

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 15 日(15.11.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/153576 A1

- (51) 国際特許分類:
B82B 1/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/62 (2006.01) B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 38/00 (2006.01) B82Y 40/00 (2011.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/058724
- (22) 国際出願日: 2012 年 3 月 30 日(30.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-104251 2011 年 5 月 9 日(09.05.2011) JP
特願 2011-104438 2011 年 5 月 9 日(09.05.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 亀田 直弘 (KAMETA Naohiro) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 丁 武孝(DING Wuxiao) [CN/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合

研究所内 Ibaraki (JP). 増田 光俊(MASUDA Mitsutoshi) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 南川 博之(MINAMIKAWA Hiroyuki) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 和田 百代(Wada Momoyo) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 清水 敏美(SHIMIZU Toshimi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

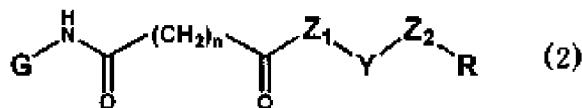
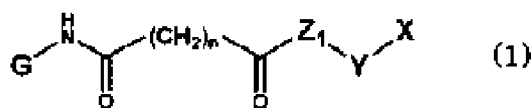
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) Title: ORGANIC NANOTUBE HAVING HYDROPHOBIZED INNER SURFACE, AND ENCAPSULATED MEDICINAL AGENT PREPARED USING THE NANOTUBE

(54) 発明の名称: 内表面疎水化有機ナノチューブ、および同ナノチューブを用いた薬剤カプセル化物



(57) Abstract: Provided is an organic nanotube having a hydrophobized inner surface, which has a hydrophilized outer surface and a hydrophobized hollow cylinder inner surface, comprises an asymmetric bicipital lipid molecule represented by general formula (1) and a derivative thereof represented by general formula (2), and is formed by binary self-assembly. In formulae (1) and (2), the same symbols have the same meanings, wherein G represents a 1-glucopyranosyl group or a 2-glucopyranosyl group; and n represents an integer of 12-22. Particularly, an asymmetric bicipital lipid molecule and an ester thereof respectively represented by general formulae (1) and (2) wherein n = an integer of 18-22, Z1 = Z2 = a single chain, Y = Gly, m's = independently an integer of 3-6, X = OH, and R = a methoxy group, an ethoxy group, or a benzyloxy group are novel substances, and can form a carboxylic-acid-type asymmetric nanotube alone or a binary system thereof can also form the carboxylic-acid-type asymmetric nanotube by binary self assembly.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/153576 A1



ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー 添付公開書類:

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

外表面が親水性であって、中空シリンダー内表面が疎水化された内表面疎水化有機ナノチューブであって、下記一般式 (1) で表わされる非対称双頭型脂質分子と共に、下記一般式 (2) で表されるその誘導体が含まれており、かつ二成分系自己集合により形成されている内表面疎水化有機ナノチューブを提供した。式 (1) 及び式 (2) において記号の意味は同一であり、式中、G は 1-グルコピラノシル基または 2-グルコピラノシル基であり、n は 12 ~ 22 の整数である。特に、前記一般式 (1) 及び (2) において、n = 18 ~ 22 の整数、Z₁ = Z₂ = 単鎖、Y = Glc, m は同一もしくは異なる 3 ~ 6 の整数、X = OH、R が、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジロキシ基の場合の非対称双頭型脂質分子及びそのエステルは、新規物質であり、単独でも、二成分系でも自己集合によりカルボン酸系非対称ナノチューブを形成する。

明 細 書

発明の名称：

内表面疎水化有機ナノチューブ、および同ナノチューブを用いた薬剤カプセル化物

技術分野

[0001] 本発明は、外表面が親水性であって、中空シリンダー部分の内表面が疎水化された中空繊維状ナノチューブ（内表面疎水化有機ナノチューブ）及びその製造方法、並びに当該内表面疎水化有機ナノチューブを用いた変性タンパク質のリフォールディング方法、及び疎水性薬剤のカプセル化方法、徐放方法とその制御に関する。

背景技術

[0002] 的確な分子設計が施された両親媒性分子が水中で自己集合することによって可逆的に形成するチューブ状構造体は、内外表面が親水基で被覆されており、水中へ容易に分散すると共に、その内径5～100nmの親水性中空シリンダーには、低分子のみならず、タンパク質（天然状態の）やDNAといった生体高分子、種々のナノ粒子等の親水性ゲストを包接可能である。また、pH、温度、光、添加剤等の外部刺激に応答して、包接した親水性ゲストの貯蔵と放出の制御が可能であり、特にバイオや医療分野で注目を集めている（非特許文献1）。これらの諸特性を用いることで、薬剤送達用および薬剤徐放用のカプセルやタンパク質などの固定マトリクスおよび保存カプセル等への応用が期待されている（非特許文献2、3）。しかし、従来の大多数の有機ナノチューブは、内外表面が同じ親水部で被覆されているため、薬剤やタンパク質などの材料を有機ナノチューブ内部へ選択的かつ効率的にカプセル化することは困難であった（非特許文献4、5、6）。具体的には、諸材料のカプセル化に際し、有機ナノチューブ内部の水を減圧下での凍結乾燥などで除去した後、材料を分散・溶解させた水溶液を添加し再水和させる（いわゆる毛細管現象）という煩雑な操作が必要とされていた（非特許文献4、

5)。

本発明者らは、これまでに疎水部アルキレン鎖の両端に異なる二つの親水基を有する非対称双頭型脂質分子の水中での自己集合により、内外表面がそれぞれの親水基で被覆された単分子膜構造から成る有機ナノチューブ（非対称有機ナノチューブ）の製造技術を開発している（特許文献1、非特許文献1）。最近、2-グルコサミンとオリゴグリシンが長鎖ジカルボン酸の両端にそれぞれアミド結合を介して結合した非対称双頭型脂質分子であり、ドキソルビシンなどアミノ基含有薬剤などを包接して徐々に放出することができ、優れた薬剤カプセルとしての特性を備えた非対称ナノチューブを開発して、特許出願している（特願2010-194544号）。非対称有機ナノチューブの内表面には、親水性ゲストと相互作用可能な官能基を位置特異的に配置できるため、親水性ゲストを選択的且つ効率的に非対称有機ナノチューブの中空シリンダーに包接できる。また外部から刺激を与え、非対称有機ナノチューブ内表面と親水性ゲスト間の相互作用を減ずることで、親水性ゲストのバルク中への放出も制御可能である。例えば、非対称有機ナノチューブ内表面に配置したアミノ基のプロトン化によりカチオン性を帯びた中空シリンダー内には、アニオン性の親水性ゲストとして、低分子、オリゴDNA、二重らせんDNA、タンパク質、ナノ粒子等の選択的且つ効率的包接が可能であった。外部刺激として、溶液中のpHを変化させ、非対称有機ナノチューブ内表面アミノ基の脱プロトン化を行うことで、包接していた親水性ゲストをバルク中へと徐放可能であった。

[0003] 薬剤を簡便かつ効率的にカプセル化し、安定に保持するとともに、ガン細胞など病変部位のターゲット細胞や組織内で持続的に放出できるカプセル化剤の開発が望まれている。特にがん治療において広く用いられるドキソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、ピラルビシンなどのアントラサイクリン系抗癌剤は、毒性、特に心臓毒性が強いため、癌細胞に直接効果的に送達し、かつ持続的な徐放が可能な優れたカプセル化剤が求められていた。また薬剤の投与回数や投与量を抑制し、結果として患者の負担

軽減ができる観点から、薬剤徐放速度の制御技術が強く望まれていた。

このような観点から行われた、リポソーム系薬剤ナノカプセル（非特許文献7）の場合は、pH勾配を用い、その後の精製が必要なため、調製が複雑で長時間必要であった。

これに対して、本発明者らの以前に開発した親水性ゲストを中空シリンダー内に包接できる上記非対称ナノチューブ（特願2010-194544号など）は、カルボン酸性内表面を有しているため、ドキソルビシンを含め、アミノ基含有薬剤などに対しては、ナノチューブと薬剤を水中で混合するだけで、簡便かつ効率的に薬剤のカプセル化が可能となり、周囲のpH変化に応じた徐放機能もあるという優れた特性を備えているので、薬剤カプセルとしての応用に極めて有効なものである。

しかしながら、本発明者らが開発した従来の非対称ナノチューブの場合、生理的な条件下で、カプセル化した薬剤の徐放特性を精密に制御する方法論が無いことと共に、チューブ自体の安定性に関しても依然として下記の問題点があり、厳密な徐放制御の課題が解決されたものとはいえなかった。

具体的には、従来のカルボン酸系の非対称双頭型脂質分子群では、生理的条件下で早いものでは2時間放置しただけで、最長でも12時間近くさらすと、徐々に非対称ナノチューブから別の形態に変化してしまい、薬剤徐放特性が失われるという問題があった。より具体的には1-グルコピラノシル基が長鎖ジカルボン酸の一端でアミド結合を介して結合した脂質分子が形成する非対称ナノチューブ（非特許文献8）は、生理的条件下（例えばPBSバッファー、pH7.5）で、約4時間後で徐々に外径120nm~200nm程度のマイクロチューブや針状結晶などに変化する。さらには、従来の非対称ナノチューブは、その製造過程において、マイクロチューブやテープ状の集合体が同時に生成してしまうため、遠心分離などによるナノチューブの分離精製工程が必要であった。加えて、室温下または冷蔵での長期保存の際に結晶化しやすく、長期的保存安定性がそれほど高くない問題点もあった。

このようなナノチューブ製造時に分離精製が必要で、ナノチューブ状態が

長期保存安定性に欠けるという問題点は、上記カルボン酸系非対称双頭型脂質分子のカルボン酸末端側の領域に、モノおよびジグリシン残基を導入した非対称双頭型脂質分子が開発されたことでかなり解決でき、当該脂質分子により形成される非対称ナノチューブではミリQ水中で長期保存性も高まった（非特許文献9，10）。しかしながら、これら非対称ナノチューブにおいても、生理的条件下（PBSバッファー、pH7.5）にさらすと、ナノチューブの内径が7nm前後であったものが50nm前後にまで変化するという点に課題が残っていた（実施例5において後述）。

本発明者らの最近開発した非対称有機ナノチューブ（特願2010-194544号）でも、生理的条件下に数時間さらすと、ファイバー状構造に変化してしまう問題点は解決しておらず、生体に薬剤カプセルとして投与する際の徐放性のさらなる向上が必要であり、より厳密な徐放制御が求められる。

[0004] また、上述のように、病変部に直接薬剤を届けようとするデリバリーシステムで対象となる薬剤は、ドキソルビシンをはじめ抗癌剤などでは、疎水性の高い薬剤が多く、疎水性ゲストを病変部まで運搬し、かつ病変部において徐々に放出することができるカプセル化剤が不可欠である。

従来の疎水性分子を内包させる技術として、シクロデキストリンの1nm前後の空孔に包接可能な疎水性低分子に限っては、シクロデキストリンとの複合体を形成させることで、両親媒性分子による有機ナノチューブの親水性中空シリンダーに包接可能であり、また水中に放出させることもできる（特許文献2）。しかしながら、複合体の調製には煩雑な操作を必要とするだけでなく、その収率は低い。また、当該文献中に記載されている有機ナノチューブは二分子膜構造をとるため内外表面が同一の親水基で覆われているので、シクロデキストリン複合体を中空シリンダー内に選択的に包接することはできず、中空シリンダー内表面とシクロデキストリン複合体との間に特別な相互作用がないので、放出を制御することもできない。

1nm～3nmの疎水性低分子を有機ナノチューブの膜壁内に分散して包埋するインターカレート型の有機ナノチューブが開発されており（特許文献

3)、有機ナノチューブの形態を維持したまま、脂質分子に対して10%程度の疎水性低分子の包埋が可能であり、水中に分散させることもできる。しかしながら、膜壁内に包埋された疎水性低分子を放出させるには、有機ナノチューブを添加剤により分解したり、またゲルー液晶相転移温度以上への加熱によって膜壁を流動状態にする必要がある(非特許文献11)。この場合、疎水性低分子の放出は比較的速く起る。

内外表面が共に疎水基で被覆された有機ナノチューブも開発されてはいるが、疎水性低分子や疎水性ナノ粒子等を吸着するのは内外表面であり、むしろ外表面に主に吸着されるため(特許文献4)、当然のことながら、当該有機ナノチューブは疎水性分子を水中へ分散させることはできない。

このように、外表面は親水性であり内表面のみが疎水化された有機ナノチューブであって、疎水性の中空シリンダー内部が十分なスペースを有し、かつ内表面と疎水性ゲストが直接相互作用可能で、しかも有機ナノチューブの形態を保ったまま疎水性ゲストを放出させることができる有機ナノチューブは未だに実現されておらず各界から切望されていた。このような有機ナノチューブを構築することができれば、疎水性低分子のみならず疎水性高分子、疎水性ナノ構造体を選択的に中空シリンダーに包接し、水中へ分散することが可能であり、従来技術(特許文献2)と異なり、有機ナノチューブ内表面と疎水性ゲストが直接相互作用可能であるため、外部からの刺激でその相互作用を減じることができれば、放出の制御も可能である。また、従来技術(特許文献3)のように有機ナノチューブを分解させたり、膜壁を流動状態にしなくても有機ナノチューブの形態を保ったまま疎水性ゲストを放出させることができる。

そして、本発明者らの最近開発した上述の非対称有機ナノチューブ(特願2010-194544号)でも、ドキシソルビシンのような疎水性の高い薬剤の場合など疎水性ゲストの場合には十分な徐放特性が得られない点、及び厳密な徐放制御の観点からは十分なものとはいえなかった。

[0005] ところで、疎水性分子の包接に関しては、従来から、遺伝子組換えタンパ

クなどに対する効率の良いリフォールディングについての要望もあった。

すなわち、変性により疎水基が一部露出したタンパク質（変性タンパク質）を包接可能なナノ空間材料の開発が、正常タンパク質の大量調製という観点から、工業的にも切望されている。多孔質無機材料である β -ゼオライトは、変性タンパク質の吸着が可能である（非特許文献12）。変性剤を洗浄後、ポリエチレングリコールや界面活性剤を含む緩衝液を加えると、 β -ゼオライトからタンパク質が脱離し、正常な構造へと巻き戻る（リフォールディング）ことが報告されている。また、親水性高分子である多糖に疎水基としてコレステリル基を導入した両親媒性高分子は、水中で自己集合して20～30 nmのゲル（ナノゲル）を形成する（非特許文献13）。ナノゲルの内部空間に変性タンパク質を包接化した後、シクロデキストリンを添加することでナノゲルを崩壊させると、タンパク質の放出と同時にリフォールディングが起こることが報告されている（非特許文献14）。しかしながら、 β -ゼオライト、ナノゲル、どちらの系においても、得られてくるタンパク質溶液には、ポリエチレングリコールや界面活性剤、シクロデキストリン、そしてシクロデキストリンと疎水化多糖の複合高分子が含まれており、それら他成分を除去するための煩雑な分離操作が必要となる。

[0006] 以上の技術的な背景から、上記の全ての課題を解決できる中空シリンドラ部分の内表面のみが疎水化された有機ナノチューブ（内表面疎水化有機ナノチューブ）の開発が強く期待されていた。すなわち、疎水性ゲストとして変性タンパク質を選択的且つ効率的に包接可能なだけでなく、リフォールディングを補助する機能を有し、特別な添加剤を加える必要無く正常タンパク質を放出できる内表面疎水化有機ナノチューブの提供が切望されていた。また、疎水性ゲストとしてドキシソルピシン等の薬剤を選択的且つ効率的に包接可能なだけでなく、外部環境に応じて薬剤をバルク中へと徐放できる内表面疎水化有機ナノチューブの提供が切望されていた。

特に薬剤徐放制御において、内表面がカルボキシル基で被覆された安定なカルボン酸系の非対称ナノチューブ群における従来からの優れた特性は維持

しつつ、かつ生理的条件下（例えばPBSバッファー中、pH 7.5、35℃）においても長時間に亘り安定なチューブ構造を維持することが可能な非対称ナノチューブを提供すること、及びそのための新規な非対称双頭型脂質分子を提供することが強く期待されていた。すなわち、マイルドな条件で非対称ナノチューブを選択的かつ高収率に製造でき、得られる非対称ナノチューブが長期保存安定性を有すると共に、ドキシソルビンなどのカチオン性薬剤を効率的に高濃度でカプセル化でき、しかも生理的条件下でそのチューブ形態が安定である、という全ての条件を満たすような、徐放制御に優れたナノチューブ状カプセル化物を製造できる非対称双頭型脂質分子の提供が切望されていた。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第4 1 7 4 7 0 2号公報

特許文献2：特開2 0 0 9－1 3 6 9 7 5号公報

特許文献3：特開2 0 0 8－2 6 4 8 9 7号公報

特許文献4：特開2 0 1 0－0 0 5 7 0 6号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：亀田ら， 高分子論文集 67, 560 (2010).

非特許文献2：Chia-Chun, C. et al., Advanced Materials, 17,404(2005).

非特許文献3：Martin, C. et al., Adv. Mater.,18,405(2006).

非特許文献4：Shimizu, T. et al., Chem. Mater.,16, 2826 (2004).

非特許文献5：Yui, H. et al., Chem. Lett., 34,232(2005).

非特許文献6：“環状・筒状超分子新素材の応用技術”、高田十志和 編集、シーエムシー出版、東京、P138-149(2006).

非特許文献7：O'Brien, M.E., Ann. Oncol., 15,440(2004).

非特許文献8：Masuda, M. et al., Langmuir, 20, 5969(2004).

非特許文献9：Lee, S.J., 第58回高分子討論会予稿集，発表番号1Pe047 (2009).

非特許文献10 : Lee, S.J., The 1st FAPS Polymer Congress, Abstract, (Nagoya), Poster No. 22PS2-006b (2009).

非特許文献11 : Kameta, N. et al., Soft Matter, 7, 85 (2011).

非特許文献12 : Mizukami, F., Anal. Biochem., 348, 307 (2006).

非特許文献13 : Akiyoshi, K., Bioconj. Chem., 10, 321 (1999).

非特許文献14 : Akiyoshi, K., Polym. J., 42, 823 (2010).

非特許文献15 : Kameta, N., et al., Small, 4, 561 (2008).

非特許文献16 : Lubineau, A., Carbohydr. Res., 266, 211 (1995).

非特許文献17 : Reinhard, R.R., J. Org. Chemistry, 30, 1450 (1965).

非特許文献18 : Kameta, N. et al., Chem. Mater., 21, 5892 (2009).

非特許文献19 : N. Kameta et al., Langmuir 23, 4634 (2007).

非特許文献20 : N. Kameta et al., Chem. Lett. 36, 896 (2007).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、外表面が親水性、中空シリンダー部分の内表面のみが疎水化された有機ナノチューブ（内表面疎水化有機ナノチューブ）を提供しようとするものである。また、変性タンパク質を選択的且つ効率的に包接可能なだけでなく、リフォールディングを補助する機能を有し、特別な添加剤を加える必要無く正常タンパク質を放出できる内表面疎水化有機ナノチューブであって、しかも、ドキシソルビンなどの疎水性薬剤を高濃度に包接可能であり、その内表面の疎水性変化や外部刺激に応じて徐放機能を有する内表面疎水化有機ナノチューブ、及び包接化組成物を提供することを目的とする。さらには、生理的条件下で安定なチューブ構造を維持することが可能な、内表面がカルボキシル基とそのエステル又はさらに疎水性アミド誘導体との混合物で被覆された非対称ナノチューブを形成することができる新規な非対称双頭型脂質分子を提供しようとするものである。また、これら非対称双頭型脂質分子を用いることで、ドキシソルビンなどのカチオン性薬剤を効率的に高濃度でカプセル化でき、かつ生理的条件下でチューブ構造を損なうことなく、同

薬剤の徐放にすぐれた非対称ナノチューブを形成させることを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、以前疎水部メチレン鎖の両端に親水部として1-グルコピラノシル残基とオリゴグリシン残基を有する非対称双頭型脂質分子とそのオリゴグリシン末端アミノ基に親水性蛍光プローブ Alexa を連結した誘導体の二成分系自己集合により、外表面が1-グルコピラノシル基、内表面がオリゴグリシンアミノ基と Alexa で被覆された非対称有機ナノチューブを形成することを報告した（非特許文献15）。

今回新たに、下記一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子とその誘導体であり末端に疎水性官能基を有する一般式（2）の二成分系自己集合により、内表面のみに疎水性官能基が配置された有機ナノチューブ（内表面疎水化有機ナノチューブ）を形成できることを見出した。

内表面疎水化有機ナノチューブは、一般式（1）のみで形成される有機ナノチューブと比較し、疎水基が露出した変性タンパク質の中空シリンダー内への包接化率、正常タンパク質へのリフォールディング効率共に高いことが明らかとなった。この中空シリンダー内の正常タンパク質は、添加剤を必要とすることなく、pH刺激によりバルク水中へと放出させることも可能であった（リフォールディング機能）。

また、内表面疎水化有機ナノチューブは、一般式（1）のみで形成される有機ナノチューブと比較し、より多くの疎水性薬剤を包接でき、分散溶媒のpH変化により中空シリンダー内に包接した疎水性薬剤をバルク水中へと放出できることを見出した。驚くべきことに、一般式（1）と一般式（2）の比率を変えて内表面の疎水性を変化させることで、疎水性薬剤の徐放性が制御できることが明らかとなった（疎水性薬剤徐放性制御機能）。

[0011] さらに、上記の内表面疎水化ナノチューブを構成している一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子、およびそのエステルのうち、オクタデカメチレン鎖以上の長さを持つ疎水部アルキル鎖の片端にグルコピラノシル基

、もう一端にカルボン酸を有する非対称双頭型脂質分子であって、1又は2残基からなるオリゴグリシンを含む脂質分子（非特許文献9，10）において、オリゴグリシン残基をさらに3～6残基にまで増加させた、新規な非対称双頭型脂質分子を合成した。この新規な非対称双頭型脂質分子は、従来の非対称双頭型脂質分子と同様に、自己集合によりカルボン酸系非対称ナノチューブを形成し、しかも、生理的条件下におけるチューブ状構造の安定性が飛躍的に高まることを見出した。具体的には、生理的条件下に32時間以上放置しても安定なチューブ状構造を維持していた。非対称双頭型脂質分子の末端カルボン酸を、メチルエステルなどのエステルに置換した場合も同様に安定な非対称ナノチューブを形成できることを確認した。

また、上記非対称双頭型脂質分子は、末端に遊離カルボキシル基を有する場合も、エステル基を有する場合も、単独でも混合した場合でも非対称ナノチューブを形成できる。このカルボン酸系非対称ナノチューブは、驚くべきことに薬剤のカプセル化効率も格段に高まり、本発明者らが以前開発したカルボン酸系非対称ナノチューブ（特願2010-194544号）と比較しても、ミリQ水中でドキシソルビシンをカプセル化する際の効率が、pH6.5、ナノチューブとドキシソルビシンの仕込み比が5/1の時に、75%から95%以上に改善され、定量的なカプセル化が可能になったばかりでなく（図18）、生理的条件下での徐放特性も格段に優れていることが明らかとなった（図19）。

さらに、本非対称ナノチューブは、pHを、弱酸性条件（pH5.5）とすることで、中性条件（pH7.4）に較べて2倍以上の速度で放出する特性を有しており、一般的にがん組織は他の正常組織と較べて弱酸性（pH6.5）側であることからみて、本非対称ナノチューブを抗癌剤用の薬剤カプセルとして用いれば、ガン組織で選択的に薬剤の放出が期待できる。

