

(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11月3日(03.11.2011)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/135905 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 9/127 (2006.01) C07K 5/10 (2006.01)  
A61K 47/44 (2006.01) C07K 7/04 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/053963
- (22) 国際出願日: 2011年2月23日(23.02.2011)
- (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 2010-103333 2010年4月28日(28.04.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 原島 秀吉 (HARASHIMA Hideyoshi). 畠山 浩人 (HATAKEYAMA Hiroto). カリル イクラミ (KHALIL Ikramy). 高良 和宏 (TAKARA Kazuhiko).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8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.
- (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, RS, 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))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2011/135905 A1

(54) Title: LIPID MEMBRANE STRUCTURE

(54) 発明の名称: 脂質膜構造体

(57) Abstract: Disclosed is a lipid membrane structure which fulfils intracellular migration properties, selectivity for target cells and *in vivo* stability and can be used for the delivery of a substance to a target cell. In the lipid membrane structure, a lipid membrane is modified with (a) polyalkylene glycol having a target-cell-selective ligand bound thereto and (b) a polypeptide containing multiple arginine residues.

(57) 要約: 細胞内移行性、標的細胞に対する選択性、及び生体内安定性を満足する標的細胞に物質を送達するための脂質膜構造体であって、脂質膜が(a)標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール; 及び(b)複数個のアルギニン残基を含むポリペプチドで修飾された脂質膜構造体。

## 明 細 書

### 発明の名称：脂質膜構造体

### 技術分野

[0001] 本発明は、核酸などの物質を標的細胞内に効率的に送達することができる脂質膜構造体に関する。より具体的には、本発明は、細胞内移行性、標的細胞に対する選択性、及び生体内安定性に優れ、核酸などを標的細胞内に効率的に送達することができる脂質膜構造体に関するものである。

### 背景技術

[0002] ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)として利用されるリポソームなどの脂質膜構造体には、薬物を保持する能力、生体内での安定性、薬物を送達すべき特定の細胞(標的細胞)に対する選択性、標的細胞内への移行性、及び標的細胞内での薬物の放出性等の様々な特性が求められる。特に、標的細胞の細胞質や核内に薬物や核酸を送達するための脂質膜構造体には、標的細胞に対する選択性のほか、細胞内、特に核などの標的細胞内部の特定のオルガネラに対する優れた移行性が求められている。

[0003] 本発明者らは、先に、オクタアルギニン(R8)などの連続したアルギニン残基を有するペプチドで脂質膜構造体の表面を修飾することにより、脂質膜構造体の細胞内移行性、特に核内移行性を向上させることができることを見いだしている(国際公開W02005/032593; Journal of Controlled Release, 98, pp. 317-323, 2004)。しかしながら、R8による修飾は、特定の細胞に対する選択的な細胞内移行性を与えるものではない。また、R8の高いカチオン性が原因となって、R8で修飾された脂質膜構造体は生体内から速やかに排除されやすいため、R8で修飾された脂質膜構造体を標的細胞内に選択的に送達することは困難であると考えられている。

[0004] 一方、脂質膜構造体の生体内安定性、特に血中安定性を高める方法として、ポリアルキレングリコール、典型的にはポリエチレングリコール(PEG)で脂質膜構造体の表面を修飾する方法が広く知られている(例えば、特開平1-24

9717号公報、特開平2-149512号公報、特開平4-346918号公報、特開2004-10481号公報などに記載されている)。この方法は、PEGによる水和層が脂質膜構造体などの微粒子キャリアを覆うと血清タンパク吸着などオプソニン化が抑制され、その結果、マクロファージによる貪食と細網内皮系組織による取り込みを回避できることに基づく。

[0005] しかしながら、R8で修飾した脂質膜構造体の生体内安定性を高める目的でさらにPEGで脂質膜構造体の表面を修飾すると、R8修飾による細胞内移行能は失われてしまうという問題がある。すなわち、R8及びPEGによる脂質膜構造体の同時修飾は、PEG修飾により脂質膜構造体の生体内安定性を向上させる一方で、細胞内の移行性を低下させてしまうという相反する問題(PEGジレンマとも呼ばれる)を抱えている。

[0006] このPEGジレンマを解消する試みとして、本発明者らはさらにPEG残基とリン脂質の残基との間にマトリックスメタロプロテアーゼの基質となりうる基質ペプチドを含むペプチドを配置したリン脂質誘導体を作成し、この脂質誘導体を含む脂質膜構造体を提案している(特開2007-099750号公報)。この脂質膜構造体はマトリックスメタロプロテアーゼによりペプチド部分が切断されてPEGが脱離される特性を有しているため、血中においては該修飾部位の存在により安定である一方、マトリックスメタロプロテアーゼを分泌する悪性腫瘍細胞の近傍では該修飾部位が脱離することにより脂質膜構造体の安定性が低下する特性を有している。この特性により、脂質膜構造体に保持された抗腫瘍剤や核酸が悪性腫瘍細胞の外部で放出され、あるいは該修飾部位が脱離した状態の脂質膜構造体が悪性腫瘍細胞中に効率的に取り込まれることによって、悪性腫瘍細胞中に薬剤や核酸を効率的に導入することができる。

[0007] もっとも、上記特開2007-099750号公報に記載された手法は、マトリックスメタロプロテアーゼを分泌する悪性腫瘍細胞に対するDDSとしては有効であるものの、その他の標的細胞、特にマトリックスメタロプロテアーゼを分泌しないか、あるいはその分泌量が少ない標的細胞に対するDDSとしての有効性はほとんど期待することができず、悪性腫瘍細胞以外の細胞における選択性を

向上させるものでもない。

[0008] また、脂質膜構造体の標的細胞に対する選択性を高める方法として、細胞膜表面に存在するレセプターなど特定の細胞に特異的に発現している生体物質に対して選択的に結合可能なリガンドにより脂質膜構造体の表面を修飾する方法が知られている。この方法では、脂質膜構造体の生体内安定性向上と標的細胞に対する選択性とを同時に満足させるために、一般的にはリガンドはPEGを介して脂質膜構造体表面に配置されることが多い。しかしながら、上記の脂質膜構造体は特異的リガンド修飾により標的細胞に対する選択性は向上するものの、飽和性のレセプター介在エンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれるため、脂質膜構造体の細胞内移行性に上限が生じ、期待されたほどの薬物等の取り込みと薬効の向上が得られないという問題を有している。このように、従来、細胞内移行性、標的細胞に対する選択性、及び生体内安定性を同時に満足する脂質膜構造体は提供されていないのが現状である。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0009] 特許文献1：国際公開W02005/032593  
特許文献2：特開平1-249717号公報  
特許文献3：特開平2-149512号公報  
特許文献4：特開平4-346918号公報  
特許文献5：特開2004-10481号公報  
特許文献6：特開2007-099750号公報

#### 非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Journal of Controlled Release, 98, pp.317-323, 2004

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明の課題は、細胞内移行性、標的細胞に対する選択性、及び生体内安定性を満足する脂質膜構造体を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行い、(a) R8など連続した数個のアルギニン残基を有する細胞内取り込み促進ペプチド((以下、このペプチドを「ポリアルギニン」又はRXと表示する場合がある。))、及び(b) 標的細胞選択性リガンドを結合したポリアルキレングリコール(Ligand-PAG)による脂質膜構造体の表面修飾の影響を詳細に調べたところ、RX+PAG修飾脂質膜構造体ではPAGによりポリアルギニンの細胞内取り込み機能が阻害されてしまい、PAG非修飾脂質膜構造体と比べて細胞内への脂質膜構造体の取り込み量や脂質膜構造体に内封された遺伝子からの遺伝子発現量が減少すること、及びLigand-PAGのみで修飾したRX非修飾脂質膜構造体ではリガンドの標的生体物質が発現している細胞内への脂質膜構造体の取り込み量の上昇が認められないことを確認した。一方、RX及びLigand-PAGで同時に修飾した脂質膜構造体について、驚くべきことに、細胞内への取り込み量が上昇するとともに、内封された核酸からの遺伝子発現活性が顕著に高まることを見出した。
- [0013] 先に説明したように、従来、ポリアルギニンにより修飾された細胞内取り込み機能を有する脂質膜構造体に対してポリアルキレングリコールによる修飾を施すとポリアルギニンの機能が阻害されてしまうが、標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール及びポリアルギニンで脂質膜構造体を表面修飾することにより、ポリアルキレングリコールによるポリアルギニンの機能阻害を効果的に排除することができ、脂質膜構造体の生体内安定性、リガンドによる標的細胞に対する選択性、及び細胞内移行性を満足する脂質膜構造体を提供できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。
- [0014] すなわち、本発明により、標的細胞に物質を送達するための脂質膜構造体であって、脂質膜が下記の(a)及び(b)：
- (a) 標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール；及び
  - (b) 複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド
- で修飾された脂質膜構造体が提供される。

- [0015] 上記脂質膜構造体の好ましい態様によれば、脂質膜構造体がりポソームである上記の脂質膜構造体；標的細胞選択性リガンドが標的細胞の細胞膜外側に発現しているレセプターに特異的に結合可能なリガンドである上記の脂質膜構造体；上記ポリアルキレングリコールの先端部に標的細胞選択性リガンドが結合した上記の脂質膜構造体；上記(a)ポリアルキレングリコール及び(b)ポリペプチドが疎水性基、好ましくはステアシル基若しくはコレステリル基などで修飾されており、前記疎水性基が脂質膜に挿入された上記の脂質膜構造体；上記(b)ポリペプチドが、4ないし20個の連続したアルギニン残基を含むポリペプチド、好ましくは4ないし20個の連続したアルギニン残基のみからなるポリペプチド、より好ましくはオクタアルギニンである上記の脂質膜構造体；上記(a)ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール(PEG)である上記の脂質膜構造体；脂質二重層を構成する総脂質に対するカチオン性脂質の割合が0~40%(モル比)である上記の脂質膜構造体が提供される。
- [0016] また、別の観点からは、送達すべき物質が内部に封入された上記のいずれかの脂質膜構造体が提供される。この発明の好ましい態様によれば、送達すべき物質が核酸、例えば遺伝子を含む核酸やsiRNAなどの機能性核酸である上記のいずれかの脂質膜構造体；脂質膜構造体が多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)である上記のいずれかの脂質膜構造体；内部に核酸及びカチオン性ポリマー、好ましくはプロタミンが封入された上記のいずれかの脂質膜構造体が提供される。
- [0017] さらに、内部に抗腫瘍剤が封入された上記のいずれかの脂質膜構造体も提供される。この発明の好ましい態様によれば、抗腫瘍剤がドキソルビシンである上記の脂質膜構造体；標的細胞選択性リガンドがリガンドペプチドである上記の脂質膜構造体；リポソーム形態である上記の脂質膜構造体；粒子径が約200 nm~400 nmの範囲、好ましくは約300 nmである上記の脂質膜構造体が提供される。
- [0018] また、ヒトを含む哺乳類動物の生体内の細胞における遺伝子発現に用いる上記の脂質膜構造体；ヒトを含む哺乳類動物の遺伝子治療に用いる上記の脂

質膜構造体；ヒトを含む哺乳類動物における悪性腫瘍の治療に用いる上記の脂質膜構造体；及び、上記の脂質膜構造体を有効成分として含む医薬組成物、好ましくは送達すべき物質として核酸又は抗腫瘍剤を含む医薬組成物も本発明により提供される。

[0019] さらに別の観点からは、ヒトを含む哺乳類動物の生体内の細胞に物質を送達する方法であって、脂質膜が(a) 標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール；及び(b) 複数個のアルギニン残基を含むポリペプチドで修飾されており、かつ送達すべき物質を内包した脂質膜構造体を該動物に投与する工程を含む方法が提供される。送達すべき物質として、疾患の予防及び／又は治療のための医薬、好ましくは遺伝子治療のための遺伝子を含む核酸又は抗腫瘍剤などが挙げられる。

[0020] この発明の好ましい態様として、ヒトを含む哺乳類動物の生体内の細胞において遺伝子を発現させる方法であって、脂質膜が(a) 標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール；及び(b) 複数個のアルギニン残基を含むポリペプチドで修飾されており、かつ送達すべき物質として遺伝子を含む核酸を内包した脂質膜構造体を該動物に投与する工程を含む方法が提供される。好ましくは、該核酸とともにカチオン性ポリマー、例えばプロタミンを内包した上記脂質膜構造体を用いることができる。さらに、遺伝子治療のために用いる上記の方法が提供される。

