

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5253402号  
(P5253402)

(45) 発行日 平成25年7月31日 (2013. 7. 31)

(24) 登録日 平成25年4月26日 (2013. 4. 26)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 9/127 (2006. 01)	A 6 1 K 9/127 Z N A
A 6 1 K 47/24 (2006. 01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/42 (2006. 01)	A 6 1 K 47/42
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47

請求項の数 30 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2009-533551 (P2009-533551)	(73) 特許権者	509111098
(86) (22) 出願日	平成19年10月19日 (2007. 10. 19)		チルドレンズ ホスピタル メディカル センター
(65) 公表番号	特表2010-507580 (P2010-507580A)		C H I L D R E N ' S H O S P I T A L M E D I C A L C E N T E R
(43) 公表日	平成22年3月11日 (2010. 3. 11)		アメリカ合衆国, 4 5 2 2 9 - 3 0 3 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/081880		オハイオ州, シンシナティ, バーネット アベニュー 3 3 3 3, エムエルヴィー 7 0 3 2
(87) 国際公開番号	W02008/051818		3 3 3 3 B u r n e t A v e n u e , M L V 7 0 3 2 , C i n c i n n a t i
(87) 国際公開日	平成20年5月2日 (2008. 5. 2)		, O H 4 5 2 2 9 - 3 0 3 9 , U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a
審査請求日	平成22年10月14日 (2010. 10. 14)		
(31) 優先権主張番号	60/862, 312		
(32) 優先日	平成18年10月20日 (2006. 10. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自発的に形成する楕円体の単層リン脂質小胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 少なくとも1つの長鎖リン脂質；  
 b) 少なくとも1つの短鎖リン脂質；および  
 c) プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチド  
 を含有している、ナノ小胞を形成する組成物であって、  
 ナノ小胞が水性溶液の添加によって自発的に形成される、組成物。

【請求項 2】

少なくとも1つの上記長鎖リン脂質は、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S )、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジオレオイルホスファチジ  
 ルイノシトール (D O P I)、ジオレオイルホスファチジン酸 (D O P A) およびこれらの  
 の混合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

少なくとも1つの上記短鎖リン脂質は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、  
 ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホス  
 ファチジリエタノールアミンおよびこれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1  
 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

上記プロサポシン誘導体化タンパク質は、サポシン C、H 1、H 2、H 3、H 4、H  
 5 またはこれらの混合物からなる群から選択される1つ以上である、請求項 1 ~ 3 のい  
 づ

10

20

れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

上記ナノ小胞は、1 モード、2 モードもしくは 3 モードの単層小胞、またはこれらの混合物のサイズ分布を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

上記ナノ小胞が、扁平楕円体の単層小胞および 3 軸楕円体の単層小胞から構成されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

上記長鎖リン脂質が、陰イオン性の長鎖リン脂質および無電荷の長鎖リン脂質からなる群から選択されており、

ここで、陰イオン性の長鎖リン脂質、無電荷の長鎖リン脂質および短鎖リン脂質の量は、

式：
$$\frac{[\text{無電荷の長鎖リン脂質}] + [\text{陰イオン性または無電荷の長鎖リン脂質}]}{[\text{短鎖リン脂質}]} = 2 \sim 10$$

によって規定される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

薬学的に活性な因子をさらに含有している、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

a) D O P S および D P P C である長鎖リン脂質；

b) D H P C である短鎖リン脂質；ならびに

c) サポシン C、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5 およびこれらの混合物から選択されるタンパク質またはポリペプチドであるプロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを含有している、ナノ小胞を形成する組成物。

【請求項 10】

D P P C に対する D O P S の割合は  $2 \sim 20$  の範囲内である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

a. 少なくとも 1 つの長鎖リン脂質、少なくとも 1 つの短鎖リン脂質、および少なくとも 1 つのプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを含有している組成物を準備する工程

b. 水性溶液を準備する工程、ならびに

c. 上記組成物を上記水性溶液と混合して、1 モード、2 モードもしくは 3 モードの単層小胞、またはこれらの混合物のサイズ分布を有するナノ小胞の集団を自発的に形成させる工程

を包含する、ナノ小胞の集団の製造方法。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの上記長鎖リン脂質は、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジオレオイルホスファチジリンイノシトール (D O P I)、ジオレオイルホスファチジン酸 (D O P A) およびこれらの混合物からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの上記短鎖リン脂質は、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルコリンである、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの上記短鎖リン脂質は、D H P C、D H P S、またはこれらの混合物からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

上記ナノ小胞の集団は、扁平楕円体の単層小胞および 3 軸楕円体の単層小胞から構成されている、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

上記プロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドは、サポシン C、H1、H2、H3、H4、H5またはこれらの混合物からなる群から選択される1つ以上である、請求項11～15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 17】

短鎖リン脂質に対する長鎖リン脂質の割合は2 から 20である、請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 18】

上記長鎖リン脂質が、陰イオン性の長鎖リン脂質および無電荷の長鎖リン脂質からなる群から選択されており、

ここで、陰イオン性の長鎖リン脂質、無電荷の長鎖リン脂質および短鎖リン脂質の量は、

式：
$$\frac{[\text{無電荷の長鎖リン脂質}] + [\text{陰イオン性の長鎖リン脂質}]}{[\text{短鎖リン脂質}]} = 2 \sim 10$$

によって規定される、請求項11～17のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 19】

上記短鎖リン脂質は陰イオン性または無電荷である、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 20】

上記ナノ小胞は薬学的に活性な因子をさらに含有している、請求項11～19のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 21】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPCおよびサポシン Cを含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 22】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPCおよびH1を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 23】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPCおよびH2を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 24】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPCおよびH5を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 25】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPC、サポシン C、H1およびH2を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 26】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPS、およびサポシン Cを含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 27】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPS、およびH1を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 28】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPS、およびH2を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 29】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPS、およびH5を含有している、請求項11および15～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 30】

上記組成物は、DOPS、DPPC、DHPS、サポシン C、H1およびH2を含有

10

20

30

40

50

している、請求項 11 および 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔優先権〕

本願は、2006年10月20日出願の米国仮出願第60/862,321号（発明の名称“Spontaneously Forming Ellipsoidal Phospholipid Unilamellar Vesicles”）および2007年4月27日出願の米国出願第11/741,323号に対する優先権を主張する。

【0002】

〔関連出願〕

本願は、2005年3月29日発行の米国特許第6,872,406号（発明の名称“Fusogenic Properties of Saposin C and Related Proteins and Peptides for Application to Transmembrane Drug Delivery Systems”）；および米国特許出願公開第10/801,517号、米国特許出願公開第2004/022799号（発明の名称“Saposin C-DOPS: A Novel Anti-Tumor Agent”）に関連する。すべての文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0003】

〔発明の分野〕

本発明は、標的化薬物送達および改善された治療学に使用されるリン脂質組成物に関する。薬学的因子がリン脂質膜内に収納され、かつ膜融合タンパク質によって送達が促進される。より詳細には、薬学的因子がリポソーム内に収納され、かつサポシン C を用いて送達が促進される。当該サポシン C は、上記リポソームと会合している。

【0004】

〔背景〕

リポソームは、同心の2重膜によって形成される脂質膜によって取り囲まれた水性の空洞を中央に有する、微細な小胞である。リポソームは、単層（1つの脂質2重膜のみを有する）、オリゴラメラ（oligolamellar）または多層（複数の2重膜を有する）であり得る。それらの構造によって、リポソームは、水性の内部に親水性の物質、または脂質膜に疎水性の物質のいずれかを組み込むことができる。

【0005】

薬物送達用の小胞として、リポソームは原理上、多くの利点を有している。無毒の構成要素からなり、一般的に非免疫原性であり、非刺激性であり、かつ生分解性であるだけでなく、リポソームは、非常に多種類の治療薬を封入し、保持し、輸送し、かつ放出できるので、これによって有害な副作用を低減できる。リポソームは、薬物の徐放にわたる支持体を形成すること、および特定の細胞種もしくは身体の一部に送達することができる。また、リポソームの治療的利用は、遊離した形態において毒性のある薬物の送達を包含する。

【0006】

リポソームは、リン脂質の混合物に機械的な力を加えることによって、一般的に形成される。例えば、多種多様な方法が、リポソーム組成物の調製に現在使用されている。当該方法としては、溶媒透析、フレンチプレス（French press）、押出（凍結融解を伴うかまたは伴わない）、逆相蒸発、単純な凍結融解、超音波処理、キレート透析、ホモジナイゼーション、溶媒浸出、微小乳化、自発的な形成、溶媒蒸発、フレンチプレス細胞技術、および制御下における界面活性剤透析などが挙げられる。例えば、Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990を参照すればよい。また、リポソームは、振とうおよびボルテックスを要する種々の処理によって形成され得る。

【0007】

リポソームに関する問題点としては、コロイドの不安定性、量産化における滅菌の困難さ、および製造における単回処理ごとの変動性が挙げられる。リポソームの調製および製

10

20

30

40

50

造は、浸出またはホモジナイゼーションの後に、有機溶媒の除去を典型的に含む。これらの処理は、リポソームの構成要素を極端な条件にさらし得る。当該極端な条件とは、例えば、脂質およびリポソームに取り込まれている他の分子を分解し得る、上昇した圧力、上昇した温度および高いせん断条件である。

【0008】

リポソームの調製は、2重膜のサイズおよび数の非常に不均一な分布をしばしば特徴とする。小規模において最適化された条件は、通常、うまく大規模化できず、かつ大規模な単回処理の調整は、取り扱いにくく非常な労力を要する。

【0009】

リポソーム応用に関する他の問題点は、コロイドの不安定性である。懸濁物におけるリポソームは、貯蔵、過熱および種々の添加物の添加によって凝集し得、かつ融合し得る。これらの安定性の問題のために、リポソームはしばしば凍結乾燥される。凍結乾燥は費用および時間がかかる。再構成によってサイズ分布がしばしば拡大し、かつ封入された物質がリポソームから漏出し得る。

10

【0010】

すべてではないがほとんどの公知のリポソーム懸濁物は、熱理学的に安定ではない。公知の懸濁物におけるリポソームは、そのリポソームの形成に用いられたエネルギーによって、より高いエネルギー状態に動力学的に捕捉される。エネルギーは、熱、超音波、押出、またはホモジナイゼーションとして供給され得る。あらゆる高エネルギー状態はより低い遊離エネルギーになるようにするので、公知のリポソーム調合物は、凝集、融合、沈降およびリポソーム結合物質の漏出を伴う問題に直面する。このため、これらの問題のいくつかを回避し得る熱力学的に安定なリポソーム調合物が求められている。

20

【0011】

このため、現在のリポソーム調合物に伴うこれらの問題に対処する新たな方法および材料を開発することが求められている。

【0012】

〔発明の要約〕

本発明は、一般的に、疾患の治療または個体に対する活性な因子の送達に有用なリポソームの集団を形成する組成物に関する。当該組成物は、a) 少なくとも1つの陰イオン性の長鎖リン脂質；b) 少なくとも1つの短鎖リン脂質；およびc) プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを備えている。ここで、上記リポソームは、水性溶液の添加によって自発的に形成される。

30

【0013】

1つの実施形態において、上記陰イオン性のリン脂質は、ジオレオイルホスファチジルセリン(DOPS)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルイノシトール(DOPI)およびジオレオイルホスファチジン酸(DOPA)からなる群から選択され得る。

【0014】

さらなる実施形態において、上記短鎖リン脂質は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、およびホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択され得る。

40

【0015】

上記組成物は、1モード(monomodal)、2モード(bimodal)、もしくは3モード(trimodal)の単層小胞のサイズ分布を有するリポソームの上記集団、または扁平楕円体の単層小胞と3軸楕円の単層小胞とによって構成されるリポソームの上記集団をさらに備え得る。

【0016】

さらなる実施形態において、上記組成物において上記プロサポシン誘導体化タンパク質は、サポシンC、H1、H2、H3、H4、H5またはこれらの混合物からなる群から選択される1つ以上である。

50

## 【 0 0 1 7 】

さらに他の実施形態において、リポソームを形成する上記組成物は、D O P S、D P P C、D H P C、およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを包含し、当該プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドが、サポシン C、H 1 ペプチド、H 2 ペプチド、H 3 ペプチド、H 4 ペプチド、H 5 ペプチドもしくはこれらの混合物からなる群から選択される。

## 【 0 0 1 8 】

さらに他の実施形態において、リポソームを形成する上記組成物は、D O P S、D H P C、およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを包含し、当該プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドが、サポシン C、H 1 ペプチド、H 2 ペプチド、H 3 ペプチド、H 4 ペプチド、H 5 ペプチドもしくはこれらの混合物からなる群から選択される。

10

## 【 0 0 1 9 】

さらに他の実施形態において、リポソームを形成する上記組成物は、D O P S、D H P S、D P P C、D H P C、およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを包含し、当該プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドが、サポシン C、H 1 ペプチド、H 2 ペプチド、H 3 ペプチド、H 4 ペプチド、H 5 ペプチドもしくはこれらの混合物からなる群から選択される。

## 【 0 0 2 0 】

20

さらに他の実施形態において、上記組成物は、薬学的に活性な因子をさらに包含する。

## 【 0 0 2 1 】

〔図面の簡単な説明〕

本明細書に組み込まれかつ本明細書の一部を構成する添付の図面は、本発明の1つ以上の実施形態を例証し、かつ詳細な説明と共に本発明の原理および実施を説明する役割を果たす。

図1：ヒトサポシン C およびその機能ドメインのアミノ酸配列。

図2：0.1%のD O P S / D P P C / D H P C のS A N S データ。

図3：0.1重量%のD O P S / D P P C / D H P C に関する改変したギニエプロット (Guinier plot)。

30

図4：D O P S / D P P C / D H P C 混合物 (A および B)、およびH 1 ドープした混合物 (C および D)、およびH 2 ドープした混合物の代表的なTEM画像。

図5：単層の2重膜を有する3軸楕円小胞の提唱モデル。

## 【 0 0 2 2 】

〔発明の詳細な説明〕

(略語)

S a p C、サポシン C；D O P G、ジオレオイルホスファチジルグリセロール；D O P S、ジオレオイルホスファチジルセリン；P C、ホスファチジルコリン；P G、ホスファチジルグリセロール；P S、ホスファチジルセリン；D M P C、ジミリスチルホスファチジルコリン。

40

## 【 0 0 2 3 】

(定義)

本発明の組成物および方法について記載する前に、もちろん変更し得るものとしての特定の方法論、手段および調合物に本発明が限定されていないことについて、理解されるべきである。また、本明細書において用いられる専門用語が、特定の実施形態を説明するためのものであることについて、理解されるべきである。そして当該専門用語が、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物によってのみ限定される本発明の範囲を制限することを意図しないことについて、理解されるべきである。

