

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6522391号  
(P6522391)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl. F I  
**CO8L 67/04 (2006.01)** CO8L 67/04 ZBP  
 CO8L 101/16 (2006.01) CO8L 101/16  
 A61K 47/34 (2017.01) A61K 47/34

請求項の数 8 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2015-71185 (P2015-71185)	(73) 特許権者	399030060
(22) 出願日	平成27年3月31日 (2015.3.31)		学校法人 関西大学
(65) 公開番号	特開2016-190921 (P2016-190921A)		大阪府吹田市山手町3丁目3番35号
(43) 公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)	(74) 代理人	110000796
審査請求日	平成30年1月26日 (2018.1.26)		特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	大矢 裕一
			大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学
			校法人関西大学化学生命工学部内
		(72) 発明者	吉田 泰之
			大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学
			校法人関西大学大学院理工学研究科内
		(72) 発明者	川原 佳祐
			大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学
			校法人関西大学化学生命工学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 温度応答性を有する生分解性ポリマー組成物及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 両末端に反応性の官能基を有するA-B-A型トリブロック共重合体、及び  
 (2) 該A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩を含有する温度応答性生分解性ポリマー組成物であって、

該反応性の官能基が、活性エステル基、アミノ基、アルデヒド基、チオエステル基、システイン残基、ジオール基、ポロン酸基、チオール-エンクリック反応可能な基、ディールスアルダー反応可能な基、触媒クリック反応可能な基、又は無触媒クリック反応可能な基であり、

該Aブロックが、ポリ( -カプロラクトン-co-グリコール酸)を含み、  
 該Bブロックが、ポリエチレングリコール鎖を含む、温度応答性生分解性ポリマー組成物

10

【請求項2】

前記(2)化合物又はその塩の含有量が、前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して、0.25~20質量部である、請求項1に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物

【請求項3】

前記Aブロックが前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体の20~75質量%を構成し、前記Bブロックが前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体の25~80質量%を構成する、請求項1又は2に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

20

## 【請求項4】

さらに、(3)前記A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーを含有する、請求項1～3の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

## 【請求項5】

前記反応性の官能基が、スクシンイミドエステル基である、請求項1～4の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

## 【請求項6】

前記(2)化合物又はその塩が、ポリアミン化合物又はその塩である、請求項1～5の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

## 【請求項7】

請求項1～6の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物の製造方法であって、

- (i)ポリエチレングリコールの存在下、 $\epsilon$ -カプロラクトン及びグリコリドを重合させて、A-B-A型トリブロック共重合体を製造する工程、
- (ii)前記工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体の両末端に、反応性の官能基を形成する工程、並びに
- (iii)前記工程(ii)で得られた(1)A-B-A型トリブロック共重合体と前記(2)A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩とを混合する工程を順に含む、生分解性ポリマー組成物の製造方法。

## 【請求項8】

前記工程(iii)において、前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーをさらに混合する、請求項7に記載の生分解性ポリマー組成物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、温度応答性を有する生分解性ポリマー組成物及びその製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

温度応答性ポリマーとは、温度変化に応答して溶解性等の物性を变化させるポリマーの総称である。このうち、溶液状態で外部の温度変化に応じてゾル-ゲル相転移現象を示すポリマーが知られている。特に薬物担体等の医療用分野においては、生体適合性及び生分解性を有し、かつ室温では溶液(ゾル)状態であるが、生体内に注入すると、体温に感応してin situでヒドロゲルを形成する温度応答性のインジェクタブルポリマー(以下、「IP」ともいう。)の開発が注目されている。

## 【0003】

このような温度応答性IPとしては、これまでに、ポリ(乳酸)(PLA)及びポリグリコール酸(PGA)の共重合体(以下、「PLGA」ということもある)と、ポリエチレングリコール(PEG)とからなるトリブロック共重合体(以下、「PLGA-b-PEG-b-PLGA」、単に「PLGA-PEG-PLGA」ともいう);ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)(PCL)及びポリグリコール酸(PGA)の共重合体(以下、「PCGA」ともいう)と、ポリエチレングリコール(PEG)とからなるトリブロック共重合体(以下、「PCGA-b-PEG-b-PCGA」、単に「PCGA-PEG-PCGA」ともいう)等が報告されている(非特許文献1～3参照。)

## 【0004】

また、混合による化学反応によって、共有結合による架橋を生成させる二液混合型IP組成物も知られている。このような二液混合型IP組成物としては、例えば、末端にスクシンイミドエステル基を有するポリエーテル化合物と末端にアミノ基を有するポリエーテル化合物とを混合した組成物が報告されている(非特許文献4参照。)

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Macromol. Rapid Commun., 2001, 22, p.587.

【非特許文献2】Macromolecular Research, 2013, 21, p.207-215.

【非特許文献3】Polym. J., 2014, 46, p.632-635.

【非特許文献4】Macromolecules, 2008, 41, p.5379.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記PLGA - b - PEG - b - PLGA及びPCGA - b - PEG - b - PCGAからなる温度応答性IPは、生体内では体温によりゲル化するものの、湿潤な環境下において、特に体液等により希釈されてしまい、ゲル状態を長期間維持することは困難であると考えられる。

10

【0007】

また、上記二液混合型IP組成物は、混合状態で放置しておくこととゲル化が進行してしまうことから、混合後すぐに生体内に注入しなければならないと、取り扱いが容易ではないと考えられる。また、生体内に注入する前の、シリンジ、カテーテル等の中にある段階でゲル化が起きてしまうと、注入できなくなることが懸念される。特に霧吹き等で噴霧して使用する方法では、目的部位に対して望み通りに噴霧できないと考えられる。

【0008】

本発明は、上記の要望に鑑みてなされたものであり、温度にตอบสนองしてゾル - ゲル転移を示す生分解性ポリマー組成物であって、湿潤条件下において、ゲル状態を長期間維持できる生分解性ポリマー組成物を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、両末端に反応性の官能基を有するトリブロック共重合体に対して、該トリブロック共重合体と反応可能な化合物を含有させたポリマー組成物が、上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、下記の温度応答性を有する生分解性ポリマー組成物及びその製造方法を提供することにある。

項1 .

30

(1)両末端に反応性の官能基を有するA - B - A型トリブロック共重合体、及び  
(2)該A - B - A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩を含有する温度応答性生分解性ポリマー組成物であって、  
該Aブロックが、ポリ( - カプロラクトン - co - グリコール酸 ) を含み、  
該Bブロックが、ポリエチレングリコール鎖を含む、温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項2 .

前記(2)化合物又はその塩の含有量が、前記(1)A - B - A型トリブロック共重合体100質量部に対して、0.25 ~ 20質量部である、項1に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項3 .

40

前記Aブロックが前記(1)A - B - A型トリブロック共重合体の20 ~ 75質量%を構成し、  
前記Bブロックが前記(1)A - B - A型トリブロック共重合体の25 ~ 80質量%を構成する、項1又は2に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項4 .

さらに、(3)前記A - B - A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーを含有する、  
項1 ~ 3の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項5 .

前記反応性の官能基が、スクシンイミドエステル基である、項1 ~ 4の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項6 .

50

前記(2)化合物又はその塩が、ポリアミン化合物又はその塩である、項1～5の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項7.

項1～6の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物の製造方法であって、(i)ポリエチレングリコール、又は脂肪族ジオールの存在下、 $\epsilon$ -カプロラクトン及びグリコリドを重合させて、A-B-A型トリブロック共重合体を製造する工程、

(ii)前記工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体の両末端に、反応性の官能基を形成する工程、並びに

(iii)前記工程(ii)で得られた(1)A-B-A型トリブロック共重合体と(2)該A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩とを混合する工程を順に含む、生分解性ポリマー組成物の製造方法。

10

項8.

前記工程(iii)において、前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーをさらに混合する、項7に記載の生分解性ポリマー組成物の製造方法。

項9.

さらに、(4)水を含む、項1～6の何れか一項に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物。

項10.

