

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5384831号
(P5384831)

(45) 発行日 平成26年1月8日(2014.1.8)

(24) 登録日 平成25年10月11日(2013.10.11)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/28	(2006.01)
A 61 K 9/16	(2006.01)
A 61 K 47/36	(2006.01)
A 61 K 47/42	(2006.01)
A 61 K 47/22	(2006.01)
	A 61 K 37/26
	A 61 K 9/16 Z N M
	A 61 K 47/36
	A 61 K 47/42
	A 61 K 47/22

請求項の数 31 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-549559 (P2007-549559)
(86) (22) 出願日	平成17年12月27日(2005.12.27)
(65) 公表番号	特表2008-528446 (P2008-528446A)
(43) 公表日	平成20年7月31日(2008.7.31)
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/047125
(87) 國際公開番号	W02006/073950
(87) 國際公開日	平成18年7月13日(2006.7.13)
審査請求日	平成20年12月12日(2008.12.12)
(31) 優先権主張番号	11/029,082
(32) 優先日	平成17年1月4日(2005.1.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	11/284,734
(32) 優先日	平成17年11月21日(2005.11.21)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507219217 ナノメガ メディカル コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 657, ニューポートビーチ, リエッツ 15
(73) 特許権者	507219239 チュ, シェン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 657, ニューポートビーチ, リエッツ 15
(73) 特許権者	507219273 スン, シン-ウェン 台湾 シンチュー, カンフーロード, セク ション2, レイン 298, アリー 7, 15番, 7階

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タンパク質ドラッグデリバリ用ナノ粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられる患者用のナノ粒子の薬学的組成物において、各ナノ粒子が、少なくとも1の生物活性剤である第1成分と、負に帯電している第2成分と、分子量が80kDa以下の正に帯電したキトサンである第3成分とを含み、前記ナノ粒子の表面が当該表面での過剰量の前記正に帯電したキトサンによって、正の表面電荷を呈示し、前記第1成分がインスリンであることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 2】

請求項1に記載の薬学的組成物において、前記第2成分がポリグルタミン酸であることを特徴とする薬学的組成物。

10

【請求項 3】

請求項1に記載の薬学的組成物において、前記第2成分が、ポリ- - -グルタミン酸であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 4】

請求項3に記載の薬学的組成物において、ナノ粒子中のポリ- - -グルタミン酸に対する前記キトサンの重量比が0.75ないし0.167又はそれ以上であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 5】

請求項1に記載の薬学的組成物において、前記第2成分がポリ- - -グルタミン酸であり、前記第1成分、前記第2成分、及び前記第3成分の重量比が0.083:0.167

20

: 0 . 75 であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記インスリンの負荷容量が前記ナノ粒子の少なくとも 8 w / w % であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記インスリンの負荷容量が前記ナノ粒子の少なくとも 14 w / w % であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子のゼータ電位が 15 ないし 40 mV であることを特徴とする薬学的組成物。 10

【請求項 9】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子のゼータ電位が 25 ないし 40 mV であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記第 2 成分が、ヘパリン又はアルギン酸塩であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子がカプセル内に更にカプセル化されることを特徴とする薬学的組成物。 20

【請求項 12】

請求項 11 に記載の薬学的組成物において、前記カプセルの表面がグリセリンを含むことを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の薬学的組成物において、前記カプセルの表面が親水性であることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記第 3 成分が架橋されていることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記第 3 成分が 50 % 未満の架橋度で架橋されていることを特徴とする薬学的組成物。 30

【請求項 16】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記第 3 成分がゲニピン、その立体異性体、及びそれらの混合物からなる群から選択される架橋剤で架橋されていることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記キトサンが、さらに、ポリアクリル酸でグラフト化されることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記キトサンが 40 kDa 未満の分子量を有することを特徴とする薬学的組成物。 40

【請求項 19】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子が 100 から 300 ナノメータの平均粒子径を有することを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子がイオングル化法を介して形成されることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子が経口投与により患者に送達されることを特徴とする薬学的組成物。 50

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載の薬学的組成物において、前記ナノ粒子が、血管投与を介して患者に送達されることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 2 3】

生物活性剤としてのインスリンと、分子量が 80 kDa 以下の正に帯電したキトサンと、負に帯電したポリグルタミン酸とを含む腸管内傍細胞輸送を増強するナノ粒子の経口用薬学的組成物であって、前記ナノ粒子の表面が当該表面での過剰量の前記正に帯電したキトサンによって、正の表面電荷を呈示し、負に帯電したポリグルタミン酸が、ナノ粒子の中心部において、正に帯電したキトサンにより中和されることを特徴とする経口用薬学的組成物。

10

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の経口用薬学的組成物において、ポリグルタミン酸に対する前記キトサンの重量比が、0.75 から 0.167 又はそれ以上であることを特徴とする経口用薬学的組成物。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 に記載の経口用薬学的組成物において、前記ナノ粒子のゼータ電位が 15 から 40 mV であることを特徴とする経口用薬学的組成物。

【請求項 2 6】

請求項 2 3 に記載の経口用薬学的組成物において、前記ナノ粒子のゼータ電位が 25 から 40 mV であることを特徴とする経口用薬学的組成物。

20

【請求項 2 7】

請求項 2 3 に記載の経口用薬学的組成物において、前記ナノ粒子が、さらに、カプセルにカプセル化されていることを特徴とする経口用薬学的組成物。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の経口用薬学的組成物において、前記カプセルの表面がグリセリンを含むことを特徴とする経口用薬学的組成物。

【請求項 2 9】

請求項 2 7 に記載の経口用薬学的組成物において、前記カプセルの表面が親水性であることを特徴とする経口用薬学的組成物。

【請求項 3 0】

30

被験動物における少なくとも 1 つの生物活性剤の傍細胞輸送を強化するのに有用な薬剤の調製におけるナノ粒子の使用であって、1 回投与量のナノ粒子を投与するステップを具え、各ナノ粒子が、前記少なくとも 1 つの生物活性剤である第 1 成分と、負に荷電した第 2 成分と、分子量が 80 kDa 以下の正に帯電したキトサンである第 3 成分とを含み、前記ナノ粒子の表面が当該表面での過剰量の前記正に帯電したキトサンによって、正の表面電荷を呈示し、前記第 1 成分がインスリンであることを特徴とする使用。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載の使用において、ナノ粒子の前記用量を投与するステップが、傍細胞輸送を増強するために経口投与を介していることを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】**【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、「Nanoparticles for Paracellular Drug Delivery」と題した、2005年1月4日に出願された、米国特許出願第 11/029,082 号の優先権を主張するものであり、この全ての内容は参考により本明細書に組み込まれている。

【0002】**本発明の分野**

本発明は、強化傍細胞ドラッグデリバリ能力を有するドラッグデリバリシステムとして

50

、タンパク質薬剤を伴うキトサン／ポリ - - グルタミン酸で成るナノ粒子の医学的使用に関する。

【0003】

本発明の背景

薬学的に活性であるペプチドとタンパク質の大量生産が実行可能になった (Bioma cromolecules 2004; 5: 1917 - 1925)。経口経路は、患者への薬物投与の最も都合の良い方法であると考えられている。それにも関わらず、腸管上皮は、ペプチドやタンパク質等の親水性薬剤の吸収に対する主要な障壁である (J. Control. Release 1996; 39: 131 - 138)。これは、親水性薬剤が、脂質二分子細胞膜を通って細胞に容易に拡散することができないからである。親水性薬剤の傍細胞輸送の改良に関心が寄せられた (J. Control. Release 1998; 51: 35 - 46)。傍細胞経路を介した親水性分子の輸送は、隣接する上皮細胞の内腔面に位置している密着結合の存在によって、厳しく制限されている (Annu. Rev. Nutr. 1995; 15: 35 - 55)。これらの密着結合は、親水性分子の傍細胞拡散を制限する障壁を形成する。密着結合の構造及び機能は、とりわけ、Ann. Rev. Physiol. 1998; 60: 121 - 160、及びBallard TS et al., Annu. Rev. Nutr. 1995; 15: 35 - 55 に記載されている。密着結合は、硬い障壁は形成しないが、内腔から血流に、及びその逆に腸管内上皮を通る拡散に重要な役割を果たす。

【0004】

胃腸管の上皮細胞を伴うような層内への細胞を互いに結合する密着結合を介した細胞間の溶質の動きは、傍細胞輸送と呼ばれている。傍細胞輸送は受動的である。傍細胞輸送は、細胞間輸送によって発生した電気化学的勾配と、密着結合による溶媒牽引に依存する。密着結合は、細胞層の先端部と基底部の体液区画を分離する細胞間障壁を形成する。先端部の体液区画から基底部の体液区画への密着結合を通る溶質の移動は、この溶質についての密着結合の「堅固さ」に依存する。

