり、例えばN-モノ

メトキシポリエチレングリコールサクシニル-2, 3-ジステアロイルオキシプロピルアミン等の非イオン性水溶性高分子で修飾された正荷電脂質；
などが挙げられる。

これらの非イオン性水溶性高分子で修飾された脂質のうち、

好適にはN-（非イオン性水溶性高分子）サクシニルジ（炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル）ホスファチジルエタノールアミンまたはN-（非イオン性水溶性高分子）カルボニルジ（炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル）ホスファチジルエタノールアミンであり、

さらに好適にはN-（非イオン性水溶性高分子）サクシニルジステアロイルホスファチジルエタノールアミンまたはN-（非イオン性水溶性高分子）カルボニル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、

さらにより好適にはN-（非イオン性水溶性高分子）サクシニル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、

特に好適にはN-モノメトキシポリエチレングリコールサクシニルジステアロイルホスファチジルエタノールアミンが挙げられる。

ここに、「炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル」基としては、前述したのと同意義を示す。

またジ（炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル）とは、ホスファチジルエタノールアミンの2つの水酸基に、それぞれ炭素数10乃至22のアルキル基および/またはアルケニル基を有するカルボン酸がエステル結合していることを意味する。

ここに前述した「非イオン性水溶性高分子」とは、水や緩衝液等の水性媒体中において末端を除いて解離基を有しない高分子または該高分子の末端をアルコキシとした高分子である。

このような非イオン性水溶性高分子としては、例えば

- ① ビニルアルコール、メチルビニルエーテル、ビニルピロリドン、ビニルオキサゾリドン、ビニルメチルオキサゾリドン、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジ

ン、N-ビニルサクシンイミド、N-ビニルホルムアミド、N-ビニル-N-メチルホルムアミド、N-ビニルアセトアミド、N-ビニル-N-メチルアセトアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-iso-プロピルアクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド、メチロールアクリルアミド、アクリロイルモルホリン、アクリロイルピロリジン、アクリロイルピペリジン、スチレン、クロロメチルスチレン、ブromoメチルスチレン、酢酸ビニル、メチルメタクリレート、ブチルアクリレート、メチルシアノアクリレート、エチルシアノアクリレート、n-プロピルシアノアクリレート、iso-プロピルシアノアクリレート、n-ブチルシアノアクリレート、iso-ブチルシアノアクリレート、tert-ブチルシアノアクリレート、グリシジルメタクリレート、エチルビニルエーテル、n-プロピルビニルエーテル、iso-プロピルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル、iso-ブチルビニルエーテル、tert-ブチルビニルエーテルなどのモノマー単位を構成成分とする非イオン性のビニル系高分子または該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

② グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンのようなアミノ酸から選択されるいずれかひとつのモノマー単位を構成成分とする非イオン性ポリアミノ酸または該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

③ グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンのようなアミノ酸から選択される2種以上のモノマー単位を構成成分とする非イオン性合成ポリペプチドまたは該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

④ グリコール酸および乳酸から選択されるモノマー単位を構成成分とする非イオン性ポリエステルまたは該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

⑤ メチレングリコール、エチレングリコール、n-プロピレングリコール、iso-プロピレングリコール、ヒドロキシプロピレングリコールのようなグリコール類から選択されるモノマー単位を構成成分とする非イオン性ポリエーテルまたは該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

⑥ デキストラン、ペクチン、プルランのような糖類などの、非イオン性天然高

分子または該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

⑦ メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのようなセルロース類などの非イオン性改変天然高分子または該高分子の末端がアルコキシ化された高分子；

⑧ 上記①乃至⑦の異なる２種以上の高分子を構成単位とするブロック重合体またはグラフト共重合体または該共重合体の末端がアルコキシ化された共重合体；などを挙げることができる。

これらの非イオン性水溶性高分子のうち、好適には非イオン性ポリエーテル、非イオン性ポリエステル、非イオン性ポリアミノ酸もしくは非イオン性合成ポリペプチドまたはこれらの高分子の末端がアルコキシ化された高分子であり、更に好適には非イオン性ポリエーテルもしくは非イオン性ポリエステルまたはこれらの高分子の末端がアルコキシ化された高分子であり、更により好適には非イオン性ポリエーテルまたは非イオン性モノアルコキシポリエーテルであり、特に好適にはポリエチレングリコールまたはモノメトキシポリエチレングリコールであり、最適にはモノメトキシポリエチレングリコールである。

また、これらの非イオン性水溶性高分子の平均分子量は、好適には１０００乃至１２０００であり、より好適には、１０００乃至５０００である。

前記リポソーム内部を構成する水相としては、通常、塩化ナトリウム水溶液、一般に使用される各種緩衝液、グルコース水溶液、トレハロース水溶液等が挙げられる。

なお、卵黄レシチンおよび大豆レシチン等のように、通常種々の炭素数および／または不飽和度を有する脂質が混合した状態で入手できるものは、これらを単一成分に分離精製することなく使用することができる。さらに、必要に応じて抗酸化作用等を目的として、 α -トコフェロール等の添加物を脂質構成成分として使用することができる。

上記脂質の中で、保存時および生体中でのリポソームの形態安定性、物質透過性、対象とする薬物の包含特性およびリポソームの体内動態特性等を考慮し、種々の脂質の種類および混合比が選択される。

