



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월29일

(11) 등록번호 10-1912978

(24) 등록일자 2018년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 81/00 (2006.01) *A61K 47/30* (2017.01)
C08G 69/48 (2006.01) *C08L 87/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7013186
(22) 출원일자(국제) 2012년11월19일
심사청구일자 2017년11월02일
(85) 번역문제출일자 2014년05월16일
(65) 공개번호 10-2014-0106511
(43) 공개일자 2014년09월03일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/079897
(87) 국제공개번호 WO 2013/073697
국제공개일자 2013년05월23일
(30) 우선권주장
61/561,022 2011년11월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2011173960 A
KR1020070006840 A
KR1020080064827 A
WO2009140421 A2

(73) 특허권자
도쿄 다이카꾸
일본 도쿄도 분쿄구 혼고 7-3-1
고쿠리츠 다이가쿠호우징 도쿄이카시카다이가쿠
일본국 도쿄도 분쿄구 유시마 1초메 5반 45고
나노카리아 가부시키가이샤
일본 지바켄 가시와시 와카시바 226반치 39 줌오
144가쿠15
(72) 발명자
가타오카, 가즈노리
일본 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7초메 3반 1고
도쿄 다이카꾸 내
이시이, 다케히코
일본 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7초메 3반 1고
도쿄 다이카꾸 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 유은결

(54) 발명의 명칭 **페닐보론산기가 도입된 블록 공중합체 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은, 바이오계 약물의 혈중에서의 안정성과 환부에서의 방출성을 양립하는 캐리어로서의 블록 공중합체를 제공한다. 본 발명의 블록 공중합체는, 폴리아미노산쇄 세그먼트와 친수성 중합체쇄 세그먼트를 포함하는 블록 공중합체이며, 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트가 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기와, 측쇄에 생리적 pH 부근에 pKa를 갖도록 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 페닐보론산기를 갖는 아미노산 잔기를 포함한다.

(72) 발명자

나이토, 미츠루

일본 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7쵸메 3반 1고
도쿄 다이가쿠 내

마츠모토, 아키라

일본 1138510 도쿄도 분쿄구 유시마 1쵸메 5반 45
고 고쿠리츠 다이가쿠호우징 도쿄이카시카다이가쿠
내

가토, 야스키

일본 2270882 지바켄 가시와시 가시와노하 5쵸메
4반 19고 나노카리아 가부시키키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

폴리아미노산쇄 세그먼트와 친수성 중합체쇄 세그먼트를 포함하는 블록 공중합체와, 핵산의 복합체에 의해 구성된 의약 조성물이며,

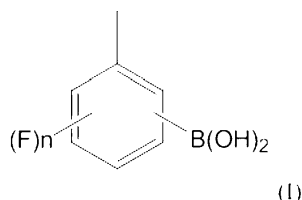
상기 폴리아미노산쇄 세그먼트가 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기와, 측쇄에 8 미만의 pKa를 갖도록 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 페닐보론산기를 갖는 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 핵산이 상기 페닐보론산기와 가역적인 공유 결합을 형성한 상태에 있는 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치환된 페닐보론산기의 pKa가 7.5 미만인 의약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치환된 페닐보론산기가 하기 화학식 (I)로 표시되는 불소화 페닐보론산기인 의약 조성물.



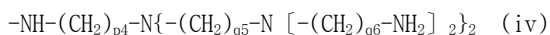
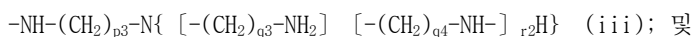
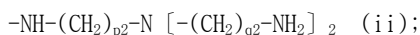
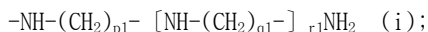
(화학식 (I) 중, F는 독립적으로 존재하고, n은 1, 2, 3 또는 4 중 어느 하나이며, n이 1일 때 F 및 B(OH)₂의 도입 개소는 오르토, 메타, 파라 중 어느 것일 수도 있음)

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 양이온성기가 아미노기인 의약 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기가 리신 잔기, 또는 산성 아미노산의 카르복실기(-C(=O)OH)의 -OH부가 하기 화학식 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나의 기로 치환된 아미노산 잔기인 의약 조성물.



(화학식 (i) 내지 (iv)에 있어서, p1 내지 p4, q1 내지 q6 및 r1 내지 r2는 각각 서로 독립적으로 1 내지 5의 정수임)

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트 중에 있어서의 상기 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수와 상기 치환된 페닐보론산기의 수가 이하의 관계를 충족하는 의약 조성물.

$$\sqrt{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수}} + 2\sqrt{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}} \geq 12.0$$

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트가 측쇄에 소수성기를 갖는 아미노산 잔기를 더 포함하는 의약 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 기재된 의약 조성물을 형성할 수 있는 블록 공중합체이며, 폴리아미노산쇄 세그먼트와 친수성 중합체쇄 세그먼트를 포함하고, 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트가 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기와, 측쇄에 8 미만의 pKa를 갖도록 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 페닐보론산기를 갖는 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트 중에 있어서의 양이온성기를 갖지만 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 아미노산 잔기의 수와 상기 치환된 페닐보론산기의 수가 이하의 관계를 충족하는 블록 공중합체.

$$\sqrt{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수}} + 2\sqrt{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}} \geq 12.0$$

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페닐보론산기가 도입된 블록 공중합체 및 당해 블록 공중합체와 약물을 포함하는 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질이나 핵산과 같은 생체 고분자를 이용하는 바이오 의약품은, 저분자 화합물을 이용하는 종래형의 의약품에 비해 효소로 분해되거나 면역계에 의해 배제되기 쉽다. 본 발명자는, 이러한 바이오계 약물의 환부로의 도달성을 향상시키는 관점에서, 폴리아미노산계의 블록 공중합체를 이용한 약물 수송체(DDS)의 개발을 진행시켜 왔다. 당해 개발의 목표 중 하나는 혈중에서의 안정성(바이오계 약물의 유지성)과 환부에서의 약물 방출성이 양립되는 캐리어의 제공에 있다.

[0003] 또한, 본 발명자는 당해 DDS 개발과는 다른 목적으로, 당 센서나 당 응답 액추에이터에 대한 적응을 목표로 한 생체 적합성 재료의 기초적인 연구도 진행시켜 왔다. 예를 들면, 생체 적합성 재료로서 페닐환을 불소화한 페닐보론산계 화합물이 제조되고 있다(특허문헌 1).

[0004] 또한, 페닐보론산기를 이용하여 핵산을 폴리아미노산계 유도체에 담지시키고, 핵산이나 핵산 관련 물질의 거동이나 구조 해석에 적용하는 시약에 관한 종래 기술로서 특허문헌 2가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2011-140537호 공보

(특허문헌 0002) 일본 특허 공개 제2002-179683호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 주목적은, 바이오계 약물의 혈중에서의 안정성과 환부에서의 방출성이 양립되는 캐리어의 제공에 있다. 또한, 특허문헌 2에는 핵산 관련 물질을 담지시킨 시약을 DDS로서 응용 전개하는 취지의 기술이 있다. 그러나, 이와 같이 하여 전개되는 DDS는 유사 RNA와 같은 프로드러그에 지나지 않으며, 침전이 발생하기 쉬운 상태에 있다. 특허문헌 2에 기재된 기술은 애당초 본 발명자가 개발을 진행시키는 DDS와는 이질적인 DDS를 지향하고 있으며, 혈중에서의 안정성이 우수한 캐리어로서는 용이하게 적용할 수 없다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명자는, DDS 개발과는 상이한 목적으로 제조한 생체 적합성 재료가, 폴리아미노산계의 블록 공중합체에 의한 바이오계 약물의 혈중에서의 안정성을 대폭 향상시키는 것을 발견하여, 본 발명을 완성시켰다. 즉, 본 발명에 따르면, 폴리아미노산쇄 세그먼트와 친수성 중합체쇄 세그먼트를 포함하는 블록 공중합체이며, 당해 폴리아미노산쇄 세그먼트가 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기와, 측쇄에 생리적 pH 부근에 pKa를 갖도록 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 페닐보론산기를 갖는 아미노산 잔기를 포함하는 블록 공중합체가 제공된다.
- [0008] 본 발명의 다른 국면에 따르면, 복합체가 제공된다. 당해 복합체는 상기 블록 공중합체와 생체 고분자의 복합체이다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명에 따르면, 바이오계 약물의 혈중에서의 안정성과 표적 세포 내에서의 방출성을 양립할 수 있는 캐리어가 제공된다.

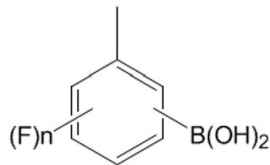
도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 FPBA기 함유량과 복합체의 안정성의 관계를 도시하는 도면이다.
- 도 2는 블록 공중합체의 독성 시험 결과를 도시하는 도면이다.
- 도 3은 복합체의 독성 시험 결과를 도시하는 도면이다.
- 도 4는 복합체의 pH 안정성을 도시하는 도면이다.
- 도 5는 복합체의 siRNA의 방출성을 도시하는 도면이다.
- 도 6은 복합체의 세포 내로의 도입능을 도시하는 도면이다.
- 도 7은 복합체의 혈중 체류성을 도시하는 도면이다.
- 도 8은 복합체의 항암 활성을 도시하는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] [A. 블록 공중합체]
- [0012] 본 발명의 블록 공중합체는 폴리아미노산쇄 세그먼트와 친수성 중합체쇄 세그먼트를 포함한다. 당해 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 측쇄에 양이온성기를 갖는 아미노산 잔기(이하, 「양이온성 아미노산 잔기」라 하는 경우가 있음)와, 측쇄에 생리적 pH 부근에 pKa를 갖도록 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 페닐보론산기(이하, 「치환 PBA기」라 하는 경우가 있음)를 갖는 아미노산 잔기(이하, 「치환 PBA기 함유 아미노산 잔기」라 하는 경우가 있음)를 포함한다. 여기서, 양이온성 아미노산 잔기와 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기는 상이한 아미노산 잔기일 수도 있고, 동일한 아미노산 잔기일 수도 있다. 구체적으로는, 당해 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 측쇄에 치환 PBA기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기와 측쇄에 양이온성기를 갖지 않는 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기를 포함할 수도 있고, 이들 중 한쪽 또는 양쪽 대신에, 또는 이들 이외에, 측쇄에 양이온성기와 치환 PBA기의 양쪽을 갖는 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다.
- [0013] 상기 치환 PBA기는, 혈액으로 대표되는 생체 환경(pH 7.5 미만)에 적합하게 하는 관점에서, 생리적 pH 부근에 pKa를 갖도록 페닐보론산기를 구성하는 페닐환 중 적어도 1개의 수소가 임의의 치환기에 의해 치환되어 있다.

상기 치환 PBA기의 pKa는 8 미만인 것이 바람직하고, 7.5 미만인 것이 보다 바람직하다. 치환되는 수소의 수는 1, 2, 3 또는 4이며, 수소가 1개만 치환될 때의 치환기 및 B(OH)₂의 도입 개소는 오르토, 메타, 파라 중 어느 것일 수도 있다. 치환기로서는, 예를 들면 불소, 염소, 브롬 등의 할로겐, 니트로기 등을 들 수 있다. 이 중에서도, 블록 공중합체의 친수성을 높이는 관점 및 pKa를 7.5 미만으로 하는 관점에서, 치환 PBA기는 하기 화학식 (I)로 표시되는 불소화 페닐보론산기(이하, 「FPBA기」라 하는 경우가 있음)인 것이 바람직하다. 상기 치환 PBA기의 pKa는 단량체로서 합성한 치환 PBA기 함유 아미노산으로부터 특징하는 것으로 한다. 상기 치환 PBA기의 pKa의 하한값은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 2, 또한 예를 들면 3일 수도 있다.



(I)

[0014]

[0015]

(화학식 (I) 중, F는 독립적으로 존재하고, n은 1, 2, 3 또는 4 중 어느 하나이며, n이 1일 때 F 및 B(OH)₂의 도입 개소는 오르토, 메타, 파라 중 어느 것일 수도 있음)

[0016]

본 발명의 블록 공중합체는, 폴리아미노산쇄 세그먼트의 측쇄 부분에 양이온성기를 가짐으로써, 생체 고분자와 회합하여 복합체, 예를 들면 폴리 이온 콤플렉스(PIC)를 형성할 수 있다.

