

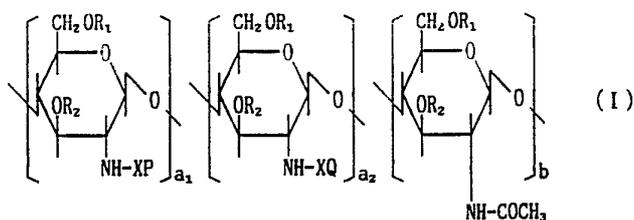


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C08B 37/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 92/03480 (43) 国際公開日 1992年3月5日 (05. 03. 1992)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01101 (22) 国際出願日 1991年8月16日 (16. 08. 91) (30) 優先権データ 特願平2/215803 1990年8月17日 (17. 08. 90) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 デイ・デイ・エス研究所 (DRUG DELIVERY SYSTEM INSTITUTE, LTD.) [JP/JP] 〒102 東京都千代田区三番町26番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井上和弘 (INOUE, Kazuhiro) [JP/JP] 〒274 千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6 Chiba, (JP) 伊藤照臣 (ITO, Teruomi) [JP/JP] 〒270 千葉県松戸市新松戸6-89-104 Chiba, (JP) 奥野 哲 (OKUNO, Satoshi) [JP/JP] 〒341 埼玉県三郷市早稲田8-5-18 Saitama, (JP) 青野勝利 (AONO, Katsutoshi) [JP/JP] 〒631 奈良県奈良市学園朝日元町2-529-3 B-308 Nara, (JP) (74) 代理人 弁理士 八木田茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.) 〒105 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : N-ACETYL CARBOXYMETHYLCHITOSAN DERIVATIVE AND PRODUCTION THEREOF

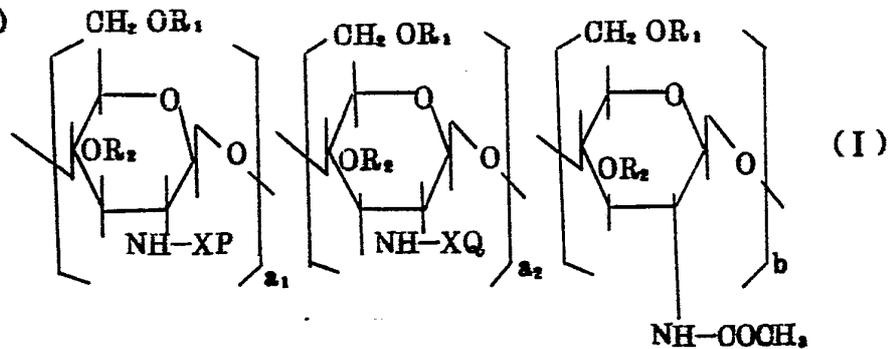
(54) 発明の名称 N-アセチルカルボキシルメチルキトサン誘導体及びその製法



(57) Abstract

A novel N-acetylcarboxymethylchitosan derivative represented by general formula (I) and having the following properties (1) to (4): (1) degree of carboxymethylation: 0.5 - 1.2, (2) molecular weight (according to gel filtration): 3,000 - 300,000, (3) a/(a+b): 0.01 - 1 wherein a = a₁ + a₂, (4) P/X (by mole): 0.1 - 1. Formula (I), wherein R₁ and R₂ represent each hydrogen or carboxymethyl; P represents R₃CO, R₄NH or R₅O; Q represents hydrogen or hydroxy; X represents a peptide chain containing 1 to 10 same or different amino acid residues; R₃COOH, R₄NH₂ and R₅OH represent carboxylic acid, amine and alcohol compounds, respectively; a₁ and a₂ represent each 0 or a positive integer except for the case where both of them are 0 at the same time; and b represents a positive integer. When the P group in the formula (I) represents a group derived from a pharmaceutical compound, the substance of the formula (I) is useful as a drug improved in the directivity toward a target organ.

(57) 要約 次式 (I)



[式中、 R_1 および R_2 は夫々に H またはカルボキシメチル基、 P は R_3 CO 基、 R_4 NH 基または R_5 O 基、 Q は H または OH 基、 X は 1 ~ 10 個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3 COOH はカルボン酸化合物、 R_4 NH₂ はアミノ化合物、 R_5 OH はアルコール化合物を意味する。 a_1 、 a_2 は 0 または正の整数を示すが、共に 0 となる場合を除く。 b は正の整数を示す。]

によって示され、下記の特性値 (1) ~ (4) : -

- (1) カルボキシメチル化度 : 0.5 ~ 1.2
- (2) 分子量 (ゲル濾過法) : 3,000 ~ 300,000
- (3) $a / (a + b)$: 0.01 ~ 1
(ただし $a = a_1 + a_2$)
- (4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

を有する新規な N - アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が本発明で得られた。

式 (I) の P が医薬化合物の基であるとき、式 (I) の物質は臓器への標的指向性等の性質が改善された医薬として有用である。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第 1 頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
 AU オーストラリア
 BB バルバードス
 BE ベルギー
 BF ブルキナ・ファソ
 BG ブルガリア
 BJ ベナン
 BR ブラジル
 CA カナダ
 CF 中央アフリカ共和国
 CG コンゴ
 CH スイス
 CI コート・ジボアール
 CM カメルーン
 CS チェコスロバキア
 DE ドイツ
 DK デンマーク

ES スペイン
 FI フィンランド
 FR フランス
 GA ガボン
 GI ギニア
 GB イギリス
 GR ギリシャ
 HU ハンガリー
 IT イタリア
 JP 日本
 KP 朝鮮民主主義人民共和国
 KR 大韓民国
 LI リヒテンシュタイン
 LK スリランカ
 LU ルクセンブルグ
 MC モナコ
 MG マダガスカル

ML マリ
 MN モンゴル
 MR モーリタニア
 MW マラウイ
 NL オランダ
 NO ノルウェー
 PL ポーランド
 RO ルーマニア
 SD スーダン
 SE スウェーデン
 SN セネガル
 SU ソビエト連邦
 TD チャド
 TG トーゴ
 US 米国

明 細 書

N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体及び

その製法

技術分野

5 本発明は新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体及びその製法に関する。更に詳しくは、本発明は、医薬化合物の生体内ターゲティングの技術に関するものであり、該医薬化合物の血液中での安定性、臓器への標的指向性並びに体内での被代謝性を高める
10 上で有用な多糖型高分子担体としての新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体に関する。また、本発明は該医薬化合物と結合した複合体の形としての新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体に関する。

15 背景技術

 水溶性高分子物質を薬物すなわち医薬化合物の担体として使用することは、従来からとりわけ医薬品製剤の分野において試みられ、関連する多数の技術が提供されてきた。それら薬物担体用の水溶性高分子物質は
20 すでに一般に公知であり、多くの場合においてカルボキシメチルセルローズ、ヒドロキシプロピルセルローズ、ヒドロキシプロピルメチルセルローズ等のセルローズ誘導体を使用されている。しかしこれらの従来技術は薬物のいわゆる徐放に関するものであり、薬物の
25 送達、すなわち薬物を薬物が必要される組織に必要な

時に必要な量だけ送達する技術には至っておらず、水溶性高分子を薬物送達の担体として使用する技術は未だ十分に開発されていないのが実状である。例えば下記文献1) 2)があり、文献1)にはカルボキシメチルキチンを体内埋め込み型の微粒子性担体として使用する技術が、また文献2)にはカルボキシル化デキストランを薬物との複合体のための担体として使用する技術が開示されている。

5
10 1) Watanabe, k. et al., Chem. Pharm. Bull., 38, 506-509, (1990)

2) 瀬崎 仁、薬学雑誌、109, 611-621, (1989)

しかしながら、文献1)記載の技術はカルボキシメチルキチンのゲル化能と生体内被分解性とに着目してそれらの性質を利用したものではあるものの、体内局所への埋め込み型であって、機能としては薬物の放出制御の範囲を出ておらず、癌組織や臓器への薬物の標的指向性を高めることは期待できない。また文献2)記載の薬物複合体は、優れた薬物送達の可能性を示しているが、薬物送達を計るための薬物複合体の分子の修飾に利用できる官能基はアルコール性水酸基に限定される。

20 25 制癌剤あるいは脳疾患治療剤等が次第に開発されるのに伴い、水溶性高分子を利用したこれら薬物のターゲティング技術の完成が急がれているのにもかかわらず、従来技術は十分なる解決を与えていない。

水溶性高分子担体を利用した薬物すなわち医薬化合物のターゲティング技術が完成されるためには、その前提条件として、第一に担体と薬物との複合体が静注投与後に標的臓器に到達するまでの時間内において血中で安定であること、換言すれば血中で必要な薬物濃度を持続できること、また第二に該担体が生体内で徐々に分解を受け、その結果その担体が長時間の体内残留を起こさないこと、第三に薬物との複合体の形で結合している該担体それ自体が臓器指向の傾向を示すことが必要であり、従って担体はまずこれらの条件を同時に満足するものとして提供されなければならない。

発明の開示

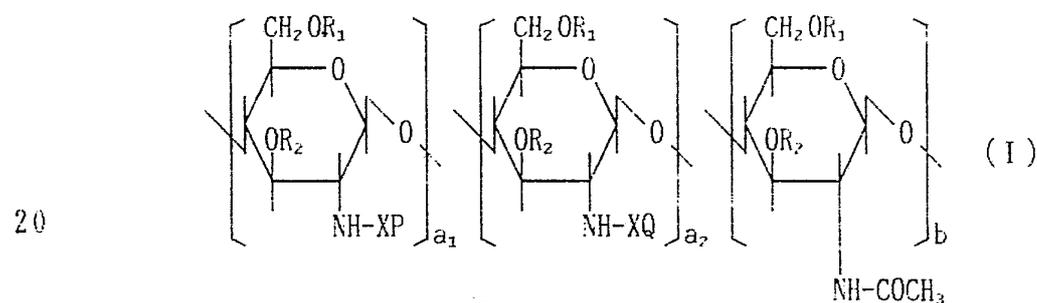
かかる課題の解決を目的として、本発明者等は種々の検討を繰り返した。その結果、前記のカルボキシメチルキチンを酵素処理およびアルカリ処理して得られた低分子化カルボキシメチルキトサンにこれのアミノ基の所でN-ペプチド鎖およびN-アセチル基を導入することにより本発明者らは、新規な物質として、N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体を今回合成することに成功すると共に、この誘導体が意外にも前記の諸条件を満足する担体として有用であること、またこれを利用すると該目的を達成できるものであることを見出だした。しかも、上記の導入されるN-ペプチド鎖は、適切なペプチド鎖を選択することによって、適用可能な医薬化合物の範囲がカルボン酸化合物、アミノ

化合物、アルコール化合物の広い範囲に及ぶことを可能にし、かつ複合体にある特定の臓器に対する臓器指向の傾向をもたらすことも見出した。これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

5 以下に本発明を詳細に説明する。

本発明の新規物質は、後記の一般式(1)で示されるN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体であり、
 10 そのキトサンの構成糖単位であるグルコサミンの6位及び/または3位の水酸基の一部のHがカルボキシメチル基で置換され、また一部の糖単位においては2位のアミノ基のHがアセチル基で置換されていること並びに他の部分の糖単位の2位アミノ基のHがペプチド鎖又は1個のアミノ酸で置換されていることが一つの特徴である。

15 第1の本発明による新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体は、下記式(1)によって示される



式(1)においてR₁およびR₂は夫々にHまたはカルボキシメチル基を表すが、ともにHであることはない。

また、ここにPはR₃CO基、R₄NH基またはR₅O基を表す。ここでPは、XをなすN-ペプチド鎖のN末端側で

25

ミノ酸に連結する場合があります、このときはPは R_5CO 基であり、更にPがXをなすN-ペプチド鎖のC末端側アミノ酸に連結する場合もあり、このときのPは R_4NH 基または R_5O 基である。なおここに R_5COOH はカルボン酸化合物、 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。

前記の R_5CO 基は、多くの場合において、具体的には、アミノ基の保護基であるか、あるいはカルボン酸系医薬化合物由来のアシル基であり、例えばアミノ保護基としては tert-ブトキシカルボニル基の如きアルコキシカルボニル基あるいはp-メトキシベンジルオキシカルボニル基の如きアラルキルオキシカルボニル基であり、あるいは更にその R_5CO 基に対応する R_5COOH がカルボン酸型の医薬化合物、例えばメトトレキサートとなるものであることもできる。

R_5O 基はカルボニル基の保護基としての低級アルコキシ基、例えば tert-ブチルオキシ基あるいはアラルキルオキシ基例えばベンジルオキシ基を挙げることができる。あるいは、また、 R_5O 基は、アルコール型の医薬化合物 R_5OH のアルコール性水酸基からHを除いた残基であることができる。

R_4NH 基は、カルボキシル基を保護するアミド型の保護基、例えばメチルイミノ基の如き低級アルキルイミノ基であることができる。あるいは、また R_4NH 基に対応する R_4NH_2 がアミノ化合物型の医薬化合物、例えば

ダウノルビシンまたはトリプロリジンを表わすことができる。

QはHまたはOH基を表す。ここにQがXをなすN-ペプチド鎖のN末端側アミノ酸に連結する場合があります、
5 このときはQはHであり、反対にQがXをなすN-ペプチド鎖のC末端側アミノ酸に連結する場合もあり、このときはQはOH基である。

更に、式(I)においてXは1~10個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖(但しアミノ酸1個の場合も、本明細書ではペプチドに包含して意味する)を意味するが、このペプチド鎖はアミノ酸のみから構成される場合のペプチド鎖はもちろん、鎖中の一部にアミノ酸以外の化合物を含む場合のペプチド鎖も包含して意味しており、後者の場合には例えばコハク酸のごとき二塩基性酸、特に二塩基性カルボン酸がペプチド鎖中の中間又は末端のアミノ酸に連結し、その結果全体として同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を構成してもよい。
10
15

更に、式(I)によるN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体は、これの塩、特に該誘導体のカルボキシメチル基のアルカリ金属塩、例えばナトリウム塩又はカリウム塩あるいはアンモニウム塩等であることを含む。
20

なお、第1の本発明による式(I)の誘導体化合物において、ペプチド鎖Xを構成するアミノ酸の数は薬物
25

放出や抗原性を考慮し、通常は 1 ~ 4 個、殊に 3 ~ 4 個が好ましい。XPにおけるペプチド鎖 X が 1 ~ 4 個のアミノ酸のみから構成されるペプチド鎖であり、その N 末端側アミノ酸に P が結合する場合の XP の例を示せば以下のごとくである。このような場合の X 中のペプチド結合はキトサン側より -NHCO- である。

P-Phe-Phe-Gly-
 P-Gly-Phe-Gly-Gly-
 P-Phe-Gly-Phe-Gly-
 10 P-Gly-Phe-Gly-Phe-
 P-Gly-Gly-Gly-
 P-Ala-Gly-Gly-Gly-

また XP におけるペプチド鎖 X が二塩基酸を含み、かつ 1 ~ 4 個のアミノ酸をふくむペプチド鎖であり、その C 末端側アミノ酸に P が結合する場合の XP の例を示せば次のごとくであり、このような場合の X 中のペプチド結合はキトサン側より -CONH- である。なお配列中 Suc はコハク酸残基を示す。

-Suc-Ala-Ala-Ala-P
 20 -Suc-Ala-Ala-Val-Ala-P

また、本発明で利用できるペプチド鎖 X についてのアミノ酸配列の別の例には、下記のものがある。

() H-Gly-Gly-Gly-Val-Ala-OH,
 -Gly-Gly-Gly-Leu-Ala- ,
 25 -Gly-Gly-Phe-Leu-Gly- ,

- Gly-Gly-Phe-Tyr-Ala-,
 -Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-,
 (iii) -Gly-Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-,
 -Gly-Gly-Gly-Gly-Leu-Ala-,
 5 -Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-,
 (iv) -Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-,
 -(Gly)₇-, -(Gly)₅-Leu-Ala-,
 (v) -(Gly)₅-Phe-Leu-Gly-,
 -(Gly)₅-,
 10 (vi) -(Gly)₃-,
 (vii) -(Gly)₁₀-

なお、本発明で利用できる医薬化合物の残基(P-)を誘導する母体の化合物の例には、下記のものがある。

メトトレキサート、レポドバ、ブメタニド、フロセ
 15 ミド、ジノプロスト、ダウノルビシン、ドキシソルビシ
 ン、マイトマイシン-C、トリブロリジン及びアクリ
 フラビン等。

更に、第1の本発明による式(I)の物質はカルボキ
 シメチル化度、分子量(ゲル濾過法)、 $a/(a+b)$ 値およ
 20 びP/Xのモル比によって特定される。

カルボキシメチル化度は、本発明においてコロイド
 滴定またはアルカリ滴定により求められる。コロイド
 滴定では下記文献3)が参照される

3) 神増 哲、農芸化学会誌、32, 303-308(1958)

25 本発明の式(I)の化合物の分子量は、本発明におい

てデキストランを標準物質とするゲル濾過法により求められる。後記実施例においては TSK-gel G4000PWXL をカラムとして使用し、溶出液：0.1M NaCl、流速：0.8ml/min、カラム温度：40℃、検出：示差屈折計で測定した。

$a/(a+b)$ 値はいわばペプチド化度とも称すべき値であり、ここで a は $-XP$ 置換された糖単位の数 a_1 と $-XQ$ 置換された糖単位の数 a_2 との合計を表し、 b はアセチル置換されている糖単位の数を表す。式(1)で示される物質の糖単位はすべて $-XP$ 置換されているか、 $-XQ$ 置換されているか、またはアセチル置換されているかのいずれかであるので、 $a+b$ は分子中の糖単位の合計の総数を示す。

なお $a/(a+b)$ は次式(1)によって求められる。

$$\frac{A}{M_m} \div \frac{100 - (A + C)}{M_s} \quad (1)$$

ここで A は式(1)における P の含量(重量%)、 M_m は P の分子量、 M_s は N -アセチルカルボキシメチルキトサンの糖単位の平均分子量、 C は式(1)において $a_2 = 0$ であるときの X の含量(重量%)を表す。なお C は次式(2)によって算出される。

$$C = B(100 - A) \times 10^{-2} \quad (2)$$

ここで B は式(1)において $a_1 = 0$ であるときの X の含量(重量%)を表し、例えばペプチド化した後、 P を導入する前にあるいは式(1)の物質から P を脱離せし

めてから、それぞれペプチド含量を測定して求めることができる。BはX中のアミノ酸に特性吸収があればこれを利用して吸光度測定法により直接に求めることができる。しかしX中のアミノ酸に特性吸収がないときはBは次式(3)によって求めてもよい。

$$B = \frac{D}{r(100 - D) + D} \times 100 \quad (3)$$

ここでDは式(1)において $a_2 = 0$ であるときのXPの含量(重量%)を表し、Pに特性吸収があればこれを利用して吸光度測定法により求めることができる。またrは次式(4)によって求められる値を示す。

$$r = M_{PX} / M_X \quad (4)$$

ここで、 M_{PX} および M_X はそれぞれXPおよびXの分子量をあらわす。

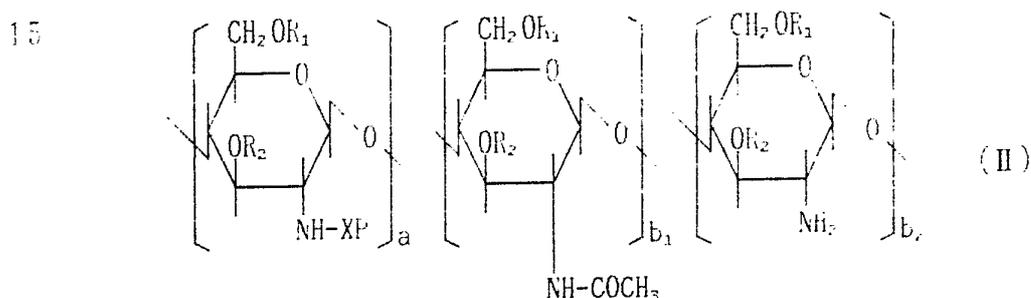
次にP/Xのモル比はペプチドに対するP化度(またはP置換度)とも称すべき値、すなわち $a_1 / (a_1 + a_2)$ であり、次式(5)によってそのモル比を求めることができる。

$$\frac{A}{M_m} \div \frac{C}{M_x} \quad (5)$$

第1の本発明による式(1)で示される物質は、前記の如く算定されるカルボキシメチル化度、分子量(ゲル濾過法)、 $a/(a+b)$ 値およびP/X値がそれぞれ0.5~1.2、3,000~300,000、0.01~1および0.1~1の各範囲にあるものである。

5 なお本明細書において、前記の式(Ⅰ)の記載は、式(Ⅰ)で示される物質の分子において -XP置換された糖単位(すなわちグルコサミン糖単位)が a_1 個、 -XQ置換された糖単位が a_2 個、 -COCH₃置換された糖単位が1個だけそれぞれ存在していることを示すに止まっており、同一種類の糖単位がそれぞれの個数だけ連続して結合しているとか、あるいはこれら3種類の糖単位が式(Ⅰ)に記載の配列順序で結合しているとかいうことを意味しない。

10 更に、第1の本発明による式(Ⅰ)の化合物におけるそのN-アセチル基の一部が欠除している部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体も新規な物質であり、そして後述される有用性を有する。従って、第2の本発明によると、式(Ⅱ)



20 によって示される部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が提供される。式(Ⅱ)においてR₁、R₂、Xは式(Ⅰ)におけると同一の意味を表すが、ここでPは式(Ⅰ)におけるより意味が多少とも拡大されており、H、OH基、R₃CO基、R₄NH基またはR₅O基を表す。Pが25 Xをなすハブチド鎖のN末端側アミノ酸に連結する場

合があり、このときはPはHまたは R_3CO 基であり、FがXをなすペプチド鎖のC末端側アミノ酸に連結する場合もあり、このときのPはOH基、 F_1NH 基または R_3O 基である。a、 b_1 、 b_2 は正の整数を表す。

5 また式(II)の物質は式(I)における同一の方法によって求められるカルボキシメチル化度、分子量(ゲル濾過法)、 $a/(a+b)$ 値およびP/Xモル比によって特定される。ただし、式(II)では、 $a/(a+b)$ 値における
10 bは式(I)で示される物質におけるbとは意味が多少異なり、アセチル置換されている糖単位の数 b_1 と2位アミノ基が置換されずに遊離のままである糖単位の数 b_2 との合計を表す。式(II)で示される物質における特性値は式(I)で示される物質におけるそれらと同一である。

15 なお、本明細書での上記の式(II)の記載は、式(II)で示される物質の分子において-SP置換された糖単位がa個、 $-COCH_3$ 置換された糖単位が b_1 個、2位アミノ基が置換されずに遊離のままである糖単位が b_2 個だけそれぞれ存在していることを示すに止まっており、同
20 一種類の糖単位がそれぞれの個数だけ連続して結合しているとか、あるいはこれら3種類の糖単位が式(II)の記載の配列順序で結合しているとかということを意味しない。

25 式(II)で示される物質は式(I)で示される物質を製造するための合成中間体であり、従って式(I)で示さ

れる物質とは産業上の利用分野が同一であり、かつ構成の主要部が同一である。

例えば、上記の式(II)の化合物において、Pが医薬化合物に由来する残基 R_3CO 基、または R_4NH 基または R_5O 基を示す場合の式(II)の化合物は、これのアミノ基を無水酢酸、あるいはアセチルクロリドの如き他の適当なアセチル化剤で適当な溶剤、例えばピリジン中でアセチル化すれば、医薬化合物の結合している場合の複合体の形の式(I)の本発明化合物を与える。また、式(II)の化合物において、Pが保護基である場合の式(II)の化合物から保護基を脱離した後に、若しくはPがHまたはOH基である場合の式(II)の化合物に対して、医薬化合物としての R_3COOH 、 R_4NH_2 または R_5OH を結合させ、次いで上記と同様に残余のアミノ基をアセチル化すると、式(I)の本発明化合物を生成することが可能である。

