

(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2017-226735

(P2017-226735A)

(43) 公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C08F 293/00 (2006.01)	C08F 293/00	4C076
A61K 31/295 (2006.01)	A61K 31/295	4C084
A61K 31/785 (2006.01)	A61K 31/785	4C086
A61K 41/00 (2006.01)	A61K 41/00	4C206
A61K 31/69 (2006.01)	A61K 31/69	4J026

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-122601 (P2016-122601)
 (22) 出願日 平成28年6月21日 (2016.6.21)

(71) 出願人 504171134
 国立大学法人 筑波大学
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 長崎 幸夫
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
 大学法人筑波大学内
 (72) 発明者 高 振宇
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
 大学法人筑波大学内
 Fターム(参考) 4C076 AA30 AA65 AA95 BB16 CC27
 CC41 CC44 EE02 EE23 EE49
 EE59

最終頁に続く

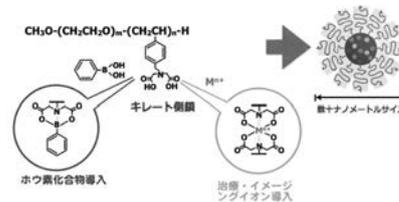
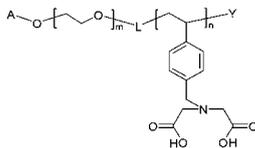
(54) 【発明の名称】 イミノ二酢酸を側鎖に有する親水性高分子及びその使用

(57) 【要約】

【課題】 医用分野のバイオマテリアルとして有用な重合体の提供

【解決手段】 式 I

【化 1】



で表されるブロック共重合体、並びに該共重合体と多価金属イオンの錯体、ホウ素化合物との複合体の提供。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

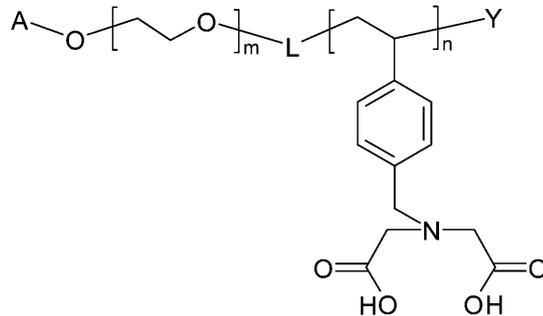
ポリ(エチレン)セグメントとポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン]セグメントを含んでなるブロック共重合体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のブロック共重合体であって、該共重合体が次式 I で表される。

式 I :

【化 1】



10

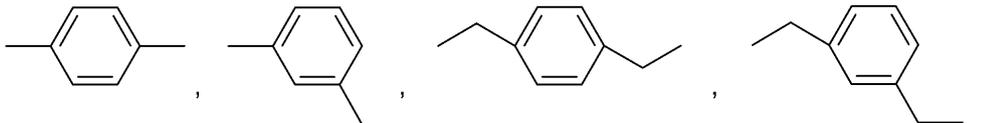
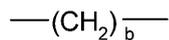
式中、

A は、非置換又は置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R_1R_2CH -$ 基を表し、ここで、 R_1 及び R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシ又は R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ 若しくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、

20

L は、式

【化 2】



30

で表される基から選ばれるか、或は又

結合、 $-(CH_2)_cS-$ 、 $-CO(CH_2)_cS-$ 、 $-(CH_2)_cNH-$ 、 $-(CH_2)_cCO-$ 、 $-CO-$ 、 $-OCO O-$ 、 $-CONH-$ からなる群より選ばれる連結基であり、

で表される基から選ばれ、

式中のジ(カルボキシメチル)アミノ基は n の総数の中の少なくとも 1 個存在し、存在しない場合には、該アミノ基は、H、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であることができ、 Y は H、SH 又は $S(C=S) - Ph$ であり、 Ph は 1 又は 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

40

b は 2 ~ 6 の整数であり、

c は 1 ~ 5 の整数であり、

m は 2 ~ 10, 000 の整数を表し、

n は 2 ~ 500 の整数を表す。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の共重合体と多価金属イオンとの錯体。

【請求項 4】

多価金属イオンが、 $Ga(III)$ 、 $Gd(III)$ 、 $Cu(II)$ 、 $Fe(II)$ 、 $Mn(II)$ 及び $Zn(II)$ イオンからなる群より選ばれる、1 種又は 2 種位以上のイオンである、請求項 3 に記載の錯体。

50

【請求項 5】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の共重合体の前記ジ（カルボキシメチル）基とフェニルボロン酸とのエステル形成複合体。

【請求項 6】

請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の錯体又は複合体であって、水性媒体中で平均粒径がナノメートルサイズの粒子として存在する、錯体又は複合体。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の錯体であって、金属イオンが Fe (II) である錯体を有効成分として含んでなる腫瘍増殖抑制用製剤。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の複合体を有効成分として含んでなる、中性子捕捉療法で使用するための腫瘍増殖抑制用製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キレート化能を有する親水性高分子並びにその使用、具体的には、多価金属イオンやホウ酸誘導体との錯体又は複合体、該錯体又は複合体の医療分野での使用、に関する。

【背景技術】

【0002】

金属イオンは MRI や PET、スペクトなどのイメージングで期待され、鉄や Gd などはすでに MRI 用造影剤として利用されている。また白金はシスプラチンとして抗がん剤となる。最近では二価鉄や二価ルテニウムを利用したフェントン反応による抗がん剤の開発が行われている。さらにホウ素は腫瘍に集積させ、熱中性子による核反応でがんを死滅させる中性子捕捉療法 (BNCT) として臨床試験が行われている段階にある。これらのホウ素や金属イオンはキレート分子によるキレート化などでそれらが本来有する毒性を低下せしめ、腫瘍への取り込み能が正常細胞のそれより高いことを利用して有意に取り込ませて効果を発揮している。

