

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6751781号
(P6751781)

(45) 発行日 令和2年9月9日 (2020.9.9)

(24) 登録日 令和2年8月19日 (2020.8.19)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44

請求項の数 11 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-569112 (P2018-569112)	(73) 特許権者	519001383
(86) (22) 出願日	平成29年2月24日 (2017.2.24)		ソウル ナショナル ユニバーシティ ア
(65) 公表番号	特表2019-522004 (P2019-522004A)		ールアンドディービー ファウンデーション
(43) 公表日	令和1年8月8日 (2019.8.8)		大韓民国 ソウル 08826, クアナク
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/002069		ーク, クアナクロー, 1 (シルリムード
(87) 国際公開番号	W02018/004105		ン)
(87) 国際公開日	平成30年1月4日 (2018.1.4)	(74) 代理人	100095407
審査請求日	平成31年1月29日 (2019.1.29)		弁理士 木村 満
(31) 優先権主張番号	10-2016-0081254	(74) 代理人	100132883
(32) 優先日	平成28年6月29日 (2016.6.29)		弁理士 森川 泰司
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)	(74) 代理人	100148633
			弁理士 桜田 圭
		(74) 代理人	100147924
			弁理士 美恵 英樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌病変選択的標識のための水和ゲル基盤ナノエマルジョン、及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大豆油を含む油相成分と、界面活性剤と、水相成分と、を含み、
 前記水相成分は、水溶性色素または水溶性薬物を含む水溶性活性成分と、アルギン酸と
、ヒアルロン酸と、を含み、
 前記界面活性剤は Tween 80 とスパン 80 とを含む共界面活性剤である、
ナノエマルジョンであって、
前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記油相成分を 70 重量%ないし 80 重量
% 含み、前記水相成分を 10 重量%ないし 20 重量%含み、前記界面活性剤を 5 重量%な
いし 15 重量%含むナノエマルジョン。

10

【請求項 2】

前記ナノエマルジョンは、前記水溶性活性成分、前記アルギン酸及び前記ヒアルロン酸
 によって構成された相互浸透高分子網状構造を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のナ
 ノエマルジョン。

【請求項 3】

前記ナノエマルジョンの平均粒子の大きさが、200 nm 以下であることを特徴とする
 請求項 1 に記載のナノエマルジョン。

【請求項 4】

前記ナノエマルジョンは、油中水滴型エマルジョンであることを特徴とする請求項 1 に
 記載のナノエマルジョン。

20

【請求項 5】

前記ナノエマルジョンに含まれたナノ平均粒子サイズの分布度は、0.2ないし0.7であり、ゼータ電位の値は、 -20 mV ないし -50 mV であることを特徴とする請求項1に記載のナノエマルジョン。

【請求項 6】

前記水溶性色素は、インジゴカルミン、メチレンブルー、ルゴール溶液、トルイジンブルー、コンゴーレッド、フェノールレッド、インドシアニングリーン、フロオレセインナトリウム及びインディアインクからなる群のうちから選択されたいずれか一つであることを特徴とする請求項1に記載のナノエマルジョン。

【請求項 7】

前記水溶性色素の濃度は、1ないし 10 mM であることを特徴とする請求項1に記載のナノエマルジョン。

【請求項 8】

前記ナノエマルジョンの親水性－親油性バランス値は、6ないし9であることを特徴とする請求項1に記載のナノエマルジョン。

【請求項 9】

大豆油を含む油相成分を準備する段階と、
Tween 80とスパン80を含む共界面活性剤である界面活性剤を準備する段階と、
水相成分を準備する段階と、
前記油相成分、前記界面活性剤及び前記水相成分を攪拌混合する段階と、を含み、
前記水相成分は、水溶性色素または水溶性薬物を含む水溶性活性成分、アルギン酸及びヒアルロン酸を含む、
ナノエマルジョンの製造方法であって、
前記ナノエマルジョンは、前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記油相成分を70重量%ないし80重量%含み、前記水相成分を10重量%ないし20重量%含み、前記界面活性剤を5重量%ないし15重量%含む、請求項1ないし8のいずれか1項に記載のナノエマルジョンの製造方法。

【請求項 10】

前記水相成分を準備する段階は、
前記アルギン酸及び前記ヒアルロン酸を含む第1水相成分を準備する段階と、
前記水溶性活性成分を含む第2水相成分を準備する段階と、を含むことを特徴とする請求項9に記載のナノエマルジョンの製造方法。

【請求項 11】

前記第1水相成分と前記第2水相成分との重量比は、1:0.5ないし1:2であることを特徴とする請求項10に記載のナノエマルジョンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌病変選択的標識のための水和ゲル基盤ナノエマルジョン、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的な造影剤を介した離型性症（dysplasia）及び早期癌に対する診断は、病変境界面の曖昧な形態により、疑わしい部位に対するランダムな生検を施行することであるが、正確な病変部の癌診断に困難な点があった。そのために、リアルタイムで病変を正確に検知し、手術時、切除部位を効果的に示す手術補助技術の発展がなされてきた。

【0003】

従って、外科的な切除術または医療装備を介した診断過程において、さらに容易であって正確な癌診断を可能とするために、癌病変に選択的に吸着された後で染色される技術が要求されてきた。前述のような技術的要求により、人体の癌病変選択的であったり、癌細

10

20

30

40

50

胞標的指向型であったりする染色剤を開発するためのナノ粒子または組成物に係わる研究が進められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】韓国公開特許第2009-0097582号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の一様相は、癌治療において、外科的な切除術または医療装備を介した診断過程において、医師の正確な診断と治療とを可能にさせるために、人体に対する選択的癌標識を行い、かつ癌細胞標的指向型染色剤を効果的に癌病変部に伝達するナノエマルジョン、及びその製造方法を提供するものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一様相は、油相成分と、界面活性剤と、水相成分と、を含み、前記水相成分は、水溶性活性成分と、多糖類と、ヒアルロン酸と、を含むナノエマルジョンを提供する。