[0012] 具体的には、本発明は以下の通りである。

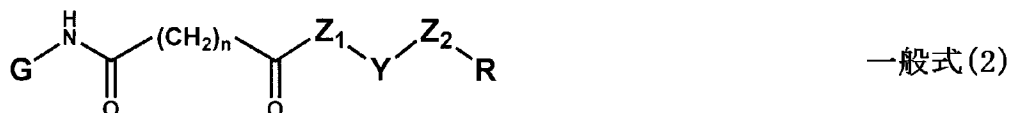
〔1〕 下記一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子と共に、下記一般式（2）で表されるその誘導体が含まれており、かつ二成分系自己集合

により形成されている内表面疎水化有機ナノチューブ；

[化1]



[化2]

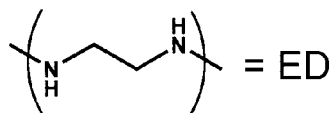


式(1)及び式(2)において記号の意味は同一であり、式中、Gは1-グルコピラノシル基または2-グルコピラノシル基である。

nは12～22の整数である。

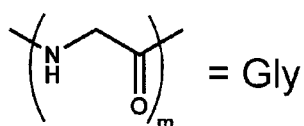
[化3]

Z₁とZ₂は、単鎖または

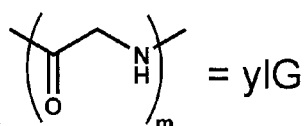


であり、Z₁がEDのとき、Z₂は単鎖である。

Yは



または



であり、mは2～6の整数

Xは、YがG | yのときOHであり、Yがy | GのときHである。

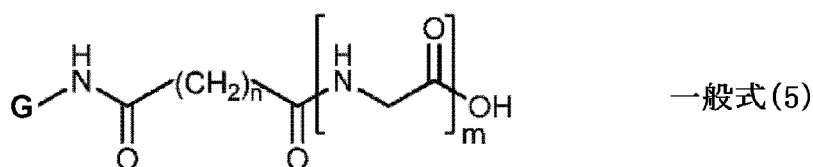
Rは、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、アセチル基、エチルカルボニル基、プロピルカルボニル基、炭素数1～4のアルコキシ基、ベンジルオキシ基、または疎水性アミノ酸である。

〔2〕 前記Rが、炭素数1～4のアルコキシ基のうち、メトキシ基、エトキシ基、もしくはt-ブトキシ基であるか、または疎水性アミノ酸のうち、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、もしくはトリプトファンである、〔1〕に記載の内表面疎水化

有機ナノチューブ。

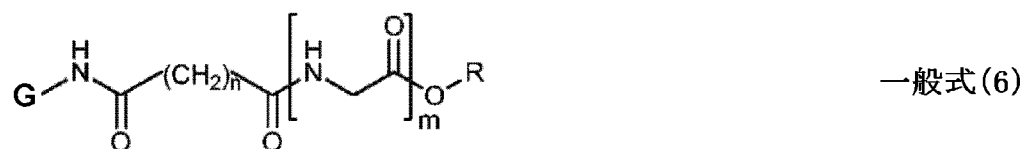
〔3〕 前記一般式（１）及び（２）において、式中、 $n = 18 \sim 22$ の整数、 $Z_1 = Z_2 =$ 単鎖、 $Y = G$ 、 $Y =$ 、 m は同一もしくは異なる $3 \sim 6$ の整数、 $X = OH$ 、 R が、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジルオキシ基であって、それぞれ下記一般式（５）及び一般式（６）で表される非対称双頭型脂質分子から形成されるカルボン酸系非対称ナノチューブであることを特徴とする、〔１〕に記載の内表面疎水化有機ナノチューブ；

〔化7〕



（式中、 n は $18 \sim 22$ の整数、 m は $3 \sim 6$ の整数を表す。）

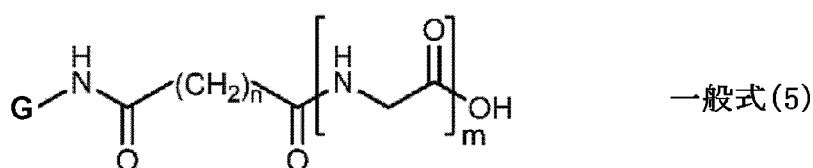
〔化8〕



（式中、 n は一般式（１）の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる、 $3 \sim 6$ の整数を表す。 R は炭素数 $1 \sim 4$ の直鎖状アルキル基を表す）。

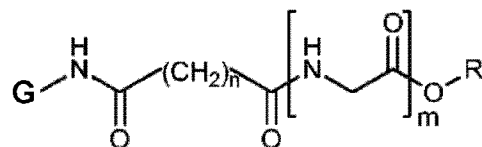
〔４〕 下記一般式（５）又は一般式（６）で表される非対称双頭型脂質分子もしくはその塩又はそのエステル；

〔化7〕



（式中、 n は $18 \sim 22$ の整数、 m は $3 \sim 6$ の整数を表す。）

[化8]



一般式(6)

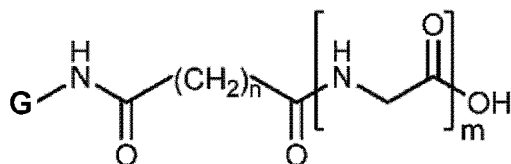
(式中、 n は一般式(5)の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる、3～6の整数を表す。 R は炭素数1～4の直鎖状アルキル基を表す)。

〔5〕 前記〔4〕に記載の非対称双頭型脂質分子もしくはその塩、又はそのエステル of いずれかが単独で又は両者が混合された状態で自己集合により形成された、カルボン酸系非対称ナノチューブ。

〔6〕 水性溶媒中において、一般式(1)で表わされる非対称双頭型脂質分子と共に、一般式(2)で表されるその誘導体を混合し、二成分自己集合させることを特徴とする、〔1〕～〔3〕及び〔5〕のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの製造方法。

〔7〕 下記一般式(5)又は(6)で表わされる非対称双頭型脂質分子又はそのエステルを、単独で又は両者を混合してジメチルスルホキシドやジメチルホルムアミドまたは水に分散し、加熱溶解後冷却することを特徴とする、カルボン酸系非対称ナノチューブの製造方法。

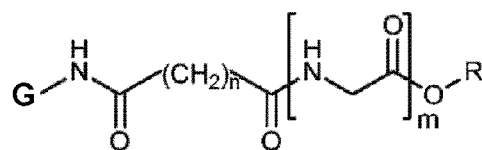
[化7]



一般式(5)

(式中、 n は18～22の整数、 m は3～6の整数を表す。)

[化8]



一般式(6)

(式中、 n は一般式(1)の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる

、3～6の整数を表す。Rは炭素数1～4の直鎖状アルキル基を表す）。

〔8〕 前記〔1〕又は〔2〕に記載の内表面疎水化有機ナノチューブを有効成分として含むタンパク質リフォールディング剤。

〔9〕 変性タンパク質を、〔1〕又は〔2〕に記載の内表面疎水化有機ナノチューブと共に水性溶媒中において分散させることにより、当該有機ナノチューブ内に包接させることを特徴とする、変性タンパク質のリフォールディング方法。

〔10〕 変性タンパク質を、前記非対称双頭型脂質分子とその誘導体とを混合して二成分自己集合させる際の水性媒体中に添加しておくことを特徴とする、〔9〕に記載のリフォールディング方法。

〔11〕 前記〔1〕又は〔2〕に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの疎水性中空シリンダー内に変性タンパク質が包接されている、リフォールディングされた正常タンパク質の放出用組成物。

〔12〕 前記〔1〕～〔3〕及び〔5〕のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブを有効成分として含む疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤。

〔13〕 疎水性薬剤を、〔1〕～〔3〕及び〔5〕のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブと共に水性溶媒中において分散させることにより、当該有機ナノチューブ内に包接させることを特徴とする、疎水性薬剤のカプセル化方法。

〔14〕 疎水性薬剤を、前記非対称双頭型脂質分子とその誘導体とを混合して二成分自己集合させる際の水性媒体中に添加しておくことを特徴とする、〔13〕に記載のカプセル化方法。

〔15〕 前記〔1～3〕及び〔5〕のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの疎水性中空シリンダー内に疎水性薬剤が包接されていることを特徴とする、カプセル化された疎水性薬剤組成物。

〔16〕 前記〔12〕に記載の疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤が、〔3〕又は〔5〕に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブを有効成分として含

むカチオン性薬剤徐放用である、疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤。

〔１７〕 前記〔１５〕に記載の疎水性薬剤組成物が、〔３〕又は〔５〕に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブがカチオン性薬剤を包接し、カチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を形成している、カプセル化された疎水性薬剤組成物。

〔１８〕 前記〔３〕又は〔５〕に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブがカチオン性薬剤を包接していることを特徴とする、カチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体。

〔１９〕 前記〔１８〕に記載のカチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を有効成分とする、カチオン性薬剤組成物。

〔２０〕 カチオン性薬剤がアミノ基を有するアントラサイクリン系抗癌剤である、前記〔１９〕に記載のカチオン性薬剤組成物。

発明の効果

[0013] 本発明により、二成分系自己集合によって、内表面のみが疎水化された有機ナノチューブである「内表面疎水化有機ナノチューブ」を簡便且つ１００％の収率で形成させる手法を確立することができた。疎水性の低分子から高分子までのゲストを対象として制御可能に包接・貯蔵・放出を行うことができ、変性タンパク質の場合は正常タンパク質へのリフォールディング機能も有する。特に、変性タンパク質や抗がん剤であるドキソルビシン等をゲストの対象にできたことは、次世代人工分子シャペロンシステムや次世代ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待できる。本発明技術は、バイオや医療分野のみならず、疎水性物質の水分散化とその徐放機能が望まれている化粧品やその他機能性材料分野においても重要である。

また、本発明により、内表面がカルボキシル基、外表面が糖残基で被覆された「カルボン酸系非対称ナノチューブ」において従来困難であった、生理的条件下（ｐＨ７．４、ＰＢＳバッファ中）のような高塩濃度においてもチューブ形態を３０時間以上の長期にわたって保持する非対称ナノチューブを製造することができる。

本発明のカルボン酸系非対称ナノチューブは水、水性溶媒又は有機溶媒のいずれにおいても高い分散性を示す。水性溶媒中に高濃度存在させても結晶化を起こすことなく、長期保存における安定性も非常に高く、 5 mg/ml といった比較的高濃度の水分散液で2ヶ月以上安定に保存可能である。また、この非対称ナノチューブを構成する非対称双頭型脂質分子は新規化合物であって、その原料となる β -D-グルコピラノシルアミン、長鎖ジカルボン酸及びオリゴグリシン類は安価であり、例えば一般式(1)のうち、Gが1-グルコピラノシル基、nが18-22の整数、 Z_1 が単鎖、Yが Gly 、 $m=3\sim6$ の整数であれば、5段階の穏和な条件での合成反応により製造でき、精製にはカラムクロマトグラフィーを使う必要がなく、全て再沈殿工程で高純度の脂質を得ることができる。同様に上記一般式(1)のエステル誘導体に対応する一般式(2)化合物(Gが1-グルコピラノシル基、nが18-22の整数、 Z_1 と Z_2 が単鎖、Yが Gly 、 $m=3\sim6$ の整数、Rが炭素数1-4のアルコキシ基やベンジルオキシ基)では、4段階で同様に合成出来る。このような非対称ナノチューブ形成性脂質分子の合成および精製が簡便であり、非対称ナノチューブも温和な条件で簡単に製造できる点は、薬剤キャリアとしてのカプセルの大量合成および最終的な薬剤組成物の低価格化の点でも重要である。

そして、本発明のカルボン酸系非対称ナノチューブの長期保存安定性や高濃度での良分散性は、抗癌剤治療においてそれぞれ薬剤の安全性の点や患者の負担軽減を図るために経静脈投与する全液量を可能な限り減らす点で必要不可欠である。また本内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブは外径が僅か15nmで、自己集合条件を変えることで長さも約100nm~10 μ mまで調節可能である。このためEPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果によって、ガン組織へ送達する量が高めることが可能となる。このように、本発明の非対称ナノチューブが備えているこれら安定性や良分散性といった特性は、薬剤キャリアとしての優れた特性の1つである。

また、本発明のカルボン酸系非対称ナノチューブや一部の内表面疎水化ナノチューブは内側が少なくとも部分的にはカルボキシル基に覆われ、中性付近のpHでは負の電荷を帯びているので、ドキソルビシンのようなアミノ基を有する薬剤やカチオン性薬剤を混合するだけで、薬剤のカプセル化が可能であるという優れた特性を有する。調製が複雑な従来のリポソーム系の薬剤カプセルは治療時に任意の比率で混合することは不可能であり、あらかじめ薬剤をカプセル化したもののみが市販されていたが、本発明では、薬剤カプセルとしてのナノチューブを医療現場で速やかに調整することや、ナノチューブ分散液と薬剤を治療時に任意の割合で混合することでカプセル化が可能である。上記したように原料の脂質合成やナノチューブの調製が極めて容易なため、安価な薬剤カプセルとして提供することも可能である。そして、本発明の非対称ナノチューブは生理的条件下では、その形態を変化させることなく、チューブ両端の空孔からカプセル化された薬剤を徐放することができる。また低pHの環境では、チューブ内表面を被覆するカルボキシル基のイオン化度が減少し、カチオン性の薬剤との静電相互作用が弱められることによって、効率的に薬剤を放出することができる。このため、上記EPR効果によるがん組織へのナノチューブの選択的送達に加え、がん組織特有の低pH環境での効率的な薬剤放出が可能である。さらに、がん細胞内に取り込まれたナノチューブ複合体の場合は、エンドソーム内での低いpH環境による速やかな放出が可能となる。

発明者が以前に報告した非対称双頭型脂質分子（非特許文献9）は、本発明のカルボン酸系非対称双頭型脂質分子とは、構造上ではアルキル鎖長がほぼ同じ（ $n = 18$ ）か若干短く（ $n = 14$ 、 16 ）、グリシン残基数が少ない（ $m = 1$ 又は 2 ）という程度の差異しかいないため製造工程もナノチューブへの組織化工程もほぼ一致している上に、得られる非対称ナノチューブの形状でもきわめて類似している。このように類似した非対称ナノチューブであっても従来のものは、生理的条件下に置くと1時間以内で、内径が7 nm程度から50 nm程度に、外径では15 nm程度から100～150 nm程度

に速やかに変化するため、包接されたゲストも直ちに放出し、徐放性は持たないし、放出速度の制御も出来なかった。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]化合物-2c (式(2)中、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ 、 Z_2 =単鎖、 $X=メトキシ基$) の ^1H-NMR (重ジメチルスルホキシド、 $DMSO-d_6$ 、 D_2O 1滴、 $60^\circ C$)
- [図2]化合物-1c (式(1)中、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ 、 $X=OH$) の ^1H-NMR ($DMSO-d_6$ 、 D_2O 1滴、 $60^\circ C$)
- [図3]化合物-2d (式(2)中、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ 、 Z_2 =単鎖、 $R=ベンジルオキシ基$) の ^1H-NMR ($DMSO-d_6$ 、 D_2O 1滴、 $60^\circ C$)
- [図4]化合物-2e (式(2)中、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=3$ 、 $Z_2=ED$ 、 $R=ベンジルオキシカルボニル基$) の ^1H-NMR ($DMSO-d_6$ 、 D_2O 1滴、 $60^\circ C$)
- [図5]非対称双頭型脂質分子 (式(1)化合物-1a、G=1-グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 $X=H$) と誘導体 (式(2)化合物-2a、G=1-グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 Z_2 =単鎖、 $R=ベンジルオキシカルボニル基$) の二成分 (混合比、式(1)化合物-1a : 式(2)化合物-2a = 10 : 1) 系自己集合により形成する内表面疎水化有機ナノチューブの透過型電子顕微鏡像。
- [図6]非対称双頭型脂質分子 (式(1)化合物-1c、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ 、 $X=OH$) と誘導体 (式(2)化合物-2e、G=1-グルコピラノシル基、 $n=18$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=3$ 、 $Z_2=ED$ 、 $R=ベンジルオキシカルボニル基$) の二成分系自己集合により形成する内表面疎水化有機ナノチューブの走査型電子顕微鏡像。 a) 混合比、式(1)化合物-1c : 式(2)化合物-2e =

10 : 2 b) 混合比、式(1)化合物-1c : 式(2)化合物-2e = 10 : 10

[図7]化合物1 (上 : (式(1)化合物-1c、 $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 = \text{単鎖}$ 、 $Y = Gly$ 、 $m = 4$ 、 $X = OH$)。下 : (式(1)化合物-1d、 $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 = \text{単鎖}$ 、 $Y = Gly$ 、 $m = 6$ 、 $X = OH$)) のジメチルスルホキシド(DMSO)中での加熱冷却による自己集合で得られた非対称ナノチューブの電子顕微鏡観察像(透過像)。

[図8]非対称双頭型脂質分子(式(2)、化合物-2c : $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $Z_1 = \text{単鎖}$ 、 $Y = Gly$ 、 $m = 4$ 、 $Z_2 = \text{単鎖}$ 、 $R = \text{メトキシ基}$) のDMSO中での加熱冷却による自己集合で得られた非対称ナノチューブの電子顕微鏡観察像(透過像)。

[図9]生理的条件下で32時間インキュベーションした場合の非対称ナノチューブの安定性の電子顕微鏡観察(透過像)での評価。本願と先行技術の比較。(a)「先願ナノチューブA」の場合。ほとんどがファイバー状に変化している。(b)「先願ナノチューブB」の場合も同様である。(c)「従来ナノチューブC」の変化。内径約50nm、外径約100~150nmとチューブ径の大きなチューブ構造に変化している。(d)本願中、式(1)化合物-1cで製造した非対称ナノチューブの変化。非対称ナノチューブ構造を保持している。

[図10]変性GFPの初濃度と有機ナノチューブ(5mg)に包接された変性GFPの濃度の関係。図中、●は式(1)化合物-1aと式(2)化合物-2aが形成する内表面疎水化有機ナノチューブ。△は式(1)化合物-1aが形成する内表面疎水化していない有機ナノチューブ

[図11]有機ナノチューブに包接された変性GFPのリフォールディング効率。図中、●は式(1)化合物-1aと式(2)化合物-2aが形成する内表面疎水化有機ナノチューブ。△は式(1)化合物-1aが形成する内表面疎水化していない有機ナノチューブ

[図12] pH 8.2 条件下における有機ナノチューブからの正常 G F P の放出。
 図中、●は式(1)化合物-1 a と式(2)化合物-2 a が形成する内表面疎水化有機ナノチューブ。△は式(1)化合物-1 a が形成する内表面疎水化していない有機ナノチューブ

[図13]変性 C A B の初濃度と有機ナノチューブ (5.5 m g) に包接された変性 C A B の濃度の関係。図中、●は式(1)化合物-1 a と式(2)化合物-2 f が形成する内表面疎水化有機ナノチューブ。△は式(1)化合物-1 a が形成する内表面疎水化していない有機ナノチューブ。

[図14]変性 C A B からリフォールディングした正常 C A B の回収率。図中、●は式(1)化合物-1 a と式(2)化合物-2 f が形成する内表面疎水化有機ナノチューブからの pH 7.8 における回収率。△は式(1)化合物-1 a が形成する内表面疎水化していない有機ナノチューブからの pH 7.8 における回収率。□は有機ナノチューブを用いない希釈法による pH 7 における回収率

[図15]種々の有機ナノチューブ／ゲスト混合比におけるドキソルビシンの内表面疎水化有機ナノチューブの取り込み (pH 6.5)。横軸の比は内表面疎水化有機ナノチューブとゲストの混合比を表す。図中右のテキストは、有機ナノチューブ中の化合物の組成を表す。すなわち上から式(1)化合物-1 c ($G = 1$ - グルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = G l y$ 、 $m = 4$ 、 $X = O H$)；式(1)化合物-1 c／式(2)化合物-2 e = 10 : 2 (モル比)；式(1)化合物-1 c／式(2)化合物-2 e = 10 : 4 (モル比)；式(1)化合物-1 c／式(2)化合物-2 e = 10 : 10 (モル比)。

[図16]内表面疎水化有機ナノチューブ／ドキソルビシンカプセル化物からのドキソルビシンの放出 (P B S バッファー中、pH 7.4)。括弧内は有機ナノチューブの組成 (式(1)化合物-1 c／式(2)化合物-2 e の混合モル比)

[図17]内表面疎水化有機ナノチューブ／ドキソルビシンカプセル化物からの

ドキソルビシンの放出（PBSバッファ中、pH 5.5）。括弧内は有機ナノチューブの組成（式（1）化合物-1 c / 式（2）化合物-2 e の混合モル比）。

[図18]非対称ナノチューブによるドキソルビシンのカプセル化率の先行技術との比較。（a）「先願ナノチューブA」の場合。（b）本願中、式（1）化合物-1 cで製造した非対称ナノチューブの場合。（a），（b）いずれもカプセル化はミリQ水中、pH調製は塩酸で行い、（a）はpH 6.5で、（b）はpH 5.0と6.5で実施した。図中のpHはカプセル化時のpHを表す。

[図19]非対称ナノチューブによるドキソルビシンの放出特性の先行技術との比較。（a）「先願ナノチューブA」の場合。（b）本願中、式（1）化合物-1 cで製造した非対称ナノチューブの場合。（a），（b）いずれもカプセル化はナノチューブ／ドキソルビシンのモル比（ONT／DOX）＝7／1で行った。図中の括弧内は用いたPBSバッファのpHを表す。

[図20]生理的条件下（PBSバッファ中）ドキソルビン放出実験後（32時間後）の非対称ナノチューブの構造安定性について、電子顕微鏡観察像（透過像）での評価。

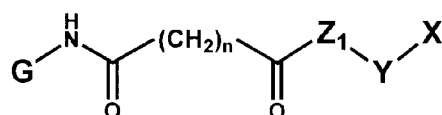
発明を実施するための形態

[0015] 1. 本発明の内表面疎水化有機ナノチューブについて

（1-1 a）本発明の内表面疎水化有機ナノチューブを構成する非対称双頭型脂質分子及びその誘導体

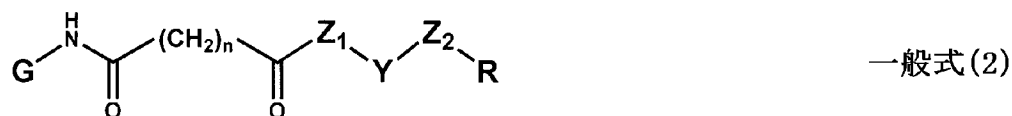
本発明の「内表面疎水化有機ナノチューブ」とは、一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子とその誘導体である一般式（2）の二成分系自己集合により形成するナノチューブであり、外表面には官能基G、内表面にはXとRが配置されていることを特徴とする。

[化1]



一般式(1)

[化2]

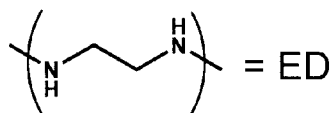


式中、Gは1-グルコピラノシル基または2-グルコピラノシル基であり、D体でもL体でもよいが、入手の容易さからD体が好適である。nは12～22の任意の整数であるが、原料の入手性から12～20が好ましい。

なお、式(1)及び式(2)において用いている記号が同一の場合、その意味は同一である。

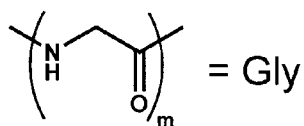
[化3]

