

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-31148

(P2017-31148A)

(43) 公開日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 2 0 6

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-151063 (P2016-151063)	(71) 出願人	598139748 國立交通大學 台灣新竹市大學路 1 0 0 1 號
(22) 出願日	平成28年8月1日 (2016. 8. 1)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	104124706	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成27年7月30日 (2015. 7. 30)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(33) 優先権主張国	台湾 (TW)	(72) 発明者	黄 唯▲ティン▼ 台灣新竹市大學路 1 0 0 1 號
		(72) 発明者	李 翊綺 台灣新竹市大學路 1 0 0 1 號
		(72) 発明者	劉 典謨 台灣新竹市大學路 1 0 0 1 號

最終頁に続く

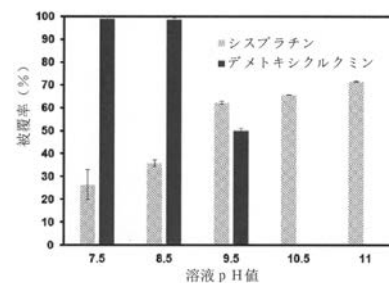
(54) 【発明の名称】 薬物組成物およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】薬物組成物およびその製造方法を提供する。

【解決手段】複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、静電力により前記複数の親水基を吸引する少なくとも一つの親水性薬物と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、前記複数の疎水基の間にある少なくとも一つの疎水性薬物と、を含む、薬物組成物を提供する。また、複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、少なくとも一つの疎水性薬物と、少なくとも一つの親水性薬物とを溶剤に分散させて混合溶液を形成し、前記混合溶液のpHを前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整することと、前記混合溶液を少なくとも12時間攪拌し、前記混合溶液のpHを6～7にすることと、を含む薬物組成物の製造方法を提供する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、少なくとも一つの疎水性薬物と、少なくとも一つの親水性薬物とを溶剤に分散させて混合溶液を形成し、前記混合溶液の pH を前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整することと、

前記混合溶液を少なくとも 12 時間攪拌し、前記混合溶液の pH を 6 ~ 7 にすることと

を含む薬物組成物の製造方法。

【請求項 2】

pH が 8.5 ~ 12.5 である水溶液を添加することにより、前記混合溶液の pH を前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整する、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

pH が 9.0 ~ 11.0 である水溶液を添加することにより、前記混合溶液の pH を前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整する、請求項 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記薬物組成物は複数の粒子である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 5】

さらに、架橋剤で標的物質を前記複数の粒子の表面に接続させることを含む、請求項 4 に記載の製造方法。

【請求項 6】

前記標的物質は、抗体、ペプチドおよびタンパク質からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

さらに、現像化合物を前記溶液に分散させることを含む、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記現像化合物は、蛍光化合物または有機金属現像剤である、請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、

前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、静電力により前記複数の親水基を吸引する少なくとも一つの親水性薬物と、

前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、前記複数の疎水基の間に存在する少なくとも一つの疎水性薬物と、

を含む、薬物組成物。

【請求項 10】

前記薬物組成物は複数の粒子である、請求項 9 に記載の薬物組成物。

【請求項 11】

前記複数の粒子の粒子径は、50 nm ~ 300 nm の範囲にある、請求項 10 に記載の薬物組成物。

【請求項 12】

さらに、架橋剤および前記架橋剤で前記複数の粒子の表面に接続されている標的物質を含む、請求項 10 に記載の薬物組成物。

【請求項 13】

前記標的物質は、抗体、ペプチドおよびタンパク質からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 12 に記載の薬物組成物。

【請求項 14】

癌細胞の生長抑制に用いられる、請求項 9 に記載の薬物組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

非小細胞肺癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、膀胱癌細胞、子宮頸癌細胞および肺癌細胞からなる群より選択される少なくとも一つの癌細胞の生長抑制に用いられる、請求項 14 に記載の薬物組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物組成物およびその製造方法に関し、特に両親媒性キトサンで疎水性薬物および親水性薬物を被覆する薬物組成物およびその製造方法に関する。

