

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3671054号
(P3671054)

(45) 発行日 平成17年7月13日(2005.7.13)

(24) 登録日 平成17年4月22日(2005.4.22)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/127

請求項の数 28 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願平4-510527	(73) 特許権者	502281057
(86) (22) 出願日	平成4年6月8日(1992.6.8)		リボクセン テクノロジーズ リミテッド
(65) 公表番号	特表平6-508610		イギリス国 ダブリュシー1エー 2アー
(43) 公表日	平成6年9月29日(1994.9.29)		ルピー ロンドン ブルームズベリー ス
(86) 国際出願番号	PCT/GB1992/001022		クエア 4 ブルームズベリー ハウス
(87) 国際公開番号	W01992/022331		スイート 23
(87) 国際公開日	平成4年12月23日(1992.12.23)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成11年3月2日(1999.3.2)		弁理士 川口 義雄
審判番号	不服2003-22819(P2003-22819/J1)	(72) 発明者	グレゴリアデイス、グレゴリー
審判請求日	平成15年11月25日(2003.11.25)		イギリス国、ミドルセックス・エイチ・エ
(31) 優先権主張番号	9112212.7		イ・6・2・アール・キュー、ノースウツ
(32) 優先日	平成3年6月6日(1991.6.6)		ド、リツクマンスワース・ロード、キュー
(33) 優先権主張国	英国(GB)		フエリー・ヒル、“クランツック”(番地
			なし)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

疾患の治療用医薬組成物の製造方法であって、共有結合を介して多糖化合物を該疾患の治療用活性成分と結合させることを含み、該活性成分はトキシイドではなく、該多糖化合物が多糖1分子当たり5以上の相互に連結したシアル酸単位を含み、該多糖化合物が、患者の血液循環における前記活性成分の有効時間を延ばし、前記活性成分の免疫原性を低下させ、及び/又は *in vivo* での前記活性成分の安定性を向上させるのに十分な量結合することを特徴とする前記製造方法。

【請求項2】

前記活性成分がペプチドまたはタンパク質を含む請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

医薬組成物の製造方法であって、多糖-脂質誘導体をリボソームに導入することを含み、多糖1分子あたり5以上のシアル酸単位を含む多糖化合物の多糖成分を表面に含みリボソームに薬理学的活性成分が取込まれており、該シアル酸単位が相互に連結し、該多糖成分が、患者の血液循環における前記活性成分の有効時間を延ばし、前記活性成分の免疫原性を低下させ、及び/又は *in vivo* での前記活性成分の安定性を向上させるのに十分な量存在することを特徴とする前記製造方法。

【請求項4】

医薬組成物の製造用の多糖化合物が結合したリボソームであって、多糖1分子あたり5以上のシアル酸単位を含む多糖化合物の多糖成分を表面に含みリボソームに薬理学的活性成

20

分が取込まれており、該シアル酸単位が相互に連結し、該多糖成分が、患者の血液循環における前記活性成分の有効時間を延ばし、前記活性成分の免疫原性を低下させ、及び／又は *in vivo* での前記活性成分の安定性を向上させるのに十分な量存在することを特徴とする前記リポソーム。

【請求項 5】

多糖化合物が、初期の急速排除ステップ後の血液循環における成分の半減期が 10 時間以上に延長されるように選択される請求項 1、2 および 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

多糖化合物が、初期の急速排除ステップ後の血液循環における成分の半減期が 10 時間以上に延長されるように選択される請求項 4 に記載のリポソーム。

10

【請求項 7】

多糖化合物が細菌多糖もしくはその誘導体、又はこの種の多糖もしくは誘導体の合成類似体である請求項 1、2、3 および 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

多糖化合物が細菌多糖もしくはその誘導体、又はこの種の多糖もしくは誘導体の合成類似体である請求項 4 および 6 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 9】

多糖が、多糖 1 分子あたり 20 以上の相互に連結したシアル酸残基を有している請求項 1、2、3、5 および 7 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 10】

20

多糖が、多糖 1 分子あたり 20 以上の相互に連結したシアル酸残基を有している請求項 4、6 および 8 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 11】

多糖が末端ガラクトース、フコース及びマンノース単位を実質的に含んでいない請求項 1、2、3、5、7 および 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

多糖が末端ガラクトース、フコース及びマンノース単位を実質的に含んでいない請求項 4、6、8 および 10 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 13】

多糖が α -2 $\rightarrow$ 8 結合によって相互に連結しているシアル酸単位を含む請求項 1、2、3、5、7、9 および 11 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 14】

多糖が α -2 $\rightarrow$ 8 結合によって相互に連結しているシアル酸単位を含む請求項 4、6、8、10 および 12 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 15】

多糖化合物が、*N. meningitidis*、大腸菌 K1、*Moraxella nonliquifaciens* 及び *Pasteurella aeruginosis* のグループ B 多糖、*N. meningitidis* のグループ C、大腸菌 K92 多糖並びに大腸菌 K1 由来のコロミン酸から選択したものである請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 16】

40

多糖化合物が、*N. meningitidis*、大腸菌 K1、*Moraxella nonliquifaciens* 及び *Pasteurella aeruginosis* のグループ B 多糖、*N. meningitidis* のグループ C、大腸菌 K92 多糖並びに大腸菌 K1 由来のコロミン酸から選択したものである請求項 12 に記載のリポソーム。

【請求項 17】

多糖化合物が、脂肪酸鎖を除去するためにアルカリ加水分解にかけた糖脂質の誘導体である請求項 15 に記載の製造方法。

【請求項 18】

多糖化合物が、脂肪酸鎖を除去するためにアルカリ加水分解にかけた糖脂質の誘導体である請求項 16 に記載のリポソーム。

50

【請求項 19】

1 分子当たり 5 以上の相互に連結したシアル酸単位を含む多糖部分が外面に結合しているリポソームであって、薬理学的または診断学的に活性な成分を内包していることを特徴とする前記リポソーム。

【請求項 20】

多糖部分が、リポソームの脂質層中に導入された疎水部分も含む多糖化合物の一部をなしている請求項 19 に記載のリポソーム。

【請求項 21】

多糖化合物が天然の糖脂質であるか、又は天然の脂質基を含む前記糖脂質の誘導体である請求項 20 に記載のリポソーム。

10

【請求項 22】

多糖化合物が、疎水部分が共有結合した天然多糖の誘導体を含む請求項 20 に記載のリポソーム。

【請求項 23】

多糖が α - 2 $\rightarrow$ 8 結合によって相互に連結しているシアル酸単位を含む請求項 20 に記載のリポソーム。

【請求項 24】

リポソーム形成脂質と、多糖 1 分子当たり 5 以上の相互に連結したシアル酸単位を含む多糖成分および疎水部分を有する多糖化合物の混合物からリポソームを製造する方法であって、多糖 - 脂質誘導体をリポソームに導入することを含み、該リポソーム中に薬理学的または診断学的に活性な成分が包含されていることを特徴とする前記方法。

20

【請求項 25】

多糖化合物が天然の糖脂質であるか、又は天然の脂質基を含む前記糖脂質の誘導体である請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

多糖化合物が、疎水部分が共有結合した天然多糖の誘導体を含む請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

多糖化合物が、シアル酸残基の 1 - 位で共有結合により結合した疎水基を含んでいる請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 28】

多糖が α - 2 $\rightarrow$ 8 結合によって相互に連結しているシアル酸単位を含む請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、患者の血液循環 (circulation) における医薬的活性化合物の滞留時間を延ばすために、又は該化合物を患者の体内の特定ターゲットに送るために、多糖又は多糖誘導体を医薬的活性化合物と組み合わせて使用する方法に関する。

循環血液中で高濃度を維持する必要、又は作用部位に直接送る必要のある薬理学的活性物質は極めて多岐に及ぶ。この種の物質には、癌及び抗菌薬療法、酵素もしくはホルモン置換療法及び免疫学で使用する一般的な薬物、ペプチド及びタンパク質、並びにオリゴヌクレオチドなどがある。これらの物質は多くの場合、血液循環中で短い半減期を示し、腎臓を介して速やかに排出されるか、又は細網内皮系 (RES) 及び他の組織に取り込まれる。このような早発の薬物損失を補償するためには、治療を要する部分に十分な量の薬物が集中し得るように、より多量の薬物が必要である。しかしながら、薬物量の増加は費用がかかるばかりでなく、毒性と、「外来タンパク質」に対する免疫応答とを誘起し得る。例えばインターフェロン (IFN - γ) 及びインターロイキン - 2 (IL - 2) のようなサイトカインは、血液循環における滞留時間を延長することができれば、効果が増強され、毒性が低下し、使用量を減らすことができると思われる。

40

最近では組換え DNA 技術の発達によって、広範囲の生物学的活性タンパク質を入手できるようになった。例えば連結遺伝子融合 (ligated gene fusion) 又

50

は部位特異的突然変異誘発による分子リモデリングによって、前述のようなタンパク質に最適活性に適合した特性が付与された事例もあるが、通常は、これらの生成物の効果的な使用は給送システム (delivery system) を介してしか達成され得ない。ターゲットとなる給送システムなしに、又は該システムに関連して、薬物の早発損失を防止するのは望ましいことであろう。

薬物給送システム (drug delivery system = DDS) は、分子又は粒状エンティティであって、該エンティティと組み合わせられた薬物の宿命及び効果を我々に有利なように制御できる任意のエンティティである。DDSは2つの一般的タイプに分類できる。第1のタイプは高分子からなり (MDDS)、例えば抗体、ネオグリコプロテイン並びに合成ポリマー、例えばポリ (ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)、ポリリシン及び重合アルキルシアノアクリレートなどがある。薬物を所望の部位に向けて送るために、モノクロナール抗体を含む種々のタイプの高分子キャリアーに薬物を組み合わせる手法は、例えばGregoriadisによりNature 265, 407-411 (1977) に記述されている。

第2のタイプは粒状DDS (PDDS) であり、例えば、アルブミンのような生分解性物質もしくはデキストラン及びアルキルシアノアクリレートポリマーのような半生分解性物質からなる極小球 (nanosphere) もしくは微小球 (microsphere)、又は非イオン界面活性剤もしくはリポソームで形成された小胞からなる。

薬物はDDSに共有的に結合するか、又はDDS内に受動的に捕捉される。例えば、界面活性剤小胞又はリポソームからなるPDDSは、界面活性剤又は脂質分子の層の適当な組み合わせで形成することによって、親水性又は疎水性の医薬的活性化合物を捕捉し得る。医薬的活性化合物は通常、例えば活性化合物がその機能を実施する前に又は実施した後で、体内で溶解され得る又はされ得ない結合 (bond) によりMDDSに共有的に結合する。リポソームについては、NIPS、4, 146-151 (1989) 及びGregoriadis編 (1988) Wiley "Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress" でGregoriadisが記述している。

MDDSの多くは、標的細胞又は組織によりその表面の受容体を介して認識される能力を本来備えている (例えば抗体) か、又は後で付与されている (例えばネオグリコプロテイン)。この種のDDSは通常、注射後にターゲットによって特異的に取り込まれる。しかしながら、特異的取り込みには制限があり、DDSの大半は (療法に) 関係のない別の組織に取り込まれる。その理由は、抗体及び別のDDSタンパク質が (ターゲットに対する特異性にもかかわらず)、他のタンパク質と同様に、生物学的寿命の最後には異化されなければならないことにある。

