

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-524446

(P2011-524446A)

(43) 公表日 平成23年9月1日(2011.9.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C08B 37/08 (2006.01)	C08B 37/08 A	4C076
A61K 47/36 (2006.01)	A61K 47/36	4C084
A61K 31/407 (2006.01)	A61K 31/407	4C086
A61K 31/704 (2006.01)	A61K 31/704	4C090
A61K 31/337 (2006.01)	A61K 31/337	4J031
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-513848 (P2011-513848)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月16日 (2009.6.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年2月10日 (2011.2.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2009/000656
 (87) 国際公開番号 W02009/152691
 (87) 国際公開日 平成21年12月23日 (2009.12.23)
 (31) 優先権主張番号 200810062568.0
 (32) 優先日 平成20年6月17日 (2008.6.17)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

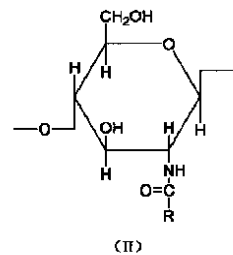
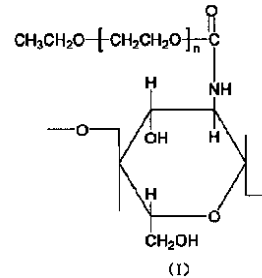
(71) 出願人 505072650
 浙江大学
 中華人民共和国浙江省杭州市浙大路38号
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 胡 富強
 中華人民共和国 310058 浙江省杭
 州市余杭塘路388号
 (72) 発明者 杜 永忠
 中華人民共和国 310058 浙江省杭
 州市余杭塘路388号
 (72) 発明者 袁 弘
 中華人民共和国 310058 浙江省杭
 州市余杭塘路388号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリグリコールで修飾されたキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体、その調製方法およびその使用

(57) 【要約】

式(I)の構造単位および式(II)の構造単位を有するポリグリコールで修飾されたキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体、ならびにその調製方法が提供され、ここで、該キトサンオリゴ糖の分子量は、200,000未満であり、脱アセチル化度は70%~100%であり、キトサンオリゴ糖鎖上の遊離アミノの一部は脂肪酸またはポリグリコールで置換され、nはポリグリコールの重合度であり、Rは11~21個の炭素原子を有するアルキルであり、脂肪酸のグラフト化率は1%~50%であり、かつポリグリコールのグラフト化率は0.05%~50%である。さらに、担体としてポリグリコールで修飾されたキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体を含む医薬組成物、および医薬組成物の製造におけるポリグリコールで修飾されたキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体の使用が提供される。

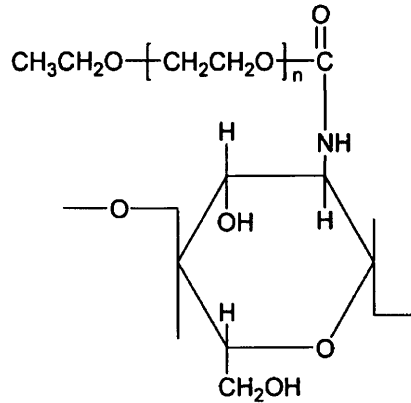


【特許請求の範囲】

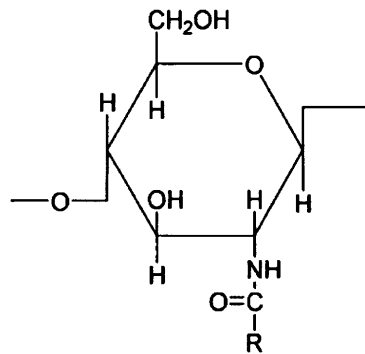
【請求項 1】

次式 (I) で表される構造単位および次式 (II) で表される構造単位

【化 1】



(I)



(II)

を含む PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖であって、

キトサンオリゴ糖鎖の遊離アミノ基の一部は、12 ~ 22 個の炭素原子を有する脂肪酸、
 または 1,000 ~ 10,000 Da の分子量を有する PEG で置換され、n は PEG の
 重合度を指し、R は 11 ~ 21 個の炭素原子を有するアルキル基であり、脂肪酸のグラフト
 化率は 1% ~ 50% であり、かつ PEG のグラフト化率は 0.05% ~ 50% である PEG
 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖。

【請求項 2】

PEG のグラフト化率が 0.5% ~ 50% である、請求項 1 に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖。

【請求項 3】

脂肪酸のグラフト化率が 5% ~ 50% である、請求項 1 または 2 に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖。

【請求項 4】

PEG が 2,000 ~ 10,000 Da の分子量を有する、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖。

【請求項 5】

脂肪酸が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、およびドコサン酸からなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖。

【請求項 6】

次のステップ：

(a) キトサンを酵素の存在下で分解して、200,000 Da 未満の分子量を有するキ

10

20

30

40

50

トサンオリゴ糖を得るステップ；

(b) キトサンオリゴ糖を 12 ~ 22 個の炭素原子を有する脂肪酸と、架橋用カップリング剤の存在下でカップリングして、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得るステップ；
および

(c) 末端で置換された、分子量が 1,000 ~ 10,000 Da である PEG を、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖とカップリングして、PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得るステップ；

を含む、請求項 1 に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製方法。

【請求項 7】

ステップ (c) において、末端で置換された PEG の、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が 1 : 20 ~ 80 : 1 である、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

末端で置換された PEG が、末端でアルデヒド化された PEG、末端でカルボキシル化された PEG、末端でスクシンイミド化された PEG、および末端で無水マレイン酸化された PEG からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

薬学的に活性な成分、および請求項 1 に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を含む医薬組成物。

【請求項 10】

薬学的に活性な成分が抗腫瘍薬であり、好ましくは該抗腫瘍薬が、マイトマイシン C、ドキソルピシン、パクリタキセル、およびヒドロキシカンプトテシンからなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

腫瘍細胞の薬物耐性を逆転させる能力のある、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

薬学的に活性な成分が遺伝子治療薬であり、好ましくは該遺伝子治療薬が、プラスミド DNA または siRNA である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

薬学的に活性な成分が抗ウイルス薬であり、好ましくは該抗ウイルス薬が、抗 B 型肝炎ウイルス薬である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 14】

抗 B 型肝炎ウイルス薬が、アデホビル、アシクロビル、アデホビルジピボキシル、エンテカビル、およびガンシクロビルからなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

医薬組成物の調製における請求項 1 に記載の PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の使用。

【請求項 16】

医薬組成物が抗腫瘍薬、遺伝子治療薬、または抗ウイルス薬を含む、請求項 15 に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾された脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖、該 PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の合成方法、それからなる医薬製剤、および医薬組成物の調製における PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用に関する。

【背景技術】

【0002】

薬物自体の *in vivo* での生物学的輸送能力に拘束されて、薬物は、その物理化学

50

的特性に応じて、体循環を介して病巣組織、病巣細胞、およびその細胞内オルガネラ中のその標的に輸送されて、その有効性を発揮するはずである。しかし、現存薬物の生物薬学的および薬物動力学的特徴により、明らかに、それらの薬物は、病理組織および健常組織に対する特異性に欠けている。満足な治療効果を達成するには、より多くの薬物投与量が要求され、そのような投与量は、薬物毒性/副作用の発生をもたらし、それによって該薬物の臨床的応用を制限する。

【0003】

標的療法は、上記の諸問題を解決するのに最も有効な手段の1つである。薬物の分子標的は、病巣組織の細胞中に主として集中され、酵素が50%を占め、受容体が35%を占め、イオンチャネルが15%を占める。薬物の治療効果は、分子標的に対する占拠効果を介して主として提供される。例えば、細胞障害性抗癌薬の分子標的の大部分は、腫瘍細胞の核中に主として存在するDNA(マイトマイシンC, ドキソルビシン, カンプトテシンなど)、または細胞質中に存在する微小管タンパク質(パクリタキセル, ビンブラスチンなど)である。遺伝子治療薬の分子標的は、また、核中のプラスミドDNAおよび細胞質中のsiRNAのように、標的細胞の細胞質または核中に存在する。抗ウイルス薬の分子標的は、また、標的細胞の核または細胞質中に存在する。適切な担体技術を通じて薬物を病理学的組織(器官)および細胞に直接的に標的化することは、低有効性および毒性/副作用の問題を解決する重要な手段の1つである。最近、国内および国外で、抗腫瘍薬を組織(器官)および細胞に標的化することに関するいくつかの進歩が、担体技術によってなされてきたが、治療効果の飛躍的進歩は得られていない。問題の本質は、抗癌薬のための分子標的の大部分が細胞内部に存在することである。したがって、腫瘍細胞内の分子標的箇所(細胞内オルガネラ)に標的化する薬物担体の材料に関する研究および開発は、癌化学療法のパトルネックを打破するための鍵である。

10

20

30

40

50

【0004】

標的担体の設計は、薬物の分子標的に対する細胞内オルガネラへの標的化効果を達成するために、病巣器官への担体の標的化効果、およびそれに基づいた病巣器官全域での病巣細胞の標的化効果に主として関連付けられる。薬物の組織または器官への初期の標的化では、小さい粒子サイズの微粒子を使用して、肝臓などの器官に受動的に導き、腫瘍組織への集中は、高められた浸透性および保持効果を介して達成される。最近、腫瘍細胞表面の特定の受容体(葉酸受容体など)の過剰発現特性に基づいて、リガンドで修飾された担体材料が、癌標的療法に首尾よく適用されて、腫瘍細胞への標的化を達成し、抗癌薬の細胞内集中を向上させ、かつ抗癌薬自体の有効性を増強している。

【0005】

最近、ポリマーミセルが、薬剤学および生物医学の分野で広範な注目を引いている。ポリマーミセルは、両親媒性ブロックコポリマーまたはグラフトコポリマーから水性媒体中で自己集合により形成され、コア-シェル構造を有する。ポリマーミセルでは、疎水性部分および親水性部分が、それぞれ、ミセルのコアおよびシェルを形成する。疎水性のコアは、貧水溶性薬物として役立つことができる。外側の親水性膜は、水性環境中でミセルの安定性を維持し、かつ物理および化学的特性を修飾してミセルの活性な標的化効果などの特定の目的を達成できる。

