

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 24 日(24.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/186204 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 25/20 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01) A61P 25/22 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/065052

(22) 国際出願日: 2016 年 5 月 20 日(20.05.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-104028 2015 年 5 月 21 日(21.05.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 片岡 一則(KATAOKA, Kazunori); 〒1138654 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 Tokyo (JP). 安楽 泰孝(ANRAKU, Yasutaka); 〒1138654 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 Tokyo (JP). 宮田 完二郎(MIYATA, Kanjiro); 〒

1138654 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 Tokyo (JP). メン ジェン(MENG, Zheng); 〒1138654 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 Tokyo (JP). 大澤 重仁(OSAWA, Shigehito); 〒1138654 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 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号丸の内北口ビル 2 1 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

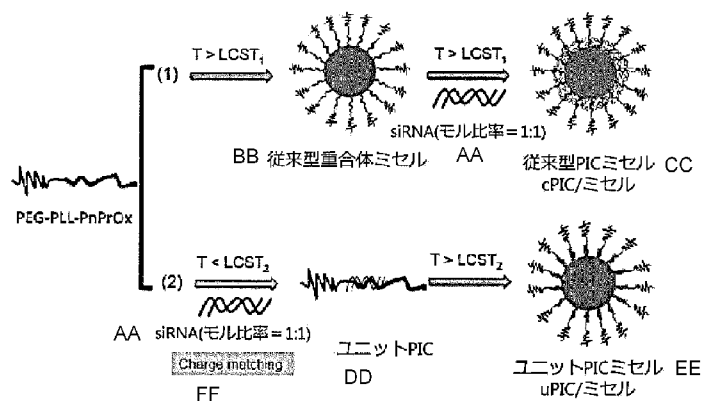
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) Title: MICELLE COMPOSITION FOR NUCLEIC ACID DELIVERY USING TEMPERATURE-SENSITIVE POLYMER AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 温度感受性重合体を用いた核酸の送達用ミセル組成物およびその製造方法



AA siRNA (molar ratio=1:1)
BB Conventional polymer micelle
CC Conventional PIC micelle
cPIC/micelle
DD Unit PIC
EE Unit PIC micelle
uPIC/micelle
FF Charge matching

(57) Abstract: Provided are a micelle for nucleic acid delivery using a temperature-sensitive polymer, and a method for producing the micelle. For example, provided is a polyion complex comprising a temperature-sensitive copolymer and a nucleic acid, wherein the temperature-sensitive copolymer comprises a cationic block and a temperature-sensitive block, said cationic block optionally carrying a hydrophilic block attached thereto, obtained by mixing the temperature-sensitive copolymer with the nucleic acid under temperature conditions not higher than the lower critical solution temperature (LCST) of the temperature-sensitive copolymer.

(57) 要約: 本発明は、温度感受性重合体を用いた核酸の送達用ミセルおよびその製造方法を提供する。例えば、温度感受性共重合体と核酸とのポリイオンコンプレックスであって、温度感受性共重合体は、カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとを有し、カチオン性ブロックには親水性ブロックが連結していてもよく、温度感受性共重合体の下限臨界

溶液温度 (LCST) 以下の温度条件下で温度感受性共重合体と核酸とを混合して得られる、ポリイオンコンプレックスが提供される。

WO 2016/186204 A1



ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

温度感受性重合体を用いた核酸の送達用ミセル組成物およびその製造方法

関連出願の参照

[0001] 本願は、特願特願 2015-104028 号（出願日：2015 年 5 月 21 日）の優先権の利益を享受する出願であり、これらは引用することによりその全体が本明細書に取り込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、温度感受性重合体を用いた核酸の送達用ミセル組成物およびその製造方法に関する。

背景技術

[0003] 核酸を送達するミセルとしては、PEG とカチオン性ポリアミノ酸を含む共重合体と核酸とにポリイオンコンプレックスを形成させて得られるミセルが知られる（特許文献 1）。このミセルは、DNA などの生化学的に安定な分子を送達する上では一定の実用性を有する。しかしながら、例えば、上記ミセルは生体内での低い安定性のために、RNA などの安定性の低い分子の送達効率において問題が残されていた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：特開第 2011-173802 号公報

発明の概要

[0005] 本発明は、温度感受性重合体を用いた核酸（例えば、siRNA）の送達用ミセルおよびその製造方法を提供する。

[0006] 本発明者らは、カチオン性ブロックを有する温度感受性重合体と生体適合性疎水基を有する核酸とを、下限臨界溶液温度（LCST）以下で結合させ、ユニット PIC を形成させてから、温度を LCST 以上としてユニット PIC にミセルを形成させると、得られたミセルは高い生体安定性を示すこと

を明らかにした。また、グルコースで覆われたミセルを特定の血糖操作を伴って投与すると、核酸を脳内に顕著に送達することができること、核酸として s i R N A を用いて脳細胞内の標的遺伝子の発現をノックダウンできることを明らかにした。本発明は、この知見に基づく発明である。

[0007] すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) 温度感受性共重合体と核酸とのポリオンコンプレックスであって、温度感受性共重合体は、カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとを有し、

温度感受性共重合体の下限臨界溶液温度 (L C S T) 以下の温度条件下で温度感受性共重合体と核酸とを混合して得ることができる、ポリオンコンプレックス。

(2) カチオン性ブロックが、カチオン性アミノ酸ポリマーブロックである、上記 (1) に記載のポリオンコンプレックス。

(3) 温度感受性共重合体が親水性ブロックを有し、親水性ブロックが、ポリエチレングリコールである、上記 (1) または (2) に記載のポリオンコンプレックス。

(4) 温度感受性共重合体が、G L U T 1 リガンドで修飾された、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のポリオンコンプレックス。

(5) 核酸が、生体適合性の疎水基で修飾されている、上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載のポリオンコンプレックス。

(6) 核酸が、s i R N A である、上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載のポリオンコンプレックス。

(7) カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとを有する温度感受性共重合体を含んでなる、ポリオンコンプレックスを作製するための組成物。

(8) カチオン性ブロックが、カチオン性アミノ酸ポリマーブロックである、上記 (7) に記載の組成物。

(9) 温度感受性共重合体が親水性ブロックを有し、親水性ブロックが、ポリエチレングリコールである、上記 (7) または (8) に記載の組成物。

(10) 温度感受性共重合体が、グルコースで修飾された、上記(7)～(9)のいずれかに記載の組成物。

(11) 上記(1)～(6)のいずれかに記載のポリオンコンプレックスを該ポリオンコンプレックスの下限臨界溶液温度(LCST)以上の温度条件下にさらして得られる、核酸を含有するミセル。

(12) 上記(11)に記載のミセルを含む、核酸送達用組成物。

(13) 上記(11)に記載のミセルであって、温度感受性共重合体がグルコースで修飾された、ミセル。

(14) 上記(13)に記載のミセルであって、ミセル中の温度感受性共重合体のグルコース修飾率が、15～40%である、ミセル。

(15) 上記(13)に記載のミセルであって、ミセル中の温度感受性共重合体のグルコース修飾率が、50～100%である、ミセル。

(16) 上記(13)または(14)に記載のミセルを含む、脳への核酸送達用組成物。

(17) 上記(13)または(15)に記載のミセルを含む、脳血管内皮細胞への核酸送達用組成物。

(18) 上記(16)または(17)に記載の脳への核酸送達用組成物であって、

組成物は、投与計画に従って対象に投与するための組成物であり、

投与計画は、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該組成物を投与することと、該対象において血糖値の上昇を誘発させることとを含む、組成物。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] 図1は、外表面がグルコースで修飾されたポリオンコンプレックス型ミセル(PICミセル)とその調製方法を示す。

[図2] 図2は、実施例1で得られたGlc(6)-Cy5-PICミセルの粒径分布の動的光散乱測定(DLS)の結果と透過型電子顕微鏡(TEM)による粒子像を示す。ここで、Glc(6)は、グルコースの6位の炭素でミ

セルを形成する高分子と結合していることを示す。

[図3]図3は、実施例1で得られたGlc(6)-Cy5-PICミセルの脳への選択的かつ効果的蓄積を示す図である。

[図4]図4は、グルコースをその3位または6位の炭素で高分子に結合させて得たミセルの脳への蓄積を示す図である。

[図5]図5は、ミセルが脳に取り込まれる際の脳実質部の蛍光顕微鏡画像(図5A)および血糖値と脳への取り込み量の推移(図5B)を示す図である。

[図6]図6は、直径100nmのPICsomeの脳への蓄積を示す図である。

[図7]図7は、グルコースで外表面を修飾したsiRNAミセルの脳への蓄積を示す。図7Aは、siRNAミセルとその調製方法を示し、図7Bは、脳への蓄積量の推移を示す。

[図8]図8は、脳細胞内へのsiRNAミセルの蓄積を示す蛍光顕微鏡像である。

[図9]図9は、グルコース1分子をコンジュゲートした高分子の脳への蓄積を示す図である。

[図10]図10は、グルコースをリンカーを介して連結させてなるIgG抗体の脳への蓄積を示す図である。G-IgGは、グルコースを連結したIgGを示す。

[図11]図11は、グルコースを腹腔内(i.p.)投与した30分後にGlc(6)-Cy5-PICミセルを静脈内(i.v.)投与した場合の脳実質における蛍光強度変化を示す図である。

[図12]図12は、Glc(6)-Cy5-PICミセルの一部が、脳血管内皮細胞に蓄積できることを示す図である。

[図13]図13は、マウス大脳皮質における静脈投与後のPICミセルの局在を示す図である。

[図14]図14は、マウス大脳皮質の切片における静脈投与後のPICミセルの局在を示す図である。

[図15]図15は、マウス大脳皮質における静脈投与後のPICミセルの継時的局

在変化を示す図である。

[図16]図16は、PEG-PLys-PnPrOxのゲル浸透クロマトグラム(a)とNMRチャート(b)を示す。図16(a)は、カップリング前のPnPrOxとPEG-PLysおよび最終生成物であるPEG-PLys-PnPrOxのGPCチャートを示す。図16(b)は、最終生成物であるPEG-PLys-PnPrOxの¹H-NMRチャートを示す。

[図17]図17は、PEG-PLys-PnPrOxによるミセル形成のスキームを示す。図17(1)は、下限臨界溶液温度(LCST)以上の温度でPEG-PLys-PnPrOxのPnPrOx部分を疎水性とし、ミセルが形成された後にsiRNAを添加してポリオンコンプレックスミセル(PICミセル)を形成するスキームを示し、図17(2)は本発明によるPICミセルを形成するスキームを示す。図17(2)では、LCST以下の温度条件下でPEG-PLys-PnPrOxとsiRNAとのイオンコンプレックス(ユニットPICまたはuPICという)を作製してから、LCST以上の温度条件下でuPICを会合させてミセルを得る方法が示されている。

[図18]図18は、作製したcPICミセルとuPICミセルのアガロース電気泳動写真である。図18(a)は、siRNAを含むミセルの電気泳動写真であり、(b)はコレステロール修飾siRNA(Chol-siRNA)を含むミセルの電気泳動写真である。

[図19]図19は、各種ミセルの平均粒径と粒径分布(PDI)を示す図である。図19では、粒径が棒グラフで示され、PDIが折れ線で示されている。

[図20]図20は、蛍光相関分光による拡散時間と本発明の温度感受性共重合体とsiRNAとの混合比率との関係を示す図である。蛍光相関分光法では、拡散時間は分子の見かけ上の粒径を反映する。

[図21]図21は、作製したcPICミセルおよびuPICのポリアニオン分子(ヘパリンナトリウム)への耐性を示す図である。

[図22]図22は、Chol-siRNAと、これを含むcPICおよびuPICのNMR分析結果を示す図である。図22(a)は、Chol-siRNAの¹H-NMRチャートを示し、(b)はChol-siRNA-cPIC／ミセルの¹H-NMRチャートを示し、(c)は、Chol-siRNA-uPIC／ミセルの¹H-NMRチャートを示す。また、図22(d)は、化学シフトから推定されるChol-siRNA-cPIC／ミセルの構造を示し、(e)は、化学シフトから推定されるChol-siRNA-uPIC／ミセルの構造を示す。

[図23]図23は、作製したuPICおよびcPICの血中滞留性を示す図である。

[図24]図24は、グルコースで被覆したChol-siRNA-uPIC／ミセルにより脳細胞にCy5で蛍光標識したsiRNAが蓄積したようすを示す図である。

[図25]図25は、グルコースで被覆したChol-siRNA-uPIC／ミセルにより脳細胞に送達されたsiRNAが標的であるBACE1遺伝子をノックダウンできることを示す図である。

発明の具体的な説明

[0009] 本明細書では、「ミセル」とは、1層の分子膜により形成される球状の集合体を意味する。ミセルとしては、界面活性剤などの両親媒性分子により形成されるミセル、および、ポリイオンコンプレックスにより形成されるミセル(PICミセル)が挙げられる。ミセルは、血中滞留時間の観点では、その外表面をポリエチレングリコールで修飾することが好ましいと知られている。

[0010] 本明細書では、「リポソーム」とは、2層の分子膜により形成される小胞を意味する。分子膜は通常はリン脂質による二重膜である。

[0011] 本明細書では、「ポリイオンコンプレックス」(以下、「PIC」ともいう)とは、アニオン性ブロックを有する重合体とカチオン性ブロックを有する重合体とのイオン性複合体を意味し、PEGとアニオン性ブロックとの共

重合体と、PEGとカチオン性ブロックとの共重合体とを水溶液中で荷電を中和するように混合すると形成されることで知られている。本明細書では、「ポリオンコンプレックスミセル」（以下、「PICミセル」ともいう）とは、PICにより形成されるミセルを意味する。PICミセルにおいて、PEGと上記の荷電性連鎖とを結合させる意義は、ポリオンコンプレックスが凝集して沈殿することを抑制すること、および、それにより、ポリオンコンプレックスが粒径数十nmの単分散なコア-シェル構造を有するナノ微粒子を形成することである。この際、PEGはナノ微粒子の外殻（シェル）を覆うため、生体適合性が高く、血中滞留時間を向上させる点で都合がよいことでも知られている。また、ポリオンコンプレックス形成において、一方の荷電性ブロックコポリマーは、PEG部分を必要としない。例えば、ポリオンコンプレックス形成において、一方の荷電性ブロックコポリマーは、ホモポリマーまたは核酸に置き換えてもよい。核酸およびPEGとカチオン性ブロックとの共重合体により形成されるPICミセルは、核酸の薬剤送達に用いることができる。

[0012] 本明細書では、「ユニットポリオンコンプレックス」（以下、「uPIC」または「ユニットPIC」ともいう）とは、アニオン性重合体（例えば、核酸）と、ポリエチレングリコール（PEG）などの親水性ブロックとカチオン性ブロックとを有する温度感受性共重合体とを下限臨界溶液温度（LCST）以下の温度で水溶液中で混合して得られる複合体を意味する。この複合体は、ブロック共重合体のカチオン性ブロックとアニオン性重合体（例えば、核酸）との間でイオン性結合が生じることにより形成されるものであるから、ポリオンコンプレックス（以下、「PIC」ともいう）の一種である。このようなPICは、カチオン性の分子とアニオン性の分子との複合体の形態であると考えられるものの、ミセル形態をとっていないと考えられ、溶液の温度をLCST以上にすることで、ミセル化することができる。本明細書では、uPICを含有する溶液の温度をLCST以上にして得られるミセルを、「uPIC／ミセル」と呼ぶことがある。

[0013] 本明細書では、「温度感受性」とは、温度に依存して水溶性から難水溶性に変化する（または難水溶性から水溶性に変化する）性質を意味する。本発明の重合体において、本発明の重合体である温度感受性共重合体、例えば、温度感受性三元共重合体（すなわち、親水性ブロックと温度感受性ブロックとポリカチオン性ブロックの三元共重合体）の温度感受性部分は、分子に固有の下限臨界溶液温度（LCST）を有し、LCSTより低い温度条件下では親水性であり水溶性であるが、LCSTより高い温度条件下では疎水性であり難水溶性である。本発明の重合体は、温度感受性の重合体部分とその他の部分との共重合体であり、それ故に温度感受性を示す共重合体である。従って、本明細書では、本発明の重合体を本発明の温度感受性共重合体と呼ぶことがある。

[0014] 本明細書では、「低血糖を誘発させる」とは、対象において、その処置がされなければ示したはずの血糖よりも血糖値を低下させることをいう。低血糖を誘発させる方法としては、糖尿病薬の投与などが挙げられる。例えば、低血糖を誘発させる際に、低血糖を誘発させるという目的を達する限りにおいて、例えば、他の薬剤を摂取し、または水などの飲料を飲むことは許容される。低血糖を誘発させることは、血糖に実質的に影響しない他の処置を伴ってもよい。

[0015] 本明細書では、「絶食させる」とは、対象に絶食、例えば、3時間以上、5時間以上、10時間以上、15時間以上、20時間以上、25時間以上、30時間以上、35時間以上、40時間以上、45時間以上または48時間以上の絶食をさせることを意味する。絶食により対象は低血糖を引き起こす。絶食期間は、対象の健康状態に鑑みて医師等により決定され、例えば、対象が空腹時血糖に達するのに十分な時間であればよい（例えば、72時間以内、48時間以内または24時間以内とすることができる）。絶食期間は、例えば、脳血管内皮細胞の血管内表面でのGLUT1の発現が増大する、またはプラトーに達する以上の時間としてもよい。絶食期間は、例えば、12時間以上、24時間以上または36時間以上である上記期間とすることができる。

きる。また、絶食は、血糖値やGLUT1の血管内表面での発現に実質的に影響しない他の処置を伴ってもよい。

[0016] 本明細書では、「血糖値の上昇を誘発させる」とは、低血糖を誘発させた対象、または、低血糖状態を維持させた対象において血糖値を上昇させることをいう。血糖値は、当業者に周知の様々な方法により上昇させることができるが、例えば、血糖値の上昇を誘発するものの投与、例えば、グルコース、フルクトース（果糖）、ガラクトースなどの血糖値の上昇を誘発する単糖の投与、マルトースなどの血糖値の上昇を誘発する多糖の投与、若しくは、デンプンなどの血糖値の上昇を誘発する炭水化物の摂取、または、食事により上昇させることができる。

[0017] 本明細書では、「血糖操作」とは、対象に対して、低血糖を誘発させ、その後、血糖値を上昇させることをいう。対象に対して低血糖を誘発させた後は、対象の血糖値を低血糖に維持することができる。対象の血糖値を低血糖に維持する時間は、例えば、0時間以上、1時間以上、5時間以上、10時間以上、15時間以上、20時間以上、30時間以上、40時間以上、48時間以上とすることができる。その後、血糖値を上昇させることができる。本明細書では、「血糖を維持する」とは、対象において低血糖を維持するという目的を達する限りにおいて、例えば、他の薬剤を摂取し、または水などの飲料を飲むことは許される。低血糖を誘発させることは、血糖に実質的に影響しない他の処置を伴ってもよい。

[0018] 本明細書では、「対象」とは、ヒトを含む哺乳動物である。対象は、健常の対象であってもよいし、何らかの疾患に罹患した対象であってもよい。ここで疾患としては、脳神経疾患、例えば、精神病性障害、うつ病、気分障害、不安、睡眠障害、認知症および物質関連障害が挙げられる。また、認知症としては、特に限定されないがアルツハイマー病およびクロイツフェルト・ヤコブ病が挙げられる。

[0019] 本明細書では、「血液脳関門」とは、血行と脳の間が存在して物質の透過に対して選択性を持つ機能的障壁をいう。血液脳関門の実態は、脳血管内皮

細胞などであると考えられている。血液脳関門の物質透過性については、不明な点が多いが、グルコース、アルコールおよび酸素は血液脳関門を通過し易いことが知られ、脂溶性物質や小分子（例えば、分子量500未満）は、水溶性分子や高分子（例えば、分子量500以上）に比べて通過し易い傾向があると考えられている。多くの脳疾患治療薬や脳診断薬が血液脳関門を通過せず、このことが脳疾患の治療や脳の分析等の大きな障害となっている。本明細書では、「血液神経関門」とは、血行と末梢神経の間に存在して物質の透過に対して選択性を持つ機能的障壁をいう。本明細書では、「血液髄液関門」とは、血行と脳脊髄液との間に存在して物質の透過に対して選択性を持つ機能的障壁をいう。本明細書では、「血液網膜関門」とは、血行と網膜組織の間に存在して物質の透過に対して選択性を持つ機能的障壁をいう。血液神経関門、血液髄液関門および血液網膜関門の実体は、それぞれの関門に存在する血管内皮細胞などであると考えられており、その機能は血液脳関門と同様であると考えられている。

[0020] 本明細書では、「GLUT1リガンド」とは、GLUT1と結合する物質を意味する。GLUT1リガンドとしては、様々なリガンドが知られ、特に限定されないが例えば、グルコースおよびヘキソースなどの分子が挙げられ、GLUT1リガンドは、いずれも本発明でグルコースの代わりにキャリアまたはコンジュゲートの調製に使用することができる。GLUT1リガンドは、好ましくはGLUT1に対してグルコースと同等またはそれ以上の親和性を有する。2-N-4-(1-アジ-2,2,2-トリフルオロエチル)ベンゾイル-1,3-ビス(D-マンノース-4-イルオキシ)-2-プロピルアミン(ATB-BMPA)、6-(N-(7-ニトロベンズ-2-オキサー-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ)-2-デオキシグルコース(6-NBDG)、4,6-O-エチリデン- α -D-グルコース、2-デオキシ-D-グルコースおよび3-O-メチルグルコースもGLUT1と結合することが知られ、これらの分子もGLUT1リガンドとして本発明に用いることができる。

[0021] 本発明者らは、カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとの共重合体と、アニオン性重合体（例えば、核酸）とを該共重合体のLCST以下の温度条件下で混合すると、本発明の温度感受性共重合体とアニオン性重合体（例えば、核酸）との複合体（ユニットポリイオンコンプレックス）が形成されること（図17（b）のユニットPIC参照）、但し、ユニットPICはこの温度条件下ではミセルを形成していないこと、および、その後に温度条件をLCST以上にすると、uPICがsiRNAをコアに取り込んだミセルが形成されることを見出した。得られたミセルは、解析により三層構造を有するミセルであると予想された（図22（e））。このようにして得られるuPIC／ミセルは、安定性が高く、例えば、生体内に多く存在するポリアニオンに誘起される崩壊に耐性を有し、かつ、高い血中滞留性を示した。また、安定であるが故に、グルコースでミセル表面を被覆したuPICミセルを血糖操作と共に静脈投与したところ、脳への核酸の送達が達成された。本発明者らは更に、siRNAを脳実質に送達する実験により、標的となるmRNAの発現レベルを顕著に低下させること（ノックダウン）にも成功した。経静脈によるボラス投与により、体内組織にこれほどまでの大量なsiRNA分子を送達する事例は今までに知られておらず、極めて驚くべき成果であるといえる。

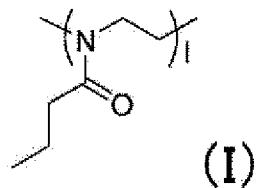
[0022] 本発明では、温度感受性共重合体として、カチオン性ブロックと、温度感受性ブロックとを有する共重合体を用いることができる。本発明ではまた、温度感受性共重合体として、温度感受性三元共重合体、すなわち、親水性ブロックと、カチオン性ブロックと、温度感受性ブロックとを有する共重合体を用いることができる。親水性ブロック（例えば、PEG）は、例えば、温度感受性共重合体のポリカチオンに連結することができ、これにより、ミセル化後は、温度感受性ブロックがミセルのコアに位置し、PEGはナノ微粒子の外殻（シェル）を覆うことができる。このようにしてPEGでミセルを覆うことにより、ミセルの生体適合性を高め、血中滞留時間を向上させることができる。

[0023] カチオン性ブロックは、カチオン性単位の重合体であり、例えば、カチオン性アミノ酸、例えば、カチオン性非天然アミノ酸またはカチオン性天然アミノ酸、例えば、ヒスチジン、トリプトファン、オルニチン、アルギニンおよびリジンなどのカチオン性天然アミノ酸、および／または、 $-(NH-(CH_2)_2)_p-NH_2$ で表される基 {ここで、 p は1～5の整数である。}を側鎖として有するポリマーブロック、例えば、上記カチオン性の側鎖を有するカチオン性非天然アミノ酸のポリマーブロック、例えば、上記カチオン性の側鎖を有するアスパラギン酸またはグルタミン酸などのカチオン性非天然アミノ酸のポリマーブロックが挙げられる。本発明のある態様では、ポリカチオンブロックは、 $-(NH-(CH_2)_2)_p-NH_2$ で表される基 {ここで、 p は1～5の整数である。}を側鎖として有するポリマーブロックとすることができる。ここで、カチオン性天然アミノ酸としては、好ましくはヒスチジン、トリプトファン、オルニチン、アルギニンおよびリジンが挙げられ、より好ましくはアルギニン、オルニチンおよびリジンが挙げられ、さらに好ましくはオルニチンおよびリジンが挙げられ、さらにより好ましくはリジンが挙げられる。

[0024] 温度感受性ブロックとしては、 $s iRNA$ が安定な温度範囲にLCSTが存在する限り特に限定されないが、例えば、 N -イソプロピルアクリルアミドの重合体および共重合体、 2 -イソプロピル- 2 -オキサゾリンの重合体および共重合体、並びに 2 - n -プロピル- 2 -オキサゾリンの重合体および共重合体が挙げられる。このような重合体および共重合体は、当業者であれば適宜作成することができ、本発明で用いることができる。

[0025] ポリ(2 - n -プロピル- 2 -オキサゾリン)は、以下の化学構造(1)を有する。

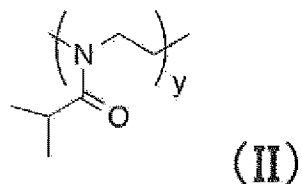
[化1]



{式中、 l は、 $10 \sim 5000$ 、 $10 \sim 1000$ 、 $50 \sim 500$ 、 $100 \sim 300$ 、または $150 \sim 200$ のいずれかの整数である。}

[0026] また、ポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)は、以下の化学構造(II)を有する。

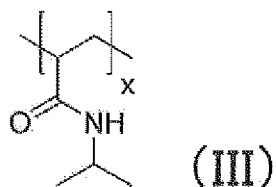
[化2]



{式中、 y は $10 \sim 5000$ 、 $10 \sim 1000$ 、 $50 \sim 500$ 、 $100 \sim 300$ 、または $150 \sim 200$ のいずれかの整数である。}

[0027] また、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)は、以下の化学構造(III)を有する。

[化3]



{式中、 x は、 $10 \sim 5000$ 、 $10 \sim 1000$ 、 $50 \sim 500$ 、 $100 \sim 300$ 、または $150 \sim 200$ のいずれかの整数である。}

[0028] カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとは、直接またはリンカーを介して連結することができる。合成の便宜上リンカーを用いる場合には、ジベ

ンジルシクロオクチンNHSエステル（DBCO-NHS）を用いると合成手順が簡略化されて好ましい。

[0029] 温度感受性共重合体は、さらに親水性ブロックを有していてもよく、例えば、親水性ブロックーポリカチオン性ブロックー温度感受性ブロックがこの順番で連結した共重合体とすることができる。

