



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116322648 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202180067172.9

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

(22) 申请日 2021.10.08

专利代理师 于巧玲

(30) 优先权数据

2020-171414 2020.10.09 JP

(51) Int.Cl.

A61K 9/107 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/037453 2021.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/075470 JA 2022.04.14

(71) 申请人 国立大学法人 东京大学

地址 日本东京

申请人 ASKA制药株式会社

(72) 发明人 H·卡布拉尔 宫崎拓也 P·陈

川岛直也

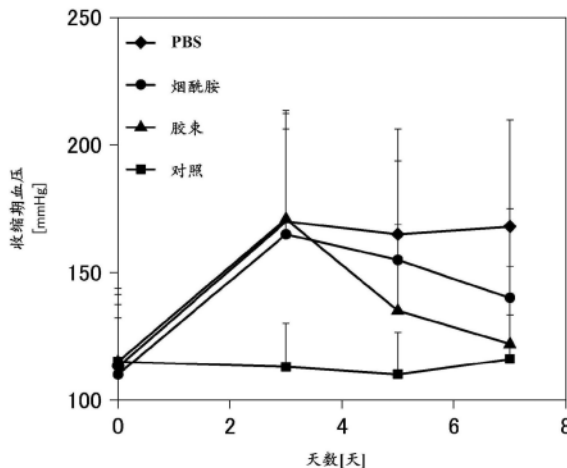
权利要求书2页 说明书18页 附图11页

## (54) 发明名称

包封烟酰胺的胶束、以及含有包封烟酰胺的胶束的妊娠高血压综合征治疗用组合物

## (57) 摘要

本发明课题为提供控制胎盘通过性的妊娠高血压综合征治疗用的组合物。提供一种粒径为25~100nm的包封烟酰胺的胶束。通过控制包封烟酰胺的胶束的粒径,可以控制胎盘通过性,抑制向胎儿的转移,同时可以将包封烟酰胺的胶束向胎盘蓄积。进一步,通过给药包封烟酰胺的胶束,在妊娠高血压综合症中发挥更优异的血压降低效果。



1. 包封烟酰胺的胶束,其是由烟酰胺结合在氨基酸侧链的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成,其中,前述胶束在通过动态光散射法测定的情形时粒径为25~100nm。

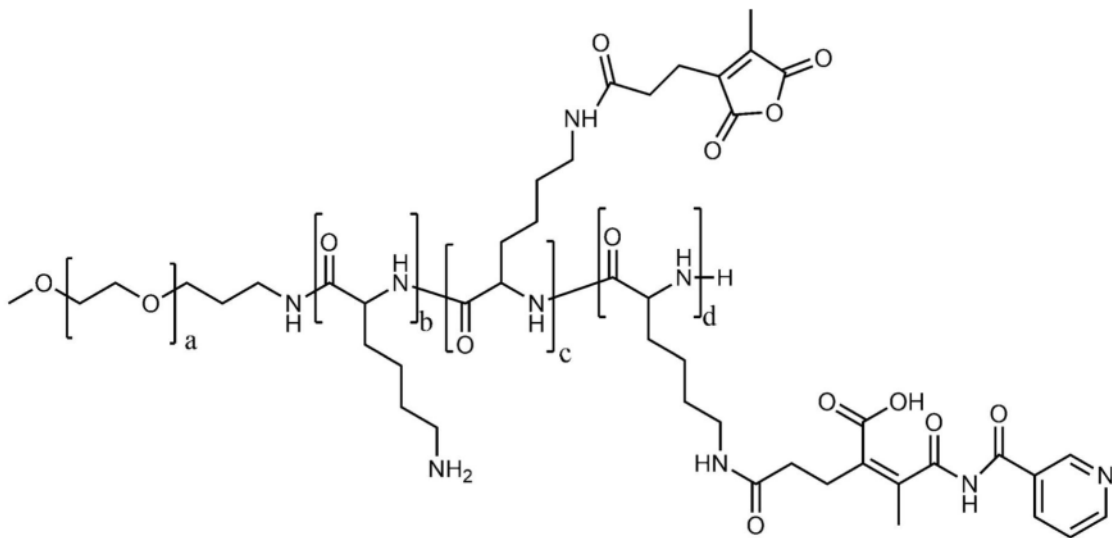
2. 权利要求1所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物含有赖氨酸作为氨基酸嵌段。

3. 权利要求1或2所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物为聚乙二醇-聚氨基酸嵌段共聚物。

4. 权利要求1~3的任一项所述的胶束,其中,烟酰胺通过二羧酸酐反应性基团结合到氨基酸侧链上。

5. 权利要求1~4的任一项所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物为以下表示的化合物:

[化1]



式中,  $a=45\sim 2000$ 、 $b=0\sim 20$ 、 $c=0\sim 39$ 以及 $d=1\sim 40$ 。

6. 权利要求1~5的任一项所述的胶束,其中,前述包封烟酰胺的胶束的粒径为30~50nm。

7. 组合物,含有权利要求1~6的任一项所述的胶束。

8. 权利要求7所述的组合物,其为妊娠中高血压的治疗或预防用的药物组合物。

9. 权利要求8所述的组合物,其为妊娠中的高血压为妊娠高血压综合征以及由妊娠高血压综合征引起的流产、早产、和/或子宫内胎儿发育不全的治疗或预防用的药物组合物。

10. 权利要求7~9的任一项所述的组合物,其降低向胎儿的移动性。

11. 权利要求7~10的任一项所述的组合物,其是胎盘靶向化组合物。

12. 用于妊娠高血压治疗的包封烟酰胺的胶束的制造方法,所述方法包括如下工序:

使烟酰胺与在氨基酸侧链上包含羧甲基马来酸酐反应基团的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物反应的工序;

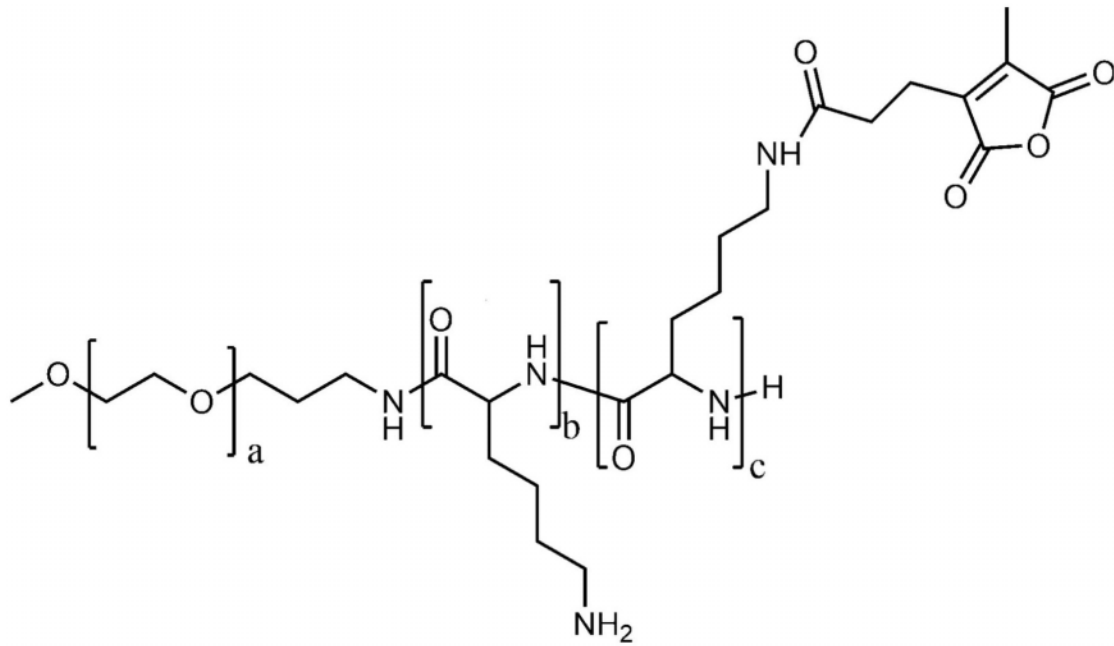
纯化搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物的工序;

将搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物溶解在极性溶剂中的工序;

使用分级分子量3500~16000的透析膜进行超滤,取得通过动态光散射法测定时具有25~100nm的粒径的胶束的工序。

13. 权利要求12所述的方法,其中,在前述氨基酸侧链上含有羧甲基马来酸酐反应基团的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物为下式表示:

[化2]



式中,  $a=45\sim 2000$ 、 $b=0\sim 20$ 、以及  $c=1\sim 60$ 。

## 包封烟酰胺的胶束、以及含有包封烟酰胺的胶束的妊娠高血压综合征治疗用组合物

### [技术领域]

[0001] 本发明涉及用于治疗具有降低胎盘渗透性的妊娠高血压综合征治疗的组合物。

### [背景技术]

[0002] 妊娠20周后发病的高血压称为妊娠高血压。通常,妊娠成立后血压缓慢下降,怀孕20周后向分娩缓慢上升。当其在妊娠少于20周时具有高血压时,其将称为高血压合并妊娠。妊娠高血压还有时伴有蛋白尿和浮肿。在怀孕期间伴随高血压发生的症状统称为妊娠高血压综合征。妊娠高血压综合征分类为妊娠高血压、妊娠高血压肾病、加重型妊娠高血压肾病,如果妊娠高血压综合征重症化,引起癫痫、脑出血、肝功能障碍、HELLP综合征、肾功能障碍、神经障碍、血液凝固障碍、胎儿发育不全、胎盘早期剥离这样的合并症。

[0003] 诊断为妊娠高血压综合征的情形下,通过安静、食疗法等观察经过,在没有发现改善的情形下进行给药降压药。另一方面,降压药有可能引起胎儿低氧、低营养,导致发育不良。因此,必须在医生的管理下慎重地进行降压药的给药。另外,由于致畸性的问题,对孕妇禁忌的药剂较多,即使是可以使用的药剂,也存在其效果不充分的情形。

[0004] 即使进行降压药的给药也不能得到充分的治疗效果,在母体和胎儿发生生命危险性的情形下,有时也会通过剖腹产和诱发分娩来选择中断妊娠。通过中断妊娠,妊娠高血压综合征的症状通常会恢复,但在重症化的情形下,产后也会持续高血压和蛋白尿等症状。随着新生儿集中治疗的进步,早期出生的低体重儿的生存率也在提高,但也有成长后后遗症发病的情况,希望确立妊娠高血压综合征的治疗方法。

[0005] 已知烟酰胺抑制环状ADP核糖的合成酶ADP核糖环化酶,抑制由内皮素-1(ET-1)和血管紧张素II(AngII)引起的血管收缩。另外,据报告,烟酰胺没有致畸性和致癌性(非专利文献1:Diabetologia(2000)vol.43(11),1337-45)。另外,烟酰胺也作为维生素药剂对妊娠给药,正在进行开发妊娠高血压综合征的治疗或预防药(专利文献1:特开2015-30721号公报)。

### [现有技术文献]

#### [专利文献]

[0006] [专利文献1]特开2015-30721号公报

#### [非专利文献]

[0007] [非专利文献1]Diabetologia(2000)vol.43(11),1337-45

[非专利文献2]Macromol.Biosci.(2020)(20)1900161

[非专利文献3]H.Cabral et.al.,Nat.Nanotech.6(2011)815-823

[非专利文献4]K.Shintaku et.al.,DrugMetab.Dispos.37(2009)962

[非专利文献5]J.R.Huston et.al.,Clin.Pharmacol.Ther.90(2011)67

[非专利文献6]M.Nagai et.al.,Drug Metab.Dispos.41(2013)2124

[非专利文献7]F.Li et.al.,PNAS(2016),vol.113,No.4713450-13455

## [发明内容]

## [发明要解决的课题]

[0008] 作为妊娠高血压综合征的治疗药,正在进行开发含有烟酰胺的治疗药。有报告称,烟酰胺以确认对人的致畸性和致癌性的安全性的量,降低孕妇的血压。但是,在对孕妇给药的情形下,通过胎盘作用于胎儿的情形下的影响,不仅需要进行致畸性和致癌性,还需要进行神经毒性等多方面的评价。因此,希望开发降低胎盘通过性,并且靶向作用部位的药剂。

## [用于解决课题的手段]

[0009] 本发明人等对药剂的胎盘通过性进行了深入研究,结果发现,通过改变亲水性聚合物或疏水性聚合物的结构并控制纳米粒子的大小,可以抑制胎盘通过性。另外,抑制胎盘通过性的结果,发现纳米粒子向胎盘蓄积,从而完成了本发明。因此,本发明涉及如下:

[0010] [1]包封烟酰胺的胶束,其是由烟酰胺结合在氨基酸侧链的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成,其中,前述胶束在通过动态光散射法测定的情形时粒径为25~100nm。

