



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114302749 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 08

(21) 申请号 202080046753.X

(22) 申请日 2020.06.26

(30) 优先权数据

2019-122063 2019.06.28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/025324 2020.06.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/262642 JA 2020.12.30

(71) 申请人 持田制药株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立研究开发法人国立国际医疗研究中心

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 张桂霞 彭昶

(51) Int.Cl.

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61K 35/39 (2015.01)

A61P 3/10 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

(72) 发明人 霜田雅之 安嶋久美子 古迫正司

权利要求书6页 说明书115页 附图9页

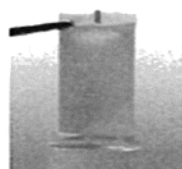
(54) 发明名称

使用了化学交联海藻酸的移植用器件

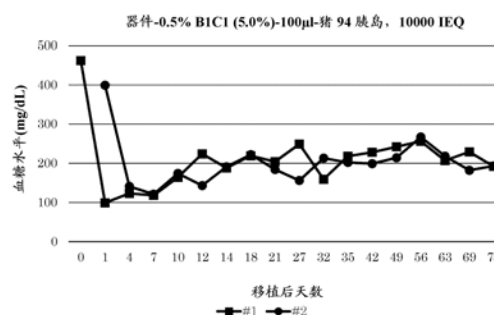
(57) 摘要

本发明提供移植用器件,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,上述水凝胶是通过化学交联使海藻酸衍生物凝胶化而得的。由此,提供新型的移植用器件。

【图4】



【图5-1】



1. 移植用器件, 其是包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶的移植用器件, 上述水凝胶是通过化学交联使海藻酸衍生物凝胶化而得的。

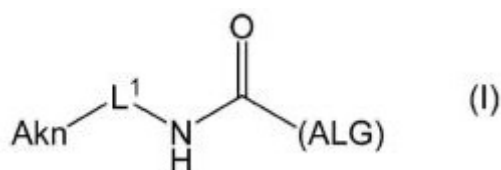
2. 权利要求1所述的移植用器件, 其中, 上述水凝胶包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联作为交联。

3. 权利要求1或2所述的移植用器件, 其中, 上述化学交联是基于以下的 (A) 和 (B) 所记载的海藻酸衍生物的组合的化学交联,

(A) :

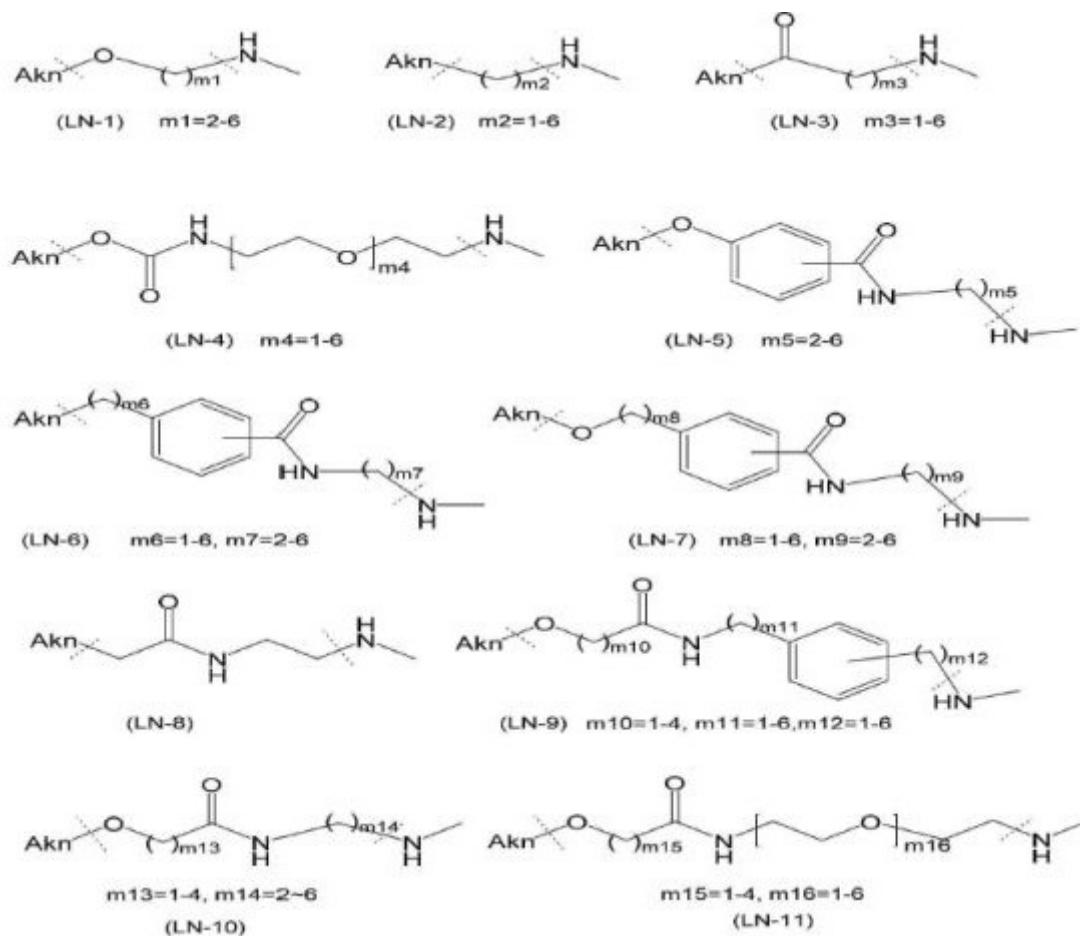
下述式 (I) 所表示的海藻酸衍生物, 其中, 经由酰胺键和2价接头 ( $-L^1-$ ) 向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基 (Akn) :

[化学式152]



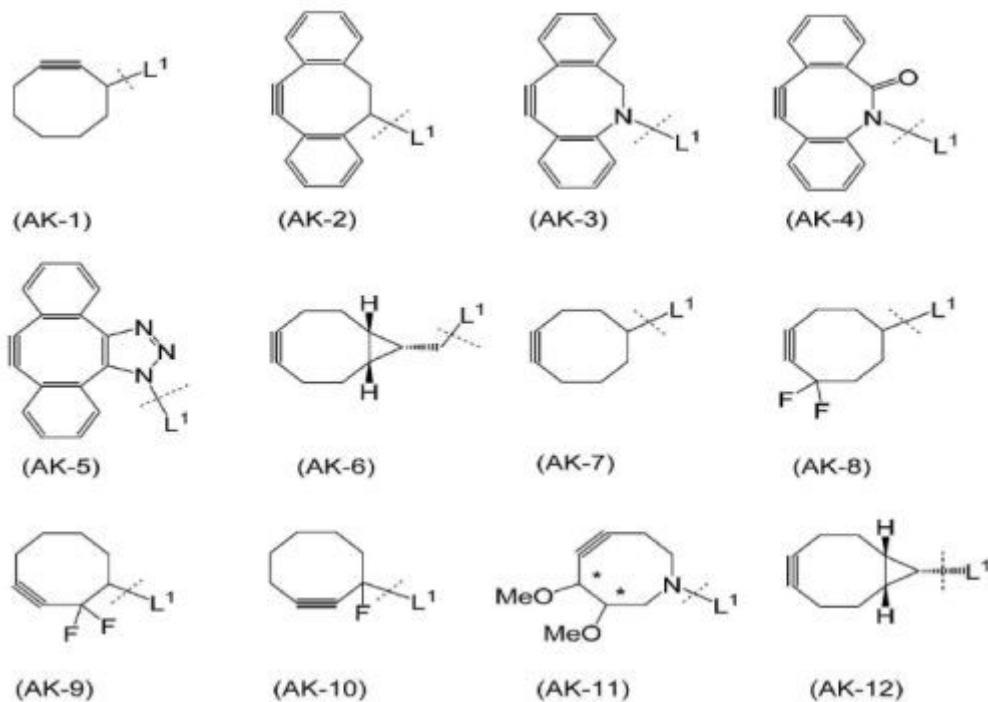
式 (I) 中, (ALG) 表示海藻酸;  $-NHC(=O)-$  表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;  $-L^1-$  表示选自下述部分结构式的2价接头, 各式中不包括两端的波浪线外侧:

[化学式153]



Akn表示选自下述部分结构式的环状炔基, 各式中不包括波浪线右侧:

[化学式154]

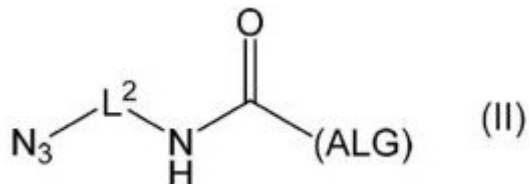


星号表示手性中心；

(B)：

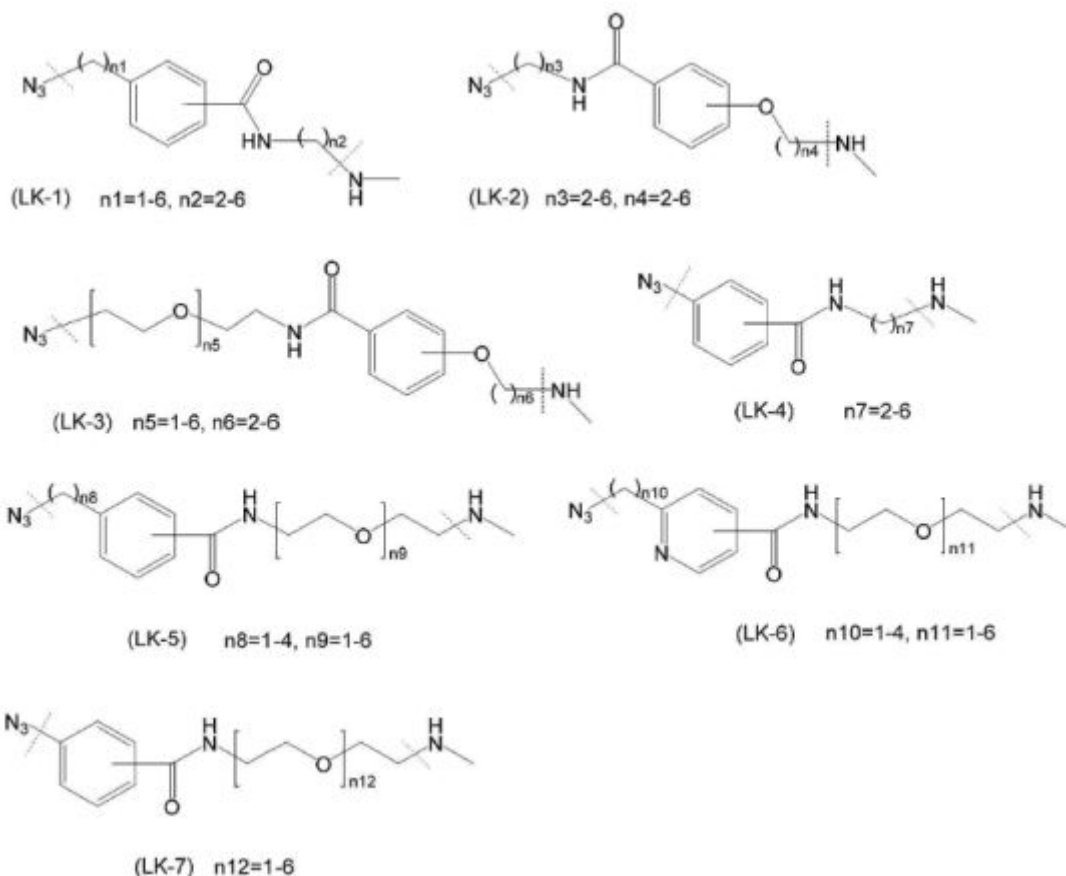
下述式 (II) 所表示的海藻酸衍生物，其中，经由酰胺键和2价接头 ( $-L^2-$ ) 向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了叠氮基，

[化学式155]



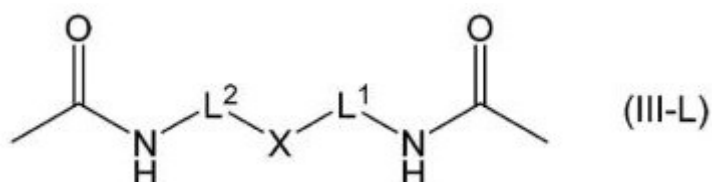
式 (II) 中，(ALG) 表示海藻酸； $-NHCO-$  表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键； $-L^2-$  表示选自下述部分结构式的2价接头，各式中不包括两端的波浪线外侧：

[化学式156]



4. 权利要求3所述的移植用器件,其中,上述化学交联的海藻酸衍生物是第1海藻酸的任意羧基与第2海藻酸的任意羧基经由下述式(III-L)结合而成的交联海藻酸:

[化学式157]



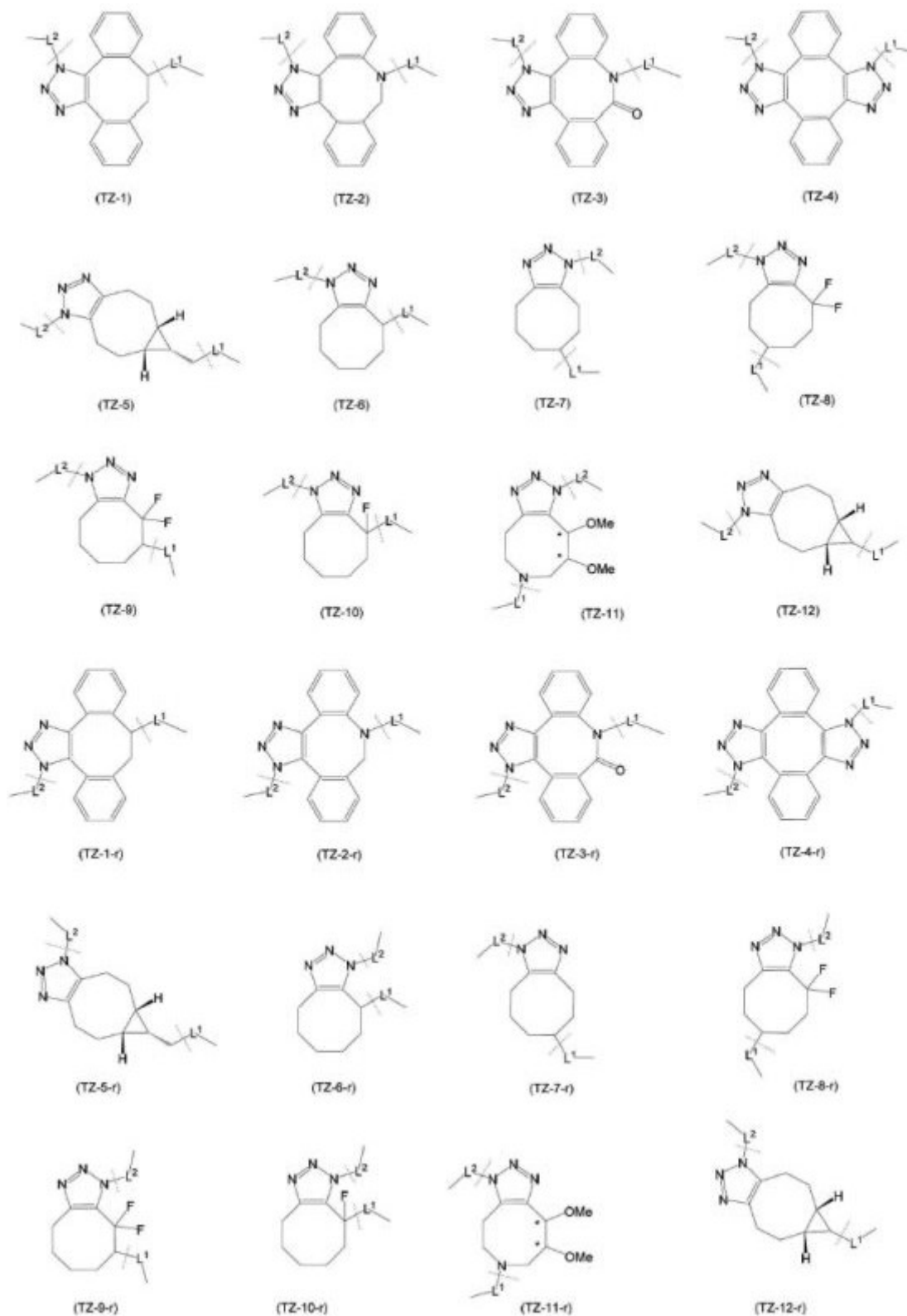
式(III-L)中,两端的-CONH-和-NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;

-L<sup>1</sup>-与上述权利要求3中的定义相同;

-L<sup>2</sup>-与上述权利要求3中的定义相同;

X为选自下述部分结构式的环状基团,各式中不包括两端的波浪线外侧,

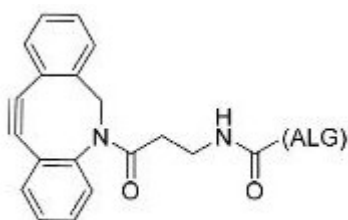
[化学式158]



星号表示手性中心。

5. 权利要求3或4所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-1-(I)-A-2):

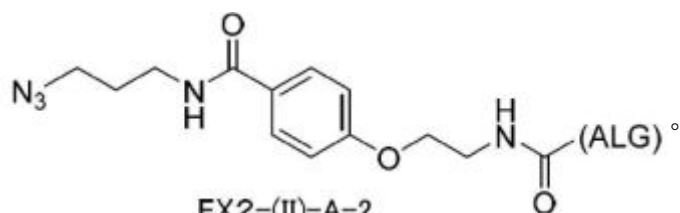
[化学式159]



EX1-(I)-A-2

式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-2-(II)-A-2):

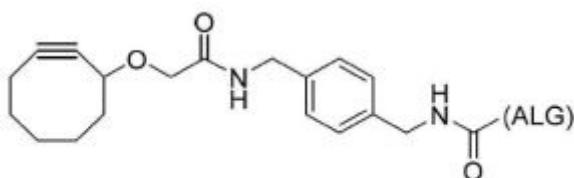
[化学式160]



EX2-(II)-A-2

6. 权利要求3或4所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-3-(I)-A-2):

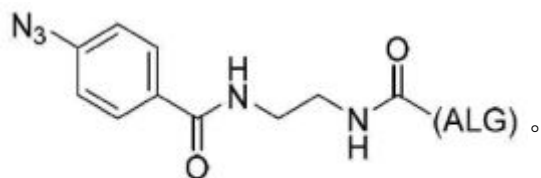
[化学式161]



**EX3-(I)-A-2**

式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-4-(II)-A-2):

[化学式162]



EX4-(II)-A-2

7. 权利要求1~6中任一项所述的移植用器件,其中,上述胰岛为人胰岛或猪胰岛。

8. 权利要求7所述的移植用器件,其中,上述胰岛为猪的成体胰岛。

9. 权利要求7所述的移植用器件, 其中, 上述胰岛为胚胎期、新生儿期或围产期的猪胰岛。

10. 权利要求1~9中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶进一步用半透膜包覆。

11. 权利要求10所述的移植用器件, 其中, 上述半透膜是由纤维素衍生物形成的透析膜。

12. 权利要求11所述的移植用器件,其中,上述纤维素衍生物为乙酸钠纤维素。

13. 权利要求1~12中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的移植部位是皮下或腹腔内。

14. 权利要求1~13中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为0.5~5mm。

15. 权利要求14所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为1~3mm。

16. 权利要求1~13中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~3mm。

17. 权利要求16所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~1mm。

18. 权利要求1~17中任一项所述的移植用器件,其中,在制作上述包含胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶后用半透膜包覆。

19. 权利要求1~17中任一项所述的移植用器件,该移植用器件如下获得:在通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中悬浮胰岛素分泌细胞或胰岛,将该悬浮有胰岛素分泌细胞或胰岛的溶液封入半透膜中,之后使该半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,从而使半透膜中的海藻酸衍生物凝胶化而得到器件。

20. 权利要求19所述的移植用器件,其中,上述含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液。

21. 移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

步骤(c):使含有2价金属离子的溶液与步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液接触,制作厚度为0.5~5mm的凝胶的步骤;

步骤(d):作为任意选择的步骤,用半透膜包覆步骤(c)中得到的凝胶的步骤。

22. 移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

步骤(c):将步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液封入半透膜中的步骤;

步骤(d):使步骤(c)中得到的半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,以将半透膜中的海藻酸溶液凝胶化的步骤。

23. 权利要求21或22所述的移植用器件的制造方法,其中,上述含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液。

## 使用了化学交联海藻酸的移植用器件

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于将细胞等移植到生物体内的器件。更具体而言,涉及使用了化学交联海藻酸的移植用器件及其制造方法。

### 背景技术

[0002] 作为I型糖尿病的治疗方法,除现有的胰岛素注射或胰腺移植以外,国内外还在实施胰岛移植,但特别是在日本国内还存在供体不足等问题,仍限于少数例子。使用了猪胰岛的异种移植可成为解决该供体不足的有效技术,但无论是同种移植还是异种移植的情形,都无法避免基于免疫的排斥反应,必须长期服用免疫抑制剂,还报道了由此引起的并发症的危险性或残留的移植胰岛的不良影响的可能性(非专利文献1:Organ Biology,第24卷, No.1,第7-12页,2017)。

[0003] 作为解决此问题的技术,一直以来都在研究生物人工胰腺(bioartificial pancreas (BAP)、也称为生物人工胰岛)的技术,该技术是使用可隔离受体的免疫细胞等、且营养成分或胰岛素等可透过的高分子凝胶或半透膜等包覆胰岛(胶囊化),并将其移植到体内(专利文献1:日本特开昭55-157502号公报、专利文献2:日本特开昭60-258121号公报、专利文献3:国际公开第95/28480号小册子、专利文献4:国际公开第92/19195号小册子、专利文献5:日本特开2017-196150号公报)。

[0004] 关于生物人工胰岛的种类,主要分为:(1)用高分子凝胶等包覆各个胰岛而得的“微囊型”、(2)用高分子凝胶或半透膜等包覆多个胰岛而得的“大胶囊型”、(3)将胰岛封入由半透膜制作的免疫隔离器件或中空纤维组件等中并使血液灌流到器件中的“血液灌流型”(非专利文献1)。

[0005] 微囊型是使用可隔离免疫细胞且营养成分或胰岛素等可透过的高分子凝胶将各胰岛胶囊化、并和通常的胰岛移植同样移植到体内(主要是腹腔内)的技术。除了可隔离受体的免疫细胞以外,还因隔离膜厚度较薄,而具有基于扩散的透过时间短、营养成分的透过或细胞的响应变快的优点,但在胰岛的功能降低时难以回收。

[0006] 血液灌流型是将血液灌流到用半透膜隔离了胰岛的流路中的技术,应用人工透析或生物人工肝脏等技术的积累,进行了多项基础研究,课题在于装置尺寸变大或血栓形成的风险大,具有长期使用时形成血栓而容易堵塞的缺点,尚未实用化。

[0007] 大微囊型是为了能够在微囊型的缺点、即胰岛的功能降低时摘出而改良的技术。然而,在使用大胶囊型异种胰岛的胰岛移植的研究中,显示优异成效的胰岛移植还未见报道,尚未发现克服供体不足、免疫抑制剂的使用、胰岛的长期存活/功能维持等胰岛移植中的问题的、使用了异种胰岛的生物人工胰岛。

[0008] 有关于利用了点击反应(click reaction)的海藻酸水凝胶胶囊的合成与它们的稳定性、水溶胀和扩散的离子交联海藻酸盐胶囊的较的报道(非专利文献2:JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH,B部分/第103B卷,第5期,第1120-1132页(2015))。该文献中公开了:通过点击反应形成的海藻酸胶囊比离子交联( $C^{2+}$ )交联稳定。

- [0009] 现有技术文献
- [0010] 专利文献
- [0011] 专利文献1:日本特开昭55-157502号公报;
- [0012] 专利文献2:日本特开昭60-258121号公报;
- [0013] 专利文献3:国际公开第95/28480号小册子;
- [0014] 专利文献4:国际公开第92/19195小册子;
- [0015] 专利文献5:日本特开2017-196150号公报;
- [0016] 非专利文献
- [0017] 非专利文献1:Organ Biology,第24卷,No.1,第7-12页,2017;
- [0018] 非专利文献2:JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH,B部分/第103B卷,第5期,第1120-1132页(2015)。

## 发明内容

- [0019] 发明所要解决的课题
- [0020] 在如上所述的状况下,要求可实用的新型移植用器件等。
- [0021] 用于解决课题的手段
- [0022] 为了解决上述课题,本发明人反复进行了深入研究,结果发现了以下的(1)~(5),根据这些见解,从而完成了本发明。
- [0023] (1)这里使用的新型海藻酸衍生物(例如,式(I)和式(II)的海藻酸衍生物)例如是通过形成化学交联而发生水凝胶化的海藻酸衍生物,使用该进行化学交联的海藻酸衍生物调制成平板形而得的海藻酸凝胶在移植到生物体内(健康小鼠的腹腔内)时,即使5周后平板形凝胶的尺寸也没有大的变化,该凝胶没有溶解而维持形状,生物体内稳定性优异。
- [0024] (2)另外,也未见该小鼠的腹腔内的粘连或炎症。
- [0025] (3)将Min6细胞包埋在平板形凝胶内培养3~4周时,可确认Min6簇的存活,增殖良好,且没有细胞毒性。
- [0026] (4)将包埋有猪胰岛的化学交联海藻酸凝胶用半透膜包覆而得的移植用器件移植到糖尿病模型小鼠中时,显示了长达75天的血糖值抑制效果。
- [0027] (5)在上述(4)中,移植后经过10周后摘出该移植用器件时,没有观察到粘连、血管生成和炎症等障碍。而且,对于移植用器件中的胰岛通过双硫腠染色确认其存活时,确认到了充分存活。另外,将移植后10周后摘出的移植用器件打开,确认其中的海藻酸凝胶时,维持了其形状状态。
- [0028] 这里使用的新型海藻酸衍生物(例如,式(I)和式(II)的海藻酸衍生物)例如是可用于形成化学交联的海藻酸衍生物、即引入了可用于形成化学交联的反应性基团或该反应性基团的互补的反应性基团的海藻酸衍生物。
- [0029] 上述化学交联形成例如通过基于Huisgen反应(1,3-偶极环加成反应)的交联反应进行,例如可在式(I)和式(II)的海藻酸衍生物间进行,或者例如可在式(I)的海藻酸衍生物与具有叠氮基的其他分子间进行,或者可在式(II)的海藻酸衍生物与具有炔基的其他分子间进行。
- [0030] 这里,提供使用通过化学交联而凝胶化的海藻酸衍生物调制的、用于将细胞等移

植到生物体内的器件,更具体而言,例如是包含包埋有胰岛素分泌细胞或胰岛等的化学交联海藻酸凝胶和根据需要包覆该凝胶的半透膜的移植用器件、其制造方法等。通过化学交联而凝胶化的海藻酸衍生物例如是经由酰胺键和2价接头向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基或叠氮基的式(I)或式(II)的海藻酸衍生物,使用式(I)和式(II)的海藻酸衍生物进行Huisgen反应(1,3-偶极环加成反应),从而得到新型的交联海藻酸。

[0031] 示例的方案可如以下的[1]~[23]所示。

[0032] [1]移植用器件,其是包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶的移植用器件,上述水凝胶是通过化学交联使海藻酸衍生物凝胶化而得的。

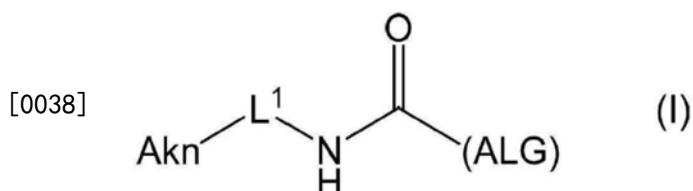
[0033] [2]上述[1]所述的移植用器件,其中,上述水凝胶包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联作为交联。

[0034] [3]上述[1]或[2]所述的移植用器件,其中,上述化学交联是基于以下的(A)和(B)所记载的海藻酸衍生物的组合的化学交联,

[0035] (A):

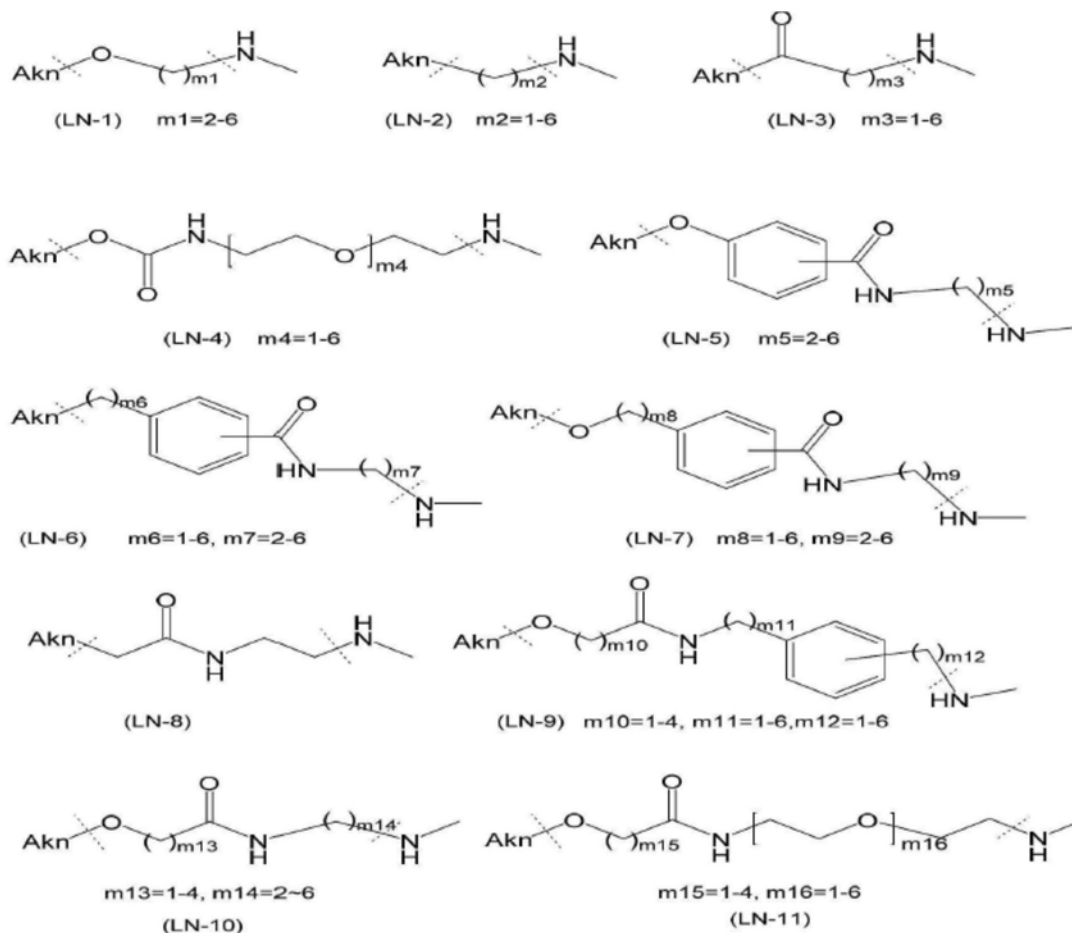
[0036] 下述式(I)所表示的海藻酸衍生物,其中,经由酰胺键和2价接头(-L<sup>1</sup>-)向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基(Akn):

[0037] [化学式1]



[0039] [式(I)中,(ALG)表示海藻酸;-NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;-L<sup>1</sup>-表示选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

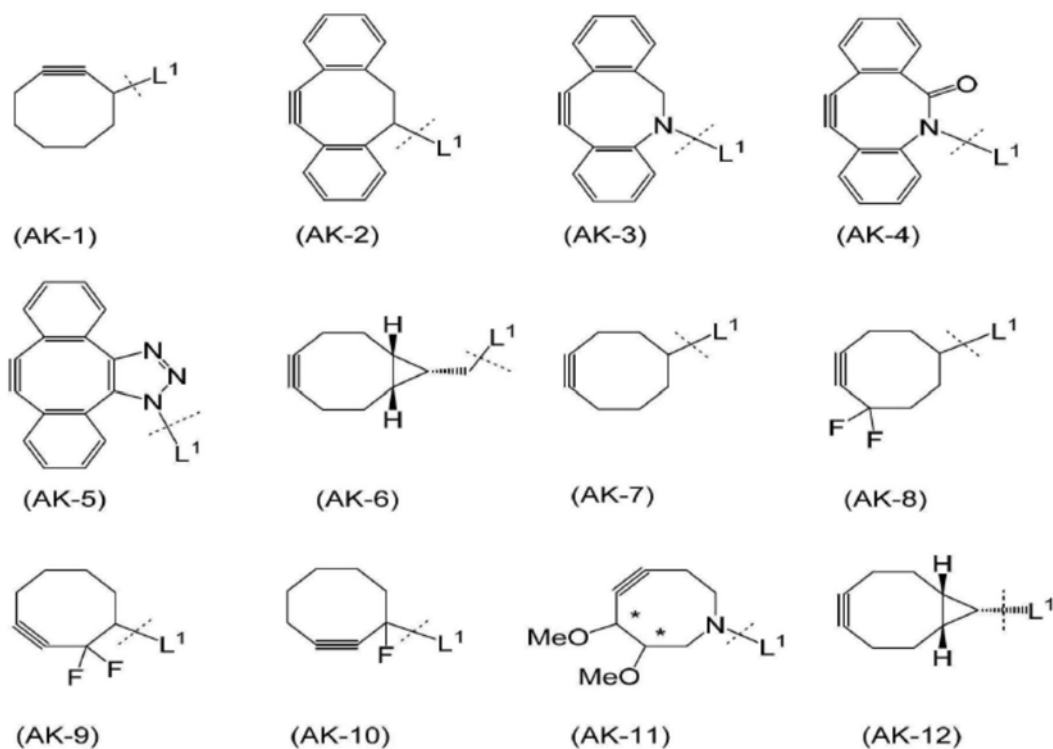
[0040] [化学式2]



[0041]

[0042] Akn表示选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0043] [化学式3]



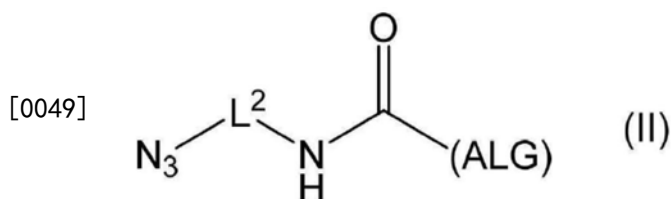
[0044]

[0045] 星号表示手性中心];

[0046] (B) :

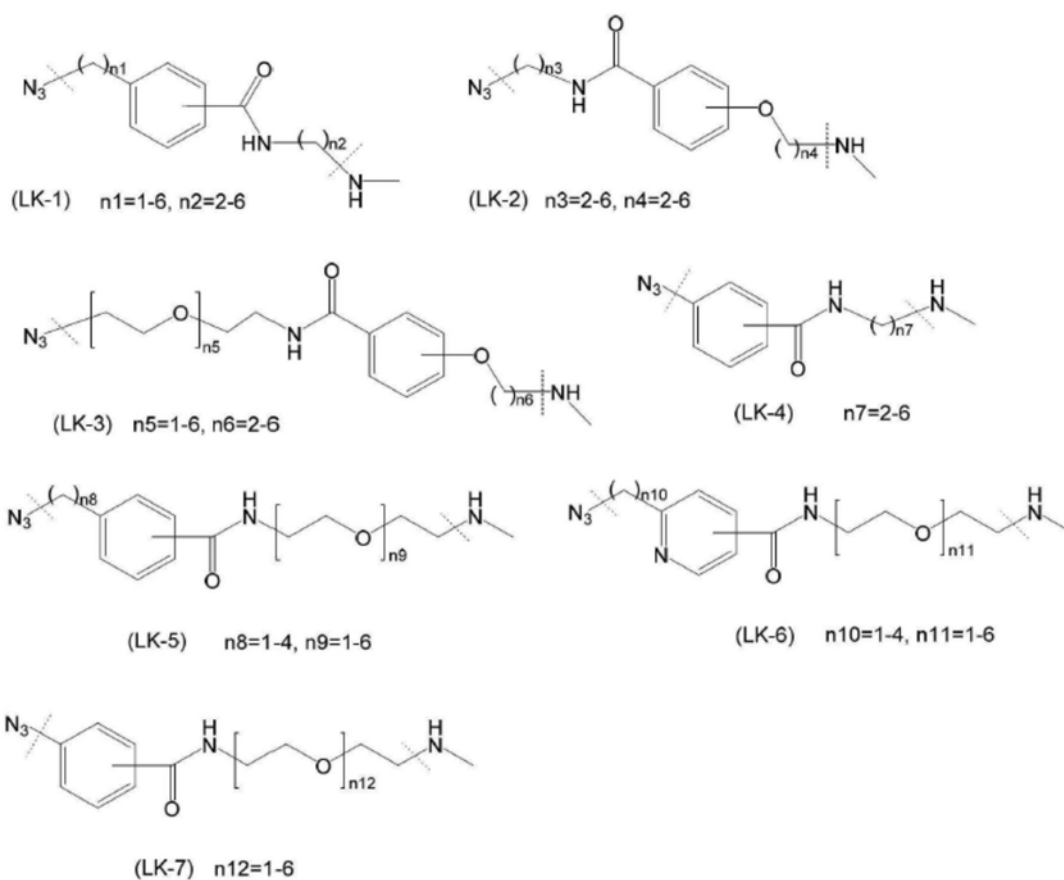
[0047] 下述式(II)所表示的海藻酸衍生物,其中,经由酰胺键和2价接头(-L<sup>2</sup>-)向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了叠氮基,

[0048] [化学式4]



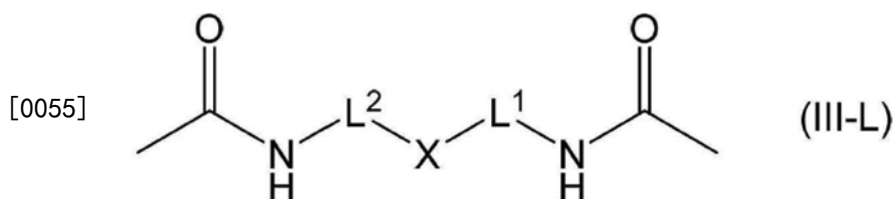
[0050] [式(II)中, (ALG)表示海藻酸;-NHC(=O)-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;-L<sup>2</sup>-表示选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头]:

[0051] [化学式5]



[0053] [4]上述[3]所述的移植用器件,其中,上述化学交联的海藻酸衍生物是第1海藻酸的任意羧基与第2海藻酸的任意羧基经由下述式(III-L)结合而成的交联海藻酸:

[0054] [化学式6]



[0056] [式(III-L)中,两端的-CONH-和-NHC(=O)-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺

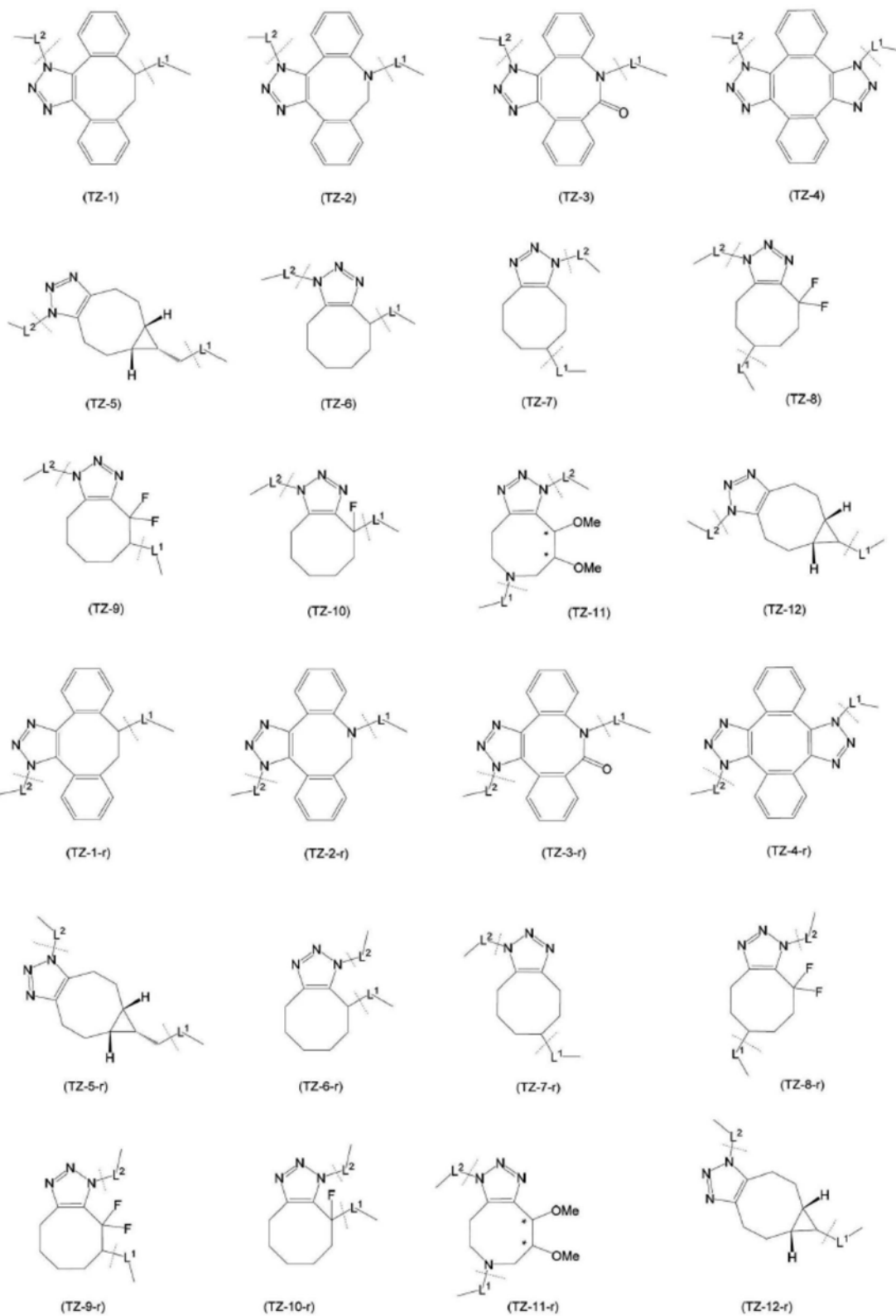
键；

[0057]  $-L^1$ -与上述方案[3]中的定义相同；

[0058]  $-L^2$ -与上述方案[3]中的定义相同；

[0059] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧),

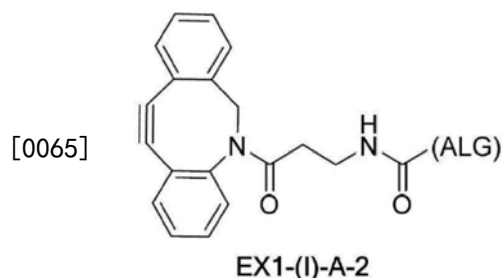
[0060] [化学式7]



[0062] 星号表示手性中心]。

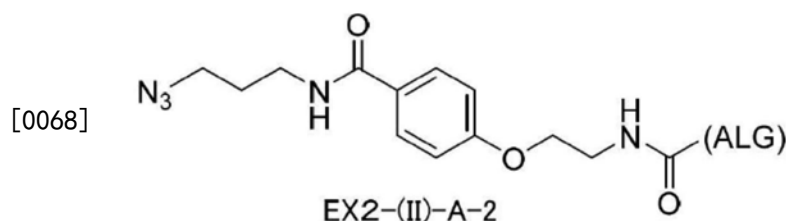
[0063] [5] 上述[3]或[4]所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-1-(I)-A-2):

[0064] [化学式8]



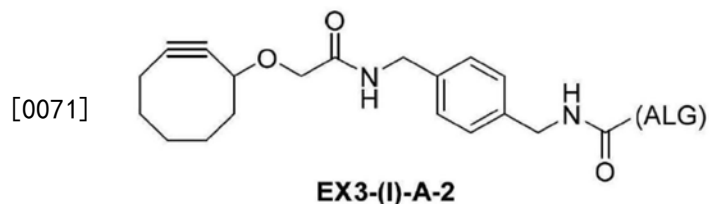
[0066] 式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-2-(II)-A-2):

[0067] [化学式9]



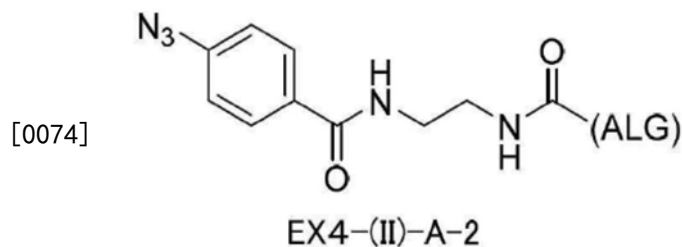
[0069] [6] 上述[3]或[4]所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-3-(I)-A-2):