【0003】

しかしながらこの種の低分子物質は正常細胞にもある程度拡散するため、強い副作用が問題となる。そのため、ナノ粒子にフェロセンを封入し、治療効果を上げる試みもあるものの、物理トラップによるフェロセンの固定化では漏れ出しが起こるため、問題の解決にはほど遠い (非特許文献 1 参照)。ポリエチレングリコール - b - ポリグルタミン酸 (PEG - b - PGLu) ブロック共重合体のカルボキシル基にシスプラチンを担持せしめ、ナノ粒子化することにより抗がん効果を上げているものもある (非特許文献 2)。しかし、弱酸であるカルボン酸へのプラチナ金属の担持のため、必ずしも安定性が万全とはいえない。

【0004】

一方、ビニルフェニル脂肪族カルボン酸 (N - (ar - ビニルベンジル) イミノ二酢酸等) がキレート化剤として提案されている (特許文献 1)。また、イミノ二酢酸の有する多価金属イオンに対する安定な錯体形成能を利用して、イミノ二酢酸をセルロース繊維の表面に化学修飾した重金属吸着剤や分子中にイミノ二酢酸残基を組込んだキレート性高分子化合物も提案されている (例えば、WO 2010 / 122954 A1)。さらに、シリカ / ポリマー複合型イミノ二酢酸系キレート吸着材、重金属の吸着分離等に用いられることも知られている (例えば、特許文献 3)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】US 2, 840, 603

【特許文献 2】WO 2010 / 122954 A1

10

20

30

40

50

【特許文献3】特開2014-25779

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Seong-Cheol Park, et al., Journal of Controlled Release 221, 37-47 (2016)

【非特許文献2】Nishiyama Nobuhiro, et al., Bioconjugate chemistry, 14(2), 449-57 (2003)

【発明の概要】

【0007】

本発明者等は、重金属の吸着材としてではなく、むしろ、抗がん剤ナノメディシンやバイオセンシングに使用できる材料を提供することを目的とし、多種多様な親水性高分子を設計してきた。特に、多価金属イオンやホウ酸誘導体との水性媒体中での反応で自己組織化することによりナノ粒子を形成し得る一定のキレート化能を有する親水性高分子として、ポリ(エチレングリコール)セグメントとポリ(スチレン誘導体)セグメントであって、イミノ二酢酸残基を側鎖に組み込んだセグメントを含む共重合体が、多価金属やホウ素化合物などを容易、かつ安定に担持させ、安定なナノ粒子を形成することを見出した。また、かような共重合体は本発明者の知る限り、従来技術文献未載の高分子化合物である。さらに、かような共重合体は、多価金属イオン又はホウ酸誘導体との錯体又は複合体は、生理学的環境下、例えば血清存在下で長期にわたり安定であること、しかも特定の治療やイメージングに適用し得ることも確認できた。

【0008】

したがって、本発明は、アミノ二酢酸基を側鎖に導入したポリマーセグメントとポリ(エチレングリコール)セグメント(単に、PEGという場合あり)を含んでなる、共重合体及びその使用を提供する。限定されるものでないが、主たる態様の発明としては、次の〔1〕～〔8〕に記載のものが挙げられる。

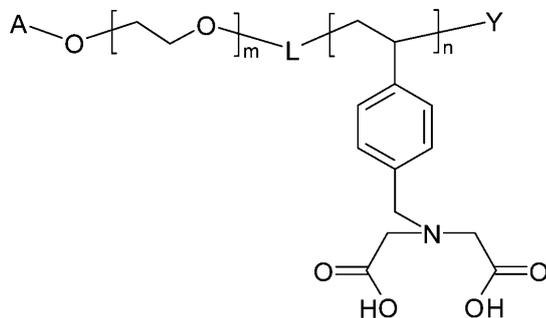
〔1〕ポリ(エチレン)セグメントとポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン]セグメントを含んでなるブロック共重合体。

〔2〕〔1〕に記載のブロック共重合体であって、該共重合体が次式Iで表される。

式I:

【0009】

【化1】



【0010】

式中、

Aは、非置換又は置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 R_1R_2CH- 基を表し、ここで、 R_1 及び R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシ又は R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ 若しくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、

Lは、式

【0011】

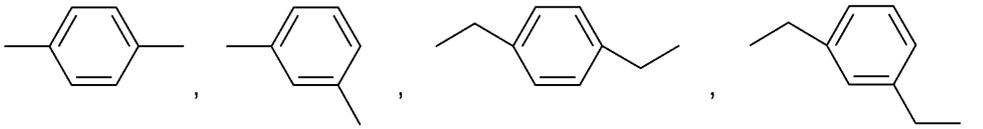
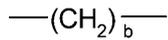
10

20

30

40

【化 2】



【0012】

10

で表される基から選ばれるか、或は又

結合、 $-(\text{CH}_2)_c\text{S}-$ 、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_c\text{S}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_c\text{NH}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{OCOO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ からなる群より選ばれる連結基であり、

で表される基から選ばれ、

式中のジ(カルボキシメチル)アミノ基は n の総数の中の少なくとも 1 個存在し、存在しない場合には、該アミノ基は、 H 、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であることができ、 Y は H 、 SH 又は $\text{S}(\text{C}=\text{S})-\text{Ph}$ であり、 Ph は 1 又は 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

b は 2 ~ 6 の整数であり、

c は 1 ~ 5 の整数であり、

m は 2 ~ 10, 000 の整数を表し、

n は 2 ~ 500 の整数を表す。

なお、上記の L の定義において、方向性がある場合には、記載されている方向性を以って式 I 中に存在するものと、理解されている。以下、式 I 以外においても同じ。