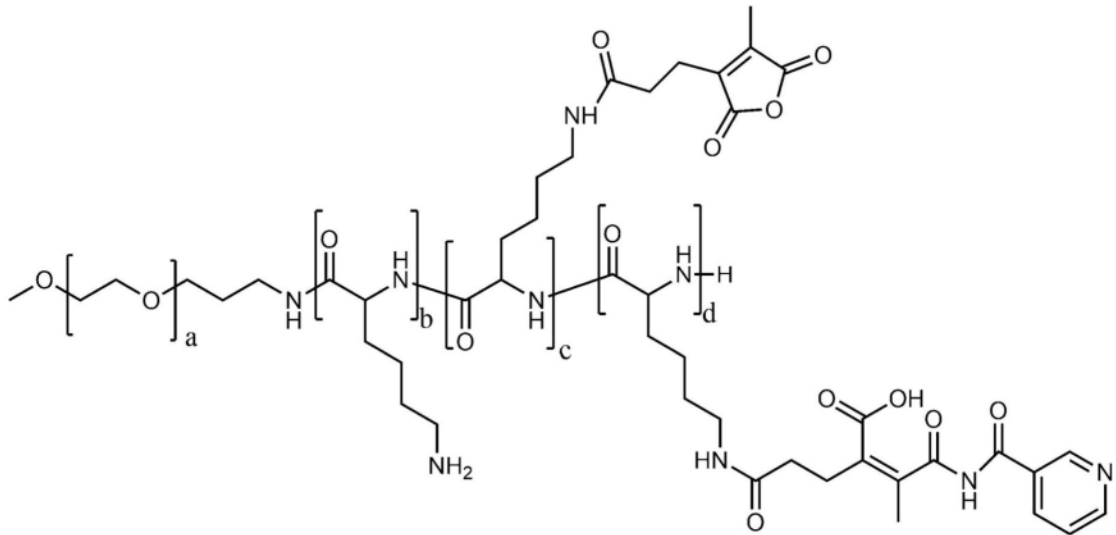
[2]项目1所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物含有赖氨酸作为氨基酸嵌段。

[3]项目1或2所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物为聚乙二醇-聚氨基酸嵌段共聚物。

[4]项目1~3的任一项所述的胶束,其中,烟酰胺通过羧甲基马来酸酐反应性基团,结合到氨基酸侧链上。

[5]项目1~4的任一项所述的胶束,其中,前述聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物为以下表示的化合物:

## [化1]



(式中,  $a=45\sim 2000$ 、 $b=0\sim 20$ 、 $c=0\sim 39$ 以及 $d=1\sim 40$ )。

[6]项目1~5的任一项所述的胶束,其中,前述包封烟酰胺的胶束的粒径为30~50nm。

[7]组合物,含有项目1~6的任一项所述的胶束。

[8]项目7所述的组合物,其为妊娠中高血压的治疗或预防用的组合物。

[9]项目8所述的组合物,其中,妊娠中的高血压为妊娠高血压综合征、以及由妊娠



[20]项目18或19所述的方法,其介导向胎儿的移动性降低。

[21]项目18或19所述的方法,其介导向胎盘的蓄积。

[22]项目1~6的任一项所述的胶束在制备治疗或预防妊娠中高血压的药物中的用途。

[23]项目1~6的任一项所述的胶束在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防妊娠高血压综合征、流产、早产、和/或子宫内胎儿发育不全。

[24]项目22或23所述的用途,其介导向胎儿的移动性降低。

[25]项目22或23所述的用途,其介导向胎盘的蓄积。

[发明的效果]

[0011] 本发明的包封烟酰胺的胶束降低胎盘通过性,抑制烟酰胺向胎儿移行。另一方面,通过内吞作用摄取进入细胞内,在内质网中低pH环境下释放烟酰胺,可以作用于进行内吞作用的细胞。另外,通过胶束化烟酰胺在血中滞留性增大,向胎盘的蓄积增大。进一步,通过烟酰胺胶束化,增大妊娠高血压综合征的受试者中血压降低效果。

[附图的简单说明]

[0012] [图1]图1A表示聚乙二醇-聚(赖氨酸)-嵌段共聚物(PEG-p(Lys))的NMR数据。图1B表示GPC数据。

[图2]图2表示聚乙二醇-聚(赖氨酸-羧甲基马来酸酐)-嵌段共聚物(PEG-p(Lys-CDM))的NMR数据。

[图3]图3表示结合烟酰胺的聚乙二醇-聚氨基酸嵌段共聚物(PEG-p(Lys-CDM-NA))的NMR数据。

[图4]图4表示包封烟酰胺的胶束(PEG-p(Lys-CDM-NA)的胶束)的NMR数据。

[图5]图5表示将包封烟酰胺的胶束对生理条件(pH7.4)以及内质网内条件(pH5.5)的外液透析的情形下,外液中的烟酰胺的释放量。

[图6]图6表示对于各自的烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束,使用人胎盘回流模型考察胎盘通过性的结果。

[图7]图7表示对于正常妊娠小鼠尾静脉分别给药烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束的情形下的血中滞留性。

[图8]图8表示对于正常妊娠小鼠尾静脉分别给药烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束的情形下的胎盘蓄积性(1)以及胎儿蓄积性(2)。

[图9]图9表示在妊娠高血压小鼠模型中考察烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束的妊娠高血压治疗效果的结果。

[图10]图10表示对于正常妊娠小鼠尾静脉分别给药烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束情形下的胎盘蓄积性(1),以及对于高血压模型小鼠尾静脉分别给药烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束情形下的胎盘蓄积性(2)。

[图11]图11表示高分子胶束在胎盘以及胎儿中的聚集性的照片。

[图12]图12是表示根据人胎盘灌注模型的药剂的胎盘透过性的图。图12A中表示对于奥沙利铂、30nm包封DACH-platin(ダハプラチン)的胶束、70nm包封DACH-platin的胶束、以及8-臂PEG的结果。图12B中表示对于10nm、20nm、30nm的涂覆PEG的金纳米粒子的结果。

### [具体实施方式]

[0013] 本说明书中使用的用语只要没有特别言及,可以理解为以本领域通常使用的含义使用。因此,只要没有另外定义,本说明书中使用的所有专门用语以及科学技术用语具有与根据本发明所属领域的从业者一般理解的用语相同的含义。本说明书中特定的数值范围包括其下限值和上限值。

#### [0014] [定义]

##### [烟酰胺]

烟酰胺(nicotinamide)是IUPAC名:吡啶-3-甲酰胺的化合物。烟酰胺也称呼为烟酸酰胺(niacinamide)或烟酸酰胺(ニコチン酸アミド),是维生素B组中所含的水溶性维生素。作为维生素B<sub>3</sub>的烟酸(niacin)在肝脏变成烟酰胺,作为维生素的功能与烟酰胺几乎相同。众所周知,烟酰胺能强力抑制作为环状ADP核糖的合成酶的ADP核糖环化酶,抑制ET-1和Ang II引起的血管收缩。烟酰胺在通常的给药量不发生致畸性/致癌性,作为对糙皮病(烟酸缺乏症)和烟酸的经口摄取不充分的孕妇用安全的药物或食品(维生素剂)被利用。

#### [0015] [妊娠高血压综合征]

妊娠高血压综合征是指以高血压为主体,引起浮肿、蛋白尿的病态,根据日本产科学会,定义为“妊娠20周以后,分娩后12周之前出现高血压的情况,或者高血压伴随蛋白尿的情况中的任一种,且这些症状指不是单纯的妊娠偶发并发症引起的症状”。

#### [0016] [胶束]

在本发明中,胶束是指包含亲水性部分和疏水性部分的多个分子通过疏水性相互作用会合而成的集合体。包含亲水性部分和疏水性部分的聚合物形成将亲水性部分作为外侧、将疏水性部分配置在内侧的胶束。在本发明中,作为包含亲水性部分和疏水性部分的分子,聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成胶束。

#### [0017] [嵌段共聚物]

嵌段共聚物是指多种单体分别依次聚合而形成多个区域的聚合物。区域的数量可以任意选择,但在本发明中,特别是指由聚醚区域和聚氨基酸区域形成的二嵌段体的共聚物。聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物包括由聚醚形成的亲水性部分、和根据侧链的性质而成为疏水性的聚氨基酸的疏水性部分。聚氨基酸的侧链上可以导入药剂,导入药剂的侧链成为疏水性,形成胶束的疏水性核心。作为聚醚,从具有充分的亲水性的观点出发,可以选择聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇等,最优选聚乙二醇。

#### [0018] [胎盘]

胎盘是联络母体和胎儿的器官。通过胎盘进行氧气、二氧化碳等气体交换、营养素的吸收、废物的释放。另外,胎盘分泌孕酮和雌激素这样的激素,有助于妊娠继续。而且,从胎盘还分泌血管扩张因子及其拮抗因子这样的血压调节因子等,通过这些作用可以产生妊娠高血压综合症。胎盘由母体来源的蜕膜(dedidua)(D)层和胎儿侧的迷路(labyrinth)(L)、D层和L层之间的海绵丝细胞(spongiotrophoblast)(S)层构成。通过胎盘,母体侧和胎儿侧血液中的物质并不能自由地来往,也被称为胎盘屏障。通过控制胶束的粒径,胎盘通过性发生变动。作为一个例子,非限制性地,如果是粒径30nm的胶束,则发现移动到D层、S层,另一方面,抑制移动到胎儿。而且,如果是粒径为70nm的胶束,则仅移动到D层(图11)。不通过胎盘的胶束的一部分蓄积在胎盘中。有关本发明的包封烟酰胺的胶束不能通过人胎盘向

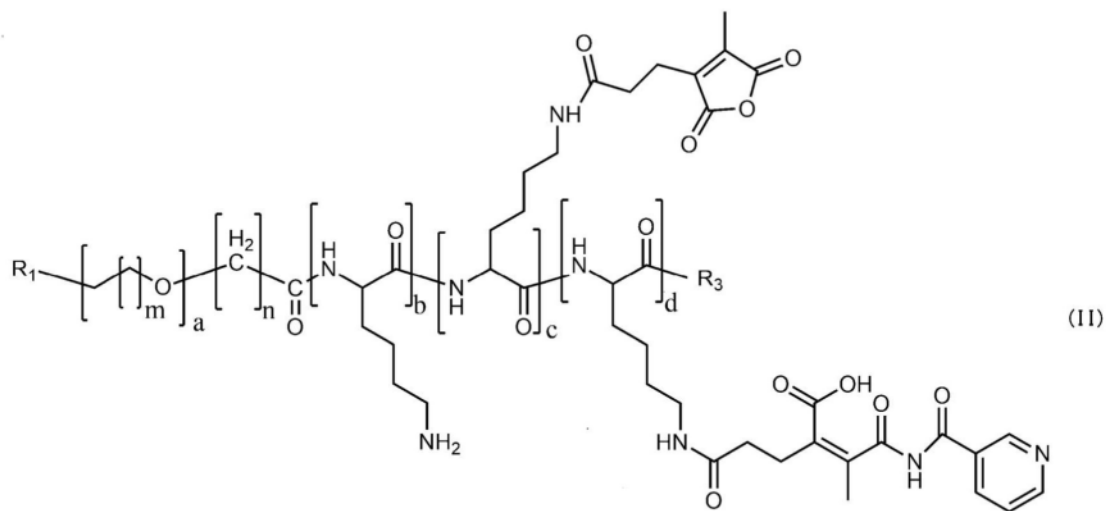
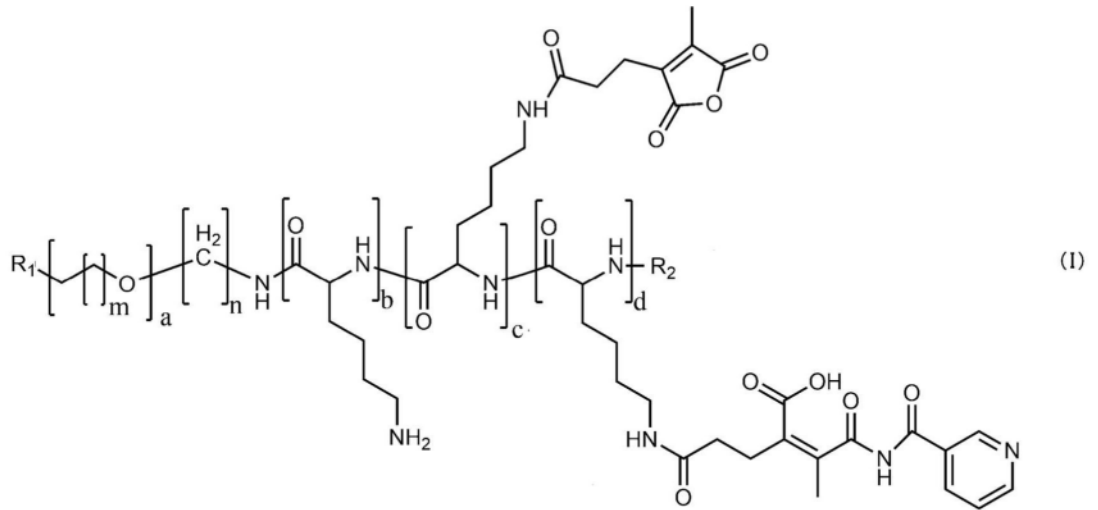
胎儿侧移动,另一方面,未胶束化的烟酰胺通过人胎盘向胎儿侧移动(图6)。蓄积在胎盘中的胶束通过内吞作用摄入构成胎盘的细胞而发挥作用。因此,在本发明的另一个实施方式中,包含本发明胶束的组合物可以用作胎盘靶向用、降低胎儿药害用或降低胎盘屏障通过用的药物组合物。

