

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-8270

(P2016-8270A)

(43) 公開日 平成28年1月18日 (2016.1.18)

(51) Int.Cl.
C08L 53/00 (2006.01)F I
C08L 53/00テーマコード (参考)
4J002

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2014-130172 (P2014-130172)
(22) 出願日 平成26年6月25日 (2014.6.25)(71) 出願人 301023238
国立研究開発法人物質・材料研究機構
茨城県つくば市千現一丁目2番地1
(72) 発明者 小土橋 陽平
茨城県つくば市千現一丁目2番地1 独立
行政法人物質・材料研究機構内
(72) 発明者 青柳 隆夫
茨城県つくば市千現一丁目2番地1 独立
行政法人物質・材料研究機構内
(72) 発明者 荏原 充宏
茨城県つくば市千現一丁目2番地1 独立
行政法人物質・材料研究機構内
Fターム(参考) 4J002 AD00Y BP03W BP03X GB00

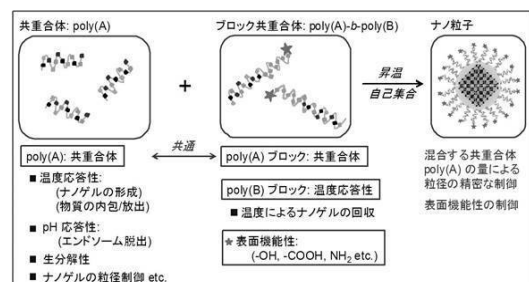
(54) 【発明の名称】 ナノ粒子及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 温度応答性のブロック共重合体を使用して多様なナノ粒子を形成する。

【解決手段】 温度応答性のブロック共重合体と当該ブロック重合体の一つのブロックと同じ構造を有する温度応答性の共重合体の水溶液を昇温することで、コア部位に共重合体を取り込んだブロック重合体のナノ粒子が形成される。使用するブロック共重合体及び共重合体の構造やそれらを構成するユニットの繰り返し数、末端の官能基等の組み合わせを適宜選択することで、多様な特徴を有するナノ粒子を形成することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

温度応答性の共重合体と、

複数のブロックから構成されるとともに、前記複数のブロック中の一つのブロックは前記共重合体と同じ構造を有する温度応答性のブロック共重合体とを含むナノ粒子。

【請求項 2】

前記一つのブロックを構成する複数のユニットと前記共重合体を構成する複数のユニットとは同じであるが前記一つのブロック内での前記複数のユニットの各々の繰り返し数と前記共重合体内での前記複数のユニットの各々の繰り返し数とが同じであるか異なっている、請求項 1 に記載のナノ粒子。

10

【請求項 3】

前記ナノ粒子は前記ブロック共重合体の昇温されたことによって疎水化された部分と昇温されたことによって疎水化された前記共重合体とを含むコア部位と、それ以外のシェル部位とから構成される、請求項 1 または 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 4】

前記コア部位中に含まれる前記疎水化された前記共重合体の重量は前記ナノ粒子を構成する前記ブロック共重合体の重量以下である、請求項 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 5】

前記ブロック共重合体は

20

2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート（ MEO_2MA と略記する）、オリゴ（エチレングリコール）メタクリレート（ OEGMA と略記する）、6-アセチルチオヘキシルアクリレート（ ATA と略記する）及び2-（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート（ DP と略記する）の4種類のモノマーが重合したものであって、

$\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA})$ なる構造を有する第1のブロック及び $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA}-\text{co}-\text{ATA}-\text{co}-\text{DP})$ なる構造を有する第2のブロックとを有する

ブロック共重合体 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA})-\text{b}-\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA}-\text{co}-\text{ATA}-\text{co}-\text{DP})$ であり、

前記共重合体は MEO_2MA 、 OEGMA 、 ATA 及び DP の4種類のモノマーが重合したものであって、前記第2のブロックと同じ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA}-\text{co}-\text{ATA}-\text{co}-\text{DP})$ なる構造を有する共重合体であり、

30

前記モノマーが前記ユニットに対応する

請求項 1 から 4 の何れかに記載のナノ粒子。

【請求項 6】

前記ブロック共重合体の前記第1のブロック中のモノマー MEO_2MA 及び OEGMA の繰り返し数はそれぞれ48及び20であり、

前記ブロック共重合体の前記第2のブロック中のモノマー MEO_2MA 、 OEGMA 、 ATA 及び DP の繰り返し数はそれぞれ25、4、3及び4であって

40

前記ブロック共重合体は $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{48}-\text{co}-\text{OEGMA}_{20})-\text{b}-\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{25}-\text{co}-\text{OEGMA}_4-\text{co}-\text{ATA}_3-\text{co}-\text{DP}_4)$ と表され、

前記共重合体中のモノマー MEO_2MA 、 OEGMA 、 ATA 及び DP の繰り返し数はそれぞれ17、2、3及び2であるか、またはそれぞれ33、5、4及び5であって、

前記共重合体は $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{17}-\text{co}-\text{OEGMA}_2-\text{co}-\text{ATA}_3-\text{co}-\text{DP}_2)$ または $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{33}-\text{co}-\text{OEGMA}_5-\text{co}-\text{ATA}_4-\text{co}-\text{DP}_5)$ と表される

請求項 1 から 5 の何れかに記載のナノ粒子。

【請求項 7】

前記ブロック共重合体の末端に官能基を有する、請求項 1 から 6 の何れかに記載のナノ

50

粒子。

【請求項 8】

前記官能基に他の物質を結合させた、請求項 7 に記載のナノ粒子。

【請求項 9】

前記他の物質はタンパク質、核酸、酵素、低分子、無機粒子及び量子ドットからなる群から選択される、請求項 8 に記載のナノ粒子。

【請求項 10】

前記他の物質はナノ粒子表面に配列している、請求項 8 または 9 に記載のナノ粒子。

【請求項 11】

水中で前記共重合体及び前記ブロック共重合体中の前記第 2 のブロックの下限臨界溶液温度よりも低温にすることによって前記共重合体と前記ブロック共重合体とに分解する、請求項 1 から 10 の何れかに記載のナノ粒子。 10

