

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2008年8月14日 (14.08.2008)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2008/096779 A1

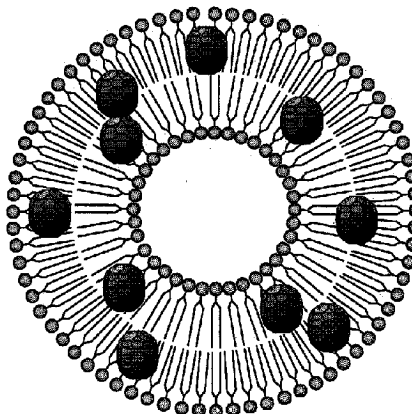
- (51) 国際特許分類:  
A61K 33/44 (2006.01)      A61K 47/40 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)     A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 47/24 (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                                PCT/JP2008/051928
- (22) 国際出願日:                                   2008年2月6日 (06.02.2008)
- (25) 国際出願の言語:                                日本語
- (26) 国際公開の言語:                               日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2007-031340    2007年2月9日 (09.02.2007)    JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学  
法人奈良先端科学技術大学院大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6300192  
奈良県生駒市高山町8916-5 Nara (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池田 篤志  
(IKEDA, Atsushi). 菊池 純一 (KIKUCHI, Jun-ichi).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所  
(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目  
北2番6号大和南森町ビル Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,

[続葉有]

(54) Title: C<SB>70</SB>-CONTAINING LIPOSOME, METHOD FOR PRODUCING THE SAME, AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: C<sub>70</sub>含有リポソームおよびその製造方法、並びにその利用

[図1]



(57) Abstract: A solution containing a cyclodextrin-C<sub>70</sub> complex is mixed with a solution containing a liposome-forming lipid at 10-45°C, thereby producing a C<sub>70</sub>-containing liposome having the intrinsic physical properties of C<sub>70</sub> fullerene, which liposome is stably soluble in a polar solvent. Specifically disclosed are a C<sub>70</sub>-containing liposome which has the intrinsic physical properties of C<sub>70</sub> fullerene and is stably soluble in a polar solvent, a method for producing such a C<sub>70</sub>-containing liposome, and a use of such a C<sub>70</sub>-containing liposome.

[続葉有]

WO 2008/096779 A1



SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

---

(57) 要約: シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体を含有する溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含有する溶液とを $10\sim 45^{\circ}C$ で混合する。これにより、 $C_{70}$ フラレンが本来有する物性を有し、安定に極性溶媒に溶解可能な $C_{70}$ 含有リポソームを製造することができる。これにより、本発明は、 $C_{70}$ フラレンが本来有する物性を有し、安定に極性溶媒に溶解可能な $C_{70}$ 含有リポソームおよびその製造方法、並びにその利用を提供する。

## 明 細 書

C<sub>70</sub> 含有リポソームおよびその製造方法、並びにその利用

## 技術分野

- [0001] 本発明は、フラーレン類を含有するリポソームおよびその製造方法、並びにその利用に関するものであって、特に、C<sub>70</sub>を含有するリポソームおよびその製造方法、並びにその利用に関するものである。

## 背景技術

- [0002] フラーレン類は、炭素原子のみからなる閉殻構造を有する。そのため、フラーレン類は、特徴的な性質を有する。具体的には、(1)特異的に $\pi$ 電子雲が非局在化している、(2)電子親和力が大きい、(3)イオン化エネルギーが比較的小さい、(4)電子受容能が高い、(5)可視光で光励起されるといった性質を挙げることができる。フラーレン類は、このような性質を有するため、半導体材料、超伝導材料、光電材料、医療材料、および化粧品材料等、多岐の産業分野への応用が期待されている。
- [0003] 例えば、医療分野では、光線力学的治療(photodynamic therapy、以下「PDT」ともいう)用途での利用が検討されている。PDTとは、癌等の治療に用いられる治療法であり、光感受性の物質に光を照射することにより、発生する活性酸素を用いて、癌細胞等を殺傷する治療法である。より具体的には、PDTでは、上記光感受性の物質を、患部に投与し、該患部に光を照射することによって、水や酸素の光化学反応により生成する一重項酸素やヒドロキシラジカル等の活性酸素を、該患部において発生させる。該活性酸素、またはそれから発生するラジカル種によって、上記患部の癌細胞の活動や増殖を阻害し、癌細胞を破壊させる。そして、最終的に、該癌細胞等の細胞を死滅させる。フラーレン類は、上述した特徴的な性質を有するゆえ、光の照射により一重項酸素等の活性酸素を効率よく発生する。そのため、PDTへの応用が期待されている。
- [0004] このように、フラーレン類は、PDT等の医療材料を含め、多岐にわたる産業分野への応用が期待されている。フラーレン類を様々な用途で用いる場合、該フラーレン類を所望の溶媒に溶解させることが必要となることがしばしばある。例えば、PDTにお

いてフラレン類を用いる場合、該フラレン類を水性溶媒に溶解させる必要がある。しかしながら、フラレン類は、水を含む極性溶媒に対して不溶である。非特許文献1には、フラレンをシクロデキストリン錯体とすることによって、水溶化できることが開示されているが、フラレンのシクロデキストリン錯体は、非常に熱的に不安定で実用的ではない。そのため、フラレン類は、上述したような様々な用途の可能性が期待されているものの、実際には、一定の制限下でしか使用できないという問題を抱えている。このような問題を解決すべく、フラレン類を水性溶媒に溶解させるための技術開発が行われている。

[0005] そのような技術として、例えば、特許文献1～特許文献4、および非特許文献2に開示される技術を挙げることができる。特許文献1には、フラレンを可溶化するためにフラレンの炭素原子にヒドロキシル基を導入した各種フラロールが開示されている。特許文献2には、金属内包フラレンまたはその塩の表面をスルホン基、ケトン基、アミノ基およびアルキル基からなる群より選ばれる官能基を有する多糖類で被覆することにより、フラレン類を可溶化できることが開示されている。また、特許文献3には、フラレンを、ポリマー鎖により被覆することにより該フラレンを可溶化する方法が開示されている。より具体的には、第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントをコアとし、ポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを構造物内に、フラレンを封入することにより、該フラレンを可溶化する方法が開示されている。さらに、特許文献4および非特許文献2には、 $C_{60}$ ・シクロデキストリン錯体から、リポソーム内に $C_{60}$ を移動(交換反応)させることにより、 $C_{60}$ 含有リポソームが得られることが開示されている。より具体的には、 $C_{60}$ ・シクロデキストリン錯体と、リポソーム溶液とを混合し、1～7時間加熱攪拌することにより $C_{60}$ をリポソーム内に移動させることができることが記載されている。また、特許文献4には、フラレンと分散安定化剤を用いて、フラレンの分散水性溶液を調製し、得られたフラレンの分散水性溶液とカリックスアレーンとを混合処理し、カリックスアレーンとフラレンとの錯体を調製することにより、フラレンを可溶化できることが記載されている。

[0006] ところで、PDTによる治療対象である癌組織には、正常組織に比べてより多くの水

溶性高分子が集積される。また、一度癌組織に集積した水溶性高分子は、他の組織に集積した場合と比較して滞留時間が長い。したがって、PDTによる癌治療にフラレンを用いる場合、該フラレンを水性溶媒に溶解させることに加えて、高分子化することが必要となる。そこで、フラレンを、PDTに用いるために、可溶化に加えて、高分子化させる技術も開発されている。例えば、特許文献5には、フラレンを水溶性高分子によって化学修飾することにより、フラレンを水性溶媒に可溶化できると共に、該可溶化したフラレンを癌組織へ移行しやすくすることができることが開示されている。

[0007] 上述した技術以外にも、フラレンを利用するための様々な技術がこれまでに開示されている(例えば、特許文献6～9参照)。特許文献6には、カチオンキャリアー系において診断化合物および治療化合物を安定化させる新規方法が開示されている。具体的には、特許文献6に記載の技術では、負の実効電荷を有するか、任意に変性されて負の実効電荷を有する、低分子量化合物をカチオンリポソーム内で安定化する。また、特許文献7には、抗酸化組成物および外用組成物が開示されており、具体的には、有機化合物により包接されたフラレンを有効成分とする抗酸化組成物が開示されている。さらに、特許文献8には、フラレンを可溶化する技術、すなわちフラレンにより高い水溶性を付与する技術が開示されている。具体的には、特許文献8には、フラレンが所定のブロックコポリマーよりなるポリマー鎖により被覆された微小粒子の複合体が開示されている。特許文献9には、電子受容性化合物と電子供与性化合物のそれぞれがホストゲスト錯体を形成している光電変換素子材料が開示されており、このような錯体として、具体的には、電子受容性化合物がフラレンであり、カリックスアレーンをホストとする錯体が示されている。

特許文献1: 日本国公開特許公報「特開平7-048302号公報(公開日:平成7(1995)年2月21日)」

特許文献2: 日本国公開特許公報「特開平8-143478号公報(公開日:平成8(1996)年6月4日)」

特許文献3: 日本国公開特許公報「特開2005-225772号公報(公開日:平成17(2005)年8月25日)」

特許文献4:日本国公開特許公報「特開2006-69812号公報(公開日:平成18(2006)年3月16日)」

特許文献5:日本国公開特許公報「特開平9-235235号公報(公開日:平成9(1997)年9月9日)」

特許文献6:日本国公開特許公報「特開2005-534718号公報(公開日:平成17(2005)年11月17日)」

特許文献7:日本国公開特許公報「特開2004-250690号公報(公開日:平成16(2004)年9月9日)」

特許文献8:日本国公開特許公報「特開2005-225772号公報(公開日:平成17(2005)年8月25日)」

特許文献9:日本国公開特許公報「特開2004-022424号公報(公開日:平成16(2004)年1月22日)」

非特許文献1:K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata and T. Braun, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2963 (1999)

非特許文献2:A. Ikeda, T. Sato, K. Kitamura, K. Nishiguchi, Y. Sasaki, J. Kikuchi, T. Ogawa, K. Yogo, T. Takeya, Org. Biomol. Chem., 3, 2907-2909 (2005)

#### 発明の開示

[0008] このように、フラーレンの可溶化技術や、PDT等の特定の用途に好適に利用できるようにフラーレンを修飾する技術の開発が進められている。しかしながら、特許文献1～3に開示されるような方法では、フラーレンの表面が修飾されるため、フラーレンが本来有する特性が損なわれるという問題がある。

[0009] さらに、上述した技術では、多くの場合、フラーレン類として、最も安価に製造でき、安定性に優れる $C_{60}$  フラーレンが用いられている。しかしながら、フラーレン類は、その炭素原子数によって、その物性が異なる。そのため、全てのフラーレンを同一の方法で可溶化できるわけではない。また、フラーレンの物性の相違に伴い、用途によって用いられるフラーレンが異なる。例えば、70個の炭素原子からなる $C_{70}$  フラーレンは、60個の炭素原子からなる $C_{60}$  フラーレンよりも、人体に害を及ぼしにくい可視光領域において光吸収率が高いため、高い光吸収率が求められる用途では $C_{70}$  を選択す

ることが考えられる。

[0010] したがって、用途に応じて好適な物性を有するフラーレンを所望に選択して利用できるよう、各フラーレンについて、可溶化する技術を確立する必要がある。

[0011] 本発明は、上記問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、 $C_{70}$  フラーレンが本来有する物性を有し、安定に極性溶媒に溶解可能な $C_{70}$  含有リポソームおよびその製造方法、並びにその利用を提供することにある。

[0012] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、シクロデキストリン $C_{70}$  錯体を含む溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含む溶液とを $10\sim 45^{\circ}\text{C}$ で混合するという単純な構成で、 $C_{70}$  含有リポソームを製造できることを独自に見出し、本発明を完成させるに至った。なお、フラーレンの水溶性化法を開示する特許文献4では、 $C_{60}$  フラーレンおよび分散安定化剤の分散水性溶液と、カリックスアレーンとを混合処理し、カリックスアレーンと $C_{60}$  との錯体を調製することにより、 $C_{60}$  を水性化している。文献中には分散安定化剤として、シクロデキストリンおよびリポソームが例示されている。しかし、特許文献4に記載の技術において用いられているリポソームはあくまでも分散剤であり、特許文献4には、 $C_{70}$  フラーレンをリポソーム中に含有させることが、記載も示唆もされていない。また、特許文献6に記載の技術は、化合物を負の実効帯電を有する部分(負に帯電した部分)で変性することを特徴としており、ここで、「変性」は、「化合物をフラーレンなどのような負に帯電した部分内に取り込む」ことを含んでいる。このような技術は、フラーレンをリポソーム内に含有する本発明と大きく異なっている。有機化合物として特許文献7に例示されているものは、有機オリゴマー、有機ポリマー、シクロデキストリン、クラウンエーテルなどに過ぎない。また、特許文献7には、包接方法について具体的な開示がなされていない。また、特許文献7～9には、リポソームを用いることも $C_{70}$  フラーレンをリポソーム中に含有することも、記載も示唆もされていない。このように、本発明者らの創意工夫および試行錯誤の結果として完成された本発明が、従来技術から容易に導き得るものではなく、従来予測し得るものではないことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