[0019] 本发明关于由结合了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成的包封烟酰胺的胶束。胶束的粒径其特征在于,根据动态光散射法测定的情形时为25~200nm。从胎盘通过性的观点,通常,粒径大于25nm,优选在30nm以上,进一步优选35nm以上。从为了避免肝脏的细网内皮系统的观点,通常,粒径在200nm以下,优选100nm以下,从靶向胎盘的观点,更优选75nm以下。如果是该尺寸的粒子。胎盘通过性降低,可以降低向胎儿的影响。在本发明的组合物中,粒子的粒径的多分散度(PDI)优选为0.2以下,进一步优选为0.15以下。比较烟酰胺和包封烟酰胺的胶束,血中滞留性得到改善(图7)。烟酰胺在给药后迅速被吸收,另一方面,包封烟酰胺的胶束在血液中滞留性高,可以发挥持续性的药效。另外,在给药烟酰胺的情形下,给药后10分钟以内向组织的蓄积达到峰值,向胎盘以及胎儿的两个组织蓄积,另一方面,给药包封烟酰胺的胶束的情形下,向胎盘的蓄积的峰值超过20分钟,另外,其蓄积量也增大,另一方面,对胎儿的蓄积被抑制(图8)。另外,在高血压模型中,与正常模型相比,向胎盘的蓄积量进一步增大,在作为作用部位的胎盘中发挥作用,期待迅速降低血压(图10)。烟酰胺除了作用于血管内皮使血压降低之外,还作用于作为作用部位之一的胎盘,抑制从胎盘产生sFlt1(非专利文献7:PNAS(2016),vol.113,No.4713450-13455)。sFlt1是由胎盘生成的血管增殖因子抑制蛋白,有助于妊娠高血压。实际上,可以推测,对妊娠高血压模型小鼠给药包封烟酰胺的胶束时的血压降低效果,比给药烟酰胺时的血压降低效果更高,聚集在烟酰胺所希望的作用部位而发挥作用(图9)。

[0020] 由聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成的胶束具有pH依赖性的药剂释放特性。所述药剂释放特性可以根据嵌段共聚物中的聚醚的单元数、氨基酸的种类及单元数、以及包封的药剂的种类及量而变化。本发明所涉及的包封烟酰胺的胶束,在血液中等生理pH值即pH7.4时,24小时释放10%左右的烟酰胺,相对于此,在pH5.5时,24小时释放约超过70%的烟酰胺。胶束在生物体内通过内吞作用被摄入细胞中,并配置在内质网中。内质网的pH低于生理pH,通常为pH5.5左右。因此,本发明的包封烟酰胺的胶束一旦被细胞摄入并配置在内质网中,就会释放药剂,直接作用于细胞。

[0021] 在本发明中使用的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,从与包封烟酰胺的结合性的观点,可以任意选择聚氨基酸部分。作为一例,可以使用赖氨酸。从容易制造的观点出发,优选使用1种氨基酸,但也可以使用多种氨基酸。赖氨酸的胺基与二羧酸酐反应基团结合,可以进一步结合烟酰胺。在本说明书的式中,作为羧酸酐反应基团,使用羧甲基马来酸酐(CDM)(IUPAC名:2,5-二氢-4-甲基-2,5-二氧代-3-咪喃丙酸)来表示,但也可以使用其他羧酸酐反应基团。形成本发明包封烟酰胺胶束的嵌段共聚物,作为一例,用下述式(I)或(II)表示:

[化3]



(式中,

$R_1$ 为聚醚的末端基团,

$R_2$ 和 $R_3$ 各自为聚氨基酸的末端基团,

$n=1\sim 5$

$m=1\sim 3$

$a=45\sim 2000$ 、

$b=0\sim 20$ 、

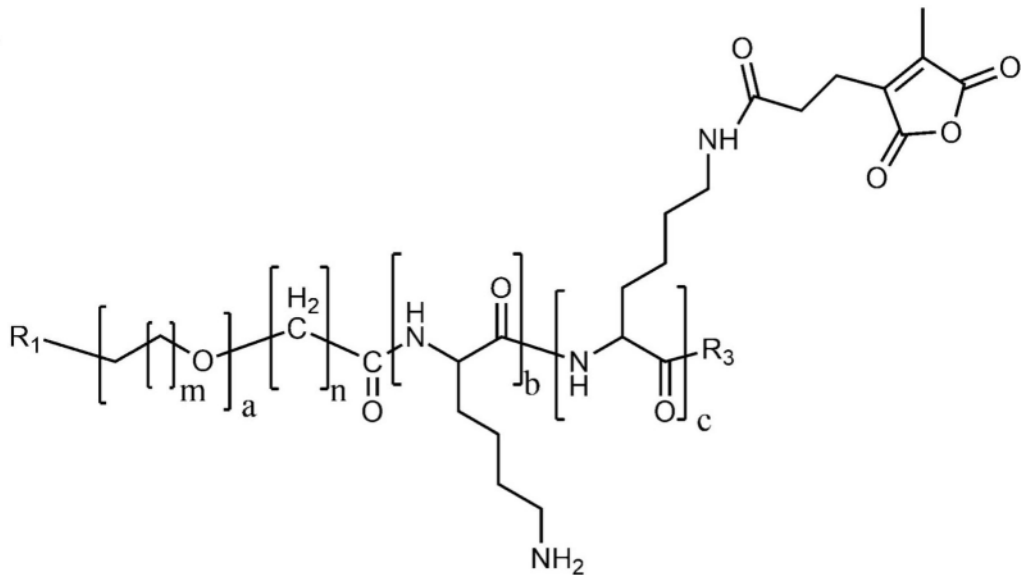
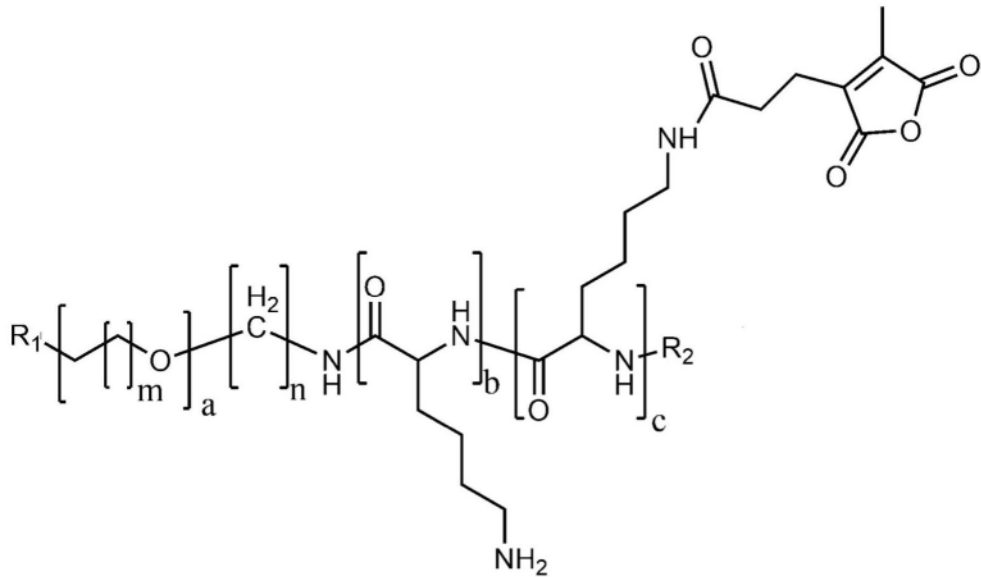
$c=0\sim 39$ ,和

$d=1\sim 40$ ).

式(I)和式(II)的聚合物通过将连接作为亲水性的聚醚部分和作为疏水性的聚氨基酸部分的基团进行变更,与仅使聚氨基酸的取向发生变化相关。这些共聚物作为共聚物的性质相同,可以使用任何共聚物。当一个取向的共聚物作为示例被提及时,也包括另一个取向的共聚物。

[0022] 烟酰胺导入前的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物用下式表示:

[化4]



(式中,

$R_1$ 为聚醚的末端基团,

$R_2$ 和 $R_3$ 各自为聚氨基酸的末端基团,

$n=1\sim 5$

$m=1\sim 3$

$a=45\sim 2000$ 、

$b=0\sim 20$ ,和

$c=1\sim 60$ )。

[0023]  $R_1$ 为聚醚的末端基团,可以是通常共聚物中通常使用的任意基团,作为一例,表示氢原子、羟基或未取代或取代的直链或支链的 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{1-12}$ 烷氧基。

$R_2$ 是聚氨基酸的末端基团,可以是通常在共聚物中通常使用的任意基团,作为一例表示氢原子、保护基、疏水性基团或聚合性基团。

$R_3$ 是聚氨基酸的末端基团,可以是通常在共聚物中通常使用的任意基团,作为一例,表示羟基、氧苄基、 $-NH-(CH_2)_m-X$ 基或引发剂残基,其中 $m$ 为 $1\sim 5$ 的整数, $X$ 为含有伯、仲、

叔胺或季铵盐中1种或2种以上的胺化合物残基,或非胺化合物残基。

[0024] 从形成胶束的观点出发,聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物的聚醚的重复数a优选为45以上,更优选为200以上,另外,从控制胶束的大小的观点出发,优选为2000以下,进一步优选为500以下。

[0025] 未结合CDM的赖氨酸残基数b根据CDM与氨基酸侧链的反应率来决定。通过使相对于聚合物的CDM量过剩,可以降低未结合CDM的赖氨酸残基数。在结合烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,从使烟酰胺数增加的观点出发,b优选为20以下,更优选为5以下。

[0026] 未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c表示未结合烟酰胺的结合了CDM的赖氨酸残基数。未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c,在作为最终生成物的结合烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,根据CDM与烟酰胺的反应率来决定,但是从减少搭载烟酰胺的观点来看,优选在39以下、通常10以下、更优选5以下。最优选也可以是0,该情形表示聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中存在的结合CDM的赖氨酸全部都搭载着烟酰胺。在作为中间生成物的烟酰胺导入前的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c是根据赖氨酸残基与二羧酸酐反应基团的反应率来决定的。未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c可以根据胶束中搭载的烟酰胺的分子数适当选择,从增加搭载的烟酰胺的分子数的观点或提高疏水性、提高胶束稳定性的观点出发,优选为10以上,进一步优选为20以上,也可以进一步更优选30以上。从使胶束稳定化的观点出发,未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c通常为60以下,例如40以下。

[0027] 结合烟酰胺的赖氨酸残基数d可以根据胶束中搭载的烟酰胺的分子数适当选择,从增加搭载的烟酰胺的分子数的观点、或提高疏水性、提高胶束稳定性的观点出发,优选为10以上,进一步优选为20以上,也可以进一步优选为30以上。结合烟酰胺的赖氨酸残基数d的最大值,在导入烟酰胺前的聚醚-氨基酸嵌段共聚物中,与未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c相等。

[0028] 聚氨基酸总数可以根据聚醚数和嵌段共聚物的性质任意决定,作为一例为2~80,优选为20~60,进一步优选为30~50。在作为最终生成物的结合烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,未结合CDM的赖氨酸残基数b、未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c、以及结合烟酰胺的赖氨酸残基数d的合计不超过聚氨基酸总数。在作为中间生成物的烟酰胺导入前的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物中,未结合CDM的赖氨酸残基数b及未结合烟酰胺结合CDM的赖氨酸残基数c的合计不超过聚氨基酸总数。

[0029] 烟酰胺通过介入结合到聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物的聚氨基酸侧链的反应性基团进行结合。反应性基团还可以介入连接基。反应性基团可以考虑与作为搭载药剂的烟酰胺的结合性任意选择。作为反应性基团的一个例子,可以使用二羧酸酐反应基团,例如羧甲基马来酸酐(CDM)、马来酸酐、琥珀酸酐等。赖氨酸侧链结合的二羧酸酐与烟酰胺的胺反应。作为一个例子,通过以下的反应,生成结合了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物。结合了羧甲基马来酸酐的侧链全部上也可以结合烟酰胺,根据反应率也可以存在未结合烟酰胺的羧甲基马来酸酐。羧甲基马来酸酐根据周围环境,也可以作为羧甲基马来酸存在。

[化5]



将搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物溶解于极性溶剂中的工序；

使用分级分子量3500~16000的透析膜进行透析的工序。通过动态光散射法测定的情形时，为了取得具有25~100nm粒径的胶束，也可以变更透析膜，进行数次透析。对于本发明进一步其他的实施方式，还涉及根据该方法制造的具有25~100nm粒径的包封烟酰胺的胶束。

[0032] 本发明的具有25~100nm粒径的包封烟酰胺的胶束的制造方法也可包括作为前工序的、调制在氨基酸侧链含有二羧酸酐反应基团的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物的工序。具体地，将聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物与二羧酸酐的酰基氯化物混合，使其反应的工序。

[0033] 烟酰胺与二羧酸酐反应基团的反应，可以在任意的溶剂中进行，作为一例，可举出在n-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、N,N-二甲基乙酰胺或缓冲溶液中进行。

[0034] 搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物的纯化可以通过添加到二乙醚、己烷等有机溶剂中，取得沉淀，然后通过减压过滤法回收聚合物来进行。

[0035] 搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物通过溶解在极性溶剂中，例如缓冲溶液中形成胶束。这样形成的聚合物胶束通常作为具有粒径20nm~100nm的胶束的集合而得到。其中，需要通过除去未结合的聚合物或药剂来纯化。作为胶束的纯化方法，可举出典型的有超滤法、透析法。作为透析法，例如使用分级分子量3500~16000的透析膜，对PBS进行透析。通过透析法，可以除去未形成胶束的聚合物或药剂、所希望的尺寸外的胶束。进而，通过使用与所希望的胶束的粒径一致的过滤器进行超滤，可以取得所希望的粒径胶束。作为一个例子，用于超滤的过滤器可以使用分级分子量为1000~100000的过滤器。通过多次进行透析和/或超滤，可以得到分散度更低的胶束。