[0017]

또한, 본 발명의 블록 공중합체가 폴리아미노산쇄 세그먼트의 측쇄 부분에 치환 PBA기를 가짐으로써, 다음과 같은 효과가 발휘될 수 있다. 첫째로, 폴리아미노산쇄 세그먼트의 소수성이 높아짐으로써, 수성 매체 중에 있어서의 복수의 본 발명의 블록 공중합체간에는 정전 상호 작용 이외에 소수성 상호 작용이 적절하게 작용한다. 그 결과, 중합체간의 회합력이 증강되기 때문에, 본 발명의 블록 공중합체는 수성 매체 중에서 매우 안정된 중합체 미셀을 형성할 수 있다. 또한, 당해 중합체 미셀에 있어서, 본 발명의 블록 공중합체는 폴리아미노산쇄 세그먼트를 내측을, 친수성 중합체쇄 세그먼트를 외측을 향해 방사상으로 배열하고 있다고 추측된다. 당해 수성 매체로서는, 예를 들면 물, 생리 식염수, 인산 완충액, 탄산 완충액, 붕산 완충액, 아세트산 완충액 등의 수성 완충액을 들 수 있다.

[0018]

둘째로, 페닐보론산 화합물은 수성 매체 중에 있어서 1,2-디올(cis-디올) 또는 1,3-디올을 갖는 분자와의 가역적인 공유 결합능을 갖고 있다. 따라서, 본 발명의 블록 공중합체는, 수성 매체 중에 있어서 1,2-디올 등을 갖는 생체 고분자 (예를 들면, siRNA)와 양이온성기와의 정전적인 결합 이외에, 치환 PBA기와의 공유 결합을 통해 강하게 결합할 수 있고, 그 결과 안정된 복합체(예를 들면, 당해 생체 고분자를 내포한 중합체 미셀)를 형성할 수 있다. 특히, 2본쇄의 각각의 3' 말단 리보오스에 cis-디올을 갖는 siRNA와는 당해 2개의 말단에서 결합할 수 있기 때문에, 매우 안정된 복합체의 형성이 가능하다.

[0019]

셋째로, 페닐보론산의 pKa는 통상 8 내지 9 정도이고, 당해 pKa 부근에서 상기 1,2-디올 등을 갖는 분자와의 공유 결합능이 최대가 되기 때문에, pH 7.5 미만인 생체 환경하에서의 페닐보론산의 사용은 원리적으로 곤란한 것으로 여겨져 왔다. 그러나, 본 발명의 블록 공중합체에 도입되는 치환 PBA기는, 생리적 pH 부근에 pKa를 갖도록(바람직하게는 8 미만의 pKa, 보다 바람직하게는 7.5 미만의 pKa를 나타내도록) 페닐환의 수소가 치환되어 있기 때문에, 생체 환경하에서 적절하게 상기 결합능을 발휘할 수 있다.

[0020]

넷째로, 상기 치환 PBA기는 pKa 이하의 pH 환경하에서 고도로 소수화되기 때문에, pKa를 적절하게 제어함으로써 생체 환경하에서 상기 1,2-디올 등을 갖는 분자와의 결합과 블록 공중합체간의 소수성 상호 작용의 쌍방을 강화할 수 있다. 그 결과, 이들 분자와의 매우 안정된 복합체가 얻어질 수 있다.

[0021]

[A-1. 폴리아미노산쇄 세그먼트]

[0022]

상기 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 측쇄에 양이온성기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기와 측쇄에 치환 PBA기를 갖는 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기를 포함한다.

[0023]

상기 양이온성 아미노산 잔기로서는, 측쇄에 아미노기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기가 바람직하다. 측쇄에 아미노기를 가짐으로써, 수성 매체 중에 있어서 상기 아미노기가 치환 PBA기의 붕소에 배위될 수 있다. 그 결과, 치환 PBA기의 도입에 의한 블록 공중합체의 소수화가 방지되고, 높은 친수성이 유지될 수 있다. 또한, 아미노기가 배위된 상태에서도, 치환 PBA기의 상기 cis-디올을 갖는 분자 등과의 결합능은 유지될 수 있다.

- [0024] 상기 측쇄에 아미노기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기가 유래하는 아미노산으로서는, 예를 들면 리신, 오르니틴, 아르기닌, 호모아르기닌, 히스티딘 등의 염기성 아미노산 및 산성 아미노산에 임의의 적절한 아민 화합물이 도입된 아미노산 유도체를 들 수 있다. 이 중에서도, 리신 및 산성 아미노산의 카르복실기(-C(=O)OH)의 -OH부가 하기 화학식 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나의 기로 치환된 아미노산 유도체가 바람직하고, 리신 및 아스파라긴산의 α 위치 또는 β 위치 또는 글루탐산의 α 위치 또는 γ 위치의 카르복실기(-C(=O)OH)의 -OH부가 하기 화학식 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나의 기로 치환된 아미노산 유도체가 보다 바람직하고, 리신 및 아스파라긴산의 α 위치 또는 β 위치 또는 글루탐산의 α 위치 또는 γ 위치의 카르복실기(-C(=O)OH)의 -OH부가 하기 화학식 (i)의 기로 치환된 아미노산 유도체가 더욱 바람직하다.
- [0025] $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{p1}\text{- [NH-(CH}_2\text{)}_{q1}\text{-]}_{r1}\text{NH}_2$ (i);
- [0026] $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{p2}\text{-N [-(CH}_2\text{)}_{q2}\text{-NH}_2\text{]}_2$ (ii);
- [0027] $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{p3}\text{-N}\{ [-(CH}_2\text{)}_{q3}\text{-NH}_2\text{]} [-(CH}_2\text{)}_{q4}\text{-NH-]}_{r2}\text{H}\}$ (iii); 및
- [0028] $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{p4}\text{-N}\{ \text{-(CH}_2\text{)}_{q5}\text{-N [-(CH}_2\text{)}_{q6}\text{-NH}_2\text{]}_2\}_2$ (iv)
- [0029] (화학식 (i) 내지 (iv)에 있어서, p1 내지 p4, q1 내지 q6 및 r1 내지 r2는 각각 서로 독립적으로 1 내지 5의 정수임)
- [0030] 상기 화학식 (i) 내지 (iv)에 있어서, p1 내지 p4 및 q1 내지 q6은 각각 서로 독립적으로 바람직하게는 2 또는 3이고, 보다 바람직하게는 2이다. 또한, r1 내지 r2는 각각 서로 독립적으로 바람직하게는 1 내지 3의 정수이다.
- [0031] 상기 양이온성 아미노산 잔기가 리신 잔기인 경우에는 폴리아미노산쇄의 합성이 용이하며, 얻어진 블록 공중합체가 생체 적합성이 매우 우수하다는 이점이 있다. 또한, 상기 양이온성 아미노산 잔기가 산성 아미노산의 카르복실기(-C(=O)OH)의 -OH부가 상기 화학식 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나의 기로 치환된 아미노산 잔기인 경우, 이들 잔기는 상이한 복수의 아민 관능기를 갖기 때문에, pKa가 복수 단계를 나타내고, 생리 조건인 pH 7.4에 있어서는 복수의 아민 관능기는 부분적으로 프로톤화 상태에 있으며, 세포에 대한 손상이 낮은 것이 밝혀져 있다. 또한, 핵산 등과 상호 작용함으로써 PIC 등의 복합체를 적절하게 형성할 수 있다는 이점이 있다. 또한, 이와 같이 하여 형성된 복합체가 엔도솜 내(pH 5.5)로 도입되어 pH가 낮아지면, 폴리아미노산쇄 세그먼트의 프로톤화가 더욱 진행되어, 버퍼 효과(또는 프로톤 스펄지 효과) 또는 막 상해 활성이 높아짐으로써 엔도솜 이탈(endosome escape)을 촉진시킬 수 있다. 그 결과, 세포질로의 약물 전달 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0032] 상기 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기에 있어서, 치환 PBA기는 대표적으로 2가의 연결기를 통해 그의 측쇄에 도입되어 있다. 당해 2가의 연결기로서는, 예를 들면 아미드 결합, 카르바모일 결합, 알킬 결합, 에테르 결합, 에스테르 결합, 티오에스테르 결합, 티오에테르 결합, 술폰아미드 결합, 우레탄 결합, 술포닐 결합, 티민 결합, 우레아 결합, 티오우레아 결합을 들 수 있다.
- [0033] 상기 치환 PBA기가 도입되는 아미노산 잔기로서는, 상기 연결기를 통해 치환 PBA기가 도입될 수 있는 한에 있어서 임의의 적절한 아미노산 잔기가 선택될 수 있다. 합성의 용이함의 관점에서, 치환 PBA기는 상기 측쇄에 아미노기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기에 도입되는 것이 바람직하다. 구체예로서는, 치환 PBA기는 측쇄에 아미노기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기에, 당해 아미노기와 폐닐환 중 적어도 1개의 수소가 치환된 카르복시페닐보론산 또는 그의 에스테르 등의 반응에 의해 발생하는 아미드 결합을 통해 도입될 수 있다. 여기서, 측쇄에 복수의 아미노기를 갖는 양이온성 아미노산 잔기에 대해서는, 치환 PBA기를 1개만 도입할 수도 있고, 복수 도입할 수도 있다. 1개만 도입하는 경우, 도입 후의 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기는 측쇄에 아미노기와 치환 PBA기의 양쪽을 갖기 때문에 양이온성 아미노산 잔기이기도 하다. 따라서, 본 발명에 있어서는, 이러한 아미노산 잔기만을 포함하는 폴리아미노산쇄 세그먼트도 또한, 양이온성 아미노산 잔기와 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 양쪽을 포함하고 있다고 이해된다. 단, 이러한 아미노산 잔기를 포함하는 폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 양이온성 아미노산 잔기의 수와 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 수의 합을 구할 때에는, 당해 아미노산 잔기에 대해서는 어느 쪽이든 한쪽만 계산하는 것으로 한다.
- [0034] 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 상기 양이온성 아미노산 잔기 및 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기 이외에, 측쇄에 소수성기를 갖는 아미노산 잔기(이하, 「소수성 아미노산 잔기」라 하는 경우가 있음)를 더 포함할 수 있다. 당해 소수성 아미노산 잔기를 포함함으로써, 수성 매체 중에 있어서 본 발명의 블록 공중합체간에 작용하

는 소수성 상호 작용이 커지고, 그 결과 보다 안정된 중합체 미셀이 형성될 수 있다. 또한, 소수성 아미노산 잔기가 세포막의 소수성 부분에 꽂혀, 당해 중합체 미셀을 세포막에 고정하는 앵커로서 기능할 수 있다. 그 때문에, 당해 중합체 미셀에 핵산 등의 생체 고분자를 내포시킨 경우에, 상기 생체 고분자의 세포 내로의 도입률을 향상시킬 수 있다.

[0035] 상기 소수성 아미노산 잔기가 유래하는 아미노산으로서는, 바람직하게는 25℃의 물 100g에 대한 용해도가 5g 이하, 보다 바람직하게는 4g 이하인 아미노산을 들 수 있다. 이러한 아미노산으로서는, 예를 들면 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판 등의 비극성 천연 아미노산이나, 측쇄에 소수성기가 도입된 아미노산의 소수성 유도체를 들 수 있다. 당해 아미노산의 소수성 유도체로서는, 바람직하게는 아스파라긴산, 글루탐산 등의 산성 아미노산의 측쇄에 소수성기가 도입된 유도체를 들 수 있다.

[0036] 상기 도입되는 소수성기로서는, 탄소수 6 내지 27의 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지상의 지방족 탄화수소기, 탄소수 6 내지 27의 방향족 탄화수소기 또는 스테릴기가 바람직하게 예시될 수 있다.

[0037] 상기 탄소수 6 내지 27의 포화 직쇄 또는 분지상의 지방족 탄화수소기로서는, 탄소수 6 내지 27의 알킬기 및 당해 알킬기 이외에 펜타코실기, 헥사코실기, 헵타코실기 등이 예시된다.

