

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-525424**(P2005-525424A)**(43) 公表日 **平成17年8月25日(2005.8.25)**(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/7076

A 6 1 K 31/7076

4 B 0 6 5

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/127

4 C 0 7 6

A 6 1 K 38/22

A 6 1 K 47/24

4 C 0 8 4

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/34

4 C 0 8 6

A 6 1 K 47/34

A 6 1 K 47/42

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-504972 (P2004-504972)

(86) (22) 出願日 平成15年5月9日 (2003.5.9)

(85) 翻訳文提出日 平成17年1月12日 (2005.1.12)

(86) 国際出願番号 PCT/US2003/014865

(87) 国際公開番号 W02003/096973

(87) 国際公開日 平成15年11月27日 (2003.11.27)

(31) 優先権主張番号 60/380,762

(32) 優先日 平成14年5月14日 (2002.5.14)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 10/397,048

(32) 優先日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504419759

ユニヴァーシティー オヴ ルイスヴィル

リサーチ ファウンデーション インコ

ーポレイテッド

アメリカ合衆国 ケンタッキー州 402

92 ルイスヴィル サウス サード ス

トリート 2301 ジューイット ホー

ル 200 ルーム 200

(74) 代理人 100082005

弁理士 熊倉 禎男

(74) 代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74) 代理人 100084663

弁理士 稲田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞エネルギーの直接的デリバリー系

(57) 【要約】

ATPおよび安定な小胞形成物質であるリン脂質を含む小胞が提供される。前記小胞は少なくとも20小胞融合/秒の融合速度を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ATPおよび安定な小胞形成物質であるリン脂質を含む小胞であって、前記小胞が少なくとも20小胞融合/秒の融合速度を有する前記小胞。

【請求項 2】

別の極性脂質をさらに含む請求項 1 に記載の小胞。

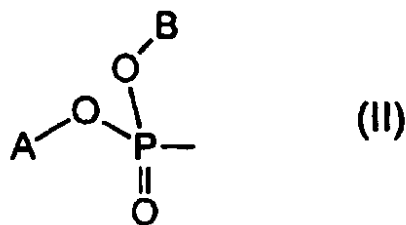
【請求項 3】

PEG、ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーをさらに含む請求項1に記載の小胞。

【請求項 4】

前記リン脂質または別の極性脂質が $X-L-Z_2$ (式 (I)) の構造を有し、
式中、Xは水素であるか、または下記式 (II) の構造を有し、

【化 1】



Bは陽イオンまたはアルキル基であり、

Aは水素またはアルキル基であり、

Lはさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに

各々のZはそれぞれ別個にH、Eまたは下記式 (XI) の構造であり、

【化 2】



式中、Eはアルキルまたはアルケニルであり、さらに一方のZがHであるとき他方のZはHではない請求項 2 に記載の小胞。

【請求項 5】

前記融合速度が少なくとも 10^3 小胞融合/秒である請求項 1 に記載の小胞。

【請求項 6】

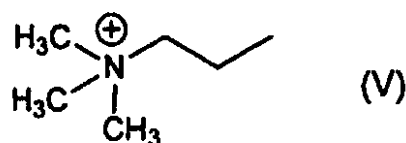
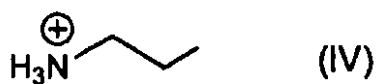
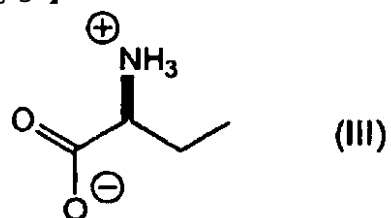
AがHであるか、または下記式 (III)、(IV)、(V)、(VI) および (VII) から成る群から選択される構造を有し、

10

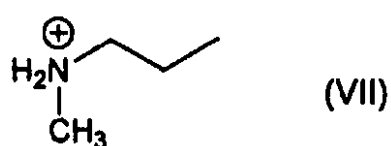
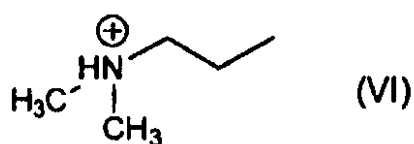
20

30

【化 3】

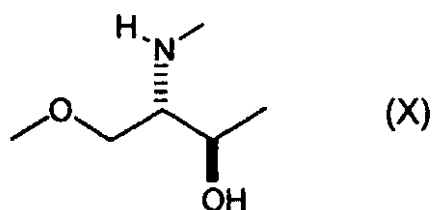
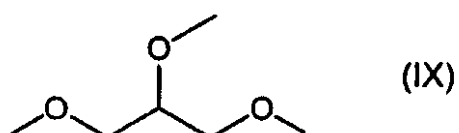
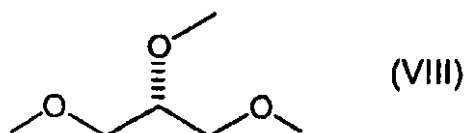


10



Lが下記式 (VIII)、(IX) または (X) から成る群から選択される構造を有し、
【化 4】

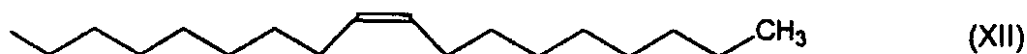
20



30

さらにEが (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) または (XVI) から成る群から選択される構造を有する請求項4に記載の小胞：

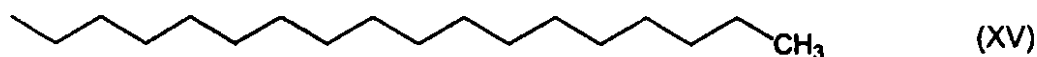
【化 5】



10



20



【請求項 7】

前記リン脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたはその混合物である請求項6に記載の小胞。 30

【請求項 8】

安定な小胞形成物質であるリン脂質、並びに別の極性脂質、PEG、ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーを含む小胞であって、前記小胞が少なくとも20小胞融合/秒の融合速度を有する前記小胞。

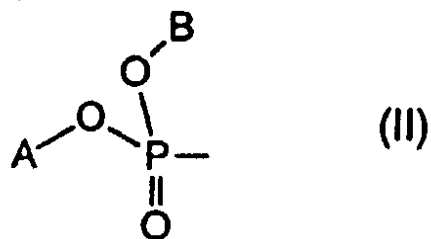
【請求項 9】

前記少なくとも1つのメンバーが別の極性脂質であり、さらに前記小胞がPEG、ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーをさらに含む請求項8に記載の小胞。 40

【請求項 10】

前記リン脂質または別の極性脂質がX-L-Z₂(式(I))の構造を有し、
式中、Xは水素であるか、または下記式(II)の構造を有し、

【化 6】



Bは陽イオンまたはアルキル基であり、

Aは水素またはアルキル基であり、

Lはさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに

各々のZはそれぞれ別個にH、Eまたは下記式 (XI) の構造であり、

10

【化 7】



式中、Eはアルキルまたはアルケニルであり、さらに一方のZがHであるとき他方のZはHではない請求項8に記載の小胞。

20

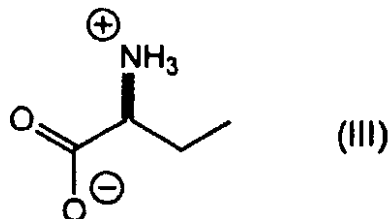
【請求項 1 1】

前記融合速度が少なくとも 10^3 小胞融合/秒である請求項8に記載の小胞。

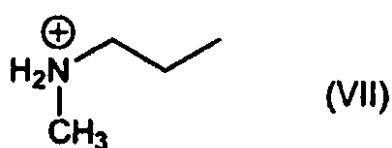
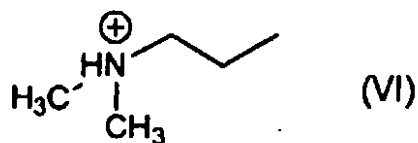
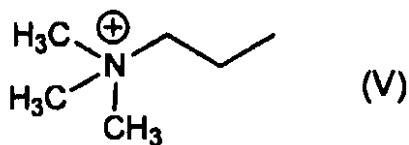
【請求項 1 2】

AがHであるか、または下記式 (III)、(IV)、(V)、(VI) および (VII) から成る群から選択される構造を有し、

【化 8】



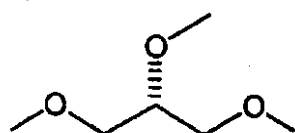
30



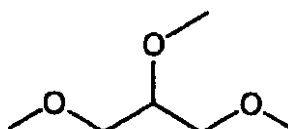
40

Lが下記式 (VIII)、(IX) または (X) から成る群から選択される構造を有し、

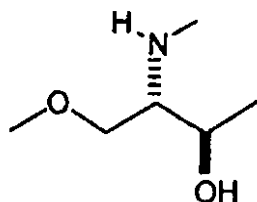
【化 9】



(VIII)



(IX)

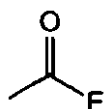


(X)

10

さらにEが下記式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) または (XVI) から成る群から選択される構造を有する請求項10に記載の小胞：

【化 10】



(XI)

20



(XII)



(XIII)

30

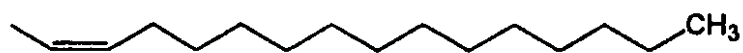


(XIV)



(XV)

40



(XVI)

【請求項 13】

前記リン脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたはその混合物である請求項12に記載の小胞。

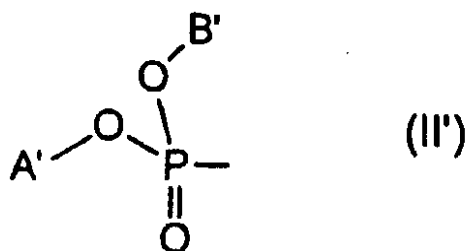
【請求項 14】

ATPおよび安定な小胞形成物質であるリン脂質を含む小胞であって、

50

前記リン脂質が $X' - L' - Z'_2$ (式 (I')) の構造を有し、
 式中、 X' は下記式 (II') の構造を有し、

【化 1 1】



10

B' は陽イオンまたはアルキル基であり、
 A' はアルキル基であり、
 L' はさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに
 一方の Z' は E'' であるか、または下記式 (XI'') の構造であり、

【化 1 2】



20

式中、 E'' はアルキルまたはアルケニルであり、さらに
 他方の Z は E' であるか、または下記式 (XI') の構造であり、

【化 1 3】



式中 E' はアルケニルである前記小胞。

【請求項 1 5】

30

さらに別の極性脂質を含む請求項14に記載の小胞。

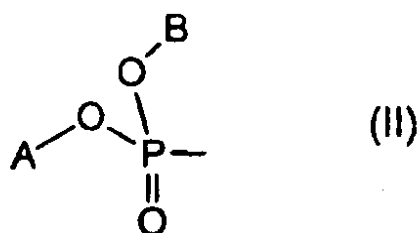
【請求項 1 6】

PEG、ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーをさらに含む請求項14に記載の小胞。

【請求項 1 7】

前記別のリン脂質が $X - L - Z_2$ (式 (I)) の構造を有し、
 式中、 X は水素であるか、または下記式 (II) の構造を有し、

【化 1 4】



40

B は陽イオンまたはアルキル基であり、
 A は水素またはアルキル基であり、
 L はさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに
 各々の Z はそれぞれ別個に H 、 E または下記式 (XI) の構造であり、

【化 1 5】



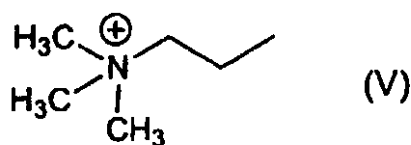
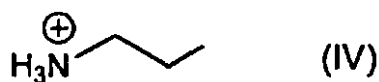
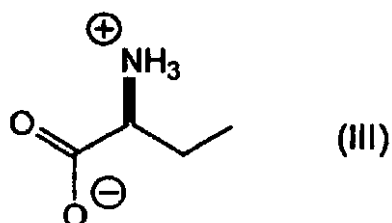
式中、Eはアルキルまたはアルケニルであり、さらに一方のZがHであるとき他方のZはHではない請求項15に記載の小胞。

【請求項 1 8】

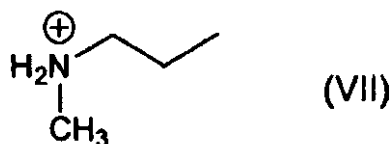
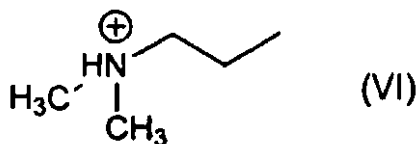
AがHであるか、または下記式 (III)、(IV)、(V)、(VI) および (VII) から成る群から選択される構造を有し、

10

【化 1 6】



20

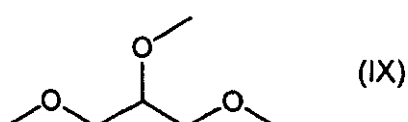
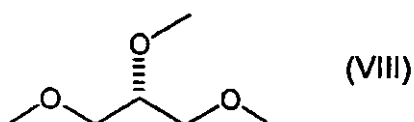


30

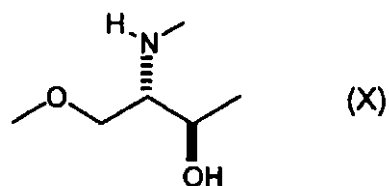
Lが下記式 (VIII)、(IX) または (X) から成る群から選択される構造を有し、

【化 1 7】

(X)

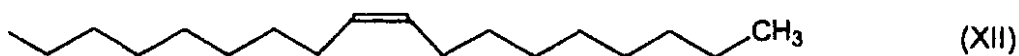


40



さらにEが下記式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) または (XVI) から成る群から選択される構造を有する請求項17に記載の小胞：

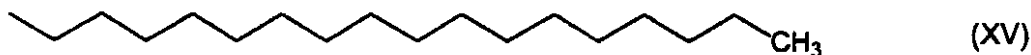
【化 1 8】



10



20



【請求項 1 9】

前記リン脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ド
コサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたはその混合物である請求項18に記
載の小胞。

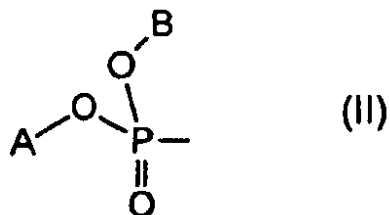
30

【請求項 2 0】

安定な小胞形成物質であるリン脂質、並びに安定な小胞形成物質ではない極性脂質およ
びPEGから成る群から選択される少なくとも1つのメンバーを含む小胞であって、安定な
小胞形成物質である前記リン脂質がX-L-Z₂(式(Ⅰ))の構造を有し、

式中、Xは水素であるか、または下記式(Ⅱ)の構造を有し、

【化 1 9】



40

Bは陽イオンまたはアルキル基であり、

Aは水素またはアルキル基であり、

Lはさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに

各々のZはそれぞれ別個にH、Eまたは下記式(XI)の構造であり、

【化 2 0】



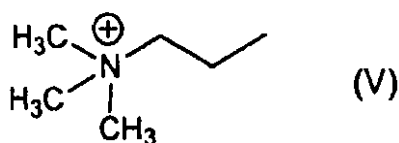
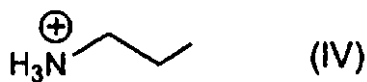
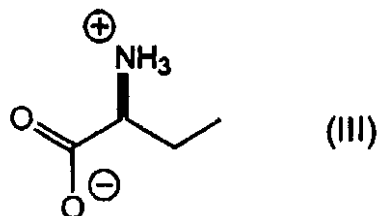
式中、Eはアルキルまたはアルケニルであり、さらに一方のZがHであるとき他方のZはHではない前記小胞。

【請求項 2 1】

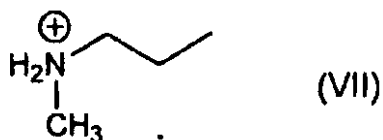
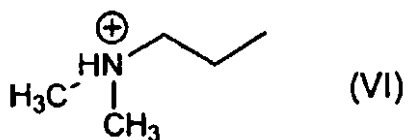
AがHであるか、または下記式 (III)、(IV)、(V)、(VI) および (VII) から成る群から選択される構造を有し、

10

【化 2 1】



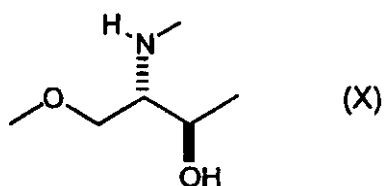
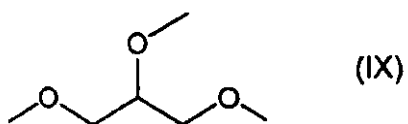
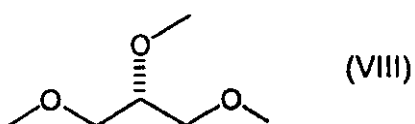
20



