

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6293779号
(P6293779)

(45) 発行日 平成30年3月14日 (2018. 3. 14)

(24) 登録日 平成30年2月23日 (2018. 2. 23)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 47/42	(2017. 01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/24	(2006. 01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/18	(2006. 01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 9/127	(2006. 01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 38/16	(2006. 01)	A 6 1 K 38/16

請求項の数 17 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-547026 (P2015-547026)
(86) (22) 出願日	平成25年12月12日 (2013. 12. 12)
(65) 公表番号	特表2016-504312 (P2016-504312A)
(43) 公表日	平成28年2月12日 (2016. 2. 12)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/076404
(87) 国際公開番号	W02014/095576
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)
審査請求日	平成28年12月8日 (2016. 12. 8)
(31) 優先権主張番号	12197904. 1
(32) 優先日	平成24年12月18日 (2012. 12. 18)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	517428148
	サリプロ バイオテック アーベー
	Salipro Biotech AB
	スウェーデン王国, 11428 ストック
	ホルム, テクニクリンゲン 38A, グリ
	ーンハウス ラボズ
(74) 代理人	100139594
	弁理士 山口 健次郎
(74) 代理人	100185915
	弁理士 長山 弘典
(74) 代理人	100090251
	弁理士 森田 憲一
(72) 発明者	フラウエンフェルト イェンス
	スウェーデン王国, 11418 ストック
	ホルム, エクハグスヴェーゲン 2
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Salipro 粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質結合性ポリペプチドと脂質とを含むディスク状粒子の製造方法であって、
前記方法は、以下の工程：

(a) 液性環境中で脂質結合性ポリペプチドを洗浄剤で可溶化された脂質に接触させる工程と、

(b) pH 6. 0 ~ 10. 0 で前記粒子を自己集合させる工程と
を含み、

前記脂質結合性ポリペプチドが、

(a) 脂質と相互作用するタンパク質の S A P L I P ファミリーに属するサポシン様タン
パク質 (S A P L I P)、又は

(b) その誘導体の形態

であり、前記誘導体は、

(i) 配列番号 1、2、3、4、5、若しくは 6 で表される全長配列と少なくとも 80 %
の配列同一性を有するタンパク質；

(ii) 配列番号 1、2、3、4、5、若しくは 6 で表される全長配列と少なくとも 40 %
の配列同一性を有するタンパク質、ここで、前記タンパク質は両親媒性であり、少なく
とも 1 つの ヘリックスを形成し、そして前記工程 (b) において、可溶化された脂質と
ともにリボタンパク質粒子中に自己集合することができるものとする；又は

(iii) アミノ酸 1 ~ 40 個が欠失、付加、挿入及び/又は置換された配列番号 1、2

10

20

、3、4、5、若しくは6で表される配列を含むタンパク質であり、そして、

前記粒子は、親水性又は水性のコアを含まない、前記方法。

【請求項2】

前記工程(b)が、工程(a)において得られた混合物を、前記工程(a)において得られた混合物よりも少ない量の洗浄剤を含有する液体で希釈する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法が、工程(b)において又は後続工程(c)として遊離脂質及び/又は遊離脂質結合性ポリペプチドの少なくとも部分的な除去による前記粒子の精製を含み、場合により、前記精製が、クロマトグラフィー、特にサイズ排除クロマトグラフィー、超遠心分離、透析、洗浄剤結合性バイオビーズへの接触、濃縮器の使用、アフィニティークロマトグラフィー、磁気ビーズ、及び/又は結合していない/組み込まれていない脂質及び/又は疎水性化合物を除去するための膜/フィルターにより実施される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

脂質結合性ポリペプチドと、

脂質と、

疎水性剤と

を含む、ディスク状粒子であって、

前記粒子は、親水性又は水性のコアを含まず、

前記疎水性剤は、脂質又は洗浄剤ではなく、そして

前記脂質結合性ポリペプチドは、

(a) 脂質と相互作用するタンパク質のSAPLIPファミリーに属するサポシン様タンパク質(SAPLIP)、又は

(b) その誘導体の形態

であり、前記誘導体は、

(i) 配列番号1、2、3、4、5、若しくは6で表される全長配列と少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質；

(ii) 配列番号1、2、3、4、5、若しくは6で表される全長配列と少なくとも40%の配列同一性を有するタンパク質、ここで、前記タンパク質は両親媒性であり、少なくとも1つのヘリックスを形成し、そして、請求項1に記載の方法において使用される場合には、可溶化された脂質とともにリポタンパク質粒子中に自己集合することができるものとする；又は

(iii) アミノ酸1~40個が欠失、付加、挿入及び/又は置換された配列番号1、2、3、4、5、若しくは6で表される配列を含むタンパク質

である、前記ディスク状粒子。

【請求項5】

前記粒子が、最大直径2nm~200nm、特に3nm~150nm、好ましくは3nm~100nmを有する、請求項4に記載の粒子。

【請求項6】

前記疎水性剤が、疎水性有機化合物及び疎水性生体分子からなる群から選択される、請求項4又は5に記載の粒子。

【請求項7】

前記疎水性有機化合物及び疎水性生体分子が、生物学的活性剤、薬剤、薬剤の活性成分、化粧品生成物の活性成分、植物保護生成物の活性成分、栄養及び/又は栄養補助食品、診断用プローブ、造影剤、標識、及びインジケータからなる群から選択される、請求項6に記載の粒子。

【請求項8】

前記疎水性生体分子が、疎水性部分を含むタンパク質であり、特に膜タンパク質、内在

10

20

30

40

50

性膜貫通タンパク質、内在性モノトピック膜タンパク質、周辺膜タンパク質、脂質に結合した状態のアμφιトロピックタンパク質、脂質アンカー型タンパク質、並びに融合された疎水性及び／又は膜貫通ドメインを有するキメラタンパク質からなる群から選択されるタンパク質である、請求項 6 又は 7 に記載の粒子。

【請求項 9】

前記脂質が、脂質二重層形成性脂質、及び／又は生体適合性脂質である、請求項 4 ～ 8 のいずれか一項に記載の粒子。

【請求項 10】

前記脂質が、真核生物の脂質、リン脂質、及び／又は脳の白質及び灰白質中に存在する脂質からなる群から選択され、特に、脂質が、リン脂質、スフィンゴ糖脂質、ステロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン (PS)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-グリセロール (POPG)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (POPE)、ジアシルグリセロール、コレステロール、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、ガングリオシド、ホスファチジイルイノシトール、及びスルホガラクトセラミド、又はそれらの組み合わせから選択され、そして特に好ましくは、脂質が、ホスファチジルセリン (PS) を含む、請求項 4 ～ 9 のいずれか一項に記載の粒子。

10

【請求項 11】

前記脂質結合性ポリペプチドが、機能的部分、例えば標的部分又は生物活性部分、をさらに含むキメラポリペプチドである、請求項 4 ～ 10 のいずれか一項に記載の粒子。

20

【請求項 12】

前記脂質結合性ポリペプチドが、サポシン A 又はその誘導体若しくはトランケーティッド体、特に、配列番号 1 との配列同一性の少なくとも 60 % を有するアミノ酸配列を含むサポシン A の誘導体である、請求項 4 ～ 11 のいずれか一項に記載の粒子。

【請求項 13】

前記粒子が、請求項 6 において定義される通りであり、前記脂質が、請求項 9 又は 10 において定義される通りであり、及び／又は前記脂質結合性ポリペプチドが、請求項 11 又は 12 において定義される通りである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の粒子の製造用の請求項 1 ～ 3 及び 13 のいずれか一項に記載の方法であって、工程 (a) において、前記脂質結合性ポリペプチドを、前記粒子内に組み込まれるべき疎水性剤を含む液性環境中で脂質に接触させるものとし、そして場合により、前記疎水性剤が、請求項 6 ～ 8 のいずれか一項において定義される通りである、前記方法。

30

【請求項 15】

請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の粒子を含み、疎水性剤が活性成分であり、及び／又は前記疎水性剤に加えて活性成分が存在する、必要とする個体に疎水性剤を送達するための医薬組成物。

【請求項 16】

医薬分野における使用のための、特に、疾患の重篤度の予防、治療、若しくは軽減における使用のための、又は診断方法若しくは化粧品における使用のための、又はワクチン製剤としての、請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の粒子。

40

【請求項 17】

疎水性剤送達粒子としての、薬剤開発用、薬剤スクリーニング用、又は膜タンパク質研究用ツールとしての、請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の粒子の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の技術分野】

【0001】

本発明は、リポタンパク質粒子、疎水性剤 (hydrophobic agents) 例えば疎水性薬剤 (

50

hydrophobic drugs) 又は膜タンパク質用の送達又は運搬システムとしてのそれらの使用、及び前記ディスク状リポタンパク質 (disk-like lipoproteins) の製造方法に関する。

【発明の背景】

【0002】

膜タンパク質及び疎水性化合物は、医薬品又はライフサイエンス研究及び用途のための主要な課題の2つ: (i) 不溶性疎水性化合物又は膜タンパク質を水溶液中で可溶性にすること、並びに (ii) 前記物質の治療剤及び診断薬としての投与、に対処しそして代表するには悪名高いほどに困難である。

【0003】

膜タンパク質は、全ORFの約30%によりコードされており (Wallin and von Heijne, Protein Science 1998 Apr; 7 (4):1029-38)、そして薬剤の大部分すなわち60%以上が、実際はこのクラスのタンパク質を標的としていることから (Overington et al., Nature Reviews Drug Discovery 5, 993-996 (December 2006))、薬剤標的の重要なクラスを代表している。膜タンパク質は、多くの生物学的プロセス、例えばシグナル伝達、分子及びエネルギーの輸送、認識、並びに細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。しかし、膜タンパク質は、天然の脂質二重層環境から抽出されたときに凝集するそれらの傾向及びそれらの不溶性のために、研究することが困難である。膜タンパク質の完全性を維持するためには、人工的な疎水性環境が必要である。ここで、最も一般的に使用される洗浄剤ミセルは、しかしながら、生体適合性にマイナスの影響を与える可能性があり、膜タンパク質の活性に有害な影響を与える可能性があり、そしてアッセイのための実験条件を妨害する可能性がある。

【0004】

別の主要な薬理学的な課題は、疎水性タンパク質及び/又は疎水性化合物の、治療剤又は診断薬としての投与及び送達により代表される。疎水性薬剤の溶解性が制限されているためにこれらは凝集する傾向があり、このことにより、高い毒性、望ましくない免疫応答が導かれ、薬剤の不活性が引き起こされる可能性がある (Allen and Cullis, SCIENCE, 303 (5665): 1818-1822, MAR 19, 2004)。

【0005】

したがって、可溶性粒子に疎水性剤例えば膜タンパク質、薬剤、又は診断化合物を組み込む用途が、非常に望まれている。これらの課題2つに対処する現在の方法は、とりわけ、リポソーム及び再構成された (reconstituted) 高密度リポタンパク質 (rHDL) 粒子である (Chan and Boxer, Current Opinion in chemical Biology 11:1-7, 2007)。

【0006】

EP 1 596 828 B1は、脂質二重層をダブルベルト状の様式で (in a double belt-like fashion) しっかりと取り囲んでいるアポリタンパク質を含むディスク状の生物活性剤送達粒子を記載している。前記粒子の内部は、脂質二重層の疎水性領域によって形成されている。これは、水性の内部を含む閉じた球状の二重層の外郭構造 (closed spherical bilayer shells) であるリポソームと対照的である。EP 1 596 828 B1に記載されたディスク状の生物活性因子送達粒子は、ストークス直径約10nm (Stokes diameter) を有し、そして疎水性医薬品例えばアンホテリシンB又はカンプトテシンの送達ビヒクル用の使用が提案されている。

【0007】

EP 1 345 959 B1は、直径約10nm及び高さ約5.5nmの同様のタイプのナノスケール粒子を記載している。粒子は、ディスク状でありそして (i) 人工膜骨格タンパク質、(ii) リン脂質二重層、及び (iii) 疎水性又は部分的に疎水性の膜タンパク質の少なくとも1つ、から構成される。前記膜骨格タンパク質は、ダブルベルト状の様式で脂質二重層を再び取り囲み、そしてヒトのアポリタンパク質A-1の誘導体又はトランケーティッド体 (truncated form) であり、ヒトのアポリタンパク質A-1のN末端球状ドメインを欠いており、両親媒性でありそして α -ヘリックスの少なくとも1つを形成し、そして水性環境において、リン脂質又はリン脂質混合物によりこのディスク状の

ナノスケールの粒子に自己集合する。改変された前記の膜骨格タンパク質 (MSP) は、ナノスケールのディスク状のリポタンパク質粒子に対して安定性、サイズの均一性、及び有用な機能を提供するであろう。

【0008】

しかし、この現在利用可能なナノディスク技術にはいくつかの欠点があり、例えば、洗浄剤の除去が粒子の集合の間に必要とされる点である。また、アポリポタンパク質由来のMSPのしっかりとしたダブルベルト状フィットによる大きさの均一性が、固定された最小粒子の大きさ及び先行技術の方法により得られる最大径に関する制限を犠牲にしていると考えられる。

【0009】

サポシンファミリーは、小型の (~80 アミノ酸) タンパク質の4種、サポシンA~Dを含み、これらは、脂質と結合及び/又は相互作用し、そしてスフィンゴ脂質異化におけるリソソーム酵素の複数のための必須の補因子として機能する (Bruhn, Biochem J. (2005) 389, 249-257及びこの中で引用されている文献を参照)。サポシンは、負に帯電した脂質及び低pHを好むことが記載されており、このことにより、リソソーム内のpHである4.75が最適pHであることとともに、酸性pHにおける顕著に増加した活性が示される。サポシンA、B、C、及びDは、単一の大きな前駆体タンパク質であるプロサポシンからタンパク質分解的に加水分解される。サポシンA、B、C、及びDのための完全なアミノ酸配列は、プロサポシンのゲノム構成及びcDNA配列と同様に報告されている (O'Brien et al. (1988) Science 241, 1098-1101; Furst et al (1992) Biochim Biophys Acta 1126: 1-16)。

【0010】

サポシンCは酸性環境下でリン脂質含有小胞の膜融合を誘導することができ (Archives of Biochemistry and Biophysics 2003 Jul 1; 415(1): 43-53)、これは、他のサポシンによって示されていない機能である。Qi et al. (2009) Clin Cancer Res 15(18):5840-5851は、水性の内部を含み平均直径約190nmを有しそしてインビボにおいて腫瘍標的活性を示すサポシンC結合ジオレオイルホスファチジルセリンナノベシクル (saposin C-coupled dioleoylphosphatidylserine nanovesicles) (SapC-DOPS) を報告している。SapC-DOPSにおいて、サポシンC又はそれに由来するペプチドは、それらが結合されるリポソームのためのホーミングペプチド (homing peptide) として機能する。その後、サポシンCは、細胞膜の外葉上でホスファチジルセリンを露出させているがん細胞に対するリポソームを標的とする。著者らは、リソソーム酵素の細胞外漏出に起因するがん細胞の周囲の独特の酸性微小環境が、腫瘍組織をサポシンCの最適な標的にすると考えている。Qiらによると、SapC-DOPSリポソームは、N₂(g)下で溶媒溶解リン脂質を乾燥させ、精製サポシンCを含有する酸性バッファ (pH5) 中で乾燥リン脂質を分散させ、生理的水溶液において前記混合物を50倍に希釈し、そしてその後の超音波処理でナノベシクルの集合を促進することにより調製される。

【0011】

Popovic et al., PNAS, Vol. 109, No.8 (2012) 2908-2912は、サポシンA洗浄剤ディスク (saposin A detergent discs) の構造を報告している。サポシンAは、可溶性でかつ脂質/洗浄剤に結合した状態で存在する。脂質の非存在下では、サポシンAは、閉じた単量体のapo構造 (apo conformation) を採用している。対照的に、Popovicらによって報告されたサポシンA洗浄剤ディスク構造は、高秩序の二重層様疎水性コアに組織された、内部で結合された洗浄剤分子40個をカプセル化する開構造のサポシンAの鎖の2つを明らかにしている。

【0012】

サポシンA洗浄剤ディスクの結晶化に加えて、Popovicらはまた、複数工程を必要とする方法によるpH4.75での可溶性脂質サポシンA複合体の調製を記載している。まず、大型単層リポソーム小胞の均一画分をクロロホルムに溶解した脂質をN₂(g)下で乾燥させることにより調製し、酸性バッファ (50mM酢酸ナトリウム (pH4.8

10

20

30

40

50

)、150 mM NaCl) 中でボルテックス混合することにより乾燥脂質を分散させ、懸濁液を凍結融解10サイクルに供し、ボルテックスミキサーで5分間ブレンドし、そして200 nmフィルターを通して混合物を押し出す。酸性バッファ中においてこのようにして調製した大型単層リポソーム小胞と精製されたサポシンAとを混合すると、可溶性脂質サポシンA粒子が得られた。前記粒子は、平均流体力学(ストークス)半径である3.2 nm周辺の狭いサイズ分布を示し、サポシンA鎖あたり約5:1の脂質分子を含有していた。粒子の正確な大きさは、脂質及びタンパク質のモル比及びリポソーム組成によってのみ穏やかに影響を受けた。著者らは、陰イオン性リン脂質、コレステロール、又はスフィンゴ糖脂質(glycosphingolipids)がリポソーム混合物に存在したか否かに関わらず、同様の3.2 nm粒子を観察した。全ての場合において、単一のピークが、ストークス半径3.2 nmの大きさの範囲で観察され、このことは、種の比較的狭い分布を示している。従って、この刊行物の技術は、pH値4.75に、前記の粒子の大きさに制限され、かつ面倒な上流のリポソーム調製工程を含んでいる。

10

【0013】

この背景に対して、膜タンパク質及び他の疎水性化合物の可溶化用のリポタンパク質粒子組成物の、信頼性が高く実施が容易で安定しており明確な生成方法の必要性が存在する。これは、ディスク状リポタンパク質粒子調製用の先行技術において開示されている複雑な複数工程の方法を考慮すると、特に当てはまる。

【0014】

多種多様な疎水性剤は、先行技術に記載されたアポリポタンパク質又はサポシンA由来のナノディスク技術から潜在的に利益を得ることができる。しかしながら、サポシンA由来の粒子の3.2 nmの大きさ制限のために、たとえあったとしても、小分子のみが、それらに開示されている酸性pHで前記粒子内に取り込まれる可能性があると考えられる。大きな(bulky)疎水性化合物及び大型の生体分子例えば(オリゴマー)膜タンパク質が、先行技術のアポリポタンパク質A由来のナノディスク中に取り込まれることができる一方で、可能な最大径は、これらの粒子のダブルベルト状アポリポタンパク質の周囲によって未だ制限されている。さらに、また、10 nmのアポリポタンパク質A由来のナノディスクは、特定の用途には大きすぎる可能性がある。

20

【0015】

したがって、リポタンパク質粒子内に組み込まれるべき疎水性剤のそれぞれの大きさに適応するための能力を特徴とする、高度なナノディスク技術と柔軟かつ制御可能な大きさの範囲を有する優れたリポタンパク質の必要性が存在する。前記の粒子は、例えば、薬学的又は生物学的に活性な化合物又は診断用化合物であることができる、膜タンパク質及び他の疎水性成分の単純な統合を可能にするであろう。

30

【発明の概要】

【0016】

本発明の根底にある問題は、その大きさを制御することができ、及び/又はその大きさを組み込まれた分子の特性に対して調節することができ、生産してそして長い期間にかけて、均一な大きさ、品質、及び組成を維持することが容易であるナノスケールのリポタンパク質粒子の条件において見られる。