## 【 0 0 2 4 】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるとき、単数形 “ a ”、“ a n

50

d”および“the”は、明確に断りがない限り、複数の対象を含む。特に定義しない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語のすべては、本発明が属する技術における当業者に通常に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されている類似または等価のあらゆる方法、手段および材料が、発明の実施または試験に使用され得るが、ここでは例示的な方法、手段および材料が説明されている。

【0025】

用語“投与された”および“投与”は、患者に対する生体適合性物質の投与を一般的に指す。生体適合性物質としては、例えば、脂質組成物および/または小胞組成物およびフラッシュ因子(flush agents)が挙げられる。したがって、“投与された”および“投与”は、例えば、脂質組成物および/または小胞組成物および/またはフラッシュ因子の血管への注入を指す。また、用語“投与された”および“投与”は、所望の領域に対する脂質組成物および/または小胞組成物および/またはフラッシュ因子の送達を指し得る。

10

【0026】

本明細書において使用されるとき、用語“アミノ酸”または“アミノ酸配列”は、オリゴペプチド配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列、もしくはタンパク質配列、またはこれらのあらゆる断片、ならびに天然に生じる分子または合成分子を指す。ここで、“アミノ酸配列”は、天然に生じるタンパク質分子を指すために本明細書において挙げられ、“アミノ酸配列”および同様の用語は、列挙されたタンパク質分子と関連する完全に未処置のアミノ酸配列にアミノ酸配列を限定することを意図していない。

20

【0027】

用語“両親媒性脂質”は、親水性の“頭部”基および疎水性の“尾部”基を有し、かつ膜形成能を有する分子を意味する。

【0028】

“類似物”によって、本発明のペプチドのアミノ酸配列における、ペプチドの融合誘導特性に悪影響を与えない置換または変更を意図される。したがって、類似物は、本明細書に与えられているペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ1つ以上のアミノ酸残基が化学的に類似のアミノ酸と保存的に置換された、ペプチドを包含し得る。保存的な置換の例としては、非極性(疎水性)残基の他の非極性残基との置換が挙げられる。非極性残基は、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンである。同様に本発明は、1つの極性(親水性)残基の(例えば、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間およびグリシンとセリンとの間)の置換が挙げられる。さらに、塩基性残基(例えば、リジン、アルギニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸)の他の塩基性残基との置換、または1つの酸性残基(例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸)の他の酸性残基との置換が包含される。

30

【0029】

本明細書において使用されるときに、用語“陰イオン性のリン脂質膜”および“陰イオン性のリボソーム”は、脂質の構成要素を含有し、かつ生理学的pHにおいて全体的に負の電荷を有する、リン脂質膜またはリン脂質リボソームを指す。

【0030】

“陰イオン性のリン脂質”は、負の電荷を有するリン脂質(リン酸塩、硫酸塩およびグリセロールに基づく脂質が挙げられる)を意味する。

40

【0031】

“生物活性因子”は、本質的に治療的または診断的な用途と関連して使用される物質を指す。当該物質は、例えば、患者における疾患の有無を診断する方法、および/または患者における疾患を処置する方法において使用される。また、本明細書において使用されるときに、“生物活性因子”は、インビトロおよび/またはインビボにおいて生物学的作用を発揮できる物質を指す。生物活性因子は、無電荷であり得るか、または正または負に帯電し得る。好適な生物活性因子の例としては、診断薬、薬学的因子、薬物、合成有機分子、タンパク質、ペプチド、ビタミン、ステロイドおよび遺伝学的材料(ヌクレオシド、ヌ

50

クレオチドおよびポリヌクレオチドが挙げられる)が挙げられる。

【0032】

用語“～(内)に含まれる”は、薬剤が外部環境から保護されるように、リン脂質膜に包まれている薬剤を指す。この用語は、“封入される”と交換可能に使用され得る。

【0033】

本明細書において使用されるとき、用語“欠失”は、1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドの非存在を生じるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列における変更を指す。

【0034】

本明細書において使用されるとき、用語“誘導”は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。ポリヌクレオチドの化学修飾の例としては、アルキル、アシル、またはアミノ基による水素の置換が挙げられる。誘導ポリヌクレオチドは、天然分子の少なくとも1つの生物学的機能を保持するポリペプチドをコードする。誘導ポリペプチドは、例えば、糖鎖付加、または誘導されたポリペプチドの少なくとも1つの生物学的機能を保持するあらゆる過程によって、修飾されたポリペプチドである。

【0035】

本明細書において使用されるとき、用語“融合誘導タンパク質または融合誘導ポリペプチド”は、2つの別個の2重膜に加えられた場合に、それらを単一の膜へと融合させることができるタンパク質またはポリペプチドを指す。融合誘導タンパク質は、細胞またはモデル膜を密接な接触状態にさせ、かつそれらを融合させる。

【0036】

本明細書において使用されるとき、単語“挿入”または“付加”は、天然に生じる分子に見られる配列に対して、1つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドの付加をそれぞれ生じるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の変化を指す。

【0037】

用語“脂質”および“リン脂質”は、交換可能に使用され、かつ脂質が水性懸濁物において示すことが知られている種々の異なる構造配列を備える脂質、リン脂質またはこれらの誘導体を含む構造を指すために使用される。これらの構造としては、これらに限定されないが、脂質2重膜小胞、ミセル、リポソーム、乳濁質、小胞、脂質リボンまたは脂質シートが挙げられる。脂質は、単独に使用され得るか、または当業者が特定の用途に所望される特性を与えること理解するあらゆる組み合わせにおいて使用され得る。さらに、脂質構造物およびリポソーム形成の技術的局面は、当業者に公知であり、かつ当該分野において通常に実施される方法のあらゆるものが、本発明にとって使用され得る。

【0038】

“脂質組成物”は、典型的に水性媒体における、脂質化合物を備える組成物を指す。例示的な脂質組成物としては、懸濁物、乳濁物および小胞化合物が挙げられる。“脂質調合物”は、生物活性因子をも備える脂質組成物を指す。

【0039】

“リポソーム”は、一般的に球状を有する、両親媒性化合物の集団または凝集体(典型的に1つ以上の同心の層(例えば、2重膜)の形態である脂質化合物が挙げられる)を指す。また、それらは本明細書において脂質小胞とも呼ばれ得る。

【0040】

用語“長鎖脂質”は、約13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24の炭素鎖長を有する脂質を指す。1つの実施形態において、鎖長は、18、19または20の鎖長から選択される。本発明と共に使用され得る脂質の例は、ウェブサイトwww.avantilipids.comにおいて入手可能である。本発明と共に使用され得る長鎖脂質の代表的な例としては、これらに限定されないが、以下の脂質：14:0 PS 1, 2 - ジミリスチル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) (DMP S) ; 16:0 PS 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) (DPP S) ; 17:0 PS 1, 2 - ジヘプタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) ; 18:0

10

20

30

40

50

PS 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) (DSPS); 18:1 PS 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) (DOPS); 18:2 PS 1, 2 - ジイリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 20:4 PS 1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 22:6 PS 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 16:0 - 18:1 PS 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) (POPS); 16:0 - 18:2 PS 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 16:0 - 22:6  
 PS 1 - パルミトイル - 2 - ドコサヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 18:0 - 18:1 PS 1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 18:0 - 18:2 PS 1 - ステアロイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 18:0 - 20:4 PS 1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 18:0 - 22:6 PS 1 - ステアロイル - 2 - ドコサヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩); 16:0 PC 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン [DP PC]; 17:0 PC 1, 2 - ジヘプタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:0 PC 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC); 16:1 PC (Cis) 1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 16:1 Trans PC 1, 2 - ジパルミテライドイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:1 PC Delta 6 (cis) 1, 2 - ジペトロセリノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:2 PC (cis) 1, 2 - ジイリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:3 PC (cis) 1, 2 - ジイリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 20:1 PC (cis) 1, 2 - ジエイコセノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 22:1 PC (cis) 1, 2 - ジエウロコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 22:0 PC 1, 2 - ジベヘノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 24:1 PC (cis) 1, 2 - ジネルボノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 16:0 - 18:0 PC 1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 16:0 - 18:1 PC 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 16:0 - 18:2 PC 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:0 - 18:1 PC 1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:0 - 18:2 PC 1 - ステアロイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:1 - 18:0 PC 1 - オレオイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:1 - 16:0 PC 1 - オレオイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 18:0 - 20:4 PC 1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン; 16:0 - 18:1 PG 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセロール)] (ナトリウム塩) (POPG); 18:1 PG 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセロール)] (ナトリウム塩) (DOPG); 18:1 PA 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (1ナトリウム塩) (DOPA); 18:1 PI 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホイノシトール (アンモニウム塩); 16:0' (D31) - 18:1 PI 1 - パルミトイル (D31) - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホイノシトール (アンモニウム塩); 18:1 PE 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); 18:2 PE 1, 2 - ジイリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンが挙

10

20

30

40

50

げられる。

【 0 0 4 1 】

本明細書において使用されるとき、用語“核酸”または“核酸配列”は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはこれらの断片を指す。“核酸”は、少なくとも2つの塩基 - 糖 - リン酸塩の組み合わせからなる糸状のものを指す（ポリヌクレオチドは、120単量体単位を超えて含有することによって、オリゴヌクレオチドと区別される）。ヌクレオチドは、核酸重合体の単量体単位である。この用語は、デオキシリボ核酸（DNA）およびオリゴヌクレオチドメッセンジャーRNAの形態であるリボ核酸（RNA）、アンチセンス、プラスミドDNA、プラスミドDNAの一部またはウイルスに由来する遺伝学的材料を包含する。アンチセンスは、DNAおよび/またはRNAの機能を干渉するポリヌクレオチドである。核酸という用語は、少なくとも2つの塩基 - 糖 - リン酸塩の組み合わせからなる糸状のものを指す。天然の核酸は、リン酸塩骨格を有し、人工核酸は、同じ塩基を含有するが、他の種類の骨格を含み得る。ヌクレオチドは、核酸重合体の単量体単位である。この用語は、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を包含する。RNAは、tRNA（転移RNA）、siRNA（短鎖干渉RNA）、snRNA（核内小分子RNA）、rRNA（リボソームRNA）、mRNA（メッセンジャーRNA）、アンチセンスRNA、およびリボザイムの形態であり得る。DNAは、プラスミドDNA、ウイルスDNA、直鎖DNA、もしくは染色体DNAまたはこれらの群の誘導体の形態であり得る。さらに、DNAおよびRNAのこれらの形態は、1本鎖、2本鎖、3本鎖または4本鎖であり得る。また、この用語は、PNA（ペプチド核酸）、siNA（短鎖干渉核酸）、ホスホロチオネート、および未処理の核酸のリン酸塩骨格の他の変異体を包含する。

10

20

【 0 0 4 2 】

本明細書において使用されるとき、用語“ヌクレオチドから作られる薬学的因子”または“ヌクレオチドから作られる医薬品”は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは核酸を包含する薬学的因子または医薬品を指す。

【 0 0 4 3 】

“患者”または“対象”または“個体”は、動物（哺乳類、好ましくはヒトが挙げられる）を指す。

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用されるとき、“薬学的因子”または“活性因子”または“薬物”は、患者に対して好適に投与された場合に所望の治療効果を誘導可能な、あらゆる化学的もしくは生物学的な物質、化合物または組成物を指す。いくつかの薬物は、インビボにおいて薬学的活性を有する代謝物に転換される、不活性な形態の固体である。本発明の目的から、用語“薬学的因子”、“活性因子”および“薬物”は、不活性な薬物および活性な代謝物を包含する。

30

【 0 0 4 5 】

用語“薬学的有効投与量、薬学的有効量、治療有効投与量または治療有効量”は、所望の生物学的結果を誘導するために十分な投与量のレベルを指す。その結果は、薬学的因子の送達、疾患もしくは生体系のあらゆる他の所望の変質の徴候、症状または原因の緩和であり得、かつ活性物の実際の量は、患者の身体的状態、処置される病気の進行などに依存する。

40

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用されるとき、用語“ペプチド類似物”は、保存的アミノ酸置換によってか、またはペプチドの生物学的活性を破壊しない位置にある1つ以上非保存的なアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸挿入によってのみ未処置のペプチドとアミノ酸配列が異なるペプチドを指す。上記保存的アミノ酸置換は、例えば、LeuのValへの置換、またはArgのLysへの置換などである。上記生物学的活性は、この場合、ペプチドの融合誘導特性である。また、本明細書において使用されるとき、ペプチド類似物は、その配列の一部またはすべてとして、1つ以上のアミノ酸類似物、アミノ酸の構造

50

を模倣する構造、および/またはペプチドもしくは他のペプチド類似物以外の分子に見られる天然のアミノ酸を包含し得る。

#### 【0047】

本明細書において使用されるとき、用語“プロサポシン誘導体化タンパク質およびプロサポシン誘導体化ポリペプチド”は、これらに限定されないが、天然に生じるサポシン A、B、C および D を包含する。この用語は、類似もしくは実質的に類似の生物学的活性を有する、合成サポシン誘導体化タンパク質および合成サポシン誘導体化ペプチドおよびペプチド類似物をさらに包含する。当該生物学的活性は、例えば、膜構造を組織化する膜相互作用、脂質と結合する膜相互作用および転写機能、脂質提示、膜再構成、膜固着などである。サポシン C およびそれらから誘導体されたポリペプチドは、本発明の1つの実施形態において使用され得る。この用語は、本明細書に記載されているか、および/または当該技術において公知である H 1、H 2、H 3、H 4 または H 5 断片、ならびに生物学的に活性なこれらに対する等価物といった断片をさらに包含し得る。

#### 【0048】

用語“短鎖脂質”は、4、5、6、7、8、9、10、11または12の炭素鎖長を有する脂質を指す。1つの実施形態において、炭素鎖長は6、7、8、9または10である。1つの実施形態において、炭素鎖長は6、7または8である。負に帯電した短鎖脂質の例は、ウェブサイト [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) において入手可能である。本発明と共に使用され得る短鎖脂質の例としては、これらに限定されないが、06:0 PS (DHPS) 1, 2 - ジヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) ; 08:0 PS 1, 2 - ジオクタノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (ナトリウム塩) ; 03:0 PC 1, 2 - ジプロピオニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 04:0 PC 1, 2 - ジブチロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 05:0 PC 1, 2 - ジバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 06:0 PC (DHPC) 1, 2 - ジヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 07:0 PC 1, 2 - ジヘプタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 08:0 PC 1, 2 - ジオクタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 09:0 PC 1, 2 - ジノナノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 06:0 PG 1, 2 - ジヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセロール)] (ナトリウム塩) ; 08:0 PG 1, 2 - ジオクタノイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセロール)] (ナトリウム塩) ; 06:0 PA 1, 2 - ジヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (1ナトリウム塩) ; 08:0 PA 1, 2 - ジオクタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (1ナトリウム塩) ; 06:0 PE 1, 2 - ジヘキサノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン ; 08:0 PE 1, 2 - ジオクタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンが挙げられる。