【0006】

ポリマーミセルは、薬物送達系として多くの利点を有する。それは、溶解度、pH値、ゼータ電位などの材料特性を調節することによって、in vivoでの薬物放出を制御することができる。ミセルの粒子サイズはかなり小さいので、それは、血液脳関門および細網内皮系を通して浸透できるだけでなく、胃腸粘膜などでの吸収を促進することができる。その結果、サイズの大きな粒子が通過できない場所に到達し、それによって、受動的標的化の目的を達成する。ポリマーミセル骨格の保護および遮蔽効果は、薬物が分解されることをある程度まで防止し、薬物の安定性を維持し、かつ薬物の毒性を低減することができる。リポソームに比較して、ポリマーミセルの薬物装填量は、相対的に多い。ポリマー材料の多様性は、ポリマーを担体として使用し、それによって各種の応用分野の要求

を満たす多様な医薬製剤の製造に好都合である。

【0007】

薬物担体の親水性PEG化は、担体上への血漿タンパク質の吸着および薬物担体のマクロファージによる貪食作用の双方を低下させ、それによって、循環系中での担体の半減期を延長させることができると報告されている。この基本原理により、ポリマーミセルの親水性シェルのPEG化は、ポリマーミセルの血漿タンパク質のオプソニン化を低減し、それによって、マクロファージによるポリマーミセルの取込みを低減し、かつ血漿からのポリマーミセルの排除を遅らせることができる。腫瘍組織中でのポリマーミセルの受動的標的化は、高められた浸透性および保持効果を介してさらに改善できる。一方、他の器官および組織への活性化標的化は、リガンド - または抗体 - 修飾によって実行できる。

10

【0008】

本発明において、本発明者らの以前の研究を基礎にして、急速な細胞内取込みおよびオルガネラへの標的化効果を示す脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを採用して、PEGでの表面修飾を実施し、細網内皮系の識別を回避できる、長期循環性の脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を合成した。このような脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、抗癌薬、遺伝子治療薬、抗ウイルス薬等々の調製および応用に適用できる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

*in vivo*での標的化、および薬学的に活性化成分の吸収を向上させるために、本発明は、ポリマーミセルを形成することによって薬学的に活性化成分の*in vivo*での放出を制御し、薬物の能動的および受動的標的化を達成し、薬物が分解されるのをある程度まで防止し、薬物の安定性を維持し、かつ薬物の毒性/副作用を低減することができる、PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を提供する。PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、抗癌薬、遺伝子治療薬、薬物などの各種薬物の調製で薬物担体として応用できる。

20

【課題を解決するための手段】

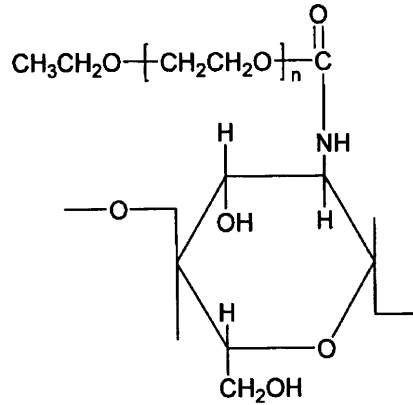
【0010】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、次式(I)で表される構造単位および次式(II)で表される構造単位を含むことができ、ここで、キトサンオリゴ糖鎖の遊離アミノ基の一部は、12~22個の炭素原子を有する脂肪酸または1,000~10,000の分子量を有するPEGで置換されている。式中、*n*はPEGの重合度を表し、*R*は、11~21個の炭素原子を有するアルキル基である。

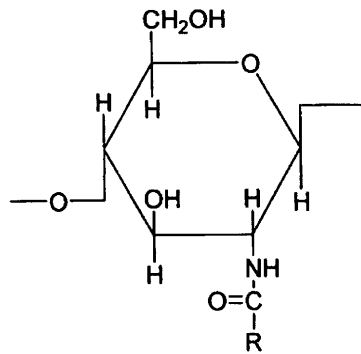
30

【0011】

【化 1】



(I)



(II)

【0012】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖において、脂肪酸のグラフト化率は1%～50%、PEGのグラフト化率は0.05%～50%である、

脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、キトサンオリゴ糖鎖中の遊離アミノ基の一部が脂肪酸で置換されているオリゴマーを指す。脂肪酸は、12～22個の炭素原子を有する飽和または不飽和の脂肪酸でよい。他方で、脂肪酸は、また、12～22個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖の脂肪酸でよい。加えて、脂肪酸は、好ましくは、12～20個の炭素原子、12～18個の炭素原子、14～22個の炭素原子、16～22個の炭素原子、14～20個の炭素原子、または16～18個の炭素原子を有する。好ましくは、脂肪酸は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、ドコサン酸、またはそれらの任意の混合物から選択できる。

【0013】

本発明中で使用されるキトサンオリゴ糖は、N-アセチルグルコサミンまたはグルコサミンが、-1,4-グリコシド連結を介して連結されたキトサンを分解することによって得ることができる。例えば、キトサンオリゴ糖は、200,000未満の分子量、および70%～100%の脱アセチル化度を有するものでよい。好ましくは、キトサンオリゴ糖の脱アセチル化度は、80%～100%でよく、中でも90%～100%が好ましく、および、70%～80%、または70%～90%でもよい。

【0014】

本発明中で使用されるキトサンオリゴ糖は、好ましくは、100,000未満、より好ましくは50,000未満、最も好ましくは5,000未満の分子量を有する。他方で、本発明中で使用されるキトサンオリゴ糖は、好ましくは、500を超える、より好ましくは1,000を超える、最も好ましくは2,000を超える分子量を有する。例えば、キトサンオリゴ糖の分子量は、500～100,000、500～50,000、500～5,000、1,000～100,000、2,000～100,000、1,000～

10

20

30

40

50

50,000、または2,000~5,000でよい。

【0015】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖において、脂肪酸のグラフト化率は、1%以上、好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上、さらにより好ましくは15%以上、最も好ましくは20%以上である。他方で、脂肪酸のグラフト化率は、50%以下、好ましくは45%以下、より好ましくは40%以下、さらにより好ましくは35%以下、最も好ましくは30%以下である。例えば、脂肪酸のグラフト化率は、1%~50%、5%~50%、10%~50%、15%~50%、20%~50%、1%~45%、1%~40%、1%~35%、1%~30%、5%~45%、10%~40%、15%~35%、または20%~30%でよい。

10

【0016】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖において、PEGのグラフト化率は0.05%以上、好ましくは0.1%以上、より好ましくは1.0%以上、さらにより好ましくは5.0%以上、最も好ましくは10.0%以上である。他方で、PEGのグラフト化率は、50%以下、好ましくは45%以下、より好ましくは40%以下、さらにより好ましくは35%以下、最も好ましくは30%以下である。例えば、PEGのグラフト化率は、0.05%~50%、0.5%~50%、1.0%~50%、5.0%~50%、10.0%~50%、0.1%~45%、0.1%~40%、0.1%~35%、0.1%~30%、0.5%~45%、1.0%~40%、5.0%~35%、または10.0%~30%でよい。

20

【0017】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖において、PEGの分子量は、1,000以上、好ましくは1,500以上、より好ましくは2,000以上、さらにより好ましくは2,500以上、最も好ましくは3,000以上である。他方で、PEGの分子量は、10,000以下、好ましくは9,500以下、より好ましくは9,000以下、さらにより好ましくは8,000以下、最も好ましくは7,000以下である。例えば、PEGの分子量は、1,000~10,000、1,500~10,000、2,000~10,000、2,500~10,000、3,000~10,000、1,000~9,500、1,000~9,000、1,000~8,000、1,000~7,000、1,500~9,500、2,000~9,000、2,500~8,000、または3,000~7,000でよい。

30

【0018】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖をPEGで修飾することによって調製できる。典型的な調製方法は、次のステップを含むことができる：

(a) キトサンを酵素の存在下で分解して、200,000未満の分子量を有するキトサンオリゴ糖を得るステップ；

(b) 該キトサンオリゴ糖を、架橋用カップリング剤の存在下で12~22個の炭素原子を有する脂肪酸とカップリングさせて、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得るステップ；

(c) PEGの分子量が1,000~10,000である末端置換PEGを、脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖とカップリングさせて、PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得るステップ。

40

【0019】

上記ステップ(a)において、キトサンの分解は、当技術分野で周知の方法で実施することができる。例えば、分解中に使用される酵素はセルラーゼでよい。さらに、酵素のキトサンに対する質量比率は、0.05~5.0:100でよい。分解は、50~65の温度および4.0~6.0のpH値で実施できる。分解完了後、分離または精製は、当技術分野で周知の方法で実施することができる。例えば、限外濾過膜を使用して限外濾過を行うことができ、得られる濾液を凍結乾燥して、200,000未満の分子量を有するキ

50

トサンオリゴ糖を得る。

【0020】

上記ステップ(b)において、キトサンと脂肪酸とのカップリングは、当技術分野で周知の方法で実施することができる。例えば、該ステップで使用される架橋用カップリング剤は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBTと略記)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス(ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOPと略記)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCと略記)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCと略記)などの当技術分野で周知のものいずれかでよい。加えて、キトサン、脂肪酸、および架橋用カップリング剤のモル比は、1:1~50:1~50でよい。キトサンと脂肪酸とのカップリングは、4~90の温度で実施することができる。カップリングの完了後、分離または精製を、当技術分野で周知の方法で実施することができる。例えば、カップリング反応溶液を、透析で精製し、次いで凍結乾燥して、疎水性の修飾されたキトサンオリゴ糖、すなわち脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得る。

10

【0021】

上記ステップ(c)において、末端置換PEGは、末端アルデヒド化基-PEG、末端カルボキシル化PEG、末端スクシンイミド化PEG、末端無水マレイン酸化PEGなどの、上記ステップ(b)で得られる脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖と適切な反応を介してカップリングすることのできる任意の末端活性化PEGでよい。ステップ(c)において、末端置換PEGの上記ステップ(b)で得られる脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は、1:20~80:1でよい。一態様において、このような比率は、好ましくは1:20~1:1、より好ましくは1:5~5:1、さらにより好ましくは1:5~10:1、さらにより好ましくは1:5~20:1、最も好ましくは1:5~50:1でよい。他方で、該比率は、好ましくは50:1~80:1、より好ましくは20:1~80:1、さらにより好ましくは10:1~80:1、さらにより好ましくは10:1~80:1、最も好ましくは5:1~80:1でよい。より好ましくは、該比率は、1:1~50:1、5:1~20:1、または10:1~20:1でよい。例えば、ステップ(c)において、末端置換PEGのキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体に対するモル比は、1:20、1:10、1:5、1:1、5:1、10:1、20:1、50:1、80:1、または任意のその他の適切な比率でよい。