[0070] [化学式10]



[0072] 式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-4-(II)-A-2):

[0073] [化学式11]



[0075] [7] 上述[1]~[6]中任一项所述的移植用器件,其中,上述胰岛为人胰岛或猪胰岛。

[0076] [8] 上述[7]所述的移植用器件,其中,上述胰岛为猪的成体胰岛。

[0077] [9] 上述[7]所述的移植用器件,其中,上述胰岛为胚胎期、新生儿期或围产期的猪胰岛。

[0078] [10] 上述[1]~[9]中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶进一步用半透

膜包覆。

[0079] [11]上述[10]所述的移植用器件,其中,上述半透膜是由纤维素衍生物形成的透析膜。

[0080] [12]上述[11]所述的移植用器件,其中,上述纤维素衍生物为乙酸纤维素。

[0081] [13]上述[1]~[12]中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的移植部位是皮下或腹腔内。

[0082] [14]上述[1]~[13]中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为0.5~5mm。

[0083] [15]上述[14]所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为1~3mm。

[0084] [16]上述上述[1]~[13]中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~3mm。

[0085] [17]上述[16]所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~1mm。

[0086] [18]上述[1]~[17]中任一项所述的移植用器件,其中,在制作上述包含胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶后用半透膜包覆。

[0087] [19]上述[1]~[17]中任一项所述的移植用器件,该移植用器件如下获得:在通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中悬浮胰岛素分泌细胞或胰岛,将该悬浮有胰岛素分泌细胞或胰岛的溶液封入半透膜中,之后使该半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,从而使半透膜中的海藻酸衍生物凝胶化而得到器件。

[0088] [20]上述[19]所述的移植用器件,其中,上述含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液。

[0089] [21]移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

[0090] 步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

[0091] 步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

[0092] 步骤(c):使含有2价金属离子的溶液与步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液接触,制作厚度为0.5~5mm的凝胶的步骤;

[0093] 步骤(d):作为任意选择的步骤,用半透膜包覆步骤(c)中得到的凝胶的步骤。

[0094] [22]移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

[0095] 步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

[0096] 步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

[0097] 步骤(c):将步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液封入半透膜中的步骤;

[0098] 步骤(d):使步骤(c)中得到的半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,以将半透膜中的海藻酸衍生物的溶液凝胶化的步骤。

[0099] [23]上述[21]或[22]所述的移植用器件的制造方法,其中,上述含有2价金属离子

的溶液为含有钙离子的溶液。

[0100] 发明效果

[0101] 根据本发明,提供新型移植用器件。优选移植用器件至少显示下述的一个以上的效果。

[0102] (1) 生物适应性或稳定性优异,细胞毒性也少,移植部位也几乎没有粘连或炎症。

[0103] (2) 凝胶的溶解少,长期维持形状。

[0104] (3) 可使降血糖作用长期持续而调节血糖。

[0105] (4) 长期使用后,半透膜中的海藻酸凝胶没有溶解,可维持形状,另外,可使胰岛存活、维持功能,可长期使用。

[0106] (5) 可交换,可免疫隔离,粘连、炎症等也少,成为安全性高的医疗材料。

[0107] 更优选的方案的移植用器件,其移植成效或功能性优异,关于原材料也是新型的,通过移植到糖尿病患者(特别是I型糖尿病和胰岛素耗竭型II型糖尿病)体内,可使降血糖作用长期持续而调节血糖。另外,在水凝胶内的胰岛素分泌细胞或胰岛的功能降低的情况下可回收。或者,可定期交换或追加移植。另外,作为封入移植用器件的水凝胶内的胰岛素分泌细胞或胰岛,也可使用由干细胞(iPS等)分化的胰岛素分泌细胞、或人胰岛。因此,更优选的方案的器件是有效的。

## 附图说明

[0108] [图1] 平板形海藻酸凝胶的照片。(a) 移植前、(b) 移植后。

[0109] [图2] 平板形海藻酸凝胶的照片。(a) 移植前、(b) 移植后。

[0110] [图3] 平板形海藻酸凝胶的照片。(a) 移植前、(b) 移植后。

[0111] [图4] 所制作的移植用器件的照片。

[0112] [图5-1] 是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至移植后第75天)。

[0113] [图5-2] 是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至移植后第305天)。

[0114] [图5-3] 是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至中继(relay)移植后第26天)。

[0115] [图6-1] 是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至移植后第75天)。

[0116] [图6-2] 是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至移植后第305天)。

[0117] [图6-3] 是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至中继移植后第26天)。

[0118] [图7-1] 是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至移植后第305天)。

[0119] [图7-2] 是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至中继移植后第26天)。

[0120] [图8-1] 是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至移植后第305天)。

[0121] [图8-2] 是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至中继移植后第26天)。

[0122] [图9-1]是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至移植后第305天)。

[0123] [图9-2]是显示移植有移植用器件的小鼠的血糖值变化的图(直至中继移植后第26天)。

[0124] [图10-1]是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至移植后第305天)。

[0125] [图10-2]是显示移植有移植用器件的小鼠的体重变化的图(直至中继移植后第26天)。

## 具体实施方式

[0126] [具体方案]

[0127] 这里,提供使用通过化学交联而凝胶化的海藻酸衍生物调制的、用于将细胞等移植到生物体内的器件,更具体而言,例如是包含包埋有胰岛素分泌细胞或胰岛等的化学交联海藻酸凝胶和根据需要包覆该凝胶的半透膜的移植用器件、其制造方法等。通过化学交联而凝胶化的海藻酸衍生物例如是经由酰胺键和2价接头向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基或叠氮基的式(I)或式(II)的海藻酸衍生物,通过使用式(I)和式(II)的海藻酸衍生物进行Huisgen反应(1,3-偶极环加成反应),得到新型的交联海藻酸。

[0128] 示例的方案可如以下的[1]~[23]所示。

[0129] [1]第1方案为移植用器件,其包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,上述水凝胶是通过化学交联使海藻酸衍生物凝胶化而得的。

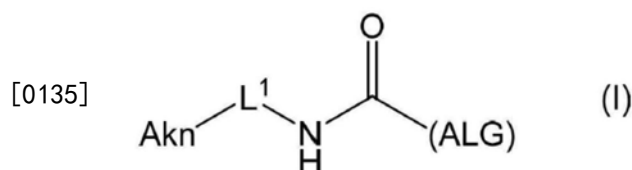
[0130] [2]第2方案为上述[1]所述的移植用器件,其中,上述水凝胶包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联作为交联。

[0131] [3]第3方案为上述[1]或[2]所述的移植用器件,其中,上述化学交联为基于以下的(A)和(B)所记载的海藻酸衍生物的组合的化学交联,

[0132] (A):

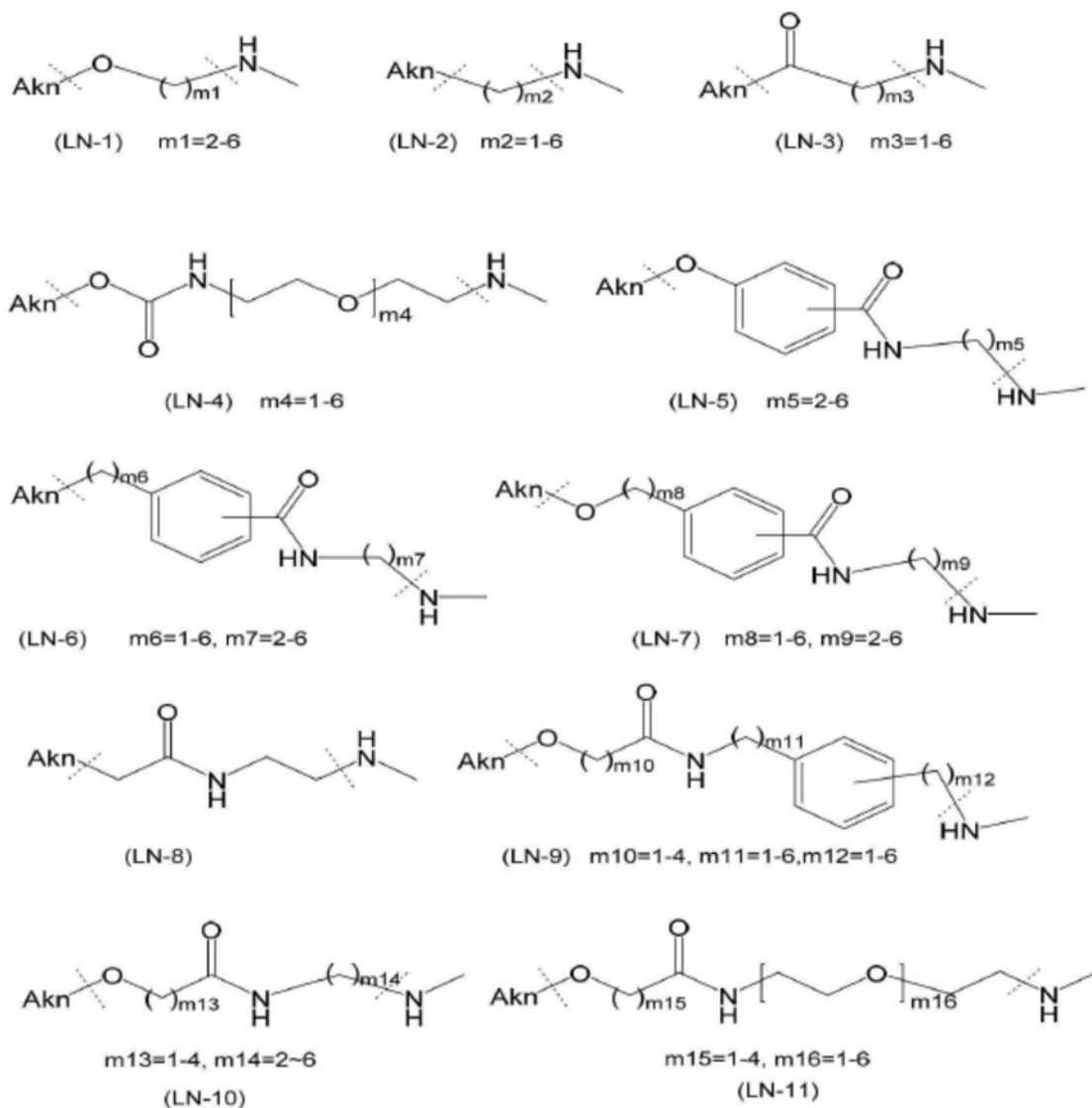
[0133] 下述式(I)所表示的海藻酸衍生物,其中,经由酰胺键和2价接头( $-L^1-$ )向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基(Akn):

[0134] [化学式12]



[0136] [式(I)中,(ALG)表示海藻酸; $-\text{NHCO}-$ 表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键; $-L^1-$ 表示选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头;

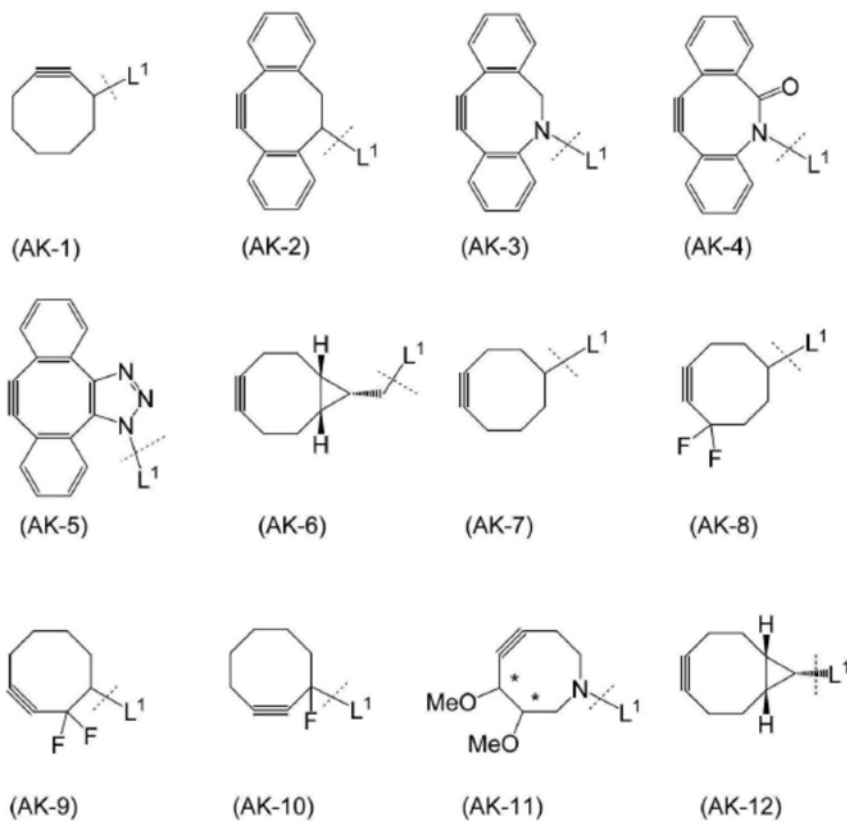
[0137] [化学式13]



[0139] Akn表示选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0140] [化学式14]

[0141]



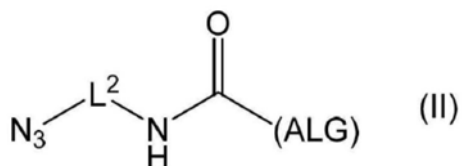
[0142] 星号表示手性中心]；

[0143] (B)：

[0144] 下述式(II)所表示的海藻酸衍生物，其中，经由酰胺键和2价接头(-L<sup>2</sup>-)向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了叠氮基：

[0145] [化学式15]

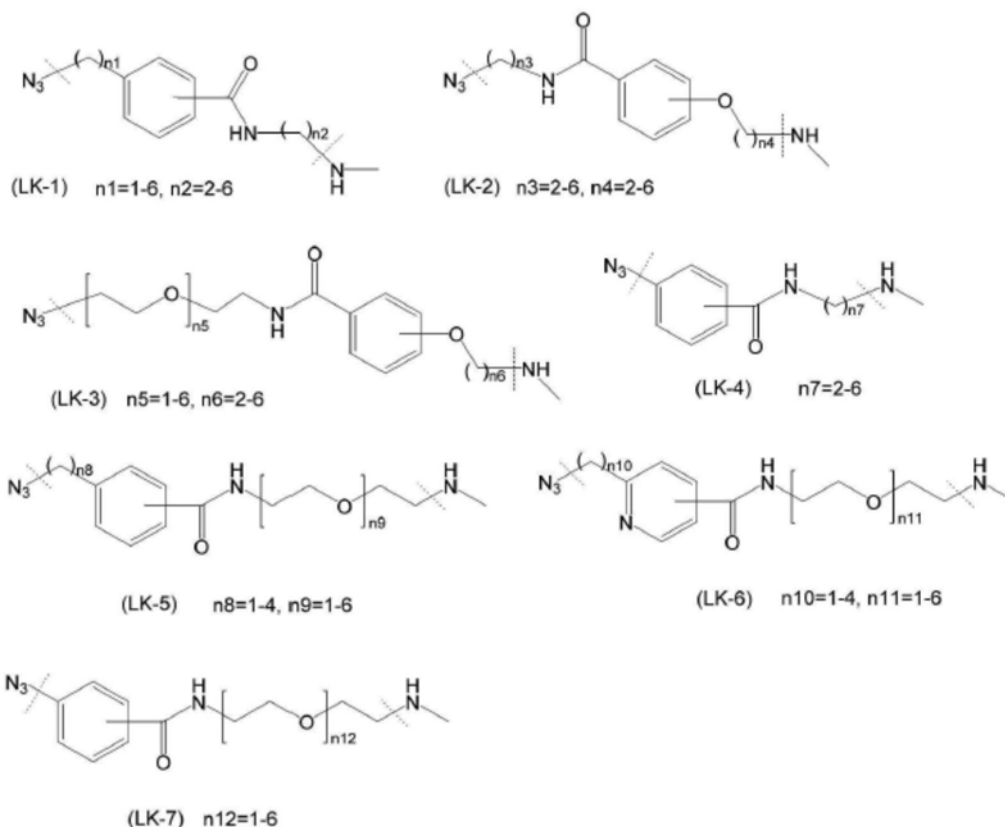
[0146]



[0147] [式(II)中，(ALG)表示海藻酸；-NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键；-L<sup>2</sup>-表示选自下述部分结构式[各式中，不包括两端的波浪线外侧]的2价接头]

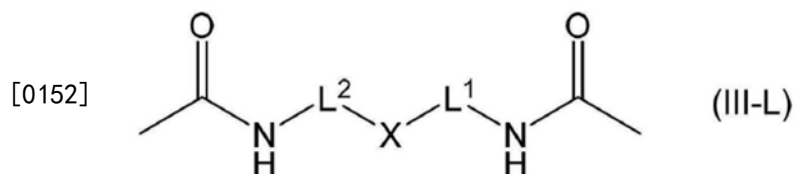
[0148] [化学式16]

[0149]



[0150] [4]第4方案为上述[3]所述的移植用器件,其中,上述化学交联的海藻酸衍生物是第1海藻酸的任意羧基与第2海藻酸的任意羧基经由下述式(III-L)结合而成的交联海藻酸,

[0151] [化学式17]



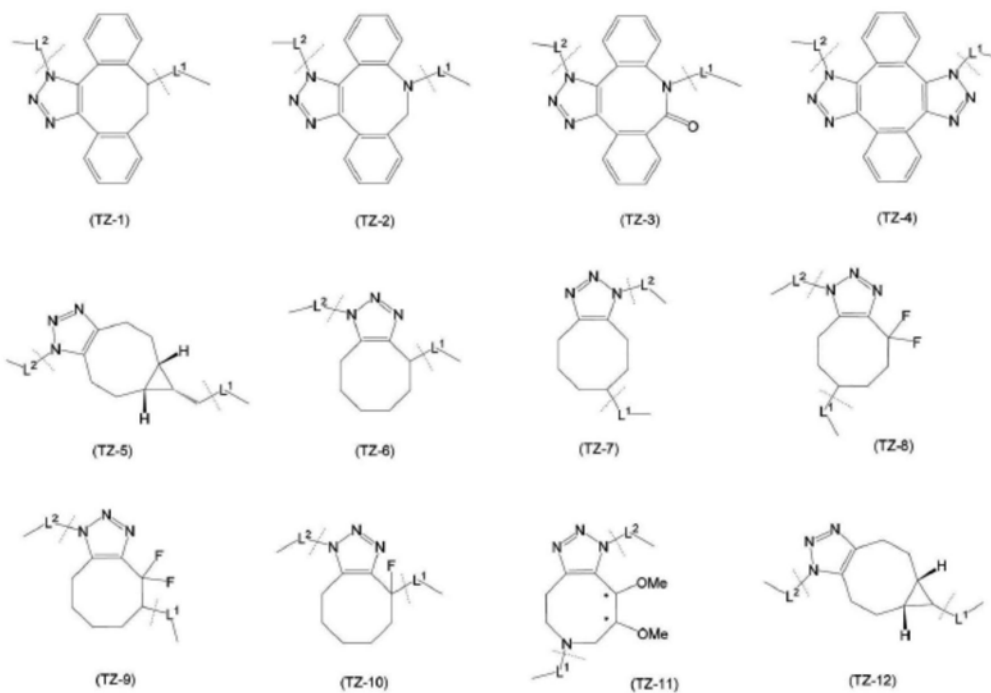
[0153] [式(III-L)中,两端的-CONH-和-NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;

[0154] -L<sup>1</sup>-与上述方案[3]中的定义相同;

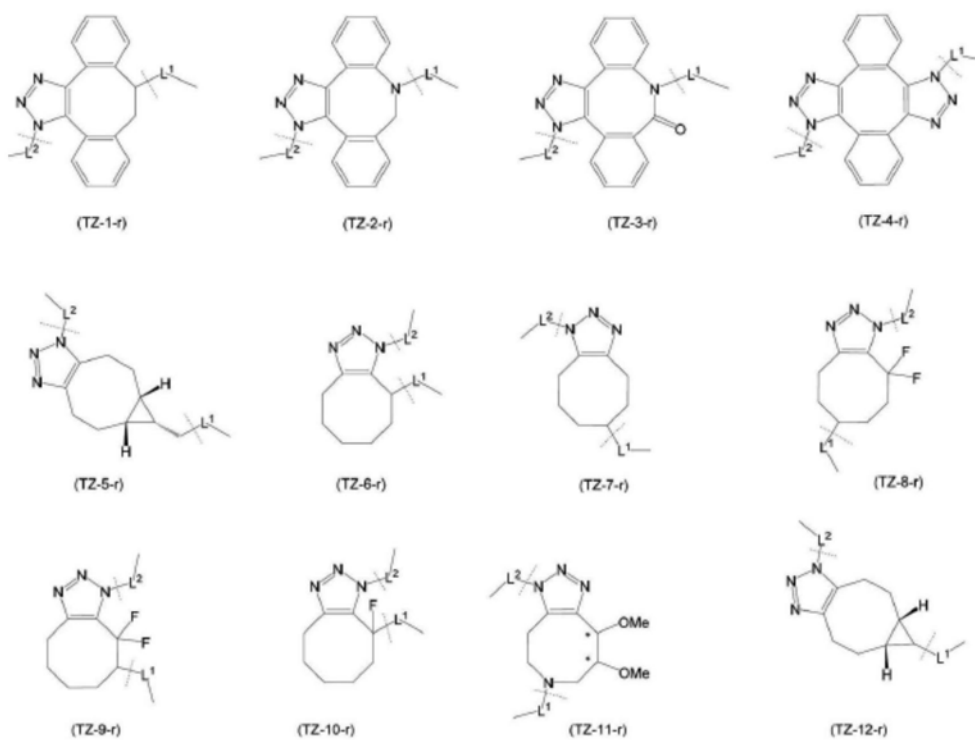
[0155] -L<sup>2</sup>-与上述方案[3]中的定义相同;

[0156] X是选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧),

[0157] [化学式18]



[0158]

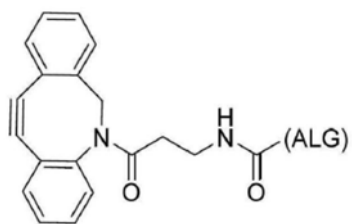


[0159] 星号表示手性中心]。

[0160] [5]第5方案为上述[3]或[4]所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-1-(I)-A-2):

[0161] [化学式19]

[0162]

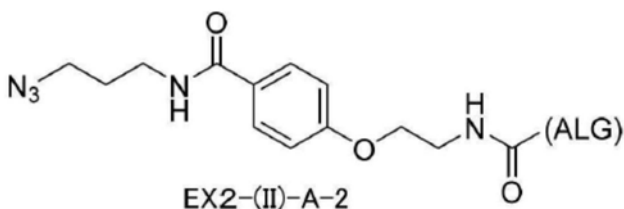


EX1-(I)-A-2

[0163] 式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-2-(II)-A-2):

[0164] [化学式20]

[0165]

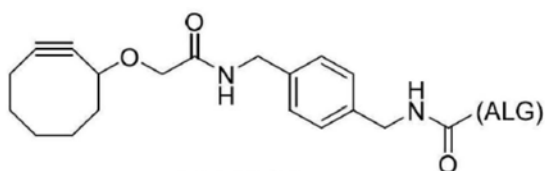


EX2-(II)-A-2

[0166] [6]第6方案为上述[3]或[4]所述的移植用器件,其中,式(I)的海藻酸衍生物为下述式(EX-3-(I)-A-2):

[0167] [化学式21]

[0168]

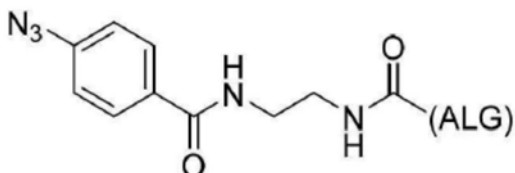


EX3-(I)-A-2

[0169] 式(II)的海藻酸衍生物为下述式(EX-4-(II)-A-2):

[0170] [化学式22]

[0171]



EX4-(II)-A-2

[0172] [7]第7方案为上述[1]~[6]中任一项所述的移植用器件,其中,上述胰岛为人胰岛或猪胰岛。

[0173] [8]第8方案为上述[7]所述的移植用器件,其中,上述胰岛为猪的成体胰岛。

[0174] [9]第9方案为上述[7]所述的移植用器件,其中,上述胰岛为胚胎期、新生儿期或围产期的猪胰岛。

[0175] [10]第10方案为上述[1]~[9]中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶进一步用半透膜包覆。

[0176] [11]第11方案为上述[10]所述的移植用器件,其中,上述半透膜是由纤维素衍生物形成的透析膜。

[0177] [12]第12方案为上述[11]所述的移植用器件,其中,上述纤维素衍生物为乙酸纤维素。

[0178] [13]第13方案为上述[1]~[12]中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的移植部位为皮下或腹腔内。

[0179] [14]第14方案为上述[1]~[13]中任一项所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为0.5~5mm。

[0180] [15]第15方案为上述[14]所述的移植用器件,其中,上述移植用器件的厚度为1~3mm。

[0181] [16]第16方案为上述[1]~[13]中任一项所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~3mm。

[0182] [17]第17方案为上述[16]所述的移植用器件,其中,上述水凝胶的厚度为0.5~1mm。

[0183] [18]第18方案为上述[1]~[17]中任一项所述的移植用器件,其中,制作上述包含胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶后用半透膜包覆。

[0184] [19]第19方案为上述[1]~[17]中任一项所述的移植用器件,该移植用器件如下获得:在通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中悬浮胰岛素分泌细胞或胰岛,将该悬浮有胰岛素分泌细胞或胰岛的溶液封入半透膜中,之后使该半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,从而将半透膜中的海藻酸衍生物进行凝胶化而得到器件。

[0185] [20]第20方案为上述[19]所述的移植用器件,其中,上述含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液。

[0186] [21]第21方案为移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

[0187] 步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

[0188] 步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

[0189] 步骤(c):使含有2价金属离子的溶液与步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液接触,制作厚度为0.5~5mm的凝胶的步骤;

[0190] 步骤(d):作为任意选择的步骤,用半透膜包覆步骤(c)中得到的凝胶的步骤。

[0191] [22]第22方案为移植用器件的制造方法,该移植用器件包含封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶,该制造方法包括以下的步骤(a)~(d):

[0192] 步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤;

[0193] 步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤;

[0194] 步骤(c):将步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液封入半透膜中的步骤;

[0195] 步骤(d):使步骤(c)中得到的半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,以将半透膜中的海藻酸衍生物的溶液凝胶化的步骤。

[0196] [23]第23方案为上述[21]或[22]所述的移植用器件的制造方法,其中,上述含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液。

[0197] 以下,对具体方案进行更详细的说明。

[0198] “移植用器件”是指使用了封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶的器件。该水凝胶是通过化学交联使海藻酸衍生物凝胶化而得的。因此,作为海藻酸衍生物,使用可通过化学交联进行凝胶化的海藻酸衍生物。封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶的形状例如为平板形。在移植用器件中,水凝胶可进一步用半透膜包覆,这种情况下形成封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶被插入半透膜中的状态。

[0199] 移植用器件中使用的“胰岛素分泌细胞”是指构成胰岛的细胞中的分泌胰岛素的 $\beta$ 细胞。

[0200] “胰岛”的别名也称为郎格罕氏岛,是由平均约2000个胰岛细胞构成的细胞团。胰岛由分泌胰高血糖素的 $\alpha$ 细胞、分泌胰岛素的 $\beta$ 细胞、分泌生长抑素的 $\delta$ 细胞、分泌生长素释放肽的 $\epsilon$ 细胞、以及分泌胰多肽的PP (pancreatic polypeptide; 胰多肽) 细胞这5种细胞构成。

[0201] “胰岛素分泌细胞或胰岛”也表述为具有生物学活性的产物的分泌功能的细胞或组织。

[0202] 在本说明书中,“胰岛细胞”只要是包含上述5种细胞中的至少1种细胞的细胞即可,优选至少包含 $\beta$ 细胞。在若干方案中,作为胰岛细胞,可以是包含所有的 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 细胞、 $\delta$ 细胞、 $\epsilon$ 细胞和PP细胞的混合物,也可以是胰岛中所含的状态的细胞。

[0203] 另外,“胰岛细胞”可以通过分化而成为胰岛细胞的细胞。这种情况下,“胰岛细胞”中例如还可包括使iPS细胞、ES细胞和成体干细胞(例如,间充质干细胞)分化而得的胰岛细胞。

[0204] 作为胰岛素分泌细胞或胰岛(包括胰岛细胞),优选在移植到患者体内时具有可使患者的疾病状态康复的程度的存活性和功能。作为胰岛素分泌细胞、胰岛或胰岛细胞的功能,例如可列举:分泌胰岛素,优选即使在移植后也维持葡萄糖响应性。

[0205] 若干方案的“移植用器件”也称为生物人工胰岛,是生物人工脏器的一例。该生物人工胰岛所具备的细胞中例如包括胰岛素分泌细胞。胰岛素分泌细胞可以由人或猪等采集的胰岛中所含的细胞、或者由干细胞(例如,ES细胞、iPS细胞和成体干细胞(例如,间充质干细胞))分化而成的胰岛的任一种。

[0206] 在本发明的移植用器件中,有时会使用除胰岛素分泌细胞、胰岛和胰岛细胞以外的细胞。

[0207] 除胰岛素分泌细胞、胰岛和胰岛细胞以外的细胞只要是可用于细胞移植的细胞即可,可使用任意的细胞,对其种类没有特别限定。另外,使用的细胞可以是1种,也可将多种细胞组合使用。作为使用的细胞,可优选列举动物细胞,更优选列举来自脊椎动物的细胞,特别优选列举来自人的细胞。来自脊椎动物的细胞(特别是来自人的细胞)的种类可以是干细胞(例如,万能细胞或成体干细胞)、前体细胞或成熟细胞的任一种。作为万能细胞,例如可使用:胚胎干(ES)细胞、生殖干(GS)细胞、或人工多能性干(iPS)细胞。作为成体干细胞,例如可使用:间充质干细胞(MSC)、造血干细胞、羊膜细胞、脐带血细胞、来自骨髓的细胞、心肌干细胞、来自脂肪的干细胞、或神经干细胞。

[0208] 作为前体细胞和成熟细胞,例如可使用:来自皮肤、真皮、表皮、肌肉、心肌、神经、骨、软骨、内皮、脑、上皮、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、口腔内、角膜、骨髓、脐带血、羊膜或毛的细胞。作为来自人的细胞,例如可使用:ES细胞、iPS细胞、MSC、软骨细胞、成骨细胞、成骨前体

细胞、间充质细胞、成肌细胞、心肌细胞、成心肌细胞、神经细胞、肝细胞、成纤维细胞、角膜内皮细胞、血管内皮细胞、角膜上皮细胞、羊膜细胞、脐带血细胞、来自骨髓的细胞、或造血干细胞。另外,细胞的来源可以是自体细胞或异体细胞的任一种。在若干方案中,即使在上述中,例如也可使用ES细胞、iPS细胞、间充质干细胞(MSC)。

[0209] “胰岛素分泌细胞或胰岛(包括胰岛细胞)”的供体可列举:人或猪等。在若干方案中,从解决供体不足的观点来看,“胰岛素分泌细胞、胰岛或胰岛细胞”的供体为猪。作为“胰岛素分泌细胞或胰岛(包括胰岛细胞)”,可以是胰岛、或者由ES细胞或iPS细胞分化的胰岛的任一者。

[0210] 在“胰岛素分泌细胞或胰岛(包括胰岛细胞)”来自猪的情况下,可列举:成体的猪胰岛、或者胚胎期、新生儿期或围产期的猪胰岛。该胰岛可在适当培养后使用。

[0211] 作为移植用器件的移植方法,可采用切开和留置、注射、内窥镜、腹腔镜等方法。

[0212] 对移植部位没有特别限定,可列举:皮下、腹腔内、肝脏内、肌肉内、大网膜内、肾被膜下等,优选移植到皮下或腹腔内。

[0213] 这里,“半透膜(semipermeable membrane)”是指仅使一定大小以下的分子或离子透过的膜。在不透过半透膜的溶质和显示透过性的溶剂的体系中具有以下性质:若经由半透膜接触2种浓度的溶液,则隔开而产生渗透压,仅溶剂透过。本说明书中记载的移植用器件可包含半透膜,或者半透膜并非必须、即也可不包含半透膜。若干方案的移植用器件为(例如,封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的)水凝胶单体、即该水凝胶未经半透膜包覆。水凝胶未经半透膜包覆的移植用器件优选为生物适应性或稳定性优异、细胞毒性也少、移植部位也几乎没有粘连或炎症、且凝胶的溶解少而长期维持形状、更优选为可使降血糖作用长期持续而调节血糖的器件。其他若干方案的移植用器件,其水凝胶用半透膜包覆。作为半透膜,例如可列举:用于透析的膜或管等,还可使用透析管、棉纤维素透析膜、再生纤维素透析膜、纤维素酯透析膜等,作为商品名,可列举:Cellu-Sep T管状膜(Membrane Filtration Products公司)、Spectra Biotech膜(SPECTRUM公司)、Spectra/Por CE透析管(SPECTRUM公司)等。

[0214] 作为“半透膜”,优选为由纤维素酯制作的半透膜。

[0215] 作为具体例子,可列举:作为透析膜的Spectra/Por CE透析管(SPECTRUM公司)。该纤维素酯更优选为乙酸纤维素的高分子。

[0216] 这里使用的半透膜含有树脂。半透膜例如可通过将至少一种以上的树脂溶解于溶剂、并使溶解的树脂凝固来制作。对这样的树脂没有特别限定。作为这样的树脂,例如可使用:乙烯-乙烯基醇系共聚物、聚砜系聚合物、聚丙烯腈系聚合物、乙酸纤维素等纤维素系聚合物、聚酰胺系聚合物、聚碳酸酯系聚合物等树脂。更优选为乙酸纤维素等纤维素系聚合物。

[0217] 这里使用的半透膜具有“截留分子量(截断分子量)”。“截留分子量”是指实质上未被阻断的最大分子量的大小。具有超过该截留分子量的分子量的分子实质上不被阻止出入该半透膜。作为这里使用的半透膜的“截留分子量”,优选为100kDa(千道尔顿)。例如,如果是作为纤维素酯透析膜的Spectra/Por CE透析管(SPECTRUM公司),则以该截留值作为“MWC0”,以100~500Da(道尔顿)、0.5~1kDa、3.5~5kDa、8~10kDa、20kDa、50kDa、100kDa、300kDa、1000kDa等标准进行出售。例如,在该截留值具有大于约500000道尔顿的截留分子

量的情况下,IgG或补体这样的分子可进入这些半透膜中,而免疫细胞这样的宿主细胞被阻止进入该半透膜,胰岛素或细胞的营养素或氧可通过该半透膜。单位道尔顿符号为Da,1000Da是指1kDa。

[0218] 这里,移植用器件的厚度的定义如下所述。在若干方案中,移植用器件的厚度优选为0.5~5mm、更优选为1~3mm。在封入有胰岛素分泌细胞或胰岛的水凝胶用半透膜包覆的情况下,移植用器件的厚度以半透膜的厚度计优选为0.5~5mm、更优选为1~3mm。

[0219] 另外,水凝胶的厚度的定义也如下所述。在若干方案中,水凝胶的厚度为0.5~5mm、优选为0.5~3mm、更优选为0.5~1mm。

[0220] 在移植用器件包含半透膜的情况下,半透膜中的水凝胶的厚度优选为1~3mm、更优选为1.5mm~2mm。

[0221] 在移植用器件不包含半透膜的情况下,水凝胶的厚度为0.5~5mm、优选为0.5~3mm、更优选为0.5~1mm。

[0222] 移植用器件的形状只要是平板状即可,没有特别限定。平板是指平坦的板,表示厚度大致一定且具有较大面积的板状。作为该板的形状,例如可列举:三角形、四边形、五边形这样的多边形或圆形等平坦的板状。另外,优选该移植用器件为上述厚度、并且板状整体为大致一定的厚度。在板状移植器件中,厚度偏差优选为±10%以内、更优选为±5%以内。移植用器件的厚度是指移植用器件的最厚部分的厚度。例如,在将水凝胶封入作为半透膜的透析管中时,通过将透析管的两端密封,有时移植用器件的形状看起来像橄榄球状这样的两端稍薄、中央比两端厚的形状。在形成这样的形状的情况下,移植用器件的厚度是指作为其最厚部分的中央附近的厚度。

[0223] 另外,水凝胶的形状只要是平板状即可,也没有特别限定。平板是指平坦的板,表示厚度大致一定且具有较大面积的板状。作为该板的形状,例如可列举:三角形、四边形、五边形这样的多边形或圆形等平坦的板状。另外,优选水凝胶为上述的厚度、并且板状整体为大致一定的厚度。在水凝胶中,厚度偏差优选为±10%以内、更优选为±5%以内。水凝胶的厚度是指水凝胶的最厚部分的厚度。在若干方案中,平板状水凝胶例如是短径为12~15mm、长径为12~18mm、厚度为0.5~5mm左右的大小的交联海藻酸的凝胶,也可形成圆形、四边形、六边形、八边形等形状。若用面积表述平板状水凝胶,则例如还可表述为144~270mm<sup>2</sup>。

[0224] 本说明书中,“IEQ”是胰岛当量(Islet Equivalents)的简写,是表示胰岛的量的国际单位,将胰岛视为球形,将直径150μm的胰岛定义为1IEQ。

[0225] 根据日本胰腺/胰岛移植研究会的新鲜胰岛移植基准(胰岛移植实施指南),移植新鲜胰岛时的条件之一为“胰岛量5000IEQ/kg(患者体重)以上”,这里也以此为参考。移植用器件可适当设定为以产生所期望的治疗效果的方式估算的胰岛数,可根据患者的体重、症状的程度等适当设定为适宜的器件。

[0226] 关于胰岛素分泌细胞的量,也可根据胰岛适当设定。

[0227] 对移植用器件的制造方法进行更详细地说明。

[0228] 在移植用器件的制造方法中,“步骤(a):作为任意选择的步骤,从生物体摘出胰腺,并分离胰岛的步骤”是指步骤(a)可任意选择。“生物体”例如是人或非人哺乳动物,作为非人哺乳动物,例如可列举:猪。在进行步骤(a)的情况下,例如说到猪胰岛的分离,可根据该技术的已知顺序、或者霜田等人(Shimoda;Cell Transplantation,第21卷,第501-508

页,2012年)所记载的方法、或者采用了埃德蒙顿方案的标准的Ricordi技术等,在无菌下由成体猪获得无菌的可存活的胰腺,分离胰岛细胞。其他的非人哺乳动物的胰岛或者人的胰岛的分离也可依据猪胰岛的分离来进行。之后,可直接使用所分离的胰岛,或者培养后使用。关于胰岛的培养,例如可根据野口(Noguchi)等人(Transplantation Proceedings,42,2084-2086(2010))的方法,在培养基中(Connaught Medical Research Laboratory (CMRL)-based Miami-defined media#1 (MM1;Mediatech-Cellgro,Herndon,VA)-补充0.5%人血清白蛋白.)、在5%CO<sub>2</sub>/95%空气的湿润气氛中,于37℃下培养1天。

[0229] 然后,在“步骤(b):在可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液中混合选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织的步骤”中,作为可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物,例如可列举:上述的式(I)和式(II)所表示的海藻酸衍生物。在步骤(b)中,例如制作上述海藻酸衍生物的0.1~5重量%的水溶液或生理盐水溶液,在该溶液中悬浮适当且必需量的选自胰岛素分泌细胞、胰岛、培养而得的胰岛细胞、以及由干细胞分化而得的胰岛细胞的细胞或组织(例如,步骤(a)中得到的胰岛、由该胰岛分离的胰岛素分泌细胞、或者培养由该胰岛分离的胰岛细胞而得的胰岛细胞)。

[0230] 这里,“可通过化学交联进行水凝胶化的海藻酸衍生物的溶液”例如是上述式(I)所表示的海藻酸衍生物的溶液和上述式(II)所表示的海藻酸衍生物的溶液这2种溶液。这种情况下,在步骤(b)中这2种溶液、以及在其中混合细胞或组织而得的溶液并没有混合而是分别制作。此时,细胞或组织可仅混合在2种溶液的一种中,或者混合在两种中。

[0231] 然后,在“步骤(c):使含有2价金属离子的溶液与步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液接触,制作厚度为0.5~5mm的凝胶的步骤”中,使悬浮有细胞或组织(例如,胰岛)的、步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液凝胶化。此时,首先,可将式(I)的海藻酸衍生物的溶液和式(II)所表示的海藻酸衍生物的溶液根据各自的化学交联基的引入率适当混合各自的用量。接下来,通过使含有2价金属离子的溶液与其混合溶液接触,在进行离子交联的同时也进行化学交联,可制作凝胶。更具体而言,凝胶可按照与后述的实施例5中记载的[平板形海藻酸凝胶的制造]<常规调制方法>同样的方式进行制作。

[0232] 然后,“步骤(d):作为任意选择的步骤,用半透膜包覆步骤(c)中得到的凝胶的步骤”是指步骤(d)可任意选择。在进行步骤(d)的情况下,按照该领域中已知的方法或基于此的方法,用半透膜包覆步骤(c)中得到的凝胶。例如,通过将凝胶插入半透膜(例如,一端密封的半透膜的管)中、并密封另一端来进行包覆。

[0233] 或者,“步骤(c):将步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液封入半透膜中的步骤”是按照该领域中已知的方法或基于此的方法,用半透膜包覆悬浮有细胞或组织(例如,胰岛)的、步骤(b)中得到的海藻酸衍生物的溶液。此时,首先,可将式(I)的海藻酸衍生物的溶液和式(II)所表示的海藻酸衍生物的溶液根据各自的化学交联基的引入率适当混合各自的用量。接下来,通过将该悬浮有细胞或组织(例如,胰岛)的混合溶液插入半透膜(例如,一端密封的半透膜的管)中、并密封另一端来进行包覆。

[0234] 然后,在“步骤(d):使步骤(c)中得到的半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,将半透膜中的海藻酸溶液凝胶化的步骤”中,使步骤(c)中得到的封入有海藻酸溶液的半透膜与含有2价金属离子的溶液接触,以将半透膜中的海藻酸溶液凝胶化。

[0235] 通过步骤(d)得到的器件可用生理盐水等溶剂进行洗涤。另外,可在培养基中培养规定期间。

[0236] 用于移植用器件的含有“2价金属离子”的溶液可列举:含有钙离子、钡离子、锶离子等的溶液。优选为含有钙离子或钡离子的溶液,更优选为含有钙离子的溶液。

[0237] 含有2价金属离子的溶液例如可通过将2价金属离子的盐溶解于溶剂而获得。作为2价金属离子的盐,可列举:氯化钙、氯化钡、氯化锶等。作为溶剂,例如可列举:水和生理盐水。

[0238] 在若干方案中,含有2价金属离子的溶液为含有钙离子的溶液,优选为含有氯化钙的水溶液。

[0239] 含有2价金属离子的溶液的使用量希望根据海藻酸衍生物的使用量或分子量等适当调节。

[0240] 在移植用器件具有半透膜的情况下,器件中的水凝胶可通过将海藻酸衍生物的溶液封入半透膜中,之后与2价金属离子溶液接触来制作,也可在封入半透膜中之前使其凝胶化,之后再封入半透膜中。

[0241] 这里,“接触”可列举:将封入有海藻酸衍生物的溶液的半透膜浸在2价金属离子溶液中;以及将2价金属离子溶液加载于封入有海藻酸衍生物的溶液的半透膜中等。

[0242] 用于移植用器件的水凝胶是指不溶于水的具有三维网眼结构的高分子及其水的溶胀体。这里,有时将水凝胶仅称为凝胶。

[0243] 通过变更在调制水凝胶时使用的高分子的浓度,可大幅地自由变更可通过该凝胶的网眼结构的分子的分子量。即,认为凝胶的网眼结构在高分子的浓度浓的情况下网眼小、而在高分子的浓度稀的情况下网眼变大。若网眼结构的网眼过大,则抗体等侵入网眼结构内。这种情况下,容易对凝胶内的胰岛素分泌细胞或胰岛发生排斥反应。排斥反应会阻碍胰岛素等必要物质的产生。