[0013] すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

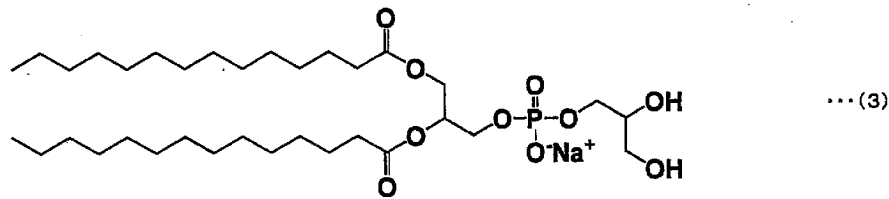
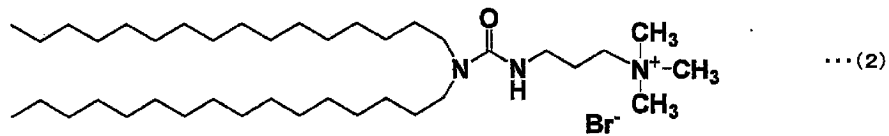
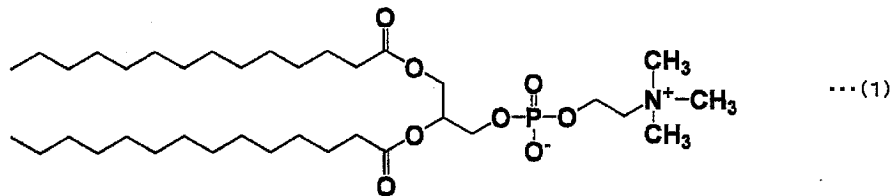
[0014] [1] $C_{70}$  フラーレンを含むリポソームの製造方法であって、シクロデキストリン $C_{70}$

錯体を含む第1溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含む第2溶液とを10～45℃で混合することを特徴とする製造方法。

[0015] [2] 上記シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体は、上記シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体は、 $\beta$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、 $\delta$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、および $\epsilon$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、並びに、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、 $\delta$ -シクロデキストリン、もしくは $\epsilon$ -シクロデキストリンのモノ、ジ、またはトリメチル化体と $C_{70}$ フラーレンとの錯体からなる群より選択される少なくとも1つのシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体であることを特徴とする[1]に記載の製造方法。

[0016] [3] 上記第2溶液は、下記式(1)～(3)

[0017] [化1]



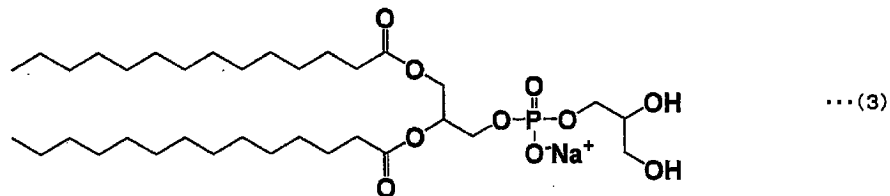
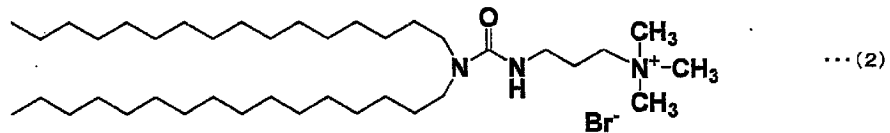
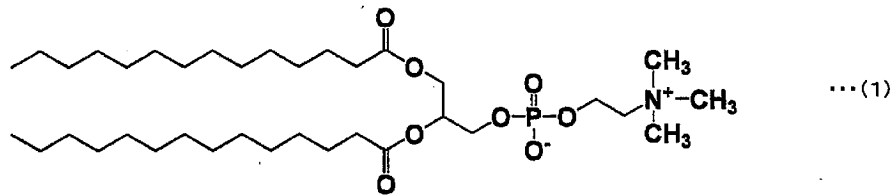
[0018] で表される脂質からなる群より選択される少なくとも1つの脂質を含むことを特徴とする[1]に記載の製造方法。

[0019] [4]  $C_{70}$ フラーレンを含むリポソームであることを特徴とする $C_{70}$ 含有リポソーム。

[0020] [5] 上記リポソームは、下記式(1)～(3)

[0021] [化2]





[0022] で表される脂質からなる群より選択される少なくとも1つの脂質を含有することを特徴とする[4]に記載のC<sub>70</sub>含有リポソーム。

[0023] [6]波長が350～800nmの光の照射により、活性酸素を発生することを特徴とする[4]に記載のC<sub>70</sub>含有リポソーム。

[0024] [7]上記リポソームを構成する全脂質に対して、0.1～20モル%のC<sub>70</sub>フラレンを含有することを特徴とする[4]に記載のC<sub>70</sub>含有リポソーム。

[0025] [8][4]～[7]のいずれかに記載のC<sub>70</sub>含有リポソームを含有することを特徴とする組成物。

[0026] [9]光線力学的治療に用いられることを特徴とする[5]に記載の組成物。

[0027] [10]

上記光線力学的治療の治療対象が、癌細胞、加齢黄斑変性症、粥状動脈硬化病変、関節リウマチ病変、難治性疣贅、尋常性座瘡、およびパピロマーウイルスからなる群より選択されることを特徴とする[9]に記載の組成物。

[0028] [11]

上記加齢黄斑変性症が滲出型であることを特徴とする[10]に記載の組成物。

[0029] [12]

C<sub>70</sub>含有リポソームの含有量が2～20モル%であることを特徴とする[8]に記載の組成物。

[0030] [13]

請求の範囲4～7のいずれか1に記載のC<sub>70</sub>含有リポソームを患部に投与する工程、および該患部に光照射する工程を包含することを特徴とする光線力学的治療法。

[0031] 本発明の他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、添付図面を参照した次の説明によって明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

[0032] [図1]本発明の一実施形態にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの構造を模式的に示す図である。

[図2]本発明の実施例にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームおよび従来技術のC<sub>60</sub>含有リポソームのUV-vis吸収スペクトルを示す図である。

[図3](a)は一般的なプラスミドの構造を示す図であり、(b)～(d)は本発明の実施例にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームのDNA切断能力を調べた結果を示す図である。

[図4]本発明の実施例にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームおよび従来技術のC<sub>60</sub>含有リポソームによる細胞殺傷能力を調べた結果を示す図である。

[図5](a)は、本発明の実施例にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法により製造されたC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液を示す図であり、(b)は、参考例にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法により製造されたC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液を示す図である。

[図6]図5の(a)および(b)に示されたC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液のUV-vis吸収スペクトルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0033] 本発明の一実施形態について、以下説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0034] <I. C<sub>70</sub>含有リポソーム>

本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームは、図1に示すようにC<sub>70</sub>フラーレン(以下、単に「C<sub>70</sub>」ともいう)を含有するリポソームである。本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームでは、

$C_{70}$  は表面が修飾されることなく、リポソーム内に存在する。それゆえ、本発明によれば、 $C_{70}$  が本来有する物性を有した状態で、 $C_{70}$  を水性溶媒に可溶化させることができる。したがって、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームは、水溶性の $C_{70}$  を用いることが望まれる技術分野に広く用いることができる。なお、図1では、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームの一実施形態として、 $C_{70}$  がリポソーム膜中に埋め込まれているリポソームが記載されているが、本発明はこれに限定されない。すなわち、本明細書において、「 $C_{70}$  を含有するリポソーム」とは、 $C_{70}$  がリポソーム膜内部に閉じ込められている水相（内部水相）中に存在しているリポソーム、 $C_{70}$  がリポソーム膜中に埋め込まれているリポソーム、および一部の $C_{70}$  が内部水相に存在し、残りの $C_{70}$  がリポソーム膜中に埋め込まれているリポソームが意図される。また、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームにおいて、 $C_{70}$  は互いに相互作用することなく単独分子で存在してもいてもよいし、複数の分子が会合した状態で存在してもいてもよい。さらには、 $C_{70}$  の一部の分子のみが会合した状態で存在してもよい。

[0035] 本明細書において、「水性溶媒」とは、水をベースとする溶媒が意図される。また、「リポソーム」とは、脂質二重膜からなるリポソーム膜により形成される構造物が意図される。上記脂質二重膜は、脂質分子からなる2分子膜であり、細胞膜と同じ構造を有する。上記脂質分子は、水を含む極性溶媒になじみやすい部分（親水部）と、油を含む非極性溶媒になじみやすい部分（疎水部）とを有する。上記脂質二重膜では、2分子の脂質分子が、疎水部が対向し、親水部が外側を向くように配置されている。

[0036] 本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームにおけるリポソームの具体的な組成は、特に限定されるものではない。カチオン性脂質、アニオン性脂質、および中性脂質をどのように組み合わせたリポソームであってもよい。つまり、カチオン性脂質、アニオン性脂質、および中性脂質を全て含む必要はなく、特定の1種もしくは2種の脂質を含むものであってもよい。本発明では、上記リポソームの組成を変更することにより、 $C_{70}$  が有する性質を所望に利用可能な $C_{70}$  含有リポソームとすることができる。

[0037] 例えば、 $C_{70}$  は、光の照射により活性酸素を発生する性質を有することが知られている。この $C_{70}$  の性質が付与された $C_{70}$  含有リポソームとする場合、上記リポソームはカチオン性脂質を含有することが好ましく、カチオン性コレステロールを含有することが

さらに好ましい。上記構成によれば、光照射により活性酸素を発生するとともに、該活性酸素によりリポソームが分解されることのない安定した $C_{70}$ 含有リポソームとすることができる。

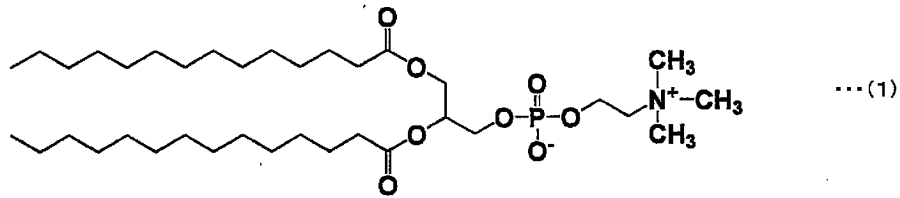
[0038] また、カチオン性脂質を含有させることにより、細胞透過性に優れる $C_{70}$ 含有リポソームとすることができる。このような活性酸素を発生し、細胞透過性に優れる $C_{70}$ 含有リポソームは、光線力学的治療(以下、「PDT」ともいう)の用途に好適に用いることができる。なお、本明細書において、「活性酸素」とは、特に限定されないが、例えば、一重項酸素およびヒドロキシラジカルが意図される。

[0039] また、 $C_{70}$ は活性酸素を消去する活性を有する。この $C_{70}$ の性質が付与された $C_{70}$ 含有リポソームとする場合、例えば、特開2006-124378号公報等に記載されたリポソームを用いることが好ましい。上記構成によれば、水性溶媒中で、活性酸素を効率よく消去することが可能な $C_{70}$ 含有リポソームとすることができる。このような $C_{70}$ 含有リポソームは、食品、医薬および化粧品等の分野に好適に用いることができる。

[0040] 以下、上記リポソームを構成する脂質についてより具体的に説明する。

[0041] 上記リポソームを構成する中性脂質としては、例えば、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、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、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジミリストリルホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジステアロイルホスファチジルセリン(DSPS)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール(DPPI)、ジステアロイルホスファチジルイノシトール(DSPI)、ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン、並びにこれらを定法により水素添加したもの(例えば水素添加大豆レシチン等)および水酸化物等のリン脂質を挙げることができる。また、本発明には、下記式(1)

