

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4650976号  
(P4650976)

(45) 発行日 平成23年3月16日(2011.3.16)

(24) 登録日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int. Cl. F I  
**B 0 1 J 13/10 (2006.01)** B O 1 J 13/02 G  
**A 2 3 L 1/00 (2006.01)** A 2 3 L 1/00 C

請求項の数 22 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2000-559929 (P2000-559929)	(73) 特許権者	390040420
(86) (22) 出願日	平成11年7月15日(1999.7.15)		マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ ャフテン・エー・ファオ
(65) 公表番号	特表2002-520151 (P2002-520151A)		Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften e. V.
(43) 公表日	平成14年7月9日(2002.7.9)		ドイツ80539ミュンヘン、ホーフガル テンシュトラーセ8番
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/005063	(74) 代理人	100061815
(87) 国際公開番号	W02000/003797		弁理士 矢野 敏雄
(87) 国際公開日	平成12年1月27日(2000.1.27)	(74) 代理人	100094798
審査請求日	平成18年3月27日(2006.3.27)		弁理士 山崎 利臣
(31) 優先権主張番号	98113181.6		
(32) 優先日	平成10年7月15日(1998.7.15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
(31) 優先権主張番号	199 07 552.2		
(32) 優先日	平成11年2月22日(1999.2.22)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的テンプレート上の高分子電解質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高分子電解質外被を有するカプセルの製造方法において、まず水溶液中のテンプレート粒子の分散液を製造し、次いで該分散液にテンプレート粒子の表面と同一か、または反対の電荷を有する高分子電解質種を添加し、引き続き過剰の高分子電解質分子が存在する場合には、該高分子電解質の除去後に第二の層の構成のために、先に施与された高分子電解質種とは反対に荷電した高分子電解質種を施与することにより生物学的または/および両親媒性材料の凝集体から選択されるテンプレート上に、相互に反対に荷電した高分子電解質分子の複数の重なり合った層を施与し、かつ引き続き該テンプレートを分解することを特徴とする、高分子電解質外被を有するカプセルの製造方法。

10

【請求項2】

テンプレートの分解前に、さらに、先に施与された層中の高分子電解質とは反対に荷電した高分子電解質分子の層を施与する工程を複数回行う、請求項1記載の方法。

【請求項3】

同一の電荷を有するそれぞれの層のために同一か、もしくは異なった高分子電解質種または高分子電解質種の混合物を選択する、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

2層~40層の高分子電解質層を施与する、請求項1から3までのいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

20

4層～20層の高分子電解質層を施与する、請求項1から3までのいずれか1記載の方法。

【請求項6】

細胞、細胞凝集体、細胞レベル下の粒子、ウイルス粒子および生体分子の凝集体からなる群から選択されるテンプレートを使用する、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

花粉をテンプレートとして使用する、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

小胞、ミセルおよび脂質凝集体からなる群から選択されるテンプレートを使用する、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

10

【請求項9】

テンプレートを固定化試薬で予備処理する、請求項1から8までのいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

ホルムアルデヒドまたはノおよびグルタルアルデヒドを固定化試薬として使用する、請求項9記載の方法。

【請求項11】

部分的に分解したテンプレートを高分子電解質分子の施与のための出発材料として使用する、請求項1から10までのいずれか1項記載の方法。

20

【請求項12】

テンプレートが環状構造を有する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

テンプレートの分解を溶解試薬の添加により行う、請求項1から12までのいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

溶解試薬がペルオキシ化合物および次亜塩素酸化合物から選択される除蛋白剤を含有する、請求項13記載の方法。

【請求項15】

次亜塩素酸ナトリウムまたは次亜塩素酸カリウムを除蛋白剤として使用する、請求項14記載の方法。

30

【請求項16】

テンプレートの分解後に少なくとも1種の脂質層を高分子電解質外被上に析出させる、請求項1から15までのいずれか1項記載の方法。

【請求項17】

少なくとも1種の別の高分子電解質層を脂質層上に析出させる、請求項16記載の方法。

【請求項18】

作用物質をカプセル中に導入する、請求項1から17までのいずれか1項記載の方法。

【請求項19】

作用物質を触媒、医薬作用物質、ポリマー、着色剤、センサー分子、香料および農薬から選択する、請求項18記載の方法。

40

【請求項20】

有機の液体もしくは気体をカプセル中に導入する、請求項1から19までのいずれか1項記載の方法。

【請求項21】

カプセル中またはノおよびカプセル上で化学反応、例えばポリマー合成を実施する、請求項1から20までのいずれか1項記載の方法。

【請求項22】

カプセル中またはノおよびカプセル上で沈殿または結晶化を実施する、請求項1から2

50

1 までのいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、高分子電解質外被を有するカプセルの製造方法ならびに該方法により得られるカプセルに関する。

【0002】

マイクロカプセルは種々の実施態様で公知であり、かつ特に医薬作用物質の制御された放出および標的に向けた輸送のため、ならびに敏感な作用物質、例えば酵素およびタンパク質を保護するために使用される。

【0003】

マイクロカプセルは機械的 - 物理的な方法により、例えば噴霧およびその後の被覆、化学的な方法、例えば界面重合もしくは界面縮合またはポリマー相分離により、あるいはリポソームへの作用物質のカプセル化により製造することができる。しかし従来公知の方法は一連の欠点を有している。

【0004】

ドイツ国特許出願公開第 1 9 8 1 2 0 8 3 . 4 号は、直径 < 1 0 μ m を有するマイクロカプセルの製造方法を記載しており、この場合、テンプレート粒子の水性分散液に反対に荷電した高分子電解質分子の複数の連続した層を施与する。この場合、テンプレート粒子として特に部分的に架橋したメラミンホルムアルデヒド粒子が記載されている。高分子電解質外被の形成後、メラミンホルムアルデヒド粒子を酸性の pH 値の調整により、またはスルホン化により溶解させることができる。

【0005】

意外なことに高分子電解質カプセルは生物細胞、生物学的または / および両親媒性材料、例えば赤血球、細菌細胞もしくは脂質小胞の凝集体から選択されるテンプレートを使用しても形成できることが判明した。カプセルに入れたテンプレート粒子を引き続き可溶化もしくは分解により除去することができる。

