

(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
2011年1月13日(13.01.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/004552 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 9/10 (2006.01) A61K 47/14 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 47/26 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/74 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)

Fukuoka (JP). 田原義朗(TAHARA, Yoshiro) [JP/JP];
〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番
1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 清水善廣(SHIMIZU, Yoshihiro); 〒1690075
東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号八城
ビル3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, 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, 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, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, 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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/004021

(22) 国際出願日: 2010年6月16日(16.06.2010)

(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:
61/224,171 2009年7月9日(09.07.2009) US

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国
立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY,
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION)
[JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目
10番1号 Fukuoka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 後藤雅宏
(GOTO, Masahiro) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡
市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人
九州大学内 Fukuoka (JP). 神谷典穂(KAMIYA,
Noriho) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎
六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

(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, 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
(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, SE, SI, SK, SM, 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(条約第21条(3))

(54) Title: WATER-SOLUBLE DRUG CARRIER AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 水溶性薬物キャリア及びその製造方法

(57) Abstract: Disclosed are: a drug delivery carrier which has no concern about the leakage of a drug therefrom, can control particle sizes thereof easily, is widely applicable even to drugs other than drugs that do not have high anionic properties, besides water-soluble drugs, can deliver water-soluble substances such as genes and proteins, and can be used as a non-viral gene vector; and a process for producing the drug delivery carrier. The drug delivery carrier is characterized in that a water-soluble drug are double-coated with two types of surfactants 1 and 2. The drug delivery carrier can be produced by a process comprising the steps of: 1) mixing an aqueous phase containing the water-soluble drug with an oily phase containing the surfactant 1 while agitating to form a W/O emulsion in which the aqueous phase containing the water-soluble drug is dispersed in the oily phase; 2) removing the inner aqueous phase from the W/O emulsion to form an S/O in which a complex of the water-soluble drug and the surfactant 1 is dispersed in the oily phase; 3) mixing the S/O with an aqueous phase containing the surfactant 2 while agitating to form an S/O/W emulsion in which the S/O is dispersed in the aqueous phase; and 4) removing the inner oily phase from the S/O/W emulsion to form an S/W in which a complex of the water-soluble drug, the surfactant 1 and the surfactant 2 is dispersed in the aqueous phase.

(57) 要約: 本願発明は、薬物漏洩等の問題がなく、粒径制御も容易で、高いアニオン性をもたない水溶性薬物以外にも広く適用可能で、遺伝子や、タンパク質等の水溶性薬物を輸送することができ、非ウイルス性遺伝子ベクターとして利用できる薬物輸送キャリアとその製造方法を提供することを目的とするものである。本願発明の薬物輸送キャリアは水溶性薬物を2種の界面活性剤1及び界面活性剤2で内外二重に被覆してなることを特徴とするもので、この薬物輸送キャリアは、1) 水溶性薬物を含む水相と、界面活性剤1を含む油相を攪拌混合して、前記水溶性薬物を含む水相を油相中に分散させたW/Oエマルションを形成する工程、2) 前記W/Oエマルションから内水相を除いて、前記水溶性薬物-界面活性剤1複合体を油相中に分散させたS/Oを形成する工程、3) 前記S/Oと、界面活性剤2を含む水相を攪拌混合して、前記S/Oを水相中に分散させたS/O/Wエマルションを形成する工程、4) 前記S/O/Wエマルションから内油相を取り除いて、水溶性薬物-界面活性剤1-界面活性剤2複合体を水相中に分散させたS/Wを形成する工程、とからなる製造方法で得られるものである。

WO 2011/004552 A1

明 細 書

発明の名称：水溶性薬物キャリア及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子や、タンパク質等の水溶性薬物を輸送することができる薬物輸送キャリアに関し、固体分散させた水溶性薬物の周りを異なる両親媒性分子（2種の界面活性剤）で二重に覆った新規の薬物輸送キャリアとその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 本出願は、2009年7月9日に出願の米国の仮出願第61/224,171号の優先権を主張し、その内容を本願発明に引用している。

一般的に水溶性薬物を輸送するキャリアとして、リポソームやWater-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルション等が知られているが、薬物漏洩や粒径制御が困難であるといった問題がある。

また、バイオテクノロジーの発展に伴い、細胞内のシグナル伝達系に関与するペプチド、細胞内で生理的に重要な役割を果たすタンパク質、あるいはその発現遺伝子を標的細胞内へデリバリーするという試みが盛んに行われている。ここで細胞内へデリバリーするにはタンパク質よりもその発現遺伝子のほうが適している場合がある。その理由は、構造が単純であること（遺伝子は発現させるタンパク質が異なっても、全体の構造や性質はタンパク質程には変わらない）、細胞導入後の効能の持続性が期待できること、発現させるタンパク質に危険性や病原性があったとしてもその発現遺伝子自体には危険性は無い等である。このとき利用される遺伝子は、病変細胞で欠損しているタンパク質を発現させる目的で投与される遺伝子以外にも、カスパーゼやチミジンキナーゼ発現遺伝子のように細胞死へ誘導できる遺伝子も挙げられ、遺伝子そのものを薬として利用する試みも行われている。したがって発現効率の高い遺伝子ベクター（細胞への高い遺伝子導入性と発現性をもつ遺伝子キャリア）あるいはその制御システムの開発は、今後の医療分野発展にお

いて重要な役割を果たすと考えられる（非特許文献1）。

ここで遺伝子を単独で細胞へ投与しても、その発現効率は非常に低い。この主な原因は、プロテオグリカン等の糖鎖の存在によって細胞膜はアニオン性が高い構造であることが知られている。その一方で遺伝子の本体であるDNAもアニオン性の高分子であるということである。現在最も効率のよい遺伝子ベクターは、アデノウイルスやレトロウイルス等の遺伝子配列に、治療用の遺伝子を挿入あるいは置換して作成されるウイルスベクターである。ウイルスベクターは細胞へ自身の遺伝子を運ぶというウイルス本来の特性を利用したもので、高効率な遺伝子発現を達成できるが、その安全性や生産性を考えるとその発展には限界がある（非特許文献2）。そこで現在、非ウイルス性の遺伝子ベクター創出に関する研究が盛んに行われており、その代表例はカチオン性リポソームである。中でも既に市販されているLipofectamineやLipofectinは、多くの種類の細胞に対して、高い遺伝子導入効率を示し、利便性や再現性が高いことから現在最も主流な非ウイルス性遺伝子ベクターである（非特許文献3）。この他にもポリエチレンジアミン（非特許文献4）やキトサン（非特許文献5）等のカチオン性ポリマーや、アミノ酸デンドリマー（非特許文献6）等でも遺伝子発現ができることが分かっている。以上の例は全てアニオン性の遺伝子がカチオン性の分子と複合化し、負電荷の細胞膜を突破するというコンセプトで作られているが、そのままでは血清耐性・血中安定性がなくin vivoでの利用が困難である場合や、さらなる機能化に限界がある場合が多い。また多機能性エンベロープ型ナノ構造体（Multifunctional Envelope-type Nano Device, MEND）（非特許文献7）や高分子ミセル（非特許文献8, 9）等、将来的な機能化を目指してDNAを封入するカプセル状キャリアの構築を試みた例があるが、これらはいずれも遺伝子の封入にはカチオン性分子を利用しており、細胞に導入した後の遺伝子の発現制御が難しいといった欠点や、高いアニオン性をもつ物質の封入以外には応用できないといった欠点が存在する。

先行技術文献

非特許文献

- [0003] 非特許文献1 : I. J. van Dillen, N. H. Mulder, W. Vaalburg, E. F. de Vries, G. A. Hospers, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 307-322 (2002).
- 非特許文献2 : H. Akita, R. Ito, I.A. Khalil, S. Futaki, H Harashima, *Mol Ther.* 9, 443-451 (2004).
- 非特許文献3 : K. Kostarelos, A. D. Miller, *Chem. Soc. Rev.* 34, 970-994 (2005).
- 非特許文献4 : J. A. Hubbell, *Gene Ther.* 13, 1371-1372 (2006).
- 非特許文献5 : D. C. Liang, W. G. Liu, A. J. Zuo, S. J. Sun, N. Cheng, G. Guo, J. Y. Zhang, K. D. Yao, *Int. J. Pharm.* 314, 63-71 (2006).
- 非特許文献6 : M. Yamagata, T. Kawano, K. Shiba, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Bioorg. Med. Chem.* 15, 526-532 (2007).
- 非特許文献7 : I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, M. Ueno, H. Kishida, M. Kudoh, Y. Mishina, K. Kataoka, M. Yamada, H. Harashima, *Gene Ther.* 14, 682-689 (2007).
- 非特許文献8 : S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 6001-6009 (2008).
- 非特許文献9 : M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *Mol. Pharm.* 5 1080-1092 (2008).
- 非特許文献10 : Y. Tahara, S. Honda, N. Kamiya, H. Piao, A. Hirata, E. Hayakawa, T. Fujii, M. Goto, *J. Control. Release* 131, 14-18 (2008).
- 非特許文献11 : N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. I. Chung, K. Kataoka, *ChemMedChem* 1, 439-444 (2006).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] そこで、本願発明は、薬物漏洩等の問題がなく、粒径制御も容易で、高いアニオン性をもたない水溶性薬物以外にも広く適用可能で、遺伝子や、タンパク質等の水溶性薬物を輸送することができる薬物輸送キャリアとその製造方法を提供することを目的とするものである。

さらにまた、非ウイルス性遺伝子ベクターとして利用できる薬物輸送キャリアとその製造方法を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するために、本発明者等は鋭意検討の結果、固体分散させた水溶性薬物の周りを異なる両親媒性分子で二重に覆うことで薬物漏洩等の問題がなく、粒径制御も容易で、高いアニオン性の有無に拘わらず、遺伝子や、タンパク質等の水溶性薬物を輸送することができる薬物輸送キャリアが得られることを知見した。

本発明はかかる知見に基づき成されたもので、本願発明の薬物輸送キャリアは請求項1記載の通り、水溶性薬物を2種の界面活性剤1及び界面活性剤2で内外二重に被覆してなることを特徴とする。

また、請求項2記載の薬物輸送キャリアは、請求項1記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記水溶性薬物はタンパク、遺伝子、オリゴ核酸、多糖類、合成高分子、ペプチド、小分子、ナノ粒子（超構造体）の何れかであることを特徴とする。

また、請求項3記載の薬物輸送キャリアは、請求項2記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記遺伝子がプラスミドDNA（以下「pDNA」と称する）で、前記タンパクがEGFPであることを特徴とする。

また、請求項4記載の薬物輸送キャリアは、請求項1乃至3の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記内側の界面活性剤1は、シヨ糖脂肪酸エステル、コレステロール、グリセリン脂肪酸エステルの何れかであることを特徴する。

また、請求項5記載の薬物輸送キャリアは、請求項1乃至4の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記外側の界面前活性剤2は、PC、L-1695

、PEG (2K) -MS、PEG (2K) -DSPE、PEG (5K) -DSPE、PEG (comb) -DSPE、Tween 80、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセリン脂肪酸エステル of 少なくとも何れかであることを特徴とする。

また、請求項 6 記載の薬物輸送キャリアは、請求項 1 乃至 5 の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記薬物輸送キャリアはDOPEやジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEIやポリ-L-リジン等のカチオン性ポリマー of 少なくとも何れかを含むことを特徴とする。

また、請求項 7 記載の薬物輸送キャリアは、請求項 1 乃至 6 の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記薬物輸送キャリアの外周をアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニンR8-str、ステアリル化テトラアルギニンR4-str等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG (2K) -DSPE、N-マレイミド-PEG (2K) -DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG (2K) -DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各種細胞膜タンパク質結合ドメイン of 何れかで修飾したことを特徴とする。

また、本発明の薬物輸送キャリアの製造方法は、請求項 8 に記載の通り、水溶性薬物を 2 種の界面活性剤 1 及び界面活性剤 2 で内外二重に被覆してなる薬物輸送キャリアの製造方法であって、

1) 水溶性薬物を含む水相と、界面活性剤 1 を含む油相を攪拌混合して、前記水溶性薬物を含む水相を油相中に分散させたW/Oエマルションを形成する工程、

2) 前記W/Oエマルションから内水相を除いて、前記水溶性薬物-界面活性剤 1 複合体を油相中に分散させたS/Oを形成する工程、

3) 前記S/Oと、界面活性剤 2 を含む水相を攪拌混合して、前記S/Oを水相中に分散させたS/O/Wエマルションを形成する工程、

4) 前記S/O/Wエマルションから内油相を取り除いて、水溶性薬物-界面活性剤 1 -界面活性剤 2 複合体を水相中に分散させたS/Wを形成する工程、とからなることを特徴とする。

また、請求項 9 記載の薬物輸送キャリアの製造方法は、請求項 8 記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記内水相及び内油相を凍結乾燥によって取り除くことを特徴とする。

また、請求項 10 記載の薬物輸送キャリアの製造方法は、請求項 8 または 9 記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記 S/O/W エマルションはグリセリン、ソルビトール、トレハロースの何れかを添加または添加されていない状態で形成することを特徴とする。

