

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6541643号
(P6541643)

(45) 発行日 令和1年7月10日(2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日(2019.6.21)

(51) Int.Cl.

F I

C O 8 L 3/00 (2006.01)

C O 8 L 3/00

C O 8 J 3/12 (2006.01)

C O 8 J 3/12

C E P A

A 6 1 K 8/73 (2006.01)

A 6 1 K 8/73

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)

A 6 1 Q 19/00

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

A 6 1 K 47/36

請求項の数 13 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-509241 (P2016-509241)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月25日 (2014.4.25)
 (65) 公表番号 特表2016-526053 (P2016-526053A)
 (43) 公表日 平成28年9月1日 (2016.9.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2014/000380
 (87) 国際公開番号 W02014/172786
 (87) 国際公開日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 審査請求日 平成29年4月24日 (2017.4.24)
 (31) 優先権主張番号 61/816,686
 (32) 優先日 平成25年4月26日 (2013.4.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 515297135
 ミレクス バイオテクノロジーズ イン
 コーポレイテッド
 カナダ オンタリオ エヌ1シー 〇エイ
 1 グェルフ ハンロン クリーク プー
 ルバード 574
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74) 代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィトグリコーゲンナノ粒子及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フィトグリコーゲン含有植物原料から得られるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む組成物であって、前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、標準タイプ (s u) 又はシュガリーエクステンダ (s e) タイプのスイートコーンから得られ、前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、63 nm ~ 150 nmの平均粒径を有し、かつ動的光散乱法 (D L S) による測定で0.3未満の多分散指数を有することを特徴とする、組成物。

【請求項 2】

前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、D L S による測定で0.1未満の多分散指数を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物が、乾燥質量に基づき、60 ~ 110 nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を80%より多く含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、ミルクステージ又はデントステージのトウモロコシ穀粒から得られる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、粉末、又は、前記フィトグリコーゲンナノ粒子の水性分散物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物の、皮膜形成剤としての使用。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物の、薬剤送達剤としての使用。

【請求項 8】

単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の製造方法であって、

(a) 破壊したフィトグリコーゲン含有植物原料を温度 0 ~ 50 の水に浸漬させる工程、

(b) 前記工程 (a) の産物を固液分離に供して、水性抽出物を得る工程、

(b1) 任意で、前記工程 (b) の生成物を遠心分離する工程、

(c) 前記工程 (b) の水性抽出物を 0.05 ~ 0.15 μm の最大平均孔径を有する精密濾過材料に通す工程、及び、

(d) 前記工程 (c) の濾液を限外濾過に供して、500 kDa 未満の分子量を有する不純物を除去し、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物を得る工程を含み、

前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、トウモロコシから得られ、

前記工程 (b) が、前記工程 (a) の産物を 10 ~ 30 分間にわたってかき混ぜる工程を含み、

前記工程 (c) が、前記工程 (b) の水性抽出物を、(c1) 10 μm ~ 40 μm の最大平均孔径を有する第 1 精密濾過材料に通す工程、(c2) 0.5 μm ~ 2.0 μm の最大平均孔径を有する第 2 精密濾過材料に通す工程、及び、(c3) 0.05 ~ 0.15 μm の最大平均孔径を有する第 3 精密濾過材料に通す工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 9】

前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、標準タイプ (su) 又はシュガリーエクステンダ (se) タイプのスイートコーンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む前記水性組成物を、アミロスクラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、分枝酵素又はこれらの任意の組み合わせを用いた酵素処理に供する工程 (e) を含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記工程 (c) 又は工程 (d) に先立って、吸着濾過補助物、任意で珪藻土を添加する工程をさらに含む、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む前記水性組成物を乾燥させて、実質的に単分散のフィトグリコーゲンナノ粒子の乾燥組成物を得る工程 (e1) をさらに含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法にしたがって製造された、実質的に単分散のナノ粒子を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2013 年 4 月 26 日に出願の米国特許出願第 61 / 816686 号の優先権を主張するものであり、その内容は全て本願に援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、フィトグリコーゲンナノ粒子及びフィトグリコーゲンナノ粒子の製造方法に関する。

【背景技術】

【0003】

フィトグリコーゲン及びグリコーゲンは - 1, 4 - グルカン鎖から構成され、 - 1, 6 - グルコシド結合を介して高度に分岐し、植物及び動物細胞においてエネルギー貯蔵媒体として機能するグルコースの多糖である。グリコーゲンは動物組織において、直径 20 ~ 200 nm の高密度粒子の形態で存在する。グリコーゲンは微生物、例えば細菌及び酵母菌内に蓄積するとも判明している。フィトグリコーゲンは、その構造及び物性の両方の点でグリコーゲンに極めて似た、植物由来の多糖である。

【 0 0 0 4 】

グリコーゲン及びフィトグリコーゲンは「高多分散性」又は不均一な物質と考えられる。グリコーゲンは典型的には、公知の調製物に関して、 $10^6 \sim 10^8$ ダルトンの分子量及び対応する大きい多分散性を有する。透過型電子顕微鏡法 (TEM) で動物及び植物組織並びに抽出したグリコーゲン/フィトグリコーゲン調製物を観察することで、これらの多糖の粒状特性が明らかとなった。一般に報告されているグリコーゲン又はフィトグリコーゲン粒径は 20 ~ 300 nm の範囲であり、連続的又はマルチモーダルな粒径分布を有する。20 ~ 30 nm の小さい粒子は 粒子 と称され、100 ~ 300 nm の大きい粒子は 粒子 と称される。 粒子 は、凝集又はクラスター形成の結果として 粒子 から構成されていると考えられている [1]。

【 0 0 0 5 】

最も多くは生物学的サンプル中に蓄積している総グリコーゲン量を定量化することを目的として、また稀にグリコーゲンを応用例において製品として使用することを目的として、生物からグリコーゲン及びフィトグリコーゲンを単離する様々な方法が編み出されている。

【 0 0 0 6 】

最も多く用いられる方法は動物組織、特に海洋動物、とりわけ軟体動物からの抽出であるが、これはそのグリコーゲン蓄積能に因るものである。例えば米国特許第 5 7 3 4 0 4 5 号明細書では、高温アルカリ抽出とそれに続く得られた溶液のカチオン樹脂での中和及び処理による、イガイからのタンパク質非含有グリコーゲンの調製方法が開示されている。グリコーゲンは、例えば国際公開第 1 9 9 7 / 0 2 1 8 2 8 号パンフレットに記載されるように、酵母菌の発酵を通じても得ることができる。米国特許第 7 6 7 0 8 1 2 号明細書には、低分子量デキストリンへの酵素混合物の曝露によるグリコーゲン様多糖の生合成での製造方法が記載されている。スイートコーン及びもち米をグリコーゲンの原料として使用することができ、例えば、グリコーゲンをもち米の穀粒から単離する方法について記載している欧州特許第 0 8 6 0 4 4 8 (B 1) 号明細書を参照のこと。

【 0 0 0 7 】

グリコーゲン/フィトグリコーゲン単離の主要な工程は典型的には：細粉化/摩砕/微粉砕等によるバイオマスの破壊；水相へのグリコーゲンの抽出；濾過及び/又は遠心分離による不溶性固形粒子の分離；微細分散した又は可溶化された脂質、タンパク質及び低分子量汚染物質の排除；並びに濃縮及び乾燥を含む。

【 0 0 0 8 】

第 2 抽出工程におけるグリコーゲンの収率を上昇させるために、抽出は多くの場合、高温で及び/又はアルカリ性若しくは酸性溶液を使用して行われる。そのような手順には、高温濃縮 (20 ~ 40 %) アルカリ溶液 [2, 3]、低温酸 [4] 又は沸騰水 [5] での摩砕した生物材料の初期処理が含まれる。

【 0 0 0 9 】

慣用のグリコーゲン単離/精製法で用いられる手順はグリコーゲンの構造の著しい加水分解につながり、低分子量産物の顕著な増加及び分子の化学的变化を伴う。

【 0 0 1 0 】

様々なより穏和な抽出手順が編み出されており、例えば冷水抽出 [6] であり、得られる生成物はグリコーゲンの自然な状態の姿に近いとされている。しかしながら、冷水抽出法で得られる公知のグリコーゲン調製物は高多分散性である [7, 1]。