[0030] 親水性ブロックとしては、生体適合性の親水性ポリマーを用いることができ、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）を用いることができる。本発明のuPIC／ミセルを脳への送達を目的として用いる態様では、温度感受性共重合体のPEG側の末端には、さらにGLUT1リガンド（例えば、グルコース）が連結していてもよい。このようにすることで、本発明のuPIC／ミセルは、その表面がGLUT1リガンドで被覆されることとなる。

[0031] 本発明のある態様では、温度感受性共重合体はPEGーポリカチオンー温度感受性ブロックがこの順番で連結した共重合体とすることができる。ほかのある態様では、温度感受性共重合体は、PEGーポリカチオンーポリ（2－n－プロピル－2－オキサゾリン）、PEGーポリカチオンーポリ（2－イソプロピル－2－オキサゾリン）、またはPEGーポリカチオンーポリ（N－イソプロピルアクリルアミド）とすることができる。ある態様では、PEGーポリリジンーポリ（2－n－プロピル－2－オキサゾリン）、PEGーポリリジンーポリ（2－イソプロピル－2－オキサゾリン）、またはPEGーポリリジンーポリ（N－イソプロピルアクリルアミド）とすることができる。

[0032] さらに本発明のある態様では、温度感受性共重合体は、GLUT1リガンドーPEGーポリカチオンー温度感受性ブロックがこの順番で連結した共重合体とすることができる。ほかのある態様では、温度感受性共重合体は、GLUT1リガンドーPEGーポリカチオンーポリ（2－n－プロピル－2－オキサゾリン）、GLUT1リガンドーPEGーポリカチオンーポリ（2－イソプロピル－2－オキサゾリン）、またはGLUT1リガンドーPEGーポリカチオンーポリ（N－イソプロピルアクリルアミド）とすることができる。

きる。ある態様では、GLUT1リガンドーPEGーポリリジンーポリ（2ーnープロピルー2ーオキサゾリン）、GLUT1リガンドーPEGーポリリジンーポリ（2ーnープロピルー2ーオキサゾリン）、またはGLUT1リガンドーPEGーポリリジンーポリ（Nーイソプロピルアクリルアミド）とすることができる。好ましい態様では、上記においてGLUT1リガンドはグルコースである。

[0033] 本発明の温度感受性共重合体は、ユニットPICを作成するために用いることができる。従って、本発明によれば、本発明の温度感受性共重合体を含んでなる、ユニットPICを作成するための組成物が提供される。本発明では、温度感受性共重合体を含んでなる上記組成物は、温度感受性共重合体のLCST以下の温度において核酸と混ぜることに用いられる。

[0034] 本発明では、核酸をポリアニオンとして用いることができる。ここで、核酸としては例えばsiRNAを用いることができる。siRNAは、RNA干渉（RNAi）を誘導することができる二本鎖RNA（核酸）を意味する。siRNAは、特に限定されないが、20～30bp、好ましくは、21～23bp、25bp、27bpからなる二本鎖RNAであって、標的遺伝子の配列と相同な配列を有する二本鎖RNAである。核酸としてはsiRNAの他にショートヘアピンRNA（shRNA）を用いてもよい。核酸としては、他のRNAを用いてもよい。siRNAは、ポリアニオンとしての性質はその配列によらず変わらないから、配列は標的配列に基づいて自由に設計してよい。siRNAは、DNAとのキメラRNAであってもよい。

[0035] 本発明で用いられるuPIC／ミセルは、特に限定されないが、例えば、その直径が400nm以下、200nm以下、150nm以下、100nm以下または80nm以下であり、例えば、20nm以上、30nm以上または40nm以上である。本発明で用いられるuPIC／ミセルは、例えば30nm～150nm、または、例えば30nm～100nmの直径を有する。

[0036] 本発明で用いられるuPIC／ミセルは、EPR効果により腫瘍に集積す

ることができる。従って、本発明は、腫瘍を抑制することのできる核酸を含むu P I C／ミセルを含んでなる、腫瘍の治療に用いるための医薬組成物を提供する。

[0037] グルコースで被覆したu P I C／ミセルは、対象に投与するだけでも脳への蓄積を示す。従って、本発明による投与計画では、絶食若しくは低血糖を誘発させなくてよく、および／または、血糖値の上昇を誘発させなくてもよい。また、グルコースが表面に露出するようにグルコースでその外表面を修飾したu P I C／ミセルをある投与計画に従って投与すると、顕著にu P I Cが血液脳関門を超えて脳内（脳実質部）に送達される。従って、本発明による投与計画は、好ましくは、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該u P I C／ミセルを投与することを含むが、より好ましくは、本発明による投与計画は、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該u P I C／ミセルを投与することおよび該対象において血糖値の上昇を誘発させることを含む。本発明による投与計画では、該u P I C／ミセルは、該対象における血糖値の上昇の誘発と、同時に、連続してまたは逐次的に該対象に投与され得る。投与計画は、該対象へのu P I C／ミセルの投与と該対象における血糖値の上昇の誘発との間にインターバルを有してもよいし、有さなくてもよい。該u P I C／ミセルが該対象における血糖値の上昇の誘発と同時に投与される場合には、該u P I C／ミセルは、血糖値の上昇の誘発を引き起こす薬剤と混合した形態で該対象に投与してもよいし、該対象における血糖値の上昇の誘発を引き起こす薬剤とは別の形態で投与してもよい。また、該u P I C／ミセルは、該対象における血糖値の上昇の誘発と、連続してまたは逐次的に該対象に投与される場合には、該u P I C／ミセルは該対象における血糖値の上昇の誘発より前に該対象に投与してもよいし、後に投与してもよいが、好ましくは、該u P I C／ミセルは該対象における血糖値の上昇の誘発より前に該対象に投与することができる。該対象への該u P I C／ミセルの投与よりも先に該対象において血糖値の上昇を誘発させる場合には、該対象において血糖値の上昇を誘発させてから、1時間以内、45分以

内、30分以内、15分以内または10分以内に該対象に該u P I C／ミセルを投与することが好ましい。また、該対象への該u P I C／ミセルの投与よりも後に該対象において血糖値の上昇を誘発させる場合には、該対象に該u P I C／ミセルを投与してから、6時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内、45分以内、30分以内、15分以内または10分以内に該対象において血糖値の上昇を誘発させることが好ましい。上記の投与計画のサイクルは、2回以上行なってもよい。グルコース投与とミセル投与との前後関係は、血液脳関門を通過させるタイミングにより決定することができる。

[0038] 大脳皮質は6層で構成され、表層から、分子層（第1層）、外顆粒層（第2層）、外錐体細胞層（第3層）、内顆粒層（第4層）、内錐体細胞層（第5層）および多形細胞層（第6層）が存在するが、これらのいずれの層においても脳実質にキャリアを送達することができる。これらの層の中では特に、外錐体細胞層（第3層）および内顆粒層（第4層）においてキャリアの送達が顕著に有効である。

[0039] 以下、本発明におけるグルコースの血液脳関門における役割を説明する。本発明におけるグルコースの役割は、脳の血管内皮細胞の血管内表面に発現するグルコーストランスポーターであるG L U T 1に結合することであると考えられる。従って、本発明では、G L U T 1リガンドもグルコースと同じ役割を果たすことができる。また、本発明では、G L U T 1リガンドは、脳の血管内皮細胞の血管内表面に発現するグルコーストランスポーターに結合することができるように、その外表面に露出するように結合させることができる。従って、G L U T 1にG L U T 1リガンドを提示することができる分子、複合体およびミセルその他であれば、G L U T 1と結合し得、結合後にグルコースによりG L U T 1が細胞内に取り込まれる際に、一緒に血管内皮細胞内に取り込まれるものと考えられる。また、血管内皮細胞に取り込まれると、取り込まれたミセルは、血液脳関門を通過して脳実質に移行する。ミセルを修飾するグルコース分子が多いと、脳実質に到達するミセルの割合がわずかであるが低下した。このことは、ミセルを修飾するグルコース分子が

多いと、ミセルがエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、そのまま、細胞を脳実質に向けて通過すること、および、ミセルが血管内皮細胞から脳実質に移行する際に、ミセルと血管内皮細胞との解離の効率が低下することを示唆するものである。言い換えれば、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれたミセルの一部は、脳血管内皮細胞と解離せず、脳血管内皮細胞に蓄積する。従って、本発明のGLUT1リガンドで被覆されたuPIC／ミセルは、脳血管内皮細胞に送達することに用いることができる。また、本発明におけるグルコースの役割は、血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門においても、同様である。特に、血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門においても、低血糖時の血管内皮細胞にはGLUT1が発現する。従って、本発明のGLUT1リガンドで被覆されたuPIC／ミセルは、血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門を通過させるために用いることができる。本発明のGLUT1リガンドで被覆されたuPIC／ミセルはまた、血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門に存在する血管内皮細胞に送達することに用いることもできる。

[0040] グルコースをその3位の炭素を介してコンジュゲートした高分子を用いて得られるミセルよりも、グルコースをその6位の炭素を介してコンジュゲートした高分子（例えば、図1（a）参照）を用いて得られるミセルの方が脳への取り込み効率が高い。GLUT1とグルコースとの結合には、1位、3位および4位の炭素原子の置換基であるOH基が強く関与していることが知られている。GLUT1との結合に使われない6位の炭素原子を介して高分子を修飾して得たミセルの方がより効果的に脳に蓄積しやすいことは、脳蓄積へのGLUT1の関与を示す。また、GLUT1との認識に重要と言われる3位の炭素原子を介して高分子を修飾して得たミセルでも脳への蓄積を示した。このことは、GLUT1との結合への関与が低い2位の炭素原子を介して高分子を修飾して得たミセルではより多くのミセルの脳への蓄積が起こることを示す。従って、グルコースは、その1位、3位および4位の炭素原子のいずれか1つの炭素原子を介して、好ましくはその2位の炭素または6

位の炭素原子を介して高分子や薬剤とコンジュゲートさせることができる。ある態様では、温度感受性共重合体にコンジュゲートしたグルコースの少なくとも、1位、3位および4位のOH基が還元末端である。このように本発明では、GLUT1リガンドは、そのリガンドとしての機能を失わないように温度感受性共重合体を修飾させることができ、当業者であればGLUT1との結合様式に基づき容易に薬剤との結合箇所を決定できる。本明細書では、 n 位の炭素原子を介して結合したグルコースを「Glc(n)」{但し、 n は、1～4および6のいずれかの整数である}と表記することがある。例えば、本明細書では、6位の炭素原子を介して結合したグルコースを「Glc(6)」と表記し、2位の炭素原子を介して結合したグルコースを「Glc(2)」と表記し、3位の炭素原子を介して結合したグルコースを「Glc(3)」と表記することがある。

[0041] 本発明では、グルコースの代わりにGLUT1に結合するグルコースの誘導体を用いてもよいであろう。

[0042] 従って、核酸を脳に送達するためには、温度感受性共重合体は、GLUT1リガンドでさらに修飾されていてもよく、GLUT1リガンドー親水性ブロックーポリカチオン性ブロックー温度感受性ブロックがこの順番で連結した共重合体とすることができる。GLUT1リガンドとしては、例えばグルコースを用いることができる。このようにすることで、ミセル形成後、GLUT1リガンドをミセル表面に露出させることができる。

[0043] 脳実質にuPIC／ミセルを送達する場合において、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体と、GLUT1リガンドで修飾されていない温度感受性共重合体とは、uPIC／ミセル中で混在していてもよい。例えば、uPIC／ミセル中では、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体の全温度感受性共重合体に対する含有量（モル％）は、例えば、10～100％とすることができ、15～50％とすることができ、20～40％とすることができる。

[0044] また、脳の血管内皮細胞にuPIC／ミセルを送達する場合において、G

GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体と、GLUT1リガンドで修飾されていない温度感受性共重合体とは、uPIC／ミセル中で混在していてもよい。例えば、uPIC／ミセル中では、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体の全温度感受性共重合体に対する含有量（モル％）は、例えば、10～100％とすることができ、50～100％とすることができ、80～100％とすることができる。

[0045] 血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門にuPIC／ミセルを通過させる場合においても同様である。すなわち、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体と、GLUT1リガンドで修飾されていない温度感受性共重合体とは、uPIC／ミセル中で混在していてもよい。例えば、uPIC／ミセル中では、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体の全温度感受性共重合体に対する含有量（モル％）は、例えば、10～100％とすることができ、15～50％とすることができ、20～40％とすることができる。また、血液神経関門、血液網膜関門および血液髄液関門に存在する血管内皮細胞内にuPIC／ミセルを送達する場合には、uPIC／ミセル中では、GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体の全温度感受性共重合体に対する含有量（モル％）は、例えば、10～100％とすることができ、50～100％とすることができ、80～100％とすることができる。

[0046] GLUT1リガンドで修飾された温度感受性共重合体の全温度感受性共重合体に対する含有量（モル％）がいかなる数値であったとしても、脳実質および脳血管内皮細胞の両方に核酸は送達される。含有量が増加するほど脳血管内皮細胞への蓄積量が増加する傾向があるので、当業者であれば目的に応じて自由に望ましい含有量を決定することができる。

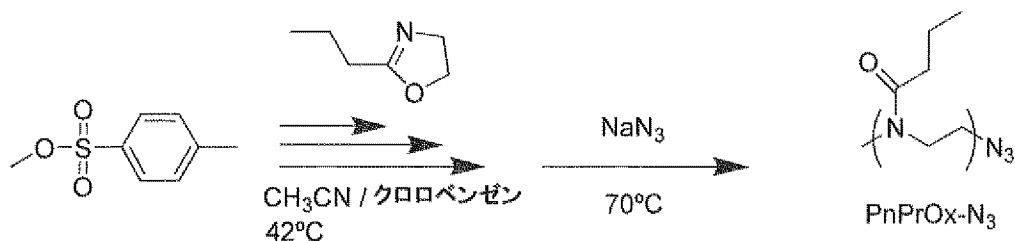
[0047] 本発明では、核酸は、生体適合性の疎水基で置換されていてもよい。特に、本発明のある態様では、核酸はsiRNAであり、生体適合性の疎水基はコレステリル基である。すなわち、ある態様では、siRNAミセルは、コレステロールをコンジュゲートしたsiRNAと、本発明の温度感受性共重

合体またはその塩とをLCST以下の温度条件下で混合し、温度感受性共重合体とsiRNAとのユニットPICを形成させてから、温度をLCST以上の温度にして得られる。siRNAと温度感受性共重合体の混合比は、それぞれが有する総電荷量の比において、1:10~10:1、好ましくは1:5~5:1、より好ましくは1:2~2:1、さらに好ましくは1:1、5~1.5:1、または約1:1とすることができる。本明細書において「約」とは、50%未満、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下または5%以下の誤差を含んでいてもよいことを意味する。混合比は、例えば、正電荷と負電荷とが中和するような化学量論比とすることができる。塩は、好ましくは、薬学的に許容可能な塩である。コレステロールをコンジュゲートしたsiRNAは、特に限定されないが、RNA鎖の5'末端または3'末端にコレステロールがコンジュゲートしたsiRNAであるが、これらは当業者であれば適宜合成することができ、または、カスタム合成により商業的に入手可能であり、本発明で用いることができる。siRNAは、特に限定されないが、好ましくは、センス鎖の3'末端またはアンチセンス鎖の5'末端若しくは3'末端にコレステロールをコンジュゲートさせることができる。例えば、コレステロールは、周知技術によりカルバメート結合を介してsiRNAに導入することができる。

[0048] 本発明の温度感受性共重合体の合成スキームを説明するために、PEG-ポリリジン-P n P r O x の合成スキームの一例を以下に示す。

[0049] スキーム1 : P n P r O xの合成

[化4]

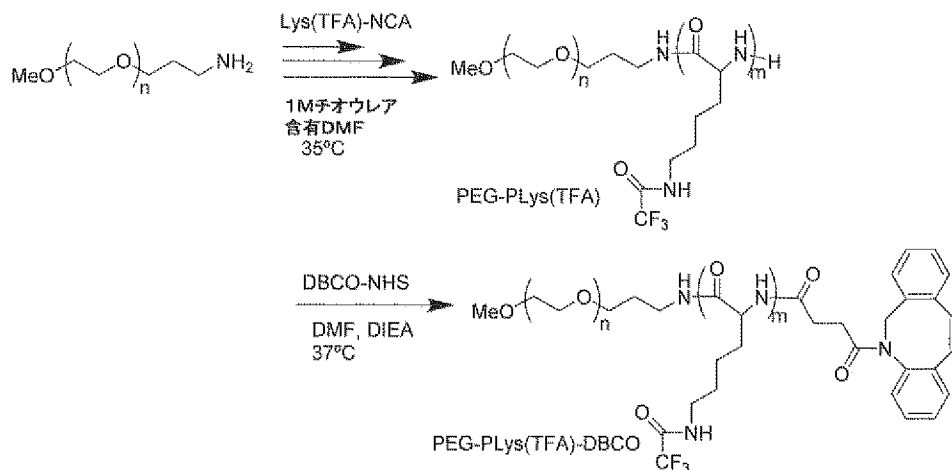


[0050] p-トルエンスルホン酸メチルをアセトニトリルおよびクロロベンゼンに

溶解し、 n -プロピルオキサゾリン ($nPrOx$) を重合させることができる。重合は、例えば、アジ化ナトリウムで停止できる。

[0051] スキーム2：PEG-ポリリジン（トリフルオロ酢酸）-DBCOの合成

[化5]

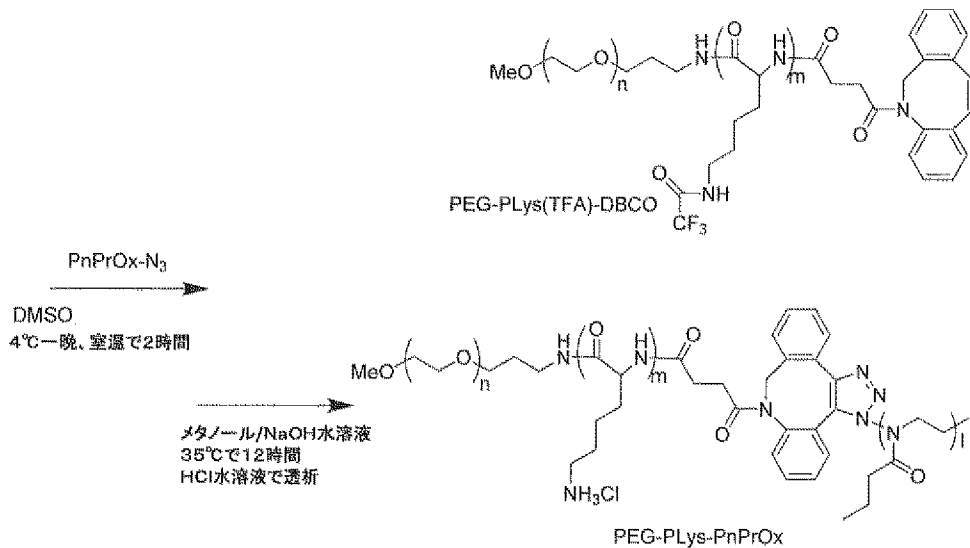


[0052] 片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (PEG-NH₂) を、1 Mチオウレアを含有するN, N'-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解する。N6-トリフルオロアセチル-L-リシン-N-カルボン酸無水物 (Lys(TFA)-NCA) を1 Mチオウレアを含有するDMFに溶解し、PEG-NH₂にLys(TFA)-NCAを重合させて、PEG-Poly(Lys(TFA))を得ることができる。

[0053] PEG-Poly(Lys(TFA))に温度感受性鎖を導入するために、一例としてジベンジルシクロオクチンNHSエステル (DBCO-NHS) を反応させて、PEG-ポリリジン（トリフルオロ酢酸）-DBCO (PEG-Poly(Lys(TFA))-DBCO)を得ることができる。

[0054] スキーム3：PEG-ポリリジン-PnPrOxの合成

[化6]



スキーム2で得られたPEG-ポリリジン（トリフルオロ酢酸）-DBCOにスキーム1で得られたPnPrOx-N₃をDMSO中、4℃で一晩かけてカップリング反応に供することができる。得られた溶液が凍結している場合にはこれを室温で放置して解凍することができる。その後、メタノールとNaOH水溶液の混合溶液中で処理してリジンの保護基を脱保護することができる。PEG-PLys-PnPrOxは、塩酸水溶液を外液として透析を行い、その後純水で透析を行って、凍結乾燥により回収することができる。

[0055] 上記において、nは、2～20000のいずれかの整数、例えば、10～5000のいずれかの整数、例えば、40～500のいずれかの整数とすることができ、mは2～5000のいずれかの整数、例えば2～500のいずれかの整数とすることができ、lは、10～5000とすることができ、

[0056] PnPrOx-N₃はアセトンに可溶性であるため、未反応のPnPrOx-N₃はアセトンに溶解させて除去することができる。目的産物は、アセトンに不溶性の画分に存在し得る。従って、アセトンに不溶の成分を回収し、純水に溶解させた後に、純水を外液として透析を行うことができる。

[0057] さらにPEG-ポリリジン-PnPrOxは、粒子形成能を利用して生成することができる。例えば、40℃では、PnPrOx部分が疎水化し、PEG-ポリリジン-PnPrOxはミセルを形成する。ミセルは限外濾過チ

チューブを用いて回収することができる。例えば、限外濾過チューブとして分画分子量300kDaのチューブを用いると、遠心分離等により、ミセルをチューブ内に保持したまま、未反応のPEG-PLys(TFA)-DBCOだけにフィルターを通過させることができる。この操作を繰り返すこともできる。得られたチューブ内の溶液を純水を外液として透析し、PEG-PLys-PnProxを得ることができる。その後、凍結乾燥してもよい。PEG-PLys-PnProxは、水系ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の分析や、 $^1\text{H-NMR}$ による構造解析により同定することができる。

[0058] GLUT1リガンドにより修飾された温度感受性共重合体は、当業者であれば適宜調製することができる。一例として、グルコースにより修飾された温度感受性共重合体（特に、Glc(6)が結合した共重合体）における、グルコースの保護基の導入は、例えば、1,2-O-イソプロピリデン-3,5-O-ベンジリデン- α -D-グルコフラノース（以下、「BIG」という）により達成される。BIGにエチレンオキサイドを重合させて、BIG-PEG-OHを合成する。BIGは、例えば、1,2-O-イソプロピリデン- α -D-グルコフラノース（以下、「MIG」という）の3位と5位の炭素の置換基であるOH基をベンジル基で保護することにより得られる。具体的には、BIGは、MIGとベンズアルデヒドを反応させ、酢酸エチルで抽出することにより得られる。次に、PEGの分子量を一定に揃える観点では、重合反応前に、反応容器内でBIG-OHをベンゼンで凍結乾燥させ、その後、減圧乾燥（例えば、70℃で一晩の減圧乾燥）させて、BIG-OHを容器壁面に付着させることが好ましい。また、重合度は添加するエチレンオキサイドの量により適宜調節することができる。重合後、BIG-PEG-OHのOH基をアミノ化してBIG-PEG-NH₂を得て、さらに、スキーム2のPEG-NH₂の代わりに、BIG-PEG-NH₂を用いることで、PEG側にGlc(6)が導入された共重合体を得ることができる。Glc(6)の脱保護は、工程の最終工程において行うことができる。

[0059] 同様に、G I c (3) で修飾された温度感受性共重合体は、上記において B I G の代わりに、例えば、1, 2, 5, 6-ジ- α -D-グルコフラノース (D I G) を出発物質として用いて合成することができ、その他の部分は、上記と全く同一である。また、同様に、G I c (2) で修飾された温度感受性共重合体も当業者であれば適宜合成することができる。

[0060] 本発明の G L U T 1 リガンドで被覆されたユニット P I C / ミセルは、対象にそのまま投与することもできるし、本発明による投与計画に基づき（例えば、血糖操作を伴って）投与することもできる。本発明による投与計画では、好ましくは、まず、対象に絶食させるか、または対象に低血糖を誘発させるが、その後、該対象にユニット P I C / ミセルを投与する。本発明による投与計画では、より好ましくは、まず、対象に絶食させるか、または対象に低血糖を誘発させるが、その後、該対象にユニット P I C / ミセルを投与することおよび該対象において血糖値の上昇を誘発させる。ここで、本発明による投与計画では、該対象へのユニット P I C / ミセルの投与は、該対象における血糖値の上昇の誘発と、同時に、連続してまたは逐次的に行なわれる。低血糖状態の誘発は、G L U T 1 を血管内皮細胞（例えば、脳血管内皮細胞）の内表面に発現させるために有用であると考えられる。但し、本発明によれば、本発明のユニット P I C / ミセルは、投与対象における血糖値の上昇がこれらの脳への送達に極めて効果的である。本発明によれば、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象における本発明のユニット P I C / ミセルの血中濃度が一定値以上であるときに、血糖値を上昇させることにより、本発明のユニット P I C / ミセルが極めて効果的に脳内に送達できるものである。また、本実施例によれば、対象において血糖値の上昇を誘発させた後もしばらくの間は本発明のユニット P I C / ミセルは該対象の脳内へ送達される。

[0061] 本発明のユニット P I C / ミセルの血中濃度を一定値以上に保つ観点では、本発明のユニット P I C / ミセルを対象に輸液投与することが好ましい。

このようにすることで、仮に血中滞留時間の短いユニットP I C／ミセルであっても、一定の血中濃度を確保し易い。例えば、血中滞留時間の短いs i R N Aを内包するs i R N Aミセルは、輸液により対象に投与すると効果を上げやすい。輸液投与は、好ましくは、30分以上、45分以上、60分以上、90分以上、または2時間以上行なうことができる。輸液投与は、好ましくは一定の輸液速度で行なう。例えば、精密投与ポンプを用いれば、一定の輸液速度による投与が可能である。G L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルを脳に送達する場合には、輸液投与は、対象における血糖値の上昇の誘発と同時になされてもよく、輸液投与中に対象において血糖値の上昇を誘発させてもよい。

[0062] 本発明のある態様では、u P I C／ミセルはボラス投与することができる。ボラス投与は、好ましくは30分未満、20分以下、10分以下または5分以下で行うことができる。

[0063] 本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、本発明による投与計画に基づき投与すると、脳への送達効率が選択的に高まる。従って、本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、脳に核酸を送達するために用いることができる。本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルはまた、核酸に血液脳関門を通過させることができる。従って、本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、従来は送達が困難であった脳実質に、核酸を送達することに用いることができる。本発明の組成物またはコンジュゲートはまた、核酸を脳血管内皮細胞に蓄積させることができる。従って、本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、従来は送達が困難であった脳血管内皮細胞に、核酸を送達することに用いることができる。また、本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、脳血管内皮細胞間の接着を弱める、または破壊する核酸を脳血管内皮細胞に送達することに用いることもできる。同様に、本発明のG L U T 1リガンドで被覆されたユニットP I C／ミセルは、網膜、末梢神経および／ま

たは髄液に、核酸を送達するために用いることができる。本発明のGLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルはまた、血液神経関門、血液網膜関門または血液髄液関門にそれぞれ存在する血管内皮細胞に核酸を送達するために用いることができる。本発明のGLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルは、血液神経関門、血液網膜関門または血液髄液関門にそれぞれ存在する血管内皮細胞間の接着を弱める、または破壊する核酸を脳血管内皮細胞に送達することに用いることもできる。血管内皮細胞間の接着を弱め、または破壊することにより、関門の機能を弱め、様々な薬剤に関門を通過させることができるようになる。