タンパク質分子は一定の寿命を有しているのではなく、ランダムに死滅する。従って、タンパク質分子は注射された瞬間から (該分子に組み合わせられた薬物と一緒に) 直線速度で異化され始め、ターゲットと接触して取り込まれることができるのは該分子の一部だけである。

マウス抗体のようなDDSは、別の種に注射した場合には外来である。宿主は次の注射によって、該外来タンパク質に対処するための抗体を産生する。このようなタンパク質は、まだ十分に解明されていないメカニズムによって、最初の注射の後に血液循環から排除される。人造ポリマーのようなDDSはオプソニンによって認識され、細網内皮系 (RES)、特に肝臓及び脾臓マクロファージによって除去される。いずれの場合も、一連の事象は宿主生体タンパク質によるDDS成分の認識及び該成分への結合を含み、通常はこれらの認識及び結合によって開始される。該認識及び/又は結合ステップの崩壊は成分分子の異化作用を妨害する。

高分子タイプのMDDSに使用される合成ポリマーは例えばポリ (ヒドロキシプロピルメタクリルアミド) ポリリシン及び重合アルキルシアノアクリレートである。これらのポリマーはRES系又は別の組織で適当なリゾソーム酵素により異化され得る。このような生分解性高分子タイプDDSの異化速度を、何らかの方法、例えばRESもしくは別の組織

10

20

30

40

50

によるD D Sの取り込みを低下させる方法、又はR E Sに取り込まれた後でリゾソーム酵素による分解を軽減させる方法で低下させるのは望ましいことであろう。

粒状D D S (P D D S) は通常R E Sにより血液循環から排除される。P D D SはR E Sに取り込まれ易いため、該組織に薬物を送るためにしばしば使用される。しかしながら、P D D SをR E Sの組織以外の組織に送ることが望ましいこともしばしばある。そのためには、R E SによるP D D Sの捕捉を防止するか又は遅延させなければならない。

これは、ポリエチレングリコール (P E G) のような、又は商品名P l u r o n i c、T e t r o n i c、P o l o x a m e r及びP o l o x a m i n eで市販されている類いのエチレンジアミンからなるブロックを含む酸化エチレン及び酸化プロピレンのブロックコポリマーのような親水性高分子でP D D Sをコーティングすることによってある程度まで達成された。これらのポリマーは人造である。その使用は、I l l u mによりG B - A - 2 1 8 5 3 9 7に記述されており、I l l u m及びD a v i sによりF E B S L e t t s . (1 9 8 4) 1 6 7, 7 9 ~ 8 2に記述されており、I l l u mらによりL i f e S c i e n c e s (1 9 8 7) 4 0, 3 6 7 - 3 7 4に記述されており、H u n t e r らによりS c a n d . J . I m m u n o l . 2 3, 2 8 7 (1 9 8 6)に記述されており、S e n i o r らによりB i o c h e m . B i o p h y s . A c t a (1 9 9 1) 1 0 6 2, 7 7 - 8 2に記述されており、またW O - A - 9 0 0 4 3 8 4にも記述されている。P E G及び酸化エチレンブロックコポリマーは親水性が高く、この性質のおかげで、(a) P D D Sを早発に取り込む組織による該P D D S (これらのポリマーが結合している) の認識と、(b) 関係のない組織による早発排出もしくは取り込みによって (これらのポリマーが結合している) 薬物、ペプチド及びタンパク質が失われる現象とを防止するか又は遅延させることができる。

A b u c h o w s k i らはJ . B i o l . C h e m . (1 9 7 7) 2 5 2, 3 2 8 2 - 8 6で、2つの分子量 (1 9 0 0 及び5 0 0 0) のP E Gをカタラーゼに共有結合させる方法を開示している。この方法は、該タンパク質の免疫原性を低下させ、マウスの血液循環における該タンパク質の半減期を増加させた。A b u c h o w s k i は、このプロセスが、例えば血液代謝物質を変化させるための、又は蓄積症を治療するための酵素療法の使用を可能にすると示唆している。しかしながら、タンパク質 (及びペプチド等) の半減期は、P G Eが可能にするとと思われる長さよりも更に長くすることが望ましい。

A b u c h o w s k i らは更に、P G Eに代えてデキストラン (多糖) を使用するという発想を捨てたと述べている。デキストランはヒトにおいては免疫原であることが知られているからである。G B - A - 2 1 8 5 3 9 7では、肝臓によるコロイド粒子の取り込みを防止するために、酸化エチレン - 酸化プロピレンブロックコポリマーに代えて、多糖類、キサンタン及びヒアルロン酸を使用し得ることが示唆されている。キサンタンゴムにカルボキシル基が存在していることが所望の効果をj 得る上で有利だと述べられている。多糖類は実際には1つも試験されておらず、多糖類がどのようにしてコロイド粒子表面に結合するのかという情報も全く記述されていない。

S e n i o r ら (前出の文献) 及びW O - A - 9 0 0 4 3 8 4は、モノメトキシポリエチレングリコールをリン脂質に共有結合させることによりリポソームをポリエチレングリコール (P E G) でコーティングする方法を開示している。このコーティングによって、血液からのリポソームのクリアランス時間は3 0 %まで増加し、リポソームは血漿成分をより緩慢に吸収するようになった。これら2つのファクターは、P E Gによって親水性を高められた小胞の表面に起因するものと考えられた。

F E B S L e t t s . (1 9 8 7) 2 8 3, 4 2 - 4 6でA l l e n及びC h o n nは、リポソーム内へのガングリオシド及びその非シアリル (a s i a l y l) 誘導体の導入について記述している。ガングリオシドは、2つの脂肪酸鎖 (主にステアリン酸) と、スフィンゴシンと、ガラクトース及び1つのシアリ酸単位を含む5つの単位を有するオリゴ糖成分とからなるグリコスフィンゴリピドである。ガングリオシドの導入はリポソームの循環時間を延長させ、肝臓と比較した血液中のリポソームの割合を増加させた。これは、R E Sによるリポソームの取り込みが低下したことを意味する。この効果は、非シアリル

10

20

30

40

50

ガングリオシドの場合にはそれほど顕著ではない。文献ではこれを、シアル酸、そして特にリポソーム表面における該酸の負の電荷が、前記効果を与えるのに重要であることを示すものであると解釈している。

“ Medical Application of Liposomes ” (K . Y o g i 編) 1986 の “ Liposomes in Chemotherapy and Immunotherapy ” と称する章の p 121 ~ 129 で Sunamoto は、リポソームを特定の組織及び細胞、特に肺に向けるために、デキストラン、プルラン、アミロペクチン、アミロース及びマンナンを含む種々の多糖類でリポソームをコーティングする方法を記述している。データによれば、該多糖コーティングしたリポソーム内に薬物を封入すると、血流中及び組織中の薬物 (イヌリン) の循環時間が遊離イヌリンの場合よりも長くなる。血流中のコーティングしたリポソーム内の薬物及びコーティングしていないリポソーム内の薬物の安定性及びクリアランスを比較するためのデータは示されていない。また、リポソームからの薬物の漏洩に関するデータもない。これらの事実は多糖コーティングの効果に関する結論の有効性に疑問を投じるものである。しかしながら、この文章からは、多糖コーティングすることによりリポソームを肺又は他の組織にめがけて送ると、リポソームの循環時間が減少するであろうことは予測される。別の研究者は、リポソームをターゲットに送るための糖タンパク質及び糖脂質の使用を記述している。これについては、例えば前出の G r e g o r i a d i s の文献、1989、1988及び1987を参照されたい。

J e n n i n g s 及び L u g o w s k i は J . I m m u n o l o g y (1981) 127 , 1011 - 1018 で、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s のワクチンを製造すべく多糖の免疫原性を増加させるために、髄膜炎菌グループ A、B 及び C 多糖類を破傷風トキソイドに結合する方法を開示している。グループ B 多糖の免疫原性は有意には増加しなかったが、結合体は破傷風トキソイドに対する抗体を依然として産生させた。本発明では、多糖成分が1分子当たり5つ以上のシアル酸単位を含む多糖化合物を、活性成分を含む医薬組成物の製造で使用する新規の方法を提供する。この使用法は、患者の血液循環における活性成分の有効時間 (a v a i l a b i l i t y) を延長させ、活性成分の免疫原性を低下させ、及び / 又は活性成分の i n v i v o 安定性を増加させるのに十分な量の多糖を前記組成物中に含ませることからなる。

本発明では、多糖成分が1分子当たり5つ以上のシアル酸単位を含む多糖化合物を、患者の血液循環における活性成分の有効時間を延長させ、活性成分の免疫原性を低下させ、及び / 又は活性成分の i n v i v o 安定性を増加させるのに十分な量で活性成分と組み合わせ含む新規の医薬組成物も提供する。

本発明は更に別のアспектとして、患者の血液循環における活性成分の有効時間を延長させ、活性成分の免疫原性を低下させ、及び / 又は活性成分の i n v i v o 安定性を増加させるために、多糖成分が1分子当たり5つ以上のシアル酸単位を含む多糖化合物の新規の使用も提供する。

本発明では、患者の血液循環における活性成分の有効時間の延長を、そのままでは薬物又は薬物複合体を取り込むであろう組織によって医薬的活性成分又は該成分を含む複合体が認識されるのを防止もしくは遅延するか、又は特異的認識以外の方法で療法上無関係の組織により早発に排出されもしくは取り込まれるために生じる医薬成分の損失を防止もしくは遅延させることにより達成し得る。これらの効果は、活性成分の安定性も増加させる。前記多糖化合物は更に、又はあるいは、そのままでは医薬的活性成分もしくは該成分を含む複合体によって誘起されるであろう免疫応答を、免疫応答の初期認識段階を妨害することによって抑制する。本発明は主に非経口投与用医薬組成物で有用である。

本発明では、多糖化合物は天然多糖、天然多糖の誘導体、例えば糖残基上の1つ以上の活性基の反応によって誘導体化した多糖、又は多糖鎖のいずれかの末端もしくは該鎖沿いの中途にある活性基により誘導体化用の基 (d e r i v a t i s i n g g r o u p) に共有的に結合した多糖であり得、あるいは天然の多糖誘導体、例えば結合したリン脂質もしくはタンパク質を含むもの、又は天然の多糖誘導体の誘導体、例えば加水分解もしくは他

10

20

30

40

50

の化学反応による誘導体のような化学的に誘導体化した化合物であり得る。該化合物の多糖部分はポリマー鎖中に5つ以上、好ましくは10以上、より好ましくは少なくとも20又は50のシアル酸残基を有する。入手が容易な多糖化合物はポリマー鎖中に合計500までの糖残基を有し得るが、通常は300以下の残基を有する。該化合物の糖残基は、その大部分又は全てがシアル酸残基であるのが好ましい。

