

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 12 月 23 日(23.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/147158 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 5/10 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060226
- (22) 国際出願日: 2010 年 6 月 16 日(16.06.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-147058 2009 年 6 月 19 日(19.06.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 Tokyo (JP). 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本 操 (MIYAMOTO, Misao) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 日産化学工業株式会社内 Tokyo (JP). 岩間 武久 (IWAMA, Takehisa) [JP/JP]; 〒2740069 千葉県船橋市坪井西 2 丁目 10 番 1 号 日産化学工業株式会社物質科学研究所内 Chiba (JP). 宮地 伸英 (MIYACHI, Nobuhide) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 日産化学工業株式会社内 Tokyo (JP). 後藤 雅宏 (GOTO, Masahiro) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁

目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

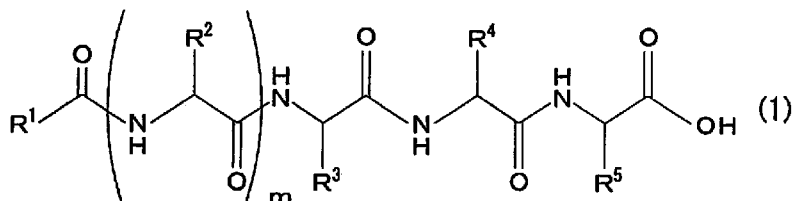
- (74) 代理人: 萼 経夫, 外 (HANABUSA, Tsuneo et al.); 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台 3 丁目 2 番地 新御茶ノ水アーバントリニティ 萼特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: GEL ENCLOSING A COMPOUND BY MEANS OF LOW-MOLECULAR WEIGHT GELLING AGENT

(54) 発明の名称: 低分子ゲル化剤により化合物が内包されたゲル



(57) Abstract: Disclosed is a gel enclosing a compound by means of a low-molecular weight gelling agent. The enclosing gel is characterized by containing a low-molecular weight gelling agent comprising a lipid peptide represented by formula (1) (wherein R₁ through R₅ represent organic groups) or a pharmaceutically usable salt thereof, an aqueous medium gelled by means of said low-molecular weight gelling agent, and at least one type of compound enclosed therein.

(57) 要約: 【課題】低分子ゲル化剤により化合物が内包されたゲルの提供。【解決手段】 【化 1】 (式 (1) 中、R₁乃至 R₅は有機基を表す。) で表される脂質ペプチド又はその薬学的に使用可能な塩からなる低分子ゲル化剤と、該低分子ゲル化剤によりゲル化された水性媒体と、これに内包された少なくとも 1 種以上の化合物とを含むことを特徴とする内包ゲル。

WO 2010/147158 A1

明 細 書

発明の名称：低分子ゲル化剤により化合物が内包されたゲル 技術分野

[0001] 本発明は、低分子ゲル化剤により化合物が内包されたゲルに関する。より詳細には、該化合物として疎水性化合物又は親水性化合物、若しくはその両方の化合物並びに酵素などの蛋白質を内包させたゲルに関する。

本発明の内包ゲルは、スキンケア製品、外用医薬品、創傷被服剤、癒着防止膜、薬物速達システム、芳香剤、消臭剤、防虫剤、殺虫剤、農薬用基材、診断薬用基材、化学反応や酵素反応の溶材、化学センサ用基材、バイオセンサ用基材などに好適に利用可能である。

背景技術

[0002] 従来より、各種溶媒をゲル化させるゲル化剤が研究されている。水溶液や有機溶剤と水溶液の混液をゲル化するゲル剤としては、重合架橋反応により得られる高分子、多糖などのような天然高分子、低分子化合物が自己組織化して形成するゲルを形成する低分子ゲル化剤が知られている。

ところで、これらゲル剤にて重合反応を用いずに安全で安定なシート状のものを作成しようとした際には、天然高分子を溶解させた溶液をシート形状の型に入れゲル化させることになるが、このように作成したゲルシートは水に浸漬しておく次第に天然高分子がゲルシートから水へと抜け落ち、崩壊してしまう。このように、物理ゲルのみでゲルシート作成は極めて困難であった（非特許文献１）。また、低分子ゲルによるゲルシートの作成は知られていなかった。

[0003] 一方、低分子ゲル化剤によるゲルに新たな機能を付与し、該ゲルを機能性材料として活用しようとした場合、例えば、低分子ゲル化剤によりビタミンＣとビタミンＥを同時に内包させたゲルは美白用化粧材として有用であることは予想されるが（特許文献１、２）、親水性低分子化合物と疎水性低分子化合物の両化合物を同時に内包させるゲルを形成することは極めて困難であ

る。

また、低分子ゲル化剤によりチトクローム c のような酵素を内包した場合、ゲル内に取り込まれた酵素がその活性を損なうことなく維持することができれば、そのゲル内で酵素反応を進行させることが可能になると考えられ、さらにゲル内で反応を見ることができ、酵素を内包したゲルをバイオセンサーや検査・診断薬等として使用することができると考えられる（特許文献 3～6）。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：特開 2005-289880
特許文献2：特開 2008-222689
特許文献3：特表 2008-530534
特許文献4：特表 2007-510155
特許文献5：特表 2006-516383
特許文献6：特開 2007-139730

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：西成勝好、K. S. Hossain、田中斎文、新田陽子、武政誠、Fang Yapeng 田中豊一記念シンポジウム ゲルの体積総転移の発見—それからの30年—要旨集、2008年9月10日—12日、SS-1、p39.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 上述より、今まで、疎水性低分子化合物、又は親水性低分子化合物と疎水性低分子化合物の両化合物を同時に内包させること並びに酵素のような蛋白質等を内包させることが可能なゲルシートを含め、そのような化合物を内包させるゲルは提案されていない。
- [0007] そこで、本発明は、上記の事情に基づきなされたものであり、その解決し

ようとする課題は、ビタミンCのような親水性の生理活性物質又はビタミンEのような疎水性の生理活性物質、若しくはそれら化合物を同時に内包させたゲル、並びにチトクロームcのような酵素を内包させたゲルを提供することを目的とする。また、本発明の化合物を内包したゲルを化学反応や酵素反応に用いる方法を提供することを目的とする。また、本発明の目的は、本発明の化合物を内包したゲルを化学反応や酵素反応に用いることにより、該内包ゲルをバイオセンサーとして使用する方法を提供することにある。

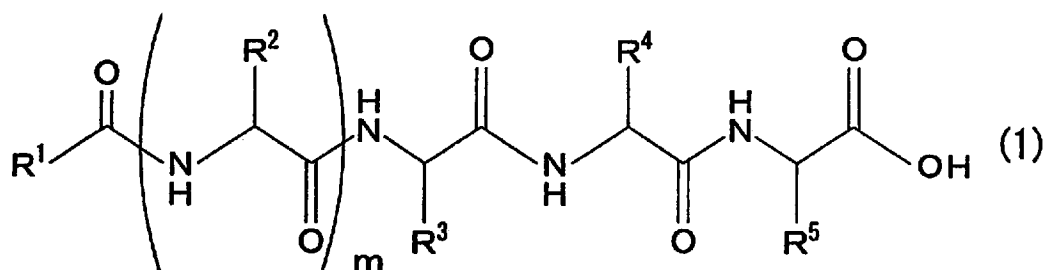
[0008] なお、重合架橋反応にて作成したゲルシートは、ゲル内に未反応の架橋剤などが残存するとゲル内で行う化学反応や酵素反応の妨げになる。一方、天然高分子によるゲルシートは不安定で水に浸漬すると溶解して崩壊する。ゲル内での化学反応や酵素反応を妨げず、かつ酵素や基質、さらには検査対象検体をゲル内に取込ませるために各種水溶に浸漬しても崩壊せず安定で安全なゲルシートを提供することでもある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記の課題を解決するべく鋭意研究を行なった結果、本発明を見出すに至った。

すなわち、第1観点として、式(1)：

[0010] [化1]



[0011] (式中、 R^1 は炭素原子数9乃至23の脂肪族基を表し、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子1乃至3の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至7のアルキル基、フェニルメチル基、フェニルエチル基、又は $(\text{CH}_2)_n - \text{X}$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち少なくとも1つが $-(\text{CH}$

2) $n-X$ 基を表し、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、又は窒素原子を1乃至3個有し得る5員環若しくは5員環と6員環から構成される縮合複素環を表し、 m は1又は2を表す。)で表される脂質ペプチド又はその薬学的に使用可能な塩からなる低分子ゲル化剤と、該低分子ゲル化剤によりゲル化された水性媒体と、これに内包された少なくとも1種以上の化合物とを含むことを特徴とする内包ゲル。

第2観点として、前記式(1)中、 R^1 が不飽和結合を0乃至2個有し得る炭素原子数1乃至23の直鎖状脂肪族基であることを特徴とする、第1観点到に記載の内包ゲル。

第3観点として、前記式(1)中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子1又は2の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至4のアルキル基、フェニルメチル基、又は $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つが $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、又は窒素原子を1乃至2個有し得る5員環又は5員環と6員環から構成される縮合複素環を表すことを特徴とする、第1観点又は第2観点到に記載の内包ゲル。

第4観点として、前記式(1)中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子1又は2の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至4のアルキル基、フェニルメチル基、又は $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つが $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、ピロール基、イミダゾール基、ピラゾール基又はインドール基を表すことを特徴とする、第3観点到に記載の内包ゲル。

第5観点として、前記式(1)中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、 n -ブチル基、 i -ブチル基、第二ブチル基、第三ブチル基、フェニルメチル基、アミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-カル

バモイルプロピル基、2-グアニジノエチル基、3-グアニジノプロピル基、ピロールメチル基、イミダゾールメチル基、ピラゾールメチル基又は3-インドールメチル基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つがアミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-カルバモイルプロピル基、2-グアニジノエチル基、3-グアニジノプロピル基、ピロールメチル基、イミダゾールメチル基、ピラゾールメチル基又は3-インドールメチル基を表すことを特徴とする、第4観点に記載の内包ゲル。

第6観点として、前記式(1)中、 R^2 乃至 R^5 は、それぞれ独立して水素原子、メチル基、i-プロピル基、i-ブチル基、第二ブチル基、フェニルメチル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-グアニジノプロピル基、イミダゾールメチル基又は3-インドールメチル基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つが4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-グアニジノプロピル基、イミダゾールメチル基、又は3-インドールメチル基を表すことを特徴とする、第5観点に記載の内包ゲル。

第7観点として前記式(1)中、 m は1を表すことを特徴とする、第1観点乃至第6観点に記載の内包ゲル。

第8観点として、前記化合物が疎水性化合物又は親水性化合物、若しくはその両方の化合物であることを特徴とする、第1観点乃至第7観点に記載の内包ゲル。

第9観点として、前記化合物が酵素であることを特徴とする、第1観点乃至第7観点の内包ゲル。

第10観点として、前記化合物がチトクロームcであることを特徴とする、第9観点に記載の内包ゲル。

第11観点として、第9観点に記載の内包ゲルを酵素反応に用いる方法。

第12観点として、第10観点に記載の内包ゲルを H_2O_2 による目的物の酸化反応に用いる方法。

第 13 観点として、第 9 観点到記載の内包ゲルを酵素反応に用いることにより、該内包ゲルをバイオセンサーとして使用する方法。

第 14 観点として、第 10 観点到記載の内包ゲルを H_2O_2 による酸化反応に用いることにより、該内包ゲルをバイオセンサーとして使用する方法。

第 15 観点として、第 11 観点又は第 12 観点到記載の内包ゲルを備えたバイオセンサー。

発明の効果

[0012] 本発明の内包ゲルは、ゲル内に疎水性化合物又は親水性化合物、若しくはその両方の化合物を内包することが可能である。また、内包した化合物を徐放することも可能である。そのため、皮膚などの損傷部位にあてるとゲルとしての保湿効果と薬物の徐放といった治療効果や、損傷となる化合物や病原となる蛋白質を捕捉することによる治療効果が期待できる。

[0013] また、本発明の内包ゲルは、化合物としてチトクローム c 等の酵素を内包することも可能であり、かつ内包したものが酵素のような活性を有する蛋白質の場合には、ゲル内に取り込んでも酵素はその活性は損なうことなく維持され、むしろ、そのゲル内で酵素反応を進行させることが可能である。したがって、このような酵素などを取り込んだゲルは、ゲル内で反応を見ることができ、バイオセンサーや検査・診断薬として使用することが可能である。また、本発明の化合物が内包されたゲルは、上述の酵素反応だけでなく、ゲル内に内包させた化合物によっては化学反応をさせることも可能である。

[0014] 以上より、本発明の内包ゲルは、生体や環境に安全であり、患部や損傷部位認識能を有する創傷被覆剤、癒着防止膜、薬物速達システム、外用医薬品用基材、芳香剤・消臭剤・防虫剤・殺虫剤・農薬などの基材、バイオセンサー用基材、環境分析用の基材、土中や水中の汚染物質の捕捉といった基材などに広く利用することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] 図 1 は脂質ペプチドの自己集合化及びそれに続くゲル化の概念図を示す図である。

[図2] 図2はP a l－G G G Hゲルと高分子ゲルにおけるA N Sの蛍光強度の比較を示す図である。

[図3] 図3はP a l－G G G Hゲルと有機溶媒におけるA N Sの蛍光強度の比較を示す図である。

[図4] 図4はゲル化剤及びA N S濃度によるA N S放出率を示す図である。

[図5] 図5はp Hの異なる放出液におけるA N S放出率（左：p H 7. 4で調製したゲル、右：p H 9. 0で調整したゲル）を示す図である。

[図6] 図6はゲルp H 7. 4における異なったp Hの放出液によるリボフラビン放出率を示す図である。

[図7] 図7はp HによるP a l－G G G Hのイオン化状態の変化を示す図である。

[図8] 図8は疎水性物質可溶化の程度の評価基準（（I）は、溶解した状態、（I I）は、若干白濁した状態、（I I I）は、溶解せずに白濁した状態）を示す図である。

