

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5679357号
(P5679357)

(45) 発行日 平成27年3月4日(2015.3.4)

(24) 登録日 平成27年1月16日(2015.1.16)

(51) Int. Cl.		F I	
CO8L 77/00	(2006.01)	CO8L 77/00	
CO8G 69/48	(2006.01)	CO8G 69/48	

請求項の数 14 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2012-526534 (P2012-526534)	(73) 特許権者	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
(86) (22) 出願日	平成23年7月27日(2011.7.27)	(73) 特許権者	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/067138	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(87) 国際公開番号	W02012/014942	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 国際公開日	平成24年2月2日(2012.2.2)	(74) 代理人	100141195 弁理士 西澤 恵美子
審査請求日	平成25年8月5日(2013.8.5)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(31) 優先権主張番号	特願2010-168880 (P2010-168880)		
(32) 優先日	平成22年7月28日(2010.7.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 静電結合型ベシクル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)の第一の重合体と、以下の(c)又は(d)の第二の重合体とにより形成された膜(但し(b)と(d)との組み合わせを除く)であり前記重合体中のカチオン性セグメント及びアニオン性セグメントの一部が架橋された膜を有してなる、ベシクルであって、

前記架橋が、その部位にジスルフィド結合が含まれる構造を有するものである、
前記ベシクル。

第一の重合体：

(a) 非荷電親水性セグメントとカチオン性セグメントとを有するブロック共重合体I

(b) カチオン性セグメントを有するアミノ酸重合体I

第二の重合体：

(c) 非荷電親水性セグメントとアニオン性セグメントとを有するブロック共重合体II

(d) アニオン性セグメントを有するアミノ酸重合体II

【請求項2】

前記膜は、外層、中間層及び内層からなる三層構造を有し、外層及び内層は非荷電親水性セグメントにより構成され、中間層はカチオン性セグメント及びアニオン性セグメントにより構成されるものである、請求項1に記載のベシクル。

【請求項3】

ブロック共重合体I及びIIのうち一方のブロック共重合体の非荷電親水性セグメントが前記外層を形成し、他方のブロック共重合体の非荷電親水性セグメントが前記内層を形成

10

20

する、請求項 2 に記載のベシクル。

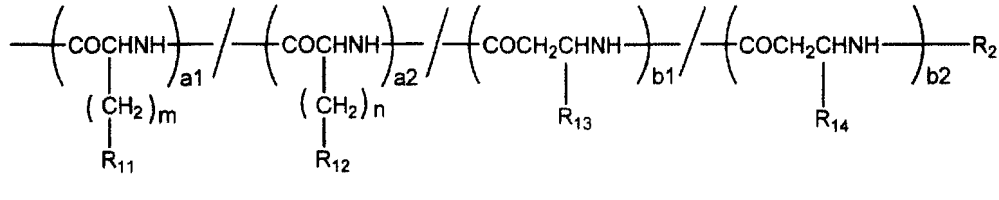
【請求項 4】

非荷電親水性セグメントが、ポリエチレングリコール及び/又はポリ(2-オキサゾリン)である、請求項 1 に記載のベシクル。

【請求項 5】

前記カチオン性セグメントが、下記式(1)で示されるものである、請求項 1 に記載のベシクル。

【化 1】



10

〔式中、

R₂は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基またはメタクリロイル基を表し、

R₁₁及びR₁₃は、それぞれ独立して-(CH₂)₃NH₂又は-CONH(CH₂)_s-X₁を表し、ここで、sは0~20の整数であり、X₁は、-NH₂、ピリジル基、モルホリル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C₁₋₆アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノC₁₋₆アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、-(CH₂)_tNH₂及び-(NR₉(CH₂)_o)_pNHR₁₀からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、R₉は水素原子又はメチル基を表し、R₁₀は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、-C(=NH)-NH₂、又はtert-ブトキシカルボニル基を表し、oは1~15の整数であり、pは1~5の整数であり、tは0~15の整数であり、

20

R₁₂及びR₁₄は、それぞれ独立してチオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基、-SR₃₀(R₃₀は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は-CONH(CH₂)_s-X₂を表し、ここで、sは0~20の整数であり、X₂は、チオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基、SR₃₀(R₃₀は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基又はSR₃₀(R₃₀は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C₁₋₆アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノC₁₋₆アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに-S-S-(CH₂)_tNH₂、-S-S-(NR₉(CH₂)_o)_pNHR₁₀、-(CH₂)_tNHCO(CH₂)_uSH及び-(CH₂)_tNHC(=NH)(CH₂)_vSHからなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、R₉、R₁₀、o、p、tは前記と同様であり、uは0~15の整数であり、vは0~15の整数であり、

30

40

m及びnは1又は2であり、

a₁及びa₂はそれぞれ0~5,000の整数であり、b₁及びb₂はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつa₁+a₂+b₁+b₂は2~5,000であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【請求項 6】

R₁₁及びR₁₃がそれぞれ独立して-CONH(CH₂)_s-NH₂(sは2~8の整数であり)であり、

R₁₂及びR₁₄がそれぞれ独立してチオール基、-CONH(CH₂)_s-S-S-(CH₂)_tNH₂、-CONH(CH₂)_s-SH、-CONH(CH₂)_sNHCO(CH₂)_uSH又は-CONH(CH₂)_sNHC(=NH)(CH₂)_vSH(sは2~8の整数であり、tは0~15の整数であり、uは1~8の整数であり、vは1~8の整数である)であり、

50

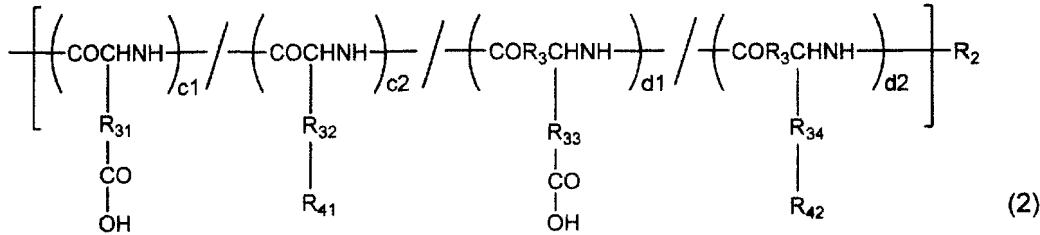
R₂が水素原子であり、

a₁及びa₂がそれぞれ0～200の整数であり、b₁及びb₂が0～200の整数であり、かつa₁+a₂+b₁+b₂が10～200である、請求項5に記載のベシクル。

【請求項7】

アニオン性セグメントが、下記式(2)で示されるものである、請求項1に記載のベシクル。

【化2】



10

〔式中、

R₂は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

R₃は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R₃₁及びR₃₂は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R₃₃及びR₃₄は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表し、

R₄₁及びR₄₂は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基、-SR₃₀ (R₃₀は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は-CONH(CH₂)_s-X₃を表し、ここで、sは0～20の整数であり、X₃は、チオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基又は-SR₃₀ (R₃₀は前記と同様である)であり、

c₁及びc₂はそれぞれ0～5,000の整数であり、d₁及びd₂はそれぞれ0～5,000の整数であり、かつc₁+c₂+d₁+d₂は2～5,000であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。〕

【請求項8】

R₂が水素原子を表し、

R₄₁及びR₄₂がチオール基又は-CONH(CH₂)_s-SH (sは2～8の整数である)であり、

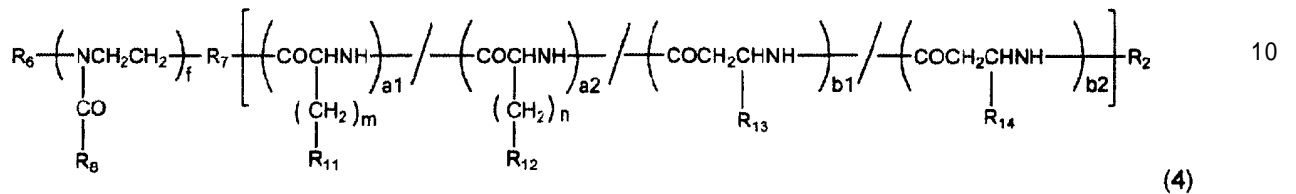
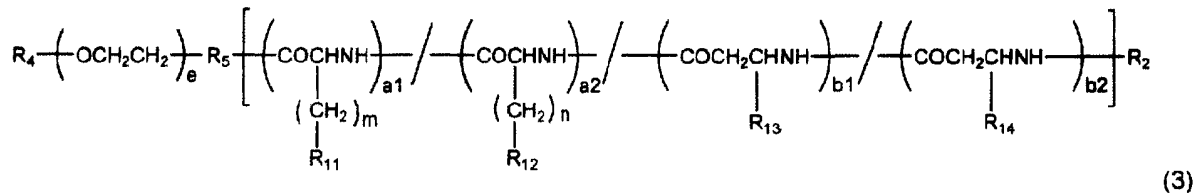
c₁及びc₂が0～200の整数であり、d₁及びd₂が0～200の整数であり、かつc₁+c₂+d₁+d₂が10～200である、請求項7に記載のベシクル。

【請求項9】

ブロック共重合体Iが、下記式(3)又は(4)で示されるものである、請求項1に記載のベシクル。

30

【化3】



〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基またはメタクリロイル基を表し、

R_{11} 及び R_{13} は、それぞれ独立して $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_1$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_1 は、 $-\text{NH}_2$ 、ピリジル基、モルホリル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 及び $-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 は水素原子又はメチル基を表し、 R_{10} は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、又はtert-ブトキシカルボニル基を表し、 o は1~15の整数であり、 p は1~5の整数であり、 t は0~15の整数であり、

R_{12} 及び R_{14} は、それぞれ独立してチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_2$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_2 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに $-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}-\text{S}-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 及び $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v\text{SH}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 、 R_{10} 、 o 、 p 、 t は前記と同様であり、 u は0~15の整数であり、 v は0~15の整数であり、

m 及び n は1又は2であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g\text{NH}-$ を表し、かつ g は0~5であり、

R_6 及び R_7 は、それぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は、直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

a_1 及び a_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、 b_1 及び b_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ は2~5,000であり、

e は5~2,500の整数であり、 f は5~2,500の整数であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【請求項10】

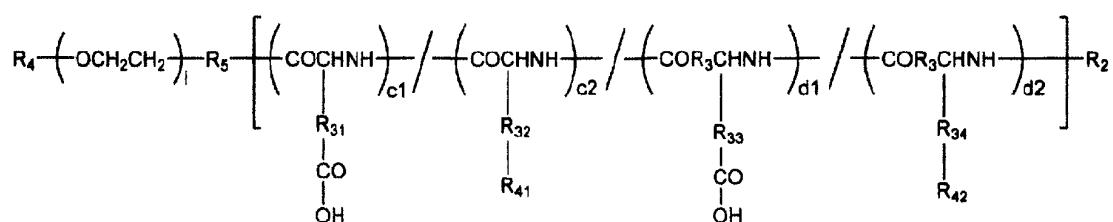
R_{11} 及び R_{13} がそれぞれ独立して $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NH}_2$ (s は2~8の整数である)であり、
 R_{12} 及び R_{14} がそれぞれ独立してチオール基、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v\text{SH}$ (s は2~8の整数であり、 t は0~15の整数であり、 u は1~8の整数であり、 v は1~8の整数である)であり、
 R_2 が水素原子であり、
 R_4 がメチル基であり、
 a_1 及び a_2 が0~200の整数であり、 b_1 及び b_2 が0~200の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ が10~200であり、 e が10~300の整数であり、 f が10~300の整数である、請求項9に記載のベシクル。

10

【請求項11】

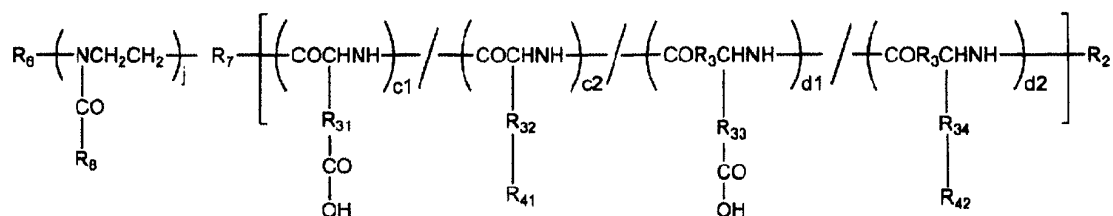
ブロック共重合体IIが、下記式(5)又は(6)で示されるものである、請求項1に記載のベシクル。

【化4】



(5)

20



(6)

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

30

R_3 は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{31} 及び R_{32} は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{33} 及び R_{34} は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表し、

R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_3$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_3 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は前記と同様である)であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

40

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g\text{NH}-$ を表し、かつ g は0~5の整数であり、

R_6 及び R_7 はそれぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

c_1 及び c_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、 d_1 及び d_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ は2~5,000であり、

i 及び j はそれぞれ5~2,500の整数であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【請求項12】

R_2 が水素原子を表し、

50

R_{41} 及び R_{42} がチオール基を表し、
 R_4 がメチル基を表し、
 R_6 がメチル基を表し、
 R_8 が $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ を表し、
 c_1 及び c_2 がそれぞれ0～200の整数であり、 d_1 及び d_2 がそれぞれ0～200の整数であり、
 かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ が10～200であり、
 i が10～300の整数であり、
 j が10～300の整数である、請求項11に記載のベシクル。

【請求項13】

ブロック共重合体Iが請求項9に係る発明における式(3)で示されるものであり、ブロック共重合体IIが請求項11に係る発明における式(5)で示されるものである、請求項1に記載のベシクル。

10

【請求項14】

物質を内包するものである、請求項1に記載のベシクル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水溶性でありかつ荷電した重合体により形成されるベシクルに関し、さらに詳しくは、チオール基、ジスルフィド基を導入した重合体を用いた静電結合型ベシクルであって薬物送達システム、各種材料として有用な機能を有するベシクルに関する。

20

【背景技術】

【0002】

一次構造が精密に制御された高分子は、自発的に組織化を生じ、高次構造体を形成することが知られている。その具体例としては、ミセル、ベシクル等の構造体が挙げられる。このような高分子の自己組織化した構造体は、多様な分子設計が可能であり、高分子が本来有している性質に加えて、新たな機能を備えた構造体となり得る。このような高分子の自己組織化した構造体を利用することが、薬物送達システムや材料科学をはじめとする種々の分野において、従前検討されている。

【0003】

例えば、特開平8-188541号公報(特許文献1)には、非荷電性セグメントと荷電性セグメントとを有するブロック共重合体からなる静電結合型高分子ミセル薬剤担体が開示されている。また、WO2006/118260号(特許文献2)には、静電結合型ベシクルとして、二つの共重合体の相互作用により形成される膜からなるベシクルが開示されている。