【0007】

また、前記ナノエマルジョンは、前記水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸によって構成された相互浸透高分子網状(interpenetrating polymer network)構造を含む。

20

【0008】

本発明の一様相において、前記ナノエマルジョンの平均粒子の大きさは、200nm以下である。

【0009】

本発明の他の一様相において、前記ナノエマルジョンは、油中水滴(water-in-oil)型エマルジョンである。

【0010】

また、前記ナノエマルジョンは、前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記油相成分を70重量%ないし80重量%含み、前記水相成分を10重量%ないし20重量%含み、前記界面活性剤を5重量%ないし15重量%含む。

30

【0011】

前記界面活性剤は、単一界面活性剤または共界面活性剤のうち少なくとも一つを含む。

【0012】

本発明の一様相において、前記ナノエマルジョンに含まれたナノ平均粒子サイズの分布度は、0.2ないし0.7であり、ゼータ電位の値は、-20mVないし-50mVである。

【0013】

本発明の一様相において、前記多糖類は、アルジネイトである。

【0014】

本発明の一様相において、前記水溶性活性成分は、水溶性色素または水溶性薬物である。

40

【0015】

具体的には、前記水溶性色素は、メチレンブルー(methylene blue)、インジゴカルミン(indigo carmine)、ルゴール溶液(Lugol溶液)、トルイジンブルー(toluidine blue)、コンゴレッド(congo red)、フェノールレッド(phenol red)、インドシアニングリーン(indocyanin green)、フロオレセインナトリウム(fluorecein sodium)及びインディアインク(India ink)からなる群のうちから選択されたいずれか一つでもあり、前記水溶性色素の濃度は、1ないし10mMでもある。

【0016】

また、本発明の前記ナノエマルジョンの親水性-親油性バランス(hydrophilic-lipoph

50

ilic balance) 値は、6 ないし 9 であることがナノエマルジョンのサイズ調節面で有利である。

【0017】

本発明は、また、油相成分を準備する段階と、界面活性剤を準備する段階と、水相成分を準備する段階と、前記油相成分、前記界面活性剤及び前記水相成分を攪拌混合する段階と、を含み、前記水相成分は、水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸を含む前述のナノエマルジョンの製造方法を提供する。

【0018】

最後に、本発明の前記水相成分を準備する段階は、前記多糖類及びヒアルロン酸を含む第1水相成分を準備する段階と、前記水溶性活性成分を含む第2水相成分を準備する段階と、を含み、前記第1水相成分と前記第2水相成分との重量比は、1：0.5ないし1：2であるナノエマルジョンの製造方法を提供する。

10

【発明の効果】

【0019】

本発明の一樣相によるナノエマルジョンを利用する場合、造影剤を介した早期癌診断の活性化に大きく寄与することができる、

【0020】

また、人体の癌選択的標識染色剤を効果的に伝達することにより、癌の早期発見だけではなく、医師の癌病変部位に対する正確な診断時、及び外科的な手術時、効果的な切除を介した癌の治療効果を極大化させることができる。

20

【0021】

また、ナノエマルジョンの活性成分を調節することにより、癌の診断だけではなく、癌の治療及び症状緩和を期待することができる。

【0022】

本発明の一樣相によるナノエマルジョンは、前臨床試験段階及び臨床試験段階を経て、商用化可能な形態の製剤として、比較的簡単な製造方法でもって量産が可能であるという利点がある。

【0023】

最後に、本発明の一樣相によるナノエマルジョンの製造方法によって形成されたナノエマルジョンは、均質性を有し、熱力学的安定性にすぐれるナノ粒子を提供することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸によって構成された相互浸透高分子網状(interpenetrating polymer network)構造と共に、ナノ粒子の癌標的指向性を示した図面である。

【図2】癌細胞とナノエマルジョンとの相互作用を示した図面である。

【図3】粒子の製造前、光学顕微鏡で観察したイメージと、粒子製造後、電子走査顕微鏡で観察したイメージの図面である。

【図4】メチレンブルーの濃度による吸光度、及び濃度別吸光度値を、線形関係で示した図面である。

40

【図5】メチレンブルーとナノエマルジョンとの(A)吸光度、及び(B)分光蛍光計による蛍光スペクトルを示した図面である。

【図6】共界面活性剤を製造するための算式と共に、ナノエマルジョンを作るための含量比を示した図面である。

【図7】親水性-親油性バランス(hydrophilic-lipophilic balance)値によるナノエマルジョンサイズを比較した図面である。

【図8】ナノエマルジョンの製造過程、及び遠心分離機で分離した後フィタリング前のナノエマルジョンの層状分離を示した図面である。

【図9】ナノエマルジョンのモルフォロジーを共焦点顕微鏡で測定した図面である。

50

【図10】メチレンブルーの搭載効率を示した図面である。

【図11】細胞生死判別試験 (cell viability) を示した図面である。

【図12】細胞とナノエマルジョンとの経時的な反応を示した図面である。

【図13】ナノエマルジョンが癌選択的標識染色剤を伝達する過程を示した図面である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明について具体的に説明する。

【0026】

本発明で使用される全ての技術用語は、異なって定義されない以上、本発明の関連分野において、当業者が一般的に理解する意味に使用される。また、本明細書には、望ましい方法や試料が記載されるが、それと類似していたり同等であったりするものも、本発明の範疇に含まれる。また、本明細書に記載された数値は、明示していなくても、「約」の意味を含むものであると見なす。本明細書において、ある部分がある構成要素を「含む」とするとき、それは、特別に反対となる記載がない限り、他の構成要素を除くものではなく、他の構成要素をさらに含んでもよいということを意味する。本明細書に参考文献として記載される全ての刊行物の内容は、全体が本明細書に参照として統合される。