[0021] また、本発明により、ヒトを含む哺乳類動物の疾患の予防及び／又は治療方法であって、脂質膜が(a) 標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール；及び(b) 複数個のアルギニン残基を含むポリペプチドで修飾されており、かつ送達すべき物質を内包した脂質膜構造体の予防及び／又は治療有効量を該動物に投与する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様として、送達すべき物質が該疾患の予防及び／又は治療のための医薬である上記の方法；送達すべき物質が遺伝子を含む核酸又は抗腫瘍剤である上記の方法が提供される。

## 発明の効果

[0022] ポリアルギニン及びPEGによる脂質膜構造体の同時修飾は、PEG修飾により脂質膜構造体の生体内安定性を向上させる一方で、細胞内の移行性を低下させてしまうという相反する問題(PEGジレンマ)を生じさせるが、本発明の脂質膜構造体は、優れた生体内安定性、リガンドによる標的細胞に対する選択性、及び細胞内移行性の全てを同時に満足する脂質膜構造体であり、例えば遺伝子を含む核酸を細胞内に送達して発現させるための脂質膜構造体や悪性腫瘍に対して選択的に抗腫瘍剤を送達するための脂質膜構造体などの用途に極めて有用である。

### 図面の簡単な説明

- [0023] [図1] ペプチドリガンドを結合したPEG及びR4で表面修飾したリポソームの細胞内取り込み促進効果を示した図である。
- [図2] ペプチドリガンドを結合したPEG及びR4で表面修飾したリポソームの細胞内取り込み促進効果を他のリポソームとの比較により示した図である。
- [図3] pDNAコア封入オクタアルギニン(R8)修飾リポソームの遺伝子発現活性がPEG修飾量に依存して減少する結果を示した図である(比較例)。
- [図4] PEGに結合したTf及びオクタアルギニンによる修飾を施したリポソームの遺伝子発現活性を示した図である。
- [図5] ペプチドリガンドを結合したPEG及びR4で表面修飾したリポソームにドキソルビシンを封入して抗腫瘍効果を調べた結果を示した図である。図中、Smallは粒子径100 nm(投与量1.5 mg/kg)、Largeは粒子径300 nm(投与量1.0 mg/kg又は6.0 mg/kg)のリポソームの結果を示す。
- [図6] ペプチドリガンドを結合したPEG及びR4で表面修飾したリポソームにドキソルビシンを封入し、投与量を6.0 mg/kgとして抗腫瘍効果を調べた結果を示した図である。図中、Largeは粒子径300 nmのリポソームであることを示し、Large PEGはPEGのみの修飾、Large NGR-PEGはペプチドリガンド(NGR)結合PEGのみによる修飾、Large R4/PEGはR4及びPEGによる修飾、Large Dualはペプチドリガンド結合PEG及びR4による修飾を施したリポソームの結果を示し、Doxilは粒子径100 nmの市販のドキソルビシン内包リポソームの結果を示す。



[図7] 粒子径300 nmのPEG修飾リポソーム(PEG濃度: 10 mol%、EPC/Chol=7:3、脂質をローダミン1 mol%で標識)を用いて0.5  $\mu$ mol脂質/250  $\mu$ lの投与量で血管内皮細胞への移行をイン・ビボで調べた結果を示した写真である。赤はリポソーム、緑は血管内皮細胞、青は核を示す。

[図8] 粒子径300 nmのリガンドペプチド(NGR)結合PEG修飾リポソーム(PEG濃度: 10 mol%、EPC/Chol=7:3、脂質をローダミン1 mol%で標識)を用いて0.5  $\mu$ mol脂質/250  $\mu$ lの投与量で血管内皮細胞への移行をイン・ビボで調べた結果を示した写真である。赤はリポソーム、緑は血管内皮細胞、青は核を示す。

[図9] 粒子径300 nmのPEG及びR4修飾リポソーム(PEG濃度: 10 mol%、STR-R4濃度: 2.5 mol%、EPC/Chol=7:3、脂質をローダミン1 mol%で標識)を用いて0.5  $\mu$ mol脂質/250  $\mu$ lの投与量で血管内皮細胞への移行をイン・ビボで調べた結果を示した写真である。赤はリポソーム、緑は血管内皮細胞、青は核を示す。

[図10] 粒子径300 nmのリガンドペプチド(NGR)結合PEG及びR4修飾リポソーム(PEG濃度: 10 mol%、STR-R4濃度: 2.5 mol%、EPC/Chol=7:3、脂質をローダミン1 mol%で標識)を用いて0.5  $\mu$ mol脂質/250  $\mu$ lの投与量で血管内皮細胞への移行をイン・ビボで調べた結果を示した写真である。赤はリポソーム、緑は血管内皮細胞、青は核を示す。

### 発明を実施するための形態

[0024] 本発明の脂質膜構造体を構成する脂質としては、例えば、リン脂質、糖脂質、ステロール、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸などが挙げられる。

リン脂質及びリン脂質誘導体としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン、プラスマロゲン、ホスファチジン酸などを挙げることができ、これらは1種又は2種以上を組み合わせる

ことができる。これらリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されないが、例えば、炭素数12~20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸などの脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチンなどの天然物由来のリン脂質を用いることもできる。

[0025] 糖脂質としては、例えば、グリセロ糖脂質（例えば、スルホキシリポシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、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、グリコシルジグリセリド）、スフィンゴ糖脂質（例えば、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド）などが挙げられる。

[0026] ステロールとしては、例えば、動物由来のステロール（例えば、コレステロール、コレステロールコハク酸、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール）、植物由来のステロール（フィトステロール）（例えば、ステグマステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール）、微生物由来のステロール（例えば、チモステロール、エルゴステロール）などが挙げられる。

飽和又は不飽和の脂肪酸としては、例えば、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸などの炭素数12~20の飽和又は不飽和の脂肪酸が挙げられる。

[0027] 脂質膜構造体の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に分散した形態として一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、O/W型エマルジョン、W/O/W型エマルジョン、球状ミセル、ひも状ミセル、又は不定型の層状構造物などを挙げることができる。本発明の脂質膜構造体の好ましい形態としてリポソームを挙げることができる。以下、本発明の脂質膜構造体の好ましい態様としてリポソームについて説明する場合があるが、本発明の脂質膜構造体はリポソームに限定されることはない。

[0028] 本発明の脂質膜構造体は、脂質膜が(a)先端部に標的細胞選択性リガンドが

結合したポリアルキレングリコール；及び(b)複数個のアルギニン残基を含むポリペプチドで修飾されていることを特徴としており、標的細胞に物質を送達するために用いられる脂質膜構造体である。

[0029] 脂質膜構造体の表面をポリアルキレングリコールで修飾することによりリポソームの血中滞留性を高める手段については、例えば、特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、特開平4-346918号公報、特開2004-10481号公報などに記載されている。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコールなどを用いることができる。ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば300~10,000程度、好ましくは500~10,000、さらに好ましくは1,000~5,000程度である。

[0030] 本発明の脂質膜構造体においては、標的細胞選択性リガンドを結合させた上記ポリアルキレングリコールを用いることができる。ポリアルキレングリコールによる表面修飾を行うにあたり、使用するポリアルキレングリコールの全部又はその一部のポリアルキレングリコールに標的細胞選択性リガンドを結合させることができる。ポリアルキレングリコールに標的細胞選択性リガンドを結合させる位置は特に限定されないが、好ましくはポリアルキレングリコールの先端部分である。本明細書においてポリアルキレングリコールの「先端部」とは、ポリアルキレングリコールの両末端のうち、脂質膜構造体に結合していない側の末端付近を意味している。一般的には直鎖状のポリアルキレングリコールの末端部分、あるいは分枝鎖状のポリアルキレングリコールについては主鎖又は側鎖の末端部分に標的細胞選択性リガンドを結合することができる。標的細胞選択性リガンドは1個のポリアルキレングリコールに複数個結合していてもよい。

[0031] 本明細書において、「標的細胞」とは本発明の脂質膜構造体を用いて核酸や医薬などの物質を送達すべき標的となる細胞を意味しているが、標的細胞選択性リガンドが特異的に結合可能なレセプターを有する細胞を標的細胞とすることができる。標的細胞の種類は特に限定されず、送達すべき物質の種

類や物質送達の目的などに応じて、適宜の細胞を標的とすることができる。例えば、標的細胞は組織や臓器を形成する細胞であってもよく、あるいは白血球細胞のように単独で存在する細胞であってもよい。固形がん細胞のように正常組織に腫瘍を形成している細胞やリンパ組織や他の組織に浸潤している細胞などであってもよい。

[0032] 本明細書において「リガンド」とはレセプターと結合する能力を有する物質を意味しており、典型的にはレセプターに特異的に結合可能な物質を利用することができる。レセプターはリガンドを結合可能な物質であり、一般的にはリガンドとの結合により何らかの反応を開始させる作用を有する物質を意味するが、本明細書において「リガンド」と「レセプター」の用語は、互いに結合可能な相手、好ましくは互いに特異的に結合可能な相手の意味で用いており、それらの結合により何らかの生体反応が惹起されるものに限定して解釈すべきではない。例えば、リガンドとして抗体を用い、レセプターとして抗原を用いる場合にはそれらの結合により生体反応が惹起されない場合もあるが、この場合も上記用語に包含される。従って、本明細書においては、リガンドとしては、神経伝達物質、ホルモン、細胞増殖因子、酵素基質のほか、抗体やそのフラグメント、タンパク質などが包含され、レセプターとしては、一般的にはタンパク質からなるレセプターのほか、酵素や抗原となる低分子物質(脂質化合物、糖化合物、ポリペプチド、オリゴペプチドなど)が包含される。

[0033] より具体的には、リガンドとしては、低分子有機化合物のほか、例えば、ジペプチド、トリペプチド、又はオリゴペプチド、あるいはポリペプチド又はタンパク質などを用いてもよい。オリゴペプチドとしては、例えば、アミノ酸残基が4~20個程度のオリゴペプチドを利用することができ、ポリペプチドとしてはアミノ酸残基が20個を超えるポリペプチドを用いることができる。例えば、リガンドとして細胞表面の抗原に対して特異的に結合可能な抗体、好ましくはモノクローナル抗体やそのフラグメント(例えば、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、又はFab' フラグメントなど)を用いてもよい。

この場合には細胞表面に存在する低分子化合物(例えば糖化合物や脂質化合物)のほか、オリゴペプチドやタンパク質などの種々の抗原がレセプターとなるが、本明細書においてレセプターの用語は上記の抗原などを含めて最も広義に解釈しなければならない。好ましくはレセプターとして標的細胞の細胞膜表面に存在するレセプターを利用することができ、標的細胞選択性リガンドとしては標的細胞の細胞膜表面に存在するレセプターに特異的に結合可能な低分子物質、例えば標的細胞の細胞膜表面に存在するレセプターに特異的に結合可能なペプチド化合物(リガンドペプチド)などを利用することができる。

[0034] ポリアルキレングリコールによる脂質膜構造体の表面修飾は、例えばポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜構成脂質として用いて脂質膜構造体を構築することにより容易に行なうことができる。例えば、ポリエチレングリコールによる修飾を行う場合にはステアリル化ポリエチレングリコール(例えばステアリン酸PEG45(STR-PEG45)など)を用いることができる。その他、N-{カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000}-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、n-{カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000}-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-{カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-750}-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-{カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000}-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-{カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000}-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミンなどのポリエチレングリコール誘導体などを用いることもできるが、ポリアルキレングリコール化脂質はこれらに限定されることはない。

[0035] 標的細胞選択性リガンドをポリアルキレングリコールに結合する手段は特に限定されないが、例えばステアリル化ポリエチレングリコールなど適当なリン脂質が縮合したポリアルキレングリコールの末端にマレイミド基を導入しておき、そのマレイミド基に対して標的細胞選択性リガンドのチオール基