また、請求項 11 記載の薬物輸送キャリアの製造方法は、請求項 8 乃至 10 の何れかに記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記 S/O を形成する工程において S/W エマルション内に DOPE やジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEI やポリ-L-リジン等のカチオン性高分子の少なくとも何れかが含まれているようにすることを特徴とする。

また、請求項 12 記載の薬物輸送キャリアの製造方法は、請求項 8 乃至 11 の何れかに記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記 S/W を形成する工程において S/O/W エマルション内にアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニン R8-str、ステアリル化テトラアルギニン R4-str 等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG (2K) -DSPE、N-マレイミド-PEG (2K) -DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG (2K) -DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各種細胞膜タンパク質結合ドメインの何れかが含まれているようにすることを特徴とする。

[0006] W/O エマルションから内水相を取り除いて、キャリア内に封入した薬物を完全に固体分散させる Solid-in-Oil (S/O) 化技術は、固体薬物の表面を界面活性剤によってコーティングすることで、水溶性薬物を油状基材への安定した分散を可能とする技術であるが、本発明では、前記 S/O 化技術の長所を活かし、別の界面活性剤によって水中に S/O 製剤の溶解した油滴を分散させて得られる Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルションから内油相を取り除き、水溶性薬物を 2 種類の界面活性剤によって水中に分散させる Solid-in-Water (S/W) 化を利用したものである。S/O とは界面活性剤によって水を油中に分散さ

せたwater-in-oil (W/O) エマルションから内水相を取り除いた状態である。このS/Oの状態では、薬物はそのまわりを界面活性剤によって被覆された界面活性剤-薬物複合体 (solid) の状態で油中に分散している。ここでさらに新たな界面活性剤によってS/Oを水中に分散させたものをsolid-in-oil-in-water (S/O/W) エマルションといい、S/WとはこのS/O/Wエマルションから内油相を取り除いた状態を指す。このとき中心の薬物は2種類の界面活性剤によって包まれた複合体 (solid) の状態で水中に分散していると考えられる。このようにして調製されたS/Wはちょうど内水相のないリポソームのような会合体であると考えられ、水溶性薬剤の輸送キャリアとして利用でき、さらには、適切な機能性分子を封入あるいは修飾することで非ウイルス性遺伝子ベクターとして利用できるものである。

[0007] 本願発明の薬物輸送キャリアは、水溶性薬物を2種の界面活性剤1及び界面活性剤2で内外二重に被覆してなるものである。

前記水溶性薬剤は、薬理活性を有する狭義の薬剤に限定されるものでなく、蛍光タンパク等の各種標識試薬等も含まれるものである。具体的には、EGFP等の蛍光タンパク、サイトカイン、抗体、遺伝子の転写因子等の薬理活性を有するタンパク、pDNA等の遺伝子、siRNA等のオリゴ核酸、デキストランやヒアルロン酸等の多糖類、合成高分子、オクタアルギニン等のペプチド、ジクロフェナク等の小分子、金ナノロッド等のナノ粒子（または超構造体）等が挙げられる。

また、前記内側の界面活性剤1としては、シヨ糖脂肪酸エステル、コレステロール、グリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。

また、前記外側の界面前活性剤2としては、PG、L-1695、PEG (2K) -MS、PEG (2K) -DSPE、PEG (5K) -DSPE、PEG (comb) -DSPE、Tween 80、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。

また、前記薬物輸送キャリアには、DOPEやジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEIやポリ-L-リジン等のカチオン性高分子の何れかを含ませることができる。

また、前記薬物輸送キャリアは、キャリアの外周をアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニンR8-str、ステアリル化テトラアルギニンR4-str等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、N-マレイミド-PEG（2K）-DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各種細胞膜タンパク質結合ドメインの何れかで修飾することができる。

本発明の薬物輸送キャリアの製造方法においては、前記内水相や内油相を取り除くには凍結乾燥によって取り除くことが好ましい。

また、前記S/O/Wエマルションはグリセリン、ソルビトールトレハロースの何れかを添加された状態で形成することが好ましい。

また、前記S/Oを形成する工程においてS/Wエマルション内にDOPEやジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEIやポリ-L-リジン等のカチオン性高分子の少なくとも何れかが含まれているようにすれば、DOPE、PEI等を含ませた薬物輸送キャリアが簡単に得られる。

また、前記S/Wを形成する工程においてS/O/Wエマルション内にアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニンR8-str、ステアリル化テトラアルギニンR4-str等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、N-マレイミド-PEG（2K）-DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各種細胞膜タンパク質結合ドメインの何れかが含まれているようにすれば、その外周をR8-str、R4-str等で修飾された薬物輸送キャリアが簡単に得られる。

発明の効果

- [0008] 本発明の薬物輸送キャリアによれば、他のドラッグキャリアと比較したときのS/Wの特徴として、(a)フィルター濾過を行う必要がない全量回収系であるため、薬物の回収性が非常に高く、(b)キャリアが固体として得られるため、最終薬物濃度の調整が可能であり、(c)エマルション調製時の有機溶媒との接触や攪拌、凍結乾燥に耐えられる薬物であれば封入でき、そして何より、（

d) 構成分子の自己集合力のみによって薬物を封入している他のキャリアに比べて、W/OエマルションやO/Wエマルションを用いて構成成分の空間的な位置関係を強制的に制御でき、キャリアのコア（中心）に薬物を確実に位置させることができるという効果を有するものである。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1] 界面活性剤の細胞毒性を示すグラフ
- [図2] 界面活性剤の重量比の影響を示す写真
- [図3] FITC-DEX封入S/Wの分散性の変化を示す写真
- [図4] DOPE添加の影響を示す写真
- [図5] pDNA封入S/OおよびS/Wの粒子径に関する特性図と電子顕微鏡写真
- [図6] pDNA封入性を示すアガロース電気泳動写真
- [図7] S/Wのゼータ電位に関するグラフ
- [図8] 遺伝子発現（ $n = 2$ ）を示すグラフ
- [図9] S/Wの細胞毒性（ $n = 3$ ）を示すグラフ
- [図10] 遺伝子の情報を示す図
- [図11] 界面活性剤の構造式を示す図
- [図12] PEG修飾遺伝子の細胞活性を示すグラフ
- [図13] pDNA封入S/Wの細胞毒性と遺伝子発現性を示すグラフ
- [図14] 遺伝子の情報を示す図
- [図15] 界面活性剤の構造式を示す図
- [図16] アガロースゲル電気泳動を示す写真
- [図17] pDNA封入S/Wの遺伝子発現性を示すグラフ
- [図18] 電気泳動を示す写真
- [図19] PEI添加したS/Wの遺伝子発現性を示すグラフ
- [図20] PEIの構造式を示す図
- [図21] アガロースゲル電気泳動を示す写真
- [図22] S/Wの粒子直径DLSを示すグラフ
- [図23] S/Wの蛍光顕微鏡写真

実施例

[0010] 以下、本発明の実施例を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実験例 1)

<界面活性剤の細胞毒性>

水に分散可能な界面活性剤 2 として使用できる、細胞膜構成成分であるホスファチジルコリン (PC 日本油脂) および親水性界面活性剤であるショ糖ラウリン酸エステル (L-1695) の細胞毒性試験を行った。尚、細胞毒性試験については、同仁化学社製 Cell counting Kit-8、Promega社製 Luciferase Assay Systemを用いた。

(1) D-MEM培地 (和光純薬) 中で培養後のB16メラノーマ細胞数をカウントし、96穴プレートに 5×10^3 cells/wellとなるように播種し、一晩培養した。

(2) 培地を除いた後、0.10、0.50、1.0、3.0 mg/mLのPCおよびL-1695を溶解させた培地をそれぞれ100 μ L/well 添加し、6 時間培養した。このとき培地のみ (controlおよびblank) のwellも用意した。

(3) (2) から6 時間後、培地を除き、WST-8 溶液 (1-Methoxy-PMSを含む) を加え、2時間呈色反応を行い、450 nmの吸光度を測定し、コントロールとの比較により、次の計算式 1 で細胞の生存率を測定した。

Cell viability [%] = $(\text{Abs}(450 \text{ nm})_{\text{sample}} - \text{Abs}(450 \text{ nm})_{\text{blank}}) / (\text{Abs}(450 \text{ nm})_{\text{control}} - \text{Abs}(450 \text{ nm})_{\text{blank}}) \times 100$ (計算式 1)

[0011] 図 1 の結果から、PCの細胞毒性は全く無いことが分かり、PCを用いれば細胞毒性の低いS/W製剤が調製できるということが確認できた。また、低濃度であれば、L-1695でも細胞毒性の低いS/W製剤が調製できるということが確認できた。

[0012] (実験例 2)

<界面活性剤の重量比の影響>

S/Oを作成できることが分かっている界面活性剤は一般的に疎水性であり、S/O中の界面活性剤-薬物複合体も疎水性の高い物質となるため、この疎水性

の高い複合体を水中に分散させることになる。そこで、疎水性界面活性剤である ER-290（シヨ糖エルカ酸エステル 三菱化学フーズ）を含むシクロヘキサンと、PCを含む水からなるO/Wエマルジョンを調製し、ER-290の重量を一定とし、ER-290:PCの重量比を1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5と変化させて S/W化することで、PCによって ER-290を水中に分散可能かどうかを確かめた。

(1) 10 mg/mLのER-290シクロヘキサン溶液0.50 mLと、0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mLのPC水溶液5.0mLから O/Wエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで PC-ER-290複合体の固体を得た。

(2) (1) の固体に水2.0mLを加えることで、それぞれの分散性を観察した。

[0013] 図2に得られたS/Wの様子を示す。ER-290: PCの重量比が1:0や1:1の写真で、上部に浮遊している白い固体が ER-290であるが、PC の増加に伴ってこのような相分離が小さくなり、ER-290:PCの重量比が1:4を超えると均一に分散することが分かった。この結果からPCによってER-290を水に分散可能であることが示され、その分散性は PCの量に依存するということが確認できた。

[0014] (実験例3)

<添加剤による微粒子化>

S/W中の粒子径を小さくするために、S/W調製時の S/O/Wエマルジョンの水相に、添加剤として表1に示す添加剤を加え、それぞれの分散性を観察した。

(1) 100 μ g/mLのFITC-DEX（分子量約 2,000,000 Sigma 社）を含む0.1 Tris-HCl・EDTA緩衝液（TE緩衝液：1.0 mM Tris-HCl, 0.10 mM EDTA, pH8.0）3.0 mLと、500 μ g/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液30 mLを、50 mLのナスフラスコ中でホモジナイザーにて攪拌し（26,000 rpm、2分間）、W/Oエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで ER-290-FITC-DEX 複合体の固体を得た。

(2) (1) にシクロヘキサン3.0 mLを加え、FITC-DEX封入S/Oを得た。

(3) (2) の溶液0.50 mLと、2.5 mg/mLのPCおよび125 mg/mLの濃度の各添加剤を含む水溶液5.0 mLを、12 mLのバイアル瓶中でホモジナイザーにて攪拌し

、 S/O/W エマルションを調製後、凍結乾燥することでPC-ER-290-FITC-DEX 複合体の固体を得た。

(4) (3) に0.1 TE緩衝液5.0 mLを加え、FITC-DEX封入S/Wを得た。

[0015] [表1]

分類	添加剤	調製時の濃度
糖アルコール	グリセリン、キシリトール、ソルビトール	125 mg/mL
単糖類	グルコース	
二糖類	スクロース、トレハロース	
多糖類	デキストラン(分子量:15,000 or 200,000)	

[0016] 図3の結果から等重量で加えた場合は、糖アルコールや単糖類等低分子の糖類を用いた場合に分散性が向上するということが確認された。この中でもグリセリン、ソルビトール、トレハロースは比較的、粒子径の小さな S/W が得られた。

[0017] (実験例4)

<DOPE添加の影響>

S/W を遺伝子ベクターとして応用する際には、細胞中でのエンドソーム脱出のために系中に DOPEを添加する必要があるが、DOPEは疎水性の高い脂質であるため、S/W調製時の S/O/Wエマルションの油相中に加えることで ER-290-薬物複合体とともに PC で水中に分散させることを試みた。検討はFITC-DEXを封入したS/Wで行い、このときのDOPE:PCの重量比を1:10、1:2、1:1変化させた。

(1) 前記実験例3の(1)に5.0または25 mg/mLのDOPE (dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine Avanti社) を含むシクロヘキサン3.0 mLを加え、FITC-DEX封入S/Oを得た。

(2) 表2に示す組成の複合体が得られるように、(1)の溶液0.50 mLと、2.5または5.0 mg/mLのPCおよび50 mg/mLのソルビトールを含む水溶液5.0 mLから、S/O/Wエマルションを調製後、凍結乾燥することで PC-(DOPE)-ER-290-FITC-DEX 複合体の固体を得た。

(3) (2) に0.1 TE緩衝液5.0 mLを加え、FITC-DEX封入S/Wを得た。

[0018] [表2]