30

Lが下記式 (VIII)、(IX) または (X) から成る群から選択される構造を有し、

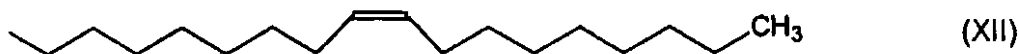
【化 2 2】



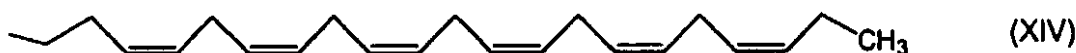
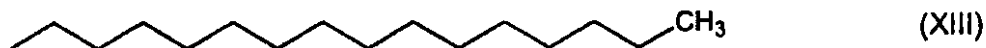
40

さらにEが下記式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) または (XVI) から成る群から選択される構造を有する請求項20に記載の小胞：

【化 2 3】



10



20



【請求項 2 2】

前記リン脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ド
コサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたはその混合物である請求項20に記
載の小胞。 30

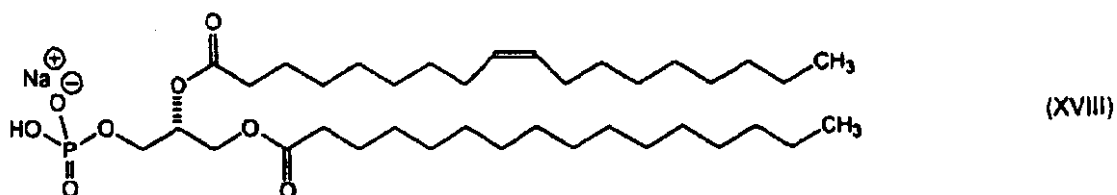
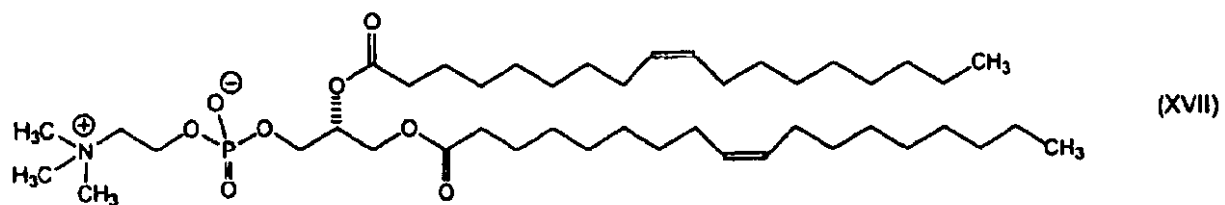
【請求項 2 3】

ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメン
バーをさらに含む請求項20に記載の小胞。

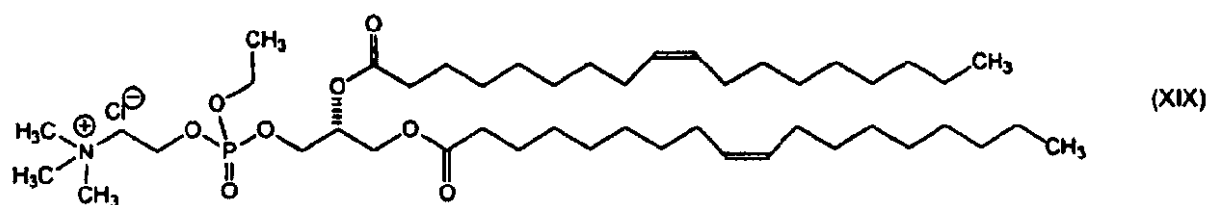
【請求項 2 4】

前記小胞が、安定な小胞形成物質ではない極性脂質を含み、さらに前記安定な小胞形成
物質ではない極性脂質が下記式 (XVII)、(XVIII)、(XIX)、(XX)、(XXI)、(XXI
I)、(XXIII)、(XXV) および (XXVI) から成る群から選択される構造を有する請求項1
9に記載の小胞： 40

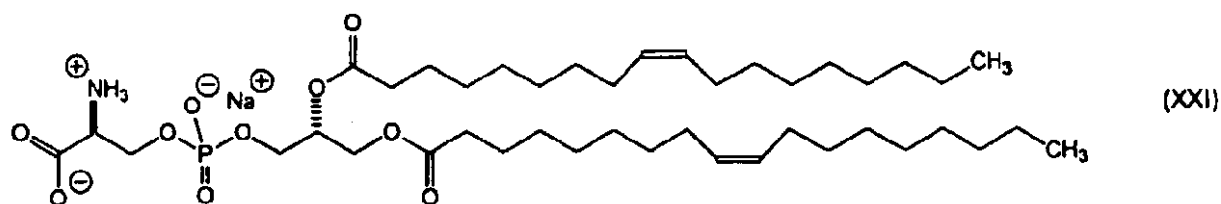
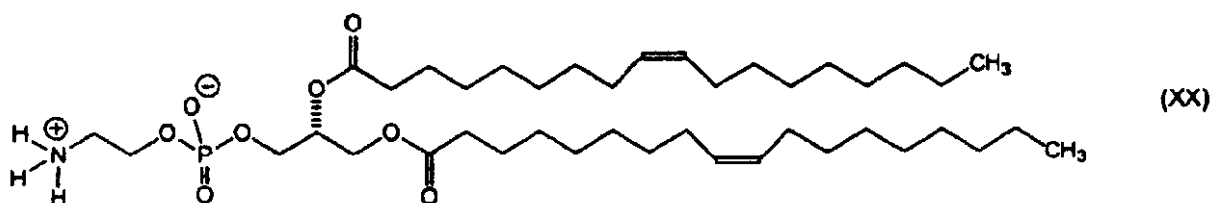
【化 2 4】



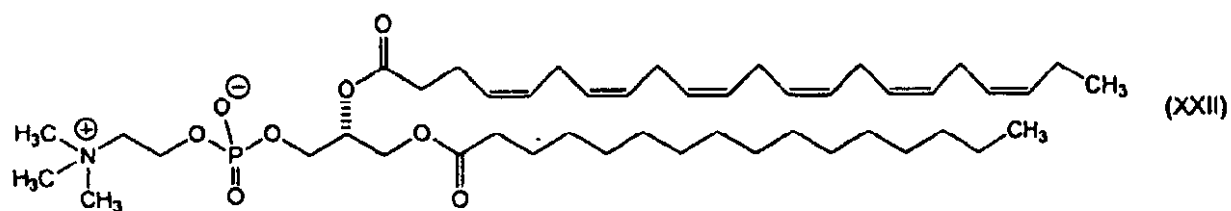
10



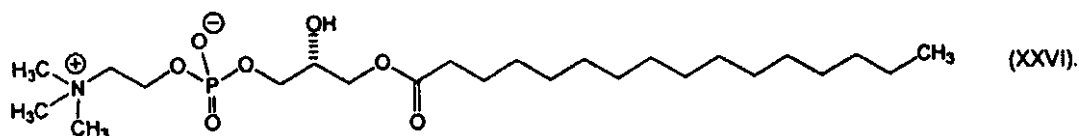
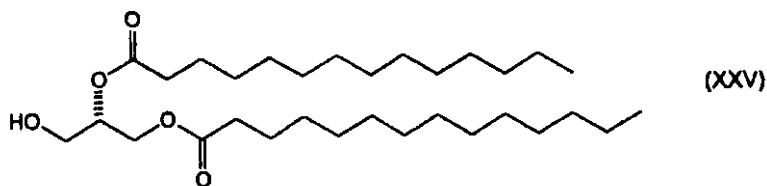
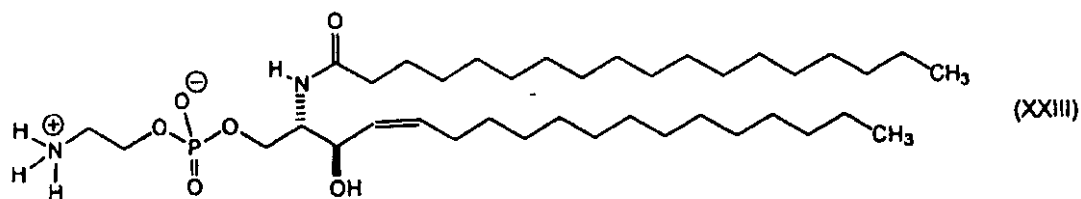
20



30



【化 2 5】



10

【請求項 2 5】

細胞を請求項1の小胞と接触させることを含む、ATPを細胞にデリバーする方法。

20

【請求項 2 6】

細胞を請求項8の小胞と接触させることを含む、ATPを細胞にデリバーする方法。

【請求項 2 7】

細胞を請求項14の小胞と接触させることを含む、ATPを細胞にデリバーする方法。

【請求項 2 8】

細胞を請求項20の小胞と接触させることを含む、ATPを細胞にデリバーする方法。

【請求項 2 9】

組織を小胞と接触させることを含む組織を保存する方法であって、前記小胞が安定な小胞形成物質であるリン脂質、およびATPを含む前記組織の保全方法。

【請求項 3 0】

前記小胞が、安定な小胞形成物質ではない極性脂質およびPEGから成る群から選択される少なくとも1つのメンバーをさらに含む請求項29に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

前記リン脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたはその混合物である請求項29に記載の小胞。

【請求項 3 2】

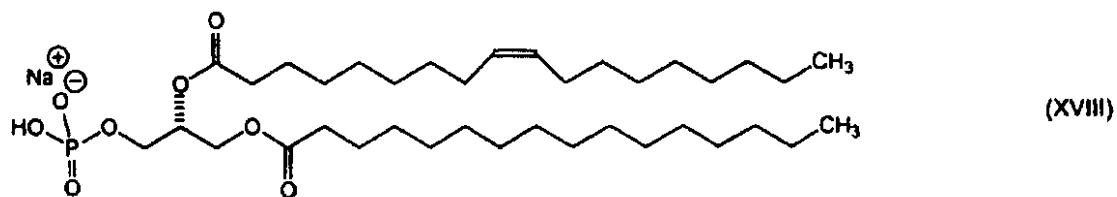
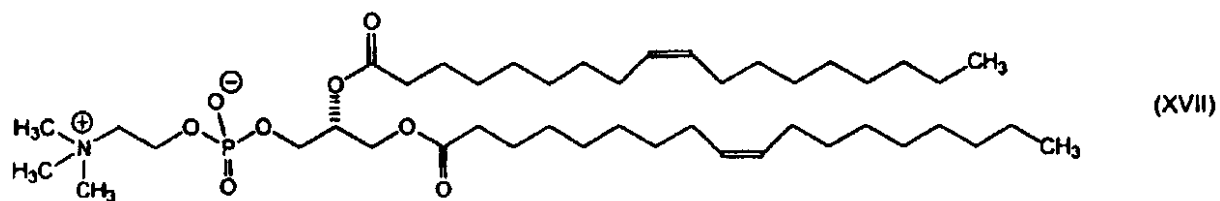
ラフト形成物質および融合タンパク質から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーをさらに含む請求項29に記載の小胞。

【請求項 3 3】

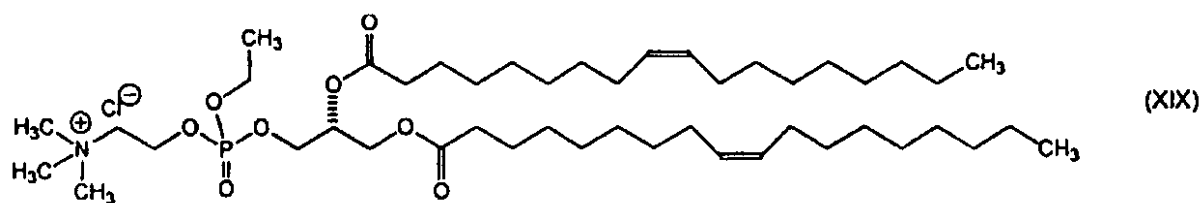
前記小胞が、安定な小胞形成物質ではない極性脂質を含み、さらに前記安定な小胞形成物質ではない極性脂質が下記式 (XVII)、(XVIII)、(XIX)、(XX)、(XXI)、(XXII)、(XXIII)、(XXV) および (XXVI) から成る群から選択される構造を有する請求項30に記載の小胞：

40

【化 2 6】

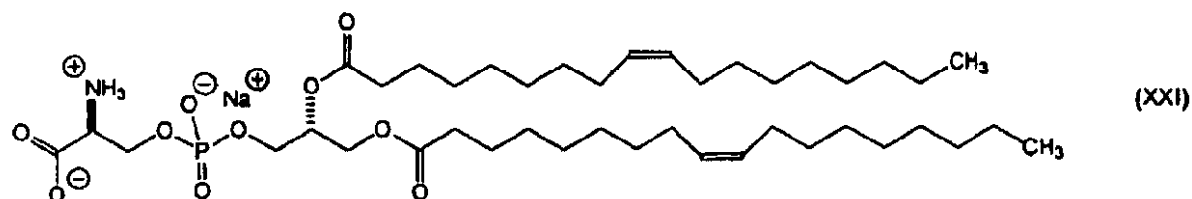
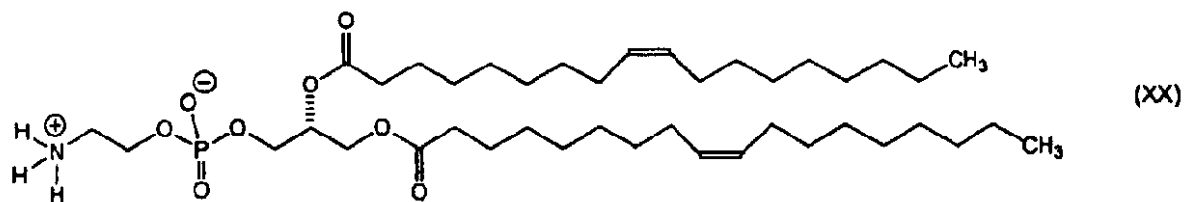


10

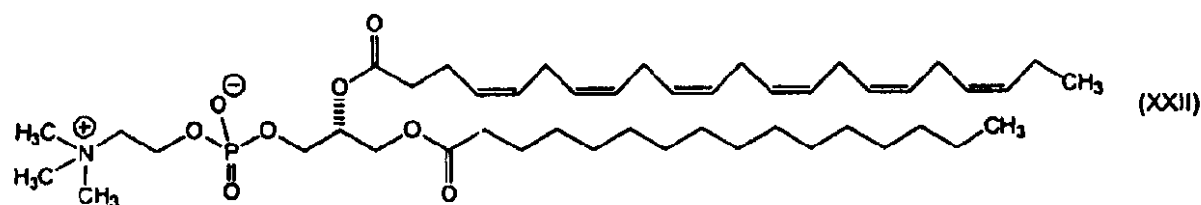


20

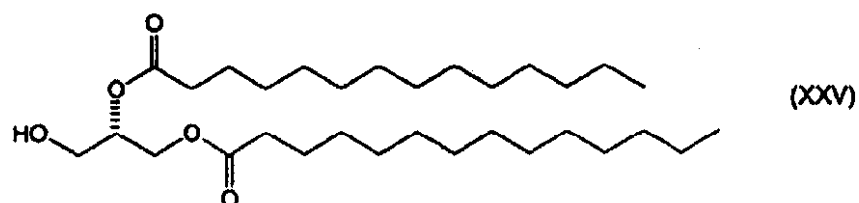
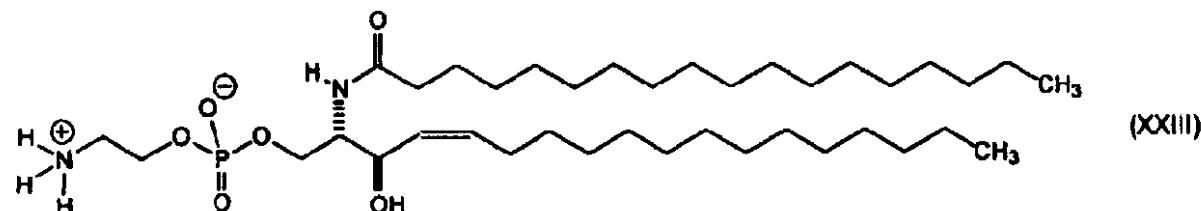
【化 2 7】