30

【0004】

さらに、Helmut Schlaad et al., *Macromolecules*, 2003, 36(5), 1417-1420(非特許文献1)には、ポリ(1,2-ブタジエン)ブロック及びポリ(セシウムメタクリレート)ブロックからなるブロック共重合体と、ポリスチレンブロック及びポリ(1-メチル-4-ビニルピリジウムアイオダイド)ブロックからなるブロック共重合体とを用い、ポリマーソームと称されるベシクルを形成することが開示されている。

【0005】

40

高分子材料により形成される構造体は、優れた有用性が期待されるにもかかわらず、製造時にクロロホルム等の有機溶媒を用いることがしばしば必要とされる。さらに、高分子材料の自己組織化した構造体の製造にあっては、数工程に及ぶ煩雑な操作が要求されることがある。従って、有用性を備え、かつ簡便な操作により製造することが可能な構造体の創出が望まれるといえる。

【0006】

Anraku Y. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(5), 1631-1636(非特許文献2)には、非荷電親水性セグメントと荷電性セグメントとを有するブロック共重合体(例えばポリエチレングリコール(PEG)-ポリアニオン等)と、前記荷電性セグメントとは逆の電荷に荷電した共重合体(例えばポリカチオン等)とを自己組織化させてなるベシクルが

50

、本発明者らの一部によって開示されている。この手法によれば、二種のポリマー水溶液を混合するだけで直径100-400 nmでサイズの揃った一枚の静電結合性膜からなるベシクルを簡便に製造することができる。通常、高分子の自己組織化により得られるベシクルは、その空隙部に各種の物質を包含・担持させ、適切な状況下において内包物を放出して利用することが考えられる（概説につきH. Nyin et al., *Soft Matter*, 2006, 2, 940-949（非特許文献3））及び「リポソーム応用の新展開」、秋吉一成等監修、エヌ・ティー・エス、2005年（非特許文献4）、岸村顕広、片岡一則、人工血液、2009, 17, 73-81（非特許文献5）参照）。従って、上記の静電結合型ベシクルについても簡便な架橋法、かつ環境応答的にベシクルの徐放能や安定性を制御する手法の確立が求められている。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開平8-188541号公報

【特許文献2】W02006/118260号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Helmut Schlaad et al., *Macromolecules*, 2003, 36(5), 1417-1420

【非特許文献2】Anraku Y. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(5), 1631-1636

【非特許文献3】H. Nyin et al., *Soft Matter*, 2006, 2, 940-949

【非特許文献4】「リポソーム応用の新展開」、秋吉一成・辻井薫監修、エヌ・ティー・エス、2005年

20

【非特許文献5】岸村顕広、片岡一則、人工血液、2009, 17, 73-81

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、水溶性でありかつ荷電した重合体により形成されるベシクル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】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、水溶性でありかつ荷電したブロック共重合体にチオール基及び/又はジスルフィド基を導入することにより、荷電性セグメント部分によるベシクルを簡便に作製し得るだけでなく、架橋によって安定化したベシクルを取得するとともに、ベシクル架橋後も架橋構造部を環境応答的に開裂する手法を見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0011】

すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の第一の重合体と、以下の(c)又は(d)の第二の重合体とにより形成された膜（但し(b)と(d)との組み合わせを除く）であって前記重合体中のカチオン性セグメント及びアニオン性セグメントの一部が架橋された膜を有してなる、ベシクルである。

第一の重合体：

40

(a) 非荷電親水性セグメントとカチオン性セグメントとを有するブロック共重合体I

(b) カチオン性セグメントを有するアミノ酸重合体I

第二の重合体：

(c) 非荷電親水性セグメントとアニオン性セグメントとを有するブロック共重合体II

(d) アニオン性セグメントを有するアミノ酸重合体II

【0012】

本発明において、架橋は、その部位にジスルフィド結合が含まれる構造を有するものである。

また、本発明の別の態様において、前記膜は、外層、中間層及び内層からなる三層構造を有し、外層及び内層は非荷電親水性セグメントにより構成され、中間層はカチオン性セ

50

グメント及びアニオン性セグメントにより構成される。

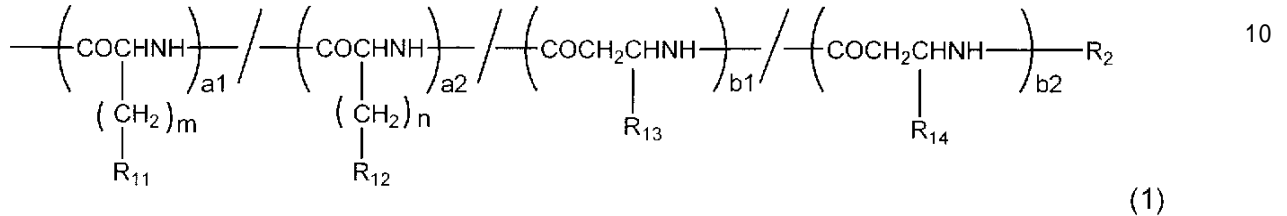
【0013】

非荷電親水性セグメントとしては、ポリエチレングリコール及び/又はポリ(2-オキサゾリン)が挙げられる。

【0014】

さらに、前記カチオン性セグメントとしては、下記式(1)で示されるものが挙げられる。

【化1】



【0015】

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基またはメタク
リロイル基を表し、

R_{11} 及び R_{13} は、それぞれ独立して $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_1$ を表し、ここで、 s は
0~20の整数であり、 X_1 は、 $-\text{NH}_2$ 、ピリジル基、モルホリル基、1-イミダゾリル基、ピ
ペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-
ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリ
ジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ
基、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 及び $-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、
ここで、 R_9 は水素原子又はメチル基を表し、 R_{10} は、水素原子、アセチル基、トリフル
オロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、又はtert-ブトキシ
カルボニル基を表し、 o は1~15の整数であり、 p は1~5の整数であり、 t は0~15の整
数であり、

R_{12} 及び R_{14} は、それぞれ独立してチオール基(-SH基)、チオール基を含有する C_{1-12} アル
キル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基
、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスル
フエニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-
X_2$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_2 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アル
キル基、 SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有する
 C_{1-12} アルキル基又は SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、
1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(
アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フ
ェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに $-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}-\text{S}-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 及び $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v\text{SH}$ からなる群から選択される少なくとも
一つであり、ここで、 R_9 、 R_{10} 、 o 、 p 、 t は前記と同様であり、 u は0~15の整数であり、 v
は0~15の整数であり、

m 及び n は1又は2であり、

a_1 及び a_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、 b_1 及び b_2 はそれぞれ0~5,000の整数であ
り、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ は2~5,000であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【0016】

本明細書において、 o は1~15の整数、好ましくは1~10の整数である。

本明細書において、 s は0~20の整数、好ましくは2~8の整数である。

【0017】

10

20

30

40

50

上記式(1)において、好ましくは、 R_{11} 及び R_{13} がそれぞれ独立して $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NH}_2$ (s は2～8の整数である)であり、 R_{12} 及び R_{14} がそれぞれ独立してチオール基、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u-\text{SH}$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v-\text{SH}$ (s は2～8の整数であり、 t は0～15の整数であり、 u は1～8の整数であり、 v は1～8の整数である)であり、

R_2 が水素原子であり、

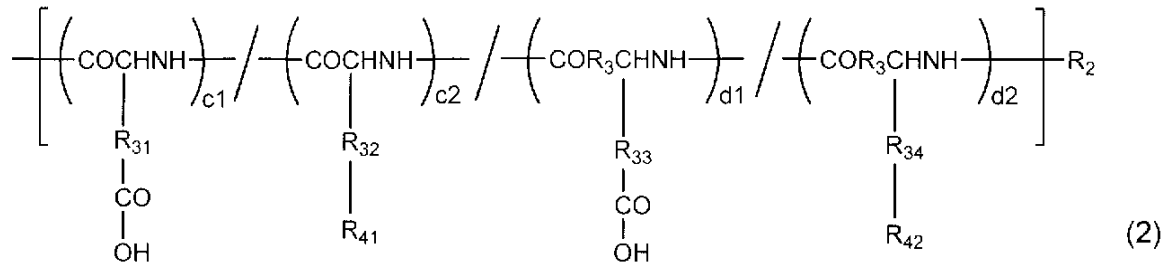
a_1 及び a_2 がそれぞれ0～200の整数であり、 b_1 及び b_2 が0～200の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ が10～200である。

【0018】

さらに、本発明において、アニオン性セグメントとしては下記式(2)で示されるものが挙げられる。

10

【化2】



20

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

R_3 は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{31} 及び R_{32} は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{33} 及び R_{34} は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表し、

R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す))、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_3$ を表し、ここで、 s は0～20の整数であり、 X_3 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は前記と同様である)であり、

30

c_1 及び c_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、 d_1 及び d_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ は2～5,000であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【0019】

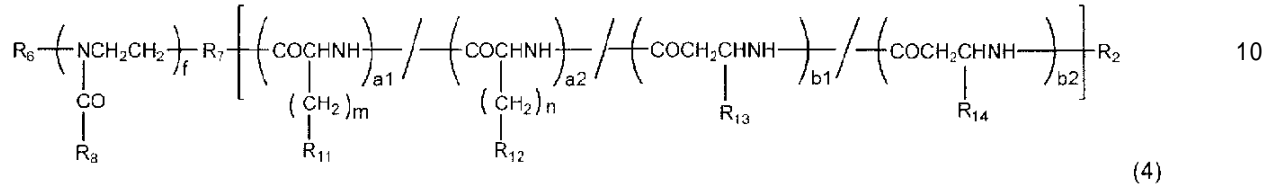
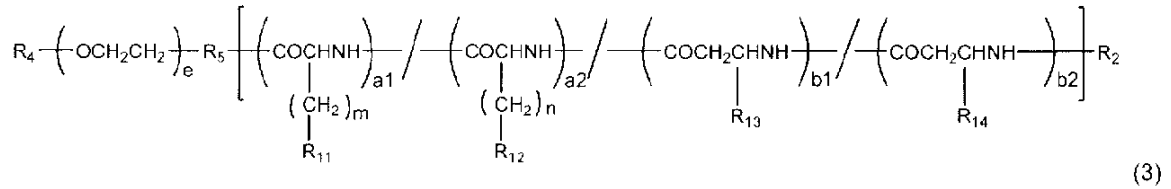
上記式(2)において、 R_2 が水素原子であり、 R_3 がメチレン基であり、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基であり、 R_{41} 及び R_{42} がチオール基又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ (s は2～8の整数である)であり、 c_1 及び c_2 が0～200の整数であり、 d_1 及び d_2 が0～200の整数であり、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ が10～200であるものが好ましい。

40

【0020】

さらに、本発明において、ブロック共重合体Iとしては、下記式(3)又は(4)で示されるものを例示することができる。

【化3】



〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

R_{11} 及び R_{13} は、それぞれ独立して $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_1$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_1 は、 $-\text{NH}_2$ 、ピリジル基、モルホリル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 及び $-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 は水素原子又はメチル基を表し、 R_{10} は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、又はtert-ブトキシカルボニル基を表し、 o は1~15の整数であり、 p は1~5の整数であり、 t は0~15の整数であり、

R_{12} 及び R_{14} は、それぞれ独立してチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_2$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_2 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに $-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}-\text{S}-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 及び $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v\text{SH}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 、 R_{10} 、 o 、 p 、 t は前記と同様であり、 u は0~15の整数であり、 v は0~15の整数であり、

m 及び n は1又は2であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g\text{NH}-$ を表し、かつ g は0~5であり、

R_6 及び R_7 は、それぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は、直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

a_1 及び a_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、 b_1 及び b_2 はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ は2~5,000であり、

e は5~2,500の整数であり、 f は5~2,500の整数であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【 0 0 2 1 】

さらに、上記式(3)又は(4)においては、 R_{11} 及び R_{13} がそれぞれ独立して $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NH}_2$ (s は2～8の整数である)であり、

R_{12} 及び R_{14} がそれぞれ独立してチオール基、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u-\text{SH}$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v-\text{SH}$ (s は2～8の整数であり、 t は0～15の整数であり、 u は1～8の整数であり、 v は1～8の整数である)であり、

R_2 が水素原子であり、

R_4 がメチル基であり、

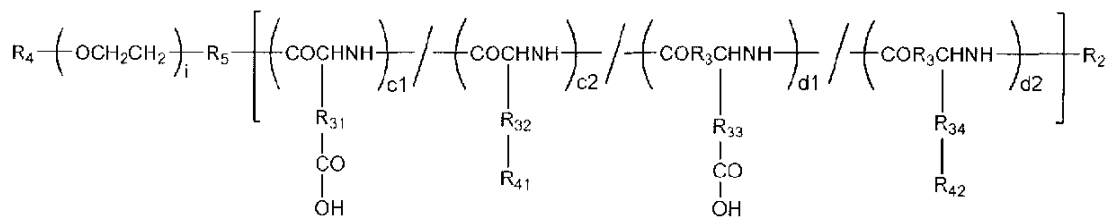
a_1 及び a_2 が0～200の整数であり、 b_1 及び b_2 が0～200の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ が10～200であり、 e が10～300の整数であり、 f が10～300の整数であるものが好ましい。

10

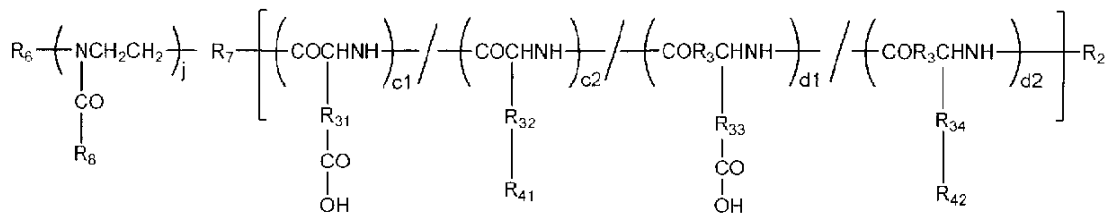
【 0 0 2 2 】

本発明において、ブロック共重合体IIとしては、下記式(5)又は(6)で示されるものを例示することができる。

【化4】



(5) 20



(6)

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

30

R_3 は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{31} 及び R_{32} は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{33} 及び R_{34} は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表し、

R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_3$ を表し、ここで、 s は0～20の整数であり、 X_3 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は前記と同様である)であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

40

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g-\text{NH}-$ を表し、かつ g は0～5の整数であり、