Z₁とZ₂は、単鎖または

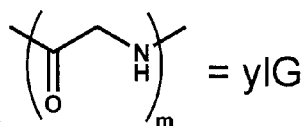


であり、Z₁がEDのとき、Z₂は単鎖である。

Yは



または



であり、mは2～6の整数

Xは、YがG | yのときOHであり、Yがy | GのときHである。

Rはベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、アセチル基、エチルカルボニル基、プロピルカルボニル基、炭素数1～4のアルコキシ基（好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、プロピル基、もしくはt-ブトキシ基）、ベンジルオキシ基、または疎水性アミノ酸（好ましくは、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、もしくはトリプトファン）のいずれかから選択され、Rが疎水性アミノ酸である場合は、Z₂とアミド結合を介して結合されることが好ましい。

また、合成のしやすさからは、Z₁が単鎖のときは、YはG | yであり、Z₁がEDのとき、Yはy | Gであることが好ましい。

一般式（１）で表わされる非対称双頭型脂質分子とその誘導体である一般式（２）の二成分系自己集合により「内表面疎水化有機ナノチューブ」は、特に後述する内表面疎水性のカルボン酸系非対称ナノチューブを形成させる場合を含め、ナノチューブ状の形態を与える範囲であれば、任意の比率で混合できるが、薬剤のカプセル化や徐放制御、またタンパク質のリフォールディングを調整する目的であれば、一般式（２）の成分を１～６０％程度、好ましく５～５０％の割合で混合することが望ましい。

（１－１ｂ）生理条件下で安定なカルボン酸系非対称ナノチューブを構成するための非対称双頭型脂質分子及びその誘導体

本発明においては、生理条件下で安定なカルボン酸系非対称ナノチューブを提供するが、そのための非対称双頭型脂質分子及びその誘導体は、いずれも文献未載の新規化合物であって、前記一般式（１）で G が１－グルコピラノシルまたは２－グルコピラノシル、 $n = 18 \sim 22$ の整数、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = G \mid y$ 、 $m = 3 \sim 6$ の整数であり、 $X = OH$ で表される非対称双頭型脂質分子もしくはその塩、又はそのエステル誘導体と表現できる。

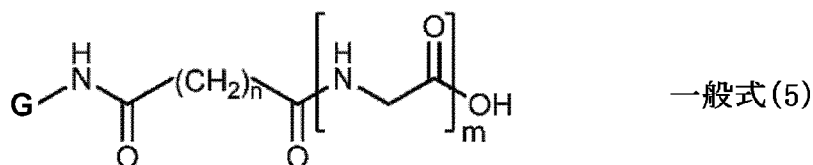
ここで、当該エステル誘導体とは、前記一般式（２）で G が１－グルコピラノシルまたは２－グルコピラノシル、 $n = 18 \sim 22$ の整数、 $Z_1 = Z_2 =$ 単鎖、 $Y = G \mid y$ 、 $m = 3 \sim 6$ の整数であり、 R が炭素数１～４のアルコキシ基のうち、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジルオキシ基である、の場合に相当する。

本発明の新規化合物であるカルボン酸系非対称ナノチューブ形成性の脂質分子又はそのエステルの形状は、長鎖カルボン酸の片端にアミド基を介し β －D－グルコピラノシルアミン残基が連結し、もう一端にオリゴグリシンのN端が縮合した非対称双頭型脂質分子またはそのエステルである。これら脂質分子又はそのエステルは、単独でも両者を適宜混合した場合でも、自己集合によりカルボン酸系非対称ナノチューブを形成することができ、その性質も外表面はいずれも親水性であるが、内表面は、もとの脂質分子及びそのエステル由来の末端カルボキシル基及び／又はそのエステル基が存在している

ため、それぞれの官能基の比率によって、内表面の疎水性環境は、きわめて疎水性の高い環境から、かなり親水性の高い環境までの幅広い環境を提供できるカルボン酸系非対称ナノチューブである。

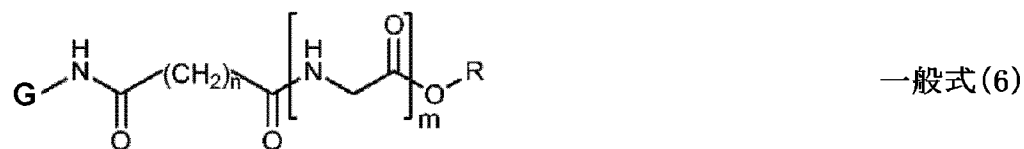
特に、両者を混合した場合に、内表面疎水性のカルボン酸系非対称ナノチューブを形成できるが、その場合 m は 3～6 の整数であれば異なってもよいので、一般式 (1) 及び (2) を用いて表現すると、
一般式 (1) 及び (2) の式中、 $n = 18 \sim 22$ の整数、 $Z_1 = Z_2 =$ 単鎖、 $Y = G$ 及び y 、 m は同一もしくは異なる 3～6 の整数、 $X = OH$ 、 R が、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジルオキシ基であるカルボン酸系非対称ナノチューブ、と表現できるが、下記一般式 (5) 及び (6) で表すこともできる。

[化7]



(式中、 n は 18～22 の整数、 m は 3～6 の整数を表す。)

[化8]



(式中、 n は一般式 (1) の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる 3～6 の整数を表す。 R は炭素数 1～4 の直鎖状アルキル基を表す)。

後述するように、一般式 (5) 及び (6) は、いずれも新規化合物であり、それぞれ単独でも、また任意の割合で配合することでも、外表面が 1-グルコサミド基で覆われ、かつ、内表面がカルボキシル基又はそのエステルで覆われた状態の新規な「カルボン酸系非対称ナノチューブ」を形成することができる。その際の両者の配合割合に応じて、内表面のカルボキシル基又は

そのエステルが存在比率が変化するので、「内表面疎水化有機ナノチューブ」のうちでも、内表面が100%エステル基に覆われた、きわめて疎水性の高い環境から、100%カルボキシル基に覆われた、かなり親水性の高い環境までを提供することができる非対称双頭型脂質分子及びそのエステルの組み合わせである。一般には、一般式(1)及び(2)で表される「内表面疎水化有機ナノチューブ」における好適な配合割合が適用され、すなわち、一般式(6)の成分を一般式(5)に対して、1~60%程度、好ましく5~50%の割合で混合することで、形成される。

しかしながら、「カルボン酸系非対称ナノチューブ」の場合は、種々のイオン特性を有し、疎水性程度も様々な各種薬剤に対応した徐放性制御カプセル化をめざすものであるため、内包される疎水性ゲストの特性に応じて両者の配合割合を調製することが好ましい。具体的には、疎水性がきわめて高いカチオン性薬剤のカプセル化や徐放には内表面の親水性を大きく低下させることが効果的であり、この点から一般式(2)の成分を99~20%程度、好ましくは60~30%程度の割合で混合することが望ましい。一方で、親水性の高いカチオン性薬剤などのカプセル化や徐放には、カルボキシル基の割合が多い方が好適であり、一般式(2)の成分を50~1%程度の割合、より好ましくは30~5%の割合で混合することが望ましい。

本発明の非対称双頭型脂質分子は外径15nm前後、内径約7~9nmの非対称なナノチューブ構造を、DMSOおよび水中での加熱冷却により選択的かつ高純度に製造できる。そのために、本発明の脂質分子のアルキレン鎖の鎖長は18~22の範囲である必要があり、脂質合成時の分散性の良さや精製の容易さからは、偶数であることがより好ましい。またオリゴグリシン残基の数は、3以上、特に3~6であれば生成されたチューブの生理的条件下での安定性や保存安定性が得られる(図9)。またこの範囲での残基の異なる混合物であってもよい。これは、上述の生理的条件下や保存下での安定性に寄与するものが、オリゴグリシン残基間のポリグリシンII型と呼ばれる多点、協同的な水素結合ネットワークに由来するためである。通常、ポリグ

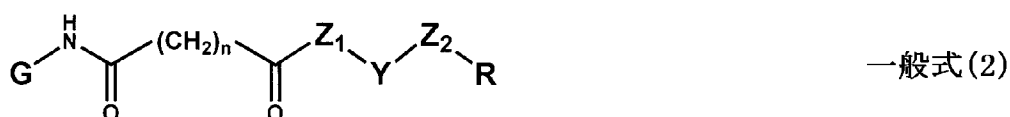
リシンなどの高分子に見られる水素結合ネットワークであるが、特にグリシン残基数が3以上であれば効果的なネットワーク形成が出来るためと考えられている。特に3又は4の場合においては、オリゴグリシンの入手のし易さに加えナノチューブ製造時の精製がしやすく本発明の所期の効果が得られる。また、本発明の非対称双頭型脂質分子は、水溶性の制約上許容される塩の状態であってもよい。例えば、ナトリウム塩、アンモニウム塩などが好ましい。

すなわち、本願発明の非対称双頭型脂質分子及びそのエステルは、下記一般式(1)で表すと、

[化1]



[化2]



上記式(1)及び式(2)の式中、Gが1-グルコピラノシルまたは2-グルコピラノシル(但し、合成のしやすさからGは1-グルコピラノシル基が好ましい。)、 $n=18\sim22$ の整数、 Z_1 =単鎖、 $\text{Y}=\text{Gly}$ 、 $m=3\sim6$ の整数であり、 $\text{X}=\text{OH}$ で表される非対称双頭型脂質分子もしくはその塩。 Z_2 =単鎖、Rが炭素数1~4のアルコキシ基のうち、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジルオキシ基である。)

上記一般式(1)で表される化合物は、水溶性でかつ薬理上許容される塩であってもよく、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩などが好ましい。

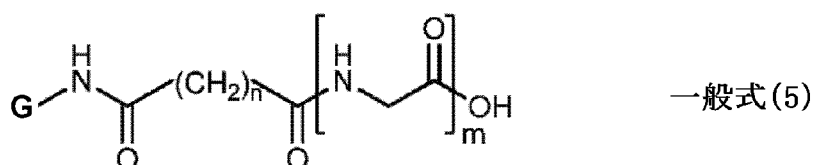
また、式(1)及び(2)において、式中、 n は18~22の任意の整数であるが、原料の入手性から18~20が好ましい。 m は3~6、あるいは

それ以上の整数であってよいが、合成上の簡便性から3～6が望ましい。また市販の化合物の入手しやすさにおいて、3又は4であってもよい。

式(2)のRは炭素数1～4の直鎖状アルコキシ基やベンジルオキシ基などが可能であるが、炭素数1～3の直鎖状アルキル基であって、メチル基又はエチル基が好ましい。

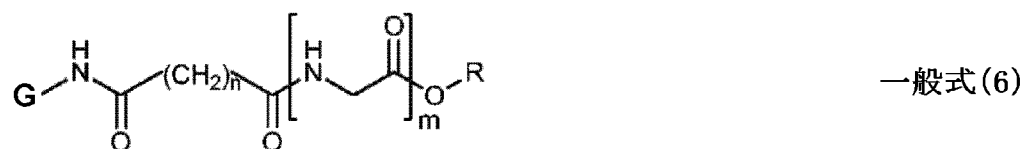
また、カルボン酸系非対称ナノチューブを形成できる非対称双頭型脂質分子又はそのエステルは、下記一般式(5)及び(6)で表すこともできる。

[化7]



(式中、nは18～22の整数、mは3～6の整数を表す。)

[化8]



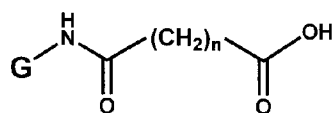
(式中、nは一般式(1)のnと同じ意味を表す。mは同一もしくは異なる3～6の整数を表す。Rは炭素数1～4の直鎖状アルキル基を表す)。

なお、本明細書中の各一般式において用いられているn、m及びRなどの用語は、特にことわらない限り、同じ用語を用いている場合は全て同じ意味を表す。

[0016] (1-2) 本発明の非対称双頭型脂質分子及びその誘導体の製造方法

一般式(1)で表わされる非対称双頭型脂質分子は及び一般式(2)で表わされる誘導体は、一般式(3)で表わされる中間体(中間体3)を経由して合成することができる。

[化4]



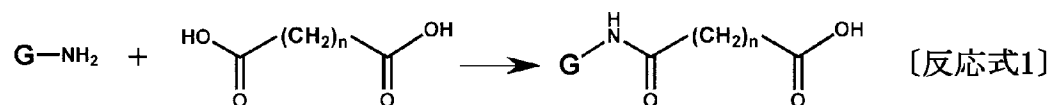
一般式(3)

式中、Gは1-グルコピラノシル基または2-グルコピラノシル基であり、D体でもL体でもよいが、入手の容易さからD体が好適である。また1-グルコピラノシル基の場合の1位のアミノ基は、 β と α の両アノマーやその混合物が使えるが、ナノチューブ形成の容易さから β アノマーが好適である。2-グルコピラノシルアミンの場合は、 α と β の両アノマーの混合物である。1-グルコピラノシル基の他の水酸基がアセチル化された保護体（2, 3, 4, 6-テトラアセチル-1-グルコピラノシル基）を用いてもよいが、最終的にアセチル基の脱保護が必要となる。アセチル基の脱保護は、メタノール中でナトリウムメトキシドを作用させることで容易に行える（特許文献1、非特許文献8）。nは12～22の任意の整数であるが、原料の入手性から12～20が好ましい。

一般式(3)は、下記に示される1-グルコピラノシルアミンまたは2, 3, 4, 6-テトラアセチル-1-グルコピラノシルアミンまたは2-グルコピラノシルアミンとジカルボン酸の間の縮合反応によって合成できる。1-グルコピラノシルアミンや2, 3, 4, 6-テトラアセチル-1-グルコピラノシルアミンはこれまでに報告されている方法で製造出来る（非特許文献8、16、特許文献1）。ジカルボン酸は塩またはモノエステル（例えばモノメチルエステル、モノエチルエステル、ベンジルエステル）の状態でも用いることができるが、モノエステルの場合には縮合反応後に加水分解が必要となる。この様なモノエステルは非特許文献17を参考にしてジカルボン酸からジエステルに変換後、加水分解反応を経て合成可能である。エステル加水分解は、メチルエステル等ではアルカリ加水分解で、ベンジルエステルの場合はパラジウムカーボンの存在下に接触水素化分解により容易に行える（特許文献1、非特許文献[8]）。また、ジカルボン酸の酸無水物や酸クロライドを用いる場合にも、縮合反応後に水を添加して、上記活性体の加水分

解が必要となる。

[化5]

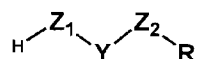


縮合反応に用いる縮合剤としては、ペプチド合成に用いられる種々の縮合剤を用いることができる。具体的には、「4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド」(DMT-MM)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミドなどを用いることができる。またこのような縮合剤を用いなくても、該当するカルボン酸の酸無水物や酸クロライドを用いることもできる。しかし、水中やメタノール中の反応でも極めて高収率の縮合物を与えるDMT-MMが望ましい。また同反応は、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシドなどを用いることができる。

[0017] 一般式(3)であらわされる中間体(中間体3)は、メタノールや水含有メタノールなどを用いた加熱・冷却による再沈殿またはシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒として例えば、クロロホルム/メタノール=20/1)によって精製することができる。

中間体-3を下記一般式(4)と縮合反応させることで一般式(2)で表わされる誘導体を合成することができる(非特許文献10、18)。

[化6]

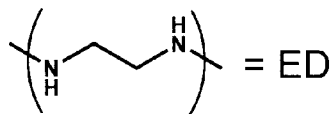


一般式(4)

式中、

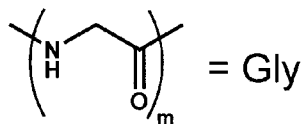
[化3]

Z_1 と Z_2 は、単鎖または

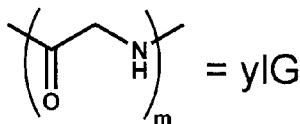


であり、 Z_1 が ED のとき、 Z_2 は単鎖である。

Y は



または



であり、 m は 2~6 の整数

R はベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、アセチル基、エチルカルボニル基、プロピルカルボニル基、炭素数 1~4 のアルコキシ基（好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、もしくは *t*-ブトキシ基）、ベンジルオキシ基、または疎水性アミノ酸（好ましくは、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、もしくはトリプトファン）のいずれかから選択され、R が疎水性アミノ酸である場合は、 Z_2 とアミド結合を介して結合されることが好ましい。

また、合成のしやすさからは、 Z_1 が単鎖のときは、Y は G | y であり、 Z_1 が ED のとき、Y は y | G であることが好ましい。

一般式（4）で Z_1 と Z_2 が単鎖の場合は、市販品を用いることができる。一般式（4）でその他の組み合わせの場合は、エチレンジアミンと N 端に R を連結したオリゴグリシンとの縮合反応、片一方の N 端に R を連結したエチレンジアミンとオリゴグリシンとの縮合反応によって合成できる。

中間体-3 に N-ベンジルオキシー-1, 2-ジアミノエタンを縮合した後、脱保護を行い、再度、N 端に R が連結したオリゴグリシンと縮合反応を行うことでも誘導体を合成できる（非特許文献 18、19）。

縮合反応に用いる縮合剤としては、DMT-MM、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩、ジシクロヘキシルカル

ボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミドなどを用いることができる。水中やメタノール中の反応でも極めて高収率の縮合物を与えるDMT-MMが望ましい。また同反応は、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシドなどを用いることができる。

誘導体は、メタノールや水含有メタノールなどを用いた加熱・冷却による再沈殿によって精製することができる。元素分析、赤外吸収スペクトル、 ^1H -NMRスペクトルにより同定することができる。

一般式(1)で表わされる非対称双頭型脂質分子は、 Z_2 が単鎖でありRがベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、メトキシ基、エトキシ基、*t*-ブトキシ基、ベンジルオキシ基の誘導体(一般式(2))において、Rは縮合反応における末端カルボン酸の保護基として働いているので、通常の前置基除去法を適用してRを除去することによって合成することができる。誘導体からのベンジルオキシカルボニル基またはベンジルオキシ基の除去は、ジメチルホルムアミド(DMF)、あるいはメタノール、メタノール/水中などでのパラジウム炭素を触媒とした接触水素化還元によって行うことができる。誘導体からの*t*-ブトキシカルボニル基の除去は、塩酸/有機溶媒、トリフルオロ酢酸等による酸処理によって行うことができる。誘導体からの9-フルオレニルメトキシカルボニル基の除去は、ピペリジン、モルホリン、ジエチルアミン等の塩基処理によって行うことができる。誘導体からのメトキシ基、エトキシ基、*t*-ブトキシ基の除去は、メタノール/水混合溶媒中での酸またはアルカリを用いる加水分解反応によって行うことができる。

Rの除去反応は定量的に進行するため、高純度の非対称双頭型脂質分子が得られるが、必要に応じてメタノールやエタノール、DMFなどで加熱冷却による精製を行ってもよい。

なお、以上のようにして合成される上記式(1)及び式(2)中、 $n=18\sim22$ の整数、 $Z_1=Z_2$ =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=3\sim6$ の整数、 $X=OH$

、 Z_2 =単鎖、Rが炭素数1～4のメトキシ基、エトキシ基、またはベンジロキシ基である場合（式（5）及び式（6）など）は、本発明の「カルボン酸系非対称ナノチューブ」を形成できる新規化合物である。

[0018] （1－3）内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブの製造法

本発明における「内表面疎水化有機ナノチューブ」のうちでも、「カルボン酸系非対称ナノチューブ」は、新規な非対称双頭型脂質分子及びそのエステルにより形成されるため、「非対称ナノチューブ」としても新規であるため、特に「カルボン酸系非対称ナノチューブ」と呼ぶことがある。以下、必要に応じて、一般的な「内表面疎水化有機ナノチューブ」の場合と分けて、「カルボン酸系非対称ナノチューブ」の場合を詳細に説明する。

（ア）加熱溶解・冷却法

内表面疎水化有機ナノチューブの場合：一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子（0.5 mg～5 mg）とそれに対して1～60 mol %の一般式（2）で表わされる誘導体を80～100℃に加熱することで1 ml純水中（ミリQ水など）に完全に溶解し、その後冷却（0.1℃～10℃毎分）することで内表面疎水化有機ナノチューブが得られる。内表面疎水化有機ナノチューブの形成は、電子顕微鏡観察によって確認できる。分散液を電子顕微鏡用のグリッドに滴下し、内部を電子線不透過な染色剤で染色することで、外径が約15 nm、内径が約8～10 nm、長さが100 nm～2 μmといった内表面疎水化有機ナノチューブのサイズや中空シリンダーを確認することができる。

本発明の内表面疎水化有機ナノチューブは構造安定性が高いので、凍結乾燥処理あるいは超音波処理などの物理的擾乱にも耐えられる。これらの物理的擾乱処理によって、収率良く軸比の短い、かつ良分散性の内表面疎水化有機ナノチューブに変換することが可能である。

一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子や一般式（2）で表わされる誘導体の水への溶解度が低い場合は、ジメチルスルホキシドやジメチル

ホルムアミド中で上記と同様に加熱、冷却により、内表面疎水化有機ナノチューブを分散液として得る。これを吸引濾過後、水に再分散することすることで水分散液も得られる。用いる溶媒は溶解性の点からジメチルスルホキシドがより好適である。ジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシド中で製造した場合は、室温での減圧濃縮、ろ過、凍結乾燥、また膜透析によってこれらの溶媒を除去することで非対称ナノチューブを得ることができる。また溶解性が向上するので、5 mg/mL以上の濃度での製造にも適している。

生体に投与することが目的の薬剤をカプセル化する場合には、薬剤を水又は水性溶媒に溶解又は分散させて用いるので、非対称ナノチューブ製造時に水又は水性溶媒を用いた場合には、薬剤をカプセル化する際に、溶媒除去工程を経ずにそのまま薬剤のカプセル化工程に供することができるので好ましい。

[0019] カルボン酸系非対称ナノチューブの場合：一般式（１）で表わされる非対称双頭型脂質分子や一般式（２）で表わされる誘導体のうちで、一般式（５）及び（６）で表される非対称脂質分子及びそのエステルを混合した場合も内表面疎水化有機ナノチューブが形成できるが、当該非対称脂質分子及びそのエステルは、一成分のみでも、同様の製造方法により、非対称ナノチューブを形成し単離できる。特に疎水部アルキル鎖長（ n ）が18～22である場合には、ジメチルスルホキシドやジメチルホルムアミド中などの方が、加熱時の溶解性が良好なため、結果として高濃度での製造が可能になる点で望ましい。また、カルボキシル基をナトリウムやカリウム、リチウム、アンモニウムなどの塩にすることにより、同様に水中、加熱時の溶解性が向上し、5 mg/mL以上の高濃度での製造がより効率的になる。

いずれの非対称ナノチューブの場合も外表面が1-グルコサミド基で覆われ、かつ、内表面がカルボキシル基又はそのエステルで覆われた状態となっているので、特に両者をあわせて「カルボン酸系非対称ナノチューブ」ということもある。つまり、「カルボン酸系非対称ナノチューブ」という場合、内表面のカルボキシル基又はそのエステルの存在比率によって、内表面疎水

化有機ナノチューブとはいっても、内表面が100%エステル基に覆われた、きわめて疎水性の高い環境から、100%カルボキシル基に覆われた、かなり親水性の高い環境までを提供することができる。

本発明の内表面疎水化有機ナノチューブやカルボン酸系非対称ナノチューブは、チューブ内にカチオン性の物質、アミノ基を有する物質、カチオン性の疎水性物質など（あわせて「カチオン性薬剤」ということもある。）を包接し、徐々にチューブ外に放出することができる。