[0038] 상기 탄소수 6 내지 27의 불포화 직쇄 또는 분지상의 지방족 탄화수소기로서는, 탄소수 6 내지 27의 알킬기의 쇄 중의 탄소-탄소 단결합의 1 내지 5개가 탄소-탄소 이중 결합이 되어 있는 기를 들 수 있다. 이러한 기가 유래하는 불포화된 지방족 탄화수소의 예로서는, 라우르산(또는 도데칸산), 미리스트산(또는 테트라데칸산), 팔미트산(또는 헥사데칸산), 팔미토올레산(또는 9-헥사데센산), 스테아르산(또는 옥타데칸산), 올레산, 리놀산, 리놀렌산, 엘레오스테아르산(또는 9,11,13-옥타데카트리엔산), 아라키드산, 아라키돈산, 베헨산, 리그노세르산, 네르본산, 세로트산, 몬탄산 등을 들 수 있다.

[0039] 상기 탄소수 6 내지 27의 방향족 탄화수소기로서는, 아릴기, 아르알킬기 등을 들 수 있다. 이들의 바람직한 구체예로서는, 페닐기, 나프틸기, 톨릴기, 크실릴기, 벤질기, 페네틸기 등을 들 수 있다.

[0040] 상기 스테릴기가 유래하는 스테롤이란, 시클로펜타논히드로페난트렌환($C_{17}H_{28}$)을 베이스로 하는 천연, 반합성 또는 합성의 화합물, 나아가 이들의 유도체를 의미하고, 예를 들면 천연의 스테롤로서는 한정되는 것은 아니지만, 콜레스테롤, 콜레스탄올, 디히드로콜레스테롤, 콜산, 캄페스테롤, 시스토스테롤 등을 들 수 있으며, 그의 반합성 또는 합성의 화합물로서는, 이들 천연물의 예를 들면 합성 전구체(필요에 따라, 존재하는 경우에는 일정한 관능기, 히드록시기의 일부 또는 전부가 당해 기술 분야에서 기지된 히드록시 보호기에 의해 보호되어 있거나, 또는 카르복실기가 카르복실 보호기에 의해 보호되어 있는 화합물을 포함함)일 수 있다. 또한, 스테롤 유도체란, 본 발명의 목적에 악영향을 미치지 않는 범위 내에서 시클로펜타논히드로페난트렌환에 C_{1-12} 알킬기, 할로젠 원자, 예를 들면 염소, 브롬, 불소가 도입되어 있을 수도 있고, 상기 환계는 포화, 부분 불포화일 수 있는 것 등을 의미한다. 상기 스테릴기가 유래하는 스테롤로서는, 바람직하게는 콜레스테롤, 콜레스탄올, 디히드로콜레스테롤, 콜산, 캄페스테롤, 시스토스테롤 등의 동식물유 기원의 스테롤이고, 더욱 바람직하게는 콜레스테롤, 콜레스탄올, 디히드록시콜레스테롤이고, 특히 바람직하게는 콜레스테롤이다.

[0041] 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 양이온성 아미노산 잔기, 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기 및 소수성 아미노산 잔기로서 각각 1종만의 아미노산 잔기를 포함할 수도 있고, 2종 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다. 또한, 폴리아미노산쇄 세그먼트에 있어서의 양이온성 아미노산 잔기, 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기 및 소수성 아미노산 잔기의 결합순은 임의이며, 랜덤 구조일 수도 있고, 블록 구조일 수도 있다.

[0042] 상기 폴리아미노산쇄 세그먼트에 포함되는 양이온성 아미노산 잔기, 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기 및 소수성 아미노산 잔기의 수는, 각 아미노산 잔기의 종류, 블록 공중합체의 용도 등에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 생체 고분자의 유지성(혈중에 있어서의 안정성)을 보다 확실하게 향상시키는 관점에서는, 이하의 관계식을 만족하도록 각 아미노산 잔기의 수를 조정하는 것이 바람직하다. 또한, 폴리아미노산쇄 세그먼트를 구성하는 반복 단위(아미노산 잔기) 중에 양이온성기가 복수개 존재하는 경우, 1개의 반복 단위 중에 복수의 치환 PBA기가 도입될 수 있다. 그 때문에, 폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환 PBA기의 총 수가, 치환 PBA기가 도입되어 있지 않은 양이온성 아미노산 잔기의 수와 치환 PBA기가 도입된 아미노산 잔기(치환 PBA기 함유 아미노산 잔기)의 수의 합을 초과하는 경우가 있다. 또한, 범용적인 구조 해석 장치에 의한 분석에서는, 복수의 치환 PBA기가 1개의 반복 단위 중에 도입되어 있는 것인지, 복수의 반복 단위 중에 분산되어 도입되어 있는 것인지를 구별이 용이하지 않은 경우가 있다. 따라서, 당해 관계식에 있어서는 편의적으로, 치환 PBA기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수로서, 양이온성 아미노산 잔기의 수와 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 합(이론값)으로부터

치환 PBA기의 수(실측값)를 감산하여 얻어지는 값으로 정하는 것을 허용한다(단, 0을 하한값으로 함). 또한, 이하의 관계식의 상한값은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 40, 38, 35, 25일 수 있다. 이하의 관계식의 값이 14 이상, 나아가 15 이상이면 더욱 확실하게 혈중에 있어서의 안정성이 향상된다.

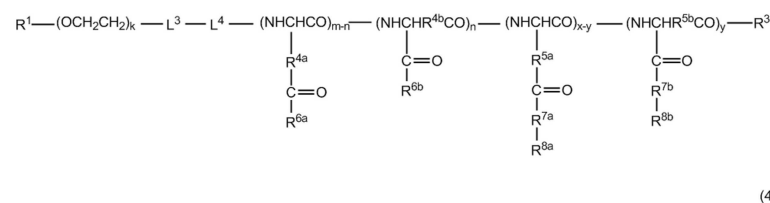
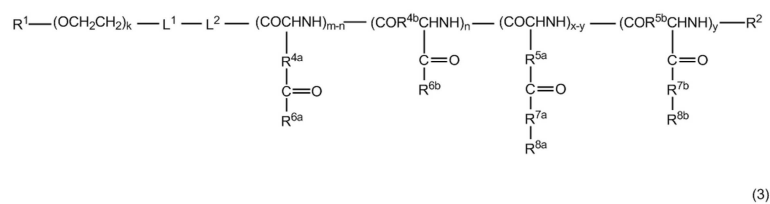
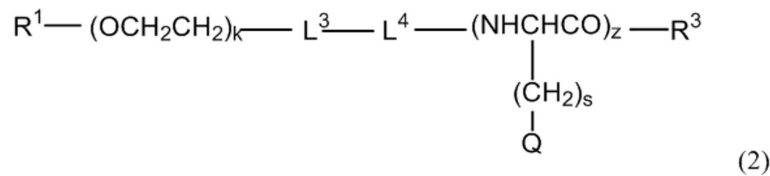
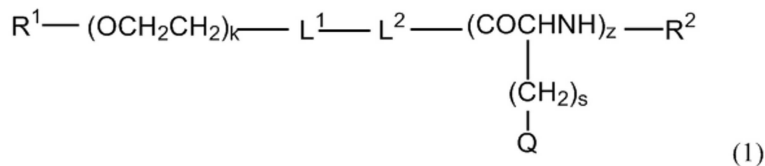
$$\sqrt{\frac{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수}}{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}} + 2\sqrt{\frac{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}} \geq 12.0$$

[A-2. 친수성 중합체쇄 세그먼트]

상기 친수성 중합체쇄 세그먼트는, 임의의 적절한 친수성 중합체에 의해 구성될 수 있다. 상기 친수성 중합체로서는, 예를 들면 폴리(에틸렌글리콜), 폴리스카라이드, 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(비닐알코올), 폴리(아크릴아미드), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴아미드), 폴리(메타크릴산), 폴리(메타크릴산에스테르), 폴리(아크릴산에스테르), 폴리아미노산, 폴리(말산) 또는 이들의 유도체를 들 수 있다. 폴리스카라이드의 구체예로서는, 전분, 벡스트란, 프록탄, 갈락탄 등을 들 수 있다. 이들 중에서도 폴리(에틸렌글리콜)은 말단에 다양한 관능기를 갖는 말단 반응성 폴리에틸렌글리콜이 시판되어 있으며, 또한 다양한 분자량의 것이 시판되어 있고, 용이하게 입수할 수 있기 때문에 바람직하게 사용될 수 있다.

[A-3. 블록 공중합체의 구체예]

본 발명의 특히 바람직한 실시 형태에 있어서의 블록 공중합체의 구체예를 하기 화학식 (1) 내지 (4)로 나타낸다. 당해 화학식 (1) 내지 (4)의 블록 공중합체에 있어서는, 치환 PBA기는 양이온성 아미노산 잔기의 측쇄에 도입된다.



(화학식 (1) 내지 (4) 중,

R^1 의 기는 수소 원자 또는 비치환 또는 치환된 탄소수 1 내지 12의 직쇄 또는 분지상의 알킬기이고,

R^2 의 기는 수소 원자, 탄소수 1 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬기 또는 탄소수 1 내지 24의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬카르보닐기이고,

[0055] R^3 의 기는 히드록실기, 탄소수 1 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬옥시기, 탄소수 2 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알케닐옥시기, 탄소수 2 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬닐옥시기 또는 탄소수 1 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬 치환 이미노기이고,

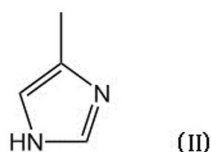
[0056] R^{4a} , R^{4b} , R^{5a} 및 R^{5b} 의 기는 서로 독립적으로 메틸렌기 또는 에틸렌기이고,

[0057] R^{6a} 및 R^{6b} 의 기는 서로 독립적으로 상기 (i) 내지 (iv)의 기로부터 선택되는 기이고,

[0058] R^{7a} 및 R^{7b} 의 기는 서로 독립적으로 -O- 또는 -NH-이고,

[0059] R^{8a} 및 R^{8b} 의 기는 서로 독립적으로 탄소수 6 내지 27의 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지상의 지방족 탄화수소기, 탄소수 6 내지 27의 방향족 탄화수소기 또는 스테릴기이고,

[0060] Q의 기는 -NH₂, -NHC(=NH)NH₂ 또는 이하의 화학식 (II)로 표시되는 기이고,



[0061]

[0062] L^1 및 L^3 은 서로 독립적으로 -S-S- 또는 원자가 결합이고,

[0063] L^2 는 -NH-, -O-, -O(CH₂)_{p1}-NH- 또는 -L^{2a}-(CH₂)_{q1}-L^{2b}-이며, 여기서 p1 및 q1은 서로 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, L^{2a} 는 OCO, OCONH, NHCO, NHCOO, NHCONH, CONH 또는 COO이고, L^{2b} 는 NH 또는 O이고,

[0064] L^4 는 -OCO-(CH₂)_{p2}-CO-, -NHCO-(CH₂)_{p3}-CO- 또는 -L^{4a}-(CH₂)_{q2}-CO-이며, 여기서 p2, p3 및 q2는 서로 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, L^{4a} 는 OCONH, -CH₂NHCO-, NHCOO, NHCONH, CONH 또는 COO이고,

[0065] k는 30 내지 20,000의 정수이고,

[0066] s는 1 내지 6의 정수이고,

[0067] m은 1 내지 300의 정수이고,

[0068] n은 0 내지 m의 정수이고,

[0069] x는 0 내지 80의 정수이고,

[0070] y는 0 내지 x의 정수이고,

[0071] z는 2 내지 300의 정수이되,

[0072] 단, z개의 Q의 기에 함유되는 1급 아미노기 및 2급 아미노기의 총 수 또는 (m-n)개의 R^{6a}의 기와 n개의 R^{6b}의 기에 함유되는 1급 아미노기 및 2급 아미노기의 총 수를 w로 했을 때, 1 이상 w 미만의 당해 아미노기의 수소 원자가 치환 PBA기(예를 들면, 상기 화학식 (I)로 표시되는 FPBA기)를 갖는 아실기로 치환되어 있음)

[0073] 상기 화학식 (1) 내지 (4)에 있어서, L^1 및 L^2 의 조합, 및 L^3 및 L^4 의 조합은 하나가 되어 1개의 연결기가 될 수 있도록 조합될 필요가 있다. 예를 들면, L^2 가 -NH-인 경우 L^1 은 -S-S-가 아니고, 원자가 결합이다.