FITC-DEX	ER-290	DOPE	PC	DOPE:PC
		5.0 mg	50 mg	1:10
50 μ g	2.5 mg	25 mg	50 mg	1:2
		25 mg	25 mg	1:1

[0019] 図4の結果より、PCに対するDOPEの比が上昇するにしたがって、粒子径の増大が見られたが、どのサンプルでも数日後もDOPEやER-290の析出は見られなかったことから、表2の組成でDOPEを含むS/Wが調製可能であることが確認できた。

[0020] (実験例5)

<DNA封入 S/Wの粒子径と封入性>

以下のようにDOPE:PCの重量比を1:1とした10 μ g/mLのpDNA封入S/Wを調製し、粒子径と封入性を評価した。

(1) 100 μ g/mLのpDNAを含む0.1 TE緩衝液0.50 mLと、500 μ g/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液 5.0 mLを、12 mLのバイアル瓶中でホモジナイザーにて攪拌し、W/Oエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(2) (1) に5.0 mg/mLのDOPEを含むシクロヘキサン溶液5.0 mLを加え、pDNA封入S/O (DOPE含む) を調製した。また (1) にシクロヘキサン溶液 5.0 mLを加え、動的光散乱 (dynamic light scattering, DLS) 測定、TEM観察にて評価した。

(3) (2) の溶液0.50 mLと、0.50 mg/mLのPCおよび50 mg/mLのソルビトールを含む水溶液5.0 mLを、12 mLのバイアル瓶中でホモジナイザーにて攪拌し、S/O/Wエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで PC-(DOPE)-ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(4) (3) に0.1 TE緩衝液0.50 mLを加え、pDNA封入S/Wを得た。

(5) 得られたS/Wの粒子径をDLS測定、TEM観察にて評価した。

(6) 得られたS/W中のpDNAの封入性を1.5%アガロースゲル電気泳動 (135 V、30分、臭化エチジウム染色) によって評価した。ここで1%Triton X-100を可溶化剤として添加したものや、(1) においてpDNA濃度を0として調製し、(4)

で10 $\mu\text{g/mL}$ のpDNAを含む0.1 TE緩衝液を加えたもの（物理混合物）の電気泳動も行った。

[0021] 図5の結果より、今回の調製条件ではS/OやS/Wの粒子サイズはそれぞれ約100 nm、約180 nmであることが示唆された。これをもとにS/OとS/W中の粒子の体積を概算すると、それぞれ $5.2 \times 10^5 \text{ nm}^3$ 、 $3.1 \times 10^6 \text{ nm}^3$ であり、体積比は約1:5.8である。つまり計算上はS/Wの1個の粒子の中には平均で5.8個のER-290-pDNA複合体が存在することになる。ここでS/W調製途中のS/O/Wエマルションの油滴中には多数のER-290-pDNA複合体が存在すると考えられるため、本来であればS/Wの1個の粒子の中には5.8個以上のER-290-pDNA複合体が存在してもおかしくない。またS/Wの粒径分布はDLS測定結果からもTEM観察の結果からも単分散ではないことも分かったため、ナノ粒子としての完成度は低い。ただしR8を用いたMENDの系では、1.0 μm 程度の粒子でも細胞デリバリーできるということが確認されていることから、粒径分布には幅があるものの、遺伝子ベクターとして応用するには十分なサイズであると考えられる。

さらに調製直後のS/Wの溶液についてアガロースゲル電気泳動を行いpDNAの封入性を評価した。ここで強力な非イオン性界面活性剤であるTriton X-100を加えて、S/W中の全ての成分を可溶化したものや、pDNAが100%リリースされた状態を模倣して、空のS/Wを調製後、pDNA水溶液を添加したもの（物理混合物）についても電気泳動を行った。

[0022] 図6のLane 1がpDNA封入S/Wのアガロース電気泳動結果であるが、pDNAの位置（Lane 4と同じ位置）にバンドが見られないこと、Lane 2でS/W中の成分を全て可溶化した（S/Wを崩壊させた）場合はpDNAの位置にバンドが出現すること、さらにLane 1の電気泳動結果は、Lane 3で空の状態のS/Wを調製してDNAを加えたものとも異なることから、pDNAがS/W中で界面活性剤と複合体を形成し、ゲルのキャスト部分付近で泳動が止まっていることが示唆された。この結果はpDNAがS/Wの複合体内部に封入されていることを支持する結果であり、カチオン性の高い物質を利用せずにDNAをキャリアに封入することに成功したといえる。

[0023] (実験例6)

＜遺伝子ベクターへの応用＞

R8-str (ステアリル化オクタアルギニン) を修飾し、DOPE:PCの重量比を1:10、1:2、1:1としたpDNA封入S/Wを調製し、以下のような条件でB16細胞に対するルシフェラーゼ発現能の評価を行った。またDOPE:PCの重量比を1:1とした場合に合わせて、表3に示すDOPEやR8-strを含まないコントロールサンプルとLipofectamine についても検討を行った。

(1) 100 μ g/mLのpDNAを含む0.1 TE緩衝液0.50 mLと、500 μ g/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液 5.0 mLを、12 mLのバイアル瓶中でホモジナイザーにて攪拌し、W/Oエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(2) (1) に0.50, 2.5, 5.0 mg/mLのDOPEを含むシクロヘキサン溶液5.0 mLを加え、pDNA封入S/O (DOPE含む) を調製した。

(3) 表3の組成の複合体が調製できるように、(2)の溶液0.50 mLと、0.50 mg/mLのPC、0.11, 0.15, 0.20 mg/mLのR8-strおよび30, 40, 50 mg/mLのソルビトールを含む水溶液5.0 mLを、12mLのバイアル瓶中でホモジナイザーにて攪拌し、S/O/W エマルジョンを調製後、凍結乾燥することでPC-(DOPE)-ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(4) (1) ~ (3) においてpDNA、DOPE、R8-strの濃度を適宜0として、表3のコントロールサンプルをそれぞれ調製した。

(5) D-MEM 培地中で培養後のB16 細胞数をカウントし、24穴プレートおよび96穴プレートに5 $\times 10^3$ cells/wellとなるように播種し、一晚培養した。

(6) (3) と (4) で得られた固体に血清使用量低減培地 (Opti-MEM Invitrogen) を加え、(5) のプレートにpDNAが 1.0 μ g/wellとなるように播種して 3時間培養した。

またLipofectamine (Lipofectamine 2000 Invitrogen社製) による遺伝子発現を同量のpDNAを用いて行った。このとき96穴プレートにはOpti-MEMのみ (controlおよびblank) のwellも用意した。

(7) (6) から 3 時間後、96 穴プレートは培地を除き、WST-8 溶液 (1-Methoxy-PMS を含む) を加え、2 時間呈色反応を行い、450 nm の吸光度を測定し、コントロールとの比較により、前記計算式 1 で細胞の生存率を測定した。

(8) (6) から 3 時間後、24 穴プレートは培地を除き、D-MEM 培地を加えて培養した。

(9) (7) から 2 日後、培地を除き、細胞溶解液 (lysis buffer : 20 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.05 % TritonX-100, pH 7.5) を添加し遠心後、ルシフェリンを加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。また Bradford 法によって細胞溶解液中のタンパク質濃度を測定し規格化した。

(10) またサンプル (c) と (g) については (3) で PC-(DOPE)-ER-290-pDNA の複合体を調製後、0.1 TE 緩衝液 5.0 mL を加え、ゼータ電位の測定を行った。

最後に R8-str を修飾し、DOPE : PC の重量比を 1 : 10、1:2、1:1 とした pDNA 封入 S/W のルシフェラーゼ発現能を確かめる実験を行った。また DOPE : PC の重量比を 1:1 とした場合に合わせて、表 3 に示す各成分を含まないコントロールサンプルと Lipofectamine についても検討を行った。また表 3 のサンプル (c) と (g) についてはゼータ電位の測定を行った。

サンプル (c) と (g) のゼータ電位測定の結果を図 7 に示すが、この結果より、R8-str の存在によって粒子の表面電荷がカチオン性になっていることから、S/W の表面にオクタアルギニンが修飾されたことが確認された。ここで動物細胞の培養で一般的に用いられる D-MEM 培地にはウシ胎児血清が含まれており、表面がカチオン性である S/W は血清中のアルブミンによって凝集が起こることが懸念される。そこで遺伝子発現実験は血清低減培地 (Opti-MEM) 中に行った。ただし Opti-MEM 中では半日以上の培養ができないため、サンプル投与から 3 時間後に D-MEM 培地に培地交換を行った。

[0024]

[表3]

No.	pDNA	ER-290	DOPE	PC	R8-str	ソルビトール
(a)	5.0 μ g		0.25 mg		0.55 mg	150 mg
(b)	5.0 μ g		1.25 mg		0.75 mg	200 mg
(c)	5.0 μ g		2.5 mg		1.0 mg	250 mg
(d)	5.0 μ g ^{**}	250 μ g	2.5 mg	2.5 mg	1.0 mg	250 mg
(e)	5.0 μ g		2.5 mg		1.0 mg ^{**}	250 mg
(f)	5.0 μ g		—		1.0 mg	250 mg
(g)	5.0 μ g		2.5 mg		—	250 mg
(h)	5.0 μ g		—		—	250 mg

[0025] 図8の結果よりルシフェラーゼ発現はpDNA 封入S/W とLipofectamine について起こり、他のコントロールサンプルでは起こらなかった。このことは発現に必要な要素であるpDNA、DOPE、R8-str等が正しくS/W中で複合化されていないと遺伝子発現は起こらないということを示している。さらにpDNA封入S/WにおいてDOPEやR8-strの添加量が増加することによって、ルシフェラーゼの発現量も増加していることや、R8-strのみ((f))やDOPEのみ((g))では発現しないことから、R8-strによるエンドサイトーシスの誘起やDOPEによるプロトンスポンジ効果等によって、遺伝子発現が起きていることが確認できた。

またサンプル投与から3時間後の細胞生存率を測定した結果を図9に示す。ここで生存率はOpti-MEMで3時間培養した細胞の生存率を100%として計算している。この結果からオクタアルギニンを含まないサンプル(g)、(h)やlipofectamineでは、サンプル自体の細胞毒性はほとんど見られなかったが、オクタアルギニンが存在するサンプル(c)~(f)では細胞生存率は40%程度であった。

[0026] 上記実験例で用いたモデルプラスミドDNA (pDNA) は、動物細胞中でルシフェラーゼを発現する約7.4 kbp (分子量: 300~400万) のpDNAで、図10Aのluc2遺伝子を図10Bの制限酵素サイトに組み込んだ遺伝子をもとにInvitrogenにて組換え、抽出、精製されたものを使用した。尚、前記ER-290はショ糖とエルカ酸(22:1)のジエステルとトリエステルの混合物であり、PCはアルキル鎖の炭素数が12~22で飽和炭化水素や不飽和炭化水素の混合物

であり、前記DOPE、R8-strとともに構図式を図11に示した。

[0027] (実験例7)

<PEG修飾界面活性剤の細胞毒性>

(1) 96穴プレートに 5×10^3 cells/wellとなるようにB16細胞を播種し、一晩培養した。

(2) (1)から溶液を除き、血清培地で調製した種々の濃度のPC、PEG(2K)-MS、PEG(2K)-DSPE、PEG(5K)-DSPE、PEG(comb)-DSPEを100 mLずつ添加して1日培養した。controlやblankとして血清培地のみのwellも用意した。なお、ここで、10% FBSと抗生物質(何れもInvitrogen社製)を含むD-MEMを“血清培地”と表記するものとする。

(3) (2)から溶液を除き、Cell counting Kit-8に付属の2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) および1-methoxy-5-methyl-phenazinium methylsulfate (1-methoxy-PMS) を含む血清培地溶液を加え、4時間呈色反応を行い、450 nmの吸光度を測定し、controlとの比較により、計算式1で細胞の生存率を測定した。

[0028] 図12の結果よりPEG(2K)-DSPEとPCはどんな濃度でもほぼ毒性がないことが分かった。PEG(2K)-DSPEやPCはキャリアへの封入性の向上が期待できる界面活性剤であり、他の界面活性剤も一定の濃度以下では毒性を示さないことが分かった。

[0029] (実験例8)

<PEG修飾界面活性剤の細胞毒性と遺伝子発現>

(1) 50 μ g/mLのpDNAを含む0.1xTris-HCl EDTA緩衝液(TE緩衝液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 0.5 mLと、0.5 mg/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液5.0 mLを攪拌し、W/O エマルジョンを調製後、凍結乾燥することでER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(2) (1)に4.5 mg/mL (6.0 mM)のDOPEを含むシクロヘキサン溶液2.5 mLを加え、pDNA封入S/O(DOPE含む)を調製した。