[0020] (イ) pH調整法

一般式(1)で表わされる非対称双頭型脂質分子を室温で等モルから2等量程度の水酸化ナトリウム水溶液または塩酸水溶液に分散・溶解し、そこに一般式(2)で表わされる誘導体を添加、加熱により誘導体も溶解する。室温まで冷却し、塩酸等の酸溶液または水酸化ナトリウムのアルカリ溶液を等モルから2等量程度添加することで、同様に内表面疎水化有機ナノチューブを得ることができる。上記水酸化物水溶液としては、水酸化ナトリウム以外にもリチウム、カリウム、ルビジウム、セシウムなどの水酸化物水溶液も用いることができるし、アンモニアの使用も可能である。また上記酸溶液としては塩酸以外にもリン酸、ギ酸、酢酸、クエン酸、アスコルビン酸、硫酸等を用いることができる。

このpH調整法を適用する場合も、超音波処理、凍結乾燥などで軸比の短い内表面疎水化有機ナノチューブに変換可能であり、そのサイズはいずれもほぼ同じである。特に後者では、再水和時の添加する水の量によって良分散な状態のまま脂質分子濃度を10mg/ml程度まで上げることができる。またそれ以上（例えば50mg/ml）に濃度を上げることも可能であるが、ゲル状に変化する。

[0021] (1-4) 本発明の内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブの安定性

こうして得られた内表面疎水化有機ナノチューブは、カルボン酸系非対称ナノチューブの場合を含め、その分散液は、そのまま室温あるいは冷蔵庫で

上記のいずれの濃度で冷蔵保存しても約6ヶ月以上、沈殿を与えることなく良好な分散液として保存可能である。さらに分散液を凍結乾燥すれば1年以上の室温保存が可能で、ミリQ水等を添加して再水和すると同様の分散液を得ることができる。

[0022] (1-5) 本発明の内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブの構造

チューブ状構造であることの確認は、ネガティブ染色後の電子顕微鏡観察によってチューブ内空間を可視化することで可能となる。すなわち、チューブの内空間に電子線を透過させない染色剤を毛細管現象によって導入し、電子顕微鏡観察による透過像を得ると、染色剤が分布するチューブ内空間が暗い像を与え、チューブの壁は電子線が透過しやすい有機物で出来ているため、薄いコントラストを与える。これによって確認可能である。

得られたナノチューブの内径、膜厚が均一であり、そのナノチューブ以外の自己集合形態が観察されなければ、非対称双頭型脂質分子と誘導体の二成分が均一に混合していることを強く示唆している。

[0023] 内表面疎水化有機ナノチューブの場合、ナノチューブ内表面に疎水基が配置されていることは、赤外分光スペクトルによって確認することができる。一般式(1)で表わされる非対称双頭型脂質分子は、オリゴグリシン部位のポリグリシンII型と呼ばれる分子間多点水素結合網により平行にパッキングし、単分子膜ナノチューブを形成する。これにより、ナノチューブの内外表面はそれぞれグルコピラノシル基、オリゴグリシンのカルボキシル基またはアミノ基で被覆される。非対称双頭型脂質分子と一般式(2)で表わされる誘導体との間に、同様に分子間多点水素結合網が形成されれば、それら二成分から成るナノチューブの内表面には、非対称双頭型脂質分子由来のオリゴグリシンのカルボキシル基またはアミノ基、そして誘導体由来の疎水基が配置される。ポリグリシンII型の分子間多点水素結合網形成は、赤外分光スペクトルにおいてC-H変角振動(1420 cm^{-1})と骨格振動(1026 cm^{-1})の明確なピークの出現によって明らかとなる(非特許文献20)。またオ

リゴメチレン鎖の副格子構造を反映する CH_2 はさみ振動吸収帯、 CH_2 横揺れ振動吸収帯において三斜晶系平行型を示す 1 本のピークがそれぞれ 1465 cm^{-1} 、 719 cm^{-1} に観察されれば、非対称双頭型脂質分子と誘導体が平行に並んで分子パッキングしていることを示している。

また非対称内外表面構造（すなわちチューブ内表面にカルボキシル基や種々の疎水性官能基が、また外表面にグルコピラノシル基を配列するように配向する構造）の確認は、ナノチューブの粉末 X 線回折パターンから得られるナノチューブの膜厚の周期 d と分子モデルから推定される分子長 L の関係から推測できる。すなわち非対称双頭型脂質分子が非対称内外表面構造のナノチューブを形成しているときは、ナノチューブの膜周期 d と分子長 L がほぼ同じか、あるいは d が若干小さくなること（ $L \geq d$ ）が知られている（非特許文献 8、19）。そこで、以下のように d と L を比較検討した結果、いずれの場合にも上記の関係を満たすことが明らかとなり（表 1）、本発明の有機ナノチューブは非対称内外表面構造であることがわかった。

[0024] X 線回折測定より得られる内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブの膜周期 d とその構成脂質分子の分子モデルから得られる分子長 L の関係を、下記（表 1）として示す。

表中の内表面疎水化有機ナノチューブとしては、下記実施例 2 によって化合物-1 c と化合物-2 e（混合モル比 = 1 / 1）から得たものを用い、分子長 L は化合物-1 c（ 4.9 nm ）と化合物-2 e（ 5.6 nm ）の平均値を示す。同様にカルボン酸系非対称ナノチューブとして、非対称双頭型脂質分子（化合物-1 c）を元に実施例 3 によって形成されたカルボン酸系非対称ナノチューブについて、以下のように d と L を比較検討した結果、上記の関係（ $L \geq d$ ）を満たすことが明らかとなった（表 1）。

以上から、本発明の有機ナノチューブは全て非対称ナノチューブであることがわかった。

[表1]

脂質とその誘導体	分子長 L (nm)	膜周期 d (nm)
内表面疎水化ナノチューブ	5.3 (平均値として)	3.5
カルボン酸系非対称ナノチューブ	4.85 (平均値として)	4.3

一般に、分子の鎖長のみが異なる一連の脂質群では、自己集合で得られるナノチューブ構造がほぼ同じ形態やサイズ（内径、外径、壁厚）を有する場合は、分子の配列様式も同様であることも知られている（非特許文献8）。したがって、 $n = 18$ よりも長い疎水鎖の $n = 19, 20, 21, 22$ の場合も同様の非対称ナノチューブ構造を形成していることが示唆される。

[0025] 2. 変性タンパク質に対するリフォールディング機能

(2-1) 対象となる変性タンパク質

本発明の内表面疎水化有機ナノチューブは、その中空シリンダー内に包接した変性タンパク質を、立体構造的に安定な本来の構造にリフォールディングすることができる。具体的に対象となる変性タンパク質としては、酵素（酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リアーゼ、異性化酵素、リガーゼ）、信号伝達タンパク質、核酸結合タンパク質、受容体タンパク質、エネルギー変換タンパク質、蛍光タンパク質等が、塩酸グアニジンや尿素、界面活性剤、有機溶媒、濃厚塩、pH、そして熱によって変性したものが挙げられる。大腸菌宿主などを用いた組換えタンパク質の大量調製過程で生じる不溶性のタンパク質凝集体（インクルージョンボディ）に対しても適用できるが、その際には、 6 mol/L 塩酸グアニジンや 8 mol/L 尿素によってあらかじめ可溶化させておくことが好ましい。

[0026] (2-2) 変性タンパク質の包接化方法

(ア) 内表面疎水化有機ナノチューブ形成時の包接化法

変性タンパク質の水溶液に一般式（1）で表わされる非対称双頭型脂質分子とその誘導体である一般式（2）が均一に混合した水溶液を添加する。この時、変性剤の濃度が 1 mol/L 程度に希釈されるよう、一般式（1）と

(2) の水溶液を添加することが望ましい。変性タンパク質共存下、pH調製法により二成分系自己集合を行い、内表面疎水化有機ナノチューブを形成させる。遠心分離操作により、変性タンパク質を包接した内表面疎水化有機ナノチューブを沈降させ、上澄み液中に含まれる未包接の変性タンパク質を除去する。純水を加え、遠心分離を行った後、上澄み液を取り除く操作を数回繰り返し、内表面疎水化有機ナノチューブの外表面に吸着した変性タンパク質も除去する。回収された未包接の変性タンパク質の濃度を分光分析（紫外吸収法、ビシンコニン酸法、ブラッドフォード法、ローリー法、ビュレット法等）によって算出し、変性タンパク質の初濃度から差し引くことによって包接化率が求められる。

[0027] (イ) 内表面疎水化有機ナノチューブ形成後の包接化法

6 mol/L 塩酸グアニジンや 8 mol/L⁻¹ 尿素等の変性剤で可溶化させた変性タンパク質の水溶液 (mg/ml オーダー) に (1-3) の製造法で調製した内表面疎水化有機ナノチューブの分散水溶液 (mg/ml オーダー) を添加する。この時、変性剤の濃度が 1 mol/L 程度に希釈されるよう、内表面疎水化有機ナノチューブの分散水溶液を添加することが望ましい。未包接の変性タンパク質の除去、及び内表面疎水化有機ナノチューブに包接された変性タンパク質の濃度計算は、(2-2) (ア) と同様に行える。

[0028] (2-3) 変性タンパク質のリフォールディングと放出

(2-2) の未包接変性タンパク質を除去するための水洗浄過程で、変性剤も併せて除去されるが、変性剤の濃度は最終的に 0.01 mol/L 以下にすることが好ましい。変性タンパク質を中空シリンダー内に包接した内表面疎水化有機ナノチューブを pH、塩濃度が調製された水溶液に再分散させ、変性タンパク質のリフォールディングを行う。pH はリン酸バッファーやグッドバッファー等を用い中性付近に調製するのが良いが、タンパク質の等電点から少し外れた pH にすることでタンパク質同士の会合を抑制する場合もある。ジスルフィド結合を持つタンパク質の場合には、酸化還元反応を行うため、pH 8 程度の弱アルカリ性にする必要がある。塩は、アルカリ金属塩

やアルカリ土類金属塩を用いるのが望ましい。

当該有機ナノチューブ内表面には、誘導体（一般式（２））由来の疎水性官能基の他に、非対称双頭型脂質分子（一般式（１））由来のグリシン残基が配置されている。そのグリシン残基の末端カルボキシル基またはアミノ基は、pHに依存してプロトン解離、プロトン付加するため、中空シリンダー内がアニオン性、カチオン性となる。リフォールディングした正常タンパク質も等電点以外では、pHに依存して表面電荷がアニオン性、カチオン性となる。内表面疎水化有機ナノチューブの内表面の電荷と正常タンパク質の表面電荷が反対の場合、静電相互作用が働き、正常タンパク質は中空シリンダー内に保持される。pH調製により、静電相互作用を減ずるまたは消失させることで、特別な添加剤を必要とせず、正常タンパク質をバルク水中へと放出可能である。

[0029] ３．疎水性薬剤のカプセル化、徐放制御

（３－１）対象となる疎水性薬剤

本内表面疎水化有機ナノチューブにカプセル化が可能な疎水性薬剤としては、チューブ内表面とは逆の電荷を有し、かつ疎水性の官能基を有する薬剤が上げられる。これは、疎水性薬剤中のイオン性官能基と内表面疎水化有機ナノチューブのイオン性官能基の静電引力とともに、チューブの疎水性内表面と薬剤中の疎水部との疎水性相互作用によって効率的に薬剤をカプセル化することが出来るからである。

例えば、一般式（１）で表わされる非対称双頭型脂質分子のうち内表面が負にイオン化できるカルボン酸系脂質と一般式（２）で表わされる疎水基を有する誘導体の組み合わせで得られる内表面疎水化有機ナノチューブ（アニオン性疎水化ナノチューブ）にはアミノ基を有する抗悪性腫瘍剤であるドキソルビシン、同様にアミノ基を有するカチオン性の疎水性薬剤である、アミロリド（抗利尿剤）、モルヒネ、プロカインアミド（抗不整脈薬）、キニジン（抗不整脈薬）、ラニチジン（H₂ブロッカー）、テトラサイクリン系抗生物質、バンコマイシン、クラリスロマイシンなどの薬剤の包接が可能である

。また疎水性ナノチューブを製造する際、一般式（２）で表わされる疎水基を有する誘導体の比率を高くすることで、内表面の疎水性をより高くすることができる。これによりカチオン性薬剤のうちでもより疎水性の高い薬剤、または疎水性薬剤（例えば、イブプロフェンやビタミンＥ）のカプセル化が優位となる。このようにして包接させるゲストのカチオン性、及び疎水性の度合いを勘案しながら、両者の配合割合を設定できるので、ゲストにとって最適な非対称ナノチューブを提供できる。

逆に内表面が正にイオン化できるアミン系脂質と疎水基を有する脂質などの組み合わせで得られる内表面疎水化有機ナノチューブ（カチオン性疎水化ナノチューブ）には、カルボン酸を有するインドメタシンなどの薬剤がカプセル化可能である。

また本発明のカルボン酸系非対称ナノチューブは、その内側がカルボキシル基で被覆されているため、中に好ましく包接される薬剤は、カルボキシル基とイオン結合可能なアミノ基などのカチオン性の官能基を有する化合物が好ましく、安定なカチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を形成する。また、チューブ内が負の電荷に満たされた環境となっているため、特にイオン結合可能な官能基を有している化合物でなくても、物質全体が正の電荷を帯びたカチオン性物質であって、サイズが0.1～5 nm程度の物質であれば包接可能であり、このようなカチオン性物質を包接した非対称ナノチューブもカチオン性物質－非対称ナノチューブ複合体を形成しているといえる。

カチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を形成する具体的なカチオン性薬剤としては、上記のドキソルビシンに加え、イダルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、ピラルビシンなどのアントラサイクリン系抗癌剤やその他のアミノ基やピリジンを有する薬剤が特に好ましく用いられる。また、シスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンなどの薬剤も、チューブ内表面のカルボキシル基と相互作用する点から好ましい。

当然のことながら、本発明の非対称ナノチューブは、このような医薬品としての薬理作用を有する薬剤のみならず、化粧品用、食品用などのカチオン

性の乳化剤、分散剤、安定剤、保湿剤等各種添加剤に対しても適用可能である。

[0030] (3-2) 疎水性薬剤のカプセル化（包接化）方法

疎水性薬剤のうち水に可溶なもののカプセル化には、内表面疎水化有機ナノチューブを水に分散し、そこに疎水性薬剤を添加、攪拌することでカプセル化が可能となる。例えばカプセル化したいカチオン性物質を純水（ミリQ水）に $0.1\text{ mg/mL} \sim 50\text{ mg/mL}$ の濃度になるように溶解又は懸濁したものと、本発明の非対称ナノチューブ分散液（濃度 $0.1\text{ mg/mL} \sim 20\text{ mg/mL}$ ）とを等量混合し、10分～24時間程度室温で放置する。そのことで、30～95%程度のカプセル化率を達成できるため、例えば抗癌剤用組成物として用いる場合など、有効量を含有させるための組成物総量を低く抑えることができる。

疎水性薬剤のうち水に難溶なものは、DMSO、DMF、アルコールなど、カプセル化する薬剤を可溶にしつつ、チューブ構造を破壊しない有機溶媒の利用（混合系あるいは純品）が必要となる。またナノチューブは温度によっても溶解性が変化するので、ナノチューブを壊さない温度を選択することも重要である。このようにして薬剤が溶解しており、かつナノチューブも形態を保っていられる様な状態で混合したのち、それを10分から24時間ほど静置することでカプセル化が可能となる。

カプセル化されなかった物質は、上記混合溶液を200nmの多孔質膜でろ過することによって、効率よく取り除くことができる。これによって、カチオン性物質をカプセル化したチューブのみを固体として単離することができるので、これを任意の濃度でミリQ水に再分散させることで濃度を調整することも可能である。またカチオン性物質をカプセル化したチューブを凍結乾燥して得た固体を同様に任意の濃度でミリQ水に分散させることで濃度を調整することができる。

薬剤のカプセル化率は、上記の手法でカプセル化した後、ナノチューブを濾別し、これをミリQ水に再分散して得られた溶液の薬剤固有のUV吸収を

測定することで、定量することができる。例えばドキシソルビシンの場合、ドキシソルビシン溶液 $200\ \mu\text{L}$ （それぞれミリQ水 $1\ \text{mL}$ あたりに $2.0\ \text{mg} \sim 0.50\ \text{mg}$ の任意の量で溶解したもの）とナノチューブ分散液（ $200\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{mg}/\text{mL}$ ）を混合し、30分室温で放置した。これより $200\ \mu\text{L}$ を取り、 $200\ \text{nm}$ の多孔質膜でろ過し、さらにミリQ水（ $400\ \mu\text{L}$ ）で洗浄した。濾別された固体（ナノチューブ）はろ紙ごと $200\ \mu\text{L}$ のミリQ水に再分散した。ドキシソルビシンのUV吸収（ $480\ \text{nm}$ ）によって、ろ過前の溶液とろ過後の溶液の吸収を比較して、カプセル化率を求めた。

水溶液系でのアニオン性疎水化ナノチューブを用いたカプセル化において、疎水性部位を持つ一般式（2）で表わされる誘導体の比率の増加は、薬剤のカプセル化率を向上させる。特にナノチューブに対して、カプセル化される薬剤の量が多い場合には、疎水成分の添加により、カルボン酸系非対称ナノチューブに較べると約10%程度のカプセル化率の向上が見られることが分かる。

[0031] （3-3）疎水性薬剤の徐放制御

内表面疎水化ナノチューブからの疎水性薬剤の徐放については、水系、有機溶媒などの種々の溶媒中で可能である。ナノチューブと薬剤との静電引力を維持し、薬剤をより長時間徐放するためには、媒体の塩濃度をなるべく抑制することが望ましい。非対称双頭型脂質分子とその誘導体の混合比を変えることでも、カプセル化された薬剤の徐放特性を制御することができる。

またカルボキシル基を内表面にもつ内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブのいずれにおいてもpH変化などの外部の刺激に応じ、チューブ内表面を被覆するカルボキシル基のイオン化状態の変化によって、条件選択的かつ効率的に薬剤を放出することができる。具体的には、ミリQ水の分散液にバッファー溶液を加えpH値を4～6程度とすることで、内表面のカルボキシル基がプロトン化するため、放出の加速が可能である。またpHを7～8程度にすることでも徐放することが可能である。

[0032] また、本発明の内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称

ナノチューブとして、超音波処理などにより長さを50nm～500nm程度にまでサイズダウンしたナノチューブを用いることで、EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により、ターゲットとなるガン細胞、組織へ送達する量を高めることが期待出来る。

ナノチューブからの薬剤放出量は、チューブ分散液を透析膜チューブ（分画分子量1200～20000程度）の内水相に密閉し、膜を通過して外水相に放出された薬剤をUVなどの分光分析によって計測することで定量的に計測可能である。

例えば、ドキソルビシンを内包化した非対称ナノチューブ（ナノチューブ／ドキソルビシン＝8／1）のPBSバッファー中（pH7.4）の場合は、これを透析膜（分画分子量14000）に密閉し、同様にPBSバッファー中（pH7.4）の外水相に入れて攪拌しながら外水相のドキソルビシンの放出量をUV吸収によってモニターした。

[0033] 4. カプセル化された薬剤組成物

（4－1）薬剤組成物について

本発明の内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブは、上述のように薬剤キャリアとして優れた特性を有しているため、治療用の薬剤を有効量含む非対称ナノチューブ複合体を有効成分として、薬理的に許容される担体と共に薬剤組成物とすることができる。なお、薬剤組成物とは、例えば抗癌剤など癌の予防、治療又は処置のための医薬組成物を含む。また、水性環境中に徐々に薬剤を放出させたい場合などにも有効であることから、この薬剤組成物としては、化粧品用、食品用として配合されるカチオン性薬剤組成物も包含される。

本発明のカプセル内の薬剤として典型的な薬剤は、上述のドキソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、ピラルビシンなどのアントラサイクリン系抗癌剤やその他のアミノ基を有する薬剤である。その他、シスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンなどのカチオン性薬剤も同様に用いることができる。なお、本発明の非対称ナノチュ

ープの内表面がカルボン酸エステル基に覆われている場合、あるいはカルボン酸基とそのエステルの混合物、又はカルボン酸基と疎水性アミド基の混合物に覆われている場合は、カチオン性薬剤のうちでもより疎水性の高い薬剤、または疎水性薬剤（例えば、イブプロフェンやビタミンE）をカプセル化させた薬剤組成物とする場合に、より有効である。

ここで、薬学的に許容される担体とは、希釈剤又は賦形剤、例えば、水又は生理的許容される緩衝液を含む。

本発明の薬剤組成物は、錠剤などの経口投与も可能であるが、静脈経由若しくは直接患部への注射、外用剤などの非経口的に投与することもできる。

本発明の薬剤組成物を患者に投与する際の投与量は、用いる薬剤の種類、医療対象の患者の年齢、体重及び病状、投与経路などに従い適宜決めることができるが、典型的には、1回の投与当たりの薬剤の有効量としては、 $1\mu\text{g}$ ～ 1g 、好ましくは $100\mu\text{g}$ ～ 10mg の範囲である。

[0034] (4-2) 薬剤組成物の機能について

本発明の内表面疎水化有機ナノチューブおよびカルボン酸系非対称ナノチューブによる薬剤カプセル化物は、中性付近での徐々に放出することができる徐放作用と、酸性条件での加速された薬剤放出効果、さらには内表面疎水化有機チューブでは、チューブ内表面の疎水性の制御による徐放制御という3つの効果が期待できる。すなわち、癌細胞の場合、若干酸性状態のがん組織付近での選択的な薬剤放出効果と共に、がん細胞内部での速やかな薬剤放出による高い抗癌活性の発現、さらには必要に応じて徐放速度を制御することでさらに毒性に由来する副作用を抑制しかつ薬効を向上させるという三つの効果が期待できる。

なお、本発明で「細胞」というとき、典型的にはヒトを含む哺乳動物細胞を指す。インビトロでの培養細胞であってもよいが、薬剤治療用の場合、生体を構成する組織、臓器内の細胞や、血液など体液中の血球細胞やリンパ球細胞などの免疫細胞、及び各種の癌細胞が対象となる。

[0035] (4-3) 薬剤組成物のin Vitro下での細胞毒性評価について

毒性評価では、H e L a細胞を用い、種々の非対称ナノチューブにドキソルビンのカプセル化させたものを添加、培養し、その細胞数を評価することで見積もることが出来る。同様に、ドキソルビンそのものとの比較、またナノチューブ自体の評価も可能となる。

実施例

[0036] 次に本発明を実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって何ら限定されるものではない。

本発明におけるその他の用語や概念は、当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。また、各種の分析などは、使用した分析機器又は試薬、キットの取り扱い説明書、カタログなどに記載の方法を準用して行った。

なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

[0037] (参考例1) 1-β-D-グルコピラノシルアミンの製造

D-グルコース (1.8g, 10mmol)、重炭酸アンモニウム (0.8g, 10mmol)、アンモニア水 (28%, 55ml) をナスフラスコに入れ、41℃で48時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、凍結乾燥し、目的とする1-β-D-グルコピラノシルアミンを固体として得た。

[0038] (参考例2) 一般式(3)で表される中間体3 (G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18)の製造