40

【0017】

この問題は、脂質結合性ポリペプチド、少なくとも1つの種類の脂質、及び疎水性剤を含む粒子であって、前記疎水性剤が、前記少なくとも1つの種類の脂質と異なるものとし、そして前記脂質結合性ポリペプチドは、サポシン様タンパク質又はその誘導体若しくはトランケーティッド体であるものとする、前記粒子により解決される。

【0018】

本発明はまた、本発明の粒子を含む、医薬又は診断組成物を提供する。

【0019】

本発明は、脂質結合性ポリペプチド及び脂質を含む粒子の製造方法であって、前記脂質結合性ポリペプチドは、サポシン様タンパク質又はその誘導体若しくはトランケーティッ

50

ド体であるものとし、前記方法が、前記脂質結合性ポリペプチドを可溶性脂質に液性環境中で接触させる工程、及びpH 5.0～10で粒子を自己集合させる工程を含むものとする前記方法を、さらに提供する。

【0020】

最後に、本発明の粒子は、疎水性剤の送達ビヒクルとして、薬剤開発、薬剤スクリーニング、膜タンパク質研究のためのツールとして、そしてワクチン製剤として使用することができる。

【0021】

この理論に縛られることなく、疎水性剤と脂質及びサポシン様タンパク質又はその誘導体若しくはトランケーティッド体との結合は、強固な構造を提供し、この構造は、広いpH範囲にわたり特に生理学的pHで水溶液中において安定でありそして3.2nmより大きな先行技術のサポシンA由来リポタンパク質粒子を可能にする。前記粒子は、pH 5.0～10で操作する本発明の方法により得ることができ、したがって、このことにより、本発明の粒子の自己集合が可能となる。

【0022】

本発明の方法により得られるサポシン様タンパク質 - リポタンパク粒子（以下、「Salipro粒子（Salipro particle）」と称する）は、複数の特徴、例えばそれらの固有の大きさの柔軟性及び前記リポタンパク質粒子に組み込まれるべき疎水剤のそれぞれの大きさに適応する能力において先行技術の粒子とは異なっている。

【0023】

サポシン - リポタンパク質の粒子がサポシンの天然の最適pHの4.75又はその近辺で最高の状態で組み立てられるであろうという予想に反して、前記粒子の調製の間により中性の又は塩基性のpHが維持される場合に、改善された特性及び拡張された応用範囲を有するサポシン - リポタンパク質粒子が得られることが発見された。驚くべきことに、pH 5.0～10の範囲でありそして可溶化された脂質の存在下で、精製されたサポシン様タンパク質又はその誘導体若しくはトランケーティッド体が、面倒な上流のリボソーム調製工程なしで安定的なりポタンパク質粒子中に自己集合することを発見した。この単純で信頼性の高い調製方法は、サポシンの天然の最適pH 4.75又は脂質の非存在下で粒子の集合を試みた場合では、満足する結果を得ることができなかった。

【0024】

本発明のSalipro粒子は、生理学的pHで、様々な脂質、膜タンパク質、及び疎水性化合物の組み込みが可能であり、これにより、水性環境中で可溶性かつ安定であるナノ複合体を生じさせることが証明されている。

【0025】

本発明のSalipro粒子は、標準的な遠心フィルターユニットを用いた濃縮、凍結融解を通して強固である。また、実証実験により、本発明のSalipro粒子は熱安定性のある程度示すことが示された。また、任意の主要な品質劣化なしで、本発明の粒子を凍結乾燥すること、保存すること、そして再水和することが可能である。

【発明の詳細な説明】

【0026】

脂質結合性ポリペプチドは、サポシン様タンパク質（SAPLIP）又はその誘導体若しくはトランケーティッド体である。本明細書で使用される用語「サポシン様タンパク質」（SAPLIP）は、当該技術分野で認識されており、そして脂質と相互作用するタンパク質のサポシン様タンパク質（SAPLIP）ファミリーの群の全てを含む。SAPLIPファミリーは、サポシン折り畳み（saposin-fold）、高度に保存された分子内ジスルフィド結合によって安定化され保存された - ヘリックス立体構造により特徴付けられる（Munford et al. (1995), Journal of Lipid Research, vol. 36, no. 8, 1653-1663 and Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257）。本発明によるサポシン様タンパク質（SAPLIP）の群の例は、Munford et al. (1995), Journal of Lipid Research, vol. 36, no. 8, 1653-1663及びBruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257において記載

10

20

30

40

50

されており、これらの両方の開示はその全体が参照により本明細書に組みこまれる。

【0027】

リガンドフリー（すなわち、洗浄剤を含まない／脂質を含まない）、「閉じた」状態では、S A P L I Pは、単量体のコンパクト4ヘリックスバンドル型構造（a monomeric compact four-helix bundle-type structure）、サポシン折り畳みを採用している。この折り畳みは、ヒトサポシンA（Protein Data Bank (PDB) ID code: 2D0B, Ahn et al. (2006) Protein Sci. 15: 1849-1857）の閉じたアポ型の構造により、又はサポシンC（PDB ID code: 1M12; de Alba et al. (2003) Biochemistry 42, 14729-14740）、N K - リジン（PDB ID code: 1NKL; Liepinsh et al. (1997) Nat. Struct. Biol. 4, 793-795）、アメーバポアA（PDB ID code: 10F9）、及びグラニューライシン（PDB ID code: 1L9L; Anderson et al. (2003) J. Mol. Biol. 325, 355-365）の構造により例示されており、これらの全てはほぼ同一であり、容易に重ねられることができる（easily super-imposable）。

10

【0028】

S A P L I Pは、リガンド例えば脂質又は洗浄剤分子に結合する際に構造変化を起こす。リガンド結合の「開いた」構造では、S A P L I Pは、結合した脂質と接触する露出した疎水性表面を有するV字型又はブーメラン型の構造（V-shaped or boomerang-shaped conformation）を採用する。開いた構造は、先行技術のサポシンA洗浄剤ディスク構造（PDB ID code: 4DDJ; Popovic et al., PNAS, Vol. 109, No.8 (2012) 2908-2912）及びS D S洗浄剤ミセルに結合するサポシンC（PDB ID code: 1SN6; Hawkins et al. (2005) J. Mol. Biol. 346: 1381-1392）の構造により例示されている。

20

【0029】

本発明の粒子においては、脂質結合性ポリペプチドは、好ましくは、その構造の一部分が多かれ少なかれ親水性でありかつ水性溶媒に直面しそして他方の部分が多かれ少なかれ疎水性でありかつ脂質を含む粒子の疎水性中心に直面する、両親媒性である。脂質結合性ポリペプチドは、好ましくは、ヘリックスの表面の1つの主により疎水性の残基（例えば、A、C、F、G、I、L、M、V、W、又はY）そしてヘリックスの他の表面に極性のある又は荷電した残基（例えば、D、E、N、Q、S、T、H、K、又はR）を有する両親媒性ヘリックスによって特徴付けられる。

【0030】

30

本明細書で使用されるアミノ酸残基の略語は、以下の通りである：A、A l a、アラニン；V、V a l、バリン；L、L e u、ロイシン；I、I l e、イソロイシン；P、P r o、プロリン；F、P h e、フェニルアラニン；W、T r p、トリプトファン；M、M e t、メチオニン；G、G l y、グリシン；S、S e r、セリン；T、T h r、スレオニン；C、C y s、システイン；Y、T y r、チロシン；N、A s n、アスパラギン；Q、G l n、グルタミン；D、A s p、アスパラギン酸；E、G l u、グルタミン酸；K、L y s、リジン；R、A r g、アルギニン；及びH、H i s、ヒスチジン。

【0031】

先行技術のアポリポタンパク質由来ナノディスクとは対照的に、本発明の脂質結合性ポリペプチドは、ダブルベルト状の様式で脂質を封入していないが（図1参照）、むしろ、本発明の粒子は、本発明の得られた粒子内での個々の脂質結合性ポリペプチド間のタンパク質-タンパク質の直接接触を有しない頭尾配向（head-to-tail orientation）において配列された、おおよそV字型又はブーメラン型の脂質結合性ポリペプチドの2つ又はそれ以上に囲まれている脂質を含むコアにより結合している（図2～7参照）。この理論に拘束されることを望むことなく、本発明の粒子内の脂質結合性ポリペプチド及び脂質のこの配列は、大きな疎水性剤又は増加された量の脂質が本発明の粒子内に組み込まれた場合に観察される大きさの柔軟性を提供する。

40

【0032】

前記両親媒特性及び三次元構造と同様に脂質と相互作用する能力がS A P L I P間で高度に保存されている一方で、それらはアミノ酸配列のレベルでは、相同性を定義するため

50

の通常の同一性の25～30%の閾値帯下の (below the usual threshold zone) 配列同一性を有し、非常に異なっている (sequence comparison in Figure 4 A and 4 B of Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257参照、これらの図は参照により本明細書に特別に組み込まれる)。

【0033】

本発明のリポタンパク質粒子において、脂質結合性ポリペプチドは、まず第一に、本発明のリポタンパク質粒子のディスク状構造の骨格を提供する構造タンパク質としての役目を果たす。この理由から、構造的特徴、特にSAPLIPの特徴であるサポシン折り畳みが、単なる配列のデターミナント (determinants) と比較して本発明の脂質結合性ポリペプチドを定義するためにより重要になる。

10

【0034】

本発明によるSAPLIPの例は、サポシンA、B、C、又はD (例えば、ヒト (Homo sapiens) [SEQ ID NO. 1～4参照]、ウマ (Equus caballus)、ウシ (Bos taurus)、ハツカネズミ (Mus musculus)、アナウサギ (Oryctolagus cuniculus)、ドブネズミ (Rattus norvegicus)、又はアフリカツメガエル (Xenopus laevis) から)；サーファクタントタンパク質B (例えば、ヒト、イヌ (Canis familiaris)、ハツカネズミ、アナウサギ、ヒツジ (Ovis aries)、又はドブネズミから)；グラニュライシン (例えば、ヒトから [SEQ ID NO. 5参照])；NK-リジン (例えば、ウマ又はヒツジから)；アマーバポア (例えば、赤痢アマーバ (Entamoeba histolytica) から)；アマーバポアオルソログ (例えば、赤痢アマーバ (Entamoeba dispar) 又は赤痢アマーバ (Entamoeba invadens) から)；アマーバポア様タンパク質 (例えば、肝蛭 (Fasciola hepatica) から)；Naegleria pores (例えば、ネグレリア-フォーレリ (Naegleria fowleri) から)；Clonorchis (例えば肝ジストマ (Clonorchis sinensis) から)；プロサポシン (例えば、ヒト、ウマ、ヒツジ、ハツカネズミ、アナウサギ、ドブネズミ、又はアフリカツメガエルから)、及びMSAP (例えばヒトから)である。

20

【0035】

本発明により使用される特定のSAPLIPの配列は、Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257の図4A及び図4Bに示されており、これらの特定の図及び配列は、参照により本明細書に特別に取り込まれる。本発明に従って使用される特定のSAPLIPの配列は、配列表に以下のように記載される。SEQ ID NO. 1 サポシンA [ヒト]、SEQ ID NO. 2 サポシンB [ヒト]、SEQ ID NO. 3 サポシンC [ヒト]、SEQ ID NO. 4 サポシンD [ヒト]、SEQ ID NO. 5 グラニュライシン [ヒト]、SEQ ID NO. 6 NK-リジン [イノシシ (Sus scrofa)]。

30

【0036】

本発明により使用されるSAPLIPはまた、多ドメインタンパク質の一部としてサポシン折り畳みを含むポリペプチドであることができる。この例は、酸性スフィンゴミエリナーゼ (ヒト、シノラブディス・エレガンス (Caenorhabditis elegans)、カタユウレイボヤ (Ciona intestinalis)、ハマダラカ (Anopheles)、ショウジョウバエ (Drosophila)、ハツカネズミ、又はドブネズミから)；GDSL (Gly - Asp - Ser - Leu) リパーゼ、例えばアシロキシ酸 (ヒト又はドブネズミから)；Countin (キイロタマホコリカビ (Dictyostelium discoideum) から)；J3-クリスタリン (ミツデリッポウクラゲ (Tripedalia cystophora))、及びアスパラギン酸プロテアーゼ (緑色植物亜界 (Viridiplantae) から)である。本発明により使用されるさらなるSAPLIPは、バクテリオシンAS-48 (bacteriocin AS-48)であることができる。バクテリオシンAS-48は抗菌活性を示し、また、脂質に結合し、残りのSAPLIPファミリーの群のように同じ折り畳みを有するが、任意のジスルフィド架橋を欠いている。

40

【0037】

これに対し、本発明は、脂質結合性ポリペプチドとしてのサポシンA又はその誘導体若しくはトランケーティッド体のさらなる詳細を以下で記載しており、そして脂質結合性ポリペプチドとしてのサポシンA又はその誘導体若しくはトランケーティッド体は、好適な

50

実施態様であり、本発明はそれらにより限定されないものとする。むしろ、本発明は、本発明の脂質結合性ポリペプチドとしてのサポシン様タンパク質 (S A P L I P) のファミリー全体に明示的に及ぶ。S A P L I P間の構造的及び機能的保存が高度であることにより、脂質結合性ポリペプチドとしてのサポシン A を有する本発明の特定の実施態様の特徵及び利点が、本発明の脂質結合性ポリペプチドとしての他の S A P L I P 又はその誘導体若しくはトランケーティッド体を用いた他の実施態様にもまた適応することが期待される。

【 0 0 3 8 】

好適な実施態様によると、S A P L I P はサポシン A、B、C、又は D、特にサポシンは、(ヒト、ウマ、ヒツジ、ハツカネズミ、アナウサギ、ドブネズミ、又はアフリカツメガエル) サポシン A、B、C、又は D から選択されるサポシンである。1つの実施態様では、S A P L I P は、(ヒト、ウマ、ヒツジ、ハツカネズミ、アナウサギ、ドブネズミ、又はアフリカツメガエル) サポシン A、サポシン B、又はサポシン D である。

10

【 0 0 3 9 】

サポシン C は、膜融合を誘導することができるという点でサポシンの中では特別であり、この特性は他のサポシンでは示されない。膜融合活性が、常に望ましいわけではない。本発明の特定の実施態様によれば、S A P L I P がサポシン C ではないことを条件にあるいは S A P L I P がサポシン C 又はその誘導体若しくはトランケーティッド体ではないことを条件に、脂質結合性ポリペプチドはサポシン様タンパク質 (S A P L I P) 又はその誘導体若しくはトランケーティッド体である。

20

【 0 0 4 0 】

1つの実施態様では、S A P L I P はヒト由来 (すなわち、ヒト S A P L I P) である。

【 0 0 4 1 】

好ましい実施態様では、S A P L I P は、サポシン A、好ましくは (ヒト、ウマ、ヒツジ、ハツカネズミ、アナウサギ、ドブネズミ、又はアフリカツメガエル) サポシン A であり、そして特に好ましくはヒトサポシン A であり、そのアミノ酸配列は S E Q I D N O . 1 で示される。サポシン A は公知のタンパク質である。L D A O - 洗浄剤複合体としてのその発現、精製、及び結晶化は、例えば、PNAS, Vol. 109, No.8 (2012) 2908-2912 (Popovic et al.) に記載されている。

30

【 0 0 4 2 】

本発明の1つの実施態様によると、脂質結合性ポリペプチドは、S A P L I P の全長配列を含む。その他の実施態様では、脂質結合性ポリペプチドは、S A P L I P の誘導体であり、特にそれぞれの S A P L I P の全長配列と少なくとも 20、30、40、50、又は 60 %、好ましくは少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである。脂質結合性ポリペプチドは、S A P L I P の全長配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % の同一性を有する配列を含むことができる。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する用語「配列同一性 (Sequence identity)」は、スコアリングマトリックス例えば Henikoff S. and Henikoff JG., P. N. A. S. USA 1992, 89: 10915-10919 に記載されている B l o s u m 6 2 マトリックスを使用した配列の最適アライメント (optimal alignment) によって計算することができる、タンパク質間の同一性の程度を意味する。Needleman 及び Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) の B l o s u m 6 2 類似性マトリックス及びアルゴリズムを用いた二配列の同一性の割合及び最適アライメントの計算は、プログラムのデフォルトパラメータを使用した G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p (G C G, M a d i s o n, W I, U S A) の G A P プログラムを用いて実施されることができる。

40

【 0 0 4 4 】

アミノ酸アライメント比較としての E M B L オンラインツール「EMBOSS Stretcher」(http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/) が使用されており、これは、プロ

50

グラムデフォルトセッティング (programs default settings) を使用している。

【 0 0 4 5 】

別の実施態様では、S A P L I P の誘導体は、それぞれの S A P L I P のアミノ酸配列において、アミノ酸欠失、付加、挿入、及び / 又は置換の 1 つ又はそれ以上を有する配列を含むポリペプチドである。例えば、S A P L I P 誘導体は、その中のアミノ酸 1 ~ 4 0、好ましくは 1 ~ 3 0、そして特に 1 ~ 2 0 又は 1 ~ 1 5 が欠失、付加、挿入及び / 又は置換された、特定の S A P L I P の配列を含むポリペプチドであることができる。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される用語「欠失」は、それぞれの初めの配列からのアミノ酸残基の、1、2、3、4、5、又はそれ以上の除去を意味する。

10

【 0 0 4 7 】

本明細書において用いられる用語「挿入」又は「付加」は、それぞれの初めの配列からのアミノ酸残基の、1、2、3、4、5、又はそれ以上の挿入又は付加を意味する。

【 0 0 4 8 】

本明細書において用いられる用語「置換」とは、特定の位置にある任意のアミノ酸残基と異なるアミノ酸残基との交換を意味する。

【 0 0 4 9 】

本発明の別の実施態様によれば、脂質結合性ポリペプチドは、S E Q I D N O 1 の断片の 1 つ以上を含むサポシン A の誘導体である。好ましい断片は、サポシン A のヘリックス 1、2、3、及び 4 に該当し、ここで、ヘリックス 1 は、以下の連続的なアミノ酸のストレッチ：「S L P C D I C K D V V T A A G D M L K」により形成され；ヘリックス 2 は、以下の連続的なアミノ酸のストレッチ：「A T E E E I L V Y L E K T C D W L」により形成され；ヘリックス 3 は、以下の連続的なアミノ酸のストレッチ：「P N M S A S C K E I V D S Y L P V I L D I I K G E M S」により形成され；そしてヘリックス 4 は、以下の連続的なアミノ酸のストレッチ：「P G E V C S A L」により形成される。本発明の特定の実施態様によれば、サポシン A の誘導体は、サポシン A のヘリックス 1、2、3、4 及びそれらの組み合わせから選択される配列を含むポリペプチド、特に、サポシン A のヘリックス 1、2、及び 3 の配列を含むポリペプチドである。サポシン A の断片例えばヘリックス 1、2、3、4 は、アミノ酸配列中にアミノ酸の 1 又はそれ以上の欠失、付加、挿入、及び / 又は置換を有することができる。

20

30

【 0 0 5 0 】

サポシン A の誘導体又はランケーティッド体が本発明による脂質結合性ポリペプチドとして使用された場合は、前記サポシン A の誘導体又はランケーティッド体は、両親媒性であり、ヘリックスの少なくとも 1 つを形成し、そして以下に詳細に記載されている本発明による調製工程において使用される場合は、可溶化された脂質とともにリポタンパク質粒子中に自己集合できるであろう。本明細書で使用する場合、「両親媒性」という用語は、親水性及び疎水性の両方の領域を有するポリペプチド又は分子を意味する。