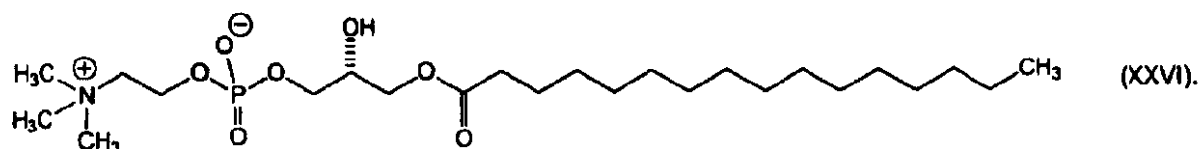
10



20



30



【請求項 3 4】

細胞を小胞と接触させることを含むATPを細胞にデリバリーする方法であって、前記小胞が安定な小胞形成物質であるリン脂質およびATPを含み、前記細胞にデリバリーされる前記ATPの量が前記細胞の代謝要求を満足させるために十分である前記ATPをデリバリーする方法

40

【請求項 3 5】

細胞を請求項1の小胞と接触させることを含むATPを細胞にデリバリーする方法。

【請求項 3 6】

細胞を請求項8の小胞と接触させることを含むATPを細胞にデリバリーする方法。

【請求項 3 7】

細胞を請求項14の小胞と接触させることを含むATPを細胞にデリバリーする方法。

【請求項 3 8】

細胞を請求項20の小胞と接触させることを含むATPを細胞にデリバリーする方法。

50

【請求項 39】

創傷を小胞を含む組成物と接触させることを含む創傷を治療する方法であって、前記小胞が安定な小胞形成物質であるリン脂質およびATPを含む前記創傷の治療方法。

【請求項 40】

創傷を請求項1の小胞を含む組成物と接触させることを含む創傷を治療する方法。

【請求項 41】

創傷を請求項8の小胞を含む組成物と接触させることを含む創傷を治療する方法。

【請求項 42】

創傷を請求項14の小胞を含む組成物と接触させることを含む創傷を治療する方法。

【請求項 43】

創傷を請求項20の小胞を含む組成物と接触させることを含む創傷を治療する方法。

【請求項 44】

前記組成物がさらにベカプレルミンを含む請求項39に記載の方法。

【請求項 45】

小胞およびベカプレルミンを含む組成物であって、前記小胞が、安定な小胞形成物質であるリン脂質およびATPを含む前記組成物。

【請求項 46】

細胞と小胞を接触させることを含む、少なくとも1つの細胞を有するバイオリアクターの生産性を向上させる方法であって、前記小胞が、安定な小胞形成物質であるリン脂質およびATPを含む前記バイオリアクターの生産性を向上させる方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は米国仮特許出願60/380,762 (Fusogenic Lipid Vesicles; William D. Ehringer & Sufan Chien) (2002年5月14日出願; 前記は参照によりその全体が本明細書に含まれる) に対して優先権を主張する。

【0002】

背景技術

ATPは全ての細胞(動物、植物、細菌、真菌など)に動力を供給する燃料である。例えばガソリンのない車のように、ATP“タンク”が空のヒトおよび他の生物は作動しない。実際そのような生物は死亡する。栄養物の分解に由来するエネルギーは最終的にはATPの高エネルギーリン酸結合に保存される。前記の結合が破壊されるとき、それら結合は、細胞、組織、器官および器官系にアクセス可能なエネルギーを提供する。細胞は定常的にATPを合成しこれを代謝する。ATPは、酸化的リン酸化により好氣的に産生されるか(この場合酸素が最終的電子受容体として用いられ、二酸化炭素(CO₂)および水が副産物として生じる)、または解糖作用中に嫌氣的に産生される。解糖作用は細胞にエネルギーを提供することができるが、前記の供給は、細胞環境が酸性になり、細胞を傷害しATPの産生を抑制するために制限を受ける。

【0003】

血管循環系は、酸素および栄養物に由来するエネルギーの持続的供給を提供する。脈管構造では、内皮細胞バリアーが栄養を供給されている細胞と血管腔とを分離させている。個々の細胞に到達するために、酸素および栄養物は内皮基底層を通過して介在空間に入り、酸素および栄養物をデリバーする必要がある。前記酸素供給は疾患および外傷の結果として停止または低下する。例えば心筋梗塞(心臓発作)、卒中、低血圧および重篤な外傷(例えば自動車事故における頸動脈の損傷)は酸素の損失をもたらし、ホメオスタシスの低下およびおそらくは死を招くであろう。

虚血的事象(組織への酸素および栄養物の減少を生じる事象)の後で血液供給が再び確立されるとき、虚血-再灌流障害が発生するであろう。再酸素供給の後、細胞はATPを合成しようとするので、毒性代謝物(例えば遊離ラジカル)が、細胞がATPを再合成しようと

10

20

30

40

50

するときに生成される。虚血は損傷関連または疾患関連事象であるだけでなく、外科手術、例えば大動脈バイパス手術、心臓切開手術、腫瘍組織の再構築、腫瘍摘出、腸切除および器官移植の副作用として誘発される。

【0004】

虚血は組織および器官移植の成功のための極めて重要な取り組み目標である。米国では毎年約14,000の腎臓および2500の心臓が移植される。摘出後、器官は栄養物および酸素欠乏下で限られた寿命をもつ。心臓は採取後4から6時間以内に移植する必要がある、一方腎臓は72時間以内に移植されねばならない。レシピエントはしばしばドナーから遠く離れているので、前記の短い生存時間は移植の障害である。血液は4で約45日しか保存できず、その後は廃棄されねばならない。手術を見越して自家性血液を入手することはさらに困難である。患者は通常は45日で2ユニットの血液しか提供できない。多くの手術方法では3ユニット、4ユニットまたはそれを超える血液を使用するので前記の量は十分ではない。

10

【0005】

低い酸素供給の有害な作用を克服または減少させるためにいくつかの試みが為された。前記のアプローチには以下が含まれる：(1)嫌氣的ATP産生を増加させるために解糖中間物質を提供する；(2)代謝要求を低下させる、例えば細胞、組織および器官を4で保存する；および(3)ATPを細胞、組織または器官に直接加える。細胞へのエネルギーの供給は好ましくはATPの直接投与によって達成されるであろうが、細胞はATPレセプターまたはチャンネルを欠くために外因性ATPをほとんど取り込まない。さらにまた、ATPは親水性であるが、細胞の形質膜は疎水性でATPの通過を妨げる。ATPの血流への導入は、ATPが内皮バリアーを通過することができず、さらに加水分解されやすいために有効ではない。ATPのデリバリーにリボソームを使用する試みはほとんど成功せず有効ではなかった(Arakawa et al. 1998, Puisieux et al. 1994)。例えば、Puisieuxらは、ATPを被包化したホスファチジルコリン、コレステロールおよびホスファチジルセリン脂質小胞を構築し、続いて前記小胞を精子細胞、肝臓および脳組織とインキュベートした。何らかの取り込みは観察されたが、ATP代謝要求に見合う制御されたデリバリーは達成されなかった。血流中に投与されたとき、通常リボソームは、その積荷ATPを細胞にデリバリーするために小胞にとって必要な事象である細胞膜との高い融合速度をもたない。

20

【0006】

動物細胞の形質膜は、総脂質の半分以上を占める以下の4つの主要なリン脂質を含む：ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンおよびスフィンゴミエリン。ホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンはほとんど外側リーフレットで見出され、一方ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルセリンは主として内側リーフレットで見出される。陰性に荷電しているホスファチジルセリンおよびホスファチジイルノシトールが外側リーフレットで優勢であることによって、細胞表面では正味の陰性電荷がもたらされる。形質膜は細胞の完全状態の維持を促進し、選択的透過性を有する。いくつかの分子は膜全体を拡散することができるが、大半(ATPを含む)は進入のために他の手段(例えば輸送タンパク質またはチャンネル)を必要とする。

30

【0007】

発明の要旨

40

第一の特徴では、本発明はATP、および安定な小胞形成物質であるリン脂質を含む小胞である。前記小胞は少なくとも20小胞融合/秒の融合速度を有する。

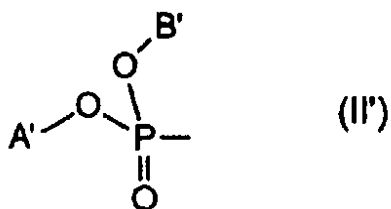
第二の特徴では、本発明は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、および別の極性脂質および/またはPEGを含む小胞である。前記小胞は少なくとも20小胞融合/秒の融合速度を有する。

第三の特徴では、本発明はATP、および安定な小胞形成物質であるリン脂質を含む小胞である。前記リン脂質は $X' - L' - Z'_2$ (式(I'))の構造を有し：

式中、 X' は下記式(II')の構造を有し、

【0008】

【化 1】



【0009】

B'は陽イオンまたはアルキル基であり、

10

A'はアルキル基であり、

L'はさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに一方のZ'はE''であるか、または下記式(XI'')の構造であり、

【0010】

【化 2】



【0011】

20

式中、E''はアルキルまたはアルケニルであり、さらに他方のZはE'であるか、または下記式(XI')の構造であり、

【0012】

【化 3】



【0013】

30

式中E'はアルケニルである。

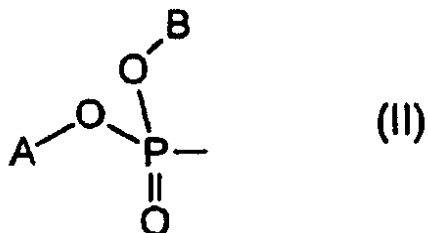
【0014】

第四の特徴では、本発明は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、および安定ではない小胞形成物質である極性脂質および/またはPEGを含む小胞である。前記安定な小胞形成物質であるリン脂質はX-L-Z₂(式(I))の構造を有し：

式中、XはHであるか、または下記式(II)の構造を有し、

【0015】

【化 4】



40

【0016】

Bは陽イオンまたはアルキル基であり、

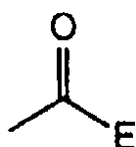
Aは水素またはアルキル基であり、

Lはさらに2つの水素原子を失ったアルキルであり、さらに各々のZはそれぞれ別個にH、Eまたは下記式(XI)の構造であり、

50

【 0 0 1 7 】

【 化 5 】



(XI)

【 0 0 1 8 】

式中、Eはアルキルまたはアルケニルであり、さらに一方のZがHであるとき他方のZはHではない。

10

【 0 0 1 9 】

第五の特徴では、本発明は細胞にATPをデリバーする方法であって、前記方法は前記細胞を小胞と接触させることを含む。前記小胞は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、およびATPを含む。前記細胞にデリバーされるATPの量は前記細胞の代謝要求を満たすために十分である。

第六の特徴では、本発明は創傷を治療する方法であって、前記方法は前記創傷を小胞を含む組成物と接触させることを含む。前記小胞は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、およびATPを含む。

第七の特徴では、本発明は小胞およびベカプレルミンを含む組成物である。前記小胞は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、およびATPを含む。

20

第八の特徴では、本発明は、少なくとも1つの細胞を有するバイオリアクターの生産性を向上させる方法であって、前記方法は前記細胞を小胞と接触させることを含む。前記小胞は、安定な小胞形成物質であるリン脂質、およびATPを含む。

【 0 0 2 0 】

定義

“アルキル” (alkyl-またはalk-) は、置換もしくは非置換、直鎖、分枝または環式炭化水素鎖を指し、好ましくは1から20個の炭素原子を含む。非置換アルキル基の適切な例にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、sec-ブチル、シクロブチル、ペンチル、シクロペンチルなどが含まれる。

“アルキルアリール” および “アルキル複素環式” 基は、それぞれアリールまたは複素環式基と共融結合したアルキル基である。

30

“アルケニル” は置換もしくは非置換、直鎖、分枝または環式の不飽和炭化水素鎖であって、少なくとも1つの二重結合および好ましくは2から20個の炭素原子を含むものを指す。典型的な非置換アルケニル基にはエテニル (またはビニル)、1-プロペニル、2-プロペニル (またはアリル)、1,3-ブタジエニル、ヘキセニル、ペンテニル、1,3,5-ヘキサトリエニルなどが含まれる。好ましいシクロアルケニル基は5から8個の炭素原子および少なくとも1つの二重結合を含む。シクロアルケニル基の例にはシクロヘキサジエニル、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプタジエニル、シクロオクタトリエニルなどが含まれる。

【 0 0 2 1 】

40

“アルコキシ” は置換または非置換-O-アルキル基を指す。典型的なアルコキシ基にはメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、t-ブトキシなどが含まれる。

“アリール” は、任意の一価の芳香族炭素環式基または複素芳香環基で、好ましくは3から10個の炭素原子を有するものを指す。アリール基は二環式 (すなわちフェニル (またはPh)) でも、または多環式 (すなわちナフチル) でもよく、置換されてなくても置換されてあってもよい。好ましいアリール基にはフェニル、ナフチル、フリル、チエニル、ピリジル、インドリル、キノリニルまたはイソキノリニルが含まれる。

“アミノ” は非置換または置換-NRR'基を指す。アミンは、置換基 (RまたはR') の数に応じて一級 (-NH₂) でも、二級 (-NHR) でも、または三級 (-NRR') でもよい。置換アミ

50

ノ基の例にはメチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、2-プロピルアミノ、1-プロピルアミノ、ジ(n-プロピル)アミノ、ジ(イソプロピル)アミノ、メチル-n-プロピルアミノ、t-ブチルアミノ、アニリノなどが含まれる。

【0022】

“複素環式ラジカル”は、安定な飽和、部分的な不飽和または芳香環（好ましくは5から10、より好ましくは5または6個の原子を含む）を指す。前記環は1回または2回以上（好ましくは1、2、3、4または5回）置換基で置換されるであろう。前記環は単環式、二環式または多環式であろう。前記複素環基は炭素原子および1から3個のヘテロ原子から成り、前記ヘテロ原子はそれぞれ別個に窒素、酸素および硫黄から選択される。前記ヘテロ原子は保護されていても保護されてなくてもよい。有用な複素環基の例には、置換もしくは非置換、保護もしくは非保護アクリジン、ベンザチアゾリン、ベンゾイミダゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、ベンゾチアゾール、ベンゾチオフェニル、カルバゾール、キノリン、フラン、イミダゾール、1H-インダゾール、インドール、イソインドール、イソキノリン、イソチアゾール、モルフォリン、オキサゾール（すなわち1,2,3-オキサジアゾール）、フェナジン、フェノチアジン、フェノキサジン、フタラジン、ピペラジン、プテリジン、プリン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリミジン、ピロール、キナゾリン、キノリン、キノキサリン、チアゾール、1,3,4-チアジアゾール、チオフェン、1,3,5-トリアジン、トリアゾール（すなわち1,2,3-トリアゾール）などが含まれる。

“置換されている”とは、当該成分が少なくとも1つ、好ましくは1から3個の置換基を含むことを意味する。適切な置換基には水素（H）およびヒドロキシル（-OH）、アミノ（-NH₂）、オキシ（-O-）、チオール、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ニトリル、ニトロ、アリールおよび複素環基が含まれる。前記置換基は場合によってさらに1から3個の置換基で置換されてもよい。置換された置換基の例にはカルボキシアミド、アルキルメルカプト、アルキルスルホニル、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、カルボキシレート、アルコキシカルボニル、アルキルアリール、アルキル複素環基などが含まれる。

【0023】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞の脂質二重膜との融合性（fusogenic）をもつ小さな脂質小胞はATPを被包化しさらに前記ATPをデリバリーすることができるという発見を利用する。ATPデリバリー速度は、他の手段同様、脂質小胞の組成を変化させて異なる融合速度を得ることによって容易に制御される。さらにまた、種々の態様の投与に適合するように前記小胞の組成を調節することができる。例えば、小さな脂質小胞が循環系に注射されたとき、前記小胞が内皮細胞と融合し、それらが前記標的細胞と効率的に融合してギャップを開放することができるように、前記小胞を作製することができる。融合を促進するため、または融合を目的として、他の成分（例えばある種のポリペプチド）を小胞に添加することができる。脂質小胞に添加されることによってATPは加水分解に対して安定化される。

【0024】

本発明の組成物および方法は効率的なATPの細胞へのデリバリーのための要件を満たす。以下の4つの要件が効率的にATPをデリバリーするために必要である。第一に、ATPは細胞膜を通過しなければならない。第二に一定のATP量が基礎代謝要求に見合う速度でデリバリーされなければならない。第三に、ATP含有組成物は投与ルートに適合しなければならない。最後に、有効であるためにはATPは加水分解される前に細胞内に入らなければならない。

脂質小胞膜は形質細胞膜に類似し、その上前記は製造が簡単である。脂質小胞膜は水性部分を有するので、種々の溶液（ATPを含有する溶液を含む）を被包化することができる。脂質小胞は細胞膜と融合して脂質小胞の内容物をデリバリーすることができる。

