明　細　書

発明の名称 ： ポリマーミセル医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ポリマーミセル医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 従来、種々のドラッグデリバリーシステム（ＤＤＳ）の開発が進められてきた。例えば、親水性セグメントと疎水性セグメントを有するブロックコポリマーを利用したポリマーミセル製剤が開発されている（例えば、特許文献１および特許文献２）。これら従来型のポリマーミセル製剤技術は、薬物の副作用を低減させつつも薬効を高めることに大いに寄与するものの、それらをより高次に両立させる観点からはさらに改善の余地がある。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第２００９／１４２３２６号パンフレット

特許文献2：国際公開第２０１０／０１３８３６号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の目的は、高い薬理作用を発揮しつつ、副作用の少ないポリマーミセル医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0005] 血中でのミセル粒子構造のより長期的な維持を指向する従来型のポリマーミセル技術分野では、ブロックコポリマー間の疎水性相互作用を強固に発揮させる観点から、ポリマーの疎水性セグメント部分の疎水性度をできる限り高く設定しようとする材料選択思想がある。例えば、ベンジル基のような疎水性構造でポリアミノ酸セグメント側鎖を埋め尽くしたブロックコポリマー（ベンジル基導入率１００％）を、ミセル構成材料として積極的に利用しようとする技術指向がある。当該指向は、ミセル構成材料として薬物非結合型

ブロックコポリマーを選択する場合に特に顕著になる。

[0006] 本発明者は、こうした従来型の材料選択思想に反して、疎水性相互作用に基づくミセル粒子構造の強固な維持への寄与が弱まるようなブロックコポリマー（いわば第三世界的なブロックコポリマー：第三のポリマー）を敢えてミセル構成材料の一部として適用すると、ポリマーミセル技術による薬物副作用抑制効果を発揮させつつも、デリバリー対象薬物による薬理作用を大幅に向上させ得ることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明によれば、

親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有するブロックコポリマーユニットαと、親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有するブロックコポリマーユニットβとを含むポリマーミセル医薬組成物であって、

該ブロックコポリマーユニットαおよび該ブロックコポリマーユニットβが、該親水性ポリマー鎖セグメントを外側に向けるとともに該疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けた状態で放射状に配列しており、

該ブロックコポリマーユニットαの該疎水性ポリマー鎖セグメントが側鎖を有する繰り返し単位で構成されており、該側鎖の少なくとも１つが親水性基を有する、ポリマーミセル医薬組成物が提供される。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、薬物による薬理作用の増強と副作用の抑制との両立がさらに顕著になるポリマーミセル医薬組成物が提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の１つの実施形態によるポリマーミセル医薬組成物の概略図である。

[図2]試験例１～６におけるミセル製剤の細胞への取り込み試験の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] ［１．ポリマーミセル医薬組成物］

本発明の１つの実施形態によるポリマーミセル医薬組成物について以下に述べる。上記ポリマーミセル医薬組成物は、ブロックコポリマーユニットα（ポリマーユニットα）とブロックコポリマーユニットβ（ポリマーユニットβ）とを含有する。ポリマーユニットαは、親水性ポリマー鎖セグメント１１と疎水性ポリマー鎖セグメント１２とを有する。ポリマーユニットβは、親水性ポリマー鎖セグメント２１と疎水性ポリマー鎖セグメント２２とを有する。ポリマーユニットαおよびポリマーユニットβは、それぞれ疎水性ポリマー鎖セグメント１２および２２を内側に向けるとともに、それぞれ親水性ポリマー鎖セグメント１１および２１を外側に向けた状態で放射状に配列している。ポリマーユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメント１２は側鎖を有する繰り返し単位で構成されている。上記側鎖の少なくとも１つは親水性基を有する。ポリマーユニットαおよびポリマーユニットβの親水性ポリマー鎖セグメントは代表的にはポリエチレングリコール鎖である。ポリマーユニットαおよびポリマーユニットβの疎水性ポリマー鎖セグメントは代表的にはポリアミノ酸鎖である。なお、以下、ブロックコポリマーユニットαを骨格ポリマーユニットα、ブロックコポリマーユニットβを骨格ポリマーユニットβと称する場合がある。さらに、本明細書における親水性基としては、任意の適切な親水性基を採用し得る。上記親水性基としては、例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、およびアミノ基が挙げられる。

[0011] 本明細書において、ブロックコポリマーユニットが放射状に配列しているとは、ブロックコポリマーユニットが疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けるとともに、親水性ポリマー鎖セグメントを外側に向けて凝集した状態にあればよく、各ブロックコポリマーユニットの配列の起点が一点に集中していない、やや崩れた放射状の配列構造を有するミセルであっても構わない。ポリマーミセル医薬組成物は、ブロックコポリマーユニットによる高分子凝集体が乾燥状態にあるものであっても構わない。

[0012] 上記ポリマーミセル医薬組成物によれば、従来型のポリマーミセル製剤に比べて治療係数を大幅に改善し得る。このような効果が得られるメカニズム

は定かではないが、以下のように推測される。まず、ポリマーミセルには、その粒子サイズに起因したＥＰＲ効果により、標的細胞周辺に滞留しやすい性質がある。そして、本発明によるポリマーミセル医薬組成物では、骨格ポリマーユニットαが、その疎水性セグメント部分の親水性度合いに起因して、ミセルから先行脱離しやすいと考えられる。標的細胞周辺に滞留したミセルからユニットαが離脱すると、ユニットαの疎水性セグメント部分の疎水性基によって、滞留ミセル近傍にある標的細胞の細胞膜が刺激されやすくなり、当該細胞のエンドサイトーシスが活発化することになる。その結果、デリバリー対象薬物を含めたポリマーミセル医薬組成物の標的細胞への到達性が向上し、当該薬物による薬理作用がより効率的に発揮されると考えられる。

[0013] ポリマーミセル医薬組成物１００は、標的結合部位３３が結合した親水性ポリマー鎖セグメント３１と、疎水性ポリマー鎖セグメント３２とを有するブロックコポリマーユニットγ（以下、骨格ポリマーユニットγと称する場合がある。）をさらに含んでいてもよい。骨格ポリマーユニットγは、親水性ポリマー鎖セグメント３１を外側に向けるとともに疎水性ポリマー鎖セグメント３２を内側に向けた状態で骨格ポリマーユニットαおよびβとともに放射状に配列し得る。

[0014] 本明細書において、標的結合部位とは、生体およびウイルスに由来する物質に対し特異的に結合して当該物質と生物学的な結合対を形成し得る、生物学的な認識機能を有する部位を意味する。生体およびウイルスに由来する物質としては、生体細胞、細菌、真菌、およびウイルスに存在する分子が例示できる。生体細胞としては、例えば、腫瘍細胞、新生血管細胞、およびそれらの周辺細胞；免疫担当細胞（例えばＢ細胞）；炎症細胞（例えば白血球）；血管内皮細胞；各種臓器を構成する細胞；等が例示できる。標的結合部位は、こうした物質と結合対を形成するタンパク質、ペプチドおよび糖鎖といった化合物をその構造の少なくとも一部として含有した状態で構成されていてもよい。

[0015] ポリマーミセル医薬組成物における薬物の含有の態様としては、例えばミセルに内包されている態様、また例えばミセル表面に担持されている態様が挙げられる。薬物は、代表的にはブロックコポリマーユニットに結合しているが、本発明の目的に悪影響を及ぼさない限り、ブロックコポリマーユニットに結合していなくてもよい。上記ブロックコポリマーユニットへの薬物の結合部位は、ミセルに内包させる場合は疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖および／または内側突出末端とし、ミセル表面に担持させる場合は親水性ポリマー鎖セグメントの外側突出末端とすればよい。薬物をミセルに内包させる場合、代表的には、疎水性ポリマー鎖セグメントを構成する繰り返し単位の側鎖に薬物を結合する。図示例では、薬物２３は骨格ポリマーユニットβの疎水性ポリマー鎖セグメント２２に結合している。上記薬物の具体例などについては後述する。なお、本発明によるポリマーミセル医薬組成物は代表的には薬物を含有するが、薬物を含有しない状態も排除しない。例えば、本発明によるポリマーミセル医薬組成物は、標的結合部位を含有する一方で薬物を含有しない状態にあってもよい。

[0016] ポリマーミセル医薬組成物は、標的結合部位を含有しない状態にあってもよいが、本発明による効果をより高次に発揮させる観点からは、標的結合部位を含有した状態にあることが望ましい。ＥＰＲ効果によって標的細胞周辺に滞留するポリマーミセルを、当該標的細胞に向けてさらに局所的に集積させやすくなるためである。本発明によるポリマーミセル医薬組成物によれば、後述する試験例にも示すように、標的結合部位としての化合物による標的細胞への本来の到達能力（例えば、抗体による細胞膜内への内在化能）を超えて、デリバリー対象薬物を標的細胞に到達させ得る。図１は、ポリマーミセル医薬組成物１００表面に標的結合部位３３が結合した態様を例示する。標的結合部位３３は、骨格ポリマーユニットγの親水性ポリマー鎖セグメント３１に結合している。なお、本発明によるポリマーミセル医薬組成物は、標的結合部位が骨格ポリマーユニットγ以外のブロックコポリマーユニットにも結合した状態も排除しない。

[0017] ポリマーミセル医薬組成物における骨格ポリマーユニットαの含有量は、例えば１５重量％以上であり、また例えば２０重量％以上であり、また例えば３５重量％以上である。後述する実施例および試験例に示すように、当該ユニットαをポリマーミセル医薬組成物に所定量以上含有させることによって、標的細胞へのポリマーミセル医薬組成物の到達性をより確実に向上させ、デリバリー対象薬物による薬理作用を大幅に増強させ得る。当該ユニットαの含有量の上限は、特に制限されないが、ポリマーミセル医薬組成物の過剰な崩壊を防止する観点から、より具体的にはポリマーミセル医薬組成物による副作用防止作用を発揮させつつも血中における標的細胞の近傍到達までのミセル構造の保持性を担保する観点からは、例えば８０重量％、また例えば６０重量％、また例えば５０重量％、また例えば４５重量％、に設定するとよい。

[0018] ポリマーミセル医薬組成物における骨格ポリマーユニットβの含有量は、例えば８０重量％以下であり、また例えば７０重量％以下であり、また例えば６０重量％以下である。当該ユニットβの含有量の下限は、特に制限されないが、ポリマーミセル医薬組成物におけるデリバリー対象薬物の搭載率を低下させ過ぎない観点からは、例えば１５重量％、また例えば２５重量％、また例えば４０質量％、に設定するとよい。骨格ポリマーユニットγをポリマーミセル医薬組成物に含有させる場合、その含有量としては、（１）下限として例えば１重量％、また例えば３重量％、また例えば５重量％、また例えば１０重量％、（２）上限として例えば２０重量％、また例えば１５重量％、に設定できる。