[図9] 図9は濁度によるビタミンE可溶化濃度の評価を示す図である。

[図10] 図10は高分子ゲルとP a l－G G G HとのビタミンE内包ゲルの比較を示す図である。

[図11] 図11はビタミンE及びビタミンCの同時内包ゲル（左：ゲル形成前、右：ゲル形成後）を示す図である。

[図12] 図12は濃度の異なるエタノールに対するビタミンEの放出挙動を示す図である。

[図13] 図13はゲルシートへのチトクロームcの吸着を示す図である。

[図14] 図14は異なるp H条件下でのゲルシートへのチトクロームc吸着量を示す図である。

[図15] 図15はチトクロームc浸漬ゲルシートの還元を示す図である。

[図16] 図16はp Hの異なる緩衝液に対するチトクロームcの放出挙動を示す図である。

[図17] 図17はP a l－G G G Hの構造を示す図である。

[図18] 図 18 はチトクローム c のペルオキシターゼ活性測定結果を示す図である。

[図19] 図 19 はCDスペクトル測定結果を示す図である。

[図20] 図 20 はUVスペクトル測定結果を示す図である。

[図21] 図 21 はペルオキシターゼ活性のゲル化剤濃度依存性測定結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明の内包ゲルは、低分子ゲル化剤によりゲル化された水性媒体に少なくとも 1 種以上の化合物を内包させたことを特徴とする内包ゲルである。

[0017] 本発明の化合物が内包されたゲルに用いる低分子ゲル化剤のゲル形成メカニズムは、該低分子ゲル化剤を構成する低分子化合物が自己集合化してファイバー状の形態を形成し、さらに該ファイバーが網目構造を形成し、この網目構造に水や各種水溶液、アルコール水、有機溶媒水等を囲い込み、ゲルを形成する。ここで、「自己集合化」とは、当初ランダムな状態にある物質（分子）群において、分子が適切な外部条件下で分子間の非共有結合性相互作用等により自発的に会合することにより、マクロな機能性集合体に成長することを指す。そのため、本発明の内包ゲルは、自己集合化したファイバーとそれにより構築された網目構造により形成されるゲルを含有し、疎水性化合物であれば疎水環境下のファイバー内に、親水性化合物であればファイバーが構成する網目構造内に内包されることが可能となる。

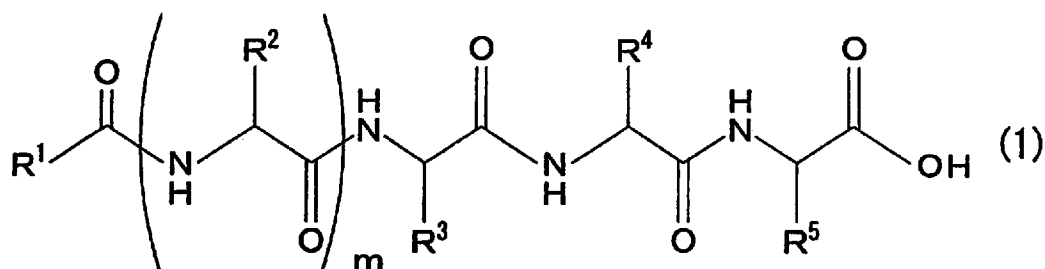
[0018] 本発明の内包ゲルは、上記低分子が自己集合して形成されたファイバーにより構成されたゲルシートなため、重合架橋反応により得たゲルシートと異なり、ゲル内で行う反応を妨げになったり、内包する化合物を分解するような試薬を取り除く作業も必要なく、また天然高分子から得たゲルシートのようにゲルシートから一本ずつ天然高分子が抜け落ちて崩壊する心配の無い、安全で安定なゲルシートを提供することが可能である。

また、このゲルシートの溶剤を凍結乾燥させずに蒸発させることで、フィルムを提供することも可能である。

[0019] 上記低分子ゲル化剤としては、脂質ペプチド又はその薬学的に使用可能な塩（疎水性部位である脂質部と親水性部位であるペプチド部とを有する低分子化合物）を用いることができる。

[0020] 上記脂質ペプチド又はその薬学的に使用可能な塩としては、下記式（１）で表される構造を有し、脂溶性の高い長鎖を有する脂質部（アルキルカルボニル基）とペプチド部（テトラペプチド）より構成される。

[0021] [化2]



[0022] 上記式（１）において、 R^1 は炭素原子数９乃至２３の脂肪族基を表し、好ましくは、 R^1 が不飽和結合を０乃至２個有し得る炭素原子数１１乃至２３の直鎖状脂肪族基である。

R^1 及び隣接するカルボニル基で構成される脂質部（アシル基）の具体例としては、

ミリストイル基、ペンタデカノイル基、パルミトイル基、マルガロイル基、オレオイル基、エライドイル基、リノレオイル基、ステアロイル基、バクセノイル基、オクタデシルカルボニル基、アラキドイル基、イコサノイル基等を挙げることができ、好ましくは、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、マルガロイル基、マルガリル基、ステアロイル基、エライドイル基、ベヘノイル基、オレオイル基、及びカルダノイル基である。

[0023] 上記式（１）において、ペプチド部に含まれる R^2 乃至 R^5 は、それぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子１乃至３の分枝鎖を有し得る炭素原子数１乃至７のアルキル基、フェニルメチル基、フェニルエチル基、又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち少なくとも１つ、より好ましく

は1つ又は2つが $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、 m は1又は2を表す。

[0024] 上記炭素原子1乃至3の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至7のアルキル基とは、好ましくは水素原子、炭素原子1又は2の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至4のアルキル基である。

該炭素原子1又は2の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至4のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、 n -ブチル基、 i -ブチル基、第二ブチル基又は第三ブチル基等を挙げることができ、好ましくは、メチル基、 i -プロピル基、 i -ブチル基、又は第二ブチル基等である。

[0025] 上記 $-(CH_2)_n-X$ 基において、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、又は窒素原子を1乃至3個有し得る5員環若しくは5員環と6員環から構成される縮合複素環を表す。

[0026] 上記 $-(CH_2)_n-X$ 基において、 X は好ましくはアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、ピロール基、イミダゾール基、ピラゾール基又はインドール基を表す。

したがって、上記 $-(CH_2)_n-X$ 基は、好ましくはアミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-カルバモイルプロピル基、2-グアニジノエチル基、3-グアニジノプロピル基、ピロールメチル基、イミダゾールメチル基、ピラゾールメチル基又は3-インドールメチル基等であり、より好ましくは4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、3-カルバモイルプロピル基、イミダゾールメチル基又は3-インドールメチル基である。

[0027] 上記式(1)で表される化合物において、低分子ゲル化剤として特に好適な脂質ペプチドとしては、以下の脂質部とペプチド部(アミノ酸集合部)から形成される化合物である。

なおアミノ酸の略称としては、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、グルタミン(Gln)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、

イソロシン (I l e)、ロイシン (L e u)、リジン (L y s)、トリプトファン (T r p)、バリン (V a l) を表す。：ラウロイル-G l y-G l y-G l y-H i s、ラウロイル-G l y-G l y-G l y-G l n、ラウロイル-G l y-G l y-G l y-A s n、ラウロイル-G l y-G l y-G l y-T r p、ラウロイル-G l y-G l y-G l y-L y s、ラウロイル-G l y-G l y-A l a-H i s、ラウロイル-G l y-G l y-A l a-G l n、ラウロイル-G l y-G l y-A l a-A s n、ラウロイル-G l y-G l y-A l a-T r p、ラウロイル-G l y-G l y-A l a-L y s、ラウロイル-G l y-A l a-G l y-H i s、ラウロイル-G l y-A l a-G l y-G l n、ラウロイル-G l y-A l a-G l y-A s n、ラウロイル-G l y-A l a-G l y-T r p、ラウロイル-G l y-A l a-G l y-L y s、ラウロイル-A l a-G l y-G l y-H i s、ラウロイル-A l a-G l y-G l y-G l n、ラウロイル-A l a-G l y-G l y-A s n、ラウロイル-A l a-G l y-G l y-T r p、ラウロイル-A l a-G l y-G l y-L y s、ラウロイル-G l y-G l y-H i s-G l y、ラウロイル-G l y-H i s-G l y-G l y、ラウロイル-H i s-G l y-G l y-G l y；ミリストイル-G l y-G l y-G l y-H i s、ミリストイル-G l y-G l y-G l y-G l n、ミリストイル-G l y-G l y-G l y-A s n、ミリストイル-G l y-G l y-G l y-T r p、ミリストイル-G l y-G l y-G l y-L y s、ミリストイル-G l y-G l y-A l a-H i s、ミリストイル-G l y-G l y-A l a-G l n、ミリストイル-G l y-G l y-A l a-A s n、ミリストイル-G l y-G l y-A l a-T r p、ミリストイル-G l y-G l y-A l a-L y s、ミリストイル-G l y-A l a-G l y-H i s、ミリストイル-G l y-A l a-G l y-G l n、ミリストイル-G l y-A l a-G l y-A s n、ミリストイル-G l y-A l a-G l y-T r p、ミリストイル-G l y-A l a-G l y-L y s、ミリストイル-A l a-G l y-G l y-H i s、ミリストイル-A l a-G l y-G l y-G l n

、ミリストイルーAla-Gly-Gly-Asn、ミリストイルーAla-Gly-Gly-Trp、ミリストイルーAla-Gly-Gly-Lys、ミリストイルーGly-Gly-His-Gly、ミリストイルーGly-His-Gly-Gly、ミリストイルーHis-Gly-Gly-Gly；パルミトイルーGly-Gly-Gly-His、パルミトイルーGly-Gly-Gly-Gln、パルミトイルーGly-Gly-Gly-Asn、パルミトイルーGly-Gly-Gly-Trp、パルミトイルーGly-Gly-Gly-Lys、パルミトイルーGly-Gly-Ala-His、パルミトイルーGly-Gly-Ala-Gln、パルミトイルーGly-Gly-Ala-Asn、パルミトイルーGly-Gly-Ala-Trp、パルミトイルーGly-Gly-Ala-Lys、パルミトイルーGly-Ala-Gly-His、パルミトイルーGly-Ala-Gly-Gln、パルミトイルーGly-Ala-Gly-Asn、パルミトイルーGly-Ala-Gly-Trp、パルミトイルーGly-Ala-Gly-Lys、パルミトイルーAla-Gly-Gly-Gln、パルミトイルーAla-Gly-Gly-Asn、パルミトイルーAla-Gly-Gly-Trp、パルミトイルーAla-Gly-Gly-Lys、パルミトイルーGly-Gly-His-Gly、パルミトイルーGly-His-Gly-Gly、パルミトイルーHis-Gly-Gly-Gly；ステアロイルーGly-Gly-Gly-His、ステアロイルーGly-Gly-Gly-Gln、ステアロイルーGly-Gly-Gly-Asn、ステアロイルーGly-Gly-Gly-Trp、ステアロイルーGly-Gly-Gly-Lys、ステアロイルーGly-Gly-Ala-His、ステアロイルーGly-Gly-Ala-Gln、ステアロイルーGly-Gly-Ala-Asn、ステアロイルーGly-Gly-Ala-Trp、ステアロイルーGly-Gly-Ala-Lys、ステアロイルーGly-Ala-Gly-His、ステアロイルーGly-Ala-Gly-Gln、ステアロイルーG

l y - A l a - G l y - A s n、ステアロイル - G l y - A l a - G l y - T r p、ステアロイル - G l y - A l a - G l y - L y s、ステアロイル - A l a - G l y - G l y - H i s、ステアロイル - A l a - G l y - G l y - G l n、ステアロイル - A l a - G l y - G l y - A s n、ステアロイル - A l a - G l y - G l y - T r p、ステアロイル - A l a - G l y - G l y - L y s、ステアロイル - G l y - G l y - H i s - G l y、ステアロイル - G l y - H i s - G l y - G l y、ステアロイル - H i s - G l y - G l y - G l y。

[0028] 最も好ましいものとして、ラウロイル - G l y - G l y - G l y - H i s、ミリストイル - G l y - G l y - G l y - H i s、パルミトイル - G l y - G l y - G l y - H i s、パルミトイル - G l y - G l y - H i s - G l y、パルミトイル - G l y - H i s - G l y - G l y、パルミトイル - H i s - G l y - G l y - G l y、ステアロイル - G l y - G l y - G l y - H i s等が挙げられる。

[0029] 本発明の内包ゲルに用いるゲル化された水性媒体は、前記低分子ゲル化剤及び水性媒体（溶媒）を含有して形成される。

前記溶媒としては、低分子ゲル化剤のファイバー化やヒドロゲル化を防げるものでなければ特に限定されないが、好ましくは、水、アルコール、水とアルコールの混合溶媒、水と水溶性溶媒の混合溶液を用いることができる。より好ましくは、水又は水とアルコールの混合溶媒であり、さらに好ましくは、水である。

前記アルコールは、好ましくは水に自由に溶解する水溶性アルコールであり、より好ましくは炭素原子数1乃至6のアルコールであり、さらに好ましくは、メタノール、エタノール、2-プロパノール又はi-ブタノールであり、さらに特に好ましくはエタノール又は2-プロパノールである。