[0036] 相对于形成得到的胶束的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物，烟酰胺的导入率可以通过将胶束溶液冷冻干燥，进行<sup>1</sup>H-NMR来决定。另外，胶束的品质可以通过动态光散射法决定胶束的粒径，另外通过凝胶渗透色谱法决定分散度来进行。本发明的胶束具有30~50nm的粒径，并且优选具有0.10~0.30的分散度。

[0037] 由纯化得到的搭载了烟酰胺的聚醚-聚氨基酸嵌段共聚物形成的包封烟酰胺的胶束，可以原样、或根据需要进一步进行灭菌处理，添加适合制剂的任意助剂，也可制成药物制剂。作为这样的药物制剂，可以举出注射剂或输液制剂。另外，也可以将包封烟酰胺的胶束溶液冷冻干燥，制成固体状的粉体。粉体也可以在给药前用可给药的溶液再构成来给药。作为能够给药的溶液，可以使用去离子水、调节到一定pH的缓冲水溶液。

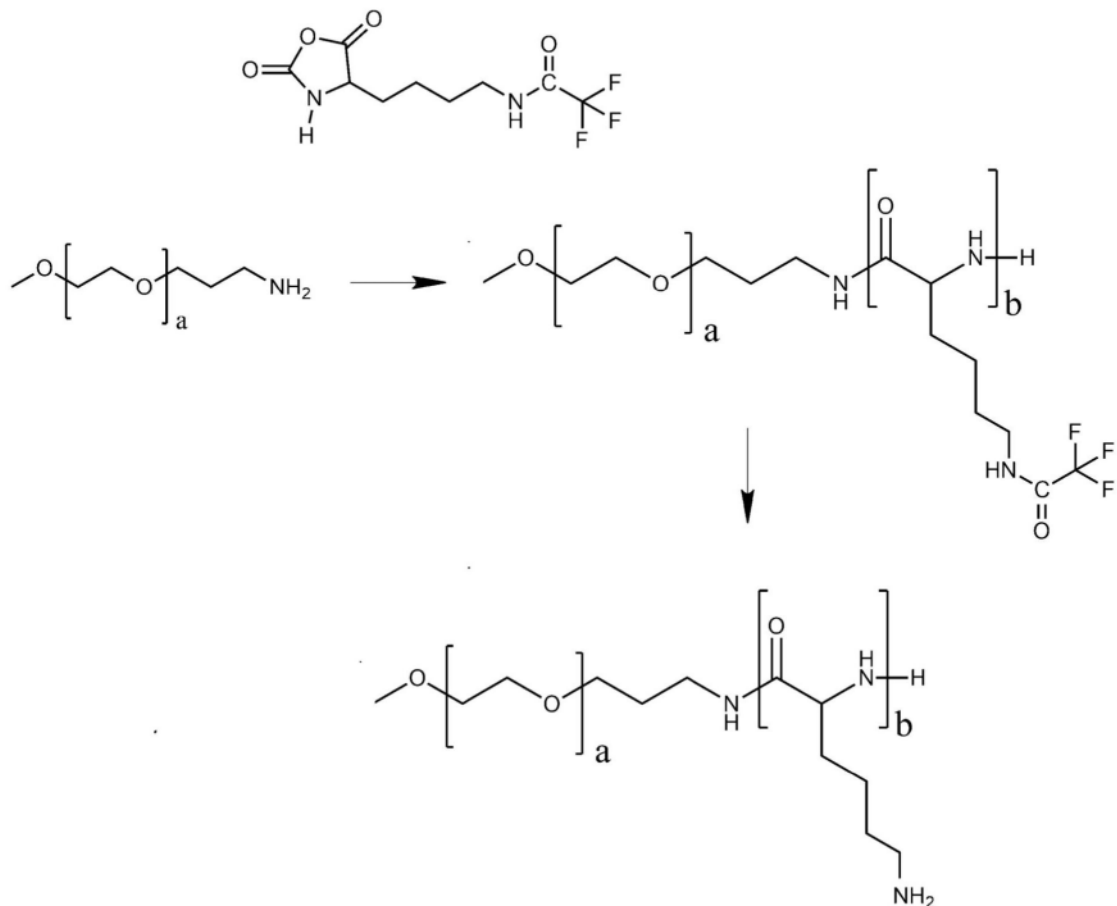
[0038] 本发明的包封烟酰胺的胶束以及含有该胶束的组合物可以对妊娠中患有高血压的受试者给药。更具体地，相关受试者是患有妊娠高血压综合征的受试者。对相关受试者，胶束可通过任意的非口服给药，例如静脉内、皮下、肌肉中给药，通常是通过静脉注射或浓注给药。

[实施例]

[0039] 实施例1:包封烟酰胺的胶束的制造

(1) 聚乙二醇-聚(赖氨酸)-嵌段共聚物(PEG-p(Lys))的调制

[化6]



(式中, a, b根据使用的PEG的分子量, 以及Lys(TFA)-NCA的反应数)

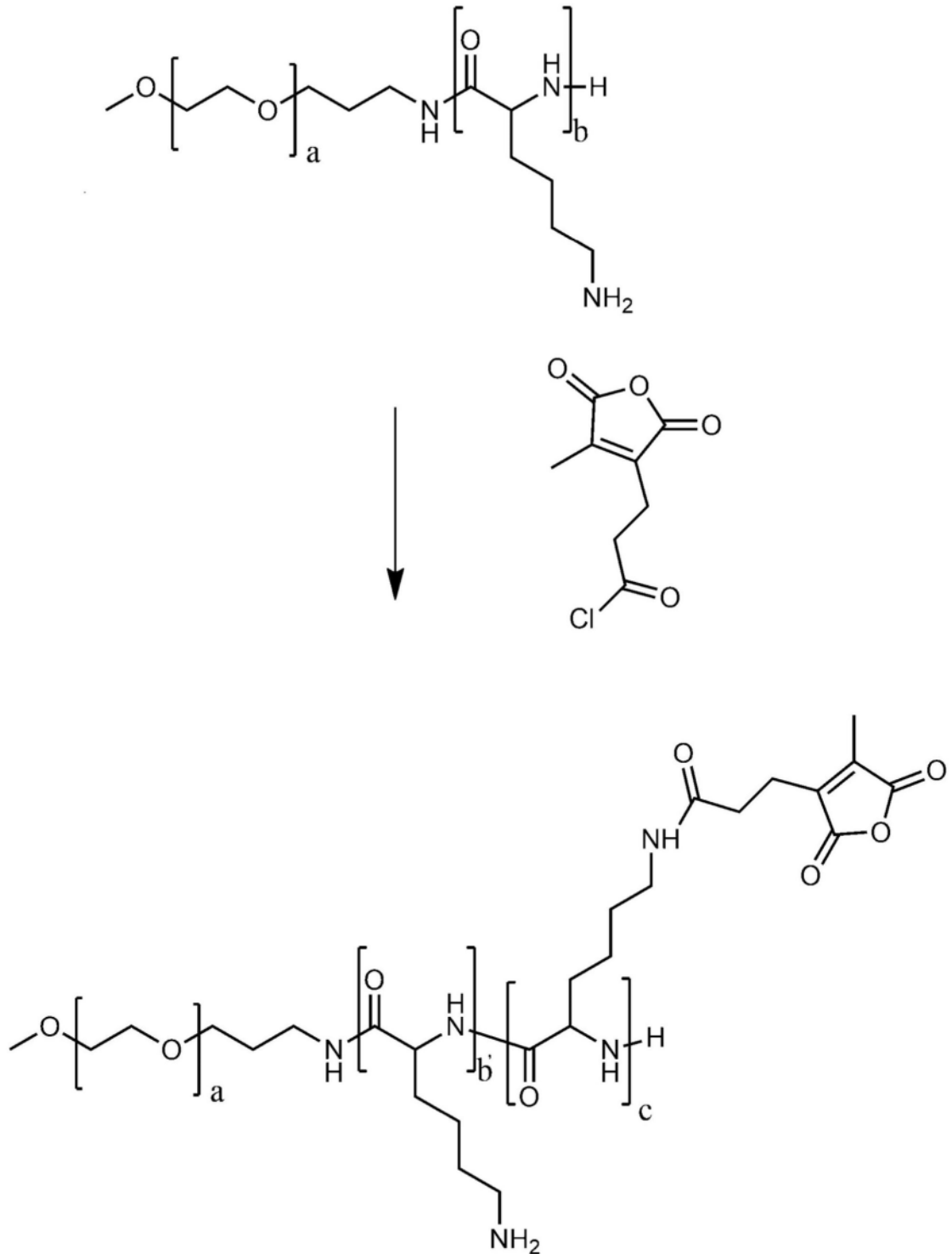
按照以往报告调制PEG-p(Lys) (非专利文献2: *Macromol. Biosci.* (2020) (20) 1900161)。具体地, 将 $\alpha$ -甲氧基- $\omega$ -氨基-聚(乙二醇) (MeO-PEG-NH<sub>2</sub>; Mw=12000g/mol) (NOF Corporation) 和N-三氟乙酰基-L-赖氨酸N-羧酸酐 (Lys(TFA)-NCA) (Chuo Kaseihin Co., Inc.) 供给开环聚合反应, 形成聚乙二醇-聚(三氟乙酰基-赖氨酸) (PEG-p(Lys-TFA)), 然后通过脱保护去除三氟乙酰基。更具体地, 将硫脲 (1.5g、20mmol) 溶解于无水DMF (20ml), 得到含有硫脲的DMF。接下来, 将MeO-PEG-NH<sub>2</sub> (1g、0.083mmol) 和Lys(TFA)-NCA (1.005g、3.75mmol) 溶解于含有硫脲的DMF (10ml), 接下来, 在氩气氛围下在35℃搅拌3天使其反应。通过在二乙醚中沉淀, 在抽吸下干燥, 得到作为白色粉末的聚合物。通过<sup>1</sup>H-NMR分光计 (DMSO-d<sub>6</sub>、80℃) 确定聚合度, 并且通过有机相GPC (溶出液: 10mM含有LiCl的DMF; 温度40℃; 流速0.8ml/分; 检测器: 折射率) 测定分子量分布。进一步, 通过35℃、在1N NaOH甲醇溶液中处理1晚, 除去三氟乙酰基保护基, 用6~8kD的MWC0透析膜进行透析。冷冻干燥后得到最终生成物, 为白色粉末。将脱保护的聚合物用<sup>1</sup>H-NMR分光计 (D<sub>2</sub>O、25℃) 分析。采用PEG的-OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-和赖氨酸的-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>的质子峰, 确定PEG-p(Lys) 嵌段共聚物的组成。用水相GPC (流动相: pH3.3乙酸缓冲生理盐水 (10mM乙酸盐和500mM NaCl); 室温; 流速0.75ml/分; 检测器: UV、波长220nm) 分析分子量分布。NMR数据以及GPC数据表示于图1。

[0040] (2) 聚乙二醇-聚(赖氨酸-羧甲基马来酸酐)-嵌段共聚物 (PEG-p(Lys-CDM)) 的调制

使羧甲基马来酸酐 (CDM) 的酰基氯化物与PEG-p(Lys) 发生反应, 得到PEG-p(Lys-

CDM)。

[化7]

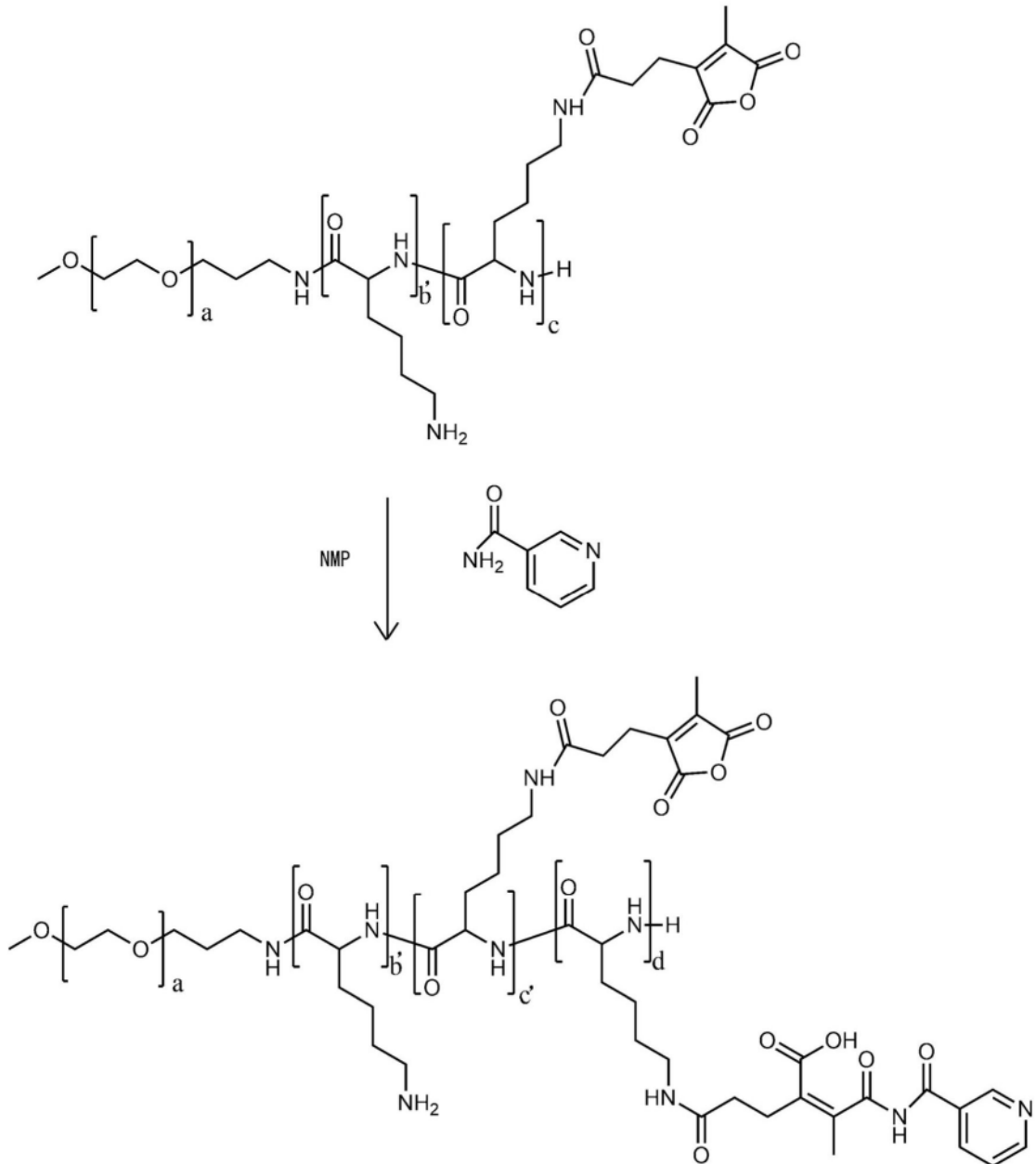


(式中, a取决于所使用的PEG的分子量, b取决于Lys(TFA)-NCA的反应数, c取决于CDM的反应数.  $b' = b - c$ )