【請求項 12】

前記下限臨界溶液温度以上に昇温することによって再度形成される、請求項 11 に記載のナノ粒子。

【請求項 13】

前記コア部位がゲル化しており、その内部に他の物質を内包させた、請求項 3 または 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 14】

前記他の物質は医薬、酵素、タンパク質、核酸、無機粒子からなる群から選択される、請求項 13 に記載のナノ粒子。 20

【請求項 15】

温度応答性の共重合体と、
複数のブロックから構成されるとともに、前記複数のブロック中の一つのブロックは前記共重合体と同じ構造を有する温度応答性のブロック共重合体と
を含む水溶液を前記共重合体及び前記ブロック共重合体の前記一つのブロックの下限臨界溶液温度以上に昇温する
ナノ粒子の製造方法。

【請求項 16】

請求項 15 の方法により製造された第 1 のナノ粒子と、 30
請求項 15 の方法により製造され、前記第 1 のナノ粒子とは前記共重合体と前記ブロック共重合体との重量比が異なる第 2 のナノ粒子と
を含む水溶液の温度を前記下限臨界溶液温度よりも低下させて、前記第 1 及び第 2 のナノ粒子を前記共重合体と前記ブロック共重合体とに分解し、

前記分解後に前記水溶液の温度を前記下限臨界溶液温度以上に昇温させて前記重量比が前記第 1 及び第 2 のナノ粒子の何れとも異なる第 3 のナノ粒子を製造する、
ナノ粒子の製造方法。

【請求項 17】

前記水溶液は更に緩衝溶液を含む、請求項 15 または 16 に記載のナノ粒子の製造方法。 40

【請求項 18】

前記ブロック共重合体の末端が官能基を有する、請求項 15 または 16 に記載のナノ粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はナノ粒子に関し、特に共重合体とブロック共重合体との混合と昇温によって自己組織化的に形成されるナノ粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

いろいろなタイプの「スマートな」重合体ナノ粒子が広範な分野に適用されてきた（非特許文献 1、2）。これらのナノ粒子は通常それぞれ実験室で作成され、それゆえ、これらの諸性質（モノマー、サイズ、構造、電荷、組成等）は独自なものであり、これにより開発の遅延が起こることが懸念される。特性が可変なナノ粒子を設計することは大きな課題であり、全世界に大きな貢献をもたらすであろう。

【0003】

ナノ粒子の作成のために、リビングラジカル重合（controlled living radical polymerization、CLRP）及びクリック反応（click chemistry）の開発による多機能性ブロック共重合体が報告されている（非特許文献 3～6）。しかしながら、ブロック共重合体の刺激応答性の数には依然として制限があり、また重合後に刺激応答性を変更するのは通常困難である。この問題を解決するため、ナノ粒子を単純なブロック共重合体の混合物から自己組織化的に構築することが提案された（非特許文献 7～9）。自己組織化のきっかけとして、取り扱いを単純化するために（可逆性、特別な機器が不要、また化学薬品の添加不要）温度が使用された。温度応答性高分子は最もよく研究されている高分子のひとつであり、またたんぱく質複合体、薬物送達システム（DDS）、細胞工学及びデバイスなどの広い範囲に応用されている（非特許文献 10～15）。溶液の温度を上昇させることにより、これらの温度応答性高分子はその物理化学的性質を可逆的に変化させることができる。この変化が起こる温度は下限臨界溶液温度（Lower Critical Solution Temperature、LCST）として知られる。本願発明者は先に、2 または 3 種類の温度応答性ブロック共重合体を使用してミセルのシェル（多機能シェル）を作成することを提案した。これらのブロック共重合体は共通の LCST を有していて、LCST 以上ではナノ粒子の混合シェルを形成した。このシェルの性質はブロック共重合体の混合比によって正確に調節された（非特許文献 9）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、一般的な両親媒性ブロック共重合体では、集合体を調製する為に、有機溶媒の添加や透析が必要となる。また集合体の高い分散安定性のため、回収に時間がかかる。本願発明者らは、先に温度応答性高分子を用い、有機溶媒を用いずに水中での昇温にて、多機能性シェルを作成することに成功した（非特許文献 9）。またブロック共重合体は二段階の温度応答性を有する為、迅速な回収が可能となった。しかしながら、非特許文献 9 に示された方法では、集合体のコア部に対しての制御が不十分であった。従って、本発明の課題は、ブロック共重合体及び共重合体の混合物を用いることにより、集合体のコア部の機能性を制御することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の一側面によれば温度応答性の共重合体と、複数のブロックから構成されるとともに、前記複数のブロック中の一つのブロックは前記共重合体と同じ構造を有する温度応答性のブロック共重合体とを含むナノ粒子が与えられる。

ここで、前記一つのブロックを構成する複数のユニットと前記共重合体を構成する複数のユニットとは同じであるが前記一つのブロック内での前記複数のユニットの各々の繰り返し数と前記共重合体内での前記複数のユニットの各々の繰り返し数とが同じであるか異なっていてよい。

また、前記ナノ粒子は前記ブロック共重合体の昇温されたことによって疎水化された部分と昇温されたことによって疎水化された前記共重合体とを含むコア部位と、それ以外のシェル部位とから構成されてよい。

また、前記コア部位中に含まれる前記疎水化された前記共重合体の重量は前記ナノ粒子を構成する前記ブロック共重合体の重量以下であってよい。

また、前記ブロック共重合体は 2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート（ MEO_2MA と略記する）、オリゴ（エチレングリコール）メタクリレート（ OEGMA