[0019] 上記ポリマーミセル医薬組成物では、骨格ポリマーユニットαと骨格ポリマーユニットβとは任意の適切な比率で存在し得るが、モル比（前者：後者）で、例えば１：２０～２０：１の範囲、好ましくは１：１０～１０：１の範囲、より好ましくは１：５～５：１の範囲、さらに好ましくは１：２～２：１の範囲で存在し得る。

[0020] 骨格ポリマーユニットαおよび骨格ポリマーユニットβと、その他の骨格

ポリマーユニット（例えば、骨格ポリマーユニットγ、および骨格ポリマーユニットα、βおよびγの何れでもない骨格ポリマーユニット）とは任意の適切な比率で存在し得るが、モル比（骨格ポリマーユニットαおよびβの合計モル量：その他の骨格ポリマーユニットの合計モル量）で、例えば１００：０～１００：３００の範囲、好ましくは１００：１～１００：１００の範囲、より好ましくは１００：２～１００：５０の範囲で存在し得る。

[0021] ポリマーミセル医薬組成物１００は、上記の各ブロックコポリマーユニットを２種類以上有していてもよい。

[0022] ［２．骨格ポリマーユニットα］

骨格ポリマーユニットαは、親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有する。

[0023] 骨格ポリマーユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメントは、側鎖を有する繰り返し単位で構成されている。上記側鎖の少なくとも１つは親水性基を有する。骨格ポリマーユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖のうち、親水性基を有する側鎖の割合は、例えば２０％以上であり、また例えば３５％以上である。後述する実施例および試験例に示すように、当該親水性基を有する側鎖の割合を所定量以上に制御することによって、標的細胞へのポリマーミセル医薬組成物の到達性をより確実に向上させ、デリバリー対象薬物による薬理作用を大幅に増強させ得る。当該親水性基を有する側鎖の割合の上限は、特に制限されないが、ポリマーミセル医薬組成物の過剰な崩壊を防止する観点からは、例えば８０％、また例えば６０％、また例えば５０％、に設定するとよい。

[0024] ポリマーミセル医薬組成物における骨格ポリマーユニットαの含有量および疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖のうち親水性基を有する側鎖の割合を上記の範囲に制御することによって、標的細胞へのポリマーミセル医薬組成物の到達性をより確実に向上させ得るメカニズムは定かではないが、例えば次のように推測される。上述のように、骨格ポリマーユニットαは、その疎水性セグメント部分の親水性度合いに起因して、ミセルから先行脱離しやす

いと考えられる。ユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖のうち親水性基を有する側鎖の割合を上記の範囲に制御すると、個別のユニットαのミセルからの先行脱離をより確実に誘導できると考えられる。そして、ミセルにおけるユニットαの含有量を上記の範囲に制御すると、標的細胞のエンドサイトーシスを高次に活性化できる量のユニットαをミセルからより確実に先行脱離させられると考えられる。その結果、デリバリー対象薬物を含めたポリマーミセル医薬組成物の標的細胞への到達性が向上することとなる。なお、ポリマーミセル技術分野の当業者であれば、仮にミセルの機能改善を図るために薬物非結合型ブロックコポリマーをミセル構成材料として追加することを想起したとしても、ミセルあたりの薬物搭載率を高く維持する観点から、通常は１０質量％以下程度の添加割合に留めることを指向する。ここで、後述する試験例に示すように、１０質量％の骨格ポリマーユニットαの添加では、当該ユニットαを添加しない場合に比べて標的細胞への到達性が却って低下してしまうことがある。このため、通常の技術指向性であれば当該ユニットαの添加割合をさらに高めようとはしない一方で、本発明者は、敢えてユニットαの添加割合をさらに増加させるとポリマーミセル医薬組成物の標的細胞への到達性がより確実に向上するという、予測困難な機能改善手段を見出した。

[0025] ポリマーミセル医薬組成物１００において、骨格ポリマーユニットαは、任意の適切な状態で放射状に配列し得る。骨格ポリマーユニットαは、例えば、親水性ポリマー鎖セグメント１１を外側に向けるとともに疎水性ポリマー鎖セグメント１２を内側に向けた状態で放射状に配列し得る。

[0026] 骨格ポリマーユニットαは、骨格ポリマーユニットβよりも低い疎水性を有することが望ましい。当該低い疎水性は、上記疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖が有する親水性基に起因するものであり得る。

[0027] 骨格ポリマーユニットβの疎水性ポリマー鎖セグメントが側鎖を有する繰り返し単位で構成されている場合、骨格ポリマーユニットαにおける疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖は、骨格ポリマーユニットβにおける疎水性ポ

リマー鎖セグメントの側鎖よりも数が多い親水性基を有し得る。

[0028] 骨格ポリマーユニットαは、代表的には標的結合部位も薬物も含有しないが、標的結合部位および／または薬物を含有した状態にあることを排除しない。

[0029] 骨格ポリマーユニットαは、一般式：A_1－B_1で表示される、ブロック共重合体であってよい。A_1はポリエチレングリコール鎖セグメントであり、B_1は側鎖の少なくとも１つが親水性基を有するポリアミノ酸鎖セグメントであり、代表的には、側鎖に疎水性基を有するアミノ酸残基と、側鎖に親水性基を有するアミノ酸残基とを含む。なお、以降、ポリエチレングリコールをＰＥＧと表示する場合がある。

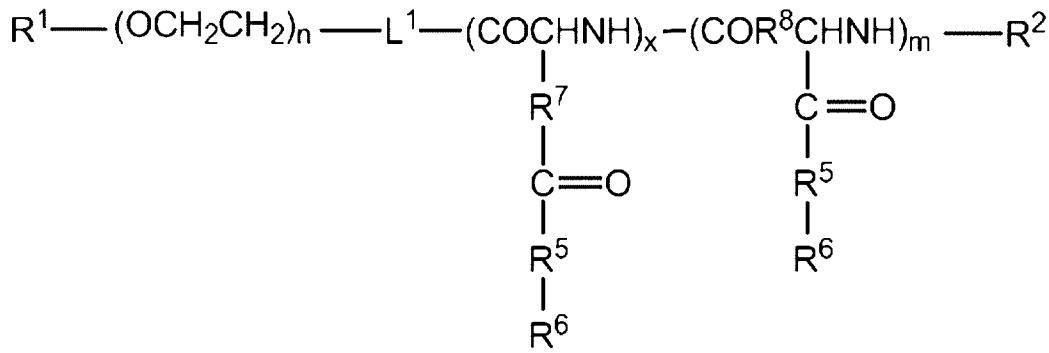
[0030] 骨格ポリマーユニットαの疎水性基と親水性基とを有するポリアミノ酸鎖セグメントとしては、ポリグルタミン酸またはそのエステルもしくはアミド誘導体、およびポリアスパラギン酸またはそのエステルもしくはアミド誘導体を例示できる。こうしたエステル又はアミド誘導体は、上記疎水性基と親水性基とを有する対応するヒドロキシ化合物またはアミノ化合物と、ポリグルタミン酸またはポリアスパラギン酸の反応性誘導体（例えばエステル）とを反応させることにより形成できる。

[0031] 上記疎水性基としては、例えば、疎水性有機基が挙げられる。上記疎水性有機基としては、例えば、C_4～C_{16}の直鎖、分岐鎖または環状構造を有するアルキル基、C_6～C_{20}のアリール基、およびC_7～C_{20}のアラルキル基またはステロール残基が挙げられる。上記C_6～C_{20}のアリール基およびC_7～C_{20}のアラルキル基としては、好ましくはフェニル基、ナフチル基、トリル基、キシリル基、ベンジル基、およびフェネチル基、さらに好ましくはベンジル基が挙げられる。また、上記ステロール残基が由来するステロールは、好ましくはコレステロール、コレスタノール、およびジヒドロキシコレステロールであり、より好ましくはコレステロールである。

[0032] 骨格ポリマーユニットαの好ましい具体例は、以下の一般式（Ｉ）および（ＩＩ）で表され得る。本発明のポリマーミセル医薬組成物は、２種類以上

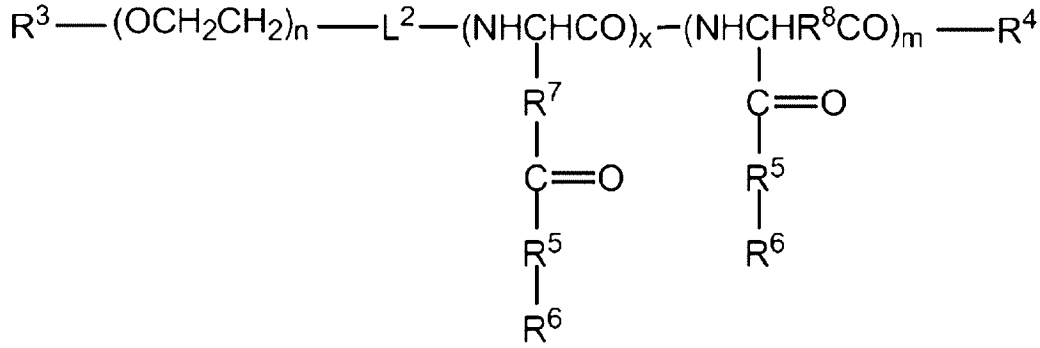
の骨格ポリマーユニットαを含有していてもよい。

[化1]



(I)

[化2]



(II)

上記各式中、R^1およびR^3は、それぞれ独立して、水素原子または保護されていてもよい官能基で置換されたもしくは未置換の低級アルキル基を表し；

R^2は水素原子、飽和もしくは不飽和のC_1～C_{29}脂肪族カルボニル基またはアリールカルボニル基を表し；

R^4は水酸基、飽和もしくは不飽和のC_1～C_{30}脂肪族オキシ基またはアリール－低級アルキルオキシ基を表し；

R^5は－Ｏ－または－ＮＨ－を表し；

R^6は、総数（ｍ+ｘ）の１０％～９０％が水素原子であり、その残りが疎水性有機基であり；

R^7およびR^8は、それぞれ独立して、メチレン基またはエチレン基を表し；

ｎは１０～２５００の整数であり；

ｘは１０～３００となる整数であり；

ｍは０～３００となる整数であり（但し、ｍが１以上である場合、繰り返し

数がｘである繰り返し単位と繰り返し数がｍである繰り返し単位との結合順は任意であり、R^6は１つのブロックコポリマー内の各繰り返し単位において各々独立に選択される）；