[0074] 상기 화학식 (1) 내지 (4)에 있어서, 에틸렌글리콜(또는 옥시에틸렌)의 반복수를 나타내는 k는 30 내지 20,000, 바람직하게는 40 내지 2,000, 보다 바람직하게는 50 내지 1,500의 정수이다.

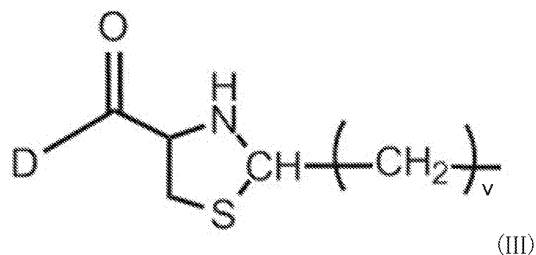
[0075] 상기 R¹ 내지 R³의 기로 정의하는 탄소수 1 내지 12의 직쇄 또는 분지상의 알킬옥시기, 알킬 치환 이미노기 및 알킬기의 알킬 부분으로서, 예를 들면 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, sec-부틸기,

tert-부틸기, n-헥실기, 데실기 및 운데실기 등을 들 수 있다. 탄소수 2 내지 12의 직쇄 또는 분지상의 알케닐 옥시기 또는 탄소수 2 내지 12의 직쇄 또는 분지상의 알킬닐옥시기에 있어서의 알케닐 또는 알킬닐 부분은, 탄소수가 2 이상인 상기에 예시한 알킬기 중에 이중 결합 또는 삼중 결합을 포함하는 것을 들 수 있다.

[0076] 이러한 기 또는 부분에 대하여 「치환된」 경우의 치환기로서는, 한정되는 것은 아니지만, C₁₋₆알콕시기, 아릴옥시기, 아릴C₁₋₃옥시기, 시아노기, 카르복실기, 아미노기, C₁₋₆알콕시카르보닐기, C₂₋₇아실아미드기, 트리-C₁₋₆알킬실록시기, 실록시기, 실릴아미노기를 나타내거나 또는 아세탈화 포르밀기, 포르밀기, 염소 또는 불소 등의 할로겐 원자를 들 수 있다. 여기서, 예를 들면 C₁₋₆과 같은 표시는 탄소수 1 내지 6을 의미하고, 이하 동일한 의미를 나타내는 것으로서 사용한다. 또한, 탄소수 1 내지 24의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬카르보닐기 중 탄소수 1 내지 12의 비치환 또는 치환된 직쇄 또는 분지상의 알킬 부분은 상술한 예시를 참고로 할 수 있으며, 탄소수 13 이상의 알킬 부분은, 예를 들면 트리데실기, 테트라데실기, 펜타데실기, 노나데실기, 도코사닐기 및 테트라코실기 등을 들 수 있다.

[0077] 별도의 실시 형태에 있어서, R¹의 기는 표적 결합 부위를 포함하는 기로 치환될 수도 있다. 표적 결합 부위를 중합체의 말단에 도입함으로써, 표적이 되는 원하는 부위로의 약물(생체 고분자)의 도달성을 향상시킬 수 있다. 표적 결합 부위를 포함하는 기로서는, 표적이 되는 조직에 대한 지향성 또는 기능성을 갖는 한에 있어서 임의의 적절한 기일 수 있으며, 예를 들면 항체 또는 그의 단편 또는 다른 기능성 또는 표적 지향성을 갖는 단백질, 펩티드, 앵타머, 락토오스 등의 당, 염산과 같은 생리 활성 물질 및 그의 유도체에서 유래하는 기일 수 있다.

[0078] 표적 결합 부위를 포함하는 기로 치환된 R¹의 기의 일례를 이하의 화학식 (III)으로 나타낸다.



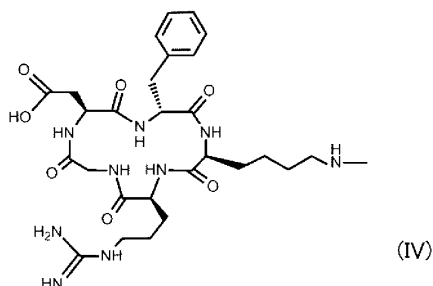
[0079] (식 중, v는 1 내지 5의 정수를 나타내고, D는 표적 결합 부위를 나타냄)

[0080]

[0081] D는, 바람직하게는 중량 평균 분자량이 50 내지 20,000인 펩티드이고, 보다 바람직하게는 중량 평균 분자량이 100 내지 10,000인 펩티드이고, 더욱 바람직하게는 중량 평균 분자량이 150 내지 3,000인 펩티드이다.

[0082] 또한, D는 1 내지 200개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드인 것이 바람직하고, 1 내지 100개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드인 것이 보다 바람직하고, 1 내지 30개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드인 것이 더욱 바람직하다.

[0083] 상기 펩티드로서는, 예를 들면 혈관 신생이나 내막 비후, 악성 종양의 증식에 관여하는 인테그린과 특이적으로 결합할 수 있는 펩티드를 들 수 있으며, 구체적으로는 RGD 펩티드를 들 수 있다. RGD 펩티드를 표적 결합 부위로서 사용함으로써, 질환 부분을 특이적으로 인식 가능한 입자 및 상기 입자를 사용한 의약 조성물이 얻어진다. 여기서, RGD 펩티드란, 아르기닌-글리신-아스파라긴산(RGD) 서열을 포함하는 펩티드를 말한다. 바람직하게는, RGD 펩티드는 환상 RGD(cRGD)펩티드이다. 구체적으로는, D는 하기 화학식 (IV)로 표시될 수 있다.



[0084]

[0085] 상기 화학식 (1) 내지 (4)에 있어서, R^{6a} 및 R^{6b}의 기로 정의하는 상기 화학식 (i) 내지 (iv)의 기 및 R^{8a} 및 R^{8b}

의 기로 정의하는 탄화수소기 또는 스테릴기에 대해서는 상술한 바와 같다. Q , R^{6a} , R^{6b} , R^{8a} 및 R^{8b} 의 기에 대해서는, 속하는 반복 단위 전부에 대하여 동일한 기가 선택될 수도 있고, 상이한 기가 선택될 수도 있다. 또한, s 는, 예를 들면 1, 3 또는 4이다.

[0086] 화학식 (3) 또는 (4)에 있어서, R^{4a} 및 R^{4b} 의 기의 양자가 에틸렌기를 나타내는 경우에는, 대표적으로는 n 이 정수 0이거나 또는 $m-n$ 이 정수 0인 폴리아미노산을 나타내게 된다. 전자는, 예를 들면 글루탐산 γ -벤질에스테르의 N -카르복실산 무수물의 중합에 의해 얻어지는 폴리- α -글루탐산을 나타내고, 후자는, 예를 들면 메주의 발효 세균을 비롯한 세균 바실루스(Bacillus)속의 균주가 생산하는 폴리- γ -글루탐산을 나타낸다. 한편, R^{4a} 및 R^{4b} 의 기의 양자 모두 메틸렌기를 나타내는 경우에는, 이들의 기를 갖는 각각의 반복 단위는 공존할 수 있는 것으로 이해되고 있다. R^{5a} 및 R^{5b} 의 기에 대해서도 동일하다. 제조 효율의 관점에서는 바람직하게는 R^{4a} 및 R^{4b} 의 기가 메틸렌기이고, R^{5a} 및 R^{5b} 의 기가 에틸렌기이다.

[0087] 화학식 (1) 또는 (2)의 블록 공중합체에 포함되는 양이온성 아미노산 잔기 및 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 총 수 z 는, 형성되는 중합체 미셀의 안정성 관점에서 1 내지 300, 바람직하게는 20 내지 300, 보다 바람직하게는 30 내지 200, 더욱 바람직하게는 40 내지 150의 정수이다.

[0088] 화학식 (3) 또는 (4)의 블록 공중합체에 포함되는 양이온성 아미노산 잔기 및 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 총 수 m 은, 형성되는 중합체 미셀의 안정성 관점에서 1 내지 300, 바람직하게는 1 내지 200, 보다 바람직하게는 1 내지 150의 정수이다. 당해 블록 공중합체가 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 경우(즉, x 가 0이 아닌 경우), 양이온성 아미노산 잔기의 수는, 예를 들면 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 15, 보다 바람직하게는 1 내지 10, 더욱 바람직하게는 1 내지 5의 정수로 할 수 있다. 이러한 블록 공중합체에 따르면, 핵산으로 대표되는 생체 고분자의 방출이 보다 적합하게 행해질 수 있다.

[0089] 화학식 (3) 또는 (4)의 블록 공중합체에 포함될 수 있는 소수성 아미노산 잔기의 수 x 는, 양이온성 아미노산 잔기의 종류 또는 수, 블록 공중합체의 용도 등에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 당해 소수성 아미노산 잔기의 수 x 는 바람직하게는 1 내지 80, 보다 바람직하게는 5 내지 70, 더욱 바람직하게는 10 내지 60의 정수이다.

[0090] 화학식 (1) 내지 (4)의 블록 공중합체에 있어서, 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기의 수는 양이온성 아미노산 잔기의 종류 또는 수, 블록 공중합체의 용도 등에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 당해 블록 공중합체, 특히 화학식 (1) 및 (2)의 블록 공중합체는, 치환 PBA기가 이하의 관계를 만족하도록 양이온성 아미노산 잔기의 측쇄에 도입되는 것이 바람직하다. 이러한 관계를 충족하는 경우, 블록 공중합체에 의한 생체 고분자의 유지성(혈중에 있어서의 안정성)이 보다 확실하게 향상된다. 또한, 이하의 관계식의 상한값은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 40, 38, 35, 25일 수 있다. 이하의 관계식의 값이 14 이상, 나아가 15 이상이면 더욱 확실하게 혈중에 있어서의 안정성이 향상된다.

$$\sqrt{\frac{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기를 갖지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수}}{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}} + 2\sqrt{\frac{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}{\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 치환된 페닐보론산기의 수}}} \geq 12.0$$

[0092] [A-4. 블록 공중합체의 제작 방법]

[0093] 본 발명의 블록 공중합체는, 임의의 적절한 합성 방법에 의해 제작될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에 있어서의 블록 공중합체의 합성 방법의 일례는 다음과 같다. 즉, R^1 을 부여할 수 있는 개시제를 사용하여 음이온 리빙 중합을 행함으로써 폴리에틸렌글리콜쇄를 형성하는 것, 당해 폴리에틸렌글리콜쇄의 성장 말단측에 아미노기를 도입하는 것; 당해 아미노 말단으로부터 NCA-Lys(TFA) 등의 보호된 아미노산 유도체를 중합시켜 폴리아미노산쇄 세그먼트를 형성하는 것; 당해 폴리아미노산의 측쇄를 탈보호하여 아미노기를 노출시키는 것; 및 당해 노출된 아미노기와 불소화 카르복시페닐보론산의 카르복실기를 반응시켜, 아마이드 결합에 의해 원하는 수의 FPBA기를 당해 측쇄에 도입하는 것에 의해 제작될 수 있다.

