

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5222739号
(P5222739)

(45) 発行日 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)

(24) 登録日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	9/51	(2006. 01)	A 6 1 K	9/51
A 6 1 K	47/24	(2006. 01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/44	(2006. 01)	A 6 1 K	47/44
A 6 1 K	47/34	(2006. 01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/36	(2006. 01)	A 6 1 K	47/36

請求項の数 46 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-558798 (P2008-558798)
(86) (22) 出願日	平成19年3月12日 (2007. 3. 12)
(65) 公表番号	特表2009-530241 (P2009-530241A)
(43) 公表日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/052276
(87) 国際公開番号	W02007/104732
(87) 国際公開日	平成19年9月20日 (2007. 9. 20)
審査請求日	平成22年3月2日 (2010. 3. 2)
(31) 優先権主張番号	06380048.6
(32) 優先日	平成18年3月13日 (2006. 3. 13)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	508278284
	アドヴァンスド イン ヴィトロ セル
	テクノロジーズ ソシエタッド リミター
	ダ
	スペイン エー08028 バルセロナ
	バルディリ イ レイクサック 4-6
	バルセロナ サイセンス パーク
(74) 代理人	110000109
	特許業務法人特許事務所サイクス
(72) 発明者	ヴィラ ペナ アナ イザベル
	スペイン エー15782 サンティアゴ
	デ コンポステーラ キャンパス スル
	パベリオン デ セルヴィシオス ラボ
	ラトリオ フェデール

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性分子の投与のための安定なナノカプセル化系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナノカプセルが

a . 下記を含む親油相 :

a . 1) 少なくとも 1 つのリン脂質成分 ; および

a . 2) 1 つ以上の飽和および / または不飽和 C₁₂ ~ C₂₄ 鎖脂肪酸またはその誘導体を含む油 ;

b . 下記を含む親水相 :

b . 1) キトサンまたはその誘導体 ; および

b . 2) ポリオキシアルキレン化合物

: を含む構造を有する、水系媒体に分散した 1 μm 未満の平均サイズを有するナノカプセルを含む系。

【請求項 2】

リン脂質成分が、ホスホグリセリドを含む、請求項 1 に記載の系。

【請求項 3】

ホスホグリセリドが、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジン酸およびその混合物から選択される請求項 2 に記載の系。

【請求項 4】

リン脂質成分がレシチンを含む、請求項 3 に記載の系。

【請求項 5】

レシチンが大豆レシチンである、請求項 4 に記載の系。

【請求項 6】

レシチンが、重量で 35% ないし 75% のホスファチジルコリン比率を有する、請求項 4 に記載の系。

【請求項 7】

レシチンが、重量で 35% ないし 55% のホスファチジルコリン比率を有する、請求項 4 に記載の系。

【請求項 8】

油がヒマシ油を含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の系。

10

【請求項 9】

ポリオキシアルキレン化合物がポリオキシエチレンまたはエチレンオキサイド - プロピレンオキサイド共重合体である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の系。

【請求項 10】

ポリオキシエチレン化合物が、ポロキサマーを含む、請求項 9 に記載の系。

【請求項 11】

ポリオキシエチレン化合物が、ポロキサマー 188 を含む、請求項 9 に記載の系。

【請求項 12】

系内のリン脂質成分の比率が、水を含む総重量について重量で 0.1% ないし 10% である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の系。

20

【請求項 13】

系内のリン脂質成分の比率が、水を含む総重量について重量で 0.5% ないし 5% である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の系。

【請求項 14】

系内のリン脂質成分の比率が、水を含む総重量について重量で 1% ないし 2.5% である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の系。

【請求項 15】

系内の油の比率が、水を含む総重量について重量で 1% ないし 20% である、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の系。

【請求項 16】

系内の油の比率が、水を含む総重量について重量で 2.5% ないし 10% である、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の系。

30

【請求項 17】

系内の油の比率が、水を含む総重量について重量で 4.5% ないし 5.5% である、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の系。

【請求項 18】

系内のキトサンの比率が、水を含む総重量について重量で 0.05% ないし 10% である、請求項 1 から 17 のいずれかに記載の系。

【請求項 19】

系内のキトサンの比率が、水を含む総重量について重量で 0.1% ないし 2% である、請求項 1 から 17 のいずれかに記載の系。

40

【請求項 20】

系内のキトサンの比率が、水を含む総重量について重量で 0.25% ないし 1% である、請求項 1 から 17 のいずれかに記載の系。

【請求項 21】

系内のポリオキシアルキレン化合物の比率が、水を含む総重量について重量で 0.05% ないし 10% である、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の系。

【請求項 22】

系内のポリオキシアルキレン化合物の比率が、水を含む総重量について重量で 0.1% ないし 5% である、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の系。

50

【請求項 2 3】

系内のポリオキシアルキレン化合物の比率が、水を含む総重量について重量で 1 % ないし 2 . 5 % である、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の系。

【請求項 2 4】

水系媒体が粘性親水性ポリマーをさらに含む、請求項 1 から 2 3 のいずれかに記載の系。

【請求項 2 5】

粘性親水性ポリマーが、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、キトサン、ポロキサマー、ポリエチレングリコールおよびその混合物の間から選択される、請求項 2 4 に記載の系。

【請求項 2 6】

ヒアルロン酸またはその任意の塩をさらに含む、請求項 1 から 2 5 のいずれかに記載の系。

10

【請求項 2 7】

ナノカプセルが平均サイズ 1 ないし 9 9 9 nm を有する、請求項 1 から 2 5 のいずれかに記載の系。

【請求項 2 8】

ナノカプセルが平均サイズ 5 0 ないし 8 0 0 nm を有する、請求項 1 から 2 5 のいずれかに記載の系。

【請求項 2 9】

ナノカプセルが平均サイズ 2 0 0 ないし 7 0 0 nm を有する、請求項 1 から 2 5 のいずれかに記載の系。

20

【請求項 3 0】

ナノカプセルが、正の表面電荷を有する、請求項 1 から 2 9 のいずれかに記載の系。

【請求項 3 1】

ナノカプセルが、+ 1 mV ないし + 7 0 mV のゼータ電位で表される、正の表面電荷を有する、請求項 3 0 に記載の系。

【請求項 3 2】

生物学的に活性な親油性分子をナノカプセルの親油相中にさらに含む、請求項 1 から 3 1 のいずれかに記載の系。

【請求項 3 3】

生物学的に活性な親油性分子が、タンパク質、ペプチド、脂質、親油化オリゴヌクレオチド、副腎皮質ステロイド、親油性ビタミン、抗菌剤、静菌剤、治療剤、抗ヒスタミン剤、麻酔剤、鎮痒剤、抗生物質、抗ウイルス剤、消毒薬、にきび薬、脱色薬、抗脂漏薬、免疫抑制剤、非ステロイド抗炎症剤 (NSAID)、およびトウガラシ由来抗炎症剤から成る群から選択される、請求項 3 2 に記載の系。

30

【請求項 3 4】

ナノカプセル中の生物学的に活性な親油性分子の比率が、水を含む系の総重量について重量で最大 5 % である、請求項 3 2 または 3 3 に記載の系。

【請求項 3 5】

親油性分子がシクロスポリンである、請求項 3 2 に記載の系。

40

【請求項 3 6】

ナノカプセル中のシクロスポリンの比率が、水を含む系の総重量について重量で 0 . 0 1 ないし 2 % である、請求項 3 5 に記載の系。

【請求項 3 7】

親油性分子が、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、フルチカゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ベクロメタゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾンである、請求項 3 2 に記載の系。