L^1は－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｏ－Ｚ－ＮＨ－、－ＣＯ－、－CH_2－、－Ｏ－Ｚ－Ｓ－Ｚ－および－ＯＣＯ－Ｚ－ＮＨ－（ここで、Ｚは独立してC_1～C_6アルキレン基である。）からなる群より選ばれる連結基を表し；

L^2が－ＯＣＯ－Ｚ－ＣＯ－および－ＮＨＣＯ－Ｚ－ＣＯ－（ここで、Ｚは独立してC_1～C_6アルキレン基である。）から選択される連結基を表す。

[0033] R^6の総数（ｍ+ｘ）における水素原子の割合は、例えば２０％以上であり、また例えば３５％以上である。上記割合は、例えば８０％以下であり、また例えば６０％以下であり、また例えば５０％以下である。

[0034] 上記ｎは、好ましくは１０～１０００、さらに好ましくは２０～６００、特に好ましくは５０～５００である。上記ｘおよびｍはそれぞれ、好ましくは２０～２００、さらに好ましくは３０～１００である。

[0035] 式（Ｉ）および（ＩＩ）で表される骨格ポリマーユニットαのポリアミノ酸セグメント中の各反復単位の結合順は任意である。上記ポリアミノ酸セグメントは、各繰り返し単位の結合順がランダムである構造（ランダム構造）、繰り返し数がｘである繰り返し単位からなるセグメントと繰り返し数がｍである繰り返し単位からなるセグメントとからなる構造（ブロック構造）、およびｍ＝０である構造（ホモポリマー構造）のいずれを有していてもよい。

[0036] 上記保護されていてもよい官能基としては、ヒドロキシル基、アセタール、ケタール、アルデヒド、糖残基、マレイミド基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、活性エステル等が挙げられる。R^1およびR^3が保護されていてもよい官能基で置換された低級アルキル基を表す場合の親水性ポリマー鎖セグメントは、例えば、ＷＯ９６／３３２３３、ＷＯ９６／３２４３４、ＷＯ９７／０６２０２に記載の方法に従って得ることができる。低級アルキル基とは、炭素数が例えば７個以下、好ましくは４個以下の直鎖または分枝

鎖アルキル基を意味し、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル基等が含まれる。

[0037] 骨格ポリマーユニットαは、例えば、親水性ポリマー鎖を有するポリマーおよびポリアミノ酸鎖を有するポリマーをそのまま、または必要により分子量分布を狭くするように精製した後、公知の方法によりカップリングすることによって得られ得る。一般式（Ｉ）のブロックコポリマーについては、例えば、R^1を付与できる開始剤を用いてアニオンリビング重合を行うことによりポリエチレングリコール鎖を形成した後、成長末端側にアミノ基を導入し、そのアミノ末端からβ－ベンジル－Ｌ－アスパルテート、γ－ベンジル－Ｌ－グルタメート等の保護されたアミノ酸のＮ－カルボン酸無水物（ＮＣＡ）を重合させることによっても形成できる。

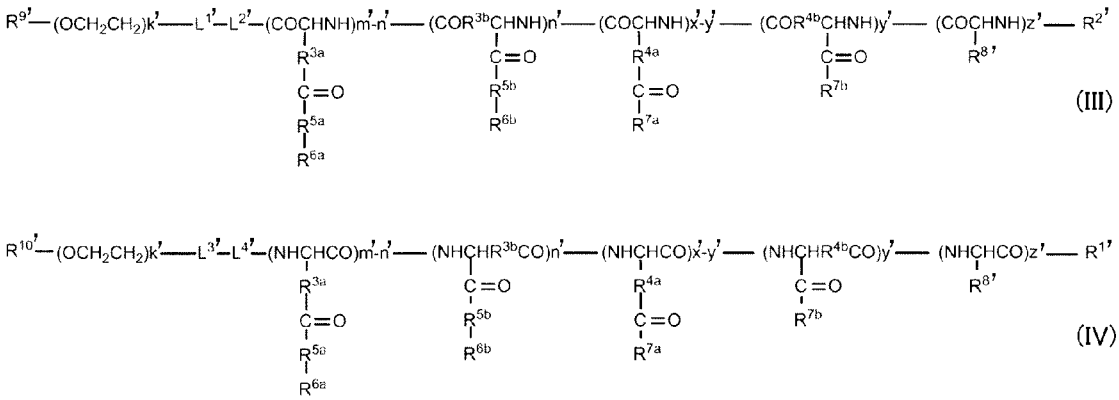
[0038] 骨格ポリマーユニットαの製造方法の具体例を以下に説明する。片末端が保護され、もう一方の末端がアミノ基であるポリエチレングリコール、例えば、ＭｅＯ－ＰＥＧ－$CH_2CH_2CH_2$－NH_2を開始剤として、脱水された有機溶媒中で、Ｎ－カルボキシ－β－ベンジル－Ｌ－アスパルギン酸無水物（ＢＬＡ－ＮＣＡ）、または、Ｎ－カルボキシ－γ－ベンジル－Ｌ－グルタミン酸無水物（ＢＬＧ－ＮＣＡ）を所望の重合度（アミノ酸ユニット数）となるように添加し、反応させることにより、ポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸ベンジルエステル、または、ポリエチレングリコール－コ－ポリグルタミン酸ベンジルエステルが得られ得る。さらに、得られたブロックコポリマーの末端をアセチルクロライドまたは無水酢酸によりアセチル化した後、アルカリ加水分解によりベンジル基を除去してポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸またはポリエチレングリコール－コ－ポリグルタミン酸とした後、有機溶媒中で、所望のエステル化率となるようにベンジルアルコールを添加し、Ｎ－Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ－Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＰＣＩ）等の縮合剤の存在下で反応させることより、部分的にベンジルエステルを有するブロックコポリマーが得られ得る。

[0039] さらに、例えば、上記ベンジルアルコールの代わりに、コレステロールを反応させれば、ポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸コレステロールエステル、ポリエチレングリコール－コ－ポリグルタミン酸コレステロールエステルが得られ得る。

[0040] 骨格ポリマーユニットαの製造方法の別の具体例としては、アミド結合により疎水性側鎖を導入する方法が挙げられる。該製造方法においては、上記と同様にしてポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸ベンジルエステル、または、ポリエチレングリコール－コ－ポリグルタミン酸ベンジルエステルの末端をアセチル化する。次いで、アルカリ加水分解によりベンジル基を除去し、生成したカルボキシル基にアミノ基を有する疎水性側鎖を反応させるか、または、ポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸ベンジルエステルもしくはポリエチレングリコール－コ－ポリグルタミン酸ベンジルエステルと一級アミンを有する化合物とを反応させ、アミノリシスを利用してエステル結合からアミド結合へ変換する。これにより、アミド結合により疎水性側鎖を導入することができる。さらに、はじめに所望のアミド化率になるように有機溶媒中で１－オクチルアミン等の一級アミンをポリエチレングリコール－コ－ポリアスパラギン酸ベンジルエステルに添加して所定の時間反応させた後、未変換のベンジルエステルに対して大過剰量の１，８－ジアミノオクタン等を加えることにより、疎水性基の末端がアミノ基で置換された疎水性側鎖とアミノ基で置換されていない疎水性側鎖とが混在するポリ（アミノ酸誘導体）セグメントにすることもできる。

[0041] 骨格ポリマーユニットαの他の好ましい具体例は、以下の一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）で表され得る。

[化3]



(III)

(IV)

上記式中、

$R^{1'}$は、ヒドロキシル基、炭素数１～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキルオキシ基、炭素数２～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルケニルオキシ基、炭素数２～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキニルオキシ基あるいは炭素数１～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキル置換イミノ基を表し、

$R^{2'}$は、水素原子、炭素数１～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキル基あるいは炭素数１～２４の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキルカルボニル基を表し、

R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}およびR^{4b}は、相互に独立して、メチレン基またはエチレン基を表し、

R^{5a}およびR^{5b}は、相互に独立して、－Ｏ－または－ＮＨ－を表し、

R^{6a}およびR^{6b}は、相互に独立して、炭素数６～２７の飽和もしくは不飽和の直鎖または分枝状の脂肪族炭化水素基、炭素数６～２７の芳香族炭化水素基あるいはステリル基を表し、

R^{7a}およびR^{7b}は、相互に独立して、下記の基：

$-NH-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NH_2$　　（ｉ）；

$-NH-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NH_2]_2$　　（ｉｉ）；

$-NH-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NH_2][-(CH_2)_{q4}-N$

Ｈ－〕$_{r2}$Ｈ}　　（ｉｉｉ）；および

－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_{p4}$－Ｎ｛－（ＣＨ$_2$）$_{q5}$－Ｎ〔－（ＣＨ$_2$）$_{q6}$－ＮＨ$_2$〕$_2$｝$_2$　　（ｉｖ）

よりなる群の同一もしくは異なる基から選ばれ、

ここで、ｐ１～ｐ４、ｑ１～６、およびｒ１～２は、それぞれ相互に独立して、１～５の整数であり、

Ｒ^{8}’は、リシン、オルニチン、アルギニン、ホモアルギニン、およびヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸の側鎖を表し、

ｍ’は、５～８０の整数であり、

ｎ’は、０～ｍ’の整数であり、

ｘ’は、０～２０の整数であり、

ｙ’は、０～ｘ’の整数であり、

ｚ’は、０～２０の整数であり、

但し、ｘ’とｚ’との和は１以上２０以下であり、上記各反復単位の結合順は任意であり、Ｒ^{6a}、Ｒ^{6b}、Ｒ^{7a}、Ｒ^{7b}およびＲ^{8}’は１つのポリアミノ酸内の各アミノ酸残基において任意に選択可能であり、

Ｌ^{1}’およびＬ^{3}’は、相互に独立して、－Ｓ－Ｓ－または原子価結合であり、

Ｌ^{2}’は、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_{p5}$－ＮＨ－、または－Ｌ^{2a}－（ＣＨ$_2$）$_{q7}$－Ｌ^{2b}－であり、ここで、ｐ５およびｑ７は、相互に独立して、１～５の整数であり、Ｌ^{2a}はＯＣＯ、ＯＣＯＮＨ、ＮＨＣＯ、ＮＨＣＯＯ、ＮＨＣＯＮＨ、ＣＯＮＨまたはＣＯＯであり、Ｌ^{2b}はＮＨまたはＯであり、