(3) (2)の溶液0.50 mLと、0.9 mg/mL (1.2 mM)のPC、2.4 mg/mL (1.2

mM) のPEG (2K) -MS、3.6 mg/mL (1.2 mM) のPEG (2K) -DSPE、7.2 mg/mL (1.2 mM) のPEG (5K) -DSPE、28.8 mg/mL (1.2 mM) のPEG (comb) -DSPEをそれぞれ含む水溶液5.0 mLを攪拌し、S/O/Wエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで表4に示す計5種類のSurfactant-(DOPE)-ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(4) (3) に血清培地5.0 mLを加え、1.0 mg/mLのpDNAを含む表4に示す計5種類のS/Wを得た。

(5) 24穴プレートに 5×10^4 cells/wellとなるように播種し、一晩培養後、(1) の血清培地溶液を1.0 mL添加した (pDNA 1.0 μ g/well)。ここでコントロールとしてpDNAを含む血清培地溶液 (naked pDNA)、naked pDNAにLipofectamineを適量 (N/P = 1.5) 加えたもの、pDNAを含む血清低減培地 (Opti-MEM) にLipofectamineを適量 (N/P = 1.5) 加えたものを使用した。

(6) (5) から3時間後にOpti-MEMを利用したwellは、血清培地に培地交換を行った。

(7) (5) から1日後、培地を除き、Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) で洗浄後、0.05 % TritonX-100含むTE緩衝を添加し、細胞を溶解後、遠心分離し、上清にルシフェリンを加え、ルシフェラーゼの発光量 (relative light unit, RLU) を測定した。またBradford法によって上清中のタンパク質濃度を測定し規格化した。

(8) 96穴プレートに 5×10^3 cells/wellとなるように播種し、一晩培養後、(5) ~ (6) の操作を同様に行い、血清培地溶液をcontrolおよびblankとして実験例7と同様の操作によってそれぞれの細胞毒性を評価した。

なお、上記EG修飾界面活性剤は何れも日油株式会社製のものを使用した。

[0030]

[表4]

No.	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
pDNA			1.0 μ g		
ER-290			100 μ g		
DOPE			0.45 mg		
PC	0.9 mg	—	—	—	—
PEG(2K)-MS	—	2.4 mg	—	—	—
PEG(2K)-DSPE	—	—	3.6 mg	—	—
PEG(5K)-DSPE	—	—	—	7.2 mg	—
PEG(comb)-DSPE	—	—	—	—	28.8 mg

[0031] 実験例7の結果から界面活性剤の濃度を全ての界面活性剤で細胞毒性の無くなる1.2 mM、添加するDOPEの濃度は0.6 mMとしたキャリアをそれぞれ調製し、ルシフェラーゼアッセイによってB16細胞添加24時間後の遺伝子発現効率を評価した。図13(A)に遺伝子発現の結果、図13(B)に細胞毒性の結果を示す。この結果よりPEG(2K)-DSPE、PEG(5K)-DSPEで調製したS/WIにおいて遺伝子発現がみられ、さらにそれぞれの細胞毒性はほぼ無いという結果が得られた。このときの細胞の様子を観察すると、PCおよびPEG(2K)-MSでは粒子の凝集が目に見えて観察され、血清によって沈殿することで遺伝子発現が起こらなかったと考えられる。またOpti-MEM中でLipofectamineを用いる場合より遺伝子発現効果は著しく低かったが、細胞毒性については本実験例で調製したキャリアのほうが上回っているため、B16細胞より弱い細胞での発現においてはこのキャリアは有効である可能性があることが確認された。

[0032] 上記実験例8で用いたpDNAは、図14(A)のluc+遺伝子を図14(B)のHind IIIからXba Iに組み込んだものを使用し、この配列のpDNAが形質転換された大腸菌を培養、抽出、精製したミツワフロンテック株式会社のものを使用した。

ここで図15に、PEG(2K)-MS、3種類のPEG-DSPE(ステアリン酸の炭素数:18)誘導体の構造式を示した。3種類のPEG-DSPE誘導体はそれぞれ、PEG(2K)-DSPE、EG(5K)-DSPE、PEG(comb)-DSPEとそれぞれ省略する。

[0033] (実験例9)

<PEG (2K) DSPEで修飾したS/Wの封入性と遺伝子発現>

(1) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のpDNAを含むBuffer #1 (0.25 mM Tris-HCl, 0.025 mM EDTA, pH 8.0) 2.0 mLと、1.1 mg/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液4.0 mLを攪拌し、W/Oエマルジョンを調製後、凍結乾燥することでER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(2) (1) に7.5, 15 mg/mL (10, 20 mM) のDOPEを含むシクロヘキサン溶液2.0 mLを加え、pDNA封入S/O (DOPE含む) を調製した。

(3) (2) の溶液0.50 mLと、0.75, 1.5 mg/mL (1.0, 2.0 mM) のPCや、3.0, 6.0, 12 mg/mL (1.0, 2.0, 4.0 mM) のPEG (2K) DSPEをそれぞれ組み合わせた水溶液5.0 mLを攪拌し、S/O/Wエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで表5に示す計9種類のSurfactant- (DOPE) -ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(4) (3) に血清培地5.0 mLを加え、2.0 mg/mLのpDNAを含む表5に示す計9種類のS/Wを得た。

(5) (3) にミリQ水5.0 mLを加え、得られたS/W中のpDNAの封入性をアガロースゲル電気泳動によって評価した。ここで1 % Triton X-100によってキャリアを崩壊させたものの電気泳動も行った。

(6) 24穴プレートにB16細胞を 5×10^4 cells/wellとなるように播種し、一晩培養後、(4) の血清培地溶液を0.5 mL/wellで添加した (pDNA 1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$) 。ここでコントロールとしてpDNAを含む血清培地溶液にLipofectamineを適量 (N/P = 1.5) 加えたものを使用した。

(7) (6) から1日後、培地を除き、Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) で洗浄後、0.05 % TritonX-100含むTE緩衝液を添加し、細胞を溶解後、遠心分離し、上清にルシフェリンを加え、ルシフェラーゼの発光量 (relative light unit, RLU) を測定した。またBradford法によって上清中のタンパク質濃度を測定し規格化した。

(8) 96穴プレートにB16細胞を 5×10^3 cells/wellとなるように播種し、一晩培養後、(4) の血清培地溶液を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。ここでcontrolやbla

nkとして血清培地のみのwellも用意した。

(9) (8) から1日後、溶液を除き、Cell counting Kit-8に付属の2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) および1-methoxy-5-methyl-phenazinium methylsulfate (1-methoxy-PMS) を含む血清培地溶液を加え、2時間呈色反応を行い、450 nmの吸光度を測定し、controlとの比較により、計算式1で細胞の生存率を測定した。

[0034] [表5]

No.	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
pDNA [$\mu\text{g}/\text{mL}$]					2.0				
ER-290 [mM]					0.2				
DOPE [mM]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0
PC [mM]	1.0	-	1.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0
PEG (2K) DSPE [mM]	-	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0

[0035] PEG (2K) DSPEがS/Wの外側の界面活性剤として適していることが示唆されたため、アガロースゲル電気泳動によってpDNAのキャリアへの封入性の評価を行った。表5の(b)、(d) (DOPE : PEG (2K) DSPE = 1 : 1、1 : 2) のサンプルについての電気泳動を行いpDNAの封入性を評価した。ここでもしキャリア中にpDNAが封入されていればNaked DNAよりも高分子量側にバンドが見られるはずである。また強力な非イオン性界面活性剤Triton X-100を加えることによってキャリアを崩壊させ、pDNAの回収性の評価も同時に行った。図16に結果を示す。図16 (B) の結果より、PEG (2K) DSPEで調製したS/WはほとんどpDNAを封入していないということが分かった。PEG (2K) DSPEはほとんどB16細胞に対する毒性はなく可溶化能力は低いと考えられたが、アガロースゲル電気泳動結果によるとTriton X-100を添加する場合とバンドの位置にほとんど変化が見られなかった。図16 (A) で(b)と同様のモル数で界面活性剤をPCとして調製したサンプル(a)の電気泳動結果を示すが、この場合はpDNAの漏洩も見られるがゲルのキャスト部分にもpDNAが見られ、Triton X-100で崩壊させた場合とは違う泳動結果が得られたことから、キャリアへの封入性は界面活性剤の種類による影響が大きいことが分かる。そこでPCとPEG (2K) DS

PEを併用したS/W ((g)) を調製すると、図16 (C) のようにほんの僅かではあるがpDNA封入が確認された。これによって封入性向上による遺伝子発現効率の向上が期待されるが同時にPCによる凝集が起こる可能性もある。

表5の全てのサンプルについて遺伝子発現実験と細胞毒性実験を行った。全てのサンプルで細胞生存率は70 ~ 96 %であり、細胞毒性はほとんど見られないことが分かった。また、遺伝子発現の結果を図17に示す。外側の界面活性剤をPCのみで調製したサンプル(a)は遺伝子発現は全く起こらなかった。細胞の様子を観察すると粒子の凝集が起こっていた。外側の界面活性剤をPEG (2K) DSPEのみで調製したサンプル(b)、(d)、(f)、(h) (DOPE : PEG (2K) DSPE = 1 : 1、1 : 2、2 : 2、2 : 4) については、遺伝子発現が確認され、このときの粒子の凝集はサンプル(f)よりは明らかに減っていた。しかしDOPEによる遺伝子発現の上昇は確認されなかった。またPCによってpDNAの封入性向上を期待して調製したサンプル(c)、(e)、(g)、(i) (DOPE : PC : PEG (2K) DSPE = 1 : 1 : 1、1 : 2 : 2、2 : 2 : 2、2 : 2 : 4) については、細胞の観察では粒子の凝集はサンプル(a)よりは明らかに減っていた。したがって粒子表面がPEGによって被覆されたことでPCによる粒子の凝集が押さえられたことが示唆される。しかしながらそれぞれの遺伝子発現はPEG (2K) DSPEのみのサンプル(b)、(d)、(f)、(h)とほとんど変化が無いことが分かった。

[0036] (実験例10)

<PEI添加S/Wの封入性と遺伝子発現>

(1) 1 M HClによってPEIを10 mg /mLの濃度で溶かし、この溶液に1 M Tris-HCl (pH 9.0) を適量加えpHを調整後、TE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 8.0) を適量加えることで、最終的に20 μ g/mLのpDNAを含むN/P = 10のPEI-pDNA複合体溶液2.0 mLを作るための10xPEI (1.07 mM PEI, 250 mM Tris-HCl, 0.25 mM EDTA, pH 6.0) を調製した。

(2) 20 μ g/mLのpDNAと0.107 mMのPEIを含むBuffer #2 (25 mM Tris-HCl, 0.025 mM EDTA, pH 6.0) 2.0 mLと、5.5, 11 mg/mLのER-290を含むシクロヘキサン溶液4.0 mLを攪拌し、W/Oエマルジョンを調製後、凍結乾燥することでER

-290-pDNA複合体の固体を得た。

(3) (2)に3.75, 7.5, 15 mg/mL (5, 10, 20 mM) のDOPEを含むシクロヘキサン溶液2.0 mLを加え、pDNA封入S/O (DOPE含む) を調製した。

(4) (3)の溶液0.50 mLと、12, 24 mg/mL (4.0, 8.0 mM) のPEG (2K) DSPEをそれぞれ組み合わせた水溶液5.0 mLを攪拌し、S/O/Wエマルジョンを調製後、凍結乾燥することで表6に示す計4種類のPEG (2K) DSPE - (DOPE) -ER-290-pDNA複合体の固体を得た。

(5) (4)に血清培地5.0 mLを加え、2.0 μ g/mLのpDNAを含むS/Wを調製後、3.2.と同様の方法で遺伝子発現実験および細胞毒性実験を行った。

(6) (4)にミリQ水5.0 mLを加え、得られたS/W中のpDNAの封入性をアガロースゲル電気泳動によって評価した。ここで1 % Triton X-100によってキャリアを崩壊させたものやPVSKによってPEIをはがしたものの電気泳動も行った。

[0037] [表6]

No.	(j)	(k)	(l)	(m)
pDNA [μ g/mL]		2.0		
ER-290 [mM]	1.0	1.0	2.0	2.0
DOPE [mM]	0.5	1.0	2.0	2.0
PEG (2K) DSPE [mM]	4.0	4.0	4.0	8.0

[0038] 血清培地中におけるS/Wの遺伝子発現においては、(1) キャリアの粒子径、(2) 封入性、(3) 叙放性、(4) (5) DOPEの添加量、(6) 血清耐性、(7) 細胞毒性を考慮し、最適な調製条件を決定する必要があると考えられる。この中でPEG (2K) DSPEを用いたS/Wで遺伝子発現効率が上がらない原因としては、キャリアへの封入性の低さが最も影響していると考えられる。そこでpDNAの漏洩にDNAの静電反発が関与していると考え、ポリカチオンを添加することでpDNAを集合させ封入性に影響するかを検討した。本実験例ではポリカチオンとして最も遺伝子発現効率が高いことで知られている直鎖型ポリエチレンイミン (PEI) を用いた。

図18にS/W(k)の1, 6, 24時間後のサンプルと、PEIとpDNAをN/P = 10で混合したPEI-pDNA複合体のアガロース電気泳動結果を示す。ここでpDNAはPEIと