【 0 0 1 1 】

様々な方法が、粗グリコーゲン抽出物を微細分散タンパク質、脂質、核酸及び他の多糖から精製する工程を行うことで知られている。タンパク質及び核酸は、デオキシコレート(DOC)トリクロロ酢酸(TCA)、多価カチオンでの選択的沈澱及び/又は酵素(プロテアーゼ、ヌクレアーゼ)処理で除去することができる。塩析(例えば、硫酸アンモニウムで)又はイオン交換によるタンパク質除去法も用いられている。別の一般的なタンパク質除去法は、通常65~100での熱凝固とそれに続く遠心分離又は濾過である。加圧滅菌(121、1気圧)もフィトグリコーゲン抽出物中のタンパク質の凝固に用いられてきた[8]。さらに、タンパク質及び脂質をフェノール-水抽出で除去することができる。

【0012】

10

国際公開第2013/019977号パンフレット(Yao)ではフィトグリコーゲンを含む抽出物を得る方法が教示されており、この方法は限外濾過を含むが、水性抽出物をフィトグリコーゲン及び他の多糖の両方を劣化させる酵素処理に供することを含む。Yaoは、ベータ-デンプン分解、すなわちベータアミラーゼを使用した酵素加水分解に供することでフィトグリコーゲン材料の粘度を低下させる方法を提供している。Yaoのこの方法で得られる「精製されたフィトグリコーゲン」材料はフィトグリコーゲンだけではなく、ベータデキストリン及び他の多糖の消化産物を含めたフィトグリコーゲンの誘導体も含む。Yaoの方法はさらに、抽出物を100に加熱することを含む(Yaoの実施例1を参照のこと)。

【0013】

20

米国特許第5895686号明細書には、フィトグリコーゲンを米から水又は含水溶媒(室温)で抽出する方法並びに熱変性及びTCA沈澱によるタンパク質の除去が開示されている。生成物はマルチモーダルな分子量分布と対応する高い多分散性及び高い水溶液粘度を有する。これらの特性は、植物原料からのグリコーゲン調製物中に相当量のアミロペクチン及びアミロースが存在すること、またグリコーゲン抽出過程でグリコーゲンが分解されることに起因すると考えられる。

【0014】

米国特許第5597913号及び第5734045号明細書には、窒素化合物を実質的に含有しないグリコーゲン並びにタンパク質及び核酸からのその純度の指標としての還元糖が得られる手順が記載されている。これらの特許は、高pH溶液中での選択された組織の煮沸の利用を教示している。

30

【0015】

米国特許出願公開第20100272639(A1)号(本発明の所有者に譲渡)は、細菌及び貝・甲殻類バイオマスからグリコーゲンを単離する方法を提供する。細菌が好ましいと教示されているが、これはこの方法を行うことで他の高分子量多糖(例えば、アミロペクチン、アミロース)を有さず且つ貝・甲殻類又は動物組織に関係した病原菌、寄生虫、ウイルス及びプリオンを含有しないバイオマスが得られるからである。開示の方法は概して、フレンチプレス又は化学処理による細胞破壊;遠心分離による不溶性の細胞成分の分離;酵素処理とそれに続く、粗多糖及びリボ多糖(LPS)を含有する抽出物が得られる透析、あるいはフェノール-水抽出による細胞可溶化物からのタンパク質及び核酸の排除;弱酸加水分解又は多価カチオンの塩での処理によるLPSの排除とその結果としての不溶性LPS産物の沈殿;限外濾過及び/又はサイズ排除クロマトグラフィによるグリコーゲン高含有画分の精製;適切な有機溶媒でのグリコーゲンの沈殿。あるいは濃縮グリコーゲン溶液は限外濾過又は超遠心分離により得られる;並びにグリコーゲン粉末を得るための凍結乾燥の工程を含む。細菌バイオマスから単離されたグリコーゲンは、分子量5.3~12.7x10⁶Daを特徴とし、直径35~40nmの粒径を有し、単分散であった(PDI=M_n/M_w=1.007~1.03)。

40

【発明の概要】

【0016】

一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料から得られるフィトグリコーゲ

50

ンナノ粒子の組成物について記載し、フィトグリコーゲンナノ粒子は動的光散乱法（DLS）による測定で0.3未満の多分散指数を有する。一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子はDLSによる測定で0.2未満の多分散指数を有する。一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子はDLSによる測定で0.1未満の多分散指数を有する。

【0017】

一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子は約30～約150nmの平均粒径を有する。一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子は約60～約110nmの平均粒径を有する。

【0018】

一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約30～約150nmの平均粒径を有する80%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約30～150nmの平均粒径を有する90%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約30～150nmの平均粒径を有する99%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約60～110nmの平均粒径を有する80%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約60～110nmの平均粒径を有する90%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約60～110nmの平均粒径を有する99%を超えるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む。

【0019】

一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料は、トウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの組み合わせから得られる。一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料は、標準タイプ（su）又はシュガリー（sugary）エクステンダ（se）タイプのスイートコーンである。一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料はミルクステージ又はデントステージのトウモロコシ穀粒から得られる。

【0020】

一実施形態において、組成物は粉末である。別の実施形態において、組成物はフィトグリコーゲンナノ粒子の水性分散物である。

【0021】

本明細書では単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の製造方法も記載し、この方法は、（a）破壊したフィトグリコーゲン含有植物原料を温度約0～約50℃の水に浸漬させ、（b）工程（a）の産物を固液分離に供することで水性抽出物を得て、（c）工程（b）の水性抽出物を約0.05～0.15μmの最大平均孔径を有する精密濾過材料に通し、（d）工程（c）の濾液を限外濾過に供して約300kDa未満の分子量を有する不純物を除去することで単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物を得ることを含む。

【0022】

本方法の一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料は穀物である。一実施形態において、穀物はトウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの混合物である。一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料は標準タイプ（su）又はシュガリーエクステンダ（se）タイプのスイートコーンである。一実施形態において、フィトグリコーゲン含有植物原料は標準タイプ（su）又はシュガリーエクステンダ（se）タイプのスイートコーンのミルクステージ又はデントステージの穀粒である。

【0023】

一実施形態において、本方法は、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物をアミロスクラーゼ（amylase）、グリコシルトランスフェラーゼ、分枝酵素又はこれらの任意の組み合わせを用いた酵素処理に供する工程（e）を含む。

【0024】

一実施形態において、本方法は、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物を乾燥させることで実質的に単分散のフィトグリコーゲンナノ粒子の乾燥組成物を得る工

程 (e 1) を含む。

【 0 0 2 5 】

一実施形態において、本方法は、工程 (c) 又は工程 (d) に先立って吸着濾過補助物を添加する工程を含む。一実施形態において、吸着濾過補助物は珪藻土である。

【 0 0 2 6 】

一実施形態において、固液分離工程は工程 (a) の生成物を 1 0 ~ 3 0 分間にわたってかき混ぜることを含む。

【 0 0 2 7 】

本方法の一実施形態においては、工程 (d) の限外濾過により 5 0 0 k D a 未満の分子量を有する不純物を除去する。

【 0 0 2 8 】

一実施形態において、工程 (c) は、工程 (b) の水性抽出物を、約 1 0 ~ 約 4 0 μm の最大平均孔径を有する第 1 精密濾過材料 (c 1)、約 0 . 5 ~ 約 2 . 0 μm の最大平均孔径を有する第 2 精密濾過材料 (c 2) 及び約 0 . 0 5 ~ 0 . 1 5 μm の最大平均孔径を有する第 3 精密濾過材料 (c 3) に通すことを含む。

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、本方法は工程 (b) の生成物を遠心分離することをさらに含む。

【 0 0 3 0 】

本明細書では、記載の方法にしたがって得られた実質的に単分散のナノ粒子の組成物についても記載する。

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、本明細書に記載の組成物は皮膜形成剤として使用される。一実施形態において、本明細書に記載の組成物は薬剤送達剤として使用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 フィトグリコーゲンナノ粒子の概略図である。

【 図 2 】 実施例 1 で単離したフィトグリコーゲンの D L S を用いた粒径分布を示す。

【 図 3 】 実施例 2 で単離したフィトグリコーゲンの D L S を用いた粒径分布を示す。

【 図 4 】 本発明のある実施形態による水中の単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の分散物に関する粘度対濃度 (質量 / 質量 %) を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 3 】

本明細書における「フィトグリコーゲン」とは、平均鎖長 1 1 ~ 1 2、1 4 結合及び 1 6 での分岐点を有し、分岐度が約 6 ~ 約 1 3 % である、植物原料から得られる α -D グルコース鎖のナノ粒子のことである。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、高分子量グルコースホモポリマーの単分散ナノ粒子の組成物が提供される。一実施形態において、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の組成物が提供される。