Ｌ^{4}’は、－ＯＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{p6}$－ＣＯ－、－ＮＨＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{p7}$－ＣＯ－、または－Ｌ^{4a}－（ＣＨ$_2$）$_{q8}$－ＣＯ－であり、ここで、ｐ６、ｐ７、およびｑ８は、相互に独立して、１～５の整数であり、Ｌ^{4a}は、ＯＣＯＮＨ、－ＣＨ$_2$ＮＨＣＯ－、ＮＨＣＯＯ、ＮＨＣＯＮＨ、ＣＯＮＨまたはＣＯＯであり、

Ｒ^{9}’およびＲ^{10}’は、相互に独立して、水素原子あるいは未置換もしくは置

換された炭素数１～１２の直鎖または分枝状のアルキル基であり、

ｋ’は、３０～２０，０００の整数を表す。

[0042] 上記式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）において、$R^{1'}$および$R^{2'}$の基で定義する、炭素数１～１２の直鎖または分枝状のアルキルオキシ基、アルキル置換イミノ基、およびアルキル基のアルキル部分としては、例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ｎ－ヘキシル基、デシル基、およびウンデシル基等を挙げることができる。炭素数２～１２の直鎖または分枝状のアルケニルオキシ基または炭素数２～１２の直鎖または分枝状のアルキニルオキシ基における、アルケニルまたはアルキニル部分は、炭素数が２以上の上記に例示したアルキル基中に二重結合または三重結合を含むものを挙げることができる。

[0043] このような基または部分について、「置換された」場合の置換基としては、限定されるものでないが、C_{1-6}アルコキシ基、アリールオキシ基、アリールC_{1-3}オキシ基、シアノ基、カルボキシル基、アミノ基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{2-7}アシルアミド基、トリ－C_{1-6}アルキルシロキシ基、シロキシ基、シリルアミノ基を示すか、またはアセタール化ホルミル基、ホルミル基、ハロゲン原子（例えば、塩素およびフッ素）を挙げることができる。ここで、例えば、C_{1-6}のごとき表示は、炭素数１～６を意味し、以下同様な意味を表すものとして使用する。さらに、炭素数１～２４の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキルカルボニル基の内の炭素数１～１２の未置換もしくは置換された直鎖または分枝状のアルキル部分は上述した例示を参考にでき、炭素数１３以上のアルキル部分は、例えば、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ノナデシル基、ドコサニル基およびテトラコシル基等を挙げることができる。

[0044] R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、およびR^{4b}の基を有する反復単位の結合順は任意であり、ランダム構造であってもよく、ブロック構造であってもよい。R^{3a}およびR^{3b}の両者がエチレン基を表す場合には、代表的には、ｎ’が整数０であ

るか、またはｍ’－ｎ’が整数０であるポリアミノ酸を表すことになる。前者は、例えば、グルタミン酸γ－ベンジルエステルのＮ－カルボン酸無水物の重合により得られるポリ－α－グルタミン酸を表し、後者は、例えば、納豆菌をはじめとする細菌バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属の菌株が生産するポリ－γ－グルタミン酸を表す。一方、R^{3a}およびR^{3b}の両者ともメチレン基を表す場合には、これらの基を有するそれぞれの反復単位は共存し得るものと理解されている。R^{4a}およびR^{4b}についても同様である。製造効率の観点からは、好ましくはR^{3a}およびR^{3b}がエチレン基であり、R^{4a}およびR^{4b}がメチレン基である。

[0045] R^{6a}およびR^{6b}の基について定義する、脂肪族炭化水素基が飽和である場合は、上記飽和の脂肪族炭化水素基は、炭素数６～２７のアルキル基に等価である。上記アルキル基としては、例えば、ヘキシル基（例えばｎ－ヘキシル基）、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基、エイコシル基、ヘンイコシル基、ヘンエイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、テトラコシル基、ペンタコシル基、ヘキサコシル基、およびヘプタコシル基が挙げられる。R^{6a}およびR^{6b}の基について定義する、脂肪族炭化水素基が不飽和である場合は、上記不飽和の脂肪族炭化水素基としては、例えば、上記に例示したアルキル基の鎖中の炭素－炭素単結合の１～５個が、炭素－炭素二重結合となっている基が挙げられる。

[0046] R^{6a}およびR^{6b}の基について定義する、炭素数６～２７の芳香族炭化水素基としては、アリール基、アラルキル基等が挙げられる。これらの好ましい具体例としては、フェニル基、ナフチル基、トリル基、キシリル基、ベンジル基、フェネチル基等が挙げられる。

[0047] R^{6a}およびR^{6b}の基について定義する、ステリル基が由来するステロールとは、シクロペンタノンヒドロフェナントレン環（$C_{17}H_{28}$）をベースとする天然、半合成または合成の化合物、さらにはそれらの誘導体を意味する。

天然のステロールとしては、限定されるものではないが、例えば、コレステロール、コレスタノール、ジヒドロコレステロール、コール酸、カンペステロール、シストステロール等を挙げることができる。半合成または合成のステロールとしては、例えば、上記天然のステロールの合成前駆体（必要により、存在する場合には、所定の官能基、ヒドロキシ基の一部もしくは全部が当該技術分野で既知のヒドロキシ保護基により保護されているか、またはカルボキシル基がカルボキシル保護により保護されている化合物を包含する）を挙げることができる。また、ステロール誘導体には、本発明の目的に悪影響を及ぼさない範囲内で、シクロペンタノンヒドロフェナントレン環にC_{1-12}アルキル基、および／またはハロゲン原子（例えば、塩素、臭素、フッ素）が導入されていてもよい。該環系は、飽和であってもよく、部分不飽和であってもよい。上記ステリル基が由来するステロールは、好ましくはコレステロール、コレスタノール、ジヒドロコレステロール、コール酸、カンペステロール、シストステロール等の動植物油起源のステロールであり、さらに好ましくはコレステロール、コレスタノール、ジヒドロキシコレステロールであり、特に好ましくはコレステロールである。

[0048] R^{7a}およびR^{7b}の基について定義する、

$-NH-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NH_2$ （i）；

$-NH-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NH_2]_2$ （ii）；

$-NH-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NH_2][-(CH_2)_{q4}-NH-]_{r2}H\}$ （iii）；および

$-NH-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NH_2]_2\}_2$ （iv）

よりなる群から選ばれる基は、同一の基であることが好ましく、式（i）の基であることがさらに好ましい。また、ｐ１～ｐ４およびｑ１～６は、それぞれ相互に独立して２または３であることが好ましく、より好ましくは２である。一方、ｒ１およびｒ２は、それぞれ相互に独立して、１～３の整数であることが好ましい。

[0049] m’－n’およびn’は、疎水性アミノ酸残基の繰り返し数を表し、x’－y’、y’、およびz’は、カチオン性アミノ酸残基の繰り返し数を表す。アミノ酸残基の繰り返し数の総数（m’＋x’＋z’）に対する、カチオン性アミノ酸残基の繰り返し数（x’＋z’）の割合は、例えば２０％以上であり、好ましくは３５％以上である。上記割合は、例えば８０％以下であり、好ましくは６０％以下であり、より好ましくは５０％以下である。x’は、好ましくは１～２０、好ましくは１～１５、さらに好ましくは１～１０、特に好ましくは１～５である。x’が１以上である場合、本発明のポリアミノ酸は、少なくとも上記R^{7a}またはR^{7b}の基を有することとなる。当該構造の骨格ポリマーユニットαは、エンドソーム内（ｐＨ５．５）へ取り込まれてｐＨが下がると、カチオン性ポリアミノ酸のプロトン化がさらに進行し、バッファー効果（またはプロトンスポンジ効果）を発揮することで、エンドサイトーシスによって同時に取り込まれたポリマーミセル医薬組成物によるデリバリー対象薬物のエンドソームエスケープを促進させ得る。

[0050] 式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）で表される骨格ポリマーユニットαのポリアミノ酸セグメント中の各反復単位の結合順は任意であり、ランダム構造であってもよく、ブロック構造であってもよい。カチオン性ポリアミノ酸が上記カチオン性アミノ酸残基からなるセグメントと疎水性アミノ酸残基からなるセグメントとを含むブロック型であると、エンドサイトーシスを誘発する機能単位とエンドソームエスケープを誘発する機能単位とをそれぞれ集合させた大きな機能単位群が形成されることになるため、より確実に機能を誘発させ得る。

[0051] 上記L^{1}’およびL^{3}’は、相互に独立して、－Ｓ－Ｓ－または原子価結合である。一方、L^{2}’は、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｏ（CH_2）$_{p5}$－ＮＨ－、または－L^{2a}－（CH_2）$_{q7}$－L^{2b}－であり、ここで、ｐ５およびｑ７は、相互に独立して、１～５の整数であり、L^{2a}はＯＣＯ、ＯＣＯＮＨ、ＮＨＣＯ、ＮＨＣＯＯ、ＮＨＣＯＮＨ、ＣＯＮＨまたはＣＯＯであり、L^{2b}はＮＨまたはＯである。また、L^{4}’は、－ＯＣＯ－（CH_2）$_{p6}$－ＣＯ－、－ＮＨＣ

Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{p7}$－ＣＯ－、または－Ｌ^{4a}－（ＣＨ$_2$）$_{q8}$－ＣＯ－であり、ここで、ｐ６、ｐ７、およびｑ８は、相互に独立して、１～５の整数であり、Ｌ^{4a}は、ＯＣＯＮＨ、－ＣＨ$_2$ＮＨＣＯ－、ＮＨＣＯＯ、ＮＨＣＯＮＨ、ＣＯＮＨまたはＣＯＯである。上記定義において、Ｌ^{1}’およびＬ^{2}’の組み合わせ、ならびに、Ｌ^{3}’およびＬ^{4}’の組み合わせは、一緒になって一つの連結基となり得るように組み合わされる必要がある。例えば、Ｌ^{2}’が－ＮＨ－である場合、Ｌ^{1}’は－Ｓ－Ｓ－でなく、原子価結合である。上記組み合わせとしては、Ｌ^{1}’またはＬ^{3}’が－Ｓ－Ｓ－である場合の連結基を形成する組み合わせが好ましい。

[0052] Ｒ^{9}’およびＲ^{10}’の基で定義する炭素数１～１２の直鎖または分枝状のアルキル基としては、Ｒ^{1}’およびＲ^{2}’の基で定義する、炭素数１～１２の直鎖または分枝状のアルキルオキシ基、アルキル置換イミノ基、およびアルキル基のアルキル部分と同様の基が挙げられる。また、その置換基も同様である。

