

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7684519号

(P7684519)

(45)発行日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(24)登録日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B	37/08	(2006.01)	C 0 8 B	37/08	Z
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	

請求項の数 15 (全76頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-524929(P2024-524929)
 (86)(22)出願日 令和5年5月31日(2023.5.31)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2023/020372
 (87)国際公開番号 WO2023/234376
 (87)国際公開日 令和5年12月7日(2023.12.7)
 審査請求日 令和6年8月8日(2024.8.8)
 (31)優先権主張番号 特願2022-88995(P2022-88995)
 (32)優先日 令和4年5月31日(2022.5.31)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 000000033
 旭化成株式会社
 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号
 (74)代理人 100149548
 弁理士 松沼 泰史
 (74)代理人 100188558
 弁理士 飯田 雅人
 (74)代理人 100165179
 弁理士 田 崎 聡
 (74)代理人 100189337
 弁理士 宮本 龍
 (72)発明者 藪内 昂平
 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号
 旭化成株式会社内
 (72)発明者 中井 貴士

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸誘導体、医薬組成物、及び医薬組成物の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される面積A1とA2の比A1/A2が0.90以上である、ヒアルロン酸誘導体。

(i)標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線と、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムとの交点をUbとする；

(ii)前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで前記Ubから終点までの曲線と、前記屈折率強度極大点Kbから前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA2とし、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで始点から前記Ubまでの曲線と、前記屈折率強度極大点Kbから前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA1とする。

【請求項2】

ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される距離DaとDbの比Da/Dbが0.00超1.20以下である、請求項1に記載のヒアルロン酸誘導体。

(i)標準物質である150kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KaからベースラインBへ垂線を引き、ベースラインとの交点をBa、前記屈折率

10

20

強度極大点 K_a と前記 B_a の間の長さを L_a とする；

(ii) 屈折率強度が $L_a / 20$ となるクロマトグラム上の 2 点のうち、溶出時間が早いほうを点 R_1 とし、溶出時間が遅いほうを点 S_1 とする；

(iv) 前記点 R_1 と前記点 S_1 を結んだ直線 D_1 と、前記屈折率強度極大点 K_a からベースライン B へ引いた垂線との交点を T_a とし、前記屈折率強度極大点 K_b からベースライン B へ引いた垂線と前記直線 D_1 との交点を T_b とする；

(v) 前記点 R_1 と前記 T_a の距離を D_a 、前記 T_a と前記 T_b の距離を D_b とする。

【請求項 3】

前記面積 A_1 と A_2 の比 A_1 / A_2 が 1.70 以上である、請求項 1 又は 2 に記載のヒアルロン酸誘導体。

10

【請求項 4】

ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

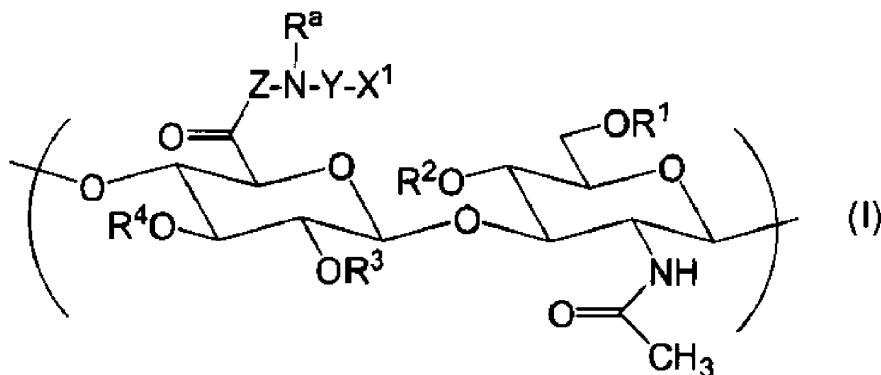
ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから算出される、標準物質である 50 kDa のポリアクリル酸の屈折率強度極大点における保持時間 P_r に対する、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点における保持時間 P_t の比 P_t / P_r が 0.5 以上 1.0 未満である、ヒアルロン酸誘導体。

【請求項 5】

前記ヒアルロン酸誘導体が、下記一般式 (I) で表される繰り返し単位を 1 以上有する、請求項 1 又は 4 に記載のヒアルロン酸誘導体。

【化 1】

20



30

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル、ホルミル及び C_{1-6} アルキルカルボニルからなる群より選択され；

Z は、直接結合、又は 2 個以上 30 個以下の任意のアミノ酸残基からなるペプチドリンカーを表し；

X^1 は、以下の式：

- $NR^b - R$ 、
- $NR^b - COO - R$ 、
- $NR^b - CO - R$ 、
- $NR^b - CO - NR^c - R$ 、
- $COO - R$ 、
- $O - COO - R$ 、
- $S - R$ 、
- $CO - Y^a - S - R$ 、
- $O - CO - Y^b - S - R$ 、
- $NR^b - CO - Y^b - S - R$ 、及び
- $S - S - R$ 、

40

で表される基からなる群より選択される基であり；

R^a 、 R^b 及び R^c は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、ここで当該基の

50

ルキル部分は、 $-O-$ 及び $-NR^f-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R^f は、水素原子、 C_{1-12} アルキル、アミノ C_{2-12} アルキル及びヒドロキシ C_{2-12} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R は、ステリル基であり；

Y は、 C_{2-30} アルキレン、又は $-(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-$ であり、ここで、当該アルキレンは、 $-O-$ 、 $-NR^g-$ 及び $-S-S-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R^g は、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

Y^a は、 C_{1-5} アルキレンであり；

Y^b は、 C_{2-8} アルキレン又は C_{2-8} アルケニレンであり；

m は、1以上100以下の整数である。）

【請求項6】

前記ステリル基がコレステリル基である、請求項1又は4に記載のヒアルロン酸誘導体。

【請求項7】

前記ヒアルロン酸誘導体を構成する二糖の繰り返し単位に対する、ステリル基の導入率が、30%以上60%以下である、請求項1又は4に記載のヒアルロン酸誘導体。

【請求項8】

前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）が4,000以上1,000,000以下である、請求項1又は4に記載のヒアルロン酸誘導体。

【請求項9】

前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）が5,000以上25,000以下である、請求項8に記載のヒアルロン酸誘導体。

【請求項10】

請求項1又は4に記載のヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する、医薬組成物。

【請求項11】

がん、感染症、及び免疫疾患からなる群より選ばれる1種以上の疾患の予防又は治療用である、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記薬効成分として、がん抗原、感染症由来抗原、及び免疫疾患における自己抗原からなる群から選択される少なくとも一つを含み、且つ、アジュバントを更に含む、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記薬効成分として、がん抗原又は感染症由来抗原を含む、請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

請求項1又は4に記載のヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する、医薬組成物の製造方法であって、

前記薬効成分を有機溶媒又は有機溶媒含有水に溶解して、前記薬効成分を含有する油相を調製する調製工程と、

前記油相と前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相との混合比が容量比で20:100~0.01:100となるように混合する混合工程と、

を含む、医薬組成物の製造方法。

【請求項15】

前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相のpHが6.00以上11.00以下である、請求項14に記載の医薬組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、ヒアルロン酸誘導体、医薬組成物、及び医薬組成物の製造方法に関する。

本願は、2022年5月31日に、日本に出願された特願2022-088995号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】**【0002】**

近年、タンパク質やペプチド、核酸を活性成分とする医薬品であるバイオ医薬品が実用化されており、その数は年々増え続けている。バイオ医薬品は、従来の低分子医薬では満たすことができなかった未充足医療ニーズを満たすことができる。しかしながら、消化管乃至粘膜等からは吸収されにくい上、体内では不安定で血中半減期が短いという課題がある。そのため、バイオ医薬品は注射による頻回投与が必要であり、患者と医療関係者いずれにとっても負担が大きい。そこで、薬理活性を損なうことなくバイオ医薬品をカプセル化して生体内で徐々に有効成分を放出することができる薬物基材（徐放性ドラッグデリバリーシステム基材）が求められている。

10

【0003】

このような背景から、特許文献1では、安全性に優れたヒアルロン酸誘導体からなる徐放性ドラッグデリバリーシステム基材が提案されている。このヒアルロン酸誘導体は、水溶液中で自発的に会合し、薬物、特にバイオ医薬品を、その生物活性を維持したまま効率よく封入することができ、生理食塩濃度下で凝集し（或いは、生理食塩濃度下でも分散し）、なおかつ血中滞留性が良好である。このヒアルロン酸誘導体は、特にバイオ医薬品を有効成分として使用する場合に、薬理活性を維持したまま多くの薬物を効率よく封入できる担体、及び血中滞留性に優れた血中徐放キャリア並びにターゲティングキャリアとして用いることができ、薬物を持続的に徐放できる局所（例えば、皮下等）徐放キャリアにもなり得るとされている。

20

【0004】

また、上記ヒアルロン酸誘導体を担体として用いたがんワクチンも報告されている（例えば、特許文献2等参照）。

【先行技術文献】**【特許文献】**

30

【0005】

【文献】国際公開第2010/053140号

【文献】国際公開第2020/158771号

【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、特許文献2等で使用されているヒアルロン酸誘導体は、粒子サイズ分布がブロードであり、且つ、不均一なものであり、ヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布とリンパ節内の免疫細胞への送達性や該免疫細胞の活性化能の関連性については具体的に検討がなされておらず、改良の余地がある。

40

【0007】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、薬効成分と製剤化した際のリンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れたヒアルロン酸誘導体、及び前記ヒアルロン酸誘導体を用いた医薬組成物及びその製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

(1) ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される面積A1とA2の比A1/A2が0.90以上である、ヒアルロン酸

50

誘導体。

(i) 標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線と、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムとの交点をUbとする；

(ii) 前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで前記Ubから終点までの曲線と、前記屈折率強度極大点Kbから前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA2とし、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで始点から前記Ubまでの曲線と、前記屈折率強度極大点Kbから前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA1とする。

(2) ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される距離DaとDbの比Da/Dbが0.00超1.20以下である、(1)に記載のヒアルロン酸誘導体。

10

(i) 標準物質である150kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KaからベースラインBへ垂線を引き、ベースラインとの交点をBa、前記屈折率強度極大点Kaと前記Baの間の長さをLaとする；

(ii) 屈折率強度がLa/20となるクロマトグラム上の2点のうち、溶出時間が早いほうを点R1とし、溶出時間が遅いほうを点S1とする；

(iv) 前記点R1と前記点S1を結んだ直線D1と、前記屈折率強度極大点KaからベースラインBへ引いた垂線との交点をTaとし、前記屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線と前記直線D1との交点をTbとする；

20

(v) 前記点R1と前記Taの距離をDa、前記Taと前記Tbの距離をDbとする。
(3) 前記面積A1とA2の比A1/A2が1.70以上である、(1)又は(2)に記載のヒアルロン酸誘導体。

(4) ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから算出される、標準物質である50kDaのポリアクリル酸の屈折率強度極大点における保持時間Prに対する、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点における保持時間Ptの比Pt/Prが0.5以上1.0未満である、ヒアルロン酸誘導体。

(5) ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

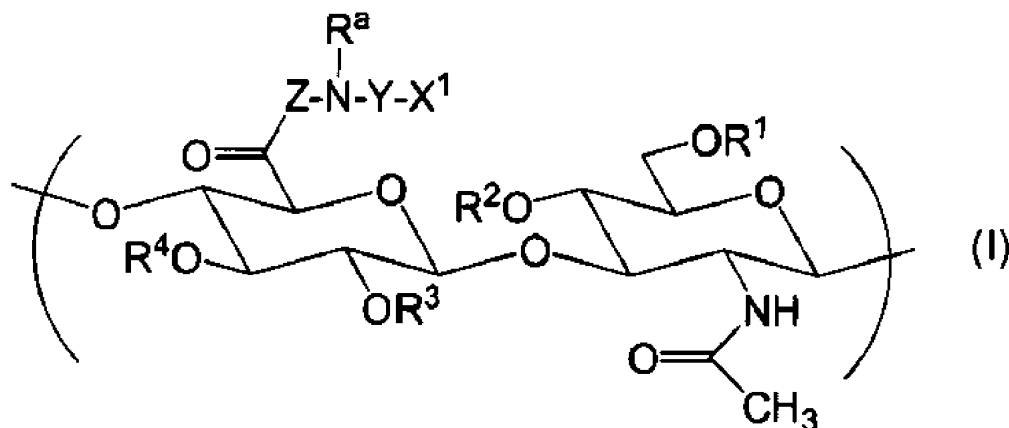
ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、各分子量が2kDa、4kDa、8kDa、18kDa、40kDa、および150kDaであるポリアクリル酸を標準物質として作成した検量線に基づき算出されるヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量が11万以上50万未満である、ヒアルロン酸誘導体。

30

(6) 前記ヒアルロン酸誘導体が、下記一般式(I)で表される繰り返し単位を1以上有する、(1)~(5)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体。

【0009】

【化1】



40

50

【 0 0 1 0 】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル、ホルミル及び C_{1-6} アルキルカルボニルからなる群より選択され；

Z は、直接結合、又は2個以上30個以下の任意のアミノ酸残基からなるペプチドリンカーを表し；

X^1 は、以下の式：

- $NR^b - R$ 、
- $NR^b - COO - R$ 、
- $NR^b - CO - R$ 、
- $NR^b - CO - NR^c - R$ 、
- $COO - R$ 、
- $O - COO - R$ 、
- $S - R$ 、
- $CO - Y^a - S - R$ 、
- $O - CO - Y^b - S - R$ 、
- $NR^b - CO - Y^b - S - R$ 、及び
- $S - S - R$ 、

10

で表される基からなる群より選択される基であり；

R^a 、 R^b 及び R^c は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、ここで当該基のアルキル部分は、 $-O-$ 及び $-NR^f-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

20

R^f は、水素原子、 C_{1-12} アルキル、アミノ C_{2-12} アルキル及びヒドロキシ C_{2-12} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R は、ステリル基であり；

Y は、 C_{2-30} アルキレン、又は $-(CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2-$ であり、ここで、当該アルキレンは、 $-O-$ 、 $-NR^g-$ 及び $-S-S-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R^g は、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

30

Y^a は、 C_{1-5} アルキレンであり；

Y^b は、 C_{2-8} アルキレン又は C_{2-8} アルケニレンであり；

m は、1以上100以下の整数である。）

【 0 0 1 1 】

(7) 前記ステリル基がコレステリル基である、(1)~(6)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体。

(8) 前記ヒアルロン酸誘導体を構成する二糖の繰り返し単位に対する、ステリル基の導入率が、30%以上60%以下である、(1)~(7)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体。

40

(9) 前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量(絶対分子量)が4,000以上1,000,000以下である、(1)~(8)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体。

(10) 前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量(絶対分子量)が5000以上25,000以下である、(9)に記載のヒアルロン酸誘導体。

(11) (1)~(10)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する、医薬組成物。

(12) がん、感染症、及び免疫疾患からなる群より選ばれる1種以上の疾患の予防又は治療用である、(11)に記載の医薬組成物。

(13) 前記薬効成分として、がん抗原、感染症由来抗原、及び免疫疾患における自己

50

抗原からなる群から選択される少なくとも一つを含み、且つ、アジュバントを更に含む、(11)または(12)に記載の医薬組成物。

(14) 前記薬効成分として、がん抗原又は感染症由来抗原を含み、且つ、アジュバントを更に含む、(11)～(13)のいずれか一つに記載の医薬組成物。

(15) (1)～(10)のいずれか一つに記載のヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する、医薬組成物の製造方法であって、

前記薬効成分を有機溶媒又は有機溶媒含有水に溶解して、前記薬効成分を含有する油相を調製する調製工程と、

前記油相と前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相との混合比が容量比で20:100～0.01:100となるように混合する混合工程と、

を含む、医薬組成物の製造方法。

(16) 前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相のpHが6.00以上11.00以下である、(15)に記載の医薬組成物の製造方法。

【発明の効果】

【0012】

上記態様のヒアルロン酸誘導体によれば、薬効成分と製剤化した際のリンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れるヒアルロン酸誘導体を提供することができる。上記態様の医薬組成物は、前記ヒアルロン酸誘導体を含み、リンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れる。上記態様の医薬組成物の製造方法は、前記ヒアルロン酸誘導体を用いており、リンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れる医薬組成物が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムの一例である。

【図2】本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムの一例である。

【図3A】合成例1-1におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図3B】合成例1-2におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図3C】合成例1-3におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図4A】実施例1-1におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図4B】実施例1-2におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図4C】実施例1-3におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図5A】比較例1-1におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図5B】比較例1-2におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図5C】比較例1-3におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図5D】比較例1-4におけるコレステリル修飾プルラン(CHP)のゲル浸透クロマトグラムである。

【図6A】実施例1-1におけるヒアルロン酸誘導体及び実施例2-1における医薬組成物中のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図6B】実施例1-2におけるヒアルロン酸誘導体及び実施例2-2における医薬組成物中のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図6C】実施例1-3におけるヒアルロン酸誘導体及び実施例2-3における医薬組成物中のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図7A】試験例1-1におけるペプチド取り込み樹状細胞(DC)に対するCD80を発現するペプチド取り込みDCの割合(%)を算出した際のFACS解析の一例を示すグラフである。

【図7B】試験例1-1におけるペプチド取り込みDCに対するCD86を発現するペプチド取り込みDCの割合(%)を算出した際のFACS解析の一例を示すグラフである。

【図7C】試験例1-1におけるペプチド取り込み標準型1型樹状細胞(cDC1)に対するCD80を発現するペプチド取り込みcDC1の割合(%)を算出した際のFACS解析の一例を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 7 D】試験例 1 - 1 におけるペプチド取り込み c D C 1 に対する C D 8 6 を発現するペプチド取り込み c D C 1 の割合 (%) を算出した際の F A C S 解析の一例を示すグラフである。

【図 7 E】試験例 1 - 1 におけるペプチド取り込みマクロファージ細胞 (M p h) に対する C D 8 0 を発現するペプチド取り込み M p h の割合 (%) を算出した際の F A C S 解析の一例を示すグラフである。

【図 7 F】試験例 1 - 1 におけるペプチド取り込み M p h に対する C D 8 6 を発現するペプチド取り込み M p h の割合 (%) を算出した際の F A C S 解析の一例を示すグラフである。

【図 8】試験例 2 - 1 ~ 2 - 8 におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。 10

【図 9】試験例 3 - 1 ~ 3 - 6 におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 10】比較例 5 - 1 におけるヒアルロン酸のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 11】比較例 5 - 1 及び 5 - 2 における抗原ペプチド - ヒアルロン酸複合体の調製を試みた時の混合液の写真と、実施例 7 - 1 - 1 における抗原ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を調製した時の溶液の写真である。

【図 12】比較例 5 - 2 におけるヒアルロン酸のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 13】比較例 6 - 1 におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 14】実施例 6 - 1 におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。 20

【図 15】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における I g G 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。

【図 16】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における I g G 1 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。

【図 17】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における I g G 2 a 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。

【図 18 A】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における希釈倍率 10 (力価 10^{-1}) である時の I g G 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。

【図 18 B】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における希釈倍率 10 (力価 10^{-1}) である時の I g G 1 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。 30

【図 18 C】実施例 6 - 1 - 1 および比較例 6 - 1 - 1 における希釈倍率 10 (力価 10^{-1}) である時の I g G 2 a 抗体価 (O D 値) を示すグラフである。

【図 19】実施例 7 - 1 におけるヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 20】実施例 7 - 1 - 1 における抗原ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 21】実施例 1 - 1 で得られたヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 22】実施例 1 - 1 で得られたヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムである。

【図 23】試験例 6 における経時的な腫瘍面積値 (平均値) を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】 40

以下、本発明の実施の形態 (以下、「本実施形態」という。) について詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で様々な変形が可能である。

【0015】

以下、本明細書において使用される用語を説明する。

【0016】

本明細書において使用される「 C_{1-20} アルキル」という用語は、炭素数 1 以上 20 以下の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*iso*-プロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*iso*-ブチル、*tert*-ブチル等の「 C_{1-4} アルキル」が含まれ、さらに、*n*-ペンチル、3-メチルブチル、2-メチル

ルブチル、1 - メチルブチル、1 - エチルプロピル、n - ヘキシル、4 - メチルペンチル、3 - メチルペンチル、2 - メチルペンチル、1 - メチルペンチル、3 - エチルブチル、2 - エチルブチル等が含まれる。C₁ - 20 アルキルには、炭素数が1以上12以下のC₁ - 12 アルキル、炭素数が1以上6以下のC₁ - 6 アルキル基も含まれる。

【0017】

本明細書において使用される「C₁ - 6 アルキルカルボニル」という用語は、アルキル部分が既に言及したC₁ - 6 アルキルであるアルキルカルボニル基を意味し、例えば、アセチル、プロピオニル、n - プロピルカルボニル、iso - プロピルカルボニル、n - ブチルカルボニル、sec - ブチルカルボニル、iso - ブチルカルボニル、tert - ブチルカルボニル等の「C₁ - 4 アルキルカルボニル」が含まれる。

10

【0018】

本明細書において使用される「アミノC₂ - 20 アルキル」という用語は、置換基としてアミノ基を有する炭素数2以上20以下の直鎖状又は分岐鎖状のアルキルを意味し、例えば、アミノ基はアルキル基の末端の炭素原子上に位置していてもよい。アミノC₂ - 20 アルキルには、炭素数が2以上12以下のアミノC₂ - 12 アルキルも含まれる。

【0019】

本明細書において使用される「ヒドロキシC₂ - 20 アルキル」という用語は、置換基としてヒドロキシ基を有する炭素数2以上20以下の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えば、ヒドロキシ基はアルキル基の末端の炭素原子上に位置していてもよい。ヒドロキシC₂ - 20 アルキルには、炭素数が2以上12以下のヒドロキシC₂ - 12 アルキルも含まれる。

20

【0020】

本明細書において使用される「C₂ - 30 アルキレン」という用語は、炭素数2以上30以下の直鎖状又は分岐鎖状の2価の飽和炭化水素基を意味し、例えば、エチレン、プロピレン等を含み、炭素数が2以上20以下のC₂ - 20 アルキレン、炭素数が2以上8以下のC₂ - 8 アルキレン、基「- (CH₂)_n -」(ここで、nは2以上30以下であり、2以上20以下が好ましく、2以上15以下がより好ましい。)を含む。

【0021】

本明細書において使用される「C₁ - 5 アルキレン」という用語は、炭素数1以上5以下の直鎖状又は分岐鎖状の2価の飽和炭化水素基を意味し、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン等を含む。

30

【0022】

本明細書で言及する用語「C₂ - 8 アルケニレン」とは、炭素数2以上8以下の直鎖状又は分岐鎖状の、1以上の二重結合を含む、2価の飽和炭化水素基を意味し、例えば、- CH = CH -、- C(CH₃) = CH -、2 - ブテン - 1, 4 - ジイル、ヘプタ - 2, 4 - ジエン - 1, 6 - ジイル、オクタ - 2, 4, 6 - トリエン - 1, 8 - ジイル等を含む。幾何異性が存在する場合は、それぞれの異性体及びそれらの混合物も含まれる。

【0023】

ヒアルロン酸誘導体

本発明の第1の実施形態のヒアルロン酸誘導体は、ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、

40

ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められる図1に示すクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される面積A₁とA₂の比A₁/A₂が0.90以上である。

(i) 標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点K_bからベースラインBへ引いた垂線と、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムとの交点をU_b、前記屈折率強度極大点K_bからベースラインBへ引いた垂線とベースラインとの交点をB_bとする；

(ii) 前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで前記U_bから終点まで曲線と、前記屈折率強度極大点K_bから前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA₂とし、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで始点から前記U_bまで

50

の曲線と、前記屈折率強度極大点 K_b から前記ベースライン B へ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値を A_1 とする。

【0024】

さらに、本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められる図2に示すクロマトグラムから、以下に示す方法により算出される距離 D_a と D_b の比 D_a / D_b が 0.00 超 1.20 以下であることが好ましい。

(i) 標準物質である $150kDa$ のポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点 K_a からベースライン B へ垂線を引き、ベースラインとの交点を B_a 、前記屈折率強度極大点 K_a と前記 B_a の間の長さを L_a とする；

(ii) 屈折率強度が $L_a / 20$ となるクロマトグラム上の2点のうち、溶出時間が早いほうを点 R_1 とし、溶出時間が遅いほうを点 S_1 とする；

(iii) 標準物質である $50kDa$ のポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点 K_b からベースライン B へ引いた垂線とベースラインとの交点を B_b とする；

(iv) 前記点 R_1 と前記点 S_1 を結んだ直線 D_1 と、前記屈折率強度極大点 K_a からベースライン B へ引いた垂線との交点を T_a とし、前記屈折率強度極大点 K_b からベースライン B へ引いた垂線と前記直線 D_1 との交点を T_b とする；

(v) 前記点 R_1 と前記 T_a の距離を D_a 、前記 T_a と前記 T_b の距離を D_b とする。

(ii) において、屈折率強度が $L_a / 20$ となるクロマトグラム上の点が3点以上ある場合、始点に最も近い交点を R_1 、終点に最も近い交点を S_1 とする。

【0025】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、従来のヒアルロン酸誘導体とは異なり、粒子サイズ分布において、特定の粒子サイズのヒアルロン酸誘導体を比較的多く含み、粒子サイズ分布がシャープに制御されたものである。発明者らは、この粒子サイズ分布が制御されたヒアルロン酸誘導体を薬効成分と製剤化することで、後述する実施例に示すように、粒子サイズ分布が制御されていないヒアルロン酸誘導体や、従来から担体として使用されているコレステロール化プルラン (CHP) と比較して、リンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能が顕著に優れることを見出して、本発明を完成するに至った。

【0026】

ここでいう免疫細胞としては、好ましくはミエロイド系細胞であり、より好ましくは、マクロファージ又は樹状細胞 (DC) であり、さらに好ましくは DC であり、特に好ましくは標準型1型樹状細胞 (cDC1) である。

【0027】

マクロファージ及び樹状細胞は、いずれも抗原提示能を有する。樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞であり、リンパ組織及び非リンパ組織における T 細胞及びナチュラルキラー細胞の増殖と機能の調整を担当している。樹状細胞にはいくつかのサブタイプがあるが、ケモカイン受容体 $XCRI$ を特異的に発現し、C型レクチンエンドサイトーシス受容体 $CLEC9A$ を選択的に発現する cDC1 は、高いクロスプレゼンテーション能を有することから、抗原を MHC クラス I 分子に効率的に搭載する (参考文献1: Noubade R et al., "Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity", Front Immunol., Vol. 10, Article 1014, pp. 1-13. 2019.)。同時に共刺激分子を発現することにより、ウイルスや細菌に感染した細胞やがん細胞を攻撃する T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞 (CTL)) を活性化することが可能である。

すなわち、マクロファージ又は DC (好ましくは cDC1) への抗原送達性を高めることは、がんの予防又は治療、感染症の予防又は治療の効果を向上させることになる。

【0028】

また、マクロファージ及び DC は抗原を MHC クラス II 分子に搭載することができる。これはヘルパー T 細胞を活性化し、B 細胞による抗体産生を促進する。

すなわち、マクロファージ又は DC (好ましくは cDC1) への抗原送達性を高めることは、感染症の予防又は治療、免疫疾患の治療の効果を向上させることになる。

【0029】

10

20

30

40

50

また、免疫細胞の活性化能としては、上述したような細胞の活性を向上、促進、又は増強させる性質を意味し、中でも、DC（好ましくはcDC1）における共刺激分子の発現を向上、促進又は維持させる性質であることが好ましい。共刺激分子としては、CD80、CD86等が挙げられる。これら共刺激分子の発現が向上、促進又は維持することで、T細胞（細胞傷害性T細胞（CTL））を顕著に誘導することができる。よって、本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、薬効成分と製剤化した際に、DC（好ましくはcDC1）におけるCD80及びCD86両方の発現を向上、促進又は維持できるものであることが好ましい。

【0030】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができ、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。これにより、免疫細胞の活性を向上、促進、又は増強させているものと推察される。なお、上記メカニズムと異なるメカニズムで所望の効果が得られる場合であっても、技術的範囲に含まれる。

10

【0031】

すなわち、本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、免疫細胞への薬効成分の送達向上剤、送達促進剤、又は送達増強剤ということもできる。或いは、免疫細胞への薬効成分の取り込み向上剤、促進剤、又は増強剤ということもできる。

また、本実施形態のヒアルロン酸誘導体と薬効成分とを含む、後述する医薬組成物は、免疫細胞の活性化用組成物、DC（好ましくはcDC1）における共刺激分子の発現向上用組成物、発現促進用組成物又は発現維持用組成物ということもできる。

20

【0032】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布は、ゲル浸透クロマトグラフィーにより測定することができ、上記のとおり制御された粒子サイズ分布であることは、ゲル浸透クロマトグラムから以下に示す方法により算出される面積A1とA2の比A1/A2で示すことができる。

前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定において標準物質として使用されるポリアクリル酸は、ポリアクリル酸ナトリウムであることが好ましく、具体的には、Polymer Standards Service - USA社製、ORDER No. PSS - Paaシリーズ（ポリアクリル酸ナトリウム）であることがより好ましい。

30

【0033】

ゲル浸透クロマトグラフィーによるヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布の測定は、以下の方法で行うことができる。

1mg/mLのヒアルロン酸誘導体水溶液、2mg/mLのポリアクリル酸標準物質水溶液を調製し、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行う。