、アミノ基、又は水酸基などの反応性官能基を反応させることができる。標的細胞選択性リガンドとしてオリゴペプチドを用いる場合には、例えば、オリゴペプチドのN末端又はC末端のシステイン(Cys)残基のチオール基を反応させることが好ましい。その典型的な反応例を本明細書の実施例に示した。例えば、J. Pharm., 281, pp. 25-33, 2004にはトランスフェリンを結合したPEGで修飾したリポソームが開示されており、J. Pharm., 342, 194-200, 2007にはFab化抗体を結合したPEGで修飾したリポソームが開示されているので、これらの刊行物を参照することにより、当業者は容易にPEGにリガンドを結合して脂質膜構造体を修飾することができる。標的細胞選択性リガンドの結合量は特に限定されず、リガンド及びレセプターの種類、リガンドとレセプターとの結合力、結合特異性、標的細胞の種類、送達すべき物質の種類などに応じて適宜選択することが可能であり、例えば本明細書の実施例に記載された具体的な手法により任意のリガンドについて適宜の修飾量を決定することができる。例えば標的細胞選択性リガンドを結合したポリアルキレングリコールの修飾量を10~15 mol%程度とすることにより好ましい結果が得られる場合がある。

[0036] 本発明の脂質膜構造体の表面は連続した複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド(ポリアルギニン)で修飾されている。ポリアルギニンとしては、好ましくは4ないし20個の連続したアルギニン残基を含むポリペプチド、さらに好ましくは4ないし20個の連続したアルギニン残基のみからなるポリペプチド、特に好ましくはオクタアルギニンなどを用いることができる。リポソームなどの脂質膜構造体の表面をオクタアルギニンなどのポリアルギニンで修飾することにより、リポソームに封入された目的物質の細胞内送達効率を向上させることができることが知られている(Journal of Controlled Release, 98, pp. 317-323, 2004; 国際公開W02005/32593)。ポリアルギニンによる脂質膜構造体表面の修飾は、上記の刊行物に記載された方法に従って、例えば脂質修飾ポリアルギニン、例えばステアシル化オクタアルギニンなどを脂質膜構造体の構成脂質として使用することにより容易に行なうことができる。

上記刊行物の開示及びこの刊行物において引用された全ての文献の開示を参照により本明細書の開示として含める。ポリアルギニンによる表面修飾量は上記刊行物を参照することにより適宜決定することができるが、血中滞留性に実質的に影響を与えない範囲で適宜選択することが好ましく、合わせて細胞への取り込み量が最大になるように選択することが好ましい。例えば、15 mol%以下で選択することができ、5 mol%程度がより好ましい場合がある。また、ポリアルギニンをポリエチレングリコールに結合させることにより、ポリアルギニンによる表面修飾とポリエチレングリコールによる表面修飾を同時に行うこともできる。

[0037] 本発明の脂質膜構造体の核内移行を促進するために、例えば、脂質膜構造体を3糖以上のオリゴ糖化合物で表面修飾することもできる。3糖以上のオリゴ糖化合物の種類は特に限定されないが、例えば、3個ないし10個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができ、好ましくは3個ないし6個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができる。

[0038] オリゴ糖化合物としてより具体的には、例えば、セロトリオース (Cellotriose:  $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-D-グルコース)、カコトリオース (Chacotriose:  $\alpha$ -L-ラムノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-ラムノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)]-D-グルコース)、ゲンチアノース (Genti-anose:  $\beta$ -D-フルクトフラノシル  $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシド)、イソマルトトリオース (Isomaltotriose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコース)、イソパノース (Isopanose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-グルコース)、マルトトリオース (Maltotriose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-D-グルコース)、マンニトリオース (Manninotriose:  $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコース)、メレジトース (Melezitose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-グルコピラノシド)、パノース (Panose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル

-(1→4)-D-グルコース)、プランテオース (Planteose:  $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-グルコピラノシド)、ラフィノース (Raffinose:  $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシド)、ソラトリオース (Solatriose:  $\alpha$ -L-ラムノピラノシル-(1→2)-[ $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1→3)]-D-ガラクトース)、ウンベリフェロース (Umbelliferose:  $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→2)- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド) などの3糖化合物；リコテトラオース (Lycotetraose:  $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1→2)-[ $\beta$ -D-キシロピラノシル-(1→3)]- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\beta$ -D-ガラクトース)、マルトテトラオース (Maltotetraose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコース)、スタキオース (Stachyose:  $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシド) などの4糖化合物；マルトペンタオース (Maltopentaose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコース)、ベルバスコース (Verbascose:  $\beta$ -D-フルクトフラノシル= $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシド) などの5糖化合物；マルトヘキサオース (Maltohexaose:  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコース) などの6糖化合物を挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0039] 好ましくはグルコースの3量体ないし6量体であるオリゴ糖化合物を用いることができ、さらに好ましくはグルコースの3量体又は4量体であるオリゴ糖化合物を用いることができる。より具体的には、イソマルトトリオース、イソパノース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースなどを好適に用いることができ、これらのうち、



グルコースが $\alpha$ 1-4結合したマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースがさらに好ましい。特に好ましいのはマルトトリオース又はマルトテトラオースであり、最も好ましいのはマルトトリオースである。オリゴ糖化合物による脂質膜構造体の表面修飾量は特に限定されないが、例えば、総脂質量に対して1~30モル%程度、好ましくは2~20モル%程度、より好ましくは5~10モル%程度である。

[0040] オリゴ糖化合物で脂質膜構造体を表面修飾する方法は特に限定されないが、例えば、脂質膜構造体をガラクトースやマンノースなどの単糖で表面を修飾したリポソーム(国際公開W02007/102481)が知られているので、この刊行物に記載された表面修飾方法を採用することができる。上記刊行物の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。この手段はポリアルキレングリコール化脂質に単糖化合物を結合して脂質膜構造体の表面修飾を行なう方法であり、この手段により脂質膜構造体の表面をポリアルキレングリコールにより同時に修飾することができるので好ましい。

[0041] 本発明の脂質膜構造体の製造にあたり、血中滞留性を高めるための脂質誘導体として、例えば、グリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトール、ガングリオシドGM3、グルクロン酸誘導体、グルタミン酸誘導体、ポリグリセリンリン脂質誘導体などを利用することもできる。また、血中滞留性を高めるための親水性ポリマーとして、ポリアルキレングリコールのほかにデキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、ステレンー無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテルー無水マレイン酸交互共重合体、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどを表面修飾に用いることもできる。

[0042] エンドソーム内から脂質膜構造体を細胞質中に効率的に脱出させるために本発明の脂質膜構造体の脂質膜をGALAで修飾してもよい。例えば、特開2006-28030号公報にはGALAで表面修飾を施したリポソームが開示されているので、上記公報に記載された方法に従って、GALAで表面修飾した脂質膜構造体を容

易に製造することができる。一般的にはGALAのコレステロール誘導体（Chol-GALA）を脂質成分として用いて脂質膜構造体を調製することにより、GALAで表面修飾した脂質膜構造体を製造することができる。GALAによる表面修飾量は特に限定されないが、例えば、総脂質量に対して0.01～10モル%程度、好ましくは0.1～4モル%程度、より好ましくは1～3モル%程度である。

[0043] 本明細書において「GALA」の用語には特開2006-28030号公報の配列表の配列番号1により特定されるペプチドのほか、上記ペプチドのアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、実質的にGALAと同様の性質（例えば酸性条件下において脂質膜同士を融合できる性質）を有する修飾ペプチドも包含される。本明細書における「GALA」の用語をいかなる意味においても限定して解釈してはならない。GALA及びGALAによる脂質膜構造体の表面修飾方法に関して、特開2006-28030号公報の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

[0044] 本発明の脂質膜構造体の表面をMPCポリマーで修飾することもできる。MPCポリマーは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）を重合して得られるMPCポリマーである。このポリマーは生体膜と類似の分子構造を有していることからポリペプチドや血球などの生体成分との相互作用が極めて小さく、優れた生体適合性を有することが示されている。本明細書において、「MPCポリマー」の用語にはMPCのホモポリマー、及びMPCと他の重合成成分とのコポリマーのいずれも包含される。

[0045] MPCポリマーは市販のポリマーを容易に入手することができる。例えば、日油株式会社から登録商標「リピジュア（LIPIDURE）」としてMPCのホモポリマー（CAS：67881-99-6）；MPCとブチルメタクリレートとのコポリマー（CAS：125275-25-4）；MPC、メタクリル酸ナトリウム、メタクリル酸ブチルの3元コポリマー；MPCと2-ヒドロキシ-3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリドとの2元コポリマー；リン脂質ポリマー（LIPIDURE-S）などが提供されており、いずれも本発明に用いることができる。

[0046] 本発明において用いられるMPCポリマーの種類は特に限定されないが、例え

ば、MPCとブチルメタクリレートなどのメタクリル酸エステルとのコポリマー、特にブロックコポリマーなどを好ましく用いることができる。このコポリマーについては特許第2890316号公報に製造方法が詳細に記載されており、当業者はこの特許公報を参照することにより所望のコポリマーを容易に製造することができる。この特許公報の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。本発明においては、水溶性を有し、かつ疎水性基を有するMPCポリマーを用いることが好ましいが、このような観点から炭素数4ないし18程度のアクリル酸エステル又はメタクリル酸エステルを用いて製造されたMPCコポリマーを好適に使用することができる。MPCとブチルメタクリレート(BMA)とのコポリマーとしては、例えば、MPCとBMAのモル比が5:5のコポリマー(PMB50)やMPCとBMAのモル比が3:7のコポリマー(PMB30)などが知られており、例えば、Polymer Journal, 22, pp. 355-360, 1990などに記載の方法に従って容易に調製することが可能である(例えば特開2007-314526号公報に具体的な製造方法の説明がある)。本発明にはPMB50を特に好ましく用いることができる。MPCポリマーの重合度や分子量は特に限定されないが、例えば、水溶性を維持する観点から平均分子量(重量平均分子量)が5,000~300,000程度、好ましくは10,000~100,000程度のポリマーを用いることができる。

[0047] MPCポリマーで脂質膜構造体を修飾する方法は特に限定されないが、例えば、リポソームなどの脂質膜構造体の水性分散物にMPCポリマーを添加し、室温で数分から数時間程度放置すればよい。上記水性分散物へのMPCポリマーの添加量は特に限定されないが、修飾すべきMPCポリマーの量に応じて、例えば、脂質膜構造体の総脂質量に対して0.01~1質量%の範囲、好ましくは0.1~10質量%、さらに好ましくは0.1~3質量%程度のMPCポリマーを添加すればよい。この操作によりMPCポリマーは速やかに脂質膜構造体の脂質成分に取り込まれ、表面がMPCポリマーで修飾された脂質膜構造体を調製することができる。MPCポリマーによる表面修飾量は特に限定されないが、例えば脂質膜構造体の総脂質量に対して0.1~5質量%程度の範囲である。

[0048] 本発明の脂質膜構造体は、ステロール、又はグリセリン若しくはその脂肪

酸エステルなどの膜安定化剤、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、又はブチル化ヒドロキシトルエンなどの抗酸化剤、荷電物質、及び膜ポリペプチドなどからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を含んでいてもよい。正荷電を付与する荷電物質としては、例えば、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの飽和又は不飽和脂肪族アミン；ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンなどの飽和又は不飽和カチオン性合成脂質；あるいはカチオン性ポリマーなどを挙げることができ、負電荷を付与する荷電物質としては、例えば、ジセチルホスフェート、コレステリルヘミスクシネート、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸などを挙げることができる。膜ポリペプチドとしては、例えば、膜表在性ポリペプチド、又は膜内在性ポリペプチドなどが挙げられる。これらの物質の配合量は特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。

[0049] また、本発明の脂質膜構造体には、例えば、温度変化感受性機能、膜透過機能、遺伝子発現機能、及びpH感受性機能などのいずれか1つ又は2つ以上の機能を付与することができる。これらの機能を適宜付加することにより、例えば遺伝子を含む核酸などを内包する脂質膜構造体の血液中での滞留性を向上させ、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織による捕捉率を低下させるとともに、標的細胞におけるエンドサイトーシスの後にエンドソームから効率的に脂質膜構造体を脱出させて細胞質内に移行させることができ、さらには核内において高い遺伝子発現活性を達成することも可能になる。