[0064] 本発明のユニットPIC／ミセルは、経口投与および非経口投与（例えば、静脈内投与または腹腔内投与）により投与することができる。

[0065] 本発明によれば、GLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与計画に従って対象に投与することを含んでなる、脳組織を標的化する方法が提供される。本発明によればまた、GLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与計画に従って対象に投与することを含んでなる、脳血管内皮細胞を標的化する方法が提供される。本発明による投与計画は、好ましくは、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象にGLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与することを含むが、より好ましくは、本発明による投与計画は、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象にGLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与することおよび該対象において血糖値の上昇を誘発させることを含む。同様に本発明によれば、GLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与計画に従って対象に投与することを含んでなる、末梢神経組織、網膜および／または髄液を標的化する方法が提供される。本発明によればまた、GLUT1リガンドで被覆されたユニットPIC／ミセルを投与計画に従って対象に投与することを含んでなる、血液神経関門、血液網膜関門または血液髄液関門にそれぞれ存在する血管内皮細胞を標的化する方法が提供される。

[0066] 本発明によれば、核酸に本発明の温度感受性共重合体と複合体を形成させて脳、末梢神経組織、網膜および／または髄液に効果的に送達することが可能である。

[0067] 本発明によれば、核酸として脳疾患治療または予防に用いられる核酸を用いることができる。この場合、本発明によれば、GLUT 1 リガンドで被覆されたユニット P I C / ミセルであって核酸として脳疾患治療または予防に用いられる核酸を含むミセルを投与計画に従ってその必要のある対象に投与することを含んでなる、脳疾患の治療または予防方法が提供される。同様に、本発明によれば、GLUT 1 リガンドで被覆されたユニット P I C / ミセルであって核酸として末梢神経疾患の治療または予防に用いられる核酸を含むミセルを投与計画に従ってその必要のある対象に投与することを含んでなる、脳疾患の治療または予防方法が提供される。同様に、本発明によれば、GLUT 1 リガンドで被覆されたユニット P I C / ミセルであって核酸として網膜疾患治療または予防に用いられる核酸を含むミセルを投与計画に従ってその必要のある対象に投与することを含んでなる、脳疾患の治療または予防方法が提供される。本発明による投与計画は、好ましくは、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該ミセルを投与することを含むが、より好ましくは、本発明による投与計画は、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該ミセルを投与することおよび該対象において血糖値の上昇を誘発させることを含む。

[0068] 脳疾患としては、核酸に血液脳関門を通過させることで治療できる脳疾患、例えば、不安、うつ病、睡眠障害、アルツハイマー病、パーキンソン病および多発性硬化症などが挙げられる。従って、本発明では、これらの脳疾患を治療するために、抗不安剤、抗うつ剤、睡眠導入剤、アルツハイマー治療薬、パーキンソン病治療薬および多発性硬化症治療薬などの脳疾患治療薬または予防薬が用いられ得る。アルツハイマー病治療薬としては、例えば、A β 抗体がよく知られ、パーキンソン病治療薬としては、例えば、ドーパミン受容体アゴニストおよびL-ドーパがよく知られ、多発性硬化症治療薬とし

ては、例えば、副腎ステロイド薬、インターフェロン β （IFN β ）、および免疫抑制剤がよく知られ、これらの治療薬が本発明で用いられ得る。末梢神経疾患としては、末梢神経疾患治療薬に血液脳関門を通過させることで治療できる末梢神経疾患、例えば、ギランバレー症候群、フィッシャー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーが挙げられる。網膜疾患としては、網膜疾患治療薬に血液脳関門を通過させることで治療できる網膜疾患、例えば、網膜色素変性症、脳回状網脈膜萎縮、コロイデレミア、クリスタリン網膜症、先天黒内障、先天性停在性夜盲、小口病、白点状眼底、白点状網膜症、色素性傍静脈網脈絡膜萎縮、スターガルト病、卵黄状黄斑ジストロフィー、若年網膜分離症、中心性輪紋状脈絡膜ジストロフィー、オカルト黄斑ジストロフィー、家族性滲出性硝子体網膜症および網膜色素線条が挙げられる。

実施例

[0069] 実施例 1：Glc（6）-PICミセルの作製

実施例 1 では、ミセル形成に必要な高分子の合成を行なった。

[0070] 1-1. Glc（6）-PEG-P（Asp）の合成

まず、1, 2-O-イソプロピリデン-3, 5-O-ベンジリデン- α -D-グルコフラノース（以下、「BIG-OH」という）を合成した。具体的には、1, 2-O-イソプロピリデン- α -D-グルコフラノース（以下、「BIG」という）（和光純薬工業社製）10 g、ベンズアルデヒド 40 mL をフラスコ中で混合し、ロータリーエバポレーターで 4 時間回転させながら混合し、反応させた。反応後、酢酸エチル 66 mL を加え、蒸留水 120 mL で洗浄し、有機層（酢酸エチル層）のみを回収し、ヘキサン 500 mL に加えて 0℃ で再結晶し、BIG-OH 9.2 g（収率 85%）を得た。

[0071] 次に、得られた BIG-OH から BIG-ポリエチレングリコール（BIG-PEG-OH）を合成した。具体的には、BIG を反応容器のガラス壁面に均一に付着させるために、ベンゼン凍結乾燥後、70℃で一晩減圧乾燥

したBIG-OH 0.72 gをテトラヒドロフラン (THF) 5 mLに溶解した。これにより、分子量の揃った単峰性のピークを有するゲル浸透クロマトグラムが得られた (データ非掲載)。0.3 Mのナフタレンカリウムを含んだTHF溶液3.3 mLをBIG-OH溶液に滴下し、エチレンオキシド (EO) 2.2 mLをアルゴン雰囲気下で添加し常温で48時間反応させる。その後、1 mLのメタノールを反応液に添加し、10%メタノールを含む冷却エーテルで再沈殿させBIG-PEG-OH 2.8 g (収率89%) を回収した。

[0072] さらに、得られたBIG-PEG-OHのOH基をアミノ化して、アミノエチル基を有するBIG-PEG-NH₂を合成した。具体的には、ベンゼン凍結乾燥したBIG-PEG-OH 2.0 gを0.8 mLのトリエチルアミンを溶解したTHF溶液20 mLに溶解する。メタンスルホニルクロリド570 mgを冷THF 20 mLに溶解した溶液を上記のBIG-PEG-OH溶液に添加し、室温で一晩反応させた。沈殿した塩を濾過により取り除き、ろ液を10%メタノールを含むジエチルエーテルを含む寒剤500 mLで再沈殿させ、濾過後、減圧乾燥した。得られた粉末を25%アンモニア水溶液100 mLに溶解し、室温で2日間反応させた。透析膜 (分画分子量1,000) を用いて2000倍希釈したアンモニウム水溶液で透析し、その後、純水で透析した。その後、sephadex C-25 (GE healthcare) でアミノ化が進まなかったフラクションを除去し、凍結乾燥を行いBIG-PEG-NH₂ 1.6 g (収率85%) を回収した。精製後のBIG-PEG-NH₂のH¹ NMRスペクトルには不純物に起因するピークは観察されなかった (データ非掲載)。

[0073] さらに、得られたBIG-PEG-NH₂からBIG-PEG-ポリ (β-ベンジルーL-アスパルテート) (以下、「BIG-PEG-PBLA」という) を合成した。具体的には、β-ベンジルーL-アスパルテート-N-カルボン酸無水物 (以下、「BLA-NCA」という) 1.7 gをDMF 3.5 mLに溶解し、30 mLのジクロロメタンで希釈した。ベンゼン凍結

乾燥後のB I G－P E G－N H₂ 200mgを4 mLのジクロロメタンに溶解し、その溶液をB L A－N C A溶液に加え、アルゴン存在下、35℃で40時間重合した。I R分析で重合反応が終了したことを確認したのち、反応混合物をヘキサン／酢酸エチル＝6：4 500mLに滴下して沈澱したポリマーを吸引濾過により回収し、真空乾燥してB I G－P E G－P B L A 1.39g（収率58％）を得た。得られたB I G－P E G－P B L Aは、分子量の揃った単峰性のピークを有するゲル浸透クロマトグラムを示した（データ非掲載）。

[0074] さらに、得られたB I G－P E G－P B L AからB I G－P E G－ポリアスパラギン酸（以下、「B I G－P E G－P（A s p.）」という）を合成した。B I G－P E G－P B L A 500mgを0.5N水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解する。コポリマーが溶解した後、透析膜（分画分子量1,000）を用いて水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してB I G－P E G－P（A s p.）132mg（収率68％）を得た。

[0075] その後、B I G－P E G－P（A s p.）からG l c（6）－P E G－P（A s p.）を合成した。ここで、G l c（6）は、グルコースがその6位の炭素でP E Gに結合していることを意味する。B I G－P E G－P（A s p.）100mgをトリフェルオロ酢酸／純水（8：2）10mLに溶解し、1時間反応させた。透析膜（分画分子量1,000）を用いて0.01N N a O H、純水の順で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してG l c（6）－P E G－P（A s p.）70mg（収率70％）を得た。

[0076] 1－2. P E G－P（A s p）およびP E G－P（A s p.－A P）の合成

まず、ポリエチレングリコール－ポリ（β－ベンジル－L－アスパルテート）ブロック共重合体（P E G－P B L A）をβ－ベンジル－L－アスパルテート－N－カルボン酸無水物（B L A－N C A）（中央化製品社に製造委託して得た）の重合により得た。具体的には、B L A－N C A 18.9gをN，N’－ジメチルホルムアミド（DMF）20mLに溶解する。メトキシ

基の末端とアミノエチル基の末端を有するポリエチレングリコール（PEG-NH₂）（分子量2,000）2.0gをDMF 20mLに溶解し、その溶液をBLA-NCA溶液に加える。混合溶液を35℃に保ちながら40時間重合した。赤外分光（IR）分析で重合反応が終了したことを確認した後、反応混合物をジエチルエーテル2Lに滴下して沈澱したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥してPEG-PBLA 15.51g（収率79%）を得た。

[0077] 次に、PEG-PBLAからポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体（PEG-P（Asp.））を合成した。具体的には、PEG-PBLA 1.0gを0.5N水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解した。コポリマーが溶解した後、透析膜（分画分子量6,000-8,000）を用いて水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してPEG-P（Asp.） 654mg（収率78%）を得た。

[0078] 次に、PEG-PBLAからポリエチレングリコール-ポリ（（5-アミノペンチル）-アスパラギン酸）ブロック共重合体（PEG-P（Asp.-AP））を合成した。具体的には、ベンゼン凍結乾燥をしたPEG-PBLA 1gをDMF 10mLに溶解する。1,5-ジアミノペンタン（DAP） 8mLをPEG-PBLA溶液に加えた。混合溶液を5℃に保ちながら1時間反応させた。その後、20重量%の酢酸水溶液15.2mLに反応液を添加し、透析膜（分画分子量6,000-8,000）を用いて水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してPEG-P（Asp.-AP） 954mg（収率81%）を得た。

[0079] 1-3. 蛍光ラベル化ポリマーCy5-PEG-P（Asp.）の合成

上記で得られたPEG-PBLA 500mgをジメチルスルフォキシド（DMSO） 20mLに溶解した。スルホ型Cy5-N-ヒドロキシスクシイミドエステル（Lumiprobe社製、製品番号：43320）25mgを、PEG-PBLA溶液に加え、常温で2日間反応させた。その後、0.5N水酸化ナトリウムを75mL添加し、室温でベンジルエステルを加水分解した。

透析膜（分画分子量 6,000-8,000）を用いてエタノール、水の順で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥して Cy5-PEG-P (Asp.) 456 mg（収率 86%）を得た。

[0080] 1-4. G1c (3)-PEG-P (Asp) の合成

まず、ベンゼン凍結乾燥した 1, 2, 5, 6-ジ-*O*-イソプロピリデン- α -D-グルコフラノース (DIG) から DIG-PEG-OH を得た。具体的には、DIG (TCI 社製) 0.72 g を THF 5 mL に溶解して、DIG-OH 溶液を得た。その後、0.3 M のナフタレンカリウムを含んだ THF 溶液 3.5 mL を得られた DIG-OH 溶液に滴下し、エチレンオキシド (EO) 2.5 mL をアルゴン雰囲気下で添加し常温で 48 時間反応させた。その後、1 mL のメタノールを反応液に添加し、10% メタノールを含むエーテルを寒剤でよく冷やしたもので再沈殿させ DIG-PEG-OH 3.2 g（収率 86%）を回収した。

[0081] 次に、得られた DIG-PEG-OH をアミノ化して DIG-PEG-NH₂ を得た。具体的には、ベンゼン凍結乾燥した DIG-PEG-OH 3.2 g を 0.8 mL のトリエチルアミンを溶解した THF 溶液 32 mL に溶解する。メタンスルホニルクロリド 912 mg を冷 THF 32 mL に溶解した溶液を上記の DIG-PEG-OH 溶液に添加し、室温で一晩反応させた。沈殿した塩を濾過により取り除き、ろ液を 10% メタノールを含むジエチルエーテルを含む寒剤 500 mL で再沈殿させ、濾過後減圧乾燥した。得られた粉末を 25% アンモニア水溶液 100 mL に溶解し、室温で 2 日間反応させた。透析膜（分画分子量 1,000）を用いて 2000 倍希釈したアンモニウム水溶液中、純水の順番で透析した。その後、sephadex C-25 (GE healthcare) でアミノ化がすすんでいないフラクションを除き凍結乾燥を行い DIG-PEG-NH₂ 2.95 g（収率 89%）を回収した。

[0082] さらに、得られた DIG-PEG-NH₂ から DIG-PEG-PBLA を合成した。具体的には、BLA-NCA 1.7 g を DMF 3.5 mL に

溶解し、30 mLのジクロロメタンで希釈した。ベンゼン凍結乾燥後のDIG-PEG-NH₂ 200 mgを4 mLのジクロロメタンに溶解し、その溶液をBLA-NCA溶液に加え、アルゴン存在下、35℃で40時間重合した。IR分析で重合反応が終了したことを確認したのち、反応混合物をヘキサン／酢酸エチル（ヘキサン：酢酸エチル＝6：4）500 mLに滴下して、沈澱したポリマーを吸引濾過により回収し、真空乾燥してDIG-PEG-PBLA 1.32 g（収率70%）を得た。

[0083] さらに、得られたDIG-PEG-PBLAからDIG-PEG-ポリアスパラギン酸（DIG-PEG-P（Asp.））を合成した。具体的には、DIG-PEG-PBLA 500 mgを0.5 N水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解する。コポリマーが溶解した後、透析膜（分画分子量1,000）を用いて水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してDIG-PEG-P（Asp.）145 mg（収率54%）を得た。

[0084] さらに、得られたDIG-PEG-P（Asp.）からGlc（3）-PEG-P（Asp.）を合成した。ここで、Glc（3）は、グルコースがその3位の炭素でPEGに結合していることを意味する。具体的には、DIG-PEG-P（Asp.）100 mgをトリフルオロ酢酸／純水（トリフルオロ酢酸：水＝8：2）10 mLに溶解し、1時間反応させた。透析膜（分画分子量1,000）を用いて0.01 N NaOH、純水の順で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してGlc（3）-PEG-P（Asp.）75 mg（収率86%）を得た。

[0085] 1-5. Cy5-PLICミセルの調製

Cy5-PEG-P（Asp.）50 mgを10 mM リン酸緩衝液（PB、pH 7.4、0 mM NaCl）50 mLに溶解し、1 mg/mLのCy5-PEG-P（Asp.）溶液を調製した。PEG-P（Asp.-AP）50 mgも同様にPB 50 mLに溶解し、1 mg/mLのPEG-P（Asp.-AP）溶液を調製した。2種類の水溶液Cy5-PEG-

P (A s p .) と P E G - P (A s p . - A P) それぞれ 4 m L と 7 . 0 m L を 5 0 m L の コニカルチューブに添加し、ボルテックスで 2 分間攪拌した (2 0 0 0 r p m) 。その後、水溶性の縮合剤である 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (E D C) (1 0 m g / m L) を含有する P B 溶液 5 . 6 m L を加え、一晩静置しポリオンコンプレックスのコアを架橋した。その後、分画分子量 1 0 0 , 0 0 0 の膜のついた限外濾過チューブを用いて、ミセル形成に関与していないポリマーおよび E D C の副生成物などを除去した。

[0086] 1 - 6 . 得られた C y 5 - P I C ミセルのキャラクタリゼーション

得られた C y 5 - P I C ミセルのサイズ (Z 平均粒子径) および多分散指数 (P D I) は、ゼータサイザー (M a l v e r n) で測定した。サイズはブラウン運動により移動している粒子の拡散を測定し、その測定結果をストークス・アインシュタインの式を用いて粒子径と粒度分布に変換した。またミセルの形状は、透過型電子顕微鏡 (T E M , J E M - 1 4 0 0) を用いて評価した。ここで、Z 平均粒子径とは、粒子分散 物等の動的光散乱法の測定データを、キュムラント解析法を用いて解析したデータである。キュムラント解析においては、粒子径の平均値と多分散指数 (P D I) が得られ、本発明においては、この平均粒子径を Z 平均粒子径と定義する。厳密には、測定で得られた G 1 相関関数の対数に、多項式をフィットさせる作業を、キュムラント解析といい、下式：

$$\ln (G 1) = a + b t + c t^2 + d t^3 + e t^4 + \dots$$
における定数 b が、二次キュムラントまたは、Z 平均拡散係数と呼ばれる。Z 平均拡散係数の値を分散媒の粘度と幾つかの装置定数を用いて粒子径に換算した値が Z 平均粒子径であり、分散安定性の指標として品質管理目的に適した値である。

[0087] 1 - 7 . G I c (6) - C y 5 - P I C ミセルの調製

G I c (6) - P E G - P (A s p .) 2 0 m g と C y 5 - P E G - P (A s p .) 4 0 m g を 1 0 m M リン酸緩衝液 (P B , p H 7 . 4 , 0 m M N a C l) 6 0 m L に溶解し、1 m g / m L の C y 5 - G I c (6) - P

EG-P (A s p.) と PEG-P (A s p.) 混合溶液を調製した。PEG-P (A s p. -AP) 50 mg も同様に PB 50 mL に溶解し、1 mg/mL の PEG-P (A s p. -AP) 溶液を調製した。2 種類の水溶液、すなわち、Cy5-PEG-P (A s p.) と PEG-P (A s p.) との混合液と PEG-P (A s p. -AP) 溶液のそれぞれ 4 mL と 7.0 mL を 50 mL のコニカルチューブに添加して、ボルテックスにより 2 分間撹拌した (2000 rpm)。その後、水溶性の縮合剤である EDC (10 mg/mL) を含有する PB 溶液 5.6 mL を加え、一晩静置しポリイオンコンプレックスのコアを架橋した。その後、分画分子量 100,000 の膜のついた限外濾過チューブを用いて、ミセル形成に関与していないポリマー、EDC の副生成物などを除去した。

[0088] 1-8. G I c (6) -C y 5 -P I C ミセルのキャラクタリゼーション

得られた G I c (6) -C y 5 -P I C ミセルのサイズ (Z 平均粒子径) および多分散指数 (P D I) は、ゼータサイザー (M a l v e r n) で測定した。その結果、平均粒径 40 nm であり、粒径が均一なミセルを得たことが明らかとなった (図 2 A)。また、ミセルの形状は、透過型電子顕微鏡 (TEM、J E M - 1 4 0 0) を用いて、酢酸ウラニルで染色後に観察した (図 2 B)。

[0089] 1-9. G I c (3) -C y 5 -P I C ミセルの調製

G I c (3) -PEG-P (A s p.) 20 mg と Cy5-PEG-P (A s p.) 40 mg を pH 7.4 10 mM リン酸緩衝液 (PB、0 mM NaCl) 60 mL に溶解し、1 mg/mL の Cy5-G I c (3) -PEG-P (A s p.) と PEG-P (A s p.) 混合溶液を調製した。PEG-P (A s p. -AP) 50 mg も同様に PB 50 mL に溶解し、1 mg/mL の PEG-P (A s p. -AP) 溶液を調製した。2 種類の水溶液 Cy5-PEG-P (A s p.)、PEG-P (A s p.) 混合液と PEG-P (A s p. -AP) 溶液のそれぞれ 4 mL と 4.3 mL を 50 mL のコニカルチューブに添加して、ボルテックスで 2 分間撹拌した (2000 r

p m)。その後、水溶性の縮合剤である EDC (10 mg/mL) を含有する PB 溶液 5.6 mL を加え、一晩静置しポリオンコンプレックスのコアを架橋した。その後、分画分子量 100,000 の膜のついた限外濾過チューブを用いて、ミセル形成に関与していないポリマー、EDC の副生成物などを除去した。得られた Glc (6) - Cy5 - PIC ミセルのサイズ (Z 平均粒子径) および多分散指数 (PDI) は、ゼータサイザー (Malvern) で測定した。またミセルの形状は、透過型電子顕微鏡 (TEM、JEM-1400) を用いて評価した。得られたミセルは、直径 32 nm (PDI = 0.043) であった (データ非掲載)。

[0090] 実施例 2. PIC ミセルの体内動態評価実験

実施例 1 で作製したミセルをマウスに静脈投与してその体内動態を調べた。ミセルを投与する際には、血糖操作の効果も加えて評価した。

[0091] 以下の実施例において、脳への蓄積は、全投与量に対する脳 1 g 当りに蓄積する量 (%) に基づいて評価した。

[0092] 上記の各ミセル溶液 (すなわち、Glc (6) - Cy5 - PIC ミセル、Glc (3) - Cy5 - PIC ミセルまたは Cy5 - PIC ミセルの溶液 (濃度 1 mg/mL)) の容量 200 μ L を 24 時間給餌しなかった絶食マウス (Balb/c 雌 6 週齢) と自由に給餌をしたマウスにそれぞれ 200 μ L ずつ静脈投与 (i. v.) した。ここで示す 1 mg/mL とはそれぞれのポリアニオンに結合してある Cy5 由来の蛍光を NanoDrop で測定した結果求められた値である。なお、絶食したマウス群は、ミセル溶液投与 6 時間後に給餌を再開した。所定の時間経過を待った後、マウスに麻酔を施し開腹後、腹部大動脈から血液を採取し、更に脳、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺および大腿筋を取り出した。採取した血液を 4℃、15,000 rpm にて 5 分間遠心して血漿を調製し、96 穴プレート (Thermo Fisher, 米国) に分注して、Tecan Infinite M1000 PRO を用いた蛍光測定によって血漿の蛍光強度から血中のミセル濃度を定量した。このとき対照として、サンプルが投与されなかったマウスの血液を

使用した。また、マウスの全血を2 mL、うち血漿の量を55%と仮定し、薬物の体内動態を評価した。脳、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺および大腿筋にそれぞれ溶解緩衝液とメタルコーンを加え、破砕して懸濁液とし、96穴プレート（Thermo Fisher、米国）にそれぞれ注入し、Tecan Infinite M1000 PROを用いた蛍光測定によってミセルの各臓器への蓄積効率（%）を定量した。

[0093] その結果、グルコースの6位の炭素を介してその外表面が修飾されたミセル（Glc（6）-PICミセル）は、絶食させてからマウスに投与した場合には、給餌の再開と同時に脳へのミセルの蓄積量が顕著に増大し、脳1 gに対して最大で全投与ミセル量の約3.8%が蓄積した（図3A）。このとき、血中ミセル濃度は給餌の再開と同時に減少した（データ非掲載）。このような脳へのミセルの蓄積量の増大は、グルコースでその外表面が修飾されていないミセルでは、観察されなかった。従って、この結果から、脳へのGlc（6）-PICミセルの蓄積は、絶食によりマウスの血糖値を低下させることと、ミセル投与前後に該マウスの血糖値を上昇させることが重要であることが明らかとなった。ただし、絶食させたマウスにおいてミセル投与後、給餌再開前であっても一部のミセルは脳に取り込まれている（図3Aの黒い四角）。また、絶食させていないマウスにおいてもミセル投与後、一部のミセルは脳に取り込まれた（図3Aの白抜き四角）。また、ミセルの各臓器への集積量を評価したところ、血糖操作により脳への蓄積量が選択的に増大した（図3B）。従って、血糖操作による蓄積量の増大は、脳特異的であることが理解できる。なお、肝臓や腎臓は、血糖操作の有無によらず、それぞれ約8%および4%の蓄積を示した（データ非掲載）。また、グルコースの6位の炭素を介してその外表面が修飾されたミセル（Glc（6）-PICミセル）を調製する際に用いられるカチオン性高分子のすべてをGlc（6）-PEG-P（Asp.）とすると、グルコース導入率50%のミセルを得ることができ、半分をGlc（6）-PEG-P（Asp.）とすると、グルコース導入率25%のミセルを得ることができる。得られたミセルを

上記方法で投与すると、グルコース導入率25%のミセルは3%を超える脳への蓄積を示したのに対して、グルコース導入率50%のミセルは約1.3%の脳への蓄積を示した。

[0094] さらに、グルコースの3位の炭素を介してその外部表面が修飾されたミセル（Glc（3）-PICミセルとGlc（6）-PICミセル）の脳への蓄積量を比較した。具体的には、上記の方法でGlc（6）-Cy5-PICミセルとGlc（3）-Cy5-PICミセルを絶食マウスにi.v.投与し、6時間後に給餌を再開し、投与から8時間後（給餌再開から2時間後）に脳を摘出し、上記の方法でそれぞれのサンプルの脳への集積量を算出した。すると、Glc（3）-PICミセルよりも多くのGlc（6）-PICミセルが脳への蓄積を示した（図4B）。

[0095] さらに脳内へのミセルの蓄積部位を詳細に調べるため、In vivo共焦点顕微鏡観察を行なった。具体的には、まず、2.5%イソフルラン麻酔下で24時間絶食したマウス（Balb/c、雌、6週齢）の開頭を行なった。次に、麻酔を維持しながら、サンプルのi.v.投与用のカテーテルを微静脈にセットし、また、グルコース溶液の腹腔内投与（i.p.）用のカテーテルを腹腔内にセットし、共焦点顕微鏡（Nikon A1R）のステージにセットした。観察開始から5分後にGlc（6）-Cy5-PICミセル（1mg/mL、200μL）をカテーテルを通してi.v.投与した（グラフ図5Bの0分は、サンプル投与のタイミングである）。次いで、サンプル投与から30分後に20v/v%グルコース溶液をカテーテルを通してi.p.投与した。蛍光は励起波長638nmのレーザーを用いて約3時間にわたり脳内におけるサンプルの挙動をリアルタイム観察した（蛍光波長662～737nm）。すると、血管内にのみ観察された蛍光が、時間経過と共に脳実質（例えば、点線部）にしみ出すようすが観察された（図5A）。上記の観察で得られた動画を基に、横軸を観察経過時間とし、縦軸を脳血管と重ならない5つの領域（図5Aに示す脳実質の点線部）のROI（region of interest）における蛍光強度の平均をプロットした。する

