

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02020/116640

発行日 令和3年10月21日(2021.10.21)

(43) 国際公開日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	2 G 0 4 5
A 6 1 K 47/56 (2017.01)	A 6 1 K 47/56	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48	M

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

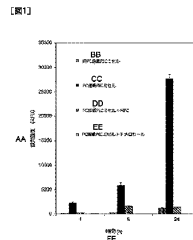
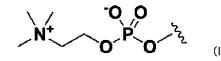
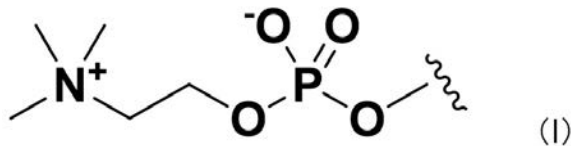
出願番号 特願2020-560070 (P2020-560070)	(71) 出願人 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2019/047917	
(22) 国際出願日 令和1年12月6日(2019.12.6)	
(31) 優先権主張番号 特願2018-229599 (P2018-229599)	(74) 代理人 100122471 弁理士 初井 孝文
(32) 優先日 平成30年12月7日(2018.12.7)	(74) 代理人 100150212 弁理士 上野山 温子
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72) 発明者 カブラル オラシオ 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
	(72) 発明者 宮崎 拓也 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
	Fターム(参考) 2G045 CB01 FB04 FB07 4C076 AA95 BB11 CC27 DD63 FF70 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物複合体、ポリマー複合体及び薬物送達用組成物

(57) 【要約】

本発明は、効率的に細胞又はミトコンドリアへ薬物を送達する技術を提供する。本発明の薬物複合体は、薬物と該薬物に結合された標的指向性部位とを含む、薬物複合体であって、該標的指向性部位が、下記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、薬物複合体。

【化1】



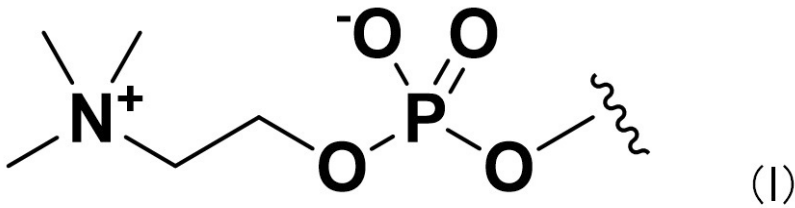
AA.. FLUORESCENCE INTENSITY
BB.. NON-PC-LOADED PIC-MICELLES
CC.. PC-LOADED MICELLES
DD.. PC-LOADED MICELLES + MPC
EE.. PC-LOADED MICELLES + THERMOGAL
FF.. TIME

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬物と該薬物に結合された標的指向性部位とを含む、薬物複合体であって、
該標的指向性部位が、下記式 (I) で表されるホスホコリン基を含む、薬物複合体。

【化 1】



10

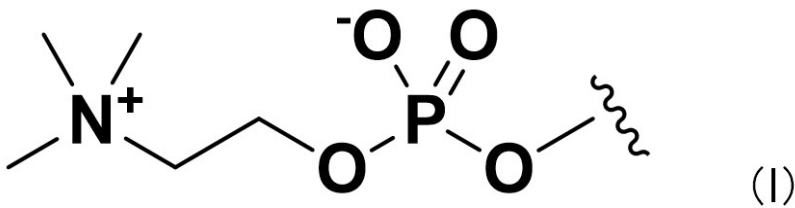
【請求項 2】

薬物送達用ポリマーと該薬物送達用ポリマーに結合された標的指向性部位とを含む、
ポリマー複合体であって、

該標的指向性部位が、下記式 (I) で表されるホスホコリン基を含む、ポリマー複合体

。

【化 2】



20

【請求項 3】

前記薬物送達用ポリマーが、親水性ポリマーセグメントと疎水性ポリマーセグメントと
を含む、請求項 2 に記載のポリマー複合体。

【請求項 4】

さらに薬物が結合されている、請求項 2 又は 3 に記載のポリマー複合体。

30

【請求項 5】

請求項 2 から 4 のいずれかに記載のポリマー複合体を含む、薬物送達用組成物。

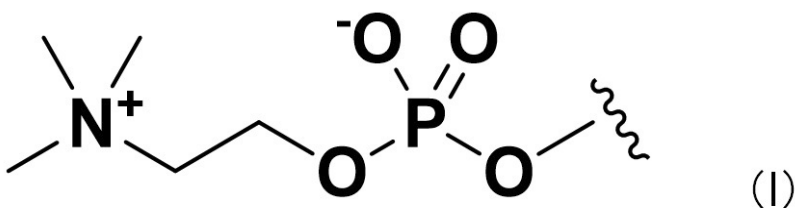
【請求項 6】

薬物をさらに含む、請求項 5 に記載の薬物送達用組成物。

【請求項 7】

送達対象化合物と、下記式 (I) で表されるホスホコリン基を有する化合物と、を結合
させる工程を含む、標的指向性を有する化合物の製造方法。

【化 3】

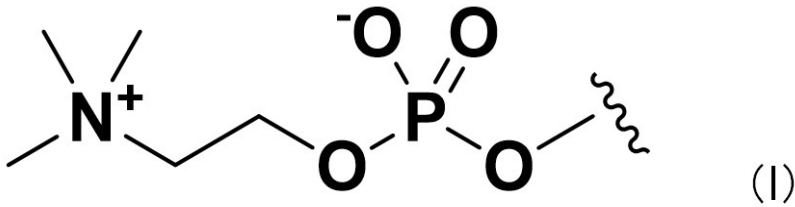


40

【請求項 8】

送達対象物を下記式 (I) で表されるホスホコリン基を含む標的指向性部位で修飾する
ことを含む、送達対象物に細胞又はミトコンドリアへの指向性を付与する方法。

【化 4】



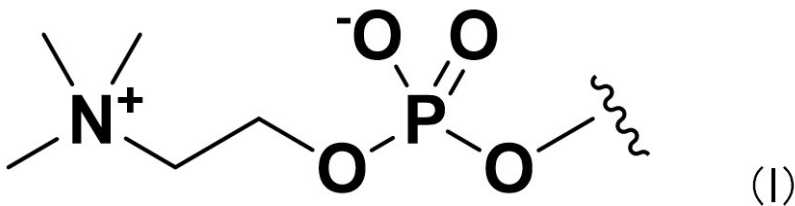
【請求項 9】

前記送達対象物が、リポソーム、高分子ミセル、ポリイオンコンプレックス、ポリプレックス、リポプレックス、リポポリプレックス、無機金属粒子、脂質ナノ粒子及びゲルから選択される、請求項 8 に記載の方法。 10

【請求項 10】

細胞又はミトコンドリアへの指向性を有する化合物の製造のための、下記式 (I) で表されるホスホコリン基又は下記式 (I) で表されるホスホコリン基を有する化合物の使用。

【化 5】

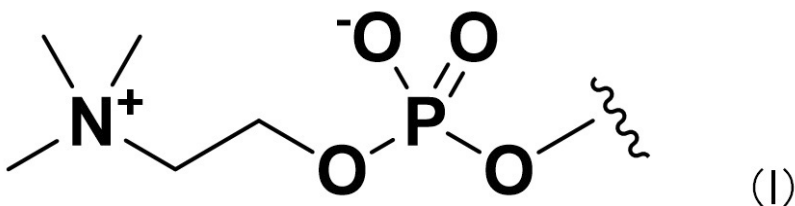


20

【請求項 11】

標的指向性部位を含み、標識物質によって標識化された検出試薬であって、該標的指向性部位が、下記式 (I) で表されるホスホコリン基を含む、検出試薬。

【化 6】



30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホスホコリン基を含む薬物複合体及びポリマー複合体、ならびに該ポリマー複合体を含む薬物送達用組成物に関する。 40

【背景技術】

【0002】

一般に、経口や静脈内注射によって薬物を全身投与すると、投薬対象の患部だけでなく、正常組織にも薬物が集積する。この結果、薬物投与による副作用が認められ、治療方法の変更や中断が必要になる場合がある。これに対し、副作用の低減を目的として、患部に薬物を選択的に輸送する薬物送達システム (DDS) が開発されている。

【0003】

薬物の患部への集積量の増大に向けて、患部を指向するリガンド分子の開発が進められている。従来は、細胞取り込み量を増大するための研究が中心であったが、近年では細胞内のミトコンドリアへの薬物送達にも関心が向けられており、ミトコンドリアへのタンパ 50

ク質や核酸等の薬物送達による難治性疾患の治療が期待されている。細胞内及びミトコンドリアへの薬物送達に関しては、例えば、トリフェニルホスホニウムをリガンド分子として利用する技術が検討されている（例えば、非特許文献1～3）。

【0004】

しかしながら、上記技術では、生体内分布の制御が不十分であり、効率的に細胞内又はミトコンドリアへ薬物を送達する技術の開発が望まれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Mol. Pharmaceutics, 2014, 11(8), 2640 - 2649 10

【非特許文献2】Chem. Commun., 2017, 53, 8790 - 8793

【非特許文献3】J. Am. Chem. Soc., 2015, 137(18), 5930 - 5938

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その主たる目的は、効率的に細胞内又はミトコンドリアへ薬物を送達する技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】 20

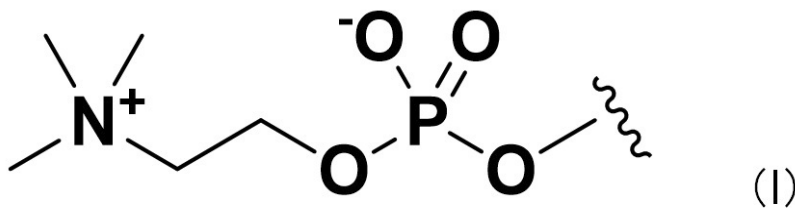
【0007】

上記課題を解決すべく本発明者らが鋭意検討したところ、送達対象の薬物や薬物を担持するキャリア又はその構成要素にホスホコリン基を含む標的指向性部位を導入することにより、がん細胞及びミトコンドリアへの指向性を付与できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の1つの局面によれば薬物と該薬物に結合された標的指向性部位とを含む、薬物複合体であって、該標的指向性部位が、下記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、薬物複合体が提供される。

【化1】 30



本発明の別の局面によれば、薬物送達用ポリマーと該薬物送達用ポリマーに結合された標的指向性部位とを含む、ポリマー複合体であって、該標的指向性部位が、上記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、ポリマー複合体が提供される。 40

1つの実施形態において、上記薬物送達用ポリマーが、親水性ポリマーセグメントと疎水性ポリマーセグメントとを含む。

1つの実施形態において、上記ポリマー複合体には、さらに薬物が結合されている。

本発明のさらに別の局面によれば、上記ポリマー複合体を含む、薬物送達用組成物が提供される。

1つの実施形態において、上記薬物送達用組成物は、薬物をさらに含む。

本発明のさらに別の局面によれば、送達対象化合物と、上記式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物と、を結合させる工程を含む、標的指向性を有する化合物の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の局面によれば、送達対象物を上記式(I)で表されるホスホコリン 50

