

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/154767

発行日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(43) 国際公開日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07D 207/46 (2006.01)	C07D 207/46 C S P	4C069
A61K 49/18 (2006.01)	A61K 49/18	4C076
A61K 49/20 (2006.01)	A61K 49/20	4C085
A61K 49/10 (2006.01)	A61K 49/10	
A61K 49/12 (2006.01)	A61K 49/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

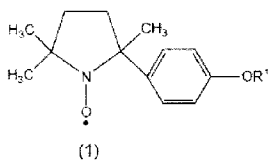
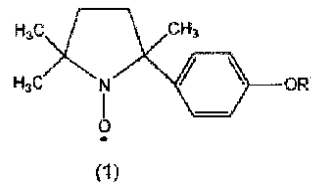
出願番号 特願2018-504443 (P2018-504443)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/008469	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(22) 国際出願日 平成29年3月3日(2017.3.3)	(72) 発明者 田村 類 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(31) 優先権主張番号 特願2016-44450 (P2016-44450)	(72) 発明者 名倉 康太 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(32) 優先日 平成28年3月8日(2016.3.8)	Fターム(参考) 4C069 AA05 AA23 BB02 BB08 BB16 BC04 BC40 CC05 4C076 DD60 EE23 FF34 4C085 HH07 JJ03 KA28 KB56 KB74
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機ニトロキシドラジカル化合物、その製造方法、ナノエマルジョン粒子及びその用途

(57) 【要約】

MRI等のメタルフリー造影剤として利用可能なナノエマルジョン粒子、及び該ナノエマルジョン粒子を容易に調製することができる有機ニトロキシドラジカル化合物を提供すること。

式(1)(式中、R¹は、炭素数10~26の直鎖アルキル基を示す。)で表される有機ニトロキシドラジカル化合物、及び該有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とが0.8:1から1.2:1のモル比で構成され、ニトロキシドラジカルが内包されている、ナノエマルジョン粒子。

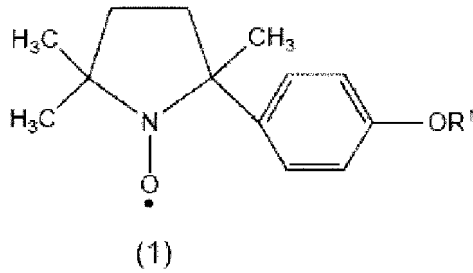


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)：

【化 1】



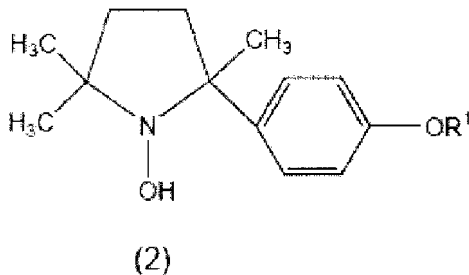
10

(式中、R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。)
で表される有機ニトロキシドラジカル化合物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の有機ニトロキシドラジカル化合物の製造方法であって、式(2)：

【化 2】



20

(式中、R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。)
で表される化合物を2価の銅化合物の存在下で酸化する、製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とが0.8 : 1 から 1.2 : 1 のモル比で構成され、ニトロキシドラジカルが内包されている、ナノエマルジョン粒子。

30

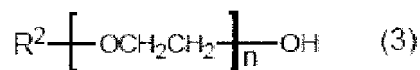
【請求項 4】

前記非イオン性界面活性剤が、炭素数10～26の直鎖アルキル基を有する非イオン性界面活性剤である、請求項 3 に記載のナノエマルジョン粒子。

【請求項 5】

前記非イオン性界面活性剤が、式(3)：

【化 3】



40

(式中、R²は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。nは2以上の整数である。)

で表されるポリオキシエチレンアルキルエーテルである、請求項 3 又は 4 に記載のナノエマルジョン粒子。

【請求項 6】

請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載のナノエマルジョン粒子を含むMRI造影剤。

【請求項 7】

請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載のナノエマルジョン粒子を含むドラッグデリバリーシステムキャリアー。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、有機ニトロキシドラジカル化合物、その製造方法、ナノエマルジョン粒子及びその用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

現在、磁気共鳴画像法(MRI)に使用される血管内投与造影剤として、Gd-DTPA等のガドリニウム製剤が用いられている。しかしながら、ガドリニウム製剤は副作用があることが知られているため、金属を含まないメタルフリーの造影剤を使用することが望まれている。

10

【0003】

有機ニトロキシドラジカルは常磁性を有しているため、近年、MRI等のメタルフリー造影剤としての応用が研究されている。例えば、非特許文献1及び2にはTEMPO(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン1-オキシル)という有機ニトロキシドラジカルを共有結合させた両親媒性ブロック共重合高分子化合物を合成し、これを用いて水中でコア・シェル型ナノ粒子を調製したことが開示されている。

また、特許文献1には、ニトロキシドラジカルを側鎖に有するポリマー、及び該ポリマーからなる高分子ミセルが開示されている。しかしながら、いずれの場合も、高分子化合物の合成及び精製が煩雑であり、粒径分布が広く、さらにニトロキシドラジカルが血液中でビタミンC等により還元されやすく、ラジカルの機能を発揮できない等の問題がある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2009/133647号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】X. Zhuang et al., Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 48, 5404-5410 (2010)

【非特許文献2】T. Yoshitomi et al., Biomacromolecules, 10, 596-601 (2009)

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

かかる状況において、本発明が解決しようとする主な課題は、MRI等のメタルフリー造影剤として利用可能なナノエマルジョン粒子、及び該ナノエマルジョン粒子を容易に調製することができる有機ニトロキシドラジカル化合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らはメタルフリー造影剤として利用可能なナノエマルジョン粒子を開発すべく鋭意検討した結果、水系溶媒中で特定の構造を有する有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とを特定の割合で混合することによりニトロキシドラジカルを内包したナノエマルジョン粒子を製造することができ、上記課題を解決できることを見出した。本発明はこのような知見に基づき完成されたものである。

40

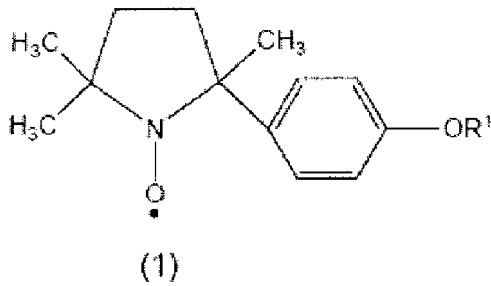
【0008】

すなわち、本発明は、下記項1～7に示す有機ニトロキシドラジカル化合物、製造方法、ナノエマルジョン粒子等に係る。

項1. 式(1):

【0009】

【化 1】



【 0 0 1 0 】

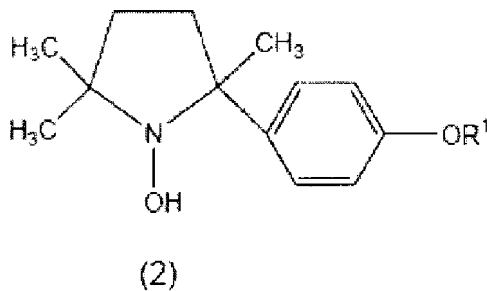
10

(式中、R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。) で表される有機ニトロキシドラジカル化合物。

項 2 . 上記項 1 に記載の有機ニトロキシドラジカル化合物の製造方法であって、式 (2) :

【 0 0 1 1 】

【化 2】



20

【 0 0 1 2 】

(式中、R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。) で表される化合物を2価の銅化合物の存在下で酸化する、製造方法。

項 3 . 上記項 1 に記載の有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とが0.8 : 1から1.2 : 1のモル比で構成され、ニトロキシドラジカルが内包されている、ナノエマルジョン粒子。

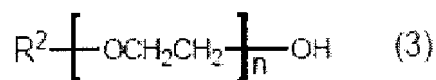
30

項 4 . 前記非イオン性界面活性剤が、炭素数10～26の直鎖アルキル基を有する非イオン性界面活性剤である、上記項 3 に記載のナノエマルジョン粒子。

項 5 . 前記非イオン性界面活性剤が、式 (3) :

【 0 0 1 3 】

【化 3】



【 0 0 1 4 】

(式中、R²は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。nは2以上の整数である。)

40

で表されるポリオキシエチレンアルキルエーテルである、上記項 3 又は 4 に記載のナノエマルジョン粒子。

項 6 . 上記項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のナノエマルジョン粒子を含むMRI造影剤。

項 7 . 上記項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のナノエマルジョン粒子を含むドラッグデリバリーシステムキャリアー。

【発明の効果】

【 0 0 1 5 】

本発明の有機ニトロキシドラジカル化合物は、本発明者らが初めて合成に成功した、文

50

献未記載の新規化合物である。かかる有機ニトロキシドラジカル化合物を、水系溶媒中において、非イオン性界面活性剤と特定の割合で混合することによりニトロキシドラジカルを内包したナノエマルジョン粒子を容易に製造することができる。

【0016】

このナノエマルジョン粒子は、分子の外側が親水性、分子の内部が疎水性という両親媒性の粒子であって、分子の内部にニトロキシドラジカルを内包していることにより磁性を有することから、MRI等の造影剤として好適に利用することができる。

また、本発明のナノエマルジョン粒子は、水系溶媒中で極めて安定であり、ビタミンC等により還元されにくい。さらに分子の内部に抗がん剤等の疎水性物質を内包させることができることから、ドラッグデリバリーシステムキャリアーとして利用することもできる。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】化合物(1)と非イオン性界面活性剤とが形成する入れ子構造の模式図である。

【図2】実施例1で得られたナノエマルジョン粒子の1日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図3】実施例1で得られたナノエマルジョン粒子の3日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図4】実施例1で得られたナノエマルジョン粒子の5日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

20

【図5】実施例1で得られたナノエマルジョン粒子の7日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図6】比較例1で得られたナノエマルジョン粒子の1日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図7】比較例1で得られたナノエマルジョン粒子の3日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図8】比較例1で得られたナノエマルジョン粒子の5日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図9】比較例1で得られたナノエマルジョン粒子の7日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

30

【図10】比較例2で得られたナノエマルジョン粒子の1日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図11】比較例2で得られたナノエマルジョン粒子の3日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図12】比較例2で得られたナノエマルジョン粒子の5日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図13】比較例2で得られたナノエマルジョン粒子の7日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図14】実施例1で得られたナノエマルジョン粒子の希釈前及び10倍希釈後のEPR及びDLSの結果を示す。

40

【図15】リン酸緩衝水溶液中で調製したナノエマルジョン粒子の1日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図16】リン酸緩衝水溶液中で調製したナノエマルジョン粒子の3日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図17】リン酸緩衝水溶液中で調製したナノエマルジョン粒子の4日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図18】リン酸緩衝水溶液中で調製したナノエマルジョン粒子の7日後に測定したEPR及びDLSの結果を示す。

