

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02008/087803**

発行日 平成22年5月6日 (2010.5.6)

(43) 国際公開日 **平成20年7月24日 (2008.7.24)**

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b> | A 6 1 K 9/127 | 4 C 0 5 3   |
| <b>A 6 1 K 47/24 (2006.01)</b> | A 6 1 K 47/24 | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 K 47/28 (2006.01)</b> | A 6 1 K 47/28 | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 38/44 (2006.01)</b> | A 6 1 K 37/50 |             |
| <b>A 6 1 P 17/18 (2006.01)</b> | A 6 1 P 17/18 |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2008-553979 (P2008-553979)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/073313  
 (22) 国際出願日 平成19年12月3日 (2007.12.3)  
 (31) 優先権主張番号 特願2007-7130 (P2007-7130)  
 (32) 優先日 平成19年1月16日 (2007.1.16)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

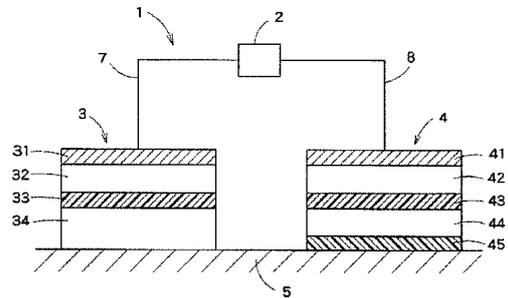
(71) 出願人 504173471  
 国立大学法人北海道大学  
 北海道札幌市北区北8条西5丁目  
 (71) 出願人 505046776  
 T T I ・エルビュー株式会社  
 東京都品川区東品川4丁目8番8号  
 (74) 代理人 100075812  
 弁理士 吉武 賢次  
 (74) 代理人 100091487  
 弁理士 中村 行孝  
 (74) 代理人 100094640  
 弁理士 紺野 昭男  
 (74) 代理人 100107342  
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化成分を封入したイオントフォーシス用リポソーム製剤

(57) 【要約】

本発明は、イオントフォーシスにより抗酸化成分を生体に投与するための製剤であって、抗酸化成分がリポソームに封入されてなることを特徴とするイオントフォーシス用リポソーム製剤に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

イオントフォレーシスにより抗酸化成分を生体に投与するための製剤であって、抗酸化成分がリポソームに封入されてなることを特徴とする、イオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 2】

前記抗酸化成分が抗酸化酵素である、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 3】

前記抗酸化酵素が、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）である、請求項 2 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。 10

## 【請求項 4】

前記抗酸化酵素が、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px）および/またはカタラーゼである、請求項 2 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 5】

前記抗酸化成分として、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px）およびカタラーゼのそれぞれが封入されたりポソームの組み合わせからなる、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 6】

前記リポソームが、カチオン性脂質、ならびに飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を構成成分として含んでなる、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。 20

## 【請求項 7】

紫外線に起因する皮膚障害の予防ないし治療のための、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 8】

毛孔を介して前記活性成分を生体に投与するための、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 9】

前記カチオン性脂質が、C1～C22 アシルオキシ基およびトリC1～C6 アルキルアンモニウム基で置換されたC1～C20 アルカンである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。 30

## 【請求項 10】

前記カチオン脂質における前記C1～C22 アシルオキシ基が 2 個であり、前記トリC1～C6 アルキルアンモニウム基が 1 個である、請求項 9 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 11】

前記カチオン性脂質が 1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム) プロパンである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 12】

前記両親媒性グリセロリン脂質がホスファチジルコリンである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。 40

## 【請求項 13】

前記両親媒性グリセロリン脂質が卵黄ホスファチジルコリンである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 14】

前記飽和脂肪酸がC12～C22の飽和脂肪酸である、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 15】

前記飽和脂肪酸が、パルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マル 50

ガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸およびベヘン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 16】

前記不飽和脂肪酸が炭素 - 炭素不飽和二重結合を 1 ~ 6 個含むものである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 17】

前記不飽和脂肪酸が C 14 ~ C 22 の不飽和脂肪酸である、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 18】

前記不飽和脂肪酸が、オレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、イワシ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものである、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 19】

前記リポソームが構成成分としてステロール類をさらに含んでなる、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 20】

前記ステロール類が、コレステロール、C 12 ~ C 31 脂肪酸コレステリルおよび C 12 ~ C 31 脂肪酸ジヒドロコレステリルおよびポリオキシエチレンコレステリルエーテルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのものである、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 21】

前記ステロール類が、コレステロール、ラノリン脂肪酸コレステリル、オレイン酸コレステリル、ノナン酸コレステリル、マカデミアナッツ脂肪酸コレステリルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのものである、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 22】

前記ステロール類がコレステロールである、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 23】

前記カチオン性脂質が 1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム) プロパンであり、

前記両親媒性グリセロリン脂質が卵黄ホスファチジルコリンであり、

前記ステロール類がコレステロールである、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 24】

前記カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質とのモル比が、3 : 7 ~ 7 : 3 である、請求項 6 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 25】

前記カチオン性脂質と、ステロール類とのモル比が、3 : 7 ~ 7 : 3 である、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 26】

前記両親媒性グリセロリン脂質と、ステロール類とのモル比が、3 : 7 ~ 7 : 3 である、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

【請求項 27】

前記カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質およびステロール類の和とのモル比が、3 : 7 ~ 7 : 3 である、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

。

10

20

30

40

50

## 【請求項 28】

前記カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質と、ステロール類とのモル比が、約 2 : 2 : 1 である、請求項 19 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 29】

前記リポソームの平均粒径が 400 nm 以上である、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 30】

前記リポソームの平均粒径が 400 ~ 1000 nm である、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 31】

前記リポソームが電流値  $0.1 \sim 0.6 \text{ mA/cm}^2$  でイオントフォレーシスにより生体に投与される、請求項 1 に記載のイオントフォレーシス用リポソーム製剤。

## 【請求項 32】

請求項 1 に記載のリポソーム製剤を保持している、イオントフォレーシスにより抗酸化成分を生体に投与するための電極構造体。

## 【請求項 33】

請求項 32 に記載の電極構造体を具備してなる、イオントフォレーシス装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の背景】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、イオントフォレーシス (iontophoresis) によって抗酸化成分を経皮的に投与する技術に関し、特に、イオントフォレーシスによって抗酸化成分を安定かつ効率的に毛孔の深部および毛孔周辺皮内組織に送達させることができ、紫外線に起因する皮膚障害の予防ないし治療に特に有用なイオントフォレーシス用リポソーム製剤に関するものである。