#### 【0049】

本明細書において使用されるとき、用語“短鎖干渉核酸”、“siNA”、“短鎖干渉RNA”、“siRNA”、“短鎖干渉核酸分子”、“短鎖干渉オリゴヌクレオチド分子”、または“化学修飾短鎖干渉核酸分子”は、例えば配列特異的な様式においてRNA干渉“RNAi”または遺伝子抑制を媒介することによって、遺伝子発現またはウイルス複製を阻害できるか、または下方制御できる、あらゆる核酸分子を指す。例示的な実施形態の範囲において、siNAは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を備える2本鎖ポリヌクレオチド分子である。ここで、アンチセンス領域は、発現の下方制御の対象である標的核酸分子におけるヌクレオチド配列、またはそれらの一部に対して相補的である分子配列を備える。そして、センス領域は、上記標的核酸配列またはそれらの一部と一致する(すなわち、実質的に同じ配列である)ヌクレオチド配列を備える。“siNA”は、例えば、短い2本鎖の核酸(または任意により長いこれら前駆体)であり、かつ標的細胞において受容できないほどに毒性である、小分子干渉核酸を意味する。本発明に範囲において有用なsiNAの長さは、ある実施形態において約21~23bpの長さに最

10

20

30

40

50

適化される。しかし、有用な s i N A ( s i R N A が挙げられる ) の長さを特に限定するものではない。例えば、s i N A は、前駆体の形態において、細胞に対して最初に提示され得る。上記前駆体は、s i N A の最終的な形態または処理を受けた形態と実質的に異なる。s i N A の最終的な形態または処理を受けた形態は、細胞に存在して、かつ標的細胞に対する送達によってか、または送達の後に遺伝子抑制活性を発揮する。s i N A の前駆形態の例としては、前駆配列エレメントが挙げられる。当該前駆配列エレメントは、遺伝子抑制の媒介のために細胞内において活性な s i N A をもたらすための送達時または送達の後、処理されるか、分解されるか、改変されるか、または切断される。このようにして、ある実施形態において、本発明の範囲内にある有用な s i N A は、前駆型の長さ（例えば、標的細胞内において活性な処理された s i N A を生じる約 100 ~ 20 塩基対、50 ~ 100 塩基対、または 50 塩基対未満）を有する。他の実施形態において、有用な s i N A または s i N A の前駆体は、約 10 ~ 49 b p、15 ~ 35 b p、または約 21 ~ 30 b p の長さである。

10

#### 【0050】

本明細書において使用されるとき、用語“自発的に形成される”は、当該技術において公知の意味を包含することを意図される。ここで、リポソームの形成は、リン脂質の混合物に対して最小に機械的な力を加えること必要とするか、または機械的な力を加えることを必要としない。しかし、機械的な力（例えば、ボルテックスまたは混合を介して）がリポソーム組成物の形成を容易にするために適用され得ることについて理解されるべきである。

20

#### 【0051】

本明細書において使用されるとき、用語“安定な”または“安定化された”は、小胞が分解（例えば、小胞構造または封入された気体または気体の前駆体の損失が挙げられる）に対して、有益な期間にわたって実質的に耐性であることを意味する。典型的に、本発明に採用される小胞は、好ましい有効期間を有しており、通常的环境条件において少なくとも 2 ~ 3 週間にわたって元の構成物のうち少なくとも約 90 % の体積がしばしば残存する。好ましい形態において、小胞は、少なくとも約 1 ヶ月、好ましくは少なくとも約 2 ヶ月、より好ましくは少なくとも約 6 ヶ月、より一層好ましくは少なくとも約 18 ヶ月、その上さらに好ましくは約 3 年以下にわたって好ましく安定である。また、本明細書に記載の小胞（気体および気体の前駆体が充填された小胞）は、悪条件（例えば、通常的环境条件において受ける温度および圧力より高いか、または低い温度および圧力）においてさえ安定である。

30

#### 【0052】

“小胞”は、1 つ以上の内部空間を形成する 1 つ以上の壁または膜の存在を特徴とする球状の物体である。小胞は、例えば脂質（本明細書に記載の種々の脂質が挙げられる）、タンパク質性材料、重合体材料（天然重合体、合成重合体および半合成重合体が挙げられる）、または界面活性剤から調製され得る。好ましい小胞は、脂質から形成される壁または膜を備える小胞である。これらの好ましい小胞において、脂質は、単分子膜または 2 重膜の形態であり得る。そして、単分子膜または 2 重膜の脂質は、1 つ以上の単分子膜または 2 重層の形成に使用され得る。2 つ以上の単分子膜または 2 重膜の場合、単分子膜または 2 重膜は同心であり得る。脂質は、単層小胞（1 つの単分子膜または 2 重膜を備える）、オリゴラメラ小胞（約 2 または約 3 つの単分子膜または 2 重膜を備える）または多層小胞（約 3 つ以上の単分子膜または 2 重膜を備える）の形成に使用され得る。同様に、タンパク質または重合体から調製された小胞は、1 つ以上の同心の壁または膜を備え得る。タンパク質または重合体から調製された小胞の壁または膜は、実質的に安定（均一）であり得るか、またはそれらは多孔性または半孔性であり得る。本明細書に記載の小胞としては、リポソーム、ミセル、気泡、超微粒気泡、微粒子、脂質 - 、重合体 - 、タンパク質 - および / または界面活性剤 - 被覆気泡、超微粒気泡および / または微粒子、マイクロバルーン、エーロゲル、ならびに包接体結合小胞などと通常に呼ばれる物質が挙げられる。小胞の内部空間は、液体（例えば、水性溶液が挙げられる）気体、気体の前駆体、および /

40

50

または固體材料もしくは溶液材料（例えば、所望の標的リガンドおよび／または生物活性因子が挙げられる）を用いて充填され得る。

【 0 0 5 3 】

（詳細）

本開示の対象は、単層のリン脂質小胞に一般的に関する。当該単層のリン脂質小胞は、例えば、選択されたリン脂質と水性溶液の組み合わせによって自発的に形成され得るリボソームである。小胞は、容易に形成され、安定であり、漏出がなく（すなわち、それらの内容物を放出しない）、かつ広範な大きさに及ぶ。プロサポシン誘導体化タンパク質（例えば、プロサポシン C、および／または Sap C の H 1 領域および H 2 領域）は、リン脂質小胞に組み込まれ得る。本明細書に記載のリン脂質小胞、またはリボソームは、疾患の処置に有用である。脂質およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ペプチドを含有するリボソームは、例えば疾患状態（例えば、がん）の処置において、付加的な薬学的因子の非存在下において治療薬として使用され得る。また、当該リボソームは、特に生物学的膜を通過する送達が有効な場合に、薬学的に活性な因子の送達および投与にさらに使用され得る。

10

【 0 0 5 4 】

簡単に述べると、本発明のリボソームは、1つ以上の陰イオン性の長鎖脂質および1つ以上のプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを、通常に包含する。ここで、脂質の特定の組み合わせはリボソームの自発的な形成を可能にする。

20

【 0 0 5 5 】

1つの実施形態において、リボソームは、1つ以上の陰イオン性の長鎖脂質、1つ以上の短鎖リン脂質、および1つ以上のプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドもしくはこれらの類似物もしくはこれらの誘導体から構成される。

【 0 0 5 6 】

さらなる実施形態において、本発明のリボソームは、そのような処置を必要とする個体に対する1つ以上の薬学的因子の送達のために、1つ以上の薬学的因子をさらに備え得る。

【 0 0 5 7 】

本明細書に記載のリボソームの製造方法は、1つ以上の乾燥リン脂質およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドもしくはこれらの類似物もしくはこれらの誘導体を準備する工程；混合物を形成するための水性溶液を加える工程；混合物にリボソームを形成させる工程を包含する。

30

【 0 0 5 8 】

代替可能な実施形態において、上記方法は、1つ以上の乾燥リン脂質およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドもしくはこれらの類似物もしくはこれらの誘導体を準備する工程；第1の混合物を形成するために有機溶媒を加える工程；第1の混合物を凍結乾燥する工程；第2の混合物を形成するために第1の混合物に水性溶液を加える工程；第2の混合物にリボソームを形成させる工程を包含し得る。1つ以上の乾燥リン脂質は、少なくとも1つの陰イオン性の長鎖リン脂質および／または少なくとも1つの短鎖リン脂質を備え得る。プロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドは、サポシン C または H 1、H 2、H 3、H 4 もしくは H 5 といった断片であり得る。

40

【 0 0 5 9 】

本発明の他の実施形態において、タンパク質 - 脂質組成物の pH は、酸性である。本発明の他の実施形態において、上記組成物の pH は約 6 . 8 ~ 2 の間である。本発明の他の実施形態において、上記組成物の pH は約 5 . 5 ~ 2 の間である。本発明の他の実施形態において、上記組成物の pH は約 5 . 5 ~ 3 . 5 の間である。

【 0 0 6 0 】

50

他の実施形態において、乾燥形態のタンパク質および脂質の組成物は酸を用いて処理される。1つの実施形態において、上記酸は酸性緩衝液または有機酸である。他の実施形態において、上記酸は、タンパク質の少なくとも一部をプロトン化するに十分な程度に加えられる。ここで、上記組成物は約5.5～約2のpHを有する。他の実施形態において、上記酸は、タンパク質を実質的にプロトン化するに十分な程度に加えられる。ここで、上記組成物は約5.5～約2のpHを有する。

#### 【0061】

さらなる実施形態において、タンパク質の少なくとも一部をプロトン化するに十分な程度の酸を用いて処理されている、タンパク質および脂質の乾燥粉末組成物は、それから実質的に中和される。1つの実施形態において、pHは中性のpH緩衝液を用いて中和される。1つの実施形態において、生じるリボソームの大きさを十分に制御する中性のpH緩衝液を用いて中和される。他の実施形態において、pHは、生じるリボソームの大きさを十分に制御して約200nmの平均直径を有するリボソームを提供する、中性のpH緩衝液を用いて中和される。他の実施形態において、リボソームは50～350nmの間の平均直径を有する。他の実施形態において、リボソームは150～250nmの間の平均直径を有する。他の実施形態において、緩衝液が上記組成物に加えられて、約5～約14、好ましくは約7～約14、より好ましくは約7～約12、より一層好ましくは約7～約10、その上さらに好ましくは約8～約10の、最終の組成物のpHを提供する。

#### 【0062】

本発明のリボソームおよび関連する方法は、当該リボソームが機械的な力の使用を必要としないような、水性溶液の添加によって自発的に形成され得ることを特徴とする。さらに、生じるリボソームの集団は、1年以上の程度の延長された有効期間を有する。したがって本発明のいくつかの実施形態において、当業者は、試薬および装置における低い資産投資を伴う、リボソームに基づく送達系および処理を容易に提供し得、かつ毒性試薬に対するばくろおよび当該試薬の処理に関わる費用を低減する。

#### 【0063】

(融合誘導タンパク質または融合誘導ポリペプチド)

小さな(～80アミノ酸の)熱安定性の糖タンパク質のファミリーであるサポシンは、スフィンゴ糖脂質の分解経路における種々のリソソーム酵素のインビボ加水分解活性にとって必須である。Grabowski, G.A., Gatt, S., and Horowitz, M. (1990) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 385-414; Furst, W., and Sandhoff, K., (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1126, 1-16; Kishimoto, Y., Kiraiwa, M., and O'Brien, J.S. (1992) *J. Lipid. Res.* 33, 1255-1267を参照すればよい。サポシンファミリーの4つの構成要素であるA、B、CおよびDは、単一の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。Fujibayashi, S., Kao, F.T., Hones, C, Morse, H., Law, M., and Wenger, D. A. (1985) *AmJ. Hum. Genet.* 37, 741-748; O'Brien, J.S., Kretz, K.A., Dewji, N., Wenger, D.A., Esch, F., and Fluharty, A.L. (1988) *Science* 241, 1098-1101; Rorman, E.G., and Grabowski, G.A. (1989) *Genomics* 5, 486-492; Nakano, T., Sandhoff, K., Stumper, J., Christomanou, H., and Suzuki, K. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)* 105, 152-154; Reiner, O., Dagan, O., and Horowitz, M. (1989) *J. Mol. Neurosci.* 1, 225-233を参照すればよい。サポシンA、B、CおよびDに関する完全なアミノ酸配列は、遺伝的機構およびプロサポシンのcDNA配列と同様に報告されている。Fujibayashi, S., Kao, F. T., Jones, C, Morse, H., Law, M., and Wenger, D. A. (1985) *Am. J. Hum. Genet.* 37, 741- 748; O'Brien, J. S., Kretz, K. A., Dewji, N., Wenger, D. A., Esch, E, and Fluharty, A. L. (1988) *Science* 241, 1098-1101; Rorman, E. G., and Grabowski, G. A. (1989) *Genomics* 5, 486-492を参照すればよい。開始コドンに変異を有するプロサポシンの完全な欠損は、関連するリソソーム加水分解酵素の欠損と共通する、複数のスフィンゴ糖脂質の基質の蓄積を引き起こす。Schnabel, D., Schroder, M., Furst, W., Klien, A., Hurwitz, R., Zenk, T., Weber, J., Harzer, K., Paton, B.C., Poulos, A., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 3312-

3315を参照すればよい。

【0064】

サポシンは、スフィンゴ脂質活性化タンパク質または補酵素と定義されている。サポシンA、B、CおよびDは、完全に保存された6つのシステイン残基を含めて、構造的に約50～60%の類似性を有する(Furst, W., and Sandhoff, K., (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1126, 1-16を参照すればよい)。完全に保存された6つのシステイン残基は、配列が同定されている3つの内部ドメインジスルフィド架橋を形成する(Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Barca, A., Tatti, M., Ciaffoni, F., Maras, B., Siciliano, R., Zappacosta, F., Amoresano, A., and Pucci, P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9953-9960参照すればよい)。サポシンのすべては、N末端側の半分にある保存された配列と共に1つの糖鎖付加部位を含んでいる。しかし、糖鎖付加は、これらの活性に必須ではない。Qi, X., and Grabowski, G.A. (1998) *Biochemistry* 37, 11544-11554; Vaccaro, A.M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D., and Scerch, C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 30576-30580を参照すればよい。さらに、サポシン AはC末端側の半分に第2の糖鎖付加部位を有する。

10

【0065】

サポシンならびにサポシン様タンパク質およびサポシン様ドメインのすべては、溶液において“サポシンフォールド(saposin fold)”を含む。このフォールドは、3つの保存されたジスルフィド構造および種々の両親媒性ペプチドを特徴とする、複数のらせんバンドルモチーフである。溶液におけるこの共通するサポシンフォールド構造にもかかわらず、サポシンおよびサポシン様タンパク質は、特定の加水分解酵素によるリソソームのスフィンゴ脂質(SL)およびスフィンゴ糖脂質(GSL)の分解の亢進において、種々のインビボにおける生物学的機能を有する。これらの役割のために、サポシンは、リソソームのスフィンゴ脂質およびスフィンゴ糖脂質の代謝の制御において中心的な位置を占めている。