〔3〕〔1〕又は〔2〕に記載の共重合体と多価金属イオンとの錯体。

〔4〕多価金属イオンが、 $\text{Ga}(\text{III})$ 、 $\text{Gd}(\text{III})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{II})$ 、 $\text{Mn}(\text{II})$ 及び $\text{Zn}(\text{II})$ イオンからなる群より選ばれる、1 種又は 2 種位以上のイオンである、〔3〕に記載の錯体。

〔5〕〔1〕又は〔2〕に記載の共重合体の前記ジ(カルボキシメチル)基とフェニルボロン酸とのエステル形成複合体。

〔6〕〔3〕~〔5〕のいずれかに記載の錯体又は複合体であって、水性媒体中で平均粒径がナノメートルサイズの粒子として存在する、錯体又は複合体。

〔7〕〔4〕に記載の錯体であって、金属イオンが $\text{Fe}(\text{II})$ である錯体を有効成分として含んでなる腫瘍増殖抑制用製剤。

〔8〕〔5〕に記載の複合体を有効成分として含んでなる、中性子捕捉療法で使用するための腫瘍増殖抑制用製剤。

【発明の効果】

【0013】

本発明は、ポリ(エチレン)セグメントとポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン]セグメントを含んでなるブロック共重合体が、各種金属イオンやホウ酸誘導体と水性媒体中で安定な錯体又は複合体ミセル又は粒子を形成すること、さらにこのような錯体又は複合体が腫瘍増殖抑制効果を示すことが確認された。したがって、少なくとも医療分野で有用な新規なバイオマテリアルが提供できる。この錯体又は複合体(又はキレート型高分子化合物)は、具体的には、図 1 に概略図として示されるように、キレート能を有する材料をポリアニオンとして導入しており、様々な金属イオンをキレートにより導入することが可能であり、治療やイメージングに利用可能である。また、ボロフェニルアラニン(BPA)などの既存の薬剤以外のフェニルボロン酸やホウ酸などでもエステル結合を介して容易にかつ安定に封入可能であり、BNC T 用薬として期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

50

【図1】本発明のブロック共重合体と多価金属イオン又はホウ素化合物との錯体又は複合体の概念図。

【図2】PEG-b-PAAMSの¹H-NMRスペクトル(酸性)

【図3】PEG-b-PECAMSの¹H-NMRスペクトル

【図4】PEG-b-PAAMSの¹H-NMRスペクトル(中性)

【図5】Fe(II)含有PEG-b-PAAMSナノ粒子の動的光散乱の測定結果

【図6】様々なイオンを封入したキレートナノ粒子を示す図に代わる写真

【図7】様々なイオンを封入したキレートナノ粒子の10%血清存在の存否に関わる粒径および散乱強度測定結果

【図8】Mn(II)、Zn(II)封入ナノ粒子の動的光散乱の測定結果

10

【図9】フェニルボロン酸導入PEG-b-PAAMSの¹H-NMRスペクトル

【図10】PEG-b-PAAMSホウ素錯合体の動的光散乱の測定結果(Z-A(d, nm))

【図11】PEG-b-PAAMSホウ素錯合体のHe p G 2に対する細胞毒性

【図12】キレート高分子の担がんマウス投与による腫瘍増殖パターン

【図13】キレート高分子の担がんマウス投与による体重変化パターン

【図14】Fe(II)内包ナノ粒子(Fe(II)NP)投与群の腫瘍増殖抑制効果

【図15】Fe(II)内包ナノ粒子(Fe(II)NP)投与群の体重変化パターン

【図16】Fe(II)内包ナノ粒子(Fe(II)NP)投与群の生存率曲線

【図17】キレートポリマーPEG-b-PAAMSおよびFe(II)内包ナノ粒子(Fe(II)NP)の細胞毒性

20

【図18】過酸化水素およびFe(II)内包ナノ粒子(Fe(II)NP)共存または非共存下での細胞毒性

【発明の詳細な説明】

【0015】

〔1〕の態様の発明において、ポリ(エチレン)セグメントとポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン]セグメントを含んでなるブロック共重合体は、本発明の目的上、水性媒体中で多価金属との錯体又はフェニルボロン酸とのエステルを形成し、自己組織化によりナノ粒子を形成することができるものが好ましい。本明細書において、水性媒体とは、水(濾過水、蒸留水、逆浸透水、イオン交換水、水道水等を包含する)、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、等を言う。また、ナノ粒子は、理論に拘束されるものでないが、錯体にあつては、図1に示されるように多価金属イオンを介するキレート化によりブロック共重合体が架橋し、ポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン]セグメントに由来する水不溶性のコアを形成し、一方、PEGは水溶性又は親水性に富んだシェルを形成することにより、動的光散乱測定したとき、平均粒径が数ナノメートル~数百ナノメートル、一般的には、5nm~200nm、好ましくは、10~100、より好ましくは、15~60を示す、高分子ミセル様粒子を意味する。フェニルボロン酸とのエステルにあつては、親水性基ジ(カルボキシメチル)アミノ基が疎水性基に転化されるため、所謂、親水性-疎水性ブロック共重合体と同様に、高分子様ミセルを形成するものと理解されている。後者においても、平均粒径は、錯体の場合と実質的な差異はない。