R_6 及び R_7 はそれぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

c_1 及び c_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、 d_1 及び d_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ は2～5,000であり、

i 及び j はそれぞれ5～2,500の整数であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

【 0 0 2 3 】

上記式(5)又は(6)において、 R_2 が水素原子を表し、

50

R_3 がメチレン基を表し、
 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基を表し、
 R_4 がメチル基を表し、
 R_6 がメチル基を表し、
 R_8 が $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ を表し、
 c_1 及び c_2 がそれぞれ0～200の整数であり、 d_1 及び d_2 がそれぞれ0～200の整数であり、
かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ が10～200であり、
 i が10～300の整数であり、
 j が10～300の整数であるものが好ましい。

【0024】

10

さらに、上記式(5)又は(6)において、 R_2 が水素原子を表し、
 R_3 がメチレン基を表し、
 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基を表し、
 R_{41} 及び R_{42} がチオール基を表し、
 R_4 がメチル基を表し、
 R_6 がメチル基を表し、
 R_8 が $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ を表し、
 c_1 及び c_2 がそれぞれ0～200の整数であり、 d_1 及び d_2 がそれぞれ0～200の整数であり、
かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ が10～200であり、
 i が10～300の整数であり、
 j が10～300の整数であるものがより好ましい

20

【0025】

さらに、本発明においては、ブロック共重合体Iが前記式(3)で示されるものであり、ブロック共重合体IIが前記式(5)で示されるものが挙げられる。

【0026】

本発明の一態様において、ベシクルは、化合物を内包するものである。

【発明の効果】

【0027】

本発明により、静電結合型ベシクルが提供される。本発明のベシクルは、荷電性セグメント部分にチオール基やジスルフィド基が導入されており、膜の内側及び外側が親水性であり、膜内の中空部に薬物等を封入することができるとともに、カチオン性セグメントとアニオン性セグメントとの結合を調整することができる。さらに、形成された静電結合性膜がチオール基間のジスルフィド形成に基づく自発的架橋形成や、ジスルフィド結合の還元性環境、酸化性環境、あるいはラジカルが発生しうような環境への応答性に基づき、ベシクルの崩壊誘起や徐放性の制御が可能である。従って、本発明のベシクルは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)に利用できる点で極めて有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】ベシクルの構造及びその形成メカニズムを示す図の一例である。

【図2】homo-P(Asp-AP-cyst)のサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す図である。

40

【図3】 ^1H NMRの測定結果を示す図である。

【図4】本発明のベシクル(PICsome)の調製スキームの概念図の一例である。

【図5】本発明のベシクルの透過型電子顕微鏡写真である。

【図6】本発明のベシクルの粒径を測定した結果を示す図である。

【図7】本発明のベシクルの粒径の経時変化を測定した結果を示す図である。

【図8】本発明のベシクルの粒径及びPDIの経時変化を測定した結果を示す図である。

【図9】本発明のベシクルのFCS測定結果を示す図である。

【図10】本発明のチオール含有ベシクルのDLS測定結果を示す図である。

【図11】シトクロムc封入ベシクルにおけるペルオキシダーゼ活性測定結果を示す図である。

50

【発明を実施するための形態】

【0029】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 概要

本発明者らは、正に荷電したセグメント及び負に荷電したセグメントを含む二つの重合体を用い、さらにこれらのセグメントを架橋することにより、構造安定性、環境応答性に優れた新規ベシクルを得られるとの知見を得た。また、本発明者らは、上記二つの重合体を水性溶液中で混合することにより、簡易に新規ベシクルを製造しようとの知見を得た。本発明はこれら知見に基づいて完成されたものである。

【0030】

本発明のベシクルは、その製造において有機溶媒を用いる必要がなく、バイオマテリアルの分野やDDSにおいて有利に利用することができる。また、本発明のベシクルは、膜の内側に空間（中央空隙）を有しており、大量の化合物等の物質を封入することができ、従って、生体内物質及び薬物の輸送キャリアーや、中央空隙を酵素の反応場とするリアクター微粒等として有利に利用することができる。さらに、本発明のベシクルは、生理食塩水や血清の存在下でその構造を安定に保持することができ、その膜には半透性等の多様な機能を付与することが可能である。さらに、本発明のベシクルは、荷電性セグメント同士がジスルフィド結合等により架橋されており、還元条件下に曝すことにより結合を解除することができる。従って、本発明のベシクルは構造安定性や環境応答性に優れたバイオマテリアル又は薬物送達システムとして有利に利用することができる。

本明細書において、「ベシクル」とは、内部に空隙を有し、膜により閉鎖された基本構造体を意味する。

【0031】

本明細書において、特に断らない限り、基または基の一部としての「アルキル」または「アルコキシ」という語は、基が直鎖状、分枝鎖状、または環状のアルキルまたはアルコキシを意味する。また、例えば「 C_{1-12} アルキル基」という場合の「 C_{1-12} 」とは、該アルキル基の炭素数が1～12個であることを意味する。

本発明において、「 C_{1-12} アルキル基」は、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*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、デシル基、ウンデシル基等が挙げられる。「 C_{1-6} アルキル基」は、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*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基等が挙げられる。

本明細書において、特に断らない限り、「アリール」とは、フェニル、ナフチル、アンスニルまたはピレニル等を意味する。

本明細書において、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子を意味する。

【0032】

本明細書において、アルキル基が「置換されていてもよい」とは、アルキル基上の1またはそれ以上の水素原子が1またはそれ以上の置換基（同一または異なっていてもよい）により置換されていてもよいことを意味する。置換基の最大数はアルキル上の置換可能な水素原子の数に依存して決定できることは当業者に明らかである。アルキル基以外の基についても、「置換されていてもよい」は上記と同様に解釈される。

【0033】

ここで置換基は、ハロゲン原子、アリール基、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、シアノ基、ホルミル基、ジメチルアセタール化ホルミル基、ジエチルアセタール化ホルミル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、 C_{2-7} アシルアミド基、トリ C_{1-6} アルキルシロキシ基（ここで、 C_{1-6} アルキルは同一であっても異なっていてもよい）、シロキシ基及びシリルアミノ基からなる群から選択されるものである。

【0034】

2. ベシクル

本発明のベシクルは、水溶性でありかつ荷電した重合体の相互作用により形成される膜を含むことを一つの特徴とする。

本発明のベシクルは、以下の第一の重合体と第二の重合体とにより形成された膜（但し(b)と(d)との組み合わせを除く）を有する。この膜は、前記重合体中のカチオン性セグメント及びアニオン性セグメントの一部が架橋されたものである。

【0035】

第一の重合体：

- (a) 非荷電親水性セグメントとカチオン性セグメントとを有するブロック共重合体I
- (b) カチオン性セグメントを有するアミノ酸重合体I

第二の重合体：

- (c) 非荷電親水性セグメントとアニオン性セグメントとを有するブロック共重合体II
- (d) アニオン性セグメントを有するアミノ酸重合体II

但し、本発明の膜の外側及び内側は親水性であることが好ましく、上記(b)及び(d)のアミノ酸重合体同士との組み合わせは除く。

【0036】

図1は、一つの態様として、本発明のベシクルの構造及びその形成されるメカニズムを示した模式図である。図1においては、便宜上、第一及び第二の重合体は、いずれも非荷電親水性セグメントと荷電性セグメントとのブロック共重合体（上記(a)と(c)との組み合わせ）を例として説明する。

【0037】

図1Aにおいて、第一のブロック共重合体101は、非荷電親水性セグメント102と、正に荷電した荷電性セグメント（カチオン性セグメント）103とを有し、他方、第二のブロック共重合体201は、非荷電親水性セグメント202と、負に荷電した荷電性セグメント（アニオン性セグメント）203とを有する。そして、第一のブロック共重合体101と第二のブロック共重合体201とは、電荷の相互作用が生じ得る系に置かれると自己集合し、図1Bに示される通り、荷電性セグメント103及び203からなるイオンコンプレックスの中間層20と、非荷電親水性セグメント102及び202からなる二つの親水性層（外層31及び内層32）とが形成され、この構造体(B)を膜とするベシクル(C)を生じる。なお、図1Bは、図1Cの枠内を模式的に拡大して示した図である。

そして、荷電性セグメントの側鎖にはチオール基等がついており、例えば酸化条件下でジスルフィド結合を形成することができる（図1(D））。

酸化条件としては、空気酸化の他、酸化剤としてヨウ素、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、硫酸銅、二酸化鉛、 Fe^{3+} 錯体、 NO 、 N_2O_4 、 NO_2 等の窒素酸化物、ジメチルスルホキシド等を用いる一般的な方法が挙げられる。

【0038】

上述の通り、本発明のベシクルは、荷電性セグメント間の静電相互作用及びジスルフィド結合等の架橋を主な駆動力として形成されるものである。従って、イオン強度や生体内のpH変化や酸化還元反応によってベシクルの形成、解離や膜の物質透過性を制御することが可能であり、その結果、本発明のベシクルは優れた環境応答性を発揮することができる。

【0039】

また、図1Cに示す通り、ベシクルの膜は、外層31、中間層20、及び内層32からなる三層構造を有する。

また、本発明のベシクルは、非荷電親水性セグメントから構成される内層を有することから、その中央空隙には水性媒体を含めることができる。

【0040】

本発明のベシクルの形態は、通常は球状である。また、本発明のベシクルの粒径は、中空構造を取る限り特に限定されないが、好ましくは $10\ \mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $50\ \text{nm} \sim 1\ \mu\text{m}$ である。

本発明のベシクルは、中間層においてポリイオンコンプレックス（PIC）を形成した小

10

20

30

40

50

胞体である。従って、本発明のベシクルを「PICsome」と呼ぶこともある。

【0041】

3. セグメント

以下、本発明のベシクルを構成するセグメントについて説明する。

(1) 荷電性セグメント

第一の重合体に含まれる荷電性セグメントと、第二の重合体に含まれる荷電性セグメントとは、互いに反対の電荷に荷電することができ、本発明においては、第一の重合体に含まれる荷電性セグメントはカチオン性セグメントであり、第二の重合体に含まれる荷電性セグメントはアニオン性セグメントである。

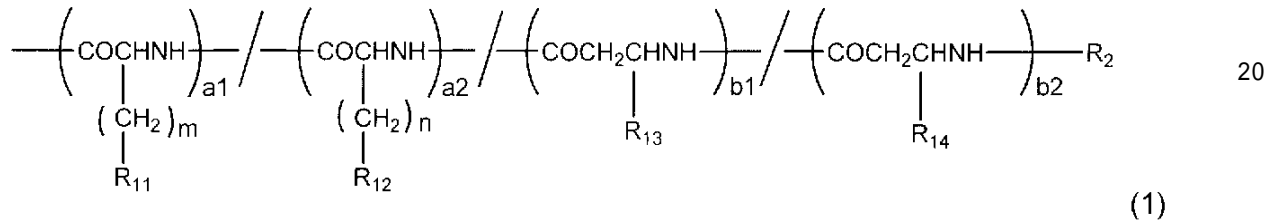
【0042】

また、本発明において、カチオン性セグメントとしてポリアミンを用いる場合、ポリアミンに酸付加して陽性に荷電させることができる。付加する酸の種類は、ベシクルの用法等に従って適宜決定される。

【0043】

本発明の好ましい態様によれば、第一の重合体のカチオン性セグメントは、下記式(1)で示されるものである。

【化5】



【0044】

上記式(1)において、 R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表す。

また、 R_{11} 及び R_{13} は、それぞれ独立して $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_1$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_1 は、 $-\text{NH}_2$ 、ピリジル基、モルホルル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 及び $-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 は水素原子又はメチル基を表し、 R_{10} は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、又はtert-ブトキシカルボニル基を表し、 o は1~15の整数であり、 p は1~5の整数であり、 t は0~15の整数である。

【0045】

R_{12} 及び R_{14} は、それぞれ独立してチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_2$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_2 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに $-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}-\text{S}-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 及び $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v\text{SH}$ からなる群から選択される少なくとも一つであ

10

20

30

40

50

り、ここで、 R_9 、 R_{10} 、 o 、 p 、 t は前記と同様であり、 u は0～15の整数であり、 v は0～15の整数であり、

m 及び n は1又は2である。

【0046】

チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基としては、例えばメルカプトメチル基、2-メルカプトエチル基、3-メルカプトプロピル基、3-メルカプトブチル基、4-メルカプトブチル基、6-メルカプトヘキシル基、3-メルカプトヘキシル基、8-メルカプトオクチル基、12-メルカプトドデシル基等が挙げられる。

a_1 及び a_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、 b_1 及び b_2 はそれぞれ0～5,000の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ は2～5,000である。

10

また、「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。

ここで、チオール基は保護基により保護されていてもよい。 R_{30} はチオール基の保護基であり、例えばベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基等が挙げられる。

【0047】

上記式(1)において、 R_{11} 及び R_{13} が $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_1$ を表す場合、 X_1 は、荷電性セグメントの繰り返し単位ごとに、同一の官能基であってもよく、または異なる官能基であってもよい。

【0048】

20

さらに、本発明のより好ましい態様によれば、上記式(1)において、 R_{11} 及び R_{13} がそれぞれ独立して $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NH}_2$ (s は2～8の整数である)であり、 R_{12} 及び R_{14} がそれぞれ独立してチオール基、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_t-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u-\text{SH}$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NHC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_v-\text{SH}$ (s は2～8の整数であり、 t は0～15の整数であり、 u は1～8の整数であり、 v は1～8の整数である)であり、 R_2 が水素原子であり、 a_1 及び a_2 がそれぞれ0～200の整数であり、 b_1 及び b_2 が0～200の整数であり、かつ $a_1+a_2+b_1+b_2$ が10～200である。

【0049】

ここで、カチオン性セグメントとアニオン性セグメントとの間でジスルフィド結合等を含む架橋構造を形成するためには、(i)カチオン性セグメント及びアニオン性セグメントにチオール基又はチオール基がスルフェニル化された基等が含まれているか、あるいは(ii)カチオン性セグメントにジスルフィド結合が含まれていることが必要である。従って、上記(i)の態様により架橋する場合は、式(1)において a_2 及び b_2 の少なくとも一方は0ではないことが好ましい。

30

両セグメントを架橋するためにリンカーを使用することもできる。両セグメントを架橋するためのリンカー部分の種類は特に限定されるものではなく、リンカーの両端でジスルフィド結合が形成され、粒子が安定化されればよい。リンカーを導入するための架橋剤としてはアルキルジチオール、チオスルフィネート(例えば、1,2-dithiane-t-4,t-5-diol r-1-oxide)及びアルキルジチオールより合成したスルフェニル化剤等が挙げられる。

【0050】

40

他方、上記(ii)の態様により架橋する場合は適切な縮合剤存在下において、カチオン性セグメントの側鎖の末端のアミノ基と、アニオン性セグメントの側鎖の末端のカルボキシル基との間にアミド結合が形成されて両セグメントを架橋することが可能である。