20

【0066】

この機能の非存在下において、スフィンゴ糖脂質は脳に蓄積して、ゴーシェ病を引き起こす。Pampols, T.; Pineda, M.; Giros, M. L.; Ferrer, I.; Cusi, V.; Chabas, A.; Sammarti, F. X.; Vanier, M. T.; Christomanou, H. *Acta Neuropathol.* 1999, 97, 91-97を参照すればよい。スフィンゴ糖脂質(GSL)の蓄積から生じる他の疾患は、リソソームの酵素およびサポシン活性化因子の欠損によっても引き起こされる、異染性白質萎縮症である(Zhang, X. L.; Rafi, M. A.; DeGala, G.; Wenger, D. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87, 1426-1430; Schnabel, D.; Schroder, M.; Sandhoff, K. *FEBS Lett* 1991, 284, 57-59を参照すればよい)。また、酵素活性における特定の役割だけでなく、Sap Cは、神経突起生成の活性化、ガングリオシドおよびGSLの膜間輸送、脂質抗原提示ならびに膜融合誘導の活性化を行う能力を有する。PS ULVと結合したSap Cの静脈内投与が、蛍光標識リン脂質の中樞神経系への輸送能の証明に使用されていることも注目すべきである。したがって、組み合わせたSap C - PS複合体は、神経疾患および脳疾患の処置に特異的な薬物および遺伝子の新たな送達系に自身を適合させ得る。

30

【0067】

本発明における使用に好適な融合誘導タンパク質および融合誘導ポリペプチドとしては、これらに限定されないが、サポシンファミリーのタンパク質(例えば、サポシン C)が挙げられる。また、サポシン Cの相同物が含まれる。ここで、当該相同物は、断片が類似または実質的に類似の生物学的活性を有するように、少なくとも80%の配列相同性、または少なくとも90%の配列相同性を有している。サポシン Cをコードする遺伝コードの変質に起因して、100%の配列相同性が本発明の実施にとって必須ではないことは、当業者によって容易に理解される。

40

【0068】

ペプチドまたはペプチド類似物の例としては、Ser - Asp - Val - Tyr - Cys - Glu - Val - Cys - Glu - Phe - Leu - Val - Lys - Glu - Val

50

l - T h r - L y s - L e u - I l e - A s p - A s n - A s n - L y s - T h r - G l u - L y s - G l u - I l e - L e u - A s p - A l a - P h e - A s p - L y s - M e t - C y s - S e r - L y s - L e u - P r o ( 配列番号 1 ) ;  
 V a l - T y r - C y s - G l u - V a l - C y s - G l u - P h e - L e u - V a l - L y s - G l u - V a l - T h r - L y s - L e u - I l e - A s p - A s n - A s n - L y s - T h r - G l u - L y s - G l u - I l e - L e u - A s p - A l a - P h e - A s p - L y s - M e t - C y s - S e r - L y s - L e u - P r o ( 配列番号 2 ) 、  
 ならびにこれらの誘導体、類似物、相同物、断片および混合物が挙げられる。

#### 【 0 0 6 9 】

また、以下の式： h - u - C y s - G l u - h - C y s - G l u - h - h - h - L y s - G l u - h - u - L y s - h - h - A s p - A s n - A s n - L y s - u - G l u - L y s - G l u - h - h - A s p - h - h - A s p - L y s - h - C y s - u - L y s - h - h

( ここで、 h は疎水性アミノ酸 ( V a l、L e u、I l e、M e t、P r o、P h e、および A l a が挙げられる ) であり ; かつ u は無電荷の極性アミノ酸 ( T h r、S e r、T y r、G l y、G l n、および A s n が挙げられる ) である ) のポリペプチドが含まれる。

#### 【 0 0 7 0 】

ヒト S a p C の機能的ドメインは、図 1 に示されている。6 つのシステイン ( 太字 ) および N - 糖鎖付加コンセンサス配列 ( \* ) が、表されている。2 つのらせん状ドメイン、H 1 ( Y C E V C E F L V K E V T K L I D ) および H 2 ( E K E I L D A F D K M C S K L P K ) は、それに応じて表示されている。略語 M B D および F D は、それぞれ膜結合ドメインおよび融合誘導ドメインを意味する。融合誘導ドメインは、H 1 ペプチドおよび H 2 ペプチドを含む S a p C 分子のアミノ末端側の半分に位置する。S a p C およびその 2 つのらせん状ドメインペプチド ( H 1 および H 2 ) の、脂質膜の不安定化および再構成に対する影響は、原子間力顕微鏡 ( A F M ) を用いて試験されている。S a p C が酸性膜を不安定化および再構成して、膜の表面により厚い “ パッチ ” を形成でき、最終的に 2 重膜の分解を導くことについて、A F M によって示されている。また、S a p C によって生じる膜の不安定化は、曲率の高度な異常が膜の不安定化を促進することを示唆する、異常から始まる。その一方、H 1 または H 2 のいずれも、単独では膜構造に対する有意な影響を有していない。H 2 は、膜の異常が存在し、かつそれから棒状構造に凝集する場合に、脂質と相互作用する傾向にある。A F M の結果は、S a p C ならびにその H 1 断片および H 2 断片の、支持される膜に対する影響を示す。しかし、小胞の安定性および形態に対するこれらのタンパク質の潜在的な影響は分かっていない。ここで、S A N S は、S a p C、H 1 および H 2 の存在および非存在における小胞を性質決定するために使用される。この技術は、小胞の大きさ、形状および多分散性に関する中構造の情報、ならびに膜の厚さに関する微小構造の情報の両方を明らかにする。

#### 【 0 0 7 1 】

( リン脂質膜およびリボソームの形成 )

リボソームは、同心の脂質 2 重膜からなる微小小胞であり、かつ本明細書において使用されるとき、球状の 2 重膜として配列された両親媒性脂質から構成される小さな小胞を指す。リボソームは、構造的に、数百オングストロームから数ミリメートルの大きさを有して、長い管から球状の大きさおよび形状に変動する。全体の形状に関係なく、2 重膜は、薄層のそれぞれを隣り合う薄層から分ける水性層を有する密接した同心の薄層として、一般的に組織化されている。小胞の大きさは、直径が約 2 0 ~ 3 0 0 0 0 n m の範囲内である。標的組織に対するリボソームの特異的な送達は、上記標的組織への治療薬の送達に適したリボソームの大きさを選択することによって達成される。上記標的組織は、例えば、増殖細胞集団、新生組織、炎症性組織、および感染組織である。例えば、1 8 0 n m の平均直径を有するリボソームは、固形腫瘍に集積せず、1 4 0 n m の平均直径を有するリボソームは、同じ固形腫瘍の周辺部に集積し、かつ 1 1 0 n m の平均直径を有するリボソームは、

10

20

30

40

50

ムは、固形腫瘍の周辺部および中心部に集積する。

【0072】

通常、リポソームは、脂質の混合物に対して機械的な力を加えることによって形成される。例えば、種々の方法がリポソーム組成物の調製に現在使用されている。当該種々の方法は、例えば、溶媒透析、フレンチプレス、押出（凍結融解を伴うかまたは伴わない）、逆相蒸発、単純な凍結融解、超音波処理、キレート透析、ホモジナイゼーション、溶媒浸出、微小乳化、自発的な形成、溶媒蒸発、溶媒透析、フレンチプレス細胞技術、および制御下における界面活性剤透析などが挙げられる。例えば、Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990を参照すればよい。また、リポソームは、振とうまたはボルテックスを含む種々の処理によって形成され得る。しかし、リポソームが機械的な力の適用を必要とせずに自発的に形成される方法および組成物を提供できることは、付加的な設備および工程が不要であり、これによってこれらの調製に関する時間および費用を低減させるという点において有益である。本発明はこの要求に対処する。

【0073】

低い多分散性を有する単層小胞（ULV）の自発的な形成は、長鎖および短いアシル鎖を含有する3元リン脂質の状態図に見られ得る。例えば、Nieh, M.-P.; Harroun, T. A.; Raghunathan, V. A.; Glinka, C. J.; J. Katsaras Biophys. J. 2004, 86, 2615-2629; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. Phys. Rev. Lett. 1999, 82, 2804-2807; Nieh, M.-P.; Raghunathan, V. A.; Kline, S. R.; Harroun, T. A.; Huang, C.-Y.; Pencer, J.; Katsaras, J. Langmuir 2005, 21, 6656-6661を参照すればよい。UVLは、温度を上昇させること（Lesieur, P.; Kiselev, M. A.; Barsukov, L. L.; Lombardo, D. J. Appl. Cryst. 2000, 33, 623-627; Nieh, M.-P.; Harroun, T. A.; Raghunathan, V. A.; Glinka, C. J.; Katsaras, J. Phys. Rev. Lett. 2003, 91, 158105を参照すればよい）、または2重膜の円盤状のミセルを希釈すること（V. A., Glinka; C. J.; J. Katsaras Biophys. J. 2004, 86, 2615-2629を参照すればよい）のいずれかによって形成される。ここで、短鎖脂質は、2重膜の円盤の高い曲率の周縁に集まって、その端部のエネルギーを最小にする。円盤状の2重膜のミセルからULVへの転移は、長鎖脂質のゲル-液状結晶に対応する温度（主転移温度）において生じる。当該転移は、長鎖脂質と短鎖脂質との間の上昇した混和性レベルが円盤状の端部から短鎖脂質を分散させることを意味する。円盤状の端部からの短鎖脂質の分散が、線張力を増加させ、かつ剛性の係数を減少させる。この一連の現象は、単分散したULVの形成を生じる。Fromherz, P. Chem. Phys. Lett. 1983, 94, 259-266を参照すればよい。これらのULVは、延長された期間（すなわち、数週間）にわたって安定である（Nieh, M.-P.; Harroun, T. A.; Raghunathan, V. A.; Glinka, C. J.; Katsaras, J. Phys. Rev. Lett. 2003, 91, 158105を参照すればよい）。よって、これらのULVは、このため薬物担体として良好な候補物と考えられる。

【0074】

（リポソームを自発的に形成する組成物および方法）

リポソーム形成の1つの方法は、長鎖脂質および短鎖脂質の使用に関する。ここで、両方の脂質の種は、少量の酸性の長鎖脂質（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG））を用いてドーブされた2飽和の両性イオンリン脂質である。本開示において、リポソームの自発的な形成の1つの実施形態に係る形態が記載されている。この実施形態において、リポソームの自発的な形成に使用される脂質の混合物は、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジヘキサノイルホスファチジルコリン（それぞれDPPCおよびDHPG）、ならびに酸性の長鎖脂質であるジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）を包含する。しかし、本発明の範囲内における好適な他の実施形態に到達するために、種々の変更および置換がこの組み合わせに対してなされ得ることは、当業者にとって容易に理解される。この混合物は、少なくとも1つのプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドまたはこれらの変異体もしくは類似物をさらに含む。

【0075】

自発的に形成されるリポソームは、以下の工程：１）乾燥脂質および少なくとも１つのプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドの混合物を準備する工程；２）上記混合物に水性溶液を加える工程；３）上記混合物にリポソームを形成させる工程の実施によってなされ得る。ここで、上記リポソームは、安定であり、かつ当該リポソームの形成のために機械的な力を加える必要がない。１つの実施形態において、上記脂質は、少なくとも１つの陰イオン性の長鎖リン脂質を包含する。１つの実施形態において、上記脂質は、少なくとも１つの陰イオン性の長鎖脂質および少なくとも１つの短鎖リン脂質を包含する。プロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドは、サポシン C（配列番号２）、H 1（配列番号３）、H 2（配列番号４）、H 3（配列番号５）、H 4（配列番号６）、H 5（配列番号７）およびこれらの混合物からなる群から選択され得る。プロサポシンは配列番号１に表されている。プロサポシン誘導体化タンパク質は、サポシン C、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5 およびこれらの混合物の、類似物または誘導体をさらに包含する。

10

#### 【 0 0 7 6 】

水性溶液は、生理学的に適合可能なあらゆる溶液であり得る。さらに、当該溶液は、リポソームが自発的に形成するように、脂質およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドの可溶化能を有する。水性溶液の非限定的な例としては、例えば、水、脱イオン水、生理食塩水、およびリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。水性溶液を加えた状態におけるタンパク質および脂質の総モル濃度は、約 3 0 0  $\mu$  M または約 4 0 0  $\mu$  M または約 5 0 0  $\mu$  M または約 1 0 0 0  $\mu$  M 以下である。水性溶液の pH は、約 7 . 4 または約 7 . 0 ~ 7 . 6、または約 6 . 8 ~ 7 . 8 である。

20

#### 【 0 0 7 7 】

水性溶液の添加後に、脂質およびタンパク質の混合物は、自発的にリポソームを形成する。しかし、リポソームの形成を早めるかまたはそうでなければ容易にするために、上記混合物がボルテックスされ得るか、または混合され得ることについて、当業者は容易に理解する。

#### 【 0 0 7 8 】

代替可能な実施形態において、上記方法は、１つ以上の乾燥脂質およびプロサポシン誘導体化タンパク質もしくはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを準備する工程；第１の混合物の形成のために有機溶媒を加える工程；第１の混合物を凍結乾燥する工程；第２の混合物を形成するために第１の混合物に水性溶液を加える工程；第２の混合物にリポソームを形成させる工程を包含し得る。１つ以上の上記乾燥脂質は、少なくとも１つの陰イオン性の長鎖リン脂質および／または少なくとも１つの短鎖リン脂質を包含し得る。プロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドは、サポシン C または H 1、H 2、H 3、H 4 もしくは H 5 といった断片であり得る。この実施形態において、有機溶媒は、あらゆる好適な有機溶媒（例えば、*t*-ブタノール（好ましくは）、イソプロパノール、１-プロパノールエタノール、エチルエーテル、メタノール、または DMSO）であり得る。有機溶媒は、凍結乾燥の前における最終的な第１の混合物の約 8 0 ~ 9 0 % または約 7 0 ~ 9 5 % または約 5 0 ~ 9 5 % を構成する。第１の混合物は、リポソームを形成するために使用される水性溶液の添加までに、数ヶ月または数年にわたって保存され得る。

30

40

#### 【 0 0 7 9 】

双性イオン脂質のみではなくて、DOPS といった負に帯電した長鎖脂質の使用は、サポシン C もしくはその断片（例えば、H 1 ペプチドおよび H 2 ペプチド）と酸性脂質の凝集体との間の相互作用を最適化すると考えられる。そして、負に帯電した長鎖脂質の使用は、リポソームの自発的な形成にとって特異に適合され、疾患の処置用のリポソームを形成する新規かつ有用な方法を提供する。代替可能な実施形態において、負に帯電した長鎖脂質は、ジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、１，２-ジオレオイル-ホスファチジイルノシトール（DOPIL）および１，２-ジオレオイル-ホスファチジン酸（DOPA）、またはこれら

