



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105451719 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

---

(21) 申请号	201480043775. 5	(51) Int. Cl.	
(22) 申请日	2014. 08. 05		<i>A61K 9/107</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据			<i>A61K 31/711</i> (2006. 01)
	2013-163106 2013. 08. 06 JP		<i>A61K 31/713</i> (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日			<i>A61K 47/34</i> (2006. 01)
	2016. 02. 02		<i>A61K 48/00</i> (2006. 01)
(86) PCT国际申请的申请数据			<i>C12N 15/115</i> (2006. 01)
	PCT/JP2014/070567 2014. 08. 05		
(87) PCT国际申请的公布数据			
	W02015/020026 JA 2015. 02. 12		
(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	片冈一则 长田健介 赛奥弗里斯·阿格里斯·由佳利		
(74) 专利代理机构	中科专利商标代理有限责任公司		
	代理人 葛凡		

权利要求书1页 说明书25页 附图8页

---

### (54) 发明名称

内包核酸的高分子微囊复合体及其制造方法

### (57) 摘要

本发明的内包核酸的高分子微囊复合体, 其特征在于, 其由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与包含 1000 个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的 2 条单链 DNA、至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的 1000 个碱基对长度以上的双链 DNA、或 1000 个碱基长度以上的 1 条单链 DNA 形成。

1.一种内包核酸的高分子微囊复合体,其特征在于,其由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与包含1000个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的1000个碱基对长度以上的双链DNA、或1000个碱基长度以上的1条单链DNA形成。

2.根据权利要求1所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与包含1000个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、或至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的1000个碱基对长度以上的双链DNA形成。

3.根据权利要求1或2所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,所述单链DNA为2000个碱基长度以上,所述双链DNA为2000个碱基对长度以上。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其在水性介质中的采用动态光散射法得到的平均粒径为100nm以下。

5.根据权利要求1~4中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,DNA和利用静电相互作用与DNA结合的阳离子性高分子链嵌段形成芯部分,非电荷性亲水性高分子链嵌段形成壳部分。

6.根据权利要求5所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,所述芯部分的平均粒径为50nm以下。

7.根据权利要求1~6中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其为球体状。

8.根据权利要求1~7中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,所述单链DNA或所述双链DNA为线状。

9.根据权利要求1~8中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,所述嵌段共聚物的至少一部分彼此交联。

10.根据权利要求1~9中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,在所述阳离子性高分子链嵌段的主链或侧链以共价键结合有疏水性基。

11.根据权利要求1~10中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,在所述阳离子性高分子链嵌段的侧链具有乙胺结构或丙胺结构。

12.一种内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其特征在于,其是制造收容有DNA的内包核酸的高分子微囊复合体的方法,

该方法具有如下工序:将含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与使双螺旋结构的至少一部分解离的状态的1000个碱基对以上的双链DNA在水性介质中混合。

13.根据权利要求12所述的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,所述双链DNA为2000个碱基对长度以上。

14.根据权利要求12或13所述的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,所述双链DNA为线状。

15.根据权利要求12~14中任一项所述的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,所述双链DNA为在60°C以上变性后的双链DNA。

## 内包核酸的高分子微囊复合体及其制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及内包核酸(DNA)的高分子微囊复合体。更详细而言,涉及内包较长链的DNA但充分小的高分子微囊复合体。

[0002] 本申请基于2013年8月6日在日本申请的日本特愿2013-163106号主张优先权,并将其内容援引于此。

### 背景技术

[0003] 作为次世代的治疗法,通过控制基因表达来治疗疾病的基因治疗被寄予极大的期待。基因治疗中的最大课题在于将基因导入靶标细胞或组织时的导入效率不充分这一点。尤其,为了实现基于全身施予的基因治疗,需要使基因在血中稳定地循环而集聚到靶标组织、并在侵入靶标细胞后有效地进行基因表达。因此,为了解决这些问题,盛行的是开发向靶标细胞等的导入效率、在靶标细胞内的基因表达效率更优选的基因转运体(基因载体)。

[0004] 例如,已知一次结构得到精密控制的高分子会自发产生组织化,可以形成微囊、泡囊等高次结构体,以往在以药物送达系统、材料科学为首的各种领域中研究了此种高分子的自组织化的结构体的利用。例如专利文献1中公开了一种静电耦合型高分子微囊药剂载体,其包含具有非电荷性链段(非电荷性高分子链嵌段)和电荷性链段(电荷性高分子链嵌段)的嵌段共聚物、且在芯部分可以内包具有与该电荷性链段相反的电荷的药剂。通过使用阳离子性链段作为上述电荷性链段,从而可以将DNA内包于芯部分。

[0005] 另外,还报告了各种实现更高分子微囊的稳定化的做法。例如,在专利文献2中公开了一种静电耦合型高分子微囊药剂载体,其通过借助交联剂使嵌段共聚物彼此交联来使其稳定化。进而,在专利文献3中还公开了含有非电荷性亲水性高分子链嵌段和在侧链的一部分导入了疏水性基的阳离子性聚氨基酸链嵌段的嵌段共聚物。该嵌段共聚物通过在侧链导入疏水性基,从而使表面能增大,因此微囊内的凝聚力增强,芯变小,结果实现了高分子微囊的稳定化。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开平8-188541号公报

[0009] 专利文献2:国际公开第2004/105799号

[0010] 专利文献3:国际公开第2009/113645号

### 发明内容

[0011] 发明要解决的课题

[0012] 在全身施予基因载体的情况下,为了在靶标细胞中导入基因,需要使基因载体的血中滞留性较高。

[0013] 另外,若基因载体的大小过大,则存在难以摄入细胞的问题。尤其对于像胰脏癌那样血管密度低的癌症,血管的透过性成为障壁,通过全身施予而使尺寸100nm的基因载体送

达癌组织深部是非常困难的。

[0014] 在静电耦合型高分子微囊药剂载体的芯收容了基因的高分子微囊复合体非常有希望成为基因载体,但是在大小、血中滞留性的方面还尚有改善的余地。

[0015] 本发明的主要目的在于提供内包较长链的DNA、大小充分小、还可以作为基因载体发挥功能的高分子微囊复合体及其制造方法。

[0016] 用于解决课题的手段

[0017] 本发明人等对在包含生物适合性中性高分子即聚乙二醇(PEG)和阳离子性高分子(以下,有时简写成“阳离子性高分子链嵌段”。)的嵌段共聚物中内包有作为环状双链DNA的质粒DNA(以下,有时简写成“pDNA”。)的高分子微囊复合体调查了阳离子性高分子链嵌段的长度(聚合度)与高分子微囊复合体的粒径的关系,结果发现:在阳离子性高分子链嵌段的长度较短的情况下,高分子微囊复合体是长轴为100nm以上的棒状,但是阳离子性高分子链嵌段的长度越长,则长轴的长度越短,在阳离子性高分子链嵌段的长度充分长时,存在减小至接近球体状的形状的倾向。另外,对PEG密度与血中滞留时间的关系进行了调查,结果发现:越是PEG密度高的高分子微囊复合体,存在血中滞留时间越长的倾向。在此,若阳离子性高分子链嵌段的长度变长,则与1分子的pDNA结合的嵌段共聚物数变少,结果导致PEG密度降低。即,可知:在内包pDNA的高分子微囊复合体的情况下,若为了减小粒径而使PEG密度降低,则血中滞留性降低。

