



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104958258 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201510353438. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 23

A61K 9/127(2006. 01)

(30) 优先权数据

2010-117823 2010. 05. 21 JP

2010-117821 2010. 05. 21 JP

(62) 分案原申请数据

201180034554. 8 2011. 05. 23

(71) 申请人 国立研究开发法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 片冈一刚 岸村显广 安乐泰孝

宫田完二郎 莎阳·川诺伊

须磨知也 大庭诚

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 胡秋玲 郑霞

权利要求书1页 说明书45页

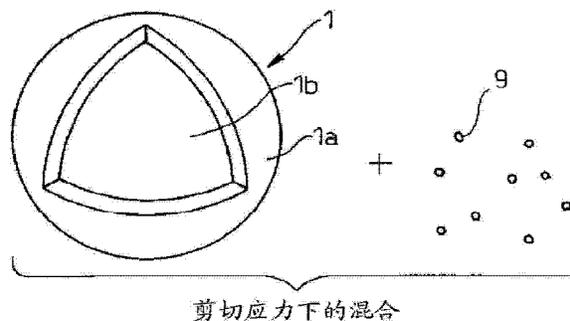
序列表3页 附图18页

(54) 发明名称

物质内包囊泡及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供一种简便且有效地制造在通过高分子的自组装而得到的囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡的方法。所述方法将具有包含第一聚合物和第二聚合物的膜以及被所述膜所包围的空隙部的空囊泡,与应内包于空隙部的物质一起在水性介质中进行混合,所述第一聚合物为具有非荷电亲水性链段及第一荷电链段的嵌段共聚物,所述第二共聚物具有携带与所述第一荷电链段相反电荷的第二荷电链段。



1. 一种囊泡,具有膜并具有被所述膜包围的空隙部,其中所述膜含有具有非荷电亲水性链段和阳离子链段的嵌段共聚物、及核酸,  
其中,所述非荷电亲水性链段为聚亚烷基二醇链段,以及  
其中所述阳离子链段是阳离子聚氨基酸链段。
2. 根据权利要求 1 所述的囊泡,其中,所述膜具有由外层、中间层及内层构成的三层结构。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的囊泡,其中,所述阳离子链段的阳离子基对所述核酸的磷酸基的摩尔比即 N<sup>+</sup>/P 比超过 1.0 且低于 3.0。
4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的囊泡,其中,所述膜还含有交联剂。
5. 根据权利要求 4 所述的囊泡,其中,所述交联剂对所述阳离子链段的阳离子基的摩尔比即 CL/N 比为 0.1 以上。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的囊泡,其中,所述交联剂为戊二醛。
7. 根据权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的囊泡,用作药物递送系统。

## 物质内包囊泡及其制造方法

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 5 月 23 日,申请号为 201180034554.8,发明名称为“物质内包囊泡及其制造方法”的申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种在空隙部中内包物质的囊泡及其制造方法。

[0003] 具体而言,涉及一种简便且有效地制造使将物质包含、负载于通过高分子的自组装而得到的空囊泡的空隙部的囊泡(物质内包囊泡)的方法和通过这种方法而得到的新型的物质内包囊泡。

### 背景技术

[0004] 已知通过使一级结构被精密地控制的高分子进行自组装,而能够形成囊泡。这种囊泡可以进行多样的分子设计,同时具有除高分子原本具有的性质以外呈现新的功能的可能性,因此,研究了作为药物递送系统(Drug Delivery System:DDS)的载体或生物材料、功能性材料等的利用。

[0005] 在专利文献 1(日本特开平 8-188541 号公报)中由本发明的部分发明人等公开了一种使具有非荷电链段和荷电链段的嵌段共聚物自组装而成的静电结合型高分子胶束药物载体。

[0006] 在非专利文献 1(Schlaad H. et al., Macromolecules, 2003, 36(5), 1417-1420) 中公开有一种使由聚(1,2-丁二烯)嵌段及聚(甲基丙烯酸铯)(ポリ(セシウムメタクリレート))嵌段构成的嵌段共聚物和由聚苯乙烯嵌段及聚(1-甲基-4-乙烯基吡啶鎓碘化物)嵌段构成的嵌段共聚物进行自组装而成的被称为聚合物囊泡的囊泡。

[0007] 在专利文献 2(国际公开第 2006/118260 号小册子)中由本发明的部分发明人等公开了一种使具有非荷电亲水性链段和阳离子链段的第一嵌段共聚物(例如 PEG-聚阳离子等)和具有非荷电亲水性链段和阴离子链段的第二嵌段共聚物(例如 PEG-聚阴离子等)进行自组装而成的囊泡。

[0008] 在非专利文献 2(Anraku Y. et al., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132(5), 1631-1636) 中由本发明的部分发明人等公开了一种使具有非荷电亲水性链段和荷电链段的嵌段共聚物(例如 PEG-聚阳离子等)与携带同所述荷电链段相反的电荷的荷电共聚物(例如聚阴离子等)进行自组装而成的囊泡。

[0009] 一般认为,通过高分子的自组装而得到的上述的各种囊泡,可将各种物质包含、负载于其空隙部(关于综述,参照非专利文献 3(H. Nyin et al. Soft Matter, 2006, 2, 940-949) 以及非专利文献 4(“リポソーム応用の新展開”,秋吉一成等主编,エヌ・ティー・エス,2005 年))。

[0010] 作为制造在空隙部中内包有物质的囊泡(以后,有时表示为“物质内包囊泡”)的方法,代表性的方法为如下方法:将应内包的物质(以后,有时表示为“被内包物质”)与作为膜的构成要素的高分子或者预形成的高分子膜一起混合,并同时利用自组

装的囊泡的形成和物质向空隙部的封入（以后，有时表示为“同时混合法”）。作为具体例，可以举出：乳化法（参照非专利文献 5(F. Szoka, Jr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 197875(9)4194-4198)）或脂质有机溶液滴加法（参照非专利文献 6(Batzri, S. et al., Biochim. Biophys Acta 1973, 298, 1015-1019)）等。

[0011] 但是，在同时混合法中，被内包物质的存在对利用自组装的囊泡的形成造成影响，存在阻碍囊泡的形成的情况或即使形成囊泡，物质也未被内包于空隙部的情况。另外，也存在如下问题：多在成膜中使用有害的有机溶剂，工艺变得繁杂的同时被内包物质容易因有机溶剂而受到损伤。进而，还存在如下问题：难以形成具有均匀的粒径、结构的囊泡，为了确保这种均匀的粒径、结构，不得不追加其它工序，工艺变得繁杂。因此，该方法的通用性不足，作为制造各种物质内包囊泡的手法不实用。

[0012] 另一方面，作为主要对中空颗粒的物质封入中所使用的手法，有在之后向既存中空颗粒的空隙部导入被内包物质，进行包含、负载的方法（以后，有时表示为“后负载法”）（例如参照非专利文献 7(W. Tong et al. J. Phys. Chem. B, 2005, 109, 13159-13165) 等），也可考虑将这种方法应用于囊泡。

[0013] 但是，在将后负载法应用于囊泡的情况下，需要用于越过空囊泡的膜而将被内包物质导入于空隙部的办法。例如一般的手法有：使空囊泡膨胀而使膜松弛，将被内包物质从产生的膜的间隙中浸透而导入空隙部后，使膜收缩而防止被内包物质的脱落的手法；在空囊泡的膜上形成孔，通过该孔将被内包物质导入空隙部后，密闭该孔而防止被内包物质的脱落的手法等。但这些手法均极其繁杂，在实用化方面非常不利。另外，一般认为，在被内包物质的封入、负载时，既存的空囊泡的粒径、结构被破坏的可能性高，非常不实用。