発明を実施するための最良の形態

次に第1の本発明による式(I)の化合物の製造について述べると、その概略は以下のごとくであるが、本発明はこれに限定されない。

本発明物質の原料であるカルボキシメチルキチンは、カニ、エビ等の甲殻類や昆虫の外皮、菌類の細胞壁等に広く存在するキチン (β -1,4-ポリ-N-アセチルグルコサミン) にアルカリ存在下、モノクロル酢酸を反応させて容易に調製できる。その反応条件を変えること

により、カルボキシメチル化度の異なるカルボキシメチルキチンが得られるが、市販品の利用も可能である。

次にカルボキシメチルキチンを低分子化するが、この低分子化にあたり、例えば市販のカルボキシメチルキチンに卵白リゾチームを作用させ、その反応条件を制御することにより、得られるカルボキシメチルキチンの分子量を調節することができる。その反応条件は、用いるカルボキシメチルキチンのカルボキシメチル化度（ds：糖残基当りのカルボキシメチル化度）によっても異なり、例えば、ds=1.0 の場合、分子量が約 1×10^5 に低減された低分子化カルボキシメチルキチンは、分子量が 1×10^6 程度のカルボキシメチルキチンに、その約1/400量の卵白リゾチームをpH 6.0、37℃で約2時間作用させることにより得られる。

更に低分子化カルボキシメチルキチンの脱N-アセチル化を行うが、これはアルカリ処理により達成される。低分子化カルボキシメチルキチンを例えば、1N NaOH に溶解後、100℃で数時間～数十時間、好ましくは3～8時間加熱還流することにより、N-アセチル基の一部を除去し、部分的にN-アセチル基が残っているカルボキシメチルキトサンが得られる。これを部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサンと呼ぶ。

次に部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサンを、例えばジメチルホルムアミドと0.5%NaHCO₃水溶液の混合溶媒に溶解後、その溶液に対して、バブチド錯塩

端アミノ酸のアミノ基に保護基を導入した本発明に係るペプチド〔以下単に保護ペプチドと呼ぶ；式「H(O-N-保護基）」で表示できる〕のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（保護ペプチドの活性エステル）を加えて反応させることにより、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサンの遊離アミノ基に保護ペプチドを結合させる。保護ペプチドの活性エステルの加える量を変えることにより、保護ペプチドの結合量の異なる「部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-保護ペプチド」複合体が得られる。保護ペプチドの活性エステルの大過剰を反応させれば、遊離アミノ基が殆ど存在しない複合体を得ることも可能である。なお保護ペプチドの活性エステルは、保護ペプチドをペプチド合成の常法により例えば、ジメチルホルムアミドに溶解後、これにN-ヒドロキシスクシンイミドとN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて反応させることにより得ることができる。

上記のように、保護ペプチドの活性エステルとの結合反応に用いる部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサンの濃度は0.1～5%（重量%）が適当であり、多糖の糖残基と保護ペプチドの活性エステルのモル比は、20：1～1：10が適当である。また、保護ペプチド中のアミノ酸の数は、1～10の範囲である。

なお上記において保護基の代わりに薬物を使用し薬物を導入した本発明に係るペプチド〔式H(O-N-薬物)〕

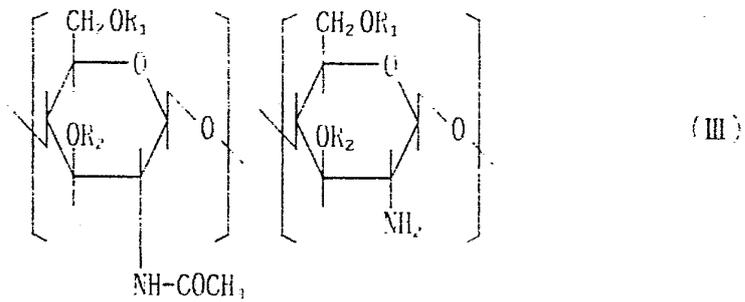
し P は医薬化合物由来の R_1CO 基、 R_1NH 基又は R_1O 基(で表示できる)の N-ヒドロキシスクシンイミドエチルを加えれば、「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド-薬物」複合体が得られる。

- 5 また上記のようにして得られた複合体から、それぞれ保護基あるいは薬物残基(P)を脱離せしめれば「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド」複合体が得られる。

10 式(II)で示される本発明物質は、上記のようにして得られる「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-保護ペプチド」複合体、「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド-薬物」複合体および「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド」複合体という3種の物質を包含する。

- 15 式(II)で示される本発明物質は、これを飽和 $NaHCO_3$ 水溶液に溶解後、無水酢酸又は他の適当なアセチル化剤、例えば塩化アセチルを反応させて式(II)の複合物質中に残存する遊離アミノ基をアセチル化することにより、対応する式(I)で示される本発明物質を得る。
- 20 ただしここで得られる物質は式(I)において $a = a_1$ 、 $a_2 = 0$ または $a = a_2$ 、 $a_1 = 0$ である場合の物質であり、例えば上記の3種の物質に夫々に対応してそれぞれ「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-保護ペプチド」複合体、「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド-薬物」複合体および「N-アセチルカルボキシ
- 25

- メチルキトサン-ペプチド」複合体を得ることができるが、前二者は $a = a_1$ 、 $a_2 = 0$ に対応する物質であり、後一者は $a = a_2$ 、 $a_1 = 0$ に対応する物質である。また前二者から後一者への変換は通常は酸処理によって行うことができる。例えば「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-保護ペプチド」複合体を弱酸処理、例えば、0.5N HCl中、30℃で16時間処理することにより、「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド」複合体を得ることができる。
- 次にこの「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド」複合体を、例えば 1% NaHCO₃ 水溶液に溶解後、カルボン酸型の医薬化合物、すなわちカルボキシル基を有する薬物のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（活性エステル）を前記複合体中のペプチド鎖のN末端に反応させることにより「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド-薬物」複合体を得ることができる。ただしここで得られる物質は、必ずしも式(1)において $a = a_1$ 、 $a_2 = 0$ である場合の物質に限定されるものではなく、実際には $a = a_1 + a_2$ 、 $a_2 \neq 0$ である場合の物質として示される。すなわちここで薬物として例えばメトトレキサート(MTX)を選択すれば「N-アセチルカルボキシメチルキトサン-ペプチド-MTX」複合体が得られるが、通常は該複合体におけるMTX含量はペプチド含量より小さくなる。
- 従って、第3の本発明によると、式(III)



[式中、 R_1 および R_2 は夫々に H またはカルボキシメチル基を表わす]

によって示され、下記の特性値(1)~(2):-

(1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.1

10 (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000

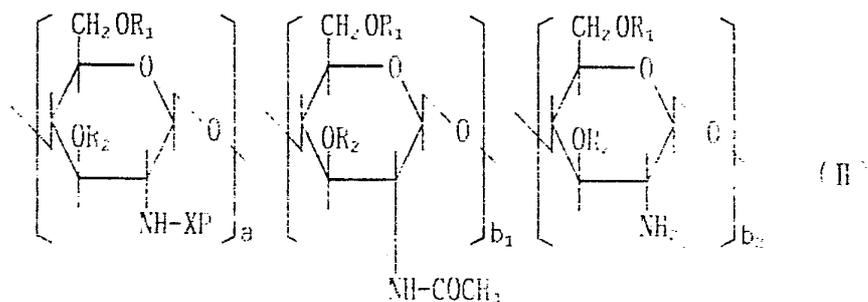
を有する部分的 λ -アセチルカルボキシメチルキトサンに次式



15 [式中、ここで P は H、OH 基、 R_3CO 基、 R_4NH 基または R_5O 基、X は 1~10 個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3COOH はカルボン酸化合物、 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。]

で示される化合物を反応せしめることを特徴とする、

20 式(II)



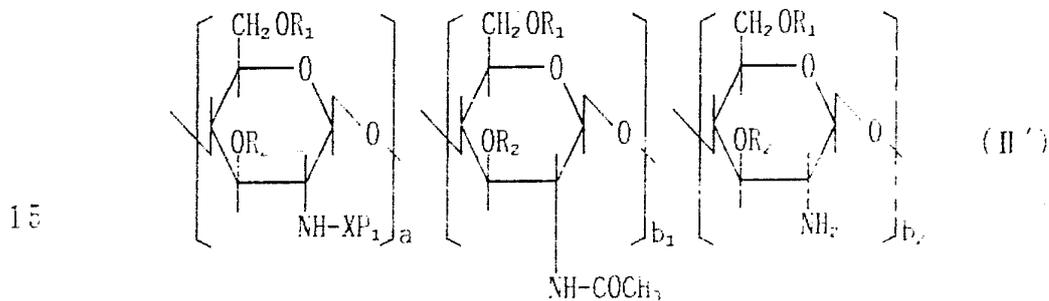
25

[式中、 R_1 、 R_2 、 P 、 X は(Ⅲ)式における前記と同じ意味を示す。 a 、 b_1 、 b_2 は正の整数を示す。]によって示され、下記の特性値(1)~(4):-

- (1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.2
- 5 (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000
- (3) $a / (a + b)$: 0.01~1
(ただし $b = b_1 + b_2$)
- (4) P / X (モル比) : 0.1~1

を有する部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体の製法が提供される。

また、第4の本発明によると、式(Ⅱ')



[式中、 R_1 および R_2 は夫々にHまたはカルボキシメチル基、 P_1 はHまたはOH基、もしくは R_3' CO基、 R_4' NH基または R_5' O基、 X は1~10個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3' COOHはカルボン酸化合物、 R_4' NH₂はアミノ化合物、 R_5' OHはアルコール化合物を意味する。 a 、 b_1 、 b_2 は正の整数を示す。]

によって示され、下記の特性値(1)~(4):-

- 25 (1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.2

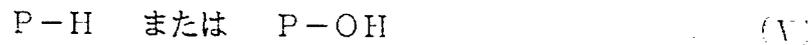
(2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000

(3) $a / (a + b)$: 0.01~1

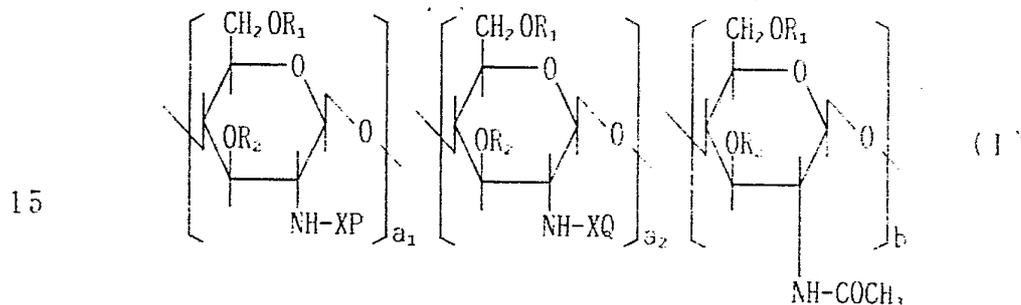
(ただし $b = b_1 + b_2$)

(4) P/X (モル比) : 0.1~1

5 を有する部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体をアセチル化し、P₁基がHまたはOH基以外の場合は、さらにP₁基を脱離せしめ、最後に次式



[式中、PはR₃CO基、R₄NH基またはR₅O基を表す。] として示される化合物を反応せしめることを特徴とする、式 (I)



[式中、R₁、R₂、P、Xは前記と同じ意味を示し、QはHまたはOH基を意味する。a₁、a₂は0または正の整数を示すが、共に0となる場合を除く。bは正の整数を示す。]

20 によって示され、下記の特性値(1)~(4):-

(1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.2

(2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000

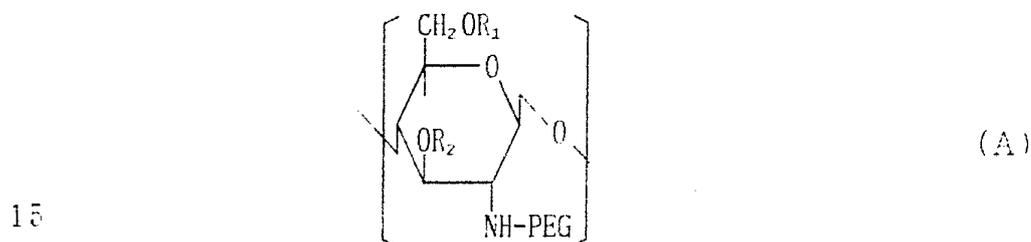
(3) $a / (a + b)$: 0.01~1

25 (ただし $a = a_1 + a_2$)

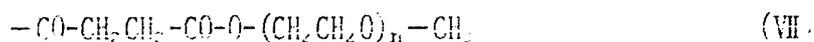
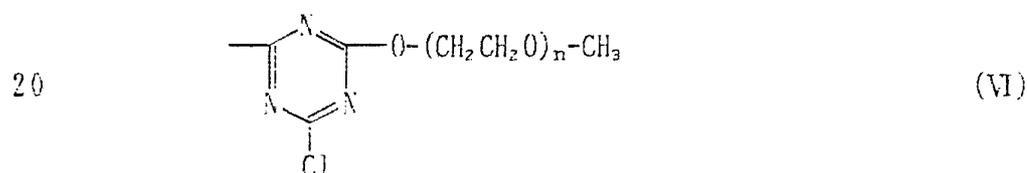
(4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体の製法が提供される。

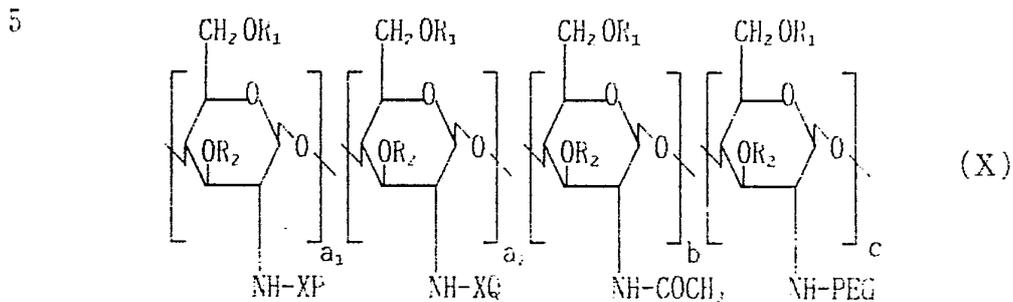
更に、本発明者は、第1の本発明に係る式(I)のN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体の性質を一層改善する研究を進めた。その結果、式(I)の誘導体の構成糖であるN-アセチルカルボキシメチルグルコサミン単位のうちの複数個を、ポリエチレングリコール鎖を含む基(以下、単にPEGと略記することがある)を2-アミノ基上に置換基として有するカルボキシメチルグルコサミン単位、詳しくは次式(A)



[式中、R₁及びR₂は前記の意味をもち、PEGは次式(VI)、(VII)、(VIII)又は(IX):-



で示される基を表わし、 n はポリエチレングリコール鎖の平均重合度を示す] で表されるカルボキシメチルグルコサミンのポリエチレングリコール置換単位の複数個と取り代えることによって、次式(X)



10 [式中、 R_1 、 R_2 、 P 、 Q 、 X は夫々に前記の式(1)におけると同じ意味をもち、PEG は上記の意味をもち、 a_1 および a_2 は夫々に 0 または正の整数を示すが、共に 0 となる場合がなく、 b および c は夫々に正の整数を示す。] で示されて且つ下記の特性値(1)~(4):-

- 15 (1) カルボキシメチル化度 : 0.5~1.2
 (2) 分子量 (ゲル濾過法) : 3,000~300,000
 (3) $a/(a+b+c)$: 0.01~1
 (ただし $a = a_1 + a_2$)
 (4) P/X (モル比) : 0.1~1

20 を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体を新規な物質として合成することに成功した。しかもこの新規な式(X)で示されるN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が式(1)のN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体それ自体に比べると増強された水溶性をもち且つ薬物の運搬用の担体として利用で

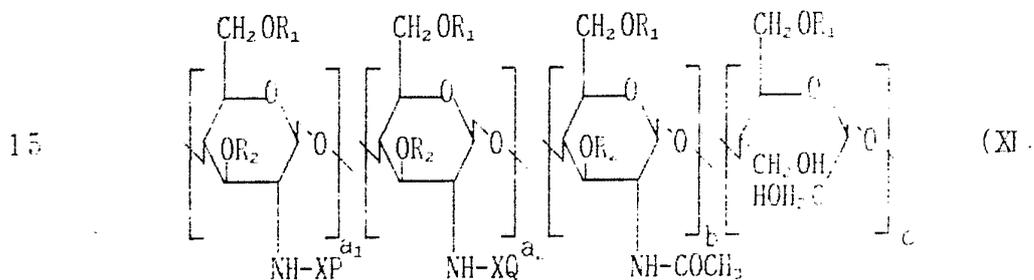
25

き、生体内に投与した後に血中に長時間滞留できることを見出した。

更にまた、本発明者らは、式(I)の誘導体の構成糖であるN-アセチルカルボキシメチルグルコサミン単位のうちの複数個を、次式(B)



10 [式中、R₁は前記と同じく水素またはカルボキシメチル基を表わす]で示されるポリオール単位の複数個と取り代えることによって、次式(XI)



20 [式中、R₁、R₂、P、Q、Xは夫々に前記の式(I)におけると同じ意味をもち、a₁およびa₂は夫々に0または正の整数を示すが、共に0となる場合がなく、bおよびcは夫々に正の整数を示す]で示されて且つ下記

25 の特性値(1)~(4)：

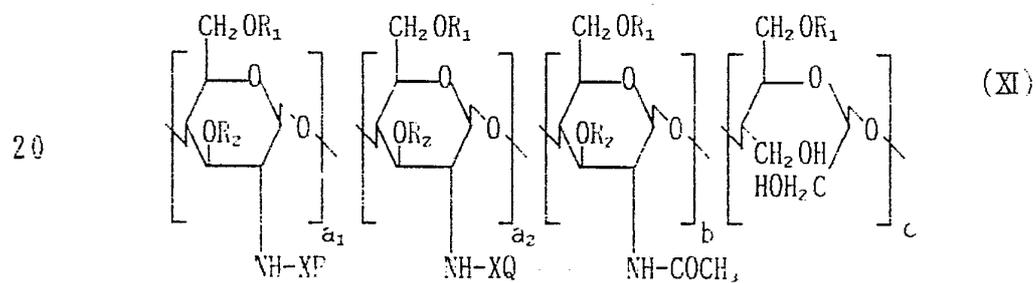
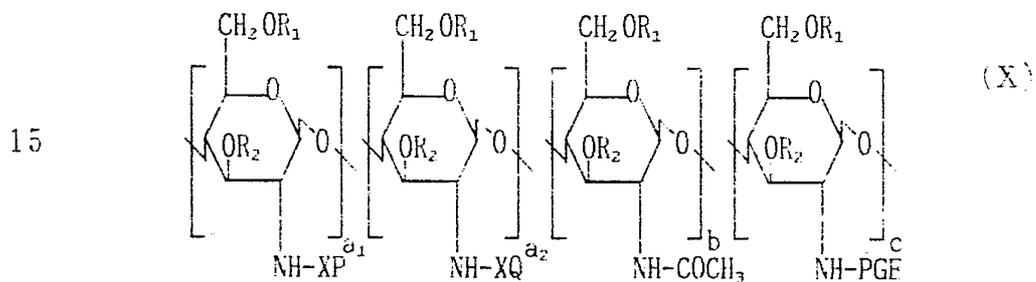
- (1) カルボキシメチル化度：0.5~1.2
- (2) 分子量(ゲル濾過法)：3,000~20,000
- (3) c/(a+b+c)：0.01~

(ただし $a = a_1 + a_2$)

(4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体を新規な物質として合成することに成功した。しかも、
 5 新規な式(XI)で示されるN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が式(I)のN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体それ自体に比べると増強された水溶性をもち且つ薬物の運搬用の担体として利用でき、生体内に投与した後に血中に長時間滞留できることを見
 10 い出した。

従って、第5の本発明においては、式(X)又は式(XI)

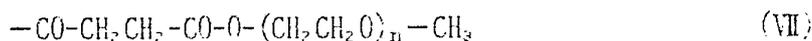
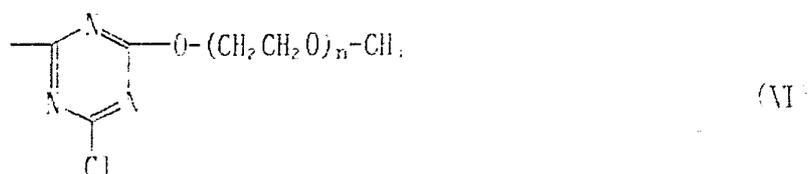


[式中、 R_1 および R_2 は夫々に H またはカルボキシメチル基、P は R_3CO 基、 R_4NH 基または R_5O 基、Q は H または OH 基、X は 1 ~ 10 個の同一または異なるアミノ酸を

25

含むペプチド鎖を意味する。なお R_3COOH はカルボン酸化合物、 R_1NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。 a_1 、 a_2 は0または正の整数を示すが、共に0となる場合を除く。 b および c は正の整数を示す。

また式(X)中で-PEGは下記の式(VI)、(VII)、(VIII)又は(IX)



の基を表わし、 n はポリエチレングリコール鎖の平均重合度を示す)によって示され且つ下記の特性値(1)~(4):

(1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.5

(2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000

(3) $a / (a + b + c)$: 0.01~1

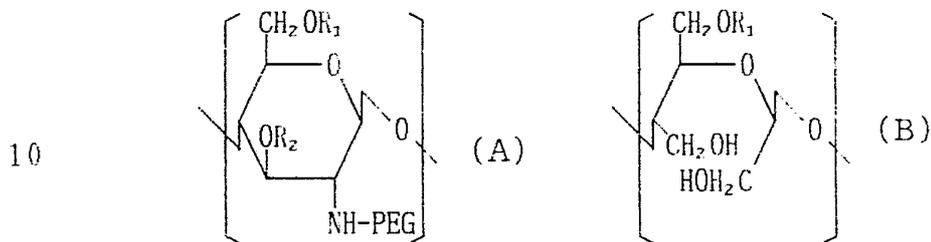
(ただし $a = a_1 + a_2$)

(4) P / X (モル比) : 0.1~1

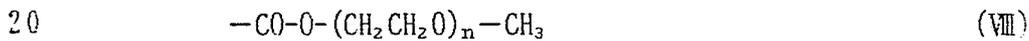
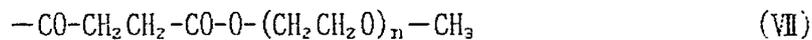
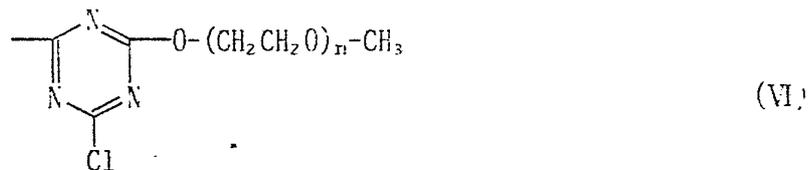
を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が提供されるものである。

第五の本発明による式(X)の誘導体は式(1)において一部の糖単位が下記の式(1)の糖単位によって

5 取代えられたN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体であり、また第5の本発明による式(XI)の誘導体は同様に下記の式(B)のポリオール単位によって取
 代えられたN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体である。後記の実施例17~21は式(X)の化合物の例を、また実施例22~23は式(XI)の化合物の例を示す。



15 式(A)の糖誘導体はカルボキシメチルグルコサミン単位の2-アミノ基がPEGによって置換された糖単位であり、ここでPEGとは具体的にはポリエチレングリコール鎖を含む下記の式(VI)~(IX)の基を表わす。