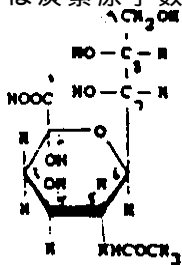
該多糖化合物では、少なくともポリシアル酸部分が、そして好ましくは化合物全体が、高親水性である。親水性が高いと、多糖化合物が組織によって認識され又は取り込まれる可能性、及び異化される可能性が低下すると考えられる。該多糖の親水性は主にシアル酸単位のカルボキシル側基とヒドロキシル基とによって与えられる。糖単位上には、アミン、ヒドロキシル又はスルフェート基のような別の糖単位上の基を含む別の基、又はこれらの基の組み合わせを存在させ得る。これらの基は天然の多糖化合物中に存在するものであり得、又は(それほど好ましくはないが)存在する天然の基の化学反応によって導入し得る。該多糖は、血液循環に存在する条件下で、即ち注射された時に、負の電荷を有するのが好ましい。該多糖は幾つかの異なる糖の単位を含み得る。

本発明で特に有用な多糖化合物は細菌によって産生された多糖化合物である。該天然化合物は多くの場合糖脂質である。即ち、リン酸エステル結合を介してリン脂質に結合された多糖成分を含む化合物である。本発明ではこの種の糖脂質を天然の形態で使用し得るが、脂肪酸鎖を加水分解によって多糖から除去した誘導体为好ましいこともある。

シアル酸多糖類はT細胞から独立した抗原(T-cell independent antigen)であり得るため、(注射すると)B細胞を直接活性化して主にIgM抗体を産生する。これらの抗体は数日しか生存せず、従って該多糖類は免疫原性が低い。これは、該多糖類を本発明で使用する上で有利なことである。

前記多糖化合物は末端ガラクトース単位を実質的に含んでいないのが好ましい。該単位は肝細胞及びKupffer細胞上のガラクトース受容体によって認識され得るため、血液循環から更に早くクリアされ得るからである。

シアル酸(ノヌロソン酸(nonulosonic acid))としても知られている)は炭素原子数9以上のアミノ含有糖類の一種である。最も重要なシアル酸は、下記の式



で示されるN-アセチルノイラミン酸(5-(アセチルアミノ)-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-ノヌロソニック、ラクタミン酸及びO-シアル酸としても知られている)である。

ポリシアル酸は、通常 α 配置で、2 $\rightarrow$ 8及び/又は2 $\rightarrow$ 9結合し得る。

ポリシアル酸は通常非毒性であり、実質的に非免疫原性である。また、生分解単位であるシアル酸は毒性であるとは知れていない。実際、シアル酸は血液細胞を含む動物の細胞に広く存在している。

多数のシアル酸単位を含む多糖化合物は、大腸菌(E-coli)、Moraxella nonliquifaciens、Pasteurella aeruginosa及びNeisseria meningitidisによって産生される多糖類又はその誘導体である。例えば、大腸菌K1から(鎖長を短縮するための加水分解によって)誘導されたコロミン酸は2 $\rightarrow$ 8 α 結合シアル酸単位を含み、平均鎖長が約16単位である。大腸菌K92株由来の多糖は2 $\rightarrow$ 8結合シアル酸単位及び $\rightarrow$ 9結合シアル酸単位を交互に含み、平均鎖長が約78単位である。N.meningitidisグループCの多糖Cは2 $\rightarrow$ 9結合シアル酸単位を含み、平均鎖長が約361単位である。最後に挙げた化合物を脱アセチル化したものは、平均鎖長が約172単位である。

10

20

30

40

50

本発明で特に有用であることが判明した多糖化合物グループの1つは、グループB多糖類である。これらの化合物は*Neisseria meningitidis*、*Moraxella nonliquifaciens*、*Pasteurella aeruginosa* A2及び大腸菌K1によって産生される。これらの化合物は、シアル酸残基を含む多糖成分と、リン脂質成分とを含んでいる。シアル酸残基は(2→8)- α 結合されており、天然ポリマーは約200の残基を有する。該糖脂質は、多糖成分の還元末端(reducing end)にリン脂質が共有結合していると思われる。

多糖化合物の由来源たる細菌は、製造時の便宜上、非病原体であるのが好ましい。従って多糖は、大腸菌の非病原株、例えば大腸菌K92から誘導するのが特に適当である。大腸菌K92単離体はよく知られており、この種の任意の株の任意のタイプを適当な多糖の由来源として使用することができる。

10

糖脂質である多糖化合物は、天然の糖脂質の形態又は誘導体として使用し得る。特に適当な誘導体は、加水分解によって脂肪酸鎖をグリセロホスフェート基から除去し、ポリシアル酸グリセロホスフェートエステルを残すようにしたものである。加水分解は通常、穏やかなアルカリで処理することによって行う。この処理は、糖脂質分子が凝集するのを防止する。この処理を行わないと、分子の脂肪酸鎖間の疎水性相互作用によって水性媒質中で前記凝集が生起する。*N. meningitidis*多糖Bの脱凝集(deaggregation)方法は、Lifelyらにより、Poolmanら編“*Gonococci and Meningococci*”(1988)pp147~152に記述されている。

20

天然多糖類は、例えばLifelyらにより*Carbohydrate Res*(1986)156、p123に記述されているように、鎖長を短くするために加水分解し得る。加水分解反応の条件(例えば時間及び温度)は、選択した平均分子量の生成物が得られるように選択し得る。

前述の多糖類は更に、シアル酸単位5-N-アセチル基の一部又は全部をN-脱アセチル化することによって誘導体化し得る。その結果得られた5-アミン基は、例えば、アミノ酸、ペプチドもしくは脂肪酸を含む酢酸以外の酸による部分的N-再アセチル化、N-アシル化等により更に誘導体化し得る。

多糖類の別の誘導体化方法の1つでは、ポリシアル酸鎖の非還元末端でアルデヒド基を形成する過ヨウ素酸ナトリウムでの酸化を行う。このようにすれば、薬物のアミノ基(例えばタンパク質側鎖又は末端基)との間でシッフ塩基反応が生じ得る。

30

これらのシアル酸含有多糖化合物を患者の血流中に投与すると、一部分が血流から迅速に取り込まれ、残りが通常は一定の速度で排除されることが判明した。初期の急速な取り込みステップの後の化合物の半減期は、本発明における多糖化合物が、活性成分の循環時間及び/又は安定性の増加、及び/又は活性成分の免疫原性の低下に適しているかどうかを示す良き指標であり、この半減期が長い化合物が特に適当な化合物ということになる。また、最初の急速なステップで排除される化合物の割合は、潜在的有用性の指標であり、有用な化合物は、最初のステップで血液循環から排除される化合物の割合が皆無であるか又は僅かではない化合物である。

本発明で使用する多糖化合物は、静脈内投与後に、例えば注射してから約5分以内に血液循環から排除される割合が約50%以下、好ましくは約25%以下、より好ましくは約20%以下であるのが好ましい。適当な多糖化合物は、最適効果を得るために、急速排除段階後の(当該組成物で処理した動物内での)半減期が10時間以上、好ましくは20時間以上、例えば30時間以上であるのが好ましい。多糖のシアル酸単位数と該化合物の急速排除及び半減期との間には相関関係があり、平均単位数が約20以上、より好ましくは50以上、更に好ましくは100以上の化合物は特に良好な特性を示すことが判明した。従って、最大限の鎖長のポリシアル酸化合物を使用するのが好ましいことになるが、用途によっては、例えばリポソームのコーティングを行うか又はタンパク質と結合させるために、天然の多糖化合物を加水分解して鎖長を短縮するのが有利なこともある。

40

本発明では、医薬的活性化合物を多糖化合物に直接共有結合させ得る。活性化合物は化学

50

量論量で多糖化合物に結合させ得る。即ち、1つの活性成分分子を1つの多糖化合物分子に結合し得る。あるいは、2つ以上の活性成分分子を1つの多糖化合物分子に結合させるか、又は2つ以上の多糖化合物分子を1つの活性成分分子に結合させるのが適当なこともある。

共有結合は例えば、一方の分子上のカルボキシル基と他方の分子上のアミン基との間のペプチド結合によって行い得、又は一方の化合物のカルボキシル基と他方の化合物のヒドロキシル基との間のエステル結合を介して行い得る。結合は場合によっては、体内、例えば活性成分が効果を示す組織内で溶解できるものであり得る。しかしながら、このような溶解は不要なことが多い。多糖は活性成分の活性に有意な影響を及ぼすとは限らないからである。活性成分を多糖化合物に共有結合させ得る別の結合としては、一方の化合物のアミ

10

ノ基と他方の化合物のアルデヒド基との間でシッフ塩基を介して行われるものがある。医薬的活性化合物は、例えば、過ヨウ素酸塩酸化によりポリマーの非還元末端に形成されたアルデヒド基と、該アルデヒド基と反応する活性成分上の遊離アミノ基との間でシッフ塩基を形成することにより、シアル酸含有多糖又はその誘導体に共有結合できる。あるいは、医薬的活性化合物上の遊離アミノ基をシアル酸残基の1-カルボキシル基と反応させてペプチジル結合を形成してもよい。あるいは、1-カルボン酸基と活性成分上のヒドロキシル基又は別の適当な活性基との間でエステル結合を形成することもできる。あるいは、医薬的活性化合物上のカルボキシル基が脱アセチル化5-アミノ基との間でペプチド結合を形成し得る。あるいは、医薬的活性化合物の分子のアルデヒド基がシアル酸残基のN-脱アセチル化5-アミノ基との間でシッフ塩基を形成し得る。例えばアミン基とチオール

20

基とを結合するために、又は2つのヒドロキシル基を結合するために、二官能価結合化合物を使用してもよい。多糖化合物は非共有的に医薬的活性化合物と組み合わせることもできる。例えば、多糖化合物と医薬的活性化合物とを、例えば多糖化合物の脂質成分を介する疎水性医薬的活性化合物との疎水性相互作用によって結合し得る。別の非共有的結合は、逆の電荷のイオンが誘引し合う静電相互作用を介して実施し得る。例えば、正の電荷の活性成分、例えば第4アンモニウムイオンを有する成分を、多糖のカルボキシレート基とイオン結合させ得る。多糖Bのカルボキシレート基にイオン結合した抗生物質ドキソルピシンはその一例である。

本発明の別の実施態様では、薬物給送システムを介して多糖化合物を医薬的活性化合物と相互作用させ得る。例えば、前述したようなDDSの一般的な分子又は粒状成分の認識及び取り込みを操作することによって血液循環における活性成分の有効時間を操作するために、多糖化合物を使用し得る。この実施態様では、多糖化合物を薬物給送システムの粒状又は分子エンティティに共有的に結合するか又は非共有的に組み合わせ得る。例えば、多糖化合物は前述のポリエチレングリコール及び/又はPluronicコポリマータイプの材料の作用と類似の作用を示し得る。

30

多糖化合物とリポソームとの間の共有的相互作用 (covalent interaction) の具体例としては、リン脂質のグリセロホスフェート頭 (head) 基の間のリン酸エステル結合を介するものが挙げられる。該共有結合は、リン脂質の小胞形成の前又は後に形成され得る。あるいは、シアル酸の1-カルボン酸基、多糖のヒドロキシル基、又は脱アセチル化によって生成されたアミン基と、疎水性鎖を含む分子上の反応基との間の相互作用を介して、多糖を脂質成分に結合することもできる。例えば、疎水性分子は、自己のアミン基に対して共有結合が形成され得る脂質、特にホスファチジルエタノールアミン誘導体であり得る。また、非イオン合成界面活性剤小胞と多糖化合物との間の共有的相互作用は、小胞の形成の前又は後に形成された分子の疎水性部分へのエステル、アミド又はエーテル結合を介して生じ得る。

