

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5531332号  
(P5531332)

(45) 発行日 平成26年6月25日(2014.6.25)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 9/10	(2006.01)	A 6 1 K 9/10
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48

請求項の数 41 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-515912 (P2010-515912)
(86) (22) 出願日	平成21年6月4日(2009.6.4)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/060253
(87) 国際公開番号	W02009/148121
(87) 国際公開日	平成21年12月10日(2009.12.10)
審査請求日	平成24年5月29日(2012.5.29)
(31) 優先権主張番号	特願2008-148521 (P2008-148521)
(32) 優先日	平成20年6月5日(2008.6.5)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)
(31) 優先権主張番号	特願2009-38871 (P2009-38871)
(32) 優先日	平成21年2月23日(2009.2.23)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(74) 代理人	100100561 弁理士 岡田 正広
(72) 発明者	原 功 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
(72) 発明者	山原 亮 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な分子集合体、それを用いた分子イメージング用分子プローブ及び薬剤搬送システム用分子プローブ、並びに分子イメージングシステム及び薬剤搬送システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマーA1、及び

10個以上の乳酸単位を少なくとも有する疎水性ポリマーA2からなる粒子状分子集合体。

【請求項2】

前記両親媒性ブロックポリマーA1は、20個以上500個以下のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10個以上100個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有するものであり、及び

前記疎水性ポリマーA2は、10個以上200個以下の乳酸単位を有するものである、請求項1に記載の粒子状分子集合体。

【請求項3】

前記疎水性ポリマーA2が、  
前記10個以上の乳酸単位がL-乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、  
前記10個以上の乳酸単位がD-乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、及び  
前記10個以上の乳酸単位がL-乳酸単位とD-乳酸単位とからなるものである疎水性ポリマー

からなる群から選ばれる、請求項1又は2に記載の粒子状分子集合体。

【請求項4】

10

20

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と、前記疎水性ポリマー A 2 とが、10 : 1 ~ 1 : 10 のモル比で含まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 5】

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 とを有機溶媒中に含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、

を含む調製方法によって得られたものである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

10

【請求項 6】

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、請求項 5 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 7】

前記有機溶媒は、1 気圧における沸点が 100 以下の低沸点溶媒である、請求項 5 又は 6 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 8】

前記有機溶媒は、クロロホルム、ジエチルエーテル、アセトニトリル、エタノール、アセトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、及びヘキサンからなる群から選ばれる、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

20

【請求項 9】

10 個以上の乳酸単位と、標識基とを少なくとも有する標識ポリマー B をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 10】

前記標識ポリマー B は、10 個以上 100 個以下の連続する乳酸単位と、標識基と、を構成成分とする標識ポリ乳酸である、請求項 9 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 11】

前記標識ポリマー B は、親水性ブロック鎖と、10 個以上 100 個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、標識基と、を有する標識両親媒性ブロックポリマーである、請求項 9 に記載の粒子状分子集合体。

30

【請求項 12】

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 と前記標識ポリマー B とを有機溶媒中に含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 と前記標識ポリマー B とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、

を含む調製方法によって得られたものである、請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

40

【請求項 13】

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、請求項 12 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 14】

前記有機溶媒は、1 気圧における沸点が 100 以下の低沸点溶媒である、請求項 12 又は 13 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 15】

前記有機溶媒は、クロロホルム、ジエチルエーテル、アセトニトリル、エタノール、ア

50

セトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、及びヘキサンからなる群から選ばれる、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 1 6】

20 個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマー A 1、及び

10 個以上の乳酸単位と、標識基と、を少なくとも有する標識ポリマー B、からなる粒子状分子集合体。

【請求項 1 7】

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 は、20 個以上 500 個以下のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上 100 個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有するものであり、及び

前記標識ポリマー B は、10 個以上 100 個以下の連続する乳酸単位と、標識基と、を構成成分とする標識ポリ乳酸である、請求項 1 6 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 1 8】

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 は、20 個以上 500 個以下のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上 100 個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有するものであり、及び

前記標識ポリマー B は、20 個以上 500 個以下のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上 100 個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、標識基と、を有する標識両親媒性ブロックポリマーである、請求項 1 6 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 1 9】

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記標識ポリマー B とを有機溶媒中に含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記標識ポリマー B とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、を含む調製方法によって得られたものである、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 0】

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、請求項 1 9 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 1】

前記有機溶媒は、1 気圧における沸点が 100 以下の低沸点溶媒である、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 2】

前記有機溶媒は、クロロホルム、ジエチルエーテル、アセトニトリル、エタノール、アセトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、及びヘキサンからなる群から選ばれる、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 3】

ミセル又はベシクルである、請求項 1 ~ 2 2 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 4】

前記標識ポリマー B における前記標識基は、シグナル基及びリガンドからなる群から選ばれる、請求項 9 ~ 2 3 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 5】

前記シグナル基が、近赤外蛍光基である、請求項 2 4 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 6】

前記シグナル基が、放射性元素含有基である、請求項 2 4 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

標識剤を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 8】

前記標識剤が、シグナル物質及びリガンド物質からなる群から選ばれる、請求項 2 7 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 2 9】

前記シグナル物質が、近赤外蛍光物質である、請求項 2 8 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 3 0】

前記シグナル物質が、放射性元素含有物質である、請求項 2 8 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 3 1】

薬剤を含む、請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の粒子状分子集合体。

【請求項 3 2】

前記薬剤が、カンプトテシン、エキサテカン（カンプトテシン誘導体）、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、イリノテカン、SN-38（イリノテカン活性代謝物）、5-FU、シスプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、及びドセタキセルからなる群から選ばれる抗がん剤である、請求項 3 1 に記載の粒子状分子集合体。

【請求項 3 3】

請求項 9 ~ 3 2 のいずれかに記載の粒子状分子集合体からなる、分子イメージング用分子プローブ。

【請求項 3 4】

請求項 2 9 に記載の粒子状分子集合体からなる蛍光イメージング用分子プローブである、請求項 3 3 に記載の分子イメージング用分子プローブ。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 に記載の粒子状分子集合体からなるポジトロン放出断層撮影用分子プローブである、請求項 3 3 に記載の分子イメージング用分子プローブ。

【請求項 3 6】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載の粒子状分子集合体からなる、薬剤搬送システム用分子プローブ。

【請求項 3 7】

20 個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマー A 1、及び、10 個以上の乳酸単位を少なくとも有する疎水性ポリマー A 2 を使用して、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 とを含む粒子状分子集合体を調製する工程を含み、

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 の使用量に対する、前記疎水性ポリマー A 2 の使用量を調整することによって前記分子集合体の粒子径を制御することを含む、粒子状分子集合体の調製方法。

【請求項 3 8】

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 は、20 個以上 500 個以下のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上 100 個以下の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有するものであり、及び

前記疎水性ポリマー A 2 は、10 個以上 200 個以下の乳酸単位を有するものである、請求項 3 7 に記載の粒子状分子集合体の調製方法。

【請求項 3 9】

前記疎水性ポリマー A 2 が、

前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、

前記 10 個以上の乳酸単位が D - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、及び

前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とからなるものである疎水性ポリマー

からなる群から選ばれる、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の粒子状分子集合体の調製方法。

【請求項 4 0】

前記疎水性ポリマー A 2 が、前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、前記 10 個以上の乳酸単位が D - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、及び前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とからなるものである疎水性ポリマーからなる群から選ばれる、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の粒子状分子集合体の調製方法。

【請求項 4 0】

10

20

30

40

50

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と、前記疎水性ポリマー A 2 とを、10 : 1 ~ 1 : 10 のモル比で使用する、請求項 37 ~ 39 のいずれかに記載の粒子状分子集合体の調製方法。

【請求項 41】

10 個以上の乳酸単位と、標識基とを少なくとも有する標識ポリマー B をさらに使用することによって、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 と、さらに前記標識ポリマー B とを含む分子集合体を調製する、請求項 37 ~ 40 のいずれかに記載の粒子状分子集合体の調製方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体適合性を有する両親媒性物質からなる新規な分子集合体、及びそれを用いた分子イメージングシステム又は薬剤搬送システムに関する。

【背景技術】

【0002】

特開 2005 - 172522 号公報（特許文献 1）に記載されているように、近年ナノテクノロジーへの関心が高まっており、ナノサイズ物質特有の性質を活かした新規機能性材料が開発されている。この新規機能性材料は、エネルギー、エレクトロニクス、及び医薬などの幅広い分野での応用が可能となっている。ナノテクノロジーは、なかでも、生体試料中の物質の検出、in vivo でのイメージングにおいて注目を浴びている。特に医薬の分野においては、リン脂質からなるナノ粒子であるリポソームなどが、薬剤搬送システム（ドラッグデリバリーシステム；DDS）における担体として用いられている。

20

【0003】

医薬の分野においては、特開 2005 - 220045 号公報（特許文献 2）に記載されているように、病気の診断及び治療において、病気により生体内に引き起こされる器官・組織の形態及び機能変化を、当該病気の初期段階で、迅速かつ精密な、さらに簡便な方法で検出することが望まれる。特にがんの早期診断及び治療では、発がん初期に小さい病変部位を特定しその大きさを確定することが必要不可欠である。そのための診断方法として、内視鏡による生体検査、X線撮影、MRI 及び超音波撮影などの画像診断が挙げられる。ただし、放射線を指示薬剤に使用する場合は、半減期の問題があるため、指示薬としての寿命が制限される。また、診断装置の価格も非常に高価なものとなる。

30

【0004】

一方、蛍光や近赤外光などを用いた指示薬を使用した画像診断も挙げられる。この方法においては、指示薬自身の寿命に大きな制限が無く、診断用の測定器の価格も、放射線を利用する物ほど高価ではなくなる。さらに、光は生体を非侵襲的に診断できる手段である。

【0005】

たとえば、腫瘍細胞の自家蛍光が、正常細胞の自家蛍光（450nm で励起、520nm で蛍光発生）よりも小さいことを利用した、内視鏡による自家蛍光観察法などが実用化されている。小動物を用いる場合には、化学発光を用いたがんの画像診断も行われている。化学発光とは、発光基質（ルシフェリン）が酵素（ルシフェラーゼ）の働きで酸化され不安定な過酸化物質となり、次いでそれらが分解される過程で光が放出される現象である。

40

【0006】

また、腫瘍部分に近赤外蛍光色素を集め、腫瘍部分をイメージングする近赤外蛍光撮影法も注目されている。この方法においては、励起光照射により近赤外領域に蛍光を放射する性質を持つ化合物を、造影剤として生体内に投与する。次に身体の外側から近赤外の波長である励起光を照射し、腫瘍部分に集まった蛍光造影剤から放射される蛍光を検出して、病変部位を確定するものである。その造影剤としてインドシアニングリーン誘導体を内包させたりリポソームなどのナノ粒子が報告されている（特開 2005 - 220045 号公

50

報（特許文献2）参照）。

【0007】

一方、より生体適合性が高いペプチド性のナノ粒子も知られている。（Journal of Controlled Release 50（1998）205-214（非特許文献1）、Journal of Controlled Release 51（1998）241-248（非特許文献2）、Journal of Colloid Interface Science 280（2004）506-510（非特許文献3）、及び、Journal of American Chemical Society 2005, 127, 12423-12428（非特許文献4）参照）。

【0008】

特開2008-024816号公報（特許文献3）には、疎水性ブロックとしてポリグルタミン酸メチルエステルを有する両親媒性ブロックポリマーを用いた、ペプチドタイプのナノ粒子が開示されている。この公報には、両親媒性ブロックポリマーの鎖長を変化させることにより、ナノ粒子の粒子径を制御できることが記載されている。また、当該ナノ粒子ががん組織へ集積することを観察したことが示されている。

【0009】

また、Chemistry Letters, vol.36, no.10, 2007, p.1220-1221（非特許文献5）には、ポリ乳酸鎖とポリサルコシン鎖から構成される両親媒性ブロックポリマーを合成し、当該両親媒性ブロックポリマーの自己集合によって、DDSにおけるナノキャリアとしての利用可能性を有する粒径20～200nmの分子集合体を調製したことが示されている。

【0010】

なお、上述のように、シグナル剤や薬剤を有する物質をがん組織に効果的に集積させる方法は、EPR（enhanced permeability and retention）効果を利用したものである。

がん組織は正常組織よりも細胞の増殖が速く、細胞の増殖に必要な酸素やエネルギーを獲得するために、がん組織中に新生血管を誘導する。この新生血管はもろいため、ある程度大きな分子も当該血管外に漏れ出すことが知られている。さらに、がん組織では物質の排泄機構が未発達であるため、当該血管から漏れ出た分子がある程度がん組織中に滞留する。この現象がEPR効果として知られているものである。

【特許文献1】特開2005-172522号公報

【特許文献2】特開2005-220045号公報

【特許文献3】特開2008-024816号公報

【非特許文献1】「ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース（Journal of Controlled Release）」、第50巻、1998年、p.205-214

【非特許文献2】「ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース（Journal of Controlled Release）」、第51巻、1998年、p.241-248

【非特許文献3】「ジャーナル・オブ・コロイド・インターフェイス・サイエンス（Journal of Colloid Interface Science）」、第280巻、2004年、p.506-510

【非特許文献4】「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ（Journal of American Chemical Society）」、2005年、第127巻、p.12423-12428

【非特許文献5】「ケミストリ・レターズ（Chemistry Letters）」、第36巻、第10号、2007年、p.1220-1221

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

内視鏡による生体検査、X線撮影、MRI及び超音波撮影などの画像診断は、それぞれ優れた特徴を有するが、被験者へ、心理的圧迫、痛みや苦痛、被爆を強いるなどの侵襲性を有する。また、放射線を指示薬剤に使用する場合は、半減期の問題があるため、指示薬としての寿命が制限される。さらに、診断装置の価格も非常に高価なものとなる。

【0012】

一方、非侵襲的な方法として、蛍光や化学発光を用いたがんの画像診断法が知られているが、特に化学発光を用いた方法は遺伝子改変を必要とするため、安全性の観点から人へ応用することは出来ない。

## 【 0 0 1 3 】

また、近赤外光を利用した特開 2 0 0 5 - 2 2 0 0 4 5 号公報（特許文献 2）などに記載方法におけるリポソームは、血液中でマクロファージなどの免疫系の細胞に認識され排除される。そのためマクロファージ様の細胞が多く存在する肝臓や脾臓などの細網内皮系（RES）などにリポソームは捕捉され、血液中での滞留性が好適ではない。このリポソームの滞留性向上を目的として、ポリエチレングリコール（PEG）でコーティングしたリポソームも報告されている（US5013556参照）。このリポソームにおけるPEGは、リポソーム表面の親水性を増し、リポソームがRESなどの免疫系から異物として認識されるのを防ぐ作用があると考えられている。しかし、このようなPEG化リポソーム及びその代謝物の、生体内での詳細な安全性については報告されていない。また、市販されているPEG化リポソームであるDoxil<sup>(R)</sup>においては、ヒトに投与した際に比較的高い頻度でアナフィラキシー様反応が起こることが報告されている（JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, 10(4), 467-484(2000)参照）。従って、安全性の面で問題がある。

10

さらに、このようなリポソームは疎水部の組成が限定されるため、粒子サイズの制御が制約されるという問題もある。

## 【 0 0 1 4 】

特開 2 0 0 8 - 0 2 4 8 1 6 号公報（特許文献 3）に記載のナノ粒子は、ペプチドタイプの両親媒性ブロックポリマー（ペプトソーム）を用いている。このため、リポソームとは異なり、ナノ粒子作成の際、ペプチドタイプの両親媒性ブロックポリマーはクロロホルムなどの低沸点溶媒に溶解しない。このため、ペプチドタイプの両親媒性ブロックポリマーをトリフルオロエタノール（TFE）などに溶解させた後、水中に分散させる方法（すなわちインジェクション法）を用いてナノ粒子を作成しなければならない。しかしながら、TFE自体に毒性があるため、インジェクション法で調製したナノ粒子を生体に投与するためには、インジェクション法により用いたTFEをゲルろ過により厳密に除去する必要性が生じる。

20

## 【 0 0 1 5 】

また、当該公報には、このペプチドタイプのナノ粒子がEPR（enhanced permeability and retention）効果によってがん組織へ集積することは示されている。しかしながら、このことは、がん組織周辺のみでの蛍光観察によって判断されたものであって、例えば、当該公報において示されていないマウスの腹側からの観察を行うと、肝臓や脾臓といったがん以外の生体組織への薬剤の集積も観測される。このため、蛍光イメージングにおいては、上記組織周辺でのがん組織のイメージングが困難である。そのため、DDSに用いる場合には、患部への薬剤送達の割合が低くなる。

30

## 【 0 0 1 6 】

さらに、当該公報には、両親媒性ブロックポリマーの鎖長を変えることによって、ナノ粒子の粒子径を制御できることが記載されている。しかしながら、実際には、ブロック鎖の成分（構成単位）が同じで鎖長が互いに異なる2種類の両親媒性ブロックポリマーから、粒子径が互いに異なる2種類のナノ粒子が得られたこと、及び、ブロック鎖の成分（構成単位）及び鎖長のいずれもが互いに異なるいくつかの両親媒性ブロックポリマーから、粒子径が互いに異なるいくつかのナノ粒子が得られたことが証明されたに過ぎない。すなわち、両親媒性ブロックポリマーに関する物理量と、ナノ粒子の粒子径との対応関係が開示も示唆もされていない。このため、当該公報に記載の発明においては、粒子径を連続的に制御することができない。

40

## 【 0 0 1 7 】

Chemistry Letters, vol.36, no.10, 2007, p.1220-1221（非特許文献5）には、ポリ乳酸鎖を含む分子集合体として、DDSにおけるナノキャリアとしての利用可能性を有するものの示唆はあるが、生体内への投与などを行ったことは記載されていないため、無論、生体内における当該分子集合体の動態についても何ら記載されていない。

さらに、前記の公報における場合と同様、粒子径を連続的に制御することについても何ら記載されていない。

50

## 【 0 0 1 8 】

本発明の目的は、がん組織以外への組織への集積性が低く、生体に対する安全性が高く、粒径制御が容易であり、調製法が容易且つ安全である分子集合体を提供することにある。また、本発明の目的は、分子イメージングシステム及び当該システムにおいて有用な分子プローブ、及び、薬剤搬送システム及び当該システムにおいて有用な分子プローブを提供することにある。

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる目的は、EPR効果を利用して、シグナル基や薬剤を有する分子集合体をごん組織に効果的に集積させるため、分子集合体の粒子径を任意に制御することができる分子集合体調製法を提供することにある。

10

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 2 0 】

本発明者らは、鋭意研究を行った結果、ポリ乳酸系の両親媒性物質ブロックポリマーと、ポリ乳酸系の標識ポリマーとから分子集合体形成させることによって、上記本発明の目的を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、さらなる鋭意研究を行った結果、ポリ乳酸系の両親媒性物質ブロックポリマーに、光学純度の異なるポリ乳酸をさまざまな比率で加え、分子集合体を調製することによって、上記本発明のさらなる目的を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【 0 0 2 1 】

20

本発明は、以下の発明を含む。

下記(1)～(24)は、分子集合体に関する。

本発明の分子集合体は、下記(1)～(5)に記載のA1/B系ラクトソーム、下記(6)～(10)に記載のA1/A2系ラクトソーム、及び下記(11)～(15)に記載のA1/A2/B系ラクトソームを含む。

「分子集合体」は、基本的に、両親媒性ブロックポリマー分子の凝集により、或いは自己集合的な配向会合により成り立つ構造体をいう。

また、分子集合体であって、乳酸単位を基本単位として有する疎水性ブロック鎖を含む両親媒性ブロックポリマーA1を含んで構成されるものを、「ラクトソーム(lactosome)」と記載することがある。従って、下記(1)～(24)における本発明の「分子集合体」も、本明細書においてラクトソーム(lactosome)として位置づける。

30

## 【 0 0 2 2 】

A1/B系ラクトソーム：

下記(1)は、両親媒性ブロックポリマーA1と、標識ポリマーBとからなる分子集合体に向けられる。本明細書においては、このような分子集合体を、A1/B系ラクトソームと記載することがある。

## (1)

20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマーA1、及び

10個以上の乳酸単位と、標識基と、を少なくとも有する標識ポリマーB、  
からなる分子集合体。

40

## 【 0 0 2 3 】

上記(1)において、「サルコシン」とは、すなわちN-メチルグリシンである。

親水性ブロック鎖が有する「親水性」とは、当該親水性ブロック鎖が、10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖に対して、相対的に親水性が強い性質をいう。

疎水性ブロック鎖が有する「疎水性」とは、当該疎水性ブロック鎖が、20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖に対して、相対的に疎水性が強い性質をいう。

## 【 0 0 2 4 】

上記(1)における「標識ポリマーB」は、以下の(2)に記載する標識ポリ乳酸及び以下の(3)に記載する標識両親媒性ブロックポリマーからなる群から1種又は複数種を

50

選択することができる。

【 0 0 2 5 】

( 2 )

前記標識ポリマー B は、10 個以上の連続する乳酸単位と、標識基と、を構成成分とする標識ポリ乳酸である、( 1 ) に記載の分子集合体。

( 3 )

前記標識ポリマー B は、親水性ブロック鎖と、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、標識基と、を有する標識両親媒性ブロックポリマーである、( 1 ) に記載の分子集合体。

【 0 0 2 6 】

( 4 )

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記標識ポリマー B とを有機溶媒中に含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記標識ポリマー B とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、を含む調製方法によって得られたものである、( 1 ) ~ ( 3 ) のいずれかに記載の分子集合体。

( 5 )

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、( 4 ) に記載の分子集合体。

【 0 0 2 7 】

A 1 / A 2 系ラクトソーム：

下記( 6 ) は、両親媒性ブロックポリマー A 1 と、疎水性ポリマー A 2 とからなる分子集合体に向けられる。下記( 6 ) に記載の分子集合体も、乳酸単位を基本単位として有する疎水性ブロック鎖を含む両親媒性ブロックポリマー A 1 を含んで構成されるため、ラクトソームである。明細書では、特にこの形態のラクトソームを、A 1 / A 2 系ラクトソームと記載することがある。また、後述のように疎水性ポリマー A 2 が乳酸単位を基本単位とするものでありうるという観点から、このような A 1 / A 2 系ラクトソームの一形態を、特にポリ乳酸混合ラクトソームと記載する場合がある。

【 0 0 2 8 】

( 6 )

20 個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマー A 1、及び

10 個以上の乳酸単位を少なくとも有する疎水性ポリマー A 2 からなる分子集合体。

【 0 0 2 9 】

上記( 6 )において、「サルコシン」とは、すなわち N - メチルグリシンである。

親水性ブロック鎖が有する「親水性」とは、当該親水性ブロック鎖が、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖に対して、相対的に親水性が強い性質をいう。

疎水性ブロック鎖が有する「疎水性」とは、当該疎水性ブロック鎖が、20 個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖に対して、相対的に疎水性が強い性質をいう。

「疎水性ポリマー A 2」が有する「疎水性」とは、疎水性ポリマー A 2 が、両親媒性ブロックポリマー A 1 の親水性ブロック鎖に対して、相対的に疎水性が強い性質をいう。

【 0 0 3 0 】

( 7 )

前記疎水性ポリマー A 2 が、

前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、

10

20

30

40

50

前記 10 個以上の乳酸単位が D - 乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、及び  
前記 10 個以上の乳酸単位が L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とからなるものである疎水  
性ポリマー

からなる群から選ばれる、(6)に記載の分子集合体。

【0031】

(8)

前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と、前記疎水性ポリマー A 2 とが、10 : 1 ~ 1 :  
10 のモル比で含まれる、(6)又は(7)に記載の分子集合体。

【0032】

(9)

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 とを有機溶媒  
中を含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー  
A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集  
合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、

を含む調製方法によって得られたものである、(6)~(8)のいずれかに記載の分子集  
合体。

(10)

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の  
分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、(9)に記載の分子集合体。

【0033】

A 1 / A 2 / B 系ラクトソーム：

下記(11)は、両親媒性ブロックポリマー A 1 と、疎水性ポリマー A 2、標識ポリマ  
ー B とからなる分子集合体に向けられる。本明細書においては、このような分子集合体を  
、A 1 / A 2 / B 系ラクトソームと記載することがある。

(11)

10 個以上の乳酸単位と、標識基とを少なくとも有する標識ポリマー B をさらに含む、  
(6)~(8)のいずれかに記載の分子集合体。

【0034】

上記(11)における「標識ポリマー B」は、以下の(12)に記載する標識ポリ乳酸  
及び以下の(13)に記載する標識両親媒性ブロックポリマーからなる群から 1 種又は複  
数種を選択することができる。

【0035】

(12)

前記標識ポリマー B は、10 個以上の連続する乳酸単位と、標識基と、を構成成分とす  
る標識ポリ乳酸である、(11)に記載の分子集合体。

(13)

前記標識ポリマー B は、親水性ブロック鎖と、10 個以上の乳酸単位を有する疎水性ブ  
ロック鎖と、標識基と、を有する標識両親媒性ブロックポリマーである、(11)に記載  
の分子集合体。

【0036】

(14)

前記分子集合体は、以下の工程：

容器中に、前記両親媒性ブロックポリマー A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 と前記標識ポ  
リマー B とを有機溶媒中を含む溶液を用意する工程、

前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に前記両親媒性ブロックポリマー  
A 1 と前記疎水性ポリマー A 2 と前記標識ポリマー B とを含むフィルムを得る工程、及び

前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルムを粒子状の分子集

10

20

30

40

50

合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、  
を含む調製方法によって得られたものである、(11)～(13)のいずれかに記載の分子集合体。

(15)

前記調製方法は、前記分子集合体の分散液を得る工程の後、さらに、前記分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含む、(14)に記載の分子集合体。

【0037】

上記(4)、(5)、(9)、(10)、(14)及び(15)に記載の分子集合体の調製方法を、本明細書中では「フィルム法」と記載することがある。

【0038】

(16)

ミセル又はベシクルである、(1)～(15)のいずれかに記載の分子集合体。

上記(16)において、特にがんの分子イメージングシステムなどにはミセルを用いることが有用な場合がある。薬剤搬送システムなどにはミセル及びベシクルのいずれも用いることができる。

【0039】

(17)

前記標識ポリマーBにおける前記標識基は、シグナル基及びリガンドからなる群から選ばれる、(1)～(5)及び(11)～(16)のいずれかに記載の分子集合体。

上記(17)において、「シグナル基」は、検出によりイメージングを可能にする特性を有する基であり、蛍光基、放射性元素含有基、磁性基などを含む。

上記(17)において、「リガンド」は、分子集合体を対象へ投与した際に、当該対象における標的部位へ当該分子集合体を特異的に結合させるためのリガンドや、分子集合体を対象へ投与した際に、当該対象における標的部位へ搬送すべき薬剤やシグナル剤などの分子・原子を配位させるためのリガンドを含む。

【0040】

(18)

前記シグナル基が、近赤外蛍光基である、(17)に記載の分子集合体。

上記(18)の分子集合体は、蛍光イメージング用分子プローブとして有用なものである。

(19)

前記シグナル基が、放射性元素含有基である、(17)に記載の分子集合体。

上記(19)の分子集合体は、ポジトロン放出断層撮影(PET)用分子プローブとして有用なものである。

【0041】

下記(20)～(23)は、上記(6)に記載の両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2とからなる分子集合体に、標識剤が内包されたものに向けられる。

(20)

標識剤を含む、(6)～(10)のいずれかに記載の分子集合体。

上記(20)の分子集合体は、分子イメージング用分子プローブとして有用なものである。

【0042】

上記(20)の分子集合体がミセルである場合、ミセル内部に標識剤を保持させることができる。両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2とからなる分子集合体のミセルは、疎水性ポリマーA2によって疎水コア部の体積が増大しているため、標識剤を内包しやすい。

また、上記(20)の分子集合体がベシクルである場合も、ベシクル内部に標識剤を保持させることができる。

【0043】

(21)

10

20

30

40

50

前記標識剤が、シグナル物質及びリガンド物質からなる群から選ばれる、(20)に記載の分子集合体。

(22)

前記シグナル物質が、近赤外蛍光物質である、(21)に記載の分子集合体。

(23)

前記シグナル物質が、放射性元素含有物質である、(21)に記載の分子集合体。

【0044】

下記(24)は、上記(1)～(23)に記載の分子集合体に、薬剤が内包などにより保持されたものに向けられる。

(24)

薬剤を含む、(1)～(23)のいずれかに記載の分子集合体。

上記(24)の分子集合体は、薬剤搬送システム(DDS)用分子プローブとして有用なものである。

上記(24)の分子集合体がベシクルである場合、ベシクル内部に薬剤を保持させることができる。

また、上記(24)の分子集合体がミセルである場合も、ミセル内部に薬剤を保持させることができる。特に、上記(6)～(15)に記載の分子集合体のミセルは、疎水性ポリマーA2によって疎水コア部の体積が増大しているため、薬剤を内包しやすい。

さらに、上記(24)の分子集合体がミセルである場合は、分子集合体の構成ポリマー(すなわち、上記の両親媒性ブロックポリマーA1、疎水性ポリマーA2、及び/又は標識ポリマーB)自体を、薬剤を有するものとして用いることによっても、ミセルに薬剤を保持させることができる。当該構成ポリマー自体が薬剤を有する形態としては、当該構成ポリマーが薬剤と共有結合している形態、当該構成ポリマーがリガンドと共有結合し、薬剤分子が当該リガンドへ配位している形態、及びミセル内に薬剤分子が内包されている形態が挙げられる。

【0045】

下記(25)～(28)は、上記の分子集合体を用いた分子プローブに関する。

(25)

(1)～(5)及び(11)～(24)のいずれかに記載の分子集合体からなる、分子イメージング用分子プローブ。

(26)

(22)に記載の分子集合体からなる蛍光イメージング用分子プローブである、(25)に記載の分子イメージング用分子プローブ。

(27)

(23)に記載の分子集合体からなるポジトロン放出断層撮影用分子プローブである、(25)に記載の分子イメージング用分子プローブ。

(28)

(24)に記載の分子集合体からなる、薬剤搬送システム用分子プローブ。

【0046】

下記(29)は、上記の(6)～(14)に記載の、少なくとも両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2とを有する分子集合体(すなわちA1/A2系ラクトソーム、及びA1/A2/B系ラクトソーム)の、粒子径を制御する方法に向けられる。

(29)

20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と、10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖と、を有する両親媒性ブロックポリマーA1、及び、10個以上の乳酸単位を少なくとも有する疎水性ポリマーA2を使用して、前記両親媒性ブロックポリマーA1と前記疎水性ポリマーA2とを含む分子集合体を調製する工程を含み、

前記両親媒性ブロックポリマーA1の使用量に対する、前記疎水性ポリマーA2の使用量を調整することによって前記分子集合体の粒子径を制御することを含む、分子集合体の調製方法。

10

20

30

40

50

## 【0047】

上記(29)において、「粒子径」とは、粒子分布で最も出現頻度の高い粒子径、すなわち中心粒子径をいう。

## 【0048】

(30)

前記疎水性ポリマーA2が、

前記10個以上の乳酸単位がL-乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、

前記10個以上の乳酸単位がD-乳酸単位からなるものである疎水性ポリマー、及び

前記10個以上の乳酸単位がL-乳酸単位とD-乳酸単位とからなるものである疎水

性ポリマー

からなる群から選ばれる、(29)に記載の分子集合体の調製方法。

## 【0049】

(31)

前記両親媒性ブロックポリマーA1と、前記疎水性ポリマーA2とを、10:1~1:10のモル比で使用する、(29)又は(30)に記載の分子集合体の調製方法。

## 【0050】

(32)

10個以上の乳酸単位と、標識基とを少なくとも有する標識ポリマーBをさらに使用することによって、前記両親媒性ブロックポリマーA1と前記疎水性ポリマーA2と、さらに前記標識ポリマーBとを含む分子集合体を調製する、(29)~(31)のいずれかに

記載の分子集合体の調製方法。

## 【0051】

下記(33)及び(34)は、上記の分子プローブを用いた方法に関する。

(33)

(25)~(27)のいずれかに記載の分子プローブを生体内に投与することを含む、分子イメージングシステム。

上記分子イメージングシステムは、より具体的には、(26)に記載の分子プローブを用いた蛍光イメージングシステムや、(27)に記載の分子プローブを用いたポジトロン放出断層撮影(PET)システムなどが含まれる。

## 【0052】

(34)

(28)に記載の分子プローブを生体内に投与することを含む、薬剤搬送システム(ドラッグデリバリシステム; DDS)。

## 【発明の効果】

## 【0053】

本発明によると、がん組織以外への組織への集積性が低く、生体に対する安全性が高く、粒径制御が容易であり、調製法が容易且つ安全である分子集合体を提供することができる。従って、本発明によると、分子イメージングシステム及び当該システムにおいて有用な分子プローブ、及び、薬剤搬送システム及び当該システムにおいて有用な分子プローブを提供することができる。

## 【0054】

より詳しくは、本発明の分子集合体は、ポリ乳酸タイプの標識ポリマーの使用によって、がん組織以外への組織への集積性が低減されたものであり、従ってがん組織への特異的な集積を可能とするものである。本発明の分子集合体は、生体への安全性が高くまた分子プローブへの応用が容易で安全な方法による調製が可能であり、且つ、優れた生体適合性及び生分解性を具備するものである。また、本発明の分子集合体においては、その調製の際、モノマーとしての乳酸の量を制御することによって、分子集合体自身の形状及び大きさを制御することも可能である。

## 【0055】

本発明の分子集合体は、がんを選択的に集積し、且つ短時間でのイメージングを可能に

10

20

30

40

50

するため、特に肝臓がんや肝臓周辺の臓器のがんのイメージングに有用である。また、肝臓がんや肝臓周辺の臓器のがんなどをターゲットとしてPET用分子プローブ及びDDS用子プローブとしても有用である。