本発明における目的のリポソームの直径としては、そのサイズ調節法の種類により異なるが、その製造可能な下限はおよそ20 nm程度である (D.D.Lasic, 「liposomes: from basic to applications」、Elsevier Science Publishers, pp.3-7 (1993) 参照。)。本発明においてはリポソームサイズの下限についてはこれ以外の特別な制約は受けない。一方、上限については、血管内投与が可能な乳濁性注射剤の規格 (第13改正日本薬局方、日本公定書協会、pp.11 (1996) 参照。) に従い、7 μm以下であることが必要であり、血中滞留性および/または腫瘍や炎症等の病体組織への集積性を考慮して、体積平均粒子径として、好適には50乃至400 nmが望ましく、さらに好適には50乃至100 nmが望ましい。

ここで、体積平均粒子径とは、複数の粒子の平均体積から算定される粒子径の平均値を意味し、粒子径測定機を使用して当業者周知の方法 (例えば、R. R. C. New, 「Liposomes: a practical approach」、pp.154-160、IRL Press (1989) 参照。) によって算定することができる。

微粒子表面のゼータ電位すなわち帯電状態は、当業者周知の通り、電荷密度、ならびに媒体から吸着する電解質の種類および量によって変化する (B. JirgensonsおよびM. E. Stramanis, 「A short textbook of colloid chemistry (Second revised ed.)」、Pergamon Press (1962) 参照。)。従って、生理的pHの水性媒体中において非イオン性水溶性高分子で修飾されたリポソームの帯電状態を負にする要因のひとつとして、次式によって定義される電荷密度が負であることを挙げるができる：

$$\text{電荷密度} = [(\text{正電荷モル数} - \text{負電荷モル数}) / (\text{全脂質モル数})] \times 100 (\%)。$$

リポソームに負電荷を供給する構成成分としては、既に述べたようにホスファチジルグリセロール類、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等の負荷電脂質のほか、N-モノメトキシポリエチレングリコールサクシニル

ジ（炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル）ホスファチジルエタノールアミン、N-モノメトキシポリエチレングリコールオキシカルボニルジ（炭素数10乃至22のアルカノイルまたはアルケノイル）ホスファチジルエタノールアミン等の非イオン性の水溶性高分子で修飾された負荷電脂質を挙げることができる。

一方、電荷密度が0に近く電解質の吸着が静電相互作用に強く依存しない場合には、陰イオンが優先的に吸着する現象が一般的に認められている（B. JirgensonsとM. E. Stramanis（著）、玉虫文一（監訳）、「コロイド化学」、培風館（1967）参照。）。

以上のことから、本発明において水溶性高分子で修飾されたりポソームが生理的pHの水性媒体中で「負の帯電状態にある」とは、実質的には次の（a）乃至（c）のいずれかの場合をいう。

（a）非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質が、負に帯電したりポソームの構成成分として使用され、非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームの電荷密度が負となり、該りポソーム表面のゼータ電位が負となる、

（b）非イオン性水溶性高分子で修飾された正荷電または中性の脂質が、りポソームの構成成分として使用され、そこに非イオン性水溶性高分子で修飾された正荷電脂質または他の正荷電をもつ化合物に対して負荷電脂質が過剰に含まれ、その結果非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームの電荷密度が負となり、該りポソーム表面のゼータ電位が負となる、

（c）非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームの電荷密度が0に近く、水性媒体からの陰イオンの優先的な吸着がおこり、該りポソーム表面のゼータ電位が負となる。

本発明においては、これらいずれの場合の負に帯電した非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームをも対象とするものであり、そこに正荷電化合物を添加することにより「負の帯電状態を小さく」するものである。

ここに、本発明の目的のりポソームの負の帯電状態が小さいとは、該りポソーム表面のゼータ電位が、好適には -50 mV 以上 0 mV 以下、さらに好適には $-$

30 mV以上0 mV以下、特に好適には−20 mV以上0 mV以下であることを意味する。

これらの

- (1) 生理的 pH の水性媒体中において負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたリポソームに対し、さらに正荷電化合物を構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくするかまたは無帯電としたリポソームにおいて、好適には、
- (2) 構成成分として正荷電化合物、脂質および非イオン性水溶性高分子で修飾された脂質を含む、(1) 記載のリポソーム、
- (3) 構成成分として正荷電化合物、中性脂質、負荷電脂質および非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質を含む、(1) または (2) に記載のリポソーム、
- (4) 正荷電化合物が正荷電脂質、カチオン性界面活性剤およびカチオン性水溶性高分子から選択される1種または2種以上である(1)乃至(3)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (5) 正荷電化合物が正荷電脂質である(1)乃至(4)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (6) 正荷電脂質がアルキルアミン、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、N-α-トリメチルアンモニオアセチルジ(炭素数10乃至20のアルキルまたはアルケニル)-D-グルタメートクロライドまたはN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N、N、N-トリメチルアンモニウムクロライドから選択される1種または2種以上である(4)または(5)記載のリポソーム、
- (7) 正荷電脂質が、N-α-トリメチルアンモニオアセチルジドデシル-D-グルタメートクロライドである(4)乃至(6)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (8) 正荷電化合物が、カチオン性界面活性剤である(1)乃至(4)から選択されるひとつに記載のリポソーム、