[0053] エチレングリコール（またはオキシエチレン）の繰り返し数を表すｋ’は、例えば３０～２０，０００、好ましくは４０～２，０００、さらに好ましくは５０～１，０００の整数を表す。

[0054] 骨格ポリマーユニットαは、例えば、上記カチオン性ポリアミノ酸と親水性ポリマーとをそのまま、または必要により分子量分布を狭くするように精製した後、公知の方法によりカップリングすることによって形成できる。また、例えば、一般式（ＩＩＩ）のブロックコポリマーは、Ｒ^{9}’を付与できる開始剤を用いてアニオンリビング重合を行うことによりポリエチレングリコール鎖を形成した後、成長末端側にアミノ基を導入し、そのアミノ末端からβ－ベンジル－Ｌ－アスパルテート、γ－ベンジル－Ｌ－グルタメート、Ｎε－Ｚ－Ｌ－リシンといった保護されたアミノ酸のＮ－カルボン酸無水物（ＮＣＡ）を重合させ、得られたポリアミノ酸の側鎖にカチオン性基を導入することによって、製造することができる。なお、上記のとおり、カチオン性ポリアミノ酸の合成の過程でアミノ酸エステル残基の一部にポリアミンの求

核攻撃に起因した構造変化（例えば、アミノ酸エステル残基の脱アルコールによるイミド環の形成）が生じる場合があるが、本明細書ではこのような構造変化を経た残基を含むブロックコポリマーについても、上記一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）に含めて取り扱うこととする。また、カチオン性アミノ酸残基における一部のＮＨ基およびＮＨ$_2$基が合成過程での酸（主に塩酸）の使用に起因して塩（主に塩酸塩）になる場合があるが、本明細書ではこうした構造を含むブロックコポリマーについても、上記一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）に含めて取り扱うこととする。

[0055] 一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）で表される骨格ポリマーユニットαのポリアミノ酸鎖セグメントは、例えば、それ自体公知のβ－ベンジル－Ｌ－アスパルテート、γ－ベンジル－Ｌ－グルタメート、Ｎε－Ｚ－Ｌ－リシン等の保護されたアミノ酸のＮ－カルボン酸無水物（ＮＣＡ）の重合によりポリアミノ酸エステルを製造し、次いで、Ｒ^{7a}、Ｒ^{7b}、およびのＲ^{8}’基に対応するポリアミンを用いてアミノリシスを行うことによりポリアミノ酸の側鎖にカチオン性基を導入することによって、製造することができる。

[0056] １つの実施形態においては、γ－ベンジル－Ｌ－グルタメートを重合した後にβ－ベンジル－Ｌ－アスパルテートを重合し、次いで、ジエチレントリアミン（ＤＥＴ）等のアミン化合物と反応させることにより、ポリ（β－ベンジル－Ｌ－アスパルテート）に対して優先的にエステルアミド交換反応が生じ、アスパラギン酸側鎖にＤＥＴ基等のアミン残基が導入される。その結果、側鎖にカチオン性基が導入されたアスパラギン酸由来のカチオン性アミノ酸残基セグメントと側鎖にベンジル基が導入されたグルタミン酸由来の疎水性アミノ酸残基セグメントとから構成されるブロック型のカチオン性ポリアミノ酸が得られ得る。一方、β－ベンジル－Ｌ－アスパルテートとγ－ベンジル－Ｌ－グルタメートとを同時に重合させ、次いで、ジエチレントリアミン（ＤＥＴ）等のアミン化合物と反応させると、側鎖にカチオン性基が導入されたアスパラギン酸由来のカチオン性アミノ酸残基と側鎖にベンジル基が導入されたグルタミン酸由来の疎水性アミノ酸残基とが任意に配置された

ランダム型のカチオン性ポリアミノ酸が得られ得る。

[0057] なお、上記合成の過程でアミノ酸エステル残基の一部にアミンの求核攻撃に起因した構造変化（例えば、アミノ酸エステル残基の脱アルコールによるイミド環の形成）が生じる場合があるが、本明細書ではこのような構造変化を経た残基を含むブロックコポリマーについても、上記一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）に含めて取り扱うこととする。この場合、上記構造変化を経た残基の数は、カチオン性ポリアミノ酸残基の数および疎水性アミノ酸残基の数には含めないものとする。また、カチオン性アミノ酸残基における一部のＮＨ基およびＮＨ$_2$基が合成過程での酸（主に塩酸）の使用に起因して塩（主に塩酸塩）になる場合があるが、本明細書ではこのような構造変化を経た残基を含むブロックコポリマーについても、上記一般式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）に含めて取り扱うこととする。すなわち、Ｒ^{7a}、Ｒ^{7b}、およびのＲ^{8}’の基における一部のＮＨ基およびＮＨ$_2$基は塩（例えば、塩酸塩）となっていてもよい。

［３．骨格ポリマーユニットβ］

[0058] 骨格ポリマーユニットβは、親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有し、該親水性ポリマー鎖セグメントを外側に向けるとともに該疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けた状態で放射状に配列している。ポリマーミセル医薬組成物は、２種類以上の骨格ポリマーユニットβを含有していてもよい。

[0059] 骨格ポリマーユニットβは、疎水性ポリマー鎖セグメントに結合した薬物を有し得る。

[0060] 骨格ポリマーユニットβは、骨格ポリマーユニットαよりも高い疎水性を有することが望ましい。上記高い疎水性は、上記薬物に起因したものであり得る。例えば、骨格ポリマーユニットβは、骨格ポリマーユニットαよりも多い親水性基を有しながらも、上記薬物に起因して、骨格ポリマーユニットαよりも高い疎水性を有し得る。

[0061] 骨格ポリマーユニットβは、一般式：Ａ$_2$－Ｂ$_2$（－Ｄ）で表示される、薬物

とブロック共重合体の複合体であってよい。A_2はポリエチレングリコール鎖セグメントであり、B_2はポリアミノ酸鎖セグメントであり、Ｄは薬物である。

[0062] 骨格ポリマーユニットβのポリエチレングリコール鎖セグメントおよびポリアミノ酸鎖セグメントとしては、骨格ポリマーユニットαの場合と同様のものが例示できる。ただし、骨格ポリマーユニットβのポリアミノ酸鎖セグメントは、側鎖に親水性基を有していなくてもよい。

[0063] 骨格ポリマーユニットβは、標的結合部位を有した状態にあることを排除しないが、代表的には薬物を含有しつつ標的結合部位を有していない状態にある。ポリマーミセル医薬組成物が薬物と標的結合部位とが別々のポリマーユニットに含有された状態にあると、ポリマーミセル医薬組成物が標的細胞の近傍にまで血流中を移動する前にミセル構造が崩壊した場合に薬物を代謝によって体外に排出でき、副作用の発生を回避しやすくなる。さらに、同一のブロック共重合体に、標的結合部位を有する化合物と薬物の双方を結合させる必要が無いので、合成時の薬剤または標的結合用化合物の失活を回避しやすくなる。なお、骨格ポリマーユニットβに標的結合部位を搭載させる場合は、親水性ポリマー鎖セグメントの突出末端に結合させることが望ましい。

[0064] 骨格ポリマーユニットβの好ましい具体例としては、上記一般式（Ｉ）および（ＩＩ）で表されるブロックコポリマーが挙げられる。ただし、上記一般式（Ｉ）および（ＩＩ）におけるR^6について、総数（ｍ＋ｘ）の１０％以上のR^6が連結基を有していてもよい薬物の残基であり、存在する場合の残りの基が水素原子または疎水性有機基である。総数（ｍ＋ｘ）に対する連結基を有していてもよい薬物の残基の割合としては、好ましくは１０％～１００％であり、より好ましくは１０％～７０％である。R^6は１つのブロックコポリマー内の各アミノ酸ユニットにおいて各々独立に選択される。骨格ポリマーユニットβのポリアミノ酸セグメント中の各繰り返し単位の結合順は任意である。

[0065] 上記薬物としては、核酸（例えば、ヌクレオシド、DNA、RNA、siRNAおよびmicroRNA）、核酸誘導体、ワクチン、薬理活性を有する抗体（いわゆる抗体医薬）、ドセタキセル、カンプトテシン類、エポチロンＡ、エポチロンＢ、エポチロンＣ、エポチロンＤおよびこれらエポチロン類の誘導体、テムシロリムス、エベロリムス、トラベクテジン、ボリノスタット、酢酸オクトレオチド、ミトキサントロン、ビンクリスチン、セファレキシン、セファクロル、アンピシリン、バカアンピシリン、アモキシシリン、カナマイシン、アミカシン、アルベカシン、ジベカシン、シソマイシン、トブラマイシン。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキタマイシン、クロラムフェニコール、バンコマイシン、フルコナゾール、ビタラビン、アシクロビル、ジダノシン、ジドブジン、ザルシタビン、ラミブジン、ザナビル、オセタミビル、ロピナビル、リトナビルを例示できる。エポチロン類の誘導体としては、Patupilone、Ixabepilone、BMS-310705、KOS-862、ZK-EPOを例示できる。

[0066] 核酸誘導体としては、ゲムシタビン、ネララビン（Nelarabine）、クロフォラビン（Clofarabine）、デシタビン（Decitabine）、ストレプトゾシン（Streptozocin）、ドキシフルリジン（Doxifluridine）、フルダラビンを例示できる。核酸は、骨格ポリマーユニットβと、例えば、共有結合および／または静電結合を介して結合し得る。核酸誘導体は塩であっても構わないが、エステル結合によって骨格ポリマーユニットβに結合させる場合は、塩ではないほうが好ましい。

[0067] 上記薬物とブロックコポリマーユニットとは、例えば、共有結合および／または静電結合を介して結合し得る。上記共有結合としては、例えば、単結合および２価の連結基が挙げられる。上記２価の連結基としては、例えば、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、および／またはヒドラジド結合を含んでいても良い炭素数０～５の２価の連結基が挙げられる。上記２価の連結基は、好ましくは、エステル結合、アミド結合、およびヒドラジド結合である。

[0068] 上記結合の態様として、１つの上記薬物と１つのブロックコポリマーユニ

ットとが、１つの共有結合または静電結合を介して結合していてもよいし、２つ以上の共有結合および／または静電結合を介して結合していてもよい。さらに、１つの上記薬物と２つ以上のブロックコポリマーユニットとが、２つ以上の共有結合および／または静電結合を介した状態で結合（すなわち、２つ以上のブロックコポリマーユニットが１つの薬物を介して架橋された状態で結合）していてもよい。

