

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 4 月 3 日(03.04.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/050509 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/074095
- (22) 国際出願日: 2013 年 9 月 6 日(06.09.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-211239 2012 年 9 月 25 日(25.09.2012) JP
- (71) 出願人: テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目 4 番 1 号 Tokyo (JP). 協和発酵キリン株式会社(KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 磯崎 正史(ISOZAKI Masashi); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 伊藤 祐貴(ITO H Yuki); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 山下 恵子(YAMASHITA Keiko); 〒

2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 野沢 滋典(NOZAWA Shigenori); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 中橋 径子(NAKAHASHI Keiko); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP). 加藤 明文(KATO Akifumi); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP). 長谷川 和正(HASEGAWA Kazumasa); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP). 佐藤 光男(SATO Mitsuo); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 渡辺 望稔, 外(WATANABE Mochitoshi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町 2 丁目 3 番 3 号 友泉岩本町ビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

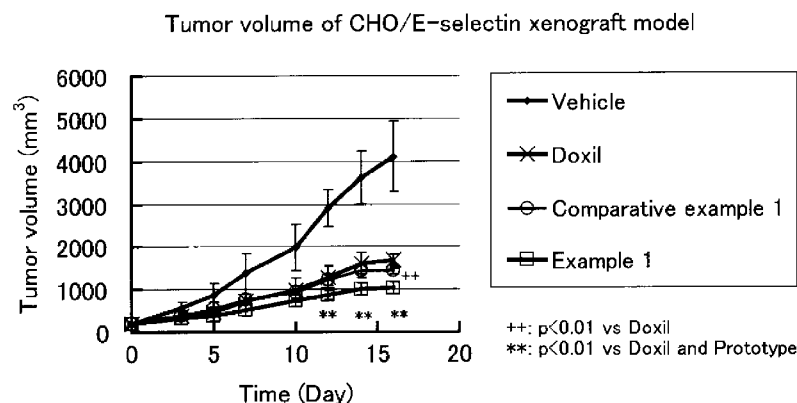
[続葉有]

(54) Title: LIPOSOME AND LIPOSOME PREPARATION

(54) 発明の名称: リポソームおよびリポソーム製剤

[図6]

FIG. 6



(57) Abstract: The present invention provides: a liposome which exhibits excellent retention properties in blood and excellent targeting properties, by modifying the surface of a closed vesicle, formed from a lipid bilayer membrane, with an oligosaccharide (sLe^x) in the amount of 0.8-2.5 mol%, by using a PEG chain having an average molecular weight (Mw) of 4000-7000; and a liposome preparation.

(57) 要約: 本発明は、脂質二重膜で形成される閉鎖小胞の表面を、平均分子量(Mw) 4000~7000のPEG鎖を介してオリゴ糖 sLe^x で 0.8~2.5 mol% 修飾する、血中滞留性に優れかつ標的指向性にも優れたリポソームおよびリポソーム製剤を提供する。



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

パ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： リポソームおよびリポソーム製剤

技術分野

[0001] 本発明は、血中滞留性に優れかつ標的指向性にも優れたリポソームおよびリポソーム製剤に関する。

背景技術

[0002] 近年、薬物を安全にかつ効率よく標的部位に送達・分布させるドラッグデリバリーシステム（DDS）が盛んに研究されている。その代表的な方法として、リポソームの薬物運搬体（担体）としての利用が挙げられる。リポソームを用いるDDSの実用化に際して、生体側の異物認識機構からの回避および体内動態の制御は重要である。特に、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織（RES）での捕捉を回避し、血液中のオプソニン蛋白質や血しょう蛋白質などとの相互作用（吸着）による凝集を防止して血中安定性（滞留性）を高める必要がある。この課題を解決する方法として、ポリエチレングリコール（PEG）などの親水性高分子による膜修飾が知られている（特許文献1）。

[0003] 親水性高分子で修飾されたりポソームは、高い血中滞留性が得られることにより、腫瘍組織や炎症部位などの血管透過性が亢進した組織への受動的な集積が可能となるが、標的指向性については実用上さらなる改善が望まれている。

標的指向性、特に標的部位への選択的結合に関連して、標的細胞膜面上の糖鎖分子認識反応が知られ、特に、炎症時に血管内皮細部に発現するE-セレクチン、P-セレクチンと白血球の細胞膜上に発現している糖鎖シアリル路易斯X（sLe^x）とが強く結合することが知られている。このsLe^xについて、リポソーム化により細胞接着阻害活性が高まるとの報告がある（非特許文献1参照）。ここでは、sLe^xを、PEG（繰り返し単位数 $n = 42 \sim 48$ ）ージステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPЕ）と結合させたsLe^x-PEG-DSPЕ誘導体を合成し、PEGリポソームの膜材

である PEG-DSPE、リン脂質およびコレステロールの混合脂質中に 0 ~ 5 mol % の各種割合で含ませたりポソームについて、in vitro で E-セレクトリン介在細胞接着阻害を評価している。sLe^x-PEG 修飾リポソームによる阻害は sLe^xオリゴ糖単体に比べ 5000 倍以上であることが示される。

[0004] 標的指向性リポソームを提案する特許文献もある（特許文献 2 参照）。ここでは、糖鎖をリンカー蛋白質（ヒト血清アルブミン）を介してリポソーム膜に結合しており、具体的には、リポソーム膜にリンカー蛋白質の一端を結合させ、次いで、リンカー蛋白質の他端に糖鎖を化学的に結合させている。リンカー蛋白質のリポソーム膜への結合も化学結合である。また、リポソーム表面の親水性化が記載されるが、親水性化合物は、PEG などの高分子量物質を用いる方法に比べ、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応が妨げられないとして低分子化合物、とりわけトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンが好ましいことを教示する。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献 1：特開平 02-149512 号公報

特許文献 2：国際公開 2005-011633 号

非特許文献

[0006] 非特許文献 1：J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6101-6104

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記非特許文献 1 は、多価リガンドとしての sLe^xリポソームと E-セレクトリン介在細胞接着阻害に関するものであり、該リポソーム内に薬物を封入することは何ら言及せず、薬物動態および薬効も記載しない。本願発明者は、ここに示される sLe^xリポソームの体内動態について検討したところ、P

EG修飾リポソームであるにも拘わらず十分な血中滞留性が得られないという知見を得た。細胞接着性は、血中滞留性と相反する一面でもあることから、親水性高分子修飾による血中滞留性向上効果が知られ、糖鎖修飾による標的指向性が示唆されているとしても、血中滞留性と標的指向性の両方に優れるリポソームの設計が容易な訳ではない。

本発明は、DDSの担体として有用な血中滞留性に優れかつ標的指向性にも優れるリポソームおよびリポソーム製剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本願発明者は、上記課題について鋭意検討したところ、sLe^xに特定されるオリゴ糖を、平均分子量(Mw)4000~7000の特定鎖長のPEGを介してsLe^x-PEGをリポソーム表面に配位させ、かつ該sLe^x-PEGによる修飾率が0.8~2.5mol%の極めて限定されたりポソームとすれば、長い血中滞留性と高い標的指向性を発揮しうることを見出した。特に、試験例として後述するように、このようなりポソームに薬物として抗癌剤を封入したりポソーム製剤が薬物動態および薬効に優れていることを確認できた。したがって、以下のような本発明を提供する。

[0009] 本発明に係るsLe^x-PEG修飾リポソームは、少なくともリン脂質を膜材として含む脂質二重膜で形成される閉鎖小胞の水性懸濁液であって、実質的に、該閉鎖小胞の表面が、平均分子量(Mw)4000~7000のポリエチレングリコール(PEG)鎖を介してオリゴ糖シアリルルイスX(sLe^x)が配位するようにPEGとsLe^xとの結合鎖(sLe^x-PEG)のみで修飾され、かつ該sLe^x-PEGによる前記膜材の総脂質量に対する修飾率が0.8~2.5mol%である。

[0010] 前記閉鎖小胞の外液側表面のみが前記sLe^x-PEGで修飾されている態様が好ましい。

[0011] 前記PEGの特に好ましい平均分子量は5000である。

[0012] 前記sLe^x-PEG修飾率は、好ましくは0.9~2mol%である。

[0013] 前記膜材は、通常、コレステロールを含む。

[0014] 前記修飾は、通常、 sLe^x -PEG-脂質誘導体を表面修飾剤として、該表面修飾剤の脂質部分が前記脂質二重膜内に配置されることにより導入されている。

[0015] 前記表面修飾剤の脂質部分は、好ましくはジステアロイルホスファチジルエタノールアミンである。

[0016] 本発明では、上記のようなりポソームの前記閉鎖小胞内に封入された薬物を含むりポソーム製剤を提供する。

特に薬物が抗癌剤および／または抗炎症剤であるりポソーム製剤は好ましい態様である。特に、実施例で後述するように既存のりポソーム製剤（抗癌剤）ドキシルに比べ、高い抗腫瘍効果が確かめられており、有効性の高い抗癌剤製剤として提供することができる。

発明の効果

[0017] 本発明に係るりポソームは、血中滞留性と標的指向性のいずれにも優れ、DDSとして有用である。本発明では、親水性高分子を含むにも拘わらず sLe^x の細胞接着阻害活性を発揮できることから、炎症、血管新生を生じて血管内皮細胞がE-セレクトリン、P-セレクトリン等を発現している病巣部位への特異的集積が期待される。E-セレクトリン、P-セレクトリン等を発現している部位の血管は内皮細胞の細胞間隙が拡大しており、集積したりポソームはその隙間から病巣部位およびその周囲に拡散し、病巣部位およびその周囲の各種細胞に取り込まれて薬物を放出すると考えられる。このため、とりわけ抗癌剤、抗炎症剤などの標的指向性の切望される薬物の担体として特に有用であり、このような薬物を含むりポソーム製剤の好ましい態様として提供し得る。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]各種りポソーム製剤の薬物動態（血中滞留性）試験における、りポソーム製剤投与後の血漿中の薬物濃度を示す。