【請求項 3 8】

親油性分子が、吉草酸ベタメタゾンである、請求項 3 2 に記載の系。

50

【請求項 39】

ナノカプセルの表面上に吸着された、ペプチド、タンパク質、ホルモン、抗原/アレルゲン、抗体、ヘパリン、DNA、RNAおよびオリゴヌクレオチドから選択される、親水性の生物学的に活性な分子をさらに含む、請求項 1 から 30 のいずれかに記載の系。

【請求項 40】

請求項 1 から 39 のいずれかで定義されるような系を含む医薬組成物。

【請求項 41】

経口、頬側、舌下、局所、目、鼻または腔経路による投与のための、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

請求項 1 から 34 のいずれかで定義されるような系を含む化粧品組成物。

【請求項 43】

皮膚軟化剤、保存料、芳香物質、にきび薬、抗菌剤、抗酸化剤、脱臭剤、制汗剤、ふけ防止剤、脱色剤、抗脂漏剤、色素、日焼けローション、UV光吸収剤、酵素、および芳香物質から選択される、化粧品として許容される親油性分子を含む、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 44】

pH調整剤、抗酸化剤または保存料をさらに含む、請求項 40 から 43 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 45】

a. リン脂質成分および油、および任意に有効成分として親油性分子の、有機溶媒への溶解による親油相の調製；
b. キトサンおよびポリオキシアルキレン化合物の水への溶解による親水相の調製；
c. 温度 40 ないし 60 への両方の相の加熱；
d. ナノカプセルの自発的形成を伴う親油性および親水相の混合；
e. 有機溶媒の除去
：を含む、請求項 1 から 38 のいずれかに記載の系の調製のための製法。

【請求項 46】

前記親油性ビタミンは、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン K およびビタミン E である、
請求項 33 に記載の系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、長期間の高い安定性を有する点で特徴づけられるナノカプセル化系を目的とする。これらの系は、特に高度に親油性の、医薬品としてまたは化粧品として活性な分子の放出制御に有用である。それは特に、水相に分散したナノカプセルを含む系、それらを含む化粧品組成物および医薬組成物、およびその調製のための製法を目的とする。

【背景技術】

【0002】

生物学的に活性な物質を放出するための系は、常に発展している研究分野を成す。それは、高い親油性が皮膚脂質バリアを通る透過を實際上不可能にするという事実のため、有効成分、特に高度に親油性の有効成分の、局所経路（経皮 または粘膜経由）による投与が特に不適当である生薬分野でよく知られている。

【0003】

このため、最近二十年間で、使用後に上皮を経由するこれらの薬剤のバイオアベイラビリティおよび吸収を高めることを可能にする、この種の分子の放出のためのさまざまな系が開発されている。これらの系のうちから、一または複数の界面活性剤が組み込まれている水相に分散している、有効成分が組み込まれている油相から構成される、リポソーム、マイクロエマルジョン、ナノスフィアおよびナノ粒子といったコロイド懸濁液の調製物が特に興味深い。

10

20

30

40

50

【0004】

このように、カルボ(Calvo)他[J. Pharm. Pharmacol., 1996, 48, 1147-52]は、界面活性剤としてポロキサマーを含む水相に分散された、レシチンおよびポリ-(ε-カプロラク톤)の油相から成る、眼経路によるインドメタシンの放出のためのコロイド系を開示する。

【0005】

それに関して、EP出願760 237は、トリグリセリド、レシチンおよび界面活性剤から成る親油性分散相、およびプロピレングリコールを含む水系親水相を含む、シクロスポリンのような非水溶性物質の放出のためのマイクロエマルジョンに関する。

【0006】

特許出願WO97/22358は、シクロスポリンが、トコフェロールまたはその誘導体から成る疎水相、および炭酸プロピレンおよびポリエチレングリコール、および界面活性剤といった一連の親水性成分を含む系に溶解されるマイクロエマルジョンを開示する。

【0007】

にもかかわらず、この種のコロイド系の主な欠点は、それが負の正味電荷を持ち、そのためある種の陽イオン性生体成分(一部のタンパク質、ナトリウムおよびカリウム)との接触は、表面電荷の中和、系の破壊および、結果として、有効成分の損失を生じることである。一方、これらの負に荷電した系はまた、生体膜による静電反発を受ける可能性があり、なぜなら前記膜もまた負電荷を有するためである。

【0008】

この限界を克服するため、正の正味電荷を有し、および、したがって、陽イオン性の生体環境を経由して吸収されることおよび/または粘膜および皮膚といった生体膜への接着を可能にするコロイド系を開発する目的で、重要な研究が行われている。

【0009】

特許出願WO96/37232は、さまざまな経路による有効成分の投与のための、ナノエマルジョン、ナノカプセルおよび、親油性核から成りおよびキトサンでコーティングされたナノ粒子に基づく系に関する。親水性キトサンポリマーの水相への組み込みは、前記系に正の正味電荷を与える。それ以来、このポリマーまたは目的の正電荷が提供されることを可能にする別のものを組み込む系が開発されている。

【0010】

このように、カルボ(Calvo)他[Colloid. Polym. Sci., 1997, 275, 46-53]は、前段落で言及した出願と同一の、しかし、ジアゼパムをモデルとして親油性分子を放出するために、さらにポロキサマーを界面活性剤として水相に組み込んだコロイド系を開示する。同様に、エル・シャブーリ(El-Shaboury)[Intern. J. Pharmac., 2002, 249, 101-8]の科学論文はコロイド系を記載し、キトサンに加えて、グリコール酸ナトリウムまたはゼラチン-Aの水相での使用、およびシクロスポリン放出についてのその能力が分析される。

【0011】

同様に、フィリポビク・グルシク(Filipovic-Grcic)[J. Microencap., 2001, 18(1), 3-12]による論文は、高分子量マーカが組み込まれた(フルオレセインイソチオシアナート-デキストラン)、キトサンでコーティングされたリポソーム核に基づく粘膜接着系に関し、キトサンの割合およびその分子量の関数として、擬似胃液中での前記系の安定性を分析する。

【0012】

にもかかわらず、医薬および化粧品学の分野におけるこの種の系の使用に伴う重要な技術上の問題は、その保存中およびそのin vivo投与後の両方におけるその不安定性に関する。具体的には、これらの系の組成は、一ヶ月を超える期間のおよび室温を上回る温度での保存中に、有効成分が親油相から徐々に放出されおよびそれが不溶である水相へ移動することを引き起こし、その沈澱、および結晶の形成に繋がる。

【0013】

このデータを踏まえて、安定なナノカプセル系の開発は、活性親油性成分および、適当な生体環境におけるこれらの分子の結合およびその放出のための大きな能力に加えて、工業応用性の観点から必須な特徴である、その保存および輸送中に明らかに改善されている安定性を有するものの放出に、特に必要である。

【 0 0 1 4 】

もう一つの技術上の問題は、オートクレーブまたは低温殺菌といった滅菌工程を受ける際にこれらの系の大部分が不安定であることである。これらの工程は、系を 1 0 0 を上回る温度に短時間供することを含む。一般的に、これらの強い物理条件は、さまざまな成分の溶解性を劇的に変化させ、およびエマルションまたは粒子の破壊に繋がり、有効成分が見出される油相の形成を伴う。したがって、局所投与できおよび滅菌工程に供される場合でさえ安定である、親油性を持つ有効成分または化粧品成分の徐放のための系を見出すことが非常に望ましい。

