世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 **A61K 47/48, 47/30, 47/26, 31/47**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO00/25825** (43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06016

(22) 国際出願日 1999年10月29日(29.10.99)

(30) 優先権データ

特願平10/310130	1998年10月30日(30.10.98)	JP
特願平10/329272	1998年11月19日(19.11.98)	JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
第一製薬株式会社
(DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]
〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)[JP/JP]
井上和泓(INOUE, Kazuhiro)[JP/JP]
久我 洋(KUGA, Hiroshi)[JP/JP]
池田政浩(IKEDA, Masahiro)[JP/JP]
塩瀬能伸(SHIOSE, Yoshinobu)[JP/JP]
是永 博(KORENAGA, Hiroshi)[JP/JP]
〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)

(74) 代理人
今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.)
〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号
KRFビル5階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME

(54)発明の名称 DDS化合物及びその測定方法

(57) Abstract

A method for assaying a DDS compound containing a saccharide compound-modified carboxy C_{1-4} alkyldextran polyalcohol and a drug compound residue bonded to this carboxy C_{1-4} alkyldextran polyalcohol, or a DDS compound wherein a polymer carrier is bonded to a drug compound residue via a spacer containing 2 to 8 amino acids bonded together via peptide bonds, which involves the step of assaying a hydrolysate obtained by treating the DDS compound with peptidase.

(57)要約

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物、及びペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
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
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

ＤＤＳ化合物及びその測定方法

技術分野

本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させたＤＤＳ化合物（ＤＤＳ：ドラッグ・デリバリ・システム）に関するものである。また、本発明は、高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させたＤＤＳ化合物の測定方法に関するものである。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖化合物を高分子キャリアーとして用い、該高分子キャリアーに対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 WO94/19376 号には、カルボキシル基を有す

る多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数１から８)が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合したＤＤＳ化合物が開示されている。また、特公平 7-84481 号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入したＤＤＳ化合物が開示されている。

これらのＤＤＳ化合物（「薬物複合体」と呼ばれる場合もある）は、高分子キャリアーに結合された抗腫瘍剤を単独で用いた場合に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。本発明者らは、多糖化合物などの高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを１から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合させることにより、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができるＤＤＳ化合物を提供している（国際公開 WO97/46260 号)。また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが高分子キャリアーとして極めて優れた性質を有していることを見出し、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むＤＤＳ化合物を提供した（上記国際公開)。

その他、ポリアルコール化多糖化合物を高分子キャリアーとして用いたＤＤＳ化合物に関する技術については、「多糖－ペプチドードキソルビシン複合体に関する研究・多糖化合物の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」(第 10 回日本ＤＤＳ学会講演要旨集, 279, 1994)；「多糖－ペプチドードキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」(第 9 回日本薬物動態学会年会講演要旨集，292, 1994)；第 19 回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集, D-9, 1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」(第 12 回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集, 51, 1995) などの報告がある。

多糖化合物などの高分子キャリアーの臓器指向性を高める方法として、例えば、糖修飾ポリグルタミン酸誘導体（特開平 5-178986 号公報)、糖修飾ポリリジン誘導体（特開平 5-222187 号公報)、ポリ-ε-置換-L-リジンの D-ガラクトピラノシ

ル-グルコン酸誘導体（特開平 7-70311 号公報）、糖修飾ポリ-ω-置換-L-グルタミン酸誘導体（特開平 7-228688 号公報）、リンカーを介して糖化合物を結合させた多糖化合物（特開平 8-85703 号公報）、及びグルコシル-蛋白誘導体（特開平 9-118699 号公報）などが知られている。しかしながら、従来、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして利用したＤＤＳ化合物の臓器指向性を高める方法は報告されていない。

一方、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物を臨床で使用する場合には、ＤＤＳ化合物自体の血中濃度を正確に測定することが必要であり、また、適正な投与量を決定したり、製品のロット差を検定するためには、ＤＤＳ化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する必要がある。従来、ＤＤＳ化合物の血中濃度の測定やＤＤＳ化合物の医薬化合物の残基の含有量測定は、医薬化合物の発する蛍光やＵＶ吸収を指標にして、ＤＤＳ化合物より医薬化合物またはこれにスペーサーの一部が結合した化合物を切り離すことなく、ＤＤＳ化合物自体を直接測定することにより行われている。また、ＤＤＳ化合物自体のＮＭＲ測定による方法や、ＤＤＳ化合物を酸処理して生じる分解物を測定する方法も提案されている。

しかしながら、医薬化合物が酸に対して不安定である場合には、酸処理等による分解物の定量法を利用することはできず、ＮＭＲ測定による定量は精度が低いという問題がある。また、ＤＤＳ化合物に存在する医薬化合物の残基のＵＶ吸収は、高分子キャリアーやペプチドスペーサーから受ける影響により、医薬化合物自体に比べて極大波長がシフトしたりモル吸光係数が変化している場合があるため、ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に測定することは一般に困難である。さらに、生体に投与された組織中のＤＤＳ化合物をＮＭＲ測定による方法やＵＶ吸収により定量することは極めて困難である。

発明の開示

本発明の課題は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むＤＤＳ化合物の臓器指向性(例えば肝臓への指向性など)を高める手段を提供し、上記の特徴を有するＤＤＳ化合物を提供することにある。

本発明の別の課題は、上記の特徴を有するＤＤＳ化合物の製造用原料として有用な多糖化合物を提供することにある。

本発明のさらに別の課題は、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物の測定方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、ＤＤＳ化合物自体、又はＤＤＳ化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する方法を提供することにある。さらに具体的には、投与されたＤＤＳ化合物の血中濃度や組織内濃度を正確に定量することができ、あるいはＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に定量可能な測定方法を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いると、極めて臓器指向性の高いＤＤＳ化合物を製造することができ、特にガラクトースを結合させたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを含むＤＤＳ化合物は優れた肝臓指向性を有していることを見出した。

また、本発明者らは、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理し、得られた加水分解物を測定することによって、ＤＤＳ化合物の血中濃度やＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に、かつ簡便に定量することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物を提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物；スペーサーが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸である上記ＤＤＳ化合物；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである上記ＤＤＳ化合物；及び、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである上記ＤＤＳ化合物が提供される。

また、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるＤＤＳ化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物が提供される。

さらに、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができるＤＤＳ化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリ

アルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物が提供される。

本発明のさらに好ましい態様によれば、糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である上記ＤＤＳ化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記ＤＤＳ化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記ＤＤＳ化合物;ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01～1.0 である上記ＤＤＳ化合物；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記ＤＤＳ化合物；医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記ＤＤＳ化合物；及び肝臓癌治療剤である上記ＤＤＳ化合物が提供される。

別の観点からは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー；及び上記ＤＤＳ化合物の製造に使用するための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが本発明により提供される。また、別の観点からは、上記ＤＤＳ化合物の製造のための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した２から８個のアミノ

酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

この発明の好ましい態様によれば、生体試料中に含まれる該ＤＤＳ化合物の濃度測定に用いる上記方法；該ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる上記方法；該加水分解物が医薬化合物である上記方法；該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物である上記方法；及び、スペーサーの一部がスペーサー由来の１個のアミノ酸である上記方法が提供される。

上記発明のさらに好ましい態様によれば、該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する高分子キャリアー、好ましくは多糖誘導体である上記方法；該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール、好ましくはカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記方法；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記方法；該高分子キャリアーが糖化合物で修飾されたものである上記方法；該ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記方法；スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチドである上記方法;スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基（式中、Y'は ｐ－フェニレン基を示す）である上記方法；ペプチダーゼがα－キモトリプシン又はパパインである上記方法；及び、医薬化合物が（1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記方法が提供される。

上記発明の特に好ましい態様では、上記方法はＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合したＤＤＳ化合物の測定に用いることができ、ペプチダーゼとしてα－キモトリプシンを用い、加水分解物として（1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定することにより、上記ＤＤＳ化合物又は上記ＤＤＳ化合物に導入された上記抗腫瘍剤の含有量を定量することができる。

図面の簡単な説明

第１図　本発明の方法（例４）で測定したＤＤＳ化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第２図　本発明の方法（例５）で測定したＤＤＳ化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第３図　糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のＤＤＳ化合物（例６）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第４図　糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のＤＤＳ化合物（例６）のGPCチャートを示す図である。

第５図　例６で製造したＤＤＳ化合物（(C)及び(D)）の肝臓への集積性を示す図である。

第６図　本発明のＤＤＳ化合物(例６(D))の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第７図　本発明のＤＤＳ化合物(例７)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第８図　本発明のＤＤＳ化合物(例９)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第９図　本発明のＤＤＳ化合物（例６(D)）のGPCチャートを示す図である。

第10図　本発明のＤＤＳ化合物（例７）のGPCチャートを示す図である。

第11図　本発明のＤＤＳ化合物（例９）のGPCチャートを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のＤＤＳ化合物は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むことを特徴としている。より具体的には、本発明のＤＤＳ化合物は、(1) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介さずに結合している場合；及び(2) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合のいずれをも包含する。

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合の例としては、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが１個のアミノ酸からなるスペーサーで結合している場合、又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合している場合や、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに-NH-Y-CO- [式中、Yは炭素数１から８個のアルキレン基又は$-C_6H_4-CH_2-O-$ ($-C_6H_4-$はフェニレン基を示し、該フェニレン基は１又は２個以上の置換基を有していてもよく、好ましくはp－フェニレン基である）で表される基を示す]で表される連結基が結合したスペーサーを介して結合している場合などを挙げることができる。本明細書において用いられる「修飾」という用語は、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合によって結合した状態を含めて最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味において

も限定的に解釈してはならない。

上記のＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーとの結合に関与できる１又は２以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基、スペーサーに存在する反応性官能基（例えば、ペプチドスペーサーを用いる場合には、そのＮ末端アミノ基若しくはＣ末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基）に結合していてもよい。また、本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

上記発明において、医薬化合物の残基とは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーと医薬化合物の残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が D-NH_2, D-COOH, D-COOR, D-OH, D-SH, D-$CONH_2$, D-NH-COOR (R は低級アルキル基等)で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ D-NH- (D-NH-CO-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-O- (D-O-CO-Q, D-O-Q など), D-S- (D-S-CO-Q, D-S-Q など), D-CONH- (D-CO-NH-CO-Q など), D-NH-CO- (D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q など) で表される（カッコ内はスペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合を

示し、Q はスペーサー及びカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからそれぞれ反応性官能基及びカルボキシル基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体)、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等）などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

医薬化合物の残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとを結合するスペーサーとして、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるスペーサーを用いる場合には、該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する)、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

好ましいスペーサーは2から6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、α－アミノ酸のほか、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、γ－アミノ酪酸などを用いてもよい。

このようなα－アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で多糖化合物に近接した位置に配置されることが好ましい。

例えばオリゴペプチドスペーサーを用いる場合の結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのＮ末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのＣ末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスペーサの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基のα－アミノ基及びε－アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がＮ末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に１個又は２個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がＮ末端のスペーサー及び両末端がＣ末端のスペーサーを利用してもよい。

オリゴペプチドからなるスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが -X-Z-で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれＮ末端側及びＣ末端側となってペプチド結合したジペプチドのＮ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-，-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位

において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離する。従って、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のＤＤＳ化合物の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平 6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項２に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、ＤＤＳ化合物に必要に応じて用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサーを利用すべきか否かの選択、あるいはスペーサーを用いる場合にその種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がＮ末端であり、Ｃ末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-Phe は D-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸は L-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したＤＤＳ化合物の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N 末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

表1

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

本発明のＤＤＳ化合物は、高分子キャリアーとして、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有することを特徴としている。本発明のＤＤＳ化合物におけるカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、α-D-1,6-結合を任意の割合で含んでいてもよい。例えば、α-D-1,6-結合の割合が 85%以上、90% 以上、又は 95% 以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば 1,000 程度から 2,000,000 程度のもの、好ましくは 3,000 程度から 800,000 程度のものを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル基を構成する C_{1-4} アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の C_{1-4} アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、α－クロルプロピオン酸、α－メチル－α－クロルプロピオン酸、β－クロルプロピオン酸、α－メチル－β－クロルプロピオン酸、α－クロル酪酸、β－クロル酪酸、γ－クロル酪酸などのハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部

分的又は完全にカルボキシ C_{1-4} アルキル化することにより行うことができる。

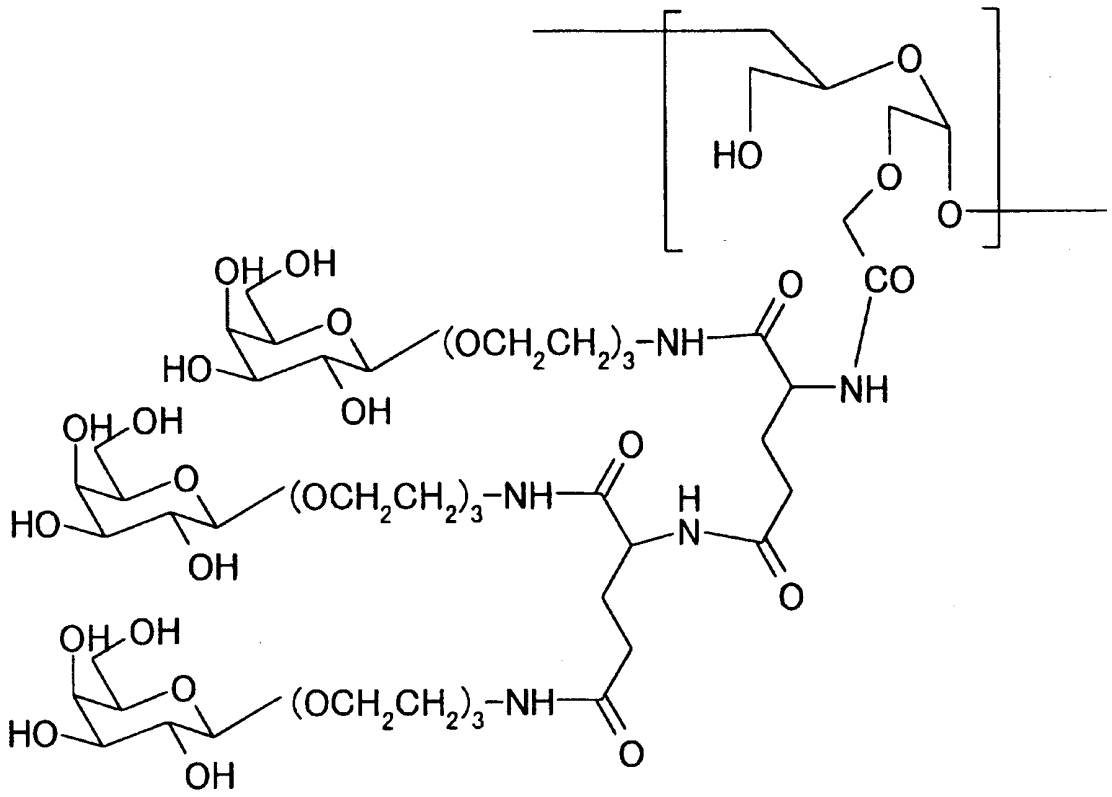
例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし 100 ℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ C_{1-4} アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、0.01～2.0 の範囲、好ましくは 0.1～1.0 の範囲である。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、ＤＤＳ化合物が指向すべき臓器の種類や体内動態などの条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合の種類は特に限定されない。糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが、例えば、O-α-グリコシド結合又は O-β-グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対する糖化合物の導入量（置換度）は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01-1.0 程度である。

リンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、

-O-$(CH_2)_n$-NH-（nは1から16の整数）又は-(O-$CH_2CH_2)_m$-NH-（mは1から10の整数）で表されるリンカーを利用することが好ましい。これらのリンカーの0末端又はN末端、好ましくは0末端を糖化合物に0-α-グリコシド結合又は0-β-グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

また、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いることにより、クラスター修飾体を製造することもできる。クラスター修飾体は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対してクラスター修飾に適するリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させた化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又はBiol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997 などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。本発明のＤＤＳ化合物におけるクラスター修飾の一例を下記に示す（下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示してあり、医薬化合物の残基は省略してある）。もっとも、本発明のＤＤＳ化合物に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることはなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。



単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロースなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-O-ベンゾイルグルコース、6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、シュークロース、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。

これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

本発明のＤＤＳ化合物の製造方法は特に限定されないが、以下に一般的な製造方法を示す。また、その一例を本明細書の実施例に具体的かつ詳細に示した。当業者は、下記の一般的説明及び実施例に記載された製造方法を参照しつつ、製造原料、反応試薬、及び反応条件などを適宜選択し、必要に応じてそれらの方法に修飾や改変を加えることにより、本発明に包含されるＤＤＳ化合物を容易に製造することが可能である。一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを適宜の方法に従って糖化合物で修飾し、該修飾体を医薬化合物の残基又は医薬化合物に結合したスペーサーと反応させることにより、本発明のＤＤＳ化合物を製造することができる。通常は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールをナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液として調製し、糖化合物の修飾及び医薬化合物（又は医薬化合物に結合したスペーサー）との反応を水中、又は含水有機溶媒中で行うことができる。

あるいは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有機アミン塩の形態に変換し、その後の反応を実質的に水を含まない有機溶媒中で行うことも可能である。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩などを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、

カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、H^+型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

医薬化合物自体とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合、又は医薬化合物を結合させたスペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はスペーサーの反応性アミノ基（ペプチドスペーサーではN末端アミノ基など）とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを、酸アミド結合させればよい。もっとも、スペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や１又は２以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、ペプチドスペーサーのC末端カルボキシル基又は医薬化合物のカルボキシル基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はペプチドスペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'- ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のような N,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDAPC) 等のカルボジイミド誘導体、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン (EEDQ) などを用いることができる。この場合、必要に応じて 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾ

ール誘導体を加えてもよい。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

反応を非水系で行う場合の溶媒としては、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種（糖化合物で修飾されたカルボキシメチルデキストランポリアルコールの有機アミンの塩及び医薬化合物又は医薬化合物を結合させたスペーサーなど）を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、N-メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入される医薬化合物の残基の量は特に限定されないが、医薬化合物の残基の種類、並びにＤＤＳ化合物の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1 ～30 重量%、好ましくは 2～15 重量%程度の範囲を選択することができる。医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤を用いる場合の導入量は、例えば 1～15 重量%、好ましくは 4～8 重量%程度である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物の残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

例えば、医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤を用いる場合、この医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えば pH3 程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えば pH10 程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入したＤＤＳ化合物は同等の抗腫瘍効果を有しているが、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと上記医薬化合物を結合させたスペーサー（例えばオリゴペプチドスペーサー）とを反応させる場合に開環型の反応種が反応系に存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行し、著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一なＤＤＳ化合物が得られない場合がある。このような副反応は、

平衡が達成されない非水系において反応種として閉環体を用いることにより回避することができる。

本発明のＤＤＳ化合物は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。また、本発明のＤＤＳ化合物は優れた血管透過性を有している。腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されているため、オリゴペプチドからなるスペーサーを有するＤＤＳ化合物はスペーサー部分で容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が細胞内に移行して薬効を発揮するか、または標的細胞の糖を認識するレセプターを介してＤＤＳ化合物が細胞内に取り込まれ、プロテアーゼにより遊離した薬物が薬効を発揮する。

また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールは生体内、例えば肝臓、脾臓、又は骨髄などで異物高分子として認識される程度が低い。このため、これらの臓器への移行性が低く、一方、糖化合物の種類に応じて対応の糖レセプターが豊富な臓器には高濃度で分布するという特徴がある。例えば、ガラクトースで修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有する本発明のＤＤＳ化合物は、肝臓に対して優れた指向性を有している。従って、医薬化合物として抗腫瘍剤を結合したＤＤＳ化合物は、肝臓癌の治療に有用である。

本発明のＤＤＳ化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH 調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができ、上記製剤は医薬組成物として調製することができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物の残基を構成する医薬化合物の投与量、ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定す

べきである。例えば、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤の残基が約6重量％ 程度の割合で導入されたＤＤＳ化合物を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 0.1～100 mg程度、好ましくは約 1～30 mg の範囲で一回投与し、3～4 週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性などを目的として行われる測定を含めて、最も広義に解釈する必要があるが、好ましくは定量を意味している。本発明の測定方法の対象となるＤＤＳ化合物は、ペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した化合物であり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。ペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーとしては、ペプチド結合した2から8個のアミノ酸のみからなるスペーサのほか、ペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに-NH-Y-CO-［式中、Y は炭素数1から8個のアルキレン基又は-C_6H_4-CH_2-O-（-C_6H_4-はフェニレン基を示し、該フェニレン基は1又は2個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは p－フェニレン基である）で表される基を示す］で表される連結基が結合したスペーサーなどを挙げることができる。本発明の測定方法は、例えば、血液や体液などの生体試料に含まれるＤＤＳ化合物自体の濃度を測定するために用いることができる。また、本発明の方法は、ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の導入量（例えば、ＤＤＳ化合物全重量に対する医薬化合物の残基の重量％など）を測定するために用いることができる。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味は上記に説明したものと同義であり、医薬化合物としては、スペーサーとの結

合に関与できる１又は２以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、スペーサーのＮ末端アミノ基若しくはＣ末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

医薬化合物の残基の具体例は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したとおりであり、好適に用いることができる医薬化合物の残基も同様である。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味はスペーサーを介して高分子キャリアーと結合するが、好ましいスペーサーは、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基、又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに -NH-Y'-CH_2-O-CO-（式中、Y'はｐ－フェニレン基を示す）で表される連結基が結合したスペーサーであり、スペーサーを構成するアミノ酸の種類、スペーサーの結合方向、アミノ酸配列、具体例などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したものと同様である。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物を構成する高分子キャリアーとしては、例えば、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、ＤＤＳ化合物の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子はいずれも高分子キャリアーとして利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体を好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適に使用できる。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；または