40

多糖化合物はPDD成分に非共有的に結合することもできる。非共有的結合は例えば、PDD成分の疎水性部分と、疎水性基 (例えば糖脂質) を含む多糖化合物又は疎水性基に共有結合した多糖化合物との間の水素結合相互作用 (hydrogen bonding interaction) であり得る。前述のような多糖化合物の疎水性誘導体は

50

、多糖化合物のシアル酸残基の1-カルボン酸基、多糖化合物のヒドロキシル基、又は多糖分子のアルデヒド誘導体を、例えばヒドロキシル基、カルボン酸基、ハロゲン原子又はアミン基と反応させることによって生成し得る。例えば、糖脂質化合物をリボソーム又は界面活性剤小胞のシェル内に導入して、その脂肪酸疎水性鎖部分を脂質又は界面活性剤の疎水性部分と相互作用させ得る。例えば多糖B、K92は、このような用途で使用するのに適している。糖脂質は、小胞の形成中に、又は小胞の形成後に、糖脂質と予形成したリボソームとの平衡化によって、界面活性剤又はリン脂質と共有的に組み合わせる。

DDSが、抗体、ネオグリコプロテイン又は合成ポリマーのような高分子成分を含んでいる場合は、多糖化合物を該高分子成分と共有的又は非共有的に結合し得る。共有結合は、医薬的活性化合物と多糖化合物との間の結合に関して上述したタイプのエステル、ペプチド又は他の結合を介して行い得、最も有利には、高分子のペプチド部分上のカルボキシル基又はアミン基との間のペプチド結合を介して行う。

多糖類と別の化合物、例えばタンパク質、ペプチド又は脂質との間の共有結合を形成する方法は多くの実施例が知られており、先に示唆した共有結合を達成するのに使用できる。

例えば還元糖は、Gray G., Arch. Biochem. Biophys. 163, 426 (1974)に記載のような反応性アミン化処理を行い、次いで、Borch R. F.らがJ. Am. Chem. Soc. 93, 2897 (1971)に記載しているようなシアノヒドリドボレートアニオンによるエナミン中間体の選択的還元を行って第二アミンを生成することにより、アミン基、例えばペプチドのN末端のアミン基、リシン含有ペプチドの側鎖のアミン基、又は脂質のエタノールアミン基のアミン基に結合し得る。

シアル酸残基を含む非還元糖はまず、Jennings H. J.らがJ. Immunol. 127, 1011 (1981)に記述しているように、過ヨウ素酸塩を用いる選択的酸化により誘導体化してアルデヒド基を形成し、その後反応アミン化処理で結合し得る。

FEBS Letts. 202, 86 (1986)に記載のWeissig V.らの方法に基づいて、糖単位のカルボン酸基、例えばシアル酸を、カルボジイミドの存在下で、アミン基、例えばペプチドのN末端のアミン基又はリシン残基の側鎖のアミン基に結合する反応方法もある。勿論この方法は、シアル酸単位の5-脱アセチル化アミン基を例えばタンパク質側鎖又はC末端のカルボン酸基に結合するためにも使用し得る。

別の反応方法では、例えば、カルボン酸基に反応させたパラ-フェニレンジアミンを用いて多糖中に導入した芳香族アミン基をジアゾ化し、次いで、Biochem. Biophys. Acta. 722, 288 (1984)に記載のSynder S. L.らによって開発された方法をBBA 1003, 58 (1989)に記載のようにSeniorらが改変した方法と類似の方法で、タンパク質のフェニルアラニン又はチロシン残基の側鎖と反応させる。

多糖化合物上の遊離ヒドロキシル基は、例えば二塩基酸又は酸誘導体を用いるエステル化により、タンパク質又は脂質上の遊離ヒドロキシル基又はチオール基に結合し得る。

炭水化物部分に結合すべき化合物がイソチオシアネート基を含んでいる(又は、イソチオシアネート基を含むように、例えばアリール基を介して誘導体化できる)場合は、Carbohydrate Res. (1973) 30, 375-378に記載のBelderらの方法に従い、例えばジブチルスズジラウレートで促進させたメチルスルホキシド中での反応により、前記化合物を多糖の遊離ヒドロキシル基に結合し得る。生成物はチオカルバモイル誘導体である。例えばフルオレセイニソチオシアネートを反応させてO-(フルオレセイニルチオカルバモイル)シアル酸誘導体を生成し得る。

シアル酸含有多糖の別の反応では、遊離アミン基を露出するために、部分的脱アセチル化、即ちN-アセチル基の一部の除去を行い、次いでこれらのアミン基を前述のように共有結合反応によって反応させる。この予備の脱アセチル化によって可能になる更に別の反応は、ヘテロ二官能価反応体、例えばヨード酢酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-スクシンイミジル-4-(2-プロモアセチルアミノ)ベンゾエート、又はN-スクシイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートとの反応であり、これに次いで、ペプチド又はタンパク質のチオール基への結合が行われる。この方法は、Wolf

10

20

30

40

50

及びGregoriadisによりBiochim. Biophys. Acta (1984) 802, 259-273に記載されていると共に、BarbetらによりJ. Supramol. Struct. Cell. Biochem. (1981) 16, 243-258に記述されている。

多糖化合物をリポソームのコーティングに使用する場合は、例えばアンカー付き (anchored) 多糖化合物、即ち疎水性アンカー部分を備えた多糖化合物をリポソーム形成脂質と混合することによって、リポソームの形成時に該化合物を導入し得る。多糖化合物は、リポソーム表面上の活性基、例えばアミン基、芳香族アミン基、カルボン酸基又は誘導体、例えば酸塩化物基との反応によって、予形成したリポソームの表面に後で反応させる (post react) こともできる。例えば、Weissig V. ら (前出の文献) は、ホスファチジルエタノールアミンのN-グルタリル誘導体であるアンカーを記述している。カルボン酸基は、カルボジイミドの存在下で、多糖化合物上のアミン基、例えば脱アセチル化又は部分的脱アセチル化ポリシアル酸化合物のアミン基と反応させ得る。あるいは、パルミトイル又は別の脂肪酸塩化物を用いて多糖化合物上のアミン基と反応させることもできる。シアル酸残基の1-カルボン酸基は、カルボン酸ナトリウム塩のクラウンエーテルを形成し次いでハロ炭化水素と反応させることにより、ヒドロカルビル-ハロゲン原子を有する疎水性基含有化合物とのエステル結合を形成するのに使用できる。リポソーム及び脂質へのタンパク質結合方法であって、リポソーム及び脂質への多糖の結合に容易に適用できる他の多くの方法がGregoriadis G. 編 "Liposomes as drug carriers" John Wiley & Sons (1988)、Heath T. ら Chem. Phys. Lipids 40, 347 (1986) 及びMachy, P. ら、"Liposome in Cell Biology and Pharmacology", Les Editions Inserms, Paris (1987) に記述されており検討されている。

本発明は更に別のアспектとして、1分子当たり5つ以上のシアル酸単位を含む多糖部分が外表面に結合している新規のリポソームを提供する。該リポソームは、療法又は診断による処理方法で使用し得る。

本発明は更に別のアспектとして、リポソーム形成脂質の混合物と、1分子当たり5つ以上のシアル酸単位を有する多糖成分を含むと共に疎水性部分を含む多糖化合物とから、リポソームを製造するための新規の方法も提供する。

本発明のこれらのアспектでは、多糖を前述の方法のいずれかをを用いてリポソーム内に導入し得る。リポソームの形成に使用する多糖化合物が天然の糖脂質以外のものである場合は、その化合物が、例えば1-位置又は窒素原子を介して多糖成分のシアル酸単位に共有結合した疎水性部分を有するのが好ましい。1-位置を介する結合は例えばエステル結合を含み得る。この種の多糖化合物は新規であると考えられ、本発明の別のアспектを構成する。

1-位置のエステル結合は、1分子当たり5つ以上のシアル酸残基を含む多糖部分を有するアルカリ金属又はアンモニウム塩形態の化合物にクラウンエーテルを反応させる第1ステップと、第1ステップの生成物を式 $X-R^1$ [R^1 は任意に置換した C_{8-30} -アルキル又は-アルケニル基であり、Xはハロゲン原子である] の化合物と反応させる第2ステップとを含む新規の方法によって形成し得る。該反応の第1ステップは、18-クラウン-6のようなクラウンエーテルの存在下で、水溶液、例えば、多糖のナトリウム塩 (即ちシアル酸のカルボキシル基のナトリウム塩) の水溶液中で実施し得る。反応後は、例えば室温で反応が完了するまで (例えば数分~数時間、例えば5分~5時間)、例えば蒸発により、又は好ましくは凍結乾燥により、水を除去する。次いでクラウンエーテルを、例えば有機溶媒、有利にはジメチルホルムアミドに再溶解し、その後ハロ炭化水素又は置換化合物を加え、反応が生起するまで高温又は好ましくは室温で例えば数時間又は数日、例えば5時間~5日間攪拌する。化合物 $X-R^1$ のアルキル又はアルケニル基は、任意にアルキル基もしくはアルケニル基のような置換基を含んでいてよい通常 C_{12-24} 、好ましくは C_{14-22} のアルキル又はアルケニル、アルキル又はアルケニル基が6~30個の炭素原子を有する

10

20

30

40

50

アルカノイルオキシ又はアルキルカルボキサミドである。

本発明の広いアспектでは、多糖が共有結合を介して活性成分の分子に直接結合されるが、その場合は、例えば活性化合物が小分子又は比較的短いポリペプチドであれば、活性成分の各分子に単一の分子を結合し得る。単一の多糖分子を結合する場合は、該分子が50以上のシアル酸単位、好ましくは約100以上のシアル酸単位で形成されていると特に有効である。多糖を、DDSを介して活性成分に結合するか、又は共有結合を介して比較的大きい分子、例えばタンパク質もしくはポリペプチドである活性成分に直接結合する場合は、1つ以上の多糖分子を、それぞれの場合に応じて、DDS単位又は各活性成分分子に組み合わせると有利であり得る。多糖のシアル酸単位数が比較的少ない場合、例えば50単位以下又は20単位以下の場合は、各DDS単位又は活性成分分子に複数の分子を組み合わせるのが好ましい。通常は、シアル酸単位数を比較的多く有する、例えば50以上又は約100以上有する複数の分子を各DDS単位又は活性成分分子と組み合わせるのが好ましい。各DDS単位又は活性成分分子と組み合わせられるシアル酸単位の総数は、活性成分に付与される総親水性に影響を及ぼす。比較的高い分子量の多糖分子を使用すると、活性成分又はDDSからより離れた地点に立体効果(steric effect)が得られる。これは、活性成分の血液循環における半減期及び安定性を増加させ、免疫原性を低下させると考えられる。高分子量多糖化合物を使用する場合は、特に活性成分が比較的低い分子量を有する時、例えばペプチドである時は、1つ以上の活性成分分子を各多糖化合物分子と組み合わせ得る。