複合化して電気泳動すると高分子量側にバンドが移動する。そこでポリアニオンであるPVSKを、PEIとpDNAの複合体からPEIをはがすために用いた。またPEIの濃度は全てN/P = 10として調製した。ここでN/P比とは、(PEIのN原子数) / (pDNAのP原子数) であり、N/P比が大きいほどpDNAの電気泳動結果は高分子量側にシフトする。N/P比はPEIのモノマー (分子量43) につき1個のN原子、pDNAのモノマー (A, T, G, Cのヌクレオチド1 bpの平均分子量640) につき2個のP原子として計算した。図18 (D) のN/P = 10のときのPEI-pDNA複合体の電気泳動結果から、前記N/P比ではPEI-pDNA複合体はnaked pDNAと比べて電気泳動結果はほとんど差が見られないことが分かった。さらにそれを2回凍結乾燥するとバンドがゲルのキャスト部分から動かなくなり、PVSKを加えてもpDNAのバンドが出て来ないことを確認した。詳細は不明だが、少なくともPEI-pDNA複合体にとって凍結乾燥という作業は複合体の状態に大きな影響を与えることが分かった。次に図18 (A) ~ (C) のS/Wのアガロース電気泳動結果であるが、1 hから24 hと放置時間を長くするに従って特にPVSKを加えた場合にnaked pDNAとほぼ同じ位置にpDNAのバンドが現れる。またS/Wのみを電気泳動した場合を時間ごとに見てみると、徐々にpDNAのバンドが現れることが分かる。もともと今回のN/P比でPEI-pDNA複合体がほとんど高分子量シフトしないことから、24時間後でS/Wのみの場合に現れたpDNAのバンドがPEI-pDNA複合体のバンドだと解釈すれば、PEI-pDNA複合体がS/W中から徐々に漏洩している可能性は高い。またPVSKでpDNAのバンドが出現していることから、2回凍結乾燥を行ったPEI-pDNA複合体とも違う状態ができていると考えられ、遺伝子発現にも影響は少ないことが予想される。この結果は他のPEIを添加したS/W(j)、(l)、(m)でも同様の結果が得られることを確認した。

[0039] 次に、遺伝子発現実験を行った結果を図19に示す。図19より、S/W(k) (ER-290 : DOPE : PEG (2K) DSPE = 1 : 1 : 4) において、現時点で最高の遺伝子発現効率 (48 h後で 2.8×10^7 [RLU/mg protein]) を達成した。これはD-MEM中でLipofectamine 2000を使用した場合に匹敵する発現効率である。また全てのサンプルで細胞生存率は70 ~ 100 %であり、目立った毒性は見ら

れなかったことから、本手法によって新しい遺伝子発現システムを構築できる可能性が示唆された。PEIを添加せずにPEG (2K) DSPE等の構成する界面活性剤は同じもので調製していたサンプル(d)については調製後すぐに漏洩していたために、48時間後に必ず遺伝子発現効率はバックグラウンドレベルに下がっていたが、48時間後でも継続的に遺伝子発現が確認された。

[0040] pDNAは上記実験例8で用いたものと同じものを使用した。図20に、今回用いたPEIの構造式を示した。

[0041] (実験例11)

<緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の細胞内導入性を評価>

封入するタンパク質性薬物のモデルとして、分子量約27 kDaの緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を用いてS/Wを調製し、その細胞内導入性を評価した。

(1)それぞれ20, 60, 100, 200, 300 μ g/ml (表7の(a)~(e)に対応)のEGFP水溶液2.0 mlを、1.1 mg/mlのER-290シクロヘキサン溶液4.0 ml中に添加して、ホモジナイザーで高速攪拌 (26,000 rpm, 2 min) することでW/Oエマルジョンを調整した。

(2)得られた溶液を凍結乾燥することでER-290-EGFP複合体 (S/O 複合体) を調製した。これにシクロヘキサン1.5 mlを添加して、EGFP含有S/Oを調整した。

(3)この溶液0.375 mlと60 mg/mlのDOPEシクロヘキサン溶液0.125 mlを、1.2 mg/mlのR4-strおよび36.4 mg/mlのソルビトール (SOR、凍結乾燥時の安定化剤10) を含む1.5 mg/mlのPC水溶液5 mlに添加し、ホモジナイザーで高速攪拌 (22,000 rpm, 2 min) することでS/O/W エマルジョンを調製した。

(4)得られた溶液を凍結乾燥することでEGFP 含有S/W 複合体を作製した。これに5 mlのMilli-Q水 (実験1) または血清使用量低減培地 (Opti-MEM) (実験2,3) を添加してEGFP 含有S/Wを調製した。また、この溶液をそれぞれ2倍、4倍希釈したサンプルも用意した。

[0042]

[表7]

	EGFP	ER-290	組成比(g:g)
(a)	40 μ g		1:110
(b)	120 μ g		1:37
(c)	200 μ g	4.4 mg	1:22
(d)	400 μ g		1:11
(e)	600 μ g		1:7

[0043] 得られたEGFP含有S/O、S/Wの状態を図2 1に示す。ここでサンプル(f)とは、サンプル(e)を1日静置後の状態である。写真のように、作製したS/OではEGFPの浮遊および沈殿が生じたサンプル(e)、(f)を除いてEGFP由来の蛍光が観察されなかった。これは、EGFPが高濃度でキャリア内に封入されていることに由来する濃度消光によるものである。DLSによりS/Oの粒子径を測定したところEGFPに対するER-290量の減少とともに粒子径の増大が見られた(表8、図2 2)。これは一つの粒子に占めるEGFP量が増大したためである。

また、最も多くのEGFPを封入できたサンプル(d)を用いて作製したS/Wでは若干懸濁しているもののDLS測定により粒子径を測定したところ1 μ mをきる粒子を得ることに成功した(表8、図2 2)。ここでS/Wでは2つのピークが観察されているがS/Oの粒子径からS/W複合体は平均粒径 325 ± 21.8 nmのピークであると考えられ、小さいほうのピークはPGやDOPE、R4-str等の正ミセルであると考えられる。さらに、ゼータ電位の測定を行ったところとポテンシャルは 35.1 ± 1.1 mVとなり、粒子表面がかなりカチオン性に帯電していることが確認された。

[0044] [表8]

サンプル	(a)	(b)	(c)	(d)	S/W
平均粒径 (nm)	171 ± 8.3	174 ± 3.6	183 ± 12	272 ± 9.3	63.9 ± 1.4 325 ± 21.8

[0045] (実験例 1 2)

<R4-str修飾によるEGFP含有S/Wの細胞導入性評価>

細胞導入を高めるR4-str(ステアリル化テトラアルギニン)とエンドソー

ム内でプロトンスポンジ効果を示すDOPEを修飾したS/Wに対してB16細胞へのEGFP導入性を評価した。

実施例12と同様にして、表9の組成のS/Wを調製した。但し、EGFP含有S/W複合体に5 mlのMilli-Q水を添加することなく、血清使用量低減培地 (Opti-MEM) を添加してEGFP含有S/Wを調製した。

次に、B16メラノーマ細胞が培地中で 5×10^5 cells/mlとなるように調製し、細胞用24穴プレートに1.0 ml/well (5×10^5 cells/well) ずつ添加して1晩培養した。培地を取り除いた後、PBS(-)1.0 mlで2回洗浄した。Opti-MEM1.0 mlで1回洗浄したあと、表9の組成のS/Wおよびこれを2倍、4倍希釈したものを用意してそれぞれ1.0 mlずつ加えCO₂インキュベーターで2時間培養した。溶液を取り除いた後PBS(-)1.0 mlで2回洗浄し、D-MEMへと培地交換を行った。得られた細胞の状態を蛍光顕微鏡で観察し、EGFPの細胞内導入性を評価した。コントロールとしてR4-strを未修飾のものおよび未処理の細胞 (non-treat) についても同様の実験を行い、R4-strの有用性を評価した。

[0046] [表9]

EGFP	ER-290	DOPE	R4-str	PC	SOR
100 μg	1.1 mg	7.5 mg	6.0 mg	7.5 mg	182 mg

[0047] 蛍光顕微鏡で観察した結果、希釈の有無にかかわらず全てのサンプルで同様の結果を示した。例として、2倍希釈したサンプルの蛍光顕微鏡観察結果を図23に示す。この結果からEGFPの細胞内導入はR4-strが修飾されたS/Wのみで起こり、EGFPの細胞内導入のためにはR4-strが必要不可欠であることが確認された。この理由として細胞表面は一般的にアニオン性であることが知られており、キャリア表面をカチオン化するR4-strの影響により細胞導入が達成されたのではないかと思われる。

請求の範囲

- [請求項1] 水溶性薬物を2種の界面活性剤1及び界面活性剤2で内外二重に被覆してなることを特徴とする薬物輸送キャリア。
- [請求項2] 請求項1記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記水溶性薬物はタンパク、遺伝子、オリゴ核酸、多糖類、合成高分子、ペプチド、小分子、ナノ粒子（超構造体）の何れかであることを特徴とする薬物輸送キャリア。
- [請求項3] 請求項2記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記遺伝子がpDNAで、前記タンパクがEGFPであることを特徴とする薬物輸送キャリア。
- [請求項4] 請求項1乃至3の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記内側の界面活性剤1は、シヨ糖脂肪酸エステル、コレステロール、グリセリン脂肪酸エステルの何れかであることを特徴する薬物輸送キャリア。
- [請求項5] 請求項1乃至4の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記外側の界面前活性剤2は、PC、L-1695、PEG(2K)-MS、PEG(2K)-DSPE、PEG(5K)-DSPE、PEG(comb)-DSPE、Tween 80、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセリン脂肪酸エステルの少なくとも何れかであることを特徴とする薬物輸送キャリア。
- [請求項6] 請求項1乃至5の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記薬物輸送キャリアは、DOPEやジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEIやポリ-L-リジン等のカチオン性高分子の少なくとも何れかを含むことを特徴とする薬物輸送キャリア。
- [請求項7] 請求項1乃至6の何れかに記載の薬物輸送キャリアにおいて、前記薬物輸送キャリアの外周をアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニンR8-str、ステアリル化テトラアルギニンR4-str等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG(2K)-DSPE、N-マレイミド-PEG(2K)-DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG(2K)-DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各

種細胞膜タンパク質結合ドメインの何れかで修飾したことを特徴とする薬物輸送キャリア。

[請求項8] 水溶性薬物を2種の界面活性剤1及び界面活性剤2で内外二重に被覆してなる薬物輸送キャリアの製造方法であって、

1) 水溶性薬物を含む水相と、界面活性剤1を含む油相を攪拌混合して、前記水溶性薬物を含む水相を油相中に分散させたW/Oエマルションを形成する工程、

2) 前記W/Oエマルションから内水相を除いて、前記水溶性薬物-界面活性剤1複合体を油相中に分散させたS/Oを形成する工程、

3) 前記S/Oと、界面活性剤2を含む水相を攪拌混合して、前記S/Oを水相中に分散させたS/O/Wエマルションを形成する工程、

4) 前記S/O/Wエマルションから内油相を取り除いて、水溶性薬物-界面活性剤1-界面活性剤2複合体を水相中に分散させたS/Wを形成する工程、

とからなることを特徴とする薬物輸送キャリアの製造方法。

[請求項9] 請求項8記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記内水相及び内油相を凍結乾燥によって取り除くことを特徴とする薬物輸送キャリアの製造方法。

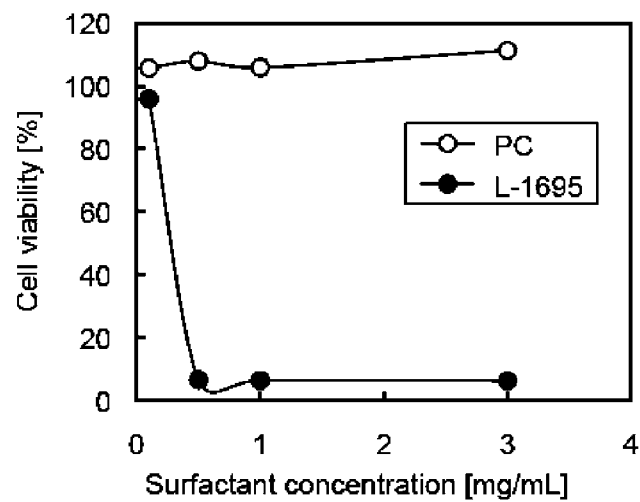
[請求項10] 請求項8または9記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記S/O/Wエマルションはグリセリン、ソルビトールトレハロースの何れかを添加または添加されていない状態で形成することを特徴とする薬物輸送キャリアの製造方法。

[請求項11] 請求項8乃至10の何れかに記載の薬物輸送キャリアの製造方法において、前記S/Oを形成する工程においてS/Wエマルション内にDOPEやジニトロクロロベンゼン等の疎水性の分子、PEIやポリ-L-リジン等のカチオン性高分子の少なくとも何れかが含まれているようにすることを特徴とする薬物輸送キャリアの製造方法。