[0018] 本发明人等进行了进一步研究,结果发现通过在使pDNA的双螺旋结构解离的状态下与嵌段共聚物混合而形成复合体,从而可以在不降低构成壳部分的非电荷性亲水性高分子链嵌段的密度的情况下形成远比棒状更小的球体状的高分子微囊复合体,以至完成本发明。

[0019] 即,本发明的内包核酸的高分子微囊复合体及其制造方法为下述[1]~[15]。

[0020] [1]一种内包核酸的高分子微囊复合体,其特征在于,其由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与包含1000个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的1000个碱基对长度以上的双链DNA、或1000个碱基长度以上的1条单链DNA形成。

[0021] [2]根据上述[1]的内包核酸的高分子微囊复合体,其由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与包含1000个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、或至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的1000个碱基对长度以上的双链DNA形成。

[0022] [3]根据上述[1]或[2]的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,上述单链DNA为2000个碱基长度以上,上述双链DNA为2000个碱基对长度以上。

[0023] [4]根据上述[1]~[3]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其在水性介质中的采用动态光散射法的平均粒径为100nm以下。

[0024] [5]根据上述[1]~[4]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,DNA和利用静电相互作用与DNA结合的阳离子性高分子链嵌段形成芯部分,非电荷性亲水性高分子链嵌段形成壳部分。

[0025] [6]根据上述[5]的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,上述芯部分的平均粒径为50nm以下。

- [0026] [7]根据上述[1]~[6]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其为球体状。
- [0027] [8]根据上述[1]~[7]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,上述单链DNA或上述双链DNA为线状。
- [0028] [9]根据上述[1]~[8]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,上述嵌段共聚物的至少一部分彼此交联。
- [0029] [10]根据上述[1]~[9]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,在上述阳离子性高分子链嵌段的主链或侧链以共价键结合有疏水性基。
- [0030] [11]根据上述[1]~[10]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体,其中,在上述阳离子性高分子链嵌段的侧链具有乙胺结构或丙胺结构。
- [0031] [12]一种内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其特征在于,其是制造收容有DNA的内包核酸的高分子微囊复合体的方法,
- [0032] 该方法具有如下工序:将含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物、与使双螺旋结构的至少一部分解离的状态的1000个碱基对长度以上的双链DNA在水性介质中混合。
- [0033] [13]根据[12]的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,上述双链DNA为2000个碱基对长度以上。
- [0034] [14]根据上述[12]或[13]的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,上述双链DNA为线状。
- [0035] [15]根据[12]~[14]中任一项的内包核酸的高分子微囊复合体的制造方法,其中,上述双链DNA为在60°C以上变性后的双链DNA。

#### [0036] 发明效果

[0037] 根据本发明,即使使用在将1000个碱基对长度以上、优选2000个碱基对长度以上的长链的DNA收容于内部时以往主要形成棒状或环状的内包核酸的高分子微囊复合体的嵌段共聚物的情况下,也能够提供球体状的高分子微囊复合体。球体状的高分子微囊复合体的粒径比棒状的内包核酸的高分子微囊复合体更小,且构成该嵌段共聚物的非电荷性亲水性高分子链嵌段的密度也较大,因此向细胞中的摄入效率和血中滞留性这两者均优异。

#### 附图说明

- [0038] 图1为表示在参考例1中各高分子微囊复合体的TEM图像和由该图像算出的高分子微囊复合体(棒状粒子)的长轴长的分布的图。
- [0039] 图2为表示在参考例1中全身施予各高分子微囊复合体后的小鼠的耳静脉的荧光强度经时变化的测定结果的图。
- [0040] 图3为实施例1中使用荧光标记PEG-PA<sub>sp</sub>(DET)-Chole所形成的高分子微囊复合体(左:PM-1、右:MCPM-1)的TEM图像。
- [0041] 图4为表示实施例1中由TEM图像算出的高分子微囊复合体的长轴长的分布的图(左:PM-1、右:MCPM-1)。
- [0042] 图5为实施例2中全身施予高分子微囊复合体MCPM-2-GFP的小鼠的胰脏癌组织的荧光图像。
- [0043] 图6为实施例2中全身施予高分子微囊复合体PM-2-GFP的小鼠的胰脏癌组织的

荧光图像。

[0044] 图7为实施例2中全身施予高分子微囊复合体MCPM-1的小鼠的胰脏癌组织的荧光图像。

[0045] 图8为表示实施例2中对施予收容GFP基因的高分子微囊复合体中的PM-2-GFP的胰脏癌模型小鼠和施予了其中的MCPM-2-GFP的胰脏癌模型小鼠的胰脏癌组织深部的GFP表达的相对荧光强度的测定结果的图。

[0046] 图9为表示在实施例3中相对于全身施予于小鼠的高分子微囊复合体的总量的、全身施予后经过30分钟后在血中滞留的高分子微囊复合体量的比例(%)的测定结果的图。

[0047] 图10为实施例4中全身施予了高分子微囊复合体(MCPM-4-Venus-CL)的小鼠的胰脏癌组织的荧光图像。

[0048] 图11为表示实施例5中各高分子微囊复合体的TEM图像的图。

[0049] 图12为表示实施例6中各高分子微囊复合体的TEM图像的图。

[0050] 图13为表示实施例6中由各高分子微囊复合体的TEM图像算出的高分子微囊复合体的长轴长的分布的图。

[0051] 图14为表示实施例7中以各温度进行变性处理后的高分子微囊复合体的长轴长及纵横比的分布的图。

[0052] 图15为表示在实施例8中转染了收容荧光素酶基因的PEG-PLys、或PEG-PLys-PDP的细胞株的荧光素酶表达的相对荧光强度的测定结果的图。

[0053] 图16为表示实施例9中对全身施予各高分子微囊复合体的小鼠测定胰脏癌的大小的结果的图。

### 具体实施方式

[0054] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体由含有非电荷性亲水性高分子链嵌段及阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚物和核酸(DNA)形成,结合有上述阳离子性高分子链嵌段的核酸形成芯部分,上述非电荷性亲水性高分子链嵌段形成壳部分。以下进行详细说明。

[0055] <非电荷性亲水性高分子链嵌段>

[0056] 本发明中所使用的嵌段共聚物含有非电荷性亲水性高分子链嵌段和阳离子性高分子链嵌段。作为非电荷性亲水性高分子链嵌段,例如可例示来自PEG、聚丙二醇等聚亚烷基二醇;聚(2-甲基-2-噁唑啉)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、聚(2-异丙基-2-噁唑啉)等聚噁唑啉;多糖、葡聚糖(dextran)、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚丙酮、聚甲基丙烯酸酯及它们的衍生物的各种嵌段等。其中,从作为生物适合性高的中性的水溶性高分子的方面出发,优选PEG、聚噁唑啉、葡聚糖、聚乙烯醇。

[0057] 非电荷性亲水性高分子链嵌段的分子量只要能够使嵌段共聚物形成内部收容有核酸的高分子微囊复合体的大小即可,并无特别限定。

[0058] 例如,在使用来自PEG的嵌段(聚氧乙烯链嵌段、以下,有时简称为“PEG嵌段”。)作为非电荷性亲水性高分子链嵌段的情况下,PEG嵌段的分子量优选为约1.0~100kDa、更优选为2~80kDa、进一步优选为8~25kDa。另外,作为PEG嵌段中的氧乙烯的重复单元数,优选22~2300个、更优选45~1850个、进一步优选180~600个。