項9に記載の温度応答性生分解性ポリマー組成物からなるゲル。

【発明の効果】

20

【0011】

本発明の生分解性ポリマー組成物は、室温下において、水溶液(ゾル)であり、温度に応答してゾル-ゲル転移を示す。特に、本発明の生分解性ポリマー組成物は、体内等の湿潤条件下においても、ゲル状態を長期間維持できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、試験例1における混合直後に、実施例1の生分解性ポリマー組成物がゾル状態を示す写真である。

【図2】図2は、実施例1の生分解性ポリマー組成物を37℃に加熱した後、ゲル状態になったことを示す写真である。

30

【図3】図3は、実施例1の生分解性ポリマー組成物を37℃で15分間加熱保持した後、4℃に下げてもゲル状態を維持したことを示す写真である。

【0013】

#### 1. 温度応答性生分解性ポリマー組成物

本発明の温度応答性生分解性ポリマー組成物(以下、「温度応答性ポリマー組成物」又は「ポリマー組成物」ということもある)は、(1)両末端に反応性の官能基を有するA-B-A型トリブロック共重合体(以下、「(1)A-B-A型トリブロック共重合体」、「(1)トリブロック共重合体」又は「第1成分」ということもある)、及び(2)該A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩(以下、「(2)化合物」、「(2)反応性化合物」又は「第2成分」ということもある)を含む、かつ該(1)A-B-A型トリブロック共重合体のAブロックが、ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン-co-グリコール酸)を含み、該(1)トリブロック共重合体のBブロックが、ポリエチレングリコール鎖を含むことを特徴とする。

40

【0014】

本発明の温度応答性生分解性ポリマー組成物は、温度に応答してゾル-ゲル転移を示す。特に、室温と体温との間の温度でゲル化できるという特徴を有する。そのため、優れたin situゲル化システムを提供でき、外科的処置の必要を無くし、注射により低侵襲にインプラントを形成することができる。生理(薬理)活性物質等を安定に内包し、それらを体内で徐放できるため、注入可能な(インジェクタブル)ドラッグデリバリーシステムを提供できる。さらに、注射可能な組織修復及び器官再生用の足場として、また、適した生細胞を内包させることにより、注射投与で生体内組織の欠損部位に細胞を移植する細胞デ

50

リバリーシステムとしても利用できる。また、血管内に注入して血流を意図的に止める血管塞栓物質等に用いることもでき、この場合には薬剤、造影剤等を含ませて使用することも可能である。さらに、外科的手術の際に癒着が生じる可能性のある面に塗布あるいは噴霧することにより、ゲル状の膜を形成させ、癒着防止材として使用することも可能である。

#### 【0015】

本発明の温度応答性生分解性ポリマー組成物は、前記(1)A-B-A型トリブロック共重合体、及び(2)該トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩を含有していれば、特に限定されない。例えば、

(I) (1)トリブロック共重合体及び(2)反応性化合物のみからなるポリマー組成物；

(II) 前記(I)に、さらに(3)前記トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマー（以下、「(3)その他の温度応答性ポリマー」ということもある）を含有するポリマー組成物；

(III) (1)トリブロック共重合体、(2)反応性化合物及び水を含有するポリマー組成物；

(IV) 前記(III)に、さらに(3)その他の温度応答性ポリマーを含有するポリマー組成物；

(V) 前記(I)に、さらに薬物、色素又は造影剤を含有するポリマー組成物；

(VI) 前記(II)に、さらに薬物、色素又は造影剤を含有するポリマー組成物；

(VII) 前記(III)に、さらに薬物、色素又は造影剤を含有するポリマー組成物；

(VIII) 前記(IV)に、さらに薬物、色素又は造影剤を含有するポリマー組成物；

等が挙げられる。なお、本明細書中において、「含有する」又は「含む」なる表現については、「含有する」、「含む」、「実質的にのみからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

#### 【0016】

以下の記載では、特に断りがない限り、本発明のポリマー組成物は固体状であるものとしてポリマー組成物を説明するが、本発明のポリマー組成物は固体に限定されない。即ち、本発明のポリマー組成物は、液体状及び固体状のいずれの形態も含むものとする。

#### 【0017】

##### 1-1. (1)両末端に反応性の官能基を有するトリブロック共重合体

本発明のポリマー組成物は、(1)両末端に反応性の官能基を有するA-B-A型トリブロック共重合体を含有する。

#### 【0018】

(1)A-B-A型トリブロック共重合体は、生分解性であって、前記Aブロックがポリ(-カプロラクトン-co-グリコール酸)(PCGA)を含み、前記Bブロックがポリエチレングリコール(PEG)鎖を含み、かつ、両末端に反応性の官能基(Fc)を有する。

#### 【0019】

該反応性の官能基(Fc)としては、特に限定はなく、例えば、縮合反応可能な基、付加反応可能な基等が挙げられる。

#### 【0020】

縮合反応可能な基としては、例えば、アミノ基等のスクシンイミドエステル基と縮合反応可能な基；スクシンイミドエステル基、ニトロフェニルエステル基、1,2,3,4,5-ペンタフルオロフェニルエステル基、4-クロロフェニルエステル基等のアミノ基と縮合反応可能な活性エステル基；アルデヒド等のアミノ基とシッフ塩基結合形成可能な基；アミノ基等のアルデヒド基とシッフ塩基結合形成可能な基；チオエステル基等のシステイン残基と縮合反応可能な基；システイン残基等のチオエステル基と反応可能な基；フェニルポロン酸基等のジオール基と反応可能な基；ジオール基等のフェニルポロン酸基と反応可能な基等が挙げられる。中でも、好ましくはスクシンイミドエステル基及びアミノ基であり、より好ましくはスクシンイミドエステル基である。

#### 【0021】

付加反応可能な基としては、例えば、チオール-エンクリック反応可能な基；ディールス-アルダー反応可能な基；クリック反応可能な基；無触媒クリック反応可能な基等が挙げられる。

## 【0022】

反応性の官能基としては、好ましくは縮合反応可能な基であり、より好ましくはスクシンイミドエステル基及びアミノ基であり、特に好ましくはスクシンイミドエステル基である。

## 【0023】

(1)A-B-A型トリブロック共重合体は、Aブロックと反応性を有する官能基(Fc)との間に、さらにリンカー部分(以下、「link」ということもある)を含むことができる。該リンカーとしては、特に限定はなく、例えば、コハク酸又はその誘導体(例えば、無水コハク酸、コハク酸ジメチル等のコハク酸ジアルキルエステル)、エチレンジイソシアナート、エチレングリコール、エチレンジアミン、ピペラジン、グリシン等のアミノ酸及びそのオリゴマー、並びにこれらの組合せから形成(誘導)される基等が挙げられる。

10

## 【0024】

本発明で使用する(1)A-B-A型トリブロック共重合体の各物性；例えば、(1)トリブロック共重合体に対するPCGAブロック(Aブロック)及びPEGブロック(Bブロック)の質量比率；

PCGAブロック及びPEGブロックの各重量平均分子量；

(1)トリブロック共重合体の数平均分子量(Mn)及び当該数平均分子量に対する重量平均分子量の比(Mw/Mn)；

PCGA中の - カプロラクトンとグリコール酸とのモル比；

- カプロラクトン及びグリコール酸の各重合度；等の各物性は、特に限定されない。

20

## 【0025】

上記各物性の好ましい一例を挙げると、

PCGAブロック及びPEGブロックの質量比率は、PCGAブロックが(1)トリブロック共重合体の20~75質量%を構成し、かつPEGブロックが(1)トリブロック共重合体の25~80質量%を構成することが好ましい。

## 【0026】

PCGAブロックの重量平均分子量は、0.8k~2.0k(800~2000)が好ましく、

PEGブロックの重量平均分子量は、0.8k~2.0k(800~2000)が好ましく、

(1)トリブロック共重合体の数平均分子量(Mn)は、2.4k~6.0k(2400~6000)が好ましく

30

(1)トリブロック共重合体の数平均分子量に対する重量平均分子量の比(Mw/Mn)は、1.0~1.8が好ましく、

PCGA中の - カプロラクトンとグリコール酸とのモル比は、 - カプロラクトン(CL) : グリコール酸(GA) = 3.0 : 1~5.0 : 1(モル比)が好ましく、

- カプロラクトンの重合度は、5~20が好ましく、

グリコール酸の重合度は、1~5が好ましい。

## 【0027】

なお、上記各モル比、重合度及び質量比率は、例えば、<sup>1</sup>H-NMR等の公知の方法を用いて測定することができる。上記各数平均分子量及び重量平均分子量は、例えば、上記<sup>1</sup>H-NMRに加えてGPC(Gel Permeation Chromatography)等を用いて測定できる。