- (9) カチオン性界面活性剤が、長鎖アルキルアミンまたはその塩、長鎖アルキルまたは長鎖アルケニル第4級アンモニウム塩、ポリオキシエチレン付加長鎖アルキルアミンまたはその塩、ポリオキシエチレン付加長鎖アルキル第4級アンモニウム塩および長鎖アルキルアミンオキシドから選択される1種または2種以上である(4)または(8)記載のリポソーム、
- (10) カチオン性界面活性剤が、長鎖アルキルアミンまたはその塩、長鎖アルキルまたは長鎖アルケニル第4級アンモニウム塩およびポリオキシエチレン付加長鎖アルキルアミンまたはその塩から選択される1種または2種以上である(4)、(8)または(9)に記載のリポソーム、
- (11) カチオン性界面活性剤が、長鎖アルキルアミンまたはその塩である(4)及び(8)乃至(10)のいずれかひとつに記載のリポソーム、
- (12) 正荷電化合物がカチオン性水溶性高分子である(1)乃至(4)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (13) カチオン性水溶性高分子が、カチオン性水溶性ビニル系合成高分子、カチオン性水溶性ポリアミノ酸、カチオン性水溶性合成ポリペプチド、カチオン性水溶性天然高分子およびカチオン性水溶性改変天然高分子から選択される1種または2種以上である(4)または(12)記載のリポソーム、
- (14) カチオン性水溶性高分子が、カチオン性水溶性ビニル系合成高分子、カチオン性水溶性ポリアミノ酸およびカチオン性水溶性合成ポリペプチドから選択される1種または2種以上である(4)、(12)または(13)記載のリポソーム、
- (15) カチオン性水溶性高分子が、カチオン性水溶性ビニル系合成高分子である(4)及び(13)乃至(14)から選択されるいずれかひとつに記載のリポソーム、
- (16) 中性脂質が、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、ジガラクトシルグリセリド、ガラクトシルグリセリド、スフィンゴミエリン、コレステロール、エルゴステロールおよびラノステロールから選択される1種または2種以上である(3)記載のリポソーム、
- (17) 中性脂質が、ホスファチジルコリンである(3)または(16)記載の

リポソーム、

- (18) 中性脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリンである (3)、(16) または (17) に記載のリポソーム、
- (19) 中性脂質が、ホスファチジルコリンおよびコレステロールである (3) および (16) 乃至 (18) から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (20) 中性脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびコレステロールである (3) 及び (16) 乃至 (19) から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (21) 非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質がN- (非イオン性水溶性高分子) サクシニルホスファチジエタノールアミンおよび/またはN- (非イオン性水溶性高分子) カルボニルホスファチジエタノールアミンである (3) 記載のリポソーム、
- (22) 非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質がN- (非イオン性水溶性高分子) サクシニルジステアロイルホスファチジエタノールアミンおよび/またはN- (非イオン性水溶性高分子) カルボニルジステアロイルホスファチジエタノールアミンである (3) または (21) 記載のリポソーム、
- (23) 非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質がN- (非イオン性水溶性高分子) サクシニルジステアロイルホスファチジエタノールアミンである (3)、(21) または (22) 記載のリポソーム、
- (24) 非イオン性水溶性高分子が非イオン性のビニル系高分子、非イオン性のポリアミノ酸、非イオン性の合成ポリペプチド、非イオン性のポリエステル、非イオン性のポリエーテル、非イオン性の天然高分子または非イオン性の改変天然高分子あるいはこれらの高分子の末端がアルコキシ化された高分子から選択される1種または2種以上である (1) 乃至 (3) および (22) 乃至 (23) から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (25) 非イオン性水溶性高分子が非イオン性のビニル系高分子、非イオン性のポリアミノ酸、非イオン性の合成ポリペプチド、非イオン性のポリエステルまたは非イオン性のポリエーテルあるいはこれらの高分子の末端が

- アルコキシ化された高分子から選択される1種または2種以上である
- (1)乃至(3)および(22)乃至(24)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (26) 非イオン性水溶性高分子が非イオン性のポリエーテルまたは非イオン性モノアルコキシポリエーテルから選択される1種または2種である(1)乃至(3)および(22)乃至(25)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (27) 非イオン性水溶性高分子がモノメトキシポリエチレングリコールである(1)乃至(3)および(22)乃至(26)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (28) 非イオン性水溶性高分子の平均分子量が1000乃至12000である(1)乃至(3)および(22)乃至(27)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (29) 非イオン性水溶性高分子の平均分子量が1000乃至5000である(1)乃至(3)および(22)乃至(28)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (30) 負荷電脂質がホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルイノシトールから選択される1種または2種以上である(3)に記載のリポソーム、
- (31) 負荷電脂質がジパルミトイルホスファチジルグリセロールである(3)または(30)に記載のリポソーム、
- (32) 体積平均粒子径が20 nm乃至7 μ mである(1)乃至(31)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (33) 体積平均粒子径が50 nm乃至400 nmである(1)乃至(32)から選択されるひとつに記載のリポソーム、
- (34) 体積平均粒子径が50 nm乃至100 nmである(1)乃至(33)から選択されるひとつに記載のリポソームである。

正荷電化合物を非イオン性水溶性高分子で修飾された負に帯電したリポソーム

に配合することにより、生理的 pH の水性媒体中における負の帯電状態を小さくするか無帯電とする、本発明の目的のリポソームは以下のようにして製造される。

本発明で使用される脂質は、市販されている（日本油脂（株）等）かまたは、これらの試薬は当業者に周知の方法によって植物種子、果肉、動物、魚等の生体から抽出、精製することができる（例えば、塩川二郎監修、「カークオスマー化学大辞典」、丸善（株）pp.573-575（1988）参照。）。