基を含む標的指向性部位で修飾することを含む、送達対象物に細胞又はミトコンドリアへの指向性を付与する方法が提供される。

1つの実施形態において、上記送達対象物が、リボソーム、高分子ミセル、ポリイオンコンプレックス、ポリプレックス、リボプレックス、リボポリプレックス、無機金属粒子、脂質ナノ粒子及びゲルから選択される。

本発明はまた、細胞又はミトコンドリアへの指向性を有する化合物の製造のための、上記式(I)で表されるホスホコリン基又は上記式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物の使用に関する。

本発明のさらに別の局面によれば、標的指向性部位を含み、標識物質によって標識化された検出試薬であって、該標的指向性部位が、上記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、検出試薬が提供される。

【発明の効果】

【0009】

DDSキャリアの設計においては、一般に、正の電荷は負に帯電する細胞膜との静電相互作用に有利であり、また、疎水の性質は、疎水的な細胞膜表面と親和性が高くなることから好ましいと考えられる。上記従来 of 標的指向性部位として利用されてきたトリフェニルホスホニウムも当該設計方針に沿ったものであり、疎水性であり、かつ、正電荷を帯びている。これに対し、本発明によれば、全体として電荷が中和され、かつ、親水性であるホスホコリン基を標的指向性部位として利用することにより、生体内分布を制御しながら、標的指向性部位が結合された薬物やキャリアに良好な細胞取り込み性とミトコンドリアへの指向性とを付与することができる。これは、電荷が中和されているホスホコリン基により、正常組織やタンパク質との非特異的な相互作用を低減できるとともに、細胞及びミトコンドリアが有するリン脂質及びリン脂質誘導体の取り込み機能を利用できるためと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】PICミセルの細胞取り込み試験、競合試験及び阻害試験の結果を示すグラフである。

【図2】PICミセルのミトコンドリアへの局在レベルを示すグラフである。

【図3】細胞生存率及びIC₅₀を示すグラフである。

【図4】mRNA内包ミセルの遺伝子発現効率を示すグラフである。

【図5】アルブミンPCコンジュゲートの細胞取り込みレベルを示すグラフである。

【図6】アルブミンPCコンジュゲートのミトコンドリアへの局在レベルを示すグラフである。

【図7】PC搭載金ナノ粒子のミトコンドリアへの移行を示すTEM観察画像である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の好ましい実施形態について説明するが、本発明はこれらの実施形態には限定されない。また、各実施形態は、適宜組み合わせることができる。

【0012】

A. 薬物複合体

本発明の1つの実施形態における薬物複合体(コンジュゲート)は、薬物と該薬物に結合された標的指向性部位とを含み、該標的指向性部位は、下記式(I)で表されるホスホコリン基を含む。

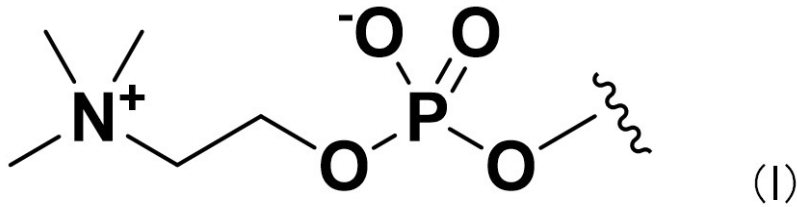
10

20

30

40

【化2】



【0013】

上記薬物としては、特に限定されず、所望の活性を有する薬物を用いることができる。好ましくは、細胞内、例えば、ミトコンドリアへの送達を所望される薬物が用いられる。なお、本明細書において、薬物とは、何らかの生理活性を有する物質をいう。薬物が有する生理活性は、医薬品の有効成分として機能し得る生理活性であればよく、例えば、抗腫瘍活性、免疫賦活活性、抗ウイルス活性、抗菌活性、抗炎症活性等が挙げられる。薬物は、酵素、ホルモン、ワクチン、抗体等のタンパク質、mRNA、pDNA、アンチセンス、リボザイム、siRNA、デコイ核酸、アプタマー等の核酸、多糖等の高分子医薬品であってもよい。

10

【0014】

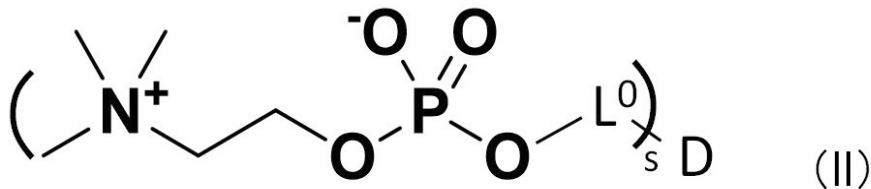
薬物と標的指向部位とは、直接結合されていてもよく、リンカー部位を介して間接的に結合されていてもよい。

20

【0015】

1つの実施形態において、本発明の薬物複合体は、下記式(II)で表され得る。

【化3】



30

(式IIにおいて、 L^0 は、単結合又は二価の原子団を表し、Dは、薬物の残基を表し、sは、1~2000の整数を表す。)

【0016】

L^0 が表し得る二価の原子団としては、本発明の効果が得られる限りにおいて特に限定されない。二価の原子団は、例えば、後述する、薬物が有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物と薬物との反応によって形成される原子団であり、当該反応によって生じる結合と当該化合物の残基とを含み得る。二価の原子団は、例えば、直鎖又は分岐の炭素数1~6のアルキレン基、 $-COO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及びこれらの任意の組み合わせであり得る。二価の原子団の主鎖の原子数は、例えば1~20、好ましくは1~15、より好ましくは1~10とすることができる。

40

【0017】

sは、薬物に結合される標的指向性部位の数(1分子あたりの結合数)を表す。sは、薬物の化学構造、立体構造、分子量等に応じて適切に選択され得る。例えば、薬物の分子量が大きい場合(薬物が高分子医薬品である場合等)、sは2以上であり得、例えば2~200、また例えば2~100又は2~50であり得る。

【0018】

上記薬物複合体は、任意の適切な方法で調製され得る。例えば、薬物が有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物を用いて、当該化合物の官能基と薬物の官能基とを反応させることによって、標的指向性部位と薬物とが結合した薬物複

50

合体を得ることができる。この場合、薬物が有する官能基は、薬物に内在するものであってもよく、付加的に導入されたものであってもよい。上記官能基の組合せの具体例としては、例えば、チオール基と(メタ)アクリロイル基、チオール基とマレイミド基、チオール基とチオール基、チオール基とカルボキシル基、(メタ)アクリロイル基とヒドロキシル基、(メタ)アクリロイル基とアミノ基、カルボキシル基とアミノ基、カルボキシル基とヒドロキシル基、アミノ基とヒドロキシル基等が挙げられる。

【0019】

上記薬物が有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物としては、上記官能基とホスホコリン基とを有する任意の適切な化合物を用いることができる。具体例としては、2-(メタ)アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルホスホリルコリン、4-(メタ)アクリロイルオキシブチルホスホリルコリン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-(メタ)アクリロイルオキシデシルホスホリルコリン、-(メタ)アクリロイル(ポリ)オキシエチレンホスホリルコリン、2-(メタ)アクリルアミドエチルホスホリルコリン、3-(メタ)アクリルアミドプロピルホスホリルコリン、4-(メタ)アクリルアミドブチルホスホリルコリン、6-(メタ)アクリルアミドヘキシルホスホリルコリン、10-(メタ)アクリルアミドデシルホスホリルコリン、-(メタ)アクリルアミド(ポリ)オキシエチレンホスホリルコリン等が挙げられる。

【0020】

B. ポリマー複合体

本発明の別の局面によれば、薬物送達用ポリマーと該薬物送達用ポリマーに結合された標的指向性部位とを含み、該標的指向性部位が上記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、ポリマー複合体(コンジュゲート)が提供される。

【0021】

上記薬物送達用ポリマーとしては、DDSの分野に適用可能な任意の適切なポリマーを用いることができ、例えば、従来用いられている公知の薬物送達用ポリマーが好ましく用いられ得る。

【0022】

上記公知の薬物送達用ポリマーとしては、静電相互作用によって電荷を有する薬物と会合してポリオンコンプレックス(PIC)を形成し得る荷電性ポリマー、薬物を内包可能な高分子ミセルを形成し得るブロックコポリマー、薬物を担持可能な微粒子を形成し得る生体適合性ポリマー、送達対象物の修飾に用いられる水溶性ポリマーが好ましく例示される。

【0023】

B-1. 荷電性ポリマーを用いた複合体

上記静電相互作用によって電荷を有する薬物と会合してPICを形成し得る荷電性ポリマーとしては、ポリマーとしての荷電の種類により、カチオン性ポリマーと、アニオン性ポリマーとに分けられる。

【0024】

上記カチオン性ポリマーは、生理的pHにおいて、カチオン基を有し、正電荷を有するポリマーである。カチオン性ポリマーは、ポリマー全体としてのカチオン性を妨げない範囲で、多少のアニオン基を有していてもよい。

【0025】

カチオン性ポリマーは、単一の繰り返し単位から構成されてもよく、二種以上の繰り返し単位を任意の組み合わせ及び比率で含有してもよい。カチオン性ポリマーは、主鎖にアミノ基を含有するポリマー又は側鎖にアミノ基を含有するポリマーであり得る。

【0026】

主鎖にアミノ基を含有するポリマーとしては、例えば、ポリエチレンジイミン等が挙げられる。

【0027】

10

20

30

40

50

側鎖にアミノ基を含有するポリマーとしては、例えば、側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸をモノマーユニットとして含むポリアミノ酸又はその誘導体が挙げられる。側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸をモノマーユニットとして含むポリアミノ酸又はその誘導体としては、ポリアスパルタミド、ポリグルタミド、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、及びこれらの誘導体等が挙げられる。ポリアスパラギン酸（又はポリグルタミン酸）を1, 5-ジアミノペンタンと反応させることにより、アスパラギン酸（グルタミン酸）の側鎖カルボン酸にアミノペンタン（AP）が導入されたポリ（Asp-AP）（又はポリ（Glu-AP））及びポリアスパラギン酸（又はポリグルタミン酸）をDET（ $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ）と反応させることにより、アスパラギン酸（又はグルタミン酸）の側鎖カルボン酸にDETが導入された、ポリ（Asp-DET）（又はポリ（Glu-DET））等が好適に用いられる。

10

【0028】

側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸をモノマーユニットとして含むポリアミノ酸又はその誘導体は、必要に応じて、側鎖に疎水性基を含有する非荷電性アミノ酸をモノマーユニットとしてさらに含んでもよい。側鎖に疎水性基を含有する非荷電性アミノ酸としては、例えば25℃の水100gに対する溶解度が5g以下、さらに好ましくは4g以下であるアミノ酸が挙げられる。このようなアミノ酸としては、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン等の非極性天然アミノ酸や、側鎖に疎水性基が導入されたアミノ酸の疎水性誘導体が挙げられる。アミノ酸の疎水性誘導体としては、好ましくはアスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸の疎水性誘導体が挙げられる。上記導入される疎水性基としては、炭素数6～27の飽和もしくは不飽和の直鎖又は分枝状の脂肪族炭化水素基、炭素数6～27の芳香族炭化水素基あるいはコレステロール残基が好ましく例示され得る。