前記水溶性有機溶媒とは、アルコール以外の有機溶媒であって、かつ水に任意の割合で溶解する有機溶媒を意味する。用いる水溶性有機溶媒の例としては、アセトン又はジオキサン等が挙げられる。

[0030] 上記ゲル化された水性媒体は塩を含有しても良い。かかる塩はヒドロゲル形成に至る段階のどの段階で加えても良いが、ヒドロゲル化剤を加える前に溶媒を加えて溶液にしておくことが好ましい。

塩は、複数種を加えても良いが、好ましくは1又は2種である。塩を2種類加えることで、溶液が緩衝能をもつことも望ましい。

前記の塩は、無機塩若しくは有機塩である。好ましい無機塩の例としては、炭酸塩、無機硫酸塩若しくは無機リン酸塩が挙げられる。より好ましくは、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム又はリン酸二水素ナトリウムである。また、好ましい有機塩の例としては、有機アミンの塩酸塩若しくは有機アミン酢酸塩が挙げられる。より好ましくは、エチレンジアミン塩酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩である。

[0031] また、本発明のゲルに内包された化合物としては、疎水性化合物、親水性化合物、酵素、及びピレン等が挙げられる。

[0032] 上記疎水性化合物としては、例えば、ビタミンE（トコフェロール）、ピレン、アゼライン酸誘導体、レチノール（ビタミンAアルコール）、レチノイン酸、ヒドロキシケイ皮酸、カフェイン、ヒノキチオール、カロテノイド、アスタキサンチン、ステロイド、インドメタシン、及びケトプロフェン等が挙げられる。

[0033] 上記親水性化合物としては、例えば、ビタミンC（アスコルビン酸）、ビタミンB2（リボフラビン）、コウジ酸、グルコサミン、アゼライン酸、ピリドキシン（ビタミンB6）、パントテン酸（ビタミンB5）、アルブチン、及びキトサン等が挙げられる。

[0034] 上記酵素としては、チトクロームc等が挙げられる。

[0035] さらに、本発明の内包ゲルは、化合物として、例えば、アスコルビン酸及びその誘導体、コウジ酸及びその誘導体、グルコサミン及びその誘導体、アゼライン及びその誘導体、レチノール酸及びその誘導体、ピリドキシン及び

その誘導体、パントテン酸及びその誘導体、アルブチン及びその誘導体、トコフェロール及びその誘導体、ヒドロキシケイ皮酸及びその誘導体、キトサン、キトサン分解物、カフェイン誘導体、ヒノキチオール、カロテノイド、及びアスタキサンチン等を内包することにより、美白効果を発揮し得る。

[0036] [ゲル形成メカニズム]

本発明に用いる低分子ゲル化剤である、上記式（１）で表される低分子化合物（脂質ペプチド）は、水溶液又はアルコール溶液系に投入されると、式（１）におけるペプチド部が水素結合により分子間非共有結合を形成し、一方、式（１）における脂質部が疎水的にパッキングするように自己集合化（或いは自己組織化ともいう）し、ファイバーが形成される。ファイバーの形状は限定されないが、筒状又は板状の形状が挙げられる。

参考として図１に脂質ペプチドの自己集合化及びゲル化の概念図の一例を示す（但し、本発明の内包ゲルにおいて、全ての脂質ペプチドが図１に示す自己集合化及びゲル化の形態をとっているとは限らない）。該脂質ペプチド分子（a）は疎水性部位である脂質部を中心として集合し（b）、自己集合化によりファイバー（c）を形成する。

ファイバー形成には、前記低分子ゲル化剤を１種類用いても良いし２種類以上を組み合わせ用いても良い。好ましくは、１種類又は２種類を用い、さらに好ましくは、１種類を用いる。ただし、２種類用いる場合は、１種類の場合と異なる性質を得ることが期待できる。

[0037] 本発明に用いる低分子ゲル化剤は、界面活性剤を混合させて自己集合化することによりファイバーを形成することもできる。かかる界面活性剤としては、アニオン界面活性剤、ノニオン界面活性剤又はカチオン界面活性剤が挙げられる。

[0038] 上記ファイバーが水溶液又はアルコール水溶液等の中で形成されると、このファイバーが三次元網目構造を形成し（例えば、図１における（d）参照）、さらに、ファイバー表面の親水性部分（ペプチド部）と水性溶媒間で非共有結合を形成して膨潤することにより、水溶液又はアルコール水溶液全体

がゲル化し、水性媒体がゲル化される。

[0039] そして、本発明の内包ゲルでは、疎水性化合物は自己集合体のファイバー内に取り込まれ、一方、親水性化合物や蛋白質はファイバーが構成する網目構造内に取り込まれ、ゲル内に化合物が内包されることとなる。

[0040] また、本発明の内包ゲルは、内包したものが酵素のような活性を有する蛋白質の場合には、ゲル内に取り込んでも酵素はその活性は損なうことなく維持されるため、そのゲル内で酵素反応や酸化還元反応を進行させることが可能である。したがって、このような酵素などを内包したゲルは、バイオセンサーや検査・診断薬として使用することが可能である。

[0041] また、チトクローム c はヘムを有し、軸配位子としてヒスチジンを有するにも関わらず、通常は軸配位子としてメチオニンが配位しており過酸化水素がヘムと接触しにくくなっていることや西洋わさび由来ペルオキシダーゼのような P u s h - P u l l 機構を担うようなアミノ酸が存在しないことから、チトクローム c 単独でのペルオキシダーゼ活性は極めて低いが、生体膜との相互作用、主にチトクローム c との相互作用、主にチトクローム c の表面の正に帯電したリジン残基と生体膜の負電荷との静電相互作用などにより、チトクローム c のヘム近傍の構造が変化しペルオキシダーゼ活性が強化されると考えられている。

そこで、P a l - G G G H ゲル中に内包されたチトクローム c は、P a l - G G G H ゲルが生体膜と同様のチトクローム c との相互作用を有することが予測され、P a l - G G G H ゲル中に内包されたチトクローム c のペルオキシダーゼ活性の強化及びチトクローム c の安定性強化が期待される。

[0042] さらに、本発明では、脂肪酸やアミノ酸といった天然由来原料により構成された低分子ゲル化剤を用いることで、皮膚面などを被覆しても安心安全に使用できる。

このため、本発明の内包ゲルは、患部や損傷部位認識能を有する創傷被覆剤、癒着防止膜、薬物速達システム、スキンケア製品、ヘアケア製品、外用医薬品、芳香剤、消臭剤、防虫剤、殺虫剤、農薬用基材、洗浄剤、塗料、防

腐剤、環境汚染物質の捕捉用基材などに広く利用することができる。

実施例

[0043] 以下、実施例を挙げて、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

[0044] [実施例で用いる略記号]

以下の実施例で用いる略記号の意味は、次のとおりである。

G l y : グリシン

H i s : ヒスチジン

H B T U : 2- (1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート (渡辺化学工業 (株))

H O B t : 1-ヒドロキシーベンゾトリアゾール ((株) ペプチド研究所)

D M F : ジメチルホルムアミド

D C M : ジクロロメタン

D I E A : N, N-ジイソプロピルエチルアミン (東京化成工業 (株))

T F A : トリフルオロ酢酸 (渡辺化学工業 (株))

T I S : トリイソプロピルシラン (渡辺化学工業 (株))

P a l -G G G H : パルミトイル-G l y -G l y -G l y -H i s

c y t c : チトクローム c

[0045] [脂質ペプチドの合成]

脂質ペプチドは、以下に示す F m o c 固相ペプチド合成法の手順に従って合成した。樹脂は主にアミノ酸-Bar l o s R e s i n を用いた。合成スケールは 0.3 m m o l で行った。

[0046] <合成例 1 : N-パルミトイル-G l y -G l y -G l y -H i s のトリフルオロ酢酸塩の合成>

ヒスチジン Bar l o s R e s i n (渡辺化学工業 (株)) 390 mg を PD-10 カラムに添加し、DCM 5 ml にて 3 回、DMF 5 ml にて 3 回、それぞれ洗浄した。次に、上記カラムに F m o c -G l y -O H (

渡辺化学工業（株））を270mg、縮合剤溶液1（HBTU 3.05g、HOBt 1.25gをDMF 16mlに溶解したもの）2.1mlを添加し、さらに縮合剤溶液2（DIEA 2.75mlをDMF 14.25mlに溶解したもの）2.1mlを加えた。これを30分間バイブレーターにて攪拌した後、DMF 5mlにて5回、DCM 5mlにて3回、さらにDMF 5mlにて3回、それぞれ洗浄した。

次に、20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて1分間攪拌した後溶液を捨て、再び20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて45分間攪拌し、DMF 5mlにて5回洗浄した。

[0047] 再度、上記カラムにFmoc-Gly-OHを270mg、前記縮合剤1及び2を2.1mlずつ添加した。これを20分間バイブレーターにて攪拌した後、DMF 5mlにて5回、DCM 5mlにて3回、さらにDMF 5mlにて3回、それぞれ洗浄した。次に、20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて1分間攪拌した後溶液を捨て、再び20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて45分間攪拌し、DMF 5mlにて5回洗浄した。

[0048] 再度、上記カラムにFmoc-Gly-OHを270mg、前記縮合剤1及び2を2.1mlずつ添加し、これを20分間バイブレーターにて攪拌した後、DMF 5mlにて5回、DCM 5mlにて3回、さらにDMF 5mlにて3回、それぞれ洗浄した。次に、20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて1分間攪拌した後溶液を捨て、再び20%ピペリジン/DMF溶液5mlを加えて45分間攪拌し、DMF 5mlにて5回洗浄した。

[0049] パルミチン酸（Aldrich社製）約230mgをカラムに添加し、前記縮合剤1及び2を2.1mlずつ添加し、90分間バイブレーターにて攪拌した。反応後、DMF 5mlにて5回、DCM 5mlにて5回、メタノール5mlにて5回、それぞれ洗浄した後、樹脂を一晩真空乾燥させた。

乾燥後、TFA 3.8ml及びTIS 0.1mlをカラムに添加し1時間攪拌した。

回収した混合溶液に水を添加し、固形物を析出させた後、吸引ろ過を行って生成物を回収し、凍結乾燥を行った後、アセトニトリル4mlにて3回洗浄することで、目的化合物を得た。

[0050] FT-MS +m/z calc. for C₂₈H₄₉N₆O₆ [M+H]⁺ 565.37140, found 565.3572

[0051] <合成例2：N-パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisのトリフルオロ酢酸塩の中和>

N-パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisのトリフルオロ酢酸塩0.5gに、50mlの飽和NaHCO₃水を加えて分散させ、遠心分離（3500rpm、10分間、8℃）（トミー社製、SRX-201高速冷却遠心機）した。得られたペレットにEtOH 40mlを加え、遠心分離（3500rpm、10分間、8℃）し、さらに、ペレットに2% NaCl水を加え、遠心分離（3500rpm、10分間、8℃）した。その後、得られたペレットに50mlの純水を加え、遠心（3500rpm、10分間、8℃）で洗浄した。この洗浄操作を2回繰り返して、ペレットを凍結乾燥（（株）池田理化社製、VFD-SP、真空凍結乾燥機）して、450mgの白色固形物を得た。

[0052] 上述の方法で合成したパルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisを低分子ゲル化剤として用いて、以下の実施例を行った。

なお、本発明で用いる低分子ゲル化剤は、不織布や高分子化合物といった基材を用いずに簡便に当該低分子ゲル化剤のみでゲルをシート形状をはじめ様々な形状にすることが可能であるが、実施例1乃至実施例7においては、便宜上、ゲルをシート状にして用いている。

[0053] <実施例1：パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisの酸性、中性、アルカリ溶液によるゲルシート>

パルミトイル-Gly-Gly-Gly-His 40.8mgをスクリー管（マルエムNO7）に入れ、0.2%（w/v）（wは質量（g）、vは体積（mL）を意味する。）の濃度になるようにリン酸緩衝液（和光純

薬工業（株）製 phosphate buffer powder、 $1/15 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH}=7.4$ 、組成： Na_2HPO_4 7.6 g、 KH_2PO_4 1.8 g/L）を添加し、ドライ・バス・インキュベーター（First Gene社製）で、加熱（ 100°C 、10分）し、得られた溶解液のうち3 mLをスチロール非帯電角型ケース（ $36 \text{ mm} \times 36 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$ ）に移し、室温まで冷却した。溶液が固化し、ゲル化を確認後、日本薬局方水3 mLを滴下し、室温で、静置させた。1日後、シート状ゲルの切片（ $1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ ）を切取り、スクリー管（マルエムNO5）に入れ、日本薬局方水、及びリン酸緩衝液（ $\text{pH}=2$ 、 $\text{pH}=7.4$ 、 $\text{pH}=11$ 、 pH は、 NaOH 又は HCl を滴下して調製）6 mLを加え、3ヶ月間、シート状ゲルの切片が融解・分解するか否か、3ヶ月間達観的に観察した。

[0054] その結果、パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisのシート状切片ゲルは、酸性、中性、アルカリ性水浸漬液中で、融解・分解することなく、3ヶ月間、シート状切片ゲルとして観察された。

[0055] [パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisゲルシートのアルブミンの吸着評価]

パルミトイル-Gly-Gly-Gly-His 81.6 mg及び60.1 mgに超純水（栗田工業（株）製）、リン酸緩衝液（和光純薬工業（株）製 phosphate buffer powder、 $1/15 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH}=7.4$ 、組成： Na_2HPO_4 7.6 g、 KH_2PO_4 1.8 g/L）を加え、2時間ソニケーション後、 90°C で3分間加熱して得られた溶解液のうち3 mLをスチロール非帯電角型ケース（ $36 \text{ mm} \times 36 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$ ）に移し、室温静置により0.3%（w/v）濃度のパルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisゲルを作成した。このゲルを1 g切り取って、超純水（栗田工業（株）製）5 mLの入ったスクリー管（マルエムNO7）に入れ24時間室温静置し、シート化した。この水浸漬中のゲルシートに超純水に溶解させたAlbumin from bovine serum Fraction V（Sigma社製、 $\geq 98\%$ 、BSA）

を最終濃度 1 mg/ml になるように添加した。浸漬液 $500 \mu\text{l}$ を採取し、外液の浸漬液中の BSA 量を HPLC で測定し、ゲルへの吸着タンパク量を算出した。

[0056] [HPLC 測定条件]

カラム: Inertsil WP300 C8 $5 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm i.d.} \times 150 \text{ mm}$

溶離液: A; $0.1\% \text{ TFA-MeCN}$ B; $0.1\% \text{ TFA-Water}$

B; $70\% (0 \text{ min}) - 20\% (10 \text{ min})$ (分析時間: 10 min)

流速: 0.3 ml/min

カラム温度: 60°C

検出: $UV 214 \text{ nm}$ ($BW 10 \text{ nm}$)

注入量: $2 \mu\text{l}$

ポストコンディショニング: 7 min

[0057] [表1]

[表1] パルミトイル-Gly-Gly-Gly-His ゲルシートのアルブミンの吸着評価

日数	BSA 吸着量 (mg/g)	
	水媒体	PBS 媒体
1	0.89	0.87
2	1.09	0.43
5	1.23	0.60

[0058] 表1の結果から、媒体として水及びPBSを用いて作成したパルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisのゲルシートは、BSAを吸着させた。

以上の結果から、パルミトイル-Gly-Gly-Gly-Hisゲルシートはアルブミン吸着効果を有する。

[0059] <実施例 3 : リボフラビン内包パルミトイル-G l y - G l y - G l y - H i s ゲルシート>

パルミトイル-G l y - G l y - G l y - H i s 128.2mg をスクリュウ管（マルエム NO7）に入れ、0.3%（w/v）の濃度になるようにリン酸緩衝液（和光純薬工業（株）製 phosphate buffer powder、1/15mol/L、pH=7.4、組成：Na₂HPO₄ 7.6g、KH₂PO₄ 1.8g/L）を加え、ドライ・バス・インキュベーター（First Gene 社製）で、加熱（100℃、10分）し、得られた溶解液のうち3ml をガラスシャーレ（直径6cm、高さ4cm）内に置いたアルミ製の円筒（直径2.5cm、高さ4cm）に移し、室温まで冷却した。溶液が固化したのを確認後、アルミ製の円筒を取り除き、日本薬局方水6ml をガラスシャーレ内に加えた。1時間後、リボフラビン（和光純薬工業（株）製）水溶液（2mg/mL）250μL をガラスシャーレ内加えると、14時間後にゲル内が黄色に着色し、リボフラビンがゲル内に内包されてシート化した。

[0060] <比較例 1 : セルロースゲル、カルボキシビニルポリマーゲル、キサンタンガムゲル、カードランゲルの水浸漬に対する影響>

セルロースゲルは、セロディーヌ 4M（ナノウオーブ、セルロースゲル 4wt%、第一工業製薬（株）製）100g に166g の日本局方水を加えて、攪拌装置 T. K. mixing analyzer MA2500（プライミクス株式会社）を用いて、5000rpm で240分間攪拌し、ゲル化が認められるまで室温静置して、セルロースゲル（1.5wt% のセルロース水分散体）を得た。

2%カルボキシビニルポリマーは、カーボポール 940（アイ・ティー・オー社製）0.252g に日本局方水を加えた後、溶解するまで水浴中で加温してゲル化させた。

5%キサンタンガムは、キサンタンガム（東京化成工業（株）製）0.725g に日本局方水を加えた後、溶解するまで水浴中で加温してゲル化させ

た。

カルボキシビニルポリマー（2 w t %，カーボポール）1 g、セルロースゲル（1. 5 w t %，セロディーヌ）1 g、キサンタンガム（1. 5 w t %）及びカードラン（1. 5 w t %）1 gをプラスチックシャーレ（直径8. 5 c m×深さ1. 4 c m）に入れ、水6 m l 水に浸漬させたところ、7 2 日後にはゲルは消失し、シートの形成は認められなかった。

[0061] [ゲルファイバー内疎水性環境の評価]

疎水性環境応答性プローブである8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸（ANS）を用いた。疎水性環境応答性プローブであるANSは、その周辺における極性が減少すると共に蛍光極大波長が短波長側にシフトし、蛍光強度が増大することが知られている。そこで、終濃度5 μ Mとなるように、リン酸緩衝液（pH 7. 5）にANSを溶解し、各ゲル（0. 5又は0. 02 w t %のP a l -G G G H、0. 5 w t %のアガロース、3 w t %のアルギン酸ナトリウム、5 w t %のポリアクリルアミド）を調整した。

また、各有機溶媒（エタノール、1-プロパノール、アセトン、ジオキサン）に、5 μ MとなるようにANSを溶解した。各ゲル及び有機溶媒の蛍光強度を測定した（e x 350 n m、e m 480 n m）。

その結果、P a l -G G G Hだけに蛍光強度の増大が見られ、ゲル内に疎水性環境を有していることが明らかとなった（図2）。一方、他の高分子ゲルでは蛍光強度にほとんど変化が見られないことから、ゲルの形成ではなく、P a l -G G G Hの自己組織化に伴った疎水性領域の形成が、蛍光強度の増大に影響を与えたものと考えられる。また、P a l -G G G Hはゲル形成濃度以下（0. 02 w t %）でも蛍光を示したことから、ゲル化していない低濃度でも自己組織化して疎水領域を形成していると考えられる。

[0062] さらに、有機溶媒及びP a l -G G G Hゲル中におけるANSの蛍光極大波長を比較したところ、エタノールや1-プロパノールとP a l -G G G Hゲルの蛍光極大波長が近いことから、ゲルファイバーの疎水性領域はエタノール、プロパノールと同程度の疎水性を持つことが示唆された（図3）。

[0063] [ゲルシートからの放出性の評価]

ゲルシートからの内包物質の放出性の評価を行った。先の実験で使用したANSとビタミンB₂（リボフラビン）を親水性内包物質とした。緩衝液はそれぞれpH3：クエン酸緩衝液溶液、pH7.4：リン酸緩衝液、pH9.0：Tris-HCl緩衝液を用いた。100又は300 μ MになるようにANS又はリボフラビンを緩衝液に溶解し、各溶液1mLに対しゲル化剤（ゲル化剤濃度0.3又は0.6wt%）を加え、ゲルシートを作成した。そこに抽出用緩衝液10mLを加え40rpmで振とうして内包物質を抽出した。サンプルは経時的にサンプリングを行い、各時間の放出濃度を吸光度（ANS：350nm、リボフラビン：445nm）から算出した。

[0064] ゲルシートからの徐放性をゲル化剤の濃度とゲル及び放出液のpHを変えて比較した。その結果、ゲル化剤の濃度を上げるとANSの放出率が低下することが示された（図4）。この理由としては、ゲル化剤濃度が増えることでゲルファイバーが増加したため、ANSの内包量が増えたのではないかと考えられる。また、ANSではpHが高くなるほど放出率が増加した（図5）が、リボフラビンではpHによる違いは生じなかった（図6）。PaI-GGGHの各pHにおけるゲル化剤分子の荷電状態（図7）はアミノ酸残基のpK_aを考慮すると、ゲル化剤分子は主にpH1.8以下においては（I）の、pH1.8から6.0においては（I I）の、pH6.0以上においては（I I I）のイオン化状態をとっていると考えられる。pH9.0のときはより多くのPaI-GGGH分子が（I I I）のイオン化状態をとっていると考えられ、マイナスの電荷を持つことが予想される。ANSは陰イオンであることから、ゲルファイバー表面のマイナスの電荷と反発して放出液中に放出されたのではないかと考えられる。リボフラビンは水溶液中で電荷を持たないため、pHの影響を受けなかったと考えられる。

[0065] <実施例4：ゲルシートへの浸漬による親水性物質の内包>

ゲルシートをリボフラビンの溶液に浸漬することで、リボフラビンをゲルシート内に取り込むことが可能であるか実験を行った。リン酸緩衝液1mL

に対しゲル化剤（ゲル化剤濃度 0.3 wt %）を加えてゲルシートを作成した。ゲルシートを各濃度（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）のリボフラビン溶液 5 ml に 68 時間浸漬させ、浸漬液の濃度を吸光度（445 nm）から算出することで、ゲルシートへのリボフラビンの内包量を求めた。

[0066] [表2]

表 2 浸漬によりゲルシート中に内包されたリボフラビン濃度

初期浸漬液濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10	50	100	200
ゲル濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	20.1	69.7	115.6	221.1

[0067] 表 2 の結果から、リボフラビン溶液にゲルシートを浸漬することでゲルシート内にリボフラビンが内包された。また、リボフラビン浸漬液の濃度の増加に比例してゲルシートへの内包量が増加した。

[0068] [P a l - G G G H のゲル化による疎水性物質の可溶化の評価]

ゲル化剤 P a l - G G G H によるゲルを用いることで、どの程度疎水性物質を可溶化できるのか、その溶解度の評価を行った。モデル疎水性物質としてピレン及びビタミン E（ α -トコフェロール）を用いた。まず疎水性物質を DMSO 又はエタノールに溶解し、ストック溶液を調製した。このストック溶液をリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈することで、疎水性物質が終濃度 $100 \mu\text{M}$ ～ $900 \mu\text{M}$ のサンプル溶液を調製した（DMSO 及びエタノール 5 % 又は 1 % を含む）。各サンプル溶液にゲル化剤（最終濃度 0.1 wt % ～ 0.4 wt %）を添加し、ゲル化した。

図 8 に示す疎水性物質可溶化の程度の基準を用いて、ゲル化による疎水性物質の溶解度の評価を目視により行った。ここで、図 8 に示す疎水性物質可溶化の程度の基準は、（I）は、溶解した状態を示し、（II）は、若干白濁した状態を示し、（III）は、溶解せずに白濁した状態を示す。

[0069] 上述のゲルファイバー内疎水性環境評価の結果により、ゲルファイバー中に疎水的な領域が存在することが明らかになったが、その疎水性領域に疎水性物質が内包することで見掛け上ゲル中の水系の溶媒中への可溶化ができると考え、疎水性物質の可溶化の評価を行った（図 9）。その結果、DMSO

、エタノールを含む状態でピレン及びビタミンE共にゲル中に可溶化できることが明らかとなった（表3）。

[0070] [表3]

表3 疎水性物質可溶化の評価

最終溶媒 濃度 (%)		5 % DMSO					1 % DMSO			
ピレン濃度 (μ M)		100	200	300	400	500	200	300	400	
ゲル化剤濃 度 (wt %)	0.1	○	△	△	—	×	—	—	—	
	0.2	○	○	○	△	×	○	△	×	
	0.3	—	—	—	△	—	—	—	—	
	0.4	—	—	—	○	—	—	—	—	
最終溶媒 濃度 (%)		5 % EtOH					1 % EtOH			
ピレン濃度 (μ M)			200	400	400		200	300	400	
ゲル化剤濃 度 (wt %)	0.2		○	×	×		○	×	×	
最終溶媒 濃度 (%)		5 % EtOH								
ビタミンE 濃度 (μ M)			200	300	400	500	600	700	800	900
ゲル化剤濃 度 (wt %)	0.2		○	○	△	△	△	×	×	×

○：図8の（I）に示す溶解した状態を表す。

△：図8の（II）に示す若干白濁した状態を表す。

×：図8の（III）に示す溶解せずには白濁した状態を表す。

[0071] <実施例5：ビタミンE内包ゲルの調整>

前述のストック溶液を、MOPS緩衝液（pH7.5）を用いて希釈し、500 μ MビタミンE水溶液を調製した（5%エタノールを含む）。これを用いて各ゲル（0.5wt%のPaa-GGGH、0.5wt%のアガロース、5%のポリアクリルアミド）を調製し、ビタミンE内包ゲルを作成した。

[0072] その結果、P a l - G G G Hゲルでは、ビタミンEの有無にかかわらず、ゲルの濁度に変化はなかった（図10）。この理由としては、ビタミンEがゲルファイバー内の疎水性領域に内包されたため、見かけ上溶解したためであると考えられる。一方、ポリアクリルアミドゲル及びアガロースゲル内にビタミンEの内包を試みたところ、ビタミンEは疎水性が高く水に不溶であるため析出し、ゲルの白濁が見られた。高分子ゲルではビタミンEを可溶化できないことが分かる。

以上より、P a l - G G G HゲルはビタミンEを可溶化することが示された。

[0073] <実施例6：ビタミンE及びビタミンCの同時内包ゲルの調整>

ビタミンC（アスコルビン酸リン酸ナトリウム）を1mg/mlとなるようにMOPS緩衝液（pH7.5）に溶解した。そこへ、0.5wt%のP a l - G G G Hを添加し、さらに500μMのビタミンEとなるようにストック溶液を加え（5%のエタノールを含む）、溶液をゲル化させ、疎水性物質であるビタミンEと親水性物質であるビタミンCの同時内包ゲルを作成した。