【背景技術】

10

【0002】

キチンは、自然界で広く分布し、甲殻類動物（例えば、エビ、カニ、昆虫の外骨格）に存在する他、微生物界（細菌の細胞壁またはキノコ類）および植物界の藻類等にも存在する。キトサン（ポリ（ α -1,4-グルコサミン）とも称する）は、キチンから異なるレベルの脱アセチル化反応により得られる不均一性重合体である。キトサンはN-アセチルグルコサミンとN-グルコサミンを構造単位とする共重合体であり、重合体におけるN-グルコサミン構造単位の含有量は、通常、60%よりも高い。キトサンは、生体親和性（*biocompatibility*）が良好で、毒性がなく、生物体内で分解でき（リゾチーム）、値段が安く、生産原料の供給が十分等の利点があるため、近年、キトサンは高分子医用材料において重要な材料になっている。

20

【0003】

従来の薬物担体被覆技術は、いずれもマルチシェルの方式で二種類以上の抗癌薬（例えば、親水性薬物および疎水性薬物）を被覆してナノ粒子を形成し、またはそのナノ粒子に特異的認識性を有する抗体/タンパク質/ペプチド/多糖体を連結させ、または現像可能物質を添加することにより、そのナノ粒子を癌治療において複数機能を持たせている。しかしながら、マルチシェルの方式で二種類の薬物を被覆すると、薬物漏れが生じ易く、被覆率が悪く、プロセスが複雑等の問題がある。また、高分子自己組織化の方式で薬物を被覆すれば、親水性と疎水性薬物を同時に被覆することが困難になる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0004】

そのため、従来のナノ粒子を多種類の薬物で被覆するには、複数工程および多種類の環境を必要とするプロセスの問題の解決、単一の工程で親水性と疎水性薬物を同時に被覆して薬担持粒子を製造することを提供することは、重要な課題である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体（*AMPHIPHILIC CHITOSAN DERIVATIVE*）と、少なくとも一つの疎水性薬物と、少なくとも一つの親水性薬物とを溶剤に分散させて混合溶液を形成し、前記混合溶液のpHを前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整することと、前記混合溶液を少なくとも12時間攪拌し、前記混合溶液のpHを6~7にすることを含む薬物組成物の製造方法を提供する。

40

【0006】

本発明は、複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、静電力により前記複数の親水基を吸引する少なくとも一つの親水性薬物と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、前記複数の疎水基の間に存在する少なくとも一つの疎水性薬物とを含む薬物組成物をさらに提供する。

【0007】

上記から分かるように、本発明は高い生体親和性を有する両親媒性キトサン高分子をベースとして使用し、前記両親媒性キトサン高分子自己組織の溶液環境を調整することによ

50

り、一種類または多種類の同じまたは異なる親水性・疎水性の薬物を同時に被覆するという目的を達成し、架橋剤により、抗体等の特異的認識性を有する標的物質で前記薬物粒子の表面を修飾し、または薬物を被覆しながら、現像効果を有する化合物を被覆でき、前記ナノ粒子を認識、現像および治療等の複数機能を有する医療手段にし、癌細胞を有効に殺す。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は異なるpH(pH7.5、pH8.5、pH9.5、pH10.5およびpH11)の溶液における二種類の薬物で被覆したナノ粒子のシスプラチン(CDDP)およびデメトキシクルクミン(DMC)の被覆率を示す。

10

【図2】図2は異なるpH(pH8、pH8.5およびpH9)の溶液における二種類の薬物で被覆したナノ粒子のシスプラチンおよびデメトキシクルクミンの被覆率を示す。

【図3】図3は二種類の薬物で被覆したナノ粒子を透過電子顕微鏡で観察した図を示す。

【図4】図4は遊離型DMC-CDDP組み合わせ、CHC/DMC-CDDPナノ粒子およびCHC/DMC-CDDP/抗-CD133ナノ粒子の三種類の薬物/担体の異なる組み合わせの細胞生存率に対する影響を示す。

【図5】図5はCHC/DMC-CDDPナノ粒子およびCHC/DMC-CDDP/抗-CD133ナノ粒子の細胞生存率に対する影響を示し、X軸はナノ粒子におけるDMCおよびCDDPの含有量を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0009】