と、血糖値の上昇に追従してミセルの脳実質への取り込みが上昇した（図5 B）。なお、マウスの血糖値は、グルコース溶液を i. p. 投与する直前、投与20分後、30分後、50分後または90分後に血液を5 μ Lずつ微静脈より採取し、実験動物用血糖値測定器を用いて、血糖値を測定して求めた（図5 B）。ミセルの脳への取り込みは、血糖値の上昇後の血糖値の低下と共に起こったことから、ミセルの投与は血糖値上昇の後であってもよいと考えられる。

[0096] 次に、ミセルの投与を血糖値上昇の後に行っても、ミセルが脳実質に移行することを確認した。具体的には、まず、2.5%イソフルラン麻酔下で24時間絶食したマウス（B a l b / c、雌、6週齢）の開頭を行なった。次に、麻酔を維持しながら、グルコース溶液の腹腔内投与（i. p.）用のカテーテルを腹腔内にセットし、共焦点顕微鏡（N i k o n A 1 R）のステージにセットした。20 ν / ν %グルコース溶液をカテーテルを通して i. p. 投与し、次いで、グルコース投与から30分後に G l c (6) - C y 5 - P I C ミセル（1 m g / m L、200 μ L）をカテーテルを通して i. v. 投与して、またはカテーテルを用いずに i. p. 投与して観察を開始した（グラフ図11 Bの0分は、サンプル投与のタイミングを示す）。蛍光は励起波長638 nmのレーザーを用いて約3時間にわたり図11 Aに示される4つの脳実質領域におけるサンプルの蓄積を蛍光強度を指標としてリアルタイム観察した（蛍光波長662～737 nm）。すると、図11 Bに示されるように、サンプルの i. v. 投与直後から脳実質内へのサンプルの取り込みが観察され、時間経過に従って穏やかに取り込み量が増大し、3時間にわたり取り込みが持続した。グルコース投与とサンプル投与の前後関係を変えることにより、サンプルの脳実質への取り込み量の経時パターンが変化した。このことは、グルコース投与とサンプル投与の前後関係を変えることにより、血液脳関門を通過させるタイミングが制御可能であることを意味する。

[0097] このことから、本発明の組成物は、血糖操作により血液脳関門を通過して効果的に脳実質に到達し得ることが明らかとなった。

[0098] 実施例3. P I C s o m e の作製と体内動態評価実験

直径約100nmの中空キャリアとしてP I C s o m e を作製し、体内動態評価により脳への標的化効果を検証した。

[0099] 3-1. ホモP (A s p. -A P) の合成

まず、ポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)(ホモPBLAポリマー)をBLA-NCAの重合により得た。具体的には、β-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(BLA-NCA)20gをN,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)33.3mL、ジクロロメタン300mLに溶解する。N-ブチルアミン89.0μLを上記BLA-NCA溶液に加える。混合溶液を35℃に保ちながら40時間重合した。赤外分光(IR)分析で重合反応が終了したことを確認したのち、反応混合物をヘキサン/酢酸エチル溶液(ヘキサン:酢酸エチル=6:4)1Lに滴下して沈澱したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥してホモPBLAポリマー14.82g(79%)を得た。

[0100] 次に、得られたホモPBLAポリマーからポリ((5-アミノペンチル)-アスパラギン酸)(ホモP(A s p. -A P))を合成した。具体的には、ベンゼン凍結乾燥をしたホモPBLA1gをN-メチル-2-ピロリドン(NMP)10mLに溶解する。DAP17.2mLをNMP17.2mLに溶解し、ホモPBLA溶液に加える。混合溶液を5℃に保ちながら40分反応した。その後、反応液に20重量%の酢酸水溶液10mLを添加し、透析膜(分画分子量6,000-8,000)を用いて水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥してP(A s p. -A P)0.76g(82%)を得た。

[0101] 3-2. G I c (6) -C y 5 -P I C s o m e の調製

実施例1で得たG I c (6) -P E G -P (A s p.)20mgとC y 5 -P E G -P (A s p.)40mgを10mMリン酸緩衝液(PB、pH7.4、0mMNaCl)60mLに溶解し、1mg/mLのG I c (6) -P E G -P (A s p.)とC y 5 -P E G -P (A s p.)との混合溶

液を調製した。また、ホモP (A s p. - A P) 5 0 m g も同様にP B 5 0 m L に溶解し、1 m g / m L のホモP (A s p. - A P) 溶液を調製した。次に、2種類の水溶液、すなわち、G l c (6) - P E G - P (A s p.) とC y 5 - P E G - P (A s p.) との混合液およびホモP (A s p. - A P) 溶液のそれぞれ4. 0 m L および5. 0 m L を5 0 m L のコニカルチューブ中で混合し、ボルテックスにより2分間攪拌した(2 0 0 0 r p m)。その後、水溶性の縮合剤であるE D C (1 0 m g / m L) を含有するP B 溶液5. 6 m L を加え、一晩静置してポリオンコンプレックスのコアを架橋した。その後、分画分子量1 0 0, 0 0 0 の膜のついた限外濾過チューブを用いて、P l C s o m e 形成に関与していないポリマー、E D C の副生成物などを除去した。得られたG l c (6) - C y 5 - P l C s o m e のサイズ(Z平均粒子径) および多分散指数(P D I) は、ゼータサイザー(M a l v e r n) で測定した。またミセルの形状は、透過型電子顕微鏡(T E M、J E M - 1 4 0 0) を用いて、酢酸ウラニルで染色後に観察した。すると、直径1 0 0 n m (P D I = 0. 0 8 6) のP l C s o m e を得たことが明らかとなった(データ非掲載)。

[0102] 3-3. 体内動態評価

P l C ミセルの代わりに得られたP l C s o m e を投与する以外は実施例2 と全く同じ方法で、P l C s o m e をマウスに投与し、脳へのP l C s o m e の蓄積を観察した。すると、グルコースでその外表面が修飾されたP l C s o m e のみが給餌後、急激に脳内に蓄積する様子が観察された(図6)。グルコースでその外表面が修飾されたP l C s o m e の脳1 g 当りの蓄積量は約2 %であった(図6)。

[0103] このことから、ミセルは直径1 0 0 n m でも問題無く血液脳関門を通過し得ることが明らかとなった。

[0104] さらに、脳(大脳皮質)の深部におけるミセルの局在を2光子顕微鏡(高速共焦点レーザー顕微鏡用多光子励起レーザー Nikon A1RMP-IS-S33)を用いて観察した。得られた結果は図13に示される通りであった。すなわち、脳表層におけるよりも、脳深部においてP l C ミセル由来の強い蛍光が観察さ

れた。

[0105] 脳の表層から $0\ \mu\text{m}$ 、 $60\ \mu\text{m}$ 、 $200\ \mu\text{m}$ 、 $300\ \mu\text{m}$ 、 $500\ \mu\text{m}$ または $600\ \mu\text{m}$ の位置における切片の蛍光像を観察した。すると、いずれの深さにおいてもPICミセルの脳実質への移行が確認されたが、特に $200\ \mu\text{m}$ ～ $500\ \mu\text{m}$ において大量の蛍光が脳実質に局在した（図14）。

[0106] さらに大脳皮質における継時的な蛍光強度変化を確認した。図15に示されるように、1日後～1週間後において、脳実質に大量の蛍光が局在した。

[0107] これらのことから、グルコースで該表面を修飾したPICミセルは、本発明の血糖操作を伴って対象に投与されると、脳深部（例えば、 $60\ \mu\text{m}$ ～ $600\ \mu\text{m}$ ）においても脳実質に蓄積させることが可能であることが明らかとなった。また、その蓄積は、投与1週間後でも持続した。脳は、表層から、分子層、外顆粒層、外錐体細胞層、内顆粒層、内錐体細胞層および多形細胞層が存在するが（例えば、図13～図15参照）、これらのいずれの層においても脳実質にキャリアを送達することができた。これらの層の中では特に、外錐体細胞層および内顆粒層においてキャリアの送達が顕著に有効であった。

[0108] 実施例4：s i R N Aミセルの作製と体内動態評価

本実施例では、血中滞留時間が短く送達効率の低いs i R N Aを用いて実施例2および3と同様に体内動態評価を行なった。より具体的には、本実施例では、グルコースをコンジュゲートしたPEG-ポリカチオンと蛍光標識s i R N Aからなるミセルを用いて、s i R N Aの脳への蓄積を評価した。

[0109] 4-1. G l c (6) - P E G - P (A s p . - T E P) - C h o l の合成

まず、実施例1に記載の方法により得たB l G - P E G - P B L AからB l G - P E G - P B L A - C h o lを合成した。具体的には、B l G - P E G - P B L A 120mgをNMP 10mLに溶解し、P B L Aの末端のアミノ基に対し10等量の4-コレステリルアミノ-4-ブタン酸および触媒量のジメチルアミノピリジンを添加し、その後、室温にて6時間攪拌した。反応溶液をジエチルエーテル/2-プロパノール（9：1）溶液に滴下し、目的物を沈殿させた。沈殿物をろ過後減圧乾燥させてB l G - P E G - P

B L A - C h o l を 1 3 0 m g 得 た (収 率 9 5 %) 。

[0110] 次に、得られた (B I G) - P E G - P B L A - C h o l から B I G - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l を 合 成 し た 。 具 体 的 に は 、 B I G - P E G - P B L A - C h o l 1 0 0 m g を N M P 5 m L に 溶 解 し 、 N M P で 希 釈 し た テ ト ラ エ チ レ ン ペ ン タ ア ミ ン (T E P) 溶 液 に 対 し ポ リ マ ー 溶 液 を 滴 下 し 、 そ の 後 2 0 ° C に て 1 時 間 反 応 し た 。 反 応 溶 液 を 氷 冷 し た 1 N 塩 酸 に 対 し て 滴 下 し 、 分 画 分 子 量 1 2 , 0 0 0 - 1 4 , 0 0 0 の 透 析 膜 を 用 い て 、 4 ° C で 透 析 し た 。 透 析 外 液 と し て は 、 0 . 0 1 N 塩 酸 を 用 い 、 そ の 後 、 透 析 外 液 と し て 純 水 を 用 い て 透 析 し た の ち 、 得 ら れ た 溶 液 を 凍 結 乾 燥 し て 、 5 6 m g の B I G - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l を 回 収 し た (収 率 7 3 %) 。

[0111] 最後に、B I G - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l から G l c (6) - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l を 得 た 。 具 体 的 に は 、 B I G - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l 5 6 m g を ト リ フ ル オ ロ 酢 酸 / 純 水 (8 : 2) 溶 液 8 m L に 溶 解 し 、 1 時 間 反 応 さ せ た 。 透 析 膜 (分 画 分 子 量 1 , 0 0 0) を 用 い て 透 析 外 液 と し て 0 . 0 1 N N a O H を 用 い て 透 析 し 、 次 い で 純 水 で 透 析 し た 。 得 ら れ た 溶 液 を 凍 結 乾 燥 し て 6 7 m g の G l c (6) - P E G - P (A s p - T E P) - C h o l (収 率 8 2 %) を 得 た 。

[0112] 4 - 2 . G l c (6) - s i R N A ミ セ ル の 調 製

G l c (6) - s i R N A ミ セ ル は 、 図 7 A の ス キ ーム に 従 っ て 調 製 し た 。 具 体 的 に は 、 1 0 m M H E P E S 緩 衝 液 中 に 溶 解 さ せ た G l c (6) - P E G - P (A s p . - T E P) - C h o l (2 m g / m L) 2 6 2 . 5 μ L を H E P E S 緩 衝 液 4 3 7 . 5 μ L で 希 釈 し た 。 北 海 道 シ ス テ ム ・ サ イ エ ンス 社 製 の ス ク ラ ン ブ ル s i R N A で あ る C y 5 - s i R N A - c h o l (7 5 μ M) 2 7 9 μ L を H E P E S 緩 衝 液 1 1 2 1 μ L で 希 釈 し た 。 得 ら れ た 2 液 を 混 合 し て 1 0 回 ピ ペ ッ テ ィ ン グ し 、 G l c (6) - s i R N A ミ セ ル を 得 た 。 I n v i v o 実 験 直 前 に 2 . 1 m L の ミ セ ル 溶 液 に 6 5 μ

Lの5M NaCl溶液を加え、ピペッティングすることで等張液にしてから投与に用いた。得られたGlc(6)-Cy5-siRNAミセルのサイズ(Z平均粒子径)および多分散指数(PDI)は、ゼータサイザー(Malvern)で測定した。またミセルの形状は、透過型電子顕微鏡(TEM、JEM-1400)を用いて、酢酸ウラニルで染色後に観察した。結果、直径80nm(PDI=0.104)のsiRNAミセルが得られたことが明らかとなった。

[0113] 4-3. 体内動態評価

得られたGlc(6)-Cy5-siRNAミセル 200 μ L/2時間を静脈投与により30分または2時間にわたりシリンジポンプ(Harvard社)を用いて精密持続静注し、投与開始5分後に20%グルコース溶液を腹腔内投与した。siRNAミセルの投与終了から1時間後に脳を摘出し、マルチビーズショッカーで粉碎後に、IVISイメージングシステム(Xenogen社)をもちいてそれぞれの輝度を評価した。すると、静脈投与の時間が長くなると、脳の輝度が上昇し、2時間の静脈投与による脳への蓄積は、30分の静脈投与による脳への蓄積よりも多かった(図7B)。また、脳への蓄積量を算出すると、siRNAミセルでは、2時間の静脈投与において、その投与量の1.3%を脳(1g当り)に送達することができていることが明らかとなった。さらに、投与終了から6時間後に脳を摘出し、共焦点顕微鏡(LSM510)で観察を行い、脳実質における蛍光強度を測定した。すると、siRNAミセルは、脳細胞内に蓄積していることが明らかとなった(図8)。

[0114] 実施例4の結果から、血中滞留時間が短く、送達効率の低いsiRNAのような物質であっても、本発明の方法により極めて効果的に脳に送達できることが明らかとなった。本発明の血糖操作によれば急速静注によってもsiRNAミセルを脳実質に送達することは可能であるが、本実施例では、持続静注により、siRNAミセルの脳実質への送達量を大幅に改善できることが明らかとなった。

[0115] 実施例 5：グルコース修飾したブロック共重合体の体内動態評価

本実施例では、G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸をミセルを形成させずにマウスに投与してその体内動態を評価した。

[0116] G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸としては、実施例 1 で合成した G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸を用いた。対照としては、P E G - ポリアスパラギン酸を用いた。

[0117] B a l b / c マウス（雌、6 週齢、n = 3）に対して、それぞれ 3 m g / m L の G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸および対照を 2 0 0 μ L ずつ静脈内投与した。投与は、2 時間かけて一定速度で行なった。投与開始 5 分後に 2 0 % グルコース溶液を腹腔内投与した。G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸および対照の投与が終了して 1 時間後にグルコース修飾したブロック共重合体の体内動態を分析した。

[0118] 結果は図 9 に示す通りであった。図 9 に示されるように、グルコースをコンジュゲートしていない P E G - ポリアスパラギン酸は、脳への蓄積を示さなかったのに対して、グルコースをコンジュゲートした G I c (6) - P E G - ポリアスパラギン酸は、脳 1 g 当り全投与量の 0. 4 % の脳の蓄積を示した。このように、上記ポリマーは 1 分子のグルコースで修飾されれば、脳への送達に十分であった。とりわけ血液脳関門を突破しやすいと言われるドネペジル塩酸塩ですら、全投与量に対して脳 1 g 当り 0. 1 3 % しか蓄積しない (Drug Metabolism and Disposition, 1999, 27 (12):1406-1414)。

[0119] 実施例 6：グルコースコンジュゲート抗体の調製と体内動態評価

本実施例では、抗体にグルコースをコンジュゲートさせ、体内動態を評価した。すると、抗体も血糖操作により脳への蓄積を示した。

[0120] 抗体としては、市販のマウス I g G、アイソタイプコントロール (Southern Biotechnology Associates Inc.) を用いた。抗体とグルコースとのコンジュゲートは以下のように作製した。

[0121] 6 - 1. D y L i g h t 4 8 8 蛍光標識化グルコース導入ポリエチレングリコール - ポリアスパラギン酸ブロック共重合体の合成

[0122] まず、THP-PEG-OHを合成した。具体的には、2-(2-ヒドロキシエトキシ)テトラヒドロピラン (THP) 0.104 mLをテトラヒドロフラン (THF) 100 mLに溶解した。0.3 Mのナフタレンカリウムを含んだTHF溶液2.8 mLをTHP溶液に滴下し、エチレンオキシド (EO) 8.9 mLをアルゴン雰囲気下で添加し40℃で1日間反応させた。その後、反応液をジエチルエーテルで再沈殿させ、片末端テトラヒドロピラニル基片末端3-ヒドロキシプロピル基のポリエチレングリコール (THP-PEG-OH) (分子量12,000) 8.56 g (収率95%)を得た。

[0123] 次に、得られたTHP-PEG-OHのOH基をメシル化した。具体的には、メタンスルホン酸クロライド (MsCl) 19.7 μ LをTHF 20 mLに溶解した。また、THP-PEG-OH (分子量12,000) 1.4 gをテトラヒドロフラン (THF) 10 mLに溶解し、そこにトリエチルアミン89 μ Lを加えた。水浴で冷却したMsCl溶液に対して、THP-PEG-OH溶液を滴下し、3時間30分攪拌した。反応混合物をジエチルエーテル200 mLに滴下して沈殿したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥することで、片末端3-メタンスルホニル基片末端テトラヒドロピラニル基のポリエチレングリコール (MsO-PEG-THP) (収率100%) 1.50 gを得た。

[0124] 次に、得られたMsO-PEG-THPからN₃-PEG-THPを合成した。具体的には、MsO-PEG-THP (分子量12,000) 15 gをN,N'-ジメチルホルムアミド (DMF) 100 mLに溶解した。反応溶液を室温で攪拌しながら、アジ化ナトリウム 1.63 gを加えた。混合溶液を45℃に保ちながら、71時間攪拌した。混合溶液を室温に戻した後、純水200 mLを加えた。混合溶液に対して、分液ロートを用いて、塩化メチレン200 mLで6回抽出を行い、得られた有機層をロータリーエバポレーターにより150 mLまで濃縮した。濃縮液をエタノール2 Lに滴下して沈殿したポリマーを吸引濾過により回収した後に真空乾燥して片末端アジ

ド基片末端テトラヒドロピラニル基のポリエチレングリコール (N_3 -PEG-THP) 14.3 g (収率95%)を得た。

[0125] 次に、 N_3 -PEG-THPを脱保護して N_3 -PEG-THPを得た。具体的には、 N_3 -PEG-THP (分子量12,000) 14.1 gをメタノール200 mLに溶解した。室温下、混合溶液中に1N HCl水溶液を24 mL加えた。反応温度を25 °Cに保ちながら、4時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテル2.5 Lに滴下して沈殿したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥することで、片末端アジド基片末端3-ヒドロキシプロピル基のポリエチレングリコール (N_3 -PEG-OH) 13.7 g (収率96%)を得た。

[0126] 次に、 N_3 -PEG-OHをアミノ化して N_3 -PEG-NH₂を得た。具体的には、 N_3 -PEG-OH (分子量12,000) 1.02 gをテトラヒドロフラン (THF) 30 mLに溶解し、そこにトリエチルアミン47.4 μ Lを加えた。メタンスルホン酸クロライド19.7 μ LをTHF 20 mLに溶解し、 N_3 -PEG-OH溶液を室温の水浴で冷却しながら、 N_3 -PEG-OH溶液に加えた。混合溶液を室温で6時間攪拌した。沈殿した塩を濾過により取り除き、反応混合物をジエチルエーテル950 mLと2-プロパノール50 mLの混合溶液に滴下して沈殿したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥した。得られた粉末を28%アンモニア水溶液8 mLに溶解し、室温で3日間反応させた。透析膜 (分画分子量6000-8000) を用いて、純水で透析した。その後、sephadex C-25 (GE healthcare) でアミノ化が進まなかったフラクションを除去し、凍結乾燥を行い、片末端アジド基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (N_3 -PEG-NH₂) 620 mg (収率61%) を回収した。

[0127] 次に、 N_3 -PEG-NH₂から N_3 -PEG-PBLAを合成した。具体的には、ベンゼン凍結乾燥後の N_3 -PEG-NH₂ (分子量12,000) 150 mgを5.4 mLのジクロロメタンに溶解した。 β -ベンジル-L-アスパ

ルテート-N-カルボン酸無水物 218 mg を DMF 0.6 mL に溶解し、その溶液を N_3 -PEG-NH₂ 溶液に加え、アルゴン存在下、35℃で2日間重合した。IR 分析で重合反応が終了したことを確認したのち、反応混合物をジエチルエーテル 150 mL に滴下して沈殿したポリマーを吸引濾過により回収し、真空乾燥して片末端アジド基のポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート) ブロック共重合体 (N_3 -PEG-PBLA) (分子量 12,000) 250 mg (収率 91%) を得た。

[0128] 次に、 N_3 -PEG-PBLA から N_3 -PEG-P(Asp) を得た。具体的には、 N_3 -PEG-PBLA 250 mg をアセトニトリル 4 mL に溶解し、そこに 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を 5.5 mL 加え、室温で1時間攪拌した。反応液を、透析膜(分画分子量 6000-8000)を用いて、水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥して、片末端アジド基のポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (N_3 -PEG-P(Asp)) (分子量 12,000) 189 mg (収率 89%) を得た。

[0129] 次に、6-アミノ-6-デオキシ-1,2:3,5-ジ-O-イソプロピリデン-α-D-グルコフラノース(P-アミノグルコース)を合成した。P-アミノグルコースは、Carbohydr. Res. 19, 197-210 (1971)の記載に基づいて合成した。

[0130] 保護グルコースを導入したポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体を合成した。具体的には、6-アミノ-6-デオキシ-1,2:3,5-ジ-O-イソプロピリデン-α-D-グルコフラノース(P-アミノグルコース) 137 mg を N, N'-ジメチルホルムアミド(DMF) 4 mL に溶解した。片末端がアジド基のポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (N_3 -PEG-P(Asp)) (分子量 12,000) 40 mg を DMF 4 mL および水 1 mL の混合溶媒に溶解し、その溶液を上記 P-アミノグルコース溶液に加えた。その後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 203 mg をさらに加えた。得られた混合溶液を室温下で13時間攪拌した。その後、混合

溶液を透析膜（分画分子量 6,000－8,000）を用いて、DMSO 中で透析し、次いで水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥して、保護グルコースを導入したポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 49 mg（収率 96%）を得た。

[0131] 次に、グルコースの保護基を脱保護して、グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体を得た。具体的には、保護グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 49 mg に対して、トリフルオロ酢酸および水をそれぞれ 18 mL および 2 mL 混合した溶液を加え、室温で 20 分撹拌した。その後、透析膜（分画分子量 6,000－8,000）を用いて、4℃に保ちながら水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥して、グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 40 mg（収率 87%）を得た。

[0132] さらに、蛍光色素として DyLight 488 で得られた共重合体を標識した。具体的には、グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 40 mg をジメチルスルホキシド（DMSO）10 mL に溶解した。また、DyLight 488 N-スクシンイミドエステルを DMSO 5 mL に溶解し、その溶液をグルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体溶液に加えた。混合溶液を室温下 48 時間撹拌した。次に、混合溶液を透析膜（分画分子量 6,000－8,000）を用いて、水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥し、黄色の固体が得られた。得られた固体を PD-10 カラム（GE Healthcare 社）により、精製した。溶出液を透析膜（分画分子量 6,000－8,000）を用いて、水中で透析した。膜内の溶液を凍結乾燥して、DyLight 488 蛍光標識化グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 33 mg を得た。

[0133] 6-2. グルコース導入抗体の調製

次に、得られた DyLight 488 蛍光標識化グルコース導入ポリエチレングリコール－ポリアスパラギン酸ブロック共重合体と抗体とをコンジュ

ゲートさせてグルコース導入抗体を得た。具体的には以下の通りである。

[0134] まず、IgG抗体をCy5標識した。具体的には、市販のマウスIgG、アイソタイプコントロール (Southern Biotechnology Associates Inc.) (5 mg/mL) 溶液の5 mLをVIVASPIN (分画分子量10,000) の上部パーツに入れた。ここで、0.1 Mリン酸バッファー (pH 8.4) を加えた後に、4℃、2000 rpmで遠心する操作を繰り返して、溶媒を0.1 Mリン酸バッファー (pH 8.4) に置換して、その後、溶液量が2.5 mLとなるまで濃縮した。次に、Cy5-N-スクシンイミドエステル (Cy5-NHS エステル) (1 mgタンパク質ラベル用) (GE Healthcare社) にN,N-ジメチルホルムアミド300 µLを加え、ピペティングを行い、そのうち250 µLをIgG溶液に加えた。その後、混合溶液を室温で4時間穏やかに震盪した。そして、VIVASPIN (分画分子量10,000) を用いて、4℃、2000 rpmで限外濾過を繰り返し、IgG溶液の精製を行うと共に、溶媒をD-PBS (-) へと置換し、Cy5標識化されたIgG (Cy5-IgG) (0.9 mg/mL) 溶液5 mLを得た。

[0135] 次に、抗体と6-1で得た共重合体とのコンジュゲートを得るため、抗体にジベンジルシクロオクチン (DBCO) を導入した。具体的には、Cy5-IgG 0.9 mg/mL溶液2 mLをVIVASPIN (分画分子量10,000) の上部パーツに入れた。上部パーツに0.1 Mリン酸バッファー (pH 8.4) を加えた後に、4℃、2000 rpmで限外濾過を繰り返し、溶媒を0.1 Mリン酸バッファー (pH 8.4) に置換して、その後、溶液量が2 mLとなるまで濃縮した。次に、IgG溶液にジベンジルシクロオクチン-N-スクシンイミドエステル (DBCO-NHS エステル) の0.41 mg/mL DMF溶液を200 µL加えた。混合溶液を室温下4時間穏やかに震盪させた。反応終了後、反応液をVIVASPIN (分画分子量10,000) の上部ユニットに入れ、D-PBS (-) を加えた後に、4℃、2000 rpmで限外濾過を繰り返し、IgG溶液の精製を行うと共に

に、溶媒をD-PBS（－）へと置換し、4 mLのDBCOが導入されたCy5標識-IgG（Cy5標識DBCO-IgG）溶液を得た。

- [0136] さらに、DBCOと6-1で得た共重合体のアジド基を反応させて、抗体と共重合体とのコンジュゲートを得た。具体的には、まず、グルコース導入DyLight 488蛍光標識化ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体3.5 mgをD-PBS（－）800 μ Lに溶解した。得られた溶液をCy5標識DBCO-IgG溶液2 mLに加えた。混合溶液を-30℃で36時間静置し、その後、4℃で4時間静置して、ゆっくりと融解させた。得られた反応液をVIVASPIN（分画分子量50,000）の上部パーツに入れた。上部パーツにD-PBS（－）を加え、4℃、2000 rpmで限外濾過を繰り返して、IgG溶液の精製を行い、DyLight 488蛍光標識化ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体が抗体1分子に対して平均2分子結合したCy5標識IgG（Glc-polymer conjugated IgG）溶液（0.11 mg/mL）3 mLを得た。