【0006】

従って本発明は高分子電解質外被を有するカプセルの製造方法に関し、この場合、生物学的または / および両親媒性材料の凝集体から選択されるテンプレート上に反対に荷電した高分子電解質分子の複数の連続する層を施与し、かつ場合により引き続き該テンプレートを分解する。

【0007】

テンプレート材料として例えば細胞、例えば真核細胞、例えば哺乳類赤血球または植物細胞、単核細胞有機体、例えば酵母、細菌細胞、例えば E . コリ細胞、細胞凝集体、細胞レベル下の粒子、例えば細胞器官、花粉、膜調製物または細胞核、ウイルス粒子および生体分子の凝集体、例えばタンパク質凝集体、例えば免疫複合体、縮合した核酸、リガンド - 受容体 - 複合体などを使用することができる。本発明による方法は生きている生物細胞および有機体のカプセル化のためにもまた適切である。テンプレートとして両親媒性材料、特に膜構造、例えば小胞、例えばリポソームもしくはミセル、ならびにその他の脂質凝集体が同様に適切である。

【0008】

これらのテンプレート上に反対に荷電した複数の高分子電解質層を析出させる。このためにテンプレート粒子を有利にはまず適切な溶剤、例えば水性媒体中に分散させる。次いで、特にテンプレート粒子が細胞またはその他の生物学的凝集体の場合、固定化試薬を十分な濃度で添加し、少なくとも部分的にテンプレート粒子を固定することができる。固定化試薬のための例はアルデヒド、例えばホルムアルデヒドまたはグルタルジアルデヒドであり、これを有利には最終濃度が 0 . 1 ~ 5 % ( w / w ) となるように媒体に添加する。

【0009】

高分子電解質とは一般にポリマー鎖の成分または置換基であってもよい、イオンのに解離することができる基と理解される。通常、高分子電解質中のイオンのに解離可能なこれら

10

20

30

40

50

の基の数は、解離した形（ポリイオンとも呼ばれる）でポリマーが水溶性であるような大きさである。ここでイオン性の基の濃度が水溶性にとって充分ではないが、しかし自己集合(Selbstassemblierung)に突入するために十分な電荷を有するイオノマーもまた高分子電解質という概念で理解される。有利には外被は「真の」高分子電解質を包含する。解離可能な基の種類に応じて高分子電解質を多価酸および多塩基に分類する。

**【 0 0 1 0 】**

解離の際にプロトンの分離下で多価酸からポリアニオンが生じ、該ポリアニオンは無機ポリマーであっても有機ポリマーであってもよい。多価酸のための例は、ポリリン酸、ポリビニル硫酸、ポリビニルスルホン酸、ポリビニルホスホン酸およびポリアクリル酸である。ポリ塩とも呼ばれる相応する塩のための例はポリリン酸塩、ポリ硫酸塩、ポリスルホン酸塩、ポリホスホン酸塩およびポリアクリル酸塩である。

10

**【 0 0 1 1 】**

多塩基は例えば酸との反応により塩を形成しながらプロトンを受け取ることができる基を有する。鎖 - もしくは側鎖の解離可能な基を有する多塩基のための例はポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアミンおよびポリビニルピリジンである。多塩基はプロトンの受容によりポリカチオンを形成する。

**【 0 0 1 2 】**

本発明により適切な高分子電解質はバイオポリマー、例えばアルギン酸、アラビアゴム、核酸、ペクチン、タンパク質およびその他のものであっても、ならびに化学的に修飾されたバイオポリマー、例えばカルボキシメチルセルロースおよびリグニンスルホネートであ

20

**【 0 0 1 3 】**

直鎖状もしくは分枝鎖状の高分子電解質を使用することができる。分枝鎖状の高分子電解質の使用は、高い度合いの壁孔隙率を有する緻密な高分子電解質の複数膜につながる。カプセル安定性を向上するために、高分子電解質分子を個々の層の内部または / およびその中間で、例えばアルデヒドを用いたアミノ基の架橋により架橋させてもよい。さらに両親媒性高分子電解質、例えば部分的に高分子電解質の特性を有している両親媒性ブロックコポリマーまたはランダムコポリマーを小さい極性分子に対する透過性を減少するために使用してもよい。このような両親媒性コポリマーは異なった官能価の単位、例えば一方では酸性もしくは塩基性の単位、および他方ではブロックとして、もしくはランダムに分散してポリマー全体に配置されていてもよい疎水性単位、例えばスチレン、ジエンまたはシロキサンなどからなる。外部の条件の相関関係としてその構造を変化するコポリマーを使用することによりカプセル壁をその透過性もしくはその他の特性に関して定義的に制御することができる。このために例えばポリ(N - イソプロピル - アクリルアミド) - 割合を有するコポリマー、例えばポリ(N - イソプロピルアクリルアミド - アクリル酸)が考えられ、該コポリマーは水素架橋結合の平衡によりその水溶性を温度の相関関係として変化させ、このことは膨潤を伴う。

30

**【 0 0 1 4 】**

特定の条件下で分解可能な、例えば光、酸もしくは塩基に不安定な高分子電解質を使用することにより、内包されている作用物質の放出をカプセル壁の溶解によって制御することができる。さらに特定の適用可能性のために導電性の高分子電解質または光学活性基を有する高分子電解質をカプセル成分として使用することができる。

40

**【 0 0 1 5 】**

基本的に使用するべき高分子電解質もしくはイオノマーに関しては、使用される分子が十分に高い電荷を有し、または / およびその他の相互作用様式、例えば水素架橋結合および / または疎水性の相互作用を介してその下に存在する層と結合する限り、制限は生じない。