本発明の方法および組成物は以下の治療を含む多数の用途を有する：出血性ショック、心臓発作、心冠状動脈疾患、卒中、低血圧、重篤な外傷、創傷治療、組織および器官の保存、心肺蘇生術および移植。重篤な外傷の場合には、本発明の組成物は野外で投与され、

医療支援が得られるまでの損傷を最小限にすることができる。本発明の方法および組成物はまた血液および血小板の保存の延長に用いることができる。

以下は医師の参考のために提示され、本発明を限定しようとするものではない。ただし他の方法、技術、細胞、試薬およびアプローチも用いることができる。

【0025】

融合性脂質小胞

脂質小胞は形質膜に類似し、前記は細胞膜と融合させることができる。以前のリボソーム実験では、リボソームと細胞膜との間で以下の4つの主要なタイプの相互作用が観察されることが示された：細胞表面への吸着；エンドサイトーシス（食細胞によるリボソームの活発な取り込み）；脂質交換（リボソームと形質膜間における個々の脂質分子の移動を含む）；および融合（この場合リボソーム膜は細胞質膜と一体化する）。脂質小胞と細胞膜との間の相互作用はおそらくリボソームと細胞膜との間の相互作用と類似する。融合は、それによって小胞の内容物を細胞内に直接導入できるのでもっとも有意義なメカニズムを提供する。吸着または脂質の交換は小胞が高い融合性をもたず、さらに小胞の水性含有成分のデリバリーを許容しないときに発生することができる。エンドサイトーシスはある種の細胞タイプ（例えば白血球）でのみ発生することができる。

10

しかしながら、大半のリボソームおよび多重層小胞は、主に、湾曲をもつ小胞ラジウスの保存エネルギーは極めて小さいという理由から容易には融合しない。しかし本発明の小さな単層小胞（前記は湾曲が描くラジウスは非常に密である）は非常に融合しやすい。小さな単層小胞（small unilamellar vesicle; SUV）の平均半径は5nmから500nm、好ましくは10nmから100nm、より好ましくは20nmから60nm（40nmを含む）である。前記サイズは小胞が内皮細胞間のギャップを通過することを可能にする。有用な小胞のサイズは大きく変動し、個々の適用に応じて選択できる。

20

【0026】

本発明の小胞を形成する組成物は、安定な小胞形成物質であるリン脂質を、好ましくは別の極性脂質とともに、さらに場合によって1つまたは2つ以上のさらに別の極性脂質および/またはラフト形成物質とともに含有する。

極性脂質は、疎水性末端および親水性末端を有する有機分子で、少なくとも6個の炭素原子を含む。前記は式（I）の構造を有し、式中Xは主部基でLは骨格基で各Zは脂肪基である。2つのZ基は同じでも異なってもよい。リン脂質は式（II）の主部基をもつ極性脂質であり、式中AおよびBは前記主部基の置換基である。

30

前記主部基Xは任意の極性脂質、好ましくは陽イオン性、陰イオン性もしくは双性イオン性の基またはHである。より好ましくはXは式（II）の基である。好ましくはBは陽イオン、例えばNa⁺、K⁺もしくはテトラメチルアンモニウムイオンであるか、またはアルキル基である。好ましくはAはHまたはアルキル基である。より好ましくはAはアミンで置換されたアルキル基である。もっとも好ましくはAは式（III）、（IV）、（V）、（VI）または（VII）の基である。本明細書を通して式はプロトン付加形での構造を示しているが、それらには非プロトン性形態も含まれることは留意されるべきである（逆もまた同様である）。任意の組成物においていずれの形態が存在するかは組成物の正確なpH、および水および/または適切な対イオンの存在によって左右される。

40

前記骨格基Lはさらに2つの水素原子を失った（合計3つの開放結合点を提供する）アルキル、好ましくはアルコキシ、またはアミノ置換アルキルである。もっとも好ましくは、Lは式（VIII）、（IX）または（X）の基である。

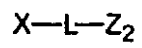
前記脂肪基Zは同じでも異なってもよく、H、E基または式（XI）である（式中Eはアルキルまたはアルケニルである。好ましくは、Eは非置換直鎖アルキルまたはアルケニルで6から26個の炭素原子を有する。より好ましくは、Eは式（XII）、（XIII）、（XIV）、（XV）または（XVI）の基である。前記脂肪基の1つがHである場合、他方は異なっていなければならない。二重結合が存在する場合はシス構造が好ましい。

10

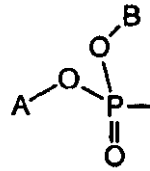
20

【 0 0 2 7 】

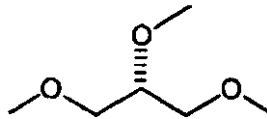
【化 6】



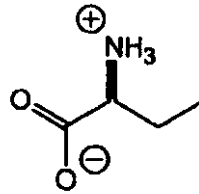
(I)



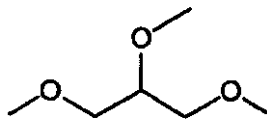
(II)



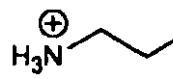
(VIII)



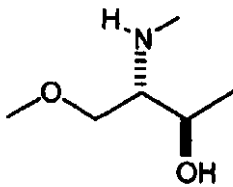
(III)



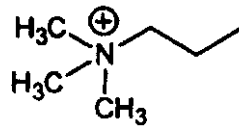
(IX)



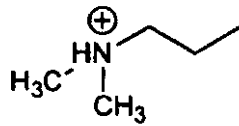
(IV)



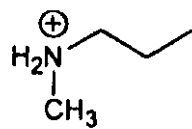
(X)



(V)



(VI)



(VII)

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

【化 7】



【 0 0 2 9 】

安定な小胞形成物質であるリン脂質（または極性脂質）は小胞を形成するリン脂質（または極性脂質）であって、少なくともその50%が以下のように調製したとき少なくとも1時間存続する：前記リン脂質をクロロホルムに溶解し、ガラスの試験管に入れる。窒素の定常流下で蒸発によって溶媒を除去し、続いてサンプルを真空中に12時間置いて空気を除去した。前記乾燥脂質材料を続いて前記脂質の相転移温度より高い温度で60分、10mMの Na_2HPO_4 中で再度水和させる。所望の最終濃度は25mg/mLである。さらに前記脂質混合物を40%の機関効率サイクルで用いられる450ワットマイクロチップ超音波発生装置により超音波処理して攪拌する。

好ましくは安定な小胞形成物質であるリン脂質の他に、少なくとも1つの他の極性脂質が含まれ、より好ましくは安定でない小胞形成物質である1つまたは2つ以上の極性脂質が含まれる。

【 0 0 3 0 】

ラフト形成物質は、小胞が水溶液中にあるとき小胞の脂質層内に存在し、小胞壁内に別個の領域を形成するかまたは形成させる化合物（またラフトとしても知られる）である。前記の別個の領域は小胞を不安定化させる傾向があり、その融合性を高める。ラフト形成物質の例はコレステロール（式XXIV）、スフィンゴミエリン並びに膜に結合することが知られているタンパク質およびポリペプチドである。融合性はまた極性脂質選択することによって強化することができる。極性脂質は小胞上に表面電荷をもたらし、前記は標的細胞のグーイ=チャップマン（Gouey-Chapman）層の電荷と反対である（典型的にはグーイ=チャップマン層は陽性に荷電されている）。

本発明で使用する極性脂質の例には以下が含まれる：1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）（式XVII；安定な小胞形成物質）、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート（POPA）（式XVIIIのナトリウム塩として示される）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（DOPC-e）（式XIXの塩化物として示される）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）（式XX）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-1-セリン]（DOPS）（式XXIのナトリウム塩として示される）、1-パルミトイル-2-ドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（式XXII；安定な小胞形成物質）、典型的なスフィンゴミエリン（式XXIII；コレステロールは、このスフィンゴミエリンとDOPCの混合物から形成された小胞に添加されるときラフトを形成するであろう）、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロール（式XXV）および1-パルミトイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（XXVI）。本発明の実施に有用な他の極性脂質にはホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルグリセロール（PG）ホスファチジルコリン混合鎖（MPC）、ホスファチジルエタノール（PE）およびデコサヘキサエン酸（decosahexaenoic acid）含有リン脂質が含まれる。cit-DOPCおよびcit-DOPC-eは特に有用である。ホスファチジルコリン（sn-1およびsn-2位にドコサヘキサエン酸を有するもの（DHPC）を含む）を用いてもよい。他の二不飽和脂質、例えばジアラキドニルホスファチジルコリン（例えば20:4DOPC:DAPC）、ジリノレノイルホスファチジルコリン（例えば18:3DOPC:DLnPC）もまた有用である。例えば、DOPCは、SUVを調製するときD LPC、DAPCおよびDHPCの量を増しながら混合することができる。有用な割合（DOPC:DLnPC、DAPCまたはDHPC）には1から1000:1、例えば25から500:1（1:1、25:1、50:1、100:1、500:1および1000:1を含む）の範囲が含まれる。大きな平均分子面積を有するリン脂質の組合せもまた用いることができる（例えばDOPC:DLnPC:DHPC）。ジアシルグリセロール（非ラメラ相脂質）もまたDOPCと混合することができる。さらにまた、20リピートから4000リピートまでの重量を有するポリエチレングリコール（PEG）を用いてもよい。

10

20

【0031】

好ましくは、安定な小胞形成物質であるリン脂質と安定な小胞形成物質ではない極性脂質の割合は1:1から500:1、より好ましくは10:1から100:1（例えば50:1）である。その例にはDOPC/DOPC-e（1:1）；DOPC/POPA（50:1）およびDOPC/POPA（1:1）が含まれる。