N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることができる。

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体を用いることができ、好ましくは分子中にカルボキシル基を有するものを用いることができる。分子中にカルボキシル基を有する高分子キャリアーの例としては、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサンなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。例えば、水酸基をカルボキシ C_{1-4} アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いたＤＤＳ化合物は本発明の方法の特に好適な測定対象である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度、製造に用いるデキストランの種類、及び製造方法などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したものと同様である。

また、高分子キャリアーとして糖化合物で修飾された高分子キャリアーを用いたＤＤＳ化合物も本発明の測定方法の好適な対象である。例えば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールなどを高分子キャリアーとして好適に用いることができる。高分子キャリアーを糖化合物で修飾する方法や糖化合物の種類などは、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の測定方法の対象は、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用い

て製造されたＤＤＳ化合物（いわゆるクラスター修飾体）であってもよい。クラスター修飾の概念は、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の方法は、上記のＤＤＳ化合物を測定するにあたり、ＤＤＳ化合物にペプチダーゼを作用させて得られる加水分解物を測定することを特徴としている。ペプチダーゼとしては、ＤＤＳ化合物のスペーサーに含まれるオリゴペプチド部分（２から８個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド部分）を加水分解することができるものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、スブチリシン、α-キモトリプシン、タイプ IV コラゲナーゼ、ペプシン、サーモリシン、パパイン、エラスターゼなどを用いることができるが、これらのうち、α-キモトリプシン又はパパインが好ましい。

加水分解物の種類は特に限定されないが、紫外線吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどの通常の分光学的手法により検出可能であることが望ましい。通常は、加水分解物として、医薬化合物自体のほか、スペーサーの一部が残存して医薬化合物の残基に結合している化合物、例えばスペーサー由来の１個のアミノ酸が結合した医薬化合物、スペーサー由来の２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドが結合した医薬化合物、又は-NH-Y-CO-［式中、Ｙは炭素数１から８個のアルキレン基又は$-C_6H_4-CH_2-O-$（$-C_6H_4-$はフェニレン基を示し、該フェニレン基は１又は２個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは p－フェニレン基である）で表される基を示す］で表される連結基を介してスペーサー由来の１個のアミノ酸若しくは上記オリゴペプチドが結合した医薬化合物などを測定することができる。また、上記の加水分解物においては、医薬化合物の反応性官能基の一部又は全部が加水分解を受けていてもよい。ＤＤＳ化合物の種類に応じて適宜のペプチダーゼを選択することにより、所望の加水分解物を測定することが可能になる。

測定のための試料としては、ＤＤＳ化合物を投与した動物（ヒトを含む）から分離された血液、リンパ液、唾液、尿、糞、摘出組織などの生体試料のほか、ＤＤＳ化合物の水溶液、又は実質的に酵素反応を阻害しない水性有機溶媒の溶液な

どを用いることができる。各種のペプチダーゼについて好適な反応条件が当業界で知られており、当業者は、ペプチダーゼの種類に応じて適宜の反応条件、例えば、基質濃度、ｐＨ、緩衝液、反応温度、反応時間などを容易に選択することができる。通常は、上記の試料を必要に応じてホモジュネートや脱蛋白質などの前処理に付した後、ＤＤＳ化合物が所望の基質濃度となるように希釈した反応液にペプチダーゼを添加し、ＤＤＳ化合物が完全に加水分解されるまで反応を継続すればよい。

加水分解物を測定する方法は特に限定されないが、ＤＤＳ化合物の定量、又は医薬化合物の導入量の定量を行う場合には、加水分解物の性質に応じて、紫外線吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定など、通常の分光学的手法を単独で又は複数組み合わせて用いることが望ましい。また、高速液体クロマトグラフィーなどの分離操作を適宜組み合わせて測定を行ってもよい。予め測定系において検量線を作成することにより、精度よく定量を行うことが可能になる。なお、本明細書の実施例には、本発明の方法の代表例が具体的かつ詳細に説明されているので、当業者は、上記の一般的説明及び実施例の具体的説明に基づいて、必要に応じてそれらに適宜の改変ないし修飾を加えることにより、本発明の方法を容易に実施できる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

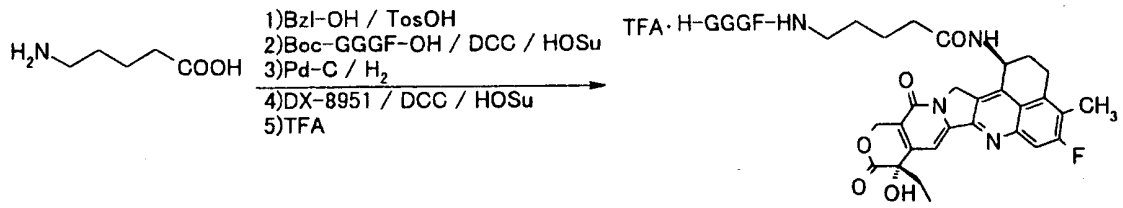
例１

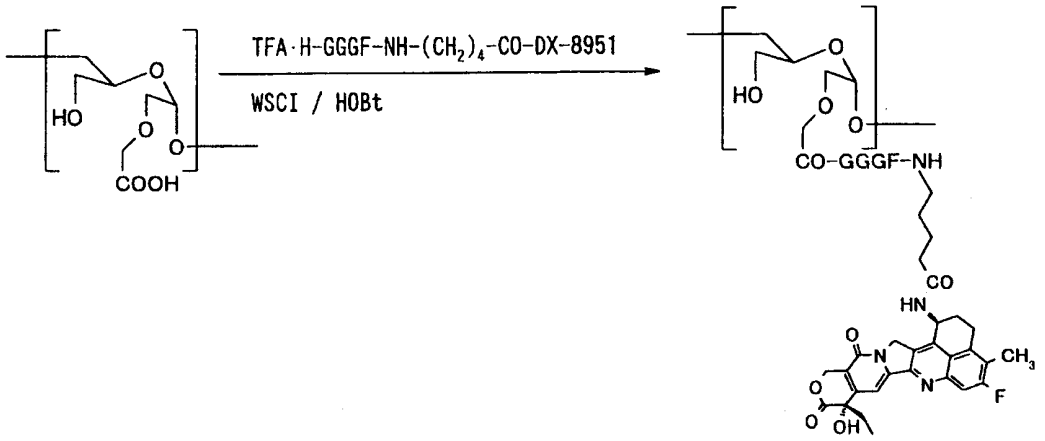
高分子キャリアーであるカルボキシメチルデキストランポリアルコール（以下CM-Dex-PA又はCMデキストランポリアルコールなどの略号を用いる場合がある）と抗腫瘍剤(特開平6-87746号公報の請求項２に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：以下、

実施例においてDX-8951と略す。）とが、-Gly-Gly-Phe-Gly-（オリゴペプチドはN末端側からの配列として示す。以下、同様である）からで表されるテトラペプチドスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物(化合物１)を、国際公開WO97/46260号の実施例15に記載の方法に準じて製造した。CM-Dex-PAとしては、平均分子量228K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4のものを用いた。

蒸留水にて400 μg/mlに調製した上記ＤＤＳ化合物10μlを180μlのBritton Robinson 緩衝液（pH6.0）に添加し、さらに蒸留水で 10mg/ml に調製した α-キモトリプシン溶液を 10 μl 添加した。反応液を40℃で２時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 200 μl 加え、遊離した加水分解物（スペーサー由来のグリシンがDX-8951のアミノ基にペプチド結合した化合物：国際公開 WO97/46260 号の実施例 50 に記載の化合物、以下、G-DX-8951と略す）をHPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18 (4.6×100 mm；3.5 μm, Watars 社）カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1：2）を36.5%含有する 0.1M 酢酸ナトリウム(pH5.0)にて溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375 nm 及び Em.445 nm）により加水分解物を検出した。この結果、上記DDS化合物の DX-8951 含有量は5.7% であった。一方、DX-8951のUV吸収（366 nm）を指標とし、分光光度計を用いて上記DDS化合物の DX-8951含有量を算出したところ4.9% であった。

例２





CM-Dex-PAとDX-8951とが-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-で表されるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物（化合物２）を下記のようにして製造した。５－アミノペンタノイックアシッド(1.0 g)と p-トルエンスルホン酸(1.95 g)とベンジルアルコール(5 ml)をトルエン(50 ml)中、140℃で Dean-Stark を用いて、生成する水を除去しながら５時間反応させた。反応液を濃縮し、得られた残さにエーテルを加えて固化した。得られた固体を濾過し、エーテルで洗浄して乾燥させ、５－アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩を 2.9g 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg)、HOSu (182 mg)、及び DCC (326 mg)を DMF (20 ml)に溶解し、30 分間攪拌した。この溶液に 5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩 (500 mg)とトリエチルアミン (0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で３日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl を 380 mg 得た (Bzl はベンジル基を示す)。 Boc-Gly-Gly-Gly-

Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (380 mg)を 50% 含水メタノール (20 ml) に溶かし、5% Pd-C (50% 含水)(300 mg)を加え、水素常圧下、1晩撹拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH を 330 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH (150 mg) と DCC (70 mg) と HOSu (40 mg) を DMF に溶かし、30 分撹拌した。この溶液に、DX-8951 (160 mg) とトリエチルアミン (0.040 ml) を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2:MeOH=20:1) で精製して、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 を 110 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (110 mg) を TFA (2 ml) に溶かし、1時間反応させた後、反応液を濃縮し、得られた残査にエーテルを加え固化させた。上澄みを除去し、固体を乾燥し、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 100mg 得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6):δ 8.45-8.55 (m,2H), 8.28-8.35(m,2H), 7.95-8.10 (br,2H), 7.79 (d,1H,J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m,1H), 7.32 (s,1H), 7.20-7.30 (m,5H), 7.15-7.25 (m,4H), 6.50-6.60 (br,1H), 5.50-5.60 (m,1H), 5.40-5.50 (m,2H), 5.18 (s,2H), 4.50-4.60 (m,1H), 3.55-3.95 (m,7H), 3.00-3.25 (m,5H), 2.75-2.85 (m,1H), 2.50 (s,3H), 2.15-2.25 (m,4H), 1.86-2.00 (m,2H), 1.55-1.65(m,2H), 1.45-1.55(m,2H), 0.88 (t,3H,J=7.35Hz)

特開平 8-144421 号公報の実施例 13 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 の CM-Dex-PA(350mg) を水 (10ml) に溶解した。この溶液に、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (50 mg) をメタノール (10 ml) に溶かした溶液を加え、さらに、HOBt (7 mg) をメタノール (5 ml) に溶かした溶液を加えた。反応液の pH を 7.0 に調整して水溶性カルボジイミド (10mg)を加え、14 時間撹拌した。さらに、水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、2 時間撹拌後に、水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、2時間撹拌した。反応液

