

(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
2012年4月26日(26.04.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/053484 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 9/127 (2006.01) A23L 1/00 (2006.01)
B01J 13/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/073847
- (22) 国際出願日: 2011年10月17日(17.10.2011)
- (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 2010-234336 2010年10月19日(19.10.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタホールディングス株式会社(KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 磯田 武寿 (ISODA, Takeshi) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反
- 田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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))

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF UNI-LAMELLAR LIPOSOME BY TWO-STAGE EMULSIFICATION TECHNIQUE WHICH INVOLVES ADDING WATER-SOLUBLE LIPID TO INNER AQUEOUS PHASE, AND UNI-LAMELLAR LIPOSOME PRODUCED BY THE PROCESS

(54) 発明の名称: 水溶性脂質を内水相に添加する二段階乳化法による単胞リポソームの製造方法およびその製造方法により得られる単胞リポソーム

(57) Abstract: The present invention provides: a uni-lamellar liposome having an improved water-soluble medicinal agent encapsulation rate; and a process for producing the uni-lamellar liposome. This uni-lamellar liposome is characterized in that an inner aqueous phase is composed of an aqueous solvent (W1) having, dissolved therein, a water-soluble lipid component (Fw) composed of a lipid having a ClogP value smaller than 11. This process for producing the uni-lamellar liposome is characterized by comprising: (1) a primary emulsification step of dissolving a water-soluble lipid component (Fw) in an aqueous solvent (W1), dissolving a mixed lipid component (F1) that does not contain the water-soluble lipid (Fw) in an organic solvent (O), and mixing/emulsifying these solutions with each other, thereby preparing W1/O emulsion; (2) a secondary emulsification step of mixing/emulsifying the W1/O emulsion produced in step (1) with an aqueous solvent (W2), thereby preparing a W1/O/W2 emulsion; and (3) a solvent removal step of removing the organic solvent from the W1/O/W2 emulsion produced in step (2), thereby preparing an aqueous liposome suspension.

(57) 要約: 本発明により、水溶性薬剤の内包率が向上した単胞リポソームおよびその製造方法が提供される。本発明に係る単胞リポソームの製造方法は、ClogPの値が11より小さい脂質からなる水溶性脂質成分(Fw)が溶解した水性溶媒(W1)を内水相とすることを特徴とする単胞リポソーム、ならびに、(1)水性溶媒(W1)に水溶性脂質成分(Fw)を溶解し、有機溶媒(O)に当該水溶性脂質(Fw)以外の混合脂質成分(F1)を溶解し、これらを混合乳化することによりW1/Oエマルションを調製する一次乳化工程; (2)上記工程(1)を経て得られたW1/Oエマルションと水性溶媒(W2)とを混合乳化することによりW1/O/W2エマルションを調製する二次乳化工程; および(3)上記工程(2)を経て得られたW1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒を除去することによりリポソームの水性懸濁液を調製する溶媒除去工程を含むことを特徴とする。

WO 2012/053484 A1

明 細 書

発明の名称：

水溶性脂質を内水相に添加する二段階乳化法による単胞リポソームの製造方法およびその製造方法により得られる単胞リポソーム

技術分野

[0001] 本発明は、医薬、食品、化粧品のドラッグキャリアとして利用可能な単胞リポソームの二段階乳化法を用いた製造方法、およびその製造方法により得られる単胞リポソームに関する。

背景技術

[0002] リポソームは、リン脂質を主成分とする脂質二重膜からなる閉鎖小胞体である。細胞膜と類似の構造および機能を有するため免疫系を刺激しにくく、素材としての安全性が高い。また、水溶性の薬剤を脂質二重膜で囲まれる内部の水相に、脂溶性の薬剤を二重膜の中に保持することができ、本来不安定で失活しやすい薬効成分を安定的に内包させることが可能である。

[0003] このような、医薬品や化粧品などの分野に利用可能なリポソームおよびその製造方法について、特にリポソームに内包させる水溶性の物質（薬剤）の内包率を向上させる手段に関して、たとえば、次のような文献が公開されている。

[0004] 非特許文献1には、W/Oエマルジョンを分散相、トリス塩酸緩衝液を外水相としてマイクロチャネル乳化法によりW/O/Wエマルジョンを作製する際に、その外水相にカゼインナトリウムを乳化剤として配合すること、これによりリポソーム（脂質カプセル）へのカルセインの内包率を80%程度に高めることができたことが記載されている。しかしながら、この非特許文献1では、内水相への添加剤については何ら注目されていない。また、内包物質としてはカルセインが例示されているのみで、薬剤についての汎用性は示されておらず、製造スケールを考慮した実用的な検証がなされていない。

[0005] また、特許文献1には、「1種または2種以上の機能性脂質を含む脂質で

構成されている内膜と、1種または2種以上の機能性脂質を含むまたは含まない脂質で構成されている外膜とからなる脂質二重膜層を有し、少なくとも、当該内膜に含まれるいずれか1つの種類の機能性脂質については、その内膜における量が、その外膜における量を上回るとの条件を満たすことを特徴とする、リポソーム」が開示されている。また、上記機能性脂質の一つとして、「たとえば、コレステロールにポリオキシアルキレン基 ($-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) を導入した化合物」のような「水溶性脂質」が挙げられており、「膜構成脂質にポリオキシアルキレン基を導入することにより、リポソームの表面が親水性になり、リポソームの安定性が向上（崩壊性・凝集性などが改善）し、また、体内で異物として認識されなくなる」といった効果が得られると記載されている。さらに、当該発明のリポソームの製造方法としては、マイクロカプセル化法、膜乳化法、超臨界二酸化炭素法などが適用できることが記載されている。

[0006] しかしながら、上記特許文献1に係る発明における「水溶性脂質」として具体的に挙げられているものは、ポリオキシアルキレン基を導入したコレステロールのような、内膜に入り込んでそれを構成する一部となる化合物である。また、当該発明については、「薬剤などの化合物と化学的に相互作用する機能性脂質を外膜よりも内膜に多く含むなど、内外膜の構成成分（機能性脂質の量）が相違するリポソームは、そのような機能性脂質を内外膜に同量含むリポソームよりも、薬剤の内包率や分散安定性、コントロールリリースに優れる」という作用効果に基づくものであることが説明されているが、そのような発明のより具体的な態様としては、「薬剤の保持に寄与する荷電脂質を内膜だけに含有させ、一方でリポソームの安定性や体内動向に関与する水溶性脂質を外膜だけに含有させ、当該荷電脂質の量が当該水溶性脂質の量を上回るもの」が挙げられているのみである。つまり、必ずしも内膜の一部をなさない水溶性脂質を内水相に添加する製造方法や、それにより得られるリポソームは、上記特許文献1によっては何ら具体的に開示されていない。

[0007] なお、体内に投与されたりポソームを免疫系に認識されにくくし（ステル

ス化) 特定の臓器に集めやすくしたり、親水性を高め血中安定性を向上させたりする目的で、リポソームの外表面にポリエチレングリコール (PEG) 鎖を導入する手法も知られている (たとえば非特許文献2)。しかしながら、そのような手法のためには、たとえばPEG化したコレステロールのような化合物がリポソームの外膜の構成脂質成分として用いられるが、リポソームの内水相ないし内膜の構成脂質成分にそのような化合物を添加することは、そのような手法によって記載ないし示唆されるものではない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2008/140081号パンフレット

非特許文献

[0009] 非特許文献1：黒岩崇，中嶋光敏，市川創作「多相エマルションを基材とした脂質カプセル作製における水相組成の影響」化学工学会 第74回年会 (2009年3月) 要旨集

非特許文献2：Biochim. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、水溶性薬剤のリポソームへの高内包率を実現させることができるとともに、W/O/Wエマルションの経時安定性を向上させ、そのプロセスにおいて内包率を維持させることができる単胞リポソームの製造方法、ならびにそのような製造方法により得られる、水溶性薬剤の高内包率の実現した単胞リポソームを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、二段階乳化法によりリポソームを製造する際に内水相に「水溶性脂質」を添加することにより、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち、本発明は、ClogPの値が11より小さい脂質からなる水溶

性脂質成分（F w）が溶解した水性溶媒（W 1）を内水相とすることを特徴とする単胞リポソームを提供する。

[0013] 前記水溶性脂質成分（F w）は、リゾ脂質、短鎖リン脂質、PEG脂質および親水性基を有する化学合成脂質からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有するものであることが好ましい。

[0014] 前記水性溶媒（W 1）にはさらに水溶性薬剤が溶解していることが好ましい。

[0015] また、本発明は、上記の単胞リポソームの乾燥粉末や、上記の単胞リポソームを含有する、または上記の乾燥粉末を水性溶媒に添加して得られる、水性懸濁液を提供する。

[0016] あわせて、本発明は、下記工程（1）～（3）を含むことを特徴とする、単胞リポソームの製造方法を提供する：

（1）水性溶媒（W 1）に水溶性脂質成分（F w）を溶解し、有機溶媒（O）に当該水溶性脂質（F w）以外の混合脂質成分（F 1）を溶解し、これらを混合乳化することによりW 1 / O エマルジョンを調製する一次乳化工程；

（2）上記工程（1）を経て得られたW 1 / O エマルジョンと水性溶媒（W 2）とを混合乳化することによりW 1 / O / W 2 エマルジョンを調製する二次乳化工程；

（3）上記工程（2）を経て得られたW 1 / O / W 2 エマルジョンに含まれる有機溶媒を除去することによりリポソームの水性懸濁液を調製する溶媒除去工程。

[0017] 前記水溶性脂質成分（F w）は、リゾ脂質、短鎖リン脂質、PEG脂質および親水性基を有する化学合成脂質からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有するものであることが好ましい。