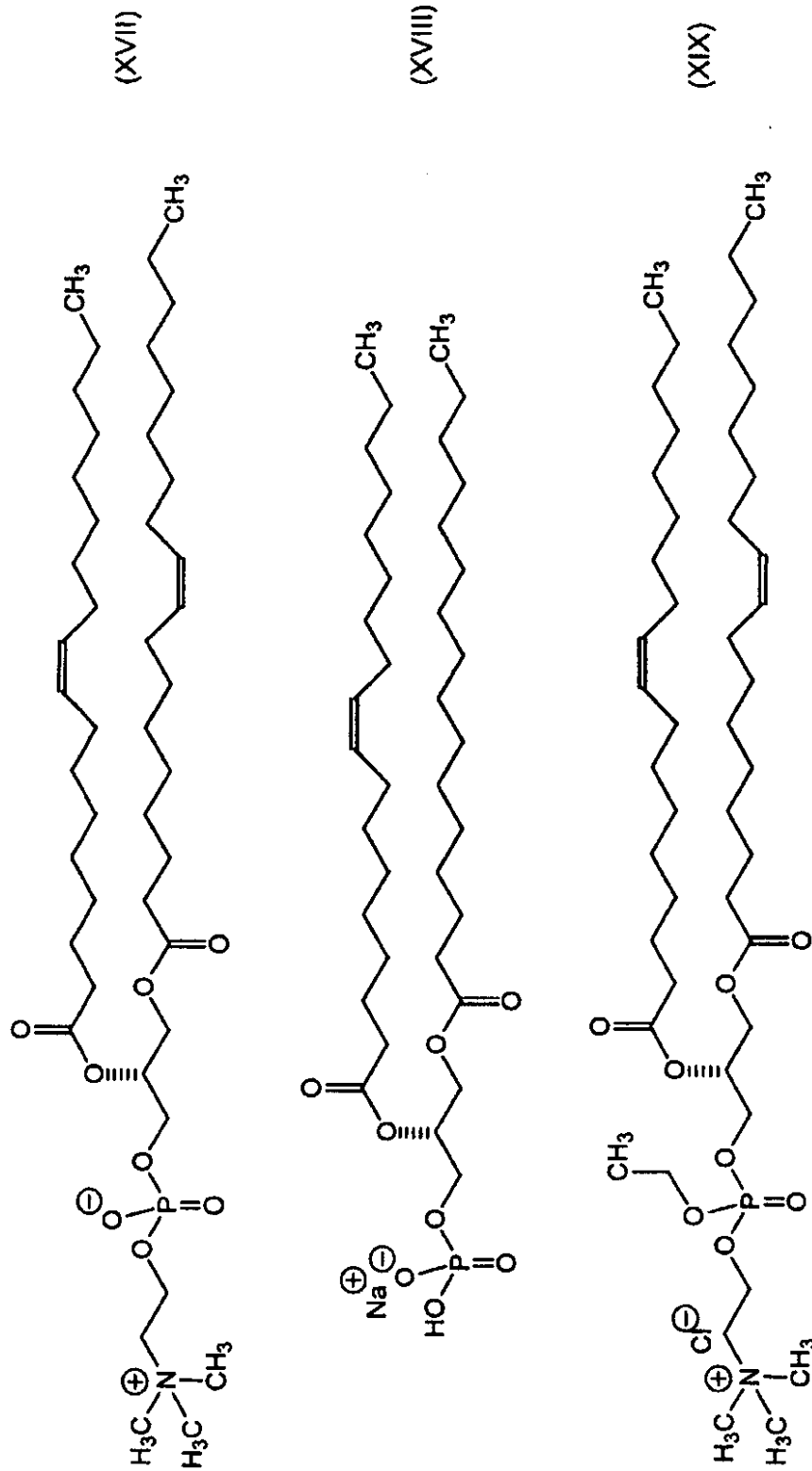
30

40

【0032】

50

【化 8】



10

20

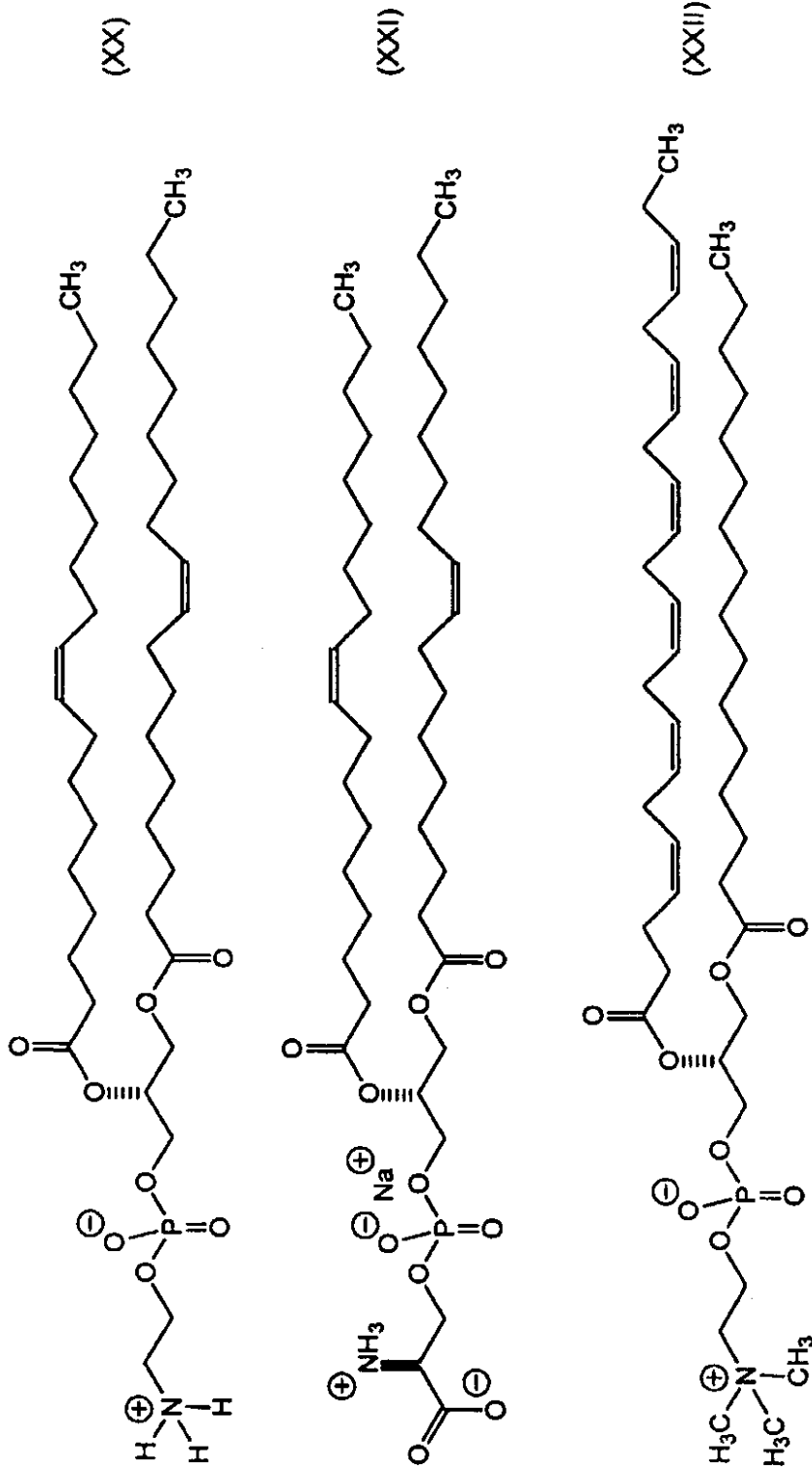
30

40

【 0 0 3 3 】

50

【化 9】



10

20

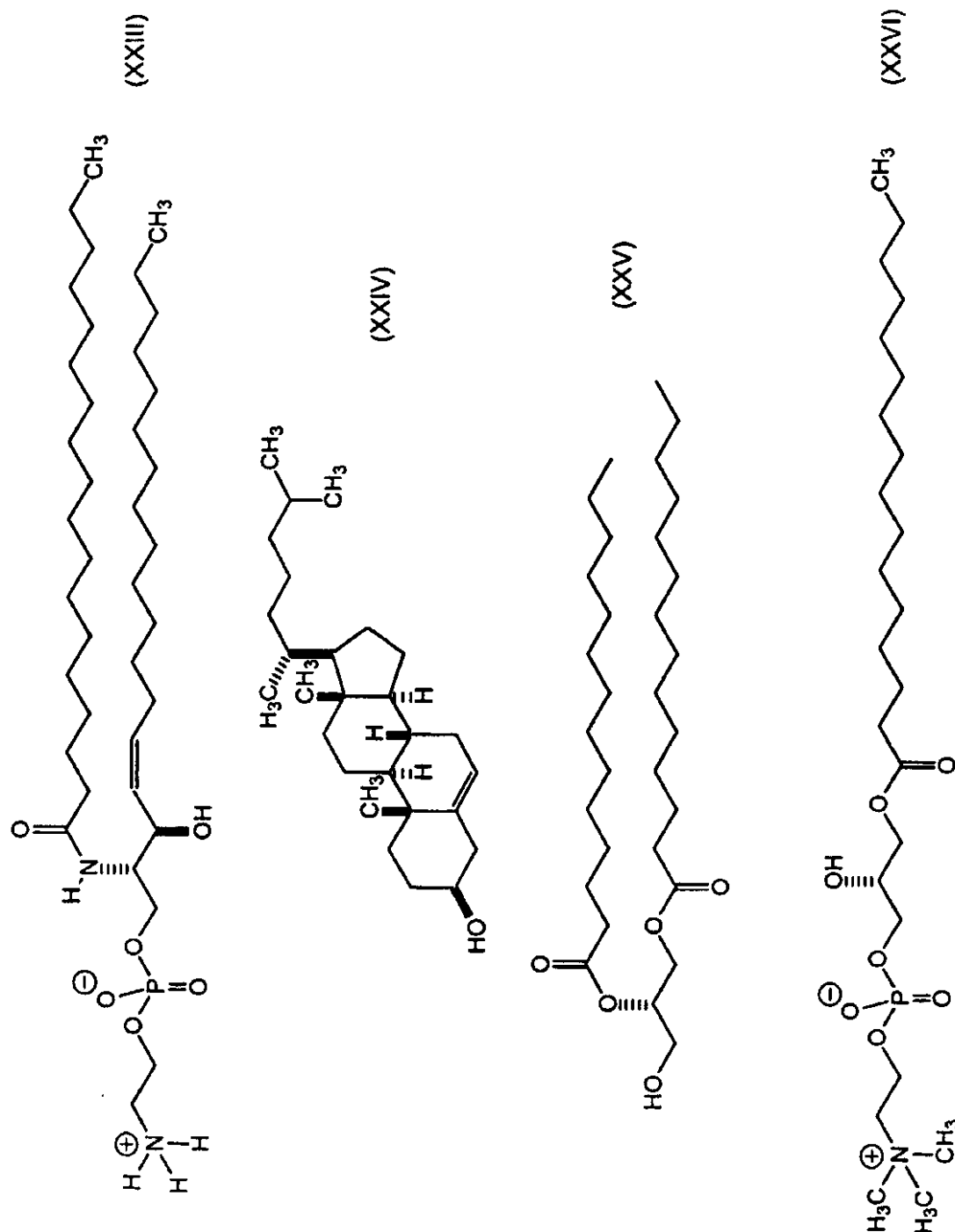
30

40

【 0 0 3 4 】

50

【化 1 0】



10

20

30

【0035】

脂質小胞構築物

脂質小胞を構築するために、脂質をクロロホルムまたは他の適切な有機溶媒に溶解して容器（例えばガラスの試験管）に入れる。溶媒を窒素または他の中性気体の定常流下で蒸発させることによって除去し、続いて、例えばサンプルを0.1から48時間（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、24、25、30、36、40、42または48時間）真空にして空気を除去する。通常は12時間で十分である。続いて、前記乾燥脂質材料を適切な緩衝液（例えばハックス塩類バランス溶液（HBSS）または10mMの Na_2HPO_4 ）に30から60分、前記脂質の相転移温度より高い温度で再度水和させる。望ましい最終濃度は通常は約1から30mg/mL、典型的には約25mg/mLである。続いて前記脂質混合物を激しく攪拌する。例えば超音波処理を用いることができる：例えば40%の機関効率サイクルで使用されるマイクロチップ450ワット超音波発生装置でSUVを作製する。超音波処理時間

40

50

は脂質材料の量に左右され、いずれの場合にも超音波処理はパーセントトランスミッションに更なる減少が認められないとき、または正確な小胞サイズが粒子サイズ分析装置を用いた分析により達成されたときに停止される。所望の場合は、脂質をUV分光光度計および薄層クロマトグラフィー（TLC）によって分析して酸化の程度を調べることができる。

【0036】

他の溶液も前記乾燥脂質の再水和時に用いることができる。前記溶液には、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸（BES）、ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ-トリス(ヒドロキシメチル)メタン（BIS-トリス）、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-3-プロパンスルホン酸（EPPSまたはHEPPS）、グリクルクリシン（glycylclysine）、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（HEPES）、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタン-スルホン酸)（PIPES）、重炭酸ナトリウム、3-(N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチル-アミノ)-2-ヒドロキシ-プロパンスルホン酸（TAPSO）、（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸（TES）、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-グリシン（トリシン）、およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン（トリス）で緩衝された溶液が含まれる。他の適切な溶液例には以下の塩類溶液が含まれる：アルスパー溶液、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水（DPBS）、アールの塩類バランス溶液、ゲイ塩類バランス溶液（GBSS）、バック食塩水液A、タイロード塩溶液、セントトーマス溶液およびウイスコンシン大溶液（University of Wisconsin Solution）。

【0037】

他の成分もSUVに取り込ませて前記SUVの融合速度を操作することができる。例えば、膜融合に中心的に関与するポリペプチド、例えばフェリチン、可溶性N-エチルアミン感受性因子結合タンパク質レセプター（SNARE）、SM(sec1/munc18)ポリペプチド（例えばVps33p、Sly1pおよびVps45pの哺乳類アイソフォーム（Jahn & Sudhof, 1999））およびウイルスエンベロープ融合タンパク質（例えばヒト免疫不全ウイルス由来のもの（HIV；例えばgp41）、セムリキ森林ウイルスおよびインフルエンザウイルス由来のもの）である。哺乳類のSNAREファミリーにはシンタキシン（1A、1B、1C；2（およびスプライシング変種）；3、3A、3B、3C、3D；4；5、5A、5B、6、7、8、10、11、12、13（おそらく12と同一）；16（A、B、C）；および17）、Hsyn16、rbet1、GS15、GOS32、GOS28、メンブリン、SNAP（25、25a、25b；23、23A、23B；29）、vti1b、シナプトブレヴィン（1およびスプライシング変種；2）、セルブレヴィン、VAMP4、VAMP5/6、Ti-VAMP、エンドブレヴィン、トモシンおよびmsec22b（Jahn & Sudhof, 1999））が含まれる。膜を脱安定化させる他の両親媒性ペプチドもまた（たとえそれらの主要機能が膜融合を仲介するためではなくても）融合促進に用いることができる（例えばアネキシン（Jahn & Sudhof, 1999））。

特定の細胞に標的として誘導するために、前記標的細胞に特異的なポリペプチドと相互作用する（例えばリガンド-レセプター相互作用）（少なくともSUVが投与される領域で）ポリペプチド、または細胞特異的抗原を認識する抗体をSUVに取り込ませてもよい。他の標的誘導ポリペプチドには、細胞膜間の輸送時に用いられるものおよびRabGTPアーゼタンパク質が含まれる。ウイルス融合タンパク質もまた標的誘導分子として利用することができる。膜結合物質、例えばビオチン化（biotinylded）脂質および炭水化物もまた用いることができる。

【0038】

ATPの被包化

典型的には、ATPのマグネシウム塩が脂質の再水和時に添加される。ATPの濃度は変動させることができ、前記は用途に依存するであろう。好ましく用いられるATP濃度には、0.01mMから200mM、好ましくは0.1mM、1mM、2.5mM、5mM、7.5mM、10mM、25mMおよび50mM、より好ましくは0.1mM、1mM、10mMが含まれる。ATPを含有する緩衝液では、脂質材料の非特異的吸収の機会を減らすためにタンパク質含有量は低くなければならない。ATPを含有するSUVは便利のようにATP-SUVと称する。

SUVによるATPの被包化は容易に判定できる。例えば、標識ATP分子（前記標識が小胞形

10

20

30

40

50

成に干渉しないようなもの)、例えば放射能標識ATP(好ましくはトリチウム付加ATPを用いることができる。放射能標識には ^{32}P および ^3H が含まれ、前記は乾燥後に脂質を再水和するときに攪拌の前に添加される。前記溶液をセファデックスG-25カラム(または他の適切なマトリックス)に適用し、未被包化ATPを除去する。前記カラムの流出液を採集し、小胞の存在についてアッセイする。SUVは通常もっとも初期の分画に溶出する。パーセント被包化は、小胞および上清分画の放射能を定量し、被包化ATPの割合を決定し100を乗じることによって決定される。好ましい被包化百分率は約1%から10%の範囲である。

ATP以外の分子、例えば有機および無機分子もSUVを用いて細胞にデリバリーすることができる。前記分子には医薬、ポリペプチド、核酸および細胞内抗原と相互作用する抗体が含まれる。

10

【0039】

SUV融合性を測定するアッセイ

融合速度は、ウェル中のHUVEC細胞(約 10^6 細胞)と1秒当たり融合する脂質小胞数の測定値である。前記アッセイは以下の工程を有する:

- (1) HUVEC細胞(アメリカ菌培養集積所(ATCC)、Manassus, VAまたはBioWhittaker; MD)を培養し;
- (2) SUVを調製し、蛍光プローブ(例えばカルボキシフルオレセイン)をロードし;
- (3) 前記SUVを細胞と接触させて融合させ;
- (4) 選択した時間に残留SUVの全てを除去し;さらに
- (5) 蛍光を測定する。

20

SUV除去後の蛍光の存在および強さは、細胞膜と融合し、内容物をデリバリーするSUVの能力を示す。

【0040】

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は例として提供される。細胞を標準的な12ウェルの培養皿(例えばCOSAR、細胞の数は約 10^6)で内皮細胞増殖培養液(EGM)でコンフルエンスに増殖させる。続いてHUVECを緩衝液(例えばHBSS)で3回洗浄する。調製した脂質小胞(例えばDOPC/DOPC-e(1:1); DOPC/POPA(50:1); DOPC/POPA(1:1); PS、PG、MPC、PE、cit-DOPCおよびcit-DOPCe)に1mMのカルボキシフルオレセインをロードする。前記小胞を前記細胞と120分、95%空気/5% CO_2 、37°Cでインキュベートし、5分経過毎に蛍光をアッセイする(前記時間後に残留する小胞を緩衝液で細胞を洗浄することによって除去する)。陰性荷電脂質小胞を用いる場合は、カルシウム(最終濃度0.1から10mM)を融合工程で添加する。

30

細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去する。ルミネセンス分光光度計または他の適切な装置を用いて蛍光を測定する(495nmで励起および520nmで放射)。

ATP-SUV組成物の融合速度は約20小胞融合/秒から 8.0×10^{11} 小胞融合/秒で、500から 1×10^8 小胞融合/秒; $750,000$ から 50×10^7 小胞融合/秒; 5×10^6 から 1×10^7 小胞融合/秒を含み、 1×10^6 から 8×10^8 小胞融合/秒; 1×10^7 から 5×10^8 小胞融合/秒を含む。融合速度の例は、少なくとも100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} および 10^{11} 小胞融合/秒である。前記の値のいくつかは、DOPCおよびDOPC/DOPC-eおよびDOPC/POPAの混合物(カルシウムを含むかまたは含まない)およびヒト内皮細胞を用いて37°Cで実験的に得られた。

40

【0041】

形質膜の脂質組成は細胞タイプによって変動するので、アッセイで使用する細胞の選択は注意深く考慮して、標的細胞と最良の状態と適合する必要がある。例えば肝細胞の形質膜は約7%のホスファチジルエタノールアミンから成るが、赤血球の形質膜は18%のホスファチジルエタノールアミンを含む(Alberts et al. 2002)。初代培養細胞[細胞株(アメリカ菌培養集積所(ATCC)、Manassus, VAから入手できる)も同様]が有用であるが、形質転換細胞では形質膜の脂質組成が変化するので初代培養が好ましい。細胞タイプには脾臓、腸、免疫系、神経系(脳、眼、鼻および耳の神経系を含む)、肺臓、心臓、血液、循環系(リンパ節および血液)、骨、軟骨、生殖系、腺、象牙質、脂肪組織、皮膚および肝臓細胞が含まれる。細胞株には前記組織に由来するもの、例えばメーデ

50

イン=ダーバイ (Madin-Darby) イヌ腎臓 (MDCK)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、HeLaなどが含まれる。細胞は他の生物 (例えば植物、真菌 (酵母を含む) および細菌) に由来するものでもよい。これら他の細胞タイプとの融合速度の例には少なくとも100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} および 10^{11} 小胞融合/秒が含まれる。別に特定されなければ、融合速度は上記の固有条件下でのHUVECに関するものである。他の細胞タイプに関する融合速度は、例えばHBSSのような緩衝液で約 10^6 細胞についてであり、小胞は、37℃で120分、95%空気/5%CO₂で細胞とともにインキュベートされ、その後残留小胞は緩衝液で細胞を洗浄することによって除去される。

【0042】

融合速度最適化のためのアッセイ

10

具体的な小胞組成物と個々の細胞タイプとの融合速度を最適化させるときに、融合速度アッセイをさらに改変することができる。例えば、脂質小胞は、小胞の二重膜の部分である蛍光または放射能トレーサーを含むことができる。

他の蛍光プローブもまた用いることができる。前記には以下が含まれる：フルオレセインイソチオシアネート；フルオレセインジクロロトリアジンおよびフルオレセインのフッ化アナログ；ナフトフルイレセインカルボン酸およびそのスクシンイミジルエステル；カルボキシローダミン6G；ピリジルオキサゾール誘導体；Cy2、3および5；フィコエリトリン；スクシンイミジルエステル、カルボン酸、イソチオシアネート、スルホニルクロリドおよびダンシルクロリドの蛍光種（プロピオン酸スクシンイミジルエステルおよびペンタン酸スクシンイミジルエステルを含む）；ローダミンレッド-Xスクシンイミジルエステル；テキサスレッドスルホニルクロリド；テキサスレッド-Xスクシンイミジルエステル；テキサスレッド-Xナトリウムテトラフルオロフェノールエステル；レッド-X；テキサスレッド染料；テトラメチルローダミン；リサミンローダミンB；テトラメチルローダミン；テトラメチルローダミンイソチオシアネート；ナフトフルオレセイン；クマリン誘導体；ピレン；ピリジルオキサゾール誘導体；ダポキシル染料；カスケードブルーおよびイエロー染料；ベンゾフランイソチオシアネート；ナトリウムテトラフルオロフェノール；および4,4'-ジフルオロ-4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン。励起波長は前記化合物に応じて変動するであろう。脂質小胞は、例えば1:800脂質/プローブの比率にあるトレーサーの存在下で作製される。他の有用な比率には1:200から1:10,000（1:400、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900および1:1000を含む）が含まれる。

20

30

【0043】

融合速度の変更

いずれの脂質小胞の融合速度も、多様な因子（例えば温度、イオン、脂質濃度、脂質小胞の組成、流速、脂質小胞サイズなど）を変化させることによって変更することができる。SUVのリン脂質組成式の変更によって、毒性を最少にするだけでなく融合速度を最大にすることができる。例えば、移植のための器官の保存または懸濁細胞（例えば血液）の保存のために、融合速度が遅いSUVが所望される。前記のような速度はDOPCのみから成る小胞により得ることができる。他方、迅速な細胞内ATPの上昇が必須である場合（例えば卒中、心臓発作または外傷者の場合）、非常に高速のデリバリー速度をもつSUVが所望される。例えば、DOPC/POPA組成物は十分なATPを5分未満でデリバリーする（実施例参照）。

