



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104093768 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201280056639.0

松元亮 加藤泰己

(22)申请日 2012.11.19

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104093768 A

代理人 龙淳

(43)申请公布日 2014.10.08

(51)Int.Cl.

C08G 81/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/561,022 2011.11.17 US

(56)对比文件

JP 2011173960 A, 2011.09.08,

JP 2002179683 A, 2002.06.26,

WO 2009133647 A1, 2009.11.05,

JP H05301880 A, 1993.11.16,

JP H083172 A, 1996.01.09,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.05.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/079897 2012.11.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/073697 JA 2013.05.23

(73)专利权人 国立大学法人东京大学

地址 日本, 东京都

专利权人 国立大学法人东京医科齿科大学

那野伽利阿株式会社

中野渡史子, 原田敦史, 片岡一則. フェニル
ボロン酸を内核に結合させたPEG-p(Lys)プロ
ソク共重合体ミセルの調製とその外部環境応答
性.《高分子学会予稿集》.1999, 第48卷(第3期),
572.

审查员 肖鑫

(72)发明人 片岡一則 石井武彦 内藤瑞

权利要求书2页 说明书19页

序列表2页 附图4页

(54)发明名称

导入有苯基硼酸基的嵌段共聚物及其使用

(57)摘要

本发明提供一种作为兼顾生物类药物在血液中的稳定性和在患部的释放性的载体的嵌段共聚物。本发明的嵌段共聚物是包含聚氨基酸链段和亲水性聚合物链段的嵌段共聚物,该聚氨基酸链段包含在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基和在侧链具有苯基硼酸基的氨基酸残基,其中,该苯基硼酸基中苯环的至少1个氢被取代,使得该苯基硼酸基具有生理性pH附近的pKa。

1. 一种医药组合物, 由包含聚氨基酸链链段和亲水性聚合物链链段的嵌段聚合物与核酸的复合体构成, 所述医药组合物的特征在于:

该聚氨基酸链链段包含在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基和在侧链具有苯基硼酸基的氨基酸残基, 其中, 所述苯基硼酸基中苯环的至少1个氢被取代, 使得所述苯基硼酸基具有小于8的pKa, 所述核酸处于与所述苯基硼酸基形成有可逆的共价键的状态,

所述阳离子性基团是氨基,

所述聚氨基酸链链段中不具有所述取代后的苯基硼酸基的阳离子性氨基酸残基数和所述取代后的苯基硼酸基数满足以下的关系,

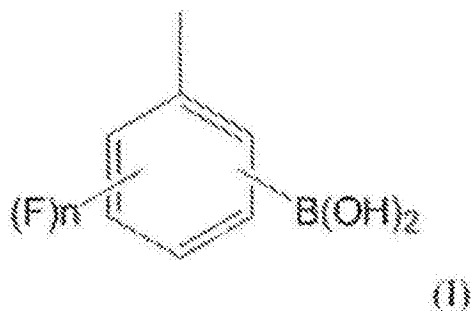
$$\sqrt{\text{聚氨基酸链链段中不具有取代后的苯基硼酸基的阳离子性残基数}} + 2 \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中取代后的苯基硼酸基数}} \geq 12.0。$$

2. 如权利要求1所述的医药组合物, 其特征在于:

所述取代后的苯基硼酸基的pKa小于7.5。

3. 如权利要求1或2所述的医药组合物, 其特征在于:

所述取代后的苯基硼酸基为下式(I)所示的氟化苯基硼酸基,



式(I)中, F独立存在, n为1、2、3或4的任一个, n是1时的F和B(OH)₂的导入位点可以为邻位、间位、对位中的任一种。

4. 如权利要求1或2所述的医药组合物, 其特征在于:

所述在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基为赖氨酸残基或酸性氨基酸的羧基(—C(=O)OH)的—OH部被下述式(i)~(iv)中任一个基取代的氨基酸残基,

—NH—(CH₂)_{p1}—[NH—(CH₂)_{q1}—]_{r1}NH₂ (i);

—NH—(CH₂)_{p2}—N[—(CH₂)_{q2}—NH₂]₂ (ii);

—NH—(CH₂)_{p3}—N{[—(CH₂)_{q3}—NH₂][—(CH₂)_{q4}—NH]_{r2}H} (iii);

和

—NH—(CH₂)_{p4}—N{—(CH₂)_{q5}—N[—(CH₂)_{q6}—NH₂]₂}₂ (iv)

式(i)~(iv)中, p₁~p₄、q₁~q₆和r₁~r₂分别相互独立, 为1~5的整数。

5. 如权利要求1或2所述的医药组合物, 其特征在于:

所述聚氨基酸链链段还包含在侧链具有疏水性基团的氨基酸残基。

6. 一种能够形成权利要求1所述的医药组合物的嵌段共聚物, 该嵌段共聚物的特征在于:

包含聚氨基酸链链段和亲水性聚合物链链段, 该聚氨基酸链链段包含在侧链具有阳离

子性基团的氨基酸残基和在侧链具有苯基硼酸基的氨基酸残基,其中,所述苯基硼酸基中苯环的至少1个氢被取代,使得所述苯基硼酸基具有小于8的pKa,

所述阳离子性基团是氨基,

所述聚氨基酸链链段中不具有所述取代后的苯基硼酸基的阳离子性氨基酸残基数和所述取代后的苯基硼酸基数满足以下的关系,

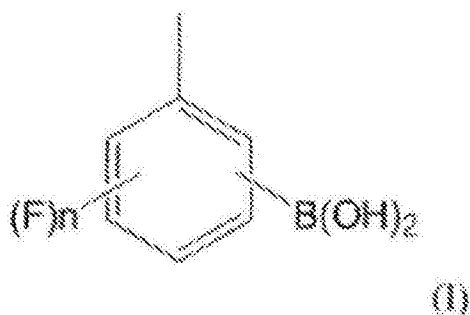
$$\sqrt{\text{聚氨基酸链链段中不具有取代后的苯基硼酸基的阳离子性残基数}} + 2 \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中取代后的苯基硼酸基数}} \geq 12.0。$$

7.如权利要求6所述的嵌段共聚物,其特征在于:

所述取代后的苯基硼酸基的pKa小于7.5。

8.如权利要求6或7所述的嵌段共聚物,其特征在于:

所述取代后的苯基硼酸基为下式(I)所示的氟化苯基硼酸基,



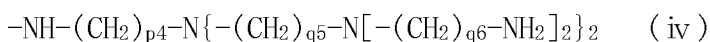
式(I)中,F独立存在,n为1、2、3或4的任一个,n是1时的F和B(OH)₂的导入位点可以为邻位、间位、对位中的任一种。

9.如权利要求6或7所述的嵌段共聚物,其特征在于:

所述在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基为赖氨酸残基或酸性氨基酸的羧基(-C(=O)OH)的-OH部被下述式(i)~(iv)中任一个基取代的氨基酸残基,



和



式(i)~(iv)中,p₁~p₄、q₁~q₆和r₁~r₂分别相互独立,为1~5的整数。

10.如权利要求6或7所述的嵌段共聚物,其特征在于:

所述聚氨基酸链链段还包含在侧链具有疏水性基团的氨基酸残基。

导入有苯基硼酸基的嵌段共聚物及其使用

技术领域

[0001] 本发明涉及导入有苯基硼酸基的嵌段共聚物和包含该嵌段共聚物与药物的复合体。

背景技术

[0002] 利用蛋白质、核酸的生物体高分子的生物医药品,与利用低分子的现有型医药品相比,容易或被酶分解或被免疫系统排除。本发明的发明人从使这样的生物类药物到达患部的到达性提高的观点出发,进行了利用聚氨基酸类共聚物的药物传递系统(DDS)的开发。该开发的目标之一在于提供一种兼顾在血液中的稳定性(生物类药物的保持性)和在患部药物的释放性的载体。

[0003] 另外,以和该DDS开发不同的目的,本发明的发明人也进行了以对糖感应器和对糖应答执行器的应用为目标的生物体适应性材料的基础性研究。例如,作为生物体适应性材料,生产出将苯环氟化得到的苯基硼酸类化合物(专利文献1)。

[0004] 此外,作为利用苯基硼酸基并使核酸载持于聚氨基酸类衍生物、应用于核酸、核酸相关物质的举动与结构解析的试剂的现有技术,有专利文献2。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:特开2011-140537号公报

[0008] 专利文献2:特开2002-179683号公报

发明内容

[0009] 发明所要解决的课题

[0010] 本发明的主要目的在于提供一种兼顾生物类药物在血液中的稳定性和在患部的释放性的载体。此外,在专利文献2中,有将使核酸相关物质载持的试剂作为DDS应用展开的主题的记述。但是,这样展开的DDS只不过是模仿RNA那样的药物前体,处于容易产生沉淀的状态。在专利文献2中记载的技术原本是指向与本发明的发明人进行开发的DDS不同的DDS,不能容易地作为在血液中的稳定性优异的载体应用。

[0011] 用于解决课题的方法

[0012] 本发明的发明人发现,以和DDS开发不同目的产生出的生物体适应性材料,由聚氨基酸系共聚物得到的生物类药物在血液中的稳定性大幅度提高,从而完成了本发明。即,根据本发明,提供一种包含聚氨基酸链链段和亲水性聚合物链链段的嵌段共聚物,该聚氨基酸链链段包含在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基和在侧链具有苯基硼酸基的氨基酸残基,其中,该苯基硼酸基中苯环的至少1个氢被取代,使得该苯基硼酸基具有生理性pH附近的pKa。

[0013] 根据本发明的其它方面,提供一种复合体。该复合体是上述嵌段共聚物与生物体高分子的复合体。

[0014] 发明的效果

[0015] 根据本发明,可以提供能够兼顾生物类药物在血液中的稳定性和在标的细胞内的释放性的载体。

附图说明

[0016] 图1是表示FPBA基含量与复合体稳定性的关系的图。

[0017] 图2是表示嵌段共聚物毒性试验的结果的图。

[0018] 图3是表示复合体毒性试验的结果的图。

[0019] 图4是表示复合体的pH稳定性的图。

[0020] 图5是表示复合体的siRNA的释放性的图。

[0021] 图6是表示复合体向细胞内的摄入能力的图。

[0022] 图7是表示复合体的血液中滞留性的图。

[0023] 图8是表示复合体的抑癌活性的图。

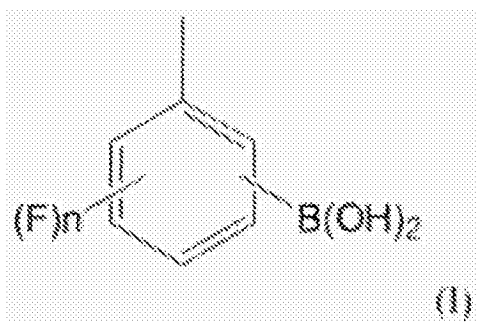
具体实施方式

[0024] [A.嵌段共聚物]

[0025] 本发明的嵌段共聚物包含聚氨基酸链链段和亲水性聚合物链链段。该聚氨基酸链链段包含在侧链具有阳离子性基团的氨基酸残基(以下,有时称为“阳离子性氨基酸残基”)和在侧链具有苯基硼酸基(以下,有时称为“取代PBA基”)的氨基酸残基(以下,有时称为“含有取代PBA基的氨基酸残基”),其中,该苯基硼酸基中苯环的至少1个氢被取代,使得该苯基硼酸基具有生理性pH附近的pKa。这里,阳离子性氨基酸残基和含有取代PBA基的氨基酸残基既可以是不同的氨基酸残基,也可以是相同的氨基酸残基。具体而言,该聚氨基酸链链段既可以包含在侧链不具有取代PBA基的阳离子性氨基酸残基和在侧链不具有阳离子性基团的含有取代PBA基的氨基酸残基,也可以包含取代这些的一种或两种,或者,除此以外,在侧链具有阳离子性基团和取代PBA基双方的氨基酸残基。