[0137] 6-3. 抗体の体内動態評価

6週齢のBalb/C雌マウス8匹の給餌を24時間止めた。8匹のマウスをA群、B群およびコントロール群（それぞれ3匹、3匹および2匹）に分けた。A群のマウスにはGlc-polymer conjugated IgGを、B群のマウスにはCy5-IgGをそれぞれ750 nMで200 μ Lずつ静脈内注射し、その5分後に20%グルコース溶液200 μ Lを腹腔内投与した。なお、各抗体のCy5に由来する蛍光強度は同等であった。A群およびB群のマウス3匹ずつを抗体投与から57分後にジエチルエーテル麻酔にかけ、その3分後に採血と臓器摘出（脳、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓および大腿筋）を行った。コントロール群2匹も別途、採血と臓器摘出を行った。採血により得られた血液は、それぞれ4℃、15,000 rpmで遠心をし、上清を回収した。8匹のマウスの摘出した臓器はまず全体の重量の測定を行った後、脳は半分、肝臓はおよそ200 mgを切りとり、ま

た、腎臓は片側を取得して、重量の測定を行い、マルチビーズショッカー用のチューブに臓器を金属のコーンとともに入れた。また、コントロール群のうちの1匹を除いた7匹の脳および肝臓のサンプルには1×Passive Lysis Bufferを600 μ L、脾臓、心臓および大腿筋のサンプルには300 μ L、腎臓および肺のサンプルには400 μ Lずつ加えた。一方、コントロール群のうちの残った1匹のマウス（100%コントロール）の臓器のサンプルには、静脈内注射したサンプル全てが該当する臓器に集積したと仮定した時のサンプル量を計算し、その量のCy5-IgG溶液を臓器のサンプルに加え、さらに加える溶液量の合計が他の7匹のマウスと同じになるように1×Passive Lysis Bufferを加えた。全ての臓器サンプルをマルチビーズショッカーにより、2000rpmで30秒動作を5回繰り返し、臓器をホモシナイズした。臓器のチューブからコーンを除いた後、それぞれのサンプルを100 μ Lずつマルチプレートの各ウェルに入れ、マルチプレートリーダーで励起波長643nm、蛍光波長667nmとして蛍光強度の測定を行った。コントロール群のうちCy5-IgG溶液を加えていない方をブランクとし、加えた方を100%として各臓器の抗体の集積率を計算し、血液以外は、得られた集積率を臓器の重量（g）で除した値を算出した。

[0138] すると、グルコースをコンジュゲートさせた抗体は、血液脳関門を突破し、脳実質に到達した。脳実質への抗体の到達量は、対照（Cy5-IgG）の2倍であった（図10）。

[0139] 上記実施例1～6によれば、外表面をグルコースで修飾したPICミセル（実施例2）、PICsome（実施例3）、siRNAミセル（実施例4）、グルコースコンジュゲート高分子（実施例5）およびグルコースコンジュゲート抗体（実施例6）は、血糖操作を伴ってマウスに投与すると、血液脳関門を通過し、顕著に脳に蓄積した。血液脳関門の物質透過性は限定的であり、多くの薬剤は血液脳関門を通過することができず、その本来の効果を示すことができない。本発明によれば、薬剤をグルコースで修飾し、または

薬剤を内包するミセルをグルコースで修飾して、血糖操作を伴って投与すると、ミセルやP I C s o m eのような巨大なミセルであっても血液脳関門を通過させることができた。この成果は、従来血液脳関門を通過しなかった分子を脳に送達する画期的な手法を提供するものであり、様々な既存のまたは今後生み出される脳疾患薬および脳画像診断薬に適用可能であり、脳疾患治療または脳画像診断における新たな途を切り拓くものである。

[0140] 実施例 7. 血管内皮細胞への送達

上記実施例 2 によれば、グルコース導入率 25% のミセルは 3% を超える脳への蓄積を示したのに対して、グルコース導入率 50% のミセルは約 1.3% の脳への蓄積を示した。このことは、グルコースの導入率が増加することにより、脳血管内皮細胞に取り込まれたミセルと脳血管内皮細胞との解離が低下することを意味すると考えられた。そこで、本実施例では、グルコース導入率と脳血管内皮細胞へのミセルの蓄積との関係を確認した。

[0141] まず、実施例 1-7 および実施例 2 に記載の通り、G I c (6) - P E G - P (A s p.) と P E G - P (A s p.) との混合量を調節して、グルコース導入率 10% のミセル、グルコース導入率 25% のミセルまたはグルコース導入率 50% のミセルを調製した。

[0142] 得られたミセルをそれぞれマウスに i. v. 投与して 2 日後に、常法により脳の組織切片（厚み：14 μ m）を作成し、免疫蛍光染色により脳血管内皮細胞を染色し、ミセルの蛍光との局在を観察した。脳血管内皮細胞は、一次抗体として抗 P E C A M - 1 抗体（Santa Cruz 社製、製品番号：SC18916, Rat monoclonal）を用い、二次抗体として A l e x a 4 8 8 コンジュゲートーヤギ抗ラット I g G (H+L) 抗体（インビトロジェン社製、製品番号：A11006）を用いて検出した。また、ミセルは C y 5 の蛍光により検出した。

[0143] すると、図 12 A に示されるように、グルコース導入率 50% のミセルを投与したマウスの脳では、脳血管内皮細胞とミセルとの共局在が特に頻繁に観察された（図 12 A 内の矢じり）。また、図 12 B に示されるように、グルコース導入率 10%、25% および 50% のいずれでも脳血管内皮細胞へ

のミセルの共局在が観察されたが、グルコース導入率50%のときに脳血管内皮細胞への局在頻度が顕著に増加した。

[0144] 実施例1～6により、表面をグルコースで覆ったミセルなどの小胞や、グルコースをコンジュゲートした抗体などの化合物は、脳血管内皮細胞を通過して脳実質内に極めて効率良く送達できることが示されたが、一方で、脳血管内皮細胞内にも一部のミセルなどの小胞や化合物が蓄積する可能性が示唆されていた。特に、表面をグルコースで覆ったミセルについては、グルコースの導入率が高まるほど、脳血管内皮細胞から脳実質に脱出するミセルの量が低下することから、ミセルはその一部が脳血管内皮細胞にも蓄積できることが示されていた。実施例7でこの事実をさらにしたところ、確かに、ミセルが脳血管内皮細胞にも蓄積することが示された。また、グルコース導入率が50%のときに顕著に脳血管内皮細胞にミセルが蓄積することが示された。

[0145] 実施例1B：温度感受性3ブロック共重合体の合成

本実施例では、温度に応答してミセル化を引き起こす温度感受性共重合体を合成した。温度感受性共重合体は、親水性鎖－カチオン性鎖－温度感受性鎖を連結した三元型ブロック共重合体とした。

[0146] 共重合体は、親水性鎖としてポリエチレングリコール（PEG）と、カチオン性鎖としてポリカチオンと、温度感受性鎖としてポリ（2－n－プロピル－2－オキサゾリン）（PnPrOx）とが連結した共重合体を合成して用いた。PnPrOxは、下限臨界溶液温度（LCST）以上の温度で疎水性を示し、LCST以下の温度で親水性を示す温度感受性の重合体である。

[0147] 出発材料

N，N－ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、アセトニトリル、クロロベンゼン、N，N－ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）、メタノール、アジ化ナトリウム、p－トルエンスルホン酸メチル（MeOTs）、N6－トリフルオロアセチル－L－リシン－N－カルボン酸無水物（Lys（TFA）－NCA）は、一般グレードのもの

を購入して適宜精製作業を行った後使用した。ノルマルプロピルオキサゾリン ($nPrOx$) は東京化成工業株式会社に委託大量合成したもの、またジベンジルシクロオクチン-N-ヒドロキシコハク酸エステル ($DBCO-NHS$) はClick Chemistry Toolsから購入したものを用了。

[0148] アジド末端を有するポリ (2-n-プロピル-2-オキサゾリン) ($PnPrOx$) の合成

開始剤 p-トルエンスルホン酸メチル ($MeOTs$) を $50\mu L$ ($61.7\mu g$) 測りとり、アセトニトリル $10mL$ 、クロロベンゼン $10mL$ を混合した溶媒に溶かした。氷冷しながらこの開始剤溶液にモノマーである n-プロピルオキサゾリン ($nPrOx$) を $8.5mL$ ($8.76g$, モノマー/開始剤 = 234) 加え、 $42^{\circ}C$ の水浴で 12 日間重合した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) で目標の分子量に達したことを確認し、重合停止剤としてアジ化ナトリウムを $430mg$ (停止剤/開始剤 = 20) 加え、 $70^{\circ}C$ で 2 日間攪拌して重合停止を行った。全ての反応はアルゴン雰囲気下で行った。なお、アセトニトリルと $nPrOx$ モノマーは脱水剤の水素化カルシウムを加えて蒸留、クロロベンゼンと開始剤 $MeOTs$ は脱水剤の五酸化ニリンを加えて蒸留したものを用了。反応後のサンプルは、メタノールに対して透析を 3 回、水に対して透析を 4 回行った後、凍結乾燥により回収した (収率 58%)。

[0149] PEG-ポリリジン (トリフルオロ酢酸) の合成

ベンゼン凍結乾燥をした片末端メトキシ基片末端 3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール ($PEG-NH_2$) (分子量 2,200) $433mg$ を、1M チオウレアを含む N, N'-ジメチルホルムアミド (DMF) $10mL$ に溶解し、開始剤溶液とした。N6-トリフルオロアセチル-L-リシン-N-カルボン酸無水物 ($Lys(TFA)-NCA$) $2.37g$ を、1M チオウレアを含む DMF $20mL$ に溶解させモノマー溶液とした。このモノマー溶液を開始剤溶液に加え、 $35^{\circ}C$ で 3 日間重合反応を行った。赤外分光 (IR) 分析で重合反応が終了したことを確認したのち、反応混合物をジ

エチルエーテル2 Lに滴下して沈澱したポリマーを吸引濾過により回収し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥してポリエチレングリコールポリ(N6-トリフルオロアセチル-L-リシン)ブロック共重合体(PEG-PLys(TFA)) 2.39 g (収率85.1%)を得た。重合度は¹H-NMRにより40(TFA基脱保護後、1分子のsiRNAと同等の電荷数を持つ重合度)であることを確認した。

[0150] PEG-PLys(TFA)-DBCOの合成

PEG-PLys(TFA) 120 mgを5 mLのDMFに溶解した。これにジベンジルシクロオクチンNHSエステル(DBCO-NHS)を34 mg加え、4時間攪拌した。その後N,N-ジイソプロピルアミン(DIEA)を11 μ L加え、37°Cで24時間攪拌した。反応後のサンプルは、ジエチルエーテル150 mLに滴下して沈澱したポリマーを吸引濾過に供し、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空乾燥して回収した。PEG-PLys(TFA)-DBCOを105 mg (収率84.6%)得た。

[0151] PEG-PLys-PnP r O xの合成

まず、PEG-PLys(TFA)-DBCOとPnP r O x-N₃のカップリング反応を行った。100 mgのPEG-PLys(TFA)-DBCOと550 mgのPnP r O x-N₃を10 mLのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、4°Cで一晩かけてポリマー溶液を凍結させた。その後室温で凍結させたポリマー溶液を融解させた。続いてTFA保護基の脱保護を行うため、この反応溶液に40 mLのメタノールと0.84 mLの6M NaOH水溶液を加え、35°Cで12時間攪拌した。反応後のポリマー溶液は、0.01 M塩酸水溶液を外液として3回透析し、さらに純水を外液として4回透析した後に凍結乾燥により回収した。

[0152] 次に、回収後のポリマー混合物より未反応のPnP r O x-N₃を取り除くため、精製作業を行った。上記ポリマーポリマーカップリングの効率は低いと考えられ、このポリマー混合物には未反応のPnP r O x-N₃、PEG-PLys-DBCO、そして生成物であるPEG-PLys-PnP r O x

が含まれていると予想された。この中で PnPrOx-N_3 のみがアセトンに対して可溶であることに着目した。ポリマー混合物 10 mg あたりに約 1 mL のアセトンを加えて攪拌し白濁溶液とした。これに対して 5000 rpm で 5 分間遠心分離を行いアセトンに不溶な成分を沈殿させた後、上澄みを除去した。この操作を 3 回繰り返して行い、アセトンに不溶な成分を回収した。これを純水に溶解させ、純水を外液として 5 回透析をおこなった後に凍結乾燥により回収した。

[0153] 先の精製作業より、ポリマーサンプルは PEG-PLys 、 PEG-PLys-PnPrOx であると考えられる。 PEG-PLys-PnPrOx のみを得るため、 PnPrOx の温度応答による疎水化とそれに続く粒子形成を利用した精製作業を試みた。ポリマーサンプルを 20 mg あたり約 1 mL の 500 mM NaCl 水溶液に溶解させ、40℃で30分程度静置した。その後分画分子量 300,000 Da の膜のついた限外濾過チューブを用いて、40℃、3,000 rpm で 20 分間遠心分離を行った。フィルターの下に落ちた洗液を取り除き、再びチューブを 40℃の 500 mM NaCl 水溶液で満たした後、40℃、3,000 rpm で 20 分間遠心分離をするという作業を 8 回繰り返した。最後にチューブに純水を加え、4℃で1時間静置してフィルターにトラップした成分を溶かして回収した。回収した溶液は外液を純水として数回透析した後、凍結乾燥により回収した。収量は 72 mg (収率 29.3%) であった。回収したサンプルは、水系ゲル浸透クロマトグラフィー (水系 GPC) による PnPrOx 、 PEG-PLys に対する分子量の違いや $^1\text{H-NMR}$ による構造解析により PEG-PLys-PnPrOx と同定した (図 16)。 PnPrOx 部分の数平均分子量は約 2 万であり、平均重合度は 177 であった。

[0154] 実施例 2B: PEG-PLys-PnPrOx と siRNA とのポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルの作製

PEG-PLys-PnPrOx 共重合体は、温度依存的にミセル形成の進行を制御できる。本実施例ではこの温度感受性共重合体を用いて siRNA

Aとのポリイオンコンプレックスを作製した。

[0155] siRNAは、コレステロール結合型および非結合型、並びに、蛍光分子結合型および非結合型をジーンデザイン社から購入した。具体的には、5'末端がコレステロール化された配列番号1のオリゴRNAと、配列番号2のオリゴRNAをジーンデザイン社から購入した。

[0156] 親疎水ミセルを用いて、数多く報告されているsiRNAデリバリーキャリアの例としては、まず親疎水ミセルを形成させ、その後、それにsiRNAを担持させる方法である。本実施例では、まずポリマー溶液を37℃に静置し、PNPnOxの温度応答による疎水化で親疎水ミセルを形成させ、続いてsiRNAをミセルと接触させてsiRNAを担持させる方法（対照）に対応する。これに対して、本発明のミセルは、LCST以下の温度で温度感受性共重合体とsiRNAとを接触させ、その後、LCST以上の温度条件下でミセルを形成させて得られるものである（ユニットPICミセルまたはuPIC／ミセルと呼ぶ）。

[0157] 対照ミセル（siRNA-cPIC／ミセル）の作製

具体的には、まず、PEG-PLys-PNPnOxを15 μMの濃度で10 mM HEPESバッファー（pH 7.4、150 mM NaCl）に溶解させ、37℃で30分間静置させた。その後このポリマー溶液と37℃とした15 μMのsiRNA溶液を同様の体積だけ混合して（ポリマーとsiRNAの電荷比1）、コンプレックス形成を行った。この方法で調製した高分子ミセルをsiRNA-cPIC／ミセルと名付ける。同様に、疎水的な分子であるコレステロールが導入されたsiRNA（choi-siRNA）を用いて高分子ミセル、choi-siRNA-cPIC／ミセルを調製した。

[0158] ユニットPIC／ミセル（uPIC／ミセル）の作製

本実施例では、PLysとsiRNAが1対1会合体（uPIC）を形成することに着目して、まずuPICを形成させた後にPNPnOxの温度応答疎水化によりuPICを束ねる形で高分子ミセルを形成させることを思い

ついた。この方法では、従来のように高次構造を作った後にPIC形成を行うのではなく、PIC形成を行った後に高次構造を形成するため、最終的な構造が従来型より秩序だったものになっていると予想され、安定な構造体であると期待される。

[0159] まず、 $15\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で 10 mM HEPESバッファ（ $\text{pH} 7.4$ 、 150 mM NaCl）にポリマーを溶かし、 $15\text{ }\mu\text{M}$ のsiRNA溶液を 4°C においてポリマー溶液と同体積分混合し（ポリマーとsiRNAの電荷比1）、uPICを形成させた。その後 37°C で30分間静置することで高分子ミセル形成を行った。この方法で調製した高分子ミセルをuPIC／ミセルと名付ける。同様に、疎水的な分子であるコレステロールが導入されたsiRNA（choi-siRNA）を用いて高分子ミセル、choi-siRNA-uPIC／ミセルを調製した。

[0160] 実施例3B：得られたuPIC／ミセルおよびcPIC／ミセルの特性分析

本実施例では、実施例2で得られたuPIC／ミセルとcPIC／ミセルの物性や生理的安定性を分析した。

[0161] （アガロース電気泳動）

まず、siRNAが高分子ミセルに封入されているかをアガロースゲル電気泳動により確認した。 $7.5\text{ }\mu\text{M}$ の濃度のsiRNA-cPIC／ミセル、siRNA-uPIC／ミセル、choi-siRNA-cPIC／ミセルおよびchoi-siRNA-uPIC／ミセル溶液をそれぞれ $20\text{ }\mu\text{L}$ ずつアガロースゲルにロードし、 100 V で30分間電気泳動を行った。泳動後はエチジウムブロマイドによりsiRNAを染色した。PIC中に取り込まれたsiRNAは、電荷が中和されているため、siRNAのバンドは開始点より動かない。一方で、会合体の形成が起きていないsiRNAは、マイナスの電荷を有し、siRNAのバンドは電気泳動により移動するはずである。

[0162] その結果、図18に示されるように、cPIC／ミセルおよびuPIC／ミセルのいずれにおいても、バンドの移動は確認されず、ポリマーによりs

iRNAの電荷が完全に中和されている、すなわち、添加されたsiRNAのほとんどがPIC／ミセルに取り込まれたことが示唆された。

[0163] (動的光散乱測定)

続いて、得られたuPIC／ミセルおよびcPIC／ミセルの粒径と粒径分布(PDI)を動的光散乱(DLS)測定で調べた。その結果、図19に示されるように、いずれのミセルも50nm程度の粒径を有しており、PDIもすべて0.20以下となった。特筆すべき点として、uPIC／ミセルの方が小さいPDI(図19中の折れ線)を示した。PDIが小さいことは得られたミセルが均一な粒径を有することを意味し、本発明のuPIC／ミセルは形状において均一であると言える。おそらく、温度感受性共重合体とsiRNAとの複合体を形成させてからミセルを形成させると、秩序だった構造を形成しやすいからであると思われる。

[0164] (蛍光相関分光測定)

uPIC／ミセルについては、37℃での静置前にuPIC(すなわち、温度感受性共重合体とsiRNAとのイオン性結合による会合分子)を形成していることの確認実験を行った。蛍光分子Alexa-647を担持したsiRNAおよびchoi-siRNA溶液をそれぞれ20nMで用意した。共重合体とsiRNAでさまざまな正電荷／負電荷比(+／-比)となるよう、PEG-PLys-PnProx溶液の濃度を調節し150μLずつsiRNA溶液150μLに加えた。調製したそれぞれのサンプルについて、蛍光相関分光法(FCS)でsiRNAまたはchoi-siRNAが担持しているAlexa-647の拡散時間を調べた。共重合体とsiRNAとが会合すると、見かけの粒径が大きくなるため、FCSで観測されるAlexa-647の拡散時間は大きくなる。実際に共重合体を添加すると拡散時間が大きくなり、イオンコンプレックスの形成が確認された(図20)。また、拡散時間は共重合体とsiRNAの+／-比が1以上では一定であることから、共重合体とsiRNAは1対1の比で会合していることが分かる。

[0165] さらに、図21に示されるように、拡散時間が300 μ 秒程度であるのに対し、LCSTを超える温度条件下でミセル形成を促進した場合の拡散時間は1300 μ 秒程度となることから、温度を加える前においては高分子ミセルよりも小さい会合状態、すなわちuPICを形成していると考えられる。

[0166] これらの結果から、uPIC／ミセルの形成過程は、図16(2)に示されるように、まず、温度感受性三元共重合体とsiRNAとの会合体であるユニットPIC(uPIC)が形成され、その後LCST以上の温度条件下にさらすことにより、uPICがミセルを形成すると考えられる。

[0167] (ポリアニオンに対する安定性評価)

生体内には数多くのポリアニオン性分子が存在する。これらのポリアニオン性分子は、PICミセルを形成しているポリアニオン性分子と置き換わりPICのミセル構造を崩壊させ、ミセルの標的への送達効率を低下させるため、PICミセルにおいては、ポリアニオンに対する安定性は重要な因子である。ここでは、ポリアニオンとして、細胞膜表面に多く存在する生体由来成分であるヘパリンのナトリウム塩を用いた。

[0168] Alexa-647でラベルしたsiRNAおよびchoi-siRNAを用い、上述の方法にてsiRNA-cPIC／ミセル、choi-siRNA-cPIC／ミセル、siRNA-uPIC／ミセルおよびchoi-siRNA-uPIC／ミセルをそれぞれ調製した。

[0169] siRNA-cPIC／ミセルおよびsiRNA-uPIC／ミセルについてはsiRNAの濃度が100nMとなるように調製し、choi-siRNA-cPIC／ミセルおよびchoi-siRNA-uPIC／ミセルについてはchoi-siRNAの濃度が10nMとなるように調製し、これらの溶液に対して、ヘパリンナトリウムの濃度を0、3、8、7.5、15、30または60 μ g／Lとなるよう添加して、37℃で30分間インキュベーションした。FCSで粒子を観察した結果は図21で示される通りであった。

[0170] 図21で示されるように、コレステロール(Chol)を含まないPIC

ミセルは、ヘパリンナトリウムを $7.5 \mu\text{g/L}$ 以上加えると拡散時間が劇的に小さくなり、ヘパリンによりPICミセルが崩壊したことが理解できる。これに対してコレステロールを導入したchoi-siRNA-cPIC／ミセルおよびchoi-siRNA-uPIC／ミセルでは、PICミセル濃度が $1/10$ であるにも関わらず、ヘパリン濃度を $15 \mu\text{g/L}$ まで高めても、拡散時間の大きな変化は見られなかった（図21）。PICミセル中では、siRNAに連結したコレステロールがポリアニオンに対する耐性を劇的に高めていると考えられる。ポリアニオンに対する耐性は、特にuPIC／ミセルにおいて顕著に高く、choi-uPIC／ミセルは $30 \mu\text{g/L}$ のヘパリンナトリウムに対しても安定であった。

[0171] (^1H -NMR測定)

cPIC／ミセルとuPIC／ミセルとの構造の違いを ^1H -NMR測定により明らかにした。図22(a)に示されるようにChoi-siRNAは、 2 ppm 付近にコレステロール基に由来するピークを有する。cPICでは、図22(b)に示されるように、このコレステロール基に由来するピークが見いだされたが、uPIC／ミセルでは、コレステロール基に由来するピークが見いだされなかった。このことは、cPIC／ミセルでは、コレステロール基がPIC／ミセルの表面の露出している（図22(d)）一方で、uPIC／ミセルでは、コレステロール基がミセルのコアの内部に格納されている（図22(e)）ことを意味する。

[0172] 本実施例では、コレステロールを連結したsiRNA-cPIC／ミセルも比較的高い安定性を示したが、本発明のuPIC／ミセルでは、ミセル形成時にコレステロールがその疎水性相互作用を介してミセルの疎水性コアに取り込まれたために、このような構造的な相違をもたらし、さらに高い安定性を示したと考えられる。

[0173] これらの結果から、コレステロールを導入したsiRNAと、本発明のuPICとの組合せは、従来にない特徴的な構造を生じ、これにより、従来よりも安定なミセルを提供するものとなる。

[0174] 実施例 4 B：生体内におけるミセルの安定性評価

本実施例では、生体内における c P I C / ミセルと u P I C / ミセルの安定性を調べた。

[0175] 本発明の u P I C / ミセルが生体内において高い安定性を有するかを確認するため、i n v i v o 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、u P I C / ミセルの血中滞留性を観察することで評価した。A l e x a - 6 4 7 でラベル化された s i R N A および c h o l - s i R N A を用い、上述の方法にて s i R N A - c P I C / ミセル、c h o l - s i R N A - c P I C / ミセル、s i R N A - u P I C / ミセルおよび c h o l - s i R N A - u P I C / ミセルを調製した。7.5 μ M の s i R N A 濃度に調製した高分子ミセル溶液 200 μ L を、マウスに尾静脈より投与した。そしてマウスの耳の静脈を i n v i v o 共焦点レーザー顕微鏡で観察し、血中にある高分子ミセルの残存量を A l e x a - 6 4 7 の蛍光量より評価した。

[0176] その結果、図 23 に示されるように、コレステロールを連結した s i R N A の血中滞留性は比較的良好であり、特に、c h o l - s i R N A - u P I C / ミセルは最も長い血中滞留性を示した。このことから、本発明の C h o l - s i R N A - u P I C / ミセルは、効率的な s i R N A デリバリーを実現することが期待される。

[0177] 実施例 5 B：脳を標的とした s i R N A の送達

標的組織は、特に限定されないが、本実施例では脳を標的とした s i R N A の送達を試みた。脳は、血液脳関門 (B B B) の存在により、最も薬剤の送達が困難な臓器であると考えられている。

[0178] 脳への s i R N A - u P I C / ミセルの送達は、グルコースをミセル表面に担持させた上で、絶食したマウスにグルコース溶液を投与して、その 30 分後に s i R N A - u P I C / ミセルを投与して行った。

[0179] グルコースをミセル表面に担持させるために、実施例 1 に記載した温度感受性共重合体の出発材料として、P E G - N H₂ の P E G 側末端に 1, 2 - O - イソプロピリデン - 3, 5 - O - ベンジリデン - α - D - グルコフラノー

ス（以下、「BIG」という）を連結した、BIG-PEG-HN₂を用いた。

[0180] BIG-PEG-PLys (TFA) の合成

実施例1におけるPEG-PLys (TFA) の合成と同様に行った。149 mgのBIG-PEG-HN₂と764 mgのLys (TFA)-NCAから、BIG-PEG-PLys (TFA) を得た。

[0181] BIG-PEG-PLys (TFA)-DBCOの合成

実施例1と同様の手順で、200 mgのBIG-PEG-PLys (TFA) と30 mgのDBCO-NHSからBIG-PEG-PLys (TFA)-DBCOを180 mg（収率87.0%）得た。

[0182] Glc (6)-PEG-PLys-PnPrOxの合成

170 mgのBIG-PEG-PLys (TFA)-DBCOと、実施例1で合成した840 mgのPnPrOx-N₃から、実施例1と同様の手順で、BIG-PEG-PLys-PnPrOxを得た。その後、BIG-PEG-PLys-PnPrOxのBIG部分の保護基をトリフルオロ酢酸を用いて脱保護して、Glc (6)-PEG-PLys-PnPrOxを90 mg（収率25.0%）得た。

[0183] siRNAとしては、蛍光色素Cy5で標識し、コレステロール基を導入したsiRNAを用いた。siRNAは、βセクレターゼBACE1遺伝子の発現をノックダウンするように設計され、具体的な配列は、配列番号：1および2に示される通りであった。