[0094] 본 발명의 다른 바람직한 실시 형태에 있어서의 블록 공중합체는, 예를 들면 이하와 같이 하여 제작될 수 있다. 즉, R^1 을 부여할 수 있는 개시제를 사용하여 음이온 리빙 중합을 행함으로써 폴리에틸렌글리콜쇄를 형성하는 것, 당해 폴리에틸렌글리콜쇄의 성장 말단측에 아미노기를 도입하는 것; 당해 아미노 말단으로부터 β -벤질-L-아스파르트레이트, γ -벤질-L-글루타메이트 등의 보호된 아미노산의 N -카르복실산 무수물을 중합시켜 폴리아미노산쇄 세그먼트를 형성하는 것; 이어서, 당해 폴리아미노산과 디에틸렌트리아민(DET) 등의 아민 화합물을 반응시켜,

에스테르아미드 교환 반응에 의해 당해 아미노산 측쇄에 DET기 등의 아민 잔기를 도입하는 것; 이어서, 당해 아민 잔기의 아미노기와 불소화 카르복시페닐보론산의 카르복실기를 반응시켜, 아미드 결합에 의해 원하는 수의 FPBA기를 당해 측쇄에 도입하는 것에 의해 제작될 수 있다. 이때, β -벤질-L-아스파르테이트와 γ -벤질-L-글루타메이트를 병용하여 폴리아미노산쇄 세그먼트를 형성하면, 그 후의 에스테르아미드 교환 반응이 β -벤질-L-아스파르테이트에 대하여 우선적으로 발생한다. 그 결과, γ -벤질-L-글루타메이트 유래의 아미노산 잔기를 소수성 아미노산 잔기로서 포함하는 블록 공중합체가 얻어질 수 있다.

[0095] 또한, 상기 합성의 과정에서 아미노산에스테르 잔기의 일부에 아민의 구핵 공격에 기인한 구조 변화(예를 들면, 아미노산에스테르 잔기의 탈알코올에 의한 이미드환의 형성)가 발생하는 경우가 있다. 본 발명에 있어서는, 폴리아미노산쇄 세그먼트는, 이러한 구조 변화를 거친 잔기도 더 포함할 수 있는 것으로 한다. 이 경우, 상기 구조 변화를 거친 잔기는, 양이온성 아미노산 잔기, 치환 PBA기 함유 아미노산 잔기 및 소수성 아미노산 잔기 중 어느 것에도 포함하지 않는 것으로 한다. 또한, 양이온성 아미노산 잔기에 있어서의 일부의 NH기 및 NH₂기가 합성 과정에서의 산(주로 염산)의 사용에 기인하여 염(주로 염산염)이 되는 경우가 있지만, 본 발명에 있어서는, 폴리아미노산쇄 세그먼트는 이러한 구조를 포함할 수 있는 것으로 한다. 즉, Q, R^{6a} 및 R^{6b}의 기에 있어서의 일부의 NH기 및 NH₂기는 염(예를 들면, 염산염)이 되어 있을 수도 있다.

[0096] 또한, α 말단에 표적 결합 부위를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 상기와 같은 블록 공중합체의 합성을 행하거나, 또는 α 말단에 나중에 표적 결합 부위를 포함하는 기를 도입할 수 있는 관능기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 상기와 같은 블록 공중합체의 합성을 행한 후에 표적 결합 부위를 포함하는 기를 도입함으로써, 친수성 중합체(폴리에틸렌글리콜)의 말단에 표적 결합 부위를 갖는 블록 공중합체를 합성할 수 있다. 표적 결합 부위를 포함하는 기를 도입하는 방법으로서 다양한 방법이 사용되지만, 예를 들면 α 말단이 아세탈화된 폴리에틸렌글리콜쇄를 갖는 블록 공중합체와 시스테인 말단을 갖는 원하는 표적 결합 부위를 갖는 화합물을 산성 용액 중에서 혼합함으로써, 폴리에틸렌글리콜쇄측의 말단에 상기 표적 결합 부위를 부여할 수 있다.

[0097] [B. 복합체]

[0098] 본 발명의 복합체는 상기 A항에 기재된 블록 공중합체와 생체 고분자의 복합체이다. 당해 복합체는 복수의 당해 블록 공중합체와 생체 고분자의 PIC일 수 있다. 또한, 당해 PIC는 복수의 당해 블록 공중합체에 의해 생체 고분자가 내포된 중합체 미셀의 형태일 수 있다. 종래형의 캐리어에서는, 생리 조건과 동일한 정도의 이온 농도의 매체 중에서 복합체가 해리된다는 문제가 있지만, 본 발명의 복합체는 안정성이 우수하기 때문에, 당해 매체 중, 나아가서는 단백질을 포함하는 매체 중이어도 복합체의 형태를 유지할 수 있다.

[0099] [B-1. 생체 고분자]

[0100] 상기 생체 고분자로서는, 예를 들면 단백질, 지질, 핵산 등을 들 수 있다. 본 명세서에 있어서, 단백질은 펩티드도 포함한다. 생체 고분자 중에서도 상기 블록 공중합체는 핵산과 적절하게 복합체를 형성할 수 있다. 또한, 복합체의 형성에 적합한 생체 고분자로서는, 상기 블록 공중합체의 pKa 이하의 pH의 범위에서 음의 전하를 갖는 음이온 하전성의 화합물을 예시할 수 있다.

[0101] 상술한 바와 같이, 상기 블록 공중합체가 폴리아미노산쇄 세그먼트의 아미노산 측쇄에 양이온성기를 가짐으로써, 당해 블록 공중합체는 소분자량의 핵산이어도 생리적 조건하에서 안정된 복합체(예를 들면, 베시클 또는 회합체)를 형성할 수 있다. 블록 공중합체와의 복합체를 제공할 수 있는 핵산으로서, 푸린 또는 피리미딘 염기, 펜토오스, 인산을 포함하는 뉴클레오타이드를 기본 단위로 하는 폴리 또는 올리고 뉴클레오타이드를 의미하고, 올리고 또는 폴리 2분쇄 RNA, 올리고 또는 폴리 2분쇄 DNA, 올리고 또는 폴리 1분쇄 DNA 및 올리고 또는 폴리 1분쇄 RNA를 들 수 있다. 또한, 동일한 쇄에 RNA와 DNA가 혼재된 올리고 또는 폴리 2분쇄 핵산, 올리고 또는 폴리 1분쇄 핵산도 포함된다. 당해 핵산에 함유되는 뉴클레오타이드는 천연형일 수도, 화학 수식된 비천연형인 것일 수도 있고, 아미노기, 티올기, 형광 화합물 등의 분자가 부가된 것일 수도 있다.

[0102] 상기 핵산이 RNA인 경우, 당해 RNA는 3' 말단 리보오스가 1,2-cis-디올을 갖기 때문에, 상기 양이온성 아미노산 잔기의 양이온성기와의 정전적 상호 작용 이외에, 치환 PBA기를 통해 상기 블록 공중합체와 가역적으로 공유 결합할 수 있다. 그 결과, 안정성이 우수한 복합체가 얻어진다. 이러한 안정성이 우수한 복합체에 따르면, RNA 분자의 혈중 농도 레벨(통상, 약 4 내지 7mM)의 글루코오스(분자 내에 cis-디올 구조를 가짐)와의 치환이 방지될 수 있기 때문에, 혈중에서의 안정성도 우수하다. 따라서, 당해 복합체가 생체 내에 투여되는 경우에는, 혈중 체류성이 향상될 수 있다. 특히, 2분쇄 RNA의 경우, 각 쇄의 3' 말단 리보오스를 결합 부위로 하는 가교 구조가 미셀 내부에 형성될 수 있기 때문에, 안정성이 매우 우수한 복합체가 얻어질 수 있다. 또한, 당해 RNA와

의 복합체가 저pH 환경인 엔도솜 내에 도입된 경우에는, 치환 PBA기의 소수화에 의해 소수성 상호 작용이 커지기 때문에, 안정성이 더욱 향상될 수 있다. 또한, 엔도솜으로부터 세포질로 이행한 후에는, ATP, 리보 핵산 등의 세포질 내에 비교적 고농도로 존재하는 1,2-cis-디올을 갖는 다른 분자와의 치환에 의해 빠르게 RNA를 방출하는 것이 가능하다.

[0103] 상기 핵산의 쇠 길이는, 예를 들면 4 내지 20,000 염기, 바람직하게는 10 내지 10,000 염기, 더욱 바람직하게는 18 내지 30 염기일 수 있다.

[0104] 상기 핵산으로서는, 그의 기능 또는 작용을 고려하면, 플라스미드 DNA, siRNA, micro RNA, shRNA, 안티센스 핵산, 디코이 핵산, 앵타머 및 리보자임을 들 수 있다.

[0105] 본 발명의 복합체에 있어서의 상기 블록 공중합체와 생체 고분자의 함유량비는, 블록 공중합체 및 생체 고분자의 종류, 복합체의 용도 등에 따라 적절하게 설정될 수 있다. 생체 고분자가 siRNA인 경우의 본 발명 복합체는, 생리적 조건하에서의 안정성을 향상시키는 관점에서는 N/P비가 2 이상인 것이 바람직하고, 중합체에 의한 독성을 억제하는 관점에서는 N/P비가 200 이하인 것이 바람직하다. 또한, N/P비란, [복합체에 함유되는 블록 공중합체 중의 폴리아미노산 측쇄의 아미노기 농도]/[핵산 중의 인산기 농도]를 의미한다. 또한, 생체 고분자가 siRNA인 경우의 본 발명의 복합체는, 생리적 조건하에서의 안정성을 향상시키는 관점에서 pH 7.4에 있어서의 [폴리아미노산쇄 세그먼트의 양전하수]/[폴리아미노산쇄 세그먼트의 음전하수 및 siRNA의 음전하수의 합계]가 예를 들면 1/2 내지 20/1, 바람직하게는 1/1 내지 10/1일 수 있다.

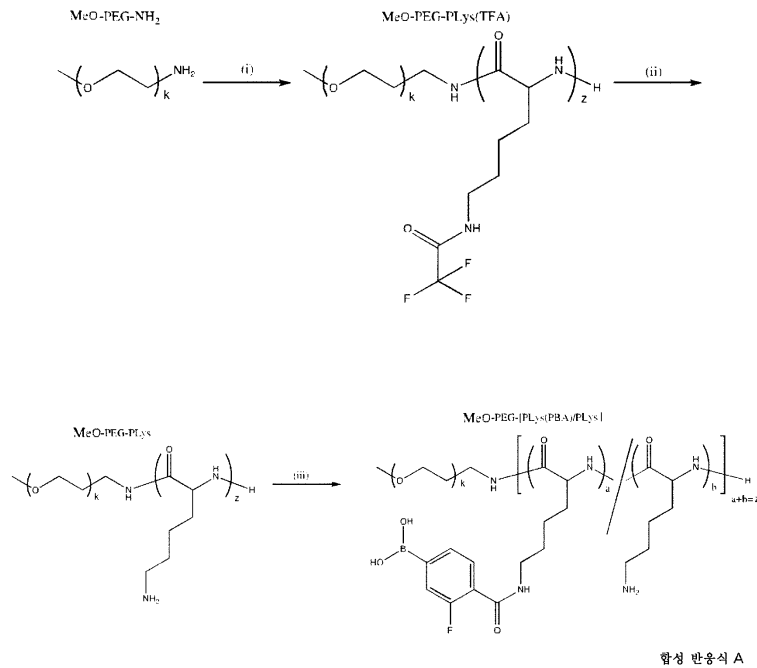
[0106] 상기 블록 공중합체는, 치환 PBA기의 종류 및 도입수를 적절하게 선택함으로써 높은 친수성을 유지할 수 있기 때문에, 본 발명의 복합체는, 예를 들면 필요에 따라 완충화된 수용액 중에서 당해 블록 공중합체와 생체 고분자를 혼합하는 것만으로 제조될 수 있다. 즉, 본 발명의 복합체는, 블록 공중합체의 말단을 별도 수식할 필요가 없고, 또한 간편한 방법으로 제조될 수 있다는 이점도 가질 수 있다.

[0107] 실시예

[0108] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이하의 실시예에 있어서는, 「PEG의 분자량(kDa)-FPBA기 함유 아미노산 잔기 수/폴리아미노산쇄 세그먼트를 구성하는 아미노산 잔기의 총 수」의 순서로 중합체 구조를 기재한다. 예를 들면, PEG의 분자량이 10,000이며, 폴리아미노산쇄 세그먼트가 중합도 40의 폴리로신에 FPBA기를 5개 도입한 것인 경우에는, 「PEG-PLL 10-5/40」으로 표기한다. 또한, 예를 들면 PEG의 분자량이 10,000이며, 폴리아미노산쇄 세그먼트가 FPBA기가 도입되어 있지 않은 중합도 40의 폴리로신인 경우에는, 「PEG-PLL 10-0/40」으로 표기한다. 여기서, 상기 표기에 있어서의 각 숫자는 블록 공중합체 전체의 평균값이다.