【0027】

本発明の一実施形態は、油相成分と、界面活性剤と、水相成分と、を含み、前記水相成分は、水溶性活性成分と、多糖類と、ヒアルロン酸と、を含むナノエマルジョンを提供する。

【0028】

本明細書において、「油相成分」とは、脂溶性であり、オイルに溶ける物質を意味する。本明細書において、前記油相成分は、大豆油 (soybean oil) でもある。

【0029】

本明細書において、「水相成分」とは、水溶性で水に溶ける物質を意味する。本発明で水相成分は、水溶性活性成分と、多糖類と、ヒアルロン酸と、を含む。

【0030】

本明細書において、「エマルジョン (emulsion)」とは、互いに不溶性である水相成分と油相成分とが分散された状態を意味し、水中油滴型 (O/W (oil-in-water) 型)、及びその反対である油中水滴型 (W/O (water-in-oil) 型) とが存在する。本明細書の前記ナノエマルジョンとは、水溶性活性成分と、多糖類と、ヒアルロン酸とによって構成されたナノ粒子を含むエマルジョンを意味する。

【0031】

本発明でヒアルロン酸は、癌細胞に過発現されるCD44受容体との相互作用を介して、ナノエマルジョンの活性成分が癌細胞病変に達した後、細胞内に流入される役割を行うことができる。そのような場合、癌切除術のために、メチレンブルーのような水溶性活性成分を局所投与し、選択的に癌病変に吸着させ、手術時、精密切除が可能になるように、ガイディング役割を行うことができる。図2は、癌細胞とナノエマルジョンとの相互作用を示した図面である。

【0032】

本発明の一実施形態において、前記多糖類は、陰イオン性多糖類または陽イオン性多糖類である。

【0033】

具体的には、本明細書において、前記多糖類は、合成化合物を除いた自然界に存在する全ての多糖類を意味し、例えばセルロース (cellulose)、ペクチン (pectin)、キチン (chitin)、ベータグルカン (beta-glucan) などがあるが、それらに限定されるものではない。

【0034】

本明細書の一実施形態において、前記多糖類が陰イオン性多糖類である場合には、陽イオン性水相造影剤または陽イオン性物質を含み、ナノエマルジョンを製造することができ

10

20

30

40

50

る。他の実施形態において、前記多糖類が陽イオン性多糖類である場合には、陰イオン性水相造影剤または陰イオン性物質を含み、ナノエマルジョンを製造することができる。

【0035】

本発明の一実施形態において、前記多糖類は、アルギン酸である。本明細書において、前記アルギン酸は、マンヌロン酸（M：mannuronic acid）及びグルロン酸（G：guluronic acid）により、ブロックとして構成された鎖形態の共重合体であり、一般的に海藻から抽出される。

【0036】

本発明の一実施形態において、前記水溶性活性成分は、水溶性色素または水溶性薬物である。

10

【0037】

具体的には、前記水溶性色素は、インジゴカルミン（indigo carmine）、メチレンブルー（methylene blue）、ルゴール溶液（Lugol 溶液）、トルイジンブルー（toluidine blue）、コンゴレッド（congo red）、フェノールレッド（phenol red）、インドシアニングリーン（indocyanin green）、フロオレセインナトリウム（fluorecein sodium）及びインディアインク（India ink）からなる群のうちから選択されたいずれか一つでもあるが、それらに限定されるものではなく、色素内視鏡に使用される、当業界で使用される色素を使用することができる。

【0038】

また、本明細書において、該水溶性薬物は、当業界で使用される必要な薬物を使用することができるが、それに限定されるものではない。

20

【0039】

本明細書の一実施形態において、前記ナノエマルジョンは、前記水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸によって構成された相互浸透高分子網状（interpenetrating polymer network）構造のナノ粒子を含む。

【0040】

本明細書において、相互浸透高分子網状構造とは、2種以上の構成成分が、共有結合で連結されず、構成成分が互いに絡み合ってもつれ合った（entangled）ネットワークを形成することを意味する。本発明による相互浸透高分子網状構造の場合には、水溶性活性成分が物理的にカプセル化され、機械的強度を高め、熱力学的安定性を増大させることができる。

30

【0041】

図1は、水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸によって構成された相互浸透高分子網状構造、及びナノエマルジョンの癌ターゲット指向性を示した図面である。

【0042】

図2は、癌細胞とナノエマルジョンとの相互作用を示した図面であり、具体的には、2つの物質間の結合は、ヒアルロン酸に存在する鎖構造と、癌細胞で過発現されるCD44受容体との特異的相互作用に起因する。

【0043】

図3は、粒子製造前、（A）光学顕微鏡で観察した様子、ボルテキシング（vortexing）を加えた場合、マイクロサイズの粒子の（B）光学顕微鏡イメージ、（C）超音波分散を介して製造したナノ粒子の電子走査顕微鏡イメージの図面である。

40

【0044】

図4は、メチレンブルーの濃度による吸光度を示した図面（右側）、及び濃度別吸光度値を線形関係で示した図面（左側）である。具体的には、図4は、メチレンブルーの濃度別吸光度（absorbance）値を測定した後、ナノ粒子の吸光度値と基準濃度（standard concentration）とを比較し、ナノエマルジョンの濃度、及びメチレンブルーの搭載効率（loading efficiency）を予測することができる。