[0184] siRNA-uPIC／ミセルは、実施例2に記載される通りに作製した。作製する際には、グルコースを結合した温度感受性共重合体と実施例1で合成した温度感受性重合体とを1：9、1：3または1：1で混ぜ合わせて用いて、10%Glc (6)-Cy5-uPIC／ミセル、25%Glc (6)-Cy5-uPIC／ミセルおよび50%Glc (6)-Cy5-uPIC／ミセルを調製した。

[0185] 脳実質へのsiRNAの取り込みとBACE1遺伝子のノックダウンの効果

24時間給餌しなかった絶食マウス (Balb/c雌6週齢) に20 v/v %のグルコース溶液を腹腔内投与 (i.p. 投与) し、i.p. 投与から30分後にCy5-siRNA-Chol (BACE1) を封入した各ミセル溶液 (uPIC/ミセル、10%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル、25%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル、50%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル 50 µg/マウス、200 µL) を200 µL微静脈投与 (i.v. 投与) した。i.v. 投与から6時間後に脳を摘出し、脳の固定および染色を行なった。

[0186] 摘出した脳の固定および染色は以下の手順で行った。

1. 4℃、4%パラホルムアルデヒドを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で一晩静置して脳を固定する。
2. 4℃、20%スクロース溶液を含有するPBS中で一晩静置 (置換1) する。
3. 4℃、30%スクロース溶液を含有するPBS中で一晩静置 (置換2) する。
4. 全脳をOCT compound (商標) に包埋し、低温ヘキサンにて凍結する。−80℃にて保存する。
5. 凍結ミクロトームで凍結した脳を10~100 µmにスライスする。
6. PBS-T (PBS+0.1% tween 20) に5分間浸してスライスを洗浄する。
7. スライスにブロッキング液 (2%BSAを含有するPBS-T) を1時間接触させる。
8. ブロッキング液を除去し、洗わずに1次抗体溶液を加え室温で2時間静置する。
9. PBS-Tでスライスを10分間洗浄する。この洗浄を3回繰り返す。
10. 2次抗体溶液を加え、スライスを室温で1時間処理する。
11. PBS-Tでスライスを10分間洗浄する。この洗浄を3回繰り返す。

[0187] 免疫組織化学染色に用いた1次抗体は、ウサギポリクローナル抗NeuN抗体 (Millipore ABN78) であり、2次抗体は、Alexa Fluor 488 コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG (Invitrogen A11034) であった。

[0188] 染色後、共焦点顕微鏡 (LSM780) で脳スライスを観察したところ、図24に示されるように、Cy5-siRNA-Cholが発する蛍光 (赤) が、ニューロン由来の蛍光 (緑) と共局在していることが明らかとなった。

[0189] このことから、グルコースで修飾した温度感受性三元共重合体とsiRNAとのuPIC/ミセルは、静脈投与したミセルを脳にまで送達するに十分安定であり、siRNAは脳に送達されて脳細胞内に取り込まれたことが理解できる。

[0190] 実施例6B: siRNA-uPIC/ミセルを用いた脳内のβセクレターゼ遺伝子の発現抑制

本実施例では、送達したsiRNAが脳細胞内で標的であるβセクレターゼ遺伝子 (BACE1) の発現を抑制しているかを確認した。

[0191] 実施例5と同様にBACE1に対するsiRNA-uPIC/ミセルを調製し、24時間給餌しなかった絶食マウス (Balb/c雌6週齢) に20v/v%のグルコース溶液を腹腔内投与 (i.p.投与) し、i.p.投与から30分後にCy5-siRNA-Chol (BACE1) を封入した各ミセル溶液 (uPIC/ミセル (対照)、0%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル、25%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル、50%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル、100%Glc (6)-Cy5-uPIC/ミセル 50μg/マウス、200μL) を200μL尾静脈投与 (i.v.投与) した。i.v.投与から2日後に脳を摘出し、脳をホモジェナイズした。その後、脳内のRNAをRNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) で抽出し、260nmのUV吸収より、抽出したRNA濃度を標準化した。逆転写PCRはQuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて行なった。BACE1とβアクチン量は、リアルタイムPCR (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA)を用いて定量化した。BACE 1のmRNA量は、 β アクチンのmRNA量を用いて規格化した(図25の相対BACE 1 mRNA量参照)。図25に示されるように、本発明のsiRNA-uPIC/ミセルは、脳内神経細胞中のNeuN遺伝子を顕著にノックダウンすることが示された。

[0192] 脳内のmRNAの発現をボラスで静脈注射したsiRNAにより顕著にノックダウンすることは、siRNAの血中安定性や、BBBの存在から容易ではないと考えられたが、本発明のuPIC/ミセルを用いれば、顕著なノックダウンが可能であることが明らかとなった。

[0193] 本実施例では、BBBを突破させるためにuPIC/ミセルの表面をグルコースで覆い、血糖操作により、血管内皮細胞が血管壁に提示するグルコーストランスポーター(GLUT1)の細胞内取り込みを促進し、これと共に、GLUT1に結合したグルコース被覆ミセルを細胞に取り込ませた。すなわち、グルコースによる修飾率が高まるほど、血管内皮細胞へのミセルの取り込み効率は向上すると考えられる。

[0194] 一方で、図25によれば、グルコースによる修飾率は、25%の場合に最もノックダウン効率が高かった。これは、グルコースの修飾率には最適値が存在することを示唆するものであり、修飾率が高い場合には、BBBを突破する際に脳の血管内皮細胞から解離しにくくなり、結果として、脳の実質までsiRNAを含むミセルが到達しにくくなることを示唆する。また、本発明者らは、グルコース修飾率が高い場合にミセルが血管内皮に蓄積しやすい傾向を有することを示すデータを得た(データ非掲載)。

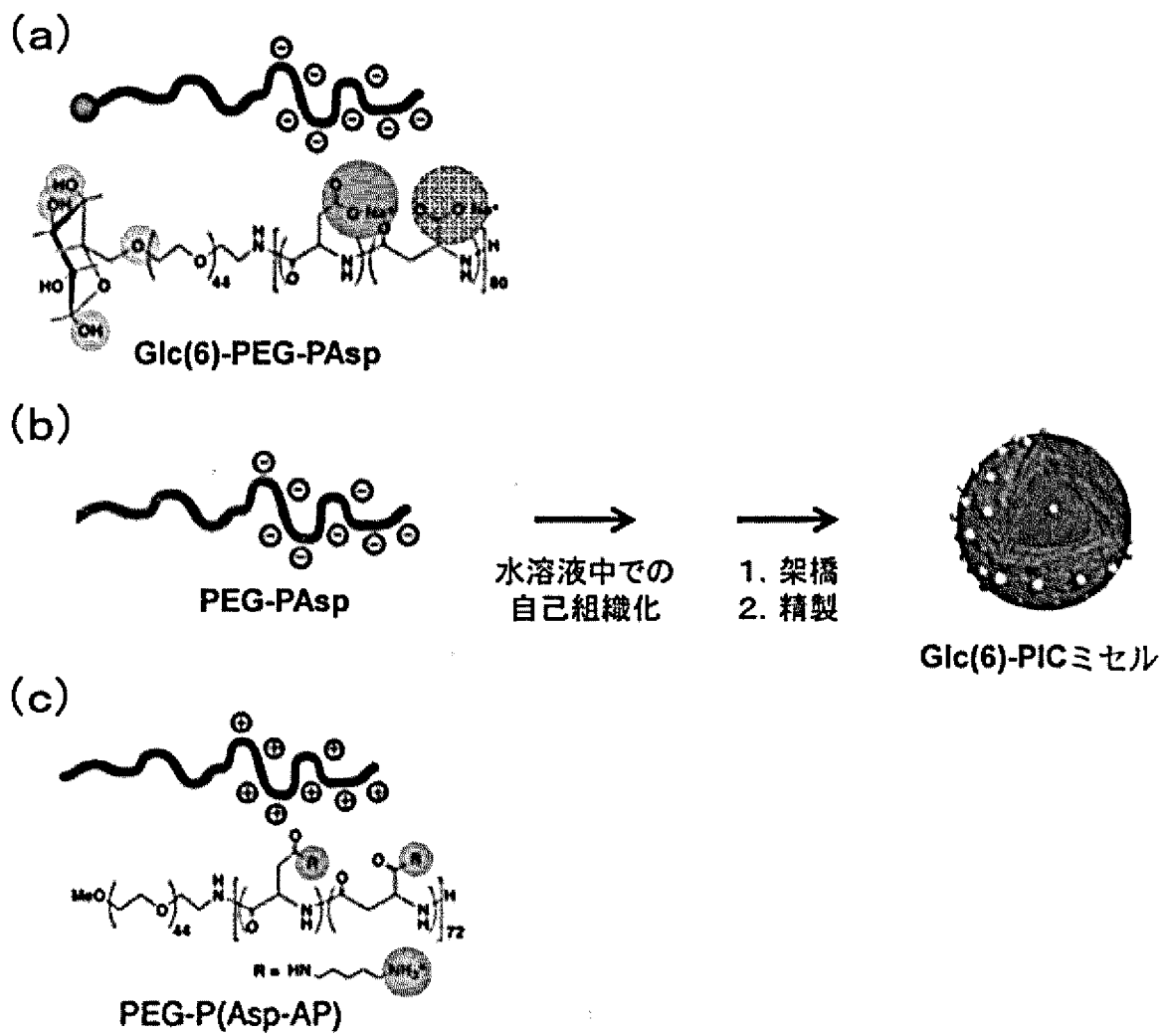
[0195] 従って、血管内皮細胞にsiRNAを送達したい場合には、グルコース修飾率の高いsiRNA-uPIC/ミセルを用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 温度感受性共重合体と核酸とのポリイオンコンプレックスであって、
- 温度感受性共重合体は、カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとを有し、
- 温度感受性共重合体の下限臨界溶液温度（LCST）以下の温度条件下で温度感受性共重合体と核酸とを混合して得られる、ポリイオンコンプレックス。
- [請求項2] カチオン性ブロックが、カチオン性アミノ酸ポリマーブロックである、請求項1に記載のポリイオンコンプレックス。
- [請求項3] 温度感受性共重合体が親水性ブロックを有し、親水性ブロックが、ポリエチレングリコールである、請求項1または2に記載のポリイオンコンプレックス。
- [請求項4] 温度感受性共重合体が、GLUT1リガンドで修飾された、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリイオンコンプレックス。
- [請求項5] 核酸が、生体適合性の疎水基で修飾されている、請求項1～4のいずれか一項に記載のポリイオンコンプレックス。
- [請求項6] 核酸が、siRNAである、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリイオンコンプレックス。
- [請求項7] カチオン性ブロックと温度感受性ブロックとを有する温度感受性共重合体を含んでなる、ポリイオンコンプレックスを作製するための組成物。
- [請求項8] カチオン性ブロックが、カチオン性アミノ酸ポリマーブロックである、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9] 温度感受性共重合体が親水性ブロックを有し、親水性ブロックが、ポリエチレングリコールである、請求項7または8に記載の組成物。
- [請求項10] 温度感受性共重合体が、グルコースで修飾された、請求項7～9のいずれか一項に記載の組成物。

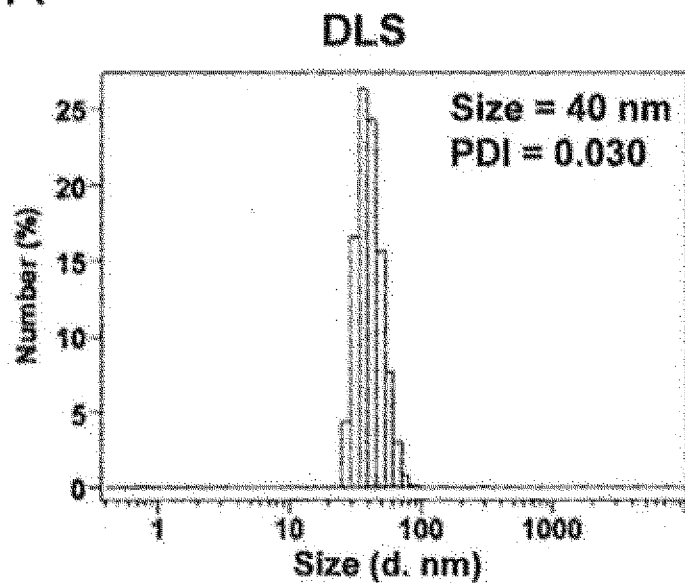
- [請求項11] 請求項1～6のいずれか一項に記載のポリイオンコンプレックスを該ポリイオンコンプレックスの下限臨界溶液温度（LCST）以上の温度条件下にさらして得られる、核酸を含有するミセル。
- [請求項12] 請求項11に記載のミセルを含む、核酸送達用組成物。
- [請求項13] 請求項11に記載のミセルであって、温度感受性共重合体がグルコースで修飾された、ミセル。
- [請求項14] 請求項13に記載のミセルであって、ミセル中の温度感受性共重合体のグルコース修飾率が、15～40%である、ミセル。
- [請求項15] 請求項13に記載のミセルであって、ミセル中の温度感受性共重合体のグルコース修飾率が、50～100%である、ミセル。
- [請求項16] 請求項13または14に記載のミセルを含む、脳実質への核酸送達用組成物。
- [請求項17] 請求項13または15に記載のミセルを含む、脳血管内皮細胞への核酸送達用組成物。
- [請求項18] 請求項16または17に記載の脳への核酸送達用組成物であって、組成物は、投与計画に従って対象に投与するための組成物であり、投与計画は、絶食させるか、または低血糖を誘発させた対象に該組成物を投与することと、該対象において血糖値の上昇を誘発させることとを含む、組成物。

[図1]

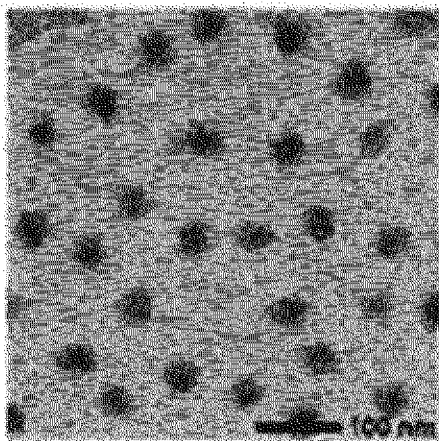


[図2]

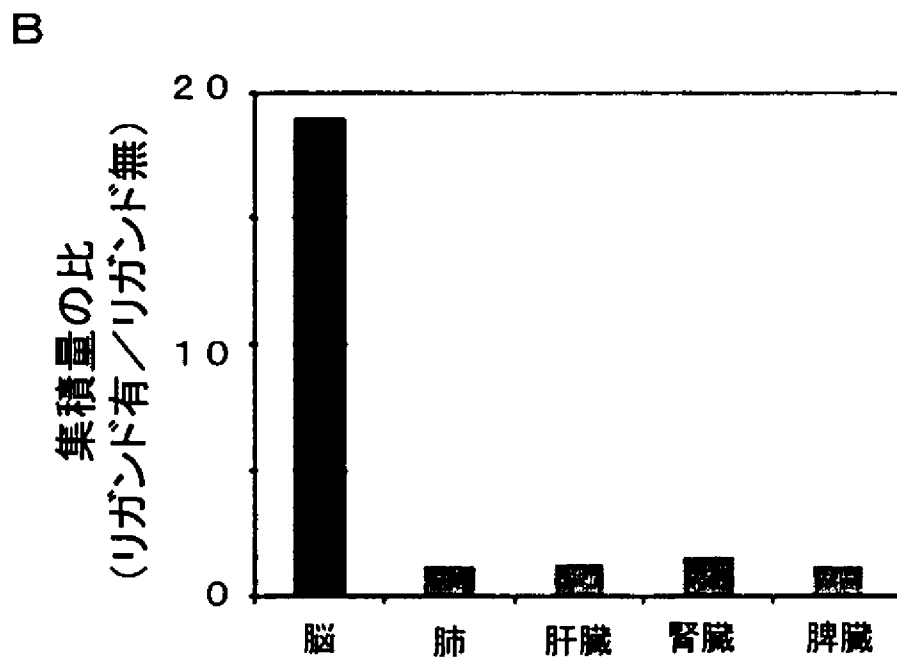
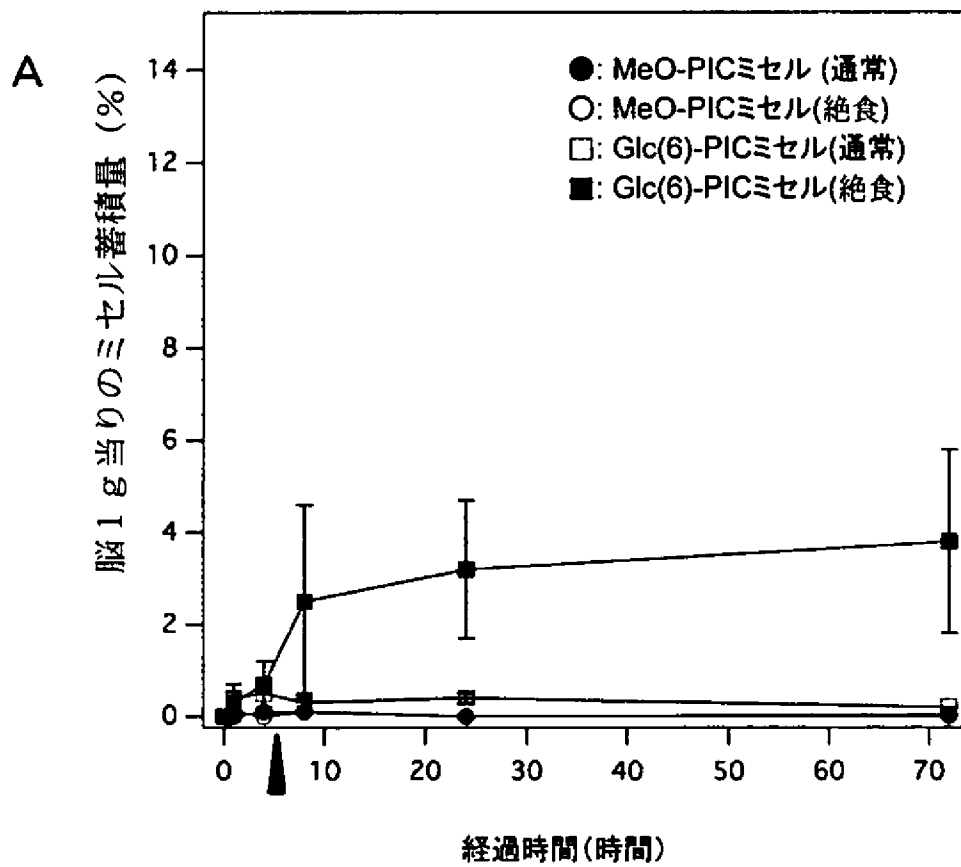
A



B

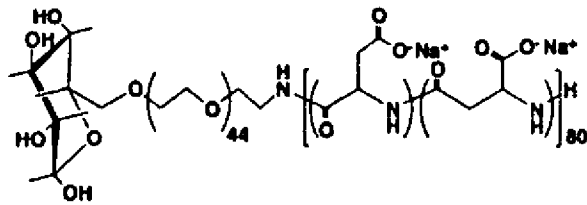
TEM

[図3]

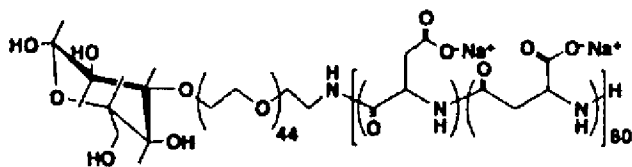


[図4]

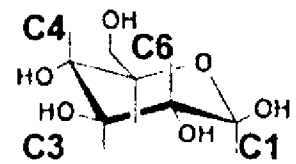
A



Glc(6)-PEG-P(Asp)

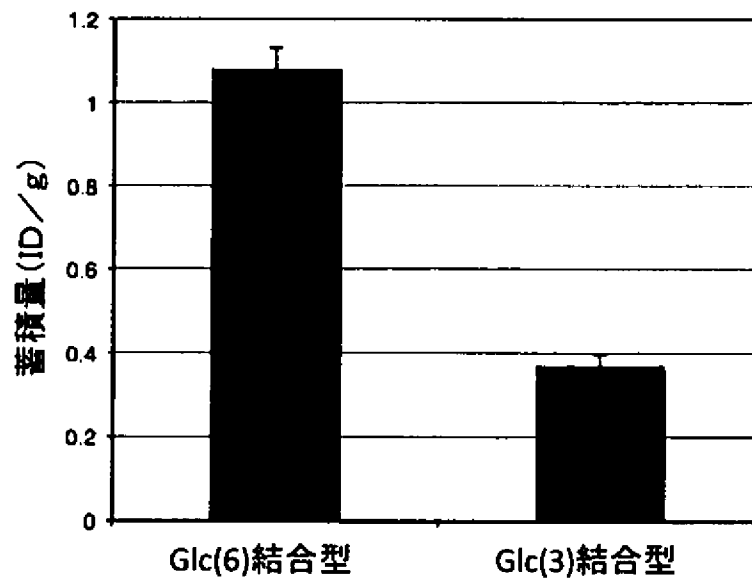


Glc(3)-PEG-P(Asp)



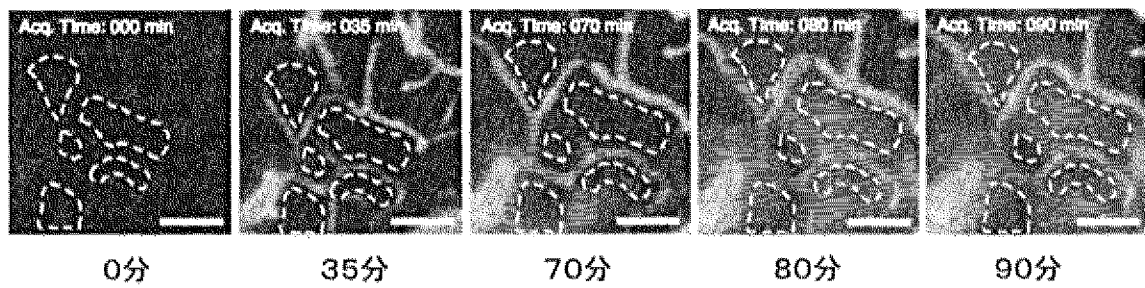
グルコース

B

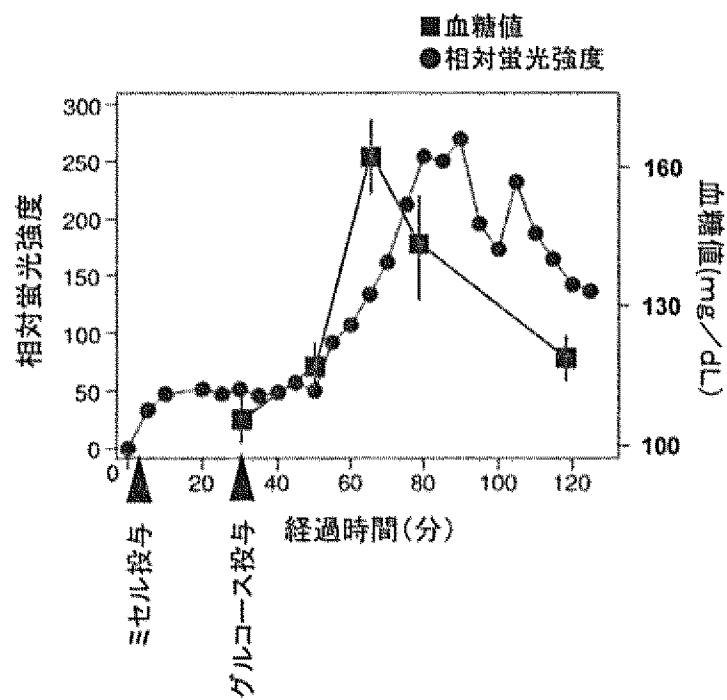


[図5]

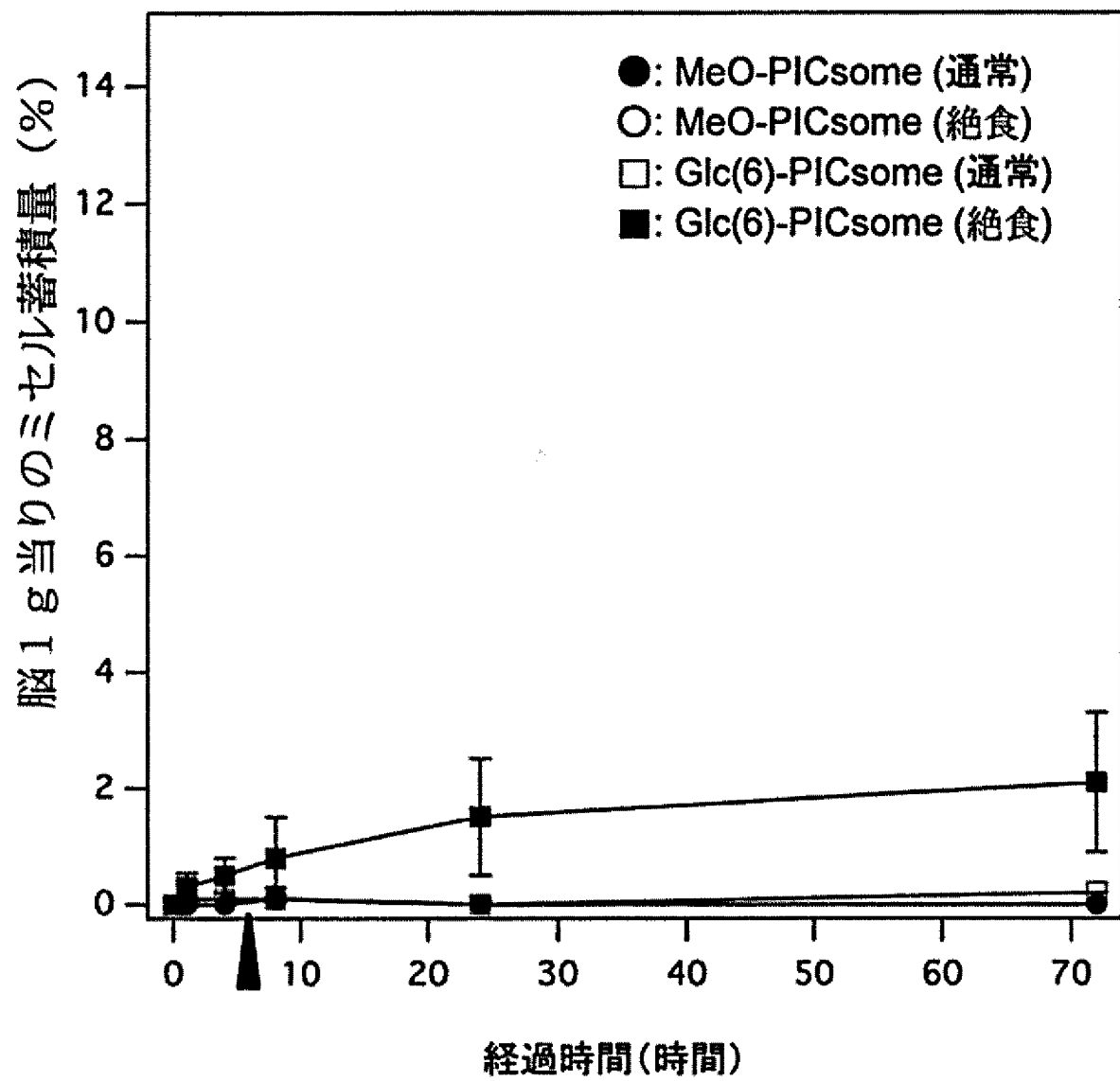
A



B

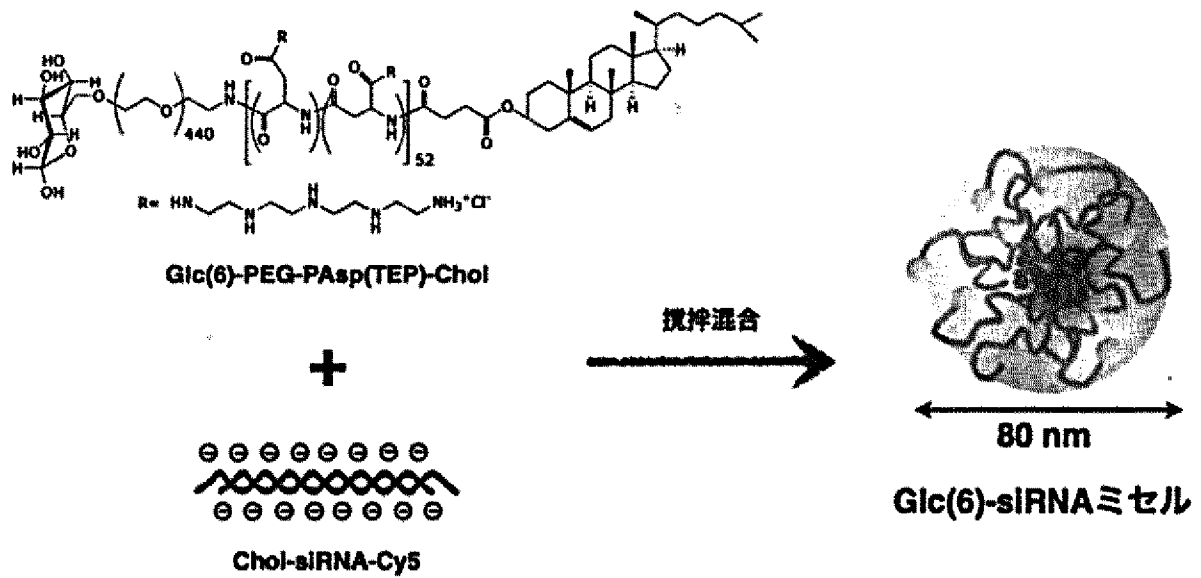


[図6]