25 上記式(VI)~式(IX)に示す基に存在するポリエチレングリコール鎖は種々の分子量をもつものであることができるが、一般に入手しやすい点で好ましいポリエチレングリコール鎖は平均分子量が約5000のものである。

り、従って、式(VI)～式(IX)の基におけるポリエチレングリコール鎖の好ましい平均重合度 n は約100～120であるが、本発明はこれに限定されない。また式(X)の誘導体の中のポリエチレングリコール含量はNMR法を用いて鎖中のメチレンプロトンに基づくピーク面積の測定から求めることができ、この含量は大きいほど好ましく、例えば1% (重量) 以上であればよいが、本発明において特に限定はない。

他方、第5の本発明による式(XI)の誘導体における式(B)のポリオール単位はカルボキシメチルグルコサミン単位の2位炭素と3位炭素の間の結合が酸化によって開裂されて、その開裂後に還元によりポリアルコールの形に転化している点において化学構造上の特徴がある。

なお、第5の本発明の式(X)及び式(XI)の誘導体における $a / (a + b + c)$ 値は式(I)における $a / (a + b)$ 値に対応して定義されるペプチド化度であり、従ってその求め方は前出の式(1)をそのまま用いて行えばよく、実際上は式(2)～(5)を準用しながら式(I)におけると全く同じ要領によって算出する。その値の範囲もまた式(I)におけると同一である。同様にカルボキシメチル化度、分子量(ゲル濾過法)の範囲についても式(I)におけると同一である。

第5の本発明による式(X)の物質の製造は、式(II)によって表される「部分的N-アセチルカルボキシメチ

ルキトサン - 保護ペプチド」複合体を原料として用意して以下のごとくに処理することによって行う。まず、この式(II)の複合体中のN-アセチル化してない遊離カルボキシメチルグルコサミン単位に対し PEG活性誘導体を反応せしめてその遊離の 2-アミノ基に式(VI)~(IX)の PEG基を置換基として導入し、更に残余の遊離のカルボキシメチルグルコサミン単位はN-アセチル化し、次に複合体中の保護ペプチド部分から保護基を脱離して脱保護し、そのペプチド部分の末端へ薬物の反応活性誘導体を反応せしめて、ペプチド末端に薬物(F)を結合する。

以上の反応工程においてN-アセチル化後の諸中間体および最終物は式(X)によって示される。

上記のPEG活性誘導体とは、例えば 2-O-モノメトキシポリエチレングリコール-3,5-ジクロロ-s-トリアジン又はメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステル(例えばN-サクシンイミドエステル)でありうる。

第5の本発明による式(XI)の物質の製造は、式(X)の物質の製造と同様に式(II)によって表される「部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-保護ペプチド」複合体を原料として用意するが、その後下記に如き処理することによって行う。まずこの原料複合体中のアセチル化していない遊離カルボキシメチルグルコサミン単位に対し、例えば過ヨウ素酸を作用させて

酸化によって環の開裂を行い、更に開裂で生じたアル
デヒドを例えば水素化ホウ素ナトリウムによって還元
してポリオールに転化し、次に複合体中の保護ペ
プチドから保護基を脱離して脱保護し、そのペプチド
5 部分の末端へ薬物の反応活性誘導体を反応せしめて、
ペプチド末端に薬物(P)を結合する。以上の反応工程
においてポリオールへの転化後の諸中間体および最終
物は式(XI)によって示される。

第5の本発明による式(X)および式(XI)の物質は水
10 溶性が高く、従って第5の本発明によっては水溶性の
改善された薬物運搬担体および薬物運搬体が提供され
る。後記の実験例4によれば、例えば式(X)の物質は
血中滞留性に優れ、また薬物として制癌剤を担持した
場合に癌選択性が向上している。

15 本発明による式(I)の誘導体並びに式(X)および
式(XI)の誘導体は下記の通り有利な性質を有する。

すなわち、後記実験例によって示されるごとく、本
発明による式(I)および式(X)の誘導体は静脈注射に
よる投与後で臓器に到達するまでの時間内において血
20 中で安定であり、すなわち、これらの本発明物質の必
要な血中濃度を持続できるのであり、他方、生体内で
徐々に酵素分解を受けるので本物質のN-アセチルカル
ボキシメチルキトサン部分が長時間にわたりの体内に
残留する懸念はない。また更に式(I)の本発明誘導体
25 並びに式(X)および式(XI)の本発明誘導体が生体内で

臓器指向の傾向をもつことも観察することができる。

なお、ここで式(1)並びに式(X)および式(XI)の本
発明化合物が標的臓器に指向する傾向をもつとは、該
化合物は、本発明の手段を加えなかった場合に比べて、
5 ある特定の標的臓器での該化合物の濃度において増加
の傾向を示すことを意味するに止まっており、該特定
臓器のみに選択的に集中することまで意味するもので
はない。

以下に記載する実施例によって本発明をさらに具体
10 的に説明する。

第1～第4の本発明は実施例1～16によって例示さ
れ、第5の本発明は実施例17～23によって例示される。

なお各実施例においてゲル濾過はいづれも次の条件
で行なった。すなわちカラム：TSK-gel G4000PWXL、
15 溶出液：0.1M NaCl、流速：0.8ml/min、カラム温度
：40℃、試料の注入量：約75 μ g

実施例 1

市販(フナコシ薬品株式会社)のカルボキシメチルキ
チン(カルボキシメチル化度：糖残基当り1.0)の5.0g
20 をpH 6.0の0.05M酢酸緩衝液(500ml)に溶解後、卵白リ
ゾチーム(12.5mg)を加え、37℃で2時間反応させた。
反応液をエタノール(2 ℓ)中に加えて析出した沈殿物
を集め、真空乾燥して、4.25gの低分子化カルボキシ
メチルキチンを得た。この物質(3.9g)を1N NaOH水溶
25 液(390ml)に溶解後、100℃で6時間加熱還流した。反

応液のpHを8に調整した後、遠心分離して得られる上清をメタノール(1.9ℓ)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、式(Ⅲ)の物質の一例としての1.91gの部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(以下、単に多糖と言うこともある)を得た。この多糖物質の分子量は、デキストランを標準物質としたゲル濾過法(G4000PWXLカラム)で約 1×10^5 であった。

上記の多糖物質(200mg)を0.5% NaHCO₃水溶液(20ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(17.5ml)を加えて均一な多糖溶液とした。他方、tert-ブトキシカルボニル基(Boc)で保護されたペプチド、N-Boc-Phe-Phe-Gly-OH(94mg)を1.5mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(23mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(37mg)を加え、4℃で24時間反応させて活性エステルとした。この反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4℃で16時間反応させた。反応液をエタノール(160ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、200mgの部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体〔式(Ⅱ)の誘導体の一例である〕を得た。

本複合体(150mg)を飽和NaHCO₃水溶液(15ml)に溶解後、無水酢酸(0.6ml)を加えて、室温で17時間N-アセチル化反応を行った。反応液を中和後、エタノール(80ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、154mgのN-アセチルカルボキシメチルキトサン

-Gly-Phe-Phe-Boc複合体〔式(1)の誘導体の一例である〕を得た。本複合体の紫外吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、添付図面の第1図と第2図に示す。本複合体のN-Bocペプチド含量は、紫外部
5 (258nm)の吸光度分析から、14.1%(重量%)であった。

本複合体(130mg)を0.5N HCl(13ml)に溶解後、30℃で17時間反応させてBocの脱離のための脱保護処理した。反応液を中和後、エタノール(70ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、121mgのN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-H複合体
10 〔式(1)の誘導体の別例である〕を得た。本複合体の紫外吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、添付図面の第3図と第4図に示す。本複合体のペプチド含量は、紫外部(258nm)の吸光度分析から、11.3%
15 (重量%)であった。

カルボン酸型の医薬化合物としての182mgのメトトレキサート(MTX)をジメチルホルムアミド(4ml)に溶解後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(82mg)を加え、4℃で17時間反応させ、その反応液にN-ヒドロキシスクシンイミド(46mg)とピリジン(63 μ l)を加え、
20 室温で5時間反応させてMTXの活性エステルを調製した。他方、上記のN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-H複合体(50mg)を0.5% NaHCO₃水溶液(10ml)に溶解後、上記のMTXの活性エステルを含む反応液の0.5mlを加えて、4℃で15時間反応させて該複

25

合体のペプチド鎖のN末端へMTXを結合させた。得られた反応液をエタノール(40ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、53mgのN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体〔式(1)の複合体の更に別の一例である〕を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、添付図面の第5図と第6図に示す。本複合体のMTX含量は、紫外部(307nm)の吸光度分析から、11.5%(重量%)であった。また、本複合体におけるP/Xのモル比、すなわち具体的にはMTX/ペプチド(モル比)は、前出の計算式の(5)式に従って、0.93と算出された。

また、本複合体について、式(1)における $a/(a+b)$ 値は、前出の計算式の(1)式に従って、0.69と概算された。

実施例 2

実施例1で得た部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(100mg)を1%NaHCO₃水溶液(10ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(6ml)を加えて均一な多糖溶液とした。p-メトキシベンジルオキシカルボニル基(pMZ)で保護されたペプチドpMZ-Gly-Gly-Gly-OH(141mg)を4mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(46mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(74mg)を加え、室温で3時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液(10)

量を上記の多糖溶液に加え、10mlのジメチルホルムアミドを追加した後、4℃で23時間反応させた。反応液に5mlの水を加えた後、遠心分離した得られる上清をエタノール(150ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、
5 真空乾燥して、120mgの部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-pMZ複合体〔式(II)の誘導体の一例である〕を得た。

この複合体(100mg)を実施例1に準じて、無水酢酸でN-アセチル化を行い、N-アセチルカルボキシメチル
10 キトサン-Gly-Gly-Gly-pMZ複合体(97mg)を得た。本複合体の紫外部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、第7図と第8図に示す。本複合体のpMZ-ペプチド含量は、紫外部(272nm)の吸光度分析から、20.1%(重量%)であった。

15 本複合体(89mg)を実施例1に準じて酸処理により保護基pMZの脱離を行って、78mgの N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-H複合体を得た。この複合体の紫外部吸収スペクトルを第9図に示す。本複合体のペプチド含量(B)は、(3)式に従って、11.3%と
20 算出された。

本複合体(50mg)を1%NaHCO₃水溶液(5ml)に溶解後、その溶液に実施例1と同様にして作成したMTXの活性エステル溶液(1ml)を加え、4℃で21時間反応させた。反応液をエタノール(25ml)中に加えて析出した沈殿物
25 を集め、真空乾燥して、式(1)の複合体の一例として、

52mgのN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、第10図と第11図に示す。本複合体のMTX含量は、
5 紫外部(307nm)の吸光度分析から、21.4% (重量%)であった。また、本複合体におけるP/Xモル比、すなわち具体的にはMTX/ペプチド(モル比)は、(5)式に従って、1.0と算出された。本複合体について、式(1)における $a/(a+b)$ 値は、(1)式に従って、0.2と算出された。
10 た。

実施例 3

実施例 1 と同様に、カルボキシメチルキチン(カルボキシメチル化度：糖残基当り1.0)の5.0gに卵白リゾチームを作用させて得られた低分子化カルボキシメチルキチン(4.28g)の 4.1gをアルカリ処理して、分子量が約 1×10^5 の部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(2.22g)を得た。
15

本物質(200mg)に、実施例 1 と同様の方法で、N-Boc-Gly-Phe-Gly-Gly-OH (90mg)の活性エステルを作用させ、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(210mg)を得た後、この200mgをN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(190mg)を得た。本複合体のN-Boc-ペプチド含量は、紫外部(258nm)の吸光度分析から、6.8% (重量%)であった。
20
25

実施例 1 と同様の方法で、この複合体 (160mg) を脱保護のため酸処理して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-H複合体 (144mg、ペプチド含量: 7.6%) を得た。

5 この 120mg に MTX (55mg) の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン -Gly-Gly-Phe-Gly-MTX 複合体 (127mg、MTX 含量: 9.5%) を得た。本複合体の MTX/ペプチド (モル比) と式 (I) における $a/(a+b)$ は、各々、(5) 式と (1) 式から、1.6、0.07 と
10 算出された。

実施例 4

実施例 3 で得た部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン (200mg) に、実施例 1 と同様の方法で、N-Boc-Gly-Phe-Gly-Phe-OH (105mg) の活性エステルを作用させ、部分的 N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Phe-Gly-Phe-Gly-Boc 複合体 (199mg) を得た。

この 188mg を N-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Phe-Gly-Phe-Gly-Boc 複合体 (191mg) を得た。本複合体の N-Boc-ペプチド含量は、紫外部 (258nm) の吸光度分析から、4.9% (重量%) であった。
20 実施例 1 と同様の方法で、この複合体 (160mg) を酸処理により脱保護して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Phe-Gly-Phe-Gly-H 複合体 (150mg、ペプチド含量: 4.0%) を得た後、この 50mg に MTX (23mg) の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキ
25

トサン-Phe-Gly-Phe-Gly-MTX複合体 (46mg、MTX含量：4.5%)を得た。本複合体のMTX/ペプチド(モル比)と式(1)における $a/(a+b)$ 値は、各々、(5)式と(1)式から1.1、0.03と算出された。

5 実施例 5

実施例 3 で得た部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(100mg)に、実施例 1 と同様の方法で、N-Boc-Phe-Gly-Phe-Gly-OH (54mg)の活性エステルを作用させ、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-Boc複合体(109mg)を得た。

この90mgをN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-Boc複合体(85mg)を得た。本複合体のN-Boc-ペプチド含量は、紫外部(258nm)の吸光度分析から、12.7%(重量%)であった。

15 実施例 1 と同様の方法で、この複合体(72mg)を酸処理により脱保護して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-H複合体(63mg、ペプチド含量：10.4%)を得た。

この50mgにMTX(23mg)の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-MTX複合体(49mg、MTX含量：9.4%)を得た。本複合体のMTX/ペプチド(モル比)と式(1)における $a/(a+b)$ は、各々、(5)式と(1)式から0.94、0.07と算出された。

25 実施例 6

実施例 3 で得た部分的 Λ -アセチルカルボキシメチル
キトサン (200mg) に、実施例 1 と同様の方法で、 Λ -Boc-
-Ala-Gly-Gly-Gly-OH (180mg) の活性エステルを作用させ、部分的 Λ -アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-
5 -Gly-Gly-Ala-Boc 複合体 (218mg) を得た後、この 150mg
を Λ -アセチル化して、 Λ -アセチルカルボキシメチルキ
トサン-Gly-Gly-Gly-Ala-Boc 複合体 (143mg) を得た。
実施例 1 と同様の方法で、この複合体 (130mg) を酸処
理して、 Λ -アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-
10 Gly-Gly-Ala-H 複合体 (120mg) を得た。

この 50mg に MTX (46mg) の活性エステルを作用させて、
 Λ -アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-
Ala-MTX 複合体 (55mg、MTX 含量: 21.5%) を得た。本複
合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パ
15 ターンを各々、第 12 図、第 13 図に示す。

実施例 7

カルボキシメチルキチン (カルボキシメチル化度:
糖残基当り 0.7) を用いて、実施例 1 に準じて調製した、
分子量が約 1×10^5 の部分的 Λ -アセチルカルボキシメ
20 チルキトサン (45mg) を、0.1M ほう酸緩衝液 (pH 8.0)
(2ml) に溶かして多糖の溶液を作る。他方 Λ -スクシニ
ル-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリド (45mg) をジメチル
ホルムアミド (2ml) に溶解後、 Λ -ヒドロキシスクシニ
イミド (12mg)、 Λ , Λ' -ジシクロヘキシルカルボジノミ
25 ド (41mg) を加え、室温で 1 時間、その後 4℃ で 18 時間

反応させてニトロアニリド成分と結合されたペプチドの活性エステルを調製した。この反応液の溶媒を減圧留去し、残渣をイソプロパノールで洗った後、ジメチルホルムアミド(0.8ml)に溶かした。これを上記の多糖溶液に加え、室温にて40時間反応させた。反応液にエタノールを加えて、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、46mgの部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリド複合体を得た。

10 さらに本複合体(26mg)を取り、飽和NaHCO₃水溶液(5ml)に溶解後、無水酢酸(0.14ml)を加えて、4℃で24時間反応させてN-アセチル化した。反応液を外液を水として透析した後、エタノール中に加えて、析出した沈殿物を真空乾燥し、N-アセチルカルボキシメチルキト

15 サン-Suc-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリド複合体(25mg)を得た。本複合体の紫外部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、第14図と第15図に示す。本複合体の-Suc-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリド含量は、315nmの吸光度分析から、3.9%(重量%)であった。

20 実施例 8

実施例 7と同様の方法で、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(45mg)にN-スクシニル-Ala-Ala-Val-Ala-p-ニトロアニリド(55mg)の活性エステルを用させ、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン

25 -Suc-Ala-Ala-Val-Ala-p-ニトロアニリド複合体(44mg

を得た。

さらに、この30mgを用いて、実施例7と同様の方法
でN-アセチル化を行ない、N-アセチルカルボキシメチ
ルキトサン-Suc-Ala-Ala-Val-Ala-p- ニトロアニリド
5 複合体(22mg)を得た。本複合体の-Suc-Ala-Ala-Val-
Ala-p-ニトロアニリド含量は、215nmの吸光度から、
4.5%(重量%)であった。

実施例9

実施例1で得た部分的N-アセチルカルボキシメチル
10 キトサン(50mg)を0.25%NaHCO₃水溶液(7ml)に溶解後、
ジメチルホルムアミド(6ml)を加えて均一な多糖の溶
液とした。別に、保護基Bocで保護されたフェニルア
ラニン N-Boc-Phe-OH(265mg)を3mlのジメチルホルム
アミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(115mg)
15 とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(190mg)を加
え、4℃で20時間反応させて活性エステルとした。こ
の活性エステルを含む反応液の1mlを上記の多糖溶液
に加え、室温で20時間反応させた。反応液をエタノー
ル(35ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥
20 して51mgの部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサ
ン-Phe-Boc複合体を得た。本複合体のN-Boc-フェニル
アラニン(Phe-Boc)含量は紫外部(258nm)の吸光度測定
から14.4%(重量%)であった。

実施例10

25 実施例3に示した低分子化カルボキシメチルキトサン

(4.1 g)をアルカリ処理して得た反応液をpH8.5に調整した。その後、その反応液を遠心分離して得られる上清を4.4倍量のメタノール中に加え、析出した沈殿物と上清に分離した。この上清にエタノール(300ml)を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、分子量が約 2×10^4 の部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(0.54g)を得た。

本物質(100mg)に、実施例1と同様の方法で、保護ペプチドN-Boc-Phe-Gly-Phe-Gly-OH(217mg)を作用させ、次いで無水酢酸でN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-Boc複合体(98mg、N-Boc-ペプチド含量：28%)を得た。この複合体(80mg)を実施例1と同様の方法で酸処理により脱保護して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-H複合体(46mg、ペプチド含量：24%)を得た。

この複合体の35mgにメトトレキサート(MTX)(69mg)の活性エステルを実施例1と同様に作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Gly-Phe-MTX複合体(35mg、MTX含量：19%)を得た。本複合体のMTX/ペプチド(モル比)と式(1)における $a/(a+b)$ は、各々、前出の計算式の(5)式と(1)式から0.92、0.19と算出された。

実施例11

実施例10に示した、分子量が約 2×10^4 の部分的N-

アセチルカルボキシメチルキトサン(50mg)を水(1.25 ml)-ジメチルスルホキシド(1.25ml)-ジメチルホルムアミド(8 ml)の混液に溶解後、実施例1と同様の方法で、 ϵ -N-Boc-O-tBu (169mg)の活性エステルを作用させて部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Gly-Phe-Gly-Lys (ϵ -N-Boc)-O-tBu複合体を得た。次いでN-アセチル化と酸処理による脱保護を行ない、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Gly-Phe-Gly-Lys-H複合体(47 mg)を得た。

この複合体(35mg)に、メトトレキサート(MTX)(23mg)の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体(29 mg、MTX含量：1.5%)を得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、第20図、第21図に示す。

実施例12

実施例1と同様の方法で、カルボキシメチルキチン(カルボキシメチル化度：糖残基当たり0.7)5.0gに卵白リゾチーム25mgを作用させて低分子化カルボキシメチルキチン(4.37g)を得た。この3.7gをアルカリ処理により部分的に脱アセチル化して、分子量約 1×10^5 (デキストラン標準)の部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(2.58g)を得た。

この部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン

(300mg)に、実施例1と同様の方法で、N-Boc-Phe-Gly-
-OH(141mg)の活性エステル(N-ヒドロキシスクシンイ
ミドエステル)を作用させて、部分的N-アセチルカル
ボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(340mg)
5 を得た。この300mgを無水酢酸でN-アセチル化して、N
-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-
Boc複合体(298mg、N-Boc-ペプチド含量：12.0%)得た。

この複合体(100mg)を、実施例1と同様の方法で、
酸処理により脱保護(Boc基の脱離)し、N-アセチルカ
10 ルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-H複合体(89mg)
を得た。

この複合体(75mg)を1% NaHCO₃水溶液(7.5ml)に溶
解し、メトトレキサート(MTX)(75mg)の活性エステル
を加えて、4℃で24時間反応して複合体のペプチドの
15 N末端へMTXを結合させた。反応液をエタノール(40ml)
中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、N-
アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX
複合体(75mg、MTX含量：10.1重量%)を黄色粉末とし
て得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲ
20 ル濾過溶出パターンを各々、第22図、第23図に示す。

実施例13

カルボキシメチルキチン(カルボキシメチル化度：
0.7)2.0gをpH6.0の0.05M酢酸緩衝液(200ml)に溶解し、
卵白リゾチーム(2.5mg)を加えて、37℃で1時間30分
25 反応して低分子化させ、更に実施例1と同様に1% NaCl

Hで処理して、分子量約 3×10^5 (デキストラン標準) の部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(1.72g)を得た。本物質(150mg)を0.5% NaHCO₃水溶液(15ml)に溶解し、実施例1と同様の方法で、N-Boc-Ala-Gly-Gly-Gly-OH(135mg)の活性エステルを作用させて部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-Boc複合体(150mg)を得た。その140mgを無水酢酸でN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-Boc複合体(154mg)を得た。更に、その130mgを酸処理によりBoc基を脱保護し、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-H複合体(106mg)を得た。この複合体(95mg)を1% NaHCO₃水溶液(4.8ml)に溶解し、MTX(86mg)の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-MTX複合体(88mg、MTX含量：13.7%)を得た。

実施例14

実施例12で得た部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(150mg)に、実施例1と同様の方法で、N-Boc-Gly-Gly-Gly-OH(109mg)の活性エステルを作用させて、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体(167mg)を得た。この150mgを無水酢酸でN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体(153mg)を得た。更に、その130mgを酸処理によりBoc基を脱離して、N-アセチ

ルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-H複合体
(110mg)を得た。この100mgにMTX(90mg)の活性エステ
ルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサ
ン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体(111mg、MTX含量：17.4重
5 量%)を得た。

実施例15

実施例12で得た部分的N-アセチルカルボキシメチル
キトサン(150mg)に、実施例iと同様の方法で、N-Boc
-Ala-Gly-Gly-Gly-OH(135mg)の活性エステルを作用
10 させて、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサ
ン-Gly-Gly-Gly-Ala-Boc複合体(162mg)を得た。この150
mgを無水酢酸でN-アセチル化して、N-アセチルカルボ
キシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-Boc複合体(157
mg)を得た。更に、その130mgを酸処理によりBoc基を
15 脱離して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly
-Gly-Gly-Ala-H複合体(114mg)を得た。この100mgに
MTX(90mg)の活性エステルを作用させて、N-アセチル
カルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ala-MTX複合
体(111mg、MTX含量：17.4重量%)を得た。

