(19)日本国特許庁(JP)

# (12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7660066号
(P7660066)

(45)発行日　令和7年4月10日(2025.4.10)

(24)登録日　令和7年4月2日(2025.4.2)

(51)国際特許分類

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ　47/61　(2017.01)* | Ａ６１Ｋ | 47/61 | |
| *Ａ６１Ｐ　13/10　(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 13/10 | |
| *Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １２３ |
| *Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 45/00 | |
| *Ａ６１Ｋ　31/58　(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/58 | |

ＦＩ

請求項の数　7　（全27頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-551622(P2021-551622)
(86)(22)出願日　令和2年10月2日(2020.10.2)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/037640
(87)国際公開番号　WO2021/066175
(87)国際公開日　令和3年4月8日(2021.4.8)
審査請求日　令和5年9月22日(2023.9.22)
(31)優先権主張番号　特願2019-183082(P2019-183082)
(32)優先日　令和1年10月3日(2019.10.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000195524
生化学工業株式会社
東京都千代田区丸の内一丁目６番１号
(74)代理人　110000523
アクシス国際弁理士法人
(72)発明者　成田 宗外
東京都千代田区丸の内一丁目６番１号
生化学工業株式会社内
(72)発明者　石井 健祐
東京都千代田区丸の内一丁目６番１号
生化学工業株式会社内
(72)発明者　志村 明人
東京都千代田区丸の内一丁目６番１号
生化学工業株式会社内
審査官　池田 百合香

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的送達システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

膀胱の粘膜下組織へのステロイド以外の医薬品有効成分の経粘膜的送達システムであって、

コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を含み、

前記疎水性化合物は、前記医薬品有効成分とスペーサー形成分子とがエステル結合した化合物で、ＣｌｏｇＰが１以上であり、

前記スペーサー形成分子は、前記コンドロイチン硫酸とアミド結合している、送達システム。

【請求項２】

前記医薬品有効成分は、前記膀胱内腔に投与された後に前記結合体から遊離する、請求項１に記載の送達システム。

【請求項３】

３６℃の１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）中での前記結合体からの前記医薬品有効成分の遊離速度が、０．１％／日～５％／日である、請求項１又は２に記載の送達システム。

【請求項４】

前記スペーサー形成分子が、以下の一般式（Ｉ）：

$H_2N-(CH_2)_p-X$　　（Ｉ）

（式中、ｐは１～１２の整数を表し、各－$CH_2$－はそれぞれ独立して置換基を有していて

もよく；Ｘはヒドロキシ基、カルボキシ基又はアミノ基を表す。）で表される、請求項１～３のいずれか１項に記載の送達システム。
【請求項５】
前記コンドロイチン硫酸の重量平均分子量が、前記医薬品有効成分の分子量の１０倍以上である、請求項１～４のいずれか１項に記載の送達システム。
【請求項６】
前記コンドロイチン硫酸の重量平均分子量が４，０００以上である、請求項１～５のいずれか１項に記載の送達システム。
【請求項７】
前記医薬品有効成分の分子量が６００以下である、請求項１～６のいずれか１項に記載の送達システム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的送達システム、膀胱疾患を処置するための薬物候補化合物をスクリーニングする方法、及び膀胱の粘膜下組織に薬効を与える方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
グリコサミノグリカンを利用した膀胱疾患の治療に関する取り組みが行われている。例えば、コンドロイチン硫酸に由来する基にステロイドに由来する基が結合したコンドロイチン硫酸誘導体を膀胱疾患処置剤として用いた例が知られている（例えば、特許文献１）。また、コンドロイチン硫酸それ自体を治療剤として、膀胱疾患である間質性膀胱炎（Interstitial cystitis：ＩＣ）に使用できるとの報告もある（例えば、非特許文献１）。さらに、特許文献２には、粘膜上皮層における高い滞留性を示す化合物として、グリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸の誘導体に係る発明が記載されており、粘膜の一つとして膀胱粘膜が例示されている。
【０００３】
上記の先行技術の一部には、膀胱内に注入された膀胱疾患処置剤が膀胱壁に到達・付着することなどの記載も認められる。しかしながら、上記のいずれの先行技術にも、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分を膀胱の粘膜下組織まで送達させることについては開示も示唆もない。すなわち、膀胱の粘膜下組織で起こる炎症などに対して医薬品有効成分を有効に送達させる手法が確立されているとはいえない。
本発明は、上記のような課題を解決するためになされたものであり、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分の粘膜下組織への効果的な送達を達成することが可能なシステムを提供することを課題とする。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【文献】国際公開第２０１６／１１１３５６号
【文献】国際公開第２００７／０４３７０２号
【非特許文献】
【０００５】
【文献】ポールＪハウザー（Paul J.Hauser）他５名、「Restoring Barrier Function to Acid-Damaged Bladder by Intravesical Chondroitin Sulfate」、ザ・ジャーナル・オブ・ウロロジー（The Journal of Urology）、第１８２巻、第２４７７－２４８２頁、２００９年
【発明の概要】
【０００６】
本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、コンドロイチン硫酸によって

誘導体化させた医薬品有効成分が、膀胱の粘膜下組織に対する医薬品有効成分の効果的な送達を達成するのに有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【０００７】

すなわち、本発明は、膀胱の粘膜下組織へのステロイド以外の医薬品有効成分の経粘膜的送達システムであって、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体（以下、結合体を「コンドロイチン硫酸誘導体」ともいう）を含み、前記疎水性化合物は、前記医薬品有効成分とスペーサー形成分子とがエステル結合した化合物で、ＣｌｏｇＰが１以上であり、前記スペーサー形成分子は、前記コンドロイチン硫酸とアミド結合している、送達システムである。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】実施例１の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図２】実施例２の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図３】実施例３の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図４】実施例４の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図５】実施例５の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図６】実施例６の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図７】比較例１の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図８】比較例２の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【図９】比較例３の蛍光標識化合物を用いた被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）である。

【発明を実施するための形態】

【０００９】

本発明によれば、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分の粘膜下組織への効果的な送達を達成することが可能な送達システム、及びこの送達システムに関連する各種方法を提供することができる。経粘膜的な化合物の浸透は、分子量が小さいほど高くなることが知られている。本発明は、ポリマーであるコンドロイチン硫酸と医薬品有効成分との結合体を膀胱内腔へ投与した場合に、医薬品有効成分自体を単剤として投与した場合と比較して、粘膜下組織へのより効果的な送達が可能となるという驚くべき発見に、少なくとも部分的に基づく。

本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。また、「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。さらに、組成物中の各成分の含有量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。本発明は以下の実施形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、当業者の通常の知識に基づいて、以下の実施形態に対し変更、改良などが適宜加えられたものも本発明の範囲に入ることが理解されるべきである。

【００１０】

（実施形態１）

本発明の実施形態１は、１つの側面において、膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的送達システムに関する。すなわち、本発明の実施形態１では、膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的送達システムであって、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を含み、前記疎水性化合物は前記医薬品有効成分を含む送達システムが提供される。

本発明の実施形態１は、別の側面において、膀胱粘膜下組織への医薬品有効成分の標的化システムに関する。すなわち、本発明の実施形態１では、膀胱粘膜下組織への医薬品有効成分の標的化システムであって、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を含み、前記疎水性化合物は前記医薬品有効成分を含む標的化システムが提供される。

本発明の実施形態１は、更なる別の側面において、膀胱の粘膜下組織に医薬品有効成分を経粘膜的に送達する方法に関する。この方法は、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む。すなわち、本発明の実施形態１では、膀胱の粘膜下組織に医薬品有効成分を経粘膜的に送達する方法であって、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含み、前記疎水性化合物は前記医薬品有効成分を含む方法も提供される。

【００１１】

本発明の実施形態１は、更なる別の側面において、膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的な送達における使用のための結合体に関する。すなわち、本発明の実施形態１では、膀胱の粘膜下組織への医薬品有効成分の経粘膜的な送達における使用のための結合体であって、前記結合体はコンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体であり、前記疎水性化合物は前記医薬品有効成分を含む結合体も提供される。

本発明の実施形態１は、更なる別の側面において、医薬品有効成分を含む疎水性化合物をコンドロイチン硫酸に結合させることにより、膀胱の粘膜下組織へ医薬品有効成分を経粘膜的に送達し、粘膜下組織において医薬品有効成分を徐放させる方法に関する。すなわち、本発明の実施形態１では、医薬品有効成分を含む疎水性化合物をコンドロイチン硫酸に結合させることにより、膀胱の粘膜下組織へ医薬品有効成分を経粘膜的に送達し（浸透させ）、粘膜下組織において医薬品有効成分を徐放させる方法であって、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む方法も提供される。

本発明の実施形態１は、更なる別の側面において、医薬品有効成分のプロドラッグに関する。すなわち、本発明の実施形態１では、医薬品有効成分のプロドラッグであって、前記プロドラッグはコンドロイチン硫酸と疎水性化合物との結合体であり、前記疎水性化合物は前記医薬品有効成分を遊離可能に含み、膀胱の粘膜下組織への前記医薬品有効成分の経粘膜的送達に使用される、プロドラッグも提供される。

【００１２】

（１）コンドロイチン硫酸誘導体（「結合体」ともいう）

コンドロイチン硫酸誘導体は、コンドロイチン硫酸（以下、「ＣＳ」と略す場合がある）と疎水性化合物とが結合した構造を有する。また、疎水性化合物は、医薬品有効成分（以下、「ＡＰＩ」と略す場合がある）を含む。ここで、医薬品有効成分とは、状態、障害若しくは疾病の予防、診断、安定化、処置などに有用な任意の種類の薬学的に活性な化合物のことをいう。好ましくは、医薬品有効成分は、疾病の治療目的で使用される化合物である。一実施形態において、ＡＰＩは、アメリカ食品医薬品局、日本国厚生労働省などのいずれかの国又は地域の薬事当局により薬事承認を受けた化合物であり得る。