将2-丙酸-3-甲基马来酸酐(CDM, Tokyo Chemical Industry Co.Ltd., 200mg、1.09mmol)溶解于无水甲苯, 在抽吸下进行蒸发。将CDM溶解于无水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15ml), 接下来, 添加草酰氯(Oxalyl chloride) (Tokyo Chemical Industry Co.Ltd., 4ml、5.9g、46mmol), 在

室温使其反应12小时。接着,通过蒸发除去 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 以及草酰氯残渣,得到透明的油。加入 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4ml) 溶解CDM-C1,使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20ml) 溶解PEG-P (Lys) (200mg、0.011mmol)。然后将PEG-p (Lys) 溶液移动到CDM-C1溶液中,在室温搅拌反应液12小时。搅拌后,通过二乙醚沉淀和一晚的抽吸干燥得到生成物。将生成物通过 $^1\text{H}$  NMR分析,确认每1聚合物包含20个未结合CDM的赖氨酸和17个结合CDM的赖氨酸。NMR数据表示于图2。

[0041] (3) 结合烟酰胺的聚乙二醇-聚氨基酸嵌段共聚物(PEG-p(Lys-CDM-NA))的制造  
[化8]



(式中,a取决于使用的PEG的分子量, $b' = b - c$ ,在此,b取决于Lys(TFA)-NCA的反应数、c取决于CDM的反应数, $c' = c - d$ ,d取决于烟酰胺的反应数)

使PEG-p(Lys-CDM) (量:10mg) 和烟酰胺(销售商:東京化成工业株式会社,相对于CDM 10倍量:12mg) 在n-甲基-2-吡咯烷酮(NMP:2mL) 中使其在室温反应24小时。将反应溶液添加于二乙醚中,形成沉淀。通过减压过滤回收聚合物。将回收聚合物利用 $^1\text{H}$  NMR分析,烟

酰胺的导入率相对于聚合物的CDM为73% (每1聚合物为15个)。NMR数据表示于图3。

#### [0042] (4) 胶束的制造

对于包封烟酰胺的胶束 (PEG-p(Lys-CDM-NA) 的胶束), 通过透析法调制。将PEG-p(Lys-CDM-NA) 聚合物溶解于n-甲基吡咯烷酮(1mg/mL) 中, 使用ポア3透析膜(MWC0:3500), 对PBS(pH7.4) 进行透析, 纯化(24小时, 计6次)。通过动态光散射法(DLS) 测定调制的胶束的尺寸和多分散度(PDI)。胶束尺寸42nm, 多分散度为0.19。对于胶束, 通过进行冷冻干燥回收聚合物, 通过<sup>1</sup>H-NMR确定烟酰胺的导入率(65%; 每1聚合物13个)。NMR数据表示于图4。

#### [0043] 实施例2: 包封烟酰胺的胶束的特性解析

##### (1) pH依赖性的药剂释放试验

使用ポア3透析膜(MWC0:3500), 将胶束溶液相对于PBS(pH7.4) 和PBS(pH6.5) 进行透析。在透析开始后、1小时、3小时、6小时以及24小时对外液取样。将取样的外液浓缩后, 进行冷冻干燥。溶解粉体, 通过HPLC法(UV268nm、流动相20mM磷酸缓冲液) 定量。结果表示于图5。

#### [0044] 实施例3: 使用尺寸不同的高分子胶束对胎盘和胎儿中的聚集性的评价

在该实施例中, 对尺寸不同的高分子胶束以及低分子化合物向胎盘以及胎儿中的聚集性, 利用妊娠模型小鼠, 通过荧光分析、元素分析以及质量分析进行评价。

##### (1) 包封DACH-platin的胶束的调制

调制荧光标记的2种(粒径30nm以及70nm、粒径30nm的胶束为Alexa-555标记、粒径70nm的胶束为Alexa647标记) 的包封DACH-platin的胶束(非专利文献3:H.Cabral et.al., Nat.Nanotech.6(2011)815-823)。

##### (2) 对妊娠模型小鼠给药

对妊娠后第14天的小鼠给药2种包封DACH-platin的胶束(粒径30nm以及70nm) 的混合溶液。给药48小时后摘出胎盘和胎儿, 调制冻干样品。其后, 制作冻干切片(厚度: 10mm), 通过赫斯特(Hoechst) 进行核染色。测定来自赫斯特的荧光(图11A)、以及来自胶束的标记(Alexa555以及Alexa647) 的荧光(图11B以及C)。从图11的结果, 可确认2种包封DACH-platin的胶束(粒径30nm以及70nm) 在胎儿(F) 中不聚集。粒径30nm的包封DACH-platin的胶束没有发现向胎儿(F) 的聚集, 但是发现胶束聚集直到胎盘的胎儿侧的迷路(labyrinth) (L) 层。对于粒径70nm的包封DACH-platin的胶束, 发现聚集直到胎盘的母体侧的蜕膜(dedidua) (D) 层, 但是没有发现向在D层和L层之间的海绵丝细胞(spongiotrophoblast) (S) 层聚集。由该结果显示, 通过精密设计药剂的尺寸可以控制胎盘内分布。

##### (3) 对于人胎盘的通过性的评价

在该实施例中, 使用人胎盘灌注模型评价尺寸不同的高分子胶束以及低分子化合物、聚合物在人胎盘中的通过性。

[0048] 根据非专利文献4(K.Shintaku et.al., Drug Metab.Dispos.37(2009)962)、非专利文献5(J.R.Huston et.al., Clin.Pharmacol.Ther.90(2011)67) 制作人胎盘灌注模型。具体地, 在来自东京大学医院的妇产科提供的人胎盘的母体侧, 导入针管(18规格(gauge)), 在胎儿侧的静脉和动脉分别导入针管(18规格), 在37°C、30分钟灌注根据非专利文献6(M.Nagai et.al., Drug Metab.Dispos.41(2013)2124) 制作的Krebs-Ringer碳酸缓

冲液(母体侧的流速:15mL/min、胎儿侧的流速:3ml/min)。在此,缓冲液通过由过氧化氢和氯化铁的氧化还原反应生成的氧来饱和。其后,60分钟灌注包封DACH-platin的胶束(粒径30nm以及70nm)(DACH-platin的给药量:85.4mg/L)、奥沙利铂(2.7mg/L)以及Cy3标记8臂PEG(荧光强度:3,000(RFU)),每5分钟回收来自胎儿侧的静脉溶液各1mL。对于奥沙利铂和包封DACH-platin的胶束给药组,通过感应耦合等离子体质量分析测定回收的样品中的铂含量。对于聚合物,根据HPLC法定量荧光强度。算出透过量相对于各药剂给药量的比例,表示于图12A。从图12A的结果,奥沙利铂透过胎盘,但是与包封DACH-platin的胶束(粒径30nm以及70nm)一起时却不透过胎盘,由此暗示了通过使药剂的尺寸在30nm以上来抑制透过胎盘。另外,对于8-臂PEG,相比于奥沙利铂,虽然降低,但也发现了透过胎盘,由此暗示了对于药剂的尺寸在10nm-30nm之间存在阈值。从图12A的结果,奥沙利铂聚集于胎盘,胶束不在胎盘聚集,由此表明,根据小鼠和人的胎盘结构不同,抑制胶束向胎盘的聚集。其结果确认了通过将药剂的尺寸在30nm以上,可以抑制向胎盘的聚集和透过。

[0049] 为了鉴定通过胎盘的物质的大小,使用PEG包覆的金纳米粒子(NP)的10、20和30nm(5mL,Nanocs,Inc.,USA),与上述方法同样地进行了离体人胎盘灌注实验。当灌注10nm金NP时,来自胎儿侧的金纳米粒子的检测量根据时间依赖性地增加,60分钟后达到给药量的4.58%。另外,在灌注20nm的金NP的情形下,来自胎儿侧的检测剂量为2.21%。另一方面,在灌注30nm的金纳米粒子的情形下,来自胎儿侧的检测剂量在60分钟后为给药剂量的0.05%。结果如图12B所示。这些结果表明,材料可以在20nm到30nm之间的尺寸截断以穿过胎盘。

#### [0050] 实施例4:采用包封烟酰胺的胶束对胎盘以及胎儿进行聚集性的评价

##### (1)对妊娠模型小鼠的给药

将实施例1制造的包封烟酰胺的胶束,与实施例3(2)同样,对妊娠模型小鼠给药,评价对于胎盘以及胎儿的聚集性。

##### [0051] (1-1)血中滞留性的评价

对妊娠后第17天的小鼠,将包封烟酰胺的胶束(胶束尺寸42nm、多分散度为0.19、烟酰胺的导入率:65%、包封在胶束中的烟酰胺10mg)溶解于PBS中,进行尾静脉给药。作为对照,对妊娠后第17天的小鼠,将10mg烟酰胺溶解于PBS,进行尾静脉给药。给药后、在1小时、3小时、6小时、24小时、48小时从眼球采集血液。调节采取的血液试样的pH,使胶束中的烟酰胺释放,通过HPLC(机器:日本分光株式会社EXTREMA、柱:东ソ一株式会社TSKgel ODS-120H 1.9 $\mu$ m)测定血液试样中的烟酰胺量。给药前的烟酰胺稀释溶液的浓度作为100,表示烟酰胺的血中浓度的变化(图7)。烟酰胺在给药后6小时减少约10分之1,而包封烟酰胺的胶束在给药后48小时减少约10分之1,提高了血中滞留性。

##### [0052] (1-2)在胎盘以及胎儿中的蓄积性的评价

对妊娠后第17天的小鼠,将包封烟酰胺的胶束(胶束尺寸42nm、多分散度为0.19、烟酰胺的导入率:65%、包封在胶束的烟酰胺10mg)溶解于PBS,进行尾静脉给药。作为对照,对妊娠后第14天的小鼠将10mg烟酰胺溶解于PBS,进行尾静脉给药。在给药前、给药后1小时、3小时、6小时、24小时、48小时,杀死小鼠,摘出胎盘以及胎儿。分别将胎盘以及胎儿称量后,匀化,溶解于PBS中,制作试样,调节pH,使胶束中的烟酰胺释放,通过HPLC(机器:日本分光株式会社EXTREMA、柱:东ソ一株式会社TSKgel ODS-120H 1.9 $\mu$ m)测定试样中的烟酰胺浓

度。测定对于每1g组织的给药量的比例(%),表示为蓄积量(图8)。包封烟酰胺的胶束向胎儿的移动性被抑制,另一方面发现向胎盘的蓄积。另外,如果着眼于向胎盘的蓄积,在给药烟酰胺的情形下,立刻产生峰值,但是给药包封烟酰胺的胶束的情形下,峰值超过24小时,持续性变长,而且也提高了胎盘蓄积量。

[0053] 对于在正常妊娠小鼠的皮下搭载渗透压泵的、妊娠第17天后的高血压模型小鼠,将包封烟酰胺的胶束(胶束尺寸42nm、多分散度为0.19、烟酰胺的导入率:65%、包封在胶束的烟酰胺10mg)溶解于PBS,进行尾静脉给药。另外,对于相同的高血压模型小鼠,将10mg烟酰胺溶解于PBS,进行尾静脉给药。在给药前、给药后1小时、3小时、6小时、24小时、48小时,杀死小鼠,摘出胎盘。将胎盘分别计量后,匀化,溶解于PBS中,制作试样,调节pH,使胶束中的烟酰胺释放,通过HPLC(机器:日本分光株式会社EXTREMA、柱:东ソ一株式会社TSKgel ODS-120H 1.9 $\mu$ m)测定试样中的烟酰胺浓度。测定相对于每1g组织的给药量的比例(%),表示为蓄积量(图10(1))。另外,图10(2)表示在对正常妊娠后第17日的小鼠进行相同实验时,向胎盘中的烟酰胺的蓄积量。对高血压模型小鼠给药包封烟酰胺的胶束的情形下,与正常小鼠比较,烟酰胺向胎盘的蓄积提高。

