

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7211603号
(P7211603)

(45)発行日 令和5年1月24日(2023.1.24)

(24)登録日 令和5年1月16日(2023.1.16)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	Z M D
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	Z N A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

請求項の数 6 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-527435(P2021-527435)	(73)特許権者	899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(86)(22)出願日	令和2年5月7日(2020.5.7)	(73)特許権者	507219686 静岡県公立大学法人 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/018512	(74)代理人	100161207 弁理士 西澤 和純
(87)国際公開番号	WO2020/255574	(74)代理人	100175824 弁理士 小林 淳一
(87)国際公開日	令和2年12月24日(2020.12.24)	(74)代理人	100126882 弁理士 五十嵐 光永
審査請求日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(72)発明者	金沢 貴憲 静岡県静岡市駿河区谷田52-1 静岡 県立大学内
(31)優先権主張番号	特願2019-115688(P2019-115688)		
(32)優先日	令和1年6月21日(2019.6.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 薬物送達用組成物および医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬物を脊髄に送達するための薬物送達用組成物であって、
ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーと、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる膜透過性ペプチドと、を含有し、

前記膜透過性ペプチドが、前記疎水性ポリエステルセグメントの、前記ポリエチレングリコールセグメントと連結していない方の末端に結合しており、
前記薬物送達組成物が経鼻的に投与される、薬物送達用組成物。

【請求項2】

前記薬物が、脊髄疾患治療用の薬物である、請求項1に記載の薬物送達用組成物。

【請求項3】

前記脊髄疾患が、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、慢性疼痛、及び脊髄損傷からなる群より選択される、請求項2に記載の薬物送達用組成物。

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項 7】

前記ブロックコポリマーと、前記膜透過性ペプチドとがミセルを形成している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の薬物送達用組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 及び 7 のいずれか一項に記載の薬物送達用組成物と、脊髄疾患治療用の薬物とを含有し、経鼻的に投与される、脊髄疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項 9】

前記脊髄疾患が、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、慢性疼痛、及び脊髄損傷からなる群より選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物送達用組成物および医薬組成物に関する。本発明の薬物送達用組成物は、経鼻的に投与され、薬物を脊髄に送達するために用いられる。

本願は、2019年6月21日に、日本に出願された特願2019-115688号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

経口投与や静脈内投与による全身循環血液を介した脊髄への薬物送達は、血液 - 脳関門や血液 - 脳脊髄液関門により著しく制限されるため、脊髄組織の薬物濃度を治療域まで高めることが難しい。また、治療域まで高めるためには大量の薬物を投与するため、全身循環血液を介して、末梢組織に対する副作用を発現させてしまうことが危惧されている。髄腔内投与は、脊髄組織に薬物を選択的に送達できるが、投与に技術を要し、また侵襲性が高く患者への負担が大きいことから、投与計画が難しい。

20

【0003】

一方、薬物を疾患部位に送達するための技術として、ドラッグデリバリー技術の開発が進められている。例えば、メトキシポリエチレングリコール (Methoxy Polyethylene Glycol: MPEG) セグメントおよびポリ(ε-カプロラクトン) (Poly(ε-caprolactone): PCL) セグメントからなるブロックコポリマーと、アルギニンおよびヒスチジンを含む10個のアミノ酸からなる、脂溶性基を含むペプチドとを含有する核酸送達組成物が報告されている (特許文献1)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】国際公開第2019/013255号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

侵襲性が低く、簡易な方法で、脊髄に薬物を送達可能な技術の開発が求められている。しかしながら、特許文献1に記載されるような核酸送達組成物が、脊髄に薬物を送達できるかは確認されていない。

40

【0006】

そこで、本発明は、侵襲性の低い、簡易な方法で薬物を脊髄に送達可能な薬物送達用組成物、および前記薬物送達組成物を含有する医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は以下の態様を含む。

[1] 薬物を脊髄に送達するための薬物送達用組成物であって、ポリエチレングリコール

50

セグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーと、膜透過性ペプチドと、を含有し、経鼻的に投与される、薬物送達用組成物。

[2] 前記薬物が、脊髄疾患治療用の薬物である、[1] に記載の薬物送達用組成物。[3] 前記脊髄疾患が、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、慢性疼痛、及び脊髄損傷からなる群より選択される、[2] に記載の薬物送達用組成物。

[4] 前記膜透過性ペプチドが、前記疎水性ポリエステルセグメントの末端に結合している、[1] ~ [3] のいずれか一つに記載の薬物送達用組成物。

[5] 前記膜透過性ペプチドに、直接又は結合基を介して、脂溶性基が結合している、[1] ~ [3] のいずれか一つに記載の薬物送達用組成物。 10

[6] 前記脂溶性基が、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルケニル基、及び置換基を有していてもよい炭素数 7 ~ 30 のアラルキル基からなる群より選択される、[5] に記載の薬物送達用組成物。

[7] 前記ブロックコポリマーと、前記膜透過性ペプチドとがミセルを形成している、[1] ~ [6] のいずれか一つに記載の薬物送達用組成物。

[8] [1] ~ [7] のいずれか一つに記載の薬物送達用組成物と、脊髄疾患治療用の薬物とを含有する、経鼻的に投与される、脊髄疾患を治療するための医薬組成物。

[9] 前記脊髄疾患が、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、慢性疼痛、及び脊髄損傷からなる群より選択される、[8] に記載の医薬組成物。 20

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、侵襲性の低い、簡易な方法で薬物を脊髄に送達可能な薬物送達用組成物、および前記薬物送達組成物を含有する医薬組成物が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】図1A~Bは、RI標識デキストラン/PEG-PCl-Tatの経鼻投与試験の結果を示す。図1Aは、脳へのRI標識デキストランの分布効率を示す。

【図1B】図1Bは、脊髄へのRI標識デキストランの分布効率を示す。

【図2A】図2Aは、ALSモデルマウスにN-アセチルシステイン(NAC)を経口投与したときの生存期間を示す。 30

【図2B】図2Bは、ALSモデルマウスにN-アセチルシステイン(NAC)を経口投与したときの運動機能障害の進行を示す。

【図3】ALSモデルマウスに対するALS治療薬の経鼻投与試験の方法の概略を示す。

【図4A】図4Aは、ALSモデルマウスに対して、NACを経鼻投与したときの運動機能障害の進行を示す。

【図4B】図4Bは、ALSモデルマウスに対して、NACを経鼻投与したときの運動ニューロンのマーカーであるSMI-32の発現を示す。

【図5】ALSモデルマウスに対して、シクロスポリンA/PEG-PCl-Tat複合体を経鼻投与したときの運動機能障害の進行を示す。 40

【図6A】図6A~Bは、神経障害性疼痛モデルマウスに対して、NAC/PEG-PCl-Tat複合体を経鼻投与したときの触刺激に対するアロディニア反応の結果を示す。図6Aは、非結紮側後肢(左肢)の結果を示す。

【図6B】図6Bは、結紮側後肢(右肢)の結果を示す。

【図7】RI標識デキストラン/PEG-PCl/ペプチド複合体の経鼻投与試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

[定義等]

本明細書において、「n-」はノルマル、「i-」はイソ、「s-」はセカンダリー、 50

「t - 」はターシャリーを意味する。

「由来する基」とは、対象となる分子から任意の位置の水素原子を取り除いた基を意味する。

【0011】

「置換基を有していてもよい」とは、無置換であるか、又は少なくとも1つの置換基で置換されていることを意味する。置換基は、水素原子(-H)を1価の基で置換する場合と、メチレン基(-CH₂-)を2価の基で置換する場合との両方を含む。

【0012】

「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子を意味する。

【0013】

「アルキル基」は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状の1価の飽和炭化水素基を包含するものとする。アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、シクロペンチル基、n-ヘキシル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、n-ウンデシル基、n-ドデシル基、n-トリデシル基、n-テトラデシル基、n-ペンタデシル基、n-ヘキサデシル基、n-ヘプタデシル基、n-オクタデシル基、n-ノナデシル基、n-イコシル基、イソオクチル基、イソデシル基、イソドデシル基、イソテトラデシル基、イソヘキサデシル基、イソオクタデシル基、t-オクチル基、t-デシル基、t-ドデシル基、t-テトラデシル基、t-ヘキサデシル基、t-オクタデシル基等が挙げられる。

本明細書において記載される炭素数がa~b個のアルキル基の具体例としては、上記アルキル基の具体例から、各々の指定の炭素原子数の範囲ものが例示される。以下に挙げる基においても同様である。

【0014】

「アルケニル基」は、少なくともいずれか1カ所に炭素-炭素二重結合を有する、直鎖状、分岐鎖状又は環状の不飽和炭化水素基であり、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルケニル基の具体例としては、例えば、1-プロペニル基、1-ブテニル基、2-メチル-2-ブテニル基、2-メチル-1,3-ブタジエニル基、1-オクテニル基、1-デセニル基、1-ドデセニル基、1-テトラデセニル基、1-ヘキサデセニル基、1-シクロヘキセニル基、3-シクロヘキセニル基、1-オクタデセニル基、cis-9-オクタデセニル基、9-ヘキサデセニル基等が挙げられる。

【0015】

「アリール基」は、炭素環アリール基および複素環アリール基を包含する。

炭素環アリール基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

複素環アリール基は、環を構成する原子中に、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子からなる群から選択される1~5個のヘテロ原子を含有する、単環系又は縮合環系のアリール基を意味する。複素環アリール基の具体例としては、例えば、ピリジル基、ピリミジニル基、キノリル基、キナゾリニル基、ナフチリジニル基、フリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、オキサゾリル基、イソキサゾリル基、トリアゾリル基、チエニル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、インドリル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチエニル基、イミダゾピリジル基等が挙げられる。

【0016】

「アラルキル基」とは、いずれか1カ所の水素原子が炭素環アリール基で置換された、アルキル基である。アラルキル基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキル基の具体例としては、例えば、ベンジル基、1-フェニルエチル基、2-フェニルエチル基、4-フェニルブチル基、3-フェニルブチル基、5-フェニルペンチル基、6-フェニルヘキシル基、8-フェニルオクチル基等が挙げられる。好ましくは4-フェニルブチル基、5-フェニルペンチル

10

20

30

40

50

基、6 - フェニルヘキシル基、8 - フェニルオクチル基等が挙げられる。

【0017】

「アルコキシ基」は、前記アルキル基に、オキシ基が結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルコキシ基の具体例としては、例えば、メトキシ基、n - プロポキシ基、シクロプロピルメチルオキシ基、n - ヘキシルオキシ基、イソプロポキシ基、s - ブトキシ基、シクロヘキシルオキシ基、t - ブトキシ基、n - オクチルオキシ基等が挙げられる。

【0018】

「アルケニルオキシ基」とは、アルケニル基がオキシ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルケニルオキシ基の具体例としては、例えば、1 - プロペニルオキシ基、1 - ブテニルオキシ基、2 - メチル - 2 - ブテニルオキシ基、2 - メチル - 1, 3 - ブタジエニルオキシ基、1 - オクテニルオキシ基、1 - デセニルオキシ基、1 - シクロヘキセニルオキシ基、3 - シクロヘキセニルオキシ基等が挙げられる。

10

【0019】

「アラルキルオキシ基」は、アラルキル基が、オキシ基に結合した基を意味する。アラルキルオキシ基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルオキシ基の具体例としては、例えば、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基等が挙げられる。

【0020】

「アリールオキシ基」は、アリール基が、オキシ基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリールオキシ基又は複素環アリールオキシ基であり、具体例としては、フェノキシ基、ナフチルオキシ基、ピリジルオキシ基等が挙げられる。