【図19】リン酸緩衝水溶液中で調製したナノエマルジョン粒子のアスコルビン酸に対する安定性を示すグラフである。

50

- 【図20】リン酸緩衝水溶液のみ(Only (-)-PBS)の吸収スペクトルである。
- 【図21】ピレンをリン酸緩衝水溶液に添加した後の上澄み溶液(Pyrene /(-)-PBS)の吸収スペクトルである。
- 【図22】ピレンのみを内包したミセル(Pyrene /5/(-)-PBS)の吸収スペクトル、及びDLSの結果を示す。
- 【図23】化合物1a及びピレンを内包したナノエマルジョン粒子(Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS)の吸収スペクトル、及びDLSの結果を示す。
- 【図24】図23の350~500nmの範囲の吸収スペクトルの拡大図である。
- 【図25】リン酸緩衝水溶液のみ(Only (-)-PBS)の蛍光スペクトルである。
- 【図26】ピレンをリン酸緩衝水溶液に添加した後の上澄み溶液(Pyrene /(-)-PBS)の蛍光スペクトルである。 10
- 【図27】ピレンのみを内包したミセル(Pyrene /5/(-)-PBS)の蛍光スペクトルである。
- 【図28】化合物1a及びピレンを内包したナノエマルジョン粒子(Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS)の蛍光スペクトルである。
- 【図29】図28の425~500nmの範囲の蛍光スペクトルの拡大図である。
- 【図30】(-)-PBS中における(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンのアスコルビン酸に対する耐性評価である。
- 【図31】4.7 Tの磁場印加条件下における(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン、擬似ドラッグ或いはドラッグを内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンのT₁強調画像及び、水の縦緩和速度定数の決定である。 20
- 【図32】(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンと7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンのHeLa細胞に対する毒性評価である。
- 【図33】(-)-PBS中における(±)-3を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製からそれぞれ2時間後と3時間後に測定した(a)EPR及び(b)DLSの結果である。界面活性剤1と(±)-3の濃度は各々10 mMである。
- 【図34】(-)-PBS中における(±)-2 (n=4)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から3時間後と3時間半後に測定した(a)EPR及び(b)DLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=4)の濃度は各々10 mMと5 mMである。 30
- 【図35】(-)-PBS中における(±)-2 (n=8)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)1時間半後及び(b)2日後に測定したEPRの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=8)の濃度は各々10 mMと5 mMである。
- 【図36】(-)-PBS中における(±)-2 (n=8)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)1時間後及び(b)2日後に測定したDLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=8)の濃度は各々10 mMと5 mMである。
- 【図37】(-)-PBS中における(±)-2 (n=14)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)2時間後及び(b)2日後に測定したEPRの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=14)の濃度は各々10 mMである。 40
- 【図38】(-)-PBS中における(±)-2 (n=14)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の(a)調製直後及び(b)調製から2日後に測定したDLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=14)の濃度は各々10 mMである。
- 【図39】(-)-PBS中における(±)-2 (n=16)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)4時間後、(b)2日後及び(c)6日後に測定したEPRの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=16)の濃度は各々10 mMである。
- 【図40】(-)-PBS中における(±)-2 (n=16)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)2時間後、(b)2日後及び(c)6日後に測定したDLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=16)の濃度は各々10 mMである。
- 【図41】(-)-PBS中における(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルシ 50

オン粒子の調製から(a)2時間後、(b)2日後、(c)7日後及び(d)14日後に測定したEPRの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=18)の濃度は各々10 mMである。

【図42】(-)-PBS中における(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)1時間後、(b)2日後、(c)7日後及び(d)14日後に測定したDLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=18)の濃度は各々10 mMである。

【図43】(-)-PBS中における(±)-2 (n=20)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)2時間後、(b)2日後及び(c)6日後に測定したEPRの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=20)の濃度は各々10 mMである。

【図44】(-)-PBS中における(±)-2 (n=20)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン粒子の調製から(a)1時間後、(b)2日後及び(c)6日後に測定したDLSの結果である。界面活性剤1と(±)-2 (n=20)の濃度は各々10 mMである。

10

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明の有機ニトロキシドラジカル化合物、その製造方法、ナノエマルジョン粒子及びその用途について詳細に説明する。

【0019】

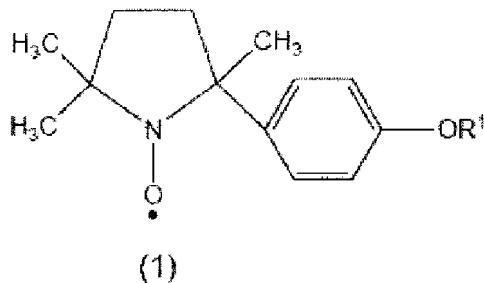
有機ニトロキシドラジカル化合物

本発明の有機ニトロキシドラジカル化合物は、式(1)：

【0020】

【化4】

20



【0021】

(式中、R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基を示す。)で表される化合物である(以下、単に「化合物(1)」ともいう。)。該有機ニトロキシドラジカル化合物は、R¹が疎水性部分であり、その他の部分が親水性部分である両親媒性を有している。

30

【0022】

R¹は、炭素数10～26の直鎖アルキル基であり、例えば、n-デシル、ラウリル、ミリスチル、セチル、ステアリル、イコシル基等が挙げられる。

R¹として、炭素数16～22の直鎖アルキル基が好ましく、炭素数18～22の直鎖アルキル基がより好ましく、炭素数18～20の直鎖アルキル基が特に好ましい。

【0023】

本発明の有機ニトロキシドラジカル化合物は、ラセミ体及び光学活性体のいずれかであることができる。

40

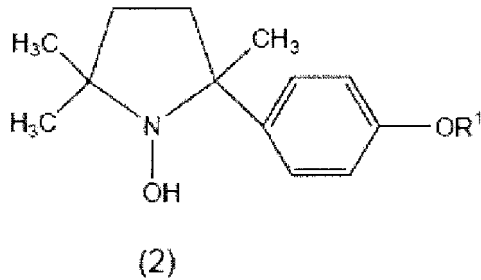
【0024】

有機ニトロキシドラジカル化合物の製造方法

化合物(1)は、例えば、式(2)：

【0025】

【化5】



【0026】

10

(式中、R¹は、前記に同じ。)

で表される化合物(以下、単に「化合物(2)」ともいう。)を酸化してラジカルを発生させることにより製造することができる。

【0027】

酸化は、例えば、適当な溶媒中、塩基の存在下で2価の銅化合物を触媒とし、酸化剤を用いて行うことができる。

【0028】

溶媒は、化合物(2)が溶解又は分散し易く、酸化反応に悪影響を及ぼさないものを使用することができる。このような溶媒として、例えば、メタノール、エタノール等のアルコール、テトラヒドロフラン等が挙げられる。溶媒の使用量は、化合物(2)1質量部に対して、通常40~60質量部程度であり、35~55質量部程度が好ましい。

20

【0029】

塩基として、例えば、アンモニア水、水酸化ナトリウム等が挙げられる。溶媒の使用量は、化合物(2)1質量部に対して、通常3~5質量部程度であり、2~4質量部程度が好ましい。

【0030】

触媒として、酢酸銅(II)、硝酸銅(II)等の2価の銅化合物が挙げられる。触媒の使用量は適宜選択することができる。例えば、化合物(2)1モルに対して、通常2~5モル程度、好ましくは3~4モル程度使用することができる。

【0031】

30

酸化剤として、酸素、オゾン、空気、酸化銀、過酸化水素等を挙げられる。酸化剤の使用量は、化合物(2)1モルに対して、通常2~5モル程度、好ましくは3~4モル程度使用することができる。

【0032】

反応温度及び反応時間は、使用する化合物(2)の量、酸化剤等により適宜調整することができる。例えば、反応温度は、通常10~40程度、好ましくは20~30程度である。反応時間は、通常1~5分間程度、好ましくは1~2分間程度である。

【0033】

化合物(2)は、市販されている製品を使用することができる。或いは、化合物(2)を公知の製造方法を適用して製造することができる。例えば、ニトロと、ベンゼン環の1位及び4位がそれぞれBr Mg基及びOR¹基で置換されたグリニャール試薬とのグリニャール反応により製造することができる。

40

グリニャール試薬の製造、及びグリニャール反応は、グリニャール反応で通常用いられる条件等に従って行うことができる。詳細な反応条件等は、実施例に記載する。

【0034】

ナノエマルジョン粒子及びその用途

本発明のナノエマルジョン粒子は、前記有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とが0.8:1から1.2:1のモル比で構成され、ニトロキシドラジカルが内包されているものである。

【0035】

50

本発明のナノエマルジョン粒子は、前記有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とで構成され、前記有機ニトロキシドラジカル化合物が前記非イオン性界面活性剤 1 モルに対して 0.8 ~ 1.2 モル含まれており、粒子中にニトロキシドラジカルが内包されていることが特徴である。

前記有機ニトロキシドラジカル化合物と前記非イオン性界面活性剤とのモル比が 0.8 : 1 から 1.2 : 1 であることにより、水系溶媒中で安定なエマルジョン粒子として存在することができる。より安定なエマルジョン粒子が得られることから、前記有機ニトロキシドラジカル化合物と非イオン性界面活性剤とのモル比は、1 : 1 であることが好ましい。

【0036】

有機ニトロキシドラジカル化合物は、上述した通りである。

10

【0037】

非イオン性界面活性剤は、疎水性部分と親水性部分とを有する両親媒性化合物である。

該非イオン性界面活性剤として、例えば、ラウリン酸グリセリン、モノステアリン酸グリセリン、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル等のエステル型界面活性剤；ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル等のエーテル型界面活性剤；ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステルポリアルキレングリコール等のエステルエーテル型界面活性剤；ラウリン酸ジエタノールアミド、ステアリン酸ジエタノールアミド等のアルカノールアミド型界面活性剤；デシルグリコシド、ラウリルグリコシド等のアルキルグリコシド、セタノール、ステアリルアルコール等の高級アルコール等が挙げられる。

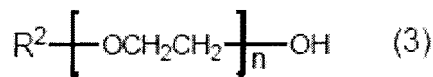
20

【0038】

これらの非イオン性界面活性剤の中で、炭素数 10 ~ 26 の直鎖アルキル基を有するものが好ましい。より好ましくは、下記式 (3) :

【0039】

【化6】



【0040】

(式中、 R^2 は、炭素数 10 ~ 26 の直鎖アルキル基を示す。n は 2 以上の整数である。)

30

で表されるポリオキシエチレンアルキルエーテルである。なお、前記式 (3) の非イオン性界面活性剤においては、 R^2 が疎水性部分であり、その他の部分が親水性部分である。

【0041】

R^2 は、炭素数 10 ~ 26 の直鎖アルキル基であり、例えば、n - デシル、ラウリル、ミリスチル、セチル、ステアリル、イコシル等が挙げられる。

R^2 の炭素数は、 R^1 の炭素数に近いことが好ましく、 R^1 の炭素数と同じであることがより好ましい。 R^2 として、炭素数 16 ~ 22 の直鎖アルキル基が好ましく、炭素数 18 ~ 22 の直鎖アルキル基がより好ましく、炭素数 18 ~ 20 の直鎖アルキル基が特に好ましい。

40

炭素数 10 ~ 26 の直鎖アルキル基を有するポリオキシエチレンアルキルエーテルとして、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレントリデシルエーテル等が挙げられる。

【0042】

n は 2 以上の整数であり、好ましくは、10 ~ 20 の整数である。

【0043】

また、前記非イオン性界面活性剤は、生体適合性を有するものが好ましい。

【0044】

50

前記非イオン性界面活性剤として、市販品を使用することができる。例えば、B r i j (登録商標) 3 0、B r i j (登録商標) 3 5、B r i j (登録商標) 5 6、B r i j (登録商標) 5 8、B r i j (登録商標) 7 8、B r i j (登録商標) 9 8等を挙げることができる。

【0045】

本発明のナノエマルジョン粒子は、水系溶媒中で前記有機ニトロキシドラジカル化合物(化合物(1))と前記非イオン性界面活性剤(化合物(2))とを混合した後、混合物を加熱することにより得ることができる。

【0046】

本発明のナノエマルジョン粒子の製造に用いる水系溶媒としては、水、親水性有機溶媒、又は水と親水性有機溶媒との混合溶媒が挙げられる。

親水性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、t e r t - ブタノール等のアルコール系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン系溶媒；酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒；N, N - ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、スルホラン、N - メチルピロリドン等の非プロトン性極性溶媒；ジエチレングリコールモノメチルエーテル、プロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート等のグリコールエーテル類；エチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール系溶媒；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル系溶媒等を使用することができる。

水系溶媒としては、水が好ましい。

【0047】

溶媒における前記有機ニトロキシドラジカル化合物の濃度は、 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ が好ましく、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ がより好ましい。濃度を前記範囲にすることにより、安定性の良好なナノエマルジョン粒子を得ることができる。

【0048】

溶媒における前記非イオン性界面活性剤のモル濃度は、 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ が好ましく、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ がより好ましい。濃度の前記範囲にすることにより、安定性の良好なナノエマルジョン粒子を得ることができる。