30

40

【0016】

〔2〕の態様の発明において、式Iで表される共重合体も、上記〔1〕について述べたのと同様に、水性媒体中で多価金属との錯体又はフェニルボロン酸とのエステルを形成し、自己組織化によりナノ粒子を形成することができるものが好ましい。ナノ粒子、その他についての説明も、上記〔1〕で述べたのと同様である。

【0017】

式Iにおいて、変動し得る基、略号、等で、mは、一般的には2~10、000の整数、好ましくは12~5、000、より好ましくは14~1、000の整数、さらにより好ましくは20~400の整数であることができ、nは、一般的には2~500の整数、好ましくは4~100、より好ましくは6~60の整数、さらにより好ましくは6~30の

50

整数であることができる。

【0018】

Yは、一般的には、水素、SH又はS(C=S)-Phであり、本発明の目的に沿う限り、さらには後者の2つの基から当該技術分野で周知の方法により変換される他の基若しくは部分であることもできる。

【0019】

式中のジ(カルボキシメチル)アミノ基はnの総数の中、少なくとも1、好ましくは4、より好ましくは6、さらにより好ましくは10個存在し、最も好ましくnの総数の全てが該アミノ基であり、存在しない場合には、該アミノ基は、H、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であることができ、少なくとも1個上記各基もしくは各基の部分としてのアルキルは、直鎖もしくは分岐鎖であることができ、限定されるものでないが、メチル、エチル、プロピル、i s o - プロピル、ブチル、s e c - ブチル、t e r t - ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、ノニル、ウンデシル、等の中の該当するものを挙げる事ができる。

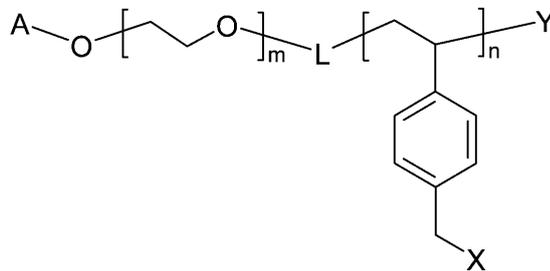
10

【0020】

式Iで表される共重合体は、如何なる方法により製造されたものであってもよい。しかし、限定されるものでないが、本発明者等の開示に基づく、WO 2009/133647 A1又はWO 2016/052463 A1に記載された、式：

【0021】

【化3】



20

【0022】

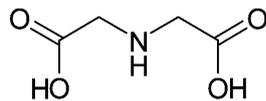
式中、A、L、Y、m及びnは、式Iについて定義したのと同義であり、Xはハロゲン原子、特に、塩素、臭素、ヨウ素である

30

で表されるブロック共重合体(特に、Xが塩素である場合、以下、PEG-PCMSと略記する)と式：

【0023】

【化4】



【0024】

で表されるイミノ二酢酸又はそのジ-C₁₋₆アルキルエステルを、脱ハロゲン化水素剤、有機アミン化合物、エチルジイソプロピルアミン等の存在下の非反応性有機溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジオキサン、ジメチルスルホン(DMSO)、等中、室温~有機溶媒の沸点までの温度で、5~24時間反応させることにより、後者においては、次いで、エステルを加水分解することにより製造できる。

40

【0025】

また、別法として、WO 2009/133647 A1又はWO 2016/052463 A1に記載される、例えばPEG-PCMSの製造方法において、出発原料のモノマーとして用いるクロロメチルスチレンに代え、ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレンを用いることにより、式Iの共重合体を製造することもできる。

50

【0026】

〔3〕～〔6〕の態様の発明について

〔3〕～〔6〕に記載の錯体は、〔2〕について説明したように、図1に示されるようなキレート化を介して水性媒体中で平均粒径がナノメートルサイズの粒子として存在するものが好ましい。したがって、かようなキレート化を生じるような割合で、該共重合体と金属イオンが含まれておれば、その割合は限定されるものでないが、しかし、該共重合体中の総ジ(カルボキシメチル)アミノ基対金属イオンが、一般的には、4:1、好ましくは3:1、より好ましくは2:1となるように該共重合体と金属イオンを含む。一方、複合体は、ジ(カルボキシメチル)アミノ基対フェニルポロン酸が、それぞれ、1~2:2~1の割合で含まれ、少なくともハーフエステル結合を形成した状態にあることが望ましい。

10

【0027】

このような錯体は、水性媒体中で室温下、数分、例えば、5分から数時間、例えば2時間、対応する共重合体とイオン化し得る金属化合物を混合することにより製造することができる。こうして得られる反応混合物は、半透膜、例えば、Spectra/Por(登録商標) Dialysis Membrane(nominal flat width = 45 mm, diameter = 29 mm, vol/length = 6.4 mL/cm, MWC0 = 3, 500)を用いて水に対して透析することにより、前述したような高分子ミセル用ナノ粒子を提供できる。このようなナノ粒子は、凍結乾燥してその後に使用のために調製しておいてもよい。一方、エステル形成複合体は、脱水又は乾燥有機溶媒(例えば、DMF)中で、共重合体とフェニルポロン酸のエステル形成反応を介して調製することができる。このような反応は、限定されるものでないが、室温から100 までの温度で、6時間~24時間実施すればよい。こうして得られる反応液は、前述のような半透膜を用いて水に対して透析することにより、前述したナノ粒子として目的のエステル複合体を提供することができる。この複合体もまた、凍結乾燥してその後に使用に備えることができる。