【 0 0 3 5 】

動的光散乱 (D L S) 技法で求められる多分散指数 (P D I) は標準偏差対平均直径比の 2 乗: $PDI = (\sigma / d)^2$ として定義される。また、PDI はポリマーの分子量分布を通して表すこともでき、 M_w 対 M_n 比として定義され、 M_w は重量平均モル質量であり、 M_n は数平均モル質量である (以後、この PDI 測定値を PDI^* と称する)。第 1 のケースにおいて単分散材料はゼロ (0 . 0) に近い PDI を有し、第 2 のケースにおいては 1 . 0 である。一実施形態において、DLS による測定で約 0 . 3 未満、約 0 . 2 未満、約 0 . 1 5 未満、約 0 . 1 0 未満、0 . 0 7 未満又は 0 . 0 5 未満の PDI を有するフィトグリコーゲンナノ粒子の組成物が提供される。一実施形態において、SEC MALS による測定で約 1 . 3 未満、約 1 . 2 未満、約 1 . 1 5 未満、約 1 . 1 0 未満又は 1 . 0 5 未満の PDI^* を有するフィトグリコーゲンナノ粒子の組成物が提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

単分散性は多くの理由から有利であり、組成物のナノ粒子が単分散ならば表面改質及び誘導体化がずっと予測通りに起きることを含む。生物組織におけるナノ粒子の分布及び蓄積、また薬物動態には粒径も影響する。さらに、診断プローブ、触媒、ナノスケール薄膜等の応用例、また制御されたレオロジーにとっては狭い粒径分布が極めて重要である。

【 0 0 3 7 】

分布（分散性）及び直径の平均値を含めたナノ粒子のサイズは、当該分野で公知の方法で測定することができる。これらには主に、DLS及び顕微鏡法（例えば、TEM、原子間力顕微鏡法）が含まれる。

【 0 0 3 8 】

一実施形態においては、約30～約150nm、一実施形態においては約60～約110nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子の単分散組成物が提供される。これらのナノ粒子は、従来の組成物でみられるクラスターを形成した粒子とは対照的に個別の粒子である。

【 0 0 3 9 】

一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子は穀物から生成される。一実施形態において、フィトグリコーゲンはトウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの混合物から生成される。

【 0 0 4 0 】

使用する品種はフィトグリコーゲンを含有していなくてはならない。ある品種がフィトグリコーゲンを含有しているか否かは、公知の技法を用いて当業者により簡単に調べることができる。加えて、多くの品種に関し、発行された文献により、ある品種がフィトグリコーゲンを含有するか否かを確認することができる。

【 0 0 4 1 】

一実施形態において、組成物はスイートコーン（トウモロコシサッカラータ種（*Zea mays var. saccharata*）及びルゴサ種（*Zea mays var. rugosa*））から得られる。一実施形態において、スイートコーンは標準（su）タイプ又はシュガリー甘味増強（se）タイプである。

【 0 0 4 2 】

一実施形態において、組成物は、スイートコーンのデントステージ又はミルクステージ穀粒から得られる。

【 0 0 4 3 】

一実施形態において、フィトグリコーゲンナノ粒子の単分散組成物は実質的に純粋である。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約30～約150nmの粒径を有する少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%のフィトグリコーゲンナノ粒子から構成される。別の実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約30～約150nmの粒径を有する少なくとも約99%のフィトグリコーゲンナノ粒子から構成される。一実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約60～約110nmの粒径を有する少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%のフィトグリコーゲンナノ粒子から構成される。別の実施形態において、組成物は、乾燥質量に基づき、約60～約110nmの粒径を有する少なくとも約99%のフィトグリコーゲンナノ粒子から構成される。

【 0 0 4 4 】

一実施形態において、組成物は実質的に他の多糖を含有しない。一実施形態において、組成物は約10%未満の他の多糖を含有する。一実施形態において、組成物は約5%未満の他の多糖を含有する。一実施形態において、組成物は約1%未満の他の多糖を含有する。

【 0 0 4 5 】

グリコーゲン

グリコーゲン及びフィトグリコーゲンは、 - 1 4 - グリコシド結合により連結され

10

20

30

40

50

、枝が α -1,6-グリコシド結合を介して結びつけられたグルコース残基の直鎖から成る。原料が異なる哺乳動物のグリコゲンを経験的に分析すると、その平均鎖長が約13残基であることが示唆される[9]。図1に示されるように、グリコゲン構造の一般に容認されているモデルは、通常2つの分岐点を有する内鎖及び分岐していない外鎖を有する。樹状ポリマー全体は、タンパク質グリコゲニン(G)の1つの分子に根差している。

【0046】

グリコゲン分子の密度は階層の数と共に指数関数的に上昇する。グリコゲン分子に13番目の階層を追加しようとしてもグルコース残基の密度的に不可能であると算出されているため、12階層が理論的な最大数となる[9]。重要な特徴は、このようにして完全に形成された任意の分子の最も外側の階層が分子の全グルコース残基の約45~50%を非分岐A鎖として含有し、最初の8つの内方階層が全グルコースの約5%しか含有していないことである。したがって、このモデルにおけるフルサイズのグリコゲン分子は12階層から成り、全部で約53000グルコース残基であり、分子質量は約107kDa、直径は約25nmとなる。大部分はグルコース残基から構成されるものの、グリコゲンは他の微量の構成要素も含有し得て、とりわけグルコサミン及びホスフェートである[1]。数学モデリングは、グリコゲン分子の構造特性が3つのパラメータ、すなわち分岐度(r)、階層数(t)及び各鎖中のグルコース残基数(gc)に左右されることを示している[9、10、11、12、13]。

【0047】

成長メカニズムにより示唆されるグリコゲン分子の球形にも関わらず、ある限界を超えて分子が成長すると、分岐度及び鎖長が最後の階層で低下することから分子は構造的均一性を喪失する。

【0048】

フィットグリコゲン

グリコゲン及びフィットグリコゲンは極めて似た構造を有するが、これらの多糖の機能的な目的には最も重要な違いがある。動物及び細菌におけるグリコゲンは、迅速な代謝回転のために最適化された短期的な「燃料」貯蔵所としての役割を果たすものである。

【0049】

植物において、主なエネルギー源はデンプンであり、葉、茎、種子、根等に貯蔵される。グリコゲンとは対照的に、デンプンは、気候状況が良くない時に植物が生き延びることを可能にする長期的なエネルギー手段である。デンプンは2つのタイプのポリグルカン：アミロペクチン(高度に分岐)及びアミロース(枝を殆ど有さずほぼ線形)を含有する。原料によってデンプンにおけるこれら2種の成分の含有量には大きな違いがあるが、貯蔵デンプンにおける主成分は一般にアミロペクチンであると考えられており、約65~85質量%を占める。

【0050】

アミロペクチンは、線形 α -1,4-グルカン鎖が α -1,6-グリコシド結合を介して高度且つ規則的に分岐しているタンデム結合クラスター(それぞれ長さ約9~10nm)から構成されるはっきりとした構造を有する。アミロペクチンの枝により形成される半結晶性構造は生物学的にも経済的にも重要であり、これはこの構造が植物による高密度(~1.6gcm⁻³)での炭素の貯蔵を可能ならしめているからである[14]。

【0051】

アミロペクチンは4種の酵素：可溶性デンプン合成酵素(SS)、デンプン分岐酵素(BE)、ADPグルコースピロホスホリラーゼ及びデンプン脱分岐酵素(DBE)の複数のアイソフォームにより合成される。これらはグリコゲン合成に関わるものと同じ4種の酵素である。

【0052】

これがアミロペクチンとグリコゲンの構造が似ている理由であり、両方とも、 α -1,6分岐を有する α -1,4-ポリグルカンである。しかしながら、アミロペクチンにおける平均鎖長(g_c)は20~25であり、グリコゲンより約2倍長く、一方、分岐度

10

20

30

40

50

(r) は約 1 . 5 ~ 2 倍低い。

【 0 0 5 3 】

イソアミラーゼ (I S A) における変異、すなわち脱分枝活性の欠乏は、アミロペクチンのフィトグリコーゲンでの部分置換につながる。そのようなフィトグリコーゲン蓄積植物の最も一般的な例は、トウモロコシ、イネ及び他の穀物の s u g a r y - 1 (s u) 変異体である。

【 0 0 5 4 】

フィトグリコーゲンは構造的にグリコーゲンに似ており、平均鎖長 1 1 ~ 1 2 及び同様の分岐度を有し、典型的には 1 0 ⁶ ~ 1 0 ⁸ D a の分子量を有する。しかしながら、報告されているグリコーゲンより大きい粒径は、低い分岐度及び / 又は低い構造的均一性を示唆している。グリコーゲンが高度に最適化された代謝産物であり、フィトグリコーゲンはアミロペクチン合成における乱れの結果であることを考えると、フィトグリコーゲンの構造的な均一性の低さは予期せぬものというわけではない。