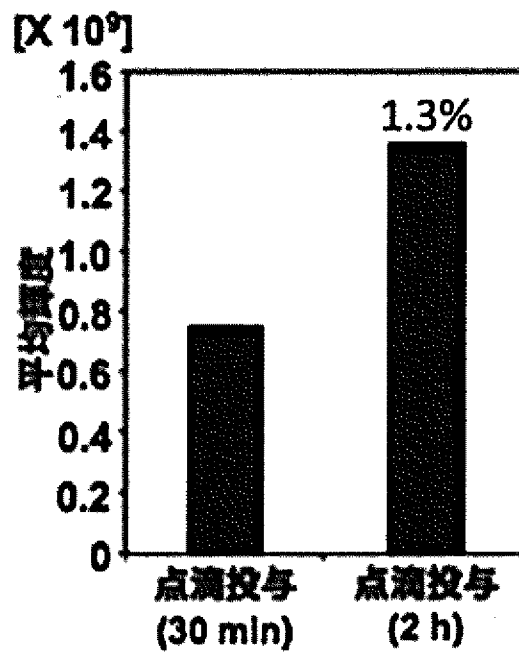


[図7]

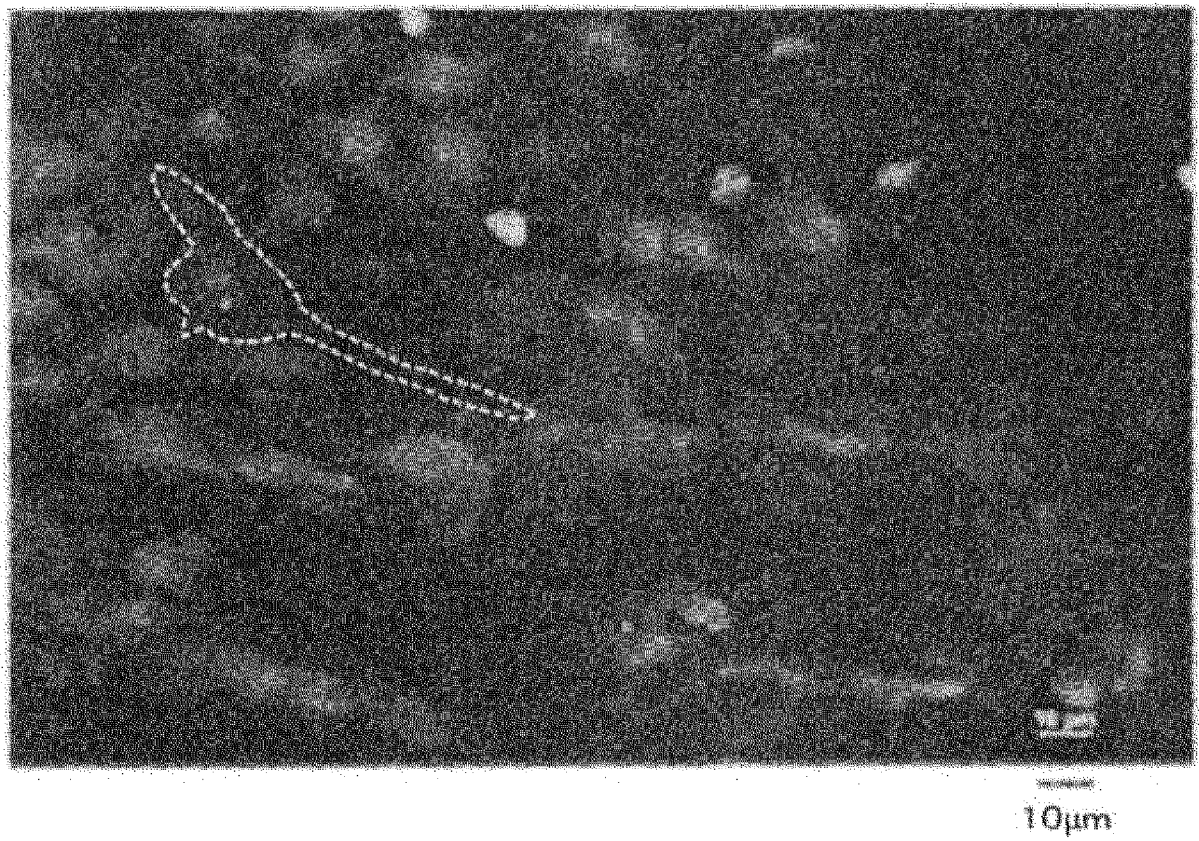
A



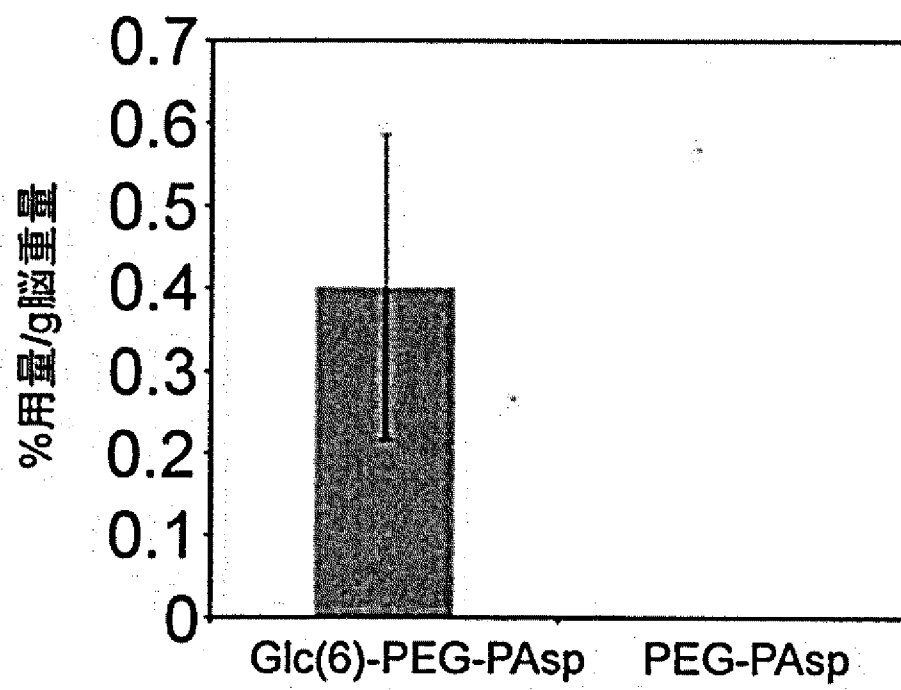
B



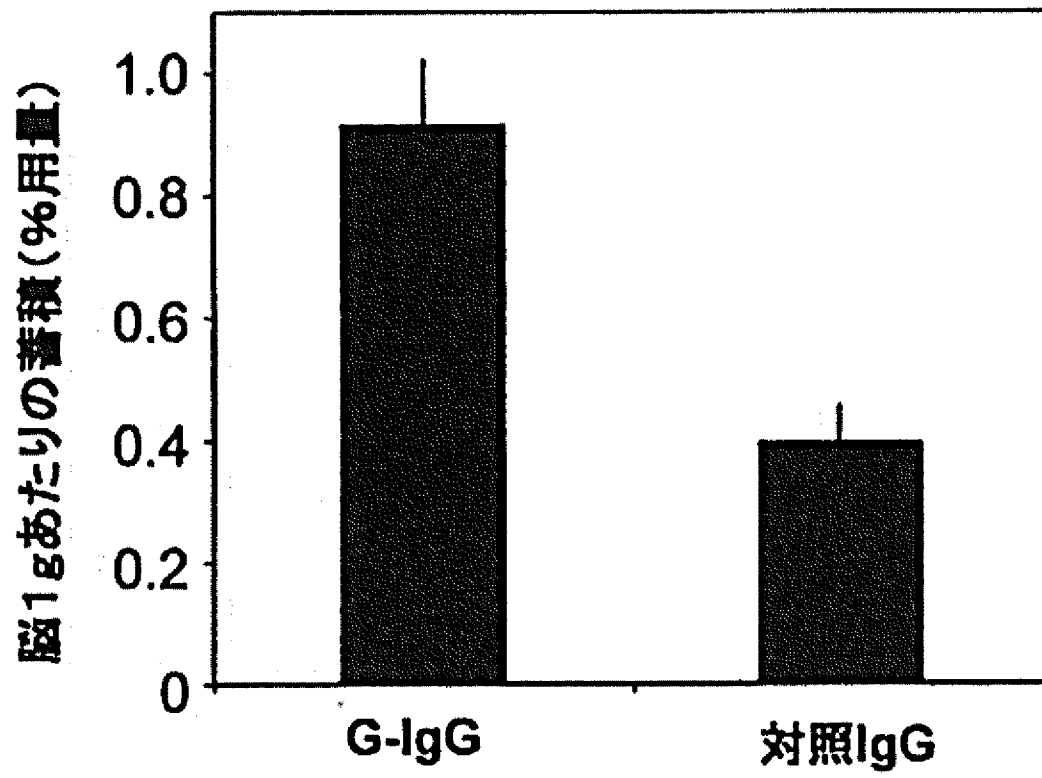
[図8]



[図9]

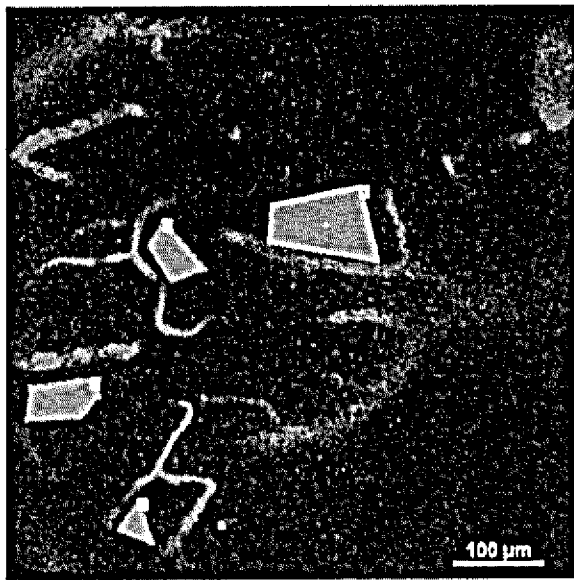


[図10]

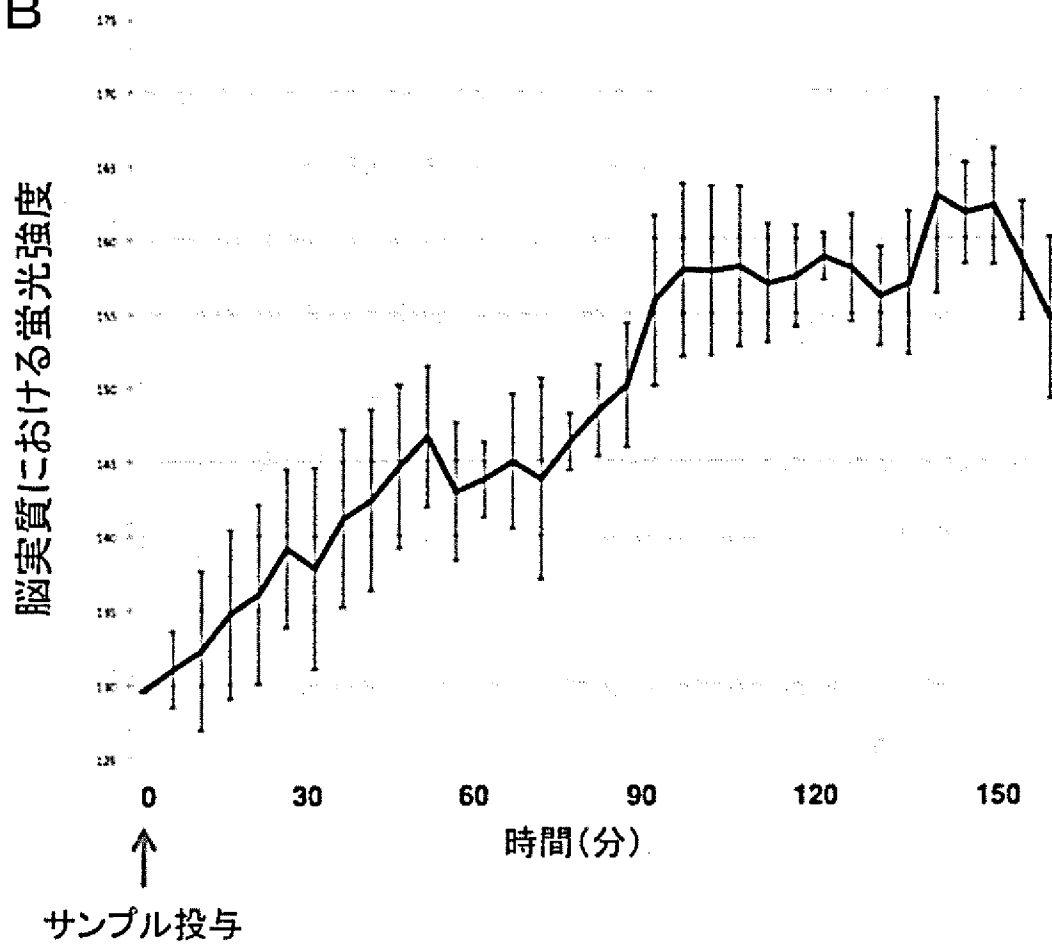


[図11]

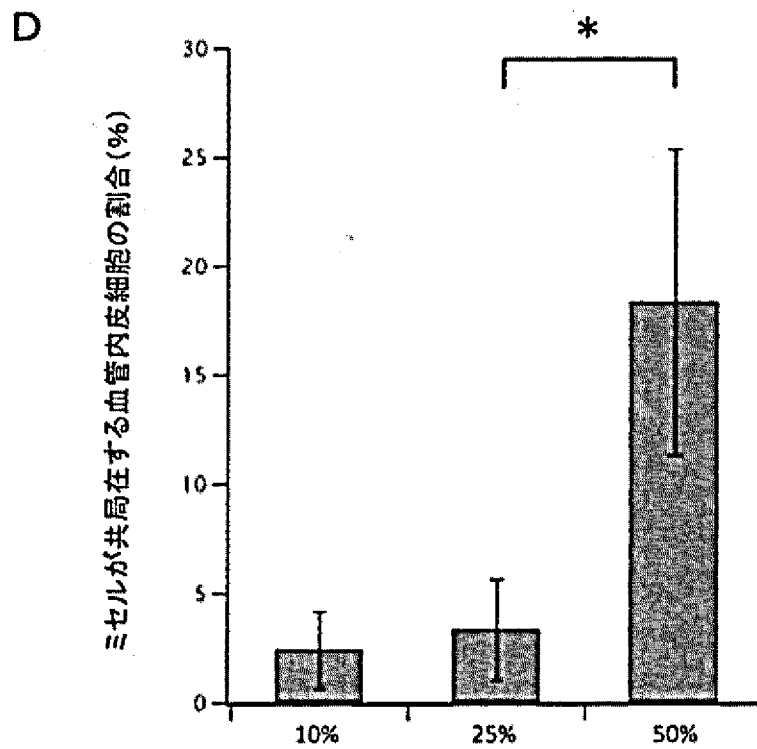
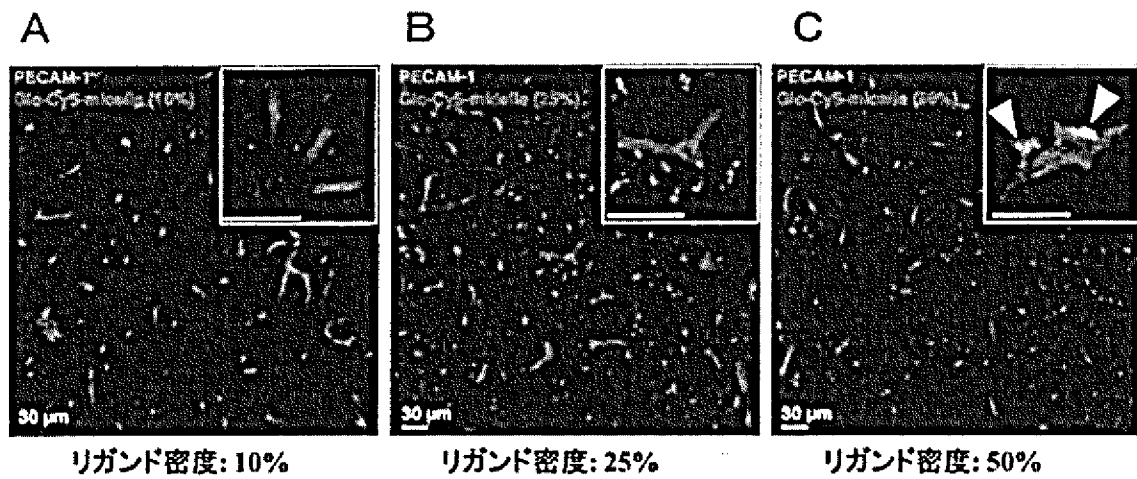
A



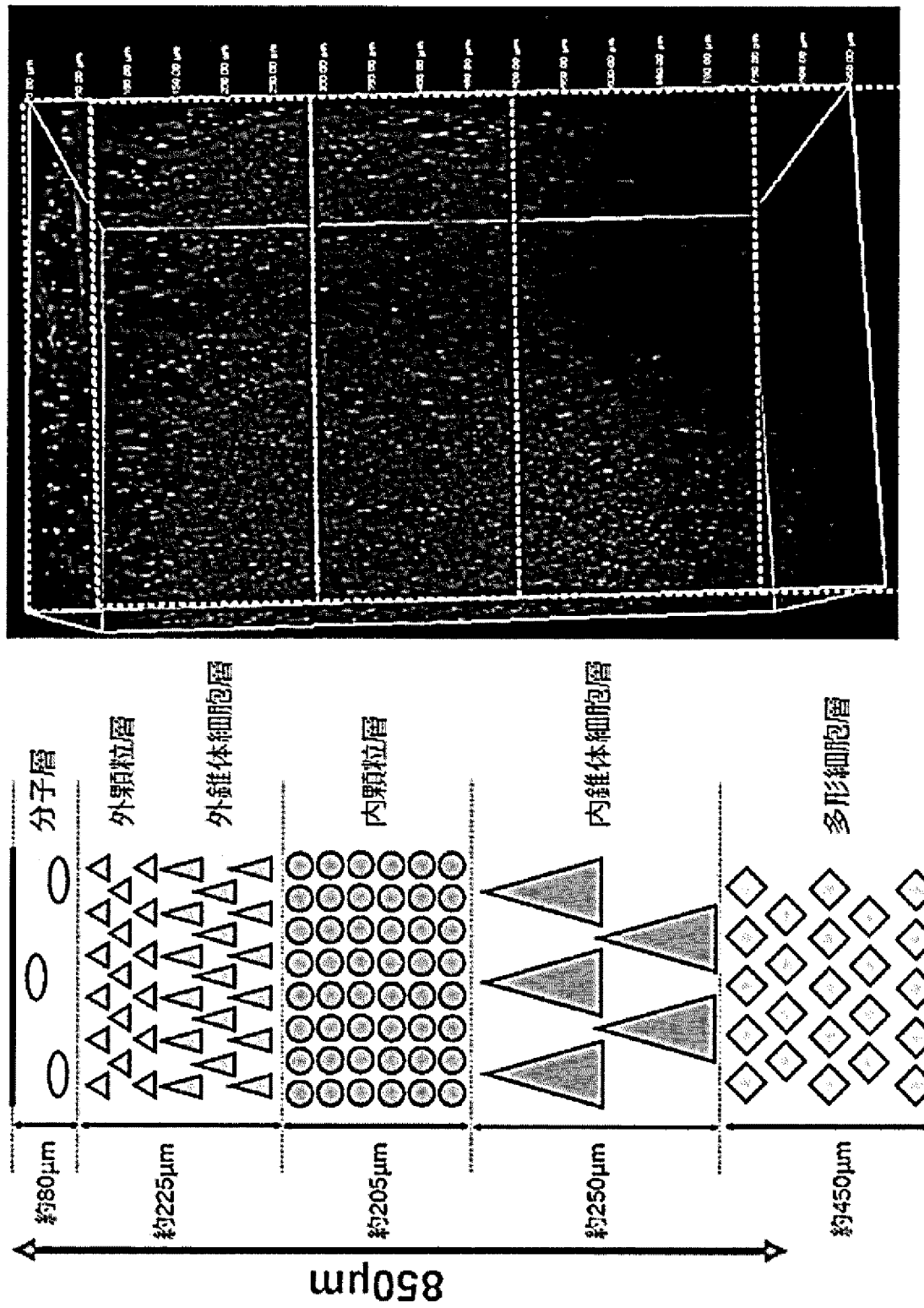
B



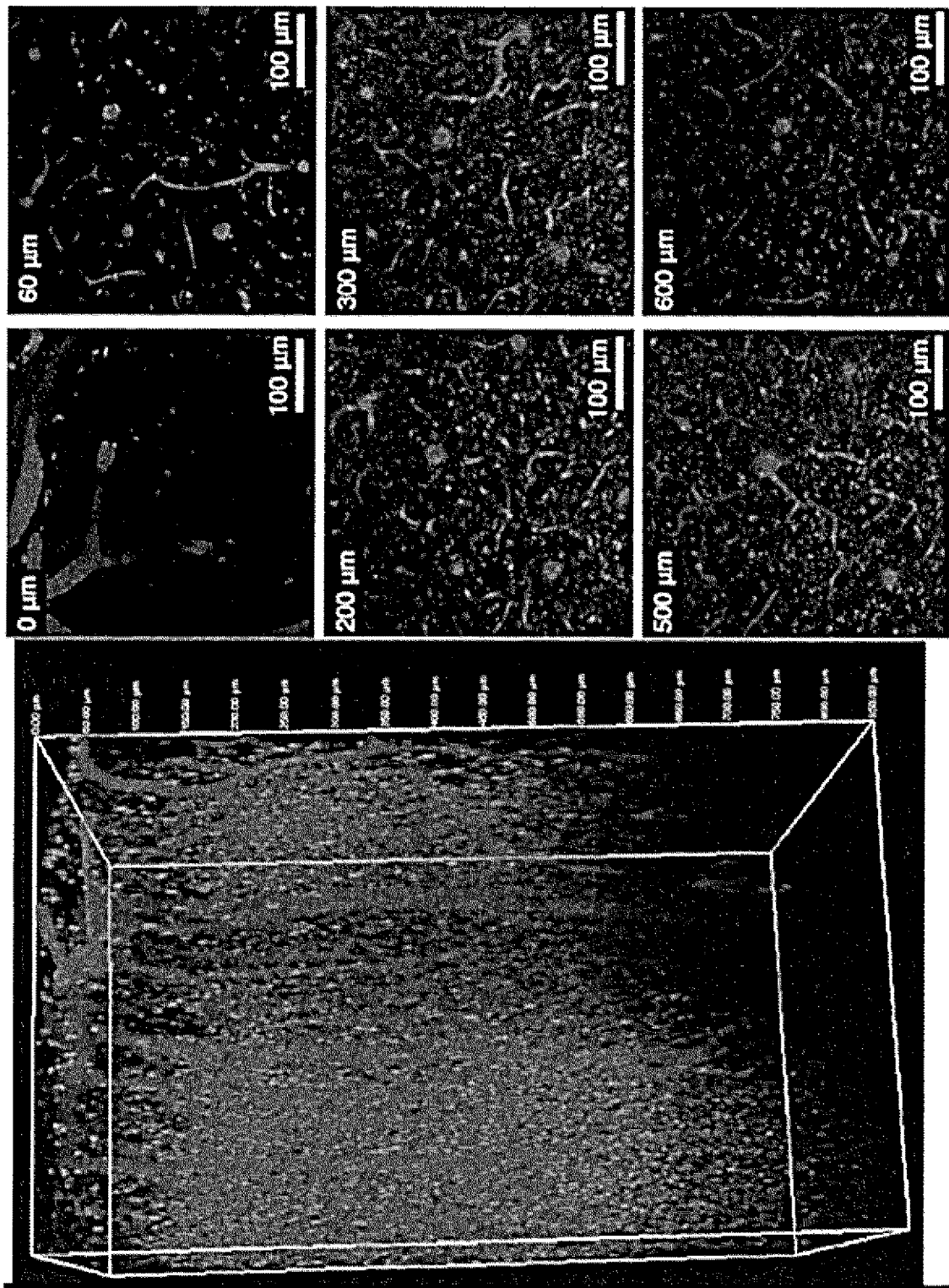
[図12]