と略記する)、6-アセチルチオヘキシルアクリレート (ATAと略記する) 及び2-(ジイソプロピルアミノ)エチルメタクリレート (DPと略記する)の4種類のモノマーが重合したものであって、 $P(MEO_2MA-co-OEGMA)$ なる構造を有する第1のブロック及び $P(MEO_2MA-co-OEGMA-co-ATA-co-DP)$ なる構造を有する第2のブロックとを有するブロック共重合体 $P(MEO_2MA-co-OEGMA)-b-P(MEO_2MA-co-OEGMA-co-ATA-co-DP)$ であり、前記共重合体は MEO_2MA 、 $OEGMA$ 、 ATA 及び DP の4種類のモノマーが重合したものであって、前記第2のブロックと同じ $P(MEO_2MA-co-OEGMA-co-ATA-co-DP)$ なる構造を有する共重合体であり、前記モノマーが前記ユニットに対応するものであってよい。

10

また、前記ブロック共重合体の前記第1のブロック中のモノマー MEO_2MA 及び $OEGMA$ の繰り返し数はそれぞれ48及び20であり、前記ブロック共重合体の前記第2のブロック中のモノマー MEO_2MA 、 $OEGMA$ 、 ATA 及び DP の繰り返し数はそれぞれ25、4、3及び4であって前記ブロック共重合体は $P(MEO_2MA_{48}-co-OEGMA_{20})-b-P(MEO_2MA_{25}-co-OEGMA_4-co-ATA_3-co-DP_4)$ と表され、前記共重合体中のモノマー MEO_2MA 、 $OEGMA$ 、 ATA 及び DP の繰り返し数はそれぞれ17、2、3及び2であるか、またはそれぞれ33、5、4及び5であって、前記共重合体は $P(MEO_2MA_{17}-co-OEGMA_2-co-ATA_3-co-DP_2)$ または $P(MEO_2MA_{33}-co-OEGMA_5-co-ATA_4-co-DP_5)$ と表されるものであってよい。

20

また、前記ブロック共重合体の末端に官能基を有してよい。

また、前記官能基に他の物質を結合させてよい。

また、前記他の物質はタンパク質、核酸、酵素、低分子、無機粒子及び量子ドットからなる群から選択されてよい。

また、前記他の物質はナノ粒子表面に配列してよい。

また、水中で前記共重合体及び前記ブロック共重合体中の前記第2のブロックの下限臨界溶液温度よりも低温にすることによって前記共重合体と前記ブロック共重合体とに分解してよい。

また、前記下限臨界溶液温度以上に昇温することによって再度形成されてよい。

また、前記コア部位がゲル化しており、その内部に他の物質を内包させてよい。

30

また、前記他の物質は医薬、酵素、タンパク質、核酸、無機粒子からなる群から選択されてよい。

本発明の他の側面によれば、温度応答性の共重合体と、複数のブロックから構成されるとともに、前記複数のブロック中の一つのブロックは前記共重合体と同じ構造を有する温度応答性のブロック共重合体とを含む水溶液を前記共重合体及び前記ブロック共重合体の前記一つのブロックの下限臨界溶液温度以上に昇温するナノ粒子の製造方法。

ここで、上に示す方法により製造された第1のナノ粒子と、上に示す請求項15の方法により製造され、前記第1のナノ粒子とは前記共重合体と前記ブロック共重合体との重量比が異なる第2のナノ粒子とを含む水溶液の温度を前記下限臨界溶液温度よりも低下させて、前記第1及び第2のナノ粒子を前記共重合体と前記ブロック共重合体とに分解し、前記分解後に前記水溶液の温度を前記下限臨界溶液温度以上に昇温させて前記重量比が前記第1及び第2のナノ粒子の何れとも異なる第3のナノ粒子を製造してよい。

40

また、前記水溶液は更に緩衝溶液を含んでよい。

また、前記ブロック共重合体の末端が官能基を有してよい。

【発明の効果】

【0006】

本発明はブロック共重合体と共重合体とを混合して昇温することによってナノ粒子を作製することにより、ナノ粒子の粒径、コア部(ナノ粒子はコア部とシェル部から成る)の機能性の制御、ナノ粒子の表面の性質をコントロールすることができる。また、温度応答性高分子を用いているため、一度形成したナノ粒子を温度を下げることで溶解させ、温度を

50

上げることで再びナノ粒子を構築させることができる。さらに、ここで使用するブロック共重合体は温度応答性であるLCSTを2つ有している（つまり、ブロック共重合体を構成する複数種類のブロックのLCSTは互いに異なっている）ので、集合体を迅速に回収することもできる。本願発明者等が先に非特許文献9で提案した多機能シェルと組み合わせれば、多様なニーズに対応してナノ粒子を調製することが可能となる。また、本発明のナノ粒子はそのコア部にナノ粒子の重量とほぼ同じ重量の疎水性の材料を取り込むことができるため、各種の物質のための効率の良いキャリアとしての応用も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】本発明の共重合体とブロック共重合体の集合による混合ナノ粒子の作製及びそのようにして作製された混合ナノ粒子の特徴を概念的に説明する図。 10

【図2】本発明の実施例で使用するブロック共重合体および共重合体の構造式を示す図。

【図3】温度制御された溶液により作製される混合ナノ粒子のためのP(MEO₂MA-co-OEGMA-co-ATA-co-DP)(4C)及びP(MEO₂MA-co-OEGMA-co-ATA-co-DP)(2Cb4C)の構造を示す図。

【図4】(A)40℃のpH7.4PBSに2Cb4C及び4C(短)を0.5wt%混合した溶液中の混合ナノ粒子の粒径/PDIと4C(短)の重量%との関係を示す図。(B)40℃のpH7.4PBSに2Cb4C及び4C(長)を0.5wt%混合した溶液中の混合ナノ粒子の粒径/PDIと4C(長)の重量%との関係を示す図。温度を15℃から40℃まで昇温した(10分毎に5℃昇温)。 20