以下、特定の具体的な実施態様により本発明の実施形態を説明し、当業者は本明細書の開示内容から本発明の利点および効果を容易に理解できる。本発明は、他の異なる実施形態により実行または応用でき、本明細書の各詳細内容は異なる観点と応用に基づいて、本発明の精神および意旨から逸脱しない範囲において、異なる修飾と変更が可能である。

【0010】

本明細書において、「ワンポット合成法(one-pot synthesis)」である用語とは、自己組織反応において、反応物(例えば、両親媒性キトサン)を親水性と疎水性薬物に被覆させ、反応効率を高めることを意味する。この方法では、冗長な分離と純化後処理を避けられ、時間と資源を節約して収率を高める。

30

【0011】

本発明は、複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、少なくとも一つの疎水性薬物と、少なくとも一つの親水性薬物とを水のような溶剤に分散させて混合溶液を形成し、前記混合溶液のpHを前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整することと、前記混合溶液を少なくとも12時間攪拌し、前記混合溶液のpHを6~7にすることと、を含む薬物組成物の製造方法を提供する。

【0012】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、前記混合溶液を12~24時間攪拌する。

【0013】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明の製造方法において、両親媒性キトサン誘導体の重量百分率の範囲は0.01wt%~2wt%であり、使用する疎水性薬物の濃度範囲は0より大きく3mMまでであり、使用する親水性薬物の濃度範囲は0より大きく3mMまでである。

40

【0014】

キトサンのヒドロキシ基(-OH)およびアミノ基(-NH₂)は、非常に修飾しやすい部位である。通常、キトサンを骨格(backbone)とし、親水性を有するようにそのヒドロキシ基末端を修飾し、疎水性を有するようにそのアミノ基末端を修飾する。修飾変性技術は公知技術であるため、省略する。

【0015】

前述製造方法の一つの実施態様において、前記混合溶液のpHを前記親水性薬物および

50

疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整する。通常、前記混合溶液を弱塩基性にし、具体的には、塩基性水溶液、すなわち pH が 8 以上の塩基性水溶液、例えば、pH が 8.5 ~ 12.5、好ましくは pH が 9 ~ 11 の範囲の塩基性水溶液を添加することにより、前記混合溶液の pH を前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整する。

【0016】

前述製造方法の一つの実施態様において、まず、疎水性薬物を両親媒性キトサン誘導体の水溶液に添加し、次に塩基性水溶液（pH が 8.5 ~ 12.5 の範囲にあり、好ましくは pH が 9.0 ~ 11.0 の範囲にある）を添加し、最後に親水性薬物を添加して、前記混合溶液の pH を前記親水性薬物および前記疎水性薬物が沈殿しない範囲に調整する。

【0017】

前記混合溶液を塩基性に調整し、または塩基を添加して前記両親媒性キトサン誘導体構造における親水基の H^+ を遊離させ、前記両親媒性キトサン誘導体構造における親水基、例えば COO^- は、静電力により、正電荷を持っている薬物、例えば親水性薬物のシスプラチンを吸引して連結させる。これと同時に、静電力により親水性薬物を吸引するので、前記両親媒性キトサン誘導体構造における疎水基、例えばカプロイル基でデメトキシクルクミンのような疎水性薬物を被覆し、最後に、これによって自己組織反応して複数の粒子という形態の薬物組成物を形成する。

【0018】

薬物を被覆し終わった後、全体の溶液の pH 値が 6 ~ 7、好ましくは pH 6.7 である。製作した薬物担体粒子は中性であり、中和反応または純化工程をさらに行わなくても使用できる。本発明の一つの具体的な実施態様によると、前記薬物組成物は複数の粒子である。また、本発明の製造方法は、さらに、架橋剤で標的物質を前記複数の粒子の表面に連結させることを含んでもよい。非限定的な実施態様において、前記標的物質は、抗体、ペプチドおよびタンパク質からなる群より選択される少なくとも一つであってもよい。

