

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-95697  
(P2010-95697A)

(43) 公開日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 8 B 37/08</b> (2006.01)	C 0 8 B 37/08	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 47/36</b> (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 0 9 0

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2009-55846 (P2009-55846)  
 (22) 出願日 平成21年3月10日 (2009.3.10)  
 (31) 優先権主張番号 097139732  
 (32) 優先日 平成20年10月16日 (2008.10.16)  
 (33) 優先権主張国 台湾 (TW)

(71) 出願人 598139748  
 国立交通大学  
 台湾新竹市大學路1001號  
 (74) 代理人 100082304  
 弁理士 竹本 松司  
 (74) 代理人 100088351  
 弁理士 杉山 秀雄  
 (74) 代理人 100093425  
 弁理士 湯田 浩一  
 (74) 代理人 100102495  
 弁理士 魚住 高博  
 (74) 代理人 100112302  
 弁理士 手島 直彦  
 (74) 代理人 100152124  
 弁理士 白石 光男

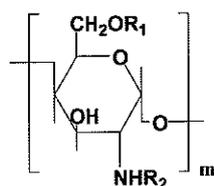
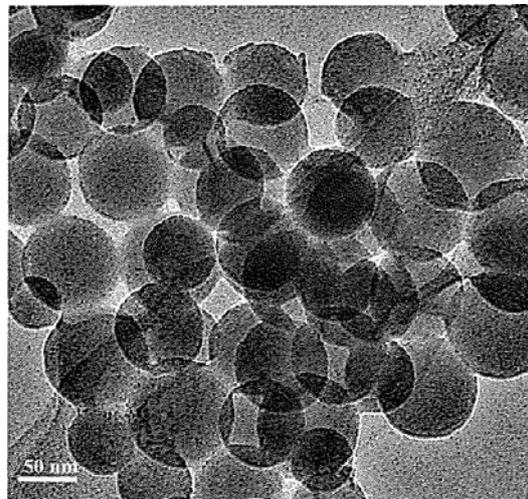
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬品用両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び両親媒性キトサン誘導体複合体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗癌剤伝達に使用する両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法の提供。

【解決手段】 以下の化学構造式に示すキトサン誘導体を含み、溶剤中において自己組織化によって中空円球を生成する両親媒性キトサン誘導体の中空円球。そのR<sub>1</sub>は各自独立した水素、炭素数1から4のアルキル基、炭素数1から6のカルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩の何れかであり、R<sub>2</sub>は、各自独立した水素、炭素数1から12のアルキル基、炭素数1から6のカルボキシ基、炭素数2から12のアシル基であり、mは100から2000間の整数である。

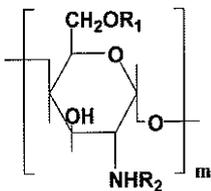


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球は、以下の化学構造式 1 に示すキトサン誘導体を含み、それは、溶剤中において自己組織化によって中空円球を生成するものであり、その $R_1$ は各自独立した水素、炭素数 1 から 4 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩の何れかであり、 $R_2$ は、各自独立した水素、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、炭素数 2 から 12 のアシル基の何れかであり、 $m$ は 100 ~ 2000 間の整数であることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

## 【化 1】



10

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記 $R_1$ は、各自独立した水素、カルボキシメチル基、カルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩、トリメチル基、スクシニルの何れかであることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記 $R_1$ は、各自独立した水素、或いはカルボキシメチル基であることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

20

## 【請求項 4】

請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記 $R_2$ は、各自独立した水素、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、炭素数 2 から 12 のアシル基、トシル基、フタロイル基、シリル基の何れかであることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

## 【請求項 5】

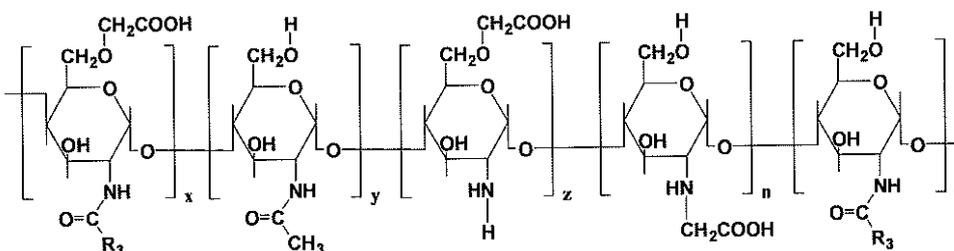
請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記 $R_2$ は、各自独立した水素、カルボキシメチル基、炭素数 2 から 12 のアシル基であることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

30

## 【請求項 6】

請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記キトサン誘導体は、以下の化学構造式 2 に示す化合物を含み、その $R_3$ は、各自独立した炭素数 5 から 11 のアルキル基で、 $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $n$ 、 $p$ は、各自独立した 20 から 2000 間の整数であることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