[0054] (2)对于人胎盘的通过性的评价

将实施例1中制造的包封烟酰胺的胶束与实施例3(3)同样,使用人胎盘回流模型,评价胎盘的通过性以及向胎盘的聚集性。

[0055] 根据非专利文献4(K.Shintaku et.al.,Drug Metab.Dispos.37(2009)962)、非专利文献5(J.R.Huston et.al.,Clin.Pharmacol.Ther.90(2011)67)制作人胎盘灌注模型。具体地,在来自东京大学医院的妇产科提供的人胎盘的母体侧,导入针管(18规格(gauge)),在胎儿侧的静脉和动脉分别导入针管(18规格),在37 $^{\circ}$ C、30分钟灌注根据非专利文献6(M.Nagai et.al.,Drug Metab.Dispos.41(2013)2124)制作的Krebs-Ringer碳酸缓冲液(母体侧的流速:15mL/min、胎儿侧的流速:3ml/min)。在此,缓冲液通过由过氧化氢和氯化铁的氧化还原反应生成的氧来饱和。其后,60分钟灌注溶解了包封烟酰胺的胶束(胶束尺寸42nm、多分散度为0.19、烟酰胺的导入率:65%、包封在胶束的烟酰胺100mg)的1L的PBS,每10分钟回收来自胎儿侧的静脉溶液各1mL。作为对照,同样60分钟灌注溶解了100mg烟酰胺的1L的PBS,回收来自胎儿侧的静脉的溶液。调节回收的试样的pH,使烟酰胺释放,用HPLC(机器:日本分光株式会社EXTREMA、柱:东ソ一株式会社TSKgel ODS-120H 1.9 $\mu$ m)测定溶液中的烟酰胺。相对于胎盘通过前的溶液中的烟酰胺浓度,将胎盘通过后的溶液中的烟酰胺的浓度的比例表示为胎盘通过性(图6)。

[0056] 实施例5:采用包封烟酰胺的胶束进行高血压治疗效果的评价

在正常妊娠小鼠(妊娠第10天)的皮下搭载渗透压泵(第0天)、直到其后妊娠第17天(第7天),皮下途径给与血管紧张素II(销售商:Sigma-Aldrich、1.5 $\mu$ g/kg小鼠),制作妊娠高血压模型小鼠。直到妊娠第13天(第3天)~第16天(第6天),尾静脉给药药剂。作为给药的药剂,分别将烟酰胺(10mg/日)、包封烟酰胺的胶束(胶束尺寸42nm、多分散度为0.19、烟酰胺的导入率:65%、包封在胶束中的烟酰胺10mg)溶解于PBS中的溶液,制作药剂。作为对照,给药未添加药剂的PBS(PBS)。另外,将血管紧张素II未给药组作为对照(对照)。在第0、3、5、7天测定小鼠的收缩压(图9)。通过给药血管紧张素II,血压升高(第3天),另一方面,在烟酰胺以及包封烟酰胺的胶束的给药组,血压降低(第5天以及第7天)。在高血压模型小鼠