本発明は、医薬的活性化合物が患者の血液循環中で長時間にわたって効果を示す必要がある場合に特に有用である。本発明は、組換えDNA技術によって形成されたタンパク質であって、自己の医薬的活性が発揮されない組織に急速に取り込まれる傾向のあるタンパク質を含む医薬的活性成分にとって特に有用である。本発明によって血液循環における有効時間が延長されるような医薬的活性化合物は、インターロイキン、例えばIL-2, IL-6又はIL-1インターフェロン、腫瘍壊死因子(TNF)、並びに例えばAbuchowski(前出の文献)によって記述されているような酵素療法で使用される酵素等である。本発明で有利に使用し得る別の化合物類は、血流中の細胞上に存在する特定の受容体との相互作用に関してHIVのようなウイルスと競合する化合物である。本発明で使用し得る活性化合物の1つは、臨床検査で利用できる蛍光物質である。例えば、フルオレセイン誘導体は多糖化合物に直接結合するか、又は多糖化合物でコーティングしたリポソーム内に導入し得る。リポソーム又は他のDDS内に通常導入するのに有用な活性成分としては、細胞成長抑制剤、サイトカイン、抗生物質、ヘモグロビン、酵素、ホルモン、ステロイド等が挙げられる。

以下の実施例は、全ての哺乳動物のモデルとして使用したマウスにおける活性成分のモデルとして使用した分子の循環時間の増加を明らかにするものである。活性成分を多糖化合物と組み合わせヒトに投与した場合にも同様の効果が観察されると予想される。

実施例

多糖化合物

グループB多糖

N. meningitidisのグループB多糖は、約200残基(シアル酸単位)の鎖長を有する(2→8)α-結合シアル酸残基と、当該ポリマーの還元末端のリン脂質末端単位とからなるポリマーである。該多糖は細菌Neisseria meningitidisの細胞壁から抽出される。該ポリマーは水溶液中で凝集する(凝集形態又は完全(intact)形態)。溶液を0.1M NaOHで37℃で4時間処理するとリン脂質のアシル鎖が除去され、ポリマー鎖は脱凝集(deaggregate)される。

大腸菌K1由来の多糖Bは約190個のシアル酸単位を有する2→8結合したシアル酸のホモポリマーである。大腸菌K1は僅かな病原性を有する。以下の実施例では大腸菌K1を「K1」と称する。

多糖Bは、100、pH7.0で1~9時間処理すると自己加水分解して、おそらく80単位未満の鎖長を有する低分子量ポリマーを形成する。以下の実施例では該多糖を「低

10

20

30

40

50

分子量 (mw) 多糖」と称する。

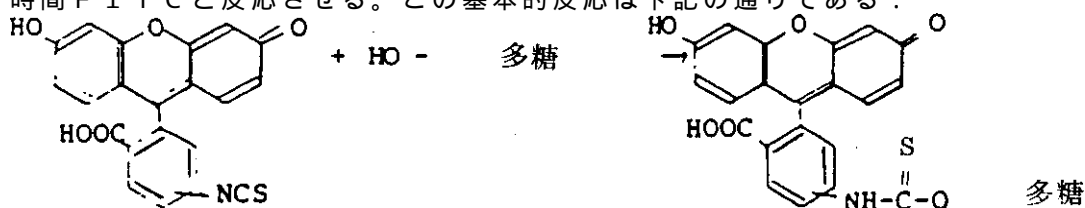
大腸菌 K 1 由来の多糖 B は、鎖長を更に短くして平均鎖長約 15 ~ 30 単位のコロミン酸として知られている生成物を形成すべく加水分解し得る。コロミン酸は市販されている。以下の実施例で使用するコロミン酸は Sigma Chemical Co. から入手したものである。

大腸菌 K 92 由来の多糖 K 92 は、多糖部分がシアル酸 2 → 8 結合及び 2 → 9 結合を交互に有する鎖長約 80 ~ 100 単位の水ポリマーからなる糖脂質である。以下の実施例では該多糖を「K 92」と称する。大腸菌 K 92 は実質的に非病原性である。リン脂質部分は N. meningitidis 多糖 B の場合と同様に加水分解によって除去し得る。

Neisseria meningitidis グループ C 由来の多糖 C は、2 → 9 結合したシアル酸単位の水ポリマーであり、鎖長は約 120 単位である。該多糖は糖脂質であり、リン脂質部分は N. meningitidis 多糖 B の場合と同様に除去し得る。

フルオレセイン結合 (fluorescein conjugation)

フルオレセインは臨床検査用の物質として使用され、そのまま、例えば in vivo の透過性及び微小循環を検査するための医薬化合物である。以下の実験の一部では、(マウスの) 血液循環からのフルオレセインのクリアランス速度に対する多糖結合の効果を調べるためにフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を使用する。フルオレセインは良く知られている方法で¹²⁵I を用いて放射性標識することができる。このようにすれば、¹²⁵I 放射性標識の存在を検出することによって、「ホット (hot)」フルオレセイン¹²⁵I をアッセイすることができる。FITC は、多糖のテトラブチルアミノ塩を形成することによってポリシアル酸多糖化合物に結合する。次いで、最初に A. N. de Belder らにより Carbohydrate Res. 30, 375 (1973) に記述された方法を用いて、前記塩を DMSO / ピリジン溶液中で撹拌しながら室温で 24 時間 FITC と反応させる。この基本的反応は下記の通りである：



透析によって非結合 FITC を抽出し、次いでエタノールで結合体を沈降させ、ゲル濾過にかけ、最後に再びエタノール中で生成物を沈降させることによって、0.93 nmol の FITC / 50,000 ダルトンの B 多糖を含む結合体を回収する。この結合後に¹²⁵I 標識を行う。

当業者には公知のように、非結合フルオレセインは約 5 分以内に血液循環から実質的にクリアされる。

ポリシアル酸のアッセイ

血液試料中でグループ B 多糖 (PSB) を含むポリシアル酸をアッセイするために、血漿試料をまずトリクロロ酢酸 (最終濃度 10%) で処理して血清タンパク質を沈降させる。該タンパク質の多くは、シアル酸を該タンパク質の末端基として含む。処理した血清を、Biochim. Biophys. Acta, vol. 24, 604 ~ 611 ページ (1957) に記載の Svennerholm の方法を少し改変したのを用いてアッセイする。このアッセイは、ポリマーシアル酸又は別のシアル酸を次のように測定するものである：多糖含有試料 (0.5 ml) を Resorcinol 試薬 (0.5 ml) と混合し、激しく沸騰している水中で 30 分間加熱する。試料を冷却し、そのまま 570 nm で読み取るか、又は色をアミルアルコール (1 ml) で抽出して 590 nm で読み取る。既知量の適当な多糖を血清に加え、さもなければ前述のように血清タンパク質を沈降させるために血清を同様の方法で処理し、これを前述の比色方法で分析することによって標準曲線を作成した。

実施例 1

静脈注射後の多糖 B の半減期

体重 25 ~ 30 g の T . O . 異系交配マウスに、凝集又は脱凝集状態の N . m e n i n g i t i d i s グループ B 多糖を 1 . 4 ~ 2 . 8 m g 含む pH 7 . 4 のリン酸塩緩衝食塩水を 0 . 2 m l 静脈（尾の静脈）注射した。注射の直前と、注射後に時間間隔をおいて動物の尾の静脈から血液を採取し、血清試料をグループ B 多糖についてアッセイした。該アッセイは、血清タンパク質の沈降後に比色法によってシアル酸を測定するものである。前記タンパク質の多くはシアル酸も含んでおり、さもなければ該方法を妨害する。血清中のグループ B 多糖の値を対数グラフにプロットし、凝集又は脱凝集状態で注射したポリマーの半減期を算出した。結果を下記の表 1 及び第 1 図のグラフに示す。

表 1

注射後の時間	脱アシル化多糖 (注射量%) *	完全多糖 (注射量%) *
2-4 分	90.0, 88.5, 87.1, 84.5, 81.02	40.0, 45.5, 48.0, 51.1, 57.8
2.5 時間	81.0, 79.5, 82.3, 84.1	40.5, 42.6, 44.5, 46.1, 47.4
5.0 時間	81.0, 79.1, 76.0, 76.5, 73.0	37.4, 38.8, 39.2, 41.0, 42.3
10.0 時間	70.1, 67.2, 71.5, 72.2, 75.0	31.2, 32.6, 34.6, 35.5, 36.1
30.0 時間	45.0, 43.2, 44.1, 47.5, 49.0	15.5, 16.3, 16.9, 17.8, 19.5
54.0 時間	23.5, 25.0, 26.4, 27.5, 29.3	6.3, 6.6, 7.4, 7.9, 8.3
85.0 時間	10.5, 11.1, 12.1, 13.7, 15.5	2.3, 2.4, 2.4, 3.1, 3.3

* 5 つの個別の実験で、T . O . マウスのペアに、それぞれ完全な又は脱アシル化した P S B を 1 . 4 ~ 2 . 8 m g 含む P B S 中 1 % N a C l を 0 . 2 m l 静脈注射した。時間間隔をおいてマウスの尾の静脈から採血し、血漿を多糖 B のアッセイにかけた。結果はマウス血液総量当たりの注射物質量の % で表す。表 1 に数値で示した結果は、注射後 2 ~ 4 分以内では、注射した多糖の 40 . 0 ~ 57 . 8 % が血液循環中に残留している、即ち凝集多糖の注射量の 42 . 2 ~ 60 % が注射後 2 ~ 4 分以内に血液循環から排除されることを示している。その後、排除速度は低下し、約 20 時間の半減期を示している。初期の急速な多糖排除の原因は、多糖が凝集状態を有しているため、形成された粒子が最初の通過（p a s s a g e）時に肺又は R E S に捕捉されることにあると思われる。これに対し、注射後最初の 2 ~ 4 分の間に組織によって排除された脱凝集多糖は 10 ~ 19 % にすぎない。注射量の残りは約 30 時間の半減期でゆっくりと排除された。

脱凝集状グループ B 多糖の注射量の殆ど全部が長い半減期（30 時間）と直線的な血液循環からのクリアランス速度（対数スケールで）とを示したという事実は、該（脱凝集形態の）ポリマーが、該ポリマーに共有的に結合した薬物、ペプチド及びタンパク質の循環時間を延長させるための手段として極めて有望であることを示唆するものである。該ポリマーは、薬物含有又は薬物結合 D D S 又は P D D S の血液循環における半減期を延ばすために、これら D D S 又は P D D S をコーティングする材料としても使用し得る。また、凝集（糖脂質）形態もリン脂質 - 小胞 P D D S の半減期を延ばすのに有用であり得る。

実施例 2

フルオレセインに結合した完全低分子量 P S B の血液循環からのクリアランス：用量の効果

完全「低」分子量多糖 B をフルオレセインと結合し、該フルオレセインを 125 I で放射能標識したものを含むリン酸塩緩衝食塩水（P B S）を T . O . マウスに 0 . 2 ~ 0 . 25 m l 静脈注射した。時間間隔をおいて動物の採血を行い、血漿中の 125 I 放射能を測定した。値は個々の動物から得たものであり、総血液（体重の 7 . 5 % で計算）中の注射物質の放射能の % を表す。用量を記した列は、注射前に混合したコールド（c o l d）（非放