このコンドロイチン硫酸誘導体は、被験者の膀胱内腔に投与した場合に、膀胱の粘膜下組織に対してＡＰＩを効果的に送達させ易くなる。一実施形態において、コンドロイチン硫酸誘導体はＡＰＩのプロドラッグであり得る。典型的には、プロドラッグは、投与後にＡＰＩが活性型又は高活性型へと代謝又は変換される化合物である。

【００１３】

ＣＳは、コンドロイチン硫酸誘導体において、ＣＳに由来する基として存在する。したがって、コンドロイチン硫酸誘導体はＣＳに由来する基の少なくとも１種を含む。一実施

形態では、ＣＳに由来する基は、ＣＳが有するカルボキシ基からヒドロキシ基が取り除かれて形成される基である。コンドロイチン硫酸誘導体において、ＣＳに由来する基は担体に相当し得る。

【００１４】

ＣＳは、Ｄ－グルクロン酸（又はＬ－イズロン酸）及びＮ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミンの２糖が、２糖単位で反復して形成される糖鎖骨格に硫酸基が保持された構造を有する限りにおいて特に限定されない。また、ＣＳが有するカルボキシ基及び硫酸基を含む酸性官能基は、塩を形成していない遊離状態であっても、薬学的に許容可能な塩を形成している状態であっても構わない。

【００１５】

薬学的に許容可能な塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属イオンとの塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属イオンとの塩などが挙げられる。ＣＳは、生体への適用性及び親和性の観点から、薬学的に許容可能なアルカリ金属イオンとの塩であることが好ましく、ナトリウム塩であることがより好ましい。

【００１６】

ＣＳは、その種類に応じ、公知の方法で製造することができる。ＣＳの製造方法としては、例えば、動物由来原料からの抽出精製、コンドロイチン産生菌などからの培養精製、糖鎖修飾、糖鎖合成などを挙げることができる。

【００１７】

ＣＳの重量平均分子量は特に限定されず、目的などに応じて適宜選択することができる。ＣＳの重量平均分子量は、例えば４，０００以上であり、６，０００～３００，０００であることが好ましく、１０，０００～１００，０００であることがより好ましい。ＣＳの重量平均分子量は、光散乱法により測定することができる。

一実施形態では、ＣＳの重量平均分子量は、ＡＰＩの分子量の１０倍以上である。

【００１８】

ＡＰＩは、コンドロイチン硫酸誘導体において、ＡＰＩに由来する基として存在する。したがって、コンドロイチン硫酸誘導体はＡＰＩに由来する基の少なくとも１種を含む。一実施形態では、ＡＰＩに由来する基は、ＡＰＩが有するヒドロキシ基から水素原子又はカルボキシ基からヒドロキシ基が取り除かれて形成される基である。なお、水素原子が取り除かれるヒドロキシ基の位置は特に限定されない。コンドロイチン硫酸誘導体において、ＡＰＩに由来する基は、生体中で分解可能な共有結合（例えば、加水分解やカルボキシエステラーゼなどの生体内酵素により分解可能な、エステル結合、チオエステル結合又はアミド結合などの共有結合）を介してＣＳに由来する基又は後述のスペーサーと連結されていることが好ましい。

【００１９】

ＡＰＩの例としては、特に限定されないが、膀胱疾患の治療目的で使用される化合物が好ましく、例えばプレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、ブデソニド、フルチカゾンなどのステロイドが例示できる。また、ステロイド以外のＡＰＩの例としては、ナプロキセン、ジクロフェナクなどの非ステロイド性抗炎症薬などが挙げられる。

ＡＰＩの分子量は例えば６００以下であってもよく、５００以下であることが好ましい。

一実施形態では、分子量が６００以下のＡＰＩと、重量平均分子量が５，０００以上のＣＳとが用いられる。別の実施形態では、分子量が５００以下のＡＰＩと、重量平均分子量が５，０００以上のＣＳとが用いられる。

【００２０】

一実施形態では、疎水性化合物は、ＡＰＩ又はＡＰＩとスペーサー形成分子とが共有結合した化合物である。スペーサー形成分子は、ＡＰＩと共有結合して疎水性化合物を形成していることが好ましい。また、スペーサー形成分子は、ＣＳと共有結合していることが好ましい。

疎水性化合物は、ＣｌｏｇＰが１以上であることが好ましい。すなわち、好ましい一実

施形態では、ＣｌｏｇＰが１以上である化合物が疎水性化合物として用いられる。疎水性化合物のＣｌｏｇＰを１以上とすることにより、コンドロイチン硫酸誘導体を被験者の膀胱内腔に投与した場合に、膀胱の粘膜下組織にＡＰＩを効果的に送達させ易くすることができる。ＣｌｏｇＰの上限は限定されないが、例えば１０以下、又は５以下であり得る。

ここで、本明細書において「ｌｏｇＰ」とは、水とオクタノールとの２相系において、それぞれに分配している化合物の濃度の比をもとにした分配係数である。ｌｏｇＰは、化合物の疎水性を示す指標であり、疎水性が大きいほどｌｏｇＰの値が大きくなる。「ＣｌｏｇＰ」は、フラグメント法を用いた計算（A. Leo, Comprehensive Medicinal Chemistry; Hansch C., Ed., Pergamon Press, Oxford, 1990, Vol.4, p.315; Leo A.J., Chemical Reviews, 1993, Vol.93, p.1281-1306）により算出したｌｏｇＰ値である。ＣｌｏｇＰは、Ｃｈｅｍ Ｄｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いて計算することができる。

【００２１】

当業者に理解されるように、膀胱の最も内腔側に存在する移行上皮（あるいは粘膜上皮層ともいう）は、内腔側から表在層（被蓋細胞を含む）、中間層（中間細胞層）及び基底層（基底細胞層）の三層で構成された重層である。本明細書において、膀胱の「粘膜下組織」は前記移行上皮より実質側（実質側とは、膀胱頂部と尿道とを結ぶ軸に対して垂直に膀胱を切断した組織断面像における、内腔からより遠い方向を指す。）の部分を指し、内腔側から固有層、粘膜下層、筋層、漿膜を含む。膀胱内腔に投与されたコンドロイチン硫酸誘導体は、固有層又は固有層より実質側へＡＰＩを送達できる。

ＡＰＩは、膀胱内腔に投与された後にコンドロイチン硫酸誘導体から遊離することが好ましい。膀胱内腔に投与された後にコンドロイチン硫酸誘導体からＡＰＩが遊離することにより、膀胱の粘膜下組織へ浸透した後に、ＡＰＩを徐放させることができる。これにより、本実施形態では、膀胱疾患処置剤として特に優れた効果を与えることができる。このような機能を得る観点から、ＡＰＩとスペーサー形成分子との結合は、生体中で分解可能な共有結合であって、縮合反応によって形成される共有結合であることが好ましく、エステル結合であることがより好ましい。コンドロイチン硫酸誘導体が膀胱内腔に投与された後に、ＡＰＩとＣＳ又はスペーサー形成分子との共有結合が分解（好ましくは加水分解）することで、ＡＰＩが遊離する。なお、ＣＳとスペーサー形成分子との結合が分解した後にＡＰＩとスペーサー形成分子との共有結合が分解してＡＰＩが遊離してもよい。一実施形態では、ＡＰＩは、膀胱内腔に投与された後にコンドロイチン硫酸誘導体から１６８時間（７日）以上の期間にわたって遊離する。

【００２２】

一実施形態では、コンドロイチン硫酸誘導体は、ＡＰＩがエステル結合又はアミド結合を介してスペーサー形成分子と共有結合している。この場合、スペーサー形成分子は、分子構造中に、カルボキシ基、ヒドロキシ基及びアミノ基から選択される官能基を２つ以上含む化合物であることがより好ましい。

コンドロイチン硫酸誘導体は、スペーサー形成分子がアミド結合を介してＣＳと共有結合していることが好ましい。また、ＡＰＩの遊離速度制御の観点から、ＡＰＩがエステル結合を介してスペーサー形成分子と共有結合していることが好ましい。したがって、スペーサー形成分子は、分子構造中に、カルボキシ基及びアミノ基を含む化合物、又はヒドロキシ基及びアミノ基を含む化合物であることが好ましい。

スペーサー形成分子が、分子構造中にカルボキシ基及びアミノ基を含む化合物である場合、ＣＳのカルボキシ基とスペーサー形成分子のアミノ基とがアミド結合し、ＡＰＩのヒドロキシ基とスペーサー形成分子のカルボキシ基とがエステル結合する。一方、スペーサー形成分子が、分子構造中にヒドロキシ基及びアミノ基を含む化合物である場合、ＣＳのカルボキシ基とスペーサー形成分子のアミノ基とがアミド結合し、ＡＰＩのカルボキシ基とスペーサー形成分子のヒドロキシ基とがエステル結合する。

【００２３】

スペーサー形成分子の例としては、以下の一般式（Ｉ）で表すことができる。

$H_2N-(CH_2)_p-X$　　（Ｉ）

式中、ｐは１～１２の整数を表し；各－$CH_2$－はそれぞれ独立して置換基を有していてもよく；Ｘはヒドロキシ基、カルボキシ基又はアミノ基を表す。ｐは、好ましくは１～６の整数であり、より好ましくは２～６である。上記置換基は、電子供与基及び立体障害性基からなる群から選択される基であり得る。一実施形態では、一般式（Ｉ）に表される－$N_2H$とＣＳのカルボキシ基とがアミド結合を形成する。