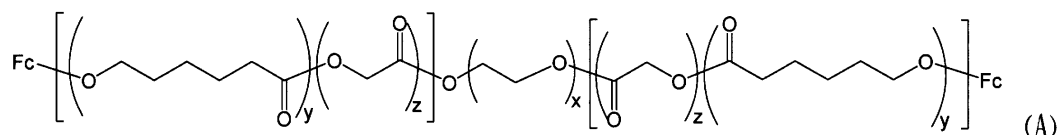
40

## 【0028】

本発明で使用する(1)A-B-A型トリブロック共重合体としては、以下の式(A)：

## 【0029】

## 【化1】



## 【0030】

50

で表すことができ、Fc - PCGA - b - PEG - b - PCGA - Fcとも称される（ここでFcは、反応性の官能基を意味し、b はblockを意味する）。上記式(A)中のx、y及びzは、それぞれ上述の各物性を満たすことができるような値であれば制限はない。中でも、例えば、xは15～50の数が好ましく、20～45の数がより好ましい。yは5～20の数が好ましく、7～15の数がより好ましい。zは1～5の数が好ましく、1～3の数がより好ましい。また、式(A)中に記載された2つのyは、ともに同じ数であってもよいし、異なる数であってもよい。このことは、式(A)中に記載された2つのzについても同様である。なお、x、y及びzは、ポリマー中の各ユニットの平均個数を表し、<sup>1</sup>H-NMR及びGPCから求められる。式(A)中の[ ]で示されるPCGAブロック内では、 $\epsilon$ -カプロラクトンユニットとグリコール酸ユニットとの配列に規則性は無く、上記式(A)の配列の順に限定されない。また、y及びzは、片方のPCGAブロック内に含まれる  $\epsilon$ -カプロラクトンユニット及びグリコール酸ユニットそれぞれのユニットの平均個数を示す。

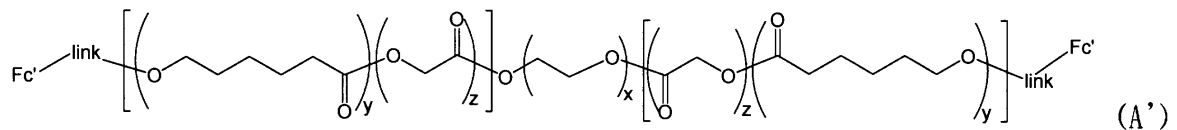
10

## 【0031】

該Fc - PCGA - b - PEG - b - PCGA - Fcは、Fc基とPCGA基との間にリンカー部位を有していてもよい。かかる化合物としては、下記一般式(A')で表すことができる。

## 【0032】

## 【化2】



20

## 【0033】

上記式A'中のx、y及びzは、前記と同じであり、Fc'は、上記反応性の官能基と同じ基である。また、linkとしては、特に制限はなく、例えば、ジカルボン酸ユニット、ジオールユニット、モノペプチドユニット、オリゴペプチドユニット等が挙げられる。該ジカルボン酸としては、アルキレンジカルボン酸が挙げられ、該アルキレンとしては、特に制限はなく、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン等の炭素数1～6の直鎖状又は分岐鎖状のアルキレン基等が挙げられる。該linkはさらに置換基を有していてもよい。該置換基としては特に制限はなく、例えば、フッ素原子、塩素原子等のハロゲン原子等が挙げられる。

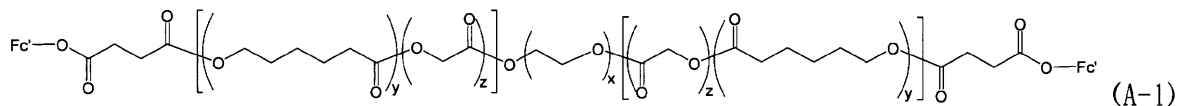
30

## 【0034】

中でも、(1)A-B-A型トリブロック共重合体としては、好ましくは下記の一般式(A-1)で表されるトリブロック共重合体であり

## 【0035】

## 【化3】



40

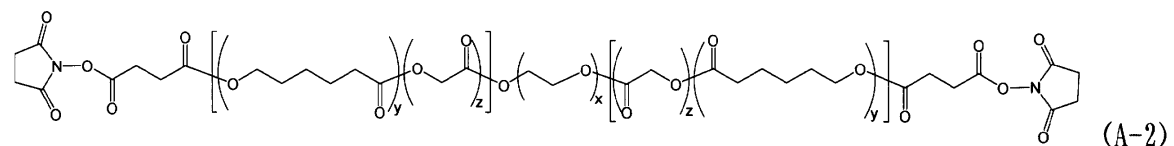
## 【0036】

(式中、x、y、z及びFc'は前記と同じ。)

より好ましくは、下記一般式(A-2)で表されるトリブロック共重合体である

## 【0037】

## 【化4】



50

## 【0038】

(式中、x、y、及びzは前記と同じ。)

## 【0039】

(1)A-B-A型トリブロック共重合体は、室温と体温付近との間にゲル転移温度を有する。具体的には、(1)トリブロック共重合体を水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)等の水を含む媒体に溶解させた場合、室温付近ではゾル状態であり、体温付近まで加温するとゲル状態に変化する。(1)A-B-A型トリブロック共重合体自体は、常温かつ無溶媒の状態では固体であるが、例えば、(1)A-B-A型トリブロック共重合体の25wt%溶液は、ゾル-ゲル転移温度が40である。さらに該溶液と、後述する(3)A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーの25wt%溶液とを1:1の比率で混合することにより、ゾル-ゲル転移温度を約33に低下させることができる。つまり、本発明において、(1)A-B-A型トリブロック共重合体と(3)A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマーとの配合割合を適宜調整することにより、ゾル-ゲル転移温度を変化させることができる。

10

## 【0040】

前記(1)トリブロック共重合体は、1種単独で使用してもよく、又は2種以上を組み合わせて使用してもよい。

## 【0041】

本発明の温度応答性生分解性ポリマー組成物における(1)A-B-A型トリブロック共重合体の含有量は、通常、5~30質量%程度、好ましくは10~25質量%程度である。

## 【0042】

トリブロック共重合体の製造方法(重合方法)の一例については、後述する。

20

## 【0043】

1-2.(2)A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩

本発明のポリマー組成物は、上記(1)両末端に反応性の官能基を有するA-B-A型トリブロック共重合体とともに、(2)該A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物又はその塩を含有する。これにより、本発明のポリマー組成物は、温度に応答するゾル-ゲル転移性を保持しつつ、体内等の湿潤条件下において、ゲル状態を長期間維持できる。これらの効果が奏される理由としては、(1)トリブロック共重合体と(2)反応性化合物とを混合させると、(1)トリブロック共重合体における反応性の官能基と(2)反応性化合物における反応性の基とが共有結合を形成し、ゲル状態を維持することが理由であると推測される。

30

## 【0044】

前記(2)反応性化合物としては、特に制限はなく、例えば、縮合反応可能な化合物、付加反応可能な化合物等が挙げられる。(2)反応性化合物は、塩であってもよい。該塩としては、特に制限はなく、例えば、ハロゲン化水素(塩化水素、臭化水素、ヨウ化水素等)、有機酸(酢酸、蟻酸等)等が挙げられる。

## 【0045】

縮合反応可能な化合物としては、例えば、スクシンイミドエステル基と反応可能なアミノ基含有化合物；スクシンイミドエステル基含有化合物、ニトロフェニルエステル基含有化合物、1,2,3,4,5-ペンタフルオロフェニルエステル基含有化合物、4-クロロフェニルエステル基含有化合物等のアミノ基と反応可能な活性エステル基を有する化合物；アルデヒド等アミノ基と Schiff 塩基結合形成可能な基を有する化合物；システイン残基を反応可能なチオエステル基含有化合物；チオエステル基と反応可能なシステイン残基含有化合物；ジオール基と縮合反応可能なフェニルボロン酸基含有化合物；フェニルボロン酸と反応可能なジオール基含有化合物等が挙げられる。

40

## 【0046】

付加反応可能な化合物としては、例えば、チオール-エン クリック反応可能な基を有する化合物；ディールス アルダー反応可能な基を有する化合物；クリック反応可能な基を有する化合物；無触媒クリック反応可能な基を有する化合物等が挙げられる。

## 【0047】

中でも、(2)反応性化合物としては、縮合反応可能な基を有する化合物又はその塩が好

50



ましく、アミノ基含有化合物又はその塩がより好ましい。

【0048】

アミノ基含有化合物又はその塩としては、特に限定はなく、例えば、ポリリシン、4-arm-PEG-NH<sub>2</sub>（4分岐したポリエチレングリコールの末端が第一級アミノ基であるもの）、PEI（ポリエチレンイミン）、BSA（ウシ血清アルブミン）、Cationic Gelatine（カチオン性のゼラチン）等のポリアミン化合物又はそれらの塩が挙げられる。(2)反応性化合物は、市販品を使用することができ、市販品がない場合は、公知の製造方法に従い製造することができる。例えば、4-arm-PEG-NH<sub>2</sub>は、特開2013-227543号公報に記載の製造方法等に従い、4-arm-PEG（日油株式会社製）とアミノ化剤（例えば、アンモニア等）とを反応させることにより製造することができる。