## 【0002】

背景技術

近年、オゾン層の破壊等の要因による紫外線量の増大が人体にもたらす影響が問題とされている。特に、紫外線に起因する皮膚障害は深刻な問題である。

## 【0003】

このような紫外線による皮膚障害は、皮膚の表面のみならず皮膚内部においても生じることが知られている。したがって、特に UVA のように皮膚内部にまで浸透する紫外線による皮膚障害を防止ないし治療するためには、皮膚内部での活性酸素の産生を効果的に阻害するか、いったん産生された活性酸素をすみやかに除去する必要がある。

しかしながら、従来 of 通常の技術では、このような皮膚内部で発生する活性酸素を除去することは困難であった。

## 【0004】

ところで、生体の所定部位の皮膚ないし粘膜 (以下、単に「皮膚」という) の表面上に配置されたイオン性の薬物に対してこのイオン性薬物を駆動させる起電力を皮膚に与えて、薬物を皮膚を介して体内に導入 (浸透) させる方法は、イオントフォレーシス (iontophoresis、イオントフォレーゼ、イオン導入法、イオン浸透療法) と呼ばれている (特開昭 63 - 35266 号等参照)。

## 【0005】

例えば、正電荷をもつイオンは、イオントフォレーシス装置の電気系統のアノード (陽極) 側において皮膚内に駆動 (輸送) される。一方、負電荷をもつイオンは、イオントフォレーシス装置の電気系統のカソード (陰極) 側において皮膚内に駆動 (輸送) される。イオントフォレーシスによれば、肝臓の初回通過効果を回避でき、薬物等の投与の開始および中断も簡単に制御できる。そこで、近年、イオントフォレーシスは、局所作用のみならず、全身作用を目的とした投与方法として注目されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

イオントフォレーシスにおいて、薬物は主に皮膚の角質層を介して生体に投与されるのが一般的である。しかしながら、角質層は脂溶性の高密度層であり、水溶性の高い物質やペプチド、核酸などの高分子を透過させることが困難な場合が少なくない。また、電荷を有しない物質はそのままではイオントフォレーシスを適用できないという問題がある。

## 【 0 0 0 7 】

種々の物理化学的性質を有する物質を経皮的に投与するため、イオントフォレーシスにおいて、荷電性のリポソームをキャリアーとして適用することが検討されている (Median VM et al., International Journal of Pharmaceutics, Dec. 8, 2005:306(1-2):1-14. Epub Nov. 2, 2005 Epub 2005 Nov 2. Review)。しかしながら、リポソームは粒子径が大きく、そのまま角質層を透過することは困難である。 10

## 【 0 0 0 8 】

一方、リポソームを効率的に経皮投与するため、皮膚表面から皮膚の深部にまで繋がる毛孔をターゲットとすることが知られている (例えば、Hoffman RT et al., Nat Med. 1995 Jul;1(7):705-706、Fleisher D et al, Life Sci. 1995;57(13):1293-1297を参照されたい)。

## 【 0 0 0 9 】

さらに、近年、イオントフォレーシスにおいても、毛孔を介してリポソームを投与することが検討されている。例えば、Protopapa EE らは、酵素を封入したリポソームを、イオントフォレーシスにより毛孔中の毛母幹細胞へ送達したことを報告している (Protopapa EE et al., J Eur Acad Dermatol Venereol. 1999 Jul;13(1):28-35)。 20

## 【 0 0 1 0 】

また、Han I らは、光線力学治療用薬剤である 5 - アミノレブリン酸を封入したリポソームを、イオントフォレーシスにより毛孔上部の毛孔脂腺等に送達したことを報告している (Han I et al., Arch Dermatol Res. 2005 Nov;295(5):210-217. Epub 2005 Nov 11)。さらに、Han I らは、毛孔関連腫瘍用の治療剤であるアドリアマイシンを封入したリポソームを、イオントフォレーシスにより毛孔へ投与したことを報告している (Han I et al., Exp Dermatol. 2004 Feb;13(2):86-92)。

## 【 0 0 1 1 】

毛孔をターゲットとした従前のイオントフォレーシスでは、皮膚表面疾患等を治療対象とし、皮膚組織の表層部に薬物を送達させることを主目的としている。しかしながら、イオントフォレーシスにおいて全身作用を目的として薬物等を投与する場合、毛孔深部に存在する皮下血管を介して全身循環系へ薬物を送達することが望まれる。 30

## 【 0 0 1 2 】

さらに上述したような皮膚の内部まで浸透する紫外線に起因する皮膚障害を治療ないし予防するためには、皮膚内部における活性酸素の産生を阻害したり、生じた活性酸素を迅速に除去するために、抗酸化成分を確実に毛孔周辺内組織に送達することが求められる。したがって、毛孔をターゲットとしたイオントフォレーシスにおいて、安定かつ効率的に毛孔の深部および毛孔周辺内組織にまで抗酸化成分を送達することは重要な課題である。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 1 3 】

したがって、本発明は、イオントフォレーシスにおいて、抗酸化成分を安定かつ効率的に毛孔の深部および毛孔周辺皮内組織に送達することを可能とするイオントフォレーシス用製剤を提供することを目的とするものである。

## 【 0 0 1 4 】

本発明者らは、リポソームに抗酸化成分を封入してイオントフォレーシスに適用することにより、抗酸化成分を安定かつ効率的に毛孔の深部および毛孔周辺皮内組織に送達することができるとの知見を得た。

## 【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明に係るイオントフォレーシス用リポソーム製剤は、イオントフォレー 50

シスにより抗酸化成分を生体に投与するための製剤であって、抗酸化成分がリポソームに封入されてなることを特徴とするものである。

【0016】

本発明の好ましい態様において、前記抗酸化成分が抗酸化酵素であり、より具体的には、抗酸化酵素が、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）である。

【0017】

さらに、別の態様においては、上記抗酸化酵素が、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px）および/またはカタラーゼであることができ、さらに、抗酸化成分として、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px）およびカタラーゼのそれぞれが封入されたリポソームの組み合わせからなることができる。

10

【0018】

本発明の好ましい態様においては、前記リポソームが、カチオン性脂質、ならびに飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を構成成分として含んでなる。

【0019】

また、本発明は、紫外線に起因する皮膚障害の予防ないし治療のための上記イオントフォレーシス用リポソーム製剤を包含し、さらに、イオントフォレーシスにより抗酸化成分を生体に投与するための電極構造体ならびにこの電極構造体を具備してなるイオントフォレーシス装置も包含するものである。