[0059] <阳离子性高分子链嵌段>

[0060] 作为本发明中所使用的阳离子性高分子链嵌段,只要是包含能够与DNA静电结合的阳离子性的高分子链的嵌段即可,并无特别限定。具体而言,例如可列举:在侧链具有阳离子性基的聚氨基酸衍生物;聚乙撑亚胺(PEI);聚甲基丙烯酸衍生物、聚丙烯酸衍生物等丙烯酸系树脂等。

[0061] 作为本发明中所使用的阳离子性高分子链嵌段,优选使用来自阳离子性氨基酸的聚氨基酸或其衍生物的嵌段、来自在阴离子性氨基酸的阴离子性基(通常为羧基)上通过酯键或酰胺键等结合有阳离子性化合物的氨基酸衍生物的嵌段。作为阳离子性氨基酸的聚氨基酸,可列举聚赖氨酸、聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚高精氨酸及聚组氨酸等。另外,作为使阴离子性氨基酸上结合有阳离子性化合物的氨基酸衍生物,可列举天冬氨酸或谷氨酸的1个羧基与除了跟羧基结合的部位以外还具有氨基、亚氨基、季氨基等阳离子性基的化合物结合的衍生物。作为具有该阳离子性基的化合物,例如可列举各种二胺等。具有来自使天冬氨酸或谷氨酸的1个羧基与二亚乙基三胺反应而得的氨基酸衍生物的重复单元的嵌段在侧链具有乙胺结构。此外,还优选具有来自在侧链导入了丙胺结构的聚氨基酸衍生物的重复单元的嵌段。

[0062] 本发明中,特别优选使用将来自以赖氨酸和/或其衍生物作为重复单元的聚氨基酸的嵌段(以下,有时称作“PLys嵌段”。)、或来自以使天冬氨酸的1个羧基与二亚乙基三胺结合而成的氨基酸衍生物和/或其衍生物作为重复单元的聚氨基酸的嵌段(以下,有时称作“PAsp(DET)嵌段”。)作为阳离子性高分子链嵌段的嵌段共聚合。

[0063] 作为阳离子性高分子链嵌段中的重复单元数,为了在嵌段共聚物形成内部收容了核酸的高分子微囊复合体时容易使形成壳的非电荷性亲水性高分子链嵌段的密度充分提高,优选10~200个,更优选20~100个。

[0064] 通过在阳离子性高分子链嵌段的侧链或其末端(与以共价键直接或间接键合于非电荷性亲水性高分子链嵌段的末端相反一侧的末端)以共价键结合疏水性基,从而可以使所得内包核酸的高分子微囊复合体更稳定化。当在阳离子性高分子链嵌段的侧链具有疏水性基的情况下,疏水性基可以以任意方式配置于阳离子性高分子链嵌段中,例如可列举无规配置的情况、以嵌段的形式配置的情况(即,由非电荷性亲水性高分子链嵌段、包含在侧链以共价键结合有疏水基的重复单元的阳离子性高分子链嵌段、和包含不担载疏水基的重复单元的阳离子性高分子链嵌段形成三嵌段的情况)。

[0065] 作为疏水性基,可列举固醇衍生物的残基或C<sub>4-24</sub>烃基。固醇是指以环戊酮氢菲环(C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>)为基体的天然、半合成或合成的化合物,例如,作为天然的固醇,并不受限定,但是可列举胆固醇、胆甾烷醇、二氢胆固醇、胆酸等,作为该半合成或合成的化合物,可为这些天然物的例如合成前体(依据需要,在存在的情况下,包含一定的官能基、羟基的一部分或全部被该技术领域中已知的羟基保护基保护或者或羧基被羧基保护基保护的化合物。)。另外,固醇衍生物是指:在对本发明的目的不带来不良影响的范围内,可以在环戊酮氢菲环上引入C<sub>1-12</sub>烷基、卤素原子例如氯、溴、氟,该环系可以为饱和或部分不饱和等。固醇衍生物的残基优选胆固醇、胆甾烷醇、二羟基胆固醇的3位羟基的氢原子被除去后的基团,更优选胆固醇3位羟基的氢原子被除去后的基团。C<sub>4-24</sub>烃基为从碳数4~24的由碳原子和氢原子组成的烃中除去一个氢原子而生成的一价基。具体而言,可列举:直链或支链的C<sub>4-24</sub>烷基、优选直链或支链的C<sub>12-24</sub>烷基;直链或支链的C<sub>4-24</sub>烯基、优选直链或支链的C<sub>12-24</sub>烯基;直链或支

链的C<sub>4-24</sub>炔基、优选直链或支链的C<sub>12-24</sub>炔基；金刚烷基等C<sub>4-24</sub>的笼状化合物、优选C<sub>12-24</sub>的笼状化合物；芳基为苯基或萘基且烷基为C<sub>1-5</sub>的芳基烷基，例如苄基等。作为本发明中所使用的嵌段共聚物中的阳离子性高分子链嵌段在侧链所具备的疏水性基，优选直链或支链的C<sub>4-20</sub>烷基、直链或支链的C<sub>4-20</sub>烯基、或者苄基，优选直链或支链的C<sub>12-20</sub>烷基、直链或支链的C<sub>12-20</sub>烯基、或者苄基，更优选直链或支链的C<sub>12-20</sub>烷基、直链或支链的C<sub>12-20</sub>烯基、或者苄基。予以说明，在上述的烯基及炔基中可以包含多个不饱和键。

[0066] 予以说明，在本申请说明书中，“C<sub>x-y</sub>”是指碳数x~y。

[0067] 在内包核酸的高分子微囊复合体中，从高分子微囊复合体的稳定性的方面出发，优选使构成其的嵌段共聚物彼此交联。例如，通过在阳离子性高分子链嵌段的侧链或其末端（与以共价键直接或间接结合于非电荷性亲水性高分子链嵌段的末端相反一侧的末端）具有硫醇基（-SH基）、与交联剂的结合部位，从而可以使所得内包核酸的高分子微囊复合体更稳定化。也可以通过使阳离子性高分子链嵌段中的硫醇基彼此以二硫键结合（SS结合）来进行交联。