を超純水で希釈し、限外ろ過膜（50K）を用いて低分子を除去し、凍結乾燥し、得られた粉体を3M食塩水に溶かし、エタノールに滴下し、析出した固体を遠心分離によって分離した。上澄みを除去し、固体を再度水に溶解し、限外濾過膜（50K）で低分子を除去した後、0.22μmのフィルターを通して凍結乾燥し、目的物を280mg得た。

蒸留水にて 2.63 mg/ml に調製した上記ＤＤＳ化合物の溶液10μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製した α-キモトリプシン溶液、又はTris-HCl（pH 9）にて 2 mg/ml に調製したサブチリシンＡ溶液を 490μl 添加した。この反応液を 40℃ で２時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 500μl 加え、遊離した加水分解物[NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm；3.5 μm, Watars 社）カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1：2）を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375 nm 及び Em.445 nm）により加水分解物を検出した。この結果、NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 は約4.8分に溶出された。NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951を検量線に用いて上記ＤＤＳ化合物中のDX-8951含有量を算出したところ3.2%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記ＤＤＳ化合物のＵＶ吸収からDX-8951含有量を算出した場合には2.9%と算出された。

例３

①サブチリシンＡ（0.1 M Tris-HCl pH 9.0）②α-キモトリプシン（0.1 M Tris-HCl pH 8.0)、③サーモリシン(0.1 M Tris-HCl/1 mM $CaCl_2$ pH 9.0)を用いて、例１で製造したＤＤＳ化合物（化合物１）のDX-8951含有量を測定した。各酵素用の緩衝液180 μl に 400 μg/ml に調製した化合物１を 10μl 添加した(最終濃度：20 μg/ml)。この混合物に各緩衝液で100 mg/ml に調製した各酵素を 10 μl 添加した後（最終濃度：5 mg/ml)、40℃で３時間反応させた。反応後、50% アセトニトリルを含有する 0.5 N HCl 溶液を200μl 添加し、その 10μl を HPLC

で分析した。Symmetry C18 (4.6×250 mm) カラムを用い、有機溶媒 (アセトニトリル：メタノール=2:1) を 31% 含有する 0.1 M AcONa 緩衝液 pH 5.0 で溶出した。蛍光スペクトル測定 (Ex.375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を測定し、G-DX-8951、DX-8951、及び化合物 1 のスペーサー由来のフェニルアラニン-グリシンが結合した DX-8951 (FG-DX-8951)をそれぞれ 2 nmol/ml 含有する溶液を用いて作成した検量線により酵素反応溶液中の加水分解物を定量した。この結果、サブチリシンＡとα-キモトリプシンは上記条件によりそれぞれ化合物 1 から G-DX-8951 を 100% 遊離した。また、サーモリシンは FG-DX-8951 を 100%遊離した。

例 4

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を BALB/c(♂)マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量：5.2%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で腹腔内投与した。投与後、経時的 (2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25 μl に 80% メタノール水を 100 μl 添加した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の 25 μl に 0.1 M Tris-HCl pH 8.5/0.1 M $CaCl_2$ を用いて 2 mg/ml に調製したサーモリシン溶液を 225 μl 添加し、50°C で 1 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μl 添加し、その 20 μl を HPLC 分析した。カラムとして Symmetry C18 (4.6×100 mm) を用い、メタノールとアセトニトリルの混液 (1：2) を 41% 含む 0.1 M AcONa (pH 5) 溶液にて溶出し、蛍光スペクトル測定 (Ex.375 nm、Em.445 nm) により加水分解物を検出した。その結果、10 mg/kg 投与では、腹水中の化合物 1 の濃度は時間の経過とともに減少したが、血中濃度は投与後次第に上昇して 24 時間で最大値となり、その後、腹水濃度とほぼ同程度に推移した (図 1)。2.5 mg/kg 投与時の腹水及び血中濃度の推移は 10 mg/kg の場合と同様であった。

例5

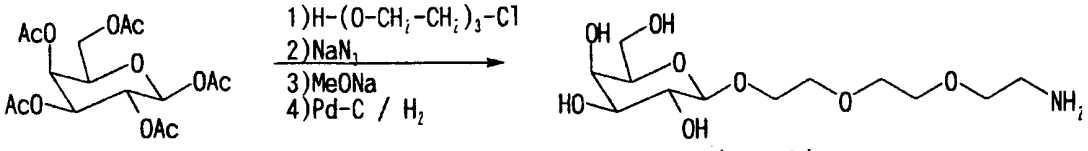
腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞（1×10^6 cells/mouse）を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1（DX-8951 含有量：6.6%）を 10 及び 2.5 mg/kg（DX-8951 換算量）で静脈内投与した（1群3匹）。投与後、経時的（5分、30分、2、4、8、24、及び48時間）に心採血し、10分放置した後、12,000 rpm、10分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25μl に Britton Robinson Buffer (pH 6) を用いて 2 mg/ml に調製したα-キモトリプシン溶液を 225 μl 添加し、40℃ で2時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μl 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 10 μl を HPLC 分析した。HPLC 分析で得られた G-DX-8951 濃度、及び用いた化合物1の DX-8951 含有量から推定される化合物1の濃度を算出した。HPLC 分析は例4の条件に従って行った。この結果、10 mg/kg 投与時には、血中の化合物1濃度は時間の経過とともに減少した。腹水での化合物1の濃度は投与後次第に上昇し、48 時間で血中濃度とほぼ同程度になった（図2）。2.5 mg/kg 投与時における化合物1の腹水中及び血中の濃度推移は、10 mg/kg の場合と同様であった。

例6

糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有するＤＤＳ化合物を以下のようにして製造した。下記のスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された1個又は2個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載したＤＤＳ化合物のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度(構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチ

ルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H^+) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s(mg)、 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を a(ml)、 0.1N 塩酸の滴定量を b(ml)とし、カルボキシメチル化度を 13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]の式により求めた。また、薬物の導入量(重量%)は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析(362 nm 付近)から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った(カラム:TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液: 0.1M NaCl、流速:0.8 ml/min、カラム温度:40℃)。

(A)化合物2－2の合成



(2－1) (2－2)

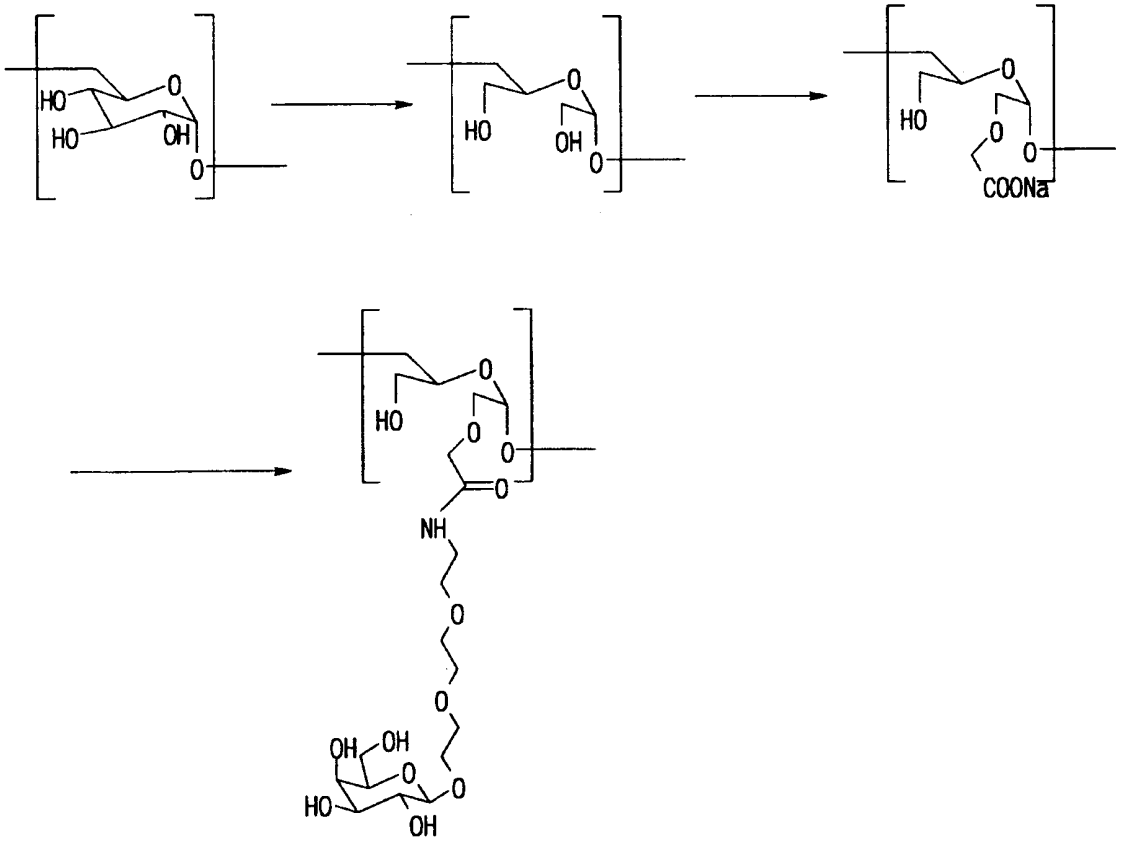
化合物2－1(5.0 g)と 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(3.75 ml)をジクロロメタン(75 ml)に溶かし、3フッ化ホウ素エーテル錯体(7.7 g)を加え、5時間撹拌した。反応液をジクロロメタン(100 ml)で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル 2:1)で精製し、クロル体を3.3g 得た。得られたクロル体(3.3 g)と NaN_3(2.0 g)を DMF(15 ml)中で 60℃で2日間撹拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を 2.8g 得た。

得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液の pH が 10 になるまで、28% MeONa 含有メタノール溶液を加え、1時間撹拌した。反応液に Dowex

50WX8(H^+)を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(2.0 g)を加え、水素常圧下1晩撹拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物2－2を1.2 g得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ4.20-4.30 (1H,br), 4.00-4.10 (1H,br), 3.80-3.85 (1H,br), 3.50-3.75 (14H,m), 2.75-2.90 (2H,m)

(B)ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールの合成



デキストラン4(フナコシ社製、平均分子量4000-6000)(20 g)の0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して4℃で10日間撹拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩撹拌した。反応液を氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩撹拌し