20

【0020】

本発明は、安定で毛孔内移動可能なリポソームに抗酸化成分が封入された製剤からなるので、イオントフォレーシスによって皮膚内部に当該リポソーム製剤を送達させることができ、これにより皮内で生じる活性酸素を消去することが可能となり、紫外線照射等に起因する皮膚障害を予防、低減ならびに治療にすこぶる有用である。また、従来困難であると考えられていた皮膚内部での活性酸素の発生に起因する傷害を防止することによって皮膚炎症を含む皮膚障害の予防のみならず、これらの傷害に起因するシミやしわの発生を抑制することができる点でもすぐれた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明によるリポソーム製剤を投与する際のin vivo皮膚透過試験に用いたイオントフォレーシス装置の概要を示す図である。

30

【図2】SOD封入リポソーム非投与ラット（A:UV照射）およびSOD封入リポソーム投与ラット（B:SODリポソーム+UV照射）のUV照射後の皮膚の生物の形態を示す写真である。

【図3】SOD封入リポソーム非投与ラット皮膚（UV）およびSOD封入リポソーム投与ラット皮膚（SOD）のUV照射後における過酸化脂質（マロンジアルデヒド：MDA）の定量結果を示すグラフである。

【図4】SOD封入リポソーム非投与ラット（UV）およびSOD封入リポソーム投与ラット（SOD）のUV照射後の皮膚切片を各種過酸化傷害マーカー抗体によって免疫染色した顕微鏡写真である。

40

【発明の具体的説明】

【0022】

本明細書において、特に断らない限り、基または基の一部における「C」とは基または基の一部における「炭素の総数」を意味する。したがって、例えば、「C1～C6の飽和脂肪酸」とは、「総炭素数が1～6個の飽和脂肪酸」を意味し、「C12～31脂肪酸コレステリル」とは、「総炭素数が12～31個の脂肪酸」を有する脂肪酸コレステリルを意味する。

【0023】

また、基または基の一部としての「アルキル」、「アルケニル」または「アルキニル」という語は、直鎖状、分枝鎖状、または環状のアルキル、アルケニルまたはアルキニルを

50

意味し、好ましくは直鎖状または分枝鎖状であり、より好ましくは直鎖状である。

【0024】

また、「脂肪酸コレステリル」または「脂肪酸ジヒドロコレステリル」において、脂肪酸は飽和または不飽和であってよい。さらに、上記脂肪酸は、直鎖状、分枝鎖状、または環状の脂肪酸であってよい。そして、「脂肪酸コレステリル」における脂肪酸は、好ましくは直鎖状であり、「脂肪酸ジヒドロコレステリル」における脂肪酸は、好ましくは直鎖状である。

【0025】

また、特に断らない限り、「アリール」とは、フェニルまたはナフチルを意味し、「ヘテロアリール」という語は、特に断らない限り、1 - 3個の窒素、酸素若しくは硫黄原子を含む5 - 6員ヘテロアリール(5 - 6員環芳香族複素環基)を意味する。

10

【0026】

また、「前面」とは、リポソームの投与に際して電極構造体内を流れる電流の経路上における生体皮膚に近い側を意味する。

【0027】

イオントフォレーシス用リポソーム

上述したように、本発明による製剤は、リポソームに封入された抗酸化成分を含んでなる。

本発明の好ましい態様においては、抗酸化成分が封入されるべきリポソームが、カチオン性脂質、ならびに飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセリン脂質を構成成分として含んでなる。このような一定の構成成分を含有するリポソームが、抗酸化成分を安定に毛孔の深部および毛孔周辺皮内組織に送達するのに有利であることは意外な事実である。

20

【0028】

そして、本発明におけるリポソームの構成成分であるカチオン脂質は、好ましくはC1 ~ C20アシルオキシ基およびトリC1 ~ C4アルキルアンモニウム基で置換されたC1 ~ C20アルカンである。

【0029】

さらに、上記C1 ~ C20アルカンは、好ましくはC1 ~ C5アルカンであり、より好ましくはC1 ~ C3アルカンである。

30

【0030】

また、上記C1 ~ C20アルカンにおいて、置換基としてのC1 ~ C20アシルオキシ基は、1 ~ 4個であり、より好ましくは2個である。また、上記C1 ~ C22アシルオキシ基は、好ましくはC1 ~ C20アシルオキシ基であり、より好ましくはC1 ~ C18アシルオキシ基である。

【0031】

また、上記C1 ~ C22アシルオキシ基としては、具体的には、アルキルカルボニルオキシ基、アケニルカルボニルオキシ基、アルキニルカルボニルオキシ基、アリールカルボニルオキシ基またはヘテロアリールカルボニルオキシ基等が挙げられるが、好ましくはアルキルカルボニルオキシ基、アケニルカルボニルオキシ基、アルキニルカルボニルオキシ基であり、より好ましくはアケニルカルボニルオキシ基である。

40

【0032】

また、上記C1 ~ C20アルカンにおいて、置換基としてのトリC1 ~ C6アルキルアンモニウム基は、好ましくは1 ~ 4個であり、より好ましくは1個である。また、上記トリC1 ~ C6アルキルアンモニウム基は、好ましくはトリC1 ~ C4アルキルアンモニウム基である。また、上記トリアルキルアンモニウム基の対イオンとしては、特に限定されないが、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン、フッ素イオン、亜硫酸イオンおよび亜硝酸イオン等が挙げられ、好ましくは塩素イオン、臭素イオンおよびヨウ素イオンである。

【0033】

50

より具体的には、カチオン脂質としては、好ましくは、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane: DOTAP)、ジオクタデシルジメチルアンモニウムクロリド(dioctadecyldimethylammonium chloride: DODAC)、N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウム(N-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium: DOTMA)、ジドデシルアンモニウムブロミド(didodecylammonium bromide: DDBA)、1,2-ジミリストイルオキシプロピル-1-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム(1,2-dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium: DMRIE)、2,3-ジオレオイルオキシ-N-[2(Sペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミウムトリフルオロアセテイト(2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propylammonium trifluoroacetate: DOSPA)であり、より好ましくはDOTAPである。

10

## 【0034】

また、本発明における両親媒性グリセロリン脂質は、飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含むことを一つの特徴とする。両親媒性グリセロリン脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、カルジオリピン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトール等が挙げられ、好ましくはホスファチジルコリンであり、より好ましくは卵黄ホスファチジルコリンである。

## 【0035】

また、両親媒性グリセロリン脂質の構成脂肪酸のうち、飽和脂肪酸としては、好ましくはC12~C22の飽和脂肪酸であり、より好ましくはC14~C18の飽和脂肪酸である。具体的には、飽和脂肪酸は、好ましくはパルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸およびベヘン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものであり、より好ましくはパルミチン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸またはステアリン酸である。