さらに、化学発光を用いて画像診断を行う場合に、遺伝子改変を伴わずに安全にがんの画像診断を行うことが可能であるため、人体への適用が可能である。

【0056】

さらに、本発明によると、分子集合体の粒子径を任意に制御することができる分子集合体調製法を提供することができる。このことによって、EPR効果を利用したシグナル基や薬剤を有する分子集合体のがん組織への効果的な集積を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】担がんマウスの蛍光イメージング試験結果である。具体的には、上から、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブP1、P2及びP3を用いた場合（実施例2）と、A2・B不含ラクトソームナノ粒子である分子プローブP5を用いた場合（比較例4）と、ペプトソームナノ粒子であるP4及びP6を用いた場合（比較例5）との結果であり、それぞれの結果について、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、3時間、6時間、及び24時間経過後のマウスを右体側部から測定したイメージと、24時間経過後のマウスを5方向（左腹、左体側、背中、右体側及び右腹）から測定したイメージとを示す。

【図2】がんと肝臓とに集積した分子プローブの蛍光強度比の比較を示すグラフである。具体的には、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブP1、P2及びP3を用いた場合（実施例2）と、A2・B不含ラクトソームナノ粒子である分子プローブP5を用いた場合（比較例4）と、ペプトソームナノ粒子であるP4及びP6を用いた場合（比較例5）との、横軸は、ナノ粒子を尾静脈注射後の時間（h）を表し、縦軸は、肝臓における蛍光強度に対するがんにおける蛍光強度の比を表す。

【図3】担がんマウスの蛍光イメージング試験結果である。具体的には、上から、A2・B不含ラクトソームナノ粒子である分子プローブP7、及びP8を用いた場合（比較例6）の結果であり、それぞれの結果について、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、30分、1時間、3時間、6時間、及び9時間経過後のマウスを腹側から測定したイメージを示す。

【図4】担がんマウスの蛍光イメージング試験結果である。具体的には、上から、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブP1を用いた場合（実施例2）の結果(A)、その凍結乾燥物P1(FD)を用いた場合（実施例3）の結果(B)である。それぞれの結果について、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、1時間、6時間、及び24時間経過後のマウスを左体側、腹側、及び右体側から測定したイメージを示す。

【図5】実施例4で得られた、ヒト肝臓がん細胞（HepG2）を同所移植した担がんマウスの、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブP2投与48時間経過後における全身（腹側）の発光と蛍光のイメージング結果（A）、及び摘出した肝臓の写真及びその発光及び蛍光イメージング結果（B）である。

【図6】実施例5で得られた、ヒト肺がん細胞（H441）を同所移植した担がんマウスの、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブP2投与48時間経過後における、摘出した肺の写真及びその発光及び蛍光イメージング結果である。

【図7】実験例10で得られた、光学純度の異なるポリ乳酸の示差走査熱量分析結果である。図7（a）は1次昇温結果を示し、図7（b）は2次昇温結果を示す。

【図8】ポリ乳酸A2（PLA）をポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1に混合することによりA1/A2系ラクトソーム（ポリ乳酸混合ラクトソーム）が調製されることを模式的に示したものである。

【図9】実施例6で得られた、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1と、5種類の光学純度の異なるポリ乳酸A2とから調製された5種類のA1/A2系ラクトソームナノ粒子の粒子径測定結果である。

【図10】比較例7で得られた、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるA2・B不含ラクトソームのピレン内包体の吸収スペクトルである。図10（a）はピレン濃度0-75 m

10

20

30

40

50

ol%である場合、図10(b)はピレン濃度100-1000 mol%である場合を示す。

【図11】実施例7で得られた、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2とからなるA1/A2系ラクトソーム(ポリ乳酸混合ラクトソーム)のピレン内包体の吸収スペクトルである。図11(a)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(PLLA)とからなるA1/A2系ラクトソーム(PLLA/ラクトソーム)の場合、図11(b)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(rac-PLA)とからなるA1/A2系ラクトソーム(rac-PLA/ラクトソーム)の場合を示す。

【図12】比較例7で得られたポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるA2・B不含ラクトソームのピレン内包体の蛍光スペクトルである。図12(a)はピレン濃度0-75 mol%である場合、図12(b)はピレン濃度100-1000 mol%である場合を示す。

10

【図13】実施例7で得られた、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2とからなるA1/A2系ラクトソーム(ポリ乳酸混合ラクトソーム)のピレン内包体の蛍光スペクトルである。図13(a)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(PLLA)とからなるA1/A2系ラクトソーム(PLLA/ラクトソーム)の場合、図13(b)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(rac-PLA)とからなるA1/A2系ラクトソーム(rac-PLA/ラクトソーム)の場合を示す。

【図14】比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームのピレン内包体の場合(図14(a))と、実施例7で得られたA1/A2系ラクトソーム(ポリ乳酸混合ラクトソーム)のピレン内包体場合(図14(b))とにおける、ピレン濃度と373 nmでの蛍光強度との関係を示す。

20

【図15】実施例8で得られた、担がんマウスの蛍光イメージング試験結果である。具体的には、A1/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブを用いた場合の結果(a)と、A1/A2/B系ラクトソームナノ粒子である分子プローブを用いた場合の結果(b)(c)(d)を示す。

【図16】実施例8で得られた、担がんマウスの蛍光イメージング試験における、がん部位とバックグラウンドとの蛍光強度比の時間変化を表したものである。

【図17】A1/B系ラクトソームを蛍光プローブに用いた場合(実施例9;(a))と、リポソームを蛍光プローブに用いた場合(比較例8;(b))との、皮下がんの蛍光造影試験の結果を比較したものである。

30

【図18】A1/B系ラクトソームを蛍光プローブに用いた場合(実施例9;(a))と、リポソームを蛍光プローブに用いた場合(比較例8;(b))とについて、皮下がんとバックグラウンドとにおける蛍光強度を比較したものである。

【図19】実験例13で得られた、標識ポリマーBである<sup>18</sup>F-PLLAのHPLCによる分取結果である。

【図20】実験例14で得られた、標識ポリマーBである<sup>18</sup>F-BzPLLAの前駆物質のHPLCによる分取結果(a)、及び標識ポリマーBである<sup>18</sup>F-BzPLLAのHPLCによる分取結果(b)である。

【図21】実施例11で得られた、A1/B系ラクトソームナノ粒子が、標識ポリマーBである<sup>18</sup>F-BzPLLAを内包していることの確認結果である。

40

【図22】実施例12で得られた、A1/B系ラクトソームナノ粒子を用いた担がんマウスのPET計測試験結果である。具体的には、A1/B系ラクトソームナノ粒子である<sup>18</sup>F-ラクトソームナノ粒子をPETプローブとして投与した担がんマウスについて、投与後1時間10分、3時間10分、及び6時間10分経過時点におけるPET計測によるシグナル強度を示したものである。

【図23】実施例12において、剖検によって、A1/B系ラクトソームナノ粒子を投与された担がんマウスの体内におけるシグナル強度を確認した結果である。

【図24】実施例13において、抗がん剤アドリアマイシンが、A1/A2系ラクトソームナノ粒子に内包されていることの確認を行った結果である。

50

【図25】実施例13で得られた、アドリアマイシン内包A1/A2系ラクトソームナノ粒子の抗がん作用試験結果である。

【図26】実施例14において、パクリタキセル内包A1/A2系ラクトソーム中のパクリタキセル量をHPLCで検出した結果(c)であり、A2・B不含ラクトソームについてのHPLC(a)及びパクリタキセル単体についてのHPLC(b)と比較して示したものである。

【図27】実施例14において、A1/A2系ラクトソーム(PLLA 50 mol%)及びA2・B不含ラクトソーム(PLLA 0 mol%)に対するパクリタキセルの混合量と、パクリタキセル検出量とを測定した結果である。

【図28】実施例15で得られた、パクリタキセル内包A1/A2系ラクトソームナノ粒子の抗がん作用試験結果である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0058】

- 目次 -

1. ラクトソームの構成ポリマー	
1-1. 両親媒性ブロックポリマーA1	
1-1-1. 両親媒性ブロックポリマーA1の構造	
1-1-1-1. 親水性ブロック鎖	
1-1-1-2. 疎水性ブロック鎖	
1-1-1-3. その他	
1-1-2. 両親媒性ブロックポリマーA1の合成	20
1-1-2-1. 合成方法	
1-1-2-2. 重合度制御及びラクトソームの形状などへの影響	
1-2. 疎水性ポリマーA2	
1-3. 標識ポリマーB	
1-3-1. ポリマー部	
1-3-1-1. ポリ乳酸	
1-3-1-2. 両親媒性ブロックポリマー	
1-3-2. 標識部	
1-3-2-1. シグナル基	
1-3-2-2. リガンド	30
1-3-2-3. 標識基の結合形態	
1-4. その他の基	
2. ラクトソーム	
2-1. ラクトソームの形状	
2-1-1. ミセル	
2-1-2. ベシクル	
2-1-3. ミセル又はベシクルの形成の確認	
2-2. ラクトソームの大きさ	
2-2-1. 粒子状ラクトソームの大きさ	
2-2-2. ラクトソームの大きさ測定	40
2-2-3. ラクトソームの大きさ制御	
2-3. ラクトソームの各構成ポリマーの割合	
2-4. ラクトソームの形成	
2-4-1. フィルム法	
2-4-2. インジェクション法	
3. 分子プローブ	
3-1. 分子イメージング用分子プローブ	
3-2. 薬剤搬送システム用分子プローブ	
3-3. 分子プローブの特性の制御	
4. 分子イメージングシステム及び薬剤搬送システム	50

- 4 - 1 . 分子プローブ投与
- 4 - 2 . 投与ターゲット
- 4 - 3 . 分子プローブの検出
- 4 - 4 . ラクトソームの血中安定性

【 0 0 5 9 】

[ 1 . ラクトソームの構成ポリマー ]

本発明の分子集合体（ラクトソーム；lactosome）は、乳酸単位を疎水性ブロックの基本とする両親媒性ブロックポリマー A 1 と、乳酸単位を基本とする疎水性ポリマー A 2、及び / 又は、乳酸単位を基本とする標識ポリマー B を構成成分として有する。

【 0 0 6 0 】

[ 1 - 1 . 両親媒性ブロックポリマー A 1 ]

以下に、本発明における両親媒性ブロックポリマー A 1 の構造及び合成について述べる。

[ 1 - 1 - 1 . 両親媒性ブロックポリマー A 1 の構造 ]

[ 1 - 1 - 1 - 1 . 親水性ブロック鎖 ]

本発明において、親水性ブロック鎖が有する「親水性」という物性の具体的な程度としては、特に限定されるものではないが、少なくとも、親水性ブロック鎖が、10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖に対して、相対的に親水性が強い性質をいう。或いは、当該親水性ブロック鎖が当該疎水性ブロック鎖とコポリマーを形成することによって、コポリマー分子全体として両親媒性を実現することが可能となる程度の親水性をいう。さらに或いは、当該両親媒性ブロックポリマーが溶媒中で自己組織化して、自己集合体、好ましくは粒子状の自己集合体を形成することが可能となる程度の親水性をいう。

【 0 0 6 1 】

親水性ブロック鎖において、その鎖を構成する構成単位の種類・比率は、ブロック鎖全体が上述したような親水性となるように、当業者によって適宜決定される。

【 0 0 6 2 】

親水性ブロック鎖は、例えば構成単位数 500 程度を上限として設計することができる。本発明においては、しばしば、50 ~ 300、好ましくは 100 ~ 200 程度の構成単位数を有する親水性ブロック鎖が合成されうる。500 程度を超えると、分子集合体を形成した場合に、当該形成された分子集合体の安定性を欠く傾向にある。構成単位数が 50 を下回ると、分子集合体の形成自体が困難となる傾向にある。

【 0 0 6 3 】

親水性ブロック鎖としては、ポリペプチド鎖、より具体的な例として、サルコシン単位を 20 個以上有するポリペプチド鎖が挙げられる。このポリペプチド鎖においては、20 個以上のサルコシン単位のすべてが連続していてもよいし、非連続であってもかまわないが、当該ポリペプチド鎖全体として後述の基本特性を損なわないように分子設計されたものであることが好ましい。

【 0 0 6 4 】

親水性ブロック鎖がサルコシン単位を 20 個以上有するポリペプチド鎖であって、且つサルコシン単位以外の構成単位を有する場合、そのような構成単位としては特に限定されないが、アミノ酸（親水性アミノ酸及びその他のアミノ酸を含む）とすることができる。なお、本明細書において「アミノ酸」は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、及びそれらの修飾及び / 又は化学的変更による誘導体を含む概念で用いる。さらに、本明細書において、アミノ酸は、 - 、 - 、 - アミノ酸を含む。好ましくは、アミノ酸である。例えば、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

【 0 0 6 5 】

また、後に 1 - 4 で述べるが、両親媒性ブロックポリマー A 1 は糖鎖やポリエーテルなどのさらなる基を有してよい。この場合は、両親媒性ブロックポリマー A 1 の親水性ブロック鎖が糖鎖やポリエーテルなどを有するように分子設計されることが好ましい。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

サルコシン（すなわちN-メチルグリシン）は水溶性が高く、また、サルコシンのポリマーはN置換アミドを有することから通常のアミド基に比べてシス-トランス異性化が可能であり、さらに、C炭素まわりの立体障害が少ないことから、高い柔軟性を有するものである。このようなポリペプチドを構成ブロック鎖として用いることは、当該ブロック鎖に高い親水性と高い柔軟性とを併せ持つという基本特性が備わる点で非常に有用である。

このような基本特性を有する親水性ブロック鎖であれば、上記具体例以外の親水性ブロック鎖も本発明に適用することができる。

【0067】

[1-1-1-2.疎水性ブロック鎖]

本発明において、疎水性ブロック鎖が有する「疎水性」という物性の具体的な程度としては、特に限定されるものではないが、少なくとも、疎水性ブロック鎖が、上記の親水性ブロック鎖に対して、相対的に疎水性が強い領域であり、当該親水性ブロック鎖とコポリマーを形成することによって、コポリマー分子全体として両親媒性を実現することが可能となる程度の疎水性を有していれば良い。或いは、当該両親媒性ブロックポリマーが溶媒中で自己組織化して、自己集合体、好ましくは粒子状の自己集合体を形成することが可能となる程度の疎水性を有していれば良い。

【0068】

本発明において、疎水性ブロック鎖は、10個以上の乳酸単位を有するものである（本明細書においては、乳酸単位を基本単位とするこの疎水性ブロック鎖を、単にポリ乳酸と記載することがある）。好ましくは、疎水性ブロック鎖は、20個以上の乳酸単位を有する。この疎水性ブロック鎖においては、乳酸単位のすべてが連続していてもよいし、非連続であってもかまわない。疎水性分子鎖において、乳酸単位以外の構成単位の種類・比率は、ブロック鎖全体が上述したような疎水性となるように、当業者によって適宜決定される。

【0069】

この疎水性ブロック鎖において、乳酸単位以外の構成単位を有する場合、そのような構成単位の種類・比率は、ブロック鎖全体が上述したような疎水性であることを満たせば特に限定されるものではないが、後述の諸特性を有するように分子設計されたものであることが好ましい。

【0070】

疎水性ブロック鎖において、乳酸単位以外の構成単位を有する場合、そのような構成単位は、乳酸以外のヒドロキシル酸及びアミノ酸（疎水性アミノ酸及びその他のアミノ酸を含む）からなる群から選択することができる。ヒドロキシル酸としては、特に限定されないが、グリコール酸、ヒドロキシイソ酪酸などが挙げられる。疎水性アミノ酸は、その多くが、脂肪族側鎖、芳香族側鎖などを有する。天然アミノ酸では、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、チロシン、及びトリプトファンなどが挙げられる。非天然アミノ酸では、特に限定されないが、グルタミン酸メチルエステル、グルタミン酸ベンジルエステル、アスパラギン酸メチルエステル、アスパラギン酸エチルエステル、アスパラギン酸ベンジルエステルなどのアミノ酸誘導体が挙げられる。

【0071】

疎水性ブロック鎖の構成単位数の上限としては特に限定されないが、100程度である。本発明においては、しばしば、10～80、好ましくは20～50程度の構成単位数を有する疎水性ブロック鎖が合成されうる。構成単位数が100程度を超えると、分子集合体を形成した場合に、当該形成された分子集合体の安定性を欠く傾向にある。構成単位数が10を下回ると、分子集合体の形成自体が困難となる。

【0072】

ポリ乳酸は、優れた生体適合性及び安定性を有するものである。このため、このようなポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から得られる分子集合体は、生体、特に人体

10

20

30

40

50

への応用性という点で非常に有用である。

また、ポリ乳酸は、優れた生分解性を有することから代謝が早く、生体内においてがん組織以外への組織への集積性が低い。このため、このようなポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から得られる分子集合体は、がん組織への特異的な集積性という点で非常に有用である。

そして、ポリ乳酸は、低沸点溶媒への溶解性に優れるものであることから、このようなポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から分子集合体を得る際に、有害な高沸点溶媒の使用を回避することが可能である。このため、このような分子集合体は、生体への安全性という点で非常に有用である。

さらに、ポリ乳酸の鎖長を調整することは、このようなポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から得られる分子集合体の形状制御及び大きさ制御の一要因として寄与する点で好ましい。このため、このような構成ブロックを用いることは、得られる分子集合体形状の用途性に優れるという点で非常に有用である。

疎水性ブロック鎖において、乳酸単位以外の構成単位を有する場合も、これらの優れた諸特性を有するように分子設計することが好ましい。

#### 【0073】

疎水性ブロック鎖は、光学純度の観点から、さらに以下のバリエーションを有することができる。

例えば、疎水性ブロック鎖における当該乳酸単位が、L - 乳酸単位のみで構成されてもよいし、D - 乳酸単位のみで構成されてもよいし、L - 乳酸単位とD - 乳酸単位との両者から構成されてもよい。疎水性ブロック鎖は、上記例示のものから選ばれた1種が単独で使用されてもよいし、複数種が組み合わされて使用されてもよい。

#### 【0074】

当該乳酸単位がL - 乳酸単位とD - 乳酸単位との両者から構成される場合、L - 乳酸単位とD - 乳酸単位との重合順番は限定されない。L - 乳酸単位とD - 乳酸単位とが1個又は2個ずつ交互に重合されていてもよいし、ランダムに重合されていてもよいし、ブロック重合されていてもよい。

#### 【0075】

従って、当該乳酸単位がL - 乳酸単位とD - 乳酸単位との両者から構成される場合、それぞれの乳酸単位の含有量は特に限定されない。すなわち、L - 乳酸単位とD - 乳酸単位とが異なる量で含有されていてもよいし、L - 乳酸単位とD - 乳酸単位とが同量含有されていてもよい。この場合、当該10個以上の乳酸単位が全体として光学純度0%のラセミ体であり得る。

#### 【0076】

どのような光学純度のものを用いるかについては、後述の疎水性ポリマーA2の光学純度との兼ね合いを考慮して決定することができる。このことについては、1 - 2で後述する。

#### 【0077】

##### [1 - 1 - 1 - 3 . その他]

両親媒性ブロックポリマーA1は、通常、標識基を有さないが、分子集合体を形成した場合に、他の成分(すなわち後述の疎水性ポリマーA2及び標識ポリマーB)と区別可能である限り、標識基をさらに有する形態を除外するものではない。

#### 【0078】

##### [1 - 1 - 2 . 両親媒性ブロックポリマーA1の合成]

##### [1 - 1 - 2 - 1 . 合成方法]

本発明において、両親媒性ブロックポリマーA1の合成法としては、特に限定されるものではなく、公知のペプチド合成法、ポリエステル合成法、及び/又はデブシペプチド合成法を用いることができる。

#### 【0079】

ペプチド合成は、例えば、アミンなどの塩基を開始剤として、N - カルボキシアミノ酸

10

20

30

40

50

無水物(アミノ酸NCA)を開環重合することなどによって行うことができる。

【0080】

ポリエステル合成は、例えば、アミンなどの塩基や金属錯体などを開始剤として、ラクチドを開環重合することなどによって行うことができる。ラクチドとしては、ブロック鎖の所望の光学純度を考慮して、当業者が適宜決定することができる。例えば、L-ラクチド、D-ラクチド、DL-ラクチド及びメソラクチドから適宜選択し、ブロック鎖の所望の光学純度に応じて当業者が適宜使用量を決定することができる。

【0081】

デプシペプチド合成は、例えば、疎水性ブロックとしてポリ乳酸を先に合成し、その後、親水性ブロックとなるポリペプチド鎖を伸張する方法と、親水性ブロックとなるポリペ

10

【0082】

本発明の分子集合体において、ポリ乳酸の鎖長を調整することが、その形状及び大きさの制御をより容易に行うことができる手段の一つであることが本発明者らによって確認されている。従って、両親媒性ブロックポリマーA1の合成の際には、ポリ乳酸の鎖長をより自由に制御するという観点から、疎水性ブロックであるポリ乳酸を先に合成し、その後、親水性ブロック鎖となるポリペプチド鎖を伸張する方法を行う方が好ましい。

【0083】

[1-1-2-2. 重合度制御及びラクトソームの形状などへの影響]

20

両親媒性ブロックポリマーA1における疎水性ブロック鎖としてのポリ乳酸は、親水性ブロック鎖としてのポリサルコシンに比べ重合度の制御をより容易に且つ正確に行うことができることが、本発明者らによって確認されている。すなわち、疎水性ブロック鎖としてポリ乳酸を用いることによって、鎖長の制御をより容易に且つ正確に行うことが可能になった。上述のように、ポリ乳酸の鎖長を調整することは、本発明の分子集合体の形状及び大きさを制御する手段の一つである。このため、ポリ乳酸について鎖長制御を正確に行うことは、分子集合体の形状及び大きさの制御を容易に行うことが可能である点で有効である。従って、分子集合体を形成するための両親媒性ブロックポリマーに、このようなポリ乳酸を構成ブロック鎖として用いることは、所望の分子集合体を正確且つ容易に形成することを可能とする。

30

【0084】

なお、本発明の両親媒性ブロックポリマーA1の分子量としては、両親媒性ブロックポリマーA1の構成単位数の総数が20個より少なくなならない程度とする。両親媒性ブロックポリマーA1の構成単位数の総数が20個より少なくなると、沈殿が生じ水に分散しなくなる傾向が強いためである。

両親媒性ブロックポリマーA1の分子量は、例えば、両親媒性ブロックポリマーA1と後述の標識ポリマーBとから形成される分子集合体が分子イメージングシステムや薬剤搬送システムにおける分子プローブとして用いられる場合に、当該分子プローブが担持する物質(すなわち標識や薬剤など)の種類、有効濃度、放出期間などを考慮し、当業者によって適宜決定されうる。

40

【0085】

[1-2. 疎水性ポリマーA2]

疎水性ポリマーA2は、10個以上の乳酸単位を少なくとも有する疎水性ポリマーである。好ましくは、疎水性ポリマーA2は、15個以上の乳酸単位を少なくとも有する。ここで、疎水性ポリマーA2が有する「疎水性」という物性の具体的な程度としては特に限定されるものではないが、少なくとも、上記の両親媒性ポリマーA1の親水性ブロックに対して、相対的に疎水性が強い。

【0086】

疎水性ポリマーA2においては、10個以上の乳酸単位が主たる構成成分であることが好ましい。しかしながら一方で、乳酸単位以外の他の構成単位を有することも許容する。

50

当該乳酸単位はそのすべてが連続していてもよいし、非連続であってもよい。

疎水性ポリマー A 2 の構成単位や鎖長は、後述するように、基本的に、上述 1 - 1 - 1 - 2 の両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖の分子設計における場合と同様の観点で決定することができる。このようにすることによって、分子集合体において、疎水性ポリマー A 2 と、両親媒性ブロックポリマー A 1 の疎水性ブロック鎖との親和性に優れるという効果も得られる。

【 0 0 8 7 】

疎水性ポリマー A 2 が、乳酸単位以外の他の構成単位を有する場合は、当該他の構成単位は、疎水性ポリマー A 2 が全体として上記定義された「疎水性」の範疇を越える影響を与えない程度に含まれる。従って、当該他の構成単位は乳酸単位より親水性であっても疎水性であってもかまわない。他の構成単位の種類・比率は、疎水性ポリマー A 2 全体が上述したような疎水性となるように、当業者によって適宜決定される。当該他の構成単位の例としては、上記 1 - 1 - 1 - 2 において乳酸単位以外の構成単位として挙げたものが含まれる。

10

【 0 0 8 8 】

疎水性ポリマー A 2 の構成単位数の上限としては、上述の両親媒性ブロックポリマー A 1 の長さを超えないものであれば特に限定されないが、好ましくは、両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロックの 2 倍の長さを超えないものとする。従って、疎水性ポリマー A 2 の構成単位数の上限としては、200 程度とすることができる。本発明においては、しばしば、10 ~ 160、好ましくは 20 ~ 100 程度の構成単位数を有する疎水性ポリマー A 2 が合成されうる。構成単位数が 200 程度を超えると、分子集合体を形成した場合に、当該形成された分子集合体の安定性を欠く傾向にある。構成単位数が 10 を下回ると、疎水コア体積増大効果及び粒子径制御効果が小さくなる。

20

【 0 0 8 9 】

上記 1 - 1 - 1 - 2 で述べたように、本発明の分子集合体は、生体適合性、安定性及び生分解性に優れ、構成ポリマーが低沸点溶媒への溶解性に優れるという緒特性を有するものであることが好ましい。従って、他の構成単位を含む場合も、疎水性ポリマー A 2 の構成は、これらの優れた諸特性を有するように分子設計されることが好ましい。

【 0 0 9 0 】

疎水性ポリマー A 2 は、光学純度の観点から、さらに以下のバリエーションを有することができる。

30

例えば、疎水性ポリマー A 2 における当該乳酸単位が、L - 乳酸単位のみで構成されてもよいし、D - 乳酸単位のみで構成されてもよいし、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との両者から構成されてもよい。疎水性ポリマー A 2 は、上記例示のものから選ばれた 1 種が単独で使用されてもよいし、複数種が組み合わされて使用されてもよい。

【 0 0 9 1 】

当該乳酸単位が L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との両者から構成される場合、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との重合順番は限定されない。L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とが 1 個又は 2 個ずつ交互に重合されていてもよいし、ランダムに重合されていてもよいし、ブロック重合されていてもよい。

40

【 0 0 9 2 】

従って、当該乳酸単位が L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との両者から構成される場合、それぞれの乳酸単位の含有量は特に限定されない。すなわち、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とが異なる量で含有されていてもよいし、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位とが同量含有されていてもよい。この場合、当該 10 個以上の乳酸単位が全体として光学純度 0 % のラセミ体であり得る。

【 0 0 9 3 】

どのような光学純度のものを用いるかについては、前述の両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖の光学純度との兼ね合いを考慮して決定することができる。分子集合体の粒子径の制御、及び標識や薬剤の安定的な保持などの観点から、前述の両親

50

媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖と、疎水ポリマー A 2 とが、ステレオコンプレックスを形成しにくい組み合わせであることが好ましい。

【 0 0 9 4 】

例えば、両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖が、L - 乳酸単位から構成される場合、疎水ポリマー A 2 の主鎖は、D - 乳酸単位から構成されたものであるか、又は、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との両方から構成されたものであることが好ましい。

また、例えば、両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖が、D - 乳酸単位から構成される場合、疎水ポリマー A 2 の主鎖は、L - 乳酸単位から構成されたものであるか、又は、L - 乳酸単位と D - 乳酸単位との両方から構成されたものであることが好ましい。

10

【 0 0 9 5 】

疎水性ポリマー A 2 は、通常、標識基を有さないが、分子集合体を形成した場合に、他の成分（すなわち前述の両親媒性ブロックポリマー A 1 及び後述の標識ポリマー B）と区別可能である限り、標識基をさらに有する形態を除外するものではない。

【 0 0 9 6 】

[ 1 - 3 . 標識ポリマー B ]

標識ポリマー B は、10 個以上の乳酸単位と、標識基とを少なくとも有する標識ポリマーである。好ましくは、標識ポリマー B は、15 個以上の乳酸単位を有する。例えば、10 個以上の乳酸単位と標識基とを主たる構成成分とするもの（すなわち標識ポリ乳酸）であつてもよいし、当該 10 個以上の乳酸単位を疎水性ブロックとし、さらにそれに対する親水性ブロックを有するもの（すなわち標識両親媒性ブロックポリマー）であつてもよい。これら標識ポリマーは、1 種又は複数種を組み合わせる用いることができる。従つて、例えば標識ポリ乳酸と標識両親媒性ブロックポリマーとを組み合わせる用いることも許容される。

20

【 0 0 9 7 】

[ 1 - 3 - 1 . ポリマー部 ]

上記 1 - 1 - 1 - 2 で述べたように、本発明の分子集合体は、生体適合性、安定性及び生分解性に優れ、構成ポリマーが低沸点溶媒への溶解性に優れるという諸特性を有するものであることが好ましい。従つて、ポリマー部の構成は、これらの優れた諸特性を有するように分子設計されることが好ましい。

30

【 0 0 9 8 】

[ 1 - 3 - 1 - 1 . ポリ乳酸 ]

標識ポリマー B が標識ポリ乳酸である場合、そのポリマー部（すなわちポリ乳酸部）は、10 個以上、好ましくは 15 個以上の乳酸単位を主たる構成成分とする。乳酸単位のすべてが連続していてもよいし、非連続であつてもかまわない。

【 0 0 9 9 】

その他、標識ポリマー B のポリ乳酸部の構成単位や鎖長に関しては、基本的に、上述 1 - 1 - 1 - 2 の両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック鎖の分子設計における場合と同様の観点で決定することができる。このようにすることによって、分子集合体において、標識ポリマー B と、両親媒性ブロックポリマー A 1 の疎水性ブロック鎖との親和性に優れるという効果も得られる。

40

【 0 1 0 0 】

[ 1 - 3 - 1 - 2 . 両親媒性ブロックポリマー ]

標識ポリマー B が標識両親媒性ブロックポリマーである場合、そのポリマー部（すなわち両親媒性ブロックポリマー部）は、親水性ブロック鎖と、10 個以上、好ましくは 15 個以上の乳酸単位とを有する疎水性ブロック鎖とを有するものとしてすることができる。乳酸単位のすべてが連続していてもよいし、非連続であつてもかまわない。

【 0 1 0 1 】

その他、標識ポリマー B の両親媒性ブロックポリマー部の構成単位や鎖長に関しては、

50

基本的に、上述 1 - 1 - 1 の両親媒性ブロックポリマー A 1 の分子設計における場合と同様の観点で決定することができる。このようにすることによって、分子集合体において、標識ポリマー B と、両親媒性ブロックポリマー A 1 の疎水性ブロック鎖との親和性に優れるという効果も得られる。

#### 【 0 1 0 2 】

##### [ 1 - 3 - 2 . 標識部 ]

標識部は、シグナル基及びリガンドからなる群から選択することができる。

##### [ 1 - 3 - 2 - 1 . シグナル基 ]

シグナル基は、検出によりイメージングを可能にする特性を有する基である。例えば、蛍光基、放射性元素含有基、磁性基などが挙げられる。これらの基を検出する手段は、当業者によって適宜選択されるものである。

10

#### 【 0 1 0 3 】

蛍光基としては、特に限定されないが、フルオレセイン系色素、インドシアニン色素などのシアニン系色素、ローダミン系色素、量子ドットなどに由来する基が挙げられる。

本発明においては、近赤外蛍光基（例えばシアニン系色素、量子ドットなどに由来する基）を用いることが好ましい。

#### 【 0 1 0 4 】

近赤外領域（700 ~ 1300 nm）では、水素結合を有する各置換基の吸収が存在するものの、その吸収は比較的小さい。このため、近赤外光は生体組織を透過しやすい特性を有する。このような近赤外光の特性を利用すれば、身体に無用の負荷を与えることなく体内の情報を得ることも可能であるといえる。特に、測定対象を小動物、体表面に近い部位に特定すると、近赤外蛍光は、有用な情報を与えることが可能になる。

20

#### 【 0 1 0 5 】

近赤外蛍光基のより具体的な例としては、ICG（インドシアニングリーン）などのインドシアニン色素、Cy7、DY776、DY750、Alexa790、Alexa750などが挙げられる。本発明の分子集合体を、例えばがんを標的として用いる場合は、がんへの集積性という観点で、ICGなどのインドシアニン色素や、DY750を用いることが特に好ましい場合がある。

#### 【 0 1 0 6 】

放射性元素含有基としては、特に限定されないが、 $^{18}\text{F}$ などの放射性同位体でラベルした、糖、アミノ酸、核酸などに由来する基が挙げられる。放射性元素含有基の導入方法の具体例の一つとしては、モノFmocエチレンジアミンを用いてラクチドの重合を行う工程、末端OHをシリル保護基で保護する工程、ピペリジン処理でFmocを脱離する工程、サルコシン-N-カルボキシ無水物（SarNCA）の重合を行い、重合物末端をターミネーションする工程、シリル保護基を外し、スルホン酸エステル（例えば、トリフルオロメタンスルホン酸エステル、パラトルエンスルホン酸エステルなど）に変換する工程、及び放射性元素含有基を導入する工程により行う方法が挙げられる。さらに、当該具体例は当業者によって適宜変更されて良い。

30

#### 【 0 1 0 7 】

磁性基としては、特に限定されないが、フェリクロームなどの磁性体を有するものや、フェライトナノ粒子、ナノ磁性粒子などにみられるものが挙げられる。

40

#### 【 0 1 0 8 】

##### [ 1 - 3 - 2 - 2 . リガンド ]

リガンドは、本発明の分子集合体を投与した際に、標的部位へ分子集合体を特異的に結合させるためのリガンドや、当該分子集合体を投与した際に、標的部位へ搬送すべき薬剤やシグナル剤などの分子や原子を配位させるためのリガンドなどを含む。