【 0 0 5 1 】

好ましくは、S A P L I P の誘導体を使用される場合には、S A P L I P 創始メンバーサポシン A (SAPLIP founding member saposin A) におけるシステイン 6 個に相当するシステイン残基 6 個が存在するであろう。この点に関しては、Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257 の図 4 A 及び図 4 B に言及されており、これらの図は参照により本明細書に特別に組み込まれる。

40

【 0 0 5 2 】

本発明による脂質結合性ポリペプチドはまた、非天然アミノ酸；アミノ酸アナログ、又はペプチド模倣構造 (peptidomimetic structure) の 1 つ以上を含むことができ、これらのペプチド結合は、代謝分解に対してより耐性を有する構造に置換される。

【 0 0 5 3 】

50

本発明の別の実施態様によれば、脂質結合性ポリペプチドは、タグ例えばHis6タグ、Streptタグ、Aviタグ、Mycタグ、GSTタグ、JSTタグ、システインタグ、FLAGタグ、又は当該技術分野で公知の他のタグをN末端又はC末端にさらに含む。

【0054】

本発明の脂質結合性ポリペプチドはまた、キメラポリペプチドであることができる。本明細書で使用する場合、「キメラ」は、別々に存在することが可能でありそしてその構成分子の所望する全ての機能を有する単一の分子を形成するために一緒に結合された分子の2つ以上を指す。キメラ分子の構成分子は、化学的結合により合成的に接合されることができ、又は、構成分子が全てポリペプチド又はその類似体それ自体である場合は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、単一の連続ポリペプチドが発現されるように組み換え技術により(recombinantly)一緒に融合することもできる。前記のキメラ分子は、「融合タンパク質」として知られている。キメラポリペプチドの種々の成分は、互いに直接に結合することができるか、又はリンカー1つ若しくはそれ以上を介して結合することができる。

【0055】

1つの実施態様では、脂質結合性ポリペプチドは、機能的部分例えば標的部分又は生物活性部分をさらに含むキメラポリペプチドである。

【0056】

本発明の粒子が薬剤送達ビヒクルとして使用される場合、前記の標的部分は、例えば、特定の細胞若しくは組織型、又は感染因子それ自体に対して本発明の粒子を標的とする機能を果たすことができる。いくつかの実施態様において、粒子は、脂質結合性ポリペプチド又は脂質成分に結合した標的部分を含んでいる。いくつかの実施態様では、粒子に組み込まれている疎水性剤は、標的能力を有する。例えば、標的部分は受容体認識特性を有し、これにより粒子は特定の細胞表面受容体を標的とすることができる。例えば、本発明の粒子は、特定種の感染性因子を有する公知の特定細胞種を標的にすることができ、例えば、粒子の脂質結合性ポリペプチド成分を修飾することにより、標的とされている前記細胞種の表面上の受容体と相互作用することが可能となる状態にする。1つの実施態様では、標的部分は、天然若しくは合成のリガンド、抗体及び抗体フラグメント、又は標的の目的に適した他の生体分子から成る群から選択される。

【0057】

脂質結合性ポリペプチドが生物活性部分を含む場合、これは、例えば、薬剤、細胞傷害剤、酵素、標識、フルオロフォア、造影剤、及び放射性標識から選択されることができる。

【0058】

本発明の目的に適した脂質は、天然に存在する脂質、合成脂質、修飾脂質、脂肪、ワックス、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質(saccharolipids)、ポリケチド、ステロール脂質、及びプレノール脂質又はそれらの組み合わせから選択することができる。

【0059】

本明細書で使用される用語「脂質」は、当該技術分野で認識されており、そして有機溶媒に可溶性若しくは部分的に可溶性であるか、又は水相中に存在する場合には疎水性の環境に分割している(partitions into)、生物学的又は合成的起源の物質を意味する。

【0060】

本明細書で使用される用語「脂質」は、本発明の粒子中の脂質単分子として意図されていない。実際には、同一の脂質分子の複数又はその中に存在する少なくとも2種の異なる脂質分子の複数のように意味される。

【0061】

好ましい実施態様によれば、脂質は、脂質二重層形成性脂質、及び/又は生体適合性脂質である。

【 0 0 6 2 】

本明細書において使用される用語「生体適合性」は、生体組織中で、毒、傷害、又は免疫応答を生成しないことによって、生物学的に適合性であることを意味する。

【 0 0 6 3 】

本明細書で使用される用語「二重層形成性脂質」は、疎水性の内部と親水性の外部とにより脂質二重層を形成することができる脂質を指す。ディスク状構造内に集合する S A P L I P 又はその誘導体若しくはトランケーティッド体と結合することができる任意の二重層形成性脂質は、本発明に従って使用することができる。二重層形成性脂質には、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、アルキルリン脂質、エーテル脂質、及びプラズマローゲンが含まれるが、これらに限定されない。二重層形成性脂質の 1 つの種類は、2 つ又はそれ以上の種類の混合物を使用されることができる。

10

【 0 0 6 4 】

粒子は、脂質二重層を形成していない脂質を含むことができる。前記の脂質としては、コレステロール、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミン（この脂質は特定の状況下で二重層を形成することができる）、オキシステロール、植物ステロール、エルゴステロール、シトステロール、カチオン性脂質、セレブロシド、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、トリアシルグリセロール、ガングリオシド、エーテル脂質、アルキルリン脂質、プラズマローゲン、プロスタグランジン、及びリゾリン脂質が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 5 】

好ましい実施態様によれば、脂質は、真核生物の脂質（eukaryotic lipids）及び／又は脳の白及び灰白質中に存在する脂質である。好ましい脂質は、例えば、リン脂質、スフィンゴ糖脂質、ステロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン（P S）、2 - オレオイル - 1 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン（P O P C）、2 - オレオイル - 1 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - グリセロール（P O P G）、2 - オレオイル - 1 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン（P O P E）、ジアシルグリセロール、コレステロール、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、ガングリオシド、ホスファチジルイノシトール、及びスルホガラクトセラミド、又はそれらの組み合わせである。好ましい脂質は、真核生物の脂質である。ホスファチジルセリン（P S）が特に好ましい脂質である。

20

30

【 0 0 6 6 】

1 つの実施態様では、脂質は、リン脂質を含むか又はリン脂質から成る。適切なリン脂質の例としては、D M P C、D M P G、P O P C、ジパルミトイルホスファチジルコリン（D P P C）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（D P P S）、カルジオリピン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（D P P G）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（D S P G）、卵黄ホスファチジルコリン（卵 P C）、大豆ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、及びカチオン性リン脂質を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施態様では、本発明の粒子に含まれる脂質は、結合した機能性部分、例えば前記の標的部分又は生物活性部分の 1 つ又はそれ以上を含む、修飾された脂質であることができる。

40

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される用語「洗剤」は、当該技術分野において認識されており、本明細書で使用される「脂質」の定義に含まれていない。

【 0 0 6 9 】

多くの脂質は、洗剤と比較すると、同様の両親媒性の一般構造、すなわち、極性の親水性の頭部基と非極性の疎水性の尾部を有するが、脂質は、モノマーの形態において、溶液中で形成される凝集物の種類において、そして凝集に必要とされる濃度範囲において洗剤とは異なる。脂質は、一般的に、実質的に円筒形である；疎水性尾部が占める体積は

50

、極性頭部基が占める体積と同じである。洗浄剤モノマーは、一般的に円錐形である。疎水性尾部が占める体積は、極性頭部基が占める体積よりも小さい。洗浄剤は、脂質の非存在下で二重層構造を形成することなく、水溶性である球形の又は楕円体のミセルに凝集する傾向がある（Anatrace（www.anatrace.com）からのハンドブック「膜タンパク質科学における洗浄剤及びそれらの使用（Detergents and their uses in membrane protein science）」を参照）。

【0070】

本明細書で使用される用語「洗浄剤」に含まれる化合物の例としては、アニオン性洗浄剤例えばアルキルベンゼンスルホン酸塩又は胆汁酸、カチオン性洗浄剤、並びに非イオン性又は両性イオン性洗浄剤例えばラウリルジメチルアミン酸化物（LDAO）、フォス・コリン、CHAPS/CHAPSO、アルキルグリコシド例えば短、中、若しくは長鎖アルキルマルトシド及びグルコシドが含まれる。

10

【0071】

本発明の粒子は、さらに、脂質とは異なるそうでなければ粒子中に含まれる疎水性剤を含む。これは、疎水性剤自体が脂質又は修飾された脂質である場合に、粒子中に含まれる脂質の大部分（すなわち、粒子中に存在する脂質の総量に基づく50モル%より多く）は、疎水性剤を形成する脂質とは異なるものでなければならないことを意味する。本発明の1つの実施態様では、疎水性剤は脂質ではない；本発明の別の実施態様では、疎水性剤は、脂質でも洗浄剤でもない。

【0072】

20

本発明の粒子に組み込まれることができる疎水性剤は、疎水性有機化合物及び/又は疎水性生体分子であることができる。これは、治療的に若しくは生物学的に活性である疎水性剤、又は本発明の粒子のディスク形状を単に安定化する疎水性剤であることができる。疎水性剤は、水相中に存在する場合に、水中で完全に浸透しないか若しくは可溶性を維持し、及び/又は凝集する傾向があり、及び/又は疎水性環境に分割する、薬剤、すなわち、化合物及び/又は生体分子である。本発明の粒子に含まれていることにより、疎水性剤は、粒子の疎水性内部において効果的に可溶化されることができる。それによって、それは、天然の機能性、例えば触媒活性又はリガンド結合を維持することができる。

【0073】

本発明の粒子に含まれる疎水性剤は、一般的に、脂質二重層の疎水性部分に結合することができる又は組み込むことができる疎水性（例えば親油性）領域の少なくとも1つを含む。疎水性剤それ自体はキメラ分子であることができ、脂質二重層の疎水性部分に結合することができる又は組み込むことができる疎水性（例えば親油性）部分、モジュール、又は化合物は、他方の分子に結合されていることができる。例えば、脂質又は脂肪酸結合化合物、特に脂質又は脂肪酸結合薬剤は、本発明による疎水性剤として使用されることができる。これらのケースにおいては、前記化合物又は薬剤それ自体は、必ずしも疎水性である必要はない。いくつかの実施態様では、疎水性剤の少なくとも一部分は、粒子内部における脂質分子の疎水性部分（例えば、脂肪酸アシル鎖）内に挿入されるか又は浸透することができる。

30

【0074】

40

疎水性剤は、例えば、生物学的活性剤、薬剤、薬剤の活性成分、化粧品生成物の活性成分、植物保護生成物の活性成分、栄養及び/又は栄養補助食品（dietary and/or nutritional supplement）、診断用プローブ、造影剤、標識、及び/又はインジケータであることができる。

【0075】

本発明の粒子に含まれることができそしてそれを必要とする患者に投与されることができる疎水性薬剤は、水性環境中における低溶解度を有する任意の薬剤であることができる。水性環境への溶解度の低さは、特定の条件下例えば、特定のpH若しくは温度範囲でのみ又は疎水性剤の濃度が一定の閾値を超える場合にのみ明らかである。

【0076】

50

例えば、本発明の粒子に含まれることができそしてそれを必要とする患者に投与されることができる薬剤は、がん治療、炎症性若しくは感染状態、心血管疾患、神経疾患、及びとりわけリウマチ用のものである。疎水性剤は、抗酸化剤、ビタミン、抗増殖剤、ホルモン、ステロイド、又は酵素であることができる。これは、除草性又は殺菌性化合物であることができる。

【 0 0 7 7 】

本発明の粒子中に組み込むことができる疎水性薬剤のいくつかの具体的な例としては、
 クルクミン、スルホンアミド、例えばスルホンアミド、スルファメトキサゾール、及びスルファセタミド；トリメトプリム、特にスルファメトキサゾールとの組み合わせ；キノリン、例えば、ノルフロキサシン及びシプロフロキサシン；ペニシリンを含む - ラクタム化合物、例えば、ペニシリン G、ペニシリン V、アンピシリン、アモキシシリン、及びピペラシリン、セファロスポリン、例えばセファロスポリン C、セファロチン、セフォキシチン、及びセフトジジム、他の - ラクタム抗生物質、例えばイミペネム、及びアズトレオナム；ベータラクタマーゼ阻害剤、例えば、クラブラン酸；アミノグリコシド、例えばゲンタマイシン、アミカシン、 Tobramycin、ネオマイシン、カナマイシン、及びネチルマイシン；テトラサイクリン、例えばクロルテトラサイクリン及びドキシサイクリン；クロラムフェニコール；マクロライド例えばエリスロマイシン；混合型真菌剤 (miscellaneous antibiotics)、例えばクリンダマイシン、ポリミキシン、及び抗菌用バシトラシン、場合によっては、抗真菌感染症として、ポリエン抗生物質、例えばアンホテリシン B、ナイスタチン、及びハマイシン；フルシトシン；イミダゾール又はトリアゾール、例えばケトコナゾール、ミコナゾール、イトラコナゾール、及びフルコナゾール；抗真菌性疾患用、例えばアスペルギルス症、カンジダ症、又はヒストプラズマ用のグリセオフルビン；抗ウイルス性疾患用のジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ビダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン、インターフェロン (例えば、インターフェロン - 2 a 又はインターフェロン - 2 b)、及びリバビリン；アスピリン、フェニルブタゾン、フェナセチン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、インドメタシン、スリンドク、ピロキシカム、ジクロフェナク；炎症性疾患用、例えば関節炎用の金 (gold) 及びステロイド系抗炎症剤；ACE 阻害剤、例えばカプトプリル、エナラプリル、リシノプリル；有機硝酸塩、例えば亜硝酸アミル、ニトログリセリン、及び硝酸イソソルビド；カルシウムチャネル遮断薬、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、及びベラパミル；アドレナリン性アンタゴニスト例えば心血管疾患用のプロプラノロール；利尿薬例えばチアジド；例えば、ベンゾチアジジン又はループ利尿薬例えばフロセミド；交感神経遮断薬、例えばメチルドパ、クロニジン、グアナベンズ、グアナネチジン、及びレセルピン；血管拡張剤例えばヒドララジン及びミノキシジル；カルシウムチャネル遮断薬例えばベラパミル；高 ACE 阻害剤例えば血圧治療用のカプトプリル；心臓不整脈治療用のキニジン、プロカインアミド、リドカイン、エンカイニド、プロプラノロール、エスモロール、ブレチリウム、及びジルチアゼム；高リポタンパク質血症治療用のロバスタチン、リピトール、クロフィブラート、コレステラミン、プロブコール、及びニコチン酸；アントラサイクリン例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、及びイダムビシン；共有結合 DNA 結合化合物 (covalent DNA binding compound)、共有結合 DNA 結合化合物及び白金化合物例えばシスプラチン及びカルボプラチン；葉酸アンタゴニスト例えばメトトレキサート及びトリメトトレキサート；代謝拮抗剤及びピリミジン拮抗薬、例えばフルオロウラシル、5 - フルオロウラシル、及びフルオロデオキシウリジン；代謝拮抗剤及びプリン拮抗薬例えば、メルカプトプリン、6 - メルカプトプリン、及びチオグアニン；代謝拮抗剤及び糖修飾アナログ、例えばシタラビン及びフルダラビン；代謝拮抗剤及びリボヌクレオチド還元酵素阻害剤例えばヒドロキシ尿素；共有結合 DNA 結合化合物及びナイトロジェンマスタード化合物、例えばシクロホスファミド及びイホスファミド；アルカンスルホン酸及びアルカンスルホン酸塩、例えばブスルファン；ニトロソウレア例えばカルムスチン；共有結合 DNA 結合化合物及びメチル化剤、例えばプロカルバジン；共有結合 DNA 結合化合物及びアジリジン、例えばマイトマイシン；非共有結合 DNA 結合化合物；非共有結合 DNA 結合化合物

10

20

30

40

50

、例えばミトキサントロン及びブレオマイシン；クロマチン機能阻害剤及びトポイソメラーゼ阻害剤、例えばエトポシド、テニポシド、カンプトテシン、及びトポテカン；クロマチン機能阻害剤及び微小管阻害剤、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、及びパクリタキセルを含むピンカアルカロイド、タキソテール、又は他のタキサン；内分泌機能に影響を与える化合物、例えばプレドニゾン、プレドニゾロン、タモキシフェン、ロイプロリド、エチニルエストラジオール、抗体例えばハーセプチン；遺伝子、例えばp-53遺伝子、p16遺伝子、MIT遺伝子、及びE-カドヘリン；サイトカイン、例えばインターロイキン、特にIL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、及びIL-12、腫瘍壊死因子例えば腫瘍壊死因子- α 及び腫瘍壊死因子- β 、コロニー刺激因子、例えば顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン、例えばインターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、及びインターフェロン- δ ；がん治療用のオールトランスレチノイン酸又は別のレチノイド；免疫抑制剤、例えば：シクロスポリン、免疫グロブリン、及びスルファサラジン、メトキサレン、及びサリドマイド；糖尿病用のインスリンとグルカゴン；骨粗しょう症治療用、高カルシウム血症、及びパジェット病治療用のカルシトニン及びナトリウムアレンドロネート；モルヒネ及び関連オピオイド；中枢作用性の鎮咳薬、例えばデキストロメトルファン；疼痛管理用のテトラヒドロカンナビノール又はマリノール、リドカイン、及びブピバカイン；クロルプロマジン、プロクロルペラジン；カンナビノイド例えばテトラヒドロカンナビノール、ブチロフェノン例えばドロペリドール；吐き気及び嘔吐治療用のベンズアミド例えばメトクロプラミド；抗凝固剤、抗血栓、又は抗血小板薬としての、ヘパリン、クマリン、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)；炎症性腸疾患治療用の、ヘパリン、スルファサラジン、ニコチン、及びステロイド、及び腫瘍壊死因子- α ；喫煙中毒治療用のニコチン；ホルモン療法用の、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、コルチコトロピン、及びソマトトロピン、そして一般的なアナフィラキシー用のアドレナリン、を含む。

【0078】

特定の化合物が、以下の実施例例えば実施例9において記載されている方法による本発明の粒子内によく組み込まれている場合に、当業者は、実験的に容易に決定することができる。分光法によって検出されない化合物については、当業者は、例えば、LC-MS又は薄層クロマトグラフィーを信用して特定の化合物が本発明の粒子内に組み込まれているかどうかを決定することができる。

【0079】

本発明の粒子内に疎水性剤を含ませることの利点は、前記粒子の安定的な構造内で効果的に可溶性になることであり、それにより、前記粒子は、水性環境中で疎水性剤用の送達沈着物(deposit)及び/又はビヒクルとして機能し、例えば、体液や組織の大部分に存在する。洗浄剤又は有機溶媒を介して可溶化させる古典的な手段と比較して、本発明の粒子は、外部から親水性であるという利点を提供する一方で、粒子の疎水性の内部において疎水性剤が効果的に可溶化され、これにより、疎水性剤が天然の機能性、例えば酵素活性又はリガンド結合を維持可能であることが意味される。さらに、ほとんどの洗浄剤及び有機溶媒とは対照的に、本発明の粒子は、生体適合性であると考えられる。

【0080】

疎水性有機化合物の他に、本発明のリポタンパク質粒子もまた、疎水性の生体分子例えば疎水性部分を含むタンパク質を安定的に組み込み可能であることが証明されている。本発明によれば、疎水性部分を含むタンパク質は、例えば、膜タンパク質、内在性膜貫通タンパク質、内在性モノトピック膜タンパク質(integral monotopic membrane protein)、周辺膜タンパク質、脂質に結合した状態のアμφイトロピックタンパク質(amphitropic protein)、脂質アンカー型タンパク質、並びに融合された疎水性及び/又は膜貫通ドメインを有するキメラタンパク質から選択されることができる。