20

【0028】

〔7〕について、非特許文献1に記載されるように、フェントン反応と称し得るように、第一鉄(Fe(II))イオンは温和な酸化剤といえる過酸化水素(H₂O₂)を高反応性であり、高細胞毒性を示すヒドロキシルラジカルに転化することが知られている。本発明したがう、前述のような錯体であって、多価金属イオンがFe(II)であるものは、生理学的条件下でナノ粒子として安定に存在することができる、水性環境に適合し得るため、フェントン反応を介して、生体内で、通常、腫瘍近傍で高発現している過酸化水素を活性ヒドロキシルラジカル(・OHラジカル)等に転化し、殺腫瘍細胞又は腫瘍増殖抑制効果をもたらし得る。したがって、本発明によれば、〔4〕に記載の錯体であって、金属イオンがFe(II)である錯体を有効成分として含んでなる腫瘍増殖抑制用製剤が提供される。

30

【0029】

かような製剤は、本発明の目的に沿う限り、それ自体当該技術分野で常用されている、キャリアーや賦形剤を含むことができる。このようなキャリアーとしては、滅菌水、緩衝化滅菌水、等を挙げることができ、賦形剤としては、ポリソルベート、各種分子量のポリエチレングリコール、単糖類若しくは二糖類又はその還元物、マルチトール、キシリトール、等を挙げることができる。このような製剤に含められる、錯体は、高分子ミセル様ナノ粒子として、水に可溶化又は均質に分散し得るので、限定されるものでないが、都合よく、生体に非経口的、特に、静脈内に、筋肉内に、また、皮下に投与することができる。かような投与量は、当業者、特に、専門医であれば、実験動物の試験の結果等、を考慮し、適切に決定することができる。しかし、錯体は経口製剤に有効成分として含めることもできる。

40

【0030】

〔8〕における、〔5〕に記載の複合体を有効成分として含んでなる、中性子捕捉療法

50

で使用するための腫瘍増殖抑制用製剤も、〔7〕の錯体を有効成分として含んでなる腫瘍増殖抑制用製剤と同様に調製及び生体に投与できる。また、生理学的水性環境下で、該複合体もナノ粒子として安定に存在し得るので、所謂、EPR効果を介して腫瘍組織内に滞留し得るので、中性子捕捉療法において、著効を奏するものと推認できる。

【実施例】

【0031】

以下、本発明を具体例に基づきより詳細に説明するが、これらの例に本発明を限定することを意図するものではない。なお、以下の実施例において、PEG-b-ポリクロロメチルスチレン(PEG-b-PCMS)は本発明らの開示に基づくWO 2016/052463 A1の実施例に記載の方法により取得したものをを使用した。したがって、後述する共重合体の構造式は、PEGセグメントとポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン](PAAMS)セグメントの連結基の記載は省略されているが、より適切には、それらのセグメント間にパラキシリレンが存在するものと理解されたい。

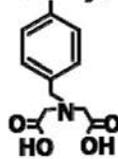
10

【0032】

<実施例1> ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン](PEG-b-PAAMS)の合成法1

【0033】

【化5】



20

【0034】

50 mLナス型フラスコにPEG-b-PCMS(MW:PEG:5kDa, CMS重合度18)の1g、イミノ二酢酸2g、エチルジイソプロピルアミン3g、DMF10mLを加え、100℃で1日反応させた。混合液をMWCO 3,500の透析バッグに入れ、pH3の水に対して24時間透析し、次いで、凍結乾燥して乾燥ポリマーを得た。図2に得られたポリマーのDMSO-d₆溶液の¹H-NMRスペクトルを示す。

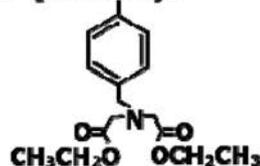
30

【0035】

<実施例2> ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ[ジ(エトキシカルボニルメチル)アミノメチルスチレン](PEG-b-PECAMS)の合成

【0036】

【化6】



40

【0037】

50 mLナス型フラスコに実施例1で用いたのと同じのPEG-b-PCMSの2g、イミノ二酢酸ジエチル5g、DMF10mLを加え、50℃で1日反応させた。混合液を500mLの冷2-プロパノールに沈殿させ、その後減圧乾燥を行い、ポリマーを得た。図3に得られたポリマーのDMSO-d₆溶液の¹H-NMRスペクトルを示す。

【0038】

<実施例3> ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ[ジ(カルボキシメチル)アミノメチルスチレン](PEG-b-PAAMS)の合成法2

50

50 mLナス型フラスコにPEG-b-PECA MSの700 mgをDMF 20 mLに溶解させ、水酸化ナトリウム0.5 g、水10 mLを加えて室温で4日間反応させた。反応混合物を上記と同様に水に対して透析後、凍結乾燥によってポリマーを得た。図4に得られたポリマーのDMSO-d₆溶液の¹H-NMRスペクトルを示す。

【0039】

<実施例4> Fe(II)含有ナノ粒子の作製

実施例3で合成したPEG-b-PAA MSの50 mgおよびFeCl₂の12 mgを10 mLの水に溶解させ、10分間攪拌し、上記と同様に水に対して透析を行った。図5に動的光散乱測定結果を示す。粒径57 nmの粒子が得られた。

【0040】

<実施例5> 種々イオンによるナノ粒子の作製

Ga(III)、In(III)、Gd(III)、Cu(II)、Fe(II)、Fe(III)に対するPEG-b-PAA MSの複合ナノ粒子化を行った(PEG-b-PAA MS:金属イオン塩化物20 mM、金属イオン:キレート分子=2:1で混合後37で1時間攪拌し、上記と同様に水に対して透析を行った。)。図6に得られた溶液の写真を示す。