#### 【 0 1 0 9 】

標的部位へ分子集合体を特異的に結合させるための、ターゲティングのためのリガンドとしては、当業者に公知のものが特に限定されることなく用いられるが、例えば、抗体、RGD（アルギニン - グリシン - アスパラギン酸）等の接着因子などが挙げられる。

50

標的部位へ搬送すべき薬剤やシグナル剤などの分子・原子を配位させるためのリガンドとしては、当業者に公知のものが特に限定されることなく用いられるが、遷移金属を配位できるトリカルボン酸等のリガンドが挙げられる。

【0110】

[1-3-2-3. 標識基の結合形態]

1個の標識ポリマーは、1個又は複数の標識基を有してよい。すなわち、標識基は、1個のポリマー部に1個又は複数個結合させることができる。この場合において、「結合」とは、具体的には共有結合をいい、「結合している」とは、ポリマー部の特定の箇所に、直接的に結合している形態と、適当なスペーサー基を介して間接的に結合している形態とを含む意味である。スペーサー基としては特に限定されることなく、当業者によって適宜選択されるが、例えば、アルキル基などでもよいし、カルボキシルメチルセルロース、アミロースなどの多糖や、ポリアルキレンオキシド鎖、ポリエチレングリコール鎖、ポリビニルアルコール鎖などの水溶性高分子でもよい。

10

【0111】

標識基の結合部位は、ポリマー部のどの部分であってもよい。

標識ポリマーBのポリマー部がポリ乳酸である場合、標識基がポリ乳酸の末端構成単位に結合していても、当該末端構成単位以外の内部構成単位に結合していてもよい。いずれにしても、このような標識ポリマーB（標識ポリ乳酸）が両親媒性ブロックポリマーA1とともに形成する分子集合体は、標識基を分子集合体内部に保持する形態を有することになる。より具体的には、分子集合体がミセルである場合には、ミセル内部における疎水性部や、親水性部と疎水性部との境界あたりに標識基を保持する形態を有しうる。分子集合体がベシクルである場合は、ベシクルの膜組織に標識基を包埋して保持する形態を有しうる。

20

【0112】

標識ポリマーBのポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合、例えば標識基が当該両親媒性ブロックポリマーの末端構成単位に結合することができる。特に、親水性ブロック側の末端構成単位に結合することができる。このような標識ポリマーB（標識両親媒性ブロックポリマー）が両親媒性ブロックポリマーA1とともに形成する分子集合体は、標識基を分子集合体表面に保持する形態、すなわち標識基による表面修飾の形態を有しうる。

30

【0113】

一方、標識ポリマーBのポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合に、標識基が当該両親媒性ブロックポリマーの末端構成単位以外の内部構成単位に結合することもできる。このような標識ポリマーB（標識両親媒性ブロックポリマー）が両親媒性ブロックポリマーA1とともに形成する分子集合体は、標識基を分子集合体内部に保持する形態を有しうる。より具体的には、分子集合体がミセルである場合には、ミセルの内部に標識基を保持する形態を有し、分子集合体がベシクルである場合は、ベシクルの膜組織に標識基を包埋して保持する形態を有しうる。

【0114】

[1-4. その他の基]

本発明において、両親媒性ブロックポリマーA1、疎水性ポリマーA2、及び/又は標識ポリマーBは、さらなる基を有しても良い。そのような基は、当業者によって適宜選択されるものであって、特に限定されるものではない。たとえば、当該基の例として、適当な鎖長を有する有機基などの機能性基が挙げられる。これらの基は、例えば、本発明の分子集合体が、分子イメージングシステムや薬剤搬送システムに用いられる分子プローブとして用いられる場合に、そのような分子プローブとしてさらに有用となるような形態・機能などを持たせるための基となりうるものであり、当業者によって適宜選択されるものである。機能性基のより具体的な例としては、糖鎖や水溶性高分子が挙げられる。糖鎖の例としては、カルボキシルメチルセルロース、アミロースなどが挙げられる。水溶性高分子の例としては、ポリエーテル鎖、ポリビニルアルコール鎖などが挙げられる。ポリエーテ

40

50

ル鎖の具体例としては、ポリエチレングリコール鎖などのポリアルキレンオキシド鎖が挙げられる。

【0115】

[2.ラクトソーム]

本発明の分子集合体(ラクトソーム)は、上記両親媒性ブロックポリマーA1と上記疎水性ポリマーA2及び/又は上記標識ポリマーBとの凝集により、或いは自己集合的な配向会合により成り立つ構造体である。すなわち、本発明の分子集合体は、両親媒性ブロックポリマーA1と標識ポリマーBとを少なくとも含んで成り立つA1/B系ラクトソーム；両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2とを少なくとも含んで成り立つA1/A2系ラクトソーム；及び両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2と標識ポリマーBとを少なくとも含んで成り立つA1/A2/B系ラクトソームを含む。

10

【0116】

[2-1.ラクトソームの形状]

上述のように、本発明の分子集合体は、上記両親媒性ブロックポリマーA1と上記疎水性ポリマーA2及び/又は上記標識ポリマーBとの凝集により、或いは自己集合的な配向会合により成り立つ構造体であるため、その形状については特に限定されるものではない。すなわち、本発明の分子集合体には、ミセル状、ベシクル状、ロッド状、及びその他分子の凝集形態のあらゆるものを含む。両親媒性ブロックポリマーの分子構造や相互作用点などを制御することによって、様々な形の分子集合体を作成することができる。

【0117】

20

例えば、本発明の分子集合体が、ミセル状、ベシクル状などの粒子状のものである場合、当該分子集合体は、分子イメージングシステムや薬剤搬送システムにおける分子プローブとして有用である。このように、分子集合体の形状は、分子集合体の用途及びその他の要因を考慮することによって、当業者によって適宜その形状が決定される。

【0118】

[2-1-1.ミセル]

上記の疎水性ポリマーA2を有する場合のミセルの一例の模式図を、図8に示す。図8は、両親媒性ブロックポリマーA1(図中PLLA<sub>30</sub>-PSar<sub>150</sub>で示される)と疎水性ポリマーA2(図中PLAで示される)とから自己組織化によって形成されるミセルを示している。

図8に例示されるように、両親媒性ブロックポリマーA1は、自己組織化によって、疎水性ブロック鎖がコア部を形成する。一方、疎水性ポリマーA2は、当該疎水コア部に位置する。このとき、疎水性ポリマーA2は、当該疎水コア部の体積を増大させる作用を発揮する。それとともに、疎水性ポリマーA2は、当該ミセルの粒子径を増大させる作用も発揮する。後述の2-2-3で述べるように、本発明者らは、このような疎水性ポリマーA2が有する作用の程度が、その配合率に依存することを見出した。

30

【0119】

上記の標識ポリマーBを有する場合、上記1-3-2-3で述べたように、標識ポリマーBのポリマー部がポリ乳酸であれば、標識基がポリ乳酸のいずれの構成単位に結合していても、ミセルは、その内部における疎水性部や、親水性部と疎水性部との境界あたりに標識基を保持する形態を有しうる。

40

【0120】

標識ポリマーBのポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合であって、標識基が例えば親水性ブロック側の末端構成単位に結合している場合、ミセルは、標識基をその表面に保持する形態、すなわち標識基による表面修飾の形態を有しうる。

一方、標識ポリマーBのポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合であって、標識基が当該両親媒性ブロックポリマーの末端構成単位以外の内部構成単位に結合している場合、ミセルは、その内部に標識基を保持する形態を有しうる。

【0121】

ミセルは後述のベシクルのように内部に中空空間を有しないが、ミセル形成時に所望の物質を共存させることによって、その内部に当該物質をさらに内包することができる。こ

50

の場合、当該物質は、ミセルの使用目的などに応じて当業者が適宜決定することができるものであるが、例えば、薬剤分子や、標識剤分子であってよい。当該薬剤分子や標識剤分子は、疎水性化合物であることが多い。この場合においては、ミセルの疎水コア部がそのような疎水性化合物を保持するキャパシティーに優れているという観点で、前述のようにミセルに疎水性ポリマー A 2 が含まれていることが好ましい。

#### 【 0 1 2 2 】

例えば、本発明の分子集合体が、がんをターゲットとした分子プローブに用いられる場合などには、E P R (enhanced permeability and retention) 効果を考慮すると、特にミセルであることが好ましい場合がある。

#### 【 0 1 2 3 】

##### [ 2 - 1 - 2 . ベシクル ]

上記の標識ポリマー B を有する場合、上記 1 - 3 - 2 - 3 で述べたように、標識ポリマー B のポリマー部がポリ乳酸である場合、標識基がポリ乳酸のいずれの構成単位に結合していても、ベシクルにおいては、ベシクルの膜組織に標識基を包埋して保持する形態を有しうる。

#### 【 0 1 2 4 】

標識ポリマー B のポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合であって、標識基が例えば親水性ブロック側の末端構成単位に結合している場合、ベシクルは、標識基をその表面に保持する形態、すなわち標識基による表面修飾の形態を有しうる。

一方、標識ポリマー B のポリマー部が両親媒性ブロックポリマーである場合であって、標識基が当該両親媒性ブロックポリマーの末端構成単位以外の内部構成単位に結合している場合、ベシクルは、その膜組織に標識基を包埋して保持する形態を有しうる。

#### 【 0 1 2 5 】

ベシクルは通常、内部の中空空間が水相で満たされており、この水相に、内包すべき物質を含ませることができる。当該物質としては、ベシクルの使用目的などに応じて当業者が適宜決定することができるものであるが、例えば、薬剤分子や標識剤分子であってよい。これらの物質は、分子集合体外部と等張の溶液又は懸濁液の形で封入されてよい。

#### 【 0 1 2 6 】

##### [ 2 - 1 - 3 . ミセル又はベシクルの形成の確認 ]

分子集合体の形状については透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; T E M ) により確認することができる。

また、分子集合体が内水相を形成する場合には、水溶性の蛍光剤を用いて確認できる。この確認は、内水相に水溶性の蛍光剤が内包されるように分子集合体を調製し、これをカラム処理に供して各フラクションの吸光度を測定し、分子集合体の吸収と蛍光剤の吸収が同じフラクションに出現することを確認することによって行うことができる。

#### 【 0 1 2 7 】

##### [ 2 - 2 . ラクトソームの大きさ ]

##### [ 2 - 2 - 1 . 粒子状ラクトソームの大きさ ]

本発明の分子集合体の大きさは、粒子状のものである場合、例えば粒子径 1 0 ~ 5 0 0 n m である。ここで「粒子径」とは、粒子分布で最も出現頻度の高い粒径、すなわち中心粒径をいう。粒子径が 1 0 n m より小さいものは作成が難しく、5 0 0 n m より大きいものは、特に生体内へ注射により投与する場合に、注射剤として好ましくない。

#### 【 0 1 2 8 】

##### [ 2 - 2 - 2 . ラクトソームの大きさ測定 ]

本発明の分子集合体の大きさを測定するための方法は特に限定されるものではなく、当業者によって適宜選択されるものである。例えば、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; T E M ) による観察法や、動的光散乱 (Dynamic Light Scattering; D L S ) 法などが挙げられる。D L S 法においては、溶液中でブラウン運動している粒子の移動拡散係数を測定する。

#### 【 0 1 2 9 】

## [ 2 - 2 - 3 . ラクトソームの大きさ制御 ]

分子集合体の大きさを制御する手段の例として、各構成ポリマーの鎖長を制御することが挙げられる。この手段は、ラクトソームの大まかな大きさを決定する際に有効である。

例えば両親媒性ブロックポリマー A 1 の鎖長を制御するには、上記 1 - 1 - 2 - 1 及び 1 - 1 - 2 - 2 で述べたように、両親媒性ブロックポリマー A 1 における疎水性ブロック（すなわちポリ乳酸）の重合度を調整することが有効である。疎水性ポリマー A 2 や標識ポリマー B の鎖長を制御する場合も同様である。

## 【 0 1 3 0 】

分子集合体の大きさを制御する手段の他の例として、後述のように疎水性ポリマー A 2 の配合量を制御することが挙げられる。この手段は、分子集合体の大きさを連続的に制御することを可能にするため、ラクトソームの微妙な大きさの調整ができる点で好ましい。すなわち、この手段は、疎水性ポリマー A 2 の配合量を適宜決定することによって、所望の大きさを有する分子集合体を得ることができるという点で有効である。

10

## 【 0 1 3 1 】

## [ 2 - 3 . ラクトソームの各構成ポリマーの割合 ]

本発明の分子集合体の構成ポリマーとして少なくとも両親媒性ブロックポリマー A 1 と標識ポリマー B とが含まれる場合（すなわち、分子集合体が A 1 / B 系ラクトソーム、及び A 1 / A 2 / B 系ラクトソームである場合）、それらポリマー A 及び B の割合は特に限定されるものではなく、当業者によって適宜選択されるものである。例えば、両親媒性ブロックポリマー A 1 と標識ポリマー B との割合を、モル基準で 1 : 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 : 1、好ましくは 1 : 1 0 0 ~ 1 0 0 : 1 とすることができる。上記範囲よりも両親媒性ブロックポリマー A 1 の割合が上回ると、標識剤が含まれない分子集合体の割合が不必要に高くなる傾向にある。また、上記範囲よりも標識ポリマー B の割合が上回ると、分子集合体が不安定となる傾向にある。

20

## 【 0 1 3 2 】

本発明の分子集合体の構成ポリマーとして少なくとも両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 とが含まれる場合（すなわち、分子集合体が A 1 / A 2 系ラクトソーム、及び A 1 / A 2 / B 系ラクトソームである場合）も、それらのポリマー A 1 及び A 2 の割合は特に限定されない。

しかしながらすでに述べたように、疎水性ポリマー A 2 の配合量を制御することによって、分子集合体の疎水コア部の体積の制御、及び分子集合体の大きさの制御が可能である。このような観点からは、例えば、両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 との使用割合を、モル基準で 1 0 : 1 ~ 1 : 1 0 とすることができる。上記範囲よりも疎水性ポリマー A 2 の割合が上回ると、分子集合体自体がその形状を保ちにくくなる傾向にある。また、上記範囲よりも疎水性ポリマー A 2 の割合が下回ると、疎水性ポリマー A 2 を混合することによる効果（すなわち、疎水コア体積増大効果及び粒子径制御効果）が得られにくくなる傾向にある。

30

## 【 0 1 3 3 】

上記の範囲を満たす量で両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 とを用いることによって、例えば 1 0 ~ 5 0 0 n m の粒子径を有する分子集合体を調製することができる。

40

## 【 0 1 3 4 】

## [ 2 - 4 . ラクトソームの形成 ]

分子集合体の作成法は特に限定されず、所望する分子集合体の形状、大きさ、特性、担持させる物質の種類、性質、含有量などに応じて、当業者が適宜選択することができる。必要に応じ、下記のように分子集合体を形成した後に、得られた分子集合体に対して、公知の方法によって表面修飾を行っても良い。

なお、粒子が形成されたことの確認は、電子顕微鏡観察によって行うと良い。

## 【 0 1 3 5 】

## [ 2 - 4 - 1 . フィルム法 ]

50

フィルム法は、リポソームの調製に用いられていた方法である。本発明における両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 及び / 又は標識ポリマー B とは、低沸点溶媒への溶解性を有するため、この方法を用いた分子集合体の調製が可能である。

フィルム法は、次の工程を含む。すなわち、容器（例えばガラス容器）中に、両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 及び / 又は標識ポリマー B とを有機溶媒中に含む溶液を用意する工程；前記溶液から前記有機溶媒を除去し、前記容器の内壁に両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 及び / 又は標識ポリマー B とを含むフィルムを得る工程；及び、前記容器中に水又は水溶液を加え、超音波処理を行い、前記フィルム状物質を粒子状の分子集合体に変換して分子集合体の分散液を得る工程、を含む。さらに、フィルム法は、前記の分子集合体の分散液を凍結乾燥処理に供する工程を含んでも良い。

10

#### 【0136】

また、両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 及び / 又は標識ポリマー B とを有機溶媒中に含む溶液は、当業者によって適宜調製される。例えば、用いるべきポリマー A 1、A 2、及び / 又は B の全てを一度に混合することによって調製されてもよいし、当該用いるべきポリマー A 1、A 2 及び / 又は B のうちの一部（例えば、ポリマー A 1）をあらかじめフィルムの状態で用意し、その後、当該用いるべき成分のうち他の成分（例えば、ポリマー A 2 及び / 又は B）を含む溶液を加えることによって調製されてもよい。あらかじめ用意される一部のポリマーのフィルムの形成法は、後述する方法（すなわちポリマー A 1、A 2、及び / 又は B を含むフィルムの形成法）に準じて行うことができる。

20

#### 【0137】

フィルム法に用いる有機溶媒としては、低沸点溶媒を用いることが好ましい。本発明における低沸点溶媒とは、1気圧における沸点が100以下、好ましくは90以下のものをいう。具体的には、クロロホルム、ジエチルエーテル、アセトニトリル、エタノール、アセトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、ヘキサンなどが挙げられる。

ポリマー A 1、A 2 及び / 又は B の溶解にこのような低沸点溶媒を使用することによって、溶媒の除去が非常に簡単になる。溶媒の除去の方法としては特に限定されることなく、使用する有機溶媒の沸点などに応じ、当業者が適宜決定すればよい。例えば、減圧下における溶媒除去を行ってもよいし、自然乾燥による溶媒除去を行ってもよい。

30

#### 【0138】

有機溶媒が除去された後は、容器内壁に両親媒性ブロックポリマー A 1 と疎水性ポリマー A 2 及び / 又は標識ポリマー B とを含むフィルムが形成される。このフィルムが張り付いた容器中に、水又は水溶液を加える。水又は水溶液としては特に限定されることなく、生化学的、薬学的に許容することができるものを当業者が適宜選択すればよい。例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、緩衝液などが挙げられる。

#### 【0139】

水又は水溶液が加えられた後、超音波処理を行う。超音波によりフィルムが容器内壁から剥がれる過程で分子集合体を形成する。超音波処理は、例えば20～60、1～60分の条件下で行うことができる。超音波処理終了時には、分子集合体が前記の水又は水溶液中に分散された分散液が容器中に調製される。

40

#### 【0140】

この分散液は、直接生体に投与されることが可能である。すなわち、無溶媒の分子集合体そのものの状態で保存される必要性がない。このため、例えば、半減期の短い薬剤を用いるPET（ポジトロン放出断層撮影）用分子プローブへの応用が非常に有用である。

#### 【0141】

また、得られた分散液を凍結乾燥処理に供する場合、その方法としては公知の方法を特に限定されることなく用いることができる。たとえば、上記のようにして得られた分子集合体の分散液を液体窒素などによって凍結させ、減圧下で昇華させることによって行うことができる。これにより、分子集合体の凍結乾燥処理物が得られる。すなわち、分子集合

50

体を凍結乾燥処理物として保存することが可能になる。必要に応じ、この凍結乾燥物に水又は水溶液を加えて、分子集合体の分散液を得ることによって、分子集合体を使用に供することができる。水又は水溶液としては特に限定されることなく、生化学的、薬学的に許容することができるものを当業者が適宜選択すればよい。例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、緩衝液などが挙げられる。

#### 【0142】

ここで、凍結乾燥処理前の分散液中には、両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2及び/又は標識ポリマーBとから形成された本発明の分子集合体以外にも、そのような分子集合体を形成しなかった両親媒性ブロックポリマーA1、疎水性ポリマーA2及び/又は標識ポリマーBが各々それ自体として残存しうる。このような分散液を凍結乾燥処理に供すると、溶媒が濃縮される過程で、本発明の分子集合体を形成せず残存していた両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2及び/又は標識ポリマーBとから、さらに分子集合体を形成することが可能になる。従って、本発明の分子集合体の調製を効率的に行うことが可能になる。

10

#### 【0143】

さらに、標識ポリマーBを用いる場合であって、凍結乾燥処理を行わない分子集合体の分散液中には、上述のように標識ポリマーBが残存しうる。このため、当該分散液が生体内に投与された際、少なくとも両親媒性ブロックポリマーA1と標識ポリマーBとから形成された分子集合体に由来するシグナルと、残存しうる標識ポリマーBに由来するシグナルとの両方が観測されうる。標識ポリマーBに由来するシグナルはイメージングにおいて不要であるため、標識ポリマーBの代謝を待って、イメージングが行われる。

20

#### 【0144】

一方、標識ポリマーBを用いる場合であって、凍結乾燥処理を経て得られた分子集合体の分散液中には、標識ポリマーBの残存量が低減されている。このため、当該分散液が生体内に投与された際、少なくとも両親媒性ブロックポリマーA1と標識ポリマーBとから形成された分子集合体に由来するシグナルと、残存しうる標識ポリマーBに由来するシグナルとの両方が観測されたとしても、標識ポリマーBの絶対量がより少ないため、不要なシグナルを与える標識ポリマーBはより速やかに代謝される。このため、イメージングの効率及び精度が向上するという効果が得られる。

30

#### 【0145】

##### [2-4-2. インジェクション法]

インジェクション法は、本発明の分子集合体に限らず、他の多くの分子集合体の調製に用いられる方法である。この方法においては、有機溶媒、例えばトリフルオロエタノール、エタノール、ヘキサフルオロイソプロパノール、ジメチルスルホキシドなどに、両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2及び/又は標識ポリマーBとを溶解し、得られた溶液を、注射用蒸留水、生理食塩水、緩衝液などの水系溶媒に分散させ、精製処理、例えばゲルろ過クロマトグラフィー、フィルタリング、超遠心などの処理を行った後、有機溶媒を除去することによって分子集合体を調製することができる。このようにして得られた分子集合体を生体内へ投与する場合であって、有機溶媒に生体に有害なものを用いた場合は、この有機溶媒の除去を厳密に行う必要がある。

40

#### 【0146】

分子集合体をベシクルとして調製する場合において、内包型のものを調製する場合は、注射用蒸留水、生理食塩水、緩衝液などの水系溶媒に、内包すべき物質を溶解又は懸濁させ、このようにして得られた水溶液又は懸濁液に、両親媒性ブロックポリマーA1と疎水性ポリマーA2及び/又は標識ポリマーBとを上記有機溶媒に溶解させて得られた溶液を分散させるとよい。

#### 【0147】

##### [3. 分子プローブ]

本発明の分子集合体は、適宜、所望の分子を保持させることによって、分子イメージングシステム、及び薬剤搬送システムにおいて有用に用いられる。本明細書においては、こ

50

のようなシステムに用いられることに向けられた分子集合体については、「分子プローブ」又は「ナノ粒子」と記載することがある。

【0148】

[3-1. 分子イメージング用分子プローブ]

本発明の分子集合体が、標識基及び/又は標識剤を有するものである場合、当該分子集合体は、分子イメージング用分子プローブとして有用に用いることができる。

標識基としては、上記1-3-2で述べたとおりである。標識基は、単独で又は複数種を組み合わせて用いることができる。

標識剤としては、上記1-3-2-1で述べたシグナル基を有する分子、及び1-3-2-2で述べたリガンド基を有する分子を用いることができる。これらの分子は、単独で又は複数種を組み合わせて用いることができる。

10

【0149】

例えば、この分子イメージング分子プローブは、標識剤が共有結合により導入されている形態、及びリガンドによって配位されたシグナル剤を有している形態を有しうる。

その他の場合において、この分子イメージング分子プローブは、ミセルの場合は内部に標識剤を含んでいる形態、ベシクルの場合は内部に標識剤を含んだ水相を有している形態を有しうる。

【0150】

この分子イメージング分子プローブは、病変部位や疾患部位に特異的に上述の標識を集積することにより、当該部位のイメージングを行うことを可能にする。

20

【0151】

分子イメージング用分子プローブの具体例としては、蛍光イメージング用分子プローブ、ポジトロン放出断層撮影(PET)用分子プローブ、及び核磁気共鳴イメージング(MRI)用分子プローブなどが挙げられる。

【0152】

[3-2. 薬剤搬送システム用分子プローブ]

本発明の分子集合体が、標識基として薬剤が配位したリガンド、及び/又は薬剤を有するものである場合、当該分子集合体は、薬剤搬送システム用分子プローブとして有用に用いることができる。

【0153】

薬剤としては、対象疾患に適したものを特に限定することなく用いることができる。具体的には、抗がん剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、ステロイド剤、ホルモン剤、血管新生阻害剤などが挙げられる。これら薬剤分子は、単独で又は複数種の組み合わせで用いることができる。

30

【0154】

より具体的には、抗がん剤の場合、カンプトテシン、エキサテカン(カンプトテシン誘導体)、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、イリノテカン、SN-38(イリノテカン活性代謝物)、5-FU、シスプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ドセタキセルなどが挙げられる。

【0155】

例えば、この薬剤搬送システム用分子プローブは、標識基として薬剤が配位したリガンドが共有結合により導入されている形態を有しうる。

その他の場合において、この薬剤搬送システム用分子プローブは、ミセルの場合は内部に薬剤を含んでいる形態、ベシクルの場合は内部に薬剤を含んだ水相を有している形態を有しうる。

40

【0156】

この薬剤搬送システム用分子プローブは、病変部位や疾患部位に特異的に薬剤を集積することにより、当該部位の細胞に薬剤を作用させることを可能にする。

【0157】

さらに、本発明の分子集合体は、薬剤とシグナル剤(或いはシグナル基)との両方を有

50

するものであってもよい。この場合、当該ナノ粒子は、薬剤搬送システム及び分子イメージングシステム両用の分子プローブとして有用に用いることができる。

【0158】

[3-3. 分子プローブの特性の制御]

本発明の分子集合体の調製において、両親媒性ブロックポリマーに、1-4で述べたような基を導入することにより、当該基に応じた様々な機能が分子プローブに付与される。また、各構成ポリマーの鎖長を変えることにより、粒子の大きさ、形状、組織選択性、生体内での分解速度、内包する薬剤やシグナル剤の徐放性等を調整することができる。さらに、疎水性ポリマーA2の配合量を制御することによって、粒子の大きさを連続的に制御することも可能である。一方、組成や分子量が異なる両親媒性ペプチドを組み合わせ

10

【0159】

[4. 分子イメージングシステム及び薬剤搬送システム]

本発明の分子イメージングシステム及び薬剤搬送システムは、上記の分子プローブを生体内に投与することを含む。本発明のこれらシステムは、上記の分子プローブを用いることに特徴付けられており、その他の具体的な手順は、公知の分子イメージングシステム及び薬剤搬送システムに準じ、当業者が適宜決定することができる。

【0160】

[4-1. 分子プローブの投与]

生体内への投与の方法としては特に限定されず、投与ターゲット及び分子プローブの用途などに応じて、当業者が適宜決定することができる。従って、投与の方法としては、全身投与及び局所投与とを問わない。すなわち、分子プローブの投与は、注射（針有型、針無型）、内服、外用のいずれの方法によっても行うことができる。

20

【0161】

[4-2. 投与ターゲット]

本発明の分子イメージングシステム及び薬剤搬送システムにおいて、投与ターゲットとしては特に限定されない。特に、本発明の分子集合体は、がん部への特異的集積性に優れたものである。本発明の分子集合体は、EPR (enhanced permeability and retention) 効果によりがん組織へ集積するため、その集積性はがんの種類によらない。従って、本発明の分子集合体の投与ターゲットとしてはがんであることが好ましい。投与ターゲット

30

【0162】

また、本発明の分子集合体のがん部への特異的集積性は、特に、肝臓での代謝の早さの実現によるところが大きい。このため、肝臓がんや肝臓の周辺に存在しうるがんをターゲットとする場合に、本発明の分子集合体は非常に大きな効果を発揮する。

【0163】

[4-3. 分子プローブの検出]

本発明の分子イメージングシステムにおいては、投与された分子プローブを検出する工程をさらに含む。投与された分子プローブを検出することによって、体外から投与ターゲットの様子（特にがんなどの組織の位置・大きさ）を観測することができる。

40

検出方法としては、投与された分子プローブを可視化させることができるあらゆる手段を用いることができる。当該手段としては、分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤の種類に応じて、当業者が適宜決定することができる。

【0164】

例えば、蛍光イメージングなどの場合は、分子プローブを投与された生体を励起光照射し、体内の分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤に基づく蛍光などのシグナルを検出することができる。

励起波長や、検出すべき蛍光波長といったパラメーターは、投与される分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤の種類、及び投与ターゲットの種類に応じて、当業者が

50

適宜決定することができる。

【0165】

ポジトロン放出断層撮影（PET）の場合は、線検出器を用いて、体内の分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤からの消滅線を検出することができる。

核磁気共鳴イメージング（MRI）の場合は、受信コイルを用いて、体内の分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤の磁性体によって生じる局所磁場歪をMRI信号の変化として検出することができる。

【0166】

投与から検出開始までの時間は、投与される分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤の種類、及び投与ターゲットの種類に応じて、当業者が適宜決定することができる。例えば、蛍光イメージングの場合は、投与後3～48時間、PETやMRIの場合は、投与後1～9時間とすることができる。上記範囲を下回ると、シグナルが強すぎ、投与ターゲットと他の部位（バックグラウンド）とを明確に分けることができない傾向にある。また、上記範囲を上回ると、分子プローブが投与ターゲットから排泄されてしまう傾向にある。

10

【0167】

分子プローブの検出は、正確性の観点から、生体の一方向からではなく、複数の方向からの測定によって行うことが好ましい。具体的には、少なくとも3方向、より好ましくは少なくとも5方向からの測定を行うと良い。5方向からの測定を行う場合は、例えば、左右両腹側から、左右両体側から、及び背中側からの測定を行うことができる。

20

【0168】

[4-4. ラクトソームの血中安定性]

本発明の分子プローブは血液中で優れた安定性を示す。

具体的には、従来から優れた特性を有するナノ粒子として知られている、水溶性高分子化合物ポリエチレングリコール（PEG）による修飾形態を有するナノ粒子と、少なくとも同等の血中滞留性を有している。血中ラクトソームの測定法も、分子プローブが有するシグナル基又はシグナル剤の種類に応じて、当業者が適宜決定することができる。

【実施例】

【0169】

以下に本発明をより詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。本明細書においては、以下の実施例を開示する。

30

実験例 1：ナノ粒子構成ポリマー前駆物質合成

実験例 2：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 両親媒性ブロックポリマー A

実験例 3：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 非乳酸系両親媒性ブロックポリマー

実験例 4：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリマー B

実験例 5：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリマー B

実験例 6：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリマー B

実験例 7：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリペプチド

実験例 8：ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリサルコシン

実施例 1：分子プローブ作成 - A1 / B系ラクトソーム

40

比較例 1：分子プローブ作成 - A2・B不含ラクトソーム

比較例 2：分子プローブ作成 - ペプトソーム

比較例 3：分子プローブ作成 - A2・B不含ラクトソーム

実施例 2：蛍光イメージング - A1 / B系ラクトソーム使用

比較例 4：蛍光イメージング - A2・B不含ラクトソーム使用

比較例 5：蛍光イメージング - ペプトソーム使用

比較例 6：蛍光イメージング - A2・B不含ラクトソーム使用

実施例 3：蛍光イメージング - A1 / B系ラクトソーム使用

実施例 4：蛍光イメージング - A1 / B系ラクトソーム使用

実施例 5：蛍光イメージング - A1 / B系ラクトソーム使用

50

- 実験例 9 : ナノ粒子構成ポリマー合成 - 疎水性ポリマー A 2  
 実験例 10 : ナノ粒子構成ポリマーの熱特性調査 - 疎水性ポリマー A 2  
 実施例 6 : ナノ粒子作成 - A 1 / A 2 系ラクトソーム  
 比較例 7 : 分子プローブ作成 - A 2・B 不含ラクトソーム  
 実施例 7 : 分子プローブ作成 - A 1 / A 2 系ラクトソーム  
 実施例 8 : 蛍光イメージング - A 1 / A 2 ( / B ) 系ラクトソーム使用  
 実施例 9 : 蛍光イメージング - A 1 / B 系ラクトソーム使用  
 比較例 8 : 蛍光イメージング - リポソーム使用  
 実験例 11 : ナノ粒子構成ポリマー前駆物質合成  
 実験例 12 : ナノ粒子構成ポリマー前駆物質合成  
 実験例 13 : ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリマー B  
 実施例 10 : 分子プローブ作成 - A 1 / B 系ラクトソーム  
 実験例 14 : ナノ粒子構成ポリマー合成 - 標識ポリマー B  
 実施例 11 : 分子プローブ作成 - A 1 / B 系ラクトソーム  
 実施例 12 : PET イメージング - A 1 / B 系ラクトソーム使用  
 実施例 13 : DDS 予備試験 - A 1 / A 2 系ラクトソーム使用  
 実施例 14 : 分子プローブ作成 - A 1 / A 2 系ラクトソーム  
 ( A 2・B 不含ラクトソームとの比較 )  
 実施例 15 : DDS 予備試験 - A 1 / A 2 系ラクトソーム使用

10

以下、それぞれの実施例の詳細を述べる。

20

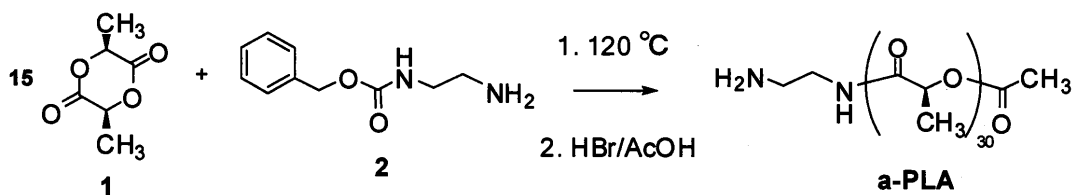
## 【 0 1 7 0 】

## [ 実験例 1 : アミノ化ポリL-乳酸 (α-PLA) の合成 ]

本実験例では、L-ラクチド (化合物 1) と N-カルボベンゾキシ-1,2-ジアミノエタン塩酸塩 (化合物 2) とを用いて、アミノ化ポリL-乳酸 (α-PLA) を合成した (スキーム 1)。