[0018] 前記一次乳化工程（1）は、さらに水溶性薬剤を添加して行われることが好ましい。

[0019] 前記溶媒除去工程（3）は、W 1 / O / W 2 エマルジョンの攪拌下に行わ

れることが好ましい。

[0020] 本発明は、上記いずれかの製造方法により製造された単胞リポソームあるいはその水性懸濁液またはその乾燥粉末も提供する。

[0021] なお、本発明において、「単胞リポソーム」（ULV、単核リポソームと同義である）は、単一の内水相を有するリポソーム構造物を指し、通常は体積平均粒径の範囲が約20～500nmである。これに対して、「多胞リポソーム」（MVL: multivesicular liposomes）は、複数の非同心円状の内水相を包囲する脂質膜を含んでなるリポソーム構造物を指し、また「多重膜リポソーム」（MLV）は、複数の「タマネギの皮」のような同心円状の膜を有し、その間に殻様の同心円状の水系コンパートメントがあるリポソーム構造物を指す。多胞リポソームおよび多重膜リポソームの特徴は、体積平均粒径がマイクロメートルの範囲であり、通常は0.5～25 μ mである。

発明の効果

[0022] 所定の水溶性脂質を内水相に添加することによりリポソームの内膜側の安定性が改善され、W/O/Wエマルジョンを攪拌または放置してO相（油相）を除去する工程を含むような方法でリポソームを製造する場合であっても、水溶性の薬剤の内包率の低下を抑制することができる。従来、このようなリポソームの製造方法においてW/O/Wエマルジョンの作製が容易に進行するのは、O相がオリーブ油やデカン、ヘキサデカンといった沸点の高い油の場合であることが知られており、一方で、水より沸点の低い有機溶媒をO相に用いる場合はW/O/Wエマルジョンの作製は容易ではなく、これは有機溶媒の表面張力が低いために粒子の球形を維持する力が足りないため、と解釈されていた。本発明により、水より沸点の低い有機溶媒をO相に用いる場合もW/O/Wエマルジョンの作製が容易になり、水溶性薬剤の内包率が比較的高いリポソームが得られやすくなる。

[0023] なお、上記の効果が生み出される原理は必ずしも明確にはなっていないが、たとえば、水溶性脂質がリポソーム膜の内壁近傍に集積することにより当該膜が強化されていること、あるいは、薬剤の種類によっては一部がリポソ

ーム膜中に混入して膜を乱し、それにより膜の強度が低下する場合があったところ、そのような混入を防止できていることなどが考えられる。また、水溶性脂質が乳化剤のような機能を有し、乳化挙動をよくしているあるいは水溶性脂質が逆ミセルを形成して薬剤に作用し、その溶解度をコントロールしているということも考えられる。

発明を実施するための形態

[0024] ー 製造原料 ー

・ 水溶性脂質成分 (F w)

本発明において、「水溶性脂質成分」とは、 $C \log P$ の値が1より小さい脂質からなる成分をさす。「 $C \log P$ 」は、有機化合物の水と1-オクタノールに対する親和性を示す係数であり、CambridgeSoft社の分子構造解析、物性計算ツールであるChemBioDraw Ultra等により計算することができる。これは、実験によって水と1-オクタノールに対する溶解量を測定し、その比で表わされる「分配係数」を計算によって算出した値である。 $C \log P$ が大きければ相対的に1-オクタノールに溶けやすいことを表し、 $C \log P$ が小さければ相対的に水に溶けやすいことを表している。

[0025] 本発明に用いることのできる水溶性脂質としては、この「 $C \log P$ 」が1より小さい値を示すものであればよく、その中でもリゾ脂質、短鎖リン脂質、PEG脂質および親水性基を有する化学合成脂質が好ましい。これらの水溶性脂質は、いずれか1種を単独で用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。水溶性脂質成分 (F w) の水性溶媒 (W 1) への添加量は、発明の作用効果および用いる水溶性脂質成分 (F w) の水への溶解量を考慮しながら適切な範囲で調整することができる。

[0026] リゾ脂質は、グリセロリン脂質の一種で、グリセロールの1位または2位に結合した脂肪酸のいずれか一方が除かれたモノアシルグリセロリン脂質であり、たとえば、リゾレシチン (リゾホスファチジルコリン)、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロールが挙げられる

。

[0027] 短鎖リン脂質は、グリセロリン脂質またはスフィンゴリン脂質のうち、結合した脂肪酸の炭素数が少ない（たとえば2～10の）ものであり、たとえば、ジデカノイルホスファチジルコリンが挙げられる。

[0028] PEG脂質は、脂質にPEG（ポリエチレングリコール）鎖を導入した誘導体であり、一方、親水性基を有する化学合成脂質は、脂質にPEG鎖以外の親水性基を導入した誘導体である。上記脂質としてはリン脂質やコレステロールなどが挙げられる。また、PEG鎖以外の親水性基としては、糖鎖、アルコール基、アミノ基、チオール基およびカルボン酸基、ならびにこれらを組み合わせたアミノ酸の鎖が挙げられる。特に親水性基として糖鎖を有する化学合成脂質（合成ステロール）の詳細は、たとえば国際公開WO2008/081686に開示されている。

[0029] ・混合脂質成分（F1）・（F2）

一次乳化工程で有機溶媒（O）に溶解する混合脂質成分（F1）は主としてリポソームの脂質二重膜の内膜を構成し、場合によっては外膜の構成にも寄与する。一方、必要に応じて二次乳化工程で添加する混合脂質成分（F2）は主としてリポソームの外膜を構成する。混合脂質成分（F1）および（F2）は、同一の組成であっても、異なる組成であってもよい。

[0030] これらの混合脂質成分の配合組成は特に限定されるものではなく、公知のリポソームの配合組成に準じたものとすることができる。一般的には、リン脂質（動植物由来のレシチン；ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸またはそれらの脂肪酸エステルであるグリセロリン脂質；スフィンゴリン脂質；これらの誘導体等）と、脂質膜の安定化に寄与するステロール類（コレステロール、フィトステロール、エルゴステロール、これらの誘導体等）とを中心に構成され、さらに糖脂質、グリコール、脂肪族アミン、長鎖脂肪酸（オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸等）、その他各種の機能性を賦与する化合物が配合されていてもよい。また、F2には、たとえば

PEG化リン脂質のような、リポソーム表面を修飾して各種の機能性を賦与するための脂質を配合することも可能である。これらの化合物の混合脂質成分中の配合比も、脂質膜の安定性やリポソームの生体内での挙動などの性状を考慮しながら、用途に応じて適切に調整すればよい。

[0031] ・水性溶媒 (W1) ・ (W2) 、有機溶媒 (O)

水性溶媒 (W1) および (W2) ならびに有機溶媒 (O) は、公知のリポソームの製造方法でも用いられているような、一般的なものを用いることができる。一次乳化工程で用いられる水性溶媒 (W1) および有機溶媒 (O) は、それぞれ W1/O エマルションの水相および油相をなし、二次乳化工程で用いられる水性溶媒 (W2) は、W1/O/W2 エマルションの外水相をなす。水性溶媒としては、たとえば純水に必要なに応じて水と混合する他の溶媒、浸透圧調整のための塩類・糖類、pH調整のための緩衝液などを配合したものが挙げられる。有機溶媒としては、たとえばヘキサン (n-ヘキサン) やクロロホルム、シクロヘキサン、1,2-ジクロロエテン、ジクロロメタン、1,2-ジメトキシエタン、1,1,2-トリクロロエテン、t-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ギ酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸メチル、メチルエチルケトン、ペンタンなどの非水溶性有機溶媒が挙げられる。また、アセトニトリル、メタノール、アセトン、エタノール、2-プロパノールなどの水溶性有機溶媒や、上記以外のエーテル、炭化水素、ハロゲン化炭化水素、ハロゲン化エーテル、エステル類が挙げられる。なかでもクロロホルム、シクロヘキサン、ジクロロメタン、ヘキサン、t-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ギ酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸メチル、メチルエチルケトン、ペンタン、アセトニトリル、メタノール、アセトン、エタノール、2-プロパノールなどが好ましい。溶媒除去工程を考慮すると有機溶媒は揮発性の化合物が好ましく、水よりも沸点の低い化合物が好ましい。これらの化合物は、いずれか1種単独で用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。たとえば、得られるナノサイズの W1/O エマルションの単分散性が良好なものとなることから、ヘ

キサンを主成分（50体積%以上）とする有機溶媒、好ましくはヘキサンが60体積%以上である有機溶媒を有機溶媒（O）とすることも好ましい。

[0032] ・水溶性薬剤（リポソームに内包させる水溶性物質）

本発明における、リポソームに内包させる水溶性の物質（「水溶性薬剤」と称する。）は特に限定されるものではなく、リポソームの用途に応じて医薬品、化粧品、食品などの分野で知られている各種の物質を用いることができる。ただし、そのような水溶性薬剤には、前述した水溶性脂質成分は含まれない。

[0033] 水溶性薬剤のうち、医療用のリポソームなどに用いられるものとしては、たとえば、造影剤（X線造影用の非イオン性ヨード化合物、MRI造影用のガドリニウムとキレート化剤とからなる錯体等）、抗がん剤（アドリアマイシン、ビラルビシン、ビンクリスチン、タキソール、シスプラチン、マイトマイシン、5-フルオロウラシル、イリノテカン、エストラサイト、エピルビシン、カルボプラチン、イントロン、ジェムザール、メソトレキセート、シタラビンアイソボリン、テガフル、シスプラチン、エトポシド、トポテシン、ビラルビシン、ネダプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド、テスパミン、ニムスチン、ラニムスチン、ダカルバチン、エノシタビン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、ダウノマイシン、アクリラルビシン、イビルビシン、アムルビシン、アクチノマイシン、タキソテル、トラスツブマブ、リツキシマブ、ゲムツズマブ、レンチナン、シゾフィラン、インターフェロン、インターロイキン、アスパラギナーゼ、ホスフェストロール、ブスルファン、ボルテゾミブ、アリムタ、ベバシズマブ、ネララビン、セツキシマブ等）、抗菌剤（マクロライド系抗生物質、ケトライド系抗生物質、セファロsporin系抗生物質、オキサセフェム系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、ベータラクタマーゼ配合剤、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、ホスホマイシン系抗生物質、カルバペネム系抗生物質、ペネム系抗生物質）、MRSA・VRE・PRSP感染症治療剤、ポリエン系抗真菌剤、ピリミジン系抗真菌剤、アゾール系抗真菌剤、