【0081】

内在性膜タンパク質は、不変的に、脂質二重層に結合し、そして通常は膜変位の形になるために洗浄剤又は非極性溶媒を必要としている膜タンパク質である。膜貫通タンパク質は、少なくとも一度は膜にまたがる (span across) 内在性膜タンパク質である。本発明の粒子に組み込むことができる膜貫通タンパク質の例としては、Gタンパク質共役受容体 (GPCR)、輸送体例えばユニポーター (uniporters)、共輸送体、若しくは交換輸送体、チャンネル例えばイオンチャンネル、又は酵素である。

【0082】

内在性モノトピック膜タンパク質は、不変的に、片側のみから膜に結合しておりそして膜をまたがることはない。このクラスは、ヘリックス膜貫通アンカーを介して膜に繋留された (tethered) 膜タンパク質を含んでいる。例としては、シトクロム P 450 オキシダーゼ及びグリコホリン A を含む。

10

【0083】

周辺膜タンパク質は、一時的に又は間接的にのみ脂質二重層又はこれに組み込まれた脂質二重層と結合している。周辺膜タンパク質は、通常、高 pH 又は高塩濃度の極性試薬で処理した後の膜から解離する。周辺膜タンパク質の例には、ホスホリパーゼ A 2 又は C、リボキシゲナーゼ、及びシトクロム C が含まれる。

【0084】

脂質アンカー型タンパク質は、脂質化、特にプレニル化又は GPI アンカー型アミノ酸残基を介して脂質二重層に結合している。例としては、細菌リポタンパク質、Gタンパク質、及び特定のキナーゼを含む。

20

【0085】

アンフィトロピックタンパク質は、少なくとも2つの立体配座状態で、脂質を含まず、水溶性の状態で、そして脂質に結合した状態で存在するタンパク質である。脂質との結合の際に、アンフィトロピックタンパク質には、それらが可逆的又は不可逆的膜結合になることを可能にする構造変化が生じる。アンフィトロピックタンパク質の例は、孔形成毒素及び抗菌性ペプチドである。

【0086】

本発明の粒子は、2 nm ~ 200 nm、特に3 nm ~ 150 nm、好ましくは3 nm ~ 100 nm の範囲のストークス半径 (流体力学半径) R_s を有するディスク状であると考えられる。当業者は、ストークス半径を決定する方法について理解している。これは、好ましくは、既知のストークス半径の基準と比較して、分析用ゲル濾過 (サイズ排除クロマトグラフィー) によって行われる。特に、粒子をゲル濾過ステップ例えば Superdex 200 HR 10/30 ゲル濾過カラムに供することができ、そして pH 7.5 において適切なバッファで 0.5 mL / 分で室温で溶出することができる。吸光度をタンパク質について 280 nm で測定する。カラムは、次のような既知のストークス半径のタンパク質標準の混合物、例えばサイログロブリン 669 kDa ($R_s = 8.5$ nm)、フェリチン 440 kDa ($R_s = 6.1$ nm)、カタラーゼ 232 kDa ($R_s = 4.6$ nm)、乳酸脱水素酵素 140 kDa ($R_s = 4.1$ nm)、ウシ血清アルブミン 66 kDa ($R_s = 3.55$ nm)、及びウマ心臓シトクロム c 12.4 kDa ($R_s = 1.8$ nm) を用いて校正する。標準タンパク質の R_s 値は、関心のある粒子の R_s 値より上及びより下に及ぶべきである。検量線は、標準的なタンパク質について R_s 対溶出位置をプロットすることによって生成される。これにより、一般的にほぼ線形のプロットが与えられるが、それ以外の場合は、点間の線を描きそしてこの標準曲線上のその溶出位置から関心のあるタンパク質の R_s を読み取ることで十分である。

30

40

【0087】

いくつかの実施態様では、例えば大きな疎水性剤又は脂質のより多い量が粒子中に存在する場合には、ストークス半径は、3.2 nm、特に、少なくとも3.5 nm、少なくとも5.0 nm、又は少なくとも10.0 nm より大きくなる。

【0088】

本発明の粒子及び具体的にはその実質的なディスク形状は、透過電子顕微鏡法を介して

50

検査することができ、又はもし前記粒子が十分な大きさであれば、以下の実施例 12 に記載のようなネガティブ染色電子顕微鏡及び単一粒子分析を介して検査することができる。

【0089】

構造解析により、本発明の粒子において、脂質は、粒子内部の離散的大きさ (discrete size) のディスク状二重層様構造中に集合することが示されている。脂質結合性ポリペプチド成分は、一般的にディスク状二重層の境界を定義し、そして粒子に構造及び安定性を提供する。ほとんどの実施態様では、粒子の内部は、疎水性領域を含む (例えば、脂質の脂肪酸アシル鎖が含まれる)。リポソームと対照的に、本発明の粒子は、典型的には、親水性又は水性のコアを含まない。粒子は、一般的にディスク状であり、水平で、ディスク状で、ほぼ円形の、脂質結合性ポリペプチドの 2 つ又はそれ以上により提供される両親媒性ヘリックスにより囲まれる脂質二重層を有し、これは、ディスク周辺の二重層の疎水性表面に結合している。本発明のディスク状粒子の具体例が、模式的に図 2 ~ 7 に示されている。

【0090】

本発明の粒子のディスク形状は、少なくとも 1.0 : 1.1、特に 1.0 : 1.5 又は 1.0 : 2.0 の最大径 (直径の長さ) に対する最大高さの比を有する円筒に近い。ディスク状粒子の最大高さは、透過電子顕微鏡法により又はもし前記粒子が十分な大きさであればネガティブ染色電子顕微鏡及び単一粒子分析により決定されるように、一般的には、少なくとも 3.5 nm、特に少なくとも 5.0 nm である。本発明の粒子は、頂部、底部、及び外周側面 (circumferential side surface) を有し、頂部及び底部表面の最大径 (直径の長さ) は、外周側面の高さより大きい。本発明の粒子のいくつかの実施態様では、脂質結合性ポリペプチドは、少なくとも部分的に粒子の外周側面を囲むように配置されている。

【0091】

本発明のいくつかの実施態様では、透過電子顕微鏡法により又はもし前記粒子が十分な大きさであればネガティブ染色電子顕微鏡及び単一粒子分析により決定されるようなディスク状粒子の最大径 (直径長さ) は、2 nm ~ 200 nm、特に 3 nm ~ 150 nm、好ましくは 3 nm ~ 100 nm である。別の実施態様では、ディスク状粒子の最大径 (直径長さ) は、3 nm ~ 80 nm、具体的には 3 nm ~ 60 nm である。実証実験により、最大径 (長径) 3 nm ~ 20 nm を有する粒子が本発明の方法を用いて特に容易に得られることが示されている。

【0092】

本発明の好適な実施態様では、例えば Hi Load SuperdexTM 200 16/60 GL カラム上のゲル濾過溶出プロファイル (gel filtration elution profile) により評価されるように、粒子は、ディスク構造の実質的に単分散集団 (monodisperse population) によって定義される。

【0093】

一般的に、粒子中の脂質結合性ポリペプチドと脂質二重層との主な相互作用は、生物活性剤送達粒子の周囲の二重層の端での、脂質結合性ポリペプチド分子の両親媒性ヘリックスの疎水性表面上の残基と脂質の疎水性表面例えばリン脂質の脂肪アシル鎖との間の疎水性相互作用を介している。脂質結合性ポリペプチド分子の両親媒性ヘリックスは、粒子の周囲の脂質二重層の疎水性表面と接触している疎水性表面と、粒子の外面に直面しておりそして前記粒子が水性媒体中に懸濁されたときに水性環境と接触する親水性表面との両方を含む。

【0094】

いくつかの実施態様において、粒子は、水溶液中で安定であり、長期保存のために凍結乾燥することができ、続いて水溶液中で再構成することができる。本明細書で使用される「安定性」又は「安定」は、粒子の断片化 (particle fragmentation) が低レベルから検出できないレベル、粒子の凝集又は調製、輸送、及び貯蔵中の品質劣化が低レベルから検出できないレベルであることを意味する。

【0095】

好ましい実施態様では、本発明の粒子は、例えば目視検査（透明でありそして沈殿のない溶液）又は分析用ゲル濾過（粒子の断片化が50%未満、特に1～40%）により決定されるように、pH5.0～8.0及び温度-210～40の水溶液中で、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも1月、少なくとも6月、又は少なくとも12月の間安定している。実証実験により、本発明の粒子はまた、例えば目視検査（透明でありそして沈殿のない溶液）又は分析用ゲル濾過（粒子の断片化が50%未満、特に1～40%）により決定されるように、pH5.0～8.0及び温度40～75の水溶液中で、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも1月、又は少なくとも3月の間安定していることが示される。

本発明の粒子は、例えば目視検査（透明でありそして沈殿のない溶液）又は分析用ゲル濾過（粒子の断片化が50%未満、特に1～40%）により決定されるように、pH5.0～8.0及び温度40～75の水溶液中で、少なくとも10分の間安定していることが証明されている。いくつかの実施態様では、粒子は長期間貯蔵用に凍結乾燥され、続いて水溶液中で再構成されることができる。いくつかの実施態様では、本発明の粒子は、例えばpH7.5の適切なバッファ中での再構成後の分析用ゲル濾過（粒子の断片化が50%未満、特に1～40%）によって決定されるように、凍結乾燥形態において、-210～40、具体的には-210～25で、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも1月、少なくとも6月、又は少なくとも12月の間安定している。本明細書で用いられる「断片化」とは、ゲル濾過の溶出プロファイルにおいて、本発明の粒子に相当するピーク（すなわち、ピーク高さ）の大きさが、新たに調製した本発明の粒子のピークの大きさと比較して、遊離非脂質結合SAPLIP及び/又は遊離脂質及び/又は凝集物のピークの大きさを犠牲にして減少したことを意味する。したがって、40%の断片化は、例えば、ピークの大きさ（すなわち、ゲル濾過の溶出プロファイルのピーク高さ）が、貯蔵前のピークの大きさ（100%）と比較して40%減少したことを意味する。

10

20

【0096】

実証実験により、本発明の粒子が、洗浄剤を実質的に含まない水溶液中でも特に安定していることが示されている。洗浄剤を実質的に含まないとは、水溶液が、水溶液の全体積に基づいて0.001%未満（w/v）の洗浄剤を含むことを意味する。

30

【0097】

さらなる観点において、本発明は、脂質結合性ポリペプチド及び脂質を含む粒子の製造方法を提供し、ここで脂質結合性ポリペプチドは、SAPLIP又はその誘導体若しくはそのトランケーティッド体であるものとする。前記方法は、

（a）液性環境中で脂質結合性ポリペプチドを可溶化された脂質に接触させる工程；及び
（b）pH5.0～10.0又は5.0～8.5；特に6.0～8.0、そして最も好ましくは7.0～8.0で粒子を自己集合させる工程
の工程を含む。

【0098】

方法のいくつかの実施態様において、脂質結合性ポリペプチド及び脂質は前記の通りである。

40

【0099】

本発明の方法の1つの実施態様において、脂質結合性ポリペプチドは、工程（a）において水性液体中で可溶化された脂質と接触する。特定の実施態様において、水性液体は、pH5.0～10.0又は5.0～8.5；特に6.0～8.0、そして最も好ましくは7.0～8.0のバッファ溶液である。

【0100】

本発明の方法の特定の実施態様では、脂質は、有機溶媒又は洗浄剤によって可溶化されている。好ましくは、工程（a）で使用される脂質は、洗浄剤で可溶化された状態である。実証実験により、多種多様な洗浄剤が、本発明の方法における使用のために、脂質を可

50

溶化するために使用可能であることが示された。例えば、本発明の方法は、アルキルグルコシド例えば短又は長鎖アルキルマルトシド及びグルコシドの0.01~5.0%、特に0.1~1.0%を含む溶液において可溶化された脂質とともに非常によく機能する。しかし、使用される脂質の種類に応じて、他の適切な洗浄剤を同様に用いることができる。脂質又は脂質混合物を可溶化するための任意の洗浄剤の能力は、凝集物、沈殿、又は相分離を有しない透明な溶液を形成することによって視覚的に容易に検査することができる。

【0101】

従来技術の方法とは対照的に、本発明の方法において、脂質は、上流のリポソーム調製工程を必要とせずに直接用いられることができる。これは、SAPLIPリポタンパク質粒子の製造工程を簡略化するので、有利である。本発明用の方法の工程(a)用の出発物質として使用される脂質の特性である可溶性を考慮して、前記脂質は実質的にリポソームの形態でないと考えられている。

10

【0102】

実証実験により、本発明の脂質結合性ポリペプチドは、精製、貯蔵、又はハンドリング中に、洗浄剤又は他の溶媒を一般的に必要としないことが示された。しかしながら、必要に応じて、また、工程(a)で使用される脂質結合性ポリペプチドは、洗浄剤で可溶化された状態にすることができる。

【0103】

本発明の方法の1つの実施態様では、工程(a)における脂質に対する脂質結合性ポリペプチドモル比は、少なくとも1:1、特に少なくとも1:3、好ましくは少なくとも1:5又は1:10である。

20

【0104】

本発明の方法の工程(b)において、5.0~10.0好ましくは5.0~8.5のpHにより、成分が、ステップ(a)において相互に接触し本発明の粒子内に自己集合することが可能となる。SAPLIPリポタンパク質粒子が、最高の状態で集合する又はサポシンの天然の最適pH4.75に近くする必要がある従来技術に基づく予想に反して、SAPLIPリポタンパク質の粒子が、前記粒子の調製中により中性又は塩基性pHに維持された場合に、簡単かつ信頼性の高い方法によって得ることができることが見出された。驚くべきことに、pH5.0~10でそして可溶化された脂質の存在下において、精製されたサポシン様タンパク質又はその誘導体若しくはトランケーティッド体が、上流のリポソーム調製工程を必要とせずに、安定的なりポタンパク質粒子内に自己集合することが見出された。この単純で信頼性の高い調製方法は、サポシンの天然の最適pH4.75又は脂質の非存在下で粒子の集合を試みた場合、満足する結果を得ることができなかった。

30

【0105】

本発明の方法の工程(b)は、工程(a)において得られた混合物を前記工程(a)において得られた混合物よりも少ない量の洗浄剤を含有する液体で希釈する工程を含むことができる。実証実験により、前記希釈工程は、本発明の粒子の自己集合をさらに誘導及び促進することが示される。この理論に縛られることを望まないが、前記希釈工程が、溶媒又は洗浄剤分子を脂質結合性ポリペプチド及び脂質の疎水性表面から効果的に除去し、それによる成分の疎水性相互作用の強化を介して、本発明の粒子の自己集合工程をトリガーしたと考えられる。

40

【0106】

粒子の自己集合工程(b)は、(a)で調製されたように、正確に同じ組成物中で行うことができる一方で、実証実験により、工程(b)は、好適には、有機溶媒/洗浄剤の除去又は希釈工程を含むことが示されている。工程(b)は、例えば、ゲル濾過工程であることができる。特定の実施態様では、工程(a)で得られた混合物をゲル濾過工程に供し、それによって、ゲル濾過バッファ又は他の溶液は、工程(a)で得られた混合物よりも少ない量の洗浄剤を含む液体となる。

【0107】

本発明の工程(a)及び/又は(b)は、1~95、特に15~80、特に好

50

適には30 ~ 40、及び/又は使用される脂質のゲルから液晶への相転移温度に近い温度で好適に実施される。使用する脂質の相転移温度は、文献中に容易に見付けることができる又は熱量測定により決定することができる。

【0108】

本発明の方法の1つの実施態様によると、工程(b)において又は任意の後続工程(c)において、少なくとも遊離脂質及び/又は遊離脂質結合性ポリペプチドの部分的除去による本発明の粒子の精製が実施される。適切な精製方法は、クロマトグラフィー法、特にサイズ排除クロマトグラフィー、超遠心分離、透析、洗浄剤結合性バイオビーズへの接触、濃縮器の使用、アフィニティークロマトグラフィー、磁気ビーズ、及び/又は結合していない/組み込まれていない脂質及び/又は疎水性化合物を除去するための膜/フィルターである。

10

【0109】

本発明の方法の生成物は、脂質結合性ポリペプチドと脂質成分とを含む粒子である。本発明のこれらの粒子は、本発明のさらなる記載においてSalipro粒子と呼ばれ、そして特定の実施態様において、脂質結合性ポリペプチド、脂質、及び疎水性剤を含むSalipro粒子についての前記の任意の又は全ての特徴を有することができる。

【0110】

本発明の方法はまた、Salipro粒子内に疎水性剤を組み込むために使用されることができ、それによって、脂質結合性ポリペプチド、脂質、及び疎水性剤を含む生成物粒子が得られる。疎水性剤は、本発明の粒子に含まれることができる種々の疎水性分子のための前記の任意の又は全ての特徴を有することができる。

20

【0111】

もし、組み込まれた疎水性剤を有するSalipro粒子を調製する必要があるれば、本発明の方法は、脂質結合性ポリペプチドが、前記粒子に組み込まれるべき疎水性剤を含む液性環境中で、脂質に接触されるという点で修正される。実証実験により、本発明の方法は、疎水性有機化合物例えばクルクミンと単量体又はオリゴマーの膜タンパク質との両方を本発明の粒子に安定的に組み込むことを可能にする。

【0112】

特定の実施態様によれば、工程(a)及び/又は(b)は、好ましくは、20 ~ 80、特に20 ~ 70、特に好適には30 ~ 70、の温度で実施される。工程(a)及び/又は(b)において30 ~ 70の温度はほとんどの化合物のために十分である一方で、実証実験により、特定の疎水性剤については、工程(a)及び/又は(b)における温度を高い温度例えば50 ~ 70の温度範囲に上昇させることにより、本発明の粒子内に組み込まれている疎水性剤の負荷が増加される。本明細書で教示される方法により、当業者は、化合物、脂質、及び使用されるタンパク質の温度安定性、並びに意図された用途のための所望の疎水性剤の負荷に関して最適なインキュベーション温度を決定することができる。

30

【0113】

1つの実施態様では、疎水性剤は、前工程(a)で使用される前に、適した有機溶媒(例えばDMO、メタノール、及び/又はクロロホルム)又は洗浄剤によって可溶化されている。好ましくは、工程(a)で使用される疎水性剤は、洗浄剤で可溶化された状態である。洗浄剤は、脂質を可溶化するために使用される洗浄剤と同じであることもでき又は異なることもできる。

40

【0114】

本発明の1つの実施態様では、脂質を可溶化するための洗浄剤、及び/又は工程(a)において使用される疎水性剤は、本発明の最終の粒子に実質的な量で引き継がれていない(carried over)。特に、本発明の方法により得られる粒子中の洗浄剤の量を、検出不可能となるまで低くすることができる。1つの実施態様では、本発明の粒子は、粒子の重量に基づいて、洗浄剤の任意の実質的な量、特に0.1重量%未満、好ましくは0.01重量%未満、特に好ましくは0.001重量%未満を含まない。粒子中に存在する洗浄剤の