## 【化 2】



40

## 【請求項 7】

請求項 1 記載の両親媒性キトサン誘導体の中空円球において、前記中空円球の平均粒径は、10nm から 500nm の範囲内であることを特徴とする両親媒性キトサン誘導体の中空円球。

## 【請求項 8】

50

医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、  
 (A) キトサンを用意し、前記キトサン上に最低一つの親水性官能基及び最低一つの疎水性官能基をグラフトしてキトサン誘導体を作り、  
 (B) キトサン誘導体を溶剤中で溶解し、キトサン誘導体溶液を作り、  
 (C) キトサン誘導体溶液と活性成分を混合すると、キトサン誘導体は自己組織化によって活性成分の内含された中空円球を生成するステップを含むことを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 9】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記キトサンの分子量は1000から400,000 g/mol間であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

10

【請求項 10】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記キトサンの脱アシル度は65%から100%間であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 11】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記親水性官能基は、カルボキシメチル基、カルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩、トリメチル基、及びスクシニルによって組成されたグループであることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

20

【請求項 12】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記疎水性官能基は、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 2 から 12 のアシル基、トシル基、フタロイル基、及びシリル基によって組成されたグループであることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 13】

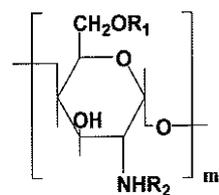
請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記疎水性官能基の疎水基グラフト量は、5%から100%間であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 14】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記キトサン誘導体は、以下の化学構造式 3 に示す化合物であり、その $R_1$ は、各自独立した水素、炭素数 1 から 4 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩の何れかであり、 $R_2$ は、各自独立した水素、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、炭素数 2 から 12 のアシル基の何れかであり、 $m$ は100~2000間の整数であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

30

【化 3】



40

【請求項 15】

請求項 14 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記 $R_1$ は、各自独立した水素、カルボキシメチル基、カルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩、トリメチル基、スクシニルであることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 16】

請求項 14 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記 $R_1$

50

は、各自独立した水素、或いはカルボキシメチル基であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 17】

請求項 14 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記  $R_2$  は、各自独立した水素、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、炭素数 2 から 12 のアシル基、トシル基、フタロイル基、シリル基の何れかであることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【請求項 18】

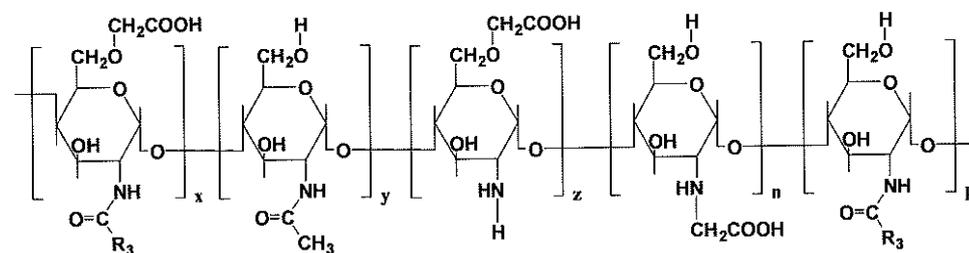
請求項 14 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記  $R_2$  は、各自独立した水素、カルボキシメチル基、炭素数 2 から 12 のアシル基の何れかであることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

10

【請求項 19】

請求項 14 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記キトサン誘導体は、以下の化学構造式 4 に示す化合物であり、その  $R_3$  は、各自独立した炭素数 5 から 11 のアルキル基で、 $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $n$ 、 $p$  は、各自独立した 20 から 2000 間の整数であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【化 4】



20

【請求項 20】

請求項 8 記載の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、前記中空円球の平均粒径は、10nm から 500nm の範囲内であることを特徴とする医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、両親媒性キトサン誘導体(amphiphilic chitosan derivatives)の中空円球(hollow sphere)及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法に関するもので、特に、抗癌剤伝達(delivery)に使用する両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法に係る。

【背景技術】

【0002】

ここ数年来、癌治療に用いる抗癌剤の担体は非常に重要な位置を占めるようになった。中でもリポソーム(liposome)は、抗癌剤を輸送並びに腫瘍エリア(tumor area)で放出するものであるが、正常組織(normal tissue)に進入し難い為、正常細胞を傷付ける可能性が低く、理想的な薬物運搬体であるとされている。しかし、リポソームは、薬物内含化率(encapsulation efficiency)が比較的 low、製造コストが高く、安定性に欠け、生体適合性(biocompatibility)が良好でない等の欠点があり、臨床(clinical)上において応用するにはやはり問題が残されている。よって、生体適合性の高い天然高分子重合体(polymer)もまた広く研究され始めており、効果的な薬物担体システムの発見が期待されている。