[0050] 温度変化感受性機能を付与することができる温度変化感受性脂質誘導体としては、例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリンなどを挙げることができる。また、pH感受性機能を付与することができるpH感受性脂質誘導体としては、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンなどを挙げることができる。

[0051] 本発明の脂質膜構造体の表面は、さらに必要に応じて、標的細胞表面のレセプターに対して特異的に結合可能なリガンドで修飾されていてもよい。例

例えば標的細胞、組織、又は臓器などに特異的に発現する生体成分に対するモノクローナル抗体などをリガンドとして脂質膜構造体の表面に配置することができる。この手法は、例えば、STEALTH LIPOSOME（第233-244頁、CRC Press, Inc. 発行、Danilo Lasic及びFrank Martin編）などに記載されている。脂質膜構造体の構成成分として、モノクローナル抗体やそのフラグメント（例えば、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、又はFab' フラグメントなど）中のメルカプト基と反応し得る脂質誘導体、例えばポリ（エチレングリコール）- $\alpha$ -ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン- $\omega$ -マレインイミド、 $\alpha$ -[N-(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォリル-エチル)カルバミル]- $\omega$ -[3-[2-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)エタンカルボキサミド]プロピル]-ポリ（オキシ-1,2-エタンジル）などのマレインイミド構造を有する脂質誘導体を含むことにより、モノクローナル抗体を脂質膜構造体の膜の表面に結合させることができる。

[0052] さらに、本発明の脂質膜構造体の表面はINF7で修飾されていてもよい。INF7はインフルエンザHAポリペプチド(HA2)由来のペプチド(1-23)を改変したグルタミン酸リッチペプチドであり、リポソームと混在させることにより脂質構造が崩壊して内包された物質が容易に放出されることが報告されており(Biochemistry, 46, pp. 13490-13504, 2007)、ポリエチレングリコールテトラアクリレート(PEG-TA)にINF7を結合させた送達システムも提案されている(The Journal of Gene Medicine, 10, pp. 1134-1149, 2008)。当業者はこれらの刊行物を参照することにより本発明においてINF7を容易に使用することが可能である。本明細書において「INF7」の用語にはBiochemistry, 46, pp. 13490-13504, 2007のTable 1に記載された配列により特定されるペプチドのほか、上記ペプチドのアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、実質的にINF7と同様の性質を有する修飾ペプチドも包含される。本明細書における「INF7」の用語をいかなる意味においても限定して解釈してはならない。上記刊行物の開示及びこの刊行物において引用された全ての文献の開示を参照により本明細書の開示と

して含める。

- [0053] INF7による脂質膜構造体の修飾方法は特に限定されないが、一般的には、脂質化合物とINF7とが共有結合した脂質修飾INF7を脂質膜構成脂質として用いて脂質膜構造体を構築することにより、INF7により表面修飾された脂質膜構造体を容易に製造することができる。脂質修飾INFとしては、例えばステアリル化INF7などを利用することができ、この化合物はFutaki, S. et al., *Bioconjug. Chem.*, 12(6), pp. 1005-1011, 2001に記載された方法に従って容易に製造することができる。INF7による表面修飾量は特に限定されないが、一般的には脂質膜構造体の総脂質量に対して1~5 モル%の範囲であり、好ましくは総脂質量に対して3 ~5 モル%程度である。
- [0054] 多機能性を付加したエンベロープ型ナノ構造体 (MEND) が知られており、本発明の脂質膜構造体として好適に使用することができる。MENDは、例えば、プラスミドDNAなどの核酸とプロタミンなどのカチオン性ポリマーとの複合体をコアとし、このコアがリポソーム形態の脂質エンベロープ膜の内部に封入された構造を有している。MENDの脂質エンベロープ膜には、必要に応じてpH応答性や膜透過性を調節するためのペプチドを配置することができ、脂質エンベロープ膜の外側表面はポリエチレングリコールなどのアルキレングリコールで修飾することができる。MENDの脂質エンベロープの内部には、凝縮化されたDNA及びカチオン性ポリマーが封入されており、効率的に遺伝子発現を達成できるように設計されている。本発明に好適に使用可能なMENDとしては、所望の遺伝子を組み込んだプラスミドDNAとプロタミンとの複合体が内部に封入され、脂質エンベロープの外側表面がオリゴ糖結合PEGで修飾されたMENDが好ましい。オリゴ糖結合PEGによる修飾は構成脂質成分として上記のポリペプチド(a)及び/又はポリペプチド(b)が結合したステアリル化ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。MENDについては、例えばDrug Delivery System, 22-2, pp. 115-122, 2007などの総説を参照することができる。上記刊行物の開示及びこの総説において引用された全ての文献の開示を参照により本明細書の開示として含める。

- [0055] 脂質膜構造体の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒（例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など）に分散された形態やこの水性分散物を凍結乾燥した形態などが挙げられる。
- [0056] 脂質膜構造体の製造方法も特に限定されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。一例を挙げれば、全ての脂質成分をクロロホルムなどの有機溶媒に溶解し、エバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことによって脂質膜を形成した後、水系溶媒を乾燥した上記の混合物に添加し、さらにホモジナイザーなどの乳化機、超音波乳化機、又は高圧噴射乳化機などにより乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することができる。脂質膜構造体の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルターなどを用いて、高圧下でイクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。分散した状態の脂質膜構造体の大きさは特に限定されないが、例えば、リポソームの場合には粒子径が50 nmから5  $\mu$ m程度であり、50 nmから400 nm程度が好ましく、50 nmから300 nm程度が好ましい。抗腫瘍剤などの医薬を内包したリポソームでは粒子径が200 nmから400 nm程度であることが好ましい場合があり、粒子径が300 nm程度であることが特に好ましい場合がある。また、粒子径として150 nmから250 nm程度がさらに好ましい場合もある。粒子径は、例えばDLS(dynamic light scattering)法により測定することができる。
- [0057] 水系溶媒（分散媒）の組成は特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。これら水系溶媒（分散媒）は脂質膜構造体を安定に分散させることができるが、さらに、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール

ル、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）や、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、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、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）などを加えてもよい。この水系溶媒に分散した脂質膜構造体を安定に長期間保存するには、凝集抑制などの物理的安定性の面から水系溶媒中の電解質を極力排除することが望ましい。また、脂質の化学的安定性の面からは水系溶媒のpHを弱酸性から中性付近（pH3.0から8.0程度）に設定し、及び／又は窒素バブリングなどにより溶存酸素を除去することが望ましい。

[0058] 得られた脂質膜構造体の水性分散物を凍結乾燥又は噴霧乾燥する場合には、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。また、上記水性分散物を凍結する場合には、例えば、前記の糖類やグリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、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、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。

[0059] 本発明の脂質膜構造体、例えばリポソームの内部には、標的細胞の細胞質内、好ましくは標的細胞の核内に送達すべき物質を封入することができる。封入すべき物質の種類は特に限定されないが、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤などの任意の医薬の有効成分のほか、糖類、ペプチド類、核



酸類、低分子化合物、金属化合物など任意の物質を封入することができる。抗腫瘍剤としては、例えばメソトレキサート、ドキソルビシン、シスプラチンなどすでに臨床で使用されている抗腫瘍剤を好ましく用いることができる。抗腫瘍剤としてドキソルビシンを内包したリポソーム製剤がすでに実用化され、注射剤として臨床で広く使用されているので(「ドキシル」(登録商標)、ヤンセンファーマ株式会社)、本発明の脂質膜構造体にドキソルビシンを内包させた医薬は注射剤として例えばドキシルと同様の投与方法及び投与量で使用することができる。核酸としては、例えば遺伝子を含む核酸を挙げることができ、より具体的には、例えば、プラスミドに組み込まれた遺伝子などを挙げることができるが、この特定の態様に限定されることはない。また、遺伝子としては任意の遺伝子を用いることができることは言うまでもない。本発明の一例として、以下、核酸を封入する場合について具体的に説明するが、本発明の範囲はこの特定の態様に限定されることはない。

[0060] 本発明の脂質膜構造体には、好ましくは核酸を封入することができる。核酸にはDNA又はRNAのほか、これらの類似体又は誘導體(例えば、ペプチド核酸(PNA)やホスホロチオエートDNAなど)が包含される。核酸は一本鎖又は二本鎖のいずれであってもよく、線状又は環状のいずれであってもよい。核酸には遺伝子が含まれていてもよい。遺伝子としては、オリゴヌクレオチド、DNA、又はRNAのいずれでもよく、特に形質転換などのイン・ビトロにおける導入用遺伝子や、イン・ビボで発現することにより作用する遺伝子、例えば、相同組換え用の正常遺伝子などの遺伝子治療用遺伝子などを挙げることができる。治療用の核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、酵素、サイトカインなどの生理活性物質をコードする遺伝子のほか、遺伝子の発現を調節する機能を有する核酸、例えばsiRNAなどのRNAなどを含む機能性核酸を用いることもでき、これらも本明細書における核酸の用語に含める。本明細書において「核酸」の用語は最も広義に解釈する必要があり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

[0061] また、本発明の脂質膜構造体に核酸を封入する場合には、核酸導入機能を有する化合物を加えることもできる。このような化合物としては、例えば、0,0'-N-ジドデカノイル-N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、0,0'-N-ジテトラデカノイル-N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、0,0'-N-ジヘキサデカノイル-N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、0,0'-N-ジオクタデセノイル-N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド、0,0',0''-トリデカノイル-N-( $\omega$ -トリメチルアンモニオデカノイル)アミノメタンブロミド及びN-[ $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル]-ジドデシル-D-グルタメート、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)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、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、3- $\beta$ -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロールなどを挙げることができる。これらの核酸導入機能を有する化合物は、脂質膜構造体の膜の任意の位置に配置されていてもよく、及び／又は脂質膜構造体の内部に充填されていてもよい。

[0062] 例えば、核酸を封入した脂質膜構造体は、標的細胞の核内に該核酸を送達するためのキャリアーとして用いることができる。遺伝子発現を目的とする場合には、核酸として所望の遺伝子を含む核酸を用い、上記のMENDを用いることが特に好ましい。例えば、遺伝子を含む核酸を封入した脂質膜構造体、好ましくはMENDをヒトを含む哺乳類動物に投与することにより、所望の標的細胞の核内に所望の遺伝子を送達して効率よく発現させることができる。投与方法は特に限定されないが、非経口投与が好ましく、静脈内投与がさらに好ましい。本発明の脂質膜構造体を医薬として使用する場合には、例えば、適宜の製剤用添加物とともに医薬組成物の形態の医薬を調製して投与することができる。

[0063] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は

下記の実施例に限定されることはない。

#### 例1

##### (1) 材料と方法

##### (a) ペプチドリガンドを用いたリポソームの調製

システイン残基を末端に有するリガンドペプチド(CYGGRGNG)のチオール基と、マレイミド基を末端に有するPEG脂質誘導体Mal-PEG-DSPEを1:1(モル比)で混合し、24時間振とうすることで、ペプチド結合PEG脂質誘導体Pep-PEG-DSPEを得た。卵黄ホスファチジルコリン(以下、「EPC」と略記する)とコレステロール(以下、「Chol」と略記する)、及びローダミン標識1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(以下、「Rho-DOPE」と略記する)の3種の脂質でリポソームを調製し、Pep-PEG-DSPE及びステアリル化テトラアルギニン(以下、「STR-R4」と略記する)を必要量、後修飾法で添加することでリポソームを調製した。

[0064] まず、ガラス試験管に脂質溶液((EPC、Cholのエタノール溶液及びRho-DOPEのクロロホルム溶液)を総量600 nmol/600  $\mu$ Lとなるように添加し、等量のクロロホルムを添加して攪拌した後、窒素ガス雰囲気下又は減圧下で溶媒を留去した。得られた脂質フィルムに対して脂質濃度0.4 mMとなるようにPBSを添加して、室温で10分間水和後、バス型ソニケーターで超音波処理し、さらにプローブ型ソニケーターにより超音波処理することでSUVリポソームを調製した。