10

【0049】

ポリアミン化合物の数平均分子量(Mn)は、特に限定はなく、通常200～100,000であり、好ましくは500～10,000であり、より好ましくは1,000～6,000である。

【0050】

(2)反応性化合物は、1種単独で使用してもよく、又は2種以上を組み合わせて使用してもよい。

【0051】

(2)反応性化合物の含有量は、特に限定はなく、例えば、(1)A-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して、0.01～50質量部が好ましく、0.025～10質量部がより好ましい。

20

【0052】

1-3. 前記トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマー

本発明の温度応答性ポリマー組成物は、さらに、(3)A-B-A型トリブロック共重合体以外の温度応答性ポリマー（以下、「(3)他の温度応答性ポリマー」ともいう）を含有しているもよい。

【0053】

該(3)他の温度応答性ポリマーとしては、公知の温度応答性ポリマーであれば特に限定はなく、例えば、ポリ乳酸；ポリグリコール酸；ポリカプロラクトン；乳酸-グリコール酸共重合体；PCGA-b-PEG-b-PCGA；PLGA-b-PEG-b-PLGA；プルロニック（ポロキサマーとも呼ぶ。PEG-b-PPG-b-PEG、該PPGはポリプロピレングリコールを意味している。「プルロニック」はBASF社の登録商標。）等が挙げられる。

30

【0054】

中でも、(3)他の温度応答性ポリマーとしては、上記(1)A-B-A型トリブロック共重合体と類似構造であるPCGA-b-PEG-b-PCGA、PLGA-b-PEG-b-PLGA等のトリブロック共重合体が好ましく、PCGA-b-PEG-b-PCGAがより好ましい。

【0055】

(3)他の温度応答性ポリマーとしてPCGA-b-PEG-b-PCGAを用いる場合、該PCGA-b-PEG-b-PCGAの各物性；例えば、トリブロック共重合体に対するPCGAブロック（Aブロック）及びPEGブロック（Bブロック）の質量比率；PCGAブロック及びPEGブロックの各重量平均分子量；トリブロック共重合体の数平均分子量(Mn)及び当該数平均分子量に対する重量平均分子量の比(Mw/Mn)；PCGA中のε-カプロラクトンとグリコール酸とのモル比；ε-カプロラクトン及びグリコール酸の各重合度；等の各物性は、特に限定されない。PCGAブロック及びPEGブロックの質量比率、PCGAブロックの重量平均分子量、PEGブロックの重量平均分子量、トリブロック共重合体の数平均分子量(Mn)、トリブロック共重合体の数平均分子量に対する重量平均分子量の比(Mw/Mn)、PCGA中のε-カプロラクトンとグリコール酸とのモル比、ε-カプロラクトンの重合度、及びグリコール酸の重合度は、上記1-1に記載した(1)A-B-A型トリブロック共重合体の各物性と同じである。

40

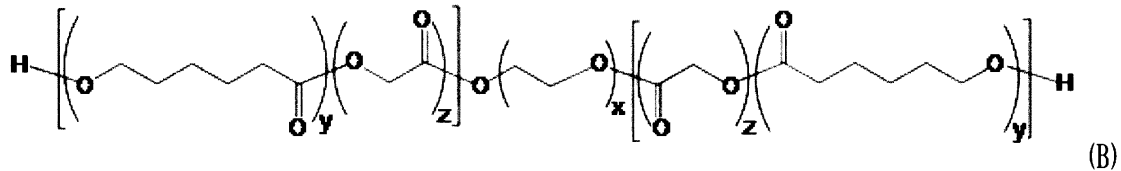
【0056】

本発明で使用する(3)他の温度応答性ポリマーとしては、例えば、下記一般式(B)：

【0057】

50

## 【化5】



## 【0058】

で表される化合物が挙げられる。

## 【0059】

上記式(B)中のx、y及びzは、それぞれ上述の各物性を満たすことができるような値であり、例えば、xは15～50の数が好ましく、20～45の数がより好ましい。yは5～20の数が好ましく、10～15の数がより好ましい。zは1～5の数が好ましく、1～3の数がより好ましい。また、式(B)中に記載された2つのyは、ともに同じ数であってもよいし、異なる数であってもよい。このことは、式(B)中に記載された2つのzについても同様である。なお、x、y及びzは、ポリマー中の各ユニットの平均個数を表し、<sup>1</sup>H-NMR及びGPCから求められる。式(B)中の[ ]で示されるPCGAブロック内では、ε-カプロラクトンユニットとグリコール酸ユニットとの配列に規則性は無く、上記式(B)の配列の順に限定されない。また、y及びzは、片方のPCGAブロック内に含まれるε-カプロラクトンユニット及びグリコール酸ユニットそれぞれのユニットの平均個数を示す。

## 【0060】

該(3)他の温度応答性ポリマーは、1種単独で使用してもよく、又は2種を組み合わせ使用してもよい。2種を組み合わせ使用する場合、その割合は特に限定されない。

## 【0061】

本発明のポリマー組成物において、(3)他の温度応答性ポリマーは含有されていなくてもよいが、(3)他の温度応答性ポリマーを含有する場合、その含有量は特に限定はない。中でも、(3)他の温度応答性ポリマーの含有量としては、(1)A-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して1～400質量部が好ましく、50～200質量部がより好ましい。本発明において、(3)他の温度応答性ポリマーを本発明のポリマー組成物に添加することにより、該組成物のゲル化温度を最適なものに調節可能であり、(1)A-B-A型トリブロック共重合体の使用量を抑え、かつ、ゲル化後におけるゲルの維持期間及び加水分解に至る期間を調節することができる。

## 【0062】

## 1-4. その他の成分

さらに、本発明のポリマー組成物は、必要に応じて、公知の薬物、色素、造影剤等を混合し、医薬組成物、薬物徐放デバイス等として用いることができる。

## 【0063】

## 2. 温度応答性生分解性ポリマー組成物の製造方法

本発明の温度応答性生分解性ポリマー組成物の製造方法は、特に限定はなく、例えば、下記(i)、(ii)並びに(iii)の工程：

(i) ポリエチレングリコール(PEG)、又は脂肪族ジオールの存在下、ε-カプロラクトン及びグリコリドを重合させて、A-B-A型トリブロック共重合体を製造する工程、

(ii) 前記工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体の両末端に反応性の官能基を形成する工程、並びに

(iii) 前記工程(ii)で得られた(1)A-B-A型トリブロック共重合体((1)トリブロック共重合体)と該A-B-A型トリブロック共重合体と反応可能な化合物((2)反応性化合物)とを混合する工程、

を順に含んでいる。

## 【0064】

当該製造方法によれば、上述の(1)A-B-A型トリブロック共重合体及び(2)反応性化合

10

20

30

40

50

物を含有する温度応答性生分解性ポリマー組成物を好適に製造することができる。

【0065】

工程(i)

本発明の製造方法における工程(i)は、PEG、又は脂肪族ジオールの存在下、 $\epsilon$ -カプロラクトン及びグリコリドを重合させて、A-B-A型トリブロック共重合体を製造する工程である。

【0066】

重合方法としては、特に制限はなく、例えば、上記式(B)のトリブロック共重合体であれば、 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  (オクチル酸錫)等の触媒の存在下、PEGを高分子開始剤として、 $\epsilon$ -カプロラクトン及びグリコリドを重合することにより製造することができる。触媒の使用量は、特に制限はなく、好ましくは $\epsilon$ -カプロラクトン及びグリコリドの混合物100質量部に対して、0.1~10質量部である。

10

【0067】

脂肪族ジオールとしては、特に制限はなく、例えば、エチレングリコール、1,2-プロピレングリコール、1,3-プロピレングリコール、1,4-ブタンジオール等の直鎖状の炭素数1~6のアルキレンジオールが挙げられる。

【0068】

$\epsilon$ -カプロラクトン、グリコリド、PEG、及び脂肪族ジオールの各原料の使用量は、特に限定はなく、例えば、上述のトリブロック共重合体の好ましい各物性を満たすように適宜調整すればよい。なお、 $\epsilon$ -カプロラクトン、グリコリド、PEG、脂肪族ジオール及び $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ は、それぞれ乾燥させたものを使用してもよい。