50

の組み合わせから選択され得る。本発明の負に帯電した長鎖脂質は、約 14 ~ 約 24 の炭素、または約 18 ~ 約 20 の炭素の長さの炭素鎖を有する、あらゆる長鎖リン脂質であり得る。脂質の網羅的なリストは、[www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)において入手可能である。当業者は、これらの脂質が本発明において使用され得ることを十分に理解する。長鎖脂質および短鎖脂質のあらゆる組み合わせが使用され得ると同時に、いくつかの組み合わせはより安定なリポソームを生じる。例えば、本発明を限定することを意図しないが、以下のものは、リポソームが形成される組成物の選択肢の指針となり得る。約 20 ~ 約 24 の炭素の長さの長鎖が使用される場合に、約 6 ~ 約 8 の長さを有する短鎖脂質は、リポソームの安定性を向上させるために使用され得る。約 14 ~ 約 18 の長さの長鎖が使用される場合に、約 6 ~ 約 7 の長さを有する短鎖脂質は、リポソームの安定性を向上させるために使用され得る。脂質のこれらの組み合わせがより安定なリポソームを生じるが、他の組み合わせは、首尾よく使用され得、かつ否定されることを意図されない。

10

#### 【0080】

安定な U L V 形成にとっての可能性は、本発明に記載のような短鎖脂質および長鎖脂質の添加を介してさらに最大化される。短鎖脂質は、当業者によって理解されるようなあらゆる好適な短鎖脂質であり得る。1つの実施形態において、例えば、短鎖脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) といった無電荷の短鎖ホスファチジルコリン脂質である。また、短鎖脂質は、DHPS といった短鎖ホスファチジルセリン脂質であり得る。本明細書に記載のような短鎖脂質の添加に伴って、形成されるリポソームの集団は、一般的に単分散している。短鎖脂質なしでは、上記集団は、多分散しており、生じるリポソームの大きさおよび形状に変動を有する。短鎖リン脂質の添加の結果として、単分散した集団を得ることが可能であり、生じる調製物の薬物動態および生体利用効率の制御能を向上させる。

20

#### 【0081】

1つの特定の実施形態において、サポシン - C リポソームを合成するために使用される脂質混合物は、負に帯電した脂質ジオレオイルホスファチジル - セリン (DOPS) を包含する。ここで、無電荷の長鎖脂質ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) および無電荷の短鎖脂質ジヘキサノイルホスファチジルコリン (DHPC) の少量が加えられる。この特定の実施形態において、 $[DOPS] : [DPPC]$  のモル比は、 $([DPPC] + [DOPS]) / [DHPC] = \text{約} 4$  という条件において、 $1 : 1 \sim 10 : 1$  の範囲内である。代替可能な実施形態において、DHPC は DHPS に置き換えられるか、DHPS と組み合わせられる。

30

#### 【0082】

電荷および長さが一致する当該技術において公知のあらゆる脂質が、使用され得る。サポシン C の少量を用いてドープされた脂質のこの組成物を含有するサンプルは、不安定化しない。しかし、高濃度のサポシン C を伴うと、大きな凝集体がこの系に使用する溶液から沈殿し得る。これは膜の不安定化を意味する。DOPS / DPPC / DHPC サンプルは 24 ヶ月にわたって安定である。つまり、無電荷の長鎖脂質および短鎖脂質の添加が、凝集体の安定性を増強することを示している。しかし、長鎖脂質および短鎖脂質のあらゆる組み合わせが、本明細書に記載のような発明にしたがって使用され得る。表 1 は、本発明の方法の実施に使用され得る長鎖脂質および短鎖脂質の非限定的な例を示す。

40

#### 【0083】

【表 1】

表 1. 長鎖リン脂質および短鎖リン脂質の組み合わせ

長鎖リン脂質		短鎖リン脂質
18:1 PS	18:0 PC	06:0 PC (DHPC)
18:1 PS		06:0 PC (DHPC)
18:1 PS	18:0 PC	06:0 PS (DHPS)
18:1 PS		06:0 PS (DHPS)
18:2 PS	18:1 PG	06:0 PS (DHPS)
18:0-18:1 PS	18:1 PE	06:0 PC(DHPC)
16:0 PS	16:1 PC	05:0 PC
20:4 PS	20:1 PC	07:0 PC

10

## 【 0 0 8 4 】

さらに、脂質鎖における飽和炭化水素の存在または非存在は、リボソームの安定性に影響を与える。例えば、約 18 以上の鎖長を有する脂質が使用され、リン脂質は飽和化または不飽和化、好ましくは不飽和化され得る。約 14 ~ 約 16 の炭素を有する脂質といったより短い長鎖脂質に関して、脂質は不飽和化され得るが、飽和脂質の利用によって本発明の性能が向上される。

20

## 【 0 0 8 5 】

脂質の比率の非限定的な例は以下の通りである。組成物における選択された負のリン脂質に対する選択された無電荷のリン脂質のモル比は、約 1 対 10 (約 10 % の無電荷のリン脂質)、または約 1 対 5 (約 20 % の無電荷のリン脂質)、または約 1 対 1 (約 50 % の無電荷のリン脂質) である。組成物における選択された短鎖脂質に対する選択された長鎖脂質のモル比は、約 4 対 1 (約 20 % の短鎖) であり得、かつ約 10 対 1 (10 % の短鎖) ~ 約 3 対 1 (約 33 % の短鎖) であり得る。

30

## 【 0 0 8 6 】

1 つの実施形態における長鎖対短鎖の比率の一例は、[ 無電荷の長鎖脂質 ] + [ 酸性の長鎖脂質 ] / [ 無電荷の短鎖脂質 ] または [ 陰イオン性の短鎖脂質 ] = 約 4 である。他の例としての 1 つの実施形態において、混合物における DOPS 対 DPPC のモル比は、( [ DPPC ] + [ DOPS ] ) / DHPC = 約 4 という条件において、約 10 ~ 8 対 1、または約 7 ~ 6 対 1、または約 5 ~ 3 対 1 または約 1 ~ 2 対 1 である。他の実施形態において、[ 無電荷の長鎖脂質 ] + [ 酸性の長鎖脂質 ] / [ 無電荷の短鎖脂質 または 陰イオン性の短鎖脂質 ] は、約 2 ~ 約 10 または約 3 ~ 約 8 または約 4 ~ 約 7 であり得る。本発明における使用に適した脂質は、当該技術に公知のあらゆる脂質、または [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) において提供されるようなあらゆる脂質から選択され得る。

40

## 【 0 0 8 7 】

本発明のリボソームは、1 つ以上の薬学的因子および / または造影剤をさらに備え得る。1 つ以上の薬学的因子および / または造影剤は、水性の内部もしくは 2 重膜の間に捕捉されているか、または 2 重膜内にある疎水性分子を捕捉することによって捕捉されている。種々の技術が、選択された宿主組織に対して封入された薬物を標的化し、かつ感受性組織から離すためのリボソームを使用することに採用され得る。これらの技術としては、リボソームの大きさ、それらの正味の表面電荷、およびそれらの投与経路を操作することが挙げられる。

## 【 0 0 8 8 】

また、本発明のリボソームは、受動輸送経路によって送達され得る。リボソームの受動

50

輸送は、種々の投与経路（例えば、静脈内、皮下、筋肉内および局所）の利用に関する。いずれの経路もリポソームの局在に差異を生じる。

【0089】

また、本発明のリポソームは、血液脳関門を越える治療薬または造影剤の送達に理想的である。本発明は、治療薬を含有するリポソームがCNSにこれらの薬剤を送達するために使用され得る方法に関する。ここで、薬剤は、上述の脂質およびサポシンC、プロサポシンもしくはサポシンの変異体を包含するリポソーム内に含まれている。治療薬を含有するリポソームは、当該技術において一般的に容認される方法を用いて、IV注入、IM注入、経鼻送達、またはあらゆる他の経血管薬物送達法を介して投与され得る。

【0090】

理論によって限定されることを意図せずに、サポシン媒介膜融合がどのように生じるかについての1つの考え得る機序は、タンパク質構造変化を介するものである。プロサポシン誘導体化タンパク質に属するサポシンAおよびサポシンCは、高度なアミノ酸同一性/類似性を示す。両方のタンパク質は、両親媒性のらせん状バンドルモチーフに折りたたまれることが計算的に予測されている。サポシンフォールドは、一般的に、5つの両親媒性らせんを有する通常の超2次構造である。5つの両親媒性らせんは、単一の球状ドメインに折りたたまれ、かつ両方のタンパク質に共通している。1つの実施形態において、折りたたみは、アミノ末端における中心に位置するらせんに沿っている。らせん2および3は一方の側からくるまれ、かつらせん4および5は他方の側からくるまれている。このフォールドが、膜相互作用にわたる接合点を提供し得る。

【0091】

サポシン媒介の陰イオン性のリン脂質膜との膜融合に関する機序は、2段階からなる過程であると考えられる。第1の段階において、正に帯電したアミノ酸（塩基の形態）であるサポシンのリジン（Lys）およびアルギニン（Arg）と、負に帯電したリン脂質膜との間の静電相互作用が、これらの2つの種の間に結合を生じる（図1を参照すればよい）。第2の段階において、2つの隣接するサポシンタンパク質のらせんの間における分子内疎水性相互作用が、2つの膜を、膜の融合を生じさせるために十分密接に近接した状態にする（図2を参照すればよい）。

【0092】

このため、本発明によれば、サポシン、特にサポシンCの脂質との結合は、約5.5以下のpH範囲を一般的に必要とする。これは、膜とサポシンCの最初の結合が、サポシンCの正に帯電した塩基性アミノ酸残基の陰イオン性膜との静電相互作用を介して生じるからである。このため、静電相互作用を多くもたすために、それらのプロトン化形態にある塩基性アミノ酸を有することが非常に好ましい。これは、脂質混合物とプロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドを混合する前に、プロサポシン誘導体化タンパク質またはプロサポシン誘導体化ポリペプチドに対する酸性溶液の添加によって達成され得る。

【0093】

代替可能に、サポシンファミリーのタンパク質から誘導される、関連融合タンパク質および関連融合ペプチドは、この低pH範囲の制限を有しないものがあり得る。このため、他の膜融合タンパク質および膜融合ペプチドのpH範囲は、生理学的pH（約7のpH）〜より低いpHの範囲にあり得る。

【0094】

（DOPS / DPPC / DHPCリポソームの構造解析）

粉末の形態のDOPS（負に帯電した長鎖脂質）、DPPC（無電荷の長鎖脂質）およびDHPC（無電荷の短鎖脂質）（Avanti Polar Lipids、アラバスター、ALから入手可能である）は、さらに精製することなく使用される。DLSC測定に関して、[DOPS] : [DPPC] のモル比は、すべてのサンプルに関して（[DPPC] + [DOPS]） / [DHPC] = 4の条件において、1 : 1 ~ 10 : 1の範囲内である。乾燥脂質混合物は、ろ過した超純水（Millipore EASY pure U

10

20

30

40

50

V) に、10 質量%の総脂質濃度において溶解され、かつボルテックスおよび4～50の温度循環によって混合される。

#### 【0095】

タンパク質を含有するリボソームの調製に関して、Sap Cは、IPTG誘導化pET系を用いたE. coliにおいて過剰発現され、かつHisタグタンパク質は、ニッケルカラムから溶出された。透析の後に、HPLCクロマトグラフィーによって以下のようにさらに精製された。C4逆相カラムが10分間に渡って0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を用いて平衡化された。それから、タンパク質は、0.1%TFAのアセトニトリル溶液の直線勾配(0～100%)において60分に渡って以上溶出された。タンパク質の主要なピークが回収され、かつ凍結乾燥された。同時にタンパク質濃度が上述のように測定された。H1ペプチド(YCEVCEFLVKEVTKLID)およびH2ペプチド(EKEILDADFDMCSKLPK)は、SynPeptide株式会社(カリフォルニア、USA)によって合成され、かつ1.5mg/mLの濃度においてD<sub>2</sub>Oに溶解された。 $[DOPS]/[DPPC] = 10$ および $([DPPC] + [DOPS])/DHP C = 4$ の条件を有する0.1質量%の脂質溶液は、それから体積比12:1の2つのペプチド溶液(1.5mg/mL)、および1:1の体積比を有するSap C溶液に加えられた。これによって、膜の不安定化を誘導するために必要とされるSap Cの濃度よりも高い、62.5 μMの最終ペプチド(またはSap C)濃度になった( $[脂質]/[ペプチド]$ のモル比=22/1)。また、6.25 μMのSap C( $[脂質]/[Sap C] = 220/1$ )のみを含有するサンプルが、比較のために調製された。

#### 【0096】

Sap C-ULV複合体の構築において、DOPS/DPPC/DHPC-ULV系に対する組成物の影響は、Sap C-膜相互作用の研究に好適な系として特徴づけされた。特に、この脂質混合物の凝集体の形態は、動的光散乱(DLS)、透過型電子顕微鏡(TEM)およびSANS測定を介して、決定された。それから、SANSは、これらのULVに対するH1、H2およびSap Cの影響を特徴付けるために使用された。

#### 【0097】

ペプチドの非存在下における凝集体に関して、DLSおよびTEMの結果によって、200 nm以下および500 nm未満のオーダーの直径を有するULVの2モードの集合が存在することが確かめられる。これは、扁平な小胞および3軸楕円の殻に関する、形態要素の組み合わせを用いたSANSデータによく一致する。SANSデータは、Sap Cが高濃度(62.5 μM)においてULVの凝集を促進する一方において、低濃度(6.25 μM)においてULV構造が乱されないことを明らかにする。H1およびH2の両方は膜厚のわずかな減少を誘導する。H1ペプチドは、ULVの大きさまたはそれらのサイズ分布の変動を示さない。その一方で、H2ペプチドは、存在する2つのULV凝集体の間における平衡状態を変動させる。定性的に、これらの結果は以前のAFMの発見と一致する。

#### 【0098】

生じるリボソームの構造および安定性を決定するために、はじめにホモジナイズした10質量%の溶液が5、2、1、0.5、0.1質量%のサンプルに、漸次的に希釈される。DLS測定の前に、0.1質量%のストック脂質サンプルが、5、50および200倍に希釈され、かつN4<sup>+</sup>粒子測定器(Coulter, Miami, FL)を用いて分析される。この方法を用いて、系の希釈が粒子のサイズに影響しないことが確認された。SANS実験に関して、同じサンプル調製手順が $[DOPS]/[DPPC] = 10$ のサンプルに適用された。サンプル調製手順は、0.5質量%の総脂質濃度を有するサンプルを得るために、H<sub>2</sub>Oの代わりにD<sub>2</sub>O(99.99%、Chalk River Laboratory, Chalk River, ON)が使用された点を除いて同じである。それから、0.5質量%のサンプルは、酸性緩衝液を用いて、0.1および0.05質量%の混合物にさらに希釈された。上記酸性緩衝液は、同じ体積の0.1 Nの酢酸ナトリウム(NaAc)および0.1 Nの酢酸(HAc)から構成される。生じた溶液は、D<sub>2</sub>O