【0051】

架橋剤を使用する場合、架橋剤の種類は制限されず、ベシクルの用途や第一の重合体及び第二の重合体の種類、他の膜成分の種類等に応じて適宜選択することができるが、効率的に架橋を行うとともに、物質内包ベシクルの安定性を高める観点からは、第一の重合体及び第二の重合体の荷電性セグメントが有する荷電性基(例えばアミノ基等のカチオン基やカルボキシル基等のアニオン基)と反応し、被内包物質とは反応しない架橋剤が好ましい。架橋剤の具体例としては、アミノ基を架橋する架橋剤(例えば、グルタルアルデヒド

50

、スベリンイミド酸ジメチル二塩酸塩 (dimethyl suberimidate dihydrochloride : D M S)、3,3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル (dimethyl 3,3'-dithiobispropionimide : D T B P))、アミノ基とカルボキシル基を縮合することで架橋する架橋剤 (例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide : E D C) 等)、リン酸基を架橋する架橋剤 (例えばカルシウムイオン等の金属イオン) 等が挙げられるが、グルタルアルデヒド、E D C 等が好ましく、E D C が特に好ましい。また、1種の架橋剤を単独で使用してもよいが、2種以上の架橋剤を任意の組み合わせ及び比率で使用してもよい。

【0052】

架橋剤を使用する場合、その量は架橋剤の性質又は架橋する基の性質等に依存して当業者であれば適宜設定することができる。例えば、アミノ基とカルボキシル基を縮合することで架橋する架橋剤の場合は、カルボキシル基またはアミノ基に対して0.05~20当量、好ましくは0.1~20当量、例えば、0.1、0.5、1.0、5.0、又は10当量用いることができる。また、チオスルフィネート等を用いて架橋する場合は、カルボキシル基側またはアミノ基側のチオール基に対し0.05~20当量、好ましくは0.1~10当量用いることができる。

10

【0053】

本発明において、第一の重合体がカチオン性セグメントを有するアミノ酸重合体Iを形成するときは、カチオン性セグメントは上記式(1)で表すことができ、そのR₂の反対側の片末端は-NH(CH₂)_{k-1}CH₃、-NH-(CH₂)_{k-1}-C(三重結合)CH (kは1以上の整数)等が挙げられ、-NH(CH₂)₃CH₃が好ましい。

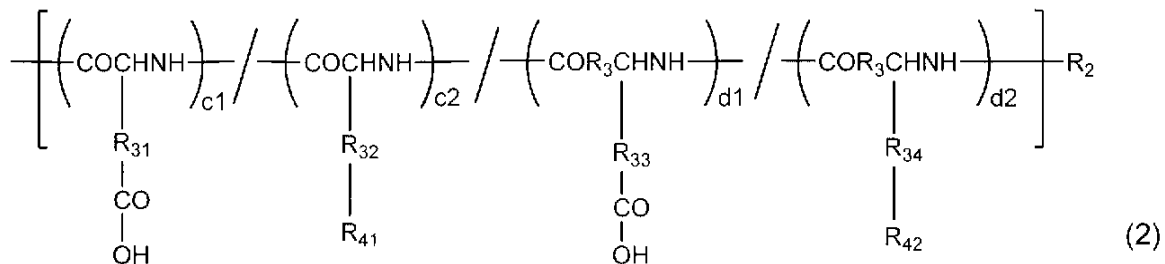
20

本発明の一つの態様において、上記アミノ酸重合体Iは、カチオン性セグメントからなるものである。

【0054】

また、本発明の好ましい態様によれば、第二の重合体のアニオン性セグメントは、下記式(2)で示されるものである。

【化6】



30

【0055】

上記式(2)において、R₂は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、R₃は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表す。

また、R₃₁及びR₃₂は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、R₃₃及びR₃₄は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表す。

40

【0056】

R₄₁及びR₄₂は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基、-SR₃₀ (R₃₀は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は-CONH(CH₂)_s-X₃を表し、ここで、sは0~20の整数であり、X₃は、チオール基、チオール基を含有するC₁₋₁₂アルキル基又は-SR₃₀ (R₃₀は前記と同様である)である。

【0057】

c1及びc2はそれぞれ0~5,000の整数であり、d1及びd2はそれぞれ0~5,000の整数であ

50

り、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ は2~5,000であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。

上記式(2)において、 R_3 は、荷電性セグメントの繰り返し単位ごとに、同一の官能基であってもよく、又は異なる官能基であってもよい。

【0058】

さらに、本発明のより好ましい態様によれば、上記式(2)において、 R_2 が水素原子を表し、 R_3 がメチレン基を表し、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基を表し、 R_{41} 及び R_{42} がチオール基又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ (s は2~8の整数である)であり、 c_1 及び c_2 が0~200の整数であり、 d_1 及び d_2 が0~200の整数であり、かつ $c_1+c_2+d_1+d_2$ が10~200である。

【0059】

また、前述の通り、カチオン性セグメント及びアニオン性セグメントにチオール基又はチオール基がスルフェニル化された基等を導入すると、両セグメント間でジスルフィド結合を形成することができる。従って、カチオン性セグメントにチオール基又はチオール基がスルフェニル化された基等を導入する場合、アニオン性セグメントとの間でジスルフィド結合を形成するようにすることが好ましい。従って、このような場合は、アニオン性セグメントの側鎖にチオール基を導入するため、式(2)において、 c_2 及び d_2 の少なくとも一方は0ではないことが好ましく、 c_1 及び d_1 の少なくとも一方並びに c_2 及び d_2 の少なくとも一方は0ではないことがより好ましい。

【0060】

また、前述の通り、カチオン性セグメントの側鎖にジスルフィド結合が含まれていれば、式(2)において c_2 及び d_2 の両者は0でもよい。そして、カチオン性セグメントの側鎖の末端のアミノ基と、アニオン性セグメントの側鎖の末端のカルボキシル基との間でアミド結合が形成されて両セグメントが架橋される。

架橋剤の種類及び組合せは前記と同様である。

【0061】

本発明において、第二の重合体がアニオン性セグメントを有するアミノ酸重合体IIを形成するときは、アニオン性セグメントは上記式(2)で表すことができ、その R_2 の反対側の片末端は $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{w-1}\text{CH}_3$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{w-1}-\text{C}(\text{三重結合})\text{CH}$ (w は1以上の整数)等が挙げられ、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ が好ましい。

本発明の一つの態様において、上記アミノ酸重合体IIは、アニオン性セグメントからなるものである。

【0062】

(2) 非荷電親水性セグメント

非荷電親水性セグメントは、非荷電かつ親水性の性質を有するポリマーセグメントである。ここで「非荷電」とは、セグメントが全体として中性であることをいう。例としてはセグメントが正・負の電荷を有さない場合が挙げられる。また、セグメントが正・負の荷電を分子内に有する場合であっても、局所的な実効電荷密度が高くなく、自己組織化によるベシクルの形成を妨げない程度にセグメント全体の荷電が中和されていれば、やはり「非荷電」に該当する。また、「親水性」とは水性媒体に対して溶解性を示すことをいう。

【0063】

ブロック共重合体に含まれる非荷電親水性セグメントとしては、例えば、ポリエチレングリコールをはじめとするポリアルキレングリコール、あるいは、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-ノルマルプロピル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)等のポリ(2-オキサゾリン)が挙げられ、さらに、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、ポリ(2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン)、等電点が7付近のペプチド、タンパク質、及びそれらの誘導体等が挙げられる。上記の非荷電親水性セグメントを含むことにより、ブロック共重合体は、水性溶液中で会合、沈殿することなく安定に存在し、効率的にベシクルを構築することができる。さらに、上記

10

20

30

40

50

の非荷電親水性セグメントを含むブロック共重合体によって構築されることにより、ベシクルは水性溶液中で安定した構造を保持することができる。

【0064】

そして、本発明の好ましい態様によれば、第一及び第二の重合体の非荷電親水性セグメントは、ポリエチレングリコール及び/又はポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)であり、好ましくはポリエチレングリコールである。非荷電親水性セグメントとしてポリエチレングリコールを用いることは、ベシクルに生体適合性を付与する上で有利である。

【0065】

そして、非荷電親水性セグメントとしてポリエチレングリコールを用いる場合、ポリエチレングリコールの分子量は、好ましくは500~15,000であり、より好ましくは1,000~5,000である。ブロック共重合体に上記の分子量を有する非荷電親水性セグメントを用いることは、ミセルを形成するよりも優先的にベシクルを形成させる上で有利である。

【0066】

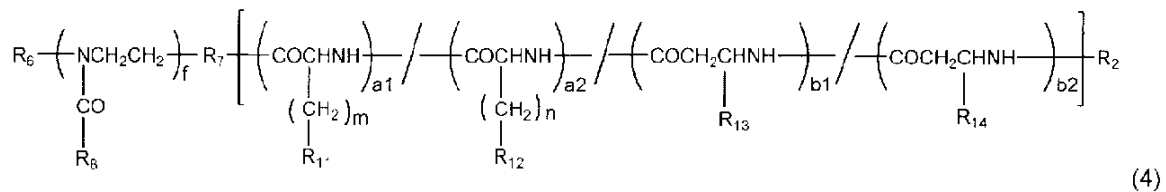
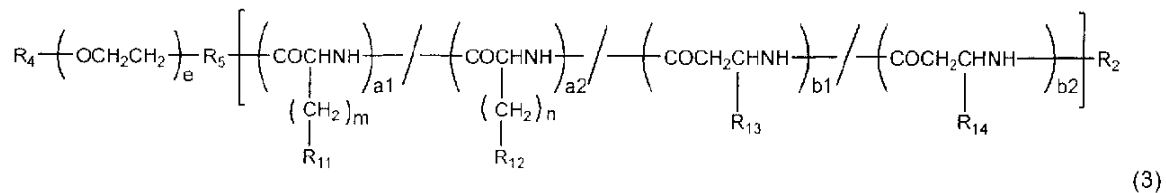
4. ブロック共重合体

(1) カチオン性セグメントを有するブロック共重合体I

本発明の好ましい態様によれば、カチオン性セグメントを有するブロック共重合体Iは、下記式(3)又は(4)で表されるものである。

【0067】

【化7】



【0068】

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

R_{11} 及び R_{13} は、それぞれ独立して $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-X_1$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_1 は、 $-\text{NH}_2$ 、ピリジル基、モルホリル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基、ピペリジニル基、グアニジノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NH}_2$ 及び $-(\text{NR}_9(\text{CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 は水素原子又はメチル基を表し、 R_{10} は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、又はtert-ブトキシカルボニル基を表し、 o は1~15の整数であり、 p は1~5の整数であり、 t は0~15の整数である。

【0069】

R_{12} 及び R_{14} は、それぞれ独立してチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(

10

20

30

40

50

アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_2$ を表し、ここで、sは0~20の整数であり、 X_2 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)、及びチオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は SR_{30} (R_{30} は前記と同様である)によって置換されたピリジル基、1-イミダゾリル基、ピペラジニル基、4-(C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、4-(アミノ C_{1-6} アルキル)-ピペラジニル基、ピロリジン-1-イル基、N-メチル-N-フェニルアミノ基及びピペリジニル基、並びに $-\text{S}-\text{S}-\text{(CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}-\text{S}-\text{(NR}_9\text{(CH}_2)_o)_p\text{NHR}_{10}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 及び $-(\text{CH}_2)_t\text{NHC(=NH)(CH}_2)_v\text{SH}$ からなる群から選択される少なくとも一つであり、ここで、 R_9 、 R_{10} 、o、p、tは前記と同様であり、uは0~15の整数であり、vは0~15の整数であり、

10

m及びnは1又は2であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g\text{NH}-$ を表し、かつgは0~5であり、

R_6 及び R_7 は、それぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は、直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

a1及びa2はそれぞれ0~5,000の整数であり、b1及びb2はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつ $a1+a2+b1+b2$ は2~5,000であり、

eは5~2,500の整数であり、fは5~2,500の整数であり、

20

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。]

上記式(3)及び(4)において、 R_{11} 及び R_{13} が $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_1$ を表す場合、 X_1 は、ブロック共重合体の繰り返し単位ごとに、同一の官能基であってもよく、または異なる官能基であってもよい。

【0070】

また、本発明のより好ましい態様によれば、上記式(3)及び(4)において、 R_{11} 及び R_{13} がそれぞれ独立して $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{NH}_2$ (sは2~8の整数である)であり、 R_{12} 及び R_{14} がそれぞれ独立してチオール基、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{S}-\text{S}-\text{(CH}_2)_t\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s\text{NHCO}(\text{CH}_2)_u\text{SH}$ 又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s\text{NHC(=NH)(CH}_2)_v\text{SH}$ (sは2~8の整数であり、tは0~15の整数であり、uは1~8の整数であり、vは1~8の整数である)であり、 R_2 が水素原子であり、 R_4 がメチル基であり、a1及びa2が0~200の整数であり、b1及びb2が0~200の整数であり、かつ $a1+a2+b1+b2$ が10~200であり、eが10~300の整数であり、fが10~300の整数である。

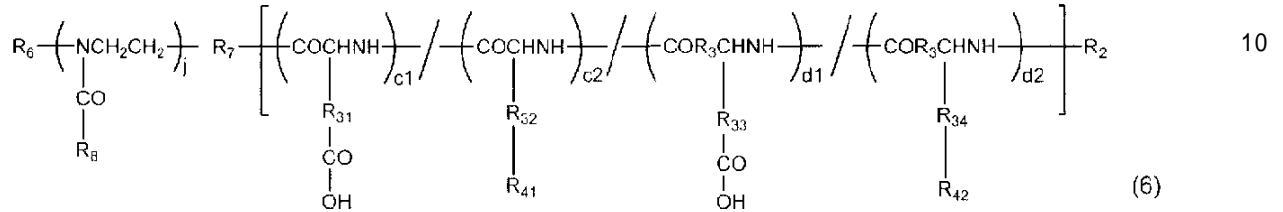
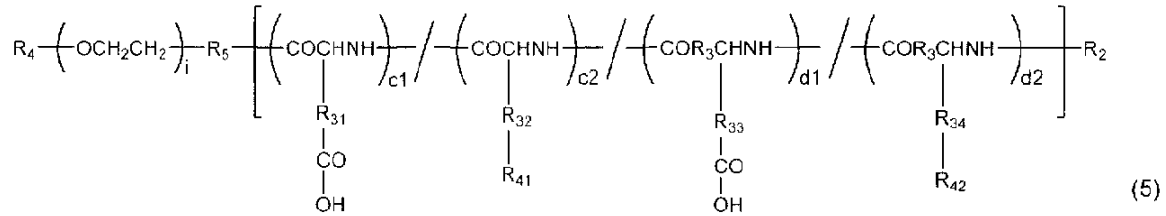
30