【 0 0 5 5 】

本発明の発明者は、フィトグリコーゲン組成物の報告されている多分散性が実際には破壊的な単離法に一部起因するものであり、観察された多分散性がさらに、微細分散している汚染物質 (例えば、タンパク質、脂質、他の多糖) の存在から生じ得ることを実験により確認した。本明細書に記載の方法を用いて、本発明の発明者はフィトグリコーゲンの単分散組成物を生成した。

【 0 0 5 6 】

単分散フィトグリコーゲンの製造方法

上述したように、グリコーゲン / フィトグリコーゲン単離の主要な工程は典型的には、(1) 細粉化 / 摩砕 / 微粉碎等によるバイオマスの破壊、(2) 水相へのグリコーゲンの抽出、(3) 濾過及び / 又は遠心分離による不溶性固形粒子 (固形物) の分離、(4) 微細分散した又は可溶化された脂質、タンパク質及び低分子量汚染物質の排除並びに (5) 濃縮及び乾燥を含む。幾つかの作業を組み合わせることができる (例えば、微粉碎と抽出) 。

【 0 0 5 7 】

一実施形態において、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の製造方法は、(a) 破壊した植物原料を温度約 0 ~ 約 5 0 、一実施形態においては約 4 ~ 約 2 0 の水に浸漬させ、(b) 工程 (a) の産物を固液分離に供することで水性抽出物を得て、(c) 工程 (b) の水性抽出物を、適切には多段階濾過プロセスにおいて、ただし約 0 . 1 μ m の最大平均孔径を有する精密濾過材料に少なくとも通して濾過し、(d) 工程 (c) の濾液を限外濾過に供することで約 3 0 0 k D a 未満、一実施形態においては約 4 0 0 k D a 未満、一実施形態においては約 5 0 0 k D a 未満の分子量を有する不純物を除去して単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物を得ることを含む。

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、本方法は工程 (b) の生成物の遠心分離をさらに含む。

【 0 0 5 9 】

次に、水性分散物を乾燥させることで、実質的に単分散のフィトグリコーゲンナノ粒子の組成物を得ることができる。

【 0 0 6 0 】

一実施形態において、植物原料は穀物である。一実施形態において、植物原料はトウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの混合物である。一実施形態において、植物原料はスイートコーンの穀粒である (トウモロコシサッカラータ種及びルゴサ種) 。一実施形態において、スイートコーンのミルクステージ又はデントステージ成熟穀粒を使用する。

【 0 0 6 1 】

フィトグリコーゲンの収率は、様々な実施形態において、植物原料の乾燥質量の約 5 ~ 50 %、約 10 ~ 約 50 %、約 20 ~ 50 %、約 30 ~ 約 50 %、約 40 ~ 約 50 %、約 10 ~ 約 40 %、約 20 ~ 40 %、約 30 ~ 約 40 % である。フィトグリコーゲンの正確な収率は、品種及び成熟度のステージを含め、使用する植物原料に左右される。トウモロコシの場合、発明者は、成熟度がミルクステージの穀粒の場合、穀粒乾燥質量の 35 ~ 40 %、成熟度がデントステージ場合、20 ~ 30 % の範囲の収率を得た。これまでに報告されたフィトグリコーゲンの高多分散性を考えると、単分散フィトグリコーゲンのこれらの収率は予期せぬものであった。

【0062】

破壊された植物原料の調製方法は当業者に公知である。バイオマスの破壊方法は、バイオマテリアルの摩砕、微粉碎又は細粉化を含む。植物原料を約 0.5 mm 未満の平均粒径まで適切に破壊する。

【0063】

一実施形態においては、冷水抽出を 10 ~ 30 分間にわたって中程度にかき混ぜることで行う。一実施形態において、冷水抽出は約 0 ~ 約 50 の温度で行われる。一実施形態において、冷水抽出は約 4 ~ 約 20 の温度で行われる。最適なかき混ぜ時間、温度及びかき混ぜ速度は破壊したバイオマスの性質次第であり、これらの決定は当業者の知識の範囲内である。

【0064】

冷水抽出で得られる水性抽出物を遠心分離に供することで不溶性の粗固形物を分離する。適切には、抽出物を任意で約 3000 ~ 約 6000 x g で遠心分離する。適切には、さらなる遠心分離を、約 6000 ~ 約 12000 x g での遠心分離により行い、粗フィトグリコーゲン抽出物から微細分散したタンパク質及び脂質を部分的に分離する。

【0065】

上清の濾過が遠心分離に続く。本明細書に記載されるように、多段階濾過及び限外濾過を行い、それによって驚くべきことに、タンパク質、脂質並びにアミロース及びアミロペクチンを含めた汚染多糖の大部分が化学的処理、酵素処理又は熱処理を行わずとも排除されて単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の組成物が得られると判明した。精密濾過を、最終濾過媒体孔径 0.1 μm で適切に多段階で行う。一実施形態において、精密濾過を連続的に、(a) 一実施形態においては約 5 ~ 約 50 μm 、一実施形態においては約 10 ~ 約 40 μm 、一実施形態においては約 15 ~ 約 35 μm 、一実施形態においては約 20 ~ 約 30 μm 、一実施形態においては約 25 μm 、(b) 一実施形態においては約 0.5 ~ 約 2.0 μm 、一実施形態においては約 1.0 μm 、(c) 一実施形態においては約 0.05 ~ 約 0.15 μm 、一実施形態においては 0.1 μm の濾過媒体孔径で行った。一実施形態においては、遠心分離に先立って、吸着濾過補助物（例えば、珪藻土）をフィトグリコーゲン抽出物に添加することができる。一実施形態において、吸着濾過補助物は約 2 ~ 10 質量 / 体積 %、一実施形態においては約 3 ~ 5 質量 / 体積 % の量で使用される。

【0066】

精密濾過で得られた最終濾液を限外濾過に供し、限外濾過は最終濾液から、塩、タンパク質及び糖（例えば、デキストリン、グルコース、スクロース、マルトース）を含めた低分子量汚染物質を除去する。限外濾過を、分子量カットオフ (MWCO) が約 300 ~ 約 500 kDa のクロスフロー濾過 (CFF) により適切に行う。

【0067】

様々な精密濾過及び限外濾過法が当業者に公知であり、いずれの適切な方法も用い得る。

【0068】

任意で、限外濾過に続いて、フィトグリコーゲンを含有する水性分散物を酵素処理に供することで多分散性を低下させ得る。適切には、アミロスクラーゼ (amylase)、グリコーゲンシンターゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、分枝酵素又はこれらの任意の組み合わせで処理し得る。しかしながら、アミロペクチン及びアミロースを消

10

20

30

40

50

化する酵素（例えば、ベータ - アミラーゼ）は回避すべきである。これらはフィトグリコーゲンナノ粒子の精製組成物ではなく、様々に分解されたポリグルカンの溶液をもたらすからである。

【0069】

フィトグリコーゲン分散物を、CFF限外濾過のプロセスで濃縮し得る（最高30%）。あるいは、CFF限外濾過に続いて、フィトグリコーゲンを適切な有機溶媒、例えばアセトン、メタノール、プロパノール等、好ましくはエタノールで沈澱させ得る。この方法は、フィトグリコーゲン抽出物を、適切には噴霧乾燥又は凍結乾燥により乾燥させることをさらに含む。様々な標準的な濃縮及び/又は乾燥法（例えば、流下膜式蒸発器、上昇膜式蒸発器の使用、噴霧乾燥、凍結乾燥、ドラム乾燥又はこれらの組み合わせ等）を用いて

10

【0070】

実施例で示されるように、得られるフィトグリコーゲン材料は、使用する開始植物原料に応じた30~150nmの粒径、DLSによる測定で0.07もの低さの多分散指数を特徴とする。

【0071】

高純度材料及びその単分散性を確保するための秘訣は、細かい精密濾過と限外濾過との組み合わせである。

【0072】

20

ナノ粒子の化学的官能化

本発明の実施形態は、化学的に官能化された表面を有するナノ粒子及び分子並びに/又は多様な分子に共役させたナノ粒子を含む。化学的官能化は合成分野で公知である。例えば、March, Advanced Organic Chemistry, 6th Ed., Wiley, 2007を参照のこと。官能化は粒子の表面又は粒子の表面と内部の両方で行い得るが、上述したような単一分岐ホモポリマーとしてのグリコーゲン分子の構造は保たれる。