## 【 0 1 7 1 】

## 【 化 1 】



## スキーム 1

## 【 0 1 7 2 】

重合開始剤である N-カルボベンゾキシ-1,2-ジアミノエタン塩酸塩 (化合物 2) (310 mg, 1.60 mmol) に、オクタン酸スズ (6.91 mg) をトルエン (1.0 mL) に拡散させたものを加えた。トルエンを減圧留去した後、L-ラクチド (化合物 1) (3.45 g, 24 mmol) を加え、Ar 雰囲気下、120 にて重合反応を行った。12 時間後、反応容器を室温に空冷した。得られた黄白色固体を少量のクロロホルム (10 mL 程度) に溶解させた。クロロホルムを冷メタノール (100 mL) に滴下することにより白色沈殿を得た。得られた白色沈殿は遠心分離により回収し、減圧乾燥した。

40

## 【 0 1 7 3 】

得られた白色沈殿 (500 mg) のジクロロメタン (1 mL) 溶液に 25v/v% 臭化水素 / 酢酸 (2.0 mL) を加え、遮光、乾燥空気下にて 2 時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を冷メタノ

50

ール (100 mL) に滴下し、析出してきた沈殿を遠心分離にて回収した。得られた白色沈殿はクロロホルムに溶解させた後、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液にて洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>にて脱水操作を行った。セライト<sup>(R)</sup>濾過によりMgSO<sub>4</sub>を除去した後、真空乾燥することにより、白色のアモルファス状粉末のα-PLA (440 mg) を得た。

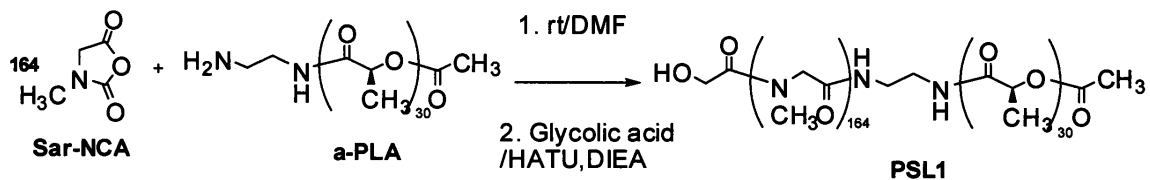
【 0 1 7 4 】

[ 実験例 2 : 両親媒性ブロックポリマー A 1 ( ポリサルコシン - ポリL-乳酸 ; PSL1 ) の合成 ]

本実験例では、サルコシン - NCA ( Sar-NCA ) とアミノ化ポリL-乳酸 ( α-PLA ) とから、両親媒性物質ポリサルコシン - ポリL-乳酸 ( PSL1 ) を合成した ( スキーム 2 ) 。

【 0 1 7 5 】

【 化 2 】



スキーム 2

【 0 1 7 6 】

α-PLA (383 mg, 0.17 mmol) とサルコシン - NCA ( Sar-NCA ) (3.21 g, 27.9 mmol) に、Ar雰囲気下、ジメチルホルムアミド ( DMF ) (140 mL) を加え、室温にて12時間攪拌した。反応溶液を0 に冷却した後、グリコール酸 (72 mg, 0.95 mmol)、O - (ベンゾトリアゾル - 1 - イル) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (HATU) (357 mg, 0.94 mmol)、及びN, N - ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (245 μL, 1.4 mmol) を加え、室温にて18時間反応させた。

【 0 1 7 7 】

ロータリーエバポレーターによりDMFを減圧溜去した後、LH20カラムにて精製を行った。UV270 nmにてピークが検出されたフラクションを回収・濃縮した。得られた濃縮溶液を0 にてジエチルエーテル中に滴下し、再沈澱することにより、目的物であるPSL1 (1.7 g) を得た。

【 0 1 7 8 】

[ 実験例 3 : サルコシン - ポリ (ロイシン - アミノイソブチル酸) (SLA) の合成 ]

本実験例では、サルコシン - NCA ( Sar-NCA ) とポリ (ロイシン - アミノイソブチル酸) (LAI) とから、両親媒性物質サルコシン - ポリ (ロイシン - アミノイソブチル酸) (SLA) を合成した ( スキーム 3 ) 。

【 0 1 7 9 】

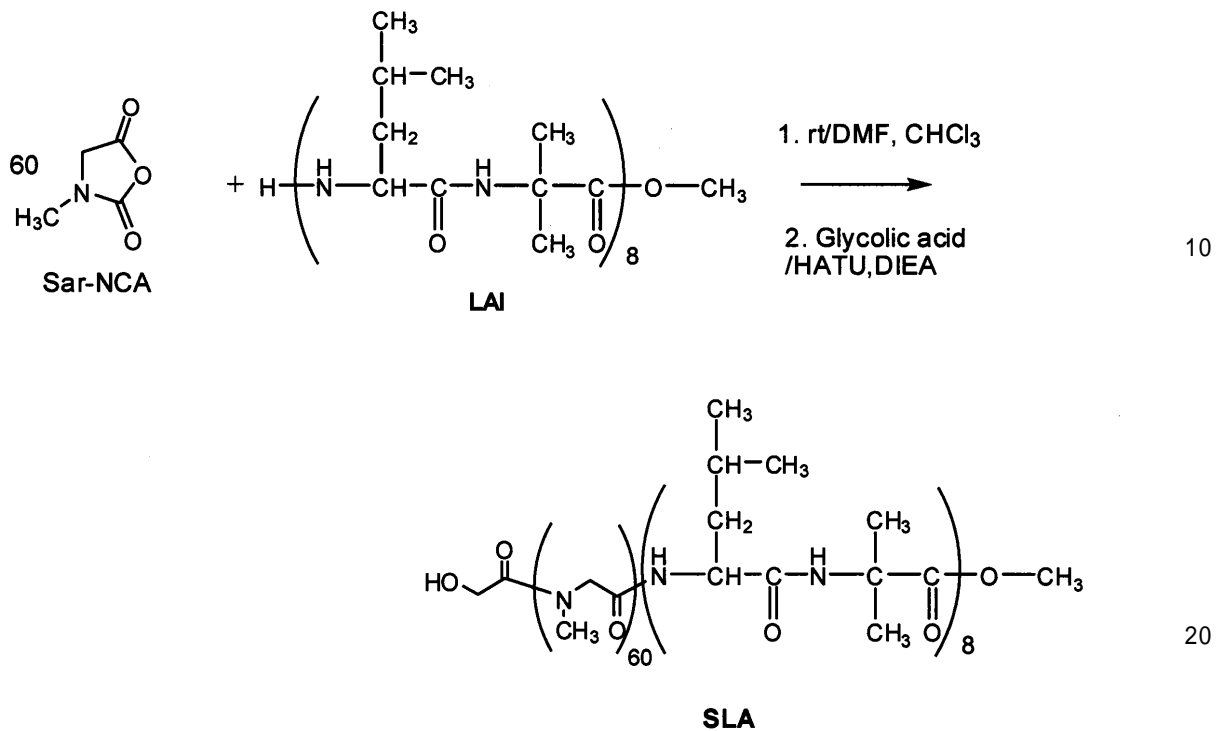
10

20

30

40

## 【化3】



スキーム3

## 【0180】

Boc-(Leu-Aib)<sub>8</sub>-OMe (600 mg, 0.349 mmol)を、6.0 mlトリフルオロ酢酸 (TFA) と0.6 mlアニソールとの混合溶液に添加し、Boc基の除去を行い、TFA塩誘導体を得た。TFA塩誘導体を、イソプロピルエーテルで洗浄し、2時間真空下で乾燥させた。これをクロロホルムに溶解し、4 wt%の炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、TFA基の除去を行った。クロロホルム溶液を濃縮し、420 mg (0.259 mmol) のポリ(ロイシン - アミノイソブチル酸) (LAI) (H-(Leu-Aib)<sub>8</sub>-OMe ; LAI) を得た。

## 【0181】

得られたLAIを8.0 mlのDMF/HCl<sub>3</sub>の1/1(v/v)混合溶液に溶解し、Sar-NCA (1.11 g, 15.6 mmol) を6.0 mlのDMF/HCl<sub>3</sub>の1/1(v/v)混合溶液に溶かしたものに添加した。Sar-NCAが反応によって消失した後、反応溶液を0 に冷却してグリコール酸 (98 mg, 1.30 mmol)、HATU (492 mg, 1.30 mmol)、及びDIEA (338 μL, 1.94 mmol)を加え、室温下で10時間攪拌した。この反応溶液に、更にグリコール酸 (40 mg, 0.52 mmol)、HATU (198 mg, 0.52 mmol)、及びDIEA (135 μL, 0.78 mmol)を加えて12時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を濃縮し、Sephadex LH-20にてゲルろ過を行うことによって、目的物SLAを精製した (186 mg)。

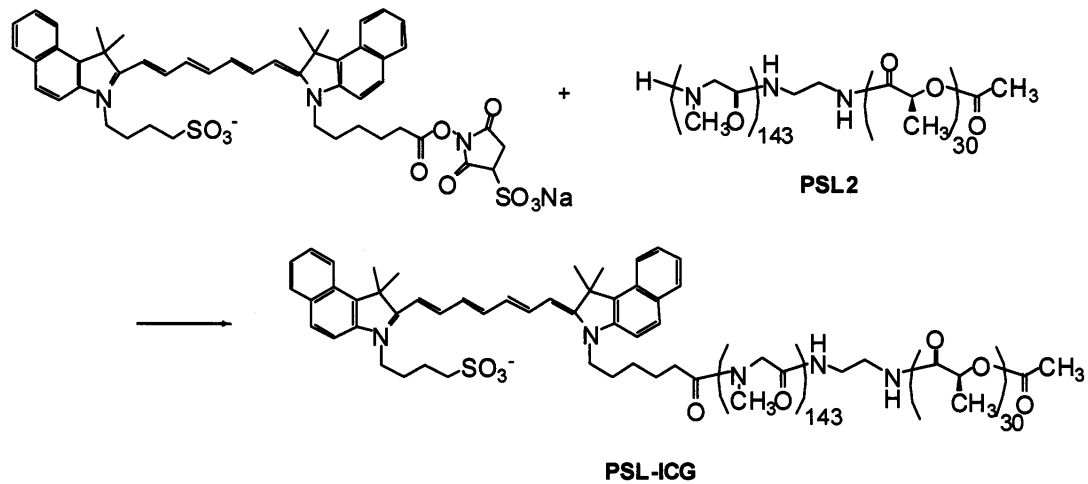
## 【0182】

[ 実験例4 : 標識ポリマーB ( ICG標識ポリサルコシン - ポリL-乳酸 ; PSL-ICG) の合成 ( 蛍光色素の導入例1) ]

本実験例では、実験例2とは鎖長の異なるポリサルコシン - ポリL-乳酸 (PSL2) を合成し、さらにPSL2にICG標識を行うことにより、標識両親媒性物質ポリサルコシン - ポリL-乳酸 (PSL-ICG) を合成した (スキーム4)。

## 【0183】

## 【化4】



10

## スキーム4

20

## 【0184】

a-PLAに対してSar-NCAを143等量使用した以外は、実験例2と同様の操作を行うことによって、両親媒性物質ポリサルコシン-ポリL-乳酸(PSL2)を合成した。PSL2を10 mg (1.0 eq)含むDMF溶液に、インドシアニングリーン誘導体(ICG-sulfo-OSu) 1mg (1.3 eq)を溶かしたDMF溶液を加え、室温で約20時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH20カラムにて精製を行い、化合物PSL-ICGを得た。

## 【0185】

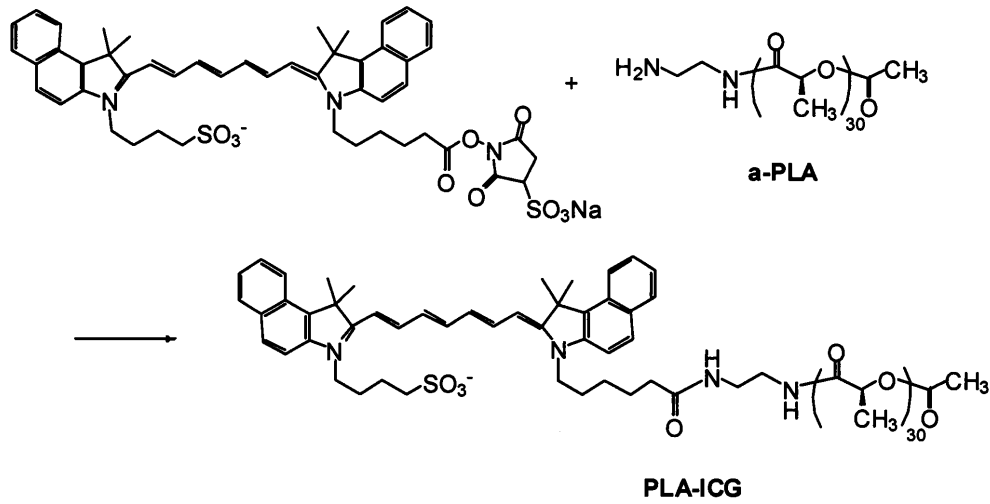
[実験例5：標識ポリマーB(ICG標識ポリL-乳酸；PLA-ICG)の合成(蛍光色素の導入例2)]

本実験例では、実験例1で得たアミノ化ポリL-乳酸(a-PLA)にICG標識を行い、ICG標識ポリL-乳酸(PLA-ICG)を得た(スキーム5)。

30

## 【0186】

## 【化5】



10

## スキーム5

20

## 【0187】

実験例1で得たa-PLAを1.9 mg (1.0 eq)含むDMF溶液に、インドシアニングリーン誘導体 (ICG-sulfo-OSu) 1mg (1.3 eq)を溶かしたDMF溶液を加え、室温で約20時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH20カラムにて精製を行い、化合物PLA-ICGを得た。

## 【0188】

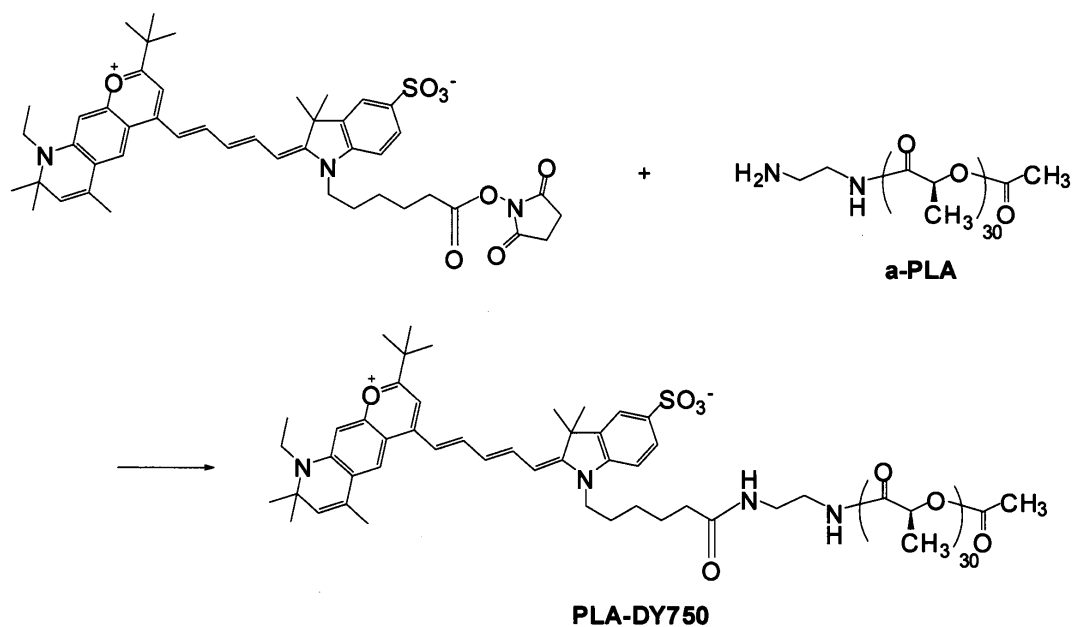
[実験例6：標識ポリマーB (DY750標識ポリL-乳酸；PLA-DY750)の合成 (蛍光色素の導入例3)]

本実験例では、実験例1で得たアミノ化ポリL-乳酸 (a-PLA) にDY750標識を行い、DY750標識ポリL-乳酸 (PLA-DY750) を得た (スキーム6)。

30

## 【0189】

## 【化6】



10

20

## スキーム6

## 【0190】

実験例1で得たa-PLAを2.1 mg (1.0 eq)含むDMF溶液に、DY750 NHS-ester (Dyomics社製) 1mg (1.3 eq)を溶かしたDMF溶液を加え、室温で約20時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH20カラムにて精製を行い、化合物PLA-ICGを得た。

## 【0191】

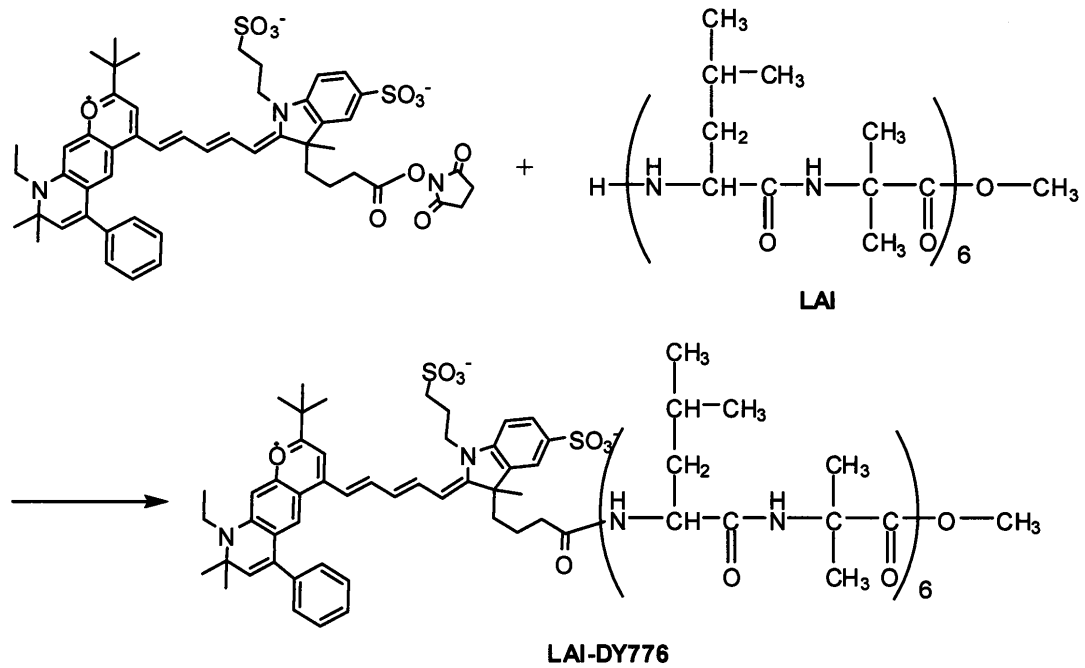
[実験例7: DY776標識ポリ(ロイシン-アミノイソブチル酸) (LAI-DY776)の合成(蛍光色素の導入例4)]

30

本実験例では、ポリ(ロイシン-アミノイソブチル酸) (LAI)にDY776標識を行い、DY776標識ポリ(ロイシン-アミノイソブチル酸) (LAI-DY776)を得た(スキーム7)。

## 【0192】

## 【化7】



## スキーム7

## 【0193】

ポリ(ロイシン - アミノイソブチル酸) ((Leu-Aib)<sub>6</sub>; LAI) は、N-t-ブトキシカルボニルロイシン (Boc-Leu) とアミノイソブチル酸メチルエステル (Aib-OMe) とを用いて、逐次合成法により合成した。得られたLAIを20 mg (5 eq)含むDMF溶液に、DY776 NHS-ester (Dyomics社製) 2.5 mg (1 eq)とHATU 5.8 mg (5 eq)とを溶かしたDMF溶液を加えた。この反応溶液を0℃に冷却した後、DIEAを10 μl加え、さらに室温で約12時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH20カラムにて精製を行い、化合物AIL-DY776を得た。

30

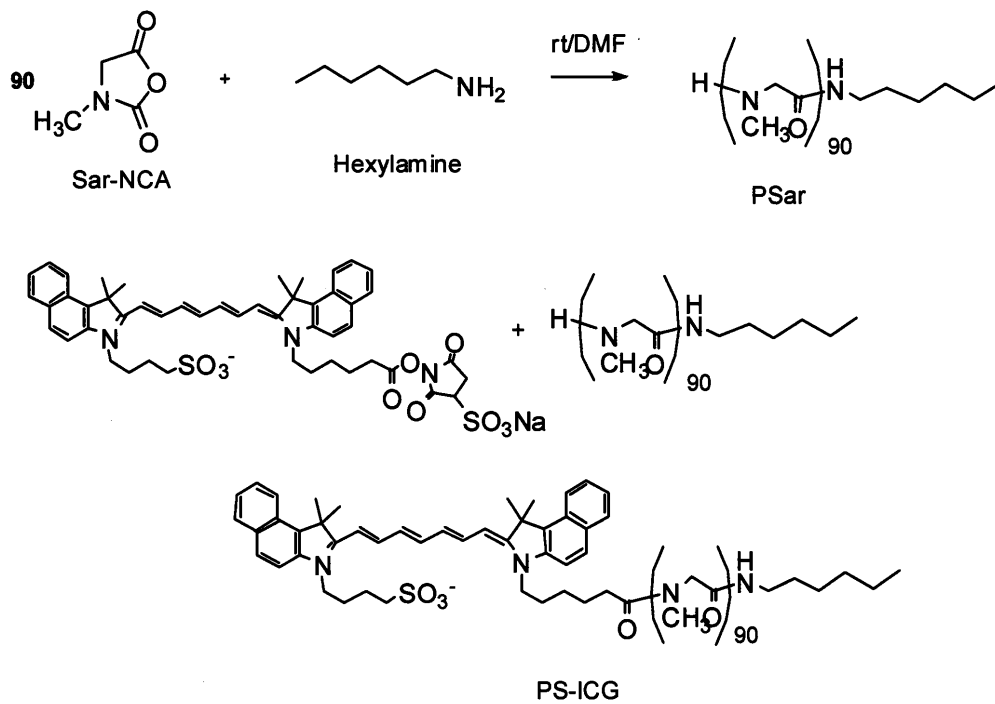
## 【0194】

[ 実験例8 : ICG標識ポリサルコシン (PS-ICG) の合成 (蛍光色素の導入例5) ]

本実験例では、ポリサルコシン (PSar) にICG標識を行い、ICG標識ポリサルコシン (PS-ICG) を得た (スキーム8)。

## 【0195】

## 【化 8】



10

20

## スキーム 8

## 【 0 1 9 6 】

ポリサルコシン (PSar) は、重合開始剤であるヘキシルアミン (3.03 mg, 29.9  $\mu\text{mol}$ ) に、Sar-NCAを90等量となる量加え、Ar雰囲気下、DMF (15 ml) に溶解し、室温にて重合反応を行った。24時間後、反応溶液を冷ジエチルエーテル (150 mL) に滴下することにより白色沈殿を得た。得られた白色沈殿は遠心分離により回収し、減圧乾燥した。得られた PSarをDMFに溶解し、ICG-sulfo-OSu 27.8 mgを溶かしたDMF溶液を加え、室温で約20時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH20カラムにて精製を行い、化合物PS-ICGを得た。

30

## 【 0 1 9 7 】

以下、実施例 1、比較例 1、比較例 2 及び比較例 3 において、表 1 に示すキャリア剤 (両親媒性ブロックポリマー A 1) 及び標識剤 (標識ポリマー B) を用いて、蛍光イメージング用分子プローブとなりうる分子集合体 (ナノ粒子) を作成した。

## 【 0 1 9 8 】

【表1】

	エントリ	調製法	キャリア剤	標識剤
実施例1	P1	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	PSL-ICG (ポリマーB)
	P1(FD)	フィルム法 <sup>(*)</sup>	PSL1 (ポリマーA1)	PSL-ICG (ポリマーB)
	P2	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	PLA-ICG (ポリマーB)
	P3	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	PLA-DY750 (ポリマーB)
比較例1	P5	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	LAI-DY776
比較例2	P4	インジェクション法	SLA	PLA-ICG
	P6	インジェクション法	SLA	LAI-DY776
比較例3	P7	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	ICG
	P8	フィルム法	PSL1 (ポリマーA1)	PS-ICG

10

(\*) 凍結乾燥処理実施

## 【0199】

20

[ 実施例1 : A1 / B系ラクトソームナノ粒子 ( P1、P1(FD)、P2及びP3 ) の作成 ]

本実施例では、A1 / B系ラクトソームナノ粒子として、標識ポリ乳酸又はポリ乳酸系標識両親媒性ブロックポリマー ( いずれも標識ポリマーB ) を用いたラクトソームナノ粒子P1、P1(FD)、P2及びP3の作成を行った。

表1に記載のキャリア剤 ( 両親媒性ブロックポリマーA1 ) 及び標識剤 ( 標識ポリマーB ) それぞれのクロロホルム溶液 ( 0.2 mM ) を調製した。キャリア剤 ( ポリマーA1 ) 及び標識剤 ( ポリマーB ) のモル比が200 : 3となるように、ガラス容器内で両溶液を混合した。その後、溶媒を減圧留去しガラス容器の壁面にキャリア剤 ( ポリマーA1 ) 及び標識剤 ( ポリマーB ) とを含むフィルムを形成させた。さらに、フィルムを形成したガラス容器内に、水又は緩衝液中に分散させ、温度60 °Cで30分間超音波処理を行うことにより、ナノ粒子P1、P2及びP3の分散液を得た。

30

また、ナノ粒子P1の分散液を液体窒素で凍結し、減圧下で昇華させることにより凍結乾燥物を得た。得られた凍結乾燥物に、再度水を加えP1(FD)を得た。

## 【0200】

[ 比較例1 : A2・B不含ラクトソームナノ粒子 ( P5 ) の作成 ]

本比較例では、疎水性ポリマーA2及び標識ポリマーBを含まないラクトソームナノ粒子 ( A2・B不含ラクトソームナノ粒子 ) として、標識ペプチドを用いたラクトソームナノ粒子P5の作成を行った。具体的には、表1に記載のキャリア剤 ( 両親媒性ブロックポリマーA1 ) 及び標識剤 ( 標識ペプチド ) を用いた以外は、実施例1と同様の方法を用いてナノ粒子P5の分散液を得た。

40

## 【0201】

[ 比較例2 : ペプトソームナノ粒子 ( P4及びP6 ) の作成 ]

本比較例では、ペプトソームナノ粒子として、ペプチド系両親媒性ポリマーを用いたペプトソームナノ粒子P4及びP6の作成を行った。

表1に記載の標識剤のクロロホルム溶液 ( 0.2 mM ) を調製し、標識剤9 nmolを含む量の溶液を試験管に移し、溶媒を減圧留去した。ここに、さらに表1に記載のキャリア剤3.56 mg ( 600 nmol ) を加え、さらにトリフルオロエタノール ( TFE ) を90 µl滴下して溶解させ、TFE溶液を得た。

## 【0202】

別の試験管に、水 ( もしくは緩衝液 ) を1 ml入れ、氷浴中でマグネティックスターラー

50

(600 rpm)で攪拌したものを用意した。この水（もしくは緩衝液）に、上記のTFE溶液60  $\mu$  lを一気に加えて分散させた。その後、氷浴中で30分間攪拌し、ナノ粒子P4及びP6の分散液を得た。

得られたナノ粒子分散液は、Sephacryl S-100カラムクロマトグラフィーにより精製した。

#### 【0203】

[比較例3：A2・B不含ラクトソームナノ粒子（P7及びP8）の作成]

本比較例では、疎水性ポリマーA2及び標識ポリマーBを含まないラクトソームナノ粒子として、非ポリマー標識化合物又は標識ポリサルコシンを用いたラクトソームナノ粒子P7及びP8の作成を行った。

表1に記載のキャリア剤（両親媒性ブロックポリマーA1）及びICGそれぞれのクロロホルム溶液（0.2 mM）を調製した。キャリア剤（ポリマーA1）及び標識剤のモル比が200：3となるように、ガラス容器内で両溶液を混合した。その後、溶媒を減圧留去しガラス容器の壁面にキャリア剤（ポリマーA1）と標識剤とを含むフィルムを形成させた。さらに、フィルムを形成したガラス容器内に、水又は緩衝液中に分散させ、温度60 で30分間超音波処理を行うことにより、ナノ粒子P7の分散液を得た。

#### 【0204】

別途、表1に記載のキャリア剤のクロロホルム溶液（0.2 mM）を調製した。その後、溶媒を減圧留去しガラス容器の壁面にキャリア剤を含むフィルムを形成させた。さらに、フィルムを形成したガラス容器内に、水に溶解したPS-ICG溶液（1  $\mu$ M）をキャリア剤（ポリマーA1）及びPS-ICGのモル比が200：3となるように加え、温度60 で30分間超音波処理を行うことにより、ナノ粒子P8の分散液を得た。

#### 【0205】

上記のようにして得られたナノ粒子P1～P8、及びP1(FD)を分子プローブとして用い、ヒトがん細胞を肩に皮下移植した担がんマウスの蛍光造影試験を行った。

#### 【0206】

[実施例2：A1/B系ラクトソームナノ粒子（P1～P3）を用いた皮下がんの蛍光造影試験1]

ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスを、次のように作成した。動物は、Balb/c nu/nu mice（クレア）7週齢を用い、ヒトがん細胞を、マウスの左肩に5  $\times 10^5$ 個/0.05 ml、右肩に1  $\times 10^6$ 個/0.1 ml、皮下移植した。2週間後にがん組織が3～7 mmに成長した時点で、マウスを下記造影試験に供した。

#### 【0207】

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブとしてナノ粒子P1、P2、又はP3の分散液を0.1 ml（0.1 nmol/body）投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。撮影は、全身を5方向、すなわち、マウスの左腹、左体側、背中、右体側及び右腹の全ての方向から行った。蛍光剤は785nmで励起して、845nm付近の蛍光を経時的に測定した。

#### 【0208】

その結果得られた画像を、図1のP1～P3に示す。図1のP1～P3それぞれにおいて、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、3時間、6時間、及び24時間経過後のマウスを右体側部から測定した結果と、24時間経過後のマウスを上述の5方向から測定した結果とを示す。図1においては、蛍光強度の違いを、色調を変化させることによって示している。また、図中の丸で示した部分のがん部を示しており、四角で囲んだ部分は肝臓部を示す。

#### 【0209】

[比較例4：A2・B不含ラクトソームナノ粒子P5を用いた皮下がんの蛍光造影試験]

分子プローブにP5を用いた以外は、実施例2と同じ操作を行った。得られた画像を、図1のP5に示す。

#### 【0210】

[ 比較例 5 : ペプトソームナノ粒子P4及びP6を用いた皮下がんの蛍光造影試験 ]

分子プローブにP5を用いた以外は、実施例 2 と同じ操作を行った。得られた画像を、図 1 の P 4 及び P 6 に示す。

【 0 2 1 1 】

[ 皮下がんの蛍光造影試験の結果比較 ( A 1 / B系ラクトソームv.s. A 2 ・ B 不含ラクトソームナノ粒子、ペプトソーム ) ]

図 1 において、ナノ粒子を尾静脈注射後、3 時間、6 時間、及び 2 4 時間経過後のマウスを右体側部から測定した結果を比較した。

ナノ粒子P1、P2、P3を用いた場合、尾静脈注射後 3 時間経過後には、がん及びマウス全体から蛍光が観測されるが、その後速やかにがん以外の蛍光強度は減少する様子が観察された。

これに対して、ナノ粒子P4を用いた場合は、ペプチド系両親媒性ポリマーを用いて作成したナノ粒子 ( ペプトソーム ) が肝臓に集積するため、蛍光剤が肝臓から腸管へ移動しゆっくりと体外に排泄される様子が観測された。

また、ナノ粒子P5及びP6を用いた場合は、尾静脈注射後 3 時間経過後にはがんと肝臓とから蛍光が観測され、その後がん及び肝臓の両方の蛍光強度が増加していく様子が観測された。

【 0 2 1 2 】

図 1 において、ナノ粒子を尾静脈注射後 2 4 時間経過後のマウスを 5 方向から観察した結果を比較した。

ナノ粒子P1、P2、P3を用いた場合は、がん以外への蛍光剤の集積がほとんどないことが観測された。

これに対して、ナノ粒子P4を用いた場合は、2 4 時間経過後も肝臓及び腸管から蛍光が観測された。これは、ポリ乳酸化蛍光剤自体は肝臓で容易に代謝されるものの、ナノ粒子を構成するポリペプチド系両親媒性ポリマーが肝臓に集積しやすく、ナノ粒子ががんに集積する割合が低くなったためと考えられる。

また、ナノ粒子P5を用いた場合は、がん以外に、胴体の中央部にある肝臓が、5 方向すべての測定結果から確認された。これは、蛍光剤を修飾しているポリペプチドが肝臓で代謝され難く、集積してしまうためと考えられる。さらに、P6の場合は、ナノ粒子及び蛍光剤共にペプチド系ポリマーを使用しているため、より肝臓へ集積しやすくなっていると考

【 0 2 1 3 】

[ 皮下がんとバックグラウンドとにおける蛍光強度の比較 ( A 1 / B系ラクトソームv.s. A 2 ・ B 不含ラクトソームナノ粒子、ペプトソーム ) ]

ナノ粒子P1～P6を用いた場合の、右体側部方向から観測したがん、バックグラウンドとしての肝臓とにおける蛍光強度の比較を行った。図 2 に、その結果を示す。図 2 において、横軸は、ナノ粒子を尾静脈注射後の経過時間 ( h ) を表し、縦軸は、肝臓における蛍光強度に対するがんにおける蛍光強度の比を表す。