【0049】

前記有機ニトロキシドラジカル化合物と前記非イオン性界面活性剤との混合比率は、有機ニトロキシドラジカル化合物：非イオン性界面活性剤 = 0.8 : 1 から 1.2 : 1 のモル比の範囲内が好ましく、1 : 1 のモル比がより好ましい。前記有機ニトロキシドラジカル化合物と前記非イオン性界面活性剤とを前記比率で混合することにより、安定性の良好なナノエマルジョン粒子を得ることができる。

このことから、本発明のナノエマルジョン粒子は、図1に示すような前記有機ニトロキシドラジカル化合物と前記非イオン性界面活性剤との入れ子構造により形成されているものと推察される。

さらに、前記非イオン性界面活性剤の炭素鎖(R^2)と前記有機ニトロキシドラジカル化合物の炭素鎖(R^1)とがほぼ等しい長さである場合には、図1のような入れ子構造を形成する際、炭素鎖同士が密に組み合わせられ、分子間で働く相互作用も増大するため、より安定なナノエマルジョン粒子が得られることが考えられる。

【0050】

水系溶媒中で前記有機ニトロキシドラジカル化合物(化合物(1))と前記非イオン性界面活性剤(化合物(2))とを混合する。化合物(1)と化合物(2)とを混合は、好ましくは攪拌下で行われる。化合物(1)と化合物(2)とを、常圧下で、数秒間から数時間攪拌しながら行うことがより好ましい。

攪拌及び混合は、例えば、マグネチックスターラー等を用いて行うこともできるし、超音波又はマイクロウェーブを照射することにより行うこともできる。例えば、水系溶媒中でとして水を用いる場合、攪拌している前記非イオン性界面活性剤の水溶液中に、前記有機ニトロキシドラジカル化合物を滴下して攪拌し、さらに超音波照射することにより両者

10

20

30

40

50

を混合することが好ましい。

前記有機ニトロキシドラジカル化合物が水に難溶である場合には、前記有機ニトロキシドラジカル化合物が可溶である親水性有機溶媒に予め溶解させ、得られた溶液を前記非イオン性界面活性剤の水溶液中に滴下することが好ましい。混合した後に加熱する温度としては、60～90 程度が好ましく、85～90 程度がより好ましい。加熱時間は、15～40 分間程度が好ましく、30 分間程度がより好ましい。

【0051】

ナノエマルジョン粒子が形成されたことは、溶液の色が濁色から透明に変化することにより確認することができるが、これに限定されるものではない。

【0052】

本発明のナノエマルジョン粒子は、粒子の外側が親水性、粒子の内部が疎水性という両親媒性の粒子であって、分子内部にニトロキシドラジカルを内包している。よって、本発明のナノエマルジョン粒子は、安定的なラジカル構造を有しており、ビタミンC等による還元を受けにくい。

本発明のナノエマルジョン粒子は、ニトロキシドラジカルにより常磁性を有しており、磁場による運動制御が可能な機能性有機材料として使用することができる。また、ラジカル構造の組織化を効率的におこなうことができるため、磁場制御による物質輸送等への応用、安定ラジカルを含む医薬品ドラッグデリバリーシステム（DDS）への活用が可能である。

【0053】

詳細には、本発明のナノエマルジョン粒子は、磁性粒子をMRIにより体内の深部までリアルタイムに追跡できることから、MRI用造影剤として利用することが可能である。

【0054】

また、本発明のナノエマルジョン粒子は、分子の内部が疎水性であることから、分子内部に抗がん剤等の疎水性物質を内包させることができる。さらに粒子径が70 nm程度であって、粒子として安定であることから、抗がん剤を内包したナノエマルジョン粒子に外部磁場を印加することにより、抗がん剤を腫瘍組織に誘導することが可能となる。よって、本発明のナノエマルジョン粒子は、DDSキャリアーとして利用することが可能である。

この手法によれば、がん細胞近辺に磁石を設置することにより、がん細胞へ効率的に抗がん剤を送達することが可能であり、特に皮膚がん、乳がん等の皮膚直下にできるがん細胞へのターゲティングに威力を発揮することが期待される。また、本発明のナノエマルジョン粒子の内部に蛍光剤を内包させれば、がん細胞の位置を特定することが可能となる。

【実施例】

【0055】

以下に実施例および比較例を示して本発明をより具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0056】

実施例における分析および評価は、以下の方法によって実施した。なお、実施例で使用した試薬は、特に断りがない限り、市販品を購入し、精製せずにそのまま用いた。

【0057】

実施例における分析及び評価は、以下の方法によって実施した。

(1) 電子常磁性共鳴 (EPR)

EPRは、パルスESR装置（日本電子株式会社製、JES-PX1050型）を使用して測定した。詳細には、サンプルをEPRキャピラリー管内に封入し、両端をパテで閉じた。次にこのキャピラリーをEPR管に挿入し、これをキャビティーに設置した。EPR測定は、室温化、0.33 Tの磁場印加条件下でサンプルにマイクロ波を照射して行った。

(2) 動的光散乱測定 (DLS)

DLSは、動的光散乱解析装置（マイクロトラック・ベル社製、UPA-UT151）を用いて

10

20

30

40

50

、動的光散乱 (D L S) 法によって流体力学的直径を測定した。

(3) 吸収スペクトル

吸収スペクトルは、紫外可視近赤外分光光度計 (株式会社島津製作所製、UV-3600型) を使用して測定した。

(4) 蛍光スペクトル

蛍光スペクトルは、BioTek Instruments, Inc. 製、Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader を使用して測定した。

【 0 0 5 8 】

製造例 1 (ニトロンの合成)

常圧下、110 で蒸留した 3 - ブテン - 2 - オン (22.0 g、0.314 mol) を 2 - ニトロプロパン (139 g、1.56 mol) に溶解させた。得られた溶液に、0 でテトラメチルグアニジン (10.8 g、0.094 mol) をゆっくり加え、混合物を常温で一晩攪拌し、その後、2 N 塩酸を加えてジエチルエーテルで抽出した。

有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を除去した。さらに、減圧蒸留により未反応の 2 - ニトロプロパンを除き、5 - メチル - 5 - ニトロヘキサン - 2 - オン (14.4 g、0.090 mol、収率 29%) を得た。

【 0 0 5 9 】

次に、5 - メチル - 5 - ニトロヘキサン - 2 - オン (20.1 g、0.125 mol) に水 (139 mL) 及び塩化アンモニウム (17.301 g、0.323 mol) を加えた。得られた混合物に 0 で亜鉛粉末 (77.9 g、0.236 mol) をゆっくり加えて 4 時間反応させた。溶液を吸引濾過して固体をメタノールで洗浄した。

濾液をクロロホルム (50 mL x 3) で抽出して無水硫酸マグネシウムで乾燥した。クロロホルムを除去した後、ベンゼン共沸により乾燥した。3 時間真空乾燥した後、ニトロン (±) - 11) を得た (4.83 g、0.038 mol、収率 30%) 。

【 0 0 6 0 】

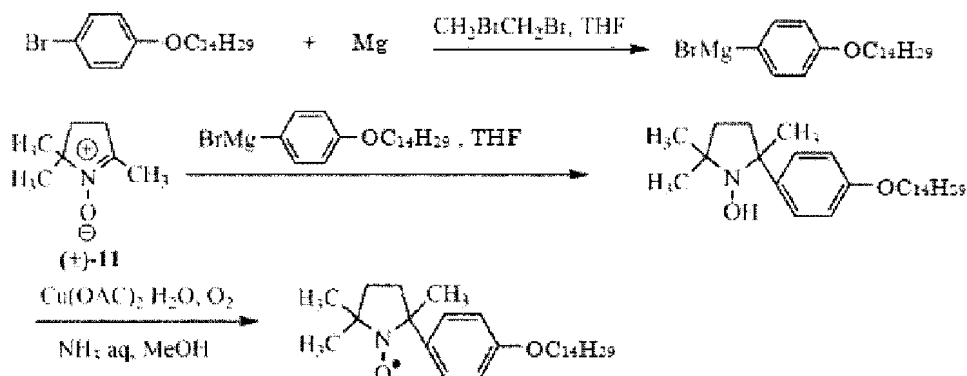
実施例 1

(1) 有機ニトロキシドラジカル化合物の合成 (炭素数 18 の合成例および元素分析結果)

式 (1) において、R¹ が炭素数 14 の直鎖アルキル基である有機ニトロキシドラジカル化合物 (化合物 1 a) を、以下のようにして合成した。

【 0 0 6 1 】

【 化 7 】



【 0 0 6 2 】

マグネシウム (0.506 g、20.0 mmol) を二口フラスコに入れ、減圧下で乾燥させ、フラスコをアルゴンで満たした。これにテトラヒドロフラン (20 mL) 及び 1 - ブロモ - 4 - テトラデシロキシベンゼン (7.10 g、20.0 mmol) を加えた。さらに、1, 2 - ジブromoエタンを少量入れて反応を開始させ、常温で 4 時間攪拌し、グリニヤール試薬を調製した。

10

20

30

40

50

【0063】

一方で、製造例1で合成したニトロノ(1.27 g、10.0 mmol)を二口フラスコに入れ、数滴のベンゼンで共沸させた。二口フラスコ内を真空にした後、アルゴンで満たした。そこにテトラヒドロフラン(20 mL)を加え、-78℃に冷却し、グリニャール試薬を滴下した。混合物をゆっくり昇温した後、常温で一晩攪拌を続けた。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液(50 mL)に注ぎ、ジクロロメタン(50 mL)で抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。

【0064】

残渣をメタノール(30 mL)に溶解させ、25%濃アンモニア水(2 mL)及び酢酸銅(0.805 g、4.00 mmol)を加え、酸素を1分間吹き込んだ。溶液が濃青色に変化した後、反応液を減圧濃縮し、メタノールを留去した。残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50 mL)を加え、ジクロロメタン(50 mL)で抽出した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。

最後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(n -ヘキサン/ジエチルエーテル = 90/10 (容積比))により精製し、化合物1a(0.478 g、1.15 mmol、収率11.5%)を得た。

【0065】

元素分析Calculated (%): C, 77.83; H, 11.13; N, 3.36. Found (%): C, 77.61; H, 11.01; N, 3.34.

EPR(THF, 25℃): g=2.0067, a_N=1.38 mT

【0066】

(2) ナノエマルジョン粒子の調製

界面活性剤として、シグマ・アルドリッチ社製Brij(登録商標)58(ポリオキシエチレンセチルエーテル、n=20)(0.114 g)をバイアルに入れ、必要量の水を加え、2分間超音波照射を行い、 1×10^{-2} Mの界面活性剤水溶液10 mLを調製した。

【0067】

化合物1a(8.52 mg、20.4 μmol)を少量のジエチルエーテルに溶解させた。得られたジエチルエーテル溶液を、激しく攪拌している界面活性剤水溶液(2.0 mL)中に少しずつ滴下し、30分間攪拌させた。その後、3分間超音波照射し、続いて90℃で30分間加熱することによりナノエマルジョン粒子を調製した。

【0068】

比較例1

1-ブロモ-4-テトラデシロキシベンゼンの代わりに1-ブロモ-4-ブトキシベンゼン(4.58 g、20.0 mmol)を使用した以外は、実施例1と同様にして、式(1)においてR¹が炭素数4の直鎖アルキル基である有機ニトロキシドラジカル化合物を合成した(0.396 g、1.43 mmol、収率14.3%)。

【0069】

元素分析Calculated (%): C, 73.87; H, 9.48; N, 5.07. Found (%): C, 73.63; H, 9.66; N, 5.02.