【0045】

図10は、メチレンブルーの搭載効率を予測した図面である。前述の結果により、ナノ

50

エマルジョンに含まれたナノ粒子の内部に含まれたメチレンブルーの含量 (loading efficiency) を予測することができる。

【0046】

図5は、メチレンブルーとナノエマルジョンとの吸光度、及び分光蛍光計による蛍光スペクトルを示した図面である。具体的には、図5の左側吸光度の結果から、メチレンブルーが668nmにおいて、蛍光波長を有することを確認することができ、右側グラフの結果により、ナノ粒子を含むナノエマルジョンの場合にも668nm近くでもピーク波長が出たという結果により、ナノ粒子内部に、メチレンブルーが含まれるということを確認することができる。製造されたナノエマルジョンにおいて、ピーク波長が左に移動 (blue-shift) する場合は、内部に存在するイオン分子コンプレックス (electrostatic complex) の差に起因すると見られる。また、蛍光スペクトルのピーク波長の結果により、メチレンブルーの存在を確認することができる。

10

【0047】

図9は、ナノエマルジョンのモルフォロジーを共焦点顕微鏡で測定した図面である。前述の図9の結果により、メチレンブルーの粒子が入っているナノエマルジョンを確認することができる。

【0048】

本発明の一実施形態において、前記ナノエマルジョンの平均粒子の大きさは、200nm以下である。

【0049】

20

本明細書のナノエマルジョンに含まれたナノ平均粒子サイズの分布度は、0.2ないし0.7である。前記粒子サイズの分布度を有する場合、均質性を有するナノ粒子を含むナノエマルジョンを提供することができる。ナノ粒子の均質性面では、ナノ粒子の平均粒子サイズの分布度が、0.2ないし0.4である場合がさらに望ましい。

【0050】

本発明の一実施形態において、前記ナノエマルジョンのゼータ電位の値は、-20mVないし-50mVである。本発明での前記ナノエマルジョンのゼータ電位値は、アルギン酸及びヒアルロン酸が水溶液状態において、負電荷値を有するようになることによって示される値であり、前記範囲のゼータ電位を有する場合には、オストバルト熟成 (Ostwald ripening) のような現象が防止され、安定したナノ粒子を含むナノエマルジョンを提供することができる。ナノ粒子の安定性面においては、ナノエマルジョンのゼータ電位の値は、-20mVないし-40mVがさらに望ましい。

30

【0051】

本発明の他の一実施形態において、前記ナノエマルジョンは、油中水滴型エマルジョンである。

【0052】

また、前記ナノエマルジョンは、前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記油相成分を70重量%ないし80重量%含み、前記水相成分を10重量%ないし20重量%含み、前記界面活性剤を5重量%ないし15重量%含む。前記界面活性剤は、単一界面活性剤または共界面活性剤 (co-surfactant) のうち少なくとも一つを含む。

40

【0053】

前述の含量範囲において、所望範囲のナノエマルジョンの大きさを制御することができ、粒子の安定度にすぐれることがある。

【0054】

本発明の他の一実施形態において、2以上の界面活性剤を混ぜ、ナノサイズ粒子を製造するのに、共界面活性剤を使用した。図6は、界面活性剤が有している固有の親水性-親油性バランス (hydrophilic-lipophilic balance) 値に基づいて、共界面活性剤の親水性-親油性バランス値を得る数式と共に、製造例示を示している。本明細書には、一実施形態において、ツイーン80 (Tween 80、HLB値：15) スパン80 (Span 80、HLB値：4.3) を使用し、二種の界面活性剤を一定重量比で混ぜた後、所望する共界

50

面活性剤の親水性－親油性バランス値を調節した。

【0055】

本発明の他の一実施形態において、前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記水相成分の重量％が、前記界面活性剤の重量％より大きい。その場合、ナノサイズ粒子を提供することができ、粒子の安定度にすぐれる。

【0056】

また、本発明の前記ナノエマルジョン製造に使用された共界面活性剤の親水性－親油性バランス値は、6ないし9であるということが、ナノエマルジョンのサイズ調節面で有利である。本発明の前記ナノエマルジョンの親水性－親油性バランス値は、6ないし9であることが、ナノエマルジョンのサイズ調節面でさらに望ましい。

10

【0057】

本明細書において、前記親水性－親油性バランスとは、親水性及び親油性の程度を示す尺度であり、界面活性剤は、0ないし20の間の固有のHLB (hydrophilic lipophilic balance) 値を有し、0に近いほど親油性であり、20に近いほど親水性の性質を示す。

【0058】

図6は、親水性－親油性バランス値によるナノエマルジョン製造の比率を比較した図面である。具体的には、図6で使用したナノエマルジョンの場合には、油相成分：共界面活性剤：水相成分の重量比を7：1：2にして製造されたナノエマルジョンである。

【0059】

本発明は、また、油相成分を準備する段階と、界面活性剤を準備する段階と、水相成分を準備する段階と、前記油相成分、前記界面活性剤及び前記水相成分を攪拌混合する段階と、を含み、前記水相成分は、水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸を含む前述のナノエマルジョンの製造方法を提供する。前記界面活性剤は、単一界面活性剤または共界面活性剤のうち少なくとも一つを含む。

20

【0060】

本発明の他の一実施形態において、前記水相成分を準備する段階は、前記多糖類及びヒアルロン酸を含む第1水相成分を準備する段階と、前記水溶性活性成分を含む第2水相成分を準備する段階と、を含む。