20

30

【0022】

ステップ(c)において、カップリングは、PEGの末端活性基と脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のアミノ基との間のSchiff反応により実施することができる。例えば、末端アルデヒド化PEGの場合、カップリングは、PEGの末端アルデヒド基とアミノ基との間のSchiff反応により実施することができる。当技術分野で周知のように、上述のSchiff反応中に、反応物と水との混合物を、超音波にかけて溶解を促進することができる。室温で攪拌することもできる。反応の完結後、当技術分野で周知の方法で分離または精製を実施することができる。例えば、カップリング反応溶液を、透析で精製し、次いで凍結乾燥して、PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得ることができる。

40

【0023】

加えて、カップリングは、PEGの末端活性基と脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のアミノ基との間の縮合反応により実施することができる。例えば、末端スクシンイミド化PEGまたは末端無水マレイン酸化PEGの場合、カップリングは、PEGの末端スクシンイミドまたは無水マレイン酸基とアミノ基との間の縮合反応により実施することができる。末端アルデヒド化PEGの場合、反応は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBTと略記)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス(ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOPと略記)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCと略記)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCと略記)などの適切な縮合剤の存在下で実施することができる。縮合

50

反応の完結後、当技術分野で周知の方法で分離または精製を実施することができる。例えば、カップリング反応溶液を、透析で精製し、次いで凍結乾燥してPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得ることができる。

【0024】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、水性媒体中で自己集合によりミセルを形成する能力を有する。例えば、1.0 mg/mLの濃度の本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、水中または1~12のpH値を有する緩衝液中でミセルを形成することができる。粒子サイズアナライザーで測定すると、前記ミセルの粒子直径は、20~500 nmの範囲である。表面電位アナライザーで測定すると、前記ミセルの表面電位は、10~50 mVの範囲である。ピレン蛍光法で測定すると、本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のPBS中での臨界ミセル濃度(CMC)は、5~300 µg/mLの範囲である。

10

【0025】

本発明は、また、担体として前述のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を含む医薬組成物を提供する。該医薬組成物は、適切な薬学的に活性な成分および本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖を含むことができる。

【0026】

本発明の医薬組成物において、薬学的に活性な成分は、マイトマイシンC、ドキシソルピシン、パクリタキセル、ヒドロキシカンプトテシン(HCPT)などの抗腫瘍薬でよい。本発明の抗腫瘍性医薬組成物は、腫瘍細胞の薬物耐性を逆転させることができる。

20

【0027】

本発明の医薬組成物において、薬学的に活性な成分は、プラスミドDNA、siRNAなどの遺伝子治療薬でよい。

【0028】

本発明の医薬組成物において、薬学的に活性な成分は、抗ウイルス薬でよい。抗ウイルス薬の典型例が、アデホビル、アシクロビル、アデホビルジピボキシル、エンテカビル、ガンシクロビルなどの抗B型肝炎ウイルス薬である。

【0029】

また、本発明の医薬組成物において、薬学的に活性な成分は、上記の薬物以外の薬物、例えば、カルシトニン、インターフェロン、インスリンなどのポリペプチドまたはタンパク質；ヘパリン、ヒアルロン酸などの多糖薬物であってもよい。

30

【0030】

加えて、本発明は、また、前記医薬組成物の調製におけるPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルのマクロファージRAW264.7中への取込みを量的に示す図である。()：比較例1のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例2のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；(x)：実施例3のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例1のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル。

40

【図2】PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの肝癌細胞HepG2中への取込みを量的に示す図である。()：比較例1のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例2のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；(x)：実施例3のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例1のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル。

【図3】PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの不死化正常肝細胞BRL-3A中への取込みを量的に示す図である。()：比較例1のステアリン酸グラ

50

フト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例2のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；(x)：実施例3のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル；()：実施例1のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル。

【図4A】PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を担体として含む本発明の医薬組成物のHBsAg、HBeAgおよびHBV-DNAの発現に対する抑制効果（He p G 2 . 2 . 1 5細胞との同時インキュベーション後）を示す図である。

【図4B】対照としての薬物溶液のHBsAg、HBeAgおよびHBV-DNAの発現に対する抑制効果（He p G 2 . 2 . 1 5細胞との同時インキュベーション後）を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明を以下の実施例により詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

(1) PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製

(比較例1～3)ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製

キトサン(6g、平均分子量：450,000Da)を、塩酸水溶液(200mL、1.25(v/v))中に添加し、撹拌しながら55～60℃で溶解した。得られた溶液のpH値を希アンモニアまたは希塩酸を用い5.0に調整した。セルラーゼを、セルロース：キトサン=0.5：100(w/w)の比率で添加した。8時間反応した後、反応生成物を4000rpmで10分間遠心した。続いて、上清液を、0.45μmの微多孔フィルター膜で前処理し、限外濾過膜を使用して分子量の相違に基づいて分画した。限外濾過液を凍結乾燥して特定の分子量を有するキトサンオリゴ糖を得た。ゲル浸透クロマトグラフィーで測定すると、キトサンオリゴ糖の平均分子量は18,600Daであった。

【0033】

上で得られたキトサンオリゴ糖を、秤量し(5.0g)、蒸留水(40mL)中に添加し、撹拌しながら溶解した。次いで、カルボジイミド(1.0g)を添加し、撹拌しながら溶解した。比較例1～3では、ステアリン酸(それぞれ、0.78g、1.5g、および2.4g)をメタノール溶液(10mL)に添加した。超音波で溶解した後、得られた溶液を上記のキトサンオリゴ糖溶液に添加した。温度60℃、400rpmで磁気撹拌しながら、反応を、24時間を超えて実施した。続いて最終反応混合物を、透析袋に入れ、2回蒸留水で24時間透析して、反応副生物を除去した。透析液を凍結乾燥して、疎水性の修飾されたキトサンオリゴ糖、すなわち、ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得た。

【0034】

当技術分野で周知のゲル浸透クロマトグラフィーで測定すると、比較例1～3のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の平均分子量は、それぞれ20,000、21,000および33,000Daであった。

(比較例4)ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製

上記比較例1で説明したのと同様の方法で、18,600Daの平均分子量を有するキトサンを調製した。上で得られたキトサンオリゴ糖を、秤量(5.0g)し、蒸留水(40mL)に添加し、撹拌しながら溶解した。次いで、カルボジイミド(1.0g)を添加し、撹拌しながら溶解した。ラウリン酸(0.5g)をメタノール溶液(10mL)に添加した。超音波で溶解した後、得られた溶液を上記のキトサンオリゴ糖溶液に添加した。温度60℃、400rpmで磁気撹拌しながら、反応を、24時間を超えて実施した。続いて、最終反応混合物を、透析袋に入れ、2回蒸留水で24時間透析して、反応副生物を除去した。透析液を凍結乾燥して、疎水性の修飾キトサンオリゴ糖、すなわち、ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得た。

【0035】

当技術分野で周知のゲル浸透クロマトグラフィーで測定すると、比較例4のラウリン酸

10

20

30

40

50

グラフト化キトサンオリゴ糖の平均分子量は、20,000 Daであった。

(比較例5) ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製

上記比較例1で説明したのと同様の方法で、18,600 Daの平均分子量を有するキトサンを調製した。上で得られたキトサンオリゴ糖を、秤量(5.0 g)し、蒸留水(40 mL)に添加し、攪拌しながら溶解した。次いで、カルボジイミド(1.0 g)を添加し、攪拌しながら溶解した。ドコサン酸(1.0 g)をメタノール溶液(10 mL)に添加した。超音波で溶解した後、得られた溶液を上記のキトサンオリゴ糖溶液に添加した。温度60、400 rpmで磁気攪拌しながら、反応を、24時間を超えて実施した。続いて、最終反応混合物を、透析袋に入れ、2回蒸留水で24時間透析して、反応副生物を除去した。透析液を凍結乾燥して、疎水性の修飾されたキトサンオリゴ糖、すなわち、ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得た。

10

【0036】

当技術分野で周知のゲル浸透クロマトグラフィーで測定すると、比較例5のドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の平均分子量は、20,500 Daであった。

(比較例6) オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の調製

上記比較例1で説明したのと同様の方法で、18,600 Daの平均分子量を有するキトサンを調製した。上で得られたキトサンオリゴ糖を、秤量(5.0 g)し、蒸留水(40 mL)に添加し、攪拌しながら溶解した。次いで、カルボジイミド(1.0 g)を添加し、攪拌しながら溶解した。オレイン酸(0.8 g)をメタノール溶液(10 mL)に添加した。超音波で溶解した後、得られた溶液を上記のキトサンオリゴ糖溶液に添加した。400 rpmで磁気攪拌しながら60の温度で、反応を、24時間を超えて実施した。続いて、最終反応混合物を、透析袋に入れ、2回蒸留水で24時間透析して、反応副生物を除去した。透析液を凍結乾燥して、疎水性の修飾されたキトサンオリゴ糖、すなわち、オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を得た。

20

【0037】

当技術分野で周知のゲル浸透イオンクロマトグラフィーで測定すると、比較例6のオレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の平均分子量は、20,000 Daであった。

(実施例1)

20,000 Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(2.68 mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は1:5であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400 w、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400 rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000 Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

30

(実施例2)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が1:1であること以外は、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

40

(実施例3)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が5:1であること以外は、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

(実施例4)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が1:10であること以外は、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

50

(実施例 5)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が1:20であること以外は、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

(実施例 6)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が80:1であること以外は、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

(実施例 7)

21,000Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200mg)、および2,000Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(380mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は20:1であった)、脱イオン水(50mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400w、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

10

(実施例 8)

33,000Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200mg)、および2,000Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(363mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は30:1であった)、脱イオン水(50mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400w、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

20

30

(実施例 9)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGが1,000Daの分子量を有し、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が20:1であることを除けば、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

(実施例 10)

PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、末端アルデヒド化PEGが10,000Daの分子量を有し、末端アルデヒド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比が2:1であることを除けば、上記実施例1に記載したと同様の方法で調製した。

40

(実施例 11)

20,000Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(100mg)、2,000Daの分子量を有する末端カルボキシル化PEG(100mg)、およびカルボジイミド(100mg)を秤量し(末端カルボキシル化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400w、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、60の温度で48時間磁気攪拌(400rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端カルボキシル化PEGを除去した。次いで、透析液を凍

50

結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

(実施例12)

20,000 Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(100 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端スクシンイミド化PEG(100 mg)を秤量し(末端スクシンイミド化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400 W、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で48時間磁気攪拌(400 rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000 Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端スクシンイミド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

10

(実施例13)

20,000 Daの分子量を有するステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(100 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端無水マレイン酸化PEG(100 mg)を秤量し(末端無水マレイン酸化PEGのステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400 W、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で48時間磁気攪拌(400 rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000 Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端無水マレイン酸化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

20

(実施例14)

比較例4で得られた20,000 Daの分子量を有するラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(200 mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400 W、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400 rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000 Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

30

(実施例15)

比較例5で得られた20,500 Daの分子量を有するドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(194 mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得られた溶液を、超音波プローブで20回(400 W、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400 rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000 Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

40

(実施例16)

比較例6で得られた20,000 Daの分子量を有するオレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(200 mg)、および2,000 Daの分子量を有する末端アルデヒド化PEG(200 mg)を秤量し(末端アルデヒド化PEGのオレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖に対するモル比は10:1であった)、脱イオン水(50 mL)に溶解した。得ら

50

れた溶液を、超音波プローブで20回(400w、間隔3秒間で各回2秒間作動させる)処理し、室温で一夜磁気攪拌(400rpm)した。続いて、反応混合物を、透析袋(カットオフ分子量:7,000Da、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)に入れ、48時間透析して、未反応の末端アルデヒド化PEGを除去した。次いで、透析液を凍結乾燥して、PEG化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を固体粉末として得た。

(2) PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の特性

前記比較例1~6で得られた脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖(10mg)および前記実施例1~16で得られたPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖(10mg)を、それぞれ秤量し、水浴中で超音波を用い、適切な量の2回蒸留水中に10分間分散させた。次いで、容積を100mLに調整し、対応するミセル溶液を得た。Zetasizer 3000HSアナライザーを使用して、溶液中のミセルの平均粒子直径(D)および表面電位(Zeta)を測定した。未修飾のまたはPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のPBS中での臨界ミセル濃度(CMC)を、当技術分野で周知のピレン蛍光法でそれぞれ測定した。PEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖中のPEGおよび脂肪酸のグラフト化率を、当技術分野で周知のトリニトロベンゼン-スルホン酸(TNBS)法で測定し、次いでアミノ基の置換度を得ることができる。実施例1~16および比較例1~6の上記特性を、表1に示した。

【0038】

【表1】

表1

	D (nm)	Zeta (mV)	CMC (μg/mL)	PEGのグラフト化率(%)	脂肪酸のグラフト化率(%)	アミノの置換度(%)
比較例1	103.4	20.1	13.8	0	5	5
比較例2	98.6	25.2	11.4	0	8	8
比較例3	45.2	24.3	8.6	0	48.3	48.3
比較例4	124.3	23.8	15.7	0	7	7
比較例5	66.8	34.6	8.8	0	4	4
比較例6	88.2	26.7	12.9	0	5	5
実施例1	119.2	14.1	12.5	0.1	5	5.1
実施例2	161.2	14.3	11.5	1	5	6
実施例3	171.8	15.9	11.7	4	5	9
実施例4	178.2	15.5	12.9	0.1	5	5.1
実施例5	185.2	16.1	13.5	0.05	5	5.05
実施例6	85.2	22.5	42.6	50	5	55
実施例7	96.3	32.5	25.6	8.1	8	16.1
実施例8	74.3	35.5	12.4	8.1	48.3	56.4
実施例9	105.4	34.2	31.7	15	5	20
実施例10	196.5	38.7	47.8	1.6	5	6.6
実施例11	87.3	35.5	55.2	7.6	5	12.6
実施例12	76.8	33.8	49.7	8.1	5	13.1
実施例13	79.1	37.2	50.1	8.3	5	13.3
実施例14	146.3	32.7	43.2	7.8	7	14.8
実施例15	78.2	38.2	38.9	8.6	4	12.6
実施例16	98.4	32.6	145.7	8.3	5	13.3

【0039】

本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、水性媒体中で自己集合によってミセルを形成する特性を有することがわかる。さらに、本発明のPEG化脂肪酸グラフ

ト化キトサンオリゴ糖は、一般的な界面活性剤のそれに比べて有意により低いCMCを有する。本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖から形成されるミセルは、薬物送達システムとして多くの利点を有する。それは、PEGおよび脂肪酸のグラフト化率、溶解度、pH値、ゼータ電位などの材料特性を調節することによって、薬学的に活性な成分のin vivoでの放出を制御することができる。ミセルの粒子サイズはかなり小さいので、それは、血液脳関門および細網内皮系を通して浸透できるだけでなく、胃腸粘膜などでの吸収を促進することができ、その結果、大きな粒子が通過できない場所に到達し、それによって、受動的標的化の目的を達成する。ポリマーミセル骨格の保護および遮蔽効果は、薬物が分解されることをある程度まで防止し、薬物の安定性を維持し、かつ薬物の毒性を低減できる。リポソームに比較して、ポリマーミセルの薬物装填量は、相対的に多い。PEGで修飾されたキトサンオリゴ糖脂肪酸グラフト体の構造の多様性は、ポリマーを担体として使用し、それによって各種の応用分野の要求を満たす多様な医薬製剤の製造に好都合である。したがって、本発明のPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、多くの医薬組成物の調製において担体として応用することができる。

(3) 種々の細胞系におけるPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の取込み

10 mgの比較例1のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖および実施例1~3のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、それぞれ秤量し、2 mLの脱イオン水に溶解し、超音波プローブで20回(400w、刺激時間2秒、中断時間3秒)処理し、次いで、2.0 mg/mLのイソシアン酸フルオレセイン(FITC)を含む200 μ Lのエタノール溶液を添加した後、暗所での磁気攪拌(400 rpm)の条件下で24時間連続的に反応した。続いて、最終反応混合物を、透析袋(7,000 Daのカットオフ分子量、Spectrum Laboratories、Laguna Hills、カリフォルニア州)中で脱イオン水を用い24時間透析して、未反応のFITCを除去した。透析液を凍結乾燥した後、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のフルオレセインで標識された生成物を得た。

【0040】

RAW264.7細胞(マクロファージ)、HepG2細胞(肝癌細胞)およびBRL-3A細胞(不死化正常肝細胞)を、10%ウシ胎児血清で補足されたDMEM中で(RAW264.7およびHepG2)、および10%新生ウシ血清で補足された1640培地中で(BRL-3A)、37°Cの5%CO₂インキュベーター中で、対数増殖期まで連続的に培養した。次いで、トリプシン消化の後、細胞を、培地で希釈し、24ウェル培養プレート(Nalge Nunc International、Naperville、イリノイ州、米国)にウェル当たり1 \times 10⁵個の接種密度で接種し、インキュベーター中で24時間培養した。次いで、FITCで標識されたPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を、ミセルの添加濃度を100 μ g/mLに調節してインキュベーション用培地に添加した。細胞を、それぞれ1.5、3、6、12および24時間培養した後、それらを、PBSで洗浄し、トリプシンで消化した。細胞消化溶液を、採取し、超音波プローブで20回(400w、刺激時間2秒、中断時間3秒)処理して、細胞溶解液を得た。蛍光分光光度計を使用して、細胞溶解液の蛍光強度を測定し、次いでPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の細胞中への取込み率を計算し、タンパク質で補正した。ミセルの細胞中への取込み率を、次式：

$$P_t (\%) = F_t / F_0 \times 100\%$$

により計算した。ここで、 P_t は、 t 時間中でのミセルの細胞中への取込み率を指し、 F_t および F_0 は、それぞれ時刻 t および時刻0の時点での蛍光吸光度(タンパク質で補正された)を表す。

【0041】

比較例1のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、および実施例1~3のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のRAW264.7細胞、HepG2細胞、およびBRL-3A細胞による取込み結果を図1~3に示した。加えて、上記ミセルのRAW264.7細胞、HepG2細胞およびBRL-3A細胞中への24時間以内での取込

み結果を、表 2 に列挙した。

【 0 0 4 2 】

【 表 2 】

表 2

	PEGのグラフト化率 (%)	24時間以内の取込み (%)		
		RAW264.7	HepG2	BRL-3A
比較例 1	0	58.4±0.63	14.1±1.7	13.2±0.5
実施例 1	0.1	45.0±3.25	14.3±2.6	13.1±1.2
実施例 2	1	29.6±4.5	14.2±1.6	13.4±0.5
実施例 3	4	17.7±17.1	12.6±2.2	11.7±1.5

10

【 0 0 4 3 】

上記の結果から、未修飾のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖（比較例 1）のミセルと比較して、マクロファージ RAW 264.7 細胞中への同一時間内での PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖（実施例 1～3）の取込み量が、有意に低下したと結論付けることができた。また、PEG 修飾比率（PEG のグラフト化率）の増大に伴って、マクロファージ中へのミセルの取込み量は徐々に減少した。

【 0 0 4 4 】

加えて、腫瘍細胞 Hep G 2 および正常細胞 BRL - 3 A 中への同一時間内での PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖（実施例 1～3）の取込み量は、未修飾のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖（比較例 1）のミセルと比較して、有意な差異はなかった。

20

【 0 0 4 5 】

したがって、PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、担体が血中マクロファージによって貪食される可能性を著しく低減し、そのため、生物体中での担体材料の循環時間および標的組織中への担体材料の分布を増大させることができると期待することができる。同時に、PEG 化は、腫瘍細胞中への担体材料の取込みに影響を及ぼさない。したがって、該担体材料を使用することによって、薬物の腫瘍細胞中への標的化送達を増大させることができる。