[0014] 另外，关于脂质体等的脂质双层囊泡，也报告有在脂质双层膜中嵌入通道蛋白质等手法（参照非专利文献 8(Ranquin A, Versees W, Miere W, Steyaert J, Gelder PV. Therapeutic Nanoreactors: Combining Chemistry and Biology in a Novel Triblock Copolymer Drug Delivery System. Nano Lett. 2005 ;5:2220-4)），但除工艺仍然极其繁杂以外，通用性也极低，仍不实用。

[0015] 因此，需要一种简便且有效地制造在通过高分子的自组装而得到的囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡的方法。

[0016] 另外，关于用于在空隙部分包含、负载有效成分的空囊泡，在有效成分的负载的稳定性方面也存在改善的余地，另外，也难以负载多个有效成分。

[0017] 因此，需要开发一种有效成分的负载稳定性和多个成分的负载控制性得到改善的新的囊泡。

[0018] 现有技术文献

[0019] 专利文献

[0020] 专利文献 1：日本特开平 8-188541 号公报

[0021] 专利文献 2：国际公开第 2006/118260 号小册子

[0022] 非专利文献

[0023] 非专利文献 1：Schlaad H. et al., Macromolecules, 2003, 36(5), 1417-1420

[0024] 非专利文献 2：Anraku Y. et al., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132(5), 1631-1636

[0025] 非专利文献 3：H. Nyin et al. Soft Matter, 2006, 2, 940-949

- [0026] 非专利文献 4：“リボソーム応用の新展開”，秋吉一成・辻井薫主编，エヌ・ティイー・エス，2005 年
- [0027] 非专利文献 5：F. Szoka, Jr. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 197875 (9) 4194-4198
- [0028] 非专利文献 6：Batzri, S. et al., Biochim. Biophys Acta 1973, 298, 1015-1019
- [0029] 非专利文献 7：W. Tong et al., J. Phys. Chem. B, 2005, 109, 13159-13165
- [0030] 非专利文献 8：Ranquin A et al., Nano Lett. 2005 ;5:2220-4

## 发明内容

[0031] 发明要解决的课题

[0032] 本发明的课题在于提供一种简便且有效地制造在通过高分子的自组装而得到的囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡的方法。

[0033] 另外，本发明的其它的课题在于提供一种有效成分的负载稳定性和多个成分的负载控制性得到改善的新的囊泡。

[0034] 用于解决课题的手段

[0035] 鉴于上述课题，本发明的发明人等进行了潜心研究，结果发现，准备规定的结构的空囊泡，将其与被内包物质一起在水性介质中进行混合，由此可得到在囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡。本方法尽管简单，但通过后负载法也可以有效地在空囊泡内导入被内包物质，同时也几乎不损伤囊泡的结构。这是极其令人吃惊的见解。

[0036] 另外，本发明的发明人等在上述方法的开发过程中，发现了在膜内含有核酸的新型的囊泡。

[0037] 即，本发明在于提供一种制造在空隙部中内包有物质的物质内包囊泡的方法，该方法含有如下工序：准备空囊泡的工序，所述空囊泡具有膜并具有被所述膜包围的空隙部，所述膜含有具有非荷电亲水性链段和第一荷电链段的嵌段共聚物即第一聚合物，和具有携带与所述第一荷电链段相反电荷的第二荷电链段的第二聚合物；将所述空囊泡及所述物质在水性介质中进行混合的工序。

[0038] 在本发明的方法中，所述混合可通过选自由搅拌、振荡、碰撞构成的组的手法进行。

[0039] 在本发明的方法中，所述空囊泡的所述膜可具有由外层、中间层及内层构成的三层结构。

[0040] 在本发明的方法中，所述物质可选自由生物分子、有机化合物及无机物质构成的组。

[0041] 在本发明的方法中，第一聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阴离子链段的嵌段共聚物，第二聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阳离子链段的嵌段共聚物，和 / 或含有阳离子链段但未含有非荷电性亲水性链段的聚合物。

[0042] 在本发明的方法中，第一聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阳离子链段的嵌段共聚物，第二聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阴离子链段的嵌段共聚物，和 / 或含有阴离子链段但未含有非荷电性亲水性链段的聚合物。

[0043] 在本发明的方法中，所述阴离子链段可为核酸。

- [0044] 在本发明的方法中,所述阳离子链段可为聚胺。
- [0045] 在本发明的方法中,所述非荷电亲水性链段可为聚亚烷基二醇。
- [0046] 另外,本发明还在于提供一种囊泡,该囊泡含有膜、被所述膜所包围的空隙部和所述空隙部内所内包的物质,其中所述膜包含具有非荷电亲水性链段和第一荷电链段的嵌段共聚物即第一聚合物,和具有携带与所述第一荷电链段相反电荷的第二荷电链段的第二聚合物。
- [0047] 在本发明的囊泡中,所述膜可具有由外层、中间层及内层构成的三层结构。
- [0048] 在本发明的囊泡中,所述物质可选自由生物分子、有机化合物及无机物质构成的组。
- [0049] 在本发明的囊泡中,第一聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阴离子链段的嵌段共聚物,第二聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阳离子链段的嵌段共聚物,和 / 或含有阳离子链段但未含有非荷电性亲水性链段的聚合物。
- [0050] 在本发明的囊泡中,第一聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阳离子链段的嵌段共聚物,第二聚合物可为含有非荷电性亲水性链段及阴离子链段的嵌段共聚物,和 / 或含有阴离子链段但未含有非荷电性亲水性链段的聚合物。
- [0051] 在本发明的囊泡中,所述阴离子链段可为核酸。
- [0052] 在本发明的囊泡中,所述阳离子链段可为聚胺。
- [0053] 在本发明的囊泡中,所述非荷电亲水性链段可为聚亚烷基二醇。
- [0054] 另外,本发明还在于提供一种囊泡,该囊泡具有膜并具有被所述膜包围的空隙部,所述膜包含嵌段共聚物和核酸,所述嵌段共聚物具有非荷电亲水性链段和阳离子链段。
- [0055] 在本发明的囊泡中,所述膜可具有由外层、中间层及内层构成的三层结构。
- [0056] 在本发明的囊泡中,所述阳离子链段的阳离子基对所述核酸的磷酸基的摩尔比即  $N^+/P$  比可超过 1.0 且低于 3.0。
- [0057] 在本发明的囊泡中,所述非荷电亲水性链段可为聚亚烷基二醇。
- [0058] 在本发明的囊泡中,所述阳离子链段可为聚胺。
- [0059] 在本发明的囊泡中,所述膜还可含有交联剂。
- [0060] 在本发明的囊泡中,所述交联剂对所述阳离子链段的阳离子基的摩尔比即  $CL/N$  比可为 0.1 以上。
- [0061] 在本发明的囊泡中,所述交联剂可为戊二醛。
- [0062] 本发明的囊泡可用作药物递送系统。
- [0063] 发明效果
- [0064] 根据本发明,可以简便且有效地制造在通过高分子的自组装而得到的囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡。另外,根据该方法,可提供一种具有可用性的新型的物质内包囊泡。
- [0065] 另外,根据本发明,也可提供一种具有新型的结构的囊泡,该囊泡利用含有规定嵌段共聚物和核酸的膜包围空隙部。

#### 附图说明

- [0066] 图 1(a) 以及 (b) 是用于说明本发明的方法的图 ;