10

【 発 明 の 開 示 】

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

【 0 0 1 5 】

発明者らは、リン脂質成分および飽和および / または不飽和 $C_{12} \sim C_{24}$ 鎖脂肪酸またはその誘導体を含む油を含む親油性核、およびキトサンおよびポリオキシアルキレン化合物を含む親水相を含むナノカプセルの系は、これらの系の工業的および商業的実行可能性の主要特性を表す、通常の保存条件で 2 年を上回る期間、水系懸濁液中で高い安定性を有することを見出している。それはさらに、高度に親油性の分子の効率的な結合および以降

20

【 0 0 1 6 】

これらの系に由来する別の長所は、粒子サイズおよびゼータ電位といった構造および性質を維持する一方で高音での滅菌工程に供される能力である。この側面は、たとえば、滅菌が義務づけられている眼用途のように、その使用が必要である場合に特に関係する。さらに、これらの系を滅菌する可能性は、最終処方に保存料を使用する必要性の低減および一部の場合には消失を可能にする。

【 0 0 1 7 】

このように、本発明の目的は、1 μm 未満の平均サイズを有する、水系媒体に分散したナノカプセルを含む系から成り、ナノカプセルは

30

a) 下記を含む親油相 :

a . 1) 少なくとも 1 つのリン脂質成分 ; および

a . 2) 1 つ以上の飽和および / または不飽和 $C_{12} \sim C_{24}$ 鎖脂肪酸またはその誘導体を含む油 ;

b) 下記を含む親水相 :

b . 1) キトサンまたはその誘導体 ; および

b . 2) ポリオキシアルキレン化合物

を含む構造を有する。

【 0 0 1 8 】

本発明の特定の一実施形態では、ナノカプセル系はさらに、ナノカプセルの親油相中に、疾患を予防、緩和または治療することができる活性親油性分子を含む。好ましい一実施形態では、活性親油性分子はシクロスポリンである。

40

【 0 0 1 9 】

別の特定の一実施形態では、ナノカプセル系はさらに、ナノカプセルの表面に吸着された、ペプチド、タンパク質、ホルモン、抗原 / アレルゲン、抗体、ヘパリン、DNA、RNA およびオリゴヌクレオチドから選択される親水性の生物学的に活性な分子を含む。

【 0 0 2 0 】

本発明の第二の目的は、前に定義された系を含む医薬組成物に関する。

【 0 0 2 1 】

本発明のもう一つの目的は、前に定義された系を含む化粧品組成物に関する。本発明の

50

特定の一実施形態では、前記化粧品組成物は、化粧品として活性な分子をさらに組み込むことができる。

【0022】

本発明の最後の目的は、下記を含む、上で定義される系の調製のための製法に関する：

a) リン脂質成分および油、および任意に有効成分として親油性分子の、有機溶媒への溶解による親油相の調製；

b) キトサンおよびポリオキシアルキレン化合物の水への溶解による親水相の調製；

c) 温度40ないし60 への両方の相の加熱；

d) ナノカプセルの自発形成を伴う親油性および親水相の混合；

e) 有機溶媒の除去。

10

【0023】

本発明の系および組成物は、ナノカプセルの親油相に組み込まれている、親油性を持つ生物学的に活性な分子の投与に特に適する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の系は、水系媒体に分散したナノカプセルを含み、前記ナノカプセルは、有効成分が組み込まれる親油相、および親水相を含む構造を有する。

【0025】

「ナノカプセル」の語は、核を「封入する」正電荷を有するキトサンを含む親水相によって囲まれる親油性の核として理解される。ナノカプセルは水系媒体中に分散され、ここで前記水系媒体は、キトサンおよび/または溶解した他の親水性ポリマーの追加量を含む。ナノカプセルのさまざまな親油性および親水性成分の結果として生じるイオン性相互作用は、特徴的な物理的実体を生じ、それは独立しておりおよび観察可能であり、その平均サイズは1 (μm未満、すなわち平均サイズ1ないし999 nmである。

20

【0026】

「平均サイズ」は、親油相および親水相を含み、水系媒体中で一緒に動く、ナノカプセル集団の平均直径として理解される。これらの系の平均サイズは、当業者に公知でありおよびたとえば下記の実験部分に記載される標準的手順を用いて測定される。

【0027】

本発明の系のナノカプセルは、1 (μm未満の平均粒子サイズを有する、好ましくは1ないし999 nm、好ましくは50ないし800 nmの平均サイズを有する点で特徴づけられる。カプセルの平均サイズは、リン脂質成分の量によって(より多量では、結果として生じるサイズはより小さい)、キトサンの量および分子量によって(サイズはより大きい量または分子量に伴って増大する)、使用した油の密度、および混合工程における攪拌速度および両方の相の温度といった調製工程のパラメーターによって主に影響される。

30

【0028】

さらに、ナノカプセルは、キトサンのアミン基が原因である表面電荷(ゼータ電位で測定される)を有する可能性があり、その大きさは+1 mVないし+70 mVで変化する。

【0029】

親油相

ナノカプセル中に存在する親油相は、少なくとも1つのリン脂質成分および、一またはいくつかの飽和および/または不飽和長鎖脂肪酸($C_{12} \sim C_{24}$)、またはその誘導体から成る油を含む。その機能は、共に薬学および化粧品の意味で活性であるならば、適当な生体環境下で後に放出される、活性な親油性成分が存在する場合に収容することである。

40

【0030】

リン脂質成分

本記載では、リン脂質成分は、一種のイオン性脂質と理解され、最も単純な形ではグリセロールを含み、それに2個の脂肪酸(1, 2 - ジアシルグリセロール)および1個のり

50

ン酸基が結合している。通常、リン酸基はホスホジエステル結合によって別の原子の基に結合し、それはしばしばたとえばコリン、セリン、またはエタノールアミンのように窒素を含み、および多くの場合電荷を有する。別のリン脂質は、アミノアルコールのスフィンゴシンまたはジヒドロスフィンゴシンに由来し（スフィンゴ脂質）、および必ずしもグリセロールに由来しない。結果として生じる化合物は、脂肪酸の鎖について親油性を有し、およびリン酸基および電荷について親水性を有する。

【0031】

本発明の系では、リン脂質成分は好ましくは、ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、セファリンおよびその混合物から選択される。ホスホグリセリド、たとえばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセリン、ホスファチジイルイノシトール、リゾホスファチジルコリンおよびホスファチジン酸は、脂肪酸、グリセリン、リン酸およびアルコール（たとえばコリン、セリン、エタノールアミン、グリセリンまたはイノシトール）によって形成される脂質である。スフィンゴミエリンのようなスフィンゴ脂質は、スフィンゴシン、脂肪酸、リン酸およびアルコールまたはアミノアルコールによって形成される。セファリンは、グリセリン、リン酸、2個の脂肪酸および2個のアルコール塩基（コリンおよびスフィンゴシン）から形成される。

10

【0032】

本発明の好ましい一実施形態では、リン脂質成分はホスホグリセリドを含む。より好ましくは、リン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリンおよびホスファチジン酸またはその混合物から選択されるホスホグリセリドを含む。