[図2]各種りポソーム製剤の薬物動態（血中滞留性）試験における、りポソーム製剤投与後の血漿中の薬物濃度より算出したAUCを示す。

[図3]各種リポソーム製剤の結合性試験（CHO／E-selectinに対する sLe^x修飾タンパクの結合阻害）の結果を示す。

[図4]各種リポソーム製剤の結合性試験（CHO／E-selectinに対する sLe^x修飾タンパクの結合阻害）の結果を示す。

[図5]各種リポソーム製剤のE-selectinに対する結合性試験の結果を示す。

[図6]各種リポソーム製剤の薬効（抗腫瘍）試験における腫瘍体積を示す。

[図7]各種リポソーム製剤の薬効（抗腫瘍）試験における体重変動率を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明をより具体的に説明する。

リポソームは、リン脂質を含む脂質の水性懸濁により形成される脂質二重膜の閉鎖小胞であり、リポソーム製剤は、このリポソームの小胞空間内（内水相）に薬物を担持させたものである。

本発明に係るリポソームは、脂質二重膜の一枚膜からなるユニラメラ小胞（SUV、LUV）でも、複数枚からなる多重ラメラ小胞（MLV）でもよいが、通常は一枚膜である。なお本発明では、リポソーム製剤を構成する全小胞中、ユニラメラ小胞が占める割合は、存在比で全体の50%以上であればよく、80%以上であることが好ましい。

[0020] 脂質二重膜を構成するリン脂質としては、ホスファチジルコリン（＝レシチン）、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、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、ホスファチジルイノシトール、さらにスフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質や、カルジオリピン等の天然あるいは合成のリン脂質もしくはこれらの誘導体、およびこれらを常法にしたがって水素添加したものなどを挙げることができる。

リポソームは、封入された薬物が、保存時にあるいは血液などの生体中で容易に漏出しないようにするため、本質的に相転移点が生体内温度（35～37℃）より高い膜材が用いられ、さらに、リポソーム製造時には、生体温度より高い温度50℃～70℃程度、典型的に60℃前後の温度に曝される場合もあり、熱によるリポソーム形成に対する影響が大きくなるので、これ

らの温度より高い相転移点を持つ膜材が特に好ましい。したがって、脂質二重膜の主膜材となるリン脂質は、相転移点は50℃以上のものが好ましく、上記のうちでも、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）などの水素添加されたリン脂質、スフィンゴミエリン等が好ましい。

[0021] 脂質二重膜は少なくとも上記リン脂質を含み、通常、膜材全量（モル）中に50モル%以上含む。膜材は、リポソームを安定的に形成できるものであれば、リン脂質とともに他の膜成分を含んでいてもよい。他の膜成分としては、たとえば、リン酸を含まない他の脂質類が挙げられ、特に限定されないがグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質およびコレステロールなどのステロールおよびこれらの水素添加物などの誘導体などを挙げることができる。

[0022] 本発明では、リン脂質とともに他の脂質類特にコレステロールを含む混合脂質から脂質二重膜を形成することが好ましい。特に好ましい膜材は、HSPCとコレステロールとの混合脂質であり、その場合、HSPC／コレステロール（モル比）が通常80／20～50／50である。

[0023] リポソームの大きさは特に限定されないが、球状またはそれに近い形態をとる場合には、粒子径（粒子外径の直径）が、50nm～200nm、好ましくは90nm～150nmである。

なお、本明細書において、粒子外径の直径は、動的光散乱法により測定されるリポソーム製剤全粒子の直径の平均値であり、Zetasizer (Malvern Instruments, 3000HSまたはZetasizer Nano ZS90) を用いて測定することができる。

[0024] リポソームに薬物を担持したリポソーム製剤は、最終滅菌として濾過滅菌法が施される濾過滅菌において、指標菌*Brevundimonas diminuta*（サイズ、約 $0.3 \times 0.8 \mu\text{m}$ ）は濾過されないことが要求されるため、*Brevundimonas diminuta*に較べ十分に小さい透過粒子であることが必要である。このような濾過滅菌工程をより確実にする上でも粒径が100nm程度であることは重要である。

[0025] 上記のようなリポソームの脂質二重膜は、実質的に、PEG鎖を介してシ

アリルルイスX (sLe^x) のみで修飾されている。

ここで、「実質的に、PEG鎖を介してsLe^xのみで修飾されている」とは、PEG鎖を介したsLe^xによる修飾以外に、PEG等の高分子による修飾を有しないか、有していてもsLe^xによる修飾に比べて十分に少ないことを意味し、典型的には、リポソームを修飾する全高分子中の80%以上をsLe^xが占めることを意味する。本発明においては、意図的にsLe^x以外の高分子修飾を行わないことが好ましい。

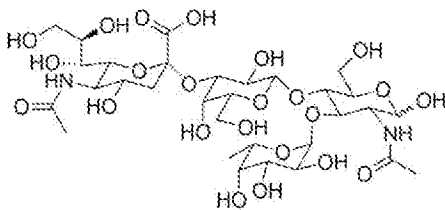
本発明において、PEGは、平均分子量(Mw)4000~7000、典型的にMw5000の鎖長に限定されている。

分子量4000のPEGの場合、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 単位の理論繰返し数nは91である。平均分子量Mw4000のPEGは、通常n=80~100である。なお、Mw2000のPEGは、通常n=42~48である。

本明細書では、PEGについて、「分子量」の語は、通常、重量平均分子量の意味で用いられる。

[0026] sLe^xは、下記構造のオリゴ糖(四糖類)である。

[化1]



sLe^x

[0027] 本発明では、PEGとsLe^xとの結合鎖(sLe^x-PEG)で修飾することにより、PEG鎖を介してsLe^xをリポソームの表面に配位させている。sLe^x-PEGの構築には、sLe^xをラクトースなどの誘導体として導入することができる。PEGの一端にはsLe^xとの結合基としてアミノ基などを導入することができる。

[0028] 本発明では、sLe^x-PEG修飾剤として、通常、sLe^x-PEG-脂

質誘導体が好ましい。脂質誘導体を用いると、疎水性である脂質部分がリポソームの脂質二重膜中に入り込み安定して保持される（アンカー）ので、リポソームの脂質二重膜の表面上に、脂質に結合したPEG-sLe^x鎖が外方に向かって突出した状態で分布・配位させることができる。

[0029] このような脂質（疎水性部分）としては、特に限定されないが、リン脂質、長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキル、またはグリセリン脂肪酸エステルなどが挙げられる。通常、リン脂質のホファチジルエタノールアミンであり、そのアシル鎖が飽和脂肪酸であることが好ましい。このアシル鎖の鎖長は、通常C₁₄－C₂₀、さらにはC₁₆－C₁₈が好ましく、具体的には、ジパルミトイル、ジステアロイルあるいはパルミトイルステアロイルである。なかでもジステアロイルホファチジルエタノールアミン（DSPЕ）は市販されており、特にこれにPEGを結合したPEG-DSPЕは汎用の化合物として入手容易である。PEG-DSPЕのPEG自由端に上記アミノ基を導入した化合物もPEGの鎖長を選択可能に市販されており、sLe^x-PEG-脂質誘導体を容易に調製することができる。

[0030] 本発明において、リポソーム表面のsLe^x-PEG修飾率は、0.8～2.5mol%、好ましくは0.9～2mol%である。

なお、本明細書において、「修飾率」は、修飾剤の種類を問わず以下の式で規定される。

$$\text{修飾率 (mol\%)} = (\text{修飾剤濃度 (mM)} / \text{膜材の総脂質濃度 (mM)}) \times 100$$

なお、本明細書において、「総脂質量」には修飾剤中の脂質を含まない。

[0031] 本発明における表面修飾は、閉鎖小胞の外液側表面のみが修飾され、sLe^x-PEG鎖が外液側表面にのみ分布し、内水相内には実質的にsLe^x-PEG鎖が存在しない構造が特に好ましい。このような分布構造であれば、たとえば内水相が酸性条件であっても、二重膜の内外液側の両方にsLe^x-PEG鎖が分布するものに比して、膜の安定性を確保でき、かつ少ない修飾率で所望の効果を得ることができる。

このような閉鎖小胞の外液側表面のみが選択的に修飾された構造のリポソームの製造プロセスは公知であり、後述するように未修飾のリポソームを形成した後、修飾工程を付すことにより得ることができる。

[0032] 本発明に係るリポソームは、上記脂質および修飾剤とともに、上記構造を保持しうるものであってリポソームに含むことができる他の膜成分を、本発明の目的を損なわない範囲で含むことができる。

他の膜成分は、脂質の物性を変化させ担体の膜成分に所望の特性を付与するための、上記 s L e^x-P E G 以外の修飾剤による立体構造的な表面修飾を含んでいてもよい。具体的には、脂質に、前記 s L e^x-P E G 以外の化合物たとえば親水性化合物が結合したものが挙げられる。

[0033] s L e^x-P E G 以外の化合物としては、たとえば P E G、グルクロン酸、シアル酸、デキストラン、プルラン、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどの水溶性多糖類；酸性官能基を有する化合物；アミノ基、アミジノ基、グアジニノ基などの塩基性官能基を有する塩基性化合物などが挙げられる。塩基性化合物としては、特開昭 6 1 - 1 6 1 2 4 6 号に開示された D O T M A、特表平 5 - 5 0 8 6 2 6 号に開示された D O T A P、特開平 2 - 2 9 2 2 4 6 号に開示されたトランスフェクタム (Transfectam)、特開平 4 - 1 0 8 3 9 1 号に開示された T M A G、国際公開第 9 7 / 4 2 1 6 6 号に開示された 3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩、D O S P A、T f x T M-5 0、D D A B、D C-C H O L、D M R I E などの化合物が挙げられる。

[0034] 他の表面修飾剤が、脂質に、塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合にはカチオン化脂質と称され、リポソーム膜と細胞との接着性等を高めることができるとされている。カチオン化脂質の脂質部分はリポソームの脂質二重膜中に安定化され、塩基性官能基部分は担体の脂質二重層の膜表面上（外膜表面上および／または内膜表面上）に存在することができる。