- [0067] 图 2 是用于说明空囊泡的结构图；
- [0068] 图 3(a) 以及 (b) 是用于说明空囊泡的膜结构的一形态的图；
- [0069] 图 4(a) 以及 (b) 是用于说明空囊泡的膜结构的其它的形态的图；
- [0070] 图 5(a) ~ (c) 是用于说明膜内含核酸囊泡（膜内含核酸含有ベシクル）的膜结构的一形态的图；
- [0071] 图 6(a) 以及 (b) 分别为表示膜内含核酸囊泡形成时的  $N^+/P$  比与平均粒径及多分散指数之间的关系的图表；
- [0072] 图 7(a) 是形成膜内含核酸囊泡的试样 ( $N^+/P$  比 = 1.2) 的透射型电子显微镜照片，图 7(b) 是未形成膜内含核酸囊泡的试样 ( $N^+/P$  比 = 2.0) 的透射型电子显微镜照片；
- [0073] 图 8(a) ~ (d) 均为经交联的膜内含核酸囊泡的相位差低温透射型电子显微镜照片；
- [0074] 图 9(a) 和 (b) 均为表示膜内含核酸囊泡的粒径以及形状的经时变化的图表；
- [0075] 图 10 是表示膜内含核酸囊泡的 RNAi 活性的图表；
- [0076] 图 11(a) 和 (b) 均为表示利用膜内含核酸囊泡的 siRNA 的细胞内吞的图；
- [0077] 图 12 是表示向膜内含核酸囊泡内包物质的图表；
- [0078] 图 13 是实施例 V-1 的物质内包囊泡的粒度分布的图表；
- [0079] 图 14 是实施例 V-1 的物质内包囊泡的利用 FCS 测定得到的衰减曲线的图表；
- [0080] 图 15 是比较例 V-1 的物质内包囊泡的粒度分布的图表；
- [0081] 图 16(a) ~ (c) 均为表示实施例 VI-1 的利用物质内包囊泡的体内活性的评价结果的荧光照片；
- [0082] 图 17 是实施例 VI-1 的物质内包囊泡的粒度分布的图表；
- [0083] 图 18 是实施例 VI-1 的物质内包囊泡的利用 FCS 测定得到的衰减曲线的图表；
- [0084] 图 19 是比较例 VI-1 的物质内包囊泡的粒度分布的图表；
- [0085] 图 20 是实施例 VII 的物质内包囊泡的利用 FCS 测定得到的衰减曲线的图表；
- [0086] 图 21(a) (b) 均为实施例 VII 的物质内包囊泡的相位差低温透射型电子显微镜照片；
- [0087] 图 22 是表示实施例 VIII 的利用物质内包囊泡的体外活性的评价结果的图表；
- [0088] 图 23 是表示因混合引起的空囊泡的结构变化的图表。

## 具体实施方式

[0089] [I:定义]

[0090] 在本说明书中,所谓“囊泡”是指具有单层(单ラメラ)结构的膜和被所述膜所包围的空隙部(内水相)的基本结构体。

[0091] 在本说明书中,所谓基团的名称或作为其一部分的“烷基”表示一价的脂肪族饱和烃基。只要没有特别说明,则烷基可以为链状,也可以为环状,还可以为链状和环状键合而成的形状。链状烷基可以为直链状,也可以为支链状。环状烷基可以为单环式,也可以为复环式,在复环式的情况下,可以为连接环,也可以为稠环,还可以为螺环。

[0092] 在本说明书中,所谓基团的名称或作为其一部分的“烷氧基”表示所述烷基键合于二价的氧原子的一方的连接键而成的基团。

[0093] 在本说明书中,作为基团的名称或作为其一部分的“芳基”表示一价的芳香族烷基。只要没有特别说明,则芳基可以为单环式,也可以为复环式,在复环式的情况下,可以为连接环,也可以为稠环,还可以为螺环。

[0094] 在本说明书中,基团的碳原子数例如如“C<sub>1-12</sub>烷基”那样表示。在此“C<sub>1-12</sub>”是指该烷基的碳原子数为1~12个。

[0095] 在本说明书中,所谓“卤原子”是指氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。

[0096] 在本说明书中,所谓某基团“可以被取代”是指该基团所具有的1或2个以上的氢原子可被1或2个以上的取代基(在2个以上的情况下,可以相同,也可以不同)取代。取代基的最大数依据该基团所具有的结构及可取代的氢原子数,只要为该领域技术人员则可以容易地确定。

[0097] 在本说明书中,所谓“取代基”只要没有特别说明,则选自卤原子、芳基、羟基、氨基、羧基、氰基、甲酰基、二甲基缩醛甲酰基、二乙基缩醛甲酰基、C<sub>1-6</sub>烷氧基羰基、C<sub>2-7</sub>酰胺基、甲硅烷氧基、三(C<sub>1-6</sub>烷基)甲硅烷氧基(在此,C<sub>1-6</sub>烷基可以相同,也可以不同)以及甲硅烷基氨基构成的组。

[0098] 在本说明书中,所谓“剪切应力”是指力的作用面的法线的方向和力的作用方向不一致的应力成分。另外,作为“在剪切应力下混合”是指以剪切应力作用于作为混合对象的物体的方式进行混合。在对含有物体(例如囊泡)的流体(例如水性介质)施加外力的情况下,通常“剪切应力”作用于在该流体内存在的物体。因此,例如在对后述的混合对象液(在水性介质中含有囊泡以及被内包物质的液体)施加外力进行混合的情况下,“剪切应力”作用于其中所含的囊泡,这种混合是“在剪切应力下混合”。

[0099] 在本说明书中,所谓“RNAi”是指RNA干扰(RNA interference)。

[0100] 在本说明书中,作为“siRNA”(小干扰RNA,small interfering RNA)是指与RNAi相关的低分子(通常为19~27碱基对,优选为21~23碱基对)双链RNA。

[0101] 以下,对本发明的实施方式进行说明。另外,以下的实施方式仅为例子,本发明可以以任意方式进行实施。

[0102] [II:物质内包囊泡的制造方法]

[0103] (II-1:概要)

[0104] 如上所述,作为物质内包囊泡的代表性的制造方法的同时混合法不仅在内包的成功与否不可靠,而且难以确保被内包物质的稳定性以及囊泡的粒径、结构的均匀性,工艺也具有繁杂性,因此作为制造各种物质内包囊泡的手法,在推广方面问题较多。另一方面,还可以考虑利用主要用于中空颗粒的后负载法,但为了越过既存的空囊泡的膜而在空隙部导入物质,需要空囊泡的膨胀引起的膜的松弛、对空囊泡的膜的孔形成、对脂质双层膜的通道蛋白质的嵌入等繁杂的手法,不仅工艺极其繁杂,而且难以控制囊泡的粒径、结构,一般认为非常不实用。

[0105] 相对于此,本发明的物质内包囊泡的制造方法(以后,有时简称为“本发明的制造方法”)为:准备规定的结构的空囊泡,将其与被内包物质一起在水性介质中进行混合,由此制作在囊泡的空隙部中内包有物质的物质内包囊泡。尽管这种手法简便,但即使通过后负载法也可有效地在空囊泡内导入被内包物质,囊泡的结构也几乎未受损。这是极其令人吃惊的见解。

[0106] 关于本发明的制造方法的概要,以下,使用图 1 进行说明。需要说明的是,图 1 为示意图,本发明并不限定于图 1。

[0107] 如图 1(a) 所示,准备规定的结构的空囊泡 1,其具有被膜 1a 所包围的空隙部 1b,将所述空囊泡 1 与被内包物质 9 一起在水性介质中进行混合。由此,如图 1(b) 所示,被内包物质 9 越过空囊泡 1 的膜 1a 被导入空隙部 1b,可得到在空隙部 1b 内包有被内包物质 9 的物质内包囊泡 1'。

[0108] 对于需要结构的高度控制的高分子自组装囊泡 1,可用这种简便的手法将物质 9 导入膜 1a 内的空隙部 1b 并进行内包是极其令人吃惊的见解。本发明的制造方法基于这种见解。