【0005】

高分子ナノ粒子は、ドラッグデリバリ用の担体として広く研究されている (Bioma terials 2002; 23: 3193 - 3201)。生体適合性が良好であるため、ポリ - - カプロラクトンやポリラクチド等の合成生分解性ポリマから作られるナノ粒子に多くの関心が寄せられている (J. Drug Delivery 2000; 7: 215 - 232; Eur. J. Pharm. Biopharm. 1995; 41: 19 - 25)。しかし、これらのナノ粒子は、これらの疎水性特性のために親水性薬剤用には理想的な担体ではない。本発明のいくつかの態様は、親水性キトサンと、単純なイオングル化法によって調製されたポリ - - グルタミン酸ハイドロゲルから成る新規のナノ粒子系に関する。このナノ粒子技術は、有害な溶媒を用いることなく緩やかな条件下で調製される。有機溶媒は、不安定で環境に敏感であるペプチド又はタンパク質薬剤の分解を引き起こすことが知られている (J. Control. Release 2001; 73: 279 - 291)。

【0006】

経口ドラッグデリバリ経路に続いて、タンパク質薬剤は、胃の中の低pHの胃媒質によって直ちに分解される。経口投与に続くタンパク質薬剤の吸収は、高分子量、親水性、及び酵素不活性化に対する感受性という欠点を有する。腸管内上皮でのタンパク質薬剤は、疎水性膜に区画できず、従って、傍細胞経路を介して上皮障壁を横断できるのみである。しかし、密着結合は、親水性分子の傍細胞拡散を制限する障壁を形成する。

【0007】

キトサン (CS)、即ち、カチオン性多糖類は、一般的に、アルカリ性脱アセチルによってキチンから取り出される (J. Control. Release 2004; 96: 285 - 300)。CSが非毒性で軟部組織適合性があることがあり、文献に報告されている (Bioma cromolecules 2004; 5: 1917 - 1925; Bi

o m a c r o m o l e c u l e s 2 0 0 4 ; 5 : 8 2 8 - 8 3 3) 。加えて、 C S が粘膜表面に付着し、上皮細胞間の密着結合を一時的に開くという特殊機能を有することが知られている (P h a r m . R e s . 1 9 9 4 ; 1 1 : 1 3 5 8 - 1 3 6 1) 。ほとんどの市販で入手できる C S は、非常に大きな分子量 (M W) を有し、ときに非実用的であるほぼ 4 . 0 又はそれ以下の p H 値の酢酸溶液に溶かす必要がある。 M W が低いと、 C S のポリカチオン特性を、生理学的範囲に近い p H 値の良好な溶解度で用いることができる。生理学的 p H 範囲でペプチド又はタンパク質薬剤を添加することは、その生物活性を保存するであろう。これに基づいて、本発明のナノ粒子を調製するためにセルラーゼを用いて、市販で入手できる C S を解重合することによって得た低 M W C S がここに開示されている。

10

【 0 0 0 8 】

- P G A 、即ち、アニオン性ペプチドは、莢膜物質として、又はバチルス属の員による粘液として製造される天然化合物である (C r i t . R e v . B i o t e c h n o l . 2 0 0 1 ; 2 1 : 2 1 9 - 2 3 2) 。 - P G A は、アミド結合によって結合した天然に存在する L - グルタミン酸から成る点でユニークである。この天然に存在する - P G A が水溶性であり、生分解性であり、非毒性ポリマであることは、文献に報告されている。

- P G A は、通常、臭化水素を用いてベンジル保護基を取り除くことによって、ポリ (- ベンジル - L - グルタミン酸) から合成される。

【 0 0 0 9 】

T hanou et al . は、腸管内吸収エンハンサとしてキトサン及びその誘導体を報告した (A d v D r u g D e l i v R e v 2 0 0 1 ; 5 0 : S 9 1 - S 1 0 1) 。酸性 p H でプロトン化した場合、キトサンは、粘膜上皮全体にペプチド薬剤の傍細胞浸透性を増加することが可能である。ペプチド薬剤とキトサン又は塩化トリメチルキトサンの共投与は、キトサン成分なしで投与した場合と比較すると、動物のペプチドの生物学的利用能を実質的に上げることが分かった。

20

【 0 0 1 0 】

本発明の概要

本発明の一の目的は、低分子量のキトサン (低 M W C S) 溶液へのポリ - - グルタミン酸 (- P G A) 溶液の添加時に、単純で緩やかなイオングル化法を用いて、傍細胞輸送ドラッグデリバリについての新規なナノ粒子系及び調製方法を提供することである。一の実施例では、本発明の低 M W C S の分子量は約 8 0 k D a 又はそれ以下であり、好みしくは、約 4 0 k D a であり、タンパク質及びペプチド薬剤の生物活性を維持する p H で適切な溶解度に適応している。分子量約 3 0 - 5 0 k D a のキトサン粒子が腎臓不活性であることが明記されている。調製したナノ粒子の粒径とゼータ電位値は、それを構成している組成によって制御される。 T E M (透過型電子顕微鏡) 試験と、 A F M (原子間力顕微鏡) 試験によって得られた結果は、調製したナノ粒子の形態が、一般的に球形であることを示した。腸管内傍細胞輸送の強化における調製したナノ粒子の評価は、 C a c o - 2 細胞単層で、インビトロで研究された。本発明のいくつかの態様では、 C a c o - 2 細胞単層の経上皮電気抵抗 (T E E R) を効果的に下げるために、表面上に占める C S を有するナノ粒子を提供する。共焦点レーザ走査顕微鏡法 (C L S M) による観察は、表面上に占める C S を有するナノ粒子が、 C a c o - 2 細胞間の密着結合が開くことを可能であり、傍細胞経路を介してナノ粒子を輸送できることを確認するものである。このことは、 S ung and associates による論文に書かれている (B i o m a c r o m o l e c u l e s 2 0 0 5 ; 6 : 1 1 0 4 - 1 1 1 2) 。

30

【 0 0 1 1 】

本発明のいくつかの態様は、患者に少なくとも一の生物活性剤をデリバリするように構成した腸管内又は血液の脳傍細胞輸送の強化方法に関し、この方法は、 - P G A とキトサンで構成されたナノ粒子を投与するステップを具える。ここで、ナノ粒子を投与するステップは、経口投与又は血管注射を介するものであっても良い。一の実施例では、キトサンは、ナノ粒子の表面を占める。別の実施例では、ナノ粒子の表面は、正の表面電荷で特

40

50

徴付けられる。

【0012】

更なる実施例では、ナノ粒子のキトサンは、低分子量のキトサンであり、この低分子量のキトサンは、約80kDaの分子量を有し、好ましくは、約50kDa未満、最も好ましくは、約40kDa又はそれ以下の分子量を有する。

【0013】

更なる実施例では、ナノ粒子は、約50から400ナノメータ、好ましくは、約100から300ナノメータ、最も好ましくは、約100から200ナノメータの平均粒径を有する。

【0014】

いくつかの実施例では、ナノ粒子は、治療上有効量の少なくとも一の生物活性剤が添加されており、この生物活性剤は、タンパク質、ペプチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗生素、及び抗炎症剤から成る群より選択される。更に、この生物活性剤は、カルシトニン、シクロスボリン、インスリン、オキシトシン、チロシン、エンケファリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、バソプレシン及びバソプレシン類似体、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターーゼ、インターロイキンII、インターフェロン、コロニイ刺激因子、腫瘍壞死因子、及びメラニン細胞刺激ホルモンから成る群より選択することができる。一の好ましい実施例では、前記生物活性剤が、アルツハイマー拮抗剤である。

【0015】

本発明のいくつかの態様は、-PGA及び低分子量のキトサンを具える腸管内又は血管脳傍細胞輸送を効果的に強化するナノ粒子の経口投与に関する。このキトサンは、ナノ粒子の表面上を占める。本発明のいくつかの態様は、コアに-PGAやヘパリン等の負の成分を、及び低分子キトサンを具える腸管内又は血液脳傍細胞輸送を効果的に強化するナノ粒子の経口投与に関し、このキトサンは正電荷でナノ粒子の表面上を占める。更なる実施例では、ナノ粒子は、インスリン、インスリン類似体、アルツハイマー病拮抗剤、パークリンソン病拮抗剤、又はその他のタンパク質/ペプチド等の少なくとも一の生物活性剤を具える。アルツハイマー病の治療用生物活性剤は、塩酸メマンチン(Merz Pharmaceuticals社製Axura(登録商標))、塩酸ドネペジル(Eisai株式会社製Aricept(登録商標))、酒石酸リバスチグミン(Novartis社製Exelon(登録商標))、塩酸ガランタミン(Johnson & Johnson社製Reminyl(登録商標))、及び塩酸タクリン(Park Davis社製CogneX(登録商標))を含んでいてもよい。インスリン又はインスリン類似体製品の例は、限定されないが、Humulin(登録商標)(Eli Lilly社製)、Humalog(登録商標)(Eli Lilly社製)及びLantus(登録商標)(Avantix社製)を含む。

【0016】

本発明のいくつかの態様は、-PGA及び低分子量のキトサンを具える腸管内又は血管脳傍細胞輸送を効果的に強化するナノ粒子の経口投与に関し、このナノ粒子は、架橋剤で、又は、紫外線の照射等の光で架橋される。