エイコサン二酸モノメチルエステル (746mg, 2.1mmol) をメタノール33ml、酢酸エチル17mlに溶解し、DMT-MM (405mg, 1.47mmol)、1-β-D-グルコピラノシルアミン (250mg, 1.4mmol) を添加後、室温で4.5時間攪拌した。反応液をろ過し、目的とする中間体3のメチルエステルを白色の固体として得た。中間体3のメチルエステル (257mg, 0.5mmol) をメタノール/水溶媒に分散さ

せ、水酸化ナトリウム水溶液（1 m o l / L, 0.9 m l）を60℃で添加して加水分解を行った。塩酸を添加してpHを4に調整し、不溶の白色固体を濾別することで目的とする中間体3（171 mg, 24%）を白色固体として得た。

[0039] （製造例1）非対称双頭型脂質分子（式（1）化合物-1 a、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=16、Z₁=ED、Y=y l G、m=3、X=H）の合成

一般式（1）で表される非対称双頭型脂質分子のうち、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=16、Z₁=ED、Y=y l G、m=3、X=H）の場合の脂質分子（化合物-1 a）は、非特許文献18の方法に従った合成した。¹H-NMR、IR、元素分析によって化合物-1 aであることを確認した。

[0040] （製造例2）非対称双頭型脂質分子（式（1）化合物-1 b、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=ED、Y=y l G、m=3、X=H）の合成

一般式（1）で表される非対称双頭型脂質分子のうち、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=ED、Y=y l G、m=3、X=H）の場合の脂質分子（化合物-1 b）は、原料としてエイコサン二酸用い、製造例1の方法に従った合成した。¹H-NMR、IRによって化合物-1 bであることを確認した。

¹H-NMR (DMSO-d₆とD₂O 1 滴、400MHz) 1.23(s, 28H, -CH₂-), 1.47(m, 4H, -CH₂-), 2.07(m, 4H, -CH₂C=O), 3.08(m, 3H, H-2, H-4, H-5), 3.09(m, 4H, NH-CH₂C=O), 3.18(t, 1H, H-3), 3.62(m, 4H, -NH-CH₂-, -CH₂-NH₂), 3.68(d, 2H, H-6a, H-6b), 3.85(s, 2H, -NH-CH₂-), 4.68(t, 1H, H-1), 7.95(m, 2H, NH), 8.32(m, 2H, NH)

[0041] （製造例3）誘導体（式（2）化合物-2 a、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=16、Z₁=ED、Y=y l G、m=3、Z₂=単鎖、R=ベンジルオキシカルボニル基）の合成

一般式(2)で表される誘導体のうち、 $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $n = 16$ 、 $Z_1 = ED$ 、 $Y = yIG$ 、 $m = 3$ 、 $Z_2 =$ 単鎖、 $R =$ ベンジルオキシカルボニル基)の場合の誘導体(化合物-2a)は、化合物-1aの前駆体であることから、化合物-1aの合成過程で得た。 ^1H-NMR によって化合物-2aであることを確認した。

^1H-NMR (DMSO- d_6 と D_2O 1滴、400MHz) 1.24(s, 24H, $-CH_2-$), 1.47(m, 4H, $-CH_2-$), 2.04(m, 4H, $-CH_2C=O$), 3.05(m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.08(m, 4H, $N-CH_2-CH_2-N$), 3.16(m, 1H, H-4), 3.40 (m, 2H, H-6), 3.63 (m, 2H, H-6), 3.65(d, 2H, $N-CH_2C=O$), 3.67(d, 2H, $N-CH_2C=O$), 3.75(d, 2H, $N-CH_2C=O$), 4.69(t, 1H, H-1), 5.03(s, 2H, $-CH_2-Phe$), 7.35(m, 5H, Phe), 7.50(t, 1H, NH), 7.81(d, 2H, NH), 8.12(t, 1H, NH), 8.16(t, 1H, NH), 8.61(d, 1H, NH)

[0042] (製造例4) 誘導体(式(2)化合物-2c、 $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = G | y$ 、 $m = 4$ 、 $Z_2 =$ 単鎖、 $R =$ メトキシ基)の合成

一般式(2)で表される誘導体のうち、 $G = 1 - \beta - D$ -グルコピラノシル基、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = G | y$ 、 $m = 4$ 、 $Z_2 =$ 単鎖、 $R =$ メトキシ基の場合の誘導体(化合物-2c)は、特許文献1あるいは非特許文献8によって得た中間体3を原料として用い、DMF(20ml)中、この中間体3(200mg、0.4mmol)にテトラグリシンメチルエステル(115mg、0.44mmol)およびDMT-MMを添加し、室温で2時間攪拌することによって合成した。反応液を減圧濃縮後、メタノール中で再沈殿、吸引ろ過することにより白色固体として化合物-2cを得た。 ^1H-NMR によって化合物-2cであることを確認した(図1)。

^1H-NMR (DMSO- d_6 と D_2O 1滴、400MHz) 1.23(s, 28H, $-CH_2-$), 1.47(m, 4H, $-CH_2-$), 2.07(m, 4H, $-CH_2C=O$), 3.08(m, 3H, H-2, H-4, H-5), 3.09(m, 4H, $NH-CH_2C=O$), 3.18(t, 1H, H-3), 3.62(m, 4H, $-NH-CH_2-$, $-CH_2-NH_2$), 3.68(d, 2H, H-6a, H-6b), 3.85(s, 2H, $-NH-CH_2-$), 4.68(t, 1H, H-1), 7.95(m, 2H, NH)

, 8.32(m, 2H, NH).

[0043] (製造例5) 非対称双頭型脂質分子(式(1)化合物-1c、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=4、X=OH)の合成

一般式(1)で表される非対称双頭型脂質分子のうち、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=4、X=OHの場合の脂質分子(化合物-1c)は、製造例4で得た誘導体(式(2)化合物-2c)から調製した。誘導体(式(2)化合物-2c、250mg, 0.34mmol)をエタノール/水(1:1体積比、25ml)に溶解し、1規定のNaOH水溶液を(0.38ml)添加。溶液を90℃で10分攪拌することで加水分解を行った後、1規定のHCl水溶液を(0.4ml)添加して、pH4付近になるように中和し、沈殿した固体をろ過、乾燥することで化合物-1cを得た(215mg, 収率85%)。¹H-NMRによって化合物-1cであることを確認した(図2)。

¹H-NMR (DMSO-d₆とD₂O 1滴、400MHz) 1.23(s, 28H, -CH₂-), 1.47(m, 4H, -CH₂-), 2.07(m, 4H, -CH₂C=O), 3.08(m, 3H, H-2, H-4, H-5), 3.09(m, 4H, NH-CH₂C=O), 3.18(t, 1H, H-3), 3.62(m, 4H, -NH-CH₂-, -CH₂-NH₂), 3.68(d, 2H, H-6a, H-6b), 3.85(s, 2H, -NH-CH₂-), 4.68(t, 1H, H-1), 7.95(m, 2H, NH), 8.32(m, 2H, NH)

[0044] (製造例6) 誘導体(式(2)化合物-2d、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=4、Z₂=単鎖、R=ベンジルオキシ基)の合成

一般式(2)で表される誘導体のうち、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=4、Z₂=単鎖、R=ベンジルオキシ基の場合、上述の製造例4に記載した方法によって得た中間体-3を原料として用い、DMF(10ml)中、この中間体-3(100mg, 0.2mmol)にテトラグリシンベンジルエステル(80mg, 0.24mmol)およびDMT-MMを添加し、室温で2時間攪拌することで合成した。

反応液を減圧濃縮後、メタノール中で再沈殿、吸引ろ過することにより白色固体として化合物 2d (150 mg, 0.18 mmol, 収率 90%) を得た。¹H-NMR によって化合物 2d であることを確認した (図 3)。

¹H-NMR (DMSO-d₆とD₂O 1 滴、400MHz) 1.23(s, 28H, -CH₂-), 1.47(m, 4H, -CH₂-), 2.07(m, 4H, -CH₂C=O), 3.08(m, 3H, H-2, H-4, H-5), 3.09(m, 4H, NH-CH₂C=O), 3.18(t, 1H, H-3), 3.62(m, 4H, -NH-CH₂-, -CH₂-NH₂), 3.68(d, 2H, H-6a, H-6b), 3.85(s, 2H, -NH-CH₂-), 4.68(t, 1H, H-1), 7.95(m, 2H, NH), 8.32(m, 2H, NH).

[0045] (製造例 7) 誘導体 (式 (2) 化合物-2e、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=3、Z₂=ED、R=ベンジルオキシカルボニル) の合成

一般式 (2) で表される誘導体のうち、G=1-β-D-グルコピラノシル基、n=18、Z₁=単鎖、Y=Gly、m=3、Z₂=ED、R=ベンジルオキシカルボニル基の場合、誘導体 (式 (2) 化合物-2e) との一部となる一般式 (4) (Z₁=単鎖、Y=Gly、m=3、Z₂=ED、R=ベンジルオキシカルボニル) の合成を行った。Boc-N-トリグリシン (2 g、6.9 mmol) を無水メタノール (50 ml) に溶解し、モノ N-ベンジルオキシカルボニルエチレンジアミン塩酸塩 (1.7 g、7.2 mmol)、トリエチルアミン (1.1 ml) および DMT-MM を添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後 (20 ml まで)、これを 4 規定の塩酸-酢酸エチル溶液 (20 ml) を 4℃ で添加、攪拌することで、沈殿物として一般式 (4) (Z₁=単鎖、Y=Gly、m=3、Z₂=ED、R=ベンジルオキシカルボニル) の塩酸塩を得た (2.4 g、87%)。上述の製造例 4 に記載した方法によって得た中間体-3 を原料として用い、DMF (20 ml) 中、この中間体-3 (200 mg、0.4 mmol) と一般式 (4) (Z₁=単鎖、Y=Gly、m=3、Z₂=ED、R=ベンジルオキシカルボニル) (175 mg、0.44 mmol) および DMT-MM とトリエチルアミンを添加し、室温で 2 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、メタノール中で再沈殿、吸引ろ過

することにより白色固体として化合物-2e (310mg、0.36mmol、収率90%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$ によって化合物-2eであることを確認した(図4)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 と D_2O 1滴, 400MHz) 1.23(s, 28H, $-\text{CH}_2-$), 1.47(m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2.07(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.08(m, 3H, H-2, H-4, H-5), 3.09(m, 4H, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.18(t, 1H, H-3), 3.62(m, 4H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3.68(d, 2H, H-6a, H-6b), 3.85(s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 4.68(t, 1H, H-1), 7.95(m, 2H, NH), 8.32(m, 2H, NH).

[0046] (製造例8) 誘導体(式(2)化合物-2f、 $G=1-\beta-D$ -グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 Z_2 =単鎖、 $R=t$ -ブトシキカルボニル基)の合成

一般式(2)で表される誘導体のうち、 $G=1-\beta-D$ -グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 Z_2 =単鎖、 $R=t$ -ブトシキカルボニル基)の場合の誘導体(化合物-2f)は、 t -ブトシキカルボニルグリシルグリシルグリシンスクシニミジルエステルを用いて、化合物-2aの合成法に従い得た。 $^1\text{H-NMR}$ によって化合物-2fであることを確認した。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 と D_2O 1滴, 60°C , 400MHz) 4.69 (t, 1H, H-1), 3.75 (d, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.67 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.65 (d, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.63 (m, 1H, H-6), 3.40 (m, 1H, H-6), 3.16 (m, 1H, H-4), 3.08 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.05 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 2.04 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1.47 (m, 4H, CH_2), 1.38 (s, 9H, CH_3), 1.24 (m, 24H, CH_2)

[0047] (実施例1) 非対称双頭型脂質分子(化合物-1a)と誘導体(化合物-2a)の二成分系自己集合による内側表面が疎水化された有機ナノチューブの製造

非対称双頭型脂質分子(式(1)化合物-1a、 $G=1-\beta-D$ -グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 $X=H$; 5mg, $7.3\mu\text{mol}$)の塩酸塩と誘導体(式(2)化合物-2a、 $G=1-\beta-D$

ーグルコピラノシル基、 $n = 16$ 、 $Z_1 = ED$ 、 $Y = yIG$ 、 $m = 3$ 、 $Z_2 =$ 単鎖、 $R =$ ベンジルオキシカルボニル基； 0.6 mg ， $0.73\text{ }\mu\text{mol}$ ）を $\text{pH } 5$ の水 5 ml に加熱溶解後、室温まで冷却した。化合物－ $1a$ と化合物－ $2a$ が均一に混合した水溶液に水酸化ナトリウムを添加し、室温下 $\text{pH } 9$ に調製した。リタングステン酸でネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡観察により、内径約 10 nm 、膜厚約 3 nm のナノチューブ構造であることを確認した（図5）。

[0048] （実施例2）非対称双頭型脂質分子（化合物－ $1c$ ）と誘導体（化合物－ $2e$ ）の二成分系自己集合による内表面が疎水化された有機ナノチューブの製造

非対称双頭型脂質分子 $1c$ （式（1）化合物－ $1c$ 、 $G = 1 - \beta - D$ ーグルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = Gly$ 、 $m = 4$ 、 $X = OH$ ）および誘導体 $2e$ （式（2）化合物－ $2e$ 、 $G = 1 - \beta - D$ ーグルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = Gly$ 、 $m = 3$ 、 $Z_2 = ED$ 、 $R =$ ベンジルオキシカルボニル基）を所定の割合（約 $10 : 1 \sim 10 : 10$ 程度）で $DMSO$ 中で混合し、その後 70°C で加熱溶解後、室温に冷却することで、二成分系自己集合を行った。これに水（ $DMSO$ の9倍体積）を加えてろ過（ 200 nm ）によりナノチューブを単離し、水を添加する（ 5 mg/ml ）とほぼ透明なナノチューブ分散液を得た。誘導体 $2e$ 単独では針状結晶として沈殿するが、上述の混合物では良分散のほぼ透明な分散液を与える。またこの分散液の電子顕微鏡観察により、内径が約 7 nm 前後のナノチューブ状構造体のみを集合形態として与える（図6）ことから、二成分系自己集合により均一な分子分散状態としてナノチューブを与えることがわかった。

[0049] （実施例3）非対称双頭型脂質分子（式（1）化合物－ $1c$ 、 $G = 1 - \beta - D$ ーグルコピラノシル基、 $n = 18$ 、 $Z_1 =$ 単鎖、 $Y = Gly$ 、 $m = 4$ 、 $X = OH$ ）の自己集合による非対称ナノチューブの形成

まず、前記製造例5において製造された、本発明の非対称双頭型脂質分子、化合物－ $1c$ を用いて、以下の分散液の加熱による溶解、その後の冷却に

よる方法において、溶媒に水およびジメチルスルホキシドを用いた場合を以下に示す。

水中での製造の場合は本発明の非対称双頭型脂質分子（ $0.5\text{ mg} \sim 5\text{ mg}$ ）を1ミリリットルの純水（ミリQ水など）に分散し、 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ に加熱溶解後、冷却（ $0.1^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 毎分）することで非対称ナノチューブが得られる。得られた非対称ナノチューブの形態、大きさなどは、分散液を電子顕微鏡用のグリッドに滴下し、内部を電子線不透過な染色剤で染色することで、確認することができる。この様にして外径が約 15 nm 、内径が約 $7 \sim 9\text{ nm}$ 、長さが、 $200\text{ nm} \sim 300\text{ nm}$ の非対称ナノチューブを得ることができた（図7上）。

ジメチルスルホキシド（ 1 mL ）中に非対称双頭型脂質分子（ $0.5\text{ mg} \sim 50\text{ mg}$ ）を分散し、 $80 \sim 120^\circ\text{C}$ に加熱溶解後、冷却（ $0.1^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 毎分）することで同様にチューブが得られる。チューブ長約 $5 \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 程度の長いナノチューブが得られる。

同様に化合物-1d（式（1）中、 $G=1-\beta\text{-D-グルコピラノシル基}$ 、 $n=18$ 、 $Z_1=\text{単鎖}$ 、 $Y=Gl_y$ 、 $m=6$ 、 $X=OH$ ）においても上記と同様の工程によって同様のサイズを持つ非対称ナノチューブを得ること画出来る（図7下）。

[0050] （実施例4） 非対称双頭型脂質分子（式（2）、化合物-2c： $G=1-\beta\text{-D-グルコピラノシル基}$ 、 $Z_1=\text{単鎖}$ 、 $Y=Gl_y$ 、 $m=4$ 、 $Z_2=\text{単鎖}$ 、 $R=\text{メトキシ基}$ ）の自己集合による非対称ナノチューブの形成

前記製造例4において製造された、本発明の非対称双頭型脂質分子の、化合物-2cを用いた非対称ナノチューブの製造方法を示す。

ジメチルスルホキシド（1ミリリットル）中に非対称双頭型脂質分子（ $0.5\text{ mg} \sim 50\text{ mg}$ ）を分散し、 $80 \sim 120^\circ\text{C}$ に加熱溶解後、冷却（ $0.1^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 毎分）することで外径が約 15 nm 、内径が約 $7 \sim 9\text{ nm}$ の非対称ナノチューブが得られる（図8）

[0051] （実施例5） 生理的条件下でのチューブ構造の安定性評価

図9に、生理的条件下（pH 7.4のPBSバッファー中に分散し32時間インキュベーション後）での種々の非対称ナノチューブ構造の安定性を検討した結果を示す。比較のために、先行技術として特許出願（特願2010-194544号）中の2種類の非対称ナノチューブ（「先願ナノチューブA（一般式1において、Gが2-グルコピラノシルアミンに置換され、 $n=12$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ に相当）」、「先願ナノチューブB（一般式1において、Gが2-グルコピラノシルアミンに置換され、 $n=14$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=4$ に相当）」）及び非特許文献9で製造した非対称ナノチューブ「従来ナノチューブC（一般式1において、Gが1-グルコピラノシルアミンに置換され、 $n=16$ 、 Z_1 =単鎖、 $Y=Gly$ 、 $m=2$ に相当）」を用いた。これらの「先願ナノチューブA、B」及び「従来ナノチューブC」は、いずれの場合にもほとんどがファイバー状に変化してしまう（図9a～c）。この場合、内径約50nm、外径約100～150nmとチューブ径の大きなチューブ構造に変化している。

一方、本願、実施例3で得た非対称ナノチューブでは、このような変化は示さず（図9d）、水中で作成したナノチューブのサイズを保持しており、生理学的条件下でも高い構造安定性を有することを示している。なお図示してはいないが、同様に実施例4で得た非対称ナノチューブ、および実施例2で得た疎水化非対称ナノチューブも上記の生理的条件下での安定性を検討し、形態変化を示さなかったことから、同様の安定性をもつことが判っている。

[0052] （実施例6）タンパク質リフォールディング機能

6mol/L塩酸グアニジンまたは8mol/L尿素によって化学変性させた緑色蛍光タンパク質（GFP、0.5～50 μ g/ μ L）共存下で実施例1と同様に式（1）-1aと式（2）-2aの二成分系自己集合を行っても同サイズ次元を有する内表面疎水化有機ナノチューブが形成した。遠心分離によって内表面疎水化有機ナノチューブを沈降させ、中空シリンダー内に包接されなかったGFPを含む上澄み液を除去した。水を加え遠心分離を行い、上澄みを除去する操作を数回繰り返した。内表面疎水化有機ナノチューブが包接

した変性GFPの量は、式(1) - 1aの単一成分自己集合によって形成する有機ナノチューブが包接可能な変性GFPの量よりも二倍程度多いことが明らかとなった(図10)。これは、内表面疎水化有機ナノチューブの方が、疎水基が一部露出した構造をとっている変性GFPと強く相互作用するためである。塩酸グアニジンまたは尿素の濃度を0.01 mol/L程度まで減少させると、有機ナノチューブの中空シリンダー内で変性GFPのリフォールディングが起こることが分かった。内表面疎水化有機ナノチューブを用いた場合のリフォールディング効率は、通常の希釈法で行った場合よりも著しく高いだけでなく、内表面を疎水化していない有機ナノチューブを用いた場合のそれよりも二倍程度高いという結果であった(図11)。リフォールディングした正常GFPはpH7付近でアニオン性であり、プロトン化した有機ナノチューブ内表面アミノ基との静電相互作用により長期間にわたって中空シリンダー内に安定に保持すること可能であった。一方、pH8付近では有機ナノチューブ内表面アミノ基の脱プロトン化により、静電相互作用が消失し、正常GFPはバルク水中へと放出されることが分かった(図12)。内表面疎水化有機ナノチューブからの正常GFPの放出速度は、内表面を疎水化していない有機ナノチューブのそれよりも速いことが分かった。遠心分離操作によって、正常GFPのみを簡便に回収できることが明らかとなった。

[0053] (実施例7) タンパク質リフォールディング機能2

非対称双頭型脂質分子(式(1)化合物-1a、 $G=1-\beta-D$ -グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 $X=H$ ；5mg，7.3 μmol)の塩酸塩と誘導体(式(2)化合物-2f、 $G=1-\beta-D$ -グルコピラノシル基、 $n=16$ 、 $Z_1=ED$ 、 $Y=yIG$ 、 $m=3$ 、 Z_2 =単鎖、 $R=t$ -ブトキシカルボニル基；0.54mg，0.69 μmol)をpH5の水1mlに加熱溶解後、室温まで冷却した。6 mol/L塩酸グアニジンによって化学変性させた炭酸脱水酵素(CAB，5～50 μg)を添加後、水酸化ナトリウムを用い、室温下pH7に調製した。リンタングステン酸で

ネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡観察により、内径約10 nm、膜厚約3 nmのナノチューブが生成したことを確認した。遠心分離によって内表面疎水化有機ナノチューブを沈降させ、中空シリンダー内に包接されなかったCABを含む上澄み液を除去した。水を加え遠心分離を行い、上澄みを除去する操作を数回繰り返した。内表面疎水化有機ナノチューブが包接した変性CABの量は、式(1) - 1aの単一成分自己集合によって形成する有機ナノチューブが包接可能な変性CABの量よりも二倍程度多いことが明らかとなった(図13)。これは、内表面疎水化有機ナノチューブの方が、疎水基が一部露出した構造をとっている変性CABと強く相互作用するためである。塩酸グアニジンまたは尿素の濃度を1 mmol/L程度まで減少させると、有機ナノチューブの中空シリンダー内で変性CABのリフォールディングが起こることが分かった。pH 7.8条件下、有機ナノチューブからCABをバルク水中へと放出させた。リフォールディングした正常CABの回収率は、変性CABを単純に希釈してリフォールディングさせた場合(希釈法)よりも著しく高く、また、内表面疎水化有機ナノチューブを用いた場合の回収率は、内表面を疎水化していない有機ナノチューブを用いた場合のそれよりも1.5倍高いという結果であった(図14)。

[0054] (実施例8) カチオン性薬剤のカプセル化および徐放性制御機能

(ドキソルビシン/ナノチューブ中の脂質のモル比=1/8、ドキソルビシンの量は239 μ g/500 μ L)

実施例2の方法で得られた化合物-1cと化合物-2eの二成分系自己集合による内表面が疎水化された有機ナノチューブのミリQ水への分散液(1.91 mg/mL, 0.5 mL, pH 6.5に調製)にドキソルビシン水溶液を添加し、そのカプセル化能を検討した結果、化合物-1c単体から得られたナノチューブとほぼ同等か若干高い包接能力を示した(図15)。

続いて包接されたドキソルビシンのナノチューブからの放出を評価した。すなわちドキソルビシンをカプセル化したナノチューブ(ドキソルビシン/ナノチューブ中の脂質のモル比=1/8、ドキソルビシンの量は239 μ g/