20

【0029】

側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸をモノマーユニットとして含むポリアミノ酸又はその誘導体のより詳細な説明については、W02006/085664、W02010/093036、W02011/105402等（これらの出願の教示は、その全体が参照により本明細書中に援用される）を参照することができる。

【0030】

上記アニオン性ポリマーは、生理的pHにおいて、アニオン基を有し、負電荷を有するポリマーである。アニオン性ポリマーは、ポリマー全体としてのアニオン性を妨げない範囲で、多少のカチオン基を有していてもよい。

30

【0031】

アニオン性ポリマーは、単一の繰り返し単位から構成されてもよく、二種以上の繰り返し単位を任意の組み合わせ及び比率で含有してもよい。アニオン性ポリマーとしては、カルボキシル基を含有するモノマーユニットを含むポリマー、硫酸基を含有するモノマーユニットを含むポリマー、リン酸基を含有するモノマーユニットを含むポリマー等を挙げることができる。カルボキシル基を含有するモノマーユニットは、好ましくは側鎖にカルボキシル基を含有するアミノ酸であり、アスパラギン酸、グルタミン酸等が例示できる。

【0032】

上記荷電性ポリマーに対して、標的指向性部位は、任意の適切な部位に結合される。例えば、ポリマーの一方又は両方の末端に結合されてもよく、側鎖に導入されてもよい。ポリマーに結合される標的指向性部位の数（ポリマー1分子あたりの結合数）は、本発明の効果が得られる範囲で制限はなく、1又は2以上であり得る。ポリマーと標的指向性部位との結合は、ポリマーが有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物を用いて、A項に記載の薬物と標的指向性部位との結合と同様の方法で行うことができる。

40

【0033】

B-2. ブロックコポリマーを用いた複合体

上記薬物を内包可能な高分子ミセルを形成し得るブロックコポリマーは、代表的には、

50

親水性ポリマーセグメントと疎水性ポリマーセグメントとを含むブロックコポリマーであり、好ましくはこれらのセグメントが直列に結合されたブロックコポリマーである。

【0034】

親水性ポリマーセグメントを構成するポリマーとしては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリ(2-オキサゾリン)、ポリサッカライド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル等が挙げられ、ポリエチレングリコールが好ましく用いられ得る。親水性ポリマーセグメントは、直鎖状であってもよく、分岐鎖状であってもよい。

【0035】

疎水性ポリマーセグメントを構成するポリマーとしては、ブロックコポリマーが水性溶媒中で親水性ポリマーセグメントを外側に向け、疎水性ポリマーセグメントを内側に向けた状態のミセルを形成可能な程度に親水性ポリマーセグメントよりも低い親水性度を有するポリマーが選択される。このようなポリマーとしては、例えば、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLA)及びその共重合体(PLGA)、ポリアミノ酸及びその誘導体、ポリエーテル及びその誘導体が挙げられ、ポリアミノ酸及びその誘導体、ポリエーテル及びその誘導体が好ましく用いられ得る。

【0036】

上記ポリアミノ酸としては、側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸、側鎖に疎水性基を含有する非荷電性アミノ酸、側鎖にカルボキシル基を含有するアミノ酸から選択される1種以上のアミノ酸又はその誘導体をモノマーユニットとして含むポリアミノ酸又はその誘導体が好ましく用いられ得る。側鎖にアミノ基を含有するアミノ酸としては、リシン、アルギニン、ヒスチジン、オルニチン等の塩基性アミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸の側鎖にアミノ基を導入したアミノ酸誘導体等が挙げられる。側鎖に疎水性基を含有する非荷電性アミノ酸及び側鎖にカルボキシル基を含有するアミノ酸については、上述のとおりである。ポリアミノ酸としては、B-1項に記載の荷電性ポリマーを用いることもできる。

【0037】

上記ポリエーテルとしては、側鎖構造を有するポリグリシジルエーテルが挙げられる。

【0038】

上記ブロックコポリマーの具体例については、WO2007/099660、WO2007/099661、WO2010/093036、WO2012/096399、WO2014/133172、WO2015/170757等(これらの出願の教示は、その全体が参照により本明細書中に援用される)を参照することができる。

【0039】

上記ブロックコポリマーに対して、標的指向性部位は、任意の適切な部位に結合され得、好ましくは親水性ポリマーセグメント側の末端に結合される。ポリマーに結合される標的指向性部位の数は、本発明の効果が得られる範囲で制限はなく、1又は2以上であり得る。ポリマーと標的指向性部位との結合は、A項に記載の薬物と標的指向性部位との結合と同様の方法で行うことができる。

【0040】

ブロックコポリマーに標的指向性部位を結合させた構成を有するポリマー複合体は、例えば、式： $Z-A^1-B^1$ で表され得る(式中、Zは、式(I)で表されるホスホコリン基を表し、 A^1 は、親水性ポリマーセグメントを表し、 B^1 は、疎水性ポリマーセグメントを表す)。

【0041】

上記ポリマー複合体の具体例を以下の式(III)又は(IV)に示す。

10

20

30

40

OH -、-NHCOO -、-CH₂CH₂SCH₂CH(CH₃)COOCH₂CH₂ -
等が挙げられる。

【0043】

上記L²は、例えば、-NH-、-O-、-O-L^{2a}-NH-、-CO-、-CH₂-、及びO-L^{2a}-S-L^{2a}-NH-（ここで、L^{2a}は独立して炭素数1～6のアルキレン基である）から選ばれる連結基であり得る。

【0044】

上記L⁴は、例えば、-OCO-L^{4a}-CO-、及びNHCO-L^{4a}-CO-（ただし、L^{4a}は炭素数1～6のアルキレン基である）から選ばれる連結基であり得る。

【0045】

上記R¹、R^{2a}及びR^{2b}の基で定義する、炭素数1～12の直鎖又は分枝状のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ヘキシル基、デシル基、及びウンデシル基等を挙げるができる。

【0046】

R¹の基で定義する、炭素数1～24の直鎖又は分枝状のアルキルカルボニル基の内の炭素数1～12の直鎖又は分枝状のアルキル部分は上述した例示を参考にでき、炭素数13以上のアルキル部分は、例えば、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ノナデシル基、ドコサニル基及びテトラコシル基等を挙げるができる。

【0047】

上記アルキル基又はアルキル部分について、「置換された」場合の置換基としては、限定されるものでないが、C₁₋₆アルコキシ基、アリーロキシ基、アリーロC₁₋₃オキシ基、シアノ基、カルボキシル基、アミノ基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、C₂₋₇アシルアミド基、トリ-C₁₋₆アルキルシロキシ基、シロキシ基、シリルアミノ基を示すか、又はアセタール化ホルミル基、ホルミル基、塩素又はフッ素等のハロゲン原子を挙げるができる。ここで、例えば、C₁₋₆のごとき表示は、炭素数1～6を意味する。

【0048】

上記R^{6a}及びR^{6b}の基で定義する疎水性有機基は、例えば、炭素数6～27の飽和もしくは不飽和の直鎖又は分枝状の脂肪族炭化水素基、炭素数6～27のアリール基又はアラルキル基、あるいはステロールに由来する残基である。

【0049】

上記R^{7a}及びR^{7b}の基は、相互に独立して、式(i)又は(v)の基であることが好ましい。式(i)において、p1及びq1は、それぞれ相互に独立して2又は3であることが好ましく、より好ましくは2である。一方、r1は、1～3の整数であることが好ましい。

【0050】

上記R⁸の基は、好ましくはリシン又はオルニチンの側鎖である。

【0051】

各アミノ酸残基の繰り返し数を表すa、b、c、d、及びeは、それぞれ独立して好ましくは0～300の整数、より好ましくは0～250の整数である。また、ポリアミノ酸の重合度(a+b+c+d+e)は、好ましくは10～300の整数、より好ましくは20～250の整数である。

【0052】

エチレングリコールの繰り返し数を表すkは、好ましくは40～2,000、さらに好ましくは45～1,000の整数を表す。

【0053】

上記式(III)又は(IV)に示されるポリマー複合体は、例えば、末端に官能基を有するポリエチレングリコールと所望のポリアミノ酸とをそのまま、又は必要により分子量分布を狭くするように精製した後、公知の方法によりカップリングすることによって

10

20

30

40

50

ブロックコポリマーを調製し、該ブロックコポリマーの末端の官能基を利用して、標的指向性部位を有する化合物を縮合又は付加反応させることによって形成できる。標的指向性部位の結合は、後述するミセル形成の後に行ってもよい。

【0054】

また、例えば、式(III)に示されるポリマー複合体は、末端に官能基を有し、末端にアミノ基を有するポリエチレングリコールを準備し、そのアミノ末端から -ベンジル-L-アスパルテート、 -ベンジル-L-グルタメート、N-Z-L-リシンといった保護されたアミノ酸のN-カルボン酸無水物(NCA)を重合させ、必要に応じて、得られたポリアミノ酸の側鎖に脱保護及び/又は(i)~(v)の基の導入を行うことによってブロックコポリマーを調製し、該ブロックコポリマーの末端の官能基を利用して、標的指向性部位を有する化合物を縮合又は付加反応させることによって形成できる。標的指向性部位の結合は、後述するミセル形成の後に行ってもよい。なお、カチオン性ポリアミノ酸を合成する場合、その合成過程でアミノ酸エステル残基の一部にポリアミンの求核攻撃に起因した構造変化(例えば、アミノ酸エステル残基の脱アルコールによるイミド環の形成)が生じる場合があるが、本明細書ではブロックコポリマーがこのような構造変化を経た残基を含む場合についても、上記式(III)及び(IV)に含めて取り扱うこととする。また、カチオン性アミノ酸残基における一部のNH基及びNH₂基が合成過程での酸(主に塩酸)の使用に起因して塩(主に塩酸塩)になる場合があるが、本明細書ではブロックコポリマーがこうした構造を含む場合についても、上記式(III)及び(IV)に含めて取り扱うこととする。

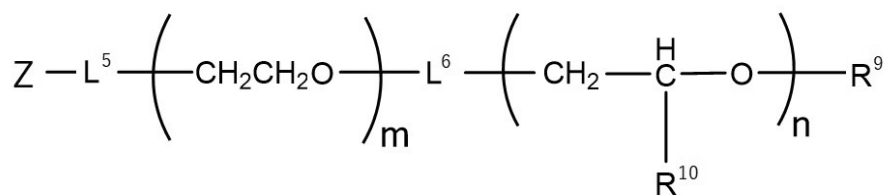
10

20

【0055】

上記ポリマー複合体の別の具体例を以下の式(V)に示す。

【化6】



(V)

30

(上記式中、

Zは、式(I)で表されるホスホコリン基を表し；

L⁵及びL⁶はそれぞれ独立して、単結合又は二価の連結基を表し；

R⁹は、水素原子、未置換又は置換された直鎖もしくは分枝の炭素数1~12のアルキル基あるいは未置換又は置換された直鎖もしくは分枝の炭素数1~24のアルキルカルボニル基を表し；

40

R¹⁰は、アルキレン基又はエステル結合を介した1級アミンを表し；

mは、5~20, 000の整数を表し；

nは、2~5, 000の整数を表す。)