[0068] 作为与交联剂的结合部位，可列举氨基（-NH<sub>2</sub>基）、硫醇基、羟基、羧基等。作为可以将这些基团作为结合部位的交联剂，可以使用：在分子内具有多个醛基的戊二醛、丁二醛、多聚甲醛（paraformaldehyde）、邻苯二甲醛（酞醛）等；在分子内具有马来酰亚胺基和活性酯基的N-[α-马来酰亚胺乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯、N-[β-马来酰亚胺丙氧基]琥珀酰亚胺酯、N-[ε-马来酰亚胺己酰氧基]琥珀酰亚胺酯、N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧基-[6-酰胺己酸酯]、间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-甲酸酯、琥珀酰亚胺基-4-[p-马来酰亚胺苯基]丁酸酯、琥珀酰亚胺基-6-[(β-马来酰亚胺丙酰胺)己酸酯]等；在分子内具有活性酯和硝基苯基叠氮基的N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺、N-琥珀酰亚胺基-6-[4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基]己酸酯等；在分子内具有苯基叠氮基和苯基乙二醛（glyoxal）基的对叠氮基苯基乙二醛等；在分子内具有多个马来酰亚胺基的1,4-双马来酰亚胺丁烷、双马来酰亚胺乙烷、双马来酰亚胺己烷、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二氧丁烷、1,8-双马来酰亚胺三乙二醇、1,11-双马来酰亚胺四乙二醇、双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰氧基)乙基]砒、三[2-马来酰亚胺乙基]胺等；在分子内具有多个磺基活性酯基的双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯、双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰氧基)乙基]砒、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯、乙二醇双[磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯]、三磺基琥珀酰基（succinidyl）氨基三乙酸酯等；在分子内具有多个烯丙基卤基的1,5-二氟-2,4-二硝基苯等；在分子内具有多个酰亚胺酯基的己二亚胺酸二甲酯（dimethyl adipimidate）、庚二亚胺酸二甲酯（dimethyl pimelimidate）、辛二亚胺酸二甲酯（dimethyl suberimidate）等；在分子内具有多个吡啶二硫基的1,4-二-[3'-(2'-吡啶二硫基)丙酰胺]丁烷等；在分子内具有多个活性酯基的二琥珀酰亚胺基戊二酸酯、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯、乙二醇双[琥珀酰亚胺基琥珀酸酯]等；在分子内具有多个乙烯基磺酸基的1,6-己烷-双乙烯基砒等；在分子内具有吡啶二硫基和活性酯基的琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶二硫基)丙酰胺]己酸酯、4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-甲基-α-[2-吡啶二硫基]甲苯、N-琥珀酰亚胺基-3-[2-吡啶二硫基]丙酸酯等；在分子内具有羟基苯基叠氮基和活性酯基的N-羟



基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基水杨酸等；在分子内具有马来酰亚胺基和异氰酸酯基的N-[对马来酰亚胺苯基]异氰酸酯等；在分子内具有马来酰亚胺基和磺基活性酯基的N-[ε-马来酰亚胺己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基苯甲酸酯、N-[κ-马来酰亚胺十一酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-甲酸酯、磺基琥珀酰亚胺基-4-[对马来酰亚胺苯基]丁酸酯等；在分子内具有吡啶二硫基和磺基活性酯基的磺基琥珀酰亚胺基-6-[3'-(2-吡啶二硫基)丙酰胺]己酸酯、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶二硫基)甲苯酰胺]己酸酯等；在分子内具有羟基苯基叠氨基和磺基活性酯基的磺基琥珀酰亚胺基[4-叠氨基水杨酰胺]己酸酯等；在分子内具有硝基苯基叠氨基和磺基活性酯基的磺基琥珀酰亚胺基-6-[4'-叠氨基-2'-硝基苯基氨基]己酸酯等；在分子内具有乙烯基磺酸基和活性酯基的N-琥珀酰亚胺基-[4-乙烯基磺酰基]苯甲酸酯等。特别优选使用戊二醛。

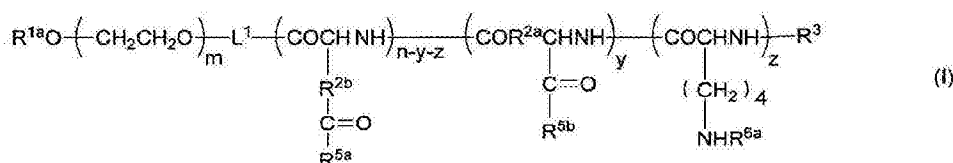
[0069] <嵌段共聚物>

[0070] 本发明中所使用的嵌段共聚物为上述非电荷性亲水性高分子链嵌段的末端与上述阳离子性高分子链嵌段的末端以共价键直接或间接(即,借助适当的连接子)结合而成的嵌段共聚物。

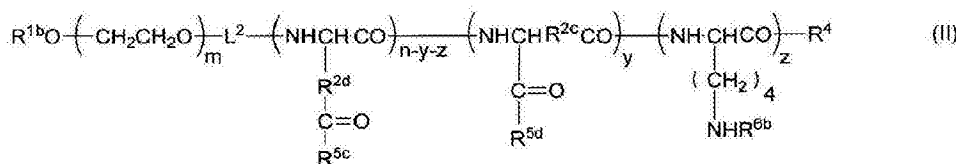
[0071] 作为本发明中所使用的嵌段共聚物,优选上述非电荷性亲水性高分子链嵌段来自聚乙二醇、且上述阳离子性高分子链嵌段来自聚氨基酸或其衍生物的嵌段共聚物,更优选上述非电荷性亲水性高分子链嵌段来自聚乙二醇、且上述阳离子性高分子链嵌段来自选自聚赖氨酸、聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚高精氨酸、聚组氨酸、聚天冬氨酸及聚谷氨酸中的聚氨基酸(包括来自聚氨基酸衍生物。)的嵌段共聚物。

[0072] 作为本发明中所使用的嵌段共聚物,具体而言,可例示出下述通式(I)或(II)所示的嵌段共聚物。予以说明,下述通式(I)及(II)中的各重复单元为了便于记载而以特定的顺序来表示,但是各重复单元也可以以无规的顺序存在。

[0073] 【化1】



[0074]



[0075] [通式(I)及(II)中,  $R^{1a}$ 及 $R^{1b}$ 分别独立地表示氢原子、或者未取代或取代的直链或支链的 $C_{1-12}$ 烷基,  $L^1$ 及 $L^2$ 表示连结基,  $R^{2a}$ 及 $R^{2b}$ 分别独立地表示亚甲基或亚乙基,  $R^3$ 表示氢原子、保护基、硫醇基、疏水性基或聚合性基,  $R^4$ 表示羟基、羟苄基、 $-NH-(CH_2)_a-X$ 基(其中,  $a$ 为1~5的整数,  $X$ 分别独立地为包含伯胺、仲胺、叔胺或季铵盐中的一种或二种以上的胺化合物残基,或者非胺化合物的残基)、硫醇基、疏水性基、或者引发剂残基,  $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{5c}$ 及 $R^{5d}$ 分

别独立地表示羟基、羟苄基或 $\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{X}$ 基,在 $\text{R}^{5a}$ 与 $\text{R}^{5b}$ 的总数及 $\text{R}^{5c}$ 与 $\text{R}^{5d}$ 的总数中, $\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{X}$ 基(其中,X为 $(\text{NH}(\text{CH}_2)_2)_e-\text{NH}_2$ ,e为1~5的整数)至少存在2个以上, $\text{R}^{6a}$ 及 $\text{R}^{6b}$ 分别独立地为氢原子、保护基(其中,保护基为通常作为氨基的保护基所使用的Z基、Boc基、乙酰基或三氟乙酰基)或 $\text{L}^3-\text{SH}$ ( $\text{L}^3$ 为选自 $\text{C}_{1-20}$ 亚烷基、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基-苯基、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基-亚苯基- $\text{C}_{1-6}$ 烷基、亚苯基及羰基- $\text{C}_{1-20}$ 烷基的连结基。),m为5~20,000的整数,n为2~5,000的整数,y为0~5,000的整数,z为1~5,000的整数,y+z不大于n,另外,通式(I)及(II)中的各重复单元为了便于记载而以特定的顺序来表示,但是各重复单元可以以无规的顺序存在。]

[0076] 在此,通式(I)及(II)的结构式中,重复单元数(聚合度)为“m”的嵌段是PEG嵌段(非电荷性亲水性高分子链嵌段),将重复单元数为“n-y-z”的部分、重复单元数为“y”的部分和重复单元数为“z”的部分合在一起嵌段是阳离子性高分子链嵌段。