50

量は、例えば質量分析によって決定することができる。

【0115】

もし工程(a)で使用される疎水性剤が、洗浄剤により可溶化状態にあるならば、実証実験により、短～中鎖疎水性尾部を用いた疎水性剤の精製及び/又は可溶化用の洗浄剤を使用することが有利であることが示されている。膜タンパク質が、疎水性剤として組み込まれている場合、これは特に当てはまる。本明細書で用いられる「短鎖疎水性尾部」は、C2～9、例えばn-ノニル- - マルトシド(NM)を意味し；本明細書で用いられる「中鎖疎水性尾部」は、C10～15、例えばn-デシル- - マルトシド(DM)又はn-ドデシル- - マルトシド(DDM)を意味する。1つの実施態様では、疎水性剤の精製及び/又は可溶化用に使用される洗浄剤は、その疎水性尾部に炭素原子2～12個、好ましくは2～10個、そして最も好ましくは2～9個を有する。

10

【0116】

いくつかの実施態様では、工程(a)における疎水性剤に対する脂質結合性ポリペプチドのモル比は、少なくとも1:0.5、好ましくは少なくとも1:2、又は少なくとも1:5、特に好ましくは1:10である。別の実施態様では、工程(a)における疎水性剤に対する脂質結合性ポリペプチドのモル比は、1:0.5～1:10000、特に1:0.5～1:1000又は1:0.5～1:500である。実証実験により、成分中の化学量論と得られる粒子のサイズとが、出発成分の比率を調整することにより適宜に制御可能であることが示されている。

【0117】

20

本発明の粒子に組み込まれるべきほとんどの疎水性剤について、工程(a)における疎水性剤に対する脂質のモル比が、10000:1～1:1000、特に10:1～0.5:1の場合に、最適の結果が達成される。

【0118】

本発明はまた、すなわち、粒子の調製に実際に使用された方法とは関係なく、前記の本発明の方法により得られる粒子にも関する。本発明の方法により得られる粒子は、複数の特徴において、例えば、それらの固有の大きさの柔軟性及びリポタンパク質粒子に組み込まれるべき疎水性剤のそれぞれの大きさに対して適応する能力に関して従来技術の粒子とは異なる。

【0119】

30

本発明はまた、必要とする個体に疎水性剤を送達するための医薬組成物を提供し、前記組成物は本発明の粒子を含み、そして前記疎水性剤は活性成分であり、及び/又は前記疎水性剤に加えて活性成分が存在する。

【0120】

本発明の粒子に加えて、医薬組成物は、任意で薬学的に許容されるビヒクル、担体、又はアジュバントを(さらに)含むことができる。

【0121】

本発明の粒子が医薬組成物中で使用するためのものである場合に、粒子及び医薬組成物の個々の成分は、薬学的に許容可能であるべきである。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容可能な」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などなしでヒトと及び下等動物の組織との接触における使用に適しておりそして合理的な利益/リスク比と釣り合っている成分、化合物又は薬剤を指す。

40

【0122】

さらに別の観点において、本発明は、上記の医薬組成物の治療的有効量によりそれを必要とする個体を治療する方法を提供する。本明細書中で使用される、医薬組成物の「治療的有効量」は、治療される疾患又は状態の重篤度を治療又は軽減するために有効な量である。本明細書で用いられる「個体」という用語は、動物、例えば哺乳動物、そしてより具体的にはヒトを意味する。

【0123】

本発明の医薬組成物は、治療されるべき疾患又は状態の重症度に応じて、経口で、直腸

50

で、非経口で、大槽内で (intracisternally)、腔内で、腹腔内で、局所で (粉末、軟膏、又はドロップによる)、又は頬側で、エアロゾルとして、経口又は経鼻スプレーなどによりヒト及び他の動物に投与することができる。特に、医薬組成物は、経腸、非経口及び/又は局所投与用に製剤化されることができる。それは、カプセル剤、点滴若しくは注射、ブラシ可能な (brushable) 若しくは飲料の組成物として、又はエアロゾルとして投与されることができる。本発明の医薬組成物のいくつかの実施態様において、本発明の粒子は、固体の形態で、分散物として、又は溶液中に存在する。

【0124】

本発明の粒子はまた、診断及び/又は化粧品用途に有用である。例えば、前記標識、マーカ、又はインジケータとして検出可能な物質を含む粒子は、診断薬として使用することができ、診断目的のために適用されることができる。ラベル、マーカ、又はインジケータはそれら自体が、疎水性剤の中に含まれるか又は疎水性剤に含まれることができるが、それらは粒子の脂質結合性ポリペプチド又は脂質成分にも結合することができる。本発明の診断及び生命科学研究ツールとしては、例えば、標識され組み込まれた疎水性タンパク質の粒子、標識された脂質結合性ポリペプチド、標識された脂質、組み込まれたフルオロフォア又は造影剤 (例えばMRイメージング用) を含む。標識は、例えば、蛍光標識されることができる。

10

【0125】

さらに、本発明の粒子は、薬剤開発、薬物スクリーニング、及び/又は膜タンパク質研究用のツールとして有用である。

20

【0126】

例えば、膜タンパク質薬物標的、例えば細胞表面受容体又はイオンチャネルは、本発明の粒子に組み込まれ、それによって可溶化されることができる。前記粒子は、次に、そのネイティブな脂質二重層環境における薬剤標的膜タンパク質の活性を研究するためにアッセイに使用されることができるか、又は新しい薬剤を同定するための薬剤スクリーニングにおいて使用されることができる。

【0127】

さらに、本発明の粒子はまた、用途例えば表面プラズモン共鳴 (SPR) 又はバイオセンサー用途のために有用にするために、固体支持体に固定されることができる。

【0128】

30

本発明の粒子は、ネイティブ様二重層微小環境において不溶性の膜タンパク質を別の方法で水溶液に可溶性にするために一般に有用である。したがって、本発明は、膜タンパク質の研究に多種多様な新たな用途を提供する。例えば、本発明の粒子は、方法例えば核磁気共鳴 (NMR)、X線結晶学、電子顕微鏡 (EM)、質量分析法、等温滴定熱量測定 (ITC)、差動光散乱、小角X線散乱 (SAXS) 等による、本発明の粒子に組み込まれた膜タンパク質の研究を可能にする。

【0129】

別の観点では、本発明の粒子は、ワクチン製剤として、その担体として、又はその薬剤送達ビヒクルとして有用である。ワクチン接種において特に強力であることができる多くの病原体抗原が、病原体の表面に露出している及び/又は細胞外膜に含まれる、すなわち病原体の脂質、他の疎水性生体分子、又は膜タンパク質に由来する。例えば、インフルエンザウイルスの主要な抗原は、内在性膜タンパク質のヘマグルチニンに存在している。前記の病原性の疎水性生体分子は、本発明の粒子とともに、その後ワクチン製剤において抗原提示送達ビヒクルとして使用可能な粒子に効果的に組み込まれることができる。これらの線に沿って、本発明の粒子はまた、適切な宿主動物例えばウサギ、ヤギ又はラマにおいて疎水性剤又は生体分子に対する抗体を生成するための抗原提示送達ビヒクルとしての機能を果たすために有用である。

40

【0130】

また、本発明の粒子は、化粧品に使用されることができ、特に、本発明の粒子は、皮膚栄養 (skin nourishing) 及び/又は育成剤 (nurturing agents) 例えばビタミン及び/

50

又は酸化防止剤を含む。

【図面の簡単な説明】

【0131】

本発明のさらなる特徴及び利点は、添付の図面における非限定的な例により示される、以下のその実施態様のいくつかの詳細な説明から明らかになるであろう：

【図1】先行技術（例えば前記のEP1596828B1）のナノディスク粒子を含有するアポリタンパク質の形状及び分子組織の概略図である。

【図2】疎水性有機化合物を含む本発明のSalipro粒子とそれらの調製の概略図である；側面図としてa）がそして上面図としてb）が描写される。

【図3】膜タンパク質を含む本発明のSalipro粒子とそれらの調製の概略図である；側面図としてa）がそして上面図としてb）が描写される。

10

【図4】疎水性有機化合物及び膜タンパク質を含む本発明のSalipro粒子とそれらの調製の概略図である；側面図としてa）がそして上面図としてb）が描写される。

【図5】オリゴマー膜タンパク質を含む本発明のSalipro粒子の概略図である；側面図としてa）がそして上面図としてb）が描写される。

【図6】標的成分例えば抗体と疎水性有機化合物とを含む本発明のSalipro粒子とそれらの調製の概略図である。

【図7】本発明のSalipro粒子及びそれらの調製の概略図である；側面図としてa）がそして上面図としてb）が描写される。

【図8】実施例2に記載の本発明のSalipro粒子（「サポシン+脂質 pH7.5（Saposin+Lipids pH 7.5）」）のゲル濾過溶出プロファイル及び比較実験（「サポシン+脂質 pH4.75（Saposin+Lipids pH 4.75）」；「サポシン pH7.5（Saposin pH 7.5）」）である。

20

【図9】実施例3に記載の本発明のSalipro粒子（「サポシン+LDAO+脂質 pH7.5」（Saposin+LDAO+Lipids pH 7.5）」）のゲル濾過溶出プロファイル及び比較実験（「サポシン+LDAO pH7.5（Saposin+LDAO pH 7.5）」；「サポシン+LDAO pH4.75（Saposin+LDAO pH 4.75）」；「サポシン+LDAO+脂質 pH4.75（Saposin+LDAO+Lipids pH 4.75）」）である。

【図10】実施例4に記載の様々な異なる脂質を使用した本発明のSalipro粒子のゲル濾過溶出プロファイルである。

30

【図11】実施例5に記載の膜タンパク質YbgHを含む本発明のSalipro粒子（「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質YbgH pH7.5（Saposin+Detergent+Lipids+MemProt YbgH pH 7.5）」）のゲル濾過溶出プロファイル及び比較実験（「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質YbgH pH4.75（Saposin+Detergent+Lipids+MemProt YbgH pH 4.75）」；「サポシン+洗浄剤+膜タンパク質YbgH pH7.5（Saposin+Detergent+MemProt YbgH pH 7.5）」；「サポシン+洗浄剤+膜タンパク質YbgH pH4.75（Saposin+Detergent+MemProt YbgH pH 4.75）」）である。

【図12】実施例6に記載の本発明のSalipro粒子（「サポシン+洗浄剤+脂質（Saposin+Detergent+Lipids）」）及び膜タンパク質MATEを含むSalipro粒子（「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質MATE（Saposin+Detergent+Lipids+MemProt MATE）」）のゲル濾過溶出プロファイル及び比較実験（「サポシン（Saposin）」；「サポシン+洗浄剤+膜タンパク質MATE（Saposin+Detergent+MemProt MATE）」）である。

40

【図13】実施例7に記載の本発明のSalipro粒子（「サポシン+脂質（Saposin+Lipids）」）又はホモ四量体膜タンパク質POT1を含むSalipro粒子（「サポシン+脂質+膜タンパク質POT1（Saposin+Lipids+MemProt POT1）」）のゲル濾過溶出プロファイルである。

【図14】実施例8に記載の本発明のSalipro粒子（「サポシン+脂質（Saposin+Lipids）」）又はヒト膜タンパク質シナプトフィジン（Synaptophysin）を含むSalipro粒子（「サポシン+脂質+膜タンパク質SYP（Saposin+Lipids+MemProt SYP）」）

50

）のゲル濾過溶出プロファイルである。

【図15】実施例9に記載の本発明のSalipro粒子（「脂質のみのSalipro（lipid-only Salipro）」）又は親油性薬剤クルクミンを含むSalipro粒子（「Salipro-クルクミン（Salipro-Curcumin）」）のゲル濾過溶出プロファイルである。

【図16】実施例10に記載の様々な量の脂質を用いて調製された本発明のSalipro粒子（「脂質のみのSalipro（lipid-only Salipro）」）のゲル濾過溶出プロファイルである。

【図17】実施例11に記載の本発明のSalipro粒子（「脂質のみのSalipro（lipid-only Salipro）」）及びPOT1又はシナプトフィジンを含むSalipro粒子（「サポシン-POT1（Saposin-POT1）」；「サポシン-SYP（Saposin-SYP）」）のゲル濾過溶出プロファイルである。

【図18】実施例12に記載のネガティブ染色電子顕微鏡を用いたSalipro-POT1粒子の単一粒子解析を示し、a)は電子顕微鏡写真、そしてb)はSalipro-POT1粒子のクラス平均である。差し込み図c)及びd)は、それぞれ上面図及び側面図におけるSalipro-POT1粒子の3D再構成で表現された表面を示す。

【図19】実施例13に記載の様々な熱処理に供された本発明のSalipro粒子のゲル濾過溶出プロファイルである。

【0132】

図1は、先行技術（例えば前記のEP1596828B1）のナノディスク粒子10を含有するアポリポタンパク質A-1の形状及び分子組織を、概略的に示している。先行技術の粒子10は、脂質3により形成された脂質二重層をダブルベルト状の様式で強固に取り囲むアポリポタンパク質骨格タンパク質11を含むディスクの形状である。前記粒子の内部は、前記脂質二重層中の脂質3の疎水性領域により形成されている。粒子10のストークス直径は、10nmの範囲内である。

【0133】

図2は、a)側面図及びb)上面図で示された、疎水性有機化合物4を含む本発明のSalipro粒子1の調製並びに形状及び分子組織を概略的に示している。

【0134】

本発明の粒子1は、精製された脂質結合性ポリペプチド2と脂質3及び組み込まれるべき疎水性有機化合物4とを混合することにより調製され、そしてpH約5.0～約10.0で粒子1の自己集合が可能となる。脂質結合性ポリペプチド2は、サポシン様タンパク質（SAPLIP）でありそして円柱状で示される両親媒性ヘリックス4個を含む。脂質3は、親水性頭部基（円で示される）と疎水性尾部例えば脂肪アシル鎖（ジグザグの線として示されている）とを含む両親媒性である。以下の図3～6にもあるように、粒子1及びその脂質3とSAPLIP2構成要素との一般的構造の特徴の詳細な説明は、図7に示される、以下の基本的な脂質のみのSalipro粒子の記載中に見出すことができる。

【0135】

粒子1では、疎水性有機化合物4は脂質3により形成される脂質二重層の疎水性部分に埋め込まれている。疎水性有機化合物4は、例えば、生物学的活性剤、薬剤、薬剤の活性成分、化粧品生成物の活性成分、植物保護生成物活性成分、栄養及び/又は栄養補助食品、診断用プローブ、造影剤、標識、及び/又はインジケータであることができる。

【0136】

図3は、a)側面図及びb)上面図で示された、内在性単量体膜タンパク質5を含む、本発明によるSalipro粒子1の調製並びに形状及び分子組織を概略的に示している。図3及び4に示されているように、膜タンパク質5は、単量体の形態の膜貫通タンパク質であることができる。しかしながら、それはまた、図5に示されるようにオリゴマーの状態であるか、又は末梢膜タンパク質、脂質結合状態のアンフィトロピックタンパク質、脂質アンカータンパク質、又は融合された疎水性及び/又は膜貫通ドメインを有するキメラタンパク質であることができ、これらの全ては単量体又はオリゴマーの状態であること

ができる。

【0137】

本発明の粒子1は、精製されたS A P L I P 2と脂質3及び組み込まれるべき膜タンパク質5とを混合することにより調製され、そしてpH約5.0～約10.0で粒子1の自己集合が可能となる。膜タンパク質5は、洗浄剤分子6及び/又は脂質12に結合することができる。洗浄剤分子6は、膜タンパク質5の精製及び/又は可溶化からもたらされることができる。膜タンパク質5に結合された脂質12は、精製前の膜タンパク質ネイティブの脂質環境からの持ち越し(carry-over)であることができる。粒子1においては、膜タンパク質5が脂質二重層の疎水性部分に埋め込まれ、そしてその天然の膜結合状態と同様の構造を採用している。粒子1は、場合により、脂質12及び/又は精製された膜タンパク質5由来の洗浄剤分子6を含むことができる。特定の実施態様では、粒子1は、洗浄剤分子6の実質的な量、特に、前記粒子の重量に基づいた0.1重量%より少ない洗浄剤分子を含まない。

10

【0138】

本発明の粒子1の大きさは柔軟である。略図2～7は、縮尺通りで描かれていない。粒子1に組み込まれた膜タンパク質5の大きさに応じて、図3に示される粒子は、図7に示される脂質のみの粒子よりも、又は図2に示すような低分子量有機疎水性化合物4を含む粒子よりも実質的に大きくなることができる。一般的に、粒子の大きさの増加は、2より多くすることができる粒子当たりのS A P L I P分子2の数によっても反映される。本発明の粒子は、例えば、S A P L I P分子2を2～20個、特に2～10個含むことができる。粒子1の大きさはまた、その調製の工程(a)において添加される脂質3の量により影響されることができる。

20

【0139】

図4は、a)側面図及びb)上面図で示された、内在性単量体膜タンパク質5及び疎水性有機化合物4を含む、本発明によるS a l i p r o粒子1の調製並びに形状及び分子組織を概略的に示している。本発明の粒子1は、精製されたS A P L I P 2と脂質3並びに組み込まれるべき膜タンパク質5及び疎水性化合物4とを混合することにより調製され、そしてpH約5.0～約10.0で粒子1の自己集合が可能となる。

【0140】

図5は、a)側面図として及びb)上面図として示された、オリゴマー膜タンパク質7を含む、本発明のS a l i p r o粒子1の概略図である。前記粒子1の大きさは柔軟であり、そしてその中に組み込まれた疎水性剤7の大きさに適応する。図5に示す実施態様では、粒子1は、頭尾の様式で配列された(arranged in a head-to-tail fashion)、粒子当たり3個のS A P L I P分子2を含む。S A P L I P分子の3個を含む粒子の流体力学半径は、組み込まれる疎水性剤に応じて5～20nmの範囲である。

30

【0141】

図6は、標的成分例えば抗体8及び疎水性有機化合物4を含む、S a l i p r o粒子1の調製並びに形状及び分子組織を概略的に示している。前記の標的成分8は、図6に示されるような脂質アンカータンパク質の形態であるか又は疎水性若しくは膜貫通ドメインが融合されたキメラタンパク質の形態であることができる。標的成分は、脂質結合性ポリペプチド2、脂質3の1つ、及び/又は疎水性化合物4のいずれかに結合される又は含まれることができる。

40

【0142】

図7は、本発明によるS a l i p r o粒子の調製並びに形状及び分子組織を概略的に示している。本発明の粒子1は、精製されたS A P L I P 2と脂質3とを混合することにより調製され、そしてpH約5.0～約10.0で粒子1の自己集合が可能となる。脂質3は、親水性頭部基(円で示される)と疎水性尾部例えば脂肪アシル鎖(ジグザグの線として示されている)を含む両親媒性である。「閉じた」アポ状態においては(図7a左側参照)、S A P L I P 2の構造は、本発明の粒子1中のその脂質結合の「開いた」構造(図7a右側参照)と比較して異なる。閉じた状態では、S A P L I P 2は、4ヘリックスバ

50

ンドルの内側に面しているその両親媒性ヘリックスの疎水性部分を有する4ヘリックスバンドル型構造を採用している。粒子1の「開いた」脂質結合構造においては、S A P L I P 2は、脂質二重層中で脂質3の疎水性領域に接触する両親媒性ヘリックスの疎水性部分を有するV字型の又はブーメラン型の構造（図7b及び図7a右側参照）を採用する。