20

## 【0036】

また、両親媒性グリセロリン脂質の構成脂肪酸のうち、不飽和脂肪酸としては、好ましくはC14~C22の不飽和脂肪酸であり、より好ましくはC14~C20の不飽和脂肪酸である。さらに、上記不飽和脂肪酸は、好ましくは炭素-炭素二重結合を1~6個、より好ましくは1~4個含むものである。

30

## 【0037】

具体的には、不飽和脂肪酸は、好ましくはオレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、-リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、イワシ酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものであり、より好ましくはオレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、-リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸およびアラキドン酸である。

40

## 【0038】

また、本発明の別の好ましい態様によれば、両親媒性グリセロリン脂質において、飽和脂肪酸が、パルミチン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸およびステアリン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものであり、不飽和脂肪酸が、オレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、-リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸およびアラキドン酸からなる群から選択される少なくとも一つのものである。

## 【0039】

本発明のより好ましい態様によれば、リポソームは、構成成分としてステロール類をさらに含んでなる。本発明におけるステロール類は、好ましくはコレステロール、C12~C31脂肪酸コレステリルおよびC12~C31脂肪酸ジヒドロコレステリル、ポリオキ

50

シエチレンコレステリルエーテルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのものであり、より好ましくは、コレステロール、ラノリン脂肪酸コレステリル、オレイン酸コレステリル、ノナン酸コレステリル、マカデミアナッツ脂肪酸コレステリルおよびジヒドロコレステロールポリエチレングリコールエーテル（具体的にはジヒドロコレス - 30等が挙げられる）からなる群から選択される少なくとも一つのものであり、さらに好ましくはコレステロールである。

【0040】

構成成分の組み合わせ

本発明におけるリポソームは、上述のように、カチオン性脂質、ステロール類、ならびに飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を、いずれも構成成分として含んでなることが好ましい。

10

【0041】

そして、本発明のより好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、2個のC1～C22アシルオキシ基および1個のトリC1～C6アルキルアンモニウム基により置換されたC1～C20アルカン；ステロール類；C12～C22の飽和脂肪酸、およびC14～C22の不飽和脂肪酸であって、炭素 - 炭素不飽和二重結合を1～6個のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を含んでなる。

【0042】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム)プロパン；コレステロール、C12～C31脂肪酸コレステリルおよびC12～C31脂肪酸ジヒドロコレステリルおよびポリオキシエチレンコレステリルエーテルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのステロール類；C12～C22の飽和脂肪酸、およびC14～C22の不飽和脂肪酸であって、炭素 - 炭素不飽和二重結合を1～6個のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を含んでなる。

20

【0043】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム)プロパン；コレステロール、ラノリン脂肪酸コレステリル、オレイン酸コレステリル、ノナン酸コレステリル、マカデミアナッツ脂肪酸コレステリルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのステロール類；C12～C22の飽和脂肪酸、およびC14～C22の不飽和脂肪酸であって、炭素 - 炭素不飽和二重結合を1～6個のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を含んでなる。

30

【0044】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム)プロパン；ステロール類；パルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸およびベヘン酸からなる群から選択される少なくとも一つの飽和脂肪酸、およびオレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、パクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、エ

40

【0045】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニウム)プロパン；コレステロール、C12～C31脂肪酸コレステリルおよびC12～C31脂肪酸ジヒドロコレステリルおよびポリオキシエチレンコレステリルエーテルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのステロール類；パルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリ

50

ン酸、アラキジン酸およびベヘン酸からなる群から選択される少なくとも一つの飽和脂肪酸、およびオレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、イワシ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される少なくとも一つの不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を含んでなる。

【0046】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン；コレステロール、ラノリン脂肪酸コレステリル、オレイン酸コレステリル、ノナン酸コレステリル、マカデミアナッツ脂肪酸コレステリルおよびポリオキシエチレンジヒドロコレステリルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つのステロール類；パルミチン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸およびベヘン酸からなる群から選択される少なくとも一つの飽和脂肪酸、およびオレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、エレオステアリン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、イワシ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される少なくとも一つの不飽和脂肪酸のいずれも構成脂肪酸として含む両親媒性グリセロリン脂質を含んでなる。

10

【0047】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、上記両親媒性グリセロリン脂質がホスファチジルコリンである。

20

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、リポソームの構成成分は、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン、コレステロール、卵黄ホスファチジルコリンを含んでなる。

【0048】

また、本発明におけるリポソームにおいて、カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質とのモル比は、イオントフォレーシスにおけるリポソームの安定性および送達効率を勘案すれば、好ましくは3:7~7:3であり、より好ましくは4:6~6:4である。また、リポソームがステロール類を含む場合、カチオン性脂質と、ステロール類とのモル比は、好ましくは3:7~7:3であり、より好ましくは4:6~6:4である。また、本発明におけるリポソームにおいて、両親媒性グリセロリン脂質と、ステロール類とのモル比は、好ましくは3:7~7:3であり、より好ましくは4:6~6:4である。また、本発明におけるリポソームにおいて、カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質およびステロール類の和とのモル比は、好ましくは3:7~7:3であり、より好ましくは4:6~6:4である。また、本発明の一つの態様によれば、カチオン性脂質と、両親媒性グリセロリン脂質と、ステロール類とのモル比は、約2:2:1である。

30

【0049】

また、本発明におけるリポソームの平均粒径は、好ましくは約400nm以上であり、より好ましくは400~1000nmである。リポソームの平均粒径は、例えば、動的光散乱法、静的光散乱法、電子顕微鏡観察法および原子間力顕微鏡観察法等の方法によって確認することができる。

40

【0050】

抗酸化成分

本発明において、封入される抗酸化成分は、リポソームに封入可能な限り、特に限定されるものではないが、好ましくは、抗酸化成分が活性酸素消去酵素等の抗酸化酵素である。

【0051】

より具体的には、好ましい抗酸化酵素は、活性酸素消去酵素であるSOD（スーパーオキシドディスムターゼ）であり、さらに、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px

50

) およびカタラーゼも用いられ得る。

【0052】

さらに、本発明においては、リポソーム製剤が、抗酸化成分として、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）、グルタチオンペルオキシターゼ（GSH-Px）およびカタラーゼのそれぞれが封入されたリポソームの組み合わせからなるものであってもよい。

【0053】

さらに、本発明においては、抗酸化成分としては、上記の他にも、たとえば、脂溶性抗酸化化合物である、 $\alpha$ -トコフェロール（ビタミンE）、 $\beta$ -カロテン、アスタキサンチン、リコピン、カプサイシンなどを、また水溶性抗酸化化合物であるアスコルビン酸（ビタミンC）、クルクミンなどのポリフェノール、システインなどを用いることができる。