（測定条件）

装置：高速GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）装置

カラム：G4000SWXL（東ソー社製、粒子径8μm、内径7.8mm、長さ30cm、品番：8542）

40

溶離液：10mM リン酸緩衝液（pH7.4）

流速：1mL/min

注入量：50μL

検出器：RI（示差屈折率検出器）

温度：30

【0034】

図1は、本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムの一例である。図1を参照しながら、面積A1及びA2の算出方法について以下に詳細を説明する。

【0035】

(i) 図1には、本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムと、標準

50

物質である50kDaのポリアクリル酸のゲル浸透クロマトグラムが記載されている。まず、標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線と、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムとの交点をUb、前記屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線とベースラインBとの交点をBbとする。ここで、測定開始時の屈折率強度をゼロとし、ここから水平に引いた線をベースラインとする。例えば、測定開始前に屈折率強度の増減が±0.5mVの範囲内に収まるよう調整し、屈折率強度が5分間で0.5mV以下の増減に収まるように調整する。例えば、屈折率強度増加量がノイズ値の5倍相当量を3回上回った最初の点をクロマトグラムの「始点」とし、溶出時間0分とする。例えば、屈折率強度が最大極大屈折率強度の1000分の1になった点をクロマトグラムの「終点」とし、屈折率強度が最大極大屈折率強度の1000分の1に至らない場合は、「Tlim」を「終点」とする。「Tlim」は、2kDaのポリアクリル酸を測定した際の極大屈折率強度を呈する溶出時間とする。

10

本装置においては、0.00167分おきに屈折率強度を算出する。

【0036】

(ii)次に、ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムにおいて、交点Ubから終点までの曲線と、屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線（交点Ubから交点Bbまでの直線）と、ベースラインBで囲まれた面積値をA2とし、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで始点から前記Ubまでの曲線と、前記屈折率強度極大点Kbから前記ベースラインBへ引いた垂線（交点Ubから交点Bbまでの直線）と、ベースラインBで囲まれた面積値をA1とする。

20

ここで、各面積値はGPCワークステーションEcoSEC Elite-WSの解析アプリケーションを用いて算出される。

各面積値を算出する際に、ゲル浸透クロマトグラフィーに使用した展開溶媒などに起因するピークや、使用したカラムや装置に起因するベースラインの揺らぎによる擬似ピークは除く。

【0037】

図1に示す面積A1とA2の比 $A1/A2$ が0.90以上であり、1.00以上であることがより好ましく、1.10以上であることがより好ましく、1.20以上であることがより好ましく、1.30以上であることがより好ましく、1.40以上、1.50以上であることがより好ましく、1.60以上であることがさらに好ましく、1.70以上であることが特に好ましい。面積A1とA2の比 $A1/A2$ が上記下限値以上であることで、粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

30

【0038】

一方、 $A1/A2$ の上限値は、面積A1の比率が面積A2よりも高ければ高いほど好ましい。すなわち、図1では、ベースラインの左側（溶出時間が短くなる）ほど粒子サイズが大きく、右側（溶出時間が長くなる）ほど粒子サイズが小さくなることから、粒子サイズが大きいものの比率が、粒子サイズが小さいものよりも高ければ高いほど好ましい。よって、 $A1/A2$ の上限値は、特に限定されないが、例えば、7.0以下、6.0以下、または5.0以下であってよい。

40

【0039】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムの形状は、特に限定されないが、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度の極大点（ピークトップ）が2つ以上あってよい。特に限定されないが、標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点KbからベースラインBへ引いた垂線の両側（左右）のそれぞれに、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度の極大点（ピークトップ）を1つ以上有して良い。

50

このとき、屈折率強度極大点 K b からベースライン B へ引いた垂線の左側のヒアルロン酸誘導体の屈折率強度の極大点（ピークトップ）における屈折率強度が、屈折率強度極大点 K b からベースライン B へ引いた垂線の右側のヒアルロン酸誘導体の屈折率強度の極大点（ピークトップ）における屈折率強度より大きくてもよい。また、右側の極大点（ピークトップ）における屈折率強度に対する、左側の極大点（ピークトップ）における屈折率強度は、特に限定されないが、1.0倍以上、2.0倍以上、3.0倍以上、5.0倍以上、または10.0倍以上であってもよく、上限は大きくて良いが、例えば、1000倍以下、100倍以下、50.0倍以下、20.0倍以下、10.0倍以下、2.0倍以下、または1.5倍以下であってよい。

【0040】

また、本実施形態のヒアルロン酸誘導体が上記のとおり制御された粒子サイズ分布であることは、以下に示す距離 D a と D b の比 $D a / D b$ でも定義することができる。

【0041】

図2は、本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムの一例であり、図2に示すヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムと標準物質である50kDaのポリアクリル酸のゲル浸透クロマトグラムは図1と同一である。しかしながら、図2では、標準物質である150kDaのポリアクリル酸のゲル浸透クロマトグラムが追記されており、各種交点等について定義されている点で上記図1とは異なる。図2を参照しながら、距離 D a 及び D b の算出方法について以下に詳細を説明する。

【0042】

(i) まず、標準物質である150kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点 K a からベースライン B へ垂線を引き、ベースラインとの交点を B a 、前記屈折率強度極大点 K a と前記 B a の間の長さを L a とする。

【0043】

(ii) 次に、屈折率強度が $L a / 20$ となるクロマトグラム上の2点のうち、溶出時間が早いほうを点 R 1 とし、溶出時間が遅いほうを点 S 1 とする。

【0044】

(iii) 次に、標準物質である50kDaのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点 K b からベースライン B へ引いた垂線とベースラインとの交点を B b とする。

【0045】

(iv) 次に、前記点 R 1 と前記点 S 1 を結んだ直線 D 1 と、前記屈折率強度極大点 K a からベースライン B へ引いた垂線との交点を T a とし、前記屈折率強度極大点 K b からベースライン B へ引いた垂線と前記直線 D 1 との交点を T b とする。

【0046】

(v) 最後に、前記点 R 1 と前記 T a の距離を D a 、前記 T a と前記 T b の距離を D b とする。

【0047】

図2に示す距離 D a と D b の比 $D a / D b$ が0.00超1.20以下であることが好ましく、0.10以上1.00以下であることがより好ましく、0.20以上、0.8以下がより好ましく、0.30以上0.95以下がさらに好ましく、0.40以上、0.94以下がよりさらに好ましく、0.50以上0.93以下が特に好ましい。距離 D a と D b の比 $D a / D b$ が上記範囲内であることで、標準物質である150kDaのポリアクリル酸よりも粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

【0048】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムにおいて、横軸は溶出時間

10

20

30

40

50

を、縦軸は示差屈折率計を用いて得られた屈折率強度を示すが、屈折率極大点はいくつあってもよい。本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムは、1～5つの極大点を有する粒子サイズ分布が好ましく、より好ましくは1～3つの極大点を有する粒子サイズ分布が好ましい。また、極小点があってもなくてもよい。

さらに、本実施形態のヒアルロン酸誘導体のゲル浸透クロマトグラムにおいて、示差屈折率計を用いて得られた屈折率強度と溶出時間で表されるクロマトグラムが左右非対称であって対称であってよい。

【0049】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体は、ヒアルロン酸誘導体中のステリル基が水中で自己会合し、単分子又は複数分子が会合することでナノサイズのハイドロゲルを形成するものである。

10

【0050】

ヒアルロン酸誘導体において、ステリル基は、ヒアルロン酸に対して直接的に結合していてもよく、リンカーを解して結合されていてもよい。

【0051】

ここでいう「リンカー」とは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリinker、又は合成化合物リンカーを用いることができるが、ヒアルロン酸誘導体においては、ペプチドリinkerが好ましい。ペプチドリinkerの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは2アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。ヒアルロン酸誘導体に含まれるペプチドリinkerは、全て同じ長さのペプチドリinkerを用いてもよく、異なる長さのペプチドリinkerを用いてもよい。

20

【0052】

[ステリル基]

本明細書において使用される「ステリル基」という用語は、ステロイド骨格を有する基であれば特に制限されない。ここでステロイドとしては、具体的には、コレステロール、コレスタノール、カンペスタノール、エルゴスタノール、スチグマスタノール、コプロスタノール、スチグマステロール、シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール、シミアレノール、胆汁酸、テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン、コルチゾール、コルチゾン、アルドステロン、コルチコステロン、デオキシコルチステロン等が挙げられる。ステリル基としては、コレステリル基、スチグマステリル基、ラノステリル基、エルゴステリル基等が挙げられ、中でも、コレステリル基（特に、コレスタ-5-エン-3-イル基）が好ましい。

30

【0053】

ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）は特に限定はされないが、ヒアルロン酸誘導体1分子あたりのステリル基導入数を増やし、薬効成分との複合体を形成する観点、また、分子の絡み合いを高め、血中での滞留性を高める観点からは、分子量の比較的大きいヒアルロン酸誘導体が好ましい。このようなヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）としては、4000（4k）以上1,000,000（1,000k）以下が好ましく、5k以上500k以下がより好ましく、6k以上500k以下がさらに好ましく、7k以上300k以下がよりさらに好ましく、7k以上100k以下がよりさらに好ましく、7k以上50k以下がよりさらに好ましく、7k以上25k以下がさらにより好ましく、8k以上15k以下が特に好ましい。あるいは、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）としては、5k以上25k以下がより好ましい。ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）が上記下限値以上であることで、分子の絡み合いをより高め、血中での滞留性をより高めることができる。一方、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）が上記上限値以下であることで、粘度の上昇を抑制でき、より高濃度のヒアルロン酸誘導体を医薬組成物中に溶解させることができる。ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（絶対分子量）は、一般的には、対応する分子量を有する原料

40

50

を使用することにより調節することができる。

【0054】

ここでいう、「ヒアルロン酸誘導体の分子量（絶対分子量）」は、サイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱検出器（SEC-MALS）により決定された重量平均分子量（絶対分子量）である。

【0055】

前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムにおいて、標準物質である50kDaのポリアクリル酸の屈折率強度極大点（ピークトップ）の保持時間Pr（溶出時間Bb）に対する、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点（ピークトップ）の保持時間Ptの比Pt/Prは特に限定はされないが、Pt/Prが0.5以上1.0未満であることが好ましく、0.7以上0.95未満であることがより好ましく、0.75以上0.92未満であることがより更に好ましい。比Pt/Prが前記範囲内である場合に、粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

10

なお、前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムにおいて、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点（ピークトップ）が複数ある場合には、屈折率強度が最大となる屈折率強度極大点（ピークトップ）における溶出時間を、前記ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点（ピークトップ）の保持時間Ptとして採用する。

20

また、前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定において標準物質として使用されるポリアクリル酸は、ポリアクリル酸ナトリウムであることが好ましく、具体的には、Polymer Standards Service - USA社製、ORDER No. PSS - Paaシリーズ（ポリアクリル酸ナトリウム）であることがより好ましい。

【0056】

ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）は特に限定はされないが、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が11万以上であることが好ましく、11万以上50万未満がより好ましく、13万以上30万未満がよりさらに好ましく、14万以上25万未満が最も好ましい。ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が前記範囲内となる場合には、粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

30

一方、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が前記上限値を超える場合、粘性が増大し、製剤として使用しにくい場合がある。

【0057】

前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）は、前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、各分子量が2kDa、4kDa、8kDa、18kDa、40kDa、および150kDaであるポリアクリル酸（PSS - Paa 2k（2kDa）、4k（4kDa）、8k（8kDa）、18k（18kDa）、40k（40kDa）、150k（150kDa）（PSS Polymer Standard service GmbH社製、ポリアクリル酸ナトリウム）を標準物質として作成された検量線に基づき、下記式： $A t^3 + B t^2 + C t + D$ に従い算出される。

40

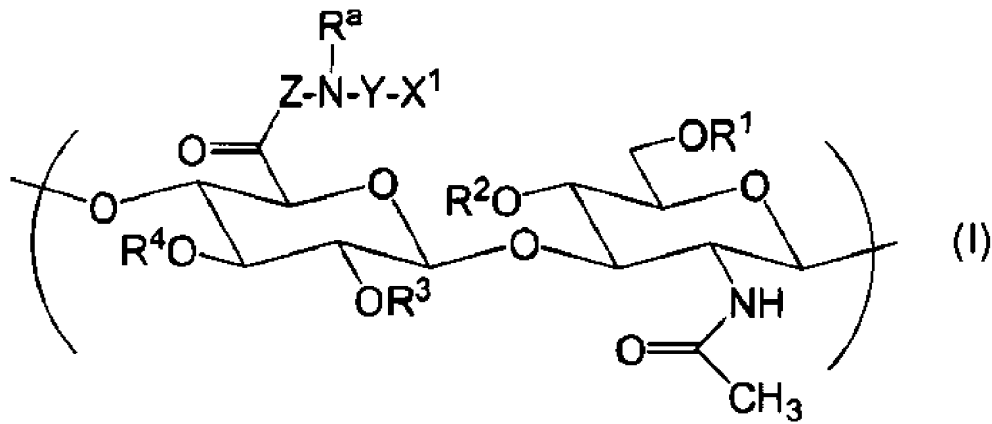
【0058】

好ましいヒアルロン酸誘導体として具体的には、例えば、下記一般式（I）で表される繰り返し単位（以下、「繰り返し単位（I）」と称する場合がある）を1以上有するヒアルロン酸誘導体等が挙げられる。

50

【 0 0 5 9 】

【 化 2 】



10

【 0 0 6 0 】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル、ホルミル及び C_{1-6} アルキルカルボニルからなる群より選択され；

Z は、直接結合、又は2個以上30個以下の任意のアミノ酸残基からなるペプチドリンカーを表し；

X^1 は、以下の式：

- $NR^b - R$ 、
- $NR^b - COO - R$ 、
- $NR^b - CO - R$ 、
- $NR^b - CO - NR^c - R$ 、
- $COO - R$ 、
- $O - COO - R$ 、
- $S - R$ 、
- $CO - Y^a - S - R$ 、
- $O - CO - Y^b - S - R$ 、
- $NR^b - CO - Y^b - S - R$ 、及び
- $S - S - R$ 、

20

30

で表される基からなる群より選択される基であり；

R^a 、 R^b 及び R^c は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、ここで当該基のアルキル部分は、 $-O-$ 及び $-NR^f-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R^f は、水素原子、 C_{1-12} アルキル、アミノ C_{2-12} アルキル及びヒドロキシ C_{2-12} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R は、ステリル基であり；

40

Y は、 C_{2-30} アルキレン、又は $-(CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 -$ であり、ここで、当該アルキレンは、 $-O-$ 、 $-NR^g-$ 及び $-S-S-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

R^g は、水素原子、 C_{1-20} アルキル、アミノ C_{2-20} アルキル及びヒドロキシ C_{2-20} アルキルからなる群より選択され、当該基のアルキル部分は $-O-$ 及び $-NH-$ からなる群より選択される基が挿入されていてもよく；

Y^a は、 C_{1-5} アルキレンであり；

Y^b は、 C^{2-8} アルキレン又は C^{2-8} アルケニレンであり；

m は、1以上100以下の整数である。）

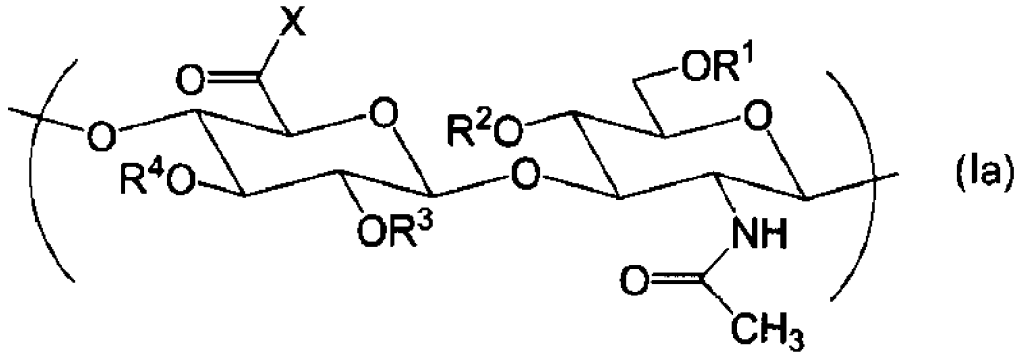
【 0 0 6 1 】

50

前記ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位 (I) として、下記一般式 (I a) で表される繰り返し単位 (以下、「繰り返し単位 (I a)」と称する場合があります) を 1 以上含むことが好ましい。

【0062】

【化3】



10

【0063】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル、ホルミル及び C_{1-6} アルキルカルボニルからなる群より選択され；

X は、 $-NR^a - Y - NR^b - COO - R$ で表される疎水性基であり；

R^a 及び R^b は、それぞれ独立に、水素原子及び C_{1-6} アルキルからなる群より選択され；

R は、ステリル基であり；

Y は、 C_{2-30} アルキレン、又は $-(CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 -$ であり、

m は、1以上100以下の整数である。)

20

【0064】

ここで、ヒアルロン酸誘導体に繰り返し単位 (I) 又は繰り返し単位 (I a) がそれぞれ 2 以上含まれる場合に、当該繰り返し単位は同一であってもよく、異なってもよい。

【0065】

ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位 (I) 又は繰り返し単位 (I a) 以外の位置において、修飾されていてもよく、例えば、ヒドロキシ基は $-O(C_{1-6}$ アルキル)、 $-O$ (ホルミル)、 $-O(C_{1-6}$ アルキルカルボニル)等に変換されていてもよく、カルボキシ基は、アミド又はエステルに変換されていてもよく、塩を形成していてもよい。

30

【0066】

[繰り返し単位 (I)]

一般式 (I) 中の基「 $-Z - N(R^a)Y - X^1$ 」は、以下の式：

$-NH - (CH_2)_{m_z} - NH - R$ ；

$-NH - (CH_2)_{m_z} - NH - COO - R$ ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - NH - COO - R$ ；

$-NH - (CH_2)_{m_z} - COO - R$ ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - COO - R$ 、

$-NH - (CH_2)_{m_z} - O - COO - R$ ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - O - COO - R$ 、

$-NH - (CH_2)_{m_z} - S - R$ ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - S - R$ ；

$-NH - (CH_2)_{m_z} - O - CO - CH(R^8) - CH_2 - S - R$ ；

$-NH - (CH_2)_{m_z} - NHCO - CH(R^8) - CH_2 - S - R$ ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - NHCO - CH(R^8) - CH_2 - S -$

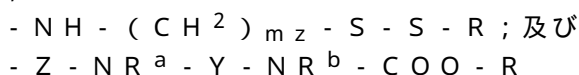
R ；

$-NH - (CH_2CH_2O)_m - CH_2CH_2 - O - CO - CH(R^8) - CH_2 - S -$

40

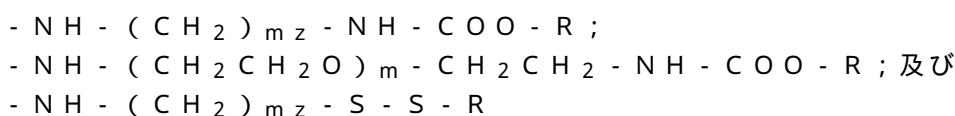
50

R ;



(ここで、mzは、2以上30以下の整数であり、R⁸は、水素原子又はメチル基であり、R及びmは、本明細書で既に定義したとおりである。)

で表される基からなる群より選択されることが好ましく、



(ここで、mz、R、及びmは、本明細書で既に定義したとおりである。)

10

からなる群より選択されることがより好ましい。

【0067】

(Z)

一般式(I)において、Zは直接結合であることが好ましい。

別の態様において、Zがペプチドリンカーである場合に、X¹は - NR^b - COO - R であることが好ましい。

さらに、別の態様において、Zは、 - NH - [CH (- Z^a) - CONH]_{n-1} - CH (- Z^a) - CO - で表されるペプチドリンカーであってもよく、ここで、nは2以上30以下の整数であり、Z^aは、それぞれ独立に、H₂N - CH (- Z^a) - COOHとして表される - アミノ酸中の置換基を表す。当該ペプチドリンカーは、N末端にてグルクロン酸部分のカルボキシ基に結合し、C末端にて基 - N (- R^a) - Y - X¹に結合する。

20

当該ペプチドリンカーのアミノ酸残基として利用できるアミノ酸の例としては、 - アミノ酸、例えばアラニン、アルギニン、アスパラギン (Asn)、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン (Gly)、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン (Leu)、リジン、メチオニン、フェニルアラニン (Phe)、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンといった天然型 (L型) のアミノ酸、それらのD体等が挙げられ、合成されたアミノ酸を含む全ての - アミノ酸を用いることができる。すなわち、Z^aとしては、例えば、 - CH₃、H₂NC (NH) NH (CH₂)₃ - 、H₂NCOCH₂ - 等が挙げられる。また、n個のZは、同一でも異なっていてよい。nは、2以上30以下の整数であるが、2以上10以下が好ましく、2以上4以下がより好ましい。ペプチドリンカーの好ましい例としては、例えば、 - Gly - Phe - Leu - Gly - 、 - Asn - Phe - Phe - 、 - Phe - Phe - 、 Phe - Gly - 等が挙げられる。

30

【0068】

(Y)

一般式(I)において、Yは - (CH₂)_{n1} - 及び - (CH₂CH₂O)_{m1} - CH₂CH₂ - (ここで、n1は、2以上20以下の整数であり、2以上15以下の整数が好ましく、2以上12以下の整数がより好ましく、2以上6以下の整数がさらに好ましい。m1は、1以上4以下の整数である) からなる群より選択される基が好ましい。具体的には、 - (CH₂)₂ - 、 - (CH₂)₆ - 、 - (CH₂)₈ - 、 - (CH₂)₁₂ - 、又は、 - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂ - が好ましい。また、純水中乃至低塩濃度下では高い溶解性を実現させつつ、生理食塩濃度下では高い沈殿形成能を示させるという観点からは、Yは - (CH₂)₂ - 、 - (CH₂)₆ - 、 - (CH₂)₈ - 及び - (CH₂)₁₂ - からなる群より選択される基が好ましく、 - (CH₂)₆ - がより好ましい。

40

【0069】

Yは、例えば、 - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - S - S - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - 、 - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂ - S - S - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - 、 - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - S - S - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂ - 、 - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂ - S - S - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂ - 等であってもよい。

50

【0070】

(Y^a)

Y^aとしては、-CH₂-又は-CH₂-CH₂-が好ましい。

【0071】

(Y^b)

Y^bとしては、-CH₂-CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-、2-ブテン-1,4-ジイル、ヘプタ-2,4-ジエン-1,6-ジイル又はオクタ-2,4,6-トリエン-1,8-ジイルが好ましく、-CH₂-CH₂-又は-CH(CH₃)CH₂-がより好ましい。

【0072】

基「-Z-N(R^a)Y-X¹」の具体例としては、-NH-(CH₂)₂-NH-CO-コレステリル、-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₃-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-CO-NH-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-CO-コレステリル、-NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-N(-(CH₂)₃-NH₂)-コレステリル等が挙げられる。好ましい基「-Z-N(R^a)Y-X¹」としては、R^a、R^b及びR^cが、水素原子であり、Yが、直鎖状のC₂-30アルキレン又は-(CH₂CH₂O)_m-CH₂CH₂-であり、Y^aが、直鎖状のC₁-5アルキレンであるか、又はY^bが、直鎖状のC₂-8アルキレン若しくは直鎖状のC₂-8アルケニレンである。

【0073】

[繰り返し単位(Ia)]

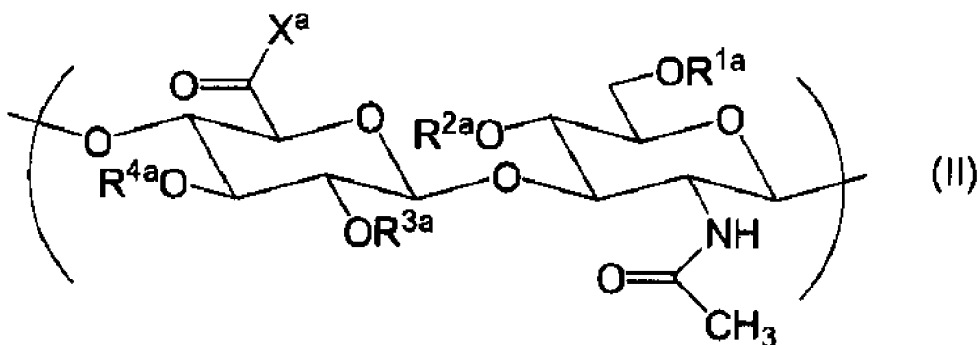
一般式(Ia)において、Xは、-NH-(CH₂)₂-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₆-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₁₂-NH-COO-コレステリル又は-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-COO-コレステリルが好ましく、-NH-(CH₂)₂-NH-COO-コレステリル、-NH-(CH₂)₆-NH-COO-コレステリル又は-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-COO-コレステリルがより好ましく、-NH-(CH₂)₆-NH-COO-コレステリルがより更に好ましい。

【0074】

ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位(I)に加えて、一般式(II)で表される繰り返し単位(以下、「繰り返し単位(II)」と称する場合がある)を更に含むことができる。

【0075】

【化4】



10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

(式中、 R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{4a} は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル、ホルミル及び C_{1-6} アルキルカルボニルからなる群より選択され；

X^a は、ヒドロキシ及び $-O-Q^+$ からなる群より選択され；ここで、 Q^+ は、カウンターカチオンである。)

【 0 0 7 7 】

ここで、ヒアルロン酸誘導体に繰り返し単位(II)が2以上含まれる場合に、当該繰り返し単位は同一であってもよく、異なってもよい。

別の態様において、ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位(I)、繰り返し単位(Ia)及び繰り返し単位(II)から実質的になるヒアルロン酸誘導体であってもよい。

10

【 0 0 7 8 】

[繰り返し単位(II)]

一般式(II)において、 Q^+ はカルボキシ基と水中で塩を形成するカウンターカチオンであれば特に限定されず、2価以上の場合は価数に応じて複数のカルボキシ基と塩を形成する。

カウンターカチオンの例としては、リチウムイオン、ナトリウムイオン、ルビジウムイオン、セシウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン等の金属イオン；式： $N^+R^jR^kR^lR^m$ (式中、 R^j 、 R^k 、 R^l 及び R^m は、それぞれ独立に、水素原子及び C_{1-6} アルキルからなる群より選択される)で表されるアンモニウムイオン等が挙げられる。

20

中でも、 Q^+ は、ナトリウムイオン、カリウムイオン、又はテトラアルキルアンモニウムイオン(例えば、テトラ n -ブチルアンモニウムイオン等)が好ましい。

前記式中、 R^j 、 R^k 、 R^l 及び R^m は、 C_{1-6} アルキルからなる群より選択される同一の基であることが好ましく、 n -ブチル基が好ましい。

【 0 0 7 9 】

R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 、並びに R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{4a} は、全て水素原子であることが好ましい。また、 R^a 及び R^b は、いずれも水素原子であることが好ましい。

【 0 0 8 0 】

中でも、ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位(I)及び繰り返し単位(II)から実質的になるヒアルロン酸誘導体であることが好ましい。ヒアルロン酸誘導体は、当該誘導体に含まれるD-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンとから成る二糖の繰り返し単位のうちの、例えば80%以上が、好ましくは90%以上が、より好ましくは95%以上が繰り返し単位(I)及び繰り返し単位(II)である。ヒアルロン酸誘導体は、繰り返し単位(I)及び繰り返し単位(II)のみから構成されていてもよく、繰り返し単位(I)のみから構成されていてもよい。

30

【 0 0 8 1 】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体において、ヒアルロン酸誘導体を構成する二糖の繰り返し単位に対する、ステリル基の導入率(以下、単に「ステリル基導入率」と称する場合がある)は、15%以上60%以下が好ましく、20%以上60%以下が好ましく、30%以上60%以下が好ましく、30%以上55%以下がより好ましく、35%以上50%以下がさらに好ましく、35%以上45%以下が特に好ましい。

40

ステリル基導入率が上記下限値以上であることで、生体内で沈殿せずに安定したハイドロゲルを保つことができる。一方で、上記上限値以下であることで、ハイドロゲルの平均粒子径を上記範囲内とすることができる。

【 0 0 8 2 】

ステリル基導入率は、 1H -NMR測定により測定することができる。すなわち、ヒアルロン酸誘導体成分の 1H -NMRスペクトルにおけるヒアルロン酸誘導体のステリル基に由来するピークの積分値と、ヒアルロン酸誘導体に含まれるN-アセチル-D-グルコサミンのアセチル基に由来するピーク($COCH_3$ 、1.6ppm以上2.0ppm以下

50

、 $3H$)の積分値と、を用いて、以下の式に基づいて計算することができる。なお、式中 n_H はピークに対応する水素原子の数を表す。

前記 1H -NMRは、例えば、測定溶媒として $0.02N$ DCl DMSO- d_6 /D $_2$ O混液($2N$ DCl D $_2$ O : DMSO- d_6 = 1 : 99)を用い、測定温度 85 にて実施することができる。

なおグルコサミンのアセチル基由来のピークが含まれる $1.6 \sim 2.0$ ppm付近のピークにはコレステリル基由来のピーク($5H$)が重なるため、 $1.6 \sim 2.0$ ppm付近のピークの積分値からコレステリル基メチル由来のピーク(0.7 ppm)の積分値を $5/3$ したものを差し引いて算出した値(即ち、積分値($1.6 \sim 2.0$ ppm) - 積分値(0.7 ppm) $\times 5/3$)をヒアルロン酸由来のアセチル基の積分値として導入率の計算に使用することができる。