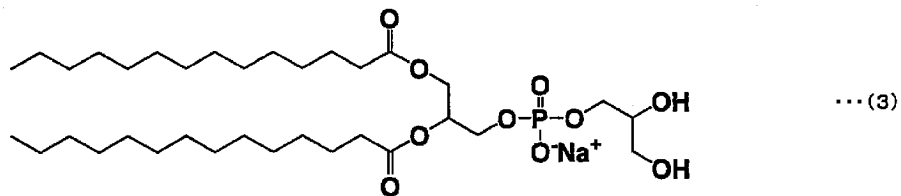
[0042] [化3]



[0043] で表される脂質を中性脂質として好適に用いることができる。

[0044] 上記リポソームを構成するアニオン性脂質として、例えば、ジミリストールホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、卵黄、または大豆のような天然物質由来のホスファチジルグリセロール、完全水素添加ホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール等の炭素数10～30程度の飽和又は不飽和の直鎖状又は分枝状の脂肪酸残基を有するアニオン性リン脂質を挙げることができる。また、本発明には、下記式(3)

[0045] [化4]

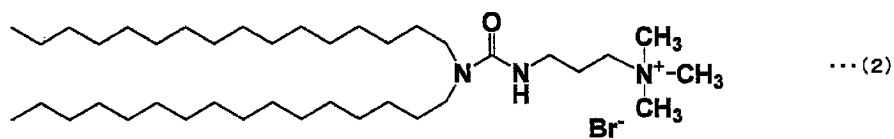


[0046] で表される脂質をアニオン性脂質として好適に用いることができる。

[0047] 上記リポソームを構成するカチオン性脂質として、例えば、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)、N, N-ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、3β [N-(N7, N'-ジメチルアミノ-エタン)-カルバモイル]コレステロール、ステアリルアミン、N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)ドデシル-D-グルタメートクロリド、N-[1-(2, 3-オレオイルオキシ)プロピル]-N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、2, 3-ジオレオイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキシアミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート(DOSPA)、N-[1-(2, 3-ジミリスチルオキシ)プロピル]-N, N-ジメチル

—N—(2-ヒドロキシエチル)アンモニウムブロミド(DMRIE)、1, 2-ジオレオイル—3-ジメチルアンモニウムプロパンジオール(DODAP)等のカチオン性脂質を挙げることができる。さらに、ホスファチジン酸とアミノアルコールとのエステル、例えばジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)もしくはジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)とヒドロキシエチレンジアミンとのエステル等のカチオン性リン脂質を用いることもできる。また、本発明には、下記式(2)

[0048] [化5]



[0049] で表される脂質をカチオン性脂質として好適に用いることができる。上記カチオン性脂質によれば、50nm～200nmの平均粒径をもつ $C_{70}$ 含有リポソームとすることができる。このような平均粒径をもつ $C_{70}$ 含有リポソームは、EPR (Enhanced permeability and retention) 効果により癌細胞に選択的にターゲティングさせることができる。

[0050] 本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームにおいて、カチオン性脂質を含有させる場合、その含有量は、全脂質量に対し90モル%以下であることが好ましく、50モル%以下であることがより好ましく、20モル%以下であることがさらに好ましい。

[0051] 本発明において、上記リポソームは、上記例示したような脂質のうち、単一の脂質を含むものであってもよいし、複数の脂質を組み合わせる含むものであってもよい。また、複数の荷電脂質(アニオン性脂質またはカチオン性脂質)を組み合わせる含有する場合、負電荷の脂質同士または正電荷の脂質同士を組み合わせる含有することが好ましい。これにより、 $C_{70}$ 含有リポソーム同士が結合し、凝集するのを低減することができる。また、中性脂質と荷電脂質とを組み合わせる含有する場合、中性脂質：荷電脂質(モル比)は、200:1～1:9であることが好ましく、100:1～1:1であることがより好ましく、40:1～5:1であることがさらに好ましい。

[0052] 複数の脂質を組み合わせる用いる実施形態について、より具体例を挙げて説明する。カチオン性脂質は、細胞透過性を有することが知られている。そのため、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームをPDT等の治療用途に用いる場合、カチオン性脂質を

含有させることが好ましい。その一方で、カチオン性脂質は、一般的に毒性を有することが知られている。したがって、カチオン性脂質の含有量は、細胞透過性と毒性による副作用とを考慮して決定されるものである。このとき、カチオン性脂質の含有量は、中性脂質とカチオン性脂質とを組み合わせる用いることによって、調整することが好ましい。このように、中性脂質とカチオン性脂質とを組み合わせる用い、カチオン性脂質の含有量を上述した範囲内で適宜変更することにより、良好な細胞透過性を有し、かつ毒性による副作用が低減された $C_{70}$ 含有リポソームを製造することができる。

[0053] また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、糖脂質を含有していてもよい。上記糖脂質としては、例えば、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステル等のグリセロ脂質、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4等のスフィンゴ糖脂質等を挙げることができる。

[0054] 本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、 $C_{70}$ と脂質以外の成分を含有していてもよい。具体的には、例えば、膜安定化剤として作用するステロール類を含有していてもよい。上記ステロール類としては、例えば、コレステロール、ジヒドロコレステロール、コレステロールエステル、フィトステロール、シトステロール、スチグマステロール、カンペステロール、コレスタノール、またはラノステロール等が挙げられる。また、安定剤として、1-O-ステロールグルコシド、1-O-ステロールマルトシドまたは1-O-ステロールガラクトシドといったステロール誘導体を含有していてもよい。本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームがステロール類を含有する場合、その含有量は、脂質全分子に対して0.05~70モル%であることが好ましく、0.1~60モル%であることがより好ましく、0.5~40モル%であることがさらに好ましい。上記範囲内であれば、 $C_{70}$ 含有リポソームの形成を阻害することなく、 $C_{70}$ 含有リポソームを安定化させることができる。また、 $C_{70}$ 含有リポソームがコレステロールを含有する場合、該コレステロールは、ポリアルキレンオキシド導入用のアンカーにもなり得る。ポリオキシアリキレン鎖の先端には、種々の機能性物質を共有結合により固定化することができる。

[0055] また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、グリコール類を含有していてもよい。上記グリコール類としては、例えば、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチ

レングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、トリメチレングリコール、1,4-ブタンジオール等を挙げることができる。また、その含有量は、 $C_{70}$ 含有リポソームの全脂質に対して0.01~20モル%であることが好ましく、0.5~10モル%であることがより好ましい。上記構成によれば、 $C_{70}$ 含有リポソーム内に、水溶性の物質を効率よく保持させることができる。また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、負荷電物質であるジセチルホスフェートといったリン酸ジアルキルエステルや、正電荷を与える化合物としてステアリルアミン等の脂肪族アミン等を含有一ついてもよい。

[0056] さらに、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、その粒子表面に、特定の機能を付与するための置換基を有していたり、特定の機能を付与するための分子が付加もしくは挿入されたりしていてもよい。上記置換基および分子としては、例えば、 $C_{70}$ 含有リポソームを生体に投与した場合に、特定の臓器や組織にターゲティングさせるための置換基および分子、並びに $C_{70}$ 含有リポソームの安定性を向上させるための置換基および分子等を挙げることができる。より具体的には、 $C_{70}$ 含有リポソームの安定性を向上させるための分子として、例えば、高分子鎖であるポリアルキレンオキシド(PAO)基(ポリオキシアルキレン鎖)または類似の基を有するリン脂質または化合物を挙げることができる。PAO基またはポリエチレングリコール(PEG)鎖を $C_{70}$ 含有リポソーム表面に付けることにより、 $C_{70}$ 含有リポソームの安定性を向上させることができる。また、 $-(CH_2CH_2O)_n-H$ であらわされるPEG基のオキシエチレン単位の長さで導入する割合を適宜変えることにより、その機能を調節することができる。PEG基としては、オキシエチレン単位が10~3500のPEG基であることが好ましく、オキシエチレン単位が100~2000のPEGであることがより好ましい。本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームがPEGを含有する場合、その含有量は、 $C_{70}$ 含有リポソームの全脂質に対して0.1~30モル%であることが好ましく、1~15モル%であることがより好ましい。なお、 $C_{70}$ 含有リポソームのPEG化には、従来公知のリポソームのPEG化技術を用いることができる。

[0057] また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームが $-(AO)_n-Y$ (式中、AOは炭素数2~4のオキシアルキレン基を表し、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数を表し、Yは、水素原子、アルキル基または機能性官能基を表す。)で表されるPAO基を有す



る場合、上記式中、 $n$ は、1～2000であることが好ましく、10～500であることがより好ましく、20～200であることがさらに好ましい。上記炭素数2～4のオキシアルキレン基としては、例えばオキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基等を挙げることができる。

[0058] また、上記式の $n$ が2以上の場合、オキシアルキレン基は、同一のものであってもよいし、異なるものであってもよい。異なるものである場合、ランダム状に付加されても、ブロック状に付加されてもよい。また、PAO基に親水性が付与される場合、オキシアルキレン基としてはエチレンオキシドが単独で付加されていることが好ましく、さらに、上記式の $n$ が10以上であることがより好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加される場合、エチレンオキシドが20モル%以上付加されることが好ましく、50モル%以上付加されることがより好ましい。PAO基に親油性が付与される場合、エチレンオキシド以外のオキシアルキレン基の付加モル数が多いことが好ましい。例えば、ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドとのブロック共重合物であることが好ましい。

[0059] また、上記式の $Y$ のアルキル基としては、炭素数1～5の脂肪族炭化水素基(分岐していてもよい)を挙げることができる。上記「機能性官能基」とは、PAO基の先端に糖、糖タンパク質、抗体、レクチン、細胞接着因子といった「機能性物質」を付加するための置換基が意図される。具体的には、例えば、アミノ基、オキシカルボニルイミダゾール基、 $N$ -ヒドロキシコハク酸イミド基といった反応性に富む置換基が挙げられる。先端に上記機能性物質が結合した $C_{70}$ 含有リポソームは、PAO基の効果に加えて、上記機能性物質の機能、例えばがん組織指向性またはがん細胞認識性といった「認識素子」としての効果をも有する。また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームがPAO基を有するリン脂質または化合物を含有する場合、該リン脂質または化合物は、単一種であってもよいし、複数種の組み合わせであってもよい。また、その含有量は、 $C_{70}$ 含有リポソームの全構成成分の0.001～50モル%であることが好ましく、0.01～25モル%であることがより好ましく、0.1～10モル%であることがさらに好ましい。また、 $C_{70}$ 含有リポソームへのPAO基の導入は、従来公知の技

術を用いて行うことができる。

[0060] 本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームの大きさは、特に限定されるものではない。具体的には、 $C_{70}$ 含有リポソームの用途に応じて、適した大きさに設計されうるものである。例えば、 $C_{70}$ 含有リポソームを向腫瘍性治療薬として用い、EPR効果により、がん組織へ選択的に $C_{70}$ 含有リポソームをターゲティングさせる場合、該 $C_{70}$ 含有リポソームの平均粒径は、50nm～200nmであることが好ましく、60nm～200nmであることがより好ましく、特に70nm～150nmであることがさらに好ましい。また、局所化学療法である動注化学療法に基づき、 $C_{70}$ 含有リポソームを、がん病巣近傍の血管までカテーテルを通して直接適用する場合、 $C_{70}$ 含有リポソームの平均粒径は、500nm～1.0 $\mu$ mであることが好ましく、700nm～900nmであることがより好ましく、750nm～850nmであることがさらに好ましく、800nm前後とすることが特に好ましい。上記平均粒径であれば、カテーテルから透過性が増した栄養動脈中に放出されても、がん組織に通じるその血管の壁孔から漏れずに、直接、標的のがん組織に、 $C_{70}$ 含有リポソームを到達させることができる。

[0061] 本発明において、 $C_{70}$ 含有リポソームに含有される $C_{70}$ の含有量は、特に限定されるものではない。 $C_{70}$ 含有リポソームにおける $C_{70}$ の含有量は、後述の $C_{70}$ 含有リポソームの製造方法に記載するように、所望に変化させることができる。 $C_{70}$ の含有量を変更することで、 $C_{70}$ 含有リポソームの性質を変化させることができる。より具体的に説明すると、 $C_{70}$ 含有リポソーム中で $C_{70}$ が会合している場合、 $C_{70}$ の含有量を変更することにより、 $C_{70}$ 含有リポソーム中での $C_{70}$ の会合状態が変化する。そのため、単に $C_{70}$ の含有量が増加したことによる性質の変化に加えて、会合状態の変化による性質の変化が期待される。したがって、 $C_{70}$ 含有リポソームにおける $C_{70}$ の含有量は、該 $C_{70}$ 含有リポソームの用途によって、適宜変更することが好ましい。例えば、 $C_{70}$ 含有リポソームをPDT用途に用いる場合、該 $C_{70}$ 含有リポソームは、全脂質に対して、0.1～20モル%の $C_{70}$ を含有することが好ましく、0.5～15モル%の $C_{70}$ を含有することがより好ましい。このような構成とすれば、 $C_{70}$ 含有リポソーム1分子当たりの光照射による活性酸素発生量を増加させることができる。それゆえ、少量の $C_{70}$ 含有リポソームで、PDTの効果を得ることができる。