【００２４】

本明細書中で用いられる「電子供与基」とは、水素原子と比べて電子を与え易い基（例えば、アルキル基、アリール基など）を意味する。また、本明細書中で用いられる「立体障害性基」とは、加溶媒分解などの化学反応に対して立体障害を起こす嵩高い基を意味する。一般式（Ｉ）におけるメチレン基が電子供与基又は立体障害性基に置換されると、ＡＰＩとスペーサー形成分子との共有結合が分解し難くなり、ＡＰＩの遊離速度が低下する。遊離速度の低下は、後述する方法により適宜測定することができる。

【００２５】

電子供与基又は立体障害性基は、一般式（Ｉ）のメチレン基に置換可能であれば特に制限されず、通常用いられる電子供与基又は立体障害性基から適宜選択することができる。具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基などの炭素数１～１２の直鎖状アルキル基；イソプロピル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基などの炭素数３～１２の分岐鎖アルキル基；シクロヘキシル基などの炭素数３～６の環状アルキル基；フェニル基、トリル基などの炭素数６～１０のアリール基；ビニル基、アリル基などの炭素数２～１２のアルケニル基；炭素数２～１２のアルキニル基；ベンジル基などの炭素数７～１２のアラルキル基などを挙げることできる。これらの中でもメチル基、炭素数３～４の分岐鎖アルキル基、ベンジル基などからなる群から選ばれる基であることが好ましい。スペーサー形成分子として具体的には、β－アラニン、イソロイシン、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニンなどのアミノ酸；２－アミノエタノール、３－アミノプロパノールなどの炭素数２～１２のアミノアルキルアルコールなどを用いることができる。

【００２６】

スペーサー形成分子は、コンドロイチン硫酸誘導体において、スペーサー形成分子に由来する基（すなわち、スペーサー）として存在する。したがって、コンドロイチン硫酸誘導体はスペーサー形成分子に由来する基の少なくとも１種を含む。一実施形態では、スペーサー形成分子に由来する基は、スペーサー形成分子が有するアミノ基から水素原子が取り除かれるとともに、スペーサー形成分子が有するカルボキシ基からヒドロキシ基又はスペーサー形成分子が有するヒドロキシ基から水素が取り除かれて形成される連結基である。

スペーサー形成分子に由来する基としては、$-HN-(CH_2)_2-CO-$、$-HN-CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)-CO-$、$-HN-CH(CH(CH_3)_2)-CO-$又は$-HN-CHCH_2(CH(CH_3)_2)-CO-$で表されるアミノ酸残基；$-HN-(CH_2)_2-O-$、$-HN-CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)-O-$、$-HN-CH(CH(CH_3)_2)-O-$、又は$-HN-CHCH_2(CH(CH_3)_2)-O-$で表されるアミノアルコールが好ましく、$-HN-(CH_2)_2-CO-$、$-HN-(CH_2)_2-O-$、$-HN-CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)-CO-$又は$-HN-CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)-O-$がより好ましい。

【００２７】

コンドロイチン硫酸誘導体からのＡＰＩの遊離速度は、目的などに応じて適宜選択できる。ＡＰＩの遊離速度は、例えば、３６℃の１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）中において、０．１～５％／日であることが好ましく、０．１～３％／日であることがより好ましい。ここでＡＰＩの遊離速度とは、遊離率（％）の一日あたりの変化量であり、横軸に時間を、縦軸にコンドロイチン硫酸誘導体に含まれるＡＰＩに由来する基の総モル数（１００％）に対するＡＰＩの遊離量（モル）の割合である遊離率（％）を取った場合、グラフの傾きとして定義される。

したがって、遊離率の変化量が測定期間中に一定値を維持する場合には、グラフは単調増加の直線となる。この場合には、例えば、３６℃の１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）中、１０日間で、コンドロイチン硫酸誘導体が含むすべてのＡＰＩが遊離した場合、遊離速度は１０％／日と表現される。

一方、遊離率の変化量が一定値を取らずに経時的に低下する場合（グラフは上に凸で単調増加する緩やかなカーブを示す）は、初期の立ち上がり期間（例えば、３日間）の遊離率変化を直線近似して遊離速度を算出する。

なお、ＡＰＩの遊離量（遊離したＡＰＩの量）はＡＰＩの種類に応じて適宜選択される方法によって測定される。

【００２８】

（２）コンドロイチン硫酸誘導体の製造方法

コンドロイチン硫酸誘導体を製造する方法は特に制限されない。例えば、コンドロイチン硫酸誘導体は、ＣＳが有する官能基と、疎水性化合物（例えば、スペーサー形成分子又はＡＰＩ）が有する官能基とを共有結合させることで得ることができる。一実施形態では、コンドロイチン硫酸誘導体は、ＣＳが有するカルボキシ基と、疎水性化合物が有するヒドロキシ基又はアミノ基とを共有結合させることで得ることができる。

以下、コンドロイチン硫酸誘導体の製造方法の一例について説明するが、以下の方法に限定されるものではない。

【００２９】

ＣＳとＡＰＩとをスペーサー形成分子を介して共有結合してなるコンドロイチン硫酸誘導体は、例えば以下の工程を含む製造方法で製造することができる。

（Ａ）ＡＰＩが有するヒドロキシ基をスペーサー形成分子のカルボキシ基と縮合して共有結合（エステル結合）させ、又はＡＰＩが有するカルボキシ基をスペーサー形成分子のヒドロキシ基と縮合して共有結合（エステル結合）させ、疎水性化合物を得る工程と、

（Ｂ）ＣＳが有するカルボキシ基をスペーサー形成分子のアミノ基と縮合して共有結合（アミド結合）させる工程と、を含む製造方法。

【００３０】

（Ａ）の工程では、ＡＰＩが有するヒドロキシ基とスペーサー形成分子のカルボキシ基とを縮合して共有結合させ、又はＡＰＩが有するカルボキシ基をスペーサー形成分子のヒドロキシ基と縮合して共有結合（エステル結合）させ、疎水性化合物を得る。このときスペーサー形成分子のＣＳと反応する予定のアミノ基は、必要に応じて通常用いられる方法で保護しておいてもよい。

（Ｂ）の工程では、ＣＳが有するカルボキシ基とスペーサー形成分子のアミノ基とを縮合して共有結合させる。このときスペーサー形成分子のＡＰＩと反応する予定のカルボキシ基又はヒドロキシ基は、必要に応じて通常用いられる方法で保護しておいてもよい。

コンドロイチン硫酸誘導体の製造方法は（Ａ）の工程と（Ｂ）の工程とを含んでいればよく、各工程が実行される順番は限定されない。

【００３１】

縮合（エステル化、アミド化）方法は、通常用いられる方法から適宜選択すればよい。縮合方法としては例えば、水溶性カルボジイミド（例えば、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミドハイドロクロライド）、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド（ＤＭＴ－ＭＭ）、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどの縮合剤を用いる方法、対称酸無水物法、混合酸無水物法、活性エステル法などの方法を挙げることができる。縮合反応条件は適用する縮合反応に応じて適宜選択される。

【００３２】

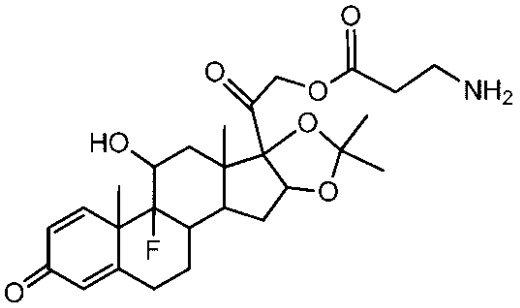
スペーサー形成分子は、ＡＰＩの所望の遊離速度が得られるように選択されることが好ましい。一実施形態では、スペーサー形成分子は、ＡＰＩとエステル結合を形成するカルボキシ基又はヒドロキシ基と、ＣＳとアミド結合を形成するアミノ基と、２つの反応性官能基を連結する連結基とを有する。連結基はＡＰＩとのエステル結合の分解速度を制御す

るように選択されることが好ましい。
【００３３】
（３）投与方法
コンドロイチン硫酸誘導体は、被験者の膀胱内腔に投与される。このようにしてコンドロイチン硫酸誘導体を投与することにより、膀胱の粘膜下組織にＡＰＩを経粘膜的に送達することができる。具体的な投与方法としては、例えば、尿道カテーテルを膀胱内腔に無菌条件下で挿入し、残尿を排出した後、同カテーテルより注入する方法などを挙げることができる。膀胱は、粘膜が障害されたものであってもよい。被検者は、ヒト、又はマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタなどの非ヒト動物であり得る。
膀胱内腔に注入されたコンドロイチン硫酸誘導体は、ＣＳと疎水性化合物とが共有結合したままで膀胱内腔に到達して粘膜に付着する。その後、コンドロイチン硫酸誘導体が膀胱粘膜下組織に浸透する。
【００３４】
コンドロイチン硫酸誘導体を液体状の下記の医薬組成物として用いて投与する際のコンドロイチン硫酸誘導体の濃度は、例えば尿道カテーテルを用いて投与する場合には、このカテーテル内を通過可能な濃度であればよく、当業者が適宜調整できる。
【００３５】
（４）医薬組成物
コンドロイチン硫酸誘導体は、医薬組成物として用いることができる。医薬組成物は、コンドロイチン硫酸誘導体の少なくとも１種を含み、必要に応じて、薬学的に許容される賦形剤などその他の成分を更に含んでいてもよい。
【００３６】
（５）膀胱疾患処置剤
コンドロイチン硫酸誘導体は、膀胱疾患処置剤として用いることができる。膀胱疾患処置剤は、コンドロイチン硫酸誘導体の少なくとも１種を含有する医薬組成物とすることが好ましく、この医薬組成物は膀胱疾患の処置に用いられる。
本明細書において用いられる「処置」とは、疾患について施される何らかの処置であればよく、例えば、疾患の治療、改善及び進行の抑制（悪化の防止）が挙げられる。また、本明細書における「膀胱疾患」とは、膀胱で起こる疾患その他の何らかの異常を意味し、例えば、膀胱炎などが含まれる。
膀胱疾患処置剤の形態は、ヒトの膀胱内腔に投与可能な製剤ないし医薬の形態である限りにおいて特に限定されないが、投与時における形態が液体であることが好ましく、例えば、溶液、懸濁液などの形態が挙げられる。溶液及び懸濁液は、コンドロイチン硫酸誘導体の粉体を用時溶解して調製することにより、投与することもできる。
【００３７】
（６）膀胱疾患を処置する方法
膀胱疾患を処置する方法は、上記の送達システムを被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む。具体的には、膀胱疾患を処置する方法は、膀胱疾患処置剤として用いられるコンドロイチン硫酸誘導体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む。膀胱疾患の処置方法は、必要に応じてその他の工程を更に含んでいてもよい。膀胱疾患処置剤の投与は、「（３）投与方法」の説明に従って同様に実施できる。
【００３８】
本発明の実施形態１によれば、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分の粘膜下組織への効果的な送達を達成することができる。
【００３９】
（実施形態２）
本発明の実施形態２は、膀胱疾患を処置するための薬物候補化合物をスクリーニングする方法に関する。この方法は、化合物を提供する工程と、化合物を膀胱内腔に投与する工程と、膀胱の粘膜下組織における化合物の存在を分析する工程とを含み、膀胱の粘膜下組織における化合物の存在を薬物候補化合物の指標とする。