【0073】

そのような官能化表面基には、以下に限定するものではないが、求核及び求電基、酸性及び塩基性基が含まれ、例えばカルボニル基、アミン基、チオール基、カルボン酸基又は他の酸性基が含まれる。アミノ基は1級、2級、3級又は4級アミノ基になり得る。本明細書に記載のナノ粒子は、不飽和基、例えばビニル及びアリル基でも官能化し得る。

30

【0074】

単離及び精製されたナノ粒子は直接又は間接的に官能化し得て、後者では1つ以上の中間リンカー又はスペーサを使用し得る。ナノ粒子は、2つ以上、3つ以上又は4つ以上の官能化工程を含む1つ以上の官能化工程に供し得る。

【0075】

官能化したナノ粒子をさらに、多種多様な用途のための関心のある、様々な所望の分子、例えば生体分子、小分子、治療薬、ミクロ及びナノ粒子、医薬的に活性な成分、巨大分子、診断標識、キレート剤、分散剤、電荷調節剤（charge modifying agent）、粘度調節剤、界面活性剤、凝固剤、凝集剤、またこれらの化合物の多様な組み合わせと共役させ得る。

40

【0076】

公知の多糖官能化又は誘導体化法を利用し得る。例えば、あるアプローチは、C-2、C-3、C-4及び/又はC-6の位置でのグルコースのヒドロキシル基の選択的酸化によるカルボニル基の導入である。使用し得る酸化剤は幅広く、例えばペリオデート（例えば、過ヨウ素酸カリウム）、臭素、ジメチルスルホキシド/無水酢酸（DMSO/Ac₂O）[例えば、米国特許第4683298号]、デス-マーチンペルヨージナン等である。

【0077】

50

本明細書に記載のナノ粒子は、カルボニル基で官能化した場合、1級又は2級アミン基を有する化合物と速やかに反応する。これによりイミンが生成され、還元剤、例えばナトリウムボロハイドレートでアミンにさらに還元し得る。したがって、この還元工程はイミン中間体より安定したアミノ生成物をもたらす、また未反応のカルボニル基をヒドロキシル基に変換する。カルボニル基を排除することで、誘導体化されたナノ粒子が、ターゲットとしない分子（例えば、血漿タンパク質）と非特異的な相互作用を起こす可能性を有意に低下させる。

【0078】

カルボニル及びアミノ化合物間での反応並びに還元工程は1つの容器で同時に行い得る（適切な還元剤を同じ反応混合物に導入する）。この反応は直接還元的アミノ化として知られる。ここでは、カルボニル基の存在下でイミンを選択的に還元するいずれの還元剤（例えば、ナトリウムシアノボロハイドレート）も使用し得る。

10

【0079】

カルボニル官能化ナノ粒子からのアミノ官能化ナノ粒子の調製には、いずれのアンモニウム塩又は1級若しくは2級アミン含有化合物も使用し得て、例えば酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、ヒドラジン、エチレンジアミン又はヘキサレンジアミンである。この反応は水又は水性極性有機溶媒、例えばエチルアルコール、DMSO又はジメチルホルムアミド中で行い得る。

【0080】

本明細書に記載のナノ粒子の還元的アミノ化は以下の2工程プロセスを用いても成し遂げ得る。第1工程はアリル化、すなわち還元剤（例えば、ナトリウムボロハイドレート）の存在下でのアリルハロゲンとの反応によるヒドロキシル基のアリル基への変換である。第2工程において、アリル基を二官能性アミノチオール化合物、例えばアミノエタンチオールと反応させる。

20

【0081】

アミノ官能化ナノ粒子はさらなる改質をし易い。例えば、アミノ基はカルボニル化合物（アルデヒド及びケトン）、カルボン酸及びこれらの誘導体（例えば、塩化アシル、エステル）、スクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、塩化スルホニル等に反応性である。

【0082】

特定の実施形態においては、本明細書に記載のナノ粒子をシアニル化のプロセスを用いて官能化する。このプロセスによりシアネートエステル及びイミドカルボネートが多糖のヒドロキシル基で形成される。これらの基は極めて穏和な条件下で1級アミンと速やかに反応し、共有結合を形成する。シアニル化剤、例えば臭化シアン、好ましくは1-シアノ-4-ジエチルアミノ-ピリジニウム（CDAP）をナノ粒子の官能化に使用し得る。

30

【0083】

官能化ナノ粒子を、カルボニル又はアミノ基に結合可能な官能基を有する化合物に直接結びつけ得る。しかしながら、一部の用途では、例えばポリマースペーサ又はリンカーを含めたスペーサ又はリンカーを介して化合物を結びつけることが重要となり得る。これらは、アミノ、カルボニル、スルフヒドリル、スクシミジル（succinimidy l）、マレイミジル及びイソシアネートを含むがこれらに限定されない官能基を有するホモ又はヘテロ2官能性リンカー、例えばジアミノヘキサン、エチレングリコビス（スルホスクシミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスルホスクシミジルタータレート（スルホ-DST）、ジチオビス（スルホスクシミジルプロピオネート）（DTSSP）、アミノエタンチオール及び同様のものになり得る。

40

【0084】

ナノ粒子/共役用の化合物及び改質剤

特定の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子の改質に使用し得る化合物には、以下に限定するものではないが、生体分子、小分子、治療薬、ミクロ及びナノ粒子、医薬的に活性な成分、巨大分子、診断標識、キレート剤、分散剤、電荷調節剤、粘度調節剤、

50

界面活性剤、凝固剤、凝集剤、またこれらの化合物の多様な組み合わせが含まれる。

【0085】

特定の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子を改質するための化合物として使用される生体分子には、以下に限定するものではないが、酵素、受容体、神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン、細胞応答化合物、例えば増殖因子、走化性因子、抗体、ワクチン、ハプテン、毒素、インターフェロン、リボザイム、アンチセンス物質及び核酸が含まれる。

【0086】

特定の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子の小分子改質剤は触媒として有用になり得るものになり得て、金属有機錯体を含むがこれに限定されない。

10

【0087】

特定の実施形態において、ナノ粒子の改質剤として使用する医薬的に有用な成分には、以下に限定するものではないが、疎水性調節剤、薬物動態調節剤、生理活性調節剤及び検出可能な改質剤が含まれる。

【0088】

特定の実施形態においては、ナノ粒子を、吸光、発光、蛍光、ルミネセンス、ラマン散乱、蛍光共鳴エネルギー移動及びエレクトロルミネセンス特性を有する化合物で改質し得る。

【0089】

特定の実施形態において、ナノ粒子の診断標識には、以下に限定するものではないが、ガンマシンチグラフィ及びポジトロン放出断層撮影法（PET）用の診断用放射性医薬品又は放射性同位元素、磁気共鳴画像法（MRI）用の造影剤（例えば、常磁性原子及び超常磁性ナノ結晶）、コンピュータ断層撮影法用の造影剤、X線での撮像用の造影剤、超音波診断法用の造影剤、中性子放射化用の剤並びに様々な光学的手法においてX線、超音波、電波及びマイクロ波、フルオロフォアを反射、散乱する又はこれらに影響する他の成分等が含まれる。診断用放射性医薬品には、ガンマ線放射核種、例えばインジウム111、テクネチウム99m及びヨード131等が含まれる。MRI（磁気共鳴画像法）用の造影剤には、磁性化合物、例えば常磁性イオン、鉄、マンガン、ガドリニウム、ランタニド、有機常磁性成分、超常磁性、強磁性及び反強磁性化合物、例えば酸化鉄コロイド、フェライトコロイド等が含まれる。コンピュータ断層撮影法及び他のX線を使用した撮像法用の造影剤には、X線を吸収する化合物、例えばヨード、バリウム等が含まれる。超音波を使用した方法用の造影剤には、超音波を吸収、反射及び散乱可能な化合物、例えばエマルション、結晶、気泡等が含まれる。他の例には、中性子放射化に有用な物質、例えばホウ素及びガドリニウムが含まれる。さらに、診断手法において有用なX線、超音波、電波、マイクロ波及び他の光線を反射、屈折、散乱させる又は他の形でこれらに影響を及ぼすことが可能な標識を利用し得る。特定の実施形態において、改質剤は常磁性イオン又は基を含む。

20

30

【0090】

特定の実施形態においては、2種以上の異なる化合物を使用して多機能誘導体を生成する。例えば、第1化合物は潜在的な特異的結合生体分子（例えば、抗体、アプタマー）のリストから選択され、次に第2化合物は潜在的な診断標識のリストから選択される。