【0071】

(2)アニオン性セグメントを有するブロック共重合体II

また、本発明の好ましい態様によれば、アニオン性セグメントを有するブロック共重合体IIは、下記式(5)又は(6)で表されるものである。

【化8】



【0072】

〔式中、

R_2 は、水素原子、アセチル基、トリフルオロアセチル基、アクリロイル基又はメタクリロイル基を表し、

R_3 は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{31} 及び R_{32} は、それぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、

R_{33} 及び R_{34} は、それぞれ独立して単結合又はメチレン基若しくはエチレン基を表し、

R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立してベンジルオキシカルボニル基、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基、 $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メチルベンジル基、N-(アセチル)アミノメチル基、tert-ブチル基、トリチル基、2-ピリジンスルフェニル基又は3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を表す)、又は $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_s-\text{X}_3$ を表し、ここで、 s は0~20の整数であり、 X_3 は、チオール基、チオール基を含有する C_{1-12} アルキル基又は $-\text{SR}_{30}$ (R_{30} は前記と同様である)であり、

R_4 は、水素原子又は置換されていてもよい直鎖若しくは分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_g\text{NH}-$ を表し、かつ g は0~5の整数であり、

R_6 及び R_7 はそれぞれ R_4 及び R_5 と同様であり、

R_8 は直鎖又は分岐鎖の C_{1-12} アルキル基を表し、

$c1$ 及び $c2$ はそれぞれ0~5,000の整数であり、 $d1$ 及び $d2$ はそれぞれ0~5,000の整数であり、かつ $c1+c2+d1+d2$ は2~5,000であり、

i 及び j はそれぞれ5~2,500の整数であり、

「/」の表記は、各モノマー単位の配列順序が任意であることを表す。〕

上記式(5)及び(6)において、 R_3 は、ブロック共重合体の繰返し単位ごとに、同一の官能基であってもよく、または異なる官能基であってもよい。

【0073】

また、本発明の別のより好ましい態様によれば、上記式(5)及び(6)において、 R_2 が水素原子であり、 R_3 がメチレン基であり、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基であり、 R_4 がメチル基であり、 R_6 がメチル基であり、 R_8 が $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、 $c1$ 及び $c2$ がそれぞれ0~200の整数であり、 $d1$ 及び $d2$ がそれぞれ0~200の整数であり、かつ $c1+c2+d1+d2$ が10~200であり、 i が10~300の整数であり、 j が10~300の整数である。

【0074】

また、本発明の別のより好ましい態様によれば、上記式(5)及び(6)において、 R_2 が水素原子であり、 R_3 がメチレン基であり、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} がメチレン基であり、 R_{41} 及び R_{42} がチオール基を表し、 R_4 がメチル基であり、 R_6 がメチル基であり、 R_8 が $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、 $c1$ 及び $c2$ がそれぞれ0~200の整数であり、 $d1$ 及び $d2$ がそれぞれ0~200の整数であり、かつ $c1+c2+d1+d2$ が10~200であり、 i が10~300の整数であり、 j が10~300の整数であ

10

20

30

40

50

る。

【0075】

5. ベシクルの製造

本発明のベシクルは、その中央空隙に化合物等の物質を内包することができる。本発明によるベシクルはまた、その膜に化合物等の物質を挿入することができる。上記物質は、ベシクルの用途及びその性質に応じて適宜選択することができるが、例えば、薬物、タンパク質、蛍光色素、核酸、微粒子等が挙げられる。

本発明のベシクルは、荷電性セグメント間の静電相互作用及び架橋を利用して形成されることから、第一の重合体Iと第二の重合体IIとを、水性溶液中で混合することにより、簡易に製造することができる。さらに、本発明の製造方法によれば、有機溶媒を用いなくともベシクルを製造することができることから、バイオマテリアルの分野やDDSにおいて有利に利用することができる。

10

【0076】

また、第一の荷電性セグメントと第二の荷電性セグメントとの比率（カチオン性セグメントとアニオン性セグメントとの比率）、及び、非荷電親水性セグメントと荷電性セグメントとの比率も任意であるが、第一の重合体と第二の重合体との自己組織化を促し、均質なベシクルを効率的に製造する観点からは、以下の基準で選択することが好ましい。

【0077】

まず、カチオン性セグメントとアニオン性セグメントとの比率については、下記式（i）に規定するC/A比が、通常0.3、好ましくは0.5以上、より好ましくは0.6以上、また、通常3.0未満、好ましくは2.0以下、より好ましくは1.7以下となるように調整することが望ましい。

20

【0078】

【数1】

$$C/A \text{ 比 (モル比)} = \frac{\text{【第一及び第二の重合体中におけるカチオン基のモル数】}}{\text{【第一及び第二の重合体中におけるアニオン基のモル数】}} \quad \text{式 (i)}$$

30

【0079】

ここで、第一及び第二の重合体中におけるカチオン基及びアニオン基のモル数は、カチオン性セグメント及びアニオン性セグメントの構造に依存する値であるが、一般的な電位差（酸・塩基）滴定により求めることが可能である。

【0080】

本発明の製造にあっては、まず、第一の重合体Iを含む第一の水性溶液と、第二の重合体IIを含む第二の水性溶液とを用意する。ここで、第一及び第二の水性溶液は、所望により濾過して精製してもよい。

【0081】

上記第一の水性溶液における第一の重合体Iの総電荷数と、第二の水性溶液における第二の重合体IIの総電荷数との比率は、好ましくは5:1~1:5、より好ましくは約1:1である。重合体がブロック共重合体の場合、ブロック共重合体における総電荷数は、ブロック共重合体中の荷電性セグメントを構成する繰り返し単位の数及びその繰り返し単位が有する電荷数等に応じて当業者により適宜決定される。上記の比率にて2つの重合体を用いることは、均質なベシクルを効率的に製造する上で有利である。

40

【0082】

また、第一の水性溶液における第一の重合体I、及び第二の水性溶液における第二の重合体IIの濃度は、上記の重合体間の総電荷数の比率及び重合体の水性溶液への溶解度、作製したいベシクルのサイズ、ベシクルの形成効率等を勘案して適宜決定される。

50

【0083】

また、親水性セグメントを有する重合体は水溶性であることから、第一及び第二の水性溶液における溶媒は、好ましくは水、バッファーであり、より好ましくは10 mM Tris/HCl バッファー、リン酸バッファー、HEPESバッファー等が挙げられる。

【0084】

また、第一及び第二の水性溶液におけるpHは、ベシクルの形成を妨げない範囲で適宜調整してよく、好ましくはpH5～pH9であり、より好ましくはpH約7である。pHの調整は、水性溶液における溶媒としてバッファーを用いることにより簡易に行うことができる。第一及び第二の水性溶液のpHを調整して用いることは、ブロック共重合体の荷電状態を保持し、効率的にベシクルを形成するために有利である。

10

【0085】

さらに、上記第一及び第二の水性溶液の温度は、重合体の溶媒に対する溶解度に応じて適宜決定されるが、好ましくは4～80 であり、より好ましくは15～50 である。

【0086】

さらに、上記第一及び第二の水性溶液におけるイオン強度は、ベシクルの形成を妨げない範囲で適宜調整してよく、好ましくは0～300 mMであり、より好ましくは0～150 mMである。

【0087】

次に、本発明においては、第一の水性溶液と第二の水性溶液とを混合する。混合方法は特に限定されず、第一の水性溶液に第二の水性溶液を加えてもよく、第二の水性溶液に第一の水性溶液を加えてもよい。また、容器に第一の水性溶液と第二の水性溶液とを同時に加えて混合してもよい。このようにして得られる、第一の水性溶液と第二の水性溶液との混合液は適宜攪拌してもよい。

20

【0088】

第一の水性溶液と第二の水性溶液とを混合する際の温度は、ベシクルの形成を妨げない範囲であれば特に限定されないが、重合体の温度に応じた溶解度を勘案して設定されることが好ましい。このような混合する際の温度としては、例えば15～50 である。

【0089】

そして、本発明の製造方法にあつては、上記混合液を静置することにより、混合溶液中にてベシクルを生成させる。混合後、形成されたベシクルをすぐに所望の用途に供してもよいが、系を平衡化させるために、混合液を静置する時間を設けてもよい。混合液を静置する時間は、ベシクルの形成効率等の条件によって異なるが、好ましくは50時間以下、より好ましくは30時間以下である。但し、前述のように架橋剤を用いない場合、形成されたベシクルの径が経時的に増大する傾向があるので、静置時間を設けないことが好ましい場合もある。混合液を静置する時間は、ベシクルの形成効率によって異なるが、例えば、ベシクルの生成系は粒子成長を伴う場合があるため、静置時間は短くてよい。その場合の静置時間は2～30分である。また、系の十分な平衡化を意図する場合は、30分以上であり、好ましくは30～50時間である。

30

短時間の静置（例えば2～30分）と長時間の静置（例えば30～50時間）により、得られるベシクルのサイズを変えることができる。

40

【0090】

架橋剤を用いる場合、上記の第一及び第二の水性溶液の混合溶液に、当該架橋剤を加えて混合すればよい。架橋剤はそのまま混合に用いてもよいが、架橋剤を含有する水性溶液を調製し、これを混合してもよい。架橋剤の水性溶液の調製における水性溶媒、pH、温度、イオン強度等の調製条件は、第一及び第二の水性溶液について上述した条件と同様である。

【0091】

本発明においては、上記第一及び第二の重合体の量と縮合剤又は架橋剤の量との関係を適宜調節することにより、荷電性セグメント間における架橋割合を変化させ、(i)架橋剤の添加量による架橋割合の調節、(ii)架橋剤の化学構造の調整による架橋後の膜の構造の

50

制御等を行うことができる。例えば、架橋を密に施すことにより、膜の透過性を下げることが期待でき、ベシクルの安定性を上げる、あるいは、応答時間を延ばすことが期待できる。あるいは、長いアルキル鎖やオリゴエチレンオキシド鎖を有する架橋剤を用いることで、膜の疎水性や親水性、柔軟性を制御することが期待できる。

【0092】

また、本発明のベシクルに化合物等の物質を内包させる場合、例えば、ベシクル形成の間に、第一及び第二の重合体を含む混合液中に物質を添加することにより、ベシクル中に物質を内包させることができる。また、第一及び第二の水性溶液のいずれか一方または両方に予め物質を添加し、これらの混合溶液を調製することにより、ベシクル中に物質を内包させてもよい。従って、本発明の製造方法は、好ましくはベシクルに内包するための化合物等の物質を添加する工程を含む。物質をベシクルに内包させる際には、さらに、透析、希釈、濃縮、攪拌等の操作を適宜に付加することができる。また、物質をベシクルの膜に挿入する場合にも上記と同様の手法を用いることができる。

本発明のベシクルを製造するのに好ましい重合体の例を図4に示す。

【0093】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0094】

ベシクルの製造1

<材料>

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), Dithiothreitol (DTT), N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。1,5-diaminopentane (DAP)は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。2-2'-Dithiobis(ethylamine) (Cystamine) dihydrochloride はSigma (St. Louis, CO、アメリカ)より購入した。Cy3-monoreactive dye pack, PD-10脱塩カラムはGEヘルスケアより購入した。

Cystamine free base (Cyst) は抽出後に減圧下蒸留を行い、使用に供した。NMPは減圧下蒸留することにより使用に供した。アニオン性ブロック共重合体PEG-poly(a,b-aspartic acid) (PEG-P(Asp); M_n of PEG = 2,000, DP(Degree of Polymerization) of P(Asp) = 75 or 85)、蛍光ラベル化アニオン性ブロック共重合体PEG-P(Asp)-Cy3、poly(L-aspartate) (homo-PBLA)、及びpoly([5-aminopentyl]-a,b-aspartamide) (homo-P(Asp-AP); DP of P(Asp-AP) = 82) は文献記載の方法(Anraku Y. et al., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132(5), 1631-1636)により合成した。

【0095】

<ジスルフィド側鎖を有するカチオン性アミノ酸重合体の合成>

凍結乾燥したhomo-PBLA (DP = 72, 50 mg) を2.5 mLのNMPに溶解し、続けてDAP (PBLAに対して2~25当量) 及び2-2'-Dithiobis(ethylamine)(Cyst) (PBLAに対して25~40当量) を溶液に加え、5分間にて1時間激しく攪拌した。反応混合物は0~5分間において20 wt %酢酸で中和し、分画分子量3,500の透析膜を用い、0.01 M塩酸に対して3日間、続いて純水に対して3日間の透析を行った。

【0096】

得られた溶液をろ過し、凍結乾燥することで、ジスルフィド含有ポリカチオンhomo-P(Asp-AP-Cyst)を得た。なお、「homo-P(Asp-AP-Cyst)」は、見かけ上ランダム共重合体であるが、homo-PBLAを原料としているため、本明細書ではこのように表記する。他の重合体(例えばhomo-P(Asp-AP))も同様に表記する場合がある。

サイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した(図2)。

【0097】

DAPとCystの最終生成物への導入比は、仕込み比を1:1~1:20で調節することで行い、 ^1H

10

20

30

40

50

NMRスペクトルから、それぞれCyst含有率の異なるポリカチオン（側鎖残基数に対し、20～75%）が合成可能であることが明らかになった。

【0098】

以降、得られたポリマーを $\text{homo-P(Asp-AP}_x\text{-Cyst}_y\text{)}_n$ ($x+y=1$, n はカチオン連鎖の総重合度)と表記する。図2及び3にCyst20%含有ポリマー $\text{homo-P(Asp-AP}_{0.8}\text{-Cyst}_{0.2})_{48}$ の分析結果を示す。

図2は、 $\text{homo-P(Asp-AP-Cyst)}$ のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）の結果を示す図である。

【0099】

カラムは、Superdex 200 10/300 GL column (GEヘルスケア製)を用い、溶離液10 mM リン酸バッファー（500 mM NaCl, pH 7.4）, 流速0.5 mL/min, 25 で分析を行った。クロマトグラフィーは、日本分光製のシステムを用いた。

【0100】

図3は、 $^1\text{H NMR}$ の測定結果を示す図である。図3では、DAPが38ユニット（ピークc-e; 6H）、Cystが10ユニット（ピークf, g; 4H）導入されたことが確認でき、カチオン性側鎖48量体に対し、約20% Cystが導入されたことが確認され、図2の結果と合わせてCyst20%含有ポリマー $\text{homo-P(Asp-AP}_{0.8}\text{-Cyst}_{0.2})_{48}$ として同定された。測定には、JNM-AL 300 (JEOL, Japan)を用い、重水中80 で測定を行った。なお、図3中、共重合体中の「m」及び「n」は重合数 ($m = 38$, $n = 10$)を示す。