[0069] 薬物に複数の水酸基が存在する場合、骨格ポリマーユニットβは、当該水酸基の１つ以上がポリアミノ酸側鎖のカルボキシル基にエステル結合した構造をとり得る。本明細書では、１つの薬物がポリアミノ酸側鎖中の複数のカルボキシル基にエステル結合した構造、そして２つ以上のブロック共重合体部分が１つの薬物を介して架橋された構造、についても骨格ポリマーユニットβに含めて取り扱うこととする。

[0070] 上記エステル結合としては、例えば、水酸基を有する薬物と、カルボキシル基を有するブロックコポリマーユニットとの間の反応によって形成されるエステル結合、およびカルボキシル基を有する薬物と、水酸基を有するブロックコポリマーユニットとの間の反応によって形成されるエステル結合が挙げられる。

[0071] 上記アミド結合としては、例えば、アミンである薬物と、エステル基を有するブロックコポリマーユニットとの間の反応によって形成されるアミド結合、および、アミノ基を有する薬物と、カルボキシル基を有するブロックコポリマーユニットとの間の反応によって形成されるアミド結合が挙げられる。

[0072] 上記ヒドラジド結合としては、例えば、ブロックコポリマーユニットのヒドラジド基にケトン構造を有する薬物が結合することによって形成されるヒドラジド結合が挙げられる。

[0073] ［４．骨格ポリマーユニットγ］

上記ポリマーミセル医薬組成物は、標的結合部位が結合した親水性ポリマー鎖セグメントと、疎水性ポリマー鎖セグメントとを有し、該親水性ポリマ

一鎖セグメントを外側に向けるとともに該疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けた状態で上記ブロックコポリマーユニットαおよびβとともに放射状に配列しているブロックコポリマーユニットγ（骨格ポリマーユニットγ）をさらに含み得る。骨格ポリマーユニットγは、上記標的結合部位を外側に向けた状態で配列し得る。

[0074] 骨格ポリマーユニットγは、ポリマーミセルの粒子骨格を形成できる程度の疎水性度（硬さ）を有することが望ましく、より具体的には骨格ポリマーユニットβと同程度の疎水性度（疎水性構造）を有することが望ましい。

[0075] 骨格ポリマーユニットγの親水性ポリマー鎖セグメントおよび疎水性ポリマー鎖セグメントとしては、それぞれ骨格ポリマーユニットαの場合と同様のものが例示できる。ただし、骨格ポリマーユニットγの疎水性ポリマー鎖セグメントは、側鎖に親水性基を有していなくてもよい。

[0076] 骨格ポリマーユニットγは、一般式：Ｚ－A_3－B_3で表示される、標的結合部位を有する化合物とブロック共重合体の複合体であってよい。Ｚは標的結合部位を有する化合物であり、A_3はポリエチレングリコール鎖セグメントであり、B_3はポリアミノ酸鎖セグメントである。

[0077] 標的結合部位を有する化合物としては、上記のとおり、生体およびウイルスに由来する物質と結合対を形成するタンパク質、ペプチドまたは糖鎖を例示できる。こうしたタンパク質としては、生体およびウイルスに由来する物質と結合する抗体およびその断片、トランスフェリンならびに上皮成長因子（EGF）を例示できる。抗体としては、がん細胞に代表される投薬対象物の表面に高発現する受容体や細胞表面の抗原である、EGFR、Her2、CD20、VEGFRおよびCD52といった抗原を認識する抗体を例示できる。抗体はモノクローナル抗体であってもよいしポリクローナル抗体であってもよい。抗体の断片としては、抗原を特異的に認識できる長さを有しているものであればよく、(Fab')2およびFabを例示できる。ペプチドとしては、インスリン、LHRH、IGFおよびそれらの誘導体を例示できる。糖類としては、グルコース、マンノース、ガラクトースおよびフコース残基を有する糖類を例示できる。標的結合部

位を有する化合物は、それ自身が薬理活性を発揮し得る化合物（例えば、抗体医薬およびワクチン）であってもよい。

[0078] 標的結合部位を有する化合物が結合対を形成すべき標的がウイルスに由来する物質である場合、当該物質を供給するべき細胞は、感染したウイルスによって細胞膜が破壊され細胞死した状態にあるため、エンドサイトーシスによってポリマーミセル医薬組成物を細胞内に取り込むことができない。したがって、本明細書では、標的がウイルスに由来する物質である場合、標的の周辺に存在する細胞を、標的を供給する細胞として取り扱うこととする。ウイルスに由来する物質が細胞外に存在する場合、こうした周辺の細胞もウイルスに感染している可能性が高いため、当該周辺細胞に薬物を供給する意義がある。

[0079] 骨格ポリマーユニットγのポリエチレングリコール鎖セグメントおよびポリアミノ酸鎖セグメントとしては、骨格ポリマーユニットαおよびβの場合と同様のものが例示でき、形成方法も同様である。

[0080] 骨格ポリマーユニットγの好ましい具体例としては、上記一般式（ｌ）および（ｌｌ）で表されるブロックコポリマーが挙げられる。本発明のポリマーミセル医薬組成物は、２種類以上の骨格ポリマーユニットγを含有していてもよい。ただし、上記一般式（ｌ）および（ｌｌ）において、R^1およびR^3は上記標的結合部位を有する化合物を表す。さらに、R^6は、水素原子または疎水性有機基を表し、総数（ｍ＋ｘ）に対する水素原子の割合としては、例えば０％～６０％、好ましくは０％～２０％であり、その残りが疎水性有機基である。

[0081] 骨格ポリマーユニットγは、ポリエチレングリコール鎖セグメントのα末端にヒドロキシル基、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、メルカプト基、マレイミド基といった連結基を有するブロック共重合体と、標的結合部位を有する化合物とを、縮合または付加反応させることによって形成できる。

[0082] ［５．ポリマーミセル医薬組成物の製造方法］

本発明のポリマーミセル医薬組成物は、例えば、骨格ポリマーユニットαと骨格ポリマーユニットβとを、または、骨格ポリマーユニットαと骨格ポリマーユニットβと骨格ポリマーユニットγとを有機溶媒に溶解し、混合して均一化された溶液を減圧留去して得られるポリマーのフィルムに水を加えて混合し、ミセル状に自己組織化させることによって形成できる。また例えば、これらの骨格ポリマーユニットを水性溶液中で混合し、ミセル状に自己組織化させることによっても形成できる。さらに例えば、本発明のポリマーミセル医薬組成物は、骨格ポリマーユニットαと骨格ポリマーユニットβと骨格ポリマーユニットγ前駆体とを有機溶媒に溶解し、混合して均一化された溶液を減圧留去して得られるポリマーのフィルムに水を加えて混合し、ミセル状に自己組織化させた後、標的結合部位を有する化合物を、骨格ポリマーユニットγ前駆体の親水性セグメントのα末端に結合させて骨格ポリマーユニットγとすることによって形成することもできる。さらに例えば、これらの骨格ポリマーユニットを水性溶液中で混合させミセル状に自己組織化させた後、標的結合部位を有する化合物を骨格ポリマーユニットγ前駆体の親水性セグメントのα末端に結合させて骨格ポリマーユニットγとすることによって形成することもできる。上記有機溶媒としては、例えば、メタノールおよびアセトンが挙げられる。上記水性溶液は、例えば、エタノールおよびジメチルスルホキシドといった水混和性有機溶媒と、公知の緩衝剤とを精製水に添加することによって形成できる。

実施例

[0083] 以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

[0084] （実施例１）

標的結合部位を有する化合物としてハーセプチンを有し、薬物としてドセタキセル（ＤＴＸ）を内包するポリマーミセル製剤である、ハーセプチン結合ドセタキセル（ＤＴＸ）ミセルを、次のようにして形成した。

[0085] （骨格ポリマーユニットα）

骨格ポリマーユニットαとして、ポリエチレングリコール－ポリグルタミン酸ベンジルエステル共重合体（但し、ポリグルタミン酸の片末端をアセチル化したものであり、ＰＥＧの平均分子量（Ｄａ）は１００００であり、グルタミン酸の平均残基数は４０であり、側鎖のカルボン酸の水素原子のうち６０％がフェニル基に置換されている。以後、PEG-PBLG(OBn:60%)と称する場合がある。）を用いた。

[0086]（骨格ポリマーユニットβ）

骨格ポリマーユニットβとしてのPEG-pAsp-DTXを、次のようにして製造した。ポリアスパラギン酸の片末端がアセチル化された状態にある、５００ｍｇのポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体（PEG-pAsp-Ac）を、１０ｍＬの無水ＤＭＦ（関東化学）に溶解させた後、さらに１．０６ｇのドセタキセル（ScinoPharm Taiwan Ltd.）を添加した。なお、このPEG-pAsp-AcにおけるＰＥＧの平均分子量（Ｄａ）は１００００であり、アスパラギン酸の平均残基数は４０であり、アスパラギン酸の側鎖はカルボン酸である。続いて、１６０ｍｇの４-ジメチルアミノピリジン（和光純薬）と、２１０μＬのN,N’-ジイソプロピルカルボジイミド（国産化学）とをこの順に添加し、室温にて一晩攪拌した。こうして得た反応液を、ヘキサンと酢酸エチルとの混合溶液（体積比１：１）５００ｍＬに滴下してポリマーを晶析させた後、当該ポリマーを減圧ろ集した。ろ集によって得たポリマーを、１００ｍＬの精製水に懸濁して高分子ミセルとし限外ろ過（ミリポア社製ラボスケールTFFシステム、分子量カットオフ値：１００００、５倍希釈後、１００ｍＬに濃縮）を行った。この限外ろ過の操作を５回繰り返し行なった後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥によって得たポリマーを、１０ｍＬの無水ＤＭＦに溶解させた状態で、ヘキサンと酢酸エチルとの混合溶液（体積比１：１）５００ｍＬに滴下してポリマーを晶析させた後、当該ポリマーを減圧ろ集した。ろ集によって得たポリマーを、粉末状態のままでヘキサンと酢酸エチルとの混合溶液（体積比１：１）１００ｍＬに添加することによって洗浄した後、減圧ろ集した。ろ集したポリマーを、室温にて１晩減圧乾燥させ

ることによって、淡黄色粉末である５３０ｍｇのPEG-pAsp-DTXを得た。

[0087] １ｍｇのPEG-pAsp-DTXを、精製水とエタノールの混合溶液（体積比１：１）１０ｍＬに溶解させ、波長２３３ｎｍの光線に対する吸光度からドセタキセルの含有量を測定したところ、１ポリマーあたり１４．３分子であった。このPEG-pAsp-DTXは、ドセタキセルがPEG-pAsp-Acにエステル結合を介して結合した状態にある。ＰＥＧの鎖長は１０ｋＤａである。