10

【0083】

[ステリル基導入率](%)

= [(ステリル基に由来するピーク積分値 $\times 3 / n_H)$] / (N-アセチル-D-グルコサミンのアセチル基に由来するピーク積分値) $\times 100$

【0084】

<ヒアルロン酸誘導体の製造方法>

ヒアルロン酸誘導体は、例えば、グルクロン酸のカルボキシ基をアミドに変換し、ステリル基を導入することで得られる。また、原料のヒアルロン酸又はその誘導体に対して、反応させるステリル基を有する化合物の配合量を調整することで、ステリル基導入率を制御することができる。

20

【0085】

グルクロン酸のカルボキシ基をアミドに変換して、ステリル基を導入する方法として、具体的には、例えば、原料のヒアルロン酸又はその誘導体、好ましくは、繰り返し単位(II)のみから構成されるヒアルロン酸又はその誘導体を、テトラアルキルアンモニウム塩(例えば、テトラブチルアンモニウム(TBA)塩)にイオン交換し、適当な縮合剤存在下、溶媒中で当該ヒアルロン酸塩と、式： $HNR^a - Y - NR^b - R$ 、 $NHR^a - Y - NR^b - COO - R$ 、 $HNR^a - Y - NR^b - COO - R$ 、 $HNR^a - Y - NR^b - CO - R$ 、 $HNR^a - Y - NR^b - CO - NR^c - R$ 、 $HNR^a - Y - COO - R$ 、 $HNR^a - Y - O - COO - R$ 、 $HNR^a - Y - S - R$ 、 $HNR^a - Y - CO - Y^a - S - R$ 、 $HNR^a - Y - O - CO - Y^b - S - R$ 、 $HNR^a - Y - NR^b - CO - Y^b - S - R$ 、 $HNR^a - Y - S - S - R$ 、又は $-Z - NR^a - Y - NR^b - COO - R$ (式中、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 Y 、 Y^a 、 Y^b 、 Z 及び R は本明細書で既に定義したとおりである)で表されるステリル基(特に、コレステリル基)を導入したアミンと、を反応させる方法が挙げられる。

30

【0086】

上記の反応において使用することができる縮合剤は特に限定されず、例えば、 $4 - (4, 6 - ジメトキシ - 1, 3, 5 - トリアジン) - 4 - メチルモルホリウム$ (DMT-MM)、 $N, N' - カルボニルジイミダゾール$ (CDI)、 $N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド$ (DCC)、 $N - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1, 2 - ジヒドロキノリン$ (EEDQ)、 $2 - ベンゾトリアゾール - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム$ 4フッ化ホウ酸塩(TBTU)、 $3, 4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 1, 2, 3 - ベンゾトリアジン$ (HODhbt)、 $ベンゾトリアゾール - 1 - オキシ - トリス - ピロリジノ - ホスホニウム$ 6フッ化リン酸塩(PyBOP)、 $ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス$ (ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(BOP)、 $1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド$ (EDC)、 $N - ヒドロキシスクシンイミド$ (NHS)等が挙げられる。

40

【0087】

特に、限定はされないが、DMT-MMは、水及び有機溶媒の混合溶媒中でも反応が高効率に進む点において好ましい。また、DMT-MMを縮合剤として使用することにより、多数のヒドロキシ基が共存する系において、エステル結合形成を抑えつつ、高選択的に

50

アミノ基とカルボキシ基によるアミド結合形成を行うことができる。この縮合剤の使用により、例えば、溶媒であるアルコールがヒアルロン酸部分のカルボキシ基と反応することや、ヒアルロン酸部分に同時に存在するカルボキシ基とヒドロキシ基とが、分子内又は分子間で結合して、望まない架橋を形成してしまうことを防ぐことができる。

【0088】

ステリル基導入反応において用いる溶媒としては、水、DMSO、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、イソプロパノール、多価アルコール、アセトニトリル、DMF、THF、ジクロロメタン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、及びこれらの混合溶媒等が挙げられる。

多価アルコールとしては、2価のアルコールであってもよく、3価のアルコールであってもよい。

10

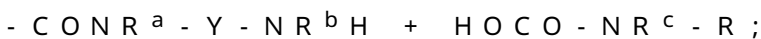
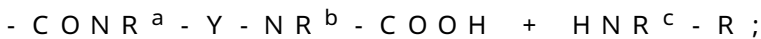
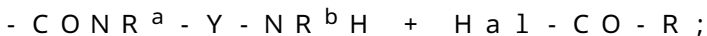
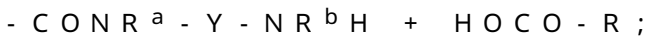
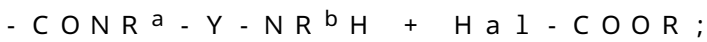
2価のアルコールとしては、例えば、エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ネオペンチルグリコール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサジオール等が挙げられる。

3価のアルコールとしては、例えば、グリセリン、トリメチロールプロパン等が挙げられる。

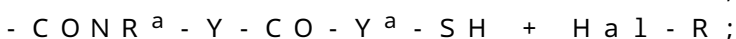
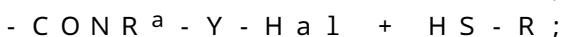
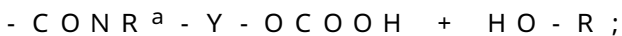
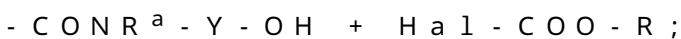
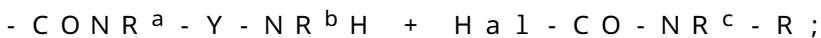
【0089】

或いは、原料のヒアルロン酸又はその誘導体を、テトラアルキルアンモニウム塩（例えば、テトラブチルアンモニウム（TBA）塩）にイオン交換し、適当な縮合剤存在下、溶媒中で当該ヒアルロン酸塩とスペーサー部分を反応させ（この際、必要に応じて保護及び脱保護反応を行ってもよい）、原料のヒアルロン酸又はその誘導体のカルボキシ基（-COOH）を変換し、その後適当な試薬と反応させてもよい。カルボキシ基から誘導される基と、反応試薬の組み合わせの例を以下に示す。

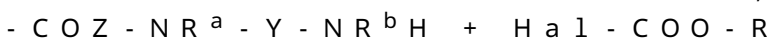
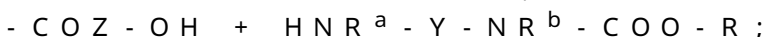
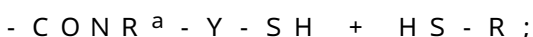
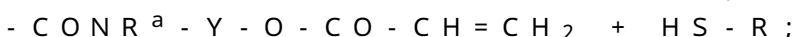
20



30



40



（式中、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 Y 、 Y^a 、 Y^b 、及び Z は本明細書で既に定義したとおりであり、 Hal は、フッ素原子、塩素原子、臭素原子及びヨウ素からなる群より選択されるハロゲン原子を表す）。

【0090】

反応様式としては、脱ハロゲン化水素反応、縮合反応、脱水反応、マイケル付加等の求

50

核付加反応、酸化的なジスルフィド形成反応等が挙げられ、これらは周知な反応であり、当業者が適宜選択し、好ましい反応条件を見出して行うことができる。変換体又は反応物がカルボキシ基を有する場合は、N - ヒドロキシコハク酸イミド（以下、「NHS」とも称す）エステルとし、反応させてもよい。

【0091】

また、原料のヒアルロン酸又はその誘導体のカルボキシ基に、2 - アミノエチル 2 - ピリジルジスルフィドを反応させて、末端に脱離基で修飾されたメルカプト基を有するスペーサーが導入されたヒアルロン酸誘導体を調製し、これにチオコレステロールを求核置換反応させてジスルフィド結合を形成する方法が挙げられる。

【0092】

さらに、ヒアルロン酸又はその誘導体のカルボキシ基にスペーサーの一部を導入したものと、ステリル基にスペーサーの一部を導入したものを調製し、これらを反応させる方法も挙げられる。具体例の一部は上述したが、さらに、Yに - S - S - が挿入されている場合は、ヒアルロン酸のカルボキシ基に、末端にメルカプト基を有するスペーサーが導入されたヒアルロン酸誘導体と、末端にメルカプト基を有するスペーサーが導入されたステリル基をそれぞれ調製し、これらを酸化的に反応させてジスルフィド結合を形成させる方法も挙げられる。このとき、一方のメルカプト基を2 - メルカプトピリジンと反応させてジスルフィドとした後に、他方のメルカプト基と置換させることもできる。

【0093】

また、ヒアルロン酸誘導体を調製後、さらに他の置換基を導入してもよい。例えば、繰返し単位 (I) 及び繰返し単位 (II) から実質的になるヒアルロン酸誘導体におけるカルボキシ基の0.1モル%以上99.5モル%以下、好ましくは40モル%以上65モル%以下を、-CO-X²、[ここで、X²は、以下の基：

- NH-(CH₂)_{p1}-O-CO-C(R¹⁷)=CH₂;
- NH-(CH₂)_{p1}-O-CO-CH(R¹⁷)-CH₂-S-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-CO-C(R¹⁷)=CH₂;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-C(=NH)-(CH₂)₃-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-CO-(CH₂)_r-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-CO-CH(R¹⁷)-CH₂-S-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-CO-CH(NH₂)-CH₂-SH;
- NH-(CH₂)_{p1}-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)₂-SH;
- NH-NH-CO-(CH₂)₄-CO-NH-NH-C(=NH)-(CH₂)₃-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-O-CO-C(R¹⁷)=CH₂;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-O-CO-CH(R¹⁷)-CH₂-S-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-NH-CO-C(R¹⁷)=CH₂;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-NH-C(=NH)-(CH₂)₃-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-NH-CO-(CH₂)_r-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(R¹⁷)-CH₂-S-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂-SH;
- NH-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(NH₂)-CH₂-SH;

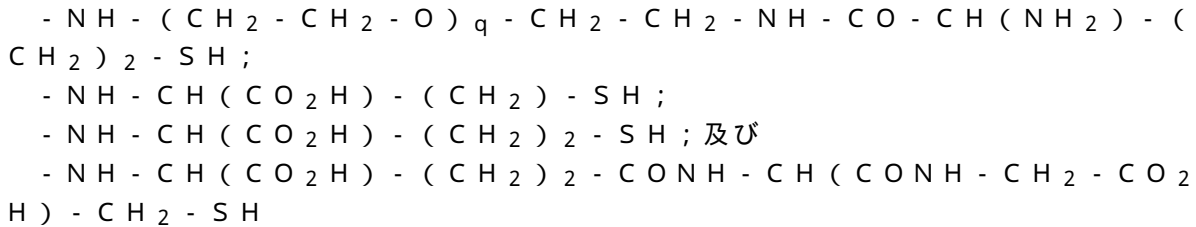
10

20

30

40

50



(ここで、 R^{17} は、水素原子又は C_{1-6} アルキル基であり、 p は2以上10以下の整数、 q は1以上100以下の整数、 r は1以上3以下の整数を、それぞれ表す)からなる群より選択される]

に変換することで、分子内或いは他分子を含めた分子間で化学的に架橋させてゲル化することもできる。

10

【0094】

透析により粒子サイズを特定の範囲に制御する場合は、MWC0(分画分子量)300kDaの透析膜で1回以上9回以下、好ましくは3回以上9回以下、より好ましくは6回以上9回以下透析することで、面積比 A_1/A_2 が0.9以上を満たす粒子サイズ分布を持つヒアルロン酸誘導体を得ることができる。透析の回数は、面積比 A_1/A_2 が0.9以上を満たせば任意の回数を当業者が適宜選択することができる。場合によっては9回以上の透析で分画してもよい。

【0095】

この時、面積比 A_1/A_2 が0.9以上を満たす粒子サイズ分布を持つヒアルロン酸誘導体を得る方法としては透析のみに限定されるものではない。例えば、限外ろ過膜或いは精密ろ過膜による遠心ろ過分離、分取精製HPLC、分取精製GPC、超遠心による分離、イオン交換樹脂による分離、膜蒸留による分離、有機又は無機膜による膜分離、活性炭やゼオライト、MOF(Metal Organic Frameworks)を利用した吸脱着法による分離、TFF(Tangential Flow Filtration)による分離、フィルターを用いた送液、加圧或いは減圧ろ過分離、塩析等を用いた沈殿分離法、ヒアルロン酸レセプターを用いた分離等でも、同様に、標準物質であるポリアクリル酸(50kDa、Polymer Standards Service-USA社製、ORDER No. PSS-Paa50k)の粒子サイズ分布以下のヒアルロン酸誘導体を除去することで、面積比 A_1/A_2 が0.9以上を満たす粒子サイズ分布を持つヒアルロン酸誘導体を取得できる。

20

30

【0096】

得られたヒアルロン酸誘導体は、乾燥させてもよい。乾燥方法としては、例えば通風乾燥、恒温槽中での乾燥、減圧乾燥、熱風循環式乾燥、凍結乾燥等が挙げられる。中でも、凍結乾燥が好ましい。凍結乾燥を行う場合に、ヒアルロン酸誘導体は、該ヒアルロン酸誘導体が形成する微粒子の粒径の増大をより効果的に抑制する観点から、凍結保護剤を更に含むことが好ましい。

【0097】

凍結保護剤は、「凍結保護剤」又は「凍結乾燥保護剤」として知られているものであれば特に限定されず、例えば、二糖類、ソルビトール、デキストラン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、グリセロール、ポリビニルピロリドン、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

40

【0098】

二糖類としては特に限定されず、例えば、スクロース、ラクツロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、セロピオース、コージピオース、ニゲロース、イソマルトース、イソトレハロース、ネオトレハロース、ソホロース、ラミナリピオース、ゲンチオピオース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオピウロース、マンノピオース、メリピオース、メリピウロース、ネオラクトース、ガラクトスクロース、シラピオース、ネオヘスペリドース、ルチノース、ルチヌロース、ピシアノース、キシロピオース、プリメベロース等が挙げられる。中でも、凍結保護剤として広く使用されていることから、

50

スクロース、トレハロース、マルトース、又はラクトースが好ましい。また、医薬品添加物としての使用実績や、凍結乾燥時におけるヒアルロン酸誘導体が形成する微粒子の粒径の増大をより効果的に抑制する観点から、スクロースがより好ましい。

【0099】

凍結保護剤は、固体の状態でもよく、水等の溶媒に溶解した状態でもよい。

【0100】

凍結保護剤の添加量は特に限定されないが、ヒアルロン酸誘導体100質量部に対して、20質量部以上が好ましい。凍結保護剤の添加量が上記下限値以上であることで、より十分な粒径増大抑制効果が得られる。一方、凍結保護剤の添加量の上限は特に限定されないが、例えば、100, 000質量部とすることができる。

10

【0101】

凍結乾燥において使用する装置も特に限定されず、例えば、市販の凍結乾燥機を用いることができる。中でも、真空度を制御する観点からは、凍結乾燥中に装置内の真空度をモニタリングできる凍結乾燥機が好ましく、また、品温を制御する観点からは、棚式凍結乾燥機が好ましい。

【0102】

本発明の第2の実施形態のヒアルロン酸誘導体は、ステリル基が導入されたヒアルロン酸誘導体であって、ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムにおいて、標準物質である50kDaのポリアクリル酸の屈折率強度極大点(ピークトップ)における保持時間 P_r に対する、ヒアルロン酸誘導体の屈折率強度極大点(ピークトップ)における保持時間 P_t の比 P_t/P_r が、0.5以上1.0未満であり、0.7以上0.95未満がより好ましく、0.75以上0.92未満が最も好ましい。比 P_t/P_r が前記範囲であることにより、粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞(好ましくはDC、より好ましくはcDC1)に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

20

【0103】

前記ゲル浸透クロマトグラフィー測定において標準物質として使用されるポリアクリル酸は、ポリアクリル酸ナトリウムであることが好ましく、具体的には、Polymer Standards Service - USA社製、ORDER No. PSS - Paa 50k(ポリアクリル酸ナトリウム)であることがより好ましい。

30

前記ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定は、例えば、以下の方法で行うことができる。

1mg/mLのヒアルロン酸誘導体水溶液、2mg/mLのポリアクリル酸標準物質水溶液を調製し、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行う。

(測定条件)

装置：高速GPC(ゲル浸透クロマトグラフィー)装置

カラム：G4000SWXL(東ソー社製、粒子径8 μ m、内径7.8mm、長さ30cm、品番：8542)

40

溶離液：10mMリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1mL/min

注入量：50 μ L

検出器：RI(示差屈折率検出器)

温度：30

その他、前記第1の実施形態のヒアルロン酸誘導体と同じ構成等について、その説明を省略する。

【0104】

本発明の第3の実施形態のヒアルロン酸誘導体は、ステリル基が導入されたヒアルロン

50

酸誘導体であって、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が、11万以上50万未満であり、13万以上30万未満が好ましく、14万以上25万未満がより好ましい。ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が前記範囲を満たす場合に、粒子サイズの大きいヒアルロン酸誘導体を比較的多く含むことができ、薬効成分と製剤化した際に、薬効成分と安定した会合状態を形成することができる。これにより、薬効成分を免疫細胞（好ましくはDC、より好ましくはcDC1）に安定的且つ効率よく送達させることができ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができる。

一方で、ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）が前記上限値を超える場合は、粘性が増し、製剤として使用しにくい場合がある。

【0105】

前記ヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量（ポリアクリル酸換算）は、ゲル浸透クロマトグラフィー測定により求められるクロマトグラムから、各分子量が2kDa、4kDa、8kDa、18kDa、40kDa、および150kDaであるポリアクリル酸を標準物質として作成された検量線に基づき、下記式： $A t^3 + B t^2 + C t + D$ に従い算出される。

前記標準物質として使用されるポリアクリル酸は、ポリアクリル酸ナトリウムであることが好ましく、具体的には、Polymer Standards Service - USA社製、ORDER No. PSS - Paaシリーズ（ポリアクリル酸ナトリウム）であることがより好ましい。

【0106】

前記ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定は、前記第1または第2の実施態様で記載の方法で行うことができる。そのほか、前記第1の実施形態、及び/又は、前記第2の実施形態のヒアルロン酸誘導体と同じ構成等について、その説明を省略する。

【0107】

医薬組成物

前記第1～第3の実施形態のヒアルロン酸誘導体は、薬効成分と製剤化して、医薬組成物として使用することができる。

すなわち、本実施形態の医薬組成物は、上述したヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する。

【0108】

本実施形態の医薬組成物において、上記ヒアルロン酸誘導体は、薬効成分と複合体（以下、「薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体」と称する場合がある）を形成している。具体的には、ヒアルロン酸誘導体中のステリル基と、薬効成分の疎水性部位とが疎水性相互作用により複合体を形成しており、薬効成分とステリル基等の疎水性部位が中心部に存在し、一方、ヒアルロン酸誘導体中のヒアルロン酸に由来する部位等の親水性部位が外縁部に存在する、コア - シェル型様の球状構造を呈しているものと推定される。すなわち、薬効成分がヒアルロン酸誘導体に封入又は内包された構造を呈しているものと推定される。

【0109】

本実施形態の医薬組成物において、薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む球状構造体の平均粒子径は、20nm以上100nm以下とすることができ、20nm以上95nm以下とすることができ、20nm以上90nm以下とすることができる。ここでいう平均粒子径とは、z平均で表される値である。平均粒子径が上記数値範囲であることで、生体内で安定した構造で存在することができ、且つ、リンパ節をより容易に通過することができる。平均粒子径は、例えば、DLS（Dynamic Light Scattering）や、ナノトラッキング粒子測定装置、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、及び電子顕微鏡法等によって、測定することができる。より具体的には、例えば、DLS装置にてヒアルロン酸誘導体濃度が1mg/mLになるように10w/v%スクロースを含有する10mMリン酸緩衝液で希釈して測定する。

【0110】

10

20

30

40

50

本実施形態の医薬組成物において、ヒアルロン酸誘導体、または薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体の重量平均分子量 M_w (ポリアクリル酸換算) は 11 万以上が好ましい。重量平均分子量 M_w (ポリアクリル酸換算) は、異なる分子量を有する複数のポリアクリル酸標品を用いて、検量線を作成することで算出することが可能である。使用されるポリアクリル酸標品は、ポリアクリル酸ナトリウムであることが好ましく、具体的には、Polymer Standards Service - USA 社製、ORDER No. PSS - Pa シリーズ (ポリアクリル酸ナトリウム) であることがより好ましい。

M_w が上記数値範囲であることで、共刺激分子の活性化に優れる会合体サイズがより多く存在し、本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチド等の薬効成分を免疫細胞 (特に、cDC1、マクロファージ) に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性 (特に、cDC1 での共刺激分子 CD80 及び CD86 の発現) を向上、促進、維持又は増強させることができると考えられる。

M_w は、例えば、DLS (Dynamic Light Scattering)、サイズ排除クロマトグラフィー、及び電子顕微鏡法等によって、測定することができる。より具体的には、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー装置にてヒアルロン酸誘導体濃度が 1 mg/mL になるように希釈して測定する。

【0111】

本実施形態の医薬組成物において、ヒアルロン酸誘導体、または薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体のサイズ排除クロマトグラフィーでの粒子径分布におけるピークトップ時間は標準物質ポリアクリル酸 (50 kDa) のピークトップ時間よりも小さいことが好ましい。ピークトップ時間が上記範囲であることで、共刺激分子の活性化に優れる会合体サイズがより多く存在し、本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチド等の薬効成分を免疫細胞 (特に、cDC1、マクロファージ) に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性 (特に、cDC1 での共刺激分子 CD80 及び CD86 の発現) を向上、促進、維持又は増強させることができると考えられる。ピークトップ時間は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって、測定することができる。より具体的には、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー装置にてヒアルロン酸誘導体濃度が 1 mg/mL になるように希釈して測定する。

【0112】

本実施形態の医薬組成物において、ヒアルロン酸誘導体の含有量は、特に限定されないが、例えば、医薬組成物の 100 質量部に対して、0.01 質量部以上 50.00 質量部以下であることが好ましく、0.10 質量部以上 25.00 質量部以下であることがより好ましく、0.20 質量部以上 10.00 質量部以下であることがさらに好ましい。

【0113】

次いで、本実施形態の構成成分について以下に詳細を説明する。

【0114】

< 薬効成分 >

薬効成分としては、特に限定されないが、抗原 (がん抗原、感染症由来抗原、免疫疾患における自己抗原等)、医薬活性ペプチド又はタンパク質、核酸、低分子化合物、中分子化合物等が挙げられる。中でも、抗原が好ましく、がん抗原、感染症由来抗原、及び免疫疾患における自己抗原からなる群から選択される少なくとも一つがより好ましく、がん抗原又は感染症由来抗原がより好ましい。

【0115】

すなわち、本実施形態の医薬組成物は、がん、感染症、及び免疫疾患からなる群より選ばれる 1 種以上の疾患の予防又は治療用医薬組成物であることが好ましく、がん又は感染症の予防又は治療用医薬組成物であることがより更に好ましい。本実施形態の医薬組成物は、適用疾患ががん、感染症又は免疫疾患である場合には、ワクチン組成物ということもできる。

10

20

30

40

50

【0116】

[抗原]

(がん抗原)

がん抗原とは、がん細胞に多く発現する抗原であり、いくつかの場合には、がん細胞によってのみ発現する。がん抗原は、がん細胞内、又はがん細胞の表面上に発現し得る。

【0117】

本実施形態の医薬組成物において使用され得る抗原タンパク質は、限定されないが、ERK1、ERK2、WT1、MART-1/Melan-A、gp100、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質(ADAbp)、FAP、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原(CRC)-C017-1A/GA733、がん胎児性抗原(CEA)、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前立腺特異的抗原(PSA)、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、CD20、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 β -カテニン、 γ -カテニン、 δ -カテニン、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質(APC)、フォドリン、コネキシン37、Igイディオタイプ、p15、gp75、GM2ガングリオシド、GD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質、腫瘍抗原のSmadファミリー、Imp-1、P1A、EBVがコードする核抗原(EBNA)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、CD20、c-erbB-2等が挙げられる。

【0118】

上記抗原タンパク質としては、その配列の全てが使用されてもよく、一部が欠失した配列が使用されてもよい。

【0119】

本実施形態の医薬組成物において使用され得る抗原ペプチドは、抗原タンパクの配列のうち、CD8陽性細胞傷害性T細胞認識エピトープ及びCD4陽性ヘルパーT細胞認識エピトープからなる群より選ばれる1種以上のエピトープを含む抗原ペプチドである。一実施形態において、抗原提示細胞での分解を経てMHCクラスI分子又はMHCクラスII分子に搭載されるという観点から、上記抗原ペプチドは、好ましくは2つ以上のエピトープを含む抗原ペプチドである。具体的には、上記抗原ペプチドとしては、腫瘍細胞の抗原タンパクのエピトープを含む抗原ペプチドが挙げられる。

【0120】

一実施形態において、上記抗原ペプチドは、例えば8~120アミノ酸、好ましくは8~80アミノ酸、より好ましくは15~80アミノ酸、さらにより好ましくは16~80アミノ酸、さらに好ましくは23~80アミノ酸、よりさらに好ましくは23~60アミノ酸、特に好ましくは23~50アミノ酸を有する。

【0121】

一実施形態において、ヘルパーT細胞による細胞傷害性T細胞(CTL)の活性化誘導の観点から、上記抗原ペプチドは、CD8陽性細胞傷害性T細胞認識エピトープ及びCD4陽性ヘルパーT細胞認識エピトープをそれぞれ1つ以上含む抗原ペプチドである。

【0122】

10

20

30

40

50

一実施形態において、エピトープを2つ以上含む場合、エピトープ間にアミノ酸リンカーを配置してもよい。該リンカーは、例えば2～10アミノ酸、好ましくは4～10アミノ酸、より好ましくは4～8アミノ酸を有する。

該リンカーに用いるアミノ酸としては、グリシン(G)、チロシン(Y)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)等が挙げられる。好ましくは、チロシン(Y)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)である。アミノ酸リンカーの具体例としては、連続した4つのチロシン(Y)からなるリンカー(4Y)、連続した4つのロイシン(L)からなるリンカー(4L)、連続した4つのトリプトファン(W)からなるリンカー(4W)、連続した6つのグリシン(G)なるリンカー(6G)、連続した6つのチロシン(Y)なるリンカー(6Y)、連続した6つのロイシン(L)なるリンカー(6L)、連続した6つのトリプトファン(W)なるリンカー(6W)、連続した8つのチロシン(Y)なるリンカー(8Y)、連続した6つのロイシン(L)なるリンカー(8L)、連続した8つのトリプトファン(W)なるリンカー(8W)が挙げられ、好ましくは、6Y、6L又は6Wである。

10

【0123】

がん抗原は、腫瘍関連抗原であっても、がん精巢抗原であっても、ウイルス抗原であっても、腫瘍特異的抗原(ネオアンチゲンを含む)であってもよい。がん抗原は一つで用いてもよく、二つ以上を組み合わせ用いてもよい。

【0124】

(感染症由来抗原)

感染症由来抗原としては、感染性病原体及び感染性病原体由来の抗原であれば特に限定されない。感染性病原体としては、ウイルス、細菌、真菌、線虫等が挙げられる。感染症病原体由来抗原は抗原タンパク質であっても、抗原ペプチドであってもよい。

20

【0125】

上記感染性病原体から罹る疾患としては特に限定されず、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、HSV-I、HSV-II、CMV、VZV)、ポックスウイルス(例えば、痘瘡若しくはワクシニア、伝染性軟属腫等のオルトポックスウイルス)、ピコルナウイルス(例えば、ライノウイルス、エンテロウイルス)、オルソミクソウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)、パラミクソウイルス(例えば、パラインフルエンザウイルス、おたふく風邪ウイルス、はしかウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV))、コロナウイルス(例えば、SARSコロナウイルス(SARS-CoV)、MERSコロナウイルス(MERS-CoV)、SARS-CoV-2)、パポウイルス(例えば、生殖器疣、尋常性疣贅、足底疣贅を引き起こすもの等の乳頭腫ウイルス)、ヘパドナウイルス(例えば、肝炎Bウイルス)、フラビウイルス(例えば、肝炎Cウイルス、デングウイルス)、レトロウイルス(例えば、HIV等のレンチウイルス)等のウイルス感染から罹る疾患等のウイルス疾患；エシェリキア属、エンテロバクター、サルモネラ、ブドウ球菌、赤痢菌、リステリア、アエロバクター、ヘリコバクター、クレブシエラ、プロテウス、シュドモナス、連鎖球菌、クラミジア、マイコプラズマ、肺炎球菌、ナイセリア、クロストリジウム、バシラス、コリネバクテリウム、マイコバクテリウム、カンピロバクター、ピブリオ、セラチア、プロビデンシア、クロモバクテリウム、ブルセラ、エルシニア、ヘモフィルス、ボルデテラ等の細菌感染から罹る疾患等の細菌疾患；クラミジア、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症、クリプトコックス髄膜炎等の真菌疾患；マラリア、ニューモシスティスカリニ肺炎、レーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ感染等が挙げられる。