【0041】

サイズ、イオン封入量及び封入率は、次のとおりである。

【0042】

【表1】

表1:

	Ga	In	Gd	Cu	Fe(II)	Fe(III)
ナノ粒子サイズ	62 nm	凝集	57 nm	57 nm	54 nm	凝集
イオン濃度:						
理論値	214 ppm		196 ppm	79.4 ppm	69.9 ppm	
計算値	227 ppm		83.1 ppm	84.3 ppm	59.2 ppm	
捕捉率	106%		42.4%	106%	84%	

【0043】

<実施例6> 金属イオン封入の安定性

実施例5で作製した金属イオン内封ナノ粒子(In(III)、Fe(III)を除く)の安定性を10%血清存在下で2日間攪拌し、動的光散乱測定を行ったところ、血清存在下でも粒径は殆ど変化せず、散乱強度の低下もみられなく、極めて安定であった(図7参照)。

【0044】

<実施例7> Mn(II)、Zn(II)の封入

実施例5で行ったと同様の方法で金属イオンをMn(II)、Zn(II)で行ったところ、粒径45-50 nmの金属内包粒子が得られた(図8参照)。

【0045】

<実施例8> PEG-b-PAA MSホウ素錯合体(又は複合体)の作製

PEG-b-PAA MSの100 mg、フェニルボロン酸100 mg、活性化したモレキュラーシーブ100 mg、脱水DMF 10 mLを30 mLフラスコにとり、80℃、1日反応させた。反応後モレキュラーシーブをろ別し、ろ液をSpectra/Por(登録商標) Dialysis Membrane(nominal flat width h=45 mm, diameter=29 mm, vol/length=6.4 mL/cm, MWCO=3,500)の透析バッグにいれ、水に対して透析したのち凍結乾燥した。収量75 mg。得られたポリマーの¹H-NMRを図9に示す。2 mg/mL水溶液を作製し、IPC-MSによりホウ素濃度を測定したところ500 ppmであった。動的光散

10

20

30

40

50

乱測定によりこのポリマーは水中で会合しており、37nmの粒径であった(図10参照)。

【0046】

<実施例9> PEG-b-PAAMSホウ素錯合体の細胞毒性

96穴プレートに 1×10^4 のHepG2細胞を播種し、0.5mg/mL及び1.0mg/mLとなるようPEG-b-PAAMSホウ素錯合体を添加し、24時間インキュベートした後EST溶液を添加、2時間後に450nmのUV吸収を測定しコントロールと比較したところいずれも80%以上の生存率を確認した(図11参照)。

【0047】

<実施例10> キレートポリマー(PEG-b-PAAMS)およびそのエステル体(PEG-b-PECAMS)の毒性、抗腫瘍特性

10

サンプル群(1群6匹):

- 1 PBS
- 2 実施例1で作製したポリマー(PEG-b-PAAMS)のPBS溶液(25mg/mL)
- 3 実施例2で作製したポリマー(PEG-b-PECAMS)のDMSO溶液をPBSに対して透析した溶液(25mg/mL)

【0048】

Balb/Cマウス皮下に 1×10^6 個のColon-26細胞を投与し7日後に上記サンプルを100 μ L尾静注した(100mb/Kg-BW, 0, 3, 6日と三回投与)。体重増加および腫瘍成長とも3つの投与群で有意な差が見られず、本キレート剤投与により強い毒性は見られなかったものの、抗腫瘍活性は見られなかった(図12, 13参照)。

20

【0049】

<実施例11> Fe(II)含有ナノ粒子の抗腫瘍活性

Balb/Cマウス皮下に 1×10^6 個のColon-26細胞を投与し7日後に実施例4で作製したFe(II)含有ナノ粒子を尾静脈から投与した(7.75mg/mL, 100 μ L, 31mg/Kg-BW, 0, 3, 6日三回投与)。Fe(II)を有する粒子は有意に腫瘍増殖抑制効果を示し、顕著な体重減少を示さなかった(図14, 15参照)。

30

【0050】

<実施例12> Fe(II)含有ナノ粒子の細胞毒性

96穴マイクロプレートに 10^4 /ウェルのHeLa細胞を播種し、24時間培養した後、培養液を除き、下記試料を加え、24時間培養した。その後WST測定により細胞生存率を求めた。図17に示すようにこの条件下ではポリマーおよびFe(II)含有ナノ粒子も全く細胞毒性を示さないことが確認された。

試料

- 1 PEG-b-PAAMS(10mg/mL、100mg/mL溶液を血清で10倍希釈)
- 2 PEG-b-PAAMS(5mg/mL、100mg/mL溶液を血清で20倍希釈)
- 3 実施例11で用いたFe(II)含有ナノ粒子(1.55mg/mL、上記動物実験で使用した溶液を血清で5倍希釈)

40

【0051】

<実施例13> フェントン(Fenton)反応によるFe(II)含有ナノ粒子の細胞毒性

96穴マイクロプレートに 10^4 /ウェルのHeLa細胞を播種し、24時間培養した後、培養液を除き、下記試料を加え、24時間培養した。その後WST測定により細胞生

50

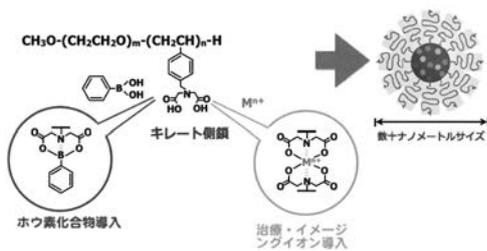
存率を求めた。図18に示すようにH₂O₂単独では3 × 10³ mol / L下で全く細胞毒性を示さないのに対し、Fe (II) 含有ナノ粒子共存下で著しい細胞毒性を示し、効果を示した。共存試験ではFe (II) 含有ナノ粒子 (1.55 mg / mL、上記動物実験で使用した溶液を血清で5倍希釈)