（ 4 ） 抗癌薬組成物における PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖ミセルの応用

30

（ 4 . 1 ） PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

（ a ） マイトマイシン C 製剤

10 mg の比較例 1 のステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、および実施例 1～3 の PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を、それぞれ秤量し、1.5 mL の PBS に溶解した。1 mg / mL のマイトマイシン C / PBS 溶液 0.5 mL を添加した後、溶液を超音波プローブで 20 回（400 w、刺激時間 2 秒、中断時間 3 秒）処理して、マイトマイシン C を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を得た。その材料濃度は 5 mg / mL であり、薬物封入効率は 30 % であった。

【 0 0 4 6 】

モデルとして肝癌細胞 Hep G 2 を使用して、マイトマイシン C を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの抗癌有効性を、薬物送達システムを細胞と同時インキュベートした後の 50 % 抑制濃度（IC₅₀）によって評価した。細胞生存率を MTT アッセイで測定した。接着細胞を 24 ウェルプレート中で 24 時間前培養した後、種々の濃度のマイトマイシン C 溶液（溶媒は PBS）およびマイトマイシン C を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルをそれぞれ添加し、対照ウェルは、各群の 3 つの繰返しで用意した。48 時間インキュベートした後、各ウェルに 60 μL の MTT を添加し、続いて 4 時間インキュベートした。その後、上清液を廃棄し、細胞を PBS 溶液で 2 回洗浄した後、各ウェルに 400 μL の DMSO を添加して反応を終結させた。培養プレートを水平に 10 分間振動させた後、ELSA メーターで波長 570 nm での吸光度を測定し、細胞生存率を次式により計算した：

40

50

細胞生存率 (%) = A_{570} (検体) / A_{570} (対照) × 100 %。

ここで、 A_{570} (検体) は、遊離薬物または薬物装填ミセルを添加した細胞の吸光度、 A_{570} (対照) は、対照細胞の吸光度である。

【0047】

加えて、同一方法を使用して、対照例として使用されたマイトマイシンC溶液の IC_{50} 値を測定した。

上記試験の結果を表3に示す。

【0048】

【表3】

表3

	対照例	比較例1	実施例1	実施例2	実施例3
IC_{50} (μ g/mL)	1.97	0.13	0.12	0.14	0.11

【0049】

上記の結果から、マイトマイシンC溶液(対照例)と比較して、マイトマイシンCを装填した本発明のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(実施例1~3)のミセルの薬物有効性は、約1.4倍高められた。また、マイトマイシンCを装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(実施形態1~3)の薬物有効性は、マイトマイシンCを装填したステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(比較例1)のミセルのそれに一致した。したがって、PEG化は、薬物装填型ミセルの抗腫瘍活性に影響を及ぼさない。

(b) アドリアマイシン製剤

実施例7で調製した50mgのPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(PEGの分子量は2,000Da;キトサンオリゴ糖の分子量は18,600Da;PEGのグラフト化率は8.1%;ステアリン酸のグラフト化率は8%であった)を秤量し、50mLのビーカーに入れ、次いで、40mLの蒸留水(pH5.7)を添加し、超音波プローブで20回(500w、刺激時間2秒、中断時間3秒)処理した。続いて、溶液をメスフラスコに移し、蒸留水で全容積を50mLとし、1mg/mLのミセル溶液を得た。20mLのPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を取り、1mg/mLのアドリアマイシンを含む2mLのジメチルスルホキシド溶液を添加した。室温で3時間攪拌した後、溶液を、分子量が3,500の透析袋中で蒸留水を用いて24時間透析した。次いで、透析濃縮溶液を、5000rpmで5分間遠心して、透析された疎水性抗癌薬を除去した。上清液を、0.22 μ mの微多孔膜を用いて濾過した後、アドリアマイシンを装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを得た。

【0050】

測定すると、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、55.8nm、表面電位は31.7mV、薬物封入効率は97.2%であった。

【0051】

続いて、抗腫瘍有効性の評価を実施した。具体的には、モデルとして使用される子宮頸癌細胞HeLaを、96ウェル培養プレート中で培養した。5×10³個のHeLa細胞を含む100 μ Lの細胞培養液を、各ウェルに添加し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。細胞がプレートに完全に接着した後、種々の濃度のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液、および塩酸ドキシソルピシン溶液を、それぞれウェルに添加し、未処理のブランク細胞を対照として使用した。上記各群の繰返しウェルを準備した。細胞を、通常のDMEM培地中で48時間培養した。20 μ Lの5mg/mLメチルチアゾールテトラゾリウム(MTT)溶液を各ウェルに添加した後、細胞を、5%CO₂インキュベーター中、37℃で4時間再培養し、次いで上清液を廃棄した。150 μ Lのジメチルスルホキシドを各ウェルに添加し、多機能マイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定し、次いで次式により細胞抑制率を計算した：

10

20

30

40

50

細胞抑制率(%) = (対照群の吸光度 - 実験群の吸光度) / 対照群の吸光度 × 100%。

【0052】

計算すると、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のIC₅₀値は563.5 μg/mL; アドリアマイシン溶液のIC₅₀値は1.7 μg/mL; 薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液のIC₅₀値は0.2 μg/mLであった。結果は、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつアドリアマイシンをPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、子宮頸癌細胞HeLaに対するその抗腫瘍有効性を8.5倍増大させることができることを示唆した。

(c) パクリタキセル製剤

実施例8で調製した50mgのPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖(PEGの分子量は2,000Da; キトサンオリゴ糖の分子量は18,600Da; PEGのグラフト化率は8.1%; ステアリン酸のグラフト化率は48.3%であった)を秤量し、50mLのビーカーに入れ、次いで、40mLの蒸留水(pH5.7)を添加し、超音波プローブで20回(500w、刺激時間2秒、中断時間3秒)処理した。続いて、溶液をメスフラスコに移し、蒸留水で全容積を50mLとし、1mg/mLのミセル溶液を得た。20mLのPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を取り、1mg/mLのパクリタキセルを含む2mLのジメチルスルホキシドを添加した。室温で3時間攪拌した後、溶液を、分子量が3,500の透析袋中で蒸留水を用いて24時間透析した。次いで、透析濃縮溶液を、5000rpmで5分間遠心して、透析された疎水性抗癌薬を除去した。上清液を、0.22 μmの微多孔膜を用いて濾過した後、パクリタキセルを装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを得た。

【0053】

測定すると、薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、89.1nm、表面電位は28.7mV、薬物封入効率は99.6%であった。

【0054】

続いて、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性を、腫瘍細胞の抑制率によって評価した。具体的には、モデルとして使用されるヒト肺癌細胞A549を、96ウェル培養プレート中で培養した。5 × 10³個のA549細胞を含む100 μLの細胞培養液を各ウェルに添加し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。細胞がプレートに完全に接着した後、種々の濃度のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液、およびタキソール溶液を、それぞれウェルに添加し、未処理のブランク細胞を対照として使用した。上記各群の繰返しウェルを準備した。細胞を、通常のDMEM培地中で48時間培養した。20 μLの5mg/mLメチルチアゾールテトラゾリウム(MTT)溶液を各ウェルに添加した後、細胞を、5%CO₂インキュベーター中、37℃で4時間再培養し、次いで上清液を廃棄した。150 μLのジメチルスルホキシドを各ウェルに添加し、多機能マイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定し、次いで次式により細胞抑制率を計算した：

細胞抑制率(%) = (対照群の吸光度 - 実験群の吸光度) / 対照群の吸光度 × 100%。

【0055】

計算すると、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のIC₅₀値は489.6 μg/mL; タキソール溶液のIC₅₀値は3.2 μg/mL; 薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液のIC₅₀値は0.1 μg/mLであった。結果は、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつパクリタキセルをPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、ヒト肺癌細胞A549に対するその抗腫瘍有効性を32倍増大させることができることを示唆した。

(d) ヒドロキシカンプトテシン製剤

実施例 7 で調製した 50 mg の PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖 (PEG の分子量は 2,000 Da ; キトサンオリゴ糖の分子量は 18,600 Da ; PEG のグラフト化率は 8.1% ; ステアリン酸のグラフト化率は 8% であった) を秤量し、50 mL のビーカーに入れ、次いで、40 mL の蒸留水 (pH 5.7) を添加し、超音波プロブで 20 回 (500 w、刺激時間 2 秒、中断時間 3 秒) 処理した。続いて、溶液をメスフラスコに移し、蒸留水で全容積を 50 mL とし、1 mg/mL のミセル溶液を得た。20 mL の PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を取り、1 mg/mL のヒドロキシカンプトテシンを含む 2 mL のエタノールを添加した。室温で 3 時間攪拌した後、溶液を、分子量が 3,500 Da の透析袋中で蒸留水を用い 24 時間透析した。透析濃縮溶液を、5000 rpm で 5 分間遠心して、透析された疎水性抗癌薬を除去した。上清液を、0.22 μm の微多孔膜を用いて濾過した後、ヒドロキシカンプトテシンを装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを得た。

10

【0056】

測定すると、薬物を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、72.9 nm、表面電位は 36.2 mV、薬物封入効率は 89.4% であった。

【0057】

続いて、PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性を、腫瘍細胞の抑制率によって評価した。具体的には、モデルとして使用されるヒト肺癌細胞 A549 を、96 ウェル培養プレート中で培養した。5 × 10³ 個の A549 細胞を含む 100 μL の細胞培養液を各ウェルに添加し、5% CO₂ インキュベーター中、37 °C で 24 時間培養した。細胞がプレートに完全に接着した後、種々の濃度の PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、薬物を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液、およびヒドロキシカンプトテシン注射液を、それぞれウェルに添加し、未処理のブランク細胞を対照として使用した。上記各群の繰返しウェルを準備した。細胞を、通常の DMEM 培地中で 48 時間培養した。20 μL の 5 mg/mL メチルチアゾールテトラゾリウム (MTT) 溶液を各ウェルに添加した後、細胞を、5% CO₂ インキュベーター中、37 °C で 4 時間再培養し、次いで上清液を廃棄した。150 μL のジメチルスルホキシドを各ウェルに添加し、多機能マイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定し、次いで次式により細胞抑制率を計算した：

20

30

細胞抑制率 (%) = (対照群の吸光度 - 実験群の吸光度) / 対照群の吸光度 × 100%。

【0058】

計算すると、PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の IC₅₀ 値は 496.3 μg/mL ; ヒドロキシカンプトテシン注射液の IC₅₀ 値は 8.6 μg/mL ; 薬物を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液の IC₅₀ 値は 0.4 μg/mL であった。結果は、PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつヒドロキシカンプトテシンを PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、ヒト肺癌細胞 A549 に対するその抗腫瘍有効性を 21.5 倍増大させることができることを示唆した。