【図5】溶液の温度を制御することによる混合ナノ粒子の再構築を説明する図。二種類の互いに異なるサイズのナノ粒子(サイズ/PDI/4C(長)量:74±30nm/0.16/50wt%及び33±8nm/0.08/0wt%)を40℃で混合した。4C(長)の総量は10wt%であった。

【図6】(A)pH7.4PBSに2Cb4C及び4C(長)を0.5wt%混合した溶液について温度に対する透過率変化を示す図。(B)2Cb4CとP(MEO₂MA₁₉-co-OEGMA₂)とからなる混合ナノ粒子の45℃におけるサイズ分布ヒストグラム(総濃度0.5wt%、混合比1:1)。(C)2Cb4Cと各種の組成、鎖長及びLCSTの共重合体との混合によるナノ粒子形成の可否を示す図表(○:作成できた、×:作成できなかった)。ここで、2Cb4Cと共重合体との混合はpH7.4のPBSで行い、混合比は1:1であった。 30

【図7】ブロック共重合体2Cb4Cからなるナノ粒子のAFM像。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明では、高分子ナノ粒子を構成する要素を二つに分けた。具体的には図1に示すように、共重合体(poly(A))及びブロック共重合体(poly(A)-b-poly(B))である。すなわち、共重合体(poly(A))はブロック共重合体(poly(A)-b-poly(B))を形成する複数のブロックのうちの一部のブロックと同じものを使用する(より正確には当該ブロックを構成する各ユニットの繰り返し数を除いては同じものを使用する。ユニット数に関しては一致しなくてもナノ粒子が形成される)。例えば図2にその構造を示すようなブロック共重合体および共重合体は、同温度(例えば35℃付近)にて集合を開始するように設計され、混合ナノ粒子を調製することができる。この温度は、組成により容易に制御することができる。また、混合ナノ粒子の溶液の温度をこれらの重合体が集合を開始する温度よりも下げることによって、混合ナノ粒子を構成していた共重合体とブロック共重合体との集合が解けて、溶解する。その後、新たにブロック共重合体を添加することで、粒径の異なる集合体、つまり混合ナノ粒子を図5に示すように再構築することができる。 40

【0009】

ブロック共重合体の末端に例えばカルボキシル基を設けておけば、集合化の際には、その表面にこれらのカルボキシル基が配列する。カルボキシル基とアミン基の反応を利用す 50

れば、分子や抗体等様々な材料とブロック共重合体を結合し、それらを混合ナノ粒子の表面に配置することができる。また、末端のカルボキシル基は、重合の際にR A F T剤を選択する事で、ノニオン性のものや、クリック反应用到に変換することも可能である。

【0010】

ブロック共重合体および共重合体の混合により、本発明の混合ナノ粒子の粒径や機能性等を精密にデザインすることが可能である。混合ナノ粒子の各種のパラメータは例えば以下のようにして制御することができる。このように比較的簡単に各種パラメータの調節が可能であるため、本発明を利用して、いくつかのブロック共重合体と共重合体を組み合わせた薬品セットを広範なナノ粒子作製用の標準キットとして提供することもできる。

【0011】

10

1. ブロック共重合体および共重合体の温度応答性について

本発明のナノ粒子の原料となる何れも温度応答性のブロック共重合体および共重合体はリビングラジカル重合により合成されるので、それらの鎖長、組成を正確に制御することができる。これにより、それぞれの高分子の構造や、温度応答性を自由に設計することが可能となる。

【0012】

2. 粒径の制御について

共重合体の混合により数nmオーダーでの粒径の調整が可能であるが、もっと大きいオーダー（数十nm）については、ブロック共重合体の鎖長を調整することで実現される。これにより、本発明の混合ナノ粒子の粒径は数十nm～数百nmの範囲で設計が可能となる。

20

【0013】

3. ブロック共重合体及び共重合体の構造／組成について

pH応答性や生分解性を共重合体へ組み込むことに成功したが、その他の刺激応答性（例えば、光応答性、分子応答性）を組み込むことで、非常に多様な複合ナノ粒子を作製できるようになる。これにより、これらのブロック共重合体及び共重合体を例えば上述したナノ粒子作成用のキットの選択肢として展開することが可能となる。

【0014】

4. ブロック共重合体の末端について

本発明で使用するブロック共重合体はR A F T（reversible addition-fragmentation chain transfer）重合により合成できるので、末端はR A F T剤に起因する。現在、複数のR A F T剤が購入可能であり、その末端はノニオン性、カチオン性、アニオン性、クリック反応基と様々である。これら市販のR A F T剤を用いるか、またはR A F T剤を合成するかにより、様々な種類の末端を持つブロック共重合体を合成し、上述したキットに含まれる材料の選択肢として提供することができる。

30

【0015】

5. ブロック共重合体の末端の反応性について

上記の様に、様々な末端をブロック共重合体に配置することができるため、本発明の混合ナノ粒子を各種の分子やタンパク質、核酸等と結合させることができる。また、これらの結合した材料は、混合ナノ粒子の表面に配列する。

40

【0016】

6. 混合集合体のコア部位の多様性について

本発明の混合ナノ粒子のコア部位はゲル化させることもできるため、その内部に薬物、酵素、タンパク質、核酸、無機粒子等を内包させることができる。このゲル化は、例えば共重合しているA T Aを脱保護し、露出したチオール(−SH)同士の架橋を利用して行う。また、ゲル化のための架橋密度や架橋量の調節により、内包量等を制御することができる。混合する材料の応答温度さえ近似していれば、異なる構造を有するブロック共重合体および共重合体でも、同一の粒子に組み込むことが可能となる。