[0026] 从上述取代PBA基适于以血液代表的生物体环境(pH小于7.5)的观点出发,构成苯基硼酸基的苯环的至少1个氢被任意的取代基取代,使得该苯基硼酸基具有生理性pH附近的pKa。优选上述取代PBA基的pKa小于8,更优选小于7.5。被取代的氢数为1、2、3或4,只有1个氢被取代时的取代基和B(OH)₂的导入位点可以为邻位、间位、对位中的任一种。作为取代基,例如,可以列举氟、氯、溴等卤素、硝基等。其中,从提高嵌段共聚物亲水性的观点和使pKa小于7.5的观点出发,优选取代PBA基为下式(I)所示的氟化苯基硼酸基(以下,有时称为“FPBA基”)。上述取代PBA基的pKa是由作为单体合成的含有取代PBA基的氨基酸规定的pKa。上述取代PBA基的pKa的下限值没有特别限制,例如可以为2,另外,例如可以为3。

[0027]



[0028] (式(I)中,F独立存在,n为1、2、3或4的任一个,n是1时的F和B(OH)₂的导入位点可以为邻位、间位、对位中的任一个。)

[0029] 本发明的嵌段共聚物,通过在聚氨基酸链链段的侧链部分具有阳离子性基团,能够与生物体高分子联合形成复合体,例如形成聚离子复合物(PIC)。

[0030] 另外,本发明的嵌段共聚物,由在聚氨基酸链链段的侧链部分具有取代PBA基,能够实现如下的效果。第一,通过提高聚氨基酸链链段的疏水性,在水性介质中多个本发明的共聚物之间静电相互作用和疏水性相互作用良好地发挥作用。其结果,聚合物之间的联合力被增强,因此,本发明的嵌段共聚物能够在水性介质中形成非常稳定的聚合物胶束。此外,推测在该聚合物胶束中,本发明的嵌段共聚物,使聚氨基酸链链段朝向内侧、亲水性聚合物链链段朝向外侧,排列为放射状。作为该水性介质,可以列举水、生理食盐水、磷酸缓冲液、碳酸缓冲液、硼酸缓冲液、乙酸缓冲液等的水性缓冲液。

[0031] 第二,在水性介质中,苯基硼酸化合物具有与带1,2-二醇(顺式-二醇)或1,3-二醇的分子可逆的共价键的能力。因此,在水性介质中,本发明的嵌段共聚物与带1,2-二醇等的生物体高分子(例如,siRNA)除了与阳离子性基团的静电结合以外,经由与取代PBA基的共价键,能够强烈地结合,其结果,能够形成稳定的复合体(例如,内包有该生物体高分子的聚合物胶束)。特别是,在双链的各个3'末端核糖具有顺式-二醇的siRNA能够以该2个末端结合,因此,能够形成非常稳定的复合体。

[0032] 第三,苯基硼酸的pKa通常为8~9左右,在该pKa附近,与具有上述1,2-二醇等分子的共价键能变得最大,因此,在低于pH7.5生物体环境下的苯基硼酸使用在原理上变得困难。但是,在本发明的嵌段共聚物中所导入的取代PBA基,由于苯环的氢被取代,使得具有生理性pH附近的pKa(优选显示低于8的pKa、更优选显示低于7.5的pKa),因此,在生物体环境下能够良好地发挥上述结合能力。

[0033] 第四,上述取代PBA基在pKa以下的pH环境下高度地疏水化,因此,通过适度地控制pKa,能够在生物体环境下强化与具有上述1,2-二醇等的分子结合和嵌段共聚物之间的疏水性相互作用两者。其结果,能够得到与这些分子的极其稳定的复合体。

[0034] [A-1. 聚氨基酸链链段]

[0035] 上述聚氨基酸链链段包含在侧链具有阳离子性基团的阳离子性氨基酸残基和在侧链具有取代PBA基的含有取代PBA基的氨基酸残基。

[0036] 作为上述阳离子性氨基酸残基,优选在侧链具有氨基的阳离子性氨基酸残基。通过在侧链具有氨基,在水性介质中,该氨基能够与取代PBA基的硼配位。其结果,能够避免由取代PBA基的导入产生的嵌段共聚物的疏水化,维持高的亲水性。此外,即使在氨基配位的状态,也能够维持取代PBA基的与具有上述顺式-二醇的分子等的结合能力。

[0037] 作为上述在侧链具有氨基的阳离子性氨基酸残基由来的氨基酸,例如,可以列举在赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸、高精氨酸、组氨酸等碱性氨基酸和酸性氨基酸中导入有任意的适合的胺化合物的氨基酸衍生物。其中,优选赖氨酸和酸性氨基酸的羧基($-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)的 $-\text{OH}$ 部分被下述式(i)~(iv)中的任一个基团取代的氨基酸衍生物,更优选赖氨酸和天冬氨酸的 α 位或 β 位或者谷氨酸的 α 位或 γ 位的羧基($-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)的 $-\text{OH}$ 部分被下述式(i)~(iv)中的任一个基团取代的氨基酸衍生物,更加优选赖氨酸和天冬氨酸的 α 位或 β 位或者谷氨酸的 α 位或 γ 位的羧基($-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)的 $-\text{OH}$ 部分被下述式(i)的基团取代的氨基酸衍生物。

[0038] $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{p1}-[\text{NH}-(\text{CH}_2)_{q1}-]_{r1}\text{NH}_2$ (i);

[0039] $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q2}-\text{NH}_2]_2$ (ii);

[0040] $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{p3}-\text{N}\{[-(\text{CH}_2)_{q3}-\text{NH}_2][-(\text{CH}_2)_{q4}-\text{NH}]_{r2}\text{H}\}$ (iii);和

[0041] $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{p4}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q5}-\text{N}[-(\text{CH}_2)_{q6}-\text{NH}_2]_2]_2$ (iv)

[0042] (在式(i)~(iv))中, $p1\sim p4$ 、 $q1\sim q6$ 和 $r1\sim r2$ 分别相互独立,为1~5的整数。)

[0043] 在上述式(i)~(iv))中, $p1\sim p4$ 和 $q1\sim q6$ 分别相互独立,优选为2或3、更优选为2。另外, $r1\sim r2$ 分别相互独立,优选为1~3的整数。

[0044] 在上述阳离子性氨基酸残基为赖氨酸残基时,具有聚氨基酸链的合成容易并且所得到的嵌段共聚物生物体适应性非常优异的优点。另外,在上述阳离子性氨基酸残基为酸性氨基酸的羧基($-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)的 $-\text{OH}$ 部分被上述(i)~(iv)中的任一个基团取代的氨基酸衍生物时,这些残基具有不同的多个胺官能团,因此,pKa显示多级,在作为生理条件的pH7.4中,多个胺官能团处于部分质子化状态,已知对细胞的伤害低。另外,具有通过与核酸等相互作用能够良好地形成PIC等复合体的优点。另外,这样操作形成的复合体摄入核内体内(pH5.5),pH下降,则聚氨基酸链链段的质子化进一步进行,缓冲效果(或质子海绵效果)或者膜伤害活性提高,由此,能够使内体逃逸促进。其结果,能够提高药物向细胞质的送达效率。

[0045] 在上述含有取代PBA基的氨基酸残基中,取代PBA基代表性地通过二价连接基团导入其侧链。作为该二价连接基团,例如,可以列举酰胺键、氨基甲酰键、烷基键、醚键、酯键、硫酯键、硫醚键、磺酰胺键、氨基甲酸酯键、磺酰键、胸腺嘧啶键、脲键、硫脲键。

[0046] 作为上述导入有取代PBA基的氨基酸残基,只要能够通过上述连接基团导入取代PBA基即可,能够选择任意适当的氨基酸残基。从合成容易度的观点出发,取代PBA基优选导入上述侧链具有氨基的阳离子性氨基酸残基。作为具体例子,取代PBA基,能够在侧链具有氨基的阳离子性氨基酸残基经由通过该氨基与苯环的至少1个氢被取代得到的羧基苯基硼酸或其酯等的反应生成的酰胺键而被导入。这里,对在侧链具有多个氨基的阳离子性氨基酸残基,既可以只导入1个取代PBA基,也可以导入多个取代PBA基。只导入1个时,导入后的含有取代PBA基的氨基酸残基,在侧链具有氨基和取代PBA基两者,因此,也是阳离子性氨基酸残基。因此,在本发明中,只包含这样的氨基酸残基的聚氨基酸链链段,也可以被理解为包含阳离子性氨基酸残基和含有取代PBA基的氨基酸残基两者。但是,在求出包含这样的氨基酸残基的聚氨基酸链链段中的阳离子性氨基酸残基数和含有取代PBA基的氨基酸残基数之和时,对于该氨基酸残基,仅作为其中一方的数量。

[0047] 上述聚氨基酸链链段,在上述阳离子性氨基酸残基和含有取代PBA基的氨基酸残基以外,还能够包含在侧链具有疏水性基团的氨基酸残基(以下,有时称为“疏水性氨基酸

残基”)。通过包含该疏水性氨基酸残基,在水性介质中,在本发明的嵌段共聚物之间发挥作用的疏水性相互作用变大,其结果,能够形成更稳定的聚合物胶束。另外,疏水性氨基酸残基插入细胞膜的疏水性部分,能够作为在细胞膜上固定该聚合物胶束的锚发挥作用。因此,使核酸等生物体高分子内包在该聚合物胶束中时,能够提高该生物体高分子向细胞内的导入率。

[0048] 作为上述疏水性氨基酸残基由来的氨基酸,可以优选列举对100g25℃水的溶解度为5g以下、更优选为4g以下的氨基酸。作为这样的氨基酸,例如,可以列举亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸等的非极性天然氨基酸,在侧链导入有疏水性基团的氨基酸疏水性衍生物。作为该氨基酸疏水性衍生物,可以优选列举在天冬氨酸、谷氨酸等的酸性氨基酸侧链导入有疏水性基团的衍生物。

[0049] 作为上述导入的疏水性基团,能够优选例示碳原子数6~27的饱和或不饱和的直链状或支链状脂肪族烃基、碳原子数6~27的芳香族烃基或甾醇基。

[0050] 作为上述碳原子数6~27的饱和的直链状或支链状脂肪族烃基,除了碳原子数6~27的烷基和该烷基以外,列举二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基等。

[0051] 作为上述碳原子数6~27的不饱和的直链状或支链状脂肪族烃基,可以列举碳原子数6~27的烷基链中1~5个碳-碳单键成为碳-碳双键的烃基。作为这样的基团由来的不饱和脂肪族烃基的例子,可以列举月桂酸(或十二烷酸)、肉豆蔻酸(或十四烷酸)、棕榈酸(或十六烷酸)、棕榈油酸(或9-十六碳烯酸)、硬脂酸(或十八烷酸)、油酸、亚油酸、亚麻酸、桐酸(或9,11,13-十八碳三烯酸)、花生酸、花生四烯酸、山萘酸、二十四烷酸、神经酸、蜡酸、褐煤酸等。

[0052] 作为上述碳原子数6~27的芳香族烃基,可以列举芳基、芳烷基等。作为这些的优选具体例子,可以列举苯基、萘基、甲基苯基、二甲苯基、苄基、苯乙基等。

[0053] 上述甾醇基由来的固醇,是指以环戊酮氢化菲环($C_{17}H_{28}$)为基础的天然、半合成或合成的化合物,还包括这些的衍生物,例如,作为天然的固醇,不受限定,可以列举胆固醇、胆甾醇、二氢胆固醇、胆酸、菜油甾醇、谷固醇等,作为其半合成或合成的化合物,例如,可以是这些的天然物的合成前体(根据需要存在时,包含以该技术领域已知的羟基保护基团保护规定的官能团、羟基的一部分或全部、或者由羧基保护基团保护羧基的化合物)。另外,固醇衍生物是指在不对本发明的目的施加不良影响的范围,在环戊酮氢化菲环中导入 C_{1-12} 烷基、卤原子、例如氯、溴、氟,该环系可以是饱和、部分不饱和等。作为上述甾醇基由来的固醇,优选为胆固醇、胆甾醇、二氢胆固醇、胆酸、菜油甾醇、谷固醇等动植物油起源的固醇,更优选为胆固醇、胆甾醇、二氢胆固醇,特别优选为胆固醇。

[0054] 上述聚氨基酸链链段,作为阳离子性氨基酸残基、含有取代PBA基的氨基酸残基和疏水性氨基酸残基,既可以只分别包含1种氨基酸残基,也可以包含2种以上的氨基酸残基。另外,在聚氨基酸链链段中的阳离子性氨基酸残基、含有取代PBA基的氨基酸残基和疏水性氨基酸残基的结合顺序是任意的,既可以是无规结构,也可以是嵌段结构。