キャンディン系抗真菌剤、ニューキノロン系合成抗菌剤、抗酸化性剤、抗炎症剤、血行促進剤、美白剤、肌荒れ防止剤、老化防止剤、発毛促進性剤、保湿剤、ホルモン剤、ビタミン類、核酸（DNAもしくはRNAのセンス鎖もしくはアンチセンス鎖、プラスミド、ベクター、mRNA、siRNA等）、タンパク質（酵素、抗体、ペプチド等）、ワクチン製剤（破傷風などのトキソイドを抗原とするもの；ジフテリア、日本脳炎、ポリオ、風疹、おたふくかぜ、肝炎などのウイルスを抗原とするもの；DNAまたはRNAワクチン等）などの薬理的作用を有する物質や、色素・蛍光色素、キレート化剤、安定化剤、保存剤などの製薬助剤が挙げられる。

[0034] 水溶性薬剤を内包させる目的は、水溶性薬剤を内水相(W1)に溶解することによって達成される。したがって水溶性の高い薬剤は、内水相(W1)に高濃度で溶解すれば、内包される絶対量は増やすことができる。一方、内水相(W1)の量は適宜変えることができ、所定の粒径の粒子(W1/O)を作成しようとするれば、それに必要な脂質量(個数)は計算できる。たとえば、100 nm のW1/Oエマルション(粒子体積 $0.0005 \mu\text{m}^3$)を形成する場合、W1相(内水相) 1.0 mLで製造すれば 2.0×10^{15} 個のW1/O粒子が生成する計算である。一方、100 nm のW1/Oナノエマルション(粒子表面積 2500 nm^2)はリン脂質分子(レシチン表面積 0.7 nm^2) 0.4×10^5 個で構成されている、と計算される。したがって、薬液 1.0 mLの1次乳化に必要な脂質量は、 2.0×10^{15} 個 $\times 0.4 \times 10^5$ 個 $=0.8 \times 10^{20}$ 個、すなわち 0.132 mmol である。レシチン以外の脂質分子も、その表面積はおおよそ 0.7 nm^2 として差し支えないため、脂質の総量として 0.132 mmol が100 nm のW1/Oナノエマルションを作成するのに必要最少量と考えられる。リポソームを作成するには、その倍の 0.264 mmol が必要であり、代表的なリン脂質のDPPCで分子量換算すると193 mgが必要である。

[0035] そこで、薬剤を1.0 mLに溶解し、100 nmのリポソームを作成する場合を考えると、薬局法記載の通りシタラピンは $0.1 \sim 1.0 \text{ g}$ 溶解するので、薬剤重量比 $0.1 \text{ g}/0.193 \text{ g} \sim 1.0 \text{ g}/0.193 \text{ g}$ 、イオヘキソール(造影剤)は 1.0 g 以上溶解するので、薬剤重量比 $1.0 \text{ g}/0.193 \text{ g}$ 以上である。これは、脂質量を低減して

効率的に薬剤を内包できることを意味し、脂質の投与量を減らすことができる点、臨床上有意義であり、本手法により薬剤重量比0.5~5が達成できる。さらに、より多くの薬剤を溶解すると、一般的に飽和状態に近づき粘度が上昇する。本手法により、内水相の粘度として10mPa・sまで内包可能である。

[0036] また、100 nmより大きい粒子を製造する場合には、脂質の必要量はそれより少なくて済むので、より効率的ということになる。

[0037] ・リポソームおよびその水性懸濁液

本発明のリポソーム、典型的には以下に説明するような本発明の製造方法により得られるリポソームは、水溶性脂質成分（Fw）が溶解した水性溶媒（W1）を内水相とするものであり、水溶性脂質成分が溶解していない水性溶媒を内水相とするものに比べて高い薬剤の内包率を達成することができる。

[0038] 本発明のリポソームは、典型的には以下に説明するような本発明の製造方法により、水性溶媒（W2：外水相）に懸濁した状態で得られる。このようなリポソームの水性懸濁液が各種の用途に供されるが、使用されるまでの間、たとえば凍結乾燥法などにより粉末状態のリポソームとして保存することもできる。使用の際には、粉末状態のリポソームを水性溶媒に添加し、再度懸濁させればよい。

[0039] 本発明のリポソームのサイズは特に限定されるものではないが、たとえば、体積平均粒子径が50~1,000nmとなるよう調整することができる。特に体積平均粒子径が50~200nmのリポソームは、毛細血管を閉塞するおそれがほとんどなく、またがん組織近辺の血管にできる間隙を通過することもできるため、医薬品等として人体に投与して使用する上で好都合である。

[0040] なお、本発明における、リポソームおよびエマルションの体積平均粒子径は、動的光散乱法により測定されるものであり、たとえば、動的光散乱式ナノトラック粒度分析計（UPA-EX150、日機装株式会社）を用いて算

出することができる。リポソームの場合には、リポソームの水性懸濁液をたとえば等張PBS溶液で10倍に希釈し、動的光散乱式ナノトラック粒度分析計を用いて粒度分布や体積平均粒子径を算出することができ、エマルションの場合には、エマルション（たとえば、W1/Oエマルション）をたとえばクロロホルム/ヘキサン混合溶媒で10倍に希釈し、動的光散乱式ナノトラック粒度分析計を用いて粒度分布や体積平均粒子径を算出することができる。

[0041] － リポソームの製造方法 －

本発明のリポソームの製造方法は、少なくとも下記工程（1）～（3）を含み、必要に応じてその他の工程をさらに含むことができるものである。

[0042] （1）一次乳化工程

一次乳化工程は、水性溶媒（W1）に水溶性脂質成分（Fw）を溶解し、有機溶媒（O）に当該水溶性脂質（Fw）以外の混合脂質成分（F1）を溶解し、これらを混合乳化することにより、W1/Oエマルションを調製する工程である。

[0043] W1/Oエマルションを調製するための方法は特に限定されるものではなく、従来のリポソームの製造方法でも用いられているような方法を採用することができる。たとえば、超音波乳化機、攪拌乳化機、膜乳化機、高圧ホモジナイザーなどの装置を用いた乳化方法が挙げられるが、平均粒径を広い範囲で制御でき、かつ得られるW1/Oエマルションが単分散性となるような方法が好ましい。

[0044] 水性溶媒（W1）のpHは、通常3～10の範囲で調節され、たとえば、混合脂質成分にオレイン酸を用いる場合、pHは6～8.5とすることが好ましい。pHを調整するためには適切な緩衝液を用いればよい。

[0045] 一次乳化工程におけるその他の条件、たとえば、混合脂質成分（F1）の量（有機溶媒（O）に対する割合）、有機溶媒（O）と水性溶媒（W1）の体積比、W1/Oエマルションの平均粒径などは、公知のリポソームの製造方法（一次乳化工程）に準じて、続く二次乳化工程の条件や最終的に調製す

るリポソームの態様などを考慮しながら、適宜調節することができる。通常、混合脂質成分（F1）の量は有機溶媒（O）に対して1～50質量%の割合であり、有機溶媒（O）と水性溶媒（W1）の体積比は100：1～1：2である。W1/Oエマルションの体積平均粒径は、好ましくは50～1,000nmであり、より好ましくは50～200nmである。

[0046] 本発明では、リポソームに水溶性薬剤を内包させるために、（i）一次乳化工程の際に水溶性薬剤を添加し、水性溶媒（W1）に水溶性薬剤を溶解させ、二次乳化工程終了時点でそれを内包するリポソームが得られるようにする方法、（ii）水溶性薬剤を内包しない（空の）リポソームを得た後に、そのリポソームが分散している水性溶媒またはそのリポソームの凍結乾燥物を再分散させた水性溶媒に水溶性薬剤を添加し、攪拌するなどして、リポソームにそれを取り込ませる方法、いずれを用いることもできる。本発明の製造方法では、上記（i）の方法を用いた場合であっても内包率が比較的高く、効率的にリポソームに水溶性薬剤を内包させることができる。

[0047] なお、必要であれば、脂溶性の物質（脂溶性薬剤）を、本発明のリポソームの脂質膜内に内包させることも可能である。その場合は、脂溶性薬剤を、上記（i）のように一次乳化工程の際に添加して有機溶媒（O）に溶解させておくか、上記（ii）のように空のリポソームを得た後に添加するようにすればよい。

[0048] （2）二次乳化工程

二次乳化工程は、上記工程（1）により得られたW1/Oエマルションと水性溶媒（W2）とを混合乳化することによりW1/O/W2エマルションを調製する工程である。

[0049] W1/O/W2エマルションを調製するための方法は特に限定されるものではなく、従来のW1/O/W2エマルションの製造方法でも用いられているような方法を採用することができる。

[0050] たとえば、乳化操作時の液滴の崩壊および液滴からの内包物質の漏出を抑えるため、乳化処理に大きな機械的剪断力を必要としないマイクロチャンネル

乳化法を用いることが好適である。マイクロチャネル乳化法では、たとえば、シリコン製マイクロチャネル基板およびこの基板上部を覆うガラス板から構成される、マイクロチャネル乳化装置モジュールを使用する。上記基板およびガラス板により形成される溝型マイクロチャネルの出口側、あるいは上記基板上に加工された貫通型マイクロチャネルの出口側には、外水相をなす水性溶媒（W2）を満たしておき、マイクロチャネルの入口側からW1/Oエマルジョンを圧入することで、W1/O/W2エマルジョンを形成できる。上記基板としては、デッドエンド型、クロスフロー型、貫通孔型など、種々の形態のものを用いることができる。