30

40

【0126】

本実施形態の医薬組成物において使用され得る抗原の構造としては、病原体を構成する種々の成分の少なくとも一部であれば特に限定されるものではなく、例えば、生ワクチン、不活化全粒子、それらの一部、タンパクサブユニット、タンパク質、ペプチド等が挙げられる。中でも、ヒアルロン酸誘導体との複合化の観点から、タンパクサブユニット、タンパク質、又はペプチドが好ましい。

50

【 0 1 2 7 】

上記インフルエンザウイルスとは、オルソミクソウイルス科に属する直径約 1 0 0 n m の粒子サイズを有する RNA エンベロープウイルスであり、内部タンパクの抗原性に基づいて、A、B 及び C 型に分けられる。上記インフルエンザウイルスは、脂質二重層構造を有するウイルスエンベロープに取り囲まれた内部ヌクレオキャプシド又は核タンパク質と会合したりボ核酸 (RNA) のコアと、外部糖タンパク質とからなる。上記ウイルスエンベロープの内層は、主としてマトリックスタンパク質で構成され、外層は大部分が宿主由来脂質物質で構成される。また、上記インフルエンザウイルスの RNA は、分節構造をとる。なお、世界中で大流行するインフルエンザは、A 型インフルエンザウイルスによるものであり、この A 型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン及びノイラミニダーゼの 2 種類のエンベロープ糖タンパク質を有し、抗原性の違いによってヘマグルチニンでは 1 6 種、ノイラミニダーゼでは 9 種の亜型に区別されている。

10

【 0 1 2 8 】

上記感染症由来抗原としては、A 型及び B 型インフルエンザウイルス由来抗原が好適に用いられる。なお、上述した A 型及び B 型インフルエンザウイルスの亜型としては特に限定されず、これまで単離された亜型であっても将来単離される亜型であってもよい。

【 0 1 2 9 】

インフルエンザウイルス由来抗原としては、上記インフルエンザウイルスを構成する種々の成分の少なくとも一部であれば特に限定されるものではなく、例えば、精製ウイルス粒子が有機溶媒 / 界面活性剤若しくは他の試薬で不活化されたウイルス全粒子、又は、該ウイルス全粒子の中から不純物を取り除き、ヘマグルチニン及びノイラミニダーゼを精製して作られたウイルスサブユニット等が挙げられる。免疫原性の観点から、ヘマグルチニンサブユニット又はウイルス全粒子が好ましい。上記ウイルス全粒子は、ホルマリン等により不活化されたものがより好ましい。また、不純物が少なく、免疫賦活剤等のアジュバントが必須となるヘマグルチニンサブユニット (スプリット) について特に有効である。

20

【 0 1 3 0 】

上記インフルエンザウイルス抗原の調製方法は、特に限定されるものではなく、公知の方法が限定なく使用できる。例えば、インフルエンザ感染動物又はインフルエンザの患者から単離されたウイルス株をニワトリ卵等に感染させて常法により培養し、精製したウイルス原液から抗原を調製する方法が挙げられる。また、遺伝子工学的に培養細胞中で調製したウイルス由来の抗原を用いてもよい。

30

【 0 1 3 1 】

(免疫疾患における抗原)

免疫疾患における抗原としては、免疫疾患の標的タンパク質のエピトープを含むものであれば特に限定されない。免疫疾患としては特に限定されず、例えば、尋常性乾癬、強直性脊椎炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、体軸性脊椎関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、気管支喘息、慢性蕁麻疹、花粉症、アトピー性皮膚炎等が挙げられる。

標的タンパク質としては特に限定されず、IL - 1 7 A、DPP 4、S 1 0 0 A 9、P C S K 9、IL - 2 3、I g E、T N F、IL - 1 2 / 2 3 p 4 0、IL - 6、4 7 インテグリン、IL - 4 / 1 3、IL - 5、B L y S、IL - 1 3 等が挙げられる。参考文献 2 (国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 4 4 0 9 号) には IL - 1 7 A 由来のペプチドが記載されている。

40

ペプチドは、標的タンパク質のエピトープだけではなく、標的タンパク質以外のエピトープを有しても良い。B 細胞エピトープであっても T 細胞エピトープであってもよい。

ペプチドはエピトープを有する配列であり、環状構造を有していてもよい。前期ペプチドは分子内に複数の環状構造を有していてもよい。

さらに前記ペプチドはタンパクへコンジュゲートされていてもよい。

投与されたタンパク質やペプチドに対する抗体が体内で産生されることにより治療効果が期待できる。

50

【 0 1 3 2 】

[医薬活性ペプチド又はタンパク質]

医薬活性ペプチド又はタンパク質としては、対象に治療有効量を投与した場合に、対象の状態又は病状に対して正の、又は有利な効果を有するものを意味する。好ましい医薬活性ペプチド又はタンパク質としては、根治的又は対症的性質を有し、疾患又は障害の1つ又は複数の症状を改善する、軽快させる、軽減する、元に戻す、症状の発症を遅らせる、又は症状の重症度を減ずるために投与することができるものである。医薬活性ペプチド又はタンパク質は予防的性質を有することもあり、疾患の発症を遅らせるか、又はこのような疾患又は病態の重症度を減ずるために使用することができる。「医薬活性ペプチド又はタンパク質」という用語は、全長タンパク質又はポリペプチドを含意し、又その医薬的に活性な断片を指すこともある。この用語は、ペプチド又はタンパク質の医薬的に活性なアナログも包含する。

10

【 0 1 3 3 】

医薬活性タンパク質の例としては、以下に限定されないが、免疫活性化合物等のサイトカイン及び免疫系タンパク質（例えば、インターロイキン、コロニー刺激因子（C S F）、顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、エリスロポエチン、腫瘍壊死因子（T N F）、インターフェロン、インテグリン、アドレシン、セレチン（s e l e t i n）、ホーミング受容体、T細胞受容体、免疫グロブリン、抗体、ホルモン（インスリン、甲状腺ホルモン、カテコールアミン、ゴナドトロピン、刺激ホルモン、プロラクチン、オキシトシン、ドーパミン、ウシソマトトロピン、レプチン等）、成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモン）、増殖因子（例えば、上皮増殖因子、神経成長因子、インスリン様成長因子等）、増殖因子受容体、酵素（組織プラスミノゲンアクチベーター、ストレプトキナーゼ、コレステロール合成（b i o s y n t h e s t i c）酵素又は分解酵素、ステロイド産生（s t e r i o d o g e n i c）酵素、キナーゼ、ホスホジエステラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、デヒドロゲナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、アロマトラーゼ、チトクロム、アデニル酸シクラーゼ又はグアニル酸（g u a n y l a s t e）シクラーゼ、ノイラミダーゼ（n e u r a m i d a s e）等）、受容体（ステロイドホルモン受容体、ペプチド受容体）、結合タンパク質（成長ホルモン結合タンパク質又は増殖因子結合タンパク質等）、転写因子及び翻訳因子、腫瘍増殖抑制タンパク質（例えば、血管新生を阻害するタンパク質）、構造タンパク質（コラーゲン、フィブリン、フィブリノーゲン、エラスチン、チューブリン、アクチン及びミオシン等）、血液タンパク質（トロンビン、血清アルブミン、第V I I 因子、第V I I I 因子、インスリン、第I X 因子、第X 因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、プロテインC、フォンヴィレブランド因子、アンチトロンビンI I I、グルコセレブロシダーゼ、エリスロポエチン、改変第V I I I 因子、抗凝固因子）等が挙げられる。

20

30

【 0 1 3 4 】

一実施形態では、医薬活性タンパク質は、リンパ球のホメオスタシスの制御に関与するサイトカインであり、好ましくは、T細胞の発生、初回刺激、増幅、分化及び生存からなる群より選ばれる1種以上に関与し、且つ、それらを誘導又は増強するサイトカインである。

40

一実施形態では、サイトカインはインターロイキンである。

一実施形態では、医薬活性タンパク質は、I L - 2、I L - 7、I L - 1 2、I L - 1 5及びI L - 2 1からなる群より選択される1種以上のインターロイキンである。

一実施形態では、医薬活性ペプチドは、環状構造を有してもよい。前記ペプチドは分子内に複数の環状構造を有していてもよい。

【 0 1 3 5 】

[核酸]

核酸としては、例えば、DNA、RNA、アンチセンス核酸、デコイ核酸、リボザイム、低分子干渉RNA、核酸アプタマー等が挙げられる。また、上記抗原がペプチド又はタ

50

ンパク質である場合には、それら抗原ペプチド又はタンパク質をコードする核酸（DNA又はmRNA等）も好ましく用いられる。

【0136】

〔低分子化合物〕

低分子化合物としては、例えば、制癌剤（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等）、免疫抑制剤、抗炎症剤（ステロイド剤、非ステロイド剤系抗炎症剤等）、抗リウマチ剤、抗菌剤（ β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤等）等が挙げられる。

【0137】

また、薬効成分としては、上述したヒアルロン酸誘導体のステリル基との相互作用を十分に発揮できることから、疎水性の高い、すなわち、難水溶性のものも好ましく用いることができる。なお、「難水溶性」とは、第17改正日本薬局方において、溶質1gを溶かすのに必要な水量が30mL以上必要であることを指す。

【0138】

難水溶性で固体状の薬効成分としては、例えば、アセトアミノフェン、イブプロフェン、安息香酸、エテンザミド、カフェイン、カンフル、キニーネ、グルコン酸カルシウム、ジメチルカプロール、スルファミン、テオフィリン、テオプロミン、リボフラビン、メフェネシン、フェノパーピタル、アミノフィリン、チオアセタゾン、クエルセチン、ルチン、サリチル酸、テオフィリンナトリウム塩、ピラピタール、塩酸キニーネ、イルガピリン、ジキトキシム、グリセオフルピン、フェナセチン等の解熱鎮痛薬、神経系医薬、鎮静催眠薬、筋弛緩剤、血圧硬化剤、抗ヒスタミン剤等；アセチルスピラマイシン、アンピシリン、エリスロマイシン、キサタマイシン、クロラムフェニコール、トリアセチルオレアンドマイシン、ナスタチン、硫酸コリスチン等の抗生物質；メチルテストステロン、メチルアンドロステトロンジオール、プロゲステロン、エストラジオールベンゾエイト、エチニレストラジオール、デオキシコルチコステロン・アセテート、コーチゾンアセテート、ヒドロコーチゾン、ヒドロコーチゾンアセテート、プレドニゾロン等のステロイドホルモン剤；ジエンストロール、ヘキサストロール、ジエチルスチルベステロール、ジエチルスチルベステロールジプロヒオネイト、クロロトリアニセン等の非ステロイド系卵黄ホルモン剤；その他脂溶性ビタミン類等の、「日本薬局方」、「局外基」、「USP（米国薬局方）」、「NF（国民医薬品集）」、「EP（欧州薬局方）」に記載の医薬品薬効成分等が挙げられる。これら薬効成分から選ばれる1種を使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

【0139】

薬効成分は、難水溶性の油状又は液状のものであってもよい。難水溶性の油状又は液状の薬効成分としては、例えば、テプレノン、インドメタシン・ファルネシル、メナテトレノン、フィトナジオン、ビタミンA油、フェニペンツール、ビタミンD、ビタミンE等のビタミン類、DHA（ドコサヘキサエン酸）、EPA（エイコサペンタエン酸）、肝油等の高級不飽和脂肪酸類、補酵素Q類、オレンジ油、レモン油、ペパーミント油等の油溶性香料等の「日本薬局方」、「局外基」、「USP」、「NF」、「EP」に記載の医薬品薬効成分等が挙げられる。ビタミンEには種々の同族体、誘導体があるが、常温で液状であれば特に限定されず、例えばd α -トコフェロール、酢酸d α -トコフェロール、d β -トコフェロール、酢酸d β -トコフェロール等が挙げられる。これら薬効成分から選ばれる1種を使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

【0140】

薬効成分は、難水溶性の半固形状の物質でもよい。難水溶性の半固形状の薬効成分としては、例えば地竜、カンゾウ、ケイヒ、シャクヤク、ボタンピ、カノコソウ、サンショウ、ショウキョウ、チンピ、マオウ、ナンテンジツ、オウヒ、オンジ、キキョウ、シャゼンシ、シャゼンソウ、石蒜、セネカ、パイモ、ウイキョウ、オウバク、オウレン、ガジュツ、カミツレ、ゲンチアナ、ゴオウ、獣胆、シャジン、ショウキョウ、ソウジュツ、チヨウ

10

20

30

40

50

ジ、チンピ、ビャクジュツ、チクセツニンジン、ニンジン、葛根湯、桂枝湯、香蘇散、紫胡桂枝湯、小紫胡湯、小青竜湯、麦門冬湯、半夏厚朴湯、麻黄湯等の漢方又は生薬エキス類；カキ肉エキス、プロポリス及びプロポリス抽出物、補酵素Q類等が挙げられる。これら薬効成分から選ばれる1種を使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

【0141】

本実施形態の医薬組成物において、薬効成分の含有量は、薬効成分の構造にもよるが、ヒアルロン酸誘導体の質量に対して、0.001質量%以上10,000質量%以下とすることができ、0.1質量%以上1000質量%以下が好ましく、1.0質量%以上100.0質量%以下であることがより好ましく、1.5質量%以上50.0質量%以下であることがさらに好ましく、3.0質量%以上30.0質量%以下であることが特に好ましく、5.0質量%以上20.0質量%以下であることが最も好ましい。

10

或いは、本実施形態の医薬組成物において、薬効成分の含有量は、ヒアルロン酸誘導体の質量に対して、0.1質量%以上100.0質量%以下であることがより好ましく、0.1質量%以上50.0質量%以下であることがさらに好ましく、0.1質量%以上30.0質量%以下であることがさらに好ましく、0.5質量%以上30.0質量%以下であることがさらに好ましく、1.0質量%以上30.0質量%以下であることがさらに好ましく、1.0質量%以上25.0質量%以下であることがさらに好ましく、1.0質量%以上20.0質量%以下であることがさらに好ましく、1.0質量%以上15.0質量%以下であることがよりさらに好ましく、1.0質量%以上10.0質量%以下であることが特に好ましい。

20

【0142】

或いは、本実施形態の医薬組成物において、薬効成分の含有量は、医薬組成物100質量部に対して、0.0001質量部以上1.00質量部以下であることが好ましく、0.001質量部以上0.100質量部以下であることがより好ましく、0.002質量部以上0.500質量部以下であることがさらに好ましい。

【0143】

或いは、本実施形態の医薬組成物において、薬効成分の含有量は、医薬組成物100質量部に対して、0.001質量部以上1.00質量部以下であることが好ましく、0.001質量部以上0.500質量部以下であることがより好ましく、0.001質量部以上0.200質量部以下であることがより好ましく、0.005質量部以上0.100質量部以下であることがさらに好ましい。

30

【0144】

薬効成分の含有量が上記下限値以上であることで、より効果的に免疫細胞を活性化させることができ、一方で、上記上限値以下であることで、薬効成分をヒアルロン酸誘導体成分に封入し、より安定的な構造とすることができる。

【0145】

<アジュバント>

本実施形態の医薬組成物がワクチン組成物である場合に、上記薬効成分及び上記ヒアルロン酸誘導体に加えて、アジュバントを更に含むことができる。これにより、より効果的に免疫を誘導することができる。ここで、誘導される免疫は液性免疫でも細胞性免疫で合っても良い。すなわち、本実施形態の医薬組成物は、上記ヒアルロン酸誘導体と、上記薬効成分として抗原（好ましくはがん抗原又は感染症由来抗原）と、を含み、且つ、アジュバントを更に含む、医薬組成物であることが好ましい。

40

【0146】

なお、一般に、液性免疫とは、B細胞と抗体が中心となる免疫機構のことをいう。ヘルパーT細胞（Th2細胞）の産生するサイトカインにより、B細胞が刺激されることで、B細胞が形質細胞へと分化し、大量の抗体を産生し、抗体は体液中を循環して全身に広がる。また、刺激されたB細胞の一部は、抗原の情報を記憶しているメモリーB細胞となっており、再度の感染の際には、最初の反応より迅速に、そしてより抗原に親和性が高い抗体を大量に産生することができる。

50

一方、細胞性免疫とは、病原体そのものやウイルス感染細胞、癌細胞等の異物の排除において、細胞が主なエフェクターとなる免疫機構のことをいう。マクロファージ、細胞傷害性T細胞（CTL、キラーT細胞）、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）等の免疫担当細胞自体による排除機構である。

【0147】

アジュバントとしては、ワクチンに通常用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、アルミニウム塩、スクアレン、自然免疫受容体に対するリガンド等が挙げられる。

【0148】

ここでいう「リガンド」とは、受容体に特異的に結合する物質を意味し、特に、受容体に特異的に結合して、種々の生理作用を示す物質を用いることができる。このような物質を「アゴニスト」ともいう。

10

【0149】

自然免疫受容体としては、例えば、トール様受容体（*toll-like receptor*; TLR）、RIG-I様受容体（*RIG-I-like receptor*; RLR）、NOD様受容体（*NOD-like receptor*; NLR）、C型レクチン受容体（*C-type lectin receptor*; CLR）等が挙げられる。

【0150】

TLRリガンドとしては、例えば、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5、TLR-6、TLR-7、TLR-8及びTLR-9からなる群より選択される少なくとも1種のTLRと相互作用するものを適宜選択すればよい。

20

【0151】

TLR-2リガンドとしては、例えば、Pam3CSK4等が挙げられる。

【0152】

TLR-3リガンドとしては、例えば、ポリICLC、ポリイノシン：ポリシチジル酸（ポリI：C）等が挙げられる。

【0153】

TLR-4リガンドとしては、例えば、R型リポ多糖、S型リポ多糖、パクリタキセル（*Paclitaxel*）、リポドA、モノホスホリルリポドA等が挙げられる。

【0154】

TLR-5リガンドとしては、例えば、フラジェリン（*Flagellin*）等が挙げられる。

30

【0155】

TLR-2及びTLR-6リガンドとしては、例えば、MALP-2等が挙げられる。

【0156】

TLR-7及びTLR-8リガンドとしては、例えば、レシキモド（*R848*）、イミキモド（*imiquimod*、*R837*）、ガルジキモド（*gardiquimod*）、ロキシリビン（*loxoribine*）等が挙げられる。

【0157】

TLR-9リガンドとしては、例えば、CpGオリゴデオキシヌクレオチド等が挙げられる。

40

【0158】

中でも、アジュバントとしては、抗原提示機能をより向上できることから、アニオン性化合物が好ましく、CpGオリゴデオキシヌクレオチドがより好ましい。

【0159】

CpGオリゴデオキシヌクレオチドとしては、例えば、CpG-ODN 1826、CpG-K3等が挙げられる。

【0160】

<その他添加剤>

本実施形態の医薬組成物は、単独で投与することもでき、或いは、薬理学上許容されうる担体とともに常套手段に従って投与することができる。薬理学上許容されうる担体と併

50

用する場合は、例えば、上記ヒアルロン酸誘導体及び上記薬効成分、並びに、必要に応じてアジュバントと、水若しくはそれ以外の生理学的に許容し得る液（例えば、生理食塩水、含水エタノール、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））等とを、混合してもよく、生理学的に許容し得る緩衝液、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、凍結乾燥補助剤等を含むこともできる。

【0161】

緩衝液としては、例えば、Tris、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、ヒスチジン、またはクエン酸等が挙げられる。

【0162】

防腐剤としては、例えば、ベンザルコニウム塩化物、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル、クロロブタノール、ソルビン酸、アルキルポリアミノエチルグリシン等が挙げられる。

10

【0163】

安定化剤としては、例えば、エデト酸ナトリウム水和物、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、ポリソルベート80等が挙げられる。

【0164】

本実施形態の医薬組成物としては、製剤化したものを用いてもよい。製剤の形態としては、固体、半固体又は液体の形態とすることができる。

固体の場合、粉末、顆粒、丸剤、ペレット、タブレット、カプセル等の形態が挙げられる。中でも、固体としては、凍結乾燥粉末であることが好ましい。

20

半固体の場合、ゲル等の形態が挙げられる。

液体の場合、粉末を水又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）等の緩衝液により希釈又は懸濁した懸濁液等の形態が挙げられる。

【0165】

< 医薬組成物の製造方法 >

本実施形態の医薬組成物は、上記ヒアルロン酸誘導体と上記薬効成分を適宜混合することで製造できるが、以下に示す方法で製造することが好ましい。

【0166】

本実施形態の医薬組成物の製造方法は、ヒアルロン酸誘導体と、薬効成分と、を含有する、医薬組成物の製造方法であって、以下の工程を含む。

30

前記薬効成分を有機溶媒又は有機溶媒含有水に溶解して、前記薬効成分を含有する油相を調製する調製工程；及び、

前記油相と前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相との混合比が容量比で20：100～0.01：100となるように混合する混合工程。

【0167】

従来では、前記油相と水相の比率によって、ヒアルロン酸誘導体は、油相によりステリル基同士の相互作用が阻害されて、粒子が解れてしまう、或いは、一部が凝集してしまうなど、ヒアルロン酸誘導体の粒子サイズの維持が困難であった。そのため、粒子が解れた比較的小さなサイズのヒアルロン酸誘導体、或いは、一部凝集した粒子を含むヒアルロン酸誘導体と薬効成分との複合体しか医薬組成物に含まれていなかった。また、透析法を用いて医薬組成物を製造していたため、ヒアルロン酸誘導体と薬効成分との重量比は制御が難しく成り行きであった。さらに目標の薬効成分濃度とするために濃縮する工程も必要であった。

40

【0168】

これに対して、本実施形態の医薬組成物の製造方法は、透析法を用いておらず、上記構成、特に油相と水相との混合比が上記数値範囲内となるように混合することで、医薬組成物の製造前のヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布を保ちながら、薬効成分との複合体を形成させることができ、ヒアルロン酸誘導体と薬効成分との重量比も一定に制御可能である。これにより、薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を安定した構造で得られる。その結果、リンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能により優れる医薬組成

50

物が得られる。

【0169】

次いで、本実施形態の医薬組成物の製造方法の各工程について、以下に詳細を説明する。

【0170】

[調製工程]

調製工程では、薬効成分を有機溶媒又は有機溶媒含有水に溶解して、薬効成分を含有する油相を調製する。

【0171】

有機溶媒又は有機溶媒含有水に溶解させることから、薬効成分としては難水溶性のものを好ましく用いることができる。薬効成分として具体的には、上記「薬効成分」において例示されたものを用いることができる。

10

【0172】

薬効成分を溶解する有機溶媒としては、医薬組成物の製造に一般的に用いられる公知のものが挙げられ、具体的には、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、1-ペンタノール、メチルエチルケトン、ヘプタン、酢酸イソブチル、酢酸イソプロピル、酢酸メチル、メチルイソブチルケトン、ジメチルホルムアミド等が挙げられる。

【0173】

[混合工程]

混合工程では、調製工程で得られた油相と前記ヒアルロン酸誘導体を含有する水相との混合比が容量比で20:100~0.01:100となるように混合する。

20

【0174】

ヒアルロン酸誘導体は、予め所望の濃度となるように水等に溶解又は分散して用いる。このとき、ヒアルロン酸誘導体を含有する水相のpHが6.00以上であることが好ましく、6.00以上11.00以下であることが好ましい。pHが上記下限値以上であることで、ヒアルロン酸誘導体の凝集をより効果的に抑制しながら、薬効成分との複合体を形成させることができ、これにより、薬効成分-ヒアルロン酸誘導体複合体をより安定した構造で得られる。pHが上記上限値以下であることで、ヒアルロン酸誘導体の分散安定性を維持しながら薬物を複合化できる。また薬物の電荷が負に傾くため、ヒアルロン酸誘導体の疎水部と薬物とがより相互作用しやすくなる側面もある。一方で、上記上限値以下であることで、ヒアルロン酸誘導体の主鎖分解をより抑制することができる。

30

【0175】

混合工程において、ヒアルロン酸誘導体のステリル基と、薬効成分との疎水性相互作用により、ステリル基及び薬効成分が内部に存在し、一方で、ヒアルロン酸に由来する親水性部位が外縁部に存在する構造からなる、薬効成分-ヒアルロン酸誘導体複合体が形成される。薬効成分の構造により、上記疎水性相互作用だけではなく静電的相互作用、水素結合等の相互作用で複合体を形成しうる。

【0176】

混合工程において、油相と水相との混合比が容量比で20:100~0.01:100であり、好ましくは10:100~0.05:100であり、より好ましくは5:100~0.1:100であり、さらに好ましくは2.5:100~0.5:100である。油相と水相との混合比が上記範囲内であることで、十分量の薬効成分をヒアルロン酸誘導体に内包させて、薬効成分-ヒアルロン酸誘導体複合体を形成することができ、且つ、ヒアルロン酸誘導体の粒子が油相によりステリル基同士の疎水性相互作用が阻害されて会合が解けることを効果的に抑制することができる。但し、疎水性相互作用だけに限るものではなく、静電的相互作用、水素結合等の構造安定に寄与しうる相互作用の崩壊についても効果的に抑制できる。

40

【0177】

混合工程において、油相へ溶解する薬効成分の濃度は特に限定されないが、油相100

50

質量部に対して、0.1質量部以上50質量部以下であることが好ましく、0.2質量部以上25質量部以下であることがより好ましく、0.5質量部以上10質量部以下であることがさらに好ましい。

【0178】

混合工程において、水相へ溶解するヒアルロン酸誘導体の濃度は特に限定されないが、水相100質量部に対して、ヒアルロン酸誘導体の濃度が0.01質量部以上10質量部以下であることが好ましく、0.1質量部以上10質量部以下であることがより好ましく、0.5質量部以上5質量部以下であることがさらに好ましい。

【0179】

混合工程において、薬効成分の疎水部をやや露出し、ヒアルロン酸誘導体と相互作用しやすくする観点から、温度を20以上65以下とすることが好ましく、23以上55以下とすることがより好ましく、25以上40以下とすることがさらに好ましい。或いは、薬効成分の構造及び特性によって、最適な温度を適宜設定することができる。

10

【0180】

混合工程において、方法は特に限定されないが、例えば、上記ヒアルロン酸誘導体の含有する水相の中に、薬効成分の含有した油相を任意の比で添加する、或いは、薬効成分の含有した油相の中に、上記ヒアルロン酸誘導体の含有する水相を任意の比で添加していき、最終的な油相と水相との混合比が容量比で20:100~0.01:100にする混合工程を経ることでヒアルロン酸誘導体の粒子サイズを維持することができる。

【0181】

混合工程は、バッチ方式（回分式）に限定されず、油相および水相をフロー法（連続式）で混合してもよい。その際の油相と水相との混合比が容量比で20:100~0.01:100にすることでヒアルロン酸誘導体の粒子サイズを維持することができる。

20

【0182】

フロー法におけるリアクターの材質や形状は、本発明の製造方法に適用可能な材質や形状を選択すればよく、特に限定されないが、例えば、油相と水相のそれぞれが通過する配管の内径は、異なる径であってもよい。

【0183】

フロー法におけるチューブの材質や形状は、本実施形態の医薬組成物の製造方法に適用可能な材質や形状を選択すればよく、特に限定されないが、例えば、テフロン（登録商標）製のチューブ、ステンレス管、ガラス管、プラスチック管等が挙げられる。

30

【0184】

混合工程において、時間は特に限定されないが、例えば、30分間以上90時間以下とすることができ、1時間以上80時間以下とすることができる。

【0185】

混合工程において、薬効成分がヒアルロン酸誘導体に複合化された後に、薬効成分を溶解した有機溶媒を、タンジェンシャルフロー濾過（TFF）、或いは、遠心ろ過、限外濾過/ダイアフィルトレーション（UFDF）膜における複数のTFF等で除く工程があってもよい。

【0186】

[滅菌工程]

混合工程の後に、得られた薬効成分-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む溶液を滅菌して、滅菌剤を得る滅菌工程を行ってもよい。剤剤の滅菌方法としては、滅菌用フィルターによるろ過滅菌、ガス滅菌、線滅菌または電子線滅菌等が挙げられる。滅菌用フィルターによるろ過滅菌が最も好ましい。

40

【0187】

[乾燥工程]

混合工程の後に、得られた薬効成分-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む溶液を乾燥して、乾燥体を得る乾燥工程を行ってもよい。乾燥方法としては、上記「ヒアルロン酸誘導体の製造方法」において例示された方法と同様の方法が挙げられる。

50

【0188】

<投与方法>

本実施形態の医薬組成物を投与する対象は、ヒトを含む哺乳類に分類される動物（サル、マーモセット、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ等）が挙げられる。

【0189】

投与経路は、例えば、髄腔内注射、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、経肺的、筋内的、経皮的、又は経口的に当業者に公知の方法により行なうことができる。中でも、本実施形態の医薬組成物がワクチン組成物である場合には、皮下注射又は筋肉内注射が好ましい。

【0190】

本実施形態の医薬組成物において、非経口的に投与する場合、その投与量は、投与対象の種類（年齢や性別等も含む）等を考慮して適宜選択することができるが、一般的に例えばヒト（体重60kgとして）においては、1回あたり、薬効成分（好ましくは、抗原）の量として、0.01 μ g以上5mg以下とすることができ、0.1 μ g以上500 μ g以下とすることができ、1 μ g以上100 μ g以下とすることができる。

【0191】

投与回数は、上述した投与量の単回投与であってもよく、上述した投与量を、1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、又は半年毎に1回等、2回以上の複数回投与であってもよい。或いは、1回の投与において2カ所以上投与してもよい。