[0074] その結果、ビタミンC誘導体存在下においてもビタミンEはゲルファイバーの疎水性領域に溶解し、ビタミンEの析出に伴うゲルの白濁も見られなかった（図11）。

以上より、P a l - G G G Hを用いることで、溶解性の異なるビタミンEとビタミンCを、同時に溶解・内包したゲルを作成可能であることが示された。

[0075] [ゲルシートからのビタミンEの放出性評価]

ビタミンEストック溶液をMOPS緩衝液（pH7.5）を用いて希釈し、500μMビタミンE水溶液を調製した（5%のエタノールを含む）。ここへ、0.3wt%となるようにP a l - G G G Hを添加し、加熱・放冷してゲルシートを作成した。ゲルシートを5mlのエタノール水溶液（50、70、100%）に浸し、45rpmで振とう攪拌しビタミンEを放出させ

た。放出液を経時的にサンプリングし、各時間におけるビタミンEの放出濃度を吸光度（292 nm）から算出した。

[0076] 疎水性物質の放出性を評価するため、ゲルシートからのビタミンEの放出性挙動を、濃度の異なるエタノール水溶液に対して評価・比較した（図12）。エタノール濃度が50%以上のとき、ビタミンEがゲルから放出されることが示された。その放出速度は、エタノールの濃度が高いほど速くなる傾向が見られた。ゲルファイバー内の疎水性領域は、エタノールと同程度と考えられるため（図3参照）、エタノール濃度によって放出速度が変化することが考えられる。

[0077] <実施例7：ゲルシートへのチトクロームcの吸着性の検討>

Pa1ーGGGHゲルシートのタンパク質吸着素材としての利用を検討するため、チトクロームcのゲルシートへの吸着実験を行った。緩衝液はそれぞれリン酸緩衝液：pH7.4、Tris-HCl緩衝液：pH9.0を用いた。各緩衝液1mlに対しゲル化剤（ゲル化剤濃度0.3wt%）を加えてゲルシートを作成した。ゲルシートを0.3mg/mlチトクロームc溶液に浸漬させ経時的に浸漬液の濃度を吸光度（407 nm）により算出してゲルシートへのチトクロームcの吸着量を求めた。

次に吸着したチトクロームcが変性していないことを確認するためにチトクロームc吸着ゲルシートに1M DTT 10μlを滴下してチトクロームcの還元を行った。

[0078] その結果、チトクロームc溶液にゲルシート（pH7.4及びpH9.0）を浸漬したところ、ゲルシート内部にチトクロームcが吸着された（図13）。また、その吸着速度はpH7.4よりもpH9.0の方が早いことがわかった（図14）。

さらに、チトクロームcが吸着したゲルシートに1M DTTを滴下したところ、酸化型でオレンジ系赤色であったチトクロームcがピンク色系に変化したため、ゲルシートに吸着したチトクロームcが還元型に変化したことが言える（図15）。つまり、シートに吸着しても変性していないことが示

唆された。また、チトクローム c は等電点が p I 10 付近のタンパク質で、今回の条件下ではプラスの電荷を持つため、より多くのマイナスの電荷を持った pH 9.0 のゲル（図 7）において、吸着量が上昇したことが考えられる。

[0079] [ゲルシートからのチトクローム c の放出性評価]

0.5 mg/ml になるようにチトクローム c をリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、0.3 wt % となるように P a l - G G G H を添加し、加熱・放冷し、チトクローム c 内包ゲルシートを作成した。ゲルシートを 10 ml の各緩衝液（pH 5.0 のクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 のリン酸緩衝液、pH 11.0 のリン酸／水酸化ナトリウム緩衝液）に浸し、400 rpm で振とう攪拌しチトクローム c を放出させた。放出液を経時的にサンプリングし、各時間におけるチトクローム c の放出濃度を吸光度（407 nm）から算出した。

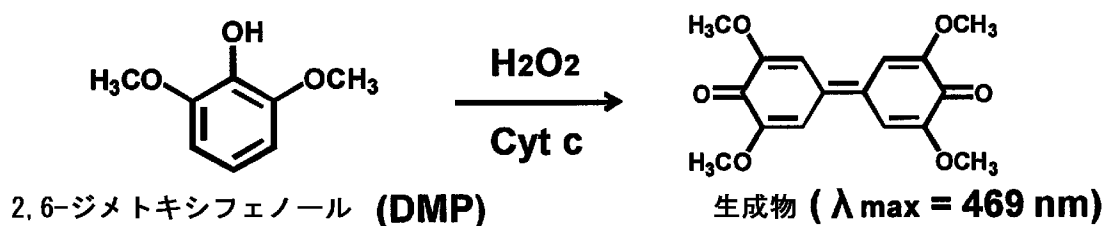
[0080] 上述より、吸着性には pH が影響していたことから、ゲルシートからのチトクローム c の放出挙動を、異なる pH の緩衝液に対して評価した（図 16）。その結果、pH 11.0 の放出液においてのみ、チトクローム c の放出が認められた。P a l - G G G H 中におけるヒスチジンの p K a（イミダゾール基：p K a 約 6.0、カルボキシル基：p K a 約 1.8）を考慮すると（図 17）、ゲルファイバー表面は、pH 11.0、pH 7.4 ではマイナス、pH 5.0 ではプラスとマイナスの両方に帯電していることが推察される。ここで、チトクローム c は等電点が p I 10 付近のタンパク質であり、今回の条件下では pH 11.0 の場合のみマイナスの電荷を持つと考えられる。従って、pH 11.0 においてのみ、チトクローム c とゲルファイバーが互いのマイナス電荷により反発し、放出されたのではないかと考えられる。

[0081] <実施例 8：P a l - G G G H ゲルに内包されたチトクローム c のペルオキシターゼ活性測定（チトクローム c を内包した P a l - G G G H ゲルを用いた H₂O₂ による 2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応）>

P a l - G G G Hゲルに内包されたチトクローム c のペルオキシターゼ活性を評価するために、下記に示される、チトクローム c を内包した P a l - G G G Hゲルを用いた H_2O_2 による 2, 6 - ジメトキシフェノールの酸化反応を行った。

ここで、チトクローム c を内包した P a l - G G G Hゲルは、ゲル化剤である P a l - G G G H粉末を含む 50 mM リン酸緩衝液にチトクローム c を加え、該緩衝液を 95 °C で加熱してゲル化剤を溶解し室温放冷することにより得た。

[化3]



[0082] 96穴マイクロプレートの各wellに、0.2 wt %の濃度でゲル化剤を含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に3 μ Mになるようチトクローム c を添加し95 °C で加熱することで得られた P a l - G G G Hゲル、チトクローム c を3 μ Mの濃度で含み前記ゲル調製と同様の95 °Cの加熱処理を行った50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 並びにチトクローム c を3 μ Mの濃度で含み加熱処理を行っていない50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) をそれぞれ50 μ L調製し、2, 6 - ジメトキシフェノール (7.5 mM) と H_2O_2 (1.5 mM) を含む混合溶液100 μ Lをそれぞれ添加した。P a l - G G G Hゲルに該混合溶液を添加する場合は、該ゲル上に該混合溶液を加えた。ペルオキシダーゼ活性の比較は、生成物由来の469 nmの吸光度を追跡することで行った。加熱処理時間は30分で、測定はその後30分ほど放置してから行い、装置の温度は35 °Cに設定した。

[0083] 図18に示すように、チトクローム c を内包した P a l - G G G Hゲルを用いた反応の方が、加熱処理を行っていないチトクローム c 溶液での反応に比較して生成物の量が多いことから、チトクローム c を内包した P a l - G

G G Hゲルはペルオキシダーゼ活性が増大していることが確認できた。また、加熱処理を行ったチトクローム c 溶液での反応においても生成物の量が多く、同様にペルオキシダーゼ活性が増大していることが確認できた。しかし、チトクローム c を内包した P a l - G G G Hゲルを用いた反応の方が加熱処理を行ったチトクローム c 溶液での反応に比べ生成物の量が多いことから、チトクローム c を内包した P a l - G G G Hゲルの方がより一層活性が高まっていると言え、P a l - G G G Hゲル中ではチトクローム c の触媒作用の安定性が強化されていることが考えられる。

[0084] <実施例 9 : P a l - G G G Hゲルに内包されたチトクローム c の C D スペクトル及び U V スペクトル測定>

チトクローム c を $10 \mu\text{M}$ の濃度で含む P a l - G G G Hゲル（ゲル化剤 0.2 wt %）、チトクローム c を $10 \mu\text{M}$ の濃度で含む前記ゲル調製と同様に 95°C の加熱処理を行った 50mM リン酸緩衝液（pH 7）及びチトクローム c を $20 \mu\text{M}$ の濃度で含む前記加熱処理を行っていない 50mM リン酸緩衝液（pH 7）をそれぞれ 1mL セルに調製し波長 250nm 乃至 450nm における C D スペクトルを測定した。加熱処理時間は 26 分であり装置の温度は 25°C に設定した。

[0085] 図 19 に示す C D スペクトル測定結果では、P a l - G G G Hゲルに内包されたチトクローム c のスペクトルにおいて溶液中のチトクローム c の C D スペクトルにみられる 280nm 、 380nm のピークが確認できなかった。

[0086] また、チトクローム c を $20 \mu\text{M}$ の濃度で含む P a l - G G G Hゲル（ゲル化剤 0.1 wt %）、チトクローム c を $20 \mu\text{M}$ の濃度で含む前記ゲル調製と同様の 95°C の加熱処理を行った 50mM リン酸緩衝液（pH 7）及びチトクローム c を $20 \mu\text{M}$ の濃度で含む前記加熱処理を行っていない 50mM リン酸緩衝液（pH 7）をそれぞれ 1mL セルに調製し、波長 350nm 乃至 800nm における U V スペクトルを測定した。加熱処理時間は 15 分であり装置の温度は 25°C に設定した。

[0087] 図20に示すUVスペクトル測定結果では、ゲル中、溶液中ともにチトクロームcのポルフィリン環の $\pi-\pi^*$ 遷移に起因する400nm付近のSoret帯と480-650nm付近に現れる分子振動に共役した遷移に基づくQ帯が確認できた。しかし、700nm付近におけるヘム鉄と第6配位子であるMet80の間の配位結合由来の電荷移動吸収帯（ $S \rightarrow Fe : LMCT$ 帯）がゲル中のチトクロームcでは確認できなかった。

[0088] CDスペクトル及びUVスペクトルの結果から、チトクロームcはPall-GGGHゲル中で構造が変化していると認められ、このことが、チトクロームcを内包するPall-GGGHゲルのペルオキシダーゼ活性の増大に関与しているものと思われる。

[0089] <実施例10：ペルオキシダーゼ活性のゲル化剤濃度依存性>

実施例8と同様の実験を、ゲル化剤濃度を0.1wt%、0.2wt%及び0.3wt%とした場合で行った。

図21から、ゲル化剤濃度の上昇に伴い反応初速度及び生成物量が増加していることが分かった。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明の内包ゲルでは、ゲル内に疎水性化合物又は親水性化合物、若しくはその両方の化合物を内包することが可能となる。また、本発明の内包ゲルは、内包した化合物を徐放することも可能である。さらに、本発明の化合物が内包されたゲルは、化合物としてチトクロームc等の酵素を内包することも可能であり、かつ内包したものが酵素のような活性を有する蛋白質の場合には、ゲル内に取り込んでも酵素はその活性は損なうことなく維持され、むしろ、そのゲル内で酵素反応を進行させることが可能である。したがって、このような酵素などを取り込んだゲルは、ゲル内で反応を見ることができ、バイオセンサーや検査・診断薬として使用することが可能である。

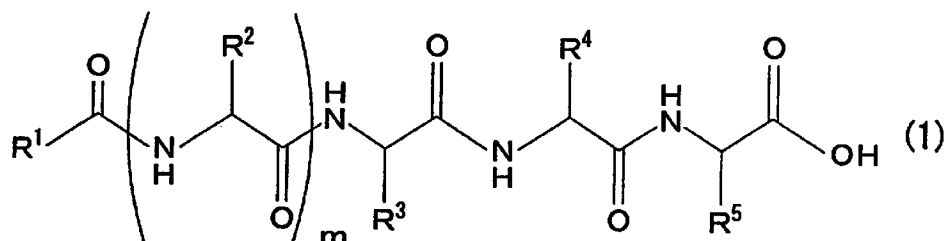
そのため、本発明の内包ゲルは、損傷部位認識能を有する創傷被覆剤、癒着防止膜、薬物速達システム、外用医薬品用基材、芳香剤・消臭剤・防虫剤・殺虫剤・農薬などの基材、検査・診断やバイオセンサー、環境分析用の基

材、土中や水中の汚染物質の捕捉といった基材などに広く利用することができる。

請求の範囲

[請求項1]

[化1]



(式中、 R^1 は炭素原子数9乃至23の脂肪族基を表し、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子1乃至3の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至7のアルキル基、フェニルメチル基、フェニルエチル基、又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち少なくとも1つが $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ 基を表し、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-\text{CONH}_2$ 基、又は窒素原子を1乃至3個有し得る5員環若しくは5員環と6員環から構成される縮合複素環を表し、 m は1又は2を表す。)で表される脂質ペプチド又はその薬学的に使用可能な塩からなる低分子ゲル化剤と、該低分子ゲル化剤によりゲル化された水性媒体と、これに内包された少なくとも1種以上の化合物とを含むことを特徴とする内包ゲル。

[請求項2]

前記式(1)中、 R^1 が不飽和結合を0乃至2個有し得る炭素原子数11乃至23の直鎖状脂肪族基であることを特徴とする、請求項1に記載の内包ゲル。

[請求項3]