40

【0003】

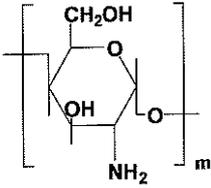
天然高分子重合体におけるキトサン(chitosan)は、低価格で、生体適合性も高く、分解性(degradability)を低下させる等の長所を有する故、薬物担体上に応用することが可能である。一般的には、現在のキトサンの多くは、キチン(chitin)を脱アシル化反応(deacetylation)させて、キチンのアセチル基(acetyl group)をアミノ基(amino group)に置換し

50

キトサンを作製することを起源とする。前記キトサンの化学構造式 1 を以下に示す。

【 0 0 0 4 】

【 化 1 】



【 0 0 0 5 】

10

キトサンは低価格で良好な生体適合性を有し、キトサンをリポソームに類似する二層構造(double layer)にするなら、同時にキトサンとリポソームの長所を結合でき、薬物を輸送する担体(carrier)を効果的に形成することも可能となる。現在、キトサンをリポソームに類似する二層構造にするには、テンプレートコーティング法(template-coating)或いはレイヤーバイレイヤー構築法(layer-by-layer building)等による合成がある。しかし、前記方法の欠点は、製造工程が比較的複雑でコスト高となり商業化が難しい点にある。

【 0 0 0 6 】

よって、現在、キトサンの特性を用い、低価格で生体適合性が高く分解性を降下させ、しかもリポソームに類似する二層構造を備えた抗癌剤の薬物担体となるような新しい薬物担体の開発が急を要されている。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明の主な目的は、両親媒性キトサン誘導体の中空円球を提供することにある。それは、両親媒性キトサン誘導体の自己組織化特性を利用して、薬物担体に応用する中空円球を形成するものである。

【 0 0 0 8 】

本発明の次の目的は、医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法を提供することにある。それは、簡単な作製方法によって、効果的に活性成分を両親媒性キトサン自己組織化の中空円球中に包み込み、且つ同時に活性成分(active component)の内含化率を向上させるものである。

30

【 課題を解決するための手段 】

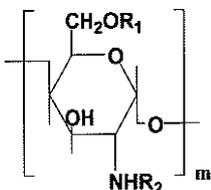
【 0 0 0 9 】

前記目的を達成する為、本発明の提供する両親媒性キトサン誘導体の中空円球は、以下の化学構造式 2 に示すキトサン誘導体を含み、それは、溶剤中において自己組織化(self-assemble)して中空円球を形成するものである。前記R<sub>1</sub>は、各自独立した水素(hydrogen)、炭素数 1 から 4 のアルキル基(alkyl)、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基(carboxyl)、硫酸塩(sulfate, -SO<sub>3</sub>)、リン酸塩(phosphate, -H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)の何れかであり、R<sub>2</sub>は、各自独立した水素、炭素数 1 から 12 のアルキル基、炭素数 1 から 6 のカルボキシ基、炭素数 2 から 12 のアシル基(acyl)であり、mは、100 ~ 2000間の整数である。

40

【 0 0 1 0 】

【 化 2 】



【 0 0 1 1 】

また、本発明において提供する医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法には

50

、次のステップを含む。

(A) キトサンを用意し、前記キトサン上に最低一つの親水性官能基(hydrophilic group)及び最低一つの疎水性官能基(hydrophobic group)をグラフトしキトサン誘導体を生成する。

(B) キトサン誘導体を溶剤中で溶解し、キトサン誘導体溶液を生成する。

(C) キトサン誘導体溶液と活性成分(active component)を混合すると、キトサン誘導体は自己組織化(self-assemble)して中空円球(hollow sphere)を生成、活性成分は前記中空円球中に含まれる。

【0012】

本発明の両親媒性キトサン誘導体は、キトサンの化学修飾(chemical modification)が容易である特性により、キトサン上に同時に親水基(hydrophilic group)及び疎水基(hydrophobic group)をグラフトする。また、両親媒性キトサン誘導体の疎水性(hydrophobicity)により、両親媒性キトサン誘導体は自己組織化してリポソーム二層構造(親水-疎水-親水)を備える中空円球を生成し、且つ、中空構造は、薬物分子の薬物積載量(drug loading)を効果的に向上させることが可能である。それと同時に、本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球の外殻(outer layer)には親水性(hydrophilicity)があり、よって、比較的高い生体適合性及び水に対する親和力(affinity)を提供し、更に、薬物によって身体が傷付けられるのを減少させる。この他、本発明の両親媒性キトサン誘導体及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体は、その製造工程が簡便であり、低コスト、生体適合性が比較的高く、リポソームに取って代わる薬物の担体となる。

10

20

【0013】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、化学構造式2キトサン誘導体の $R_1$ は、各自独立した水素(hydrogen)、カルボキシメチル基(carboxymethyl)、カルボキシ基(carboxyl)、硫酸塩、リン酸塩、トリメチル基(trimethyl)、スクシニル(succinyl)の何れかであり、 $R_1$ は好ましくは、各自独立した水素、或いはカルボキシメチル基である。