【0061】

本発明の一実施形態において、前記油相成分、前記界面活性剤及び前記水相成分を攪拌混合する段階は、超音波処理を利用して攪拌混合する。

30

【0062】

図7は、ナノエマルジョンの製造時、界面活性剤の親水性－親油性HLB値により、製造された粒子サイズ、及び熱力学的安定性を確認した結果である。

【0063】

前述の結果により、ナノエマルジョン製造に使用する界面活性剤の親水性－親油性HLB値が、6～7である場合、1週が過ぎた後、粒子サイズが増大しないということを推し量るとき、粒子の熱力学的安定性が維持されるということを確認することができる。界面活性剤の親水性－親油性HLB値が8～9である場合は、粒子サイズが最も小さいことが確認されたが、粒子のサイズ安定性が維持されず、親水性－親油性HLB値が4～5及び10～11で製造された粒子サイズが相対的に大きく、粒子安定性が確保されないことを確認した。

40

【0064】

図8は、ナノエマルジョンの製造過程、及び遠心分離機で分離した後、フィタリング前のナノエマルジョンの層状分離を示した図面である。具体的には、界面活性剤を含む油相成分に、第1水相成分及び第2水相成分を含む水相成分を混合し、チップ (tip) 型の超音波粉碎器 (sonicator) を利用し、ナノ粒子を製造した。該超音波処理後、水相成分は、ナノ粒子を含むので、遠心分離器で分離した後、フィルタしてナノエマルジョンを得ることができる。

【0065】

50

図11は、細胞生死判別試験 (cell viability) を示した図面である。図11の結果により、本発明のナノエマルジョンの場合には、細胞毒性がないことを確認することができる。

【0066】

図12は、細胞とナノエマルジョンとの経時的な反応を示した図面である。図12の結果により、経時的に、人体に癌標識染色剤を効果的に伝達するということを確認することができる。

【0067】

前述のナノエマルジョン製造方法において、油相成分、界面活性剤及び水相成分は、前述のものと同一である。

【実施例】

【0068】

以下、本明細書について具体的に説明するために、実施例を挙げ、詳細に説明する。しかし、本明細書による実施例は、多くのさまざまな異なる形態に変形され、本明細書の範囲は、以下で記述する実施例に限定されるものであると解釈されるものではない。本明細書の実施例は、当業界で当業者に、本明細書についてさらに完全に説明するために提供されるものである。

【0069】

製造例1. ナノエマルジョン1の製造

ヒアルロン酸 (Research grade from Lifecore, MW = 41 – 65 kDa)、精製した大豆油 (Sigma) を準備した。BSC (Biological Staining Commission) において、顕微鏡用に保証されたメチレンブルー水溶液 (Sigma) を準備した。細胞培養に、適切な界面活性剤 Span 80 (HLB値 4.3 : Sigma)、Tween 80 (HLB値 15 : Sigma) を準備した。下記表のように、多様な親水性－親油性バランスを有する界面活性剤を、Span 80 と Tween 80 との重量比を調節して準備した。

【0070】

前述の準備された界面活性剤を含む油相成分 (大豆油)、第1水相成分 (0.5% アルギン酸ナトリウム (w/w) 及び 0.5% ヒアルロン酸ナトリウム (w/w)) 並びに第2水相成分 (造影剤 : 10 mM メチレンブルー水溶液または 10 mM インジゴカルミン水溶液) をそれぞれ準備した。

【0071】

油相成分 : 界面活性剤 : 第1水相成分 : 第2水相成分を、70 : 10 : 10 : 10 の重量比で含む混合溶液に対して、10分間超音波処理 (Sonic、VC-505 model、振幅 : 20%) し、攪拌混合してナノエマルジョンを製造した。

【0072】

青色の混合物が、透明または半透明になるまで超音波で処理した後の油相成分の結果物は、油相成分からナノエマルジョンが分離しながら、脱イオン水 (DI water) 内で再分散された。ナノ粒子を含む水相成分は、セルロースアセテートシリンジフィルタ (model D I S M I C - 1 3 from Advantec) でフィルタした。

【0073】

製造例2. ナノエマルジョン2の製造

前述の製造例1において、油相成分 : 界面活性剤 : 水相成分の重量比を、7 : 1 : 2 の代わりに 8 : 1 : 1 に調節したことを除いては、前記製造例1と同一方法でナノエマルジョンを製造した。

【0074】

実験例1.

前記製造例1及び2で製造されたナノエマルジョンに対して、ナノ粒子分析機 (dynamic light scattering) を利用し、粒子サイズ、粒子サイズの分布度 PDI、ゼータ電位を測定した結果を下記表1に記載した。

【0075】

【表 1】

サンプル	共界面活性剤 HLB 値	油相/界面活性剤		0日	
		/水相 比率 (wt%)	サイズ* (nm, DLS Z-avg)	PDI	ZP (mV)
NE a	5	7 : 1 : 2	88.62±7.01	0.650±0.10	-22.22±0.71
NE b	6		12.10±17.68	0.448±0.12	-46.01±0.44
NE c	7		15.18±0.90	0.417±0.06	-22.24±0.58
NE d	8		42.12±23.53	0.418±0.05	-24.64±0.39
NE e	5	8 : 1 : 1	59.12±18.25	0.588±0.06	-43.30±0.26
NE f	6		55.96±29.71	0.312±0.03	-46.17±0.35
NE g	7		44.69±22.78	0.295±0.03	-44.20±0.72
NE h	8		61.25±16.6	0.536±0.13	-27.77±0.25

10

【0076】

前記表 1 の結果により、前記ナノエマルジョンの親水性－親油性バランス値を調節し、ナノエマルジョンの大きさを制御することができることを確認した。

【0077】

20

製造例 3. ナノエマルジョン 3 の製造

前記製造例 1 において、平均分子量 (MW = 91 – 175 kDa) がさらに大きいヒアルロン酸を使用したことを除いては、前記製造例 1 と同一方法により、油相成分：界面活性剤：水相成分の重量比 7 : 1 : 2 を使用し、ナノエマルジョンを製造した。第 1 水相成分に該当するアルギン酸ナトリウムとヒアルロン酸ナトリウムとの濃度による粒子のサイズ変化、及びゼータ電位の変化、並びにメチレンブルー濃度による粒子サイズの変化、及びゼータ電位の変化を測定した結果を下記表 2 及び表 3 に記載した。