実施例16

実施例12で得た部分的N-アセチルカルボキシメチル
キトサン(200mg)に、実施例1と同様の方法で、N-Boc
-Gly-Phe-Gly-Gly-OH(87mg)の活性エステルを作用
させて、部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサ
ン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(206mg)を得た。この100
25

mgを無水酢酸でN-アセチル化して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(92mg、N-Boc-ペプチド含量：7.4%)を得た。更に、その80mgを酸処理によりBoc基を脱離して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-H複合体(71mg)を得た。この50mgにMTX(45mg)の活性エステルを作用させて、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-MTX複合体(50mg、MTX含量：7.0%)を得た。

10 実施例17

実施例12で得た部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(カルボキシメチル化度：0.7、N-Boc-ペプチド含量：13.2%)の50mgを0.1% NaHCO₃水溶液(2.5ml)に溶解し、2-0-モノメトキシポリエチレングリコール-3,5-ジクロロ-s-トリアジン(分子量5000、シグマ社製)(以下、PEG₁と略記)(80mg)を加えて、0℃で4時間反応した。生成された部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-Boc複合体を含む反応液に水(2.5ml)、炭酸水素ナトリウム(500mg)、無水酢酸(200μl)を加え、4℃で18時間反応してN-アセチル化した。反応液を水に対して透析し、透析内液を3mlに濃縮し、アセトン(90ml)を加えて析出した沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空乾燥して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(72mg、PEG

含量：37%)を得た。

この複合体(60mg)を0.5N HCl(3.5ml)に溶解し、30℃で16時間反応してBoc基を脱離し、反応液をエタノール-エーテル(1:2)の混合溶媒(60ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空乾燥して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(44mg、PEG含量：26%)を得た。本複合体のゲル濾過溶出パターンを第24図に示す。N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(35mg)を1% NaHCO₃水溶液(1.75ml)に溶解し、MTX(16mg)の活性エステルを加え、4℃で18時間反応した。反応液を水に対して透析し、透析内液を3mlに濃縮し、アセトン(60ml)を加えて析出した沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空乾燥して、式(X)の誘導体の一例として、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-MTX複合体(29mg、PEG含量：21%、MTX含量：7.9%)を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々第25図、第26図に示す。

20 実施例18

実施例12で得た部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(カルボキシメチル化度：0.7、N-Boc-ペプチド含量：13.2%)の50mgを0.1% NaHCO₃水溶液(2.5ml)に溶解し、実施例17で用いたPEG₁(12mg)を加えて、実施例17と同様の方法で、

N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-Boc複合体 (49mg、PEG含量：8.0%)を得、この40mgを用い、Boc基を脱保護して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(33mg)を得た。N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(21mg)を1% NaHCO₃水溶液(1.1ml)に溶解し、MTX(9.5mg)の活性エステルを加えて、4℃で18時間反応した。反応液をエタノール(11ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空乾燥して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-MTX複合体(17mg、PEG含量：6.1%、MTX含量：8.5%)を得た。

実施例19

実施例12に準じて合成した部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(カルボキシメチル化度：0.7、N-Boc-ペプチド含量：14.8%)の50mgを0.1% NaHCO₃水溶液(5ml)に溶解し、PEG₁(200mg)を加えて、実施例17と同様の方法で、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(100mg、PEG含量：58%)を得た。この90mgを用いて、そのBoc基を脱離して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(67mg、PEG含量：45%)を得た。N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-H複合体(50mg)を用いて、実施例17と同様にしてMTXの活性エステルと反応させ

て、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Phe-Phe-MTX複合体 (42mg、PEG含量：43%、MTX含量：6.3%)を得た。

実施例20

5 実施例16に準じて合成した部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(カルボキシメチル化度：0.7、N-Boc-ペプチド含量：7.9%)の25mgを0.1% NaHCO₃水溶液(1.25ml)に溶解し、PEG₁(50mg)を加えて、実施例17と同様の方法で、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体(42mg、PEG含量：42%)を得た。この30mgを用いて、そのBoc基を脱離して、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Gly-Phe-Gly-H複合体(20mg)を得た。N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Gly-Phe-Gly-H複合体(15mg)を用いて、実施例17と同様にしてMTXの活性エステルと反応させ、N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₁-Gly-Gly-Phe-Gly-MTX複合体(11mg、PEG含量：27%、MTX含量：6.1%)を得た。

20 実施例21

実施例12に準じて合成した部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(カルボキシメチル化度：0.7、N-Boc-ペプチド含量：14.8%)の100mgを0.5% NaHCO₃水溶液(10ml)に溶解し、ジメチルホルムアミド(8.5ml)を加えて均一な溶液とした

この溶液に、メトキシポリオキシエチレンカルボン酸
(分子量：5000、シグマ社製) (以下、PEG_{co}と略記)の
100mgの活性エステルを加えて、4℃で18時間反応さ
せて前記の複合体の糖単位のN-アセチル化されていな
いアミノ基へPEG_{co}を結合させた。反応液を水に対し
て透析し、透析内液(27ml)に炭酸水素ナトリウム(3.6
g)、無水酢酸(2.1ml)を加えて、4℃で20時間反応し
て部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG_{co}-
-Gly-Phe-Phe-Boc複合体をN-アセチル化した。反応液
を水に対して透析し、透析内液を6mlに濃縮し、アセ
トン(120ml)を加えて析出した沈殿物を集め、塩化メ
チレンで洗浄し、真空乾燥して、N-アセチルカルボキ
シメチルキトサン-PEG_{co}-Gly-Phe-Phe-Boc複合体(109
mg、PEG含量：9.0%)を得た。この50mgを用い、酸処
理によりそのBoc基を脱離して、N-アセチルカルボ
キシメチルキトサン-PEG_{co}-Gly-Phe-Phe-H複合体
(35mg、PEG含量：4.7%)を得た。N-アセチルカルボキ
シメチルキトサン-PEG_{co}-Gly-Phe-Phe-H複合体(25mg)
を用いて、実施例18と同様にして、MTXの活性エステ
ルを反応させ、N-アセチルカルボキシメチルキトサン
-PEG_{co}-Gly-Phe-Phe-MTX複合体(25mg、PEG含量：4.5
%、MTX含量：9.1%)を得た。

実施例22

実施例1と同様の方法で調製した部分的N-アセチル
カルボキシメチルキトサン(300mg)に、実施例1と同

様の方法でN-Boc-Gly-Gly-Gly-OH(289mg)の活性エステルを作用させて部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体(334mg)を得た。

この125mgを水(12ml)に溶解し、3.3%メタ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液(5ml)を加えて、遮光下、室温で4時間反応させた。この反応液を水に対して透析後、透析内液を約12mlまで濃縮し、水素化ホウ素ナトリウム(30mg)を加えて、一晩反応させた。この反応液のpHを4.5に下げた後、8.0に上げ、次いでエタノール(60ml)中に加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、一部のピラノース環が開環してポリオール化したN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体(77mg)を得た。

この複合体(60mg)を実施例1と同様の方法で酸処理して、Boc基を脱離させ、ポリオール化N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-H複合体(46mg)を得た。この複合体(35mg)にMTX(46mg)の活性エステルを作用させて、ポリオール化N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体(42mg、MTX含量：29%)を得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲル濾過溶出パターンを各々、第27図、第28図に示す。

実施例23

実施例1と同様の方法で調製した部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン(250mg)に、実施例1と同

様の方法でN-Boc-Gly-Phe-Phe-Gly-OH(527mg)の活性
エステルを作用させて部分的N-アセチルカルボキシメ
チルキトサン-Gly-Phe-Phe-Gly-Boc複合体(327mg)を
得た。この複合体(200mg)を実施例22と同様の方法で、
5 過ヨウ素酸で酸化し、次いで還元して、ポリオール化
N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe
-Gly-Boc複合体(113mg、N-Boc-ペプチド含量：28%)
を得た。

この複合体(60mg)を実施例1と同様の方法で酸処理
10 して、Boc基を脱離し、ポリオール化N-アセチルカル
ボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Gly-H複合体(36
mg、ペプチド含量：24%)を得た。この30mgにMTX(55
mg)の活性エステルを作用させて、ポリオール化N-ア
セチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Gly
15 -MTX複合体(22mg、MTX含量：19%)を得た。本複合体
のMTX/ペプチド(モル比)と式(XI)における $a/(a+b+c)$
は、各々、前出の計算式の(5)式と(1)式から0.93、
0.19と算出された。

以下に記載する実験例1～4によって本発明の式
20 (I)、式(X)および式(XI)の誘導体の諸性質を試験し
た。

実験例1

[試料と方法]

実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキ
25 トサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体と実施例2で得られた

N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX 複合体を夫々に生理食塩水に溶解して、400 μ g/ml の試料溶液 2 種を準備した。マウス数匹より採取した血液を遠心分離して得られた血漿(190 μ l)に、上記の各試料溶液 (10 μ l) を加え、37 $^{\circ}$ C で反応させた。経時的に反応液を取り、除蛋白した後、ゲル濾過法(カラム: TSK-gel G4000PW_{XL}、溶出液: 0.1M NaCl、流速: 0.8ml/min、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、検出: 307nmにおける紫外吸収)で分析することにより、複合体として存在している MTX の血漿中での残存%を求めた

[結果]

結果を第16図に示す。第16図は式(1)で表わされる複合体として存在している MTX の血漿中での残存パーセントの経時変化を示すグラフである。図中で●印線はN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体、□印線はN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体についての結果を示す。

第16図より、上記2種のいずれの複合体も血液中で殆ど分解を受けず、安定であることが認められる。

20 実験例 2

[試料と方法]

実施例 1 で得られた N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX 複合体 (1 mg) と実施例 2 で得られた N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX 複合体 (1 mg) を夫々に卵白リゾチーム (10 μ g)

の存在下および非存在下で0.1M酢酸緩衝液(pH6.0、1 ml)中37℃で反応させ、1、3、6および13時間後の反応液を実験例1記載と同じゲル濾過法により分析することにより、N-アセチルカルボキシメチルキトサンが分解を受けて複合体が低分子化する結果としての溶出時間(ゲル濾過における)の延長を求めた。

〔結果〕

結果を第17図に示す。第17図は反応時間とその反応時間での反応液においてピークの溶出が現われる溶出時間との関係を示すグラフである。図中で○印線および●印線はN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体についてリゾチームが存在しない場合およびリゾチームが存在する場合におけるそれぞれの結果を示し、また□印線および■印線はN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体についてリゾチームが存在しない場合およびリゾチームが存在する場合におけるそれぞれの結果を示す。

第17図より、リゾチームの作用により上記の複合体のN-アセチルカルボキシメチルキトサン部分が分解を受け、その結果、いずれの複合体も低分子化することが認められるので、複合体が長時間にわたり体内に残留することは起らないことが期待される。

実験例3

〔試料〕

MTX部分が可逆的に結合している実施例2のN-アセチル

カルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体を
検体試料の化合物とした。別に調製した実施例
の工程途中で得られた部分的N-アセチルカルボキシメ
チルキトサンを対照試料として用意した。

5 〔方 法〕

ICR系の雄性マウスにSarcoma 180を皮下に植え込み、
10日後の担癌マウスを実験に用いた。試料を生理食塩
水に溶解し、各3群匹のマウスを用い、尾静脈より20
mg/kgを投与した。投与後15分、30分、1時間、2時
10 間、6時間および24時間に大腿動脈および静脈を切断
し、血液を採取した。血液を遠心分離して得られた血
清と癌組織の放射活性を燃焼法により測定し、血清と
癌組織中での試料化合物濃度を求めた。

〔結 果〕

15 結果を第18図、第19図に示す。第18図は試料化合物
の血清中濃度の経時変化を示すグラフであり、第19図
は癌組織での試料化合物の濃度の経時変化を示すグラ
フである。共に図中の□印線は対照試料についての結
果を、●印線は上記の検体試料についての結果を表す。

20 第18図により、上記検体試料はペプチド鎖を介して
MTXを多糖体（N-アセチルカルボキシメチルキトサン）
に結合した複合体であり、従ってこのような複合体は
血中消失が速いと予想されるにもかかわらず、実際には
結合させる以前の単なる多糖体すなわちN-アセチル
25 カルボキシメチルキトサンそれ自体と比較して上記

の複合体の形の検体試料化合物の血中滞留性は同程度
またはそれ以上に増加していることが認められる。ま
た第19図より、上記検体試料は上記の単なる多糖体と
比較してみるとペプチド鎖を具有することにより癌組
織に集合しやすい性質を新たに獲得していることが認
められる。従って、式(1)の本発明物質において適切
なペプチド鎖(-X-)を選択することにより式(1)の本
発明物質に臓器指向の傾向を具備させることができる
実験例4

10 本実験例では、式(X)の本発明物質の数例を試料と
して用いて、下記の実験を行った。

すなわち、MTX部分が³Hラベルしている実施例18、
実施例17、実施例19の最終生成物としての複合体（そ
れぞれの複合体のポリエチレングリコール(PEG)含量
が6%、21%、43%)を検体1、検体2、検体3のた
めのラベル化合物として用意した。別に、PEGを欠除
された形の但しMTX部分を³Hラベルした複合体を対照
のためのラベル化合物として用意した。検体1、検体
2、検体3の複合体及び対照の複合体の全てにおいて、
複合体のカルボキシメチルグルコサミン単位の2-アミ
ノ基に結合されたペプチド鎖はいずれもGly-Phe-Phe
であり、検体1、検体2、検体3におけるPEGはいず
れも実施例17に記載されたPEG₁(分子量5000)である

(試験方法)

25 ウェスター系の雌性ラットに癌細胞ウエーカー 251

を鼠径部皮下に移植し、移植6日後の担癌マウスを実験に用いた。試料投与液は³Hラベルした複合体を、対応する非放射性の複合体を溶解した生理食塩水溶液で適宜希釈して用意し、複合体として10 μ g/kgの投与量となるように1群3匹のラットの頸静脈内に試料を投与した。

エーテル麻酔下に頸静脈より経時的(30分、1時間、2時間、4時間および6時間)に採血を行い血漿を分離した。投与後24時間にエーテル麻酔下に採血を行い放血死させた。組織および臓器を採取し、全体および一部を秤量後、放射能を測定した。

なお、採取された測定組織中の放射能は、コンバストコーンに採取したサンプルを乾燥後、自動試料燃焼装置(ASC-113、ALOKA)にて燃焼させた後、シンチレーター(AQUASOL-2, NEN)を加えて、液体シンチレーションカウンター(LSC-3600, ALOKA)にて測定し、外部標準線源法により補正した。

(試験結果)

試験結果を添付図面の第29図、第30図および後記の表1に示す。第29図は投与後24時間までの各試料についての血漿中濃度の経時変化を示すグラフであり、第30図は各試料について投与量に対する組織中濃度の体内分布を示すグラフであり、表1は各試料について第29図に基づいて求めたAUC値および各試料についての投与量に対する腫瘍中濃度を示す表である。

第29図より示されるごとく、PEGの導入量が多い程複合体の血中滞留性は優れており、これを表1のAUC値によって示すと、対照に対して検体1(PEG導入量6%)は約1.3倍、検体2(PEG導入量21%)および検体3(PEG導入量43%)は約3倍にも増大していることが判る。

また第30図より示されるごとく、腫瘍組織以外の臓器ではPEG導入量による顕著な差は認められないのに対し、腫瘍組織ではPEG導入量によって腫瘍中濃度が着実に高くなっているのが認められ、具体的には表1の腫瘍中濃度の値によって示されるごとくである。すなわちN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体においてPEGが導入された場合には、癌組織を認識する傾向が現われるようになり、従って制癌剤の必要投与量を少量化することができ、その結果、他の臓器への好ましくない影響を低減することが可能となる。

表1

試料	血漿AUC _{0-∞}	腫瘍
	(% of dose·hr/ml)	(% of dose/g at 24hr)
対照	15.83	0.18
検体1	20.85	0.22
検体2	46.26	0.35
検体3	45.52	0.44

図面の簡単な説明

添付図面について、

第1図：本発明の実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Hoc複合体の紫外外部吸収スペクトル(濃度：1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：30% EtOH)を示す。

5 第2図：本発明の実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-Hoc複合体のゲル濾過溶出パターン(検出：258nmにおける紫外外部吸収)を示す。

10 第3図：本発明の実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-H複合体の紫外外部吸収スペクトル(濃度：1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：30% EtOH)を示す。

15 第4図：本発明の実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-H複合体のゲル濾過溶出パターン(検出：258nmにおける紫外外部吸収)を示す。

20 第5図：本発明の実施例1で最終生成物として得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：0.1% NaHCO₃)を示す。

25 第6図：本発明の実施例1で最終生成物として得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体のゲル濾過溶出パターン(検出：258nmにおける紫外外部吸収)を示す。

30 第7図：本発明の実施例1で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：0.1% NaHCO₃)を示す。

ルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-pMZ複合体の紫
外部吸収スペクトル(濃度: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溶媒: 水)を示
す。

5 第8図: 本発明の実施例2で得られたN-アセチルカ
ルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-pMZ複合体のゲ
ル濾過溶出パターン(検出: 272nmにおける紫外部吸収
を示す)。

10 第9図: 本発明の実施例2で得られたN-アセチルカ
ルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-H複合体の紫
外部吸収スペクトル(濃度: 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溶媒: 水)を示
す。

15 第10図: 本発明の実施例2で最終生成物として得ら
れたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-
Gly-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度:
48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溶媒: 0.1% NaHCO₃)を示す。

第11図: 本発明の実施例2で最終生成物として得ら
れたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-
Gly-MTX複合体のゲル濾過溶出パターン(検出: 277nm
における紫外部吸収)を示す。

20 第12図: 本発明の実施例6で得られたN-アセチルカ
ルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ara-MTX複合体
の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溶媒:
0.1% NaHCO₃)を示す。

25 第13図: 本発明の実施例6で得られたN-アセチルカ
ルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-Ara-MTX複合体

のゲル濾過溶出パターン(検出：307nmにおける紫外部吸収)を示す

第14図：本発明の実施例7で最終生成物として得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリド複合体の紫外部吸収スペクトル(濃度：500 μ g/ml、溶媒：水)を示す

第15図：本発明の実施例7で最終生成物として得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Ala-Ala-Ala-p-ニトロアニリドのゲル濾過溶出パターン(検出：315nmにおける紫外部吸収)を示す

第16図：本発明による実験例1において測定されて、キトサンとの複合体として存在している医薬化合物メトトレキサート(MTX)の血漿中での残存パーセントの経時変化(in vitro)を示すグラフである。

第17図：本発明による実験例2において測定されて、本発明の複合体を酢酸緩衝液で分解させる反応に当たって、反応時間とその反応時間での反応液においてピークの溶出が現われる溶出時間との関係を示すグラフを示す。

第18図：本発明による実験例3で測定されて、試料化合物の血清中濃度の経時変化(in vivo)を示すグラフである。

第19図：本発明による実験例4で測定されて、試料化合物の癌組織での濃度の経時変化を示すグラフである。

第20図：本発明の実施例11で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度：490 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：0.1% NaHCO₃)を示す。

5 第21図：本発明の実施例11で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Suc-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体のゲル濾過溶出パターン(検出：307nmにおける紫外部吸収)を示す。

第22図：本発明の実施例12で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体(カルボキシメチル化度：0.7)の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：0.1% NaHCO₃)を示す。

10 第23図：本発明の実施例12で得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Phe-Phe-MTX複合体(カルボキシメチル化度：0.7)のゲル濾過溶出パターン(検出：307nmにおける紫外部吸収)を示す。

第24図：本発明の実施例17で生成されたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₂-Gly-Phe-Phe-MTX複合体のゲル濾過溶出パターン(検出：258nmにおける紫外部吸収)を示す。

20 第25図：本発明の実施例17で最終生成物として得られたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG₂-Gly-Phe-Phe-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：0.1% NaHCO₃)を示す。

25 第26図：本発明の実施例17で最終生成物として得ら

れたN-アセチルカルボキシメチルキトサン-PEG-Gly-Phe-Phe-MTX 複合体のゲル濾過溶出パターン（検出：367nmにおける紫外部吸収）を示す。

第27図：本発明の実施例22で得られたポリオール化N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル（濃度：4.4 μ g/mL、溶媒：0.1% NaHCO₃）を示す。

第28図：本発明の実施例22で得られたポリオール化N-アセチルカルボキシメチルキトサン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体のゲル濾過溶出パターン（検出：367nmにおける紫外部吸収）を示す。

第29図：本発明の実験例4で測定されて、投与後24時間までの各試料についての血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。

第30図：各試料について投与量に対する組織中濃度の体内分布を示すグラフである。

産業上の利用可能性

本発明による新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体は医薬化合物の生体内ターゲティングを目標としており、医薬化合物の血液中での安定性、臓器への標的指向性並びに体内での被代謝性を高める点で医薬化合物のための多糖型高分子担体として有用である。また、本発明により医薬化合物と結合した複合体の形として新規なN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体は、臓器への標的指向性及びその他

利な性質を有し、医薬として有用である

5

10

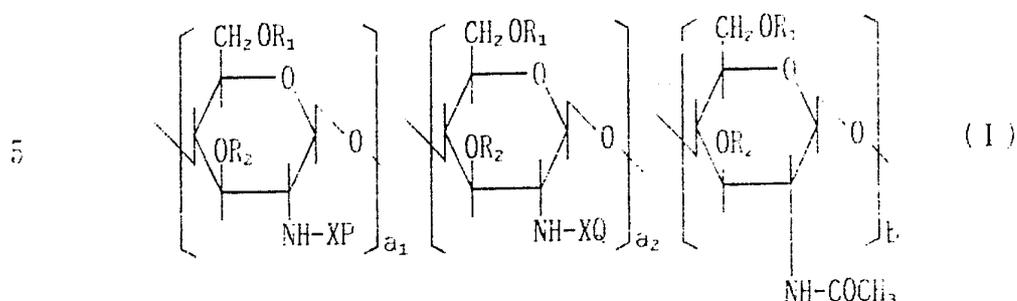
15

20

25

請求の範囲

1. 式(I)



〔式中、 R_1 および R_2 は夫々に H またはカルボキシメチル基、 P は H 、 CO 基、 R_3NH 基または OR_3 基、 Q は H または OH 基、 X は 1 ~ 10 個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_2COOH はカルボン酸化合物、 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。 a_1 、 a_2 は 0 または正の整数を示すが、共に 0 となる場合を除く。 b は正の整数を示す。〕

15 によって示され、下記の特性値(1)~(4) :-

- (1) カルボキシメチル化度 : 0.5 ~ 1.2
- (2) 分子量(ゲル濾過法) : 2,000 ~ 300,000
- (3) $a / (a + b)$: 0.01 ~ 1

(ただし $a = a_1 + a_2$)

20 (4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

を有する N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体

2. XP における X が 1 ~ 4 個の同一または異なるアミノ酸からなるペプチド鎖であり、その N 末端側アミノ酸に P が結合する請求の範囲 1 記載の N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体

25

3. XPが下記のいずれかである請求の範囲2記載の
N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体:

P-Phe-Phe-Gly-
P-Gly-Phe-Gly-Gly-
5 P-Phe-Gly-Phe-Gly-
P-Gly-Phe-Gly-Phe-
P-Gly-Gly-Gly-
P-Ala-Gly-Gly-Gly-

4. XPにおけるXが、二塩基性酸を含み、かつ1～
10 4個の同一または異なるアミノ酸からなるペプチド鎖
であり、そのC末端側アミノ酸にPが結合する請求の
範囲1記載のN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘
導体。