中,给药包封烟酰胺的胶束的情形下,与给药烟酰胺的情形相比较,血压降低效果得以提高。

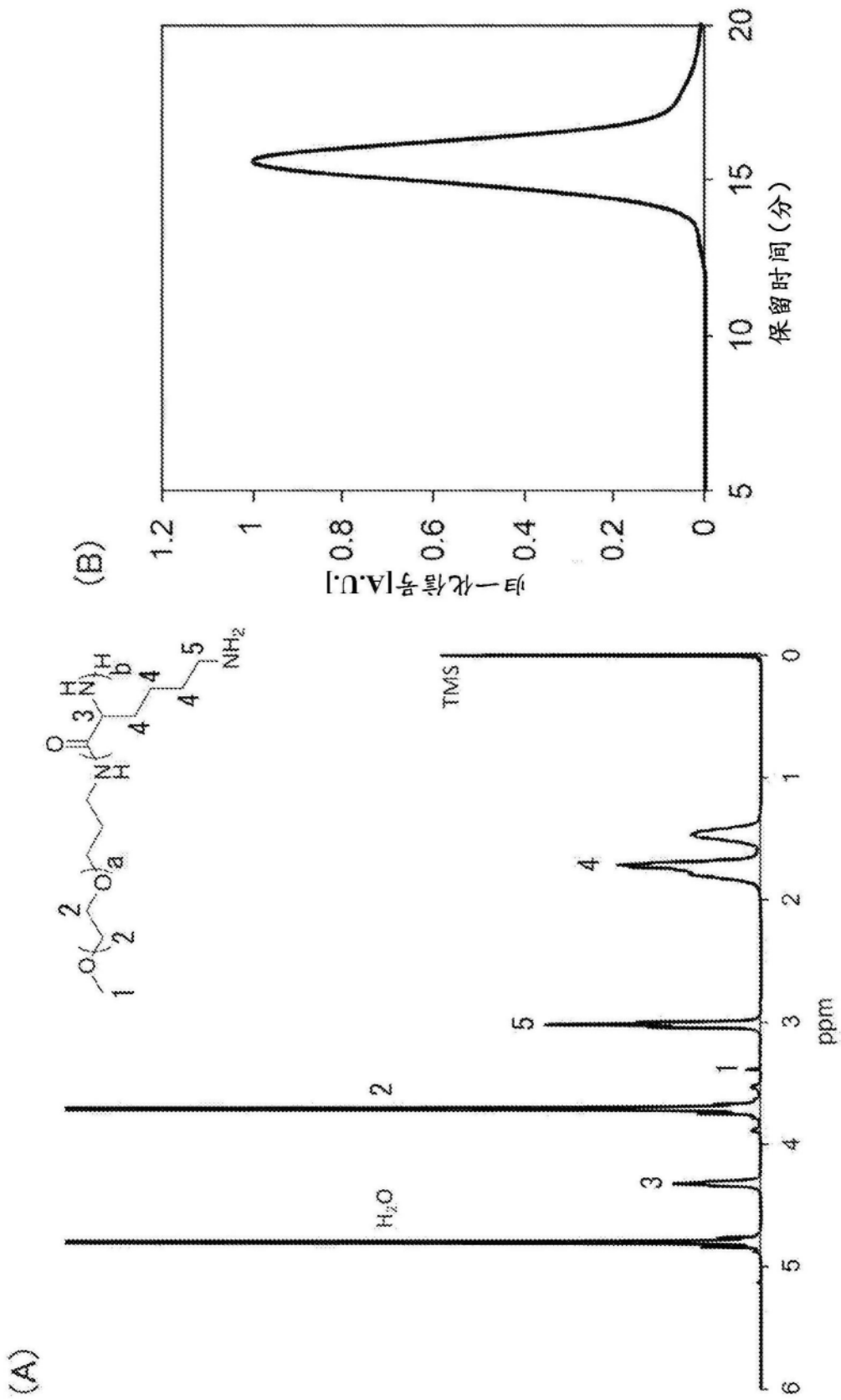


图1

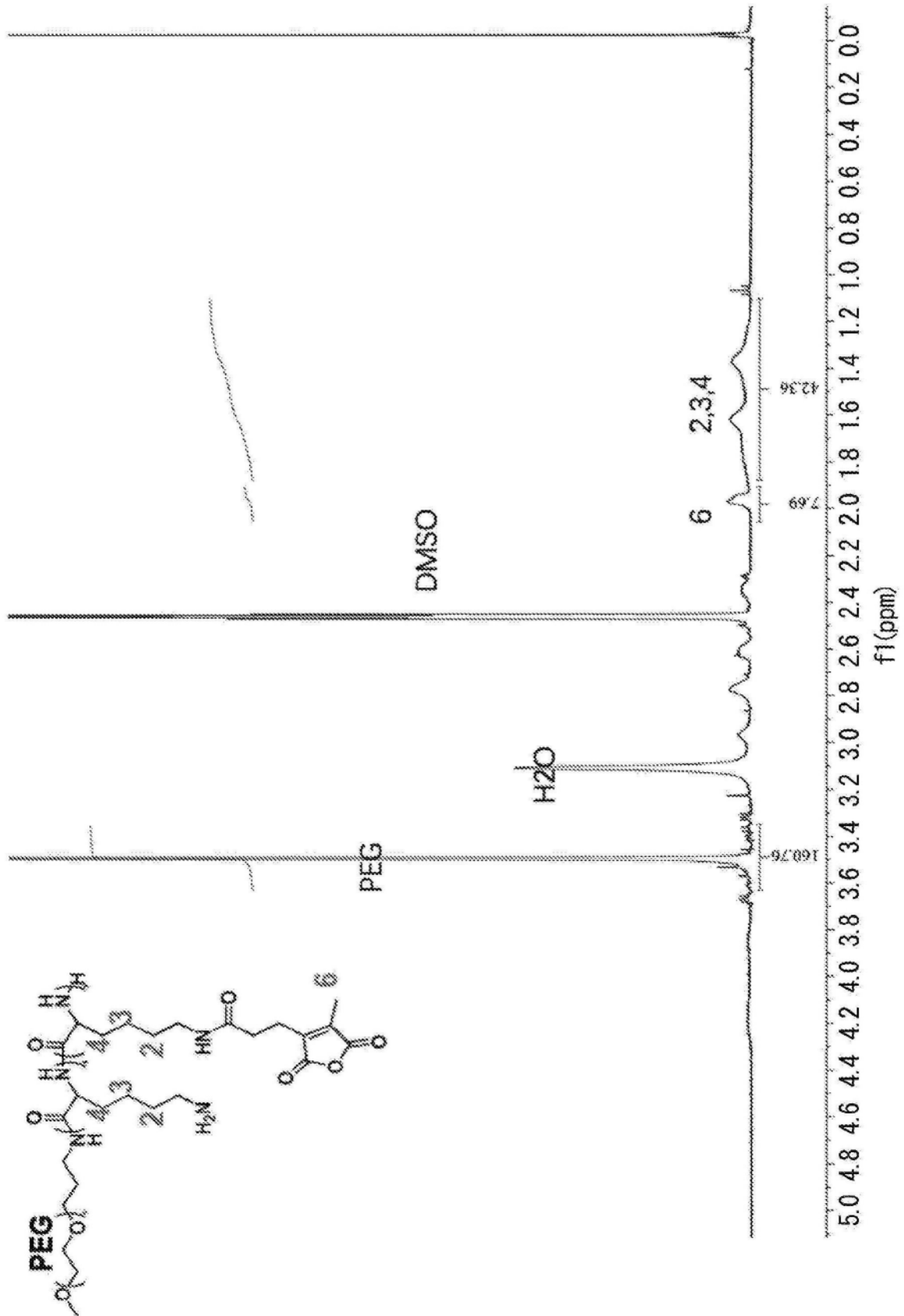


图2

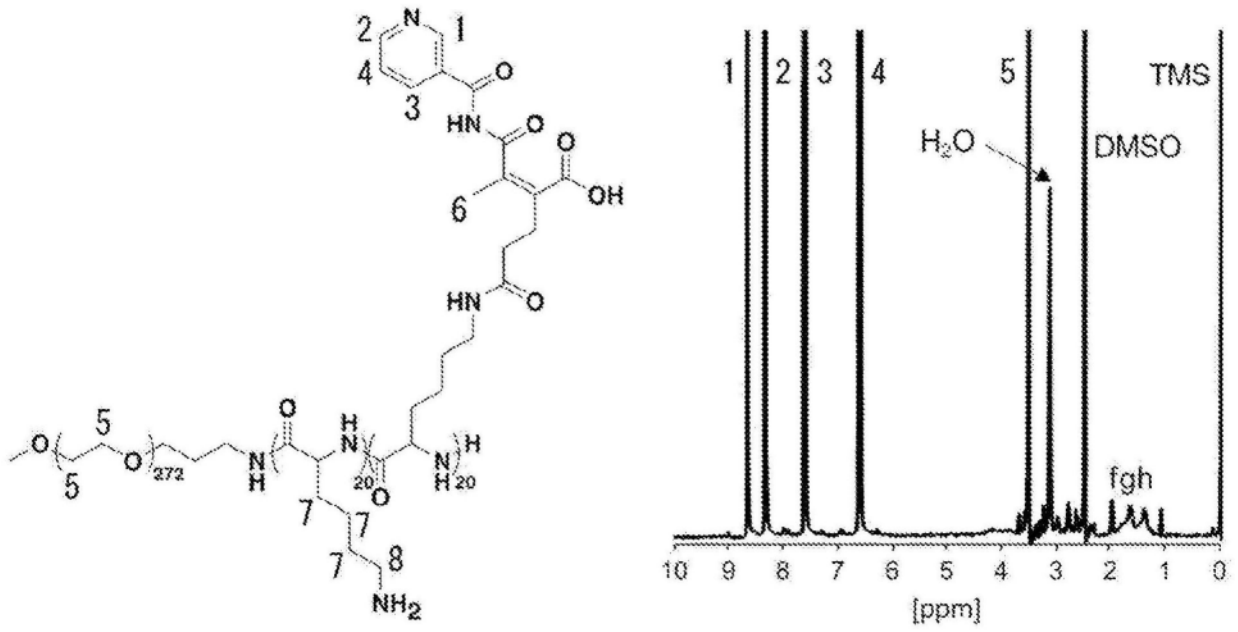


图3

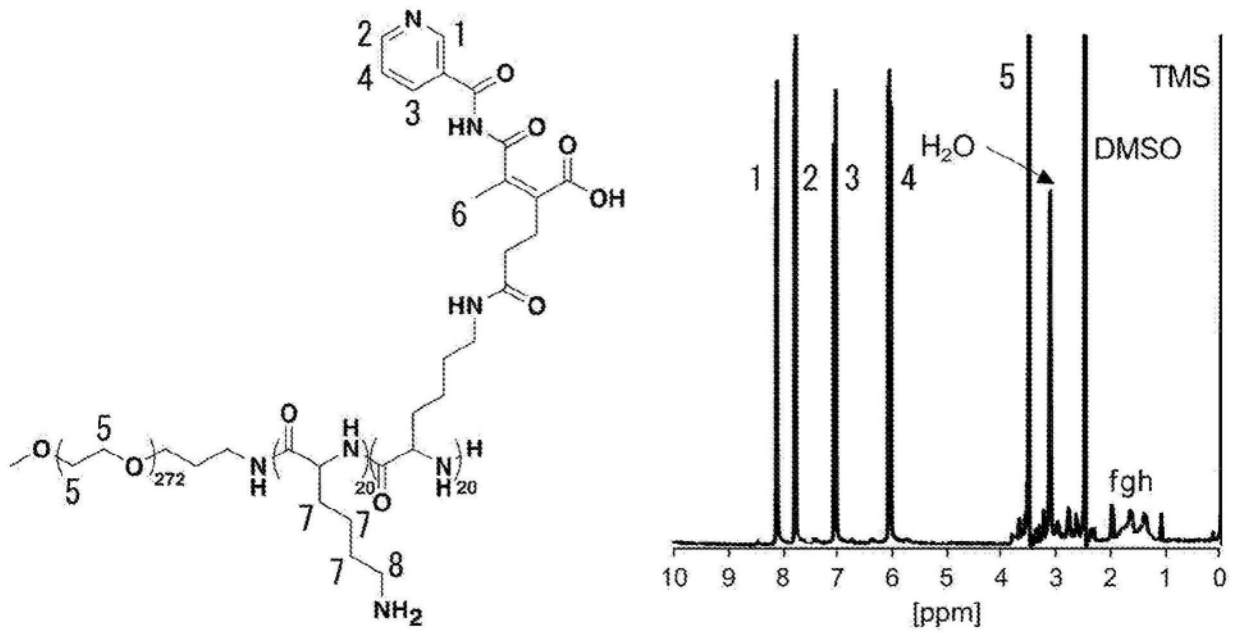


图4

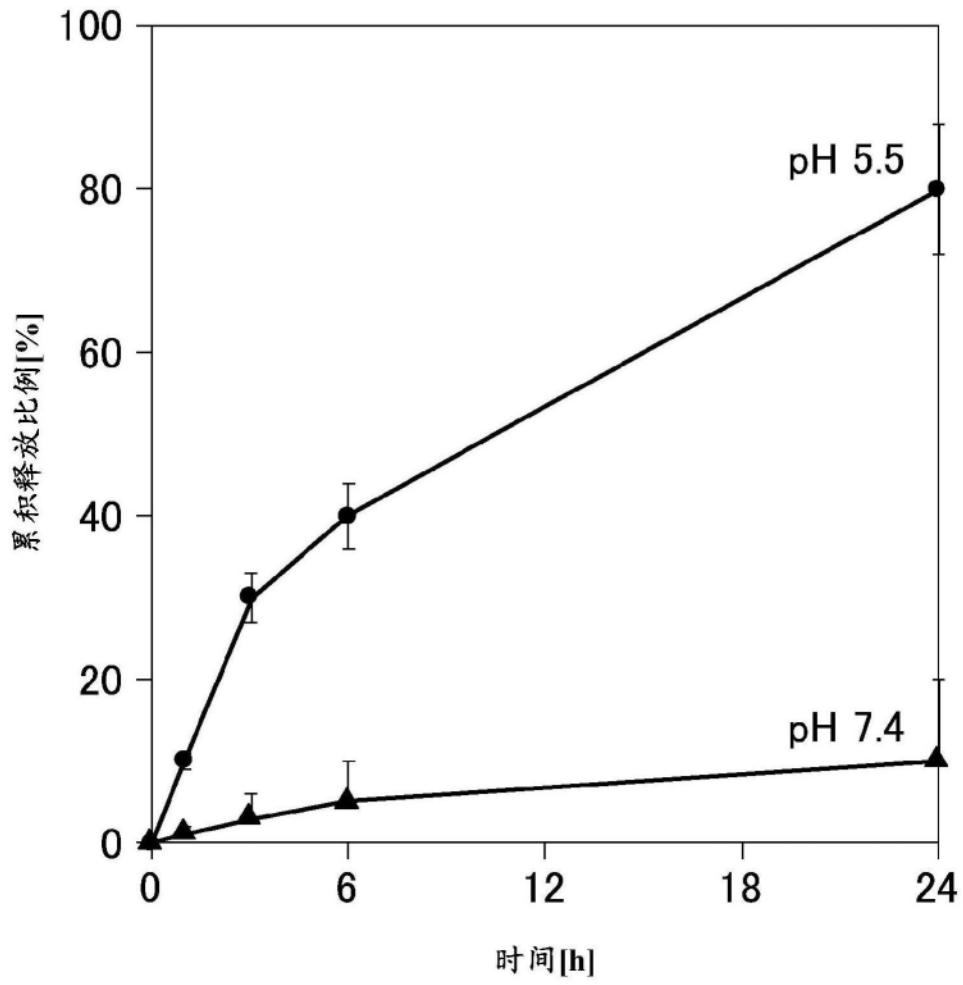


图5

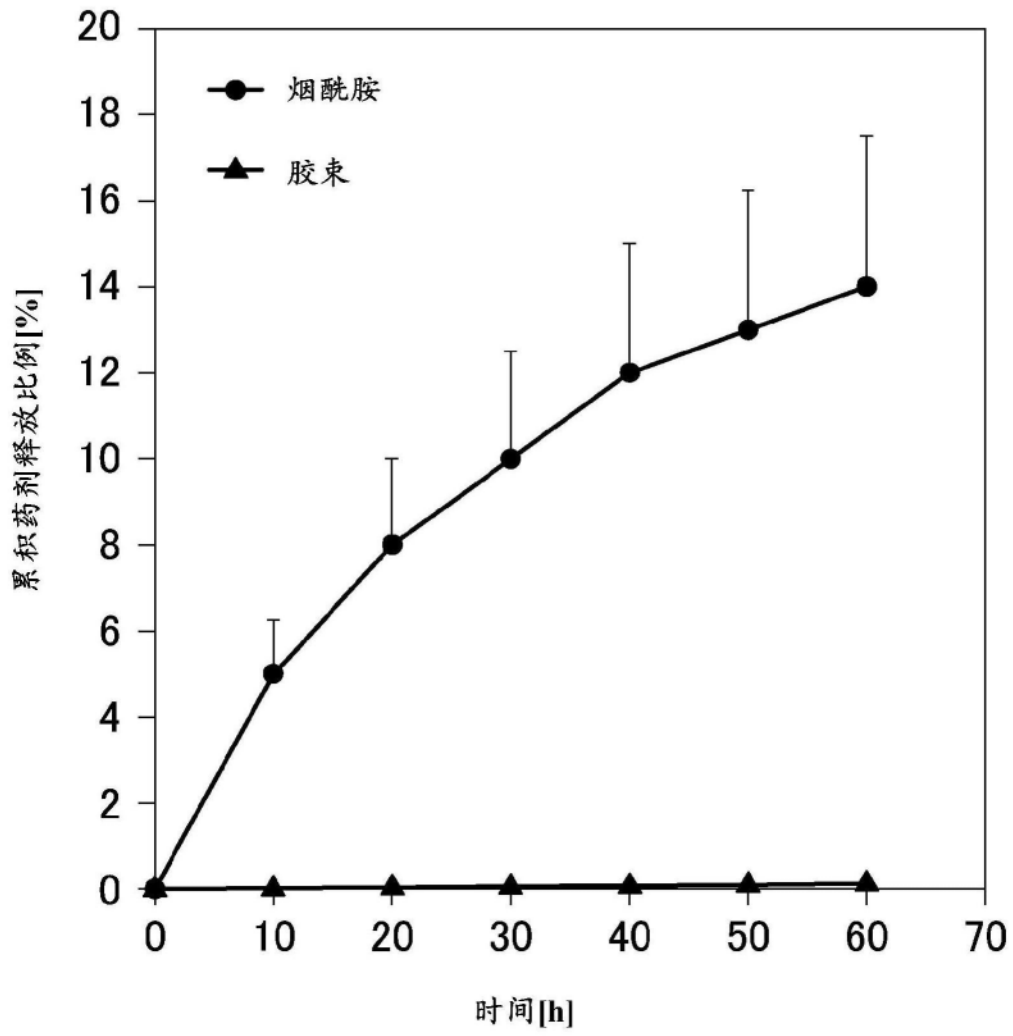


图6