【0014】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、化学構造式2キトサン誘導体の $R_2$ は、各自独立した水素(hydrogen)、炭素数1から12のアルキル基(alkyl)、炭素数1から6のカルボキシ基(carboxyl)、炭素数2から12のアシル基(acyl)、トシル基(tosyl)、フタロイル基(phthaloyl)、シリル基(silyl)の何れかとする。 $R_2$ は好ましくは、各自独立した水素、カルボキシメチル基、或いは炭素数2から12のアシル基の何れかであり、 $R_2$ は最も好ましくは、各自独立した水素、或いは炭素数2から12のアシル基である。

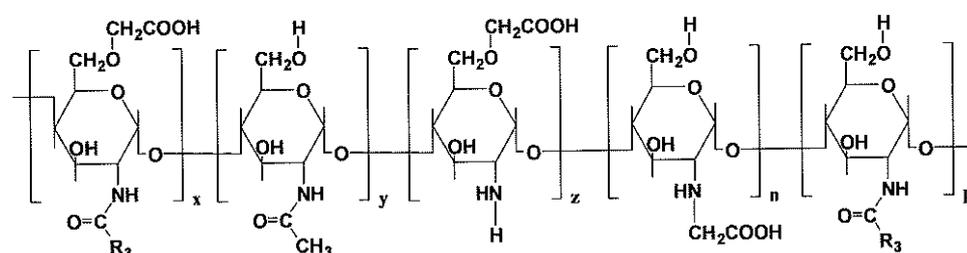
30

【0015】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、キトサン誘導体は以下の化学構造式3に示す化合物である。その $R_3$ は、各自独立した炭素数5から11のアルキル基で、 $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $n$ 、 $p$ は、各自独立した20から2000間の整数である。

【0016】

【化3】



40

【0017】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合

50

体の作製方法において、両親媒性キトサン誘導体が形成する中空円球の平均粒径(mean size)は、10nmから500nmの範囲内である。

【0018】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、溶剤は水溶液、有機溶剤、或いは何れかの混合溶液である。

【0019】

本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球及び医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、キトサン誘導体の自己組織化によって中空円球を生成する温度は、0 から80 間である。

【0020】

本発明の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、キトサンの分子量(molecular weight)は、1000から400,000 g/mol間である。また、キトサンの脱アシル度(deacetylation degree)は、65%から100%間であり、前記脱アシル度は、キチンのアセチル基(acetyl group)のアミノ基(amino group)への置換率である。

【0021】

本発明の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、親水性官能基は、カルボキシメチル基、カルボキシ基、硫酸塩、リン酸塩、トリメチル基、及びスクシニルにより組成されるグループから選択することが可能である。また、疎水性官能基は、炭素数1から12のアルキル基、炭素数2から12のアシル基、トシル基、フタロイル基、及びシリル基により組成されるグループである。

【0022】

本発明の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、疎水性官能基の疎水基グラフト量は、5%から100%間であり、前記疎水基グラフト量とは、キトサンのアミノ基に疎水性官能基をグラフトした百分率である。

【0023】

また、本発明の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、ステップ(C)には更に、キトサン誘導体溶液と活性成分を混合し、超音波振動(sonication)によってキトサン誘導体が自己組織化して活性成分を内含する中空円球を生成するステップを含む。

【0024】

更に、本発明の医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体の作製方法において、活性成分は薬物である。

【発明の効果】

【0025】

本発明の親水性と疎水性修飾の両親媒性キトサン誘導体は、自身の自己組織化方法によって約20-200nmサイズの中空円球構造を形成し、それは親水-疎水-親水性の二層構造を備えるものである。よって、公知のテンプレートコーティング法或いはレイヤーバイレイヤー構築法で合成した二層構造のキトサン中空円球と比較すると、本発明のキトサン中空円球の製造工程は簡便で低コストである。また、本発明のキトサン中空円球は自己組織化の方法で形成される故、薬物自身の活性を破壊せずに薬物包含作業を完成させる。この他、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空構造は、薬物分子の安定性を維持し、しかもその内含化率を大幅に向上させることが可能である。更に、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球は、親水性及び疎水性官能基の種類、グラフト量、疎水性官能基の側鎖長さ等を変化させて、中空円球の臨界凝集濃度及び表面特性(surface character)を調節することにより、異なる性質を有する薬物の内含化率及び薬物放出行為を制御することが可能である。よって、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球はリポソームに取って代わる癌治療や薬物担体となるものである。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球に関する透過型電子顕微鏡写真である

10

20

30

40

50

。

【図2】本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球に関する疎水基グラフト量と粒径分布の関係グラフである。

【図3】本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球脱水後状態に関する走査型電子顕微鏡写真である。

【図4】本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球に関する疎水基グラフト量と薬物内含化率の関係グラフである。

【図5】本発明の両親媒性キトサン誘導体中空円球に関する疎水基グラフト量と薬物放出比率の関係グラフである。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

[比較例1]