【0017】

本発明のいくつかの態様は、腸管内又は脳血管傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でなる第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでなる第3成分とを具え、この第3成分は、ナノ粒子の表面上を占めている。一の実施例では、第2成分は、-PGA、ヘパリン、又はアルギニンである。別の実施例では、ナノ粒子調製溶液中に第1成分は、0.075から0.091mg/mlの範囲の濃度のインスリンを具え、第2成分は、0.150から0.184mg/mlの範囲の濃度の- PGAを具え、0.67から0.83mg/mlの濃度範囲の第3成分を具える。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの態様は、腸管内又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でなる第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでなる第3成分とを具え、この第3成分は、ナノ粒子の表面上を占めており、少なくとも一の生物活性剤が、アルツハイマー病用拮抗剤であるか、又は、塩酸メマンチン、塩酸ドネペジル、酒石酸リバスチグミン、塩酸ガランタミン、塩酸タクリンから成る群より選択されたアルツハイマー病治療用の生物活性剤である。更なる実施例では、少なくとも一の生物活性剤が、インスリン又はインスリン類似体である。更なる別の実施例では、少なくとも一の生物活性剤が、タンパク質、ペプチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗生剤、及び抗炎症剤から成る群より選択される。

10

【0019】

本発明のいくつかの態様は、腸管内傍細胞輸送、又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、このナノ粒子は、ゲルカプセル、ソフトゲル等で、更にカプセル化されている。

【0020】

本発明のいくつかの態様は、腸管内、又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でなる第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでなる第3成分とを具え、この第3成分はナノ粒子の表面上を占めており、この第3成分は、架橋されている。一の実施例では、架橋度は、50%未満である。別の実施例では、架橋度は、1%から20%の範囲である。

20

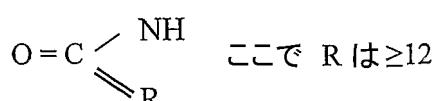
【0021】

本発明のいくつかの態様は、腸管内又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でなる第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでなる第3成分とを具え、この第3成分はナノ粒子の表面上を占めており、ここで、この第3成分は、ゲニピン、その誘導体、類似体、立体異性体、及びこれらの混合物から成る群より選択される架橋剤で架橋されている。一の実施例では、架橋剤は、エポキシ化合物、酸化デンプン (dialdehyde starch)、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、スペルイミノ酸ジメチル、カルボジイミド、スクシンイミジル類、ジイソシアナート類、アシリアジド、ロイテリン、紫外線の放射、デヒドロサーマル処理 (dehydrothermal treatment)、トリス(ヒドロキシメチル)ホスフィン、アスコルビン酸銅、グルコース-リシン、及び光酸化剤 (photo-oxidizers) から成る群より選択される。

30

【0022】

本発明のいくつかの態様は、腸管内又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の投与を提供し、低分子量のキトサンが、80kDa又はそれ以下の分子量を有する。一の実施例では、低分子量のキトサンは、化学式：



40

を有するポリマで更にグラフトされる。

【0023】

本発明のいくつかの態様は、1回分のナノ粒子を投与するステップを具える腸管内又は脳血傍細胞輸送の強化方法を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でなる第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでなる第3成分とを具え、この第3成分はナノ粒子の表面上を占めている。一の実施例では、前記投与量のナノ粒子の投与ステップが、前記腸管内傍細胞輸送を強化するために経口投与を介して行われる。

50

別の実施例では、前記投与量のナノ粒子の投与ステップは、前記脳血管傍細胞輸送を強化するために血管投与、又は静脈血管注射を介して行われる。

【0024】

例示的実施例の詳細な説明

以下に記載されている本発明の好ましい実施例は、特に、キトサン／ポリ- - グルタミン酸／インスリンを具えるナノ粒子の調製、及び上皮細胞間の密着結合を開くことによって、腸管内又は血脳傍細胞透過を強化する透過性に関する。記載が種々の実施例の特定の詳細を説明しているが、この記載は例示のみであり、本発明を限定するような方法で解釈されるべきではないことは明らかである。更に、当業者が考えられる本発明の種々の用途、及びこれらへの変更も、以下に記載されている一般的な概念に包含されている。

10

【0025】

- P G A は、 - アミノ酸と - カルボン酸基のアミド結合によって結合した L - グルタミン酸ユニットから作られる天然に存在するアニオン性ホモポリアミドである (C r i t . R e v . B i o t e c h n o l . 2 0 0 1 ; 2 1 : 2 1 9 - 2 3 2)。 - P G A は、 T C A サイクルを介して細胞内で生産されるある種のバチルス種の細胞外ポリマであり、醜酵培養液中に自由に排出される。環境ストレスに曝されると、生成している株の生存を増加するように - P G A が結合される可能性があるが、その正確な生物学的役割は完全には知られていない。その水溶性、生分解性、可食性、及びヒト及び環境に対する非毒性から、食物、化粧品、医薬、及び水処理においていくつかの用途が、過去数年に研究されてきた。

20

【0026】

例 1

【0027】

ナノ粒子調製の材料及び方法

【0028】

ほぼ 85 % の脱アセチル度を有する C S (M W ~ 2 . 8 × 1 0 ⁵) を、 C h a l l e n g e B i o p r o d u c t s 社 (台中、台湾所在) から入手した。酢酸、セルラーゼ (1 . 9 2 ユニット / mg) 、フルオレセインイソチオシアナート (F I T C) 、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 、過ヨウ素酸、酢酸ナトリウム、ホルムアルデヒド、次硝酸ビスマス、及びハンクス緩衝液 (H B S S) を、 S i g m a C h e m i c a l 社 (S t . L o u i s , MO 所在) から購入した。無水エタノール (E t h a n o l a b s o l u t e a n h y d r o u s) 、及び酒石酸カリウムナトリウムを M e r c k 社 (D a r m s t a d t , Germany 所在) から得た。非必須アミノ酸 (N E A A) 溶液、ウシ胎仔血清 (F B S) 、ゲンタミシン及びトリプシン - E D T A を G i b c o 社 (G r a n d I s l a n d , NY 所在) から入手した。イーグル最小必須培地 (M E M) を B i o W e s t 社 (N u a i l l e , France 所在) から購入した。その他の全ての化学物質及び試薬は、分析グレードであった。

30

【0029】

例 2

【0030】

酵素加水分解による C S の解重合

【0031】

通常の C S を酵素 (セルラーゼ) で処理し、いくつかの変更を有する Q i n e t a l によって記載された方法によって、低 M W C S を製造した (F o o d C h e m . 2 0 0 4 ; 8 4 : 1 0 7 - 1 1 5)。 C S の溶液 (2 0 g / l) を 2 % 酢酸の C S に溶解することによって調製した。 C S の総溶解度を保証するように注意が払われた。 C S の溶解度を確定するよう注意を払った。次いで、 C S 溶液を血管内に導入し、 2 N N a O H 水溶液で所望の pH 5 . 0 に調節した。次いで、セルラーゼ (0 . 1 g) を C S 溶液 (1 0 0 m l) に加えて、 3 7 ℃ で 1 2 時間継続して攪拌した。その後、解重合した C S を、 pH 7 . 0 - 7 . 2 で N a O H 水溶液で沈殿させ、この沈殿した C S を脱イオン水で 3 回洗

40

50

浄した。得られた低MW CSを、凍結乾燥器（東京、日本所在のEylea社製）内で凍結乾燥した。

【0032】

解重合CSの平均分子量を、一連のPLアクアゲル-OHカラム（英国所在のPL Laboratories社製、Guard 8 μm、50×7.5 mmを1本と、MIXED 8 μm、300×7.5 mmを2本）を具えたゲル透過クロマトグラフィ（GPC）システムと、屈折率（RI）検出器（Torrance, CA所在のSFD社製RI 2000-F）によって決定した。多糖類標準（180から788,000の範囲の分子量、英国所在のPolymer Laboratories社製）を用いて、較正曲線を作成した。移動相は、0.01M NaH₂PO₄と0.5M NaNO₃を含有し、pH 10 2.0にした。移動相の流量は1.0 ml/分であり、カラムとRI検出器セルを30に維持した。

【0033】

大抵の市販のCSの用途を制限する要因は、CSの高分子量であり、従って、高粘度及び生理学的pH範囲で難溶性であることである。低MW CSは、これらの制限を克服し、それ故に、様々な分野で非常に広い用途を見出す。低MW低抗原効果であるため、CSを親薬物担体として用いることが提案された（Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004; 57: 101-105）。低MW CSを、非ウイルス遺伝子送出システムとして用い、有望な結果が得られた（Int. J. Pharm. 1999; 178: 231-243）。リゾチーム、ペクチナーゼ、セルラーゼ、プロメライン、ヘミセルラーゼ、リパーゼ、パパイン等のいくつかの疎水性酵素を、解重合CSに用いることができる（Biochim. Biophys. Acta 1996; 1291: 5-15; Biochem. Eng. J. 2001; 7: 85-88; Carbohydr. Res. 1992; 237: 325-332）。標準MW CS（通常MWとしても知られている）と低MW CSの双方のGPCクロマトグラムが、Sung and associates（Biopolymers 2005; 6: 1104-1112）による論文に示されている。セルラーゼは、CS中のグリコシド結合の開裂を触媒することが知られている（Food Chem. 2004; 84: 107-115）。この研究で用いられている低MW CSは、pH 7.0-7.2でNaOH水溶液で解重合CS溶液を沈殿することによって得られた。このようにして得られた低MW CSは、約50kDaのMWを有する。好ましい実施例では、低分子量のキトサンは、約40kDa又はそれ未満の分子量を有する。