前記式(1)中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子1又は2の分枝鎖を有し得る炭素原子数1乃至4のアルキル基、フェニルメチル基、又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つが $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ 基を表し、 n は1乃至4の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-\text{CONH}_2$ 基、又は窒素原子を1乃至2個有し得る5員環又は5員環と6員環

から構成される縮合複素環を表すことを特徴とする、請求項 1 又は請求項 2 に記載の内包ゲル。

[請求項 4] 前記式 (1) 中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、炭素原子 1 又は 2 の分枝鎖を有し得る炭素原子数 1 乃至 4 のアルキル基、フェニルメチル基、又は $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つが $-(CH_2)_n-X$ 基を表し、 n は 1 乃至 4 の数を表し、 X はアミノ基、グアニジノ基、 $-CONH_2$ 基、ピロール基、イミダゾール基、ピラゾール基又はインドール基を表すことを特徴とする、請求項 3 に記載の内包ゲル。

[請求項 5] 前記式 (1) 中、 R^2 乃至 R^5 はそれぞれ互いに独立して、水素原子、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、 n -ブチル基、 i -ブチル基、第二ブチル基、第三ブチル基、フェニルメチル基、アミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-カルバモイルプロピル基、2-グアニジノエチル基、3-グアニジノプロピル基、ピロールメチル基、イミダゾールメチル基、ピラゾールメチル基又は 3-インドールメチル基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は二つがアミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-カルバモイルプロピル基、2-グアニジノエチル基、3-グアニジノプロピル基、ピロールメチル基、イミダゾールメチル基、ピラゾールメチル基又は 3-インドールメチル基を表すことを特徴とする、請求項 4 に記載の内包ゲル。

[請求項 6] 前記式 (1) 中、 R^2 乃至 R^5 は、それぞれ独立して水素原子、メチル基、 i -プロピル基、 i -ブチル基、第二ブチル基、フェニルメチル基、4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-グアニジノプロピル基、イミダゾールメチル基又は 3-インドールメチル基を表し、かつ R^2 乃至 R^5 のうち一つ又は

二つが4-アミノブチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、3-グアニジノプロピル基、イミダゾールメチル基、又は3-インドールメチル基を表すことを特徴とする、請求項5に記載の内包ゲル。

[請求項7] 前記式(1)中、mは1を表すことを特徴とする、請求項1乃至請求項6に記載の内包ゲル。

[請求項8] 前記化合物が疎水性化合物又は親水性化合物、若しくはその両方の化合物であることを特徴とする、請求項1乃至請求項7に記載の内包ゲル。

[請求項9] 前記化合物が酵素であることを特徴とする、請求項1乃至請求項7に記載の内包ゲル。

[請求項10] 前記化合物がチトクロームcであることを特徴とする、請求項9に記載の内包ゲル。

[請求項11] 請求項9に記載の内包ゲルを酵素反応に用いる方法。

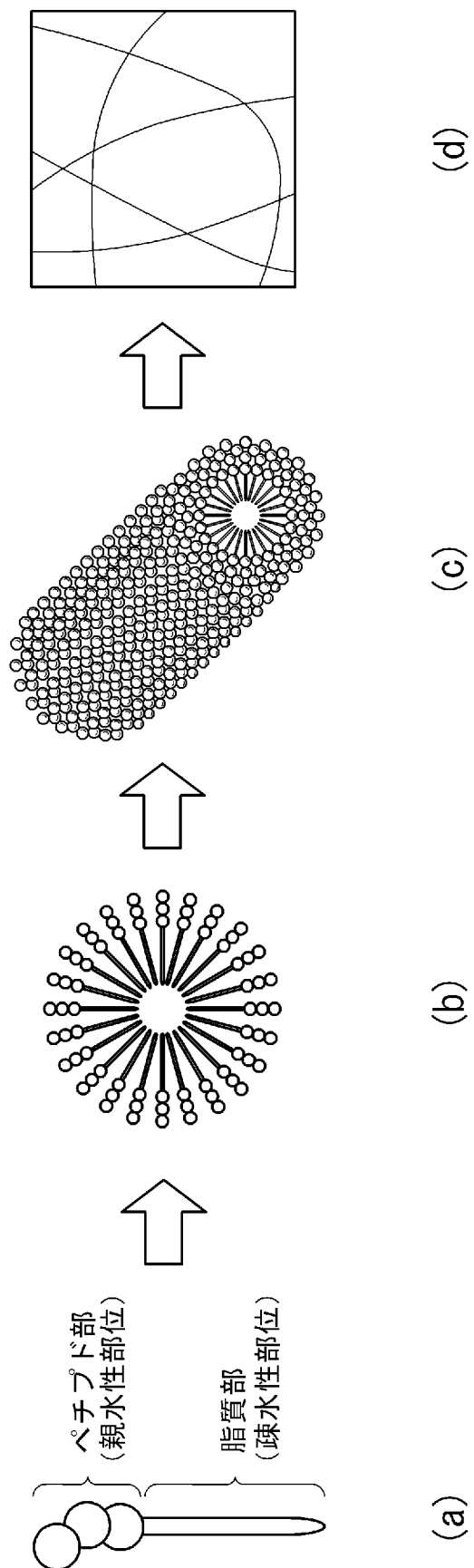
[請求項12] 請求項10に記載の内包ゲルを H_2O_2 による目的物の酸化反応に用いる方法。

[請求項13] 請求項9に記載の内包ゲルを酵素反応に用いることにより、該内包ゲルをバイオセンサーとして使用する。

[請求項14] 請求項10に記載の内包ゲルを H_2O_2 による酸化反応に用いることにより、該内包ゲルをバイオセンサーとして使用する。

[請求項15] 請求項11又は請求項12に記載の内包ゲルを備えたバイオセンサー。

[図1]



[図2]

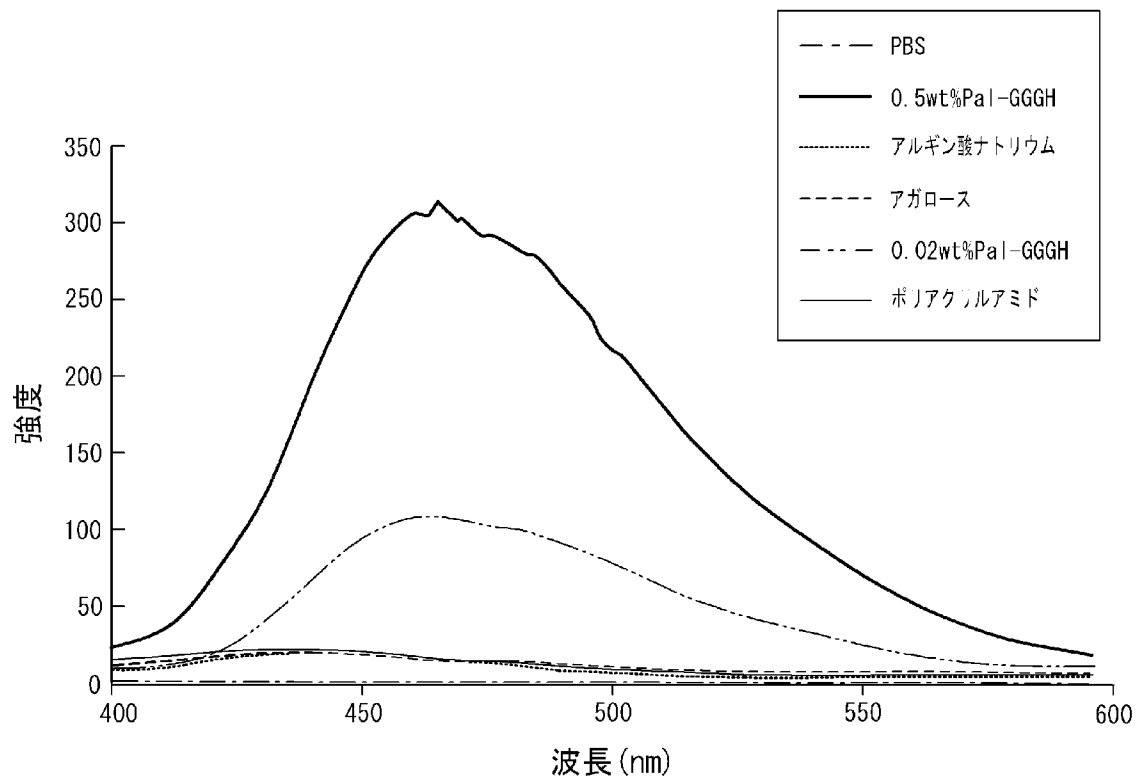


図2 : Pal-GGGHゲルと高分子ゲルにおけるANSの蛍光強度の比較

[図3]

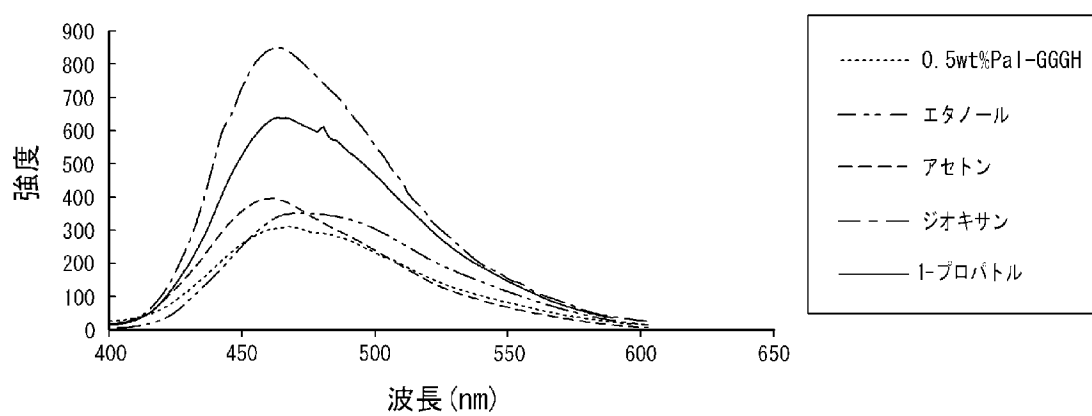


図3 : Pal-GGGHゲルと有機溶媒におけるANSの蛍光強度の比較

[図4]

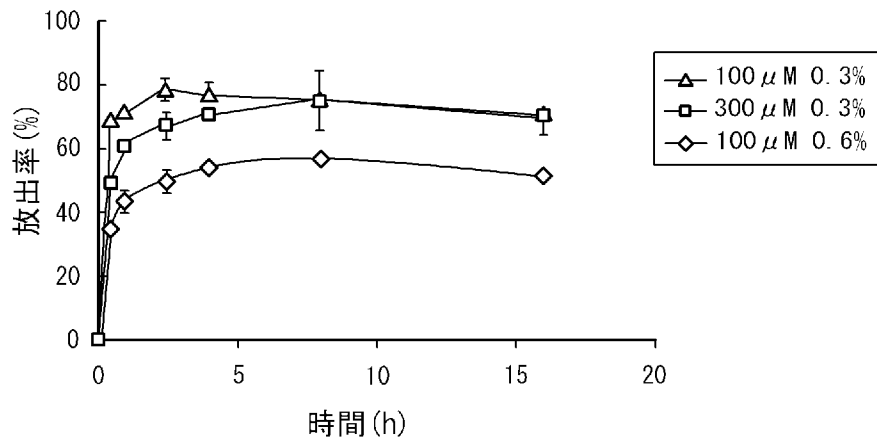


図4：ゲル化剤及びANS濃度によるANS放出率

[図5]

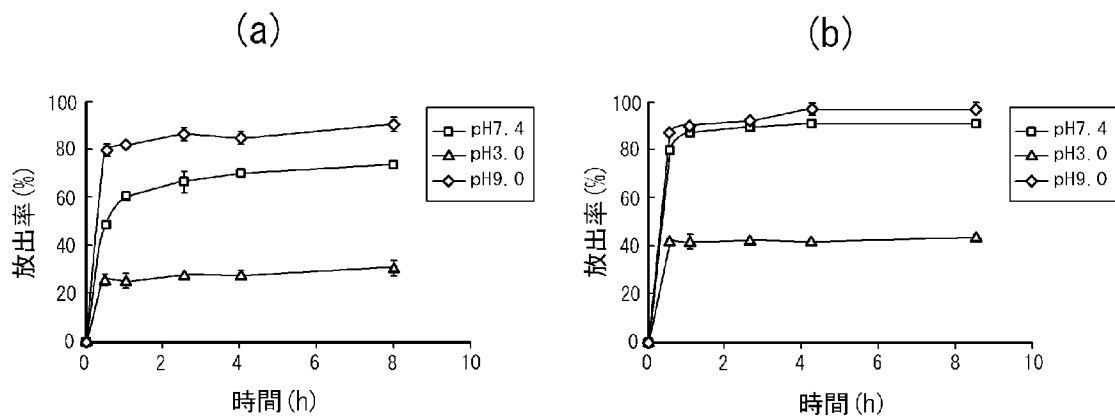


図5：pHの異なる放出液におけるANS放出率
 (左：pH7.4で調整したゲル、右：pH9.0で調整したゲル)

[図6]