[0077] 上述通式(I)及(II)中, $\text{R}^{1a}$ 及 $\text{R}^{1b}$ 分别独立地表示氢原子、或者未取代或取代的直链或支链的 $\text{C}_{1-12}$ 烷基。作为直链或支链的 $\text{C}_{1-12}$ 烷基,例如可列举甲基、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,作为取代时的取代基,可列举缩醛化甲酰基、氰基、甲酰基、羧基、氨基、 $\text{C}_{1-6}$ 烷氧基羰基、 $\text{C}_{2-7}$ 酰基酰胺基、相同或不同的三 $\text{C}_{1-6}$ 烷基硅氧基、硅氧基或甲硅烷基氨基。在此,缩醛化是指由甲酰基的羰基与例如2分子的碳数1~6个的烷醇或与碳原子数2~6个的可以具有支链的亚烷基二醇的反应所致的缩醛部的形成,也为该羰基的保护方法。例如,在取代基为缩醛化甲酰基时,可以在酸性的温和条件下水解而转化为其他取代基即甲酰基(-CHO;或醛基)。

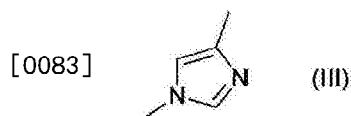
[0078] 另外,在根据需要使用具有氨基等反应性高的取代基的基团作为 $\text{R}^{1a}$ 及 $\text{R}^{1b}$ 的情况下,可以通过该取代或根据需要进一步引入具有活性酯基、马来酰亚胺基的结合基后使靶标指向性分子结合。作为靶标指向性分子,例如可列举前述的物质。

[0079] 上述通式(I)及(II)中, $\text{L}^1$ 及 $\text{L}^2$ 表示连结基。具体而言, $\text{L}^1$ 优选为 $-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}-$ (其中,b为0~5的整数。), $\text{L}^2$ 优选为 $-(\text{CH}_2)_c-\text{CO}-$ (其中,c为1~5的整数。)。予以说明,在b为0的情况下,“ $-(\text{CH}_2)_b-$ ”表示单键。

[0080] 上述通式(I)及(II)中, $\text{R}^{2a}$ 、 $\text{R}^{2b}$ 、 $\text{R}^{2c}$ 及 $\text{R}^{2d}$ 分别独立地表示亚甲基或亚乙基。在 $\text{R}^{2a}$ 及 $\text{R}^{2b}$ 的任一者为亚甲基的情况下,相当于聚(天冬氨酸衍生物),在为亚乙基的情况下,相当于聚(谷氨酸衍生物),另外,在 $\text{R}^{2c}$ 及 $\text{R}^{2d}$ 的任一者为亚甲基的情况下,相当于聚(天冬氨酸衍生物),在为亚乙基的情况下,相当于聚(谷氨酸衍生物)。在这些通式中,在 $\text{R}^{2a}$ 及 $\text{R}^{2b}$ ( $\text{R}^{2b}$ 及 $\text{R}^{2a}$ )表示亚甲基及亚乙基这两者的情况以及 $\text{R}^{2c}$ 及 $\text{R}^{2d}$ ( $\text{R}^{2d}$ 及 $\text{R}^{2c}$ )表示亚甲基及亚乙基这两者的情况下,天冬氨酸衍生物及谷氨酸衍生物的重复单元分别形成嵌段而存在、或者无规地存在。

[0081] 上述通式(I)及(II)中, $\text{R}^3$ 表示氢原子、保护基、硫醇基、疏水性基或聚合性基。具体而言, $\text{R}^3$ 优选为乙酰基、丙烯酰基、甲基丙烯酰基、硫醇基或疏水性基。疏水性基具体为借助连结基 $\text{B}^1$ ( $\text{B}^1$ 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_h-\text{CO}-$ (其中,h为1~5的整数。))或下述式(III)结合的上述的固醇衍生物的残基或 $\text{C}_{4-24}$ 烃基。作为 $\text{R}^3$ 中的疏水性基,优选借助连结基 $\text{B}^1$ 结合的固醇衍生物的残基,更优选胆固醇、胆甾烷醇或二羟基胆固醇的3位羟基的氢原子被除去后的基团借助连结基 $\text{B}^1$ 结合的基团,进一步优选胆固醇3位羟基的氢原子被除去后的基团借助连结基 $\text{B}^1$ 结合的基团。

[0082] 【化2】



[0084] 上述通式(I)及(II)中,  $R^4$ 表示羟基、羟苄基、 $-NH-(CH_2)_a-X$ 基、硫醇基、疏水性基、或引发剂残基。其中, 优选:  $a$ 为1~5的整数,  $X$ 为包含伯胺、仲胺、叔胺或季铵盐中的1种或2种以上的胺化合物残基、或者非胺化合物的残基。进而, 根据情况还优选使 $R^4$ 为 $-NH-R^9$ (其中,  $R^9$ 表示未取代或取代的直链或支链的 $C_{1-20}$ 烷基。)。疏水性基具体为上述的固醇衍生物的残基或 $C_{4-24}$ 烃基。作为 $R^4$ 中的疏水性基, 优选固醇衍生物的残基, 更优选胆固醇、胆甾烷醇、二羟基胆固醇的3位羟基的氢原子被除去后的基团, 进一步优选胆固醇3位羟基的氢原子被除去后的基团。

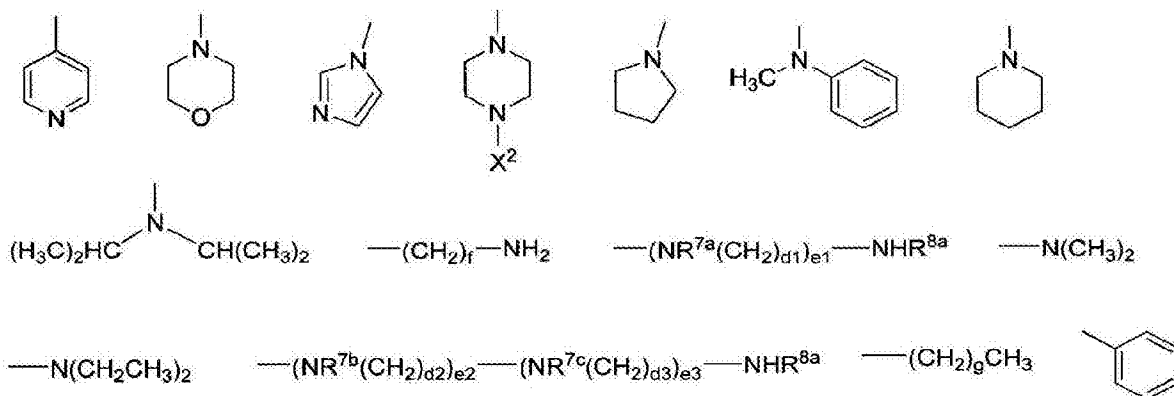
[0085] 上述通式(I)及(II)中,  $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{5c}$ 及 $R^{5d}$ 分别独立地表示羟基、羟苄基、 $-NH-(CH_2)_a-X$ 基。其中, 优选:  $a$ 为1~5的整数,  $X$ 为包含伯胺、仲胺、叔胺或季铵盐中的1种或2种以上的胺化合物残基、或者非胺化合物的残基。