【0078】

【表 2】

サンプル	油相	共界面活性剤 (Span 80 / Tween 80)	水相
NE 1	3.5	0.42 / 0.08	0.4 / 0.4 / 0.2 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 2	3.5	0.37 / 0.13	0.4 / 0.4 / 0.2 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 3	3.5	0.32 / 0.18	0.4 / 0.4 / 0.2 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 4	3.5	0.28 / 0.22	0.4 / 0.4 / 0.2 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 5	3.5	0.42 / 0.08	m.25 / 0.25 / 0.5 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 6	3.5	0.37 / 0.13	m.25 / 0.25 / 0.5 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 7	3.5	0.32 / 0.18	m.25 / 0.25 / 0.5 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 8	3.5	0.28 / 0.22	m.25 / 0.25 / 0.5 = HA 1wt% / Alg 1wt% / MB 10mM
NE 9	3.5	0.42 / 0.08	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 1mM
NE 10	3.5	0.37 / 0.13	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 1mM
NE 11	3.5	0.32 / 0.18	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 1mM
NE 12	3.5	0.28 / 0.22	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 1mM

30

40

【0079】

【表 3】

	共界面活性剤 HLB 値	0日		7日		ZP (mV)
		サイズ* (nm, DLS Z-avg)	PDI	サイズ* (nm, DLS Z-avg)	PDI	
NE 1	6	208.4±1.4	0.208±0.015	227.2±3.4	0.238±0.007	-46.2±8.7
NE 2	7	196.8±2.8	0.239±0.013	246.2±6.3	0.284±0.010	-30.0±1.8
NE 3	8	114.5±3.4	0.265±0.002	114.5±3.8	0.445±0.029	-30.3±0.2
NE 4	9	42.1±4.3	0.683±0.132	86.0±0.9	0.592±0.001	-35.4±0.4
NE 5	6	142.2±0.5	0.194±0.009	149.5±1.2	0.235±0.001	-38.4±2.7
NE 6	7	157.3±3.1	0.313±0.003	157.8±1.5	0.325±0.052	-31.2±2.4
NE 7	8	149.5±6.5	0.306±0.042	162.8±2.3	0.250±0.009	-33.6±0.8
NE 8	9	184.3±4.7	0.359±0.045	176.0±2.4	0.301±0.035	-28.4±1.3
NE 9	6	158.0±1.6	0.147±0.015	160.9±1.8	0.124±0.027	-31.9±1.8
NE 10	7	125.9±2.6	0.284±0.006	127.4±2.6	0.269±0.005	-33.4±0.7
NE 11	8	38.4±0.4	0.503±0.003	47.2±0.6	0.597±0.005	-33.7±1.0
NE 12	9	47.3±0.8	0.622±0.009	64.6±2.5	0.648±0.032	-23.5±2.1

【0080】

前記表 2 及び表 3 の結果により、前記表 1 の結果のように、ナノエマルジョンの親水性－親油性バランス値により、粒子サイズが変化するというを確認することができる。また、第 1 水相成分と第 2 水相成分（アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、メチレンブルー）との濃度により、粒子サイズと安定性が変化するというを確認することができる。

【0081】

以上、本発明について、その望ましい実施例を中心に説明した。本発明が属する技術分野において当業者であるならば、本発明が、本発明の本質的な特性から外れない範囲で変形された形態に具現されるということを理解することができるでしょう。従って、前述の実施例は、限定的な観点ではなく、説明的な観点から考慮されなければならない。本発明の範囲は、前述の説明ではなく、特許請求の範囲に示されており、それと同等な範囲内にある全ての差異は、本発明に含まれたものであると解釈されなければならないのである。

【0082】

（付記）

（付記 1）

油相成分と、界面活性剤と、水相成分と、を含み、

前記水相成分は、水溶性活性成分と、多糖類と、ヒアルロン酸と、を含むナノエマルジョン。

【0083】

（付記 2）

前記ナノエマルジョンは、前記水溶性活性成分、前記多糖類及びヒアルロン酸によって構成された相互浸透高分子網状構造を含むことを特徴とする付記 1 に記載のナノエマルジョン。

【0084】

（付記 3）

前記ナノエマルジョンの平均粒子の大きさが、200nm以下であることを特徴とする付記 1 に記載のナノエマルジョン。

【0085】

(付記4)

前記ナノエマルジョンは、油中水滴型エマルジョンであることを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0086】

(付記5)

前記ナノエマルジョンは、前記ナノエマルジョンの全体重量を基準に、前記油相成分を70重量%ないし80重量%含み、前記水相成分を10重量%ないし20重量%含み、前記界面活性剤を5重量%ないし15重量%含むことを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0087】

10

(付記6)

前記界面活性剤は、単一界面活性剤または共界面活性剤のうち少なくとも一つを含むことを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0088】

(付記7)

前記ナノエマルジョンに含まれたナノ平均粒子サイズの分布度は、0.2ないし0.7であり、ゼータ電位の値は、-20mVないし-50mVであることを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0089】

(付記8)

20

前記多糖類は、アルギン酸であることを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0090】

(付記9)

前記水溶性活性成分は、水溶性色素または水溶性薬物であることを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0091】

(付記10)

前記水溶性色素は、インジゴカルミン、メチレンブルー、ルゴール溶液、トルイジンブルー、コンゴーレッド、フェノールレッド、インドシアニングリーン、フロオレセインナトリウム及びインディアイソクからなる群のうちから選択されたいずれか一つであることを特徴とする付記9に記載のナノエマルジョン。