[0051] また、W1/Oエマルジョンを乳化膜を通過させて水性溶媒（W2）中に液滴として分散させることによりW1/O/W2エマルジョンを調製する、膜乳化法を用いることもできる。特に、直径0.1~5.0 μ m程度の微細な細孔を有するSPG（Shirasu Porous Glass：シラス多孔質ガラス）で形成された乳化膜を用いる膜乳化法が好適であり、コストが安く処理量が多い、工業的に有利な方法とすることができる。

[0052] なお、W1/O/W2エマルジョンの平均粒径の単分散性を向上させるために、上記のような方法または他の方法による膜乳化でW1/O/W2エマルジョンを得た後、さらに1回ないし複数回、当該膜乳化で用いた膜と同じ膜またはそれとは異なる膜にW1/O/W2エマルジョンによる膜処理を行ってもよい。特に、膜乳化に用いる膜よりも小さな細孔径を有する膜を用いて膜処理を行うようにした場合、膜処理を行うことなく1回の膜乳化でW1/O/W2エマルジョンを調製する場合に較べて、膜乳化および膜処理それぞれの膜への負荷（エマルジョンを膜に通過させるために必要な圧力）を小さくすることができ、それにより膜の長寿命化や二次乳化工程に要する処理時間の短縮を図ることができ、リポソームの生産性の向上および低コスト化にも有利である。

[0053] さらに、機械的剪断力の生じる可能性のある攪拌乳化においても、W1/O/W2エマルジョンを得ることができる。本発明においても、公知の攪拌

乳化法において二液以上の流体を混合するために用いられる各種の方法・装置を用いることができる。たとえば攪拌装置にはいろいろな形状の物が存在し、単に棒・板・プロペラ状の攪拌子を槽内で一定速度・一方向に回転させるものが多いが、攪拌子を間欠回転させたり逆回転させる場合もある。特殊な状況では複数の攪拌子を並べ交互に逆回転させたり、槽側に攪拌子と組合された突起あるいは板を取り付けて攪拌子が発生するせん断応力を増強させるなどの様々な工夫がなされる。攪拌子への動力伝達方法も様々であり、回転軸を介して攪拌子を回転させるものが殆どであるが、磁石を封入しテフロン（登録商標）等でコーティングした攪拌子を容器の外部から回転する磁界で動力を伝達するマグネチックスターラーも存在する。攪拌子のサイズ（半径）や毎分回転数などの条件は、本発明の作用効果や公知の攪拌乳化法における条件を考慮しながら、適切な範囲で調整すればよい。

[0054] 二次乳化工程におけるその他の条件、たとえば、W1/Oエマルジョンと水性溶媒（W2）の体積比、W1/O/W2エマルジョンの平均粒径などは、公知のリポソームの製造方法（二次乳化工程）に準じて、最終的に調製するリポソームの用途などを考慮しながら適宜調節することができる。

[0055] さらに、二次乳化工程では、水性溶媒（W2）およびW1/Oエマルジョンに、必要に応じて混合脂質成分（F2）や、混合脂質成分（F2）の一部として或いはこれに代えて、混合脂質成分（F1）を添加してもよく、またそれらリポソーム脂質膜を破壊しない水溶性乳化剤を添加してもよい。界面化学の分野では多くの乳化剤が知られており、代表的には、タンパク質、多糖類、イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤などが、水溶性乳化剤として乳化・分散プロセスに用いられている。

[0056] 上記タンパク質としては、ゼラチン（コラーゲンを加熱により変性させた可溶性のタンパク質）、アルブミンやトリプシンなどが挙げられる。ゼラチンは通常、数千～数百万の分子量分布を有するが、たとえば重量平均分子量が1,000～100,000であるものが好ましい。医療用ないし食品用として市販されているゼラチンを用いることができる。アルブミンには、卵ア

ルブミン（分子量約45,000）、血清アルブミン（分子量約66,000…ウシ血清アルブミン）、乳アルブミン（分子量約14,000… α -ラクトアルブミン）などが含まれ、たとえば卵アルブミンである乾燥脱糖卵白が好ましい。

[0057] 上記多糖類としては、デキストラン、デンプン、グリコーゲン、アガロース、ペクチン、キトサン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、キサンタンガム、ローカストビーンガム、グァーガム、マルトトリオース、アミロース、プルラン、ヘパリン、デキストリンなどが挙げられ、たとえば重量平均分子量が1,000~100,000のデキストランが好ましい。

[0058] 上記イオン性界面活性剤としては、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0059] 上記非イオン性界面活性剤としては、オクチルグルコシド等のアルキルグリコシド、ポリアルキレンオキサイド化合物、たとえば「Tween 80」（東京化成工業株式会社、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート、分子量1309.68）や「プルロニック F-68」（BASF、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール、数平均分子量9600）の製品や、重量平均分子量が1000~100000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。ポリエチレングリコール(PEG)は、製品として「ユニループ」（日油株式会社）、GL4-400NP、GL4-800NP（日油株式会社）、PEG200,000（和光純薬）、マクロゴール（三洋化成工業株式会社）などが挙げられる。

[0060] 分子量は、小さすぎると脂質膜中に混入しやすくなってリポソームの形成を阻害するおそれがあり、逆に大きすぎるとW1/O/W2エマルジョンの外水相中への分散や界面への配向の速度が遅れてリポソームの合一や多胞リポソームの形成につながるおそれがある。そのため、水溶性乳化剤の重量平均分子量は1,000~100,000の範囲内にあることが好ましい。また、この範囲の重量平均分子量であると、リポソームの薬剤の内包率が良い。

[0061] 上記のようにして混合脂質成分（F2）および／または水溶性乳化剤を用

いる場合の各種の条件、たとえば、それらの量や、水性溶媒（W2）およびW1/Oエマルジョンとの混合態様（添加順序等）は特に限定されるものではなく、公知のリポソームの製造方法に準じて、適切なものとするればよい。たとえばF2が主として水溶性脂質からなる場合、あらかじめそのようなF2および/または水溶性乳化剤をW2に添加しておき、それにW1/Oエマルジョンを添加して乳化処理を行うことができる。一方、F2が主として脂溶性脂質からなる場合、あらかじめ（W1/Oエマルジョン調製後）そのようなF2をW1/Oエマルジョンの油相に添加しておき、それを、必要に応じて水溶性乳化剤が添加されているW2に添加して乳化処理を行うことができる。

[0062] (3) 溶媒除去工程

溶媒除去工程は、前記二次乳化工程により得られたW1/O/W2エマルジョンに含まれる有機溶媒相（O）を除去し、リポソームを形成させる工程である。すなわち、W1/O/W2エマルジョンを回収し、開放容器内に移し静置あるいは攪拌することで、W1/O/W2エマルジョンに含まれる有機溶媒（O）を蒸発除去することができる。これにより、混合脂質膜成分（F1）（および必要に応じて添加される（F2））からなる脂質膜を内水相の周囲に形成し、リポソームを得ることができる。

[0063] 上記のような方法によるW1/O/W2エマルジョンから溶媒を除去は、定法に従い、必要に応じて加温、減圧、攪拌を用いながら行えばよい。有機溶媒（O）に含まれる化合物の種類に応じて、それらの有機溶媒が突沸することのない条件範囲が設定される。温度条件は0～60℃の範囲が好ましく、0～25℃がより好ましい。また、減圧条件は溶媒の飽和蒸気圧～大気圧の範囲内に設定されることが好ましく、溶媒の飽和蒸気圧の+1%～10%の範囲内に設定されることがより好ましい。異なる溶媒を混合して用いる場合、より飽和蒸気圧の高い溶媒種に合わせた条件が好ましい。これらの除去条件は、溶媒が突沸しない範囲で組み合わせてもよく、例えば、熱に弱い薬剤を使用する際は、より低温側でかつ減圧条件で溶媒を溜去することが好ま

しい。溶媒除去にはW1/O/W2エマルションの攪拌が無くともよいが、攪拌をしたほうがより均一に溶媒除去が進む。

[0064] なお、上記のような製造方法により得られるリポソームには、製法の工程上、W/O/Wエマルション由来の多胞リポソームがある程度の割合含まれることがあるが、これを減じるために、攪拌、減圧、またはそれらの組み合わせを行うことが効果的である。たとえば、溶媒の大半が抜ける時間より長く減圧および攪拌を行なうことにより、リポソームを構成する脂質の水和が進み、内包物の漏出を起こさないまま、多胞リポソームが解けて単胞のリポソーム状態にばらけることが可能である。また、本法で副生する、あるいは残存する多胞リポソームはその内部がW/O由来の50~200nm程度の水滴を多く含む構造であるので、W/Oの粒子径よりもわずかに大きな孔径のフィルターを通過させることで、50~200nm程度の単胞リポソームへ変換することも可能である。このような操作をしても残った多胞リポソームがある場合には、フィルターにより除去することもできる。

実施例

[0065] <カルセイン内包リポソーム>

[実施例1]

1. 一次乳化工程 (W1/Oエマルションの調製)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社) 0.3g、コレステロール (Chol) 0.152gおよびオレイン酸 (OA) 0.108gを含むヘキサン15mLを有機溶媒相 (O) とし、カルセイン (0.4mM) およびM-LysoPC (ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン (リゾレシチン)、日油株式会社、ClogP=6.7) 0.010gを含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) 5mLを内水相用の水分散相 (W1) とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置 (UH-600S、株式会社エスエムテ) により、25℃にて15分間超音波を照射し (出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、

この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約200nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は29%であった。

[0066] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルションの調製)