【0034】

このようにして得られた低MW CSは、pH 6.0で水溶液に容易に溶解するが、解重合前にpH約4.0の酢酸溶液に溶解させる必要があることが分かった。加えて、低MW CSで調製したナノ粒子は、その粘度が低いため、高MW（標準MWとしても知られている）CSで調製した対応するナノ粒子よりも狭い分布で（解重合前）、有意により小さいサイズを有する。例として、0.20%高MW CS溶液（粘度5.73±0.08 cP、粘度計によって測定した）へ0.10% -PGA水溶液を添加したときの、調製したナノ粒子の平均粒径は、多拡散指数1.0の878.3±28.4であったが、低MW CS溶液（粘度1.29±0.02 cP）へ0.10%の -PGA水溶液を添加すると、多拡散指数0.3で平均粒径218.1±4.1 nmのナノ粒子を形成した。

【0035】

例3

【0036】

- PGAの生成及び精製

【0037】

- PGAは、Yoon et al. によって報告された方法に少し変更を加えるだけで、バチルスリケニホルミス（ATCC 9945, 新竹, 台湾所在のBioresearch Collection and Research Center製）によ

って生成された (Biotechnol. Lett. 2000; 22: 585 - 588)。高粘液性のコロニイ (ATCC 9945a) は、E 培地 (成分は、L-グルタミン酸、20.0 g/l; クエン酸、12.0 g/l; グリセロール、80.0 g/l; NH₄Cl、7.0 g/l; K₂HPO₄、0.5 g/l; MgSO₄ · 7H₂O、0.5 g/l; FeCl₃ · 6H₂O、0.04 g/l; CaCl₂ · 2H₂O、0.15 g/l; MnSO₄ · H₂O、0.104 g/l、pH 6.5) 寒天プレート上で 37 度数回培養したバチルスリケニホルミス (ATCC 9945) から選択した。次いで、若い粘液性コロニイを 10 ml E 培地に移し、24 時間 250 rpm の振盪培養器内で 37 度培養した。その後、500 µl の培養液を、50 ml の E 培地と混合して、950 ml の E 培地を含有する 2.5 リットルジャーファーメンタ (大阪、日本所在の Mituwa 社製 KMJ-2B) に移した。細胞を 37 度培養した。pH を、25% (v/v) の NH₄OH、及び / 又は 2M HCl の自動給送によって 6.5 に調節した。溶解酸素濃度を、空気を供給し、攪拌速度を 1000 rpm まで調節することによって、40% の空気飽和に制御した。
10

【0038】

40 時間後、4 度で、12,000 × g で 20 分間、遠心分離することによって、細胞を培養液から分離した。-PGA を含有する上澄み液を 4 ボリュームのメタノールに注ぎ、緩やかに攪拌をしながら一晩放置した。粗 -PGA を含有する得られた沈殿は、4 度で、12,000 × g で 40 分間、遠心分離することによって回収し、次いで、脱イオン水に溶解して、4 度で、24,000 × g で 20 分間、遠心分離することによって、不溶性の不純物を除去した。-PGA 水溶液を、水を何回か交換しながら 12 時間、蒸留水に対して透析 (MWCO: 100,000, Laguna Hills, CA 所在の Spectrum Laboratories 社製) をすることによって脱塩し、最後に凍結乾燥させて純粋な -PGA を得た。
20

【0039】

例 4

【0040】

CS - - PGA ナノ粒子の調製

【0041】

室温で磁気攪拌の下に、種々の濃度 (0.01 w/v %, 0.05 w/v %, 0.10 w/v %, 0.15 w/v %, 又は 0.20 w/v %) で、低 MW CS 水溶液 (pH 6.0, 10 ml) にピペット (0.5 - 5 ml, Germany 所在の BrandTech Scientific 社製 PLASTIBRAND) を用いて -PGA 水溶液 (pH 7.4, 2 ml) を添加して、ナノ粒子を得た。ナノ粒子を、1 時間 38,000 rpm で超遠心分離法によって収集した。上澄み液を捨て、更なる実験用に、ナノ粒子を脱イオン水に再懸濁させた。FT-IR を用いて、CS - - PGA ナノ粒子中の低 MW CS と -PGA のカルボン酸塩のアミノ基のピーク偏差を分析した。
30

【0042】

上記のように、室温で磁気攪拌の下に、低 MW CS 水溶液 (pH 6.0) へ -PGA 水溶液 (pH 7.4) を添加して、即時にナノ粒子を得た。低 MW CS 水溶液及び CS - - PGA ナノ粒子の FT-IR スペクトルは、Sung and associates による論文に示されている (Biomacromolecules 2005; 6: 1104 - 1112)。2 つの高分子電解質 (-PGA 及び CS) 間の静電相互作用は、長い疎水性セグメント (又は、高密度の中性イオン対を有するセグメント) の形成を即時に誘発し、従って、コロイド状のナノ粒子に分割された高い中性複合体に成る。
40

【0043】

例 5

【0044】

CS - - PGA ナノ粒子の特性

【0045】

C S - - P G A ナノ粒子の形態学的試験を、 T E M (透過電子顕微鏡法) 及び A F M (原子間力顕微鏡法) によって実施した。炭素で被覆した 4 0 0 メッシュの銅格子上に 1 滴のナノ粒子溶液を置いて、 T E M サンプルを準備した。沈殿後約 2 分で、格子をろ過紙で軽くたたいて表面の水を除去し、アルカリ性ビスマス溶液を用いて確実に着色した (Microbiol. Immunol. 1986; 30: 1207-1211)。スライドガラス上に 1 滴のナノ粒子溶液を滴下することによって、 A F M サンプルを準備し、次いで、真空中で乾燥させた。準備したナノ粒子のサイズ分布及びゼータ電位を、 Z et a s i z e r (Worcestershire, 英国所在の Malvern Instruments 社製 3000HS) を用いて測定した。

【0046】

10

種々の濃度の - P G A 及び C S で調製した C S - - P G A ナノ粒子の粒径及びゼータ電位値を決定し、この結果を表 1 a 及び 1 b に示す。調製したナノ粒子の粒径及びゼータ電位値を、シンク溶液 (sink solution) 中の C S の周囲濃度に対する添加溶液中の - P G A の局所濃度の相対量によって主に決定される。 C S が固定濃度で、

- P G A 濃度が増加することによって、 - P G A 分子がより多くの C S 分子と相互作用することができ、従って、より大きなサイズのナノ粒子が形成された (表 1 a, p < 0.05)。

【0047】

C S 分子の量が、局所 - P G A 分子の量を超過すると、過剰の C S 分子がいくつか、 C S - - P G A ナノ粒子の表面上に絡む。従って、得られたナノ粒子は、正に帯電した C S 裸 (表 1 b) によって囲まれた中性高分子電解質複合体コアの構造を示し、コロイドの安定性を確実にする (Langmuir. 2004; 20: 7766-7778)。これと対照的に、局所 - P G A 分子の量が周囲の C S 分子の量を十分に超える場合は、形成したナノ粒子は、この表面上に露出した - P G A を有し、従って、ゼータ電位の負の電荷を有していた。従って、調製した C S - - P G A ナノ粒子の粒径と、ゼータ電位値は、その構成された組成によって制御ができる。 T E M 及び A F M 試験によって得られた結果は、調製したナノ粒子の形態が、滑らかな表面を有する球状であることを示した (図 1 a 及び 1 b)。本発明のいくつかの態様は、約 50 から 400 ナノメータ、好ましくは、約 100 から 300 ナノメータ、最も好ましくは、約 100 から 200 ナノメータの平均粒径を有するナノ粒子に関する。このナノ粒子の形態は、2.5 から 6.6 の p H で滑らかな表面を有する球形を示す。一の実施例では、約 2.5 又はそれ以下の低い p H での本発明のナノ粒子の安定性により、胃の中の酸性媒質に露出した場合、ナノ粒子を無傷のままとすることができます。

20

【0048】

30

例 6

【0049】

C a c o - 2 細胞培養と T E E R 測定

【0050】

40

C a c o - 2 細胞を、 3×10^5 cell / insert の播種密度で、 Costar Transwell 6 ウエル / プレート (NY 所在の Corning Costar 社製) の組織培養表面処理ポリカーボネートフィルタ (直径 24.5 mm、培養領域 4.7 cm²) 上に播種した。20% の F B A 、1% の N E A A 、及び 40 μg / ml の抗生素のゲンタマイシンを添加した M E M (p H 7.4) を培養培地として用い、供与体及び受容体双方の区画に添加した。最初の 6 日間、48 時間毎に培地を交換し、その後は 24 時間毎に培地を交換した。この培地を 37 度 95% の空気と 5% の C O₂ の大気中に保存し、播種後、18 - 21 日で傍細胞輸送実験に用いた (600 - 800 cm² の範囲の T E E R 値)。

【0051】

C a c o - 2 細胞単一層の T E E R 値を、一対のチョップステイック電極に接続した Millipore (登録商標) - 電気抵抗システム (マサチューセッツ州 Bedford