[0109] 以下,对本发明的制造方法进行详细叙述,但对空囊泡以及被内包物质的详细情况另起一章进行后述,在此对其它的条件以及步骤进行说明。

[0110] (II-2:空囊泡及被内包物质的混合)

[0111] 本发明的制造方法包括将空囊泡及被内包物质在水性介质中进行混合的工序(另外,以后,有时将在此作为混合的对象空囊泡及被内包物质包含于水性介质中的液体称为“混合对象液”。)。

[0112] 进行混合的手法没有特别限制,用对水性介质施加外力的手法进行。即,在水性介质中加入空囊泡及被内包物质并静置,使其自然扩散并混合的手法(以后,有时称为“静置、扩散混合”。)被排除在外。作为对水性介质施加外力的混合的例子,可以举出:搅拌、振荡、碰撞等。

[0113] 作为利用搅拌的手法的例子,可以举出:将含有混合对象液的容器利用旋涡混合器等使其旋转进行搅拌的手法或利用搅拌桨等将溶液直接进行搅拌的手法等。

[0114] 作为利用振荡的手法的例子,可以举出:将含有混合对象液的容器利用振荡机等进行振荡的手法。

[0115] 作为利用碰撞的手法的例子,可以举出:利用超声波照射等对混合对象液施加振动或其它的各种碰撞的手法等。

[0116] 通过这种混合,在囊泡空隙部中内包有物质,可制造物质内包囊泡。

[0117] 通过混合形成物质内包囊泡的原因尚未确定,但通过对水性介质施加外力,剪切应力作用于空囊泡(因此,可以将对水性介质施加外力的混合换言之为在剪切应力下的混合。)。一般认为,通过这种剪切应力,空囊泡的结构被搅乱而分解成大致均匀的小集合体,其再次自组装使囊泡均匀地再生的同时将存在于水性介质中的被内包物质在囊泡再生时封入囊泡内(这种机制也可从如下内容推测:在后述的参考实验中,确认到利用混合分解囊泡而成的小聚集体。)。这是在通常的状态的囊泡上难以产生的现象,利用了这种现象的本发明的制造方法可以说是极其崭新的方法。

[0118] 混合的条件没有限制,但若考虑上述机制,则优选水性介质中的空囊泡的结构被充分搅乱的同时在搅乱后囊泡的结构可再生的程度的条件。通常混合成力作用于混合对象液整体的程度即可,但优选混合成混合对象液整体大致均匀的程度。

[0119] 具体的混合的条件根据混合法而不同,例如在搅拌的情况下,以通常 500rpm 以上、优选 1000rpm 以上、另外通常 10000rpm 以下、优选 5000rpm 以下的转数进行较为理想。转数过低时,有时难以形成均质的物质内包囊泡。转数过高时,有时囊泡会被损伤、破坏。

[0120] 另外,利用旋涡混合器的搅拌时间也根据转数而不同,但通常为 60 秒以上,优选为 120 秒以上,另外,通常为 10 分钟以内,优选为 5 分钟以内。若搅拌时间过短,则有时难以形成均质的物质内包囊泡。若搅拌时间过长,则有时囊泡会被损伤、破坏。

[0121] 作为使用其它的混合法(利用搅拌翼的搅拌、利用振荡机的振荡、利用超声波照射的碰撞等)时的具体的条件,以与在上述的转数以及搅拌时间的基础上进行利用旋涡混合器的搅拌而得到的力相同程度的力作用于混合对象液的方式酌情调整条件即可。

[0122] 另外,若仍然考虑上述机制,则优选在混合对象液的混合后,经一定程度的时间静置混合对象液,确保囊泡均匀再生的时间。这种静置时间没有限制,例如设为 1 分钟以上,优选设为 3 分钟以上。

[0123] 另外,可以通过利用荧光相关分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy:FCS)检查扩散系数(diffusion coefficient)变化、利用体积排阻色谱的分离、利用透射型电子显微镜的直接观察等手法来确认在囊泡的空隙部中内包有物质。在利用荧光相关分光法测定扩散系数的情况下,使用荧光材料作为被内包物质,通过对荧光材料的扩散系数的变化进行测定,可以确认被内包物质不均匀分布在囊泡内(即,得到了物质内包囊泡)。

[0124] (II-3:关于混合的其它的条件)

[0125] 通常制备在水性介质中含有空囊泡以及被内包物质的液体(混合对象液)并供于上述的混合。

[0126] 水性溶剂的种类没有限定。优选为水,但也可以在不空囊泡的结构造成不理想的影响或不妨碍向内部导入被内包物质的范围内,使用在水中混合了其它的成分的溶剂(例如生理盐水、水性缓冲液、水和水溶性有机溶剂的混合溶剂等)。作为水性缓冲液,可以举出:10mM HEPES 缓冲液等。

[0127] 被混合液的制备步骤也是任意的,但由于如后述通常在水性介质中制备空囊泡,因此,优选对于所制备的空囊泡含有液加入被内包物质,供于混合。被内包物质可以直接加入空囊泡含有液,但也可以以水性介质中的溶液或悬浮液等形态加入。

[0128] 被混合液中的空囊泡及被内包物质的各浓度也没有特别限制,考虑空囊泡的结构、被内包物质的种类、对于空囊泡的被内包物质的期望的内包比率等条件确定即可。

[0129] 但是,从提高被内包物质在空囊泡中的内包效率的观点考虑,将空囊泡对于水性介质的浓度通常设为 0.1mg/ml 以上,其中,优选设为 1mg/ml 以上,另外,通常设为 100mg/ml 以下,其中,优选设为 10mg/ml 以下。特别是空囊泡的浓度过低时,有时无法形成物质内包囊泡。另外,一般认为得到的物质内包囊泡的粒径依赖于空囊泡的浓度,因此,空囊泡的浓度应根据期望的物质内包囊泡的粒径确定。

[0130] 另外,被内包物质对于水性介质的浓度也根据被内包物质的性质而不同,但通常设为 0.1mg/ml 以上,其中,优选设为 1mg/ml 以上,另外,通常设为 100mg/ml 以下,其中,优选设为 50mg/ml 以下。特别是被内包物质的浓度过低时,有时无法形成物质内包囊泡。

[0131] 被混合液的 pH 也没有特别限定,可以考虑空囊泡的结构、被内包物质的种类、被混合液中的空囊泡以及被内包物质的各浓度等条件酌情调整,但优选为 pH5 以上,更优选为 pH6.5 以上,另外,优选为 pH9 以下,更优选为 pH7.5 以下。通过使用缓冲液作为溶剂,可以容易地进行 pH 的调整。调整被混合液的 pH 后使用,在保持空囊泡的结构且有效地使被

内包物质内包于空囊泡方面有利。

[0132] 被混合液的离子强度可以在不会破坏空囊泡的结构或不会阻碍被内包物质向空囊泡的内包的范围内进行酌情调整,但优选为 0mM 以上,更优选为 10mM 以上,另外,优选为 200mM 以下,更优选为 50mM 以下。

[0133] 被混合液混合时的温度只要在不会破坏空囊泡的结构或不会破坏被内包物质向空囊泡的内包的范围内就没有限定,但优选为 10℃ 以上,更优选为 20℃ 以上,另外,优选为 80℃ 以下,更优选为 50℃ 以下。

[0134] 在混合后,可以将所形成的物质内包囊泡立即供于期望的用途,但为了平衡体系,也可以设置静置混合液的时间。静置混合液的时间根据物质内包囊泡的形成效率等条件而不同,优选为 50 小时以内,更优选为 30 小时以内。但是,在如后述未使用交联剂的情况下,所形成的物质内包囊泡的直径有经时增大的倾向,因此,也有时优选不设置囊泡的均匀再生所需要的时间以上的静置时间。