【 0 2 1 4 】

ナノ粒子P1、P2、P3を用いた場合は、尾静脈注射後24時間経過後の蛍光強度比が、それぞれ1.81、1.66、2.07であるのに対して、ナノ粒子P4、P5、P6を用いた場合は、同様にそれぞれ約1.13、0.95、0.75である。

このことから、ナノ粒子を構成するキャリア剤としての両親媒性ポリマー及び標識剤としてのポリマー共に乳酸系のポリマーを用いることが、肝臓への集積の低減、及び肝臓でのポリ乳酸化蛍光剤の速やかな代謝を実現したことが示された。従って、本発明によって、短時間でがん部位のイメージングができることが示された。

【 0 2 1 5 】

[ 比較例 6 : A 2 ・ B 不含ラクトソームナノ粒子P7、P8を用いた皮下がんの蛍光造影試験 ]

ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスは、実施例 2 と同様に作成した。

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブとして

10

20

30

40

50

ナノ粒子P7、又はP8の分散液を0.1 ml (0.1 nmol/body)投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。撮影は、IVIS200 (Xenogen社製)を用いて、マウスの腹側の方向から行った。蛍光剤は710-760 nmで励起して、810-875 nmの蛍光を経時的に測定した。

【0216】

その結果得られた画像を、図3のP7及びP8に示す。図3のP7及びP8それぞれにおいて、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、30分、1時間、3時間、6時間、及び9時間経過後に測定した結果を示す。図3においては、蛍光強度の違いを、色調を変化させることによって示している。

図3が示すように、P7とP8共にがんへの集積は観測されなかった。その原因として、ICG及びPS-ICGがポリ乳酸鎖を有していないために、安定してナノ粒子と分子集合体を形成しなかったことが考えられる。

【0217】

ナノ粒子P7を用いた場合、尾静脈注射後30分経過後には、肝臓から蛍光が観測され、その後速やかに腸管に代謝され、体外に排泄される様子が観察された。

これに対して、ナノ粒子P8を用いた場合、尾静脈注射後30分経過後には、膀胱から蛍光が観測され、その後速やかに体外に排泄される様子が観測された。

【0218】

ICGは人に対する肝臓の造影剤として使用されており、肝臓へ集積した後腸管へ代謝されることが分かっている。P7の場合、ICG単独ではラクトソームとの相互作用が弱く、生体内で安定にラクトソームに保持されないため、ICG単独で生体に投与した場合と同様の挙動を示したと考えられる。

【0219】

P8の場合、ICGをポリサルコシンで修飾することにより、水溶性が向上し、肝臓への集積は回避されるものの、水溶性が高すぎるためにラクトソームとの相互作用が弱く、膀胱から速やかに体外に排泄された。

【0220】

P1~P3の結果と、P7及びP8の結果とから、標識基をラクトソームに安定に保持させるためには、標識基のポリ乳酸による修飾が必要と考えられる。

【0221】

[実施例3：凍結乾燥したA1/B系ラクトソームナノ粒子P1(FD)を用いた皮下がんの蛍光造影試験]

ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスは、実施例2と同様に作成した。

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブとしてナノ粒子P1(FD)の分散液を0.1 ml (0.1 nmol/body)投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。撮影は、IVIS200 (Xenogen社製)を用いて、マウスの腹側の方向から行った。蛍光剤は710-760 nmで励起して、810-875 nmの蛍光を経時的に測定した。

【0222】

その結果得られた画像を、図4の(A)及び(B)に示す。図4の(A)及び(B)それぞれにおいて、左から、ナノ粒子を尾静脈注射後、1時間、6時間、及び24時間経過後に測定した結果を示す。図4においては、蛍光強度の違いを、色調を変化させることによって示している。

【0223】

図4が示すように、凍結乾燥後再び水に分散させたナノ粒子P1(FD)を用いた場合、がん組織部(図中丸印)の蛍光は同様に観測されるが、尾静脈注射後1時間及び6時間経過後の膀胱からの蛍光がP1と比較して低減されることが明らかになった。

この理由として、凍結乾燥を行うことにより、溶媒が濃縮される過程で、単独で溶解しているキャリア剤及び標識剤が分子集合体を形成するため、単独で溶解している標識剤を低減することができると考えられる。

10

20

30

40

50

これらの結果から、標識剤をラクトソームにより効率的に保持させるためには、凍結乾燥を行うことがより有効と考えられる。

【0224】

[実施例4：A1/B系ラクトソームナノ粒子P2を用いた肝臓がんの蛍光造影試験]

本実施例では、ナノ粒子P2を用い、ヒト肝臓がん細胞を肝臓に同所移植した担がんマウスの蛍光造影試験を行った。

ヒト肝臓がん細胞(HepG2)の同所移植による担がんマウスを、次のように作成した。

動物は、Balb/c nu/nu mice (クレア) 7週齢を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したHepG2細胞をマウスの肝臓に $1 \times 10^6$ 個/0.1 mlを移植した。1週間後にがん組織が1~2 mmに成長した時点で、マウスを下記造影試験に供した。

【0225】

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブ分散液を0.1 ml (0.1 nmol/body)投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。蛍光剤は785nmで励起して、845nm付近の蛍光を経時的に測定した。また、がん組織の位置を確認するために、測定開始後48時間後に、ルシフェリンを0.2 ml (2 mg/body)腹腔内投与し、Xenogen社製のIVIS200を使用して、がん細胞特異的に発現しているルシフェラーゼ由来の発光測定を行った。

【0226】

その結果得られた画像を図5に示す。図5(A)は担がんマウスの尾静脈からプローブ分散液の投与後4~8時間後の蛍光及び発光のイメージング画像である。全身を腹側から測定した結果から、蛍光及び発光共に、肝臓の同じ場所からシグナルが観測されていることがわかる。さらに、図5(B)は、当該担がんマウスから摘出した肝臓の写真(明視野)、発光イメージ及び蛍光イメージである。肝臓を摘出した結果、肝臓の表面に約 $1 \times 1$  mm程度のがん組織(図中丸印)が存在しており、最も強く蛍光が観測された場所は、がん細胞由来の発光が観測された場所と一致した。

【0227】

以上より、本発明の分子プローブは、肝臓への集積が少なく、且つ肝臓での代謝が速いことから、肝臓の表面に存在するがんでも蛍光イメージングが可能であることが示された。化学発光を用いて画像診断を行う従来の方法においては遺伝子改変を必要とするが、本発明のように近赤外蛍光剤を外部から投与する方法によって肝臓がんの検出ができたことで、遺伝子改変を必要としないがんの画像診断が可能となる。

【0228】

[実施例5：A1/B系ラクトソームナノ粒子P2を用いた肺がんの蛍光造影試験]

本実施例では、ナノ粒子P2を用い、ヒト肺がん細胞を肺に同所移植した担がんマウスの蛍光造影試験を行った。

【0229】

ヒト肺がん細胞(H441)の同所移植による担がんマウスを、次のように作成した。

動物は、Balb/c nu/nu mice (クレア) 6週齢を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したH441細胞をマウスの肺に $1 \times 10^5$ 個/0.1 mlを移植した。11日後にがん組織が5~10 mmに成長した時点で、マウスを下記造影試験に供した。

【0230】

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブ分散液を0.1 ml (0.1 nmol/body)投与した。プローブ分散液の投与後48時間後に、ルシフェリンを0.2 ml (2 mg/body)腹腔内投与した。その後、肺を取り出し、Xenogen社製のIVIS200を使用して、がん細胞特異的に発現しているルシフェラーゼ由来の発光測定を行うと共に、蛍光測定を行なった。蛍光剤は785nmで励起して、845nm付近の蛍光を測定した。

【0231】

その結果得られた画像を図6に示す。図6の左から順に、当該担がんマウスから取り出した肺の明視野、発光、及び蛍光の画像を示す。肺を摘出した結果、左肺の約半分程度の領域にがんが増殖しており、蛍光が観測された場所は、がん細胞由来の発光が観測された

10

20

30

40

50

場所と一致した。

【0232】

実施例4及び実施例5の結果から、ラクトソームは皮下に移植したがんだけでなく、同所移植した肝臓がんや肺がんにも集積することから、薬物搬送システム(ドラッグデリバリーシステム)としても有用と考えられる。

【0233】

[実験例9：疎水性ポリマーA2(光学活性の異なるポリ乳酸)の合成]

本実験例では、ラクチドの光学異性体をさまざまな比率で用いることによって、下記表2に示す、光学活性の異なる5種のポリ乳酸誘導体PLLA、PDLA、rac-PLA、PDLLA(14:1)、PDLLA(10:5)を合成した(以下、これらポリ乳酸誘導体を、単にポリ乳酸と呼称する)。

【0234】

【表2】

Run		L-lactide D-lactide DL-lactide		
		mol比		
1	PLLA	100	0	0
2	PDLA	0	100	0
3	rac-PLA	0	0	100
4	PDLLA	14	0	1
5	PDLLA	10	0	5

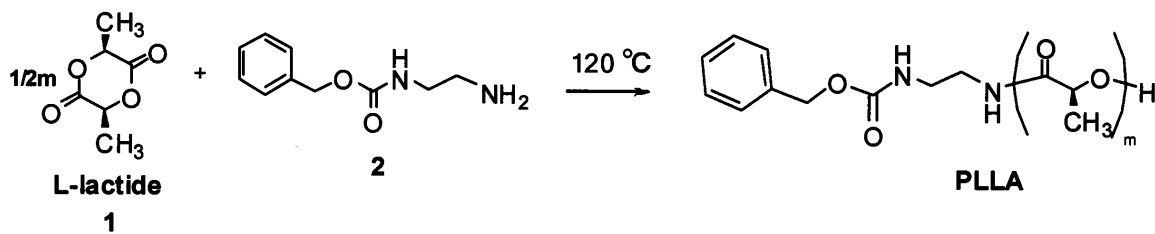
【0235】

<1. PLLAの合成>

L-ラクチド(化合物1)とN-カルボベンゾキシ-1,2-ジアミノエタン塩酸塩(化合物2)を用いて、ポリL-乳酸(PLLA)を合成した(スキーム9)。

【0236】

【化9】



スキーム9

【0237】

重合開始剤であるN-カルボベンゾキシ-1,2-ジアミノエタン塩酸塩(化合物2)(400 mg, 2.06 mmol)に、オクタン酸スズ(22.25 mg)をトルエン(1.0 mL)に拡散させたものを加えた。トルエンを減圧留去した後、L-ラクチド(化合物1)(4.45 g, 30.9 mmol)を加え、Ar雰囲気下、120にて重合反応を行った。8時間後、反応容器を室温に空冷した。得られた黄白色固体を少量のジメチルホルムアミド(10 mL程度)に溶解し、LH20カラムで精製した。270nmの吸収があるフラクションを回収し濃縮後、濃縮液をクロロホルムに溶解した。クロロホルム溶液を冷メタノール(100 mL)に滴下することによ

り白色沈殿を得た。得られた白色沈殿は遠心分離により回収し、減圧乾燥することにより、化合物PLLAを得た。

【0238】

< 2 . PDLAの合成 >

L-ラクチド（化合物1）の代わりに、D-ラクチドを用いたことを除いては、上記1（PLLAの合成）と同じ方法を行うことによって、化合物PDLAを得た。

【0239】

< 3 . rac-PLAの合成 >

L-ラクチド（化合物1）の代わりに、DL-ラクチドを用いたこと除いては、270nmの吸収があるフラクションを回収し、濃縮する工程まで上記1と同じ方法を行った。得られた濃縮物に、ジエチルエーテルを用いて2回又は3回共沸させ、さらに減圧乾燥することにより、オイル状の化合物rac-PLAを得た。

【0240】

< 4 . PDLLA(14:1)の合成 >

L-ラクチド（化合物1）の代わりに、L-ラクチドとDL-ラクチドとの14：1混合物（モル比）を用いたことを除いては、上記1と同じ方法を行うことによって、化合物PDLLA(14:1)を得た。

【0241】

< 5 . PDLLA(10:5)の合成 >

L-ラクチド（化合物1）の代わりに、L-ラクチドとDL-ラクチドとの10：5混合物（モル比）を用いたことを除いては、270nmの吸収があるフラクションを回収し、濃縮する工程まで上記1と同じ方法を行った。得られた濃縮物に、ジエチルエーテルを用いて2回又は3回共沸させ、さらに減圧乾燥することにより、オイル状の化合物PDLLA(10:5)を得た。

【0242】

表3に、合成されたこれらのポリ乳酸の平均重合度と分子量、及び化合物の性状を示す。ポリ乳酸の平均重合度は、<sup>1</sup>H NMRの測定結果から、末端のベンゼン環由来のシグナルを基準として決定した。

【0243】

【表3】

Run		平均重合度(m)	分子量(Mw)	性状
1	PLLA	33	2572.21	白色固体
2	PDLA	32	2500.15	白色固体
3	rac-PLA	32	2500.15	オイル
4	PDLLA(L:DL=14:1)	31	2428.09	白色固体
5	PDLLA(L:DL=10:5)	26	2067.79	オイル

【0244】

[ 実験例10：ポリ乳酸の熱特性 ]

本実験例では、実験例9で合成したPLLA、PDLA、rac-PLA、PDLLA(14:1)及びPDLLA(10:5)の5種類の光学純度の異なるポリ乳酸（以下、これら5種類の光学純度の異なるポリ乳酸を総称してPLAと記載する場合がある）について示差走査熱量計（DSC）による分析を行い、ポリ乳酸の熱特性を調べた。

【0245】

試料を2 mg 程度はかり取り、標準アルミニウム試料容器（アルミナクリンプセル）に入れ、蓋をかぶせ、シーラ・クリンパー（SSC-30）でクリンプし、密閉した。基準物質にはアルミナを用いた。昇温速度は10 /minで30～150 の温度範囲で測定を行った。測定にはDSC-60（島津製作所社製）を用いた。

## 【0246】

図7(a)に一次昇温の結果を、図7(b)に二次昇温の結果を示した。いずれの図においても、横軸は温度(Temperature) / °Cを表し、縦軸は熱流/mWを表す。

図7(a)では、どのポリ乳酸にも発熱ピークが観察できなかった。しかし、一次昇温後、結晶化温度よりも十分に高い温度である150 °Cから、ガラス転移点以下の温度まで急冷したところ、図7(b)の二次昇温の結果では、白色個体が得られたPLLA、PDLA、およびPDLLA(14:1)には、発熱ピークである結晶化温度および、吸熱ピークである融解温度が観測された。そのため、上記3種類のポリ乳酸は結晶性のポリマーであることが分かった。一方で、オイル状の化合物が得られたrac-PLAおよびPDLLA(10:5)には、吸熱反応も発熱反応も観察できなかった。そのため、非晶性のポリマーが得られたことが分かった。

10

## 【0247】

[実施例6：A1/A2系ラクトソームナノ粒子の粒子径制御]

本実施例では、実験例9で合成したポリ乳酸(PLA)を疎水性ポリマーA2として使用し、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1に混合することによって、ポリ乳酸混合ラクトソームを調製し、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1に対するポリ乳酸A2の混合比率を変化させることによって粒子径制御を行った。この場合において、実験例9で合成した5種類のポリ乳酸(PLA)、すなわち光学純度の異なるPLLA、PDLA、rac-PLA、PDLLA(14:1)及びPDLLA(10:5)それぞれを疎水性ポリマーA2として用い、5種類のポリ乳酸混合ラクトソームを調製した。

図8に、ポリ乳酸A2(PLA)をポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1に混合することによってポリ乳酸混合ラクトソームが調製されることを模式的に示す。

20

## 【0248】

本実施例では、さらに、当該5種類のポリ乳酸混合ラクトソームそれぞれの調製において、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2との配合比率が異なるものを調製し、得られた分子集合体の粒子径の変化を調べた。

## 【0249】

試験管に、下記表4で示した比率で、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>33</sub>-PSar<sub>163</sub>)とポリ乳酸A2(PLA)とを全量9 mgになるように調製して加え、クロロホルム1.5 mlで溶解した。減圧乾燥を行ってクロロホルムを除去し、試験管の内壁にポリマーフィルムを形成させた。その後、純水もしくは緩衝液を3 ml加え、55 °Cで超音波処理することにより粒子化を行い、A1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームナノ粒子を得た。

30

なお、参考用として、ポリ乳酸A2を使用しないことによって、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1の含有比率100%のラクトソームナノ粒子(A2・B不含ラクトソームナノ粒子)も同じ手法で調製した。

## 【0250】

## 【表4】

PLLA-Psar (mol %)	100	95	90	75	50	25
※ PLA (mol %)	0	5	10	25	50	75

40

※PLA = PLLA, PDLA, rac-PLA, PDLLA (L:DL=14:1), PDLLA (L:DL=10:5)

## 【0251】

ポリ乳酸A2の配合比率がそれぞれ異なるラクトソームナノ粒子の粒子径を、動的散乱法(DLS: Dynamic Light Scattering)を用いて測定・検討した。測定には、動的光散乱測定装置(Malvern Instruments社製、Zetasizer Nano)を用いた。その結果、ポリ乳酸A2としてPDLAが用いられた場合を除いては、ポリ乳酸A2の配合比率により、粒子径を30から130 nmまで連続的に制御が可能であり、且つ、この連続的な粒子径制御は、光学純

50

度に抛らず可能であることが分かった(図9)。

【0252】

なお、ポリ乳酸A2としてPDLAが用いられた場合、他の場合と異なる結果が得られたが、これは安定的な粒子形成が困難であったためであると考えられる。その要因のひとつとして、本実施例で用いられたポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1の疎水性ブロックの光学純度との兼ね合いが考えられる。すなわち、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1のL-乳酸ブロック鎖とポリ乳酸A2のD-乳酸鎖とがステレオコンプレックスを形成したことが、安定的な粒子形成を阻害する一要因になったと考えられる。

【0253】

下記比較例7及び実施例7においては、それぞれ、ラクトソーム(A2・B不含ラクトソーム)及びポリ乳酸混合ラクトソーム(A1/A2系ラクトソーム)をキャリアとし、化合物を内包させたナノ粒子をフィルム法によって調製し、得られたナノ粒子の評価を行った。

10

内包する化合物としては、ピレンを用いた。ピレンは、分子イメージング用プローブに内包される蛍光剤や、DDS用プローブに内包される抗がん剤に多く用いられている物質と、芳香族系疎水性低分子化合物である点や、蛍光物質でもある点で共通しているため、当該物質のモデル化合物として適したものである。

【0254】

[比較例7: A2・B不含ラクトソームナノ粒子(ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるラクトソームナノ粒子)へのピレンの内包]

20

本比較例では、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるラクトソームナノ粒子への疎水性低分子化合物(ピレン)の内包試験を行った。

【0255】

ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>35</sub>-PSar<sub>152</sub>)9mgに対して、0mol%、5mol%(6.8μg)、10mol%(13.5μg)、25mol%(33.8μg)、50mol%(67.5μg)、75mol%(101.3μg)、100mol%(135μg)、200mol%、(270μg)、400mol%(540μg)、600mol%(810μg)、800mol%(1080μg)及び1000mol%(1350μg)のそれぞれの配合率となるようにピレンを加え、クロロホルム1.5mlで溶解した。クロロホルムを減圧留去し、試験管の内壁に薄い透明のフィルムを形成させた。その後、超純水を3ml加え、55℃で30分間、超音波処理した。その後、2600gで15分間遠心分離を行い、上清を0.20μmフィルター(Millex<sup>(R)</sup>-LG・日本ミリポア株式会社製)で処理し、ピレンを内包したラクトソームナノ粒子の分散溶液を得た。

30

【0256】

[実施例7: A1/A2系ラクトソームナノ粒子(ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2とからなるポリ乳酸混合ラクトソームナノ粒子)へのピレンの内包]

ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(PLLA)とをモル比1:1(全量9mg)の割合でブレンドしたA1/A2系ラクトソーム(PLLA/ラクトソーム)、及び、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(rac-PLA)とをモル比1:1(全量9mg)の割合でブレンドしたA1/A2系ラクトソーム(rac-PLA/ラクトソーム)を調製した。この2種類のA1/A2系ラクトソームそれぞれについて、ピレンを0μg、10μg、50μg、100μg、500μg及び1000μgの量でそれぞれ加え、上記比較例7と同様の方法によって、ピレンを内包した、A1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームナノ粒子の分散溶液を得た。

40

【0257】

上記比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームのピレン包含体と、上記実施例7で得られたA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームのピレン包含体とについて、以下のように吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定を行った。

【0258】

[A2・B不含ラクトソームのピレン包含体とA1/A2系ラクトソームのピレン包含体との吸収スペクトル比較]

50

比較例7及び実施例7で得られたそれぞれのラクトソームがピレンを内包していることの確認のため、吸収スペクトルの測定を行った。

吸収スペクトルは、紫外可視分光光度計 (UVmini-1240 島津製作所製) で測定した。

【0259】

<比較例7の場合>

比較例7で得られた、A2・B不含ラクトソーム (ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるラクトソーム) のピレン内包体の吸収スペクトルを測定した。この場合において、コントロール実験として、ピレンのみ (9 mg) で同様の操作を行った溶液も作成した。

【0260】

ピレンを内包したA2・B不含ラクトソームナノ粒子の吸収スペクトルを図10に示す。図10において、横軸は波長 (Wavelength) /nmを表し、縦軸は任意単位 (Abs) である (後述の図11においても同じ)。

10

図10 (a) はピレン濃度0-75 mol%である場合、図10 (b) はピレン濃度100-1000 mol%である場合を示す。この結果、ピレンのみを用いたコントロール溶液にはピレン由来する吸収がほとんどなく、ピレンをポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1に混合した場合のみ、ピレン由来の吸収が観測されたことから、ピレンがA2・B不含ラクトソームナノ粒子に内包されたことが分かった。すなわち、それ自身ではH<sub>2</sub>Oに溶解しない疎水性の低分子化合物であるピレン (溶解度[H<sub>2</sub>O]: 7.2 × 10<sup>-4</sup> mmol/l) を、A2・B不含ラクトソームに混合することにより、H<sub>2</sub>O中に分散させることができた。

【0261】

20

<実施例7の場合>

実施例7で得られた、A1/A2系ラクトソーム (ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2とからなるポリ乳酸混合ラクトソーム) のピレン内包体の吸収スペクトルを測定した。

【0262】

ピレンを内包した、A1/A2系 (ポリ乳酸混合) ラクトソームナノ粒子の吸収スペクトルを図11に示す。図11 (a) は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1 (PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>) とポリ乳酸A2 (PLLA) とからなるA1/A2系ラクトソーム (PLLA / ラクトソーム) の場合、図11 (b) は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1 (PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>) とポリ乳酸A2 (rac-PLA) とからなるA1/A2系ラクトソーム (rac-PLA / ラクトソーム) の場合を示す。この結果、A1/A2系 (ポリ乳酸混合) ラクトソームナノ粒子にもピレンが内包できることが分かった。

30

【0263】

[A2・B不含ラクトソームのピレン包含体とA1/A2系ラクトソームのピレン包含体との蛍光スペクトル比較]

まず、疎水コアの結晶性の違いがピレンとの相互作用にどのように影響するのか比較をするために、ラクトソームに内包されたピレンの蛍光スペクトルを測定した。

蛍光測定は、分光蛍光光度計 (RF-5300PC、島津製作所社製) で行った。測定条件は、スキャン範囲300 nm -500 nm、励起波長 (ex =336 nm)、励起側スリット3.0 nmもしくは1.5 nm、蛍光側スリット3.0 nmもしくは1.5 nmで行った。

40

【0264】

<比較例7の場合>

比較例7で得られた、A2・B不含ラクトソーム (ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1からなるラクトソーム) のピレン内包体の蛍光スペクトルを測定した。

具体的には、比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームのうち、ピレンを0 mol %、10 mol % (13.5 μg)、25 mol % (33.8 μg)、50 mol % (67.5 μg)、75 mol % (101.3 μg)、100 mol % (135 μg)、200 mol % (270 μg)、400 mol % (540 μg) の割合で含ませたものをそれぞれ蛍光スペクトル測定に供した。この場合、ピレンを50 mol %及び75 mol % の割合で含ませたラクトソームについては200倍希釈を行ったものを、それ以外のラクトソームについては100倍希釈を行ったものをそれぞれ蛍光スペク

50

トル測定に供した。

【0265】

ピレンを内包したA2・B不含ラクトソームナノ粒子の蛍光スペクトルを図12に示す。図12において、横軸は波長(Wavelength)/nmを表し、縦軸は蛍光の強度(Intensity)を表す(後述の図13において同じ)。

図12(a)はピレン濃度0-75 mol%である場合、図12(b)はピレン濃度100-1000 mol%である場合を示す。

【0266】

<実施例7の場合>

実施例7で得られた、A1/A2系ラクトソーム(ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1とポリ乳酸A2とからなるポリ乳酸混合ラクトソーム)のピレン内包体の蛍光スペクトルを測定した。

具体的には、実施例7で得られたA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームのピレン内包体のすべてについて、600倍希釈を行ったものをそれぞれ蛍光スペクトル測定に供した。

【0267】

ピレンを内包したA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームの蛍光スペクトルを図13に示す。図13(a)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(PLLA)とからなるA1/A2系(ラクトソーム(PLLA/ラクトソーム))の場合、図13(b)は、ポリ乳酸系両親媒性ポリマーA1(PLLA<sub>31</sub>-PSar<sub>150</sub>)とポリ乳酸A2(rac-PLA)とからなるA1/A2系(ラクトソーム(rac-PLA/ラクトソーム))の場合を示す。

【0268】

次に、各蛍光スペクトルに基づいて、ピレン濃度と373 nmでの蛍光強度との関係について、上記比較例7と上記実施例7との比較を行った結果を、図14に示す。図14においては、横軸にラクトソームを形成するポリマーの総重量に対するピレン重量のパーセンテージを表し、縦軸に蛍光強度を表す。図14(a)は、比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームのピレン内包体の場合を、図14(b)は、実施例7で得られたA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームのピレン包含体の場合を示す。

【0269】

図14(a)では、比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームの場合、ピレン濃度の増加によって粒子形成が阻害されることが示されている。すなわち、比較例7で得られたA2・B不含ラクトソームは、高濃度のピレンを含有することが不可能であることが示された。

【0270】

これに対し、図14(b)では、ピレンの含有量の増加に伴って高い蛍光強度を呈している。すなわち、実施例7で得られたA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソーム場合、ピレン濃度が増加しても安定的に粒子形成が行われることが示されている。これは、実施例7のようにラクトソームにポリ乳酸A2を混合することによって、疎水性化合物ピレンと相互作用する部分、すなわち疎水コアの体積が大きくなり、比較例7のA2・B不含ラクトソームよりも多くの疎水性低分子化合物を内包できると考えられる。

【0271】

さらに図14(b)では、内包するポリ乳酸の光学純度による違いも観察できた。具体的には、PLLAを内包したA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームは、rac-PLAを内包したA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームよりも蛍光強度が高いことから、疎水コアの結晶性の違いがピレンとの相互作用に影響することが分かった。

【0272】

いずれにしても、実施例7で得られたA1/A2系(ポリ乳酸混合)ラクトソームは、高濃度のピレンを含有することができ、このことによって、高濃度のピレンを水中に安定して分散できることが示された。

10

20

30

40

50

## 【0273】

上述の結果から、本発明のA1/A2系（ポリ乳酸混合）ラクトソームは、上記のピレンに代えて、他のシグナル剤を内包させることによって、分子イメージング用プローブとして用いることが可能である。また、本発明のA1/A2系（ポリ乳酸混合）ラクトソームは、上記のピレンに代えて、他の薬剤を内包させることによって、DDS用プローブとして用いることが可能である。その具体例として、後述の実施例13及び15に、抗がん剤として使用されているアドリアマイシンとパクリタキセルとをそれぞれ実際に使用した例を示した。

## 【0274】

[実施例8：A1/B系ラクトソームナノ粒子、及びA1/A2/B系ラクトソームナノ粒子を用いた皮下がんの蛍光造影試験]

本実施例では、両親媒性ブロックポリマーA1（PSL1）及び標識ポリマーB（PLA-ICG）を構成ポリマーとして含むA1/B系ラクトソームナノ粒子と、疎水性ポリマーA2（PLLA）を構成ポリマーとしてさらに含むA1/A2/B系ラクトソームナノ粒子とを蛍光イメージング用分子プローブとして用い、ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスの蛍光造影試験を行った。

## 【0275】

A1/B系ラクトソームナノ粒子及びA1/A2/B系ラクトソームナノ粒子は、以下のようにして作成した。

両親媒性ブロックポリマーA1（PSL1）、標識ポリマーB（PLA-ICG）を200：3のモル比で含むクロロホルム溶液（0.2 mM）に、疎水性ポリマーA2（PLLA）を、0、10、25、50 mol%の濃度で含む分散液を調製した。その後、溶媒を減圧留去しガラス容器の壁面にフィルムを形成させた。さらに、フィルムを形成したガラス容器内に、水又は緩衝液中に分散させ、温度60℃で30分間超音波処理を行うことにより、ナノ粒子の分散液を得た。

## 【0276】

ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスは、次のように作成した。

動物は、Balb/c nu/nu mice（クレア）7週齢を用い、ヒトがん細胞を、マウスの右大腿部に $1 \times 10^6$ 個/0.05 ml、皮下移植した。2週間後にがん組織が約10 mmに成長した時点で、マウスを下記造影試験に供した。

## 【0277】

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブとしてのナノ粒子の分散液を0.05 ml（0.1 nmol/body）投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。撮影は、全身を5方向、すなわち、マウスの左腹、左体側、背中、右体側及び右腹の全ての方向から行った。蛍光剤は785nmで励起して、845nm付近の蛍光を経時的に測定した。

## 【0278】

その結果得られた24時間後の蛍光測定画像を、図15の(a)~(d)に示す。図15においては、蛍光強度の違いを、色調を変化させることによって示している。また、図16は48時間後までの、がん部位（右大腿部）とバックグラウンド（左大腿部）との蛍光強度比（Intensity ratio of fluorescence (tumor/background)）の時間（Time(h)）変化を示している。

## 【0279】

図15の結果から、疎水性ポリマーA2（ポリ乳酸）を混合しない場合にも、疎水性ポリマーA2（ポリL乳酸）を混合して粒子径を変化させた場合にも、いずれもがん部位への集積が確認された。また、図16の結果から、疎水性ポリマーA2（ポリ乳酸）を50 mol%混合した場合でも、24時間後にがん部位とバックグラウンドの蛍光強度比が1を超えていることから、投与したプローブががんに集積しているといえる。さらに、疎水性ポリマーA2（ポリ乳酸）を25 mol%混合した場合に、がんとバックグラウンドとの蛍光強度比が疎水性ポリマーA2（ポリ乳酸）を加えない場合と比較して高い値を示しており、粒子径を変えることによりナノ粒子のがん部位への集積を高めることができる可能性が示さ

10

20

30

40

50

れた。

【0280】

[実施例9：A1/B系ラクトソームナノ粒子(P2)を用いた皮下がんの蛍光造影試験2]

ヒトがん細胞の皮下移植による担がんマウスを、次のように作成した。

動物は、Balb/c nu/nu mice (クレア) 6週齢を用い、マウス腹水癌細胞を、マウスの右大腿部に $1 \times 10^6$ 個/0.05 ml、皮下移植した。2週間後にがん組織が約15 mmに成長した時点で、マウスを下記造影試験に供した。

【0281】

上記担がんマウスをイソフルランにより麻酔し、その尾静脈から、分子プローブとしてA1/B系ラクトソームナノ粒子P2分散液を(0.1 nmol (ICG) /body)投与した。プローブ分散液の投与後、マウス全身の蛍光画像を経時的に撮影した。撮影は、全身を5方向、すなわち、マウスの右背中、右体側、腹側、左体側及び左背中全ての方向から行った。蛍光剤は785nmで励起して、845nm付近の蛍光を経時的に測定した。

10

【0282】

その結果得られた、A1/B系ラクトソーム投与24時間後の蛍光測定画像を、図17の(a)に示す。図17においては、蛍光強度の違いを、色調を変化させることによって示している。

【0283】

[比較例8：リポソームナノ粒子を用いた皮下がんの蛍光造影試験]

20

分子プローブに、リポソームナノ粒子である、ICG標識したヒト血清アルブミン(HSA-ICG)を内包したリポソームナノ粒子の分散液を0.05 ml (6 nmol (ICG) /body)用いた以外は実施例9と同じ操作を行った。

このリポソームナノ粒子は、以下のようにして作成した。

ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC) 20 mg、コレステロール10 mg、ジアセチルホスフェート2 mg、及びコール酸ナトリウム32 mgをクロロホルム/メタノール1:1混合溶媒3 mlに溶解し、溶媒を減圧留去した。得られた脂質膜にTAPS緩衝液(pH 8.4)を3 ml加え超音波処理を行うことによりミセル溶液を調製した(溶液1)。ヒト血清アルブミン(HSA) 20 mgに対してICG-Sulfo-OSuを1 mg混合し、TAPS緩衝液(pH 8.4)を3 ml加え、37℃で3時間反応させた。反応終了後の溶液を遠心濃縮器を用いて、未反応のICG-Sulfo-OSuを除去することにより、ICG標識ヒト血清アルブミン(HSA-ICG)を調製した(溶液2)。溶液1と溶液2とを混合し、遠心濃縮器を用いてTAPS緩衝液(pH8.4)に溶媒置換することにより、HSA-ICG内包リポソームを調製した。

30

その結果得られた、リポソーム投与6時間後の蛍光測定画像を、図17の(b)に示す。

【0284】

[皮下がんの蛍光造影試験の結果比較(A1/B系ラクトソームv.s.リポソーム)]

図17において、実施例9によるA1/B系ラクトソームナノ粒子投与24時間後の蛍光測定画像(a)と、比較例8によるリポソームナノ粒子投与6時間後の蛍光測定画像(b)とを比較した。図17が示すように、リポソームはがん以外の肝臓や腹部への蛍光剤の集積が多いことに対し、ラクトソームはがん以外への臓器への集積がほとんどないことがわかった。