EPR(THF, 25℃): g=2.0067, a_N=1.39 mT

【0070】

実施例1(2)で調製した界面活性剤水溶液(1×10^{-2} M)に、上で得られた有機ニトロキシドラジカル化合物(2.76 mg、10 μmol)をマイクロシリンジで滴下した。そこに5秒間超音波照射するとマクロエマルジョン(粒子径約1 μm)が生成し、バイアル底部に沈降した。このマクロエマルジョンは永久磁石(最大500 mT)に反応し、水中を自由に動いた。

これは、該マクロエマルジョン中の有機ニトロキシド化合物が磁性を有していることに基づくものである。これより、同様の有機ニトロキシド化合物を有している実施例1で調製したナノエマルジョン粒子も、磁性を有していることが容易に予想できる。

【0071】

10

20

30

40

50

その後、再度超音波照射し（20秒間）、次いで90℃で30分間加熱することによりナノエマルジョン粒子を調製した。

【0072】

比較例2

1-ブロモ-4-テトラデシロキシベンゼンの代わりに1-ブロモ-4-オクトキシベンゼン（5.71g、20.0mmol）を使用した以外は、実施例1と同様にして、式（1）においてR¹が炭素数8の直鎖アルキル基である有機ニトロキシドラジカル化合物を合成した（0.686g、2.06mmol、収率20.6%）。

【0073】

元素分析Calculated (%): C, 75.86; H, 10.31; N, 4.21. Found (%): C, 75.99; H, 10.35; N, 4.19.

EPR(THF, 25℃): g=2.0066, a_N=1.39 mT

【0074】

上記で得られた有機ニトロキシドラジカル化合物を用い、実施例1（2）と同様にしてナノエマルジョン粒子を調製した。

【0075】

試験例1（ナノエマルジョン粒子の安定性評価）

実施例1、比較例1及び比較例2で調製したナノエマルジョン粒子について、1日後、3日後、5日後、及び7日後にEPR及びDLSを測定した。実施例1のナノエマルジョン粒子の結果を図2～5に、比較例1のナノエマルジョン粒子の結果を図6～9に、及び比較例3のナノエマルジョン粒子の結果を図10～13に示す。

【0076】

図2～5より、実施例1のナノエマルジョン粒子は、1日目から2日目にかけて粒径が急激に増加し、2日目以降、粒径が一定（約70nm）となったことから、7日間にわたって安定に存在することが分かった。EPRスペクトルに化合物1a由来のピーク（3本線）が見られなかったことから、滴下したほぼすべての化合物1aがナノエマルジョン粒子内部に内包されていることがわかった。

【0077】

図6～9より、7日間にわたって粒径は一定（約9nm）であり、EPRスペクトルの線形にも大きな変化が見られなかったことから、ナノエマルジョン粒子は7日間にわたって安定に存在していることがわかった。しかし、EPRスペクトルのピークが若干3本見えていることから、ナノエマルジョン粒子から化合物1aの漏れが生じていることがわかった。

【0078】

図10～13より、7日間にわたって粒径は一定（約100nm）であり、EPRスペクトルの線形にも大きな変化が見られなかったことから、ナノエマルジョン粒子は7日間にわたって安定に存在していることがわかった。しかし、EPRスペクトルのピークが若干2本見えていることから、ナノエマルジョン粒子から化合物1aの漏れが生じていることがわかった。

【0079】

上記結果より、実施例1のナノエマルジョン粒子は水中で安定に存在することがわかった。

【0080】

試験例2（ナノエマルジョン粒子の安定性評価（10倍希釈））

実施例1でナノエマルジョン粒子を調製した後、水溶液の濃度を10倍に希釈し、EPR及びDLSを測定した。その結果を図14に示す。

【0081】

図14より、希釈の前後でEPRスペクトルの線形に大きな変化はなく、粒子径も変わらないことから、実施例1で調製したナノエマルジョン粒子は、10倍希釈後も安定に存在することがわかった。

【0082】

実施例 2

ナノエマルジョンをリン酸バッファー中で調製した。

【0083】

界面活性剤であるBrij（登録商標）58（0.114g）をバイアルに入れ、必要量のリン酸緩衝水溶液（-）-PBS）を加え、2分間超音波照射を行い、 1×10^{-2} Mの界面活性剤のリン酸緩衝水溶液10mLを調製した。

【0084】

化合物1a（8.52mg、20.4 μ mol）を少量のエーテルに溶解させた。得られたエーテル溶液を、激しく攪拌している界面活性剤のリン酸緩衝水溶液（2.0mL）中に少しずつ滴下し、30分間攪拌させた。その後、3分間超音波照射し、続いて90で1時間加熱することによりナノエマルジョン溶液（2.0mL）を調製した。

10

【0085】

試験例 3（リン酸バッファー中におけるナノエマルジョン粒子の安定性評価）

実用性を評価する目的で、化合物1aを内包した界面活性剤のナノエマルジョン粒子のリン酸緩衝水溶液中における安定性（経時変化）をEPR分光法及びDL S測定により評価した。結果を図15～18に示す。

【0086】

図15～18より、純水中とは異なり、7日目にはエマルジョン粒子同士が合一した。これは、エマルジョン以外の別の構造体（会合ミセル、ラメラ構造等）に変化したと考えられる。よって、ナノエマルジョン粒子は、リン酸緩衝水溶液中においては純水中ほど安定することができないと考えられる。

20

【0087】

試験例 4（リン酸バッファー中におけるナノエマルジョン粒子のアスコルビン酸に対する安定性評価）

アスコルビン酸に対する安定性を評価するため、実施例2と同様にして調製したナノエマルジョン粒子のリン酸緩衝水溶液（2.0mL）に、アスコルビン酸（3.59mg、0.02mmol）を添加し、EPRスペクトルを測定した。測定開始直後の314.5mT～339.5mT（3145～3395ガウス）の範囲のEPRスペクトルの面積値（2回積分値）を100%として、スペクトル面積値の時間変化を測定した。結果を図19に示す。

30

【0088】

図19より、化合物1aの濃度が一定となるまでに約150分かかった。よって、このナノエマルジョン粒子は還元剤に対して徐々に還元されるため、DDS、MRI用造影剤等への適用に有利であると考えられる。

【0089】

実施例 3

リン酸バッファー中でピレン（疑似薬剤）及び化合物1aを内包した界面活性剤のナノエマルジョン粒子を調製した。

【0090】

化合物1a（8.52mg、20.4 μ mol）及びピレン（0.20mg、0.99 μ mol）を少量のエーテルに溶解させた。得られたエーテル溶液を、激しく攪拌している界面活性剤のリン酸緩衝水溶液（2.0mL）中に少しずつ滴下し、30分間攪拌させた。その後、3分間超音波照射し、続いて90で1時間加熱することによりナノエマルジョン溶液（2.0mL）を調製した。

40

【0091】

試験例 5（リン酸バッファー中におけるピレンを内包したナノエマルジョン粒子の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定）

エマルジョン内部にピレンが内包されていることを確認するために、実施例3で調製したナノエマルジョン粒子（Pyrene/(\pm)-10c/5/(-)-PBS）の吸収スペクトルを測定した。

50

比較として、リン酸緩衝水溶液のみ (Only (-)-PBS)、ピレンをリン酸緩衝水溶液に添加した後の上澄み溶液 (Pyrene /(-)-PBS)、ピレンを内包したミセル (Pyrene /5/(-)-PBS) の吸収スペクトルをそれぞれ測定した。

また、ナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) 及びピレンを内包したミセル (Pyrene /5/(-)-PBS) については DLS を測定した。それらの結果を図 20 ~ 23 に示す。

また、ナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) については、350 ~ 500 nm の範囲の吸収スペクトルの拡大図を図 24 に示す。

【0092】

図 23 より、化合物 1 a とともにピレンが内包された界面活性剤のナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) では、ピレン由来の吸収スペクトルが確認された。また、ピレンは通常水に極めて難溶でありバイアルの底部に沈殿するが、実施例 3 で調製したエマルジョン溶液ではバイアルの底部に沈殿物は確認されなかった。よって、加えられたピレンは磁性エマルジョンの内部に内包されていると考えられる。

10

【0093】

また、DLS 測定より、化合物 1 a 及びピレンを内包したナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) の粒径は約 15 nm となった (図 23)。

化合物 1 a なしでピレンのみを内包したミセル (Pyrene /5/(-)-PBS) の粒径が約 10 nm であることから (図 22)、エマルジョン粒子 1 個に内包されるピレンは微量であると考えられる。

20

【0094】

さらに、化合物 1 a とともにピレンが内包された界面活性剤のナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) については蛍光スペクトルを測定した。比較のために、リン酸緩衝水溶液のみ (Only (-)-PBS)、ピレンをリン酸緩衝水溶液に添加した後の上澄み溶液 (Pyrene /(-)-PBS)、ピレンを内包したミセル (Pyrene /5/(-)-PBS) の蛍光スペクトルをそれぞれ測定した。

図 23 の吸収スペクトルから最大吸収波長を見積もり、励起波長 ($\lambda_{ex}=320 \pm 10\text{nm}$) を決定した。それらの結果を図 25 ~ 28 に示す。

また、ナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) については、425 ~ 500 nm の範囲の蛍光スペクトルの拡大図を図 29 に示す。

30

【0095】

図 28 より、化合物 1 a 及びピレンを内包したナノエマルジョン粒子に関しては、強度の大きい発光現象は見られなかった。この原因は、化合物 1 a 中のニトロキシドラジカル ($\text{N-O}\cdot$) が $n-\pi^*$ 遷移 (450 nm) を有しているため (図 24 参照)、蛍光消光するためと考えられる。

その証拠に、図 28 の化合物 1 a 及びピレンを内包したナノエマルジョン粒子 (Pyrene/(±)-10c/5/(-)-PBS) の蛍光スペクトルを拡大すると、450 nm 近傍にわずかながら発光が見られた (図 29)。

【0096】

実施例 4

磁性ナノエマルジョンの MRI 造影能評価と抗癌剤内包磁性ナノエマルジョンの細胞毒性評価

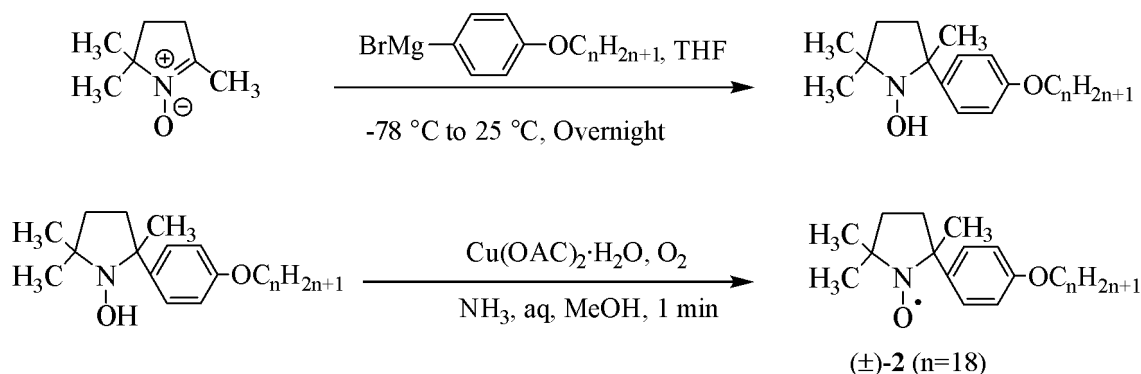
40

【0097】

(1) 有機ニトロキシドラジカル化合物 (±)-2(n=18) の合成

式 (1) において、 R^1 が炭素数 18 の直鎖アルキル基である有機ニトロキシドラジカル化合物 (化合物 1 b) を、以下のようにして合成した。

【化 8】



10

【0098】

削り状のマグネシウム(0.253 g, 10 mmol)を二口フラスコに入れ、減圧下で乾燥させ、フラスコをアルゴンで満たした。これにテトラヒドロフラン(10 mL)及び少量の1,2-ジブプロモエタンを加え、10分間攪拌させた。これに、事前にベンゼン共沸により乾燥させた1-ブromo-4-オクタデシロキシベンゼン(4.255 g, 10 mmol)を溶解させたテトラヒドロフラン溶液(40 mL)を加えた。常温で2時間攪拌し、グリニャール試薬を調製した。

【0099】

20

一方で、製造例1で合成したテトラメチルニトロン(0.635 g, 5.00 mmol)を二口フラスコに入れ、数滴のベンゼンで共沸させた。二口フラスコ内を真空にした後、アルゴンで満たした。そこにテトラヒドロフラン(20 mL)を加え、-78 °Cに冷却し、グリニャール試薬を滴下した。混合物をゆっくり昇温した後、常温で一晩攪拌を続けた。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液(100 mL)に注ぎ、ジクロロメタン(100 mL)で抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。

【0100】

残渣をメタノール(30 mL)とジクロロメタン(30 mL)の混合溶液に溶解させ、25%濃アンモニア水(2 mL)及び酢酸銅(0.805g, 4.00 mmol)を加え、酸素を1分間吹き込んだ。溶液が濃青色に変化した後、反応液を減圧濃縮し、メタノールを留去した。残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(100 mL)を加え、ジクロロメタン(100 mL)で抽出した。

30

【0101】

得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。最後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン/ジエチルエーテル = 90/10 (容積比))により精製し、有機ニトロキシドラジカル化合物(±)-2 (n=18) (0.440 g, 0.93 mmol、収率18.6%)を得た。

元素分析Calculated (%): C, 78.76; H, 11.51; N, 2.96. Found (%): C, 78.89; H, 11.49; N, 2.78.