【0019】

一つの実施態様において、前記架橋剤は、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)およびヒドロキシスクシンイミドからなる群より選択される少なくとも一つの化合物であってもよい。

【0020】

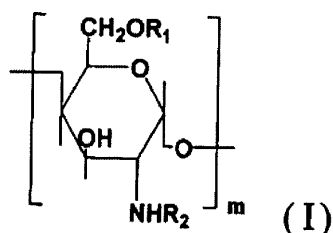
本発明の製造方法の一つの具体的な実施態様によると、さらに、現像化合物を前記溶液に分散させることを含み、前記現像化合物は、蛍光化合物または有機金属現像剤である。

【0021】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、前記両親媒性キトサン誘導体は、下記式(I)で表される構造の複数の繰り返し単位を有する。

【0022】

【化1】



【0023】

式中、 R_1 は、それぞれ独立に、水素、C1 ~ C4 アルキル基または C1 ~ C6 カルボキシル基であり、 R_2 は、それぞれ独立に、水素、C1 ~ C12 アルキル基、C1 ~ C6 カルボキシル基または C2 ~ C12 アシル基であり、 m は 100 ~ 2000 の整数である。

【0024】

10

20

30

40

50

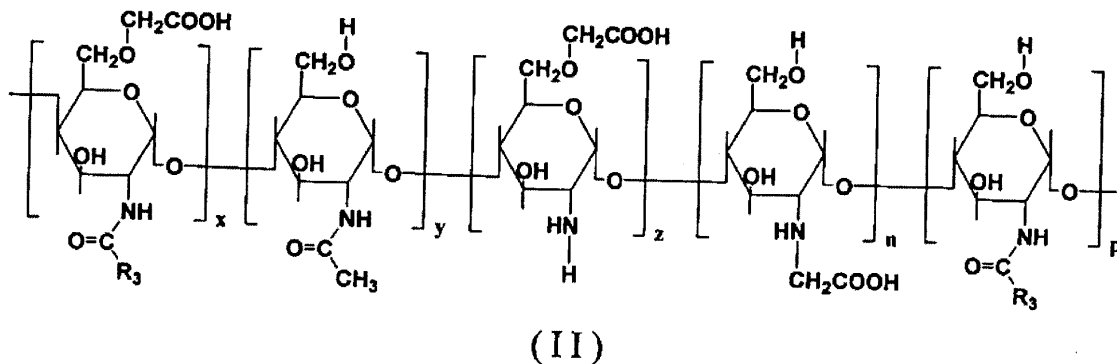
その中に、 R_1 が C 1 ~ C 4 アルキル基および C 1 ~ C 6 カルボキシル基より選択される繰り返し単位の数 は 2 0 ~ 2 0 0 0 であり、 R_2 が C 1 ~ C 1 2 アルキル基、C 1 ~ C 6 カルボキシル基または C 2 ~ C 1 2 アシル基より選択される繰り返し単位の数 は 2 0 ~ 2 0 0 0 である。

【 0 0 2 5 】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明に使用されるキトサン誘導体は、下記式 (I I) で表される。

【 0 0 2 6 】

【 化 2 】



10

20

【 0 0 2 7 】

式中、 R_3 は、それぞれ独立に、C 5 ~ C 1 1 アルキル基であり、 x 、 y 、 z 、 n および p は、それぞれ独立に、2 0 ~ 2 0 0 0 の整数である。

【 0 0 2 8 】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明に使用される疎水性薬物は、タキソール (Taxol)、カンプトテシン (Camptothecin)、デメトキシクルクミン (Demethoxycurcumin、以下、DMCとも称する)、トポテカン (Topotecan)、シクロスポリン A (Cyclosporine A)、エピルビシン (Epirubicin) およびラパマイシン (Rapamycin) からなる群より選択される少なくとも一つであるが、これらに限定するものではない。

30

【 0 0 2 9 】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明に使用される親水性薬物は、シスプラチン (Cisplatin、以下、CDDPとも称する)、ドキソルビシン (Doxorubicin)、オキサリプラチン (Oxaliplatin)、カルボプラチン (Carboplatin)、ネダプラチン (Nedaplatin) およびサトラプラチン (Satraplatin) からなる群より選択される少なくとも一つであるが、これらに限定するものではない。