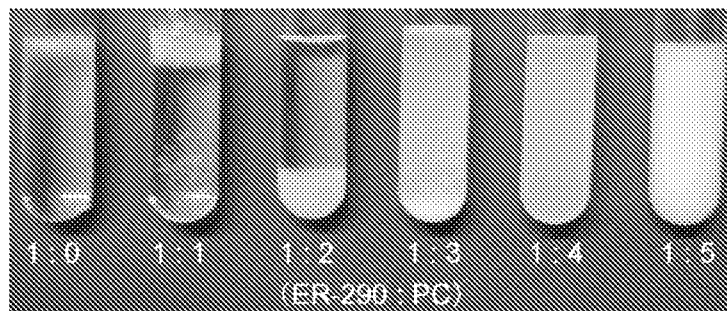
[請求項12] 請求項8乃至11の何れかに記載の薬物輸送キャリアの製造方法にお

いて、前記S/Wを形成する工程においてS/O/Wエマルション内にアルキル化膜透過性ペプチド（例えば、ステアリル化オクタアルギニンR8-str、ステアリル化テトラアルギニンR4-str等）、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、N-マレイミド-PEG（2K）-DSPE、N-ヒドロキシスクシンイミド-PEG（2K）-DSPE、これらによって修飾された抗体やサキナビル、ヒアルロン酸等の各種細胞膜タンパク質結合ドメインの何れかが含まれているようにすることを特徴とする薬物輸送キャリアの製造方法。

[図1]

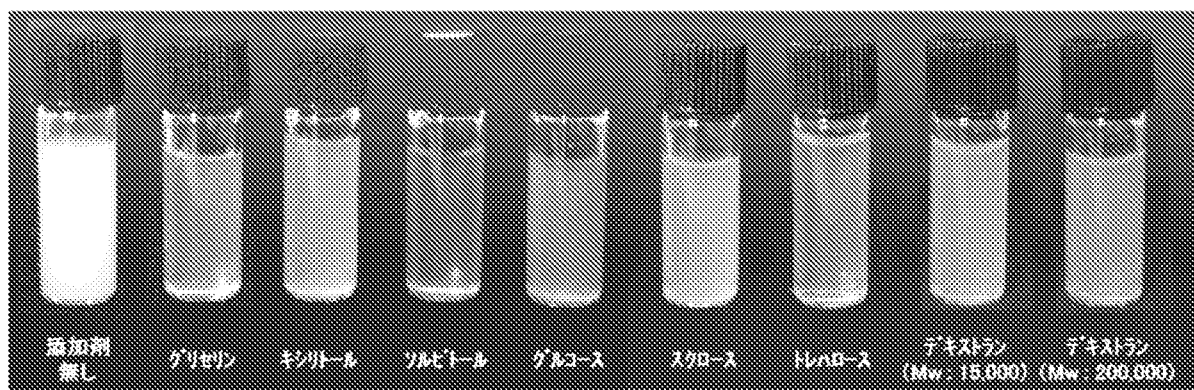


[図2]

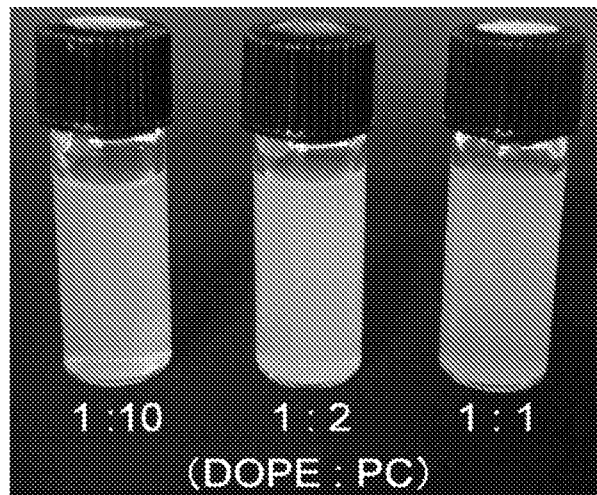


界面活性剤の重量比の影響

[図3]



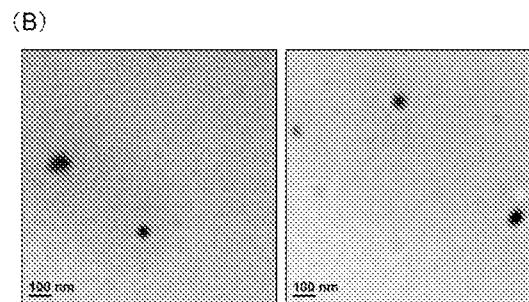
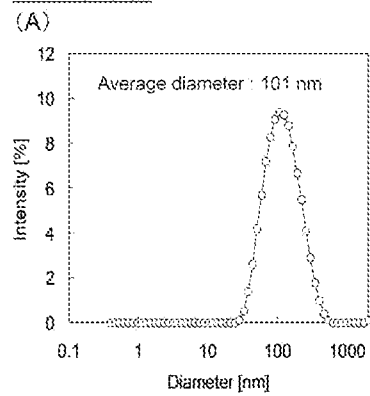
[図4]



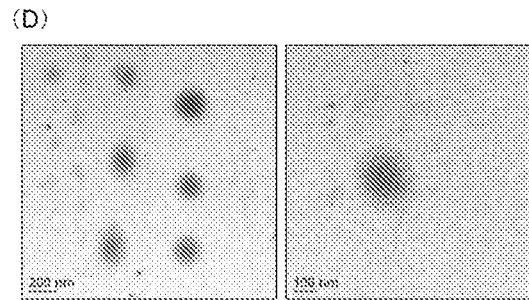
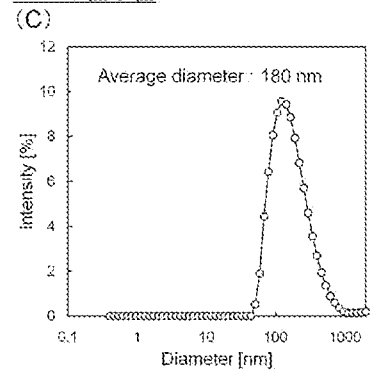
DOPE 添加の影響

[図5]

S/Oの粒子径

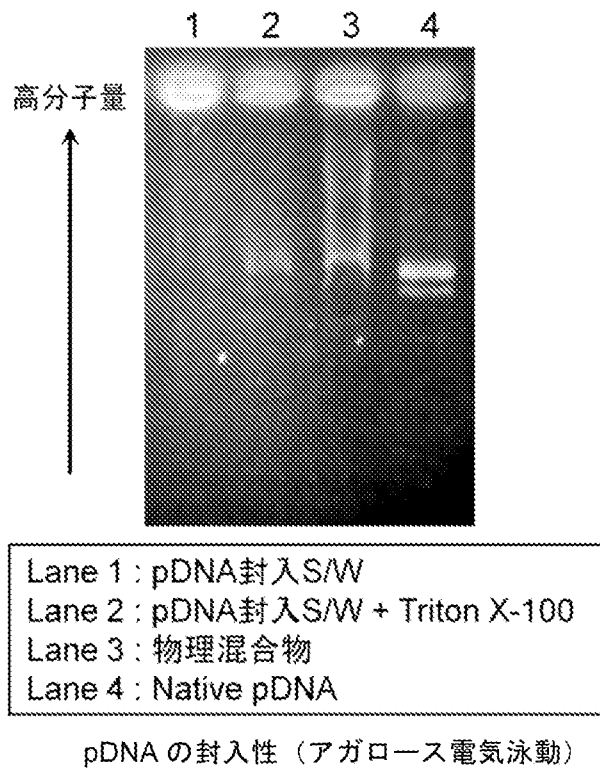


S/Wの粒子径



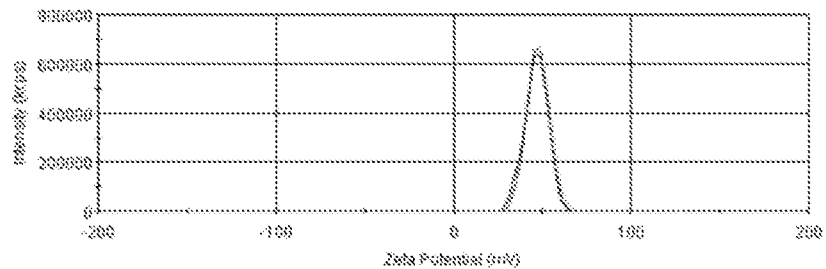
pDNA 封入 S/O および S/W の粒子径 (A, C : DLS 測定、B, D : TEM 観察)

[図6]

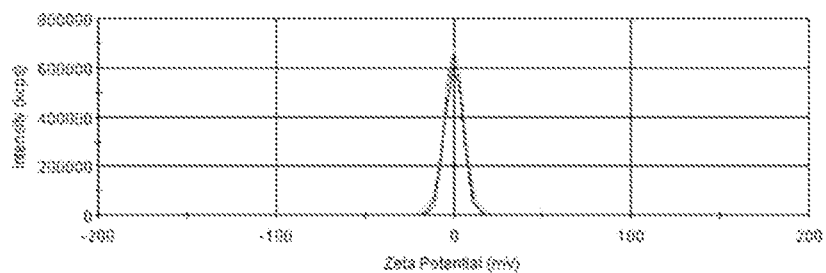


[図7]

サンプル(c)(R8-strあり)・・・ ζ potential = 46.9 ± 0.2 mV

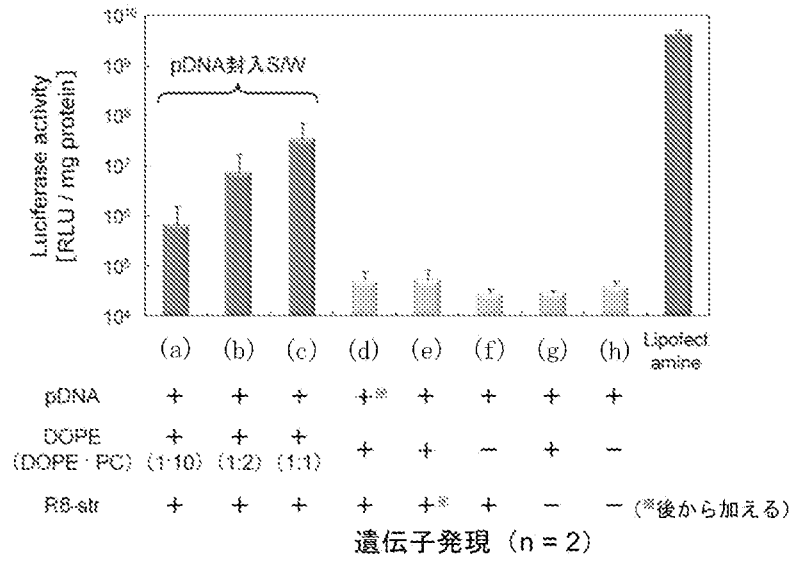


サンプル(g)(R8-strなし)・・・ ζ potential = -0.02 ± 0.07 mV

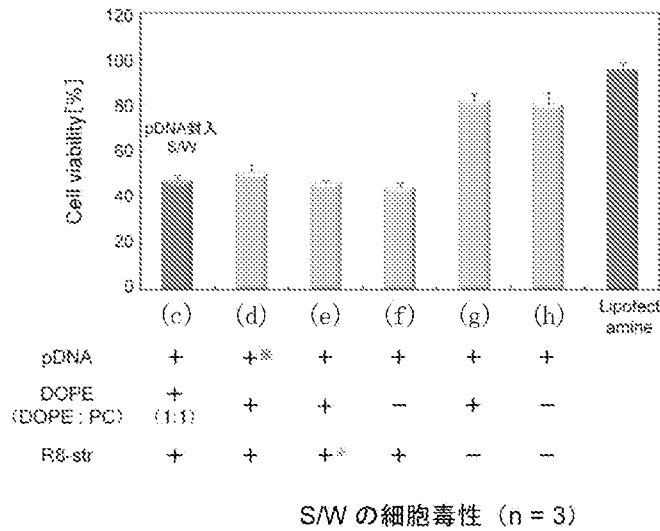


S/W のゼータ電位 (n = 3)

[図8]

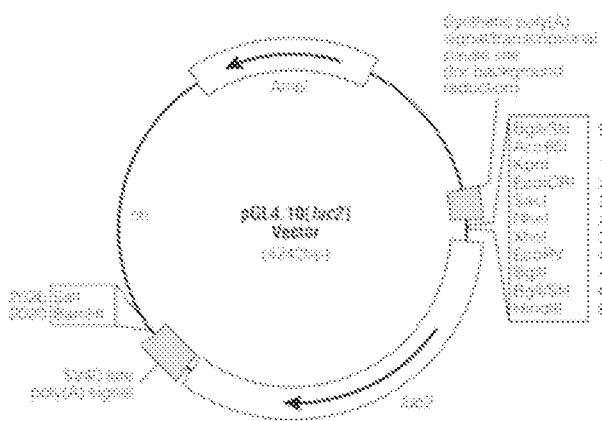


[図9]