50

所在の Millipore 社製)でモニタした。輸送実験を開始するために、供与体及び受容体区画の培養培地を吸引し、予め暖めておいた輸送培地(25 mM グルコース, pH 6.0 を添加した HBSS)で 2 回洗浄処理した。37 の輸送培地を用いて 30 分間平衡を保った後、この細胞を、37 で 0.5 ml の試験ナノ粒子溶液(0.2 mg/ml)を含有する 2 ml の輸送培地で 2 時間インキュベートした。次いで、ナノ粒子の溶液を注意深く除去し、細胞を HBSS で 3 回洗浄し、新しい培養培地に取り替えた。T E E R を別の 20 時間測定し、Caco-2 細胞単一層上の試験ナノ粒子の効果の可逆性を実験した。

【0052】

細胞間の密着結合は、巨大分子の傍細胞輸送に対する主要な障壁の 1 つである (J. C 10
ontrol. Release 1996; 39: 131-138; J. Control.
Release 1998; 51: 35-46)。経上皮イオン輸送は、細胞間の結合の密着性の良好な指標であると考えられており、この実験で、Caco-2 細胞単一層の T E E R を測定することによって評価された。T E E R の測定を用いて、親水性分子の傍細胞輸送を予測することができる事が報告された (Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004; 58: 225-235)。密着結合が開くと、T E E R 値は、傍細胞経路を通る水及びイオン経路に起因して減少する。Caco-2 細胞単一層は、インビトロモデルとして巨大分子の腸管内傍細胞の浸透性を評価するのに広く用いられている。

【0053】

Caco-2 細胞単一層の T E E R 値に関する調製した CS - - PGA ナノ粒子の効果が図 2 に示されている。図のように、正の表面電荷で調製したナノ粒子は(表面上を CS が支配している、0.01% - PGA : 0.05% CS、0.10% - PGA : 0.2% CS、及び 0.20% - PGA : 0.20% CS)、Caco-2 細胞単一層の T E E R の値を有意に減少することができた ($p < 0.05$)。これらのナノ粒子を 2 時間インキュベートした後、Caco-2 細胞単一層の T E E R 値は、対照群(輸送培地中にナノ粒子の添加がないもの)と比較して、初期値の約 50% に減少した。このことは、表面を支配する CS を有するナノ粒子が、Caco-2 細胞間の密着結合を効果的に開いて、T E E R 値の減少させることを表している。細胞表面上の負に帯電している部位との CS の正に帯電したアミノ基の相互作用と密着結合が、F- アクチンと密着結合のタンパク質 ZO-1 の再分布を誘発する。これは、増加した傍細胞透過性を伴う (Drug Dev. 2001; 50: S91-S101)。キトサンと密着結合タンパク質 ZO-1 間の相互作用が、細胞骨格に対する転位を導くことを示唆している。

【0054】

表 1 a

調製した CS - - PGA ナノ粒子の粒径への - PGA 及び CS の濃度の影響

平均粒径 (nm, n = 5)						
CS	γ -PGA	0.01% ^{a)}	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0.01% ^{b)}		79.0 ± 3.0	103.1 ± 4.6	96.7 ± 1.9	103.6 ± 1.9	140.5 ± 2.0
0.05%		157.4 ± 1.7	120.8 ± 3.9	144.5 ± 2.4	106.2 ± 3.8	165.4 ± 1.7
0.10%		202.2 ± 3.1	232.6 ± 1.2	161.0 ± 1.8	143.7 ± 2.7	218.1 ± 4.1
0.15%		277.7 ± 3.2	264.9 ± 2.1	188.6 ± 2.9	178.0 ± 2.2	301.1 ± 6.4
0.20%		284.1 ± 2.1	402.2 ± 4.0	▲	225.5 ± 3.1	365.5 ± 5.1

a) CS の濃度 (w/v)

b) - PGA の濃度 (w/v)

凝集塊の沈殿が観察された

【0055】

10

20

30

40

50

表 1 b

調製した C S - - P G A ナノ粒子のゼータ電位への - P G A 及び C S の濃度の影響

ゼータ電位 (mV, n = 5)		0.01% ^{a)}	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
CS γ-PGA						
0.01% ^{b)}		15.4 ± 0.3	22.8 ± 0.5	19.8 ± 1.5	16.5 ± 1.4	17.2 ± 1.6
0.05%		-32.7 ± 0.7	23.7 ± 1.7	27.6 ± 0.7	20.3 ± 0.8	19.2 ± 0.6
0.10%		-33.1 ± 1.3	21.1 ± 1.6	20.3 ± 1.1	23.6 ± 0.9	24.7 ± 1.2
0.15%		-33.2 ± 2.1	-21.9 ± 2.0	19.2 ± 0.4	16.9 ± 1.7	19.8 ± 0.3
0.20%		-34.5 ± 0.5	-34.6 ± 0.3	▲	14.6 ± 0.7	16.3 ± 0.7

^{a)} C S の濃度 (w / v)^{b)} - P G A の濃度 (w / v)

凝集塊の沈殿が観察された

【0056】

インキュベートしたナノ粒子の除去後に、T E E R 値の段階的な増加に気付いた。この現象は、C a c o - 2 細胞単一層の細胞間密着結合が、徐々に回復し始めたことを示した；しかし、T E E R 値は、初期値に回復しなかった（図2）。対照的に、負の表面電荷（表面上を占める - P G A、C S、0 . 1 0 % - P G A : 0 . 0 1 % C S、及び0 . 2 0 % - P G A : 0 . 0 1 % C S、及び0 . 2 0 % - P G A : 0 . 2 0 % C S、図2）を有するナノ粒子でインキュベートしたC a c o - 2 細胞単一層のT E E R 値は、対照群と比較して有意に大きな差を示さなかった（p > 0 . 0 5）。これは、- P G A が、細胞間密着結合を開くことについて効果を有さないことを示した。

【0057】

例 7

【0058】

f C S - - P G A ナノ粒子調製及びC L S M 視覚化

【0059】

蛍光 (F I T C) - 標識化 C S - - P G A (f C S - - P G A) ナノ粒子を、共焦点レーザ走査顕微鏡 (C L S M) 用に調製した。本発明のナノ粒子は、正に帯電したキトサンシェルによって囲まれた中性高分子電解質複合体コアの構造を示す。F I T C - 標識化低M W C S (f C S) は、文献 (Pharm. Res. 2003; 20: 1812 - 1819) で報告されているように、F I T C のイソチオシアナート基と、C S の第1級アミノ基との反応に基づいている。簡単に言えば、150 m l の無水メタノール中の100 m g のF I T C を、0 . 1 M 酢酸中の100 m l の1 % 低M W C S に加えた。周囲条件で、暗い中で3時間反応させた後に、0 . 5 M N a O H を用いてp H を約8 - 9 に上げることによって、f C S を沈殿させた。非結合F I T C を取り除くために、蛍光が上澄み液に検出されなくなるまで、沈殿を洗浄して遠心分離すること（10分間に40,000 × g）を繰り返し行った。次いで、80 m l の0 . 1 M 酢酸に溶解させたf C S を、毎日水を交換しながら、5リットルの蒸留水に対して暗い中で3日間透析した。結果として生じたf C S を、凍結乾燥器で凍結乾燥させた。f C S - - P G A ナノ粒子を、例4に記載されている手順に従って調製した。

【0060】

次いで、f C S - - P G A ナノ粒子 (0 . 2 m g / m l) を含有する輸送培地を、C a c o - 2 細胞の供与体区画内に導入した。この細胞は、18 - 21日間トランスウェルの上で前培養した。実験温度は、温度制御システム (Hamden, C T 所在のWarren Instruments社製D H - 35 Culture Dish Heater) によって37 ℃ に維持した。特定の時間間隔でインキュベーションした後、試験サン

10

20

30

40

50

プルを吸引した。次いで、3.7%パラホルムアルデヒドで細胞を固定する前に、前洗浄P B S溶液で2回洗浄した(Pharm. Res. 2003; 20: 1812 - 1819)。逆方向CLSM(inversed CLSM)(TCS SL, Leica, Germany)の下で細胞を試験した。アルゴンレーザ(488nmで励起、510 - 540nmの範囲で収集した発光)を用いて、蛍光画像を観察した。

【0061】

CLSMを用いて、Caco-2細胞単一層の上へ蛍光標識化CS--PGA(fCS--PGA)ナノ粒子の輸送を視覚化した。この非侵襲的方法によって、構造を破壊することなく、Caco-2細胞単一層上へ輸送路の光学的切り出し及び画像化が可能になる(J. Control. Release 1996; 39: 131 - 138)。 10

【0062】

ナノ粒子を用いてインキュベーションした60分後には、細胞間スペースで観察された蛍光強度はより強くなり、インキュベーション後20分で、観察された蛍光強度より深いレベルで蛍光強度が出現した。TERで確認したこれらの観察は、正の表面電荷を有するナノ粒子(表面上を占めるCS)が、Caco-2細胞間の密着結合を開くことができ、傍細胞経路を介した受動的拡散によってナノ粒子の輸送が可能であることを示す。より詳細なデータを、Sung and associatesによる論文に見出すことができる(Biomacromolecules 2005; 6: 1104 - 1112)。