[0065] リポソーム溶液に対してSTR-R4水溶液を必要量添加し、55°Cで30分間振とうさせてSTR-R4を修飾した後、PEG-DSPE又はPep-PEG-DSPEを必要量添加し、55°Cで30分間さらに振とうすることでPEG修飾を行った。粒子径およびゼータ電位はDLS法(dynamic light scattering)によって測定した。

##### [0066] (b) タンパク質リガンドを用いたリポソームの調製

1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(以下、「DOPE」と略記する)、Chol及びステアリル化オクタアルギニン(以下、「STR-R8」と略記する)の3種の脂質を含有した脂質エンベロープに、プラスミドDNA(pDNA

)をポリエチレンイミン(PEI)で凝縮化したコア粒子を封入してpDNA封入リポソーム調製した。ベースの脂質組成はDOPE、Chol、及びSTR-R8を70:20:10((モル比)の組成比となるように調整した。

[0067] pDNAコア粒子は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードしたpDNA(7,037 bp)とPEIを+/-比0.8で混合することで作製した。pDNA及びPEIを10 mM HEPES (pH7.4) 溶液とした後、ボルテックス中のプラスミドDNA溶液(0.075 mg/ml) 200  $\mu$ lに対してPEI溶液(2.4 mM) 100  $\mu$ lを徐々に滴下することで時間をかけて混合させた。さらに室温で15分間静置することでコア粒子を調製した。

[0068] ガラス試験管に90 nmolの脂質を含むクロロホルム/エタノール溶液3:1(v/v)を添加し、減圧下で溶媒を留去して脂質フィルムを得た。脂質フィルムにコア粒子溶液300  $\mu$ lを添加した後、室温で15分間静置することで水和させ、約1分間超音波処理を行うことでpDNAコア封入R8修飾リポソームを得た。また、PEG-DSPE又はMal-PEG-DSPEを必要量含む10 mM HEPES((pH7.4) 溶液をpDNAコア封入リポソーム溶液に添加した後、室温で30分静置することでPEG修飾を行った。

[0069] PBSにトランスフェリン(Tf)(125 mM)及びSPDP(132 mM)を溶解し、室温で30分間振とうした。その後、Sephadex G-25を用いたゲル濾過によりPDP化Tf画分を回収した。DTT(100 mM)をPDP化Tfに添加して室温で30分間振とうして還元反応を行った。Sephadex G-25を用いたゲル濾過により還元剤を除去し、還元型Tf(SH-Tf)画分を回収し、タンパク定量で回収量を測定した。Mal-PEG-DSPEを修飾したpDNAコア封入リポソームに対してSH-Tfを添加(pDNA 1  $\mu$ gに対してSH-Tf 16  $\mu$ g)し、4°Cで一晩振とうした。反応液を4°C、30000  $\times$  g、2時間の超遠心を行い、上清の未反応Tfを除き、沈殿したTf修飾pDNA封入リポソーム画分を回収した。10 mM HEPES (pH7.4) 溶液で懸濁後、核酸をSDOC(5 mM)及びPI(100  $\mu$ g/ml)で染色することで定量した。粒子径およびゼータ電位はDLSによって測定した。

[0070] (c)細胞内取り込み評価

MS-1細胞を24 well-plateに $4 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度となるように播種

し、24時間後にPBS(-)でwellを洗浄し、蛍光標識リポソームを含むkrebs buffer 500  $\mu$ l/well (脂質濃度0.12 mM) を添加した後、37°Cで3時間インキュベートした。リポソームを除去し、krebs bufferで洗浄後、Reporter Lysis Buffer (70  $\mu$ l/well) を添加して-80°Cで20分以上静置した。解凍後、セルスクレーパーで細胞を回収し、4°C、15000 rpm、5分間遠心した。上清50  $\mu$ lを純水で2倍希釈した後、蛍光強度を測定した (Ex./Em.=555/575 nm)。

[0071] (d) 遺伝子発現評価

HeLa細胞を24 well-plateに $4 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度となるように播種し、24時間後にPBS(-)でwellを洗浄し、pDNA封入リポソームを添加した10%血清含有DMEMを300  $\mu$ l/well (0.4  $\mu$ g pDNA/well) 添加した後、37°Cで3時間インキュベーションした。pDNA封入リポソームを含むDMEMを除去し、10%血清含有DMEMを1 ml/well添加し、37°Cで21時間インキュベーションした。PBSで洗浄後、Reporter Lysis Buffer (70  $\mu$ l/well) を添加して-80°Cで20分以上静置した。解凍後、セルスクレーパーで細胞を回収し、4°C、15000 rpm、5分間遠心した後、上清のルシフェラーゼ活性及びタンパク量を測定してルシフェラーゼ発現量を算出した。

[0072] (2) 結果

(a) ペプチドリガンドによるリポソームの細胞内取り込み

調製したリポソームは組成によらず100 nm前後の粒子径を示し、ゼータ電位はほぼ中性を示した(表1)。ペプチドリガンドとして用いたNGRモチーフを有するペプチドは腫瘍血管内皮マーカーであるCD13を特異的に認識することが知られている。リガンドであるNGRモチーフ-PEG脂質誘導体を修飾したリポソームの細胞内取り込み量は、リガンドなしのPEG脂質を修飾した場合と比較して大きく変化することはなかった(図1A, white bars vs. black bars)。また、PEG修飾量依存的にその取り込みは減少した(図1A)。また、リポソームにSTR-R4を0.25mol%修飾することにより取り込み量は上昇するが、PEGを修飾すると濃度依存的に取り込みは減少した(図1B, white bars)。一方、PEGにNGRリガンドを結合させ、STR-R4とともにリポソームを修飾をした場合には、10

mol%まで細胞内取り込み量は上昇した(図1B、black bars)。

[0073] [表1]

Conc. of PEG-lipid	PEG-LP		NGR-PEG-LP		PEG/R4-LP		NGR-PEG/R4-LP	
	Size (nm)	zeta-potential (mV)	Size (nm)	zeta-potential (mV)	Size (nm)	zeta-potential (mV)	Size (nm)	zeta-potential (mV)
0%	97±5	0.2±0.1	-	-	89±5	2.2±1	-	-
1%	101±2	0.2±0.2	103±1	-1.6±0.9	91±8	0.8±0.5	91±8	1.3±0.8
2%	100±6	-5.0±2.4	103±8	1.5±0.7	93±2	-0.1±0.1	99±3	0.8±0.6
5%	103±8	-0.8±0.1	102±2	-0.8±0.7	92±3	-0.2±0.1	91±2	-0.1±0.1
10%	100±5	-1.5±0.4	102±6	-2.5±0.8	90±4	-1.6±0.3	88±3	-0.9±0.1
15%	100±4	-2.1±0.5	99±2	-3.6±0.6	85±7	-3.2±0.6	93±6	-1.2±0.8

[0074] (b) CD13発現モデルMS-1細胞において最適な修飾条件であったPEG濃度10 mol%の各リポソームの細胞内取り込み量をPEG未修飾リポソームの相対値として図2に示した。PEG修飾によって減少した細胞内取り込み量は、NGR又はSTR-R4いずれか一方の修飾で若干上昇が認められるものの、その効果はわずかであり、PEG未修飾の場合を上回ることはなかった。一方、PEGにNGRリガンドを結合させ、STR-R4とともにリポソームを修飾をした場合には細胞内取り込み量が大きく上昇することが示された。これは、標的細胞選択性リガンドと細胞膜透過性ペプチド(GPP)であるテトラアルギニンがPEG修飾の影響を受けずに相乗的に機能していること示しており、本発明のリポソームがPEG修飾の影響を受けることなく、標的細胞に対する特異性及び細胞内への薬物送達特性を発揮できることが明らかである。

[0075] (c) タンパク質リガンドを用いたリポソームによる遺伝子発現活性

pDNAコアの平均粒子径は $88 \pm 6$  nm、ゼータ電位は $-25 \pm 8$  mVであった。pDNAコア封入R8リポソームは高いゼータ電位を示したが、PEG修飾依存的にゼータ電位は減少した(表2)。また、粒子径はPEG修飾により若干減少するものの、大きな変化は認められなかった。これらのpDNAコア封入R8リポソームをHeLa細胞にトランスフェクションして得られた遺伝子発現活性を図3に示す。PEGの修飾により、R8リポソームの遺伝子発現活性は大きく減少した。

[0076]

[表2]

	PEG濃度 (mol%)				
	0	5	10	15	20
粒子径 (nm)	261±21	208±21	216±41	218±16	224±29
ゼータ電位 (mV)	41±3	21±4	9±3	4±1	-3±5

[0077] がん細胞にはTfが過剰発現していることが知られている。Tfを標的細胞選択性リガンドとしてpDNA封入R8リポソームのPEG先端部に結合させたTf修飾R8リポソームを調製した。このリポソームの粒子径・ゼータ電位を表3に示す。Tf修飾により粒子径に変化はなかったが、ゼータ電位は中性から負に転じた。この結果はTfが負電荷を帯びているためであり、リポソームがPEGに結合したTfで修飾されていることを示している。

[0078] [表3]

PEG濃度 (mol%)	10		15		20	
	Tf修飾 -	Tf修飾 +	Tf修飾 -	Tf修飾 +	Tf修飾 -	Tf修飾 +
粒子径 (nm)	199±9	179±2	184±2	180±6	181±8	193±7
ゼータ電位 (mV)	7±4	-15±3	1±5	-17±1	-2±1	-18±6

[0079] これらのpDNAコア封入リポソームをHeLa細胞にトランスフェクション後の遺伝子発現活性について、Tf未修飾リポソームをコントロールとして図4に示した。PEG濃度10%及び15%では、Tfの修飾により遺伝子発現活性はそれぞれ6.8倍、3.3倍と大きく上昇し、20%ではPEGによる細胞内取り込み阻害効果が大きく、上昇はわずかであった。以上の結果から、細胞膜透過性ペプチドとしてオクタアルギニンを用い、標的細胞選択性リガンドとしてTfをPEGに結合してリポソーム修飾を行った場合には、PEG修飾による細胞内取り込み阻害の影響を受けることなく、相乗的に遺伝子発現活性を上昇させることができることが示された。

[0080] 例2

## (1) 材料と方法

## (a) ペプチドリガンドを用いたリポソームの調製

システイン残基を末端に有するリガンドペプチド (CYGGRGNG) のシステイン残基 (C) 中のチオール基と、マレイミド基を末端に有するPEG脂質誘導体Mal-PEG-DSPEをモル比1:1で混合し24時間室温で振とうし、ペプチド結合PEG脂質誘導体 (Pep-PEG-DSPE) を得た。EPC及びCholをモル比7:3で混合しRho-DOP Eを1mol%加えてリポソームを調製し、Pep-PEG-DSPE及びSTR-R4を必要量、後修飾法で添加することでペプチド結合PEG及びR4で修飾されたリポソーム (Dual-ligand型リポソーム) を調製した。

[0081] まず、ガラス試験管に脂質溶液 (EPC、Choのエタノール溶液およびRho-DOP Eのクロロホルム溶液) を総量600  $\mu\text{mol}$ /600  $\mu\text{L}$ となるように添加し、等量のクロロホルムを添加し攪拌後、窒素ガス雰囲気下又は減圧下で溶媒を留去した。得られた脂質フィルムに対して脂質濃度8.0 mMとなるようにPBSを添加して、室温で10分間水和後、ボルテックスにより約1分間攪拌した。得られたリポソーム溶液を、エクストルーダーを用いてポアサイズ 400 nmのメンブレンフィルターを7回通してリポソームを整粒してLarge sizeリポソームとした。Small sizeリポソームは、Large sizeリポソーム溶液を、さらにエクストルーダーを用いてpore size 50 nmのメンブレンフィルターを11回通しリポソームを整粒することで調製した。

[0082] 整粒後のLarge size およびsmall sizeリポソームについて脂質膜に含まれているcholの濃度をコレステロールE-テストワコーを用いて行い定量し、総脂質濃度を算出した。算出された総脂質量を基に、STR-R4及びPEG-DSPE若しくはPep-PEG-DSPEの添加量を計算し、リポソーム溶液に添加することで修飾を行った。リポソーム溶液に対して、STR-R4水溶液を必要量添加し55°Cで30分間振とうさせてSTR-R4を修飾した後、PEG-DSPE又はPep-PEG-DSPEを必要量添加し、55°Cで30分間さらに振とうすることでPEG修飾を行った。粒子径およびゼータ電位はdynamic light scattering (DLS) によって測定した。