本発明で使用されるカチオン性界面活性剤は、市販されている（日本油脂（株）等）か、または当業者に周知の有機合成法（例えば、S.H.Pine、「Organic Chemistry fifth edition」、McGraw-Hill International Editions（1987）参照。）に従い、製造することができる。例えば、長鎖アルキルアミンはハロゲン化長鎖アルキルとアンモニアとの求核置換反応により製造することができる。

本発明で使用されるカチオン性水溶性高分子は、市販されている（シグマ化学会社等）。

また、カチオン性水溶性ビニル系合成高分子については、後述する非イオン性水溶性高分子の製造法と同様に、一般的な高分子合成法（例えば、G.Allenら（編）、「Comprehensive polymer science」vols. 3, 4, Pergamon Press（1989）参照。）に従い、それぞれ付加重合法によって製造することができ、またカチオン性のポリアミノ酸やポリペプチドについても、後述する非イオン性水溶性高分子の製造法と同様に、一般的なペプチド合成法（例えば、M.Bodanszky、「Principles of peptide synthesis」、Springer-Verlag（1984）／M.Bodanszkyら、「The practice of peptide synthesis」、Springer-Verlag（1984）参照。）に従い、それぞれ製造することができる。

本発明で使用される非イオン性水溶性高分子は、市販されている（シグマ化学社等）。

また、非イオン性水溶性ビニル系高分子、非イオン性水溶性ポリエステルおよび非イオン性水溶性ポリエーテルについては、一般的な高分子合成法（例えば、G.Allenら（編）、「Comprehensive polymer science」vols. 3-5, Pergamon Press（1989）参照。）に従い、それぞれ付加重合法および重縮合法によって製造する

ことができる。例えば、ビニル系高分子の一種であるポリビニルアルコールは、過酸化ベンゾイル等の重合開始剤等を使用して酢酸ビニルを付加重合し、アルカリ条件下で脱アセチル化することによって得ることができる。ポリエステル的一种であるポリグリコール酸は、グリコール酸を減圧下に加熱することによって重縮合し得ることができる。ポリエーテルの一種であるポリメチレングリコール、すなわちメチレングリコールをモノマー単位とする高分子は、トリフルオロメタンスルホン酸等の重合開始剤を使用し環状ホルマールを開環重合することによって得ることができる。

また、非イオン性水溶性ポリアミノ酸および非イオン性水溶性合成ポリペプチドは、一般的なペプチド合成法（例えば、M.Bodanszky、「Principles of peptide synthesis」、Springer-Verlag（1984）／M.Bodanszkyら、「The practice of peptide synthesis」、Springer-Verlag（1984）参照。）に従い、それぞれ製造することができる。例えば、ポリアミノ酸であるポリグリシンは、ホスゲンを作用させることによってグリシンをN-カルボキシ無水物化してから、重合開始剤を作用させることによって製造することができる。合成ポリペプチドは、一般的にC末端を保護したアミノ酸またはペプチドとN末端を保護したアミノ酸またはペプチドとを脱水縮合させた後、N末端を脱保護するという工程を繰り返すことによって製造することができる。また、グラフト共重合体およびブロック共重合体は、G.Allenら（編）、「Comprehensive polymer science」vol. 6、Pergamon Press（1989）に記載の方法に従い、高分子反応等を利用して製造することができる。

本発明で使用される非イオン性水溶性高分子で修飾された脂質は、当業者周知の有機合成法（例えば、S.H.Pine、「Organic Chemistry fifth edition」McGraw-Hill International Editions（1987）参照。）に従い製造することができる。例えば、N-モノメトキシポリエチレングリコールサクシニルホスファチジルエタノールアミンは、モノメトキシポリエチレングリコールの片末端の水酸基に無水コハク酸を結合させることによってカルボキシル基を導入し、該カルボキシル基とホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とを脱水縮合させることによって製造することができる。

これらの原料を用いて、当業者周知の方法（D.D.Lasic、「liposomes: from basic

to applications」、Elsevier Science Publishers、pp.63-107 (1993) 参照。)に従いリポソームを製造し、サイズを調節することができる。すなわち、上記で選ばれた脂質等および塩化ナトリウム水溶液、緩衝液またはグルコース水溶液等を用い、薄膜法、逆相蒸発法、エタノール注入法、エーテル注入法または脱水-再水和法等により製造でき、超音波照射法、凍結融解後の超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法またはホモジナイゼーション法等の方法によりサイズが調節できる。本発明においても、これらの方法に従いリポソームを製造し、必要に応じてリポソームのサイズを調節する。

また、カチオン性界面活性剤およびカチオン性水溶性高分子はいずれも水溶性であるため、あらかじめ製造した非イオン性水溶性高分子で修飾されたリポソームの分散液に添加する方法によってリポソームの構成成分とすることができる。これらのカチオン性化合物の添加方法は、リポソームに包含させる薬物がカチオン性である場合に効果的な方法である。すなわち、荷電した薬物のリポソームへの包含効率(薬物の処方量に対する包含量の割合)は、該薬物と反対符号の荷電を有する脂質等をリポソームの構成成分とすることによって高めることができる(D.D.Lasic、「liposomes: from basic to applications」、Elsevier Science Publishers、pp.307-317 (1993) 参照。)が、リポソームの外表面に吸着した薬物は容易に脱離するため、結果として得られる薬物包含リポソームの帯電状態は、リポソームを構成する脂質の帯電状態に支配され負となりやすい。従って、カチオン性薬物を効率的に包含し、かつ負の帯電状態を小さくすることは一般に困難であるが、負荷電脂質を構成成分としてカチオン性薬物を効率良く包含したリポソームを製造した後、カチオン性界面活性剤またはカチオン性水溶性高分子を添加することによって、カチオン性薬物を効率良く包含し、かつ、リポソームの負の帯電状態を小さくすることが可能である。