40

【0285】

[皮下がんとバックグラウンドにおける蛍光強度の比較(A1/B系ラクトソームv.s.リポソーム)]

図18に、ナノ粒子を投与した後96時間までの、がん(tumor)部位である右大腿部における蛍光強度とバックグラウンド(background)である左大腿部における蛍光強度との時間変化を示す。図18(a)は、A1/B系ラクトソームナノ粒子を投与した実施例9の結果を表し、図18(b)は、ペプトソームナノ粒子を投与した比較例8の結果を示す。図18において、横軸は、ナノ粒子を投与後の経過時間(time(h))を表し、縦軸は、蛍光強度(fluorescence Intensity)を表す。

50

【0286】

その結果、リポソームはがん以外の肝臓や腹部への蛍光剤の集積が多く、がんとバックグラウンドとにおける蛍光強度の比が約1.95であるのに対して、ラクトソームはがん以外の臓器への集積がほとんどなく、がんとバックグラウンドとにおける蛍光強度の比が約5.40であり、リポソームの場合と比較して有意に高いことが分かった。

【0287】

以下において、<sup>18</sup>F標識したポリ-L-乳酸 (<sup>18</sup>F-PLLA、<sup>18</sup>F-BzPLLA) を合成し、ポジトロン放出断層撮影用分子プローブを作成した。

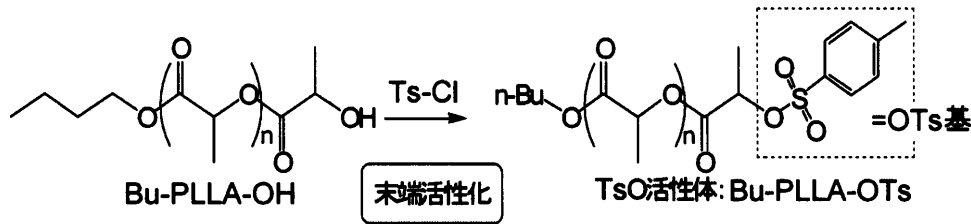
【0288】

[ 実験例 1 1 : トシル基標識されたポリ乳酸の合成 ]

平均重合度30.4のBu-PLLA-OH (Bu = n-butyl-) を用い、6モル当量のパラトルエンスルホン酸クロリド (Ts-Cl) を0.5モル当量のジメチルアミノピリジン (DMAP) 共存下で反応させた。その結果、トシル基標識された目的物であるBu-PLLA-OTsを収率90.3%で得ることができた (スキーム 1 0)。

【0289】

[ 化 1 0 ]



スキーム 1 0

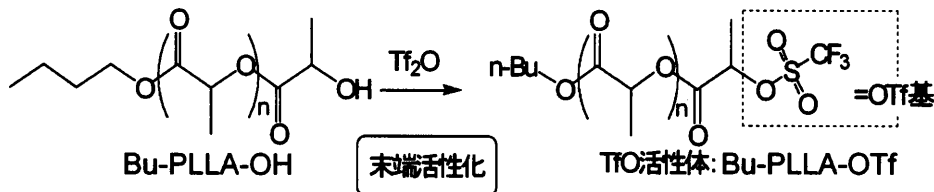
【0290】

[ 実験例 1 2 : トリフレート標識されたポリ乳酸の合成 ]

平均重合度30.4のBu-PLLA-OH (Bu = n-butyl) を用い、2モル当量のトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (TfO無水物) を2モル当量のピリジン (pyridine) 共存下で反応させた。その結果、トリフレート標識された目的物であるBu-PLLA-OTfを収率89.0%で得ることができた (スキーム 1 1)。

【0291】

[ 化 1 1 ]



スキーム 1 1

【0292】

[ 実験例 1 3 : 標識ポリマー B (<sup>18</sup>F標識したポリ-L-乳酸 (<sup>18</sup>F-PLLA)) の合成 ]

実験例 1 2 で得られたBu-PLLA-OTfを用いて<sup>18</sup>F標識反応を行った (スキーム 1 2) 。

10

20

30

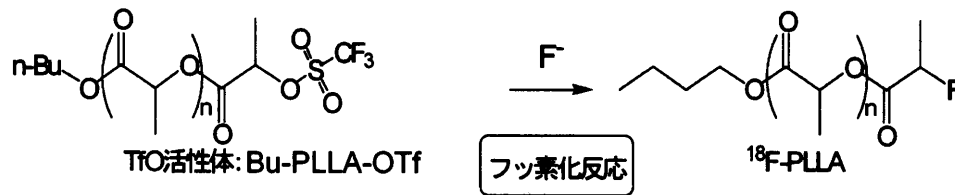
40

50

の結果、 $^{18}\text{F}$ で標識されたポリ乳酸 $^{18}\text{F}$ -PLLAの生成を、ガンマディテクターと吸光計とを装備したHPLC上で確認した。図19に、HPLCによる $^{18}\text{F}$ -PLLAの分取結果を示す。

【0293】

【化12】



10

### スキーム12

【0294】

[実施例10: PET用分子プローブ(A1/B系 $^{18}\text{F}$ -ラクトソームナノ粒子)の作成]

本実施例では、PET用分子プローブとして、実験例13で得られた $^{18}\text{F}$ 標識ポリ-L-乳酸( $^{18}\text{F}$ -PLLA)を用いたA1/B系 $^{18}\text{F}$ -ラクトソームナノ粒子を作成した。具体的には、実験例13で得られた $^{18}\text{F}$ 標識ポリ-L-乳酸( $^{18}\text{F}$ -PLLA)を標識ポリマーBとして用いたことを除いては、実施例1と同じ操作を行うことによって作成した。

20

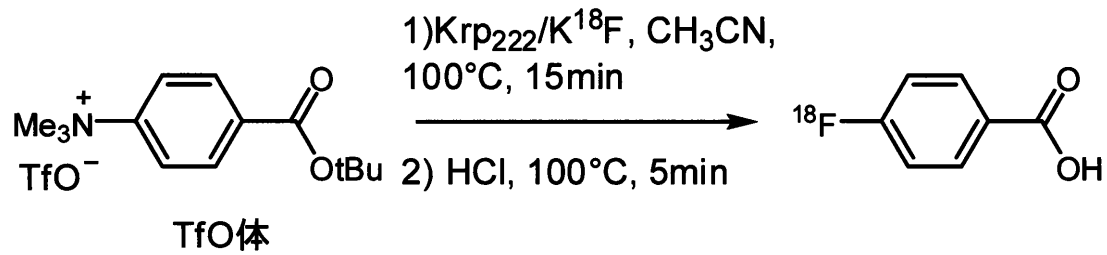
【0295】

[実験例14: 標識ポリマーB( $^{18}\text{F}$ 標識したベンゾイルポリ-L-乳酸( $^{18}\text{F}$ -BzPLLA))の合成]

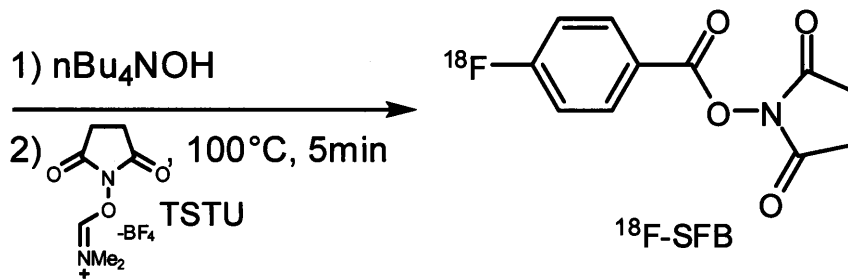
この実験例においては、まず $^{18}\text{F}$ -SFBを合成し(スキーム13)、次に $^{18}\text{F}$ -SFBと末端アミノ基を有するポリ乳酸との反応を行い、 $^{18}\text{F}$ 標識ベンゾイルポリ乳酸( $^{18}\text{F}$ -BzPLLA)を合成した(スキーム14)。

【0296】

【化13】



10



20

スキーム13

【0297】

脱水アセトニトリル150  $\mu\text{l}$ 、 $^{18}\text{F}$ -の $\text{K}_2\text{CO}_3$ 水溶液をシリンジバイアル内で混合し、110で加熱しアルゴンガスを吹付けながら溶媒を留去した。さらに脱水アセトニトリル500  $\mu\text{l}$ を加えて、110にてアルゴンガスを吹付けながら溶媒を飛ばす操作を3回繰り返し、 $\text{K}^{18}\text{F}$ /クリプトフィックス222を調製した。調製した $^{18}\text{F}$ 標識試薬 $\text{K}^{18}\text{F}$ /クリプトフィックス222、11.2 mCi ~ 13.7 mCi (414.4 MBq ~ 506.9 MBq)とTfO体1.0 mgとを無水アセトニトリル300  $\mu\text{l}$ 中100で15分間加熱した。室温まで冷却後1M塩酸を150  $\mu\text{l}$ 加え、100にて5分間

30

加熱した。その後、反応液に蒸留水を6 ml加えて希釈液をSep-Pak light C18カートリッジに付した。Sep-Pak light C18カートリッジに保持された放射能をアセトニトリルにて溶出し、溶出液に10%テトラブチルアンモニウムヒドロキシド-メタノール溶液を50  $\mu\text{l}$ 加え、アルゴンガスを吹付けながら加熱乾燥した。残渣にO-(N-succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborate(TSTU) 10 mgとアセトニトリル300  $\mu\text{l}$ とを加え100

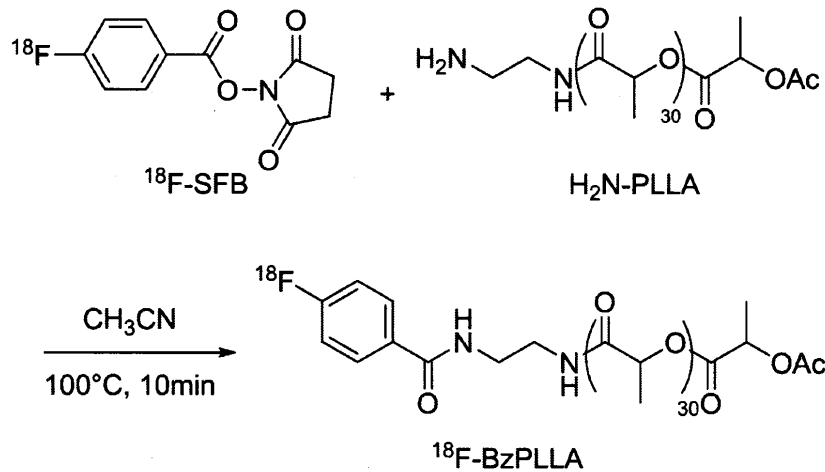
40

で5分間加熱して、活性エステルの導入反応を行った。反応液を5v/v%酢酸10 mlで希釈し、希釈液をSep-Pak light C18カートリッジに付し蒸留水1 mlでSep-Pak light C18カートリッジを洗浄した。保持されたSep-Pak light C18カートリッジ中の放射能はアセトニトリル300  $\mu\text{l}$ にて溶出した。全合成時間80分、放射化学的収率26 ~ 16.6% (減衰補正)、放射化学的純度は95%であった。

SepPakC18簡易精製後の溶出液のHPLCの結果を図20(a)に示す。

【0298】

## 【化14】



10

スキーム14

20

## 【0299】

H<sub>2</sub>N-PLLAを1.0 mg溶解した300 μlのアセトニトリルに、<sup>18</sup>F-SFBを1.2 mCi投入し、100のオイルバス中にて反応溶液を加熱し、標識反応10分間を行った。反応終了後、反応溶液をHPLCにて精製した。カラムはAsahipak GF-310HQ (7.6 × 300 mm)を用いてアセトニトリルにて溶出し、目的の<sup>18</sup>F-BzPLLAを得た。全合成時間120分、放射化学収率20%、放射化学的純度は100%であった。HPLCの結果を図20(b)に示す。

## 【0300】

[実施例11: A1/B系ラクトソームナノ粒子の作成]

本実施例では、実験例14で合成した<sup>18</sup>F標識したベンゾイルポリ-L-乳酸(<sup>18</sup>F-BzPLLA)を標識ポリマーBとして用い、PLLA<sub>30</sub>-PSar<sub>158</sub>を両親媒性ポリマーA1として用い、A1/B系ラクトソームナノ粒子を作成した。

30

PLLA<sub>30</sub>-PSar<sub>158</sub>(両親媒性ポリマーA1)を9 mgまたは3 mg使用して作成したポリマーフィルムに<sup>18</sup>F-BzPLLA(標識ポリマーB)のアセトニトリル溶液を100 μCi(0.3 ml)加え、Arガスを吹き付けながら110に加熱してアセトニトリルを留去した。ここに2 mlの水を加えて50 加温下で10分間ソニケーション処理を行い粒子化を行った。

## 【0301】

<sup>18</sup>F-BzPLLA(標識ポリマーB)のラクトソームへ内包は、ゲルろ過により確認した。カラムはセファクリルS-100HR(内径1.5cm 高さ22cm)を用いて、1/15mol/lリン酸緩衝液(pH7.4)により、1フラクションあたり40滴(約2cc、1滴につき約5秒の流速)ずつ分取し、放射能及びUVを測定した。両親媒性ポリマーA1を9 mg及び3 mg使用した場合のゲルろ過の溶出結果を、それぞれ図21(a)及び(b)に示す。

40

その結果、<sup>18</sup>F-BzPLLA放射能の98%以上(フィルムポリマー9mgの場合)、或いは99%以上(フィルムポリマー3mgの場合)が、ラクトソームと同じフラクションに溶出された。一方、カラム中にはほとんど放射能は残存していなかった。これらのことから、<sup>18</sup>F-BzPLLAがラクトソームに内包されていることを確認した。

## 【0302】

[実施例12: A1/B系ラクトソームナノ粒子を用いた担がんマウスのPET計測試験]

本実施例では、実施例10で得られたA1/B系<sup>18</sup>F-ラクトソームナノ粒子をPET用分子プローブとして用い、担がんマウスのPET計測試験を行った。

担がんマウスは、PET測定用と剖検用との2種を用意した。いずれの担がんマウスも、

50

実施例 8 と同様の操作を行うことによって作成した。

【 0 3 0 3 】

$^{18}\text{F}$ -ラクトソームを、PET測定用マウス及び剖検用マウスに投与し、各実験を開始した。PET測定用マウスには、約10 MBq / 匹の $^{18}\text{F}$ -ラクトソームを投与した。剖検用マウスには、約5 MBq / 匹の $^{18}\text{F}$ -ラクトソームを使用した。PET測定 (n=2) は、投与直後30分間連続して行い、その後、経過時間が1時間10分、2時間10分、3時間10分、4時間10分、5時間10分、及び6時間10分となるそれぞれの時点で各20分間行った。

【 0 3 0 4 】

PET測定の結果を図 2 2 に示す。図 2 2 が示すように、投与6時間後でもマウスの全身からシグナルが観測された。また、特定の臓器への特異的な集積は観測されなかった。なお、背骨から比較的強いシグナルが観測された理由は、低分子化した $^{18}\text{F}$ 標識ポリ乳酸が骨に集積するためと考えられる。また、本発明のラクトソームが血中滞留性に優れることも示された。

10

【 0 3 0 5 】

剖検によるマウス体内のシグナル強度の確認の結果を図 2 3 に示す。図 2 3 が示すように、心臓・肺・骨への集積が多いものの、がん部位への特異的な集積が認められた。また血液のシグナルが高いことから、血中滞留性が高いことが分かった。

【 0 3 0 6 】

以下において、薬剤搬送システム用分子プローブを作成し、抗がん作用について試験を行った。

20

【 0 3 0 7 】

[ 実施例 1 3 : A 1 / A 2 系ラクトソームナノ粒子を用いたヒトがん細胞に対する抗がん作用試験 1 ]

本実施例では、アドリアマイシンを内包した A 1 / A 2 系ラクトソームナノ粒子を薬剤搬送システム用分子プローブとして用い、ヒトがん細胞に対する抗がん作用試験を行った。

【 0 3 0 8 】

抗がん剤として利用されているアドリアマイシン (ADM) 11.4 mg を milliQ 水 50 ml に溶解し、クロロホルムを 50 ml を加えた。次に、攪拌しながら 1 N NaOH 水溶液を 0.04 ml 滴下して加え、ADM を脱塩酸し、クロロホルム層に抽出した。分液ロートでクロロホルム層を回収した後、硫酸ナトリウムを適量加え脱水を行い、硫酸ナトリウムをろ過して除去し、減圧乾燥し、脱塩酸したアドリアマイシン (ADM/-HCl) 10.6 mg を得た。

30

【 0 3 0 9 】

ラクトソームへの ADM/-HCl 内包は、PLLA<sub>30</sub>-PSar<sub>150</sub> (両親媒性ポリマー A 1) に PLLA<sub>30</sub> (疎水性ポリマー A 2) を 50 mol% 混合したラクトソームに対して ADM/-HCl を 5 wt% 混合して粒子化することによって行った。

【 0 3 1 0 】

アドリアマイシンがラクトソームへ内包されていることの確認は、別途、アドリアマイシン内包 A 1 / A 2 / B 系ラクトソームナノ粒子を調製し、ゲルろ過することによって行った。内包の確認用に用いる A 1 / A 2 / B 系ラクトソームナノ粒子は、上記ポリマー A 1、ポリマー A 2 及び ADM/-HCl と同時に、標識ポリマー B である蛍光剤 (ICG) 標識したポリ乳酸も混合することによって調製した。

40

【 0 3 1 1 】

調製した内包確認用ナノ粒子をゲルろ過 (Sephacrose 4B) によって精製した結果を図 2 4 に示す。図 2 4 ( a ) は、アドリアマイシン内包 A 1 / A 2 / B 系ラクトソームナノ粒子のゲルろ過の結果 (横軸: フラクシオン番号 (fraction No.)、縦軸: 吸収 (absorbance)) を表し、図 2 4 ( b ) は、11 番目のフラクションの吸収スペクトル (横軸: 波長 (wavelength)、縦軸: 吸収 (absorbance)) を表す。図 2 4 が示すように、蛍光剤 (ICG) とアドリアマイシンとに由来する吸収が同じ位置に溶出されており、アドリアマイシンがラクトソームへ内包されたことを確認した。

50

## 【 0 3 1 2 】

抗がん剤であるアドリアマイシン (ADM) と、脱塩酸したアドリアマイシン (ADM/-HCl) を内包したラクトソーム ((ADM/-HCl)/Lactosome) とについて、抗がん作用試験を、ヒトすい臓がん由来のSUIT-2細胞を用いて行った。96 wellプレートにSUIT-2細胞 $1 \times 10^4$  cell/0.1 mlを、5% FBS-Dulbecco's modified Eagle medium を用いて37 °C で24時間培養し、ADM及び(ADM/-HCl)/Lactosomeをそれぞれ終濃度 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2}$  mMとなるように10  $\mu$ l加え、培養した。培養開始後24、48、72時間経過時に、細胞数測定試薬SF (ナカライテスク社製) を5  $\mu$ l加え、37 °Cで2時間放置した。その後、450 nmの吸収を測定し、薬剤を含まないコントロールと比較した細胞生存率 (cell viability) を求めた。その結果を図25に示す。図25において、横軸はアドリアマイシン濃度 (ADM conc.) を表し、縦軸は薬剤を含まないコントロールと比較した細胞生存率 (cell viability) を表す。

10

## 【 0 3 1 3 】

[ 実施例 14 : ラクトソームを用いた難水溶性薬剤の水中分散量の検討 ]

本実施例では、A1/A2系ラクトソームを用いて、難水溶性の抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) をどのくらいH<sub>2</sub>Oに分散させることができるか検討した。

クロロホルム溶液中で、PLLA<sub>30</sub>-PSar<sub>150</sub> (両親媒性ポリマーA1) に対してPLLA<sub>31</sub> (疎水性ポリマーA2) を50 mol%混合し、全量を3 mgとし、PTXをそれぞれ0.5、1、2、4、8、16、24 wt%となるように加え、溶媒を減圧留去しフィルム化を行った。その後、milliQ水を3 ml加え、55 °Cで10分間超音波処理を行い粒子化を行った。得られた粒子溶液を0.2  $\mu$ mのフィルターを通すことにより、パクリタキセル内包A1/A2系ラクトソーム (PTX/Lactosome) 水溶液を調製した。全量を凍結乾燥した後、1 mg程度秤量し、10 mg/mlとなるように、LiBrを10 mMの濃度で混合したDMF溶液中に溶解させ、HPLCを用いてPTX量を決定した。HPLCの条件は、ゲルろ過カラムとしてAsahipak GF-310HQ (7.6  $\times$  300 mm) を用い、DMFにLiBrを10 mMの濃度となるように混合した溶液を溶媒として使用し、270 nmの吸収を測定した。

20

## 【 0 3 1 4 】

比較用として、疎水性ポリマーA2を含まないラクトソーム (A2・B不含ラクトソーム) を3 mg用いた場合についても、同様の操作を行った。

## 【 0 3 1 5 】

別途、PTX単体及びラクトソーム単体 (すなわちPTXを包含しないA1/A2系ラクトソーム) をそれぞれ0.1 mg/ml及び10 mg/mlとなるように上記溶媒 (DMFにLiBrを10 mMの濃度となるように混合した溶液) に溶解させ、10  $\mu$ lを分析に使用した。その結果、PTXは14.0 min付近に (図26 (b))、またラクトソームは10.3 min付近に (図26 (a)) 溶出されることが分かった。

30

## 【 0 3 1 6 】

同様に、凍結乾燥したPTX/Lactosomeを上記溶媒に10 mg/mlとなるように溶解し、10  $\mu$ lを分析に使用した。その結果、PTX/Lactosomeを構成する両親媒性ポリマーが10.8 minに溶出され、PTXが14.2 minに溶出された (図26 (c)) ことから、PTXがPTX/Lactosome水溶液中に存在していることを確認した。

40

## 【 0 3 1 7 】

疎水性ポリマーA2を50 mol%含む場合 (すなわちパクリタキセル内包A1/A2系ラクトソーム (PTX/Lactosome) である場合) と、含まない場合 (すなわち比較用に用意したパクリタキセル内包A2・B不含ラクトソーム) について、PTX混合量に対するPTXの検出量を図27に示す。

疎水性ポリマーA2を含まない場合は、PTXの混合量16 wt%に対して検出量は12.8 wt%であった。さらにPTX混合量を24 wt%に増やしたところ、0.2  $\mu$ mのフィルターを通過しなくなった。

それに対して、疎水性ポリマーA2を50 mol%含むラクトソームを用いた場合は、PTXの混合量を24 wt%とした場合にも0.2  $\mu$ mのフィルターを通過し、PTXの検出量は18.9 wt%であ

50

った。すなわち、疎水性ポリマー A 2 を含む場合、疎水性ポリマー A 2 を含まない場合と比較して、より多くのPTXを内包することができることを確認した。

【 0 3 1 8 】

[ 実施例 1 5 : A 1 / A 2 系ラクトソームナノ粒子を用いたヒトがん細胞に対する抗がん作用試験 2 ]

本実施例では、パクリタキセルを内包した A 1 / A 2 系ラクトソームを薬剤搬送システム用分子プローブとして用い、ヒトがん細胞 ( ヒトすい臓がん由来のSUIT-2細胞 ) に対する抗がん作用試験を行った。

パクリタキセルを内包した A 1 / A 2 系ラクトソーム ( PTX/Lactosome ) は、上記実施例 1 4 の方法によって作成した。この際、パクリタキセルの混合量は 5 wt% とした。

一方、市販の抗がん剤であるパクリタキセル ( プリストル・マイヤーズ株式会社製 TAXOL<sup>(R)</sup> ) ( PTX-i ) を用いた場合についても同様の抗がん作用試験を行った。

【 0 3 1 9 】

96 wellプレートにSUIT-2細胞  $1 \times 10^4$  cell / 0.1 ml を 5% FBS-Dulbecco ' s modified Eagle medium を用いて 37 °C で 24 時間培養し、PTX-i 及び PTX/Lactosome を終濃度 0.016-2  $\mu$ M となるようにそれぞれ 10  $\mu$ l 加え、培養した。培養開始後 24、48、72 時間経過時に、生細胞数測定試薬 SF ( ナカライテスク社製 ) を 5  $\mu$ l ずつ加え、37 °C で 2 時間放置した。その後、450 nm の吸収を測定し、薬剤を含まないコントロールと比較した細胞生存率 ( cell viability ) を求めた。その結果を図 2 8 に示す。図 2 8 において、横軸はパクリタキセル濃度 ( PTX conc. ) を表し、縦軸は薬剤を含まないコントロールと比較した細胞生存率 ( cell viability ) を表す。

【 産業上の利用可能性 】

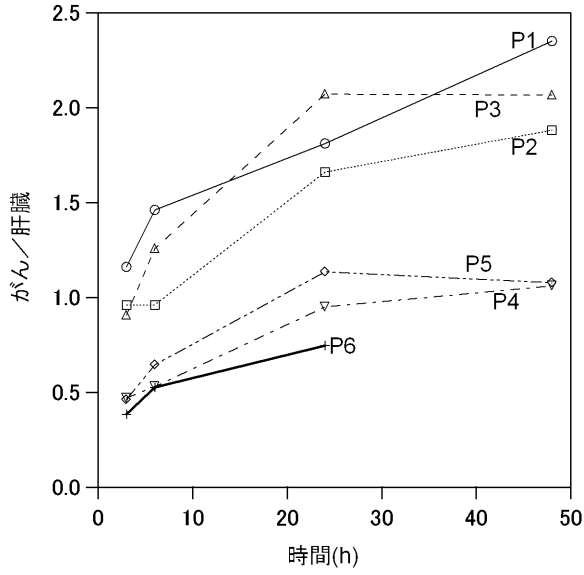
【 0 3 2 0 】

本発明によると、がん組織以外への組織への集積性が低く、生体に対する安全性が高く、粒径制御が容易であり、調製法が容易且つ安全である分子集合体を提供することができる。従って、本発明によると、分子イメージングシステム及び当該システムにおいて有用な分子プローブ、及び、薬剤搬送システム及び当該システムにおいて有用な分子プローブを提供することができる。

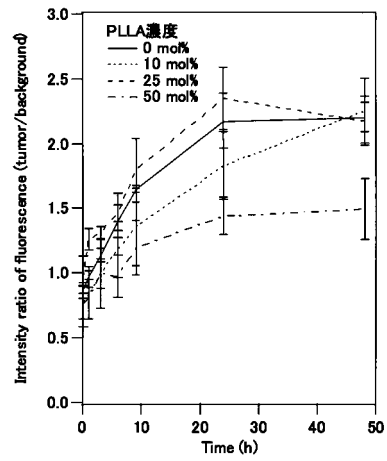
10

20

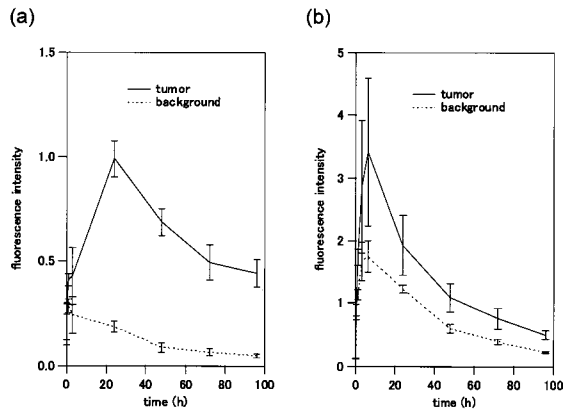
【 図 2 】



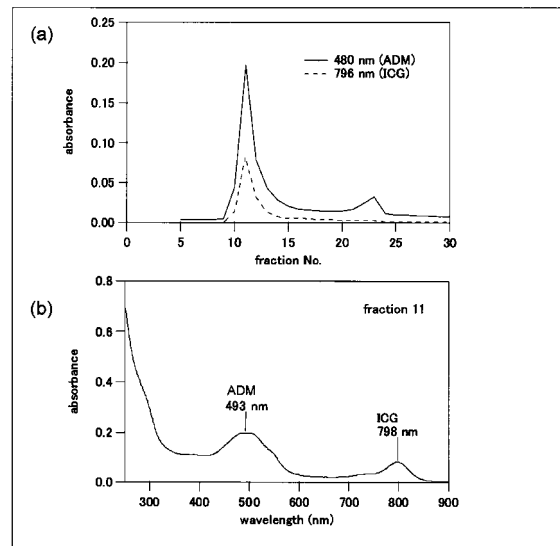
【 図 1 6 】



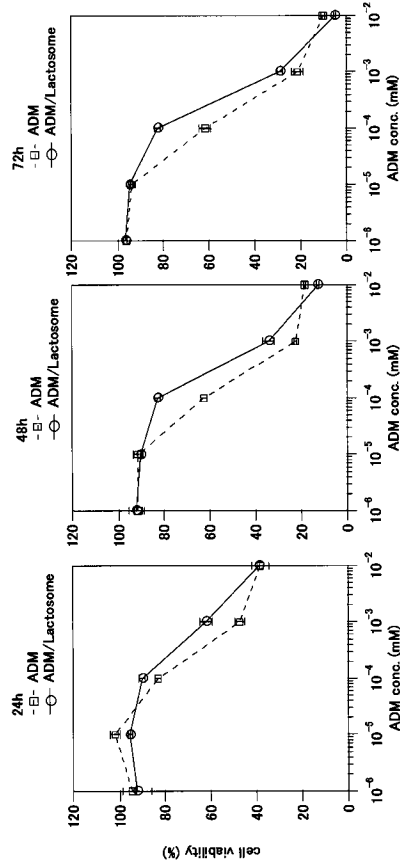
【 図 1 8 】



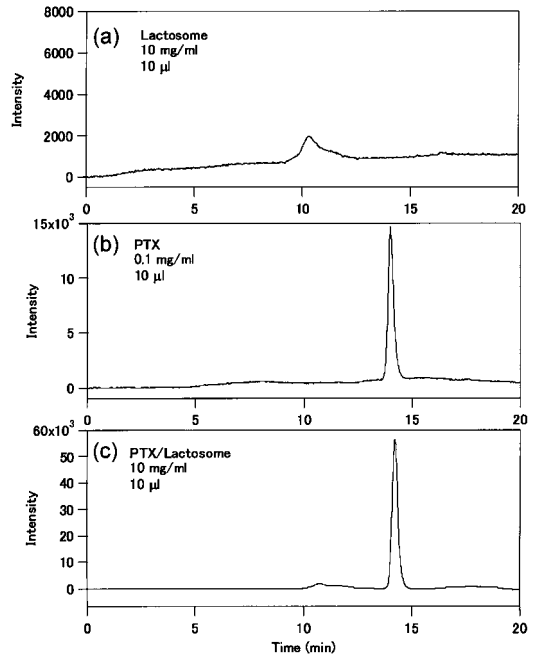
【 図 2 4 】



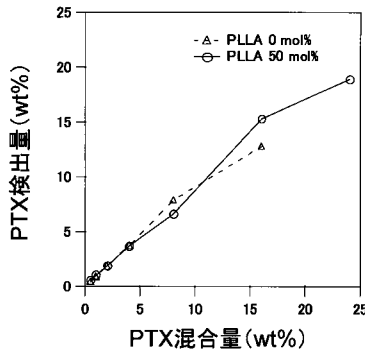
【 図 2 5 】



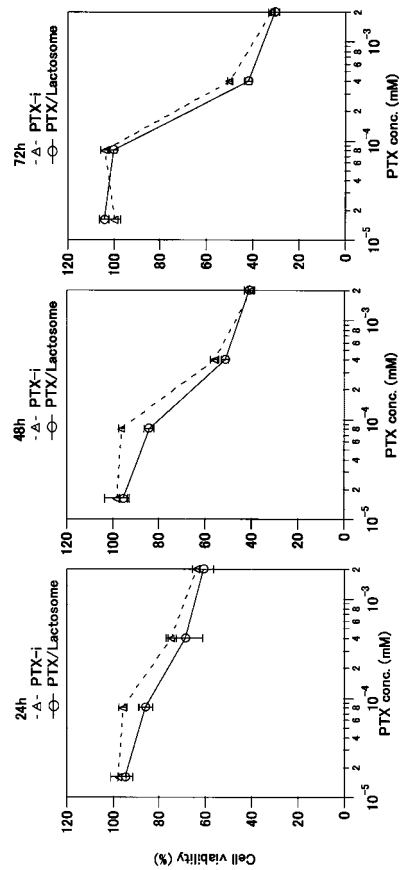
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】