[0035] 本発明において、上記リポソームの内水相 p H は、薬物を安定に担持することができればよい。本発明の好ましい態様の外液側表面のみが修飾された

リポソームは、内水相 pH がたとえば 5 以下であっても、リポソームの膜安定性・形状安定性に優れている。

[0036] 上記のような本発明に係るリポソームは、血中滞留性に優れ、かつ高い標的指向性を発揮する。

なお「血中滞留性」とは、リポソーム製剤を投与した宿主において、リポソーム担体に担持された状態の薬物が血液中に存在する性質を意味する。

[0037] 上記のようなリポソームには、種々の薬物を担持させることができる。たとえば治療のための薬物としては、具体的に、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離阻害剤、血管内皮細胞の増殖促進または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤、AGEs (Advanced glycation endproducts) 阻害剤、ラジカルスカベンジャー、タンパク質、ペプチド、グリコサミノグリカンおよびその誘導体、オリゴ糖および多糖およびそれらの誘導体等が挙げられる。

[0038] また診断のための薬物としては、X線造影剤、超音波診断剤、蛍光造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬などの体内診断薬が挙げられる。

[0039] 薬物はその種類によっても所望担持量が異なるが、一般的には高担持率であることが望ましい。

本発明のリポソーム製剤において、好ましい薬物担持量は、リポソーム膜の総脂質に対する濃度で、少なくとも 0.05 mol 薬物/mol 脂質であり、より好ましくは少なくとも 0.1 mol 薬物/mol 脂質である。

なお本発明において「担持」とは、本質的に、リポソーム（担体）の閉鎖

空間内に薬物が封入された状態をいうが、薬物の一部を、膜内に含む状態で、あるいはリポソームの外表面に付着した状態で含んでいてもよい。

[0040] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される安定化剤および／または酸化防止剤をさらに含むものであってもよい。

安定化剤としては、特に限定されないが膜流動性を低下させる物質が挙げられ、グリセロール、シュクロースなどの糖類が挙げられる。また、膜構成成分の他の脂質として上述したコレステロールなどのステロールはこの安定化剤として作用する。

酸化防止剤としては、特に限定されないがアスコルビン酸、尿酸あるいはトコフェロール同族体、たとえばビタミンEなどが挙げられる。トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが、本発明においてはいずれも使用できる。

[0041] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される添加物をさらに含むものであってもよい。このような添加物の例として、水、生理食塩水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、PBS、生体内分解性ポリマー、無血清培地、医薬添加物として許容される界面活性剤、前述した生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液などが挙げられる。

添加物は、上記の中から適宜選択され、あるいはそれらを組合せて使用されるが、これらに限定されるものではない。

[0042] 本発明では、これら添加物を含む態様のリポソーム製剤を、医薬組成物と

して供することができる。本発明の医薬組成物は、通常の方法、たとえば0～8℃での冷蔵あるいは1～30℃の室温で保存することができる。

[0043] 次に、本発明の特定構造のリポソームの好ましい製造方法例を示すが、これに限定されるものではない。

たとえばフラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次に、当該フラスコ内に内水相溶液を加え、激しく攪拌する。次いで、遠心分離し、上清をデカンテーションし精製することにより、リポソーム懸濁液を得ることができる。

[0044] sLe^x-PEGによりリポソーム表面を修飾する手段として、sLe^x-PEGの脂質誘導体をそのままあるいは水溶液として、リポソーム懸濁液に添加することによりsLe^x-PEG鎖が外表面にのみ分布するリポソームを製造することができる。

また上記とは別に、反応活性な官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質を含有するリポソームを常法にて製造した後、リポソーム外液に片末端活性化PEG-sLe^xを添加して官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質と結合させることにより、リポソームの外表面のみを修飾することもできる。あるいは、反応活性な官能基を持つPEG-リン脂質等の膜構成脂質を含有するリポソームを常法にて製造した後、リポソーム外液に活性官能基を有するsLe^x誘導体を添加して官能基を持つPEG-リン脂質等の膜構成脂質と結合させることにより、リポソームの外表面のみを修飾することもできる。

[0045] またリポソームは、上記方法以外にも、上記の各構成成分を混合し、高圧吐出型乳化機により高圧吐出させることにより得ることもできる。この方法は、「ライフサイエンスにおけるリポソーム」（寺田、吉村ら；シュプリングー・フェアラク東京（1992））に具体的に記載されており、この記載を引用して本明細書に記載されているものとする。

[0046] 上記において、リポソームを所望のサイズにサイジングするために、いくつかの技術が利用可能である（G.Gregoriadis編「Liposome Technology Lipo

some Preparation and Related Techniques」 2nd edition, Vol. I-III、CRC Press)。この記載を引用して本明細書に記載されているものとする。

リポソーム懸濁液は、エクストルーダーを用いて、フィルターを複数回強制通過させることによりユニラメラ化することができる。通常、フィルターは、所望径より大径の孔径をもつもの、最後に所望径の得られるものの孔径の異なるものを2種以上使用する。口径の異なるフィルターを用いて、エクストルージョンの回数を多くするほどユニラメラ化率が高くなり、実質的にLUVリポソームとみなすことができる。

[0047] 上記のようなリポソームに薬物を担持するには、薬物を含む水溶液でリポソームを構成する脂質膜を水和させることにより薬物をリポソームに担持させる方法 (Passive loading)、またはリポソーム膜の内側／外側にイオン勾配を形成し、このイオン勾配に従い薬物をリポソーム膜透過させ担持させる方法 (Remote loading) がある (前記サイジング技術を記載した文献および米国特許第5192549号、米国特許第5316771号など参照)。後者のRemote loadingは、高い薬物／脂質を達成でき、臨床に有効な高担持率のリポソーム製剤を得ることができることから好ましい。

[0048] 例えば、pH勾配によるイオン勾配を用いるRemote loading法としては、フラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次いで、酸性緩衝液 (例えばpH4の緩衝液) を加え振とうしリポソーム懸濁液を得る。さらに必要に応じリポソーム粒径のサイジングを行い、リポソーム外液をゲルろ過などの方法によりpHが中性付近の外液に置換する方法や適当なpH調整剤によりリポソーム外液のpHを中性付近 (例えばpH7～7.5付近) に調整する方法等によりpH勾配を形成し、このリポソーム懸濁液に薬物を含む水溶液を加え、この溶液をある時間加温することにより薬物を担持させることができる。なお、sL_o-PEGの修飾は、前述した通り脂質二重膜の小胞を形成した後であれば、薬物担持操作の前後どちらでも行うことができる。

[0049] また、アンモニウムイオン勾配を用いる方法としては、上記薄膜形成後、硫酸アンモニウム溶液を用いリポソーム懸濁液を得る。次いで、透析あるいはゲルろ過法によりリポソームの外液のアンモニウムイオンをナトリウムまたはカリウムイオンなどに置換することにより、リポソームの内側／外側にアンモニウムイオン勾配を形成し、ここに薬物を含む水溶液を加え、ある時間加温することにより薬物を担持することができる。また、硫酸アンモニウム懸濁液に適当なpH調整剤を加えることにより、リポソームの内水相のpHを5以下とすることもできる。

[0050] リポソーム製剤の非経口的投与の経路としては、たとえば点滴などの静脈内注射（静注）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。リポソーム製剤の具体的な投与方法としては、医薬組成物をシリンジや点滴によって投与することができる。また、カテーテルを患者または宿主の体内、たとえば管腔内、たとえば血管内に挿入して、その先端を標的部位付近に導き、当該カテーテルを通して、所望の標的部位またはその近傍あるいは標的部位への血流が期待される部位から投与することも可能である。

[0051] 本発明のリポソーム製剤は、病気に既に悩まされる患者に、疾患の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。たとえばリポソーム製剤に封入される薬物の有効投与量は、通常、一日につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。しかしながら、本発明のリポソーム製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。投与時期は、疾患が生じてから投与してもよいし、あるいは疾患の発症が予測される時に発症時の症状緩和のために予防的に投与してもよい。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

実施例 1

[0052] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるべきものではない。

なお、以下の実施例では、薬物を内封したリポソーム製剤を単にリポソ-

ムと称することがある。

<材料>

塩酸ドキシソルビシン（分子量 579.98）：RPG Lifescience LTD

ICG：インドシアニンググリーン（分子量 774.96, Sigma Ardrich社製）

HSPC（分子量 790, Lipoid社製, SPC3）水素添加大豆ホスファチジルコリン

Chol（分子量 386.65, Solvay社製）：コレステロール

PEG₅₀₀₀：分子量 5000 のポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール鎖

PEG₂₀₀₀：分子量 2000 のポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール鎖

DSPE：ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン

PEG₅₀₀₀-DSPE（分子量 6123, 日本油脂社製）：ポリエチレングリコール（PEG₅₀₀₀）ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン

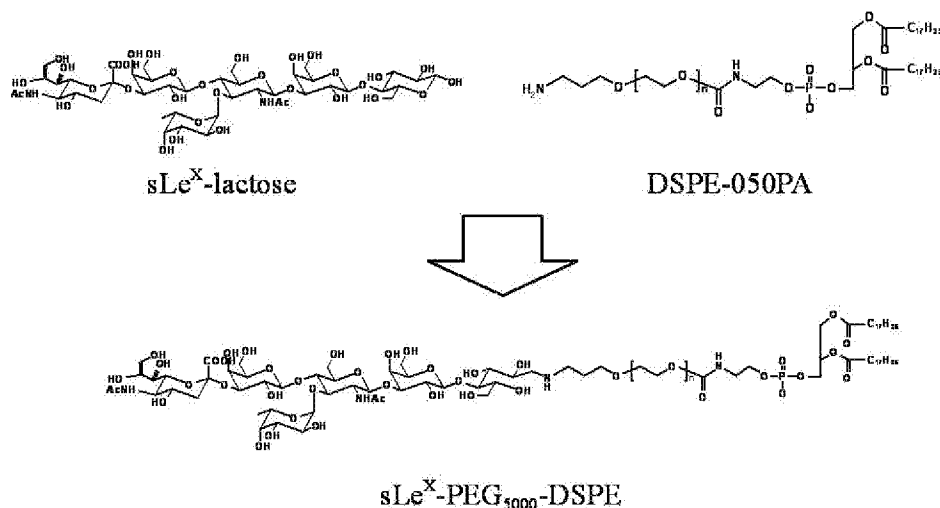
PEG₂₀₀₀-DSPE（分子量 2898, 日本油脂社製）：ポリエチレングリコール（PEG₂₀₀₀）ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン

DSPE-050PA（商品名）（分子量 5657, 日油）：ポリエチレングリコール鎖の分子量が 5000 の N-（アミノプロピルポリエチレングリコール）カルバミルジステアロイルホスファチジル-エタノールアミン

DSPE-020PA（商品名）（分子量 2899, 日油）：ポリエチレングリコール鎖の分子量が 2000 の N-（アミノプロピルポリエチレングリコール）カルバミルジステアロイルホスファチジル-エタノールアミン

[0053]（合成例 1）sLe^x結合 PEG₅₀₀₀-DSPE の合成

[化2]



[0054] 分子量5000のポリエチレングリコール鎖を有するDSPE-050PA（商品名）（分子量5657，日油）622.3mgをナスフラスコに入れて、クロロホルム10mLで溶解させた後、溶液を減圧留去し、さらに真空ポンプで減圧乾燥（2時間）し、薄膜を形成した。

そこに200mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）を22.5mLに加え、約60℃で攪拌し、水和した。その後、加温を約50℃として、sialyl lewis X-lactose（東京化成）251.9mgを加え3時間攪拌した。さらに、加温を40℃として、ピリジンボラン（和光純薬）137.5μLの脱水メタノール（関東化学）2.5mL溶液を滴下、その後、ピリジンボラン137.5μLのメタノール2.5mL溶液を3回（16時間後、24時間後、40時間後）追加滴下し、7日間攪拌した。

反応液を減圧濃縮後、5mLの水を加え、水で平衡化したゲルろ過クロマトカラム（Sephadex G-25，GEヘルスケアバイオサイエンス）200mLに通し、脱塩し、分取液を凍結乾燥した。

次に、凍結乾燥した反応物に水5mLを加え溶解し、セルロース透析膜（Spectra/por（登録商標）7，MWCO 3500，Spectrum Laboratories）を用いて1M NaCl溶液に対して24時間、次いで水に対して24時間透析し、そして凍結乾燥した。さらに、得られた反応物を、シリカゲルクロマトグラフィー（富士シリシア）にかけ、50%～60%メタノール（国産化学）ークロ

ロホルム（国産化学）溶出画分より、 $sLe^x-PEG_{5000}-DSPeO.11g$ を得た。

[0055]（合成例2） sLe^x 結合 $PEG_{2000}-DSPe$ の合成

$DSPe-O50PA$ に代えて分子量2000のポリエチレングリコール鎖を有する $DSPe-O20PA$ （商品名）を用いた以外は、合成例1と同様な手順で $sLe^x-PEG_{2000}-DSPe$ を得た。

[0056]（実施例1） sLe^x-PEG 修飾リポソーム（ドキソルビシン製剤）の調製

（1）リポソーム懸濁液の形成

水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）0.7057gおよびコレステロール（Chol）0.2947gを秤量し、70℃で加温した無水エタノール1mLを添加し、加温溶解した。

得られた脂質のエタノール溶液1mLに、約70℃に加温した250mM硫酸アンモニウム水溶液9mLを添加し、攪拌して粗リポソーム懸濁液を調製した。

この粗リポソーム懸濁液を、約70℃に加温したエクストルーダーT10（Lipex Biomembranes社製）に取り付けたフィルター（孔径0.2 $\mu m \times 3$ 回、0.2 $\mu m \times 10$ 回、ポリカーボネートメンブラン、Whatman社）に順次通し、リポソーム懸濁液を得た。

[0057]（2）外液置換

pH7.5 20mM HEPES溶液で置換したゲルカラム（Sephacrose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences）を用いて、上記リポソーム懸濁液の外液置換を行った。リン脂質定量キットを用いて測定したHSPC濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0058]（3）薬物導入

リン脂質定量キットを用いて算出した総脂質濃度をもとに、塩酸ドキソルビシン／総脂質（mol/mol）が0.16となるように塩酸ドキソルビシンの量を計算した。計算結果をもとに必要な量の塩酸ドキソルビシンを秤量し、RO水を用いて15mg/mLの塩酸ドキソルビシン溶液（薬物溶液）を

調製した。外液置換後のリポソーム懸濁液 4.5 mL に塩酸ドキシソルビン溶液 2.39 mL を加え 60℃ で 60 分間加温することで薬物導入を行った。導入後のサンプルは氷冷した。

[0059] (4) 未封入薬物除去

薬物導入後のリポソーム懸濁液を、pH 7.5 20 mM HEPES 溶液で透析を行い、リポソームに封入されていない薬物を除去した。リン脂質定量キットを用いて測定した HSPC 濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0060] (5) 表面修飾

得られたリポソーム懸濁液 4 mL を 65℃ に加温し、表面修飾剤として合成例 1 で得た sLex-PEG₅₀₀₀-DSPC の 37.65 mg/mL 水溶液を、sLex-PEG 修飾率 (mol%) が 2.0 mol% となる量の 0.86 mL 加え、65℃ で 30 分加温することによりリポソームの膜表面 (外表面) を sLex-PEG 修飾した。加温終了後のリポソーム懸濁液は、速やかに氷冷した。

[0061] (6) 未封入薬物除去

薬物導入後のリポソーム懸濁液を、pH 6.5 の 10 mM L-ヒスチジン / 10% スクロース溶液で十分に置換したカラム (Sephacrose 4Fast Flow, Amersham Biosciences) を用いて外液置換し、リポソームに封入されていない薬物を除去した。その後、フィルター滅菌 (Sartrius 社、MINISART PLUS 0.20 μm) を行って最終製剤とした。結果を表 1 に示す。

[0062] なお、以下の各表中、

「薬物濃度」は、リポソーム懸濁液中のリポソームに担持された薬物濃度 (測定値) であり、薬物 / リポソーム懸濁液で示す。

「総脂質濃度」は、リポソーム懸濁液中の総脂質濃度 (測定値) である。ただし、「総脂質」には、PEG 誘導体は含まれない。

「修飾率」は、上記総脂質のモル濃度 (測定値) に対する修飾剤のモル濃度 (測定値) の率であり、たとえば修飾剤が sLex-PEG₅₀₀₀-DSPC の場合には以下の式で求められる。

修飾率 (mol%) = (sLe^x-PEG₅₀₀₀-DSPC 濃度 (mM) / 総脂質濃度 (mM)) × 100

「薬物／脂質比」は、上記総脂質濃度に対する薬物濃度の比をモル比で示す。

「粒子径」は、薬物封入リポソームを粒度分布系 (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments社) にて測定した平均粒子径で示す。

[0063] [表1]

表1

	薬物濃度	総脂質濃度	sLe ^x -PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(mol/mol)	(nm)
実施例 1	2.2	14.6	1.8	0.15	135

[0064] (実施例 2) sLe^x-PEG 修飾リポソーム (ドキソルビシン製剤) の調製

(1) リポソーム懸濁液の形成

HSPC 7.0870 g およびコレステロール 2.9612 g を秤量し、70℃で加温した無水エタノール 10 mL を添加し、加温溶解した。

得られた脂質のエタノール溶液 10 mL に、約 70℃に加温した 250 mM 硫酸アンモニウム水溶液 90 mL を添加し、攪拌して粗リポソーム懸濁液を調製した。この粗リポソーム懸濁液を、約 70℃に加温したエクストルーダー T100 (Lipex Biomembranes 社製) に取り付けしたフィルター (孔径 0.2 μm × 3 回、0.1 μm × 10 回、ポリカーボネートメンブラン、Whatman 社) に順次通し、リポソーム懸濁液を得た。

[0065] (2) 外液置換

実施例 1 の (2) と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、HSPC 濃度を測定し、総脂質濃度を算出した。

[0066] (3) 薬物導入

実施例 1 の (3) と同様にして、塩酸ドキソルビシン／総脂質 (mol/mol) が 0.16 となるように計算した必要量の塩酸ドキソルビシンを秤量し、RO 水を用いて 15 mg/mL の塩酸ドキソルビシン溶液を調製した。

この塩酸ドキソルビン溶液 7.2 mL を外液置換後のリポソーム懸濁液 12 mL に加えた以外は実施例 1 の (3) と同様にして薬物導入工程を行った。

[0067] (4) 未封入薬物除去

実施例 1 の (4) と同様に HEPES 溶液で透析してリポソームに封入されていない薬物を除去し、リン脂質定量キットを用いて測定した HSPC 濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0068] (5) 表面修飾

得られたリポソーム懸濁液 4 mL に対し、sLe^x-PEG₅₀₀₀-DSPC の 37.65 mg/mL 水溶液を、sLe^x-PEG 修飾率 (mol%) が 1.0 mol% となる 0.52 mL 加えた以外は実施例 1 の (5) と同様にしてリポソーム膜の sLe^x-PEG 修飾を行なった。

[0069] (6) 未封入薬物除去

実施例 1 の (6) と同様にして、L-ヒスチジン/スクロース溶液置換カラムを用いて外液置換 (未封入薬物除去) した後、フィルター滅菌 (Sartrius 社、MINISART PLUS 0.20 μm) を行って最終製剤とした。結果を表 2 に示す。

[0070] [表2]

表2

	薬物濃度	総脂質濃度	sLe ^x -PEG 修飾率	薬物/脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(mol/mol)	(nm)
実施例 2	2.9	21.8	0.9	0.14	115.1

[0071] (比較例 1) PEG/sLe^x-PEG 修飾リポソーム (ドキソルビン製剤) の調製

(1) PEG による表面修飾

実施例 1 の (1) と同様にして得られたリポソーム懸濁液を加温状態で維持したまま、表面修飾剤として PEG₂₀₀₀-DSPC の 37.65 mg/mL 水溶液を、PEG 修飾率 (mol%) が 1.5 mol% となる量の 0.76 mL

直ちに加え、65℃で30分加温することによりリポソームの膜表面（外表面）をPEG修飾した。加温終了後のリポソーム懸濁液は、速やかに氷冷した。

[0072] (2) 外液置換

実施例1の(2)と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、HSPC濃度を測定し、総脂質濃度を算出した。

[0073] (3) 薬物導入

実施例1の(3)と同様にして、塩酸ドキソルビン／総脂質(mol/mol)が0.16となるように計算した必要量の塩酸ドキソルビンを秤量し、RO水を用いて15mg/mLの塩酸ドキソルビン溶液を調製した。