【0017】

以下では、本発明を実施例に基づいてより詳細に説明する。

50

【実施例】

【0018】

本願では図3に示される共重合体及びブロック共重合体からなるナノ粒子の混合コアに着目した。ここで、コア部とは昇温により疎水化した部位のことである。このブロック共重合体は同じ重量の疎水性の共重合体（つまり、同じく昇温によって疎水化した共重合体）をコア部に取り込むことが可能であることが見出された。また、混合ナノ粒子の平均粒径はその混合比により5nmの範囲内に正確に制御できた（混合比範囲：10～50wt%；ここで「混合比」＝「共重合体重量」／（「共重合体重量」＋「ブロック共重合体重量」）。このナノ粒子の構造は溶液の温度を制御することによって再構築することが可能であって、当該微細構造は混合された共重合体の分子量及びLCSTに強く影響されることも見出された。この理解を用いて、混合される共重合体及びブロック共重合体を選択することによってこのナノ粒子を正確かつ簡単に設計することができる。ナノ粒子を設計後、共重合体をLCST未満の温度で水媒体に溶解させ、LCSTよりも高い温度にすることで、目的のナノ粒子が構築される。調節できる特性は、粒径、刺激応答性の数や種類、表面特性、架橋構造の形成制御、及び様々な材料のカプセル化に及ぶ。

【0019】

図3は共重合体（4C及び2Cb4C）のそれぞれの構造を示す。モノマーとして2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート（2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate、 MEO_2MA ）／オリゴ（エチレングリコール）メタクリレート（oligo(ethylene glycol) methacrylate、 OEGMA ）、6-アセチルチオヘキシルアクリレート（6-acetylthiohexyl acrylate、 ATA ）及び2-（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート（2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate、 DP ）を選択して、温度、生分解性及びpHへの応答性をそれぞれ制御した（ここで先頭の2つのモノマー、 MEO_2MA と OEGMA 、の間の区切りが「／」になっているのは、 MEO_2MA と OEGMA の2つによって温度応答性の制御を行っていて、これら2つの組み合わせの意味が他とは異なることを表すためである）。 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA})$ 及び $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA}-\text{co}-\text{ATA}-\text{co}-\text{DP})$ のLCSTをそれぞれ60℃及び35℃に調節した。これらのLCST間の関係との二元共重合体 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{X})$ の中のXの量（具体的にはXのmol%。別の形で表現すればXのユニット数）との組合せを使用することによって、複雑な組成（例えば、四元共重合体）の場合であってもLCSTを予測することが可能であった。4C及び2Cb4Cの特性の設計のため、各種の溶液（milliQ、pH7.4のPBS及びpH5.5の緩衝溶液）中で、 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{X})$ （ここで $\text{X}=\text{OEGMA}$ 、 ATA 及び DP ）のLCSTを測定した。

【0020】

チオール（SH）基同士による架橋（-S-S-）は、細胞中では還元性の環境のために壊すことが可能であるので（非特許文献16）、薬物キャリアとして使用されている。しかしながら、チオール基はラジカル・スカベンジャーとして機能するので、チオール基を有するモノマーをラジカル重合で直接重合することは困難である。そこで、チオール基を保護するとともに重合後は簡単に脱保護できることから（非特許文献17）、 ATA モノマーが選択された。実際、 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{ATA})$ 中の ATA の脱保護の効率は、還元剤の濃度及び反応時間により、36.7%から67.7%まで制御できる。生体材料中のpH応答性重合体として DP （ $\text{pK}_a=6.3$ ）が適用されている。プロトンスポンジ効果（非特許文献18）により、重合体の DP ユニットのカチオン電荷からエンドソーム脱出（endosome escape）が引き起こされる。これらの生体適合性、生分解性及びエンドソーム脱出は、薬物のキャリアに必要とされる能力のひとつである。本発明によれば、共通のLCSTを有するブロック共重合体および共重合体を混合するだけでコアの機能性を簡単に設計することができる。

【0021】

本発明で使用する共重合体の例として、四元共重合体 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-\text{OEGMA}-\text{co}-\text{ATA}-\text{co}-\text{DP})$ （4C）とブロック共重合体 $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{co}-$

—OEGMA)—b—P(MEO₂MA—co—OEGMA—co—ATA—co—DP)
(2Cb4C)とを準備した。このブロック共重合体は同一の4Cブロックを共通の温度応答性ブロック(LCST: pH7.4のPBS中で35℃)(図3)として有している。2Cb4Cの方は、重合体鎖の端にカルボキシル基を有していて、これらのカルボキシル基は、自己組織化後はナノ粒子上に位置する。その位置は、溶液特性に強く影響し(非特許文献19)、またカルボキシル基は、低分子、酵素、たんぱく質、核酸及び無機材料との反応サイトのために使用される。重要なことに、カルボキシル基はRAFT剤に由来し、様々な官能基(非イオン性、スクシンイミド、アジド基等)を有するRAFT剤が購入あるいは合成可能である。もちろん、反応点としてジチオエステルの末端基も使用することができる(非特許文献20、21)。

10

【0022】

図4はPBS中における40℃での2Cb4C並びに4C(短)あるいは4C(長)からなる混合ナノ粒子の粒径及びPDI(多分散度指数(polydispersity index))を示す。2Cb4Cのナノ粒子の粒径は 33 ± 8 nmであった(PDI: 0.079)(AFMから、2Cb4Cのナノ粒子は球状であることも確認された(図7))。一方、図4(A)に示すように、4C(短)共重合体の混合量を増やしていくにつれて、混合ナノ粒子の粒径はPDIが0.1未満と狭い分布のままで少し大きくなった。混合ナノ粒子(4C(短)の量が50wt%)において、ブロック共重合体は、同程度の質量の共重合体を内包することができたことは注目すべきことであった。これは、2Cb4Cは、その4Cコア中に340%([コア中に取り込まれた共重合体4Cの重量]/[コア中のブロック共重合体の4Cの部分の重量]×100)もの重量の4C(短)を取り込むことができることを意味している。温度を20℃から40℃へ直接上げたときには、粒径と共重合体の内包量との関係は温度をゆっくり上げた場合と同様であった。この驚くほど高いカプセル化率及び安定性は表面上のカルボキシル基も関係していると考えられる。このカルボキシル基はRAFT剤に由来し、その官能基は分子、ペプチド、抗体、タンパク質、核酸及び無機粒子のような材料との反応サイトとしても使用される。