[0109] [폴리로신계 블록 공중합체의 제작]

[0110] 이하의 실험예에서 사용한 폴리로신계의 블록 공중합체의 합성 반응식 A를 이하에 나타낸다. 구체적으로는, (1-i) 내지 (1-iii)에 기재된 바와 같이 하여 블록 공중합체를 제작하였다.



[0111]

[0112] (1-i) 벤젠 동결 건조한 메톡시-PEG-NH₂를 1M의 티오우레아를 포함하는 디메틸포름아미드(DMF)에 용해한다. 얻어진 용액에 1M 티오우레아 함유 DMF에 용해한 NCA-Lys(TFA)를 첨가하고, 3일간 25℃에서 교반함으로써 중합을 행한다. 중합 후의 반응액을 디에틸에테르에 적하하고, 생성된 침전을 여과하여 회수하고, 감압하에 건조함으로써 MeO-PEG-PLys(TFA)를 얻는다.

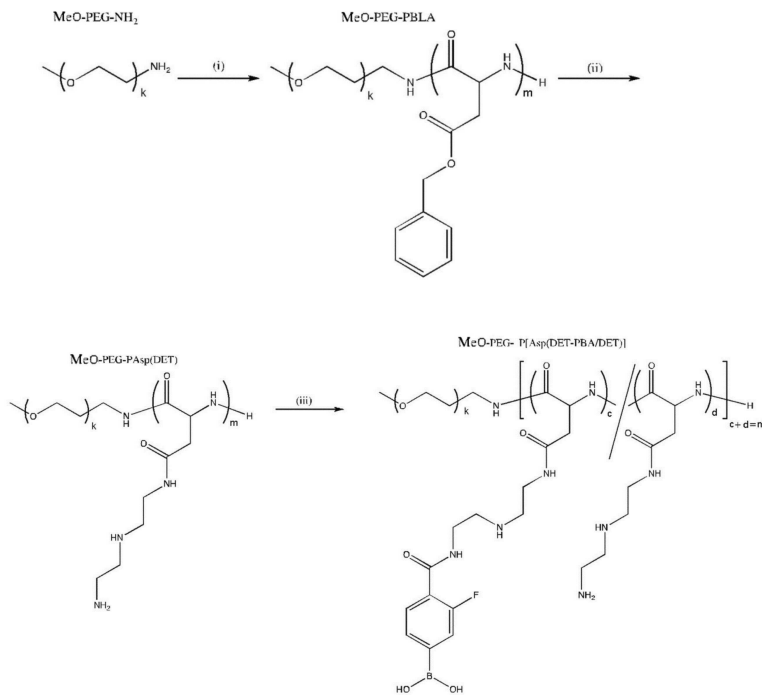
[0113] (1-ii) MeO-PEG-PLys(TFA)를 1N의 NaOHaq./메탄올=1/10 중 35℃에서 12시간 교반하고, 투석(외액은 물) 및 동결 건조를 거쳐서 MeO-PEG-PLys를 얻는다.

[0114] (1-iii) MeO-PEG-PLys와 PLys의 아미노기에 대하여 5당량의 D-만니톨을 50mM의 NaHCO₃ 수용액 중에 용해시킨다. 얻어진 용액에 메탄올에 용해한 3-플루오로-4-카르복시페닐보론산을 첨가하고, 이어서 축합제 DMT-MM을 가한다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하고, 투석(외액은 물) 및 동결 건조를 거쳐서 MeO-PEG-[PLys(FPBA)/PLys]를 얻는다.

[0115] 얻어진 블록 공중합체의 분자량은, 겔 투과 크로마토그래프(GPC)에 의해 측정하였다. 이 때, 50mM의 NaHCO₃에 D-소르비톨을 50mg/mL이상 용해한 용액, 인산 완충액(pH 5 내지 7) 또는 50mg/mL의 D-소르비톨을 함유하는 500mM NaCl 수용액과 메탄올의 혼합 용매(NaCl aq./메탄올=1/4)를 이동상으로서 사용하였다. 또한, FPBA기의 도입량은, ¹H-NMR 스펙트럼으로 측쇄와 페닐환의 적분비로부터 어렵잡았다. 이 때, D-소르비톨을 소량 포함하는 D₂O에 중합체를 용해한 용액을 측정 샘플로 하였다.

[0116] [PAsp(DET)계 블록 공중합체의 제작]

[0117] 이하의 실험예에서 사용한 PAsp(DET)계의 블록 공중합체의 합성 반응식 B를 이하에 나타낸다. 구체적으로는, (2-i) 내지 (2-iii)에 기재된 바와 같이 하여 블록 공중합체를 제작하였다.



[0118]

[0119] (2-i) 벤젠 동결 건조한 메톡시-PEG-NH₂를 디클로로메탄에 용해한다. 얻어진 용액에 DMF/디클로로메탄=1/10으로 용해한 NCA-BLA를 가하고, 3일간 35℃에서 교반함으로써 중합을 행한다. 중합 후의 반응액을 디에틸에테르에 적하하고, 침전물을 여과에 의해 회수하고, 감압하에서 건조함으로써 MeO-PEG-PBLA를 얻는다.

[0120] (2-ii) 벤젠 동결 건조한 MeO-PEG-PBLA를 N-메틸-2-피롤리돈(NMP) 중에 용해한다. 얻어진 용액을 디에틸렌트리아민의 NMP 용액 중에 적하하고, 5 내지 10℃에서 1시간 교반한다. 빙냉하에 염산으로 중화하고, 투석(외액은 0.01N의 염산) 및 동결 건조를 거쳐서 MeO-PEG-PAsp(DET)를 얻는다.

[0121] (2-iii) MeO-PEG-PAsp(DET) 및 PAsp(DET)의 1급 아민에 대하여 5당량의 D-만니톨을 빙냉하(0℃)에 있어서 50mM의 NaHCO₃ 수용액 중에 용해한다. 얻어진 용액에 메탄올에 용해한 3-플루오로-4-카르복시페닐보론산을 첨가하고, 이어서 축합제 DMT-MM을 첨가한다. 얻어진 용액을 6시간 교반하고, 5℃에서 투석(외액은, 임의로 소르비톨을 포함하는 0.01N의 염산)하고, 동결 건조를 거쳐서 MeO-PEG-P[Asp(DET-FPBA/DET)]를 얻는다.

[0122] 얻어진 블록 공중합체의 분자량은, 겔 투과 크로마토그래프(GPC)에 의해 측정하였다. 이 때, 50mM의 인산 버퍼(pH 7.4)에 50mg/mL의 D-소르비톨을 용해한 용액을 이동상으로서 사용하였다. 또한, FPBA기의 도입량은 ¹H-NMR 스펙트럼으로 측쇄와 페닐환의 적분비로부터 어림잡았다. 이 때, NaOD를 소량 포함하는 D₂O에 중합체를 용해한 용액을 측정 샘플로 하였다.

[0123] [siRNA]

[0124] 이하의 실험예에서 사용한 siRNA의 서열은 다음과 같다. Cy3 등의 표식은 모두 센스쇄의 5' 말단에 도입하였다.

[0125] (1) hVEGF-siRNA(인간 혈관 내피 성장 인자에 대한 siRNA):

[0126] 센스쇄: 5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCCdTdT-3'(서열 번호 1)

[0127] 안티센스쇄: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUCCdTdT-3'(서열 번호 2)

[0128] (2) 스크램블-siRNA(비치료용 서열 siRNA):

[0129] 센스쇄: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3'(서열 번호 3)

[0130] 안티센스쇄: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3'(서열 번호 4)

[0131] (3) GL3-siRNA(반딧불이-루시페라아제에 대한 siRNA)

- [0132] 센스쇄: 5'-CUUACGCUGACUACUUCGAUU-3'(서열 번호 5)
- [0133] 안티센스쇄: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'(서열 번호 6)
- [0134] [FPBA기 함유량과 복합체의 안정성의 관계]

[0135] 상기 (1-i) 내지 (1-iii) 및 (2-i) 내지 (2-iii)에 기재된 바와 같이 하여, 아미노산 중합도 및 FPBA기 함유량이 상이한 다양한 블록 공중합체를 제작하였다. 또한, 메톡시-PEG-NH₂로서는, PEG의 분자량(Mw)이 12,000인 것을 사용하였다. 당해 블록 공중합체와 Cy3으로 형광 표식한 siRNA를 N/P비가 8이 되도록 혼합하였다. 얻어진 혼합액을 냉장고 내에서 1 내지 2시간 정치한 후, 혈청 용액(150mM NaCl, 10mM Hepes, 10% FBS)으로 siRNA 농도가 50nM이 되도록 희석하였다. 얻어진 희석액을 1시간 정도 실온에서 정치하고, 공초점 레이저 스캔 현미경(칼 짜이즈(Carl Zeiss)사 제조, 제품명 「LSM510」)으로 siRNA의 확산 시간을 측정하였다(10초×10회). 결과를 표 1 및 도 1에 도시한다. 또한, 블록 공중합체와 혼합하지 않는 것 이외에는 동일하게 측정한 경우에 있어서의 확산 시간(siRNA 단독의 확산 시간)은 157.5μ초이다. 또한, siRNA로서는 GL3-siRNA를 사용하였다.

표 1

PLys계 블록 공중합체										
PEG쇄의 분자량	12000									
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 아미노산 잔기의 총 수	21		43						54	
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수	18.0	16.3	43.0	35.3	32.9	28.8	24.1	51.1	43.3	38.1
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기의 수	3.0	4.7	0.0	7.7	10.1	14.2	18.9	2.9	10.7	15.9
확산 시간 [μ초, N/P=8]	323.3	331.4	298.6	321.1	440.2	773.4	783.6	337.0	434.9	1002.2
$\sqrt{(\text{FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수}) + 2\sqrt{(\text{FPBA기의 수})}}$	7.7	8.4	6.6	11.5	12.1	12.9	13.6	10.6	13.1	14.1
PLys계 블록 공중합체										
PEG쇄의 분자량	12000									
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 아미노산 잔기의 총 수	74						106			
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수	74.0	70.7	68.2	65.9	62.1	56.9	108.0	104.5	101.9	93.7
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기의 수	0.0	3.3	5.8	8.1	11.9	17.1	0.0	1.5	4.1	12.3
확산 시간 [μ초, N/P=8]	379.1	1326.2	553.1	764.2	1073.0	1238.9	382.4	2120.6	1778.7	2896.3
$\sqrt{(\text{FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수}) + 2\sqrt{(\text{FPBA기의 수})}}$	8.6	12.1	13.1	13.8	14.8	15.8	10.3	12.7	14.2	16.7
PAsp(DET)계 블록 공중합체										
PEG쇄의 분자량	12000									
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 아미노산 잔기의 총 수	35.6	33.9	34.5	57.4	74.1	74.0				
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수	32.9	23.7	14.5	48.1	69.9	67.0				
폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기의 수	2.6	10.2	20.0	9.3	4.2	7.0				
확산 시간 [μ초, N/P=8]	313.3	367.6	807.8	1241.9	1622.6	1417.7				
$\sqrt{(\text{FPBA기 비함유 양이온성 아미노산 잔기의 수}) + 2\sqrt{(\text{FPBA기의 수})}}$	9.0	11.3	12.7	13.0	12.4	13.5				

- [0136]
- [0137] 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 블록 공중합체와 혼합한 경우의 siRNA의 확산 시간이 siRNA 단독의 경우보다도 길기 때문에, 이 블록 공중합체는 모두 siRNA와 복합체를 형성하는 것을 알 수 있었다. 또한, FPBA기가 도입된 블록 공중합체는, 도입되어 있지 않은 블록 공중합체보다도 확산 시간이 길기 때문에, 보다 안정된 복합체를 형성하는 것을 알 수 있다. 그 중에서도, $[\sqrt{(\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기를 포함하지 않는 양이온성 아미노산 잔기의 수}) + 2\sqrt{(\text{폴리아미노산쇄 세그먼트 중의 FPBA기의 수})} \geq 12.0]$ 의 관계를 만족하는 블록 공중합체를 사용한 경우에는, siRNA의 확산 시간이 400μ초 이상이기 때문에, 고도로 안정된 복합체가 형성된 것이 시사된다.
- [0138] [블록 공중합체의 독성 시험]
- [0139] A549-Luc 세포를 96웰의 배양 접시에 2,500셀/웰이 되도록 파종하고, 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지를 사용하여 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 배지를 새로운 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지로 교환함과 함께, 생리 식염수에 용해한 각 블록 공중합체를 다양한 아민 농도가 되도록 첨가하였다. 이어서, 48시간 배양한 후, 제품명 「셀 카운팅 키트(Cell Counting Kit) 8」(도진 가가꾸 갱규조사 제조)에 의해 생세포수를 측정하고, 세

포 생존율을 산출하였다(N=4). 결과를 도 2에 나타낸다.