続いて、上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相とし、実験用デッドエンド型マイクロチャネル乳化装置モジュールを使用して、マイクロチャネル乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。

[0067] 上記モジュールのマイクロチャネル基板はシリコン製であり、マイクロチャネル基板のテラス長、チャネル深さおよびチャネル幅はそれぞれ約60μm、約11μmおよび約16μmであった。上記マイクロチャネル基板にガラス板を圧着させてチャネルを形成し、このチャネルの出口側に外水相溶液(W2)である3%のアルカリ処理ゼラチン(等電点約5)を含むトリス塩酸緩衝液(pH8、50mmol/L)を満たしておき、チャネルの入口側から前記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションを製造した。

[0068] 3. 溶媒除去工程 (リポソームの水性懸濁液の調製)

次に、上記W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで15分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替え、室温下で約20時間、攪拌子により攪拌し、ヘキサンを揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。カルセインの内包率は71%であった。

[0069] [実施例2]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで360分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は68%であった。

[0070] [実施例3]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで360分振とうしたのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は61%であった。

[0071] [比較例1]

1. 一次乳化工程 (W1/Oエマルジョンの調製)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社) 0.3g、コレステロール (Chol) 0.152gおよびオレイン酸 (OA) 0.108gを含むヘキサン15mLを有機溶媒相 (O) とし、カルセイン (0.4mM) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) 5mLを内水相用の水分散相 (W1) とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプローブをセットした超音波分散装置 (UH-600S、株式会社エスエムテ) により、25°Cにて15分間超音波を照射し (出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルジョンは体積平均粒径約200nmの単分散W/Oエマルジョンであることが確認され、CV値は29%であった。

[0072] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルジョンの調製)

続いて、上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルジョンを分散相とし、実験用デッドエンド型マイクロチャネル乳化装置モジュールを使用して、マイクロチャネル乳化法によるW1/O/W2エマルジョンの製造を行った。

[0073] 上記モジュールのマイクロチャネル基板はシリコン製であり、マイクロチャネル基板のテラス長、チャネル深さおよびチャネル幅はそれぞれ約60μm、約11μmおよび約16μmであった。上記マイクロチャネル基板にガラス板を圧着させてチャネルを形成し、このチャネルの出口側に外水相溶液 (W2) である3%のアルカリ処理ゼラチン (等電点約5) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) を満たしておき、チャネルの入口

側から前記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションを製造した。

[0074] 3. 溶媒除去工程（リポソームの水性懸濁液の調製）

次に、上記W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で15分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替え、室温下で約20時間、攪拌子により攪拌し、ヘキサンを揮発させた。微細なリポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。カルセインの内包率は65%であった。

[0075] [比較例2]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で360分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は比較例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は48%であった。

[0076] [比較例3]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で360分振とうしたのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は比較例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は31%であった。

[0077] [実施例4]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにS-LysoPC（ステアロイル基を有するリゾホスファチジルコリン、日油株式会社、ClogP=8.7）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は73%であった。

[0078] [実施例5]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにS-LysoPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0079] [実施例6]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにS-LysoPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は65%であった。

[0080] [実施例7]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Na（ジラウロイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩、日油株式会社、ClogP=9.02）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は82%であった。

[0081] [実施例8]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は77%であった。

[0082] [実施例9]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は71%であった。

[0083] [実施例10]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりに短鎖リン脂質DDPC（ジデカノイルホスファチジルコリン、日油株式会社、ClogP=10）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0084] [実施例11]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりに短鎖リン脂質DDPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0085] [実施例12]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりに短鎖リン脂質DDPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

濁液を調製した。カルセインの内包率は66%であった。

[0086] [実施例13]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPEGリン脂質「PM020CN」（ジミリストイルホスファチジルエタノールアミンにPEG鎖（数平均分子量約2000）を導入したPEGリン脂質、日油株式会社、ClogP=8）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は81%であった。

[0087] [実施例14]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPEGリン脂質「PM020CN」を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は75%であった。

[0088] [実施例15]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPEGリン脂質「PM020CN」を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は77%であった。

[0089] [実施例16]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりに、国際公開WO2008/081686に記載の方法（合成例1参照）に従って調製した合成ステロールman-3-chol（コレステロールの3位にマンノースを導入した化合物、ClogP=9.5）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は74%であった。

[0090] [実施例17]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにman-3-cholを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0091] [実施例18]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにman-3-cholを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を

調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0092] [比較例4]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPE（ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、日油株式会社、ClogP=11.2）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0093] [比較例5]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は60%であった。

[0094] [比較例6]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は33%であった。

[0095] [比較例7]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、日油株式会社、ClogP=18.9）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0096] [比較例8]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は52%であった。

[0097] [比較例9]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は40%であった。

[0098] [比較例10]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPE（ジエルコイルホスファチジルエタノールアミン、日油株式会社、ClogP=24.5）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は71%であった。

[0099] [比較例11]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は51%であった。

[0100] [比較例12]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPEを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は39%であった。

[0101] [比較例13]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Na（ジステアロイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩、日油株式会社、ClogP=16.7）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は69%であった。

[0102] [比較例14]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は56%であった。

[0103] [比較例15]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は38%であった。

[0104] [比較例16]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPG-Na（ジエルコイルホスファチジルエタノールアミンナトリウム塩、日油株式会社、ClogP=22.5）を内

水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は70%であった。

[0105] [比較例17]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPE-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は55%であった。

[0106] [比較例18]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDEPE-Naを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は40%であった。

[0107] [比較例19]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPC（ジラウロイルホスファチジルコリン、日油株式会社、 $C_{logP}=12.2$ ）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は72%であった。

[0108] [比較例20]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は52%であった。

[0109] [比較例21]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は44%であった。

[0110] [比較例22]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDPPC（ジパルミトイルホスファチジルコリン、日油株式会社、 $C_{logP}=17.8$ ）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は75%であった。

[0111] [比較例 2 3]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDPPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は55%であった。

[0112] [比較例 2 4]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDPPCを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は40%であった。

[0113] [比較例 2 5]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンにPEG鎖（数平均分子量約2000）を導入したPEGリン脂質、日油株式会社、ClogP=13.6）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は80%であった。

[0114] [比較例 2 6]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は60%であった。

[0115] [比較例 2 7]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は38%であった。

[0116] [比較例 2 8]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりに、国際公開WO2008/081686に記載の方法（合成例13参照）に従って調製した合成ステロールman-6-cho1（コレステロールの6位にマンノースを導入した化合物、ClogP=11.1）を内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例1と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は74%であった。

[0117] [比較例 29]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにman-6-cholを内水相 (W1) に溶解させたこと以外は実施例2と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は58%であった。

[0118] [比較例 30]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにman-6-cholを内水相 (W1) に溶解させたこと以外は実施例3と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。カルセインの内包率は45%であった。

[0119]

[表1]

表1 カルセイン内包リポソームの内包率

水溶性脂質成分	ClogP	2次乳化	添加剤	カルセインの内包率(%)		
				W1/O/W2作成から溶媒除去工程移行までの間 15分静置	360分静置	360分振盪
添加なし	-	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	65	48	31
リゾレシチン						
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社	6.7	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	71	68	61
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社	8.7	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	73	70	65
Phosphatidylethanolamine 日油株式会社	11.2	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	70	60	33
Phosphatidylethanolamine 日油株式会社	18.9	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	70	52	40
Phosphatidylethanolamine 日油株式会社	24.5	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	71	51	39
Phosphatidylglycerol 日油株式会社	9.02	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	82	77	71
Phosphatidylglycerol 日油株式会社	16.7	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	69	56	38
Phosphatidylglycerol 日油株式会社	22.5	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	70	55	40
短鎖リン脂質						
日油株式会社	10	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	70	70	66
日油株式会社	12.2	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	72	52	44
日油株式会社	17.8	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	75	55	40
PEGリン脂質						
PEG2000 日油株式会社	8	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	81	75	77
日油株式会社	13.6	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	80	60	38
合成ステロール						
man-3-cholesterol WO2008/081686:合成例1	9.5	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	74	70	70
man-6-cholesterol WO2008/081686:合成例13	11.1	マイクロ手ヤンネル	ゼラチン	74	58	45

添加なし

リゾレシチン

Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社

Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社

Phosphatidylethanolamine 日油株式会社

Phosphatidylethanolamine 日油株式会社

Phosphatidylethanolamine 日油株式会社

Phosphatidylglycerol 日油株式会社

Phosphatidylglycerol 日油株式会社

Phosphatidylglycerol 日油株式会社

短鎖リン脂質

日油株式会社

日油株式会社

日油株式会社

PEGリン脂質

PEG2000

日油株式会社

日油株式会社

合成ステロール

man-3-cholesterol

man-6-cholesterol

WO2008/081686:合成例1

WO2008/081686:合成例13

[0120] <シタラビン内包リポソーム>

[実施例19]

1. 一次乳化工程 (W1/Oエマルションの調製)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社) 0.3g、コレステロール (Chol) 0.152gおよびオレイン酸 (OA) 0.108gを含むヘキサン15mLを有機溶媒相 (O) とし、シタラビン (80mM) およびM-LysoPC (ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン (リゾレシチン)、日油株式会社、ClogP=6.7) 0.010gを含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) 5mLを内水相用の水分散相 (W1) とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置 (UH-600S、株式会社エスエムテ) により、25℃にて15分間超音波を照射し (出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約200nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は29%であった。

[0121] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルションの調製)

続いて、上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相とし、実験用デッドエンド型マイクロチャネル乳化装置モジュールを使用して、マイクロチャネル乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。

[0122] 上記モジュールのマイクロチャネル基板はシリコン製であり、マイクロチャネル基板のテラス長、チャネル深さおよびチャネル幅はそれぞれ約60μm、約11μmおよび約16μmであった。上記マイクロチャネル基板にガラス板を圧着させてチャネルを形成し、このチャネルの出口側に外水相溶液 (W2) である3%のアルカリ処理ゼラチン (等電点約5) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) を満たしておき、チャネルの入口側から前記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルション

を製造した。

[0123] 3. 溶媒除去工程（リポソームの水性懸濁液の調製）

次に、上記W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で15分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替え、室温下で約20時間、攪拌子により攪拌し、ヘキサンを揮発させた。微細なリポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。シタラビンの内包率は47%であった。

[0124] [実施例20]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で360分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例19と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は43%であった。

[0125] [実施例21]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で360分振とうしたのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例19と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は40%であった。

[0126] [実施例22]

1. 一次乳化工程（W1/Oエマルジョンの調製）

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」（日油株式会社）0.3g、コレステロール（Chol）0.152gおよびオレイン酸（OA）0.108gを含むヘキサン15mLを有機溶媒相（O）とし、シタラビン（80mM）およびM-LysoPC（ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン（リゾレシチン）、日油株式会社、ClogP=6.7）0.010gを含むトリス-塩酸緩衝液（pH8、50mmol/L）5mLを内水相用の水分散相（W1）とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置（UH-600S、株式会社エスエムテ）により、25℃にて15分間超音波を照射し

(出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約200nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は29%であった。

[0127] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルションの調製)

得られたW1/Oエマルションを分散相として、SPG膜乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。SPG膜乳化装置 (SPGテクノ社製、商品名「外圧式マイクロキット」) に直径10mm、長さ20mm、細孔径10 μ mの円筒形SPG膜を用い、装置出口側に外水相溶液 (W2) である3%のアルカリ処理ゼラチン (等電点約5) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH7.4、50mM) を満たしておき、装置入口側から上記W1/Oエマルションを供給して、W1:W2が1:40となるようにW1/O/W2エマルションを製造した。

[0128] 3. 溶媒除去工程 (リポソームの水性懸濁液の調製)

次に、上記W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで15分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替え、室温下で約20時間、攪拌子により攪拌し、ヘキサンを揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。シタラビンの内包率は50%であった。

[0129] [実施例23]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで360分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例22と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は46%であった。

[0130] [実施例24]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20°Cで360分振とうしたのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例22と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した

。シタラビンの内包率は40%であった。

[0131] [実施例25]

1. 一次乳化工程 (W1/Oエマルションの調製)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社) 0.3g、コレステロール (Chol) 0.152gおよびオレイン酸 (OA) 0.108gを含むヘキサン15mLを有機溶媒相 (O) とし、シタラビン (80mM) およびM-LysoPC (ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン (リゾレシチン)、日油株式会社、ClogP=6.7) 0.010gを含むトリス-塩酸緩衝液 (pH8、50mmol/L) 5mLを内水相用の水分散相 (W1) とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置 (UH-600S、株式会社エスエムテ) により、25℃にて15分間超音波を照射し (出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約200nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は29%であった。

[0132] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルションの調製)

得られたW1/Oエマルションを分散相とし、3%のアルカリ処理ゼラチン (等電点約5) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH7.4、50mM) の水分散相 (W2) を外水相として、攪拌乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。攪拌乳化は、スターラーによりW2を強く攪拌しているところに、上記W1/Oエマルションを供給し、W1:W2が1:40となるようにW1/O/W2エマルションを製造した。

[0133] 3. 溶媒除去工程 (リポソームの水性懸濁液の調製)

次に、上記W1/O/W2エマルションを密閉したサンプル瓶に入れて20℃で15分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替え、室温下で約20時間、攪拌子により攪拌し、ヘキサンを揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認

された。シタラビンの内包率は50%であった。

[0134] [実施例26]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶にいれて20°Cで360分静置したのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例25と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は43%であった。

[0135] [実施例27]

溶媒除去工程において、W1/O/W2エマルジョンを密閉したサンプル瓶にいれて20°Cで360分振とうしたのち蓋のない開放ガラス製容器に移し替えたこと以外は実施例25と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は39%であった。

[0136] [実施例28]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Naを内水相(W1)に溶解させたこと以外は実施例22と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は49%であった。

[0137] [実施例29]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Naを内水相(W1)に溶解させたこと以外は実施例23と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は48%であった。

[0138] [実施例30]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDLPG-Naを内水相(W1)に溶解させたこと以外は実施例24と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は45%であった。

[0139] [実施例31]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相(W1)に溶解させたこと以外は実施例25と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は53%であった。

[0140] [実施例32]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例26と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は51%であった。

[0141] [実施例33]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相（W1）に溶解させたこと以外は実施例27と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は53%であった。

[0142] [実施例34]

一次乳化工程においてM-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相（W1）に溶解させたこと、また二次乳化工程において3%のアルカリ処理ゼラチン（等電点約5）の代わりに0.1%のプルロニックF-68（ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール、数平均分子量9600、登録商標、非イオン界面活性剤プロノン(#188P, 日油株式会社)を含むトリスー塩酸緩衝液（pH8、50mmol/L）を用いたこと以外は、実施例19と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は60%であった。

[0143] [実施例35]

一次乳化工程においてM-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相（W1）に溶解させたこと、また二次乳化工程において3%のアルカリ処理ゼラチン（等電点約5）の代わりに0.1%のプルロニックF-68を含むトリスー塩酸緩衝液（pH8、50mmol/L）を用いたこと以外は、実施例20と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は60%であった。

[0144] [実施例36]

一次乳化工程においてM-LysoPCの代わりにPM020CNを内水相（W1）に溶解させたこと、また二次乳化工程において3%のアルカリ処理ゼラチン（等電点約5）の代わりに0.1%のプルロニックF-68を含むトリスー塩酸緩衝液（pH8、50mmol/L）を用いたこと以外は、実施例21と同様にし

て、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は52%であった。

[0145] [比較例31]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例19と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は40%であった。

[0146] [比較例32]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例20と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は32%であった。

[0147] [比較例33]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例21と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は12%であった。

[0148] [比較例34]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例22と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は43%であった。

[0149] [比較例35]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例23と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は30%であった。

[0150] [比較例36]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこと以外は実施例24と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は20%であった。

[0151] [比較例37]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相(W1)に溶解させなかったこ

と以外は実施例 2 5 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 4 3 %であった。

[0152] [比較例 3 8]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相 (W 1) に溶解させなかったこと以外は実施例 2 6 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 3 4 %であった。

[0153] [比較例 3 9]

一次乳化工程において、M-LysoPCを内水相 (W 1) に溶解させなかったこと以外は実施例 2 7 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 2 3 %であった。

[0154] [比較例 4 0]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Naを内水相 (W 1) に溶解させたこと以外は実施例 2 2 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 4 9 %であった。

[0155] [比較例 4 1]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Naを内水相 (W 1) に溶解させたこと以外は実施例 2 3 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 3 9 %であった。

[0156] [比較例 4 2]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPG-Naを内水相 (W 1) に溶解させたこと以外は実施例 2 4 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 2 6 %であった。

[0157] [比較例 4 3]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相 (W 1) に溶解させたこと以外は実施例 2 5 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 5 1 %であった。

[0158] [比較例 4 4]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相 (W 1) に溶

解させたこと以外は実施例 2 6 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 4 0 %であった。

[0159] [比較例 4 5]

一次乳化工程において、M-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相 (W 1) に溶解させたこと以外は実施例 2 7 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 3 2 %であった。

[0160] [比較例 4 6]

一次乳化工程においてM-LysoPCを内水相 (W 1) に溶解させなかったこと、また二次乳化工程において 3 %のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0. 1 %のプルロニックF-68を含むトリス-塩酸緩衝液 (p H 8、5 0 m m o l / L) を用いたこと以外は、実施例 1 9 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 4 4 %であった。

[0161] [比較例 4 7]

一次乳化工程においてM-LysoPCを内水相 (W 1) に溶解させなかったこと、また二次乳化工程において 3 %のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0. 1 %のプルロニックF-68を含むトリス-塩酸緩衝液 (p H 8、5 0 m m o l / L) を用いたこと以外は、実施例 2 0 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 3 0 %であった。

[0162] [比較例 4 8]

一次乳化工程においてM-LysoPCを内水相 (W 1) に溶解させなかったこと、また二次乳化工程において 3 %のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0. 1 %のプルロニックF-68を含むトリス-塩酸緩衝液 (p H 8、5 0 m m o l / L) を用いたこと以外は、実施例 2 1 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 2 2 %であった。

[0163] [比較例 4 9]

一次乳化工程においてM-LysoPCの代わりにDSPE020を内水相 (W 1) に溶解させたこと、また二次乳化工程において 3 %のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0. 1 %のプルロニックF-68を含むトリス-塩酸緩衝液

(pH 8、50 mmol/L) を用いたこと以外は、実施例 19 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 58% であった。

[0164] [比較例 50]

一次乳化工程において M-LysoPC の代わりに DSPE020 を内水相 (W1) に溶解させたこと、また二次乳化工程において 3% のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0.1% のプルロニック F-68 を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8、50 mmol/L) を用いたこと以外は、実施例 20 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 44% であった。

[0165] [比較例 51]

一次乳化工程において M-LysoPC の代わりに PM020CN を内水相 (W1) に溶解させたこと、また二次乳化工程において 3% のアルカリ処理ゼラチン (等電点約 5) の代わりに 0.1% のプルロニック F-68 を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8、50 mmol/L) を用いたこと以外は、実施例 21 と同様にして、リポソームの水性懸濁液を調製した。シタラビンの内包率は 32% であった。

[0166]

[表2]