20

【0023】

混合ナノ粒子の粒径は4C(短)の混合比により5nmの範囲に正確に制御された。混合量が70wt%を上回ると、凝集または沈殿が観測された。また、FRET(fluorescence resonance energy transfer、蛍光共鳴エネルギー移動)現象(非特許文献22、23)を用いることで、ナノ粒子の混合コアは共重合体(ピレン単位(pyrene unit)を有する)及びブロック共重合体(クマリン343単位を有する)からなることが示された。混合ナノ粒子が形成された後、高強度のFRETが観察された。図4(B)は2Cb4Cと4C(長)との間の混合ナノ粒子の粒径を示す。粒径は、同量の4C(短)の場合と比べて僅かに大きくなった。興味深いことに、50wt%の混合量でPDIが0.1より大きくなり、粒径が大きく増加した。これらの結果は、分子量の小さな共重合体はブロック共重合体のコア中への混合に有利であることを示唆している。

30

【0024】

以下の表1に、上で形成した混合ナノ粒子の成分(表1の上からそれぞれ2C、2Cb4C、4C(長)及び4C(短))の組成、分子量、分子量分布をまとめたものを示す。

40

【0025】

【表 1】

	P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ブロック ^{a)}		P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA-co-ATA-co-IP)ブロック ^{b)}								M _w /M _n ^{c)} (-)
	原料中		重合体中		共重合体中						
	OEGMA (mol%)	OEGMA (mol%)	OEGMA (mol%)	ATA (mol%)	OEGMA (mol%)	ATA (mol%)	PD (mol%)	ATA (mol%)	PD (mol%)		
モノマー ^{a)}											
P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ₃	30	29.7									1.16
P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ₃ - b-P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ₃ - co-ATA-co-IP)	30	29.7									1.31
P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ₃ - co-ATA-co-IP)	-	-									1.36
P(OEGMA ₁₈ -co-OEGMA) ₃ - co-ATA-co-IP)	-	-									1.35

a) モノマー^{a)}はGPC及び¹H NMRによって計測した。
b) ブロック共重合体及び重合体中のmol%は¹H NMRによって決定した。
c) 1.0 mM LiBr DMF を使用してGPCによって決定した。

【0026】

温度応答性重合体であるために、混合ナノ粒子は溶液の温度を制御するだけで簡単に再構築できる。これに対して、通常の自己組織化ナノ粒子の再構築には、有機溶液を使用したり化学薬品を添加したりする必要がある。図5は異なるサイズを有するナノ粒子の混合物を示す(サイズ/PDI/4C(長)量:図4(B)に示す74±30nm/0.16/50wt%、及び33±8nm/0.08/0wt%)。なお、4C(長)量が0wt%の場合は2Cb4Cのみのナノ粒子となって図4(A)と図4(B)とで同じものとなるので、図4(B)側では省略した)。混合物全体の4C(長)の合計量は、10wt%である。最初、40℃で両者を混合した直後は、二つのピークが観測された。ナノ粒子入り溶液の温度を4℃まで下げたところ、ピークは全く観測されなくなった。続いて、溶液の温度を40℃まで上昇させることにより、狭いPDIを有するナノ粒子(粒径34±7nm、PDI0.07)が再構築されることが見出された。この観測されたサイズ及びPDIは図4(B)に示す10wt%の4C(長)を含む混合ナノ粒子のそれと一致した。

【0027】

上述したナノ粒子の混合コアは4C及び同じ組成(つまりMEO₂MA、OEGMA、ATA及びDP)の2Cb4Cからなっていた。その結果から、共重合体と別の組成及びLCSTを有するブロック共重合体とを混合できるか否かという問題が導かれる。非特許文献24によれば、静電的相互作用によって形成されたポリイオンミセル(polyion complex micelle)は混合されたブロック共重合体の鎖長を認識できる。本願の場合、図4に示すように、鎖長だけではなくLCSTが、粒子構造にとって重要なファクターとなる。従って、別の鎖長及びLCSTを有するいくつかの種類の共重合体について、それらが本発明のナノ粒子を形成するのに適合するか否かを調べた。図6(A)は各種の混合比で2Cb4Cと4C(長)とを混合したものの温度に対する透過率変化を示す。4C(長)による透過率の減少は、2Cb4C量を減少させるにつれて次第に強くなった。52℃付近のもう一つの透過率の減少は2Cブロックの脱水によるものであった。2Cb4Cを混合することによる、共重合体4Cの脱水和に起因する透過度の減少が弱くなることは、形成された集合体による光の散乱が弱いことを意味し、ナノ粒子が形成されていることを示唆

10

20

30

40

50

する。2 C b 4 C の繰り返しユニット及び L C S T はそれぞれ 68 / 36 (ユニット) 及び 60 / 35 (°C) であった。鎖長が長く (70 ユニット) かつ類似の L C S T (35 °C) を有する共重合体は、2 C b 4 C と混合したことで凝集及び沈殿を示した (混合比 1 : 1)。興味深いことには、図 6 (C) に示すように、鎖長が短く (21 ユニット) かつ L C S T が 42 °C と高い共重合体は 2 C b 4 C と混合ナノ粒子を形成した (35 ± 7 nm、P D I 0.078)。この共重合体と 2 C b 4 C 中の 4 C ブロックとの間には L C S T に 7 °C の差がある。温度応答性重合体の脱水は連続的な挙動であり、L C S T よりも低温でもナノスケールの脱水を示すことが知られている (非特許文献 25)。弱い相互作用及び短い鎖長によって高度な組織化構造がもたらされるかもしれない。2 C b 4 C と 43 °C 付近の L C S T 及び長い鎖長 (86 ユニット) を有する共重合体との混合物は溶液の温度を上げていくにつれて凝集 / 沈殿を示した。これらの結果から、ブロック共重合体はそれと混合される共重合体の鎖長及び L C S T を認識する可能性があることが示唆される (図 5)。実際、互いの L C S T に 7 度の差があっても混合ナノ粒子を形成できる場合もある。混合ナノ粒子の形成には L C S T と共重合体の鎖長が関係している。図 6 (C) からわかるように、同じ L C S T を有しても、鎖長 (共重合体の長さ) が長いと、うまく混合できなかった。その上、疎水性もまた高度なナノ粒子を形成するのに重要な役割を演じていると予想される。同じ L C S T を有する共重合体同士はそれらの構造のために互いに異なる疎水性を有する (非特許文献 26、27)。