【0192】

その他実施形態

一実施形態において、本発明は、上記医薬組成物の有効量を、患者又は患者に投与することを含む、がん、感染症及び免疫疾患からなる群より選ばれる1種以上の疾患の予防又は治療方法を提供する。

なお、感染症としては、上記「抗原」の「感染症由来抗原」において例示されたものが挙げられる。

また、ここでいう「有効量」とは、予防又は治療に有効な量、すなわち、上記疾患の発症予防又は治療に適する量が包含される。

【0193】

一実施形態において、本発明は、がん、感染症及び免疫疾患からなる群より選ばれる1種以上の疾患の予防又は治療のための組成物であって、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を提供する。

【0194】

一実施形態において、本発明は、医薬組成物を製造するための、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体の使用を提供する。

前記医薬組成物は、感染症ワクチン、がんワクチン、または免疫疾患用医薬組成物であることが好ましい。

【0195】

一実施形態において、さらに、本発明はヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と、前記抗原に対する免疫受容体を発現するリンパ球を含むこと特徴とする、医薬組成物を提供する。ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と抗原特異的リンパ球を組み合わせるにより、より強く、より効率的に、より持続的に、及び/又はより広範囲において抗腫瘍効果を発揮することができる。

【0196】

抗原に対する免疫受容体を発現するリンパ球を含有する、前期ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物との併用投与に用いるための医薬組成物を提供する。

【0197】

ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と、抗原特異的リンパ球との組合せからなることを特徴とする、医薬組成物は、キットの形態であることもできる。当該医薬組成

10

20

30

40

50

物は、例えば、ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と抗原特異的リンパ球とを含むがん治療キットであることができる。

【0198】

本発明の好ましい一態様において、ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物は抗原特異的リンパ球を投与する前に投与されることが好ましい。本発明の好ましい一態様において、ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物が1回投与された後に抗原特異的リンパ球が1回輸注されることを投与回数の単位とした際に、1単位又は2単位の投与がなされた後に、ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物が少なくとも1回投与されることが好ましい。

【0199】

本発明の好ましい一態様において、ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物の投与1回目と投与2回目の間隔は、例えば1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、又は14日以上であることができる。また、当該間隔は、例えば28日以下、24日以下、21日以下、17日以下、14日以下、13日以下、12日以下、11日以下、10日以下、9日以下、8日以下、7日以下、6日以下、5日以下、4日以下、3日以下、又は2日以下であることができる。

【0200】

一実施形態において、本発明はヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物は、がん治療に用いられる1種類以上の抗体と組み合わせて投与してもよい。

抗体は、例えば腫瘍による免疫抑制シグナルを阻害する抗体、または免疫細胞の共刺激シグナルを活性化する1種類以上の抗体であり、好ましくは腫瘍による免疫抑制シグナルを阻害する抗体または免疫細胞の共刺激シグナルを活性化する抗体である。具体的には、抗CTLA4抗体、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗OX40、および抗4-1BB抗体からなる群から選択される1種類以上の抗体である。

【0201】

組み合わせて投与する場合のヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物の投与量は、例えば0.01~100mg/回、好ましくは0.1~50mg/回、より好ましくは0.1~20mg/回であり、抗体の投与量は、例えば0.01~200mg/kg体重、好ましくは0.1~100mg/kg体重、より好ましくは1~40mg/kg体重である。

【0202】

抗体はヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と同じタイミング（製剤中に抗体が含まれる場合を含む）で投与しても、異なるタイミングで投与してもよい。異なるタイミングで投与する場合は、一方を投与後にもう一方を、例えば1分~24時間、好ましくは1分~5時間以内に投与するのが好ましい。

【0203】

ヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物は、上記アジュバントと抗体の両方と組み合わせて投与してもよい。その場合のヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物の投与量は、例えば0.01~100mg/回、好ましくは0.1~50mg/回、より好ましくは例えば0.1~20mg/回であり、アジュバントの投与量は、例えば0.01~100mg/kg体重、好ましくは0.1~50mg/kg体重、より好ましくは0.1~10mg/kg体重であり、抗体の投与量は、例えば0.01~200mg/kg体重、好ましくは0.1~100mg/kg体重、より好ましくは1~40mg/kg体重である。アジュバントおよび抗体はヒアルロン酸誘導体及び抗原を含有する組成物と同じタイミング（製剤中にアジュバントが含まれる場合を含む）で投与しても、異なるタイミングで投与してもよい。異なるタイミングで投与する場合は、ワクチン製剤、アジュバント、および抗体の全てを、例えば1分~24時間、好ましくは1分~5時間以内に投与するのが好ましい。

【0204】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明は、薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強するための組成物であって、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を提供する。

【0205】

一実施形態において、本発明は、免疫細胞の活性を向上、促進、又は増強するための組成物であって、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を提供する。

【0206】

一実施形態において、本発明は、DC（特に、cDC1）の共刺激分子（特に、CD80及びCD86）の発現を向上、促進、維持又は増強するための組成物であって、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を提供する。

10

【0207】

一実施形態において、本発明は、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を投与することを含む、インビボ又はインビトロにおいて薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させる方法を提供する。

【0208】

一実施形態において、本発明は、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を投与することを含む、インビボ又はインビトロにおいて免疫細胞の活性を向上、促進、又は増強させる方法を提供する。

【0209】

一実施形態において、本発明は、上記薬効成分 - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む、組成物を投与することを含む、インビボ又はインビトロにおいてDC（特に、cDC1）の共刺激分子（特に、CD80及びCD86）の発現を向上、促進、維持又は増強させる方法を提供する。

20

【実施例】

【0210】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を実施例に制限することを意図したものではない。

【0211】

<ヒアルロン酸誘導体の合成>

[合成例1-1]

30

ヒアルロン酸誘導体を次の工程1～工程3に従って調製した。

【0212】

1. 工程1

(コレステリル 6 - アミノヘキシルカーバメート塩酸塩の合成)

コレステリル 6 - アミノヘキシルカーバメート塩酸塩 (Chol 塩酸塩) を、次に示す工程1-1、続いて工程1-2に従って合成した。

【0213】

(1) 工程1-1

コレステリルクロロホルメート (3.37g、7.5mmol) の無水ジクロロメタン (20mL) の溶液に、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン (TEA、1.05mL) を加えて攪拌した。氷冷下で、6 - (t - ブトキシカルボニル) アミノ - 1 - アミノヘキサン (1.12mL、5mmol) を滴下して加え、そのまま氷冷下で30分間攪拌後、室温 (25 程度) まで昇温し、当該混合物を一晩攪拌した。反応混合物を、超純水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 酢酸エチル: n - ヘキサン = 1:4) で精製し、目的物のフラクションを合わせて溶媒を減圧下留去した。

40

【0214】

(2) 工程1-2

得られた残渣を酢酸エチル (40mL) に溶解し、4N塩酸/酢酸エチル溶液 (40mL) を加えて室温 (25 程度) で一晩攪拌した。生じた沈殿物を遠心分離により回収し

50

た。得られた固体を酢酸エチルにて4回洗浄後、減圧下で乾燥し、コレステリル 6 - アミノヘキシルカーバメート塩酸塩 (Chol 塩酸塩) 1.2 g を得た。

【0215】

2. 工程 2

(ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム (TBA) 塩の調製)

ヒアルロン酸 (HA) の TBA 塩 (HA - TBA) を次に示す工程 2 - 1、続いて工程 2 - 2 に従って調製した。

【0216】

(1) 工程 2 - 1

DOWEX (登録商標) 50WX - 8 - 400 (アルドリッチ社製) を超純水に懸濁させ、デカンテーションにより樹脂を超純水で3回程度洗浄した。40 wt % テトラブチルアンモニウムヒドロキシド水溶液 (TBA - OH) (アルドリッチ社製) を樹脂のカチオン交換能に対し約 1.5 倍モル等量加え、30 分間、室温 (25 程度) で攪拌した。余剰の TBA - OH 溶液をデカンテーションにより除去した後、さらに過剰の超純水で洗浄することで、TBA 塩化したカチオン交換樹脂を得た。

10

【0217】

(2) 工程 2 - 2

重量平均分子量 (絶対分子量) 10,000 (10 kDa) の原料ヒアルロン酸ナトリウム塩 (HA - Na) を 15 mg / mL の濃度で超純水に溶解した。「(1) 工程 2 - 1」で TBA 塩化したカチオン交換樹脂の懸濁液を HA ユニット (ユニット分子量 401.3) のモル数に対し樹脂のイオン交換能換算で 5 倍モル等量添加した。室温 (25 程度) で 15 分間攪拌した後、0.45 μm のフィルターを用いて濾過を行い、濾液を凍結乾燥し、ヒアルロン酸の TBA 塩 (HA - TBA) を白色固体として得た。

20

【0218】

3. 工程 3

「2. (2) 工程 2 - 2」で調製した HA - TBA の無水 DMSO 溶液 (10 mg / mL) を調製した。その後、「1. 工程 1」で合成した HA - TBA 中に存在する二糖繰り返し単位 (HA ユニット) に対する Chol 塩酸塩の添加量がモル比で 44 / 100 となるように添加した。次に、HA ユニットに対する 4 - (4, 6 - ジメトキシ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) - 4 - メチルモルホリニウムクロリド (DMT - MM) の添加量がモル比で 48 / 100 となるように加え、室温 (25 程度) で一晩攪拌した。反応溶液は、0.3 M 酢酸アンモニア / DMSO 溶液、0.15 M NaCl 水溶液、超純水の順で、スペクトラポア 7 透析膜 (Spectrum Laboratories 社製製、分画分子量 (MWC0) : 3,500) を用いて透析した。得られた透析液を凍結乾燥して目的物 (HA - C₆ - Chol) を白色固体として得た。

30

【0219】

得られた白色固体におけるコレステロール導入率を以下の方法で算出した。

測定溶媒として 0.02 N DCl DMSO - d₆ / D₂O 混液 (2 N DCl D₂O : DMSO - d₆ = 1 : 99) を用い、NMR 装置として JNM - ECS 400 (日本電子株式会社製) を用い、85 °C で測定を行い、白色個体の ¹H - NMR スペクトルを得た。得られた ¹H - NMR スペクトルにおいて、N - アセチル - D - グルコサミンのアセチル基由来のピーク (COCH₃, 1.6 ppm 以上 2.0 ppm 以下、3 H)、コレステリル基中のメチル基由来のピーク (CH₃, 0.7 ppm、3 H) が確認され、コレステロール導入率は 44 % であった。

40

【0220】

凍結乾燥品であるヒアルロン酸誘導体 (10 k HA - C₆ - Chol - 44 %) を 1 mg / mL で注射用水に溶解し、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図 3 A は、得られたクロマトグラムである。

【0221】

(測定条件)

50

装置：HLC8420-GPC（東ソー社製）
 カラム：G4000SWXL（東ソー社製、粒子径8 μ m、内径7.8mm、長さ30cm、品番：8542）
 溶離液：10mMリン酸緩衝液（pH7.4）
 流速：1mL/min
 注入量：50 μ L
 検出器：RI
 温度：30

【0222】

[合成例1-2]

合成例1-1と同様の手順により、ヒアルロン酸誘導体を合成した。

生成物の¹H-NMRスペクトルにおいて、N-アセチル-D-グルコサミンのアセチル基由来のピーク（COCH₃、1.6ppm以上2.0ppm以下、3H）、コレステリル基中のメチル基由来のピーク（CH₃、0.7ppm、3H）が確認され、コレステロール導入率は44%であった。上記合成例1-1に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、得られたクロマトグラムを図3Bに示す。

10

【0223】

[合成例1-3]

合成例1-1と同様の手順により、ヒアルロン酸誘導体を合成した。

生成物の¹H-NMRスペクトルにおいて、N-アセチル-D-グルコサミンのアセチル基由来のピーク（COCH₃、1.6ppm以上2.0ppm以下、3H）、コレステリル基中のメチル基由来のピーク（CH₃、0.7ppm、3H）が確認され、コレステロール導入率は44%であった。上記合成例1-1に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、得られたクロマトグラムを図3Cに示す。

20

【0224】

[実施例1-1]

合成例1-1で得たヒアルロン酸誘導体の分取を次のとおり行った。凍結乾燥品のヒアルロン酸誘導体（10k HA-C₆-Chol-44%）を5mg/mLで注射用水に溶解し、透析カセット（フローライザーG2、MWCO：300,000、家田貿易株式会社）に移し、10mMリン酸緩衝液pH7.4に対して9回透析を行った。得られた透析内液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図4Aは、得られたクロマトグラムである。図21及び図22は、後述する面積比A₁/A₂及び距離の比D_a/D_bの算出方法を説明するために、実施例1-1で得られたヒアルロン酸誘導体及び標準物質であるポリアクリル酸のクロマトグラムを重ねて示した図である。

30

る液を所望の濃度まで限外濃縮器（Vivaspin20、MWCO：10,000、ザルトリウス）にて濃縮した。

【0225】

[実施例1-2]

実施例1-1と同様の手順により、合成例1-2で得たヒアルロン酸誘導体の分取を行った。得られた透析内液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図4Bは、得られたクロマトグラムである。

40

【0226】

[実施例1-3]

実施例1-1と同様の手順により、合成例1-3で得たヒアルロン酸誘導体の分取を行った。得られた透析内液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図4Cは、得られたクロマトグラムである。

【0227】

[比較例1-1]

合成例1-1で得たヒアルロン酸誘導体の分取を次のとおり行った。凍結乾燥品のヒア

50

ルロン酸誘導体 (10k HA-C₆-Chol-44%) を 10mg/mL で注射用水に溶解し、100mMリン酸緩衝液にて、10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) となるように希釈した。その後、限外ろ過器 (Vivaspin (登録商標) 20、MWCO: 300,000、ザルトリウス) にてろ過し、得られたろ液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図5Aは、得られたクロマトグラムである。ろ液を所望の濃度まで限外濃縮器 (Vivaspin 20、MWCO: 10,000、ザルトリウス) にて濃縮した。

【0228】

[比較例1-2]

比較例1-1と同様の手順により、合成例1-2で得たヒアルロン酸誘導体の分取を行った。得られたろ液のヒアルロン酸誘導体について、所望の濃度まで限外濃縮器 (Vivaspin 20、MWCO: 10,000、ザルトリウス) にて濃縮した。その後、1mg/mL になるように注射用水で希釈し、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図5Bは、得られたクロマトグラムである。

10

【0229】

[比較例1-3]

比較例1-2と同様の手順により、合成例1-3で得たヒアルロン酸誘導体の分取を行った。得られたろ液のヒアルロン酸誘導体について、所望の濃度まで限外濃縮器 (Vivaspin 20、MWCO: 10,000、ザルトリウス) にて濃縮した。その後、1mg/mL になるように注射用水で希釈し、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図5Cは、得られたクロマトグラムである。

20

【0230】

[比較例1-4]

コレステリル修飾プルラン (CHP: 日油社製, 製品番号 CHP-80T) の凍結乾燥体を 1mg/mL になるように注射用水に溶解し、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図5Dは、得られたクロマトグラムである。

【0231】

[ヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布の評価: 面積比 A_1 / A_2 及び距離の比 D_a / D_b]

実施例1-1で得られたヒアルロン酸誘導体と標準物質であるポリアクリル酸のゲル浸透クロマトグラムから、面積比 A_1 / A_2 及び距離の比 D_a / D_b を算出した。

30

標準物質であるポリアクリル酸 (50kDa) は、Polymer Standards Service - USA 社製、ORDER No. PSS-Paa50k (ポリアクリル酸ナトリウム) を使用した。

標準物質であるポリアクリル酸 (150kDa) は、Polymer Standards Service - USA 社製、ORDER No. PSS-Paa150k (ポリアクリル酸ナトリウム) を使用した。

標準物質ポリアクリル酸の粉末は 2mg/mL の濃度となるように注射用水にて溶解させた。これ以降記載する標準物質であるポリアクリル酸は全て、Polymer Standards Service - USA 社製 (ポリアクリル酸ナトリウム) のものを用いた。

40

【0232】

次に示す方法により、図21に示すゲル浸透クロマトグラムから面積 A_1 及び A_2 を算出して、面積比 A_1 / A_2 を計算した。

【0233】

(i) まず、標準物質である 50kDa のポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点 K_b からベースライン B へ引いた垂線と、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムとの交点を U_b 、前記屈折率強度極大点 K_b からベースライン B へ引いた垂線とベースラインとの交点を B_b とした。ここで、屈折率強度極大点 K_b における溶出時間は 7.41 分であった。

50

(i i) 次に、ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムにおいて、U b から終点までの曲線と、屈折率強度極大点K b からベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA 2とし、前記ヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムで始点から前記U bまでの曲線と、前記屈折率強度極大点K b から前記ベースラインBへ引いた垂線と、ベースラインで囲まれた面積値をA 1とした。

【 0 2 3 4 】

次に示す方法により、図 2 2 に示すゲル浸透クロマトグラムから距離D a及びD bを算出して、距離の比D a / D bを計算した。

【 0 2 3 5 】

(i) まず、標準物質である150 k D aのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点K aからベースラインBへ垂線を引き、ベースラインとの交点をB a、前記屈折率強度極大点K aと前記B aの間の長さをL aとした。ここで、屈折率強度極大点K aにおける溶出時間は6 . 4 6分であった。

10

(i i) 次に、屈折率強度がL a / 2 0となるクロマトグラム上の2点のうち、溶出時間が早いほうを点R 1とし、溶出時間が遅いほうを点S 1とした。ここで、点R 1における溶出時間は5 . 7 4分であり、点S 1における溶出時間は7 . 6 8分であった。

(i i i) 次に、標準物質である50 k D aのポリアクリル酸のクロマトグラム上の屈折率強度極大点K bからベースラインBへ引いた垂線とベースラインとの交点をB bとした。ここで、屈折率強度極大点K bにおける溶出時間は前記の通りである。

(i v) 次に、前記点R 1と前記点S 1を結んだ直線D 1と、前記屈折率強度極大点K aからベースラインBへ引いた垂線との交点をT aとし、前記屈折率強度極大点K bからベースラインBへ引いた垂線と前記直線D 1との交点をT bとした。

20

(v) 最後に、前記点R 1と前記T aの距離をD a、前記T aと前記T bの距離をD bとした。

【 0 2 3 6 】

実施例 1 - 1 で得られたヒアルロン酸誘導体と同様の方法で、合成例 1 - 1 ~ 1 - 3、実施例 1 - 2 ~ 1 - 3 及び比較例 1 - 1 ~ 1 - 4 で得られた各ヒアルロン酸誘導体と標準物質であるポリアクリル酸のゲル浸透クロマトグラムから、面積比A 1 / A 2及び距離の比D a / D bを算出した。

【 0 2 3 7 】

算出された面積比A 1 / A 2及び距離の比D a / D bを以下の表 1 に示す。なお、表 1 において、比較例 3 のコレステリル修飾プルラン (C H P) の距離の比D a / D bはR I の値が小さく、算出できなかった。

30

【 0 2 3 8 】

【表 1】

	A 1 / A 2	D a / D b
合成例 1 - 1	0.51	0.68
合成例 1 - 2	0.89	0.69
合成例 1 - 3	0.60	0.71
実施例 1 - 1	1.79	0.76
実施例 1 - 2	4.24	0.91
実施例 1 - 3	3.87	0.92
比較例 1 - 1	0.31	0.22
比較例 1 - 2	0.245	0.021
比較例 1 - 3	0.350	0.28
比較例 1 - 4	0.343	—

40

【 0 2 3 9 】

表 1 に示すように、精製前の合成例 1 - 1 ~ 1 - 3 のヒアルロン酸誘導体に比べて、面

50

積比 A 1 / A 2 が高い実施例 1 - 1 ~ 1 - 3 のヒアルロン酸誘導体を得られた。

【 0 2 4 0 】

< 医薬組成物の製造 >

[実施例 2 - 1]

実施例 1 - 1 で得られたヒアルロン酸誘導体を 5 m g / m L の濃度になるように 1 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4 にて希釈して調製した。

一方、別の容器にて、蛍光標識ペプチドの濃度が 5 0 m g / m L となるようにジメチルスルホキシド (D M S O) へ溶解させた。蛍光標識ペプチドはバイオロジカ社製の N 末にフルオロセインが結合している次のアミノ酸配列を有する蛍光標識ペプチドを用いた。

【 0 2 4 1 】

N D H I A Y F L Y Q I L R G L Q Y I H S A N V L H R D L K P S N L L L N T (配列番号 1)

【 0 2 4 2 】

室温 (2 5 程度) で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液と蛍光標識ペプチドの D M S O 溶液を容量比で 1 0 0 : 1 の割合で混合し、室温 (2 5 程度) で 2 4 時間攪拌することで、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

【 0 2 4 3 】

その後、固体の精製スクロース (富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号 1 9 8 - 1 8 3 8 5) を、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して 1 0 質量 % スクロースとなるように添加して、室温 (2 5 程度) で 1 時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、1 0 質量 % スクロース含有 1 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4 にてペプチドの濃度が約 0 . 3 m g / m L となるように希釈し、0 . 2 μ m P E S (ポリエーテルスルホン) (P a l l 社製、アクロディスクシリンジフィルター、2 5 m m) を用いて滅菌ろ過し、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物 1 0 0 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0 . 0 3 1 7 質量部であった。

【 0 2 4 4 】

合成例 1 - 1 に記載の方法で、ヒアルロン酸誘導体が 1 m g / m L となるように希釈してゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行ったところ、ペプチド封入前後でヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムに大きな変化は認められなかった (図 6 A) 。この時、ペプチド濃度は 0 . 1 m g / m L となり、仕込みのペプチドが 1 0 0 % 封入できていることも確認された。

【 0 2 4 5 】

[実施例 2 - 2]

実施例 1 - 2 で得られたヒアルロン酸誘導体を用いて、実施例 2 - 1 と同様の手順により、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物 1 0 0 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0 . 0 4 7 8 質量部であった。

合成例 1 - 1 に記載の方法で、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行ったところ、ペプチド封入前後でヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムに大きな変化は認められなかった (図 6 B) 。

【 0 2 4 6 】

[実施例 2 - 3]

実施例 1 - 3 で得られたヒアルロン酸誘導体を用いて、実施例 2 - 1 と同様の手順により、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物 1 0 0 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0 . 0 3 0 3 質量部であった。

合成例 1 - 1 に記載の方法で、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行ったところ、ペプチド封入前後でヒアルロン酸誘導体のクロマトグラムに大きな変化は認められなかった (図 6 C) 。

【 0 2 4 7 】

[比較例 2 - 1]

10

20

30

40

50

比較例 1 - 1 で取得したヒアルロン酸誘導体を 5 mg / mL の濃度になるように 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 にて希釈して調製した。

一方、別の容器にて、蛍光標識ペプチドの濃度が 50 mg / mL となるように DMSO へ溶解させた。

【0248】

室温 (25 程度) で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液と蛍光標識ペプチドのジメチルスルホキシド溶液を容量比で 100 : 1 の割合で混合し、室温 (25 程度) で 24 時間攪拌することで、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

【0249】

その後、固体の精製スクロース (富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号 198 - 18385) を蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して 10 質量%スクロースとなるように添加して、室温 (25 程度) で 1 時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、10 質量%スクロース含有 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 にてペプチドの濃度が 0.3 mg / mL となるように希釈し、0.2 μm PES (ポリエーテルスルフォン) (Pall 社製、アクロディスクシリンジフィルター、25 mm) で滅菌ろ過し、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物 100 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0.0308 質量部であった。

10

【0250】

[比較例 2 - 2]

比較例 1 - 2 で取得したヒアルロン酸誘導体を用いて、比較例 2 - 1 と同様の手順により、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。医薬組成物 100 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0.0332 質量部であった。

20

【0251】

[比較例 2 - 3]

比較例 1 - 3 で取得したヒアルロン酸誘導体を用いて、比較例 2 - 1 と同様の手順により、蛍光標識ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。医薬組成物 100 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0.0348 質量部であった。

【0252】

[比較例 3]

CHP (日油社製、製品番号 CHP - 80T) の凍結乾燥体を 10 mg / mL の濃度になるように 6 M 尿素含有リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 に溶解させた。

一方、別の容器にて、蛍光標識ペプチドの濃度が 50 mg / mL となるようにジメチルスルホキシドへ溶解させた。

【0253】

室温 (25 程度) で、上記 6 M 尿素含有 CHP 水溶液と蛍光標識ペプチドのジメチルスルホキシド溶液を容量比で 100 : 1 の割合で混合し、室温 (25 程度) で 24 時間攪拌することで、蛍光標識ペプチド - CHP 複合体を含む組成物を得た。

【0254】

その後、透析カセット (Thermo 社製、Slide - A - Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 3.5 K MWCO, 15 mL, No. 87724) に移し、0.6 M 尿素含有リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 で透析した。続いて、0.06 M 尿素含有リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4、リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 の順に透析を行った。さらに所望の濃度まで限外濃縮器 (Vivaspin 20, MWCO : 10,000、ザルトリウス) にて濃縮した。

40

【0255】

最後に、0.2 μm PES (ポリエーテルスルフォン) (Pall 社製、アクロディスクシリンジフィルター、25 mm) で滅菌ろ過し、蛍光標識ペプチド - CHP 複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物 100 質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は 0.0420 質量部であった。

50

【0256】

[比較例4-1]

合成例1-1で取得したヒアルロン酸誘導体の凍結乾燥体を秤量し、5 mg/mLの濃度になるように注射用水を添加し、一晚攪拌して十分に溶解させた。

一方、別の容器にて、蛍光標識ペプチドの濃度が50 mg/mLとなるようにDMSOへ溶解させた。

【0257】

室温(25程度)で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液と蛍光標識ペプチドのジメチルスルホキシド溶液を容量比で100:1の割合で混合し、室温(25程度)で24時間攪拌することで、蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

10

【0258】

その後、固体の精製スクロース(富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号198-18385)を蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して10質量%スクロースとなるように添加して、室温(25程度)で1時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、10質量%スクロース含有25 mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの濃度が0.3 mg/mLとなるように希釈し、0.2 μm PES(ポリエーテルスルホン)(Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25 mm)で滅菌ろ過し、蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物100質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は0.0316質量部であった。

20

【0259】

[比較例4-2]

合成例1-2で取得したヒアルロン酸誘導体の凍結乾燥体を用いて、比較例4-1と同様の手順により、蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

【0260】

その後、固体の精製スクロース(富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号198-18385)を蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して10質量%スクロースとなるように添加して、室温(25程度)で1時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、10質量%スクロース含有30 mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの濃度が0.33 mg/mLとなるように希釈し、0.2 μm PES(ポリエーテルスルホン)(Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25 mm)で滅菌ろ過し、蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物100質量部に対する、蛍光標識ペプチドの含有量は0.0358質量部であった。

30

【0261】

[蛍光標識ペプチド濃度の確認]

以下の条件の高速液体クロマトグラフィー測定によって、実施例2-1~2-3及び比較例2-1~2-3、3、4-1、4-2の蛍光標識ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物において、蛍光標識ペプチドがヒアルロン酸誘導体に複合化されて可溶化していることを確認し、また、各医薬組成物中の蛍光標識ペプチドの濃度を提供した。

40

【0262】

(測定条件)

HPLC装置: 日本分光HPLC-EXTREMA

カラム: PLRP-S 1000A 8 μm 長さ50 mm × 内径4.6 mm (アジレント・テクノロジー株式会社製、製品番号: PL1512-1802)

カラム温度: 40

移動相: (A) 0.1 v/v% トリフルオロ酢酸/アセトニトリル

(B) 0.1 v/v% トリフルオロ酢酸/水

流速: 2 mL/分

注入量: 30 μL

50

検出器：UV (215 nm)

グラジエントプログラム：以下の表2に示す。表2中、「%」は「v/v%」を意味する。

【0263】

【表2】

時間 (min)	移動相A (%)	移動相B (%)
0 → 0.5	5	95
0.5 → 3.4	5 → 100	95 → 0
3.4 → 3.45	100 → 5	0 → 95
3.45 → 13.0	100 → 5	0 → 95

10

【0264】

[試験例1-1]

(リンパ節内マクロファージ細胞へのペプチドの取り込み及び活性化解析)

1. 材料

アジュバント：CpGオリゴDNA1668 (味の素バイオファーマサービスジーンデザインから購入)

投与した組成物：実施例2-1、比較例2-1、比較例3、及び比較例4-1の医薬組成物。

20

【0265】

評価に用いた蛍光標識抗体は以下のとおりである。全てBiolegendより購入した。

Brilliant Violet 421 標識抗マウスF4/80抗体 (クローンBM8) ;

Brilliant Violet 510 標識抗マウスCD11c抗体 (クローンN418) ;

APC-Cy7 標識抗マウスXCR1抗体 (クローンZET) ;

APC 標識抗マウスCD80抗体 (クローン16-10A1) ;

APC 標識抗マウスCD86抗体 (クローンGL-1) ;