【0143】

図7aは側面図としての粒子1とその調製を示し、図7bは上面図である。本発明の粒子1はおおよそディスク状であり、S A P L I P分子2の2つの両親媒性ヘリックスにより取り囲まれた方形の脂質二重層に対して平坦で、ディスク状で略円形（roughly circular）である。脂質3は、粒子1の内部で、個々の大きさのディスク状脂質二重層構造内に集合する。S A P L I P 2は粒子1内でディスク状二重層の境界を定義し、その内部は疎水性であり、すなわち脂質の脂肪アシル鎖に含まれそして親水性又は水性コアを欠いている。粒子1は、粒子1の二重層コア内の脂質3の疎水性相互作用と脂質3及び粒子の内部に向いているS A P L I P 2の両親媒性ヘリックスの疎水性部分の相互作用とにより、主に結合している。S A P L I P 2は頭尾の様式で配列しており、そして粒子1内におけるS A P L I P 2間の分子内でのタンパク質-タンパク質の接触は実質的には存在しない。その最小の形態において、粒子1は、S A P L I P 2の2分子と周囲の脂質分子3の少なくとも10分子とを含有すると考えられる。しかしながら、本発明の粒子1は、大きさが柔軟である。その調製に使用される成分の大きさ及びモル比に応じて、それは、S A P L I P分子2の複数すなわち2分子以上とより多くの脂質3と場合により更なる成分とを収容することができる。例えば、粒子は、S A P L I P分子2の2～20、特に2～10分子を含有することができる。

【0144】

その脂質のみの形式でのS a l i p r o粒子1の最大の高さは、脂質二重層の高さに対応しており、約5nmである。粒子1は、上面（図7bにおいて見られる）、底面、及び周側面（circumferential side surface）を有しており、上面及び底面の直径（長径）は、周側面の高さよりも大きい。

【実施例】

【0145】

以下の実施例は、特定の実施態様及び図面を参照して、本発明をより詳細に、具体的に説明するのに有用であるが、本開示を限定することを意図しない。

【0146】

I 略語

以下の略語が使用される：

P O T 1：原核生物膜タンパク質、ペプチド輸送体

P O T 2：原核生物膜タンパク質、ペプチド輸送体

P O T 3：原核生物膜タンパク質、M A T E輸送体

S Y P：ヒト膜タンパク質

Y b G H：原核生物膜タンパク質（大腸菌由来）、ペプチド輸送体（D t p Dとしても公知である）

D D M：ドデシル - D - マルトシド

L D A O：N, N - ジメチルドデシルアミン - N - オキシド；

P S：ホスファチジルセリン

P O P C：2 - オレオイル - 1 - パルイトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン

P O P G：2 - オレオイル - 1 - パルイトイル - s n - グリセロ - 3 - グリセロール

T E V：タバコエッチ病ウイルス

T C E P：トリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン

R T：室温

サポシンA（S a p o s i n A）：サポシンA（ヒト）1.2mg/mL、20mMヘ
ペス（Hepes）（pH7.5）、150mM NaCl

脳脂質溶液 (Brain-lipid-solution) : 脳脂質 5 mg / mL、50 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM

脳脂質 : Sigma - Aldrich、ウシ脳由来脳抽出物、I 型、Folch 画分 I (Folch Fraction I) ; B - 1502

GF - バッファ (pH 7.5) : 50 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl

GF - バッファ (pH 4.75) : 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.75)、150 mM NaCl

【0147】

II サポシン A の精製

《実施例 1》

精製サポシン A は以下のように調製された。サポシン A タンパク質発現を pNIC - Bsa4 プラスミド内に挿入されたヒトサポシン A (SEQ ID NO: 1) コード領域を有するベクターを使用して実行し、大腸菌 Rosetta gami - 2 (DE3) (Novagen) 系統で形質転換しそして発現させた。細胞をテトラサイクリン、クロラフェニコル、及びカナマイシンを添加した TB 培地中で 37 °C で増殖させ、0.7 mM IPTG を用いて誘導した。誘導の 3 時間後に、細胞を 12000 X g で 15 分間の遠心分離により収集した。上澄を廃棄し、細胞ペレットを溶解バッファ (20 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl、20 mM イミダゾール) を用いて再懸濁し、超音波を用いて崩壊させた。溶解物を 26000 X g で 30 分間の遠心分離に供し、上澄を 85 °C で 10 分間加熱し、続いて 26000 X g で 30 分間の追加の遠心分離工程を行った。準備としての (Preparative) IMAC 精製を、SephacroseTM 6 Fast Flow 培地の転倒型回転 (end-over-end rotation) 60 分間による上清のバッチ吸着によって行った。サポシン A の IMAC 樹脂への結合の後に、クロマトグラフィー培地を 10 mM (i.d.) オープン重力流カラム (open gravity flow column) に充填し、未結合タンパク質を溶解バッファ 15 ベッドボリュームで洗浄することにより除去した。樹脂を洗浄バッファ WB2 (20 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl、40 mM イミダゾール) の 15 ベッドボリュームで洗浄した。サポシン A を、溶出バッファ EB (20 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl、400 mM イミダゾール) の 15 ベッドボリュームを添加することにより溶出した。溶出液を組換え TEV プロテアーゼを添加したゲル濾過バッファ GF (pH 7.5) (20 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl) に対して一晩透析した。非開裂 His タグ (un-cleavable His-tag) を含む TEV プロテアーゼを IMAC 樹脂 2 mL に通過させることによって溶出液から除去した。切断された標的タンパク質を、遠心濾過ユニットを用いて、体積 5 mL まで濃縮し、そして AKTA explorerTM 10 クロマトグラフィーシステムを使用した HiLoad SuperdexTM 200 16/60 GL カラムにロードした (両方とも GE Healthcare)。ピーク画分をプールし、1.2 mg / mL のタンパク質に濃縮した。タンパク質サンプルを液体窒素中で急速冷凍し - 80 °C で保存した。

【0148】

III Salipro 粒子の生成

《実施例 2》

Salipro 粒子 (図 8 において「サポシン + 脂質 pH 7.5」と示されている) の再構成のために、精製サポシン A (1.2 mg / mL、20 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 10 µL を 1% (w/v) LDAO - 洗浄剤溶液 1.6 µL 及び脳脂質溶液 (脳脂質 5 mg / mL、Sigma - Aldrich; 50 mM ヘペス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM) 4 µL と混合し、37 °C で 10 分間インキュベートした。次に、GF - バッファ (pH 7.5) 49.4 µL を混合物に添加し、そして体積 65 µL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を Autosampler A - 905 を備えた AKTA microTM クロマトグラフィーシステムを使用した SuperdexTM 200 5/150 GL 分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し (両方とも GE Healthcare)

、前記 Autosampler A - 905 は、サンプルを含有しているタンパク質 25 μL を自動的に注入する。分析ゲル濾過を GF - バッファ (pH 7.5) 中において流速 0.2 mL / 分で 4 で行った。

【0149】

《比較例 2》

GF - バッファ (pH 7.5) の代わりに GF - バッファ (pH 4.75) (図 8 において「サポシン + 脂質 pH 4.75」と示されている) を使用した以外は実施例 2 を繰り返して実施した。

【0150】

ネガティブコントロール (図 8 において「サポシン pH 7.5」と示されている) として、精製サポシン A 10 μL を 37 で 10 分間インキュベートした。次に、GF バッファ (pH 7.5) 55 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を前記のゲル濾過工程に供した。

10

【0151】

実施例 2 におけるような pH 7.5 での脳脂質とのサポシン A のインキュベーションは、より高い分子量の安定した脂質 - タンパク質粒子 (図 8 の「サポシン + 脂質 pH 7.5」参照) に関するピークシフトをもたらした。対照的に、比較例 2 (図 8 の「サポシン + 脂質 pH 4.75」参照) におけるような pH 4.75 での脳脂質とのインキュベーション後には、安定した脂質 - タンパク質粒子は観察されなかった。

【0152】

20

《実施例 3》

この実験の目的は、本発明による方法のための脂質の存在の重要性を評価することである。

【0153】

精製サポシン A (1.2 mg / mL、20 mM ヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 10 μL を 1% (w / v) LDAO - 洗浄剤溶液 1.6 μL 及び脳脂質溶液 (脳脂質 5 mg / mL、Sigma - Aldrich; 50 mM ヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w / v) DDM) 4 μL と混合し、37 で 10 分間インキュベートした。次に、GF - バッファ (pH 7.5) 49.4 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を GF - バッファ (pH 7.5) を用いて上記のゲル濾過工程に供した (図 9 における「サポシン + LDAO + 脂質 pH 7.5」参照)。

30

【0154】

《比較例 3》

精製サポシン A 10 μL を LDAO - 洗浄剤溶液 (1%) 1.6 μL 及び脳脂質溶液 4 μL と混合し、37 で 10 分間インキュベートした。次に、GF - バッファ (pH 4.75) 49.4 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を GF - バッファ (4.75) を用いて上記のゲル濾過工程に供した (図 9 における「サポシン + LDAO + 脂質 pH 4.75」参照)。

40

【0155】

本発明の方法 (図 9 の「サポシン + LDAO pH 7.5」を用いて安定的なサポシン A - 洗浄剤を生成するために、精製サポシン A (1.2 mg / mL、20 mM ヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 15 μL を 1% (w / v) LDAO - 洗浄剤溶液 1.6 μL と混合し、37 で 10 分間インキュベートした。次に、GF - バッファ (pH 7.5) 48.4 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を Autosampler A - 905 を備えた AKTAmicroTM クロマトグラフィーシステムを使用した SuperdexTM 200 5 / 150 GL 分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し (両方とも GE Healthcare)、前記 Autosampler A - 905 は、サンプルを含有し

50

ているタンパク質 25 μL を自動的に注入する。分析ゲル濾過を GF - バッファ (pH 7.5) 中において流速 0.2 mL / 分で 4 で行った。

【0156】

GF - バッファ (pH 7.5) の代わりに GF - バッファ (pH 4.75) (図 9 において「サポシン + LDAO pH 4.75」と示されている) を使用した以外は、再度実施例 2 に記載されたように実験を実施した。

【0157】

図 9 に示される結果により、本発明の Salipro 粒子の調製方法が脂質の存在を必要とすること (実施例 3 及び図 9 の「サポシン + LDAO + 脂質 pH 7.5」、並びに比較例 3 及び図 9 の「サポシン + LDAO pH 7.5」参照)、そして比較例 3 にあるように (図 9 の「サポシン + LDAO + 脂質 pH 7.5」及び「サポシン + LDAO + 脂質 pH 4.75」参照)、リソソームの pH が 4.75 では安定的な粒子を得ることができないことが実証された。洗浄剤の存在は、安定的な Salipro 粒子の形成を妨害しない一方で、洗浄剤単独の存在下においては、本発明の粒子を得ることは不可能であった (実施例 3 及び図 9 の「サポシン + LDAO + 脂質 pH 7.5」、並びに比較例 3 及び「サポシン + LDAO pH 7.5」参照)。

【0158】

《実施例 4》

POPG、POPC、脳脂質、及び PS (Sigma - Aldrich 又は Avanti Polar Lipids から、全て粉末の形態) を 1% (w/v) DDM を添加した GF バッファ (pH 7.5) に 20 mg / mL で溶解し、中程度のボルテックス撹拌をしながら 37 で一時間インキュベートしそして -80 で貯蔵した。使用のために、脂質溶液を 0.03% (w/v) DDM を添加した GF バッファ (pH 7.5) に 5 mg / mL に希釈し、5 mg / mL 脂質、50 mM ヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM の最終組成物が得られた。

【0159】

精製サポシン A (1.2 mg / mL、20 mM ヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 10 μL を各々の脂質溶液 (PG、PC、脳脂質、PS) 5 μL と混合し、そして 37 で 10 分間インキュベートした。次に、0.03% (w/v) DDM を添加した GF - バッファ (pH 7.5) 45 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を Autosampler A - 905 を備えた AKTAmicroTM クロマトグラフィーシステムを使用した SuperdexTM 200 5 / 150 GL 分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し (両方とも GE Healthcare)、前記 Autosampler A - 905 は、サンプルを含有しているタンパク質 25 μL を自動的に注入する。分析ゲル濾過を GF - バッファ (pH 7.5) 中において流速 0.2 mL / 分で 4 で行った (図 10 の「サポシン + PG」、「サポシン + PC」、「サポシン + 脳脂質」、及び「サポシン + PS」参照)。

【0160】

ネガティブコントロールとして、精製サポシン A 10 μL を 37 で 10 分間インキュベートした。次に、GF バッファ (pH 7.5) 55 μL を混合物に添加し、そして体積 65 μL の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を前記のゲル濾過工程に供した (図 10 の「サポシン」参照)。

【0161】

図 10 に示される結果により、本発明の Salipro 粒子の調製方法が様々な異なる脂質とともに機能することが実証された。注目すべきは、Salipro の粒子の大きさは可変であり、例えば、粒子の調製に使用される脂質により影響される可能性があることである (図 10 参照)。

【0162】

IV タンパク質性疎水性剤を含有する Salipro 粒子

疎水性生体分子用担体としてのS a l i p r o粒子の能力を実証するために、膜タンパク質を上記のアプローチを用いて、すなわち生理学的p Hにおいて生成サポシンAと脂質及び組み込まれるべき膜タンパク質とに混合して続いてゲル濾過することにより、本発明のS a l i p r oナノ粒子中に組み込んだ。

【0163】

《実施例5》

細菌の膜タンパク質Y b g Hを含むS a l i p r o粒子(S a l i p r o - Y b g H、図11において「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質Y b g H p H 7.5」と示されている)の再構成のために、精製サポシンA(1.2mg/mL、20mMヘベス(p H 7.5)、150mM NaCl)10μLを1%(w/v)LDAO-洗浄剤溶液1.6μL及び脳脂質溶液(脳脂質5mg/mL、Sigma-Aldrich; 50mMヘベス(p H 7.5)、150mM NaCl、0.28%(w/v)DDM)4μLと精製膜タンパク質Y b g H(10mg/mL、20mMヘベス(p H 7.5)、150mM NaCl、5%グリセロール、0.03%(w/v)DDM、0.5mM TCEP)2.6μLとに混合し、37℃で10分間インキュベートした。次に、GF-バッファ(p H 7.5)46.8μLを混合物に添加し、そして体積65μLの最終生成物を得た。室温での10分間のインキュベーション後、混合物をAutosampler A-905を備えたAKTAmicroTMクロマトグラフィーシステムを使用したSuperdexTM 200 5/150 GL分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し(両方ともGE Healthcare)、前記Autosampler A-905は、サンプルを含有しているタンパク質25μLを自動的に注入する。分析ゲル濾過をGF-バッファ(7.5)中において流速0.2mL/分で4℃で行った。

【0164】

《比較例5》

GF-バッファ(p H 7.5)の代わりにGF-バッファ(p H 4.75)(図11における「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質Y b g H p H 4.75」参照)を使用した以外は実施例5を繰り返して実施した。

【0165】

加えて、精製サポシンA10μLを1%(w/v)LDAO-洗浄剤溶液1.6μL及び精製膜タンパク質Y b g H(10mg/mL、20mMヘベス(p H 7.5)、150mM NaCl、5%グリセロール、0.03%(w/v)DDM、0.5mM TCEP)2.6μLと混合し、37℃で10分間インキュベートした。次に、GF-バッファ(p H 7.5)50.8μLを混合物に添加し、そして体積65μLの最終生成物を得た。室温での10分間のインキュベーション後、混合物を上記のゲル濾過工程に供した(図11における「サポシン+洗浄剤+膜タンパク質Y b g H p H 7.5」参照)。

【0166】

最終的に、精製サポシンA10μLを1%(w/v)LDAO-洗浄剤溶液1.6μL及び精製膜タンパク質Y b g H(10mg/mL、20mMヘベス(p H 7.5)、150mM NaCl、5%グリセロール、0.03%(w/v)DDM、0.5mM TCEP)2.6μLと混合し、37℃で10分間インキュベートした。次にGF-バッファ、(p H 4.75)50.8μLを混合物に添加し、そして体積65μLの最終生成物を得た。室温での10分間のインキュベーション後、混合物をGF-バッファ(p H 4.75)を用いて上記のゲル濾過工程に供した(図11における「サポシン+洗浄剤+膜タンパク質Y b g H p H 4.75」参照)。

【0167】

図11に示される結果により、本発明によるS a l i p r o粒子の調製方法が前記粒子内への膜タンパク質のさらなる組み込みを可能にすることが実証された(図5参照)。S a l i p r o - Y b g Hの溶出プロファイル(図11における「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質Y b g H p H 7.5」参照)は、2つの主要なピークを示しており、溶出体積1.5mLの第一ピークはS a l i p r o粒子に組み込まれた膜タンパク質に該当

し、以前に観察されているものと同じ体積に溶出している溶出体積 1.8 mL の第二ピークは脂質のみの S a l i p r o 粒子に該当する (図 10 における「脂質のみの S a l i p r o 粒子」参照) 。

【 0 1 6 8 】

さらに、疎水性剤を含む本発明の S a l i p r o 粒子の調製方法が脂質の存在を必要とすること (実施例 5 及び図 11 の「サポシン + 洗浄剤 + 脂質 + 膜タンパク質 Y b g H p H 7.5」、並びに比較例 5 及び図 11 の「サポシン + 洗浄剤 + 膜タンパク質 Y b g H p H 7.5」参照)、そしてリソソームの p H (4.75) では安定的な粒子を得ることができないこともまた実証された (比較例 5 及び図 11 の「サポシン + 洗浄剤 + 脂質 + 膜タンパク質 Y b g H p H 4.75」参照)。脂質の非存在下においては (比較例 5 及び図 11 の「サポシン + 洗浄剤 + 膜タンパク質 Y b g H p H 7.5」参照)、精製サポシン A に該当する溶出プロファイルは上昇的ショルダー (ascending shoulder) を示し、後者はおそらく Y b g H 単独により形成された。

10

【 0 1 6 9 】

《 実施例 6 》

異なる原核生物膜タンパク質、M A T E 輸送体を含む S a l i p r o 粒子を調製した (S a l i p r o - M A T E、図 12 の「サポシン + 洗浄剤 + 脂質 + 膜タンパク質 M A T E」参照)。

【 0 1 7 0 】

精製サポシン A (1.2 mg / mL、20 mM ヘ pes (p H 7.5)、150 mM N a C L) 10 μ L を 1 % (w / v) L D A O - 洗浄剤溶液 2 μ L、脳脂質溶液 (脳脂質 5 mg / mL、Sigma - A l d r i c h ; 50 mM ヘ pes (p H 7.5)、150 mM N a C L、0.28 % (w / v) D D M) 5 μ L、及び精製膜タンパク質 M A T E (9 mg / mL、20 mM ヘ pes (p H 7.5)、150 mM N a C L、5 % グリセロール、0.01 % (w / v) D M N G、0.5 mM T C E P) 7 μ L とに混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。次に、G F - バッファ (p H 7.5) 41 μ L を混合物に添加し、そして体積 65 μ L の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を A u t o s a m p l e r A - 905 を備えた A K T A m i c r o ^{T M} クロマトグラフィーシステムを使用した S u p e r d e x ^{T M} 200 5 / 150 G L 分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し (両方とも G E H e a l t h c a r e)、前記 A u t o s a m p l e r A - 905 は、サンプルを含有しているタンパク質 25 μ L を自動的に注入する。分析ゲル濾過を G F - バッファ (7.5) 中において流速 0.2 mL / 分で 4 $^{\circ}$ C で行った (図 12 の「サポシン + 洗浄剤 + 膜タンパク質 M A T E」参照)。

20

30

【 0 1 7 1 】

《 比較例 6 》

精製サポシン A 10 μ L を 1 % (w / v) D D M - 洗浄剤溶液 2 μ L 及び精製膜タンパク質 M A T E (9 mg / mL、20 mM ヘ pes (p H 7.5)、150 mM N a C L、5 % グリセロール、0.01 % D M N G、0.5 mM T C E P) 7 μ L と混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。次に、G F - バッファ (p H 7.5) 46 μ L を混合物に添加し、そして体積 65 μ L の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を上記のゲル濾過工程に供した (図 12 における「サポシン + 洗浄剤 + 膜タンパク質 M A T E」参照)。