**【 0 0 1 6 】**

従って適切な高分子電解質は分子量の小さい高分子電解質もしくはポリイオンであっても

50

分子量の大きい高分子電解質、例えば生物由来の高分子電解質であってもよい。

【0017】

高分子電解質層をテンプレート上に施与するために有利にはまず水溶液中のテンプレート粒子の分散液を製造する。次いでこの分散液にテンプレート粒子の表面と同一または反対の電荷を有する高分子電解質種を添加する。場合により存在する過剰の高分子電解質分子の分離後に、第二の層の構成のための使用される、反対に荷電した高分子電解質種を添加する。引き続きさらに反対に荷電した高分子電解質の層を交互に施与し、その際、同一の電荷を有するそれぞれの層に関して同一または異なった高分子電解質種または高分子電解質種の混合物を選択することができる。層の数は基本的に任意に選択することができ、かつ例えば2~40層、特に4~20層の高分子電解質層となる。

10

【0018】

所望の数の層を施与した後で、所望の場合には、外被で覆われたテンプレート粒子を分解することができる。分解は溶解試薬の添加により行うことができる。この場合、生物学的材料、例えばタンパク質または/および脂質を溶解することができる溶解試薬が適切である。有利には溶解試薬は除蛋白剤、例えばペルオキシ化合物、例えば $H_2O_2$ または/および次亜塩素酸化合物、例えば次亜塩素酸ナトリウムもしくは次亜塩素酸カリウムを含有している。意外なことにテンプレート粒子の分解は室温で短いインキュベーション時間、例えば1分~1時間以内に行われる。テンプレート粒子の分解は十分に完全である、というも残留している外被を電子顕微鏡により観察する場合でさえ粒子の残留物はもはや検出不能であるからである。生物学的高分子電解質を外被へ組み込む際に空の層もまた高分子電解質外被中に存在していてもよい。

20

【0019】

本発明による方法により得られるカプセルは10nm~50 $\mu$ m、有利には50nm~10 $\mu$ mの範囲の直径で球形から逸脱してもよい、つまり異方性の形状で製造してもよい。壁厚は高分子電解質層の数により決定され、かつ例えば2~100nmの範囲、特に5~80nmの範囲である。該カプセルはその単分散性により優れている、つまり適切なテンプレートを選択すると、平均的な直径からの逸脱が50%を上回るカプセルの割合が10%未満、および特に有利には1%未満であるカプセル組成物が得られる。

【0020】

該カプセルは化学的、生物学的、有機的および熱的な負荷に対して極めて安定している。これらは凍結させるか、または凍結乾燥させ、引き続き再び適切な溶剤中に溶解させることができる。

30

【0021】

該カプセルはその内部に含有されているテンプレートのマイクロ型(Mikroabdruecke)であり、かつテンプレートの除去後にもその形を保持するので、異方性の粒子を製造することができ、この場合、これは生物学的構造、例えば細胞、ウイルス粒子もしくは生体分子凝集体のマイクロ型である。

【0022】

外被中の浸透性の修飾は、少なくとも1つの高分子電解質層中の孔の形成もしくは変化により達成することができる。このような孔は相応する高分子電解質を使用して自己形成することができる。さらにアニオン性または/およびカチオン性の基または/および界面活性物質、例えば表面活性剤、または/および透過性を修飾するための脂質およびその他の特性を有するナノ粒子を使用することができる。さらに浸透性は高分子電解質の析出の際に支配的な条件の変更により修飾することができる。従って例えば周囲媒体の高い塩濃度は高分子電解質外被の高い透過性につながる。

40

【0023】

高分子電解質外被の透過性の特に有利な修飾は、脂質層または/および両親媒性高分子電解質を、テンプレート粒子の分解後に高分子電解質外被上に析出させることにより達成することができる。この方法で小さく、かつ極性分子のための高分子電解質外被の浸透性を著しく低下させることができる。高分子電解質外被上に析出させることができる脂質の例

50

は、少なくとも1つのイオン性もしくはイオン化可能な基を有する脂質、例えばリン脂質、例えばジパルミトイルホスファチジン酸または両性イオン性のリン脂質、例えばジパルミトイルホスファチジルコリンあるいはまた脂肪酸もしくは相応する長鎖のアルキルスルホン酸である。両性イオン性の脂質を使用する際に高分子電解質外被上に脂質の複数層を析出させることができる。脂質層上に引き続き別の高分子電解質層を析出させることができる。

#### 【0024】

本方法により得られるカプセルは作用物質の封入のために使用することができる。これらの作用物質は無機物質であっても有機物質であってもよい。このような作用物質のための例は触媒、特に酵素、医薬作用物質、ポリマー、着色剤、例えば蛍光性化合物、センサー分子、つまり周囲の条件（温度、pH値）の変化に対して検出可能な反応をする分子、農薬および香料である。

10

#### 【0025】

該カプセルを化学反応のためのマイクロ反応空間として、または沈殿 - もしくは結晶化テンプレートとして使用することもできる。カプセル壁の浸透性は制御可能であるため、該壁は例えば分子量の小さい物質を通過させることができるが、しかし高分子を十分に抑止するという事実に基づいて、化学反応の際に生じる高分子の生成物の場合、例えば重合の際に生じるポリマーの場合に、容易な方法で合成中に内部空間に抑止することができる。外部媒体中で同時に合成される反応生成物を例えば遠心分離または/および濾過により後から、あるいはまたすでに反応の間に除去することができる。

20

#### 【0026】

反応の間、反応基質の供給をカプセル壁による拡散により制御することができる。この場合、反応の進行に介入する新規の方法が生じる。例えば濾過により連続的に、もしくは例えば遠心分離により外部媒体を突発的に交換することもまた可能であるので、重合反応を基質除去により任意に停止させるかもしくはモノマーを交換することができる。従って新規の方法で、定義されたコポリマーもしくはマルチポリマーの製造を実施することが可能である。浸透により反応の進行はモノマー供給を介して制御可能であるので、カプセル中で新規の、およびその他の分子量分布を有する生成物、例えば高度に単分散性の生成物を製造することができる。カプセル内部で合成したポリマーを例えば蛍光染料を用いた滴定により分光分析を用いて、および共焦点の顕微鏡により検出することができる。個別粒子の光の散乱を用いて質量の増加ひいては反応速度論を追跡することができる。