[0055] 在上述聚氨基酸链链段中包含的阳离子性氨基酸残基数、含有取代PBA基的氨基酸残基数和疏水性氨基酸残基数,能够根据各氨基酸残基的种类、嵌段共聚物的用途等适当地调整。从使生物体高分子的保持性(在血液中的稳定性)更可靠提高的观点出发,优选调整各氨基酸残基数,使得满足以下的关系式。此外,在构成聚氨基酸链链段的重复单元

(氨基酸残基)中存在多个阳离子性基团时,能够在1个重复单元中导入多个取代PBA基。因此,聚氨基酸链链段中的取代PBA基总数有时大于未导入取代PBA基的阳离子性氨基酸残基数和导入有取代PBA基的氨基酸残基(含有取代PBA基的氨基酸残基)数之和。另外,在利用通用的结构解析装置进行的分析中,有时不容易区别多个取代PBA基被导入1个重复单元中还是在多个重复单元中分散而被导入。因此,在该关系式中,为了方便,作为不具有取代PBA基的阳离子性氨基酸残基数,允许确定为从阳离子性氨基酸残基数和含有取代PBA基的氨基酸残基数之和(理论值)减去取代PBA基数(实际测定值)而得到的值(其中,以0为下限值)。另外,以下关系式的上限值不没有特别限制,例如,可以为40、38、35、25。如果以下关系式的值为14以上、更为15以上,在血液中的稳定性更加可靠地提高。

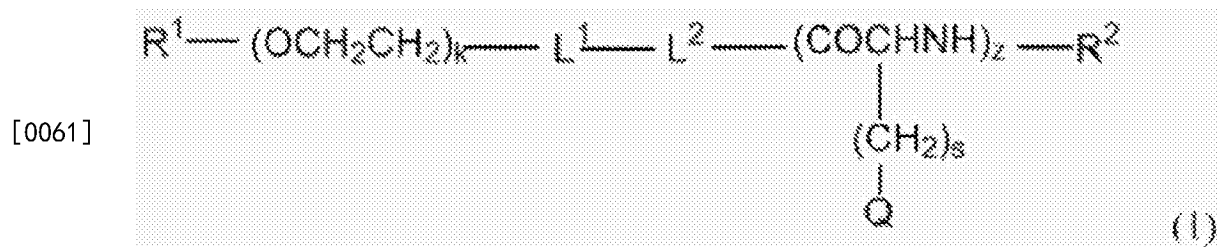
$$[0056] \quad \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中不具有取代后的苯基硼酸基的阳离子性残基数}} + 2 \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中取代后的苯基硼酸基数}} \geq 12.0$$

[0057] [A-2. 亲水性聚合物链链段]

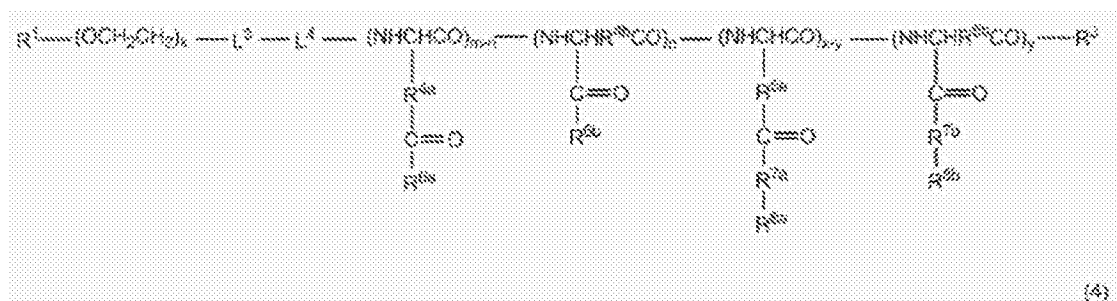
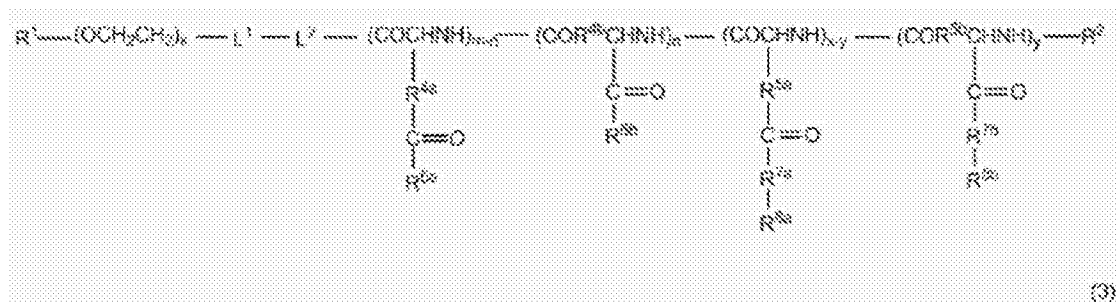
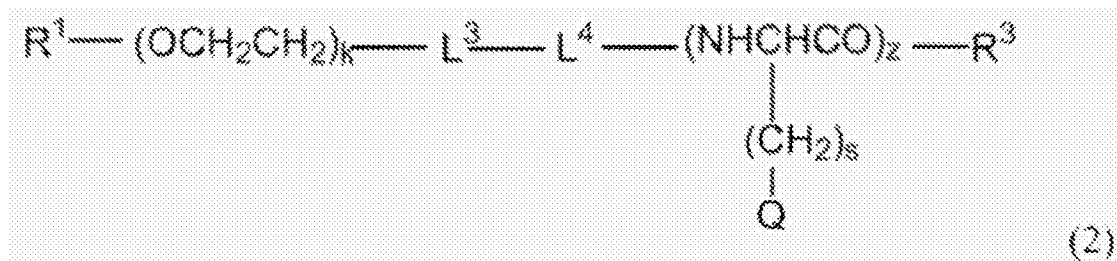
[0058] 作为上述亲水性聚合物链链段,能够由任意适合的亲水性聚合物构成。作为该亲水性聚合物,例如,可以列举聚(乙二醇)、多糖、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乙醇醇)、聚(丙烯酸胺)、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(丙烯酸酯)、聚氨基酸、聚(苹果酸)或这些的衍生物。作为多糖的具体例子,可以列举淀粉、葡聚糖、果聚糖、半乳糖等。这些之中,聚(乙二醇)由于在末端具有各种官能团的末端反应性聚乙二醇有市售,另外,各种分子量的都有市售,能够容易得到,因此,能够优选使用。

[0059] [A-3. 嵌段共聚物的具体例子]

[0060] 在式(1)~(4)中表示在本发明特别优选的实施方式中的嵌段共聚物的具体例子。在该式(1)~(4)的嵌段共聚物中,取代PBA基被导入阳离子性氨基酸残基的侧链。



[0062]



[0063] (式(1)~(4)中, R^1 的基团为氢原子或者未取代或取代的碳原子数1~12的直链状或支链状的烷基;

[0064] R^2 的基团为氢原子、碳原子数1~12的未取代或取代的直链状或支链状的烷基、或者碳原子数1~24的未取代或取代的直链状或支链状的烷基羰基;

[0065] R^3 的基团为羟基、碳原子数1~12的未取代或取代的直链状或支链状的烷氧基、碳原子数2~12的未取代或取代的直链状或支链状的链烯氧基、碳原子数2~12的未取代或取代的直链状或支链状的炔氧基、或者碳原子数1~12的未取代或取代的直链状或支链状的烷基取代亚氨基;

[0066] R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 和 R^{5b} 的基团相互独立,为亚甲基或亚乙基;

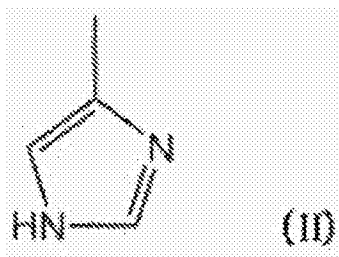
[0067] R^{6a} 和 R^{6b} 的基团相互独立,为选自上述(i)~(iv)的基团;

[0068] R^{7a} 和 R^{7b} 的基团相互独立,为-O-或-NH-;

[0069] R^{8a} 和 R^{8b} 的基团相互独立,为碳原子数6~27的饱和或不饱和的直链状或支链状的脂肪族烃基、碳原子数6~27的芳香族烃基或甾醇基;

[0070] Q 的基团为-NH₂、-NHC(=NH)NH₂、或下式(II)所示的基团;

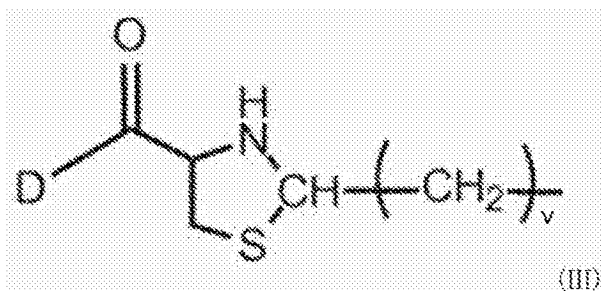
[0071]

[0072] L^1 和 L^3 相互独立,为-S-S-或价键,[0073] L^2 为-NH-、-O-、-O(CH₂)_{p1}-NH-或- L^{2a} -(CH₂)_{q1}- L^{2b} -,这里, p_1 和 q_1 相互独立,为1~5的整数, L^{2a} 为OCO、OCO₂NH、NHC₂O、NHC₂O₂、NHCONH、CONH或COO, L^{2b} 为NH或O, L^4 为-OCO-(CH₂)_{p2}-CO-、-NHC₂O-(CH₂)_{p3}-CO-或- L^{4a} -(CH₂)_{q2}-CO-,这里, p_2 、 p_3 和 q_2 相互独立,为1~5的整数, L^{4a} 为OCO₂NH、-CH₂NHC₂O-、NHC₂O₂、NHCONH、CONH或COO,[0074] k 为30~20000的整数,[0075] s 为1~6的整数,[0076] m 为1~300的整数,[0077] n 为0~ m 的整数,[0078] x 为0~80的整数,[0079] y 为0~ x 的整数,[0080] z 为2~300的整数,[0081] 其中,设 z 个Q基中所含有的伯氨基和仲氨基的总数或者 $(m-n)$ 个 R^{6a} 基和 n 个 R^{6b} 基中所含有的伯氨基和仲氨基的总数为 w 时,1以上且小于 w 的该氨基的氢原子被具有取代PBA基(例如,上述式(I)所示的FPBA基)的酰基取代。[0082] 在上述式(1)~(4)中, L^1 和 L^2 的组合及 L^3 和 L^4 的组合,必须组合为能够结合在一起形成一个连接基团。例如, L^2 为-NH-时, L^1 不是-S-S-而是价键。[0083] 在上述式(1)~(4)中,表示乙二醇(或氧化乙烯)重复数的 k 为30~20000、优选为40~2000、更优选为50~1500的整数。[0084] 作为以上述 R^1 ~ R^3 基定义的、碳原子数1~12的直链状或支链状的烷氧基、烷基取代亚氨基和烷基的烷基部分,例如,能够列举甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正己基、癸基和十一烷基等。碳原子数2~12的直链状或支链状的链烯氧基或者碳原子数2~12的直链状或支链状的炔氧基中的链烯基或炔基部分,能够列举在碳原子数2以上的上述例示的烷基中包含双键或三键的基团。[0085] 关于这样的基团或部分,作为“取代”时的取代基,不受限定,能够列举C₁₋₆烷氧基、芳氧基、芳基C₁₋₃氧基、氰基、羧基、氨基、C₁₋₆烷氧基羰基、C₂₋₇酰基酰胺基、三-C₁₋₆烷基甲硅烷氧基、甲硅烷氧基、甲硅烷氨基、或缩醛化甲酰基、甲酰基、氯或氟等的卤原子。这里,例如,如C₁₋₆的表示是指碳原子数1~6,以下作为表示同样的意义的符号使用。另外,碳原子数1~24的未取代或取代的直链状或支链状的烷基羰基内的碳原子数1~12的未取代或取代的直链状或支链状的烷基部分能够参考上述的示例,碳原子数13以上的烷基部分,例如,能够列举十三烷基、十四烷基、十五烷基、十九烷基、二十二烷基和二十四烷基等。[0086] 在其它实施方式中, R^1 的基团也可以被包含标的结合部位的基团取代。通过在聚合物末端导入标的结合部位,能够提高药物(生物体高分子)向作为标的的希望部位的到