【0063】

例8

【0064】

蛍光標識ナノ粒子でのインビボ実験

【0065】

蛍光(FITC)-標識化CS--PGAナノ粒子を共焦点レーザ走査顕微鏡(CLSM)用に調製した。ラットにfCS--PGAナノ粒子を与えた後、ラットを所定の時間に犠牲にして、腸をCLSM試験用に取り出した。適切な時間に、ナノ粒子の蛍光画像を、十二指腸、空腸、及び回腸を含む腸管の外側面に対する内側面からの様々な深さで、マウスの腸管を貫通するCLSMによって明瞭に観察した。これは、例12で議論される。 20

【0066】

例9

【0067】

ナノ粒子のインスリン負荷容量

【0068】

蛍光(FITC)-標識化--PGAを、キトサン溶液に加え、共焦点レーザ走査顕微鏡(CLSM)評価及び生物活性分析を用いて、インビボ動物実験用の蛍光(FITC)-標識、インスリン負荷CS--PGAナノ粒子を調製した。CS溶液へインスリン--PGA溶液を加えて、イオングル化法を用いることによってインスリン負荷CS--PGAナノ粒子を製造し、次いで、容器内で、磁気攪拌器で攪拌した。 30

【0069】

2つのインスリン濃度を有するナノ粒子を、キトサンで0.75mg/mlから0.167mg/mlの--PGA率に対する調製する。これらの粒径及びゼータ電位を、以下の表2に示す。

【0070】

表2

インスリン濃度 (mg/ml) (n=5)	平均粒子サイズ (nm)	多分散指数 (PI)	ゼータ電位 (mV)
0*	145.6±1.9	0.14±0.01	+32.11±1.61
0.042	185.1±5.6	0.31±0.05	+29.91±1.02
0.083	198.4±6.2	0.30±0.09	+27.83±1.22

(*) インスリンのない対照参照

【0071】

更に、インスリンの結合効率及びインスリンの負荷容量を分析して次式によって計算したもの 10 を図 3 及び図 4 に示す。

【0072】

$$\text{インスリン結合効率 (AE \%)} = \frac{\text{上澄み液中のインスリニーアイソスリニンの全量}}{\text{インスリンの全量}} \times 100\%$$

【0073】

$$\text{負荷容量 (LC)} = \frac{\text{上澄み液中のインスリニーアイソスリニンの全量}}{\text{回収粒子の重量}} \times 100\%$$

【0074】

図 3 は、キトサンと - P G A のナノ粒子中の負荷容量及び結合効率を示し、図 4 は、参考として、キトサン単独 (- P G A の入っていない) のナノ粒子中のインスリンの負荷容量及び結合効率を示す。このデータは、インスリン負荷容量とインスリン結合効率の双方が、コア中の - P G A を有するナノ粒子に対して統計的に高くなっていることを明確に示している。C S - - P G A ナノ粒子に対するインスリンの A E (40 ~ 55 %) と L C (5.0 ~ 14.0 %) は、 - P G A 溶液と混合したインスリンを C S 溶液に加えたときに、イオングル化法を用いることによって得られ、次いで、ナノ粒子を分離するために磁気攪拌器で攪拌した。本発明のいくつかの態様は、コア中に負の成分 (- P G A、ヘパリン、又はアルギン酸等) と低分子量のキトサンを具える腸管又は血液脳傍細胞輸送を効果的に強化するナノ粒子の経口投与に関し、ここで、キトサンは、正に帯電したナノ粒子の表面上を占めている。アルギン酸は非生分解性であるが、約 30 - 50 k D a の分子量を有するアルギン酸粒子は、腎臓不活性であることが規定されている。 30

【0075】

C a l c e t i et al. は、経口インスリン - P E G デリバリシステムのインビボ評価を報告した (Eur J Pharma Sci 2004; 22: 315 - 323)。インスリン - P E G を、チオール化ポリマであるポリ(アクリル酸) - システインによって構成した粘膜接着タブレット内に形成した。治療薬は、5 時間以内で、これらのタブレットから放出されるように維持された。インビボで、糖尿病のマウスに経口投与することによって、グルコースレベルが、時間が経つにつれて著しく減少することが分かった。更に、K r a u l a n d et al. は、非糖尿病ラットについてのチオール化キトサン - インスリンタブレットの別の経口インスリンデリバリ実験を報告した (J. Control. Release 2004, 95: 547 - 555)。デリバリタブレットは、キトサンに共有結合した 2 - イミノチオランを用いて、キトサン - T B A (キトサン - 4 - チオブチルアミジン) 接合体を形成した。非糖尿病覚醒ラットへキトサン - T B A - インスリンタブレットを経口投与した後、血液グルコースレベルが 24 時間で著しく低下した。このことは、腸管内吸収による本明細書で現在開示されているナノ粒子の持続したインスリン放出の観察を支持するものである。M o r c o l et al. による更なる報告 (Int. J. Pharm. 2004; 277: 91 - 97) では、P E G - インスリン - カゼイン - リン酸カルシウム粒子を具える経口デリバリシステムは、糖尿病ラッ 40

10

20

30

40

50

トに経口投与後の長期の血糖低下作用を示す。

【0076】

Pan et al. は、250 - 400 nm の粒径で、インスリン - キトサンナノ粒子を有し、0.1よりも小さい多拡散性を有し、正に帯電して安定したインビボインスリンの腸管内吸収を改善するキトサンナノ粒子 (Int J Pharma 2002; 249: 139 - 147) を開示した。インスリン - キトサンナノ粒子の投与後、強化した薬理学的生物学的利用能で、低血糖が持続されることが分かった。これらのデータは、図 3 及び 4 に示されるような我々の観察を裏付けた；しかし、本発明のインスリン負荷容量及びインスリン結合効率は、コア中の - PGA を有するキトサン - インスリンナノ粒子に対して実質的に高い。

10

【0077】

例 10

【0078】

インスリンナノ粒子安定性

【0079】

図 5 は、CS 0.75 mg / ml、- PGA 0.167 mg / ml、及びインスリン 0.083 mg / ml の例示的な組成を有する本発明のインスリン負荷ナノ粒子の安定性を示す。脱イオン水に懸濁させた調製したインスリン負荷ナノ粒子は、40 日までの貯蔵期間、安定である。まず（図 5 に示すように）、ナノ粒子貯蔵溶液中のインスリン含有率は、およそ 9.5 % の一定レベルに維持する。ナノ粒子安定性は、更に、約 40 日間、約 200 nm の実質的に一定の粒径と、約 +28 mV の実質的に一定のゼータ電位から明らかである。日光、熱、大気条件等の環境効果からナノ粒子を更に分離するソフトジェル又はジェルキャップカプセル中で調製した場合、本発明のインスリン含有ナノ粒子は、その生物安定性を更に持続する。一の実施例では、容易な嚥下が可能となるように、ジェルキャップカプセルの表面に、グリセリンで、又は親水性に、更に処理されても良い。本発明のいくつかの態様は、糖尿病患者を治療又は管理するインスリンの有効量のインスリンナノ粒子の投与を含むジェルキャップピル又はカプセルを提供し、インスリン含有ナノ粒子の安定性は、少なくとも 40 日間、好ましくは 6 月以上、最も好ましくは 2 年以上である。組成物が、単回投与形態で宿主に投与される場合、「有効量のインスリン」によって、十分な量のインスリンが、所望の治療的、予防的（prophylactic）、又はその他の生物学的效果を与えるであろうことを意味する。

20

【0080】

従って、簡便で効果的な経口投与のためには、本発明のナノ粒子の薬学的に有効な量は、ジェルカプセル等のカプセルに入れる、及び、液体溶液等に懸濁させる又はそれ以上の賦形剤でタブレット化することができる。ナノ粒子は、非経口投与用の脱イオン溶液に懸濁させることができる。ナノ粒子を、従来の技術による摂取用のパック塊に形成することができる。例えば、ナノ粒子は、公知のカプセル化手順及び材料を用いて、「硬カプセル」又は軟カプセルとしてカプセル化することができる。カプセル化材料は、胃液内で高い溶解性を有するべきであり、その結果、カプセル摂取後に、粒子が、胃で即座に拡散する。好ましくは、カプセルやタブレットの各単位投与は、薬学的に有効な量のナノ粒子を提供する好適なサイズ及び量のナノ粒子を含む。一の実施例は、サイズ 0 のゼラチンカプセルである。

30

【0081】

例 11

【0082】

インビトロインスリン放出実験

【0083】

図 6 は、ナノ粒子中、CS 0.75 mg / ml、- PGA 0.167 mg / ml、及びインスリン 0.083 mg / ml の例示的組成を有する pH 感受性実験用の pH 調製溶液中の代表的なタンパク質薬剤（例えば、インスリン）放出プロファイルを示す。

40

50

一の実施例では、例示の組成物は、次のような±10%の濃度範囲で各成分を含む：C S 0.75 mg / ml (0.67から0.83 mg / mlの濃度範囲)、- P G A 0.167 mg / ml (0.150から0.184 mg / mlの濃度範囲)、及びインスリン 0.083 mg / ml (0.075から0.091 mg / mlの濃度範囲)。まず、インスリン負荷ナノ粒子の溶液をp H 2.5に調製し、37°、100 rpmでD I S T E K - 2230 A 容器内で胃の環境をシミュレーションした。所定の特定の時間間隔で試料 (n = 5) を採取し、遊離粒子溶液 (p a r t i c l e - f r e e s o l u t i o n) を、22,000 rpmで30分間、遠心分離することによって得、H P L C によって、溶液中の遊離インスリン又は放出インスリンを分析した。試料溶液中の遊離インスリン内容物が、およそ26%に一定するまで(図6に示す)、p Hを6.6に調製し、腸の入口部分をシミュレーションした。この特定の時間間隔の間の、正味放出インスリンは、約(26%から33%)7%である。言い換えれば、p H 2.5とp H 6.6の双方で(溶液中の最小測定可能なインスリンによって明らかであるように)極めて安定である。