Purified CD16/32抗体 (クローン93)。

30

【0266】

なお、後述するFACS解析で用いた抗体の組み合わせは以下のとおりである。

【0267】

【表3】

細胞種	第1の抗体	第2の抗体	第3の抗体
マクロファージ (Mph)	V421 標識抗 マウス F4/80 抗体	APC 標識抗 マウス CD80 抗体	—
	V421 標識抗 マウス F4/80 抗体	APC 標識抗 マウス CD86 抗体	—
樹状細胞 (DC)	V510 標識抗 マウス CD11c 抗体	APC 標識抗 マウス CD80 抗体	—
	V510 標識抗 マウス CD11c 抗体	APC 標識抗 マウス CD86 抗体	—
標準型1型樹状細胞 (cDC1)	V510 標識抗 マウス CD11c 抗体	APC 標識抗 マウス CD80 抗体	APC-Cy7 標識抗 マウス XCR1 抗体
	V510 標識抗 マウス CD11c 抗体	APC 標識抗 マウス CD86 抗体	APC-Cy7 標識抗 マウス XCR1 抗体

40

50

【0268】

2. 解析方法

蛍光（フルオロセイン）標識ペプチド濃度が0.3mg/mL程度となるように、実施例2-1、比較例2-1及び比較例4-1の医薬組成物を10質量%スクロース10mMリン酸緩衝液pH7.4で希釈し、また比較例3の医薬組成物をリン酸緩衝生理食塩水pH7.4で希釈してから、各医薬組成物の希釈液をBALB/cマウスの右側後背部にペプチドとして各60µgとなるように皮下投与した。同時に、アジュバントとして、PBSに溶解した50µgのCpGオリゴDNA1668（味の素バイオファーマサービスデザイン）を投与した。

【0269】

投与から20時間後に投与部位の所属リンパ節（右鼠径リンパ節）を採取し、スライドガラスを用いてリンパ節を磨砕後、細胞をRPMI1640培地に懸濁した。このとき、1群2匹分の細胞をプールした。遠心分離（400×g、5分間、4）後に上清を除去し、RPMI1640培地を用いて2回洗浄後、10v/v%FBS含有RPMI1640培地に懸濁した。細胞血球計を用いて細胞数を測定し、細胞濃度が 1.2×10^7 個/mLになるよう調製した。

【0270】

96穴V底マイクロプレート（ヌンク、Thermo Fisher Scientific）に、1ウェルあたり 6×10^5 個となるように、細胞懸濁液50µLを添加した。細胞懸濁液を遠心分離（2000rpm、2分間、4）し、上清を除去後、200µLの染色用バッファー（0.5v/v%FBS含有PBS）を用いて2回洗浄後懸濁した。遠心分離して上清を除去後、50倍希釈した抗マウスCD16/CD32抗体を含む溶液50µLを添加し、4の暗所にて10分間静置した。150µLの染色用バッファーを加え、遠心分離して上清を除去後、さらに200µLの染色用バッファーで細胞を2回洗浄した。各抗体のメーカーが推奨する使用濃度に従い、上記表3に記載の組み合わせとなるように、第1、第2、及び第3の抗体を含む溶液50µLを添加し混合後、4の暗所にて15分間静置した。150µLの染色用バッファーを加え、遠心分離して上清を除去後、さらに200µLの染色用バッファーで細胞を2回洗浄した。遠心分離して上清を除去後、200µLの染色用バッファーに再懸濁を行い、丸底ポリスチレンチューブ（BDバイオサイエンス）へ移した。細胞はフローサイトメーターFACS Canto II（BDバイオサイエンス）及び付属の解析ソフトウェア（FACSDiva）を用いて解析した。

【0271】

樹状細胞（DC）はCD11c陽性、マクロファージ（Mph）はF4/80陽性、標準型1型DC（cDC1）はCD11c陽性且つXCR1陽性の集団として検出した。

細胞種毎に、FITC（フルオロセイン）陽性細胞を、ペプチド取り込み細胞として検出した。

共刺激分子であるCD80及びCD86の発現は、各細胞種におけるFITC陽性細胞に対して解析した。

FACS解析方法を図7A～図7Fに示す。

また、解析結果を表4-1～表4-3に示す。例えば、表4-1において、「ペプチド+CD80+DC」は「CD80を発現するペプチド取り込み樹状細胞（DC）」を意味し、「ペプチド+CD86+DC」は「CD86を発現するペプチド取り込み樹状細胞（DC）」を意味し、「ペプチド+DC」は「ペプチド取り込み樹状細胞（DC）」を意味する。

【0272】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

DC (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC
実施例 2 - 1	51.1	50.9
比較例 2 - 1	44.1	31.7
比較例 4 - 1	50.2	46.3
比較例 3	27.4	23.9

【0273】

10

【表 4 - 2】

cDC1 (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1
実施例 2 - 1	65.8	63.2
比較例 2 - 1	44.7	45.3
比較例 4 - 1	53.7	37.1
比較例 3	23.7	17.0

【0274】

20

【表 4 - 3】

Mph (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ Mph ／ペプチド ⁺ Mph	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ Mph ／ペプチド ⁺ Mph
実施例 2 - 1	52.0	39.1
比較例 2 - 1	40.5	19.5
比較例 4 - 1	43.8	30.1
比較例 3	57.8	37.0

【0275】

30

表 4 - 1 ~ 表 4 - 3 に示すように、実施例 2 - 1 の医薬組成物を投与したマウス群では、比較例 2 - 1 及び比較例 4 - 1 (分画前ヒアルロン酸誘導体) の医薬組成物を投与したマウス群よりも、マクロファージ及び DC (特に cDC1) での共刺激分子 (CD80 及び CD86) の高発現が確認された。また、DC (特に cDC1) においては、実施例 2 - 1 の医薬組成物を投与したマウス群では、他の多糖 (プルラン) の誘導体である比較例 3 の医薬組成物を投与したマウス群よりも、マクロファージ及び DC (特に cDC1) での共刺激分子 (CD80 及び CD86) の高発現が確認された。

【0276】

[試験例 1 - 2]

実施例 2 - 2、比較例 2 - 2、比較例 4 - 2 の医薬組成物を用いて、蛍光 (フルオロセイン) 標識ペプチド濃度が 0.2 mg/mL 程度となるように 10 質量%スクロース 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 で希釈し、ペプチドとして各 40 µg となるように皮下投与した以外は、試験例 1 - 1 と同様の方法で実施した。解析結果を表 5 - 1 ~ 表 5 - 3 に示す。

40

【0277】

50

【表 5 - 1】

DC (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC
実施例 2 - 2	46.3	37.0
比較例 2 - 2	30.7	25.4
比較例 4 - 2	39.6	33.7

【0278】

【表 5 - 2】

10

cDC1 (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1
実施例 2 - 2	82.1	75.9
比較例 2 - 2	59.0	55.7
比較例 4 - 2	73.7	66.3

【0279】

【表 5 - 3】

20

Mph (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ Mph ／ペプチド ⁺ Mph	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ Mph ／ペプチド ⁺ Mph
実施例 2 - 2	46.9	36.5
比較例 2 - 2	34.7	13.4
比較例 4 - 2	31.3	20.9

【0280】

試験例 1 - 1と同様に、実施例 2 - 2の医薬組成物を投与したマウス群では、比較例 2 - 2及び比較例 4 - 2(分画前ヒアルロン酸誘導体)の医薬組成物を投与したマウス群よりも、マクロファージ及びDC(特にcDC1)での共刺激分子(CD80及びCD86)の高発現が確認された。比較例 4 - 2はcDC1に対するCD80及びCD86の発現が比較的高いものの、マクロファージでのCD80及びCD86の発現が低く、実施例 2 - 2の医薬組成物よりも劣っていた。

30

【0281】

[試験例 1 - 3]

実施例 2 - 3の医薬組成物を用い、ペプチドとして各40 μ gとなるように皮下投与した以外は、試験例 1 - 1と同様の方法で実施した。解析結果を表 6 - 1～表 6 - 3に示す。

【0282】

【表 6 - 1】

40

DC (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ DC ／ペプチド ⁺ DC
実施例 2 - 3	79.4	67.7

【0283】

【表 6 - 2】

cDC1 (単位：%)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ cDC1 ／ペプチド ⁺ cDC1
実施例 2 - 3	85.4	86.3

50

【 0 2 8 4 】

【表 6 - 3】

M p h (単位 : %)	ペプチド ⁺ CD80 ⁺ M p h ／ペプチド ⁺ M p h	ペプチド ⁺ CD86 ⁺ M p h ／ペプチド ⁺ M p h
実施例 2 - 3	66.7	51.2

【 0 2 8 5 】

試験例 1 - 1 及び試験例 1 - 2 と同様に、実施例 2 - 3 の医薬組成物を投与したマウス群では、マクロファージ及び DC (特に cDC1) での共刺激分子 (CD80 及び CD86) の高発現が確認された。

10

【 0 2 8 6 】

ここで、マクロファージに対する CD86 の発現が低下していると、免疫抑制に働く、或いは、働いていると報告されている (参考文献 3 : Taams LS et al., "Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells.", Hum Immunol., Vol. 66, Issue 3, pp. 222-230, 2005.; 参考文献 4 : Sansom DM et al., "What's the difference between CD80 and CD86?", Trends in Immunology., Vol. 24, Issue 6, pp. 313-318, 2003.)。前記参考文献 3 の報告内容と上記試験例 1 - 1 ~ 試験例 1 - 3 の結果によれば、DC のみならずマクロファージでも CD86 が強く発現している実施例 2 - 1、実施例 2 - 2 及び実施例 2 - 3 の医薬組成物は、より強い免疫を誘導することが期待される。

20

【 0 2 8 7 】

これらの結果から、本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチド等の薬効成分を免疫細胞 (特に、cDC1、マクロファージ) に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性 (特に、cDC1 での共刺激分子 CD80 及び CD86 の発現) を向上、促進、維持又は増強させたと推察される。

【 0 2 8 8 】

< 医薬組成物の製造条件の検討 >

[参考例 1]

合成例 1 - 1 で得たヒアルロン酸誘導体を用いて、ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物の調製を行なった。

30

【 0 2 8 9 】

ペプチドとしては、バイオロジカ社製の次のアミノ酸配列を有する gp100RP2RP1_6Y ペプチドを用いた。

【 0 2 9 0 】

SVYDFFVWLYYYYYYTWHRYLHLLYYYYYEGSRNQDWL (配列番号 2)

【 0 2 9 1 】

具体的には、まず、合成例 1 - 1 で得たヒアルロン酸誘導体の凍結乾燥体を秤量し、以下の表 7 の濃度になるように注射用水を添加し、一晚攪拌して十分に溶解させた。

40

一方、別の容器にて、ペプチドの濃度が 50 mg / mL となるように DMSO へ溶解させた。

溶解を確認した後に、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液に対して、1 mol / L の水酸化ナトリウム水溶液 (富士フィルム和光社製) を以下の表 7 に従い、添加した。

【 0 2 9 2 】

室温 (25 程度) で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液とペプチドのジメチルスルホキシド溶液を以下の表 7 に記載の容量比で混合し、室温 (25 程度) で 24 時間攪拌することで、ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。この時の溶液の pH も測定した。

50

【 0 2 9 3 】

(ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体の安定性：水溶液の外観)

24時間後のペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物（水溶液）の様子を目視で判断し、白濁しているか検証した。結果は以下の表7に示した。

【 0 2 9 4 】

【表7】

参考例	ヒアルロン酸誘導体水溶液の濃度 (mg/mL)	ヒアルロン酸誘導体水溶液 (容量比)	1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液 (容量比)	ペプチドのDMSO溶液 (容量比)	pH	ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体の様子	医薬組成物中のペプチド濃度 (mg/mL)	平均粒子径 (nm)
1	5	100	2	1	8.90	透明	0.302	86.7

10

【 0 2 9 5 】

その後、固体の精製スクロース（富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号198 - 18385）をペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースの合計質量に対して10質量%スクロースとなるように添加して、室温（25 程度）で1時間以上攪拌した。続いて、10質量%スクロース含有25mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの理論濃度が0.3mg/mLとなるように希釈し、0.2µmPES（ポリエテルスルホン）（Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25mm）で滅菌ろ過し、ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。この時のペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物中のペプチド濃度を上述の実施例2 - 1と同様な方法で定量し、結果を上記表7に示した。

20

【 0 2 9 6 】

(平均粒子径)

以下に示す方法で製造したペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物について、以下条件で動的光散乱法（DLS）による測定を行い、z平均粒子径を得た。結果を上記表7に示す。

30

【 0 2 9 7 】

(測定条件)

DLS装置：大塚電子製、ELS Z 2000

セル：微量粒径セル

温度：25

ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体の濃度：4.95mg/mL

【 0 2 9 8 】

上記表7に示すように、医薬組成物の製造において、混合溶液のpHを特定の範囲内に調整することで、ペプチド等の薬効成分とヒアルロン酸誘導体との複合体の粒子径を一定の範囲内に保ち、該複合体の溶液中での安定性を良好なものとしてできることが明らかとなった。

40

【 0 2 9 9 】

[参考例2 - 1 ~ 2 - 3]

合成例1 - 1で得たヒアルロン酸誘導体、及び、参考例1とは異なるペプチドを用いて、ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物の調製を行なった。

【 0 3 0 0 】

ペプチドとしては、バイオロジカ社製の次のアミノ酸配列を有するペプチドを用いた。

【 0 3 0 1 】

GSNPARYEFLWGPRALAETS YVKVLEHVVRVNARVRIAY P (配列番号3)

50

【0302】

具体的には、まず、合成例1-1で得たヒアルロン酸誘導体の凍結乾燥体を秤量し、以下の表8の濃度になるように注射用水を添加し、一晚攪拌して十分に溶解させた。

一方、別の容器にて、ペプチドの濃度が50mg/mLとなるようにDMSOへ溶解させた。

溶解を確認した後に、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液に対して、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液（富士フィルム和光社製）を以下の表8に従い、添加した。

【0303】

室温（25 程度）で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液とペプチドのDMSO溶液を以下の表8に従う容量比の割合で混合し、室温（25 程度）で24時間攪拌することで、ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。この時の溶液のpHも測定した。

その後、固体の精製スクロース（富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号198-18385）を、ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースの合計質量に対して、10質量%スクロースとなるように添加して、室温（25 程度）で1時間以上攪拌した。続いて、0.2µm PES（ポリエーテルスルホン）（Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25mm）で滅菌ろ過し、ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。この時のペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物中のペプチド濃度を上述の実施例2-1と同様な方法で定量し、ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物の平均粒子径を上述の参考例1と同様な方法で測定した。その結果を以下の表8に示した。

【0304】

【表8】

参考例	ヒアルロン酸誘導体水溶液の濃度 (mg/mL)	ヒアルロン酸誘導体水溶液 (容量比)	1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液 (容量比)	ペプチドのDMSO溶液 (容量比)	pH	医薬組成物中のペプチド濃度 (mg/mL)	平均粒子径 (nm)
2-1	5	100	0	1	6.23	0.188	85.7
2-2	5	100	0.5	1	7.24	0.256	64.3
2-3	5	100	2	1	9.10	0.256	—

【0305】

上記表8に示すように、参考例1とは異なるペプチドを用いた医薬組成物の製造においても、混合溶液のpHを特定の範囲内に調整することで、ペプチド等の薬効成分とヒアルロン酸誘導体との複合体の粒子径を一定の範囲内に保ち、該複合体の溶液中での安定性を良好なものとでき、医薬組成物中のペプチド濃度を高められることが明らかとなった。

【0306】

<適切な粒子サイズ分布を維持する製造条件>

[試験例2-1~2-8]

実施例1-1と同様な手法で分取したヒアルロン酸誘導体について、濃度5mg/mLの水溶液を準備し、ヒアルロン酸誘導体を含有する水相と油相の混合比について詳細な検討を行った。

5mg/mLのヒアルロン酸誘導体400µLに対し、下記表9に従って油相であるDMSOを混合させた。十分に混合した後、最終的なヒアルロン酸誘導体濃度が一定となるように注射用水を下記表9に従い添加する。さらに、24時間室温（25）でインキュベートした後に、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、実施例1-1と同様な方法で面積比A1/A2を算出した（表9）。得られたゲル浸透クロ

マトグラムを図 8 に示す。

【 0 3 0 7 】

(測定条件)

装置：HLC8420-GPC (東ソー社製)

カラム：G4000SWXL (東ソー社製、粒子径 8 μm、内径 7.8 mm、長さ 30 cm、品番：8542)

溶離液：10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

流速：1 mL/min

注入量：50 μL

検出器：RI

温度：30

【 0 3 0 8 】

【表 9】

試験例	油相 DMSO 混合量 (μL)	注射用水 混合量 (μL)	水相(100容量%)に 対する油相含有量 (容量%)	A1/A2
2-1	4	396	1	1.469
2-2	20	380	5	1.367
2-3	40	360	10	1.239
2-4	80	320	20	0.927
2-5	160	240	40	0.655
2-6	240	160	60	0.457
2-7	320	80	80	0.303
2-8	400	0	100	0.205

【 0 3 0 9 】

[試験例 3 - 1 ~ 3 - 6]

油相を DMSO ではなく、エタノールを用いた以外は、前記試験例 2 - 1 ~ 2 - 8 と同じ方法で適切な粒子サイズ分布を維持する混合比率の検証を行った。ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、実施例 1 - 1 と同様の方法で面積比 A1/A2 を算出し、下記表 10 に結果を示した。得られたゲル浸透クロマトグラムを図 9 に示す。

【 0 3 1 0 】

【表 10】

試験例	油相 エタノール 混合量 (μL)	注射用水 混合量 (μL)	水相(100容量%)に 対する油相含有量 (容量%)	A1/A2
3-1	4	396	1	1.438
3-2	20	380	5	1.334
3-3	40	360	10	1.170
3-4	160	240	40	0.345
3-5	240	160	60	0.075
3-6	400	0	100	0.062

【 0 3 1 1 】

試験例 2 - 1 ~ 2 - 8 および 3 - 1 ~ 3 - 6 の結果より、油相とヒアルロン酸誘導体の含有する水相との混合比が容量比で 20 : 100 ~ 0.01 : 100 にする混合工程を経

ることで薬効に優れるヒアルロン酸誘導体の粒子サイズを維持することができることがわかった。

【0312】

[比較例5-1]

重量平均分子量Mw(絶対分子量)が980kDaのヒアルロン酸(キッコーマン社製)の粉末を、1mg/mLとなるように注射用水へ溶解し、合成例1-1に示す同様の条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、得られたクロマトグラムを図10に示す。

【0313】

さらに重量平均分子量Mw(絶対分子量)が980kDaのヒアルロン酸の粉末を、10mg/mLとなるように注射用水へ溶解し、その後、5mg/mLとなるように注射用水で希釈し、ヒアルロン酸水溶液を得た。

一方、別の容器にて、抗原ペプチドの濃度が50mg/mLとなるようにジメチルスルホキシド(DMSO)へ溶解させ、抗原ペプチドのDMSO溶液を得た。抗原ペプチドはバイオロジカ社製の次のアミノ酸配列を有するペプチドを用いた。

【0314】

NDHIAYFLYQLRGLQYIHSANVLRDLKPSNLLLNT(配列番号1)

【0315】

室温(25程度)で、上記ヒアルロン酸水溶液と抗原ペプチドのDMSO溶液を容量比で100:1の割合で混合し、室温(25程度)で24時間攪拌することで、抗原ペプチド-ヒアルロン酸複合体の調製を試みた。得られた混合液は、図11において「ヒアルロン酸(980kDa)」と記載された写真により確認されるように、白濁が認められ、抗原ペプチドが溶解せず、多量のペプチドが封入されていないことが示唆された。

【0316】

その後、固体の精製スクロース(富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号198-18385)を、ペプチド-ヒアルロン酸複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して10質量%スクロースとなるように添加して、室温で1時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、10質量%スクロース含有10mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの濃度が約0.30mg/mLとなるように希釈し、0.2µm PES(ポリエテルスルフォン)(Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25mm)で滅菌ろ過し、ペプチド-ヒアルロン酸複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物中のペプチド含有量は実施例2-1と同様の方法で高速液体クロマトグラフィー測定によって定量した。その結果、医薬組成物中のペプチド含有量は検出限界未満であった。

【0317】

[比較例5-2]

重量平均分子量Mw(絶対分子量)が650kDaのヒアルロン酸の粉末(キューピー社製)を1mg/mLとなるように注射用水へ溶解し、合成例1-1に示す同様の条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、得られたゲル浸透クロマトグラムを図12に示す。

【0318】

重量平均分子量Mw(絶対分子量)が650kDaのヒアルロン酸の粉末を10mg/mLとなるように注射用水へ溶解し、5mg/mLになるように注射用水で希釈してヒアルロン酸水溶液を得た。

一方、別の容器にて、抗原ペプチドの濃度が50mg/mLとなるようにジメチルスルホキシド(DMSO)へ溶解させ抗原ペプチドのDMSO溶液を得た。抗原ペプチドはバイオロジカ社製の次のアミノ酸配列を有するペプチドを用いた。

【0319】

NDHIAYFLYQLRGLQYIHSANVLRDLKPSNLLLNT(配

10

20

30

40

50

列番号 1)

【 0 3 2 0 】

室温 (2 5 程度) で、上記ヒアルロン酸水溶液と抗原ペプチドの D M S O 溶液を容量比で 1 0 0 : 1 の割合で混合し、室温 (2 5 程度) で 2 4 時間攪拌することで、抗原ペプチド - ヒアルロン酸複合体の調製を試みた。得られた混合液は、図 1 1 において「ヒアルロン酸 (6 4 0 k D a) 」と記載された写真により確認されるように、白濁が認められ、抗原ペプチドが溶解せず、ペプチドが封入されていないことが示唆された。

【 0 3 2 1 】

その後、固体の精製スクロース (富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号 1 9 8 - 1 8 3 8 5) を、ペプチド - ヒアルロン酸複合体を含む組成物とスクロースとの合計質量に対して 1 0 質量 % スクロースとなるように添加して、室温 (2 5 程度) で 1 時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、1 0 質量 % スクロース含有 1 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4 にてペプチドの濃度が約 0 . 3 0 m g / m L となるように希釈し、0 . 2 μ m P E S (ポリエーテルスルホン) (P a l l 社製、アクロディスクシリンジフィルター、2 5 m m) で滅菌ろ過し、ペプチド - ヒアルロン酸複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物中のペプチドの含有量は実施例 2 - 1 と同様の方法で高速液体クロマトグラフィー測定によって定量した。その結果、医薬組成物中のペプチド含有量は検出限界未満であった。

【 0 3 2 2 】

比較例 5 - 1、5 - 2 の結果から、面積比 $A 1 / A 2$ が 0 . 9 以上となる高分子量ヒアルロン酸においてはペプチドの封入が困難であり、ペプチド等の薬効成分を免疫細胞 (特に、c D C 1、マクロファージ) に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることが困難であった。

【 0 3 2 3 】

< 感染症ワクチンとしての機能評価 (外来性抗原に対する抗体産生評価) および免疫疾患治療用抗体体内産生機能評価 >

[試験例 4]

【 0 3 2 4 】

[比較例 6 - 1]

合成例 1 - 1 と同様な方法で、ヒアルロン酸誘導体を合成した。分画は行わず、そのまま用いた。取得したヒアルロン酸誘導体の凍結乾燥体を秤量し、5 m g / m L の濃度になるように注射用水を添加し、室温で一晩攪拌して十分に溶解させた。上記ヒアルロン酸誘導体水溶液について、1 m g / m L となるように注射用水で 5 倍希釈してゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図 1 3 は、得られたゲル浸透クロマトグラムである。また、実施例 1 - 1 等と同様な方法でヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布の評価を実施し、結果を下記表 1 1 に示した。

【 0 3 2 5 】

[実施例 6 - 1]

合成例 1 - 1 と同様な方法で合成したヒアルロン酸誘導体を、実施例 1 - 1 と同様な方法で分画し、ヒアルロン酸誘導体を取得した。得られた透析内液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図 1 4 は、得られたゲル浸透クロマトグラムである。また、実施例 1 - 1 等と同様な方法でヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布の評価を実施し、結果を下記表 1 1 に示した。

【 0 3 2 6 】

【 表 1 1 】

	$A 1 / A 2$	$D a / D b$
比較例 6 - 1	0 . 8 1	0 . 6 2
実施例 6 - 1	2 . 0 3	0 . 7 9

10

20

30

40

【0327】

<医薬組成物の製造>

[実施例6-1-1]

実施例6-1で取得したヒアルロン酸誘導体水溶液におけるヒアルロン酸誘導体の濃度を、既知濃度のヒアルロン酸誘導体の面積値から算出すると、4.28 mg/mLであった。

別の容器にて、オボアルブミン(OVA、富士フイルム和光純薬株式会社製低エンドトキシン品)の濃度が5 mg/mLとなるようにPBS(pH7.4)(富士フイルム和光純薬株式会社製、製品番号:166-23555)へ溶解させ、OVA/PBS溶液を得た。

注射用水、ヒアルロン酸誘導体水溶液、OVA/PBS溶液の順で混合したのちに、10%スクロース等張液となるようにスクロースを固体添加して清澄な溶液になるまで十分に室温で攪拌した。製剤中のOVA濃度は0.15 mg/mL、ヒアルロン酸誘導体濃度は3.0 mg/mLであり、10 mM PB(pH7.4)を含む10%スクロース溶液とした。75℃、1時間の加熱条件下でインキュベートし、OVA-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

【0328】

[比較例6-1-1]

比較例6-1で取得したヒアルロン酸誘導体水溶液を用い、実施例6-1-1と同様の方法でOVAをヒアルロン酸誘導体に封入し、OVA-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を得た。

【0329】

[抗体産生試験]

実施例6-1-1、比較例6-1-1で調製したOVA-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物を、BALB/cマウスに対して、OVAが20 µgとなるように、0日目、7日目に皮下投与し、10日目に血清を採取した。なお、OVA-ヒアルロン酸誘導体複合体投与時にアジュバントであるCpG1826(製造元:INVIVOGEN、製品コード:tlrl-1826-1)を50 µg皮下投与した。OVAに対する抗体価をELISAキット(Chondrex社製、Mouse Anti-OVA IgG Antibody Assay Kit、Mouse Anti-OVA IgG1 Antibody Assay Kit、Mouse Anti-OVA IgG2a Antibody Assay Kit)を用いて、添付のプロトコールに準じて測定した。血清の希釈倍率は10、50、250、1250、6250、31250とした。

【0330】

Mouse Anti-OVA IgG Antibody Assay Kitを用いて算出したIgG抗体価(OD)を図15、Mouse Anti-OVA IgG1 Antibody Assay Kitを用いて算出したIgG1抗体価(OD)を図16、Mouse Anti-OVA IgG2a Antibody Assay Kitを用いて算出したIgG2a抗体価(OD)を図17に示す。希釈倍率10における各抗体価を図18A(IgG抗体価)、図18B(IgG1抗体価)および図18C(IgG2a抗体価)に示す。

【0331】

血清希釈が1250倍以上である場合には抗体価に差異はないが、希釈倍率がそれより低い場合には、実施例6-1-1のOVA-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物の方が、比較例6-1-1のOVA-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物よりも高い抗体価が得られることが確認された。これにより、実施例6-1のヒアルロン酸誘導体(A1/A2=2.03)は比較例6-1のヒアルロン酸誘導体(A1/A2=0.81)よりも、外来抗原に対する高い抗体産生能を有することが明らかとなり、治療用抗体の体内産生機能が高いことも示された。

【0332】

抗原を添加した成熟樹状細胞はIFN-γ産生I型ヘルパーT細胞の誘導を介して抗原

10

20

30

40

50

特異的 I g G 2 a 産生を亢進させると報告されている（参考文献 5 : Shigeharu Fujita et al., “Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model.”, J Allergy Clin Immunol 2008;121:95-104.）。前記参考文献 5 の報告内容と上記試験例 4 の結果によれば、実施例 6 - 1 - 1 の O V A - ヒアルロン酸誘導体を含む医薬組成物が D C の共刺激分子を活性化し、C D 8 0 及び C D 8 6 が強く発現され、続く抗原特異的な T 細胞の誘導と I F N - 産生能を高めたことで、その結果、抗原特異的 I g G 2 a 産生を亢進させたと推察される。よって、実施例 6 - 1 - 1 の医薬組成物は、液性免疫だけでなく、細胞性免疫も誘導し、感染症ワクチンとしてより強い免疫応答を誘導することが期待される。

【0333】

本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチドだけでなく、タンパク抗原の薬効成分でも加熱条件下から保護し、適切な 3 次元構造を維持したままに免疫細胞（特に、c D C 1、マクロファージ）に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性（特に、c D C 1 での共刺激分子 C D 8 0 及び C D 8 6 の発現）を向上、促進、維持又は増強させたと推察される。

ヘルパー T 細胞の活性化を促し、さらに B 細胞の活性化・増大の促すことにより、エピトープに対する抗原が産生されたと推察される。

【0334】

前記第 1 ~ 第 3 の実施形態のヒアルロン酸誘導体を用いることで、従来のヒアルロン酸誘導体を用いるよりも優れた外来抗原に対するワクチン（主に感染症ワクチン）を提供できると考えられる。同時に優れた治療用抗体誘導抗原を含む医薬品を提供できると考えられる。

【0335】

<がんワクチンとしての機能評価（ヒアルロン酸誘導体および抗原を含む投与組成物を用いたがんワクチン抗腫瘍試験）>

[試験例 5]

面積比 A 1 / A 2 の異なるヒアルロン酸誘導体のがんワクチンによる抗腫瘍効果について明らかにするため、免疫チェックポイント阻害剤（I C I）抵抗性繊維肉腫細胞株 C M S 5 a 担癌マウスを用いて、C M S 5 a に発現する変異型 E R K 2 抗原（m E R K 2）の C D 8 エピトープを含む長鎖ペプチド抗原と種々のヒアルロン酸誘導体を複合化した長鎖ペプチド抗原搭載ヒアルロン酸誘導体がんワクチンを作製し、治療効果を検討した。