40

(4.2) PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

実施例 14 で調製した 50 mg の PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を取り、上記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して、薬物を装填した PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを調製した。

【0059】

測定すると、PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、123.7 nm、表面電位は 31.4 mV、薬物封入効率は 99.3% であった。

【0060】

続いて、PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性を、上記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して評価した。評価結果は、PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の IC₅₀ 値が 456.1 μg/mL ; タキソール溶液の IC₅₀

50

値が $3.2 \mu\text{g}/\text{mL}$; 薬物を装填した PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液の IC_{50} 値が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であったことを示す。結果は、PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつバクリタキセルを PEG 化ラウリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、ヒト肺癌細胞 A549 に対するその抗腫瘍有効性を 32 倍増大させることができることを示唆した。

(4.3) PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

実施例 15 で調製した 50 mg の PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を取り、前記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して、薬物を装填した PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを調製した。

【0061】

測定すると、PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、 86.4 nm 、表面電位は 33.1 mV 、薬物封入効率は 99.8% であった。

【0062】

続いて、薬物を装填した PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性を、前記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して評価した。評価結果は、PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の IC_{50} 値が $438.8 \mu\text{g}/\text{mL}$; タキソール溶液の IC_{50} 値が $3.2 \mu\text{g}/\text{mL}$; 薬物を装填した PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液の IC_{50} 値が $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ であったことを示す。結果は、PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつバクリタキセルを PEG 化ドコサン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、ヒト肺癌細胞 A549 に対するその抗腫瘍有効性を 16 倍増大させることができることを示唆した。

(4.4) PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

実施例 16 で調製した 50 mg の PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を取り、前記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して、薬物を装填した PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを調製した。

【0063】

測定すると、薬物を装填した PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、 109.2 nm 、表面電位は 35.2 mV 、薬物封入効率は 99.4% であった。

【0064】

続いて、薬物を装填した PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性を、前記 (4.1) (c) と同様の方法を使用して評価した。評価結果は、PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の IC_{50} 値が $413.7 \mu\text{g}/\text{mL}$; タキソール溶液の IC_{50} 値が $3.2 \mu\text{g}/\text{mL}$; 薬物を装填した PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液の IC_{50} 値が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であったことを示す。結果は、PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつバクリタキセルを PEG 化オレイン酸グラフト化キトサンオリゴ糖で封入した後に、ヒト肺癌細胞 A549 に対するその抗腫瘍有効性を 32 倍増大させることができることを示唆した。

(5) 腫瘍の薬物耐性を逆転させるための PEG 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

(a) アドリアマイシン製剤

前記 (4.1) (b) と同様の方法を使用して、アドリアマイシンを装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを調製した。

【0065】

測定すると、PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、 67.2 nm 、表面電位は 38.3 mV 、薬物封入効率は 96.4% であった。

【0066】

続いて、腫瘍細胞の抑制率を使用して、薬物を装填した PEG 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性、および薬物耐性腫瘍細胞の薬物耐性の逆転効率を評価した。

10

20

30

40

50

【0067】

具体的には、モデル細胞として使用される乳癌細胞（MCF-7）およびその薬物耐性細胞（MCF-7-adr）を、96ウェル培養プレート中で培養した。5×10³個のMCF-7またはMCF-7-adr細胞を含む100μLの培養液を、各ウェルに添加し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。細胞がプレートに完全に接着した後、種々の濃度のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液、およびドキシソルピシンを、それぞれウェルに添加し、未処理のブランク細胞を対照として使用した。上記各群の繰返しウェルを準備した。細胞を、通常のDMEM培地中で48時間培養した。20μLの5mg/mLメチルチアゾールテトラゾリウム（MTT）溶液を各ウェルに添加した後、細胞を、5%CO₂インキュベーター中、37℃で4時間再培養し、次いで上清液を廃棄した。150μLのジメチルスルホキシドを各ウェルに添加し、多機能マイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定し、次いで次式により細胞抑制率を計算した：

細胞抑制率（%）=（対照群の吸光度 - 実験群の吸光度）/ 対照群の吸光度 × 100%。

【0068】

計算すると、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖、ドキシソルピシン溶液、および薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液の、MCF-7およびその薬物耐性細胞MCF-7-adrに対するIC₅₀値を表4に要約した。

【0069】

【表4】

表4

	IC ₅₀ (μg/mL)	
	MCF-7	MCF-7-adr
PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖	435.3	378.8
塩酸ドキシソルピシン溶液	0.48	24.8
薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖	0.28	0.30

【0070】

上記の結果は、本発明のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖が低毒性材料であり、かつアドリマイシンをPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルで封入した後に、感受性MCF-7細胞に対する抗腫瘍有効性が、1倍増加することがあり、かつその薬物耐性細胞の薬物耐性を、完全に逆転させることができることを示唆した。

(b) パクリタキセル製剤

前記(4.1)(c)と同様の方法を使用して、パクリタキセルを装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを調製した。

【0071】

測定すると、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの粒子直径は、85.6nm、表面電位は32.5mV、薬物封入効率は98.5%であった。

【0072】

続いて、腫瘍細胞の抑制率を使用して、薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の抗腫瘍有効性、および薬物耐性腫瘍細胞の薬物耐性の逆転効率を評価した。

【0073】

具体的には、モデル細胞として使用される卵巣癌細胞SKOV-3およびその薬物耐性細胞SKOV-3/ST30を、96ウェル培養プレート中で培養した。5×10³個のSKOV-3またはSKOV-3/ST30細胞を含む100μLの培養液を、各ウェルに添加し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。細胞がプレート

に完全に接着した後、種々の濃度の薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液、およびタキソール溶液を、それぞれウェルに添加し、未処理のブランク細胞を対照として使用した。上記各群の繰返しウェルを準備した。細胞を、通常のDMEM培地中で48時間培養した。20 μ Lの5mg/mLメチルチアゾールテトラゾリウム(MTT)溶液を各ウェルに添加した後、細胞を、5%CO₂インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで4時間再培養し、次いで上清液を廃棄した。150 μ Lのジメチルスルホキシドを各ウェルに添加し、多機能マイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定し、次いで次式により細胞抑制率を計算した：

細胞抑制率(%) = (対照群の吸光度 - 実験群の吸光度) / 対照群の吸光度 \times 100%。

【0074】

計算すると、タキソール溶液、および薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液のSKOV-3およびその薬物耐性細胞に対するIC₅₀値を表5に要約した。

【0075】

【表5】

表5

	IC ₅₀ (μ g/mL)	
	SKOV-3	SKOV-3/ST30
タキソール溶液	0.45 \pm 0.05	10.25 \pm 0.23
薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖	0.10 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03

【0076】

これらの結果は、パクリタキセルを、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルで封入した後に、卵巣癌細胞の感受性細胞SKOV-3に対する抗腫瘍有効性を3.5倍高めることができ、かつ卵巣癌の薬物耐性細胞の薬物耐性を完全に逆転させることができることを示唆した。

(6) 遺伝子治療用医薬組成物におけるPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

(a) プラスミドDNA製剤

プラスミドDNAを装填したPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの調製
実施例8で調製した10mgのPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖(PEGの分子量は2,000Da;キトサンオリゴ糖の分子量は18,600Da;PEGのグラフト化率は8.1%;ステアリン酸のグラフト化率は48.3%であった)を正確に秤量し、10mLの水に溶解して、ミセル溶液を調製した。超音波水浴で15分間処理した後、溶液を、滅菌のため0.22 μ mの微多孔膜で濾過した。pEGFP(緑色蛍光タンパク質プラスミドDNA)溶液(500 μ g/mL)を25mM Na₂SO₄溶液で調製した。ミセル溶液と緑色蛍光タンパク質プラスミドDNA溶液とを3のN/P比率(キトサンオリゴ糖のアミノ基のDNAのリン酸基に対するモル比)で混合し、続いて室温で25分間静置して、ミセル/プラスミドDNAの複合ナノ粒子の形成をさらに促進した。

【0077】

適切な量の混合懸濁液を、脱イオン水で適切に希釈し、次いで粒子サイズおよび表面電位を粒子サイズ表面電位アナライザーで測定した。プラスミドDNAを装填したPEG化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の物理的および化学的特性を表6に示した。

【0078】

【表6】

表6

対照ミセルの粒子直径(nm)	pEGFPの粒子直径(nm)	CSO-SA/pEGFPの粒子直径(nm)	表面電位(mv)
87.2	25.3	128.1	32.1

10

20

30

40

50

【0079】

これらの結果は、グラフト体のミセルと p E G F P D N A との複合ミセルが形成されると、粒子サイズが増加し、p E G F P プラスミド D N A の、複数のグラフト体のミセルとの封入および接着を介して、複合ミセルの形成が達成されることを示した。

p E G F P 遺伝子を装填したグラフト体のミセルの細胞中でのトランスフェクション
A 5 4 9 細胞の培養

ヒト I I 型肺上皮細胞 A 5 4 9 を、10%ウシ胎児血清で補足された培地中で連続的に培養した(5%CO₂、37℃のインキュベーター)。続いて、対数増殖期中の細胞を、トリプシン処理し、D M E M で希釈した。希釈された細胞を、24ウェル培養プレートに、ウェル当たり 2×10^5 個の接種密度で接種し、インキュベーター中で24時間前培養した。

10

グラフト体 - p E G F P ミセルの *i n v i t r o* トランスフェクション

A 5 4 9 細胞を、トランスフェクションの24時間前に、24ウェル細胞培養プレートにウェル当たり 2×10^5 個の接種密度で接種し、次いで細胞の80~90%が融合されるまで5%CO₂インキュベーター中、37℃で再培養した。トランスフェクションの前に、プレート中の古い培地を除去した。細胞をP B S で2回洗浄した後、リボソームリポフェクタミン T M 2 0 0 0 , グラフト体 - p E G F P の複合ナノ粒子懸濁液、および適切な血清不含 D M E M 培地(そのpHは、7.4に調製)を細胞に添加して、最終容積を0.5mlとし、6時間培養した後、培地を、完全培地で置き換え、続いて72時間再培養した。