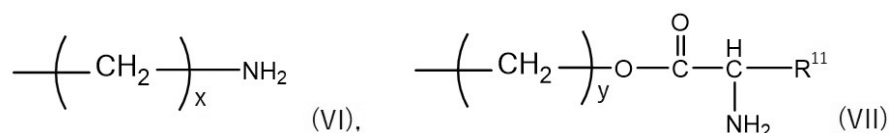
【0056】

上記R⁹については、式(III)で規定するR¹と同様の説明が適用される。

【0057】

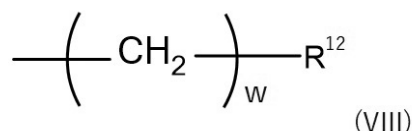
上記R¹⁰については規定されるアルキレン基又はエステル結合を介した1級アミンとしては、例えば、下記式(VI)又は(VII)に示すものが挙げられる。

【化 7】



(上記式中、R¹¹は水素原子、又は下記式(VIII))

【化 8】



(式中、R¹²は炭素数1~20の直鎖状若しくは分岐状の炭化水素基、置換基を有していてもよいフェニル基、又は置換基を有していてもよい複素環式官能基を表し、wは1~5の整数を表す。)で示される基を表し、x、yはそれぞれ独立して、1~5の整数を表す。)

【0058】

上記R¹²に関して規定される置換基を有していてもよい複素環式官能基としては、例えばインドリル環、ピロリドン基、フラン環、ピリジン環、モルホリン環、エポキシ環、プリン環、ピリミジン環等が挙げられる。

【0059】

1つの実施形態において、xは、例えば1、2又は3であり、また例えば1又は2、また例えば1であり得る。

【0060】

1つの実施形態において、yおよびwはそれぞれ独立して、例えば1、2又は3であり、また例えば1又は2、また例えば1であり得る。また、R¹²は、例えばインドリル環

【0061】

上記L⁵は、例えば、直鎖又は分岐の炭素数1~6のアルキレン基、-COO-、-CONH-、-NH-、-CO-、-O-、-S-、及びこれらの任意の組み合わせであり得る。二価の連結基の主鎖の原子数は、例えば1~20、好ましくは1~15、より好ましくは1~10とすることができる。具体例としては、-NHCOCH₂CH₂-、-CH₂CH₂NHCH₂CH₂-、-CH₂CH₂SCH₂CH₂-、-CH₂CH₂OCH₂CH₂-等が挙げられる。

【0062】

上記L⁶は、例えば、単結合又は-CH₂CH₂O-である。

【0063】

mは、好ましくは40~2,000の整数、より好ましくは45~1,000の整数を表す。また、nは、好ましくは10~300の整数、より好ましくは20~250の整数を表す。

【0064】

上記式(V)に示されるポリマー複合体は、例えば、末端に官能基を有するポリエチレングリコールを準備し、エピクロロヒドリン、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、1-アリル-2,3-エポキシプロパン、エピプロモヒドリン、3,4-エポキシ-1-ブタン、1,2-エポキシ-9-デセン、2,3-エポキシプロピルプロパルギルエーテル等のエポキシ基含有モノマーを用いたエポキシ開環重合を行って、ポリエチレングリコール

10

20

30

40

50

と、側鎖を有するポリグリシジル鎖とのブロックコポリマーを得ること、得られたブロックコポリマーの末端の官能基を利用して、標的指向性部位を有する化合物を縮合又は付加反応させること、及び、標的指向性部位が付加されたブロックコポリマーのポリグリシジル鎖の側鎖に1級アミンを導入することを含む方法によって得られ得る。

【0065】

1つの実施形態において、ポリマー複合体には、薬物が結合されていてもよい。薬物は、ブロックコポリマーの疎水性ポリマーセグメントの側鎖及び/又は末端に導入され得る。ポリマーに結合される薬物の数は、本発明の効果が得られる範囲で制限はなく、例えば1~200、好ましくは2~100とすることができる。

【0066】

薬物が結合されたポリマー複合体は、例えば、式： $Z - A^2 - B^2 (-D)$ で表される(式中、Zは、式(I)で表されるホスホコリン基を表し、 A^2 は、親水性ポリマーセグメントを表し、 B^2 は、疎水性ポリマーセグメントを表し、Dは、薬物の残基を表す)。具体例としては、上記式(III)~(V)に示されるポリマー複合体の疎水性ポリマー側鎖に薬物が結合された実施形態が挙げられる。

【0067】

例えば、ブロックコポリマーが疎水性ポリマーセグメント側鎖にカルボキシル基を有する場合(式(III)及び(IV)において、 $R^{5a} = O$ 、 $R^{6a} = H$ 及び/又は $R^{5b} = O$ 、 $R^{6b} = H$ の場合)、水酸基を有する薬物と当該カルボキシル基とを反応させることによって、ブロックコポリマーの疎水性ポリマーセグメント側鎖にエステル結合を介して薬物を結合させることができる。

【0068】

また例えば、疎水性ポリマーセグメント側鎖にエステル基を有するブロックコポリマーと、アミンである薬物との間の反応によって形成されるアミド結合又は疎水性ポリマーセグメント側鎖にカルボキシル基を有するブロックコポリマーと、アミノ基を有する薬物との間の反応によって形成されるアミド結合によって、ブロックコポリマーの疎水性ポリマーセグメント側鎖に薬物を結合させることができる。

【0069】

B-3. 生体適合性ポリマーを用いた複合体

上記薬物を担持可能な微粒子を形成し得る生体適合性ポリマーとしては、例えば、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLA)及びそれらの共重合体(PLGA)、ポリ-ε-カプロラクトン、キトサン等が挙げられる。これらのポリマーに対して、標的指向性部位は、任意の適切な部位に結合される。例えば、ポリマーの一方又は両方の末端に結合されてもよく、側鎖に導入されてもよい。ポリマーに結合される標的指向性部位の数は、本発明の効果が得られる範囲で制限はなく、1又は2以上であり得る。ポリマーと標的指向性部位との結合は、ポリマーが有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物を用いて、A項に記載の薬物と標的指向性部位との結合と同様の方法で行うことができる。

【0070】

B-4. 水溶性ポリマーを用いた複合体

上記水溶性ポリマーは、可溶化、徐放化、血中滞留性の向上、酵素分解の回避等を目的とした送達対象物の修飾に用いられる。このような水溶性ポリマーとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール及びこれらの共重合体、アルブミン等の可溶性タンパク質、多糖等が挙げられ、なかでもポリエチレングリコールが好ましく用いられ得る。

【0071】

修飾される送達対象物は、薬物であってもよく、リポソーム、ミセル、ゲル、金ナノ粒子等の薬物を担持するキャリアであってもよい。例えば、ポリエチレングリコールによる修飾(PEG修飾)は当該技術分野で周知であり、PEG化インターフェロン等のPEG化タンパク質やPEG修飾リポソームが得られ得る。

10

20

30

40

50

【0072】

上記水溶性ポリマーに対して、標的指向性部位は、任意の適切な部位に結合される。例えば、ポリマーの一方又は両方の末端に結合されてもよく、側鎖に導入されてもよい。ポリマーに結合される標的指向性部位の数（ポリマー1分子あたりの結合数）は、本発明の効果が得られる範囲で制限はなく、1又は2以上であり得る。ポリマーと標的指向性部位との結合は、ポリマーが有する官能基と結合可能な官能基と、標的指向性部位と、を有する化合物を用いて、A項に記載の薬物と標的指向性部位との結合と同様の方法で行うことができる。

【0073】

リポソーム等のキャリアを修飾する水溶性ポリマーを用いたポリマー複合体は、一方の末端に上記式(I)で表されるホスホコリン基を含む標的指向性部位を有し、他方の末端にキャリア表面と相互作用し得る基を有することが好ましい。リポソームを修飾する場合、当該ポリマー複合体は、式： $Z - E - R^X$ で表され得る（式中、Zは、式(I)で表されるホスホコリン基を表し、Eは水溶性ポリマーセグメントを表し、 R^X は、リン脂質、長鎖脂肪酸、ステロール等に由来する疎水性基を表す）。

10

【0074】

C. 薬物送達用組成物

本発明のさらに別の局面によれば、B項に記載のポリマー複合体を含む薬物送達用組成物が提供される。1つの実施形態において、薬物送達用組成物は、上記ポリマー複合体によって形成される粒子を含む。粒子の平均粒径は、用いるポリマー複合体によって変動し得るが、例えば1000nm以下、好ましくは400nm以下、200nm以下、150nm以下、100nm以下又は80nm以下であり、例えば20nm以上又は30nm以上である。当該粒子の平均粒径は、市販の動的光散乱(DLS)測定装置を用いて測定することができる。

20

【0075】

1つの実施形態において、薬物送達用組成物は、上記ポリマー複合体に加えて薬物をさらに含み得る。薬物を含むことにより、上記粒子に薬剤を担持（例えば、内包）させて、細胞内、さらにはミトコンドリア内に薬物を効率的に送達することができる。当該実施形態は、ポリマー複合体に薬物が結合されていない場合に特に有用であるが、薬物が結合されたポリマー複合体と薬物とを組み合わせることもできる。

30

【0076】

1つの実施形態において、薬物送達用組成物は、上記ポリマー複合体に加えて標的指向性部位を含まない薬物送達用ポリマーをさらに含み得る。標的指向性部位を含まない薬物送達用ポリマーとしては、上記B項に記載の公知の薬物送達用ポリマーを用いることができる。ポリマーの組合せは、目的に応じて適切に選択され得、例えば、標的指向性部位が結合されたブロックコポリマー（すなわち、B-2項に記載のポリマー複合体）と標的指向性部位が結合されていない荷電性ポリマーとを組合せて用いることができる。薬物送達用組成物中における、ポリマー複合体と標的指向性部位を含まない薬物送達用ポリマーとの含有割合（モル比）は、例えば5:95~95:5、また例えば10:90~90:10とすることができる。

40

【0077】

荷電性ポリマーと標的指向性部位とを含むポリマー複合体を用いる場合、必要により緩衝化された水溶液中で、当該荷電性ポリマーと反対の電荷を有する薬物と、当該ポリマー複合体とを混合することにより、これらが静電相互作用によって結合又は集合して粒子状のPICを形成することができる。カチオン性ポリマーの複合体とアニオン性薬物とを用いる場合、組成物中におけるアニオン性薬物由来のアニオン基のモル数(A)に対するカチオン性ポリマー由来のカチオン基のモル数(N)の比(N/A比)が、例えば1以上、好ましくは3以上、より好ましくは5~100とすることができる。一方、アニオン性ポリマーの複合体とカチオン性薬物とを用いる場合、組成物中におけるカチオン性薬物由来のカチオン基のモル数(N)に対するアニオン性ポリマー由来のアニオン基のモル数(A