【0101】

<ジスルフィド含有ベシクル（PICsome）の調製>

PEG-P(Asp)₈₅と $\text{homo-P(Asp-AP-cyst)}_{48}$ の10 mM リン酸バッファー（0 mM NaCl, pH 7.4）溶液をそれぞれ別途作製した（本実施例においてポリマー濃度は、全て1 mg/mL）。それぞれの溶液を、溶液中に含まれる荷電側鎖の比が等しくなるよう、即ち、 $-\text{COO}^-$ と $-\text{NH}_3^+$ の数が等しくなるように混合し、2分間攪拌しPICsomeを得た（図4参照）。図4は、PICsomeの調製スキームの概念図である。ホモポリカチオンとPEGポリアニオンを混合することにより、PICsomeを得ることができる。なお、図4（a）中、共重合体中の「m」及び「n」は重合数 ($m = 45$, $n = 75$ あるいは85)を示す。図4（b）中、共重合体中の「m」及び「n」は重合数 ($m = 38$, $n = 10$)を示す。

【0102】

PICsomeの同定は、後述の透過型電子顕微鏡（TEM）観察と動的光散乱（DLS）測定により行った。得られたPICsomeのポリイオンコンプレックス（PIC）膜を架橋するためにEDC溶液（10 mg/mL）を $-\text{COO}^-$ 側鎖に対して10当量になるように加えた。比較例として、ジスルフィドを含有しないPICsomeを $\text{homo-P(Asp-AP-Cyst)}$ の代わりに homo-P(Asp-AP) を用いることで作製した。

【0103】

<TEM観察によるPICsomeの構造確認>

上記のプロセスにより製造されたPICsomeの構造確認を透過型電子顕微鏡（TEM）により行った。製造したPICsomeを架橋後にウラニル染色し、TEMグリッド状で乾燥後観察に供した。観察には、日立製透過型電子顕微鏡H-7000を用いた。

その結果、ジスルフィド含有PICsomeはユニラメラ型のベシクルであることが示唆された（図5）。

図5は、得られたPICsomeのTEM観察写真（酢酸ウラニル染色後、撮影）である。

ベシクル由来の中空構造に特徴的な像（中空部位が乾燥によりへこむのに対応した見え方）を確認した。

(a) : Cyst20% -PICsome: (+) $\text{homo-P(Asp-AP}_{0.8}\text{-Cyst}_{0.2})_{48}$ / (-) PEG-P(Asp)₈₅

(b) : Cyst45% -PICsome: (+) $\text{homo-P(Asp-AP}_{0.55}\text{-Cyst}_{0.45})_{45}$ / (-) PEG-P(Asp)₈₅

【0104】

<DLS測定によるPICsomeの塩安定性の確認>

ジスルフィド含有PICsomeの生理条件下での安定性について評価を行うため、先に調製

10

20

30

40

50

したCyst45%-PICsome (10 mM リン酸バッファー; 0mM NaCl, pH 7.4, 25)について、150 mM NaCl添加の粒子に与える影響を動的光散乱解析装置 (DLS) による粒径 (直径) 測定により評価した。

その結果、適切なEDC架橋 (側鎖-COO⁻に対して1当量以上のEDC添加) を施すことで、塩安定性が賦与されることを確認した (図6)。

図6は、150 mM NaCl添加の有無に対応したDLS測定の結果を示す図である。

Cyst45%-PICsomeについて、(a)架橋なし、(b)架橋後 (10当量のEDC添加) について測定を行ったが、架橋後はNaClを添加しても粒径に変化は見られなかった。

【0105】

<ジスルフィド含有PICsome (無架橋型) の還元剤に対する応答性のDLSによる評価>

10

架橋を施さないCyst45%-PICsomeの還元剤に対する応答性を、DTT溶液添加後にDLS測定を行うことで評価した。DTTによる還元は、20 mM DTT溶液をPICsome溶液全量に対して25%量添加することで行った。

ジスルフィドを含有するCyst45%-PICsomeと、ジスルフィドを含有しないCyst0%-PICsome [(+) homo-P(Asp-AP)₈₂/(-) PEG-P(Asp)₈₅]を用いて比較検討を行った結果を図7に示す。

【0106】

図7は、10 mMリン酸バッファー (0mM NaCl, pH 7.4, 25) 中におけるDLSの測定結果を示す図であり、20 mM DTT添加前後における(a)粒径及び(b)多分散指数 (PDI) の経時変化を示す。

20

Control: Cyst0%-PICsome

45cyst: Cyst45%-PICsome

Cyst0%-PICsomeでは、DTT添加前後において粒径及びPDIに経時変化は見られなかったのに対し、Cyst45%-PICsomeでは、DTT添加後しばらくして急激な粒径及びPDIの増大が見られた。以上より、ジスルフィド含有PICsomeの還元環境への応答性が確認された。

【0107】

<ジスルフィド含有PICsome (架橋型) の還元剤に対する応答性のDLSによる評価>

架橋を施したCyst45%-PICsomeの還元剤に対する応答性を、DTT溶液添加後にDLS測定を行うことで評価した。架橋は、EDC添加当量を0.1~5.0で変えた4種を用意した (図8) 。DTT添加は、20 mM DTT溶液をPICsome溶液全量に対して25%量添加することで行った。

30

図8は、10mMリン酸バッファー (0mM NaCl, pH 7.4, 25) 中におけるDLSの測定結果を示す図であり、20 mM DTT添加後における(a)粒径及び(b)PDIの経時変化を示す (EDC0.1: EDC 0.1当量, EDC0.5: EDC 0.5当量, EDC1.0: EDC 1.0当量, EDC5.0: EDC 5.0当量)。5.0当量のEDCを添加した条件を除き、粒径及びPDIともにDTT添加後に何らかの影響を受けた。EDC5.0当量添加の場合のみ、DTT添加の影響を受けずに一定の粒径、PDIを示した。これより、本発明のベシクルは架橋状態に応じて、応答性が変化させられる材料であることが示唆された。

【0108】

<架橋型PICsomeの還元剤に対する応答性のFCSによる評価>

架橋を施したCyst58%-PICsomeの還元剤に対する応答性を、DTT溶液添加後に蛍光相関分光法 (FCS) 測定を行うことで評価した。PEG-P(Asp)₇₅の末端をCy3で蛍光ラベル化したPEG-P(Asp)₇₅-Cy3を用いて、蛍光ラベル化PICsomeを製造した。蛍光ラベル化Cyst58%-PICsome及び蛍光ラベル化Cyst0%-PICsomeにEDC 5当量をそれぞれ添加して架橋した。DTTによる還元は、5 mM DTT溶液をPICsome溶液全量に対して25%量添加することで行った。FCS測定は、励起波長543 nmで3回行った。

40

図9は10 mMリン酸バッファー (150 mM NaCl, pH 7.4, 25) 中におけるFCS測定の結果を示す図であり、5 mM DTT添加、あるいは添加しない条件における並進拡散時間の経時変化を示す。

58cyst(+):Cyst58%-PICsome + DTT

58cyst(-):Cyst58%-PICsome

50

Normal (+/-) : Cyst 0 % -PICsome (+/-) DTT

Cyst 0 % -PICsomeでは、DTT添加の有無に関わらず、並進拡散時間に経時変化は見られなかったのに対し、Cyst58% -PICsomeでは、DTT添加のみ徐々に並進拡散時間の増大が見られた。

以上より、本発明のベシクルは還元環境への応答性を示すことが示唆された。

【実施例 2】

【0109】

ベシクルの製造 2

<材料>

(R)-2-amino-3-(4-methoxybenzylthio)propanoic acid (H-Cys(Mob)-OH)はSigma (St. Louis, CO、アメリカ)より購入した。トリホスゲン、トリブチルホスフィン、3-Nitro-2-pyridinesulfonyl chloride(NpysCl)、2-iminothiolane、Diisopropylethylamine、脱水THF、脱水DMF、脱水NMP、脱水CH₂Cl₂は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。4-methoxy-L-lysine poly(ethylene glycol)(PEG-NH₂)(分子量2,000)は日油株式会社(東京)より購入した。n-Butylamine (Bu-NH₂)は蒸留し、使用に供した。1,5-diaminopentane (DAP)は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。

10

【0110】

<保護システインカルボン酸無水物の合成>

H-Cys(Mob)-OH 4gをTHFに溶解し、2当量のトリホスゲンと50 で2時間反応させ、得られた溶液をヘキサンで沈殿させた。得られた沈殿物をCH₂Cl₂に溶解させ、ヘキサンで再結晶にて精製した。LC-MSと¹H NMRから、4-メトキシベンジルシステイン N-カルボン酸無水物(Cys(Mob)-NCA)が合成されていることを確認した。

20

【0111】

<保護チオール含有ブロック共重合体の合成>

凍結乾燥を行い、水分を除去したPEG-NH₂ 100 mgにDMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 5 mLを加え、PEG-NH₂溶液を得た。また、DMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 5 mlにCys(Mob)-NCA 10当量を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてPEG-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 で攪拌しながら1日間反応させた。

【0112】

別のナスフラスコに、上記のCys(Mob)-NCAと同様の方法で、4-benzyloxycarbonyl-L-aspartateを原料として合成したBLA-NCA 790 mg (90当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒25 mLを加えて溶液を得た。この溶液を、シリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 で攪拌しながら2日間反応させた。所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥させ、ブロック共重合体PEG-PCys(Mob)-PBLAを得た。

30

【0113】

PEG-PCys(Mob)-PBLAについて、¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm付近のピーク及びPEGエチレン鎖ピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約9、PBLAの重合数が約80と見積もられた。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5~30、PBLAの重合数が30~150のブロック共重合体を合成することが可能である。

40

【0114】

<チオール含有ブロック共重合体の合成>

合成したPEG-PCys(Mob)-PBLA 100 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL、NpysCl 30 mg (3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システインの保護基である4-メトキシベンジル(Mob)基から、3-Nitro-2-pyridinesulfonyl (Npys)基への置換反応を行った。続いて、反応溶液にトリブチルホスフィン 200 μlを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有ブロック共重合体PEG-PCys-PBLAを得た。

50

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7～9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0115】

<チオール含有アニオン性ブロック共重合体の合成>

合成したPEG-PCys-PBLA 100 mgを少量のアセトニトリルに溶解させ、続いて1 M NaOH水溶液を10 ml加え、室温にて1時間攪拌した。得られた反応溶液を透析チューブ(MWCO 3,500)に入れ、蒸留水を外液として透析を3日間行った。外液を数回交換し、内液を回収した後、凍結乾燥を行い、チオール含有アニオン性ブロック共重合体であるPEG-PCys-PAspを得た。

PEG-PCys-PAspについて¹H NMR測定を行い、3.5 ppm付近のPEGエチレン鎖ピークと、2.6 ppm付近のPAsp及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からPAspとPCysの合計重合数を約85と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した。

【0116】

<チオール含有重合体の合成>

Bu-NH₂のDMF溶液(10 mg/mL) 365 μLにDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 10 mLを加えた。また、別途調製したDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 10 mLとCys(Mob)-NCA 134 mg(10当量)を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてBu-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 で攪拌しながら1日間反応させた。

【0117】

別のナスフラスコにBLA-NCA 1122 mg(90当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 20 mLを加えて得た溶液を、シリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 で攪拌しながら2日間反応させた。所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を凍結乾燥させ、保護チオール含有重合体PCys(Mob)-PBLAを得た。

【0118】

PCys(Mob)-PBLAについて¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm付近のピークが見られ、末端ブチル基に由来するピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約10、PBLAの重合数が約95と見積もられた。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5～30、PBLAの重合数が30～150のアミノ酸重合体を合成することが可能である。

【0119】

得られたPCys(Mob)-PBLA 200 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL、NpysCl 30 mg(3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システインの保護基であるMob基から、Npys基への置換反応を行った。続いて、反応溶液にトリブチルホスフィン 200 μLを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有重合体PCys-PBLAを得た。

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7～9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0120】

<チオール含有カチオン性アミノ酸重合体の合成>

回収したチオール含有重合体PCys-PBLAをNMP 2.5 mLに溶解し、続けてDAP(PBLAに対して25～40当量)を溶液に加え、5 にて1時間激しく攪拌した。反応混合物は0～5 において20 wt%酢酸で中和し、0.01 M塩酸に対して3日間、続いて純水に対して3日間の透析を行った。内液を凍結乾燥により回収し、チオール含有カチオン性アミノ酸重合体であるPCys-P(Asp-AP)を得た。

PCys-P(Asp-AP)について¹H NMR測定を行い、3.5 ppm付近のPEGエチレン鎖ピークと、2.6 ppm付近のPAsp及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からPAspとPCysの合計重合数を約100と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した

10

20

30

40

50

【0121】

<チオール含有ベシクル(PICsome)の調製と酸化>

上記のように合成したアニオン性共重合体とカチオン性アミノ酸重合体をTCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine)還元し、PD-10脱塩カラムで精製後、凍結乾燥したものをを用いて、チオール含有ベシクルの調製を行った。

アニオン性共重合体PEG-PCys-PAspとカチオン性アミノ酸重合体PCys-P(Asp-AP)の10 mMリン酸バッファー(0 mM NaCl, pH 7.4)溶液をそれぞれ別途作製した(本実施例において、ポリマー濃度は全て1 mg/mL)。それぞれの溶液を、溶液中に含まれる荷電側鎖の比が等しくなるよう、即ち、 $-COO^-$ と $-NH_3^+$ の数が等しくなるように混合し、2分間攪拌しPICsomeを得た。

10

PICsomeの粒径をDLSで測定した。結果を図10に示す。得られたPICsomeの懸濁液は自発的に空気酸化が進行し、ジスルフィド結合が形成され、生理条件下で安定であることが確認できた。

【0122】

以下、実施例3~5に第一の重合体及び第二の重合体の合成例を示す。

【実施例3】

【0123】

<チオール含有アニオン性ブロック共重合体の合成>

凍結乾燥を行い、水分を除去したPEG-NH₂ 100 mgにDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 5 mLを加え、PEG-NH₂溶液を得た。また、DMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒25 mLにCys(Mob)-NCA 133.65 mg(10当量)とBLA-NCA 1121.49 mg(90当量)を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてPEG-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 で攪拌しながら2日間反応させた。所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥させ、ブロック共重合体PEG-P(BLA-r-Cys(Mob))を得た。

20

なお、ここで式中の-r-はアミノ酸の主鎖にシステインがランダムに配置されていることを示す。

【0124】

PEG-P(BLA-r-Cys(Mob))について、¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm付近のピーク及びPEGエチレン鎖ピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約9、PBLAの重合数が約88と見積もられた。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5~30、PBLAの重合数が30~150のブロック共重合体を合成することが可能である。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。

30

【0125】

合成したPEG-P(BLA-r-Cys(Mob))200 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL, NpysCl 30 mg(3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システインの保護基であるMob基から、Npys基への置換反応を行った。続いて反応溶液にトリブチルホスフィン 200 μLを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有ブロック共重合体PEG-P(BLA-r-Cys)を得た。