【0084】

腸の出口部分を更にシミュレーションするために、インスリン含有ナノ粒子溶液は、p H 7.4に調節される。残ったインスリン(約67%)は、ナノ粒子から放出される。上記のように、ナノ粒子中のインスリンは、本発明のナノ粒子が外側表面のキトサン(腸壁上の選択的粘膜接着)と、正電荷(傍細胞密着結合輸送を強化する)を有するために、遊離インスリンよりも傍細胞輸送モードで腸壁に浸透するのにより効果的である。

【0085】

本発明のいくつかの態様は、腸管内傍細胞輸送又は脳血傍細胞輸送を強化することによって特徴付けられるナノ粒子の患者への投与を提供し、各ナノ粒子は、少なくとも一の生物活性剤でできた第1成分と、負に帯電している第2成分と、低分子量のキトサンでできた第3成分とを具え、第1及び第2成分は中心部を占有し、第3成分は、ナノ粒子の表面を占めている。一の実施例では、第2成分は、- P G A であり、- P G A に対するキトサンの重量比は、0.75から0.167、又はそれ以上である。- P G A に対して過剰のキトサンを有する調製溶液は、ナノ粒子の表面で安定化した正電荷を有するナノ粒子を生じるであろう。本発明のナノ粒子の表面電荷(ゼータ電位)は、約15から40 m Vであり、好ましくは、約25から40 m Vである。

【0086】

例示の目的で、糖尿病治療用のナノ粒子の投与は、インスリンでできた第1成分、- P G A でできた第2成分、及び低分子量のキトサンでできた第3成分を具え、3つの成分の重量比(インスリン：- P G A : C S)は、約0.083 : 0.167 : 0.75である。図4に示すように、従来のキトサン-インスリン混合物のインスリン内容物(即ち、インスリン負荷容量)は、C S : インスリンの比0.75 : 0.043で約7.1±0.1 w / w %、又は、調製溶液中のC S : インスリンの比0.75 : 0.043で、約0.7±0.1 w / w %のインスリン負荷容量である。本発明のいくつかの実施例では、インスリン負荷容量は、ナノ粒子の最小の8 w / w %であり、好ましくは、ナノ粒子の少なくとも14 w / w %である。

【0087】

例12

【0088】

インスリン負荷蛍光標識ナノ粒子でのインビボ実験

【0089】

インビボ実験で、ラットに、0.01 M クエン酸緩衝液(p H 4.3)のストレプトゾトシン(S T Z 75 mg / kg 腹腔内)を注射して、糖尿病ラットを誘導した。ラットの尾から採取した血液を市販のグルコメータで分析して、血液グルコースを測定した。空腹時でない(n = 5)通常のウイスターオスラット(W i s t a r m a l e r a t s)については、ラットの血液グルコースレベルは、107.2±8.1 mg / d Lと測定されるが、糖尿病ラットの血液グルコースレベルは、469.7±34.2 mg / d Lで

10

20

30

40

50

ある。この動物実験において、糖尿病ラットは、12時間空腹にし、4つの異なる条件：(a) 経口脱イオン水(DI)投与と；(b) 30U/kgの経口インスリン投与と；(c) 30U/kgの経口インスリン負荷粒子投与と；(d) 正の対照として、5U/kgの皮下(SC)インスリン注射と；にした。実験中の時間中にラットの尾から血液グルコース濃度を測定した。

【0090】

図7は、グルコース変化(低血糖指数)対インビボ動物実験の時間(n=5)を示す。8時間の時間間隔に渡って、経口DI投与と経口インスリン投与の双方についての、ベースラインの割合としてのグルコース変化は、実験測定誤差範囲内で、比較的一定である。経口投与経路からの実質的に全てのインスリンが、ラットの胃で分解されたことを示している。予想されたように、SCインスリン注入経路についてのこのグルコースの減少は、非常に早い時間間隔でラットの血液中に見られ、この例示的な実験では3時間後に徐々に減り始める。この実験の最も重要な観察は、インスリン負荷ナノ粒子での経口投与経路によってもたらされる。血液グルコースは、投与後約2時間でベースラインから減り始め、実験から8時間以上で、より低いグルコースレベルで持続する。インスリン負荷ナノ粒子が、持続した、又は延期した有効モードで動物のグルコースレベルを調節することを示している。

【0091】

本発明のいくつかの態様は、密着結合を効果的に開くように構成されている表面を占めるCSを有する低MW CS及び-PGAを具える新規なナノ粒子システムに関する。このナノ粒子の表面は、正の表面電荷で特徴付けられている。一の実施例では、本発明のナノ粒子は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質薬剤、その他の親水性高分子等を含む生物活性剤を効果的に腸管内へ送出することを可能にする。このようなポリペプチド剤は、ヒトの患者に経口投与できるあらゆる天然又は合成ポリペプチドであってよい。例示の薬剤は、限定されないが、インスリン；上皮増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、形質転換増殖因子(TGF)、神経増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、骨形態形成タンパク質(BMP)、線維芽細胞増殖因子等の増殖因子；ソマトスタチン；ソマトレム；カルシトニン；副甲状腺ホルモン；コロニイ刺激因子(CSF)；凝固因子；腫瘍因子；インターフェロン；インターロイキン；血管活性腸管ペプチド(VIP)、コレサイトキニン(CCK)、ガストリン、セクレチン、等の胃腸ペプチド；エリスロポエチン；成長ホルモン及びGRF；バソプレシン；オクトレオチド；膵酵素；スーパーオキシドジスマターゼ等のジスマターゼ；甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)；甲状腺刺激ホルモン；黄体形成ホルモン；LHRH；GHRH；組織プラスミノーゲン活性剤；マクロファージ活性剤；絨毛性ゴナドトロピン；ヘパリン；心房性ナトリウム利尿ペプチド；ヘモグロビン；レトロウイルスペクター；レラキシン；シクロスボリン；オキシトシン；ワクチン；モノクローナル抗体；等；及びこれらの化合物の類似物及び誘導体を含む。本発明の生物活性剤は、オキシトシン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン、プロラクチン、ルリベリン又は黄体形成ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、ソマトスタチン、グルカゴン、インターフェロン、ガストリン、テトラガストリン、ペントガストリン、ウロガストリン、セクレチン、カルシトニン、エンケファリン、エンドルフィン、アンジオテンシン、レニン、プラジキニン、バシリトラシン、ポリミキシン、コリスチン、チロシジン、グラミシジン、及びこれらの合成類似体、これらの修飾剤及び薬理活性フラグメント、モノクローナル抗体、及び可溶性ワクチンから成る群より選択されてよい。一の実施例では、生物活性剤は、幹細胞を含む。

【0092】

別の実施例では、本発明のナノ粒子は、血脳障壁及び/又は胃腸障壁を越える生物活性剤の吸収が増加する。更なる別の実施例では、生物活性剤及びナノ粒子が2成分系で経口投与される、又は実質的に同時に経口投与される場合に、外側の層及び表面正電荷にキトサンを有するナノ粒子は、投与した生物活性剤の傍細胞薬物(生物活性剤)輸送を強化するエンハンサとして働く。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

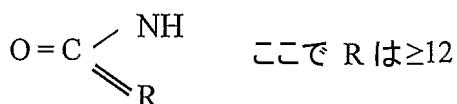
本発明のいくつかの態様は、- P G A 及びキトサンを具えるナノ粒子を投与するステップを具える患者に少なくとも一の生物活性剤をデリバリするよう構成され、適合された背骨活性剤の腸管内又は血脳傍細胞輸送を強化する方法に関し、このナノ粒子は、治療上有効な量又は投与量の少なくとも一の生物活性剤で満ちている。本発明のナノ粒子は、ペプチド及びタンパク質薬剤及びその他の大きな親水性分子用の効果的な腸管内デリバリシステムである。更なる実施例では、生物活性剤は、タンパク質、ペプチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗生素、及び抗炎症剤から成る群より選択される。更なる実施例では、生物活性剤は、カルシトニン、シクロスボリン、インスリン、オキシトシン、チロシン、エンケファリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (T R H) 、卵胞刺激ホルモン (F S H) 、黄体形成ホルモン (L H) 、パソプレシン及びパソプレシン類似体、カタラーゼ、スーパー オキシドジスマターゼ、インターロイキン - I I (I L 2) 、インターフェロン、コロニイ刺激因子 (C S F) 、腫瘍壊死因子 (T N F) 、及びメラニン細胞刺激ホルモンから成る群より選択される。更なる実施例では、生物活性剤は、アルツハイマー拮抗剤である。

(0 0 9 4)