[0244] 通常,水凝胶的材料由如下所述的高分子构成。例如可列举:胶原蛋白、透明质酸、明胶、纤连蛋白、弹性蛋白、生腱蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、多肽、硫酸乙酰肝素、软骨素、硫酸软骨素、角质素、硫酸角质素、硫酸皮肤素、角叉菜胶、肝素、甲壳素、壳聚糖、海藻酸盐、海藻酸衍生物、琼脂糖、琼脂、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糖原和它们的衍生物、以及血纤蛋白、血纤蛋白原、凝血酶、和聚谷氨酸、聚乳酸、聚羟基乙酸、乳酸-羟基乙酸共聚物、乙烯基醇系聚合物、结冷胶、黄原胶、半乳甘露聚糖、瓜尔豆胶、刺槐豆胶和刺云实胶(塔拉胶)等。

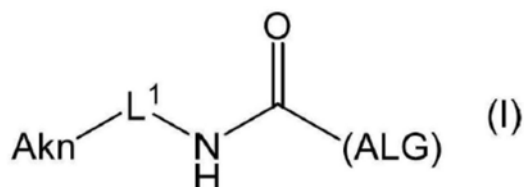
[0245] 这里,作为水凝胶的材料,从生物适应性、胰岛的长期存活/功能维持等方面考虑,优选海藻酸衍生物。

[0246] 以下,对可用于移植用器件的海藻酸衍生物进行详细地说明。该海藻酸衍生物可包括以下的方案[1]~[17]的海藻酸衍生物。

[0247] [1]海藻酸衍生物的第1方案如下。下述式(I)所表示的海藻酸衍生物,其中,经由酰胺键和2价接头( $-L^1-$ )向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了环状炔基(Akn):

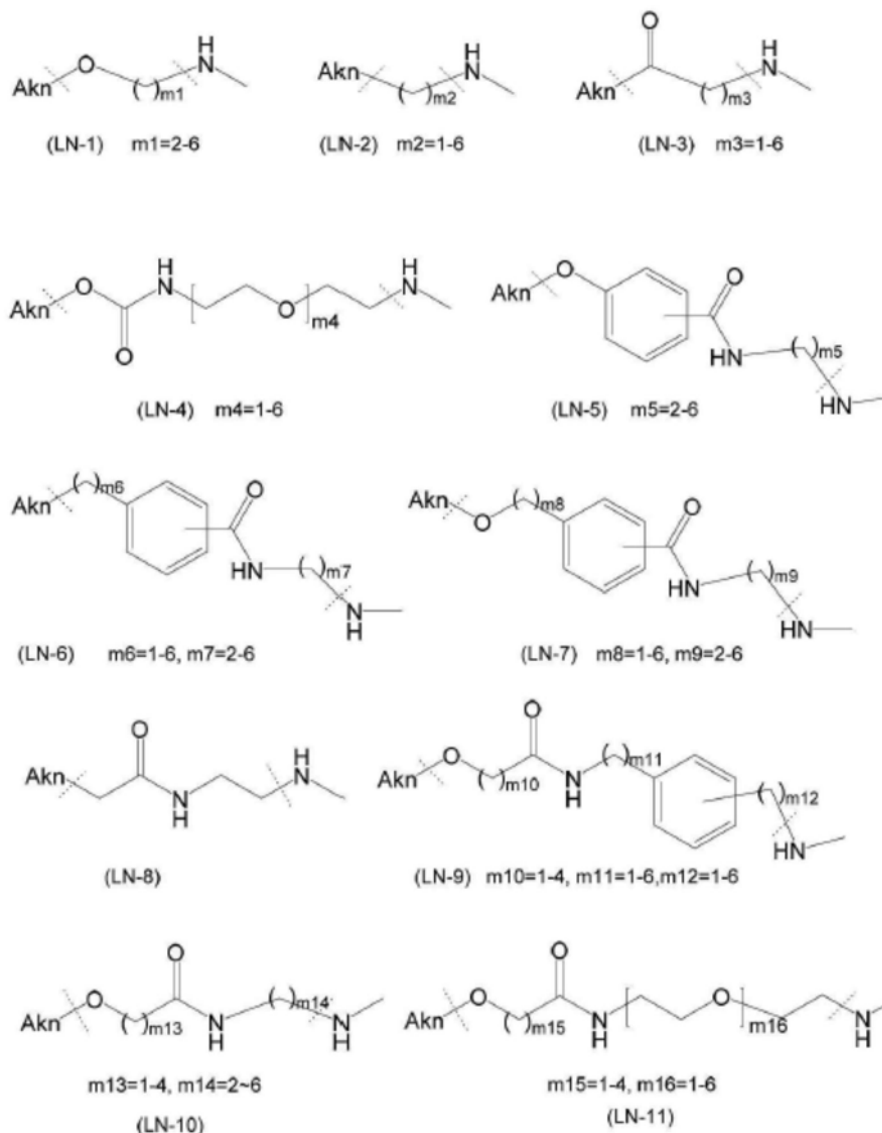
[0248] [化学式23]

[0249]



[0250] [式(I)中, (ALG)表示海藻酸; -NHC(=O)-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键; -L<sup>1</sup>-表示选自下述部分结构式[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0251] [化学式24]

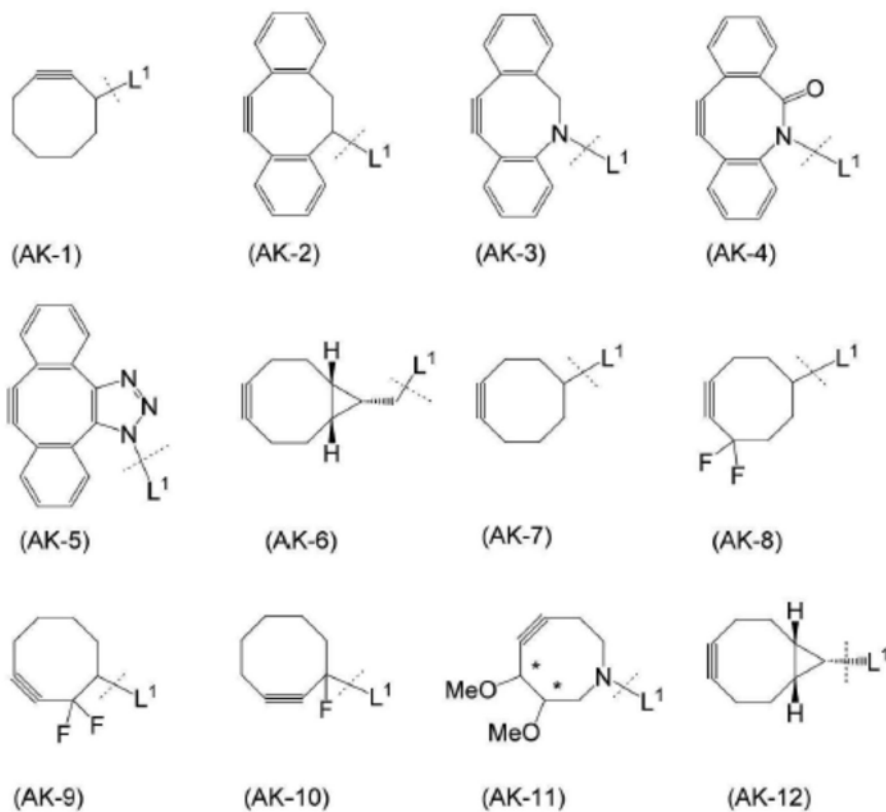


[0252]

[0253] Akn表示选自下述部分结构式[各式中, 不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0254] [化学式25]

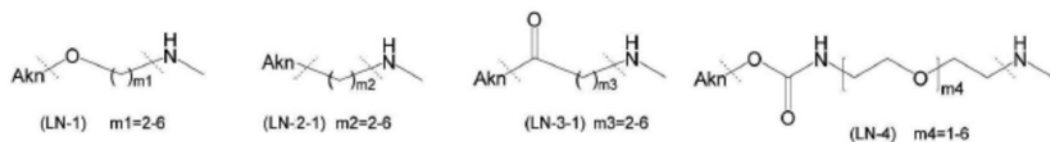
[0255]



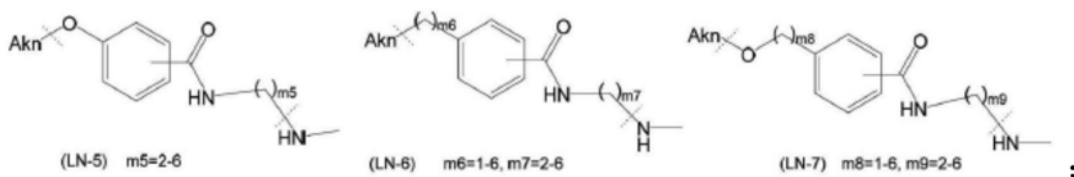
[0256] 星号表示手性中心]。

[0257] [1-1]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,  $-L^1$ - 优选为选自下述部分结构式[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0258] [化学式26]

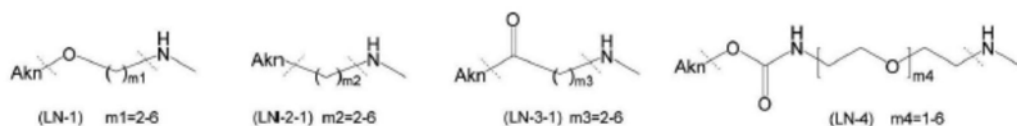


[0259]

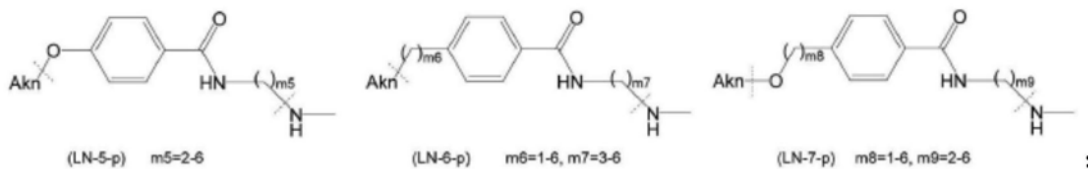


[0260] 更优选为选自下述部分结构式[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0261] [化学式27]

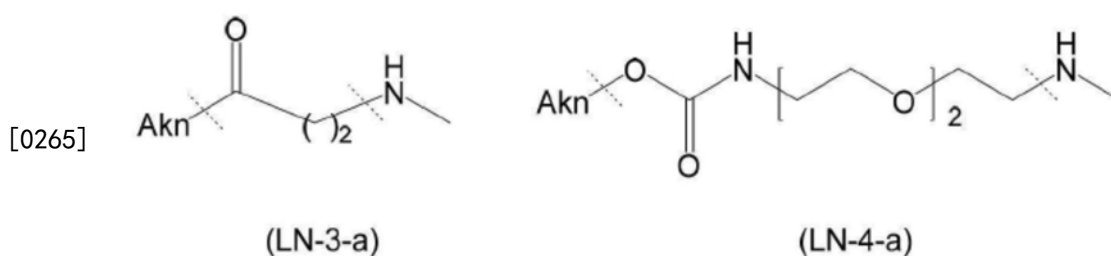


[0262]



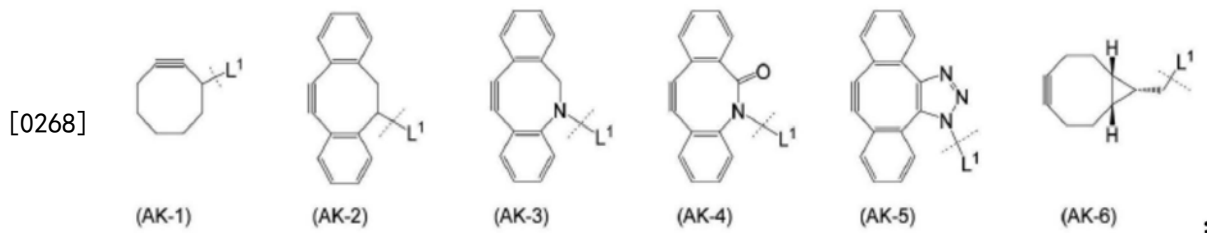
[0263] 进一步优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0264] [化学式28]



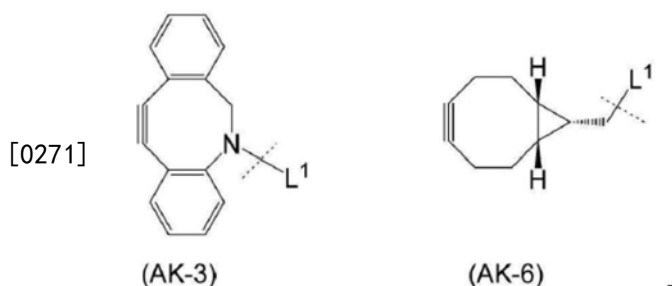
[0266] [1-2]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0267] [化学式29]



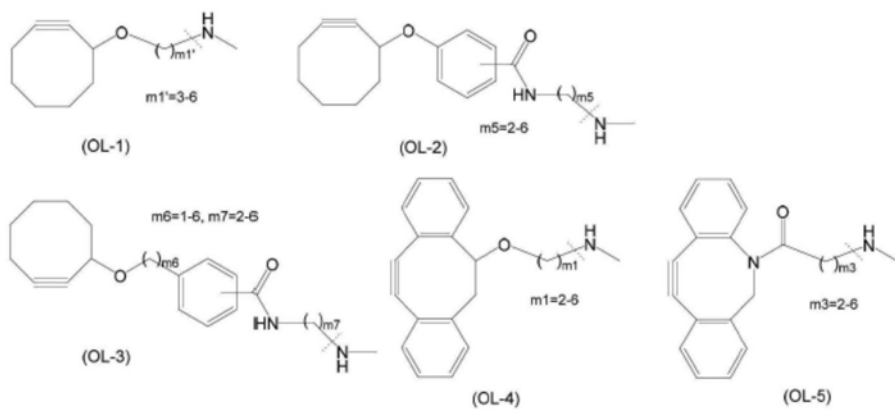
[0269] 更优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0270] [化学式30]

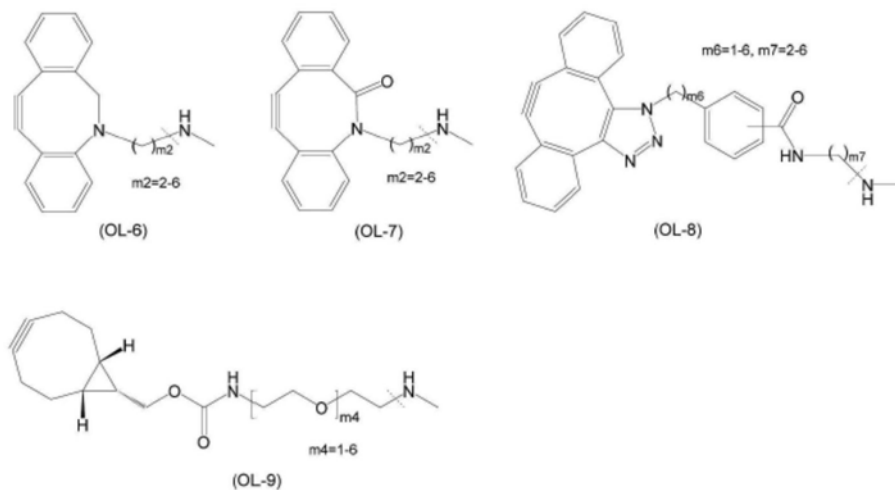


[0272] [1-3]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn和-L<sup>1</sup>-的组合优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

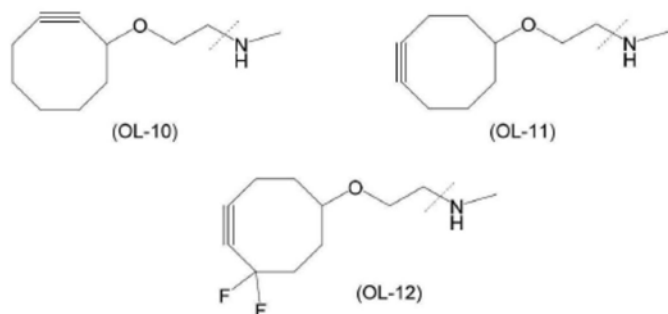
[0273] [化学式31]



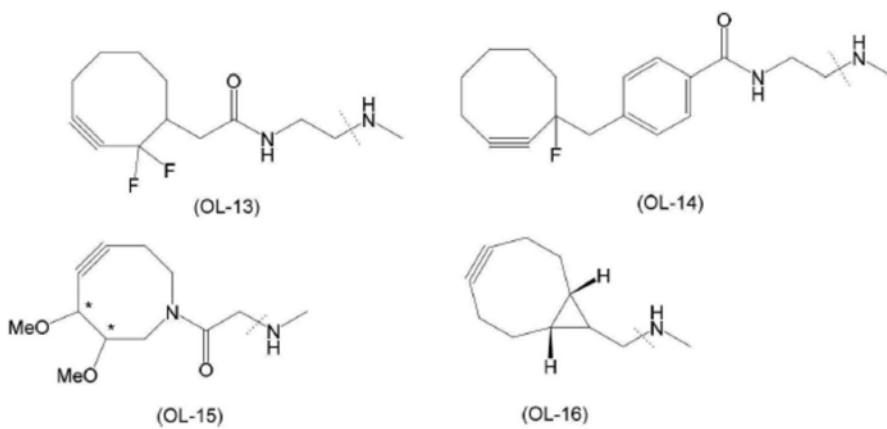
[0274]



[0275] [化学式32]



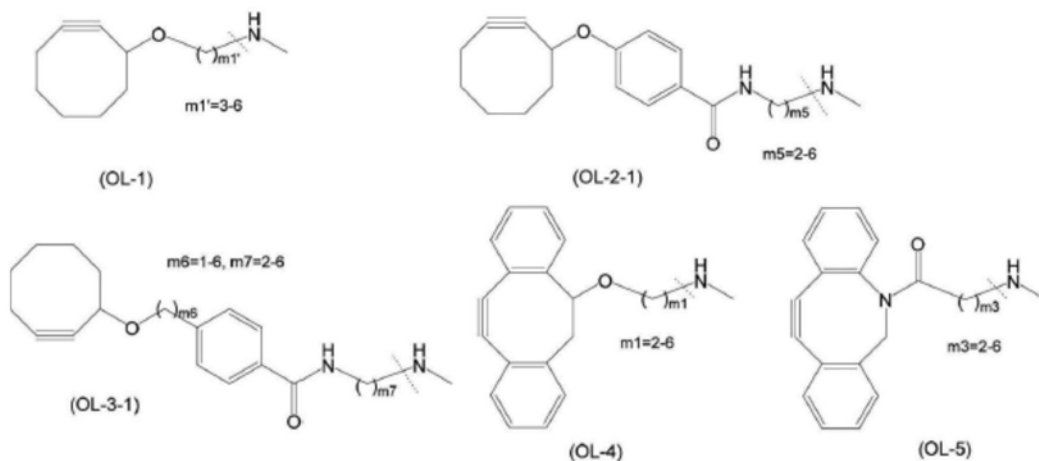
[0276]



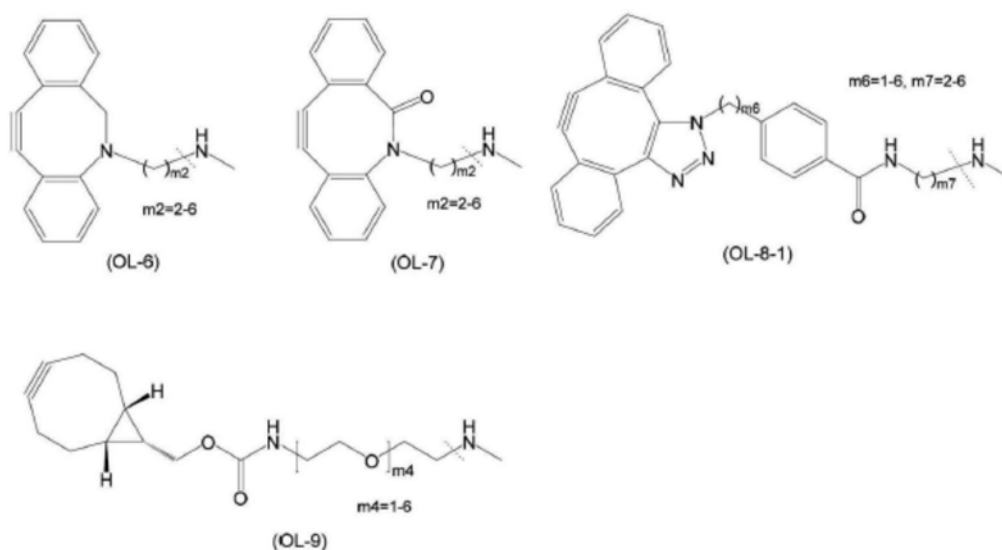
;

[0277] 更优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

[0278] [化学式33]



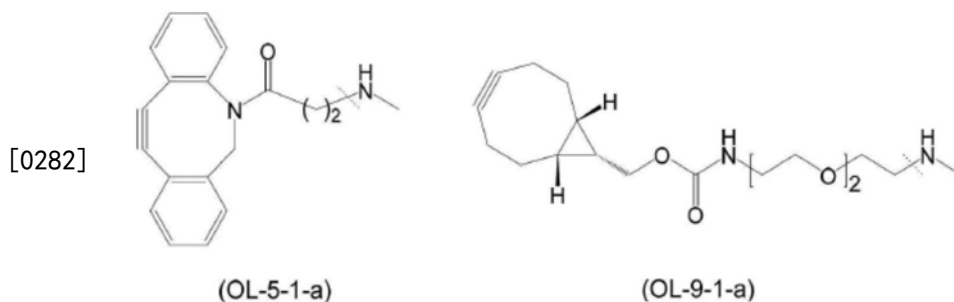
[0279]



;

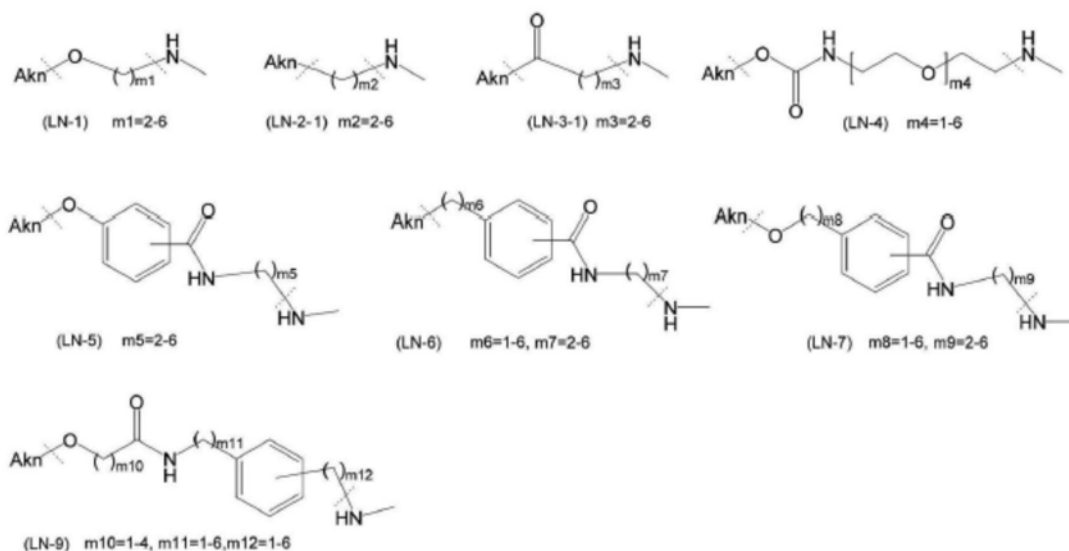
[0280] 进一步优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

[0281] [化学式34]



[0282] [1-1a]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中, -L<sup>1</sup>- 优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:[化学式35]

[0284]

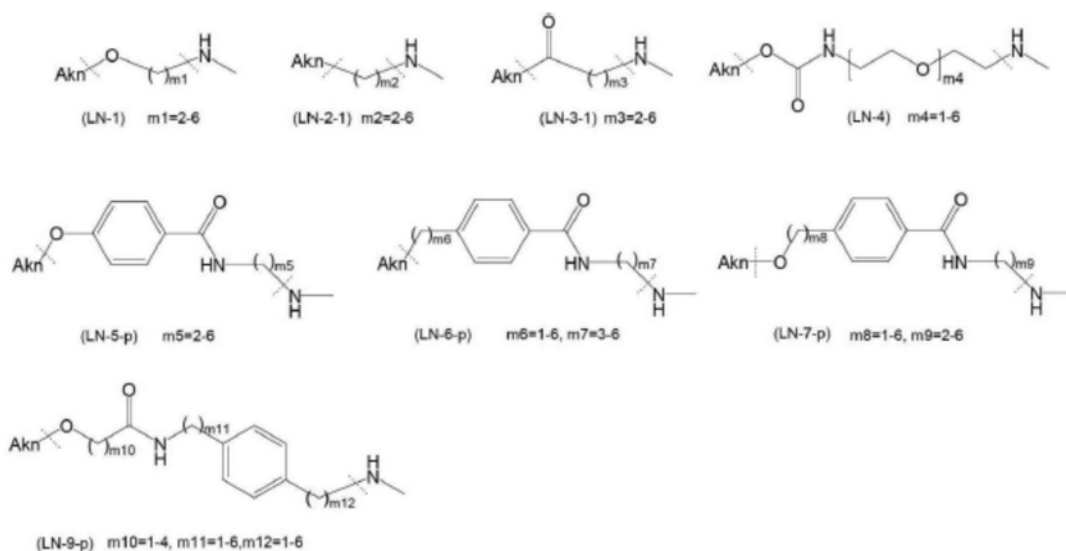


;

[0285] 更优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0286] [化学式36]

[0287]

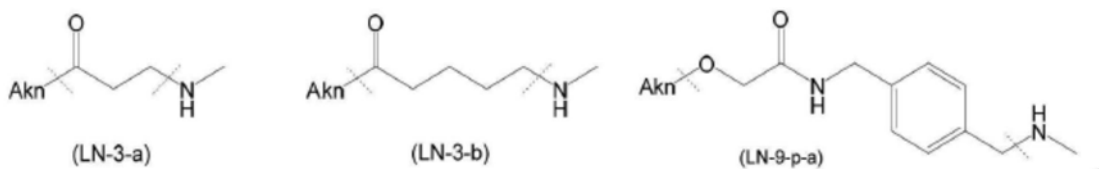


;

[0288] 进一步优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0289] [化学式37]

[0290]

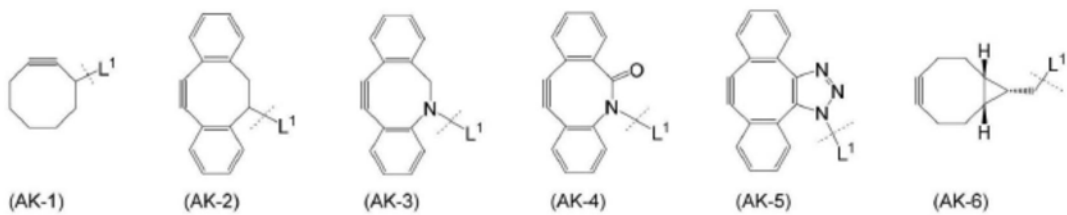


。

[0291] [1-2a]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0292] [化学式38]

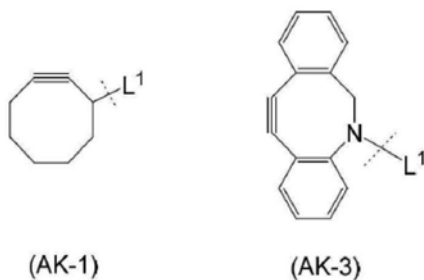
[0293]



[0294] 更优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

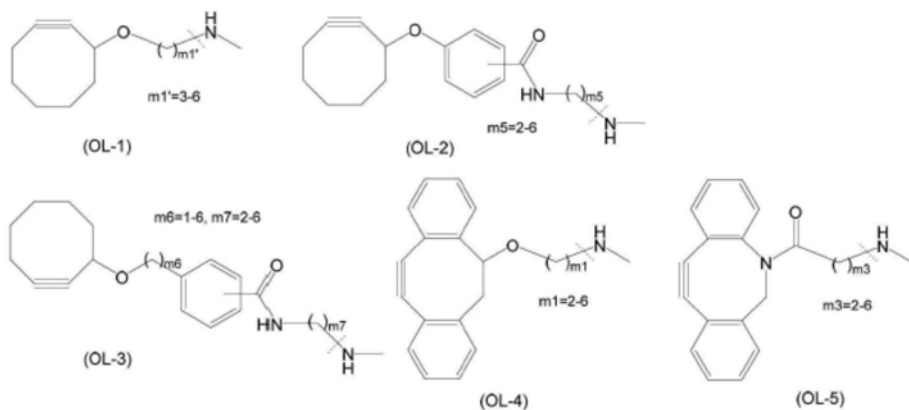
[0295] [化学式39]

[0296]

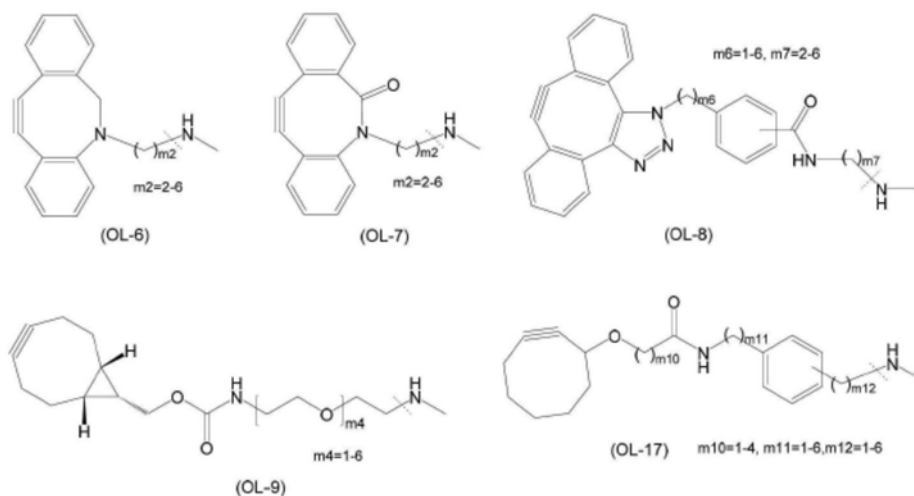


[0297] [1-3a]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn和-L¹-的组合优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

[0298] [化学式40]

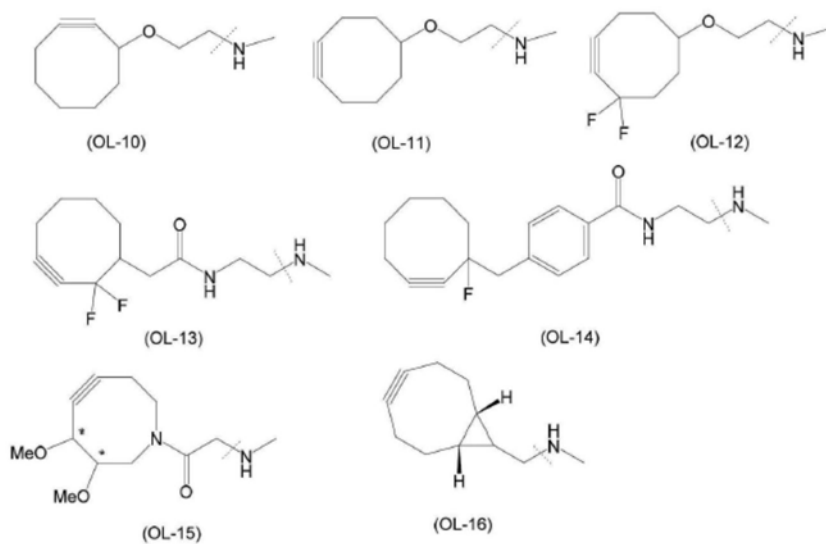


[0299]



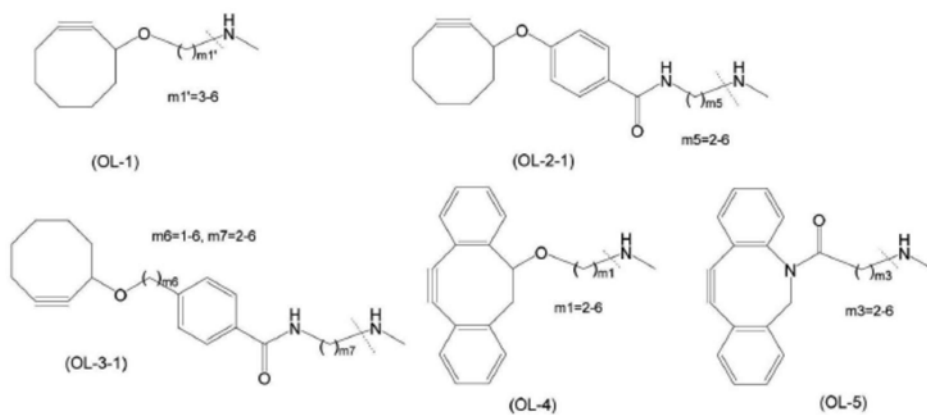
[0300] [化学式41]

[0301]

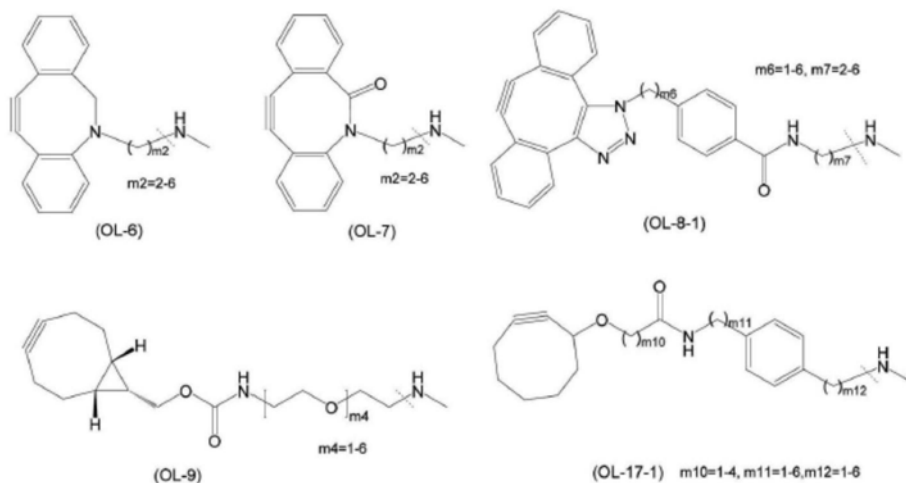


[0302] 更优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

[0303] [化学式42]

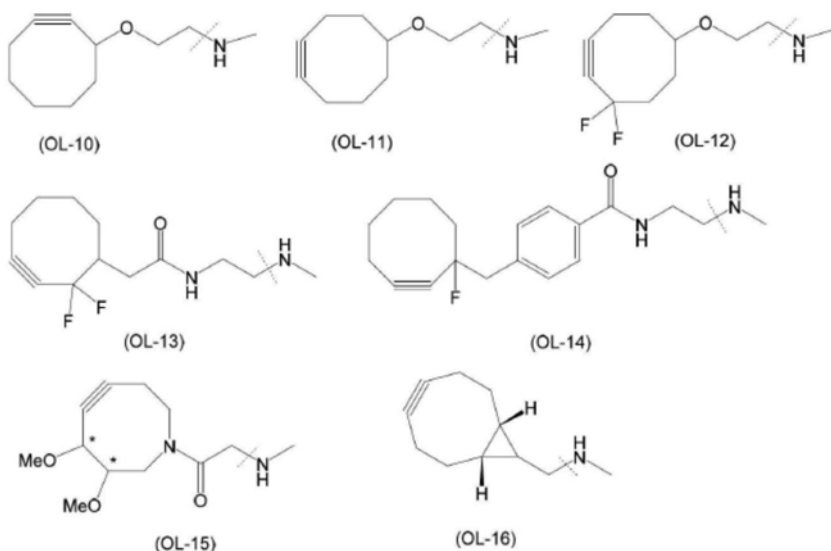


[0304]



[0305] [化学式43]

[0306]

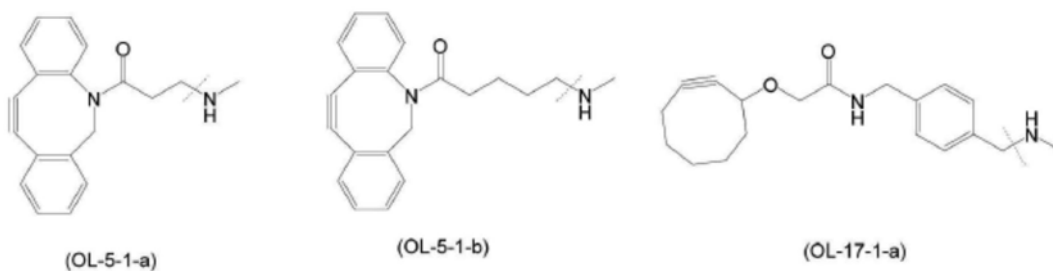


;

[0307] 进一步优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

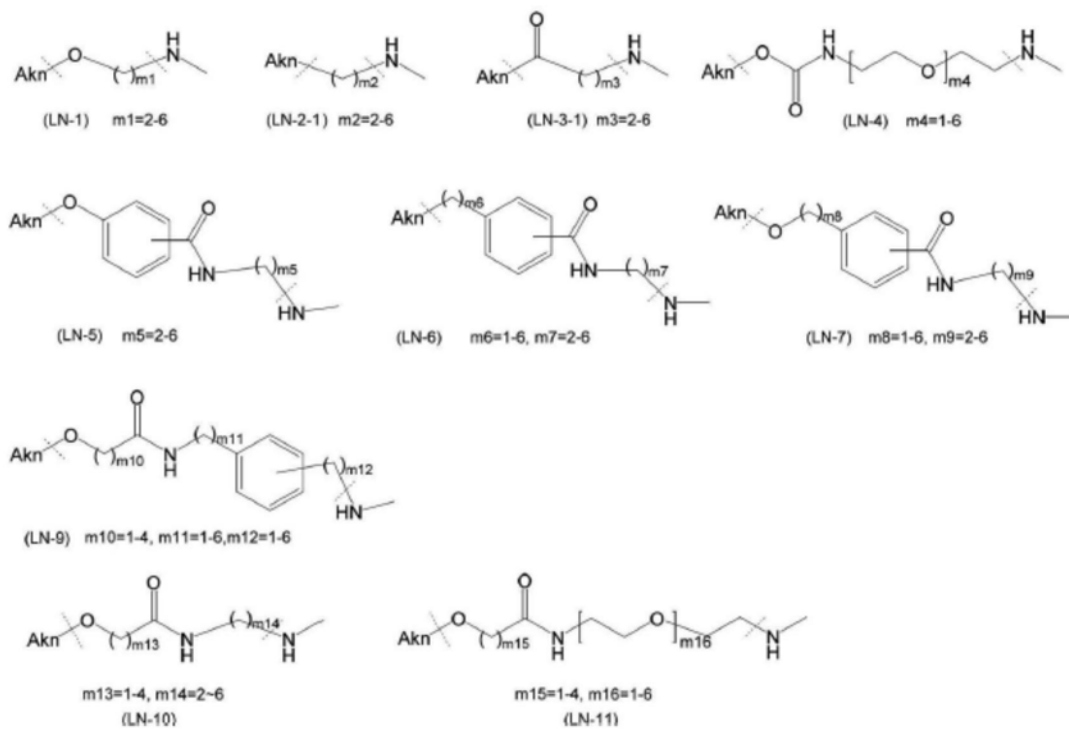
[0308] [化学式44]

[0309]



。

[0310] [1-1b]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中, -L<sup>1</sup>- 优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:[化学式45]

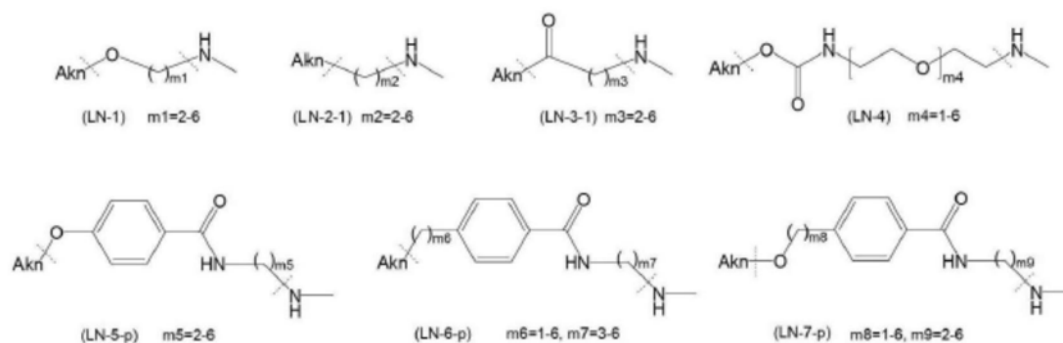


[0311]

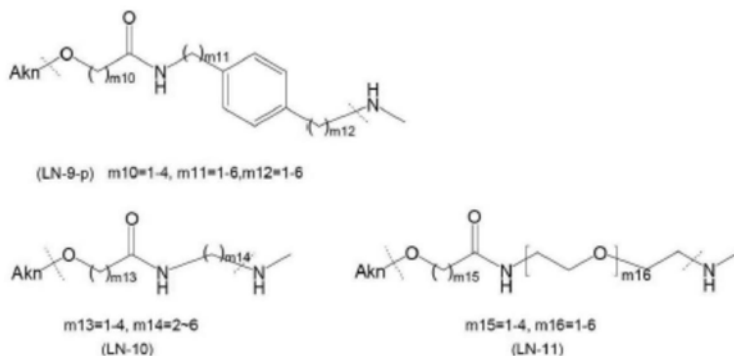
;

[0312] 更优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0313] [化学式46]



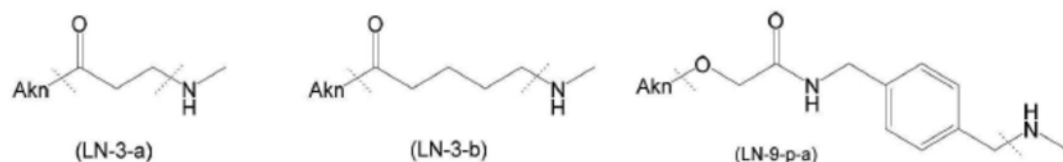
[0314]



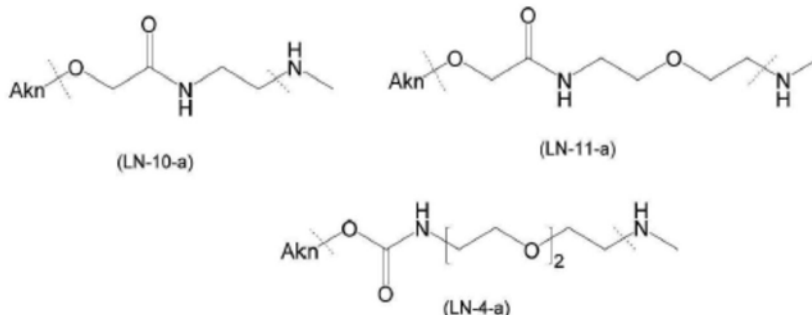
;

[0315] 进一步优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0316] [化学式47]



[0317]

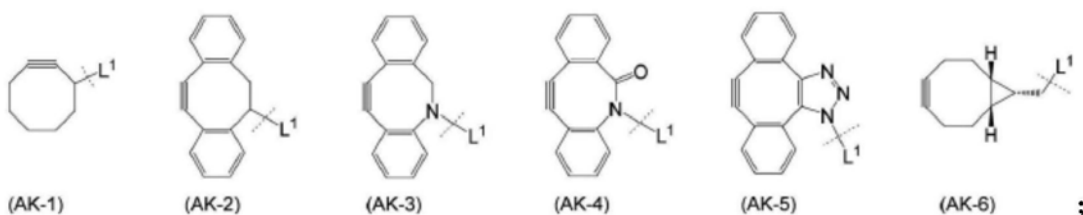


。

[0318] [1-2b]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0319] [化学式48]

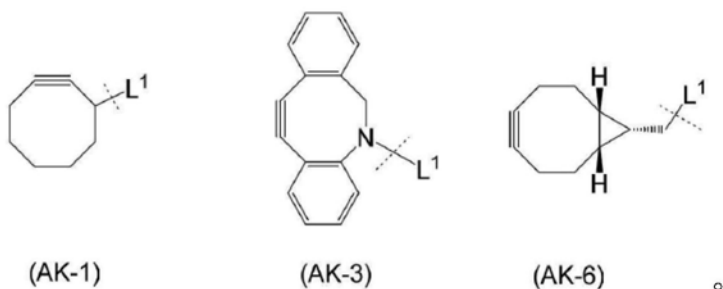
[0320]



[0321] 更优选为选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧]的环状炔基:

[0322] [化学式49]

[0323]