【0336】

材料及び方法を以下に示す。

（1）細胞

R P M I 1 6 4 0 培地（2 - メルカプトエタノール添加）は細胞科学研究所から購入した。

ウシ胎児血清（F B S）は G i b c o から購入した。

マウス線維肉腫 C M S 5 a 細胞株はメモリアルスローンケタリングがん研究所より分譲され、三重大学で継代したものをを用いた。マウス線維肉腫 C M S 5 a 細胞株は、変異型 E R K 2 蛋白質を発現している。変異型 E R K 2 蛋白質の変異部分を含むペプチド（Q Y I H S A N V L（配列番号 4））は、B A L B / c マウスの C D 8 陽性細胞傷害性 T 細胞に認識される。このペプチドを認識する T 細胞受容体（T C R）が単離され、T C R を遺伝子導入したトランスジェニックマウス（D U C 1 8 マウス）が作出されている。

【0337】

（2）試験動物

雌性 B A L B / c マウス（C D 9 0 . 2 陽性）は 6 週齢 ~ 8 週齢のものを日本 S L C から購入した。

両マウスは三重大学先端科学研究支援センター動物実験施設にて飼育した。動物実験のプロトコールは、三重大学医学部の倫理委員会の承認を得た。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 8 】

(3) 長鎖ペプチド抗原

合成長鎖ペプチド抗原はシグマジェノシスから購入した。配列は次の通りであった。
NDHIA YFLYQILRGLQYIHSANV LHRDLKPSNLL LNT (配列番号 1)。

当該配列は、前記変異型 ERK 2 の CD 8 陽性細胞障害性 T 細胞認識エピーブ配列として 16 番目の Q から 24 番目の L までの 9 個のアミノ酸配列 (Q Y I H S A N V L (配列番号 4)) を、CD 4 陽性ヘルパー T 細胞認識エピーブ配列として 13 番目の R から 29 番目の K までの 17 個のアミノ酸配列 (R G L Q Y I H S A N V L H R D L K (配列番号 5)) を含む。

10

当該長鎖ペプチド抗原と種々のヒアルロン酸誘導体を複合化した長鎖ペプチド抗原搭載ヒアルロン酸誘導体を、「長鎖ペプチド抗原搭載 HA ナノゲルがんワクチン」又は「HA ナノゲルがんワクチン」と示すこともある。

【 0 3 3 9 】

[実施例 7 - 1]

比較例 6 - 1 で得たヒアルロン酸誘導体を次のとおり分画した。凍結乾燥品のヒアルロン酸誘導体 (10 k HA - C₆ - Chol - 41.3%) を 5 mg / mL で注射用水に溶解し、透析カセット (フローライザー G 2、MWCO : 300,000、家田貿易株式会社) に移し、10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 に対して透析を行い、得られた透析内液のヒアルロン酸誘導体について、ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図 19 は、得られたゲル浸透クロマトグラムである。実施例 1 - 1 等と同様な方法で、ヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布の評価を実施した。結果を表 12 に示す。

20

【 0 3 4 0 】

【 表 1 2 】

	A 1 / A 2	D a / D b
実施例 7 - 1	6. 6 2	0. 8 0

【 0 3 4 1 】

< 医薬組成物の製造 >

30

[実施例 7 - 1 - 1]

実施例 7 - 1 で得られたヒアルロン酸誘導体水溶液中におけるヒアルロン酸誘導体の濃度を、既知濃度のヒアルロン酸誘導体の面積値から算出すると、3.8 mg / mL であった。

一方、別の容器にて、抗原ペプチドの濃度が 50 mg / mL となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) へ溶解させ、抗原ペプチドの DMSO 溶液を得た。抗原ペプチドはバイオロジカ社製の次のアミノ酸配列を有するペプチドを用いた。

【 0 3 4 2 】

NDHIA YFLYQILRGLQYIHSANV LHRDLKPSNLL LNT (配列番号 1)

40

【 0 3 4 3 】

室温 (25 程度) で、上記ヒアルロン酸誘導体水溶液と抗原ペプチドの DMSO 溶液をヒアルロン酸誘導体 100 質量部に対して、ペプチド 10 質量部となる比率で混合し、室温 (25 程度) で 2 時間攪拌することで、抗原ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体の調製を試みた。この時の溶液の様子を目視で確認したところ、図 11 において「ヒアルロン酸誘導体」と記載された写真により確認されるように、清澄な溶液が取得できた。このことから、ペプチドが確かに封入できていることが確認された。

【 0 3 4 4 】

その後、固体の精製スクロース (富士フィルム和光社製、製造専用、製品番号 198 - 18385) を、ペプチド - ヒアルロン酸誘導体複合体を含む組成物とスクロースとの合

50

計質量に対して10質量%スクロースとなるように添加して、室温(25程度)で1時間以上攪拌した。スクロースが十分に溶解したことを確認して、10質量%スクロース含有10mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの濃度が約0.30mg/mLとなるように希釈し、0.2µm PES(ポリエーテルスルホン)(Pall社製、アクロディスクシリンジフィルター、25mm)で滅菌ろ過し、ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物を得た。医薬組成物中のペプチド含有量は実施例2-1と同様の方法で高速液体クロマトグラフィー測定によって定量した。その結果、医薬組成物100質量部に対する、ペプチドの含有量は0.383質量部であった。さらに上記ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物が250µg/mLのペプチド濃度となるように10質量%スクロース含有10mMリン酸緩衝液pH7.4で希釈して投与液の医薬組成物を得た。上記ペプチド-ヒアルロン酸誘導体複合体を含む医薬組成物について、実施例1-1に記載の方法で、以下に示す測定条件でゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。図20は、得られたゲル浸透クロマトグラムである。

10

【0345】

(測定条件)

装置：HLC8420-GPC(東ソー社製)

カラム：G4000SWXL(東ソー社製、粒子径8µm、内径7.8mm、長さ30cm、品番：8542)

溶離液：10mMリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1mL/min

注入量：50µL

検出器：RI

温度：30

20

【0346】

[比較例7-1-1]

実施例7-1-1で用いたペプチドを50mg/mLとなるようにジメチルスルホキシド(DMSO)へ溶解させた。10質量%スクロース含有10mMリン酸緩衝液pH7.4にてペプチドの濃度が0.25mg/mLとなるように希釈した。

【0347】

[試験例6]

腫瘍増殖試験

T75培養フラスコ(コーニング)を用い、マウス線維肉腫CMS5a細胞株を10%FBS含有RPMI1640培地中で培養した。培養した細胞は0.5%トリプシン含有PBSを用いて剥離し、10%FBS含有RPMI1640培地に懸濁した。懸濁液を遠心分離(400×g、5分、4)した後に上清を除いた。その後、RPMI1640培地を用いて2回洗浄し、 1×10^6 個/100µLの濃度でRPMI1640培地に懸濁した。100µL/個体の用量でBALB/cマウスの右側前背部に皮下移植した(1群あたり5匹)。

30

【0348】

長鎖ペプチド抗原搭載HANANOゲルがんワクチンを投与する際には、腫瘍移植7日後、10日後、13日後、及び16日後に、長鎖ペプチド抗原搭載HANANOゲルがんワクチン50µgを、PBSに溶解した50µgのCpGオリゴDNA(味の素バイオファーマサービスジーンデザイン)と共にマウスの右側後背部に皮下投与した。その後、経時的に腫瘍面積を測定した。

40

比較例7-1-1の長鎖ペプチド抗原を投与する際にも、腫瘍移植7日後、10日後、13日後、及び16日後に、長鎖ペプチド50µgを、PBSに溶解した50µgのCpGオリゴDNA(味の素バイオファーマサービスジーンデザイン)と共にマウスの右側後背部に皮下投与した。その後、経時的に腫瘍面積を測定した。

【0349】

経時的な腫瘍面積値(平均値)を図23に示す。

50

実施例 7 - 1 のヒアルロン酸誘導体 (A 1 / A 2 = 6 . 6 2) と前記長鎖ペプチド抗原とを複合化して得た長鎖ペプチド抗原搭載 H A ナノゲルがんワクチンと C p G オリゴ D N A を組み合わせた医薬組成物は、比較例 7 - 1 の前記長鎖ペプチド抗原と C p G オリゴ D N A を組み合わせた医薬組成物よりも、C M S 5 a 腫瘍の増殖を抑制することが明らかとなった。このことから A 1 / A 2 = 6 . 6 2 であるヒアルロン酸誘導体を用いることで、優れたがんワクチンを提供できると考えられる。

【 0 3 5 0 】

< サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によるピークトップ (屈折率強度極大点) の保持時間の免疫細胞活性化およびワクチン機能への影響) >

[試験例 7]

[ヒアルロン酸誘導体の粒子サイズ分布におけるピークトップの保持時間比]

合成例 1 - 1 ~ 1 - 3、実施例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、及び、比較例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、7 - 2 で得たヒアルロン酸誘導体と、標準物質であるポリアクリル酸 (5 0 k D a) について、実施例 1 - 1 に記載の方法にてサンプルを調製し、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行った。

【 0 3 5 1 】

(測定条件)

装置 : H L C 8 4 2 0 - G P C (東ソー社製)

カラム : G 4 0 0 0 S W X L (東ソー社製、粒子径 8 μ m、内径 7 . 8 m m、長さ 3 0 c m、品番 : 8 5 4 2)

溶離液 : 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4)

流速 : 1 m L / m i n

注入量 : 5 0 μ L

検出器 : R I

温度 : 3 0

【 0 3 5 2 】

合成例 1 - 1 ~ 1 - 3、実施例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、及び、比較例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、7 - 2 で得たヒアルロン酸誘導体のピークトップ保持時間 P t と、標準物質であるポリアクリル酸 (5 0 k D a) のピークトップ保持時間 P r を下記表 1 3 に示す。また、ヒアルロン酸誘導体のピークトップ保持時間 P t と標準物質であるポリアクリル酸 (5 0 k D a) のピークトップ保持時間 P r の比である、P t / P r を算出し、下記表 1 3 に記載した。

【 0 3 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

	ピークトップ保持時間		P t / P r
	P t [m i n]	P r [m i n]	
合成例 1-1	8. 6 1	—	1. 1 4
合成例 1-2	8. 3 3	—	1. 1 1
合成例 1-3	8. 6 4	—	1. 1 5
実施例 1-1	5. 9 9	—	0. 8 0
実施例 1-2	6. 0 2	—	0. 8 0
実施例 1-3	5. 9 7	—	0. 7 9
比較例 1-1	8. 6 4	—	1. 1 5
比較例 1-2	8. 4 2	—	1. 1 2
比較例 1-3	8. 6 7	—	1. 1 5
実施例 6-1	6. 8 6	—	0. 9 1
比較例 6-1	8. 0 1	—	1. 0 6
実施例 7-1	5. 9 7	—	0. 7 9
比較例 7-1	8. 0 1	—	1. 0 6
比較例 7-2	8. 0 8	—	1. 0 7
ポリアクリル酸 (50kDa)	—	7. 5 3	—

10

20

【0354】

ヒアルロン酸誘導体のピークトップ保持時間 P t が標準物質であるポリアクリル酸 (50kDa) におけるピークトップ保持時間 P r よりも短い会合粒子サイズの場合に、共刺激分子の活性化に優れる会合体サイズがより多く存在し、本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチドやタンパクの薬効成分を免疫細胞 (特に、c D C 1、マクロファージ) に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性 (特に、c D C 1での共刺激分子 C D 8 0 及び C D 8 6 の発現) を向上、促進、維持又は増強させたと推察される。

【0355】

< G P C - S E C による平均分子量 (ポリアクリル酸換算) の免疫細胞活性化およびワクチン機能への影響 >

[試験例 8]

合成例 1 - 1 ~ 1 - 3、実施例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、及び、比較例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1 で得たヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量 (M w) および数平均分子量 (M n) (ポリアクリル酸換算) を以下の条件で測定を行った。ポリアクリル酸を標準物質として、検量線を作成し、合成例 1 - 1 ~ 1 - 3、実施例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1、7 - 1、及び、比較例 1 - 1 ~ 1 - 3、6 - 1 で得たヒアルロン酸誘導体のポリアクリル酸を基準とした各分子量を算出した。前記ポリアクリル酸標準物質としては P S S - P a a 2 k (2 k D a)、4 k (4 k D a)、8 k (8 k D a)、1 8 k (1 8 k D a)、4 0 k (4 0 k D a)、1 5 0 k (1 5 0 k D a) (P S S P o l y m e r S t a n d a r d s e r v i c e G m b H 社製 (ポリアクリル酸ナトリウム)) を用いた。結果を表 1 4 に示す。

30

40

【0356】

(測定条件)

装置：H L C 8 4 2 0 - G P C (東ソー社製)

カラム：G 4 0 0 0 S W X L (東ソー社製、粒子径 8 μ m、内径 7 . 8 m m、長さ 3 0 c m、品番：8 5 4 2)

溶離液：1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4)

流速：1 m L / m i n

50

注入量：50 μ L

検出器：RI

サンプル濃度：合成例、実施例、比較例で得たヒアルロン酸誘導体は1 mg/ml、ポリアクリル酸標準物質は2 mg/ml

検量線条件：近似式として3次： $A t^3 + B t^2 + C t + D$ を用いた。

【0357】

【表14】

	Mw	Mw/Mn
合成例1-1	69201	2.784
合成例1-2	86393	2.293
実施例1-1	133892	2.565
実施例1-2	152674	2.073
比較例1-1	45799	2.209
比較例1-2	43722	1.826
実施例6-1	137659	2.201
比較例6-1	74840	1.825
実施例7-1	204104	2.056

10

【0358】

ポリアクリル酸を標準物質として算出したヒアルロン酸誘導体の重量平均分子量Mw（ポリアクリル酸換算）が11万以上を満たす場合には、共刺激分子の活性化に優れる会合体サイズがより多く存在し、本実施形態の医薬組成物を用いることで、ペプチド等の薬効成分を免疫細胞（特に、cDC1、マクロファージ）に安定的且つ効率よく送達させ、さらに、該薬効成分の免疫細胞への取り込みを向上、促進、又は増強させることができ、同時に、免疫細胞の活性（特に、cDC1での共刺激分子CD80及びCD86の発現）を向上、促進、維持又は増強させたと推察される。

20

【0359】

<SEC（サイズ排除クロマトグラフィー）による分取方法>

[実施例8]

【0360】

分取方法は透析膜を用いた分画方法だけに限らない。

合成例1-1で取得したヒアルロン酸誘導体を20 mg/mLで注射用水に溶解し、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる分取を行う。例えば、0.1分おきに分取する。

【0361】

（測定条件）

装置：HITACHI, CHROMASTER

カラム：G4000SWXL（東ソー社製、粒子径8 mm、内径7.8 mm、長さ30 cm、品番：8542）

ガードカラム：TSKGEL GUARDCOLUMN SWXL（6.0 mm I.D. X 4 CM）

溶離液：10 mm リン酸緩衝液（pH 7.4）

流速：1 mL/min

注入量：100 mL

検出器：RI

【0362】

分取後、合成例1-1に記載の方法でGPC分析し、面積比A1/A2が0.90以上の画分であることを確認し、目的のヒアルロン酸誘導体を得る。

【0363】

30

40

50

< 適切な粒子サイズ分布を維持する医薬組成物の製造条件 >

[実施例 9 - 1 ~ 9 - 4、比較例 9 - 1 ~ 9 - 4]

実施例 1 - 1 と同様な手法で分取したヒアルロン酸誘導体について、濃度 5 mg / mL の水溶液を準備し、ヒアルロン酸誘導体を含有する水相と油相の混合比について詳細な検討を行った。

6 mL のクリーンバイアルに、ペプチド薬物であるシクロスポリン（東京化成工業社製、製品番号：C 2 4 0 8）を秤量し、ペプチドが 5 0 mg / mL の濃度となるように D M S O（富士フイルム和光社製、製品番号：0 4 5 - 2 4 5 1 1）へ溶解させた。

続いて、5 mg / mL のヒアルロン酸誘導体 4 0 0 μ L に対し、薬物を含有した油相である 5 0 mg / mL のシクロスポリンを 4 μ L 添加した。その後、下記表 1 5 に従って油相 D M S O を混合させた。十分に混合した後、最終的なヒアルロン酸誘導体濃度が一定となるように注射用水を下記表 1 5 に従い添加する。さらに、2 4 時間、室温（2 5 $^{\circ}$ C）でインキュベートした後、以下に示す条件にてゲル浸透クロマトグラフィーによる測定を行い、実施例 1 - 1 と同様の方法で面積比 A 1 / A 2 を算出した（表 1 5）。

【 0 3 6 4 】

（測定条件）

装置：H L C 8 4 2 0 - G P C（東ソー社製）

カラム：G 4 0 0 0 S W X L（東ソー社製、粒子径 8 μ m、内径 7 . 8 mm、長さ 3 0 cm、品番：8 5 4 2）

溶離液：1 0 mM リン酸緩衝液（p H 7 . 4）

流速：1 mL / min

注入量：5 0 μ L

検出器：R I

温度：3 0

【 0 3 6 5 】

【表 1 5】

実施例/比較例	油相 DMSO 混合量 (μ L)	注射用水 混合量 (μ L)	A 1 / A 2
実施例9-1	0	396	1.46
実施例9-2	16	380	1.37
実施例9-3	36	360	1.25
実施例9-4	76	320	1.03
比較例9-1	156	240	0.69
比較例9-2	236	160	0.43
比較例9-3	316	80	0.30
比較例9-4	396	0	0.17

【 0 3 6 6 】

実施例 9 - 1 ~ 9 - 4 および比較例 9 - 1 ~ 9 - 4 の結果より、油相とヒアルロン酸誘導体の含有する水相との混合比が容量比で 2 0 : 1 0 0 ~ 0 . 0 1 : 1 0 0 にする混合工程を経ることで薬効に優れるヒアルロン酸誘導体の粒子サイズを維持することができることがわかった。

【産業上の利用可能性】

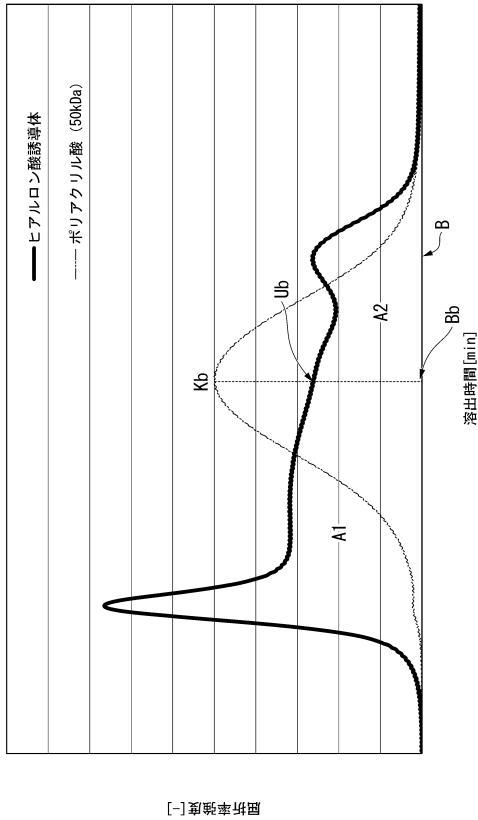
【 0 3 6 7 】

本実施形態のヒアルロン酸誘導体によれば、薬効成分と製剤化した際のリンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れるヒアルロン酸誘導体を提供することができる。本実施形態の医薬組成物は、前記ヒアルロン酸誘導体を含み、リンパ節内の免

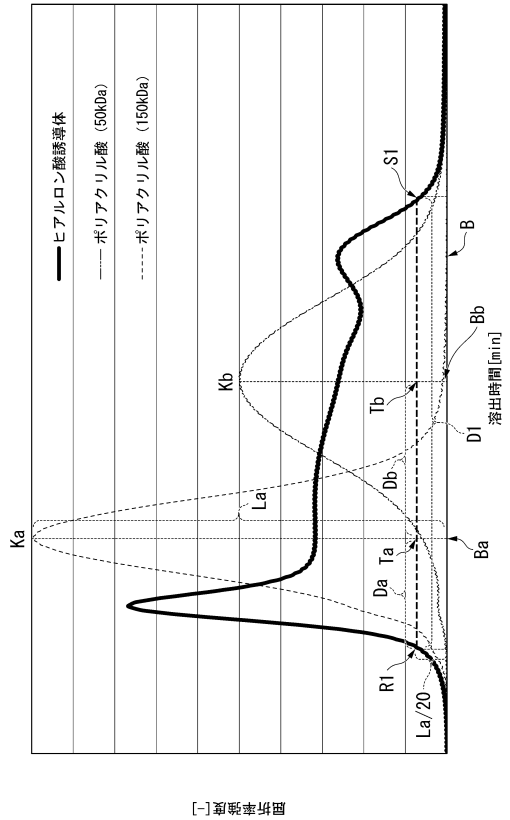
疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れる。本実施形態の医薬組成物の製造方法は、前記ヒアルロン酸誘導体を用いており、リンパ節内の免疫細胞への送達性及び該免疫細胞の活性化能に優れる医薬組成物が得られる。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