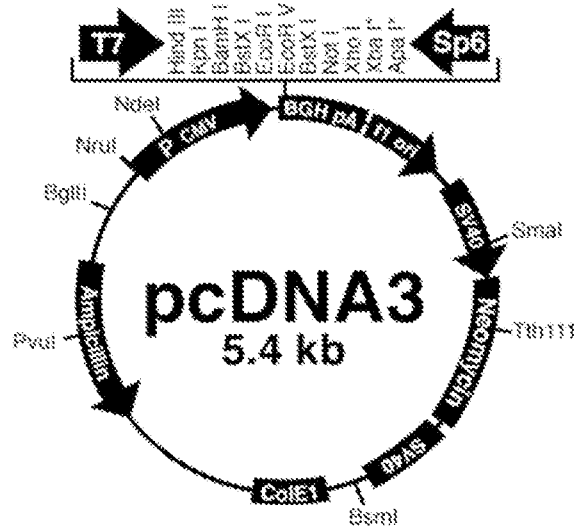


[図10]

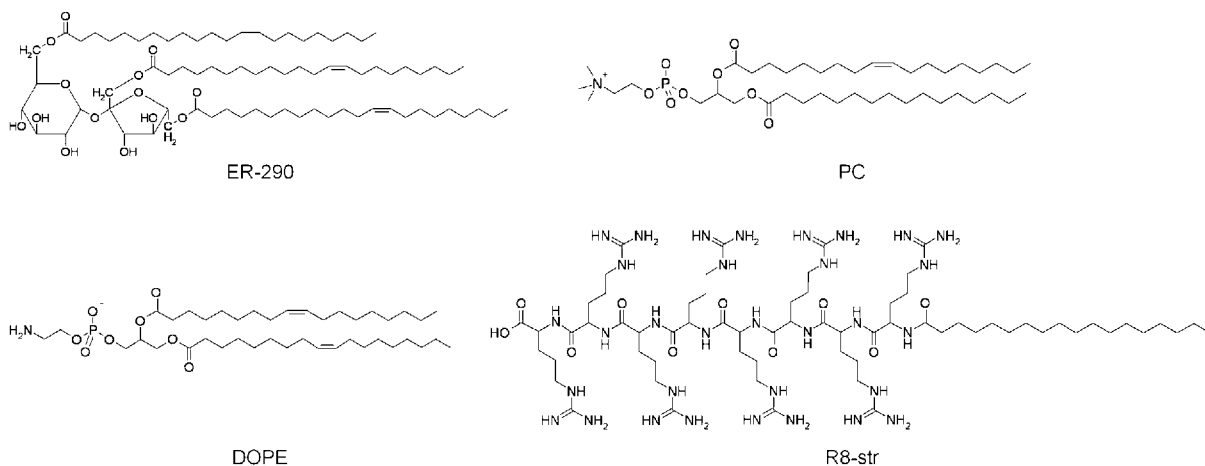
(A)



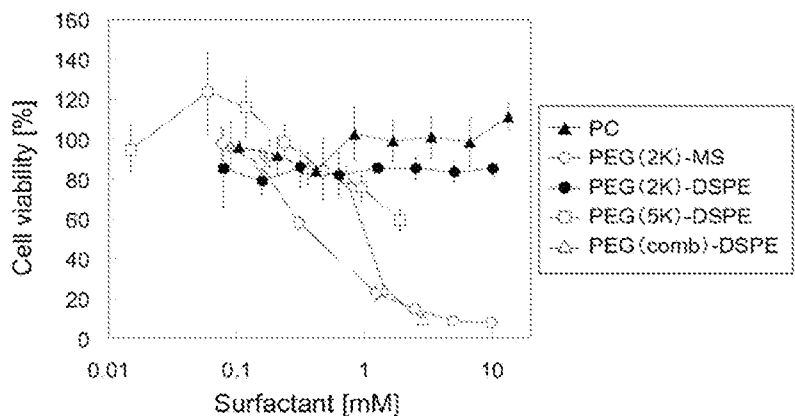
(B)



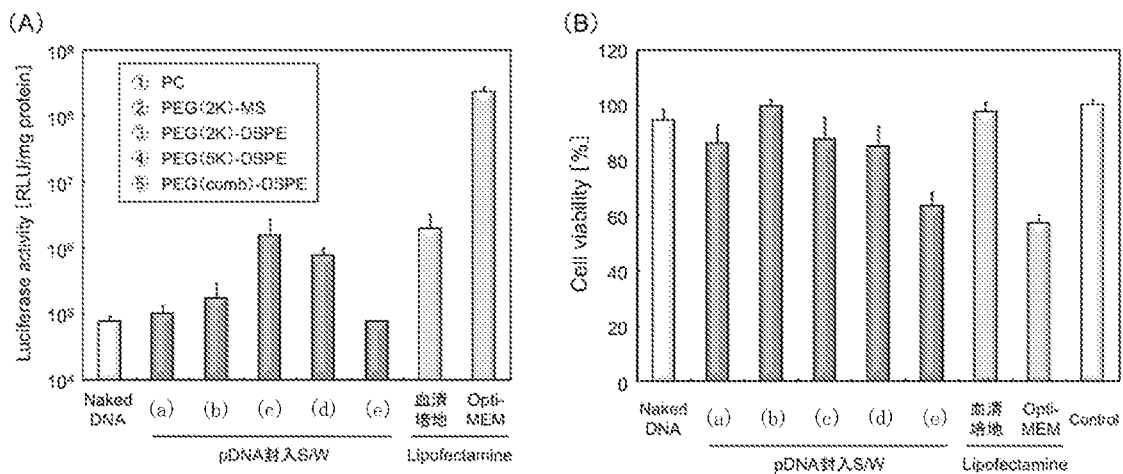
[図11]



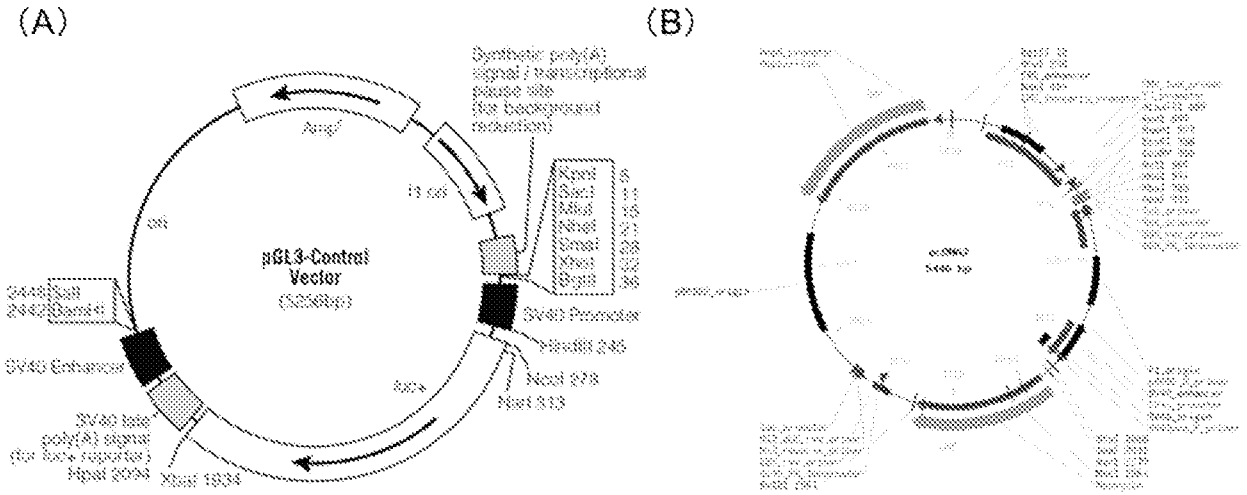
[図12]



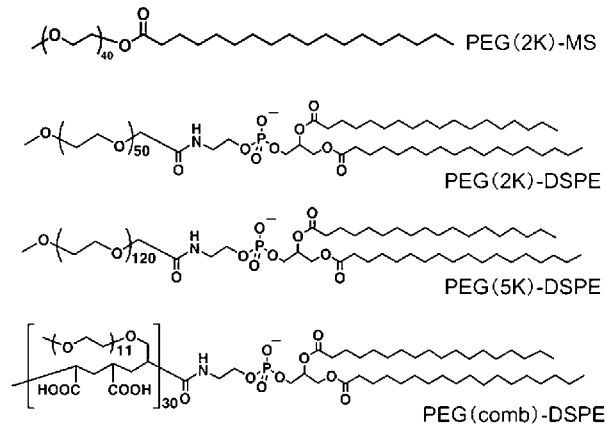
[図13]



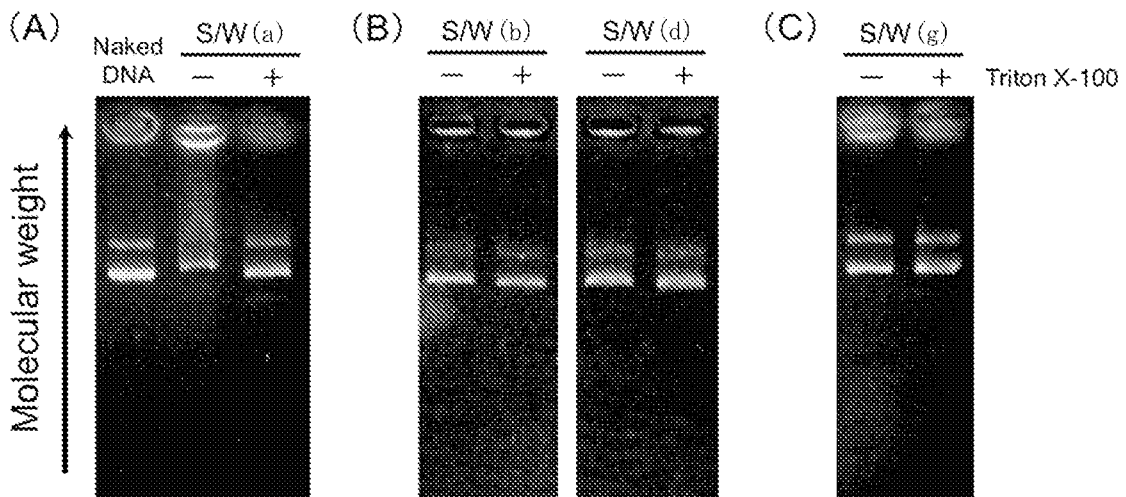
[Fig 14]



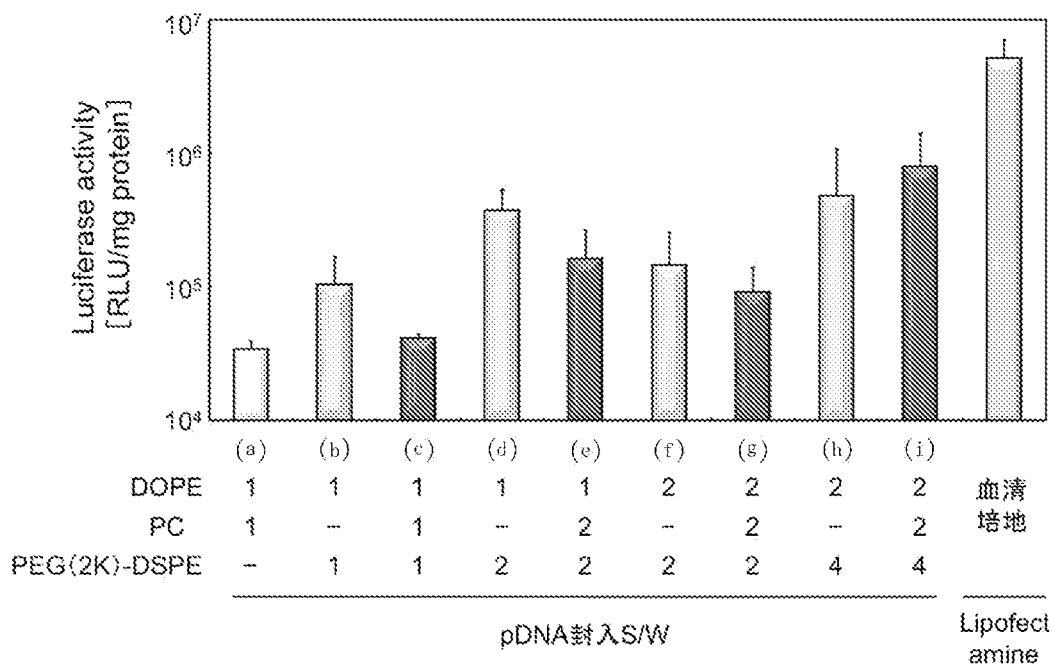
[Fig 15]