[0083] 2) Dual-ligand型リポソームの腫瘍血管内皮細胞への標的性の評価



BALB/cAJcl (4週齢、雄性、日本クレア) の左背部皮下にOSRC-II (ヒト腎細胞癌由来細胞) を移植し、担癌モデルマウスを作成した。腫瘍体積が80~120 mm<sup>3</sup>に成長した担癌モデルマウスに対してジエチルエーテル麻醉下で蛍光標識リポソームを尾静脈より投与した(投与volume 200  $\mu$ L/mouse)。24時間後にジエチルエーテル麻醉下で癌組織を回収した。回収した癌組織をPBS(-)で洗浄し、予め染色液を加えたPBS(-)に添加し、一時間、遮光下及び室温で静置した。染色液はPBS(-)にHoechst 33342(終濃度40  $\mu$ M)及びIsolectin-Alexa647(終濃度20  $\mu$ g/mL)を加えて調製した。染色した癌組織をPBS(-)で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon A1)を用いて、投与した蛍光標識リポソームの癌組織における局在を観察した。

[0084] 3) ドキソルビシン封入Dual-ligand型リポソームの調製

Hydrogenated soy phosphatidylcholine (以下「HSPC」と略記する)とCholを7:3のモル比で混合しリポソームを調製し、pH勾配法でドキソルビシンをリポソーム内に封入した。その後、PEG-DSPEまたはPep-PEG-DSPEおよび下STR-R4を必要量、後修飾法で添加することでドキソルビシン(Dox)封入Dual-ligand型リポソームを調製した。

[0085] まず、ガラス試験管に脂質溶液(HSPC、Choのエタノール溶液を総量600  $\mu$ mol/600  $\mu$ Lとなるように添加し、等量のクロロホルムを添加し攪拌後、窒素ガス雰囲気下又は減圧下で溶媒を留去した。得られた脂質フィルムに対して、脂質濃度20.0 mMとなるように硫酸アンモニウム(155 mM、pH 5.5)を添加して、10分間、65°Cに加温して水和後、約1分間ボルテックスを行い、予め60°Cに加温しておいたExtruderを用いてリポソーム溶液をポアサイズ 400 nmのメンブレンフィルターを7回通し整粒することでLarge sizeリポソームを調製した。Sephadex(登録商標)G-25 Fineを用いて作成したゲル濾過カラム(溶媒:PBS(-))にリポソーム溶液を添加し、外水相を硫酸アンモニウムからPBS(-)へと置換した。コレステロール定量を行うことで、リポソーム溶液に含まれる総脂質濃度を計算し、適量のDox溶液(3 mg/mL in PBS(-))を添加し、60°Cで1時間攪拌振とうし、ドキソルビシンをリポソームの内水相に封入した。

[0086] リポソーム溶液に対して、STR-R4水溶液を必要量添加し55°Cで30分間振とうさせSTR-R4を修飾後、PEG-DSPE又はPep-PEG-DSPEを必要量添加し、55°Cで30分間さらに振とうすることでPEG修飾を行った。粒子径およびゼータ電位はdynamic light scattering (DLS) によって測定した。

[0087] リポソームに封入されていないFree ドキソルビシンを除去するために26°C、1時間、1000 Gで限外濾過(amicon centrifugal filter units)を行った。リポソームに封入されているドキソルビシン濃度の定量は蛍光強度を測定することにより行った。ドキソルビシン溶液(3 mg/mL in PBS(-))を0.0006、0.0015、0.006、0.015 mg/mLとなるようにメタノールで希釈系列を作成し検量線を作成した。ドキソルビシン封入リポソーム10  $\mu$ Lにメタノール990  $\mu$ L加え、リポソームを希釈した。各サンプルの蛍光強度を測定し(Ex./Em.=450/590 nm)、検量線より、リポソームに封入されているドキソルビシン濃度を測定した。

[0088] 4) ドキソルビシン封入PEGリポソーム(Doxil)の調製

DoxilはMol. Phram., 6, pp.246-254, 2009に報告されている方法に従って作成した。HSPCとChol、PEG-DSPEをモル比3:2:0.265で混合しリポソームを調製後、pH勾配法でドキソルビシンを封入した。まず、ガラス試験管に脂質溶液(HSPC、Chol、PEG-DSPEのエタノール溶液)を総量600  $\mu$ mol/600  $\mu$ Lとなるように添加し、等量のクロロホルムを添加し攪拌後、窒素ガス雰囲気下又は減圧下で溶媒を留去した。得られた脂質フィルムに対して、脂質濃度20.0 mMとなるように硫酸アンモニウム(155 mM、pH 5.5)を添加し、室温で10分間水和後、バス型ソニケーターで超音波処理し、さらにプローブ型ソニケーターにより超音波処理することでSUVリポソームを調製した。Sephadex(登録商標) G-25 Fineを用いてゲル濾過を行い、外水相を硫酸アンモニウムからPBS(-)へと置換した。コレステロール定量を行い、リポソーム溶液に含まれる総脂質濃度を計算し、適量のDox溶液(3 mg/mL in PBS(-))を添加し、60°Cで1時間攪拌振とうし、ドキソルビシンをリポソームの内水相に封入した。ドキソルビシン封入後、リポソームに封入されていないFree ドキソルビシンを除去す

るために26°C、1時間、1000 Gで限外濾過 (amicon centrifugal filter units) を行った。ドキソルビシン溶液 (3 mg/mL in PBS(-)) を0.0006、0.0015、0.006、0.015 mg/mLとなるようにメタノールで希釈系列を作成し検量線を作成した。ドキソルビシン封入リポソーム10  $\mu$ Lにメタノール990  $\mu$ L加え、リポソームを希釈した。各サンプルの蛍光強度を測定し (Ex./Em. =450/590 nm)、検量線より、リポソームに封入されているドキソルビシン濃度を測定した。

[0089] 5) Dual-ligand型リポソームを用いた抗腫瘍効果の検討

BALB/cAJcl (4週齢、雄性、日本クレア) の左背部皮下にOSRC-II (ヒト腎細胞癌由来細胞) を移植し、担癌モデルマウスを作成した。腫瘍体積が80~120 mm<sup>3</sup>に成長した担癌モデルマウスをジエチルエーテル麻酔下で、調製したドキソルビシン封入リポソームを尾静脈より投与 (投与volume 200  $\mu$ L/mouse) を2回行った (Day0およびDay3)。投与後、経時的に腫瘍体積を測定した。

腫瘍体積の算出法 : volume=長径  $\times$  短径<sup>2</sup>  $\times$  0.5

[0090] [表4]

**Large size**

Formulation	PEG-LP	NGR-PEG-LP	R4/PEG-LP	Dual-LP
Diameter (nm)	286 $\pm$ 30	287. $\pm$ 14	279 $\pm$ 14	305 $\pm$ 23
zeta-potential (mV)	-9.2 $\pm$ 1.9	-13.4 $\pm$ 2.5	-7.0 $\pm$ 1.3	-9.2 $\pm$ 2.8

※蛍光標識・ドキソルビシン封入どちらも同じ組成。物性は同等。

**Amount of PEG-lipid and R4**

Formulation	PEG-LP	NGR-PEG-LP	R4/PEG-LP	Dual-LP
PEG-DSPE	10 mol%	-	10 mol%	-
NGR-PEG-DSPE	-	10 mol%	-	10 mol%
STR-R4	-	-	2.5 mol%	2.5 mol%

[0091]

[表5]

Small size		
Formulation	PEG-LP	Doxil
Diameter (nm)	91±3	88±6
zeta-potential (mV)	-9.1±4.4	-10.3±0.2
	※蛍光標識	※ドキソルビシン封入

Amount of PEG-lipid and R4		
Formulation	PEG-LP	Doxil
PEG-DSPE	10 mol%	5.3 mol%
NGR-PEG-DSPE	-	-
STR-R4	-	-

## [0092] (2) 結果

## 1) Dual-ligand型リポソームを用いた抗腫瘍効果

ドキソルビシンを封入した腫瘍血管内皮細胞指向性のDual-ligand型リポソームはLarge size (約300 nm)のほうがSmall size (100 nm)に比べて高い抗腫瘍性を示した。また、Large sizeリポソームの投与量を6.0 mg/kgとしたときには投与量1.0 mg/kgの場合に比べて高い抗腫瘍活性が認められた(図5)。Large sizeリポソーム(投与量6.0 mg/kg)は臨床応用されているドキシル(粒子径100 nm)よりも高い抗腫瘍作用を示した。また、リガンド結合PEG及びR4で修飾したDual-ligand型リポソームはPEGのみ又はリガンド結合PEGのみで修飾したリポソーム、又はPEG及びR4で修飾したリポソーム(いずれもLarge size)に比べて強い抗腫瘍活性を示した(図6)。

## [0093] 2) Dual-ligand型リポソームの腫瘍血管内皮細胞への標的性の評価

PEGのみで修飾したリポソーム及びPEG及びR4で修飾したリポソームではリポソームの存在を示す赤色のシグナルは腫瘍血管内皮細胞にはほとんど認められなかった(それぞれ図7及び9)。また、リガンドペプチド結合PEGで修飾したリポソームではシグナルのわずかな増加が認められるものの変化はほとんど認められなかった(図8)。一方、リガンド結合PEG及びR4で修飾したDual型のリポソームでは腫瘍血管内皮細胞において多数のシグナルの存在が認めら

れた(図10)。この結果から、本発明のリポソームが腫瘍血管内皮細胞に対して高い標的移行性を有していることが示された。

### **産業上の利用可能性**

[0094] 本発明の脂質膜構造体は、優れた生体内安定性、リガンドによる標的細胞に対する選択性、及び細胞内移行性の全てを同時に満足する脂質膜構造体であり、例えば遺伝子を含む核酸を細胞内に送達して発現させるための脂質膜構造体や悪性腫瘍に選択的に抗腫瘍剤を送達するための脂質膜構造体などの用途に極めて有用である。

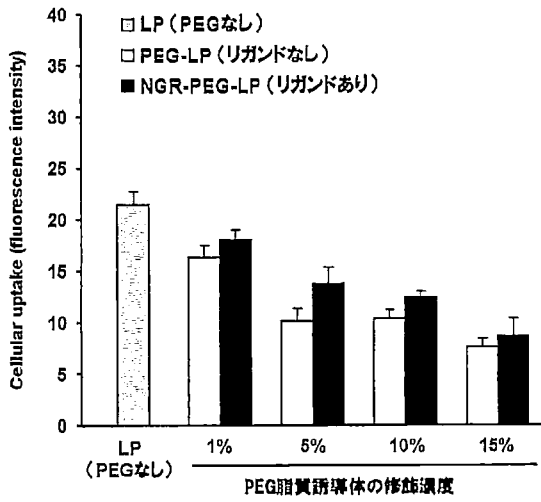
## 請求の範囲

- [請求項1] 標的細胞に物質を送達するための脂質膜構造体であって、脂質膜が下記の(a)及び(b)：
- (a) 標的細胞選択性リガンドが結合したポリアルキレングリコール；  
及び
- (b) 複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド  
で修飾された脂質膜構造体。
- [請求項2] 脂質膜構造体がりポソームである請求項1に記載の脂質膜構造体。
- [請求項3] 脂質膜構造体の表面が上記(a)ポリアルキレングリコール及び(b)ポリペプチドで修飾された請求項1又は2に記載の脂質膜構造体。
- [請求項4] 標的細胞選択性リガンドが標的細胞の細胞膜外側に発現しているレセプターに特異的に結合可能なリガンドである請求項1ないし3のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項5] 上記(a)ポリアルキレングリコールの先端部に標的細胞選択性リガンドが結合した請求項1ないし4のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項6] 上記(a)ポリアルキレングリコール及び(b)ポリペプチドが疎水性基で修飾されており、前記疎水性基が脂質膜に挿入された請求項1ないし5のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項7] 上記(b)ポリペプチドが4ないし20個の連続したアルギニン残基を含むポリペプチドである請求項1ないし6のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項8] 上記(a)ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項1ないし7のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項9] 送達すべき物質が内部に封入された請求項1ないし8のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項10] 内部に遺伝子を含む核酸及びカチオン性ポリマーが封入された請求項9に記載の脂質膜構造体。