[0140] [복합체의 독성 시험]

[0141] A549-Luc 세포를 96웰의 배양 접시에 2,500셀/웰이 되도록 파종하고, 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지를 사용하여 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 배지를 새로운 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지로 교환함과 함께, siRNA와 블록 공중합체의 복합체를 다양한 siRNA 농도가 되도록 첨가하였다. 이어서, 48시간 배양한 후, 제품명 「셀 카운팅 키트 8」(도진 가가꾸 갱류소사 제조)에 의해 생세포수를 측정하고, 세포 생존율을 산출하였다(N=4). 결과를 도 3에 나타낸다. 또한, 상기 복합체는, 각 블록 공중합체와 GL3-siRNA를 N/P비가 4이며 siRNA 농도가 80nM이 되도록 10mM HEPES 완충액(pH 7.3)에 첨가 및 혼합하고, 1 내지 2시간 정도 실온에서 정치한 후, 다양한 농도로 희석하여 사용하였다.

[0142] 도 2에 나타낸 바와 같이, FPBA기를 도입하고 있지 않은 블록 공중합체 처리군보다도 FPBA기를 도입한 블록 공중합체 처리군 쪽이 높은 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, FPBA기를 도입하고 있지 않은 블록 공중합체를 사용하여 형성한 복합체 처리군보다도 FPBA기를 도입한 블록 공중합체를 사용하여 형성한 복합체 처리군 쪽이 높은 세포 생존율을 나타내었다. 이상의 결과로부터, FPBA기 도입에 의한 세포 독성은 인정되지 않고, FPBA기를 도입한 블록 공중합체가 충분한 생체 적합성을 갖는 것을 알 수 있었다.

[0143] [복합체의 pH 안정성 평가]

[0144] 블록 공중합체(PEG-PLL 12-23/43)와 Cy3으로 표식한 GL3-siRNA를 다양한 pH의 완충액(인산 완충액 또는 인산-시트르산 완충액)에 용해하고, N/P비가 4이며 siRNA 농도가 50nM이 되도록 혼합하였다. 얻어진 혼합액을 1시간 정도 실온에서 정치하고, 공초점 레이저 스캔 현미경(칼 짜이즈사 제조, 제품명 「LSM510」)으로 siRNA의 확산 시간을 측정하였다(10초×10회). 결과를 도 4에 나타낸다.

[0145] 도 4에 나타낸 바와 같이, 생체 내 환경(약 pH 7.4)으로부터 엔도솜 내 등의 산성 환경(약 pH 5.5)까지의 넓은 pH 범위에서 siRNA의 확산 시간이 800μ초를 초과하여 길기 때문에, 본 발명의 블록 공중합체가 당해 pH 범위에서 siRNA와 안정된 복합체(siRNA 내포 중합체 미셀)를 형성할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0146] [복합체의 siRNA의 방출성 평가]

[0147] 블록 공중합체(PEG-PLL 12-23/43)와 Cy3으로 표식한 GL3-siRNA를 10mM HEPES 완충액(pH 7.3)에 각각 용해하고, N/P비가 4가 되도록 혼합하였다. 얻어진 혼합액을 1 내지 2시간 정도 냉장고 내에서 정치한 후, 다양한 농도의 글루코오스, dTMP 또는 UMP를 포함하는 10mM HEPES 완충액(pH 7.3)으로 siRNA 농도가 50nM이 되도록 희석하였다. 얻어진 희석액을 실온에서 1시간 정도 정치하였다. 이어서, 공초점 레이저 스캔 현미경(칼 짜이즈사 제조, 제품명 「LSM510」)으로 siRNA의 확산 시간을 측정하였다(10초×10회). 결과를 도 5에 나타낸다.

[0148] 도 5에 도시한 바와 같이, 혈중 내와 동일한 정도의 글루코오스 농도(통상, 약 4 내지 7mM)에 있어서 siRNA의 확산 시간이 800μ초를 초과하여 길기 때문에, 본 발명의 블록 공중합체가 혈중 내에서 siRNA와 안정된 복합체(siRNA 내포 중합체 미셀)를 형성할 수 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 혈중보다도 높은 글루코오스 농도에서는 서서히 확산 시간이 짧아져 가기 때문에, 이들의 농도에서는 미셀이 붕괴되고, siRNA가 빠르게 방출되는 것을 알 수 있었다. 또한, 이러한 미셀의 붕괴는, 미셀 내에서 1,2-디올 구조를 통해 FPBA기와 결합하고 있었던 RNA 분자가 마찬가지로 1,2-디올 구조를 갖는 글루코오스로 치환됨으로써 발생한다고 추측된다.

[0149] 마찬가지로, 1,2-디올 구조를 갖는 UMP의 존재하에서는, UMP가 저농도인 경우에는 미셀 형상을 유지할 수 있지만, UMP 농도가 1mM을 초과하면 RNA 분자와 UMP와의 치환에 의해 미셀이 붕괴되고, siRNA가 빠르게 방출되는 것을 알 수 있었다. 한편, UMP와 유사한 구조를 갖지만 1,2-디올 구조를 갖지 않는 dTMP의 존재하에서는, 10mM을 초과하는 농도에 있어서도 미셀 형상이 안정적으로 유지되어 있다. 이것은, RNA 분자와의 치환이 발생하지 않기 때문이라고 추측된다.

[0150] [복합체의 세포 내로의 도입능 평가]

[0151] 48웰 접시에 10,000셀/웰이 되도록 A549-Luc 세포를 파종하고, 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지를 사용하여 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 배지를 새로운 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM 배지로 교환하고, siRNA가 100nM/웰이 되도록 Cy3으로 표식한 siRNA 또는 상기 siRNA와 블록 공중합체의 복합체를 배지에 첨가하였다. 인큐베이터에서 37℃에서 5시간 또는 9시간 배양한 후, 세포를 1mL의 PBS 완충액으로 3회 세정하고, 트립신-EDTA 용액으로 세포를 접시로부터 박리하였다. 박리한 세포를, Cy3 필터를 세팅한 플로우 사이토미터(BD사 제조, LSRII)를 사용하여 히스토그램 해석을 행하고, 세포 내로의 siRNA의 도입량을 평가하였다(N=4). 또한, siRNA로

서는, GL3-siRNA를 사용하였다. 세포 내로의 siRNA 도입량을 나타내는 그래프를 도 6에 나타낸다. 또한, 상기 복합체는, 각 블록 공중합체와 siRNA를, N/P비가 8이며 siRNA 농도가 4 μ M이 되도록 10mM HEPES 완충액(pH 7.3)에 첨가 및 혼합하고, 1 내지 2시간 정도 실온에서 정치함으로써 제조하였다.

[0152] 도 6에 나타낸 바와 같이, siRNA를 단독으로 첨가한 경우 및 FPBA기가 도입 되어 있지 않은 블록 공중합체와의 복합체로서 첨가한 경우에 비해, FPBA기가 도입되어 있는 블록 공중합체와의 복합체로서 첨가한 경우의 쪽이 siRNA의 도입량이 각별히 향상되었다.

[0153] [복합체의 혈중 체류성 평가]

[0154] 블록 공중합체(PEG-PLL 12-23/43)와 Cy5-GL3-siRNA를, N/P비가 8이며 siRNA 농도가 7.5 μ M이 되도록 10mM HEPES 완충액(pH 7.3)에 첨가 및 혼합하고, 1 내지 2시간 정도 실온에서 정치함으로써 복합체 용액을 제조하였다. 상기 복합체 용액 또는 siRNA 용액(10mM HEPES 완충액)을 마우스(암컷의 Balb/C 누드, 6주령, N=4)에 siRNA의 투여량이 20 μ g이 되도록 미정맥 투여하고, siRNA의 혈중 잔존량을 경시적으로 조사하였다. 결과를 도 7에 나타낸다.

[0155] 도 7에 나타낸 바와 같이, siRNA 단독 투여의 경우에는 투여 후 10분의 시점에 10%정도 밖에 잔존하고 있지 않고, 1시간 경과 후에는 대부분 잔존하고 있지 않은 것에 비해, 복합체 투여의 경우에는 투여 후 1시간의 잔존량이 40% 이상이며, 2시간 경과 후에도 10% 이상이 잔존하고 있었다. 이로부터, 본 발명의 블록 공중합체와 siRNA로부터 형성되는 복합체(siRNA 내포 미셀)는, 혈중 체류성이 매우 우수한 것을 알 수 있었다.

[0156] [복합체의 항암 활성 평가]

[0157] (1) FPBA기 함유 블록 공중합체의 제조

[0158] 반응식 B와 유사한 반응식에 의해, Ace-PEG-PAsp(DET) 12-62/75의 블록 공중합체를 얻었다. 구체적으로는, PEG 측 말단에 아세탈기를 갖는 Ace-PEG-PBLA(12-110)를 DET로 아미노분해하여, Ace-PEG-PAsp(DET)(12-90)를 얻었다. 이어서, NaCl 용액으로 투석하여 반대 이온을 아세트산으로부터 클로라이드로 한 후에, 축합제(DMT-MM)를 사용하여 4-카복시-3-플루오로페닐보론산을 축합시켜, Ace-PEG-PAsp(DET) 12-62/75의 블록 공중합체를 얻었다.

[0159] (2) cRGD 도입 블록 공중합체의 제조

[0160] 이어서, 아세탈기에 대하여 5당량의 cRGD 펩티드(사이클릭(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)를 pH 7.2로 DTT와 1시간 혼합하고, 얻어진 혼합액과 상기 블록 공중합체를 혼합하여, pH를 2로 조정하였다. 1시간 교반한 후, 2M의 아세트산나트륨 및 NaOH를 사용하여 pH를 5로 하였다. 그 후, 중합체 농도가 20mg/mL가 되도록 물을 첨가하여 밤새 교반하였다. 순수에 대하여 투석하고, 미반응물 및 불필요한 물질을 제거한 후, 동결 건조에 의해 PEG쇄의 말단에 cRGD가 도입된 블록 공중합체 cRGD-PEG-PAsp(DET) 12-62/75를 얻었다. 또한, 반응, 투석은 4℃(냉장고)에서 행하였다.

[0161] (3) 복합체의 제조

[0162] 블록 공중합체를 10mg/mL가 되도록 10mM HEPES 완충액에 용해하였다. 12.18 μ L의 상기 중합체 용액과, 75 μ L의 siRNA(15 μ M 10mM HEPES 완충액)와, 7.81 μ L의 10mM HEPES 완충액을 혼합하고, 밤새 정치하였다. 상기 혼합액에 투여 수 시간 전에 3M NaCl 10mM HEPES 완충액을 5 μ L 첨가하고, NaCl 농도가 150mM이 되도록 조정하였다(전량 100 μ L). 이에 따라, 복합체(siRNA 내포 중합체 미셀)를 얻었다. 제조한 복합체에 있어서의 siRNA와 블록 공중합체의 조합 및 혼합비를 표 2에 나타낸다.