20

【0021】

「アルキレン基」は、アルキル基から、任意の位置の水素原子を取り除いた2価の基であり、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルキレン基の具体例としては、例えば、メチレン基、エチレン基、プロパン - 1, 3 - ジイル基、プロパン - 1, 2 - ジイル基、プロパン - 1, 1 - ジイル基、プロパン - 2, 2 - ジイル基、2, 2 - ジメチル - プロパン - 1, 3 - ジイル基、ヘキサ - 1, 6 - ジイル基、3 - メチルブタン - 1, 2 - ジイル基、シクロプロパン - 1, 2 - ジイル基等が挙げられる。

30

【0022】

「アルキルチオ基」は、アルキル基が、チオ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルキルチオ基の具体例としては、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、イソプロピルチオ基、シクロプロピルメチルチオ基、シクロペンチルチオ基、n - ヘキシルチオ基、シクロヘキシルチオ基等が挙げられる。

【0023】

「アラルキルチオ基」は、アラルキル基が、チオ基に結合した基を意味する。アラルキルオキシ基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルチオ基の具体例としては、例えば、ベンジルチオ基、フェネチルチオ基等が挙げられる。

40

【0024】

「アリールチオ基」は、アリール基が、チオ基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリールチオ基又は複素環アリールチオ基であり、具体例としては、フェニルチオ基、ナフチルチオ基、ピリジルチオ基等が挙げられる。

【0025】

「アルキルスルフィニル基」は、アルキル基が、スルフィニル基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルキルフルフィニル基の具体例としては、例えば、メチルスルフィニル基、イソプロピルスル

50

フィニル基、シクロヘキシルスルフィニル基等が挙げられる。

【0026】

「アラルキルスルフィニル基」は、アラルキル基が、スルフィニル基に結合した基を意味する。アラルキルスルフィニル基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルスルフィニル基の具体例としては、例えば、ベンジルスルフィニル基、フェネチルスルフィニル基等が挙げられる。

【0027】

「アリールスルフィニル基」は、アリール基が、スルフィニル基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリールスルフィニル基又は複素環アリールスルフィニル基であり、具体例としては、フェニルスルフィニル基、ナフチルスルフィニル基、ピリジルスルフィニル基等が挙げられる。

10

【0028】

「アルキルスルホニル基」は、アルキル基が、スルホニル基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルキルスルホニル基の具体例としては、例えば、メチルスルホニル基、イソプロピルスルホニル基等が挙げられる。

【0029】

「アラルキルスルホニル基」は、アラルキル基が、スルホニル基に結合した基を意味する。アラルキルスルホニル基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルスルホニル基の具体例としては、例えば、ベンジルスルホニル基、フェネチルスルホニル基等が挙げられる。

20

【0030】

「アリールスルホニル基」は、アリール基が、スルホニル基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリールスルホニル基又は複素環アリールスルホニル基であり、具体例としては、フェニルスルホニル基、ナフチルスルホニル基、ピリジルスルホニル基等が挙げられる。

【0031】

「モノアルキルアミノ基」は、1つのアルキル基が、アミノ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。モノアルキルアミノ基の具体例としては、例えば、メチルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ネオペンチルアミノ基、n-ヘキシルアミノ基、シクロヘキシルアミノ基、n-オクチルアミノ基等が挙げられる。

30

【0032】

「ジアルキルアミノ基」は、同一又は異なる2つのアルキル基が、アミノ基に結合した基を意味する。ジアルキルアミノ基におけるアルキル基は、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。ジアルキルアミノ基の具体例としては、例えば、ジメチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、N-メチル-N-シクロヘキシルアミノ基等が挙げられる。

【0033】

「環状アミノ基」は、環を構成する原子として少なくとも1個の窒素原子を含有する3～11員の飽和の複素環から、窒素原子に結合する1つの水素原子を取り除いた基である。具体例としては、モルホリノ基、ピペラジン-1-イル基、4-メチルピペラジン-1-イル基、ピペリジン-1-イル基、ピロリジン-1-イル基等が挙げられる。

40

【0034】

「モノアリールアミノ基」は、1つのアリール基が、アミノ基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリールアミノ基又は複素環アリールアミノ基であり、具体例としては、フェニルアミノ基、ナフチルアミノ基、ピリジルアミノ基等が挙げられる。

【0035】

「ジアリールアミノ基」は、同一又は異なる2つのアリール基が、アミノ基に結合した基を意味し、例えば、ジ(炭素環アリール)アミノ基、ジ(複素環アリール)アミノ基又

50

はN - (炭素環アリール) - N - (複素環アリール) アミノ基であり、具体例としては、ジフェニルアミノ基、N - フェニル - N - ピリジルアミノ基等が挙げられる。

【0036】

「アシル基」は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アリール基、又はアラルキル基がカルボニル基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アシル基の具体例としては、例えば、ホルミル基、アセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、ピリジルカルボニル基等が挙げられる。

【0037】

「アルコキシカルボニル基」は、アルコキシ基がカルボニル基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルコキシカルボニル基の具体例としては、例えば、メトキシカルボニル基、t - ブトキシカルボニル基等が挙げられる。

10

【0038】

「アラルキルオキシカルボニル基」は、アラルキルオキシ基が、カルボニル基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルオキシカルボニル基の具体例としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0039】

「アシルオキシ基」は、アシル基がオキシ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アシルオキシ基の具体例としては、例えば、ホルミルオキシ基、アセトキシ基、ベンゾイルオキシ基、ピリジルカルボニルオキシ基等が挙げられる。

20

【0040】

「アルコキシカルボニルオキシ基」は、アルコキシカルボニル基がオキシ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルコキシカルボニルオキシ基の具体例としては、例えば、メトキシカルボニルオキシ基、t - ブトキシカルボニルオキシ基等が挙げられる。

【0041】

「アラルキルオキシカルボニルオキシ基」は、アラルキルオキシカルボニル基がオキシ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルオキシカルボニルオキシ基の具体例としては、例えば、ベンジルオキシカルボニルオキシ基等が挙げられる。

30

【0042】

「アシルアミノ基」は、アシル基がアミノ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アシルアミノ基の具体例としては、例えば、ホルミルアミノ基、アセチルアミノ基、ベンゾイルアミノ基等が挙げられる。

【0043】

「アルコキシカルボニルアミノ基」は、アルコキシカルボニル基がアミノ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アルコキシカルボニルアミノ基の具体例としては、例えば、メトキシカルボニルアミノ基、エトキシカルボニルアミノ基等が挙げられる。

40

【0044】

「アラルキルオキシカルボニルアミノ基」は、アラルキルオキシカルボニル基がアミノ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。アラルキルオキシカルボニルアミノ基の具体例としては、例えば、ベンジルオキシカルボニルアミノ基等が挙げられる。

【0045】

「アルキルスルホニルアミノ基」は、アルキルスルホニル基がアミノ基に結合した基を意味し、特に断りがない限り、直鎖状、分岐鎖状及び環状のものを包含するものとする。

50

アルキルスルホニルアミノ基の具体例としては、例えば、メタンスルホニルアミノ基が挙げられる。

【0046】

「アリアルスルホニルアミノ基」は、アリアルスルホニル基がアミノ基に結合した基を意味し、例えば、炭素環アリアルスルホニルアミノ基又は複素環アリアルスルホニルアミノ基であり、具体例としては、ベンゼンスルホニルアミノ基、ピリジルスルホニルアミノ基等が挙げられる。

【0047】

置換基を有するカルバモイル基は、前記モノアルキルアミノ基、前記ジアルキルアミノ基、前記環状アミノ基、前記モノアリアルアミノ基又は前記ジアリアルアミノ基が、カルボニル基に結合した基を意味し、例えば、ジメチルカルバモイル基、フェニルカルバモイル基等が挙げられる。

10

置換基を有するスルファモイル基は、前記モノアルキルアミノ基、前記ジアルキルアミノ基、前記環状アミノ基、前記モノアリアルアミノ基又は前記ジアリアルアミノ基が、スルホニル基に結合した基を意味し、例えば、ジメチルスルファモイル基、フェニルスルファモイル基等が挙げられる。

置換基を有するカルバモイルオキシ基としては、置換基を有する前記カルバモイル基が、オキシ基に結合した基を意味し、例えば、ジメチルカルバモイルオキシ基、フェニルカルバモイルオキシ基等が挙げられる。

置換基を有するスルファモイルアミノ基は、置換基を有する前記スルファモイル基が、アミノ基、前記モノアルキルアミノ基、又は前記モノアリアルアミノ基の窒素原子に結合した基を意味し、例えば、ジメチルスルファモイルアミノ基等が挙げられる。

20

置換基を有するウレイド基は、置換基を有する前記カルバモイル基が、アミノ基、前記モノアルキルアミノ基、又は前記モノアリアルアミノ基の窒素原子に結合した基を意味し、例えば、トリメチルウレイド基、1-メチル-3-フェニル-ウレイド基等が挙げられる。

【0048】

シリル基としては、トリアルキルシリル基又はモノアルキルジアリアルシリル基が挙げられる。前記シリル基におけるアルキル基としては、炭素数1~6のアルキル基が挙げられる。具体例としては、例えば、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリスプロピルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基等が挙げられる。

30

【0049】

「ペプチド」は、アミド結合によって結合したアミノ酸のポリマーを指す。ペプチドは、天然アミノ酸のポリマーであってもよく、天然アミノ酸と非天然アミノ酸(天然アミノ酸の化学的類似体、修飾誘導体等)とのポリマーであってもよく、非天然アミノ酸のポリマーであってもよい。特に明示しない限り、アミノ酸配列は、N末端側からC末端側に向かって、IUPAC-IUBガイドラインの1文字表記または3文字表記によって表す。

【0050】

[薬物送達用組成物]

本発明の第1の態様は、薬物を脊髄に送達するための薬物送達用組成物であって、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーと、膜透過性ペプチドと、を含有し、経鼻的に投与される、薬物送達用組成物である。

40

【0051】

<薬物>

本態様にかかる薬物送達組成物は、薬物を脊髄に送達するための薬物組成物である。前記薬物は、好ましくは脊髄疾患治療用の薬物である。後述する実施例で示されるように、本態様の薬物送達組成物を経鼻的に投与することにより、薬物を脊髄に効率的に送達することができる。

50

【 0 0 5 2 】

「脊髄疾患」とは、脊髄の損傷または機能障害に起因する疾患をいう。脊髄疾患としては、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、神経障害性慢性疼痛、脊髄損傷、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳変性症、球脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症および脊髄腫瘍からなる群より選択される疾患が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

薬物は、脊髄疾患を治療するために用いられるものであれば、特に限定されず、低分子化合物、ペプチド（生理活性ペプチド、ホルモン様ペプチド、サイトカイン様ペプチド、環状ペプチド、合成ペプチドなど）、タンパク質（抗体、酵素、栄養因子、サイトカイン、ホルモンなど）、核酸（プラスミドDNA、siRNA、miRNA、アンチセンス核酸、shRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、mRNA、デコイ核酸、リボザイム、DNAアプタマー、RNAアプタマー、DNA酵素など）、脂質等であることができる。

10

【 0 0 5 4 】

ALS治療用の薬物としては、例えば、活性酸素除去剤、CYP1A2阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症薬、PGE2合成酵素阻害剤、EP2受容体阻害剤、栄養因子、ビタミン剤、グルタミン酸受容体拮抗剤、ドパミン作動剤、チロシンキナーゼ阻害薬、ホルモン、および核酸等が挙げられる。具体例としては、N-アセチルシステイン、シクロスポリンA、タクロリムス（FK506）、ノビレチン、非ステロイド性抗炎症薬、PF-0441848、TG6-10-1、神経栄養因子（NGF、NT-1）、脳由来神経栄養因子（BDNF、NT-2）、肝細胞増殖因子（HGF）、ビタミン12、ビタミンB12誘導体、リルゾール、ペランパネル、レボドパ、ロビニロール、ボスチニブ、インスリン、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、エリスロポエチン、およびTofersen等が挙げられる。