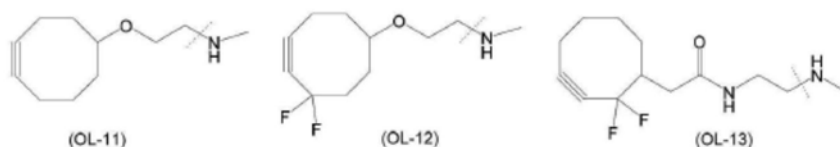
[0324] [1-3b]在上述方案[1]的上述式(I)的海藻酸衍生物中,Akn和-L<sup>1</sup>-的组合优选如下表的任一个组合(表中的-L<sup>1</sup>-或Akn的各式如上述方案[1]、[1-1]、[1-1a]、[1-2]、[1-2a]和[1-1b]所记载)、或选自下述式的基团[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]所示:

[0325] [表1]

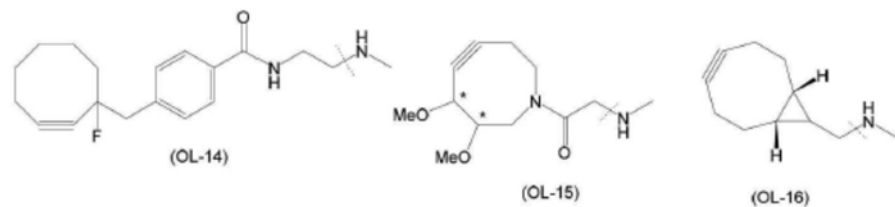
[0326]

-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn
LN-1	AK-1	LN-5	AK-6
LN-1	AK-2	LN-6	AK-1
LN-1	AK-6	LN-6	AK-2
LN-2-1	AK-1	LN-6	AK-3
LN-2-1	AK-2	LN-6	AK-4
LN-2-1	AK-3	LN-6	AK-5
LN-2-1	AK-4	LN-6	AK-6
LN-2-1	AK-5	LN-7	AK-1
LN-2-1	AK-6	LN-7	AK-2
LN-3-1	AK-1	LN-7	AK-6
LN-3-1	AK-2	LN-9	AK-1
LN-3-1	AK-3	LN-9	AK-2
LN-3-1	AK-4	LN-9	AK-6
LN-3-1	AK-5	LN-10	AK-1
LN-3-1	AK-6	LN-10	AK-2
LN-4	AK-1	LN-10	AK-6
LN-4	AK-2	LN-11	AK-1
LN-4	AK-6	LN-11	AK-2
LN-5	AK-1	LN-11	AK-6
LN-5	AK-2		

[0327] [化学式50]



[0328]



[0329] 更优选如下表的任一个组合(表中的-L<sup>1</sup>-或Akn的各式如上述方案[1]、[1-1]、[1-1a]、[1-2]、[1-2a]和[1-1b]所记载)所示:

[0330] [表2]

[0331]

-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn
LN-1	AK-1	LN-5-p	AK-6
LN-1	AK-2	LN-6-p	AK-1
LN-1	AK-6	LN-6-p	AK-2
LN-2-1	AK-1	LN-6-p	AK-3
LN-2-1	AK-2	LN-6-p	AK-4
LN-2-1	AK-3	LN-6-p	AK-5
LN-2-1	AK-4	LN-6-p	AK-6
LN-2-1	AK-5	LN-7-p	AK-1
LN-2-1	AK-6	LN-7-p	AK-2
LN-3-1	AK-1	LN-7-p	AK-6
LN-3-1	AK-2	LN-9-p	AK-1
LN-3-1	AK-3	LN-9-p	AK-2
LN-3-1	AK-4	LN-9-p	AK-6
LN-3-1	AK-5	LN-10	AK-1
LN-3-1	AK-6	LN-10	AK-2
LN-4	AK-1	LN-10	AK-6
LN-4	AK-2	LN-11	AK-1
LN-4	AK-6	LN-11	AK-2
LN-5-p	AK-1	LN-11	AK-6
LN-5-p	AK-2		

[0332] 进一步优选如下表的任一个组合(表中的-L<sup>1</sup>-或Akn的各式如上述方案[1]、[1-1]、[1-1a]、[1-2]、[1-2a]和[1-1b]所记载)所示:

[0333] [表3]

[0334]

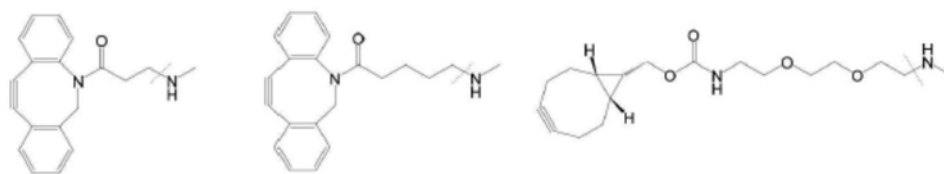
-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn
-------------------	-----	-------------------	-----

LN-3-a	AK-1	LN-4-a	AK-6
LN-3-a	AK-3	LN-9-p-a	AK-1
LN-3-a	AK-6	LN-9-p-a	AK-6
LN-3-b	AK-1	LN-10-a	AK-1
LN-3-b	AK-3	LN-10-a	AK-6
LN-3-b	AK-6	LN-11-a	AK-1
LN-4-a	AK-1	LN-11-a	AK-6

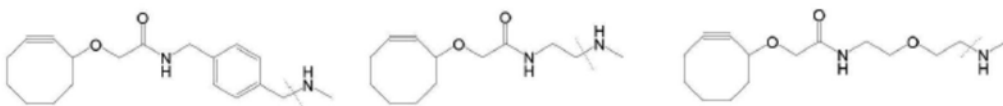
;

[0335] 特别优选如选自下述部分结构式[各式中,不包括波浪线右侧(亚氨基侧)]的基团所示:

[0336] [化学式51]



[0337]



[0338] 通过将上述方案[1]的优选方案、以及Akn和-L<sup>1</sup>-的定义适当组合,可任意地形成上述方案[1]的上述式(I)所表示的海藻酸衍生物的优选方案。

[0339] [2]海藻酸衍生物的第2方案如下。上述方案[1]所述的式(I)的海藻酸衍生物,其中,Akn-L<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>基(Akn和-L<sup>1</sup>-与上述方案[1]中的定义相同)的引入率为0.1%~30%。

[0340] [2-1]在上述方案[2]中,Akn-L<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>基的引入率优选为2%~20%、更优选为3~10%。

[0341] [2-1a]在上述方案[2]中,Akn-L<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>基的引入率优选为0.3%~20%、更优选为0.5~10%。

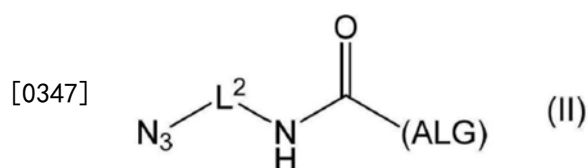
[0342] [3]海藻酸衍生物的第3方案如下。上述方案[1]所述的式(I)的海藻酸衍生物,其中,海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量为10万Da~300万Da。

[0343] [3-1]在上述方案[3]中,海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量优选为30万Da~250万Da、更优选为50万Da~200万Da。

[0344] [3-1a]在上述方案[3]中,海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量优选为30万Da~250万Da、更优选为100万Da~200万Da。

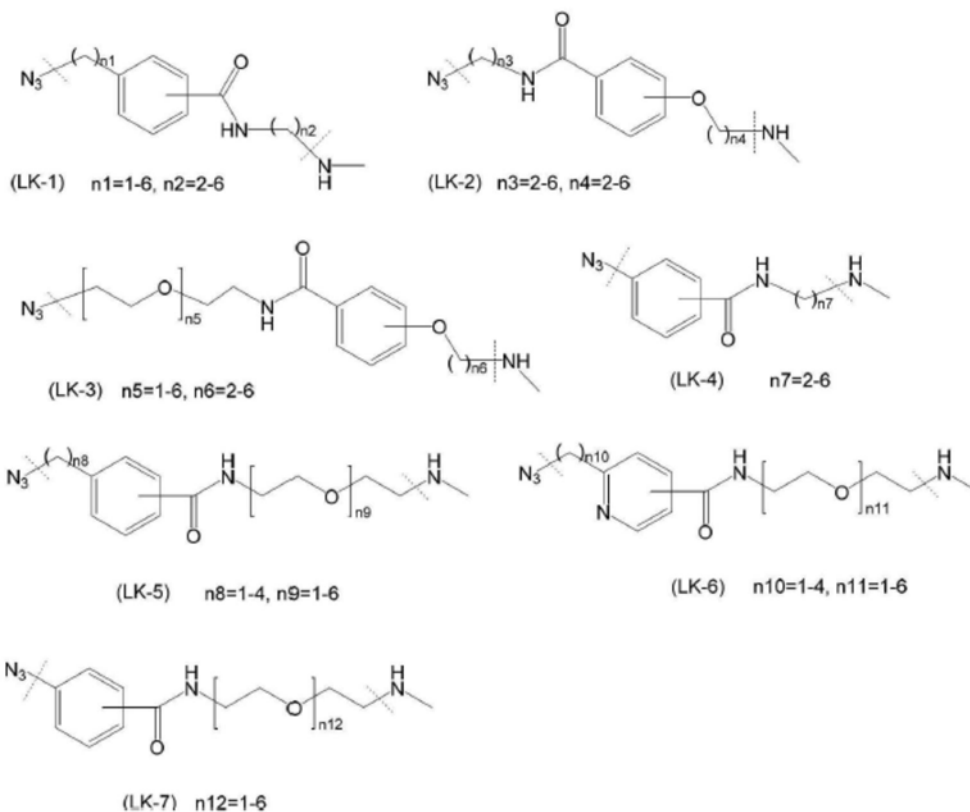
[0345] [4]海藻酸衍生物的第4方案如下。下述式(II)所表示的海藻酸衍生物,其中,经由酰胺键和2价接头(-L<sup>2</sup>-)向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了叠氮基:

[0346] [化学式52]



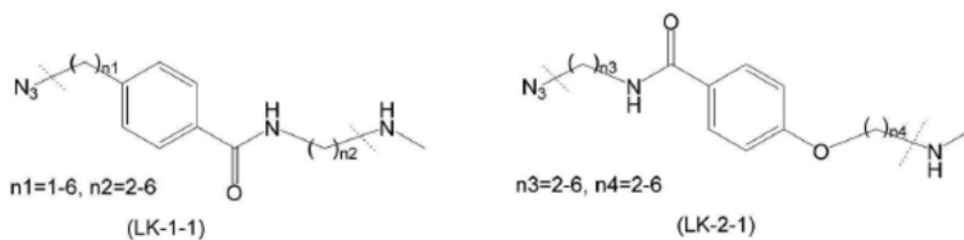
[0348] [式(II)中, (ALG)表示海藻酸; -NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键; -L<sup>2</sup>-表示选自下述部分结构式[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]的2价接头]:

[0349] [化学式53]

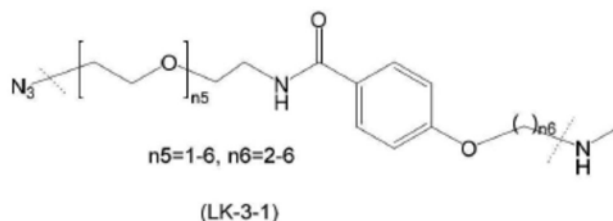


[0351] [4-1]在上述方案[4]的上述式(II)的海藻酸衍生物中, -L<sup>2</sup>-优选为选自下述部分结构式的接头[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]:

[0352] [化学式54]

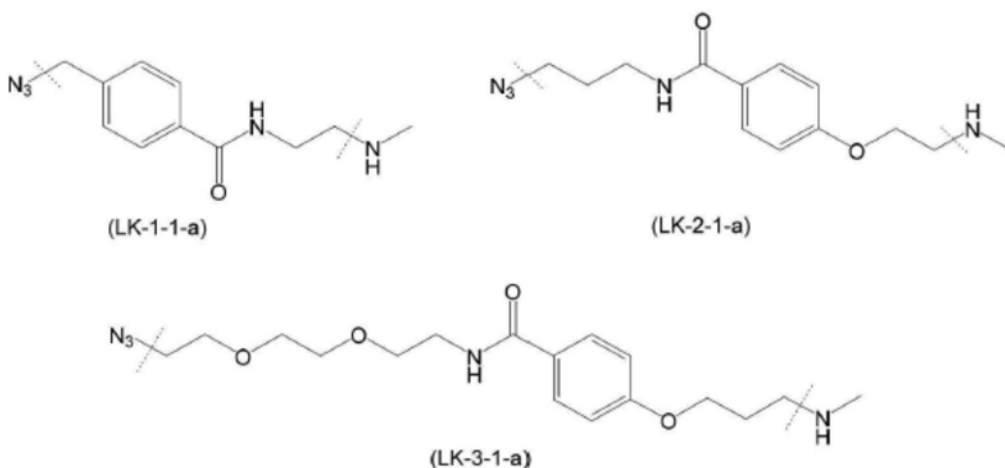


[0353]



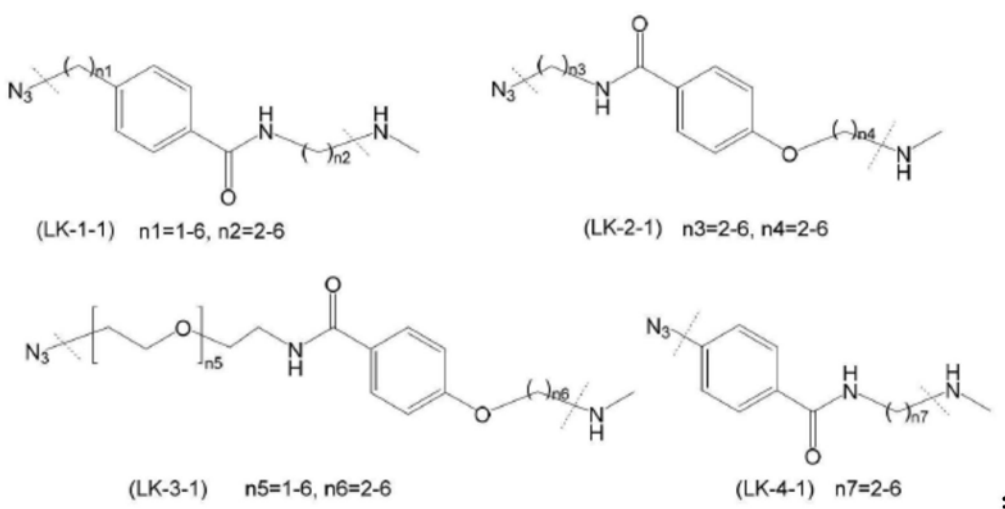
[0354] 更优选为选自下述部分结构式的接头:

[0355] [化学式55]



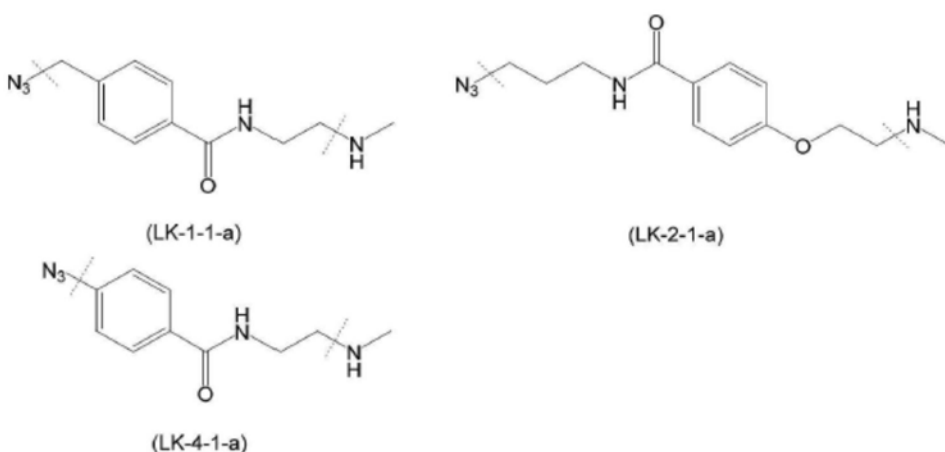
[0357] [4-1a]在上述方案[4]的上述式(II)的海藻酸衍生物中, -L<sup>2</sup>- 优选为选自下述部分结构式的接头[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]:

[0358] [化学式56]



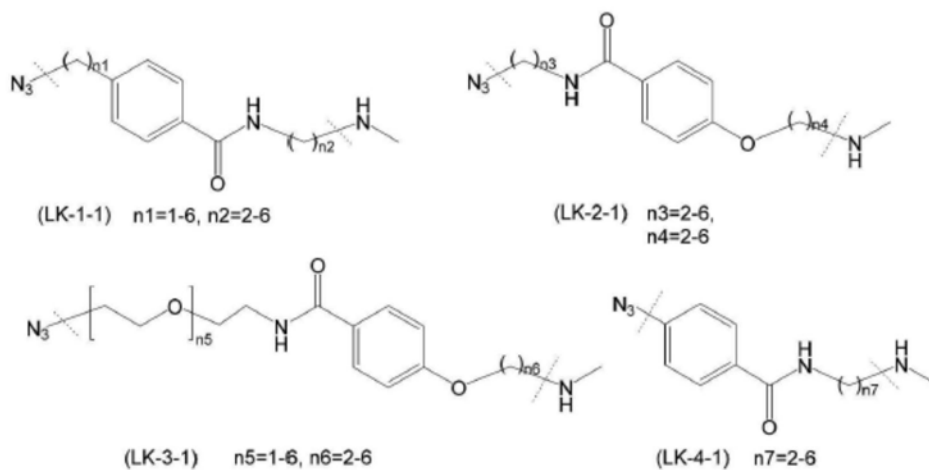
[0360] 更优选为选自下述部分结构式的接头:

[0361] [化学式57]

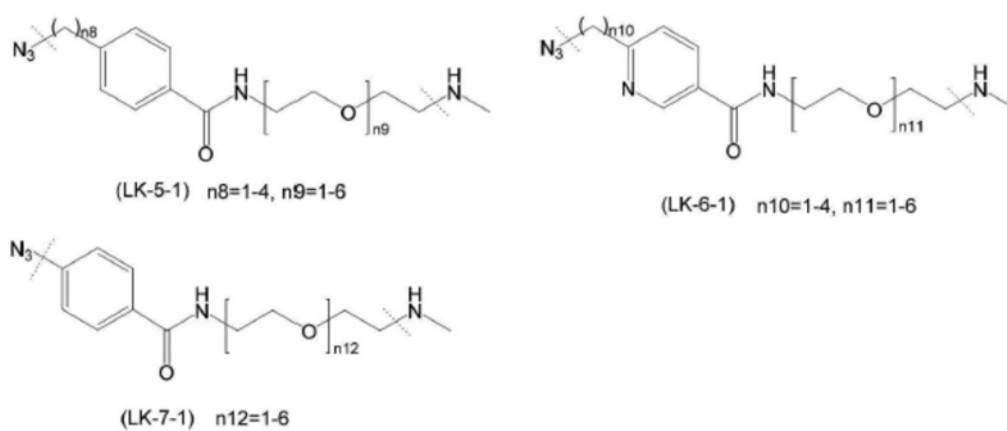


[0363] [4-1b]在上述方案[4]的上述式(II)的海藻酸衍生物中, -L<sup>2</sup>- 优选为选自下述部分结构式的接头[各式中, 不包括两端的波浪线外侧]:

[0364] [化学式58]



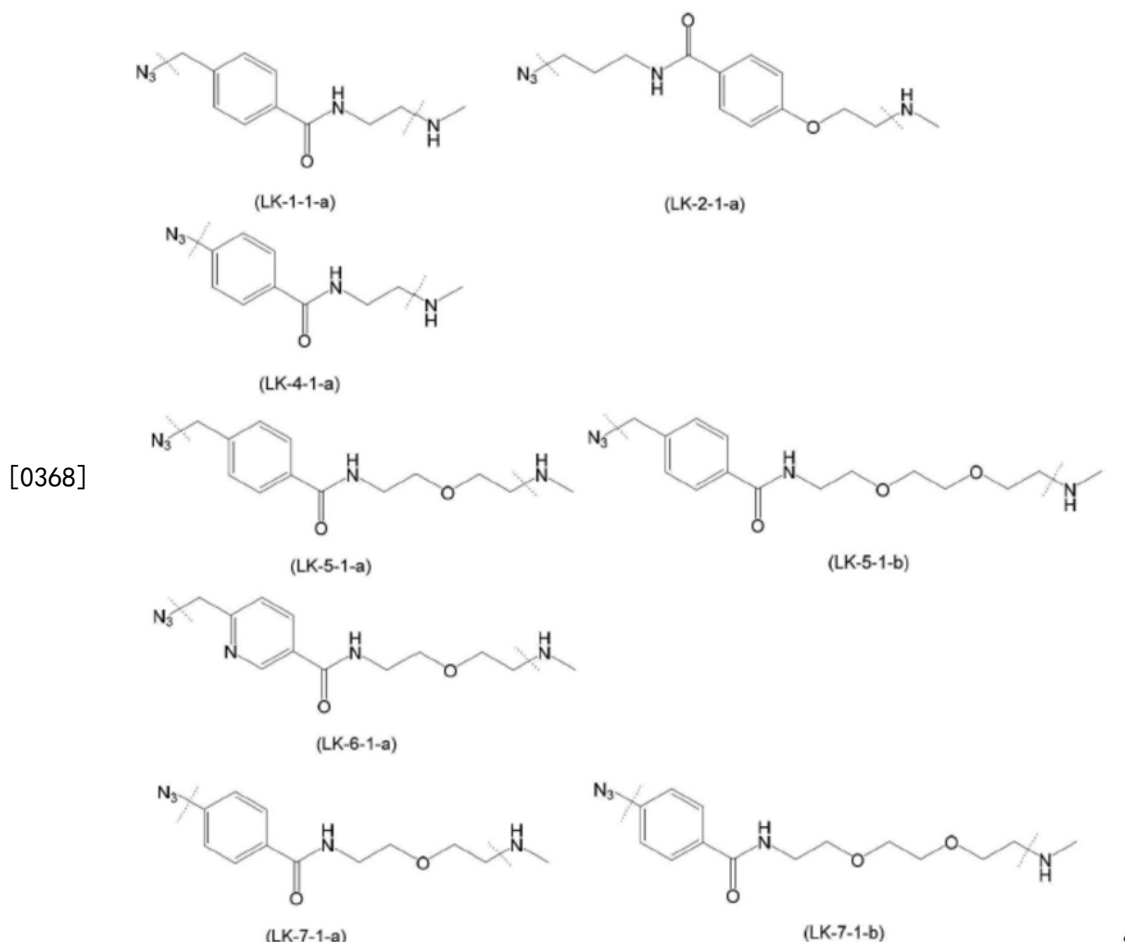
[0365]



;

[0366] 更优选为选自下述部分结构式的接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

[0367] [化学式59]



[0369] 通过将上述方案[4]的优选方案、以及叠氮基和-L<sup>2</sup>-的定义适当组合,可任意地形成上述方案[4]的上述式(II)所表示的海藻酸衍生物的优选方案。

[0370] [5]海藻酸衍生物的第5方案如下。上述方案[4]所述的式(II)的海藻酸衍生物,其中,N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>基(-L<sup>2</sup>-与上述方案[4]中的定义相同)的引入率为0.1%~30%。

[0371] [5-1]在上述方案[5]中,N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>基的引入率优选为2%~20%、更优选为3~10%。

[0372] [5-1a]在上述方案[5]中,N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>基的引入率优选为0.3%~20%、更优选为0.5~15%。

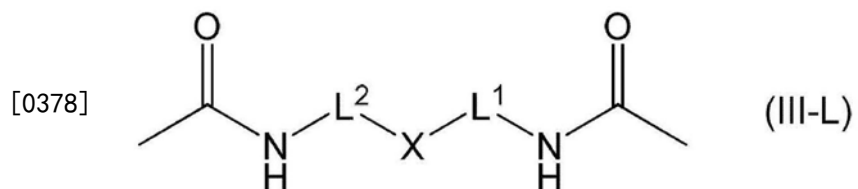
[0373] [6]海藻酸衍生物的第6方案如下。上述方案[4]所述的式(II)的海藻酸衍生物,其中,海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量为10万Da~300万Da。

[0374] [6-1]在上述方案[6]中,式(II)的海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量优选为30万Da~250万Da、更优选为50万Da~200万Da。

[0375] [6-1a]在上述方案[6]中,式(II)的海藻酸衍生物通过凝胶过滤色谱法测定的重均分子量优选为30万Da~250万Da、更优选为100万Da~200万Da。

[0376] [7]海藻酸衍生物的第7方案如下。第1海藻酸的任意羧基与第2海藻酸的任意羧基经由下述式(III-L)结合而成的交联海藻酸:

[0377] [化学式60]



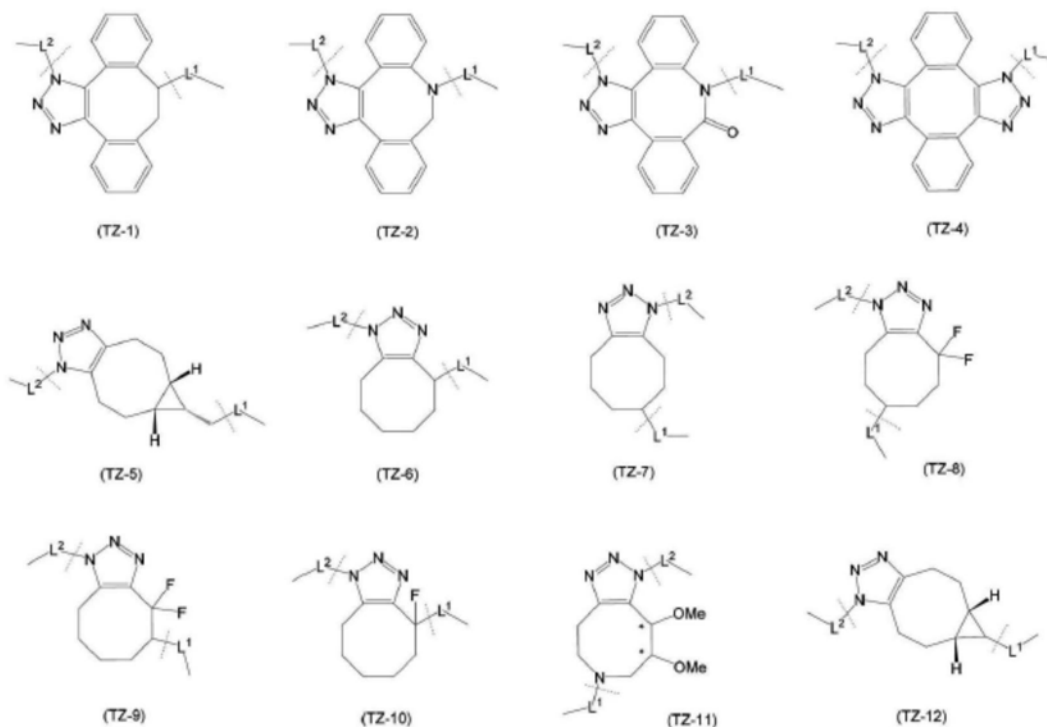
[0379] [式 (III-L) 中, 两端的 -CONH- 和 -NHC(=O)- 表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;

[0380] -L<sup>1</sup>- 与上述方案[1]中的定义相同;

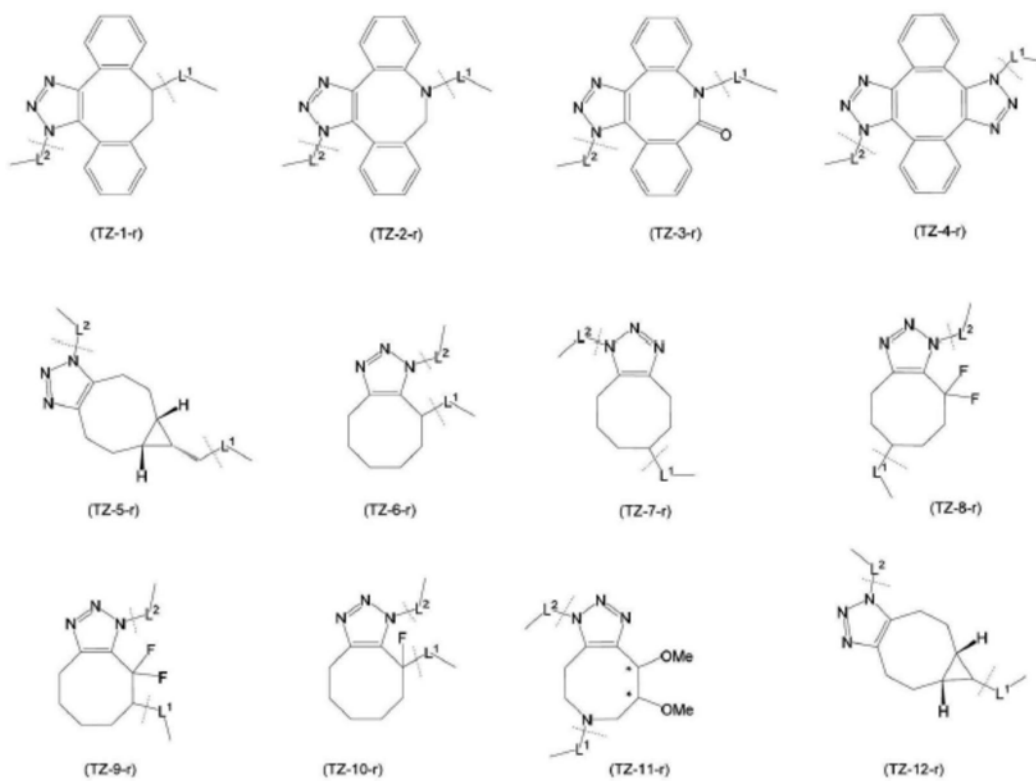
[0381] -L<sup>2</sup>- 与上述方案[4]中的定义相同;

[0382] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中, 不包括两端的波浪线外侧), 星号表示手性中心]:

[0383] [化学式61]

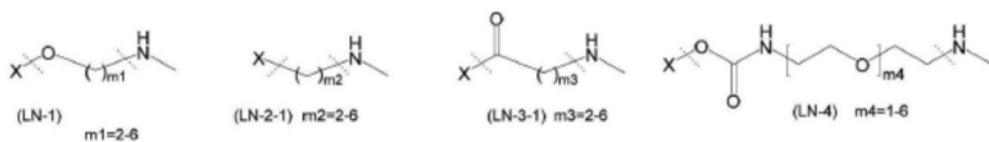


[0384]

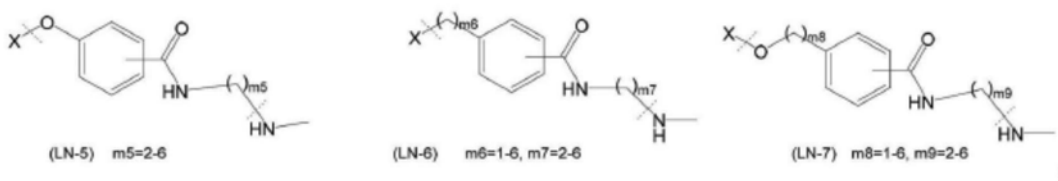


[0385] [7-1]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选-L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

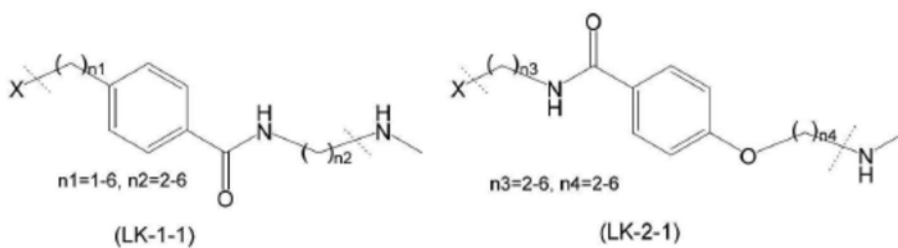
[0386] [化学式62]



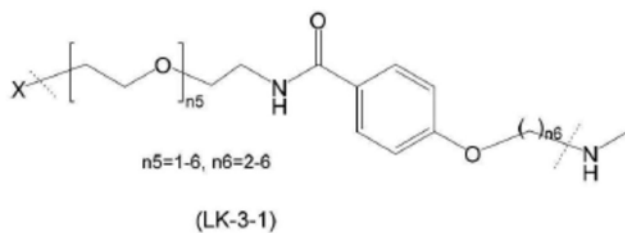
[0387]

[0388]  $-L^2-$ 为选自下述部分结构式的2价接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

[0389] [化学式63]

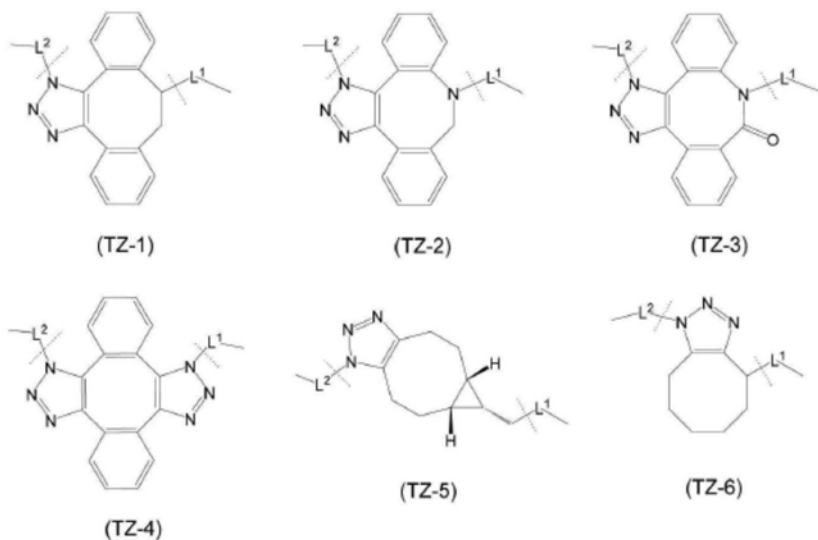


[0390]

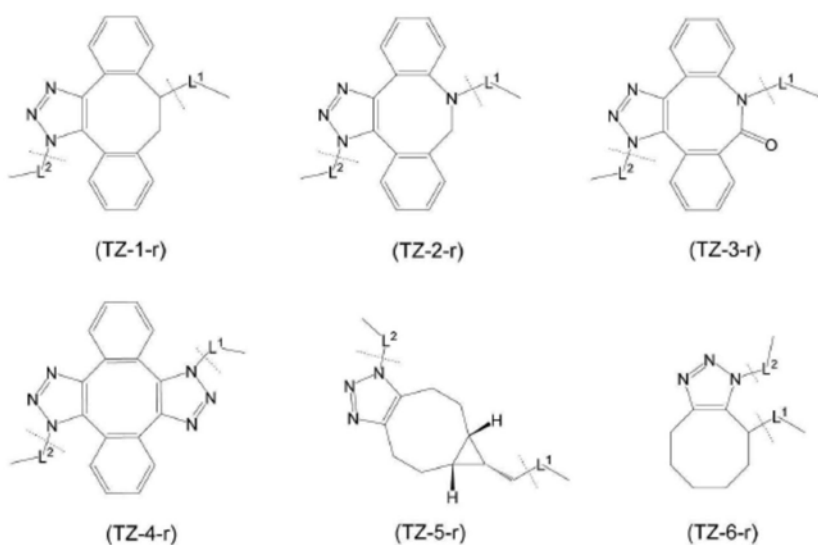


[0391] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧)]:

[0392] [化学式64]

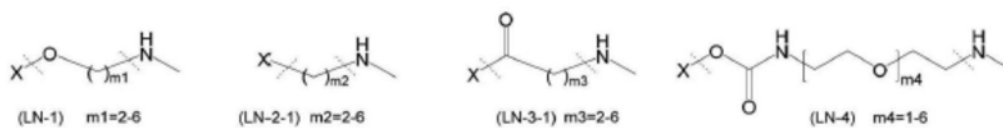


[0393]

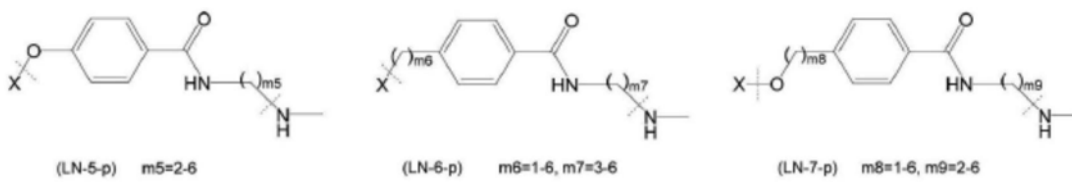


[0394] [7-2]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,更优选: $-L^1-$ 为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0395] [化学式65]

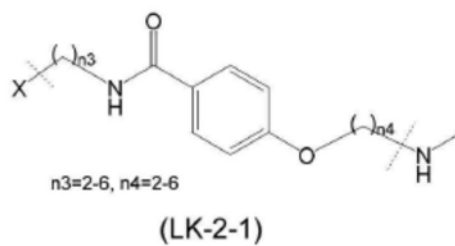
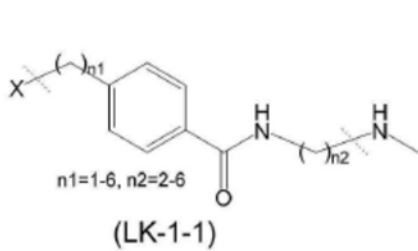


[0396]

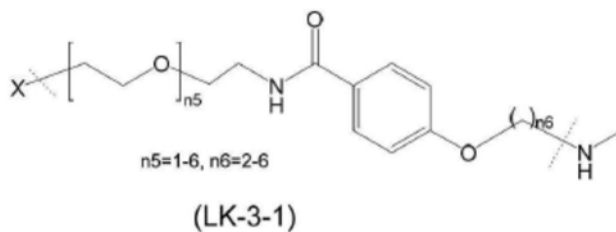


[0397]  $-L^2-$ 为选自下述部分结构式的2价接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

[0398] [化学式66]



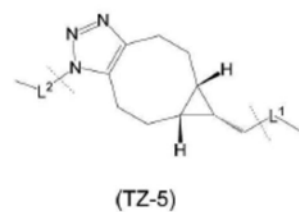
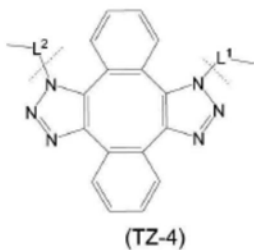
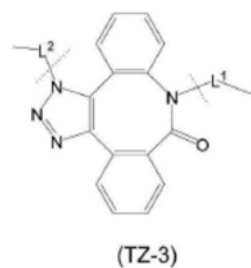
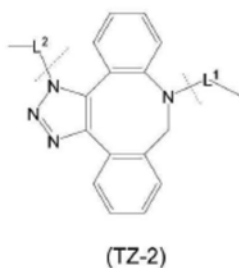
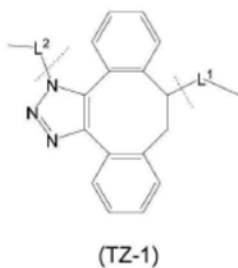
[0399]



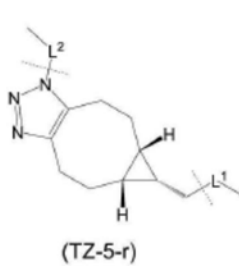
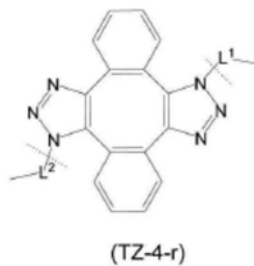
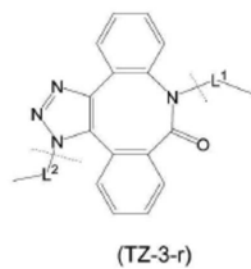
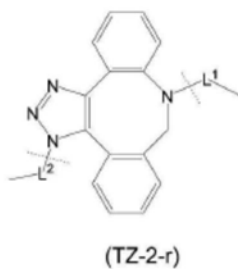
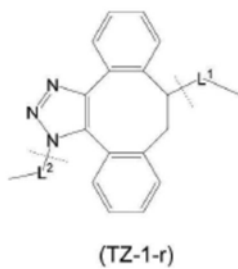
;

[0400] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧)]:

[0401] [化学式67]



[0402]

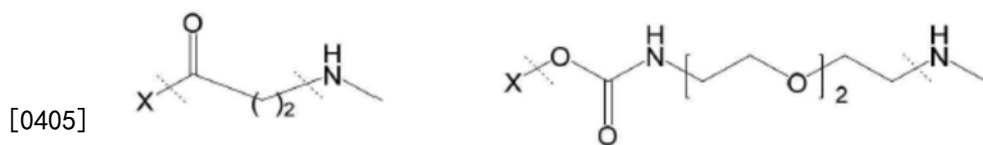


。

[0403] [7-3]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,进一步优选:-L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构

式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0404] [化学式68]



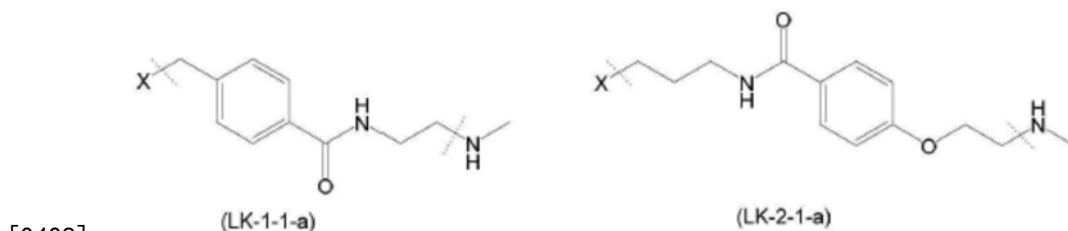
(LN-3-a)

(LN-4-a)

;

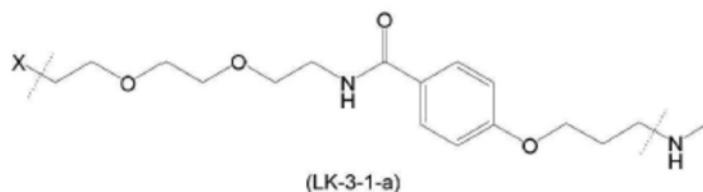
[0406]  $-L^2-$ 为选自下述部分结构式的2价接头(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0407] [化学式69]



(LK-1-1-a)

(LK-2-1-a)

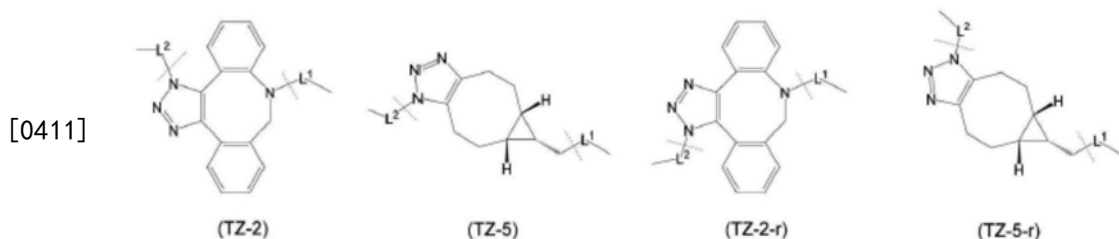


(LK-3-1-a)

;

[0409] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0410] [化学式70]



(TZ-2)

(TZ-5)

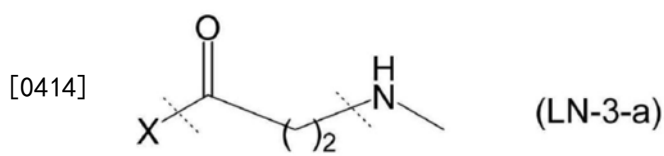
(TZ-2-r)

(TZ-5-r)

。

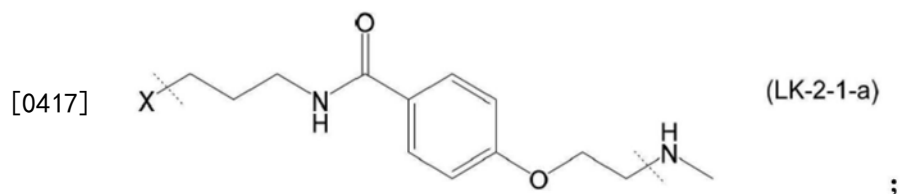
[0412] [7-3-1]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,特别优选 $-L^1-$ 为下述部分结构式的2价接头(式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0413] [化学式71]