[0135] 在使用交联剂的情况下,在含有所形成的物质内包囊泡的被混合液中加入交联剂并混合即可。交联剂可以直接加入,但也可以制备含有交联剂的水性溶液并将其加入。对交联剂的水性溶液的制备中的水性溶剂、pH、温度、离子强度等制备条件而言,与上述关于被混合液的条件相同。

[0136] 另外,也可以进一步酌情附加透析、稀释、浓缩、搅拌等操作。

[0137] [III:空囊泡]

[0138] (III-1:空囊泡的结构)

[0139] 在本发明的制造方法中,使用囊泡作为空囊泡,所述囊泡具有膜和由所述膜包围的空隙部,所述膜由具有非荷电亲水性链段及第一荷电链段的嵌段共聚物即第一聚合物和具有携带同所述第一荷电链段相反电荷的第二荷电链段的第二聚合物而形成。

[0140] 参照图 2~4 对空囊泡的结构例子进行说明。另外,图 2~4 均为示意图,本发明并不限定于这些图。

[0141] 图 2 为囊泡 1 的局部剖视图。如图 2 所示,囊泡 1 具有膜 1a 和被膜 1a 所包围的空隙部 1b。

[0142] 图 3(a) 为本发明的一形态的囊泡 1 的膜 1a 的局部剖面放大图。图 3(a) 所示的膜 1a 具有由外层 1a<sub>o</sub>、中间层 1a<sub>m</sub> 及内层 1a<sub>i</sub> 构成的三层结构,主要由第一聚合物 2 和第二聚合物 3 形成。

[0143] 图 3(b) 为图 3(a) 所示的第一聚合物 2 及第二聚合物 3 的放大图。如图 3(b) 所示,第一聚合物 2 为具有非荷电亲水性链段 2a 和第一荷电链段 2b 的嵌段共聚物,第二聚合物 3 为由携带同第一荷电链段 2b 相反电荷的第二荷电链段 3 构成的聚合物。而且,优选如图 3(a) 所示,非荷电亲水性链段 2a 形成膜 1a 的外层 1a<sub>o</sub>,第一荷电链段 2b 和第二荷电链段 3 静电结合而形成中间层 1a<sub>m</sub>。而且,优选主要由非荷电亲水性链段 2a 形成膜 1a 的内层 1a<sub>i</sub>。

[0144] 图 4(a) 为本发明的其它的形态的囊泡 1 的膜 1a 的局部剖面放大图。图 4(a) 所示的膜 1a 也具有由外层 1a<sub>o</sub>、中间层 1a<sub>m</sub> 及内层 1a<sub>i</sub> 构成的三层结构,主要由第一聚合物 2 和第二聚合物 3' 形成。

[0145] 图 4(b) 为图 4(a) 所示的第一聚合物 2 以及第二聚合物 3' 的放大图。如图 4(b)

所示,第一聚合物 2 为具有非荷电亲水性链段 2a 和第一荷电链段 2b 的嵌段共聚物,第二聚合物 3' 为由非荷电亲水性链段 3a 和携带同第一荷电链段 2b 相反电荷的第二荷电链段 3b 构成的聚合物。而且,优选如图 4(a) 所示,非荷电亲水性链段 2a、3a 的一方或两方形成膜 1a 的外层 1a<sub>o</sub>,第一荷电链段 2b 和第二荷电链段 3b 静电结合而形成中间层 1a<sub>m</sub>。优选主要由非荷电亲水性链段 2a、3a 的一方或两方形成膜 1a 的内层 1a<sub>i</sub>。

[0146] 虽然不是被理论所束缚,但一般如下考虑由第一聚合物 2 及第二聚合物 3、3' 形成囊泡 1 的机制。即,图 3(b)、图 4(b) 所示的第一聚合物 2 以及第二聚合物 3、3' 被置于可产生电荷的相互作用的体系(例如水性介质中)时,进行自组装,如图 3(a)、图 4(a) 所示,彼此带电相反的第一荷电链段 2b 及第二荷电链段 3、3b 静电结合而形成中间层 1a<sub>m</sub>,同时在其外侧配置非荷电亲水性链段 2a、3a 而形成外层 1a<sub>o</sub>。另外,优选在中间层 1a<sub>m</sub>的内侧也主要配置非荷电亲水性链段 2a、3a 而形成内层 1a<sub>i</sub>。这样形成图 3(a)、图 4(a) 所示的三层结构的膜 1a,作为结果,一般认为是形成图 2 所示的囊泡 1 的膜。

[0147] 另外,囊泡 1 的膜 1a 可以仅由第一聚合物 2 及第二聚合物 3、3' 构成,但只要概略保持以上的结构,则也可以含有其它的成分。其它的成分没有限定,作为例子,可以举出交联剂、荷电聚合物、荷电分子等。关于交联剂在后面进行详细叙述。

[0148] 另外,如后述,通常在水性媒质中制备囊泡 1,另外,膜 1a 的内层 1a<sub>i</sub>主要由非荷电亲水性链段 2a、3a 构成,因此,通常水性介质存在于囊泡 1 的空隙部 1b(因此,在本说明书中,有时将空隙部 1b 表示为“内水相”)。但是,在空隙部 1b 中也可以存在其它的物质。

[0149] 囊泡 1 的形状没有限定,通常为球状或大致球状。

[0150] 囊泡 1 的粒径根据第一聚合物 2 及第二聚合物 3、3' 的种类及量比、交联剂的有无、囊泡 1 的周边环境(水性介质的种类)等而不同,但优选为 10nm 以上,更优选为 50nm 以上,另外,优选为 1000nm 以下,更优选为 400nm 以下,进一步优选为 200nm 以下。

[0151] 囊泡 1 的膜 1a 的膜厚根据第一聚合物 2 及第二聚合物 3、3' 的种类及量比、交联剂的有无、囊泡 1 的周边环境(水性介质的种类)等而不同,但优选为 5nm 以上,更优选为 10nm 以上,另外,优选为 30nm 以下,更优选为 15nm 以下。

[0152] (III-2:第一以及第二聚合物)

[0153] 本发明的制造方法中所使用的空囊泡具有由第一聚合物及第二聚合物构成的膜。

[0154] 第一聚合物为具有非荷电亲水性链段和第一荷电链段的嵌段共聚物。第一聚合物可以仅为 1 种,也可以以任意的组合以及比率并用 2 种以上。

[0155] 第二聚合物为具有携带同第一荷电链段相反电荷的第二荷电链段的聚合物。可以为仅由第二荷电链段构成的聚合物,但也可以为除第二荷电链段以外还具有非荷电亲水性链段的嵌段共聚物。第二聚合物可以仅为 1 种,也可以以任意的组合以及比率并用 2 种以上。在 2 种以上的情况下,也可以并用仅由第二荷电链段构成的第二聚合物和除第二荷电链段以外还具有非荷电亲水性链段的第二聚合物。

[0156] 第一聚合物以及第二聚合物分别可以除上述的链段以外进一步具有其它的链段。

[0157] (III-2a:非荷电亲水性链段)

[0158] 第一聚合物具有非荷电亲水性链段。另外,第二聚合物也可以具有非荷电亲水性链段。

[0159] 非荷电亲水性链段为具有非荷电且亲水性的性质的聚合物链段。在此,所谓“非荷

电”是指链段整体为中性。作为例子,可以举出链段不具有正、负电荷的情况。另外,即使在链段在分子内具有正、负电荷的情况下,局部的实效电荷密度不高,只要链段整体的荷电被中和至不妨碍利用白组装的囊泡的形成的程度,则仍然符合“非荷电”。另外,作为“亲水性”是指对于水性介质显示溶解性。