20

神経障害性慢性疼痛治療用の薬物としては、例えば、抗酸化剤、PGE2合成酵素阻害剤、EP2受容体阻害剤、ATP受容体阻害剤、鎮痛剤、抗うつ剤、および抗痙攣剤等が挙げられる。具体例としては、N-アセチルシステイン、P2X4受容体阻害剤（5-BDBD、NP-1815-PX）、PPADS、TNP-ATP、非ステロイド性抗炎症薬、アセトアミノフェン、ノビレチン、オピオイド、トラマドール、三環系抗うつ剤、セロトニンノルアドレナリン再取り込み阻害剤（SNRI）、Ca²⁺チャネル2リガンド（プレガバリン、ミロガバリン、ガバペンチン）、Na⁺チャネル阻害作用（カルバマゼピン、ラモトリギン）、GABA系賦活作用（バルプロ酸ナトリウム、クロナゼパム）等が挙げられる。

30

脊髄損傷治療用の薬物としては、例えば、抗炎症剤、鎮痛剤、活性酸素除去剤、神経栄養因子、造血因子、ペプチド、および核酸等が挙げられる。具体例としては、副腎皮質ステロイド、エダラボン、肝細胞増殖因子（HGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、エリスロポエチン、等が挙げられる。

脊髄性筋萎縮症治療用の薬物としては、例えば、アンチセンス核酸、スプライシング修飾剤、siRNA等が挙げられる。具体例としては、リスジブラム、ヌシネルセン等が挙げられる。

40

脊髄小脳変性症治療用の薬物としては、例えば、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）、TRH誘導体等が挙げられる。具体例としては、ヒルトニン、セレジスト、ボグニン、タルチレリン、プロチレリン、塩酸メキシレチン、アセタゾラミドおよびTRHを発現するmRNA等が挙げられる。

球脊髄性筋萎縮症治療用の薬物としては、例えば、黄体形成ホルモン刺激ホルモン（LHRH）アナログ、熱ショック蛋白質（Hsp70）誘導剤、ユビキチンプロテアソーム系（UPS）賦活化剤、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤、等が挙げられる。具体例としてはリュープロレリン、GGA（geranylgeranylacetone）、17-AAG（17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin）等が挙げられる。

50

原発性側索硬化症治療用の薬物としては、例えば、筋弛緩薬等が挙げられる。具体例としてはバクロフェン、ダントロレン等が挙げられる。

脊髄腫瘍治療用の薬物としては、例えば、抗がん剤、鎮痛剤、抗炎症剤、抗体、および核酸等が挙げられる。

【0055】

<ブロックコポリマー>

本態様にかかる薬物送達組成物は、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーを含有する。

【0056】

ポリエチレングリコールセグメント

ポリエチレングリコールセグメントは、エチレンオキシ基(-CH₂CH₂O-)単位の繰り返し構造を有するポリエチレングリコール鎖を含むセグメントである。ポリエチレングリコールセグメントの重合度は、例えば、5~12,000であり、好ましくは20~700であり、より好ましくは、30~400であり、さらに好ましくは30~200であり、特に好ましくは、40~100である。またポリエチレングリコールセグメントの数平均分子量(M_n)は、例えば200~500,000、好ましくは500~30,000であり、より好ましくは1,000~10,000であり、さらに好ましくは1,000~7,000であり、さらにより好ましくは、1,000~6,000であり、特に好ましくは1,000~3,000である。本明細書において、数平均分子量は、GPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)で測定されるポリスチレン換算の数平均分子量である。

【0057】

ポリエチレングリコールセグメントの一方の末端は、後述する疎水性ポリエステルセグメントと直接的に連結されているか、あるいは、結合基を介して疎水性ポリエステルセグメントと連結されている。もう一方の末端は、特に限定されるものではなく、ポリエチレングリコールの末端のヒドロキシ基であってもよく、又は末端のヒドロキシ基を修飾した任意の末端基であってもよい。もう一方の末端の末端基としては、水素原子、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよい炭素数1~12のアルコキシ基、置換基を有していてもよい炭素数1~12のアルケニルオキシ基、置換基を有していてもよい炭素数7~20のアラルキルオキシ基等を挙げることができる。前記炭素数1~12のアルコキシ基、炭素数1~12のアルケニルオキシ基、炭素数7~20のアラルキルオキシ基における置換基としては、ヒドロキシ基、アミノ基、ホルミル基、カルボキシ基等が挙げられる。前記もう一方の末端の末端基は、好ましくは、置換基を有していてもよい炭素数1~6のアルコキシ基であり、より好ましくは、置換基を有さない炭素数1~6のアルコキシ基であり、さらに好ましくは、置換基を有さない炭素数1~3のアルコキシ基であり、さらにより好ましくはメトキシ基である。

【0058】

また、ポリエチレングリコールセグメントは、前記末端基を介して、標的指向性分子を有してもよい。標的指向性分子としては、糖、脂質、ペプチド及びタンパク質並びにそれらの誘導体、又は葉酸等が挙げられる。また、脊髄の神経細胞表面にある各種タンパク質に相互作用することにより、当該臓器に特異性高く効率的に送達できるという観点では、受容体のリガンド、抗体、それらの断片のペプチド又はタンパク質が挙げられる。

【0059】

疎水性ポリエステルセグメント

疎水性ポリエステルセグメントは、分子内にカルボキシ基とヒドロキシ基を有するモノマーが重縮合した疎水性のセグメントである。疎水性ポリエステルセグメントは、単一モノマーのホモ重合体であってもよく、二種以上のモノマーの共重合体であってもよい。疎水性ポリエステルセグメントは、好ましくは、単一モノマーのホモ重合体である。ホモ重合体である疎水性ポリエステルとしては、ポリ(-カプロラクトン)及びポリ乳酸が挙げられる。二種以上モノマーの共重合体である疎水性ポリエステルとしては、ポリ(乳酸-グ

10

20

30

40

50

リコール酸コポリマー)が挙げられる。中でも、疎水性ポリエステルセグメントとしては、ポリ(ε-カプロラクトン)が好ましい。前記ポリ乳酸および前記乳酸-グリコール酸コポリマーの乳酸部分は、D体、L体およびD体とL体との混合物のいずれを用いてもよいが、D体とL体との混合物が好ましい。

【0060】

疎水性ポリエステルセグメントの一方の末端は、上述のポリエチレングリコールセグメントと直接的に連結されているか、あるいは、結合基を介してポリエチレングリコールセグメントと連結されている。もう一方の末端は、特に限定されるものではなく、疎水性ポリエステルセグメントの末端のカルボキシ基であってもよく、又は末端のカルボキシ基を修飾した任意の末端基であってもよい。また、もう一方の末端には、後述する膜透過性ペプチドが、直接または結合基を介して連結されていてもよい。

10

【0061】

疎水性ポリエステルセグメントの数平均分子量(M_n)は、例えば500~30,000であり、好ましくは1,000~10,000であり、より好ましくは1,000~8,000であり、さらに好ましくは、1,000~7,000であり、さらにより好ましくは1,000~3,000である。

【0062】

ブロック型コポリマーにおける、ポリエチレングリコールセグメントと、疎水性ポリエステルセグメントは、直接的あるいは適切な結合基を介して間接的に連結されていてもよいが、好ましくは直接的に連結されている。ポリエチレングリコールセグメントと、疎水性ポリエステルセグメントとが直接的に連結される結合様式は、ポリエチレングリコールセグメントの末端ヒドロキシ基と、疎水性ポリエステルセグメントの末端カルボキシ基とで形成されるエステル結合であることが好ましい。ポリエチレングリコールセグメントと、疎水性ポリエステルセグメントとが間接的に連結される場合の結合基としては、2つのポリマーセグメントを化学結合により連結する基であれば、特に限定されるものではなく、ポリエチレングリコールセグメントの末端基及び疎水性ポリエステルセグメントの末端基と結合できる官能基から形成される結合基であればよい。前記結合基は、好ましくは、炭素数1~6のアルキレン基である。前記結合基のポリエチレングリコールセグメントとの結合様式は、ポリ(オキシエチレン)基の末端酸素原子によるエーテル結合が好ましく、疎水性ポリエステルセグメントとの結合様式はアミド結合又はエステル結合であることが好ましい。

20

30

【0063】

ブロックコポリマーの具体例としては、モノメトキシポリエチレングリコール-ポリ(ε-カプロラクトン)共重合体、モノメトキシポリエチレングリコール-ポリ乳酸共重合体、及びモノメトキシポリエチレングリコール-ポリ(乳酸-グリコール酸コポリマー)共重合体が挙げられる。好ましい例としては、モノメトキシポリエチレングリコール-ポリ(ε-カプロラクトン)共重合体が挙げられる。中でも、ポリエチレングリコールの数平均分子量が1,000~6,000、ポリ(ε-カプロラクトン)の数平均分子量が1,000~6,000である、モノメトキシポリエチレングリコール-ポリ(ε-カプロラクトン)共重合体が好ましく、ポリエチレングリコールの数平均分子量が1,000~3,000、ポリ(ε-カプロラクトン)の数平均分子量が1,000~3,000である、モノメトキシポリエチレングリコール-ポリ(ε-カプロラクトン)共重合体がより好ましい。

40

【0064】

ブロックコポリマーの製造方法は、特に限定されず、公知の方法により製造することができる。例えば、ポリエチレングリコールセグメントと、疎水性ポリエステルセグメントとを、適切な結合様式により結合させる方法で製造することができる。また、ポリエチレングリコールセグメントの末端ヒドロキシ基を開始点とし、環状エステルモノマーとの開環重合により、逐次重合反応させてブロックコポリマーを調製してもよい。好ましくは、ポリエチレングリコールセグメントの末端ヒドロキシ基を開始点とし、環状エステルモノ

50

マーとの開環重合により、逐次重合反応させてブロックコポリマーを調製する。ポリエチレングリコールセグメントに対する環状エステルモノマーの仕込み比を変化させることにより、各ユニットの種々の重合度を有する共重合体を得ることが可能である。環状エステルモノマーとして - カプロラクトンを用いることで、ポリエチレングリコール - ポリ(- カプロラクトン) が製造され、ジラクチドを用いることで、ポリエチレングリコール - ポリ乳酸が製造される。ジラクチド及びグリコリドを用いることで、ポリエチレングリコール - ポリ(乳酸 - グリコール酸コポリマー) が製造される。具体的な製造方法としては、例えば、バイオマテリアルズ, 24巻, 3563 - 3570頁(2003年)、バイオマテリアルズ, 26巻, 2121 - 2128頁(2005年)、インターナショナルジャーナル オブ ファーマシューティクス, 182巻, 187 - 197頁(1999年)などを参照できる。

10

【0065】

<膜透過性ペプチド>

本態様にかかる薬物送達組成物は、膜透過性ペプチドを含有する。

「膜透過性ペプチド」とは、細胞膜または粘膜を透過可能なペプチドをいう。膜透過性ペプチドは、公知のものを特に制限なく用いることができる。膜ペプチドを構成するアミノ酸残基は、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸であってもよく、L体、D体のいずれでも特に限定されずに用いることができる。

【0066】

膜透過性ペプチドは、アルギニンを含むことが好ましい。アルギニンはグアニジンユニットを有することによって、細胞膜あるいはエンドソームなどのオルガネラ膜との相互作用によりペプチドに膜透過性を付与する。アルギニン残基の数は、ペプチド全残基の合計数に対し、30～100%であることが好ましく、40～100%であることがさらに好ましい。