【００４０】
この方法に供される化合物（被験物質）としては、いかなる化合物であってもよいが、膀胱疾患に対する薬効が期待される化合物であることが好ましい。
化合物が投与される膀胱内腔は、膀胱疾患を惹起させた動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、イヌ、サルなど）の膀胱内腔であってもよい。
膀胱内腔に化合物を投与する方法は、特に限定されないが、例えば、尿道カテーテルを膀胱内腔に無菌条件下で挿入し、残尿を排出した後、同カテーテルより注入する方法などを挙げることができる。化合物の投与量としては、膀胱内腔の粘膜全体を被覆するのに足る量であればよく、動物の種類に応じて適宜設定すればよい。
【００４１】
膀胱の粘膜下組織における化合物の存在を分析する方法としては、特に限定されず、公知の方法を用いることができる。分析方法としては、イメージング、質量分析、イムノアッセイ、放射能測定などから、化合物の種類に応じて適宜選択すればよい。これらの方法は、単独又は２種以上を組み合わせて用いてもよい。
【００４２】
ここで、一例として、イメージング、特に蛍光イメージングを用いて膀胱の粘膜下組織における化合物の存在を分析する方法を説明する。
蛍光イメージングを用いる場合、粘膜下組織における化合物の発光を光学的に検出する。化合物の発光を検出するためには、被験物質の化合物について蛍光標識しておく必要がある。蛍光標識の方法としては、特に限定されないが、被験物質の化合物に蛍光色素化合物を導入する方法などを用いればよい。例えば、ＡＰＩを有するコンドロイチン硫酸誘導体を被験物質の化合物として用いる場合、ＡＰＩ又はＣＳの官能基にフルオレセインなどの蛍光色素を導入すればよい。被験物質は、ポリマーなどの高分子構造を有するものであることが好ましい。
【００４３】
粘膜下組織における化合物の存在は、動物の膀胱を採取して凍結切片を作製した後、凍結切片を蛍光顕微鏡で観察することによって分析することができる。蛍光顕微鏡の励起波長及び吸収波長などの条件は、導入した蛍光色素の種類に応じて適宜調整すればよい。
粘膜下組織における化合物の存在は、膀胱内腔への化合物の投与から６時間以上後に分析されることが好ましい。分析を６時間以上後に行うことにより、膀胱の粘膜から粘膜下組織に浸透した化合物の存在が確認し易くなる。
【００４４】
粘膜下組織における化合物の存在は、蛍光画像から輝度の積算値を算出することによって評価してもよい。例えば、膀胱疾患に有効な化合物について蛍光画像から輝度の積算値を予め求めて評価基準とし、この評価基準よりも大きい輝度の積算値を有する化合物を薬物候補化合物と判断してもよい。
【００４５】
上記の方法によってスクリーニングされた薬物候補化合物は、膀胱疾患を処置するための薬物（膀胱疾患処置剤）として使用することができる。
【００４６】
上記の方法は、膀胱疾患を処置するための薬物（膀胱疾患処置剤）を製造する方法に用いることができる。すなわち、膀胱疾患を処置するための薬物（膀胱疾患処置剤）を製造する方法は、膀胱疾患を処置するための薬物候補化合物をスクリーニングする方法（以下、「スクリーニング工程」という）に含まれる。
また、膀胱疾患を処置するための薬物（膀胱疾患処置剤）を製造する方法は、スクリーニング工程の前に、被験物質である化合物を合成又は抽出する工程を含んでもよい。
【００４７】
本発明の実施形態２によれば、膀胱疾患を処置するのに有効な薬物候補化合物を適切にスクリーニングすることができる。
【００４８】

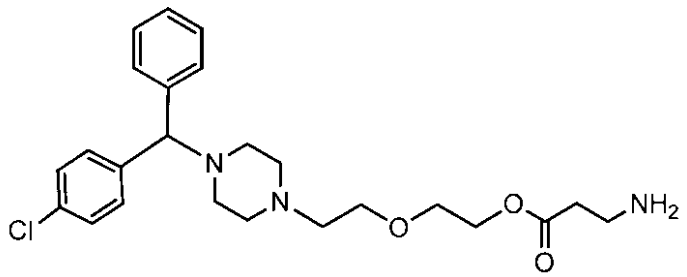
（実施形態３）
本発明の実施形態３は、膀胱の粘膜下組織に薬効を与える方法に関する。この方法は、コンドロイチン硫酸と疎水性化合物とが結合したコンドロイチン硫酸誘導体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む。
コンドロイチン硫酸誘導体としては、本発明の実施形態１で説明したコンドロイチン硫酸誘導体と同様のものを用いることができる。また、コンドロイチン硫酸誘導体の投与方法も、本発明の実施形態１で説明した投与方法と同様に実施できる。
【００４９】
本発明の実施形態３は、膀胱疾患を処置する方法に用いることができる。すなわち、膀胱疾患を処置する方法は、膀胱の粘膜下組織に薬効を与える方法を含む。具体的には、膀胱疾患を処置する方法は、膀胱疾患処置剤として用いられるコンドロイチン硫酸誘導体を被験者の膀胱内腔に投与する工程を含む。膀胱疾患の処置方法は、必要に応じてその他の工程を更に含んでいてもよい。
【００５０】
本発明の実施形態３によれば、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分について粘膜下組織で効果的に薬効を発現させることができる。
【実施例】
【００５１】
以下、本発明の実施例及び試験例をより具体的に詳説する。しかしながら、これにより本発明の技術的範囲が制限されるものではない。なお、下記に示す実施例のうち、実施例１及び４は参考例である。
【００５２】
（実施例１）
（１－１）　２１－（Ｂｏｃ－β－アラニル）－トリアムシノロンアセトニドの調製
２．６３ｇのＢｏｃ－β－アラニン（渡辺化学工業株式会社製）を４０ｍＬのジクロロメタン及び１０ｍＬのジメチルホルムアミドに溶解し、５．０１ｇのトリアムシノロンアセトニド（和光純薬工業株式会社製；以下、「ＴＡ」とも略記する）を加えた。その後、氷冷下で４２６ｍｇの４－ジメチルアミノピリジン及び３．３２ｇの水溶性カルボジイミドを加えて室温にて終夜撹拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。トルエン及び水を用いて分液抽出をし、集めた有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水溶液で順次洗浄した。その後、硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した後、溶媒を減圧留去し、目的とする２１－（Ｂｏｃ－β－アラニル）－トリアムシノロンアセトニドを６．６６ｇ得た（収率９６％）。
【００５３】
（１－２）　２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド塩酸塩の調製
６．６６ｇの２１－（Ｂｏｃ－β－アラニル）－トリアムシノロンアセトニドを９０ｍＬのテトラヒドロフランに溶解し、氷冷下で４Ｍの塩酸／酢酸エチル９０ｍＬを加え、室温にて３時間撹拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認後、溶媒を減圧留去した。濃縮物をジエチルエーテルで洗浄し、溶媒を減圧留去し、目的とする２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド塩酸塩を５．７８ｇ得た（収率９７％）。
【００５４】
なお、２１－（β－アラニル）－トリアムシノロンアセトニドは、下記の構造を有しており、ＣｈｅｍＤｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、２．１７であった。
【００５５】