親水性カルボキシメチル基(carboxymethyl)修飾(modified)のキトサン誘導体を作製する。

初めに、室温下において、5gのキトサン(Mw=215,000 g/mol、脱アシル度=80-90%、Adrich-Sigma社製)を2-プロパノール(2-propanol)(50 mL)中で懸濁(suspend)し、並びに、30分間攪拌する。得られた懸濁液(suspension)をゆっくりと水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液(12.5 mL)と混合すると混合溶液となる。前記混合溶液中の水酸化ナトリウム濃度を調節することで親水性官能基のグラフト量をコントロール可能である。ここでは、混合溶液中には13.3Mの水酸化ナトリウムが含まれる。続いて、前記混合溶液とクロロ酢酸(chloroacetic acid)を反応させると、水溶性の親水性カルボキシメチル修飾キトサン(carboxymethyl-modified chitosan)が生成され、並びにこれを乾燥する。

20

【0028】

[実施例1]

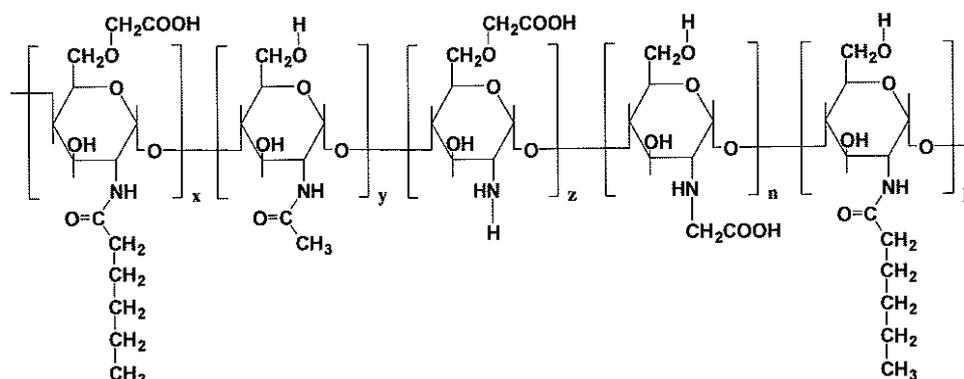
疎水性ヘキサノイル基(hexanoyl)修飾及び親水性カルボキシメチル修飾の両親媒性キトサン誘導体は次の通りである。

2gの乾燥した比較例1の親水性カルボキシメチル酸修飾のキトサンを純水(50 mL)中で溶解し、並びに24時間攪拌する。続いて、得られた溶液とメタノール(methanol)(50 mL)を混合し、更に0.2 Mの無水ヘキサノイル酸(hexanoyl anhydride)を添加して反応溶液を得る。室温下において20時間反応させた後、反応溶液を収集してエタノール水溶液(ethanol solution)(25% v/v)で24時間透析(dialysis)し、乾燥後に生成物を収集すると、疎水性ヘキサノイル基修飾及び親水性カルボキシメチル酸修飾の両親媒性キトサン誘導体が得られる。この化学構造式4は下記に示す通りである。また同時に、<sup>1</sup>H NMR スペクトラム及びN含量の元素分析(elemental analysis)を用いて、キトサン誘導体中の置換基(substitution group)の位置(site)及びヘキサノイル基グラフト量を確認する。本実施例におけるヘキサノイル基グラフト量は13%である。

30

【0029】

【化4】



40

【0030】

50

## [実施例 2]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 1 と同様であるが、添加する無水ヘキサノイル酸濃度は0.4 Mで、ヘキサノイル基グラフト量26%のキトサン誘導体を生成する。

【0031】

## [実施例 3]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 1 と同様であるが、添加する無水ヘキサノイル酸濃度は0.5 Mで、ヘキサノイル基グラフト量33%のキトサン誘導体を生成する。

【0032】

## [実施例 4]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 1 と同様であるが、添加する無水ヘキサノイル酸濃度は1.0 Mで、ヘキサノイル基グラフト量48%のキトサン誘導体を生成する。

10

【0033】

## [実施例 5]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 1 と同様であるが、デカン酸無水物(decanoic anhydride)を用いて無水ヘキサノイル酸(hexanoic anhydride)を置換するとデカノイル基グラフト量12%のキトサン誘導体が生成される。

【0034】

## [実施例 6]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 2 と同様であるが、デカン酸無水物を用いて無水ヘキサノイル酸を置換するとデカノイル基グラフト量24%のキトサン誘導体が生成される。

20

【0035】

## [実施例 7]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 3 と同様であるが、デカン酸無水物を用いて無水ヘキサノイル酸を置換するとデカノイル基グラフト量34%のキトサン誘導体が生成される。

【0036】

## [実施例 8]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 4 と同様であるが、デカン酸無水物を用いて無水ヘキサノイル酸を置換するとデカノイル基グラフト量45%のキトサン誘導体が生成される。