表2 シタラピン内包リボソームの内包率

水溶性脂質成分	ClogP	2次乳化	添加剤	シタラピンの内包率(%)			
				W1/O/W2 15分静置	作成から溶媒除去工程移行までの間 360分静置	360分振盪	
添加なし	-	マイクロチャンネル	ゼラチン	40	32	12	比較例31~33
添加なし	-	SPG	ゼラチン	43	30	20	比較例34~36
添加なし	-	攪拌	ゼラチン	43	34	23	比較例37~39
添加なし	-	マイクロチャンネル	プルロニック	44	30	22	比較例46~48
リゾレシチン							
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC	6.7	マイクロチャンネル	ゼラチン	47	43	40	実施例19~21
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC	6.7	SPG	ゼラチン	50	46	40	実施例22~24
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC	6.7	攪拌	ゼラチン	50	43	39	実施例25~27
Phosphatidylglycerol 日油株式会社 DLPG-Na	9.02	SPG	ゼラチン	49	48	45	実施例28~30
Phosphatidylglycerol 日油株式会社 DSPG-Na	16.7	SPG	ゼラチン	49	39	26	比較例40~42
PEGリン脂質							
PEG2000 日油株式会社 PM020CN	8	攪拌	ゼラチン	53	51	53	実施例31~33
PEG2000 日油株式会社 DSPE020	13.6	攪拌	ゼラチン	51	40	32	比較例43~45
PEG2000 日油株式会社 PM020CN	8	マイクロチャンネル	プルロニック	60	60	52	実施例34~36
PEG2000 日油株式会社 DSPE020	13.6	マイクロチャンネル	プルロニック	58	44	32	比較例49~51

[0167] <造影剤内包リポソーム>

[実施例37]

1. 一次乳化工程 (W1/Oエマルションの調製)

オムニパーク350 (イオヘキソール含有量 750 mg/mL, 10 mPa·s) 0.25 mL に M-LysoPC (ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン (リゾレシチン)、日油株式会社、 $C_{logP}=6.7$) 0.010 g を溶解させて内水相 (W1) とし、DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン、「MC-6060」、日油株式会社) 50 mg、および DPPG (ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、「COATSOME MG-6060LA」、日油株式会社) 10 mg を含む混合溶媒 (ヘキサン/ジクロロメタン=3/1) 1.25 mL を有機溶媒相 (O) とした。3.5 mL のサンプル瓶にこれらの混合液を入れ、 $\phi 7$ mm のプローブをセットした超音波分散装置 (UH-600S、株式会社エスエムテ) により、20°C にて 15 分間超音波を照射し乳化処理を行った。

[0168] 2. 二次乳化工程 (W1/O/W2エマルションの調製)

得られた W1/Oエマルションを、0.1% のプルロニック F68 を含む トリス-塩酸緩衝液 (W2、pH 7.4、50 mM) 15 mL 中にスターラー攪拌下で添加し、15 分間攪拌して、W1/O/W2エマルションを製造した。

[0169] 3. 溶媒除去工程 (リポソームの水性懸濁液の調製)

得られた W1/O/W2エマルションを密閉容器に移し替え、20°C・500 mbar の減圧条件下で約 8 時間攪拌し、次いで 20°C・180 mbar の減圧条件下で約 8 時間攪拌し、段階的に溶媒を揮発させた。得られたリポソーム懸濁液は半透明の黄色であり、この粒子内には造影剤イオヘキソールが含まれていることが確認された。リポソームのイオヘキソール内包率は 48% であった。

[0170] [比較例52]

一次乳化工程において、M-LysoPC を内水相 (W1) に溶解させなかったこ

と以外は実施例 37 と同様にしてリポソームの水性懸濁液を調製した。イオヘキソールの内包率は 39%であった。

[0171]

[表3]

表3 イオヘキソール内包リポソームの内包率

水溶性脂質成分		ClogP	2次乳化	添加剤	イオヘキソールの内包率
リゾレシチン					
Lyso-Phosphatidylcholine	日油株式会社 M-LysoPC	6.7	攪拌	プルロニック	48
添加なし		-	攪拌	プルロニック	39

実施例37
比較例52

[実施例 38]

内水相 (W1) として、等張 PBS 溶液 0.25 mL に siRNA (ランダム配列) 10 mg および M-LysoPC (ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン (リゾレシチン)、日油株式会社、 $C_{logP}=6.7$) 0.010 g を溶解させた溶液を用いたこと、および外水相 (W2) として 0.1% のプルロニック F68 を含む等張 PBS 溶液を用いたこと以外は実施例 37 と同様にしてリポソームの水性懸濁液を調製した。siRNA の内包率は 57% であった。

[0173] [比較例 53]

一次乳化工程において、M-LysoPC を内水相 (W1) に溶解させなかったこと以外は実施例 38 と同様にしてリポソームの水性懸濁液を調製した。siRNA の内包率は 48% であった。

[0174]

[表4]

表4 siRNA内包リポソームの内包率

水溶性脂質成分	ClogP	2次乳化	添加剤	siRNAの内包率(%)
リゾレシチン Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC 添加なし	6.7 -	攪拌 攪拌	ブルロニック ブルロニック	57 48
				実施例38 比較例53

[0175] [実施例39] (SPG2次乳化で20倍スケールアップ)

(一次乳化工程によるW1/Oエマルションの製造)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社製)6.0g、コレステロール(Chol)3.04gおよびオレイン酸(OA)2.16gを含む混合溶媒(ヘキサン:ジクロロメタン=8:2)300mLを有機溶媒相(O)とし、シタラビン(MW243.22, 20mg/mL, 80mM)およびM-LysoPC(ミリストイル基を有するリゾホスファチジルコリン(リゾレシチン)、日油株式会社、ClogP=6.7)0.20gを含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4, 50mmol/L)100mLを内水相用の水分散相(W1)とした。高圧ホモジナイザー(ナノマイザー、吉田機械興業社製)を用いて100MPaの圧力条件で一次乳化工程の処理を行った。得られたW1/Oエマルションの室温下での平均粒径は137nmであった。

[0176] (二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造)

上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相として、SPG乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。SPG膜乳化装置(SPGテクノ社製、商品名「高速ミニキットKH-125」)に直径10mm、長さ125mm、細孔径1.0 μ mの円筒形SPG膜用い、装置出口側に外水相溶液(W2)である3%のアルカリ処理ゼラチン(等電点約5)を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4, 50mmol/L)を満たしておき、装置入口側から上記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションを製造した。膜乳化に必要とした圧力は約10kPaであった。

[0177] (有機溶媒相の除去によるリポソームの製造)

上記二次乳化工程により得られたW1/O/W2エマルションを密閉容器に移し替え、500mbarの減圧室温条件下で約4時間攪拌し、次いで180mbarの減圧室温条件下で約18時間攪拌し、溶媒を揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはシタラビンが含まれていることが確認された。得られたりポソームのシタラビン内包率は47%

であった。

[0178] (考察) 処理量の増加に伴い、SPG膜乳化に90分かかった。その後20°Cで270分静置してから有機溶媒の除去を実施したので、おおよそ実施例23と同様の静置を実施したことになる。スケールアップ実験においても実施例23と同様のシタラビン内包率を得ることができた。

[0179] [実施例40] (攪拌2次乳化で20倍スケールアップ)

二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造において、外水相溶液(W2)である3%のアルカリ処理ゼラチン(等電点約5)を含むトリスー塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)を用いて攪拌乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行ったこと以外は実施例39と同様に実験した。攪拌乳化は、スターラーによりW2を強く攪拌しているところに、上記W1/Oエマルションを供給し、W1:W2が1:40となるようにW1/O/W2エマルションを製造した。得られたリポソームのシタラビン内包率は47%であった。

[0180] (考察) 処理量の増加に伴い、攪拌時間を30分とした。その後20°Cで330分静置してから有機溶媒の除去を実施したので、おおよそ実施例26と同様の静置を実施したことになる。スケールアップ実験においても実施例26と同様のシタラビン内包率を得ることができた。

[0181] (考察2) 攪拌2次乳化によるリポソーム製造法は、マイクロカプセル化法(たとえばIshii et al., J. Dispers. Sci. Technol., vol.9, No.1, pp.1-15, 1988. 参照)として知られているが、内包する薬剤によっては高い内包率を実現できない。せん断力によってやわらかいW/O/W粒子が壊れて内包された薬剤が外に出てしまうのが原因と考えられ、内包率数%という結果に終わることもある。大きなスケールで攪拌効率を維持するためには大きなトルクで攪拌する必要があり、攪拌羽の近くの局所的にはせん断力が大きくなってしまうので、この傾向は顕著になる。しかしながら、水溶性脂質添加による膜を強化する効果が表れて大きなスケールでも再現性が得られたものと考えられる。

[0182] [表5]

表5 シタラビン内包リポソームの内包率(20倍スケールアップ)

水溶性脂質成分	ClogP	2次乳化	添加剤	W1/O/W2作成から溶媒除去工程移行までの間 270分静置	シタラビンの内包率(%) 330分静置
リンレシチン					
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC	6.7	SPG	ゼラチン	47	実施例39
Lyso-Phosphatidylcholine 日油株式会社 M-LysoPC	6.7	攪拌	ゼラチン		実施例40

[0183] (フィルターろ過)

実施例 3 1, 3 2, 3 3 および比較例 4 3, 4 4, 4 5 で得られたリポソーム懸濁液を顕微鏡で観察したところ多胞リポソームの存在が確認され、粒度分布測定結果もマイクロ粒子が確認できた。得られたリポソーム懸濁液をメンブランフィルタDISMIC (0.2 μm のセルロースアセテート製、アドバンテック東洋製) を 20°C で通過させることで、顕微鏡観察および粒度分布測定から多胞リポソームがなくなったことが確認でき、なおかつメンブランフィルタろ過の前後で内包率に変化がないことを確認できた。なお、他の実施例および比較例においては、多胞リポソームは観察されなかった。

[0184] (カルセインの内包率測定方法)