30

#### 【0027】

作用物質の封入のために、または合成もしくは沈殿法のための反応空間として異方性のカプセルを使用し、かつ場合により引き続きテンプレート外被を溶解する際に、粒子組成物を規定の形および形状を有する分散液として製造することができる。従って本発明は、高分子電解質外被中の作用物質のカプセル化により、例えば合成および沈殿および引き続き熱的もしくは化学的な処理によるテンプレートの除去により得られる異方性の粒子組成物に関する。有利にはこれらの異方性粒子はテンプレートとして使用されるバイオ構造の形を有している。

#### 【0028】

さらに該カプセルを有機的な液体、例えばアルコールもしくは炭化水素、例えばヘキサノール、オクタノール、オクタンもしくはデカンの導入のため、または気体のカプセル化のために使用することができる。このような水と非混和性の有機液体で充填されたカプセルは化学反応、例えば重合反応のためにもまた使用することができる。例えばモノマーをその分布平衡によりカプセルの内部空間中で適切に富化させることができる。場合によりモノマー溶液はすでに合成の開始前にカプセルの内部空間に封入されている。

40

#### 【0029】

しかしその大きさに基づいて高分子電解質外被中に浸透することができない作用物質もまたカプセルに封入することができる。このために封入すべき作用物質をテンプレート粒子に固定するか、または例えば生きている細胞の場合にはファゴサイトーシスもしくはエ

50

ンドサイトーシスによりテンプレート粒子により封入する。テンプレート粒子の分解後に作用物質を高分子電解質外被の内部へ放出する。その際、有利には作用物質の不所望の分解が生じないようにテンプレート粒子の分解の際の条件を選択する。

【0030】

該カプセルは数多くの適用領域、例えばセンサー工学、表面分析化学で、エマルションキャリア(Emulsionstraeger)、例えば触媒法、重合法、沈殿法もしくは結晶化法のためのマイクロ反応空間として、製剤学および医学において、例えば作用物質のターゲッティングのため、または超音波造影剤として、食料品科学技術、化粧品、バイオテクノロジー、センサー工学、情報科学技術および印刷産業(着色剤のカプセル封入)において使用することができる。さらに該カプセルをマイクロ複合材料もしくはナノ複合材料、つまり少なくとも2つの異なった材料からなり、かつマイクロ-もしくはナノスケープなオーダーを有している作用物質の構成のために使用することができる。

10

【0031】

本発明のもう1つの実施態様は固定化された形のテンプレート粒子を有利には高分子電解質被覆の前に溶解試薬で処理することにより部分的に分解することである。溶解プロセスを適切な時間で中断すると、部分的に溶解した構造、例えば中心に穴の空いた環状構造が得られ、該構造を引き続き被覆することができる。引き続き該テンプレート粒子を完全に分解した後で、リング状のカプセルが最終生成物として得られる。これは例えば光学(マイクロ反響丸天井効果(Mikrofluusterbogeneffekt))におけような興味深い適用可能性を有する全く新規の位相品質である。

20

【0032】

本発明を以下の実施例および図面に基づいてさらに詳細に説明する。図面は以下のものを示している：

図1は、電位の変化(A)および蛍光強度の上昇(B)を、グルタルジアルデヒドで固定したヒト赤血球上でのポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム塩(PSS))およびポリ(塩酸アリルアミン)(PAH)の析出の層の数の相関関係として示す。

【0033】

図2は、10層のPSSおよびPAH層で被覆した円板状赤血球の走査型電子顕微鏡の画像を示す。

【0034】

図3は、未被覆(A)および被覆した(B)円板状赤血球ならびに被覆した円板状赤血球の溶解後に得られる高分子電解質外被(C)の透過型電子顕微鏡の図を示す。

30

【0035】

図4は、円板状赤血球(A)およびエキノサイト(B)上に析出した高分子電解質外被の原子力顕微鏡による画像を示す。

【0036】

図5は、エキノサイト上に析出し、かつ11層のPSS/PAHからなる高分子電解質外被を共焦点顕微鏡で撮影した画像を示す。

【0037】

図6は、6-カルボキシフルオレセインで充填した高分子電解質外被を共焦点顕微鏡により撮影した画像を示す。

40

【0038】

図7は、付加的な被覆を有していない円板状赤血球上の高分子電解質外被の電子回転スペクトル(A)またはDPPA(B)もしくはDPPC(C)で被覆した円板状赤血球上の高分子電解質外被の電子回転スペクトルを示す。

【0039】

図8は、光学顕微鏡(A)および相応する走査型電子顕微鏡の画像(B)による円板状赤血球上に析出した高分子電解質外被の画像を示す。

【0040】

図9は、高分子電解質外被の外側および内部でのラジカル重合によるポリ(ジアリルメチ

50

ルアンモニウムクロリド)の画像を示す。

【0041】

#### 実施例

1. テンプレートとしてウシおよびヒトの赤血球を用いたポリマー外被の調製 新鮮なヒトもしくはウシの血液から血漿を遠心分離する。引き続き燐酸塩で緩衝した等張食塩溶液 P B S ( 5 . 8 m M 燐酸塩緩衝液 p H 7 . 4、K C l 5 . 6 m M、N a C l 1 5 0 m M ) 中で2回洗浄する。引き続き赤血球をグルタルジアルデヒドを用いて2%の濃度に固定する。ここに赤血球沈殿物 1 m l を P B S 1 m l と共に補充する。次いでこの溶液にグルタルジアルデヒド(グルタルジアルデヒド(2.5%水溶液)1部およびP B S 9部) 8 m l を滴加する。20 で60分の作用時間の後で該溶液を遠心分離し、かつ赤血球を 2回蒸留水で4回洗浄する。引き続き固定した赤血球を、緩衝していない154 m M の N a C l 溶液で補充する。