【 0 0 3 0 】

本発明は、複数の親水基と複数の疎水基で変性された両親媒性キトサン誘導体と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、静電力により前記複数の親水基を吸引する少なくとも一つの親水性薬物と、前記両親媒性キトサン誘導体に埋め込められ、前記複数の疎水基の間に存在する少なくとも一つの疎水性薬物とを含む薬物組成物をさらに提供する。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、前記薬物組成物は複数の粒子である。本発明のもう一つの具体的な実施態様によると、前記複数の粒子の粒子径は 5 0 n m ~ 3 0 0 n m の範囲内にある。

【 0 0 3 2 】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明の薬物組成物は、癌細胞の生長抑制、その中、非小細胞肺癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞 (testicular cancer cell)、膀胱癌細胞、子宮頸癌細胞および肺癌細胞からなる群より選択され

50

る少なくとも一つの癌細胞の生長抑制に用いられる。

【0033】

本発明の一つの具体的な実施態様によると、本発明の薬物組成物は、凍結乾燥、減圧濃縮、真空乾燥の方法によって、溶剤および水分を除去できる。

【0034】

下記実施例により本発明をさらに説明するが、これらの実施例は、例示して説明するためのものだけであって、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0035】

<実施例1>

疎水性カプロイル基および親水性カルボキシメチルで修飾した両親媒性キトサン誘導体の製造

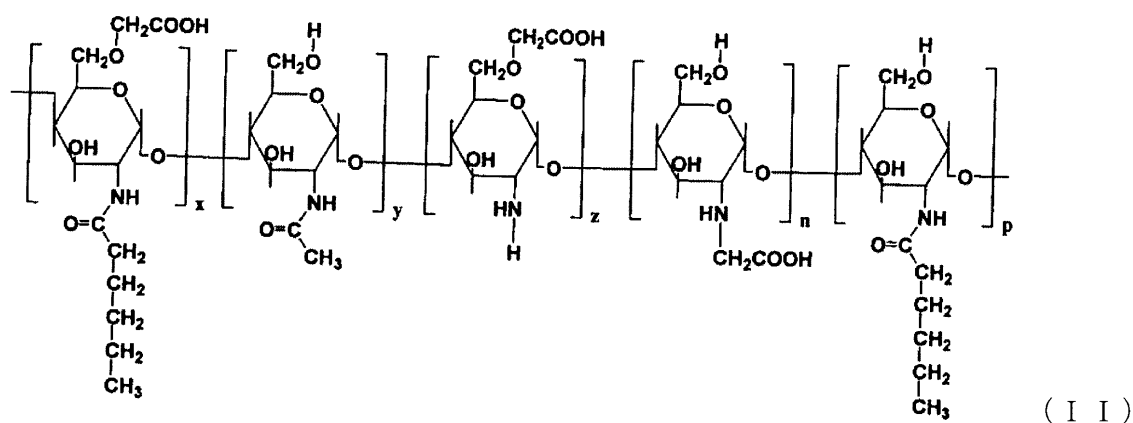
まず、室温で、5 gのキトサン ($M_w = 215,000 \text{ g/mol}$ 、脱アセチル度80~90%、Aldrich-Sigmaから購入)を、イソプロパノール (50 mL) に懸濁させ、30分間撹拌した。得られた懸濁液を水酸化ナトリウム水溶液 (12.5 mL) に徐々に混合して混合溶液を得、混合溶液における水酸化ナトリウムの濃度を調整することによって親水性官能基のグラフト (graft) 量を制御できる。ここで、混合溶液には13.3 Mの水酸化ナトリウムが含まれた。次に、この混合溶液をクロロ酢酸 (chloroacetic acid) と反応させ、水溶性の親水性カルボキシメチルで修飾したキトサン (carboxymethyl-modified chitosan) を得、乾燥させた。