达性。作为包含标的结合部位的基团,只要是具有对作为标的的组织的指向性或功能性即可,能够为任意适当的基团,例如,能够为抗体或其链段、或具有其它功能性或标的指向性的蛋白质、肽、适体、乳糖等糖、叶酸这样的生理活性物质及其衍生物的基团。

[0087] 在以下式(III)中表示被包含标的结合部位的基团取代的R¹的基团的一个例子。

[0088]



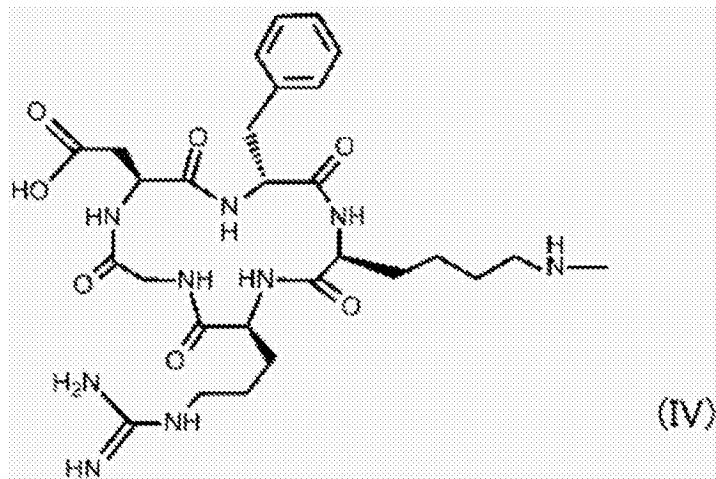
[0089] 这里,v表示1~5的整数,D表示标的结合部位。

[0090] D优选为重均分子量50~20000的肽、更优选为重均分子量100~10000的肽、更加优选为重均分子量150~3000的肽。

[0091] 另外,D优选为具有1~200个氨基酸残基的肽、更优选为具有1~100个氨基酸残基的肽、更加优选为具有1~30个氨基酸残基的肽。

[0092] 作为上述肽,例如,可以列举能够和血管生成、内膜增生、恶性肿瘤增殖相关的整联蛋白特异地结合的肽,具体而言,可以列举RGD肽。通过将RGD肽作为标的结合部位使用,可以得到能够特异地识别疾患部分的颗粒和使用该颗粒的医药组合物。这里,RGD肽是指包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的肽。优选RGD肽为环状RGD(cRGD)肽。具体而言,D能够以下式(IV)表示。

[0093]



[0094] 在上述式(1)~(4)中,以R^{6a}和R^{6b}的基团定义的上述(i)~(iv)的基团及以R^{8a}和R^{8b}的基团定义的羟基或醚基如上所述。Q、R^{6a}、R^{6b}、R^{8a}和R^{8b}的基团,可以对所述的全部重复单元选择相同基团、也可以选择不同的基团。另外,s例如可以为1、3或4。

[0095] 在式(3)或(4)中,在R^{4a}和R^{4b}的基团两者表示亚乙基时,代表性地,表示n为整数0、或m-n为整数0的聚氨基酸。前者例如表示能够通过谷氨酸γ-苄基酯的N-羧酸酐聚合得到的聚-α-谷氨酸,后者表示以纳豆菌为代表的细菌芽孢杆菌(Bacillus)属的菌株生产的聚-γ-谷氨酸。另一方面,在R^{4a}和R^{4b}的基团两者都表示亚甲基时,理解为具有这些基团的各自重复单元能够共存。关于R^{5a}和R^{5b}的基团也是同样。从制造效率的观点出发,优选R^{4a}和R^{4b}的

基团为亚甲基、 R^{5a} 和 R^{5b} 的基团为亚乙基。

[0096] 从所形成的聚合物胶束稳定性的观点出发,在式(1)或(2)的嵌段共聚物中所包含的阳离子性氨基酸残基和含有取代PBA基的氨基酸残基的总数 z 为1~300的整数、优选为20~300的整数、更优选为30~200的整数、更加优选为40~150的整数。

[0097] 从所形成的聚合物胶束稳定性的观点出发,在式(3)或(4)的嵌段共聚物中所包含的阳离子性氨基酸残基和含有取代PBA基的氨基酸残基的总数 m 为1~300的整数、优选为1~200的整数、更优选为1~150的整数。在该嵌段共聚物包含疏水性氨基酸残基时(即 x 不为0时),阳离子性氨基酸残基数例如能够为1~20的整数、优选为1~15的整数、更优选为1~10的整数、更加优选为1~5的整数。根据这样的嵌段共聚物,能够更良好地进行以核酸为代表的生物体高分子的释放。

[0098] 在式(3)或(4)的嵌段共聚物中所包含的疏水性氨基酸残基数 x ,能够根据阳离子性氨基酸残基的种类或数量、嵌段共聚物的用途等适当调整。该疏水性氨基酸残基数 x 优选为1~80的整数、更优选为5~70的整数、更加优选为10~60的整数。

[0099] 在式(1)~(4)的嵌段共聚物中,含有取代PBA基的氨基酸残基数,能够根据阳离子性氨基酸残基的种类或数量、嵌段共聚物的用途等适当调整。该嵌段共聚物、特别是式(1)和式(2)的嵌段共聚物,优选在阳离子性氨基酸残基的侧链导入取代PBA基,使其满足以下关系。满足这样的关系时,由嵌段共聚物产生的生物体高分子的保持性(在血液中的稳定性)更可靠地提高。另外,以下关系式的上限不受特别限制,例如,可以为40、38、35、25。如果以下的关系式值为14以上、进一步为15以上,在血液中的稳定性更加可靠地提高。

$$[0100] \quad \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中不具有取代后的苯基硼酸基的阳离子性残基数}} + 2 \sqrt{\text{聚氨基酸链链段中取代后的苯基硼酸基数}} \geq 12.0$$

[0101] [A-4.嵌段共聚物的制作方法]

[0102] 本发明的嵌段共聚物能够通过任意适当的合成方法制作。本发明的优选实施方式中的嵌段共聚物的合成方法的一个例子如下所述。即,能够通过如下步骤来制作:通过使用能够赋予 R^1 的引发剂进行阴离子活性聚合,形成聚乙二醇链,在该聚乙二醇链的生长末端侧导入氨基;从该氨基末端使NCA-Lys(TFA)等被保护的氨基酸衍生物聚合形成聚氨基酸链链段;将该聚氨基酸的侧链脱保护,使氨基露出;和使该露出的氨基与氟化羧基苯基硼酸的羧基反应,通过酰胺键在该侧链导入所希望数量的FPBA基。

[0103] 本发明的其它优选实施方式中的嵌段共聚物,例如,可以如下操作来制作。即,能够通过如下步骤来制作:通过使用能够赋予 R^1 的引发剂进行阴离子活性聚合,形成聚乙二醇链,在该聚乙二醇链的生长末端侧导入氨基;从该氨基末端使 β -苄基-L-天冬氨酸、 γ -苄基-L-谷氨酸等被保护的氨基酸的N-羧酸酐聚合来形成聚氨基酸链链段;接着,使该聚氨基酸与二亚乙基三胺(DET)等的胺化合物反应,通过酯酰胺交换反应在该氨基酸侧链导入DET基等的胺残基;接着,使该胺残基的氨基与氟化羧基苯基硼酸的羧基反应,通过酰胺键在该侧链导入所希望数量的FPBA基。此时,如果并用 β -苄基-L-天冬氨酸和 γ -苄基-L-谷氨酸形成聚氨基酸链链段,则此后的酯酰胺交换反应优先对 β -苄基-L-天冬氨酸发生。其结果,能够得到将 γ -苄基-L-谷氨酸由来的氨基酸残基作为疏水性氨基酸残基包含的嵌段共聚物。

[0104] 另外,在上述合成的过程中,有时在一部分氨基酸酯残基中胺亲核攻击引起结构变化(例如,由氨基酸酯残基的脱醇产生的酰亚胺环的形成)。在本发明中,聚氨基酸链链段可以为还包含经过了这样的结构变化的残基的聚氨基酸链链段。此时,经过了上述结构变化的残基为不包含于阳离子性氨基酸残基、含有取代PBA基的氨基酸残基和疏水性氨基酸残基中的任一个的残基。另外,有时由于阳离子性氨基酸残基中的一部分的NH基和NH₂基在合成过程中使用的酸(主要是盐酸),形成盐(主要是盐酸盐),在本发明中,聚氨基酸链链段为包含这样的结构的聚氨基酸链链段。即,Q、R^{6a}和R^{6b}基中的一部分NH基和NH₂基也可以形成盐(例如盐酸盐)。

[0105] 另外,使用在α末端具有标的结合部位的聚乙二醇进行如上所述的嵌段共聚物的合成,或使用在α末端具有能够在后来导入包含标的结合部位的基团这样的官能团的聚乙二醇进行如上所述的嵌段共聚物的合成,之后导入包含标的结合部位的基团,由此能够合成在亲水性聚合物(聚乙二醇)的末端具有标的结合部位的嵌段共聚物。作为导入包含标的结合部位的基团的方法,可以使用各种方法,例如,通过在酸性溶液中混合α末端具有缩醛化的聚乙二醇链的嵌段共聚物和具有半胱氨酸末端的所希望的标的结合部位的化合物,能够在聚乙二醇链侧的末端赋予上述标的结合部位。

[0106] [B. 复合体]

[0107] 本发明的复合体是上述A项中所述的嵌段共聚物与生物体高分子的复合体。该复合体能够是多个该嵌段共聚物与生物体高分子的PIC。另外,该PIC能够是由多个该嵌段共聚物内包生物体高分子的聚合物胶束的形态。在现有型的载体中,有在与生理条件同等程度的离子浓度的介质中复合体解离的问题,但本发明的复合体稳定性优异,因此,在该介质中、以及在包含蛋白质的介质中,也能够维持复合体的形态。

[0108] [B-1. 生物体高分子]

[0109] 作为上述生物体高分子,例如,可以列举蛋白质、脂质、核酸等。在本说明书中,蛋白质也包括肽。在生物体高分子中,上述嵌段共聚物也能够与核酸良好地形成复合体。另外,作为适于复合体的形成的生物体高分子,能够例示在上述嵌段共聚物的pKa以下的pH范围中具有负电荷的阴离子荷电性的化合物。

[0110] 如上所述,上述嵌段共聚物在聚氨基酸链链段的氨基酸侧链具有阳离子性基团,由此,即使是小分子量的核酸,也能够与生理条件下与该嵌段共聚物形成稳定的复合体(例如小泡或联合体)。作为能够提供与嵌段共聚物的复合体的核酸,是指以嘌呤或嘧啶碱基、戊糖、磷酸构成的核苷酸为基本单位的多聚或寡聚核苷酸,能够列举寡聚或多聚双链RNA、寡聚或多聚双链DNA、寡聚或多聚单链DNA和寡聚或多聚单链RNA。另外,也包括在同一链中混合存在有RNA和DNA的寡聚或多聚双链核酸、寡聚或多聚单链核酸。在该核酸中所含有的核苷酸既可以是天然型、也可以是被化学修饰的非天然型,另外,还可以是带有氨基、硫醇基、荧光化合物等的分子的核苷酸。

[0111] 上述核酸为RNA时,该RNA的3'末端核糖具有1,2-顺式二醇,因此,除了与上述阳离子性氨基酸残基的阳离子性基团的静电相互作用以外,还能够通过取代PBA基与上述嵌段共聚物可逆地共价键。其结果,可以得到稳定性优异的复合体。根据这样的稳定性优异性的复合体,能够避免RNA分子与血液中浓度水平(通常为约4~7mM)的葡萄糖(在分子内具有顺式二醇结构)的置换,因此,在血液中的稳定性也优异。因此,在生物体内投与该复合体时,