20

【0069】

工程(i)における反応は、無溶媒で行ってもよく、又は溶媒を用いてもよい。

【0070】

工程(i)における反応温度は、通常50~200℃であり、好ましくは100~180℃であり、より好ましくは120~170℃である。

【0071】

工程(i)における反応時間は、通常1~72時間であり、好ましくは6~48時間であり、より好ましくは10~24時間である。

【0072】

工程(i)は、密閉容器中に行ってもよい。その容器としては、特に制限はなく、ステンレス製密閉容器、耐圧仕様のガラス製密閉容器等が挙げられる。

30

【0073】

工程(i)は、窒素、アルゴン等の不活性ガスの雰囲気下で行ってもよい。反応圧力は、特に制限はなく、常圧で反応を実施してもよいし、加圧下で反応を行ってもよい。

【0074】

重合終了後は、良溶媒及び貧溶媒を用いて再沈殿させ、さらに当該沈殿物を乾燥させることにより、白色粉末のトリブロック共重合体を得ることができる。上記良溶媒としては、例えばクロロホルムを使用することができ、上記貧溶媒としては、例えばジエチルエーテルを使用することができる。

40

【0075】

工程(ii)

本発明の製造方法における工程(ii)は、工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体の両末端をキャップ化する(エンドキャップ)工程である。

【0076】

該工程(ii)によって、(1)両末端に反応性の官能基を有するA-B-A型トリブロック共重合体(1)トリブロック共重合体)が製造できる。

【0077】

該反応性の官能基を形成する方法としては、特に制限はない。例えば、工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体とリンカー部位を形成させる化合物とを反応させる工

50

程(ii-1)、及び該工程(ii-1)で得られたリンカー部位を有するA-B-A型トリブロック共重合体と、反応性の官能基を形成させる化合物とを反応させる工程(ii-2)を含んでいる。

【0078】

該反応性の官能基が、例えば、スクシンイミドエステル基である場合は、工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体と無水コハク酸とを反応させて、両末端にカルボキシル基(COOH基)を有するA-B-A型トリブロック共重合体を得る工程(ii-1)、及び該工程(ii-1)で得られた両末端にCOOH基を有するA-B-A型トリブロック共重合体とN-ヒドロキシスクシンイミドとを縮合剤の存在下で反応させて、両末端にスクシンイミドエステル基を有するA-B-A型トリブロック共重合体を製造する工程(ii-2)を経て製造できる。

工程(ii-1)

リンカー部位を形成させる化合物としては、ジカルボン酸、ジオール、モノペプチド、オリゴペプチド等のユニットを形成させる化合物が挙げられる。例えば、ジカルボン酸ユニットを形成させる化合物としては、例えば、炭素数1~6のアルキレンジカルボン酸等が挙げられる。

【0079】

該リンカー部位を形成させる化合物の使用量としては、特に制限はなく、例えば、工程(i)で得られたA-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して、10~500質量部である。

【0080】

該工程(ii-1)の反応は、溶媒中で行うことができる。溶媒としては、例えば、トルエン、キシレン等の炭化水素系溶媒；塩化メチレン、クロロホルム等の塩素系溶媒；水；これらの混合溶媒等が挙げられる。

【0081】

溶媒の使用量は、工程(i)で得られた、トリブロック共重合体100質量部に対して、通常10質量部以上であり、好ましくは20~500質量部であり、より好ましくは40~100質量部である。

【0082】

工程(ii-1)における反応温度は、通常100~200 であり、好ましくは100~150 であり、より好ましくは120~150 である。

【0083】

工程(ii-1)における反応時間は、通常5~72時間であり、好ましくは12~48時間であり、より好ましくは20~30時間である。

【0084】

工程(ii-1)は、密閉容器中に行ってもよい。その容器としては、特に制限はなく、ステンレス製密閉容器、耐圧仕様のガラス製密閉容器等が挙げられる。

【0085】

工程(ii-1)は、窒素、アルゴン等の不活性ガスの雰囲気下で行ってもよい。反応圧力は、特に制限はなく、常圧で反応を実施してもよいし、加圧下で反応を行ってもよい。

【0086】

反応終了後、精製工程を行ってもよく、又はそのまま次の反応を行ってもよい。精製工程を行う場合は、得られる反応混合物から、未反応の原料化合物等を、蒸留、ろ過、遠心分離等の通常の分離方法により除去し、両末端にリンカー部位を有するA-B-A型トリブロック共重合体を取り出すことができる。

【0087】

工程(ii-2)

反応性の官能基を形成させる化合物としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、パラニトロフェノール等が挙げられる。中でも、好ましくはN-ヒドロキシスクシンイミドである。

【0088】

該反応性の官能基を形成させる化合物の使用量としては、特に制限はなく、例えば、工程(ii-1)で得られたリンカー部位を有するA-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対し

10

20

30

40

50

て、2~40質量部である。

【0089】

該工程(ii-2)の反応は、溶媒中で行うことができる。該溶媒としては、例えば、塩化メチレン、クロロホルム等の塩素系溶媒；トルエン、キシレン等の炭化水素系溶媒；N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)等の極性有機溶媒；水；これらの混合溶媒等が挙げられる。

【0090】

溶媒の使用量は、(ii-1)で得られた、両末端にリンカー部位を有するトリブロック共重合体100質量部に対して、通常50質量部以上であり、好ましくは100~2000質量部であり、より好ましくは200~1000質量部である。

10

【0091】

縮合剤としては、公知の縮合剤を使用することができ、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)等が挙げられる。該縮合剤の使用量としては、特に制限はなく、例えば、工程(ii-1)で得られたリンカー部位を有するA-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して、通常0.1~10質量部である。

【0092】

工程(ii-2)の反応は、必要に応じて反応促進剤を加えることができる。反応促進剤としては、例えば、ジメチルアミノピリジン(DMAP)等が挙げられる。該反応促進剤を使用する場合、その使用量としては、特に制限はなく、例えば、工程(ii-1)で得られたリンカー部位を有するA-B-A型トリブロック共重合体100質量部に対して、通常0.1~10質量部である。

20

【0093】

工程(ii-2)における反応温度は、反応初期の約2時間の反応温度が、通常0~30 であり、より好ましくは0~5 であり、その後の反応温度が、通常10~100 であり、より好ましくは20~30 である。

【0094】

工程(ii-2)における反応時間は、最初の2時間の工程を含めて通常5~48時間であり、より好ましくは8~24時間である。

【0095】

工程(ii-2)は、密閉容器中に行ってもよい。その容器としては、特に制限はなく、ステンレス製密閉容器、耐圧仕様のガラス製密閉容器等が挙げられる。

30

【0096】

工程(ii-2)は、窒素、アルゴン等の不活性ガスの雰囲気下で行ってもよい。

【0097】

反応圧力は、特に制限はなく、常圧で反応を実施してもよいし、加圧下で反応を行ってもよい。

【0098】

反応終了後、精製工程を行ってもよく、又はそのまま使用してもよい。精製工程を行う場合は、得られる反応混合物から、未反応の原料化合物等を、蒸留、ろ過、遠心分離等の通常の方法により除去し、(1)トリブロック共重合体を取り出すことができる。

40

【0099】

工程(iii)

本発明の製造方法における工程(iii)は、(1)トリブロック共重合体、及び(2)反応性化合物を混合する工程である。さらに、本発明の製造方法における工程(iii)は、必要に応じて、(1)トリブロック共重合体、及び(2)反応性化合物だけでなく、(3)他の温度応答性ポリマーを混合することができる。

【0100】

該(2)反応性化合物の使用量としては、特に制限はなく、例えば、(1)トリブロック共重合体100質量部に対して、0.1~100質量部であり、好ましくは0.2~50質量部であり、より

50

好ましくは0.25～20質量部である。

【0101】

本発明のポリマー組成物のうち、(3)他の温度応答性ポリマーを含有する温度応答性ポリマー組成物の場合、該(2)反応性化合物の使用量としては、特に制限はなく、例えば、(1)トリブロック共重合体100質量部に対して、0.01～100質量部であり、好ましくは0.01～20質量部であり、より好ましくは0.025～10質量部である。

【0102】

該(3)他の温度応答性ポリマーの使用量としては、特に制限はなく、例えば、(1)トリブロック共重合体100質量部に対して、0～400質量部であり、好ましくは50～200質量部である。

10

【0103】

溶媒としては、特に限定はなく、例えば、水、水を含む媒体、アセトン等が挙げられる。中でも、水を含む媒体が好ましい。水を含む媒体としては、上述の水を含む媒体（即ち、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、食塩のっていないリン酸緩衝液等）を使用することができる。溶媒の使用量は、(1)トリブロック共重合体が6～25質量%程度となるように溶媒を使用することが好ましい。