표 2

복합체	블록 공중합체	siRNA	혼합비*1	평균 직경
(+)hVEGF	cRGD-PEG-PAsp (DET) 12-62/75	siRNA-hVEGF	5	—
(-)hVEGF	Ace-PEG-PAsp (DET) 12-62/75	siRNA-hVEGF	5	39.95nm
(+) 스크램블	cRGD-PEG-PAsp (DET) 12-62/75	siRNA-스크램블	5	—

* 1 : pH 7.4에 있어서의 폴리아미노산쇄 세그먼트의 양전하수와, 폴리아미노산쇄 세그먼트의 음전하수 및 siRNA의 음전하수의 합계의 비(양전하/음전하의 합계)

[0163]

[0164] (4) 항암 활성 평가

[0165] 6주령의 마우스(암컷의 Balb/C 누드, N=4)를 구입한 후, 1주일 사육하고, 5.0×10^7 셀/mL로 한 HeLa-luc 세포를 각 마우스에 100 μ L씩 피하에 주사하였다. 그 후 4일간 더 사육하고, 치료(즉, 복합체의 투여)를 개시하였다. 구체적으로는, 상기 (3)에서 제조한 복합체를 하루 간격으로 6일째까지 미정맥으로부터 투여하였다(즉, 투여 개시일을 0일째로 하여, 0, 2, 4, 6일째의 합계 4회 투여). 1회의 투여에 대하여 15 μ g/100 μ L의 siRNA를 투여하였다. 대조군에 대해서는, 1회의 투여에 대하여 100 μ L의 HEPES 용액을 투여하였다. 투여 개시일에 있어서의 종양 부피에 대한 종양 부피의 상대값과 투여 후의 경과 일수의 관계를 도 8에 나타낸다.

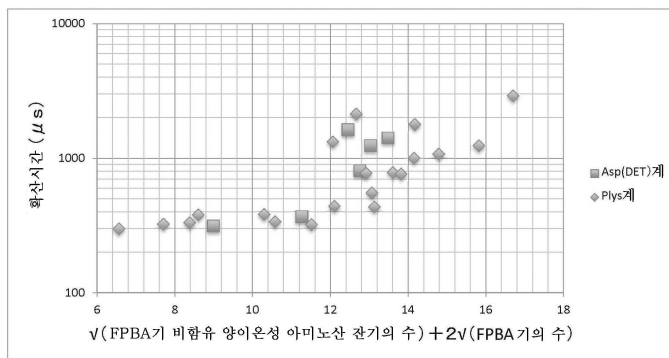
[0166] 도 8에 나타낸 바와 같이, PEG 말단에 cRGD가 도입되어 있지 않은 본 발명의 블록 공중합체를 캐리어로 하는 (-)hVEGF 복합체 투여군에 있어서, 대조군 및 (+)스크램블 복합체 투여군보다도 명백하게 종양의 성장이 억제되었다. 이로부터, siRNA가 상기 블록 공중합체에 의해 혈중에서 안정적으로 유지되어, RNA 간섭능을 발휘할 수 있었던 것을 알 수 있었다. 또한, PEG 말단에 cRGD가 도입된 블록 공중합체를 캐리어로 하는 (+)hVEGF 복합체 투여군에 있어서는, 대조군 및 (+)스크램블 복합체 투여군보다도 유의하게 종양의 성장이 억제되었다. 이로부터, 상기 복합체가 우수한 혈중 안정성을 갖고, 나아가 높은 이행률로 종양 조직에 도입되어 RNA 간섭 효과를 효율적으로 발휘하는 것을 알 수 있었다.

산업상 이용가능성

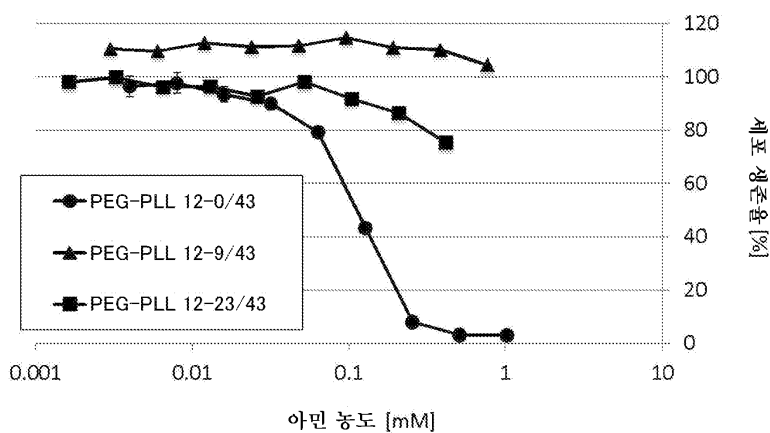
[0167] 본 발명의 블록 공중합체는 DDS의 분야에 있어서 적절하게 적용될 수 있다.

도면

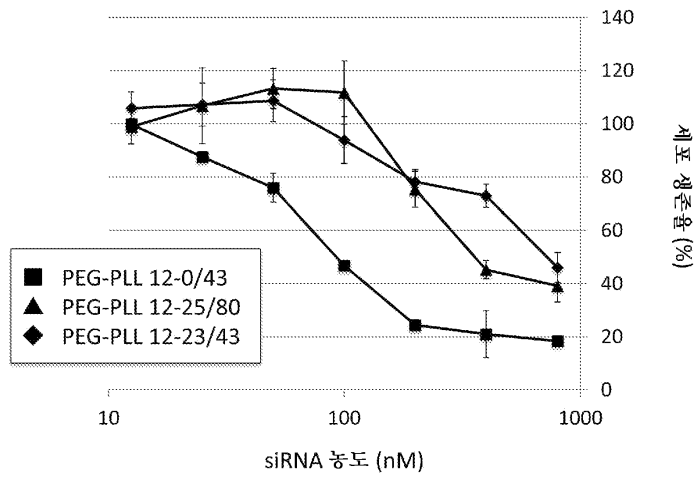
도면1



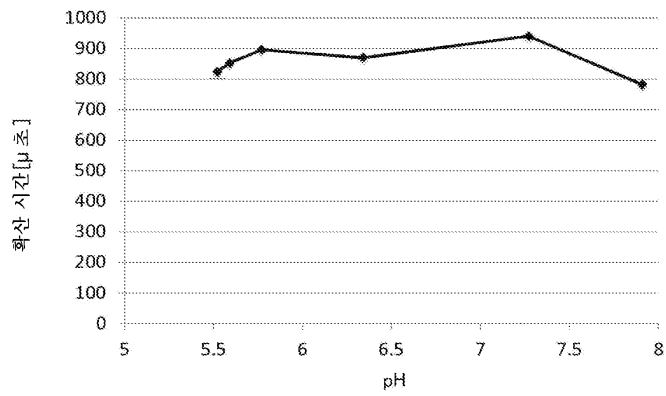
도면2



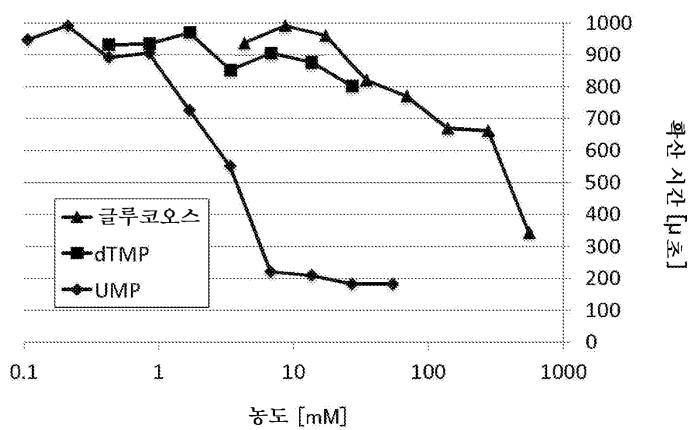
도면3



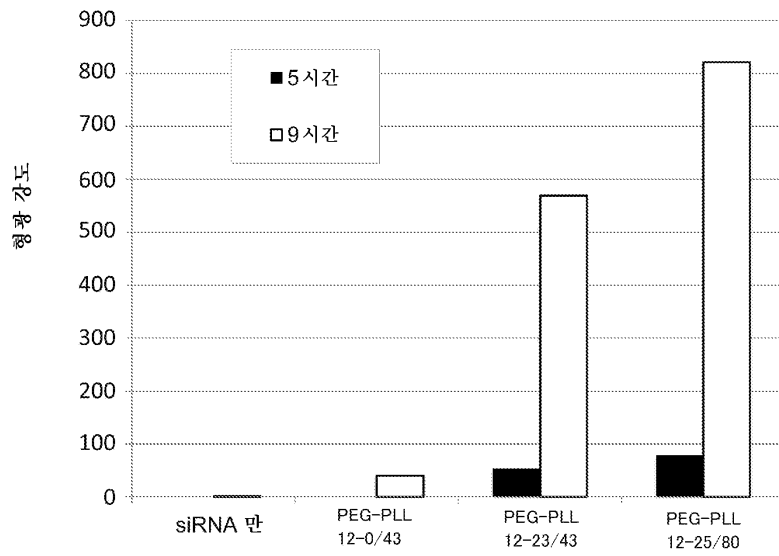
도면4



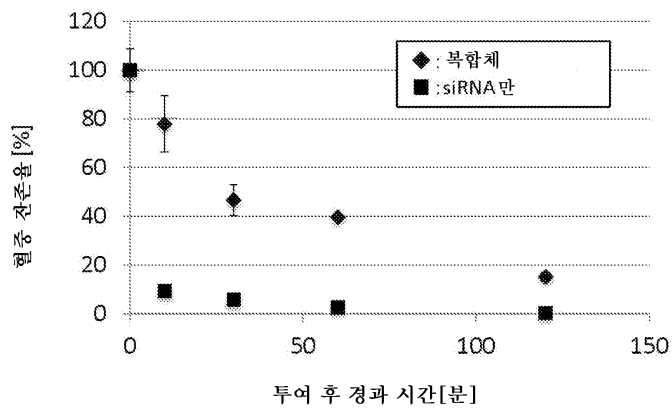
도면5



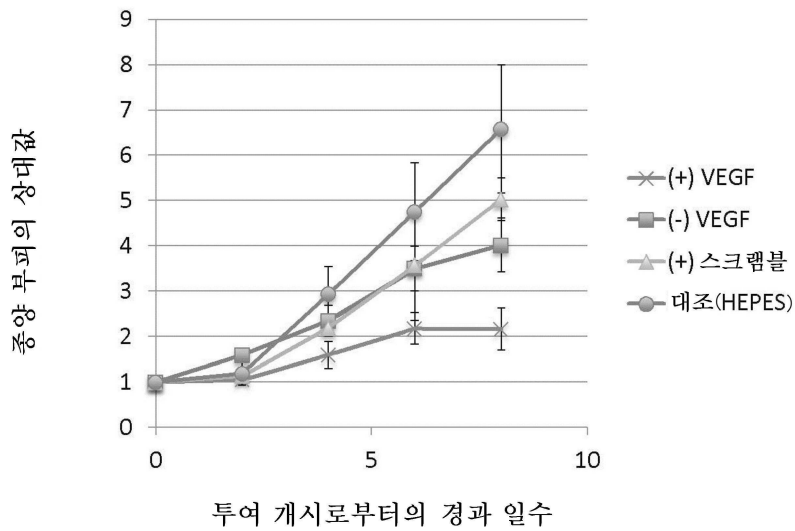
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Tokyo
National University Corporation Tokyo Medical and Dental
University
NanoCarrier Co., Ltd.

<120> Blockcopolymer in which a phenylboronic acid group is introduced
and use thereof

<130> NC1104W

<150> US61/561,022

<151> 2011-11-17

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense strand of siRNA for human vascular endothelial growth
factor including dT terminus

<400> 1
gaucucauca gggguacucct t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense strand of siRNA for human vascular endothelial growth
factor including dT terminus

<400> 2
ggaguacccu gaugagauct t 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense strand of non-therapeutic siRNA

<

400> 3

uucuccgaac gugucacguu u 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense strand of non-therapeutic siRNA

<400> 4

acgugacacg uucggagaau u 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense strand of siRNA for firefly luciferase

<400> 5

cuuacgcuga cuacuucgau u 21

<210>

6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense strand of siRNA for firefly luciferase

<400> 6

ucgaaguacu cagcguaagu u 21