20

【0080】

トランスフェクション効率の測定：培地を除去した後、細胞をP B S で2回洗浄し、消化し、一定量のP B S で懸濁させた。トランスフェクション効率は、フローサイトメトリーで測定した。結果は、グラフト体(N/P58)で媒介された細胞トランスフェクション効率は14.2%、リボソームリポフェクタミン T M 2 0 0 0 で媒介されたトランスフェクション効率は25.1%であることを示した。

p E D F 遺伝子を装填したグラフト体のミセルを使用する *i n v i v o* での遺伝子治療
理論的遺伝子としてP E D Fを取り、薬物を装填したグラフト体のミセルを調製した。

動物モデルとしてのQ G Y腫瘍を有するヌードマウスに、2.5mg/kgのプラスミド D N A (担体容積7.5mg/kg)を2回(それぞれ第1日目および5日目に)、21日後に1回投与し、Q G Y腫瘍を有する動物モデルの腫瘍抑制率は49.04%達することがあった(陽性対照として、2mg/kgのアドリアマイシン1回での連続7日間の投与の治療を実施し、78.85%の腫瘍抑制率が最終的に得られた)。

30

(b) s i R N A 製剤

s i R N A を装填したP E G 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの調製

10mgのP E G 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖(P E G の分子量は2,000Da;キトサンオリゴ糖の分子量は18,600Da;P E G のグラフト化率は8.1%;ステアリン酸のグラフト化率は48.3%であった)を、10mLの水に溶解し、ミセル溶液を調製した。超音波水浴で15分間処理した後、溶液を、滅菌のため0.22μmの微多孔膜で濾過した。s i R N A 溶液(500μg/mL)を25mM Na₂SO₄溶液で調製した。ミセル溶液とs i R N A 溶液とを、3のN/P比率で混合し、続いて室温で25分間静置して、ミセル/s i R N A の複合ナノ粒子の形成をさらに促進した。

40

【0081】

適切な量の混合懸濁液を、脱イオン水で適切に希釈し、次いで粒子サイズおよび表面電位を粒子サイズおよび表面電位アナライザーで測定した。s i R N A を装填したP E G 化脂肪酸グラフト化キトサンオリゴ糖の物理的および化学的特性を表7に示した。

【0082】

【表 7】

表 7

対照ミセルの粒子直径 (nm)	s i R N A の粒子直径 (nm)	C S O - S A / s i R N A の粒子直径 (nm)	表面電位 (mV)
87.2	24.2	108.0	27.8

【 0 0 8 3 】

(7) 抗ウイルス薬組成物における P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の応用

抗ウイルス薬を装填した P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル調製
 実施例 8 で調製した 1 0 0 m g の P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖 (P E G の分子量は 2 , 0 0 0 D a ; キトサンオリゴ糖の分子量は 1 8 , 6 0 0 D a ; P E G のグラフト化率は 8 . 1 % ; ステアリン酸のグラフト化率は 4 8 . 3 % であった) を、
 5 0 m L のビーカーに入れ、次いで 9 0 m L の蒸留水 (p H 5 . 7) を添加し、超音波ブ
 ローブで 2 0 回 (5 0 0 w 、 刺激時間 2 秒、中断時間 3 秒) 処理した。続いて、溶液をメ
 スフラスコに移し、蒸留水で全容積を 1 0 0 m L とし、1 m g / m L のミセル溶液を得た。
 2 0 m L の P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセル溶液を取り、そ
 れぞれ、1 m g / m L のアデホビル、アシクロビル、アデホビルジピボキシル、エンテカ
 ビル、およびガンシクロビル溶液を 1 m L 添加した。室温で 3 時間攪拌した後、それら
 を超音波ブローブで 2 0 回 (5 0 0 w 、 刺激時間 2 秒、中断時間 3 秒) で処理し、0 . 2 2
 μ m の微多孔膜を用いて濾過して、抗ウイルス薬を装填した P E G 化ステアリン酸グラフ
 ト化キトサンオリゴ糖のミセルを得た。

【 0 0 8 4 】

薬物を装填したミセルの粒子サイズおよび表面電位を、粒子サイズおよび表面電位アナ
 ライザーで測定し、薬物封入効率を H P L C で測定した。抗ウイルス薬を装填した P E G
 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖の物理的および化学的特性を表 8 に示した。

【 0 0 8 5 】

【表 8】

表 8

薬物	薬物を装填したミセルの粒子直径 (nm)	薬物を装填したミセルの表面電位 (mV)	薬物封入効率 (%)
アデホビル	108.6	39.0	27.8
アシクロビル	110.4	32.7	25.7
アデホビルジピボキシル	98.8	33.5	34.9
エンテカビル	101.5	34.2	29.3
ガンシクロビル	108.4	36.8	25.7

【 0 0 8 6 】

P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルの抗ウイルス活性

H e p G 2 . 2 . 1 5 細胞を、約 1 0 % のウシ血清で補足された R P M I 1 6 4 0 培
 地中で培養した (5 % C O ₂ 、 3 7 ° C のインキュベーター中で) 。細胞を、それら
 が対数増殖期に入るようにインキュベートした。具体的には、対数増殖期の細胞を、P B S
 で洗浄し、トリプシン処理し、培地で希釈した。次いで、希釈した細胞を、2 4 ウェル培
 養プレートにウェル当たり 1×10^4 個の接種密度で接種し、続いて細胞がプレートに接
 着するまでインキュベーター中で 2 4 時間培養した。古い培地を除去した後、細胞を、p H 7
 . 4 の緩衝液 (P B S) で 2 回洗浄し、種々の濃度のアデホビル溶液、およびアデホビル
 を装填した P E G 化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルを添加した。細胞
 を 2、4、6、8 および 1 0 日間再培養した。最後に、培地を集め、それを使用して、酵
 素免疫アッセイキットで表面抗原 (H B s A g) および e 抗原 (H B e A g) レベルを検
 出し、リアルタイム定量 P C R 法で B 型肝炎ウイルスの D N A (H B V D N A) を測定

し、MTTアッセイで細胞生存率を測定した。

【0087】

アデホビルジピボキシルおよび薬物を装填したPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖のミセルをHe p G 2 . 2 . 1 5細胞と共にインキュベートした後、HBsAg、HBeAgおよびHBV-DNAの発現抑制率に対するそれらの効果を図4Aおよび4Bに示した。

【0088】

結果は、アデホビルジピボキシルを装填したグラフト体のミセルが、薬物の抗ウイルス効果を有意に高めることができ；特に、B型肝炎ウイルスのDNAの発現に対する抑制効果は、B型肝炎ウイルスのDNAの発現をそのより低い投与量で完全抑制できるほど意味のあるものであることを明らかにした。

10

【0089】

治療指数(TI)は、抗ウイルス薬の臨床的応用の見込みを評価するための指標の1つである。TI > 2は、有効かつ低毒性であることを意味し、1 < TI < 2は、低効率かつ有毒性であることを表し、TI < 1は毒性効果を意味する。TI = TC₅₀ / IC₅₀であり、ここで、TC₅₀は、ウイルス感染細胞を薬物で処理して10日目後に50%の細胞死をもたらす薬物濃度を指し、当技術分野で周知の方法で測定することができ；IC₅₀は、ウイルス感染細胞を薬物で処理して10日目後にHBsAgおよびHBeAgに対して50%の抑制率に達する薬物濃度を指す。アデホビルジピボキシルを装填したグラフト化ミセル送達システムのHBsAgおよびHBeAgに対する治療指数を表9に示した。

20

【0090】

【表9】

表9

	TC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)	IC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)	TI
HBsAg	1.13	0.472	2.4
HBeAg	1.13	0.121	9.3

【0091】

結果は、アデホビルジピボキシルを装填したグラフト体のミセル送達システムのHBsAgおよびHBeAgに対する治療指数は、すべて2を超え、担体として本発明のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖を使用する抗ウイルス薬組成物は、効率が高く、かつ毒性が低い抗ウイルス製剤であることを示している。

30

【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明のPEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖は、各種医薬組成物において薬物担体として広範に使用することができ、in vivoでの薬物活性成分の標的化吸収を改善するだけでなく、薬物が分解するのをある程度まで予防し、それによって薬物の安定性を維持し、薬物の副作用を低減することができる。したがって、PEG化ステアリン酸グラフト化キトサンオリゴ糖および本発明のグラフト体を含む医薬組成物は、産業において広範に応用できる。