40

4つの一般的なアプローチを用い脂質組成を操作することによって融合速度を変更することができる：

- (1) 静電的相互作用の強化；
- (2) 二重膜の脱安定化；
- (3) 非二重膜相の増加；および
- (4) 非類似脂質相の生成。

【0044】

静電的相互作用の強化：静電的相互作用を利用して融合速度を高めることができる。リン脂質はそれらの電荷にしたがって分類される（陽イオン性、陰イオン性および双性イオン）。陽イオン性リン脂質（例えばPE）および陰イオン性リン脂質（例えばホスファ

50

チジン酸、POPA)の多くは生理的pHで閉鎖小胞を形成しない。しかしながら、双性イオン性ホスファチジルコリンと混合された陰イオン性および陽イオン性脂質は生理的pHで閉鎖小胞を形成することができる。

ほとんどの細胞の形質膜は正味の陰性荷電を有する。この陰性荷電のために、均衡するイオン(典型的にはカルシウム、マグネシウム、ナトリウムおよびカリウム)の層が存在し、前記は正味の陽性荷電を提供する。リポソームと形質膜との間の前記静電的相互反応を利用しながら、SUVは正味の陰性荷電をもつように、したがって細胞-脂質小胞融合を最大にするように作製される。しかしながら、いくつかの形質膜はより多くの陽イオン性脂質を含有し、前記は陰イオン性イオン層と均衡する。前記のような状況下では、SUVは正味の陽性荷電をもち、細胞-脂質小胞融合を最大にするように作製される。

10

【0045】

非類似脂質相の生成：形質膜は、特定の脂質種に富む脂質ドメインまたはラフトを含有する。そのような膜ラフトの境界には非類似脂質種領域が存在する。前記の領域は潜在的な不安定性を有し、前記膜と他の膜との相互反応の態様を決定する。いくつかのリン脂質は脂質ラフトの形成を高めることが知られている。前記にはホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンおよびコレステロールの混合物が含まれる。例えば、DOPC、18:0スフィンゴミエリンおよびコレステロールは、SUV調製時に1:1:1の割合で混合される。コレステロールは優先的にスフィンゴミエリン相に分配され、DOPCが豊富でコレステロールが乏しい領域、およびスフィンゴミエリンが豊富でコレステロールが豊富な領域を生じる。

融合の物理的パラメーター、温度、濃度、イオン強度および融合時間を変化させることによって融合速度に影響を及ぼすことができる。温度を変化させることによって、系の自由エネルギー(G)が変化し、種々の融合速度がもたらされる。脂質小胞濃度もまた(特に非常に高い濃度で)膜の融合速度に影響を与えることができる。融合時間(融合の長さ)および融合の回数もまたSUVの被包化内容物のデリバリー速度に影響を与える。

20

【0046】

温度：ATP-SUVを組織とともに前記組織が保存される温度で5、10、15、30、60または120分インキュベートする(4：低温、22：室温、37：通常温度)。小胞溶液の温度上昇は小胞の動力学的エネルギーの増加をもたらす、したがって融合能力の増加をもたらす。温度はまた小胞の自由な拡散に影響を与える。

小胞融合に対する濃度：濃度上昇はSUV内容物のデリバリーの強化をもたらすということは直観的に認識されるが、膜融合は直線的ではない。いったんSUV脂質が形質膜の利用可能な表面を占有したら、更なる融合は制限される。形質膜との融合の程度は膜の容積および特性(例えばイオンの透過性および脂質の編成)に影響を与える。したがって、SUVを投与するとき、SUVの濃度は標的細胞が効果的に治療されるように制御する必要がある。

30

融合時間：融合が生じる時間の長さは、被包化物質がデリバリーされる程度の制御に役立つ。好ましい融合時間は1から180分、例えば1、5、10、30、60、120および180分である。融合を中止させるために、小胞を除去するか(例えば緩衝液による洗浄によって)、または投与される小胞の濃度は所望の時間の終了時には前記小胞が枯渇するような時間である。融合はまた、小胞の全てのデリバリーが1回の投与をまたは複数回の投与の全体を通して制御されるように最適化することができる。例えば、標的の融合時間が120分である場合、60分2回を用いてもよく、または30分を4回、10分を12回、もしくは5分の融合時間を24回用いてもよい。適切な装置が利用可能であることを条件として、1分またはそれよりも短い融合時間もまた実施できる。ただしこのような時間はしばしば不便であり、技術が要求される。

40

【0047】

標的細胞および組織のATP要求の測定

ATP投与の最適速度は、細胞のATPに対する基礎代謝要求に近似するものであり、前記は当分野で公知の任意の方法によって決定できる。酸素消費速度、ピルベート、グルコース、ラクテートおよびプロトンリークを計算し、前記のデータから組織のATP消費をATP消費/分として決定できる。

50

組織の酸素消費：組織サンプルを予め-20℃に冷却したガラスのホモジナイザーに入れる。氷冷の単離緩衝液（例えば200mMのシュクロース、70mMのKCl、5mMのマレエートおよび40mMのトリス（pH7.3））を添加し、組織を穏やかに均質化する。前記ホモジネートを簡単に遠心して未均質化物質を除去する。続いて5mLの酸素付加緩衝液を酸素計に入れ、37℃に平衡化させる。前記細胞をYSI酸素浴スターラー（Yellow Springs, OH）に最終タンパク質濃度2から3mg/mLで入れる。前記溶液に酸素プローブを入れ、YSI酸素計を用いて前記溶液中の酸素%を測定する。続いて前記酸素浴にADPを添加し第二段階の呼吸速度を実施し、続いてグルタメートを添加し、第三段階の呼吸速度を実施する。いったん前記組織がグルタメートを消費したら、最終段階の呼吸状態、第四段階を実施する。前記ホモジネートに添加したADP量に対する第三段階の呼吸速度をグラフに表すことによって、リン/酸素（P/O）比を算出できる。この値は、組織がADP/分から生成することができるATP量を決定する。前記は組織が1分間に消費するATP量の指標である。

10

【0048】

膜電位およびプロトンリーク：組織サンプルを単離し、膜電位蛍光プローブMC540（Sigma; St. Louis, MO）とインキュベートする。以前に報告されたように（Brand, 1995）、種々の量のカリウムを添加したときのMC540の蛍光における変化を膜電位およびプロトンリークの指標として測定する。

グルコース、ピルベートおよびラクテートレベル：これらの代謝中間物質は標準的な方法または市販の分析キット（例えばSigmaから入手できるようなもの）を用いて測定される。前記の中間物質のレベルをタンパク質レベルに対して調整し、120分にわたって測定する。

20

ATP消費の測定：ラクテート、ピルベートおよびグルコース蓄積速度、酸素消費並びにプロトンリークから、文献の記載にしたがって（Ainscow & Brand, 1999）化学量論的反応を用いることによって、前記系を通過する全ての流量を算出することが可能である。

【0049】

投与

医薬組成物：多くの事例で、ATP-SUVは、前記ATP-SUVおよび前記の製造に用いた緩衝液を含む簡単な組成物としてデリバリーすることができる。しかしながら、所望の場合には他の生成物（例えば医薬組成物の担体として慣例的に用いられるもの）も添加することができる。

30

“医薬的に許容できる担体”には、医薬としての投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌および抗カビ剤、等張性および吸収抑制剤などが含まれる（Remington, 2000）。前記の担体または希釈剤の好ましい例には、水、食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が含まれる。補充的活性化合物もまた前記組成物に取り入れることができる。

一般的考慮：本発明の医薬組成物は、その意図した投与経路（静脈内、皮内、皮下、経口、吸入、経皮、経粘膜および直腸投与を含む）に適合するように製剤化することができる。非経口、皮内または皮下適用のために用いられる溶液および分散液は以下を含む：無菌的希釈剤（例えば注射用水、食塩水溶液、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えばアスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；緩衝剤（例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）；および浸透圧調節剤（例えば塩化ナトリウムおよびデキストロース）。pHは酸または塩基（例えば塩酸または水酸化ナトリウム）で調節することができる。非経口用調製物は、ガラスまたはプラスチック製アンプル、使い捨て注射筒またはマルチドースバイアルに封入することができる。

40

ATP-SUVで陰性荷電脂質小胞を用いる場合は、カルシウムが融合部位での最終濃度が好ましくは0.1mMから10mM（0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10mMを含む）となるように含まれる。

【0050】

ATP-SUV中のATPは通常はATP-SUVを取囲む一切の溶液中のATPと平衡状態にある。典型的

50

には総ATPのわずかに1から10%がATP-SUV内に存在する。残りのATPはレセプター（例えばプリノレセプターP2y）と結合して、イオンを細胞から流出させ、イオンバランスおよびホメオスタシスに干渉することができる。通常は、細胞はイオンバランスおよびホメオスタシスを再度確立させることができるが、そのためにさらに新たなATPを消費する。したがって、特に迅速な機能回復が要求される組織については（例えば器官移植または四肢の再結合時）、1つまたは2つ以上のプリノレセプターP2yアンタゴニストを前記組成物に含むことは有利である。プリノレセプターP2yアンタゴニストは好ましくは小胞形成後、または投与の直前に前記組成物に添加される。なぜならば、前記アンタゴニストはSUV内に存在する必要がないからである。プリノレセプターP2yのアンタゴニストの例には以下が含まれる：ピリドキサル5-ホスフェート、ビタミンB6（ピリドキサル-5-リン酸）および反応性ブルー2（1-アミノ-4-[[4-[[4-クロロ-6-[[3(または4)-スルホフェニル]アミノ]-1,3,5-トリアジン-2-イル]アミノ]-3-スルホフェニル]アミノ-9,10-ジヒドロ-9,10-ジオキソ-2-アントラセン sulfonic acid]並びにその組合せ。前記プリノレセプターP2yアンタゴニストは、好ましくは0.1から250 μ モル/L、より好ましくは1から100 μ モル/Lの濃度で用いることができる。

10

【0051】

注射用製剤：注射に適した医薬組成物は、無菌注射溶液もしくは分散液の即席調製物のための無菌的水溶液または分散液を含む。静脈内投与の場合、適切な担体には生理学的食塩水、制菌水、CREMOPHOR EL（登録商標）（BASF, Parsippany, N.J.）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。全ての事例で、前記組成物は無菌的であり、注射筒を用いて投与できるように液体でなければならない。そのような組成物は製造および保存中に安定で、微生物（例えば細菌およびカビ）の夾雑に対して保護されなければならない。前記担体は、例えば水、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコール）および他の適合性を有し適切な混合物を含む分散媒体であろう。種々の抗菌および抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサルを微生物の夾雑防止に含むことができる。等張剤、例えば砂糖、ポリペプチドアルコール、例えばマンニトール、ソルビトールおよび塩化ナトリウムを前記組成物に含むことができる。吸収を遅らせることができる組成物は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことができる。

20

無菌的注射溶液は、必要な量のATP-SUVを必要とされる成分の1つまたは組合せとともに適切な溶媒に取り込ませ、続いて滅菌することによって調製できる。無菌的注射溶液調製のための無菌的固形物を製造する方法は、ATP-SUV脂質および所望される任意の成分（例えばATP）を含有する固形物を得るために無菌的溶液を真空乾燥および凍結乾燥することを含む。

30

【0052】

経口用組成物：一般的には経口用組成物は不活性な希釈剤または食用担体を含む。前記はゼラチンカプセルに封入するか、または圧縮して錠剤にすることができる。治療的経口投与のためには、活性化合物は賦形剤とともに取り入れられ、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で用いることができる。経口用組成物はまた、口内洗浄液として使用するために液状担体を用いて調製することができる。この場合、前記液状担体中の化合物が経口的に用いられる。医薬的に適合できる結合剤および/またはアジュバント物質を含むことができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは以下の成分のいずれかまたは類似の性質をもつ化合物を含むことができる：結合剤、例えば微晶質セルロース、アラビアゴムまたはゼラチン；賦形剤、例えば澱粉またはラクトース；崩壊剤、例えばアルギン酸、PRIMOGELEまたはトウモロコシ澱粉；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはSTEROTES；潤滑剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えばシュクロースまたはサッカリン；香料、例えばペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料。

40

【0053】

吸入用組成物：吸入による投与の場合、前記化合物は、エロゾルスプレーとしてネブライザーまたは加圧容器（適切な発射薬（例えば二酸化炭素のような気体）を含む）から

50

デリバーされる。

経粘膜または経皮投与：投与は経粘膜または経皮でもよい。経粘膜または経皮投与の場合、標的バリアーを浸透することができる浸透剤が選択される。経粘膜浸透剤には、洗剤、胆汁塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。鼻腔スプレーまたは座薬は経粘膜投与に用いることができる。経皮投与の場合、活性化合物は軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームとして製剤化される。座薬（例えばココアバターおよび他のグリセリドのような基剤を含む）または直腸デリバリー用停留浣腸もまた調製できる。

担体：ある実施態様では、活性化合物は、身体から迅速に排除されないように前記化合物を保護する担体とともに調製される。前記は例えば徐放性製剤であり、インプラントおよび被包化マイクロデリバリー系が含まれる。生体内崩壊性または生体適合性ポリマー、例えば酢酸エチレンビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ酪酸を用いることができる。そのような物質は以下から購入するか（ALZA Corporation (Mountain View, CA) ; NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA)）、または当業者により調製することができる。

10

【0054】

投与量：投与量は、種々のSUV脂質組成が変動するATP-SUVの固有の特性、個々の所望される治療効果および投与経路によって決定され、前記に直接的に左右される。個々のいずれの患者または適用に対しても固有の用量レベルおよび頻度は変動するであろう。考慮しなければならない要件には以下が含まれる：（１）投与が実施され融合が許容される温度；（２）投与部位のイオン環境およびATP-SUV組成物のイオン強度；および（３）融合が許容される時間。前記の要件を管理して被包化物質（ATPを含む）がデリバーされる程度を制御することができる。

20

SUVを投与するとき、SUV濃度を制御して標的細胞を効率的に治療しつつ、一方でSUV脂質により形質膜を飽和させることによって標的細胞の機能を阻害しないようにする。好ましいSUV濃度は、脂質組成、標的細胞の分散および投与されるべき容積に左右されるが、0.5mg/mLから100mg/mL、例えば0.5mg/mL、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mLおよび100mg/mLであろう。

【0055】

静電氣的相互作用により生じる小胞融合は、カルシウムおよび/またはマグネシウム濃度の変化によって大きく影響を受け、さらに前記より程度は低いナトリウムおよび/またはカリウム濃度によって影響を受ける。前記のイオン濃度をATP-SUV投与に用いる組成物において、またはATP-SUV投与の前後に標的部位に投与する組成物において調節することは、投与量を考える上で影響を与える。好ましくは、0.01nMから1mMのイオン濃度（0.1nM、1nM、10nM、100nM、1000nM、10 μ モル/Lおよび100 μ モル/Lを含む）が用いられる。前記のイオンおよび他のイオンの組合せもまた用いることができる。

30

長期間の投与計画または単回投与を用いてもよく、治療のタイプ、投与経路、小胞それ自体に応じて選択される。好ましい融合時間には1から180分、例えば1、5、10、30、60、120および180分が含まれる。融合を停止させるためには、前記ATP-SUVを除去するか（例えば緩衝液で洗浄することによって）、または前記小胞濃度は、所望の時間の終了時点で前記小胞が消費し尽くされるような濃度である。融合はまた、小胞の総デリバリーが1回投与またはマルチ投与の全体を通して制御されるように最適化される。例えば、融合時間が120分の場合、60分間2回を用いてもよく、または30分4回、10分12回、5分24回を用いてもよい。

40

【0056】

ATP-SUVの使用

ATPに対し細胞が普遍的にATPを要求するので、ATP-SUVおよび他のSUV/ATP組成物は、生物界全体に及ぶ広い用途を有する。

血液：血液は、赤血球が生命活性を失うまで約45日間冷蔵下で保存することができる。赤血球は典型的には循環系で約120日間生存し、その後脾臓および肝臓がそれらを除去および破壊する。したがって、生命活性をもたない細胞を輸血した場合、それらは同様に循

50

環系から直ちに除去される。

採集した血液にATP-SUVまたは他のSUV被包化ATP組成物を添加することによって、赤血球はより長期間維持され、生命活性の保存時間を延長し、循環系で前記細胞は存続し破壊されない公算が高くなる。