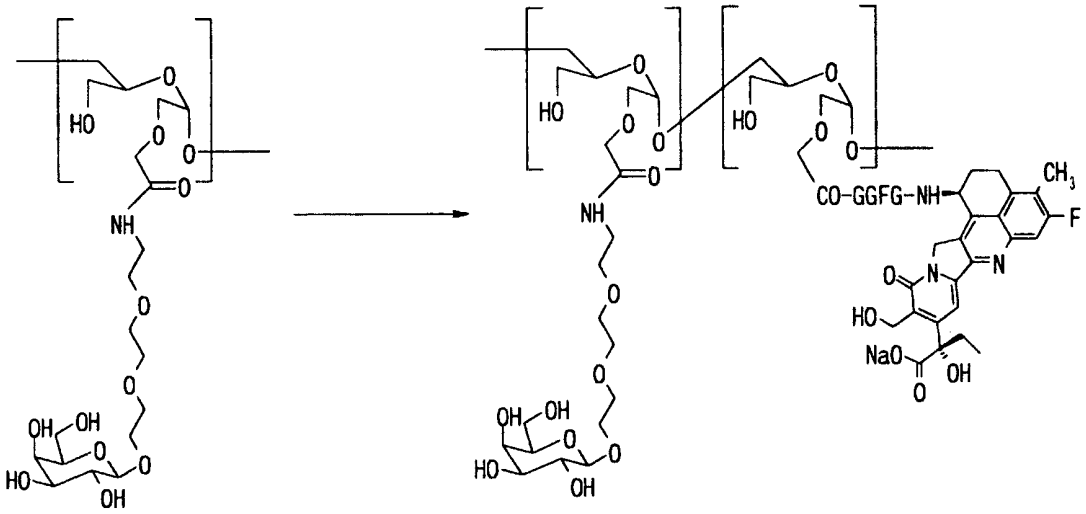
た。氷冷して、酢酸でpH5.5に調整し、4℃で1時間撹拌した。氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。以上の行程を2回行い、得られた2つの水溶液を1つにまとめ、バイオマックス-3膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9Kであった。

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル（以下、CMと略す）デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。

この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14Kであり、糖残基あたりのCM化度はアルカリ滴定から0.7であった。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例1の化合物2－2(800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(240 mg)を2時間おきに3回添加し、計6時間撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を1.1 g得た。本化合物中のガラクトース含有量をフ

エノール-硫酸法により定量した結果、糖10残基当たり、1.0の割合であった。

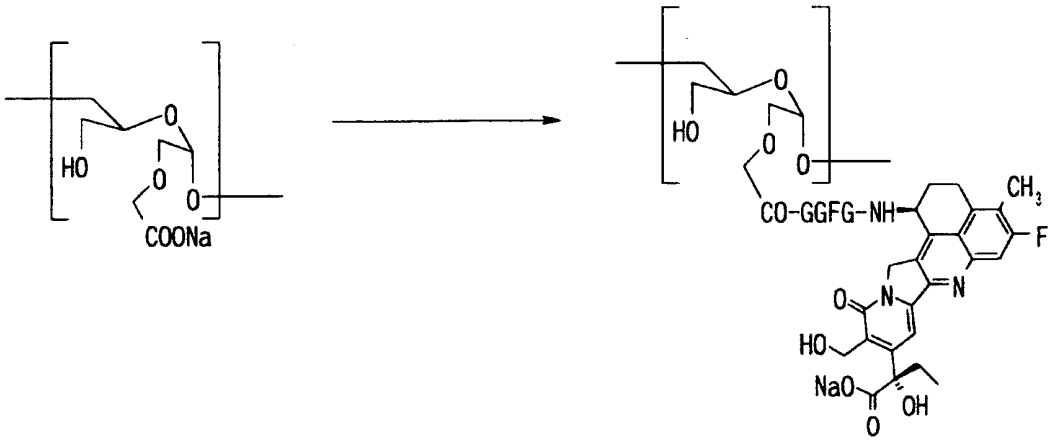
(C)ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成



上記(B)で得られたガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(30 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (150 mg)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(35 mg)のメタノール溶液(40 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(35 mg)を2時間ごとに、3回加えた後、1晩撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm, 8 分)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を900mg得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図3及び図4に示す。本化合物中の DX-8951 含有量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて

定量したところ、4.9% (W/W)であった。

(D)CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成



上記(B)で得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8(Et_3NH^+)を通し、CMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)とGly-Gly-Phe-Gly-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩 (350 mg) を含むN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩撹拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 1.4g得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図6及び図9に示す。本化合物中のDX-8951含量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリ

ス緩衝液（pH 10.0）中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

(E)ＤＤＳ化合物の測定

上記(C)で得られたガラクトース修飾ＤＤＳ化合物および対照として上記(D)のＤＤＳ化合物を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951 に換算した濃度が 0.5 mg/ml となるように調製した。これらのＤＤＳ化合物水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的（0.5, 1, 2, 4 および 24 時間）に肝臓を採取し、これらのＤＤＳ化合物量を求めた。得られた肝臓の重量に対し水を５倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15,000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50 μl に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した α-キモトリプシン溶液 450 μl を添加し、40 ℃ で２時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl 溶液を 500 μl 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20 μl を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することでＤＤＳ化合物量を求めた。この時、投与に用いた各ＤＤＳ化合物水溶液を、蒸留水により 50、10、2 μg/ml に調製し、それぞれ 50 μl を上述の方法により酵素処理して G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

HPLC 分析条件

カラム：Symmetry C18 (4.6×100mm)

流速：1.0 ml/min

カラム温度：40℃

検出波長（蛍光）：Ex.375 nm、Em.445 nm

溶出液：メタノール：アセトニトリル = 1 : 2 (29%) 0.1% TFA (71%)

結果を図５に示す。上記のガラクトース修飾ＤＤＳ化合物は、対象のＤＤＳ化合物（上記(D)）に比べて高い肝臓集積性を示した。

例７：ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成

デキストラン T500(ファルマシア社製、分子量 500K)(50 g)の 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)(5000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g)の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光して４℃で 10 日間撹拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晩撹拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 6.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(70 g)を水(2000 ml)に懸濁させた液を加えた。溶解後、室温で一晩撹拌した。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、４℃で 1 時間撹拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液を限外濾過膜(1000K、フィルトロン社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール(21.1 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、128K であった。

水酸化ナトリウム(13.84 g)を水(150 ml)に溶かして得られる水溶液に上記で得たデキストランポリアルコール(5 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸のナトリウム塩(61.6 g)を加えて溶解させた後室温で一晩反応させた。この反応液の pH を 8.5 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、428K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.9 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(500 mg)を水(50 ml)に溶解し、実施例１の化合物２－２(400 mg)のメタノール(20 ml)溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(160 mg)のメタノール(20 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(120 mg)を 2 時間おきに３回添加し、計６時間撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、

バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥し、目的物を 600 mg 得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.7 の割合であった。

得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(200 mg)を水(3 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩(27 mg)のメタノール溶液(3 ml)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(7mg)のメタノール溶液(3 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(7 mg)を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(10 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 180 mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 7 及び図 10 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、3.7% (W/W)であった。

例 8 : 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトースの合成

特開平 5-202085 号公報に記載の方法により合成した 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アセチルアミノ-2-デオキシ-3,4,6-トリアセチルガラクトース (2.64 g)をメタノール(10 ml)に溶解した溶液を氷冷した。この溶液にナトリウムメトキシドの 28%メタノール溶液(0.64 ml)を加え、そのまま氷冷下で 5 時間撹拌した。反応液に酢酸(0.186 ml)を加えた後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=9:1 溶

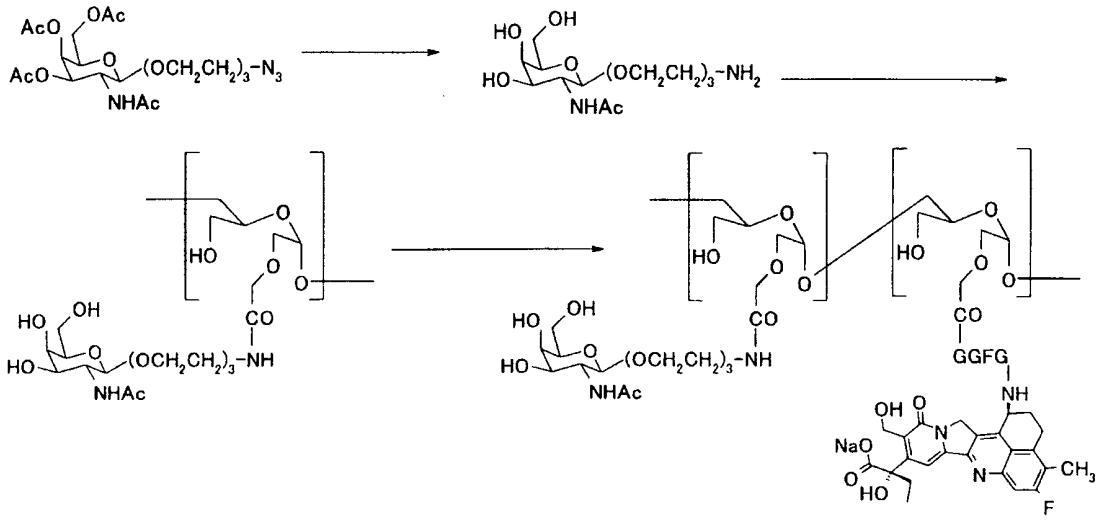
液）で精製して 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (1.98 g)を得た。

^{1}H-NMR (CD_3OD)δ：4.44 (d,1H,J=8.8Hz), 3.94-3.98 (m,1H), 3.92 (dd,1H,J=8.8, 10.7Hz), 3.83 (d,1H,J=2.9Hz), 3.62-3.79 (m,11H), 3.58 (dd,1H,J=3.4,10.7Hz), 3.49 (dd,1H,J=5.9, 6.3Hz), 3.39 (t,2H,J=4.9Hz), 1.99 (s,3H).

上記の 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (640 mg)をエタノール(10 ml)に溶解した溶液にリンドラー触媒(430 mg)を加え、常圧水素下 1.5 時間接触還元した。さらに、リンドラー触媒(215 mg)を加え、常圧水素下 3.5 時間接触還元した。触媒を濾去した後、濾液を減圧乾固して 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (601 mg)を得た。

^{1}H-NMR (CD_3OD)δ：4.32 (d,1H,J=7.5Hz), 3.80-3.91 (m,2H), 3.30-3.75 (m,14H), 2.73 (t,2H,J=6.5Hz), 1.98 (s,3H).