10

【0042】

次の工程として反対に荷電した2種類の高分子電解質の連続的吸着を行う。固定された赤血球の出発電荷はマイナスであったので、有利にはまずプラスに荷電した、50~60 k D の分子量を有するポリ(アリルアミン)ヒドロクロリド(P A H)(Aldrich)を使用する。しかしまたマイナスに荷電した高分子電解質をまず第一の層として赤血球上に析出させてもよい。赤血球の被覆のために0.5 g / d l P A H および0.5 M の N a C l 濃度を有する溶液4 m l を約2.5(v/v)の赤血球濃度で添加する。20 で10分間の作用時間の後で、赤血球を遠心分離し、かつ154 m M の N a C l 中で2回洗浄する。引き続き第二の層の吸着を行う。この目的のために70 k D の分子量を有し、マイナスに荷電したポリ(スチレンスルホネート)-ナトリウム塩(P S S)を使用する。すでにP A H で被覆した赤血球上での第一のP S S 層の施与のためにP S S 0.5 g / d l および0.5 M の N a C l の濃度および約2.5%(v/v)の赤血球濃度を有する溶液を作った。20 で10分間の作用時間後に赤血球を遠心分離し、かつ154 m M の N a C l 溶液中で2回洗浄した。P A H 層およびP S S 層の施与は任意で数回繰り返してもよい。例えばそれぞれ5つのP A H 層および5つのP S S 層を施与することができる。

20

【0043】

テンプレートの溶解のために、固定された赤血球を1.2%のN a O C l 溶液へピペットで移した。同様に市販の除蛋白剤(Produkt、メーカー)または排水清浄剤(例えばChlor ix、メーカー)が適切である。作用時間は20 で約20分であり、かつ溶液の濁りの消失により光学的に制御可能である。残留しているポリマー外被を引き続きN a C l 溶液中で洗浄する。

30

【0044】

2. E . コリ細菌または酵母をテンプレートとして用いるポリマー外被の調製 まずE . コリ細胞をP B S 等張溶液中で2回洗浄することにより培養液から分離する。引き続きグルタルジアルデヒドを用いて固定を行う。このためにコリ細菌の沈殿物をP B S で2 m l になるまで補充する。この溶液にグルタルジアルデヒド溶液8 m l を添加して最終濃度を2%とする。20 で60分の作用時間の後、該溶液を遠心分離し、かつ固定したE . コリ細胞を2回蒸留水で4回洗浄する。

40

【0045】

引き続き、反対に荷電した2種類の高分子電解質の連続した吸着を例1に記載したとおりに行う。

【0046】

相応の方法で予備的な固定を行わずに酵母細胞もまた被覆した。

【0047】

3. 高分子電解質外被上への脂質層の堆積

高分子電解質外被上に脂質層を析出させるために2つの異なった方法を使用した。

【0048】

3. 1

50

高分子電解質外被の懸濁液 200  $\mu$ l をメタノール中で繰り返し洗浄することにより再懸濁させた。3 回目の洗浄の後、純粋なメタノールの代わりに、例えばメタノール中ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPFA) またはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 1 mg/ml の脂質溶液 500  $\mu$ l を沈殿物に添加する。外被をこのメタノール-脂質溶液中に再懸濁させ、かつ該懸濁液を 90 の温度で水浴中に保持する。蒸発させるべきメタノールを、その都度 20  $\mu$ l の分量の水の滴加により交換する。メタノール 700  $\mu$ l と水との交換は約 30 分を要する。

【0049】

蒸発終了後に外被懸濁液を水で 3 回洗浄し、かつ繰り返し遠心分離する。25000 rpm で 20 分の遠心分離により脂質被覆した外被を沈殿させることができる。

10

【0050】

3.2

水中で脂質 1 mg/ml の濃度を有する DPFA または DPPC 90% と DPFA 10% との分散液を超音波処理により製造する。得られた脂質小胞の分散液 500  $\mu$ l を濃縮した外被懸濁液 200  $\mu$ l に添加する。30 分後に試料を 25000 rpm で 20 分間遠心分離する。上澄みを除去し、かつ水を添加する。この手順を 3 回繰り返す。その際、脂質で被覆された外被の濃懸濁液が得られる。

【0051】

4. 高分子電解質外被中への有機溶剤の封入

高分子電解質外被の水性懸濁液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離する。上澄みを除去した後でメタノールを添加する。外被を再懸濁させ、かつ 4000 rpm で 10 分間遠心分離する。改めて上澄みを除去し、メタノールを添加し、かつ該試料を前記と同一の条件下で遠心分離する。この手順を 3 回繰り返す。メタノールを用いた最後の遠心分離の後で上澄みをヘキサノールと交換する。外被を再懸濁させ、かつ 5000 rpm で 10 分間遠心分離する。この手順を再度 3 回繰り返す。

20

【0052】

オクタノール、オクタンまたはデカンを外被に封入するために類似の手順を使用するが、その際、出発材料としてヘキサノール溶液中に存在する外被を使用する。遠心分離の速度はオクタノールおよびオクタンに関しては 7000 rpm (10 分) に高め、かつデカンに関しては 7500 rpm (10 分) に高める。

30

【0053】

最後に得られた沈殿物を水中に再懸濁させる。外被は水相中に残留し、その一方で外被同士の間で沈殿物中にまだ存在する痕跡量の溶剤は第二の有機相を形成する。有機相および水相のために蛍光標識を使用することにより共焦点顕微鏡を用いて外被が有機溶剤により充填されていることを示すことができる。

【0054】

記載の手順により、水中の無極性の液体の高度に安定したエマルジョンを製造することが可能になる。本来の外被の単分散の結果として、得られたエマルジョンは同様に単分散性である。もう一つの利点は、個々の小滴の形でさえ、使用されるテンプレートに依存して、制御することができることである。このことにより、球とは異なった表面：体積比を有するエマルジョンの製造が可能になる。

40

【0055】

5. 高分子電解質外被の特徴付け

図 1 はゼータ電位における変化 (A) および蛍光強度の上昇 (B) を、グルタルジアルデヒドで予備処理したヒトの赤血球上へのポリ (スチレンスルホン酸ナトリウム塩) およびポリ (塩酸アリルアミン) を析出させる際の層の数の関数として示している。電位を電気泳動移動度の測定 (Elektrophor, Hasotec) により生理食塩溶液中で測定する。蛍光強度の分布は貫流血球計算 (FACScan, Becton Dickinson) により FITC-標識した PAH の使用下に 3 つの連続した層析出サイクルで記録する。