【0028】

結論として、別々の温度応答性共重合体及びブロック共重合体から構成された混合コアを有するナノ粒子を作製することができた。このブロック共重合体はその L C S T 以上に昇温されることによって疎水化した共重合体をコア中に自重と同程度取り込むことができ、また混合ナノ粒子の粒径は混合される共重合体の比率により 5 nm の範囲に正確に制御される。その組み立てられた構造は溶液の温度を制御することによって再構築することができ、また当該構造は混合される共重合体の鎖長及び L C S T により強く影響されるものであった。

【産業上の利用可能性】

【0029】

以上詳細に説明したように、本発明によれば、広い範囲の調節可能な特性を有する高分子ナノ粒子を簡単に作製することができ、またこれに限定する意図はないが、生体内部への薬剤送達等の生体関係の応用が大いに期待できる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0030】

【非特許文献 1】Cohen Stuart, M. A.; Huck, W. T. S.; Genzer, J.; Mueller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S. Nat. Mater. 2010, 9, 101-113.

【非特許文献 2】Hoffman, A. S. Adv. Drug Deliver. Rev. 2013, 65, 10-16.

【非特許文献 3】Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. Chem. Rev. 2001, 101, 3689-3745.

【非特許文献 4】Braunecker W. A.; Matyjaszewski, K. Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 93-146.

【非特許文献 5】Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Polymer 2008, 49, 1079-1131.

【非特許文献 6】Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004-2021.

【非特許文献 7】Palyulin V. V.; Potemkin I. I. Macromolecules 2008, 41, 4459-4463.

【非特許文献 8】Kim, S. H.; Tan, J. P. K.; Nederberg, F.; Fukushima, K.; Yang, Y. Y.; Waymouth, R. M.; Hedrick J. L. Macromolecules 2009, 42, 25-29.

【非特許文献 9】Kotsuchibashi, Y.; Ebara, M.; Idota, N.; Narain, R.; Aoyagi, T. *Polym. Chem.* 2012, 3, 1150-1157.

【非特許文献 10】Wei, H.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. *Prog. Polym. Sci.* 2009, 34, 893-910.

【非特許文献 11】Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 37, 686-714.

【非特許文献 12】Stayton, P. S.; Shimoboji, T.; Long, C.; Chilkoti A.; Chen, G.; Harris, J. M.; Hoffman, A. S. *Nature* 1995, 30, 472-474.

【非特許文献 13】Mackenzie, K. J.; Francis, M. B. J. *Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 293-300.

10

【非特許文献 14】Sekine, H.; Shimizu, T.; Sakaguchi, K.; Dobashi, I.; Wada, M.; Yamato, M.; Kobayashi, E.; Umezumi, M.; Okano, T. *Nat. Commun.* 2013, 4, 1399.

【非特許文献 15】Okabe, K.; Inada, N.; Gota, C.; Harada, Y.; Funatsu, T.; Uchiyama, S. *Nat. Commun.* 2012, 3, 705.

【非特許文献 16】Miyata, K.; Kakizawa, Y.; Nishiyama, N.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Koyama, H.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 2355-2361.

【非特許文献 17】Hrsic, E.; Zografou, I.; Schulte, B.; Pich, A.; Keul, H.; Moeller, M. *Polymer*, 2013, 54, 495-504.

【非特許文献 18】Yu, H.; Zou, Y.; Wang, Y.; Huang, X.; Huang, G.; Sumer, B. D.; Boothman, D. A.; Gao, J. *ACS Nano* 2011, 5, 9246-9255.

20

【非特許文献 19】Kotsuchibashi, Y.; Narain, R. *Polym. Chem.* 2014, 5, 3061-3070.

【非特許文献 20】Keddie, D. J.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* 2012, 45, 5321-5342.

【非特許文献 21】Willcock, H.; O'Reilly, R. K. *Polym. Chem.* 2010, 1, 149-157.

【非特許文献 22】Hong, S. W.; Kim, K. H.; Huh, J.; Ahn, C.-H.; Jo W. H. *Chem. Mater.* 2005, 17, 6213-6215.

【非特許文献 23】Li, C.; Liu, S. *Chem. Commun.* 2012, 48, 3262-3278.

【非特許文献 24】Harada, A.; Kataoka, K. *Science* 1999, 283, 65-67.

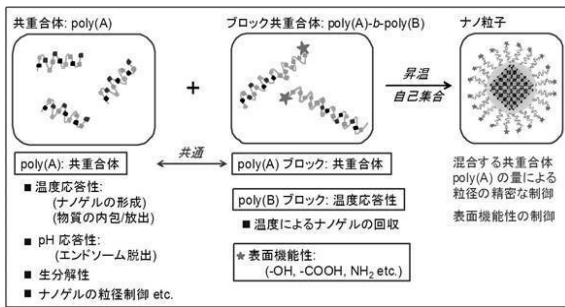
【非特許文献 25】Motokawa, R.; Morishita, K. Koizumi, S.; Nakahira, T.; Annaka, M. *Macromolecules* 2005, 38, 5748-5760.