[0160] 非荷电亲水性链段的种类没有限定。可以为由单一的重复单元构成的链段,也可以为以任意的组合以及比率含有二种以上的重复单元的链段。作为非荷电亲水性链段的具体例,可以举出:聚亚烷基二醇、聚(2-噁唑啉)、多糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚(2-甲基丙烯酸酯氧乙基磷酰胆碱)、等电点为7附近的肽、蛋白质以及它们的衍生物等。其中,优选聚亚烷基二醇、聚(2-噁唑啉)等,特别优选聚亚烷基二醇。作为聚亚烷基二醇,可以举出:聚乙二醇、聚丙二醇等,但优选聚乙二醇。

[0161] 非荷电亲水性链段的分子量没有限定,但从促进第一聚合物和第二聚合物的自组装,有效地制造均质的囊泡的观点考虑,优选具有规定的范围内的分子量。具体的分子量的范围会根据非荷电亲水性链段的种类或与荷电链段的组合等而不同,但使用聚乙二醇作为非荷电亲水性链段的情况下,其分子量(Mw)优选为500以上,更优选为1000以上,另外,优选为15000以下,更优选为5000以下的范围。非荷电亲水性链段的重复单元数也没有限制,但通常以非荷电亲水性链段的分子量满足上述的分子量范围的方式,根据其重复单元的种类来确定。

[0162] 通过使用满足所述条件的非荷电亲水性链段,可以防止第一聚合物以及第二聚合物在水性溶液中的聚集、沉淀并稳定化,可有效地构建囊泡。

[0163] (III-2b:荷电链段)

[0164] 第一聚合物所具有的第一荷电链段和第二聚合物所具有的第二荷电链段为携带彼此相反电荷的荷电链段。即,只要第一荷电链段为阳离子链段,则第二荷电链段为阴离子链段,只要第一荷电链段为阴离子链段,则第二荷电链段成为阳离子链段。

[0165] (III-2b-1:阳离子链段)

[0166] 阳离子链段为具有阳离子基团,且显示阳离子性(正离子性)的聚合物链段。但是,阳离子链段也可以在不妨碍利用第一聚合物和第二聚合物的自组装而形成囊泡的范围内具有一些阴离子基团。

[0167] 阳离子链段的种类也没有限定。可以为由单一的重复单元构成的链段,也可以为以任意的组合以及比率含有二种以上的重复单元的链段。作为阳离子链段,优选聚胺等,特别优选在侧链具有氨基的聚氨基酸或其衍生物。作为在侧链具有氨基的聚氨基酸或其衍生物,可以举出:聚天冬酰胺、聚谷氨酰胺、聚赖氨酸、聚精氨酸、聚组氨酸以及这些的衍生物等,但特别优选聚天冬酰胺衍生物以及聚谷氨酰胺衍生物。

[0168] 阳离子链段的分子量没有限定,但从促进第一聚合物和第二聚合物的自组装并有效地制造均质的囊泡的观点考虑,优选具有规定的范围内的分子量。阳离子链段的重复单元数也没有限制,但通常以阳离子性链段的分子量满足规定的范围的方式,根据其重复单元的种类来确定。具体而言,在使用聚天冬氨酸衍生物作为阳离子链段的情况下,其重复单元数优选为10以上,更优选为50以上,另外,优选为200以下,更优选为100以下的范围。

[0169] 通过使用满足上述条件的阳离子链段,可以防止第一聚合物和第二聚合物在水性

溶液中的聚集、沉淀并稳定化,可以有效地构建囊泡。

[0170] (III-2b-2:阴离子链段)

[0171] 阴离子链段为具有阴离子基且显示阴离子性(负离子性)的聚合物链段。但是,阴离子链段也可以在不妨碍利用第一聚合物和第二聚合物的自组装而形成囊泡的范围内具有一些阳离子基团。

[0172] 阴离子链段的种类也没有限定。可以为由单一的重复单元构成的链段,也可以为以任意的组合以及比率含有二种以上的重复单元的链段。作为阴离子链段,优选聚羧酸、聚磺酸、聚磷酸(核酸等)等,特别优选在侧链具有羧基的聚氨基酸或其衍生物、核酸。

[0173] 作为在侧链具有羧基的聚氨基酸或其衍生物,可以举出:聚天冬氨酸、聚谷氨酸、用上述的聚阳离子使适当量的乌头酸酐或柠康酸酐与在侧链具有氨基的聚氨基酸或其衍生物的氨基作用而得到的聚羧酸、以及这些的衍生物等,但特别优选聚天冬氨酸、聚谷氨酸。

[0174] 作为核酸,可以举出:单链或双链的 DNA 或 RNA。核酸可以为根据囊泡的用途的功能性核酸。作为功能性核酸,可以举出:siRNA、miRNA(微 RNA)、反义 RNA、反义 DNA、核酶、DNA 酶等。这些可根据囊泡的用途选择。例如在将囊泡用于 RNAi 用的 DDS 的情况下,作为核酸,可使用 siRNA。另外,核酸可以被修饰。作为经修饰的核酸的例子,可以举出:面向囊泡稳定化等用途而键合有胆固醇或维生素 E 等的疏水性官能团的核酸。

[0175] 阴离子链段的分子量没有限定,但从促进第一聚合物和第二聚合物的自组装且有效地制造均质的囊泡的观点考虑,优选具有规定的范围内的分子量。阴离子链段的重复单元数也没有限制,但通常以阴离子链段的分子量满足规定的范围的方式,根据其重复单元的种类来确定。具体而言,在使用聚羧酸、聚磺酸、或核酸作为阴离子链段的情况下,其重复单元数优选为 10 以上,更优选为 50 以上,另外,优选为 200 以下,更优选为 100 以下的范围。

[0176] 通过使用满足所述条件的阴离子链段,可以防止第一聚合物和第二聚合物在水性溶液中的聚集、沉淀并稳定化,可以有效地构建囊泡。

[0177] (III-2c:非荷电亲水性链段与荷电链段的组合)

[0178] 第一聚合物所具有的非荷电亲水性链段与第一荷电链段的组合,在第二聚合物除第二荷电链段以外具有非荷电亲水性链段的情况下的非荷电亲水性链段与第二荷电链段的组合均没有限制,可以组合任意的非荷电亲水性链段与任意的荷电链段(另外,在以后的记载中,有时将第一荷电链段及第二荷电链段汇总表示为“荷电链段”)。

[0179] 非荷电亲水性链段以及荷电链段的个数也是任意的,可以分别为 1 个,也可以为 2 个以上,在 2 个以上的情况下,可以彼此相同,也可以不同。

[0180] 非荷电亲水性链段和荷电链段的键合形态也没有限制,可以直接键合,也可以经由连接基团进行键合。

[0181] 作为连接基团的例子,可以举出具有对应于非荷电亲水性链段及荷电链段的总个数的价数的烃基。作为连接基团的烃基可以为脂肪族,也可以为芳香族,还可以为它们连接而成的物质,在脂肪族的情况下,可以为饱和,也可以为不饱和,另外,可以为直链,也可以为支链,还可以为环状。作为连接基团的烃基的分子量没有限制,通常为 5000 以下,优选为 1000 以下。作为连接基团的烃基的例子,可以举出:没食子酸衍生物、3,5-二羟基苯甲酸衍生物、甘油衍生物、环己烷衍生物、L-赖氨酸等,但优选 3,5-二羟基苯甲酸衍生物等。

[0182] 作为连接基团的其它的例子,可以举出:二硫基。二硫基用于连接1个非荷电亲水性链段和1个荷电链段。通过经由二硫基连接非荷电亲水性链段和荷电链段,通过囊泡的所放置的环境或来自外部的作用使二硫基开裂,可以改变囊泡的形态或性质。一般认为,若对其进行利用,则例如在囊泡中内包药物,将得到物质内包囊泡用于药物递送用的 DDS 的情况下,通过在生物体内使二硫基开裂,还可以促进囊泡内所内包的物质的释放。