10

【0054】

#### 製造方法

本発明におけるリポソームおよびこれを含む組成物の製造方法としては、例えば、以下の方法を用いることができる。まず、カチオン性脂質、両親媒性グリセロリン脂質および所望によりステロール類を、 $\text{CHCl}_3$ 等の有機溶媒中に所望の比率で混合し、懸濁液を得る。この懸濁液を減圧留去した後、有機溶媒の添加および減圧留去を繰り返し、脂質フィルムを得る。次に、脂質フィルムに、10～50mMのHEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1piperazinyl] ethanesulfonic acid)等のバッファーおよび所望の量の抗酸化成分を添加する。得られた混合液を室温で10分間放置して水和させ、ソニケーションを行う。ソニケーションの条件としては、例えば、85W、室温、1分間程度が挙げられるが、これに限定されない。さらに混合液をメンブランフィルターやエクストリューダー等により処理して粒径を調節し、本発明におけるリポソームを得る。さらに、得られたリポソームを薬理的に許容可能な担体等とともに、さらに適宜混合し、本発明によるリポソーム製剤を得ることができる。

20

【0055】

本発明に用いられる薬理的に許容可能な担体としては、イオントフォレーシスによるリポソームの投与を妨げない限り特に限定されないが、例えば、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、HEPES等の緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、安定化剤、抗酸化剤および着色剤等の添加剤等が挙げられる。さらに、本発明によるリポソーム製剤は、イオントフォレーシスによるリポソームの投与を妨げない限り、所望により適当な剤型とすることができる。しかしながら、イオントフォレーシスによる効率的なリポソームの投与を勘案すれば、HEPESバッファーや後述する電解液とともに溶液または懸濁液とすることが好ましい。

30

【0056】

#### リポソーム製剤の適用

本発明によるリポソームは、毛孔の深部や皮内組織への安定かつ効率的な抗酸化成分の送達を可能とすることから、局所的皮膚障害の予防・治療や皮内への抗酸化成分の適用、さらには全身作用を必要とする活性酸素の消去を含む治療等に有利に利用することができる。

【0057】

また、本発明のさらに別の態様によれば、イオントフォレーシスにより抗酸化成分を生体に投与する方法であって、本発明による組成物を生体の皮膚表面に配置し、上記皮膚に通電することを少なくとも含んでなる方法が提供される。上記方法において、製剤のリポソームに封入された抗酸化成分は、毛孔を介して生体に投与される。

40

【0058】

本発明によるリポソーム製剤を皮膚表面に配置する方法としては、例えば、リポソーム製剤をそのまま皮膚に塗布してもよく、イオントフォレーシス装置の電極構造体に製剤を保持させ、この電極構造体を皮膚表面に配置してもよい。抗酸化成分を封入した本発明におけるリポソームは、そのまま通電してイオントフォレーシスに用いてもよく、本発明にはかかる態様も包含される。

50

## 【0059】

通電においては、本発明におけるリポソームはカチオン性であるため、電気系統の陽極側において陽電流を印加することが好ましい。通電の際、その電流値は、好ましくは0.1～0.6 mA/cm<sup>2</sup>であり、より好ましくは0.3～0.5 mA/cm<sup>2</sup>であり、さらに好ましくは約0.45 A/cm<sup>2</sup>である。また、通電時間は、好ましくは0.5～1.5時間であり、より好ましくは0.75～1.25時間であり、さらに好ましくは約1時間である。

## 【0060】

また、上記生体としては、好ましくは哺乳類であり、より好ましくはラット、ヒトモルモット、ウサギ、マウスおよびブタであり、さらに好ましくはヒトである。

10

## 【0061】

イオントフォレーシス用の電極構造体および装置

本発明によるリポソーム製剤は、上述の通り、イオントフォレーシス用の電極構造体に保持させて用いることができる。

## 【0062】

したがって、本発明の好ましい態様によれば、本発明によるリポソーム製剤を保持している、イオントフォレーシスにより抗酸化成分を生体に投与するための電極構造体が提供される。

## 【0063】

たとえば、本発明において好ましい態様として使用されるリポソームはカチオン性であり、電極構造体はイオントフォレーシス装置の電気系統の陽極側に接続される。したがって、本発明による電極構造体は、陽電極と、本発明によるリポソーム製剤に保持されている抗酸化成分保持部とを少なくとも含んでなる。このような電極構造体においては、上記抗酸化成分保持部を陽電極の前面に直接配置してもよく、イオントフォレーシスによるリポソームの投与を妨げない限り、陽電極と抗酸化成分保持部との間にイオン交換膜等の他の部材を配置してもよい。このような他の部材を用いる電極構造体としては、例えば、陽電極と、陽電極の前面に配置された電解液を保持する電解液保持部と、該電解液保持部の前面に配置されたアニオン交換膜と、本発明による製剤を保持するための抗酸化成分保持部とを少なくとも含むものが挙げられる。さらに、上記抗酸化成分保持部の前面には、所望によりカチオン交換膜をさらに配置してもよい。

20

30

## 【0064】

さらに、本発明の別の態様によれば、上記電極構造体を具備してなる、イオントフォレーシス装置が提供される。該イオントフォレーシス装置は、電源装置と、電源装置に接続された、本発明による製剤を保持している電極構造体と、該電極構造体の対電極としての電極構造体とを少なくとも具備してなる。対電極としての電極構造体の構成は、イオントフォレーシスによるリポソームの投与を妨げない限り特に限定されないが、例えば、陰電極と、陰電極の前面に配置された電解液を保持する電解液保持部と、該電解液保持部の前面に配置されたイオン交換膜とから構成することができる。上記イオン交換膜は、アニオン交換膜またはカチオン交換膜であってよいが、好ましくはアニオン交換膜である。

## 【0065】

上述のような、本発明による電極構造体およびイオントフォレーシス装置の具体例としては、後述する図1および本出願人による国際公開W003/037425A1に記載されているもの等が挙げられる。

40

## 【0066】

本発明によるイオントフォレーシス装置において、リポソームは、通電時には電場（電界）により陽電極の反対側へ泳動して、電極構造体から効率的に放出される。したがって、本発明の別の態様によれば、イオントフォレーシス装置の作動方法であって、本発明による電極構造体および該対電極としての電極構造体を生体の皮膚表面に配置し、イオントフォレーシス装置を通電し、本発明による電極構造体からリポソームを放出させる方法が提供される。

50

## 【0067】

上記イオントフォーシス装置において、抗酸化成分保持部または電解液保持部は、本発明による組成物または電解液で満たされた、アクリル製等のセル（電極室）として構成してもよく、本発明による組成物または電解液を含浸保持する特性を有する薄膜体で構成してもよい。この薄膜体は、抗酸化成分保持部および電解液保持部において同種の材料が使用可能である。