【化１】



【００５６】
（１－３）　２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　５２４ｍｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。４５８ｍｇの２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド塩酸塩及び８３９ｍｇの４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド含水和物（以下、ＤＭＴ－ＭＭ）（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計３ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．１ｇの塩化ナトリウム及び共洗いの５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水を加え、塩化ナトリウムを溶解した反応液を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水３００ｍＬに順次加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＴＡ－コンジュゲートを８１９ｍｇ得た。
【００５７】
（１－４）　蛍光標識２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　５００ｍｇのＣＳ－ＴＡ－コンジュゲートを５．５ｍＬの蒸留水に溶解し、５．５ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計１０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、５．０ｇの塩化ナトリウムを３７．５ｍＬの蒸留水に溶解し、１２５ｍＬの２－プロパノールを加えた溶液に、反応液を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水９ｍＬで共洗いしながら加えた後、２５ｍＬの２－プロパノールを加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲートを４７１ｍｇ得た。
【００５８】
（実施例２）
（２－１）　（Ｂｏｃ－β－アラニル）－ヒドロキシジンの調製
　２．００ｇのヒドロキシジン二塩酸塩（富士フィルム和光純薬株式会社製；以下、「ＨＹＤ」とも略記する）、１．０９ｇの４－ジメチルアミノピリジン（富士フィルム和光純薬株式会社製）及び０．８４６ｇのＢｏｃ－β－アラニン（渡辺化学工業株式会社製）を２０ｍＬのジクロロメタンに加えて溶解した。その後、１．７１ｇの水溶性カルボジイミド（東京化成工業株式会社製）を加えて室温にて終夜撹拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後に撹拌を停止し、５％（ｗ／ｖ）炭酸水素ナトリウム水溶液、２０％（ｗ／ｖ）塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄した。その後、硫酸ナトリウムで脱水、ろ過した後、溶媒を減圧留去した。濃縮物をシリカゲルカラム（クロロホルム：メタノール）で精製し、目的とする（Ｂｏｃ－β－アラニル）－ヒドロキシジンを１．９９ｇ得た（収率８２％）。

【００５９】
（２－２）　β－アラニル－ヒドロキシジン三塩酸塩の調製
　１．９３ｇの（Ｂｏｃ－β－アラニル）－ヒドロキシジンを７１ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で４ｍｏｌ／Ｌ－ＨＣｌ／ＡｃＯＥｔ（渡辺化学工業株式会社製）１９．４ｍＬを加えて、氷冷下で１１０分撹拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認後、溶媒を減圧留去した。得られた油状物質をジクロロメタンで溶解後、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテルを加え、結晶を析出させた。結晶を４０℃で終夜減圧乾燥し、目的とするβ－アラニル-ヒドロキシジン三塩酸塩を１．４５ｇ得た（収率７４％）。
【００６０】
　なお、β－アラニル－ヒドロキシジンは、下記の構造を有しており、Ｃｈｅｍ Ｄｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏＰを計算した結果、４．３１であった。
【００６１】
【化２】




【００６２】
（２－３）　β－アラニル－ヒドロキシジン導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＨＹＤ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　１．０４ｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。１１１ｍｇのβ－アラニル－ヒドロキシジン三塩酸塩及び１６７ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、２．００ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水８０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水１５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＨＹＤ－コンジュゲートを９０３ｍｇ得た。
【００６３】
（２－４）　蛍光標識β－アラニル－ヒドロキシジン導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＨＹＤ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　５００ｍｇのＣＳ－ＨＹＤ－コンジュゲートを５ｍＬの蒸留水に溶解し、５ｍＬのアセトン及び５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水５ｍＬを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．７５ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した。反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＨＹＤ－コンジュゲートを４４８ｍｇ得た。
【００６４】
（実施例３）
（３－１）　（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－ナプロキセンの調製

１．０６ｇのＮ－Ｂｏｃ－エタノールアミン（東京化成工業株式会社）、１．５０ｇの（Ｓ）－ナプロキセン（富士フィルム和光純薬株式会社製；以下、「ＮＡＰ」とも略記する）及び１．５９ｇの４－ジメチルアミノピリジン（富士フィルム和光純薬株式会社製）を２８ｍＬのジクロロメタンに加えて溶解した。その後、２．５０ｇの水溶性カルボジイミド（東京化成工業株式会社製）を加えて室温にて終夜撹拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後に撹拌を停止し、１０％（ｗ／ｖ）硫酸水素カリウム水溶液、５％（ｗ／ｖ）炭酸水素ナトリウム水溶液、２０％（ｗ／ｖ）塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄した。その後、硫酸マグネシウムで脱水、ろ過した後、溶媒を減圧留去し、目的の（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－ナプロキセンを２．３２ｇ得た（収率９５％）。

【００６５】

（３－２）　２－アミノエチル－ナプロキセン塩酸塩の調製

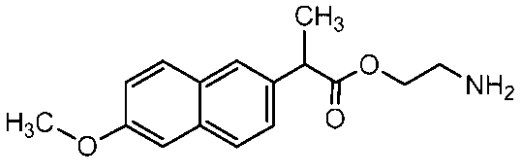
２．１５ｇの（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－ナプロキセンを１１５ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で４ｍｏｌ／Ｌ－ＨＣｌ/ＡｃＯＥｔ（渡辺化学工業株式会社製）３１．６ｍＬを加えて室温にて１．５時間、撹拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認後、反応液中に析出した結晶をろ取した。結晶を４０℃で終夜減圧乾燥し、目的とする２－アミノエチル-ナプロキセン塩酸塩を１．４２ｇ得た（収率８０％）。

【００６６】

なお、２－アミノエチル－ナプロキセンは、下記の構造を有しており、Ｃｈｅｍ Ｄｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、２．６２であった。

【００６７】

【化３】




【００６８】

（３－３）　２－アミノエチル－ナプロキセン導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＮＡＰ－コンジュゲート」と略記する）の調製

１．０４ｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。６０ｍｇの２－アミノエチル－ナプロキセン塩酸塩及び１６７ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、２．００ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水８０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＮＡＰ－コンジュゲートを１．０３ｇ得た。

【００６９】

（３－４）　蛍光標識２－アミノエチル－ナプロキセン導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＮＡＰ－コンジュゲート」と略記する）の調製

５００ｍｇのＣＳ－ＮＡＰ－コンジュゲートを５ｍＬの蒸留水に溶解し、５ｍＬのアセトン及び５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水５ｍＬを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．７５ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加

えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＮＡＰ－コンジュゲートを５６８ｍｇ得た。

【００７０】

（実施例４）

（４－１）　（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－デヒドロコール酸エステルの調製

２．００ｇのデヒドロコール酸（東京化成工業株式会社製；以下、「ＤＥＨ」とも略記する）、０．８０ｇのＮ－Ｂｏｃ－エタノールアミン（東京化成工業株式会社）、１．２２ｇの４－ジメチルアミノピリジン（富士フィルム和光純薬株式会社製）を２１ｍＬのジクロロメタンに加えて溶解した。その後、１．９０ｇの水溶性カルボジイミド（東京化成工業株式会社製）を加えて室温にて終夜撹拌した。撹拌を停止し、１０％（ｗ／ｖ）硫酸水素カリウム水溶液、５％（ｗ／ｖ）炭酸水素ナトリウム水溶液、２０％（ｗ／ｖ）塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄した。その後、硫酸マグネシウムで脱水、ろ過した後、溶媒を減圧留去し、目的とする（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－デヒドロコール酸エステルを２．２０ｇ得た（収率８１％）。

【００７１】

（４－２）　２－アミノエチル－デヒドロコール酸エステル塩酸塩の調製

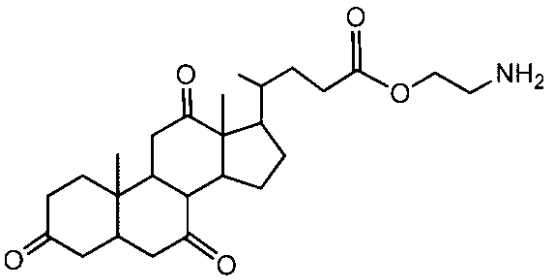
２．１６ｇの（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－デヒドロコール酸エステルを７９ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で４ｍｏｌ／Ｌ－ＨＣｌ／ＡｃＯＥｔ（渡辺化学工業株式会社製）２１．７ｍＬを加えて室温にて９０分撹拌後、反応液中に析出した結晶をろ取した。結晶を４０℃で終夜減圧乾燥し、目的とする２－アミノエチル－デヒドロコール酸エステル塩酸塩を１．２５ｇ得た（収率６６％）。

【００７２】

なお、２－アミノエチル－デヒドロコール酸は、下記の構造を有しており、ＣｈｅｍＤｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、２．０３であった。

【００７３】

【化４】

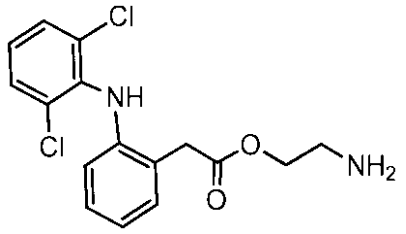



【００７４】

（４－３）　２－アミノエチル－デヒドロコール酸導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＤＥＨ－コンジュゲート」と略記する）の調製

１．０４ｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。９６ｍｇの２－アミノエチル－デヒドロコール酸エステル塩酸塩及び１６７ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、２．００ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水８０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＤＥＨ－コンジュゲートを１．０５ｇ得た。