500 μ L) を透析チューブに密封し、外水相として HEPES-saline バッファー (20 mM, HEPES ; 150 mM NaCl, pH 7.4 か 5.5 に調製、20 ml) を用い、攪拌 (200 rpm) しながら、外水相に漏れ出してくるドキソルビシンの量を分光光度計で定量した。その結果、ナノチューブ内表面の疎水性官能基の割合によって放出速度が大きく変化することが分かった (図 16)。また分散媒の pH が 7.4 から 5.5 に低下すると放出速度が増大することが分かった (図 16 と図 17 の比較)。これは、がん組織が若干酸性に変化することが知られているので、がん組織における選択的な放出を促進する優れた特性となる。

[0055] (実施例 9) 薬剤内包化実験

上記実施例 3 で化合物 1-c より製造した非対称性ナノチューブ、および上記「先願ナノチューブ A」を用いてドキソルビシンの内包化を以下の実験によりおこなった。

ドキソルビシン溶液 200 μ L (それぞれ 2, 1, 0.714, 0.625, 0.555, 0.5 mg/mL のミリ Q 水に溶解したもの) と上記のそれぞれの非対称ナノチューブの分散液 (200 μ L、5 mg/mL) を混合し、30 分室温で放置した。200 μ L を取り、多孔質膜 (200 nm) でろ過し、さらにミリ Q 水で洗浄した (400 μ L)。固体はミリ Q 水 (200 μ L) に再分散した。ドキソルビシンの UV 吸収 (480 nm) によって、ろ過前の溶液とろ過後の溶液の吸収を比較して、カプセル化率を求めた。図 18 a には先行技術として特許出願 (特願 2010-194544 号) 中の非対称ナノチューブ (先願ナノチューブ A) の場合、図 18 b に本願実施例 3 で製造した非対称ナノチューブのカプセル化率を示した。

その結果、本願の場合、ナノチューブ/ドキソルビシンのモル比 (ONT/DOX) = 5/1 ~ 11/1 では、95% 以上がカプセル化されていることから、混合するだけで高いカプセル化率を示すことが示された (図 18 b)。また「先願ナノチューブ A」でも同様に混合することでドキソルビシンのカプセル化を確認しているが、ONT/DOX = 5/1 では本願よりも 2

0%も低い75%のカプセル化率であった(図18a)。また95%以上のカプセル化を達成するにはONT/DOX=7/1以上のチューブが必要であった。以上より本願の非対称ナノチューブの方がドキソルビシンのカプセル化率が高いことがわかった。またカプセル化後もナノチューブの形態は変化していないことを別途、電子顕微鏡観察によって確認している。

[0056] (実施例10) 薬剤放出実験

次に、前記(実施例9)で記述したドキソルビシンを内包化した先行技術および本願より得た二種類の非対称性ナノチューブからのドキソルビシンの放出実験を、PBSバッファ(pH7.4とpH5.5)中での透析法によって行った。その結果を図19aおよびbにそれぞれ示した。図19bの様に、本願の非対称ナノチューブにおいて中性付近(pH7.4)では、12~13時間後に全内包化量の50%が放出され、32時間たっても放出量は全体の70%にとどまっているのに対して、弱酸性状態(pH5.5)では、約5時間で約50%を放出し、25時間ではほぼ全量放出してしまうことがわかった。一方、図19aの様に上記「先願ナノチューブA」を用いた場合では、pH7.4では、約4時間で50%のドキソルビシンが放出されてしまう。すなわち放出速度は本願では1/3に減少しており、優れた徐放性をもつことがわかった。これは、図9に示した通り、生理的条件下、32時間後では本願のナノチューブがそのチューブ構造を維持しているのに対し、「先願ナノチューブA」は、同時間後にはファイバー状に変化してしまうことに起因していると考えられる。さらに図20に示す様に、本願のナノチューブは本薬剤放出の実験後もチューブ構造を維持していることが明かとなっている。以上、ナノチューブの生理的条件下でのチューブ形態の安定性が薬剤の徐放性に極めて重要であることが示唆された。

弱酸性下のpH5.5でも同様、先行技術に較べて本願のナノチューブの方が徐放性に優れていることが示唆された。この弱酸性下では、中性付近と比較して薬剤放出の加速がみられる。これは、非対称ナノチューブ内表面を覆うカルボキシル基から生じたカルボキシラートのプロトン化が刺激となって

抗癌剤の放出を加速できることを示している。この低 pH 条件で抗癌剤放出が加速される点は、一般に、ガン組織および細胞は、正常細胞に比べて酸性（低 pH）であるという特性を有するから、ガン組織での選択的な薬剤放出が期待でき、ナノチューブを薬剤カプセルとして利用することの有効性は極めて高いと考えられる。

[0057] (実施例 11) カチオン性薬剤の in Vitro 評価

薬剤組成物の in Vitro 下での細胞毒性評価について

前記実施例 8 で得たドキソルビシンをカプセル化した種々の非対称ナノチューブの細胞毒性を以下の様に評価した。すなわちカプセル化細胞用培地としてウシ胎児血清（10%）を添加した DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）を用い、96 穴プレート上で HeLa 細胞（各 1×10^4 個）と実施例 8 で得たドキソルビシンをカプセル化した種々のナノチューブを、各ドキソルビシンの濃度が同一になるように添加し、37℃、5%CO₂下で24時間培養した。このドキソルビシンの濃度を 0.01~20 μg/mL で実施した。また用いたカプセル化体でのドキソルビシンとチューブの割合は、モル比で化合物 1 / Dox = 7 とした。対照実験としてドキソルビシンでも同様に調べた。培養後、上清を除去、細胞を PBS バッファー（pH 7.4）で洗浄した。その後の細胞生存率を WST-8 アッセイで調べて、半数阻害濃度（IC₅₀）を算出した。また実施例 3 で化合物 1-c より得た非対称ナノチューブ自体の細胞毒性も同様に調べた（表 2）。

[表2]

サンプル	非対称ナノチューブ	Dox	Dox@非対称ナノチューブ	Dox@疎水化非対称ナノチューブ	Dox@疎水化非対称ナノチューブ
				(6:2)	(6:5)
IC ₅₀	497.6	0.91 ± 0.12	1.12 ± 0.19	4.78 ± 0.63	8.65 ± 0.55

ドキソルビシン（Dox）、ドキソルビシンカプセル化非対称ナノチューブ、非対称ナノチューブの半数阻害濃度 IC₅₀（μg/mL）。

まず非対称ナノチューブ自体では、IC₅₀が約 0.5 mg/mL であること

から、細胞毒性も非常に低く、生体に比較的安全な化合物であることが示唆された。またドキソルビシンカプセル化非対称ナノチューブの毒性は、ドキソルビシンそのものに較べて低減されていることがわかる。特に、徐放性に優れた疎水化非対称ナノチューブでは IC_{50} が約 9 ～ 10 倍になっていることから、大幅な毒性低減効果をもつことが判った。この様に非対称ナノチューブ、中でも疎水化非対称ナノチューブでの優れた副作用抑制効果が明らかとなった。

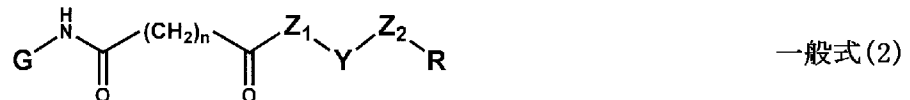
請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で表わされる非対称双頭型脂質分子と共に、下記一般式（２）で表されるその誘導体が含まれており、かつ二成分系自己集合により形成されている内表面疎水化有機ナノチューブ；

[化1]



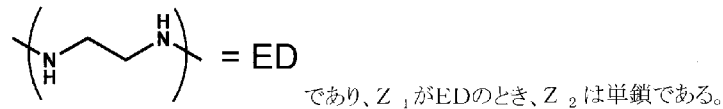
[化2]



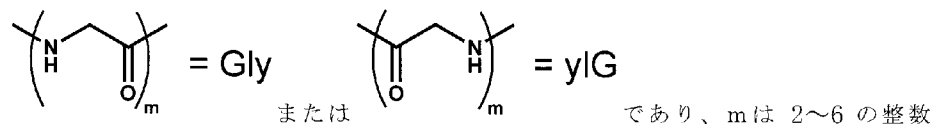
式（１）及び式（２）において記号の意味は同一であり、式中、Gは1-グルコピラノシル基または2-グルコピラノシル基である。
nは12～22の整数である。

[化3]

Z₁とZ₂は、単鎖または



Yは



Xは、YがG | yのときOHであり、Yがy | GのときHである。

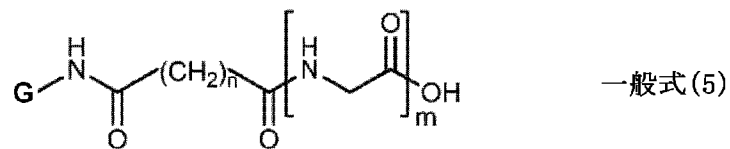
Rは、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、アセチル基、エチルカルボニル基、プロピルカルボニル基、炭素数1～4のアルコキシ基、ベンジルオキシ基、または疎水性アミノ酸である。

[請求項2] 前記Rが、炭素数1～4のアルコキシ基のうち、メトキシ基、エト

キシ基、もしくは α -ブトキシ基であるか、または疎水性アミノ酸のうち、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、もしくはトリプトファンである、請求項1に記載の内表面疎水化有機ナノチューブ。

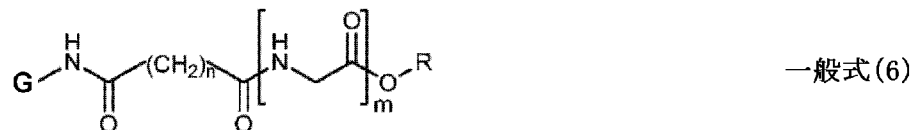
[請求項3] 前記一般式(1)及び(2)において、式中、 $n = 18 \sim 22$ の整数、 $Z_1 = Z_2 =$ 単鎖、 $Y = G$ 、 m は同一もしくは異なる3～6の整数、 $X = OH$ 、 R が、メトキシ基、エトキシ基、またはベンジルオキシ基であって、それぞれ下記一般式(5)及び一般式(6)で表される非対称双頭型脂質分子から形成されるカルボン酸系非対称ナノチューブであることを特徴とする、請求項1に記載の内表面疎水化有機ナノチューブ；

[化7]



(式中、 n は18～22の整数、 m は3～6の整数を表す。)

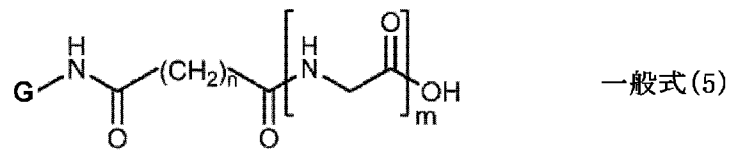
[化8]



(式中、 n は一般式(1)の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる3～6の整数を表す。 R は炭素数1～4の直鎖状アルキル基を表す)。

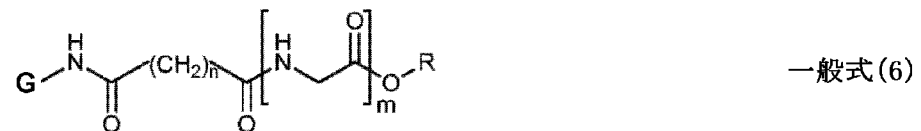
[請求項4] 下記一般式(5)又は一般式(6)で表される非対称双頭型脂質分子もしくはその塩又はそのエステル；

[化7]



(式中、 n は 18 ～ 22 の整数、 m は 3 ～ 6 の整数を表す。)

[化8]



(式中、 n は一般式 (5) の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる、3 ～ 6 の整数を表す。 R は炭素数 1 ～ 4 の直鎖状アルキル基を表す)。

[請求項5]

請求項 4 に記載の非対称双頭型脂質分子もしくはその塩、又はそのエステル of のいずれかが単独で又は両者が混合された状態で自己集合により形成された、カルボン酸系非対称ナノチューブ。

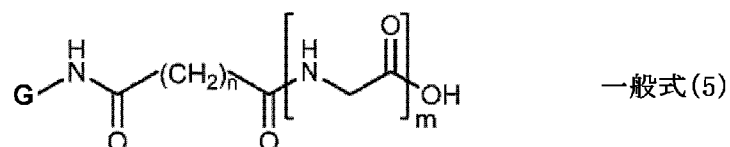
[請求項6]

水性溶媒中において、一般式 (1) で表わされる非対称双頭型脂質分子と共に、一般式 (2) で表されるその誘導体を混合し、二成分自己集合させることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの製造方法。

[請求項7]

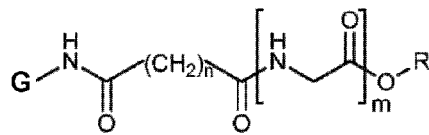
下記一般式 (5) 又は (6) で表わされる非対称双頭型脂質分子又はそのエステルを、単独で又は両者を混合してジメチルスルホキシドやジメチルホルムアミドまたは水に分散し、加熱溶解後冷却することを特徴とする、カルボン酸系非対称ナノチューブの製造方法。

[化7]



(式中、 n は 18 ～ 22 の整数、 m は 3 ～ 6 の整数を表す。)

[化8]



一般式(6)

(式中、 n は一般式(1)の n と同じ意味を表す。 m は同一もしくは異なる、3～6の整数を表す。 R は炭素数1～4の直鎖状アルキル基を表す)。

[請求項8] 請求項1又は2に記載の内表面疎水化有機ナノチューブを有効成分として含むタンパク質リフォールディング剤。

[請求項9] 変性タンパク質を、請求項1又は2に記載の内表面疎水化有機ナノチューブと共に水性溶媒中において分散させることにより、当該有機ナノチューブ内に包接させることを特徴とする、変性タンパク質のリフォールディング方法。

[請求項10] 変性タンパク質を、前記非対称双頭型脂質分子とその誘導体とを混合して二成分自己集合させる際の水性媒体中に添加しておくことを特徴とする、請求項9に記載のリフォールディング方法。

[請求項11] 請求項1又は2に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの疎水性中空シリンダー内に変性タンパク質が包接されている、リフォールディングされた正常タンパク質の放出用組成物。

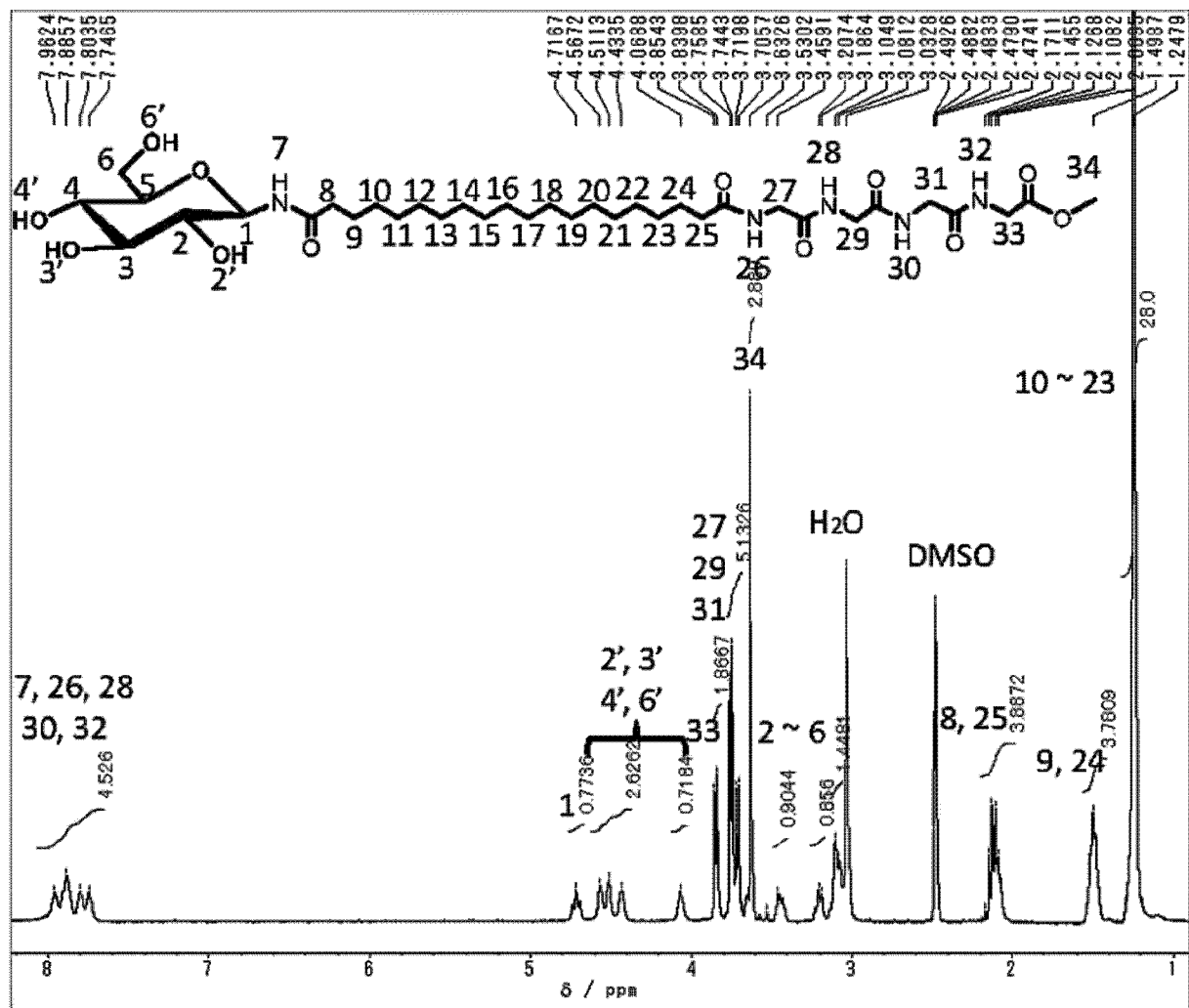
[請求項12] 請求項1～3及び5のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブを有効成分として含む疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤。

[請求項13] 疎水性薬剤を、請求項1～3及び5のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブと共に水性溶媒中において分散させることにより、当該有機ナノチューブ内に包接させることを特徴とする、疎水性薬剤のカプセル化方法。

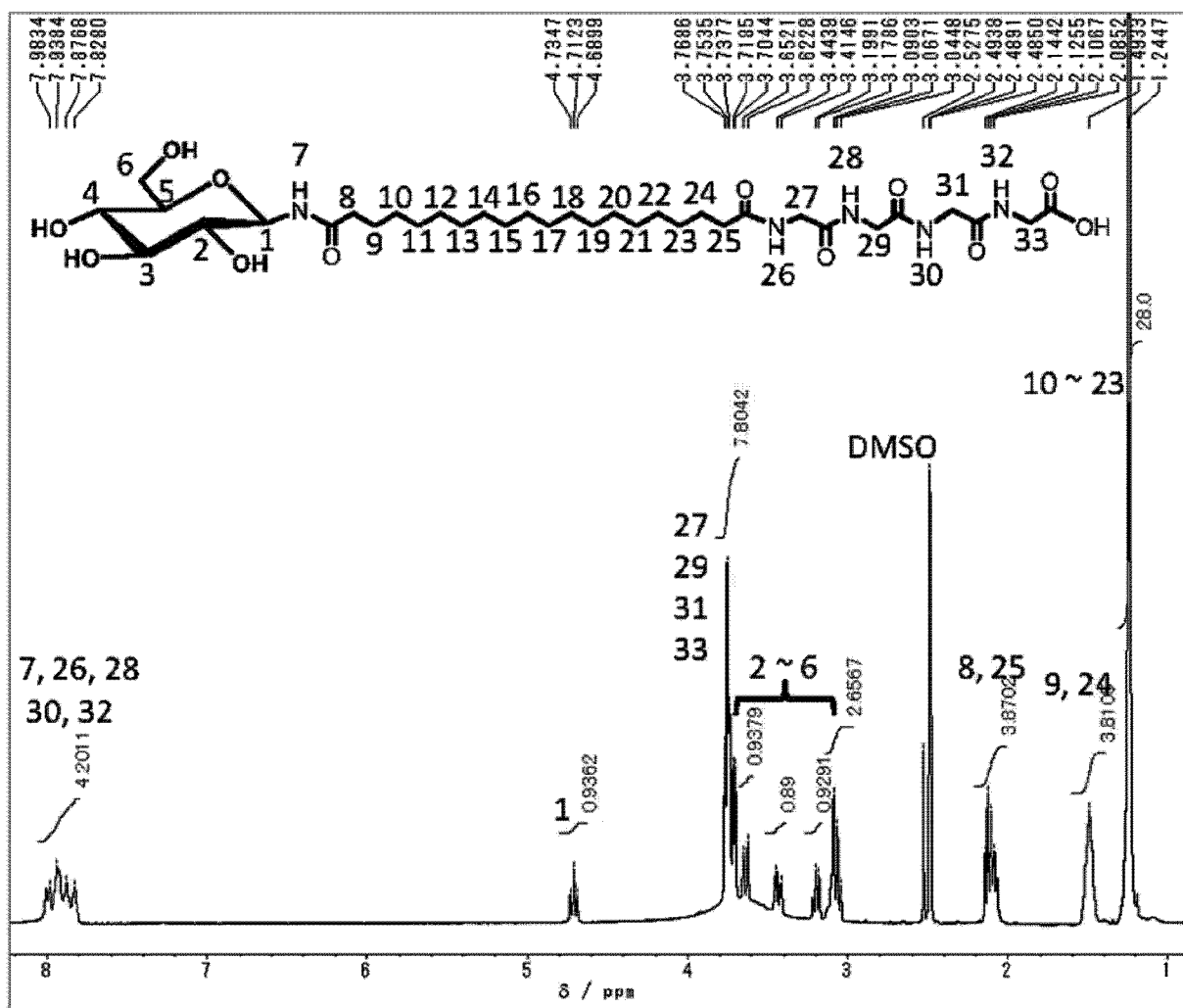
[請求項14] 疎水性薬剤を、前記非対称双頭型脂質分子とその誘導体とを混合して二成分自己集合させる際の水性媒体中に添加しておくことを特徴とする、請求項13に記載のカプセル化方法。

- [請求項15] 請求項1～3及び5のいずれか1項に記載の内表面疎水化有機ナノチューブの疎水性中空シリンダー内に疎水性薬剤が包接されていることを特徴とする、カプセル化された疎水性薬剤組成物。
- [請求項16] 請求項12に記載の疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤が、請求項3又は5に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブを有効成分として含むカチオン性薬剤徐放用である、疎水性薬剤徐放用カプセル化製剤。
- [請求項17] 請求項15に記載の疎水性薬剤組成物が、請求項3又は5に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブがカチオン性薬剤を包接し、カチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を形成している、カプセル化された疎水性薬剤組成物。
- [請求項18] 請求項3又は5に記載のカルボン酸系非対称ナノチューブがカチオン性薬剤を包接していることを特徴とする、カチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体。
- [請求項19] 前記請求項18に記載のカチオン性薬剤－非対称ナノチューブ複合体を有効成分とする、カチオン性薬剤組成物。
- [請求項20] カチオン性薬剤がアミノ基を有するアントラサイクリン系抗癌剤である、前記請求項19に記載のカチオン性薬剤組成物。