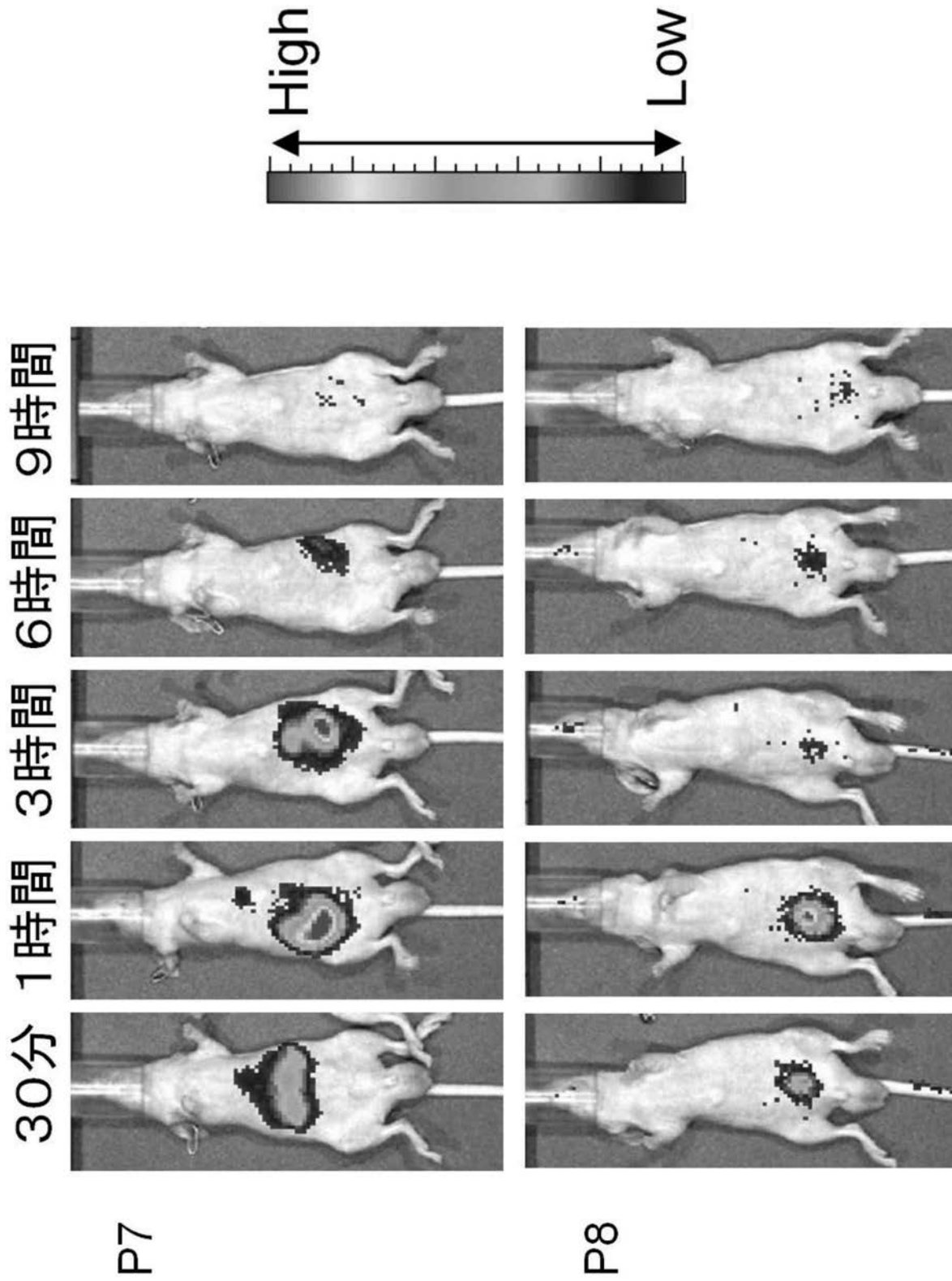


【 図 2 8 】



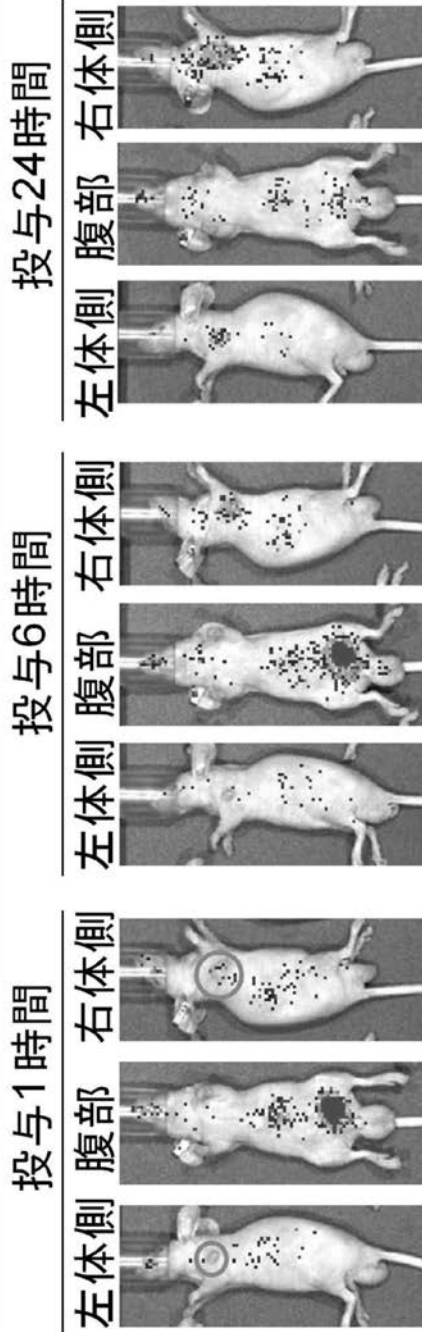


【 図 3 】



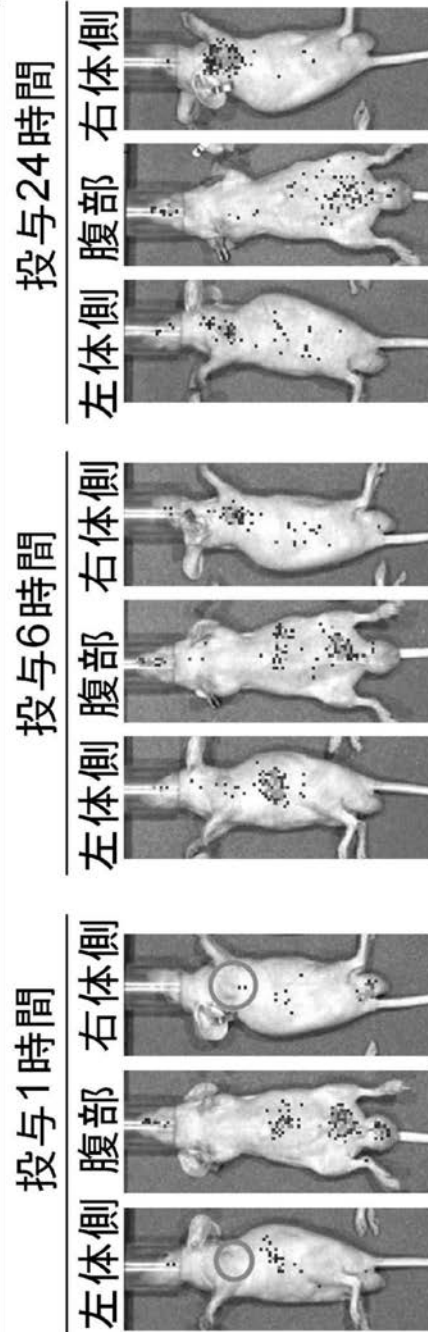
【 図 4 】

(A) フィルム法

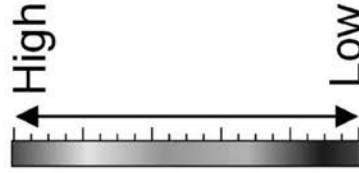


○:がん組織

(B) フィルム法 + 凍結乾燥

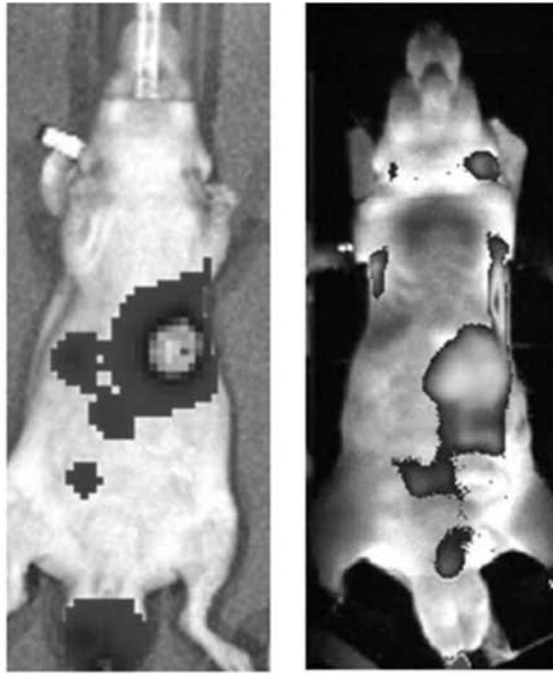


○:がん組織



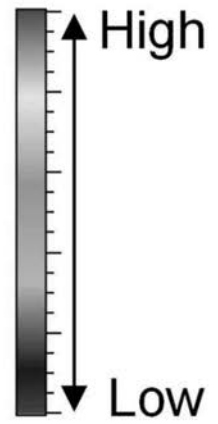
【図5】

(A)

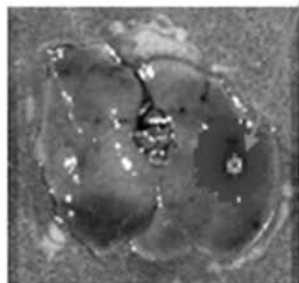
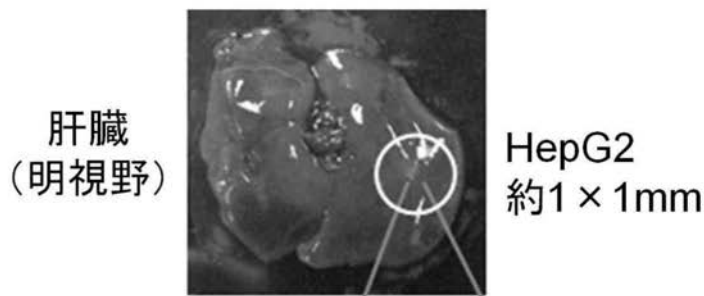


腹側(発光)

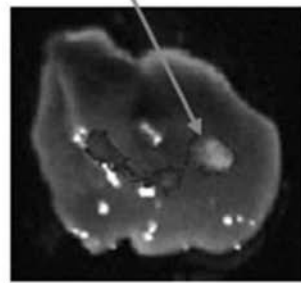
腹側(蛍光)



(B)



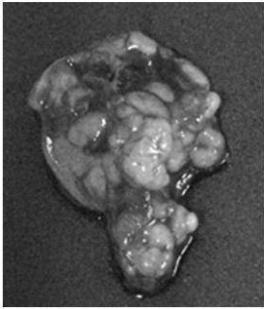
肝臓(発光)



肝臓(蛍光)

【 図 6 】

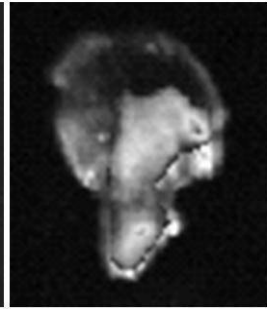
肺摘出後



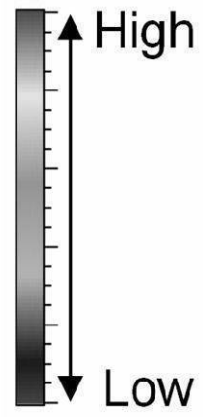
明視野



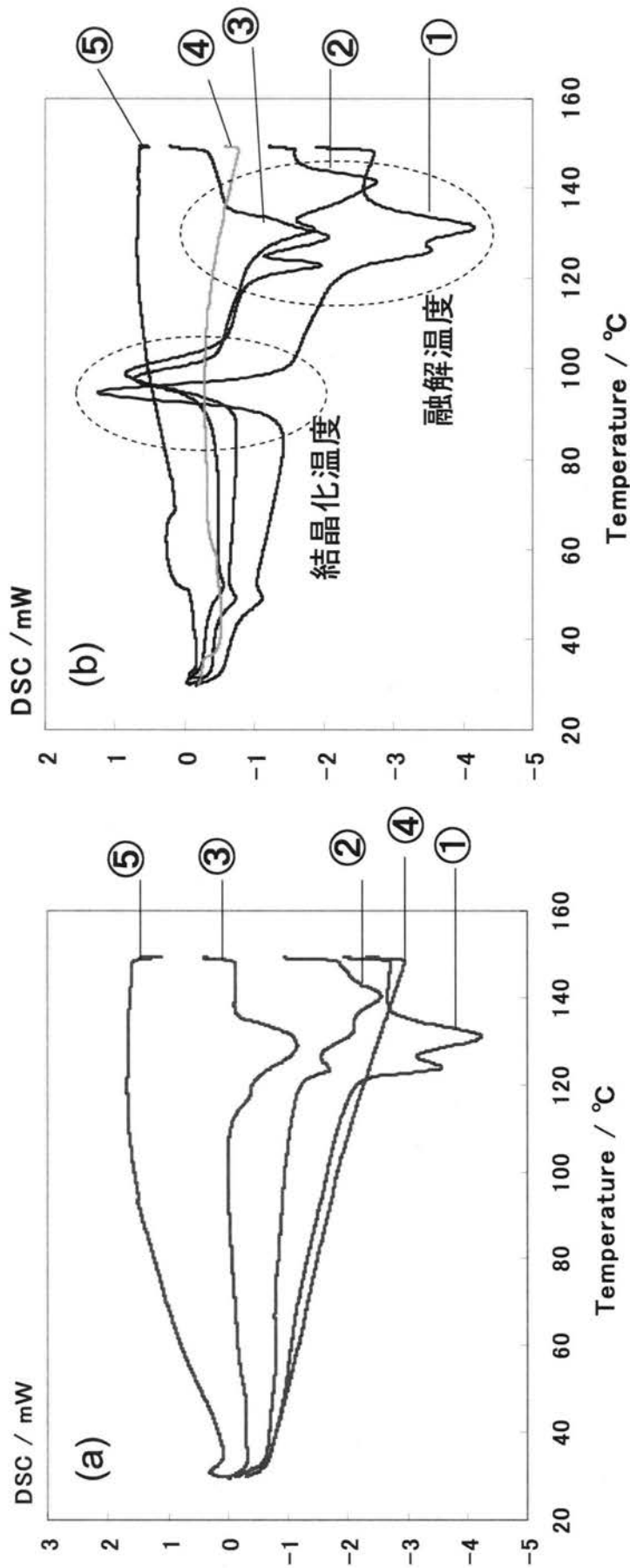
発光



蛍光



【 図 7 】

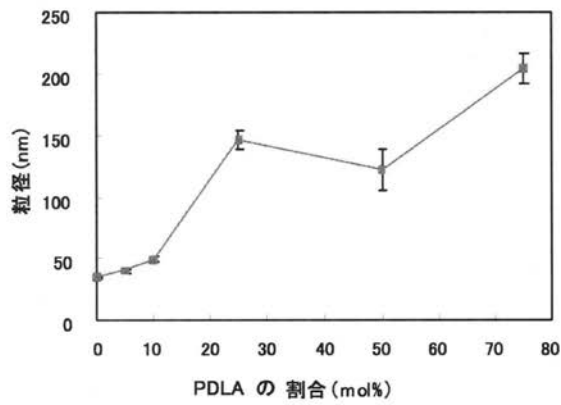
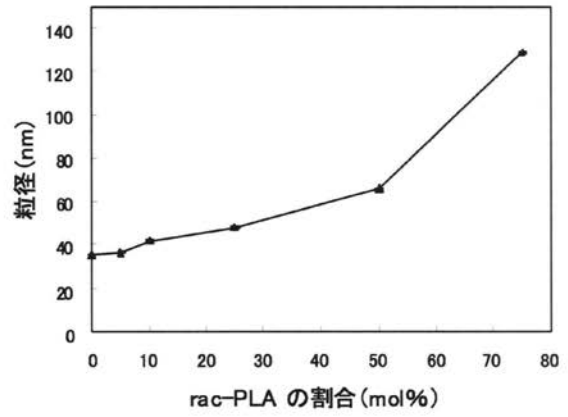
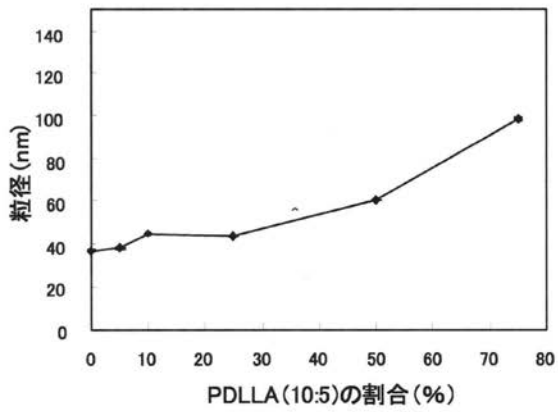
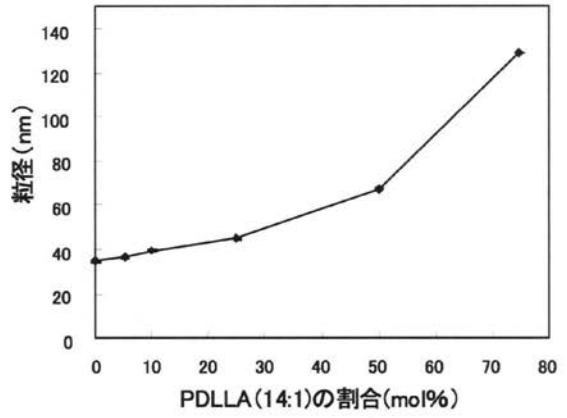
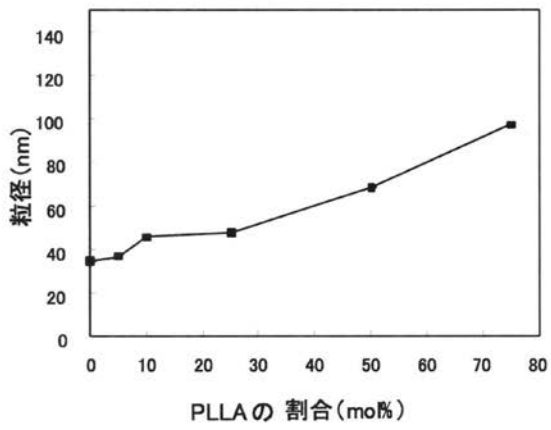


- ① PLLA<sub>33</sub> / ラクトソーム
- ② PDLA<sub>32</sub> / ラクトソーム
- ③ PDLLA<sub>31</sub> (14:1) / ラクトソーム
- ④ PDLLA<sub>26</sub> (10:5) / ラクトソーム
- ⑤ *rac*-PLLA<sub>32</sub> / ラクトソーム

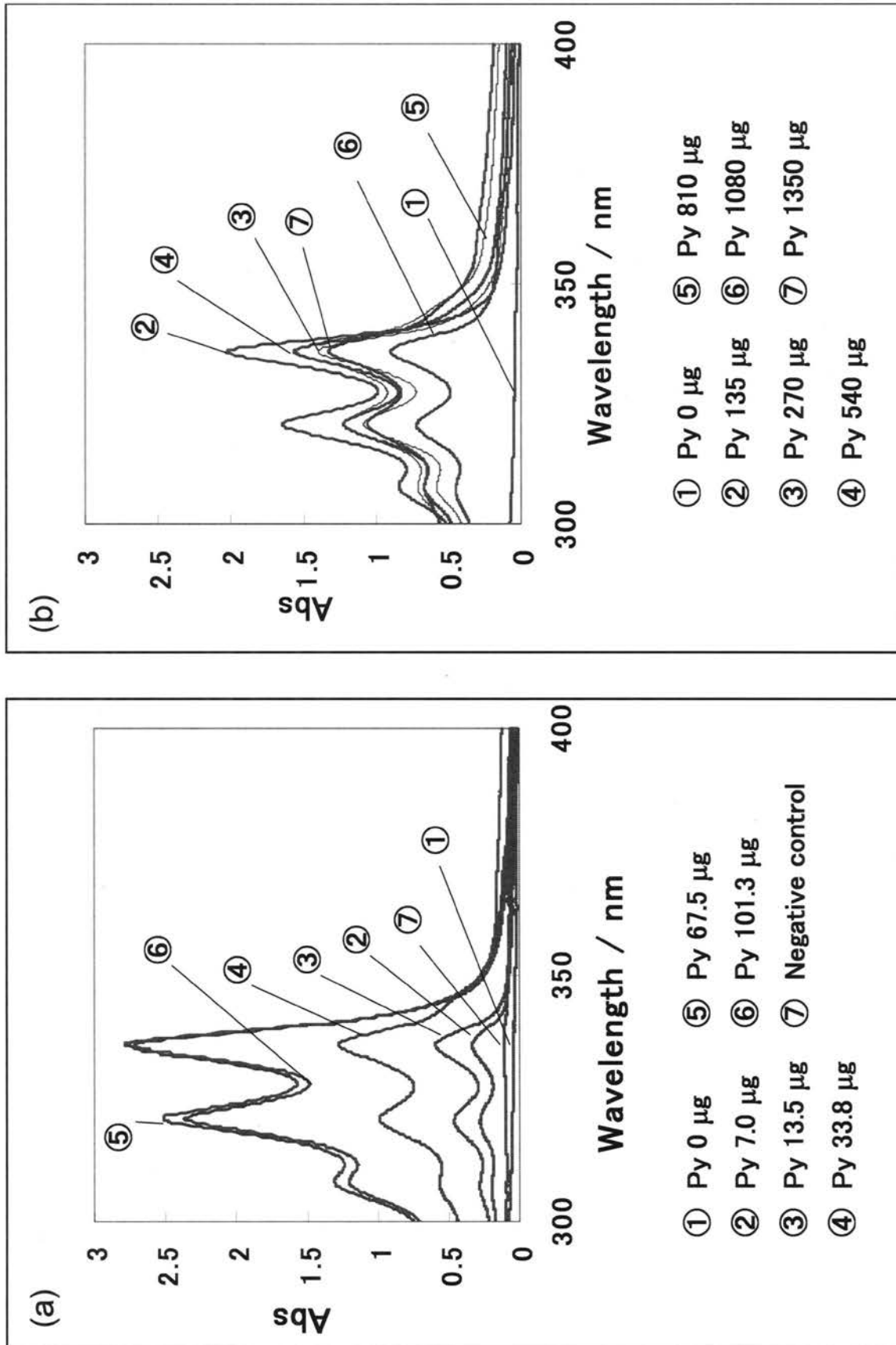
【 図 8 】



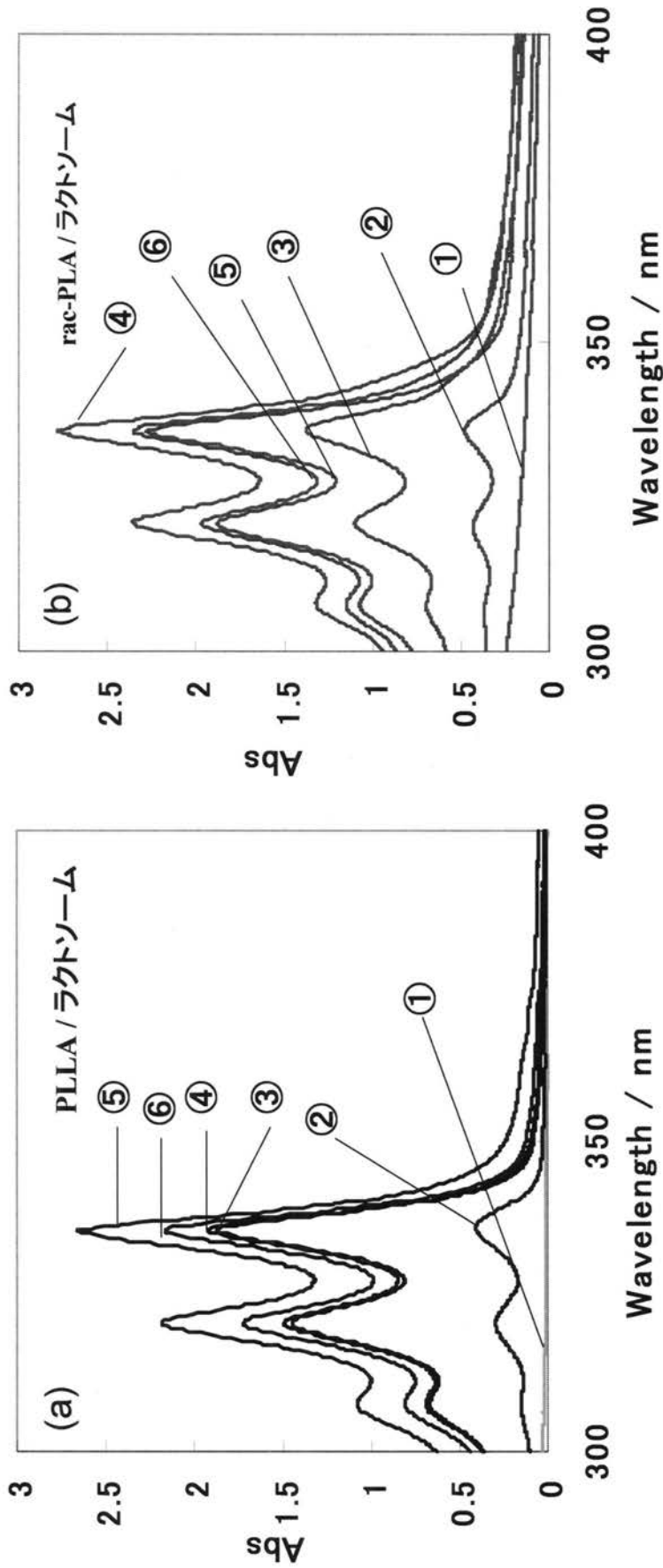
【 図 9 】



【 図 10 】

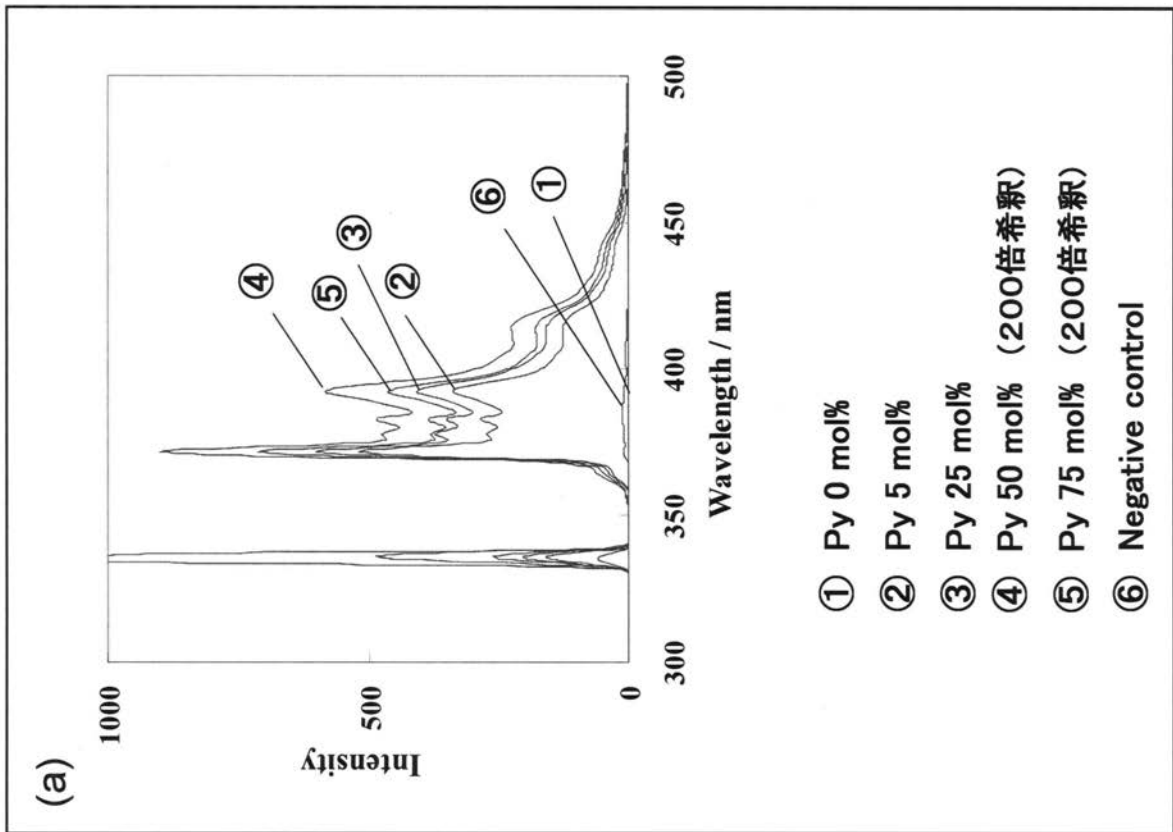
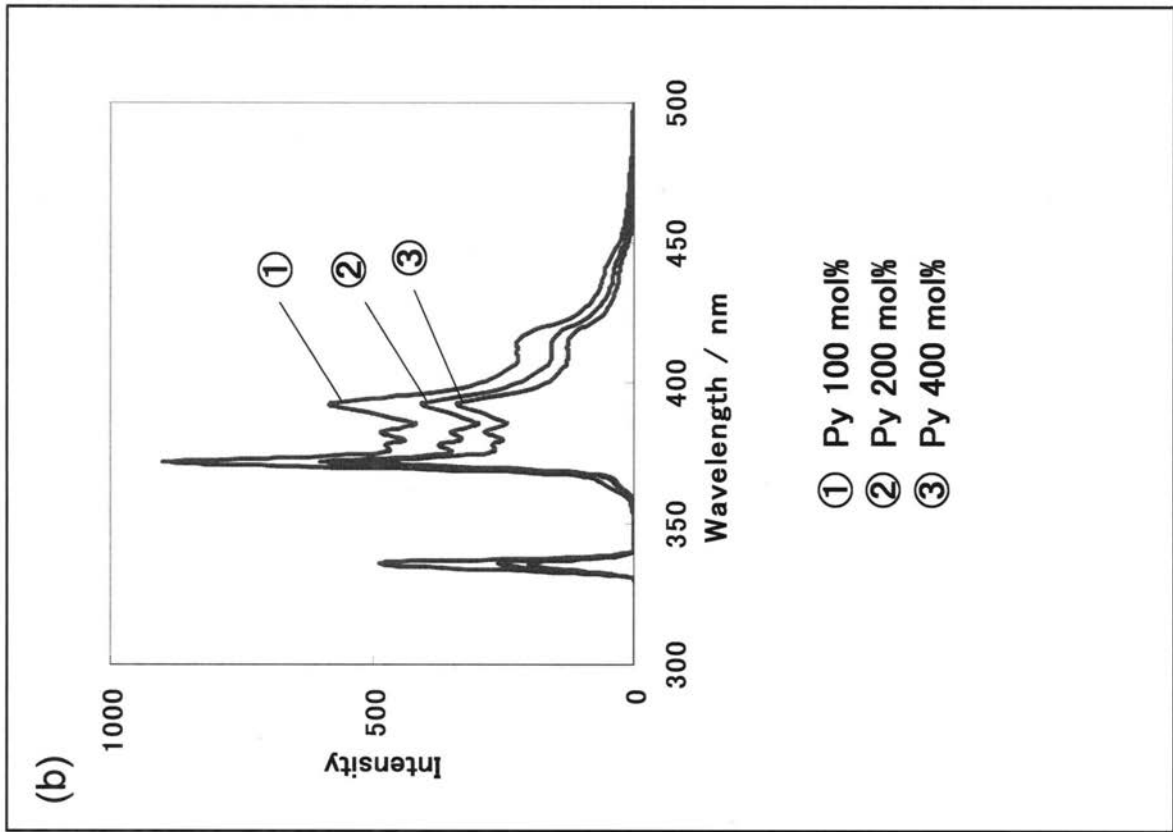


【 図 1 1 】

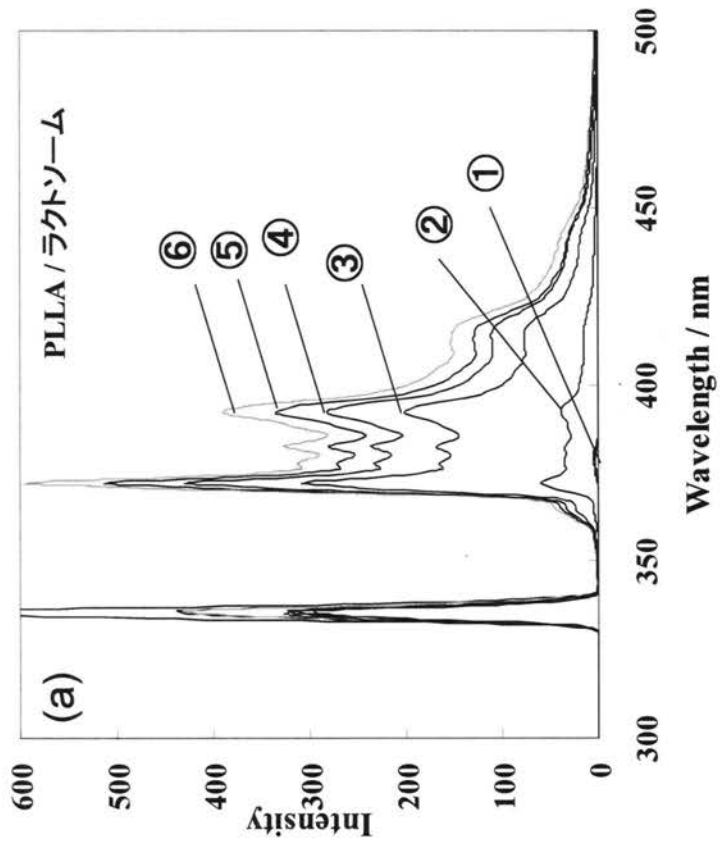
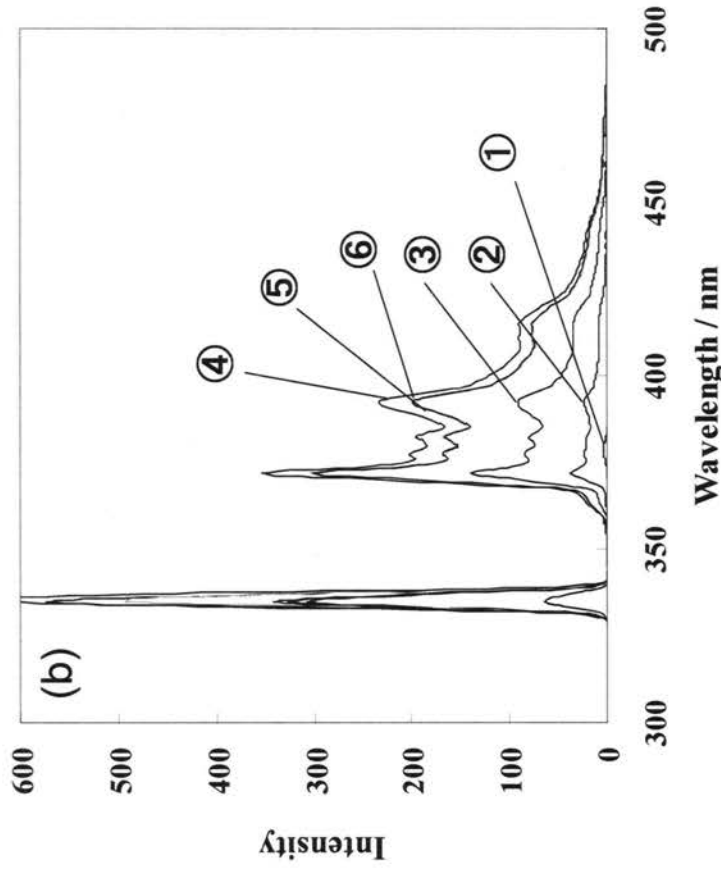