【００７５】
（４－４）　蛍光標識２－アミノエチル－デヒドロコール酸導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＤＥＨ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　５００ｍｇのＣＳ－ＤＥＨ－コンジュゲートを５ｍＬの蒸留水に溶解し、５ｍＬのアセトン及び５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水５ｍＬを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．７５ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＤＥＨ－コンジュゲートを５７１ｍｇ得た。
【００７６】
（実施例５）
（５－１）　Ｂｏｃ－２－アミノエチルブロマイドの調製
　２．１５５ｇの２－ブロモエチルアミン臭化水素酸塩を２０ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で１．４６３ｍＬのトリエチルアミンを加え、２．２９９ｇの$Boc_2O$のジクロロメタン溶液５ｍＬを更に加えて撹拌した。室温で９０分間撹拌した後、酢酸エチルを加え、５％（ｗ／ｖ）クエン酸水溶液、水、飽和食塩水で順次分液洗浄した。硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、目的のＢｏｃ－２－アミノエチルブロマイドを２．２８７ｇ得た（収率９７％）。
【００７７】
（５－２）　２－アミノエチル－ジクロフェナク塩酸塩の調製
　２．２８７ｇのＢｏｃ－２－アミノエチルブロマイドのＤＭＦ溶液５ｍＬを氷冷し、３．２５５ｇのジクロフェナクナトリウムのＤＭＦ溶液６ｍＬを加え、室温で一晩撹拌した。６０℃で１１時間撹拌し、室温で一晩撹拌した。酢酸エチルを加え、５％（ｗ／ｖ）炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次分液洗浄した。硫酸ナトリウムで脱水後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン：酢酸エチル＝２０：１（ｖ／ｖ）、０．５％（ｖ／ｖ）トリエチルアミン）で精製し、Ｂｏｃ－２－アミノエチル－ジクロフェナクを２．６７５ｇ得た。
　次に、２．１０８ｇのＢｏｃ－２－アミノエチル－ジクロフェナクを５ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で４Ｍ塩酸／酢酸エチル２０ｍＬを加えて２．５時間撹拌した。ジエチルエーテル、ヘキサンを加えて沈殿させ、沈殿を減圧乾燥し、目的とする２－アミノエチル－ジクロフェナク塩酸塩を１．７７５ｇ得た（収率９８％）。
【００７８】
　なお、２－アミノエチル－ジクロフェナクは、下記の構造を有しており、ＣｈｅｍＤｒａｗＰｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、４．３８であった。
【００７９】
【化５】




【００８０】
（５－３）　２－アミノエチル－ジクロフェナク導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＤＩＣ－コンジュゲート」と略記する）の調製

１．０４ｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。７３ｍｇの２－アミノエチル－ジクロフェナク塩酸塩及び１６７ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、２．００ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水８０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＤＩＣ－コンジュゲートを１．０８ｇ得た。

【００８１】

（５－４）　蛍光標識２－アミノエチル－ジクロフェナク導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＤＩＣ－コンジュゲート」と略記する）の調製

５００ｍｇのＣＳ－ＤＩＣ－コンジュゲートを５ｍＬの蒸留水に溶解し、５ｍＬのアセトン及び５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水５ｍＬを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％アセトン／蒸留水（計５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．７５ｇの塩化ナトリウムを溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水５ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＤＩＣ－コンジュゲートを５７２ｍｇ得た。

【００８２】

（実施例６）

（６－１）　（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－プロベネシドの調製

１．５１ｇのプロベネシド（東京化成工業株式会社製；以下、「ＰＲＯ」とも略記する）、０．８５ｇのＮ－Ｂｏｃ－エタノールアミン（東京化成工業株式会社）及び１．２９ｇの４－ジメチルアミノピリジン（富士フィルム和光純薬株式会社製）を２３ｍＬのジクロロメタンに加えて溶解した。その後、２．０２ｇの水溶性カルボジイミド（東京化成工業株式会社製）を加えて室温にて終夜撹拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後に撹拌を停止し、１％（ｗ／ｖ）硫酸水素カリウム水溶液、５％（ｗ／ｖ）炭酸水素ナトリウム水溶液、２０％（ｗ／ｖ）塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄した。その後、硫酸マグネシウムで脱水、ろ過した後、溶媒を減圧留去し、目的の（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－プロベネシドを１．９６ｇ得た（収率８６％）。

【００８３】

（６－２）　２－アミノエチル－プロベネシド塩酸塩の調製

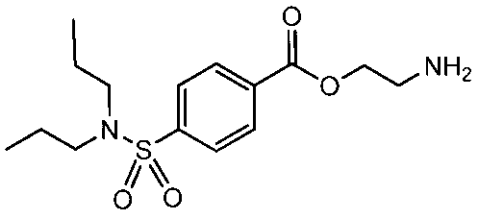
１．８９ｇの（Ｂｏｃ－２－アミノエチル）－プロベネシドを８８ｍＬのジクロロメタンに溶解し、氷冷下で４ｍｏｌ／Ｌ－ＨＣｌ／ＡｃＯＥｔ（渡辺化学工業株式会社製）２４．２ｍＬを加えて室温にて８０分撹拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認後、溶媒を減圧留去した。濃縮物をメチルｔｅｒｔ－ブチルエーテルで洗浄した後、溶媒を減圧留去した。得られた結晶をメタノールで溶解後、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテルを加え、結晶を析出させた。結晶を４０℃で終夜減圧乾燥し、目的とする２－アミノエチル－プロベネシド塩酸塩を１．３６ｇ得た（収率８５％）。

【００８４】

なお、２－アミノエチル－プロベネシドは、下記の構造を有しており、ＣｈｅｍＤｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、２．６１であった。

【００８５】

【化６】



【００８６】

（６－３）　２－アミノエチル-プロベネシド導入ＣＳ（以下、「ＣＳ－ＰＲＯ－コンジュゲート」と略記する）の調製

１．０４ｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）１．０４ｇを１０ｍＬの蒸留水に溶解し、１０ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。７１ｍｇの２－アミノエチル－プロベネシド塩酸塩及び１６７ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、２．００ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水８０ｍＬに５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水１０ｍＬで共洗いしながら加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＣＳ－ＰＲＯ－コンジュゲートを９１６ｍｇ得た。

【００８７】

（６－４）　蛍光標識２－アミノエチル－プロベネシド導入ＣＳ（以下、「蛍光標識ＣＳ－ＰＲＯ－コンジュゲート」と略記する）の調製

５００ｍｇのＣＳ－ＰＲＯ－コンジュゲートを７．５ｍＬの蒸留水に溶解し、７．５ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、０．７５ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、反応液を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４０ｍＬに加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳ－ＰＲＯ－コンジュゲートを４６２ｍｇ得た。

【００８８】

（比較例１）

（１－１）　蛍光標識ＣＳの調製

５００ｍｇのＣＳ（ナトリウム塩、生化学工業株式会社製、光散乱法により測定した重量平均分子量：約２万）を７．５ｍＬの蒸留水に溶解し、７．５ｍＬのアセトンを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水（計１．５ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。１７５ｍｇの塩化ナトリウムを５０％（ｖ／ｖ）アセトン／蒸留水２ｍＬで共洗いしながら加えた後、５３ｍＬのエタノールを加えて沈殿形成し、上清を捨てた。沈殿を２０ｍＬの蒸留水で再溶解後、１００ｍｇの塩化ナトリウム及び９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水１００ｍＬを加えて再度、沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、エタノールで順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＣＳを３８０ｍｇ得た。

【００８９】

（比較例２）

（２－１）　２１－β－アラニル-トリアムシノロンアセトニド導入ＨＡ（以下、「ＨＡ－ＴＡ－コンジュゲート」と略記する）の調製

２．１７ｇのＨＡ（ヒアルロン酸ナトリウム、生化学工業株式会社製）を２００ｍＬの

蒸留水に溶解し、２００ｍＬのエタノールを加えて撹拌した。２７２ｍｇの２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド及び４３１ｍｇのＤＭＴ－ＭＭ（株式会社トクヤマ製）を５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水（計２０ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、反応液半量に０．７５ｇの炭酸水素ナトリウムを溶解した蒸留水１１ｍＬを加えた。４時間静置後、０．２ｍＬの酢酸を加えた。反応液に５．０ｇの塩化ナトリウムを溶解した後、９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水４８３mLに加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とするＨＡ－ＴＡ－コンジュゲートを９２９ｍｇ得た。

【００９０】

（２－２）　蛍光標識２１－β－アラニル－トリアムシノロンアセトニド導入ＨＡ（以下、「蛍光標識ＨＡ－ＴＡ－コンジュゲート」と略記する）の調製

５００ｍｇのＨＡ－ＴＡ－コンジュゲートを５０ｍＬの蒸留水に溶解し、５０ｍＬのエタノールを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水（計３ｍＬ）で共洗いしながら加え、終夜撹拌した。その後、反応液に３７５ｍｇの炭酸水素ナトリウムを溶解した５ｍＬの蒸留水を加えた。４時間静置後、０．１０ｍＬの酢酸を１ｍＬの蒸留水で共洗いしながら加えた。反応液に２．５ｇの塩化ナトリウムを溶解した後、９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水２４２ｍＬに加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＨＡ－ＴＡ－コンジュゲートを５６７ｍｇ得た。

【００９１】

（比較例３）

（３－１）　３－アミノプロピル－ケイ皮酸導入ＨＡ（以下、「ＨＡ－ＣＩＮ－コンジュゲート」と略記する）の調製

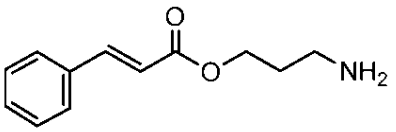
１７２ｍｇ／５ｍＬのＮ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＨＯＳｕ：渡辺化学工業株式会社）の水溶液、１４３ｍｇ／５ｍＬの１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣＩ・ＨＣｌ）（渡辺化学工業株式会社）の水溶液、及び１８１ｍｇ／５ｍＬのケイ皮酸３－アミノプロピル塩酸塩（東京化成工業株式会社）の水溶液を、水（１１５ｍＬ）／ジオキサン（１４４ｍＬ）中のヒアルロン酸ナトリウム（１．０６ｇ、生化学工業株式会社）の溶液に加えた。この混合物を３時間撹拌して、７５０ｍｇ／１０ｍＬの炭酸水素ナトリウム（日本薬局方）水溶液を加えた。更に２時間３０分撹拌後、酢酸（２１４ｍｇ）及び塩化ナトリウム（１．０ｇ）により反応を停止させた。エタノール（３００ｍＬ）を加え、生じた沈殿物を濾別して、順に８０％（ｖ／ｖ）エタノール、９５％（ｖ／ｖ）エタノールで２回洗浄した。この固体を真空にて４０℃で一晩乾燥することにより、ＨＡ－ＣＩＮ－コンジュゲートを１．０６ｇ得た。