## 【0068】

また、電解液としては、適用する抗酸化成分の特性条件に応じて適宜所望のものが使用できるが、電極反応により生体の皮膚に障害を与えるものは回避すべきである。本発明において好適な電解液においては、生体の代謝回路において存在する有機酸やその塩は無害性という観点から好ましい。例えば、乳酸、フマル酸等が好ましく、具体的には、1 Mの乳酸と1 Mのフマル酸ナトリウムの1：1比率の水溶液が特に好ましい。

10

## 【0069】

また、抗酸化成分保持部を構成する薄膜体としては、組成物や電解液を含浸し保持する能力が充分であり、所定の電場条件のもとで含浸保持したイオン化されたりポソームを皮膚側へ移行させる能力（イオン伝達性、イオン導電性）が充分であることが重要である。良好な含浸保持特性と良好なイオン伝達性の双方を具備する材料としては、アクリル系樹脂のヒドロゲル体（アクリルヒドロゲル膜）、セグメント化ポリウレタン系ゲル膜、あるいはゲル状固体電解質形成用のイオン導電性多孔質シート（例えば、特開昭11-273452に開示された、アクリロニトリルが50モル%以上、好ましくは70～98モル%以上であり、空隙率が20～80%であるアクリルニトリル共重合体をベースにした多孔質重合体）等を挙げることができる。また、上記のような抗酸化成分保持部を含浸させる場合、その含浸率（乾燥時の重量をD、含浸後の重量をWとして場合の $100 \times (W - D) / D$  [%]）は、好ましくは30～40%である。

20

## 【0070】

本発明による組成物または電解液を抗酸化成分保持部または電解液保持部において含浸させる条件は、電解液およびイオン性薬剤の含浸量、含浸速度等に応じて適宜決定される。このような含浸条件としては、例えば、40にて30分とすることができる。

## 【0071】

また、電極構造体の電極としては、例えば、炭素、白金のような導電性材料からなる不活性電極が好ましく用いられ得る。

30

## 【0072】

また、電極構造体を使用されるイオン交換膜としては、カチオン交換膜とアニオン交換膜を併用することが好ましい。カチオン交換膜としては、好ましくは、（株）トクヤマ製ネオセプタ（NEOSEPTA, CM 1、CM 2、CM X、CMS、CMB、CLE 04 - 2）等が挙げられる。また、アニオン交換膜としては、好ましくは、（株）トクヤマ製ネオセプタ（NEOSEPTA, AM 1、AM 3、AM X、AHA、ACH、ACS、ALE 04 - 2、AIP - 21）等が挙げられる。また、他の好ましい例としては、多孔質フィルムの空隙部の一部または全部に、陽イオン交換機能を有するイオン交換樹脂が充填されたカチオン交換膜、または陰イオン交換機能を有するイオン交換樹脂が充填されたアニオン交換樹膜が挙げられる。

40

## 【0073】

上述したような各構成材料等の詳細については、本出願人による国際公開W003/037425A1に記載されており、本発明はこの文献に記載された内容を含めるものとする。

## 【実施例】

## 【0074】

実施例リポソーム製剤の調製

まず、下記の方法により、イオントフォーシス可能な安定脂質膜組成のリポソーム（

50

カチオン性脂質 DOTAP を含む ) に、活性酸素消去酵素である SOD (スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)) を封入し、イオントフォレーシス用リポソーム製剤を調製した。

#### 【0075】

10 mM DOTAP (AVANTI社)の  $\text{CHCl}_3$  溶液 250  $\mu\text{L}$ 、10 mM コレステロール(以下、「Chol」という; AVANTI社)の  $\text{CHCl}_3$  溶液 125  $\mu\text{L}$ 、10 mM 卵黄ホスファチジルコリン(日本油脂社)の  $\text{CHCl}_3$  溶液 250  $\mu\text{L}$  を混合した。得られた混合液に、500  $\mu\text{L}$  の  $\text{CHCl}_3$  を添加し、懸濁液(モル比; DOTAP: Chol: 卵黄ホスファチジルコリン = 2: 1: 2)を得た。この懸濁液をエバポレーターにより減圧留去した後、400  $\mu\text{L}$  の  $\text{CHCl}_3$  を添加して再度減圧留去し、脂質フィルムを得た。この脂質フィルムに 10 mM HEPES バッファー 1 mL ならびに SOD (SIGMA社製) 5mg(4470units/mg相当)/ml in 10mMリン酸バッファー (pH 7.4) 溶液を 0.5 mL を添加した。得られた混合液を室温で 10 分間放置して水和した後、ソニケーション(アイワ医科工業(株)社製 AU-25C 超音波洗浄装置、85 W、室温、1 分間)を行った。さらに混合液をポアサイズ 400 nm および 100 nm の PC メンブラン(製品名: Nuclprep Track-Etch Membrane、Whatman社製)を用い、エクストリューダー(製品名: Mini-Extruder、Avanti Polar Lipids, Inc.社製)により処理してリポソーム懸濁液を得た。得られたリポソーム懸濁液(リポソーム製剤)の平均粒径は、約 260 ~ 400 nm の範囲であった。

10

#### 【0076】

20

#### 経皮投与試験

下記の要領で、毛を刈ったラットの背中に、イオントフォレーシス装置を用いて、上記で得られたリポソーム製剤のイオントフォレーシスによる経皮投与を実施した。

#### 【0077】

まず、SD ラット(オス、9 週齢、日本クレア製)に麻酔(ネブタール(50 mg / ml) 1 mL / 体重 kg)を投与し、背中の毛を剃った。次に、図 1 に示される通り、露出した皮膚 5 上に、電源装置 2 と、作用電極構造体 3 と非作用電極構造体 4 とから構成されるイオントフォレーシス装置 1 を配置した。ここで、露出した皮膚 5 と、作用電極構造体 3 との接触面には上記リポソーム懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を予め塗布した。また、上記イオントフォレーシス装置 1 において、作用電極構造体 3 は、陽電極 3 1 と、陽電極 3 1 の前面に配置された電解液(生理食塩水) 1 mL を保持する電解液保持部 3 2 と、アニオン交換膜 3 3 と、アニオン交換膜 3 3 の前面に配置された、リポソーム懸濁液 200  $\mu\text{L}$  を保持する抗酸化成分保持部 3 4 とから構成した。一方、非作用電極構造体 4 は、陰電極 4 1 と、陰電極 4 1 の前面に配置された電解液 1 mL を保持する電解液保持部 4 2 と、カチオン交換膜 4 3 と、カチオン交換膜 4 3 の前面に配置された生理食塩水 800  $\mu\text{L}$  を保持する電解液保持部 4 4 と、電解液保持部 4 4 の前面に配置されたアニオン交換膜 4 5 とから構成した。また、上記アニオン交換膜 3 3, 4 5 (ALE04-2、(株)トクヤマ製)およびカチオン交換膜 4 3 (CLE04-2、(株)トクヤマ製)は予め生理食塩水中に保管していたものを使用した。