[0062] 本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、以上のような構成を備えているため、水性溶媒に対して可溶である。また、平均粒径、 $C_{70}$ の含有量、リポソームの組成、およびその他の成分の添加により、 $C_{70}$ 含有リポソームの物性を所望に制御することができる。それゆえ、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、その物性に応じて、様々な用途に用いることができる。具体的には、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、一実施形態において、光照射により活性酸素を発生する性質を有する。このような $C_{70}$ 含有リポソームは、光活性が高く、後述の実施例に示すように、波長が350～700nmの光による励起によっても、多くの活性酸素を発生することができる。それゆえ、このような $C_{70}$ 含有リポソームは、PDT、殺菌、滅菌等の用途に好適に用いることができる。また、DNAを切断するための用途、例えば、研究用試薬としても用いることができる。なお、本明細書でいう「光活性」とは、光の照射により励起される活性が意図され、好ましくは、光の照射により活性酸素を生成する活性が意図される。また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、一実施形態として、活性酸素を消去する性質を有する。このような $C_{70}$ 含有リポソームは、活性酸素の消去が必要とされる用途に幅広く用いることができる。

[0063] <II.  $C_{70}$ 含有リポソームを含有する組成物>

また、本発明は、一実施形態として、上述した本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームを含有する組成物を提供する。本発明にかかる組成物は、上述した $C_{70}$ 含有リポソームを含んでいればよく、その他の具体的な構成は特に限定されるものではない。例えば、 $C_{70}$ 含有リポソームが水性溶媒に溶解した溶液は、本発明にかかる組成物に含まれる。また、本発明にかかる溶液の用途も、特に限定されるものではない。以下、本発明にかかる組成物の一実施形態として、薬学的組成物、殺菌用組成物および化粧品用組成物について説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0064] (A)薬学的組成物

本実施形態にかかる組成物は、光照射、好ましくは、波長が350～800nmの光照射、より好ましくは、波長が350～700nmの光照射により、活性酸素を発生する $C_{70}$ 含有リポソームを含有する。具体的には、 $C_{70}$ がカチオン性脂質を含有するリポソームによって包含された $C_{70}$ 含有リポソームであることが好ましい。上記カチオン性脂質と

しては、例えば、上記例示したカチオン性脂質を含有させることができるが、中でも、上記式(2)で表される脂質を含有させることが好ましい。また、その含有量は、全脂質量の1~50モル%であることが好ましく、10モル%であることがより好ましい。

[0065] さらに、本実施形態では、上記リポソームは、カチオン性脂質に加えて、中性脂質を含有することが好ましい。該中性脂質についても、例えば、上記例示した中性脂質を含有させることができるが、中でも、上記式(1)で表される脂質を含有させることが好ましい。その含有量は、全脂質量の50~99モル%であることが好ましく、90モル%であることがより好ましい。つまり、本実施形態にかかる組成物に含有される $C_{70}$ 含有リポソームの好ましい一実施形態として、全脂質量に対して、上記式(2)で表される脂質を10モル%、上記式(1)で表される脂質を90モル%含有する $C_{70}$ 含有リポソームを挙げることができる。

[0066] 本実施形態にかかる組成物において、上記 $C_{70}$ 含有リポソームの含有量は、特に限定されるものではないが、2~20モル%であることが好ましく、5~15モル%であることがより好ましい。また、本実施形態にかかる組成物では、上記 $C_{70}$ 含有リポソーム以外に、薬学的に許容される成分を含有していてもよい。そのような成分としては、例えば、生理学的に許容される各種の緩衝剤、EDTA  $Na_2$ -Ca、EDTA  $Na_2$  等といったエドト酸系のキレート化剤、薬理的活性物質(例えば血管拡張剤、凝固抑制剤等)、さらには浸透圧調節剤、安定化剤、抗酸化剤(例えば $\alpha$ -トコフェロール、アスコルビン酸)、粘度調節剤、保存剤等を挙げることができる。上記浸透圧調節剤としては、例えば、生理食塩水(0.9%食塩水)を挙げることができる。また、pH緩衝剤としては、アミン系緩衝剤および炭酸塩系緩衝剤が挙げられる。

[0067] 本実施形態にかかる組成物は、PDT用として用いることができる。その場合、本実施形態にかかる組成物を投与する方法は特に限定されるものではなく、例えば、治療すべき患部に対して皮下注射、静脈注射、外科的手段等によって投与することができる。また、本実施形態にかかる組成物をPDTに用いる場合、該組成部を投与後、患部を一定時間、光に曝露しない環境に置いたのちに、該患部に対して一定時間の光を照射する。この際、光の波長は特に限定されるものではないが、350~800nmであることが好ましく、350~700nmであることがより好ましい。このような波長の光

によれば、患部に効率よく光を照射することができる。また、光を照射する方法は特に限定されるものではなく、例えば、人工拡散光源、レーザー等各種の光源を用いて光を照射することができる。好ましい光源としては、より具体的には、ハロゲン灯、キセノン灯、メタルハライド灯等を挙げることができる。中でも、可視光に強い放射強度スペクトルを持つ光源としてメタルハライド灯を用いることが好ましい。また、光源としてLEDや有機EL素子等の発光素子を用いることもできる。

[0068] また、本実施形態にかかる組成物をPDTに用いる場合、その治療対象は特に限定されるものではない。例えば、癌細胞、加齢黄斑変性症、粥状動脈硬化病変、関節リウマチ病変、難治性疣贅、尋常性座瘡、およびパピロマーウイルスに対する治療に用いることができる。中でも、癌細胞、および加齢黄斑変性症の治療に好適に用いることができる。上記癌細胞の種類は特に限定されず、各種の癌細胞に対して用いることができる。また、加齢黄斑変性症は、色を識別する細胞を持つ網膜の黄斑と呼ばれる部分が加齢に伴い変化する疾患であるが、本実施形態にかかる組成物は、加齢黄斑変性症の中でも、脈絡新生血管を伴う「滲出型」の加齢黄斑変性症の治療に好適に用いることができる。

[0069] (B) 殺菌用組成物

本実施形態にかかる組成物は、光照射、好ましくは、波長350～800nmの光照射、より好ましくは波長350～700nmの光照射により、活性酸素を発生するC<sub>70</sub>含有リポソームを含有する。その含有量は、特に限定されず、光照射によりC<sub>70</sub>含有リポソームが発生する活性酸素により微生物等を死滅させることができる程度の量であればよい。また、本実施形態にかかる組成物の具体的な使用方法は、特に限定されるものではないが、例えば、本実施形態にかかる組成物を微生物が存在する部分に散布し、散布した領域を自然太陽光に曝すか、もしくは人工光源によって一定時間光照射する。人工光源によって照射する場合は、紫外光をフィルター等でカットした光を照射することが好ましい。

[0070] また、本実施形態にかかる組成物を用いて殺菌を行う場合、殺菌対象となる微生物は特に限定されない。例えば、大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌等の細菌に対する殺菌あるいは抗菌に用いることができる。また、クラドスポリウム(クロカビ)、アルペルギ

ウス等のカビの除去あるいは発生防止に用いることも可能である。

[0071] (C)化粧品用組成物

本実施形態にかかる組成物は、活性酸素を消去することが可能なC<sub>70</sub>含有リポソームを含有する。本実施形態にかかる組成物は、該C<sub>70</sub>含有リポソームと共に、他の化粧品の配合成分を含有することが好ましい。上記他の化粧品の配合成分としては、例えば、ゲル化剤、紫外線吸収剤、抗菌剤、pH調整剤、動植物由来及び微生物由来の抽出物、ビタミン類、アミノ酸類、核酸関連物質、ホルモン、酵素、血行促進剤、皮膚収斂剤、および抗脂漏剤等を挙げることができる。

[0072] 上記ゲル化剤としては、例えば、N-ラウロイル-L-グルタミン酸、 $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジ-n-ブチルアミン等のアミノ酸誘導体、デキストリンパルミチン酸エステル、デキストリンステアリン酸エステル、デキストリン2-エチルヘキ酸パルミチン酸エステル等のデキストリン脂肪酸エステル、シヨ糖パルミチン酸エステル、シヨ糖ステアリン酸エステル等のシヨ糖脂肪酸エステル、モノベンジリデンソルビトール、ジベンジリデンソルビトール等のソルビトールのベンジリデン誘導体、ジメチルベンジルドデシルアンモニウムモンモリロナイトクレー、ジメチルジオクタデシルアンモニウムモンモリロナイトクレー等の有機変性粘土鉱物等を挙げることができる。

[0073] 上記紫外線吸収剤としては、たとえb、パラメキシケイ皮酸-2-エチルヘキシル、パラメキシケイ皮酸イソプロピル、パラメキシハイドロ皮酸ジエタノールアミン塩、ジパラメキシケイ皮酸-モノ-2-エチルヘキサ酸グリセリル、メキシケイ皮酸オクチル、ジイソプロピルケイ皮酸メチル等のケイ皮酸系紫外線吸収剤; 2-ヒドロキシ-4-メキシベンゾフェノン、2-ヒドロキシ-4-メキシベンゾフェノン-5-硫酸、2-ヒドロキシ-4-メキシベンゾフェノン-5-硫酸ナトリウム、2, 4-ジヒドロキシベンゾフェノン、2, 2'-ジヒドロキシベンゾフェノン、2, 2', 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン、2-ヒドロキシ-4-n-オクトキシベンゾフェノン等のベンゾフェノン系紫外線吸収剤; パラアミノ安息香酸、パラアミノ安息香酸エチル、パラアミノ安息香酸ブチル、パラジメチルアミノ安息香酸-2-エチルヘキシル、パラアミノ安息香酸グリセリル、パラアミノ安息香酸アミル等の安息香酸系紫外線吸収剤; サリチル酸-2-エチルヘキシル、サリチル酸トリエタノールアミン、サリチル酸ホモメンチル、サリチル

酸ジプロピレングリコール、サリチル酸メチル、サリチル酸エチレングリコール、サリチル酸フェニル、サリチル酸アミル、サリチル酸ベンジル、サリチル酸イソプロピルベンジル、サリチル酸カリウム等のサリチル酸系紫外線吸収剤;4-*t*-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン、4-イソプロピルジベンゾイルメタン、4-メトキシベンゾイルメタン、4-*t*-butiru-4'-ヒドロキシジベンゾイルメタン等のジベンゾイルメタン系紫外線吸収剤;メチル-*O*-アミノベンゾエート、2-フェニル-ベンズイミダゾール-5-硫酸、2-フェニル-5-メチルベンゾキサゾール、3-(4-メチルベンジリデン)カンフル、2-エチルヘキシル-2-シアノ-3,3-ジフェニルアクリレート、2-エチル-2-シアノ-3,3'-ジフェニルアクリレート、2-(2'-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール、アントラニル酸メンチル等のアントラニル酸系紫外線吸収剤;ウロカニン酸エチル等のウロカニン酸紫外線吸収剤;酸化チタン、酸化ジルコニウム、酸化セリウム等を挙げることができる。

- [0074] 上記抗菌剤としては、例えば、安息香酸、安息香酸ナトリウム、サリチル酸、石炭酸、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸エステル、パラクロルメタクレゾール、ヘキサクロロフェン、塩化ベンザルコニウム、塩化クロルヘキシジン、トリクロロカルバニリド、感光素、ビス(2-ピリジルチオ-1-オキシド)亜鉛、ペンタジオール、アイチュリン、サーファクチン、ポリグリシン、エタノール、フェのキシエタノール、イソプロピルフェノール等を挙げることができる。
- [0075] 上記pH調整剤としては、例えば、乳酸、クエン酸、グリコール酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素アンモニウム等、清涼剤としては、L-メントール、カンフル等を挙げることができる。
- [0076] 上記動植物由来及び微生物由来の抽出物としては、例えば、ブタ、ウシ等の血液抽出液、血清除蛋白抽出物、脾臓抽出物、トリの卵成分、鶏冠抽出物、魚肉抽出部、イカスミ、キチン、キトサン、貝殻抽出物、貝肉抽出物、ローヤルゼリー、シルクプロテイン及びその分解物又はそれらの誘導體、ヘモグロビン又はその分解物、牛乳、カゼイン及びその誘導體又はそれらの分解物、ラクトフェリン又はその分解物、コラーゲン及びその誘導體又はそれらの加水分解物、エラスチン及びその誘導體又はそれらの加水分解物、ケラチン及びその誘導體又はそれらの分解物等、哺乳類、鳥類