血液中滞留性能够得到提高。特别在双链RNA时,在胶束内部能够形成使各链的3'末端核糖作为结合部位的交联结构,因此,能够得到稳定性极其优异的复合体。另外,与该RNA的复合体被摄入低pH环境的核内体内时,由于取代PBA基的疏水化而疏水性相互作用变大,因此,稳定性能够得到进一步提高。另外,在从核内体移动到细胞质后,通过与ATP、核糖核酸等的细胞质内以比较高的浓度存在的具有1,2-顺式二醇的其它分子的置换,能够迅速释放出RNA。

[0112] 上述核酸的链长,例如,能够为4~20000碱基、优选为10~10000碱基、更优选为18~30碱基。

[0113] 作为上述核酸,考虑其功能或作用,可以列举质粒DNA、siRNA、microRNA、shRNA、反义核酸、诱杀核酸、适体和核酶。

[0114] 本发明的复合体中的上述嵌段共聚物与生物体高分子的含量比,能够根据嵌段共聚物和生物体高分子的种类、复合体的用途等适当设定。生物体高分子为siRNA时的本发明的复合体,从提高在生理条件下的稳定性的观点出发,N/P比优选为2以上,从抑制由聚合物产生的毒性的观点出发,N/P比优选为200以下。另外,N/P比是指[在结合体中所含有的嵌段共聚物中的聚氨基酸侧链的氨基浓度]/[核酸中的磷酸基浓度]。另外,生物体高分子为siRNA时的本发明的复合体,从提高在生理条件下稳定性的观点出发,在pH7.4中的[聚氨基酸侧链链段的正电荷数]/[聚氨基酸侧链链段的负电荷数与siRNA的负电荷数的合计],例如能够为1/2~20/1、优选为1/1~10/1。

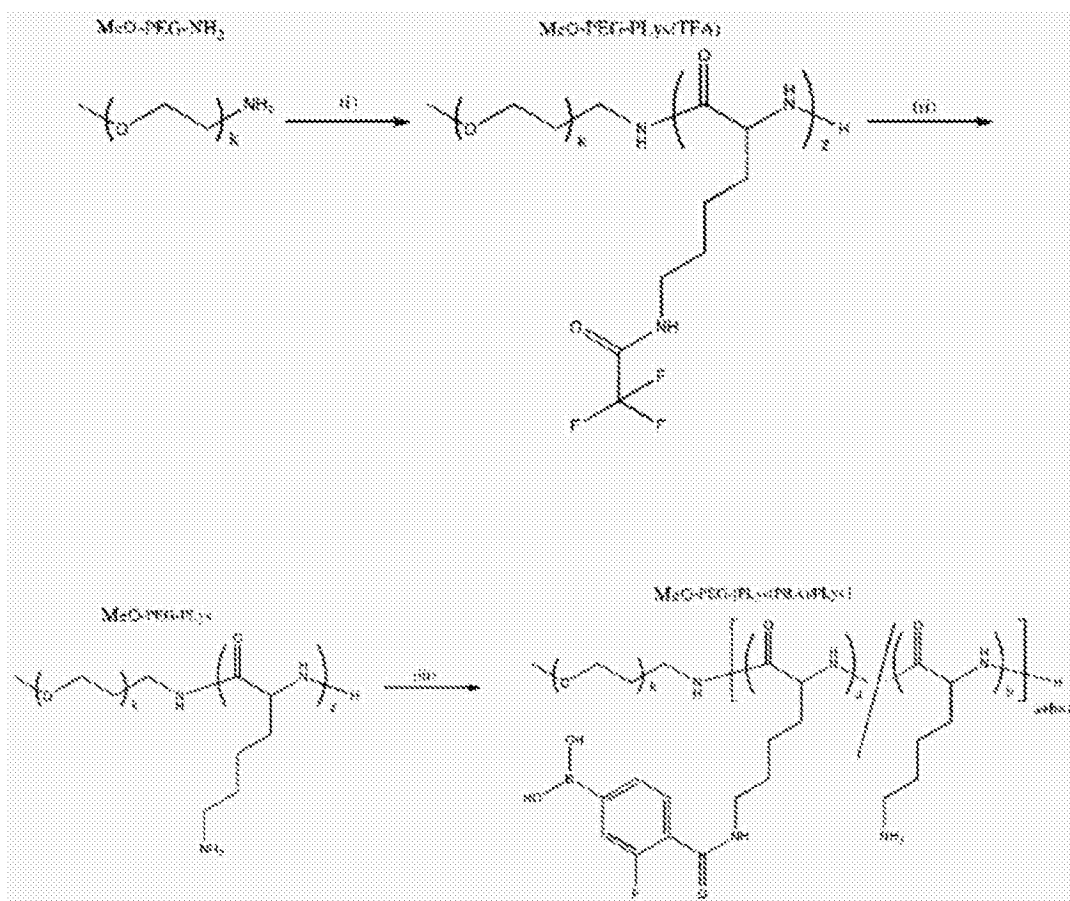
[0115] 上述嵌段共聚物,能够通过适当选择取代PBA基的种类和导入数维持高亲水性,因此,本发明的复合体,例如,能够通过根据需要缓冲化的水溶液中仅混合该嵌段共聚物和生物体高分子来制备。即,本发明的复合体还具有不必另外修饰嵌段共聚物的末端并且能够以简便的方法制备的优点。

[0116] 实施例

[0117] 以下,通过实施例具体说明本发明,但本发明不受这些实施例任何限定。此外,在以下的实施例中,以“PEG的分子量(kDa)-含有FPBA基的氨基酸残基数/构成聚氨基酸链链段的氨基酸残基的总数”的顺序记载聚合物结构。例如,在PEG的分子量为10000、聚氨基酸链链段为在聚合度40的聚赖氨酸中导入5个FPBA基时,记为“PEG-PLL10-5/40”。另外,例如,在PEG的分子量为10000、聚氨基酸链链段为未导入FPBA基的聚合度40的聚赖氨酸时,记为“PEG-PLL10-0/40”。这里,在该标记中的各数字为嵌段共聚物整体的平均值。

[0118] [聚赖氨酸类嵌段共聚物的制作]

[0119] 在以下表示在以下的实验例中使用的聚赖氨酸类嵌段共聚物的合成流程图A。具体而言,如(1-i)~(1-iii)所述地制作嵌段共聚物。



[0120]

[0121] 合成流程图A

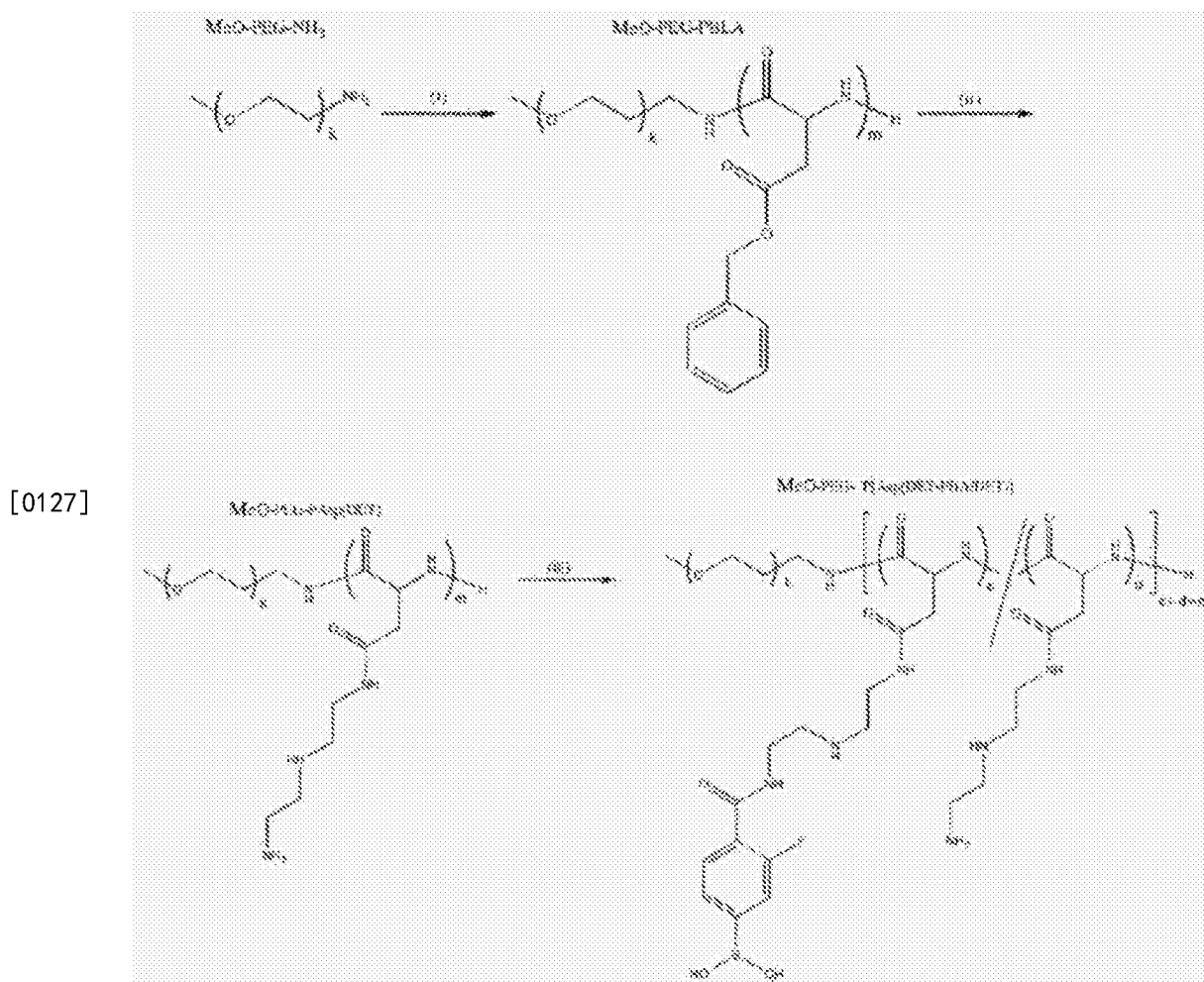
[0122] (1-i) 在含有1M硫脲的二甲基甲酰胺(DMF)中溶解苯冷冻干燥的Methoxy-PEG-NH₂。在所得到的溶液中加入溶解在含有1M硫脲的DMF中的NCA-Lys(TFA),在25℃搅拌3天,由此进行聚合。在二乙醚中滴加聚合后的反应液,过滤回收生成的沉淀,在减压下干燥,由此得到MeO-PEG-PLys(TFA)。

[0123] (1-ii) 将MeO-PEG-PLys(TFA)在1N的NaOH aq./甲醇=1/10中,在35℃搅拌12小时,经过透析(外液是水)和冷冻干燥,得到MeO-PEG-PLys。

[0124] (1-iii) 在50mM的NaHCO₃水溶液中,使MeO-PEG-PLys和相对PLys的氨基为5当量的D-甘露醇溶解。在所得到的溶液中添加溶解在甲醇中的3-氟-4-羧基苯基硼酸,接着,加入缩合剂DMT-MM。将所得到的溶液在室温中搅拌过夜,经过透析(外液是水)和冷冻干燥,得到MeO-PEG-[PLys(FPBA)/PLys]。

[0125] 所得到的嵌段共聚物的分子量通过凝胶渗透色谱(GPC)测定。此时,将在50mM的NaHCO₃中溶解有50mg/mL以上D-山梨糖醇的溶液、在磷酸缓冲液(pH5~7)或含有50mg/mL以上D-山梨糖醇的500mM NaCl水溶液与甲醇的混合溶剂(NaCl aq./甲醇=1/4)作为移动相使用。另外,FPBA基的导入量从在¹H-NMR光谱中侧链和苯环的积分比估算。此时,以在含有少量D-山梨糖醇的D₂O中溶解有聚合物的溶液为测定样品。[PAsp(DET)类嵌段共聚物的制作]

[0126] 在以下表示在以下的实验例中使用的PAsp(DET)类嵌段共聚物的合成流程图B。具体而言,如(2-i)~(2-iii)所述地制作嵌段共聚物。



[0128] 合成流程图B

[0129] (2-i) 在二氯甲烷中溶解苯冷冻干燥的Methoxy-PEG-NH₂。在所得到的溶液中加入以DMF/二氯甲烷=1/10溶解的NCA-BLA, 在35℃搅拌3天, 由此进行聚合。在二乙醚中滴加聚合后的反应液, 过滤回收沉淀物, 在减压下干燥, 由此得到MeO-PEG-PBLA。