30

#### 【0078】

40

次に、図 1 に示されるイオントフォレーシス装置 1 により、1.14mA (0.45mA/cm<sup>2</sup>)、1 時間の条件で通電することによってリポソーム製剤を投与した。

#### 【0079】

リポソーム製剤の投与 1 時間後に紫外線を受けて活性酸素を産生する色素(8-methoxypsoralen)を塗布した後、UVA (365nm) ランプを用いて、4 時間紫外線を照射した(34.5J/cm<sup>2</sup>)。

#### 【0080】

4 4 時間後に皮膚を回収し、皮膚中の過酸化脂質量(マロンジアルデヒド MDA 量)を TBA 法によって定量するとともに、酸化傷害を検出する抗体(抗 MDA 抗体(脂質酸化)、抗ヘキサノイルリジン抗体(タンパク質酸化)、抗 8-OH-デオキシグアノシン(

50

DNA酸化))を用いて、免疫染色によって酸化傷害を評価した。

【0081】

その結果、紫外線照射したラットの皮膚は炎症が起こっており、皮膚表面にシミが認められた。しかし、SOD封入リポソーム製剤を投与したラットの皮膚は、紫外線照射前と同じであった(図2(A)および(B)参照)。図2(A)はSOD封入リポソーム製剤の投与を行わずに紫外線を照射した場合であり、皮膚に炎症が認められる。一方、図2(B)はSOD封入リポソーム製剤の投与後に紫外線照射を行った場合の例であり、皮膚は紫外線照射前と同様の状態を維持していた。

【0082】

さらに、紫外線照射したラットの皮膚に対して免疫染色を行ったところ、酸化傷害に対する抗体によって有意に染色がされたが、SOD封入リポソーム製剤を投与したラットにおいては、酸化傷害の存在は認められなかった。また、MDA量を比較すると、SOD封入リポソーム製剤を投与したラットにおいては、リポソーム製剤非投与ラットよりも低い値を示すことが明らかになった。ちなみに、SOD封入リポソーム製剤を皮膚の表面に塗布しただけでは、これらの保護効果は認められなかった。

10

【0083】

図3および図4はこれらの結果を示すものである。図3に示すグラフは、SOD封入リポソーム非投与ラット皮膚(UV)およびSOD封入リポソーム投与ラット皮膚(SOD)のUV照射後における過酸化脂質(マロンジアルデヒド:MDA)量を定量した結果である。ここで、過酸化脂質量は、皮膚1g当たりのモル量(nmol/g wet weight)として示した。

20

【0084】

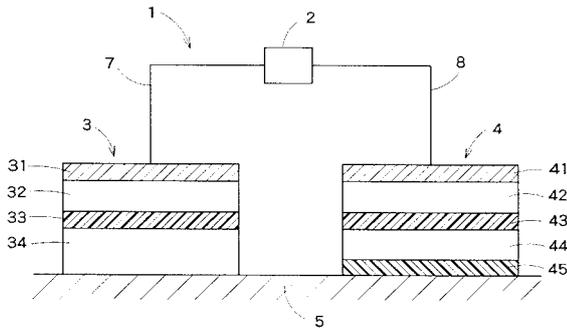
一方、図4(A)~(F)は、SOD封入リポソーム非投与ラット(UV)およびSOD封入リポソーム投与ラット(SOD)のUV照射後の皮膚切片を各種過酸化傷害マーカー抗体によって免疫染色したものを、共焦点レーザー顕微鏡によって蛍光観察した写真である。すなわち、図4(A)は、SOD封入リポソーム非投与ラット(UV)皮膚を抗ヘキサノイルリジン(HEL)で免疫染色したものの、図4(B)は、SOD封入リポソーム非投与ラット(UV)皮膚を抗マロンジアルデヒド(MDA)で免疫染色したものの、図4(C)は、SOD封入リポソーム非投与ラット(UV)皮膚を抗8-OH-デオキシグアノシン(8-OHdG)で免疫染色したものの、図4(D)は、SOD封入リポソーム投与ラット(UV)皮膚を抗ヘキサノイルリジン(HEL)で免疫染色したものの、図4(E)は、SOD封入リポソーム投与ラット(UV)皮膚を抗マロンジアルデヒド(MDA)で免疫染色したものの、図4(F)は、SOD封入リポソーム投与ラット(UV)皮膚を抗8-OH-デオキシグアノシン(8-OHdG)で免疫染色したものの、である。

30

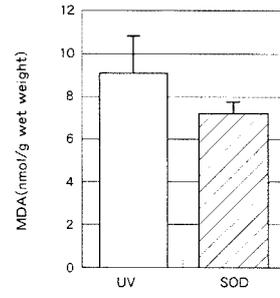
【0085】

これらの結果から、本発明によるリポソームが毛孔から皮内へとその構造を保持したまま拡散していることが確認され、さらに、SOD封入リポソーム製剤をイオントフォレーシスによって皮膚内部に投与することによって紫外線による皮膚内部での皮膚障害を効果的に防止ないし抑制できることが確認された。