この塩酸ドキソルビン溶液1.6mLを外液置換後のリポソーム懸濁液4.5mLに加えた以外は実施例1の(3)と同様にして薬物導入工程を行った。

[0074] (4) 未封入薬物除去

実施例1の(4)と同様にしてHEPES溶液で透析してリポソームに封入されていない薬物を除去し、リン脂質定量キットを用いて測定したHSPC濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0075] (5) sLex-PEGによる表面修飾

sLex-PEG₅₀₀₀-DSPEに代えて、合成例2で得たsLex-PEG₂₀₀₀-DSPEの37.65mg/mL水溶液を調製し、sLex-PEG修飾率(mol%)が1.0mol%となる量の0.29mL加えた以外は実施例1の(5)と同様にしてリポソーム膜のsLex-PEG修飾を行なった。

[0076] (6) 未封入薬物除去

実施例1の(6)と同様にして、L-ヒスチジン／スクロース溶液置換カラムを用いて外液置換（未封入薬物除去）した後、フィルター滅菌（Sartrius社、MINISART PLUS 0.20μm）を行って最終製剤とした。結果を表3に示す。

[0077]

[表3]

表3

	薬物濃度	総脂質濃度	PEG 修飾率	sLc ^X -PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(%)	(mol/mol)	(nm)
比較例1	1.8	12.5	1.6	1.0	0.15	122.1

[0078] (比較例2) PEG修飾リポソーム(ドキソルビン製剤)の調製

(1) PEGによる表面修飾

PEG₂₀₀₀-DSPCの37.65 mg/mL水溶液を、PEG修飾率(mol%)が2.5 mol%となる量の3.2 mL直ちに加えた以外は比較例1の(1)と同様にしてリポソームの膜表面をPEG修飾した。

[0079] (2) 外液置換

実施例1の(2)と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、HSPC濃度を測定し、総脂質濃度を算出した。

[0080] (3) 薬物導入

実施例1の(3)と同様にして、塩酸ドキソルビン／総脂質(mol/mol)が0.16となるように計算した必要量の塩酸ドキソルビンを秤量し、RO水を用いて15 mg/mLの塩酸ドキソルビン溶液を調製した。

この塩酸ドキソルビン溶液2.99 mLを外液置換後のリポソーム懸濁液7 mLに加えた以外は実施例1の(3)と同様にして薬物導入工程を行った。

[0081] (4) 未封入薬物除去

実施例1の(6)と同様にして、L-ヒスチジン／スクロース溶液置換カラムを用いて外液置換(未封入薬物除去)した後、フィルター滅菌(Sartorius社、MINISART PLUS 0.20 μm)を行って最終製剤とした。結果を表4に示す。

[0082]

[表4]

表4

	薬物濃度	総脂質濃度	PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(mol/mol)	(nm)
比較例2	3.0	22.8	2.3	0.14	125.0

[0083] (比較例3) sLe^x-PEGによる低修飾リポソーム（ドキソルビシン製剤）の調製

実施例2の（5）において、得られたリポソーム懸濁液4 mLに対し、sLe^x-PEG₅₀₀₀-DSPЕの37.65 mg/mL水溶液を、sLe^x-PEG修飾率（mol%）が実施例2の半量の0.5 mol%となる0.26 mL加えた以外は、実施例2と同様の各工程を実施してリポソーム膜のsLe^x-PEG修飾を行なった。結果を表5に示す。

[0084] [表5]

表5

	薬物濃度	総脂質濃度	sLe ^x -PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(mol/mol)	(nm)
比較例3	2.8	20.6	0.5	0.14	107.9

[0085] (比較例4) PEG／sLe^x-PEG修飾リポソーム（ドキソルビシン製剤）の調製

（1）リポソーム懸濁液の形成

HSPCを7.0599 gおよびコレステロールを2.9470 g秤量した以外は、実施例2の（1）と同様にしてリポソーム懸濁液を得た。

[0086] （2）表面修飾

得られたリポソーム懸濁液10 mLを加温状態で維持したまま、総脂質量の1.0 mol%の表面修飾剤としてPEG₅₀₀₀-DSPЕの37.65 mg/mL水溶液を2.68 mL直ちに加え、65℃で30分加温することによりリポソームの膜表面（外表面）をPEG修飾した。加温終了後のリポソーム懸濁液は、速やかに氷冷した。

[0087] (3) 外液置換

実施例1の(2)と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、HSPC濃度を測定し、総脂質濃度を算出した。

[0088] (4) 薬物導入

実施例1の(3)と同様にして、塩酸ドキソルビン／総脂質(mol/mol)が0.16となるように計算した必要量の塩酸ドキソルビンを秤量し、RO水を用いて15mg/mLの塩酸ドキソルビン溶液を調製した。

この塩酸ドキソルビン溶液3.03mLを外液置換後のリポソーム懸濁液6mLに加えた以外は実施例1の(3)と同様にして薬物導入工程を行った。

[0089] (5) 未封入薬物除去

実施例1の(4)と同様にしてHEPES溶液で透析してリポソームに封入されていない薬物を除去し、リン脂質定量キットを用いて測定したHSPC濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0090] (6) 表面修飾

得られたリポソーム懸濁液4mLに対し、sLe^x-PEG₅₀₀₀-DSPCの37.65mg/mL水溶液を、sLe^x-PEG修飾率(mol%)が1.0mol%となる0.58mL加えた以外は実施例1の(5)と同様にしてリポソーム膜のsLe^x-PEG修飾を行なった。

[0091] (7) 未封入薬物除去

実施例1の(6)と同様にして、L-ヒスチジン／スクロース溶液置換カラムを用いて外液置換(未封入薬物除去)した後、フィルター滅菌(Sartorius社、MINISART PLUS 0.20μm)を行って最終製剤とした。結果を表6に示す。

[0092]

[表6]

表6

	薬物濃度	総脂質濃度	PEG 修飾率	sLe ^x -PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(%)	(mol/mol)	(nm)
比較例4	2.6	17.8	0.8	0.9	0.15	129.9

[0093] (比較例5) sLe^x-PEG修飾リポソーム(ドキソルビン製剤)の調製

(1) 外液置換

比較例4の(1)リポソーム懸濁液の形成と同様にして得たリポソーム懸濁液を実施例1の(2)と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、HSPC濃度を測定し、総脂質濃度を算出した。

[0094] (2) 薬物導入

実施例1の(3)と同様にして、塩酸ドキソルビン／総脂質(mol/mol)が0.16となるように計算した必要量の塩酸ドキソルビンを秤量し、RO水を用いて15mg/mLの塩酸ドキソルビン溶液を調製した。

この塩酸ドキソルビン溶液3.24mLを外液置換後のリポソーム懸濁液6mLに加えた以外は実施例1の(3)と同様にして薬物導入工程を行った。

[0095] (3) 未封入薬物除去

実施例1の(4)と同様にしてHEPES溶液で透析してリポソームに封入されていない薬物を除去し、リン脂質定量キットを用いて測定したHSPC濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

[0096] (4) sLe^x-PEGによる表面修飾

得られたリポソーム懸濁液4mLに対し、sLe^x-PEG₅₀₀₀-DSPCに代えて、合成例2で得たsLe^x-PEG₂₀₀₀-DSPCの37.65mg/mL水溶液を調製し、sLe^x-PEG修飾率(mol%)が1.0mol%となる量の0.39mL加えた以外は実施例1の(5)と同様にしてリポソーム膜のsLe^x-PEG修飾を行なった。

[0097] (5) 外液置換

実施例１の（２）と同様にしてゲルカラムによるリポソーム懸濁液の外液置換を行い、リン脂質定量キットを用いて測定したＨＳＰＣ濃度をもとに、総脂質濃度を算出した。

（６）未封入薬物除去

実施例１の（６）と同様にして、Ｌ－ヒスチジン／スクロース溶液置換カラムを用いて外液置換（未封入薬物除去）した後、フィルター滅菌（Sartrius社、MINISART PLUS 0.20 μ m）を行って最終製剤とした。結果を表７に示す。

[表7]

表 7

	薬物濃度	総脂質濃度	sLe ^x -PEG 修飾率	薬物／脂質 比	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(mol/mol)	(nm)
比較例 5	30.	21.8	1.0	0.14	122.1

[0098] （試験例１）薬物動態（血中滞留性）

実施例１～２、比較例１～２および５のリポソーム製剤の薬物動態を試験した。

検体を満たしたシリンジに２７Ｇの翼付静注針を装着し、マウスホルダーにて保定したラットの尾静脈から投与した。投与量は塩酸ドキソルビンとしてとして２mg/kgを投与した。

投与後、０．２５，１，２，４，８，１２，２４，４８時間目に、尾静脈より０．２mLの採血を行った。血漿を分離後、ＨＰＬＣ法により血漿中の塩酸ドキソルビン濃度を算出した。結果を図１に示す。

血漿中濃度より算出したＡＵＣ（血中濃度下面積）を図２に示す。

図２に示されるとおり、PEG修飾リポソーム（比較例２）を基準にすると、PEG-sLe^x修飾リポソームのＡＵＣはいずれも減少したが、PEG₂₀₀₀を介してsLe^x修飾したリポソーム（比較例１，５）の減少率が約４０％以上であるのに対し、PEG₅₀₀₀を介してsLe^x修飾したリポソーム（実施例１，２）の減少率は約１０％程度と小さく、血中滞留性の高いPEG修飾リ

ポソームと遜色がなかった。

[0099] (試験例2) 結合性評価－1

E-セレクトイン (E-selectin) と各種リポソームの結合活性を、E-selectin発現細胞株に対するシアリルルイスX (sLe^x) 修飾タンパク質の結合阻害活性の測定にて比較した。

市販プラスミドBBG57 (British Biotechnology) 由来のヒトE-selectin DNAを発現ベクターpAGE110に組み込み、E-selectin発現プラスミドを作製した。常法 (Cytotechnology 13, 79-88(1993)) に従って該発現プラスミドをCHO (DXB11) (東大医科研より入手) に導入後、メトトレキサートを用いた遺伝子増幅によりE-selectin発現細胞株 (CHO/E-selectin) を取得した。