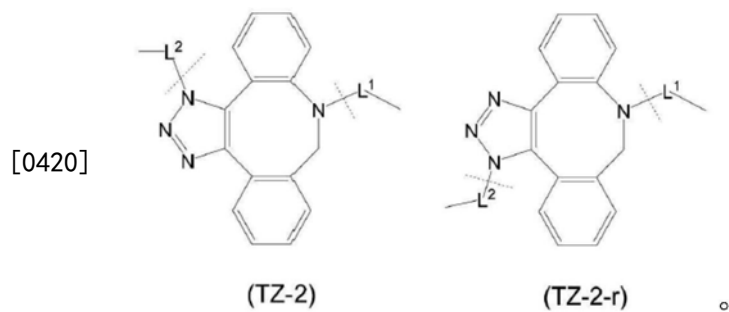
[0415]  $-L^2-$ 为下述部分结构式的2价接头(式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0416] [化学式72]



[0418] X为下述部分结构式的任一个环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

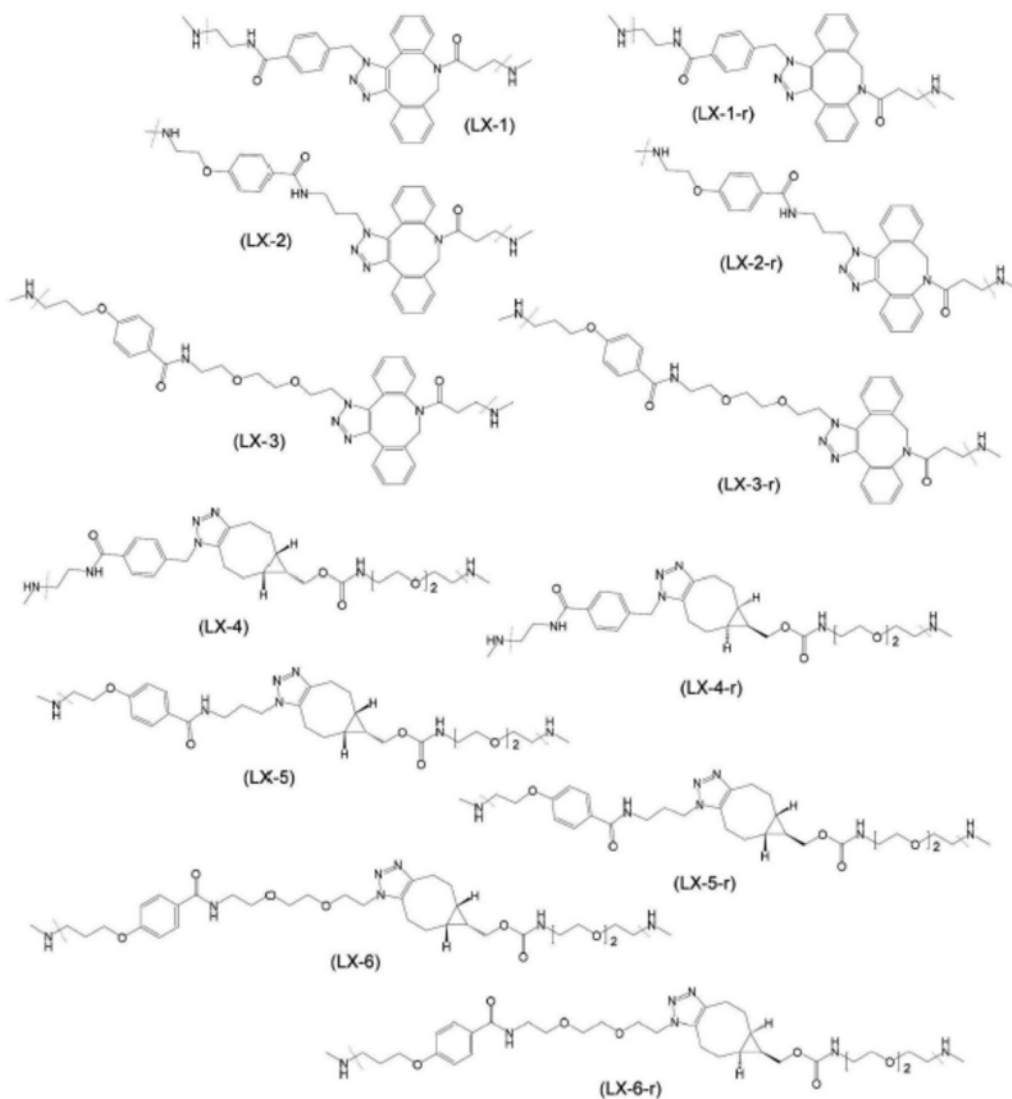
[0419] [化学式73]



[0421] [7-4]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选-L<sup>2</sup>-X-L<sup>1</sup>-的组合如选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的部分结构所示:

[0422] [化学式74]

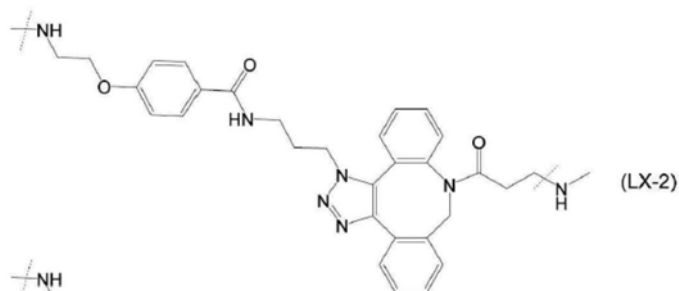
[0423]



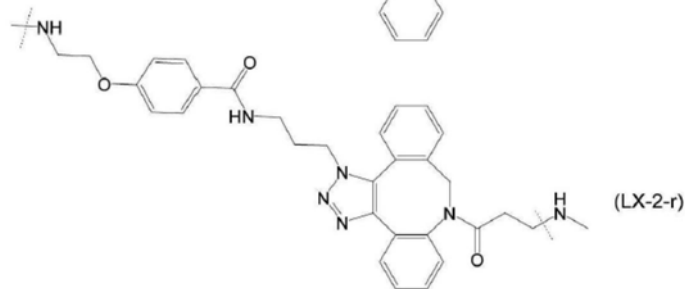
;

[0424] 更优选  $-L^2-X-L^1-$  的组合如下述部分结构式[式中,不包括两端的波浪线外侧]的任一个所示:

[0425] [化学式75]



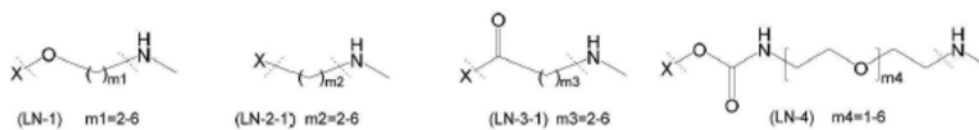
[0426]



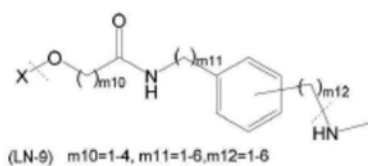
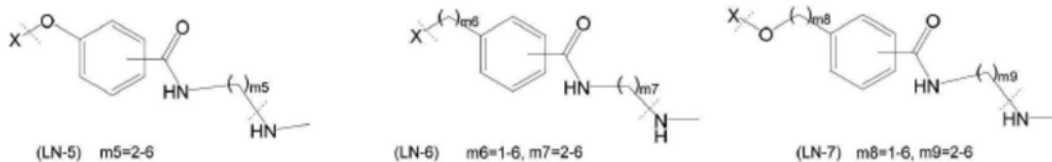
[0427] [7-1a]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选:  $-L^1-$  为选自下述部分结构式[各

式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0428] [化学式76]



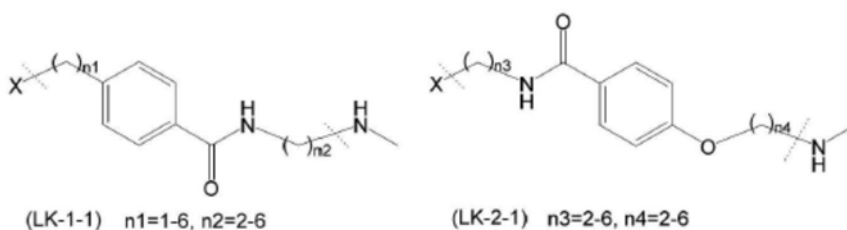
[0429]



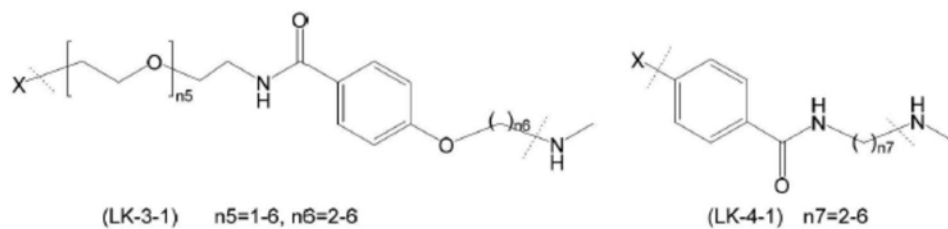
;

[0430]  $-L^2-$ 为选自下述部分结构式的2价接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

[0431] [化学式77]



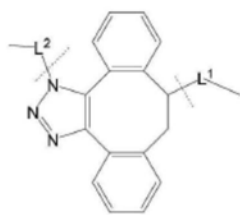
[0432]



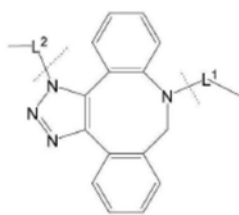
;

[0433] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧)]:

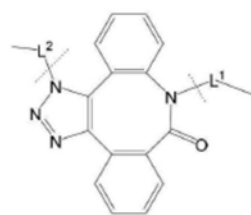
[0434] [化学式78]



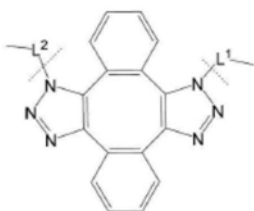
(TZ-1)



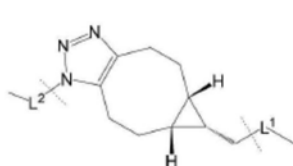
(TZ-2)



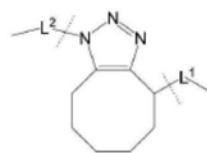
(TZ-3)



(TZ-4)

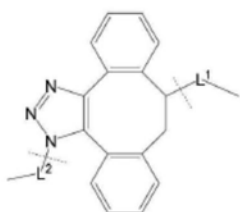


(TZ-5)

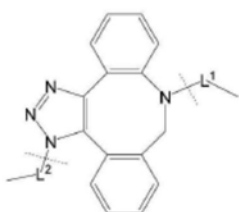


(TZ-6)

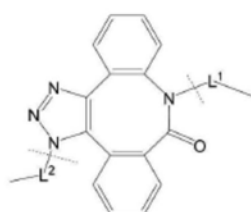
[0435]



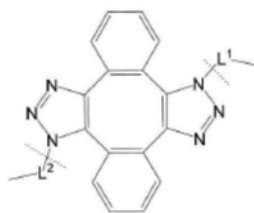
(TZ-1-r)



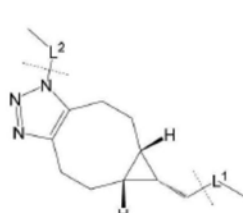
(TZ-2-r)



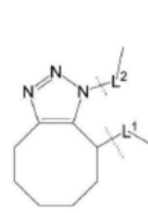
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

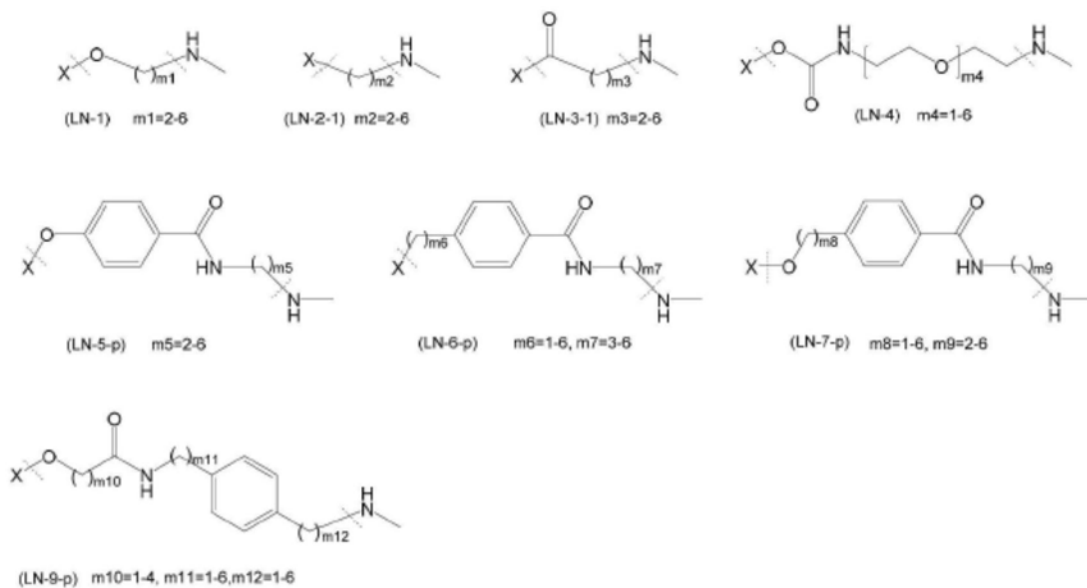


(TZ-6-r)

[0436] [7-2a]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,更优选: $-L^1-$ 为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0437] [化学式79]

[0438]

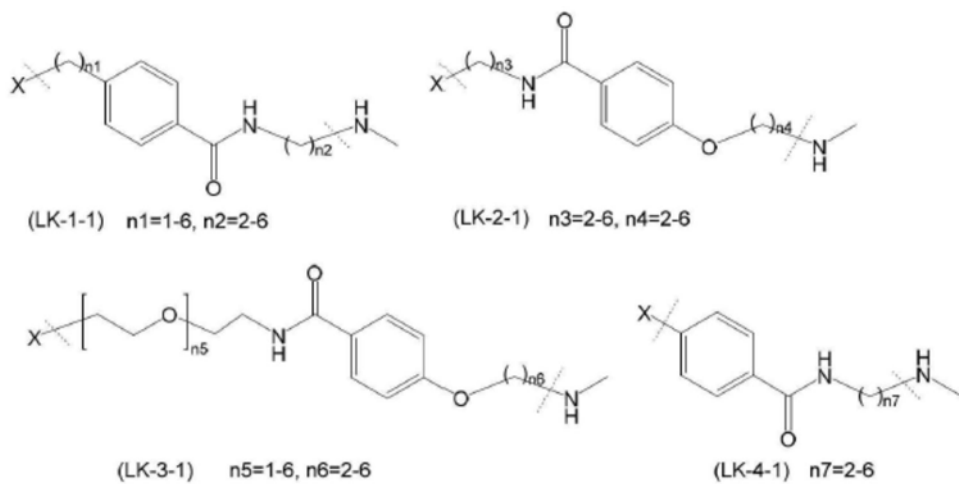


;

[0439]  $-L^2-$  为选自下述部分结构式的2价接头〔各式中, 不包括两端的波浪线外侧〕:

[0440] [化学式80]

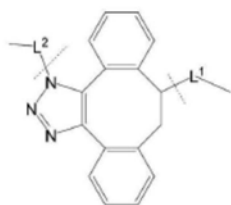
[0441]



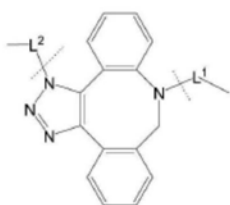
;

[0442] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中, 不包括两端的波浪线外侧)]:

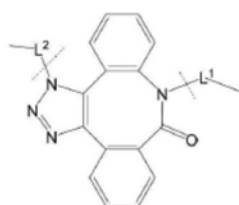
[0443] [化学式81]



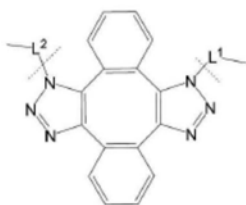
(TZ-1)



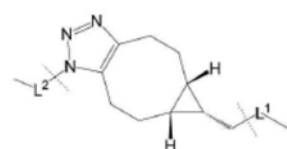
(TZ-2)



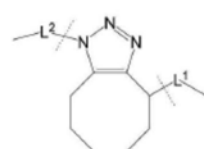
(TZ-3)



(TZ-4)

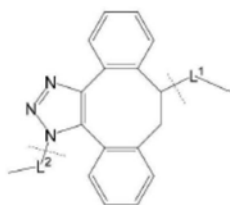


(TZ-5)

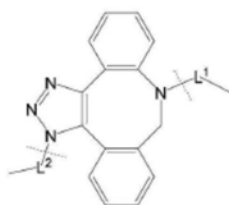


(TZ-6)

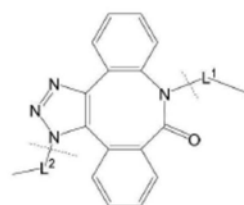
[0444]



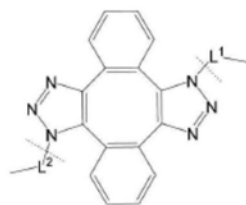
(TZ-1-r)



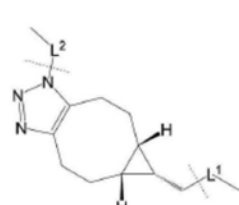
(TZ-2-r)



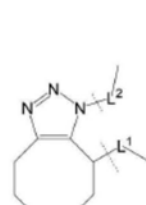
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



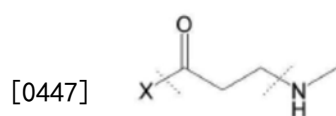
(TZ-5-r)



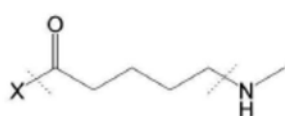
(TZ-6-r)

[0445] [7-3a]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,进一步优选:-L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

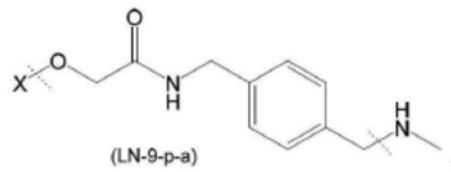
[0446] [化学式82]



(LN-3-a)



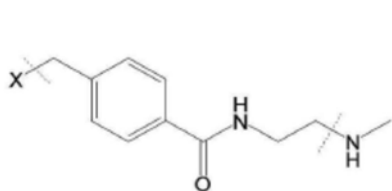
(LN-3-b)



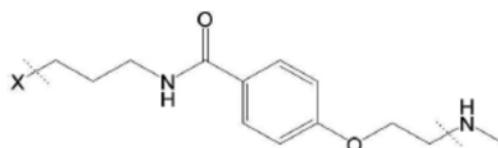
(LN-9-p-a)

[0448] -L<sup>2</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0449] [化学式83]

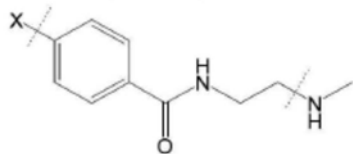


(LK-1-1-a)



(LK-2-1-a)

[0450]

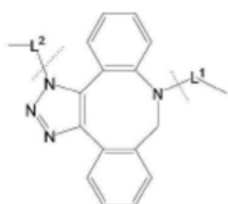


(LK-4-1-a)

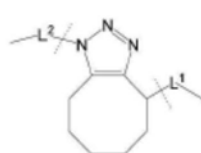
;

[0451] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

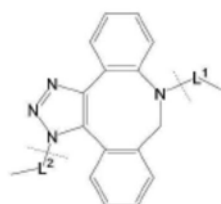
[0452] [化学式84]



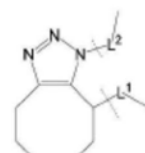
(TZ-2)



(TZ-6)



(TZ-2-r)

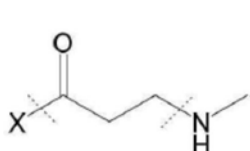


(TZ-6-r)

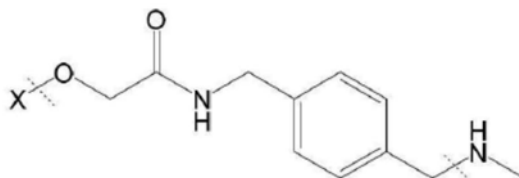
。

[0454] [7-3a-1]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,特别优选:-L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头(式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0455] [化学式85]



(LN-3-a)

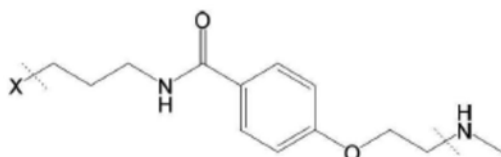


(LN-9-p)

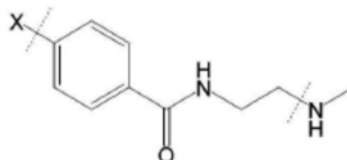
;

[0457] -L<sup>2</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头(式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0458] [化学式86]



(LK-2-1-a)



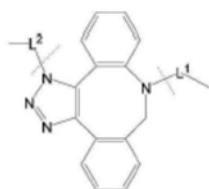
(LK-4-1-a)

;

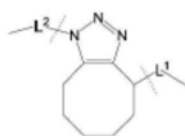
[0460] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0461] [化学式87]

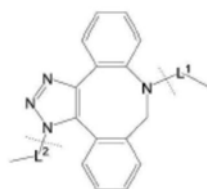
[0462]



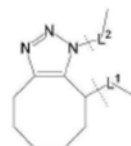
(TZ-2)



(TZ-6)



(TZ-2-r)



(TZ-6-r)

[0463] [7-4a]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选 $-L^2-X-L^1-$ 的组合如选自下表的式的部分结构所示(表中的 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 或 $-X-$ 的各式如上述方案[1]、[1-1]、[1-1a]、[1-1b]、[4]、[4-1]、[4-1a]、[4-1b]、[7]、[7-1]、[7-2]、[7-3]、[7-3-1]、[7-1a]、[7-2a]、[7-3a]和[7-3a-1]所记载):

[0464] [表4]

[0465]

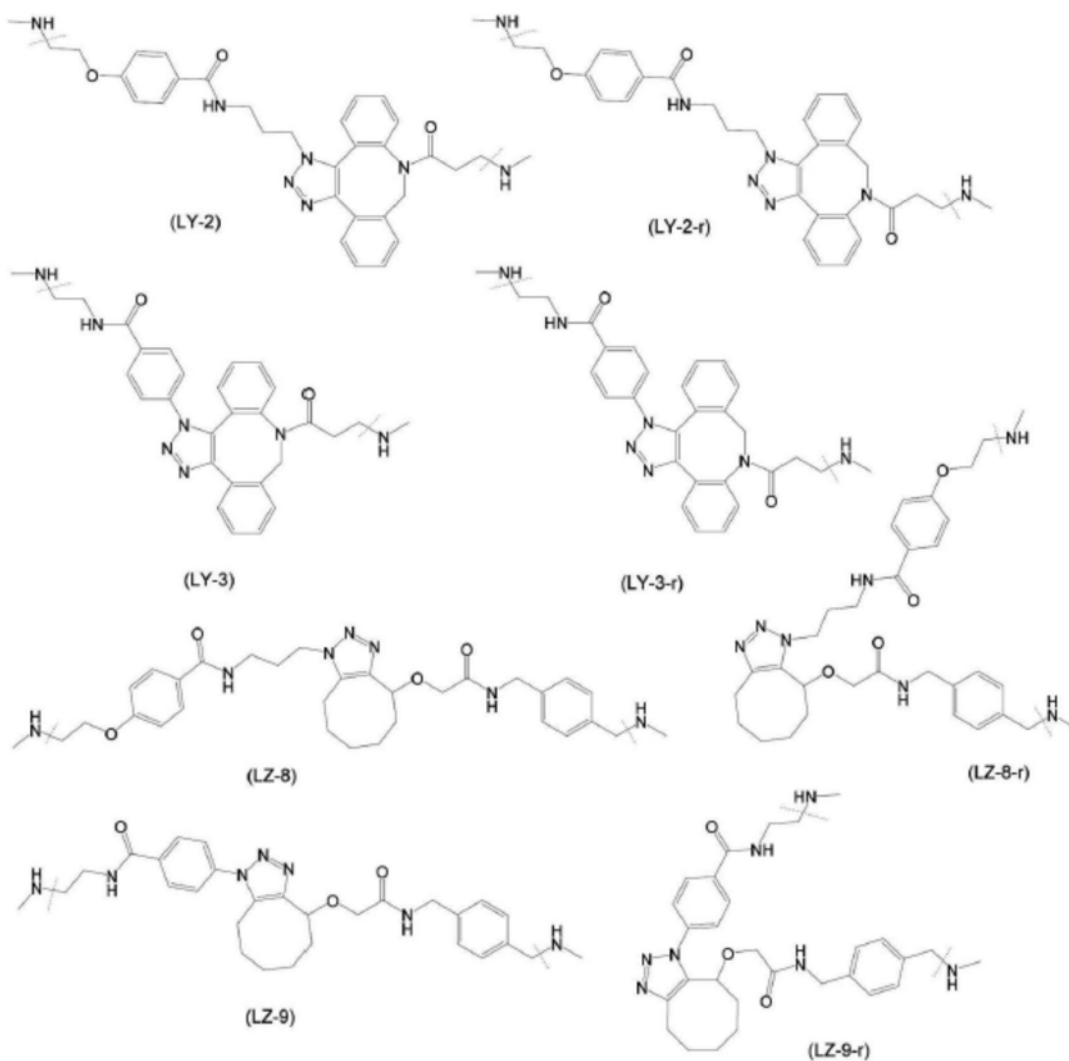
	$-L^2-$	$-X-$	$-L^1-$
(LY-1)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-2)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-3)	(LK-4-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-4)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-5)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-6)	(LK-4-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-7)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-9-p)
(LY-8)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-9-p)
(LY-9)	(LK-4-1-a)	(TZ-2)	(LN-9-p)
(LY-1-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-a)
(LY-2-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-a)
(LY-3-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-a)
(LY-4-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-b)
(LY-5-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-b)
(LY-6-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-3-b)
(LY-7-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-9-p)
(LY-8-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-9-p)
(LY-9-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-2-r)	(LN-9-p)
(LZ-1)	(LK-1-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-a)
(LZ-2)	(LK-2-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-a)
(LZ-3)	(LK-4-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-a)
(LZ-4)	(LK-1-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-b)
(LZ-5)	(LK-2-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-b)
(LZ-6)	(LK-4-1-a)	(TZ-6)	(LN-3-b)
(LZ-7)	(LK-1-1-a)	(TZ-6)	(LN-9-p)
(LZ-8)	(LK-2-1-a)	(TZ-6)	(LN-9-p)
(LZ-9)	(LK-4-1-a)	(TZ-6)	(LN-9-p)
(LZ-1-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-a)
(LZ-2-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-a)
(LZ-3-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-a)
(LZ-4-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-b)
(LZ-5-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-b)
(LZ-6-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-3-b)
(LZ-7-r)	(LK-1-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-9-p)
(LZ-8-r)	(LK-2-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-9-p)
(LZ-9-r)	(LK-4-1-a)	(TZ-6-r)	(LN-9-p)

;

[0466] 更优选- $L^2$ -X- $L^1$ -的组合如选自下述部分结构式[式中,不包括两端的波浪线外侧]的部分结构所示:

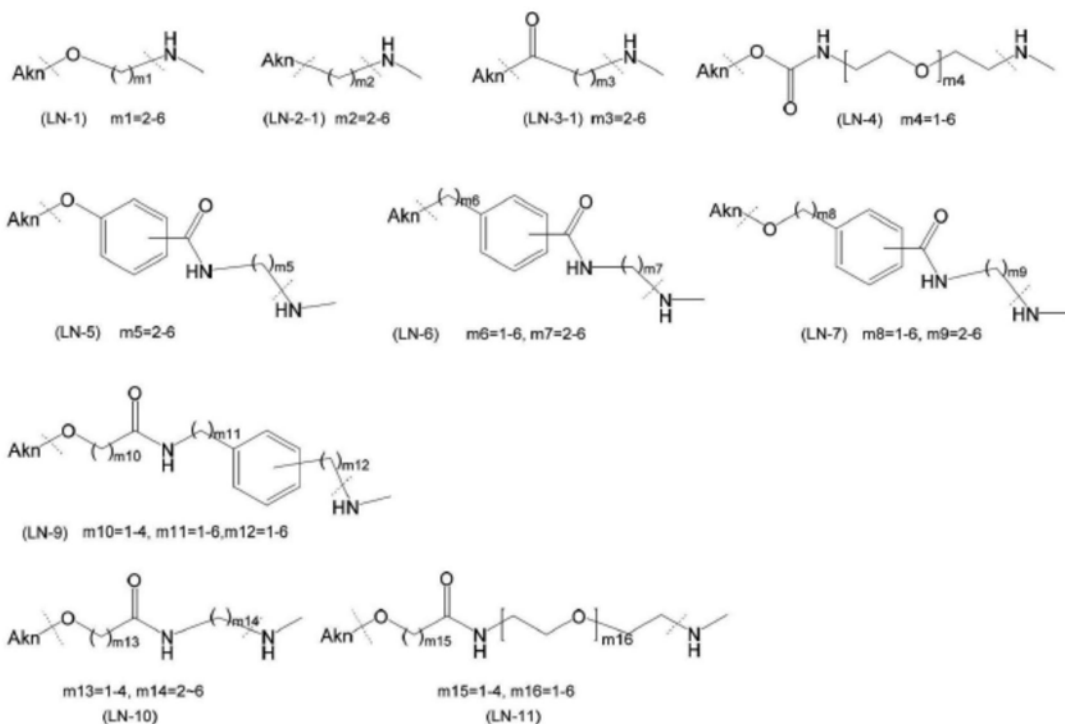
[0467] [化学式88]

[0468]



[0469] [7-1b]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选:- $L^1$ -为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

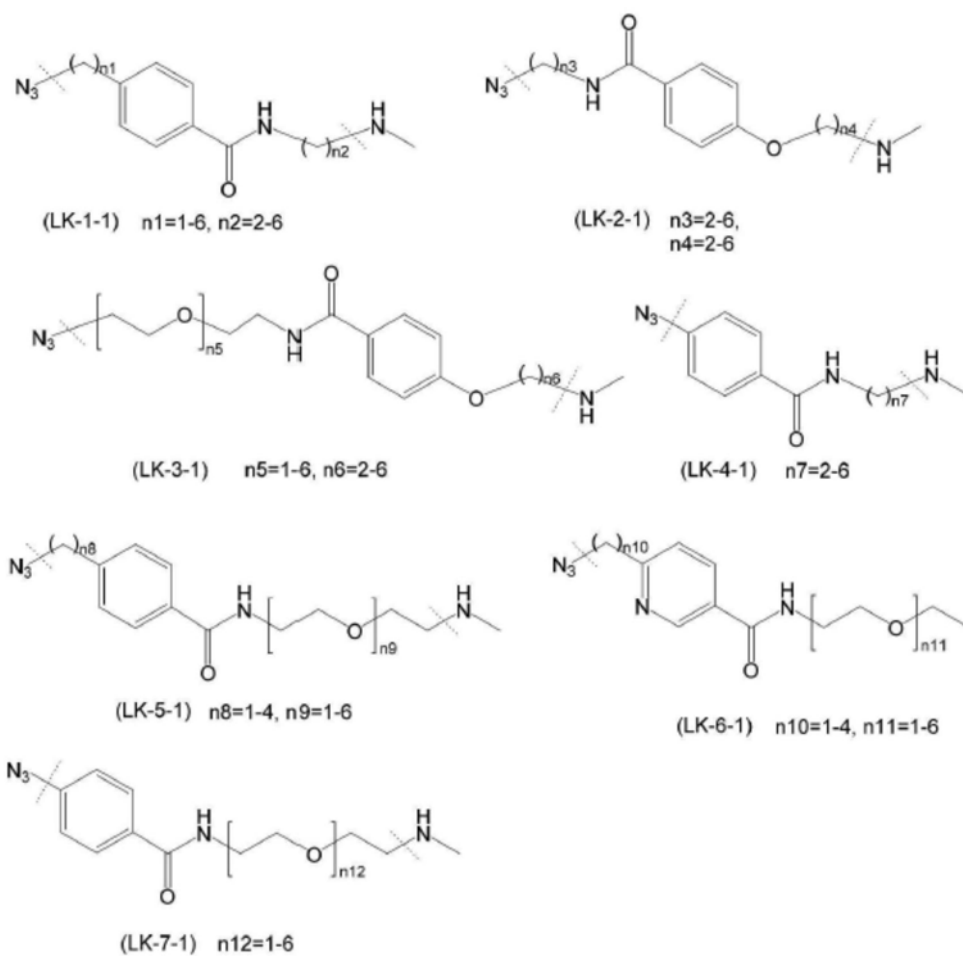
[0470] [化学式89]



[0471]

[0472] -L<sup>2</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

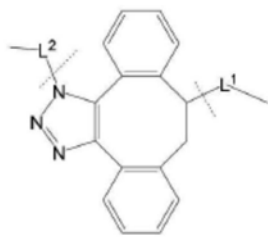
[0473] [化学式90]



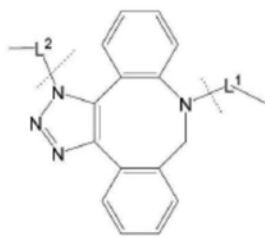
[0474]

[0475] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧)]:

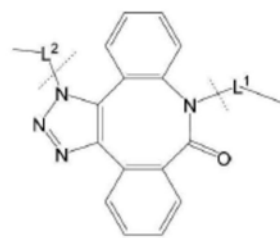
[0476] [化学式91]



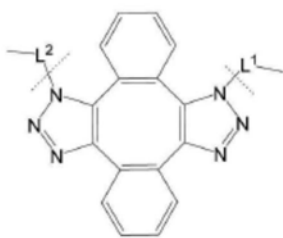
(TZ-1)



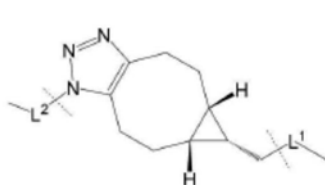
(TZ-2)



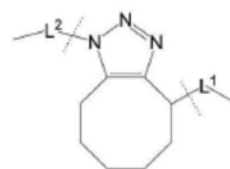
(TZ-3)



(TZ-4)

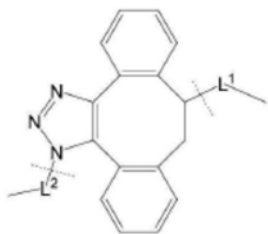


(TZ-5)

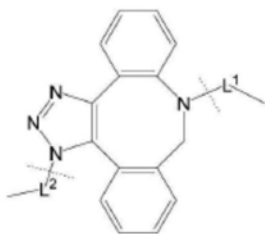


(TZ-6)

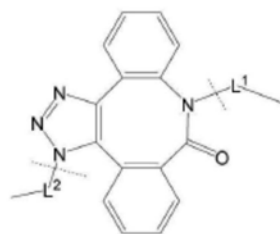
[0477]



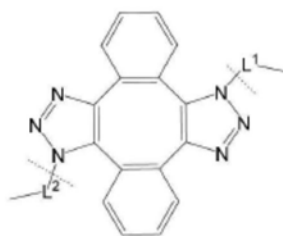
(TZ-1-r)



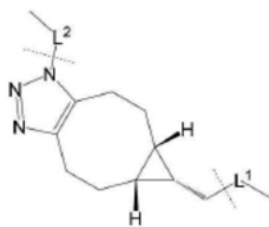
(TZ-2-r)



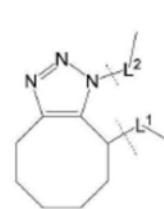
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



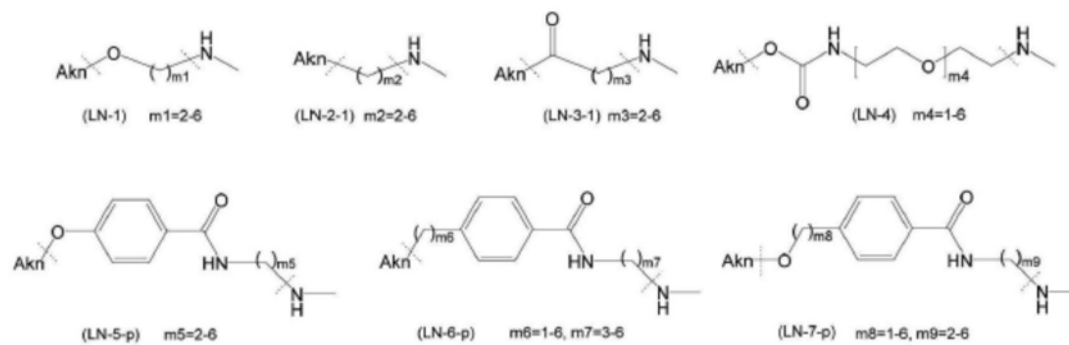
(TZ-5-r)



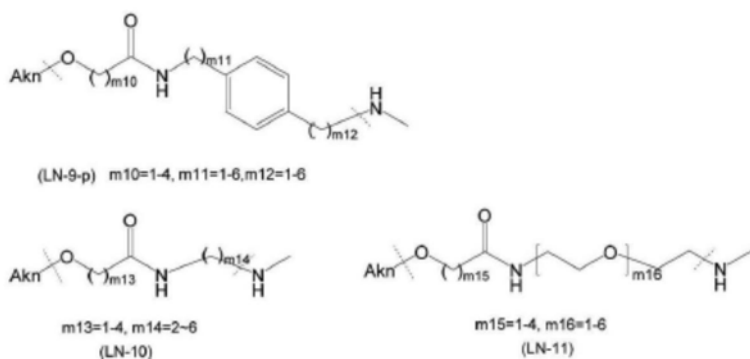
(TZ-6-r)

[0478] [7-2b]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,更优选: -L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

[0479] [化学式92]



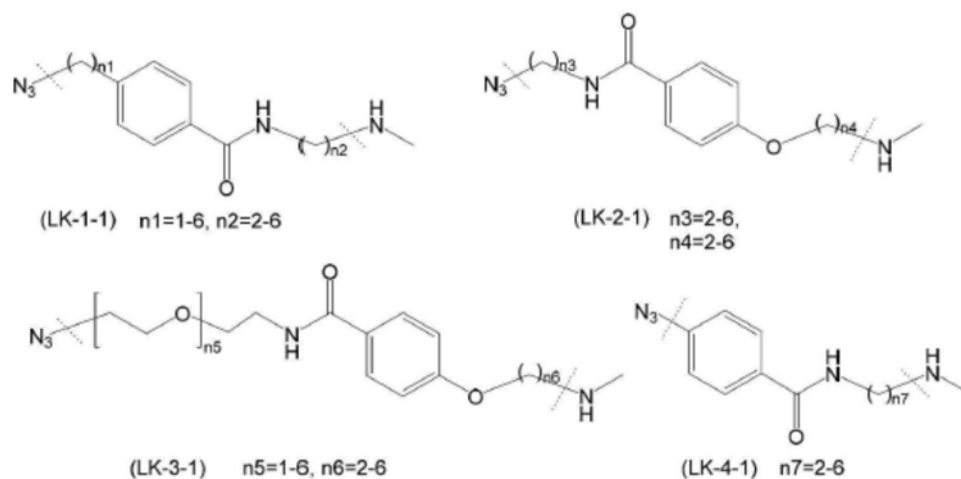
[0480]



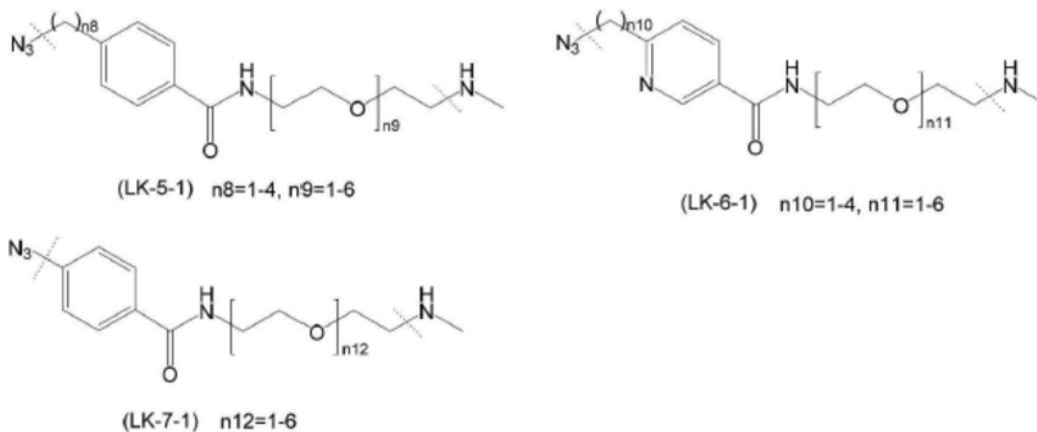
;

[0481] -L<sup>2</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头[各式中,不包括两端的波浪线外侧]:

[0482] [化学式93]



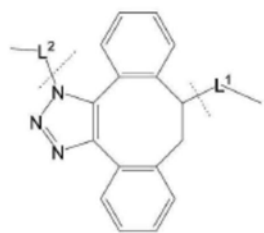
[0483]



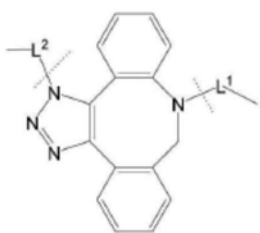
;

[0484] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧)]:

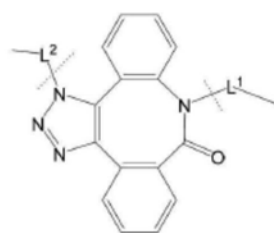
[0485] [化学式94]



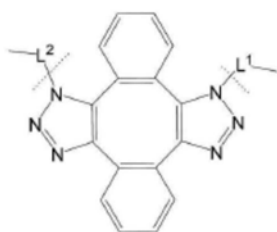
(TZ-1)



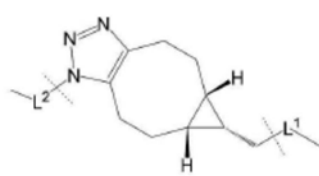
(TZ-2)



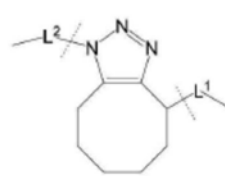
(TZ-3)



(TZ-4)

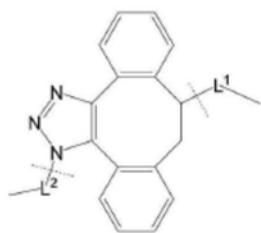


(TZ-5)

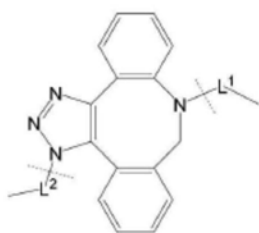


(TZ-6)

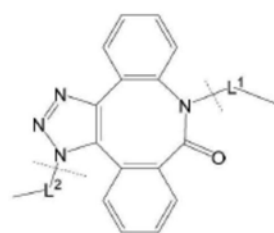
[0486]



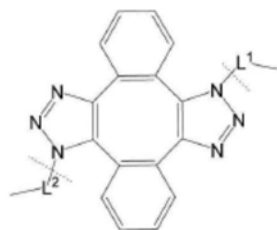
(TZ-1-r)



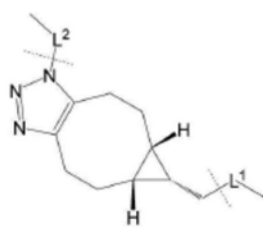
(TZ-2-r)



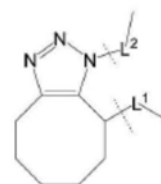
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

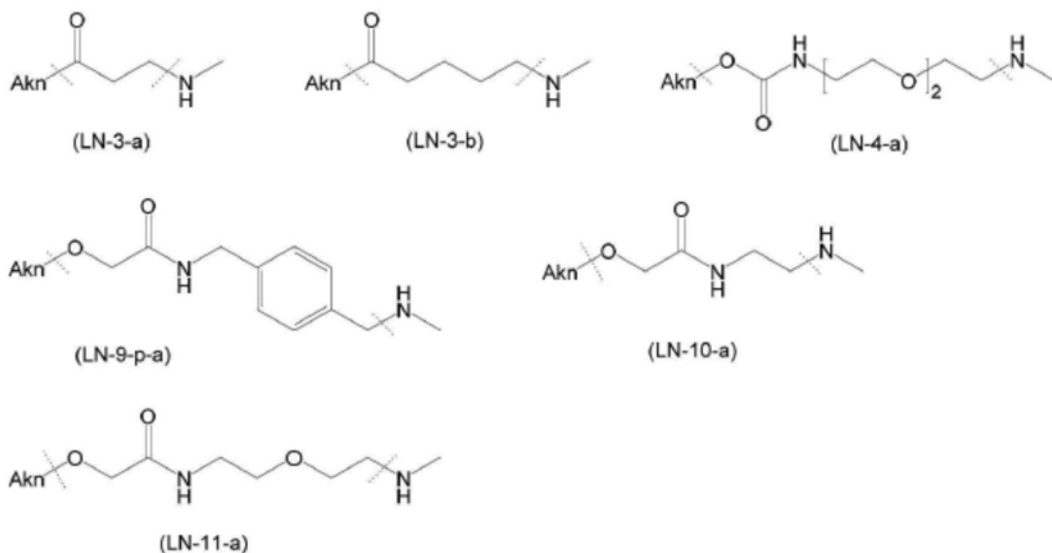


(TZ-6-r)