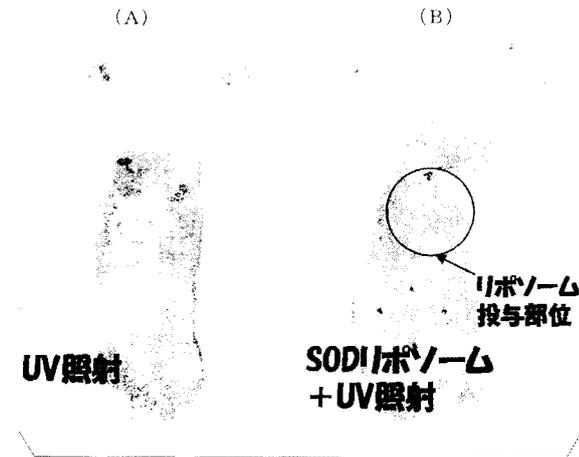
【 図 1 】



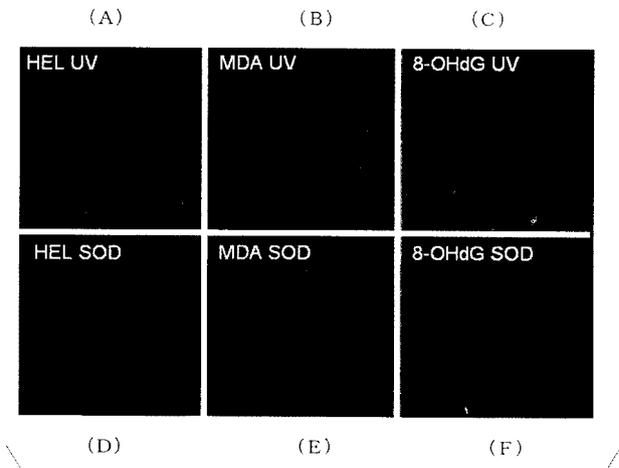
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International application No.<br>PCT/JP2007/073313                                |
|--|--|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>A61K9/127(2006.01)i, A61K38/44(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61P17/18(2006.01)i<br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61K9/127, A61K38/44, A61K47/24, A61K47/28, A61P17/18<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008<br>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>WPI, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, BIOSIS (STN), CAPlus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)   |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| Y  | HAN, I. et al, Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis, Exp Dermatol, 2004, Vol.13, No.2, p.86-92, particularly, Abstract, page 88, left column, Par. No. [0001], right column, Par. No. [0003] to page 90, left column, Par. No. [0001], page 91, left column, Par. No. [0002] to right column, Par. No. [0001] | 1-33  |
| Y  | US 5942245 A (KATINGER, H. et al.), 24 August, 1999 (24.08.99), Claim 1; abstract, column 1, lines 14 to 35, example 3<br>& WO 1996/014083 A1 & EP 789584 A1   | 1-33  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>10 January, 2008 (10.01.08)   |  | Date of mailing of the international search report<br>22 January, 2008 (22.01.08) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office   |  | Authorized officer  |
| Facsimile No.  |  | Telephone No.   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/073313

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | JP 2005-524601 A (The Scripps Research Institute),<br>18 August, 2005 (18.08.05),<br>Claims 2 to 3; Par. Nos. [0064], [0079]<br>& WO 2002/022573 A2 & EP 1367998 A2<br>& US 2004/116350 A1 & US 2004/157280 A1<br>& US 2005/129680 A1 | 1-6, 8-33             |
| Y         | JP 2006-241110 A (National University Corporation Hokkaido University, Riken, Japan),<br>14 September, 2006 (14.09.06),<br>Par. Nos. [0075] to [0077], [0081] to [0082],<br>[0090]<br>(Family: none)                                  | 6, 9-30               |
| Y         | JP 2006-238839 A (National University Corporation Hokkaido University),<br>14 September, 2006 (14.09.06),<br>Par. Nos. [0022] to [0023], [0034], [0036],<br>[0091] to [0092]<br>(Family: none)  | 6, 9-28               |
| Y         | WO 2003/037425 A1 (R & R Ventures Inc.),<br>08 May, 2003 (08.05.03),<br>Claim 1; page 1, lines 8 to 18; page 7,<br>lines 23 to 26; page 18, lines 1 to 16; page 26,<br>lines 6 to 12<br>& EP 1440707 A1 & US 2005/070840 A1           | 32-33                 |

| 国際調査報告   |   | 国際出願番号 PCT/JP2007/073313  |         |
|--|---|---|---------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. A61K9/127(2006.01)i, A61K38/44(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61P17/18(2006.01)i   |   |   |         |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. A61K9/127, A61K38/44, A61K47/24, A61K47/28, A61P17/18   |   |   |         |
| 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<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2008年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2008年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2008年   |   |   |         |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)<br>WPI, JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース, BIOSIS(STN), CApius(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)                                       |   |   |         |
| C. 関連すると認められる文献  |   |   |         |
| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号  |         |
| Y  | HAN, I. et al, Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis, Exp Dermatol, 2004, Vol. 13, No. 2, p. 86-92, 特に Abstract、第 88 頁左欄第 1 段落、第 88 頁右欄第 3 段落-第 90 頁左欄第 1 段落、第 91 頁左欄第 2 段落-右欄第 1 段落などを参照 | 1-33  |         |
| Y  | US 5942245 A (KATINGER, H. et al.) 1999.08.24, Claim 1, ABSTRACT, 第 1 欄第 14-35 行, EXAMPLE 3 & WO 1996/014083 A1 & EP 789584 A1  | 1-33  |         |
| <input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。  |   | <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。  |         |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「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<br>「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<br>「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)<br>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 |   | の日後に公表された文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」同一パテントファミリー文献 |         |
| 国際調査を完了した日<br>10.01.2008   |   | 国際調査報告の発送日<br>22.01.2008  |         |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>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)<br>齋藤 志  | 4C 3953 |
|  |   | 電話番号 03-3581-1101 内線 3452   |         |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/073313

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | JP 2005-524601 A (ザ スクリップス リサーチ インスティテュート) 2005.08.18, 【請求項2】 - 【請求項3】, 【0064】, 【0079】 & WO 2002/022573 A2 & EP 1367998 A2 & US 2004/116350 A1 & US 2004/157280 A1 & US 2005/129680 A1 | 1-6, 8-33        |
| Y                     | JP 2006-241110 A (国立大学法人 北海道大学, 独立行政法人理化学研究所) 2006.09.14, 【0075】 - 【0077】, 【0081】 - 【0082】, 【0090】 (ファミリーなし)   | 6, 9-30          |
| Y                     | JP 2006-238839 A (国立大学法人 北海道大学) 2006.09.14, 【0022】 - 【0023】, 【0034】, 【0036】, 【0091】 - 【0092】 (ファミリーなし)   | 6, 9-28          |
| Y                     | WO 2003/037425 A1 (アール アンド アール ベンチャーズ株式会社) 2003.05.08, 請求の範囲1, 第1頁第8-18行, 第7頁第23-26行, 第18頁第1-16行, 第26頁第6-12行 & EP 1440707 A1 & US 2005/070840 A1                                       | 32-33            |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 47/18 (2006.01)</b> | A 6 1 K 47/18 |             |
| <b>A 6 1 N 1/30 (2006.01)</b>  | A 6 1 N 1/30  |             |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72) 発明者 小 暮 健太郎

北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院薬学研究院内

(72) 発明者 宮 下 萌子

北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学薬学部内

(72) 発明者 原 島 秀吉

北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院薬学研究院内

F ターム (参考) 4C053 HH02

4C076 AA19 AA95 BB31 CC03 CC18 CC29 DD19 DD63F DD70 FF31

4C084 AA02 AA03 BA44 CA62 DC24 MA05 MA24 NA03 NA10 NA13

ZC372

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。