【0104】

混合方法としては、上記各成分が均一に混合できれば特に限定はない。例えば、(1)トリブロック共重合体を含む溶液と(2)反応性化合物を溶媒に溶解又は分散させた溶液を混合する方法；(1)トリブロック共重合体を含む溶液に溶媒を含まない固体又は油状の(2)反応性化合物を加えて混合する方法等が挙げられる。

20

【0105】

さらに、(3)他の温度応答性ポリマーを含有する温度応答性ポリマー組成物の場合の混合方法としては、(1)トリブロック共重合体、(2)反応性化合物及び(3)他の温度応答性ポリマーが均一に混合できれば特に限定はない。例えば、(1)トリブロック共重合体及び(3)他の温度応答性ポリマーを、各々別個に溶媒に溶解又は分散させた溶液を調製してから合一し、その後(2)反応性化合物を混合する方法；固体状の(1)トリブロック共重合体と溶媒を含まない固体又は油状の(3)他の温度応答性ポリマーのいずれかを溶媒に溶解又は分散させた溶液を調製して、該溶液に、もう一方の成分を加えて混合し、次いで、これに(2)反応性化合物を混合する方法等が挙げられる。

30

【0106】

溶媒としては、特に限定はなく、例えば、水、水を含む媒体、アセトン等が挙げられる。中でも、水を含む媒体が好ましい。水を含む媒体としては、上述の水を含む媒体（即ち、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、食塩のっていないリン酸緩衝液等）を使用することができる。溶媒の使用量は、(1)トリブロック共重合体が5～30質量%程度となるように溶媒を使用することが好ましい。

【0107】

なお、(3)他の温度応答性ポリマーを含有する温度応答性ポリマー組成物の場合、その溶媒の使用量は、(1)トリブロック共重合体が5～30質量%程度となるように溶媒を使用することが好ましい。

40

【0108】

該工程(iii)は、必要に応じて、酸性溶液（例えば、塩酸）、アルカリ性溶液（例えば、水酸化ナトリウム水溶液）を加えてpHを適宜調整することができる。

【0109】

なお、(1)A-B-A型トリブロック共重合体が溶解又は分散しにくい場合は、該溶液又は分散液を加温することによりゲル化させて、その後室温に戻す操作を繰り返して、溶解又は分散させることができる。

【0110】

3. 温度応答性ポリマー組成物の性質及び用途

本発明のポリマー組成物は、上記したように、良好な生体適合性、生分解性、及び温度

50

応答性を有し、かつ長期間ゲル状態を維持できる。

【0111】

ここで、温度応答性ゾル-ゲル転移とは、一般に化合物（又はポリマー組成物）の溶液がゲル化温度を境にして、ゾル（溶液）状態から、ゲル（固体）状態への転移を示す性質をいう。具体的には、化合物（又は高分子組成物）の水溶液をゲル化温度以上の温度に加熱するとゲル状態となり、それ以下の温度に冷却すると再び溶解して透明のゾル状態に戻るといった性質をいう。

【0112】

本発明のポリマー組成物の水溶液は、10～50 程度の範囲にゲル化温度が存在し、かかる範囲で容易にゲル化温度を調節でき、その応用範囲は極めて広範である。特に、薬物と混合して医用材料として用いることができる。

10

【0113】

例えば、25～35 の範囲にゲル化温度を有するポリマー組成物の水溶液では、室温（例えば10～20 程度）と体温（35～40 程度）付近の間にゲル化温度が存在することより、溶液（ゾル）状態のまま注射により体内に投与可能で体内でハイドロゲルを形成することができる。このようなポリマー組成物を薬物と混合すると、室温付近では溶液状態であるため注射時における取扱が容易であり、一方体温付近では不溶のゲル状態となるため、体内に投与後は不溶物となり薬物の早期拡散を抑制し、投与部位での薬物の滞留性を向上させることができる。そのため、インジェクタブル製剤、特に持続性インジェクタブル製剤における生分解性ポリマー材料として好適に用いることができる。

20

【0114】

投与形態としては、例えば、皮下注射、筋肉内注射等が挙げられる。

【0115】

医薬組成物への高分子組成物の配合量は、用いる薬物の種類等により適宜選択することができ、例えば、医薬組成物の全質量に対し、60～99.9質量%程度であればよい。

【0116】

該医薬組成物に用いられる薬物としては、特に限定されないが、生理活性を有するペプチド類、蛋白質類、核酸類、その他の抗生物質、抗腫瘍剤、解熱剤、鎮痛剤、消炎剤、鎮咳去痰剤、鎮静剤、筋弛緩剤、抗てんかん剤、抗潰瘍剤、抗うつ剤、抗アレルギー剤、強心剤、不整脈治療剤、血管拡張剤、降圧利尿剤、糖尿病治療剤、抗凝血剤、止血剤、抗結核剤、ホルモン剤、麻薬拮抗剤等が挙げられる。

30

【0117】

本発明の医薬組成物における薬物の配合量は、薬物の種類等により適宜選択することができる。特に、持続性注射剤とした場合には、薬物の配合量は、薬物の種類、持続放出させる期間等によって定められる。例えば、薬物がペプチド類の場合、約1週間～約1ヶ月の徐放製剤とするためには、通常、医薬組成物全質量に対し、10質量%～50質量%程度含有させればよい。

【0118】

また、本発明のポリマー組成物は、温度応答性、生分解性、及び生体に対する安全性を有することから、手術後の組織癒着防止材として用いることができる。塗布又はスプレー等により術後の内臓組織等を被覆し、他の生体組織と一定期間、隔離することで癒着を防止することができる。

40

【0119】

さらに、本発明のポリマー組成物は、再生医療用のスカフォールド（足場）、細胞培養基材等としての応用も可能である。スカフォールドとしては、細胞、本発明のポリマー組成物及び培養液等を低温においてゾル状態で混合し、この混合物を高温で所定の形状にゲル化することでスカフォールドとして用いることができる。細胞培養基材としては、所定の3次元の形状を持つ繊維質又は多孔質の基材に、細胞、本発明の高分子組成物及び培養液を含む液状混合物を含浸させ、所定温度でゲル化させて、基材中に再生細胞を保持することも可能である。なお、繊維質又は多孔質の基材としては、コラーゲン、ハイドロキシ

50

アパタイト等の生体親和性の高い材料を使うことが可能で、軟骨組織、骨組織の再生等に特に有効である。さらに、損傷組織に細胞を移植する（細胞デリバリー）システムを提供することが可能である。

【実施例】

【0120】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。但し、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0121】

[製造例1]

トリブロック共重合体(B1)の合成

PEG(1,000) (Polyethylene glycol(1,000)、和光純薬工業社製)のみを140 オイルバス中で3時間減圧乾燥させた後、ε-カプロラクトン(和光純薬工業株式会社製)、グリコリド(Polysciences社製)及びSn(Oct)<sub>2</sub>(和光純薬工業社製)を加えて、さらに6時間乾燥させた。次いで、160 オイルバス中で12時間重合を行った。反応終了後、良溶媒にクロロホルム、貧溶媒にジエチルエーテルを用いて再沈殿を行い、白色沈殿物を得た。当該沈殿物を乾燥後、白色粉末のPCGA-b-PEG-b-PCGAトリブロック共重合体(後述する化学式6に示す構造式(B))。以下、「CP-OH」ということもある)を得た。トリブロック共重合体(B1)の各物性を、以下の表1に示す。

【0122】

[製造例2]

トリブロック共重合体(B2)の合成

PEG(1,000)に代えて、PEG(1,540) (Polyethylene glycol(1,540)、和光純薬工業社製)を使用する以外は製造例1と同様にして、白色粉末のPCGA-b-PEG-b-PCGAトリブロック共重合体(B2)を得た。トリブロック共重合体(B2)の各物性を、以下の表1に示す。

【0123】

【表1】

	ポリマーB	コード	Mn <sup>a)</sup>	Mw/Mn <sup>b)</sup>	CL/GA <sup>a)</sup> (mol/mol)	DP of CL <sup>a, c)</sup>	DP of GA <sup>a, d)</sup>	PEG 含有量 (wt%) <sup>a)</sup>	水に 対する 溶解性
製造例1	B1	0.9k-1.0k-0.9k	2,800	1.4	3.9	7	1.8	36	○
製造例2	B2	1.8k-1.5k-1.8k	5,200	1.4	3.6	14	3.8	30	○

【0124】

a) <sup>1</sup>H-NMR (solvent:CDCl<sub>3</sub>).により測定

b) GPC (eluent:DMF, standard:PEG、TOSOH製Tosoh GPC-8020 series system)により測定

c) Degree of polymerization of ε-caprolactone.

d) Degree of polymerization of glycolide.