30

【0037】

## [実施例 9]

2gの乾燥した比較例 1 の親水性カルボキシメチル酸修飾のキトサンを純水(50 mL)中で溶解し、並びに24時間攪拌する。続いて、得られた溶液とメタノール(50 mL)を混合し、更に0.2 Mの無水ドデカン酸(dodecanoic anhydride)を添加すると、反応溶液が得られる。50℃で2時間反応させ、続いて室温下において18時間反応させた後、反応溶液を収集してエタノール水溶液(25% v/v)で24時間透析し、乾燥後に生成物を収集すると疎水性ドデカノイル基(dodecanoyl)修飾及び親水性カルボキシメチル酸修飾の両親媒性キトサン誘導体が得られる。また同時に、<sup>1</sup>H NMR スペクトラム及びN含量の元素分析を用いて、キトサン誘導体中の置換基の位置及びドデカノイル基グラフト量を確認する。本実施例中のドデカノイル基グラフト量は10%である。

40

【0038】

## [実施例 10]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 9 と同様であるが、添加する無水ドデカン酸濃度は0.4 Mで、ドデカノイル基グラフト量22%のキトサン誘導体を生成する。

【0039】

## [実施例 11]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 9 と同様であるが、添加する無水ドデカン酸濃度は0.5 Mで、ドデカノイル基グラフト量30%のキトサン誘導体を生成する。

50

## 【 0 0 4 0 】

## [実施例 1 2]

本実施例の反応条件及びステップは実施例 9 と同様であるが、添加する無水ドデカン酸濃度は 1.0 M で、ドデカノイル基グラフト量 44% のキトサン誘導体を生成する。

## 【 0 0 4 1 】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球の作製は次の通りである。

室温下において、100 mg の比較例 1 及び実施例 1 から 12 のキトサン誘導体を純粋中で懸濁し 24 時間攪拌する。続いて、超音波プロセッサ (Automatic Ultrasonic Processor UH-500 A) を使い数分間振動させる (sonicate) と、疎水性官能基の相互作用 (interaction) により、自己組織化が生じ、ナノメートル級或いはマイクロ級サイズの中空球体で、しかも親水-疎水-親水性の二層 (double layer) 構造が形成される。

10

## 【 0 0 4 2 】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球における物理特性測定 (characterization) は次の通りである。

比較例 1 及び実施例 1 から 4 の両親媒性キトサン誘導体の中空円球の粒径 (mean size) 及び粒径分布は、動的光散乱 (dynamic light scattering, DLS)、ナノ粒子径分布測定器 (Nanoparticle Size Analyzer) (LB-550, HORIBA, Japan) によって測定する。また、ピレン (pyrene) は疎水基に対して比較的高い親和力 (affinity) を有する為、ピレンを蛍光プローブ (fluorescence probe) として、蛍光スペクトラム (fluorescent spectrum) 上から両親媒性キトサン誘導体の臨界凝集濃度 (critical aggregation concentration, CAC) を測定することが可能である。臨界凝集濃度が小さい程、中空円球が容易に生成されることを示す。両親媒性キトサン誘導体の中空円球粒径 (mean size) 及び臨界凝集濃度等の物理特性は表 1 に示す通りである。

20

## 【 0 0 4 3 】

## 【表 1】

	疎水基	疎水基 グラフト量	CAC x 10 <sup>-2</sup> (mg/mL)	平均粒径 1 (nm)	平均粒径 2 (nm)
比較例 1	—	0%	25.0	19.8±1.2	189.2±2.4
実施例 1	ヘキサノイル基	13%	9.21	21.5±1.6	210.5±1.9
実施例 2	ヘキサノイル基	26%	3.17	22.3±0.7	209.3±1.4
実施例 3	ヘキサノイル基	33%	0.91	22.9±1.1	210.9±0.7
実施例 4	ヘキサノイル基	48%	0.40	23.5±0.7	222.7±2.0
実施例 5	デカノイル基	12%	6.20	—	—
実施例 6	デカノイル基	24%	1.80	—	—
実施例 7	デカノイル基	34%	0.57	—	—
実施例 8	デカノイル基	45%	0.36	—	—
実施例 9	ドデカノイル基	10%	5.00	—	—
実施例 10	ドデカノイル基	22%	1.20	—	—
実施例 11	ドデカノイル基	30%	0.36	—	—
実施例 12	ドデカノイル基	44%	0.32	—	—

30

40

## 【 0 0 4 4 】

表 1 の結果に示す通り、両親媒性キトサン誘導体は、二種の異なる粒径の中空円球を形成することが可能である。また、図 1 は平均粒径 2 の両親媒性キトサン誘導体の中空円球に関する透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM) (JEOL2100, Japan) の写真である。疎水性グラフト量が大きい程、両親媒性キトサン誘導体は粒径 2 の中空円球を形成する傾向があり、疎水基グラフト量と粒径分布の関係は、図 2 に示す通りである