[0088] （マレイミド結合ポリマー）

ＰＥＧ末端にマレイミド基を有する、マレイミド－ポリエチレングリコール－ポリグルタミン酸共重合体（但し、ポリグルタミン酸の片末端をアセチル化したものであり、ＰＥＧの平均分子量（Ｄａ）は１００００であり、グルタミン酸の平均残基数は４０であり、側鎖のカルボン酸の水素原子全てがフェニル基に置換されている。）を用意した。以後、Maleimide-PEG-PBLGと称する場合がある。

[0089] （ミセルの形成）

PEG-PBLG(OBn:60%)とPEG-pAsp-DTXとMaleimide-PEG-PBLGとを、重量比４：５：１でバイヤルに別々に精秤し、メタノールまたはアセトンを添加して溶解した。各溶液を混合した後、ロータリーエバポレーター（ビュッヒ製、Rotavapor R-205、Vac(R) V-513）で溶媒留去して混合ポリマーのフィルムを形成し、更に一昼夜乾燥した。１００ｍＭ ＰＢＳ（pH7.4）を加えてフィルムを分散させた後、ナノヴェイタ（吉田機械興業製、NM2-L200）を用いて高圧分散処理してミセルを得た。当該ミセル画分には、PEG-PBLG(OBn:60%)とPEG-pAsp-DTXとMaleimide-PEG-PBLGとが放射状に配列したミセルが含有されている。

[0090] （ハーセプチンとマレイミドとの反応）

Maleimide-PEG-PBLGに対してモル比０．４のハーセプチンが入ったバイヤルに、精製水を添加してハーセプチン溶液を調製した。このハーセプチン溶液のホウ酸緩衝液の最終濃度が５０ｍＭになりＥＤＴＡの最終濃度が１ｍＭになるようにし、１０ｍｇ／ｍＬのトラウト試薬（ピアス社）をさらに添加

した後、３０℃にて４５分間静置した。続いて、こうして得た反応液をゲルろ過精製［GEサイエンス社製PD-10、溶離液：１００ｍＭ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．４）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ］し、高分子画分を回収した。

[0091] この回収液と、上記ミセル画分とを混合し、３０℃にて２時間静置することによって、Maleimide-PEG-PBLGのマレイミド基とハーセプチンとを反応させ、骨格ポリマーユニットγとしてのハーセプチン結合ポリマーを含有するミセルを形成した。こうして得た反応液を限外ろ過精製（ミリポア社製、Amicon Ultra-15、膜分画：300,000）することによって、未反応のハーセプチンを除去し、PEG-PBLG(OBn:60%)を有するハーセプチン結合ドセタキセルミセルを含有する溶液を得た。ミセル溶液中のドセタキセル含量は、2.154mg/mLであった。

[0092] （比較例１）

PEG-pAsp-DTXとMaleimide-PEG-PBLGとを重量比９：１で用い、PEG-PBLG(OBn:60%)を用いなかった以外は実施例１と同様にしてハーセプチン結合ドセタキセルミセルを含有する溶液を得た。ミセル溶液中のドセタキセル含量は、1.273mg/mLであった。

[0093] （比較例２）

PEG-pAsp-DTXのみを用いてドセタキセルミセルを含有する10%スクロース溶液を得た。ミセル溶液中のドセタキセル含量は、3.486mg/mLであった。

[0094] 〔細胞障害性試験１〕

実施例１のPEG-PBLG(OBn:60%)を有するハーセプチン結合ドセタキセルミセルによる細胞障害性を、比較例１のハーセプチン結合ドセタキセルミセル、および比較例２のドセタキセルミセルによる細胞障害性と比較した。各サンプルによる細胞障害性を、住商ファーマインターナショナル株式会社を介し、ＡＴＣＣから購入したヒト前立腺癌由来ＰＣ－３細胞（HER2ネガティブ）を用い、ＷＳＴ法に基づき次のように評価した。

[0095] ９６ウェルプレートに、１ウェルあたり約５０００個のＰＣ－３細胞が含まれるように、当該細胞を９０μＬの培地に懸濁した状態で播き、３７℃、

５％CO_2の雰囲気下で一晩培養した。培地としては、RPMI1640（Gibco™, Invitrogen）と１０％ＦＢＳ（biowest社）を用いた。続いて、各サンプルを種々のドセタキセル濃度になるように培地で希釈した溶液を各ウェルに添加し（１ウェルあたり１０μＬ）、３７℃、５％CO_2の雰囲気下で７２時間培養した。その後、WST Reagent（同仁）を添加し（１ウェルあたり１０μＬ）、３７℃、５％CO_2の雰囲気下で約２時間培養を続けた。各ウェルから、波長４５０ｎｍの光線に対する吸光度（Abs450）を測定し、下記の数式に基づき細胞増殖率（％ Cell Growth）を算出した。なお、当該数式中のコントロールのAbs450値とは、ドセタキセルを含有しない培養液を使用して上記の培養を実施したウェルから得た吸光度を意味する。

[0096] [数1]

$$\%\ \text{cell growth} = \frac{(\text{サンプル液添加後のAbs450値}) - (\text{ブランクのAbs450値})}{(\text{コントロールのAbs450値}) - (\text{ブランクのAbs450値})} \times 100$$

[0097] ドセタキセル濃度としては、0.05ng/mL、0.14ng/mL、0.41ng/mL、1.23ng/mL、3.7ng/mL、11.1ng/mL、33.3ng/mL、および100ng/mLとした。縦軸を細胞増殖率（％）、横軸をドセタキセル濃度（ng/mL）として、結果を対数近似し、IC25（25%阻害濃度(ng/mL)）を算出した。結果を表１に示す。

[0098] なお、以下に細胞障害性試験１のデータの具体例を記載する。

（ドセタキセル換算濃度3.7ng/mLの場合）

ＰＣ－３細胞の細胞増殖率（％）は、81.9％（実施例１）、106％（比較例１）、109％（比較例２）であった。

（ドセタキセル換算濃度11.1ng/mLの場合）

ＰＣ－３細胞の細胞増殖率（％）は、46.5％（実施例１）、59.6％（比較例１）、62.4％（比較例２）であった。

（ドセタキセル換算濃度33.3ng/mLの場合）

ＰＣ－３細胞の細胞増殖率（％）は、24.6％（実施例１）、30.0％（比較例１）、33.9％（比較例２）であった。

[0099] 〔細胞障害性試験２〕

住商ファーマインターナショナル株式会社を介し、ＡＴＣＣから購入したヒト胃癌由来NCI-N87細胞（HER2ポジティブ）を用いた点、１ウェルあたり約１００００個のNCI-N87細胞とした点、ドセタキセル濃度を0.5ng/mL、1.4ng/mL、4.1ng/mL、12.4ng/mL、37.0ng/mL、111.1ng/mL、333.3ng/mL、および1000.0ng/mLとした点、ならびに３７℃、５％CO_2の雰囲気下で１時間培養し、その後、ウェル内から培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）にてウェル内を２回洗浄した後、新鮮培地を添加し（１ウェルあたり１００μＬ）、総培養時間が７２時間になるまで引き続き培養した点を除き、細胞障害性試験１と同様の実験を行い、IC25（25%阻害濃度(ng/mL)）を算出した。結果を表１に示す。

[0100] なお、以下に細胞障害性試験２のデータの具体例を記載する。

（ドセタキセル換算濃度37.0ng/mLの場合）

NCI-N87細胞の細胞増殖率（%）は、82.6%（実施例１）、92.9%（比較例１）であった。

（ドセタキセル換算濃度111.1ng/mLの場合）

NCI-N87細胞の細胞増殖率（%）は、73.0%（実施例１）、88.0%（比較例１）であった。

[0101] [表1]

	実施例1	比較例１	比較例２
PC-3 細胞	3.3	8.4	9.2
NCI-N87 細胞	88.1	403.4	N.D.

[0102] 上記結果から、PEG-PBLG(OBn:60%)を有するポリマーミセル医薬組成物（実施例１）は、PEG-PBLG(OBn:60%)を有さないポリマーミセル医薬組成物（比較例１および２）に比べて、格段に低濃度域で殺細胞効果を発揮することが分

かった。上記結果は、細胞のハーセプチンの抗原の有無に関わらず観察されたことから、PEG-PBLG(OBn:60%)の混合による有利な作用は、標的結合部位を有する骨格ポリマーユニットγの有無によらず発揮されると考えられる。さらに、ポリマーミセル医薬組成物の粒子構造の維持／崩壊が作用メカニズムの骨子と考えられるため、内包される薬物には特段の制限はないものと考えられる。

[0103] ［抗腫瘍効果確認試験］

HER2陽性ヒト胃癌NCI-N87細胞をＡＴＣＣから住商ファーマインターナショナル株式会社を通じて購入した。RPMI1640+10%FBS培地を用い、5%CO_2下、37℃にて培養し、移植に必要とする細胞数になるまで増殖させた。細胞を生理食塩水に懸濁し、6.0×10^7cells/mLになるよう調製した。この細胞懸濁液に氷冷した細胞培養用基質（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、商品名「ＢＤマトリゲル」（登録商標））を等量加えた（細胞濃度：3.0×10^7cells/mL）。雄性ヌードマウス（Balb nu/nu、６週齢、日本チャールス・リバー株式会社製）１匹当たり3.0×10^6個/100μLになるよう右側腹部皮下に接種した。その後１５日間ヌードマウスを飼育し、腫瘍体積が約130mm^3になったところで薬剤を投与した。ドセタキセル換算で７mg/kgの投与量で実施例１のミセルと比較例１のミセルを単回尾静脈内投与した。さらに、比較例３として、媒体である１０％スクロース液を投与した。各実施例および各比較例では、１群として５例の動物を用いた。ミセル製剤投与直前および投与後１０日目に、ヌードマウスの腫瘍体積および体重を測定し、腫瘍体積および体重のミセル製剤投与直前に対する投与後１０日目の相対値を測定した。結果を表２に示す。

[0104]

[表2]

	実施例1	比較例1	比較例3
相対腫瘍体積	119.6%	147.5%	174.8%
相対体重	104.6%	104.3%	106.3%

[0105] 表２に示した結果から、PEG-PBLG(OBn:60%)を有するポリマーミセル医薬組成物（実施例１）を投与すると、PEG-PBLG(OBn:60%)を有さないポリマーミセル医薬組成物（比較例１）を投与した場合、および媒体を投与した場合（比較例３）に比べて、マウスの体重変化に相違がない状態を実現しつつ、ヒト胃癌NCI-N87細胞の増殖を顕著に抑制できることが分かった。