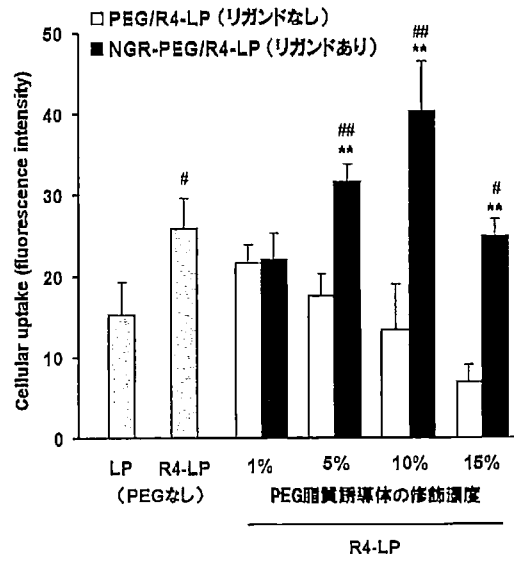
- [請求項11] 内部に抗腫瘍剤が封入された請求項9に記載の脂質膜構造体。
- [請求項12] 抗腫瘍剤がドキソルビシンである請求項11に記載の脂質膜構造体。
- [請求項13] 標的細胞選択性リガンドがリガンドペプチドである請求項11に記載の脂質膜構造体。
- [請求項14] リポソーム形態である請求項11ないし13のいずれか1項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項15] 粒子径が約200 nm～400 nmの範囲である請求項14に記載の脂質膜構造体。
- [請求項16] 請求項9ないし15のいずれか1項に記載の脂質膜構造体を有効成分として含む医薬組成物。

[図1]

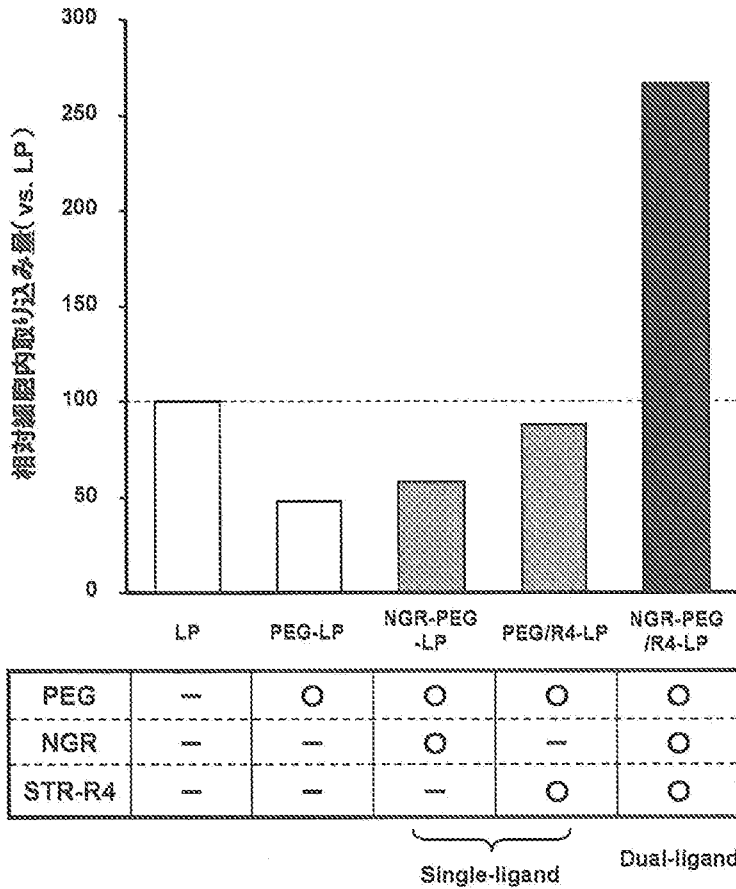
A: ペプチドリガンドのみ修飾 (NGR)



B: ペプチドリガンド、STR-R4を修飾

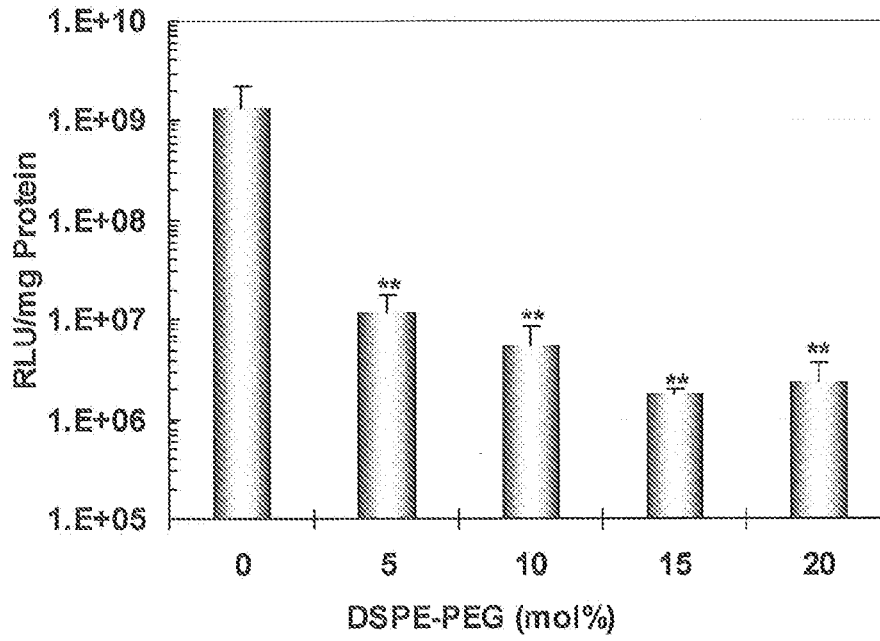


[図2]

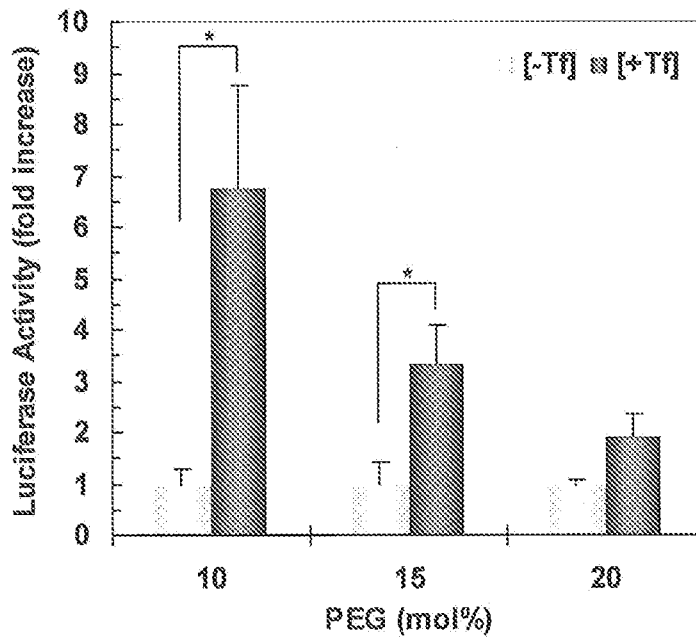




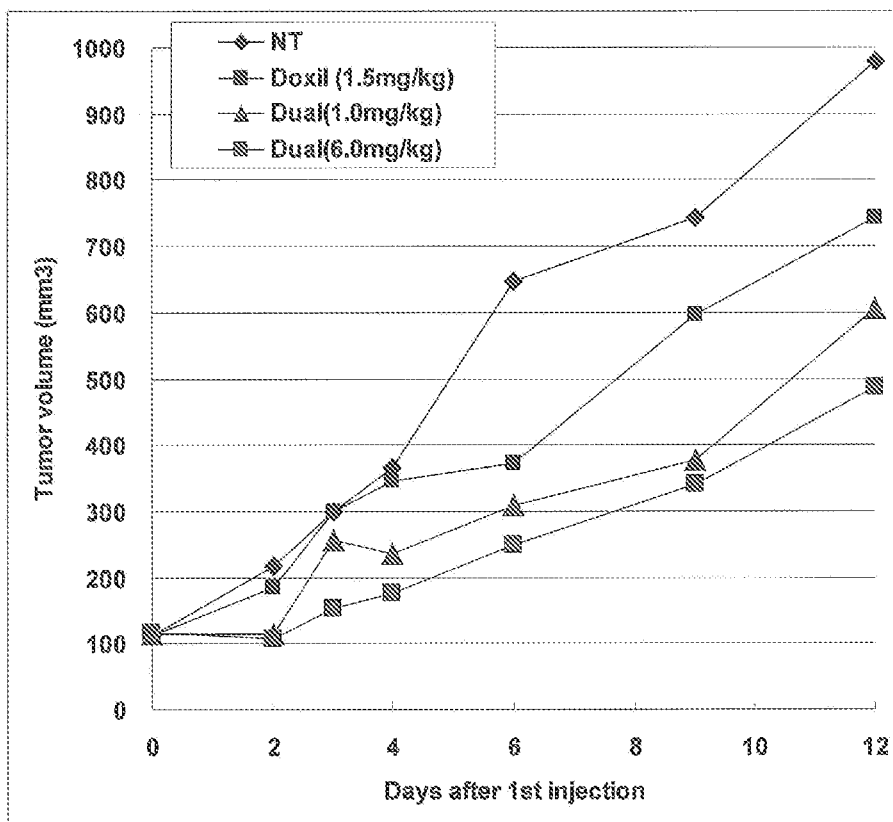
[図3]



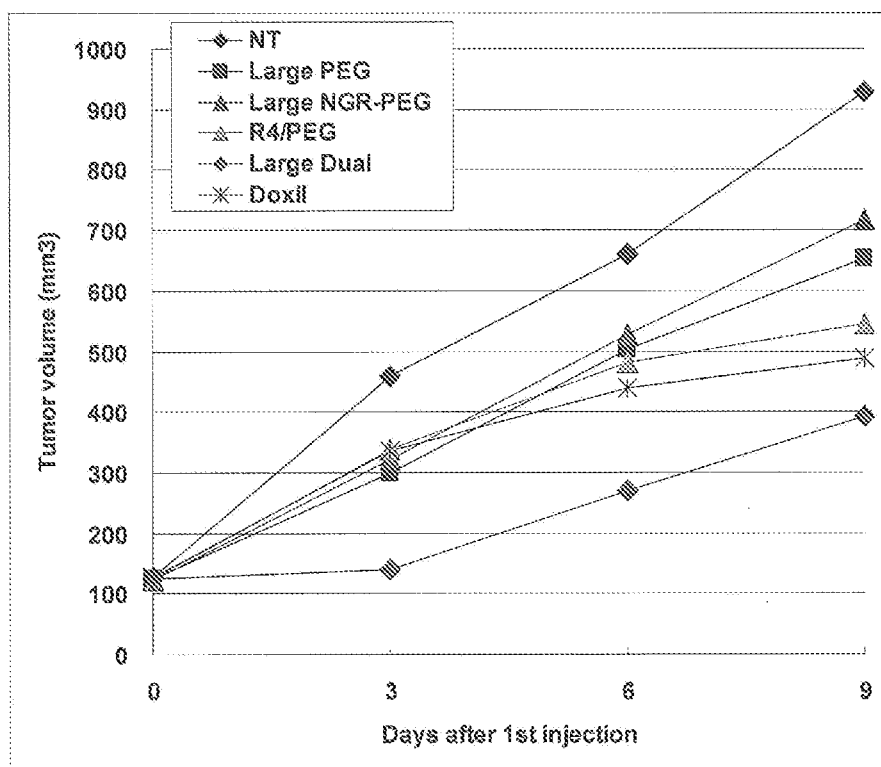
[図4]