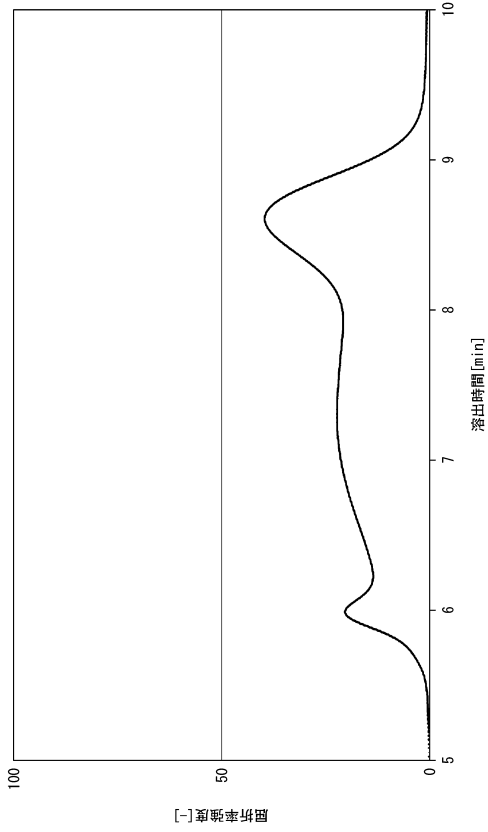
20

30

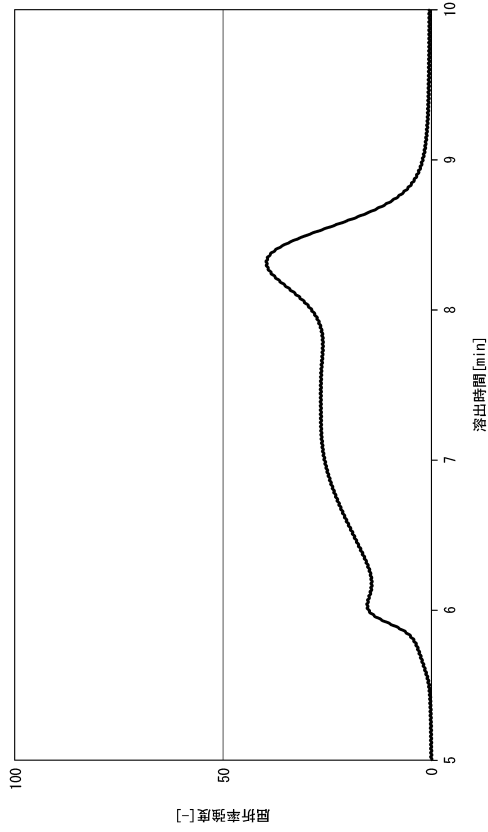
40

50

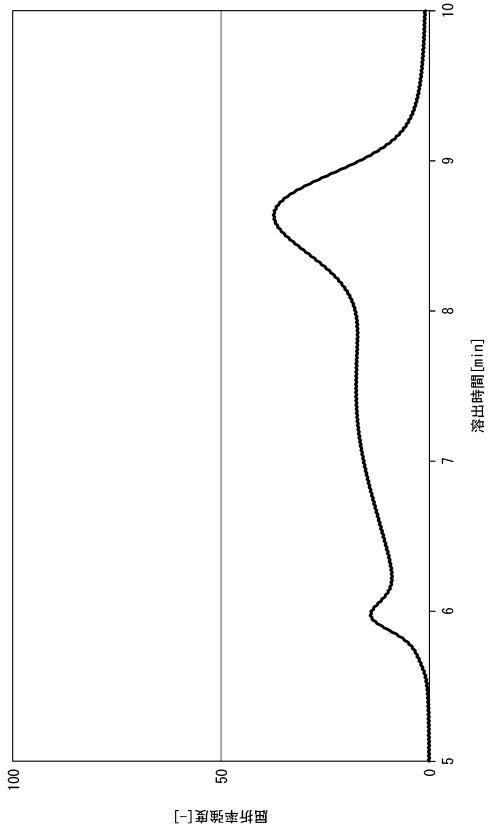
【 3 A】



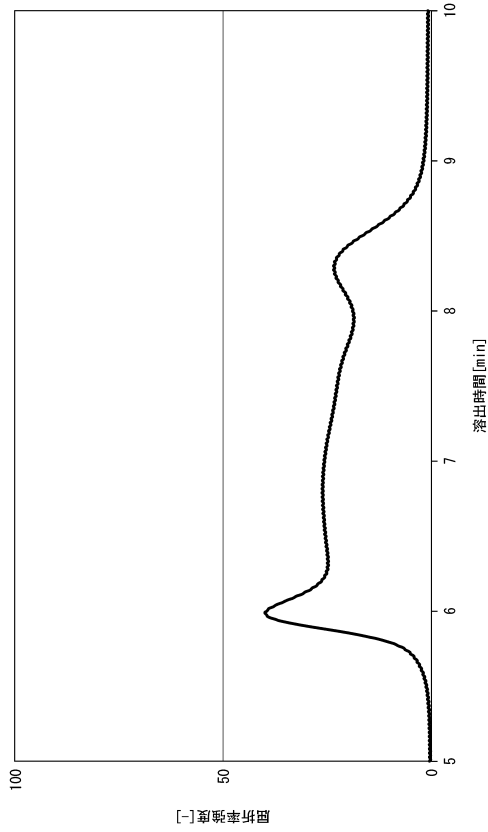
【 3 B】



【 3 C】



【 4 A】




10

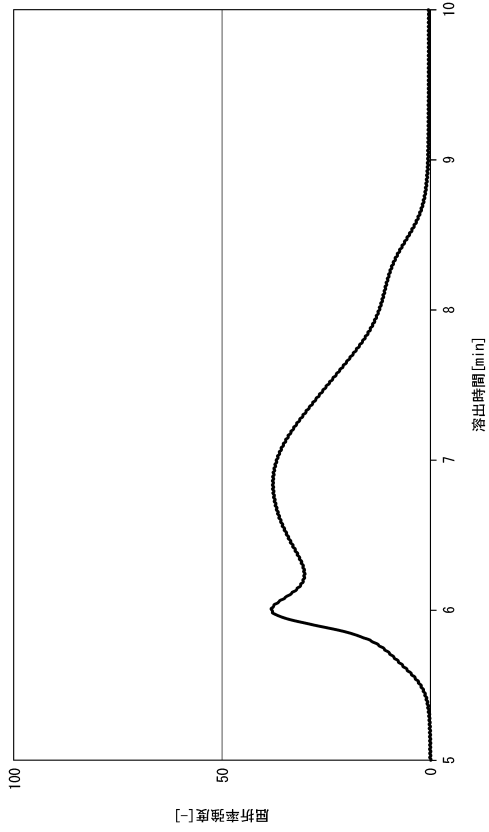
20


30

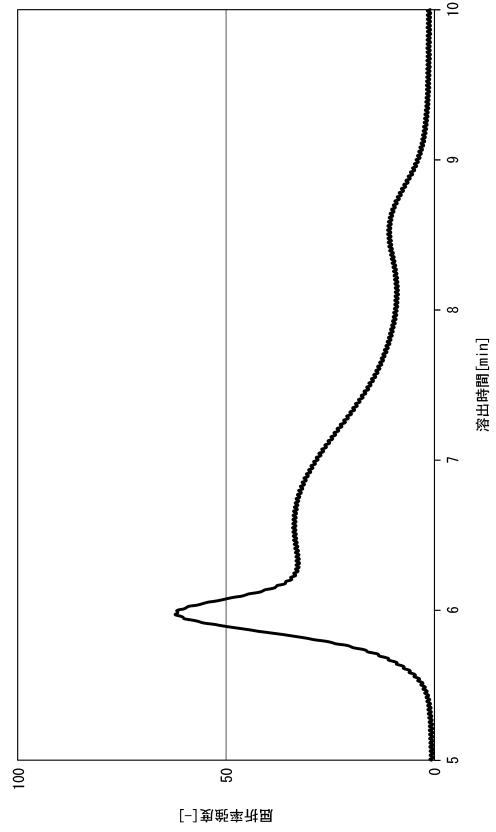
40


50

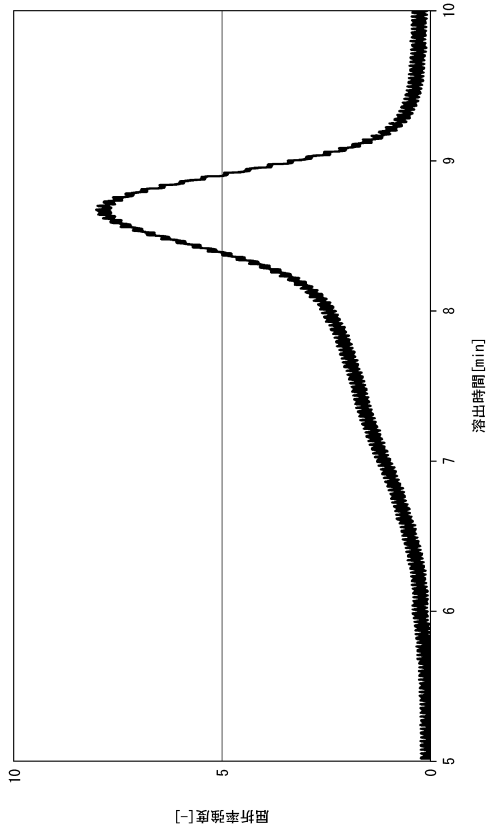
【 4 B】




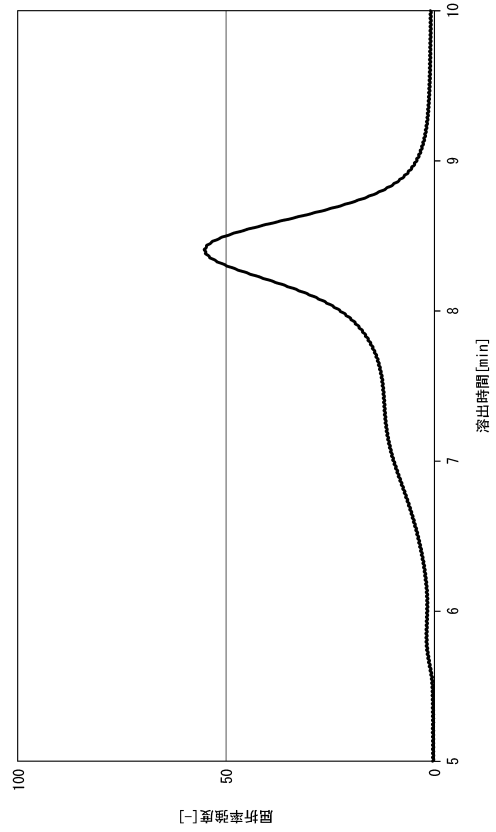
【 4 C】



【 5 A】



【 5 B】



10

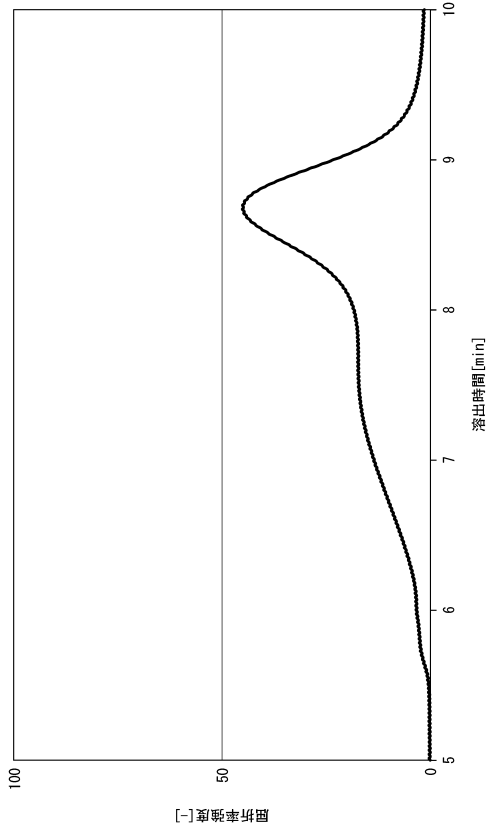
20

30

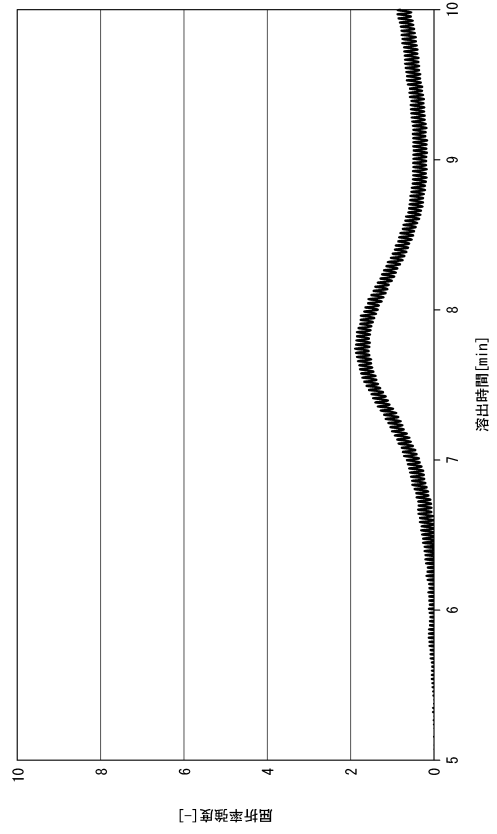
40

50

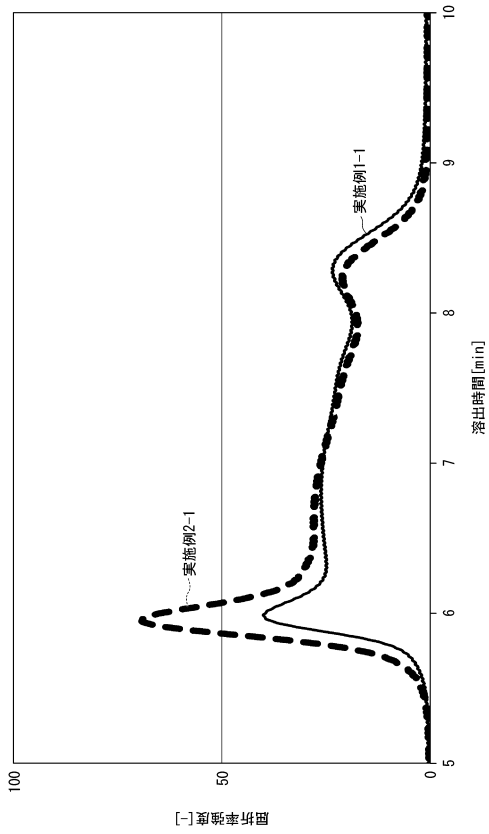
【図 5 C】



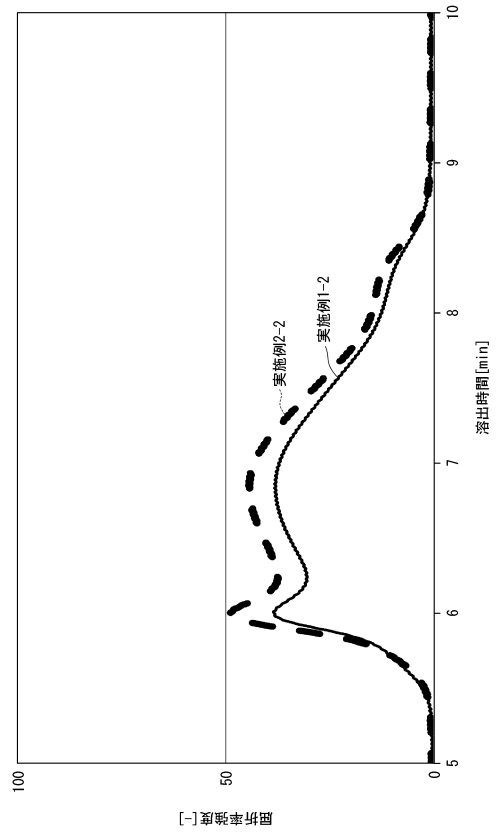
【図 5 D】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

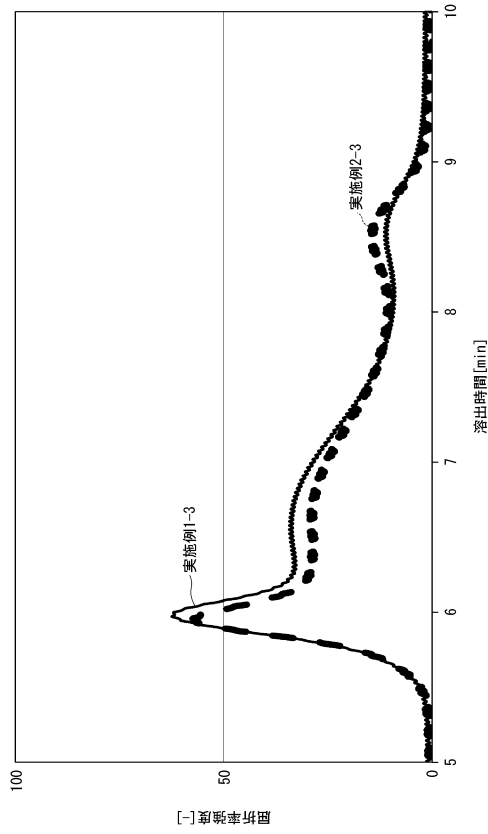
20

30

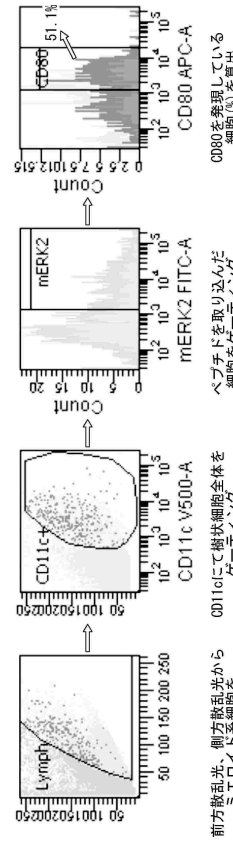
40

50

【図 6 C】



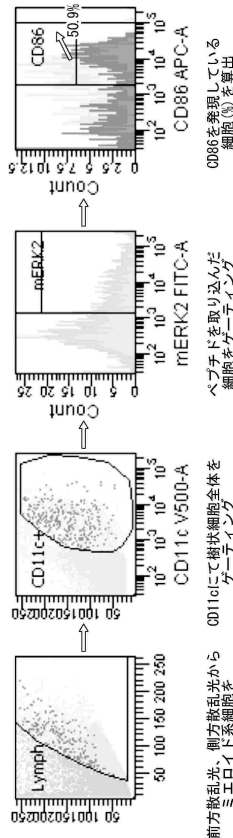
【図 7 A】



10

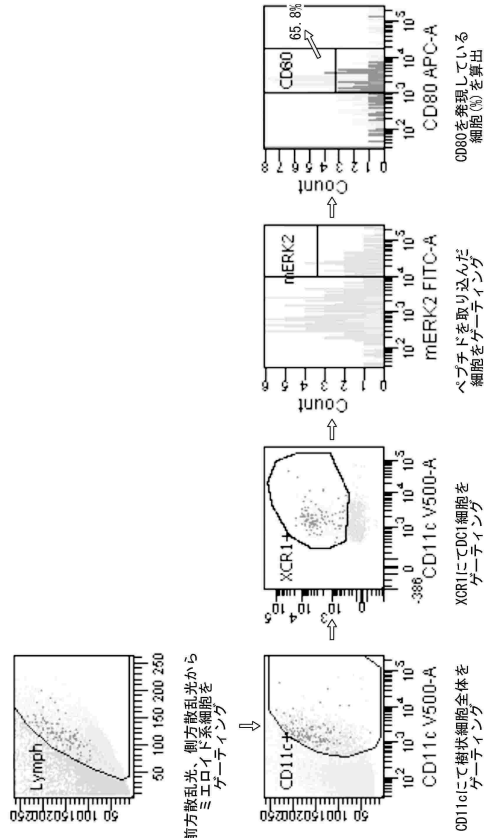
20

【図 7 B】



30

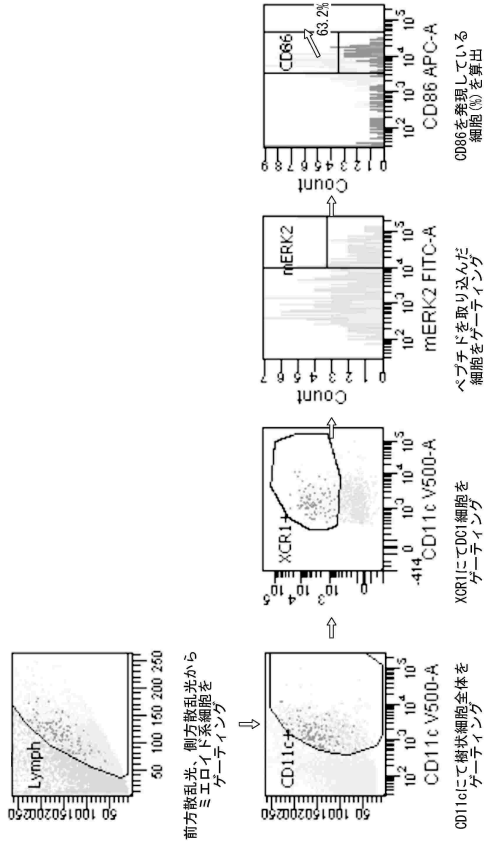
【図 7 C】



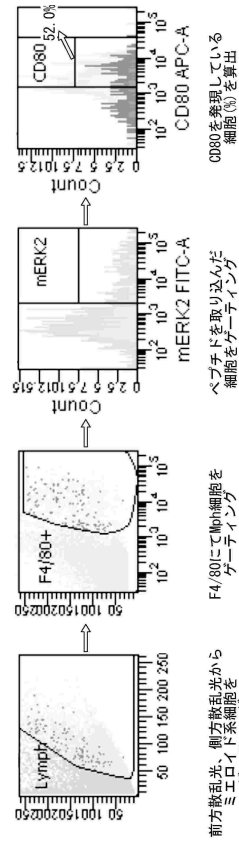
40

50

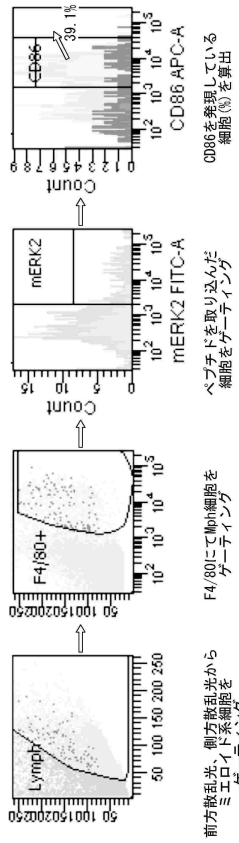
【図7D】



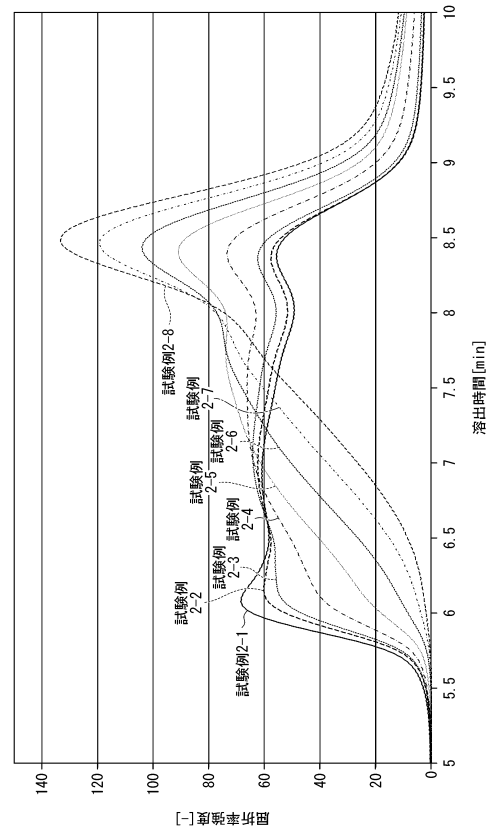
【図7E】



【図7F】



【図8】



10

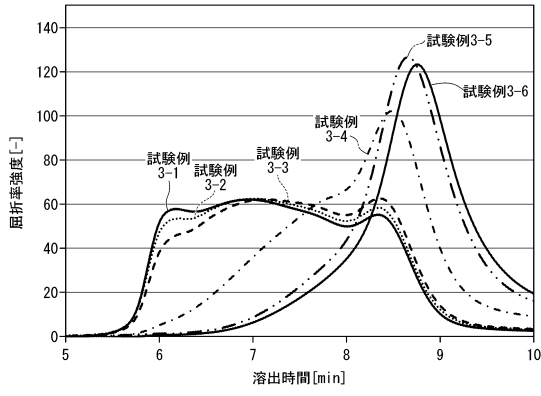
20

30

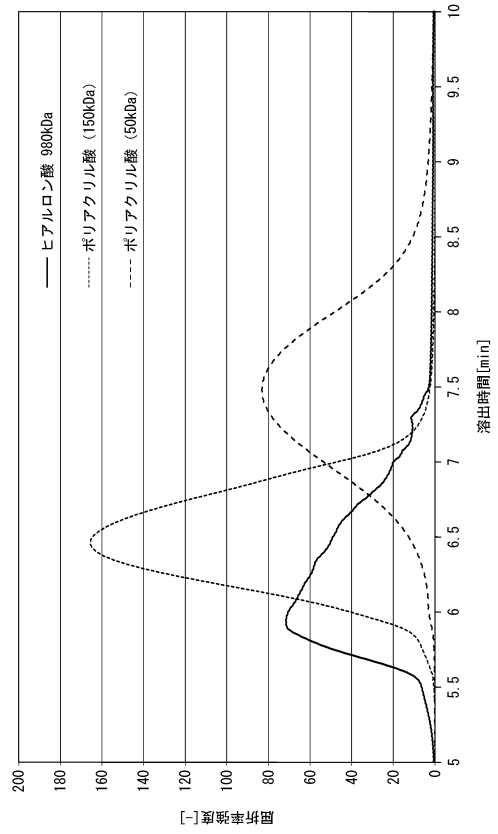
40

50

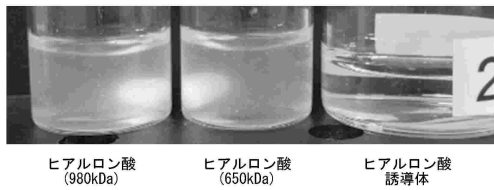
【図 9】



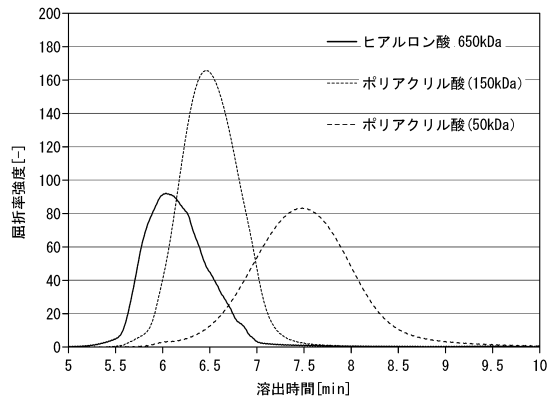
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

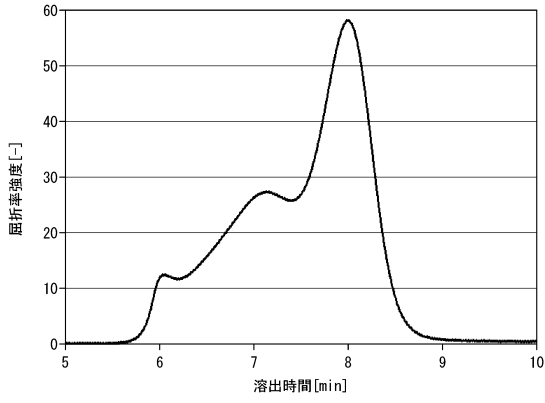
20

30

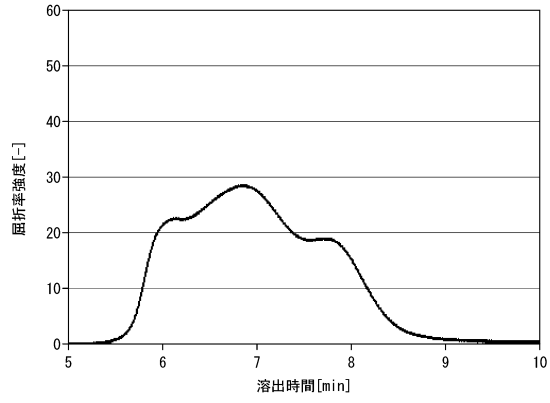
40

50

【図 1 3】

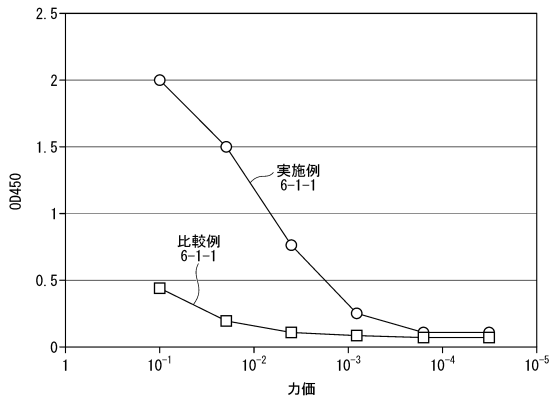


【図 1 4】

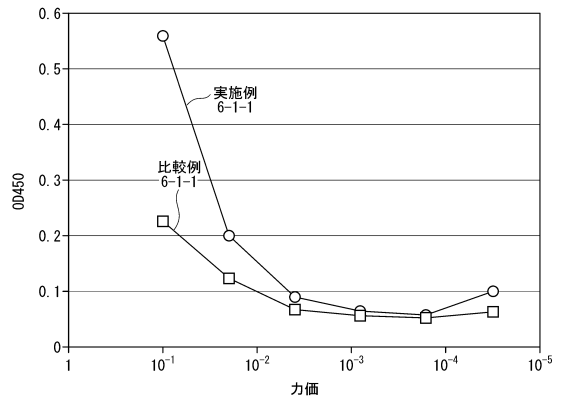


10

【図 1 5】

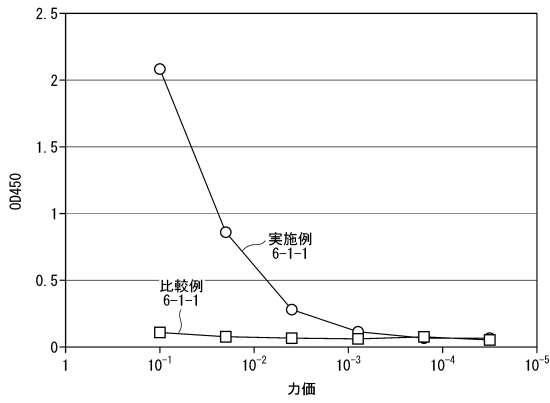


【図 1 6】

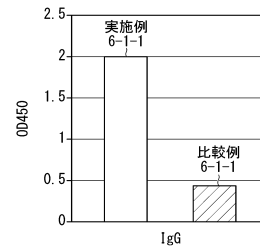


20

【図 1 7】



【図 1 8 A】

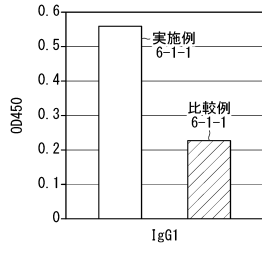


30

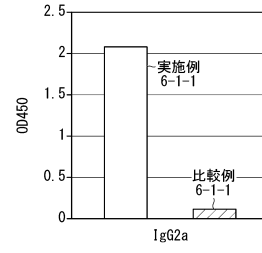
40

50

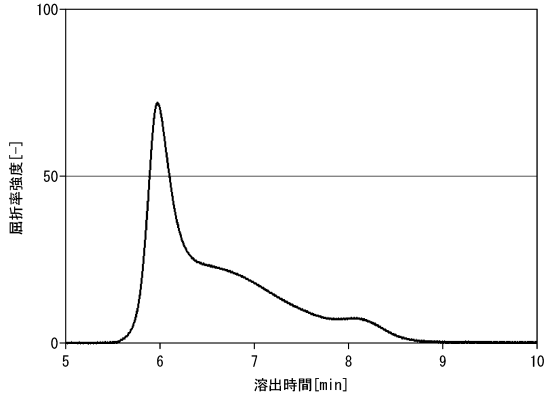
【 18 B】



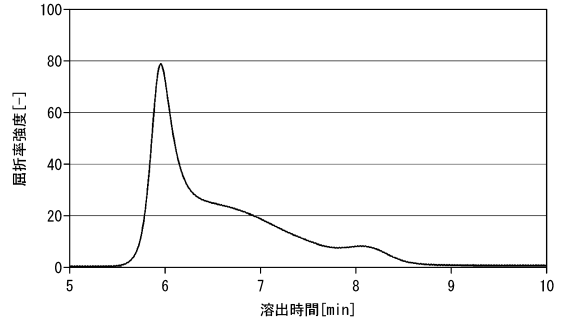
【 18 C】



【 19】



【 20】



10

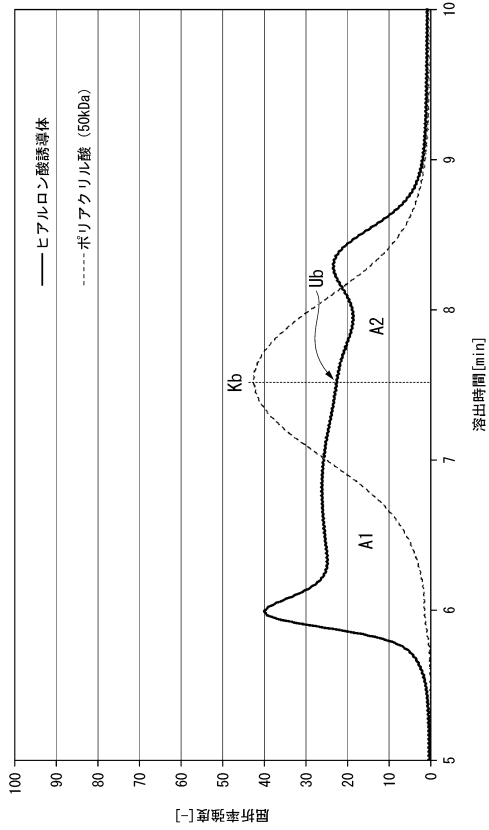
20

30

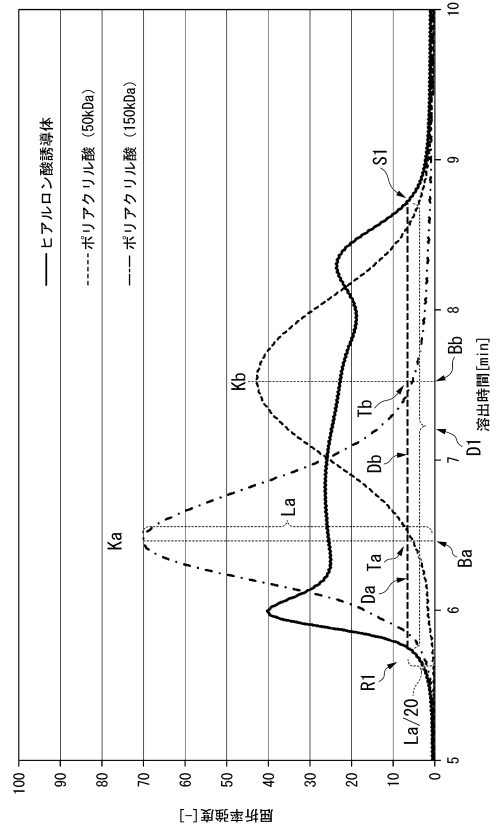
40

50

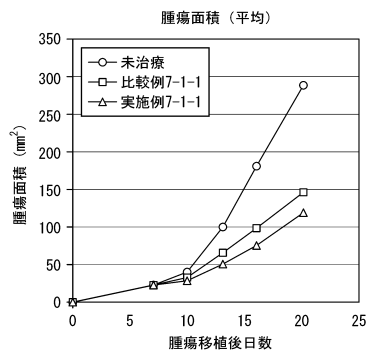
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】



【配列表】

0007684519000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	M
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	38/38 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/38	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
		A 6 1 K	38/16	
		A 6 1 K	39/00	G Z N A

東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭化成株式会社内

(72)発明者 百瀬 文康

三重県津市栗真町屋町1577 国立大学法人三重大学内

(72)発明者 珠玖 洋

三重県津市栗真町屋町1577 国立大学法人三重大学内

審査官 増永 淳司

(56)参考文献

国際公開第2021/157665(WO, A1)

国際公開第2020/158771(WO, A1)

シリカ-疎水化ヒアルロン酸複合ヒドロゲルの合成, 日本化学会春季年会講演予稿集(CD-ROM), 2019年

疎水化ヒアルロン酸-リン酸カルシウムハイブリッド微粒子の合成, 日本化学会春季年会講演予稿集(CD-ROM), 2016年

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 8 B 3 7 / 0 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 K 4 7 / 3 6

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 3 9 / 3 9

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 3 8

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 1 6

J S T P l u s (J D r e a m I I I)

J M E D P l u s (J D r e a m I I I)

J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)