20

【0033】

別の好ましい一実施形態では、リン脂質成分はレシチンである。好ましくは市販の大豆レシチンが使用されるが、卵レシチンもまた使用されうる。

【0034】

レシチンは脂質化合物の複雑な混合物であり、その大部分はリン脂質化合物、具体的にはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびリゾホスファチジルコリンである。一般的に、レシチンは商品名および組成中のホスファチジルコリンの割合を示す数字で表される。レシチン中のホスファチジルコリンの割合は、35%ないし事実上100%で変動しうるが、にもかかわらず本発明では、この割合が35%ないし75%、好ましくは35%ないし55%であるレシチンが好ましくは使用される。非常に高い割合のホスファチジルコリン（80%を超える）を含むレシチンの使用は、ナノカプセル懸濁液中に遊離油の存在を生じるため、勧められない。これに関連して、ホスファチジルコリン割合80%以下の特性を持つ市販の数種類のレシチンがある。このように、好ましくはエピクロン（Epikuron）135F、エピクロン145V、エピクロン170、リポイド（Lipoid）S30、リポイドS45およびリポイドS75が使用される。

30

【0035】

同様に、ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン比は、適当な安定性を有するナノカプセルの形成に影響する。したがって、ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン比が約7／1でありおよびホスファチジルコリンの比率が組成物中で35%を上回るエピクロン（Epikuron）135Fの使用が、最高の安定性結果を与えることが実証されている。

40

【0036】

油

親油相に含まれる油は、一または数種類の不飽和および／または飽和C₁₂～C₂₄鎖脂肪酸またはその誘導体から成る。前記脂肪酸の例は、飽和脂肪酸、たとえばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アカシジン酸、カルナシリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、またはセロチン酸；一不飽和脂肪酸、たとえばラウロレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、セトレイン酸、ま

50

たはエルカ酸；多価不飽和脂肪酸、たとえばリノール酸、リノレン酸、ガンマリノレン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、イワシ酸またはドコサヘキサエン酸を含むがそれらに限定されない。

【0037】

同様に、これらの脂肪酸の誘導体もまた使用でき、それはこの定義によって高い親油性を持ちおよびたとえば、前記脂肪酸のエステルまたはアミドといった、アルコールまたはアミンとの酸基の反応の結果として生じる化合物と理解される。同様に、脂肪酸誘導体の定義は、炭化水素鎖の置換基として水酸基、エーテル基またはアルキル基を有する脂肪酸、そのエステルまたはそのアミド、たとえば、セレブロン酸、ヒドロキシネルボン酸、リシノール酸、ツベルクロステアリン酸またはフィタン酸；または炭化水素鎖に環状構造を有する脂肪酸、たとえばラクトバチルス酸またはチョールムーグラ酸を含む。

10

【0038】

一般論として、たとえば、ヒマワリ油、トウモロコシ油、大豆油、綿実油、落花生油、大豆油、月見草油、ルリヂサ油、オリーブ油、ココナツ油、パーム油、麻種子油、杏仁油または杏種子油、小麦胚芽油、トウモロコシ胚芽油、ココアバター油、マカダミア油、アーモンド油、アボカド油、カレンデュラ油、グレープシード油、ゴマ油、ホホバ油、ヘーゼルナッツ油などといった任意の植物油が使用されうる。

【0039】

驚くべきことに、ナノカプセルの組成へのこの種類の油の組み込みは、たとえば商品名をミグリオール (Miglyol) またはラブラファク (Labrafac) という油とといった最新技術で用いられる他の油と比較して、長期間に系に高い安定性を与えることに特に関連することが見出されている。特に、加速条件でシミュレートされた検定を用いて、本発明の系は5～6ヶ月間37 周辺の温度にて安定であることが観察されており、それは室温にて通常の保存条件で2年間にほぼ同等である。これをミグリオール (Miglyol) 840 およびラブラファク・リポフィル (Labrafac Lipophile) (飽和 $C_8 \sim C_{10}$ 鎖脂肪酸のジエステルまたはトリグリセリドの混合物から成る) といった別の種類の油の結果と比較して、系安定性は最大6倍上昇することがわかっている。

20

【0040】

本発明の好ましい一実施形態では、親油相に含まれる油はヒマシ油である。前記油はトウゴマ (Ricinus Communis L.) 種子を非加熱圧搾することによって得られる。しかし、それは市販の製品である。ヒマシ油は、パルミチン酸2% (最大)、ステアリン酸2.5% (最大)、オレイン酸2.5～6.0%、リノール酸2.5～7.0%、リノレン酸1% (最大)、およびリシノール酸85～92%の長鎖脂肪酸 ($C_{16} \sim C_{18}$) 組成を有する。

30

【0041】

親水相

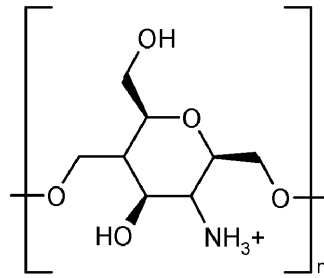
親水相は、水に加えて、キトサンまたはその誘導体および界面活性剤として作用するポリオキシアルキレン化合物を含む。この相の機能は、おそらく、ナノカプセルに正電荷を与えて陽イオン性の生体環境を通じて吸収されるのを可能にすることまたはそれへの吸収に加えて、ナノカプセルのコーティングである。

40

【0042】

キトサン

キトサンはキチン (ポリ-N-アセチル-D-グルコサミン) に由来する天然起源のポリマーであり、Nのアセチル基の重要な部分が加水分解によって除去されている。脱アセチル化の程度は、好ましくは40%より大、より好ましくは60%より大である。一変形では、60～98%である。キトサンはしたがってアミノポリ多糖構造および陽イオン性を有する。キトサンは式(I)のモノマー単位の反復：



(I)

10

ここで n は整数であり、およびさらにアミン基がアセチル化されている m 個の単位を含む。 $n + m$ の合計が重合度、すなわちキトサン鎖中のモノマー単位の数を表す。

【0043】

本発明のナノカプセルを製造するのに用いられるキトサンは、2 ないし 2000 kDa、好ましくは 2 ないし 500 kDa、より好ましくは 5 ないし 150 kDa の分子量を有する。使用されうる市販のキトサンの例は、ノバマトリクス社 (Nova Matrix) (ノルウェー、ドランメン (Drammen)) から入手可能な UPG 113、UPCL 213 および UPL 113 である。

【0044】

20

キトサンの代替物として、キトサンの溶解性を高める目的でまたはその接着性を高める目的で 1 つ以上の水酸基および / または 1 つ以上のアミン基が修飾されているキトサンと理解されるその誘導体もまた使用されうる。これらの誘導体は、特に、ロバーツ (Roberts) の『キチン化学』 (Chitin Chemistry)、マクミラン社 (Macmillan), 1992, 166 に記載される通り、アセチル化、アルキル化またはスルホン化キトサン、チオール化誘導体を含む。好ましくは、誘導体が使用される場合、誘導体は O - アルキルエーテル、O - アシルエステル、トリメチルキトサン、ポリエチレングリコール修飾キトサンなどから選択される。他の可能な誘導体は、クエン酸、硝酸、乳酸、リン酸、グルタミン酸などといった塩である。いずれにしろ、当業者には、最終処方の安定性および商業的実行可能性に影響することなく、キトサンになされうる修飾を