【0125】

[製造例3]

(1)両末端に反応性の官能基を有するトリブロック共重合体の合成

【0126】

10

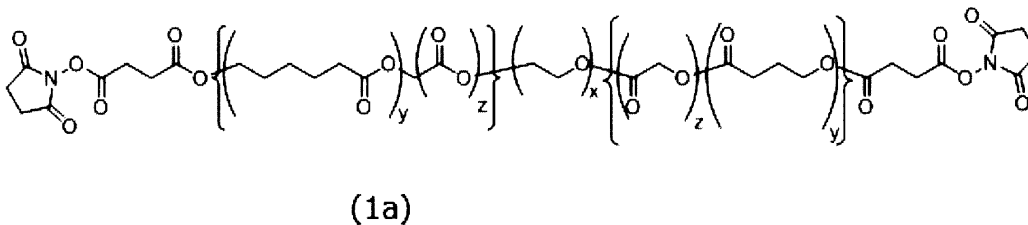
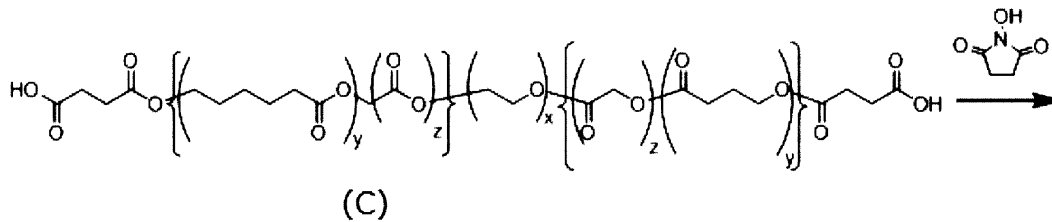
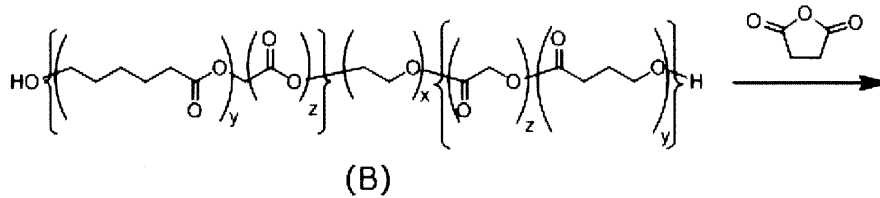
20

30

40



## 【化6】



10

20

## 【0127】

## 工程(i)

製造例2で得られたCP-OH(B2)を19.86 g、無水コハク酸(東京化成工業社製)3.87 g及びトルエン0.01 Lを、0.1 Lのフラスコに入れ、130 で24時間還流させて反応させた。その後、エバポレーターによりトルエンを留去し、クロロホルムを加えて吸引ろ過により未反応の無水コハク酸を取り除き、両末端にカルボキシル基を有するPCGA-b-PEG-b-PCGA(上記化学式6に示す構造式(C))。以下、「CP-COOH」という)を20.63 g得た。

## 【0128】

## 工程(ii)

工程(i)で得られたCP-COOHを20.63 g、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)1.78 g、ジメチルアミノピリジン(DMAP)0.47 g、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)1.59 g及び塩化メチレン0.1 Lを0.1 Lフラスコに加え、氷冷下で2時間、室温下で24時間反応させた。エバポレーターにて濃縮後、吸引ろ過によりジシクロヘキシル尿素(DCUrea)及び未反応のNHSを取り除き、貧溶媒としてジエチルエーテル:メタノール=10:1を用いて再沈殿して、両末端がスクシンイミドエステル化(キャップ)されたPCGA-b-PEG-b-PCGA(上記化学式6に示す構造式(1a))。以下、「CP-OSu」という)の白色沈殿物を14.2 g得た(OSu導入率:98%以上)。

30

## 【0129】

## [製造例4]

上記製造例2で得られたCP-OH(1.8k-1.5k-1.8k)(100mg, 19.4 μmol)を粉末の状態でサンプル管に入れて、さらにリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH=7.4)294 μlを加えて、80 の温浴に5秒浸漬後(ゲル化)、ポルテックスミキサーにより30秒間攪拌し、室温に戻す(ゾル化)する操作を3回繰り返し、溶解させ、25.5wt%の混合ポリマー水溶液(最終濃度5.0wt%)を得た(以下、単に「比較ポリマー水溶液1」とする。)

40

## 【0130】

## [製造例5]

## ポリマー水溶液の調製(CP-OSu:CP-OH=1mol:2mol)

製造例3で得られたトリブロック共重合体(CP-OSu)(50.3mg, 9.1 μmol, OSu基:18.2 μmol)と製造例1で得られたCP-OH(50.1mg, 17.9 μmol)とをそれぞれ固体(粉末)の状態サンプル管に入れて、さらにリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH=7.4)268 μlを加えて、

50

80 の温浴に5秒浸漬後（ゲル化）、ボルテックスミキサーにより30秒間攪拌し、室温に戻す（ゾル化）する操作を3回繰り返し、溶解させた。1 M NaOH 16  $\mu$ lを加えてpH=7.4に調整し、26.1wt%の混合ポリマー水溶液（最終濃度25.0wt%）を得た（以下、単に「ポリマー水溶液」とする。）。

【0131】

[製造例6]

ポリリシン溶液の調製

ポリアミン化合物としてポリリシン [Poly(L-Lysine)臭化水素酸塩 (Sigma Aldrich社製 mol wt 1,000-5,000)] 6.5mgをPBS(pH=7.4)40  $\mu$ lで溶解させて、1 M NaOH 5  $\mu$ lとを加えて、ポリリシン溶液 (pH=7.4, 0.144mg/ml) を調製した。

10

【0132】

[製造例7]

比較例用ポリリシン溶液の調製

ポリアミン化合物としてポリリシン [(Poly(L-Lysine)臭化水素酸塩 (Sigma Aldrich社製分子量 1,000-5,000)] 32.9mgをPBS(pH=7.4)83  $\mu$ lで溶解させて、1 M NaOH 17  $\mu$ lとを加えて、ポリリシン溶液 (pH=7.4, 0.329mg/ml) を調製した。

【0133】

[実施例1]

本発明の生分解性ポリマー組成物の製造

混合ポリマー溶液の調製[工程(iii)]

上記製造例5で得られたポリマー溶液284  $\mu$ l (OSu基: 18.2  $\mu$ mol)と上記製造例6で得られたポリリシン溶液18.0  $\mu$ l (Poly(L-Lysine)臭化水素酸塩:2.51 mg)とを混合し、室温でボルテックスミキサーにより約10秒間攪拌することで、OSu基とNH<sub>2</sub>基を約1:1の割合で含む混合ポリマー溶液1 (302  $\mu$ l)を調製した (Poly(L-Lysine)臭化水素酸塩:2.51mg, 0.83wt%)。

20

【0134】

[実施例2~6]

第2成分である(2)反応性化合物の種類、及び生分解性ポリマー組成物中の(2)反応性化合物の含有量を表2のように代えた以外は、実施例1と同様にして、液体状の各ポリマー組成物2~6 (実施例2~6)を得た。

30

【0135】

<第2成分>

- ・ Poly-L-lysine hydrobromide (分子量: 4,000-15,000) [Sigma Aldrich社製]
- ・ PEI (分子量: 10,000) [和光純薬工業株式会社製]
- ・ BSA (分子量: 66,000) [和光純薬工業株式会社製]
- ・ 4-arm PEG-NH<sub>2</sub> (分子量: 5,140) (特開2013-227543号公報に記載の方法に従い製造)