50

)の比(A/N比)が、例えば1以上、好ましくは3以上、より好ましくは5~100とすることができる。

【0078】

ブロックコポリマーと標的指向性部位とを含むポリマー複合体を用いる場合、必要により緩衝化された水溶液中に当該ポリマー複合体を添加して攪拌することにより、高分子ミセルが形成され得る。あるいは、当該ポリマー複合体を有機溶媒に溶解及び混合して均一化された溶液を減圧留去してポリマーフィルムを調製し、得られたポリマーのフィルムに水を加えて混合して自己組織化させることにより、高分子ミセルが形成され得る。高分子ミセル中に薬物を内包させる場合は、薬物の存在下でミセルの形成を行えばよい。互いに反対の電荷を有するブロックコポリマーと薬物とを用いる場合における組成物中のN/A比又はA/N比は、荷電性ポリマーに関して記載したとおりである。また、必要に応じて、架橋剤を用いて、あるいは、側鎖にある官能基を利用して疎水性ポリマーセグメント間に架橋構造を形成してもよい。高分子ミセルの調製方法については、WO2007/099660、WO2007/099661、WO2010/093036、WO2012/096399、WO2014/133172、WO2015/170757等を参照することができる。

10

【0079】

生体適合性ポリマーと標的指向性部位とを含むポリマー複合体を用いる場合、水中エマルジョン溶媒拡散(ESD)法等の高分子球形晶析法、エマルジョン溶媒蒸発法、相分離法、相転移法等によって薬物を担持した粒子を形成することができる。

20

【0080】

水溶性ポリマーと標的指向性部位とを含むポリマー複合体を用いる場合、必要により緩衝化された水溶液中で、キャリアと混合することにより、表面がポリマー複合体で修飾されたキャリアが得られ得る。キャリアには、予め薬物を内包させておくことができる。例えば、リポソームは、代表的には、リン脂質の2分子膜によって形成される小胞であり、当業者であれば適宜調製することができ、薬物を内包させることも可能である。

【0081】

D. 薬物複合体又は薬物送達用組成物の使用方法

上記薬物複合体又は薬物送達用組成物は、薬物の投与を必要とする個体に対して投与される。1つの実施形態において、薬物は、細胞内に取り込まれることが所望される薬物であり、好ましくはミトコンドリアに送達されること所望される薬物である。

30

【0082】

投与対象の個体としては、例えばヒト又はヒト以外の哺乳動物が挙げられる。投与方法は、経口投与であってもよく、非経口投与であってもよい。好ましくは、非経口投与であり、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、腹腔内投与、髄腔内投与等が例示できる。

【0083】

本発明の薬物複合体又は薬物送達用組成物によれば、薬物を効率的に細胞内に送達し、さらには、ミトコンドリアに局在させることができる。

【0084】

E. 標的指向性を有する化合物の製造方法

本発明の別の局面によれば、送達対象化合物と、式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物と、を結合させる工程を含む、標的指向性を有する化合物の製造方法が提供される。送達対象化合物に付与される標的指向性は、細胞内への指向性であり、より具体的にはミトコンドリア内への指向性である。

40

【0085】

送達対象化合物としては、薬物又は薬物送達用ポリマーが挙げられる。これらの具体例としては、それぞれA項に記載の薬物及びB項に記載の公知の薬物送達用ポリマーを挙げることができる。

【0086】

送達対象化合物と、式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物と、を結合させ

50

る方法としては、任意の適切な方法が選択され得る。例えば、送達対象化合物が有する官能基と反応可能な官能基と、式(Ⅰ)で表されるホスホコリン基と、を有する化合物を選択し、当該化合物の官能基と送達対象化合物の官能基とを反応させる方法が用いられ得る。このような化合物の具体例としては、A項に記載の薬物複合体の製造に用いられるホスホコリン基含有化合物が挙げられる。

【0087】

F. 送達対象物にミトコンドリアへの指向性を付与する方法

本発明の別の局面によれば、送達対象物を上記式(Ⅰ)で表されるホスホコリン基を含む標的指向性部位で修飾することを含む、送達対象物に細胞又はミトコンドリアへの指向性を付与する方法が提供される。

10

【0088】

送達対象物は、薬物であってもよく、薬物を担持するキャリアであってもよい。薬物を担持するキャリアとしては、DDSに適用可能であれば、制限はなく、リポソーム、高分子ミセル、ポリオンコンプレックス、ポリプレックス、リボプレックス、リボポリプレックス、無機金属粒子、脂質ナノ粒子、ゲル等が挙げられる。これらのキャリアは、DDS分野において広く知られており、当業者によって容易に調製され得る。

【0089】

上記キャリアを上記式(Ⅰ)で表されるホスホコリン基を含む標的指向性部位で修飾する方法としては、キャリア表面に式(Ⅰ)で表されるホスホコリン基を含む標的指向性部位を結合させることが挙げられる。この場合、結合は、共有結合に限定されず、静電相互作用、疎水的相互作用等の分子間力に起因する非共有結合であってもよい。薬物を修飾する方法は、A項に記載のとおりである。

20

【0090】

共有結合によるキャリアの修飾は、例えば、予めキャリアの構成要素に標的指向性部位を結合しておき、当該標的指向性部位が結合された構成要素を用いてキャリアを形成する方法、又は、官能基を有する構成要素を用いて当該官能基がキャリア表面に露出するようにキャリアを形成した後に、当該官能基と反応し得る官能基と標的指向性部位とを有する化合物と反応させる方法によって行われ得る。前者の具体例としては、例えば、B項に記載のポリマー複合体を用いてキャリアを形成する方法、より具体的には、B-2項に記載のポリマー複合体を用いて高分子ミセルを形成する方法が挙げられる。後者の具体例としては、親水性ポリマーセグメントと疎水性ポリマーセグメントとを含み、親水性ポリマーセグメント側の末端に官能基(ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、チオール基、マレイミド基等)を有するブロックコポリマーを用いて高分子ミセルを形成し、次いで、当該官能基と反応し得る官能基と標的指向性部位とを有する化合物と反応させる方法が挙げられる。

30

【0091】

非共有結合によるキャリアの修飾は、例えば、キャリアを形成した後に、該キャリアをその表面と相互作用し得る基と標的指向性部位とを有する化合物と相互作用させることによって行われ得る。具体例としては、帯電性のキャリア(例えば、帯電性のリポソーム、ポリオンコンプレックス)を形成し、当該キャリアと反対の電荷を有する荷電基と標的指向性部位とを有する化合物(例えば、一方の末端に荷電基を有し、他方の末端にホスホコリン基を有するB-4項に記載のポリマー複合体)を静電結合させる方法、疎水性表面を有するキャリア(例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子、リボプレックス)を形成し、疎水性基と標的指向性部位とを有する化合物(例えば、一方の末端に疎水性基を有し、他方の末端にホスホコリン基を有するPEG)を、当該疎水性基をアンカーとしてキャリア表面に固定する方法等が挙げられる。

40

【0092】

上記方法によれば、ホスホコリン基を含む標的指向性部位を表面に有するDDSキャリアが得られ得る。

【0093】

50

G. 検出試薬

本発明のさらに別の局面によれば、標的指向性部位を含み、標識物質によって標識化された検出試薬であって、該標的指向性部位が、上記式(I)で表されるホスホコリン基を含む、検出試薬が提供される。上記式(I)で表されるホスホコリン基は、ミトコンドリアへの指向性を発揮することから、上記検出試薬を用いることにより、細胞又は個体におけるミトコンドリアの観察を好適に行うことができる。

【0094】

標識物質としては、目的に応じて、任意の適切な標識が用いられ得る。具体的には、蛍光標識、発光物質標識、放射標識、酵素標識等が好ましく例示できる。蛍光標識としては、蛍光色素、例えば、Alexa化合物、Cy3、Cy5、フィコエチニン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、FITC、ローダミン、ランタニド等、もしくはこれらの蛍光色素の誘導体、又は、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)等もしくはその変異体を利用することができる。また、発光物質による標識の場合には、ルミノール、フルオロセイン、ローダミンB等の化学発光物質、ルシフェリン、イオクリン等の生物発光物質を用いてもよい。放射標識の場合には、放射性同位元素、例えば、 ^{33}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{131}I 等を利用することができる。酵素を用いて標識する場合には、ガラクトシダーゼ、 α -ラクタマーゼ、GUS、カラシペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ又はルシフェラーゼ等を用いることができる。

10

【0095】

検出試薬は、例えば、標識物質と、式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物とを結合させることによって得られ得る。また例えば、検出試薬は、標識物質と、式(I)で表されるホスホコリン基を有する化合物とをそれぞれ、ポリマー、金属粒子等の他の担体に結合させることによって得られ得る。

20

【実施例】

【0096】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。なお、以下の実施例の記載において、ホスホコリン基を「PC」と略記する場合がある。

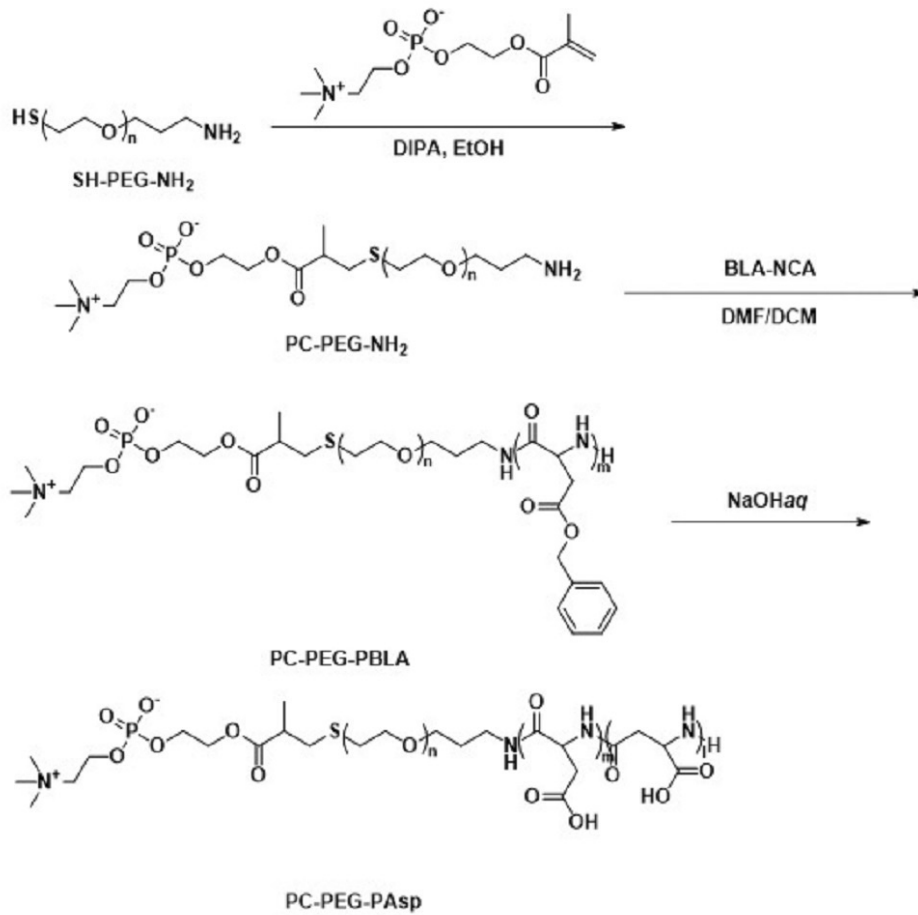
【0097】

[製造例1] PC-PEG-PAspの合成

以下に示すスキームに従って、PC-PEG-PAspを合成した。

30

【化9】



10

20

【0098】

まず、SH-PEG-NH₂ (分子量：10 kDa) をエタノール (20 mg/mL) に溶解し、2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリン (MPC、10当量) を加えた。15分間のアルゴンバブリング後に、ジイソプロピルアミン (DIPA、10当量) を加え、30度で48時間反応した。エタノールを減圧乾燥で取り除き、ポリマーを純水に溶解させ、純水に対する透析 (MWCO：3,500) 後に凍結乾燥によりPC-PEG-NH₂を得た。重クロロホルム中での¹H-NMRからPCの導入率が98%であることが確認された。