50

。図2からわかるように、実施例3及び実施例4における大部分の両親媒性キトサン誘導体が粒径約200nmの中空円球を形成している。

#### 【0045】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球の外殻(shell)に関する厚み(layer thickness)測定は次の通りである。

両親媒性キトサン誘導体が確実に中空円球を形成することを確認する為に、両親媒性キトサン誘導体の中空円球をエタノール脱水(dehydration)した後、同時に中空円球外部及び内部にある水分子を除去する。続いて、走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscopy, SEM) (S6500, JEOL, Japan)を用いて脱水した両親媒性キトサン誘導体の中空円球を観察する。その結果は図3に示す通りである。その内の粒径約200nmの中空円球は脱水後、その外観の完全性を再び保てず、凹み(collapse)が現れる。嵌入(insert)は図3の写真でわかる通り、二層外殻(double shell)を合算した総厚みは約9nmである故、中空円球の外殻(single shell)の厚みは約4.5nmである。

10

#### 【0046】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球に関する薬物内含化率(encapsulation efficiency)の測定は次の通りである。

まず、ドキソルビシン(Doxorubicin, DOX)を用意する。並びに、DOXと20 mLの比較例1及び実施例1から12のキトサン誘導体溶液を混合する。前記DOXの最終濃度は20 µg/mLである。24時間攪拌した後、超音波プロセッサ(Automatic Ultrasonic Processor UH-500 A)を使って数分間振動させると、キトサン誘導体の自己組織化により中空円球が生成される。DOXは中空円球中に内含され、医薬品用両親媒性キトサン誘導体の複合体を形成する。4 下において2000 rpmで5分間遠心した後、中空円球中に未内含(free)DOXを分離する。その後、4 下において15000 rpmで15分間遠心した後、医薬品用両親媒性キトサン誘導体複合体を溶液中から分離することができる。UV-VISスペクトラム(SP-8001, Metertech Inc.)を用いて、分離させた未内含(free)のDOXを測定することにより、両親媒性キトサン誘導体の中空円球に関する薬物内含化率(encapsulation efficiency, EE)を算出できる。前記薬物内含化率は $EE = (A-B)/A \times 100$ 計算で得られるものである。

20

そのAはDOX総量、Bは未内含のDOX量である。また、計算結果は図4に示す通りである。図中のX軸は疎水基グラフト量で、Y軸は内含化率である。図4からわかるように、内含化率は、疎水基グラフト量及び疎水基側鎖の長さの増加に従い増加する。その原因は、中空円球外殻内層の疎水性作用力を増加させることができ、DOXを中空円球内に制限することができることにある。よって、疎水性グラフト量及び側鎖(side chain)の長さを調節することにより薬物の放出行為(release behavior)を制御することが可能となる。

30

#### 【0047】

両親媒性キトサン誘導体の中空円球に関する薬物放出行為は次の通りである。

37 下においてDOX及びDOX-両親媒性キトサン誘導体複合体(実施例1から4の両親媒性キトサン誘導体を使用)の溶液を0.1Mのバッファー溶液(buffer)(100 mL)で透析(dialysis)する。一定時間毎にバッファー溶液中のDOX濃度を測定し、両親媒性キトサン誘導体の中空円球に関する薬物放出行為を観察する。図5に示す通り、図中のX軸は疎水基グラフト量で、Y軸はDOX放出比率(releasing percentage)である。図5の結果で明らかなように、疎水基グラフト量の増加に伴い、DOXは中空円球から放出され難くなり、よって薬物を長時間かけて放出できる故、両親媒性キトサン誘導体の疎水基グラフト量を調節すれば薬物放出行為の制御が可能となる。これにより、本発明の両親媒性キトサン誘導体は、抗癌剤用の伝達(delivery)に適合することがわかる。

40

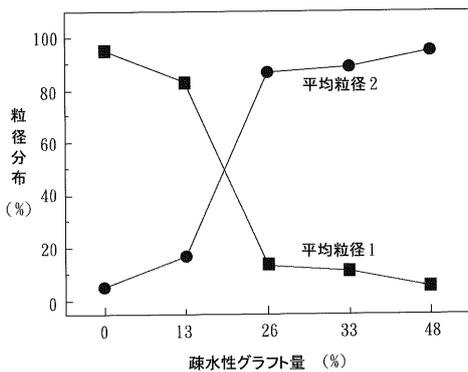
#### 【0048】

前述をまとめると、本発明の親水性と疎水性修飾の両親媒性キトサン誘導体は、自身の自己組織化方法によって約20-200nmサイズの中空円球構造を形成し、それは親水-疎水-親水性の二層構造を備えるものである。よって、公知のテンプレートコーティング法或いはレイヤーバイレイヤー構築法で合成した二層構造のキトサン中空円球と比較すると、本発明のキトサン中空円球の製造工程は簡便で低コストである。また、本発明のキトサン中空