20

【0067】

膜透過性ペプチドを構成する、その他のアミノ酸残基としては、例えばリジン、グリシン、 - アラニン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン等の炭化水素系アミノ酸、プロリン、トリプトファン等の環状系アミノ酸、システイン等の硫黄系アミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸等を用いることができる。

30

【0068】

膜透過性ペプチドの残基数としては、4～30が例示され、5～20であり、より好ましくは5～15であり、さらに好ましくは、6～12であり、特に好ましくは8～10である。

【0069】

膜透過性ペプチドの具体例としては、例えば、以下のものが挙げられる。

T a t : G R K K R R Q R R R G (配列番号1)、G R K K R R Q R R R P P Q (配列番号3)等

ポリアルギニン: R_n ($n = 4 \sim 12$)

アルギニンリッチペプチド

C H H R R R R H H C (配列番号2)

C H H R R (配列番号4)

H H R R R R H H (配列番号5)

H H H H R R R R (配列番号6)

R R R R H H H H (配列番号7)

ペネトラチン: R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号8)

T r a n s p o r t a n : G W T L N S A G Y L L G K I N L K A L (配列番号9)

P e p - 1 : K E T W W E T W W T E W S Q P K K K R K V (配列番号10)

p V E C C a d h e r i n : L L I I L R R R I R K Q A H A H S K (配列番号11)

【0070】

40

50

一実施形態において、膜透過性ペプチドは、疎水性ポリエステルセグメントの、ポリエチレングリコールセグメントと連結していない方の末端に結合されている。膜透過性ペプチドと、疎水性ポリエステルセグメントとの結合は、直接結合されていてもよく、結合基を介して結合されていてもよいが、好ましくは直接結合されている。疎水性ポリエステルセグメントと膜透過性ペプチドとの結合様式は、疎水性ポリエステルセグメントの末端カルボキシ基と、膜透過性ペプチドの末端アミノ基とで形成されるアミド結合であることが好ましい。あるいは、疎水性ポリエステルセグメントと膜透過性ペプチドとの結合様式は、疎水性ポリエステルセグメントの末端ヒドロキシ基と、膜透過性ペプチドの末端カルボキシ基とで形成されるエステル結合であることが好ましい。疎水性ポリエステルセグメントと、膜透過性ペプチドとが間接的に連結される場合の結合基としては、両者を化学結合により連結する基であれば、特に限定されるものではなく、疎水性ポリエステルセグメントの末端基及び膜透過性ペプチドの末端基と結合できる官能基から形成される結合基であればよい。前記結合基は、好ましくは、炭素数 1 ~ 6 のアルキレン基である。前記結合基の疎水性ポリエステルセグメントとの結合様式はアミド結合又はエステル結合であることが好ましく、膜透過性ペプチドとの結合様式はアミド結合又はエステル結合であることが好ましい。

10

疎水性ポリエステルセグメントと膜透過性ペプチドとの結合は、例えば、カルボジイミド系の縮合剤の存在下で、前記ブロックコポリマーと膜透過性ペプチドとを反応させることを行うことができる。

【0071】

20

他の実施形態において、膜透過性ペプチドは、脂溶性基を直接又は結合基を介して含有する。脂溶性基を含有することで、ブロックコポリマーの疎水性ポリエステルセグメントとの疎水性相互作用が増し、薬物送達用組成物の安定性が向上する。

前記脂溶性基は、脂溶性の基であれば、特に限定されないが、例えば、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルケニル基及び置換基を有していてもよい炭素数 7 ~ 30 のアラルキル基から選択され、好ましくは、置換基を有していてもよい炭素数 8 ~ 20 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 8 ~ 20 のアルケニル基及び置換基を有していてもよい炭素数 8 ~ 20 のアラルキル基から選択される。また、別の形態として、前記脂溶性基は、好ましくはコレステロールに由来する基及び脂溶性ビタミンに由来する基から選択される。

30

【0072】

前記脂溶性基におけるアルキル基、アルケニル基及びアラルキル基が有する置換基としては、スルファニル基、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、カルバモイル基、スルファモイル基、炭素環アリール基、複素環アリール基、アルキルチオ基、アラルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルスルフィニル基、アラルキルスルフィニル基、アリールスルフィニル基、アルキルスルホニル基、アラルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、置換基を有するスルファモイル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基、アシルオキシ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アラルキルオキシカルボニルオキシ基、置換基を有するカルバモイルオキシ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、アシルアミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、アラルキルオキシカルボニルアミノ基、置換基を有するウレイド基、アルキルスルホニルアミノ基、アリールスルホニルアミノ基、置換基を有するスルファモイルアミノ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、置換基を有するカルバモイル基及びシリル基等を挙げることができる。ここで、前記炭素環アリール基、複素環アリール基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルスルフィニル基、アリールスルフィニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、置換基を有するスルファモイル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アシルオキシ基、アルコキシカルボニルオキシ基、置換基を有するカルバモイルオキシ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、アシルアミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、置換基を有するウレイド基、アルキルスルホニルアミノ基、アリールスルホニルアミ

40

50

ノ基、置換基を有するスルファモイルアミノ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、置換基を有するカルバモイル基及びシリル基等は、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、及び炭素数 1 ~ 8 のアルコキシ基、炭素数 7 ~ 8 のアラルキルオキシ基等により置換されていてもよい。

【0073】

例えば、アルコキシ基としては、炭素数 1 ~ 8 のアルコキシ基が挙げられる。

例えば、ハロゲン原子で置換されたアルコキシ基としては、ハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 8 のアルコキシ基が挙げられ、その具体例としては、トリフルオロメトキシ基、2, 2, 2 - トリフルオロエトキシ基等が挙げられる。

例えば、ハロゲン原子で置換されたアルコキシカルボニルオキシ基としては、ハロゲン原子で置換された炭素数 2 ~ 9 のアルコキシカルボニルオキシ基が挙げられ、その具体例としては、トリフルオロメトキシカルボニルオキシ基等が挙げられる。

10

【0074】

前記脂溶性基は、より好ましくは、炭素数 15 ~ 20 のアルキル基であり、さらに好ましくは、炭素数 15 ~ 20 のアルキル基であり、さらに好ましくは、ヘプタデシル基（ステアシル基）又はオクタデシル基であり、特に好ましくは、ヘプタデシル基（ステアシル基）である。

【0075】

前記脂溶性基における脂溶性ビタミンとしては、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E、ビタミン K が挙げられる。

20

【0076】

前記脂溶性基は、ペプチドの N 末端のアミノ基又は C 末端のカルボキシ基に、直接又は結合基を介して結合する。脂溶性基が、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルケニル基、又は置換基を有していてもよい炭素数 7 ~ 30 のアラルキル基であり、前記アルキル基、アルケニル基、又はアラルキル基が、直接ペプチドの N 末端と結合する場合、N 末端アミノ基と、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基の炭素原子が、直接結合する。しかし、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基が、N 末端アミノ基と、適切な結合基を介して結合する態様が、調製し易さの点で好ましい。

適切な結合基としては、 $-CO-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-NH-CO-$ 、 $-NH-(CH_2)-CO-$ 、 $-NH-(CH_2)-NHCO-$ 、 $-NH-(CH_2)-OCO-$ 、 $-O-(CH_2)-CO-$ 、 $-O-(CH_2)-NHCO-$ 、 $-O-(CH_2)-OCO-$ 及び $-NH-(CH_2)_2-SS-(CH_2)_2-NHCO-$ 等が挙げられる。ここで、 n は 1 ~ 12 の整数であり、好ましくは 4 ~ 12 の整数であり、より好ましくは 6 ~ 12 の整数である。

30

適切な結合基は、特に好ましくは、 $-CO-$ である。

【0077】

脂溶性基が置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルケニル基、又は置換基を有していてもよい炭素数 7 ~ 30 のアラルキル基であり、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基が、直接ペプチド C 末端と結合する場合、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基が、C 末端カルボキシ基のヒドロキシ基を置き換えて、ケトン型構造で結合する。しかし、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基が、C 末端カルボキシ基と、適切な結合基を介して結合する態様が、調製し易さの点で好ましい。

40

適切な結合基としては、オキシ基、アミノ基又はチオ基が好ましい。前記結合基としてオキシ基（酸素原子）を用いる場合、前記脂溶性基である置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 4 ~ 30 のアルケニル基又は置換基を有していてもよい炭素数 7 ~ 30 のアラルキル基は、エステル結合の様式にて前記ペプチドに結合する。また、前記結合基としてアミノ基を用いる場合、前記アルキル基、前記アルケニル基、又は前記アラルキル基は、アミド結合の様式にて前記ペプチドに結合する。前記結合基としてチオ基（硫黄原子）を用いる場合、前記アルキル基、前記アル

50

ケニル基、又は前記アラルキル基は、チオエステル結合の様式にて前記ペプチドに結合する。

また、C末端カルボニル基への別の適切な結合基としては、 $-NH-(CH_2)_n-NH-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-O-$ 、 $-O-(CH_2)_n-NH-$ 、 $-O-(CH_2)_n-O-$ 及び $-NH-(CH_2)_2-SS-(CH_2)_2-NH-$ 等が挙げられる。ここで、 n は1~12の整数であり、好ましくは4~12の整数であり、特に好ましくは6~12の整数である。

【0078】

前記脂溶性基がコレステロールに由来する基又は脂溶性ビタミンに由来する基である場合は、コレステロール又は脂溶性ビタミンのヒドロキシ基から水素原子を取り除いた部分と、前記ペプチドC末端カルボキシ基からヒドロキシ基を取り除いた部分（以下、C末端カルボニル基と呼ぶ）とで、エステル結合の様式にて結合することが好ましい。あるいは、前記ペプチドC末端カルボニル基と、 $-(CH_2)_n-NH-$ 又は $-(CH_2)_n-O-$ 等の結合基を介して結合することが好ましい。ここで、 n は1~12の整数であり、好ましくは4~12の整数であり、特に好ましくは6~12の整数である。

前記脂溶性基がコレステロールに由来する基又は脂溶性ビタミンに由来する基である場合の別の形態としては、コレステロール又は脂溶性ビタミンのヒドロキシ基から水素原子を取り除いた部分と、前記ペプチドN末端アミノ基とで、 $-CO-$ 、 $-(CH_2)_n-CO-$ 、 $-(CH_2)_n-NHCO-$ 、 $-(CH_2)_n-OCO-$ 、 $-(CH_2)_2-SS-(CH_2)_2-NHCO-$ 等の結合基を介して結合することが好ましい。ここで、 n は1~12の整数であり、好ましくは4~12の整数であり、特に好ましくは6~12の整数である。

【0079】

脂溶性基が直接N末端と結合したペプチドは、ペプチドの末端アミノ基と、アルデヒド基やケトン基、適切な脱離基（ハロゲン、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基など）、エポキシ基等を有する、前記脂溶性基に対応する化合物とを既知のN-アルキル化条件などにより反応させることで製造できる。

前記脂溶性基が、ペプチドのN末端アミノ基と、結合基を介して結合したペプチドは、末端アミノ基と、カルボン酸、エステル、活性エステル（N-ヒドロキシスクシンイミド化等）、酸クロリド、活性化炭酸ジエステル（4-ニトロフェニル炭酸ジエステル等）、イソシアネート等を有する、対応する脂溶性基を有する化合物と、を既知のN-カルボニル化条件などにより反応させることで製造できる。

脂溶性基が直接C末端と結合したペプチドは、ペプチドの末端カルボン酸を、酸クロリド、酸無水物、エステルへ変換し、該酸クロリド、酸無水物、エステルを、対応する脂溶性基を有する有機金属化合物等（例えば、グリニヤール反応剤、有機リチウム化合物、有機亜鉛化合物等）とを既知のケトン化反応条件などにより反応させることで製造できる。脂溶性基が、ペプチドのC末端カルボキシ基と、結合基を介して結合したペプチドは、ペプチドの末端カルボキシ基と、アミノ基、ヒドロキシ基又はチオール基を有する、対応する脂溶性基を有する化合物とを既知の縮合反応により反応することで製造できる。また、ペプチドの末端カルボキシ基をエステル、活性エステル（N-ヒドロキシスクシンイミド化等）、酸クロリド等へ変換した基質を用いて、既知の縮合反応などにより反応させることもできる。