。

[0487] [7-3b]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,进一步优选:-L<sup>1</sup>-为选自下述部分结构式[各式中,不包括两端的波浪线外侧]的2价接头:

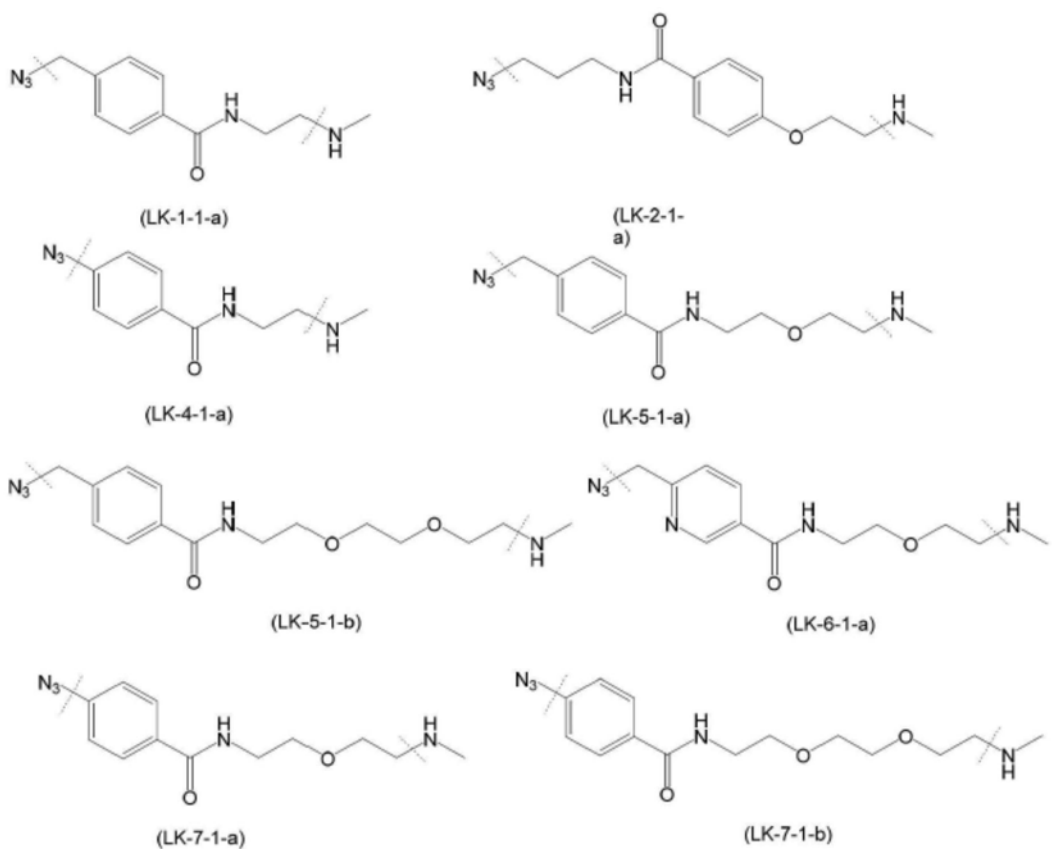
[0488] [化学式95]



;

[0490] -L<sup>2</sup>-为选自下述部分结构式的2价接头(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0491] [化学式96]

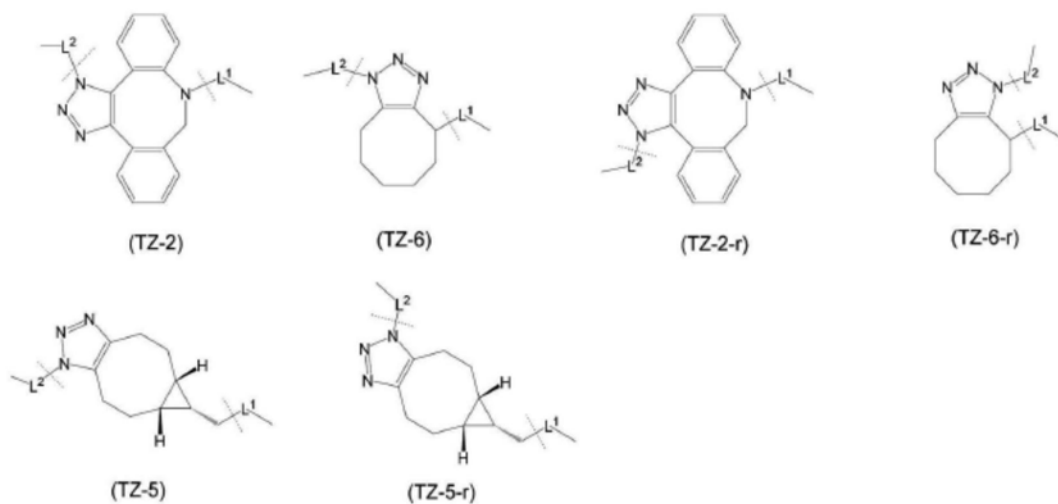


;

[0493] X为选自下述部分结构式的环状基团(各式中,不包括两端的波浪线外侧):

[0494] [化学式97]

[0495]



[0496] [7-4b]在上述方案[7]的上述式(III-L)中,优选 $-L^1-X-L^2-$ 的组合如选自下表的式的组合的部分结构所示(表中的 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 或 $-X-$ 的各式如上述方案[1]、[1-1]、[1-1a]、[1-1b]、[1-1b]、[4]、[4-1]、[4-1a]、[4-1b]、[7] [7-1]、[7-2]、[7-3]、[7-3-1]、[7-1a]、[7-2a]、[7-3a]、[7-3a-1]、[7-1b]、[7-2b]和[7-3b]所记载):

[0497] [表5-1]

[0498]

-L <sup>1</sup> -	-X-	-L <sup>2</sup> -	-L <sup>1</sup> -	-X-	-L <sup>2</sup> -
LN-3-a	TZ-2	LK-1-1-a	LN-3-b	TZ-2	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-2-r	LK-1-1-a		TZ-2-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5	LK-1-1-a		TZ-5	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5-r	LK-1-1-a		TZ-5-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6	LK-1-1-a		TZ-6	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a

[0499] [表5-2]

[0500]

	TZ-6-r	LK-7-1-b		TZ-6-r	LK-7-1-b
		LK-1-1-a			LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
LN-4-a	TZ-5	LK-1-1-a	LN-9-p-a	TZ-5	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5-r	LK-1-1-a		TZ-5-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6	LK-1-1-a		TZ-6	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6-r	LK-1-1-a		TZ-6-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
LN-10-a	TZ-5	LK-1-1-a	LN-11-a	TZ-5	LK-1-1-a

[0501] [表5-3]

[0502]

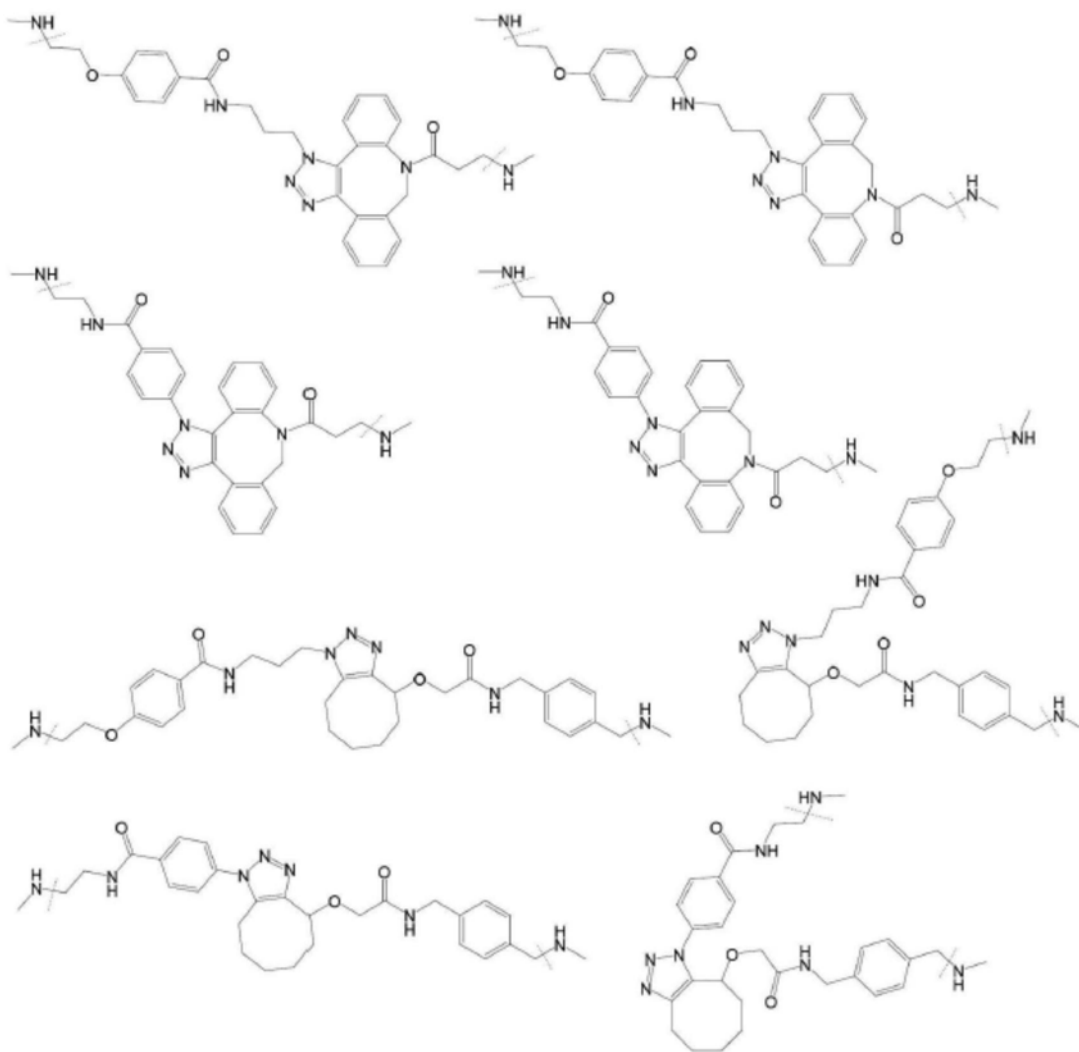
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5-r	LK-1-1-a		TZ-5-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6	LK-1-1-a		TZ-6	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6-r	LK-1-1-a		TZ-6-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b

;

[0503] 更优选-L<sup>2</sup>-X-L<sup>1</sup>-的组合如选自下述部分结构式[式中,不包括两端的波浪线外侧]的部分结构所示:

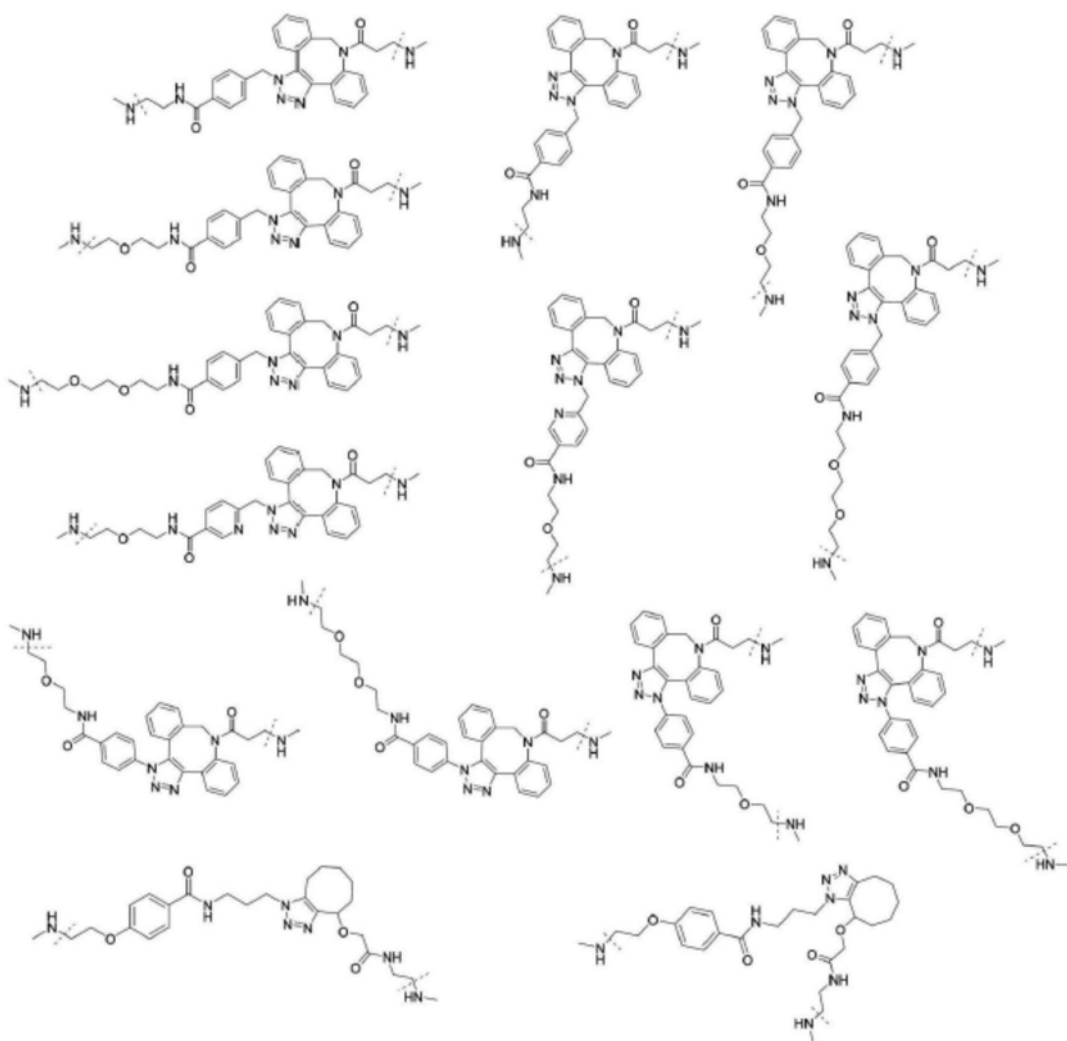
[0504] [化学式98]

[0505]



[0506] [化学式99]

[0507]



[0508] 通过将方案[7]的优选方案、以及 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 和X的定义适当组合,可任意地形成上述方案[7]的交联海藻酸的优选方案。

[0509] [8]海藻酸衍生物的第8方案如下。制造交联海藻酸的方法,该方法包括:将上述方案[1]所述的式(I)的海藻酸衍生物和上述方案[4]所述的式(II)的海藻酸衍生物混合以进行Huisgen反应,从而得到上述方案[7]所述的交联海藻酸。

[0510] [8-1]第8-1的方案如下。交联海藻酸,其包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联和通过钙离子部分地形成的离子交联作为交联。

[0511] [9]海藻酸衍生物的第9方案如下。交联海藻酸结构体,其是通过将混合有上述方案[1]所述的式(I)的海藻酸衍生物和上述方案[4]所述的式(II)的海藻酸衍生物的海藻酸衍生物的混合溶液滴加到氯化钙溶液中而得到的。

[0512] [10]海藻酸衍生物的第10方案如下。上述方案[9]所述的交联海藻酸结构体,其包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联和通过钙离子部分地形成的离子交联作为交联。

[0513] [11]海藻酸衍生物的第11方案如下。制造交联海藻酸结构体的方法,该方法包括:将混合有上述方案[1]所述的式(I)的海藻酸衍生物和上述方案[4]所述的式(II)的海藻酸衍生物的海藻酸衍生物的混合溶液滴加到氯化钙溶液中,以得到上述方案[9]或[10]所述的交联海藻酸结构体。

[0514] [12]海藻酸衍生物的第12方案如下。上述方案[9]或[10]所述的交联海藻酸结构体,该结构体为平板形凝胶。

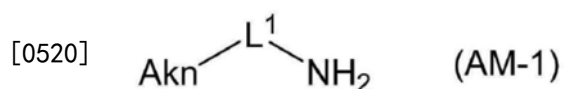
[0515] [13]海藻酸衍生物的第13方案如下。医疗用材料,该材料包含上述方案[9]、[10]和[12]中任一项所述的交联海藻酸结构体。

[0516] [14]海藻酸衍生物的第14方案如下。上述方案[13]所述的医疗用材料,该材料为平板形凝胶。

[0517] [15]海藻酸衍生物的第15方案如下。上述方案[1]~[6]中任一项所述的海藻酸衍生物、上述方案[7]或[8-1]所述的交联海藻酸、以及上述方案[9]、[10]和[12]中任一项所述的交联海藻酸结构体,它们均具有生物适应性。

[0518] [16]第16方案如下。下述式(AM-1)所表示的氨基化合物、或其药学上可接受的盐、或它们的溶剂合物:

[0519] [化学式100]



[0521] [式(AM-1)中, -L<sup>1</sup>-和Akn的组合为下表的任一个组合(各式与上述方案[1]的定义相同)]:

[0522] [表6-1]

[0523]

Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -
AK-1	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-5	LN-6
AK-2	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-6	LN-6
AK-6	LN-1	AK-7	LN-6
AK-7	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-8	LN-6
AK-8	LN-1	AK-9	LN-6
AK-9	LN-1	AK-10	LN-6 (其中, 除外对位取代、m6=1、m7=2)
AK-10	LN-1	AK-11	LN-6
AK-12	LN-1	AK-12	LN-6
AK-1	LN-2	AK-1	LN-7
AK-2	LN-2	AK-2	LN-7
AK-3	LN-2	AK-6	LN-7
AK-4	LN-2	AK-7	LN-7
AK-5	LN-2	AK-8	LN-7
AK-6	LN-2	AK-9	LN-7
AK-7	LN-2	AK-10	LN-7
AK-8	LN-2	AK-12	LN-7
AK-9	LN-2	AK-1	LN-8
AK-10	LN-2	AK-2	LN-8
AK-11	LN-2	AK-3	LN-8
AK-12	LN-2 (其中, 除外m2=1)	AK-4	LN-8
AK-1	LN-3	AK-5	LN-8
AK-2	LN-3 (其中, 除外m3=2)	AK-6	LN-8
AK-3	LN-3 (其中, 除外m3=1、2、3、5)	AK-7	LN-8
AK-4	LN-3 (其中, 除外m3=1)	AK-8	LN-8
AK-5	LN-3	AK-10	LN-8
AK-6	LN-3	AK-11	LN-8
AK-7	LN-3	AK-12	LN-8
AK-8	LN-3	AK-1	LN-9
AK-9	LN-3	AK-2	LN-9

[0524] [表6-2]

[0525]

Akn	-L1-	Akn	-L1-
AK-10	LN-3	AK-6	LN-9
AK-11	LN-3 (其中, 除外m3=1)	AK-7	LN-9
AK-12	LN-3	AK-8	LN-9
AK-1	LN-4 (其中, 除外m4=2、3)	AK-9	LN-9
AK-2	LN-4 (其中, 除外m4=2、4)	AK-10	LN-9
AK-6	LN-4 (其中, 除外m4=2、3、4)	AK-12	LN-9
AK-7	LN-4	AK-1	LN-10
AK-8	LN-4	AK-2	LN-10 (其中, 除外m13=1、m14=2)
AK-9	LN-4	AK-6	LN-10
AK-10	LN-4	AK-7	LN-10
AK-12	LN-4	AK-8	LN-10
AK-1	LN-5	AK-9	LN-10
AK-2	LN-5	AK-10	LN-10
AK-6	LN-5	AK-12	LN-10
AK-7	LN-5	AK-1	LN-11
AK-8	LN-5	AK-2	LN-11 (其中, 除外m15=1、m16=2)
AK-9	LN-5	AK-6	LN-11
AK-10	LN-5	AK-7	LN-11
AK-12	LN-5	AK-8	LN-11
AK-1	LN-6	AK-9	LN-11
AK-2	LN-6	AK-10	LN-11
AK-3	LN-6	AK-12	LN-11
AK-4	LN-6		

。

[0526] [16-1]在上述方案[16]的上述式(AM-1)中,优选Akn-L<sup>1</sup>-的组合为下表的任一个组合(各式如上述方案[1-1]、[1-2]、[1-1a]、[1-2a]、[1-1b]、和[1-2b]所记载):

[0527] [表7]

[0528]

Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -
AK-1	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-3	LN-6
AK-2	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-4	LN-6
AK-6	LN-1	AK-5	LN-6
AK-1	LN-2-1	AK-6	LN-6
AK-2	LN-2-1	AK-1	LN-7
AK-3	LN-2-1	AK-2	LN-7
AK-4	LN-2-1	AK-6	LN-7
AK-5	LN-2-1	AK-1	LN-8
AK-6	LN-2-1	AK-2	LN-8
AK-1	LN-3-1	AK-3	LN-8
AK-2	LN-3-1 (其中, 除外m3=2)	AK-4	LN-8
AK-3	LN-3-1 (其中, 除外m3=2、3、5)	AK-5	LN-8
AK-4	LN-3-1	AK-6	LN-8
AK-5	LN-3-1	AK-1	LN-9
AK-6	LN-3-1	AK-2	LN-9
AK-1	LN-4 (其中, 除外m4=2、3)	AK-6	LN-9
AK-2	LN-4 (其中, 除外m4=2、4)	AK-1	LN-10
AK-6	LN-4 (其中, 除外m4=2、3、4)	AK-2	LN-10 (其中, 除外m13=1、m14=2)
AK-1	LN-5	AK-6	LN-10
AK-2	LN-5	AK-1	LN-11
AK-6	LN-5	AK-2	LN-11 (其中, 除外m15=1、m16=2)
AK-1	LN-6	AK-6	LN-11
AK-2	LN-6		

;

[0529] 更优选为下表的任一个组合(各式与上述方案[1-1]、[1-2]、[1-1a]、[1-2a]、[1-1b]和[1-2b]的定义相同):

[0530] [表8]

[0531]

Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -
AK-1	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-1	LN-6-p
AK-6	LN-1	AK-3	LN-6-p
AK-1	LN-2-1	AK-6	LN-6-p
AK-3	LN-2-1	AK-1	LN-7-p
AK-6	LN-2-1	AK-6	LN-7-p
AK-1	LN-3-1	AK-1	LN-9-p
AK-3	LN-3-1 (其中, 除外m3=2、3、5)	AK-6	LN-9-p
AK-6	LN-3-1	AK-1	LN-10
AK-1	LN-4 (其中, 除外m4=2、3)	AK-6	LN-10
AK-6	LN-4 (其中, 除外m4=2、3、4)	AK-1	LN-11
AK-1	LN-5-p	AK-6	LN-11
AK-6	LN-5-p		

;

[0532] 进一步优选为下表的任一个组合(各式与上述方案[1-1]、[1-2]、[1-1a]、[1-2a]、[1-1b]和[1-2b]的定义相同):

[0533] [表9]

[0534]

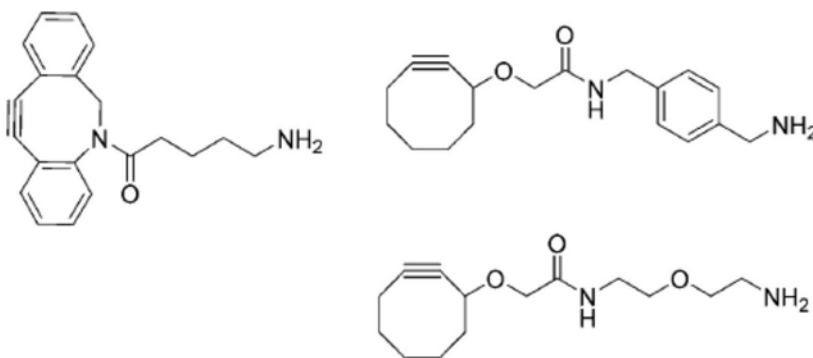
Akn	-L <sup>1</sup> -	Akn	-L <sup>1</sup> -
AK-1	LN-1 (其中, 除外m1=2)	AK-6	LN-9-p-a
AK-6	LN-1	AK-1	LN-10
AK-1	LN-3-a	AK-6	LN-10
AK-3	LN-3-1 (其中, 除外m3=2、3、5)	AK-1	LN-11
AK-6	LN-3-a	AK-6	LN-11
AK-1	LN-9-p-a		

;

[0535] 例如,如下述结构式中的任一个结构式所示:

[0536] [化学式101]

[0537]



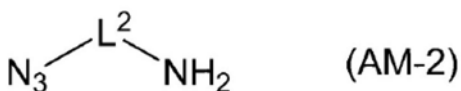
。

[0538] 通过将方案[16]的优选方案、以及Akn和-L<sup>1</sup>-的定义适当组合,可任意地形成上述方案[16]的氨基化合物、或其药学上可接受的盐、或它们的溶剂合物的优选方案。

[0539] [17]第17方案如下。下述式(AM-2)所表示的氨基化合物、或其药学上可接受的盐、或它们的溶剂合物:

[0540] [化学式102]

[0541]



(AM-2)

[0542] [式(II)中,  $-L^2-$ 为式(LK-1)(其中,除外式中苯环的取代方式为对位取代、 $n_1=1$ 和 $n_2=3$ )、式(LK-2)、式(LK-3)、式(LK-4)(其中,除外式中苯环的取代方式为间位取代、 $n_7=3$ 、以及式中苯环的取代方式为对位取代、 $n_7=2,3,4,6$ )、式(LK-5)(其中,除外式中苯环的取代方式为对位取代、 $n_8=1$ 和 $n_9=2$ )、式(LK-6)和式(LK-7)[各式与上述方案[4]的定义相同]]。

[0543] [17-1]在上述方案[17]的上述式(AM-2)中,优选 $-L^2-$ 为式(LK-1-1)(其中,式中除外 $n_1=1$ 和 $n_2=3$ )、式(LK-2-1)、式(LK-3-1)、式(LK-4-1)(其中,除外 $n_7=2,3,4,6$ )、式(LK-5-1)(其中,式中除外 $n_8=1$ 和 $n_9=2$ )、式(LK-6-1)和式(LK-7-1)[各式与上述方案[4-1]、[4-1a]或[4-1b]的定义相同];

[0544] 更优选为式(LK-1-1-a)、式(LK-2-1-a)、式(LK-3-1-a)、式(LK-5-1-a)、式(LK-6-1-a)、式(LK-7-1-a)和式(LK-7-1-b)[各式与上述方案[4-1]、[4-1a]或[4-1b]的定义相同]。

[0545] 通过将方案[17]的优选方案、以及叠氮基和 $-L^2-$ 的定义适当组合,可任意地形成上述方案[17]的氨基化合物、或其药学上可接受的盐、或它们的溶剂合物的优选方案。

[0546] 以下,对海藻酸衍生物的各方案进行更详细地说明。

#### [0547] 1.海藻酸

[0548] 本说明书中,在记载为海藻酸的情况下,是指选自海藻酸、海藻酸酯、以及它们的盐(例如,海藻酸钠)的至少1种海藻酸(有时称为“海藻酸类”)。使用的海藻酸可来自天然也可以是合成物,优选来自天然。优选使用的海藻酸类是由巨藻(Lessonia)、巨藻属(macrocystis)、昆布属(Laminaria)、泡叶藻属(Ascophyllum)、褐藻公牛藻属(Durvillaea)、杜父鱼(Cottus pollux)、爱森藻(Eisenia bicyclis)、昆布等褐藻类萃取的生物体内吸收性多糖类,是D-甘露糖醛酸(M)和L-古罗糖醛酸(G)这2种糖醛酸聚合成直链状而得的聚合物。更具体而言,是D-甘露糖醛酸的均聚物组分(MM组分)、L-古罗糖醛酸的均聚物组分(GG组分)、以及D-甘露糖醛酸和L-古罗糖醛酸随机排列而得的组分(M/G组分)任意结合而成的嵌段共聚物。

[0549] 本说明书中,将海藻酸记作(ALG)、将海藻酸的任意羧基之一记作 $-COOH$ ,海藻酸有时表述为(ALG)- $-COOH$ 。

[0550] 在若干方案中,海藻酸为海藻酸钠。海藻酸钠可使用市售品的海藻酸钠。这里,在后述的实施例中,海藻酸钠使用下表中记载的A-1、A-2、A-3、B-1、B-2和B-3的海藻酸钠(销售方:持田制药株式会社)。各海藻酸钠的1w/w%的水溶液的粘度、重均分子量和M/G比见下表。

[0551] [表10]

海藻酸钠	1w/w%的粘度 (mPa · s)	重均分子量		M/G比
		GPC	GPC-MALS	
A-1	10~40	300,000 ~ 700,000	60,000 ~ 130,000	0.5~1.8
A-2	50~150	700,000 ~ 1,400,000	130,000 ~ 200,000	
A-3	300~600	1,400,000 ~ 2,000,000	200,000 ~ 400,000	
B-1	10~40	150,000 ~ 800,000	60,000 ~ 130,000	0.1~0.5
B-2	70~150	800,000 ~ 1,500,000	130,000 ~ 200,000	
B-3	400~600	1,500,000 ~ 2,500,000	200,000 ~ 350,000	

[0552] 上述海藻酸钠A-1、A-2、A-3、B-1、B-2和B-3的各物性值通过下述的各种方法进行测定。测定方法并不限于该方法，有时各物性值根据测定方法而不同于上述的物性值。

[0554] [海藻酸钠的粘度测定]

[0555] 按照日本药典(第16版)的粘度测定法，利用旋转粘度计法(锥板型旋转粘度计)进行测定。具体的测定条件如下。样品溶液的调制使用MilliQ水来进行。测定仪器使用锥板型旋转粘度计(粘度粘弹性测定装置Rheostress RS600 (Thermo Haake GmbH) 传感器:35/1)。测定1w/w%的海藻酸钠溶液时，转速设为1rpm。读取时间测定2分钟，取从开始1分钟到2分钟的平均值。以3次测定的平均值作为测定值。测定温度设为20℃。

[0556] [海藻酸钠的重均分子量测定]

[0557] 通过(1)凝胶渗透色谱(GPC)和(2)GPC-MALS这2种测定方法进行测定。测定条件如下。

[0558] [预处理方法]

[0559] 在样品中加入洗脱液进行溶解，之后用0.45μm薄膜过滤器进行过滤，以所得滤液作为测定溶液。

[0560] (1)凝胶渗透色谱(GPC)测定

[0561] [测定条件(相对分子量分布测定)]

[0562] 柱:TSKgel GMPW-XL×2+G2500PW-XL(7.8mm I.D.×300mm×3根)；

[0563] 洗脱液:200mM的硝酸钠水溶液；

[0564] 流量:1.0mL/分钟；

[0565] 浓度:0.05%；

[0566] 检测器:RI检测器；

[0567] 柱温:40℃；

[0568] 注入量:200μL；

[0569] 分子量标准:标准普鲁兰多糖、葡萄糖。

[0570] (2)GPC-MALS测定

[0571] [折射率增量(dn/dc)测定(测定条件)]

- [0572] 差示折射率计:Optilab T-rEX;
- [0573] 测定波长:658nm;
- [0574] 测定温度:40℃;
- [0575] 溶剂:200mM的硝酸钠水溶液;
- [0576] 样品浓度:0.5~2.5mg/mL (5个浓度)。
- [0577] [测定条件(绝对分子量分布测定)]
- [0578] 柱:TSKgel GMPW-XL×2+G2500PW-XL (7.8mm I.D.×300mm×3根);
- [0579] 洗脱液:200mM的硝酸钠水溶液;
- [0580] 流量:1.0mL/分钟;
- [0581] 浓度:0.05%;
- [0582] 检测器:RI检测器、光散射检测器(MALS);
- [0583] 柱温:40℃;
- [0584] 注入量:200μL。
- [0585] 本说明书中,在海藻酸、海藻酸衍生物、交联海藻酸、以及交联海藻酸的分子量中,有时附注Da(道尔顿)作为单位。
- [0586] 海藻酸类的D-甘露糖醛酸与L-古罗糖醛酸的构成比(M/G比)主要根据海藻等作为来源的生物的种类而不同,另外,还受其生物的生长场所或季节的影响,遍布M/G比为约0.2的高G型~M/G比为约5的高M型的宽范围。已知海藻酸类的凝胶化能力和生成的凝胶的性质受M/G比的影响,通常在G比率高的情况下凝胶强度变高。此外,M/G比还对凝胶的硬度、脆性、吸水性、柔软性等产生影响。使用的海藻酸类和/或其盐的M/G比通常为0.2~4.0、更优选为0.4~3.0、进一步优选为0.5~3.0。
- [0587] 本说明书中,用“~”显示的数值范围表示分别包括“~”前后所记载的数值作为最小值和最大值的范围。
- [0588] 本说明书中,对使用的“海藻酸酯”、“海藻酸盐”没有特别限定,因为与交联剂反应,所以要求不具有抑制交联反应的官能团。作为海藻酸酯,优选列举:海藻酸丙二醇酯等。
- [0589] 本说明书中,作为海藻酸盐,例如可列举:海藻酸的1价盐、海藻酸的2价盐。作为海藻酸的1价盐,优选列举:海藻酸钠、海藻酸钾、海藻酸铵等,更优选为海藻酸钠或海藻酸钾,特别优选为海藻酸钠。作为海藻酸的2价盐,优选列举:海藻酸钙、海藻酸镁、海藻酸钡、海藻酸锶等。
- [0590] 海藻酸为高分子多糖类,难以准确地确定分子量,通常以重均分子量计为1000~1000万、优选为1万~800万、更优选为2万~300万的范围。已知在来自天然物的高分子物质的分子量测定中,根据测定方法,可使值产生差异。
- [0591] 例如,通过凝胶渗透色谱(GPC)或凝胶过滤色谱(也将它们一并称为体积排阻色谱法)测定的重均分子量优选为10万以上、更优选为50万以上,另外,优选为500万以下、更优选为300万以下。其优选范围是10万~500万、更优选为15万~300万。
- [0592] 另外,例如可根据GPC-MALS法测定绝对重均分子量。通过GPC-MALS法测定的重均分子量(绝对分子量)优选为1万以上、更优选为5万以上、进一步优选为6万以上,另外,优选为100万以下、更优选为80万以下、进一步优选为70万以下、特别优选为50万以下。其优选范围是1万~100万、更优选为5万~80万、进一步优选为6万~70万、特别优选为6万~50万。

[0593] 通常,在利用如上所述的方法计算高分子多糖类的分子量的情况下,可产生10%~20%的测定误差。例如,如果是40万,则可在32万~48万左右的范围产生值的变动,如果是50万,则可在40万~60万左右的范围产生值的变动,如果是100万,则可在80万~120万左右的范围产生值的变动。

[0594] 海藻酸类的分子量的测定可按照常规方法进行测定。

[0595] 在分子量测定中采用凝胶过滤色谱的情况下,代表性的条件如后述的本说明书的实施例所述。柱例如可使用Superose6 Increase10/300GL柱(GE Healthcare Sciences公司),例如可使用含有0.15mol/L NaCl的10mmol/L的磷酸缓冲液(pH7.4)作为展开溶剂,可使用蓝色葡聚糖、甲状腺球蛋白、铁蛋白、醛缩酶、伴清蛋白、卵清蛋白、核糖核酸酶A和抑肽酶作为分子量标准。

[0596] 对本说明书中使用海藻酸的粘度没有特别限定,在以1w/w%的海藻酸类的水溶液的形式测定粘度的情况下,优选为10mPa·s~1000mPa·s、更优选为50mPa·s~800mPa·s。

[0597] 海藻酸的水溶液的粘度测定可按照常规方法进行测定。例如,可使用旋转粘度计法的同轴双圆筒形旋转粘度计、单圆筒形旋转粘度计(Brookfield型粘度计)、圆锥-平板形旋转粘度计(锥板型粘度计)等进行测定。希望优选依据日本药典(第16版)的粘度测定法。更优选使用锥板型粘度计。

[0598] 海藻酸类在由褐藻类萃取之初分子量大、粘度升高,但在热干燥、纯化等过程中分子量变小、粘度降低。通过制造步骤的温度等条件管理、作为原料的褐藻类的选择、制造步骤中的分子量的分馏等方法,可制造分子量不同的海藻酸类。而且,通过与具有不同的分子量或粘度的另一批次的海藻酸类混合,还可制得具有目标分子量的海藻酸类。

[0599] 本说明书中使用海藻酸,在若干方案中是未进行低内毒素处理的海藻酸,或者在其他的若干方案中是进行了低内毒素处理的海藻酸。低内毒素是指内毒素水平低至实质上不会引起炎症或发热的程度。希望更优选为进行了低内毒素处理的海藻酸类。

[0600] 低内毒素处理可通过已知方法或基于此的方法进行。例如,可按照菅等人的纯化透明质酸钠的方法(例如,参照日本特开平9-324001号公报等)、吉田等人的纯化 $\beta$ 1,3-葡聚糖的方法(例如,参照日本特开平8-269102号公报等)、William等人的纯化海藻酸盐、结冷胶等生物高分子盐的方法(例如,参照日本特表2002-530440号公报等)、James等人的纯化多糖的方法(例如,参照国际公开第93/13136号小册子等)、Lewis等人的方法(例如,参照美国专利第5589591号说明书等)、Herman Frank等人的纯化海藻酸盐的方法(例如,参照Appl Microbiol Biotechnol (1994) 40:638-643等)等或基于这此的方法进行实施。低内毒素处理并不限于这些,还可通过洗涤、过滤器(去除内毒素的过滤器或带电的过滤器等)的过滤、超滤、使用柱(内毒素吸附亲和柱、凝胶过滤柱、离子交换树脂柱等)的纯化、吸附于疏水性物质、树脂或活性炭等、有机溶剂处理(有机溶剂萃取、通过添加有机溶剂进行的析出/沉淀等)、表面活性剂处理(例如,参照日本特开2005-036036号公报等)等已知的方法、或将它们适当组合来实施。在这些处理步骤中,可适当组合离心分离等已知的方法。希望结合海藻酸的种类适当选择。

[0601] 内毒素水平可通过已知的方法进行确认,例如,可通过基于鲎试剂(LAL)的方法、使用Endospecy(注册商标)ES-24S Set(生化学工业株式会社)的方法等进行测定。

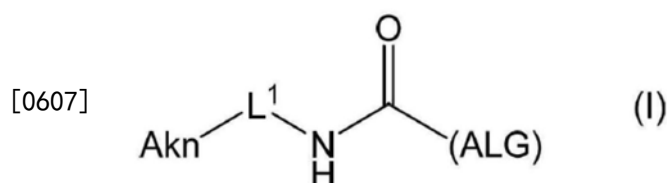
[0602] 对使用的内毒素的处理方法没有特别限定,其结果,在使用鲎试剂(LAL)进行内毒素测定的情况下,海藻酸类的内毒素含量优选为500内毒素单位(EU)/g以下、进一步优选为100EU/g以下、尤其优选为50EU/g以下、特别优选为30EU/g以下。进行了低内毒素处理的海藻酸钠例如可通过Sea Matrix(注册商标)(持田制药株式会社)、PRONOVA<sup>TM</sup> UP LVG(FMCBioPolymer)等市售品获取。

[0603] 2.海藻酸衍生物

[0604] 本说明书中提供新型的海藻酸衍生物。本说明书中,作为海藻酸衍生物,是经由酰胺键和2价接头向海藻酸的任意1个以上的羧基中引入了Huisgen反应中的反应性基团或该反应性基团的互补性反应性基团而得的海藻酸衍生物。

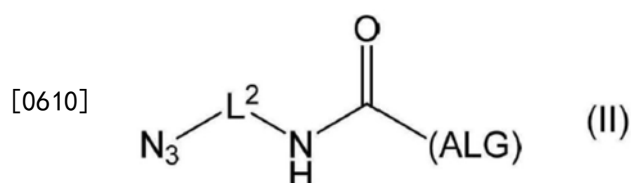
[0605] 更具体而言,是下述式(I)所表示的海藻酸衍生物和下述式(II)所表示的海藻酸衍生物:

[0606] [化学式103]



[0608] [式(I)中,(ALG)、-L<sup>1</sup>-、Akn的定义与上述第1方案中的定义相同];

[0609] [化学式104]

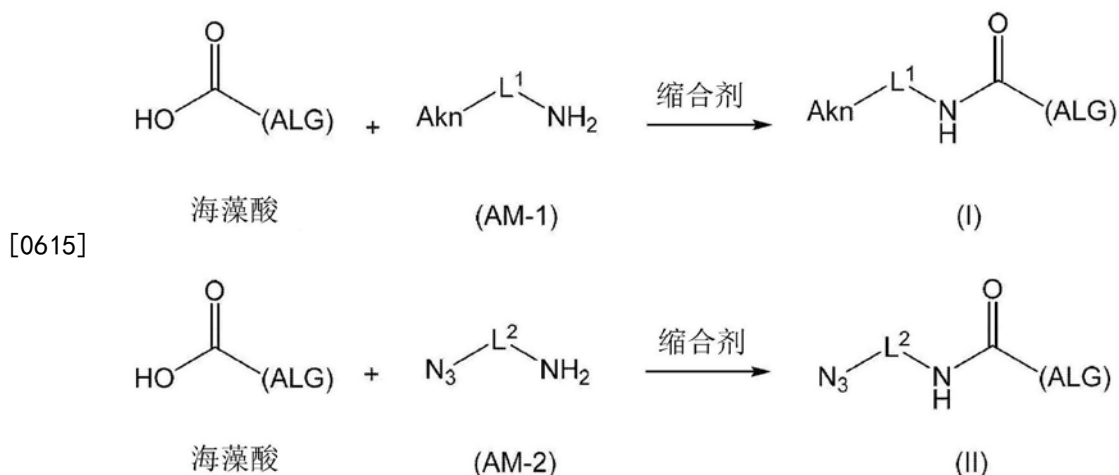


[0611] [式(II)中,(ALG)、-L<sup>2</sup>-的定义与上述第4方案中的定义相同]。

[0612] 上述的2价接头(-L<sup>1</sup>-或-L<sup>2</sup>-)只要不阻碍反应性基团和与该反应性基团互补的反应性基团的反应即可,可使用任意的直链状基团。具体而言,可列举:直链亚烷基(-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、n=1~30)(该基团中的-CH<sub>2</sub>-可被-C(=O)-、-CONH-、-O-、-NH-、-S-、苯环、杂环(吡啶环、哌啶环、哌嗪环等5~6元芳族杂环或5~6元非芳族杂环)等多个(例如,1~10个、或1~5个)基团取代,该-CH<sub>2</sub>-的氢原子可被选自桥氧基(=O)、C<sub>1-6</sub>烷基(例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基等基团)、卤原子(例如,氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等)、羟基(-OH)等基团的多个(例如,1~10个、或1~5个)基团取代)。

[0613] 本说明书中的作为新型海藻酸衍生物的式(I)和式(II)所表示的海藻酸衍生物例如可通过下述式的方法(详情参照后述的常规制造方法)进行制造。

[0614] [化学式105]



[0616] 本说明书的式(I)或式(II)所表示的海藻酸衍生物的重均分子量为10万Da~300万Da、优选为30万Da~250万Da、更优选为50万Da~200万Da。这两种海藻酸衍生物的分子量可通过后述的方法求出。

[0617] 本说明书中,式(I)的Akn-L<sup>1</sup>-NH-基无需与海藻酸构成单元的全部羧基结合,而且式(II)的N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH-基也无需与海藻酸构成单元的全部羧基结合。

[0618] 本说明书中,在将式(I)的Akn-L<sup>1</sup>-NH-基称为反应性基团的情况下,式(II)的N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH-基成为互补的反应性基团。反之,在将式(II)的N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH-基称为反应性基团的情况下,式(I)的Akn-L<sup>1</sup>-NH-基成为互补的反应性基团。