脂質組成を変更してATPデリバリーを最適化させることができる。例えば、血液は4で保存されるので、ATPの代謝要求は低いであろう。たとえSUVの融合速度もまた前記温度で低下するとしても、前記速度は生命活性の保存には高すぎ、SUV脂質組成は前記血液細胞の代謝要求により良好に適合するように誘導される。

採集血液全体が本発明の組成物と接触状態で保存されるときには、白血球および血小板もまた利益を受けより長期にわたって生命活性を維持するであろう。

10

【0057】

切断身体部分の再移植のための維持：身体部分の切断（通常は不注意）後に、再移植が成功するか否かは、その本体から分離して生存する前記付属物の能力に大きく左右される。虚血時間が長ければ長いほど、再移植が機能的な付属物をもたらす可能性またはいずれの成功をもたらす可能性も減少する。

ある実施例では、再生させる受傷四肢の主要な栄養供給動脈に還流のために挿管される。前記四肢にATP-SUVを4時間毎に、または組織ATPレベルの変化から必要であると決定されたときに還流を実施する。前記四肢の動脈圧を還流中にモニターし流れにより誘発される損傷（flow-induced injury）の機会を減らし、さらに前記受傷四肢の全体的な保存状態をモニターする（より高い還流圧は四肢の病的状態の指標となるであろう）。前記保存時間の後、四肢をリンゲル液または他の適切な溶液でフラッシュしてATP-SUVの痕跡を除去する。続いて前記四肢を周知の方法を用いて外科的に再結合させる。吻合後の四肢機能の外的指標（色、微小血栓の証拠、温度、拍動、酸素飽和、ドップラーフロー値）を査定して成功をモニターする。再移植の前後にヘパリンを適用し、抗生物質治療を開始して感染の可能性を抑える。

20

心停止：低酸素症状後直ちに、または可能な限り速やかにATP-SUVを静脈内注射または心臓内注射によって心臓に注入する。SUV脂質組成物はATPデリバリーが心臓組織の代謝要求に綿密に適合し、心機能を最大限にできるように操作される。ATP-SUVは、虚血の危険が過ぎ去るまで定常的に生理的状态で心臓に還流させることができる。

【0058】

器官保存のためのATPのデリバリー：器官（例えば心臓、肝臓、肺臓、腎臓または脾臓）をドナーから取り出し、前記器官の主要な栄養供給動脈に挿管する。前記器官の血液を食塩水、リンゲル溶液または他の適切な溶液を用いて前記器官から洗い流す。ATP-SUVを通常の保存溶液または緩衝液に添加し、前記器官に穏やかに還流させる（80mmHg）。その頻度は器官によって変動する。同じATP-SUVを動物実験室の設定で用いることができる。例えば、ラーゲンドルフ（Legendorff）心臓（または他の器官）還流装置が用いられる。大動脈に挿管し、心臓を還流チャンバーに置く。前記心臓にATP-SUVを加えた酸素付加還流液を還流させる。高濃度のカリウム溶液を注射して心停止を発生させることができる。ATP-SUVによる心停止法を前記保存期間中に採用することができる。機能実験のために前記心臓を再還流してもよいし、また虚血保存後に移植することもできる。

30

40

【0059】

ATPの全身的デリバリー：ATP-SUVを種々の理由のために生物に投与することができる。例えば、ATP-SUVを用いて身体にエネルギーを補充することができる（好ましい投与経路は経口的、局所のおよび吸入である）。またATP-SUVを用いて全身の酸素依存度を低下させることができる（この場合の好ましい投与経路は静脈内であろう）。ATP-SUVを頸動脈から動物に持続輸液によって投与するとき、心拍および血圧は減少し、呼吸が停止する。低酸素症の9分後でさえ動物を蘇生させることができる（実施例参照）。

創傷のためのATP-SUV：創傷への血流が減少するために、創傷周辺の細胞が利用できる酸素は減少する。酸素供給の低下はATP産生の低下をもたらし、前記は、創傷治療に必要な多くの細胞事象（タンパク質および核酸の合成、イオンチャネル機能、シグナルトラン

50

スダクションおよび運動機能を含む)を遅らせる。

【0060】

ATP-SUVは創傷の治癒の度合いまたはATP消費の度合いによって必要に応じて前記創傷に適用される。例えば、創傷の境界部の細胞に十分なATPを提供して創傷の閉鎖を加速するために、ATP-SUVは好ましくは1日に1回から12回、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12回/日適用される。好ましくは、ATP-SUVは創傷上に特別にデザインされたアプリケーション中に直接配置される。前記アプリケーションは、創傷境界部の細胞と直接接触させる状態で水を基剤とした前記ATP-SUVを保持する。また別には、ATP-SUVはクリームまたは他の局所用医薬組成物として局所的に適用することができる。

ATP-SUVはまた、既に利用可能な治癒組成物と一緒にしてさらに治癒を強化することができる。例えば、ATP-SUVは、レグラネックス(Regranex(登録商標))で見出されるようにベカプレルミンと一緒にすることができる。ベカプレルミン以外の他の創傷治療成分には防腐薬、抗生物質および麻酔薬が含まれる。“創傷治療成分”という用語はSUVを含まない。

10

【0061】

出血性ショックのためのATP-SUV：出血性ショックは、内部損傷または外傷によって生じる出血または大量の血液を失うことに起因する。血液供給が不十分であるために、対象者はしばしば低血圧を発症し、器官不全および急死をひき起こす。

出血性ショックの発症に対抗するために、輸液の補充としてATP-SUVを静脈内に輸液する。続いて全身の酸素付加が改善されるにつれて、ATP-SUVを減少させることができる。

20

血小板保存のためのATP-SUV：血小板は約5日の保存期間を有する。その後、血小板は廃棄されねばならない。血小板機能の低下は部分的にはATPの低下に起因する。

単離血小板に細胞内ATPレベルの維持に必要とされるときにATP-SUVを添加する。血小板の保存期間がそれによって延長される。ATP-SUVを血小板保存用の適切な溶液、例えば食塩水に分散させる。SUV脂質組成物はATP投与を最適化させるために変更することができる。例えば血小板は室温(22から24)で保存されるので、ATPの代謝要求は生理学的温度(37)よりも低いであろう。前記温度ではSUVの融合速度もまた低下するとしても、その速度は生命活性を保持する保存には高すぎ、SUV脂質組成は血小板の代謝要求により良好に適合するように誘導される。

【0062】

30

器官および組織のエンジニアリングのためのATP-SUV：組織は今では極めて効率的にin vitroで増殖させることができる。しかしながら、そのような組織は血液供給と連結されるべき血管構造を欠く。ATP-SUVはこの欠陥の克服に役立つ。

ATP-SUVを用いて単離組織(例えば骨格筋)に由来する血管ネットワークを選択的に保存することができる。ATP-SUVの脂質組成を前記ATP-SUVが血管から容易に脱出できないように作製する。ATP-SUVの投与は血管構造を維持するが、実質は維持されない(前記は壊死する)。続いて無傷の血管構造を播種し、固有の組織に分化する能力を有する幹細胞とともに適切な条件下で培養する。前記のような態様で血管構造を生じることができるin vitro生成組織には肝臓、脾臓、心臓、肺臓および脾臓が含まれる。

また別には、前記同じアプローチを用いてin vitroでの構築が既に進行している器官を部分的に血管形成させることができるが、ただし前記血管構造物は前記器官細胞が増殖を開始した後で採集され処理される。

40

【0063】

外科手術時のATP-SUV：大手術の過程では血流および酸素の減少を受ける。ATP-SUVを全身または外科手術を受けている領域に投与して、虚血または低酸素症に由来する一切の損傷を最小限にすることができる。ATP-SUVが有用な外科手術の例には、冠動脈バイパス手術、心臓切開手術、遊離皮弁移動手術およびいくつかの形成外科手術が含まれる。

ある手術では、術時に脊髄が十分な酸素を受け取らないために時に麻痺が残る。前記は主として大動脈瘤切除で発生する。患部領域へのまたは静脈投与ATP-SUVの適用によって外科医はより長時間手術を実施することができ、酸素低下を誘発する損傷の可能性が減少

50

し、合併症が減少する。

卒中に対するATP-SUV：従来は、脳への血流減少の影響を少なくするために卒中発作後ただちに高グルコース溶液投与が実施される。グルコースは、神経細胞のATPレベルを上昇させ、神経細胞死を減少させると期待される。しかしながら、前記の目標は酸素供給が限定されているときは達成が困難である。ATP-SUVは神経組織にATPをより効率的に提供するであろう。

【0064】

呼吸器障害に対するATP-SUV：多くの呼吸器系アリメントは生活の質を低下させ、しばしば死をもたらす。これらの事例では、主要な死因は血中酸素の欠乏であり、組織および器官の死をもたらす。対象者にATP-SUVを輸液して血中酸素レベルの低下の影響を少なくする。

10

癌患者に対するATP-SUV：末期癌患者は合併症により死亡する。癌または治療によって前記患者は衰弱しているので、彼らはしばしば肺炎で死亡する。前記衰弱は、重要な代謝資源を癌細胞が強奪し、したがって健全な細胞を衰えさせるため、または非癌性健全細胞が治療中に破壊されるため、またはその両方により生じる。癌患者に毎日ATP-SUVを投与して全身のATPレベルを補充し、したがって癌細胞が代謝資源を使用することによる影響を少なくする。ATP-SUVを投与することによって、癌の余病を少なくし、余命を延長する。

有毒化学物質に対するATP-SUV：ミトコンドリアのATP産生を阻害するか、また別には細胞のATP産生を低下させるシアン化物および他の化学物質は、ATP-SUVを用いることによってその作用を阻害することができる。ATP-SUVはシアン化物に侵された細胞および組織の生存活性を維持する。すなわち、ATP-SUVはミトコンドリアのATP産生の非存在下で細胞質ATPを増加させる。ATP-SUVは、シアン化物およびシアン化物と類似の態様で作用する他の毒物に対する解毒剤として用いることができる。ATP-SUVはまた一酸化炭素中毒の影響を少なくするために用いることができる。

20

【0065】

タンパク質、炭水化物、オリゴヌクレオチドおよび他の薬剤のデリバリーのためのATP-SUV：ATP-SUVを含む高度に融合性の脂質小胞を水溶性で膜結合性を有するタンパク質、炭水化物、オリゴヌクレオチド、および他の薬剤の存在下で作製し、その結果サイトゾルまたは細胞膜への上述の物質の効率的なデリバリーを達成することができる。前記のドラッグデリバリー方法によって多くの慣例的な問題が回避され、さらに(1)膜を透過することができない医薬の導入が可能になり、したがって膜透過率の低い医薬の有効性を高めるとともに使用可能な医薬範囲が大きく拡大され、さらに(2)ポリペプチドおよび炭水化物を直接細胞膜に取り込むことが可能になる。この最後の利点は、例えば不確かな遺伝子治療を回避する代替療法を可能にする。例えば、対象者が細胞上のレセプターを欠く場合は、前記レセプターをATP-SUVに取り込ませ、それらを適切に投与することができる。

30

前記の方法は、ATPを細胞に導入する方法に類似するが、ただしSUVは小胞内物質および/または膜包含分子を搭載されている。

他の低酸素状態に対するATP-SUV：水中ダイビング、宇宙旅行、高高度および他の酸素が希薄な状況は身体への酸素デリバリーの低下をもたらす。酸素欠乏を代償するために、ATP-SUVを静脈内に、経口的に、または吸入により投与する。

40

肉の保存のためのATP-SUV：組織および器官の保存並びに動物および患者で使用する他に、ATP-SUVは酸素の非存在下で肉の中の細胞を生きた状態で維持することができる。屠殺後、動物は放血され残留血液は屠殺体から洗い流される。ATP-SUVを前記動物に頸動脈または他の太い動脈から輸液し、血管系をATP-SUVで満たす。続いてATP-SUVを前記の場所に含む前記動物を輸送し、前記動物の細胞を生きた状態で維持し、したがってATP-SUVが血液の保存期間を延長するのと同じ程度に肉の保存期間が延長される。ATP-SUVは内在性成分を利用するので、肉の味および触感には影響はない。

【0066】

植物のためのATP-SUV：植物は生命および生長の維持に光合成を利用する。光合成は2つ

50

の反応に分けることができる。すなわち光反応（前記は日光からエネルギーを採集し、前記を化学エネルギー、ATPおよびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェートの還元形（NADPH）に変換する）および暗反応（前記はATPおよびNADPHを用いてCO₂を固定する）である。

植物にはATP-SUVは根系を介して提供されるか、または葉、茎、花、分裂組織もしくは他の植物部分に直接適用される。ATP-SUVは、暗反応に必要なATPを植物細胞にデリバリーする。ATP-SUVによるATPのデリバリーは日光の必要性を減少または回避し、暗所または光の少ない条件下での生長を可能にする。さらにまた、ATP-SUVは植物の生長を高め、植物の生命を維持する。前記は市場の野菜の鮮度、切花産業および水耕栽培にとって重要な特徴である。

10

バイオリアクターのためのATP-SUV：バイオリアクターの生産性に対する主要な制限因子は、細菌および酵母（これらの物質の一次生産者）はATPの産生に十分な基質を持たねばならないということである。したがって、細菌または酵母の数はいずれの培養においても限定される。ATP-SUVをバイオリアクターに注入し、微生物数を増し、バイオリアクターの生産量を増加させる。前記適用は細菌およびカビに限定されない。なぜならば培養される昆虫細胞、動物細胞、植物細胞および他の真核細胞はATP産生のために同じ要件を有するからである。

【0067】

実施例

以下の実施例は本発明の例示のために提供される。当業者は本発明の組成物および方法で本質的ではない変更を容易に実施することができよう。本実施例は本発明をいずれの態様においても制限しようとするものではない。

20

【0068】

実施例 1

脂質小胞の構築

小胞は、脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（DOPC-e）および1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート（POPA）から構築した（全て以下から入手：Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL）。前記脂質はさらに精製することなく用いた。脂質をクロロホルムに溶解し、ガラスの試験管に入れた後、前記クロロホルムを窒素ガスの定常流の下で蒸発によって除去し、一晩ポンプで真空にした。前記乾燥させた脂質材料をその相転移温度（25℃）よりも高い温度でHBSS実験緩衝液（Sigma; St. Louis, MO）で30分再水和させた。2つのガラスビーズを前記緩衝液/脂質混合物に添加し、前記懸濁液をヴォルテックスミキサーで5分攪拌して多重層小胞を形成した。続いて、前記ミルク状溶液をマイクロチップブランソン超音波処理装置450を用い、前記マイクロチップ試験管に入れて超音波処理した。さらに前記小胞を40%の機関効率サイクルを用いレベル5で5分間超音波処理して小さな単層小胞（SUV）を作製した。

30

【0069】

実施例 2

ATPの被包化

実施例1の小胞へのATPの取り込みを示すために、多重層小胞を作製する前に、30 μ Ciの³H-ATP（Amersham; Arlington Heights, IL）を実験緩衝液に添加した。前記懸濁液をセファデックスG-25（Sigma）カラム（1cmX40cm）に通して被包化されなかったATPを除去した。前記小胞を最初の50mLの流出液を採集した。液体シンチレーション計測により小胞内および上清中に含まれる放射能活性を測定することによってパーセント被包化を求めた。DOPC、DOPC:DOPC-e（1:1）、DOPC:POPA（50:1）およびDOPC:POPA（1:1）を含む小胞は全て、最初の溶液中のATP量の1から25%の範囲でほぼ同じATPパーセント被包化を示した。

40

【0070】

実施例 3

50

小胞のHUVECへの融合速度および被包化内容物の細胞質への放出

SUVの融合速度を明らかにするために、SUVに蛍光プローブをロードし、細胞にin vitroで提供し、さらに洗浄し、続いて細胞の蛍光を分析した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は1回継代で購入し (BioWhitaker; Walkersville, MD)、8回継代まで培養し、その後は、それら細胞はもはや用いられなかった。HUVECは内皮細胞増殖培養液 (EGM; BioWhitaker) でコンフルエンスに達するまで12ウェルの培養皿で増殖させた。続いて前記HUVECをHBSSで3回洗浄した。脂質小胞は実施例1のように作製したが、ただし1mMのカルボキシフルオレセインを小胞にロードした。続いて前記小胞を細胞とともに37℃で5、10、30、45、60、90、120または240分、湿潤なCO₂インキュベーターでインキュベートし、その後で前記小胞を細胞から洗い流し、細胞をトリプシンで穏やかに処理して培養皿から取り外した。前記HUVEC中のカルボキシフルオレセインの蛍光を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) LS50Bルミネッセンス分光光度計 (Wellesly, MA) を用い495nmの励起および520nmの放射で測定した。いくつかの実験では、融合事象の均質性を示すために、細胞をトリプシン処理せずに前記細胞の光学顕微鏡写真を撮影した。この実験の蛍光ユニットの範囲は0から450ユニットであった。