前記、N-アルキル化条件、N-カルボニル化条件、ケトン化反応条件、縮合反応の条件の具体的な反応条件としては、例えば、{コンプリヘンシブ オーガニック トランスフォーメーションズ セカンド エディション (Comprehensive Organic Transformations Second Edition) 1999年、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons, INC.)}等を参照することができる。これら既知の文献に記載の方法、それに準じた方法、又はこれらと常法とを組み合わせることにより本発明のペプチドを製造することができる。

【0080】

前記ブロックコポリマーと膜透過性ペプチドの含有比率としては、膜透過性ペプチド1当量に対して、ブロックコポリマーが、好ましくは0.05~50当量であり、より好ま

しくは0.2~2.0当量であり、特に好ましくは0.5~1.5当量である。

【0081】

前記ブロックコポリマーと前記膜透過性ペプチドと薬剤とは、粒子を形成することが好ましく、その粒子径は、100nm以下が好ましく、50nm以下がより好ましく、30nm以下が特に好ましい。ブロックコポリマーの疎水性ポリエステルセグメントが疎水性相互作用により会合することにより、ミセル粒子が形成され、薬剤が当該ミセルに内包されると考えられる。また、膜透過性ペプチドが脂溶性基を有する場合には、ブロックコポリマーの疎水性ポリエステルセグメントと膜透過性ペプチドの脂溶性基とが疎水性相互作用により会合することにより、ミセル粒子が形成され、薬剤が当該ミセルに内包されると考えられる。

10

前記粒子径は、動的光散乱法により、光散乱粒子径測定装置（例えば、Malvern Instruments社製、Zetasizer Nano ZS；大塚電子（株）製、DLS-7000など）を用いて測定できる。光散乱粒子径測定装置は、キュムラント平均粒径や、質量平均粒径を測定できる。いずれの光散乱粒子径測定装置も、互換可能に使用できるが、好ましくは、Malvern Instruments社製、Zetasizer Nano ZSで測定されるキュムラント平均粒径が用いられる。

【0082】

本態様にかかる薬剤送達用組成物の作製法は、特に限定されない。ブロックコポリマーの疎水性ポリエステルセグメントの末端に膜透過性ペプチドが結合している場合には、前記膜透過性ペプチド結合ブロックコポリマーを適切な溶媒に溶解または分散することで、薬剤送達用組成物を作製することができる。前記溶媒としては、例えば、水、生理食塩水、グルコース等張液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（HEPES）等の緩衝液等が挙げられる。

20

【0083】

膜透過性ペプチドに脂溶性基が結合している場合には、例えば、ブロックコポリマーを含む水溶性有機溶媒溶液と、膜透過性ペプチドを含む水性溶媒溶液とを混合し、有機溶媒を除去することで、ブロックコポリマーと膜透過性ペプチドとの複合体を形成され、薬物送達用組成物を作製することができる。

前記水溶性有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロピルアルコール、t-ブチルアルコール、エチレングリコール等のアルコール溶媒、1,2-ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン等のエーテル溶媒、アセトン等のケトン溶媒、アセトニトリル等のニトリル溶媒、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド溶媒、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド溶媒等が挙げられる。好ましくは、エーテル溶媒が用いられる。中でも、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール及びジメチルスルホキシドから選択される1つ以上の溶媒を用いることが好ましく、テトラヒドロフランを用いることがより好ましい。

30

前記水性溶媒としては、水、生理食塩水、グルコース水溶液、リン酸緩衝生理食塩水〔PBS〕や4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸〔HEPES〕等の緩衝液等が挙げられる。

40

ブロックコポリマーと膜透過性ペプチドとの混合溶液から有機溶媒を除去する方法としては例えば、限外ろ過膜を用いる方法（例えば、透析又は、遠心式限外ろ過デバイスを用いる方法等）及び溶媒留去法等が挙げられるが、限外ろ過膜を用いる方法が好ましい。

【0084】

各成分の溶液及びそれら混合液のpHは、粒子形成能を阻害しない範囲で適宜調整することが可能である。pHは好ましくは5~9、より好ましくは6.5~8.0であり、さらに好ましくは7.0~8.0である。pHの調整は、溶媒として緩衝液を使用することで、容易に行うことができる。各成分の溶液、及びそれら混合液の緩衝液の塩の濃度は、粒子形成能を阻害しない限り適宜調整することが可能であるが、好ましくは1mM~300mM、より好ましくは5mM~150mMである。

50

【 0 0 8 5 】

前記調製方法において、各成分の溶液調製時及びそれらの混合時の温度は、ブロックコポリマーの溶解度を考慮して設定することが好ましく、通常、0 以上であり、好ましくは0 ~ 60 であり、より好ましくは、5 ~ 40 である。

前記調製方法において、混合液を静置することにより平衡化する時間を設けてもよい。具体的には、例えば0 ~ 60 で、0 . 1 ~ 5 0 時間静置されることが好ましい。

【 0 0 8 6 】

本態様にかかる薬物送達用組成物は、上記成分に加えて、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、例えば、薬学的に許容される担体が挙げられる。「薬学的に許容される担体」とは、有効成分の生理活性を阻害せず、且つ、その投与対象に対して実質的な毒性を示さない担体を意味する。「実質的な毒性を示さない」とは、その成分が通常使用される投与量において、投与対象に対して毒性を示さないことを意味する。薬学的に許容される担体としては、医薬品に通常使用されている各種添加剤等が挙げられる。添加剤としては、例えば、賦形剤、増量剤、充填剤、結合剤、湿潤剤、滑沢剤、潤滑剤、界面活性剤、崩壊剤、溶剤、可溶化剤、分散剤、緩衝剤、安定化剤、懸濁化剤、溶解補助剤、保存剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、等張化剤、色素、香料等が挙げられる。かかる添加剤は、1 種を単独で使用してもよく、2 種以上を任意の比率で組み合わせて使用してもよい。

10

【 0 0 8 7 】

本態様にかかる薬物送達組成物の剤型は、経鼻投与に適した任意の剤型とすることができる。例えば、経鼻投与に適した剤型としては、液性製剤、エアゾール製剤、粉末製剤等が挙げられる。

20

【 0 0 8 8 】

本態様にかかる薬物送達組成物は、前記薬物送達用組成物を含み、該薬物送達用組成物に脊髄疾患治療用の薬物を添加する方法が記載された添付文書を一体に包装したキットを包含する。

本態様にかかる薬物送達組成物は、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーを含有する第1の組成物と、細胞透過性ペプチドを含有する第2の組成物とを一体に包装したキットを包含する。該キットは、前記第1の組成物と前記第2の組成物とを混合して、前記薬物送達用組成物を作製する方法が記載された添付文書を含んでいてもよい。該ブロックコポリマーと該細胞透過性ペプチドの含有比率は、前記薬物送達用組成物と同様である。該ブロック型コポリマーと該ペプチドは、前記添加剤や溶剤と共に充填されていて良い。

30

【 0 0 8 9 】

本態様にかかる薬物送達組成物によれば、薬物を、経鼻投与という簡易な方法で効率よく脊髄に送達することができる。

【 0 0 9 0 】

[医薬組成物]

本発明の第2の態様は、前記第1の態様にかかる薬物送達組成物と、脊髄疾患治療用の薬物と、を含有し、経鼻的に投与される、脊髄疾患を治療するための医薬組成物である。

40

【 0 0 9 1 】

本態様にかかる医薬組成物は、脊髄疾患を治療するための医薬組成物であり、脊髄疾患治療用の薬物を含有する。脊髄疾患としては、例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄小脳変性症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、慢性疼痛、脊髄損傷および脊髄腫瘍からなる群より選択される疾患が挙げられる。これらを治療するための薬物としては、前記「[薬物送達組成物]」で挙げたものと同様のものが挙げられる。

【 0 0 9 2 】

本態様にかかる医薬組成物の作製方法は、特に限定されない。本態様にかかる医薬組成物は、例えば、前第1の記態様にかかる薬物送達組成物を適切な溶媒に溶解または分散させた溶液と、薬物を適切な溶媒に溶解または分散させた薬液と、を混合・攪拌することで

50

、作製することができる。前記溶媒としては、例えば、水、生理食塩水、グルコース等張液、PBS、HEPES等の緩衝液等が挙げられる。

前記薬物送達組成物と脊髄疾患治療用の薬物との混合割合は、薬物の種類に応じて適宜設定すればよい。例えば、前記薬物送達組成物：脊髄疾患治療用の薬物 = 1 : 10 ~ 10 : 1 (質量比) 等が挙げられる。

【0093】

上記態様にかかる薬物送達組成物と、薬物とを混合することで、薬物が、前記ブロックコポリマーと膜透過性ペプチドとが形成する粒子(ミセル)に取り込まれ、薬物が搭載されたミセルが形成される。この形態で薬物を経鼻投与することで、薬物が効率よく脊髄に送達される。

10

【0094】

本態様にかかる医薬組成物の適用対象は、脊髄疾患を発症する動物であることが好ましい。例えば、本態様にかかる医薬組成物は、ヒト、又はヒト以外の哺乳類に好適に使用することができる。ヒト以外の哺乳類は、特に限定されないが、霊長類(サル、チンパンジー、ゴリラなど)、げっ歯類(マウス、ハムスター、ラットなど)、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。

【0095】

本態様にかかる医薬組成物の剤型は、経鼻投与に適した任意の剤型とすることができる。例えば、経鼻投与に適した剤型としては、液性製剤、エアゾール製剤、粉末製剤等が挙げられる。

20

【0096】

本態様にかかる医薬組成物の投与経路は、経鼻投与である。本態様にかかる医薬組成物を経鼻投与することにより、薬物を効率よく脊髄に送達することができる。

【0097】

本態様にかかる医薬組成物は、薬物の治療的有効量を投与することができる。「治療的有効量」とは、対象疾患の治療又は予防のために有効な薬剤の量を意味する。例えば、薬物の治療的有効量は、脊髄疾患の発症及び/又は進行を遅らせることができる量であり得る。治療的有効量は、薬物の種類、患者の症状、体重、年齢、及び性別等、並びに医薬組成物の剤型、及び投与方法等によって適宜決定すればよい。例えば、本実施形態の医薬組成物は、薬物の1回の投与量として、投与対象の体重1kgあたり、0.01~1000mgとすることができる。前記投与量は、0.15~800mg/kgであってもよく、0.5~500mg/kgであってもよく、1~400mg/kgであってもよく、1~300mg/kgであってもよい。

30

【0098】

本態様にかかる医薬組成物は、単位投与形態あたり、治療的有効量の薬物を含んでいてもよい。例えば、本態様にかかる医薬組成物における薬物の含有量は、0.01~90質量%であってもよく、0.05~80質量%であってもよく、0.1~60質量%であってもよい。

【0099】

本態様にかかる医薬組成物の投与間隔は、薬物の種類、患者の症状、体重、年齢、及び性別等、並びに医薬組成物の剤型、及び投与方法等によって適宜決定すればよい。投与間隔は、例えば、数時間毎、1日1回、2~3日に1回、1週間に1回等とすることができる。

40

【0100】

[他の態様]

一実施形態において、本発明は、経鼻的投与により薬物を脊髄に送達するための薬物送達用組成物の製造における、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマーと、膜透過性ペプチドの使用を提供する。

一実施形態において、本発明は、経鼻的投与により脊髄疾患を治療または予防するための医薬組成物の製造における、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステル

50

セグメントとが連結したブロックコポリマー、膜透過性ペプチド、および脊髄疾患用の薬物の使用を提供する。

一実施形態において、本発明は、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマー、膜透過性ペプチド、および脊髄疾患治療用の薬物を含む医薬組成物を、経鼻的に投与することを含む、脊髄疾患の治療方法を提供する。

一実施形態において、本発明は、経鼻的投与により薬物を脊髄に送達するための、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマー、および膜透過性ペプチドを提供する。

一実施形態において、本発明は、経鼻的投与により脊髄疾患を治療または予防するための、ポリエチレングリコールセグメントと疎水性ポリエステルセグメントとが連結したブロックコポリマー、および膜透過性ペプチドを提供する。

【実施例】

【0101】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0102】

[PEG - PCL - Tatの合成例]

PEG - PCL - Tatの合成には、以下のものを使用した。

MethoxyPEG - PCL (Methoxy poly(ethylene glycol) - block - poly(ε-caprolactone)2k - 2k、Sigma - Aldrich Co. ; PCLの数平均分子量 = 2,000、PEGの数平均分子量 = 2,000)

Tat - G (GRKKRRQRRRG (配列番号1), BEX Co., Ltd.)