30

【0045】

ポリオキシアルキレン化合物

その役割について、ポリオキシアルキレン化合物は、構造内にアルキレンオキサイド単位を有する非イオン性の合成親水性ポリマーを意味すると理解され、ポリオキシエチレン (PEO) またはエチレンオキサイド - プロピレンオキサイド (PEO - PPO) 共重合体の使用が好ましい。この最後の場合については、PEO および PPO の共重合体を使用される場合、共重合体中の PEO の比率は重量で 10 % ないし 80 % の範囲にわたることができ、残り (最大 100 %) が PPO である。

【0046】

40

これらのポリマーはさまざまな分子量で市販されているが、にもかかわらず、本発明では 1000 ないし 25000 の分子量を有するポリオキシエチレン化誘導体の使用が好ましい。好ましい一実施形態では、ポリオキシエチレン化誘導体は、たとえば市販名ポロキサマーといった三ブロック共重合体 (PEO - PPO - PEO) である。たとえばプルロニック (Pluronic) F68 (ポロキサマー 188) を用いて良好な結果が得られている。

【0047】

ポリオキシアルキレン化合物は、系内で界面活性剤として使用され、およびその存在は、系に安定性を与えるのに特に必要であり、さもないとナノカプセルは保存中に凝集する。このように、それが存在しなければ、粒子サイズの増大が 37 にて 2 週間後に観

50

察されている。さらに、表 I で観察できる通り、この化合物の組み込みは、形成されるナノカプセルのサイズにほとんど影響しないことを実証できている。

【表 1】

表I: ナノカプセル安定性に対するポロキサマーの量の影響

ポロキサマー (mg)	当初サイズ	37℃にて2週間後のサイズ
0	492	754
125	482	475
205	439	442
500	410	423

10

【0048】

本発明の一変形では、系は、水を含む系の総重量について重量で好ましくは0.1%ないし10%、好ましくは0.5%ないし5%、より好ましくは重量で1%ないし2.5%のリン脂質成分の比率を有する。リン脂質成分の比率0.1%未満は、ナノカプセル懸濁液中の遊離油の存在に繋がるため推奨されない；対照的に、10%を上回る比率は、負電荷を有する脂質成分と正電荷を有するキトサンの相互作用のため、粒子の形成およびカプセル化されない系の形成に繋がる。

【0049】

20

一方、本発明の別の一変形では、系内の油の比率は、水を含む系の総重量について重量で1%～20%、好ましくは2.5%ないし10%の範囲にわたる。より小さな量はカプセル化されうる活性成分の低減を伴い、一方、より大きな量は、系内の遊離油の存在を回避するためにリン脂質成分といった別の成分の比率の増大を必要とする。

【0050】

本発明の別の一変形では、キトサン、またはその誘導体の比率は、水を含む系の総重量について重量で好ましくは0.05%ないし10%、好ましくは0.1%ないし2%、およびより好ましくは0.25%ないし1%である。上記より大きい比率は懸濁液の粘度の増大を生じ、それは一部の用途について有利でありうるが、しかし溶媒除去相および処方濃縮を顕著に妨害する。

30

【0051】

その役割について、ポリオキシアルキレン化合物の比率は重量で好ましくは0.05%ないし10%、重量で好ましくは0.1%ないし5%、より好ましくは1%ないし2.5%である。

【0052】

すべての場合で、残りの比率は主に、ナノカプセルが分散される精製水に相当する。これは、別の成分がナノカプセル（1つ以上の親油性有効成分、化粧品成分など）に、それが分散される水系媒体（増粘剤、保存料、香料など）に、またはそれらに吸着されて（親水性有効成分、ヒアルロン酸など）存在できないという意味ではない。

【0053】

40

本発明の系の一変形では、ナノカプセルは水系媒体に分散され、水系媒体はさらに親水性ポリマーを含み、親水性ポリマーの機能は、系に粘性を与え、その密度を大幅に高めることである。この成分の添加は、本発明の水系溶媒に分散されたナノカプセル系が結果として一部の場合では、特にゼリー、クリーム、軟膏またはバームといった半固体の医薬組成物または化粧品組成物を製造したい場合に、用途の観点から流動性が高すぎるためである。粘性を有する親水性ポリマーのうち、特に、炭化水素および誘導体、カルボン酸、ポリビニルアルコールのようなポリグリコール、ポリビニルピロリドンの誘導体、キトサンまたはその誘導体、ポロキサマー、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸またはその混合物が使用されうる。

【0054】

50

本発明の別の一変形では、ナノカプセルの形成後に、ヒアルロン酸またはその塩を、そのさまざまな性質および機能のために、水系媒体に組み込む。一方で、それはナノカプセルに吸収され、電荷とその性質の一部を変化させる。他方で、それは細胞膜およびムチン（粘膜中に存在するタンパク質）との相互作用を促進できることが知られている。加えて、使用する品質に依存して、それは水系媒体中に溶解したままであることが可能であり、および系の粘度の調節に寄与する。いずれにしろ、表ⅠⅠで判る通り、特に系のサイズおよびゼータ電位の測定において、それは系の性質に悪影響を与えないことが知られている。

【表 2】

表Ⅱ. ヒアルロン酸の組み込み後のナノカプセルのサイズおよびゼータ電位。

キトサン:ヒアルロン酸 (mg)	サイズ(nm)	ゼータ電位(mV)
50:0	330	+61.6
50:10	312	+51.0
50:20	372	+38.1
50:30	481	+29.3

【0055】

本発明の系のより興味深い用途の一つは、親油性分子の投与目的、特に、それらが医薬品としてまたは化粧品として活性な化合物である場合である。本発明に記載される系は、ナノカプセル内の生物学的に活性な親油性分子の結合のための高い能力を有する。

【0056】

したがって、本発明のナノカプセル系はさらに、疾患を予防、緩和または治療できる、生物学的に活性な親油性分子を親油相に含む。

【0057】

「生物学的に活性な親油性分子」の語は、疾患の治療、治癒、予防または診断に使用されるかまたは、ヒトおよび動物の身体的および精神的福祉を改善するために使用される、親油性の任意の物質に関する。親油性を有するこれらの分子は、タンパク質、ペプチド、脂質、修飾オリゴヌクレオチド（親油化）、副腎皮質ステロイド、親油性ビタミン、たとえば A、D、K および E、抗菌剤、静菌剤、治療剤、抗ヒスタミン剤、麻酔剤、鎮痒剤、抗生物質、抗ウイルス剤、消毒薬、にきび薬、脱色薬、抗脂漏薬、免疫抑制剤、非ステロイド抗炎症剤（NSAID）、トウガラシ由来抗炎症剤を含む。

【0058】

好ましい一実施形態では、生物学的に活性な親油性分子はシクロスポリンである。

【0059】

別の好ましい一実施形態では、生物学的に活性な親油性分子は、たとえば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、フルチカゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、ベタメタゾン、ベクロメタゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾンといった副腎皮質ステロイドである。

【0060】

好ましい一変形では、副腎皮質ステロイドは吉草酸ベタメタゾンである。

【0061】

ナノカプセルに封入された有効成分の比率は、水を含む系の総重量について重量で最大 5% となりうる；より多量は、系の安定性を低減させ、およびすべての有効成分を封入するためにより多量のリン脂質成分の添加を必要にする。にもかかわらず、適当な比率は、それぞれの場合で封入すべき有効成分に依存する。