放射性ヨウ素化)及びホット(放射性ヨウ素化)FITC-多糖B結合体の総量を示す。括弧内の数字は前記混合物中の放射性ヨウ素化結合体の量(μg)を表す。

結果を下記の表2及び第2図のグラフに示す。

表 2

用量 μg 合計(ホット)	血液循環における注射量の%				
	2 分	30 分	2時間+30 分	4時間+30 分	23 時間
1528 (28)	50.3	23.7	16.2	15.7	1.5
866 (6)	71.6	37.0	25.5	17.4	2.3
528 (28)	52.0	28.6	16.3	16.3	6.4
511 (11)	60.7	32.4	20.5	14.3	3.8
128 (28)	52.7	26.8	16.3	15.6	6.3
117 (17)	52.0	24.7	22.8	16.3	2.5
28 (28)	65.5	26.4	18.5	13.5	1.2
28 (28)	59.5	28.8	22.4	13.7	1.6

これらの結果は、結合フルオレセインが非結合フルオレセインの既知のクリアランス速度と比べて比較的遅い速度で血液循環からクリアされることを示している。低分子量多糖結合は、注射後30分以内に約70%のFITC結合体を血液循環からクリアさせている。半減期は約6時間であり、用量には依存していない。最後に挙げた事実は、比較的高い用量で投与する必要がある何らかの活性成分について、即ち多糖の用量を多くする場合に、多糖が活性成分の循環時間を延長させる効果を発揮するのを妨害し得る「飽和濃度」が存在しないことを意味する。別の利点は、極めて少量の多糖の使用によって活性成分の循環時間を延ばすことができることにある。また、クリアランス速度がホットFITC対総FITCの比に作用されないため、コールドFITCと異なるであろうホットFITCのクリアランス速度を測定するだけではない。

実施例 3

フルオレセインに結合した脱アシル化低分子量多糖B(N. meningitidis)の血液からのクリアランス：用量の効果

加水分解(脱アシル化)「低」分子量多糖BをFITCに結合しその後FITCを¹²⁵Iで放射能標識したものを含むPBSを、T.O.マウスに0.2~0.25ml静脈注射した。放射性ヨウ素化結合体と混合したFITC-多糖B結合体を用いて、リン脂質のアシル基を除去するための加水分解を行った(37℃、pH8.0で4時間)。

結果を下記の表3及び第3図のグラフに示す。

表 3

用量 (μg)	血液循環における注射量の%				
	2 分	30 分	2時間 30 分	5時間	24 時間
1528 (28)	84.2	70.7	19.0	14.7	1.9
510 (10)	75.6	31.4	18.6	13.0	0.0
102 (2)	75.2	29.8	16.3	11.0	0.0
28 (28)	92.0	39.0	20.8	16.6	1.0

これらの結果は実施例 2 の結果と類似しており、実施例 2 で使用したものと類似しているが加水分解によってリン脂質部分を脱アシル化した該多糖化合物との結合を行った場合には、注射後最初の 30 分程度で 29.3 ~ 70.2 % の FITC 結合体が血液循環からクリアされ、従って半減期は約 5 時間半であることを示している。リン脂質部分の脱アシル化は循環時間の増加に関する限りは多糖化合物の特性に殆ど影響しないと思われる。但し、脱アシル化多糖 (表 3) の対応する時間の濃度がより高い最初の数分間は例外である (表 3)。これはおそらく、天然多糖を加水分解して鎖長を短くすると、多糖分子の僅かな部分だけがリン脂質鎖を結合してもつことになるためである。従って、リン脂質の脱アシル化は少数の分子にしか作用しない。

実施例 4

静脈注射後の血液循環からの多糖 C (PSC) (N. meningitidis) のクリアランス

N. meningitidis 多糖 C を用いて実施例 1 の方法で操作を行った。完全多糖と、リン脂質基を脱アシル化した加水分解形態の多糖とを比較した。

完全な、又はリン脂質を脱アシル化するために加水分解した多糖 C (PSC) を T. O. マウスに 1250 μg 静脈注射した。時間間隔をおいてこれらの動物の採血を行い、血漿試料を N - アセチルノイラミン酸 (NANA) (シアル酸) について分析した。個々の動物の結果を総血液当たりの注射物質の % で表す。

結果は下記の表 4 及び第 4 図のグラフに示した。

表 4

注射した物質	血液循環中に残留している注射量の%					
	2 分	1 時間	3 時間	6 時間	24 時間	48 時間
PSC (完全)	29	23	24	13	4	1
PSC (完全)	30	28	22	12	6	6
PSC (加水分解)	48	36	-	35	18	10
PSC (加水分解)	40	34	35	28	17	7
PSC (加水分解)	45	39	37	34	24	10

これらの結果は、実施例 1 の結果と同様に、完全 P S C の場合も、加水分解（脱アシル化）した P S C の場合も、注射後に多糖化合物の一部が比較的急速に血液循環から排除されるが、その後は排除速度が低下することを示している。加水分解形態多糖の排除速度（半減期 20 時間）よりも完全多糖の排除速度の方が高く（従って半減期がより小さく、8 時間）、加水分解形態多糖は循環時間を延長させ且つ活性成分を安定させるための物質として有望である。

実施例 5

静脈注射後の血液循環からの多糖 K 9 2 のクリアランス

多糖 K 9 2 を完全形態及び（リン脂質基を脱アシル化するために）加水分解した形態で使用して、実施例 1 及び 4 の操作を繰り返した。

T . O . マウスに 1 2 3 0 μ g の完全又は加水分解（脱アシル化）多糖 K 9 2 （P S K 9 2 ）を静脈注射した。時間間隔をおいてこれらの動物の採血を行い、血漿試料を N - アセチルノイラミン酸（N a N a ）について分析した。個々の動物の結果は、総血液当たりの注射物質の % を表す。

結果は下記の表 5 及び第 5 図のグラフに示した。

表 5

注射した物質	血液循環中に残留している注射量の%							
	2 分	1 時間+20 分	4 時間	7 時間	24 時間	48 時間	72 時間	120 時間
PS K92 (完全)	80	73	56	52	52	-	11	7
PS K92 (完全)	82	79	65	55	41	24	17	10
PS K92 (完全)	85	69	62	52	56	33	19	11
PS K92 (加水分解)	91	79	57	55	45	22	16	4
PS K92 (加水分解)	90	77	60	51	37	25	26	3
PS K92 (加水分解)	109	87	65	52	37	21	9	5

これらの結果は、どちらの多糖化合物でも、注射後の最初の数分における初期損失が比較的少ないことを示している（試験したその他の多糖化合物と比較して）。また、その後の血液循環からの排除速度は極めて低く、いずれの場合も半減期は約 40 時間である。従って、5 日後でも、有意な割合の多糖が循環中に残留している。

該化合物のリン脂質部分からのアシル基の除去は半減期に有意な影響を及ぼすように思われないうが、その理由は十分には解明されていない。化合物の特定の構成が特性に著しい影響を与えるためにリン脂質の存在が効果を殆ど示さないのかもしれない。これらの化合物は、薬物の循環時間及び安定性の増加に極めて有効であると予想され、薬物に十分に長い放出特性を付与し、ターゲティング基によって器官又は細胞へのターゲティングを最適化させると思われる。

実施例 6

静脈注射後のコロミン酸及びコロミン酸 - F I T C 結合体の血液循環からのクリアランス
完全コロミン酸について実施例 1 の方法を繰り返した。¹²⁵I で標識した F I T C - コロミン酸結合体も別の組の実験で投与し、結果を実施例 2 と同様に評価した。

T . O . マウスに 1 6 0 0 μ g （F I T C - コロミン酸）又は 1 9 2 0 μ g の完全コロミン酸を静脈注射した。時間間隔をおいてこれらの動物の採血を行い、血漿試料を N a N a について分析した。個々の動物の結果は総血液当たりの注射物質の % である。

結果を下記の表 6 及び第 6 図のグラフに示す。

表 6

注射した物質	血液循環中に残留している注射量の%			
	2 分	30 分	2 時間 +30 分	6 時間
コロミン酸	27.5	7.0	0.0	0.0
コロミン酸	23.4	4.7	0.0	0.0
コロミン酸	34.0	3.6	0.0	0.0
FITC- コロミン酸	19.3	8.8	4.0	0.0
FITC- コロミン酸	28.9	5.8	3.6	0.0
FITC- コロミン酸	34.0	5.4	3.2	0.0

これらの結果は、F I T C - コロミン酸結合体の血液循環からの排除速度が単独コロミン酸の排除速度と実質的に同じであることを示している。該多糖はF I T Cの循環時間の増加についてはある程度の効果を示すが、その改善度は半減期のより長い高分子量多糖の場合ほど著しくはない。

実施例 7

コロミン酸 - 脂質誘導体の調製

材料及び方法

卵レシチンをLipid Products, Nuthill, Surreyから入手した。コレステロール、ジクロロメタン(DCM)、ジメチルホルムアミド(DMF)、クロホルム及びメタノールはE. Merck(ドイツ)から入手し、それ以上精製せずに使用した。大腸菌由来のコロミン酸ナトリウム塩((ポリ-2, 8-N-アセチルノイラミン酸)及びSephadex G-200(粗)はSigma Chemicals, Londonから入手した。18-クラウン-6、2-ブロモヘキサデカン酸、1-テトラデシルアミン、1-ブロモオクタデカン及び2, 4, 6トリクロロフェノールはAldrich Chemical社から入手し、それ以上精製せずに使用した。

実施例 7. 1

オクタデカンとのコロミン酸結合体の合成(図式1)

(a) コロミン酸クラウンエーテルの調製

コロミン酸(ナトリウム塩)(50mg)を20mlの蒸留水に溶解し、18-クラウン-6(30mg)を加え、20℃で30分間攪拌した。水を凍結乾燥によって蒸発させた。

(b) コロミン酸クラウンエーテルと1-ブロモオクタデカンとの結合(生成物D6)

コロミン酸クラウンエーテル(35mg)を1.5mlのDMFに溶解し、1-ブロモオクタデカン(6mg)を加え、20℃で24時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、生成物を1mlの蒸留水に再溶解した。凍結乾燥によって水を除去した。

実施例 7. 2

N-テトラデシルヘキサデシルカルボキサミドとのコロミン酸結合体の合成(図式2)

N-テトラデシル-(2-ブロモヘキサデシルカルボキサミド)の合成

(a) 2-ブロモヘキサデカン酸フェニルエステルの調製

2 - ブロモヘキサデカン酸 (1 g) を乾燥クロロホルム (20 ml) に溶解した。2, 4, 6 トリクロロフェノール (0.558 g) を加えた後、該反応混合物を氷浴中に配置した。乾燥クロロホルム (2 ml) に溶解したジシクロヘキシルカルボジイミド (0.736 g) を前記溶液に加えた。該溶液を氷浴中で15分間撹拌した後、温度を20℃に調整した。ジクロロメタン/メタノール (10 : 0.1 v / v) 混合物を溶剤とするケイ酸プレート上での薄層クロマトグラフィーにより生成物の形成を確認した。前記溶液を20℃で24時間撹拌し、沈殿した尿素を濾過によって除去した。濾液を重炭酸ナトリウム (0.05 M) 溶液及び水で2回洗浄した。粗反応生成物を、同じ溶剤系を溶離剤として用いてシリカゲル上で液体クロマトグラフィーにかけることにより精製した。