【0103】

Tat - GとMPEG - PCLとをN,N - ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した。これに、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(WSCI)、4 - ジメチルアミノピリジンを加え、室温下で24時間反応させることにより、Tat - GのC末端であるGly - COOHとMPEG - PCLの-OH末端とをエステル結合させた。反応液を有機溶媒用透析膜(Spectra/Por Dialysis Membranes, MWCO: 3,500)に移し、蒸留水で3日間透析を行った。その後、凍結乾燥して、Tat - 修飾MPEG - PCL(PEG - PCL - Tat)の粉末を得た。

【0104】

[実施例1]

< RI標識デキストラン / PEG - PCL - Tatの経鼻投与試験 >

(RI標識デキストラン / PEG - PCL - Tat複合体の調製)

RI標識デキストランとして、[¹⁴C] - デキストラン(Mw: 10,000)を用いた。[¹⁴C] - デキストラン(4 uCi / mL 溶媒: HEPES緩衝液(pH 7.4))を、PEG - PCL - Tat(4.8 mg / mL 溶媒: HEPES緩衝液(pH 7.4))に、等量液量ずつ混合し、30分静置させることで、[¹⁴C] - デキストラン / PEG - PCL - Tat複合体を調製した。

【0105】

(経鼻投与)

マウス(ddY、オス、4 - 6週齢)に、RI標識デキストラン / PEG - PCL - Tat複合体の経鼻投与を行った。鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、30秒毎に、前記複合体を2 μLずつ、マウスの左右の鼻腔に交互に投与した。

【0106】

(分布効率の測定)

10

20

30

40

50

前記複合体の投与から一定時間後に、嗅球、前脳、後脳、脊髄を摘出し、各組織中の [^{14}C] の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。投与液の RI 活性も同様に測定し、投与量に対する分布効率 ($\% \text{ID} / \text{g tissue}$) を算出した。

【0107】

(結果)

大脳および脊髄における、RI 標識デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体の分布効率の経時変化を図 1A ~ B に示す。図 1A ~ B 中、「薬液単独」は RI 標識デキストランを単独投与、「PEG-PCL-Tat」は RI 標識デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体投与を示す。図 1A は、大脳における分布効率であり、図 1B は脊髄における分布効率である。図 1A ~ B に示すように、大脳および脊髄のいずれにおいても、薬液単独 (デキストラン単独) で投与した場合と比較して、デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体を投与した場合の方が、分布効率が高かった。特に、脊髄では、投与直後におけるデキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体の分布効率が高くなっていた (図 1B)。この結果は、デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体は、経鼻投与後、速やかに脊髄に送達されることを示している。

【0108】

経鼻投与から 60 分経過後の各組織における RI 標識デキストランの分布効率を表 1 に示す。表 1 中、「相対比」は、薬液単独 (デキストラン単独) で経鼻投与した場合の分布効率を 1 としたときの相対比である。表 1 中、「PEG-PCL」はデキストラン / PEG-PCL 複合体、「PEG-PCL-Tat」はデキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体を表す。

表 1 に示されるように、いずれの組織においても、デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体の分布効率が最も高かった。

脊髄では、他の組織と比較して、デキストラン / PEG-PCL-Tat 複合体とすることにより、分布効率が飛躍的に向上することが確認された。

【0109】

【表 1】

嗅球	ID%/g tissue	Standard Error	相対比
薬液単独	2.104	0.501	1
PEG-PCL	1.887	0.565	0.90
PEG-PCL-Tat	3.150	0.735	1.49
前脳部	ID%/g tissue	Standard Error	相対比
薬液単独	0.159	0.042	1
PEG-PCL	0.113	0.067	0.71
PEG-PCL-Tat	0.187	0.046	1.17
後脳部	ID%/g tissue	Standard Error	相対比
薬液単独	0.130	0.022	1
PEG-PCL	0.158	0.082	1.21
PEG-PCL-Tat	0.317	0.052	2.43
全脳	ID%/g tissue	Standard Error	相対比
薬液単独	0.177	0.033	1
PEG-PCL	0.145	0.072	0.82
PEG-PCL-Tat	0.218	0.040	1.23
脊髄	ID%/g tissue	Standard Error	相対比
薬液単独	0.042	0.018	1
PEG-PCL	0.067	0.048	1.60
PEG-PCL-Tat	0.185	0.016	4.40

【 0 1 1 0 】

[参考例 1]

< A L S モデルマウスに対する N A C の経口投与試験 >

(試験薬物)

N - アセチルシステイン (N - A c e t y l - C y s t e i n e : N A C) は、細胞内でグルタチオン (G S H) に変換され、G S H の抗酸化作用により細胞の酸化ストレスを抑制し、細胞保護作用を発現することが報告されている (Arakawa M and Ito Y. Cerebellum. 2007;6(4):308-14.) 。 N A C は、活性酸素の除去効果により A L S 治療に有効であると考えられている。そこで、A L S 治療用試験薬物として、N A C を用いた。

【 0 1 1 1 】

(試験動物)

試験動物として、A L S モデル動物の一つである G 9 3 A S O D 1 トランスジェニックマウス (G 9 3 A) を用いた。この G 9 3 A は、家族性 A L S に見いだされた変異 S O D 1 遺伝子を有し、1 4 ~ 1 6 週齢以降に下肢に始まる運動麻痺を呈すること (運動機能の指標の一つである R o t a r o d 潜時の低下) が知られている。本発明者らの研究グループでも、既に、この G 9 3 A の運動機能障害の変化 (進行) の特徴については報告している (Miyagisi H et al., J Pharmacol Sci., 118, 225-236 (2012)) 。

【 0 1 1 2 】

(N A C の投与)

G 9 3 A に対して、A L S 発症後の 1 5 週齢 (1 0 5 日齢) から N A C を経口投与し、運動機能と生存期間を調べた。ネガティブコントロールとして水を経口投与した。

【 0 1 1 3 】

(運動機能の評価)

運動機能は、R o t a - R o d (室町機械株式会社) を用いて評価した。マウスを R o t a - R o d に慣れさせるために、測定開始日の 3 週間前 (1 2 週齢) より訓練させた。R o t a - R o d の回転速度は、2 4 回 / 分とした。測定は週に 2 回行い、マウスが R o t a - R o d から落下するまでの時間 (秒) を測定した。カットオフ値を 3 0 0 秒とし、落下した場合は 3 回の平均値をその日のスコアとし、生後 1 3 3 日齢まで測定した。

【 0 1 1 4 】

(結果)

結果を図 2 に示す。N A C 投与群と水投与群との間で (A) 運動機能、(B) 生存期間に差はなく、N A C 投与による運動機能低下の抑制と延命効果は確認できなかった。また、運動機能を R o t a - R o d (室町機械株式会社) を用いて評価したところ、N A C 投与群と水投与群との間で、運動機能障害の進行に変化はなかった。

N A C は、血液脳関門 (B B B) の透過性が低いことや体内での安定性が低いことが知られている (Arakawa M and Ito Y. Cerebellum. 2007;6(4):308-14.) 。図 2 の結果は、経口投与であるために、N A C が、A L S の主な病巣である脊髄に移行しなかったためと考えられる。

【 0 1 1 5 】

[実施例 2]

< A L S モデルマウスに対する N A C / P E G - P C L - T a t の経鼻投与試験 >

(薬液の調製)

N A C / P E G - P C L - T a t 複合体の薬液 :

1 0 0 m g / m L の濃度で H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 4) に溶解した N A C と、2 0 m g / m L の濃度で H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 4) に溶解した P E G - P C L - T a t とを、等量液量ずつ混合し、3 0 分静置させることで、薬液を調製した。

【 0 1 1 6 】

N A C 単独薬液 :

5 0 m g / m L の濃度で H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 4) に N A C を溶解することで、薬液を調製した。

10

20

30

40

50

【0117】

(薬液の経鼻投与)

G93Aに対して、生後105日齢(15週齢)から120日齢までの期間、週5日の頻度で薬液の投与を行った。経鼻投与は、既に、報告している方法(Kanazawa T et al., J Vis Exp., 141, e58485 (2018))を用いて行った。鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、30秒毎に薬液2 μ Lずつを左右の鼻腔に交互に投与した(図3参照)。試験には、雄性マウスのみを用い、原則、投与は午前中(10:00~12:00)に行った。NAC/PEG-PCL-Tat複合体の薬液投与群およびNAC単独薬液投与群は、それぞれ6匹ずつとした。

【0118】

(運動機能の評価)

運動機能は、Rota-Rod(室町機械株式会社)を用いて評価した。マウスをRota-Rodに慣れさせるために、測定開始日の3週間前(12週齢)より訓練させた。Rota-Rodの回転速度は、24回/分とした。測定は週に2回行い、マウスがRota-Rodから落下するまでの時間(秒)を測定した。カットオフ値を300秒とし、落下した場合は3回の平均値をその日のスコアとし、生後122日齢まで測定した。

【0119】

(SMI-32の発現量の測定)

SMI-32の発現量は、Western-blot法により測定した。深麻酔下のマウスから腰髄を取り出して、細胞溶解液[150mM NaCl、1%Nonidet P-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、50mM Tris-HCl(pH8.0)、1%Triton X-100、5mM EDTA]中に回収し、超音波ホモジナイザー(Handy sonic、TOMY SEIKO)でホモジナイズした。その後、6000gで15分間遠心した上清を抽出液とした。タンパク定量は、ウシ血清アルブミンを標準物質としてBradfordらの方法により行った。5~15%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、イモビロンTM-Pトランスファーメンブレン(Millipore)に転写した。その後、メンブレンはブロッキング液[5%スキムミルク/Tween Tris 緩衝生理食塩水(TTB S)[20mM Tris-HCl(pH7.6)、137mM NaCl、0.05% Tween 20]]を用いて、室温で1時間ブロッキングした後、抗-SMI32抗体(1:1000)と4で一晩反応させた。TTBSで洗浄後、HRPで標識された二次抗体(1:10000)を室温で攪拌しながら1時間反応させ、洗浄後にECLまたはECL plus(GE Healthcare Life Sciences)を用いて検出した。内部標準として β -アクチンを用いた。バンドはScion画像処理ソフトを用いて解析した。

【0120】

(結果)

結果を図4Aに示す。NAC/PEG-PCL-Tat複合体の薬液およびNAC単独薬液を経鼻投与したものは、未治療のものと比較して、運動機能の低下が抑制された。なかでも、NAC/PEG-PCL-Tat複合体の薬液を経鼻投与したもので、運動機能の低下の抑制効果が高かった。