【0062】

有効成分としてシクロスポリンを封入する具体的な場合に、前記系内のその比率は、重量で好ましくは0.01%ないし5%、より好ましくは0.1%ないし2%となる。

【0063】

吉草酸ベタメタゾンが組み込まれる場合、系に含まれるこの成分の割合は、好ましくは0.01%ないし3%、より好ましくは0.05%ないし0.5%の範囲となる。

【0064】

本発明の別の態様では、ナノカプセルを含む系はまた、高い親油性を有しない有効成分の投与に使用されうる。その場合、それらはナノカプセルに封入されるが、その表面に吸収される。この変形は、特にペプチド、タンパク質、ホルモン（インシュリン、LRH、LDなど）、目的に応じて免疫応答または寛容を生じるための抗原/アレルゲン（破傷風トキソイド、ジフテリア毒素など）、抗体、ヘパリン（低分子量および非分画）、DNA、RNAおよびオリゴヌクレオチドといった、親水性の生物学的に活性な分子の投与のための、安定な系の調製に有用でありうる。

【0065】

本発明の別の目的は、上記で定義された通りのナノカプセル化系を含む医薬組成物に関する。

【0066】

医薬組成物の例は、経口、頬側、舌下、局所、眼、鼻、または腔投与のための任意の液体組成物（すなわちナノカプセルの懸濁液または分散系）または、局所、眼、鼻または腔投与のためのゼリー、軟膏、クリームまたはバームの形態の任意の組成物を含む。

【0067】

好ましい一態様では、処方は粘膜を経由して投与される。ナノカプセルが有する正の表面電荷は、負に荷電した粘膜および上皮細胞の表面との相互作用を介して、粘膜表面上の薬剤のより良好な吸収を提供する。

【0068】

別の好ましい一態様では、処方はいずれも皮内にまたは経皮的に投与され、皮膚を通じたまたは皮膚上の投与と理解される。この形態の投与は、本発明の系は経皮経路による薬物の吸収および透過を促進するだけでなく、皮膚表面上の系の吸着および以後の有効成分の徐放（「デポ」型）を促進するため特に有意義である。

【0069】

皮膚上または皮膚を通じた投与のための良好な性質のため、および長期安定性のため、本発明のナノカプセル系はまた化粧品用途に非常に適している。

【0070】

したがって、本発明の別の目的は、以前に定義されたナノカプセル系を含む化粧品組成物から成る。これらの化粧品組成物は、任意の液体組成物（ナノカプセルの懸濁液または分散系）、または本発明の系を含みおよび局所投与のためにゼリー、クリーム、軟膏またはバームの形態である任意の組成物を含む。前記組成物は、結合している化粧品として活性な分子を保たない場合でさえ、皮膚軟化、保護および治癒特性を有する点で特徴づけられる。

【0071】

本発明の一変形では、化粧品組成物はまた、治療効果を何ら有しなくても化粧品物質としての性質を有する、親油性の活性分子を組み込むことができる。ナノカプセルに組み込まれうる活性分子のうち、特に、皮膚軟化剤、保存料、芳香物質、にきび薬、抗菌剤、抗酸化剤、脱臭剤、制汗剤、ふけ防止剤、脱色剤、抗脂漏剤、色素、日焼けローション、UV光吸収剤、酵素、芳香物質を挙げることができる。

【0072】

医薬品組成物および化粧品組成物はさらに、たとえば組成物のpHが5を下回る値に低下するのを防ぐ緩衝剤のようなpH調整剤、リン脂質成分および油の酸化を阻害する抗酸化剤、および処方の重要な構造変化を回避する保存料を含む。このように、一変形では、pHの調節および同時に抗酸化剤としての作用を可能にする二機能を有するクエン酸緩衝

10

20

30

40

50

液が親油相に使用され、および保存料としてパラベンが親水相に使用される。

【 0 0 7 3 】

機能に応じて、これらの追加の成分は、ナノカプセルを構成する相に、またはナノカプセルが分散される水系媒体に、またはナノカプセルに完全にまたは一部が吸収されて存在しうる。当業者は、どの追加の成分が使用されうるかを決定でき、およびそれらが必要である場合は、その多数は医薬品組成物および化粧品組成物で共通に使用される。

【 0 0 7 4 】

本発明の最後の目的は、上記で定義されおよびナノカプセルを含む本発明の系の調製のための製法に関する。前記製法は、一方で、リン脂質成分および油の有機溶媒への溶解による親油相の調製を含む。随意的な医薬品または化粧品親油性有効成分の組み込みは、溶液に添加される順序にかかわらず、リン脂質成分および油と共にこの親油相へのその溶解によって実施される。

【 0 0 7 5 】

有機溶媒の選択は、組み込まれる有効成分に大幅に依存する。たとえばエタノールおよびイソプロパノールといった、医薬品として許容される有機溶媒の使用が好ましいが、シクロスポリンを封入したいような一部の場合には、下記の表から判る通り、シクロスポリンへの高い親和性を有するエタノールまたはイソプロパノールといった溶媒は、水相および親油相の以降の混合中に有効成分の水相への拡散を引き起こすため、アセトンを使用する。

【表 3】

表III. ナノカプセル形成に対するシクロスポリンの量および有機溶媒の種類の影響

シクロスポリン 負荷	有機溶媒	温度	キトサン	結果
1%	エタノール	50°C	100mg	凝集
	イソプロパノール			凝集
	アセトン			ナノカプセル
0.5%	アセトン			ナノカプセル
2%	アセトン			凝集

【 0 0 7 6 】

有機溶媒は残りの工程中に完全にまたは一部がさらに除去されなければならないため、有機溶媒の最小量を使用することが好ましい。

【 0 0 7 7 】

特定の一実施形態では、有機溶媒は重量で 0 . 0 0 5 % ないし 0 . 0 1 5 % の量のリン脂質成分、重量で約 0 . 0 2 5 % の量の油、および重量で 0 . 0 0 2 5 % ないし 0 . 0 0 5 % の量の有効成分へ添加され、すべての割合は有機溶媒の総重量について測定される。

【 0 0 7 8 】

一方、親水相は、キトサンおよびポリオキシアルキレン化合物を見ずに溶解することによって調製される。好ましい一実施形態では、重量で 0 . 0 0 0 5 % ないし 0 . 0 0 2 % のキトサンおよび 0 . 0 0 1 % ないし 0 . 0 0 5 % のポリオキシアルキレン化合物が水に溶解され、すべての割合は水の総重量について測定される。

【 0 0 7 9 】

次に、両方の相を温度 4 0 ないし 6 0 、好ましくは 5 0 へ加熱し、およびついでそれらを混合する。ナノカプセル、および安定な系が、その範囲の温度で形成されるとは予想されないため、これは驚くべきことである。その最大値を超えて加熱される場合、結果として得られる調製物は、懸濁物中の遊離油の存在のため不適當であることが観察されている。対照的に、4 0 未満で加熱される場合、親油性成分の固化の開始が観察される

。添加順序は系の特性に影響しないため、この混合段階は、水相を有機相へ、および有機相を水相へ、加えることの両方によって実施されうる。両方の相を混合する際に、ナノカプセルが溶媒置換過程によって自発的に形成され、ここで一方の相が他方の相に組み込まれる際、有機溶媒が水相へ拡散し、リン脂質成分、油および任意に有効成分から成る脂質小滴を形成する。後者は高度に負である点によって特徴づけられ、キトサンポリマーの正電荷のためのイオン性相互作用によってその周囲へのキトサンの直接配置を生じ、それはまたさらに、系の表面電荷もまた正にする。

【 0 0 8 0 】

ナノカプセルが一旦形成されると、使用した有機溶媒は当業者に公知である任意の方法によって除去される。有機溶媒の除去は、医薬組成物中にその存在が認められないという事実のためである。