【００９２】

なお、３－アミノプロピル－ケイ皮酸は、下記の構造を有しており、Ｃｈｅｍ Ｄｒａｗ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ ｖｅｒ.１８．１.２．１８（パーキンエルマー社）を用いてＣｌｏｇＰを計算した結果、２．１４であった。

【００９３】

【化７】




【００９４】

（３－２）　蛍光標識３－アミノプロピル－ケイ皮酸導入ＨＡ（以下、「蛍光標識ＨＡ－

ＣＩＮ－コンジュゲート」と略記する）の調製
　５００ｍｇのＨＡ－ＣＩＮ－コンジュゲートを５０ｍＬの蒸留水に溶解し、５０ｍＬのエタノールを加えて撹拌した。５ｍｇのフルオレセイニルグリシンアミド（セタレバイオテック社製）及び２４ｍｇのＤＭＴ－ＭＭを５０％（ｖ／ｖ）アセトン/蒸留水（計１４ｍＬ）に溶かして加え、終夜撹拌した。その後、３７５ｍｇの炭酸水素ナトリウムを５ｍＬの蒸留水に溶かして加えた。０．１０ｍＬの酢酸を３ｍＬの蒸留水に溶かして加えた。２．５ｇの塩化ナトリウムを加えて溶解した後、９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水２４２ｍＬを加えて沈殿形成し、上清を捨てた。その後、沈殿を９０％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水、９５％（ｖ／ｖ）エタノール／蒸留水で順次洗浄した。得られた沈殿を４０℃で終夜減圧乾燥することで、目的とする蛍光標識ＨＡ－ＣＩＮ－コンジュゲートを４６２ｍｇ得た。
【００９５】
＜遊離試験＞
　遊離試験にかかる実施例では、以下のようにして各蛍光標識をしていないコンドロイチン硫酸誘導体及びヒアルロン酸誘導体からの医薬品有効成分（ＡＰＩ）遊離率を評価した。
（１）リン酸緩衝液の調製
　７８０ｍｇ（５．０ｍｍｏｌ）のリン酸二水素ナトリウム・二水和物を５００ｍＬの精製水に溶解し、Ａ液とした。別途、１．７９ｇ（５．０ｍｍｏｌ）のリン酸水素二ナトリウム・１２水和物を５００ｍＬの精製水に溶解し、Ｂ液とした。Ａ液とＢ液を３：７の比率で混合し、ｐＨ７．４のリン酸緩衝液を調製した。
【００９６】
（２）評価方法
　実施例１～６のコンドロイチン硫酸誘導体について、濃度が５ｍｇ／１０ｍＬとなるようｐＨ７．４のリン酸緩衝液に溶解したのち、３６℃の恒温槽中で１週間加温し、その間のＡＰＩの遊離率を２４時間ごとに高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で評価した。
　サイズ排除クロマトグラフィーカラム（ＴＯＳＯＨ社製ＴＳＫｇｅｌ　α）を用い、誘導体中のＡＰＩ量及び遊離したＡＰＩ量に相当するＨＰＬＣのピーク面積の比によって遊離率を算出した。
　　遊離率（％）＝遊離したＡＰＩのピーク面積／（各誘導体中のＡＰＩのピーク面積＋遊離したＡＰＩのピーク面積）×１００
　液体クロマトグラフィーの条件の詳細は以下の通りである。
　分析時間：４０分
　流速：０．５ｍＬ／ｍｉｎ
　グラジェント：ｉｓｏｃｒａｔｉｃ
　溶出液：アセトニトリル（ＨＰＬＣ用）：生理食塩液＝１：２（ｖ：ｖ）
　検出器：紫外線検出器（２１０ｎｍ、２３０ｎｍ、２４０ｎｍ又は２８０ｎｍ）
　温度：３６℃。
比較例２～３のヒアルロン酸誘導体についても、実施例に準じて評価した。
【００９７】
（３）評価結果
　遊離試験の評価結果を表１に示す。
【００９８】

【表１】

| | | 実施例 | | | | | | 比較例 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 |
| 化合物 | | CS-TA-コンジュゲート | CS-HYD-コンジュゲート | CS-NAP-コンジュゲート | CS-DEH-コンジュゲート | CS-DIC-コンジュゲート | CS-PRO-コンジュゲート | HA-TA-コンジュゲート | HA-CIN-コンジュゲート |
| 経過時間（日） | 0 | 0.10% | 0.00% | 0.08% | 0.45% | 0.00% | 0.31% | 23.23% | 0.00% |
| | 1 | 1.22% | 0.65% | 0.27% | 0.53% | 0.95% | 0.83% | 32.86% | 0.00% |
| | 2 | 1.91% | 1.48% | 0.39% | 0.52% | 2.06% | 1.43% | 40.59% | 0.00% |
| | 3 | 2.93% | 2.38% | 0.52% | 0.66% | 3.13% | 2.13% | 47.40% | 0.00% |
| | 4 | 3.92% | 3.35% | 0.68% | 0.65% | 4.11% | 2.91% | 53.06% | 0.00% |
| | 5 | 4.52% | 4.30% | 0.82% | 0.78% | 5.40% | 3.63% | 57.00% | 0.00% |
| | 6 | 5.73% | 5.24% | 0.97% | 1.29% | 6.55% | 4.56% | 61.61% | 0.00% |
| | 7 | 6.17% | 6.05% | 1.06% | 1.42% | 7.62% | 5.29% | 63.76% | 0.00% |
| 遊離速度 | | 0.48%/日 | 0.89%/日 | 0.14%/日 | 0.14%/日 | 1.10%/日 | 0.72%/日 | 5.74%/日 | 0.00%/日 |

【００９９】

表１に示されるように、実施例１～６のコンドロイチン硫酸誘導体はいずれも緩やかな遊離速度を示した。これに対して比較例２のヒアルロン酸誘導体は、試験開始時において既に有効成分の大幅な遊離が確認された。また、比較例３のヒアルロン酸誘導体は、ケイ皮酸の遊離が認められなかった。

【０１００】

＜ラットを用いた評価１＞

（１）被験物質の調製

実施例１～６及び比較例１～３の蛍光標識化合物を２．３％（ｖ／ｖ）グリセリン含有リン酸緩衝食塩液に溶解して被験物質を調製した。被験物質における各蛍光標識化合物の濃度は１％（ｗ／ｖ）とした。

（２）試験動物の前処理

イソフルラン吸入麻酔下（濃度：２．０～４．０％、流速：２～３Ｌ／ｍｉｎ）において、ラット（ＳＤ系（ＳＰＦ）、雌性、７～９週齢）の下腹部を圧迫し、ラットの膀胱から残尿を排出した。カテーテル（ＰＥ５０）を経尿道的に膀胱内腔へ挿入し、０．２ｍＬの生理食塩液で膀胱内腔を洗浄した。その後、０．４ｍｏｌ／Ｌの塩酸０．２ｍＬを膀胱内腔に注入し、３分１５秒間留置した。塩酸留置後、０．４ｍＬの生理食塩液で膀胱内腔を４回洗浄した。

【０１０１】

（３）評価方法

前処理後１日目に、イソフルラン吸入麻酔下でカテーテル（ＰＥ５０）を用いて０．２ｍＬの各被験物質を経尿道的に膀胱内腔に投与し、３０分間留置した。

被験物質の投与後１日目、ラットの膀胱を採取し、膀胱頂部と尿道とを結ぶ軸に対して垂直に凍結切片を作製した。凍結切片について蛍光顕微鏡を用いて、明視野画像（可視光）及び蛍光画像（励起波長４７０ｎｍ、吸収波長５２５ｎｍ）を撮影した。また、得られた蛍光画像を蛍光顕微鏡付属のソフトウェア（ＢＺ－Ｘ Ａｎａｌｙｚｅｒ）のハイブリッドセルカウントで解析した。蛍光の抽出閾値は４０とし、各蛍光画像の輝度の積算値を算出した。試験毎にＣＳ－ＴＡ－コンジュゲート（実施例１）を陽性対照化合物とし、これを基準とした場合の相対値を算出した。

【０１０２】

（４）評価結果

被験物質の投与後１日目における凍結切片の明視野画像（ａ）及びそれに対応する蛍光画像（ｂ）を、図１～６（各実施例）及び図７～９（各比較例）に示す。なお、蛍光画像（ｂ）において、白色部が蛍光を発している部分を表す。

図１～６に示す通りコンドロイチン硫酸誘導体の投与群（実施例）では、膀胱の移行上皮及び粘膜下組織に強く広範な蛍光が観察され、膀胱の粘膜下組織への高い浸透性が示された。これに対し、図７のコンドロイチン硫酸の投与群及び図８～９のヒアルロン酸誘導体の投与群（比較例）では、膀胱の移行上皮及び粘膜下組織における蛍光が微弱であり、

膀胱の粘膜下組織への浸透性が低いことが示された。
　また、各被験物質の投与後１日目における輝度の積算値（実施例１を基準とした相対値）を表２に示す。
【０１０３】
【表２】

| | 化合物 | 輝度の積算値（投与後１日目） |
|---|---|---|
| 実施例１ | 蛍光標識CS-TA-コンジュゲート | 1.00 |
| 実施例２ | 蛍光標識CS-HYD-コンジュゲート | 1.50 |
| 実施例３ | 蛍光標識CS-NAP-コンジュゲート | 1.83 |
| 実施例４ | 蛍光標識CS-DEH-コンジュゲート | 1.27 |
| 実施例５ | 蛍光標識CS-DIC-コンジュゲート | 2.36 |
| 実施例６ | 蛍光標識CS-PRO-コンジュゲート | 1.22 |
| 比較例１ | 蛍光標識CS | 0.32 |
| 比較例２ | 蛍光標識HA-TA-コンジュゲート | 0.07 |
| 比較例３ | 蛍光標識HA-CIN-コンジュゲート | 0.05 |