5. XPが下記のいずれかである請求の範囲4記載の
15 N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体。

-Suc-Ala-Ala-Ala-P
-Suc-Ala-Ala-Val-Ala-P

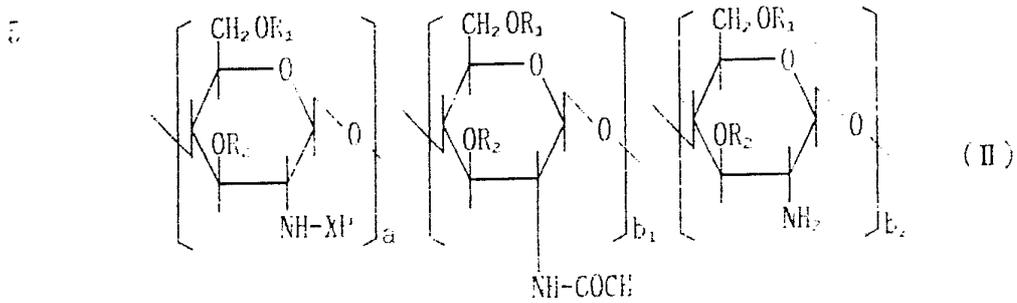
(Sucはコハク酸残基を示す)

6. R_3CO 基と R_5O 基が保護基である請求の範囲1～
20 5のいずれかの項に記載のN-アセチルカルボキシメ
チルキトサン誘導体。

7. R_3CO 基がtert-ブトキシカルボニル基またはp-
メトキシベンジルオキシカルボニル基であり、また
25 R_5O 基がtert-ブチルオキシ基である請求の範囲6記載
のN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体

8. R_3COOH がメトトレキサートである請求の範囲1
 ~5のいずれかの項に記載のN-アセチルカルボキシメ
 チルキトサン誘導体。

9. 式(II)



10 [式中、 R_1 および R_2 は夫々にHまたはカルボキシメチ
 ル基、ここでPはH、OH基、 R_3CO 基、 R_4NH 基または R_5O
 基、Xは1~10個の同一または異なるアミノ酸を含む
 ペプチド鎖を意味する。なお R_3COOH はカルボン酸化合
 15 物を意味する。 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物
 を意味する。 a 、 b_1 、 b_2 は0または正の整数を示す。こ
 によって示され、下記の特性値(1)~(4):-

- (1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.2
- (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000
- (3) $a / (a + b)$: 0.01~1

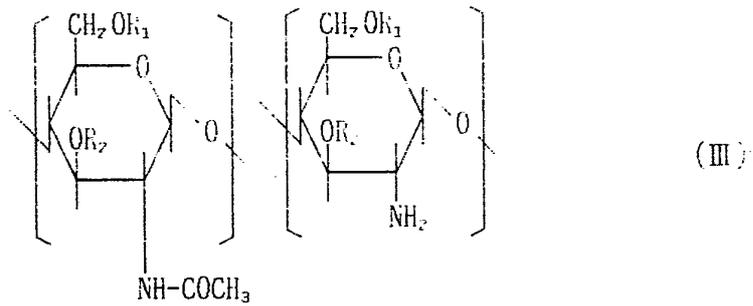
20 (ただし $b = b_1 + b_2$)

- (4) P/X (モル比) : 0.1~1

を有する部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン
 誘導体。

10. 式(III)

25



5

[式中、 R_1 および R_2 は夫々に H またはカルボキシメチル基を表わす]

によって示され、下記の特性値(1)~(2):-

(1) カルボキシメチル化度: 0.5~1.2

10 (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000~300,000

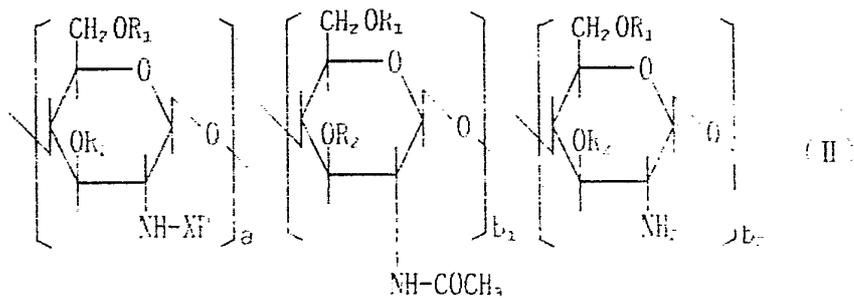
を有する部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサンに次式



15 [式中、ここで P は H、OH基、 R_3CO 基、 R_4NH 基または R_5O 基、X は 1~10個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3COOH はカルボン酸化合物、 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。]

で示される化合物を反応せしめることを特徴とする、

20 式(II)



25

[式中、 R_1 、 R_2 、 P 、 X は(Ⅲ)式における前記と同じ意味を示す。 a 、 b_1 、 b_2 は正の整数を示す。]

によって示され、下記の特性値(1)～(4):-

(1) カルボキシメチル化度: 0.5～1.2

5 (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000～300,000

(3) $a / (a + b)$: 0.01～1

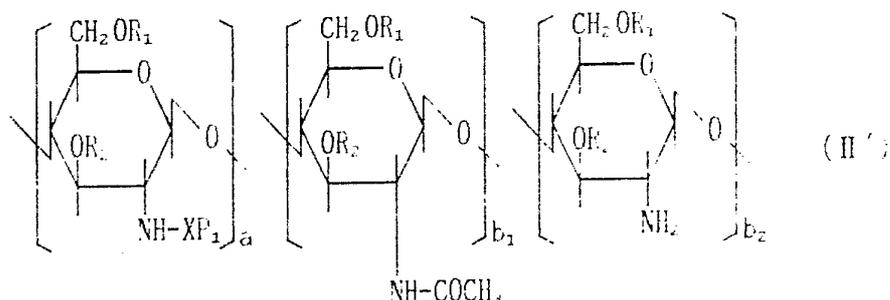
(ただし $b = b_1 + b_2$)

(4) P / X (モル比) : 0.1～1

を有する部分的 N -アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体の製法。

10

11. 式(Ⅱ')



15

[式中、 R_1 および R_2 は夫々にHまたはカルボキシメチル基、 P_1 はHまたはOH基、もしくは R_3' CO基、 R_4' NH基または R_5' O基、 X は1～10個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3' COOHはカルボン酸化合物、 R_4' NH₂はアミノ化合物、 R_5' OHはアルコール化合物を意味する。 a 、 b_1 、 b_2 は正の整数を示す。] によって示され、下記の特性値(1)～(4):-

20

(1) カルボキシメチル化度: 0.5～1.2

25 (2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000～300,000

(3) $a / (a + b)$: 0.01 ~ 1

(ただし $b = b_1 + b_2$)

(4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

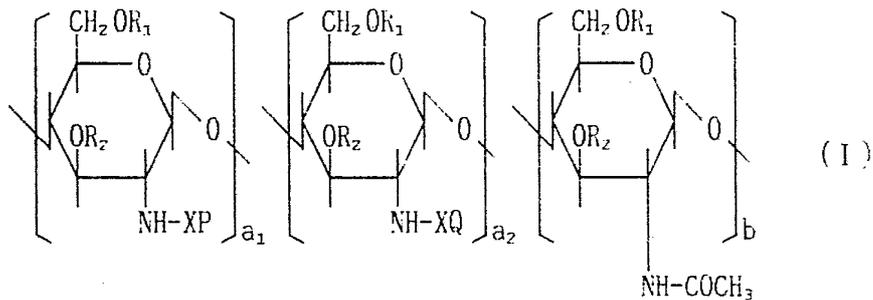
5 を有する部分的N-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体をアセチル化し、 P_1 基がHまたはOH基以外の場合は、さらに P_1 基を脱離せしめ、最後に次式



[式中、Pは R_3CO 基、 R_3NH 基または R_3O 基を表す。]

で示される化合物を反応せしめることを特徴とする、

10 式(I)



15

[式中、 R_1 、 R_2 、P、Xは前記と同じ意味を示し、QはHまたはOH基を意味する。 a_1 、 a_2 は0または正の整数を示すが、共に0となる場合を除く。 b は正の整数を示す。]

20 によって示され、下記の特性値(1)~(4):-

(1) カルボキシメチル化度: 0.5 ~ 1.2

(2) 分子量(ゲル濾過法) : 3,000 ~ 300,000

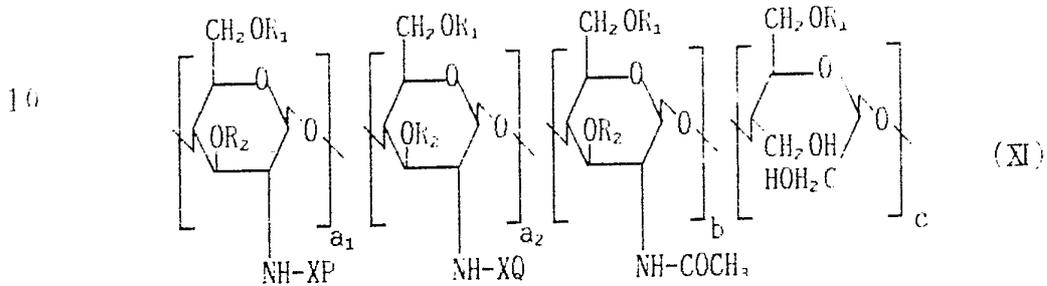
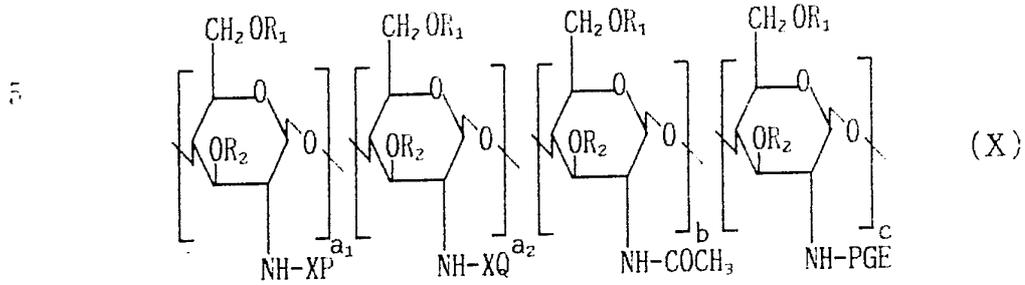
(3) $a / (a + b)$: 0.01 ~ 1

(ただし $a = a_1 + a_2$)

25 (4) P / X (モル比) : 0.1 ~ 1

を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体の製法。

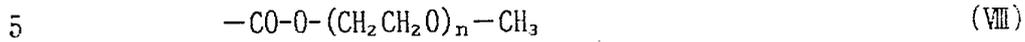
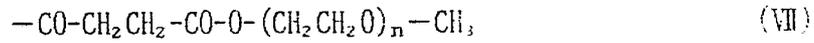
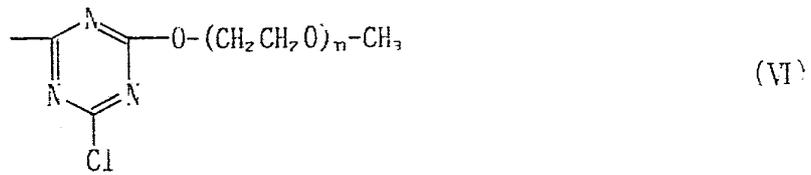
12. 式(X)又は式(XI)



〔式中、 R_1 および R_2 は夫々にHまたはカルボキシメチル基、 P は R_3CO 基、 R_4NH 基または R_5O 基、 Q はHまたはOH基、 X は1~10個の同一または異なるアミノ酸を含むペプチド鎖を意味する。なお R_3COOH はカルボン酸化合物、 R_4NH_2 はアミノ化合物、 R_5OH はアルコール化合物を意味する。 a_1 、 a_2 は0または正の整数を示すが、共に0となる場合を除く。 b および c は正の整数を示す。

また式中、-PEGは下記の式(VI)、(VII)、(VIII)又は(IX)

- 72 -



の基を表わし、nはポリエチレングリコール鎖の平均重合度を示す]

によって示され且つ下記の特性値(1)~(4) :-

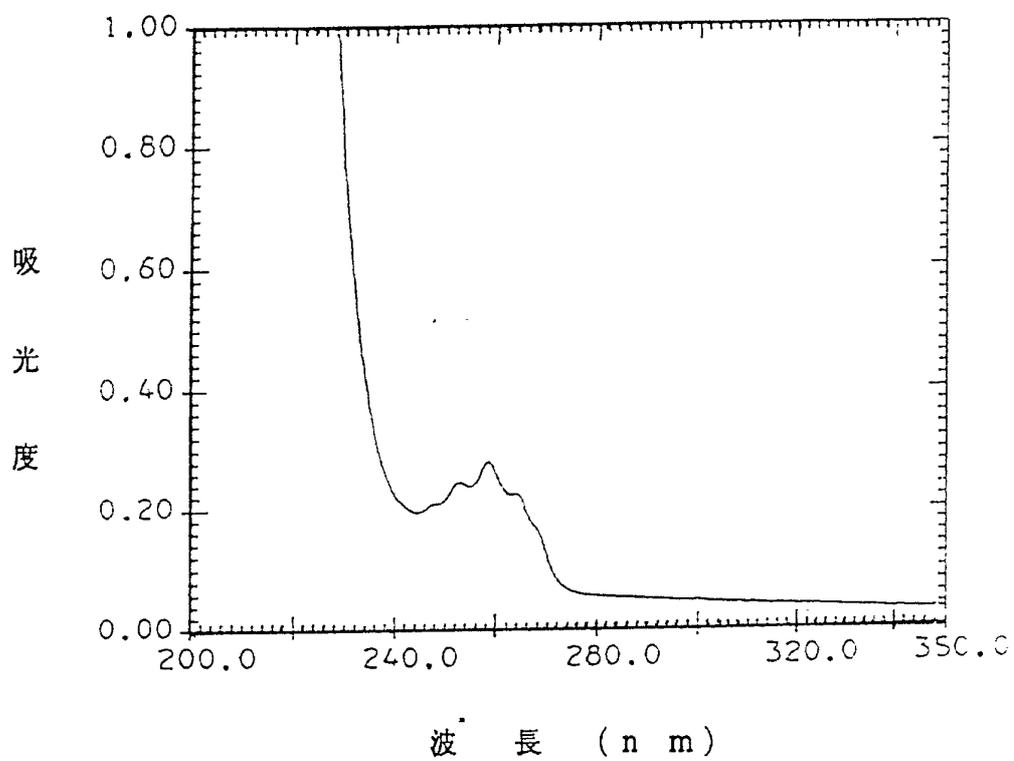
- 10 (1) カルボキシメチル化度 : 0.5~1.2
 (2) 分子量 (ゲル濾過法) : 3,000~300,000
 (3) $a / (a + b + c)$: 0.01~1
 (ただし $a = a_1 + a_2$)
 (4) P / X (モル比) : 0.1~1

15 を有するN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体:

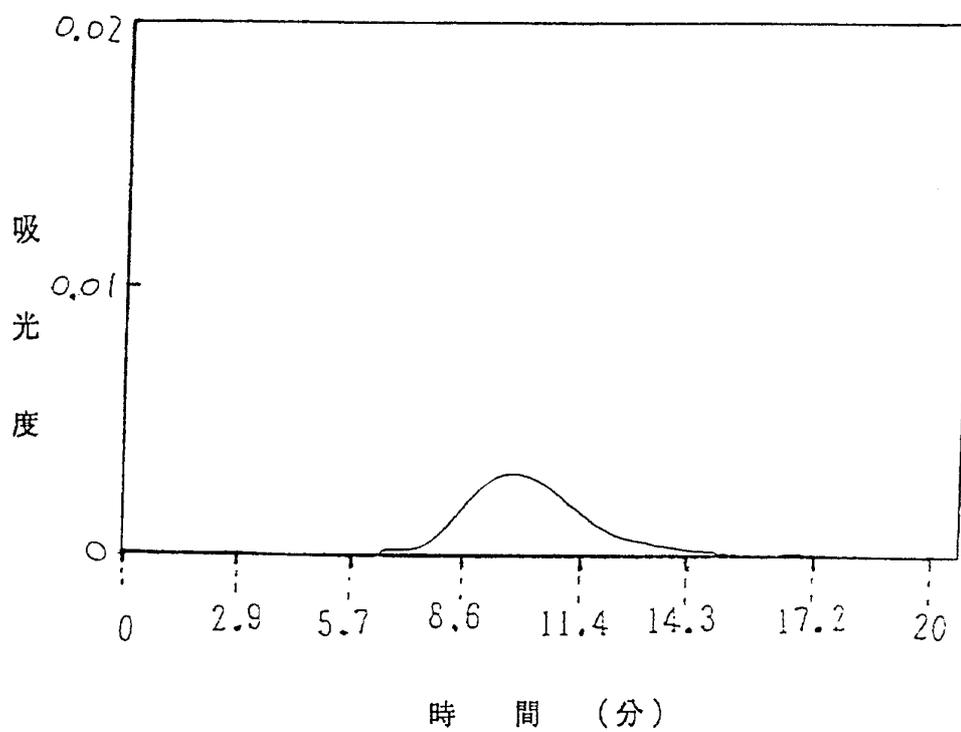
20

25

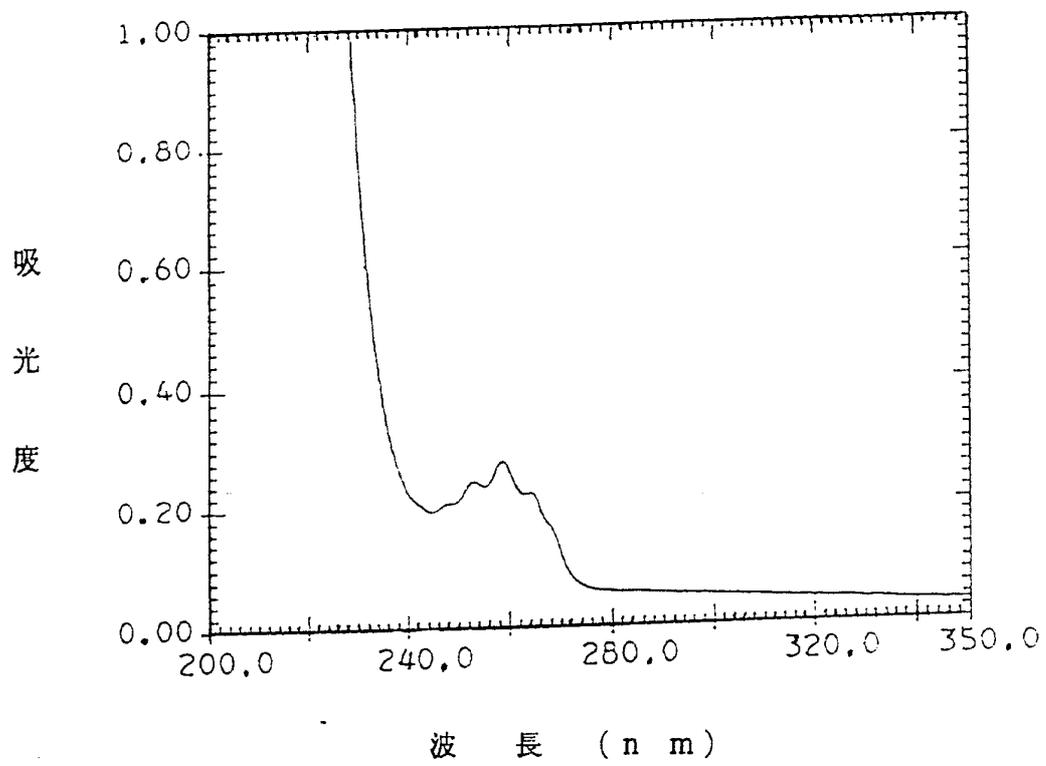
第 1 図



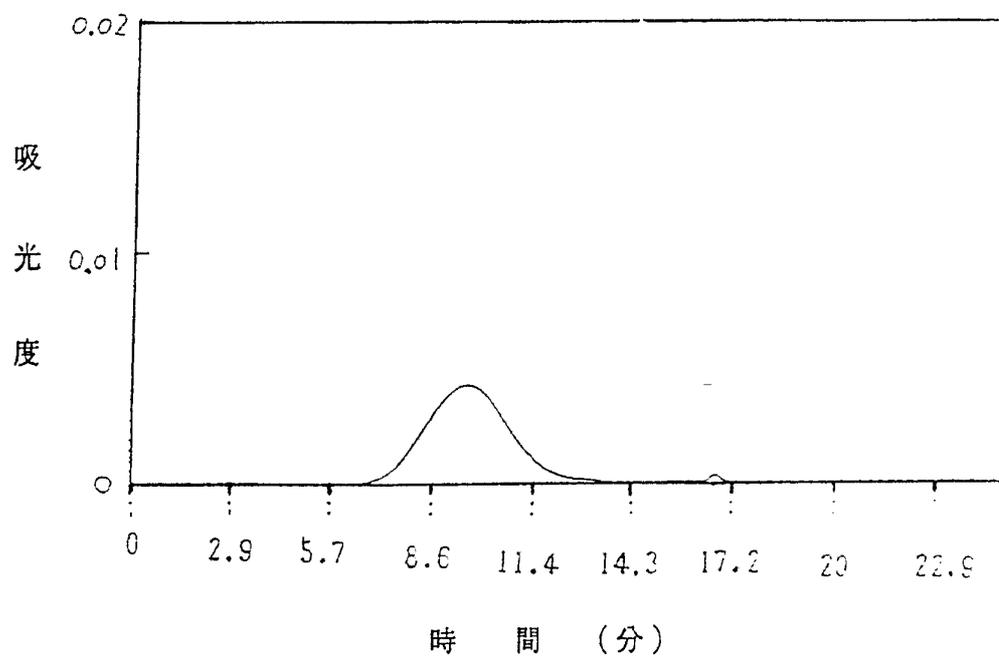
第 2 図



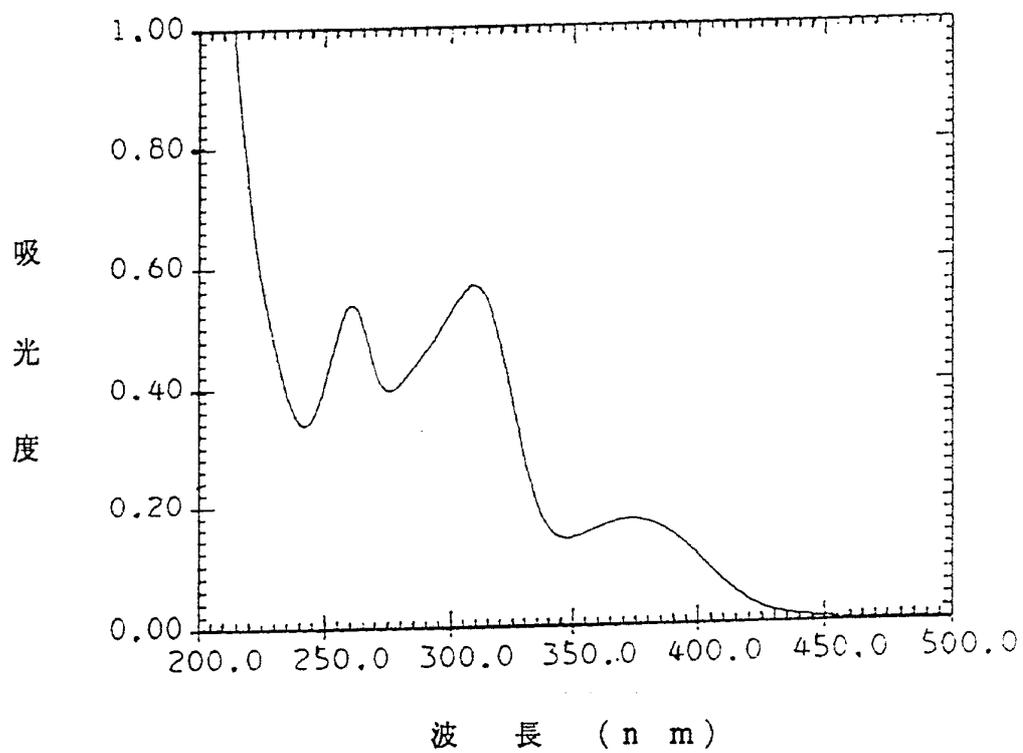
第 3 図



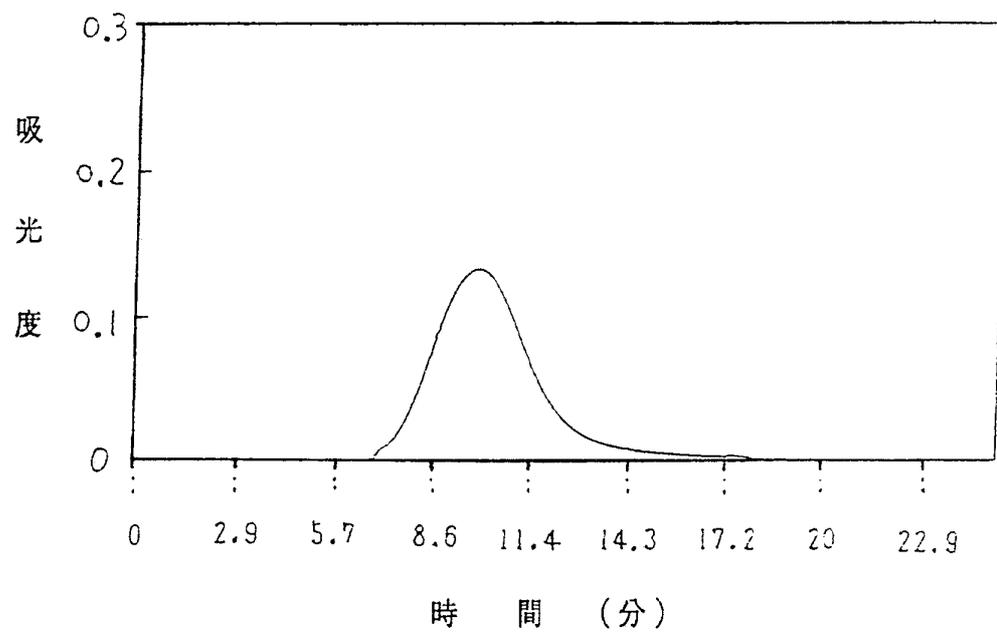
第 4 図



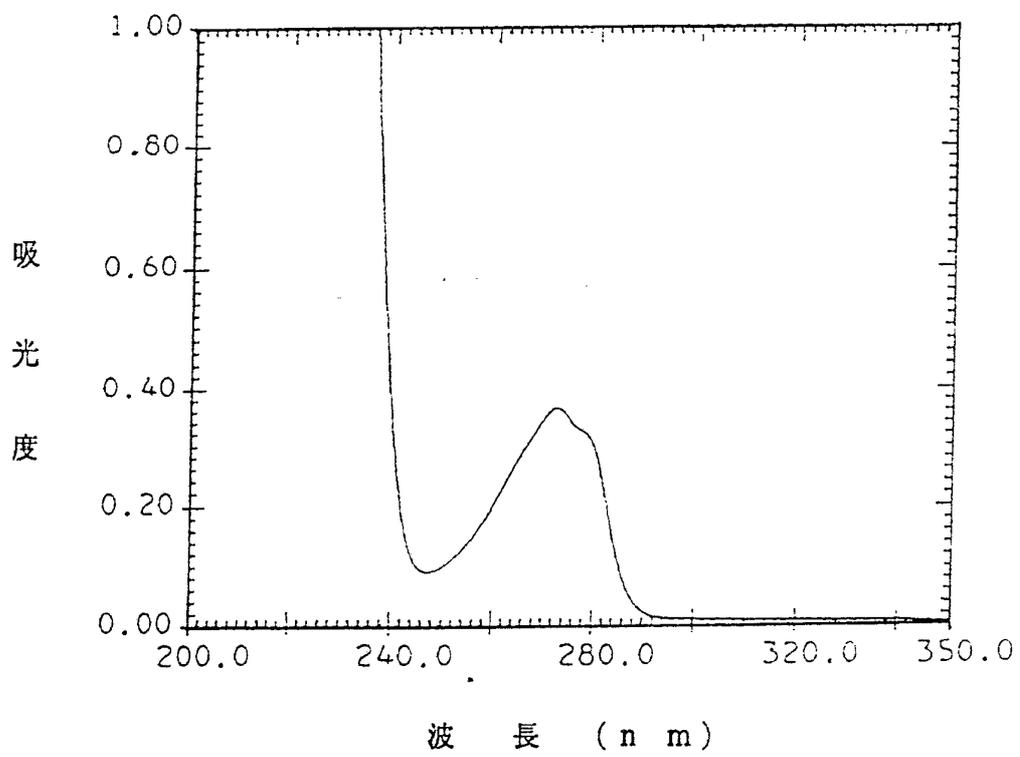
第 5 図



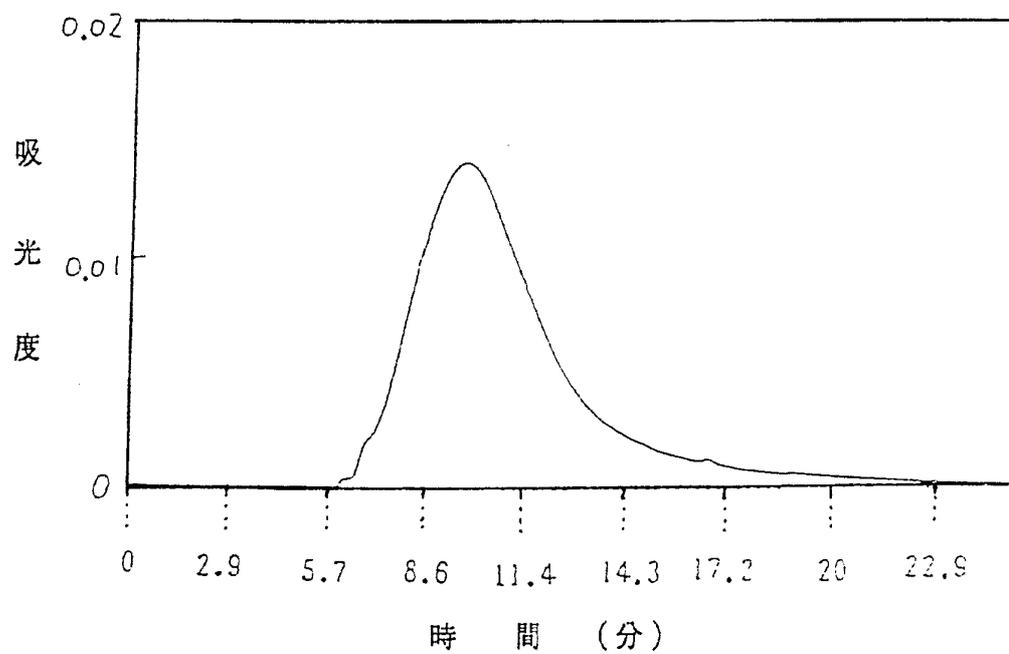
第 6 図



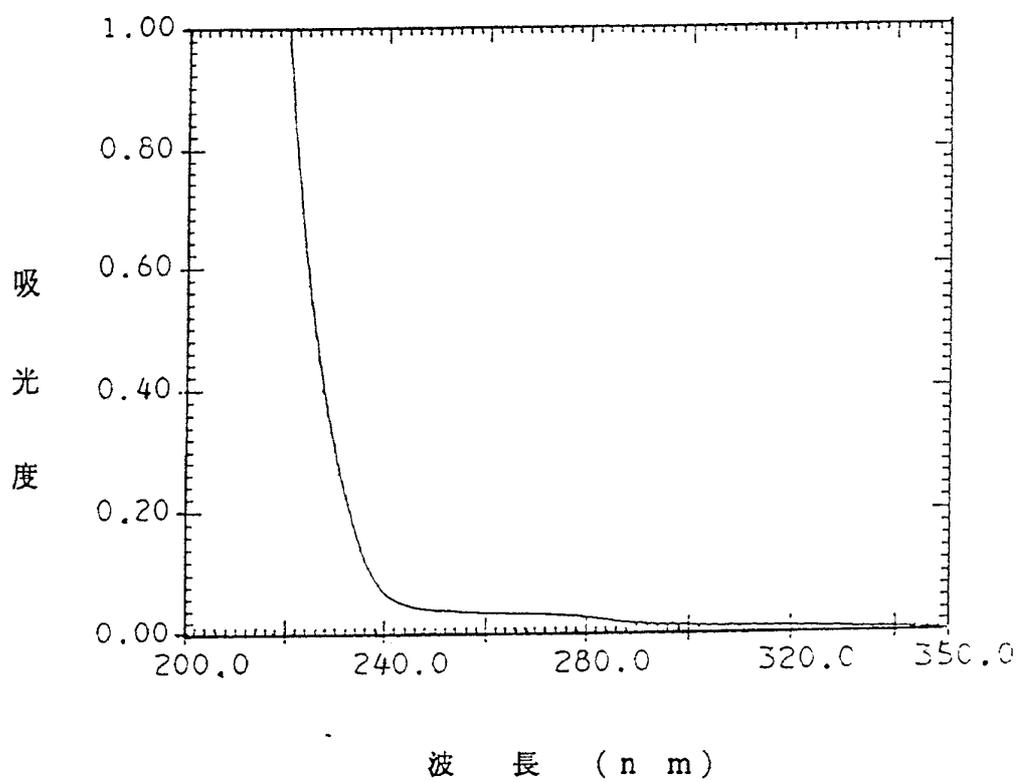
第 7 図



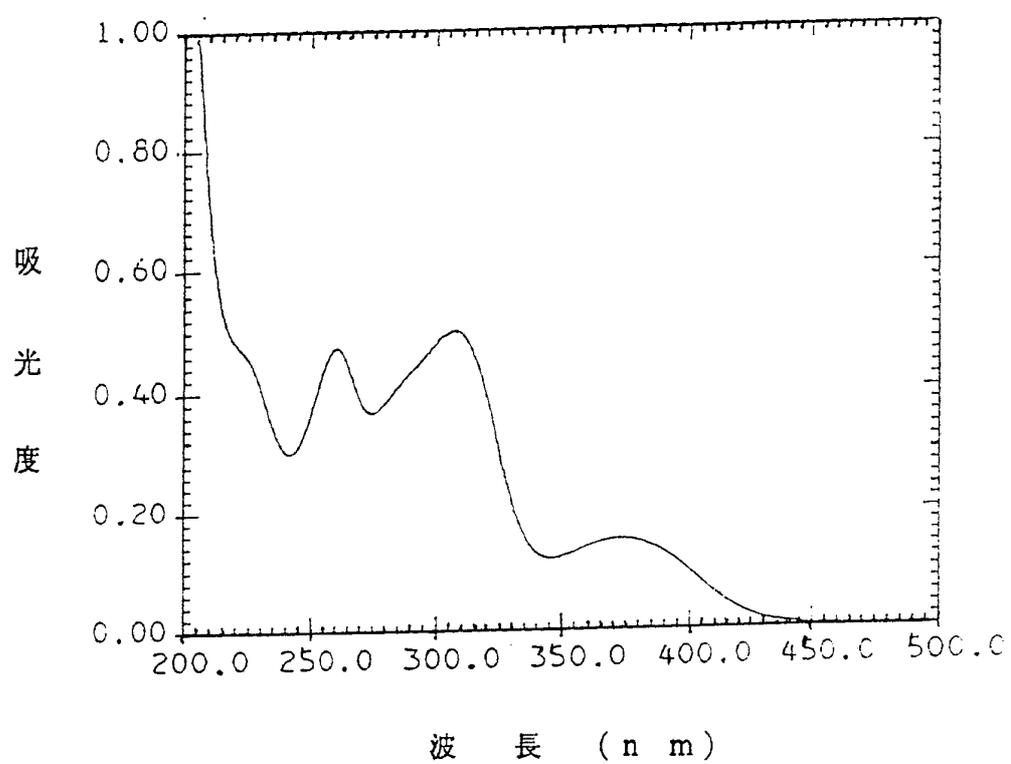
第 8 図



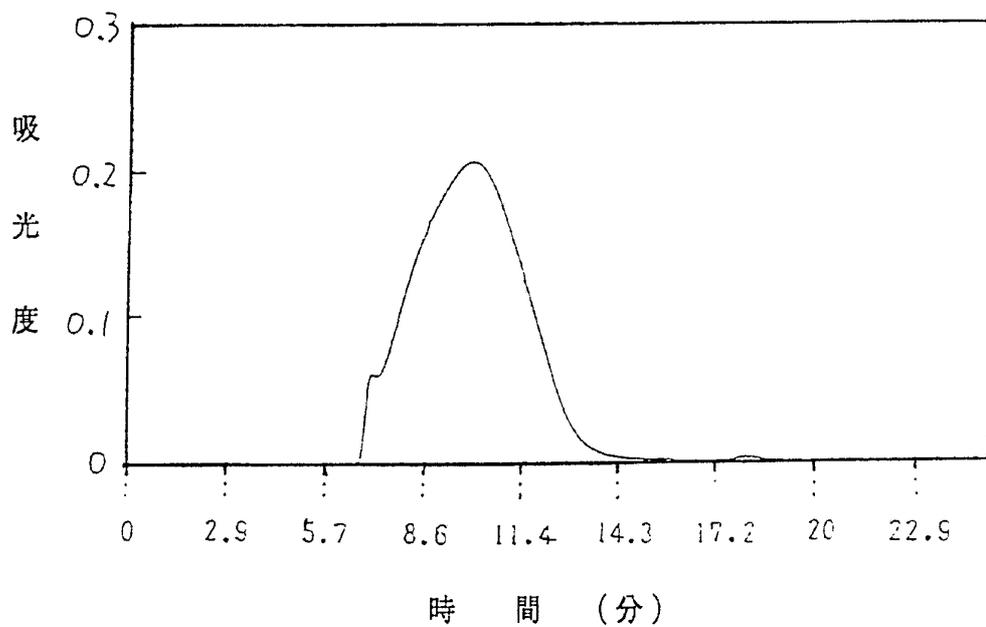
第 9 图



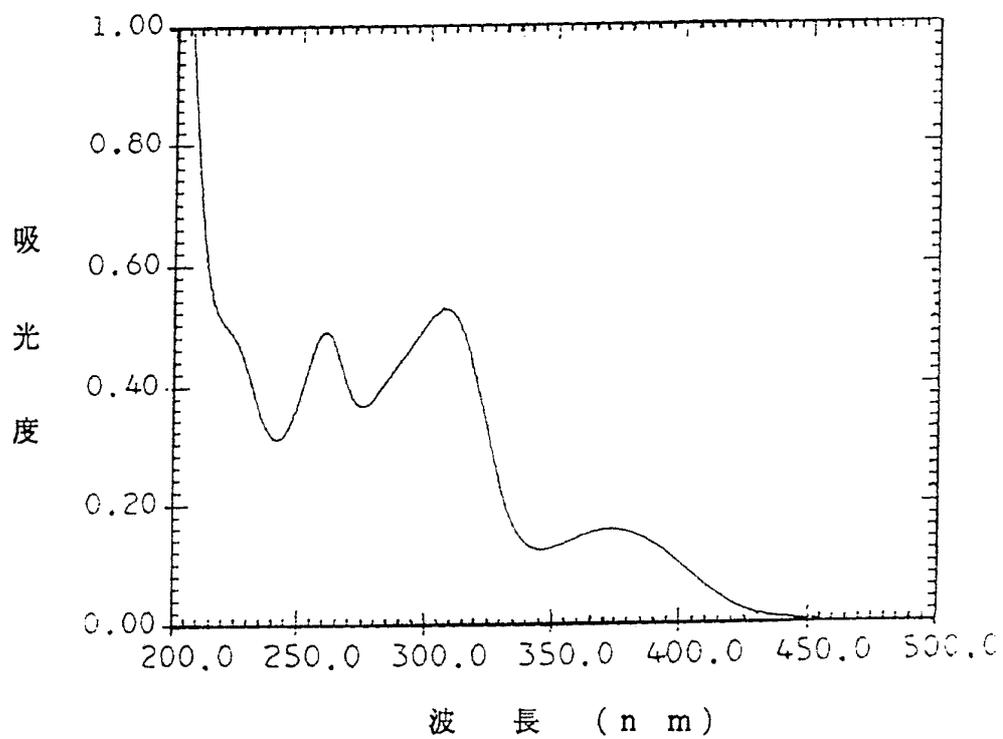
第10図



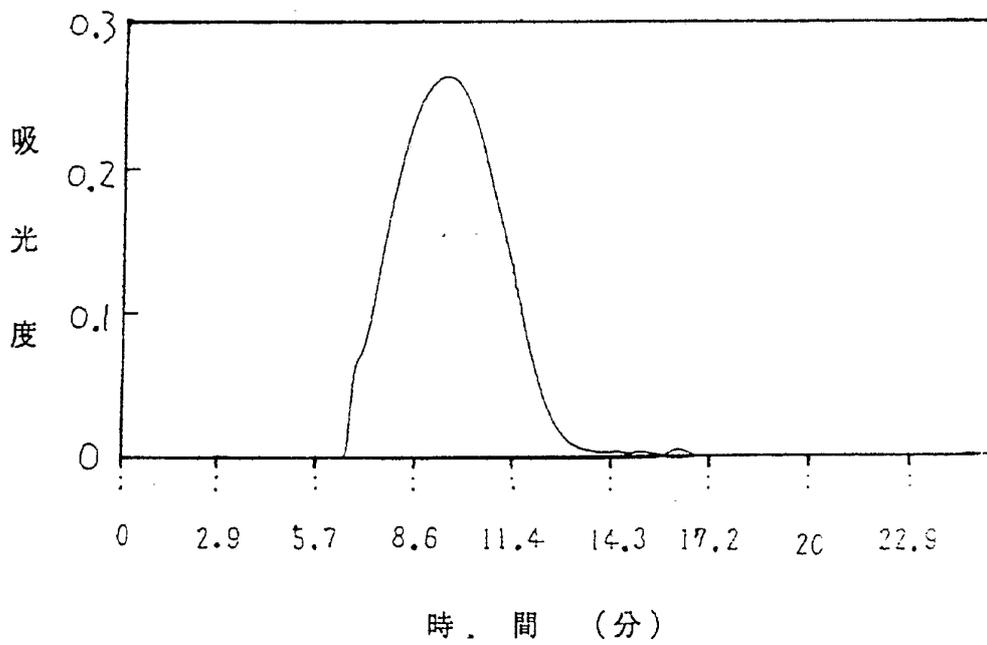
第 1 1 図



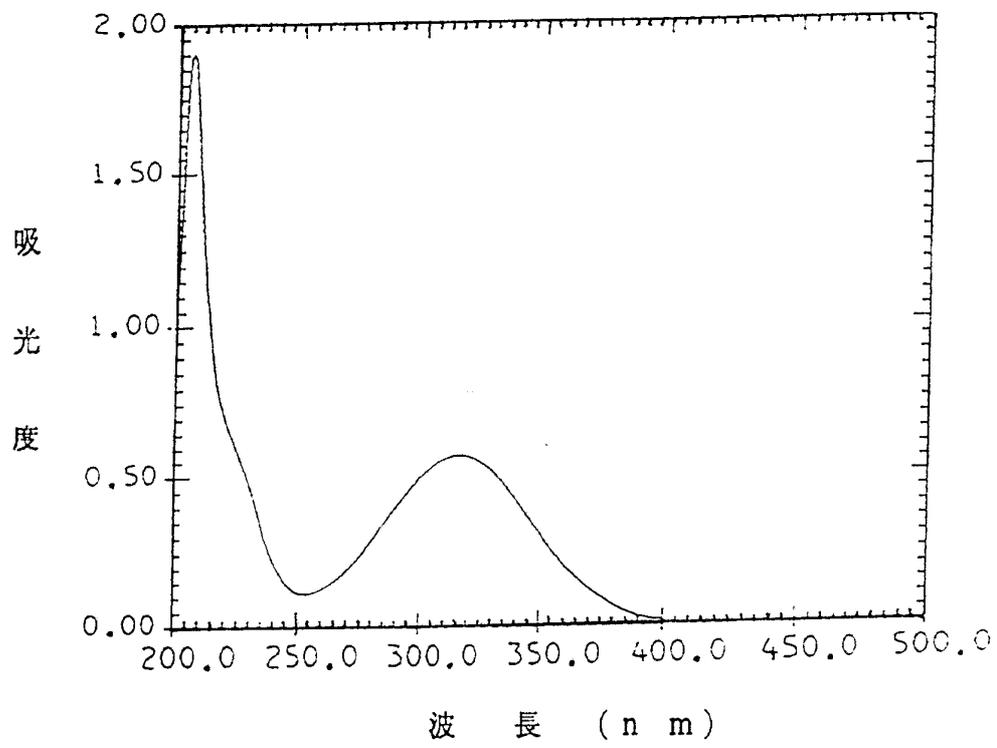
第12図



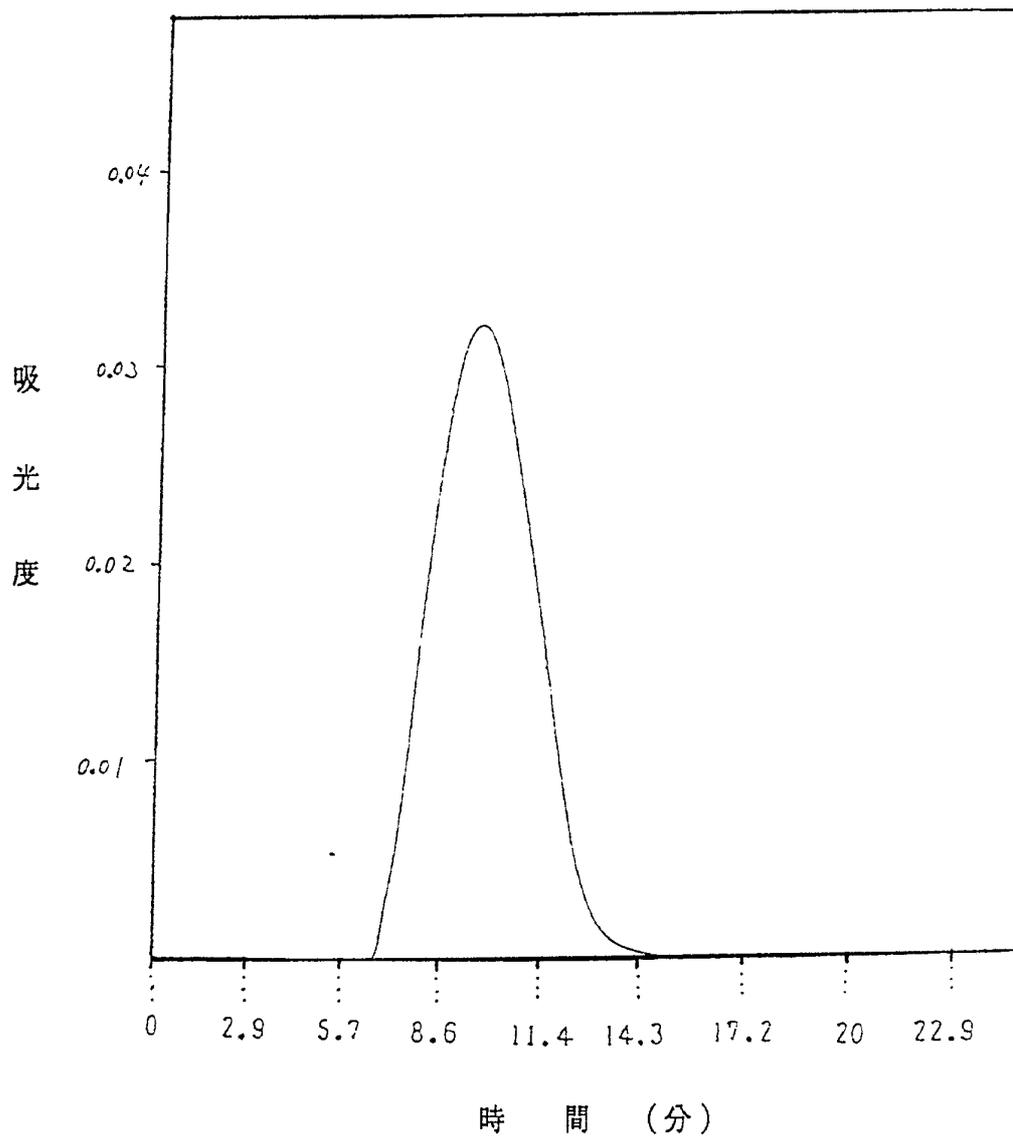
第13図



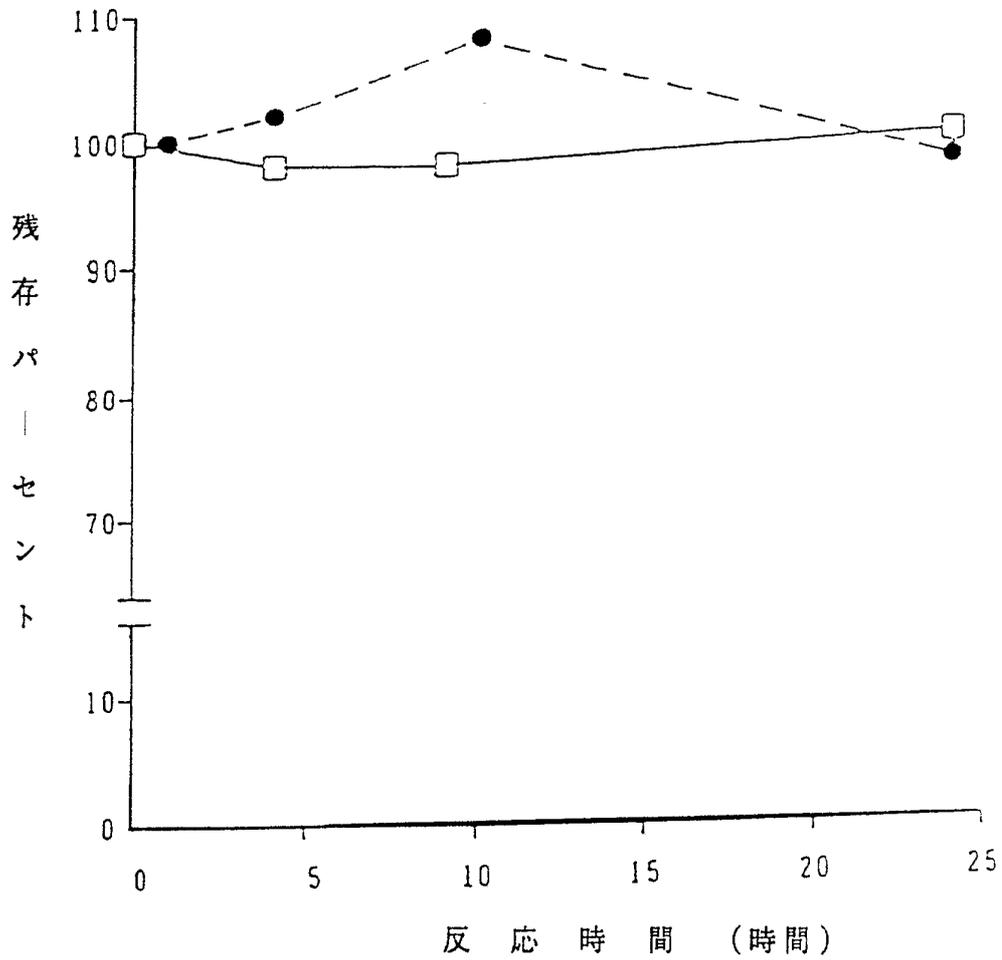
第 1 4 図



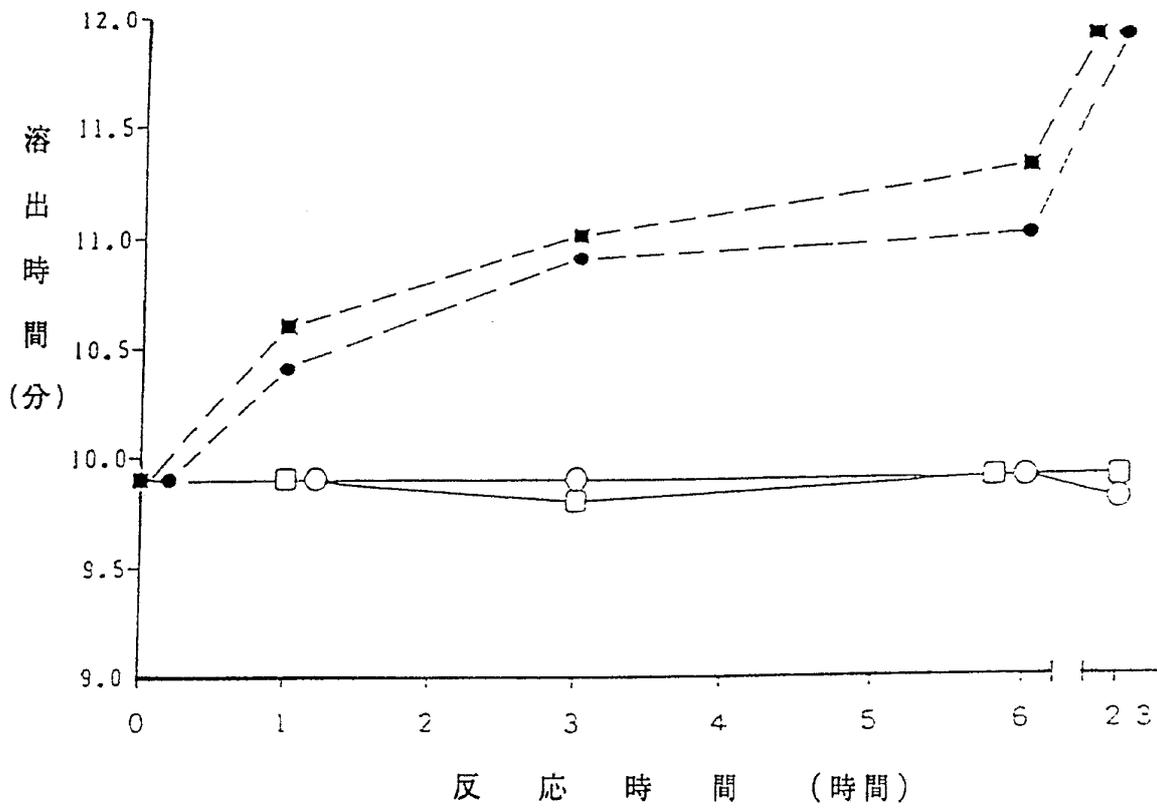
第15図



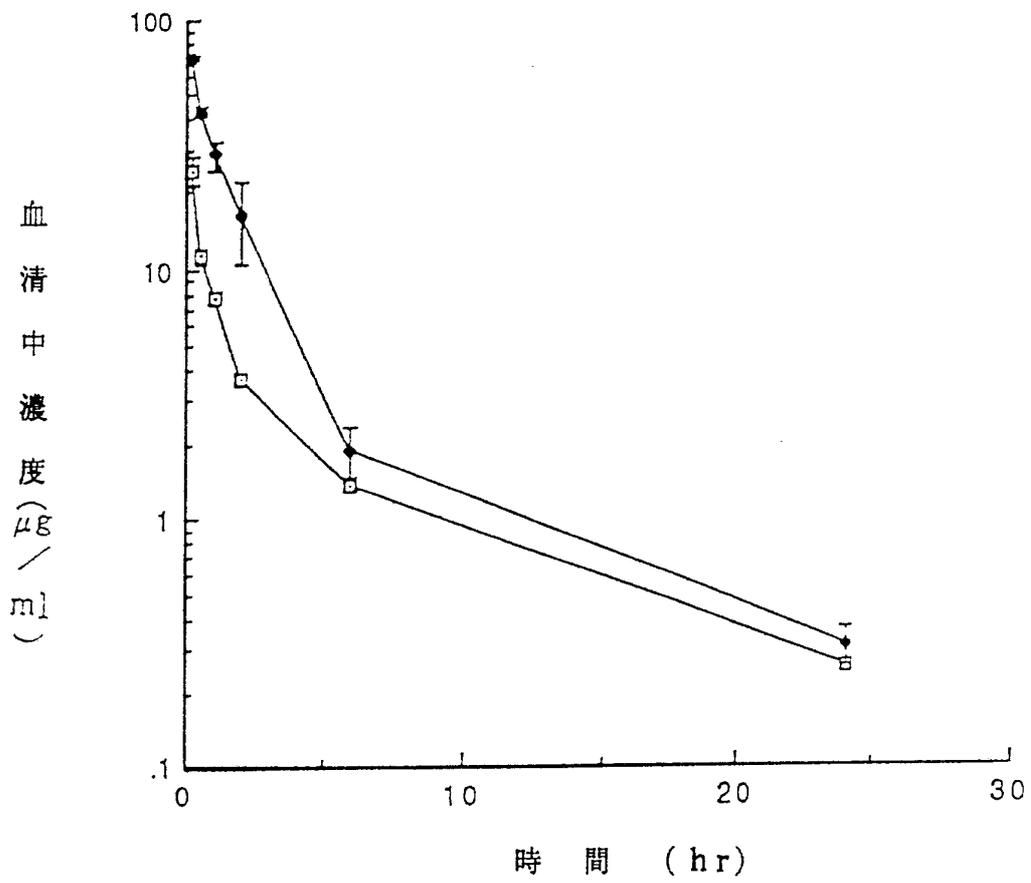
第16図



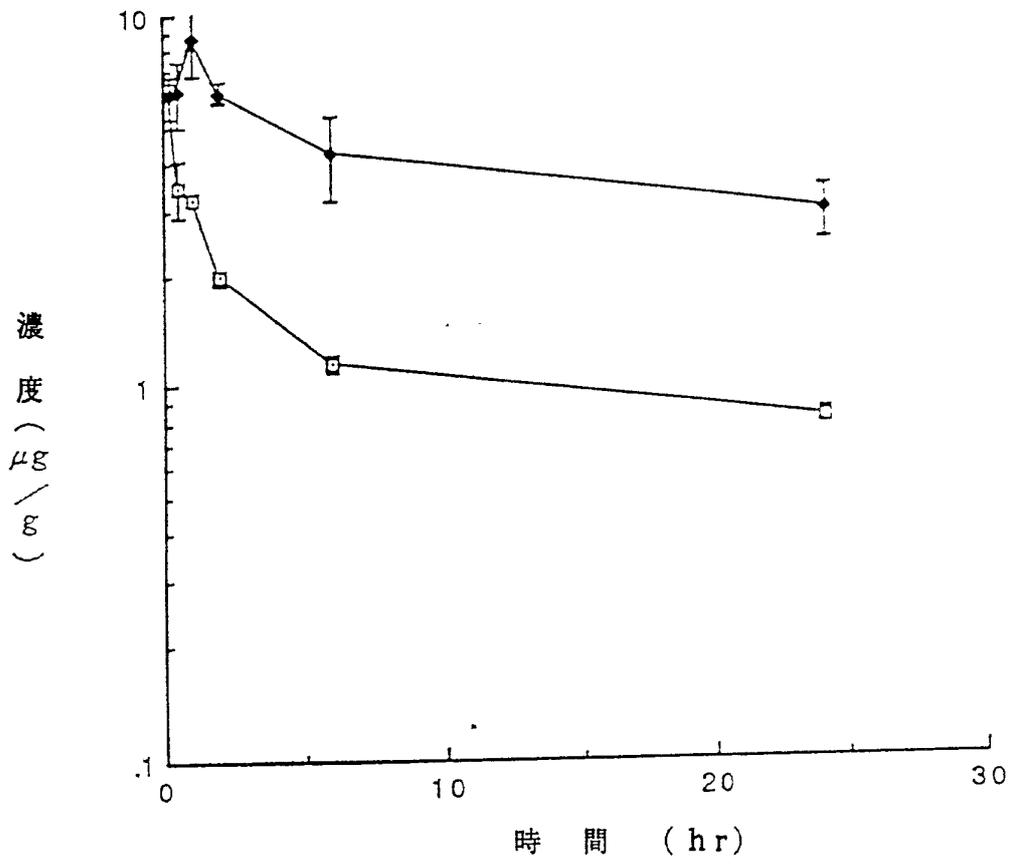
第17図



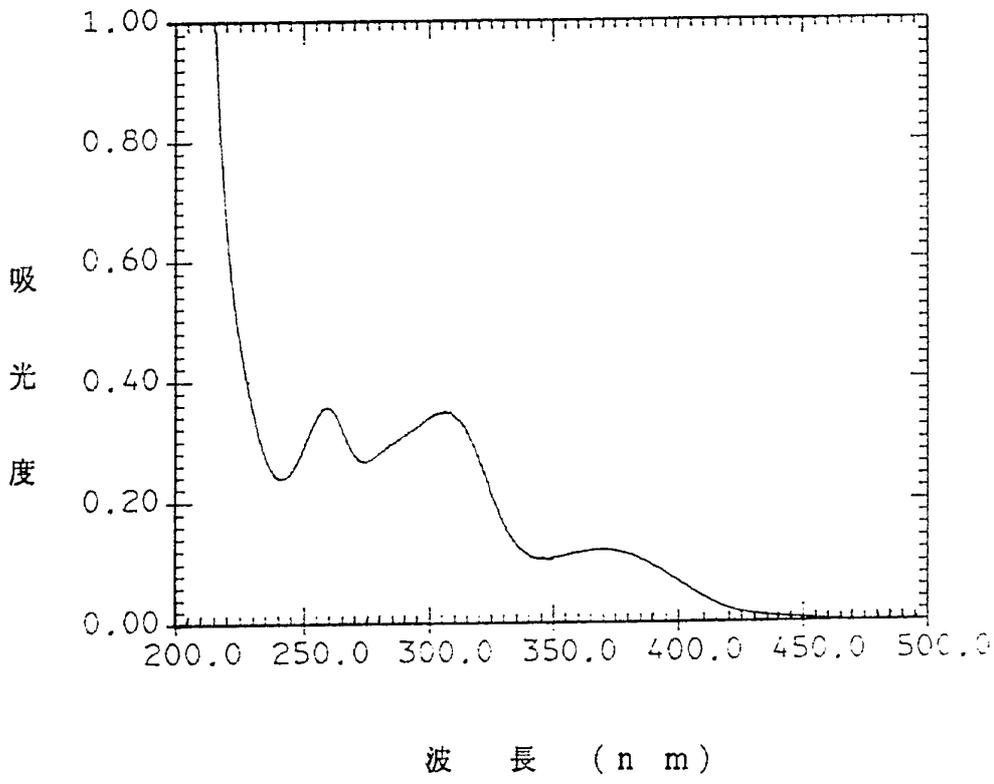
第18図



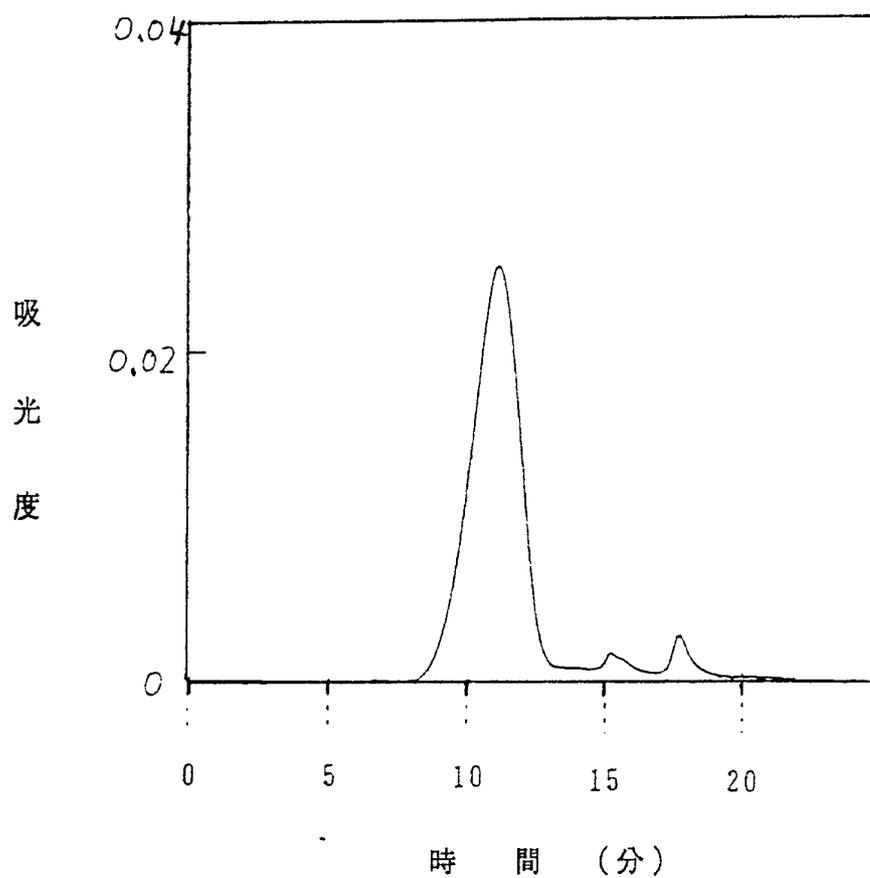
第19図



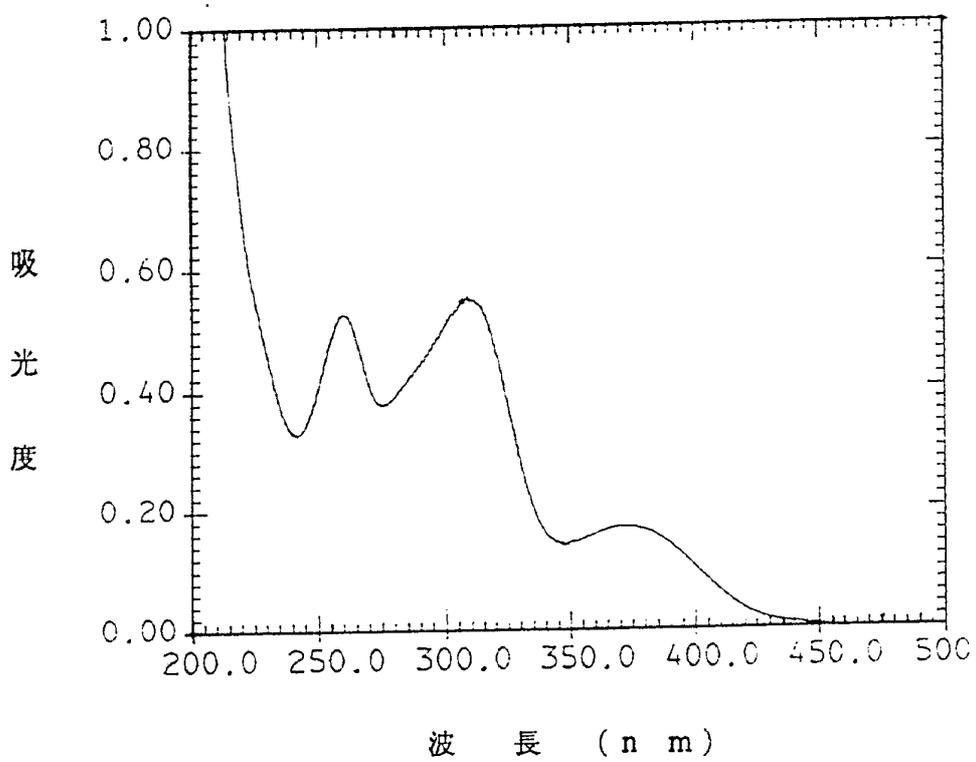
第20図



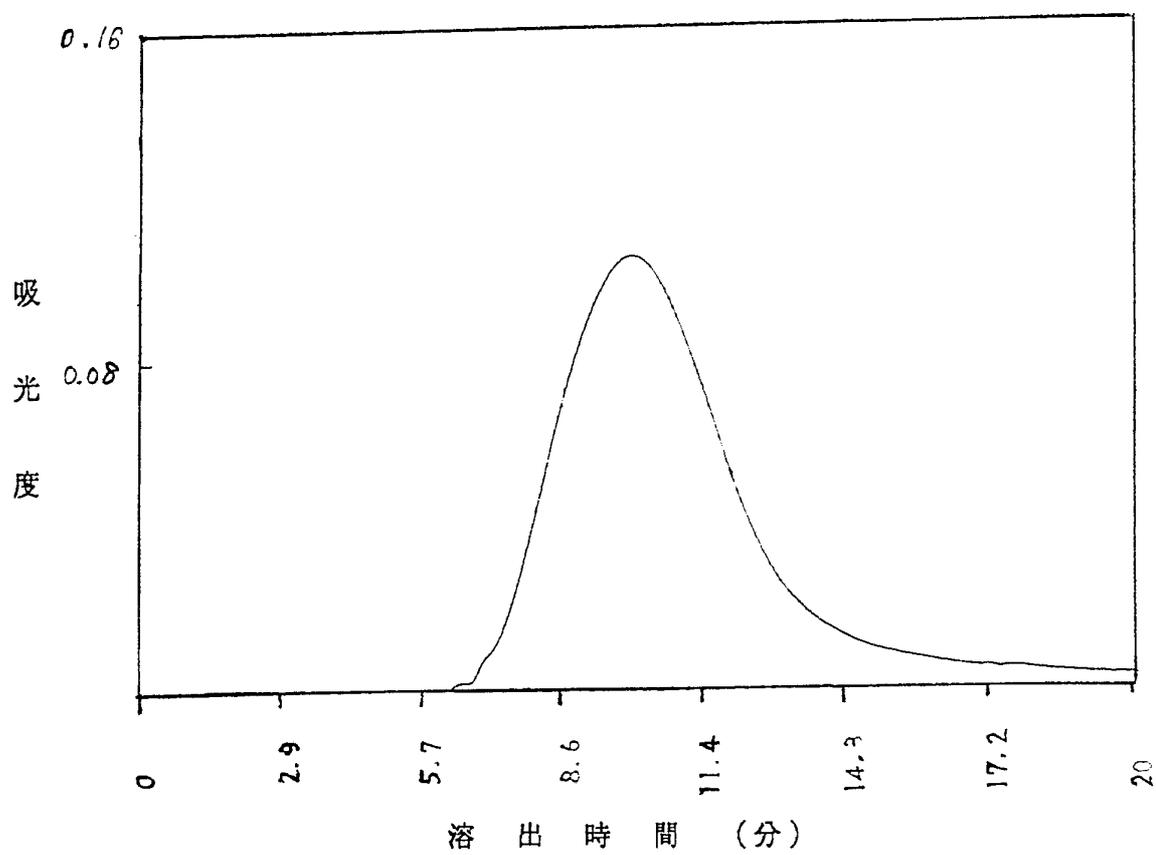
第21図



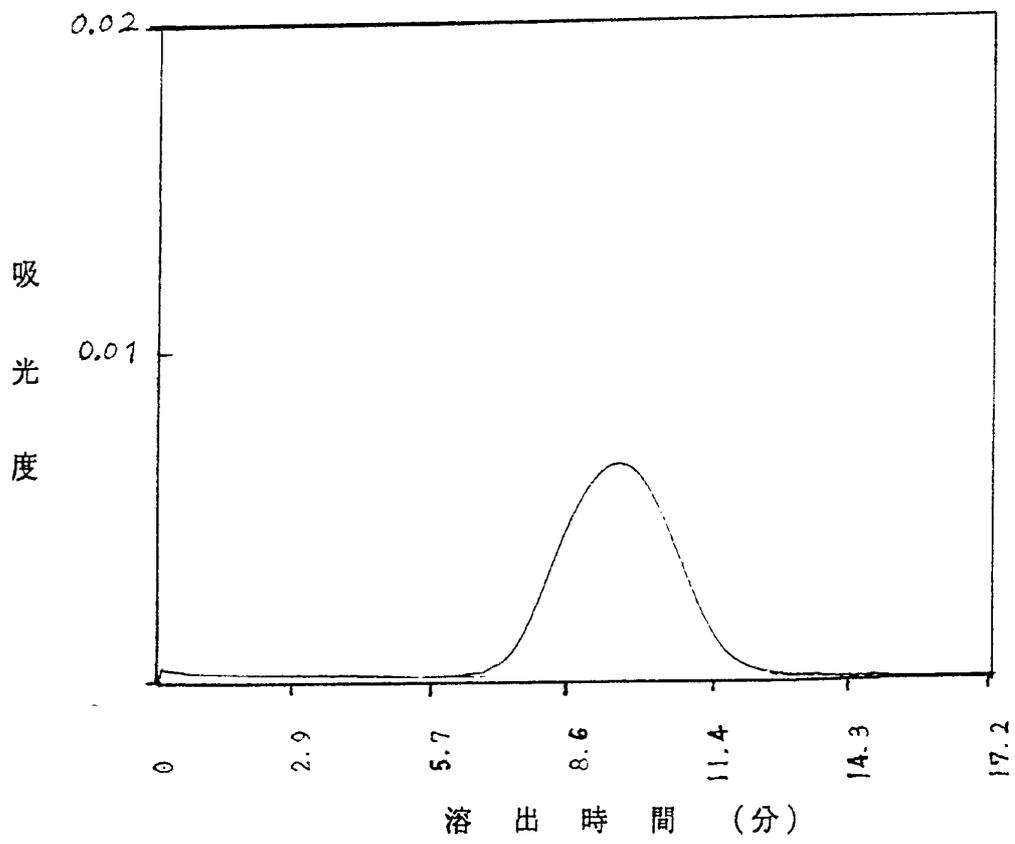
第 2 2 図



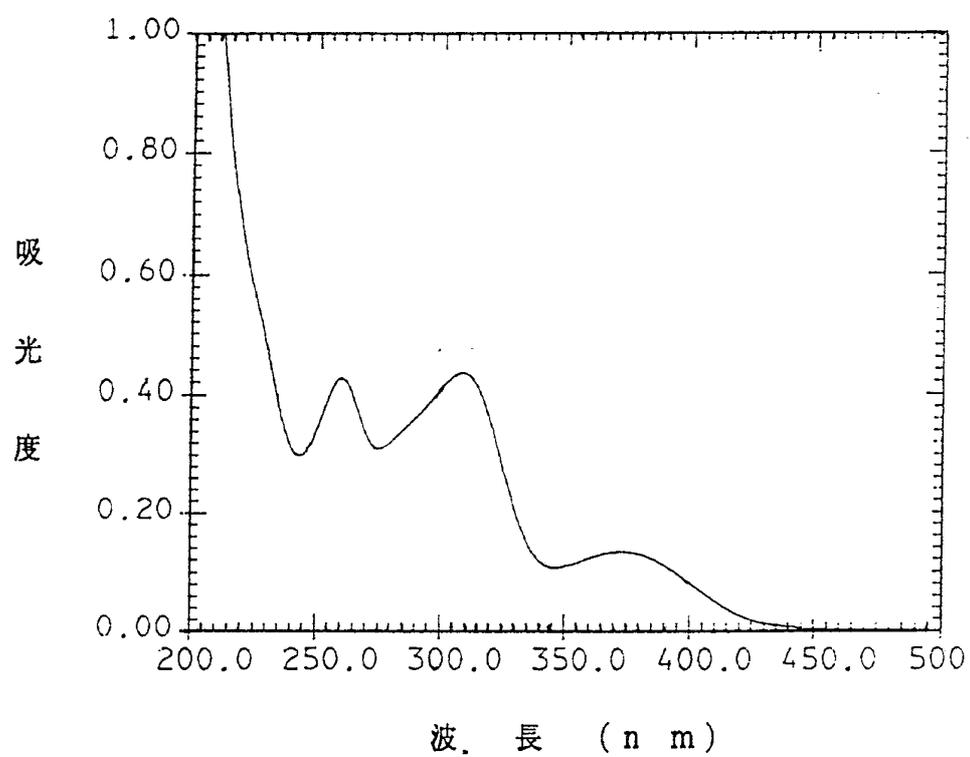
第23図



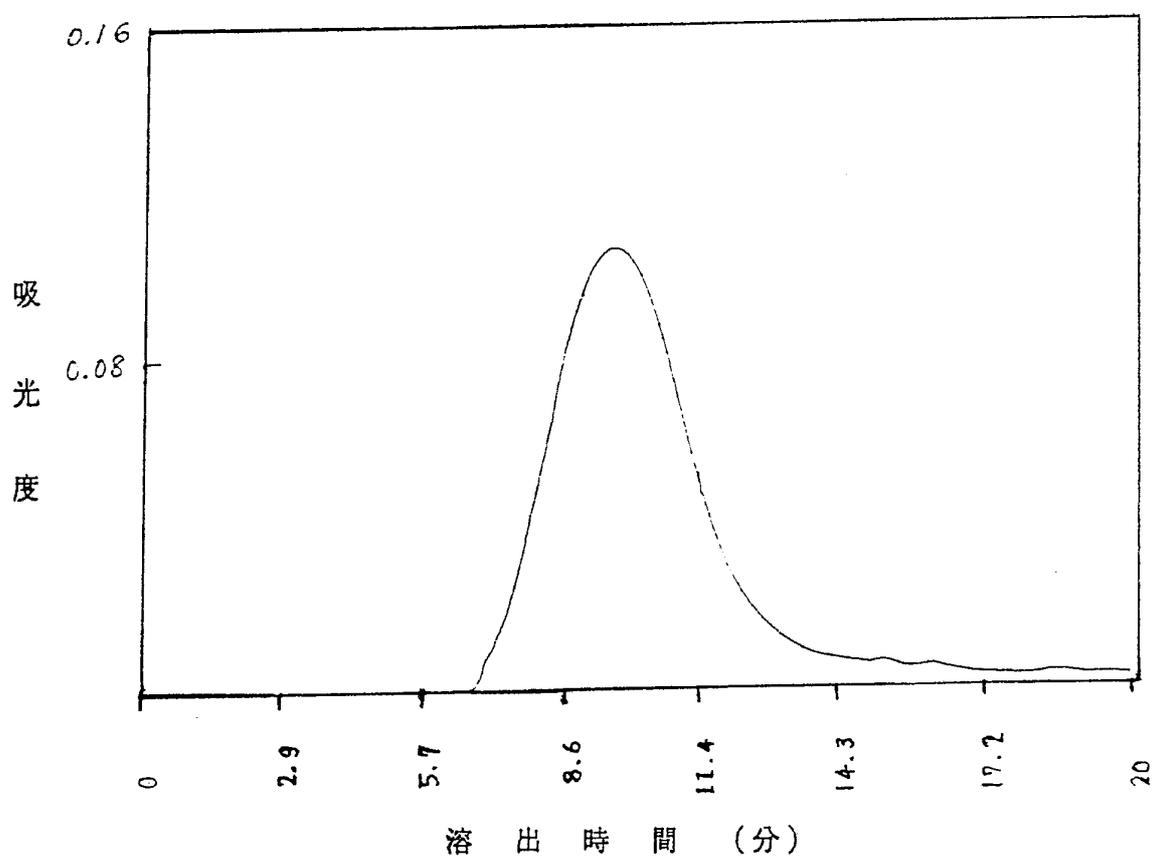
第24図



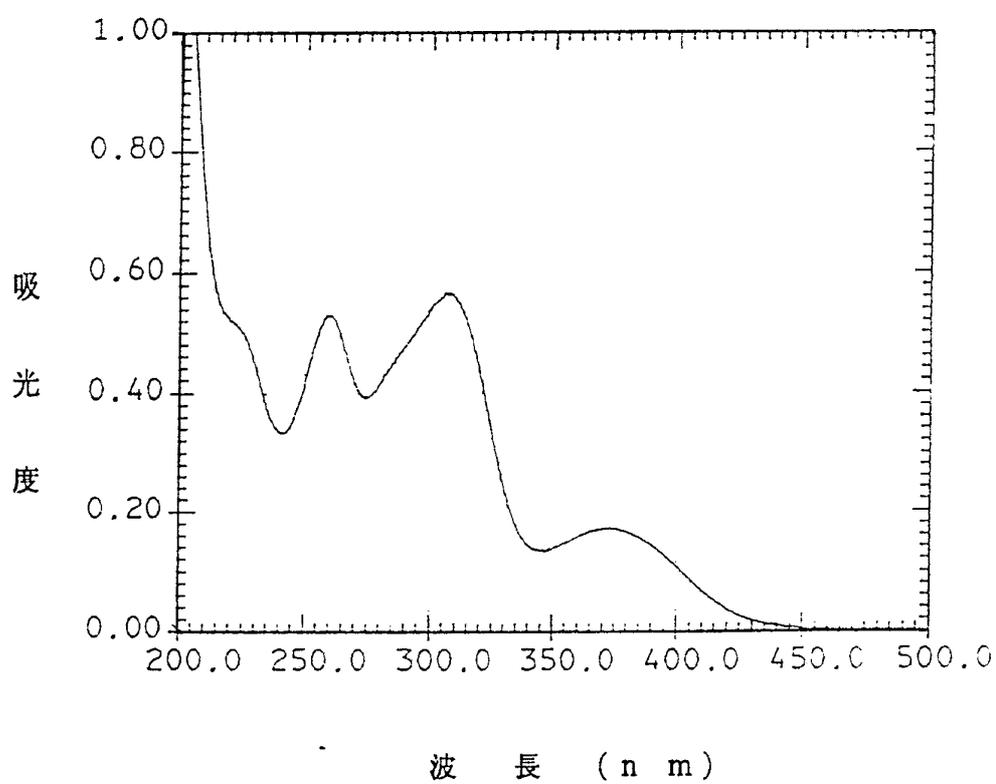
第25図



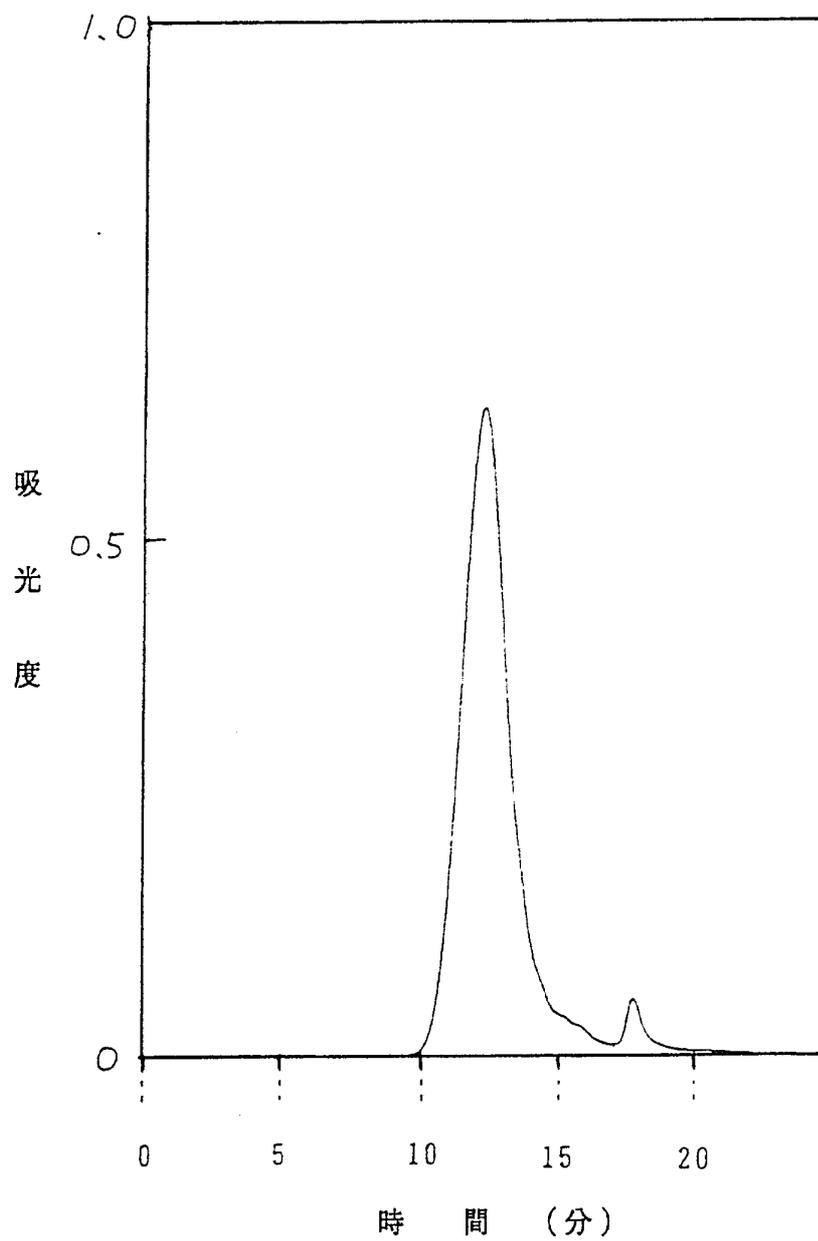
第26図



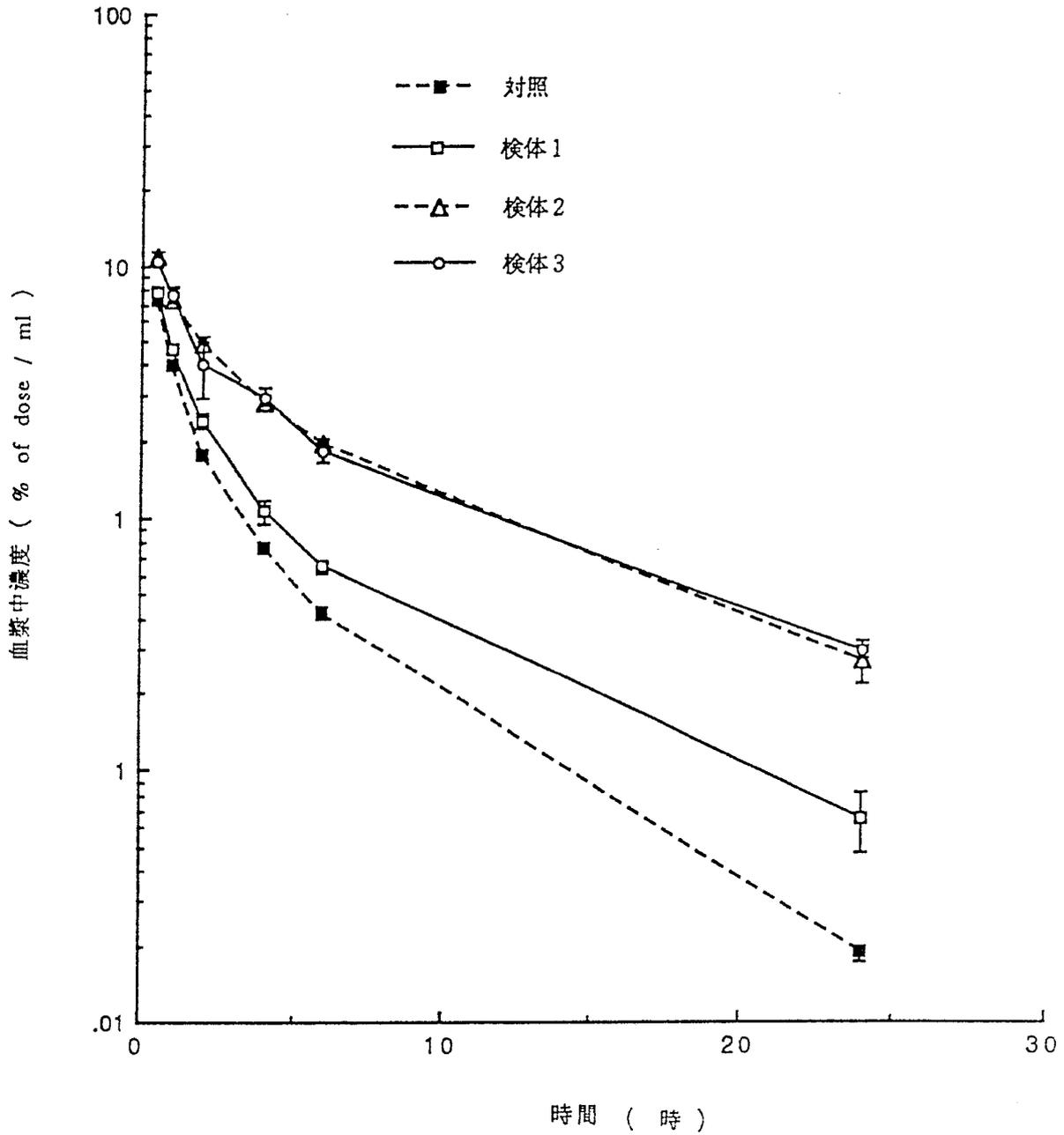
第 27 図



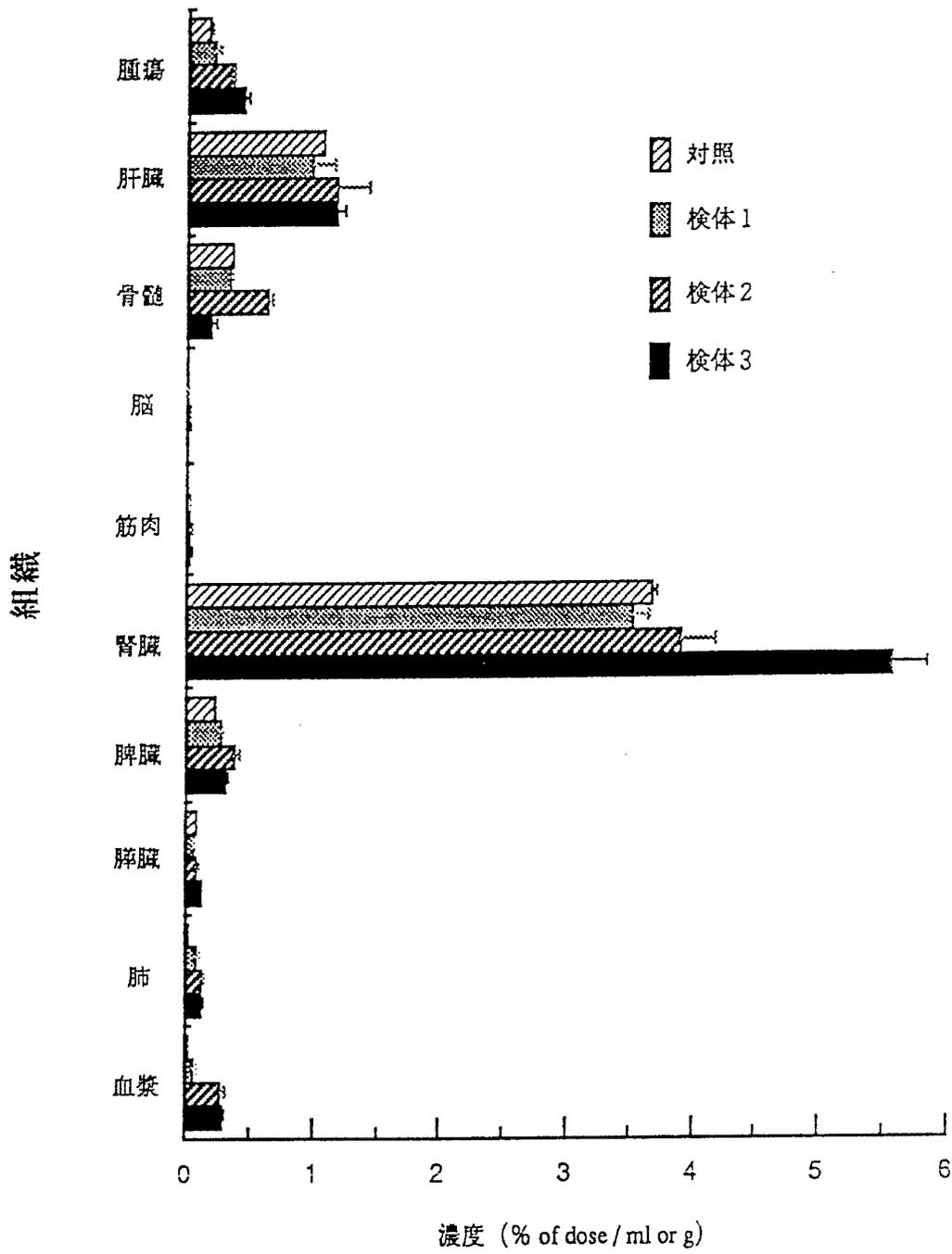
第28図



第 29 図



第30図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01101