【0056】

50

図2にはPSSおよびPAHの10の層で覆われた円板状赤血球の走査型電子顕微鏡の画像を示す。乾燥工程は細胞の端部に沿った高分子電解質層の長軸方向のしわの発生につながる。

【0057】

図3は未被覆(A)および被覆後(B)の円板状赤血球の透過型電子顕微鏡の画像を示している。高分子電解質外被は明らかに認められる。細胞の可溶化の後に得られる高分子電解質外被(C)は、2つの意想外の特徴を示す。倍率はAおよびBでは1:15000およびCでは1:17000である。第一にこれらは本来の細胞の形に類似しており、かつ第二にこれらは外被に亀裂もしくは比較的大きな孔が認識されずに完全に空であるように見える。

10

【0058】

図4には原子力顕微鏡(AFM)により得られた2つの画像(幅10 $\mu$ m)が示されており、これは円板状赤血球(A)およびエキノサイト(B)上に析出した、合計9つの層からなる高分子電解質外被を示している。楕円形の円板状赤血球上に析出した外被はわずかなしわを示すのみである一方で、星形のエキノサイト上の析出プロセスは、その上に本来のテンプレートの突出部さえも認識できるような良好に構造化された外被につながる。このことは図5に示された、エキノサイト上に析出したPSS/PAHの11の層からなる高分子電解質外被の共焦点顕微鏡の画像からよりいっそう明らかになる。最外層はFITCにより標識したPAHからなる。画像の幅は7 $\mu$ mである。スキャンを2つのレベルで1 $\mu$ mの間隔により別々に行った。スキャンAはスライドガラス上に施与した外被上の上部を通過して走行する。この画像上で外被の内部は、突出部の領域においてさえも空であることが認識される。

20

【0059】

図6は共焦点顕微鏡を用いて撮影した、円板状赤血球上に析出した、PSS/PAHの10の層からなる高分子電解質外被の画像を示している。外被を6-カルボキシフルオレsein(6-CF)溶液100 $\mu$ Mを用いて処理した。図6Aでは外被内にフルオレseinが認識される。このことは6-CF分子が外被の内部の侵入できることを示している。

【0060】

100nMの6-CFを用いた外被のインキュベーションの際に蛍光を発見することはできなかった。このことは溶解試薬を用いた処理により6-CFを結合する能力のあるアミノ基がPAHにより分解されるおよび/またはブロックされることを示している。6-CFのわずかな濃度に基づいて溶液の蛍光は背景として検出できるためには少なすぎる。

30

【0061】

気化による例3に記載の高分子電解質外被上へのジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)または両性イオン性の脂質、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)の吸着により安定した脂質層で覆われた高分子電解質外被が得られる。脂質層は外被への6-CFの侵入を十分に阻止する(図6B)。図6Aおよび6B中に記載されている画像の幅は16もしくは15 $\mu$ mである。別の実験は脂質層が少なくとも4週間は安定しており、かつ脂質層上に別の高分子電解質層が、その下に存在する脂質層を破壊することなく析出できることを示している。

40

【0062】

エレクトロローテーション(Elektrorotation)の技術(Arnold et al., J. Phys. Chem. 91 (1987), 5093; Fuhr et al., In: Electromanipulation of Cells, U. Zimmermann und G. A. Neil, Hrgs., CRC Press, Boca Raton (1996), 259-328; Prueger et al., Biophys. J. 72 (1997), 1414)は多層構造の誘電性の区別を可能にする分光分析法である。この場合、kHz範囲~MHz範囲で回転する電界を粒子懸濁液において印加する。誘導されたダイポールモーメントは、電界の回転速度が速すぎ、誘導するべきダイポールモーメントが電界に従うことができない場合に、印加された電界ベクターを有する角度を形成する。結果として該粒子は回転モーメントを得、これは再度認識可能な粒子自体の回転につながる。電子回転のスペクトルは粒子の回転速度の測定により外側の電界の回転数の関数

50

として得られる。

【0063】

図7はコントロールとしての未被覆の高分子電解質外被(A)、DPPA被覆した高分子電解質外被(B)およびDPPCで被覆した高分子電解質外被(C)のための3つの典型的な電子回転スペクトルを示す。外被の外側の水相の導電率は $2.000\mu\text{S}/\text{cm}$ 、 $80\mu\text{S}/\text{cm}$ もしくは $100\mu\text{S}/\text{cm}$ であった。絶縁性の脂質層の存在はkHz範囲におけるマイナスの回転方向につながる。強導電性の高分子電解質外被(約 $10^4\mu\text{S}/\text{cm}$ )は、コントロールにおいてMHz領域で認識可能なプラスのピークを生じる。弱導電性のDPPA層は周波数が高い場合にショートする。DPPC被覆の場合にプラスの回転が存在しないことは脂質の複数層が存在していることを示唆している。この結果は、透過性を制御するために高分子電解質の複数層を脂質で有利に被覆でき、かつ被覆した外被はイオン性の化合物、例えば塩に関してほとんど透過性ではないことを示している。

10

【0064】

空の高分子電解質外被は、有機または無機材料の制御された沈殿または結晶化のためにも使用することができる。このために円板状赤血球をテンプレートとした高分子電解質外被を30mMの6-CF溶液中pH7でインキュベーションする。引き続きpH値は急速に3.5の値に変化し、その際、6-CFは十分に不溶性になる。1~12時間にわたるインキュベーションの後、明らかに完全に6-CFで充填され、かつ空の外被の混合物が得られる。図8Aは高分子電解質外被(10層)の光学顕微鏡による撮影を、および図8Bは相応する走査型電子顕微鏡による画像を示している。完全に暗い画像Aは結晶化した6-CFの顕著な吸着に起因する。SEM画像は、外被の内部で結晶化した6-CFが本来のテンプレートの形をとっていることを示している。画像Aの幅は $8\mu\text{m}$ である。別の実験ではローダミンBをpH値の上昇により沈殿させることができることが示された。作用物質の沈殿はその他の手段、例えば溶剤の交換、塩沈殿などによってもまた誘発することができる。これらの結果は、高分子電解質外被を結晶化もしくは沈殿法のためのテンプレートとして使用できることを示しており、これにより反応により生じたコロイド状の粒子の大きさおよび形の制御が可能になる。