において  $4.78 \pm 0.02$  の pH を有し、かつ  $D_2O$  を用いた 12 倍希釈の間、安定であった。

#### 【0099】

SANS 実験は、米国標準技術局 (NIST) 中性子研究センター (NCNR、Gaithersburg、Maryland、USA) に設置されている 30m NG7 SANS 機器において実施された。8.09 オングストロームの波長 ( ) の中性子、中性子屈折光学および長いサンプル - 検出器間の距離 ( $SDD = 15.3\text{ m}$ ) を用いることによって、最も低い散乱ベクトル  $[q = 4 / \cdot \sin( / 2)]$ 、ここでは散乱角である ] に達した。また、2つの他の  $SDD$  (5m および 1m) が使用された。他の2つの  $SDD$  を使用することによって、3つのすべての  $SDD$  に関して、0.002 ~ 0.35 オングストロームの範囲内の組み合わせた  $q$  を包含する。未加工の2次元データ検出器のバックグラウンド、細胞なしの散乱およびサンプル透過について補正された。それから、補正されデータは、光線の中心について環状に平均化されて、通常の1次元データを生じた。それから、これらのデータは、公知の入射光線放射束を用いて、絶対強度スケール (absolute intensity scale) に関して見積もられた。非干渉性のプラトーが、10 ~ 20 高い  $q$  のデータ点の強度を平均化すること、および低減したデータを引くことによって決定された。

10

#### 【0100】

ULV の大きさは、N4 + サブミクロン粒子粒径分析器 (Coulter、Miami、FL) を用いた、陽子相関分光分析<sup>23</sup>、<sup>24</sup> によって決定された。大きな粒子が、20 ~ 800 nm の間の粒径を有して多分散した状態において見られた。ANOVA 分析は、統計学的有意性および標準偏差を表すエラーバーを決定するために使用された。

20

#### 【0101】

TEM 画像は、80 kV の加速電圧において運転させたヒタチ TEM (H-7600、日立、日本) を用いて撮影された。各サンプルの液滴は、支持フォルムバール膜 (support formvar film) に覆われたニッケル網 (200 目、30 ~ 75 nm の範囲の厚さ、Electron Microscopy Science、PA) 上に載せられた。網は、TEM 分析の前に2時間室温において、ろ紙上に置かれた。バックグラウンドが高倍率において最適化されると同時に、所望の領域が低倍率 (50 ~ 1000 倍) に設定された。単一の小胞は、最大 50000 万倍において観察され得た。TEM 顕微鏡写真は、適切な画像収集ソフトウェアを有する、デュアル AMT CCD カメラ (2k x 2k、16 ビット) を用いて撮影された。

30

#### 【0102】

Sap C が、酸性条件下の負に帯電した不飽和脂質 (すなわち、DOPS) の存在下においてのみ機能するので<sup>23</sup>、この系は、主に DOPS ならびに少量の DPPC および DHP C から構成される。種々の  $[DOPS] / [DPPC]$  モル比のサンプル (表1) の DLS の結果は、 $[DOPS] / [DPPC] = 10$  のサンプルのみが2モードのサイズ分布を示す一方において、残りのサンプルが少なくとも3つの集団を含有することを示している。この理由から、 $[DOPS] / [DPPC] = 10$  のサンプルのみが、これらの ULV の構造に対する Sap C、H1 および H2 の影響をさらに調べるために使用された。また、DLS のデータは、DOPS / DPPC / DHP C サンプルの構造が12ヶ月に渡って安定であることを示している (表2)。これは、DPPC および DHP C の添加が、DOPS を超音波処理することと比べて、これらの凝集体の安定性を劇的に増強するという証拠であり、かつこれらが実用され得る可能性を提供する。

40

#### 【0103】

DLS の結果から予測されるような ULV の見かけの大きさ、または流体力学的半径は、ULV が球状であるという仮定に基づいていることを留意すべきである。長球の小胞または扁平な小胞に関する文献<sup>29</sup> に詳細が論じられているように、小胞の軸率の正確な決定には、DLS および静的光散乱 (SLS) のそれぞれによる、小胞の流体力学的半径および回転の半径の測定が必要である。楕円小胞に関して、見かけの流体力学的半径は、扁

50

平な小胞または長球の小胞のそれぞれについてのULVの大きさまたは表面積を、多少（ $< 10\%$ ）の過小評価または過大評価される。

【0104】

【表2】

表2. 溶液中のDOPS/DPPC/DHPC凝集体のDL Sデータから得られた流体力学的半径（nm）。ここで、 $([DOPS] + [DPPC]) / DHPC = 4$ 。括弧内は、各凝集体の集団の百分率を示す。

DOPS/DPPC 比率	存続期間 (日)	R <sub>H</sub> , nm (%)		
		1-100	100-200	400-800
1	1	40 (79)	145 (12)	441 (9)
1	40	42 (76)	173 (7)	705 (17)
5	1	29 (78)	157 (11)	570 (11)
5	40	なし	147 (51)	689 (49)
10	1	なし	138 (70)	582 (30)
10	40	なし	178 (56)	746 (44)
10	240	なし	161 (49)	452 (51)
10	365	なし	159 (51)	471 (49)

10

20

【0105】

図2は、0.1質量%の脂質混合物（ $[DOPS] / [DPPC] = 10$ ）、ならびに酢酸D<sub>2</sub>O緩衝液における、H1およびH2をドープした脂質混合物のSANSデータを示している。低濃度（ $6.25 \mu M$ ）のSap Cは、ULVの大きさまたはそれらの膜構造の乱れを示さない（非ドープの混合物と同様である）。高濃度（ $62.5 \mu M$ ）のSap Cの場合には、Sap C添加の脂質系は、溶液から沈殿する（SANSに受け容れられない）大きな凝集体を形成する。この観察はSap Cが膜を不安定化する<sup>2,3</sup>というこれまでの研究と一致する。このため、われわれは、小胞の構造に対するH1およびH2の影響にのみ焦点を絞っている。0.1%のDOPS/DPPC/DHPC（ ）、H1をドープした混合物（ ）、およびH2をドープした混合物（ ）のSANSデータが、図2に示されている。実線はデータに対する最良適合を表している。矢印によって指し示されている2つの広いピークは、系にある相関長の結果である。点線および長点の線のそれぞれは、0.1%の非ドープ系を適合させるために使用された、3軸楕円殻モデルおよび扁平殻モデルの結果である。図2に示されているSap C非ドープのサンプルの散乱曲線は、それらが2つの広いピークを含むという通常の特徴を共有している。0.01オングストローム<sup>-1</sup>未満のqおよび0.03オングストローム<sup>-1</sup>未満のqの間に中心を有する2つの広いピークは、系に2つの相関長が存在することを示している。また、これらのピークの由来をより理解するために、0.05質量%の単一の脂質混合物が試験された。0.05質量%のサンプルのSANSデータは、0.1質量%のサンプルデータと重ねるために縮小され得る。これによって、2つの広いピークが凝集体の形態に固有のものであり、かつ粒子間の相互作用の結果ではないことを示している。

30

40

【0106】

q > 0.06 オングストローム<sup>-1</sup> について、3つ1組のデータの間に於いて強度の違

50

いは見られない。改変したギニエプロットの分析<sup>30</sup>（クラツキ - ボロッドプロットとしても知られる）は、3つのサンプルのすべてに適用された。ここで、 $\ln(I \cdot q^2)$ は、 $5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-2}$  オングストローム<sup>-2</sup>の範囲にある $q^2$ の条件における直線関係を有する。これは層状構造の存在を示している。図3は、0.1質量%のDOPS/DPPC/DHPC混合物（ ）、H1をドープした系（ ）、およびH2をドープした系（ ）に関する改変したギニエプロットを示している。線はデータの最良適合を表している。それから、2重膜の厚さは、ルート12を掛けた傾斜の平方根から得られる。最良適合の結果は、非ドープの混合物が最も厚い（ $37.7 \pm 0.7$  オングストローム）2重膜を形成する一方において、H1をドープした2重膜およびH2をドープした2重膜がわずかに薄い（それぞれ $35.8 \pm 0.8$ 、 $36.2 \pm 0.6$  オングストローム）ことを示している。

10

【0107】

$q = 0.06$  オングストローム<sup>-1</sup>について、H1をドープした系の散乱曲線は、H2をドープした散乱曲線と比べて、非ドープの脂質混合物の散乱曲線と類似している。つまり、これは、H1ペプチドを用いた膜のドープによって凝集体の形態に有意な変化が起こらないことを示している。また、この観察は以前のAFMの報告と一致している。当該報告において、H1は、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルセリン（POPS）に対して影響しないことが見出された。H2をドープしたサンプルのSANSデータの場合には、単一の脂質混合物のSANSデータとの定性的な差が、 $q$ の低い領域（ $q < 0.003$  オングストローム<sup>-1</sup>）の傾斜、ならびに2つのピークの幅および強度に観察された。

20

【0108】

3つのサンプルのすべてのTEM画像が得られ、かつ形態の2つの集団を有する粒子が観察された。図4は、DOPS/DPPC/DHPC混合物（AおよびB）、およびH1をドープした混合物（CおよびD）、およびH2をドープした混合物の代表的なTEM画像を示している。3軸楕円の小胞（すなわち、A、CおよびE）は、すべてが同様の大きさ（ $150 \sim 200 \text{ nm} \times 600 \sim 800 \text{ nm}$ の投影断面積）である。このとき、3軸楕円の小胞は、約 $10 \sim 150 \text{ nm}$ の投影半径を有する扁平小胞である。これらの容積は、層状3軸楕円小胞に関する以下の数学モデルに従って、SANSデータの最良適合の結果と一致する。

30

【0109】

3軸楕円の単層小胞に関するモデルは、3つの主軸、 $a_{core}$ 、 $b_{core}$ および $c_{core}$ （ $a_{core} \cdot b_{core} \cdot c_{core}$ ）に沿った異なる中心長を有する楕円殻として表される。軸、 $a_{shell}$ 、 $b_{shell}$ および $c_{shell}$ に沿った殻の長さは、それぞれ（ $a_{core} + l$ ）、（ $b_{core} + l$ ）および（ $c_{core} + l$ ）と定義される（ここで $l$ は2重膜の厚さである）。この近似は、2重膜の通常の傾向に従って、ULV全体に渡って一定の2重膜の厚さを仮定していないことに留意すべきである。したがって、考えられるすべての方向に渡って平均化された3軸楕円殻に関する形成因子 $P_{triax}(q)$ は、

【0110】

40

【数1】

$$P_{triax}(q) = \frac{1}{V_{triax}} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 A_{triax}(a_{core}, b_{core}, c_{core}, l, x, y, q)^2 dx dy, \quad (A-1)$$

【0111】

【数 2】

$$A_{triax}(q) = 3(\rho_{D_2O} - \rho_{lipid}) \left[ \frac{V_{total} j_1(u_{shell})}{u_{shell}} - \frac{V_{core} j_1(u_{core})}{u_{core}} \right], \quad (A-2)$$

として表され得る。ここで、 $j_1$  は、1 次楕円ベッセル関数であり、

【0 1 1 2】

【数 3】

$$j_1(x) = \frac{\sin x}{x^2} - \frac{\cos x}{x} \quad 10$$

であり、 $u_i$  は、

【0 1 1 3】

【数 4】

$$q \sqrt{a_i^2 \cos^2 \left( \frac{\pi x}{2} \right) + b_i^2 \sin^2 \left( \frac{\pi x}{2} \right) (1 - y^2) + c_i^2 y^2}$$

と定義され ( $i$  は  $shell$  または  $core$  を表す)、かつ  $V_{total}$  および  $V_{core}$  のそれぞれは、楕円体の全容積および中心部の容積である。 $D_2O$  および  $lipid$  は、 $D_2O$  および脂質の散乱長密度を意味する。 20

【0 1 1 4】

扁平な楕円体小胞に関して、形成因子  $P_{oblate}(q)$  は、 $c_{core} = b_{core}$  にすることによって得ることができる。したがって、 $u_i$  は、

【0 1 1 5】

【数 5】

$$q \sqrt{a_i^2 \cos^2 \left( \frac{\pi x}{2} \right) + b_i^2 \sin^2 \left( \frac{\pi x}{2} \right)}$$

30

になる。さらに、シュルツ関数  $f(a)$  は、以下の式

【0 1 1 6】

【数 6】

$$f(a) = \frac{p^{-2/p^2}}{\langle a \rangle \Gamma \left( \frac{1}{p^2} \right)} \left( \frac{a}{\langle a \rangle} \right)^{(1-p^2)/p^2} \exp \left( -\frac{a}{p^2 \langle a \rangle} \right), \quad (A-3)$$

(ここで、 $\langle a \rangle$  は  $a$  の平均である) に示されるような短軸 (すなわち、 $a_{core}$ ) の分布を説明するために使用される。 $p$  は、 $\sigma / \langle a \rangle$  と定義される多分散度である。ここで、 $\sigma$  は  $a$  の標準偏差である。 $p$  として適当な値は、0 ~ 1 の範囲内である<sup>4 5</sup>。ガンマ関数  $\Gamma(1/p^2)$  は、シュルツ関数の積分を標準化するために使用される。等式 A - 3 は、 40

【0 1 1 7】

【数 7】

$$P_{oblate}(q) = \frac{1}{V_{oblate}} \int_{-1}^1 \int_0^\infty f(a_{core}) \cdot A_{oblate}(a_{core}, b_{core}, l, x, q)^2 da_{core} dx \quad (A-4)$$

50

となって等式 A - 1 内に入れられる。

【 0 1 1 8 】

次に、相互作用しない小胞（扁平な楕円体および 3 軸楕円体）にとっての総散乱強度は、

【 0 1 1 9 】

【 数 8 】

$$I(q) = (\Phi_{lip} - \Phi_{oblate})P_{triax}(q) + \Phi_{oblate} P_{oblate}(q), \quad (A-5)$$

と記載され得る。ここで、 $\Phi_{lip}$  および  $\Phi_{oblate}$  のそれぞれは、溶液における脂質および扁平殻の総量の体積分率である。適合手法は、I G O R プログラミングコードに記載されている。I G O R プログラミングコードは、N I S T S A N S グループによって開発されたデータ分析パッケージから修正されている。