40

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7~9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0126】

合成したPEG-P(BLA-r-Cys)100 mgを少量のアセトニトリルに溶解させ、続いて1 M NaOH水溶液 10 mL加え、室温にて1時間攪拌した。得られた反応溶液を透析チューブ(MWCO 3,500)に入れ、蒸留水を外液として透析を3日間行った。外液を数回交換し、内液を回収した後、凍結乾燥を行い、チオール含有アニオン性ブロック共重合体であるPEG-P(Asp-r-Cys)を得た。

50

PEG-P(Asp-r-Cys)について¹H NMR測定を行い、3.5 ppm付近のPEGエチレン鎖ピークと、2.6 ppm付近のPAsp及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からPAspとPCysの合計重合数を約90と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した。

【0127】

<チオール含有カチオン性アミノ酸重合体の合成>

Bu-NH₂のDMF溶液(10 mg/mL) 366 μLにDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 10 mLを加えた。また、別途調製したDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒25 mLにCys(Mob)-NCA 134 mg(10当量)とBLA-NCA 1121 mg(90当量)を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてBu-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 で攪拌しながら2日間反応させた。所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥させ、保護チオール含有重合体P(BLA-r-Cys(Mob))を得た。

10

【0128】

P(BLA-r-Cys(Mob))について¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm付近のピークが見られ、末端ブチル基に由来するピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約10、PBLAの重合数が約95と見積もられた。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5~30、PBLAの重合数が30~150の重合体を合成することが可能である。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。

20

【0129】

得られたP(BLA-r-Cys(Mob)) 200 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL、NpysCl 30 mg(3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システインの保護基であるMob基からNpys基への置換反応を行った。続いて、反応溶液にトリブチルホスフィン 200 μLを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有重合体P(BLA-r-Cys)を得た。

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7~9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0130】

回収した生成物をNMP 2.5 mLに溶解し、DAP(PBLAに対して25~40当量)の溶液に加え、5 にて1時間激しく攪拌した。反応混合物は0~5 において20 wt%酢酸で中和し、0.01 M塩酸に対して3日間、続いて純水に対して3日間の透析を行った。内液を凍結乾燥により回収し、チオール含有カチオン性アミノ酸重合体であるP((Asp-AP)-r-Cys)を得た。P((Asp-AP)-r-Cys)について¹H NMR測定を行い、末端ブチル基に由来するピークと、2.6 ppm付近のP(Asp-AP)及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からP(Asp-AP)とPCysの合計重合数を約100と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した。

30

【実施例4】

【0131】

<チオール含有アニオン性ブロック共重合体の合成>

凍結乾燥を行い、水分を除去したPEG-NH₂ 100mg にDMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 5 mLを加え、PEG-NH₂溶液を得た。また、DMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 5 mLにCys(Mob)-NCA 133.65 mg(10当量)を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてPEG-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 で攪拌しながら1日間反応させた。

40

別のナスフラスコにBLA-NCA 996.88 mg(80当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1:4の混合溶媒 25 mLを加えて溶液を得た。この溶液をシリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 で攪拌しながら2日間反応させた。

【0132】

50

その後、また別のナスフラスコにCys(Mob)-NCA 133.65 mg (10当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 5 mLを加えて溶液を得た。この溶液をシリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 °Cで攪拌しながら1日間反応させた。

所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥させ、ブロック共重合体PEG-PCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob)を得た。

【0133】

PEG-PCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob)について、¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm付近のピーク及びPEGエチレン鎖ピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約18、PBLAの重合数が約75と見積もられた。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5~30、PBLAの重合数が30~150のブロック共重合体を合成することが可能である。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。

【0134】

合成したPEG-PCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob) 200 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL, NpysCl 60 mg (3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システイン保護基であるMob基から、Npys基への置換反応を行った。続いて、反応溶液にトリブチルホスフィン 400 μLを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有ブロック共重合体PEG-PCys-PBLA-PCysを得た。

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7~9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0135】

合成したPEG-PCys-PBLA-PCys 100 mgを少量のアセトニトリルに溶解させ、続いて1 M NaOH水溶液 10 mL加え、室温にて1時間攪拌した。得られた反応溶液を透析チューブ(MWC 0.3,500)に入れ、蒸留水を外液として透析を3日間行った。外液を数回交換し、内液を回収した後、凍結乾燥を行い、チオール含有アニオン性ブロック共重合体であるPEG-PCys-PAsp-PCysを得た。

PEG-PCys-PAsp-PCysについて¹H NMR測定を行い、3.5 ppm付近のPEGエチレン鎖ピークと、2.6 ppm付近のPAsp及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からPAspとPCysの合計重合数を約90と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した。

【0136】

<チオール含有カチオン性アミノ酸重合体の合成>

Bu-NH₂のDMF溶液(10 mg/mL) 365 μLにDMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 10 mLを加えた。また、別途調製したDMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 10 mLとCys(Mob)-NCA 134 mg(10当量)を加えて得られた溶液を、シリンジを用いてBu-NH₂溶液の入ったナスフラスコへ攪拌しながら加えた。溶液の入ったナスフラスコを35 °Cで攪拌しながら1日間反応させた。

別のナスフラスコにBLA-NCA 996.88 mg(80当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 20 mLを加えて得た溶液を、シリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 °Cで攪拌しながら2日間反応させた。

【0137】

その後、また別のナスフラスコにCys(Mob)-NCA 133.65 mg(10当量)、DMF/CH₂Cl₂ = 1 : 4の混合溶媒 5 mLを加えて溶液を得た。この溶液をシリンジを用いて上述の反応溶液中へ攪拌しながら加えた。35 °Cで攪拌しながら1日間反応させた。

所定時間後、反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥させ、重合体PCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob)を得た。

【0138】

PCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob)について¹H NMR測定を行い、Mob基に由来する7及び7.8 ppm

10

20

30

40

50

付近のピークが見られ、末端ブチル基に由来するピークとのプロトン比から、PCys(Mob)の重合数が約16、PBLAの重合数が約80と見積もられた。原料の混合比率を変更することで、PCys(Mob)の重合数が5~30、PBLAの重合数が30~150の重合体を合成することが可能である。またサイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。

【0139】

得られたPCys(Mob)-PBLA-PCys(Mob) 200 mgに、CH₂Cl₂ 10 mL, NpysCl 60 mg (3当量)を加え、室温で5時間反応させ、システインの保護基であるMob基から、Npys基への置換反応を行った。続いて、反応溶液にトリブチルホスフィン 400 μLを加え、10分間室温で反応させた。得られた反応溶液に5倍量程度のエーテルを加えて沈殿物を得た。この沈殿物をろ過し、エーテルで数回洗浄した後、ろ物を減圧下で乾燥し、チオール含有重合体PCys-PBLA-PCysを得た。

10

得られた生成物は¹H NMR測定を行い、Mob基及びNpys基に由来する7~9 ppm付近のピークが消失し、チオール基の脱保護反応を確認した。

【0140】

回収したチオール含有重合体PCys-PBLA-PCysをNMP 2.5 mLに溶解し、DAP (PBLAに対して25~40当量)の溶液に加え、5分間にて1時間激しく攪拌した。反応混合物は0~5分間において20 wt%酢酸で中和し、0.01 M塩酸に対して3日間、続いて純水に対して3日間の透析を行った。内液を凍結乾燥により回収し、チオール含有カチオン性アミノ酸重合体PCys-P(Asp-AP)-PCysを得た。

20

PCys-P(Asp-AP)-PCysについて¹H NMR測定を行い、末端ブチル基に由来するピークと、2.6 ppm付近のP(Asp-AP)及びPCysのメチレンピークとのプロトン比からP(Asp-AP)とPCysの合計重合数を約90と算出した。この結果から、PBLAの脱保護反応が定量的に進行したことを確認した。

【実施例5】

【0141】

<側鎖末端にチオールを含有するカチオン性アミノ酸重合体の合成>

合成したhomo-P(Asp-AP) (DP = 77, 75 mg)をNMP 2 mLに溶解し、続けて2-iminothiolane 58.2 mg及びdiisopropylethylamine 250 μLを溶液に加え、室温にて約1時間攪拌した。続いて反応溶液にLiCl 100 mgを加え、約1時間攪拌した。反応混合物は0.01M塩酸で中和し、純水に対して3日間の透析を行った。

30

得られた溶液を凍結乾燥することで、側鎖アミノ末端に1-imino-4-mercaptobutyl (IM)基を含有するカチオン性アミノ酸重合体 P(Asp-AP-IM)を得た。サイズ排除クロマトグラフィーから、単峰性のピークを確認し、適切な反応の進行を確認した。また¹H NMRより、原料のhomo-P(Asp-AP)がほぼ100%反応したと確認された。2-iminothiolaneの加える量を変化させることで、IMの導入率を0~100%でコントロールすることが可能である。

【実施例6】

【0142】

ベシクルの製造3

<材料>

40

1,2-dithiane-4,5-diolは東京化成工業株式会社(東京)より購入した。

【0143】

<環状ジスルフィドの合成>

1,2-dithiane-t-4,t-5-diol r-1-oxideは1,2-dithiane-4,5-diolを原料として、文献記載の方法 (Prmod K.S. et al., J. Org. Chem., 1988, 53, 2608-2612)により合成した。

【0144】

<ジスルフィド架橋型ベシクル (PICsome) の製造>

PEG-PCys-PAspとPCys-P(Asp-AP)の10 mM リン酸バッファー (0 mM NaCl, pH 7.4) 溶液 (1 mg/mL)をそれぞれ別途作製した。それぞれの溶液を、溶液中に含まれる荷電側鎖の

50

比が等しくなるよう、即ち、 $-COO^-$ と $-NH_3^+$ の数が等しくなるように混合し、2分間攪拌しPICsomeを得た。

このPICsome溶液に1,2-dithiane-t-4,t-5-diol r-1-oxideをPEG-PCys-PAsp側のチオール基に対し0.5~10当量になるように加え、両ポリマー間の架橋を行った。

【実施例7】

【0145】

シトクロムc封入ベシクルの製造と評価

<材料>

2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) はSigma (St. Louis, CO、アメリカ)より購入した。hydrogen peroxide (H_2O_2) は和光純薬工業株式会社 (大阪)より購入した。PD-10脱塩カラムはGEヘルスケアより購入した。

10

【0146】

<ボルテックス法によるジスルフィド含有ベシクル (PICsome) への物質封入>

実施例1で製造したジスルフィド含有ベシクル45cyst PICsomeの懸濁液を、再びボルテックスで攪拌させながら、シトクロムcのリン酸バッファー溶液 (12.4 mg/mL) を5 v/v (%) 添加することで、シトクロムcをPICsomeに封入させた。EDC溶液 ($-COO^-$ 側鎖に対し10当量) を加え、4℃で一晩反応させた。過剰量のEDC及び未封入シトクロムcはPD-10カラム及び透析 (MWCO 300,000) により除去した。

【0147】

<ジスルフィド含有ベシクルに封入されたシトクロムcのペルオキシダーゼ活性評価>

20

45cyst PICsomeに封入されたシトクロムcのペルオキシダーゼ活性は、 H_2O_2 及びABTS溶液添加後の吸光度変化 (418 nm) にて評価した。ジスルフィドを含有する45cyst PICsome及びジスルフィドを含有しないNormal PICsome [(+) homo-P(Asp-AP)₈₂/(-) PEG-P(Asp)₇₅] の懸濁液に、11.25 mM H_2O_2 溶液及び0.9 mM ABTS溶液を添加することで行った。結果を図11に示す。ジスルフィドの有無に関わらず、ベシクルに封入したシトクロムcの活性が確認された。このことからベシクルの薬物送達システム及びバイオリアクターとしての有用性を示すことができた。

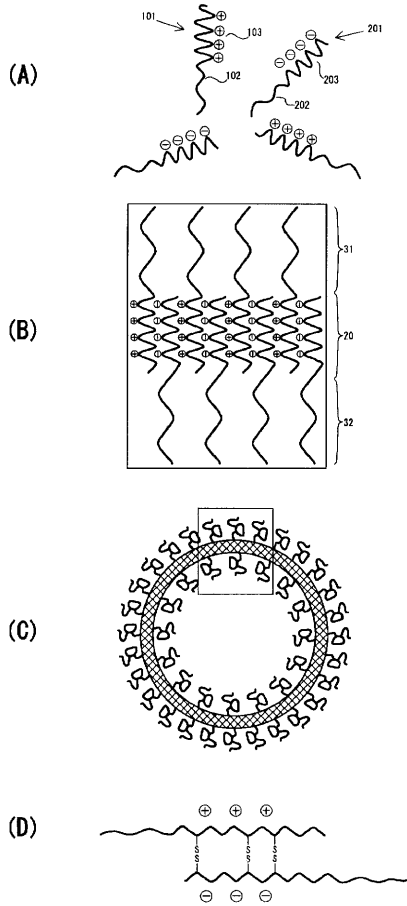
【産業上の利用可能性】

【0148】

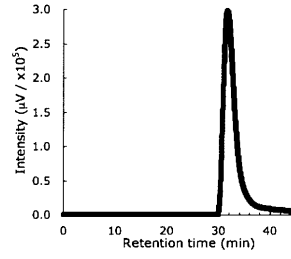
本発明により、ジスルフィド結合が導入された静電結合型ベシクルが提供される。本発明のベシクルは、膜の内側に化合物等の物質を内包できることから、薬物送達システム、各種材料として有用である。