2004年8月11日に出願された米国特許出願第10/916,170号である同時属出願では、生物組織内のリシン、ヒドロキシリシン、又はアルギニン残渣の遊離アミノ基を有する生体材料が、架橋剤であるゲニピンと架橋することができる事が開示されている(Biomaterials 1999; 20: 1759-72)。また、架橋可能な生体材料は、架橋剤で、又は紫外線の照射等の光で架橋することができ、この架橋可能な生体材料は、コラーゲン、ゼラチン、エラスチン、キトサン、NOCC(N,O,カルボキシルメチルキトサン)、フィブリン接着剤、生物学的シーラント等から成る群より選択される。更に、架橋剤は、ゲニピン、その誘導体、類似体(例えば、アグリコン型ゲニポシド酸)、立体異性体、及びこれらの混合物から成る群より選択する事が開示されている。一の実施例では、架橋剤は、更に、エポキシ化合物、酸化デンプン(dialdehyde starch)、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、スペルイミノ酸ジメチル、カルボジイミド、スクシンイミジル類、ジイソシアナート類、アシルアジド、ロイテリン、紫外線の放射、デヒドロサーマル処理(dehydrothermal treatment)、トリス(ヒドロキシメチル)ホスфин、アスコルビン酸銅、グルコース-リシン、及び光酸化剤(photo-oxidizers)等から成る群より選択される。一の実施例では、架橋可能な生体材料を具えるナノ粒子は、例えば、生体材料の架橋可能な成分の架橋の約50%程又はそれ以上、好ましくは、約1から約20%程まで架橋され、生体材料の持続性生分解、及び/又は持続性薬物放出を可能にする。

(0 0 9 5)

メチル、アルキル（例えば、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、等）を有するキトサン、ポリエチレングリコール（PEG）、又はヘパリンをグラフトする等、キトサン構造を変性して、その電荷特性を変えることによって、CS- - - PGAナノ粒子の表面電荷密度（ゼータ電位）は、pH耐性、又は親水性をより大きくすることができる。一の実施例では、このキトサンは、ポリアクリル酸、又は化学式：



を有するポリマでグラフトされる。

(0 0 9 6)

例示の目的で、塩化トリメチルキトサンを用いて、pH 2.5より低いpH、好ましくは、1.0程度の低いpHで、その球形生物安定性を維持するために、CS- - PGAナノ粒子を形成する。本発明のいくつかの態様は、pH 2.5よりも低いpH、好ましく

は、1.0程度の低いpHで、生物安定性を強化する生体適合性薬物担体として、ゲニピン又はその他の架橋剤で架橋された薬物負荷キトサン含有生体材料を提供する。

【0097】

本発明は、これらのいくつかの実施例の特定の詳細を参照して記載されているが、添付の特許請求の範囲に含まれることを除いて、及び含まれる程度まで、本発明の範囲の限定として見なされることを意図していない。多くの改良例及び変型例が、上記の開示を考慮して可能である。

【図面の簡単な説明】

【0098】

本発明の追加の目的及び特徴は、添付の図を参照して読むとより明確になり、この開示自体が、次の例示の実施例の詳細な説明から最も良く理解されるであろう。10

【0099】

【図1a】図1aは、調製したCS- - PGAナノ粒子(0.10% - PGA : 0.20%CS)のTEM顕微鏡写真を示す。

【図1b】図1bは、調製したCS- - PGAナノ粒子(0.01% - PGA : 0.01%CS)のAFM顕微鏡写真を示す。

【図2】図2は、調製したCS- - PGAナノ粒子がCaco-2細胞単一層のTER値に及ぼす影響を示す。

【図3】図3は、キトサン及び - PGAのナノ粒子中のインスリンの負荷容量及び結合効率を示す。20

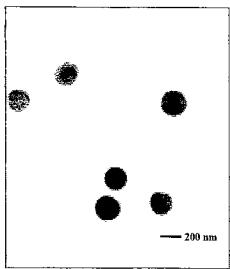
【図4】図4は、参考としてキトサンのナノ粒子中のインスリンの負荷容量及び結合効率を示す。

【図5】図5は、インスリン負荷ナノ粒子の安定性を示す。

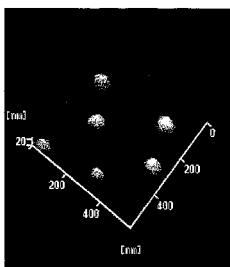
【図6】図6は、pH調製溶液のインスリン放出プロファイルを有する典型的なインビトロ実験を示す。

【図7】図7は、糖尿病ラットに経口投与したインスリン負荷ナノ粒子のインスリンの生物利用能を示す。

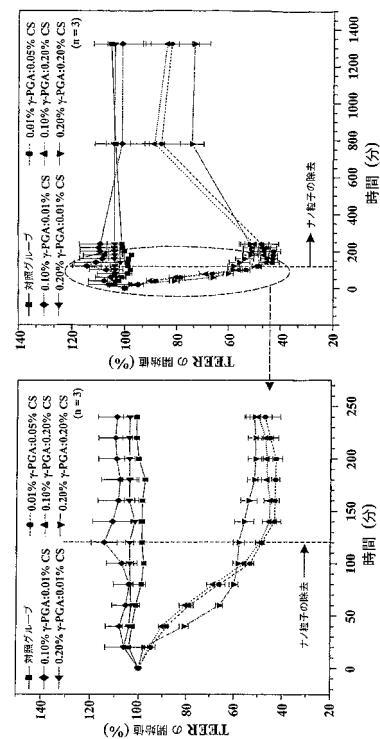
【図1a】



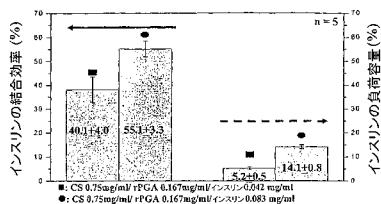
【図1b】



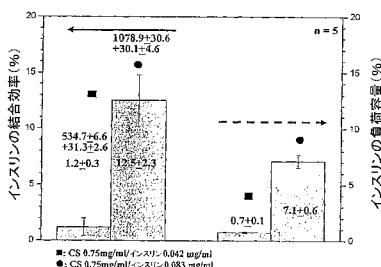
【図2】



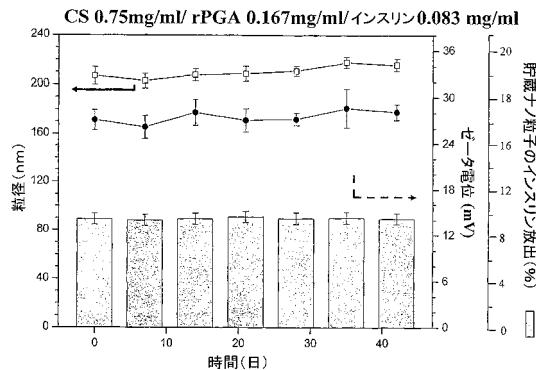
【図3】



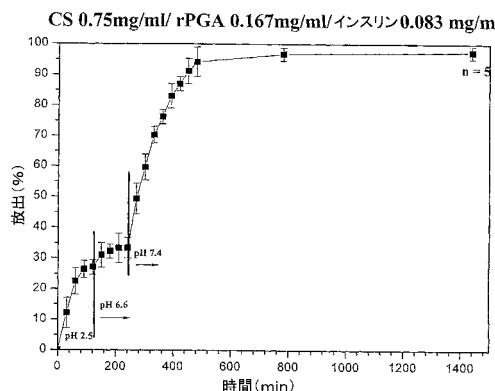
【図4】



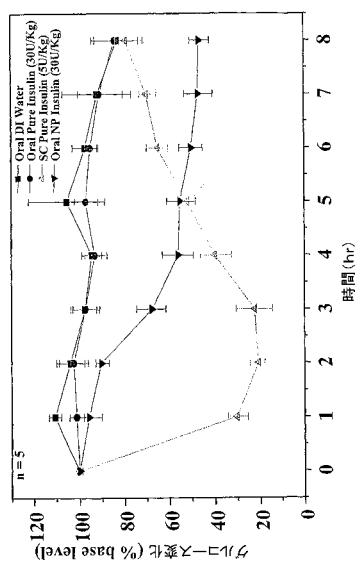
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 K 47/10 (2006.01) A 61 K 47/10

(74)代理人 110001302
特許業務法人北青山インターナショナル

(72)発明者 チュ, シエン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92657, ニューポートビーチ, リエツ 15

(72)発明者 スン, シン - ウェン
台湾 シンチュー, カンフーロード, セクション2, レイン 298, アリー 7, 15番, 7階

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 国際公開第01/001964 (WO, A1)
カナダ国特許出願公開第02535364 (CA, A1)
国際公開第99/018934 (WO, A1)
国際公開第03/059321 (WO, A1)
藤本良太ら, ポリグルタミン酸 キトサン顆粒体の調製とその応用, 粉体に関する討論会講演
論文集, 2004年 9月17日, p.112-115, P4b

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 9/00 - 9/72,
A 61 K 31/00 - 31/80,
A 61 K 47/00 - 47/48,
A 61 K 38/00 - 38/58,
A 61 P 1/00 - 43/00

C A p l u s (S T N),
R E G I S T R Y (S T N),
M E D L I N E (S T N),
E M B A S E (S T N),
B I O S I S (S T N),
P u b M e d