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC	
Int. Cl ⁵ C08B37/08	
II. FIELDS SEARCHED	
Minimum Documentation Searched ⁷	
Classification System ¹	Classification Symbols
IPC	C08B37/08
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹	
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 61-133232 (Kogyo Gijutsuin-cho), June 20, 1986 (20. 06. 86), (Family: none) 1-12
A	JP, A, 62-70401 (Fujibo Co., Ltd.), March 31, 1987 (31. 03. 87), (Family: none) 1-12
A	JP, A, 62-81319 (Toyo Contact Lens Co., Ltd.), April 14, 1987 (14. 04. 87), (Family: none) 1-12
A	JP, A, 1-252603 (Ihara Chemical Industry Co., Ltd.), October 9, 1989 (09. 10. 89), (Family: none) 1-12
A	JP, A, 1-252604 (Ihara Chemical Industry Co., Ltd.), October 9, 1989 (09. 10. 89), (Family: none) 1-12
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p>	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
October 31, 1991 (31. 10. 91)	November 11, 1991 (11. 11. 91)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

- | | | |
|---|---|------|
| A | JP, A, 1-252605 (Ihara Chemical Industry Co., Ltd.),
October 9, 1989 (09. 10. 89),
(Family: none) | 1-12 |
| A | Watanabe, K. et al., Chem. Pharm. Bull.,
38. 506-509, (1990) | 1-12 |
| A | Hitoshi Sezaki, Yakugaku Zasshi, 109,
611-621 (1989) | 1-12 |

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers _____, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically

3. Claim numbers _____, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a)

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 91/ 01101