[0086] 在 $R^{5a}$ 与 $R^{5b}$ 的总数及 $R^{5c}$ 与 $R^{5d}$ 的总数中,  $-NH-(CH_2)_a-X$ 基(其中,  $X$ 为 $NH-(CH_2)_e-NH_2$ (其中,  $e$ 为1~5的整数。))优选存在至少2个以上, 更优选存在上述总数的50%以上, 进一步优选存在上述总数的85%以上。另外,  $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{5c}$ 及 $R^{5d}$ 的全部或部分优选为 $-NH-(CH_2)_a-NH-(CH_2)_e-NH_2$ 。

[0087] 进而, 作为 $R^4$ 以及 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{5c}$ 及 $R^{5d}$ 的例示, 特别优选上述的 $-NH-(CH_2)_a-X$ 基中 $X$ 为选自下述15个式子所示的基团的情况。

[0088] 【化3】

[0089]



[0090] 其中, 在上述的各式中,  $X^2$ 表示氢原子、或者 $C_{1-6}$ 烷基或氨基 $C_{1-6}$ 烷基,  $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$ 及 $R^{7c}$ 分别独立地表示氢原子或甲基,  $d_1$ 、 $d_2$ 及 $d_3$ 分别独立地表示1~5的整数,  $e_1$ 、 $e_2$ 及 $e_3$ 分别独立地表示1~5的整数,  $f$ 表示0~15的整数,  $g$ 表示0~15的整数,  $R^{8a}$ 及 $R^{8b}$ 分别独立地表示氢原子、保护基、或 $L^3-SH$ ( $L^3$ 为选自 $C_{1-20}$ 亚烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-苯基、 $C_{1-6}$ 烷基-亚苯基- $C_{1-6}$ 烷基、亚苯基及羰基- $C_{1-20}$ 烷基的连结基。)。其中, 该保护基优选为选自通常作为氨基的保护基所使用的 $Z$ 基、Boc基、乙酰基及三氟乙酰基的基团。予以说明, 在 $f$ 及 $g$ 为0的情况下, 分别是指单键。

[0091] 上述通式(I)及(II)中,  $R^{6a}$ 及 $R^{6b}$ 分别独立地为氢原子、保护基、或 $L^3-SH$ ( $L^3$ 为选自 $C_{1-20}$ 亚烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-苯基、 $C_{1-6}$ 烷基-亚苯基- $C_{1-6}$ 烷基、亚苯基及羰基- $C_{1-20}$ 烷基的连

结基。)。其中,保护基优选为选自通常作为氨基的保护基所使用的Z基、Boc基、乙酰基及三氟乙酰基的基团。

[0092] 上述通式(I)及(II)中, $m$ 为5~20000的整数。另外, $n$ 为2~5000的整数, $y$ 为0~5000的整数, $z$ 为1~5000的整数。但是, $y$ 与 $z$ 的总和( $y+z$ )不大于 $n$ 。

[0093] 上述通式(I)及(II)所示的嵌段共聚物的制造方法并无限定,例如可列举:预先合成包含 $R^{1a}O-$ 或 $R^{1b}O-$ 与PEG链的PEG嵌段,并在该PEG嵌段的单个末端(与 $R^{1a}O-$ 或 $R^{1b}O-$ 相反的末端)依次聚合规定的单体,之后根据需要对侧链以包含阳离子性基的方式进行置换或变换的方法;或者,预先分别合成上述PEG嵌段和阳离子性高分子链嵌段(将重复单元数为“ $n-y-z$ ”的部分、重复单元数为“ $y$ ”的部分和重复单元数为“ $z$ ”的部分合在一起后的嵌段),并将这些嵌段彼此连结的方法等。该制法中的各种反应的方法及条件可以考虑常规方法进行适当选择或设定。上述PEG嵌段例如可以使用国际公开第96/32434号公报、国际公开第96/33233号公报及国际公开第97/06202号公报等中记载的嵌段共聚物的PEG嵌段部分的制法来制备。

[0094] 作为通式(I)及(II)所示的嵌段共聚物的、更具体的制造方法,例如可优选列举:使用在末端具有氨基的PEG嵌段衍生物,并在该氨基末端聚合 $\beta$ -苄基-L-天冬氨酸酯(BLA)及 $N\epsilon$ -Z-L-赖氨酸等保护氨基酸的N-羧酸酐(NCA)而合成嵌段共聚物,之后,以使各嵌段的侧链成为具有上述阳离子性基的侧链的方式用二亚乙基三胺(DET)等进行置换或变换的方法。

[0095] 本发明中,作为通式(I)及(II)所示的嵌段共聚物的具体例,例如可优选列举:后述的实施例中记载的PEG-聚[N-[N'-(2-氨基乙基)-2-氨基乙基]天冬酰胺](PEG-PAsp(DET))、PEG-聚赖氨酸(PEG-PLys)、以及在上述阳离子性嵌段的主链末端直接或根据需要借助连结基附加固醇衍生物的残基的嵌段共聚物、在上述阳离子性嵌段的侧链附加硫醇基的嵌段共聚物等。

[0096] <嵌段共聚物的修饰>

[0097] 在将高分子微囊复合体用作基因载体时,为了将基因(DNA)有效地搬运至靶标组织、靶标细胞,而优选使表面具有与特定的细胞或组织的亲和性高的分子(靶标指向性分子)。例如,在非电荷性亲水性高分子链嵌段的2个末端中,在与以共价键直接或间接地结合于阳离子性高分子链嵌段的末端相反一侧的末端,直接或借助适当的连接子附加靶标指向性分子,由此可以形成在表面露出了靶标指向性分子的内包核酸的高分子微囊复合体。作为靶标指向性分子,例如可列举针对特定的受体蛋白等的配位体或抗体(其片段:F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)等)、糖、核定位信号分子(nuclear localization signal molecule)等。本发明的内包核酸的高分子微囊复合体尽管在内部收容2000个碱基对长度以上的长度的DNA,但是仍是以往所没有的小粒子。因此,通过在其表层具有核定位信号分子,从而即使对非分裂细胞也可以成功地经由通过核膜孔而导入基因。

[0098] <内包核酸的高分子微囊复合体>

[0099] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体内包的核酸为包含2000个碱基长度以上的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、或2000个碱基长度以上的1条单链DNA。就包含彼此互补的碱基序列的2条单链DNA而言,通常彼此结合的双链DNA采取双螺旋结构。双螺旋结构刚性非常强,因此在通过仅将双链DNA和嵌段共聚物混合并利用自组织化形成内包DNA的

高分子微囊复合体的以往方法形成内包核酸的高分子微囊复合体的情况下,只要不使壳部分的非电荷性亲水性高分子链嵌段的密度充分降低,则无法形成接近球体状的小粒子。

[0100] 对此,本发明的内包核酸的高分子微囊复合体内包包含1000个碱基长度以上(优选1500碱基长以上、更优选2000个碱基长度以上)的彼此互补的碱基序列的2条单链DNA、至少双螺旋结构的一部分解离为单链结构的1000个碱基对长度以上(优选1500碱基对长以上、更优选2000个碱基对长度以上)的双链DNA、或1000个碱基长度以上(优选1500碱基长以上、更优选2000个碱基长度以上)的1条单链DNA作为芯部分。即,在本发明的内包核酸的高分子微囊复合体内包pDNA等2条链DNA的情况下,1000个碱基对长度以上(优选1500碱基对长以上、更优选2000个碱基对长度以上)的双链DNA以使双螺旋结构至少一部分解离、优选全部解离的状态与上述嵌段共聚物中的阳离子性高分子链嵌段静电耦合而被收容。因单链DNA表现为挠性链(flexible chain),因此在与上述嵌段共聚物静电耦合时,能够凝缩转移成球体状。即,可以使芯部分(DNA)的表面积非常小,由此壳部分的非电荷性亲水性高分子链嵌段的密度也会飞跃性地增大。