、魚類、軟体動物類、甲殻類、貝類、昆虫類等の動物由来抽出物；酵母代謝物、醗酵代謝産物、酵母抽出物、乳酸菌抽出物、ビフィズス菌抽出物等の微生物由来の抽出物、グラブリジン、グラブレン、リクイリチン、イソリクイリチン及びこれらを含むカンゾウ抽出物、胎盤抽出物、カロチノイド類及びこれらを含む動植物抽出物、ネオアガロビオース、アガロースオリゴサッカライド、アスパラガス抽出物、イブキトラノオ抽出物、エンドウ豆抽出物、エイジツ抽出物、オウゴン抽出物、オノニス抽出物、海藻抽出物、キイチゴ抽出物、クジン抽出物、ケイケツウ抽出物、ゴカヒ抽出物、リノール酸を含む植物油、サイシン抽出物、サンザシ抽出物、サンペンス抽出物、シラユリ抽出物、シャクヤク抽出物、センブクカ抽出物、ソウハクヒ抽出物、大豆抽出物、茶抽出物、トウキ抽出物、糖蜜抽出物、ビャクレン抽出物、ブナノキ抽出物、ブドウ種子抽出物、フローデマニータ抽出物、ホップ抽出物、マイカイカ抽出物、モッカ抽出物、ユキノシタ抽出物、ヨクイニン抽出物及び羅漢果抽出物、アスパラガス、アカネ、アカブドウ、アカメガシワ、アケビ、アサ、アサガオ、アズキ、アセンヤク、アマチャ、アマチャヅル、イタドリ、イチジク、イチョウ、イランイラン、ウツボグサ、ウメ、ウワウルシ、ウンシュウミカン、エゾウコギ、エビスグサ、エンジュ、エンドウ、オオバコ、オクラ、オグルマ、オニグルミ、オミナエシ、オランダイチゴ、カキ、カキドウシ、カシュウ、カシュー、カノコソウ、カラスウリ、カリン、ガラナ、キキョウ、キク、キササゲ、ギシギシ、ギムネマ・シルベスタ、キンミズヒキ、グアバ、クコ、クズ、クスノキ、クリ、ケイケツウ、ゲッケイジュ、ケイヒ、ゴシヨイチゴ、コシヨウ、コーヒー、ゴマノハグサ、コロombo、サザンカ、サンショウ、サフラン、サクラ、ザクロ、サンズコン、サンペンス、シオン、ショウブ、スイカ、ステビア、スモモ、セイヨウキズタ、セイヨウナシ、セイヨウノギリソウ、セイヨウネズ、セイヨウワサビ、セキショウ、セリ、セネガ、センナ、ダイオウ、ダイダイ、タマリンド、タラノキ、タンポポ、チコリ、チョウジ、チョウセンゴミシ、チョレイ、ツキミソウ、ツボクサ、ツユクサ、ツルナ、テウチグルミ、トウガン、トチュウ、トロロアオイ、ナズナ、ナツミカン、ナンテン、ニガキ、ノギリソウ、パイナップル、ハイビスカス、パパイヤ、バジル、ハス、ハダカムギ、ヒオウギ、ピーナツ、ヒキオコシ、ヒシ、ピスタチオ、ヒバ、ヒメマツタケ、ビャクシ、ビワ、フキタンポポ、フシノキ、フジバカマ、ブルーベリー、ボウフウ、ホオズキ、ホオノキ、ボケ、マイカイ、マオウ、マンゴー、マンネンタケ、ミシマサイコ、ミソハギ、ミツバ、ミ



モザ、メリロート、メロン、モクレン、モモルディカ・グロスベノリイ、モロヘイヤ、モヤシ、ヤクチ、ヤクモソウ、ガグルマソウ、ヤシ、ヤシヤジツ、ヤドリギ、ヤナギタデ、ヤマゴボウ、ヤマモモ、ユズリハ、ヨモギ、ライムギ、ラン、リュウガン、リンゴ、レイシ、レンギョウ等を挙げることができる。

[0077] 上記ビタミン類としては、例えば、リノレン酸及びその誘導体等のビタミンF類；フィトナジオン、メナキノン、メナジオン、メナジオール等のビタミンK類；エリオシトリン、ヘスペリジン等のビタミンP類；その他、ビオチン、カルチニン、フェルラ酸等を挙げることができる。

[0078] 上記アミノ酸類としては、例えば、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、シスチン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、プロリン、ヒドロキシプロリン、オルチニン、シトルリン、テアニン等のアミノ酸及びそれらの誘導体並びにそれらの塩、あるいはピロリドンカルボン酸等のアミノ酸誘導体またはその誘導体等が挙げられる。

[0079] 上記核酸関連物質としては、例えば、デオキシリボ核酸及びその塩、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸から選ばれるアデニル酸誘導体及びそれらの塩、リボ核酸及びその塩、サイクリックAMP、サイクリックGMP、フラビンアデニンヌクレオチド、グアニン、アデニン、シトシン、チミン、キサンチン及びそれらの誘導体であるカフェイン、デオフィリン並びにそれらの塩等が挙げられる。

[0080] 上記ホルモンとしては、例えば、エストラジオール、エテニルエストラジオール等が挙げられる。さらに、上記酵素としては、例えば、リパーゼ、パパイン等が挙げられる。

[0081] 上記血行促進剤としては、例えば、ノニル酸ワレニルアミド、カプサイシン、ジンゲロン、カンタリスチンキ、イクタモール、 $\alpha$ -ボルネオール、イノシトールヘキサニコチネート、シクランデレート、シンナリジン、トラゾリン、アセチルコリン、バラパミル、セファランチン、 $\gamma$ -オリザノール等が挙げられる。また、上記皮膚収斂剤としては、例えば、タンニン酸等が挙げられ、上記抗脂漏剤としては、例えば、イオウ、チアントロール等が挙げられる。

[0082] また、本実施形態にかかる組成物の形状は特に限定されるものではなく、粉末状、

バルク状、ペースト状、溶液状、分散液状、膜状、あるいはゲル状等でありうる。

[0083] <III. C<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法>

本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法は、上述した本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームを製造するために、好適に用いることができるものである。以下、本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法の一実施形態について説明するが、それに先立ち、本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法を発明するに至った経緯について説明する。

[0084] 特許文献4および非特許文献2には、C<sub>60</sub>フラレン(以下、単に「C<sub>60</sub>」ともいう)のシクロデキストリン錯体を含有する溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含有する溶液とを、70～80℃程度で、数時間加熱攪拌してC<sub>60</sub>含有リポソームを製造する方法が開示されている。C<sub>60</sub>は、C<sub>70</sub>よりも自己会合しにくいという性質を有する。逆に言えば、C<sub>70</sub>は、C<sub>60</sub>よりも自己会合しやすい。フラレンは、自己会合するとリポソームに取り込まれにくくなると考えられる。したがって、特許文献4および非特許文献2に開示されるような方法では、C<sub>70</sub>をリポソームに取り込ませることは困難であることが予想される。また、従来、C<sub>70</sub>含有リポソームが製造された例はなかった。このような状況下で、本発明者らは、後述の参考例に示すように、特許文献4および非特許文献2に順ずる方法でC<sub>70</sub>含有リポソームの製造を試みた。その結果、C<sub>70</sub>含有リポソームは製造できたが、リポソームへのC<sub>70</sub>の取り込み効率が悪い、粒子径が大きくなるといった問題があることが明らかとなった。そこで、本発明者らは、鋭意検討し、C<sub>70</sub>のシクロデキストリン錯体を含有する第1溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含有する第2溶液とを10～45℃で混合することにより、上記問題点が解消されたC<sub>70</sub>含有リポソームを、1分以内という実に短時間で製造できることを独自に見出し、本発明を完成させたのである。

[0085] すなわち、本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法は、シクロデキストリンC<sub>70</sub>錯体を含有する第1溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含有する第2溶液とを10～45℃で混合する工程(以下、「混合工程」ともいう)を含んでいればよく、その他の構成、使用器具、使用装置等は特に限定されるものではない。例えば、本発明にかかるC<sub>70</sub>含有リポソームの製造方法は、一実施形態として、上記混合工程の後、C<sub>70</sub>

含有リポソームの表面に、特定の機能を付与するための置換基を導入したり、特定の機能を付与するための脂質を挿入したりするといった $C_{70}$ 含有リポソームを修飾する工程(以下、「修飾工程」ともいう)を含んでいてもよい。より具体的には、上記修飾工程は、上述の<I.  $C_{70}$ 含有リポソーム>で説明した構造を有する $C_{70}$ 含有リポソームを製造するために必要となる操作工程を包含するものである。本明細書において、「 $C_{70}$ 含有リポソームの修飾」とは、 $C_{70}$ 含有リポソームを化学的または物理的に改変することが意図される。また、上記修飾工程は、上記混合工程の後に行うことに限定されるものではなく、上記混合工程の前に行ってもよいし、上記混合工程と同時に進行してもよい。

[0086] また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームの製造方法は、一実施形態として、 $C_{70}$ 含有リポソームを精製する工程(以下、「精製工程」ともいう)を含んでいてもよい。上記混合工程では、 $C_{70}$ 含有リポソームを含む水溶液が製造される。上記精製工程では、上記水溶液から $C_{70}$ 含有リポソームのみを単離したり、その単離した $C_{70}$ 含有リポソームを他の溶媒に溶解したり、上記水溶液中の不純物(析出物や沈殿物)を除去したりすることができる。

[0087] 以下、上記混合工程について、より詳細に説明する。

[0088] 上記混合工程では、上記第1溶液と第2溶液とを $10\sim 45^{\circ}\text{C}$ で混合する。混合方法は、特に限定されるものではなく、上記第1溶液と第2溶液とは混ざり合っ、均一な溶液となればよい。

[0089] 上記第1溶液は、少なくともシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体を含有する水溶液であればよく、その他の成分が含有されていてもよい。上記シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体は、水性溶媒に可溶であるが、熱的に安定性に乏しいという欠点があり、産業上の利用性が少ないとされる。本発明者らは、シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体のこの不安定性を逆に利用して、安定性に優れ、実用的な $C_{70}$ 含有リポソームを製造することに成功したのである。上記シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、非特許文献1に開示される方法に製造することができる。また、シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体を構成するシクロデキストリンは、特に限定されるものではない。例えば、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、 $\delta$ -シクロデキストリン、 $\epsilon$ -シク

ロデキストリン、およびそれらのメチル化されたシクロデキストリンを挙げることができる。すなわち、本発明におけるシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体は、 $\beta$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、 $\delta$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、および $\epsilon$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体、並びに、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、 $\delta$ -シクロデキストリン、もしくは $\epsilon$ -シクロデキストリンのモノ、ジ、またはトリメチル化体と $C_{70}$ フラレーンとの錯体からなる群より選択されるシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体である。中でも、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体を用いることが好ましい。また、上記例示したシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体は、単独で用いてもよいし、複数を組み合わせて用いてもよい。選択するシクロデキストリン $C_{70}$ 錯体の種類および/または組み合わせを変更することにより、物性の異なる $C_{70}$ 含有リポソームを製造することができる。

[0090] 上記第2溶液は、リポソームを形成可能な脂質を含有する水溶液であればよく、その他の構成は特に限定されない。すなわち、リポソームを形成可能な脂質以外の成分が含まれていてもよい。このような成分としては、例えば、得られる $C_{70}$ 含有リポソームを修飾するための成分を挙げることができる。具体的には、例えば、上述の<I.  $C_{70}$ 含有リポソーム>に例示した成分を含有させることができる。このような成分を含有させることにより、得られる $C_{70}$ 含有リポソームに特定の機能を付与することができる。