40

【0091】

特定の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子を、当該分野で一般に知られている方法を用いた無機ナノ材料の調製用テンプレートとして使用し得る（例えば、Nanobiotechnology II, Eds Mirkin and Niemeyer, Wiley-VCH, 2007を参照のこと）。これには、荷電官能基でのナノ粒子の官能化とそれに続くミネラル化が含まれ、ミネラル化は官能化されたナノ粒子の様々なカチオン（例えば、金属、半導体）溶液中でのインキュベーションを含み得る。次に、本明細書に記載のミネラル化ナノ粒子を精製し、様々な用途において使用し得て、用途には、以下に限定するものではないが、医療用診断装置、センサ、光学素子、エレクトロニクス

50

等が含まれる。

【0092】

組成物

一実施形態において、ナノ粒子組成物は、限外濾過工程後に得られるような水性抽出物の形態である。

【0093】

一実施形態において、ナノ粒子組成物は乾燥させられ、組成物は粉末である。

【0094】

本発明の乾燥させたナノ粒子組成物は水、グリセリン及び一部の有機溶媒、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)又はジメチルホルムアミドDMFに溶解/分散し易い。一実施形態において、組成物は水又は溶媒に分散させた乾燥ナノ粒子を含む。単分散ナノ粒子組成物はこれまでのグリコーゲン組成物と比較すると独特のレオロジー特性を有する。本発明のナノ粒子組成物の水性分散物は濃度25質量%までは大きな粘度を見せない。比較として、Yao(国際公開第2013/019977号)の「純粋なフィトグリコーゲン」は15.2質量/質量で3.645Pasの粘度を示す(3645±315mPas)。

10

【0095】

一実施形態において、組成物は、製造日から少なくとも24ヶ月にわたって室温での保存が可能である。

【0096】

20

産業上の利用可能性

本明細書で開示の単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の組成物は幅広い食品、パーソナルケア、工業及び医療用途で使用し得る。例えば、組成物をレオロジー、保水及び表面特性を調節するための添加剤として使用し得る。用途の例には、炭水化物の皮膜形成低グリセミック指数ソース、テクスチャ向上剤、皮膚注入剤、ビタミン及び他の光感受性生理活性化合物用の安定剤、体質顔料、医療用潤滑剤及び賦形剤、薬剤送達物質が含まれる。本発明の組成物はサンケア製剤の紫外線防御効果を改善するために、また生理活性物質及び他の感光性化合物(例えば、日焼け止め、ビタミン、医薬品)の光安定性を強化するために使用し得る。様々な用途が“Polyfunctional Glycogen and Phytoglycogen Additives”(同一出願人により本願と同時に出願されており、その内容は参照により全て援用される)と題された国際特許出願において詳述されている。

30

【0097】

本明細書で開示の単分散フィトグリコーゲンナノ粒子は皮膜形成剤として特に有用である。ナノ粒子は単分散であるため、均一で最密な膜が可能である。組成物は低水分活性の安定した膜を形成する。水分活性は、ある材料が水に結合できる度合い、また水分子が材料内で移動できる度合いを特徴づける。水分活性は、製品の物理的強度(その乾き度と共に上昇)と製品の味(含水量が高くなると共に向上することが多い)とのバランスをとることが必要な食品業界において重要である。水分活性の制御は、構造的に異なる成分を幾つも含有する食品(例えば、マフィン本体とマフィン上部の糖衣)において特に重要である。本発明の組成物は、食品の異なる成分間でのバリア膜として使用し得る。例えば、食品が比較的乾燥しているならば、別の成分を第1成分と接触させる前に本発明の単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の濃縮水溶液を食品成分の表面に噴霧し、乾燥させることができる。食品がすでになんかの水分を含有している場合は、フィトグリコーゲンナノ粒子の微粉末を、連続的な膜が形成されるまで第1食品成分の表面にふりかけることができ、その後、第2成分を接触させる。組成物はバリア膜を形成し、一方の食品成分からもう一方への水分子の拡散を実質的に減少させる。このバリア膜形成特性は、成分間での水の拡散が望ましくない薬剤及びビタミン剤の製造にも使用し得る。

40

【0098】

一実施形態において、本明細書で開示の単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の組成物は

50

薬物送達に使用される。単分散フィトグリコーゲンナノ粒子は非毒性であり、アレルゲン性は知られておらず、ヒトの体のグリコーゲン分解酵素（例えば、アミラーゼ及びホスホリラーゼ）で分解可能である。酵素分解による生成物は非毒性で中性のグルコース分子である。ナノ粒子は極めて優れた化合物担持能を示すが、これはナノ粒子を薬剤に直接又は分子スパーサ若しくはテザーを介して共役可能だからである。薬剤と共役させたナノ粒子は、特定の組織標的分子（例えば、葉酸、抗体、アプタマー）でさらに改質し得る。低多分散性により均一な誘導化及び薬剤分布とそれに伴う予測可能な薬物動態が可能になる。最後に、緻密な球状分子、中性電荷及び高親水性は効率的な細胞取り込みに関係している。

【実施例】

10

【0099】

実施例1：スイートコーン穀粒からのグリコーゲン（フィトグリコーゲン）の抽出

1 kgの冷凍スイートコーン穀粒（含水率75%）を2 Lの脱イオン水（20℃）と混合し、ブレンダー（3000 rpm）で3分間にわたって細粉化した。ドロドロになったスイートコーン粉を12000 x gで15分間にわたって4℃で遠心分離した。合わせた上清画分を孔径0.1 µmのメンブランフィルタを使用したCFFに供した。濾液を、MWCOが500 kDaのメンブランを使用した、室温、ダイアフィルトレーション容量6でのバッチダイアフィルトレーションによりさらに精製した（ダイアフィルトレーション容量とは、ダイアフィルトレーション中に作業過程で導入する総ミリQ水体積の濃縮水体積に対する比である）。

20

【0100】

濃縮水画分を2.5体積の95%エタノールと混合し、8000 x gで10分間にわたって4℃で遠心分離した。濃縮水を2.5体積の95%エタノールと混合し、8000 x gで10分間にわたって4℃で遠心分離した。フィトグリコーゲンを含有するペレットを50℃の炉で24時間にわたって乾燥させ、次に45メッシュまで微粉碎した。乾燥させたフィトグリコーゲンの質量は97 gであった。

【0101】

DLS測定によると、得られたフィトグリコーゲンナノ粒子は83.0 nmの粒径及び0.081の多分散指数を有した（図2）。

【0102】

30

実施例2

デントステージで収穫したNK199種の250 gの乾燥トウモロコシ穀粒を0.5 mm未満の粒径まで摩砕した。冷水抽出を20℃、中程度のかき混ぜで20分間にわたって行った。不溶性成分を8000 x gでの遠心分離により沈澱させた。多段階精密濾過を上清に対して、濾過媒体孔径10.0、1.0及び0.1 µmで行った。クロスフロー濾過（ダイアフィルトレーション）を300 kDaのMWCOで室温、ダイアフィルトレーション容量6で行った。濃縮水を2.5体積の95%エタノールと混合し、8000 x gで10分間にわたって4℃で遠心分離した。フィトグリコーゲンを含有するペレットを50℃の炉で24時間にわたって乾燥させ、次に45メッシュまで微粉碎した。乾燥させたグリコーゲンの質量は17.5 gであった。

40

【0103】

DLSで測定すると、得られたフィトグリコーゲンナノ粒子は63.0 nmの粒径及び0.053の多分散指数を有した（図3）。

【0104】

実施例3：本発明のトウモロコシ穀粒フィトグリコーゲンのキャラクタリゼーション

本発明の実施例2で調製したフィトグリコーゲンナノ粒子のDLSによるキャラクタリゼーションを行い、結果を表1に示す。全ての栽培変種植物が標準（su）タイプである。

【0105】

【表 1】

栽培変種植物*	収率、穀粒絶乾質 量に対する%	粒径、n m	多分散指数
カントリージェントルマン (Country Gentlemen)	24.78	68.8	0.103
シュガードッツ (Sugar Dots)	28.02	69.4	0.081
ジュビリー (Jubilee)	27.25	66.9	0.086
ストウエルズエバグリーン (Stowell's Evergreen)	27.47	66.6	0.071
NK199	28.46	63	0.053
ハニーアンドクリーム (Honey and Cream)	32.64	68.8	0.103
シルバークイーン (Silver Queen)	27.20	68.5	0.129
ゴールデンバンタム (Golden Bantam)	35.71	68.1	0.098
クイッキー (Quickie)	31.43	63.9	0.118
アーリヴィーイエロー (Earlivee Yellow)	31.81	77.5	0.107
アーリーサングロー (Early Sunglow)	23.79	69.6	0.099
G90	29.01	67.1	0.087
セネカホライズン (Seneca Horizon)	25.55	73.3	0.109
イオシェフ (Iochieff)	30.11	66.5	0.107
バターアンドシュガー (Butter and Sugar)	30.05	75.3	0.075