【 0 1 2 0 】

3 軸楕円体の単層 2 重膜小胞にとっての提唱モデルが図 5 に示されている。親水性領域（頭部基）および疎水性領域（炭化水素尾部）が示されている。扁平小胞の場合には、b は c と等しい。

【 0 1 2 1 】

1 つの形態は、150 ~ 200 nm 以下の半径を有する、環状の 2 次元投影を有する。一方において、他の形態は、それぞれ 600 ~ 800 nm の長さの長軸および 100 ~ 200 nm の長さの短軸を有する、引き伸ばされた楕円投影を有する。この結果は D L S データと一致する。しかし、2 モード分布は、投影に対して直交する軸に沿った粒子の厚さに依存して、球状の楕円体小胞の混合物、または扁平な 3 軸楕円体小胞の混合物のいずれかであり得る。前者（球状の楕円体小胞の混合物）は、われわれの S A N S データと適合しない。われわれは、S A N S の結果と適合する扁平な 3 軸楕円体小胞殻を包含するモデルを作り出している（上述した 3 軸の 2 重膜単層小胞に関する数学モデルを参照すればよい）。扁平な形態は、2 つの等しい主軸および 1 つの多分散の副軸を有する（図 4 の B、D、F）。一方において、3 軸楕円体の形態は、長さが異なる 3 つの軸を有する（図 4 の A、C、E）。このモデルは、8 つの適合要素を必要とする。8 つの要素とは、すなわち、3 軸楕円体の小胞に関する 3 つの軸、扁平な殻に関する 2 つの軸、扁平な形態に関する短軸の多分散性、2 重膜の厚さおよび 3 軸対扁平の集団の比率である。しかし、T E M および D L S 測定、ならびにクラツキ - ポロッド分析からの結果は、2 重膜の厚さ、ならびに扁平な殻の場合の 2 つの主軸の長さおよび 3 軸楕円の殻にとっての 2 つの長軸の長さが、われわれにとって制限される。これによって、短軸の長さ、扁平殻の短軸の多分散性、および 3 軸対辺部の集団比率を、自由な要素として残せる。最良適合の結果は、扁平楕円体および 3 軸楕円体が 40 ± 5 オングストロームの厚さを有することを示している。これは、改変したギニエプロットから得られた結果よりもわずかに大きい。3 軸楕円体の最も短い軸および扁平な形態の副軸のそれぞれは、250 ± 20 オングストロームおよび 100 ± 10 オングストロームである。これらの特性は、S A N S データにおける広い（0.01 オングストローム以下および 0.03 オングストローム以下）ピークを生じる。さらに、扁平な形態の主軸の長さ（150 nm 以下）および楕円体の形態の 2 つの長軸の長さ（200 nm 以下および 500 nm 以下）に関する最良適合は、図 4 に示される T E M の結果と一致する。扁平楕円体の集団の割合は、H 2 をドープした混合物の場合に 40 ± 10 % 以下であり、一方、非添加または H 1 をドープした混合物に関して 60 ± 10 % 以下であることが分かった。3 軸楕円体小胞の集団が大きいことを示す第 1 のピークのより高い強度が H 2 をドープした系に見られることは、最良適合の結果と一致する。このため、H 2 ペプチドが 3 軸楕円体の小胞の形成に好ましいと考えられる。要約すると、3 つの手法のすべては、2 つの形態（すなわち、3 軸楕円体および扁平楕円体）の存在を指し示している。

【 0 1 2 2 】

Sap C および Sap C 断片 (H1 および H2) を用いた ULV 系の形成に使用される DPPC / DHP C / DOPS 混合物は、意外なことに予測しなかった脂質混合物の挙動を示した。われわれの当初の予測は、われわれの以前の実験結果<sup>3</sup>に基づいて、単分散した球状の ULV の形成にとって好適な条件を見つけることであった。しかし、上述したように、われわれは、DPPC / DHP C / DOPS が ULV を形成すると同時に、DLS によって調べられた混合物のサイズ分布が多モードであることを見出している。2 モードに分散した ULV の場合に、われわれは、各集団が非球状の形態および狭いサイズ分布を有することを見出している。この観察は、われわれにこの ULV 形成に関する機序が DMPC / DHP C / DMPC G 混合物に生じる機序とは異なるという推測を導く。

#### 【0123】

以前の研究において、われわれは、低い多分散性の ULV の形成が、ミセル (2 胞性) の形態を 2 重膜にした低い温度からこの系を加熱することが必要なことを見出した。ULV の大きさは、2 つの胞の大きさに依存することが見出された。さらに、ULV の大きさは、周辺の線張力、2 重膜の曲げ剛性および 2 つの胞の融合の割合といった因子によっておそらく改変された。さらに、DMPC / DHP C / DMPC G の 2 つの胞 ULV の転移は、23 以下において生じる、DMPC のゲル 液晶の転移と密接な関連していた。DPPC / DHP C / DOPS が類似の挙動を示した場合には、2 胞性の形態が -11 付近またはそれ以下において見られるだろう。-11 は DOPS の脂肪酸鎖が融解転移を受ける温度である。高温において DMPC / DHP C / DMPC G 混合物が広いサイズ分布を有する ULV の形成を生じるので<sup>3</sup>、われわれは、ここでの ULV の形成機序が以前に調べられた機序とは異なると推論する。

#### 【0124】

これまでの技術は、希釈によって、かつ集団的な膜の変動の結果として、単一の DOPS の層状の重なりが、多分散した ULV の形成を完全に許容することを示唆している。これは、2 モードの集団のリボソームを形成するための利用とは関係なく示唆されている。したがって、単一の DOPS の懸濁によって ULV も形成できるが、われわれは、ここで生じる形成の機序としてはこれを捨てることができる。われわれは、観察された非球状の ULV が、ULV の高い曲率の領域を占めている無電荷の短鎖 DHP C を有することによって、安定化されていると同時に、長鎖 DPPC が安定な 2 重膜に必要とされる剛性を提供することを推測している。

#### 【0125】

本開示は、2 モードの ULV サイズ分布が観察されるが、個々の集団の多分散性がかなり小さいという、上述の予期されなかった発見を示している。当該発見は、これらの 2 つの集団が、材料を自由に變更し得る平衡状態、最小のエネルギー状態を示すことであり得るか、または個々の ULV がこれらの 2 つの形態の間において転換可能な流体力学的構造であることであり得る。形態が自由に転移するという考えは、これまでに論理的に予測されており、かつこれまでの実験的観察と類似でもあり得る。ここで、遊離した長球の小胞は扁平な小胞に、そして逆に場合も同じく転移する<sup>29</sup>、<sup>35</sup>、<sup>36</sup>。

#### 【0126】

また、楕円体の ULV の形態は、予想外であるが、膜の側方における異質性の結果であり得る。飽和および不飽和の脂質を含有する 3 成分の混合物が側方に偏りを示し得ることは、最近 SANS によって示されている<sup>37</sup>。さらに、ゲル 液晶の転移を経て上昇する温度に応じて、巨大な ULV における複合化された球状 - 多角形 - 楕円体の転移が見出されている<sup>38</sup>。外見上、多角形の形状 (図 4 の B) は、おそらく 2 つの相の間における側方の相の分離から生じた。ここで、DOPS および DHP C 脂質は L 相であると同時に、DPPC はゲル相である。さらに、異なる炭化水素鎖の長さを有する脂質の異なる種に起因して、各ドメインは、楕円の軸のそれぞれの長さを決めることに寄与し得る。われわれが知る限り、単一のリン脂質の系または単一の脂質の混合物に由来する多分散した 3 軸楕円体の小胞は、これまで報告されていないが、アクチンの重合体化によって誘導される扁平な形状または不規則な形状をした小胞に転移する球状の小胞の例がある。われわれは

、その結果が膜内における側方への分離に起因すると推測する。

【0127】

高いqのデータに対する最良適合は、2重膜の厚さが38～40オングストロームの間にあるという結果を生じる。楕円殻モデルが、主軸に沿った一定の2重膜の厚さ、および2重膜の全体に渡って均一な散乱長密度を仮定しているため、2重膜の厚さに関する値は、より詳細なモデルから得られる値よりもわずかに大きいと予想され得る。変更したギニエプロットは、H1をドーブしたULVおよびH2をドーブしたULVと比較して、非ドーブのULVがより厚い2重膜を有することを示している。これは、H1およびH2が2重膜に対する薄膜化の影響を有するが、それらが2重膜を不安定化することを証明する。WangらはH1およびH2がSapC誘導膜融合を阻害できることを報告している。これは、それらがSapCと同じようにDOPS部位におそらく結合し、このようにしてSapCの膜との相互作用を弱める。また、これらの結果は、H1が膜融合の阻害においてH2よりも有効であることを示した。これは、H1が2重膜の薄膜化に対するより大きな影響を有することと一致している。

10

【0128】

以前のAFMの研究は、H2が膜に対してパッチを形成したことを示している。これは、2重膜欠損の領域を構成する棒状構造であると推測された。SANSデータは、非ドーブのULVおよびH1をドーブしたULVと比べて、集団が、H2の添加によって扁平なULVから3軸のULVへと粒子形態を変化させることを示している。短鎖DHPcは膜に欠陥を作り出すことが知られているので、脂質混合物は、3軸楕円体ULVの好ましい形成を導く、H2の会合にとって好適な環境を提供し得る。

20

【0129】

SANS、TEMおよびDLSの利用を介して、DOPS/DPPC/DHPcの混合物によって仮定される種々の形態が特徴付けられた。2つの低い多分散性の形態、すなわち扁平なULVおよび3軸楕円体のULVが観察される。ここで、ULV形成の機序は、これまでに報告されている機序とは異なると考えられる。また、当該機序は、低い多分散性のULVが、ゲル-液晶の転移を受ける長鎖脂質の非存在下においてさえ形成され得ることを証明している。SANSの結果は、以前のAFMデータと一致して、H1およびH2が2重膜の形態を不安定化しないことを示している。しかし、H1は2重膜の薄膜化により大きな影響を有することを示している。さらに、H2ペプチドの添加は、扁平楕円体の小胞に対する3軸楕円体の小胞の比率を増加させる。これは、おそらく、種々の脂質構成要素の混和性の変化に起因する。一方、SapCの添加は、膜を不安定化し、かつ大きな凝集体の溶液からの沈殿を生じる。

30

【0130】

リポソーム小胞が種々の治療学にとって有効な担体であることが、さらなる証拠によって示唆される。しかし、疾患の処置および商業的な実現性における特定の系の有効性が、第1に重要である。本開示において、ホスファチジルセリン含有ULVが自発的に形成することを示し、高い安定性を有し、かつ低い多分散性を有することが証明される。記載されている手順は、SapC結合ULVの大規模化した産業的製造に好適であり、SapC-PS-ULVの開発に有用である。SapC-PS-ULVは、それから治療薬のインビボ輸送に関して試験され得る。

40

【0131】

本発明の長鎖脂質は、約14～約24の炭素を有する長さの炭素鎖、または約18～約20の炭素を有する長さの炭素鎖を有する、あらゆる長鎖脂質であり得る。脂質の網羅的なリストは、[www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)において入手可能である。当業者は、これらの脂質が本発明に使用され得ることを十分に理解する。長鎖脂質および短鎖脂質のあらゆる組み合わせが使用され得ると同時に、いくつかの組み合わせがより安定なリポソームを生じる。例えば、本発明を限定することを意図しないが、以下のものが、リポソームが形成される組成物の選択肢を導き得る。リポソームの安定性を向上させるために、約20～約24の炭素の長さを有する長鎖脂質が使用され、約6～約8の長さを有する短鎖脂質が

50

使用される。リポソームの安定性を向上させるために、約 14 ～ 約 18 の長さを有する長鎖が使用され、約 6 ～ 約 7 の長さを有する短鎖脂質が使用される。脂質のこれらの組み合わせがより安定なりポソームを生じる。一方において、他の組み合わせが首尾よく使用され得、かつこれらが否定されることを意図しない。表 2 は、より安定なりポソームを生成するために使用され得るリン脂質の組み合わせの例を説明する。しかし、これらの例は、リン脂質の他の組み合わせが本発明と共に使用され得ないことを意味しない。

【 0 1 3 2 】

【 表 3 】

表 2. 長鎖リン脂質および短鎖リン脂質の組み合わせの非限定的な例。

長鎖リン脂質の長さ (炭素数)	短鎖リン脂質の長さ (炭素数)
14～24	4～8
16～22	5～7
18～20	6～7
20～24	7～8
14～18	4～6

【 0 1 3 3 】

さらに、リポソームの安定性は、脂質鎖における飽和炭化水素の存在または非存在に影響を受ける。例えば、約 18 以上の鎖長を有する脂質が使用され、リン脂質は、飽和または不飽和、好ましくは不飽和であり得る。約 14 ～ 約 16 の炭素を有する長鎖脂質といったより短い長鎖脂質に関して、脂質は不飽和であり得るが、飽和脂質の使用によって、本発明の向上した性質が生じる。

【 0 1 3 4 】

( 付加的な試薬 )

また、上述の生物適合性の脂質および重合体に加えて、ある物質の組成物を用いた微粒子の調製が本発明の一部であると意図される。当該物質は、安定性および上述の基準に適合するように微粒子が調整されるように供給される。

【 0 1 3 5 】

プロピレングリコールは、脂質粒子の分散または溶解を容易にすることによって、濁りを除去するために加えられ得る。また、ポリプロピレングリコールは、増粘剤として機能し得る。増粘剤としてのポリプロピレングリコールは、微粒子の膜または表面の表面張力を上昇させることによって微粒子の形成および安定性を向上させる。ポリプロピレンは、付加的な層としてさらに機能することが考えられる。当該層は、微粒子の膜または表面を被い、このようにしてさらなる安定性を提供する。このような基本的または補助的なさらなる安定化化合物の例として、使用可能な従来の界面活性剤 ( 例えば、米国特許第 4 , 6 8 4 , 4 7 9 号明細書および米国特許第 5 , 2 1 5 , 6 8 0 号明細書 ) がある。

【 0 1 3 6 】

補助的および基本的なさらなる安定化化合物としては、ピーナッツ油、キャノーラ油、オリーブ油、ベニバナ油、トウモロコシ油、またはあらゆる他の油といった物質が挙げられる。当該あらゆる他の油は、本明細書において上述した要件および指示に合致して安定化剤としての使用に好適であり、摂取可能であることが通常に知られているものである。

【 0 1 3 7 】

さらに、混合したミセルの系の製造に使用される化合物は、基本的または補助的な安定

10

20

30

40

50

化化合物としての使用に好適であり得る。これらの化合物としては、これらに限定されないが、ラウリルトリメチルアンモニウム プロマイド（ドデシル - ）、セチルトリメチルアンモニウム プロマイド（ヘキサデシル - ）、アルキルジメチルベンジルアンモニウム クロライド（アルキル = C 1 2、C 1 4、C 1 6）、ベンジルジメチルドデシルアンモニウム プロマイド/クロライド、ベンジルジメチル ヘキサデシルアンモニウム プロマイド/クロライド、ベンジルジメチル テトラデシルアンモニウム プロマイド/クロライド、セチル - ジメチルエチルアンモニウム プロマイド/クロライド、またはセチルピリジニウム プロマイド/クロライドが挙げられる。