[0091] 上記脂質は、カチオン性脂質、アニオン性脂質、および中性脂質のいずれであってもよく、これらを組み合わせて用いてもよい。つまり、上記<I.  $C_{70}$ 含有リポソーム>で例示したような脂質を適宜組み合わせて用いることができる。上記第2溶液の脂質の組成を変更することにより、得られる $C_{70}$ 含有リポソームの物性を所望に制御することができる。例えば、上記第2溶液にカチオン性脂質を含有させることにより、 $C_{70}$ 含有リポソームの細胞への取り込み効率(細胞透過性)を向上させることができる。さらに、 $C_{70}$ 含有リポソームに光を照射したときに、リポソームを損傷することなく、 $C_{70}$ から発生する活性酸素を $C_{70}$ 含有リポソーム外へ放出することができる。また、上述の式(1)および(2)で表される脂質を含むリポソームを用いれば、平均粒径がEPR効果により癌細胞に効率よくターゲティング可能な $C_{70}$ 含有リポソームを製造することができる。

[0092] 上記第2溶液中において、上記脂質は、リポソームを形成していてもよいし、上記混

合工程において、リポソームが形成されてもよい。

[0093] また、上記第1溶液中のシクロデキストリン $C_{70}$  錯体濃度および第2溶液中のリポソーム濃度は、特に限定されるものではなく、それぞれ、調製が可能な濃度範囲であればよい。また、上記第1溶液と第2溶液とを混合する比率も特に限定されるものではなく、製造する $C_{70}$  含有リポソームにおける $C_{70}$  の含有量が所望のものとなるように、適宜設定すればよい。つまり、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームの製造方法では、混合するシクロデキストリン $C_{70}$  錯体と脂質とのモル比を調整することにより、 $C_{70}$  含有リポソームにおける $C_{70}$  の含有量を所望に制御することができる。本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームの製造方法では、交換反応はほぼ完全に起こる。そのため、例えば、シクロデキストリン $C_{70}$  錯体1モルに対して、脂質が10モルとなるように、上記第1溶液と第2溶液とを混合すると、脂質の10モル%の $C_{70}$  を含有する $C_{70}$  含有リポソームを製造することができる。 $C_{70}$  含有リポソームに含有される $C_{70}$  の含有量が変化すると、該 $C_{70}$  含有リポソーム中における $C_{70}$  の会合状態が変化する。それゆえ、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームによれば、物性、例えば光特性が所望に制御された $C_{70}$  含有リポソームを製造することができる。

[0094] 以上のように、本発明にかかる $C_{70}$  含有リポソームの製造方法は上述の構成を備えているため、上記第1溶液と第2溶液とを混合して直ちに(具体的には1分以内に)、 $C_{70}$  含有リポソームが形成される。それゆえ、生産効率よく、 $C_{70}$  含有リポソームを製造することができる。また、上記構成によれば、加熱等の処理が不要であるため、設備の制限を受けることなく、低コストに $C_{70}$  含有リポソームを製造することができる。さらに、上記構成によれば、リポソームの組成や $C_{70}$  の含有量を所望に変更することが可能であるため、活性酸素に対して安定性に優れる $C_{70}$  含有リポソームや、活性酸素を効率よく消去する $C_{70}$  含有リポソームや、EPR効果により癌細胞へのターゲティングが可能な $C_{70}$  含有リポソーム等、所望の物性をもつ $C_{70}$  含有リポソームを製造することができる。

[0095] なお本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に

含まれる。

### 実施例

[0096] 本発明について、実施例、および図2～図6に基づいて、より具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正および改変を行うことができる。

[0097] [製造例1:  $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体の製造]

5.0mgの $C_{70}$ を、8倍モル等量の $\gamma$ -シクロデキストリン(61mg)と共に、高速振動条件で20分間処理した。これにより得られた混合物を、1.5mlの水で処理し、赤褐色の水溶液を得た。該赤褐色の水溶液を5倍希釈して、UV-vis吸収スペクトルを測定した。その吸収スペクトルは、シクロヘキサンに溶解した $C_{70}$ とほぼ同じであった。上記水溶液の原液を、 $2 \times 10^4$ Mとなるように希釈した。なお、濃度計算では、上記水溶液の381nmにおける分子吸光係数 $\epsilon_{381} = 3.80 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ を用いた。

[0098] [実施例1:  $C_{70}$ 含有リポソームの製造]

製造例1で製造した $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体を用いて、 $C_{70}$ 含有リポソームを製造した。具体的には、まず、製造例1で製造した、0.20mM  $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体溶液(1ml)に、2.0mM脂質溶液(上記式(1)で表される脂質:90モル%、上記式(2)で表される脂質:10モル%)を、室温(25°C)で加え、混合し、 $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液を得た。

[0099] なお、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体溶液中の $\gamma$ -シクロデキストリン濃度および $C_{70}$ 濃度、並びに脂質濃度は、それぞれ、NMRスペクトルの積算強度を用いて評価した。その結果、 $\gamma$ -シクロデキストリン濃度は1.9mM、 $C_{70}$ 濃度は0.1mM、脂質濃度は1.0mMであった。つまり、 $\gamma$ -シクロデキストリン: $C_{70}$ :脂質(モル比)は、1.9:0.1:1.0であった。

[0100]  $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体が、 $C_{70}$ 含有リポソームに変化したことは、US-vis吸収スペクトルの変化により確認した。また、得られた $C_{70}$ 含有リポソームにおける $C_{70}$ 濃度は、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体溶液の初期濃度と同じであった。つまり、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体中の $C_{70}$ は、全てリポソーム中に移動することが分かった。したがって、本実施例で製造された $C_{70}$ 含有リポソームは、脂質の10モル%の $C_{70}$

を含有していた。

[0101] こうして得られた $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液を用いて、 $C_{70}$ 含有リポソームのUV-vis吸収スペクトルを測定し、 $C_{60}$ 含有リポソームのUV-vis吸収スペクトルと比較した。

なお、 $C_{60}$ 含有リポソームは、非特許文献2に記載された方法で製造した。

[0102] その結果、図2に示すように、 $C_{70}$ 含有リポソームは、 $C_{60}$ 含有リポソームよりも全ての波長領域で高い吸光度を示した。特に、波長350nm~700nmの領域において、高い吸光度を示した。

[0103] [実施例2: $C_{70}$ 含有リポソームのDNA切断効果]

実施例1で製造した $C_{70}$ 含有リポソームによるDNA切断効果を、DNAとして、ColE1スーパーコイルプラスミドを用いて調べた。プラスミドは、図3の(a)に示すように、全く切断されていないスーパーコイルを形成した状態(図3の(a)中のFormI)、切断によりスーパーコイル構造が解けた環状の状態(図3の(a)中のFormII)、および、さらに切断され、直鎖状となった状態(図3の(a)中のFormIII)をとる。本実施例では、 $C_{70}$ 含有リポソームにより、FormIのColE1プラスミドが切断され、FormIIまたはFormIIIとなる割合を調べた。

[0104] 実験では、ColE1スーパーコイルプラスミド(FormI、反応液中の濃度1.3mg/l)に、(1)何も添加しない、(2)光のみを照射する、(3) $C_{60}$ 含有リポソーム(反応液中の濃度30 $\mu$ M)のみを添加する、(4) $C_{60}$ 含有リポソーム(反応液中の濃度30 $\mu$ M)を添加して光を照射する、(5) $C_{70}$ 含有リポソーム(反応液中の濃度30 $\mu$ M)のみを添加する、または(6) $C_{70}$ 含有リポソーム(反応液中の濃度30 $\mu$ M)を添加して光を照射することによって、FormIIまたはFormIIIに切断された割合(切断率)を評価した。光照射は、500Wキセノンランプ(UI-502Q; Ushio, Inc)を用いて、10cmの距離から、好気条件、25°Cで、3時間行った。また、上記切断率の評価は、次の方法で行った。上記の処理後の試料に10% SDSおよびサンプルバッファー(和光純薬)を順に加え、0.9アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動後のゲルをSYBR Gold(10000倍希釈; Molecular Probes Inc.)で染色し、UVトランスイルミネーターで観察した画像の画像解析により上記切断率を算出した。

[0105] その結果、図3の(b)に示すように、(1)何も添加しなかった場合、ColE1スーパーコ

イルプラスミドは全く切断されなかった。また、(2)光のみを照射した場合、(3) $C_{60}$ 含有リボソームのみを添加した場合、(5) $C_{70}$ 含有リボソームのみを添加した場合にも、ColE1スーパーコイルプラスミドはほとんど切断されなかった。一方、(4) $C_{60}$ 含有リボソームを添加して光を照射した場合、および(6) $C_{70}$ 含有リボソームを添加して光を照射した場合には、ColE1スーパーコイルプラスミドは切断された。その程度は、(6) $C_{70}$ 含有リボソームを添加して光を照射した場合のほうがはるかに高く、(6) $C_{70}$ 含有リボソームを添加して光を照射した場合には90%以上が切断されたのに対して、(4) $C_{60}$ 含有リボソームを添加して光を照射した場合には、26%と、約1/4程度のDNAしか切断されなかった。

[0106] また、 $C_{70}$ 含有リボソームによるDNAの光切断と、 $C_{60}$ 含有リボソームによるDNAの光切断とを、光照射開始後、経時的に比較した。その結果、図3の(c)に示すように、 $C_{70}$ 含有リボソームでは、約2時間で90%以上のDNAが切断されるのに対して、 $C_{60}$ 含有リボソームでは、3時間経過しても、約30%のDNAしか切断されなかった。さらに、 $C_{70}$ 含有リボソームによるDNAの光切断の切断レベルを調べた。その結果、図3の(d)に示すように、光照射時間が長くなるにつれて、FormIIIまで切断されるDNAの割合が増加した。

[0107] 以上の結果、 $C_{70}$ 含有リボソームは、 $C_{60}$ 含有リボソームよりも、DNAの光切断能力が遥かに高いことが分かった。

[0108] [実施例3: $C_{70}$ 含有リボソームのHeLa細胞への光線力学活性]

実施例1で製造した $C_{70}$ 含有リボソームのHeLa細胞に対する光線力学活性を評価した。また、実験では、 $C_{60}$ 含有リボソームについても同様の評価を行い、両者の比較も併せて行った。

[0109] 実験は、以下の方法により行った。まず、培養したHeLa細胞を35mmディッシュに撒き、 $37^{\circ}\text{C}$ -5%  $\text{CO}_2$ 条件下で、80%コンフルエントに達するまでインキュベートした。そこに、(1) $C_{70}$ 含有リボソーム溶液、(2) $C_{60}$ 含有リボソーム、または(3)リボソーム溶液を、脂質濃度 $50\ \mu\text{M}$ となるように添加し、24時間インキュベートした。その後、取り込まれていないリボソームを取り除くため、培地を吸引除去し、 $37^{\circ}\text{C}$ に温めておいたPhosphate Buffer Saline (PBS) 1mlで洗浄を3回行った。さらに、 $37^{\circ}\text{C}$ に温め



ておいた培地2mlを添加し、光照射サンプルとした。その後、35°Cのインキュベーターに移し、400~800nmの波長領域で30分間光照射した。光照射後のディッシュの培地を除き、Annexin V-Propidium Iodide溶液 100  $\mu$  lをカバーグラス上に添加した。暗所で15分間静置後、1×PBSで洗浄(500  $\mu$  l×1回)した。さらに、蛍光剤溶液 100  $\mu$  lをカバーグラス上に添加し、暗所で15分間静置後、1×PBSで洗浄(500  $\mu$  l×1回)した。染色した細胞面を挟むようにカバーグラスをスライドグラスに被せたものを観察サンプルとし、顕微鏡下で観察した。その結果を図4に示す。図4の上段のパネルは位相差像を示すものである。該位相差像では、全細胞を観察することができる。一方、図4の下段のパネルは、ヨウ化プロピジウムで染色した細胞を蛍光顕微鏡下で観察した像を示す図である。該像では、死細胞を観察することができる。つまり、図4の上段のパネルの像と下段のパネルの像とを比較することにより、全細胞のうち、どの程度の細胞が死細胞であるかを評価することができる。

[0110] 図4に示すように、(3)リポソーム溶液で処理した場合(図4中、コントロールと記載)、ほとんど死細胞は観察されなかった。また、(2)C<sub>60</sub>含有リポソームで処理した場合、死細胞は観察されたが、全細胞に占める死細胞の割合は、5%と非常に低かった。一方、(1)C<sub>70</sub>含有リポソーム溶液で処理した場合、多くの死細胞が観察され、全細胞に占める死細胞の割合は、ほぼ100%であり、(2)C<sub>60</sub>含有リポソームで処理した場合よりも遥かに高かった。