10

20

【0106】

30

得られたフィトグリコーゲンナノ粒子は0.071~0.129の多分散指数、0.10の平均多分散指数を有した。

【0107】

実施例3：本発明のトウモロコシ穀粒フィトグリコーゲンのキャラクタリゼーション

デントステージで収穫したs e及びs hタイプのトウモロコシ穀粒を使用して本発明の実施例2で調製したフィトグリコーゲンナノ粒子のキャラクタリゼーションを行い、結果を表2に示す。

【0108】

【表 2】

栽培変種植物	タイプ	収率、穀粒乾燥質 量に対する%	粒径、nm	
ナバホ (Navajo)	s e バイカラー	5. 4	9 5. 2	
ウェルカム (Welcome)	s e イエロー	7	9 8. 7	
スピーディスイート (Speedy Sweet)	s e バイカラー	7. 2	6 0. 3	
フリートバイカラー (Fleet bicolor)	s e バイカラー	9. 5	9 5. 1	
ヘッドスタート (Head Start)	s e イエロー	1 7. 3	8 8	10
アラジン (Aladdin)	s e バイカラー	2 0. 4	9 2. 1	
センサー (Sensor)	s e バイカラー	2 1. 4	8 4. 3	
シルバーキング (Silver King)	s e ホワイト	2 5. 8	8 8. 1	
センサー (Sensor)	s e バイカラー	2 1. 1	1 0 2. 8	
デレクタブル (Delectable)	s e バイカラー	2 0. 1	9 1. 1	
コロロー (Colorow)	s e イエロー	2 4	1 0 0. 4	
ブロード (Brocade)	s e バイカラー	2 0	1 1 5	20
トリニティ (Trinity)	s e バイカラー	1 7. 6	9 5. 8	
テンプテーション (Temptation)	s e バイカラー	1 4. 2	9 4. 2	
シーバ A (Sheba A)	s h	0	—	
グルメオブセッション (Gourmet Obsession)	s h	0	—	
グルメ 2 2 8 1 (Gourmet 2281)	s h	0	—	
デボーション (Devotion)	s h	0	—	30

【 0 1 0 9 】

実施例 4

本発明の乾燥ナノ粒子組成物を、5 ~ 30 質量 / 質量 % の様々な濃度で水に溶解させた。結果を図 4 に示す。得られた溶液は透明で、濃度 2.5 質量 % まで大きな粘度を示さなかった。粘度は濃度が 2.5 質量 / 質量 % を超えると大幅に上昇した。20 質量 / 質量 % を超えた濃度に関し、溶液は強いせん断減粘特性 (shear thinning properties) を示した。

【 0 1 1 0 】

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔 1 〕 フィトグリコーゲン含有植物原料から得られるフィトグリコーゲンナノ粒子を含む組成物であって、前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、動的光散乱法 (DLS) による測定で 0.3 未満の多分散指数を有することを特徴とする、組成物。

〔 2 〕 前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、DLS による測定で 0.2 未満の多分散指数を有する、前記〔 1 〕に記載の組成物。

〔 3 〕 前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、DLS による測定で 0.1 未満の多分散指数を有する、前記〔 2 〕に記載の組成物。

〔 4 〕 前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、約 30 ~ 約 150 nm の平均粒径を有する、前記〔 1 〕 ~ 〔 3 〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔 5 〕 前記フィトグリコーゲンナノ粒子が、約 60 ~ 約 110 nm の平均粒径を有する、前記〔 4 〕に記載の組成物。

〔 6 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、80%を超える、約30～約150nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 4 〕に記載の組成物。

〔 7 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、90%を超える、約30～150nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 6 〕に記載の組成物。

〔 8 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、99%を超える、約30～150nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 7 〕に記載の組成物。

〔 9 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、80%を超える、約60～110nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 5 〕に記載の組成物。

〔 10 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、90%を超える、約60～110nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 9 〕に記載の組成物。

10

〔 11 〕前記組成物が、乾燥質量に基づき、99%を超える、約60～110nmの平均粒径を有するフィトグリコーゲンナノ粒子を含む、前記〔 10 〕に記載の組成物。

〔 12 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、トウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの組み合わせから得られる、前記〔 1 〕～〔 11 〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔 13 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、標準タイプ(su)又はシュガリーエクステンダ(se)タイプのスイートコーンである、前記〔 12 〕に記載の組成物。

〔 14 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、ミルクステージ又はデントステージのトウモロコシ穀粒から得られる、前記〔 12 〕又は〔 13 〕のいずれか一項に記載の組成物。

20

〔 15 〕前記組成物が、粉末である、前記〔 1 〕～〔 14 〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔 16 〕前記組成物が、前記フィトグリコーゲンナノ粒子の水性分散物である、前記〔 1 〕～〔 14 〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔 17 〕前記〔 1 〕～〔 16 〕のいずれか一項に記載の組成物の、皮膜形成剤としての使用。

〔 18 〕前記〔 1 〕～〔 16 〕のいずれか一項に記載の組成物の、薬剤送達剤としての使用。

〔 19 〕単分散フィトグリコーゲンナノ粒子の製造方法であって、

(a)破壊したフィトグリコーゲン含有植物原料を温度約0～約50℃の水に浸漬させる工程、

30

(b)前記工程(a)の産物を固液分離に供して、水性抽出物を得る工程、

(c)前記工程(b)の水性抽出物を約0.05～0.15μmの最大平均孔径を有する精密濾過材料に通す工程、及び、

(d)前記工程(c)の濾液を限外濾過に供して、約300kDa未満の分子量を有する不純物を除去し、単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む水性組成物を得る工程を含むことを特徴とする、方法。

〔 20 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、穀物である、前記〔 19 〕に記載の方法。

〔 21 〕前記穀物が、トウモロコシ、イネ、オオムギ、モロコシ又はこれらの混合物である、前記〔 20 〕に記載の方法。

40

〔 22 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、標準タイプ(su)又はシュガリーエクステンダ(se)タイプのスイートコーンである、前記〔 21 〕に記載の方法。

〔 23 〕前記フィトグリコーゲン含有植物原料が、標準タイプ(su)又はシュガリーエクステンダ(se)タイプのスイートコーンの、ミルクステージ又はデントステージの穀粒である、前記〔 21 〕又は〔 22 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 24 〕単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む前記水性組成物を、アミロスクラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、分枝酵素又はこれらの任意の組み合わせを用いた酵素処理に供する工程(e)を含む、前記〔 19 〕～〔 23 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 25 〕前記工程(c)又は工程(d)に先立って、吸着濾過補助物を添加する工程をさ

50

らに含む、前記〔 1 9 〕～〔 2 4 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 6 〕前記吸着濾過補助物が、珪藻土である、前記〔 2 5 〕に記載の方法。

〔 2 7 〕前記固液分離が、前記工程（ a ）の生成物を 1 0 ～ 3 0 分間にわたってかき混ぜる工程を含む、前記〔 1 9 〕～〔 2 6 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 8 〕前記工程（ d ）の限外濾過により、約 5 0 0 k D a 未満の分子量を有する不純物を除去する、前記〔 1 9 〕～〔 2 7 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 9 〕前記工程（ c ）が、前記工程（ b ）の水性抽出物を、約 1 0 ～約 4 0 μ m の最大平均孔径を有する第 1 精密濾過材料に通す工程（ c 1 ）、約 0 . 5 ～約 2 . 0 μ m の最大平均孔径を有する第 2 精密濾過材料に通す工程（ c 2 ）、及び、約 0 . 0 5 ～ 0 . 1 5 μ m の最大平均孔径を有する第 3 精密濾過材料に通す工程（ c 3 ）を含む、前記〔 1 9 〕～〔 2 8 〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔 3 0 〕前記工程（ b ）の生成物を遠心分離する工程をさらに含む、前記〔 1 9 〕～〔 2 9 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 1 〕単分散フィトグリコーゲンナノ粒子を含む前記水性組成物を乾燥させて、実質的に単分散のフィトグリコーゲンナノ粒子の乾燥組成物を得る工程（ e 1 ）をさらに含む、前記〔 1 9 〕～〔 3 0 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 2 〕前記〔 1 9 〕～〔 3 1 〕のいずれか一項に記載の方法にしたがって製造された、実質的に単分散のナノ粒子を含む組成物。