ヒト α 2,3シアル酸転移酵素IVのDNAをpAGE249 (JBC 269, 14730 (1994)) に、ヒト α 1,3フコース転移酵素VIIのDNAをpKANTEX93由来のベクターにそれぞれ組み込んで発現プラスミドを作製した。これらを常法 (Cytotechnology 13, 79-88(1993)) に従ってCHOに導入し、糖転移酵素発現細胞株を得た。この細胞より産生したシアリルルイスX (sLe^x) 修飾タンパク質を、Alexa647ラベリングキット (インビトロジェン) を用いて蛍光標識した。

播種したCHO/E-selectinに、蛍光標識したsLe^x修飾タンパク質を添加してFMAT (Applied Biosystems) を用いて測定し、添加濃度に応じて蛍光強度が増大することを確認した。一定濃度のsLe^x修飾タンパクと同時に各種リポソーム製剤を添加して測定した蛍光強度から、各添加量 (脂質濃度) におけるsLe^x修飾タンパク質の結合活性 (%) を求めた。結果を図3～4に示す。

結合活性 (%) が小さいほど、CHO/E-selectinに対するsLe^x修飾タンパク質の結合が阻害されていることを示す。

[0100] 比較例2、比較例4のリポソームは、sLe^x修飾タンパクとCHO/E-selectinの結合に影響を与えなかったが、実施例1、実施例2、比較例1、比

較例 5 のリポソームは、C H O／E-selectin に対する s L e^x 修飾タンパクの結合を濃度依存的に阻害した。

実施例 1 のリポソームは、比較例 1 のリポソームと比較してさらに強い結合阻害活性を示した。

[0101] (試験例 3) 結合性評価－ 2

E-selectin と各種リポソームの結合を、ビアコアを用いて比較した。

Biacore™ T100 (G Eヘルスケア) のWizardに従って、センサーチップCM 5 (G Eヘルスケア) に抗ヒト I g G F c 抗体 (G Eヘルスケア) を固定化し、さらに組み換えヒト E-selectin -ヒト I g G F c 複合体 (R & D) を結合させた。

Biacore™ T100に、各種リポソームをそれぞれ流入して、チップ上の結合・解離の状態をセンサーグラムとして検出し、リポソーム間で比較した。結果を図 5 に示す。

[0102] <結合性能と血中滞留性の評価>

上記実施例、比較例の結合性能 (結合性評価－ 2) と血中滞留性の評価結果を模式的にまとめて表 8 に示す。

[表8]

表 8

	結合性能	血中滞留性
比較例 1	++	++
比較例 2	—	+++++
比較例 3	+	
比較例 5		++
実施例 1	+++++	+++
実施例 2	++++	+++

上記に示されるとおり、本発明の s L e^x-P E G リポソームは、従来の P E G リポソーム (比較例 2) の長い血中滞留性をほぼ同等に保持し、一方 P E G リポソームとは比較にならない強い結合性能を有する。また、P E G 鎖

長が短い s L e^x-P E G リポソームよりも血中滞留性および結合性ともに格別に優れている。

[0103] (試験例 4) 抗腫瘍効果

C H O / E-selectin を免疫不全マウスに皮下移植し、19 日間増殖させた。個体を生理食塩水、ドキシル（登録商標）（既存の塩酸ドキソルビシン内包 P E G₂₀₀₀ 化リポソーム製剤、ヤンセンファーマ社）、比較例 1 のリポソームおよび実施例 1 のリポソーム投与群に群分けし、各々 1 m g / k g を D a y 0 および 7 に静脈内投与し、D a y 16 まで腫瘍径と体重を測定した。

腫瘍径から腫瘍体積を算出した結果を図 6 に示す。

体重から D a y 0 からの体重変動率を算出した結果を図 7 に示す。

D a y 16 の比較例 1 リポソーム投与群の腫瘍体積は、ドキシル処方に対して有意に小さかった。また、実施例 1 リポソームは D a y 12 以降、ドキシルおよび比較例 1 リポソームと比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。

体重は、いずれのリポソームを投与した場合も 2 回目投与以降に減少傾向を示したが、実施例 1 リポソーム投与の体重推移はドキシルと同等であった。

[0104] (実施例 3) I C G 標識 s L e^x-P E G 修飾リポソーム製剤の調製

(1) リポソーム懸濁液の形成

10 m M リン酸緩衝液 16 m L に 1.6 m g の I C G を溶解させ、内水相を調製した。

H S P C とコレステロールを 54 : 46（モル比）で混合した混合脂質を 1.0046 g 秤量し、70℃で加温した無水エタノール 1 m L を添加し、加温溶解した。

得られた脂質のエタノール溶液 1 m L に、約 70℃に加温した内水相 9 m L を添加し、攪拌して粗リポソーム懸濁液を調製した。

この粗リポソーム懸濁液を、約 70℃に加温したエクストルーダー T 10（Lipex Biomembranes 社製）に取り付けたフィルター（孔径 0.2 μ m × 3 回

、 $0.1\ \mu\text{m} \times 10$ 回、ポリカーボネートメンブラン、Whatman社）に順次通し、リポソーム懸濁液を得た。

[0105] (2) 表面修飾

得られたリポソーム懸濁液 $2\ \text{mL}$ を 65°C に加温し、表面修飾剤として合成例 1 で得た $\text{sLe}^x\text{-PEG}_{5000}\text{-DSPe}$ の $135\ \text{mg/mL}$ 水溶液を、 $\text{sLe}^x\text{-PEG}$ 修飾率 (mol%) が $1.0\ \text{mol}\%$ となる量の $0.1\ \text{mL}$ 加え、 65°C で 30 分加温することによりリポソームの膜表面（外表面）を $\text{sLe}^x\text{-PEG}$ 修飾した。加温終了後のリポソーム懸濁液は、速やかに氷冷した。

[0106] (3) 外液置換

次いで、リポソーム懸濁液を、 $\text{pH } 6.5$ の $10\ \text{mM}$ L-ヒスチジン / 10% スクロース溶液で十分に置換したカラム (Sephacrose 4Fast Flow, Amersham Biosciences) を用いて外液置換（未封入薬物除去）した後、フィルター滅菌 (Sartrius社、MINISART PLUS $0.20\ \mu\text{m}$) を行って最終製剤とした。結果を表 9 に示す。

[表9]

表 9

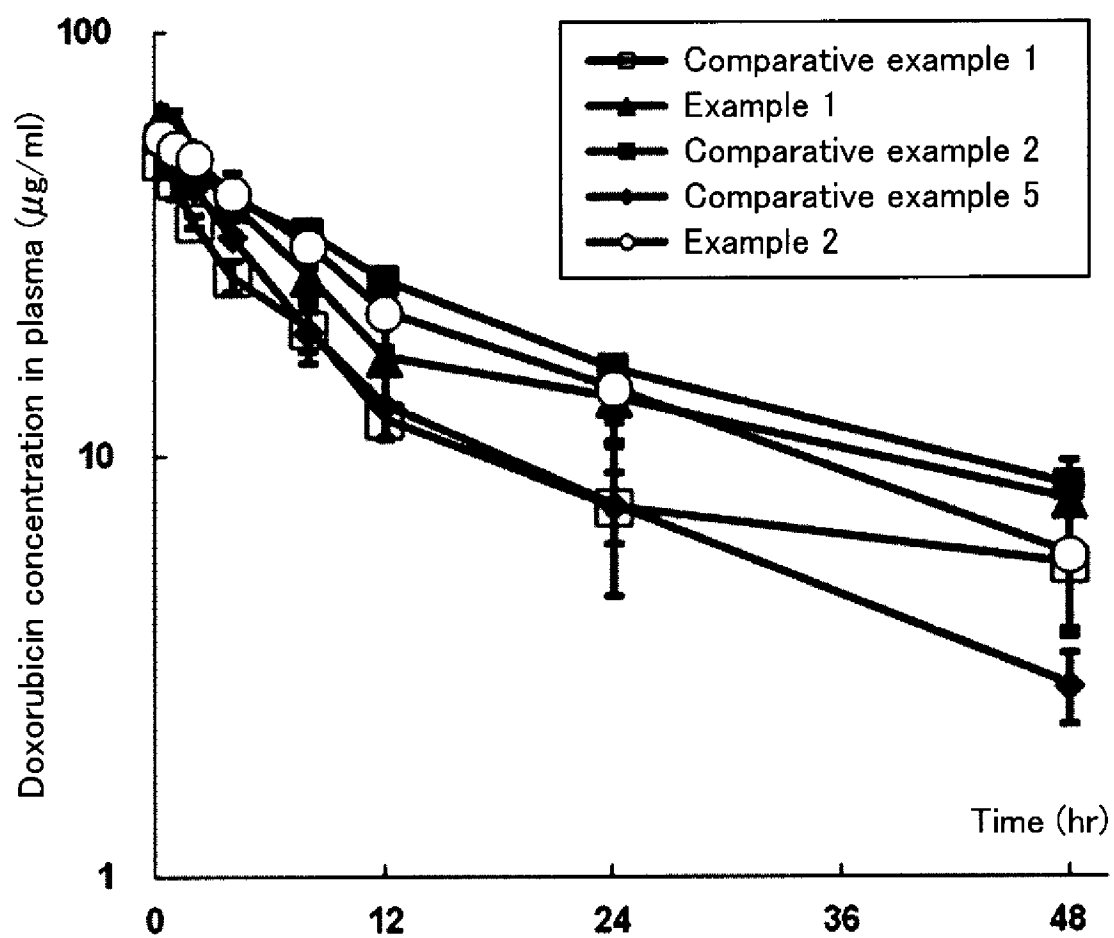
	ICG 濃度	総脂質濃度	$\text{sLe}^x\text{-PEG}$ 修飾率	粒子径
	(mg/mL)	(mg/mL)	(%)	(nm)
実施例 3	0.012	15.9	1.1	121.9