【0036】

2 gの乾燥した親水性カルボキシメチルで修飾したキトサンを純水 (50 mL) に溶解させ、24時間撹拌した。次に、得られた溶液をメタノール (50 mL) と混合し、さらに0.2 Mの無水カプロン酸を添加して反応溶液を得た。室温で20時間反応した後、反応溶液を収集してエタノール水溶液 (25% v/v) で24時間透析し、乾燥後に収集した産物として、下記式 (II) で表される構造を有する疎水性カプロイル基および親水性カルボキシメチルで修飾した両親媒性キトサン誘導体を得た。同時に、 ^1H NMRスペクトルおよびN含有量の元素分析で、キトサン誘導体における置換基の位置およびカプロイル基グラフト量を確認した。本実施例において、カプロイル基グラフト量は13%である。

【0037】

【化3】



【0038】

<実施例2>

両親媒性キトサン誘導体により薬物を被覆する

実施例1で製造した両親媒性キトサン粉末を0.5 mg秤量し、200 μL の0.1%のデメトキシクルクミン (メタノールに溶解する) に添加し、振とう機で少し混合した後

、540 μ Lの蒸留水を添加し、さらに60 μ LのpH10.5の蒸留水を添加し、最後に200 μ Lの0.1%のシスプラチン(cisplatin)(水に溶解する)を添加し、12時間攪拌し、水溶液の全体のpHが6~7になるようにさせ、二種類の薬物(デメトキシクルクミンおよびシスプラチンを含む)で被覆したナノ粒子を製造した。その後、必要に応じて、その溶液をそのまま使用してもよく、その溶液を(例えば蒸留水で)希釈または濃縮してから使用してもよい。

【0039】

<実施例3>

二種類の薬物で被覆したナノ粒子の被覆率試験

合成された二種類の薬物で被覆したナノ粒子を、濃縮遠心管に入れ、回転速度4000 rpmで30分間遠心した。

10

【0040】

(1)シスプラチン被覆率

濃縮遠心管の下澄液を20倍希釈し、1:1の割合で0.14% o-フェニレンジアミンのジメチルホルムアミド溶液と混合し、100 で30分間加熱した後、-20 の冷蔵庫に10分間放置して冷却し、最後に溶液をUV-可視光で波長705 nmにおけるピークを検出し、換算して被覆されていないシスプラチン含有量が分かり、さらにシスプラチンの被覆率が分かる。

【0041】

(2)デメトキシクルクミン被覆率試験

20

濃縮遠心管のろ過膜上のナノ粒子を蒸留水で再溶解し、この溶液とメタノールとを1:1の割合で混合し、HPLCで分析した。流速1 mL/minでC18を固定相とし、アセトニトリルと0.3%FA(50:50, v/v)を移動相とし、波長425 nmの条件で検出し、デメトキシクルクミンの濃度を換算して薬物被覆率を得た。

【0042】

図1に示すように、両親媒性キトサン誘導体、親水性薬物および前記疎水性薬物を混合した水溶液のpH値が高くなると、シスプラチンの被覆率が増加するのに対し、一方、デメトキシクルクミンの被覆率はpH値が高くなるに従って低くなることを示す。デメトキシクルクミンは塩基性環境で、容易に薬物活性を失って沈殿するため、水溶液のpH値をpH8.0~9.0の間に調整することが好ましい。

30

【0043】

図2に示すように、水溶液のpH値が9.0である場合が最も好ましい二種類の薬物の被覆率を有する。また、被覆終了後の溶液全体のpH値が6.7であった。なお、上記の実施例では蒸留水を使用した。逆浸透水、逆浸透水を蒸留した水、または、蒸留水を逆浸透処理した水を使用してもよい。

【0044】

<実施例4>

抗体を二種類の薬物で被覆したナノ粒子に連結させる

適量の抗体(抗-CD133)と0.01%50 μ L架橋剤(EDC)を上記二種類の薬物で被覆したナノ粒子溶液に添加し、5時間攪拌し、抗体を上記二種類の薬物で被覆したナノ粒子表面に連結させ、製造された二種類の薬物で被覆したナノ粒子の直径は190 nmである。下記表1に、両親媒性キトサンナノ粒子(以下、CHCとも称する)、二種類の薬物で被覆したナノ粒子(以下、CHC/DMC-CDDPとも称する)、および抗体を接続した二種類の薬物で被覆したナノ粒子(以下、CHC/DMC-CDDP-抗体とも称する)の直径およびゼータ電位(zeta potential)をまとめた。