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)	Int. Cl. ⁸ C 08 B 37 / 08	
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C 08 B 37 / 08	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A, 61-133232 (工業技術院長), 20. 6月. 1986 (20. 06. 86), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, A, 62-70401 (富士紡績株式会社), 31. 3月. 1987 (31. 03. 87), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, A, 62-81319 (東洋コンタクトレンズ株式会社) 14. 4月. 1987 (14. 04. 87), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, A, 1-252603 (イハラケミカル工業株式会社), 9. 10月. 1989 (09. 10. 89), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, A, 1-252604 (イハラケミカル工業株式会社), 9. 10月. 1989 (09. 10. 89), (ファミリーなし)	1-12
*引用文献のカテゴリ		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に、及ぶ文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	31. 10. 91	国際調査報告の発送日 11. 11. 91
国際調査機関	特許庁の職員	4 C. 7 6 2 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	種 村 慈 樹 印

第2ページから続く情報

(III 欄の続き)

- | | | |
|---|---|------|
| A | JP, A, 1-252605
(イハラケミカル工業株式会社),
9. 10月. 1989 (09. 10. 89), (ファミリーなし) | 1-12 |
| A | Watanabe, K. et al., Chem. Pharm. Bull.,
38. 506-509, (1990) | 1-12 |
| A | 瀬崎 仁, 薬学雑誌, 109, 611-621 (1989) | 1-12 |

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a) の 2 文の規定に従って引用されていない。

VI. 発明の甲乙の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際調査には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願の甲乙での調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注記

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。