請求の範囲

- [請求項1] 少なくともリン脂質を膜材として含む脂質二重膜で形成される閉鎖小胞の水性懸濁液であって、実質的に、該閉鎖小胞の表面が、平均分子量 (Mw) 4000～7000のポリエチレングリコール (PEG) 鎖を介してオリゴ糖シアリルルイスX (sLe^x) が配位するようにPEGとsLe^xとの結合鎖 (sLe^x-PEG) のみで修飾され、かつ該sLe^x-PEGによる前記膜材の総脂質量に対する修飾率が0.8～2.5mol%である、sLe^x-PEG修飾リポソーム。
- [請求項2] 前記閉鎖小胞の外液側表面のみが前記sLe^x-PEGで修飾されている請求項1に記載のリポソーム。
- [請求項3] 前記PEGの平均分子量が5000である請求項1または2に記載のリポソーム。
- [請求項4] 前記sLe^x-PEG修飾率が0.9～2mol%である請求項1～3のいずれかに記載のリポソーム。
- [請求項5] 前記膜材がコレステロールを含む請求項1～4のいずれかに記載のリポソーム。
- [請求項6] 前記修飾が、sLe^x-PEG-脂質誘導体を表面修飾剤として、該表面修飾剤の脂質部分が前記脂質二重膜内に配置されることにより導入されている請求項1～5のいずれかに記載のリポソーム。
- [請求項7] 前記表面修飾剤の脂質部分がジステアロイルホスファチジルエタノールアミンである請求項1～6のいずれかに記載のリポソーム。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載のリポソームの前記閉鎖小胞内に封入された薬物を含むリポソーム製剤。
- [請求項9] 前記薬物が抗癌剤および／または抗炎症剤である請求項8に記載のリポソーム製剤。

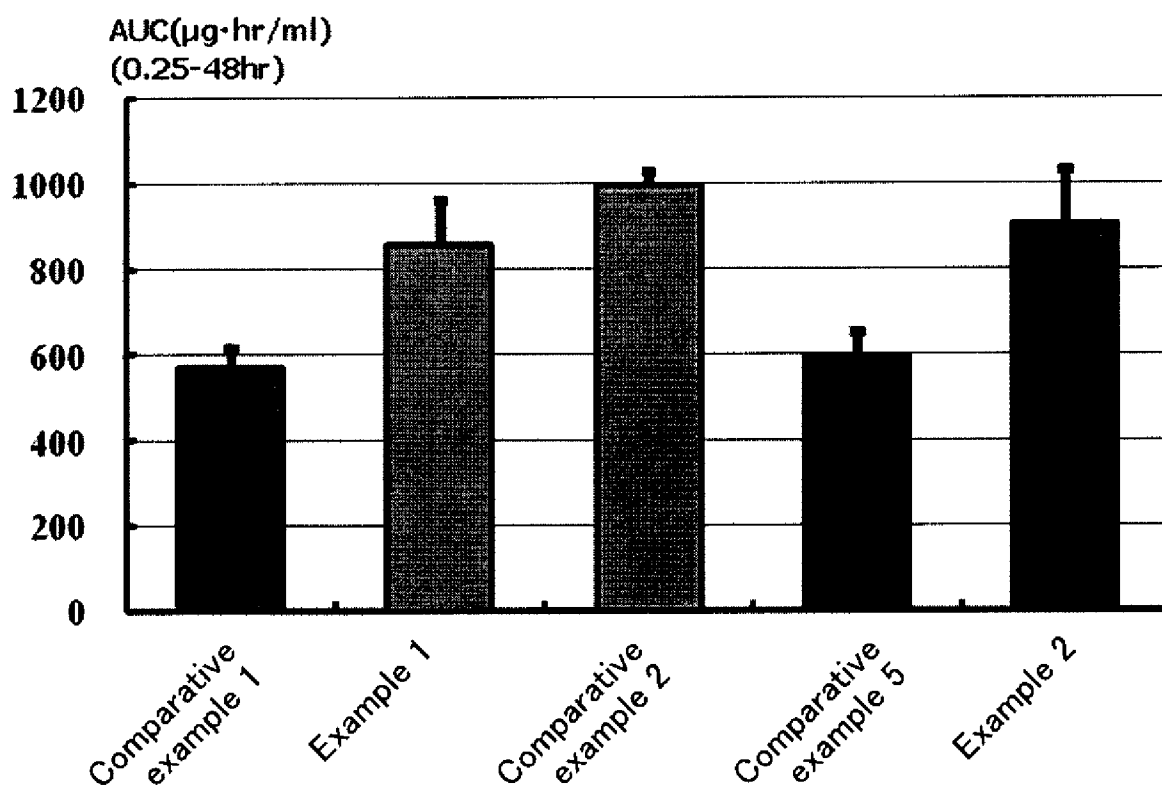
[図1]

FIG. 1



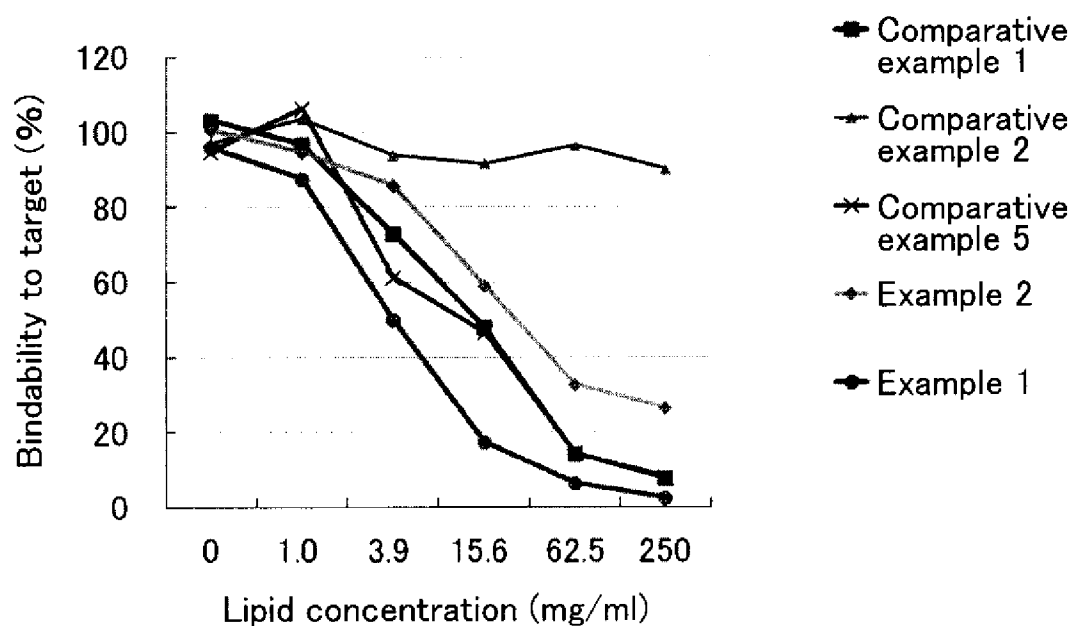
[図2]

FIG. 2



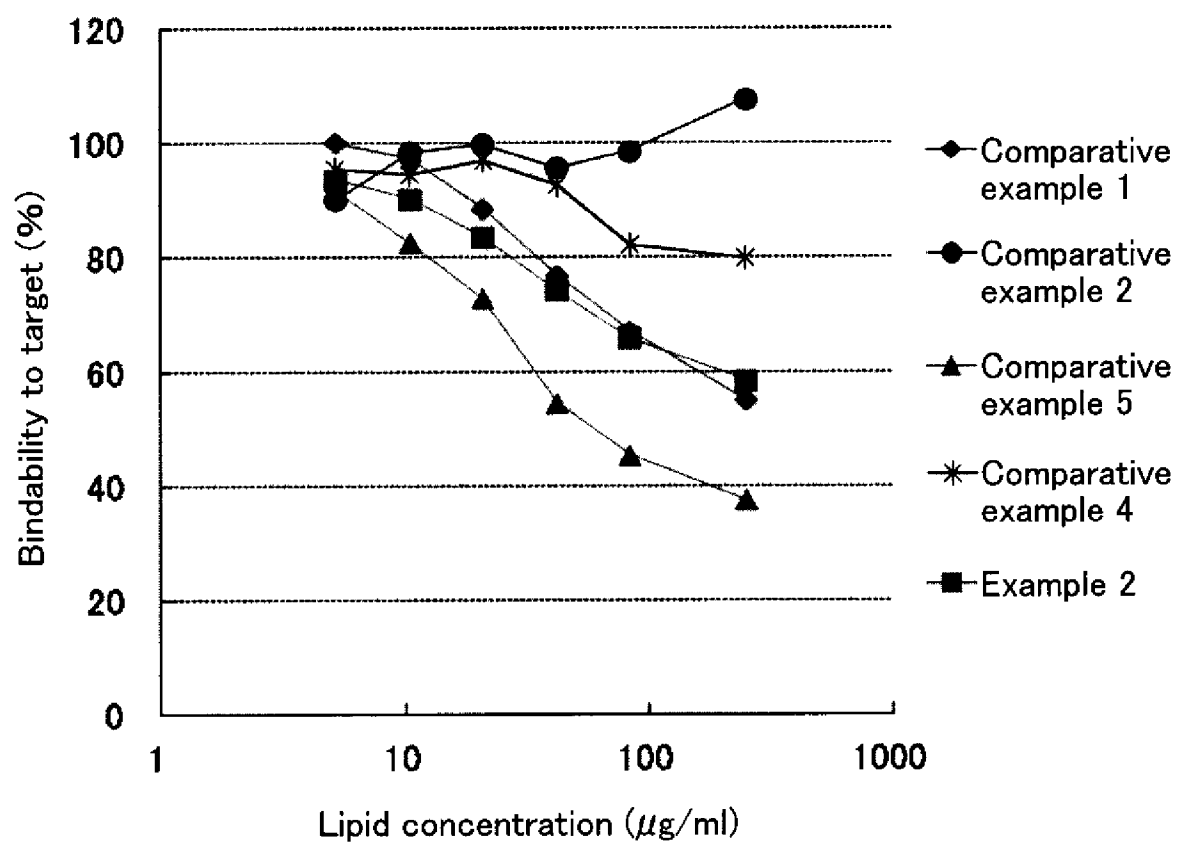
[図3]