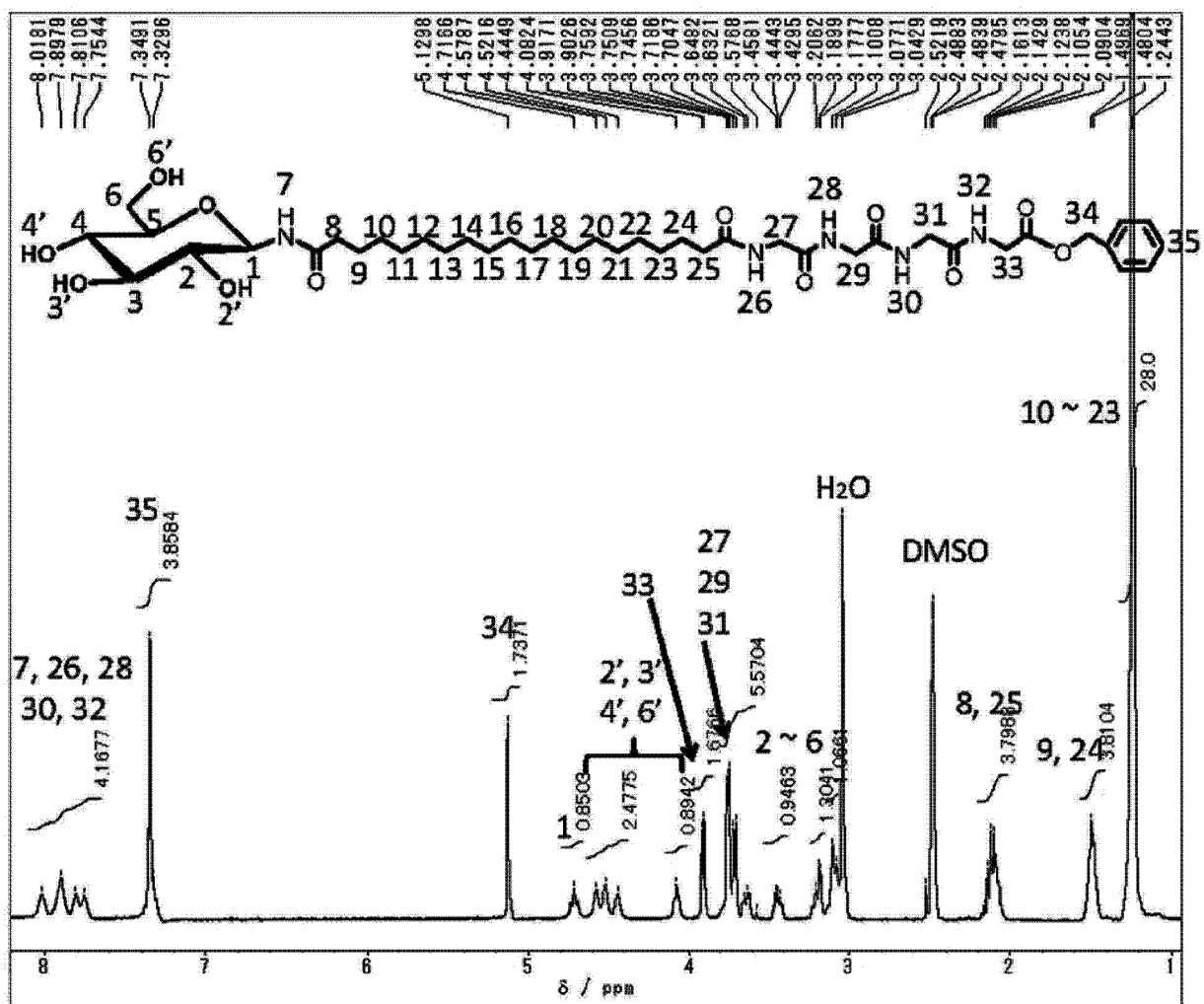
[図1]



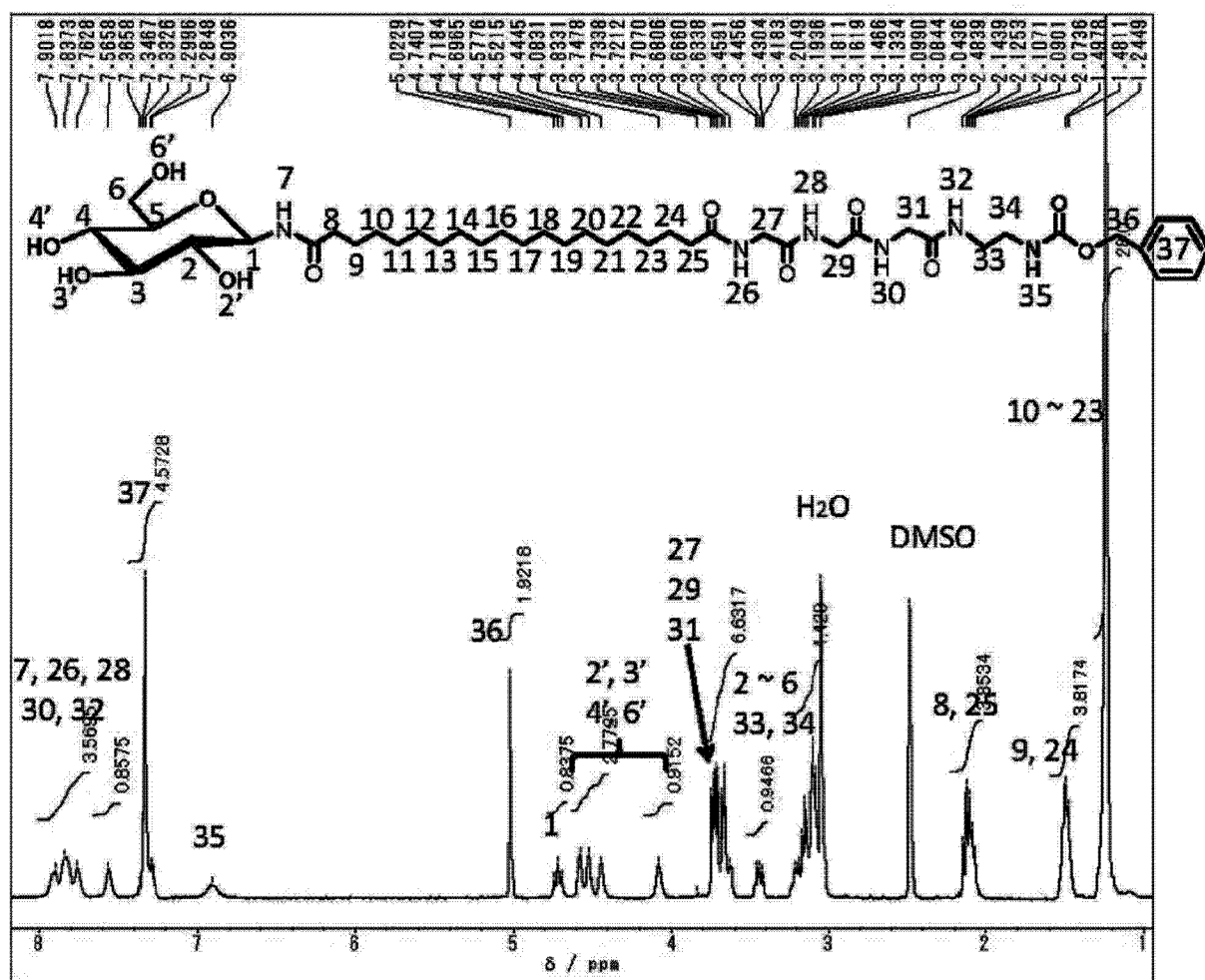
[図2]



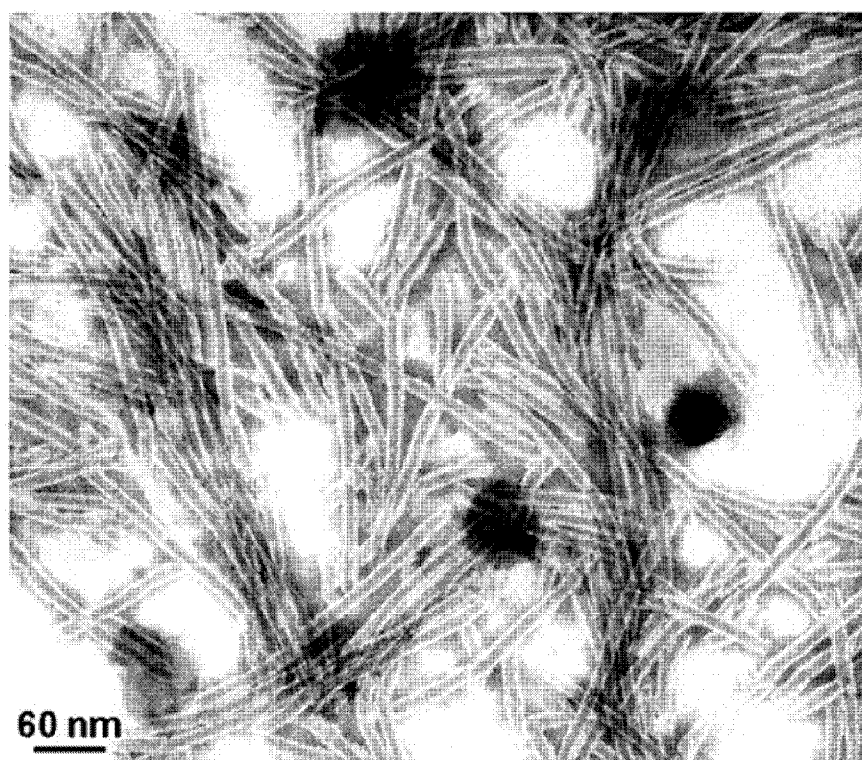
[図3]



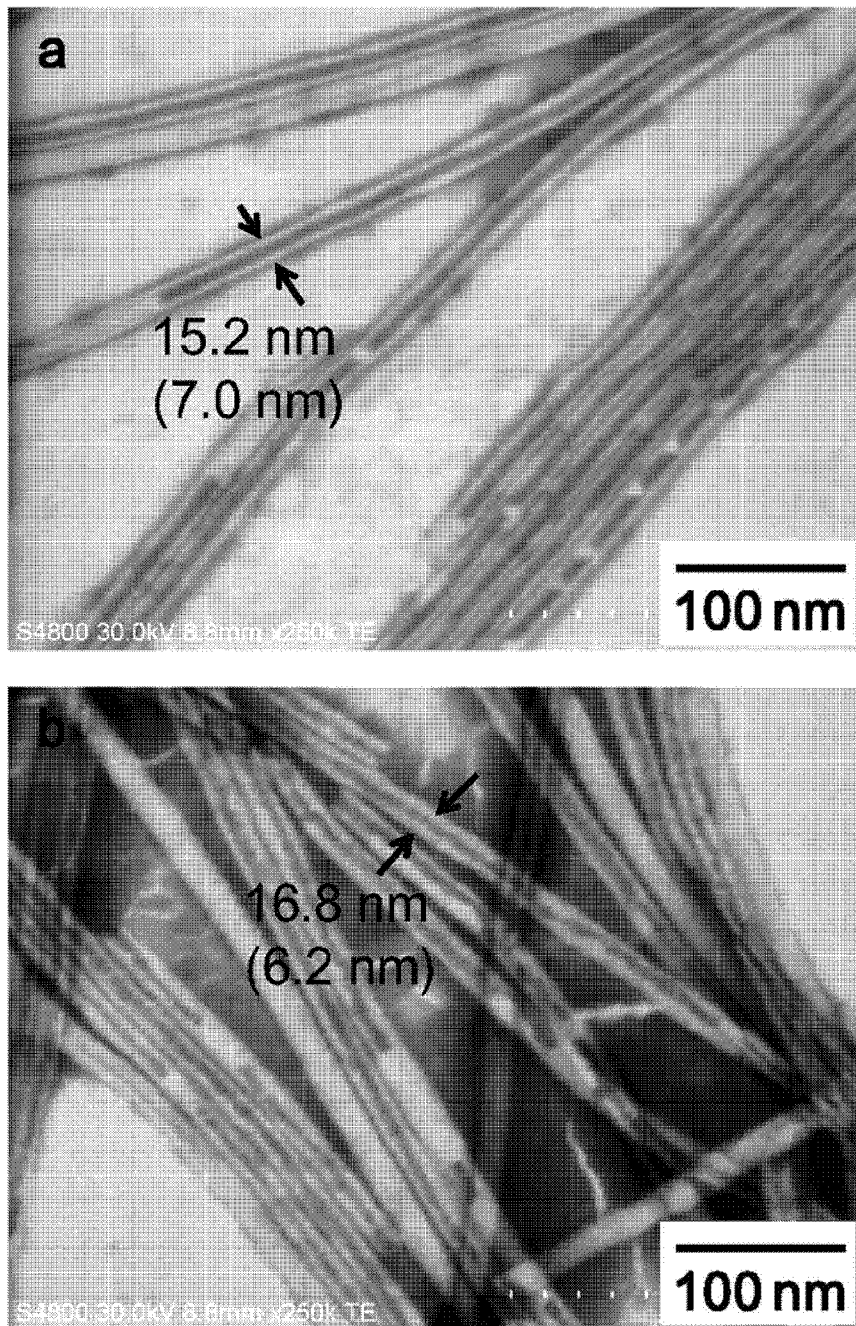
[図4]



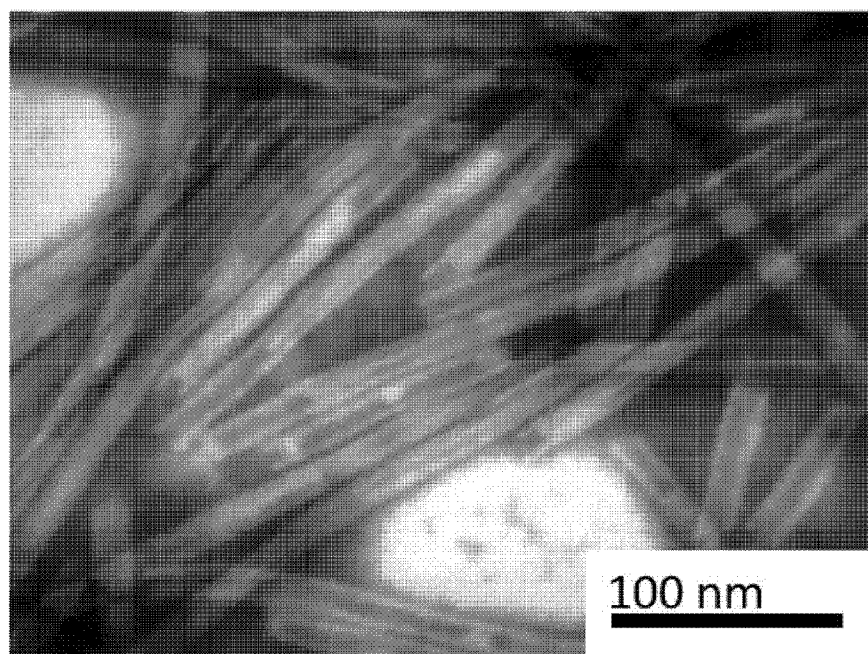
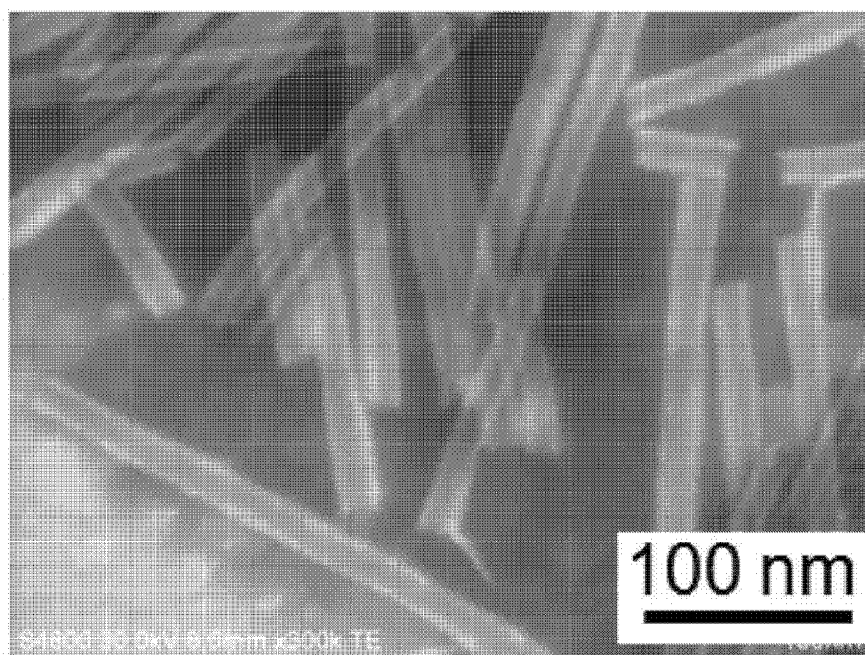
[図5]



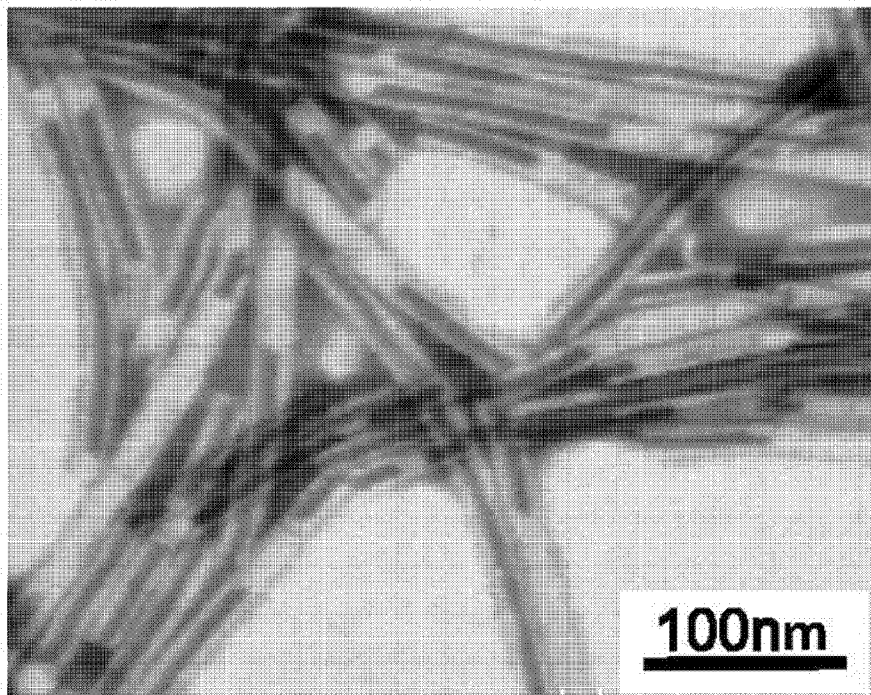
[図6]



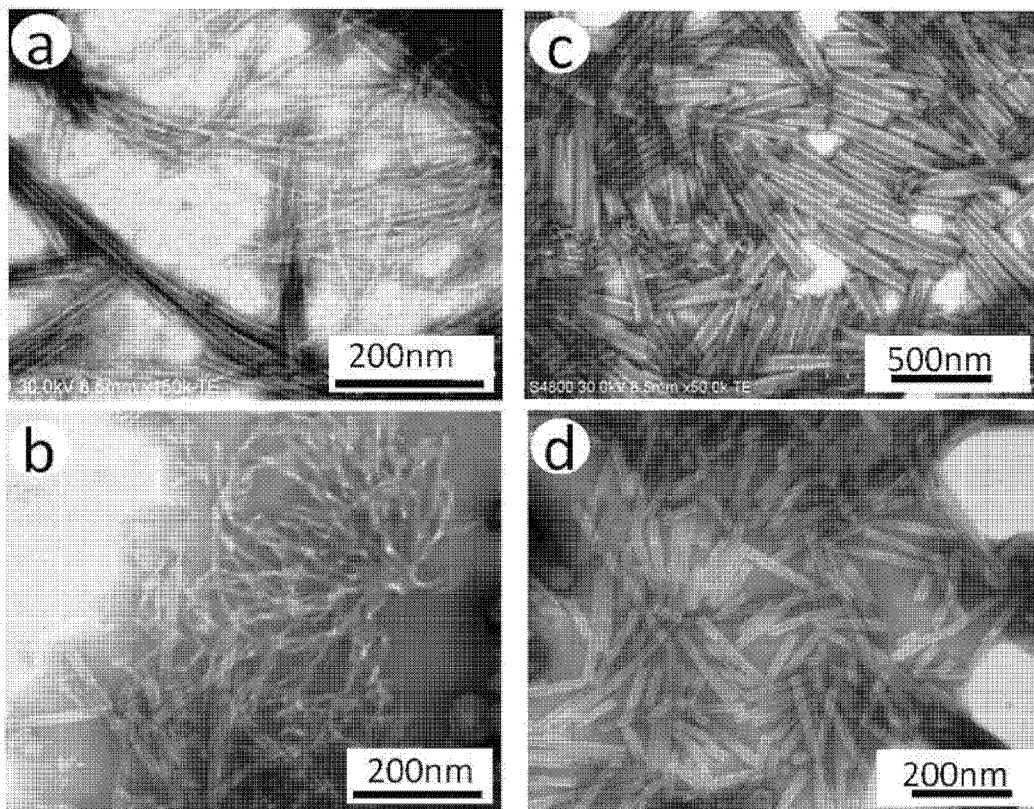
[図7]



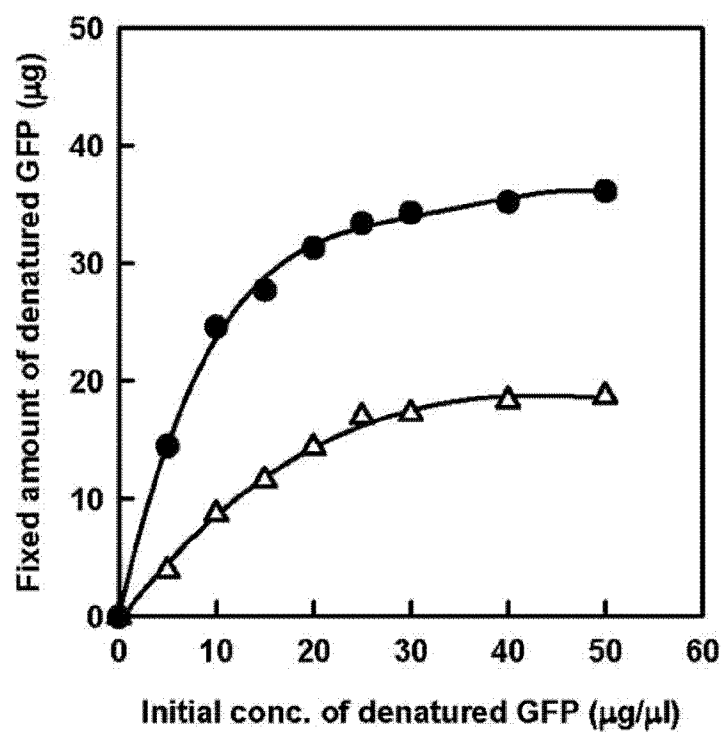
[図8]