4-arm PEG-NH<sub>2</sub>の製造

4-arm PEG-OH (商品名: SUNBRIGHT PTE-5000、分子量5,143、日油株式会社製) 1.2507 g (243  $\mu$ mol) を110 減圧条件下で2時間乾燥した。室温に冷却後、4-arm PEG-OHを脱水塩化メチレン10mlに溶解させ、この溶液にトリエチルアミン (TEA) 1.1ml (7.8 mmol)を加えた。得られた混合溶液を氷冷下で攪拌しながら、ゆっくりとメタンスルホニルクロリド (MeSO<sub>2</sub>Cl) 300  $\mu$ l (3.9 mmol)を滴下した。氷冷下で2時間、次いで室温で10時間攪拌した後、エバポレーターにより溶媒を留去し、この濃縮物をクロロホルム5mlで再溶解させた。そして、貧溶媒にジエチルエーテル100mlを用い、再沈殿により精製し、得られた白色粉末を減圧乾燥した。そして、得られた粉末をアンモニア水50mlに溶解させ、室温で2日間攪拌した。攪拌後、塩化メチレン50mlで抽出して、有機層を回収し、エバポレーターで溶媒を除いた。得られた濃縮物を塩化メチレンに再溶解させ、貧溶媒にジエチルエーテルを用いて再沈殿させた。その沈殿物を濾過し、得られた粉末をクロロホルム5 mlに再溶解させ、貧溶媒にジエチルエーテル100 mlを用いて再沈殿を行った。その沈殿物を濾過し、得られた粉末を乾燥後、4-arm PEG-NH<sub>2</sub> (収量: 0.38 g, 収率: 30%)を得た。

40

50

## 【 0 1 3 6 】

## [比較例1]

比較例1は、上記製造例5で得られたポリマー水溶液のみである。

## 【 0 1 3 7 】

## [比較例2]

上記製造例4で得られた比較ポリマー水溶液1 292  $\mu$ l (23.6  $\mu$ mol)と製造例7で調製したポリリシン溶液7.6  $\mu$ l (Poly(L-Lysine):2.51mg)とを混合し、室温でボルテックスミキサーにより約10秒間攪拌することで、比較混合ポリマー溶液300  $\mu$ lを調製した。

## 【 0 1 3 8 】

## [試験例1]

混合直後のゲル化の判定

表2に記載の第1成分を含むポリマー溶液と第2成分を含む溶液とを各々サンプル管(直径約1cm)中で混合し、室温で約10秒間攪拌した後、25℃で5分間放置し、試験管傾斜法により、混合直後にゾル状態であるか、又はゲル状態であるかを判断した。

## 【 0 1 3 9 】

具体的には、所定温度で所定時間経過した後、上記サンプル管を約135度傾斜させ、約30秒の間に、流れなければ「ゲル」、流れたら「ゾル」と判断した。その結果は下記表2に示した。

## 【 0 1 4 0 】

## [試験例2]

水中におけるゲル状態の維持期間の評価

小サンプル管(直径約1cm)に入った実施例1~6の混合ポリマー水溶液、比較例1の溶液及び比較例2の溶液をそれぞれ37℃で10分間インキュベートしてゲル化させた。その後、各サンプル管を、PBS (pH=7.4, 37℃) 25mlが入った大きなサンプル管(直径約3cm)にそれぞれ浸漬し、37℃の恒温槽で静置した。所定時間ごとに取り出し、試験管傾斜法により、水中における各溶液のゾル-ゲル転移の有無を調べた。

## 【 0 1 4 1 】

具体的には、下記表2に記載の所定温度で所定時間経過した後、上記サンプル管を傾斜させ、約30秒の間に、流れなければ「ゲル」、流れたら「ゾル」と判断した。

## 【 0 1 4 2 】

表2には、37℃で1分間加熱後の状態とゲル状態の維持期間(日)の結果を示した。

## 【 0 1 4 3 】

10

20

30

【表2】

表2	第1成分 [ポリマー 溶液]	含有量 (wt%)	第2成分 [反応性化合物] (分子量)	含有量 (wt%)	混合直後 (室温) の状態	37℃加熱 1分後の 状態	ゲル状態 の維持期 間 (日)
実施例1	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	0.8	ゾル	ゲル	>29
実施例2	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	0.3	ゾル	ゲル	6
実施例3	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (4,000-15,000)	0.8	ゾル	ゲル	>28
実施例4	CP-OSu	25	4-arm PEG- NH <sub>2</sub> (5,140)	8.8	ゾル	ゲル	3
実施例5	CP-OSu	25	PEI (10,000)	0.7	ゾル	ゲル	1
実施例6	CP-OSu	25	BSA (66,000)	6	ゾル	ゲル	3
比較例1	CP-OSu	25	なし	—	—	ゲル	<1
比較例2	CP-OH	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	1.1	ゾル	ゲル	<1

## 【0144】

< 評価結果 >

実施例1～6で得られた生分解性ポリマー組成物は、室温（25℃）で第1成分と第2成分とを混合しただけではゾルの状態であり、さらに、実施例1では3日間4℃で放置してもゲル化は起こらず、ゾルのままであった。

## 【0145】

したがって、本発明の生分解性ポリマー組成物は体温まで温度を上げなければ、ゲル化しないことが分かった。

## 【0146】

また、実施例1～6で得られた生分解性ポリマー組成物は、37℃で1分間加熱した後、いずれもゲル化し、その後PBS中37℃で加温し続けたところ、ゲルの状態を1日から30日程度維持した。

## 【0147】

一方、比較例1及び比較例2の溶液は、37℃で1分間加熱した直後にゲル化したものの、PBS中37℃で加温し続けたところ、ゲル状態を維持した期間は24時間未満であった。

## 【0148】

## [試験例3]

## 温度低下によるゾル化の判定

実施例1～6の混合ポリマー水溶液、比較例1の溶液及び比較例2の溶液を、上記試験例2のように37℃に加温して、ゲル化させ、所定時間経過した後、ゲルの温度をそれぞれ4℃に下げた。1分経過後に、各ゲルを試験管傾斜法により、その状態を調べた。

## 【0149】

具体的には、各試料の入ったサンプル管を傾斜させ、約30秒の間に、流れなければ「ゲル」、流れたら「ゾル」と判断した。

## 【0150】

【表 3】

表 3	第 1 成分 [ポリマー溶液]	含有量 (wt%)	第 2 成分 [反応性化合物] (分子量)	含有量 (wt%)	37℃の 保持時間	4℃に 下げた後 の状態
実施例1	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	0.8	15分	ゲル
実施例2	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	0.3	15分	ゲル
実施例3	CP-OSu	25	Poly-L-lysine hydrobromide (4,000-15,000)	0.8	1分	ゲル
実施例4	CP-OSu	25	4-arm PEG- NH <sub>2</sub> (5,140)	8.8	1分	ゲル
実施例5	CP-OSu	25	PEI (10,000)	0.7	1分	ゲル
実施例6	CP-OSu	25	BSA (66,000)	6	5分	ゲル
比較例1	CP-OSu	25	なし	—	1分	ゾル
比較例1	CP-OSu	25	なし	—	1時間	ゾル
比較例2	CP-OH	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	1.1	1分	ゾル
比較例2	CP-OH	25	Poly-L-lysine hydrobromide (1,000-5,000)	1.1	1時間	ゾル

## 【0151】

&lt; 評価結果 &gt;

実施例1～6の生分解性ポリマー組成物は、37℃で表3に記載した保持時間加熱した後、温度を4℃に下げても、いずれもゲル状態を維持した(図3)。


## 【0152】

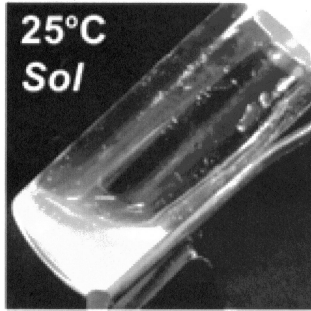
一方、比較例1及び2のゲルは、37℃で1分間又は1時間保持した後、温度を4℃に下げると、いずれもゾルに戻った。


10

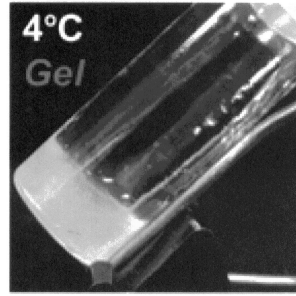
20


30

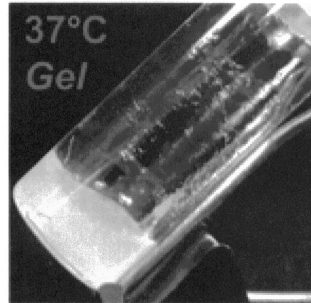
【 1】



【 3】



【 2】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 高橋 明裕  
大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学先端科学技術推進機構内
- (72)発明者 葛谷 明紀  
大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学化学生命工学部内

審査官 尾立 信広

- (56)参考文献 特開2014-221731(JP, A)  
特開2014-221732(JP, A)  
国際公開第2014/157186(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08L 67/00 - 67/08  
A61L 24/00 - 24/12  
A61L 31/00 - 31/18  
A61K 9/00 - 9/72  
A61K 47/00 - 47/69  
C08F 293/00  
C08G 81/00