10

【 0 0 8 1 】

次に、ナノカプセル系の調製において典型的な工程の一つは、成分濃度を高めるためのその濃縮である。本発明では、初期体積が予想外に、ナノカプセル処方の体積より最大で 17 倍小さく濃縮されうることが観察されており、それを下回ると系が安定性を失いはじめる。

【 0 0 8 2 】

有機溶媒の除去後または濃縮段階後、上記の追加の物質が添加されうる（増粘剤、ヒアルロン酸またはその塩、保存料など）。

【 0 0 8 3 】

20

系が、非親油性の生物学的に活性な分子の投与のために使用される場合、それらはナノカプセルの形成後に、または有機溶媒の除去後に添加されうる。

【 0 0 8 4 】

さらに、驚くべきことに、本発明の水相に分散されたナノカプセル系は、安定性に影響することなく高温滅菌工程に供することができるのが観察されている。前記工程は、たとえば、オートクレーブ処理、チンダリゼーション、H T S T（高温短時間）およびU H T（超高温）を含む。これらの工程は当業者に公知であり、および、眼経路による投与でそうであるように、本発明の系を滅菌が必要な用途に使用できる目的で実施される。同様に、この特徴に由来する別の長所は、別の経路を目的とする市販処方の製造において保存料の使用を顕著に低減することを可能にする点である。

30

【 0 0 8 5 】

高温滅菌に一般的に使用される条件は、ナノカプセルの融解、および、したがって、有効成分の放出を引き起こしうる。にもかかわらず、本発明のナノカプセルが滅菌工程後にサイズおよび表面電荷を維持することが観察できており、および、さらに、系において有効成分の結晶の出現は観察されない。これは、ナノカプセルから水相への前記有効成分の放出がないことを明らかにする。

【 0 0 8 6 】

別の特徴として、滅菌工程に供されている系はまた長期にわたって安定であることも極めて重要であり、その安定性は少なくとも4ヶ月37℃にての加速試験で証明されており、それは本発明に付属の実施例で示される通り通常条件で1年より長期に相当し、したがってこれらの系の工業的および商業的実行可能性が確認される。

40

【 0 0 8 7 】

下記で、本発明の特徴および長所を明らかにするいくつかの例示的な実施例が記載されるが、しかし、それらは請求項で定義される本発明の目的を限定すると解釈されない。

【 実施例 】

【 0 0 8 8 】

下記に詳細に示す実施例に共通する工程として、ナノカプセルは、サイズ、ゼータ電位（または表面電荷）、封入効力およびシクロスポリンA結晶の存在の観点から特徴づけられている。ナノカプセル安定性試験はハイドルフ（H e i d o l p h）ストープ（タイトラマックス（T i t r a m a x）1000）で、およびオートクレーブ処理はプレソクレ

50

ープ (Presoclave) 75 (セレクト社 (Selecta)) で実施された。

【0089】

サイズ分布は光子相関スペクトル法 (PCS; ゼータサイザー (Zeta Sizer)、ナノシリーズ、ナノ-ZS、マルバーン・インスツルメンツ社 (Malvern Instruments)、英国) を用いて実施し、ナノ粒子集団の平均サイズ値を得ている。

【0090】

ゼータ電位はレーザードップラー流速法 (LDA; ゼータサイザー (Zeta Sizer)、ナノシリーズ、ナノ-ZS、マルバーン・インスツルメンツ社 (Malvern Instruments)、英国) を用いて測定されている。電子移動度を測定するために、試料をミリQ (Milli-Q) 水に希釈した。

10

【0091】

キトサンナノカプセルからのシクロスポリンAおよび吉草酸ベタメタゾンの放出は、目視で評価されており、水相に結晶の形成があるかを観察し、およびシクロスポリン濃度をHPLCによって(外相中の最大溶解度16(g/ml)または吉草酸ベタメタゾン(外相中の最大溶解度5(g/ml))を、封入された有効成分に応じて定量している。この方法で、外相中に定量された量が有効成分の最大溶解度に等しい場合、目に見えなくても結晶形成が存在すると推論される。

【0092】

実施例に使用したキトサン(プロタサン(Protasan)UP Cl 113)はノバマトリクスFMCバイオポリマー(NovaMatrix-FMC Biopolymer)、シクロスポリンAはLCラボラトリーズ(LC Laboratories)、吉草酸ベタメタゾンはギナマ(Guinama)、ヒマシ油はガリンド社(Galindo)、ホスファチジルコリンはデグッサ(Degussa)(エピクロン(Epikuron)135F)、ポロキサマー188はBASF(BASF Corporation)、アセトンはボルキミカ(Vorquimica)(アナレマ(Analema))および使用したそれ以外の製品はシグマアルドリッチ(Sigma Aldrich)(スクロース、グルコースおよびマンニトール)から入手する。

20

【0093】

実施例 1

30

37 でのシクロスポリンAを含むキトサンナノカプセルの懸濁液中の安定性試験
シクロスポリンAを含むキトサンナノカプセルは下記の通り調製する:

a) レシチン250mg、ヒマシ油0.5ml、シクロスポリンAを50または100mgおよびアセトン25mlを用いて油相の調製。

b) キトサン50mg、ポロキサマー188を125mg、および蒸留水100mlを用いて水相の調製。

【0094】

両方の相を50 ℃へ加熱し、および次いで有機相を水相へ加え、ナノカプセルが自発的に形成される。

【0095】

40

次いで、アセトンを減圧下で加熱(37 ℃)することによって除去し、および残量を次いで水10mLが残るまで濃縮する。

【0096】

その調製の結果として生じたナノカプセルは、一ミクロン未満のナノサイズ、およびより具体的には200~700nm、正ゼータ電位(+10mV~+70mV)、事実上100%のシクロスポリンA封入効力(これは有効成分の分解および抽出後に直接的に、および外水相の定量後に間接的に定量された)。

【0097】

それらのナノカプセルを安定性試験に供し、その間ナノカプセルは37 ℃にて6ヶ月保存され、粒子サイズ、ゼータ電位およびシクロスポリンの水相中の存在を1ヶ月間隔で測

50

定した。シクロスポリンは水に不溶である事実のため、不安定性の場合には、沈澱しおよび可視的結晶の出現を生じる傾向がある。

【表 4】

表IV:

37℃にて保存されたシクロスポリンA (1%) 含有キトサンナノカプセルの特徴(平均値±SD)。

37℃での 時間(月)	サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)	シクロスポリンA 結晶の存在
0	474±42	+42±3	無し
2	541±26	+37±2	無し

10

【 0 0 9 8 】

表 I V に示す通り、1 % シクロスポリンを含むナノカプセルは、1 ミクロン以下の直径、正のゼータ電位を維持し、およびそれらは少なくとも2 ヶ月間37℃にて安定である。

【表 5】

表V:

37℃にて保存されたシクロスポリンA (0.5%) 含有キトサンナノカプセルの特徴(平均値±ST)。

20

37℃での 時間(月)	サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)	シクロスポリンA 結晶の存在	外水相中の濃度
0	452±11	+36±4	無し	< 16 μg/ml
2	601±28	+21±5	無し	< 16 μg/ml
3	585±13	+30±1	無し	< 16 μg/ml
4	490±4	+28±2	無し	< 16 μg/ml
5	396±4	+29±5	無し	< 16 μg/ml