【0121】

図4Bは、薬液の経鼻投与後、運動ニューロンのマーカーであるSMI-32の発現量をWestern blot法により測定した結果を示す。図4Bの上図は、代表的なSMI-32および β -Actinのバンドパターンを示す。図4Bの下図は、SMI-32のバンド強度を、 β -Actinのバンド強度で除した値を表したグラフである。NAC/PEG-PCL-Tat複合体の薬液を経鼻投与したものでは、未治療及びNAC単独薬液を経鼻投与したものに比べて、SMI-32の発現量が向上した。

【0122】

これら結果は、NACを経鼻投与することにより、NACが脊髄に送達され、脊髄にお

10

20

30

40

50

いて抗酸化作用を発現したためと考えられる。また、NAC/PEG-PCL-Tat複合体で効果が高かったのは、複合体とすることにより脊髄への分布効率が向上したためと推測される。

【0123】

[実施例3]

<ALSモデルマウスに対するCysA/PEG-PCL-Tatの経鼻投与試験>

(薬液の調製)

CysA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液：

10mgのPEG-PCL-Tatと、1mgのシクロスポリンA(Cyclosporine A:CysA)と、をメタノールに溶解後、エバポレーションで溶媒留去した。生成したCysA含有PEG-PCL-Tatの薄膜をHEPES緩衝液(pH7.4)で水和後、0.8μmメンブランフィルターでろ過し、CysA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液とした。

10

【0124】

CysA単独薬液：

CysAを1mg/mLの濃度でHEPES緩衝液(pH7.4)に溶解し、CysA単独の薬液とした。

【0125】

(薬液の経鼻投与)

G93Aに対して、生後105日齢(15週齢)から120日齢までの期間、週5日の頻度で薬液の投与を行った。鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、30秒毎に薬液2μLずつを左右の鼻腔に交互に投与した(図3参照)。試験には、雄性マウスのみを用い、原則、投与は午前中(10:00~12:00)に行った。NAC/PEG-PCL-Tat複合体の薬液投与群は、8匹とした。

20

【0126】

(運動機能の評価)

運動機能は、Rota-Rod(室町機械株式会社)を用いて評価した。マウスをRota-Rodに慣れさせるために、測定開始日の3週間前(12週齢)より訓練させた。Rota-Rodの回転速度は、24回/分とした。測定は週に2回行い、マウスがRota-Rodから落下するまでの時間(秒)を測定した。カットオフ値を300秒とし、落下した場合は3回の平均値をその日のスコアとし、生後122日齢まで測定した。

30

【0127】

(結果)

結果を図5に示す。CysA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液を経鼻投与したものは、未治療のものと比較して、運動機能の低下が抑制された。

この結果はCysA/PEG-PCL-Tat複合体を経鼻投与することにより、CysAが脊髄に送達され、脊髄において治療効果を発現したためと考えられる。

【0128】

[実施例4]

<ALSモデルマウスに対するhuman SOD1(hSOD1)標的siRNA/PEG-PCL-Tatの経鼻投与による脊髄内hSOD1標的siRNA相対的発現量の測定試験>

40

(siRNAの配列)

hSOD1標的siRNA(センス鎖配列)：

5'-caagaugcugugccgaugu-3'(配列番号12)

コントロールsiRNA(センス鎖配列)：

5'-aucgcgcgaugaacguaTT-3'(配列番号13)

【0129】

(薬液の調製)

hSOD1標的siRNA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液：

50

160 nmol/mLの濃度でHEPES緩衝液(pH7.4)に溶解したhSOD1標的siRNAと、96 mg/mLの濃度でHEPES緩衝液(pH7.4)に溶解したPEG-PCL-Tatとを、等量液量ずつ混合し、30分静置させることで、薬液を調製した。

【0130】

コントロールsiRNA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液：

160 nmol/mLの濃度でHEPES緩衝液(pH7.4)に溶解したコントロールsiRNAと、96 mg/mLの濃度でHEPES緩衝液(pH7.4)に溶解したPEG-PCL-Tatとを、等量液量ずつ混合し、30分静置させることで、薬液を調製した。

10

【0131】

(薬液の経鼻投与)

G93Aに対して、1日1回、3日間連続で薬液の投与を行った。鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、計25 µLの薬液を30秒毎に2 µLずつ左右の鼻腔に交互に投与した(図3参照)。試験には、雄性マウスのみを用い、原則、投与は午前中(10:00~12:00)に行った。各薬液投与群は、4匹とした。

【0132】

(脊髄内human SOD1 mRNA発現量の測定)

mRNA発現量はリアルタイムPCR法により行った。摘出した脊髄にRNA抽出試薬を加えホモジナイズしたのち、2-プロプラノロールによりTotal RNAを沈殿させ回収した。回収したTotal RNAをDNase処理により精製した。吸光度から算出した濃度から1 µg相当のRNA量を算出し、逆転写用試薬を加えて逆転写反応を行い、cDNAを得た。得られたcDNAに、PCR反応液(プライマー、SYBR Green)を加え、標的となるhSOD1及びリファレンスのGAPDHについてリアルタイムPCRを行った。反応終了後、hSOD1及びGAPDHのサイクル数(Ct値)を用い、Ct法によりhSOD1の相対的な発現量を算出した。

20

【0133】

hSOD1の相対的な発現量の算出方法を以下に示す。

(1)式(1)より各脊髄組織のCt値を求めた。

30

$$Ct(hSOD1) - Ct(GAPDH) = Ct \quad (1)$$

Ct: ある一定量のDNA量に達するまでに必要なPCRサイクル数

(2)式(2)より全ての脊髄組織の中でCtが最大の値から各Ctを減じ、各脊髄組織のCtを求めた。

$$Ct(max) - Ct = -Ct \quad (2)$$

(3)式(3)にCt値を代入し、得られた値を各脊髄組織ごとに平均した。

$$2^{-Ct} \dots (3)$$

(4)式(4)より各siRNA投与群/未処置群の比を標的mRNAのサイレンシング効果として求めた。

標的mRNAサイレンシング効果

40

$$= (各核酸投与群の2^{-Ct}) / (未処置群の2^{-Ct}の平均) \quad (4)$$

【0134】

(結果)

結果を表2に示す。hSOD1標的siRNA/PEG-PCL-Tat複合体の薬液を経鼻投与したものは、コントロールsiRNA/PEG-PCL-Tat複合体や未処置のものと比較して、脊髄中の標的hSOD1 mRNAのGAPDH mRNAに対する相対的な発現量が65%まで抑制された。この結果はsiRNA/PEG-PCL-Tat複合体を経鼻投与することにより、siRNAが脊髄中に送達され、脊髄において配列特異的にRNAサイレンシング効果を発揮したためと考えられる。

【0135】

50

【表 2】

	相対的 hSOD1/GAPDH mRNA 発現比	実験誤差
未処置		0.078
hSOD1 標的 siRNA/PEG-PCL-Tat	1	0.061
コントロール siRNA/PEG-PCL-Tat	0.65	0.093

【0136】

10

[実施例 5]

< 神経障害性疼痛モデルマウスに対する NAC / PEG - PCL - Tat の経鼻投与試験 > (試験動物)

試験動物として、1990年にSelzlerらによって報告された (Selzer Z. et al, Pain, 43, 205-218 (1990)) ラット坐骨神経半周結紮モデルをマウスに応用し、イソフルラン (導入 4 % , 維持 2 %) 麻酔下において、ICRマウス (6 週齢、オス) の右肢坐骨神経を手術用縫合糸ネスコスーチャー (アルフレッサファーマ) で半周結紮することで作製した坐骨神経部分結紮モデルマウス (partial sciatic nerve ligated mice : PSNLマウス) を用いた。

【0137】

20

(薬液の調製)

NAC / PEG - PCL - Tat 複合体の薬液 :

100 mg / mL の濃度で HEPES 緩衝液 (pH 7 . 4) に溶解した NAC と、25 mg / mL の濃度で HEPES 緩衝液 (pH 7 . 4) に溶解した PEG - PCL - Tat とを、等量液量ずつ混合し、30分静置させることで、薬液を調製した。

【0138】

(薬液の経鼻投与)

PSNLマウスに対して、神経結紮8日後から13日後まで、毎日、午前中 (10 : 00 ~ 12 : 00) に一回投与を行った。経鼻投与は、既に、報告している方法 (Kanazawa T et al., J Vis Exp., 141, e58485 (2018)) を用いて行った。鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、30秒毎に薬液 1 μ L ずつを左右の鼻腔に交互に投与した (図3参照) 。NAC / PEG - PCL - Tat 複合体の薬液投与は、10匹とした。

30

【0139】

(触刺激に対するアロディニア反応の測定)

触刺激に対するアロディニア反応は、神経結紮3日、5日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、および13日日後に測定した。機械的アロディニアは、マウスの両足底に von Frey filament (North Coast Medical, Inc.) 刺激を与えて逃避反応が出現する最小圧力を up - down法 (Horiguchi, N et al., Pharmacol. Biochem. Behav., 113, 46-52. (2013)) にて測定した。なお、各測定前にはポリプロピレン製の網上に設置したアクリル製円筒 (直径 9 cm、高さ 20 cm) 内でマウスを最低1時間馴れさせ、無拘束下にて測定を行った。

40

【0140】

(結果)

結果を図6A~Bに示す。NAC / PEG - PCL - Tat 複合体の薬液を経鼻投与したものは、未治療のものと比較して、神経結紮側後肢 (右肢) における逃避閾値の低下が有意に抑制された。この結果は、NAC / PEG - PCL - Tat 複合体を経鼻投与することにより、NACが脊髄に送達され、脊髄において治療効果を発現したためと考えられる。

【0141】

50

[PEG - PCL / ペプチド混合ミセルの調製例]

PEG - PCL / ペプチド混合ミセルの調製には、以下のものを使用した。

MethoxyPEG - PCL (MW: 2000 - 2000, Sigma - Aldrich Co.)

ステアリン酸修飾塩基性オリゴペプチド (STR - CHHRRRRHHC, BEX Co., Ltd.; CHHRRRRHHC (配列番号2) のN末端のアミノ基に、-CO- を介してステアリル基が結合した修飾ペプチド)

【0142】

PEG - PCL (9.6 mg) をテトラヒドロフラン (1.0 mL) に溶解し、528 μ L を抜き出した (A液)。ステアリン酸修飾塩基性オリゴペプチド (4.0 mg) を50 mMのHEPES緩衝液 (pH = 7.4、1.6 mL) に溶解し、798 μ L を抜き出し、これに100 mMジチオトレイトール (750 μ L) を混合した (B液)。B液にA液を混合・攪拌し、10 mMのHEPES緩衝液 (pH = 7.4、1650 μ L) で希釈し、遠心式フィルターユニット (Amicon Ultra、メンブレンNMWL3, 000、メルクミリポア社製) を用いて、約900 μ Lまで濃縮した。さらに、10 mMのHEPES緩衝液 (pH = 7.4、1650 μ L) で希釈・濃縮を2回繰り返すことで、混合ミセルを得た。

【0143】

[実施例6]

< RI標識デキストラン / PEG - PCL / ペプチド複合体の経鼻投与試験 >

(RI標識デキストラン / PEG - PCL / ペプチド複合体の調製)

[¹⁴C] - デキストラン (4 μ Ci / mL 溶媒: HEPES緩衝液 (pH 7.4)) を10 mMのHEPES緩衝液 (pH = 7.4、2250 μ L) で希釈した (C液)。上記で得られたPEG - PCL / ペプチド混合ミセルに、C液を混合・攪拌することで、[¹⁴C] - デキストラン、Mw: 10,000) / PEG - PCL / ペプチド混合ミセル複合体を得た。

【0144】

(経鼻投与)