[0619] 本说明书中,反应性基团或互补的反应性基团的引入率分别为0.1%~30%或1%~30%、优选为2%~20%、更优选为3%~10%。

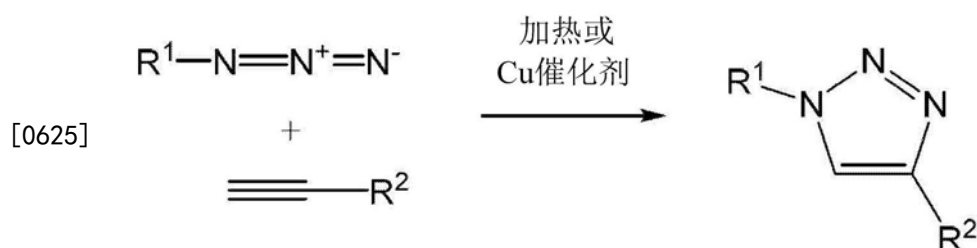
[0620] 上述反应性基团或互补的反应性基团的引入率是指,在海藻酸类的重复单元即糖醛酸单糖单元中,引入了各反应性基团的糖醛酸单糖单元的数以百分率表示而得的值。本说明书中,只要没有特别说明,则海藻酸衍生物(式(I)或式(II))中的反应性基团或互补的反应性基团的引入率中使用的%是指mol%。各反应性基团或互补的反应性基团的引入率可通过后述的实施例中记载的方法求出。

[0621] 本说明书中,式(I)中的环状炔基(Akn)和式(II)中的叠氮基通过Huisgen反应形成三唑环,由此形成交联。

[0622] 3.Huisgen反应

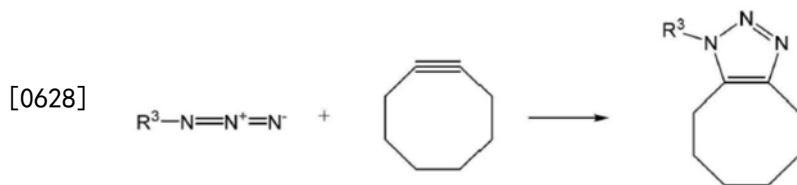
[0623] Huisgen反应(1,3-偶极环加成反应)是如下述式所示具有末端叠氮基和末端炔基的化合物间的缩合反应。反应的结果,以高收率得到二取代1,2,3-三唑环,具有不产生多余的副产物的特征。虽然认为该反应可生成1,4-或1,5-二取代三唑环,但通过使用铜催化剂,可位置选择性地得到三唑环。

[0624] [化学式106]



[0626] 另外,由Wittig和Krebs报道了不使用铜催化剂的Huisgen反应。即,是仅通过混合环辛炔和叠氮苯即可得到环加成物的反应(下述式中, $R^3$ =苯基)。该反应因环辛炔的三键发生大的应变,故通过与叠氮苯反应而产生的应变的消除成为驱动力,反应自发地进行,从而不需要催化剂。

[0627] [化学式107]



[0629] 如上所述,Huisgen反应可使用:具有被取代的伯叠氮基、仲叠氮基、叔叠氮基、芳族叠氮基等的叠氮化合物;以及具有作为叠氮基的互补的反应性基团的末端或环状炔基的化合物。另外,在Huisgen反应中,由于基本上是仅叠氮基和炔基发生反应,所以在反应基质中可取代各种官能团(例如,酯基、羧基、烯基、羟基、氨基等)。

[0630] 在若干方案中,在为了不产生不希望的副产物、避免铜催化剂引起的细胞毒性而不使用铜催化剂的情况下,为了在短时间内、容易且有效地在海藻酸分子间形成基于1,2,3-三唑环的交联,作为Huisgen反应的炔基,例如使用上述方案[1]中记载的环状炔基(环辛基)。

[0631] 在优选方案的海藻酸衍生物交联方法中,通过该反应(Huisgen反应)几乎没有形成不希望的副产物。这种情况下,在使用了海藻酸的新型形态的生物适应性材料的制作、以及海藻酸水凝胶的形成中,可摄入各种生物活性分子,并且,可在用于重建外科或用于基因疗法的海藻酸水凝胶中摄入细胞物质。

[0632] 4. 交联海藻酸

[0633] 交联海藻酸有:(i)经由2价金属离子键形成的交联海藻酸、(ii)经由化学键形成的交联海藻酸、或者(iii)经由2价金属离子键和化学键两者形成的交联海藻酸。每一种交联海藻酸都具有形成凝胶状~半固体、根据情况为海绵样形态的特性。

[0634] 经由2价金属离子键形成的交联海藻酸以超高速进行反应且可逆,相对于此,经由化学键形成的交联海藻酸在比较温和的条件下平稳地进行反应且不可逆。交联海藻酸的物性例如可通过变更所使用的含有2价金属离子的水溶液(例如,氯化钙水溶液)的浓度、或引入到海藻酸中的反应性基团的引入率等方法进行调整。

[0635] 通过利用上述的交联反应,可制作各种海藻酸结构体。例如,通过离子交联反应,可由海藻酸溶液瞬间地制作特定的结构体,为了强化该结构体的结构(例如,获得长期稳定性等),可利用基于化学键的交联反应。另外,例如在经由2价金属离子键和化学键两者形成的交联海藻酸结构体中,通过离子交联摄入的2价金属离子可逆地释放,还可制作仅残留有基于化学键的交联的结构体。

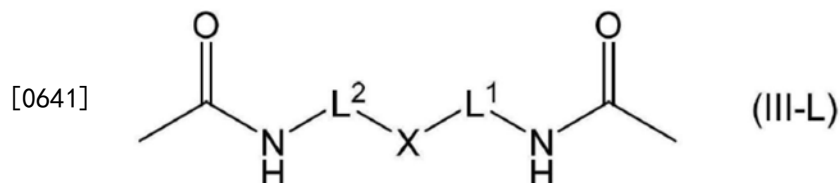
[0636] 需要说明的是,使用了优选方案的海藻酸衍生物交联海藻酸结构体因包含基于化学键的交联而具有稳定性,与使用了海藻酸钠的仅离子交联的交联海藻酸结构体相比,可长期维持形状,是有利的。

[0637] 某方案的交联海藻酸可通过混合上述式(I)和上述式(II)的海藻酸衍生物进行Huisgen反应而获得。

[0638] 某方案的交联海藻酸经由化学交联(基于由炔基和叠氮基形成的三唑环的交联)形成三维网眼结构。优选的海藻酸衍生物,其交联后的交联海藻酸的稳定性有所改善。

[0639] 若干方案的交联海藻酸是第1海藻酸的任意羧基与第2海藻酸的任意羧基间经由下述式(III-L)形成酰胺键而得的交联海藻酸:

[0640] [化学式108]



[0642] [式(III-L)中,两端的-CONH-和-NHCO-表示经由海藻酸的任意羧基形成的酰胺键;-L<sup>1</sup>-、-L<sup>2</sup>-和X与上述第7方案中的定义相同]。

[0643] 在若干方案中,调制交联海藻酸时的、式(I)的海藻酸衍生物与式(II)的海藻酸衍生物的混合比以式(I)的衍生物与式(II)的衍生物的重量比计,例如为1~1.5:1、优选为1.2~1.5:1或1~1.2:1、更优选为1:1。

[0644] 在若干方案中,调制交联海藻酸时的、式(II)的海藻酸衍生物与式(I)的海藻酸衍生物的混合比以式(II)的衍生物与式(I)的衍生物的重量比计,例如为1~4.0:1、优选为1.5~4.0:1或1.2~1.5:1或1~1.2:1、更优选为1:1。

[0645] 在若干方案中,调制交联海藻酸时的、式(I)的海藻酸衍生物与式(II)的海藻酸衍生物的混合比更优选以式(I)的海藻酸衍生物与式(II)的海藻酸衍生物的反应性基团的引入率(mol%)比计,例如为1~1.5:1、优选为1.2~1.5:1或1~1.2:1、更优选为1:1。

[0646] 在若干方案中,调制交联海藻酸时的、式(II)的海藻酸衍生物与式(I)的海藻酸衍生物的混合比更优选以式(II)的海藻酸衍生物与式(I)的海藻酸衍生物的反应性基团的引入率(mol%)比计,例如为1~4.0:1、优选为1.5~4.0:1或1.2~1.5:1或1~1.2:1、更优选为1:1。

[0647] 尚需说明的是,在上述混合比中,也可将式(I)的海藻酸衍生物替换成式(II)的海藻酸衍生物、将式(II)的海藻酸衍生物替换成式(I)的衍生物。

[0648] 交联海藻酸无需海藻酸的构成单元的全部羧基均具有上述式(III-L)的交联。交联海藻酸中的上述式(III-L)所表示的交联的引入率(也称作交联率)例如为0.1~80%、0.3~60%、0.5~30%、或1.0~10%的范围。

[0649] 用于获得交联海藻酸的Huisgen反应中的式(I)或式(II)的海藻酸衍生物的浓度通常为1~500mg/mL、优选为5~100mg/mL的范围。

[0650] Huisgen反应的反应温度通常为外温4~60℃、优选为外温15~40℃的范围。

[0651] 用于形成交联海藻酸(水凝胶)的搅拌时间例如为数秒~24小时、数秒~12小时、数秒~30分钟、或数秒~10分钟。

[0652] 对用于Huisgen反应的反应溶剂或反应溶液没有特别限定,例如可列举:自来水、纯水(例如,蒸馏水、离子交换水、RO水、RO-EDI水等)、超纯水、细胞培养用培养基、磷酸缓冲生理盐水(PBS)和生理盐水等,优选为超纯水。

[0653] 若干方案的交联海藻酸是包含基于通过Huisgen反应形成的三唑环的化学交联、和通过钙离子部分地形成的离子交联作为交联的交联海藻酸。

[0654] 5. 交联海藻酸结构体

[0655] 交联海藻酸结构体可通过包括对上述海藻酸衍生物实施交联反应的方法来获得。例如,可通过以下的方法来调制,但并不限于这些。

[0656] [混合法]

[0657] 通过将混合式(I)的海藻酸衍生物和式(II)的海藻酸衍生物而得的海藻酸衍生物的混合溶液滴加到含有2价金属离子的溶液中,可得到交联海藻酸结构体,该结构体是形成有化学交联(基于通过Huisgen反应由炔基和叠氮基形成的三唑环的交联)和离子交联(通过2价金属离子部分地形成的交联)的特定结构体。

[0658] [涂层法]

[0659] 将含有式(I)的海藻酸衍生物的溶液滴加到含有2价金属离子的溶液中等,得到部分地交联的特定结构体。通过将上述得到的例如凝胶等结构体添加至上述的含有式(II)的海藻酸衍生物的溶液中,对上述结构体的表面等施行进一步的交联反应(Huisgen反应),从而可得到交联海藻酸结构体。尚需说明的是,该方法也可将式(I)的海藻酸衍生物替换成式(II)的海藻酸衍生物、将式(II)的海藻酸衍生物替换成式(I)的海藻酸衍生物来实施。

[0660] 对上述方法中使用的2价金属离子没有特别限定,例如可列举:钙离子、镁离子、钡离子、锶离子、锌离子等,优选为钙离子。

[0661] 对上述方法中使用的含有钙离子的溶液没有特别限定,例如可列举:氯化钙水溶液、碳酸钙水溶液、葡萄糖酸钙水溶液等水溶液,优选为氯化钙水溶液。

[0662] 对上述方法中使用的含有钙离子的溶液的钙离子浓度没有特别限定,例如可列举:1mM~1M,优选为5mM~500mM、更优选为10mM~300mM。

[0663] 对上述方法中使用的溶剂或溶液也没有特别限定,例如可列举:自来水、纯水(例如,蒸馏水、离子交换水、RO水、RO-EDI水等)、超纯水、细胞培养用培养基、磷酸缓冲生理盐水(PBS)和生理盐水等,优选为超纯水。

[0664] 作为特定的交联海藻酸结构体,例如可列举:纤维状结构体、纤维、珠粒、凝胶、近似球形的凝胶等。优选的交联海藻酸结构体,其稳定性有所改善。另外,交联海藻酸结构体可具有在其内部保持内容物的能力(内容物保持性)。

[0665] 海藻酸凝胶的物性可通过硬度、弹性、斥力、断裂力、断裂时应力等物性值来调节。

[0666] 6. 海藻酸衍生物、光交联海藻酸衍生物的生物适应性

[0667] 本说明书中,海藻酸衍生物或光交联海藻酸结构体具有生物适应性。本说明书中,生物适应性是指不会引起生物体用材料(这里是指式(I)所表示的引入了光反应性基团的海藻酸衍生物、以及使用该海藻酸衍生物制造的光交联海藻酸结构体)与生物体间的相互作用、与上述生物体用材料相邻的组织局部反应、或全身反应等反应的性质,即具有生物适应性(biocompatibility)。

[0668] 本说明书中,关于海藻酸衍生物或光交联海藻酸结构体的生物适应性,可通过后述的与生物适应性相关的实施例来确认。

[0669] 7. 交联海藻酸结构体的稳定性

[0670] 交联海藻酸结构体的稳定性例如可通过测定凝胶稳定性等来确认,而透过性可通过测定凝胶透过率等来确认。

[0671] [凝胶稳定性的测定方法]

[0672] 对装在容器中的交联海藻酸结构体凝胶添加磷酸缓冲生理盐水(PBS),测定泄漏到PBS中的海藻酸的浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。用测得的海藻酸浓度除以通过分解交联海藻酸结构体凝胶而得的总海藻酸浓度,所得值以百分率表示,以得到的值作为崩解率。具体而言,凝胶稳定性可通过后述的实施例中记载的方法求出。

[0673] 本说明书中,交联海藻酸结构体的凝胶崩解率优选为0%~90%、更优选为0%~70%、进一步优选为0%~50%。交联海藻酸结构体的稳定性意味着:泄漏到水溶液中的海藻酸的浓度越低、即凝胶崩解率越低,则稳定性就越高。

[0674] [凝胶透过率的测定方法]

[0675] 制作内包有异硫氰酸荧光素-葡聚糖的交联海藻酸结构体凝胶,对装在容器中的上述凝胶添加生理盐水,测定泄漏到生理盐水中的葡聚糖浓度。用测得的葡聚糖浓度除以通过分解内包异硫氰酸荧光素-葡聚糖的交联海藻酸结构体凝胶而得的总葡聚糖浓度,所得值以百分率表示,得到的值为凝胶透过率。具体而言,凝胶透过率可通过后述的实施例中记载的方法求出。

[0676] 关于交联海藻酸在添加生理盐水24小时后的凝胶透过率,例如在内包有分子量为200万的葡聚糖的情况下,优选为0%~90%、更优选为0%~70%、进一步优选为0%~50%。另外,在内包有分子量为15万的葡聚糖的情况下,例如如果该交联海藻酸结构体凝胶的使用目的为蛋白或抗体的释放/产生,则优选为1%~100%、更优选为10%~100%、进一步优选为30%~100%。另外,如果使用目的为免疫隔壁,则优选为0%~90%、更优选为0%~70%、进一步优选为0%~50%。

[0677] 交联海藻酸结构体的透过性意味着:透过率越低,则内容物或凝胶外物质的透过性就越低;透过率越高,则内容物或凝胶外物质的透过性就越高。

[0678] 凝胶的透过率可通过所使用的海藻酸的分子量、浓度、引入到海藻酸中的交联基的种类或引入率、用于凝胶化的2价金属离子的种类或浓度、或它们的组合来调整。

[0679] [内包有内容物的交联海藻酸结构体凝胶的调制方法]

[0680] 例如,内包有异硫氰酸荧光素-葡聚糖作为内容物的交联海藻酸结构体凝胶可通过以下的方法进行调制。

[0681] (1) 混合式(I)所表示的海藻酸衍生物的溶液和异硫氰酸荧光素-葡聚糖溶液。

[0682] (2) 向通过(1)得到的混合溶液中混合式(II)所表示的海藻酸衍生物的溶液。

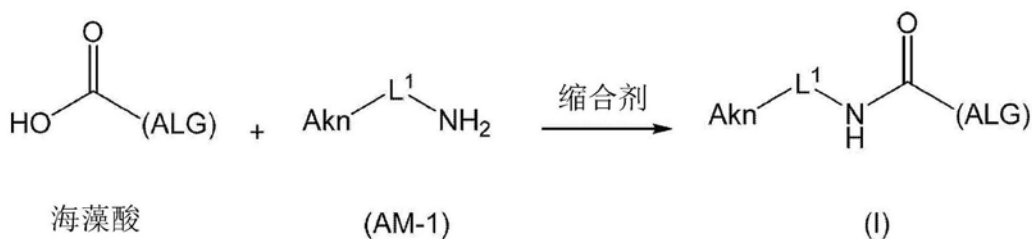
[0683] (在将(1)的式(I)变更为式(II)的情况下,(2)的式(II)变更为式(I))

[0684] (3) 将通过(2)得到的混合溶液滴加到含有钙离子的溶液中,所得凝胶在溶液中形成化学交联和离子交联,从而得到内包异硫氰酸荧光素-葡聚糖的交联海藻酸结构体凝胶。

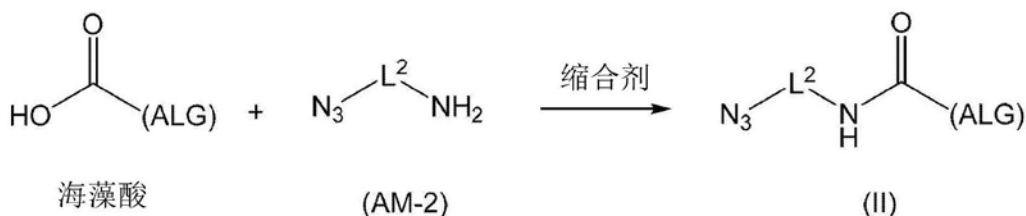
[0685] 8. 海藻酸衍生物的合成方法

[0686] 在本说明书中,式(I)或式(II)所表示的海藻酸衍生物可分别通过使 $\text{H}_2\text{N}-\text{L}^1-\text{Akn}$ (式中, $\text{L}^1$ 和 $\text{Akn}$ 与上述方案[1]中的定义相同)所表示的胺衍生物(AM-1)、或 $\text{H}_2\text{N}-\text{L}^2-\text{N}_3$ (式中, $\text{L}^2$ 与上述方案[4]中的定义相同)所表示的胺衍生物(AM-2)与海藻酸类的任意羧基经过使用缩合剂的缩合反应来制造。

[0687] [化学式109]



[0688]



[0689] [式(I)的海藻酸衍生物的制造方法]

[0690] 使用0.5重量%~1重量%的海藻酸水溶液和式(AM-1)所表示的胺,依据文献已知的方法、例如“实验化学讲座,第5版16,有机化合物的合成IV、羧酸和衍生物、酯类,第35-70页,酸酰胺和酸酰亚胺,第118-154页,氨基酸/肽,第258-283页,2007年,丸善”等中记载的方法,在选自1,3-二环己基碳化二亚胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(WSC/HCl)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP试剂)、双(2-氧代-3-噁唑烷基)次磷酰氯(BOP-Cl)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎓六氟磷酸盐(CIP)、或氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)等的缩合剂的存在下,在不析出海藻酸的程度的选自四氢呋喃、1,4-二噁烷等醚系溶剂、甲醇、乙醇、2-丙醇等醇系溶剂、N,N-二甲基甲酰胺等极性溶剂等的溶剂与水的混合溶剂中,在碳酸氢钠、碳酸钠等无机碱、或三乙胺、吡啶等有机碱的存在下或不存在下,在0℃~50℃间的温度下进行缩合反应,从而可制造式(I)的海藻酸衍生物。

[0691] [式(II)的海藻酸衍生物的制造方法]

[0692] 使用0.5重量%~1重量%的海藻酸水溶液和式(AM-2)所表示的胺,依据上述的[式(I)的海藻酸衍生物的制造方法]进行反应,从而可制造式(II)的海藻酸衍生物。

[0693] 在上述式(I)的海藻酸衍生物或式(II)的海藻酸衍生物的制造方法中,关于式(AM-1)或式(AM-2)的胺的引入率,可考虑该胺的性质等,通过适当选择下述(i)~(v)等反应条件并组合来调节。(i)缩合剂的等量的增减、(ii)反应温度的上升/下降、(iii)反应时间的延长/缩短、(iv)反应基质的海藻酸的浓度调整、(v)为了提高式(AM-1)或式(AM-2)的胺的溶解度而添加混合于水的有机溶剂等。

[0694] 以下,在式(AM-1)或式(AM-2)所表示的胺中,给出更具体的胺的制造方法。

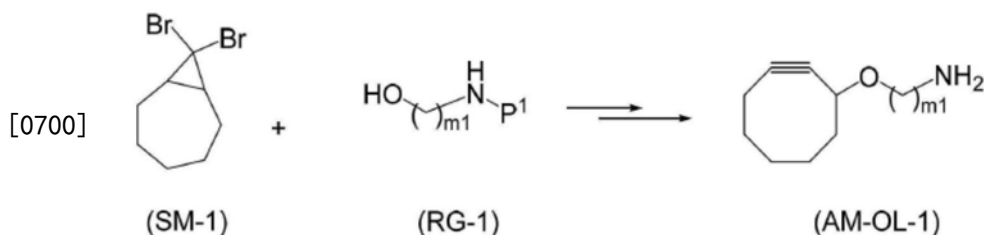
[0695] 尚需说明的是,在以下的各制造方法中, $R^A$ =甲基、乙基等 $C_{1\sim6}$ 烷基; $P^1$ 为选自-C(=O)O-叔丁基、-C(=O)O-Bn基、-C(=O)CH<sub>3</sub>基、-C(=O)CF<sub>3</sub>基等的氨基的保护基; $P^2$ 为选自-C(=O)O-叔丁基、-C(=O)O-Bn基、-C(=O)CH<sub>3</sub>基、-C(=O)CF<sub>3</sub>基、-SO<sub>2</sub>Ph、-SO<sub>2</sub>PhMe基、-SO<sub>2</sub>Ph(NO<sub>2</sub>)基等的氨基的保护基;E=卤原子(氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等)、-OTs基、-OMs基等离去基团。

[0696] 另外,在以下的各制造方法中,保护基 $P^1$ 和 $P^2$ 的保护/脱保护可依据文献已知的方法、例如“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis第4版)第4版,2007年,John Wiley&Sons, Greene等人”的期刊中记载的脱保护的方法进行保护/脱保护。

[0697] [制造方法A]

[0698] 式 (AM-OL-1) 所表示的胺的制造方法:

[0699] [化学式110]

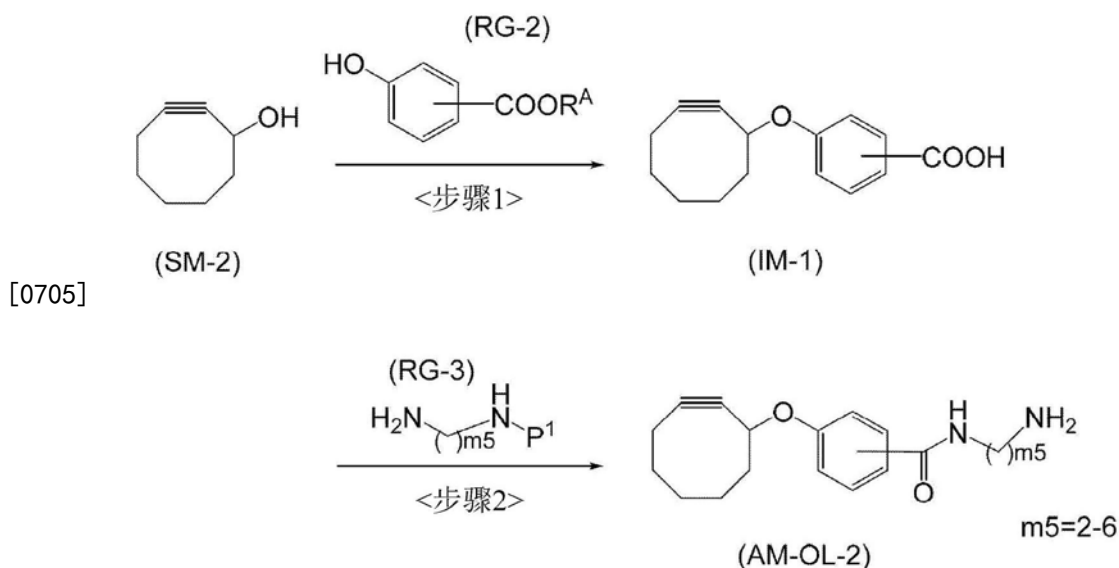


[0701] 使用式 (SM-1) 的化合物[式 (SM-1) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物]和式 (RG-1) 的化合物[式 (RG-1) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_1=2\sim 6$ 的整数],依据文献已知的方法、例如“Carbohydrate Polymers,169,第332-340页,2017年”等中记载的方法,通过 (i) 在 $\text{AgO}_3\text{SCF}_3$ 存在下,在甲苯等不参与反应的溶剂中置换 (RG-1);然后, (ii) 通过使用 DBU 进行脱溴化反应,形成炔基;以及 (iii) 对保护基 $\text{P}^1$ 进行脱保护,可制成式 (AM-OL-1) 所表示的胺化合物、或式 (AM-OL-1) 的盐。

[0702] [制造方法B]

[0703] 式 (AM-OL-2) 所表示的胺的制造方法:

[0704] [化学式111]



[0706] <步骤1>

[0707] 使用式 (SM-2) 的化合物[式 (SM-2) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物]和式 (RG-2) [式 (RG-2) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物]的化合物,依据文献已知的方法、例如“European Journal of Organic Chemistry,2014(6),第1280-1286页;2014年”等中记载的方法,通过 (i) 在 $\text{PPh}_3$ 和 $\text{N}_2(\text{CO}_2\text{CHMe}_2)_2$ 试剂的存在下,在四氢呋喃等不参与反应的溶剂中进行光延反应;然后, (ii) 在氢氧化钠等碱的存在下,在甲醇、乙醇、四氢呋喃、水等不参与反应的溶剂或它们的混合溶剂中进行水解,可制造式 (IM-1) 所表示的化合物。

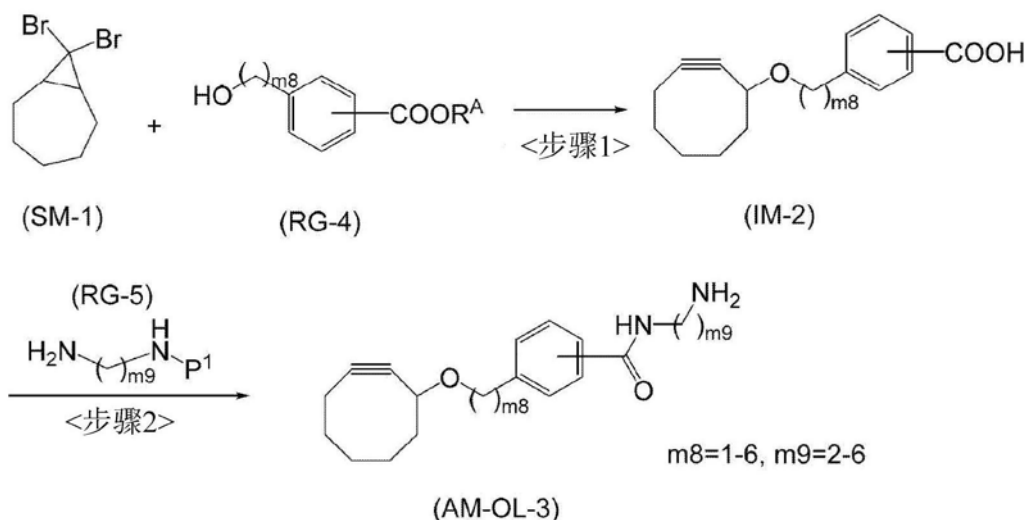
[0708] <步骤2>

[0709] 使用通过[制造方法B]<步骤1>得到的式(IM-1)的化合物和式(RG-3) [式(RG-3)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_5=2\sim 6$ 的整数]的化合物,通过(iii)进行与上述[式(I)的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应;然后,(iv)对保护基 $P^1$ 进行脱保护,可制成式(AM-OL-2)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-2)的盐。

[0710] [制造方法C]

[0711] 式(AM-OL-3)所表示的胺的制造方法:

[0712] [化学式112]



[0714] <步骤1>

[0715] 使用式(SM-1)的化合物和式(RG-4)的化合物[式(RG-4)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_8=1\sim 6$ 的整数],依据文献已知的方法、例如“Journal of the American Chemical Society,126(46),第15046-15047页,2004年”等中记载的方法,通过(i)在 $AgClO_4$ 存在下,在甲苯等不参与反应的溶剂中置换式(RG-4)的化合物;然后,(ii)通过使用NaOMe进行脱溴化反应,形成炔基;(iii)在氢氧化锂、氢氧化钠等碱的存在下,在甲醇、乙醇、四氢呋喃、水等不参与反应的溶剂或它们的混合溶剂中进行水解,可制造式(IM-2)所表示的化合物。

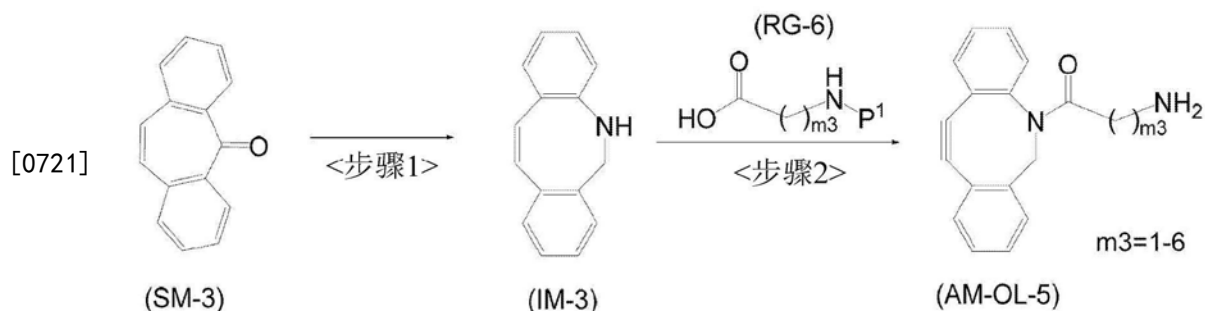
[0716] <步骤2>

[0717] 使用通过[制造方法C]<步骤1>得到的式(IM-2)的化合物和式(RG-5)的化合物[式(RG-5)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_9=2\sim 6$ 的整数],进行与上述[式(I)的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应,然后对保护基 $P^1$ 进行脱保护,从而可制成式(AM-OL-3)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-3)的盐。

[0718] [制造方法D]

[0719] 式(AM-OL-5)所表示的胺的制造方法:

[0720] [化学式113]



[0722] <步骤1>

[0723] 使用式 (SM-3) 的化合物[式 (SM-3) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物], 依据文献已知的方法、例如“Faming Zhuanli Shenqing, 104529898, 22Apr 2015年”等中记载的方法, 通过 (i) 在吡啶等碱的存在下, 在乙醇等不参与反应的溶剂中, 使  $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$  反应形成肟; 然后, (ii) 通过在  $\text{P}_2\text{O}_5$ 、甲磺酸中使五氧化二磷反应进行贝克曼重排, 形成8元环内酰胺; 然后, (iii) 在二乙醚等不参与反应的溶剂中, 使用  $\text{BH}_3$ 、 $\text{LiAlH}_4$  等还原剂进行酰氨基的还原, 从而可制造式 (IM-3) 所表示的化合物。

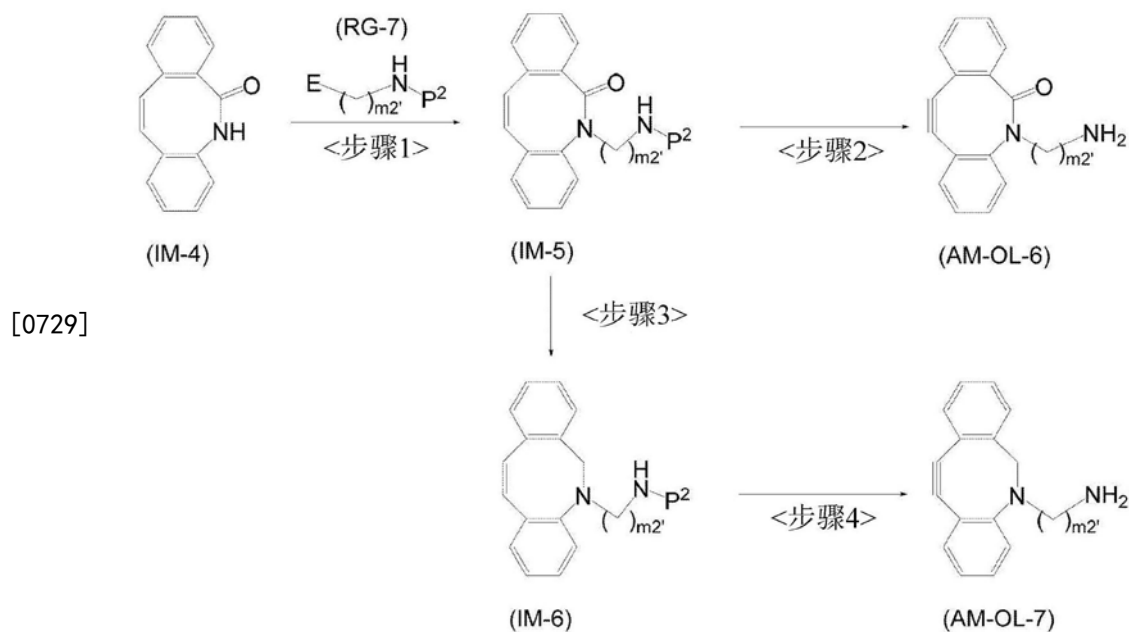
[0724] <步骤2>

[0725] 使用通过[制造方法D]<步骤1>得到的式 (IM-3) 和式 (RG-6) [式 (RG-6) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物;  $m3=1\sim6$  的整数] 的化合物, 通过 (iv) 进行与上述[式 (I) 的海藻酸衍生物的制造方法] 同样的缩合反应得到缩合体; 然后, (v) 加成溴后, 通过使用  $\text{tert-BuOK}$  进行脱溴化反应形成炔基; 然后 (vi) 对保护基  $\text{P}^1$  进行脱保护, 可制成式 (AM-OL-5) 所表示的胺化合物、或式 (AM-OL-5) 的盐。

[0726] [制造方法E]

[0727] 式 (AM-OL-6) 和式 (AM-OL-7) 所表示的胺的制造方法:

[0728] [化学式114]



[0730] <步骤1>

[0731] 使用[制造方法D]<步骤1>的 (ii) 中得到的式 (IM-4) 的化合物和式 (RG-7) 的化合

物[式(RG-7)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_2' = 2 \sim 6$ 的整数],依据文献已知的方法、例如“Synthesis, 46 (5), 第669-677页, 2014年”等中记载的方法,通过在氢氧化钠等碱和四丁基溴化铵等相转移催化剂的存在下,在甲苯等不参与反应的溶剂中进行反应,可制造式(IM-5)所表示的化合物。

[0732] <步骤2>

[0733] 在[制造方法E]<步骤1>中得到的式(IM-5)的化合物上加成溴后,通过使用tert-BuOK等碱进行脱溴化反应形成炔基,然后对保护基 $P^2$ 进行脱保护,从而可制成式(AM-OL-6)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-6)的盐。

[0734] <步骤3>

[0735] 使用[制造方法E]<步骤1>中得到的式(IM-5)的化合物,依据[制造方法D]<步骤1>的(iii)的还原法进行反应,从而可制造式(IM-6)的化合物。

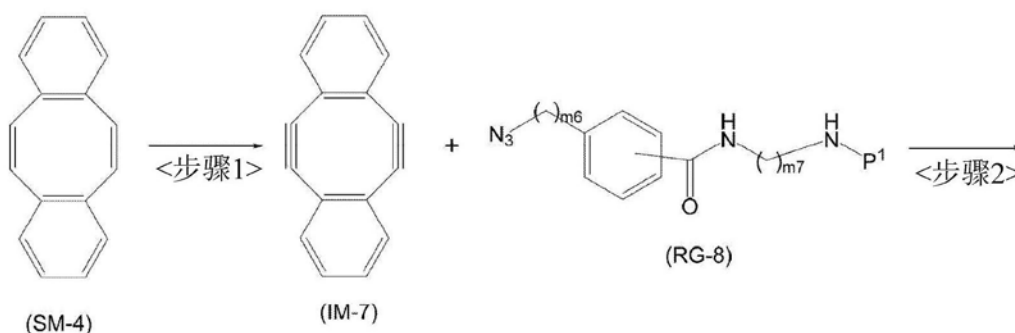
[0736] <步骤4>

[0737] 使用[制造方法E]<步骤3>中得到的式(IM-6)的化合物,与[制造方法E]<步骤2>同样地进行反应,从而可制成式(AM-OL-7)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-7)的盐。

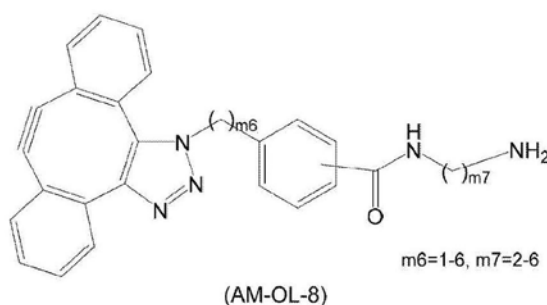
[0738] [制造方法F]

[0739] 式(AM-OL-8)所表示的胺的制造方法:

[0740] [化学式115]



[0741]



[0742] <步骤1>

[0743] 使用式(SM-4)的化合物[式(SM-4)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物],依据文献已知的方法、例如“Synthesis, (9), 第1191-1194页;2002年”等中记载的方法,在加成溴后,通过使用tert-BuOK进行脱溴化反应形成炔基,从而可制造式(IM-7)所表示的化合物。

[0744] <步骤2>

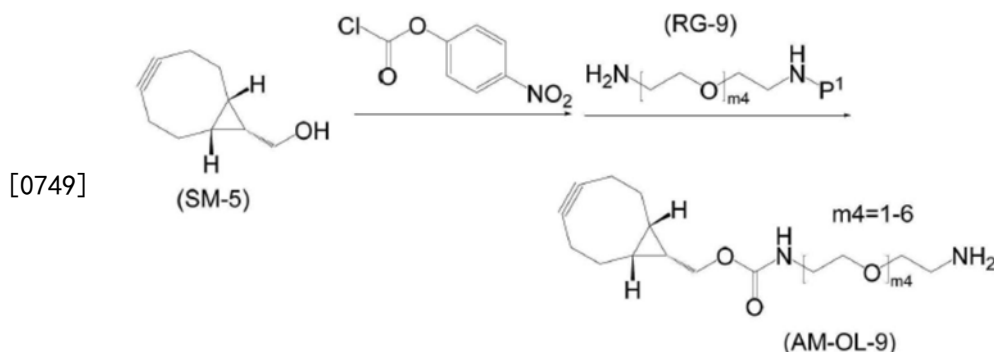
[0745] 使用[制造方法F]<步骤1>中得到的式(IM-7)的化合物和式(RG-8)的化合物[式

(RG-8)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物(详情参照后述的制造方法H); $m_6=1\sim 6$ 的整数; $m_7=2\sim 6$ 的整数],依据文献已知的方法、例如“Journal.American.Chemical.Society.,126,第15046-15047页,2004年”或“Chem.Ber.,94,第3260-3275页,1961年”等中记载的方法,进行Huisgen反应,然后对保护基 $P^1$ 进行脱保护,从而可制成式(AM-OL-8)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-8)的盐。

[0746] [制造方法G]

[0747] 式(AM-OL-9)所表示的胺的制造方法:

[0748] [化学式116]

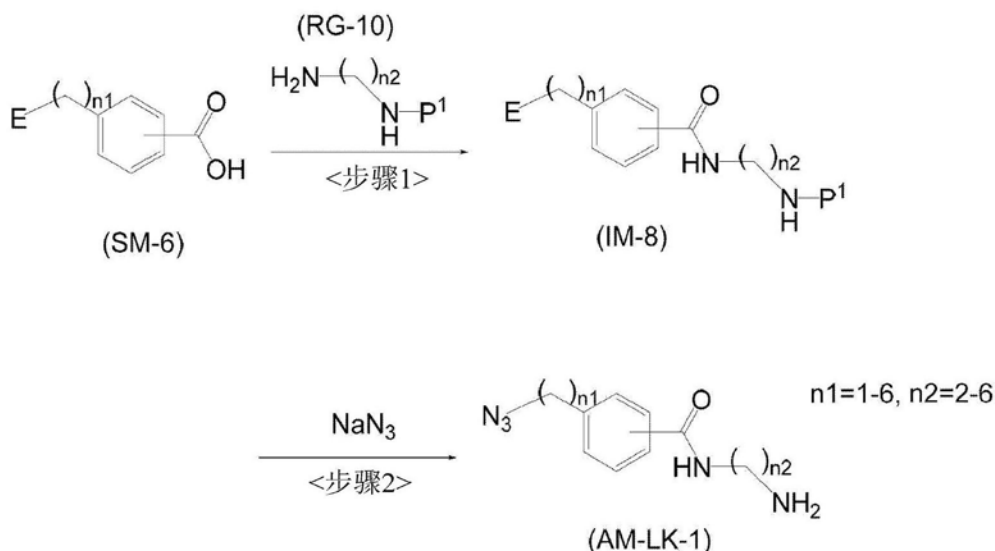


[0750] 使用式(SM-5)的化合物[式(SM-5)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物],依据文献已知的方法、例如“美国专利申请公开2013-0137861号说明书”等中记载的方法,在二氯甲烷等不参与反应的溶剂中,在吡啶等碱的存在下/不存在下,使氯甲酸对硝基苯酯反应,从而得到碳酸酯体。然后,在三乙胺的存在下,在N,N-二甲基甲酰胺溶剂中,使式(RG-9)的化合物[式(RG-9)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_4=1\sim 6$ 的整数]反应,从而得到氨基甲酰体。再对保护基 $P^1$ 进行脱保护,从而可制成式(AM-OL-9)所表示的胺化合物、或式(AM-OL-9)的盐。

[0751] [制造方法H]

[0752] 式(AM-LK-1)所表示的胺的制造方法[式(AM-LK-1)中, $n_1=1$ 、 $n_2=3$ 的对位取代胺也可依据国际公开第2016/152980号小册子等中记载的方法进行制造。]:

[0753] [化学式117]



[0754]

[0755] &lt;步骤1&gt;

[0756] 使用式 (SM-6) 的化合物[式 (SM-6) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物;n1=1~6的整数]和式 (RG-10) 的化合物[式 (RG-10) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物;n2=2~6的整数],进行与上述[式 (I) 的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应,从而可制造式 (IM-8)。

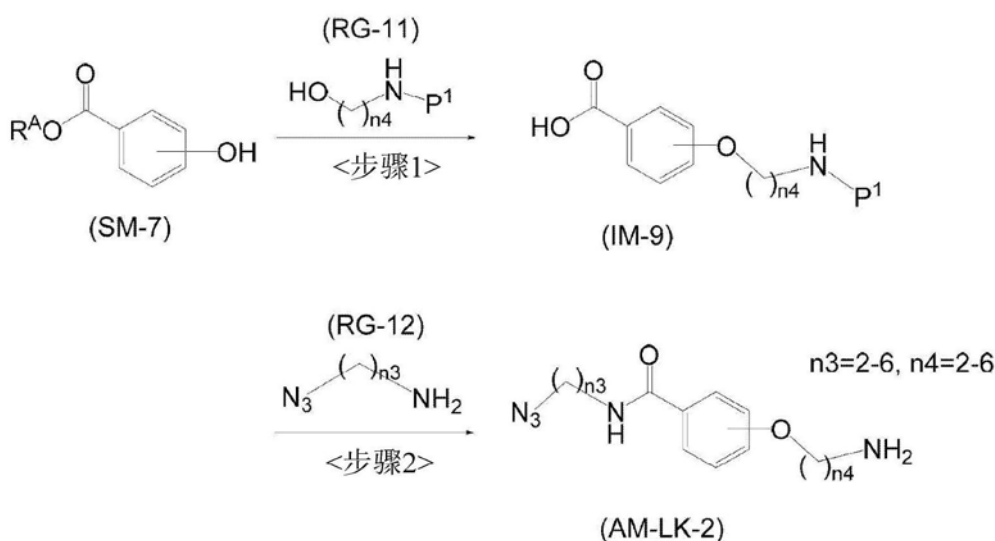
[0757] &lt;步骤2&gt;

[0758] 使用[制造方法H]<步骤1>中得到的式 (IM-8) 的化合物,依据文献已知的方法、例如“Organometallics, 29 (23), 第6619-6622页;2010年”等中记载的方法,在二甲基亚砜等不参与反应的溶剂中使NaN<sub>3</sub>反应引入叠氮基,之后对保护基P<sup>1</sup>进行脱保护,从而可制成式 (AM-LK-1) 所表示的胺化合物、或式 (AM-LK-1) 的盐。

[0759] [制造方法J]