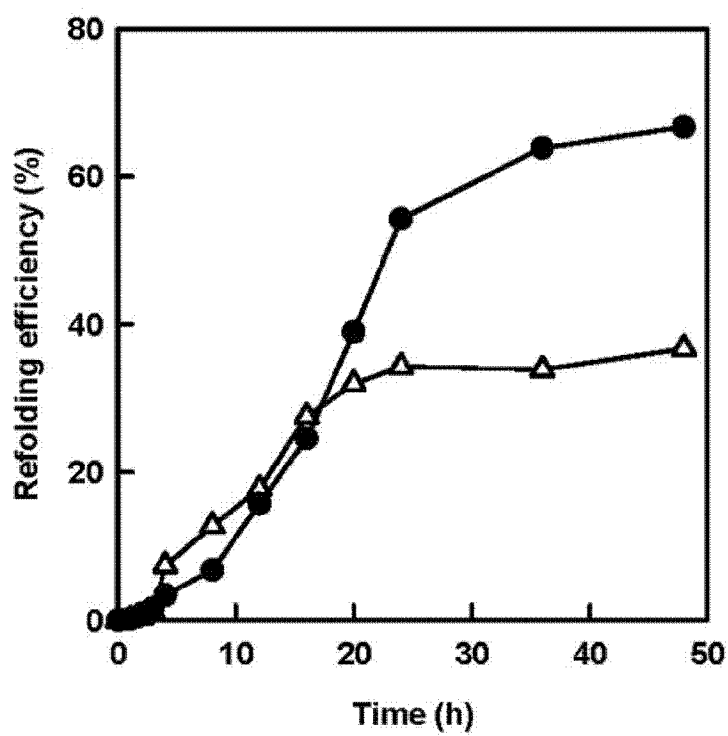
[図9]



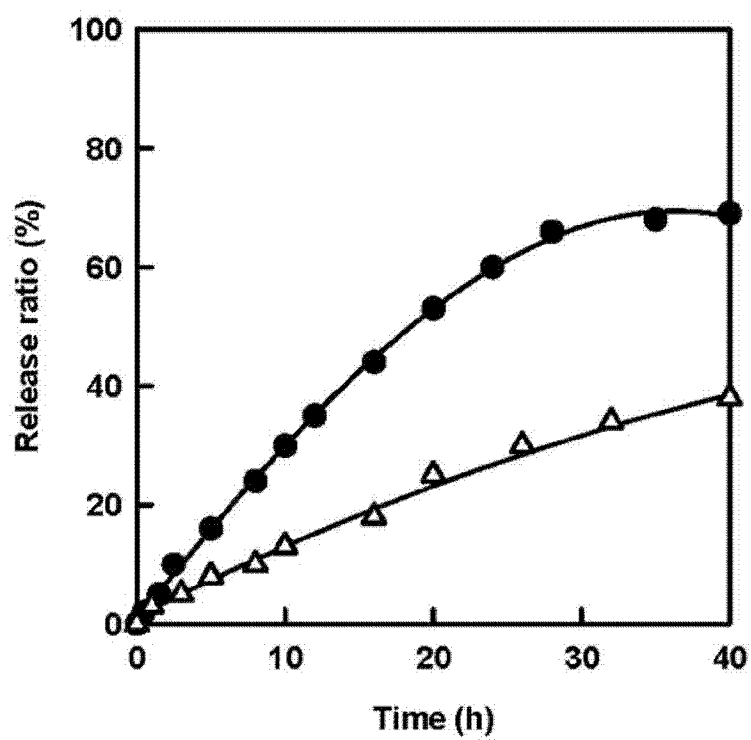
[図10]



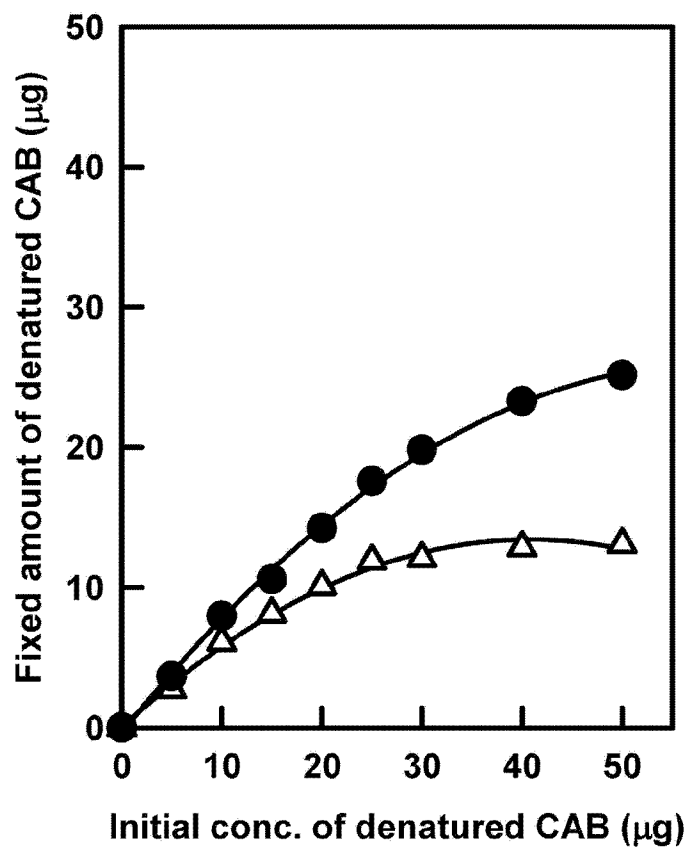
[図11]



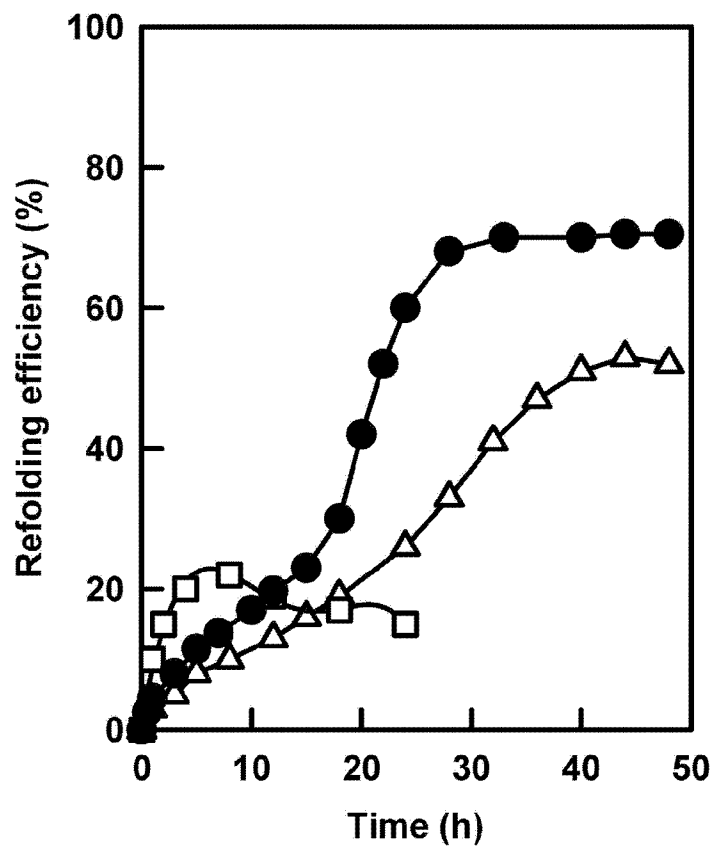
[図12]



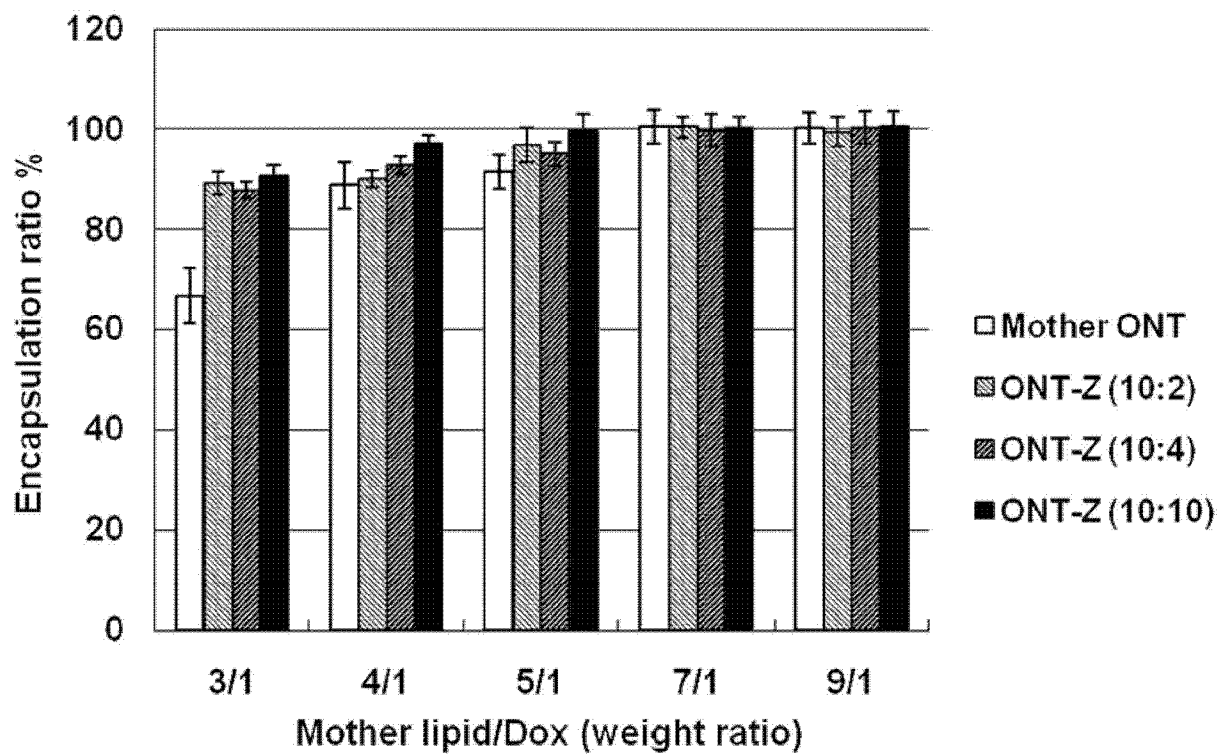
[図13]



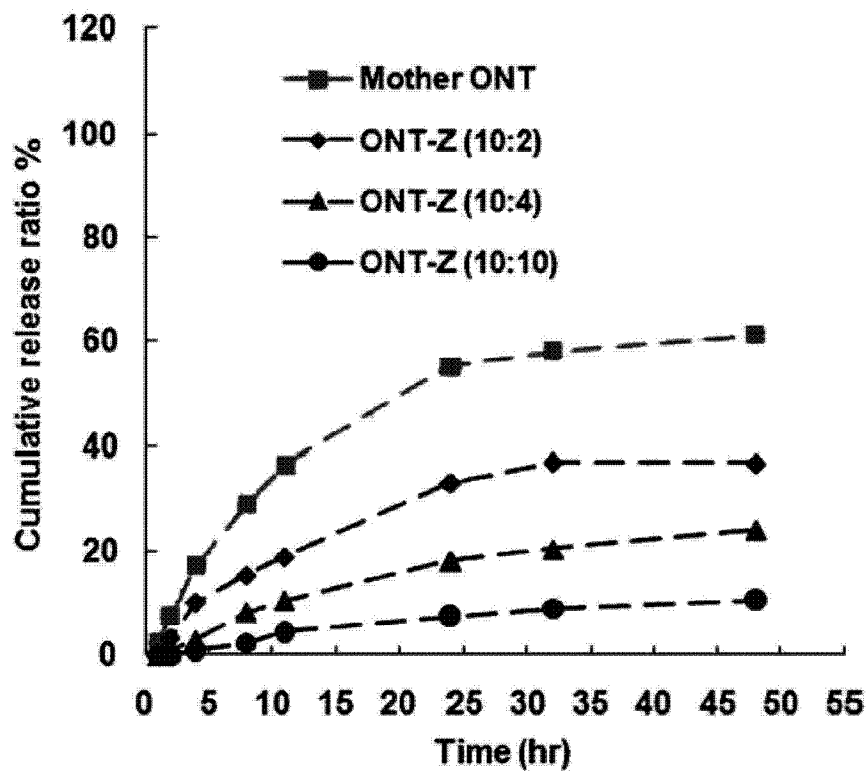
[図14]



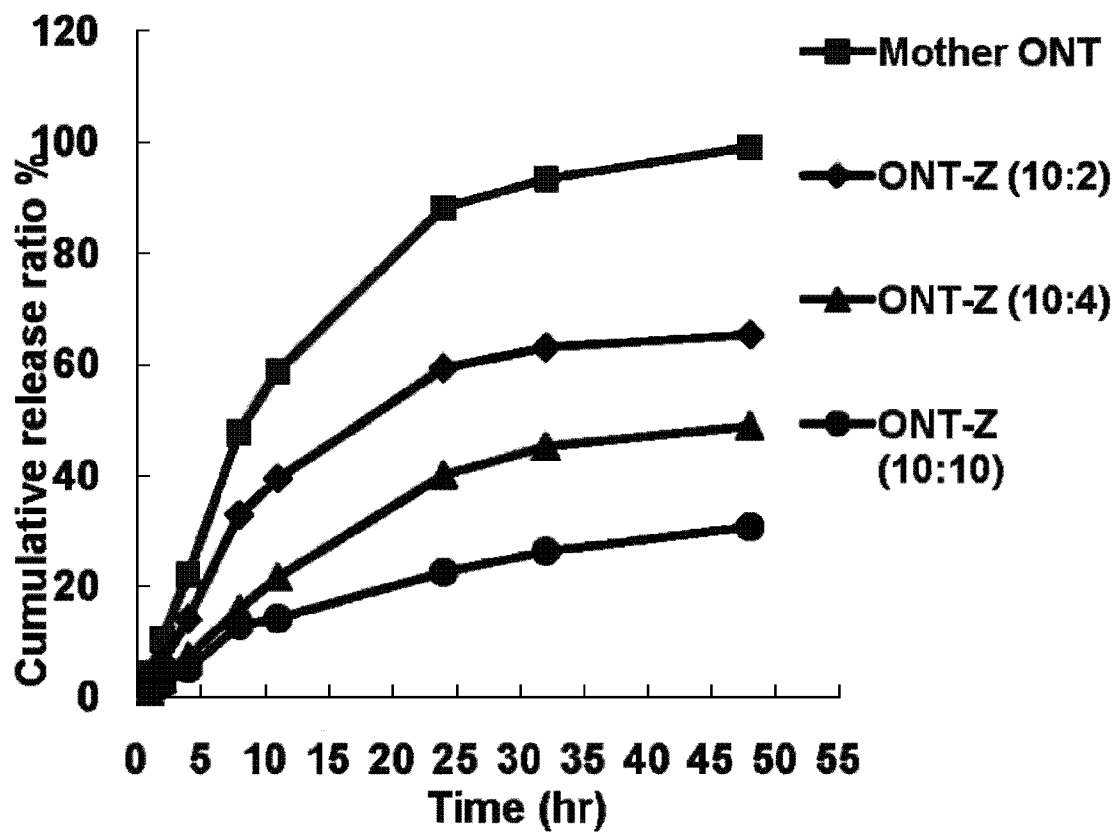
[図15]



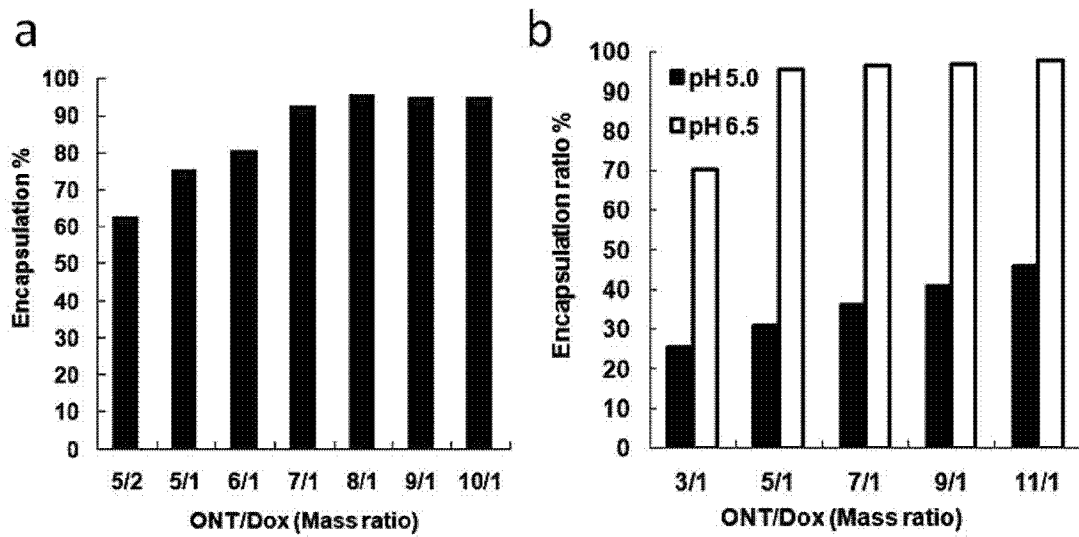
[図16]



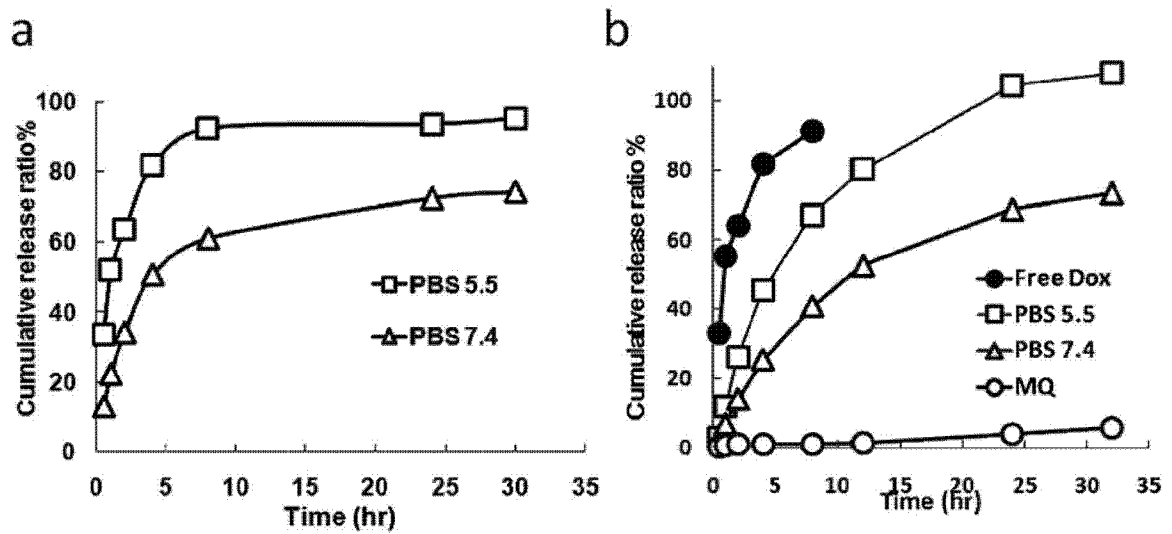
[図17]



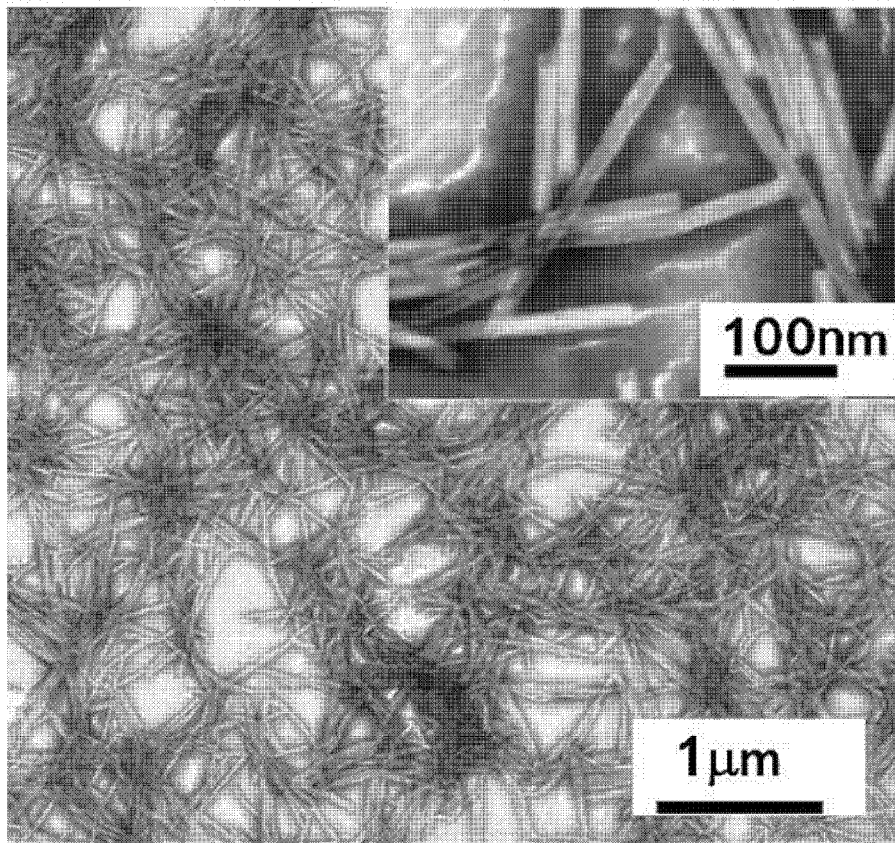
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B82B1/00(2006.01)i, A61K9/51(2006.01)i, A61K9/62(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/16(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B82B1/00-3/00, B82Y5/0099/00, A61K9/51, A61K9/62, A61K38/00, A61K38/16, A61K47/42

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/090821 A1 (Japan Science and Technology Agency), 31 August 2006 (31.08.2006), entire text; all drawings & JP 4706026 B & US 2009/0211907 A1 & EP 1870704 A1 & CA 2599335 A	1-20
A	JP 2002-322190 A (Japan Science and Technology Corp.), 08 November 2002 (08.11.2002), entire text; all drawings & US 2004/0120998 A1 & EP 1396496 A1 & WO 2002/090370 A1 & DE 60237681 D	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2012 (27.04.12)

Date of mailing of the international search report
15 May, 2012 (15.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058724

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Toshimi SHIMIZU, "Molecular Building Blocks That Self-Assemble into Discrete Organic Tubular Architectures", Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 01 March 2008 (01.03.2008), vol.66, no.3, pages 229 to 238	1-20
P,A	JP 2011-184391 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 22 September 2011 (22.09.2011), entire text; all drawings (Family: none)	1-20
P,A	JP 2012-51828 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 15 March 2012 (15.03.2012), entire text; all drawings (Family: none)	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. B82B1/00(2006.01)i, A61K9/51(2006.01)i, A61K9/62(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61K38/16(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. B82B1/00-3/00, B82Y5/0099/00, A61K9/51, A61K9/62, A61K38/00, A61K38/16, A61K47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/090821 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2006.08.31 全文、全図 & JP 4706026 B & US 2009/0211907 A1 & EP 1870704 A1 & CA 2599335 A	1 - 2 0
A	JP 2002-322190 A (科学技術振興事業団) 2002.11.08 全文、全図 & US 2004/0120998 A1 & EP 1396496 A1 & WO 2002/090370 A1 & DE 60237681 D	1 - 2 0

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

2 7 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 5 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山口 剛

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 2 6

2 G

9 8 0 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	清水敏美, “孤立した有機ナノチューブ形成のための分子構造要素と組織化”, 有機合成化学協会誌, 2008. 03. 01, Vol. 66, No. 3, pp. 229-238	1 - 2 0
P, A	JP 2011-184391 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2011. 09. 22 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 2 0
P, A	JP 2012-51828 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2012. 03. 15 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 2 0