【０１０４】
　表２に示されるように、実施例１～６の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸誘導体）は、比較例１の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸）及び比較例２～３の蛍光標識化合物（ヒアルロン酸誘導体）に比べて、投与後１日目における輝度の積算値が大きかった。この結果から、実施例１～６の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸誘導体）は、膀胱の粘膜下組織に対する医薬品有効成分（ＡＰＩ）の浸透性を高めることができるといえる。
【０１０５】
＜ラットを用いた評価２＞
１．コンドロイチン硫酸誘導体とコンドロイチン硫酸との比較
　前記の評価１に記載の手法に準じて、実施例１の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸誘導体）及び比較例１の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸）を投与した後、７日目における蛍光画像を測定し、輝度の積算値を算出した。その結果を表３に示す。
【０１０６】
【表３】

| | 化合物 | 輝度の積算値（投与後７日目） |
|---|---|---|
| 実施例１ | 蛍光標識CS-TA-コンジュゲート | 1.00 |
| 比較例１ | 蛍光標識CS | 0.03 |

【０１０７】
　表３に示す通り、実施例１の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸誘導体）は、比較例

１の蛍光標識化合物（コンドロイチン硫酸）に比べて、投与後７日目における輝度の積算値が著しく大きかった。この結果から、コンドロイチン硫酸誘導体は、膀胱の粘膜下組織においてコンドロイチン硫酸よりも多量に存在しているといえる。

【０１０８】

２．コンドロイチン硫酸誘導体と医薬品有効成分（単剤）との比較

（１）被験物質の調製

実施例１のコンドロイチン硫酸誘導体（ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲート）を２．３％（ｖ／ｖ）グリセリン含有５ｍＭリン酸緩衝液に溶解して被験物質を調製した。また、市販のトリアムシノロンアセトニド製剤（ケナコルト）を比較化合物（単剤）として用いた。実施例及び比較例ともに、ＴＡの投与量が０．８ｍｇ／匹となるように設定した。

（２）試験動物の前処理

評価１と同様にして行った。

【０１０９】

（３）評価方法

前処理後１日に、イソフルラン吸入麻酔下でカテーテル（ＰＥ５０）を用いて各被験物質を経尿道的に０．２ｍＬ膀胱内に投与し、３０分間留置した。

被験物質投与後７日に、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈を切断し放血安楽死させた後、膀胱を採取した。メタノール／緩衝液（１０ｍｍｏｌ／Ｌギ酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ６．０）：メタノール＝３：２（ｖ／ｖ））混液中で膀胱をホモジナイズし、０．０５ｇ／ｍＬの組織濃度になるように測定試料を調製した。

次に、以下の条件下でＬＣ／ＭＳ／ＭＳ分析によりＴｒｉａｍｃｉｎｏｌｏｎｅ－６－$d_1$ Ａｃｅｔｏｎｉｄｅ－$d_6$を内標準物質として、測定試料中のＴＡ量を定量した。

・測定機器

ＨＰＬＣ：Ｎｅｘｅｒａ Ｘ２（島津製作所）

ＭＳ：ＱＴＲＡＰ ６５００（ＡＢ ＳＣＩＥＸ）

・ＨＰＬＣ条件

分析カラム：逆相カラム（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ ＯＤＳ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ、ＧＬサイエンス）

分析時間：７分

流速：０．４ｍＬ／ｍｉｎ

移動相：移動相Ａ：０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸水溶液、移動相Ｂ：メタノール

グラジェント

温度：４０℃

・ＭＳ条件

イオン化モード：ＥＳＩ（Ｔｕｒｂｏ Ｓｐｒａｙ Ｉｏｎ Ｄｒｉｖｅ）

測定モード：ＭＲＭ

検出モード：Ｐｏｓｉｔｉｖｅ

（４）評価結果

被験物質の投与後７日目におけるＡＰＩ（ＴＡ）の濃度の結果を表４に示す。

【０１１０】

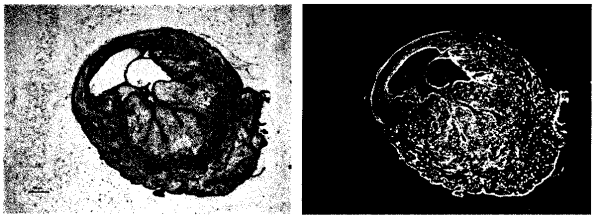
【表４】

| 化合物 | API(TA)濃度 (ng/g) |
|---|---|
| CS-TA-コンジュゲート | 20.73 |
| TA | 4.09 |

【０１１１】
表４に示されるように、ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲートは、ＴＡに比べて、投与後７日目におけるＴＡ濃度が高かった。すなわち、コンドロイチン硫酸誘導体（ＣＳ－ＴＡ－コンジュゲート）を投与した群では、医薬品有効成分（ＴＡ）単剤を投与した群よりも医薬品有効成分が多量に存在していた。
以上の結果から、ＡＰＩを導入したコンドロイチン硫酸誘導体は、ＡＰＩ単剤の場合に比べて、膀胱の粘膜下組織にＡＰＩを効果的に送達させることができるといえる。
【０１１２】
以上の結果からわかるように、本発明によれば、膀胱内腔へ投与した医薬品有効成分（ＡＰＩ）の粘膜下組織への効果的な送達を達成することが可能なシステムを提供することができる。
【０１１３】
本出願は、２０１９年１０月３日付で日本国特許庁に出願された特願２０１９－１８３０８２号に基づく優先権を主張し、その内容は参照によって全体として本出願に組み込まれる。

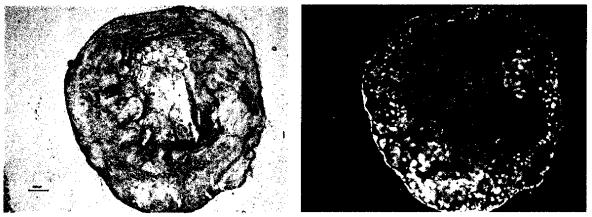
【図面】

【図１】



(a) (b)

【図２】



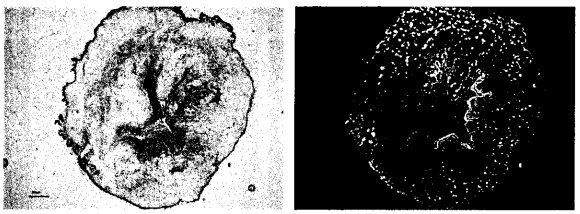
(a) (b)

【図３】



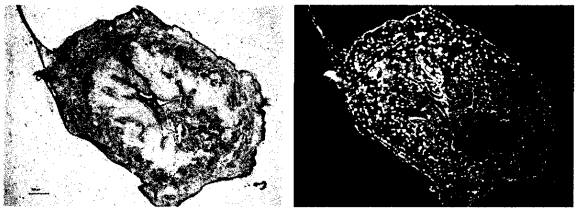
(a) (b)

【図４】



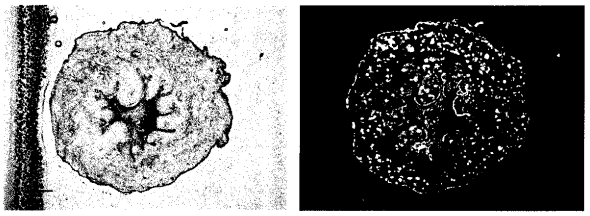
(a) (b)

【図５】



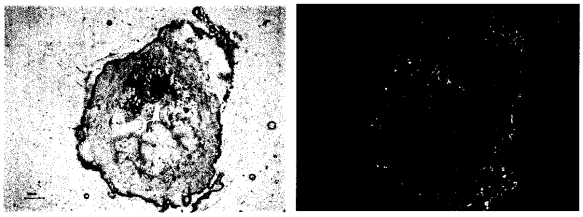
(a) (b)

【図６】



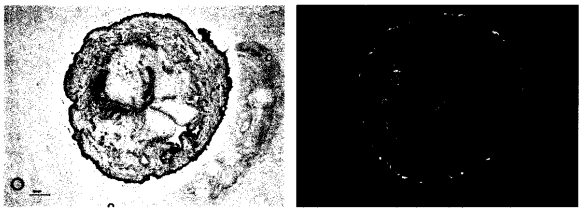
(a) (b)

【図７】



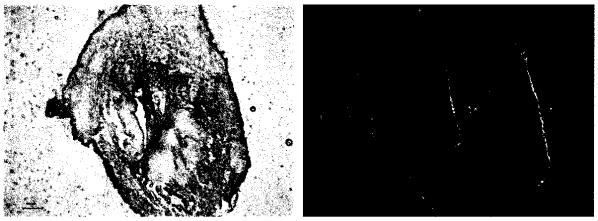
(a) (b)

【図８】



(a) (b)

【図９】



(a) (b)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | | | |
|---|---|---|---|
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***31/495(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 31/495 |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***31/575(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 31/575 |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***31/192(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 31/192 |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***31/196(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 31/196 |

(56)参考文献

特開２０１７－０３６４５５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１５／００５４５８（WO，Ａ１）
宮本葵ほか，液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いる環境水中副腎皮質ステロイド類分析法の開発，BUNSEKI KAGAKU，2010年，Vol.59, No.4，pp.301-309
ONISHI, H. et al.，Conjugate between Chondroitin Sulfate and Prednisolone with Glycine Linker: Preparation and in Vitro Conversion Analysis，Chem. Pharm. Bull.，2013年，Vol.61, No.9，pp.902-912

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ａ６１Ｋ　４７／００ ～ ４７／６９
Ａ６１Ｋ　３１／００ ～ ３３／４４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）