30

【 0 0 9 9 】

表 V で見られる通り、シクロスポリン A (0.5%) を組み込んだキトサンナノカプセルは、少なくとも5 ヶ月間37℃にて安定であり、1 μm未満の直径、正のゼータ電位およびシクロスポリン A 結晶形成の不在を維持し、分子がナノカプセルの油核内に留まることを示す。系はサイズおよび電位について最低6 ヶ月間(試験の最長時間)安定である。

【 0 1 0 0 】

実施例 2

シクロスポリン A を含むキトサンナノカプセルのオートクレーブ処理に対する安定性試験

40

シクロスポリン A を含むキトサンナノカプセルを実施例 1 に記載の製法に従って調製し、および、次いで、一部をオートクレーブ処理(120℃、20 分間)に供した。この試験の主な目的は、ナノカプセルのサイズおよび電位がオートクレーブ処理中に変化しているかを評価することであった。

【表 6】

表VI:

オートクレーブ処理後のシクロスポリンA含有キトサンナノカプセルの特徴(平均値±SD)

	サイズ (nm)	ゼータ電位Z (mV)	シクロスポリンA 結晶の存在	外水相中の濃度
オートクレーブ 処理前	575±5	+42.1±0.7	無し	<16 μg/ml
オートクレーブ 処理後	591±11	+46.2±0.8	無し	<16 μg/ml

10

【0101】

表VIで見られる通り、オートクレーブ処理後、ナノカプセルはサイズおよび表面電荷を維持する。さらに、オートクレーブ処理後、シクロスポリンA結晶は出現せず、それはナノカプセルから水相への活性分子の有意な放出が無いことを明らかにする。

【0102】

実施例 3

37℃での懸濁液中のオートクレーブされたシクロスポリンA含有キトサンナノカプセルの安定性試験

シクロスポリンAを含むキトサンナノカプセルを実施例1に記載の製法に従って調製し、次いでそれを実施例2に記載の処理後にオートクレーブし、および37℃にて5ヶ月間保存した。この系の安定性を評価する目的で、粒子サイズ、ゼータ電位およびシクロスポリン結晶の水相中の存在を、1ヶ月間隔で測定した。

20

【表 7】

表VII:

オートクレーブ処理および37℃にて保存したシクロスポリンA含有キトサンナノカプセルの特徴(平均値±SD)。

37℃での 時間(月)	サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)	シクロスポリンA 結晶の存在	外水相中の濃度
0	591±11	+46±1	無し	<16 μg/ml
2	635±15	+41±1	無し	<16 μg/ml
3	506±17	+51±1	無し	<16 μg/ml
4	485±9	+47±1	無し	<16 μg/ml

30

【0103】

キトサンでコーティングされた、およびオートクレーブされた、シクロスポリンA含有ナノカプセルは、37℃にて少なくとも4ヶ月間安定である(表VII)。

40

【0104】

実施例 4

吉草酸ベタメタゾンを含むキトサンナノカプセルの調製

キトサンナノカプセルを、吉草酸ベタメタゾンを用いて下記の通り調製した:

a) レシチン250mg、ヒマシ油0.5ml、吉草酸ベタメタゾン10mgおよびアセトン25mlを用いて油相の調製。

b) キトサン50mg、ポロキサマー188を125mg、および蒸留水100mlを用いて水相の調製。

c) 両方の相を50℃へ加熱し、および次いで有機相を水相へ加え、ナノカプセルが自発的に形成される。

50

【 0 1 0 5 】

得られたエマルションを、熱（ 3 7 ）および真空を加えて終容量 1 0 m l へ濃縮する（有機溶媒を除去）。

【 0 1 0 6 】

その調製の結果として生じたナノカプセルは、一ミクロン未満のナノサイズ、およびより具体的には 2 0 0 ~ 6 0 0 n m)、正ゼータ電位（ + 2 5 m V ~ + 6 0 m V ）、吉草酸ベタメタゾン封入効力 9 9 . 9 %（これは外水相の定量後に間接的に定量された）を有する。より具体的には、ナノカプセルの物理化学的特徴および封入効力を表 V I I I に記載する。

【表 8】

10

表VIII:

吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルの物理化学的特徴および封入効力（平均値±SD）。

サイズ(nm)	ゼータ電位(mV)	封入効力(%)
348±71	+46. 9±1. 3	99. 94±0. 01

【 0 1 0 7 】

実施例 5

20

室温にて懸濁液中の吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルの安定性試験

実施例 4 に示す通り調製されたナノカプセルを、安定性試験に供し、室温にて 6 ヶ月間保存し、粒子サイズ、ゼータ電位および吉草酸ベタメタゾンの水相中の存在を測定した。表 I X に示す通り、ナノカプセルはナノサイズ、正ゼータ電位を維持し、および吉草酸ベタメタゾンはナノカプセルの脂質核内に留まる。

【表 9】

表IX:

室温にて保存された吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルの特徴（平均値±SD）。

室温での時間 (月)	サイズ (nm)	ゼータ電位(mV)	外水相中の濃度
0	383±41	+46. 9±1. 3	< 5 μ g / ml (0. 6 μ g / ml)
6	413±10	+48. 2±2. 6	< 5 μ g / ml (0. 9 μ g / ml)

30

【 0 1 0 8 】

実施例 6

40

3 7 にて懸濁液中の吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルの安定性試験

実施例 4 に示す通り調製されたナノカプセルを、安定性試験に供し、3 7 にて 6 ヶ月間保存し、粒子サイズ、ゼータ電位および吉草酸ベタメタゾンの水相中の存在を測定した。吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルは表 X に示す通り安定である。

【表 10】

表X:

37℃にて保存された吉草酸ベタメタゾン含有キトサンナノカプセルの特徴
(平均値±SD)。

37℃での 時間(月)	サイズ (nm)	ゼータ電位(mV)	外水相中の濃度
0	383±41	+46. 9±1. 3	< 5 μ g/ml (0. 6 μ g/ml)
6	465±14	+58. 4±1. 8	< 5 μ g/ml (1. 5 μ g/ml)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/573
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/14	(2006.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	9/107	(2006.01)	A 6 1 K	9/107
A 6 1 K	8/11	(2006.01)	A 6 1 K	8/11

(72)発明者 スアレス ルーケ シルヴィア

スペイン エ - 1 5 7 8 2 サンティアゴ デ コンポステーラ キャンパス スル パベリオン
デ セルヴィシオス ラボラトリオ フェデール

(72)発明者 アロンソ フェルナンデス マリア ホセ

スペイン エ - 1 5 7 8 2 サンティアゴ デ コンポステーラ キャンパス スル パベリオン
デ セルヴィシオス ラボラトリオ フェデール

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特表平07 - 504848 (JP, A)

特表2005 - 513097 (JP, A)

米国特許第05843509 (US, A)

欧州特許出願公開第01243323 (EP, A1)

欧州特許出願公開第00771566 (EP, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	9 / 5 1
A 6 1 K	8 / 1 1
A 6 1 K	9 / 1 0 7
A 6 1 K	3 1 / 5 7 3
A 6 1 K	3 8 / 0 0
A 6 1 K	4 7 / 1 2
A 6 1 K	4 7 / 1 4
A 6 1 K	4 7 / 2 4
A 6 1 K	4 7 / 3 2
A 6 1 K	4 7 / 3 4
A 6 1 K	4 7 / 3 6
A 6 1 K	4 7 / 4 4