リポソーム水溶液 (3 mL) 全体の蛍光強度 (F_{total}) を分光光度計 (U-3310、日本分光株式会社) により測定した。次に 0.01 M, CaCl_2 トリス塩酸緩衝液 30 μL を加えて外水相に漏出したカルセインの蛍光を Ca^{2+} により消光することで、ベシクル内の蛍光強度 (F_{in}) を測定した。さらに、カルセインを加えないでサンプルと同じ条件でベシクルを作製し、脂質自身が発する蛍光 (F_{l}) を測定した。内包率は下記式より算出した；

$$\text{内包率 } E (\%) = (F_{\text{in}} - F_{\text{l}}) / (F_{\text{total}} - F_{\text{l}}) \times 100$$

(粒度分布の測定方法)

実施例および比較例の一次乳化工程で得られた W1/O エマルションの体積平均粒径および CV 値は、下記の方法に従って測定した。

[0185] W1/O エマルションをヘキサン/ジクロロメタン混合溶媒 (体積比: 1/1) で 10 倍に希釈し、動的光散乱式ナノトラック粒度分析計 (UPA-EX150、日機装株式会社) を用いて粒度分布を測定し、これに基づき体積平均粒径および CV 値 (= (標準偏差/体積平均粒径) $\times 100$ [%]) を算出した。また、リポソームの体積平均粒径は、同装置を用いて、作製したリポソーム懸濁液をそのまま測定した。

[0186] (シタラビンの内包率測定方法)

リポソーム粒子の懸濁液を超遠心条件のもと超遠心装置を用い成分分離し

、固形分(リポソーム)と上澄溶液とに含まれるシタラビンの量をそれぞれHPLC(カラム: VarianPolaris C18-A (3 μ m, 2x40mm))で定量した。固形分(リポソーム)の定量値、すなわちリポソームに内包されているシタラビンの量と、上澄溶液の定量値、すなわちリポソームに内包されていないシタラビンの量との合計値で、前者のリポソームに内包されているシタラビンの量を除した値に100を乗じて、シタラビンの内包率(%)を算出した。

[0187] (イオヘキソールの内包率測定方法)

造影剤用化合物(イオヘキソール)内包リポソームの分散液50 μ Lを採取し1.8%生理食塩水950 μ Lを加えて遠心分離(6,000rpm、20分)を行った。得られた上清および残渣(リポソーム)を完全に分離した後、各々アルコールを加えて溶解し20mLに仕上げた。波長約245nmにおける吸光度を測定し、内包造影剤用化合物の吸光度と造影剤用化合物の濃度の検量線に基づき、リポソームに内包される造影剤用化合物の質量および系内の全造影剤用化合物の質量を計算して、以下の式で造影剤用化合物の内包率を求めた。ここで、リポソーム内包造影剤用化合物質量は残渣から測定された造影剤用化合物質量、全造影剤用化合物質量は上清と残渣から測定された造影剤用化合物質量の和とする。

[0188] 造影剤用化合物内包率(%)

$$= \text{リポソーム内包造影剤用化合物質量} / \text{全造影剤用化合物質量} \times 100$$

(siRNAの内包率測定方法)

siRNAの内包率は、リポソーム液を超遠心分離して外液とリポソームを分離し、各siRNA量をHPLCで測定することで求めた。

[0189] (ClogPの算出方法)

分配係数は、実際に測定しなくても定量的構造活性相関アルゴリズムを用いた計算によって求めることができる。フラグメント法では、ある分子の分配係数を、その分子の部分構造ごとの分配係数の総和によって計算する。ソフトウェアChemDrawに搭載された計算プログラムで、フラグメントのClogP値を算出し、BioByte社が開発したフラグメントベースでのClogP値計算に準じ

、その値を加算して算出した。たとえばM-LysoPCはその構造式を二つのフラグメントに分けることができ、それぞれのClogPを計算すると5.18、1.42であるので、M-LysoPCのClogP値はそれらを加算して6.7とした。

請求の範囲

- [請求項1] C I o g Pの値が11より小さい脂質からなる水溶性脂質成分 (F w) が溶解した水性溶媒 (W 1) を内水相とすることを特徴とする単胞リポソーム。
- [請求項2] 前記水溶性脂質成分 (F w) が、リゾ脂質、短鎖リン脂質、PEG脂質および親水性基を有する化学合成脂質からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有するものである、請求項1に記載の単胞リポソーム。
- [請求項3] 前記水性溶媒 (W 1) にさらに水溶性薬剤が溶解している、請求項1または2に記載の単胞リポソーム。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載の単胞リポソームの乾燥粉末。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれかに記載の単胞リポソームを含有する、または請求項4に記載の乾燥粉末を水性溶媒に添加して得られる、水性懸濁液。
- [請求項6] 下記工程 (1) ～ (3) を含むことを特徴とする、単胞リポソームの製造方法：
- (1) 水性溶媒 (W 1) に水溶性脂質成分 (F w) を溶解し、有機溶媒 (O) に当該水溶性脂質 (F w) 以外の混合脂質成分 (F 1) を溶解し、これらを混合乳化することによりW 1 / Oエマルジョンを調製する一次乳化工程；
- (2) 上記工程 (1) を経て得られたW 1 / Oエマルジョンと水性溶媒 (W 2) とを混合乳化することによりW 1 / O / W 2エマルジョンを調製する二次乳化工程；
- (3) 上記工程 (2) を経て得られたW 1 / O / W 2エマルジョンに含まれる有機溶媒を除去することによりリポソームの水性懸濁液を調製する溶媒除去工程。
- [請求項7] 前記水溶性脂質成分 (F w) が、リゾ脂質、短鎖リン脂質、PEG脂質および親水性基を有する化学合成脂質からなる群より選ばれる少

なくとも1種を含有するものである、請求項6に記載の製造方法。

[請求項8] 前記一次乳化工程(1)がさらに水溶性薬剤を添加して行われるものである、請求項7に記載の製造方法。

[請求項9] 前記溶媒除去工程(3)がW1/O/W2エマルションの攪拌下に行われるものである、請求項7または8に記載の製造方法。

[請求項10] 請求項7~9のいずれかに記載の製造方法により製造された単胞リポソームあるいはその水性懸濁液またはその乾燥粉末。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/127(2006.01) i, B01J13/04(2006.01) i, A23L1/00(2006.01) n

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, B01J13/04, A23L1/00

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	1996-2011
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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2008/140081 A1 (Konica Minolta Holdings, Inc.), 20 November 2008 (20.11.2008), claims; paragraphs [0012], [0029]; example 1 & US 2010/0215582 A1 & EP 2153820 A1	1-5, 10 6-9
X A	JP 2008-120721 A (Konica Minolta Holdings, Inc.), 29 May 2008 (29.05.2008), paragraph [0020]; example 7 (Family: none)	1-5, 10 6-9
X A	JP 2006-280376 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 October 2006 (19.10.2006), examples 21, 27, 28 & US 2002/0111326 A1 & WO 1998/045463 A1	1-5, 10 6-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2011 (09.11.11)Date of mailing of the international search report
22 November, 2011 (22.11.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073847

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 11-171772 A (Sankyo Co., Ltd.), 29 June 1999 (29.06.1999), example 1 (Family: none)	1-5, 10 6-9
X A	JP 7-118142 A (Kao Corp.), 09 May 1995 (09.05.1995), examples (Family: none)	1-5, 10 6-9
X A	JP 61-267509 A (Junzo SUNAMOTO), 27 November 1986 (27.11.1986), example 1 (Family: none)	1-5, 10 6-9
X A	WO 2008/081686 A1 (Konica Minolta Holdings, Inc.), 10 July 2008 (10.07.2008), synthesis example 1; example 1 (Family: none)	1-5, 10 6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073847

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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

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

The inventions in claims 1-5 and 10 are disclosed in some of the following documents 1-7, and therefore cannot be considered to be novel and have no special technical feature.

(continued to extra sheet)

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073847

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Document 1: WO 2008/140081 A1

Document 2: JP 2008-120721 A

Document 3: JP 2006-280376 A

Document 4: JP 11-171772 A

Document 5: JP 7-118142 A

Document 6: JP 61-267509 A

Document 7: WO 2008/081686 A1

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, B01J13/04(2006.01)i, A23L1/00(2006.01)n

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, B01J13/04, A23L1/00

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 1971-2011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)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	WO 2008/140081 A1 (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2008.11.20, 特許請求の範囲、[0012]、[0029]、実施例1 & US 2010/0215582 A1 & EP 2153820 A1	1-5, 10 6-9
X A	JP 2008-120721 A (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2008.05.29, 【0020】、実施例7 (ファミリーなし)	1-5, 10 6-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 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</p>	<p>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</p>
---	---

国際調査を完了した日 09.11.2011	国際調査報告の発送日 22.11.2011
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) 遠藤 広介 電話番号 03-3581-1101 内線 3452
	4C 3953

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 2006-280376 A (第一製薬株式会社) 2006. 10. 19, 実施例 2 1、 2 7、2 8 & US 2002/0111326 A1 & WO 1998/045463 A1	1-5, 10
A		6-9
X	JP 11-171772 A (三共株式会社) 1999. 06. 29, 実施例 1 (ファミリー なし)	1-5, 10
A		6-9
X	JP 7-118142 A (花王株式会社) 1995. 05. 09, 実施例 (ファミリーな し)	1-5, 10
A		6-9
X	JP 61-267509 A (砂本順三) 1986. 11. 27, 実施例 1 (ファミリーな し)	1-5, 10
A		6-9
X	WO 2008/081686 A1 (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2008. 07. 10, 合成例 1、実施例 1 (ファミリーなし)	1-5, 10
A		6-9

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

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1-5、10に係る発明は、以下の文献1-7のいずれかに記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献1：WO 2008/140081 A1

文献2：JP 2008-120721 A

文献3：JP 2006-280376 A

文献4：JP 11-171772 A

文献5：JP 7-118142 A

文献6：JP 61-267509 A

文献7：WO 2008/081686 A1

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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