30

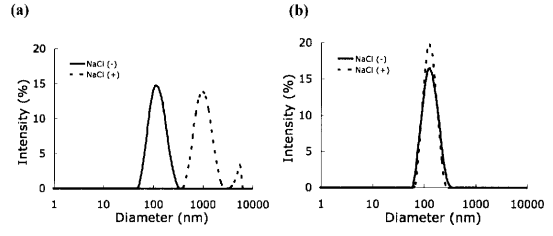
【 図 1 】



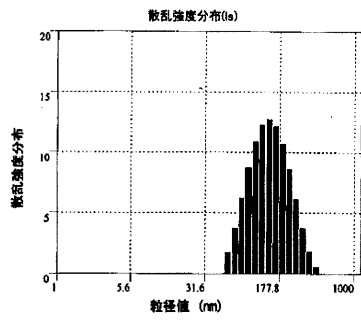
【 図 2 】



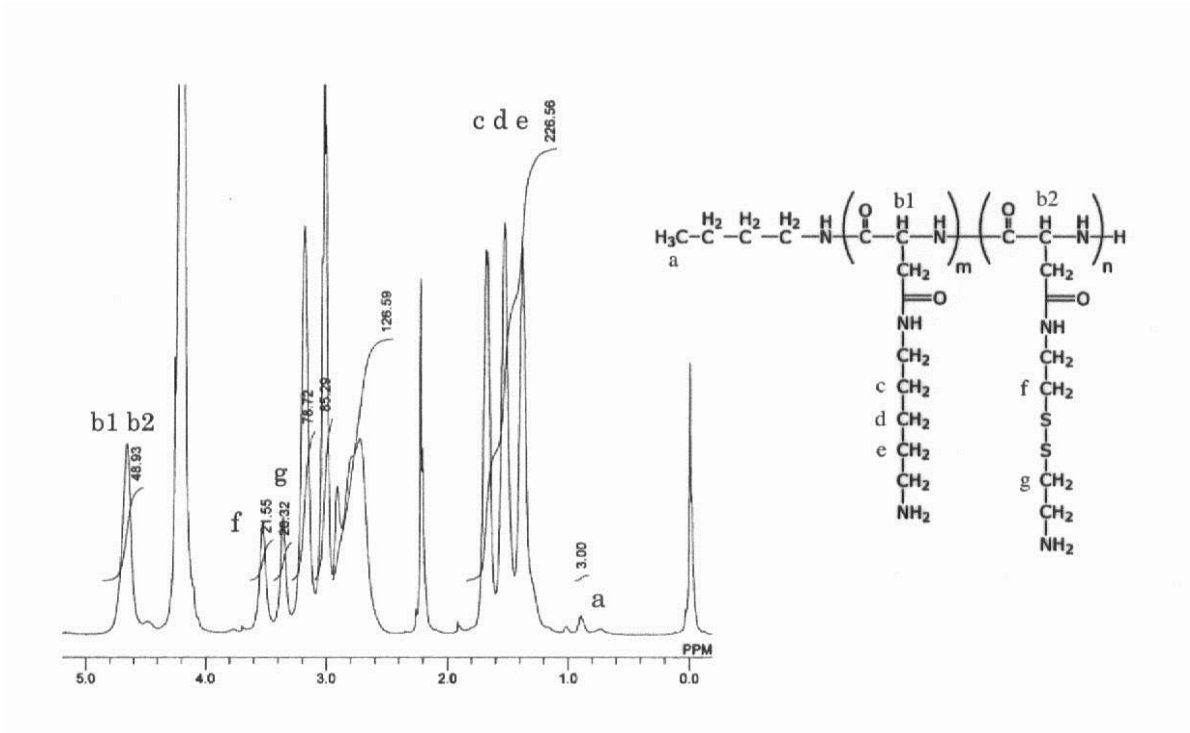
【 図 6 】



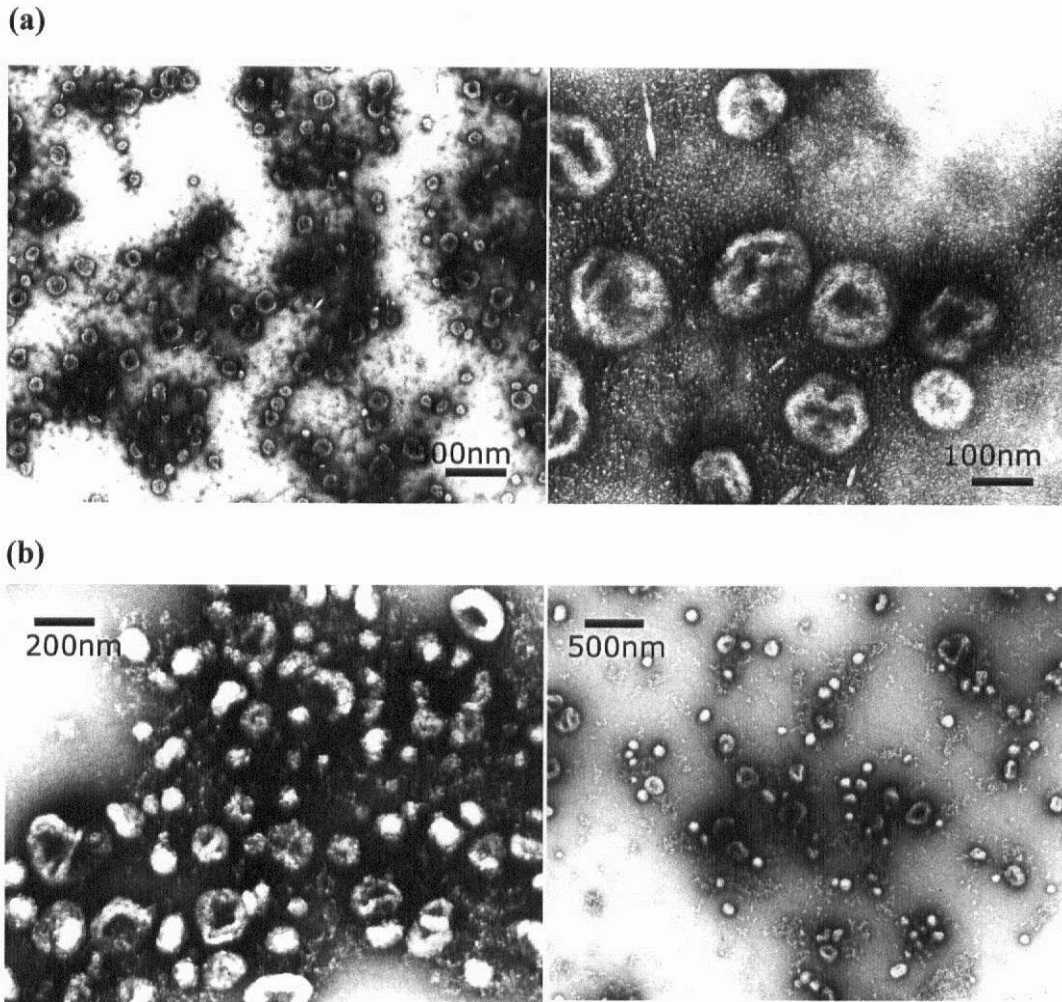
【 図 10 】



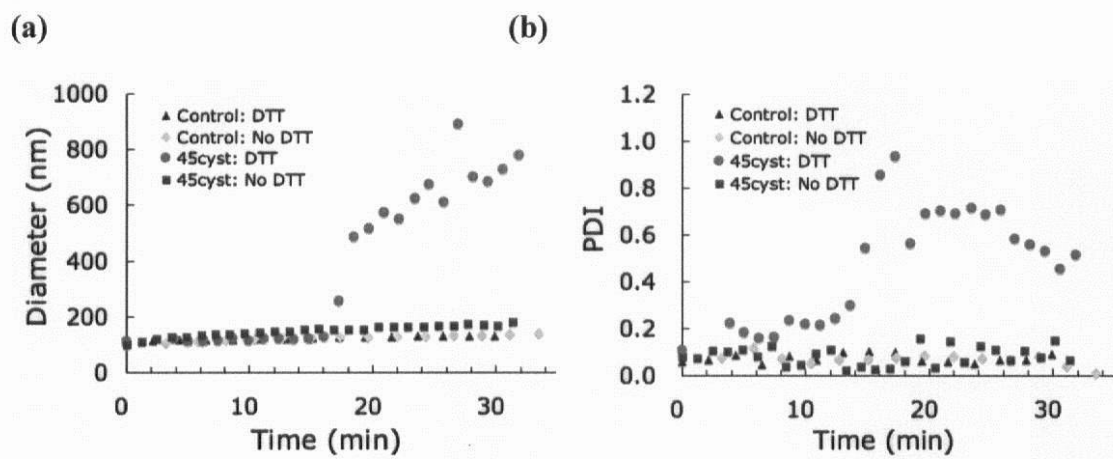
【 図 3 】



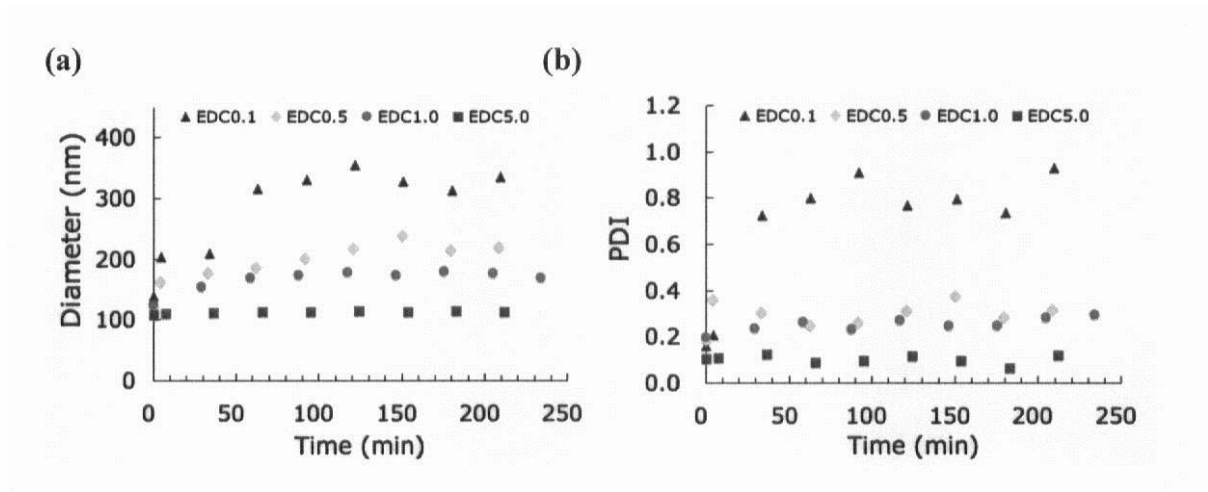
【 図 5 】



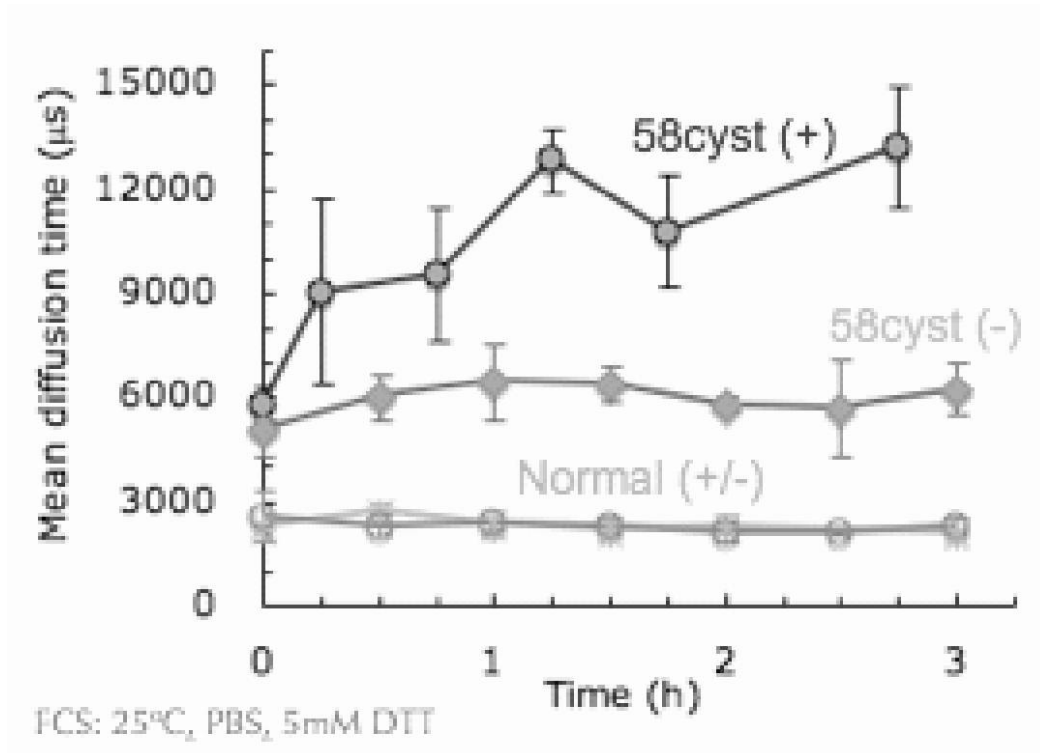
【 図 7 】



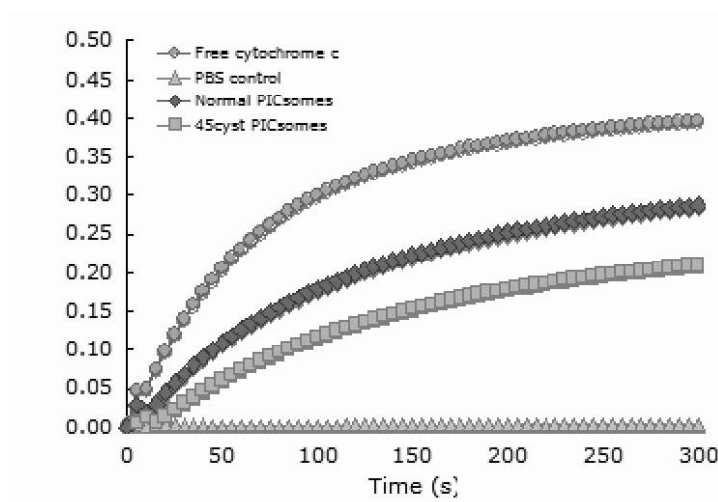
【 8 】



【 9 】



【 1 1 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100153693
弁理士 岩田 耕一
- (72)発明者 岸村 顕広
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 片岡 一則
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 リー ステファニー
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 安楽 泰孝
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 小出 彩
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社内
- (72)発明者 酒井 満
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社内
- (72)発明者 郁 秋明
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社内

審査官 藤井 勲

- (56)参考文献 国際公開第2011/145745(WO, A1)
特開2001-146556(JP, A)
国際公開第2009/133968(WO, A1)
国際公開第2006/118260(WO, A1)
米国特許第06835394(US, B1)
米国特許出願公開第2009/0325171(US, A1)
Yasutaka Anraku et al., Spontaneous Formation of Nanosized Unilamellar Polyion Complex Vesicles with Tunable Size and Properties, Journal of American Chemical Society, 米国, ACS Publications, 2010年 1月15日, 132, 1631-1636
松田裕之、岸村顕広、山崎裕一、片岡一則、ブロック共重合体からなるPolyion Complex型中空微粒子(PICsome)の形態制御および架橋を用いた固定, 第57回高分子学会年次大会 予稿集, 日本, 社団法人 高分子学会, 2008年 5月 8日, 57巻1号, 1036
岸村顕広、Dong Wen-Fei、安楽泰孝、Chuanoi Sayan、小穴英廣、山崎裕一、片岡一則、PEG含有量が制御されたポリイオンコンプレックスの集合形態の精密制御とその機能, 第58回高分子討論会予稿集, 日本, 社団法人 高分子学会, 2009年10月1日, 58巻2号, 2917

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08L 1/00 - 101/14
C08K 3/00 - 13/08
C08G 69/00 - 69/50
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)