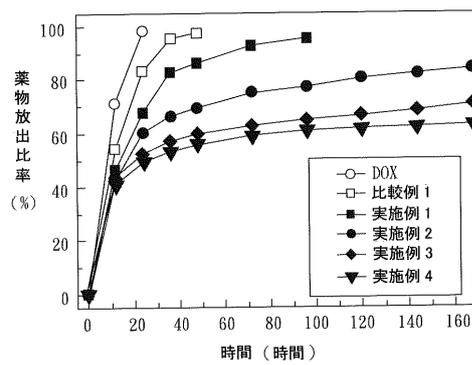
50

円球は自己組織化の方法で形成される故、薬物自身の活性を破壊せずに薬物包含作業を完成させる。この他、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空構造は、薬物分子の安定性を維持し、しかもその内含化率を大幅に向上させることが可能である。更に、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球は、親水性及び疎水性官能基の種類、グラフト量、疎水性官能基の側鎖長さ等を変化させて、中空円球の臨界凝集濃度及び表面特性(surface character)を調節することにより、異なる性質を有する薬物の内含化率及び薬物放出行為を制御することが可能である。よって、本発明の両親媒性キトサン誘導体の中空円球はリポソームに取って代わる癌治療や薬物担体となるものである。

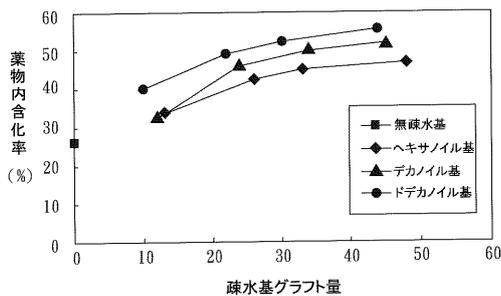
【 図 2 】



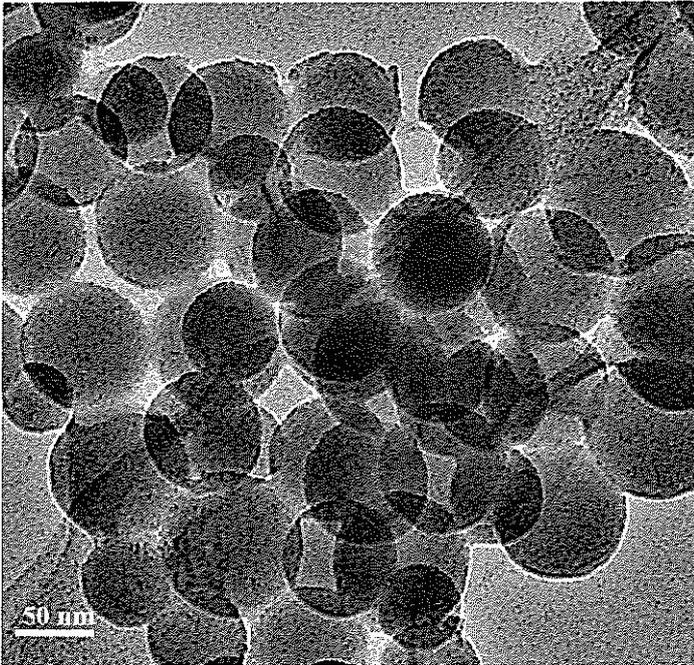
【 図 5 】



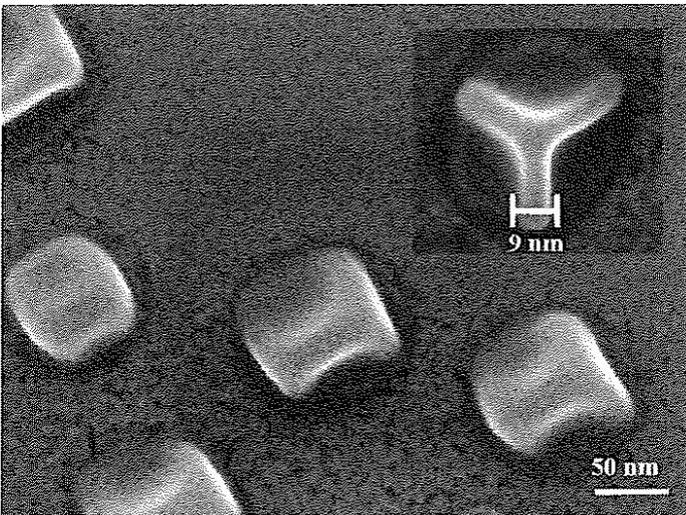
【 図 4 】



【 図 1 】



【 図 3 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 陳 三元

台湾新竹市南中街87巷14弄9號

(72)発明者 劉 昆和

台湾花蓮市東興一街133巷36號

(72)発明者 劉 典謨

台湾新竹縣新竹市文仁街90號8樓

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 EE37A FF31

4C090 AA05 BA47 BB65 BB97 BD25 BD36 BD37 CA38 DA22

【要約の続き】

【選択図】図1