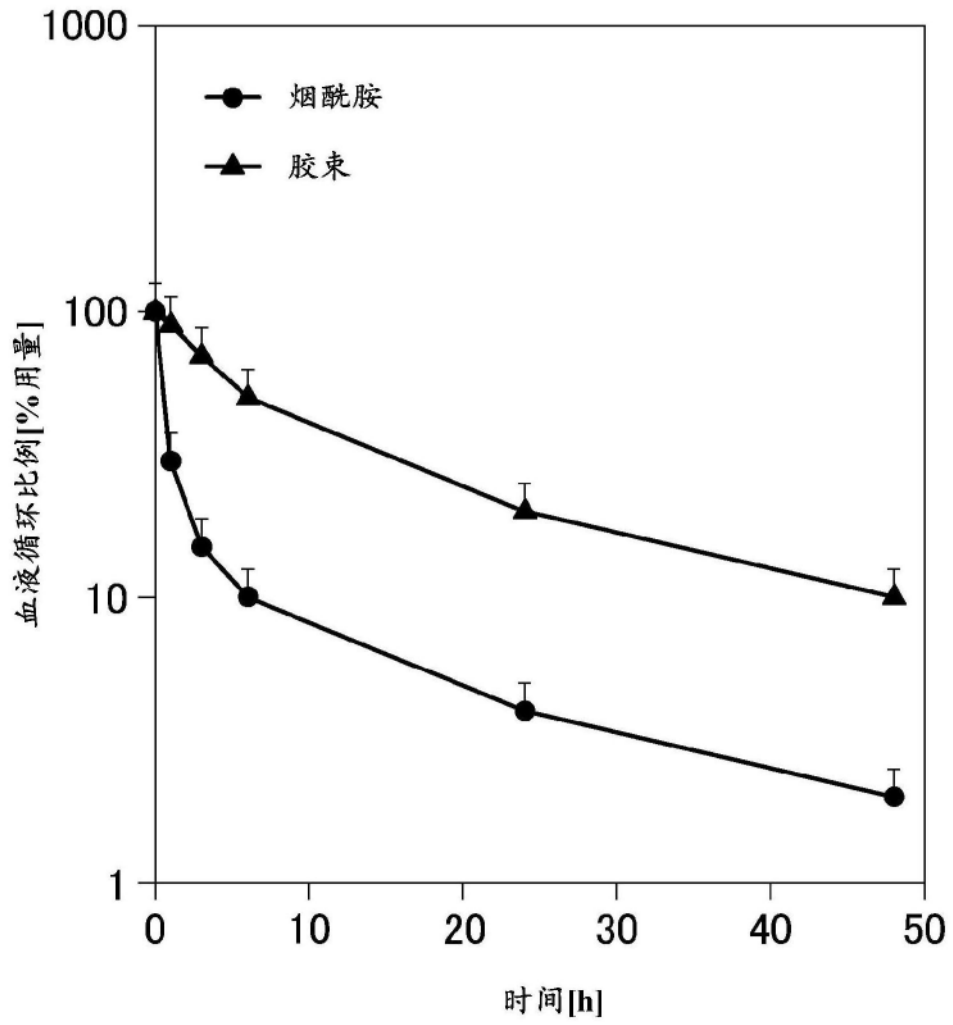


图7

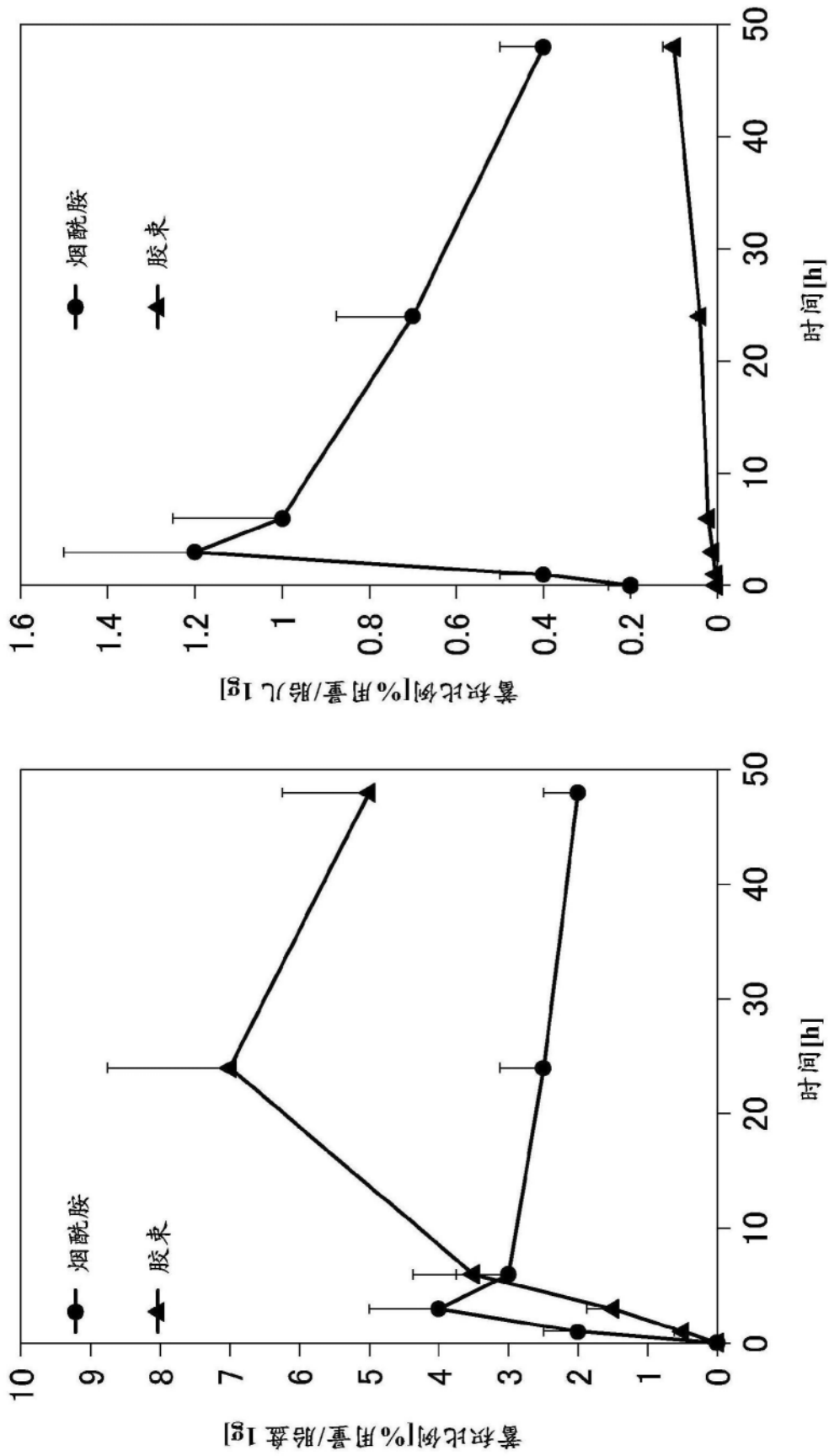


图8

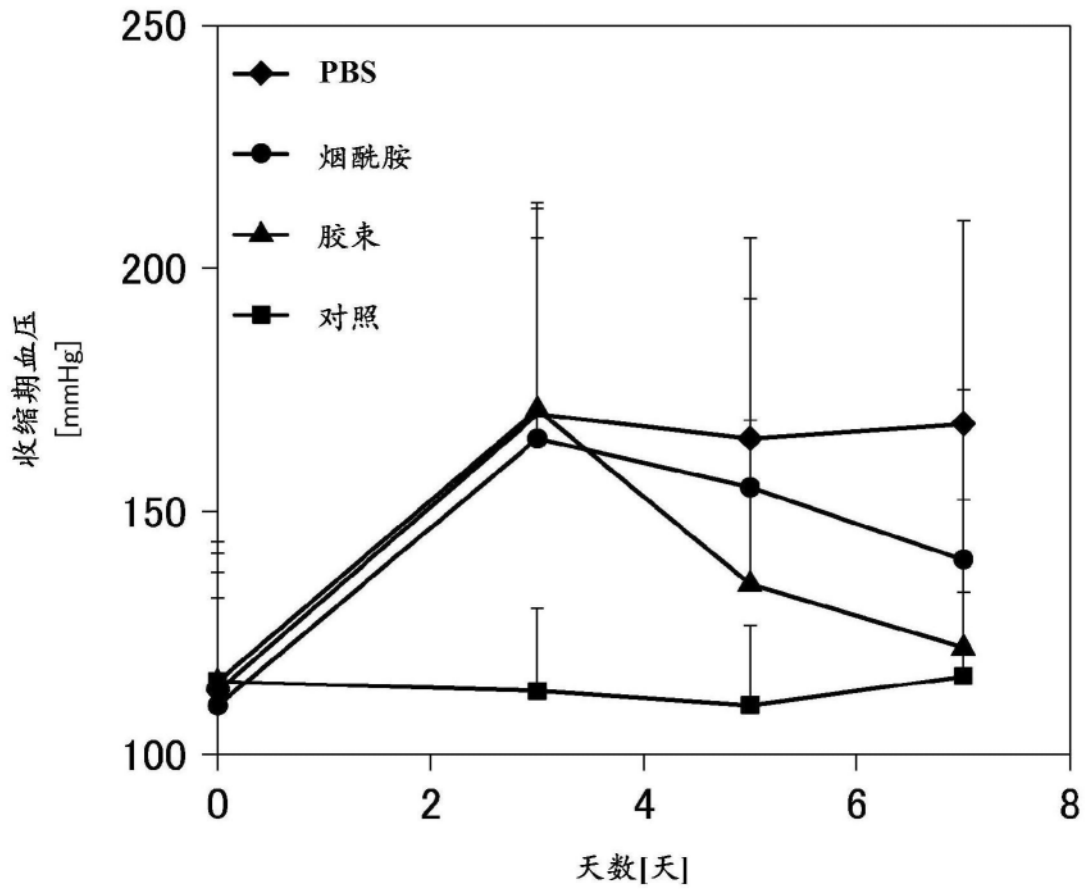


图9

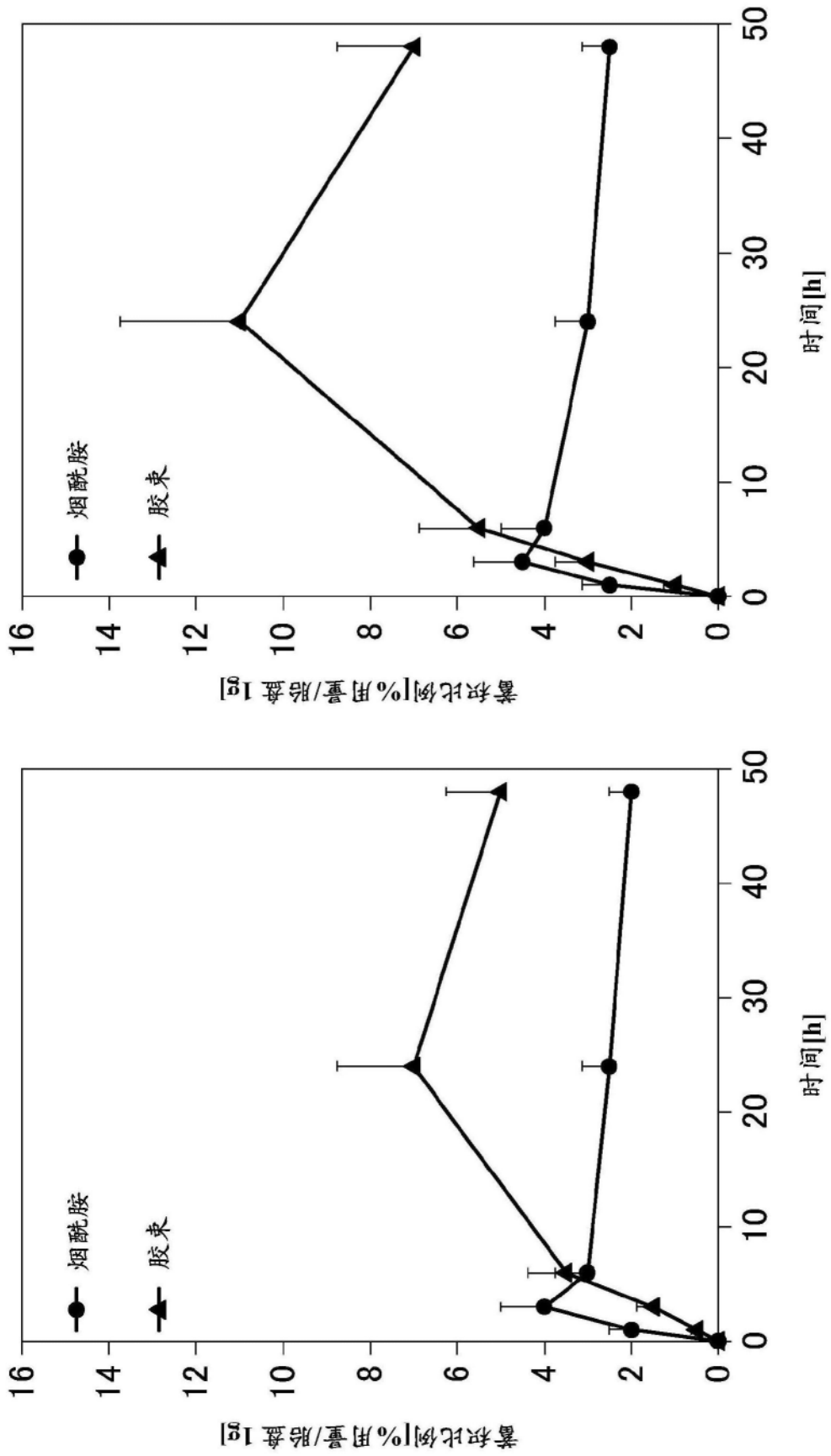


图10

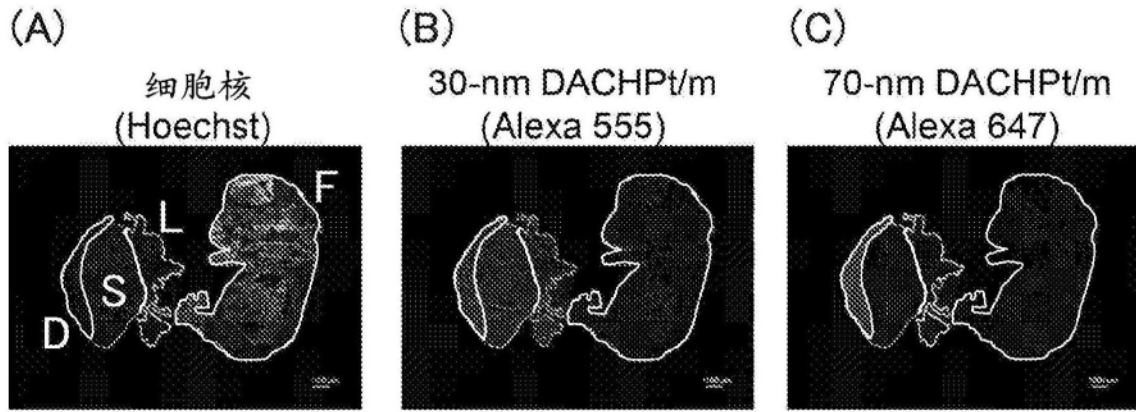
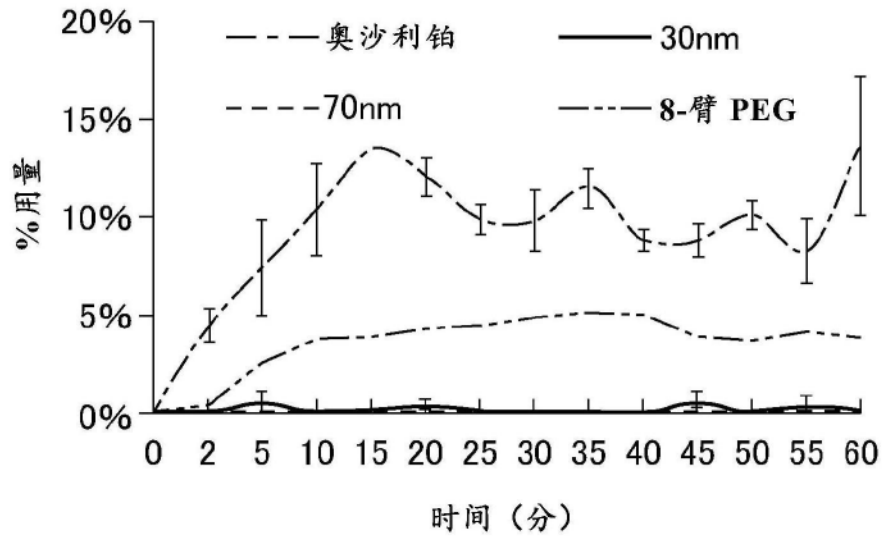


图11

A



B

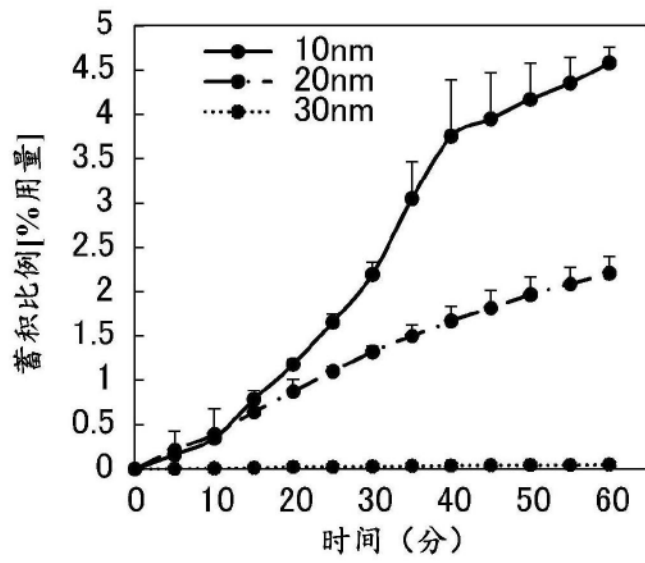


图12