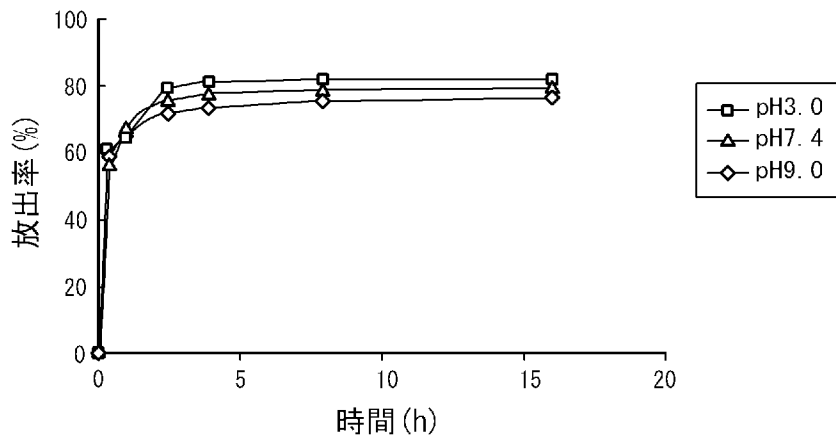


図6：ゲルpH7.4における異なったpHの放出液によるリボフラビン放出率

[図7]

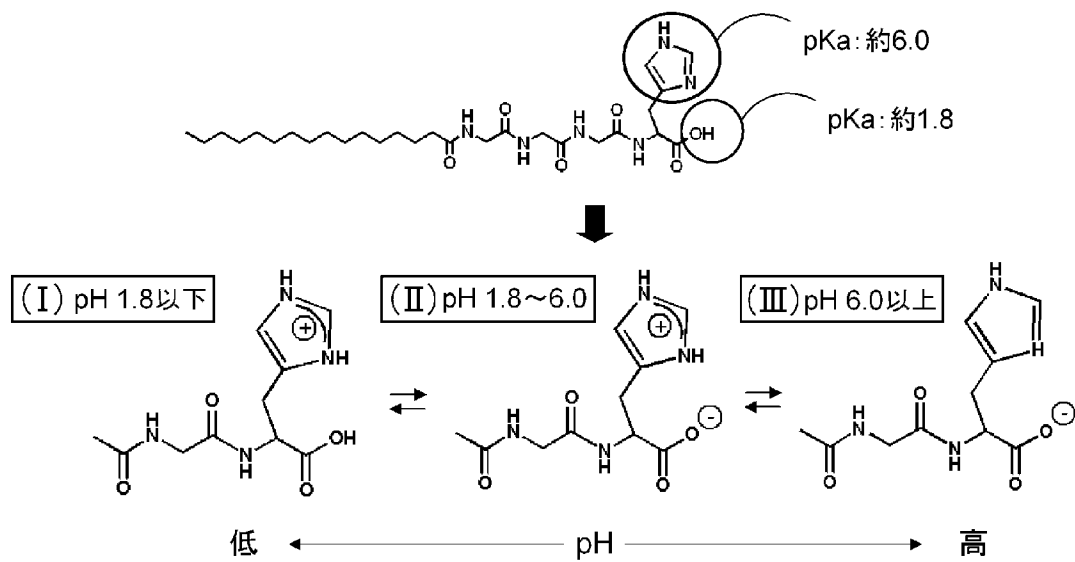


図7：pHによるPa I-GGGHのイオン化状態の変化

[図8]

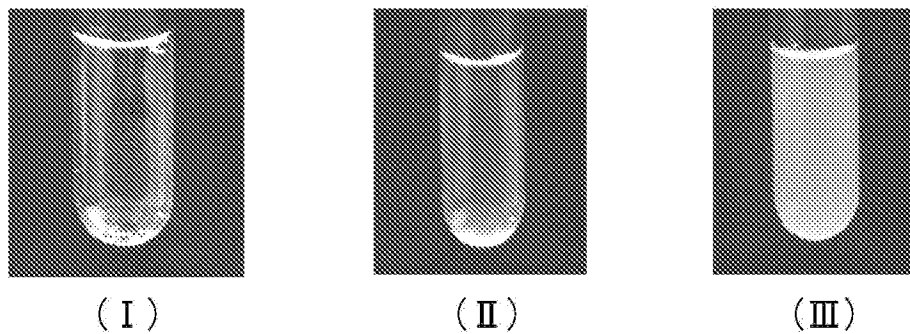


図8:疎水性物質可溶化の程度の評価基準

[図9]

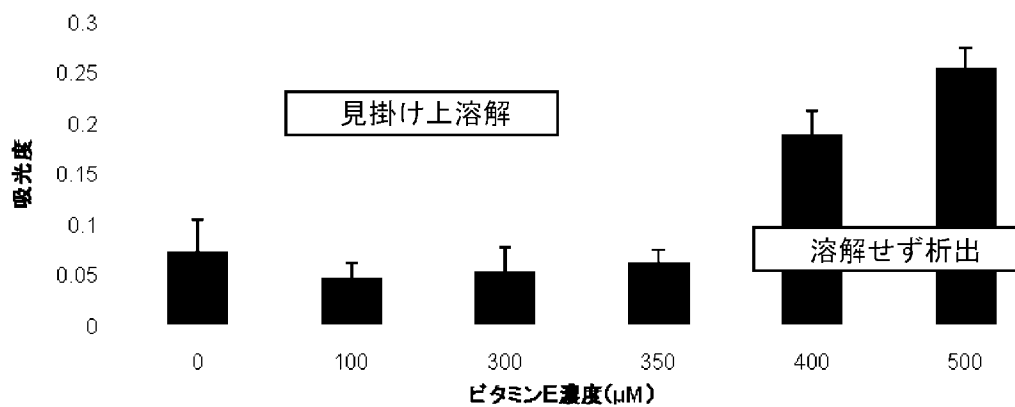


図9:濁度によるビタミンE可溶化濃度の評価

[図10]

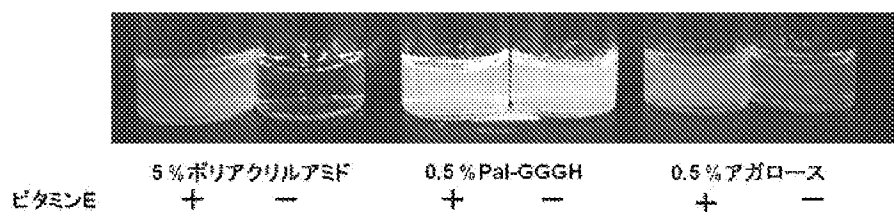


図10:高分子ゲルとPal-GGGHとのビタミンE内包ゲルの比較

[図11]

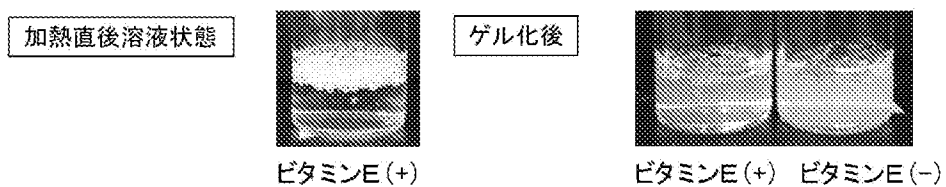


図11:ビタミンE及びビタミンCの同時内包ゲル(左:ゲル形成前、右:ゲル形成後)

[図12]

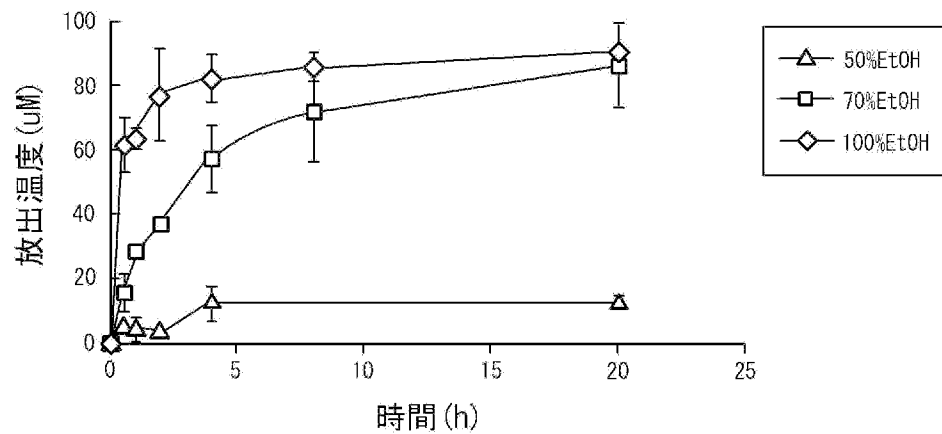


図12：濃度の異なるエタノールに対するビタミンEの放出挙動

[図13]

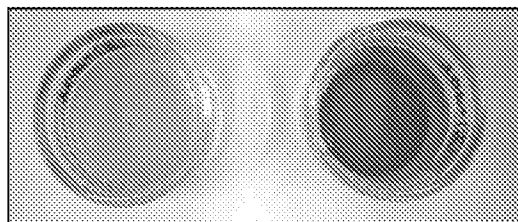


図13：ゲルシートへのチトクロームcの吸着(左：pH7.4、右：pH9.0)

[図14]

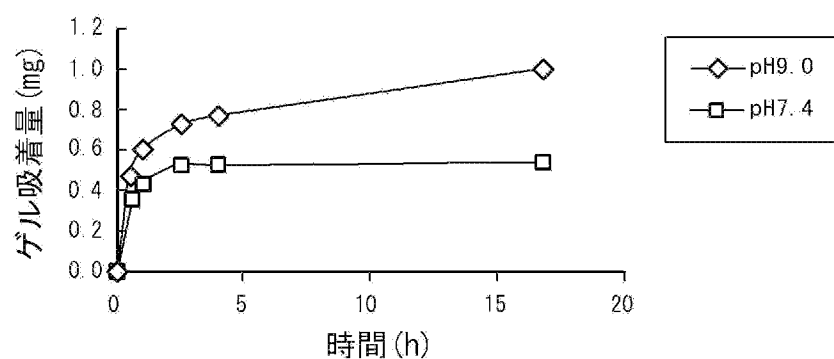


図14：異なるpH条件下でのゲルシートへのチトクロームc吸着量

[図15]

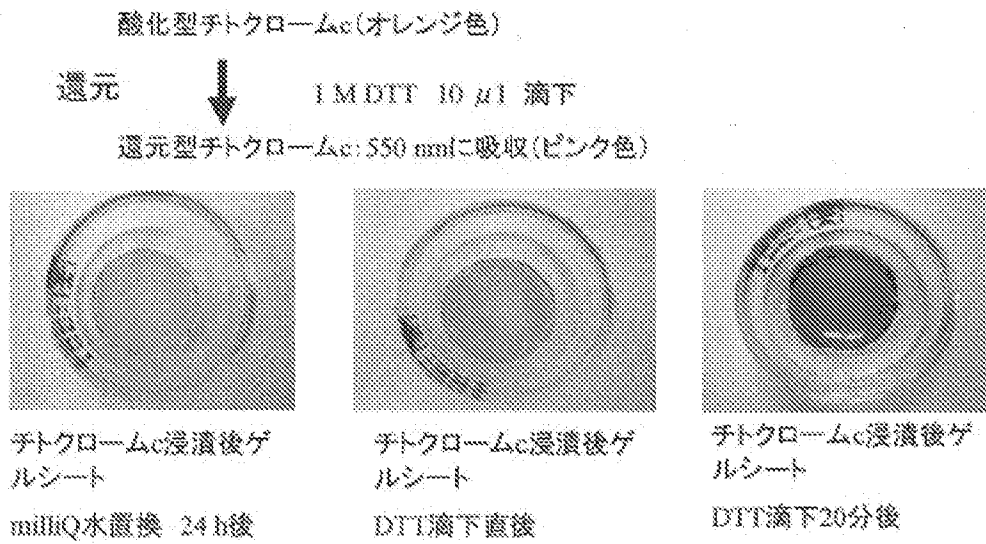


図15: チトクロームc浸漬ゲルシートの還元

[図16]

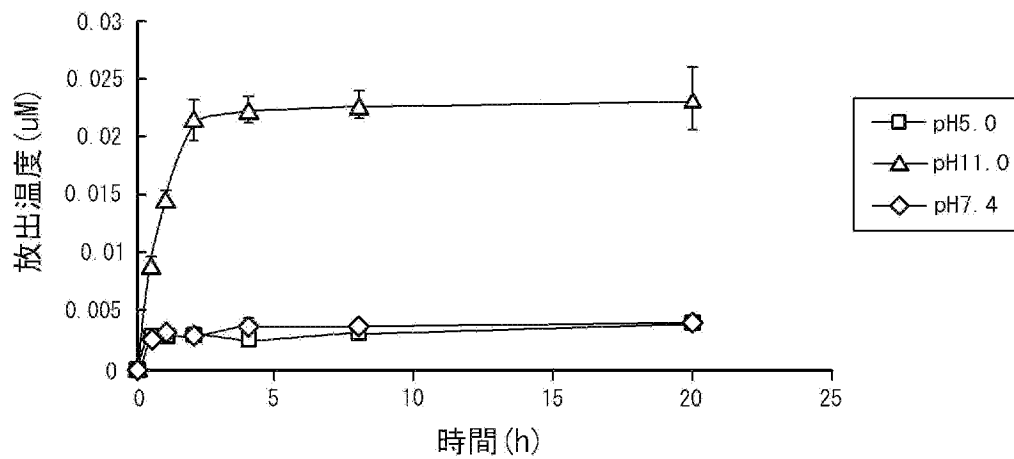


図16: pHの異なる緩衝液に対するチトクロームcの放出挙動

[図17]