FIG. 3



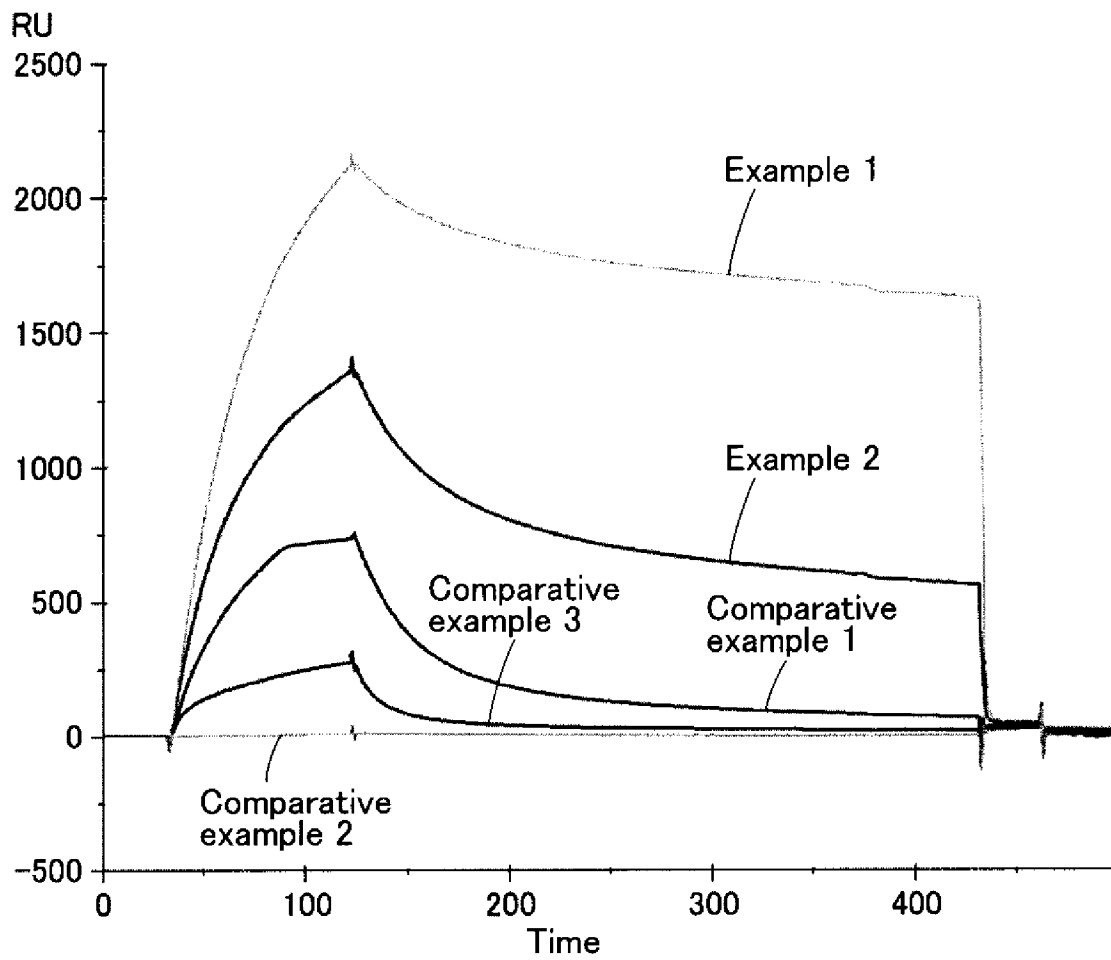
[図4]

FIG. 4



[図5]

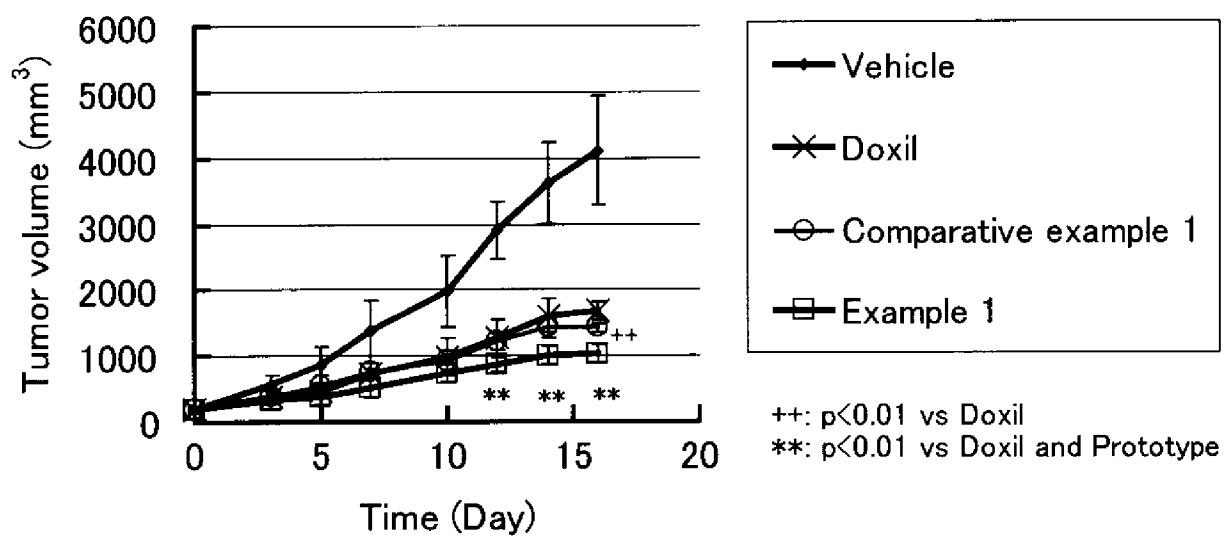
FIG. 5



[図6]

FIG. 6

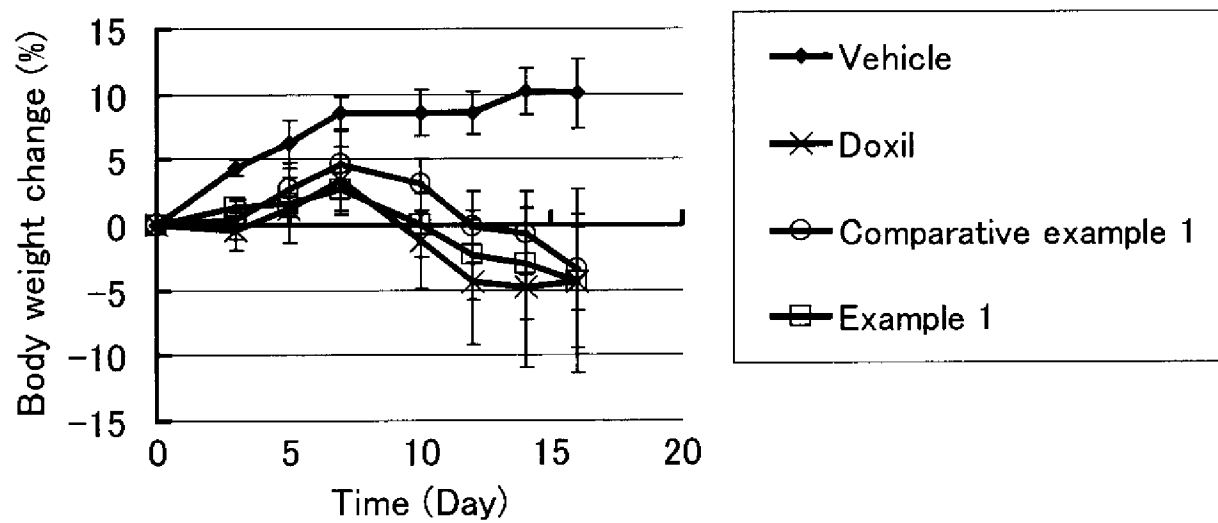
Tumor volume of CHO/E-selectin xenograft model



[図7]

FIG. 7

Body weight change of CHO/E-selectin xenograft model



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/127(2006.01)i, A61K31/704(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)

A61K9/127, A61K31/704, A61K47/24, A61K47/28, A61K47/34, A61P35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-508256 A (Sequus Pharmaceuticals, Inc.), 03 September 1996 (03.09.1996), claims 1, 5 to 7; page 11, lines 12 to 16; page 12, lines 8 to 10; page 15, 4th line from the bottom to page 16, line 8; page 32, line 6 to 8th line from the bottom & WO 94/21235 A1 & US 6180134 B1 & EP 689428 A1	1-9
Y	N. Kuznetsova et al. 'Hemocompatibility of Liposomes Loaded with Diglyceride Esters of Methotrexate and Melphalan' European Cells & Materials, 2010, Vol.20 Suppl.3, p.152	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 September, 2013 (25.09.13)

Date of mailing of the international search report
08 October, 2013 (08.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074095

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	S.A Defrees et al. 'Sialyl Lewis x Liposomes as a Multivalent Ligand and Inhibitor of E-Selectin Mediated Cellular Adhesion' Journal of the American Chemical Society, 1996, Vol.118, No.26, p.6101-6104	1-9
A	WO 2009/148169 A1 (Katayama Chemical Industries Co., Ltd.), 10 December 2009 (10.12.2009), all references (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K9/127(2006.01)i, A61K31/704(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i,
A61K47/34(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K9/127, A61K31/704, A61K47/24, A61K47/28, A61K47/34, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 8-508256 A (シキユウス ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド), 1996.09.03 特許請求の範囲第 1, 5-7 項, 第 11 頁第 12-16 行, 第 12 頁第 8-10 行, 第 15 頁下から第 4 行-第 16 頁第 8 行, 第 32 頁第 6 行-下から第 8 行 & WO 94/21235 A1 & US 6180134 B1 & EP 689428 A1	1-9
Y	N. Kuznetsova et al. ' Hemocompatibility of Liposomes Loaded with Diglyceride Esters of Methotrexate and Melphalan' European Cells & Materials, 2010, Vol.20 Suppl.3, p.152	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平井 裕彰

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

9 6 3 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	S.A Defrees et al. ' Sialyl Lewis x Liposomes as a Multivalent Ligand and Inhibitor of E-Selectin Mediated Cellular Adhesion' Journal of the American Chemical Society, 1996, Vol.118, No. 26, p. 6101-6104	1-9
A	WO 2009/148169 A1 (片山化学工業株式会社), 2009.12.10 全文献 (ファミリーなし)	1-9