例９：N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



例７で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(375 mg)を水(10ml)に溶解し、例８で得られた 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (300 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(120 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(90 mg)を２時間おきに３回添加した。一晩撹拌した後、反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥し、N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール(443 mg)を得た。本化合物の N-アセチルガラクトサミン含量をエルソンーモルガン法で定量した結果、糖 10 残基あたり 1.6 の割合であった。

得られたN-アセチルガラクトサミン修飾CMデキストランポリアルコール (200 mg) を水 (10 ml)に溶解し、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフロオロ酢酸塩 (30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール(30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(10 mg)を２時間おきに３回添加した。２時間撹拌した後、pH を 8.5 にした。反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥し、標記化合物(203 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-6000XL 、溶媒：20%アセトニトリル含有 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液(pH 10.0)：アセトニトリル＝7:3 中, 0.16 mg/ ml)をそれぞれ図８および図 11 に示す。本化合物の医薬化合物の残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0)：アセトニトリル＝7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 4.6% (W/W)であった。

例10：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951中のDX-8951含有量の測定

蒸留水にて1mg/mlに調製したCM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951（Y'はp－フェニレン基を示す）の溶液5μlにBritton Robinson緩衝液（pH6）にて2mg/mlに調製したパパイン溶液を95μl添加した。この反応液を40℃で4時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した0.5 N HCl溶液を100μl加え、遊離した加水分解物[DX-8951]をHPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm;3.5μm, Waters社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2）が12分間に20%から70%となる0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nmおよびEm.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951は約5.7分に溶出された。DX-8951を検量線に用いて上記DDS化合物中のDX-8951含有量を算出したところ、4.0%と算出された。一方、DX-8951を検量線として上記DDS化合物のUV吸収からDX-8951含有量を算出した場合には3.3%と算出された。

例11：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951中のDX-8951含有量の測定

蒸留水にて1mg/mlに調製したCM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951の溶液5μlにBritton Robinson緩衝液（pH6）にて2 mg/mlに調製したα-キモトリプシン溶液を95μl添加した。この反応液を40℃で4時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した0.5 N HCl溶液を100μl加え、遊離した加水分解物[DX-8951]をHPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm;3.5μm, Waters社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2）が12分間に20%から70%となる0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nmおよびEm.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951は約5.7分に溶出された。DX-8951を検量線に用いて上記DDS化合物中のDX-8951含有量を算出したところ、2.5%と算出された。

一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 1.7%と算出された。

例 12：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 100μg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 の溶液 5μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95μl 添加した。この反応液を 40℃で 4 時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100μl 加え、遊離した加水分解物[NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6x100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2）を 32%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nm および Em.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.3 分に溶出された。 NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記DDS化合物中のDX-8951含有量を算出したところ、3.0%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.1%と算出された。

例 13：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR（DXR:ドキソルビシン）中の DXR 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した DDS 化合物の溶液 10μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 190μl 添加した。この反応液を 40℃で 2 時間インキュベートした後、アセトニトリルを 200μl 加え、遊離した加水分解物[DXR]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry RP18 (4.6×100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2）を 34%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定(Ex.480nm および Em.590nm)により加水分解物を検出した。この結果、DXR は約 3.8 分に溶出された。 DXR を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DXR 含

有量を算出したところ、5.3%と算出された。一方、DXR を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DXR 含有量を算出した場合には 4.3%と算出された。

例 14：CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の合成

WO97/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 274K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(30 mg)を 50%メタノールを含有する 0.05 M コリジン-HCl 緩衝液(2 ml)に溶解させた。この溶液に WO97/46260 の実施例 43 に記載の方法に準じて合成した Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の塩酸塩(4 mg)を含むメタノール溶液(400μl)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(2.4 mg)を含むメタノール溶液(240μl)を加え、2 時間撹拌した。これに 3 M 食塩水 30 ml を加え、バイオマックス-50K 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22μm)で濾過した後、凍結乾燥して表記化合物(25 mg)を得た。本化合物の医薬化合物の残基の含量は、PBS(pH7.4)中での 480 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.3%(W/W)であった。

例 15：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(575mg)、HOSu (182mg)と DCC (326mg)を DMF (20ml)に溶解し、30 分間攪拌した。ここに、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩(500 mg)とトリエチルアミン(0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で 3 日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィ(CH_2Cl_2:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl を 560 mg 得た。 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (560 mg)を 50%含水メタノール(60 ml)に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(1.5 g)を加え、水素常圧下、1 晩撹拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH を 300 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH (300 mg)と DCC (138 mg)と HOSu (77 mg)を DMF に溶かし、30 分撹拌した。ここに、DX-8951(317mg)とトリエチルアミン(0.078ml)を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2:MeOH=10:1)で精製して、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 を 400 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951(300mg)を TFA(2ml)に溶かし、1 時間反応させた後、反応液を濃縮した。得られた残査にエーテルを加え固化させ、上澄みを除去し、固体を乾燥して H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 250mg 得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6):δ 8.45-8.55 (m,2H), 8.28-8.35(m,2H), 7.95-8.10 (br,2H), 7.79 (d,1H,J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m,1H), 7.32 (s,1H), 7.20-7.30 (m,5H), 7.15-7.25 (m,4H), 6.50-6.60 (br,1H), 5.50-5.60 (m,1H), 5.40-5.50 (m,2H), 5.18 (s,2H), 4.50-4.60 (m,1H), 3.55-3.95 (m,7H), 3.00-3.25 (m,5H), 2.75-2.85 (m,1H), 2.50 (s,3H), 2.15-2.25 (m,4H), 1.86-2.00 (m,2H), 1.55-1.65(m,2H), 1.45-1.55(m,2H), 0.88 (t,3H,J=7.35Hz)

WO97/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)を DMF(10 ml)に溶かした。ここに、H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩(30 mg)、トリエチルアミン(10μl)を含むメタノール(4ml)溶液を加え、さらに、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(200 mg)を含むメタノール(3 ml)溶液を加え、遮光下、室温で 1 晩撹拌した。反応液を 3M 食塩水で希釈し、限外濾過膜(50K)で低分子を除去し、0.22μm のフィルターを通し、凍結乾燥して目的物を 178 mg 得た。

産業上の利用可能性

糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いた本発明のＤＤＳ化合物は、極めて臓器指向性が高く、優れた治療効果を発揮できる医薬として有用である。また、本発明のＤＤＳ化合物の測定方法は、ＤＤＳ化合物の血中濃度やＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確かつ簡便に定量することができるので、ＤＤＳ化合物の臨床への適用に際して極めて有用な方法として利用できる。

請 求 の 範 囲

1．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物。

2．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した請求の範囲第１項に記載のＤＤＳ化合物。

3．スペーサーが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸である請求の範囲第２項に記載のＤＤＳ化合物。

4．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

5．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである請求の範囲第４項に記載のＤＤＳ化合物。

6．カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるＤＤＳ化合物。

7．該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第６項に記載のＤＤＳ化合物。

8．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができ

る請求の範囲第６項又は第７項に記載のＤＤＳ化合物。

９．カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができるＤＤＳ化合物。

１０．該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第９項に記載のＤＤＳ化合物。

１１．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる請求の範囲第９項又は第10項に記載のＤＤＳ化合物。

１２．糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である請求の範囲第１項ないし第11項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１３．糖化合物がＮ－アセチルガラクトサミンである請求の範囲第１項ないし第12項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１４．ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり0.01～1.0である請求の範囲第12項に記載のＤＤＳ化合物。

１５．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求の範囲第１項ないし第14項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１６．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第１項ないし第 15 項のいずれか

1項に記載のＤＤＳ化合物。

１７．医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第１項ないし第 16 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１８．医薬化合物が抗腫瘍剤である請求の範囲第 17 項に記載のＤＤＳ化合物。

１９．医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第１項ないし第 18 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

２０．肝臓癌治療剤である請求の範囲第 19 項に記載のＤＤＳ化合物。

２１.請求の範囲第１項ないし第 20 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造に使用するための糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

２２．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

２３．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー。

２４．ペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

２５．生体試料中に含まれる該ＤＤＳ化合物の濃度測定に用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

２６．該ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

２７．該加水分解物が医薬化合物である請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか１項に記載の方法。

２８．該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物で

ある請求の範囲第24項ないし第26項のいずれか1項に記載の方法。

２９．スペーサーの一部がスペーサー由来の１個のアミノ酸である請求の範囲第28項に記載の方法。

３０．該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか1項に記載の方法。

３１．該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールである請求の範囲第30項に記載の方法。

３２．該ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第24項ないし第31項のいずれか1項に記載の方法。

３３.スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチドである請求の範囲第24項ないし第32項のいずれか1項に記載の方法。

３４．スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基（式中、Y'はｐ－フェニレン基を示す）である請求の範囲第24項ないし第32項のいずれか1項に記載の方法。

３５．ペプチダーゼがα－キモトリプシン又はパパインである請求の範囲第24項ないし第34項のいずれか1項に記載の方法。

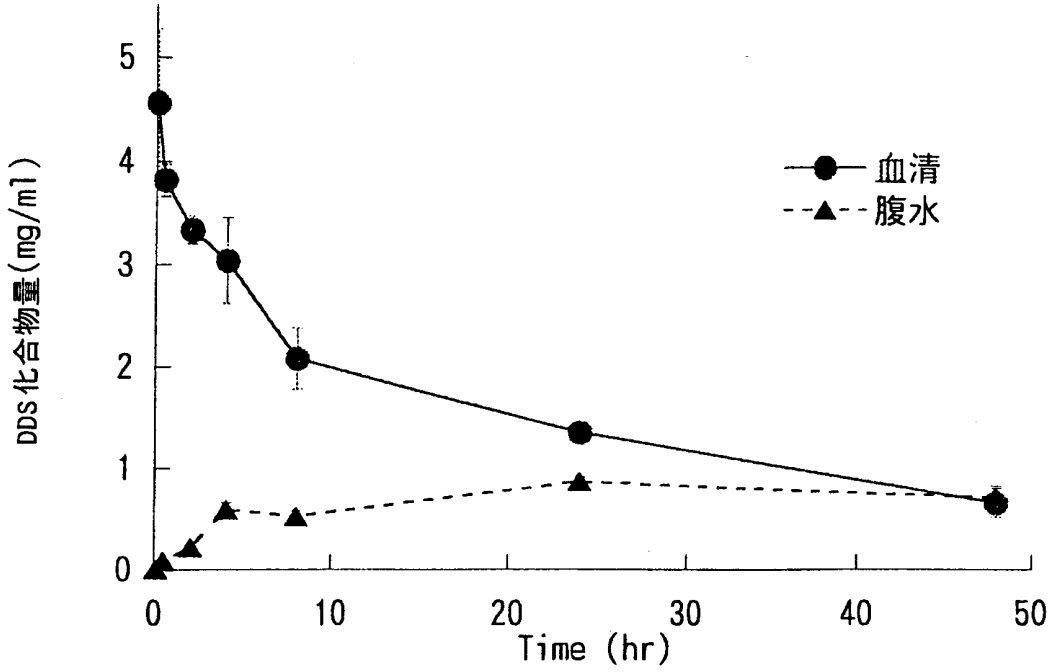
３６．医薬化合物が（1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第24項ないし第35項のいずれか1項に記載の方法。