(b) N - テトラデシル - (2 - ブロモヘキサデシルカルボキサミド) の調製

10

1 - テトラデシルアミン (0.591 g) を、乾燥クロロホルム中の2 - ブロモヘキサデカン酸フェニルエステル (1.425 g) の溶液に加え、20℃で24時間撹拌した。ジクロロメタン/メタノール (10 : 0.1 v / v) 混合物を溶剤としてケイ酸プレート上で薄層クロマトグラフィーにかけることによりペプチドの形成を確認した。該反応混合物をクエン酸溶液 (10 % , w / v) 、重炭酸ナトリウム溶液 (0.05 M) 及び水 (× 3) で洗浄した。

(c) N - テトラデシル - (2 - ブロモヘキサデシルカルボキサミド) とコロミン酸クラウンエーテルとの結合 (生成物 D 1 1)

コロミン酸クラウンエーテル (80 mg) を乾燥ジメチルホルムアミド (DMF) (4 ml) に溶解した。N - テトラデシル - (2 - ブロモヘキサデシルカルボキサミド) (60 mg) を加え、得られた溶液を20℃で24時間撹拌した。次いで、該溶媒を真空下で蒸発させた。残渣を水 (2 ml) に溶解し、該水を凍結乾燥によって除去した。

20

実施例 7 . 3

リポソームへのコロミン酸 - 脂質誘導体の導入

前記誘導体を包含した小さい一枚膜リポソーム (SUV) を調製するために、クロロホルム中の卵ホスファチジルコリン (PC) (32 μmol) とコレステロール (32 μmol) とを1 : 1 のモル比で混合した。前述のように合成したコロミン酸 - 脂質誘導体 (総リポソーム脂質の10 % w / w) をクロロホルム/メタノール (1 : 1 v / v) に溶解し、前記脂質混合物に加えた。真空下で回転蒸発を用いて溶媒を除去し、乾燥脂質を2 ml のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4、0.1 M) に加えて静かに震盪させて懸濁させた。得られた乳状懸濁液を氷浴中で、1分間の超音波処理に30秒間隔で10回かけた。超音波処理した試料を20℃で2時間静置した。包含されなかった材料を、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4、0.1 M) で予め平衡化した Sephadex G - 200 上でのカラムクロマトグラフィーによりリポソームから分離した。

30

コロミン酸の測定

前述の一般的方法を用いてクロマトグラフィーで得たフラクション0.1 ml 中で、コロミン酸を分光測光により測定した。リポソーム内へのコロミン酸の導入 (包含) の程度 (使用総量の %) を、リポソームピークに属するフラクションと、その後で回収されたフラクション (導入されなかった材料の第2ピーク) で回収された総量に基づいて計算した。

結果

40

N - テトラデシル - (2 - ブロモヘキサデシルカルボキサミド) の特徴分析

2 - ブロモヘキサデカン酸と1 - テトラデシルアミンとの結合 (図式 2 b) を質量分析法によって確認した。結合前に、2 - ブロモヘキサデカン酸の活性エステルを合成した (図式 2 a) 。生成物の質量スペクトルでは、514 m / z のピークの存在が2 - ブロモヘキサデカン酸と2, 4, 6 トリクロロフェノールとの間の結合の形成を示す。次いで生成物を1 - テトラデシルアミンと結合させると、得られた材料の質量スペクトルは530 m / z にピークを示した。これは、前記2つの化合物の結合が完了したことを意味する。

リポソームの特徴分析

実験全体を通して、小さい一枚膜小胞 (SUV) はPC及びコレステロールでモル比1 : 1で調製し、コロミン酸 - 脂質誘導体は必要に応じて脂質混合物に加えた (総脂質重量の

50

10%)。SUVは、Sephadex G-200を用いる分子ふるいクロマトグラフィーによって非導入材料から分離した。

第7図は、コロミン酸及びSUV(適用前に混合)の溶離プロフィルを示している。リポソーム(フラクション14~22)及びコロミン酸(フラクション22~24)を表す2つの別個のピークが見られる。これらのフラクションでは適用したコロミン酸の約95%が検出された。D₆又はD₁₁(スキーム1及び2参照)包含SUVをSephadex G-200カラムにかけた。第8図はリポソームD₆の溶離プロフィルを示している。該コロミン酸誘導体(D₆)の約51%がリポソームと共に回収された(即ち、二重層に包含されていた)。コロミン酸誘導体D₁₁(第9図)も同じくらい(52.14%)SUV内に包含されていた。

10

実施例 8

リポソームへの多糖Bの導入

多糖B(PSB)がそのリン脂質部分を小さい一枚膜リポソーム(SUV)の二重層に挿入し、リポソーム表面を親水性にし、それによって血液循環における小胞の半減期を延ばすことができるかどうかを確かめるために実験を行った。

方法

卵ホスファチジルコリン(PC)又はジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)と等モルのコレステロール(25mgのリン脂質及び12.5mgのコレステロール)とをクロロホルムに溶解した。回転蒸発によって溶媒を除去した後、1.2mgの多糖Bを含む0.06Mカルボキシフルオレセイン(CF)を2ml加えた。容器を激しく震盪して脂質膜を破壊し、該懸濁液を4 (PC)及び60 (DSPC SUV)で3分間浴超音波処理した。該懸濁液を同じ温度で、1分毎に30秒の休止時間をおきながら6分間プローブ超音波処理した。次いで、SUVを含んだ透明懸濁液をSephacrose CL-4Bカラムに通してリポソーム包含CF及びPBSを遊離物質から分離した。典型的な実験での分離パターンは、19.2%のPSBがSUVフラクションと共に回収されたことを示している。8つの実験で得たPC又はDSPC SUVへのPSB導入の結果を表7に示す。

20

表 7

30

SUVへのPSBの導入

実験	使用した脂質	使用したPBS (μg)	SUV上の PSB%	μg SUV上のPSB%
9.1	PC,CHOL	1200	19.2	236
9.2	PC,CHOL	1800	18.5	323
9.3	PC,CHOL	1400	19.9	278
9.4	PC,CHOL	1500	21.2	318
9.5	PC,CHOL	500	18.8	94
9.6	PC,CHOL	1500	22.2	333
9.7	DSPC,CHOL	500	29.0	145
9.8	DSPC,CHOL	1500	21.4	321

40

実施例 10

SUV中のPSBが静脈注射後のマウスの血液循環からの小胞クリアランスに及ぼす効果

50

T.O.マウスを2匹ずつ2つのグループに分割し、PCとコレステロールとからなり（モル比1：1）且つPSBを導入した又はしていないCFを含むSUVを尾の静脈に注射した。CF含有SUV又は118 μ gのPSBでコーティングしたCF含有SUVを静脈注射した。注射後、時間間隔をおいて、これらの動物の採血を行い、血漿試料をKirby、Clarke及びGregoriadisの方法（Biochem. Journal 186, 591（1980））に従って、総CFの分析にかけた。数値は個々の動物から得たものであり、総血液当たりの注射リポソームCFの%を表す。

表8及び第10図のグラフに示した結果は、注射後に時間間隔をおいて測定した血液中のリポソームCF濃度を示している。2つのグループの数値の比較から明らかなように、リポソーム表面にPSBが存在するとクリアランス速度が低下する。DSPCとコレステロールとを用いて前述のように調製したPSBコーティングしたSUVを用いて行った別の実験、並びにDSPCとコレステロールとで調製したPSBコーティングしたSUVを用いて実施した実験でも同様の結果が得られた。

表 8

静脈注射後のリポソーム内CFのクリアランス

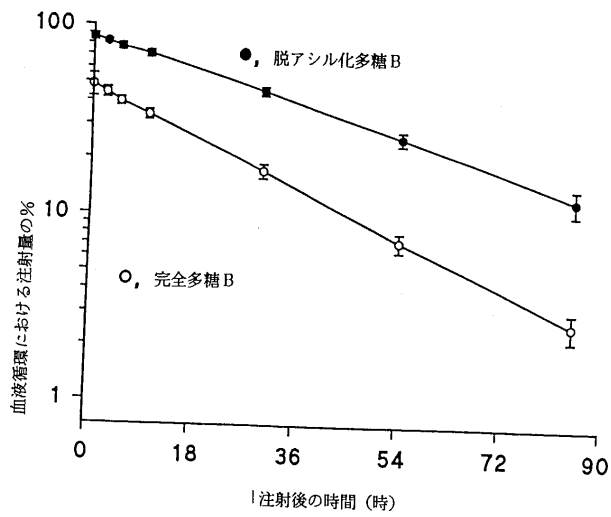
注射した調製物	統血液中の注射量%			
	7	1	3	23
CF- 含有 SUV	44.3	33.9	25.7	2.5
	39.3	33.4	27.0	1.7
PSB- コーティングした CF- 含有SUV	89.1	47.1	28.2	5.0
	78.2	55.5	43.7	6.6