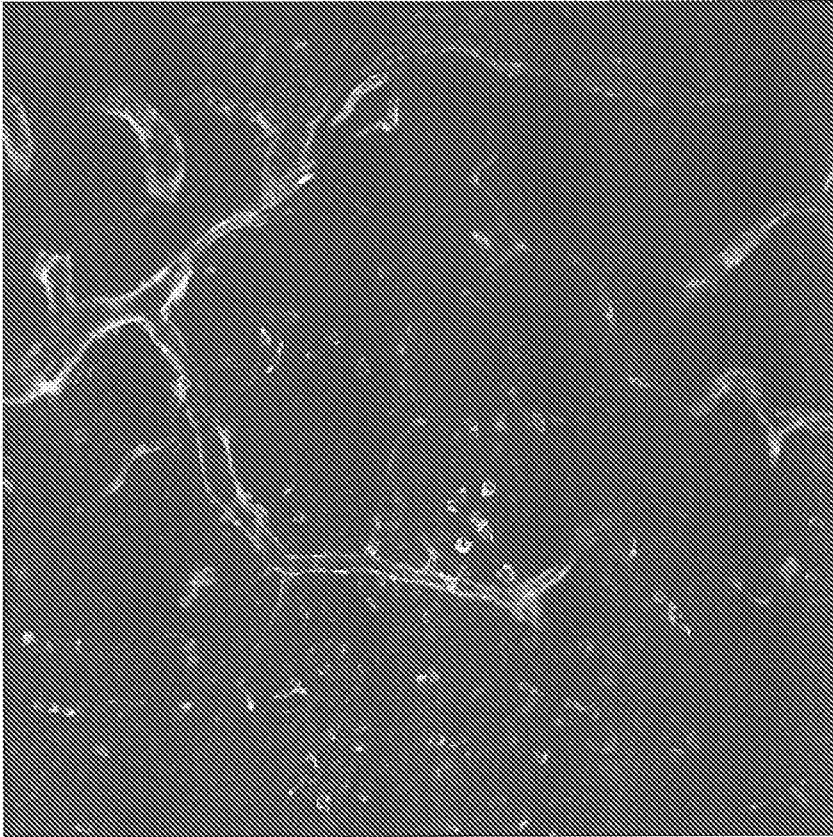
[圖5]



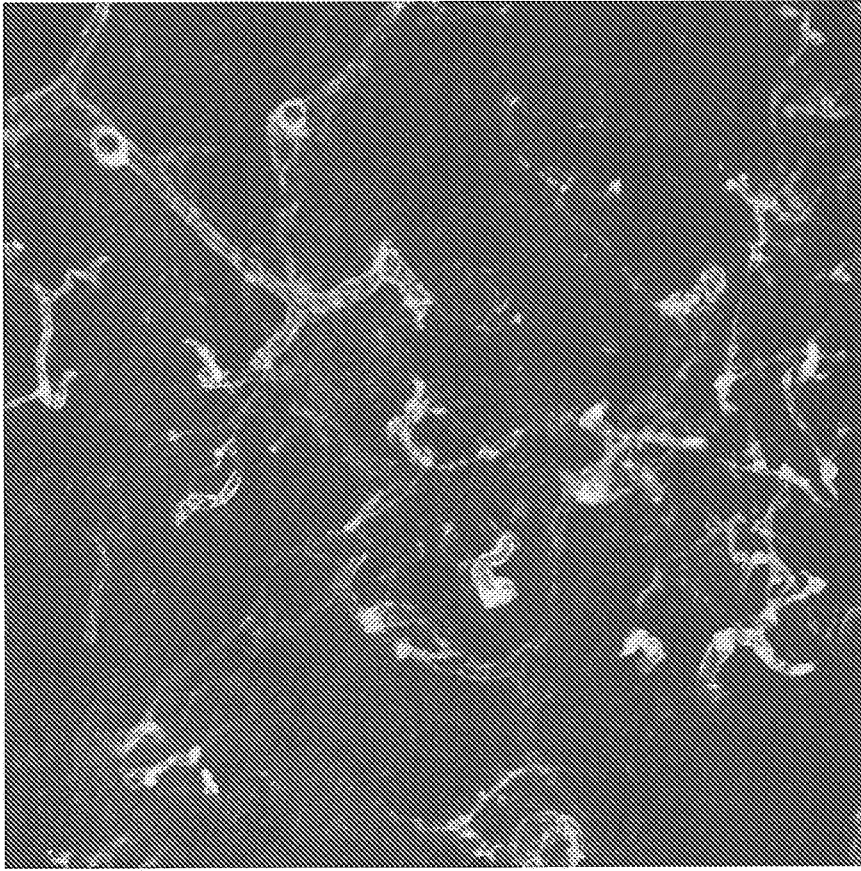
[圖6]



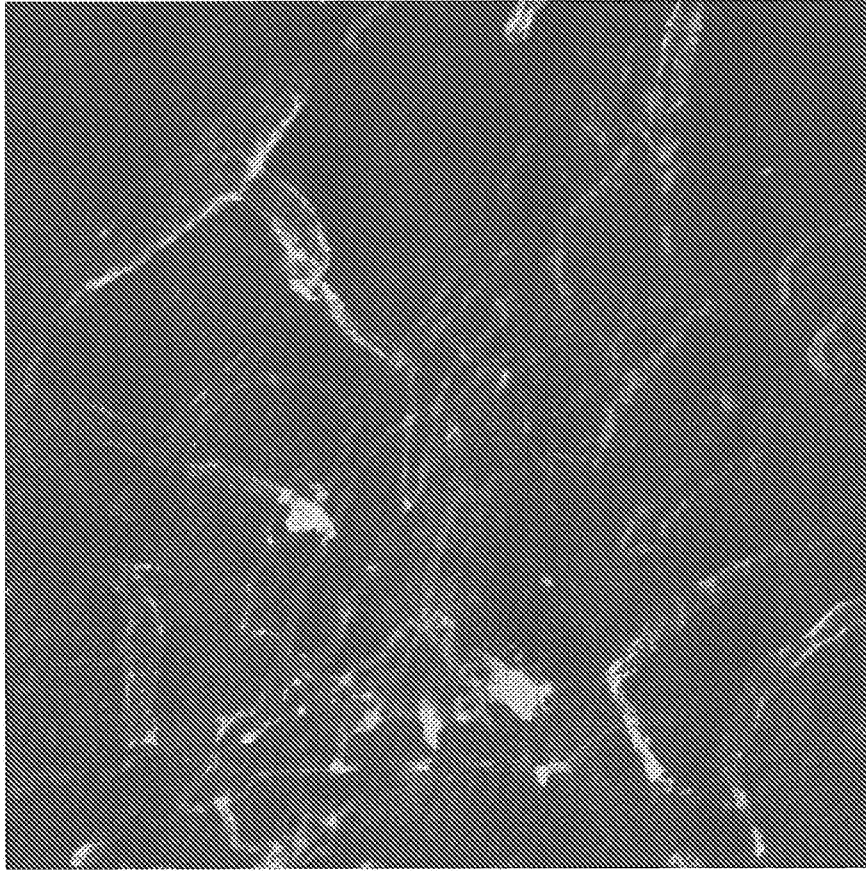
[図7]



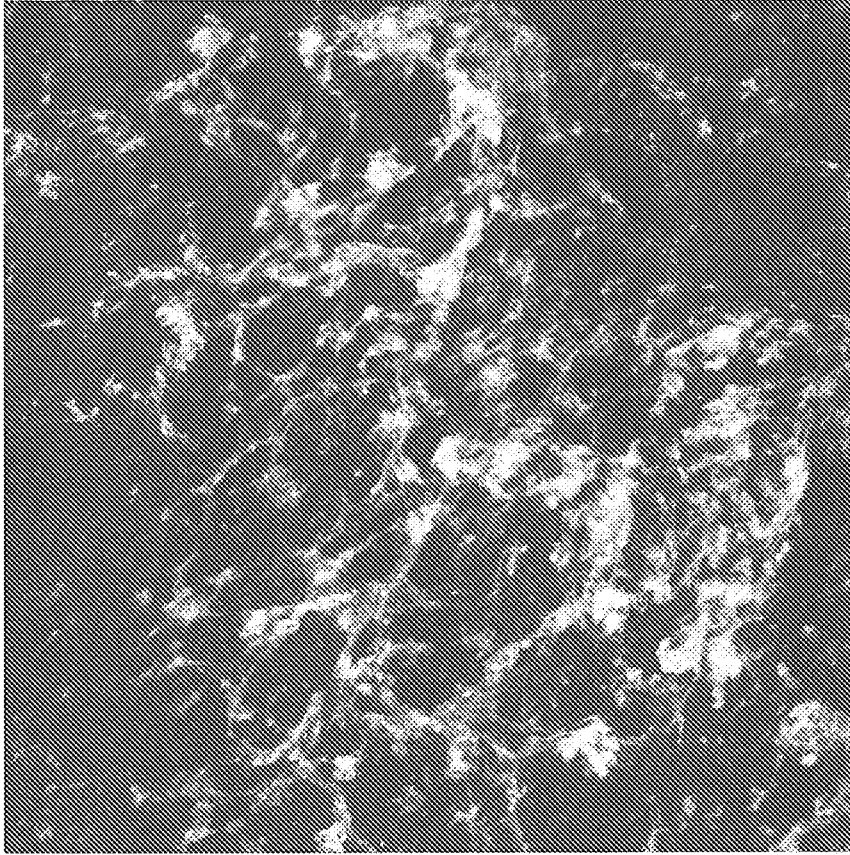
[図8]



[図9]



[図10]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/053963

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K9/127(2006.01)i, A61K47/44(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C07K5/10(2006.01)i, C07K7/04(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K9/127, A61K47/44, A61K48/00, C07K5/10, C07K7/04

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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.
P, A	WO 2010/110471 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 30 September 2010 (30.09.2010), entire text (Family: none)	1-16
A	WO 2009/131216 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 29 October 2009 (29.10.2009), entire text (Family: none)	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 March, 2011 (14.03.11)

Date of mailing of the international search report  
29 March, 2011 (29.03.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053963

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-99750 A (National University Corporation Hokkaido University), 19 April 2007 (19.04.2007), entire text & US 2009/0022782 A1      & EP 1862470 A1 & WO 2006/090813 A1	1-16
A	WO 2005/32593 A1 (Japan Science and Technology Agency), 14 April 2005 (14.04.2005), entire text & US 2007/0059353 A1      & EP 1676588 A1 & CA 2540917 A              & KR 10-2006-0080926 A & CN 1863558 A	1-16
A	JP 2004-10481 A (Mebiopharm Co., Ltd.), 15 January 2004 (15.01.2004), entire text & US 2003/0224037 A1      & US 2004/0022842 A1 & EP 1369132 A1              & CA 2409795 A	1-16
A	Hiroto HATAKEYAMA et al., "Development of a Novel Systemic Gene Delivery System for Cancer Therapy with a Tumor-specific Cleavable PEG-lipid", YAKUGAKU ZASSHI, 2007, vol.127, no.10, pages 1549 to 1556	1-16



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K9/127(2006.01)i, A61K47/44(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C07K5/10(2006.01)i, C07K7/04(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. A61K9/127, A61K47/44, A61K48/00, C07K5/10, C07K7/04

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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
PA	WO 2010/110471 A1 (国立大学法人北海道大学) 2010.09.30, 全文 (ファミリーなし)	1-16
A	WO 2009/131216 A1 (国立大学法人北海道大学) 2009.10.29, 全文 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 2007-99750 A (国立大学法人北海道大学) 2007.04.19, 全文 & US 2009/0022782 A1 & EP 1862470 A1 & WO 2006/090813 A1	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

14.03.2011

国際調査報告の発送日

29.03.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 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)

辰己 雅夫

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

2941

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
A	WO 2005/32593 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.04.14, 全文 & US 2007/0059353 A1 & EP 1676588 A1 & CA 2540917 A & KR 10-2006-0080926 A & CN 1863558 A	1-16
A	JP 2004-10481 A (メビオファーム株式会社) 2004.01.15, 全文 & US 2003/0224037 A1 & US 2004/0022842 A1 & EP 1369132 A1 & CA 2409795 A	1-16
A	畠山浩人, 外 3 名, 腫瘍特異的に分解される PEG 脂質誘導体を用いた全身投与型腫瘍遺伝子デリバリーシステムの開発, YAKUGAKU ZASSHI, 2007, Vol.127, No. 10, p.1549-1556	1-16