３７.Ｎ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合した

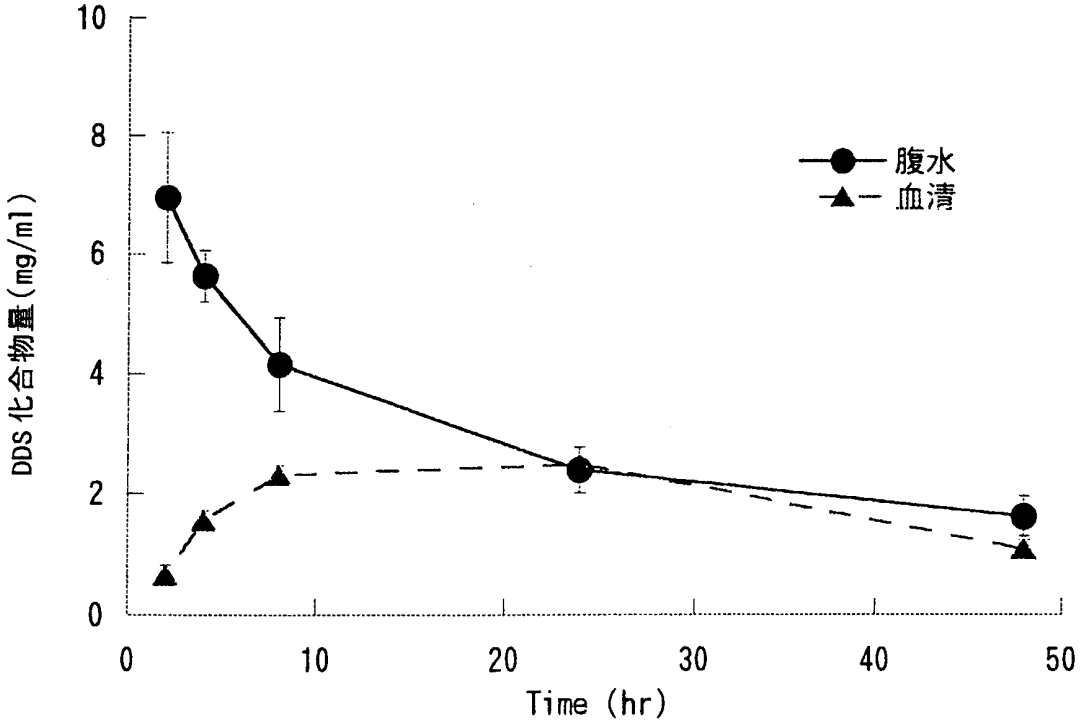
ＤＤＳ化合物の測定に用いる請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか１項に記載の方法。

３８．ペプチダーゼとしてα－キモトリプシン又はパパインを用い、加水分解物として（1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定する請求の範囲第37項に記載の方法。