- ① Py 0  $\mu\text{g}$
- ② Py 10  $\mu\text{g}$
- ③ Py 50  $\mu\text{g}$
- ④ Py 100  $\mu\text{g}$
- ⑤ Py 500  $\mu\text{g}$
- ⑥ Py 1000  $\mu\text{g}$

【 図 1 2 】

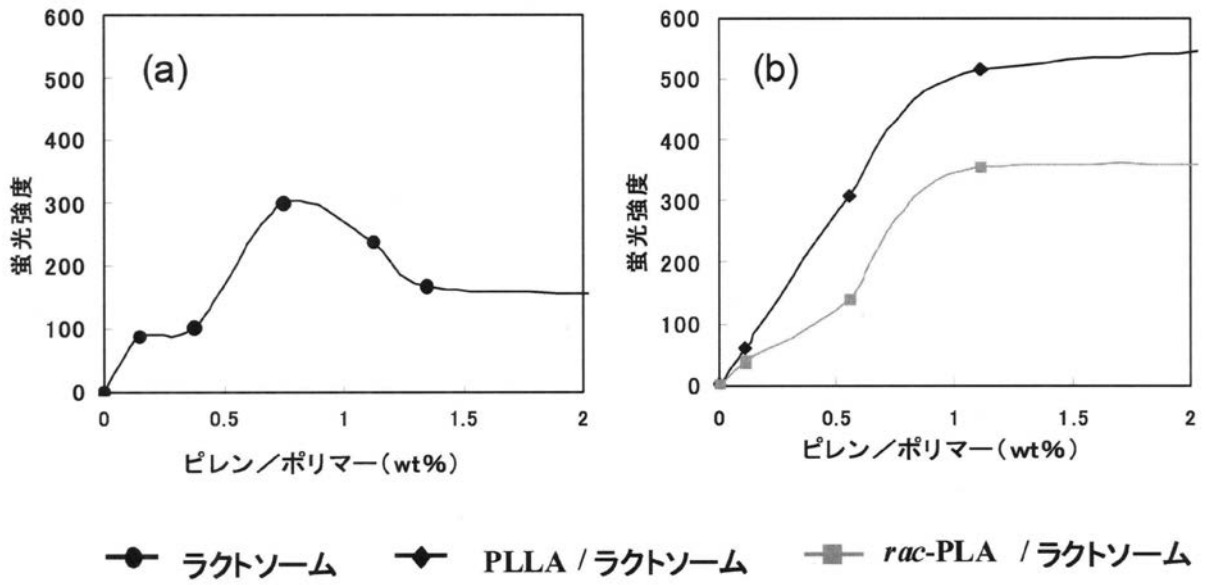


【 図 1 3 】



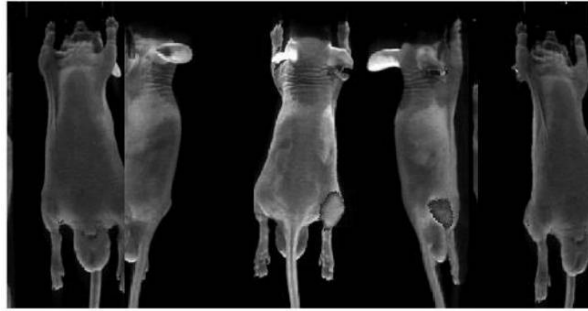
- ① Py 0  $\mu\text{g}$
- ② Py 10  $\mu\text{g}$
- ③ Py 50  $\mu\text{g}$
- ④ Py 100  $\mu\text{g}$
- ⑤ Py 500  $\mu\text{g}$
- ⑥ Py 1000  $\mu\text{g}$

【 図 1 4 】

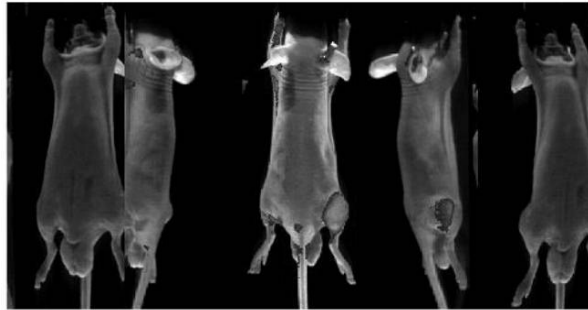


【図15】

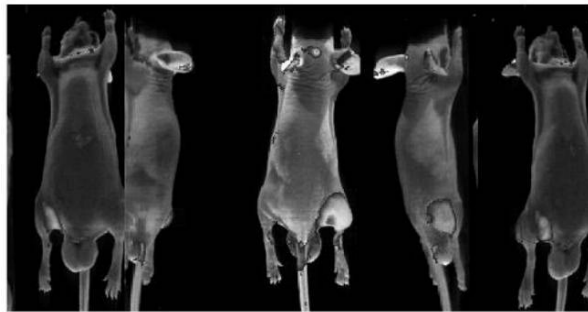
(a) PLLA  
なし



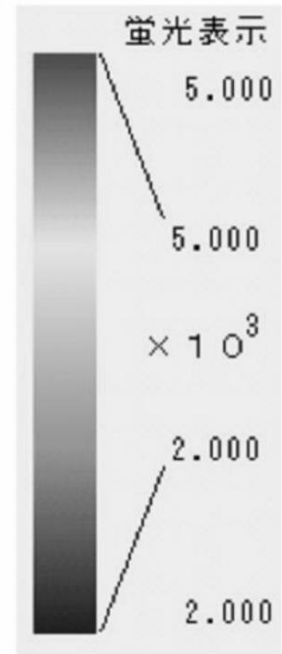
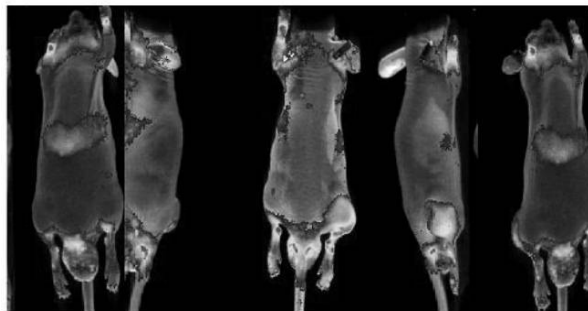
(b) PLLA  
10 mol%



(c) PLLA  
25 mol%

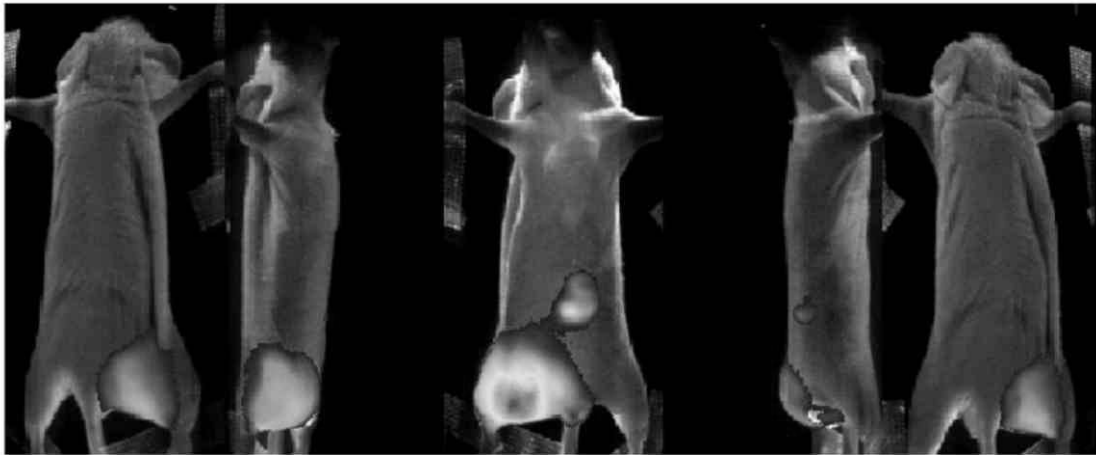


(d) PLLA  
50 mol%

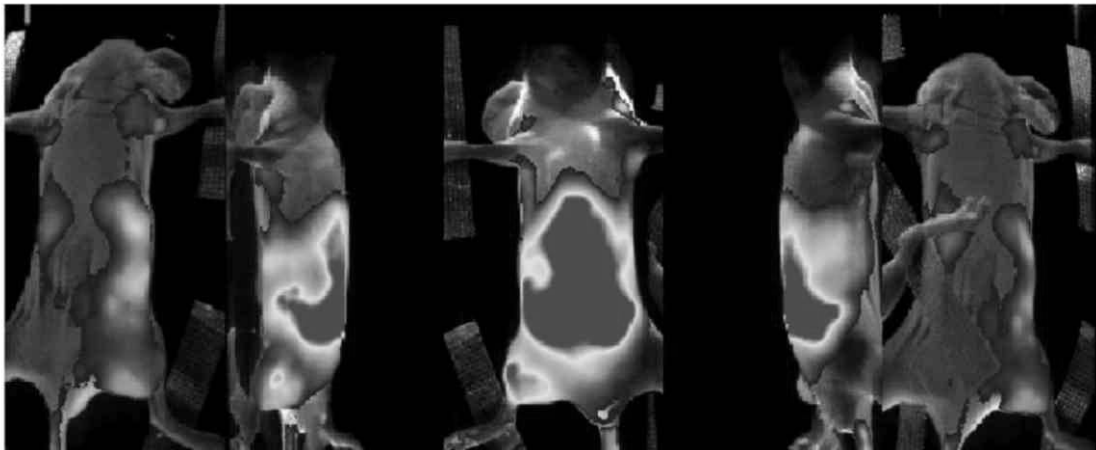


【図17】

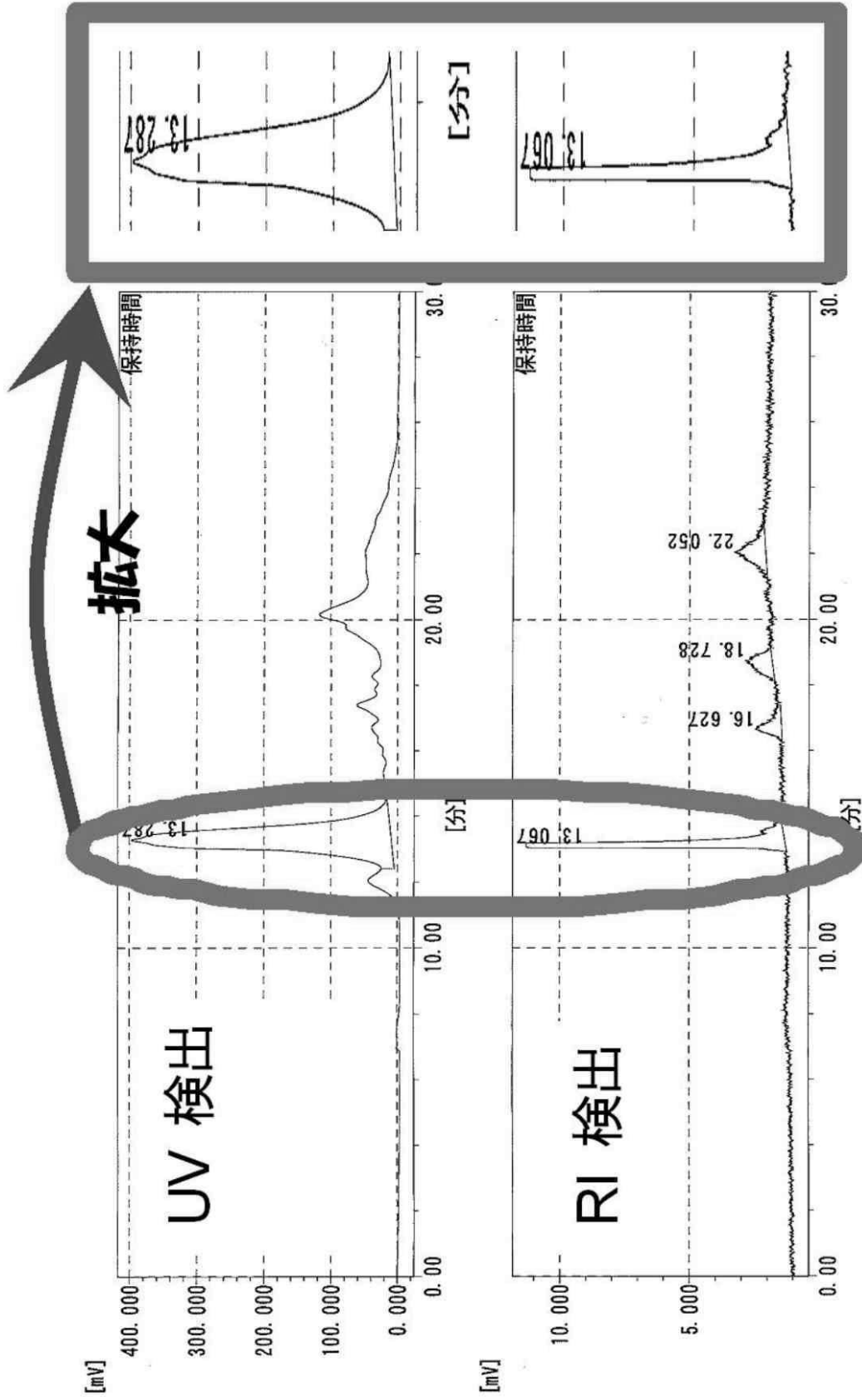
(a) ICG標識ラクトソーム投与24時間後



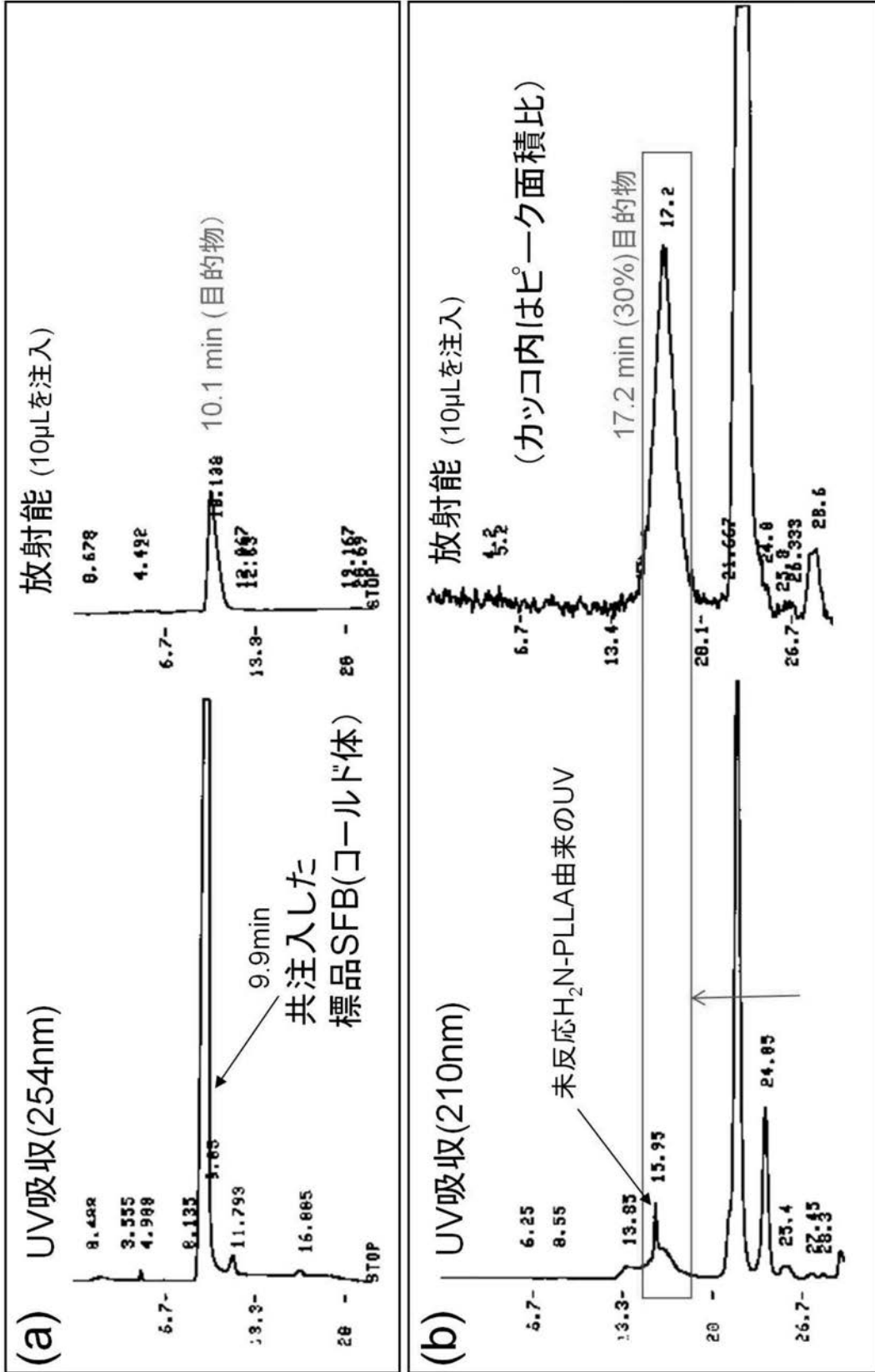
(b) HAS-ICG内包リポソーム投与6時間後



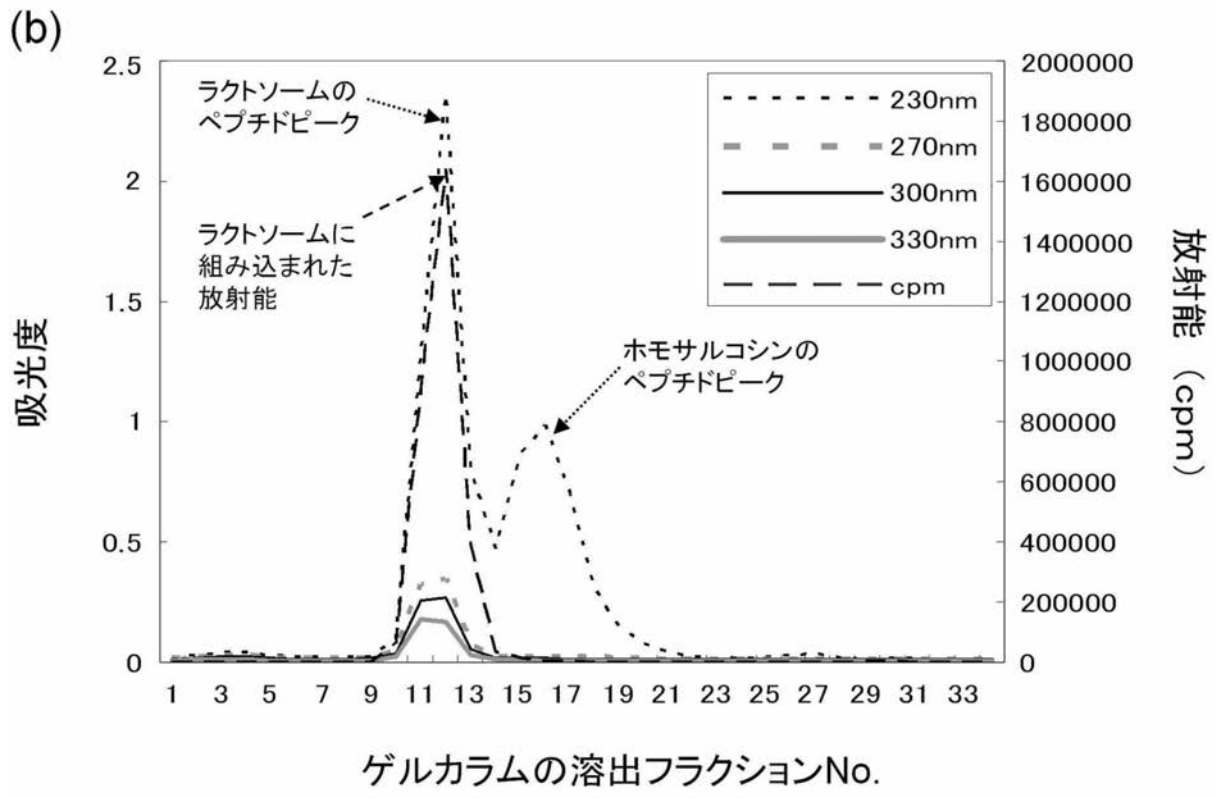
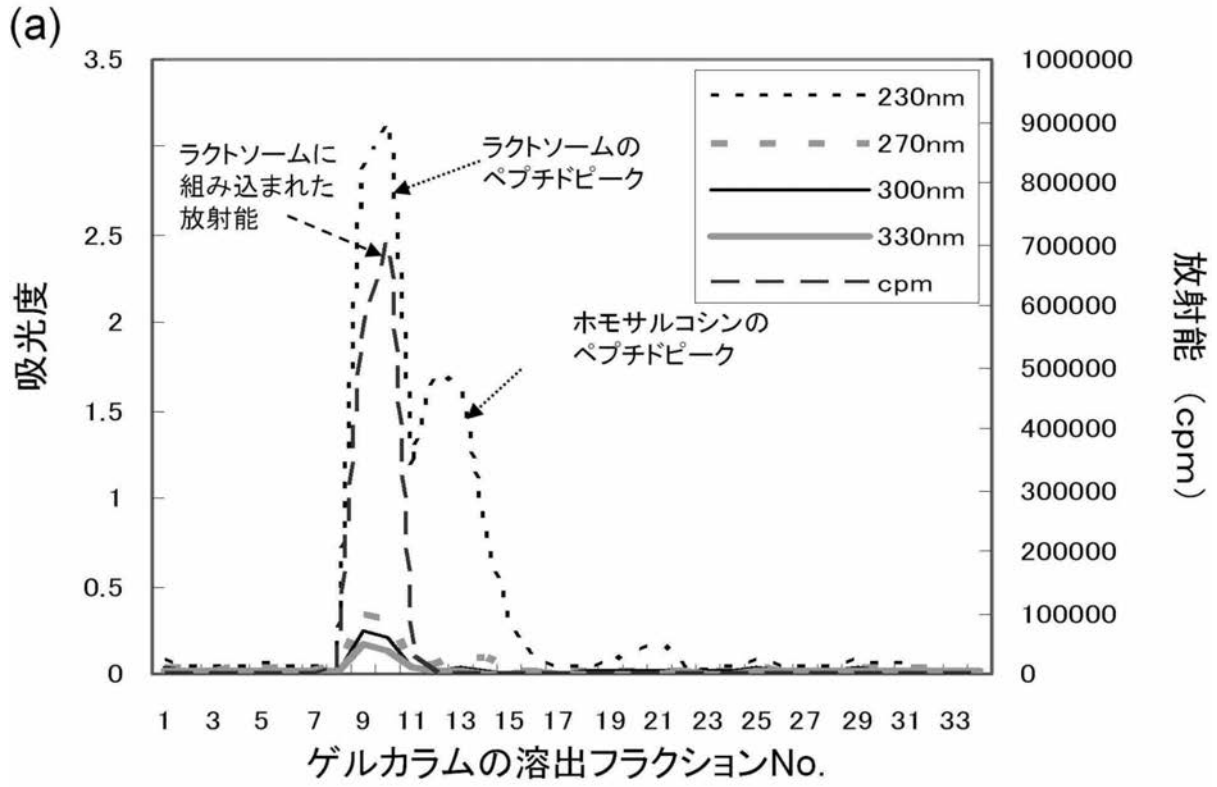
【 図 1 9 】



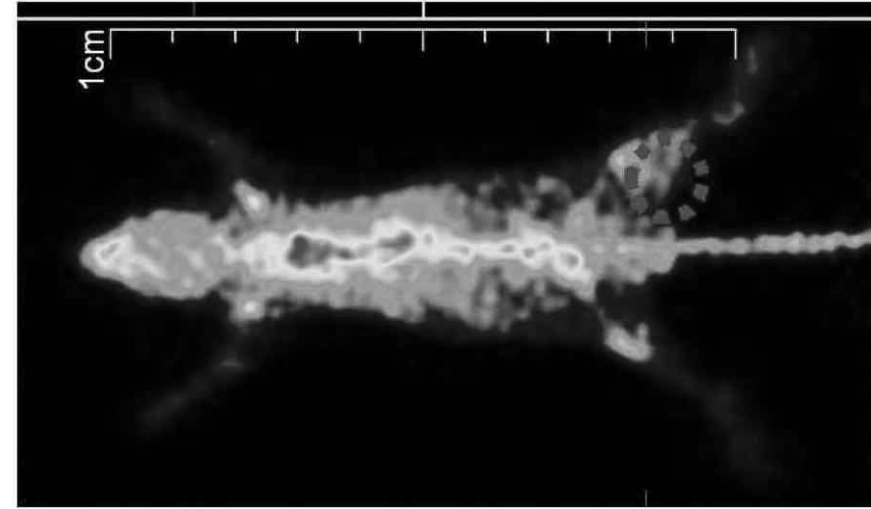
【 図 2 0 】



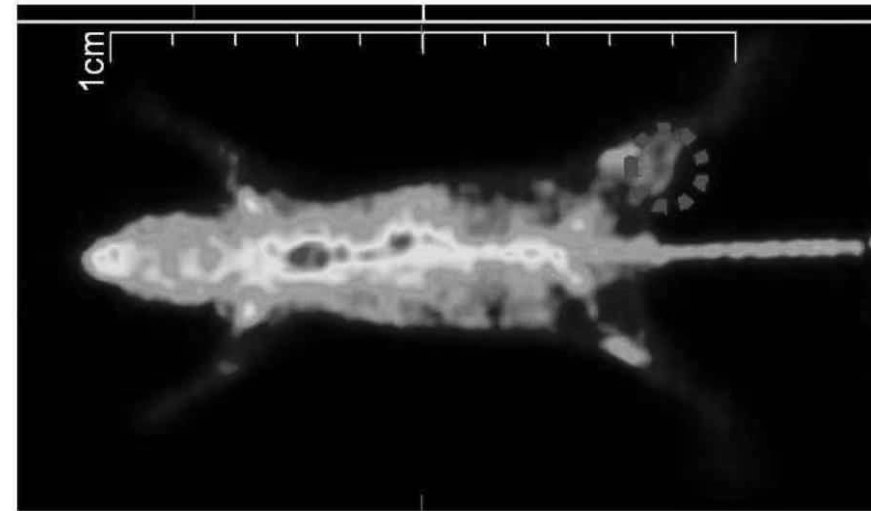
【図 2 1】



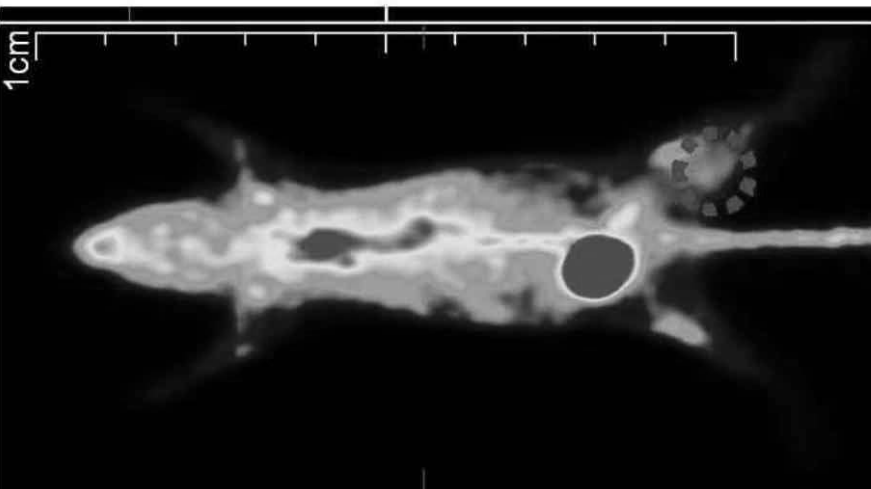
【 図 2 2 】



6時間10分

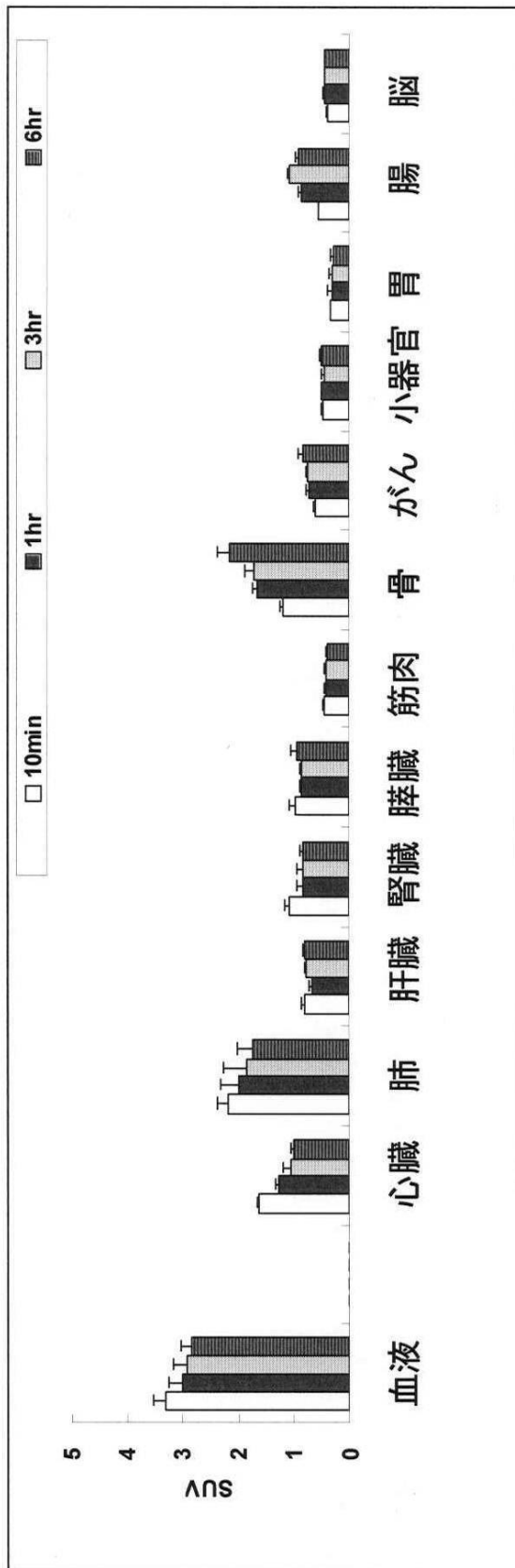


3時間10分



1時間10分

【 図 2 3 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 K 49/00 (2006.01) A 6 1 K 49/00  
 A 6 1 K 51/00 (2006.01) A 6 1 K 49/02  
 A 6 1 K 9/19 (2006.01) A 6 1 K 9/19  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

- (72)発明者 小関 英一  
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 竹内 恵理  
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 木村 俊作  
 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学法人京都大学大学院工学研究科内
- (72)発明者 近藤 科江  
 京都府京都市左京区聖護院川原町5-4 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内
- (72)発明者 牧野 顕  
 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学法人京都大学大学院工学研究科内
- (72)発明者 山本 文彦  
 京都府京都市左京区聖護院川原町5-4 国立大学法人京都大学医学部附属病院内

審査官 石井 裕美子

- (56)参考文献 特表2007-536219(JP,A)  
 MAKINO Akira et al, Preparation of Novel Polymer Assemblies, 'Lactosome', Composed of Poly(L-lactic acid) and Poly(sarcosine), Chem Lett, 2007年, Vol.36, No.10, Page. 1220-1221  
 Lifeng Zhang et al, Multiple Morphologies and Characteristics of "Crew-Cut" Micelle-like Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions, J. Am. Chem. Soc., 1996年, No.118, Vol.13, p 3168-3181  
 SHOUPING XU et al, Aggregates of Amphiphilic Fluorinated Copolymers and their Encapsulating and Unloading Homopolymer Behaviors., Journal of Polymer Science Part B, 2008年 6月 1日, Vol.46, No.11, p1000-1006  
 Ruxandra Gref et al, Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis, Polymer International, 1999年, Vol.48, No.4, pages 251-256  
 笹津備尚 他, 標識体PLA Pyreneの合成とPLA誘導体ナノパーティクルの粒子特性, 薬剤学, 2008年 4月30日, Vol.68, No.Supplement, Page.281  
 笹津備尚 他, MeO PEG amine PLA block copolymer/PLAを基剤としたナノパーティクル 粒子特性と体内分布, 日本薬学会年会要旨集, 2007年 3月 5日, Vol.127th, No.3, Page.125

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8  
 A 6 1 K 4 9 / 0 0  
 A 6 1 K 5 1 / 0 0  
 A 6 1 P 3 5 / 0 0  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