【産業上の利用可能性】

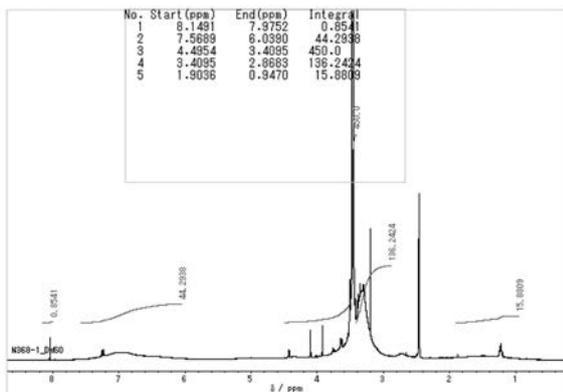
【0052】

本発明のブロック共重合体は、多価金属イオン又はホウ素化合物と生理的条件下で安定なナノ粒子として錯体又は複合体を提供でき、また、かようなナノ粒子は腫瘍増殖抑制効果を示す。したがって、本発明は医用分野で利用可能である。

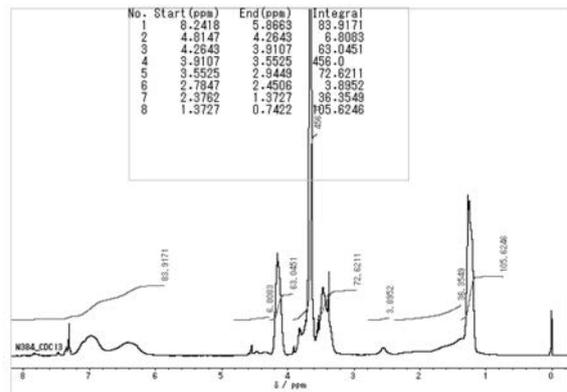
【図1】



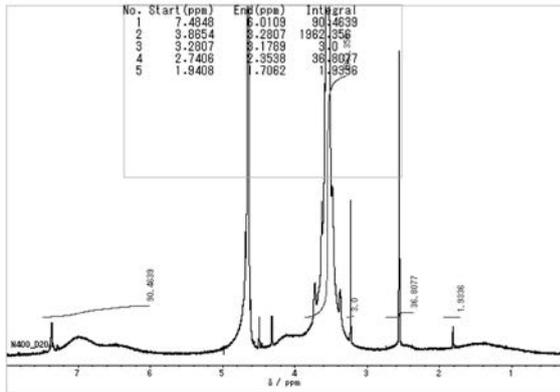
【図2】



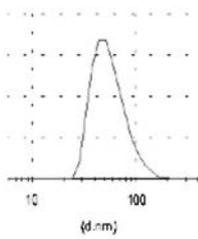
【図3】



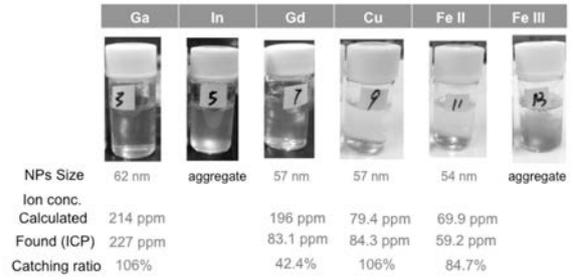
【 図 4 】



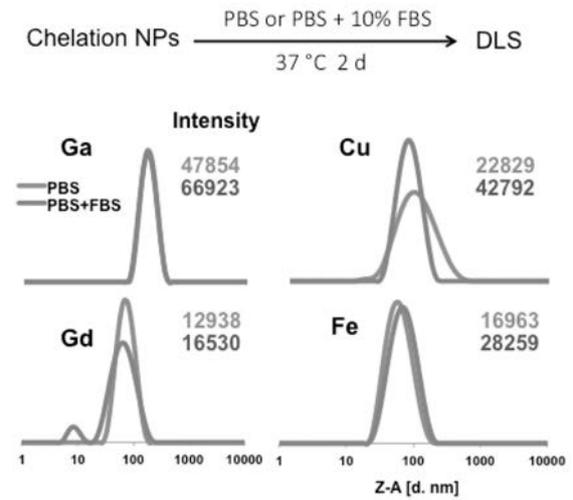
【 図 5 】



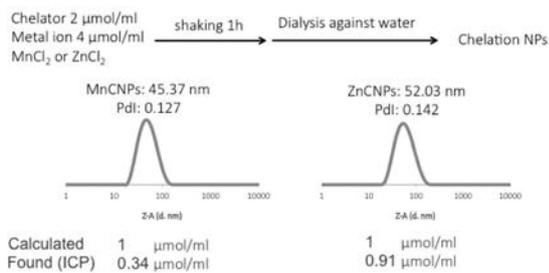
【 図 6 】



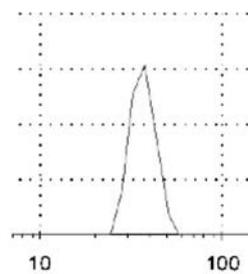
【 図 7 】



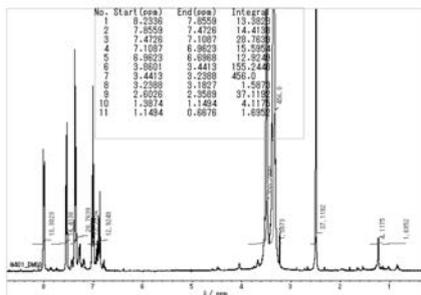
【 図 8 】



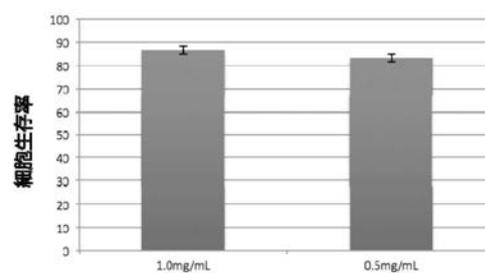
【 図 10 】



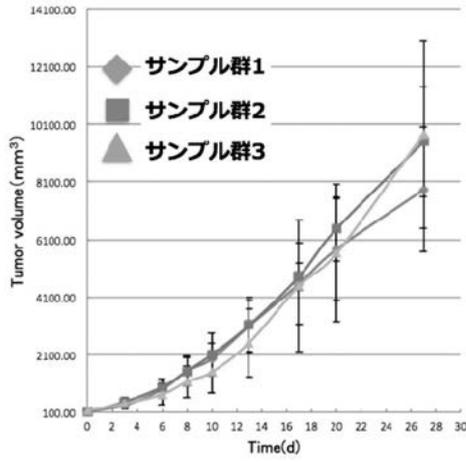
【 図 9 】



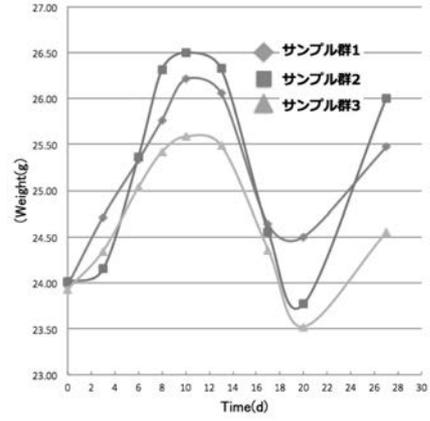
【 図 11 】



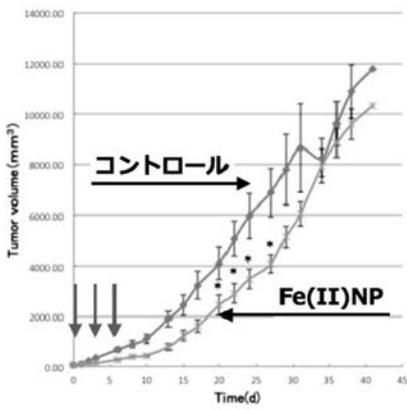
【 図 1 2 】