〔 3 3 〕前記〔 1 9 〕～〔 3 0 〕のいずれか一項に記載の方法にしたがって製造された、前記〔 1 6 〕に記載の組成物。

20

〔 3 4 〕前記〔 3 1 〕に記載の方法にしたがって製造された、前記〔 1 5 〕に記載の組成物。

参考文献

1. Manners, Carbohydrate Polymers, 16 (1991) pp. 37-82.
2. Pfluger, 1894, Archiv. fuer Physiologie, pp 394-396.
3. Somogyi, 1934, J.Biol. Chem., 104:245-253.
4. Stetten et al., 1956. J.Biol. Chem. 222, 587-599.
5. Bell and Young, 1934, Biochem. J. 28:882-890.
6. Orell et al., 1964, J. Biol Chem., 239: 4021-4026.
7. Bueding and Orrell. J. Biol Chem. 1961, 236: 2854-7.
8. Huang and Yao, Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 1165-1171.
9. Melendez-Havia et al., (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule, Biochem. J. 295: 477-483.
10. Melendez et al., (1997) How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. J. Mol. Evol. 45:446-455.
11. Melendez et al., (1998) Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. Biophys. J. 75: 106-114.
12. Melendez et al., (1999) The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize the cell metabolism. Biophys. J. 77:1327-1332.
13. DiNuzzo M. (2013) Kinetic analysis of glycogen turnover: relevance to human brain (13)C-NMR spectroscopy. Journal of cerebral blood flow and metabolism 33:1540-1548.
14. Thompson, D.B. (2000) Carbohydr. Res. 43: 223-239.

30

40

【図 1】

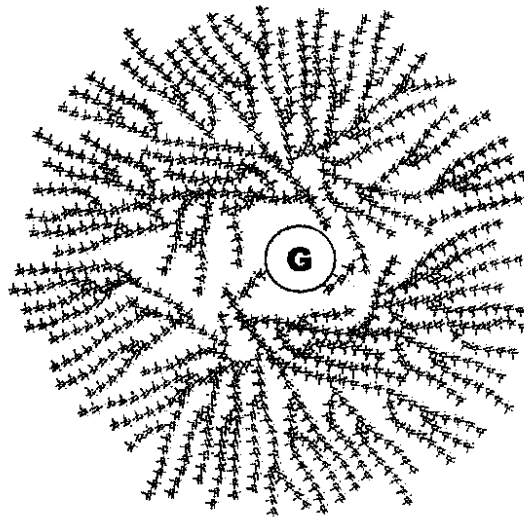
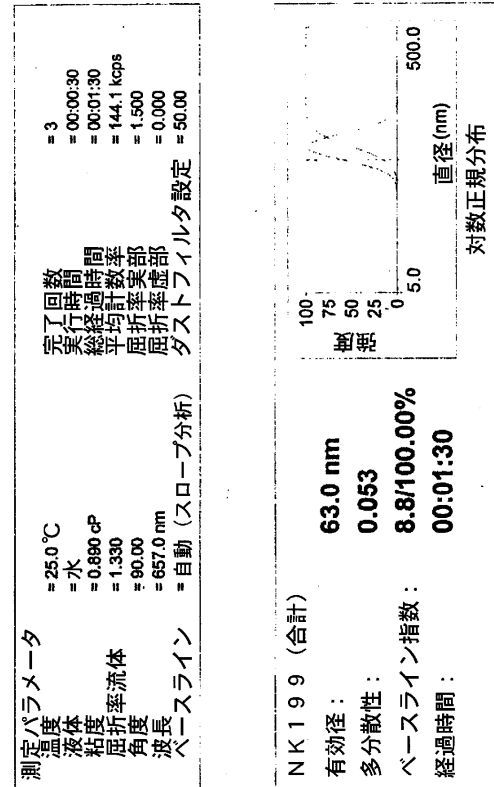


FIGURE 1.

【図 2】

FIGURE 2.



【図 3】

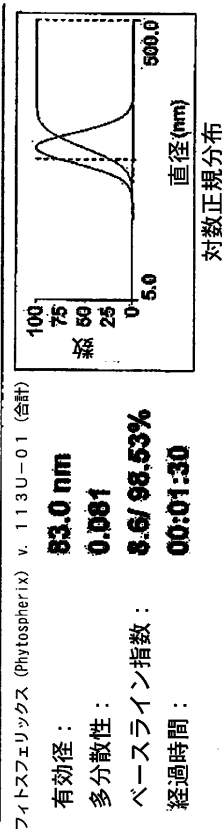
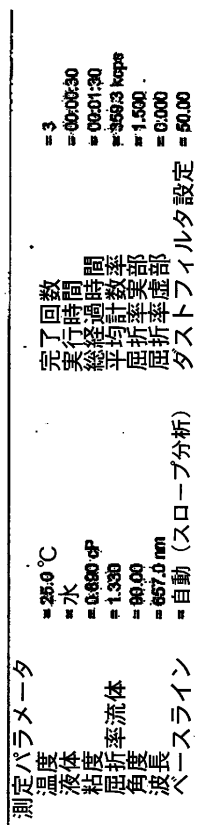


FIGURE 3.

【図 4】

ゼロ相対せん断粘度

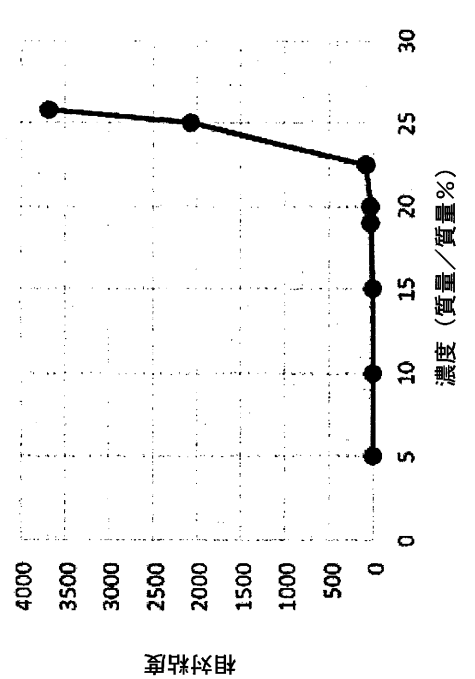


FIGURE 4.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 Q 17/04 (2006.01)		A 6 1 Q 17/04	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)		A 6 1 K 9/14	
C 0 8 B 37/00 (2006.01)		C 0 8 B 37/00	Q
C 0 8 B 37/02 (2006.01)		C 0 8 B 37/02	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)		A 6 1 K 9/10	
B 8 2 Y 30/00 (2011.01)		B 8 2 Y 30/00	
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)		B 8 2 Y 40/00	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)		B 8 2 Y 5/00	
A 2 3 L 33/105 (2016.01)		A 2 3 L 33/105	

- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100196405
弁理士 小松 邦光
- (72)発明者 コレネフスキ アントン
カナダ オンタリオ エヌ1ジー 2エックス7 グエルフ ヴァニエイ ドライヴ 40 アパ
ートメント 507
- (72)発明者 パップ - サボ エルジェーベト
カナダ オンタリオ エヌ1イー 2エックス5 グエルフ エリザベス ストリート 175
- (72)発明者 ダッチャー ジョン ロバート
カナダ オンタリオ エヌ1エイチ 5シー5 グエルフ ライオン アベニュー 33
- (72)発明者 ストゥカロフ オレク
カナダ オンタリオ エヌ2イー 3ヴィ8 キッチナー マックス ベッカー ドライヴ 69

審査官 中西 聡

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0272639 (US, A1)
特開2002-193740 (JP, A)
特開2000-095660 (JP, A)
国際公開第2013/019977 (WO, A2)
国際公開第2013/056227 (WO, A2)
特表2002-523584 (JP, A)
国際公開第2009/081287 (WO, A2)
国際公開第2011/062999 (WO, A2)
特表2016-519192 (JP, A)
特開平10-234315 (JP, A)
特開2008-101218 (JP, A)
平松肇 外, トウモロコシ由来フィトグリコーゲンの機能と香粧品への応用, FRAGRANCE JOURNAL
, 1998年, Vol.26, No.3, p.49-54

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 8 L 1 / 0 0 - 1 0 1 / 1 4
A 2 3 L 3 1 / 0 0 - 3 3 / 2 9
A 6 1 K 8 / 0 0 - 9 / 7 2 , 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A61Q 1/00 - 90/00

B82Y 5/00 - 99/00

C08B 1/00 - 37/18

C08J 3/00 - 3/28

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)