30

【0099】

次に、PC-PEG-NH₂を開始剤とするNCA重合法によりPC-PEG-PBLAを合成した。具体的には、PC-PEG-NH₂をジクロロメタン (DCM、67 mg/mL) に溶解し、DCMとN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) との混合溶媒 (DCM：DMF = 10：1、67 mg/mL) に溶解した。ベンジル-L-アスパラギン酸-N-カルボン酸無水物 (BLA-NCA、100当量) を加え、35度で3日間反応した。反応溶液を過剰量のジエチルエーテルに加え、減圧乾燥することによりPC-PEG-PBLAを得た。重DMSO中での¹H-NMRから、PBLA鎖の重合度が76であることが確認された。

40

【0100】

最後に、PC-PEG-PBLAのPBLA鎖の側鎖構造のベンジルエステルを脱保護することによりPC-PEG-PAspを合成した。具体的には、PC-PEG-PBLAに水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 M、380当量) を加え、室温で1時間反応した。純水に対する透析 (MWCO：6,000 - 8,000) 後の凍結乾燥によりPC-PE

50

G - P A s pを得た。重水中での¹H - NMRから、ベンジル基が完全に脱保護されていることが確認された。末端がメトキシ基であり、P Cがついていないコントロールのポリマー (Me O - P E G - P A s p) についてもMe O - P E G - N H₂を開始剤とするN C A重合法及びベンジルエステルの脱保護により同様に合成した。

【 0 1 0 1 】

[製造例 2] H o m o - P (A s p - A P) の合成

N - ブチルアミンを開始剤とするN C A重合法によりH o m o - P B L Aを合成した。具体的には、N - ブチルアミンに、D C MとD M Fの混合溶媒 (D C M : D M F = 1 0 : 1、6 7 m g / m L) に溶解したB L A - N C A (1 0 0 当量) を加え、3 5 度で3 日間反応した。反応溶液を過剰量のジエチルエーテルに加え、減圧乾燥することによりH o m o - P B L Aを得た。重D M S O中での¹H - NMRから、P B L A鎖の重合度が6 5 であることが確認された。

10

【 0 1 0 2 】

次に、H o m o - P B L Aの側鎖構造のベンジルエステルのアミノリシス反応によりH o m o - P (A s p - A P) を合成した。具体的には、H o m o - P B L AをD C M (4 0 m g / m L) に溶解し、ベンゼン (4 m g / m L) を加えて凍結乾燥した。ポリマーをN - メチル - 2 - ピロリドン (N M P) に溶解し、N M P中のジアミノペンタン (D A P、6、5 0 0 当量) に加え、1 2 度で1 時間反応した。塩酸による中和後に純水に対する透析 (M W C O : 3、5 0 0) を行い、凍結乾燥によりH o m o - P (A s p - A P) が得られた。重水中での¹H - NMRから、ベンジル基が完全に脱保護され、アミノペンタンが導入されたことが確認された。なお、必要に応じて、得られたH o m o - P (A s p - A P) にC y 5 又はC y 3 蛍光標識を付したものを実験に用いた。

20

【 0 1 0 3 】

[製造例 3] ポリオンコンプレックス (P I C) ミセルの調製

P C - P E G - P A s pとH o m o - P (A s p - A P) をそれぞれ、1 0 m Mリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) に溶解し、P A s p鎖のカルボキシル基とP (A s p - A P) 鎖の1 級アミンのモル比が1 になるように混合してP C搭載P I Cミセルを調製した。また、コントロールのP I Cミセルとして、P C - P E G - P A s pの代わりにコントロールのポリマー (Me O - P E G - P A s p) を用いたこと以外は上記と同様にして、非P C搭載P I Cミセルを調製した。次に、P I CミセルにP A s pのカルボキシル基に対して1 0 当量の1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (E D C) を添加し、室温で1 晩反応した。限外ろ過法 (M W C O : 1 0 0、0 0 0) により精製し、E D C架橋後のP I Cミセルのサイズ及び多分散度 (P D I) を動的な光散乱 (D L S) 法により測定した。また、P I Cミセルのゼータ電位を電気泳動光散乱 (E L S) 法により測定した。結果を表 1 に示す。

30

【 0 1 0 4 】

【 表 1 】

	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
P C搭載P I Cミセル	46	0.06	0.713
非P C搭載P I Cミセル	42	0.06	-0.121

40

【 0 1 0 5 】

P C搭載P I Cミセルの細胞取り込み試験

ヒトすい臓がん細胞 (B x P C 3) を9 6 ウェルプレートに播種 (5、0 0 0 c e l l s / w e l l、培地 : 1 0 0 μ L) した。2 4 時間後に培地を交換し、C y 5 で蛍光標識

50

したPC搭載PICミセルとCy3で蛍光標識したコントロールの非PC搭載PICミセルを添加(Cy3及びCy5の蛍光強度: 1, 000)した。1、6、24時間後にPBSにより洗浄し、ヘキストによる核染色を行った。Cy5、Cy3及びヘキスト由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡法により測定し、蛍光強度をImageJにより定量した。

【0106】

PC搭載PICミセルの細胞取り込みの競合試験

2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリン(MPC)を用いてPC搭載PICミセルの細胞取り込みの競合試験を行った。具体的には、ヒトすい臓がん細胞(BxPC3)を96ウェルプレートに播種(5,000 cells/well、培地: 100 µL)した。24時間後に培地を交換し、Cy5で蛍光標識したPC搭載PICミセルとCy3で蛍光標識したコントロールのPICミセルとを添加(Cy3及びCy5の蛍光強度: 1, 000)し、競合実験群についてはMPC溶液(PBS、10 mM)を添加した。1、6、24時間後にPBSにより洗浄し、ヘキストによる核染色を行った。Cy5、Cy3及びヘキスト由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡法により測定し、蛍光強度をImageJにより定量した。

10

【0107】

PC搭載PICミセルの細胞取り込みの阻害試験

MPC溶液(PBS、10 mM)の代わりにリン脂質転送タンパク質(phospholipid transfer protein (PLTP))の阻害剤であるチメロサル溶液(PBS、10 nM)を添加したこと以外は上記競合試験と同様にして、PC搭載PICミセルの細胞取り込みの阻害実験を行った。

20

【0108】

上記PICミセルの細胞取り込み試験、競合試験及び阻害試験の結果を図1にまとめて示す。

【0109】

図1に示すとおり、PC搭載PICミセルを単独で添加した実験群は、非PC搭載PICミセルを添加した実験群よりも顕著に高い蛍光強度を示し、このことから、細胞取り込み量が増大されたことがわかる。また、MPCを添加した実験群及びチメロサルを添加した実験群では、このような細胞取り込み量の増大が抑制されていることから、当該細胞取り込み量の増大がPCと細胞表面のPLTPとの相互作用によってエンドサイトーシスが増大したことによるものであることが示唆される。

30

【0110】

ミトコンドリア染色によるPC搭載PICミセルの細胞内分布の評価

ヒトすい臓がん細胞(BxPC3)を96ウェルプレートに播種(5,000 cells/well、培地: 100 µL)した。24時間後に培地を交換し、製品名「Cell Light Mitochondria - GFP」(2 µL/well)によりミトコンドリアを染色した。24時間後にCy5で蛍光標識したPC搭載PICミセルとCy3で蛍光標識した非PC搭載PICミセルとを添加(Cy3及びCy5の蛍光強度: 1, 000)し、製品名「Cell Light Mitochondria - GFP」(2 µL/well)をさらに添加した。1、6、24時間後にPBSにより洗浄し、ヘキストによる核染色を行った。Cy5、Cy3、GFP及びヘキスト由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡法により測定し、Cy5とGFP又はCy3とGFPの共局在比(ミトコンドリア全量に対するミセルと共局在しているミトコンドリアの比率)をそれぞれImageJにより定量した。結果を図2に示す。

40

【0111】

図2に示すとおり、PC搭載PICミセルは、コントロールの非PC搭載PICミセルよりも数倍高い共局在比でミトコンドリア内に局在化していた。

【0112】

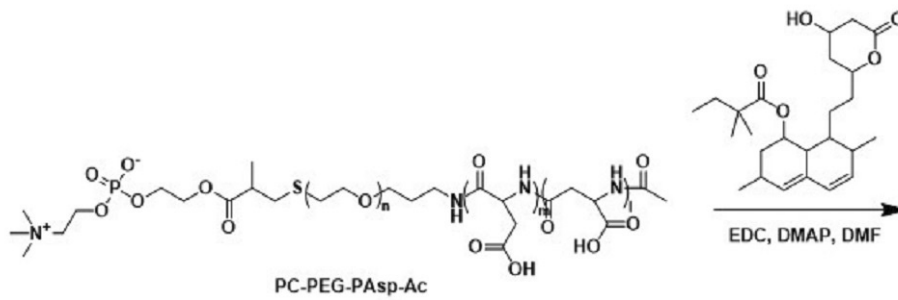
[製造例4] PC-PEG-P(Asp-simvastatin)の合成

以下に示すスキームに従って、PC-PEG-P(Asp-simvastatin)

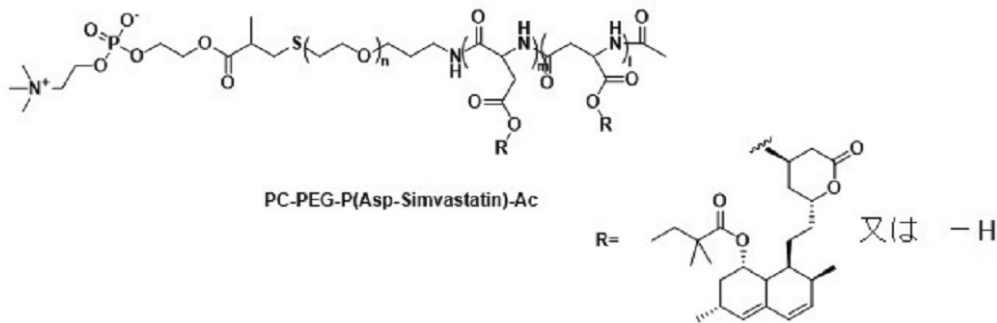
50

を合成した。

【化 1 0】



10



20

【 0 1 1 3】

具体的には、PC-PEG-P(Asp)-Acを10mM LiClを含むDMF(10mg/mL)に溶解し、EDC(345当量)、ジメチルアミノピリジン(DMAP、345当量)及びシンバスタチン(345当量)を添加した。室温で24時間反応後、過剰量のジエチルエーテルに添加し、減圧乾燥によりPC-PEG-P(Asp-simvastatin)-Acを得た。重DMF中での¹H-NMRよりシンバスタチンの導入率を算出したところ86%であった。結果を表2に示す。