EPR (0.1 mM in THF, 25 °C): g=2.0068, aN=1.39 mT

【0102】

40

(2) (-)-PBS中における(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性

(ナノエマルジョン粒子の調製)

界面活性剤として、シグマ・アルドリッチ社製Brij (登録商標) 58 (ポリオキシエチレンセチルエーテル、n = 20) (0.225 g, 200 μmol)をバイアルに入れ、必要量の(-)-PBSを加え、加熱(90 °C, 2分間)と超音波照射(1分間)を行い、10 mMの界面活性剤水溶液20 mLを調製した。

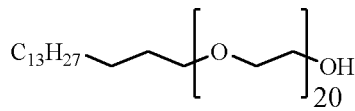
化合物(±)-2 (n=18) (7.06 mg, 15 μmol)を少量のジエチルエーテルに溶解させた。これに界面活性剤水溶液(1.5 mL)を滴下し、1分間攪拌させた。その後、90 °Cで10分間加熱することにより(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンを調製した。

50

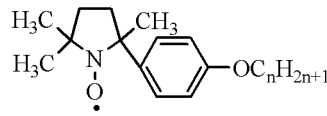
【 0 1 0 3 】

(3) (±) - 2 (n = 18) を内包した界面活性剤 1 の磁性ナノエマルジョンの還元耐性

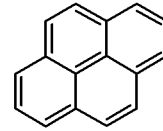
【 化 9 】



1

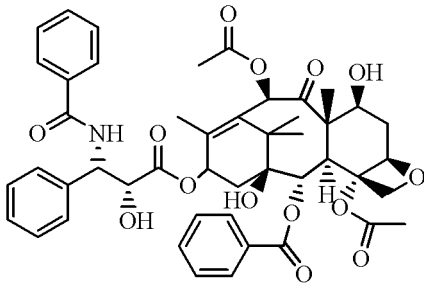


(±) - 2 (n = 18)

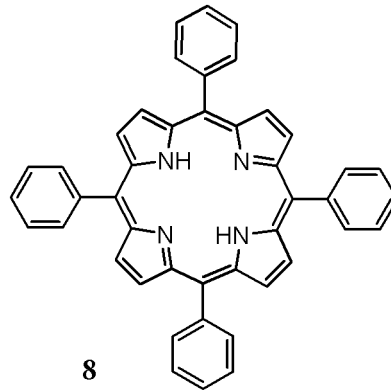


6

10

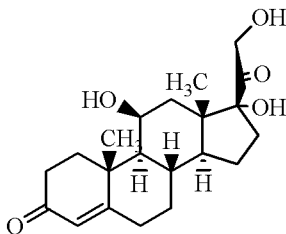


7



8

20



9

【 0 1 0 4 】

(±) - 2 (n = 18) を内包した界面活性剤 1 の磁性ナノエマルジョンをダルベッコリン酸緩衝液 (-) - PBS (Wako, Lot. DSJ7024) 中で作製し、磁性ナノエマルジョンの還元剤に対する安定性を評価した。具体的には、(±) - 2 (n = 18) を内包した界面活性剤 1 の磁性ナノエマルジョンの水溶液にラジカルに対して 1.75 倍のアスコルビン酸を添加し、磁性ナノエマルジョンのアスコルビン酸耐性を DLS 法と EPR 分光法を用いて評価した。

30

【 0 1 0 5 】

界面活性剤 1 と (±) - 2 (n = 18) とアスコルビン酸の濃度比は、[1 / (±) - 2 (n = 18) / Ascorbic acid = 1.0 × 10⁻² mM / 1.0 × 10⁻² mM / 1.75 × 10⁻² mM] とした。調製方法は、少量のエーテルに溶解させた (±) - 2 (n = 18) の溶液に界面活性剤水溶液を 1.5 mL 加えた後、90 で加熱し、エーテルを系から除去することで、磁性ナノエマルジョンを調製した。得られた磁性ナノエマルジョンにアスコルビン酸を添加し、EPR 測定と DLS 測定を直ちに行った。

40

【 0 1 0 6 】

ラジカル濃度の変化については、EPR スペクトルを二回積分し、開始直後の EPR スペクトルの二回積分値を 100 として計算を行った (図 3 0) 。

その結果、この磁性ナノエマルジョンは TEMPOL のような水溶性ラジカルと比べて、ゆっくりと還元を受けることが分かった。この結果は、磁性ナノエマルジョンがアスコルビン酸に対して優れた還元耐性を有していることが示された。

本測定では、EPR 装置として JEOL RE-2X を使用した。

【 0 1 0 7 】

(4) MRI ファントム測定

50

ガドリニウム製剤に代わるMRI造影剤として(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンが有効であると考えた。

そこで、4.7 Tの磁場印加条件下でMRIファントム測定を行い、磁性ナノエマルジョンと疎水性擬似ドラッグ或いはドラッグを内包した磁性エマルジョンのMRIにおける画像造影能力を評価した。

擬似ドラッグとしてピレン6 (SIGMA-ALDRICH, Lot. S22012)、テトラフェニルポルフィリン8を使用した。また、疎水性のドラッグとしてヒドロコルチゾン9 (TCI, LOT. SZ6YA)とパクリタキセル7 (サワイ、パクリタキセル注射液30 mg)を使用した。7は実際に医療現場で使用されている抗がん剤である。

【0108】

測定法

本測定では、Bruker 4.7 Tマシン (BioSpec 47 USR) を使用した。(-)-PBS中で(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン[1 / (±)-2 (n=18) = 10 mM / 10 mM]を調製した。さらに、この溶液を1/2, 1/8, 1/16に希釈し、1.25 mMから10 mMの(±)-2 (n=18)を内包した磁性ナノエマルジョンを計4種類調製した。

【0109】

また、擬似ドラッグ或いはドラッグを内包した磁性エマルジョンについては、(±)-2 (n=18)に対して10 mol%の疎水性化合物6, 7, 8或いは9を内包した磁性ナノエマルジョン [1と(±)-2 (n=18)の最終濃度: 各々10 mM] を調製した。ただし、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンについては、先と同様に水溶液を希釈し、1.25 mMから10 mMの(±)-2 (n=18)を内包した磁性ナノエマルジョンを計4種類調製した。

【0110】

これらのサンプルから1 mLをプラスチック製のチューブに移し、それをサンプルホルダーに設置した。続いてこのホルダーをMR装置内に挿入した。最後に、レーザーによるサンプルの位置決めを行った後、室温条件下で測定を行った。測定手法としてはスピンエコー法を用いた。画像用の測定条件と r_1 値算出用の測定条件は異なっており、それぞれ次のようになっている。

【0111】

[画像用の条件; エコー時間 (TE) = 20 ms, 繰り返し時間 (TR) = 200 ms, r_1 値算出用の測定条件; エコー時間 (TE) = 10 ms, 繰り返し時間 (TR) = 5000, 3000, 1500, 800, 400 and 200 ms].

【0112】

測定結果

図3 1 aに得られたMR画像を示す。

(a) パネル(A-D): (±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンの T_1 強調画像 [1と(±)-2 (n=18)の最終濃度: 各々10, 5, 2.5, 1.25 mM] パネル(E-H): 10 mol%の7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンの T_1 強調画像 [1と(±)-2 (n=18)の最終濃度: 各々10, 5, 2.5, 1.25 mM] パネル(I-K): 10 mol%の(I) 6、(J) 8、(K) 9を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンの T_1 強調画像 [1と(±)-2 (n=18)の最終濃度: 各々10 mM] パネル(L): コントロール(-)-PBS.

図3 1 aより、コントロール[(-)-PBS]と比較して、何れのサンプルからもコントラストの増加が観察されたが、10 mMの(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンは優れた造影効果を示した。

さらに、10 mol%の7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンはより優れた造影効果を示すことが分かった。

(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンと7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンに関しては、各々の濃度における T_1 緩和時間を算出し、(±)-2 (n=18)の造影能力の指標となる r_1 値を算出した。 r_1 値は

10

20

30

40

50

軸に T_1 緩和時間の逆数を、x軸に(±)-2 (n=18)の濃度をとって描いた近似直線の傾きとして求められる。

【0113】

図3 1bと図3 1cは、それぞれ、(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンと7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョン中に含まれる(±)-2 (n=18)の濃度と T_1 緩和時間の関係を示す。

(b) (±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンと(c) 7を内包した界面活性剤1 と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンにおける(±)-2 (n=18)の濃度と T_1 緩和時間の関係。

グラフの傾きから r_1 値を算出すると、それぞれ $0.12 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$ と $0.16 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$ と算出された。この結果は、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンが、(±)-2 (n=18)のみを内包した磁性ナノエマルジョンと比べて水の緩和をより効果的に短縮することを示唆している。

7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンの粒径は12 nmであり、(±)-2 (n=18)のみを内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン (粒径16 nm)よりも小さい。また、EPRスペクトルは三本線成分が観察された。

これらのことを勘案すると、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンにおいては、その内部に存在している水分子と外部に存在している水分子との間で早い交換が起こっていると考えられる。さらに、(±)-2 (n=18)の回転相関時間が増加していることを示唆されている。

【0114】

(5) In vitroにおける細胞毒性評価

(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンと、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンのHeLa細胞に対する毒性評価を行った。

【0115】

測定法

10%のウシ胎児血清 (SIGMA-ALDRICH, LOT 14A189)と1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Wako, Penicillin-Streptomycin Solution (×100))を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Wako, LOT DSG7015)中で培養されたHeLa細胞を、96ウェルマイクロプレート (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Nunclon(TM) Delta 96-Well MicroWell(TM) Plates, Sterile)の各ウェルにHeLa細胞を9,000個/100 μL ずつ播種した。

続いて界面活性剤1のミセル水溶液、(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン、0.001 mol%の7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョン、7の(-)-PBS溶液をそれぞれ10 μL ずつウェルに加え、インキュベータ(Thermo SCIENTIFIC, HERACELL 150i)で24時間培養 (温度: 37 °C、二酸素濃度: 5%)した。

ミセル水溶液 [1の濃度: 10 mM]、(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョン [1 と(±)-2 (n=18)の濃度: 各々10 mM]と7の(-)-PBS溶液 [7の濃度: 10 μM]は、ウェルに添加される前に(-)-PBSで1/32 [1 と(±)-2 (n=18)の最終濃度: 各々0.313 mM]、1/64 [0.156 mM]、1/128 [0.078 mM]、1/256 [0.039 mM]に希釈された。

続いて、これらの水溶液を各ウェルに添加した。24時間培養後、各ウェルを(-)-PBSで二回洗浄し、cck-8 評価法 (同仁化学研究所、LOT JH159)により評価した。

本測定では、cck-8試薬を添加後、30分間培養し、マイクロプレートリーダー (TECAN, infinite M200)により細胞数に応じた吸光度 (波長: 450 nm)を測定した。解析の際は、コントロールとして(-)-PBSのみを添加した際に得られた細胞生存率を100%として各サンプルにおける細胞生存率を算出した。また、一つのサンプルにつき4ウェル使用し、各ウェルから得られた細胞生存率の平均を算出した。

なお、ミセル水溶液とすべての磁性エマルジョンは(-)-PBS中で調製した。

【0116】

10

20

30

40

50

測定結果

図3 2a: 界面活性剤1のミセル水溶液と(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンの細胞毒性.