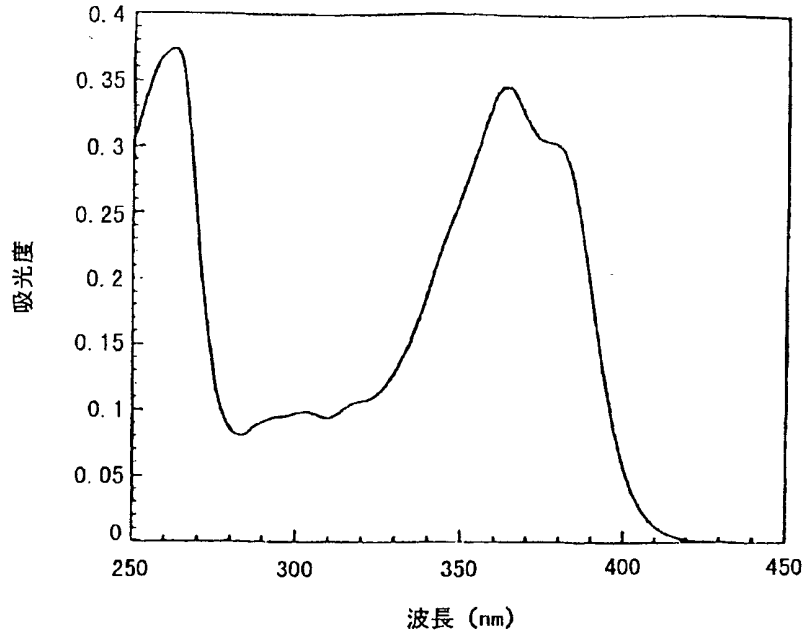
第１図


DDS化合物量(mg/ml)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
血清
腹水

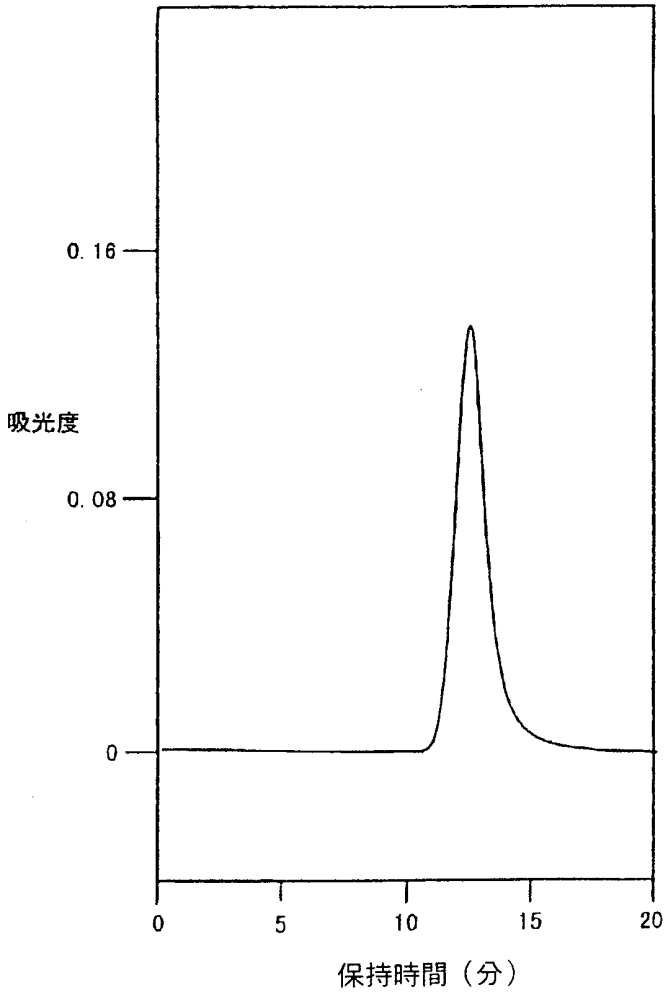
第２図


DDS化合物量(mg/ml)
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
腹水
血清

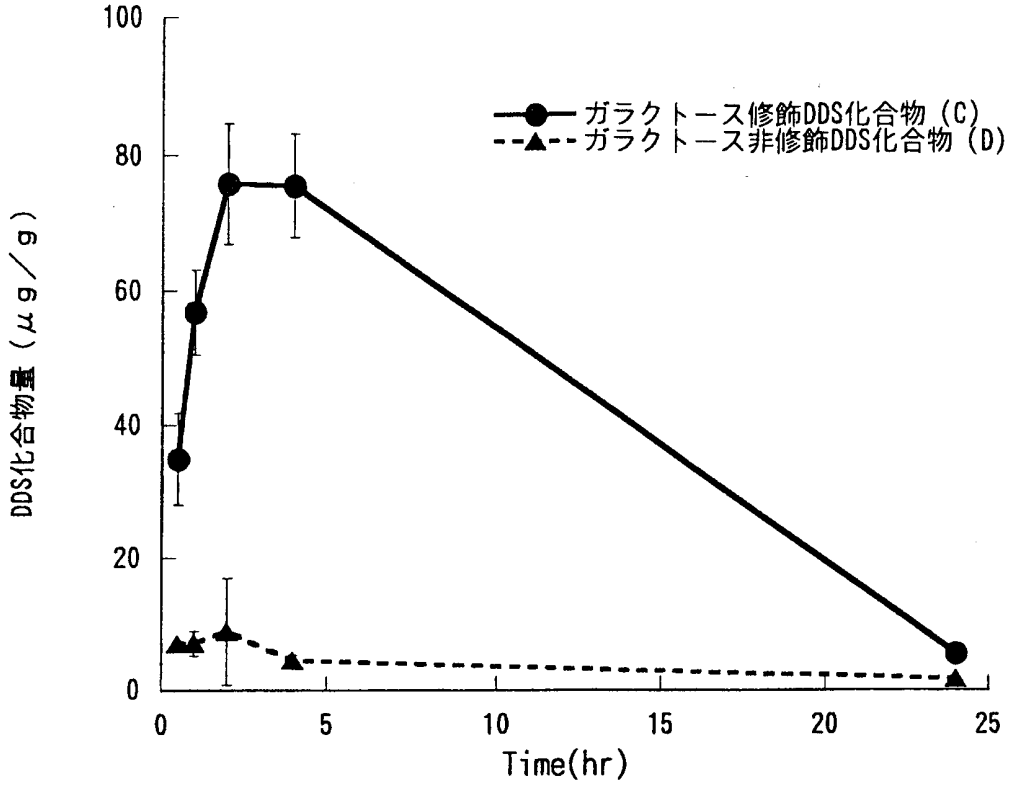
第３図


0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（nm）

第４図

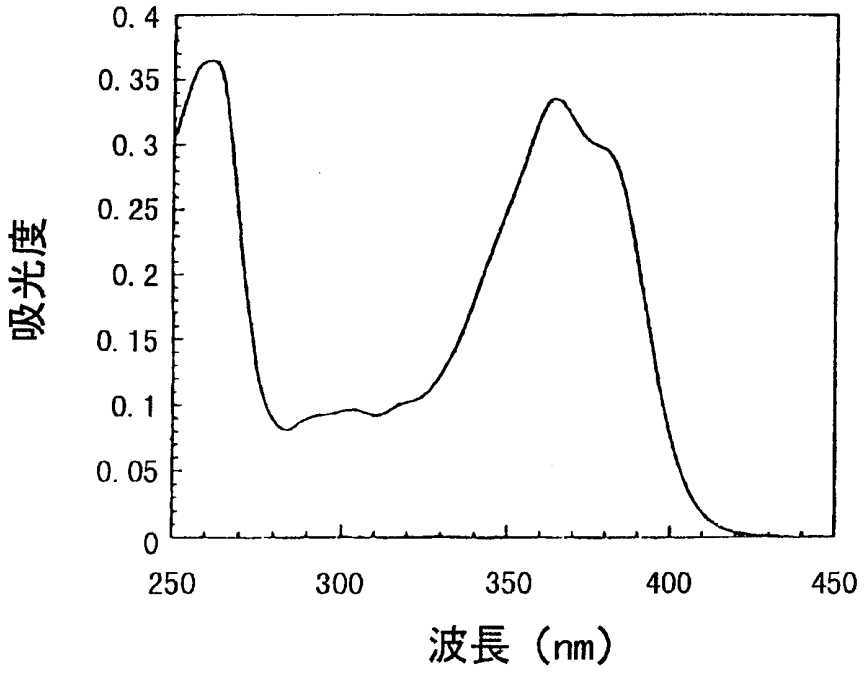

0.16
吸光度
0.08
0
0
5
10
15
20
保持時間（分）

第５図

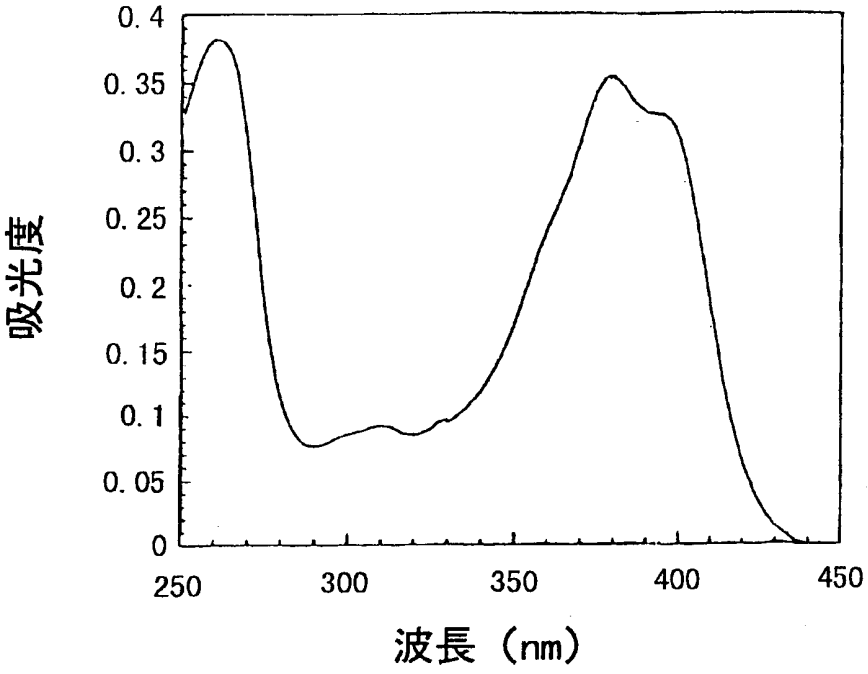


DDS化合物の肝臓への集積性

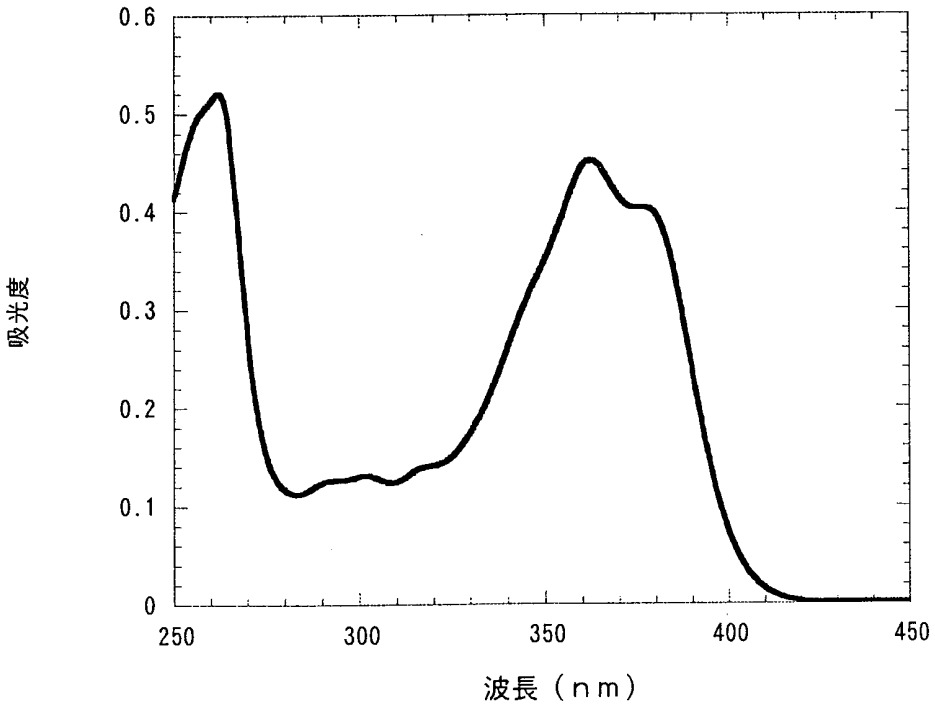
第６図



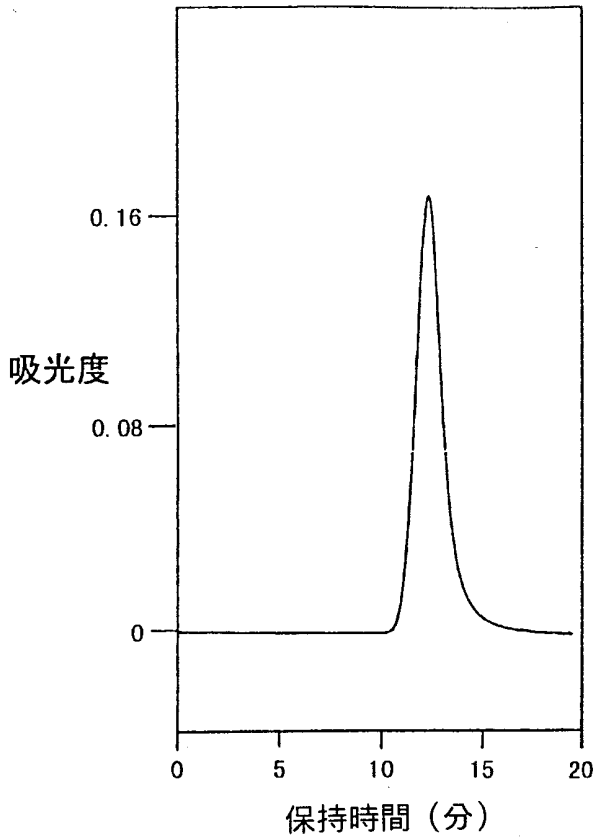
第７図


0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（nm）

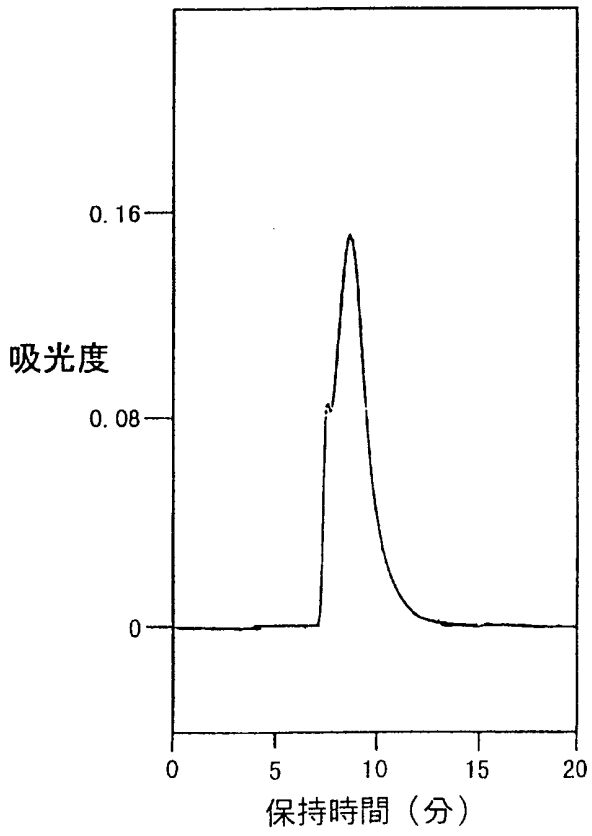
第８図


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（ｎｍ）

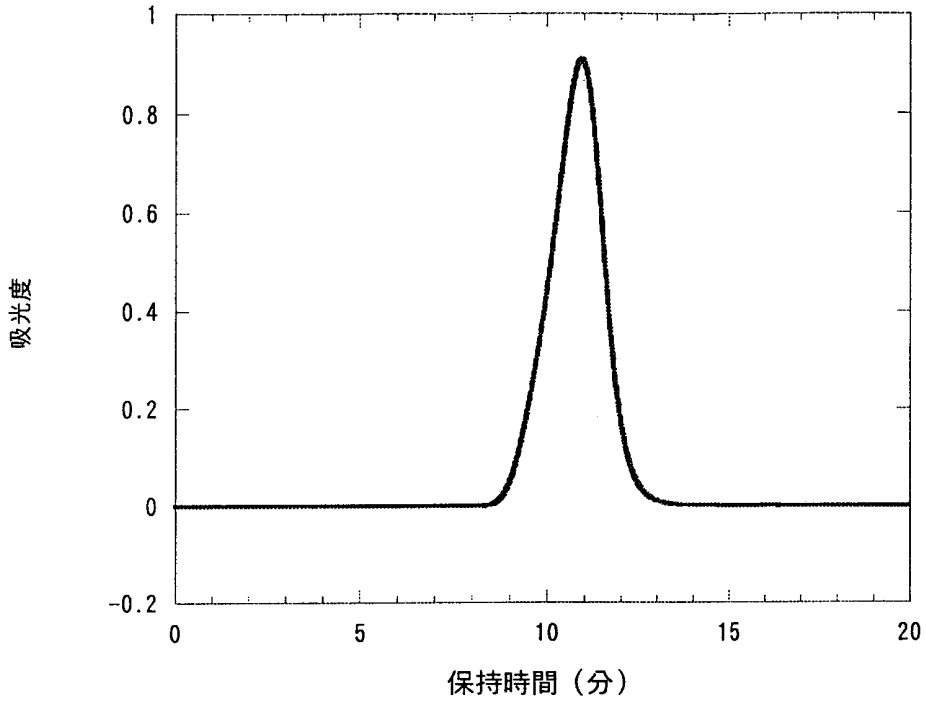
第９図



第１０図



第１１図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 December, 1997 (11.12.97) & EP, 916348, A1	1-23,31,37,38
Y	JP, 8-319317, A (Kanagawa Kagaku Gijutsu Academy), 03 December, 1996 (03.12.96), Par. Nos. [0005] to [0007] (Family: none)	1-23
X Y	EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD), 22 May, 1996 (22.05.96) & JP, 8-024325, A & US, 5658592, A	24-30,32-35 31,36-38
Y	JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29.03.94) (Family: none)	36-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 January, 2000 (26.01.00)	08 February, 2000 (08.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP99／06016

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl⁷　A61K47／48, A61K47／30, A61K47／26, A61K31／47

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl⁷　A61K47／48, A61K47／30, A61K47／26, A61K31／47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CAPLUS（STN）
REGISTRY（STN）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求の範囲の番号
Y	WO, 97／46260, A1（第一製薬株式会社） 11. 12月. 1997（11. 12. 97） & EP, 916348, A1	1-23, , 31, 37, 38
Y	JP, 8－319317, A　（財団法人　神奈川科学技術アカデミー） 3. 12月. 1996（03. 12. 96） 【0005】－【0007】（ファミリーなし）	1-23
X	EP, 712635, A1（KURARAY CO LTD） 22. 5月. 1996（22. 05. 96）	24-30, 32-35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「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」国際出願日前の出願または特許であるが、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、展示等に言及する文献
「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文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
26. 01. 00	08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4P	9840
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	吉住　和之 電話番号　03－3581－1101　内線　3491		

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９９／０６０１６

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求の範囲の番号
Ｙ	＆ ＪＰ，８－０２４３２５，Ａ ＆ ＵＳ，５６５８５９２，Ａ	31，36-38
Ｙ	ＪＰ，６－８７７４６，Ａ （第一製薬株式会社） ２９．３月．１９９４（２９．０３．９４） （ファミリーなし）	36-38