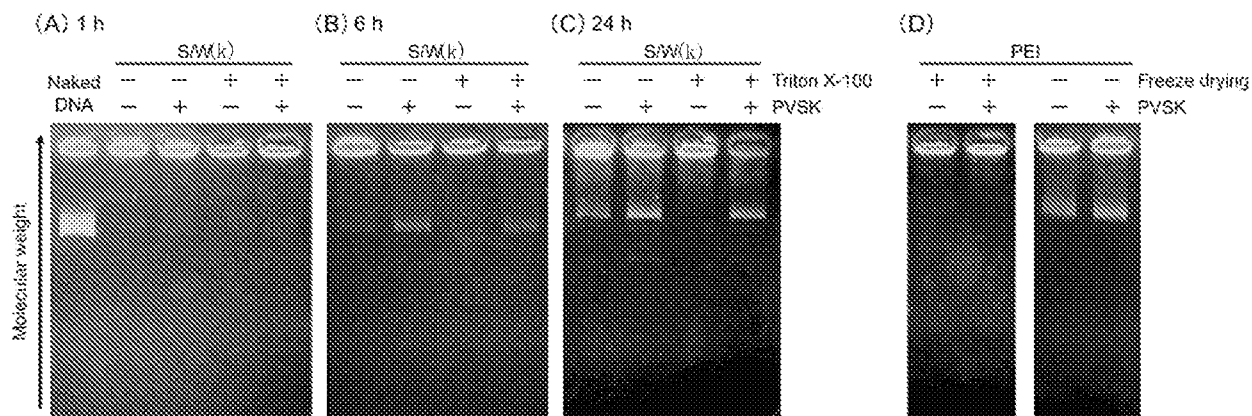
[Fig 16]



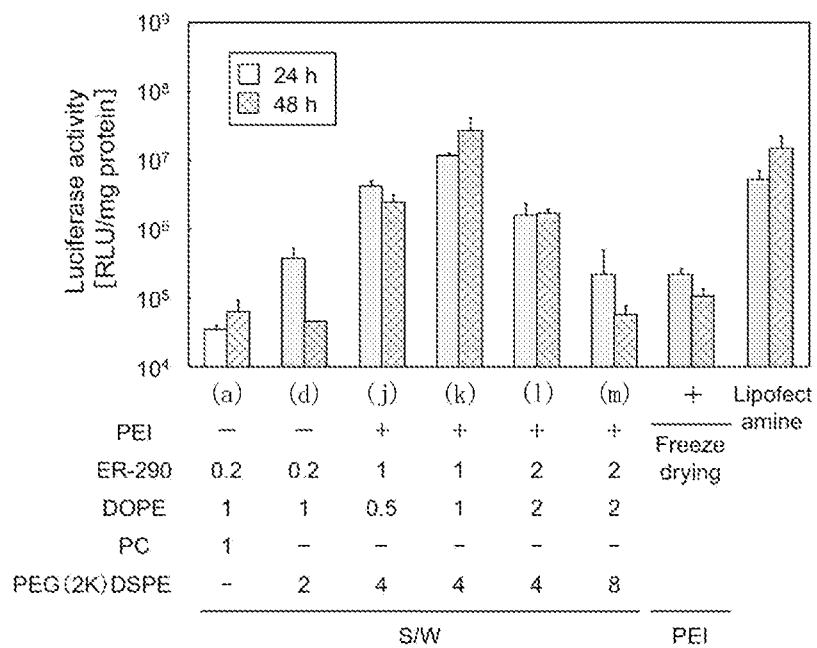
[17]



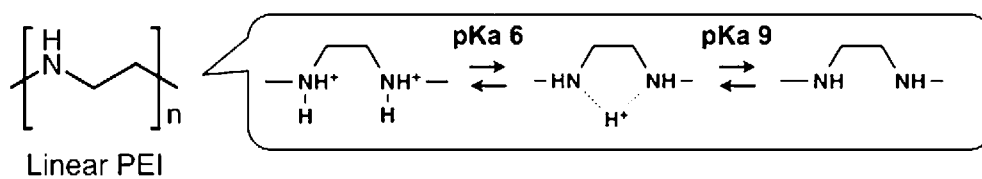
[18]



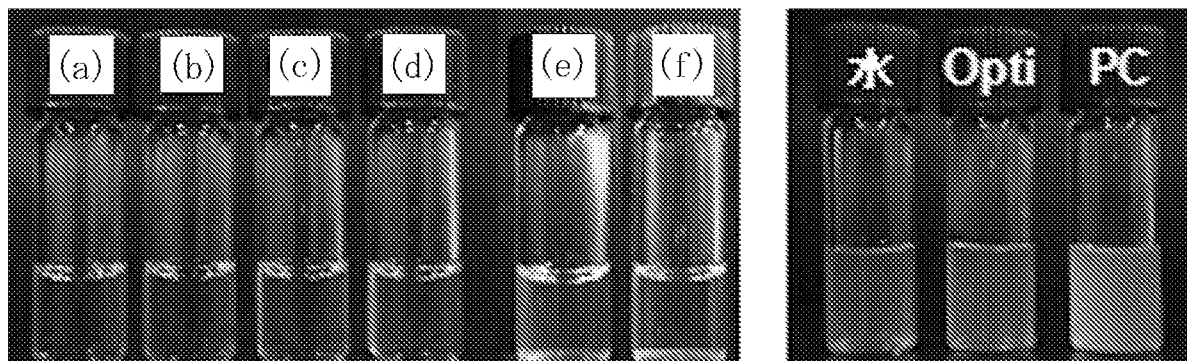
[19]



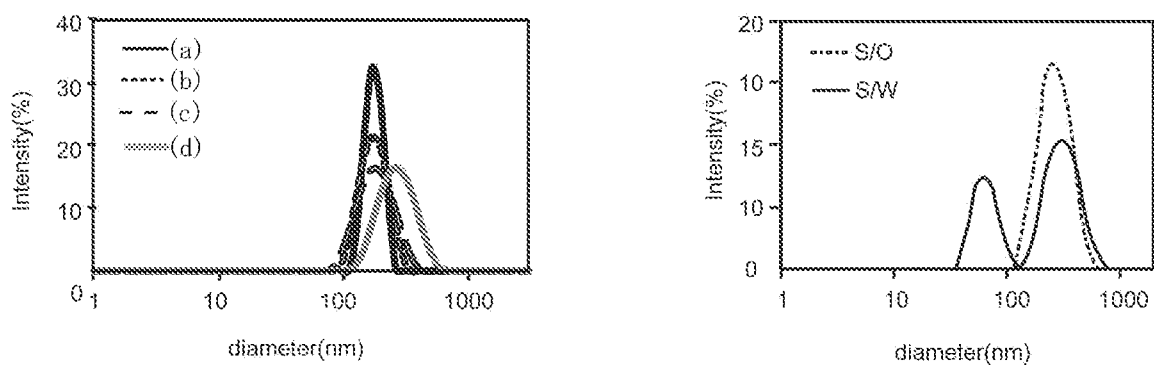
[図20]



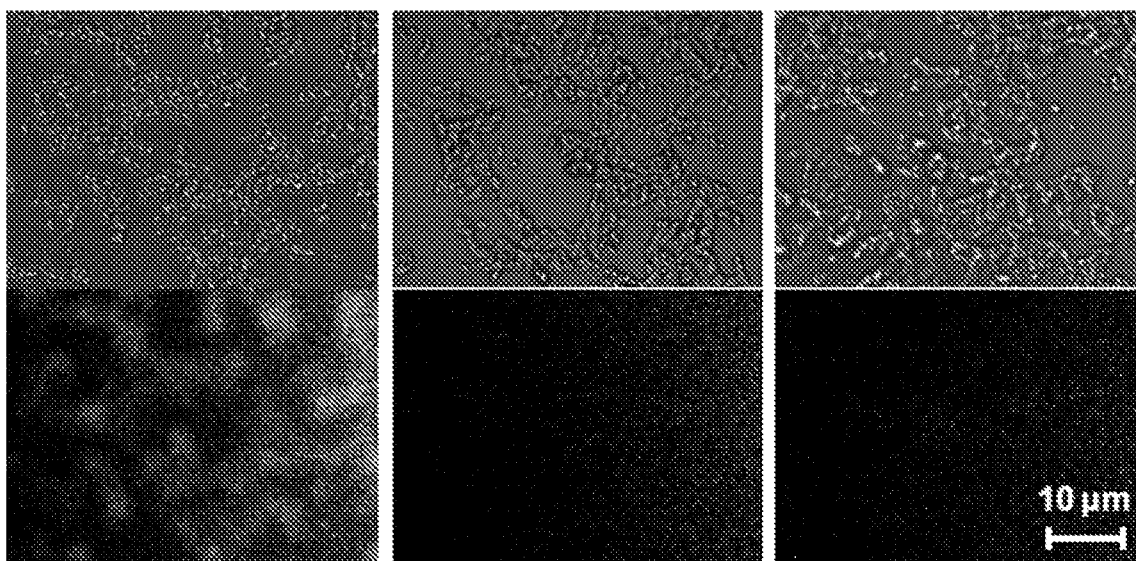
[図21]



[図22]



[図23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/004021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
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) A61K9/10, A61K9/50, A61K31/713, A61K31/715, A61K31/74, A61K38/00, A61K39/395, A61K47/10, A61K47/12, A61K47/14, A61K47/24, A61K47/26, A61K47/28, A61K47/34, A61K47/36, A61K47/42, A61K48/00		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2004-043355 A (MITSUBISHI KAGAKU FOODS KABUSHIKI KAISHA), 12 February 2004 (12.02.2004), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-7 8-12
X A	JP 2004-008837 A (MIYAZAKI KEN), 15 January 2004 (15.01.2004), entire text; particularly, claims; examples & JP 4269078 B2	1-7 8-12
X A	JP 2007-119436 A (MIYAZAKI KEN), 17 May 2007 (17.05.2007), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-7 8-12
<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 August, 2010 (31.08.10)		Date of mailing of the international search report 07 September, 2010 (07.09.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/004021

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/057808 A1 (ASPION CO., LTD., JP), 07 May 2009 (07.05.2009), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-12
A	JP 2008-508302 A (SD PHARM INC.), 21 March 2008 (21.03.2008), entire text; particularly, claims; examples & US 2006/024360 A1 & WO 2006/015120 A2 & EP 1778217 A2	1-12
A	JP 07-255478 A (MITSUI CYANAMID KABUSHIKI KAISHA), 09 October 1995 (09.10.1995), entire text; particularly, claims; examples & JP 3543994 B2	1-12
A	JP 2006-504636 A (BIOPHARM SOLUTIONS INC., US), 09 February 2006 (09.02.2006), entire text; particularly, claims; examples & WO 2003/101600 A2 & EP 1572341 A2 & US 6998393 B2 & US 2006/121121 A1 & WO 2003/101600 A3	1-12
A	WO 2009/060609 A1 (KANEKA CORP., JP), 14 May 2009 (14.05.2009), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-12
A	Khalil I A, Kogure K, Futaki S, et al. Octaarginine-modified multifunctional envelop- type nanoparticles for gene delivery, Gene Therapy, 2007, Vol.14, pages 682-689, entire text	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/004021

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K9/10(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K31/715(2006.01)i, A61K31/74(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K47/10(2006.01)i, A61K47/12(2006.01)i,
A61K47/14(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i,
A61K47/28(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i,
A61K47/42(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照		
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. A61K9/10, A61K9/50, A61K31/713, A61K31/715, A61K31/74, A61K38/00, A61K39/395, A61K47/10, A61K47/12, A61K47/14, A61K47/24, A61K47/26, A61K47/28, A61K47/34, A61K47/36, A61K47/42, A61K48/00		
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 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)		
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
X A	JP 2004-043355 A (MITSUBISHI KAGAKU FOODS KK) 2004.02.12, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-7 8-12
X A	JP 2004-008837 A (MIYAZAKI KEN) 2004.01.15, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 & JP 4269078 B2	1-7 8-12
<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 31.08.2010	国際調査報告の発送日 07.09.2010	
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) 北畑 勝彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	4C 3337

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
X	JP 2007-119436 A (MIYAZAKI KEN) 2007. 05. 17,	1-7
A	文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	8-12
A	WO 2009/057808 A1 (ASPION CO LTD, JP) 2009. 05. 07, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2008-508302 A (SD PHARM INC) 2008. 03. 21, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 & US 2006/024360 A1 & WO 2006/015120 A2 & EP 1778217 A2	1-12
A	JP 07-255478 A (MITSUI CYANAMID KK) 1995. 10. 09, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 & JP 3543994 B2	1-12
A	JP 2006-504636 A (BIOPHARM SOLUTIONS INC, US) 2006. 02. 09, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 & WO 2003/101600 A2 & EP 1572341 A2 & US 6998393 B2 & US 2006/121121 A1 & WO 2003/101600 A3	1-12
A	WO 2009/060609 A1 (KANEKA CORP, JP) 2009. 05. 14, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-12
A	Khalil I A, Kogure K, Futaki S, et al. Octaarginine-modified multifunctional envelop-type nanoparticles for gene delivery, Gene Therapy, 2007, Vol.14, pages 682-689 文献全体	1-12

発明の属する分野の分類

A61K9/10(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i,
A61K31/74(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/10(2006.01)i,
A61K47/12(2006.01)i, A61K47/14(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i,
A61K47/28(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i