図3 2b: 7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンと、7の(-)-PBS溶液の細胞毒性.

図3 2aより、32倍かそれ以上の希釈条件ではHeLa細胞に対してほとんど毒性を示さないことがわかった。

一方、図3 2bより、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンと7の(-)-PBS溶液は、32倍かそれ以上の希釈条件においてもHeLa細胞に対して毒性を示した。

この結果は、抗がん剤を磁性ナノエマルジョンに内包させた場合でも、それが抗がん剤として有効に働くことを示している。さらに、64倍と128倍希釈条件における殺細胞効果を見ると、磁性ナノエマルジョンに内包された7が、溶液中に分散した状態である7よりも2倍の細胞毒性を示すことが分かった。

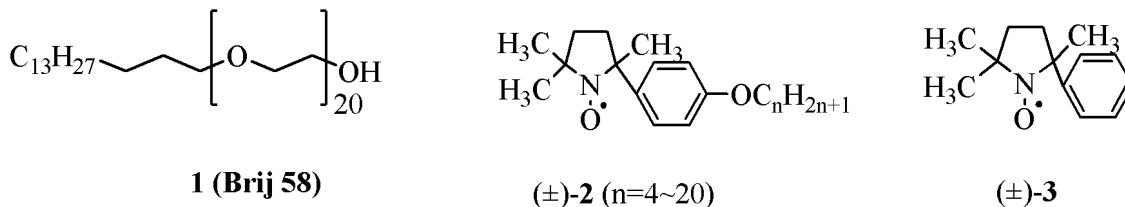
このことは、比較的低濃度条件において、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンがHeLa細胞内に効果的に取り込まれることを示している。磁性ナノエマルジョン内部から放出された7が薬剤活性であるという事実は、7を内包した界面活性剤1と(±)-2 (n=18)から構成された磁性ナノエマルジョンが薬剤送達システムのキャリアとして有効であることを示している。

【0117】

実施例5

化合物の最適化の経緯を示すデータ

【化10】



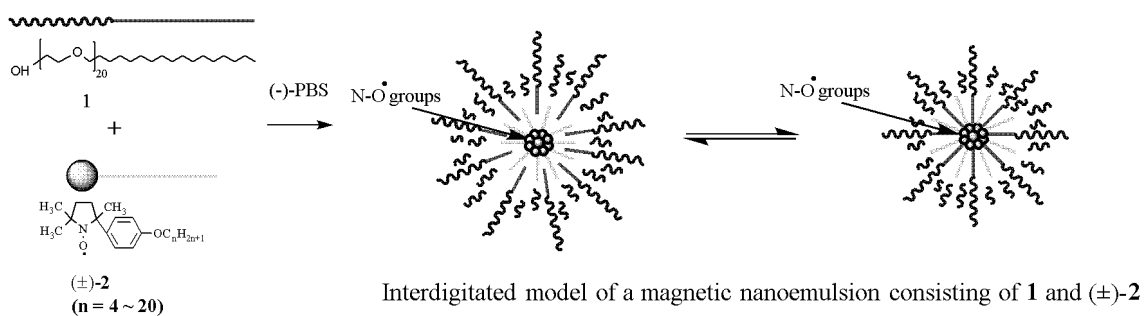
(Molecular structures used in this work)

界面活性剤1とそれぞれ長さの異なるアルキル側鎖を有する疎水性のラジカルを用いて、リン酸緩衝液(-)-PBS中で純有機磁性ナノエマルジョンを作製し、その安定性を評価した。

具体的には(-)-PBS中で作製した磁性ナノエマルジョンの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した。

磁性ナノエマルジョンの安定化条件の結果を示す。

【化11】



(The preparation of the magnetic nanoemulsion consisting of 1 and (±)-2 (10 mM, each).)

【0118】

10

20

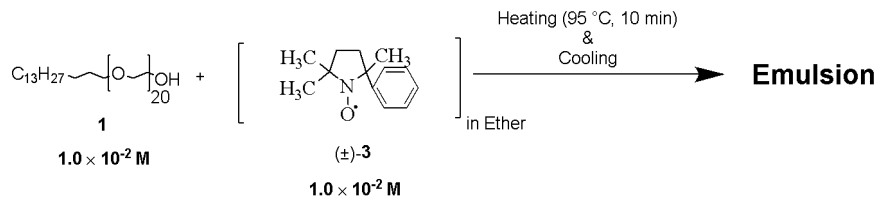
30

40

50

(1) (±) - 3 を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

【化 1 2】



10

(±) - 3 をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した。

界面活性剤1と(±) - 3 の濃度比は、[1 / (±) - 3 = 10 mM / 10 mM] とした。調製方法は、少量のエーテルに溶解させた(±) - 3 の溶液に、界面活性剤水溶液を1 mL加えた後、90 で加熱し、エーテルを系から除去することで、ナノエマルションを調製した。系からエーテルが除去されると、溶液の色が黄濁色から黄色透明に変化した。

図 3 3 は調製後のEPRスペクトルと平均粒径である。EPR測定の結果から、三本線成分が確認された。これは、ラジカルが(-) - PBS中で分散していることを示している。

【 0 1 1 9】

20

(2) (±) - 2 (n = 4) を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

同様に、(±) - 2 (n = 4) をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した。

界面活性剤1と(±) - 2 (n = 4) の濃度比は、[1 / (±) - 2 (n = 4) = 10 mM / 5.0 mM] とした。界面活性剤に対してラジカルの量は半分である。調製方法は、少量のエーテルに溶解させた(±) - 2 (n = 4) の溶液に、界面活性剤水溶液を1 mL加えた後、90 で加熱し、エーテルを系から除去することで、ナノエマルションを調製した。

系からエーテルが除去されると、溶液の色が黄濁色から黄色透明に変化した。図 3 4 は調製後のEPRスペクトルと平均粒径である。(±) - 3 の場合と同様に、EPRスペクトルを測定すると三本線成分が確認された。

30

これは、ラジカルが(-) - PBS中で分散していることを示す。

【 0 1 2 0】

(3) (±) - 2 (n = 8) を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

(±) - 2 (n = 8) をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した(図 3 5 及び 3 6)。

界面活性剤1と(±) - 2 (n = 8) の濃度比は、[1 / (±) - 2 (n = 8) = 10 mM / 5.0 mM] とした。界面活性剤に対してラジカルの量は半分である。調製方法は、少量のエーテルに溶解させた(±) - 2 (n = 8) の溶液に、界面活性剤水溶液を1 mL加えた後、90 で加熱し、エーテルを系から除去することで、磁性ナノエマルションを調製した。

40

系からエーテルが除去されると、溶液の色が黄濁色から黄色透明に変化した。調製してから20分経過しないうちに溶液が白濁した。DLS測定の結果から、調製3日後に1000 nm付近に大きな会合体由来のピークが観察された。

これらの結果は、(±) - 2 (n = 8) を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションが(-) - PBS中で非常に不安定であることを示す。

【 0 1 2 1】

(4) (±) - 2 (n = 14) を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

(±) - 2 (n = 14) は水に難溶である。そこで、(±) - 2 (n = 14) をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより磁性ナノエマルションの調製を試み、

50

磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した(図37及び38)。

界面活性剤1と(±)-2 (n=14)の濃度比は、 $[1 / (\pm)\text{-}2 (n=14) = 1.0 \times 10^{-2} \text{ M} / 1.0 \times 10^{-2} \text{ M}]$ とした。調製方法は、少量のエーテルに溶解させた(±)-2 (n=14)の溶液に、界面活性剤水溶液を1 mL加えた後、90 °Cで加熱し、エーテルを系から除去することで、ナノエマルションを調製した。

エーテルが除去されると、溶液の色が黄濁色から黄色透明に変化した。DLS測定の結果から、2日後の磁性ナノエマルションの粒径が調製直後と比較して増加していることが分かった。また、水溶液の色も黄色透明から黄濁色に変化していた。6日後には、水溶液中に浮遊物が確認された。

この水溶液は0.45 μm のmembrane filterを通過出来なかったため、DLS測定等は行っていない。

10

以上の結果から、(±)-2 (n=14)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションは(-)-PBS中で不安定であると考えられる。

【0122】

(5) (±)-2 (n=16)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

(±)-2 (n=16)をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより黄色透明の磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した(図39及び40)。

EPR測定の結果、(-)-PBS中では、会合体形成に由来するブロードな一本線のみが観測された。また、粒形の経時変化は1日目が16 nm、2日後が27 nm、6日後が37 nmであり、徐々に大きくなった。

20

この結果から、磁性ナノエマルションは7日間に渡って、安定に存在していることがわかった。

【0123】

(6) (±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

(±)-2 (n=18)をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより黄色透明の磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した(図41及び42)。

EPR測定の結果、(-)-PBS中では、会合体形成に由来するブロードな一本線のみが観測された。また、粒形の経時変化は1日目が16 nm、2日後が17 nm、14日後が24 nmであり、徐々に大きくなった。

30

この結果から、磁性ナノエマルションは14日間に渡って、安定に存在していることがわかった。また、DLS測定の結果から(±)-2 (n=16)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションと比較して、会合し難いことが分かった。

このことは、(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションが、(±)-2 (n=16)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションよりも(-)-PBS中で安定であることを示している。

【0124】

(7) (±)-2 (n=20)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルション

同様に、(±)-2 (n=20)をエーテルに溶解させて、この溶液を界面活性剤水溶液で分散させることにより黄色透明の磁性ナノエマルションの調製を試み、磁性ナノエマルションの安定性をEPR分光法とDLS法により評価した(図43及び44)。

40

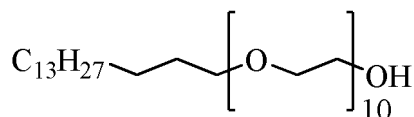
EPR測定の結果、(-)-PBS中では、会合体形成に由来するブロードな一本線のみが観測された。また、粒形の経時変化は7日間に渡って17 nmで一定となった。

この結果から、(±)-2 (n=20)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションが、(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルションと同様に、(-)-PBS中で7日間以上、安定であることが分かった。

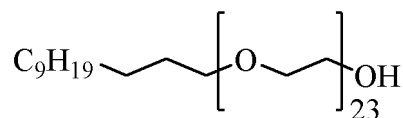
【0125】

(8) 類似のPEG系界面活性剤から構成された磁性ナノエマルション

【化 1 3】



4 (Brij 10)



5 (Brij 35)

界面活性剤4と界面活性剤5を用いて、(-)-PBS中で安定な(±)-2 (n = 12, 14, 16, 18 or 20)を内包した磁性ナノエマルジョンを調製することはできなかった。この理由としては、入れ子構造を形成するには、4と5のポリエチレングリコール鎖或いは、アルキル鎖の長さが短すぎると考えられる。

10

【 0 1 2 6】

(9) 結論

(±)-2 (n=18)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンの平均粒径は16 nm (調製直後)となった。この値は、界面活性剤1のミセル水溶液の粒径(9.0 nm)と(±)-2 (n=18)の分子長(3.3 nm, MM2計算より)の2倍値(6.6 nm)の合計(15.6 nm)とほぼ等しい値である。

(±)-2 (n=20)を内包した界面活性剤1の磁性ナノエマルジョンの場合は、(±)-2 (n=20)の分子長が3.4 nmであるので、合計(15.8 nm)となる。この値も、DLS測定の結果とよく一致している。