[0183] 另外,第一荷电链段和第二荷电链段的比率(阳离子链段和阴离子链段的比率)以及非荷电亲水性链段和荷电链段的比率也是任意的,但从促进第一聚合物和第二聚合物的自组装且有效地制造均质的囊泡的观点考虑,优选以以下的基准进行选择。

[0184] 首先,关于阳离子链段和阴离子链段的比率,下述式(i)中规定的C/A比以通常为0.3,优选为0.5以上,更优选为0.6以上,另外,通常低于3.0,优选为2.0以下,更优选为1.7以下的方式进行调整较为理想。

[0185] [数学式1]

[0186]

$$\text{C/A比(摩尔比)} = \frac{\text{[第一和第二聚合物中的阳离子基的摩尔数]}}{\text{[第一和第二聚合物中的阴离子基的摩尔数]}} \quad \text{式(i)}$$

[0187] 在此,第一及第二聚合物中的阳离子基以及阴离子基的摩尔数为依赖于阳离子链段及阴离子链段的结构,但可以通过一般的电位差(酸、碱)滴定来求出。

[0188] 另外,第一及第二聚合物中的非荷电亲水性链段和荷电链段的比率优选考虑满足所述C/A比的范围的阳离子链段和阴离子链段的比率来确定。具体而言,优选将下式(ii)所规定的非荷电亲水性链段的分子量比率X收于通常0.01以上,优选0.05以上,另外,通常为0.35以下,优选0.1以下的范围。

[0189] 在分别使用1种阳离子链段(设为每1个单体具有1个正电荷)及阴离子链段(设为每1个单体具有1个负电荷),至少向一方导入非荷电亲水性链段进行使用的情况下,(即,在第一聚合物为由阳离子或者阴离子链段和非荷电亲水性链段构成的嵌段共聚物,第二聚合物为阴离子或者阳离子链段的均聚物或由其和非荷电亲水性链段构成的嵌段共聚物的情况下),通过下式规定其X。

[0190] [数学式2]

[0191]

$$X = \frac{M_{NA} + M_{NC} * \frac{(C/A比) * P_A}{P_C}}{M_{NA} + M_A + (M_C + M_{NC}) * \frac{(C/A比) * P_A}{P_C}} \quad \text{式(ii)}$$

[0192]  $M_{NA}$ 表示与阴离子链段连接的非荷电亲水性链段的分子量,

[0193]  $M_{NC}$ 表示与阳离子链段连接的非荷电亲水性链段的分子量,

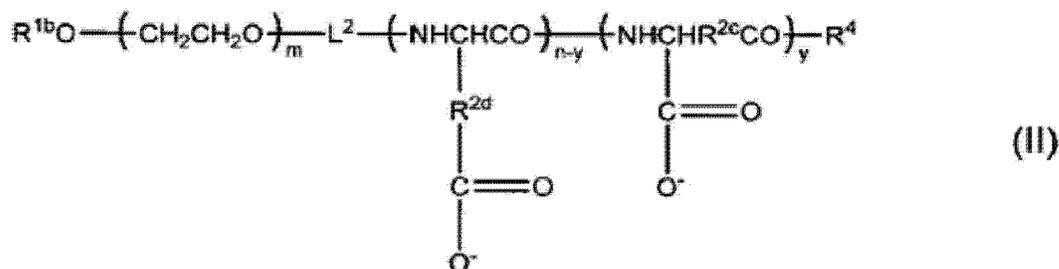
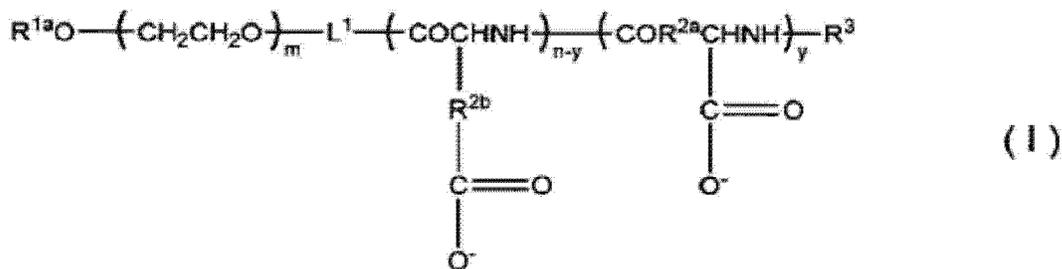
[0194]  $M_C$ 表示阳离子链段的分子量,

[0195]  $M_A$ 表示阴离子链段的分子量,

[0196]  $P_C$ 表示阳离子链段的聚合度,

[0197]  $P_A$ 表示阴离子链段的聚合度。

- [0198] (111-2d:第一及第二聚合物的具体例)
- [0199] 作为第一及第二聚合物的具体例,可以举出以下的[例1]、[例2]。
- [0200] [例1]
- [0201] 使用下述(A1)作为第一聚合物,使用下述(B1)作为第二聚合物。
- [0202] (A1)含有非荷电性亲水性的链段和阴离子性的链段的嵌段共聚物。
- [0203] (B1)下述(i)的嵌段共聚物和/或下述(ii)的聚合物。
- [0204] (i)含有非荷电性亲水性的链段和阳离子性的链段的嵌段共聚物。
- [0205] (ii)含有阳离子性的链段的聚合物(但是,不含有非荷电性亲水性的链段)。
- [0206] [例2]
- [0207] 使用下述(A2)作为第一聚合物,使用下述(B2)作为第二聚合物。
- [0208] (A2)含有非荷电性亲水性的链段和阳离子性的链段的嵌段共聚物。
- [0209] (B2)下述(iii)的嵌段共聚物和/或下述(iv)的聚合物。
- [0210] (iii)含有非荷电亲水性的链段和阴离子性的链段的嵌段共聚物。
- [0211] (iv)含有阴离子性的链段的聚合物(但是,不含有非荷电亲水性的链段)。
- [0212] 另外,在本发明中,如所述(B1)(ii)及(B2)(iv)的聚合物,为了方便,有时将不含有非荷电亲水性的链段的聚合物称为均聚物。
- [0213] 作为所述(B1)(i)、(ii)以及(A2)的各聚合物中的阳离子性的链段,没有限定,例如可以优选举出源自侧链具有阳离子性基团的多肽的链段。
- [0214] 同样,在所述(A1)及(B2)(iii)、(iv)的各聚合物中,作为阴离子性的链段,没有限定,例如可以优选举出源自侧链具有阴离子性基团的多肽或核酸的链段。
- [0215] 更具体而言,作为所述(A1)及(B2)(iii)的各嵌段共聚物,例如可以优选举出下述通式(I)和/或(II)所示的共聚物。
- [0216] [化学式1]
- [0217]



- [0218] 在此,通式(I)以及(II)的结构式中,重复单元数(聚合度)为“m”的链段为源

自 PEG 的非荷电亲水性链段（以后，有时表示为“PEG 链段”），将重复单元数为“ $n-y$ ”的部分和“ $y$ ”的部分合并的链段为源自聚阴离子的阴离子链段（以后，有时表示为“聚阴离子链段”）。