20

【0065】

図9はPAH/PSS外被中でのジアリルジメチルアンモニウムクロリド(DADMAC)のラジカル重合の結果を示している。このために2%のカプセル懸濁液中の3%モノマー溶液に重合開始剤ペルオキシ二硫酸ナトリウム( $30\text{mg}/100\text{ml}$ )を添加し、かつ70で9.5時間重合した。遠心分離により界面層中で合成されるポリマーPDADMACを分離した。100mMの6-CFを用いた処理の後で、PDADMACのアミノ基への色素の結合は明らかに認識することができる。該ポリマーはマイナスのカプセル壁に吸着されるが、しかしカプセルの内部にもみられる。

30

【0066】

9つの層からなる高分子電解質外被([PSS/PAH]<sub>4</sub>PSS)をヒト赤血球上に析出させ、かつテンプレート粒子を除去した。引き続き別の層PAHを施与した。アクリル酸をポリアクリル酸へとラジカル重合するためにカプセルを使用した。このために2%のカプセル懸濁液中の3%のモノマー溶液に開始剤ペルオキシ二硫酸ナトリウム( $30\text{mg}/100\text{ml}$ )を添加し、かつ70で9.5時間重合させた。遠心分離により界面層中で合成されるポリアクリル酸を除去した。100nMのローダミンB(選択的にアニオン基に結合する)の添加後にマイナスに荷電したカプセル壁に、あるいはまたカプセルの内部に吸着されたポリアクリル酸の存在を検出することができた。アクリル酸により媒介される架橋形成に基づいてカプセルの凝集化が行われた。アクリル酸のこの吸着は、外側のマイナスの荷電を有するカプセルの使用により防止することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 電位(A)の変化および蛍光強度(B)の上昇を示す図

【図2】 PSSおよびPAHの層で被覆した円板状赤血球の走査型電子顕微鏡の画像を示す図

50

【図3】 未被覆（A）および被覆した（B）円板状赤血球ならびに被覆した円板状赤血球の溶解後に得られる高分子電解質外被（C）の透過型電子顕微鏡による画像を示す図

【図4】 円板状赤血球（A）およびエキノサイト（B）上に析出した高分子電解質外被の原子力顕微鏡による画像を示す図

【図5】 エキノサイト上に析出し、かつPSS/PAHからなる高分子電解質外被の共焦点顕微鏡による画像を示す図

【図6】 6-カルボキシフルオレセインで充填した高分子電解質外被の共焦点顕微鏡による画像を示す図

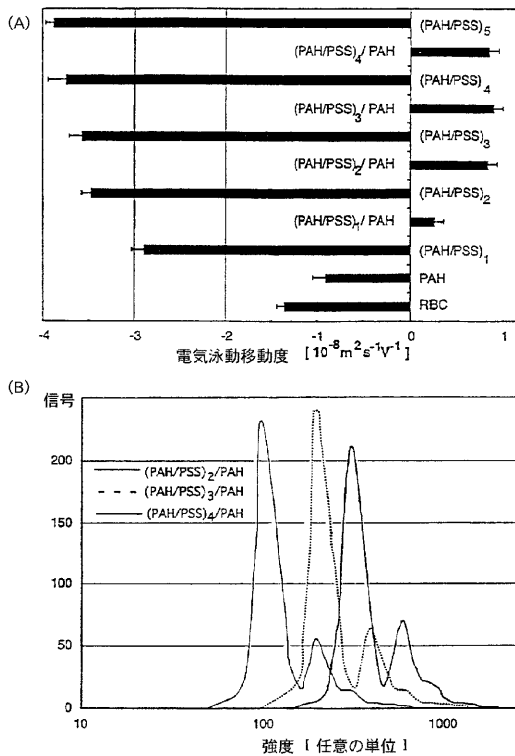
【図7】 付加的な被覆を有していない円板状赤血球上の高分子電解質外被の電子回転スペクトル（A）またはDPPA（B）もしくはDPPC（C）で被覆した円板状赤血球上の高分子電解質外被の電子回転スペクトルを示す図

10

【図8】 光学顕微鏡（A）および相応する走査型電子顕微鏡の画像（B）による円板状赤血球上に析出した高分子電解質外被を示す図

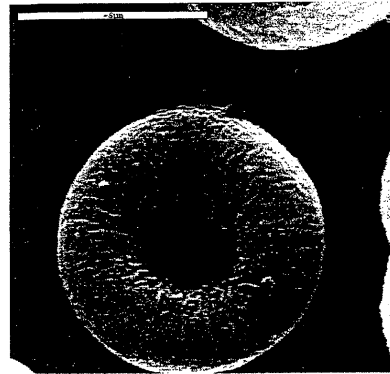
【図9】 高分子電解質外被の外側および内部でのラジカル重合によるポリ（ジアリルメチルアンモニウムクロリド）の画像を示す図