[0106] （試験例１）

（Alexa488ラベルされたＳＨ化ハーセプチンの調製）

ハーセプチン製剤(22mg/mL) 1mLを1.5mL マイクロチューブに分取した。製剤中に含まれるヒスチジンを除去するため、ゲルろ過精製（ＧＥヘルスケアジャパン株式会社製、商品名「PD-10」）を行った。分光光度計を用い、280nmにおける抗体の濃度測定を行い10mg/mLになるように調製した。Alexa488ラベル化キット（ライフテクノロジーズ社製、商品名「Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit」）を使用し、添付文書に記載されているプロトコールに従って抗体中のアミノ基をラベル化した。未反応のラベル化剤（フルオロセイン誘導体）はPD-10を用いて除去し、再度分光光度計にて抗体の濃度算出を行った（280nmおよび494nm）。Alexa488ラベルされたハーセプチン１００重量部に対して20当量の10mg/mL Traut's Reagent溶液（1mM EDTA ホウ酸緩衝液（pH 8.0））を添加した。Traut's ReagentによるＳＨ化反応はウォーターバス中で３０℃、４５分行い、反応終了後にPD-10を用いて過剰量のTraut's Reagentを除去した。この状態のAlexa488ラベルされたＳＨ化ハーセプチンを、以下Alexa-Herceptin-SHと表記する。

[0107] （ミセルの形成）

PEG-PBLG(OBn:100%) 90mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量９：１）を計量し、メタノールまたはアセトンで各ポリマーを溶解させた。それぞれのポリマー溶液を100mLナスフラスコ中で混合および均一化し、エバポレーターで有機溶媒を留去することで混合ポリマーのフィルム状アモルファスを得た。得たポリマーのフィルム約100mgにPBSを10mL添加し、超音波装置を用い溶解させた。上記溶液を高圧分散装置(吉田機械興業株式会社製：ナノヴェイタ NM2-L200)を用いて、高分子ミセル化を行い10mg/mL混合ポリマーミセル溶液を得た。高圧分散処理により得られたこのミセル溶液について、ダイナミック光散乱光度計にて粒子径測定を行った。

[0108] （Alexa-Herceptin-SHとマレイミドとの反応）

上記で得られたAlexa-Herceptin-SH溶液0.75mL（ハーセプチンとして1.5mg分）と上記10mg/mLの混合ポリマーミセル溶液4mLをクライオバイアルを用いて混和し、３０℃で２時間反応させた（Maleimide-PEG-PBLG中のマレイミドとＳＨ化ハーセプチンとの付加反応）。反応後、４℃下で一晩保管した後、粒子径測定を行った。反応液中に含まれる未反応のAlexa-Herceptin-SHを除去するために遠心限外ろ過フィルター（メルクミリポア社製、商品名「Amicon Ultra Ultracel-100K：100,000MWCO」）を用いて４℃下、3000rpmで５倍濃縮を３回行った。遠心限外ろ過後の上清に10mg/mL L-システイン PBS溶液を理論量のマレイミドに対して５当量添加し、室温で３０分反応させることでミセル中の未反応のマレイミド部分のクエンチを行った。過剰量のL-システインを除去するためにゲルろ過精製（ＧＥヘルスケアジャパン株式会社製、商品名「PD-10」)を行った。このとき溶離液として１０％スクロース水溶液（w/v）で溶液の置換を行うことでミセルの凝集を防止している。得られた抗体結合ミセル溶液に対して、ろ過滅菌（フィルターポアサイズ：0.22μm）および分注操作を行うことにより、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤の調製を終了した。最終製剤の粒子径をダイナミック光散乱光度計にて行った。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が0質量％であり、骨格ポリマーユニットβの含有率が90質量％であり、骨格ポリ

マーユニットγの含有率が10質量％である態様に相当する。なお、疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が0％である擬似ユニットαを40質量％含有し、ユニットβを50質量％含有した態様として読み替えることもできる。

[0109] （試験例２）

PEG-PBLG(OBn:76.8%) 10mgとPEG-PBLG(OBn:100%) 80mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量１：８：１）とを用いた以外は、試験例１と同様にして、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤を調製した。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が10質量％であり、ユニットαにおける疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が23.2%である態様に相当する。また、当該ミセル製剤は、下記の試験例４と同様に、骨格ポリマーユニットβの含有率が80質量％であり、骨格ポリマーユニットγの含有率が10質量％である態様に相当する。

[0110] （試験例３）

PEG-PBLG(OBn:76.8%) 40mgとPEG-PBLG(OBn:100%) 50mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量４：５：１）とを用いた以外は、試験例１と同様にして、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤を調製した。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が40質量％であり、ユニットαにおける疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が23.2%である態様に相当する。また、当該ミセル製剤は、下記の試験例５と同様に、骨格ポリマーユニットβの含有率が50質量％であり、骨格ポリマーユニットγの含有率が10質量％である態様に相当する。

[0111] （試験例４）

PEG-PBLG(OBn:60.6%) 10mgとPEG-PBLG(OBn:100%) 80mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量１：８：１）とを用いた以外は、試験例１と同様にして、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤を調製した。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が10質量％であり、ユニットαにおける疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が39.4%である態様に相当する。

[0112] （試験例５）

PEG-PBLG(OBn:60.6%) 40mgとPEG-PBLG(OBn:100%) 50mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量４：５：１）とを用いた以外は、試験例１と同様にして、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤を調製した。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が40質量%であり、ユニットαにおける疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が39.4%である態様に相当する。

[0113] （試験例６）

PEG-PBLG(OBn:60.6%) 20mgとPEG-PBLG(OBn:100%) 70mgとMaleimide-PEG-PBLG 10mg（順に含有量２：７：１）とを用いた以外は、試験例１と同様にして、Alexa488ラベルされたハーセプチン結合ミセル製剤を調製した。当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットαの含有率が20質量%であり、ユニットαにおける疎水性セグメント鎖の親水性基保有率が39.4%である態様に相当する。また、当該ミセル製剤は、骨格ポリマーユニットβの含有率が70質量%であり、骨格ポリマーユニットγの含有率が10質量%である態様に相当する。

[0114] （ミセル製剤の細胞への取り込み試験）

１．５ｍＬマイクロチューブあたり約２５００００個のＮＣＩ－Ｎ８７細胞が含まれるように、当該細胞を９０μＬの培地に懸濁した状態で添加した。培地としては、RPMI1640（Gibco™, Invitrogen）と１０％ＦＢＳ（biowest社）を用いた。ハーセプチンとしての終濃度が４μｇ／ｍＬになるよう、試験例１～６のミセル製剤を各チューブに添加し、３７℃、５％CO_2の環境下で２時間培養した。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、２％パラホルムアルデヒド／ＰＢＳで細胞を固定し、フローサイトメーター（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、商品名「BD Accuri™ C6 フローサイトメーター」）を用い蛍光強度（FL1-A）を測定した。得られた蛍光強度値を、ポリマーミセル濃度を一定に揃えた数値に補正して、各細胞へのミセル製剤の到達量を、より具体的には細胞表面への結合量および細胞内への取込量の総量を、評価した

。結果を図２に示す。なお、図２のグラフの縦軸は、試験例１において算出された蛍光強度のメジアン値を１００％としたときの相対値である。図２に示すとおり、ユニットαに起因したミセル製剤における疎水性構造部分の親水性度合いを所定の範囲に制限することによって、標的細胞へのミセル製剤の到達性がより確実に向上する。

産業上の利用可能性

[0115] 本発明は、抗がん剤等の医薬製剤等の分野で、好適に利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] 親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有するブロックコポリマーユニットαと、親水性ポリマー鎖セグメントと疎水性ポリマー鎖セグメントとを有するブロックコポリマーユニットβとを含むポリマーミセル医薬組成物であって、

該ブロックコポリマーユニットαおよび該ブロックコポリマーユニットβが、該親水性ポリマー鎖セグメントを外側に向けるとともに該疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けた状態で放射状に配列しており、

該ブロックコポリマーユニットαの該疎水性ポリマー鎖セグメントが側鎖を有する繰り返し単位で構成されており、該側鎖の少なくとも１つが親水性基を有する、ポリマーミセル医薬組成物。

[請求項2] 前記ブロックコポリマーユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖の２０％～８０％が親水性基を有する、請求項１に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項3] 前記ブロックコポリマーユニットαを１５重量％～８０重量％含有する、請求項１または２に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項4] 前記ブロックコポリマーユニットαおよびβの親水性ポリマー鎖セグメントがポリエチレングリコール鎖であり、疎水性ポリマー鎖セグメントがポリアミノ酸鎖である、請求項１～３のいずれか１項に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項5] 標的結合部位が結合した親水性ポリマー鎖セグメントと、疎水性ポリマー鎖セグメントとを有するブロックコポリマーユニットγをさらに含み、

該ブロックコポリマーユニットγが、該親水性ポリマー鎖セグメントを外側に向けるとともに該疎水性ポリマー鎖セグメントを内側に向けた状態で前記ブロックコポリマーユニットαおよびβとともに放射状に配列している、請求項１～４のいずれか１項に記載のポリマーミ

セル医薬組成物。

[請求項6] 前記ブロックコポリマーユニットαが、前記疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖が有する親水性基に起因して、前記ブロックコポリマーユニットβよりも疎水性が低い、請求項１～５のいずれか１項に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項7] 前記ブロックコポリマーユニットβの疎水性ポリマー鎖セグメントが側鎖を有する繰り返し単位で構成されており、

前記ブロックコポリマーユニットαの疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖が有する親水性基の数が、前記ブロックコポリマーユニットβの疎水性ポリマー鎖セグメントの側鎖が有する親水性基の数よりも多い、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項8] 前記ブロックコポリマーユニットβに薬物が結合している、請求項１～７のいずれか１項に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項9] 前記ブロックコポリマーユニットαが、標的結合部位および薬物のいずれも有しない、請求項１～８のいずれか１項に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項10] 前記ブロックコポリマーユニットβが、前記薬物に起因して前記ブロックコポリマーユニットαよりも疎水性が高い、請求項８に記載のポリマーミセル医薬組成物。

[請求項11] 前記ブロックコポリマーユニットβが、前記ブロックコポリマーユニットαよりも多い親水性基を有しながらも、前記薬物に起因して前記ブロックコポリマーユニットαよりも疎水性が高い、請求項８に記載のポリマーミセル医薬組成物。