30

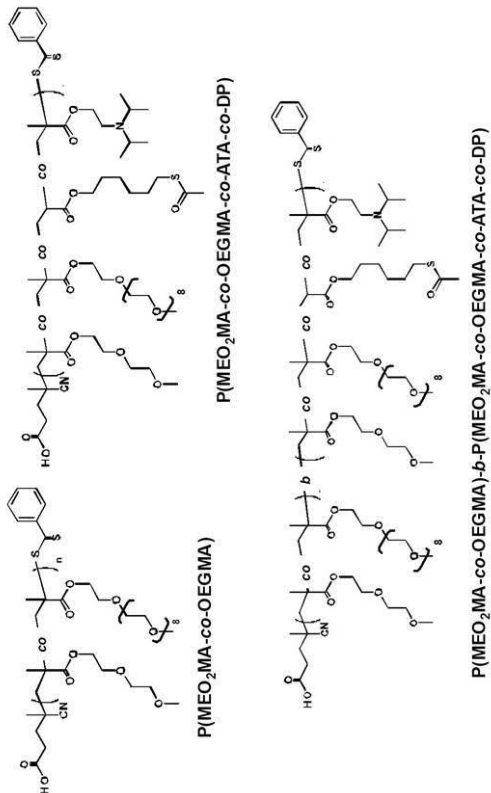
【非特許文献 26】Lutz, J.-F.; Akdemir, O.; Hoth, A. J. *Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 13046-13047.

【非特許文献 27】Sugihara, S.; Yamashita, K.; Matsuzuka, K.; Ikeda, I.; Maeda, Y. *Macromolecules* 2012, 45, 794-804.

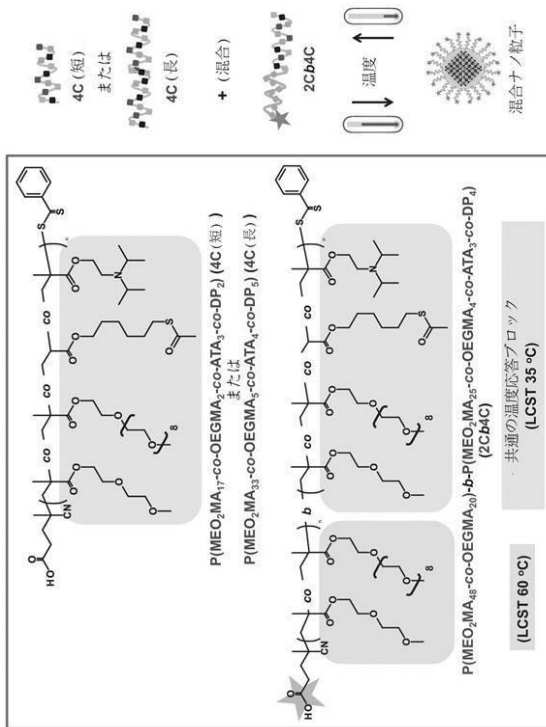
【図 1】



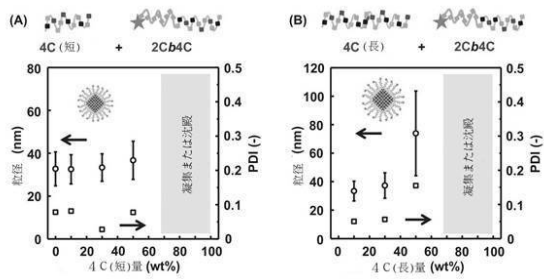
【図 2】



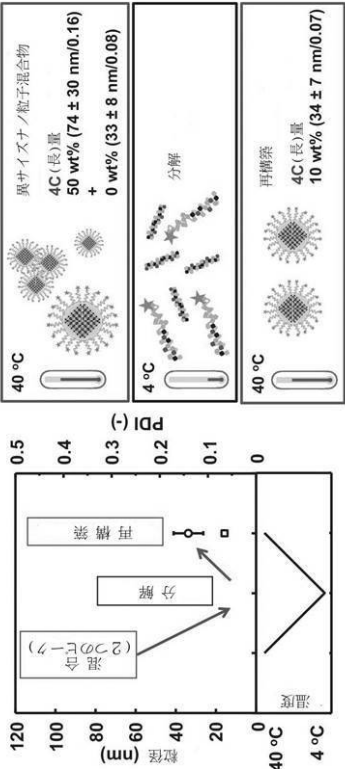
【図 3】



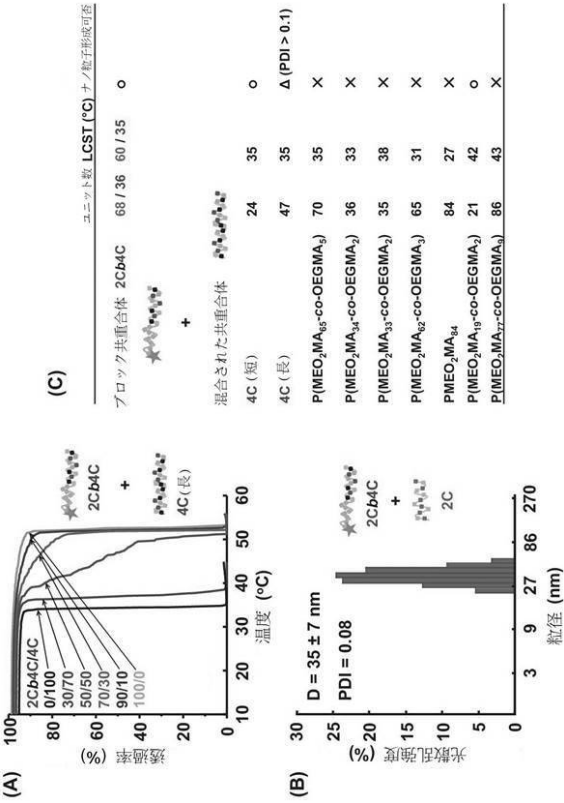
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