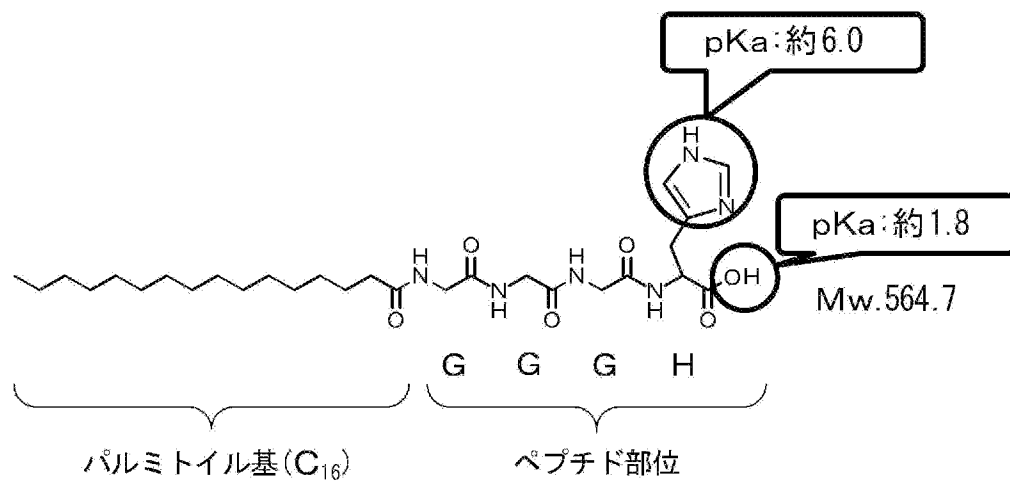


図 17: Pal-GGGHの構造

[図18]

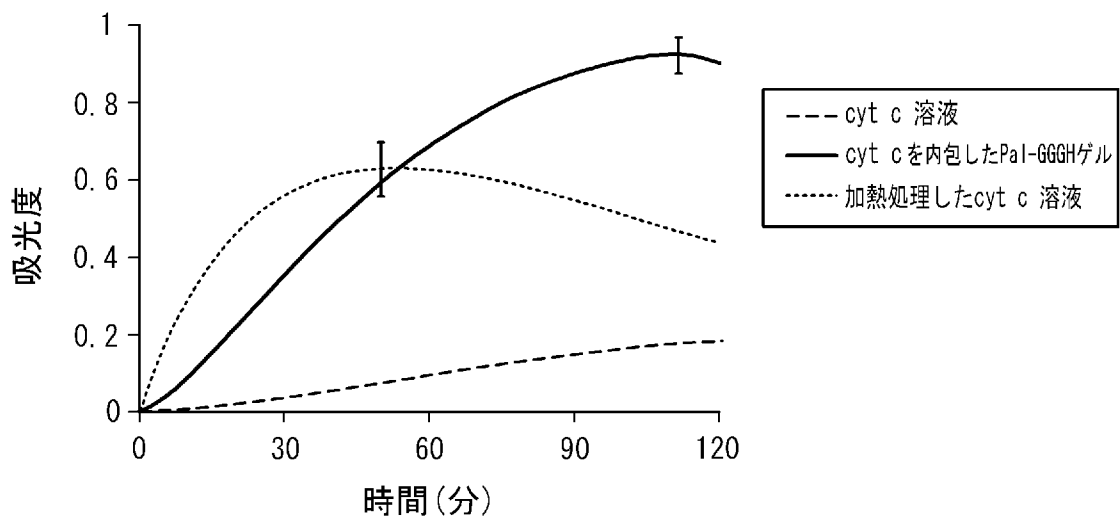


図18 : チトクローム c のペルオキシダーゼ活性測定結果

[図19]

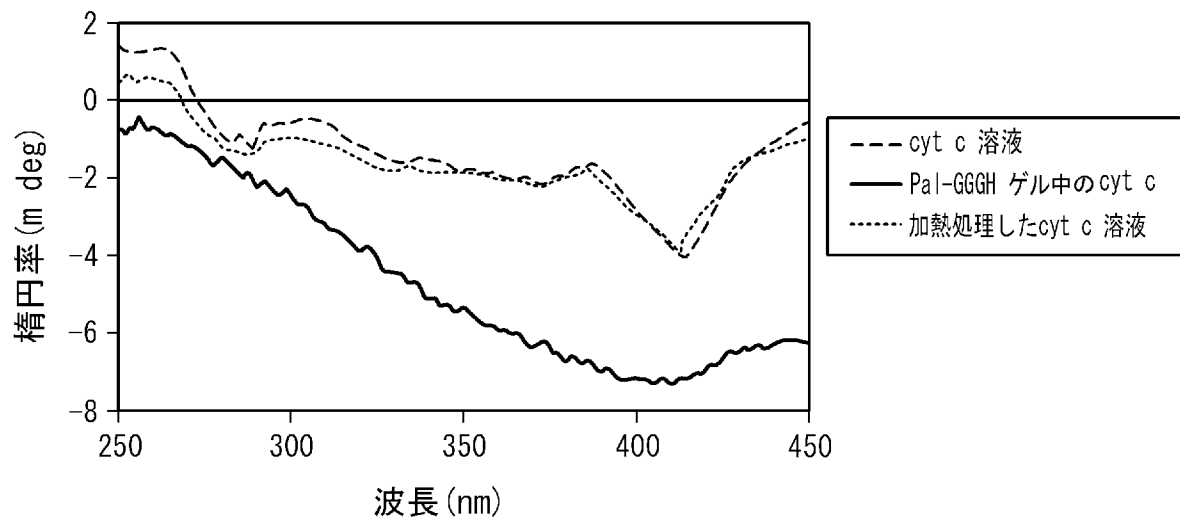


図19 : CDスペクトル測定結果

[図20]

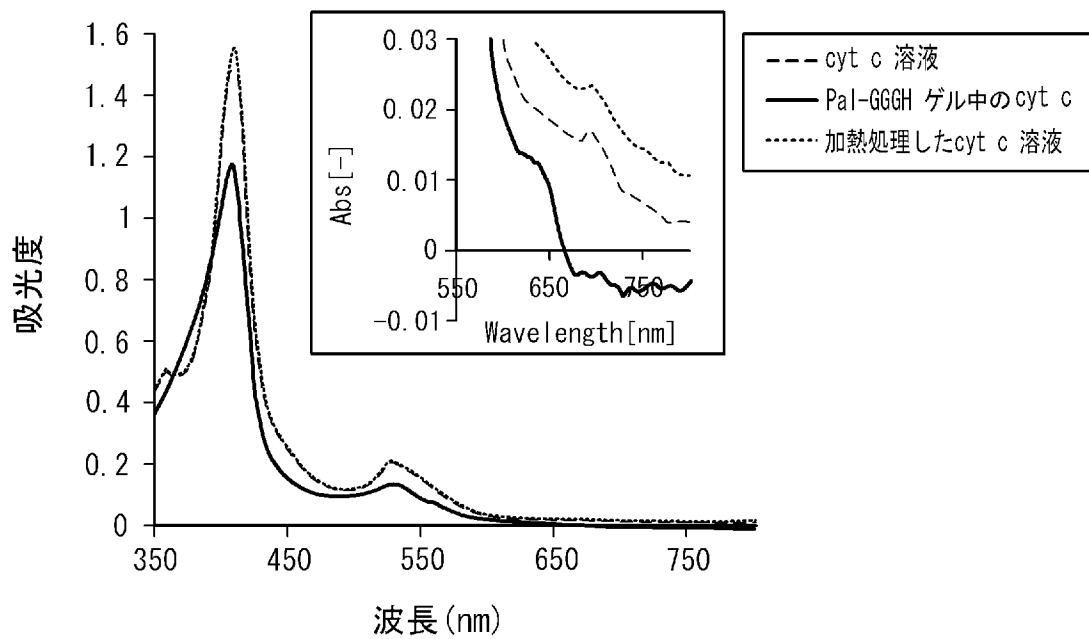


図20 : UVスペクトル測定結果

[図21]

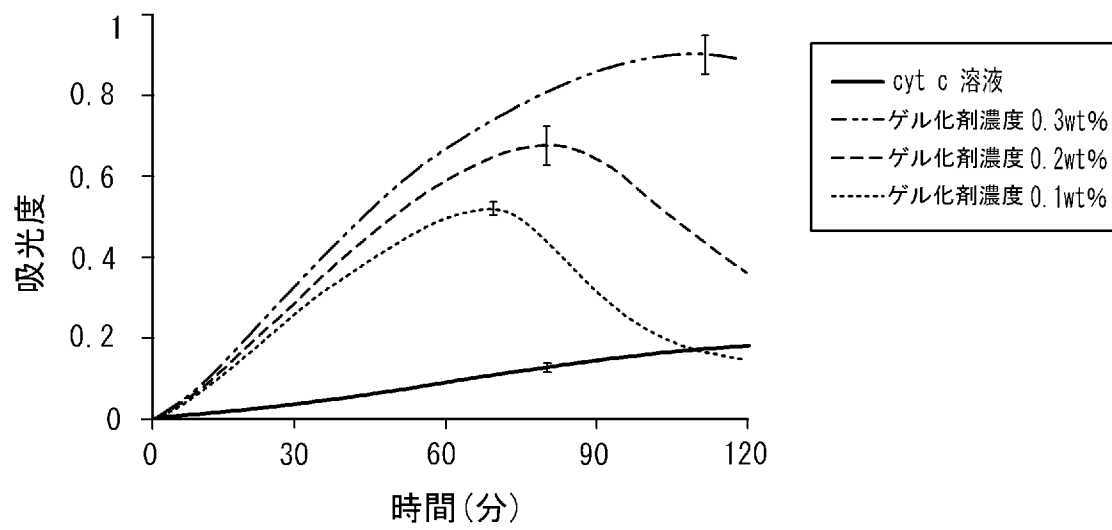


図21：ペルオキシダーゼ活性のゲル化剤濃度依存性測定結果

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K5/10(2006.01) i, A61K9/00(2006.01) i, A61K47/42(2006.01) i, C07K7/06(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K5/00-7/66, A61K9/00, A61K47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2009/005151 A1 (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 08 January 2009 (08.01.2009), & EP 2172475 A1	<u>1-12</u> <u>13-15</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2009/005152 A1 (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 08 January 2009 (08.01.2009), & EP 2180027 A1	<u>1-12</u> <u>13-15</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	WO 2007/100588 A1 (EDWARDS LIFESCIENCES CORP.), 07 September 2007 (07.09.2007), & JP 2009-528083 A & EP 1991111 A1 & US 2008/0029390 A1	<u>13-15</u> <u>1-12</u>



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August, 2010 (23.08.10)

Date of mailing of the international search report

31 August, 2010 (31.08.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	KIM, S.H. et.al., Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress. Anal. Chem., 2005, vol.77, no.21, pp.6828-6833	<u>13-15</u> 1-12
<u>Y</u> A	SUN, Y.X. et.al., Hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase incorporated in a new hydrogel film. Sens. Act. B, 2007, vol.124, no.2, pp.494-500	<u>13-15</u> 1-12
A	Daisuke KODA et al., "Histidine Gan'yu Peptide-sei Kaimen Kasseizai ni yoru Hydrogel no Keisei", Preprints of Joint Chemical Conference of Kyushu Branch, 2007, vol.44, page 79[3_3.029]	1-15
A	Daisuke KODA et al., "Shippei Kanren Seitai Shokubai ni Oto shita Chobunshi Hydrogel Keisei", Abstracts of Annual Meeting of the Society of Chemical Engineers, Japan, 2009, Feb., vol.74, page Q105	1-15
P,X	WO 2010/013555 A1 (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 04 February 2010 (04.02.2010), (Family: none)	1-15
P,A	JP 2010-047534 A (Kyushu University), 04 March 2010 (04.03.2010), (Family: none)	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K5/10(2006.01)i, A61K9/00(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K5/00-7/66, A61K9/00, A61K47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> Y	WO 2009/005151 A1（日産化学工業株式会社）2009. 01. 08. & EP 2172475 A1	<u>1-12</u> 13-15
<u>X</u> Y	WO 2009/005152 A1（日産化学工業株式会社）2009. 01. 08. & EP 2180027 A1	<u>1-12</u> 13-15
<u>Y</u> A	WO 2007/100588 A1（EDWARDS LIFESCIENCES CORPORATION）2007. 09. 07. & JP 2009-528083 A & EP 1991111 A1 & US 2008/0029390 A1	<u>13-15</u> 1-12

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

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

2 3 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

3 1 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

4 B

3 9 6 4

戸来 幸男

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	KIM, S.H. et.al., Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress. Anal. Chem., 2005, vol.77, no.21, pp.6828-6833	<u>13-15</u> 1-12
<u>Y</u> A	SUN, Y.X. et.al., Hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase incorporated in a new hydrogel film. Sens. Act. B, 2007, vol.124, no.2, pp.494-500	<u>13-15</u> 1-12
A	香田大輔他, ヒスチジン含有ペプチド性界面活性剤によるハイドロゲルの形成. 化学関連支部合同九州大会講演予稿集, 2007, vol.44, pp.79[3_3.029]	1-15
A	香田大輔他, 疾病関連生体触媒に応答した超分子ハイドロゲル形成. 化学工学会年会研究発表講演要旨集, 2009, Feb., vol.74, pp.Q105	1-15
P, X	WO 2010/013555 A1 (日産化学工業株式会社) 2010. 02. 04. (ファミリーなし)	1-15
P, A	JP 2010-047534 A (国立大学法人九州大学) 2010. 03. 04. (ファミリーなし)	1-15

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. 提出手段 ☐ 紙形式

☒ 電子形式

b. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☒ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：