[0130] (2-ii) 在N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中溶解苯冷冻干燥的MeO-PEG-PBLA。在二亚乙基三胺的NMP溶液中滴加所得到的溶液, 在5~10℃搅拌1小时。在冰冷下用盐酸中和, 经过透析(外液是0.01N的盐酸)和冷冻干燥, 得到MeO-PEG-PAsp(DET)。

[0131] (2-iii) 在冰冷下(0℃), 在50mM的NaHCO₃水溶液中, 溶解MeO-PEG-PAsp(DET)和相对PAsp(DET)的伯胺氨基为5当量的D-甘露醇。在所得到的溶液中添加溶解在甲醇中的3-氟-4-羧基苯基硼酸, 接着, 加入缩合剂DMT-MM。将所得到的溶液搅拌6小时, 在5℃透析(外液包含任意的山梨糖醇、0.01N的盐酸), 经过冷冻干燥, 得到MeO-PEG-P[Asp(DET-FPBA/DET)]。

[0132] 所得到的嵌段共聚物的分子量由凝胶渗透色谱(GPC)测定。此时, 将在50mM的磷酸缓冲液(pH7.4)中溶解有50mg/mL的D-山梨糖醇的溶液作为移动相使用。另外, FPBA基的导入量从¹H-NMR光谱中侧链和苯环的积分比估算。此时, 以在含有少量NaOD的D₂O中溶解有聚合物的溶液为测定样品。

[0133] [siRNA]

[0134] 在以下的实验例中使用的siRNA的序列如下所述。Cy3等的标记全部在正义链的5'

末端导入。

[0135] (1)hVEGF-siRNA(对人类血管内皮生长因子的siRNA):

[0136] 正义链:5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCCdTdT-3'(序列序号1)

[0137] 反义链:5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUCdTdT-3'(序列序号2)

[0138] (2)scramble-siRNA(非治疗用序列siRNA):

[0139] 正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUUC-3'(序列序号3)

[0140] 反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3'(序列序号4)

[0141] (3)GL3-siRNA(对荧光虫荧光素酶的siRNA):

[0142] 正义链:5'-CUUACGCUGACUACUUCGAUU-3'(序列序号5)

[0143] 反义链:5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'(序列序号6)

[0144] [FPBA基含量与复合体稳定性的关系]

[0145] 如上述(1-i)~(1-iii)和(2-i)~(2-iii)的所述,制作氨基酸聚合度和FPBA基含量不同的各种嵌段共聚物。此外,作为Methoxy-PEG-NH₂,使用PEG的分子量(M_w)为12000的Methoxy-PEG-NH₂。混合该嵌段共聚物和以Cy3荧光标记的siRNA,使N/P比为8。将所得到的混合液在冰箱内静置1~2小时后,以血清溶液(150mM NaCl,10mM Hepes,10%FBS)稀释,使siRNA浓度为50nM。将所得到的稀释液在室温静置1小时左右,用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss公司生产,产品名称“LSM510”)测定(10秒×10次)siRNA的扩散时间。在表1和图1中表示结果。此外,除了不与嵌段共聚物混合以外,同样地测定时的扩散时间(siRNA单独的扩散时间)为157.5μ秒。另外,作为siRNA,使用GL3-siRNA。

[0146] [表1]

[0147]

PLys 类嵌段共聚物										
PEG 链的分子量	12000									
聚氨基酸链链段中的氨基酸残基总数	21		43					54		
聚氨基酸链链段中的不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数	18.0	16.3	43.0	35.3	32.9	28.8	24.1	51.1	43.3	38.1
聚氨基酸链链段中的 FPBA 基数	3.0	4.7	0.0	7.7	10.1	14.2	18.9	2.9	10.7	15.9
扩散时间 [μsec、N/P=8]	323.3	331.4	298.6	321.1	440.2	773.4	783.6	337.0	434.9	1002.2
$\sqrt{(\text{不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数}) + 2\sqrt{(\text{FPBA 基数})}}$	7.7	8.4	6.6	11.5	12.1	12.9	13.6	10.6	13.1	14.1
PLys 类嵌段共聚物										
PEG 链的分子量	12000									
聚氨基酸链链段中的氨基酸残基总数	74						106			
聚氨基酸链链段中的不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数	74.0	70.7	68.2	65.9	62.1	56.9	106.0	104.5	101.9	93.7
聚氨基酸链链段中的 FPBA 基数	0.0	3.3	5.8	8.1	11.9	17.1	0.0	1.5	4.1	12.3
扩散时间 [μsec、N/P=8]	379.1	1326.2	553.1	764.2	1073.0	1238.9	382.4	2120.6	1778.7	2896.3
$\sqrt{(\text{不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数}) + 2\sqrt{(\text{FPBA 基数})}}$	8.6	12.1	13.1	13.8	14.8	15.8	10.3	12.7	14.2	16.7
PAsp (DET) 类嵌段共聚物										
PEG 链的分子量	12000									
聚氨基酸链链段中的氨基酸残基总数	35.6	33.9	34.5	57.4	74.1	74.0				
聚氨基酸链链段中的不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数	32.9	23.7	14.5	48.1	69.9	67.0				
聚氨基酸链链段中的 FPBA 基数	2.6	10.2	20.0	9.3	4.2	7.0				
扩散时间 [μsec、N/P=8]	313.3	367.6	807.8	1241.9	1622.6	1417.7				
$\sqrt{(\text{不含有 FPBA 基的阳离子性氨基酸残基数}) + 2\sqrt{(\text{FPBA 基数})}}$	9.0	11.3	12.7	13.0	12.4	13.5				

[0148] 如表1和图1所示,由于与上述嵌段共聚物混合时的siRNA的扩散时间比siRNA单独时更长,可知这些嵌段共聚物都与siRNA形成复合体。另外,由于导入有FPBA基的嵌段共聚物比未导入的嵌段共聚物的扩散时间更长,可知形成更稳定的复合体。其中,在使用满足

$\left[\sqrt{(\text{聚氨基酸链链段中的不含有FPBA基的阳离子性氨基酸残基数})} \right.$

$\left. + 2\sqrt{(\text{聚氨基酸链链段中的FPBA基数})} \geq 12.0 \right]$ 的关系的嵌段共聚物时,由于siRNA的扩散时间为400微秒以上,暗示形成了高度稳定的复合体。

[0149] [嵌段共聚物的毒性试验]

[0150] 在96孔的培养皿中播种A549-Luc细胞,使其为2500个细胞/孔,使用含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,在恒温箱中培养24小时。将培养基更换为新的含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,同时,添加溶解在生理食盐水中的各种嵌段共聚物,使其为各种胺浓度。接着,培养48小时后,利用产品名称“Cell Counting Kit8”(同仁化学研究所社生产)测定活细胞数,算出细胞生存率(N=4)。在图2中表示结果。

[0151] [复合体的毒性试验]

[0152] 在96孔的培养皿中播种A549-Luc细胞,使其为2500个细胞/孔,使用含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,在恒温箱中培养24小时。将培养基更换为新的含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,同时,添加siRNA和嵌段共聚物的复合体,使其为各种siRNA浓度。接着,培养48小时后,利用产品名称“Cell Counting Kit8”(同仁化学研究所社生产)测定活细胞数,算出细胞生存率(N=4)。在图3中表示结果。此外,上述复合体,在10mM HEPES缓冲液(pH7.3)中添加和混合各嵌段共聚物和GL3-siRNA,使N/P比为4且siRNA浓度为80nM,在室温静置1~2小时左右后,稀释为各种浓度使用。

[0153] 如图2所示,导入有FPBA基的嵌段共聚物处理组比未导入FPBA基的嵌段共聚物处理组显示高的细胞生存率。另外,如图3所示,使用导入有FPBA基的嵌段共聚物形成的复合体处理组比使用未导入FPBA基的嵌段共聚物形成的复合体处理组显示高的细胞生存率。从以上的结果可知,没有发现由FPBA基导入产生的细胞毒性,导入有FPBA基的嵌段共聚物具有充分的生物体适应性。

[0154] [复合体的pH稳定性评价]

[0155] 在各种pH的缓冲液(磷酸缓冲液或磷酸-柠檬酸缓冲液)中溶解嵌段共聚物(PEG-PLL12-23/43)和以Cy3标记的GL3-siRNA,混合为N/P为4且siRNA浓度为50nM。将所得到的混合液在室温静置1小时左右,用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss公司生产,产品名称“LSM510”)测定(10秒×10次)siRNA的扩散时间。在图4中表示结果。

[0156] 如图4所示,在从生物体内环境(约pH7.4)到核内体内等酸性环境(约pH5.5)的广大范围中,siRNA的扩散时间超过800μ秒,较长,由此可知,本发明的嵌段共聚物在该pH范围中能够形成稳定的复合体(siRNA内包聚合物胶束)。

[0157] [复合体的siRNA的释放性评价]

[0158] 在10mM HEPES缓冲液(pH7.3)中分别溶解嵌段共聚物(PEG-PLL12-23/43)和以Cy3标记的GL3-siRNA,混合为N/P为4。将所得到的混合液在冰箱内静置1~2小时左右后,用各种浓度的葡萄糖、含有dTMP或UMP的10mM HEPES的缓冲液(pH7.3)稀释,使得siRNA浓度为50nM。将所得到的稀释液在室温静置1小时左右。接着,用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss公司生产,产品名称“LSM510”)测定(10秒×10次)siRNA的扩散时间。在图5中表示结果。

[0159] 如图5所示,在与血液内同等程度的葡萄糖浓度(通常为约4~7mM),siRNA的扩散时间超过800μ秒,较长,由此可知,本发明的嵌段共聚物在血液中能够与siRNA形成稳定的复合体(siRNA内包聚合物胶束)。另外,在比血液中更高的葡萄糖浓度中,扩散时间慢慢变短,由此可知,在这些浓度下,胶束崩解,siRNA被迅速释放。此外,可以推测,这样的胶束崩解,是由于与在胶束内经由1,2-二醇结构与FPBA基结合的RNA分子相同的、具有1,2-二醇结构的葡萄糖取代而产生的。

[0160] 同样地,在具有1,2-二醇结构的UMP的存在下,UMP为低浓度时,能够维持胶束形状,但如果UMP浓度大于1mM,由于RNA分子与UMP的置换,胶束崩解,可知siRNA被迅速释放。另一方面,在具有与UMP类似的结构但不具有1,2-二醇结构的dTMP的存在下,即使在大于10mM的浓度中,胶束形状也稳定地维持。可以推测这是因为不发生与RNA分子的置换的缘故。

[0161] [复合体向细胞内的摄入能力评价]

[0162] 在48孔培养皿中播种A549-Luc细胞,使其为10000个细胞/孔,使用含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,在恒温箱中培养24小时。将培养基更换为新的含有10%牛胎儿血清的DMEM培养基,在培养基中添加以Cy3标记的siRNA或该siRNA与嵌段共聚物的复合体,使siRNA为100nM/孔。在37℃在恒温箱中培养5小时或9小时后,用PBS缓冲液清洗细胞3次,用胰蛋白酶-EDTA溶液从培养皿取下细胞。使用设置了Cy3过滤器的流式细胞仪(BD公司制,LSR II),对取下的细胞进行直方图解析,评价siRNA向细胞内的摄入量(N=4)。此外,作为siRNA,使用了GL3-siRNA。在图6中表示siRNA向细胞内的摄入量的图表。此外,上述复合体通过在10mM HEPES缓冲液(pH7.3)中添加和混合各嵌段共聚物和siRNA,使得N/P比为8、siRNA浓度为4 μ M,在室温静置1~2小时左右来制备。

[0163] 如图6所示,将siRNA单独添加时和作为未导入FPBA基的嵌段共聚物的复合体添加时相比,作为和未导入FPBA基的嵌段共聚物的复合体添加时,siRNA的摄入量格外提高。

[0164] [复合体的血液中滞留性评价]