40

【 図 1 】

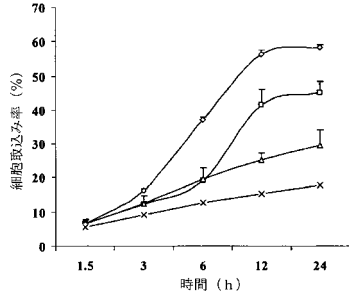


図 1

【 図 3 】

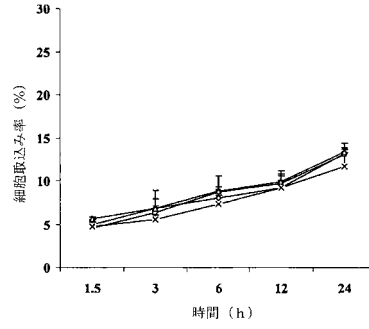


図 3

【 図 2 】

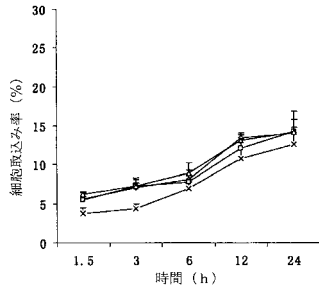


図 2

【 図 4 A 】

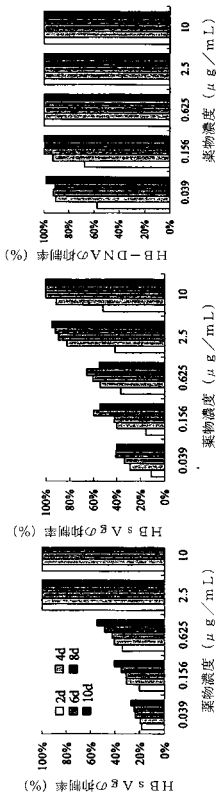


図 4A

【 図 4 B 】

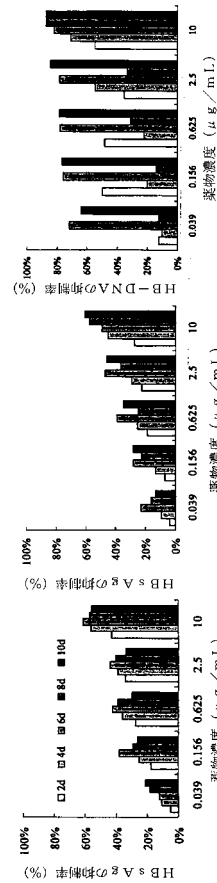


図 4B

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2009/000656
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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)		
IPC: C08B;C08G;A61K;A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, EPODOC, PAJ; CNKI; CNPAT(CPRS)		
PEG?,POLYGLYCOL?,POLYETHLENEGLYCOL?,POLYETHYLENE GLYCOL, CHITOSAN?,CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE?,CSO,LCS,MODIF+,GRAFT+,PEGYLAT+,FATTY ACID?,ALIPHATIC ACID?,STEARIC ACID?,TUMOUR?,CANCER?,MEDICIN??,MEDICAL, CARRIER?,SUPPORT????,BEARER?, DRUG, RELEAS+, CIRCULAT+, DELIVER+, TARGET+, MACROPHAGE,MEGALOPHAGE,ENGULF+,PHAGOCYTOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101293933A(UNIV ZHEJIANG) 29 Oct. 2008(29.10.2008) page 2, paragraph 4 - page 4, paragraph 1, examples	1-16
Y	CN101148483A(UNIV ZHEJIANG) 26 Mar. 2008(26.03.2008) page 3, paragraph 1- page 4, paragraph 2, examples	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 15 Sep. 2009(15.09.2009)	Date of mailing of the international search report 24 Sep. 2009 (24.09.2009)	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer XIANG Xin Telephone No. (86-10)62084426	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/000656

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO2006097558A(ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES SL) 21 Sep. 2006(21.09.2006) claims 1-28	1-16
Y	Moghimi, S. Moein ET AL: "Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice", Pharmacological Reviews, 53(2), 283-318, 2001, ISSN: 0031-6997 the whole document	1-16
A	CN1718592A(UNIV ZHEJIANG) 11 Jan. 2006(11.01.2006) claims 1-9	1-16
A	CN1883708A(UNIV ZHEJIANG) 27 Dec. 2006(27.12.2006) claims 1-6, page 2 paragraph 2 - page 4, paragraph 2	1-16
A	EP1304346A(WEST PHARM SERVICES DRUG DELIVERY & CLIN) 23 Apr. 2003(23.04.2003) the whole document	1-16
PA	CN101254308A(UNIV NANKAI) 03 Sep. 2008(03.09.2008) the whole document	1-16
Y	ZHOU Xu ET AL: "Study on Surface Modification and Transfection of Gene-chitosan Nanoparticles", Med J Nat Defending Forces in North China, 17(1), 3-5, Feb. 2005, the whole document	1-16
Y	XU Haic ET AL: "Grafting chitosan with folic acid and poly(ethylene glycol)", Chemical Research and Application, 19(1), 60-63, Jan. 2007, the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2009/000656

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date		
CN101293933 A	29.10.2008	None			
CN101148483A	26.03.2008	None			
WO2006097558A	21.09.2006	ES2259914A1	16.10.2006		
		ES2259914B1	16.06.2007		
		EP1864653A2	12.12.2007		
		AU2006224548A1	21.09.2006		
		US2008095810A1	24.04.2008		
		CN101175486A	07.05.2008		
		JP2008533108T	21.08.2008		
		CN1718592A	11.01.2006	CN1318453C	30.05.2007
		CN1883708A	27.12.2006	CN100417417C	10.09.2008
		EP1304346A	23.04.2003	WO9901498A1	14.01.1999
AU8230598A	25.01.1999				
ZA9805831A	29.03.2000				
EP0993483A1	19.04.2000				
JP2002508020T	12.03.2002				
US2003166783A1	04.09.2003				
US6730735B2	04.05.2004				
US2004166158A1	26.08.2004				
CN101254308A	03.09.2008	None			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/000656

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

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

C08B37/08 (2006.01)i

C08G65/48 (2006.01)i

A61K47/36 (2006.01)i

A61P35/00 (2006.01)i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2009/000656
A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C08B; C08G; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI; EPODOC; PAJ; PEG?,POLYGLYCOL?,POLYETHYLENGLYCOL?,POLYETHYLENE GLYCOL, CHITOSAN?,CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE,CSO,LCS,MODIF+,GRAFT+,PEGYLAT+,FATTY ACID?,ALIPHATIC ACID?,STEARIC ACID?,TUMOUR?,CANCER?,MEDICIN??.MEDICAL, CARRIER?,SUPPORT????,BEARER?, DRUG, RELEAS+, CIRCULAT+, DELIVER+, TARGET+, MACROPHAGE,MEGALOPHAGE,ENGULF+,PHAGOCYTOSIS		
CNKI; CNPAI(CPRS); 乙二醇, 聚醚, 壳聚糖, 壳寡糖, 脂肪酸, 硬脂酸, 接枝, 改性, 修饰, 嫁接, 巨噬细胞, 吞噬, 释放, 循环, 长效, 缓释, 肿瘤, 载体, 靶向		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101293933 A (浙江大学) 29.10 月 2008 (29.10.2008) 第 2 页第 4 段-第 4 页第 1 段, 实施例	1-16
Y	CN101148483A (浙江大学) 26.3 月 2008 (26.03.2008) 第 3 页第 1 段-第 4 页第 2 段, 实施例	1-16
Y	WO2006097558A (ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES SL) 21.9 月 2006 (21.09.2006) 权利要求 1-28	1-16
Y	Moghimi, S. Moein ET AL: "Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice", Pharmacological Reviews, 53 (2), 283-318, 2001, ISSN: 0031-6997, 全文	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“&” 同族专利的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 15.9 月 2009 (15.09.2009)	国际检索报告邮寄日期 24.9 月 2009 (24.09.2009)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 相欣 电话号码: (86-10) 62084426	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2009/000656

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1718592A (浙江大学) 11.1 月 2006 (11.01.2006) 权利要求 1-9	1-16
A	CN1883708A (浙江大学) 27.12 月 2006 (27.12.2006) 权利要求 1-6, 第 2 页第 2 段-第 4 页第 2 段	1-16
A	EP1304346A (WEST PHARM SERVICES DRUG DELIVERY & CLIN) 23.4 月 2003 (23.04.2003) 全文	1-16
PA	CN101254308A (南开大学) 03.9 月 2008 (03.09.2008) 全文	1-16
Y	周旭等: “基因壳聚糖纳米粒表面修饰和转染研究”, 华北国防医药, 17 (1), 3-5, 2 月 2005, 全文	1-16
Y	徐海娥等: “叶酸和聚乙二醇接枝作基因载体用壳聚糖的合成与表征”, 化学研究与应用, 19 (1), 60-63, 1 月 2007, 全文	1-16

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2009/000656

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101293933 A	29.10.2008	无	
CN101148483A	26.03.2008	无	
WO2006097558A	21.09.2006	ES2259914A1	16.10.2006
		ES2259914B1	16.06.2007
		EP1864653A2	12.12.2007
		AU2006224548A1	21.09.2006
		US2008095810A1	24.04.2008
		CN101175486A	07.05.2008
		JP2008533108T	21.08.2008
CN1718592A	11.01.2006	CN1318453C	30.05.2007
CN1883708A	27.12.2006	CN100417417C	10.09.2008
EP1304346A	23.04.2003	WO9901498A1	14.01.1999
		AU8230598A	25.01.1999
		ZA9805831A	29.03.2000
		EP0993483A1	19.04.2000
		JP2002508020T	12.03.2002
		US2003166783A1	04.09.2003
		US6730735B2	04.05.2004
		US2004166158A1	26.08.2004
CN101254308A	03.09.2008	无	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2009/000656

主题的分类:

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

C08B37/08 (2006.01) i

C08G65/48 (2006.01) i

A61K47/36 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

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 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/662 (2006.01)	A 6 1 K 31/662	
A 6 1 K 31/522 (2006.01)	A 6 1 K 31/522	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	
C 0 8 G 81/00 (2006.01)	C 0 8 G 81/00	

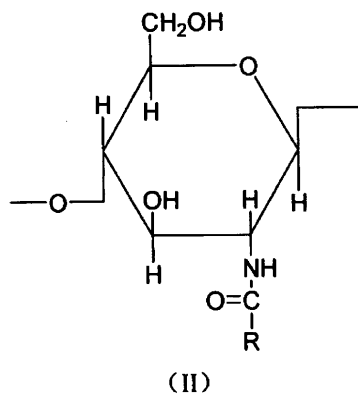
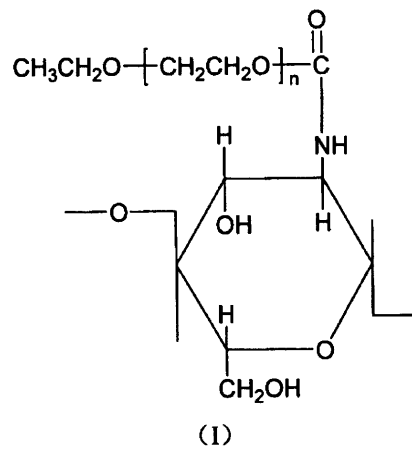
(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 蒙 分

中華人民共和国 3 1 0 0 5 8 浙江省杭州市余杭塘路 3 8 8 号

Fターム(参考) 4C076 AA16 AA17 AA95 CC27 CC35 DD09F EE23A EE23F EE37A EE37F
EE48A
4C084 AA13 MA05 MA22 NA13 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332
4C086 AA01 AA02 BA02 CB03 CB07 CB22 EA10 EA16 MA02 MA05
NA13 ZB26 ZB33
4C090 AA02 AA05 AA09 BA47 BB53 BB65 BB69 BB82 BB85 BB98
BD02 BD36 CA35 DA04 DA23
4J031 AA02 AA53 AB06 AC03 AC07 AD01 AE10 AF03

【要約の続き】



【選択図】なし