【0071】

融合速度はSUVの脂質組成に高度に依存する。DOPCは最初の30分間にほとんどまたは全く融合を示さず、その後融合速度は対数的に増加し約350FUに達した。対照的に、DOPC:DOPC-e (1:1) は、はるかに速い初期融合速度およびより遅い最終融合速度を示した (5分で約35FU; 120分で約100FU)。もっとも速い融合速度はDOPC:POPA (1:1) を用いて見出され、前記は5分以内にATPの顕著なデリバリーを示した。デザインにしたがって前記3種の小胞の融合速度は高速、中速および低速と特徴づけることができる。

解決された1つの問題は、小胞は実際に細胞と融合したのか、または単に細胞表面で凝集したのかということであった。前記の問題を調べるために、脂質小胞に暴露し、培養ウェルから取り外さなかったHUVECを蛍光顕微鏡で蛍光の分布について調べた。3種の組成物のいずれに暴露した細胞も5分後に小さな斑点というよりはむしろ細胞全体に分散した蛍光を示し、前記は、リソゾームが前記小胞を隔離しそれによって細胞がカルボキシフルオレセインにアクセスするのを防いでいることを示唆しているであろう。また別には、前記小胞は細胞表面で凝集していた。これらの結果は、脂質小胞は細胞表面で凝集するのではなく、またはリソゾームによって隔離されるのではなくむしろ細胞と融合して被包化された内容物を細胞質内に放出すること示している。

【0072】

カルボキシフルオレセインと同様にATPもまた細胞内に導入されるのか否かを決定するために、小胞融合およびATPのHUVECへの放出を実施例2の³H-ATP含有小胞を用いて追跡した。小胞をHUVECとともに5、10、15、30、45、60、90、120または240分間インキュベートした。図1に示した結果は1時間後のATPの細胞内分配係数である。DOPC/POPAは、この時間範囲で最大のパーセント取り込みを示し、DOPC/DOPC-eがこれに続き、さらに小胞をもたない³H-ATPのみが続いた。細胞を繰返し洗浄したとき、細胞の放射能活性に顕著な変化があった。DOPCはわずかであるが意義のある放射能活性の低下を示し、DOPC/DOPC-eは反復洗浄後に放射能活性の低下を示さなかったが、一方、遊離³H-ATPは放射能活性の完全な消失を示し、遊離ATPは細胞膜に侵入することができないことが確認された。前記のデータは、融合データと併せて、DOPC小胞はエンドサイトーシスによって取り込まれ、DOPC:DOPC-e小胞は融合し、さらに遊離ATPは細胞に入らないことが示唆している。DOPC:POPA小胞もまた洗い流すことができず、それらもまた細胞と融合し、被包化内容物を細胞質内にデリバリーすることを示唆している。

【0073】

実施例4

巨大分子の内皮透過性

細胞に分子を直接デリバリーするのとは対照的に、循環系を通じてin vivoで被包化分子をデリバリーする本発明の小胞のいずれの使用においても、小胞および/または分子は血管

内皮を通過することが要求される。血管内皮はバリアーを構成するが、細胞間バリアーは、例えば白血球が循環系を出て間質の間隙に入るときのように橋をかけて越えることができる。この問題を調べるために、本発明の脂質小胞の内皮透過性に対する影響を測定した。

微小孔をもつフィルター（ $0.8\mu\text{m}$ ）上でHUVECをコンフルエンスに達するまでEGMで増殖させた。単層内皮を通過するタンパク質流量を測定できる特殊なチャンバーに前記細胞を置いた。脂質小胞の内皮透過性に対する影響を調べるために用いたトレーサーはFITC-アルブミン（ 1mg/mL ）であった。前記FITC-アルブミンおよび脂質小胞を0時点で内皮細胞に添加した。5分毎に $500\mu\text{L}$ の上清サンプルを採集し、続いてパーキンエルマーLS50Bルミネッセンス分光光度計を用い蛍光を分析した。DOPC小胞は透過性に対し影響を全くもたず、一方、HUVECの透過性はDOPC/DOPC-eの存在下で増加し、これらの小胞は隣接する内皮細胞間に小さなギャップを生じることを示唆した。

10

【0074】

実施例 5

ATPに対する代謝要求

必要な最適速度の決定例として、ラット肝細胞のATPに対する代謝要求を決定した。完全なラット肝臓を単離し、単離緩衝液（ 0.25M シュクロース、 0.04M トリス（ $\text{pH}7.2$ ））に入れ、滅菌した鋏で細切し結合組織片を注意深く取除いた。続いて前記肝臓を#60のステンレススチールのワイヤーメッシュ篩に通し、細胞を含む溶出液を氷上で採集した。前記分散液を4で5分間遠心して細胞を沈澱させた。上清を廃棄し、細胞を酸素付加緩衝液（ 200mM シュクロース、 70mM のKCl、 5mM のマレエートおよび 40mM トリス（ $\text{pH}7.3$ ））に再分散させた。5mLの酸素付加緩衝液を酸素計（Yellow Springs Instruments Oxygen Meter, Yellow Springs, OH）に入れ、37で平衡させた。 $50\mu\text{L}$ の細胞抽出物をチャンバーに入れ、2から 3mg/mL の最終タンパク質濃度にした。続いて基礎酸素消費を1分間モニターし、その後 100mM のADPを前記細胞に添加し、第二段階呼吸を測定した。次に 5mM のグルタメートを添加し第三段階呼吸を測定した。添加ADP量対消費酸素量を測定して ADP/O_2 比を決定した。したがって、第三段階呼吸は組織 1mg につき1分間に細胞によって消費されたATP量の測定値である。

20

【0075】

実施例 6

ATP-SUVは創傷治癒を加速させる

ヌードマウスの頭上部領域の皮膚（ほぼ 80mm^2 の円形）に表層損傷を加えた。続いてATP-SUVを前記創傷に1日2回適用し、境界細胞にATPを提供した。ATP-SUVは、特別にデザインしたアプリケーションターの中で創傷上に直接置いた。前記アプリケーションターは水を基剤とするATP-SUVを創傷と直接接触する状態で保持する。

図2に示したように、ATP-SUVで処理された創傷は、コントロール物質で処理された創傷と比較してより迅速に治癒した。ATP-SUV処理創傷に対する曲線（治癒時間に対する創傷面積がプロットされている）は対数的曲線を示すが、コントロールでは治癒速度はより直線的であることが示された。4日目では、ATP-SUV処理（約 30mm^2 ；最初の創傷面積の半分未満）とコントロール処理（約 60mm^2 ）との間でほぼ 30mm^2 の相違が認められ、一方、10日目ではATP-SUV処理創傷で創傷は実質的に消失するが、コントロール処理創傷（約 25mm^2 ）では消失しなかった。定性的には、4日目のヴァイタルゾル（VitalSol）処理創傷とコントロールの10日目の創傷とが類似し、一方、10日目と17日目のコントロールと類似する。ATP-SUVで処理された創傷では創傷は17日目までに治癒したが、この日にはコントロールはまだ完全には治癒しなかった。

40

【0076】

実施例 7

四肢の再結合

ラットの後肢を切断し、ATP-SUV輸液のために受傷肢の主要な栄養供給動脈に挿管し、 1mM のATP溶液をロードした。前記後肢にATP-SUVまたはコントロール溶液（表1参照）を3時

50

間毎または組織ATPレベルの変化により必要と思われたときに還流を実施した。前記後肢の動脈圧を輸液中にモニターし、流れによって誘発される損傷の機会を減らし、さらに受傷肢の全体的な保全をモニターした（より高い還流圧は四肢の病的状態の指標となるであろう）。前記保存期間の後、前記後肢をリングでフラッシュしてATP-SUVの痕跡を除去する。続いて前記後肢を外科的に再結合させ、吻合後の後肢機能の外的指標（肢の色、微小血栓、血液凝固の証拠、肢の温度）を査定した。再移植の前後に前記動物にヘパリンを投与し血流遮断を予防した。さらにまた、前記動物に抗生物質治療を施して感染を抑えた。コントロール肢には担体のみ、担体およびATPのみ、または担体およびSUVのみを還流させた。

最移植後21時間で、ATP-SUV処理肢は健常な桃色を示し、生理学的温度を再び獲得した。150日以降にATP-SUV処理肢を結合させた動物は、あたかも前記肢が切断されたことがなかったかのようにこれらの四肢を使った。単なる定性的な副作用はつま先の湾曲であり、前記はおそらく理学療法欠如のため、理学療法によって前記の小さな血管は修正されたであろう。しかしながら、コントロールでは前記肢は黒く着色し触ると冷たく壊死の徴候を示した。これらの結果の要旨は表1に示されている。定性的な結果は図3に示されている。

表1：四肢移植実験の要旨

グループ	肢の結果	n
担体のみ	壊死	2
担体および1 mMのATPのみ	壊死	2
担体およびSUVのみ	壊死	2
担体およびATP-SUV	生着	5

【0077】

実施例8

ATP-SUVは単離心臓を低酸素症から保護する

ラットから取り出した心臓をラーゲンドルフ心還流装置を用いてモニターした。心臓に挿管し、心臓に還流させる特別にデザインしたチャンバーに置き、ATP-SUVの注入を可能にした。心臓に還流させていた酸素付加還流液を停止し、ATP-SUVを心臓に注入した。続いて高カリウム溶液の注射によって前記心臓を心停止させた。流動のない状態で前記ATP-SUVを37℃で120分心臓で保持した。続いて前記心臓を酸素付加還流溶液でフラッシュし、心機能をモニターした。ATP-SUV処理心臓はコントロール心臓と比較して心機能を再獲得した。

【0078】

実施例9

血液保存の改善（予想例）

ATP含有小胞が血液を保存するか否か、および糖分解性中間物質ホスホエノールピルベート（PEP）およびフラクトース-1,6-ジホスフェート（FDP）の添加がさらに生命活性を改善するか否かを確認するために、以下の実験を実施する。小胞をDOPCのみを用いて実施例2の方法にしたがって構築する。標準的な方法にしたがって血液を標準的なデキストロース-クエン酸-アデニン-ホスフェート混合物を含むバッグ（Baxter; Deerfield, IL）に採集する。各実験セットについて、1ユニットの血液を等分量のアリコットに分け、さらに新たな添加物を含まないポリエチレンバッグに無菌的に移す（コントロール）。テスト物質を別のアリコットに以下のように添加する：

- コントロール、添加物なし
- コントロール、PEP、FDPおよびリボースを含む小胞、
- ATP-SUV

30、45、60および90日でアリコットを取り、赤血球の状態を以下のパラメーターにしたがって査定する：ATP含有量、ヘマトクリット、ヘモグロビンおよび血球の生存度（トリ

パンブルー (Sigma) 排除またはLIVE/DEADキット (Molecular Products:Eugene, OR) を用いる)。予想結果: ATP含有小胞の存在下で保存された細胞はコントロールよりも良好な状態であろう。すなわち、ATP含有量は高く、pHの低下はより少なく(糖分解がより少ないことを示す)、赤血球は機能的な赤血球に典型的な両面がくぼんだ形状を保持するであろう。

【0079】

参考文献

Alberts B, Johnson MA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.

10

Ainscow, E.K., 及び Brand, M.D. (1999) Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. 263: 671-685.

Arakawa A, Ishiguro S, Ohki K, Tamai M. (1998) Preparation of liposome-encapsulating adenosine triphosphate. Tohoku J Exp Med 184: 39-47.

Brand, M.D. (1995). Measurement of mitochondrial proton motive force. In Bioenergetics, a Practical Approach/Brown, G.C., 及び Cooper, C.E., eds. Oxford University Press, Oxford. 39-62.

20

Jahn R, Sudhof TC. (1999) Membrane fusion and exocytosis. Annu Rev Biochem 68: 863-911.

Puisieux F, Fattal E, Lahiani M, Auger J, Jouannet P, Couvreur P, Delattre J. (1994) Liposomes, an interesting tool to deliver a bioenergetic substrate (ATP). in vitro and in vivo studies. J Drug Target 2: 443-448.

Remington: the science and practice of pharmacy (2000) Alfonso R. Gennaro, chairman of the editorial board and editor. Edition: 20th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

30

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 内の1時間後のATPの分配係数を示す。

【図2】ヌードマウスにおける本発明の組成物の創傷治癒に対する効果を示す。

【図3】ラットにおける切断四肢の再移植の成功を示す。前記四肢は再接着後に完全に機能を有する。

【図 1】

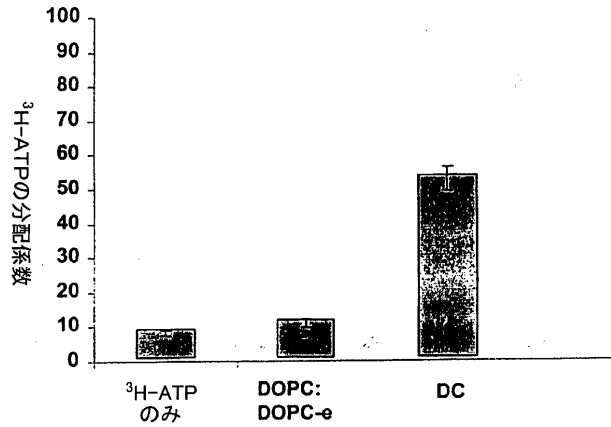


Figure 1

【図 2】

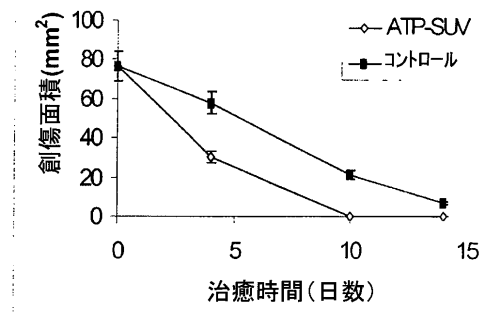
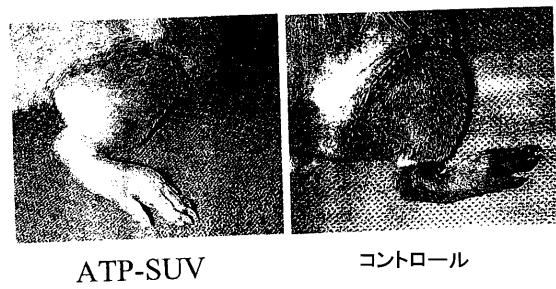


Figure 2

【図 3】

Figure 3



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/14865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :A61K/129 US CL :424/450 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) U.S. : 424/450 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: Search terms: ATP, adenosine triphosphate, liposomes, vesicles, DOPC, DPPC, polar lipids, peg, fusion proteins.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,674,528 A (OGATA et al) 07 October 1997, col. 10, line 10 through col. 11, line 44 and claim 1.	1-2, 5, 25, 30, 31, 36, & 47.
X -- Y -- A	Zang, D et al. The distribution of liposome-encapsulated ATP in experimental ischemic myocardium. Chemical Abstracts, vol. 109, No. 11, 12 September 1988, Abstract No. 85657M.	1-2, 5, 25, 30, 36 & 47 ----- 3-4, 6-24, 26-29, 31-35 & 40-44 ----- 45-46
Y	US 6,086,851 A (BONI et al) 11 July 2000, col. 2, line 28-48, col. 14, lines 6-31 and examples.	1-44 & 47
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "E" earlier document published on or after the international filing date "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 "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) "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 OCTOBER 2003		Date of mailing of the international search report 17 DEC 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer GOLLAMUDI S. KISHORE Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/14865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,011,020 A (GOLD et al) 04 January 2000, col. 13, lines 21-42.	1-44 & 47
Y	JP 03236320 A, 22 October 1991, abstract.	40-44

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/42	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 43/00	C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 N 5/06	A 6 1 K 37/24	

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

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 イーリンガー ウィリアム ディー

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 1 1 1 チャールスタウン リッジフィールド ドライヴ
6 0 1 9

(72)発明者 チェン スーファン

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 1 1 9 フロイズ ノブズ スティラー ロード 5 6 3
9

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BA30 BB11 BB12 BB15 BB19 CA44

4C076 AA19 AA95 CC14 CC19 DD63H EE23 EE41Q

4C084 AA02 AA03 BA44 CA53 DB55 MA02 MA05 MA24 MA66 NA13

ZA892 ZC752

4C086 AA01 EA18 MA01 MA02 MA05 MA24 NA13 ZA89 ZC75