[0165] 在10mM HEPES缓冲液(pH7.3)中添加和混合嵌段共聚物(PEG-PLL12-23/43)和Cy5-GL3-siRNA,使N/P比为8、siRNA浓度为7.5 μ M,在室温静置1~2小时左右,由此制备复合体溶液。对小鼠(雌性的Balb/C nude、6周龄、N=4)尾静脉给药该复合体溶液或siRNA溶液(10mM HEPES缓冲液),使siRNA的给药量为20 μ g,经时研究siRNA的血液中残余量。在图7中表示结果。

[0166] 如图7所示,siRNA单独给药时,在给药后10分钟的时刻只残留10%左右,经过1小时后几乎无残留,复合体给药时,给药后1小时的残留量为40%以上,经过2小时后也残留10%以上。从此可知,由本发明的嵌段共聚物与siRNA形成的复合体(siRNA内包胶束)血液中滞留性极其优异。

[0167] [复合体的抑癌活性评价]

[0168] (1)含有FPBA基的嵌段共聚物的制备

[0169] 通过与流程B类似的流程,得到Ace-PEG-PAsp(DET)12-62/75的嵌段共聚物。具体而言,在PEG末端将具有缩醛基的Ace-PEG-PBLA(12-110)以DET氨解,得到Ace-PEG-PAsp(DET)(12-90)。接着,用NaCl溶液进行透析,由乙酸将平衡离子氯化后,使用缩合剂(DMT-MM)使4-羧基-3-氟苯基硼酸缩合,得到Ace-PEG-PAsp(DET)12-62/75的嵌段共聚物。

[0170] (2)导入cRGD的嵌段共聚物的制备

[0171] 接着,在pH7.2将相对于缩醛基为5当量的cRGD肽(Cyclic(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys))与DTT混合1小时,混合所得到的混合液和上述嵌段共聚物,将pH调整为2。搅拌1小时后,使用2M的乙酸钠和NaOH,使pH为5。此后,加水,使聚合物浓度为20mg/mL,搅拌一晚。对纯水透析,除去未反应物和废弃物后,冷冻干燥,由此得到在PEG链末端导入了cRGD的嵌段共聚物cRGD-PEG-PAsp(DET)12-62/75。另外,反应、透析在4℃(冰箱)中进行。

[0172] (3)复合体的制备

[0173] 在10mM HEPES缓冲液中溶解嵌段共聚物,使其为10mg/mL。混合12.18 μ L的该聚合物溶液、75 μ L的siRNA(15 μ M 10mM HEPES缓冲液)和7.81 μ L的10mM HEPES缓冲液,静置一晚。在该混合液中,在给药数小时前,添加5 μ L的3M NaCl 10mM HEPES缓冲液,NaCl浓度调整为150mM(全部量为100 μ L)。由此得到复合体(siRNA内包聚合物胶束)。在表2中表示制备的复合体中的siRNA和嵌段共聚物的组合和混合比。

[0174] [表2]

[0175]

复合体	嵌段共聚物	siRNA	混合比*1	平均直径
(+)hVEGF	cRGD-PEG-PAsp(DET)12-62/75	siRNA-hVEGF	5	—
(-)hVEGF	Ace-PEG-PAsp(DET)12-62/75	siRNA-hVEGF	5	39.95nm
(+)Scramble	cRGD-PEG-PAsp(DET)12-62/75	siRNA-Scramble	5	—

[0176] *1:pH7.4中的聚氨基酸链链段的正电荷数与聚氨基酸链链段的负电荷数和siRNA的负电荷数的合计之比(正电荷/负电荷的合计)

[0177] (4)抑癌活性评价

[0178] 购入6周龄的小鼠(雌性的Balb/C nude、N=4)后,饲养1周,在各小鼠中分别皮下注射100 μ L制成为 5.0×10^7 个细胞/mL的Hela-luc细胞。此后,再饲养4天,开始治疗(即,复合体的给药)。具体而言,每隔一天,直至第6天,通过尾静脉投与在上述(3)中制备的复合体(即,以给药开始日为0天,第0、2、4、6天合计给药4次)。对于1次给药,投与15 μ g/100 μ L的siRNA。对于对照组,对于1次给药,投与100 μ L的HEPES溶液。在图8中表示相对给药开始日的肿瘤体积的肿瘤体积相对值和给药后经过天数的关系。

[0179] 如图8所示,在将在PEG末端未导入cRGD的本发明的嵌段共聚物作为载体的(-)hVEGF复合体给药组中,比对照组和(+)Scramble复合体给药组更明显地抑制肿瘤的成长。由此可知,siRNA由该嵌段共聚物在血液中稳定地保持,能够发挥RNA干扰能力。另外,在将在PEG末端导入有cRGD的嵌段共聚物作为载体的(+)hVEGF复合体给药组中,比对照组和(+)Scramble复合体给药组更显著地抑制肿瘤的成长。由此可知,该复合体具有优异的血液中稳定性,还以高移动率被肿瘤组织摄入、有效地发挥RNA干扰效果。

[0180] 工业上的可利用性

[0181] 本发明的嵌段共聚物能够在DDS领域中良好地应用。

序列表

[0001]	<110>	国立大学法人东京大学 国立大学法人东京医科齿科大学 那野伽利阿株式会社	
	<120>	导入有苯基硼酸基的嵌段共聚物及其使用	
	<130>	NC1104W	
	<150>	US61/561,022	
	<151>	2011-11-17	
	<160>	6	
	<170>	PatentIn 3.5 版	
	<210>	1	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工合成序列	
	<220>		
	<223>	包括 dT 末端的人类血管内皮生长因子的 siRNA 的正义链	
	<400>	1	
		gaucucauca ggguacucct t	21
	<210>	2	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工合成序列	
	<220>		
	<223>	包括 dT 末端的人类血管内皮生长因子的 siRNA 的反义链	
	<400>	2	
		ggaguaccu gaugagauct t	21
	<210>	3	
	<211>	21	

	<212> RNA	
	<213> 人工合成序列	
	<220>	
	<223> 非治疗用 siRNA 的正义链	
	<400> 3	
	uucuccgaac gugucaguu u	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工合成序列	
	<220>	
	<223> 非治疗用 siRNA 的反义链	
	<400> 4	
	acgugacacg uucggagaau u	21
[0002]	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工合成序列	
	<220>	
	<223> 荧光虫荧光素酶的 siRNA 的正义链	
	<400> 5	
	cuuacgcuga cuacuucgau u	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工合成序列	
	<220>	
	<223> 荧光虫荧光素酶的 siRNA 的反义链	
	<400> 6	
	ucgaaguacu cagcuaagu u	21