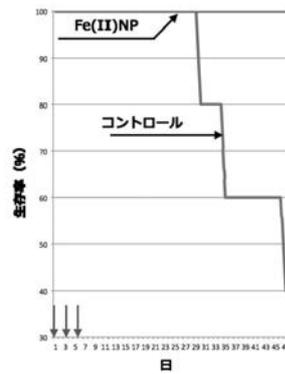
【 図 1 3 】



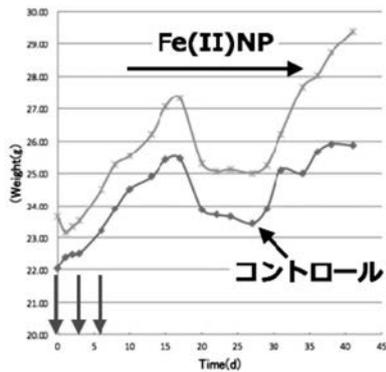
【 図 1 4 】



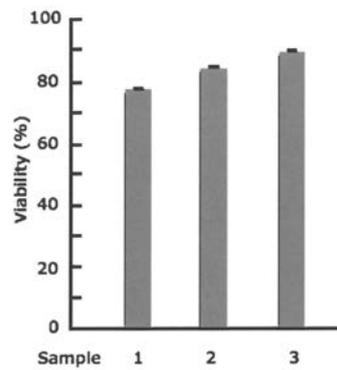
【 図 1 6 】



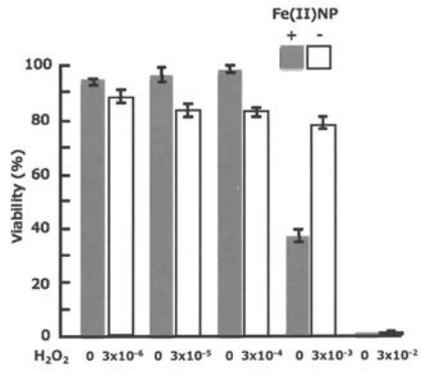
【 図 1 5 】



【 図 1 7 】



【 図 18 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 J 1 0 0
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K 9/51	(2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32	
A 6 1 K 47/50	(2017.01)	A 6 1 K	47/48	
C 0 8 F 8/30	(2006.01)	C 0 8 F	8/30	

Fターム(参考) 4C084 AA11 MA38 MA66 NA14 ZB26 ZC752
 4C086 AA01 AA02 AA03 DA43 FA03 FA06 HA11 MA01 MA04 MA38
 NA13 NA14 ZB26 ZC75
 4C206 AA01 AA02 JB11 MA01 MA04 MA25 MA30 MA58 NA13 NA14
 ZB26 ZC75
 4J026 HA45 HB08 HB50 HD08 HE01
 4J100 AB08P BA10H BA28H CA04 EA09 FA03 FA19 FA28 GC25 HA33
 HA61 HC47 HD19 HE05 HE08 HE14 HG01 JA50 JA53