[0101] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体可以通过如下方式获得:在使双链DNA的双螺旋结构的全部或至少一部分解离的状态下,与嵌段共聚物混合,并使其自组织化,由此形成以DNA作为芯的高分子微囊复合体。为了使DNA凝缩得最小而得到球体状的芯,优选使内包的双链DNA以完全解离的2条单链DNA的状态与嵌段共聚物混合,并使其自组织化。由此,形成在芯中包含2条单链DNA的内包核酸的高分子微囊复合体、或者在芯中包含1条单链DNA的内包核酸的高分子微囊复合体。予以说明,双链DNA的双螺旋结构向单链结构的解离可以通过由利用加热处理的变性(热变性)所致的变性等以往公知的变性方法来适当进行。加热处理的温度只要为室温以上即可,优选60℃以上、更优选70℃以上、进一步优选80℃以上、特别优选95℃以上。通过上述温度以上进行加热处理,从而可以使1000个碱基对长度以上的双链DNA的双螺旋结构适当地解离。双链DNA的双螺旋结构的解离的程度可以通过调查熔解曲线来进行判别。

[0102] 本发明中,嵌段共聚物中内包的DNA只要是在与嵌段共聚物的混合时使双螺旋结构至少一部、优选全部解离的状态即可,可以为环状DNA。本发明中,为了使双螺旋结构更容易解离,优选的是线状DNA。环状DNA通过预先利用限制酶处理等使其线状化,从而可以更容易使双螺旋结构解离。

[0103] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体除了以使内包的双链DNA变性(单链化)的状态与嵌段共聚物混合以外,可以与专利文献1~3等中所公开的形成内包核酸的高分子微囊复合体的方法同样地形成。例如,作为成为将变性的DNA与嵌段共聚物混合的反应溶剂的水性介质,为水(尤其是去离子水)或在水中包含各种无机缓冲剂或有机缓冲剂的水性介质,可以在对本发明的复合体的形成反应不带来不良影响的范围内包含乙腈、二甲基甲酰胺、乙醇等与水共混的有机溶剂。制备的内包核酸的高分子微囊复合体的分离及精制可以利用常规方法从水性介质中回收。作为典型的方法,可列举超滤法、渗滤(diafiltration)、透析方法。

[0104] 另外,当使用在阳离子性高分子链嵌段中具有硫醇基的嵌段共聚物的情况下,形成内包DNA的高分子微囊复合体后,将含有该高分子微囊复合体的水性介质放置于氧化条件下,由此可以将阳离子性高分子链嵌段彼此利用基于硫醇基的SS键进行交联。通常,就氧

化条件而言,在周围环境下放置或在空气氧化的条件下放置为佳。交联的程度并无特别限定,但优选在形成高分子微囊复合体的阳离子性高分子链嵌段中导入5~20%、优选8~15%的SH基、并使所有的硫醇基氧化的程度。

[0105] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体利用动态光散射法测定的水性介质中的平均粒径优选为100nm以下、更优选为80nm以下、进一步优选为70nm以下。本发明的内包核酸的高分子微囊复合体如上述那样非常小,因此可有效地进入靶标细胞或组织中。予以说明,内包核酸的高分子微囊复合体在水性介质中的粒径例如可以使用采用了非接触后方散射光学系(NIBS)的动态光散射式粒径·粒度分布测定装置来测定。作为该装置,例如可列举Zetasizer Nano ZS(制品名)(Malvern公司制)。另外,内包核酸的高分子微囊复合体在水性介质中的平均粒径是指利用动态光散射法测定的水性介质中的zeta平均流体力学粒径。

[0106] 本发明的内包核酸的高分子微囊复合体可以利用透射型电子显微镜(TEM)来观察芯部分(DNA)。本发明的内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分为球体状而不为棒状。若实际上用TEM观察本发明的内包核酸的高分子微囊复合体,则观察到圆状而非棒状的芯部分。在本发明及本申请说明书中,“球体状”不仅包括真正的球状,而且还包括接近球的椭球体状(例如,三径中的最长径与剩余一方的径之比为2:1~1:1的椭球体状)。就本发明的内包核酸的高分子微囊复合体而言,通过使芯部分为球体状,从而可比芯部分为棒状的内包核酸的高分子微囊复合体提高芯部分的单位表面积的嵌段共聚物的平均密度。本发明的内包核酸的高分子微囊复合体中,越是提高芯部分的单位表面积的嵌段共聚物的平均密度,越难以受到多数存在于生体内的细胞内外的聚阴离子的影响,可提高生体内稳定性。

[0107] 另外,作为本发明的内包核酸的高分子微囊复合体的大小,芯部分的平均粒径优选为50nm以下、更优选为40nm以下、进一步优选为30nm以下、更进一步优选为25nm以下。予以说明,在本发明及本申请说明书中,“内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分”是指在利用TEM拍摄内包核酸的高分子微囊复合体时被拍摄到的部分,“芯部分的粒径”是指球体状的半径(即,在TEM图像中所拍摄到的芯部分的圆状的半径)。内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的粒径可以如后述参考例(6)所示那样从TEM图像求得。

[0108] 就本发明的内包核酸的高分子微囊复合体而言,芯部分的单位表面积的嵌段共聚物的平均密度优选为0.01链/nm<sup>2</sup>以上、更优选为0.03链/nm<sup>2</sup>以上、进一步优选为0.05链/nm<sup>2</sup>以上。本发明的内包核酸的高分子微囊复合体能够充分地增大嵌段共聚物密度,因此在对全身进行施予时能够使血中滞留性良好。

[0109] 予以说明,内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的单位表面积的嵌段共聚物的平均密度可以利用以下的方法来计算。首先,使用经荧光标记的嵌段共聚物,得到本发明的内包核酸的高分子微囊复合体。接着,从反应溶剂中离心除去复合体,以荧光强度作为指标对上清液中所含的不参与复合体形成的嵌段共聚物进行定量。由与复合体制备时所使用的嵌段共聚物总量的差值算出与复合体结合的嵌段共聚物的分子数,再由该分子数除以反应中所使用的双链DNA的分子数,由此算出形成1分子内包核酸的高分子微囊复合体的嵌段共聚物的平均分子数(单位:链)。进而,对所得内包核酸的高分子微囊复合体的TEM图像进行拍摄,并对所得TEM图像中的多个内包核酸的高分子微囊复合体求得各自的芯部分的圆形半径的长度,将各内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的表面积作为以TEM图像上的半

径为旋转轴的旋转球来进行计算,算出每1分子内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的平均表面积( $\text{nm}^2$ )。最后,由形成1分子内包核酸的高分子微囊复合体的嵌段共聚物的平均分子数除以每1分子内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的平均表面积,由此求得内包核酸的高分子微囊复合体的芯部分的单位表面积的嵌段共聚物的平均密度(链/ $\text{nm}^2$ )。

[0110] 实施例

[0111] 以下,利用实施例等对本发明进行更详细地说明,但是本发明并不受这些例子的限定。另外,以下的所有动物实验依据与国立大学法人东京大学的实验动物的管理和使用有关的指南来进行。