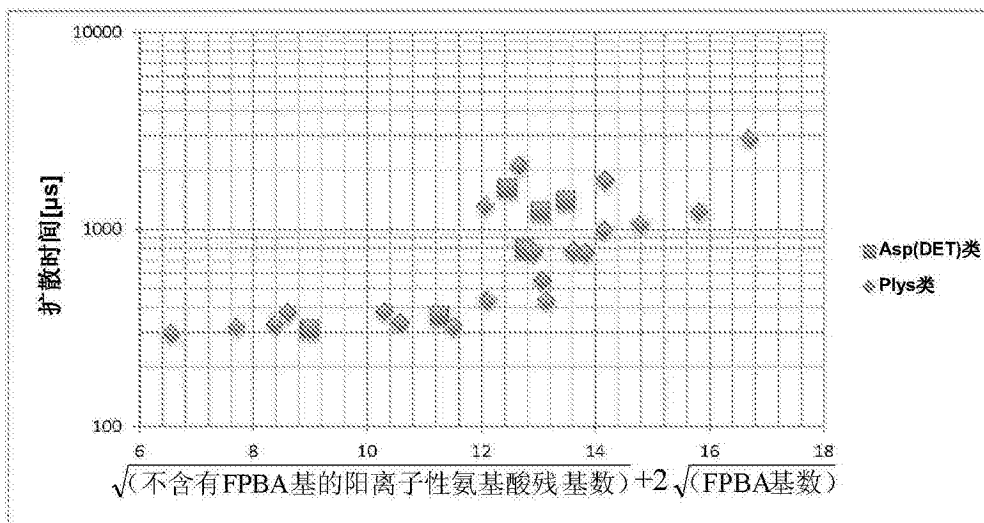


图1

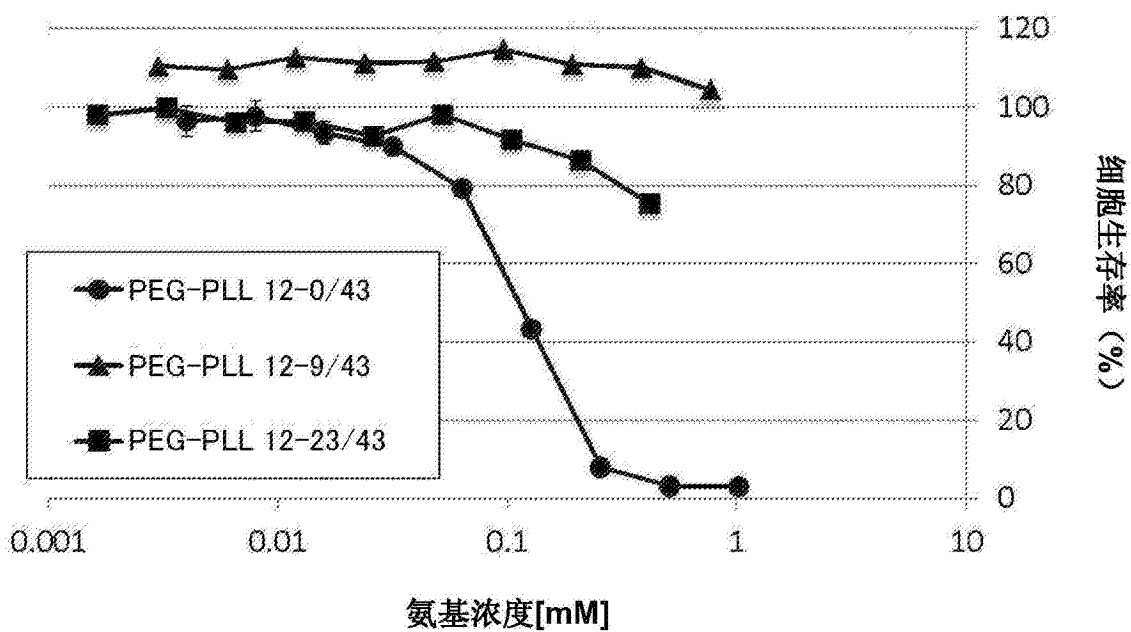


图2

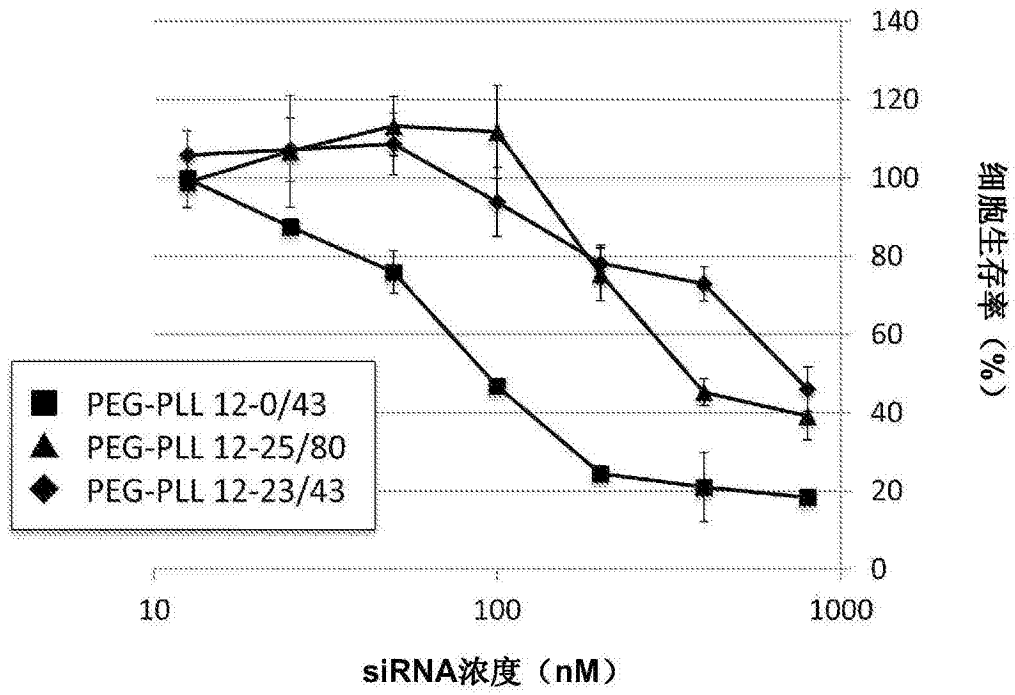


图3

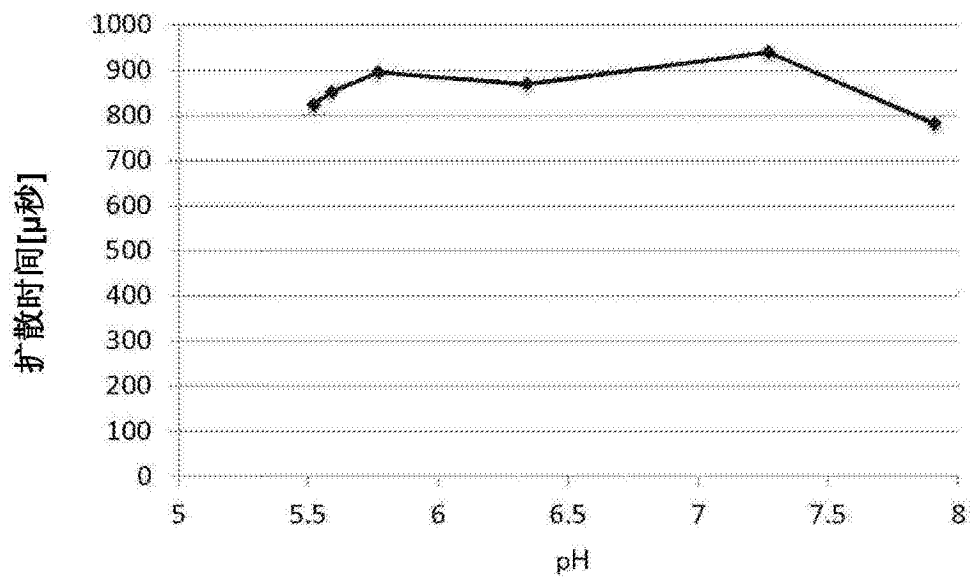


图4

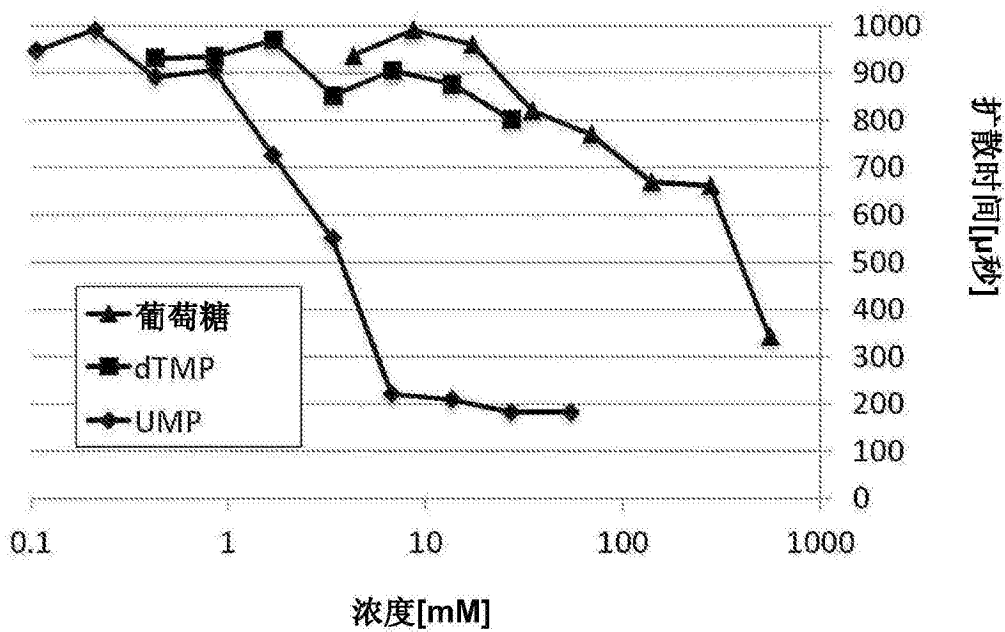


图5

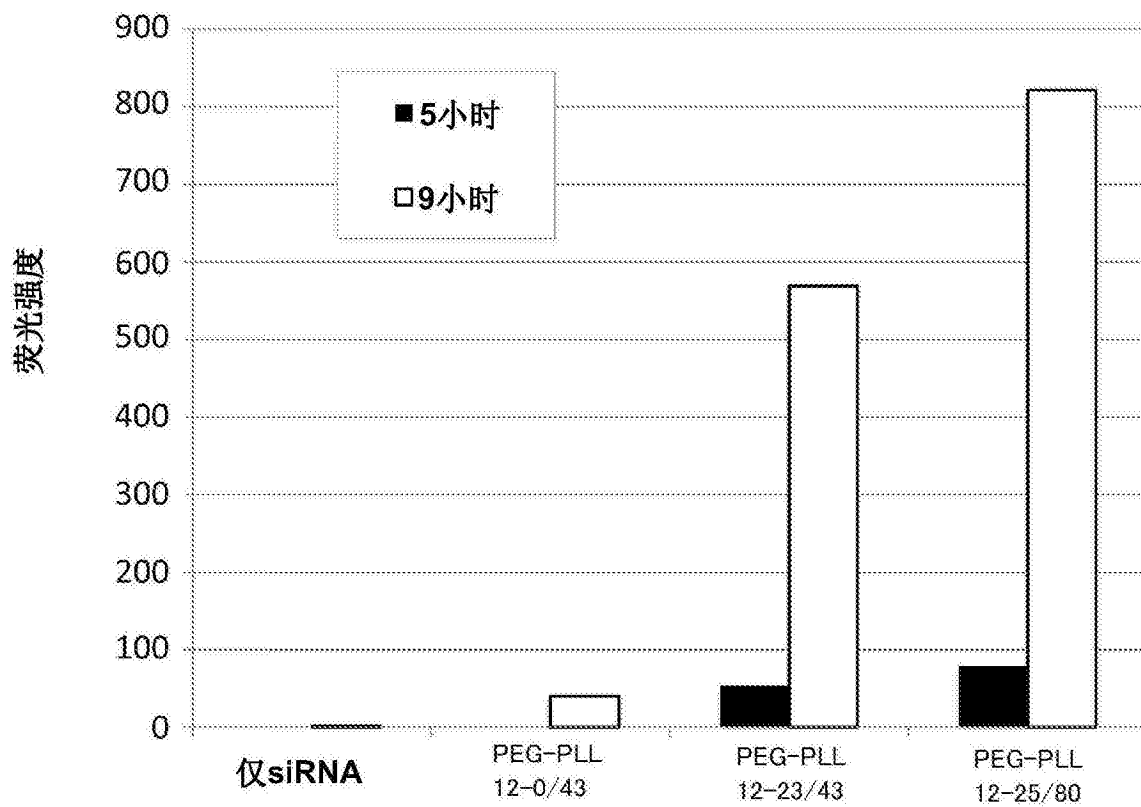


图6

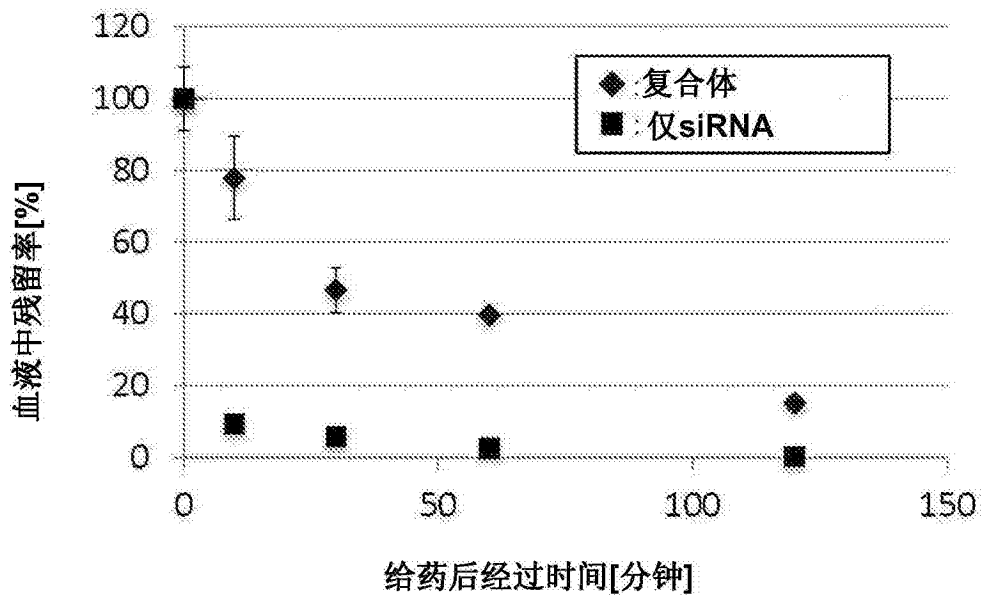


图7

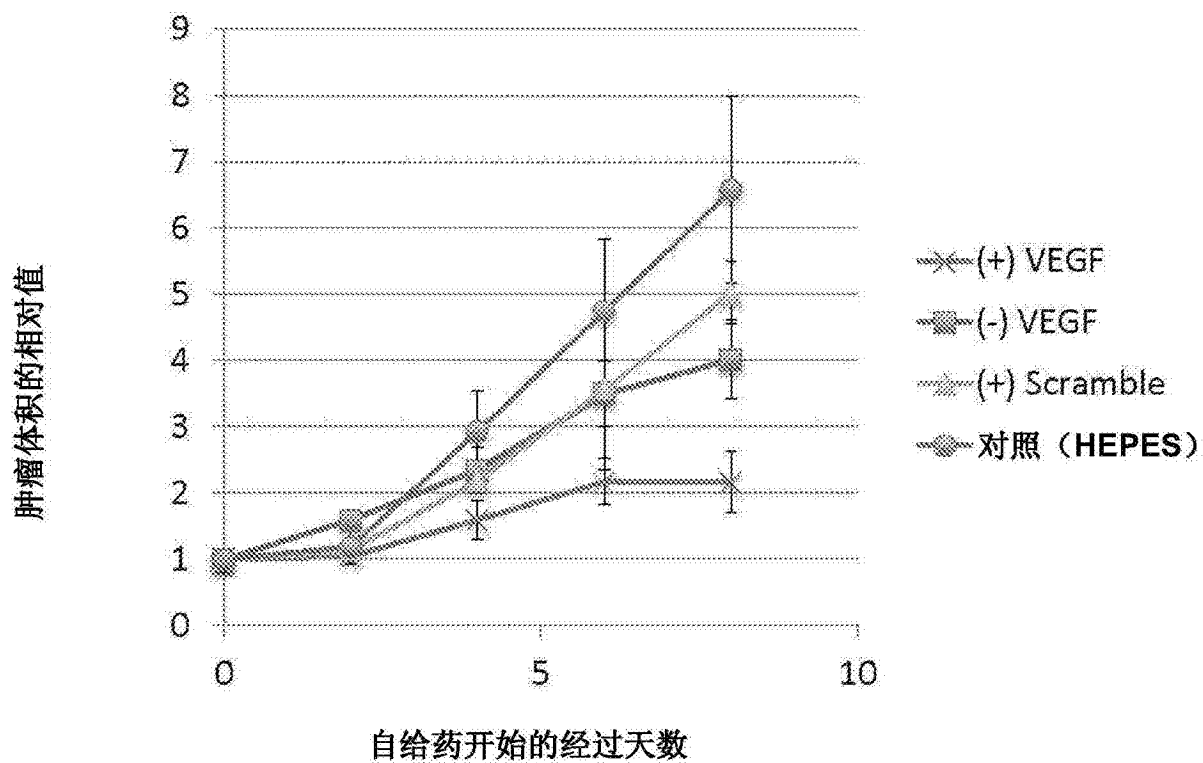


图8