30

【0092】

(付記11)

前記水溶性色素の濃度は、1ないし10mMであることを特徴とする付記9に記載のナノエマルジョン。

【0093】

(付記12)

前記ナノエマルジョンの親水性-親油性バランス値は、6ないし9であることを特徴とする付記1に記載のナノエマルジョン。

【0094】

40

(付記13)

油相成分を準備する段階と、

界面活性剤を準備する段階と、

水相成分を準備する段階と、

前記油相成分、前記界面活性剤及び前記水相成分を攪拌混合する段階と、を含み、

前記水相成分は、水溶性活性成分、多糖類及びヒアルロン酸を含むものである付記1ないし11のいずれか1つに記載のナノエマルジョンの製造方法。

【0095】

(付記14)

前記水相成分を準備する段階は、

50

前記多糖類及びヒアルロン酸を含む第1水相成分を準備する段階と、

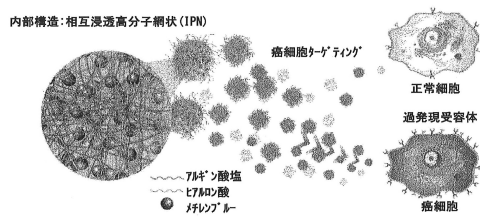
前記水溶性活性成分を含む第2水相成分を準備する段階と、を含むことを特徴とする付記13に記載のナノエマルジョンの製造方法。

【0096】

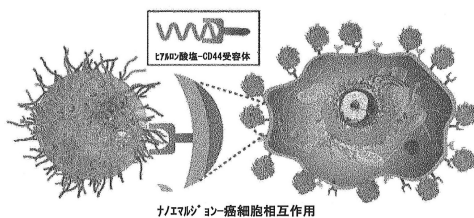
(付記15)

前記第1水相成分と前記第2水相成分との重量比は、1：0.5ないし1：2であることを特徴とする付記14に記載のナノエマルジョンの製造方法。

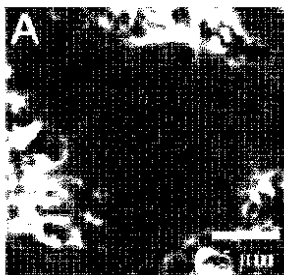
【図1】



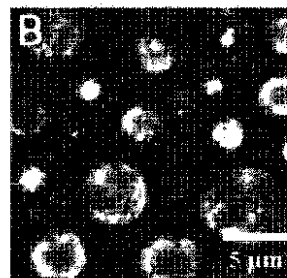
【図2】



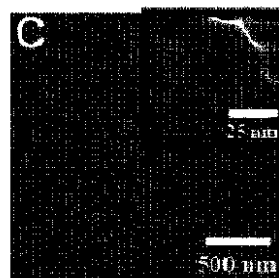
【図3A】



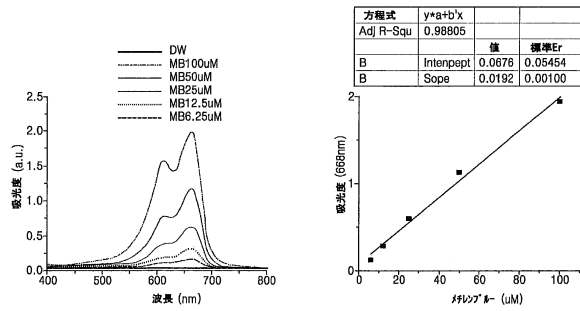
【図3B】



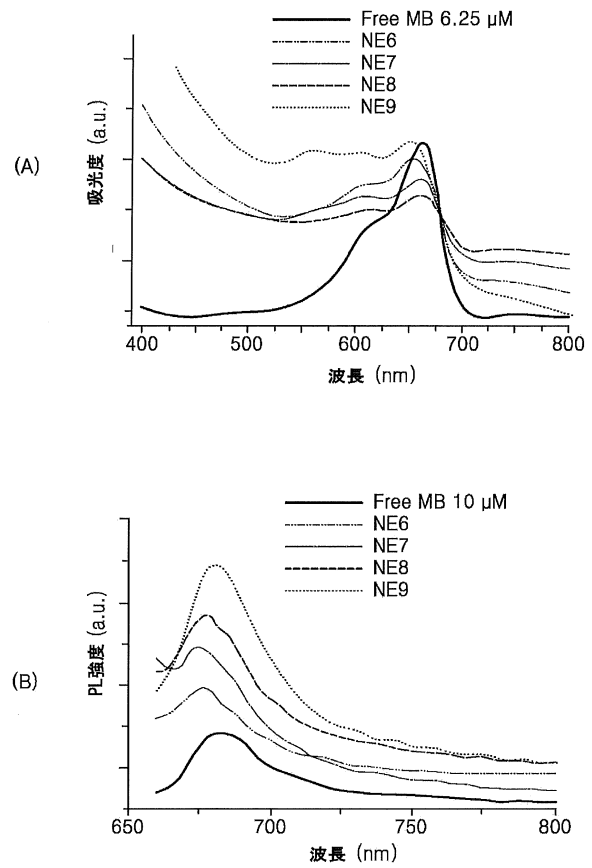
【図3C】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