40

【 0 1 7 2 】

脂質のみの S a l i p r o 粒子のコントロールのように、精製サポシン A 10 μ L を 1 % (w / v) D D M 2 μ L 及び脳脂質溶液 5 μ L と混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。次に、G F - バッファ (p H 7.5) 48 μ L を混合物に添加し、そして体積 65 μ L の最終生成物を得た。室温での 10 分間のインキュベーション後、混合物を上記のゲル濾過工程に供した (図 12 における「サポシン + 洗浄剤 + 脂質」参照)。

【 0 1 7 3 】

ネガティブコントロールとして、精製サポシン A 10 μ L を 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュ

50

ベートした。次に、GFバッファ(pH 7.5) 55 µLを混合物に添加し、そして体積65 µLの最終生成物を得た。室温での10分間のインキュベーション後、混合物を前記のゲル濾過工程に供した(図12の「サポシン」参照)。

【0174】

図12に示される結果により、原核生物膜輸送体MATEは、以下の本発明による方法により容易にSalipro粒子内へ組み込まれることが実証された。Salipro-MATEの溶出プロファイル((実施例6及び図12の「サポシン+洗浄剤+脂質+膜タンパク質MATE」参照))は、溶出体積1.5 mLに主要なピークの1つを示しており、これはSalipro粒子に組み込まれた膜タンパク質に該当し、そして以前に観察されているものと同じ体積に溶出している、分子量がより小さくより低い溶出体積1.8 mLのピークは脂質のみのSalipro粒子に該当する(脂質のみのSalipro粒子コントロール「サポシン+洗浄剤+脂質」参照、そして図10参照)。

10

【0175】

《実施例7》

異なる原核生物膜タンパク質、S. oenidensisペプチドPOT1を含むSalipro粒子を調製した(Salipro-POT1、図13の「サポシン+脂質+膜タンパク質POT1」参照)。

【0176】

脳脂質溶液(脳脂質5 mg/mL、Sigma-Aldrich; 50 mMヘベス(pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM) 230 µLを37 °Cで10分間インキュベートし、精製膜タンパク質POT1(10 mg/mL、20 mMヘベス(pH 7.5)、150 mM NaCl、5%グリセロール、0.3% NM、0.5 mM TCEP) 250 µLを添加して37 °Cで30秒間インキュベートした。次に精製サポシンA(1.2 mg/mL、20 mMヘベス(pH 7.5)、150 mM NaCl) 460 µLを添加し、37 °Cで10分間インキュベートし、GF-バッファ(pH 7.5) 630 µLを添加した。室温での1分間のインキュベーション後、GF-バッファ(pH 7.5) 2 mLを添加しそしてサンプルを14000 rpmで2分間遠心分離した。上澄をGF-バッファ(7.5)を用いてAKTA ExplorerTM 10クロマトグラフィーシステムを使用したHiLoad SuperdexTM 200 16/60 GLカラム上で(両方ともGE Healthcare)ゲル濾過工程に供した(図13の「サポシン+脂質+膜タンパク質POT1」参照)。

20

30

【0177】

POT1を添加しなかった以外は、前段落を繰り返して実施した(図13における「サポシン+脂質」参照)。

【0178】

Salipro-POT1の溶出プロファイルは、Salipro粒子に組み込まれた膜タンパク質に該当するピークの1つを示し、分子量がより小さくより低いピークは脂質のみのSalipro粒子に該当する。したがって、サポシンA、脂質及び膜タンパク質は組み込まれた膜タンパク質を有する可溶性粒子を形成するように結合した。

【0179】

《実施例8》

原核生物膜タンパク質、精製ヒト膜タンパク質シナプトフィジン(SYP)を含むSalipro粒子を調製した(Salipro-SYP、図14の「サポシン+脂質+膜タンパク質SYP」参照)。

【0180】

脳脂質溶液(脳脂質5 mg/mL、Sigma-Aldrich; 50 mMヘベス(pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM) 500 µLを37 °Cで10分間インキュベートし、精製膜タンパク質SYP(4.2 mg/mL、20 mMヘベス(pH 7.5)、150 mM NaCl、5%グリセロール、0.03% DDM) 800 µLを添加して37 °Cで30秒間インキュベートした。次に精製サポシンA(1.2

40

50

mg/mL、20 mMヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 900 μ Lを添加し、37 で10分間インキュベートし、GF - バッファ (pH 7.5) 630 μ Lを添加した。室温での10分間のインキュベーション後、GF - バッファ (pH 7.5) 1.9 mLを添加しそしてサンプルを14000 rpmで2分間遠心分離した。上澄をGF - バッファ (7.5) を用いてAKTA explorerTM 10クロマトグラフィーシステムを使用したHiLoad SuperdexTM 200 16/60 GLカラム上で (両方ともGE Healthcare) ゲル濾過工程に供した (図14の「サポシン + 脂質 + 膜タンパク質 SYP」参照)。

【0181】

脳脂質溶液 (脳脂質 5 mg/mL、Sigma - Aldrich; 50 mMヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM) 230 μ Lを37 で10分間インキュベートした。次に精製サポシン A (1.2 mg/mL、20 mMヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 460 μ Lを添加し、混合物を37 で1分間インキュベートし、次にGF - バッファ (pH 7.5) 630 μ Lで希釈した。室温での10分間のインキュベーション後、GF - バッファ (pH 7.5) 2 mLを添加しそしてサンプルを14000 rpmで2分間遠心分離した。上澄をGF - バッファ (7.5) を用いてAKTA explorerTM 10クロマトグラフィーシステムを使用したHiLoad SuperdexTM 200 16/60 GLカラム上で (両方ともGE Healthcare) ゲル濾過工程に供した (図14の「サポシン + 脂質」参照)。

【0182】

Salipro - SYPは、その位置に脂質のみのSalipro粒子が存在することを示す小規模な下降的ショルダーの単一のピークを示す (図14の「サポシン + 脂質 + 膜タンパク質 SYP」及び「サポシン + 脂質」参照)。

【0183】

V 疎水性有機化合物を含むSalipro粒子

疎水性化合物用の担体、例えば親油性薬剤としてのSalipro粒子の能力を評価するために、上記と同じ組み込みのための方法を用いて、本発明のSalipro粒子にこのような化合物を組み込むこと、すなわち精製サポシン Aと脂質及び組み込まれるべき化合物とを後続のゲル濾過工程を用いて生理的 pHで混合することが可能であるかどうか評価した。

【0184】

《実施例9》

クルクミンを、本発明の方法を用いたSalipro粒子への組み込みを試験するための疎水性のモデル薬剤として使用した。クルクミンは、主に脂質環境におけるその様々な薬理学的影響 (例えば、抗癌、抗炎症、抗酸化剤、及び抗増殖活性) と蛍光とにより選択された。脂質環境でのUV吸光度及び蛍光特性 (励起波長 420 nm、発光 500 nm) を用いて、Salipro粒子へのクルクミンの組み込みを容易に追跡することができる。

【0185】

クルクミン (10 mg/mL、DMSO中) 1 μ Lを脳脂質溶液 (脳脂質 5 mg/mL、Sigma - Aldrich; 50 mMヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.28% (w/v) DDM) 60 μ Lと混合し、37 で15分間インキュベートした。次に精製サポシン A (1.2 mg/mL、20 mMヘプス (pH 7.5)、150 mM NaCl) 100 μ Lを添加し、37 で10分間インキュベートし、GF - バッファ (pH 7.5) 89 μ Lを添加し、続いて混合物を室温で10分間インキュベートした。次にGF - バッファ (pH 7.5) 250 μ Lを添加しそしてサンプルをGF - バッファ (7.5) を用いてAKTA explorerTM 10クロマトグラフィーシステムを使用したSuperdexTM 200 10/300 GLカラム上で (両方ともGE Healthcare) ゲル濾過工程に供した。UV吸光度を280 nm (タンパク質) 及び420 nm (クルクミン) で測定した。図15の「Salipro - クルクミン」参照

。

【0186】

クルクミンを添加しなかった以外は、前段落を繰り返して実施した（図15における「脂質のみのSalipro」参照）。

【0187】

図15に示される結果により、脂質のみのSalipro粒子が小さな蛍光ピーク（図15の「脂質のみのSalipro」参照）のみを示す一方で、280nmと特徴的なSaliproタンパク質吸光ピークが存在する正確な位置の両方に蛍光ピークが存在することにより、クルクミンは、本発明によるSalipro粒子により組み込まれることが実証された。クルクミンの放出が500nmで記録された場合にも同様の結果が得られた。280nmでは、精製Salipro-クルクミン粒子は、脂質のみのSalipro粒子とほとんど同一の単分散ピークを示す（図15の「Salipro-クルクミン」及び「脂質のみのSalipro粒子」参照）。

10

【0188】

さらなる実験により、サポシンAの非存在下では、脂質とクルクミンとを含む混合物は、可溶性の脂質クルクミン複合体中に自己集合することができないということが実証された。本発明のSalipro粒子は、Saliproナノスケール粒子の脂質環境への組み込みにより、不溶性親油性化合物を別の方法で可溶性の状態にすることが可能である。

【0189】

VI Salipro粒子は組み込んだ粒子の大きさ/特性を調節する

20

《実施例10》

前記の実施例4の結果により、本発明の方法によって得られるSalipro粒子の大きさが本質的に柔軟であることが示された（図10中の粒子の調製に使用される様々な脂質の影響を参照）。これは、本発明の方法によるSalipro粒子の調製において、脂質の量を増加させて使用するその後の実験で確認することができた。

【0190】

脳脂質溶液（脳脂質5mg/mL、Sigma-Aldrich；50mMヘPes（pH7.5）、150mM NaCl、0.28%（w/v）DDM）の様々な量（「脂質5」：1μL、「脂質12.5」：2.5μL、「脂質25」：5μL、「脂質50」：10μL、「脂質100」：20μL）を37℃で10分間インキュベートした。精製サポシンA10μLを添加し、37℃で1分間インキュベートし、そしてGF-バッファ（pH7.5）を添加しそして最終体積を41μLとした。室温での10分間のインキュベーション後、GF-バッファ（pH7.5）24μLを添加しそしてサンプルをAutosampler A-905を備えたAKTAmicroTMクロマトグラフィーシステムを使用したSuperdexTM 200 5/150 GL分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し（両方ともGE Healthcare）、前記Autosampler A-905は、サンプルを含有しているタンパク質25μLを自動的に注入する。分析ゲル濾過をのGF-バッファ（7.5）中において流速0.2mL/分で4℃で行った（図16の「サポシン+脂質5」、「サポシン+脂質12.5」、「サポシン+脂質25」、「サポシン+脂質50」、「サポシン+脂質100」参照）。

30

40

【0191】

ネガティブコントロールとして、精製サポシンA（1.2mg/mL、20mMヘPes（pH7.5）、150mM NaCl）10μLを37℃で1分間インキュベートし、そしてGFバッファ（pH7.5）31μLを添加した。室温での10分間のインキュベーション後、GF-バッファ（pH7.5）24μLを添加しそしてサンプルをAutosampler A-905を備えたAKTAmicroTMクロマトグラフィーシステムを使用したSuperdexTM 200 5/150 GL分析濾過カラム上でゲル濾過工程に供し（両方ともGE Healthcare）、前記Autosampler A-905は、サンプルを含有しているタンパク質25μLを自動的に注入する。分析ゲル濾過をGF-バッファ（7.5）中において流速0.2mL/分で4℃で行った（図16

50

の「サポシン」参照)。

【0192】

図16に示される結果により、本発明の方法により得られたSalipro粒子は大きさが柔軟であり、それによって例えば粒子の調製中に添加される脂質の量により、大きさを制御することができる。

【0193】

《実施例11》

Salipro粒子の大きさの固有の柔軟性はまた、異なる大きさの膜タンパク質が本発明のSalipro粒子に組み込まれた実験から明らかになる。

【0194】

小さな(27kDa)ヒトシナプトフィジン(サポシン-SYP)を含むSalipro粒子、四量体(4×56kDa)大腸菌ペプチド輸送体POT1を含むSalipro粒子(サポシン-POT1)、及び脂質のみのSalipro粒子を実施例7及び8に記載したように調製した。サンプルをGFバッファ(7.5)を用いてAKTAexplorerTM10クロマトグラフィーシステムを使用したHiLoad SuperdexTM200 16/60 GLカラム上でゲル濾過工程に供した(両方ともGE Healthcare)。

【0195】

図17における溶出プロファイルの比較から明らかであるように、本発明のSalipro粒子の大きさは柔軟であり、その中に組み込まれた疎水性剤の大きさに対して調節していると考えられる。「空(empty)」すなわち、脂質のみのSalipro粒子が約3nmの平均流体力学的半径を有する一方で、オリゴマーPOT1輸送体を含むSalipro粒子は、約10nmの平均流体力学的半径を示すまで拡大する。

【0196】

VII Salipro粒子の視覚化

細菌のペプチド輸送体を取り込まれたSalipro粒子(Salipro-POT1)を実施例7に記載したように調製し、そしてネガティブ染色電子顕微鏡で分析した。

【0197】

《実施例12》

Salipro-POT1サンプルを炭素薄膜でコーティングされたグロー放電銅グリッド(glow-discharged copper grids)に塗布しそしてギ酸ウラニルで染色した。イメージングを、加速電圧200kVでJEOL JEM2100F電子顕微鏡を用いて実施した。顕微鏡写真は、4KのCCDカメラで記録した。精製Salipro-POT1の典型的な電子顕微鏡写真を図18a)に示す。Salipro-POT1は、グリッド上の様々な、すなわち粒子の側面又は上面/底面図を見ることができる配向を採用する正方形の粒子に一般的に似ており、これにより3D単一粒子再構成が可能となる。

【0198】

単一のSalipro-POT1粒子を顕微鏡写真から採取し、そしてEMAN2スイート(EMAN2 suite)を使用して処理した。3D再構成のために、対称性(symmetry)は使用しなかった。図18b)は粒子のクラス平均を示し、そして図18c)及びd)の表面は、上面図及び側面図のそれぞれにおいてSalipro-POT1の3D再構成を提供する。

【0199】

正方形の形状のSalipro-POT1ディスクの外観と寸法は、その天然の細菌膜環境中の細菌ペプチド輸送体POT1によって形成されたホモ四量体膜タンパク質複合体(homo-tetrameric membrane protein complex)とよく一致している。ディスクの厚さは約5nmであり、これは、脂質二重層の寸法を連想させ、そして主に膜貫通ヘリックスから成り大きな細胞質ゾルドメインを欠いているPOT1の公知の構造と一致している。直径及び最大直径(長径)は12nm~2nmの範囲内である。Salipro-POT1粒子の見かけの化学量論と大きさとを考えると、各々の粒子は、POT1タンパク質4個

10

20

30

40

50

及びサポシン A 分子 4 個で構成されていると考えられる。これは、組み込まれた疎水性剤の大きさに適合させることにより、均一にかつ安定的にリポタンパク質複合体内に集合するサポシン A の特定の柔軟性を示している。

【0200】

S a l i p r o 粒子は、したがって、ホモ四量体 P O T 1 の例の場合のように（図 5 及び 18 参照）、大きな疎水性脂質 / タンパク質アセンブリの周囲のサポシン A 分子の複数、並びに空の、脂質のみの状態の又は低分子量及び / 又はモノマー疎水性剤（図 2 ~ 4 及び 6 ~ 7 参照）と共にロードされた場合の、脂質 / 洗浄剤コアに取り囲まれたサポシン A 分子の 2 つから構成されている。

【0201】

10

V I I I S a l i p r o 粒子の安定性

前記の例によって示されるように、S a l i p r o 粒子は、生理学的 pH で様々な脂質、膜タンパク質、及び疎水性化合物を組み込み、それによって水性環境下で可溶性であるナノスケールの複合体を生じさせることが可能である。本発明の S a l i p r o 粒子の実用性を確認するために、時間、温度、及び様々な処理条件にわたって、それぞれの安定性を試験した。

【0202】

《実施例 13》

熱安定性を評価するために、実施例 7 で記載されているように調製された脂質のみの S a l i p r o 粒子サンプル（各々 65 μ L）を急速冷凍し、- 80 で保存し、解凍して、0、37、50、73、又は 95 で 10 分間解凍した。続く分析は、A u t o s a m p l e r A - 905 を備えた A K T A m i c r o ^{T M} クロマトグラフィーシステムを使用した S u p e r d e x ^{T M} 200 5 / 150 G L 分析濾過カラム上でのゲル濾過工程を介して実施し（両方とも G E H e a l t h c a r e ）、前記 A u t o s a m p l e r A - 905 は、サンプルを含有しているタンパク質 25 μ L を自動的に注入する。分析ゲル濾過を G F - バッファ（7.5）中において流速 0.2 mL / 分で 4 で行った。

20

【0203】

図 19 に示される結果により、本発明の S a l i p r o 粒子が特定の熱安定性を示すことを実証する。

30

【0204】

さらなる実験は、本発明の S a l i p r o 粒子はまた、標準的な遠心フィルターユニットを用いた濃縮、凍結、及び解凍にわたり強固（robust）であることが明らかになった。さらに、S a l i p r o 粒子は、有意な品質劣化なしで凍結乾燥、貯蔵、及び再水和することが可能である。