鼻孔付近を開閉可能なマスクを用いた吸入麻酔下で、マイクロピペットにより、30秒毎に、前記複合体を2 μ Lずつ、左右の鼻腔に交互に投与した。

【0145】

(分布効率の測定)

投与から30分後に脊髄を摘出し、脊髄組織中の[¹⁴C]の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。投与液のRI活性も同様に測定し、投与量に対する分布効率 (% ID / g tissue) を算出した。

【0146】

(結果)

結果を図7に示す。図7中、「薬液単独」はRI標識デキストランを単独投与したものを示し、「PEG - PCL / ペプチド」は、RI標識デキストラン / PEG - PCL / ペプチド複合体を投与したものを示す。図7に示すように、PEG - PCL / ペプチドは、デキストラン複合体とすることにより、脊髄への分布効率が飛躍的に向上することが確認された。

【0147】

表3に、薬液単独、デキストラン / PEG - PCL複合体 (PEG - PCL)、RI標識デキストラン / PEG - PCL / ペプチド複合体 (PEG - PCL / ペプチド)、又はRI標識デキストラン / PEG - PCL - Tat (PEG - PCL - Tat) を経鼻投与したときの脊髄への分布効率をまとめた。脊髄への分布効率は、RI標識デキストラン / PEG - PCL - Tatが最も高く、次いでRI標識デキストラン / PEG - PCL / ペプチド複合体が高かった。この結果から、PEG - PCL - Tatが、脊髄への薬物送達に最も適していることが確認された。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 8 】

【表 3】

	ID%/g tissue	SE	相対比
薬液単独	0.042	0.018	1
PEG-PCL	0.067	0.048	1.60
PEG-PCL/ペプチド	0.092	0.072	2.19
PEG-PCL-Tat	0.185	0.016	4.40

【産業上の利用可能性】

10

【 0 1 4 9 】

本発明によれば、侵襲性の低い、簡易な方法で薬物を脊髄に送達可能な薬物送達用組成物、および前記薬物送達組成物を含有する医薬組成物が提供される。

20

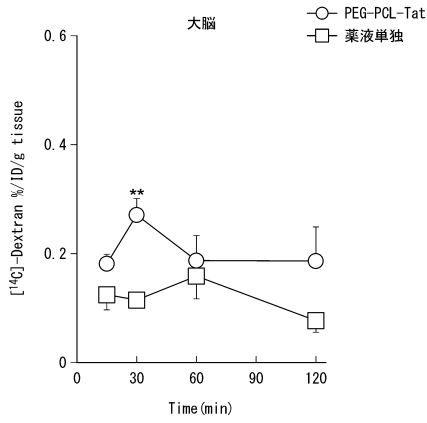
30

40

50

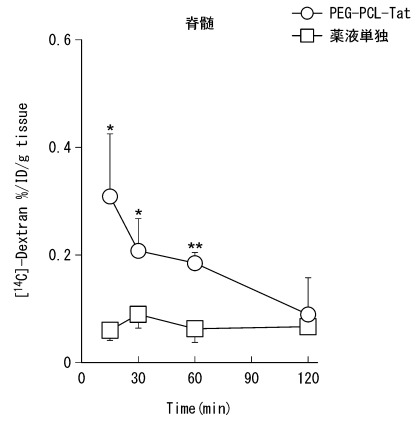
【図面】

【図 1 A】



*P<0.05 (t-test), **P<0.01 (t-test), mean±S. E. (n=4-7)

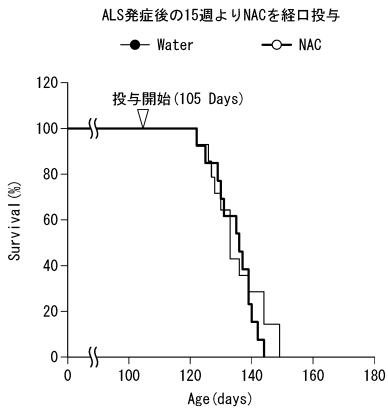
【図 1 B】



*P<0.05 (t-test), **P<0.01 (t-test), mean±S. E. (n=4-7)

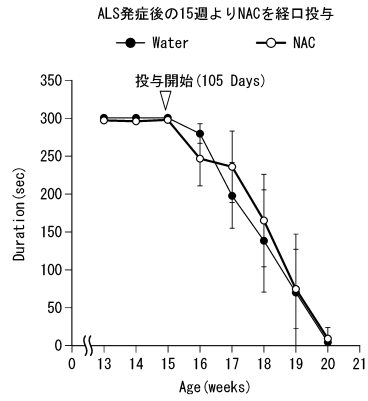
10

【図 2 A】



	平均値	中央値
Water (n=14)	135 days	133 days
NAC (n=13)	135 days	136 days

【図 2 B】



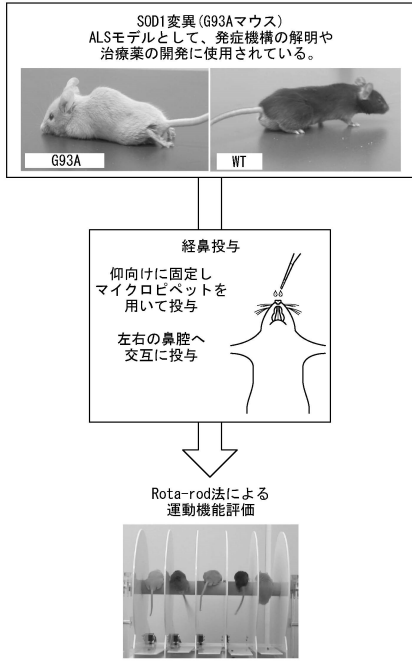
20

30

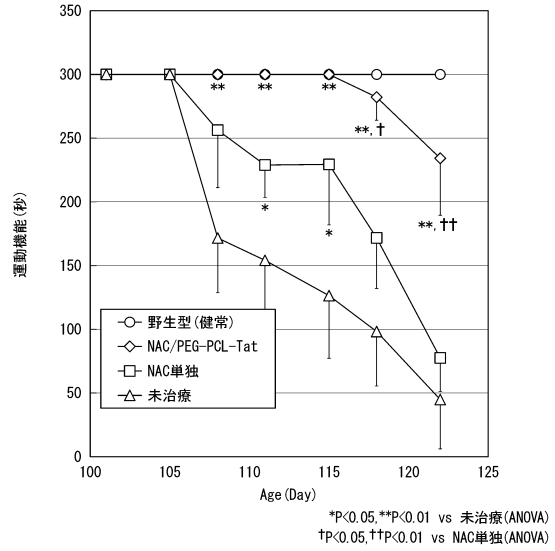
40

50

【 図 3 】



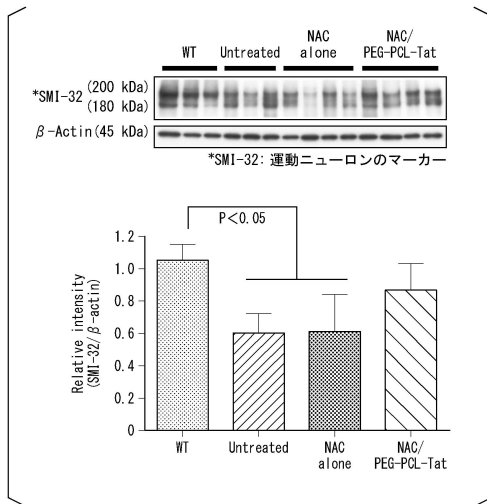
【 図 4 A 】



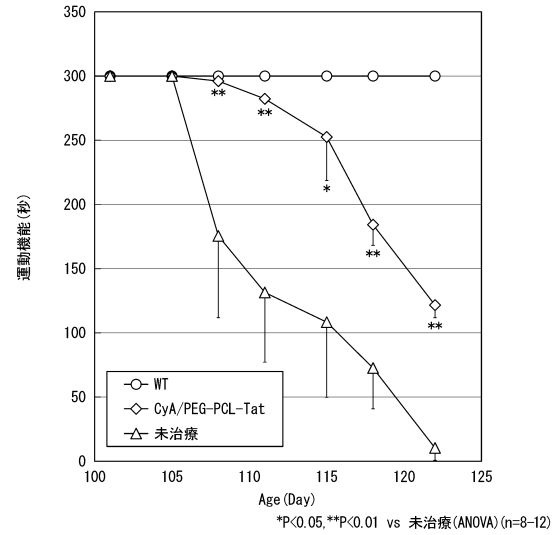
10

20

【 図 4 B 】



【 図 5 】

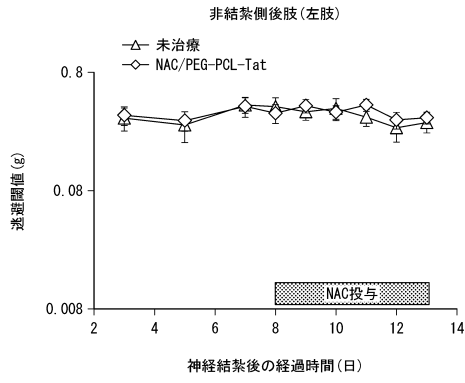


30

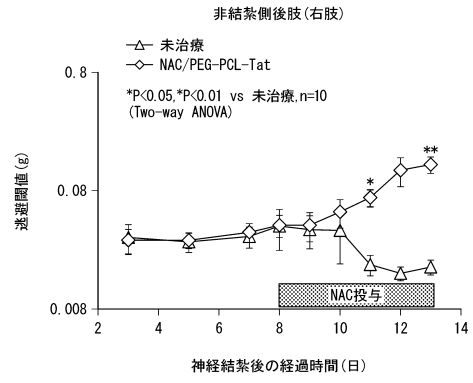
40

50

【図 6 A】

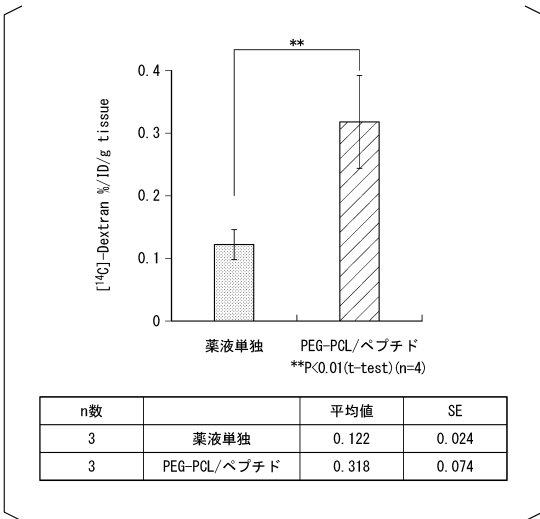


【図 6 B】



10

【図 7】



20

【配列表】

0007211603000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 9/107(2006.01)

F I

A 6 1 K 9/107

(72)発明者 小菅 康弘

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 宮岸 寛子

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 鈴木 直人

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 9 / 0 1 3 2 5 5 (W O , A 1)

特表 2 0 0 2 - 5 3 1 4 8 9 (J P , A)

金沢貴憲, 非侵襲的な脳内への薬物送達技術の開発と脳神経疾患治療への応用, 薬学雑誌, 2018年, Vol. 138, No. 4, pp. 443-50, ISSN 0031-6903

金沢貴憲, 高島由季, 高分子ミセルをキャリアとする経鼻投与による脳への薬物・核酸デリバリー, Drug Delivery System, 2013年, Vol. 28, No. 4, pp. 318-27, ISSN 1881-2732

丸花奈央, 外8名, リポソームの経鼻投与後の脳・脊髄移行性に及ぼす粒子サイズおよびPEG修飾の影響, 第62回日本薬学会関東支部大会 日本薬学会関東支部 若手シンポジウム

要旨集, 2018年09月10日, p. 172

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 7 / 0 0

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)