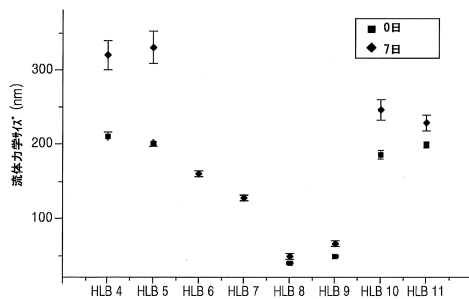
サンプル	油相	共界面活性剤 (Span 80 / Tween 80)	水相
NE 6	3.5	0.42 / 0.08	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 0.1mM
NE 7	3.5	0.37 / 0.13	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 0.1mM
NE 8	3.5	0.32 / 0.18	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 0.1mM
NE 9	3.5	0.28 / 0.22	0.25 / 0.25 / 0.5 = HA 0.5wt% / Alg 0.5wt% / MB 0.1mM

(% w/w)

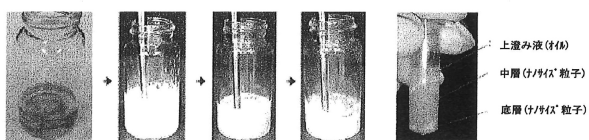
所定のHLB値を得るために、tween 80(a)がspan 80(b)と
いかなる程度の量で混合されているかということを
計算するために次の方程式を利用する:

$$\% (A) = \frac{(X - HLB) \times 100}{HLB - HLB} \quad \% (B) = 100 - \% (A)$$

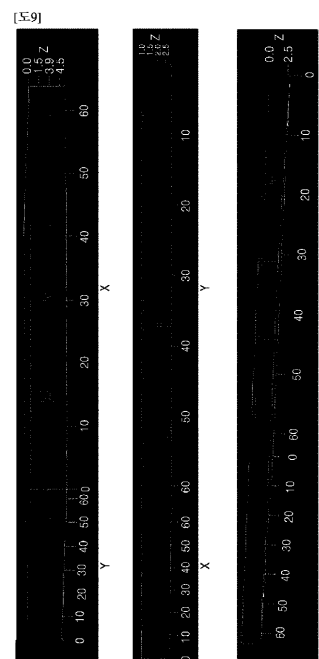
【図 7】



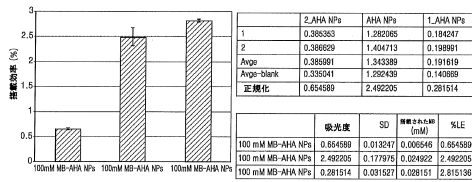
【図 8】



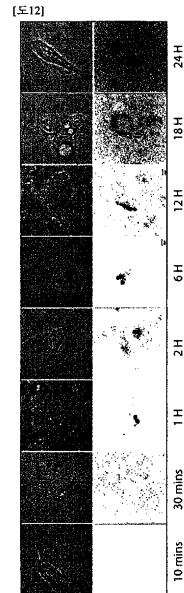
【図 9】



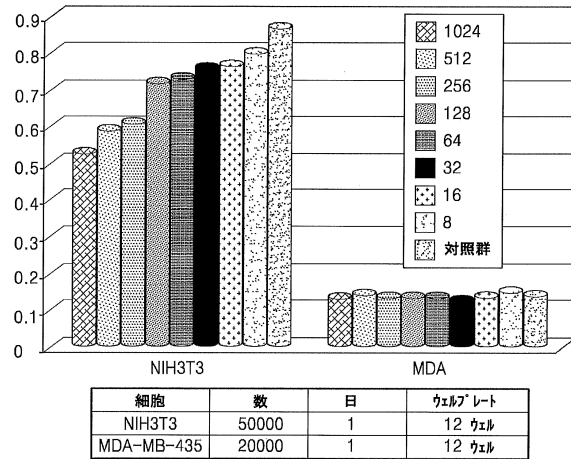
【図 10】



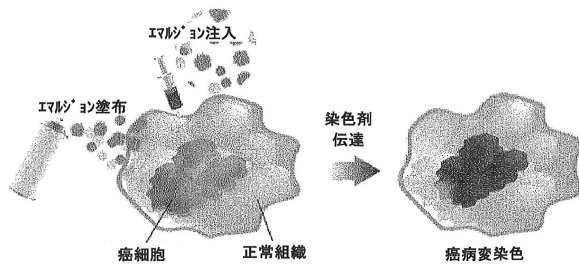
【図 12】



【図 11】



【図 13】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 B 8 2 Y 40/00 (2011.01) B 8 2 Y 40/00 Z NM
 B 8 2 Y 5/00 (2011.01) B 8 2 Y 5/00

(72)発明者 イ、カンウォン
 大韓民国 1 6 2 2 9 キョンギード スウォンーシ ヨントンーク クァンギョーロ 1 4 5 D
 - 3 0 4

(72)発明者 チョン、ヨン
 大韓民国 1 6 2 2 9 キョンギード スウォンーシ ヨントンーク クァンギョーロ 1 4 5 D
 - 6 0 7

(72)発明者 リ、サラ
 大韓民国 1 6 2 2 9 キョンギード スウォンーシ ヨントンーク クァンギョーロ 1 4 5 D
 - 6 0 7

審査官 新熊 忠信

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 1 2 9 4 2 (JP, A)
 国際公開第 1 9 9 8 / 0 2 3 2 9 3 (WO, A1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 6 2 0 0 0 (US, A1)
 特表 2 0 1 1 - 5 0 6 7 1 9 (JP, A)
 国際公開第 2 0 1 4 / 1 8 9 2 5 1 (WO, A1)
 Journal of Pharmaceutical Sciences, 2 0 0 7 年, Vol.96, No.12, p.3379-3389
 Carbohydrate Polymers, 2 0 1 1 年, Vol.86, p.837-843
 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2 0 1 1 年, Vol.88, p711-716
 Open Pharmaceutical Sciences Journal, 2 0 1 5 年, Vol.2, p.21-30

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 4 9 / 0 0
 A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
 B 8 2 Y 5 / 0 0
 B 8 2 Y 4 0 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)