薬物は、当業者周知の方法に従い、リポソームに包含させることができる(D.D.Lasic、「liposomes: from basic to applications」、Elsevier Science Publishers、pp.307-317 (1993) 参照。)。例えば、脂溶性が高い薬物は、該薬物を脂質の1成分とみなして他の脂質と混合しリポソームを製造することにより、

また、水溶性の高い薬物は、水相に溶解してリポソームを製造することにより、それぞれリポソームに包含させることができる。

実際に薬物を包含した非イオン性高分子で修飾されたりポソームを製造する際、どの程度の帯電状態の、非イオン性高分子で修飾されたりポソームを使用するかは、包含される薬物の性質（例えば、毒性、帯電状態等）によって決定する。

薬物を包含した非イオン性高分子で修飾されたりポソームより構成される製剤は、通常配合時の組成から計算される、リポソームを構成する脂質の濃度が1乃至300 mMとなるように、適宜、緩衝液、生理食塩液または糖類もしくは塩類の水溶液等を使用して希釈、または遠心分離により濃縮を行ない、ヒトに対して総体積1乃至100 mlを静脈内注射により、または100 ml乃至1000 mlを静脈内点滴により投与する。

[図面の簡単な説明]

【図1】実施例1で製造したリポソームのPBS (pH 7.4) 中でのゼータ電位と電荷密度との関係図。

【図2】CDF1マウスに対する実施例1で製造したリポソームの最大投与可能量(MTD)とPBS (pH 7.4) 中でのゼータ電位 (zeta potential) との関係図 (各プロットに記した番号は処方例の番号を表し、処方例2乃至5のプロットは、MTDが5 mg/kgより大きな値であることを表す)。

【図3】ウイスターラットに実施例1および比較例1で製造したリポソームを静脈内投与した後のリポソームの血漿中残存量推移図 (□: 処方例11のリポソーム、○: 処方例1のリポソーム、△: 処方例3のリポソーム)。

[発明を実施するための最良の形態]

以下に実施例、比較例および試験例を挙げて、本発明について更に具体的に詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

なお、下記の例で使用した脂質は、コレステロールは東京化成(株)の製品であり、それ以外は川原油化(株)の製品である。

〔実施例 1〕 ゼータ電位の異なる非イオン性水溶性高分子で修飾されたリポソームの製造

中性脂質であるジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoyl-phosphatidylcholine。以下、DPPCという。) ならびにコレステロール、負荷電脂質であるジパルミトイルホスファチジルグリセロール (dipalmitoyl-phosphatidylglycerol。以下、DPPGという。)、正荷電化合物であるN- α -トリメチルアンモニオアセチルジドデシル-D-グルタメートクロライド (N- α -trimethylammonioacetyldidodecyl-D-glutamate chloride。以下、TMAGという。)、非イオン性水溶性高分子で修飾された負荷電脂質であるポリエチレングリコール部分の分子量が約2000のN-モノメトキシポリエチレングリコールサクシニルジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (N-monomethoxypoly(ethylene glycol) succinyldistearoylphosphatidylethanolamine。川原油化(株)製。以下、PEG-DSPEという。)、リポソームの蛍光標識剤である1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸塩 (1,1'-dioctadecylindo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate。Lambda Probes & Diagnostics社製品。以下、DiIという。E. Claassen, J. Immunol. Methods 147, 231-240 (1992)参照。) および10重量%トレハロース水溶液を使用し、Banghamらの方法 (J. Mol. Biol. 8, 660-668 (1964) 参照。) に従い、次のようにしてリポソームを製造した。

すなわち、所定量の上記の脂質等をナス型フラスコにはかりとり、クロロホルム5 mLを加えて溶解した。次にクロロホルムを減圧留去することにより、フラスコ内壁に脂質の薄層を形成させた。この脂質薄層に所定量の10重量%のトレハロース水溶液を加え、ボルテックスミキサーで振とうすることにより、脂質濃度100 mMのリポソームの粗分散液を得た。処方例における脂質の構成比を表1に示す。

【表 1】*

DPPC コレステロール DPPG TMAG PEG-DSPE

処方例 1	5 5	4 0	0	0	5
処方例 2	5 3	4 0	0	2	5
処方例 3	5 0	4 0	0	5	5
処方例 4	4 5	4 0	0	1 0	5
処方例 5	3 5	4 0	0	2 0	5
処方例 6	3 0	4 0	2 5	0	5
処方例 7	2 5	4 0	2 5	5	5
処方例 8	2 0	4 0	2 5	1 0	5
処方例 9	5 0	4 0	5	0	5
処方例 1 0	4 5	4 0	1 0	0	5

*各脂質の数値は、処方した μmol 数を表す。この他、いずれのリポソーム処方においても標識剤のD i Iを総脂質モル数に対して0.2mol%処方した。

次に、超音波破碎装置 (Model 7600、セイコー電子工業 (株) 社製。) を使用した超音波照射法 (出力25W、照射時間5分乃至1時間。) により、リポソームの体積平均粒子径を血中滞留性の高い100nm以下となるように調節した。