【図 1】

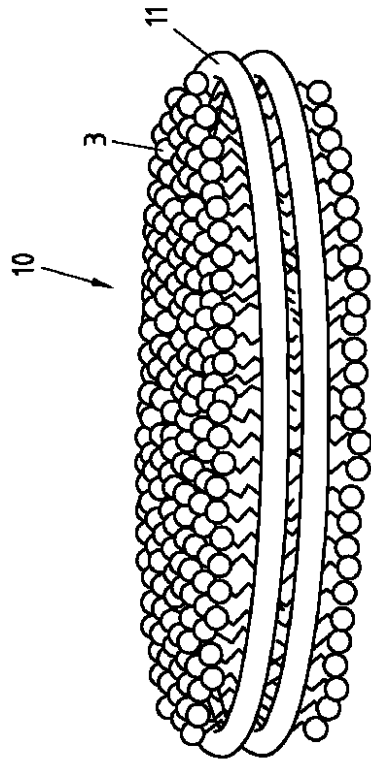


Fig.1 Prior Art

【図 2 b】

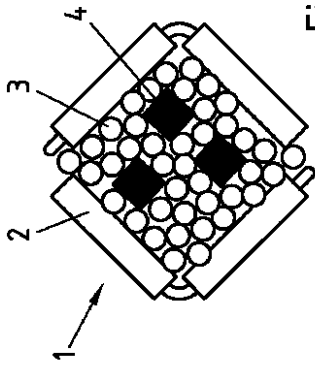


Fig.2b

【図 2 a】

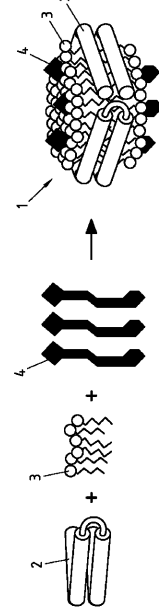


Fig.2a

【図 3 a】

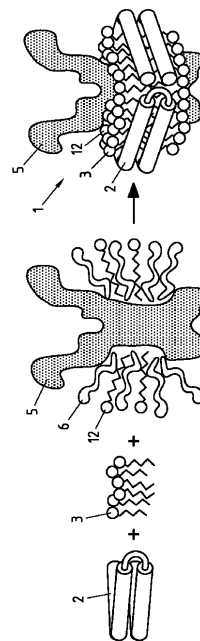


Fig.3a

【図 3 b】

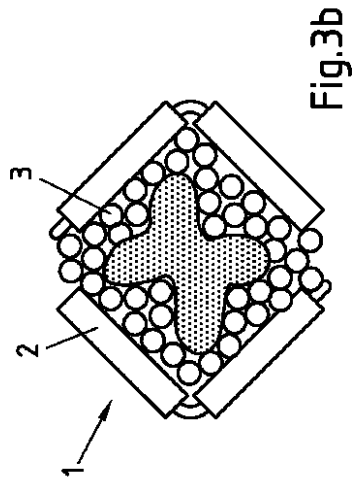


Fig.3b

【図 4 a】

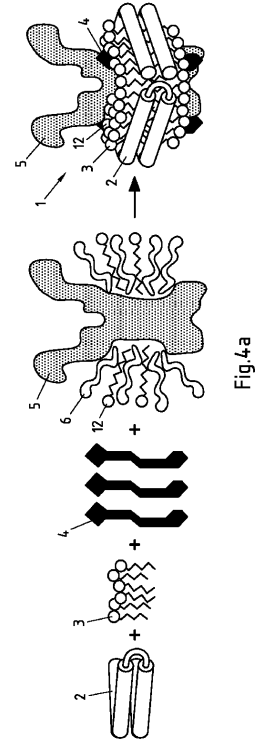


Fig.4a

【図 4 b】

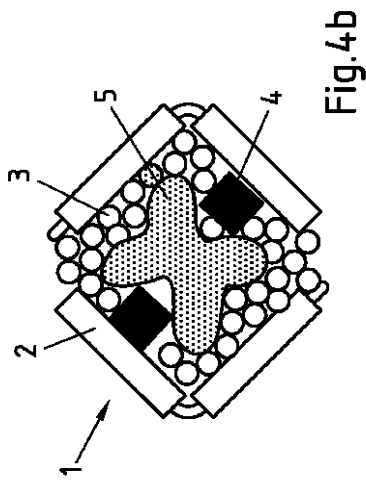


Fig.4b

【図 5 b】

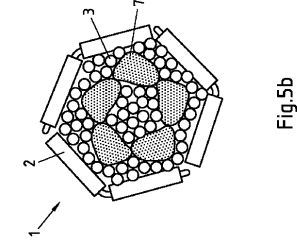


Fig.5b

【図 5 a】

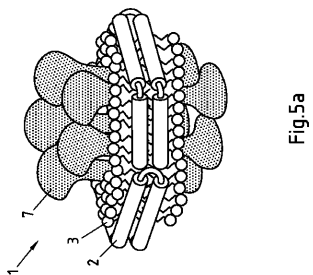


Fig.5a

【図 6】

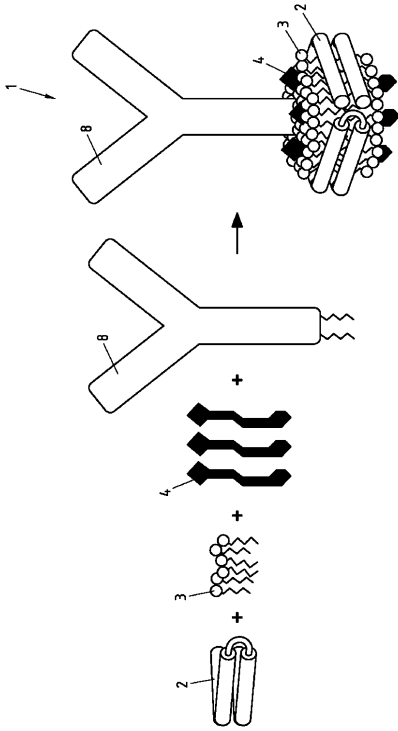


Fig.6

【図 7 a】

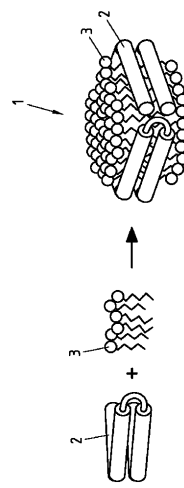


Fig.7a

【図 7 b】

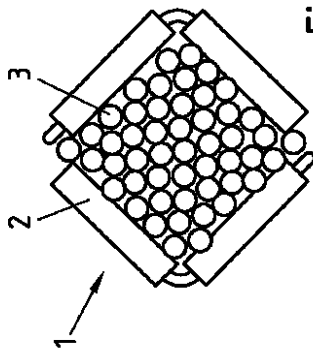


Fig.7b

【図 8】

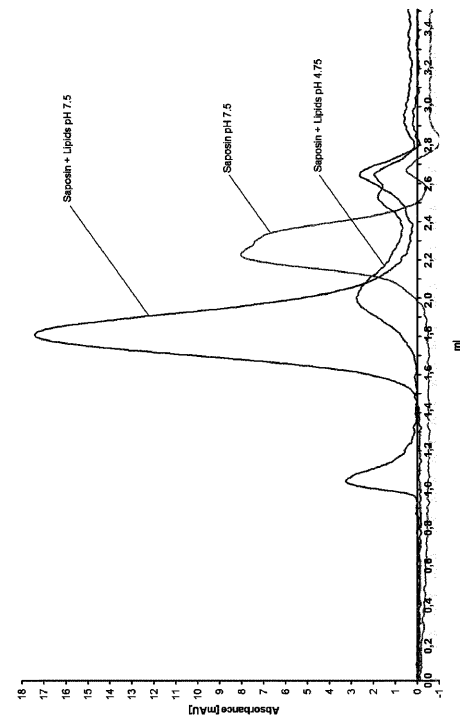
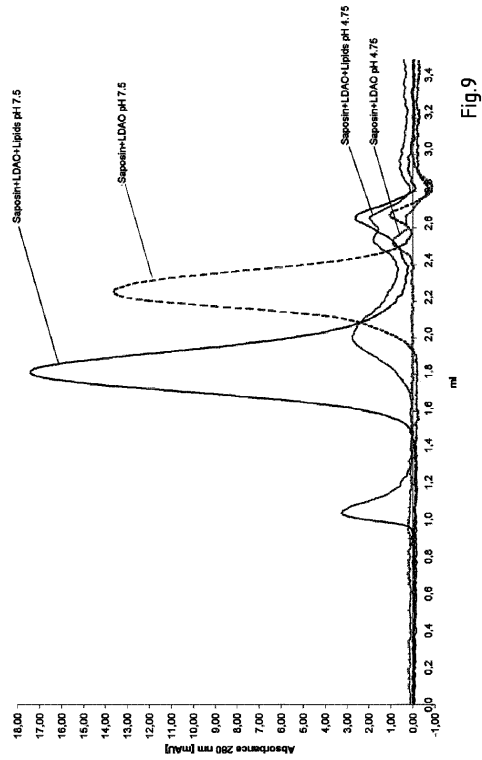
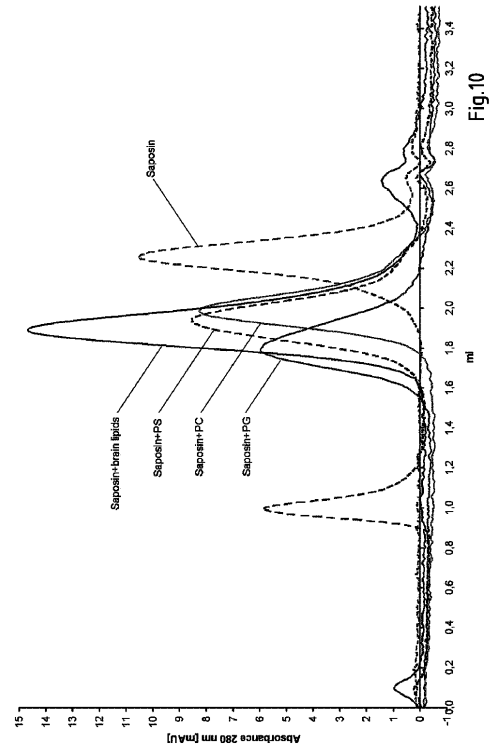


Fig.8

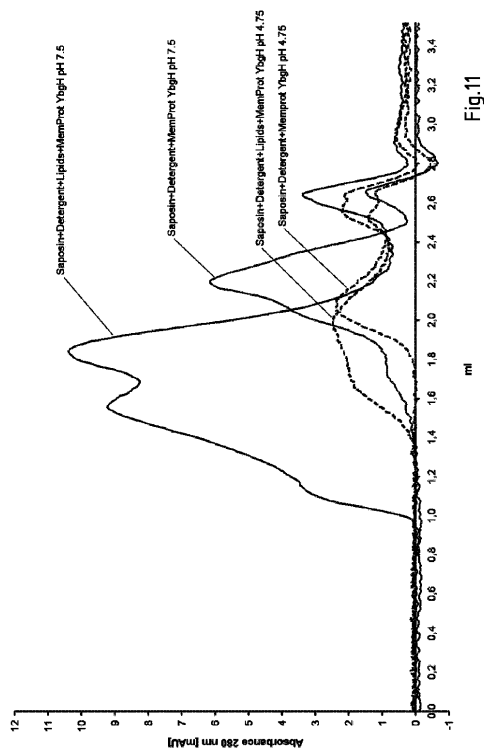
【図 9】



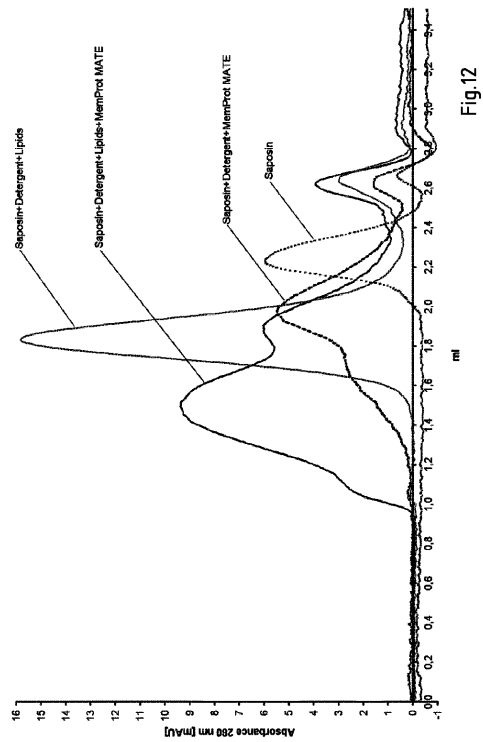
【図 10】



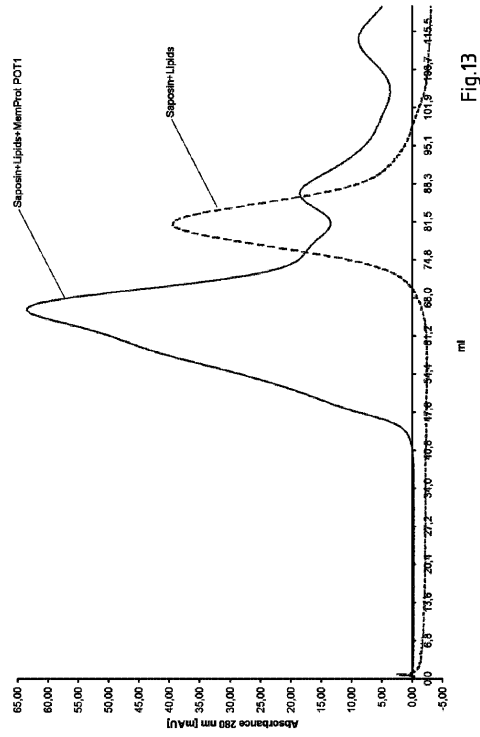
【図 11】



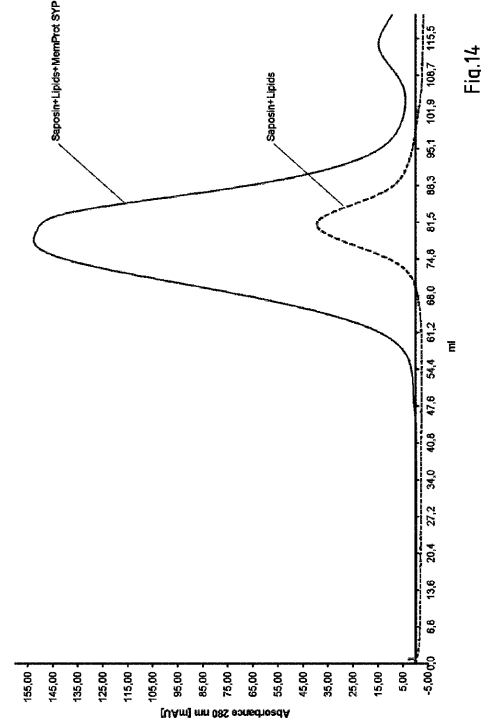
【図 12】



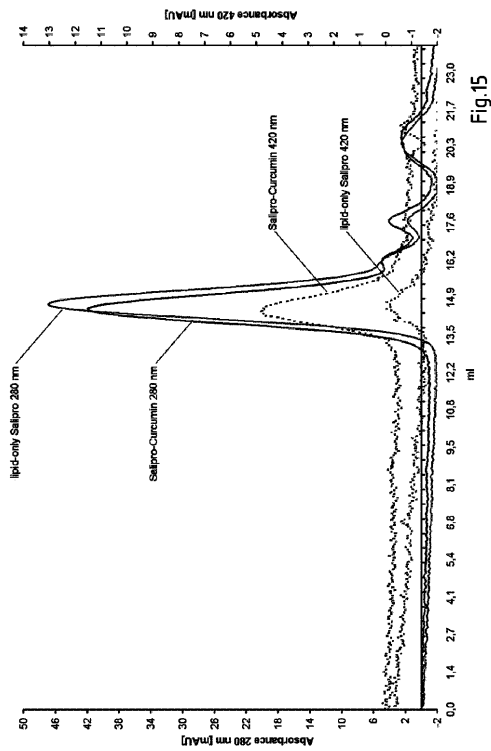
【図 13】



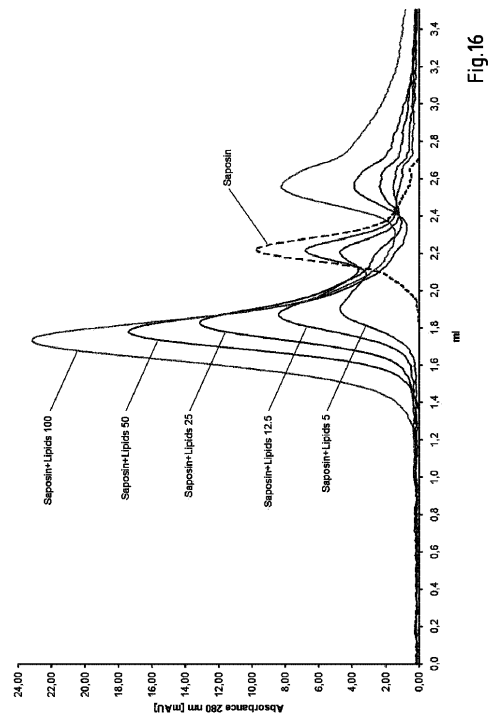
【図 14】



【図 15】



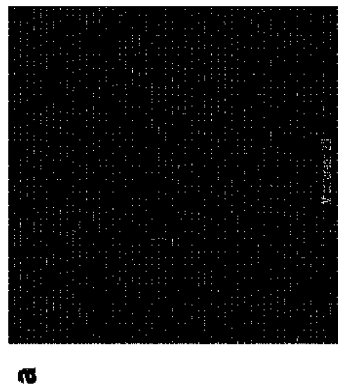
【図 16】



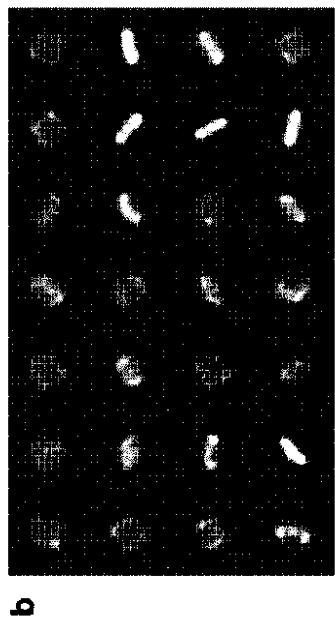
【 図 1 7 】



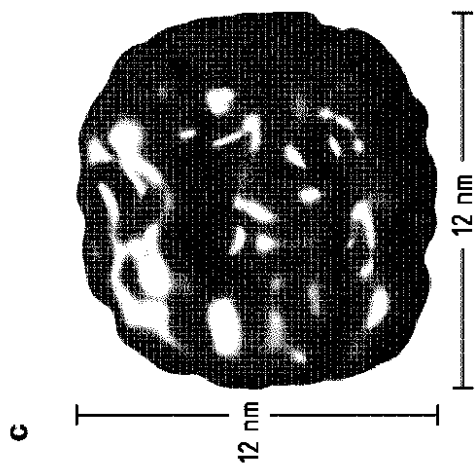
【 図 1 8 a 】



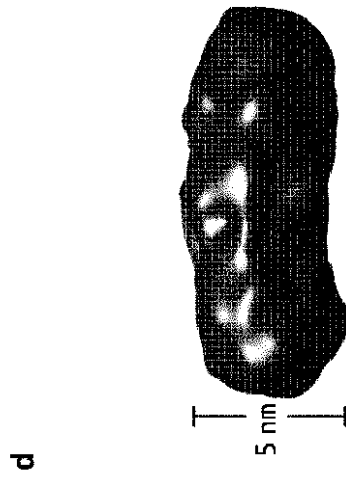
【 図 1 8 b 】



【 図 1 8 c 】



【図 18 d】



【図 19】

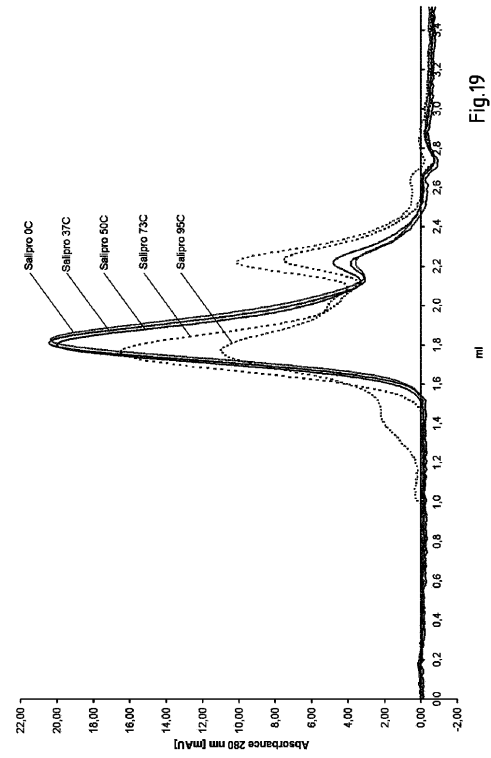


Fig.19

【配列表】

0006293779000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 31/121	(2006.01)	A 6 1 K 31/121	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A

審査官 今村 明子

(56)参考文献 国際公開第2012/154825(WO, A1)
特表2010-507580(JP, A)
特表2012-508233(JP, A)
PNAS, 2012年 2月21日, Vol.109, No.8, p.2908-2912

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)