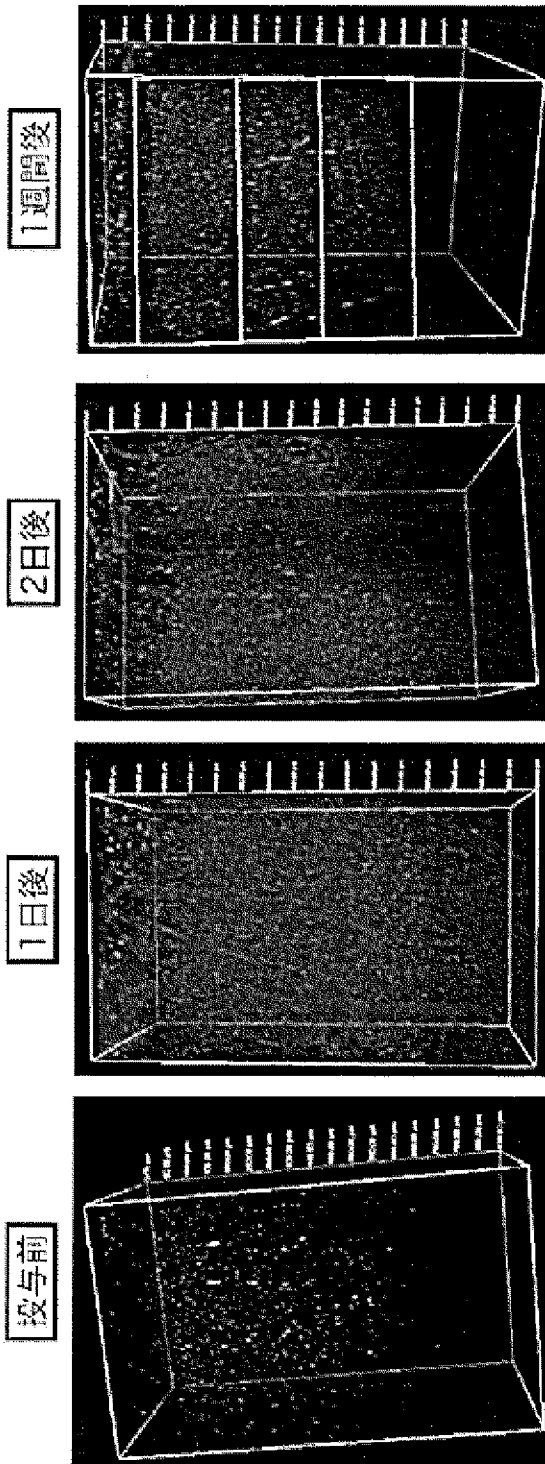
[図13]



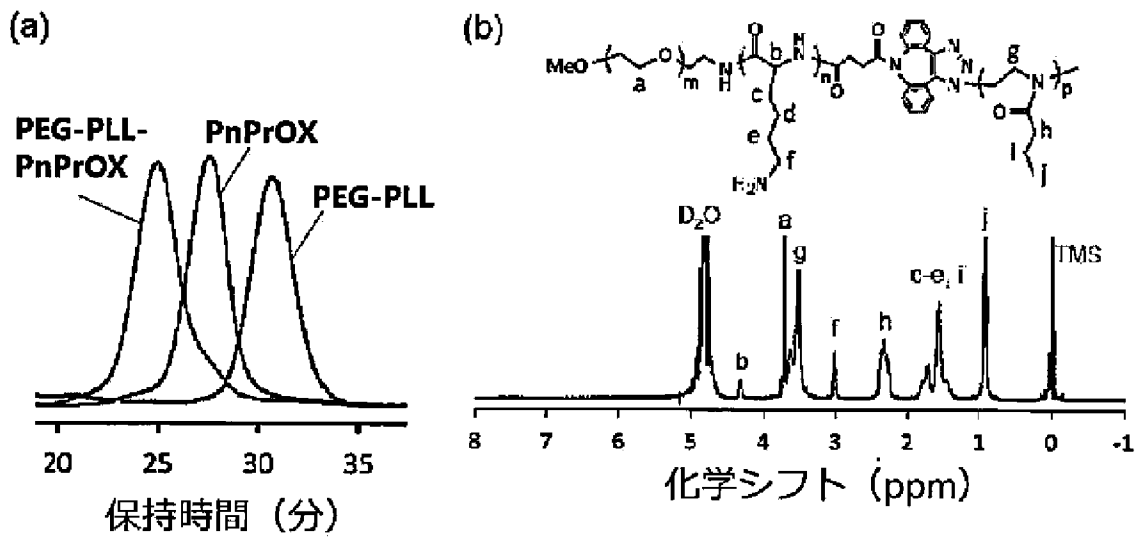
[図14]



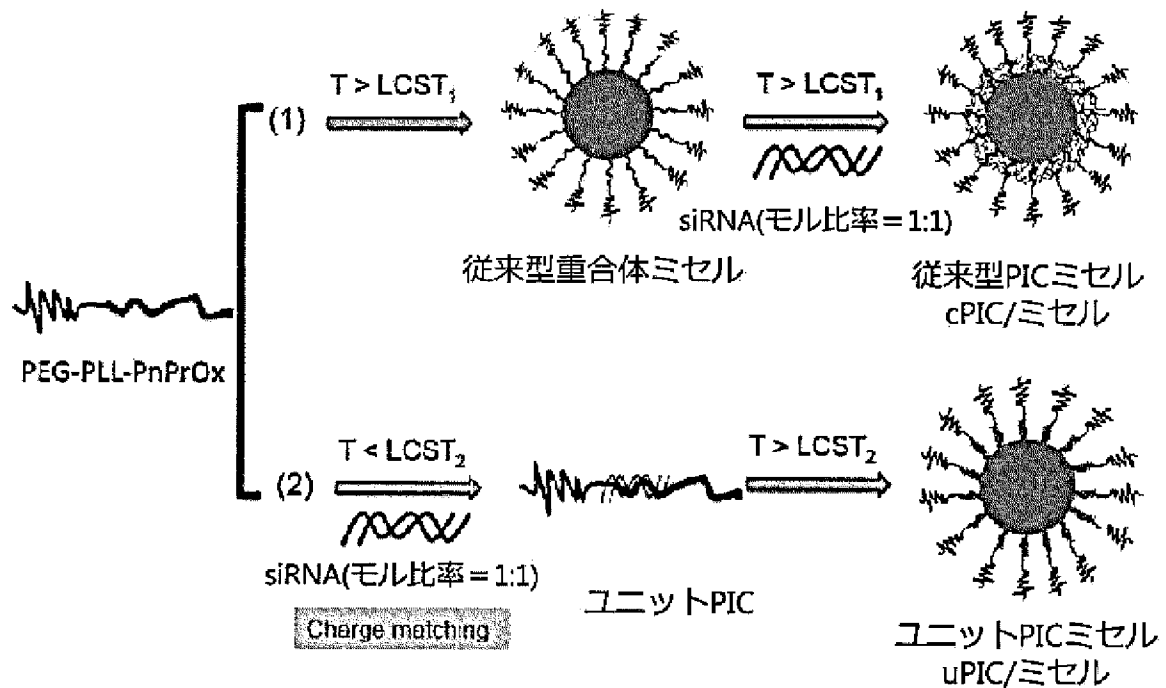
[図15]



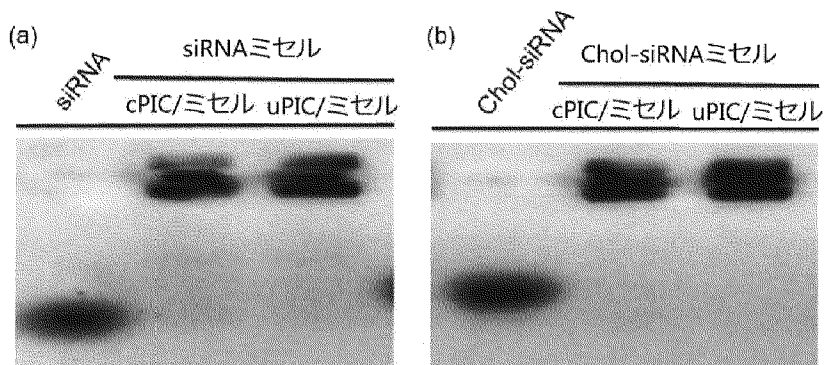
[図16]



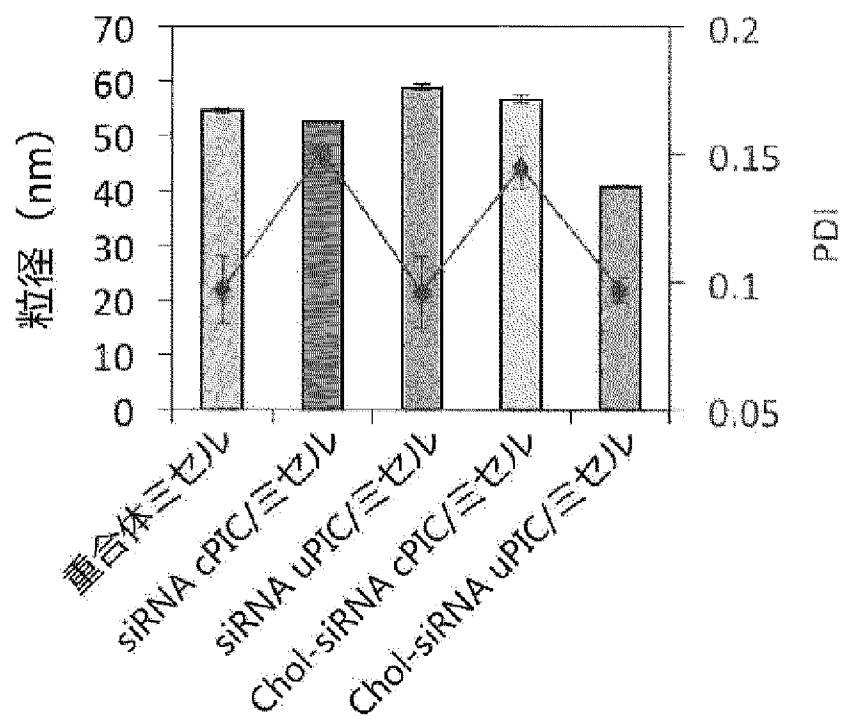
[図17]



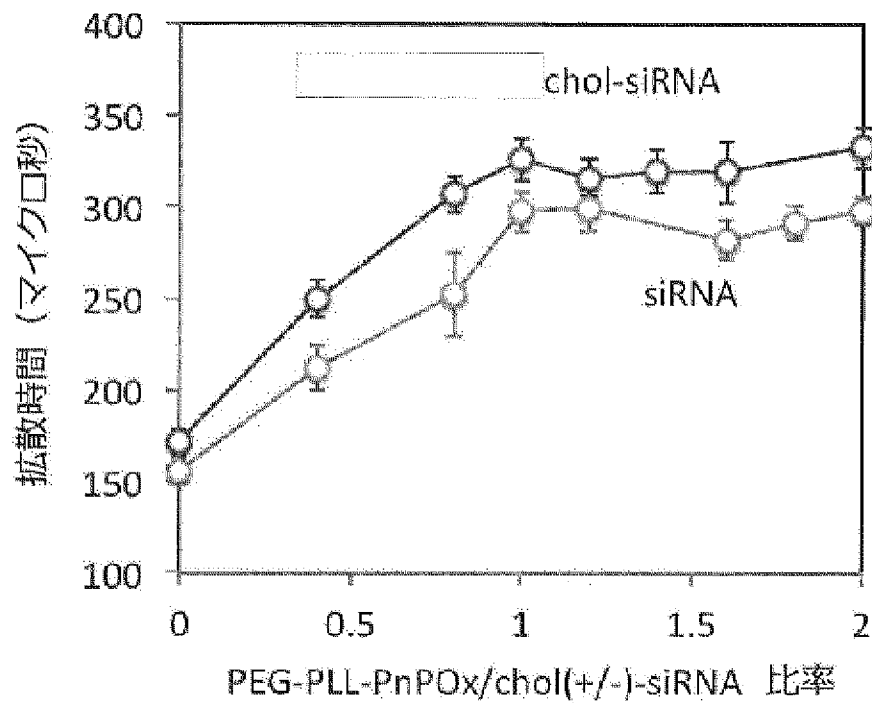
[図18]



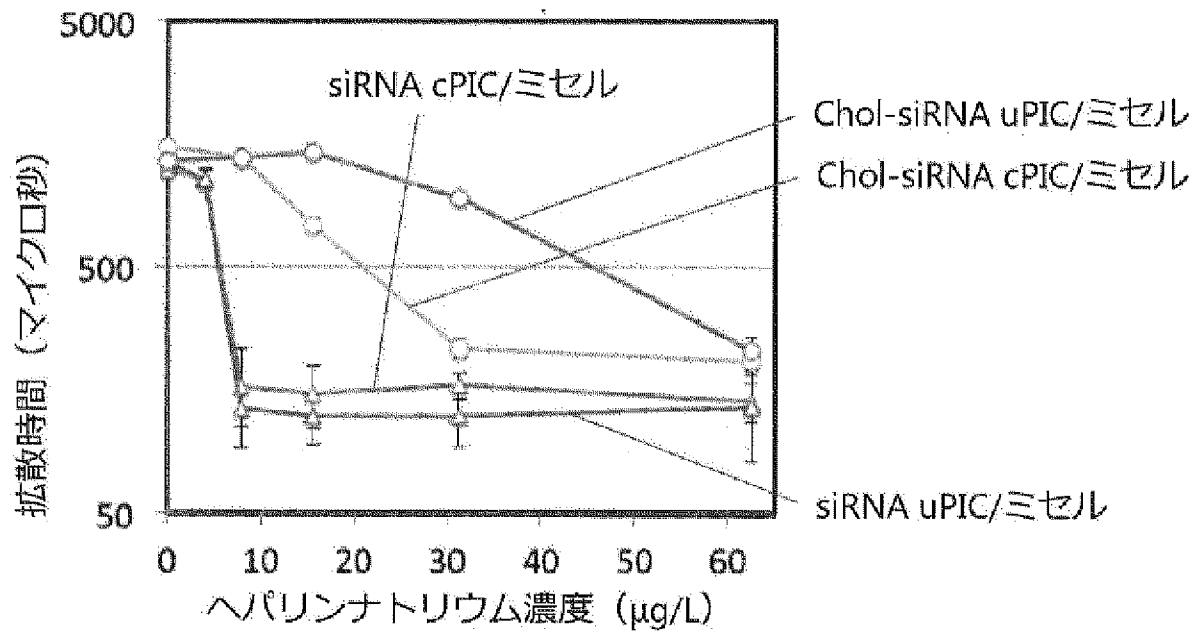
[図19]



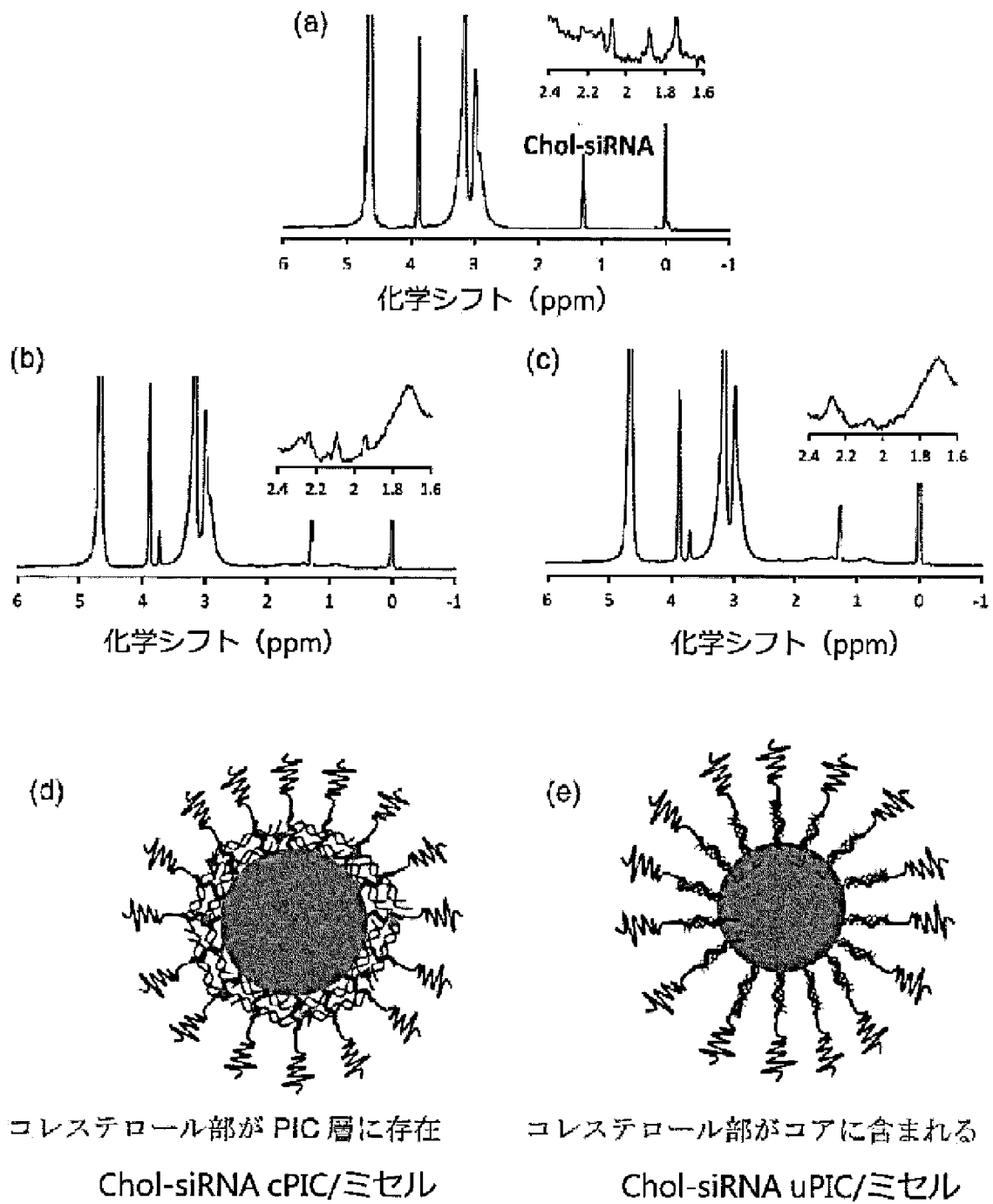
[図20]



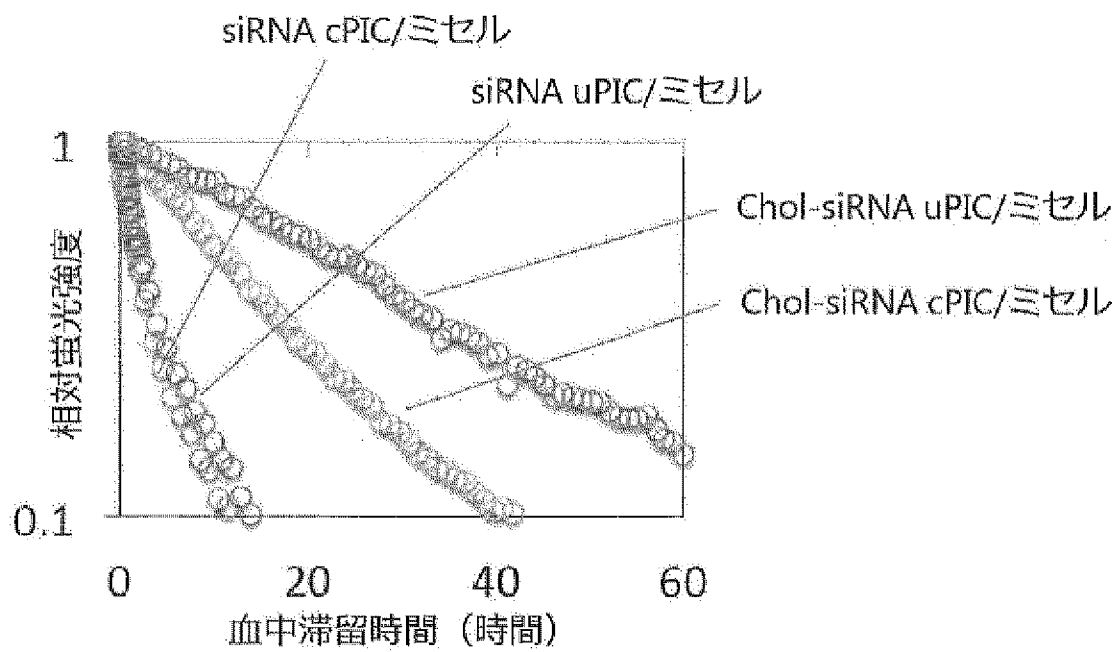
[図21]



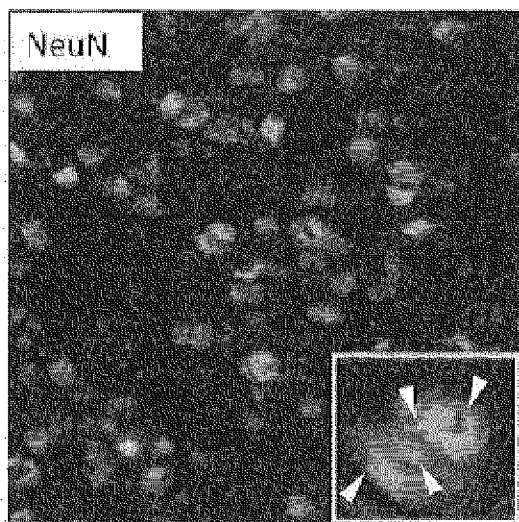
[図22]



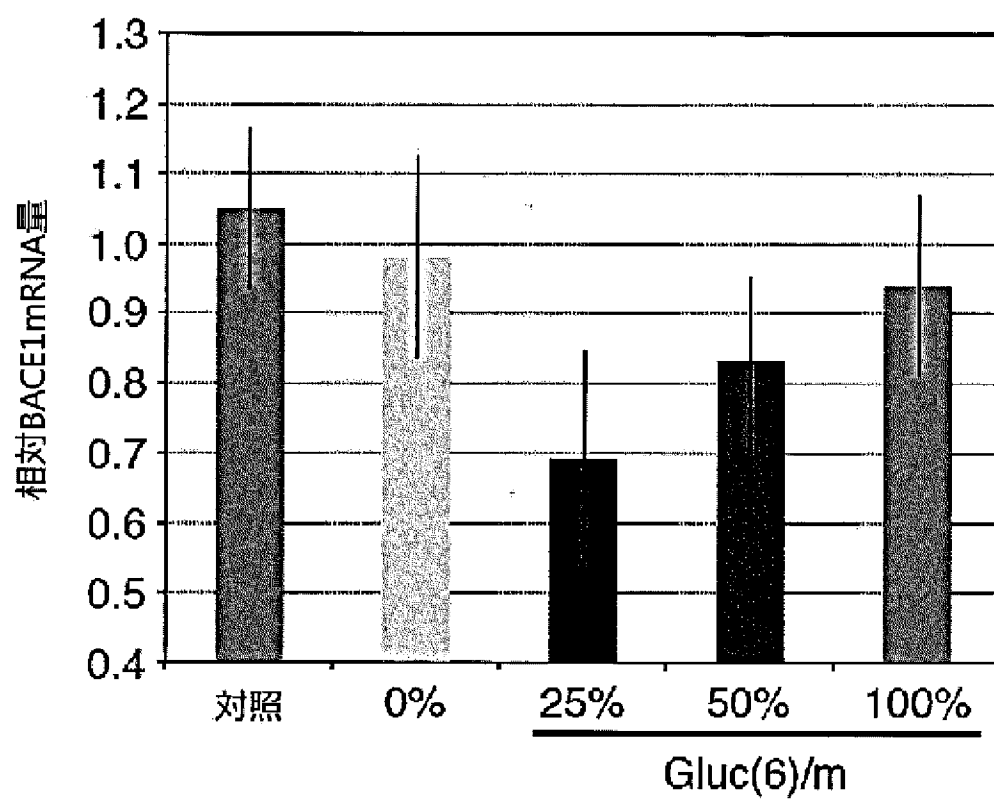
[図23]



[図24]



[図25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/7105, A61K9/10, A61K31/713, A61K47/34, A61K47/48, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/02, A61P25/16, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P27/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shigehito OSAWA, "Sosuisei Hogoso o Core-Shell Kaimen ni Yusuru Kobunshi Micelle-gata Idenshi Carrier no Sosei", Symposium on Polymers and Biosciences Koen Yoshishu, 2014, 24th, pages 15 to 16, particularly, fig. 1	1, 2, 7, 8, 11, 12
Y		3-6, 9, 10, 13-18
X	HALADJOVA E. et al, Polymeric Nanoparticle Engineering: From Temperature-Responsive Polymer Mesoglobules to Gene Delivery Systems, Biomacromolecules, 2014, vol.15, ISSN 1525-7797, p.4377-4395, particularly, Table 3, 4, Fig 9, 10, 15, Scheme 8	7-10
Y		3-6, 9, 10, 13-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 June 2016 (15.06.16)

Date of mailing of the international search report
28 June 2016 (28.06.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QIN Y. et al, In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes, Journal of Drug Targeting, 2010, vol.18, no.7, ISSN 1029-2330, p.536-549, particularly, Figure 1	4-6, 10, 13-18
Y	YANG Z. et al, Thermo-sensitive nanoparticles for triggered release of siRNA, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2015.01.08, vol.26, no.4, ISSN 1568-5624, p.264-276, particularly, Scheme 1	6
A	JP 2013-505200 A (Universiteit Utrecht Holding B.V.), 14 February 2013 (14.02.2013), particularly, claims 5, 8; examples & US 2011/0217448 A1 claims 5, 9; examples & WO 2010/033022 A1	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065052

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/10(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,
A61P25/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i,
A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/7105, A61K9/10, A61K31/713, A61K47/34, A61K47/48, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/02, A61P25/16, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P27/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	大澤重仁, 疎水性保護層をコア-シェル界面に有する高分子ミセル型遺伝子キャリアの創成, バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集, 2014, 24th, p.15-16, 特に Fig.1	1, 2, 7, 8, 11, 12 3-6, 9, 10, 13-18
X Y	HALADJOVA E. et al, Polymeric Nanoparticle Engineering: From Temperature-Responsive Polymer Mesoglobules to Gene Delivery Systems, Biomacromolecules, 2014, vol.15, ISSN 1525-7797, p.4377-4395, 特に Table 3,4, Fig 9,10,15, Scheme 8	7-10 3-6, 9, 10, 13-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.2016

国際調査報告の発送日

28.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山中 隆幸

4U

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	QIN Y. et al, In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes, Journal of Drug Targeting, 2010, vol.18, no.7, ISSN 1029-2330, p.536-549, 特に Figure 1	4-6, 10, 13-18
Y	YANG Z. et al, Thermo-sensitive nanoparticles for triggered release of siRNA, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2015.01.08, vol.26, no.4, ISSN 1568-5624, p.264-276, 特に Scheme 1	6
A	JP 2013-505200 A (ユニフェルジテイト・ユトレヒト・ホールディング・ベスローテン・フェンノートシャップ) 2013.02.14, 特に請求項 5, 8, 実施例 & US 2011/0217448 A1, claim5, 9, examples & WO 2010/033022 A1	1-18

発明の属する分野の分類

A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/10(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P25/02(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i,
A61P25/24(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i