ここで、体積平均粒子径およびゼータ電位は、粒子径測定機 (Nicomp Particle Sizer Model 370、Nicomp Particle Sizing Systems社製。) およびゼータ電位測定機 (ZEM5000、Malvern社製。) をそれぞれ使用して測定した。なお、微粒子のゼータ電位の符号および大きさは、当業者周知の方法 (例えば、J. Hunter、*「Zeta potential in colloid science」*、pp.125-178、Academic Press (1981) 参照。) によって算定した。

これらのリポソームの体積平均粒子径、および25℃、リン酸緩衝生理食塩液 (20mMのリン酸二水素ナトリウムおよび135mM塩化ナトリウムからなり、1規定水酸化ナトリウム水溶液でpH7.4に調整したもの。以下、PBSとする。) 中におけるゼータ電位を、次式：

$$\text{電荷密度} = [(** \text{正電荷モル数} - ** \text{負電荷モル数}) / ** \text{全脂質モル数}] \times 100 (\%)$$

**いずれもリポソーム調製時の脂質の配合量から求めた値

により算出した電荷密度とともに表2に示す。

【表2】

	電荷密度 (mol %)	ゼータ電位 (mV)	***体積平均粒子径 (nm)
処方例1	- 5	- 20.3	97.7 ± 44.7
処方例2	- 3	- 14.8	82.8 ± 37.7
処方例3	0	- 13.9	78.4 ± 32.8
処方例4	+ 5	- 12.2	97.9 ± 41.2
処方例5	+ 15	- 6.0	94.8 ± 36.3
処方例6	- 30	- 27.3	98.2 ± 35.4
処方例7	- 25	- 25.9	97.2 ± 32.3
処方例8	- 20	- 22.7	97.1 ± 42.5
処方例9	- 10	- 21.7	97.0 ± 33.8
処方例10	- 15	- 23.9	90.3 ± 31.2

***体積平均粒子径±粒子径の分布幅（標準偏差；SD）として表す。

このように、いずれのリポソームも生理的pHの水性媒体中において正に帯電していないことが確認された。次に表2のデータを用い、ゼータ電位と電荷密度との関係を図1に示す。このように、非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソーム（以後、高分子修飾リポソームという。）および正荷電化合物を加えた高分子修飾リポソームの電荷密度とPBS中におけるゼータ電位との間には密接な関係があり、脂質の種類および該脂質の組成比により、高分子修飾リポソームのゼータ電位を制御できることができた。すなわち、正荷電化合物を高分子修飾リポソームに含有させることによりリポソームの負の帯電状態を0に近づけることが可能であることが示された。さらに、高分子修飾リポソームが、負電荷を過剰に有している場合のみならず、正電荷密度と負電荷密度とが等しい場合や正電荷を

過剰に有している場合でも、なお、生理的 pH の水性媒体中において負に帯電していることが示された。この事実は、本発明が、リポソーム製造時の組成比から算定される電荷密度の符号が負でない場合においても適用されることを意味する。

また、表 1 の脂質組成にて製造した高分子修飾リポソームおよび正荷電化合物を加えた高分子修飾リポソームの体積平均粒子径はいずれも 100 nm 以下であり、血中滞留性に優れるサイズに調節できた。

〔比較例 1〕非イオン性水溶性高分子で修飾されていないリポソームの製造

実施例 1 と同様にして、表 3 で示す処方で、非イオン性水溶性高分子で修飾されていないリポソーム（以後、高分子非修飾リポソームという。）を製造した。リポソームの電荷密度、PBS 中でのゼータ電位および体積平均粒子径の値を表 4 に示す。

【表 3】

	**** DPPC	コレステロール	DPPG	TMAG	PEG-DSP
処方例 1 1	70	30	0	0	0

****各脂質の数値は、処方した μmol 数を表す。この他、標識剤の DiI を総脂質モル数に対して 0.2 mol% 処方した。

【表 4】

	電荷密度 (mol%)	ゼータ電位 (mV)	*****体積平均粒子径 (nm)
処方例 1 1	0	-2.0	95.3 ± 32.8

*****体積平均粒子径 ± 粒子径の分布幅（標準偏差；SD）として表す。

〔試験例 1〕毒性の検討

実施例1で製造したリポソームの分散液を、0.1乃至2.5 mlの所定の各量(0.1から1.0 mlまでは0.3 mlおき、1.0 mlから2.5 mlまでは0.5 mlおきの量。)を、体重20乃至30 gのCDF1マウス(日本チャールズリバー社製。)に静脈内投与した。マウスの生死を投与後1時間にわたり観察することにより、リポソームの最大投与可能体積、すなわち、マウスが生存した投与体積のうち最も大きい投与体積を決定した。

最大投与可能量(Maximum Tolerated Dose。以下、MTDという。)は次式：
$$MTD (g/kg) = [最大投与可能体積 (mL) \times 脂質の濃度 (g/mL)] /$$

マウスの体重 (kg)
より算出した。

このようにして求められたMTDをPBS中でのゼータ電位の関数として図2に示す。なお、この図においてプロットに付けられた数字は、それぞれ処方例の番号を表し、縦軸をスケールアウトしたプロットは、MTDが5.5 g/kgより大きいことを示す。

実施例1で製造したリポソームのMTDは、PBS中での該リポソームの負のゼータ電位が0に近づくほど増大した。すなわち、高分子修飾リポソームに正荷電化合物を加えて、生理的pHの水性媒体中における負のゼータ電位を0近づけることで高分子修飾リポソームの毒性が軽減された。