10

20

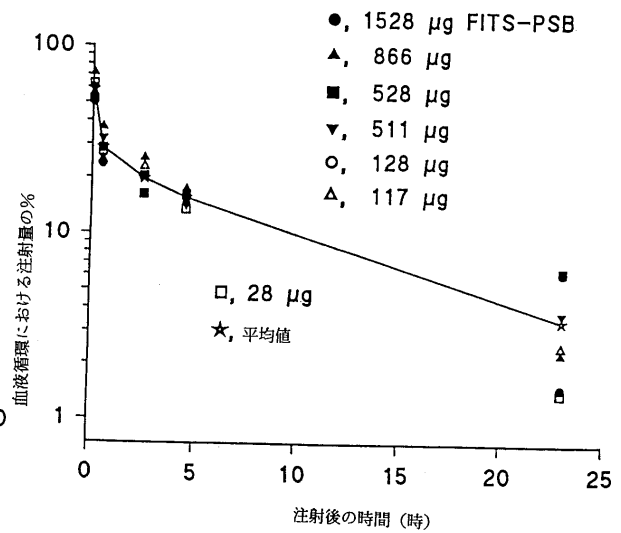
【 図 1 】

Fig.1



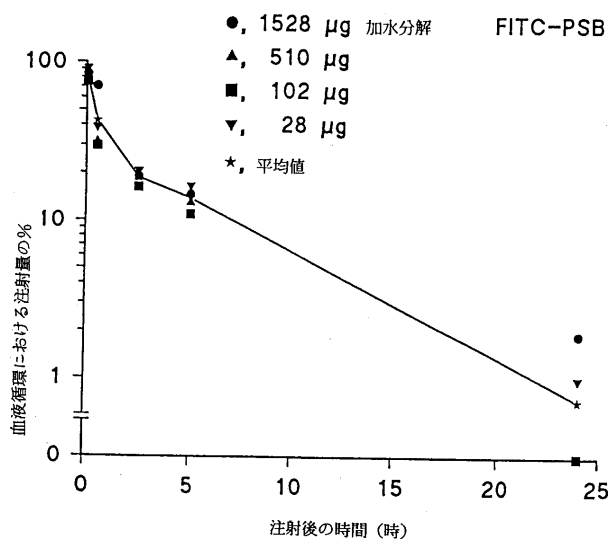
【 図 2 】

Fig.2



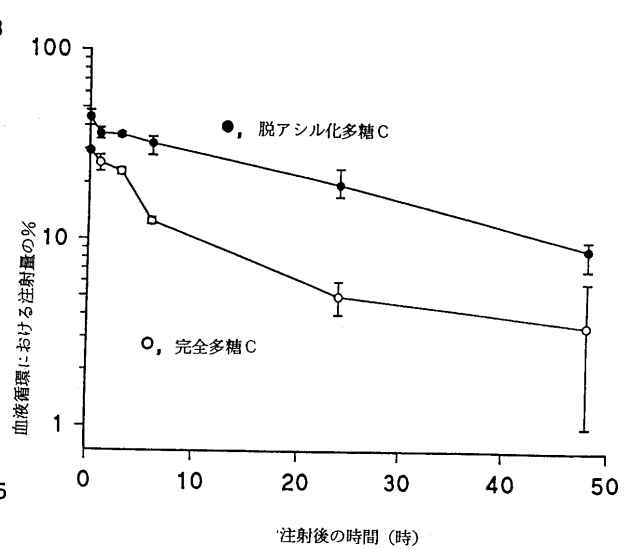
【 図 3 】

Fig.3



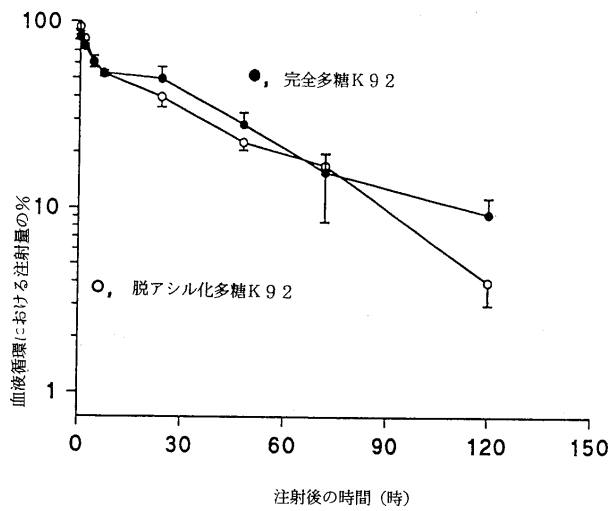
【 図 4 】

Fig.4



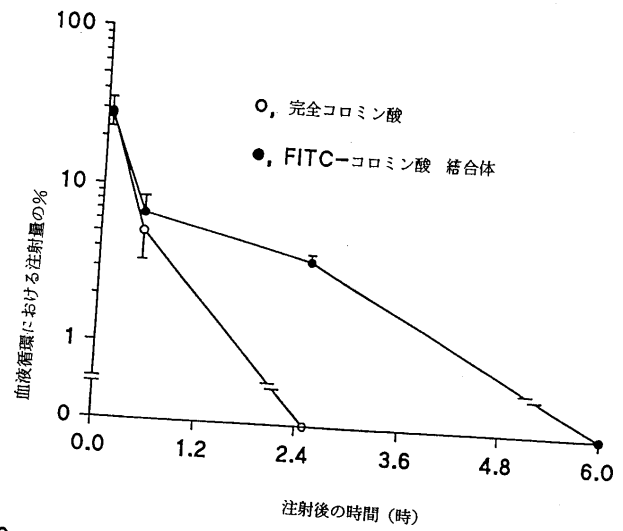
【 図 5 】

Fig. 5



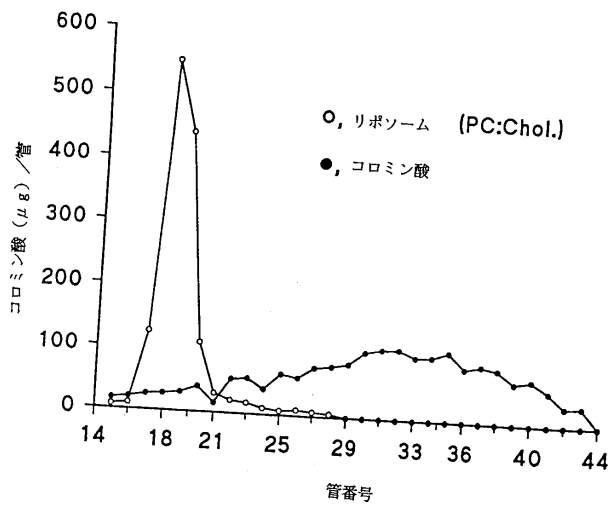
【 図 6 】

Fig. 6



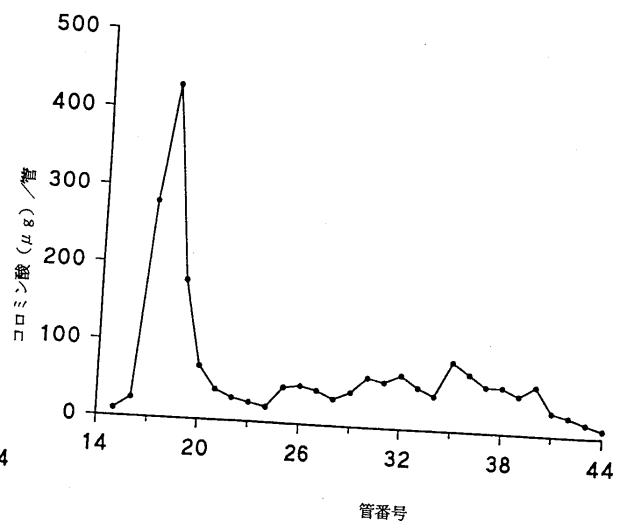
【 図 7 】

Fig.7



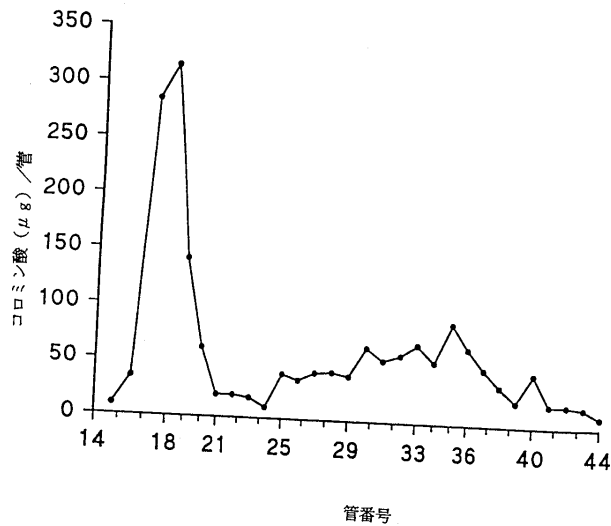
【 図 8 】

Fig.8



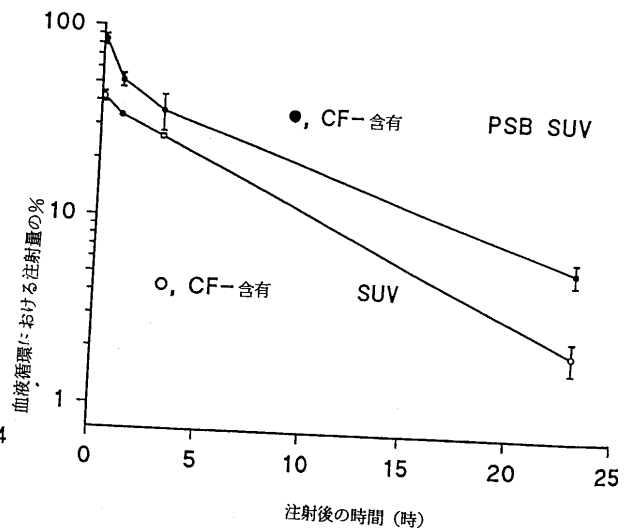
【図 9】

Fig. 9

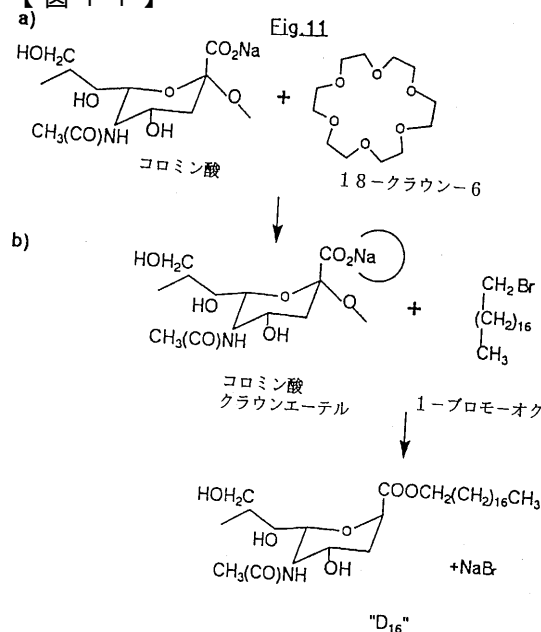


【図 10】

Fig.10



【図 11】



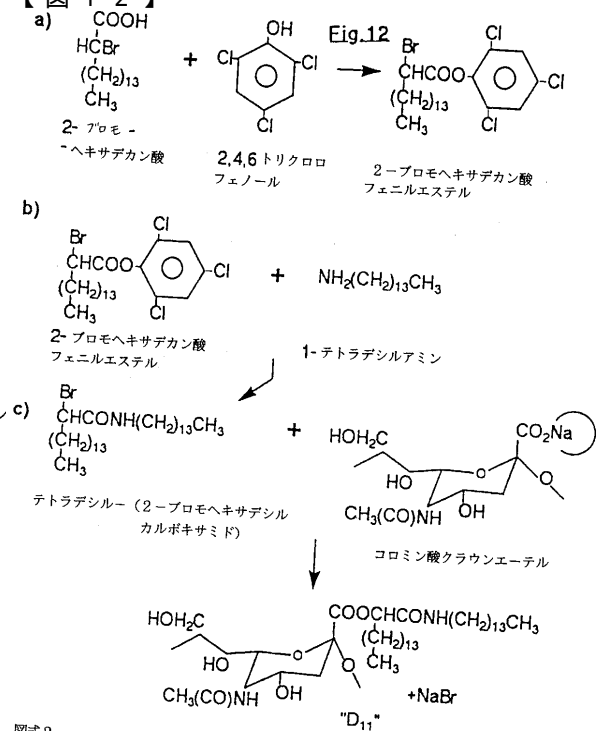
図式 1

1-ブロモオクタデカンとコロミン酸との結合

a) コロミン酸クラウンエーテルの調製

b) コロミン酸クラウンエーテルと1-ブロモオクタデカンとの結合

【図 12】



図式 2

N-テトラデシル-2-ブロモヘキサデシルカルボキサミドとコロミン酸クラウンエーテルとの結合

a) 2-ブロモヘキサデカン酸フェニルエステルの調製

b) 2-ブロモヘキサデカン酸フェニルエステルと1-テトラデシルアミンとの結合

c) N-テトラデシル-2-ブロモヘキサデシルカルボキサミドとコロミン酸クラウンエーテルとの結合

フロントページの続き

合議体
審判長 竹林 則幸
審判官 亀田 宏之
審判官 渕野 留香

(56)参考文献

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, VOL. 127, NO. 3, (1981), p. 1011 - 1018
BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA, VOL. 1023, (1990), P. 357 - 364
BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA, VOL. 986, (1989), P. 106 - 114

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K47/48
A61K9/127