20

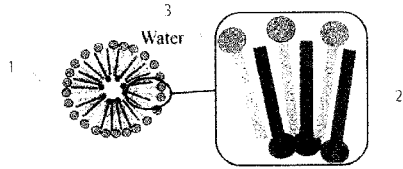
以上より、(±)-2 (n=18)と1または、(±)-2 (n=20)と1の組み合わせが、安定な磁性ナノエマルジョンを作製する上で最適な選択肢であると結論付けられる。

【符号の説明】

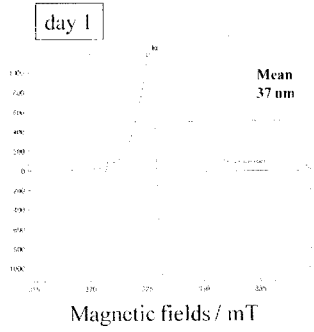
【 0 1 2 7】

- 1 ナノエマルジョン粒子
- 2 有機ニトロキシドラジカル化合物
- 3 非イオン性界面活性剤

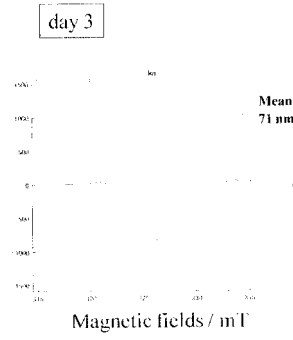
【 図 1 】



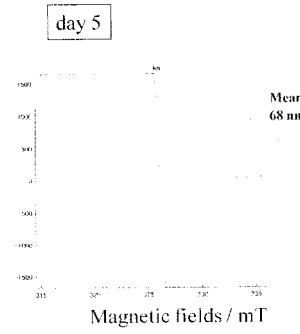
【 図 2 】



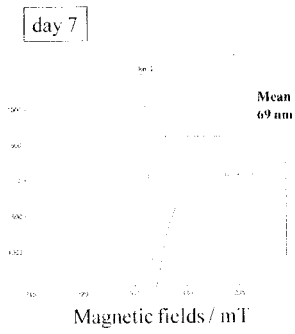
【 図 3 】



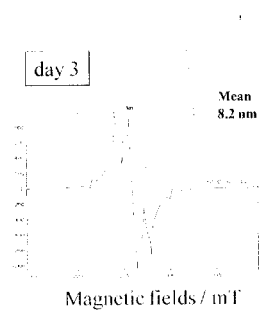
【 図 4 】



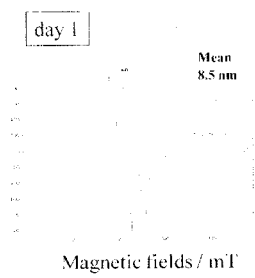
【 図 5 】



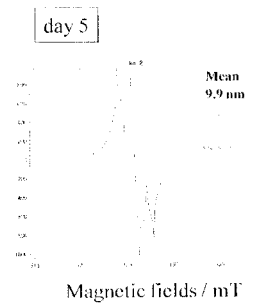
【 図 7 】



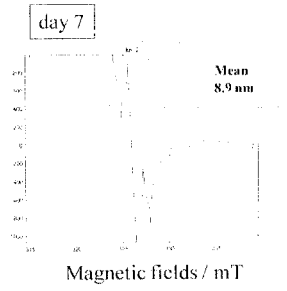
【 図 6 】



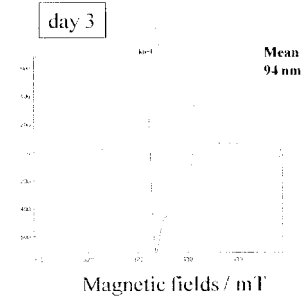
【 図 8 】



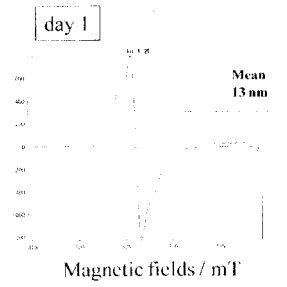
【 図 9 】



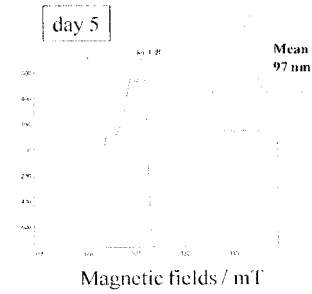
【 図 1 1 】



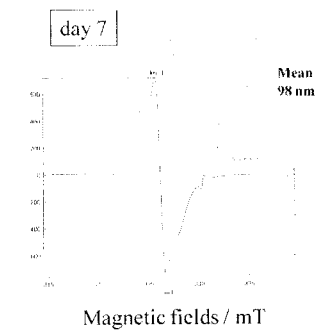
【 図 1 0 】



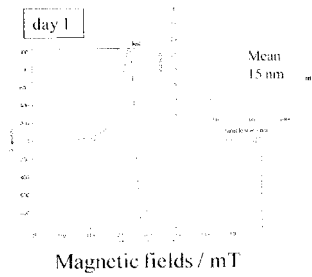
【 図 1 2 】



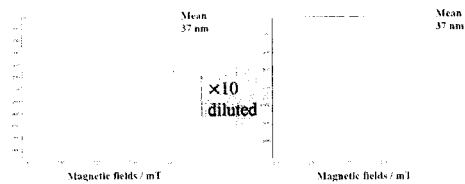
【 図 1 3 】



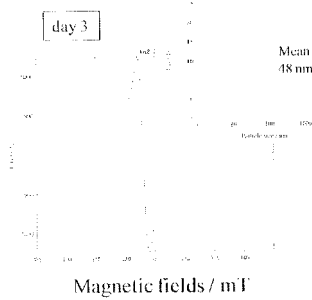
【 図 1 5 】



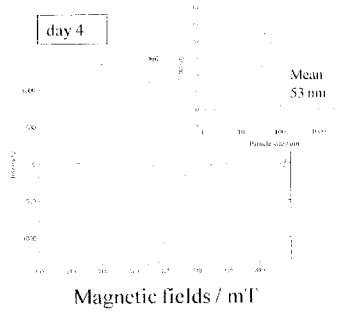
【 図 1 4 】



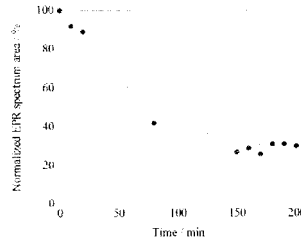
【 図 1 6 】



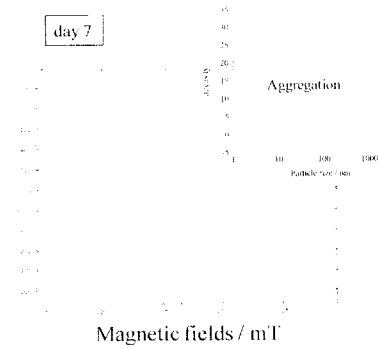
【 図 1 7 】



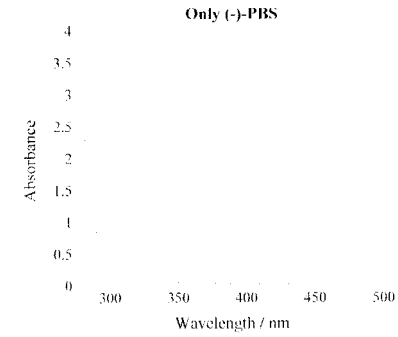
【 図 1 9 】



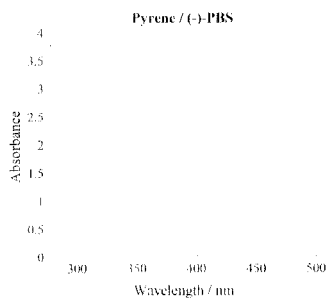
【 図 1 8 】



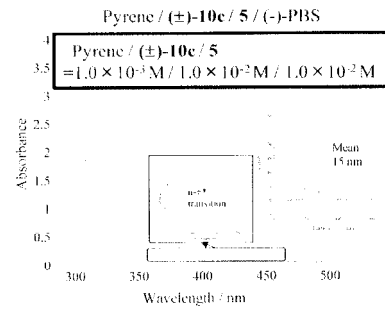
【 図 2 0 】



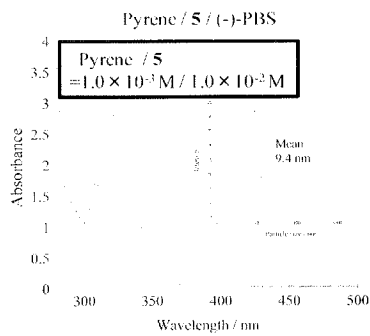
【 図 2 1 】



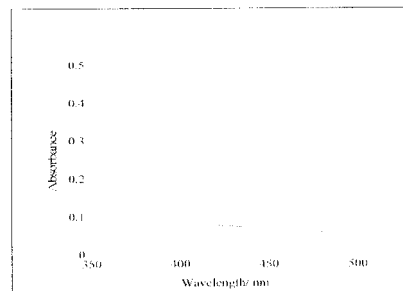
【 図 2 3 】



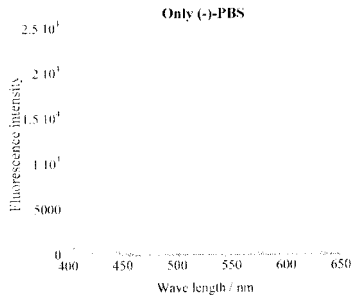
【 図 2 2 】



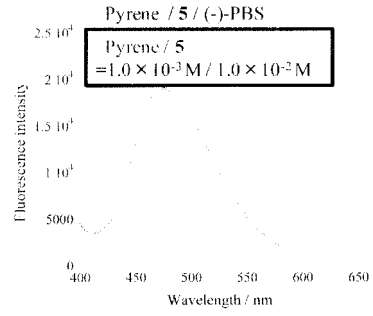
【 図 2 4 】



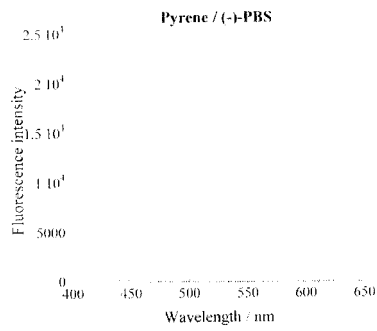
【 図 2 5 】



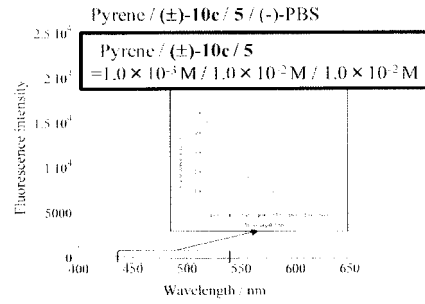
【 図 2 7 】



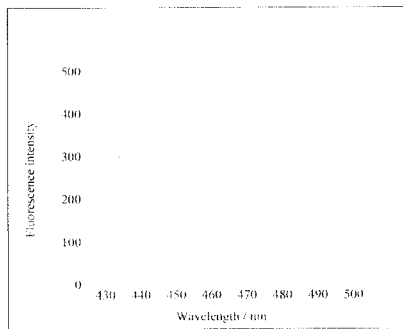
【 図 2 6 】



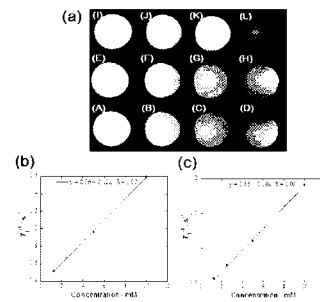
【 図 2 8 】



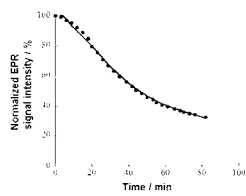
【 図 2 9 】



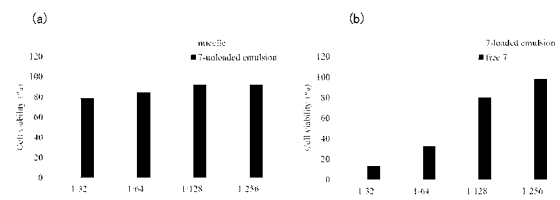
【 図 3 1 】



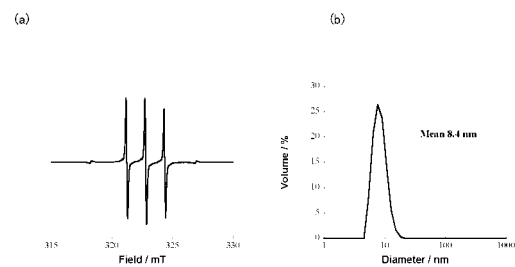
【 図 3 0 】



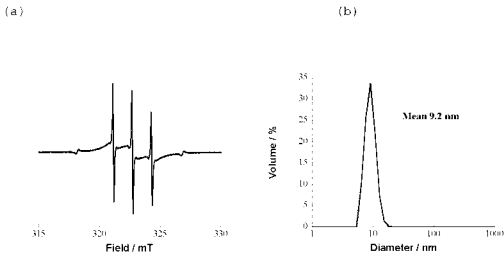
【 図 3 2 】



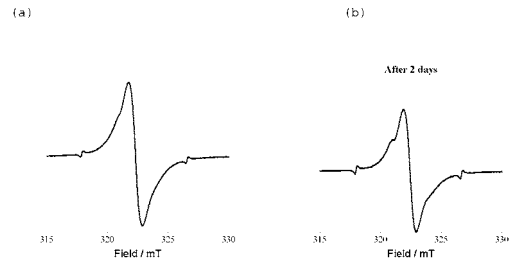
【 図 3 3 】



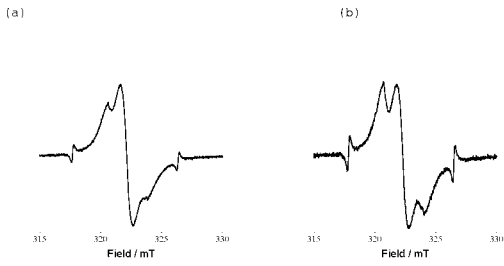
【 3 4 】



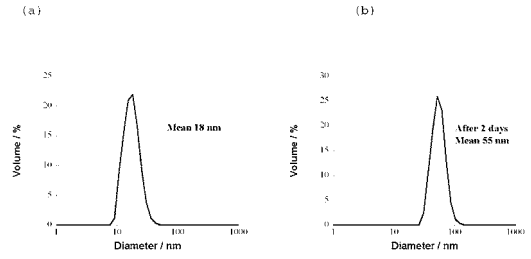
【 3 7 】



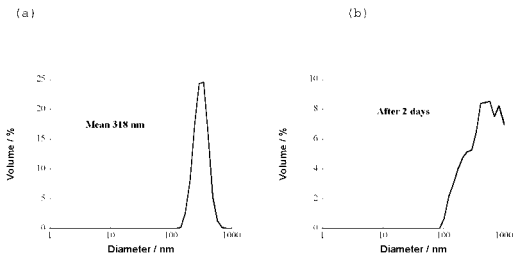
【 3 5 】



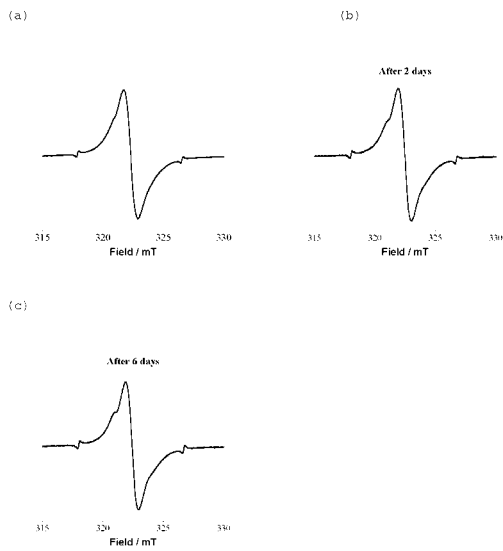
【 3 8 】



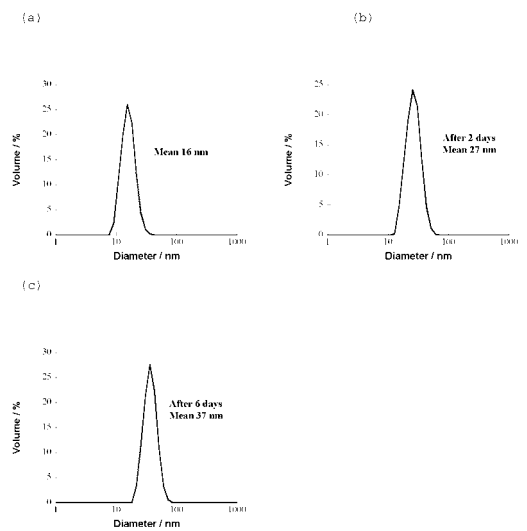
【 3 6 】



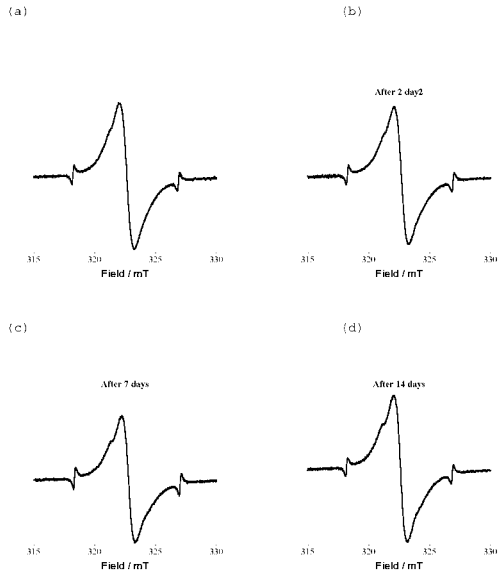
【 3 9 】



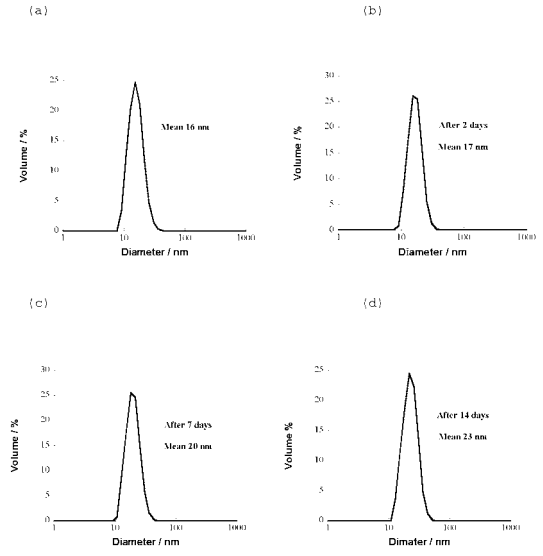
【 4 0 】



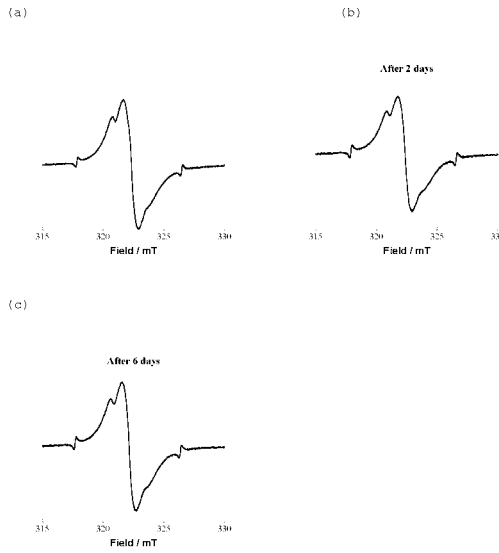
【 4 1 】



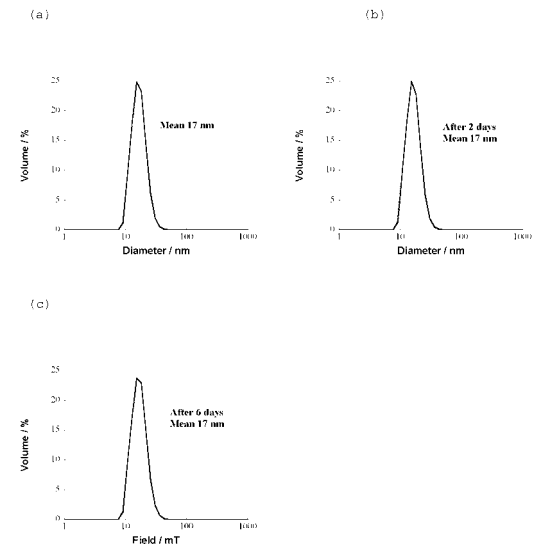
【 4 2 】



【 4 3 】



【 4 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/008469
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D207/46(2006.01)i, A61K9/107(2006.01)i, A61K47/34(2017.01)i, A61K49/20(2006.01)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) C07D207/46, A61K9/107, A61K47/34, A61K49/20 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 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-188388 A (Kyoto University), 04 October 2012 (04.10.2012), entire text; particularly, claims; examples 1, 5 (Family: none)	1-7