40

【0045】

図3に示すように、さらに、電子顕微鏡で抗体を接続した二種類の薬物で被覆したナノ粒子を観察した。

【0046】

【表 1】

表 1 本発明の各ナノ粒子の直径およびゼータ電位

試料名	直径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
CHC	55 ± 2.3	-22.5 ± 0.91
CHC/DMC-CDDP	140 ± 7.3	-13.0 ± 3.5
CHC/DMC-CDDP -抗体	190 ± 6.1	-5.1 ± 0.6

【0047】

10

< 実施例 5 >

本発明のCHC/DMC-CDDPおよびCHC/DMC-CDDP-抗体のナノ粒子で癌細胞を殺す細胞生存率の試験

肺癌幹細胞 (A549-ON) を24ウェルのプレートに、各ウェルごとに 1×10^5 個の細胞で培養し、異なる量の遊離型DMC-CDDP組み合わせ (free drug) (図4において、左から右までの量は、 $3.25 - 75 \text{ g/mL}$ 、 $7.5 - 150 \text{ g/mL}$ 、 $7.5 - 300 \text{ g/mL}$ 、 $15 - 300 \text{ g/mL}$ および $20 - 600 \text{ g/mL}$)、CHC/DMC-CDDPナノ粒子 (図4において、左から右までの量は、 $1.25 - 95 \text{ g/mL}$ 、 $3 - 125 \text{ g/mL}$ 、 $5 - 200 \text{ g/mL}$ 、 $6 - 250 \text{ g/mL}$ および $9 - 265 \text{ g/mL}$)、およびCHC/DMC-CDDP/抗-CD133ナノ粒子 (図4において、左から右までの量は、 $1.25 - 95 \text{ g/mL}$ 、 $3 - 125 \text{ g/mL}$ 、 $5 - 200 \text{ g/mL}$ 、 $6 - 250 \text{ g/mL}$ および $9 - 265 \text{ g/mL}$) を、肺癌幹細胞に与えて24時間培養した後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物 (以下、MTTとも称する) で細胞生存率を分析した。図4は、三種類の薬物/担体の異なる組み合わせの細胞生存率に対する影響を示し、図4に示すように、Y軸はコンビネーションインデックス (combination index、以下、CIとも称する) であり、前記CI値が1より小さい場合、相乗効果があることを意味し、Faは細胞死亡率を示し、数値が1に近づくほど細胞死亡率が高く、より好ましい癌細胞を殺す効果を奏することを意味する。図4から分かるように、CHCで被覆されていない薬物 (すなわち、遊離型DMC-CDDP組み合わせ) は相乗効果がなく、二種類の薬物を同時に使用して癌細胞を殺す効果を向上させることができない。また、CHCで被覆した二種類の薬物は、一部の量 (CHC/DMC-CDDP: $6 - 250 \text{ g/mL}$ および $9 - 265 \text{ g/mL}$ 、CHC/DMC-CDDP/抗-CD133: $5 - 200 \text{ g/mL}$ 、 $6 - 250 \text{ g/mL}$ および $9 - 265 \text{ g/mL}$) において二種類の薬物の相乗効果を示し、優れた癌細胞を殺す効果があったことが明らかである。図5は、CHC/DMC-CDDPナノ粒子およびCHC/DMC-CDDP/抗-CD133ナノ粒子の細胞生存率に対する影響、すなわち、CHC二種類の薬物で被覆した抗体が連結された/連結されていないナノ粒子の肺癌幹細胞を殺す効果を示し、図5から分かるように、CHC/DMC-CDDP/抗-CD133ナノ粒子 (抗体にグラフトした) は、肺癌幹細胞の生存率を効果的に低下させることができる。