[試験例2] 血中滞留性の検討

実施例1および比較例1で製造し、150 mM塩化ナトリウム水溶液で希釈して総脂質濃度をそれぞれ16.7 mMとした処方例1、3または11のリポソーム分散液を、体重315乃至385 gのウイスターラット(動繁研社製。)に対し、総脂質の投与量が47.7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ となるように尾静脈より投与した。1乃至24時間の所定の各時間後に尾静脈より血液を約500 μl 採取し、遠心分離(1000 g \times 5分。)により血漿を得た。この血漿10 μl に150 mM塩化ナトリウム水溶液40 μl を加え、さらに1重量%のポリエチレングリコールモノ-4-オクチルフェニルエーテル(東京化成工業(株)製。)を含むPBS 1

mlで希釈した。分光蛍光光度計（650-40型。（株）日立製作所製。）を使用し、この血漿の希釈液の蛍光強度（励起波長：550nm、蛍光波長：565nm。）を求めた。この蛍光強度、および投与したリポソーム製剤を1重量%のポリエチレングリコール-モノ-4-オクチルフェニルエーテルを含むPBSで100倍希釈した溶液の蛍光強度を使用し、全血液量が体重の5重量%、血液中の血漿の体積分率が60重量%であるとし、リポソームの血中残存量を求めた。このリポソームの血中残存量の推移を図3に示す。

この図において、□は処方例11で製造した高分子非修飾リポソームを示し、○は処方例1で製造した高分子修飾リポソームを示し、△は処方例3で製造した正荷電化合物を含む高分子修飾リポソームを示す。図3から、処方例3のリポソームは、処方例1のリポソームと同等の優れた血中滞留性を有した。

また、処方例11のリポソームは、処方例1、3のリポソームと同等の体積平均粒子径を有しているにもかかわらず、血中滞留性が劣っていた。

この試験結果から、正荷電化合物を構成成分として含有させた場合でも、リポソームを修飾する非イオン性水溶性高分子による血中滞留性向上効果が維持されることが明らかとなった。

[産業上の利用の可能性]

本発明により、高い血中滞留性を有し、従来に比べ毒性が著しく軽減された非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームが得られた。本発明の目的のリポソームは、非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームの安全性を高めることにより包含された薬物の投与量を増加させることを可能とし、薬物の治療効果を高める上で有用性が高い。

請 求 の 範 囲

1. 生理的 pH の水性媒体中において負に帯電する非イオン性水溶性高分子で修飾されたりポソームに対し、さらに正荷電化合物を構成成分として配合し、負の帯電状態を小さくするか無帯電としたりポソーム。