【図1】



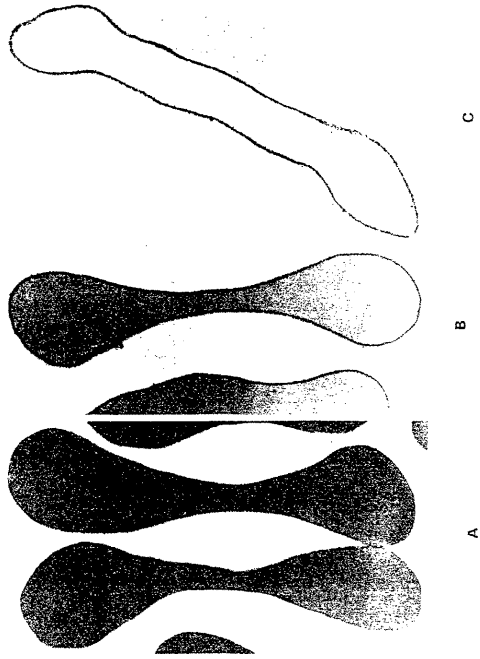
【図2】

Figure 2



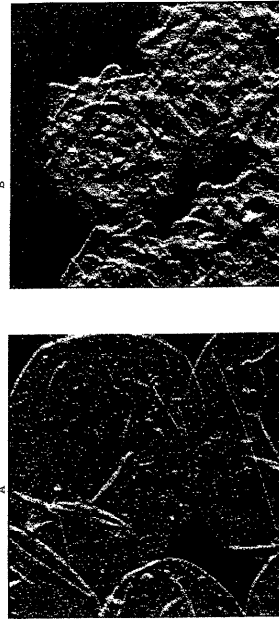
【 3 】

Figur 3



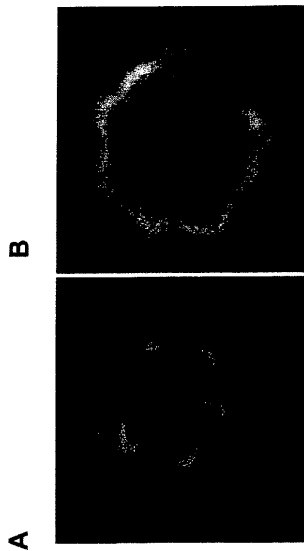
【 4 】

Figur 4



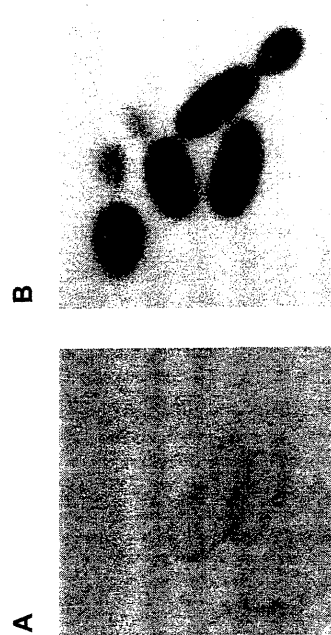
【 5 】

Figur 5

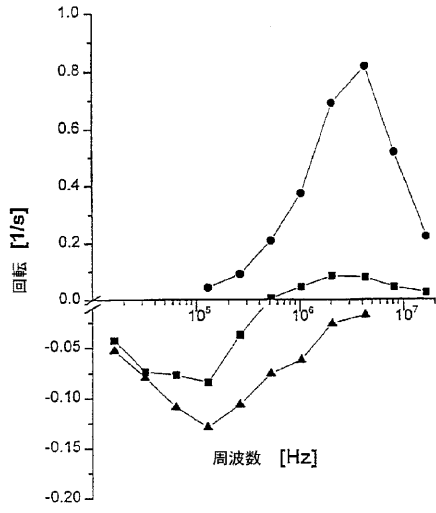


【 6 】

Figur 6

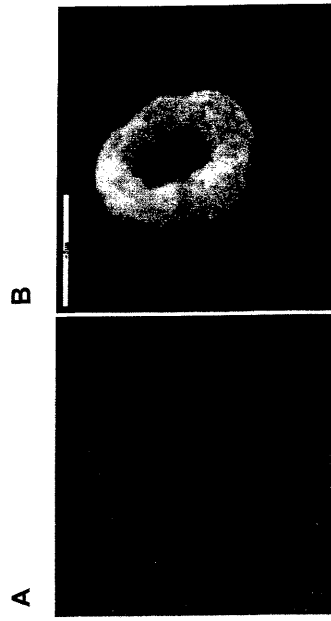


【 図 7 】



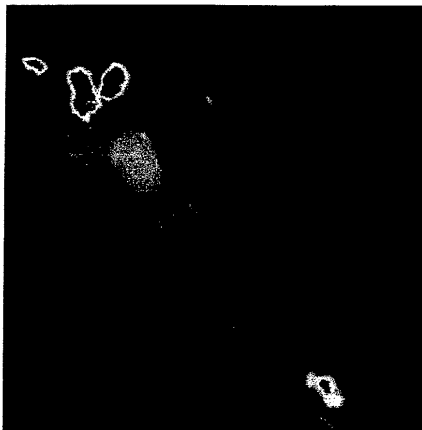
【 図 8 】

Figure 8



【 図 9 】

Figure 9



## フロントページの続き

- (74)代理人 100099483  
弁理士 久野 琢也
- (74)代理人 100114890  
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (74)代理人 230100044  
弁護士 ラインハルト・アインゼル
- (72)発明者 ビョルン ノイ  
ドイツ連邦共和国 ベルリン インヴァリーデンシュトラッセ 101
- (72)発明者 ハンス ボイムラー  
ドイツ連邦共和国 ベルリン クラウスターラー シュトラッセ 30
- (72)発明者 エドウィン ドナート  
ドイツ連邦共和国 ギーゼンホルスト ドレーツァー シュトラッセ 1
- (72)発明者 セルジオ モヤ  
ドイツ連邦共和国 ベルリン カロリンガープラッツ 1
- (72)発明者 グレーブ スホルコフ  
ロシア国 モスクワ ディストリクト ミクロレイオン エービー - 5 - 33 プシーノ (番地なし)
- (72)発明者 ヘルムート メーヴァルト  
ドイツ連邦共和国 ビンゲン ドクトル - ゲバウアー - シュトラッセ 21
- (72)発明者 フランク カルーン  
ドイツ連邦共和国 ベルリン レンネベルクシュトラッセ 6

審査官 谷水 浩一

- (56)参考文献 特表平09-509612(JP,A)  
特開昭60-224627(JP,A)  
特開昭62-213839(JP,A)  
特開平08-310115(JP,A)  
特開平10-005577(JP,A)  
特開平05-138009(JP,A)  
特表平05-504573(JP,A)  
国際公開第95/026714(WO,A1)  
特開昭60-190229(JP,A)  
特表平03-500721(JP,A)  
特表2002-515932(JP,A)  
特表2002-506719(JP,A)  
特表2003-522621(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B01J 13/02-13/22  
A61K 9/00-9/72  
A61K 47/00-47/48  
A23L 1/00-1/035