30

また、PC-PEG-P(Asp)の代わりにMeO-PEG-P(Asp)を用いたこと以外は上記と同様にして、PCのついていないシンバスタチン結合ポリマー(MeO-PEG-P(Asp-simvastatin)-Ac)を得た。

【 0 1 1 4】

[製造例5] PC搭載シンバスタチン内包ミセルの調製

PC-PEG-P(Asp-simvastatin)-Acをメタノール(10mg/mL)に溶解し、メタノールを減圧乾燥により取り除いてポリマー薄膜を得た。得られたポリマー薄膜に純水(1mg/mL)を添加し、室温で30分間超音波処理によりミセル化してPC搭載シンバスタチン内包ミセルを調製した。また、PC-PEG-P(Asp-simvastatin)-Acの代わりにMeO-PEG-P(Asp-simvastatin)-Acを用いたこと以外は上記と同様にして、非PC搭載シンバスタチン内包ミセルを調製した。フィルターによる精製後にミセルのサイズ及びPDIをDLS法により測定し、ミセルのゼータ電位をELS法により測定した。結果を表2に示す。

40

【 0 1 1 5】

【表 2】

	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	シンバスタチン導入率 (mg シンバスタチン/ mg ポリマー)
PC搭載シンバスタチン 内包ミセル	39	0.23	-1.69	1.4
非PC搭載シンバスタチン 内包ミセル	35	0.20	-0.49	1.2

10

【0116】

PC搭載シンバスタチン内包ミセルの毒性試験

ヒトすい臓がん細胞 (BxPC3) を 96 ウェルプレートに播種 (5,000 cells/well、培地: 100 μ L) した。24 時間後に培地を交換し、PC搭載シンバスタチン内包ミセル溶液、非PC搭載シンバスタチン内包ミセル溶液又はシンバスタチン溶液を添加した。48 時間後に PBS により洗浄し、Cell Counting Kit-8 (CCK-8、10 μ L/well) を添加した。30 分後にプレートリーダーにより吸光度を測定し、細胞生存率及び IC₅₀ を算出した。結果を図 3 に示す。

20

【0117】

図 3 に示すとおり、PC搭載シンバスタチン内包ミセル溶液は、シンバスタチン溶液よりも顕著に低く、非PC搭載シンバスタチン内包ミセル溶液よりもやや高い細胞毒性を示した。このことから、ミセル化によってシンバスタチンの細胞障害性が顕著に抑制されること、及び、PCの付加に起因する細胞取り込みの増大によってミセル化されていてもシンバスタチンの細胞障害性を発揮できることがわかる。

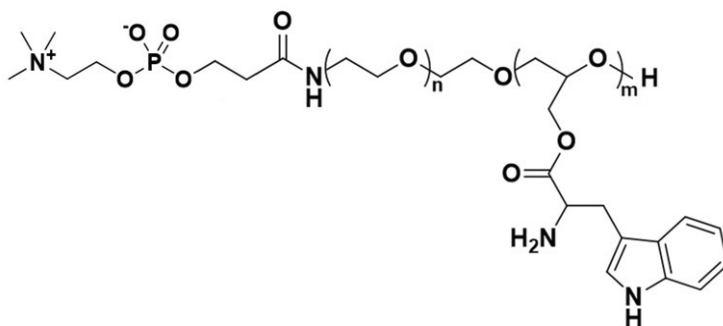
【0118】

[製造例 6] PC-PEG-PGTrp の合成

以下に示す PC-PEG-PGTrp を合成した。具体的な手順は以下のとおりである。

30

【化 11】



40

NH₂-PEG-poly(Glycerol) (PEG分子量: 12 kDa、Glycerol重合度: 80) を純水 (30 mg/mL) に溶解し、MPC (10 当量)、EDC (10 当量)、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS-OH、10 当量) を加えた。室温で 24 時間の反応後、純水に対する透析 (MWCO: 6,000 - 8,000) を行い、凍結乾燥により PC-PEG-poly(Glycerol) を得た。重水中での ¹H-NMR より PC の導入率を算出したところ、73% であった。

【0119】

PC-PEG-poly(Glycerol) を DMF (10 mg/mL) に溶解し、

50

Fmoc-NH-tryptophan-OH (810当量)、EDC (810当量) 及びDMAP (810当量) を添加した。室温で24時間の反応後に、過剰量のジエチルエーテルに添加し、減圧乾燥によりPC-PEG-P (Glycidyl Tryptophan (Fmoc)) を得た。重DMSO中での¹H-NMRよりFmoc-NH-tryptophan-OHの導入率を算出したところ、88%であった。

【0120】

PC-PEG-poly (Glycidyl Tryptophan (Fmoc)) を20%のピペリジンを含むDMF (10mg/mL) に溶解し、室温で24時間反応した。反応後に過剰量のジエチルエーテルに添加し、減圧乾燥によりPC-PEG-PGTrpを得た。重水中での¹H-NMRよりFmoc基の脱保護を確認した。また、PC-PEG-poly (Glycerol) の代わりにMeO-PEG-poly (Glycerol) を用いたこと以外は上記と同様に、PCのついていないポリマー (MeO-PEG-PGTrp) を得た。

10

【0121】

[製造例7] PC搭載mRNAミセルの調製

PC-PEG-PGTrpとmRNA (Gaussia luciferase (GLuc)) を10mM HEPES緩衝液 (pH7.3) に溶解し、PGTrp鎖の1級アミン (N) とmRNA中のリン酸基 (P) のモル比 (N/P) が3になるように混合し、PC搭載mRNAミセルを調製した。また、PC-PEG-PGTrpの代わりにMeO-PEG-PGTrpを用いたこと以外は上記と同様に、非PC搭載mRNAミセルを調製した。mRNAミセルのサイズ及びPDIをDLS法により測定した。また、ミセル1つあたりのmRNA分子の会合数を蛍光相関分光 (FCS) 法により測定した。結果を表3に示す。

20

【0122】

【表3】

	サイズ (nm)	PDI	mRNAの 会合数
PC搭載mRNAミセル	54	0.17	1.9
非PC搭載mRNAミセル	59	0.18	1.9

30

【0123】

PC搭載mRNAミセルの遺伝子発現効率

ヒトすい臓がん細胞 (BxPC3) を96ウェルプレートに播種 (5,000 cells/well) した。24時間後に培地を交換し、GLuc mRNAミセル溶液 (50µg/well) を添加した。24時間後に上清をプレートに添加し、ルシフェリン添加後に発光強度をルミノメーターにより測定した。結果を図4に示す。

【0124】

40

図4に示すとおり、PC搭載mRNAミセルは、非PC搭載mRNAミセルよりも有意に高い遺伝子発現効率を示した。PCの付加に起因する細胞取り込みの増大によって遺伝子発現効率も増大したことが示唆される。

【0125】

[製造例8] アルブミンPCコンジュゲートの合成

Alexa647修飾アルブミンを10mMリン酸緩衝液 (pH7.4, 5mg/mL) に溶解し、100mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP, 1mL) を添加した。室温で30分の反応後にMPC (350当量) とDIPA (350当量) を添加し、室温で48時間反応した。反応後に限外ろ過法 (MWC0:3,000) により精製し、アルブミンへのPCの導入を行った。イールマン試薬によるチオール基の定

50

量から、アルブミン 1 分子あたりに導入された PC は 10 分子であった。

【0126】

アルブミン PC コンジュゲートの細胞取り込み試験

ヒトすい臓がん細胞 (BxPC3) を 96 ウェルプレートに播種 (5,000 cells/well) した。24 時間後に培地を交換し、Alexa647 修飾アルブミン PC コンジュゲート溶液を添加した。また、コントロール群には、Alexa647 修飾アルブミンを添加した。6、24 時間後に PBS により洗浄し、ヘキストによる核染色を行った。Alexa647 及びヘキスト由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡法により測定し、蛍光強度を ImageJ により定量した。結果を図 5 に示す。

【0127】

図 5 に示すとおり、アルブミン PC コンジュゲートを添加した実験群は、アルブミン単体を添加した実験群よりも顕著に高い蛍光強度を示した。このことから、アルブミン PC コンジュゲートの細胞取り込みが増大したことがわかる。

【0128】

ミトコンドリア染色によるアルブミン PC コンジュゲートの細胞内分布の評価

ヒトすい臓がん細胞 (BxPC3) を 96 ウェルプレートに播種 (5,000 cells/well、培地: 100 μ L) した。24 時間後に培地を交換し、製品名「Cell Light Mitochondria - GFP」(2 μ L/well) によりミトコンドリアを染色した。24 時間後に Alexa647 修飾アルブミン PC コンジュゲート溶液又は Alexa647 修飾アルブミン (コントロール) を添加 (蛍光強度: 1,000) し、製品名「Cell Light Mitochondria - GFP」(2 μ L/well) をさらに添加した。6、24 時間後に PBS により洗浄し、ヘキストによる核染色を行った。Alexa647、GFP 及びヘキスト由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡法により測定し、Alexa647 と GFP の共局在比をそれぞれ ImageJ により定量した。結果を図 6 に示す。

【0129】

図 6 に示すとおり、アルブミン PC コンジュゲートは、アルブミン単体よりも高い共局在比でミトコンドリア内に局在化していた。このことから、PC を薬物に結合することにより、薬物をミトコンドリア内に効率的に送達できることがわかる。

【0130】

[製造例 9] PC 搭載金ナノ粒子の調製

PC-PEG-lipoic acid の合成

製造例 1 と同様の方法で調製した PC-PEG-NH₂ (10 kDa, 30 mg) を DMSO (4 mL) に溶解し、 ω -リポ酸 (20 当量, 12 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (20 当量, 12 mg)、N-ヒドロキシスクシンイミド (20 当量, 7 mg) を添加し、35 度で 1 晩攪拌した。その後、反応溶液を透析用パック (MWCO: 3,500 Da) に入れて純水に対して 1 晩透析を行った。凍結乾燥後に得られたポリマーを重クロロホルム中の ¹H-NMR により、ポリマーへの ω -リポ酸の導入率が 77% であることが確認された。

【0131】

PC 搭載金ナノ粒子の調製

金ナノ粒子 (4.0 $\times 10^{11}$ particles/mL、溶液: 50 μ L) に PC-PEG-lipoic acid 溶液 (0.01 mg/mL, PBS, 17 μ L) を添加し、常温で 1 晩反応した。その後、フィルター (ポアサイズ: 220 nm) により不純物を除き、動的光散乱法 (DLS) によりサイズおよび多分散度を測定したところ、86 nm (PDI = 0.17) であった。

【0132】

PC 搭載金ナノ粒子のミトコンドリア移行の確認

BxPC3 細胞 (ヒトすい臓がん細胞) を 6 ウェルプレートに播種した (1 $\times 10^6$ cells/well、培地: 2 mL)。24 時間後に上記の手順で作製した PC 搭載金