図 1

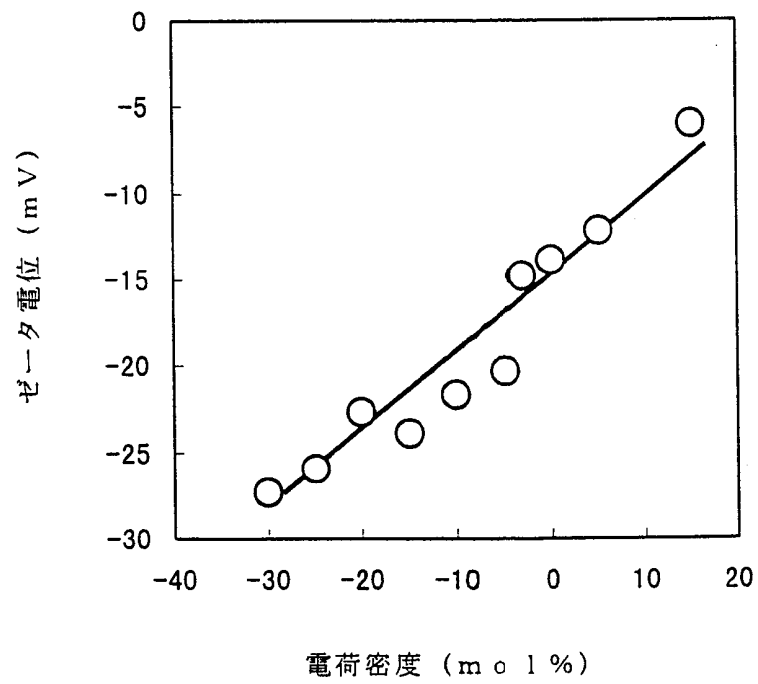


図 2

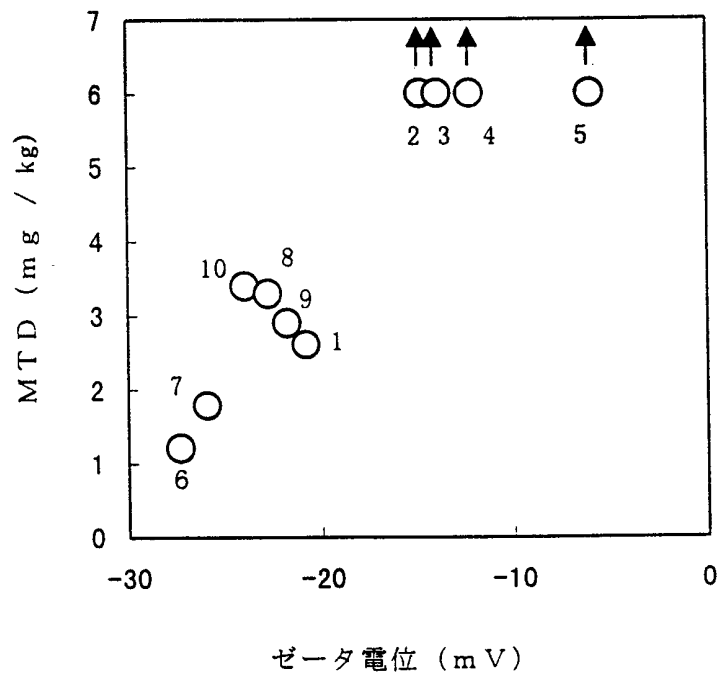
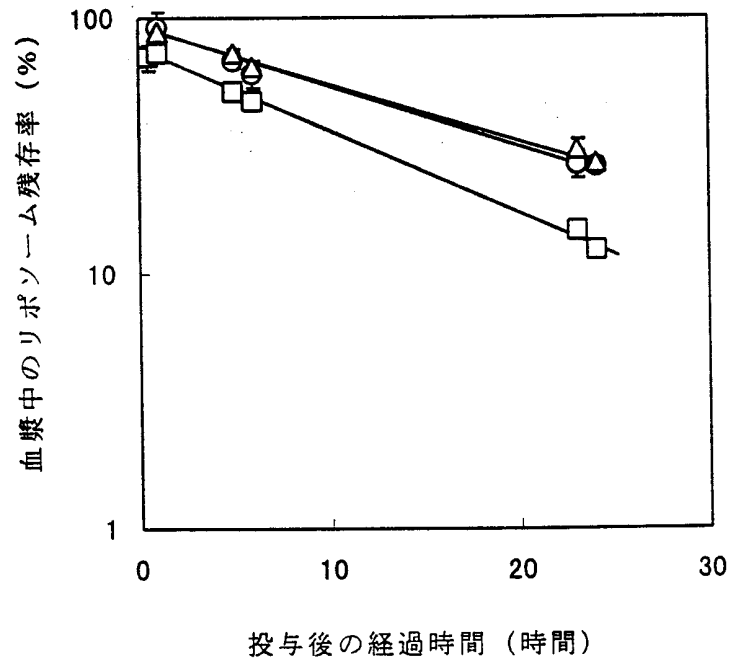


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K 9/127, 47/24, 47/34

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K 9/00-9/72, 47/00- 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN (CA), STN (MEDLINE), STN (WPIDS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/10392, A1 (The University of British Columbia), 11 April, 1996 (11.04.96), page 12, lines 1-14; page 13, lines 8-29; page 23, lines 13-17; page 40, line 28 to page 41, line 28; page 47, Claim 5; page 48, Claim 9 & JP, 10-506395, A page 19, lines 7-23; page 20, line 13 to page 21, line 14; page 32, lines 17-21; page 51, line 18 to page 52, line 21; page 2, Claim 5; page 3, Claim 9 & EP, 792142, A1	1
Y	JP, 7-89874, A (TERUMO CORORATION), 04 April, 1995 (04.04.95), Claims 1, 2; page 11; Par. No. [0125]; page 12; Fig. 1 (Family: none)	1
A	JP, 7-173079, A (NOF Corporation), 11 July, 1995 (11.07.95) (Family: none)	1

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
27 December, 1999 (27.12.99)Date of mailing of the international search report
11 January, 2000 (11.01.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05976

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 90/4384, A1 (Royal Free Hospital School of Medicine), 03 May, 1990 (03.05.90) & JP, 4-501117, A & EP, 445131, A1	1
A	US, 5376380, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 th December, 1994 (27.12.94) & JP, 4-103527, A	1
A	JP, 4-82839, A (Green Cross Corporation), 16 March, 1992 (16.03.92) (Family: none)	1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 9/127, 47/24, 47/34

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. Cl⁷ A61K 9/00-9/72, 47/00-47/48

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

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)

STN(CA), STN(MEDLINE), STN(WPIDS)

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
Y	WO, 96/10392, A1 (The University of British Columbia), 11. 4月. 1996 (11. 04. 96), 第12頁, 第1-14行, 第13頁, 第8-29行, 第23頁, 第13-17行, 第40頁, 第28行-第41頁, 第28行, 第47頁, 請求項5, 第48頁, 請求項9 & JP, 10-506395, A, 第19頁, 第7-23行, 第20頁, 第13行-第21頁, 第14行, 第32頁, 第17-21行, 第51頁, 第18行-第52頁, 第21行, 第2頁, 請求項5, 第3頁, 請求項9 & EP, 792142, A1	1

C欄の続きにも文献が列举されている。 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 27. 12. 99

国際調査報告の発送日 11.01.00

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 9053
高原 慎太郎 
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
Y	JP, 7-89874, A (テルモ株式会社), 4. 4月. 1995 (04. 04. 95), 請求項1, 2, 第11 頁, 段落【0125】, 第12頁, 図1 (ファミリーなし)	1
A	JP, 7-173079, A (日本油脂株式会社), 11. 7月. 1995 (11. 07. 95) (ファミリーなし)	1
A	WO, 90/4384, A1 (Royal Free Hospital School of Medicine), 3. 5月. 1990 (03. 05. 90) & JP, 4-501117, A & EP, 445131, A1	1
A	US, 5376380, A (第一製薬株式会社), 27. 12月. 1994 (27. 12. 94) & JP, 4-103527, A	1
A	JP, 4-82839, A (株式会社ミドリ十字), 16. 3月. 1992 (16. 03. 92) (ファミリーなし)	1