A	JP 2009-215182 A (Toray Fine Chemicals Co., Ltd.), 24 September 2009 (24.09.2009), entire text; particularly, formula [I]; paragraph [0014] (Family: none)	1-7
A	SHOBHA, J., Differential Modes of Incorporation of Probe Molecules in Micelles and in Bilayer Vesicles, THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, 1989, 93(1), 17-20 Comp.VIII, IX	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 01 May 2017 (01.05.17)		Date of mailing of the international search report 23 May 2017 (23.05.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/008469

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOSHITOMI, T., Design of Core-Shell-Type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core, BIOMACROMOLECULES, 2009, 10(3), 596-601 Fig. 2, 4	1-7
A	WO 2009/133647 A1 (University of Tsukuba), 05 November 2009 (05.11.2009), entire text; particularly, claims & CA 2723118 A & US 2011/0142787 A1	1-7
A	US 4099918 A (KEANA, J.F.W.), 11 July 1978 (11.07.1978), entire text; particularly, claims; example 1 (Family: none)	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 8 4 6 9													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D207/46(2006.01)i, A61K9/107(2006.01)i, A61K47/34(2017.01)i, A61K49/20(2006.01)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 (IPC)) Int.Cl. C07D207/46, A61K9/107, A61K47/34, A61K49/20															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017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) CAplus/REGISTRY (STN)															
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	JP 2012-188388 A (国立大学法人京都大学) 2012.10.04, 全文、とくに請求の範囲、実施例1、5 (ファミリーなし)	1-7													
A	JP 2009-215182 A (東レ・ファインケミカル株式会社) 2009.09.24, 全文、とくに式[I]、段落0014 参照 (ファミリーなし)	1-7													
A	SHOBHA, J., Diffrential Modes of Incorporation of Probe Molecules in Micelles and in Bilayer Vesicles, THE JOURNAL OF PHYSICAL	1-7													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 01.05.2017		国際調査報告の発送日 23.05.2017													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 東 裕子	4 P 9709												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 8 4 6 9
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
	CHEMISTRY, 1989, 93(1), 17-20 Cmpd. VIII, IX	
A	YOSHITOMI, T., Design of Core-Shell-Type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core, BIOMACROMOLECULES, 2009, 10(3), 596-601 Fig. 2, 4	1-7
A	WO 2009/133647 A1 (国立大学法人筑波大学) 2009.11.05, 全文、とくに請求の範囲 & CA 2723118 A & US 2011/0142787 A1	1-7
A	US 4099918 A (KEANA, J. F. W.) 1978.07.11, 全文、とくに請求の範囲、EX. 1 (ファミリーなし)	1-7

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10	
A 6 1 K 47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, 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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。