[0111] 以上の結果、C<sub>70</sub>含有リポソームは、C<sub>60</sub>含有リポソームよりも、細胞を死滅させる能力(細胞殺傷能力)が遥かに高いことが分かった。

[0112] [参考例1]

$\gamma$ -シクロデキストリンC<sub>70</sub>錯体溶液に脂質溶液を加えた後、80°Cで2時間、加熱攪拌したことを除いて、実施例1と同様の方法で、C<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液を製造した。

[0113] その結果、図5の(a)に示すように、実施例1のC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液では沈殿物(析出物)が見られなかったのに対して、図5の(b)に示すように、本参考例のC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液では、沈殿物(析出物)がサンプル瓶の壁面に付着していた。

[0114] さらに、実施例1のC<sub>70</sub>含有リポソーム水溶液および本参考例のC<sub>70</sub>含有リポソーム

水溶液を用いて、UV-vis吸光スペクトルを測定した。その結果を図6に示す。図6中、実線は室温で調製された $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液(実施例1の $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液)の吸収スペクトルを、破線は80°Cで2時間、加熱攪拌して調製された $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液(本参考例の $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液)の吸収スペクトルである。

[0115] 図6に示すように、本参考例の $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液では、800nmに0.010の散乱による吸光度の上昇が見られた。これは、 $C_{70}$ 含有リポソーム同士が融合し、大きな $C_{70}$ 含有リポソームに成長していることを示している。つまり、本参考例の方法で製造された $C_{70}$ 含有リポソームは、実施例1の方法で製造された $C_{70}$ 含有リポソームと比較して、平均粒子径が大きいことが分かった。また、本参考例の $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液では、 $C_{70}$ 由来の吸収ピークがブロードニングしていた。これは、 $C_{70}$ 同士の会合が進んでいることを示している。つまり、本参考例の方法では、 $C_{70}$ が沈殿しやすい状態にあることが分かった。さらに、本参考例の $C_{70}$ 含有リポソーム水溶液では、220nmおよび245nmのピークの吸光度が減少していた。これは、 $C_{70}$ の沈殿(析出)によって、系内の $C_{70}$ 濃度、換言すれば、 $C_{70}$ 含有リポソームに取り込まれた $C_{70}$ 量が低下していることを示している。つまり、本参考例の方法で製造された $C_{70}$ 含有リポソームは、光活性が低いことが分かった。

[0116] なお本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態や実施例にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態や実施例についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

[0117] 以上のように、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームは、 $C_{70}$ フラーレンがリポソームに包含された状態にある。それゆえ、 $C_{70}$ フラーレンが本来有する物性を有する状態で、安定に極性溶媒に対して $C_{70}$ フラーレンを可溶化することができるという効果を奏する。また、本発明にかかる $C_{70}$ 含有リポソームの製造方法によれば、シクロデキストリン $C_{70}$ 錯体を含む第1溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含む第2溶液とを10~45°Cで混合するという単純な工程で $C_{70}$ 含有リポソームを製造できる。それゆえ

、特別な設備を必要とすることなく、短時間で極性溶媒に対して可溶性C<sub>70</sub>含有リポソームを製造できるという効果を奏する。

[0118] 発明の詳細な説明の項においてなされた具体的な実施形態または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内において、いろいろと変更して実施することができるものである。

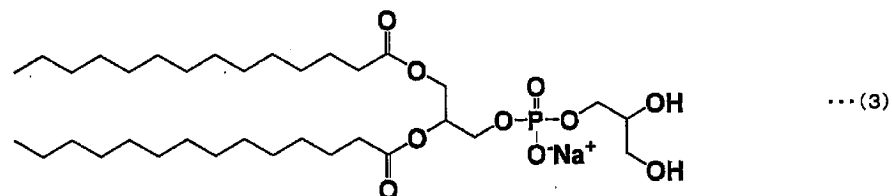
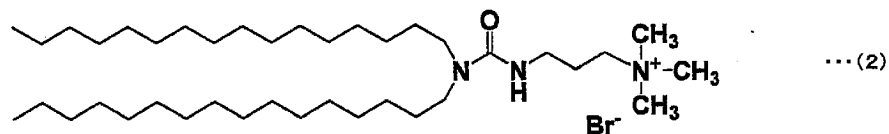
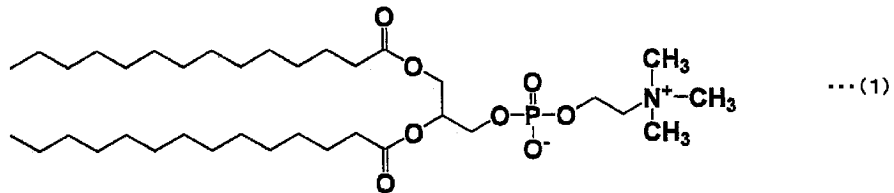
#### 産業上の利用可能性

[0119] 本発明は、C<sub>70</sub>をリポソームに包含させるため、機能を損なうことなく、C<sub>70</sub>を水性溶媒に対して可溶化することができる。それゆえ、PDT薬、殺菌剤、化粧品等の用途に用いることができるだけでなく、水溶性のC<sub>70</sub>を用いる医薬化学分野、材料化学分野、電気化学分野等に幅広く利用することができる。

## 請求の範囲

- [1]  $C_{70}$  フラーレンを含有するリポソームの製造方法であって、  
シクロデキストリン $C_{70}$  錯体を含有する第1溶液と、リポソームを形成可能な脂質を含有する第2溶液とを10～45℃で混合することを特徴とする $C_{70}$  含有リポソームの製造方法。
- [2] 上記シクロデキストリン $C_{70}$  錯体は、 $\beta$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体、 $\gamma$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体、 $\delta$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体、および $\epsilon$ -シクロデキストリン $C_{70}$  錯体、並びに、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、 $\delta$ -シクロデキストリン、もしくは $\epsilon$ -シクロデキストリンのモノ、ジ、またはトリメチル化体と $C_{70}$  フラーレンとの錯体からなる群より選択される少なくとも1つのシクロデキストリン $C_{70}$  錯体であることを特徴とする請求の範囲1に記載の $C_{70}$  含有リポソームの製造方法。
- [3] 上記第2溶液は、下記式(1)～(3)

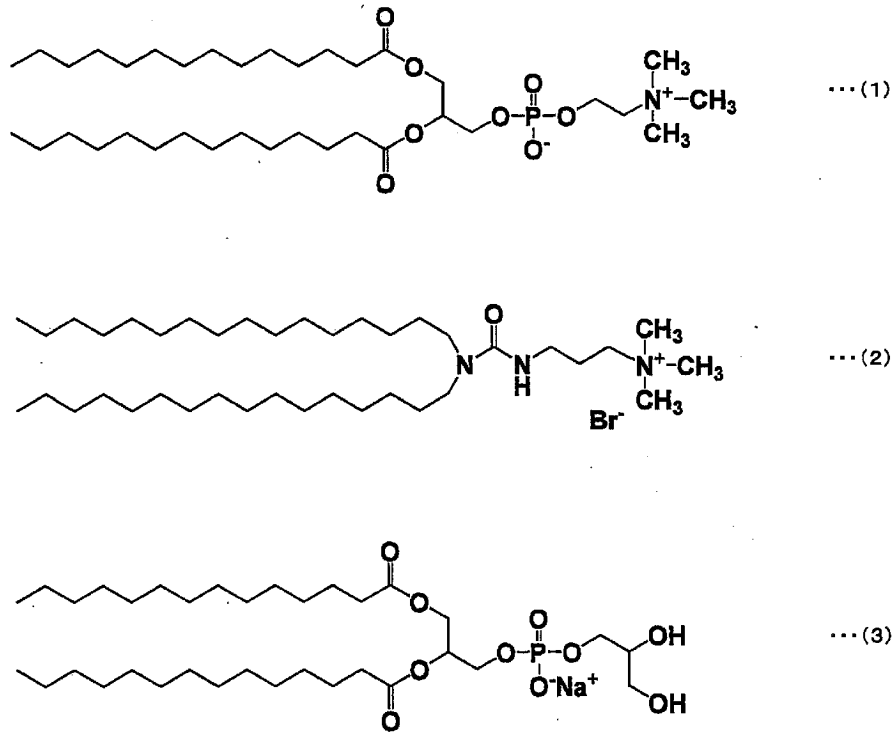
[化1]



で表される脂質からなる群より選択される少なくとも1つの脂質を含有することを特徴とする請求の範囲1に記載の $C_{70}$  含有リポソームの製造方法。

- [4] C<sub>70</sub> フラーレンを含有するリポソームであることを特徴とするC<sub>70</sub> 含有リポソーム。
- [5] 上記リポソームは、下記式(1)～(3)

[化2]

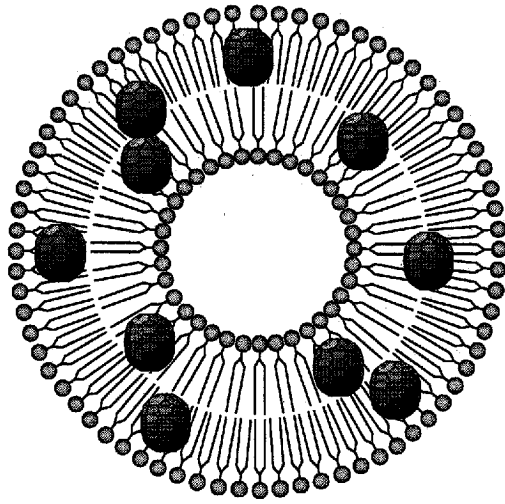


で表される脂質からなる群より選択される少なくとも1つの脂質を含有することを特徴とする請求の範囲4に記載のC<sub>70</sub> 含有リポソーム。

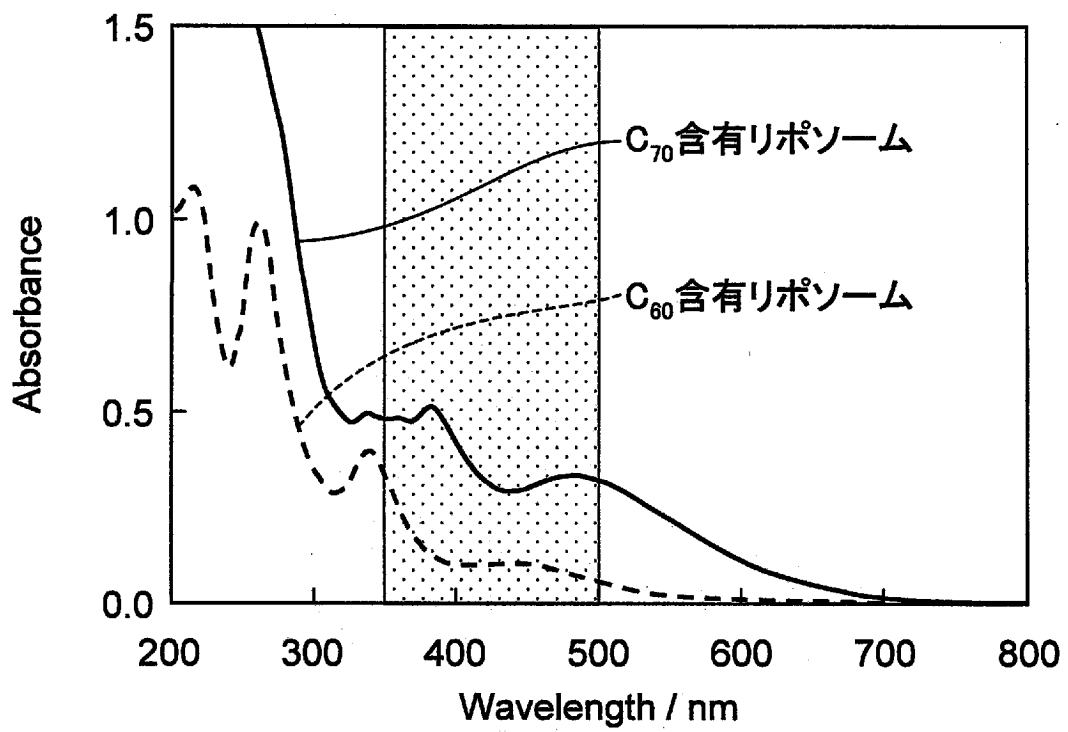
- [6] 波長が350～800nmの光の照射により、活性酸素を発生することを特徴とする請求の範囲4に記載のC<sub>70</sub> フラーレン含有リポソーム。
- [7] 上記リポソームを構成する全脂質に対して、0.1～20モル%のC<sub>70</sub> を含有することを特徴とする請求の範囲4に記載のC<sub>70</sub> 含有リポソーム。
- [8] 請求の範囲4～7のいずれか1に記載のC<sub>70</sub> 含有リポソームを含有することを特徴とする組成物。
- [9] 光線力学的治療に用いられることを特徴とする請求の範囲8に記載の組成物。
- [10] 上記光線力学的治療の治療対象が、癌細胞、加齢黄斑変性症、粥状動脈硬化病変、関節リウマチ病変、難治性疣贅、尋常性座瘡、およびパピロマーウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求の範囲9に記載の組成物。