10

20

30

40

50

ナノ粒子を各ウェルに 1×10^{10} 個ずつ (2 mL) 添加し、24 時間インキュベートした (PC 搭載金ナノ粒子数は、動的光散乱法 (DLS) により測定した)。細胞をトリプシン処理して、遠心にて回収し、前固定液 (4% パラホルムアルデヒド、0.1 M PBS、25% グルタルアルデヒドの 5:4:1 の混合溶液) を用いた前固定および後固定液 (2% オスミウム酸、0.1 PBS の 1:1 混合液) を用いた後固定を行った。次いで、上昇エタノール脱水を行い、エポン樹脂で包埋した後、ダイヤモンドカッターで $1 \mu\text{m}$ の厚さに切断することにより、超薄切片を作製した。得られた超薄切片に対して、ウラン染色液 (酢酸ウラン, 50% アルコール溶液) を用いた染色、次いで、レイノルズ鉛染色液 (硝酸鉛 2.66 g、クエン酸ナトリウム 3.52 g、1 M NaOH 16 mL) を用いた染色を各 10 分を行い、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察に供した。TEM 観察画像を図 7 に示す。

10

【0133】

図 7 (a) は、B x PC3 細胞の断面画像であり、図 7 (b) は図 7 (a) 中の四角で囲まれた部分の拡大画像であり、その中央部にミトコンドリアが撮像されている。図 7 (b) に示されるとおり、ミトコンドリア内部には、PC 基が結合した金ナノ粒子に基づく黒点が観察でき、このことから、PC 搭載金ナノ粒子は細胞内に取り込まれた後、ミトコンドリア内に移行したことが確認された。

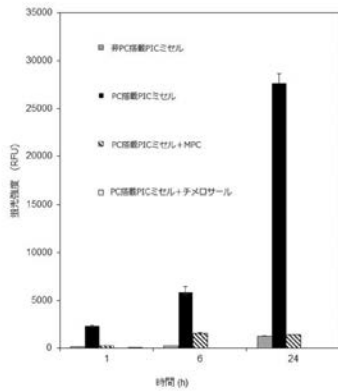
【産業上の利用可能性】

【0134】

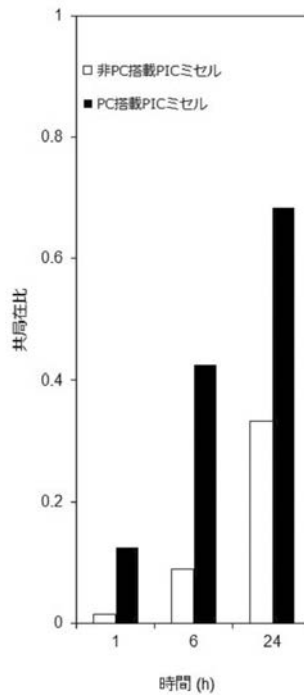
本発明は、例えば、DDS 分野において好適に用いられ得る。

20

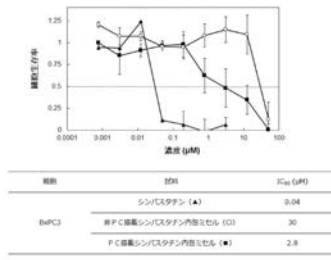
【図 1】



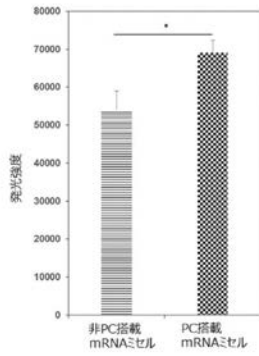
【図 2】



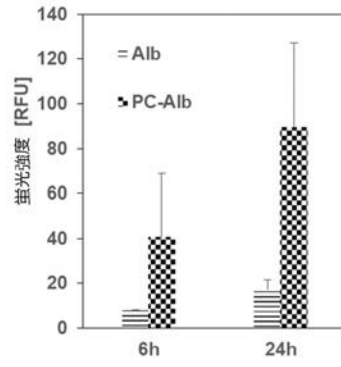
【 図 3 】



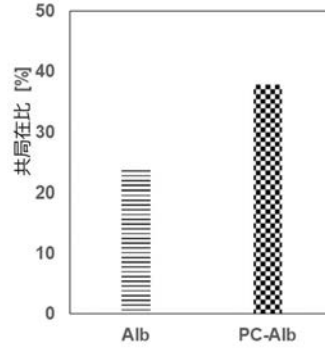
【 図 4 】



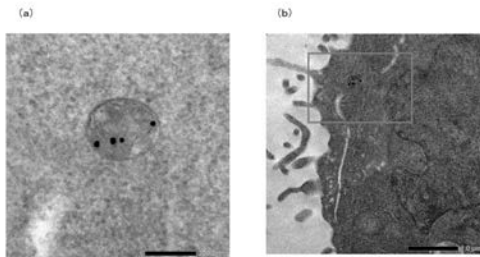
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/047917
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/69(2017.01)i FI: A61K47/54; A61K47/60; A61K47/64; A61K47/69 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) A61K47/54; A61K47/60; A61K47/64; A61K47/69 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-509976 A (AMUR RESEARCH CORP.) 29.09.1998 (1998-09-29) claims, pp. 6-7, examples, etc.	1, 3, 8, 10, 11
X	LEWIS, A. L, "PC Technology as a platform for drug delivery: from combination to conjugation", Expert Opin Drug Deliv, 2006, vol. 3, no. 2, pp. 289-98, ISSN 1742-5247, abstract, figures, pp. 4-8, etc. abstract, figures, pp. 4-8, etc.	1-11
X	MINNEUI, C. et al., "A Poloxamer-407 modified liposome encapsulating epigallocatechin-3-gallate in the presence of magnesium: Characterization and protective effect against oxidative damage", Int J Pharm, 01 December 2018, vol. 552, pp. 225-34, ISSN 0378-5173, abstract, figures, etc. abstract, figures, etc.	1-11
<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 27 February 2020 (27.02.2020)		Date of mailing of the international search report 10 March 2020 (10.03.2020)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/047917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DING, K. et al., "Folate ligand Orientation Optimized during Cell Membrane Mimetic Micelle Formation for Enhanced Tumor Cell Targeting", <i>Langmuir</i> , 09 July 2018, vol. 35, pp. 1257-65, ISSN 1520-5827, abstract, figures, etc. abstract, figures, etc.	1-11
X	ZHUNSUK, P. O. et al., "Gold Nanorods Stabilized by Biocompatible and multifunctional Zwitterionic Copolymer for Synergistic Cancer Therapy", <i>Mol Pharm</i> , 02 June 2018, vol. 15, pp. 164-74, ISSN 1543-8384, abstract, figures, etc. abstract, figures, etc.	1-11
X	LU, L. et al., "Liposomes assembled from dimeric retinoic acid phospholipid 11th improved pharmacokinetic properties", <i>Eur J Pharm Sci</i> , 15 June 2018, vol. 112, pp. 186-94, ISSN 0928-0987, abstract, figures, etc. abstract, figures, etc.	1-11
X	OU, H. et al., "Surface-adaptive zwitterionic nanoparticles for prolonged blood circulation time and enhanced cellular uptake in tumor cells", <i>Acta Biomater</i> , 01 June 2018, vol. 65, pp. 339-48, ISSN 1742-7061, abstract, schemes, figures, etc. abstract, schemes, figures, etc.	1-11
X	NANG, W. et al., "Tailor-Made a PH-Responsive Poly(choline phosphate) Prodrug as a Drug Delivery System for Rapid Cellular Internalization", <i>Biomacromolecules</i> , 2016, vol. 17, pp. 2223-32, ISSN 1525-7797, abstract, schemes, figures, etc. abstract, schemes, figures, etc.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/047917

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 10-509976 A	29 Sep. 1998	US 5703063 A claims, columns 3-4, examples, etc. WO 1996/016680 A1 EP 796112 A1	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2019/047917

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/69(2017.01)i FI: A61K47/54; A61K47/60; A61K47/64; A61K47/69		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) A61K47/54; A61K47/60; A61K47/64; A61K47/69		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 10-509976 A (アムール リサーチ コーポレーション) 29,09,1998 (1998-09-29) 特許請求の範囲、第6-7頁、実施例、等	1, 3, 8, 10, 11
X	LEWIS, A.L., PC Technology as a platform for drug delivery: from combination to conjugation, Expert Opin Drug Deliv, 2006, Vol. 3, No. 2, p. 289-98, ISSN 1742-5247, Abstract, Figures, 第4-8項、等 Abstract, Figures, 第4-8項、等	1-11
X	MINNELLI, C. et al., A Poloxamer-407 modified liposome encapsulating epigallocatechin-3-gallate in the presence of magnesium: Characterization and protective effect against oxidative damage, Int J Pharm, 2018.12.01, Vol. 552, p. 225-34, ISSN 0378-5173, Abstract, Figures, 等 Abstract, Figures, 等	1-11
X	DING, K. et al., Folate Ligand Orientation Optimized during Cell Membrane Mimetic Micelle Formation for Enhanced Tumor Cell Targeting, Langmuir, 2018.07.09, Vol. 35, p.1257-65, ISSN 1520-5827, Abstract, Figures, 等 Abstract, Figures, 等	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。
* 引用文献のカテゴリー "A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの "E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの "L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) "O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 "P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの "X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの "Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの "&" 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 27.02.2020	国際調査報告の発送日 10.03.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 (特許庁審査官) 伊藤 基章 4C 4146 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2019/047917

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KHUNSUK, P.O. et al., Gold Nanorods Stabilized by Biocompatible and Multifunctional Zwitterionic Copolymer for Synergistic Cancer Therapy, Mol Pharm, 2018.06.02, Vol. 15, p.164-74, ISSN 1543-8384, Abstract, Figures, 等 Abstract, Figures, 等	1-11
X	LU, L. et al., Liposomes assembled from dimeric retinoic acid phospholipid with improved pharmacokinetic properties, Eur J Pharm Sci, 2018.06.15, Vol. 112, p. 186-94, ISSN 0928-0987, Abstract, Figures, 等 Abstract, Figures, 等	1-11
X	OU, H. et al., Surface-adaptive zwitterionic nanoparticles for prolonged blood circulation time and enhanced cellular uptake in tumor cells, Acta Biomater, 2018.06.01, Vol. 65, p. 339-48, ISSN 1742-7061, Abstract, Schemes, Figures, 等 Abstract, Schemes, Figures, 等	1-11
X	WANG, W. et al., Tailor-Made a PH-Responsive Poly(choline phosphate) Prodrug as a Drug Delivery System for Rapid Cellular Internalization, Biomacromolecules, 2016, Vol. 17, p. 2223-32, ISSN 1525-7797, Abstract, Schemes, Figures, 等 Abstract, Schemes, Figures, 等	1-11

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2019/047917

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 10-509976 A	29.09.1998	US 5703063 A Claims、第3-4 欄、Examples、等	
		WO 1996/016680 A1	
		EP 796112 A1	

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 31/366 (2006.01)	A 6 1 K 31/366	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	

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

(出願人による申告) 平成 29 年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、次世代がん医療創生研究事業「難治性がん治療のための薬剤搭載ナノ DDS の開発」、産業技術力強化法第 17 条の適用を受ける特許出願

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA13 NA14
4C086 AA01 AA02 BA17 MA01 MA04 MA66 NA13 NA14 ZC35

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