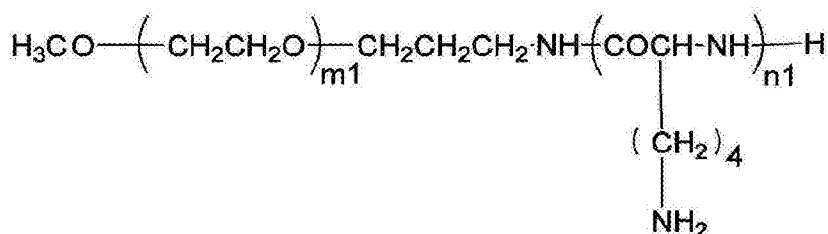
[0112] [参考例1]

[0113] 利用包含PEG嵌段和PLys嵌段的嵌段共聚物,调查内包双螺旋结构的双链DNA(pDNA)的高分子微囊复合体中的、PLys嵌段的聚合度与高分子微囊复合体的形状的关系。

[0114] (1)PEG-PLys

[0115] 使用基于由本发明人之一已经公开的方法(Kataoka et al., Macromolecules, 1996, vol. 29, p. 8556-8557)得到的 $\alpha$ -甲氧基- $\omega$ -氨基PEG(PEG、 $M_w=12\text{kDa}$ 、 $M_w/M_n=1.05$ )作为引发剂,并使N<sup>ε</sup>-三氟乙酰基-L-赖氨酸的N-甲酸酐(NCA)进行开环聚合,由此制造PEG嵌段-聚( $\epsilon$ -三氟乙酰基-L-赖氨酸)嵌段(PEG-PLys(TFA))。此时,调节引发剂与单体NCA之比,由此制造聚合度不同的3种PEG-PLys(TFA)。将如此得到的3种PEG-PLys(TFA)的三氟乙酰基(TFA基)用氢氧化钠进行脱保护,得到聚合度(下述化学式中的“n1”)不同的3种PEG-PLys。

[0116] 【化4】



[0117]

[0118] 各PEG-PLys的PLys嵌段的聚合度基于由<sup>1</sup>H-NMR测定得到的PEG链(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)的亚甲基的质子的总量与赖氨酸重复单元[-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>]的亚甲基的质子的总量之比各自求得为19、39、及70。予以说明,凝胶渗透色谱法(GPC)(使用东曹公司制的高效GPC装置HLC-8220GPC。)的结果:3种PEG-PLys的分散度( $M_w/M_n$ )均不足1.1。

[0119] (2)荧光标记PEG-PLys

[0120] 为了确认PEG-PLys与DNA结合,而预先将PEG-PLys进行荧光标记。具体而言,依据制造者的使用说明书,使Alexa Fluor(注册商标)680 carboxylic acid succinimidyl ester(Molecular Probes公司制)与上述(1)得到的PEG-PLys反应而结合。将未反应的荧光物质使用PD-10脱盐柱(GE Healthcare Life Sciences公司制)来除去。通过具备UV检测器、IR检测器及荧光检测器的GPC来确认PEG-PLys实际被荧光标记的情况。计算荧光标记效率的结果为:在大致全部的PEG-PLys中每40个赖氨酸重复单元结合1分子的荧光物质。

[0121] (3)使用的核酸

[0122] 为了形成用于测定芯部分的每单位表面积的PEG的平均密度 $\sigma$ 的内包核酸的高分子微囊复合体,使用了市售的质粒pBR322(4361bp、TAKARA BIO公司制)。

[0123] 为了形成用于调查血中滞留性的内包核酸的高分子微囊复合体,使用了被荧光物质Cy(注册商标)5标记过的质粒pCAG-Luc2(6.4kbp)。pCAG-Luc2的荧光标记使用Label IT(注册商标)Tracker Nucleic Acid Localization Kit(Mirus Bio公司制)来进行。予以说明,pCAG-Luc2是在质粒pCAGGS(由理研基因库提供)中重组从质粒pGL4(Promega公司制)切出编码Luc2的基因的质粒。

[0124] (4)内包核酸的高分子微囊复合体的形成

[0125] 在PEG-PLys溶液中以N/P比为2的方式快速混合DNA溶液,由此形成内包pDNA的PEG-PLys的高分子微囊复合体。予以说明,N/P比为[PLys嵌段中的胺基的摩尔浓度]/[pDNA中的磷酸基的摩尔浓度]。反应溶剂为10mM HEPES缓冲液(pH7.3),就反应溶液中的pDNA浓度而言,在形成用于测定PEG的平均密度( $\sigma$ )的内包核酸的高分子微囊复合体的情况下,为33.3ng/ $\mu$ L,在形成用于测定血中滞留性的内包核酸的高分子微囊复合体的情况下,为100ng/ $\mu$ L。

[0126] (5)形成内包核酸的高分子微囊复合体的PEG-PLys的确定

[0127] 对于使用荧光标记PEG-PLys所形成的高分子微囊复合体,为了使未结合pDNA的游离的荧光标记PEG-PLys分离与结合了pDNA的荧光标记PEG-PLys分离,将形成高分子微囊复合体后的反应溶液加入到厚壁的聚碳酸酯制管(制品编号:343776、Beckman Coulter公司制)中进行超离心分离处理。关于超离心分离处理,使用具备TLA-120.1转子(Beckman Coulter公司制)的超离心分离机Optima TLX(Beckman Coulter公司制),以50000 $\times$ g进行3小时超离心分离处理。通过Beckman分析用超离心分离机XL-I(Beckman Coulter公司制)确认:在该条件下,游离的PEG-PLys残留于上清液中,而高分子微囊复合体完全沉淀。测定上清液在702nm下的荧光强度,使用基于游离的荧光标记PEG-PLys的标准品的结果制成的标准曲线,算出该上清液的荧光标记PEG-PLys的浓度。予以说明,702nm为荧光物质Alexa Fluor(注册商标)680的极大荧光波长。

[0128] 将从最初添加于用于形成高分子微囊复合体的反应溶液中的荧光标记PEG-PLys的量减去该上清液中的荧光标记PEG-PLys的量后所得的量,作为所形成的全部高分子微囊复合体中所含的荧光标记PEG-PLys的总量(摩尔),将其除以最初添加于反应溶液中的DNA量(摩尔),由此算出与1分子的pDNA结合的荧光标记PEG-PLys的平均分子数(即,每1分子高分子微囊复合体中所含的荧光标记PEG-PLys的平均分子数、单位:链)。

[0129] 该结果为:就每1分子高分子微囊复合体中所含的荧光标记PEG-PLys的平均分子数而言,包含PLys嵌段的聚合度为19的荧光标记PEG-PLys的高分子微囊复合体为436 $\pm$ 31.2链,包含PLys嵌段的聚合度为39的荧光标记PEG-PLys的高分子微囊复合体为258 $\pm$ 10.4链,包含PLys嵌段的聚合度为70的荧光标记PEG-PLys的高分子微囊复合体为168 $\pm$ 2.5链。即可知如下倾向:构成内包核酸的高分子微囊复合体的嵌段共聚物的阳离子性高分子链嵌段的聚合度越大,每1分子高分子微囊复合体中所含的荧光标记PEG-PLys的平均分子数越小。

[0130] (6)TEM观察

[0131] 对使用PEG-PLys所形成的高分子微囊复合体拍摄了TEM图像。在TEM图像中出现