[0219] 通式 (I) 及 (II) 中， $R^{1a}$  及  $R^{1b}$  分别独立地表示氢原子或未取代或者取代的直链或者支链的  $C_{1-12}$  烷基。作为直链或者支链的  $C_{1-12}$ ，例如可以举出：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基、癸基、十一烷基等。另外，作为经取代的情况下的取代基，可以举出：缩醛化甲酰基、氰基、甲酰基、羧基、氨基、 $C_{1-6}$  烷氧基羰基、 $C_{2-7}$  酰胺基、相同或者不同的三- $C_{1-6}$  烷基甲硅烷氧基、甲硅烷氧基或甲硅烷基氨基。在此，所谓缩醛化是指利用甲酰基的羰基和，例如碳原子数 1 ~ 6 个的链烷醇的 2 个分子或碳原子数 2 ~ 6 个的可分支的亚烷基二醇（アルキレンジオール）的反应而形成缩醛部分，也是该羰基的保护方法。例如取代基为缩醛化甲酰基时，在酸性的温和的条件下水解，可以转化为其它的取代基即甲酰基（-CHO）（或醛基）。

[0220] 通式 (I) 及 (II) 中， $L^1$  和  $L^2$  表示连接基团。具体而言，优选  $L^1$  为  $-(CH_2)_b-NH-$ （在此， $b$  为 1 ~ 5 的整数），优选  $L^2$  为  $-(CH_2)_c-CO-$ （在此， $c$  为 1 ~ 5 的整数）。

[0221] 通式 (I) 以及 (II) 中， $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{2c}$  和  $R^{2d}$  分别独立地为亚甲基或亚乙基。在  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  均为亚甲基的情况下，与聚（天冬氨酸衍生物）相当，在亚乙基的情况下，与聚（谷氨酸衍生物）相当，另外，在  $R^{2c}$  和  $R^{2d}$  均为亚甲基的情况下，与聚（天冬氨酸衍生物）相当，在亚乙基的情况下，与聚（谷氨酸衍生物）相当。这些通式中，在  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$ （ $R^{2b}$  和  $R^{2a}$ ）表示亚甲基和亚乙基两者的情况下，及  $R^{2c}$  和  $R^{2d}$ （ $R^{2d}$  和  $R^{2c}$ ）表示亚甲基和亚乙基两者的情况下，天冬氨酸衍生物和谷氨酸衍生物的重复单元可以分别形成嵌段而存在或者可以无规地存在。

[0222] 通式 (I) 及 (II) 中， $R^3$  表示氢原子、保护基、疏水性基团或聚合性基团。具体而言， $R^3$  优选为乙酰基、丙烯酰基或甲基丙烯酰基。

[0223] 通式 (I) 以及 (II) 中， $R^4$  表示羟基、氧基苄基、 $-NH-(CH_2)_a-X$  基或引发剂残基。在此， $a$  为 1 ~ 5 的整数， $X$  优选为含有伯胺、仲胺、叔胺或季铵盐中的 1 种或 2 种以上的胺类化合物残基，或非胺类化合物残基。进而，根据情况，优选  $R^4$  为  $-NH-R^9$ （在此， $R^9$  表示未取代或取代的直链或支链的  $C_{1-20}$  烷基）。

[0224] 通式 (I) 和 (II) 中， $m$  为 5 ~ 2,000 的整数，优选为 5 ~ 270 的整数，更优选为 10 ~ 100 的整数。另外， $n$  为 2 ~ 5,000 的整数， $y$  为 0 ~ 5,000 的整数， $n$  和  $y$  优选为 5 ~ 300 的整数，更优选为 10 ~ 100 的整数。其中，设为  $y$  不大于  $n$ 。

[0225] 通式 (I) 和 (II) 中的各重复单元为了记载的方便以特定的顺序进行表示，但各重复单元可以以无规的顺序存在。特别是仅对于聚阴离子链段中的各重复单元，优选可以如上所述以无规的顺序存在。

[0226] 通式 (I) 和 (II) 所示的嵌段共聚物的分子量 ( $M_w$ ) 没有限定，但优选为 3,000 ~ 30,000，更优选为 5,000 ~ 20,000。另外，关于各个链段，PEG 链段的分子量 ( $M_w$ ) 优选为 500 ~ 15,000，更优选为 1,000 ~ 5,000，聚阴离子链段的分子量 ( $M_w$ ) 优选以整体计为 500 ~ 50,000，更优选为 1,000 ~ 20,000。

[0227] 通式 (I) 和 (II) 所示的嵌段共聚物的制造方法没有限定，例如可以举出：预先合成含有  $R^{1a}O-$  或  $R^{1b}O-$  与 PEG 链的嵌段部分的链段 (PEG 链段)，对该 PEG 链段的一个末端（与  $R^{1a}O-$  或  $R^{1b}O-$  相反的末端）依次聚合规定的单体，然后，根据需要以含有阴离子性基团

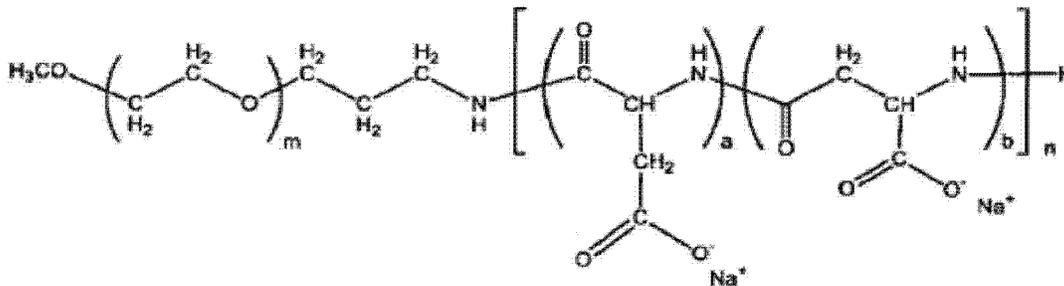
的方式对侧链进行取代或转化的方法；或者预先合成上述 PEG 链段和具有含有阴离子性基团的侧链的嵌段部分，将这些相互连接的方法等。该制法中的各种反应的方法和条件可以考虑常法酌情选择或设定。上述 PEG 链段例如可以使用 W096/32434 号公报、W096/33233 号公报及 W097/06202 号公报等中记载的嵌段共聚物的 PEG 链段部分的制法进行制备。

[0228] 作为通式 (I) 和 (II) 所示的嵌段共聚物的更具体的制造方法，例如可以优选举出如下方法：使用在末端具有氨基的 PEG 链段衍生物，使  $\beta$ -苄基-L-天冬氨酸盐 (BLA) 及 N $\epsilon$ -Z-L-赖氨酸等受保护氨基酸的 N-羧酸酐 (NCA) 与其氨基末端聚合而合成嵌段共聚物，然后，以各链段的侧链成为上述具有阴离子性基团的侧链的方式进行取代或转化。

[0229] 在本发明中，作为通式 (I) 和 (II) 所示的嵌段共聚物的具体例，例如可以优选举出：由非荷电亲水性链段即聚乙二醇（以后，有时表示为“PEG”）和阴离子链段即聚天冬氨酸（以后，有时表示为“P(Asp)”）构成的下述式的阴离子性嵌段共聚物（以后，有时表示为“PEG-P(Asp)”）等（另外，在以后的式中，作为平衡阳离子的例子，有时表示为 Na<sup>+</sup>，但平衡阳离子并不限于于此）。

[0230] [化学式 2]

[0231]



[0232] 上述式中，

[0233] m 为表示 PEG 的聚合度的整数。

[0234] n 为表示 P(Asp) 的聚合度的整数。

[0235] a、b 为均比 0 大且小于 1 的数。其中，a+b = 1。

[0236] 作为 PEG-P(Asp)，特别优选 PEG 链段的分子量 (Mw) :2,000，表示聚阴离子链段的 P(Asp) 的单元数（上述式中 n）:70 或 75。

[0237] 作为所述 (A2) 和 (B1) (i) 的各嵌段共聚物，例如可以优选举出下述通式 (III) 和 / 或 (IV) 所示的化合物。

[0238] [化学式 3]

[0239]