- [11] 上記加齢黄斑変性症が滲出型であることを特徴とする請求の範囲10に記載の組成物。
- [12]  $C_{70}$ 含有リポソームの含有量が2～20モル%であることを特徴とする請求の範囲8に記載の組成物。
- [13] 請求の範囲4～7のいずれか1に記載の $C_{70}$ 含有リポソームを患部に投与する工程、および該患部に光照射する工程を包含することを特徴とする光線力学的治療法。

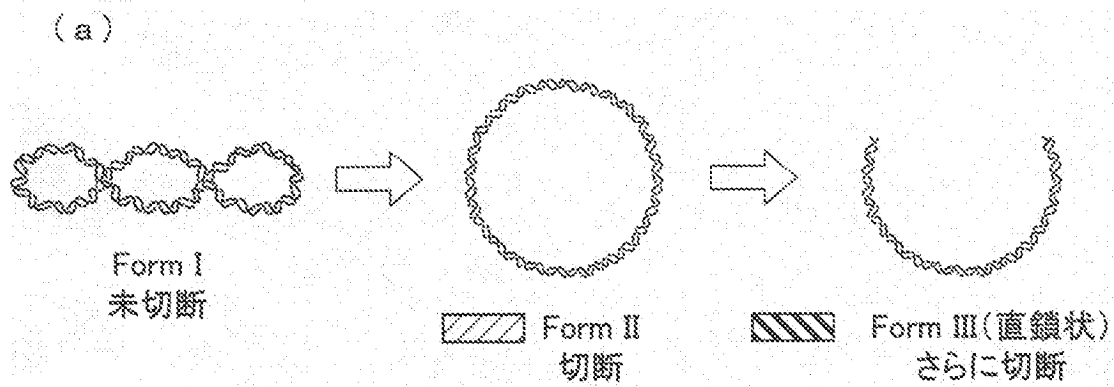
[図1]



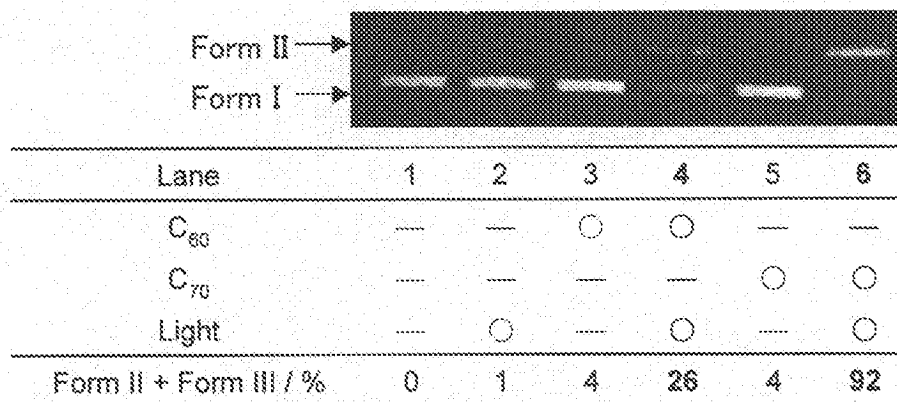
[図2]



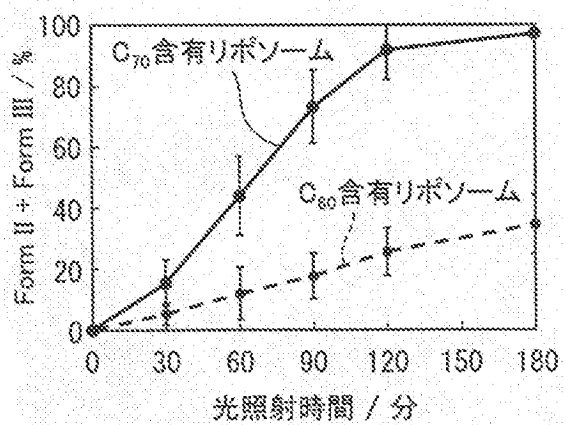
[図3]



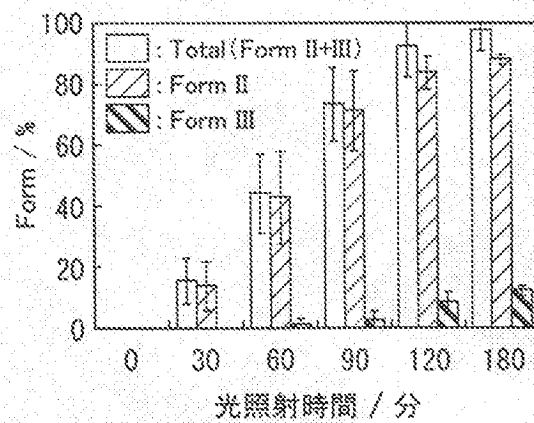
(b)



(c)

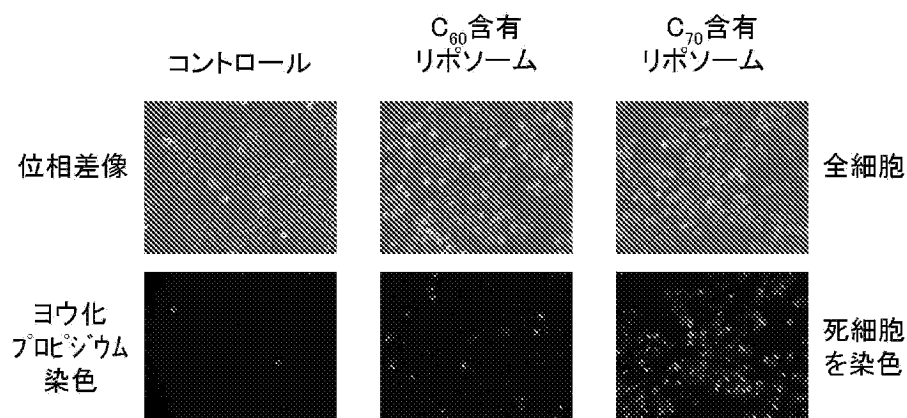


(d)

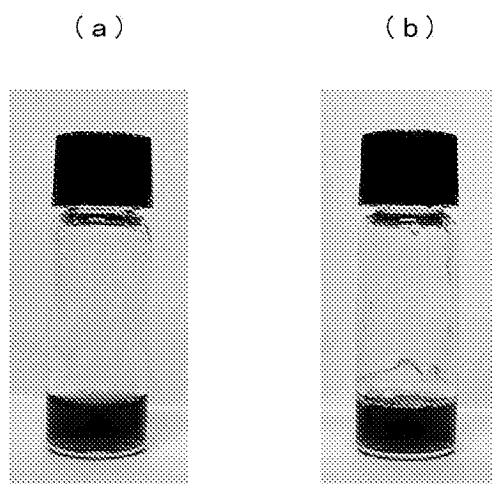




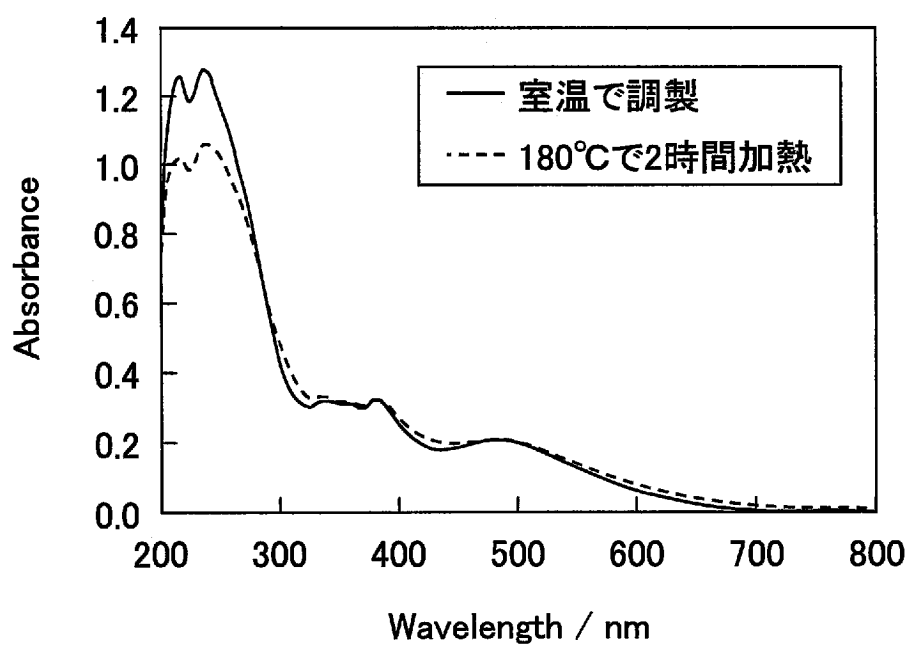
[図4]



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/051928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K33/44(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/40(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) A61K33/44, A61K9/127, A61K47/24, A61K47/40, 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 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	IKEDA, A. et al, An extremely effective DNA photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer, J Am Chem Soc, 2007.03.20, Vol.129, No.14, p.4140-4141	1-12
X Y	JP 2006-069812 A (UNIV NARA), 16 March, 2006 (16.03.06), Examples; referential examples (Family: none)	1-8 9-12
Y	IKEDA, A. et al, Efficient photocleavage of DNA utilising water-soluble lipid membrane-incorporated [60]fullerenes prepared using a [60]fullerene exchange method, Org Biomol Chem, 2005, Vol.3, No.16, p.2907-2909	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 31 March, 2008 (31.03.08)		Date of mailing of the international search report 08 April, 2008 (08.04.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/051928

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Atsushi IKEDA et al., "Konodo C60 Naiho Liposome no Shinchoseiho to Sono DNA Hikari Setsudanno no Hyoka", Kobunshi Kako, Vol.55, No.4, 2006, pages 180 to 184	1-12
Y	Naoki MIYATA et al., "Fullerene no Hikari Zokan Seibutsu Sayo ni Kan'yo suru Hanno Kasseishu no Kaiseki", Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, Vol.120, No.10, 2000, pages 1007 to 1016	1-12
Y	WEI,X. et al, New chemical method for selective generation of C70 'n-' (n=1,2,3) anions and formation and properties of an aqueous colloidal solution of C70., J Chem Soc Perkin Trans 2, 1999, No.1, p.121-126	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/051928

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 13 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K33/44(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/40(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 (IPC)) Int.Cl. A61K33/44, A61K9/127, A61K47/24, A61K47/40, 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008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) CAplus (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (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 請求の範囲の番号	
PX	IKEDA, A. et al, An extremely effective DNA photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer, J Am Chem Soc, 2007.03.20, Vol.129, No.14, p.4140-4141	1-12	
X	JP 2006-069812 A (UNIV NARA) 2006.03.16, (ファミリーなし)	1-8	
Y	実施例、参考例、参照。	9-12	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 31.03.2008		国際調査報告の発送日 08.04.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 安藤 倫世	4 P   9 8 3 7
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

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 請求の範囲の番号
Y	IKEDA, A. et al, Efficient photocleavage of DNA utilising water-soluble lipid membrane-incorporated [60]fullerenes prepared using a [60]fullerene exchange method, Org Biomol Chem, 2005, Vol.3, No.16, p. 2907-2909	1-12
Y	池田篤志 他, 高濃度 C60 内包リボソームの新調製法とその DNA 光切断能の評価, 高分子加工, Vol.55, No.4, 2006, p.180-184	1-12
Y	宮田直樹 他, フラーレンの光増感生物作用に関する反応活性種の解析, 薬学雑誌, Vol.120, No.10, 2000, p.1007-1016	1-12
Y	WEI, X. et al, New chemical method for selective generation of C70 <sup>n-</sup> (n=1,2,3) anions and formation and properties of an aqueous colloidal solution of C70., J Chem Soc Perkin Trans 2, 1999, No.1, p.121-126	1-12

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 1 3 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 1 3 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。