#### 【 0 1 3 8 】

本発明に使用されるリポソームは、本明細書に記載の種々の付加的または補助的な安定化剤のなかから選択することによって、大きさ、溶解性および熱安定性に基づいて制御され得ることが見出されている。これらの薬剤は、脂質の被膜とのこれらの物理的な相互作用によってだけではなく、リポソームの表面の粘性および表面張力を改変するそれらの能力によってもまた、微粒子のこれらの要素に影響を与えることができる。したがって、本発明に使用されるリポソームは、例えば 1 つ以上の多種多様な（ a ）粘性改変剤；（ b ）乳化剤および/または可溶化剤；（ c ）懸濁化剤および/または増粘剤；（ d ）合成懸濁化剤；ならびに（ e ）浸透圧向上剤（ *tonicity rising agent* ）の添加によって、好ましく改変され得、さらに安定化され得る。（ a ）粘性改変剤としては、これらに限定されないが、炭水化物ならびにそれらのリン酸化誘導体およびスルホン酸化誘導体；ならびにポリエーテル（好ましくは 4 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 の範囲内の分子量を有する）；ジヒドロキシアルカンおよびトリヒドロキシアルカンならびにこれらの重合体（好ましくは 2 0 0 ~ 5 0 0 0 の範囲内の分子量を有する）が挙げられる。（ b ）乳化剤および/または可溶化剤は、また所望の改変およびさらなる安定化を達成するために、脂質と共に使用され得る。（ b ）乳化剤および/または可溶化剤としては、例えばこれらに限定されないが、アラビアゴム、コレステロール、ジエタノールアミン、グリセロールモノステアレート、ラノリンアルコール、レチシン、モノグリセリドおよびジグリセリド、モノエタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポロキサマー（例えば、ポロキサマー 1 8 8、ポロキサマー 1 8 4、およびポロキサマー 1 8 1）、ポリオキシエチレン 5 0 ステアレート、ポリオキシ 3 5 キャスターオイル、ポリオキシ 1 0 オレイルエーテル、ポリオキシ 2 0 セトステアリルエーテル、ポリオキシ 4 0 ステアレート、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 4 0、ポリソルベート 6 0、ポリソルベート 8 0、プロピレングリコール ジアセテート、ポリプロピレン モノステアレート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、モノラウリル酸ソルピタン、モノオレイン酸ソルピタン、モノパルミチン酸ソルピタン、モノステアリン酸ソルピタン、ステアリン酸、トロラミンならびに乳化蠟が挙げられる。（ c ）懸濁化剤および/または増粘剤は、脂質と共に使用され得る。（ c ）懸濁化剤および/または増粘剤としては、これらに限定されないが、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、モノステアリン酸アルミニウム、ベントナイト、泥膏、カルボマー 9 3 4 P、カルボキシメチルセルロース、カルシウムおよびナトリウムおよびナトリウム 1 2、カラゲナン、セルロース、デキストラン、ゼラチン、グアールガム、イナゴマメガム、ビーガム（ *vee gum* ）、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピル メチルセルロース、マグネシウム - アルミニウム - ケイ酸塩、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレンオキシド、ポビドン、アルギン酸プロピレングリコール、酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、トラガカントゴム、キサンタムガム、アルファ - d - グルコノラクトン、グリセロールならびにマンニトールが挙げられる。（ d ）合成懸濁化剤としては、ポリエチレングリコール（ P E G ）、ポリビニルピロリドン（ P V P ）、ポリビニルアルコール（ P V A ）、ポリプロピレングリコール、およびポリソルベートといったものが使用され得る。（ e ）浸透圧向上剤としては、これらに限定されないが、ソルビトール、プロピレングリコールおよびグリセロールといった薬剤が挙げられ得る。

#### 【 0 1 3 9 】

水性環境を作り出すために採用され得る希釈剤としては、これらに限定されないが、安定化した微粒子の製造および維持、またはMRIの造影剤としてのそれらの利用に干渉しない、脱イオン化水またはあらゆる数の溶解した塩を含有する水など；ならびに通常の食塩水および生理食塩水が挙げられる。

#### 【0140】

気体および気体の前駆物質が充填された小胞を調製する安定化物質として有用な生物適合性の重合体は、無電荷の半合成（改変した天然）起源のもの、または合成起源のものであり得る。本明細書において使用されるとき、重合体という用語は、2つ以上の繰り返し単量体単位、好ましくは10以上の繰り返し単量体単位から構成される化合物を意味する。本明細書において使用されるときに、半合成の重合体（または改変した天然の重合体）という表現は、ある様式において化学的に合成されている天然の重合体を意味する。本発明における使用に好適な例示的な天然の重合体としては、天然に生じるポリサッカライドが挙げられる。当該ポリサッカライドとしては、例えば、アラビナン、フルクタン、フカン（fucans）、ガラクトン、ガラクトツロナン、グルカン、マンナン、（例えば、イヌリンといった）キシラン、レバン（levan）、フコイダン、カラギナン、ガラクトカロロース、ペクチン酸、ペクチン（アミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、デキストリン、ポリデキストロース、プスツラン（pustulan）、キチン、アガロース、ケラチン、コンドロイチン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンガム、スターチおよび種々の他の天然ホモポリマーもしくはヘテロポリマーが挙げられる）が挙げられる。種々の他の天然ホモポリマーもしくはヘテロポリマーは、例えば、1つ以上のアルドース、ケトース、酸またはアミンを含有する重合体である。アルドース、ケトース、酸またはアミンは、アルドース、ケトース、酸またはアミンは、エリスロース、トレオース、リボース、アラビノース、キシロース、アロース、アルトロース、ルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、エリチルトース（erytrose）、リブロース、キシルロース、ブシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、マルトース、セロビオース、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクトツロン酸、およびノイラミニン酸、ならびにこれらの天然に生じる誘導体である。したがって、好適な重合体としては、例えば、アルブミンといったタンパク質が挙げられる。例示的な半合成の重合体としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルメチルロース、メチルセルロース、メチルセルロース、およびメトキシセルロースが挙げられる。本発明における使用に好適な、例示的な合成重合体としては、（例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンおよびポリエチレンテレフタレートといった）ポリエチレン、（例えば、ポリプロピレングリコールといった）ポリプロピレン、（例えば、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルクロライドおよびポリビニルピロリドンといった）ポリウレタン、ポリアミド（ナイロン、ポリスチレンが挙げられる）、ポリ酪酸、フッ化炭化水素、（例えば、ポリテトラフルオロエチレンといった）フッ化炭素、およびポリメチルメタクリレート、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。安定化化合物として重合体を採用する小胞の調製方法は、本開示事項が当該技術に公知の情報と組み合わせられる場合に、本開示に接した当業者に容易に理解される。当該技術に公知の情報は、例えば、米国特許第5,205,290号明細書に記載および言及の情報である。米国特許第5,205,290号明細書は、言及によってその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0141】

代替可能に、1つ以上の抗菌剤および/または保存剤が、上記組成物の調合物に含まれ得る。抗菌剤および保存剤は、例えば、安息香酸ナトリウム、4級アンモニウム塩、アジ化ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、クロロブタノ

10

20

30

40

50

ール、デヒドロ酢酸、エチレンジアミン、モノチオグリセロール、安息香酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム、重亜硫酸カリウム、2 酸化硫黄、および有機水銀塩である。他の従来の方法（例えば、放射線照射）によっても達成され得るそのような滅菌は、安定化された小胞が侵入性の環境下において（例えば、血管内のまたは腹腔内的に）画像化するために使用される場合に、必要である。滅菌に適した方法は、本開示を元にして当業者に理解される。

#### 【0142】

（ジサッカライド）

上述の付加的な成分に加えて、ジサッカライドが、リポソームの安定性を向上させるために加えられ得る水性溶液の添加の前にか、または当該水溶液の添加と共に乾燥脂質に加えられる。好適なジサッカライドの非限定的な例としては、これらに限定されないが、トレハロース、スクロース、マルトース、ラクトース、メリピオース、ガラクトース、グルコース、フルクトース、またはラクトースが挙げられる。一般的に、ジサッカライドは、10 mg の総タンパク質につき約 50 ~ 約 100 mg（すなわち、約 1 : 10 のタンパク質対ジサッカライドの比率）含まれる。

#### 【0143】

（抗膜試薬）

さらに、抗がん（または“抗膜”）剤として知られる他の脂質が、本明細書に記載の組成物および方法と共に使用され得る。本明細書に記載の組成物に加えられるのは、例えば、エデルフォシン（Edelfosine）（sn-ET-18-OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>または1-O-オクタデシル-2-O-メチル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン）、または他のリン脂質（例えば、リゾホスファチド、カルディオリピン、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴシン、セレブロシド、コレステロール、これらの脂質の改変形態、および上述の脂質のあらゆる組み合わせ）である。例示的な組成物は、Sap C（100 μM）+ DOPS（280 μM）+ エデルフォシン（20 μM）；またはSap C（100 μM）+ DOPS（290 μM）+ エデルフォシン（10 μM）を包含し得る。エデルフォシンの量は、約 2 ~ 50 μM の範囲内であり得；DOPSの量は、約 250 ~ 298 μM の範囲内であり得、ここでSap Cは約 100 μM である。他の例示的な範囲は、1 : 3 : 0.2 ~ 1 : 10 : 0.7 のSap C : DOPS : エデルフォシンのモル比を含み得る。Sap Cが説明されている場合に、本明細書に記載の他のプロサポシン誘導体化タンパク質またはポリペプチドが置き換えられ得るか、または組み合わせて使用され得ることを理解されるべきである。

#### 【0144】

本発明は、最も好ましい実施形態に関して説明されているが、付加的な実施形態は、特許請求の範囲の発明の範囲および精神の範囲内である。本発明の好ましい手段は、本発明を説明することを目的としているに過ぎず、以下の特許請求の範囲に規定されるような本発明の範囲を限定しない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0145】

【図1】ヒトサポシン C およびその機能ドメインのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】0.1 % の DOPS / DPPC / DHP C の SANS データを示す図である。

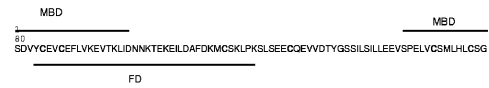
【図3】0.1 重量 % の DOPS / DPPC / DHP C に関する改変したギニエプロットの結果を示す図である。

【図4】DOPS / DPPC / DHP C 混合物（A および B）、および H1 ドープした混合物（C および D）、および H2 ドープした混合物の代表的な TEM 画像を示す図である。

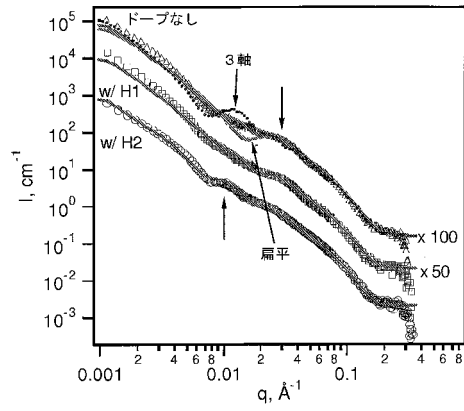
【図5】単層の2重膜を有する3軸楕円小胞の提唱モデルを示す図である。

【図 1】

Figure 1

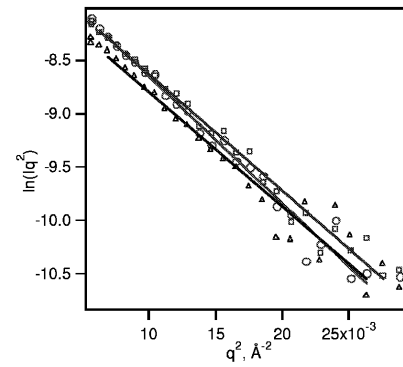


【図 2】

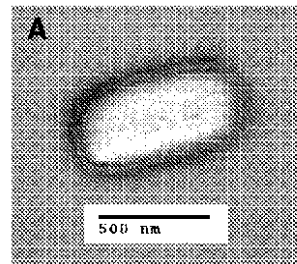


【図 3】

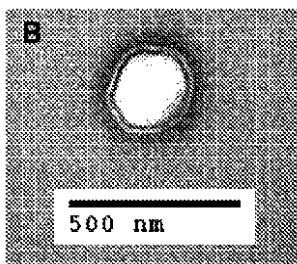
Figure 3



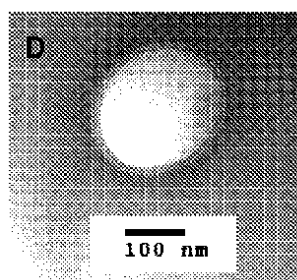
【図 4 A】



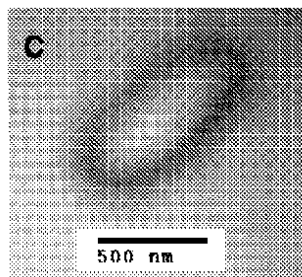
【図 4 B】



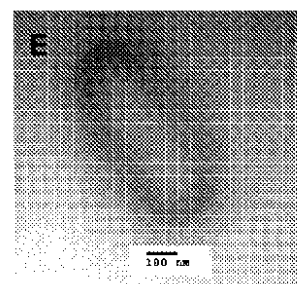
【図 4 D】



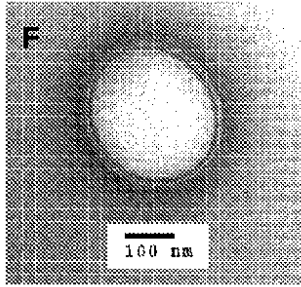
【図 4 C】



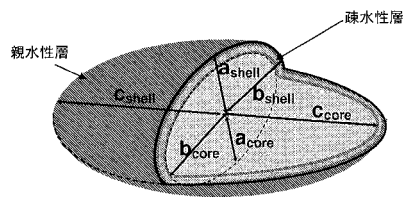
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 5】



【配列表】

0005253402000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 110000338

特許業務法人原謙三国際特許事務所

(72)発明者 チ, シャオヤン

アメリカ合衆国, 4 5 1 4 0 オハイオ州, ラブランド, モーガンストラス ドライブ 1 0 0 2  
0

(72)発明者 カートサラス, ジョン

カナダ, オンタリオ州 ケー0ジェイ 1ピー0, ディープ リバー, キャボット プレース 5

(72)発明者 ニー, ム - ビン

カナダ, オンタリオ州 ケー0ジェイ 1ピー0, ディープ リバー, クレセント, ダーウィン  
5, ピーオー ボックス 1 9 0 1

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0095999(US, A1)

米国特許第04921706(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)