20

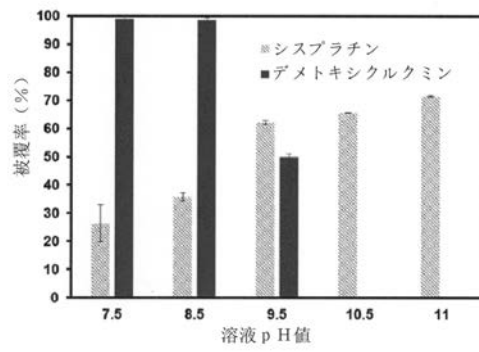
30

40

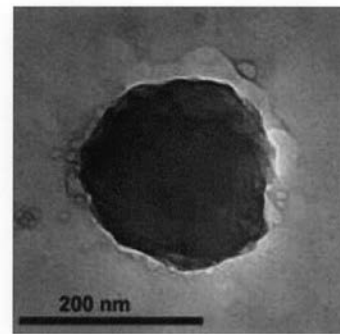
【0048】

上記実施例は本発明の原理およびその効果を例示的に説明するためのものだけであって、本発明を制限するものではない。当業者は本発明の精神および範囲から逸脱しない範囲において、上記実施例を修飾または/および変更することができる。そのため、当業者が本発明が開示している精神および技術原理の範囲内で行ういかなる修飾と変更は、特許請求の範囲に含まれる。

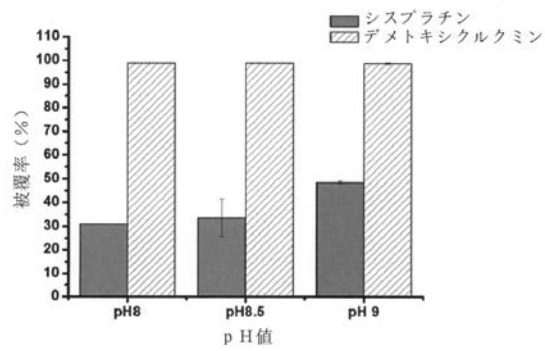
【図 1】



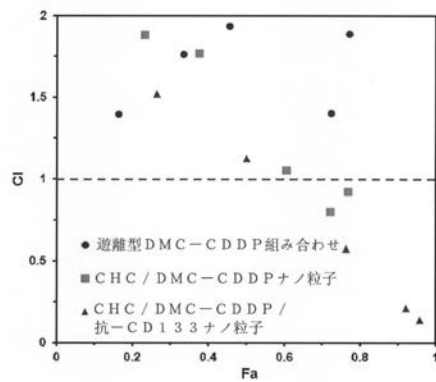
【図 3】



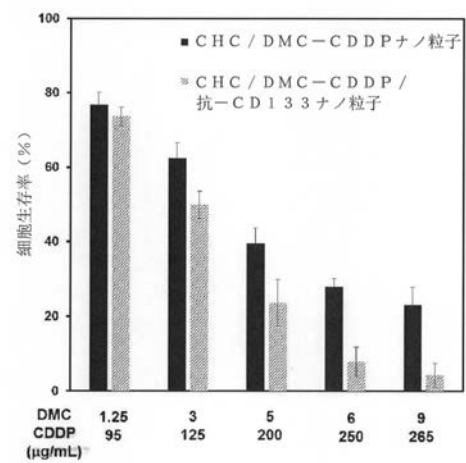
【図 2】



【図 4】



【図 5】



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 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	C	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	
A 6 1 K 31/121 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	A	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K	31/121		
	A 6 1 K	33/24		

F ターム(参考) 4C076 AA16 CC27 EE37 FF68
 4C084 AA20 MA05 MA21 NA05 NA10 ZB261 ZB262 ZC751
 4C085 AA26 EE01 HH01 HH11 JJ01 KA27 KB02 LL18
 4C086 AA01 AA02 HA12 HA24 HA26 HA28 MA03 MA05 MA21 NA02
 NA05 NA10 ZB26 ZC75
 4C206 AA01 AA02 CB14 MA03 MA05 MA41 NA02 NA05 NA10 ZB26
 ZC75

【外国語明細書】
2017031148000001.pdf