[0760] 式 (AM-LK-2) 所表示的胺的制造方法:

[0761] [化学式118]



[0762]

[0763] &lt;步骤1&gt;

[0764] 使用式 (SM-7) 的化合物[式 (SM-7) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物]和式 (RG-11) 的化合物[式 (RG-11) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_4=2\sim 6$ 的整数],依据[制造方法B]<步骤1>进行光延反应,然后在氢氧化钠等碱的存在下,在甲醇、乙醇、四氢呋喃、水等不参与反应的溶剂或它们的混合溶剂中进行酯基的水解,从而可制造式 (IM-9) 所表示的化合物。

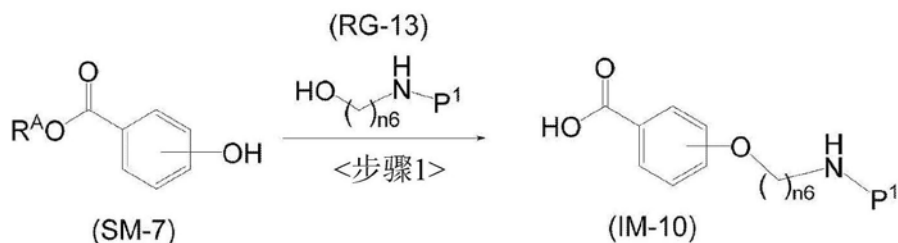
[0765] <步骤2>

[0766] 使用[制造方法J]<步骤1>中得到的式 (IM-9) 的化合物和式 (RG-12) [式 (RG-12) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_3=2\sim 6$ 的整数]的化合物,通过进行与上述[式 (I) 的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应得到缩合体,然后对保护基 $P^1$ 进行脱保护,从而可制成式 (AM-LK-2) 所表示的胺化合物、或式 (AM-LK-2) 的盐。

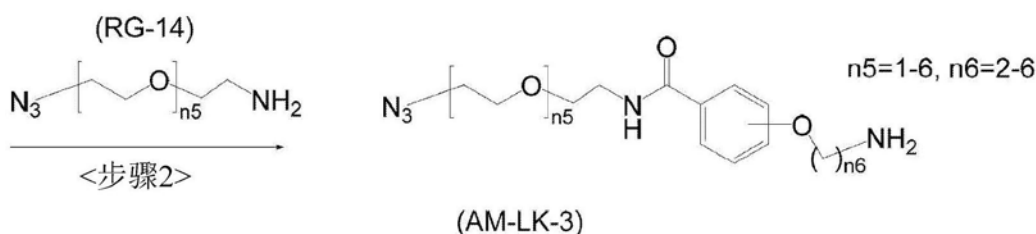
[0767] [制造方法K]

[0768] 式 (AM-LK-3) 所表示的胺的制造方法:

[0769] [化学式119]



[0770]



[0771] <步骤1>

[0772] 使用[制造方法J]<步骤1>的式 (SM-7) 的化合物和式 (RG-13) 的化合物[式 (RG-13) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_6=2\sim 6$ 的整数],依据[制造方法B]<步骤1>进行光延反应,然后在氢氧化钠等碱的存在下,在甲醇、乙醇、四氢呋喃、水等不参与反应的溶剂或它们的混合溶剂中进行酯基的水解,从而可制造式 (IM-10) 所表示的化合物。

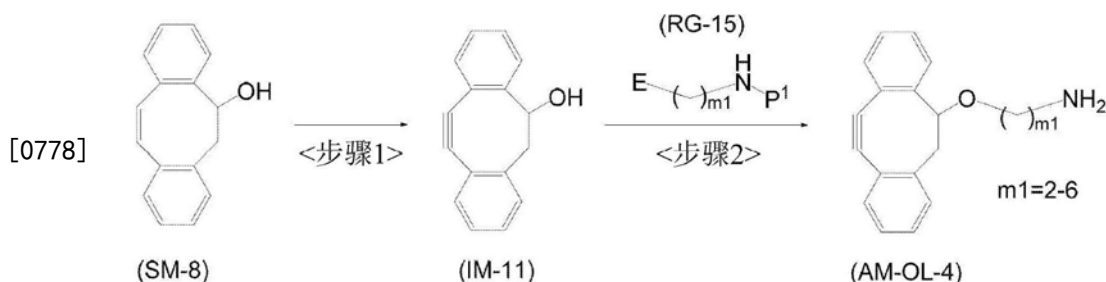
[0773] <步骤2>

[0774] 使用[制造方法K]<步骤1>中得到的式 (IM-10) 的化合物和式 (RG-14) [式 (RG-14) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_5=1\sim 6$ 的整数]的化合物,通过进行与上述[式 (I) 的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应得到缩合体,然后对保护基 $P^1$ 进行脱保护,从而可制成式 (AM-LK-3) 所表示的胺化合物、或式 (AM-LK-3) 的盐。

[0775] [制造方法L]

[0776] 式 (AM-OL-4) 所表示的胺的制造方法:

[0777] [化学式120]



[0779] <步骤1>

[0780] 使用式 (SM-8) 的化合物[式 (SM-8) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物], 依据文献已知的方法、例如“国际公开第2009/067663号小册子”等中记载的方法, 在加成溴后使用 $\text{LiN}(\text{i-Pr})_2$ 进行脱溴化, 从而可制造式 (IM-11) 的化合物。

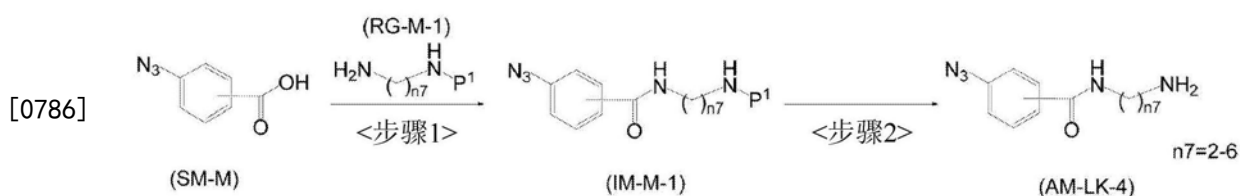
[0781] <步骤2>

[0782] 使用[制造方法L]<步骤1>中得到的式 (IM-11) 的化合物和式 (RG-15) 所表示的化合物[式 (RG-15) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m1=2\sim6$ 的整数], 在氢化钠等碱的存在下, 在四氢呋喃等不参与反应的溶剂中进行反应, 从而得到引入了侧链的化合物。然后, 对保护基 $\text{P}^1$ 进行脱保护, 从而可制成式 (AM-OL-4) 所表示的胺化合物、或式 (AM-OL-4) 的盐。

[0783] [制造方法M]

[0784] 式 (AM-LK-4) 所表示的胺的制造方法:

[0785] [化学式121]



[0787] <步骤1>

[0788] 使用式 (SM-M) 的化合物和式 (RG-M-1) 的化合物[式 (SM-M) 的化合物和式 (RG-M-1) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n7=2\sim6$ 的整数], 进行与上述[式 (I) 的海藻酸衍生物的制造方法]同样的缩合反应, 从而可制造式 (IM-M-1) 所表示的化合物。

[0789] 另外, 依据文献已知的方法、例如“实验化学讲座第5版16, 羧酸和衍生物、酰卤化物、酸酐, 第99-118页, 2007年, 丸善”等中记载的方法, 将式 (SM-M) 所表示的羧酸转换成酰卤化物或酸酐, 使用式 (RG-M-1) 的化合物, 在三乙胺、吡啶等碱的存在下, 在选自二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂、二乙醚、四氢呋喃等醚系溶剂、甲苯、苯等芳族烃系溶剂、N,N-二甲基甲酰胺等极性溶剂等的溶剂中, 在 $0^\circ\text{C}\sim$ 溶剂回流的温度下进行反应, 从而可同样地制造式 (IM-M-1) 的化合物。

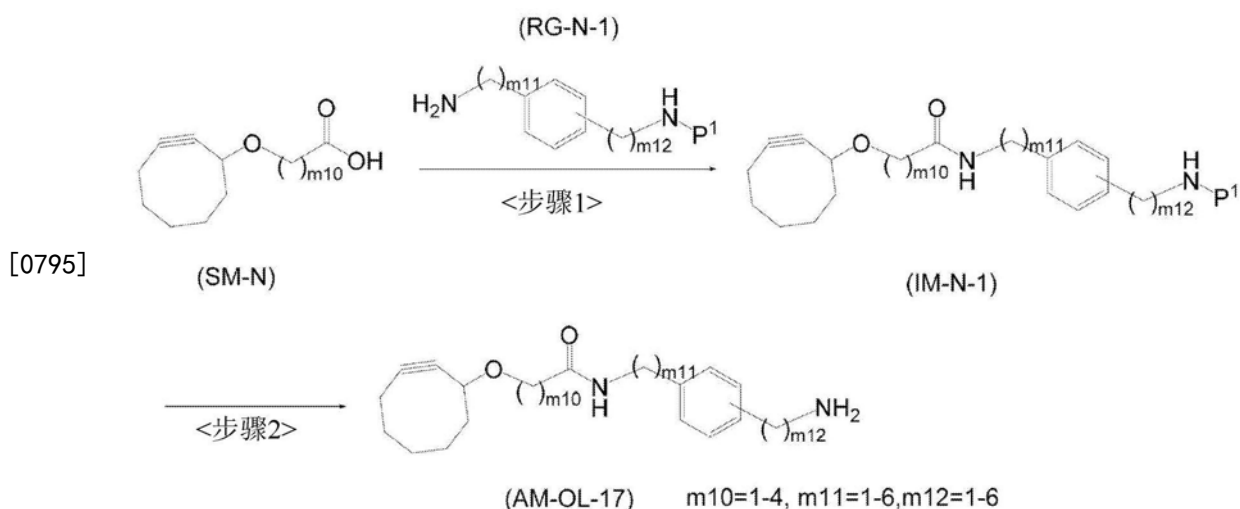
[0790] <步骤2>

[0791] 使用[制造方法M]<步骤1>中得到的式(IM-M-1)的化合物,按照文献已知的方法、例如“Greene等人的“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)”第4版,2007年,John Wiley&Sons”的期刊中记载的方法,根据保护基的种类选择适当的脱保护法进行反应,从而可制成式(AM-LK-4)所表示的化合物、或式(AM-LK-4)的盐。

[0792] [制造方法N]

[0793] 式(AM-OL-17)所表示的胺的制造方法:

[0794] [化学式122]



[0796] <步骤1>

[0797] 使用式(SM-N)的化合物和式(RG-N-1)的化合物[式(SM-N)的化合物和式(RG-N-1)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m_{10}=1\sim 4$ 、 $m_{11}=1\sim 6$ 、 $m_{12}=1\sim 6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式(IM-N-1)所表示的化合物。

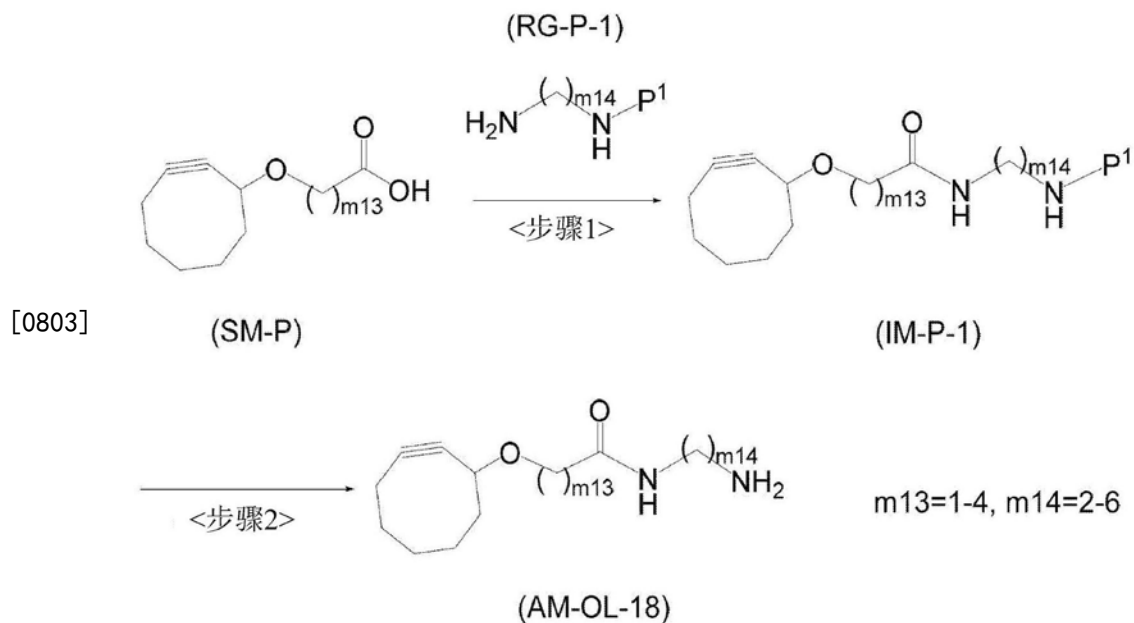
[0798] <步骤2>

[0799] 使用[制造方法N]<步骤1>中得到的式(IM-N-1)的化合物,利用文献已知的方法、例如“Greene等人的“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)”第4版,2007年,John Wiley&Sons”的期刊中记载的方法,根据保护基的种类选择适当的脱保护法进行反应,从而可制成式(AM-OL-17)所表示的化合物、或式(AM-OL-17)的盐。

[0800] [制造方法P]

[0801] 式(AM-OL-18)所表示的胺的制造方法[式(AM-OL-18)中, $m_{13}=1$ 、 $m_{14}=2$ 的胺也可依据国际公开第2015/143092号小册子等中记载的方法进行制造。]:

[0802] [化学式123]



[0804] <步骤1>

[0805] 使用式 (SM-P) 的化合物和式 (RG-P-1) 的化合物[式 (SM-P) 的化合物和式 (RG-P-1) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m13=1\sim 4$ 、 $m14=2\sim 6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式 (IM-P-1) 所表示的化合物。

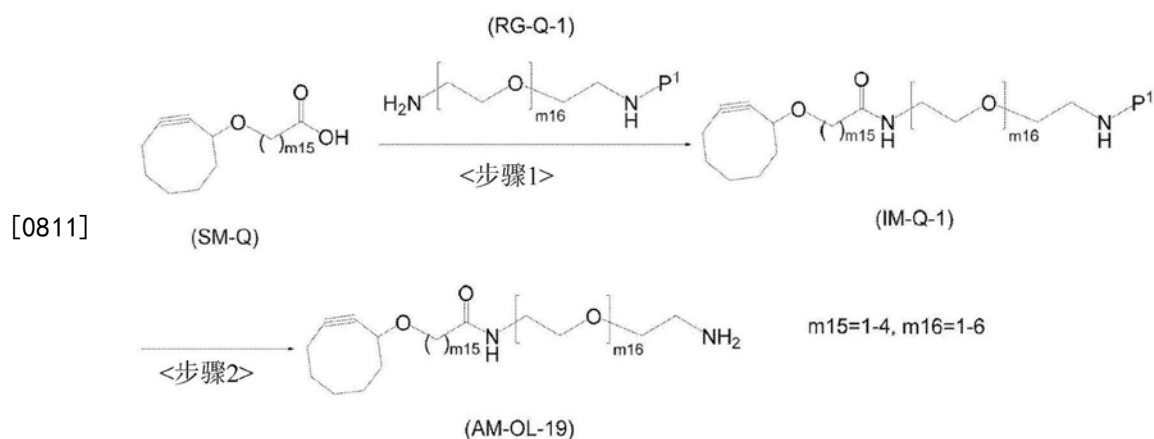
[0806] <步骤2>

[0807] 使用[制造方法P]<步骤1>中得到的式 (IM-P-1) 的化合物,利用文献已知的方法、例如“Greene等人的“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)”第4版,2007年,John Wiley&Sons”的期刊中记载的方法,根据保护基的种类选择适当的脱保护法进行反应,从而可制成式 (AM-OL-18) 所表示的化合物、或式 (AM-OL-18) 的盐。

[0808] [制造方法Q]

[0809] 式 (AM-OL-19) 所表示的胺的制造方法:

[0810] [化学式124]



[0812] <步骤1>

[0813] 使用式 (SM-Q) 的化合物和式 (RG-Q-1) 的化合物[式 (SM-Q) 的化合物和式 (RG-Q-1) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $m15=1$

~4、 $m16=1\sim6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式(IM-Q-1)所表示的化合物。

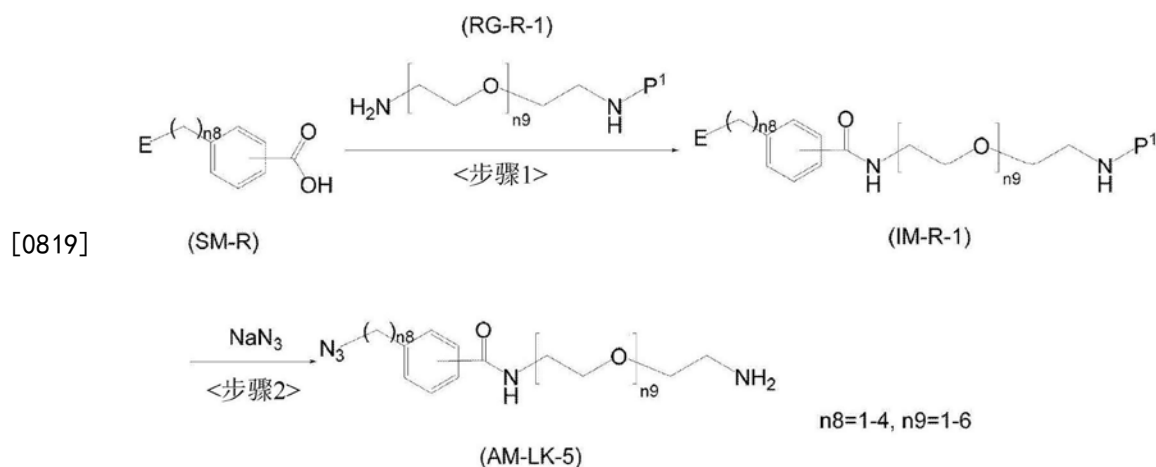
[0814] <步骤2>

[0815] 使用[制造方法Q]<步骤1>中得到的式(IM-Q-1)的化合物,利用文献已知的方法、例如“Greene等人的“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)”第4版,2007年,John Wiley&Sons”的期刊中记载的方法,根据保护基的种类选择适当的脱保护法进行反应,从而可制成式(AM-OL-19)所表示的化合物、或式(AM-OL-19)的盐。

[0816] [制造方法R]

[0817] 式(AM-LK-5)所表示的胺的制造方法[式(AM-LK-5)中, $n8=1$ 、 $n9=2$ 的胺也可依据国际公开第2016/152980号小册子等中记载的方法进行制造。]:

[0818] [化学式125]



[0820] <步骤1>

[0821] 使用式(SM-R)的化合物[式(SM-R)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n8=1\sim4$ 的整数]和式(RG-R-1)的化合物[式(RG-R-1)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n9=1\sim6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式(IM-R-1)所表示的化合物。

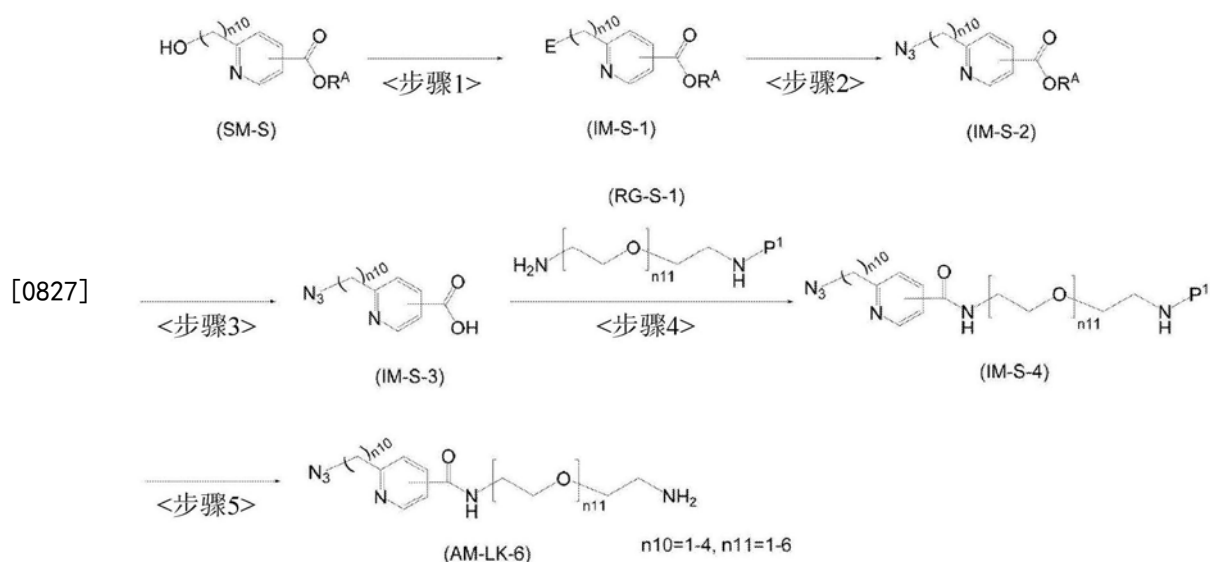
[0822] <步骤2>

[0823] 使用[制造方法R]<步骤1>中得到的式(IM-R-1)的化合物,与上述[制造方法H]<步骤2>同样地使 $\text{NaN}_3$ 反应引入叠氮基,之后对保护基 $\text{P}^1$ 进行脱保护,从而可制成式(AM-LK-5)所表示的胺化合物、或式(AM-LK-5)的盐。

[0824] [制造方法S]

[0825] 式(AM-LK-6)所表示的胺的制造方法:

[0826] [化学式126]



[0828] <步骤1>

[0829] [E=OTs基或OMs基的情况]:

[0830] 使用式 (SM-S) 的化合物[式 (SM-S) 的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_{10}=1\sim 4$ 的整数]和甲磺酰氯、对甲苯磺酰氯、对甲苯磺酸酐等试剂,依据文献已知的方法、例如“Journal of the American Chemical Society,136 (29),第10450-10459页,2014年”等中记载的方法,在三乙胺、N,N-二异丙基乙基胺、吡啶等碱的存在下,使用二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂、二乙醚、四氢呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、1,4-二噁烷等醚系溶剂、苯、甲苯等芳族烃系溶剂等不参与反应的溶剂、或它们的混合溶剂或者在无溶剂下,在 $-78^{\circ}\text{C}\sim$ 溶剂回流的温度下进行反应,可制造式 (IM-S-1) 所表示的化合物。

[0831] [E=卤素(氯、溴、碘的情况)]:

[0832] 使用式 (SM-S) 的化合物,依据文献已知的方法、例如“实验化学讲座第4版19,有机合成I,烃/卤化合物,第363-482页,1992年,丸善”等中记载的方法,适当选择下述所示的各种卤化剂(氯化剂、溴化剂、碘化剂)和不参与反应的溶剂,在 $0^{\circ}\text{C}\sim$ 溶剂回流的温度下进行反应,从而可制造式 (IM-S-1) 所表示的卤化化合物(E=氯、溴、碘)。

[0833] <E=氯的情况>

[0834] 通过使用氯化氢/氯化锌( $\text{HCl}/\text{ZnCl}_2$ )、氯化氢/六甲基磷酸三酰胺( $\text{HCl}/\text{HMPA}$ )、亚硫酸氯( $\text{SOCl}_2$ )、四氯化碳/三苯基膦( $\text{CCl}_4/\text{PPh}_3$ )、三光气/三苯基膦( $(\text{CCl}_3)_2\text{CO}/\text{PPh}_3$ )、三光气/N,N-二甲基甲酰胺( $\text{POCl}_3/\text{DMF}$ )等试剂作为氯化剂,可制造所期望的氯化物。

[0835] <X=溴的情况>

[0836] 通过使用48%的氢溴酸( $48\%\text{HBr}$ )、48%的氢溴酸/硫酸( $48\%\text{HBr}/\text{H}_2\text{SO}_4$ )、溴化氢/溴化锂( $\text{HBr}/\text{LiBr}$ )、溴化钠/硫酸( $\text{NaBr}/\text{H}_2\text{SO}_4$ )、三溴化磷( $\text{PBr}_3$ )等试剂作为溴化剂,可制造所期望的氯化物。另外,在式 (IM-S-1) 中,通过使溴化钠( $\text{NaBr}$ )与E=OTs或OMs的化合物反应,也可制造所期望的溴化物。

[0837] <X=碘的情况>

[0838] 通过使用氢碘酸( $\text{HI}$ )、碘/三苯基膦( $\text{I}_2/\text{PPh}_3$ )等试剂作为碘化剂,可制造所期望的碘化物。另外,在式 (IM-S-1) 中,通过使碘化钠( $\text{NaI}$ )与E=OTs或OMs的化合物反应,也可制

造所期望的碘化物。

[0839] <步骤2>

[0840] 使用[制造方法S]<步骤1>中得到的式(IM-S-1)的化合物,与上述[制造方法H]<步骤2>同样地使 $\text{NaN}_3$ 反应,从而可制造式(IM-S-2)的化合物。

[0841] <步骤3>

[0842] 使用[制造方法S]<步骤2>中得到的式(IM-S-2)的化合物,与上述[制造方法B]<步骤1>的酯基的水解反应同样地进行水解,从而可制造式(IM-S-3)的化合物。

[0843] <步骤4>

[0844] 使用[制造方法S]<步骤3>中得到的式(IM-S-3)和式(RG-S-1)的化合物[式(RG-S-1)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_{11}=1\sim 6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式(IM-S-4)所表示的化合物。

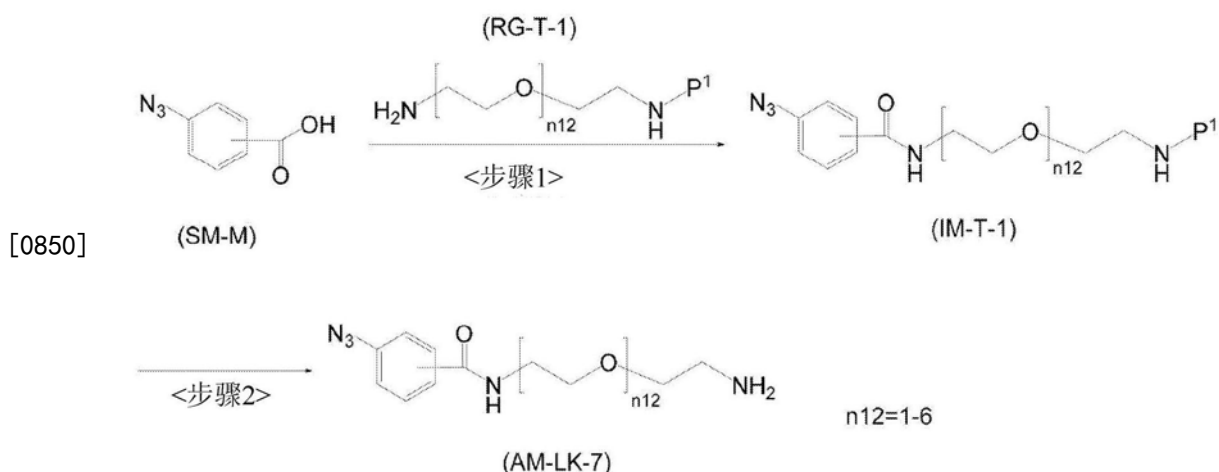
[0845] <步骤5>

[0846] 通过对[制造方法S]<步骤4>中得到的式(IM-S-4)的化合物的保护基 $\text{P}^1$ 进行脱保护,可制成式(AM-LK-6)所表示的胺化合物、或式(AM-LK-6)的盐。

[0847] [制造方法T]

[0848] 式(AM-LK-7)所表示的胺的制造方法:

[0849] [化学式127]



[0851] <步骤1>

[0852] 使用式(SM-M)的化合物和式(RG-T-1)的化合物[式(SM-M)的化合物和式(RG-T-1)的化合物为市售化合物或可由市售化合物通过文献已知的制造方法制造的化合物; $n_{12}=1\sim 6$ 的整数],进行与上述[制造方法M]<步骤1>同样的缩合反应,从而可制造式(IM-T-1)所表示的化合物。

[0853] 另外,依据文献已知的方法、例如“实验化学讲座第5版16,羧酸和衍生物、酰卤化物、酸酐,第99-118页,2007年,丸善”等中记载的方法,将式(SM-M)所表示的羧酸转换成酰卤化物或酸酐,使用式(RG-T-1)的化合物,在三乙胺、吡啶等碱的存在下,在选自二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂、二乙醚、四氢呋喃等醚系溶剂、甲苯、苯等芳族烃系溶剂、N,N-二甲基甲酰胺等极性溶剂等的溶剂中,在 $0^\circ\text{C}\sim$ 溶剂回流的温度下进行反应,从而可同样地制造式(IM-T-1)的化合物。

[0854] <步骤2>

[0855] 使用[制造方法T]<步骤1>中得到的式(IM-T-1)的化合物,利用文献已知的方法、例如“Greene等人的“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)”第4版,2007年,John Wiley&Sons)”的期刊中记载的方法,根据保护基的种类选择适当的脱保护法进行反应,从而可制成式(AM-LK-7)所表示的化合物、或式(AM-LK-7)的盐。

[0856] 关于用于制造式(I)或式(II)所表示的海藻酸衍生物的、引入了炔基的胺(Akn-L<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>)或引入了叠氮基的胺(N<sub>3</sub>-L<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>),通过将上述[制造方法A]~[制造方法N]和[制造方法P]~[制造方法T]中记载的各反应、文献已知的方法、例如“实验化学讲座第5版,各本,2007年,丸善”、“Comprehensive Organic Transformations,A Guide to Functional Group Preparations,第3版(Richard C.Larock编),2018年”,“Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis,(Laszlo Kurti,Barbara Czako编),Academic Press,2005年”等中记载的方法适当组合,可制造所期望的胺。需要说明的是,关于下表中的胺,也可根据表中记载的现有技术文献所记载的方法来制造。

[0857] [表11]

[0858]	胺 (Akn-L1-NH2)	Akn	L1	条件	现有技术文献
	AM-K2N4	AK-2	LN-4	m4=2	国际公开第2009/067663号小册子
	AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=2	国际公开第2011/136645号小册子
	AM-K12N2	AK-12	LN-2	m2=1	国际公开第2013/036748号小册子
	AM-K1N1	AK-1	LN-1	m1=2	国际公开第2015/020206号小册子
	AM-K2N1	AK-2	LN-1	m1=2	
	AM-K7N1	AK-7	LN-1	m1=2	
	AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=1	
	AM-K4N3	AK-4	LN-3	m3=1	
	AM-K9N8	AK-9	LN-8	*	
	AM-K10N6	AK-10	LN-6	对位、m6=1、m7=2	
	AM-K11N3	AK-11	LN-3	m3=1	
	AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=2	国际公开第2015/112014号小册子
	AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=4	国际公开第2016/054315号小册子
	AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=3	国际公开第2016/168766号小册子
	AM-K2N3	AK-2	LN-3	m3=2	Macromolecular Rapid Communications, 39(1), 2018年.
	AM-K2N4	AK-2	LN-4	m4=4	Journal of the American Chemical Society, 133(18), 第7054-7064页, 2011年.
	AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=3	Bioconjugate Chemistry, 23(8), 第1680-1686页, 2012年.
	AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=5	ACS Medicinal Chemistry Letters, 2(12), 885-889, 2011年.
	AM-K1N10	AK-1	LN-10	m13=1、m14=2	国际公开第2015/143092号小册子
	胺 (N3-L2-NH2)	L1	取代位置	条件	现有技术文献
	AM-LK1 (p)	LK-1	对位	n1=1、n2=3	国际公开第2016/152980号
	AM-LK4 (m)	LK-4	间位	n7=3	Journal of Medicinal Chemistry (2011), 54(18), 6319-6327.
	AM-LK4 (p)	LK-4	对位	n7=2、3、4、6	n7=2、3、4; Journal of Medicinal Chemistry, (2011), 54(18), 第6319-6327页. n7=6; Experientia, 39(10), 第1063-72页.
	AM-LK5 (p)	LK-5	对位	n8=1、n9=2	国际公开第2016/152980号小册子

[0859] 本说明书中,式(AM-1)或式(AM-2)所表示的胺化合物(也包括各式的下位式)有时会形成药学上可接受的盐(例如,酸加成盐)。作为这样的盐,只要是药学上可接受的盐即可,没有特别限定,例如可列举:与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与酸性氨基酸形成的盐等。作为与无机酸形成的盐的适当例子,例如可列举:与盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸、磷酸等形成的盐。作为与有机酸形成的盐的适当例子,例如可列举:与甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、庚酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、乳酸、山梨酸、杏仁酸等脂肪族一元羧酸等形成的盐;与草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苹果酸、酒石酸等脂肪族二元羧酸形成的盐;与枸橼酸等脂肪族三元羧酸形成的盐;与苯甲酸、水杨酸等芳族一元羧

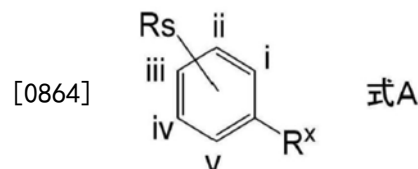
酸形成的盐；与邻苯二甲酸等芳族二元羧酸形成的盐；与肉桂酸、羟基乙酸、丙酮酸、含氧酸、水杨酸、N-乙酰半胱氨酸等有机羧酸形成的盐；与甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等有机磺酸形成的盐；与天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸类形成的酸加成盐。作为与酸性氨基酸形成的盐的适当例子，例如可列举：与天冬氨酸、谷氨酸等形成的盐。其中，优选药学上可接受的盐。

[0860] 上述盐可按照常规方法、例如通过混合上述化合物和含有适量的酸或碱的溶液而形成目标盐后进行分步滤取、或者馏去该混合溶剂而获得。有关盐的综述，出版了Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Stahl & Wermuth (Wiley-VCH, 2002)，在本书中进行了详细记载。

[0861] 本说明书中，式(AM-1)或式(AM-2)所表示的胺化合物(也包括各式的下位式)或其盐可与水、乙醇、甘油等溶剂形成溶剂合物。

[0862] 本说明书中，只要没有特别说明，则在可变取代基在环状基团上取代的情况下，意味着该可变取代基不与环状基团的特定碳原子结合。例如，意味着下述式A中的可变取代基Rs可在该式A中的碳原子i、ii、iii、iv或v的任一处取代。

[0863] [化学式128]



[0865] 9. 海藻酸衍生物、交联海藻酸结构体的用途

[0866] 如上所述，海藻酸衍生物可用于制作移植用器件。除移植用器件以外，海藻酸衍生物可在食品、医疗、化妆品、纤维、造纸等广泛领域用于代替现有的海藻酸。作为海藻酸衍生物或光交联海藻酸结构体的优选用途，具体而言，可列举：创伤包覆材料、防术后粘连材料、药剂缓释用基材、细胞培养用基材、细胞移植用基材等医疗用材料。

[0867] 在用作医疗用材料的情况下，作为交联海藻酸结构体的形状，可列举：管状、纤维状、纤维、珠粒、凝胶、近似球形的凝胶等，优选形成珠粒、凝胶或近似球形的凝胶，更优选形成近似球形的凝胶。

[0868] 使用海藻酸衍生物的特别优选的方案移植用器件，其生物适应性或稳定性优异，细胞毒性也少，在移植部位也几乎没有粘连或炎症，(无论半透膜的有无)凝胶的溶解少，长期维持形状，可使降血糖作用长期持续而调节血糖。

[0869] 需要说明的是，本说明书中记载的所有文献和出版物，不管其目的如何，均通过参照而将其整体纳入本说明书中。另外，本说明书是通过参照作为本申请的优先权要求的基础的日本专利申请No. 2019-122063 (2019年6月28日申请) 的权利要求书、说明书和附图的公开内容而纳入。

[0870] 另外，本发明的目的、特征、优点及其构思通过本说明书的记载为本领域技术人员所明了，本领域技术人员可根据本说明书的记载容易地实施本发明。用于实施发明的最佳方式和具体实施例等显示本发明的优选实施方案，是为了例示或说明而给出的，本发明并不限于这些。在本说明书所公开的本发明的意图以及范围内，根据本说明书的记载可进行各种修饰，这对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0871] 实施例

[0872] 接下来,列举实施例、试验例以进一步详细地说明本发明,但这些例子仅为实施例、试验例而已,并不限定本发明,并且在不脱离本发明范围的范围内可进行变更。

[0873] 核磁共振波谱(NMR)的测定中使用JEOL JNM-ECX400 FT-NMR(日本电子)。液相色谱-质谱(LC-Mass)按照以下方法进行测定。使用[UPLC]Waters AQUITY UPLC系统和BEH C18柱(2.1mm×50mm、1.7μm)(Waters),采用乙腈:0.05%三氟乙酸水溶液=5:95(0分钟)~95:5(1.0分钟)~95:5(1.6分钟)~5:95(2.0分钟)的流动相和梯度条件。

[0874] <sup>1</sup>H-NMR数据中,在NMR信号的图案中,s为单峰、d为双峰、t为三重峰、q为四重峰、m为多重峰、br为宽峰、J为偶联常数、Hz为赫兹、CDCl<sub>3</sub>为氘代氯仿、DMSO-D<sub>6</sub>为氘代二甲基亚砜、D<sub>2</sub>O为重水(氧化氘)。在<sup>1</sup>H-NMR数据中,关于羟基(OH)、氨基(NH<sub>2</sub>)、羧基(COOH)的质子等因宽谱带而无法确认的信号,未记录在数据中。

[0875] 在LC-Mass数据中,M为分子量,RT为保留时间,[M+H]<sup>+</sup>、[M+Na]<sup>+</sup>为分子离子峰。

[0876] 实施例中的“室温”通常表示约0℃~约35℃的温度。

[0877] 实施例中的反应性取代基引入率(摩尔%)表示引入的反应性取代基的摩尔数与由<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O)算出的构成海藻酸的单糖(古罗糖醛酸和甘露糖醛酸)单元的摩尔数的比例。

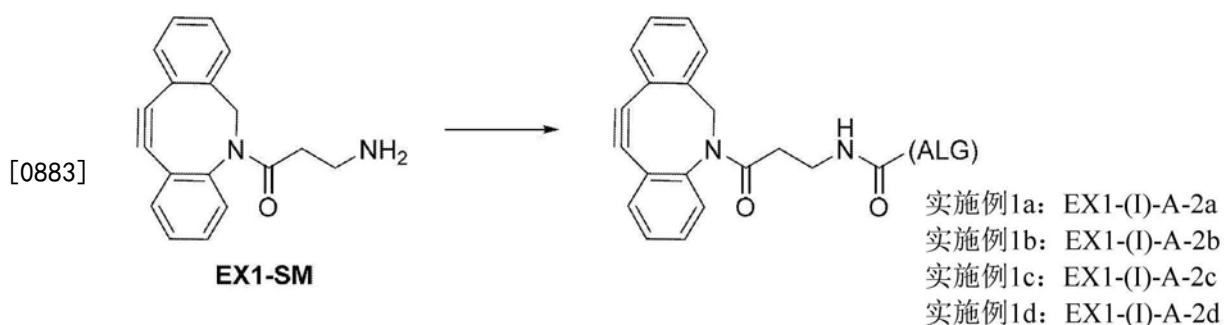
[0878] 在实施例中,引入反应性基团或互补的反应性基团之前的海藻酸钠,使用显示上述表10所记载的物性值的海藻酸钠。

[0879] 表12显示(实施例1)~(实施例4-2)中得到的、引入了反应性基团的海藻酸衍生物(实施例1a、实施例2a)的物性值(具体而言,反应性基团引入率(mol%)、分子量和重均分子量(万Da))。

[0880] (实施例1)

[0881] 引入了二苯并环辛炔-氨基的海藻酸(实施例1a、实施例1b、实施例1c和实施例1d)的合成:

[0882] [化学式129]



[0884] (实施例1a) 引入了二苯并环辛炔-氨基的海藻酸(EX1-(I)-A-2a)的合成:

[0885] 在调制成1重量%的43.6mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入111.65mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、403.5μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液。向该溶液中滴加83.62mg市售的二苯并环辛炔-胺[CAS:1255942-06-3](EX1-SM)的2mL乙醇溶液,在室温下搅拌18小时。加入400mg氯化钠后,加入87.2mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了376mg为淡黄色固体的标题化合物EX1-(I)-A-2a。

[0886] 反应性取代基(二苯并环辛炔-氨基)的引入率为6.9mol%(NMR积分比)。

[0887] (实施例1b) 引入了二苯并环辛炔-氨基的海藻酸(EX1-(I)-A-2b)的合成:

[0888] 在调制成1重量%的120mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入330mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、300μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液。向该溶液中滴加80mg市售的二苯并环辛炔-胺[CAS:1255942-06-3](EX1-SM)的12mL乙醇溶液,在30℃下搅拌4小时。加入1.2g氯化钠后,加入240mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.19g为白色固体的标题化合物EX1-(I)-A-2b。

[0889] 将该白色固体溶解于80mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥23小时,得到了1.2g为白色无定形的标题化合物EX1-(I)-A-2b。

[0890] 反应性取代基(二苯并环辛炔-氨基)的引入率为5.0mol% (NMR积分比)。

[0891] (实施例1c) 引入了二苯并环辛炔-氨基的海藻酸(EX1-(I)-A-2c)的合成:

[0892] 在调制成1重量%的120mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入167mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、151μL浓度为1摩尔-碳酸氢钠水溶液。向该溶液中滴加42mg市售的二苯并环辛炔-胺[CAS:1255942-06-3](EX1-SM)的12mL乙醇溶液,在30℃下搅拌3.5小时。加入1.2g氯化钠后,加入240mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.2g为白色固体的标题化合物EX1-(I)-A-2c。

[0893] 将该白色固体溶解于80mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥23小时,得到了1.15g为白色无定形的标题化合物EX1-(I)-A-2c。

[0894] 反应性取代基(二苯并环辛炔-氨基)的引入率为2.3mol% (NMR积分比)。

[0895] (实施例1d) 引入了二苯并环辛炔-氨基的海藻酸(EX1-(I)-A-2d)的合成:

[0896] 在调制成1重量%的201mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入281mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、253μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液。向该溶液中滴加70mg市售的二苯并环辛炔-胺[CAS:1255942-06-3](EX1-SM)的20mL乙醇溶液,在32℃下搅拌3小时。加入2.01g氯化钠后,加入402mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.94g为白色固体的标题化合物EX1-(I)-A-2d。

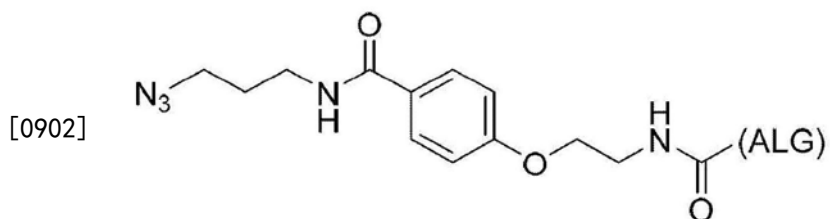
[0897] 将该白色固体溶解于130mL水中,冷冻干燥后,在室温下干燥2小时,得到了1.84g为白色无定形的标题化合物EX1-(I)-A-2d。

[0898] 反应性取代基(二苯并环辛炔-氨基)的引入率为2.4mol% (NMR积分比)。

[0899] (实施例2)

[0900] 引入了4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基的海藻酸(实施例2a、实施例2b、实施例2c和实施例2d)的合成:

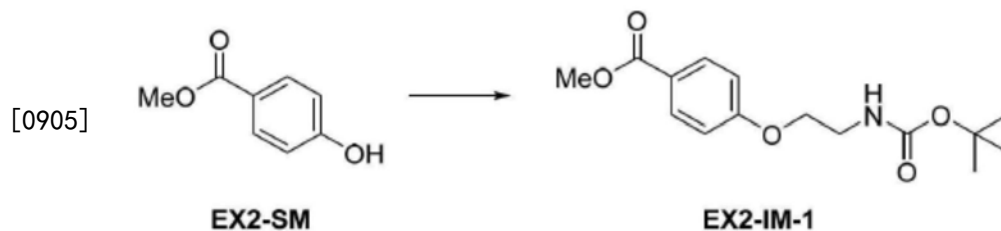
[0901] [化学式130]



实施例2a: EX2-(II)-A-2a  
 实施例2b: EX2-(II)-A-2b  
 实施例2c: EX2-(II)-A-2c  
 实施例2d: EX2-(II)-A-2d

[0903] <步骤1>4-(2-((叔丁氧羰基)氨基)乙氧基)苯甲酸甲酯(化合物EX2-IM-1)的合成:

[0904] [化学式131]

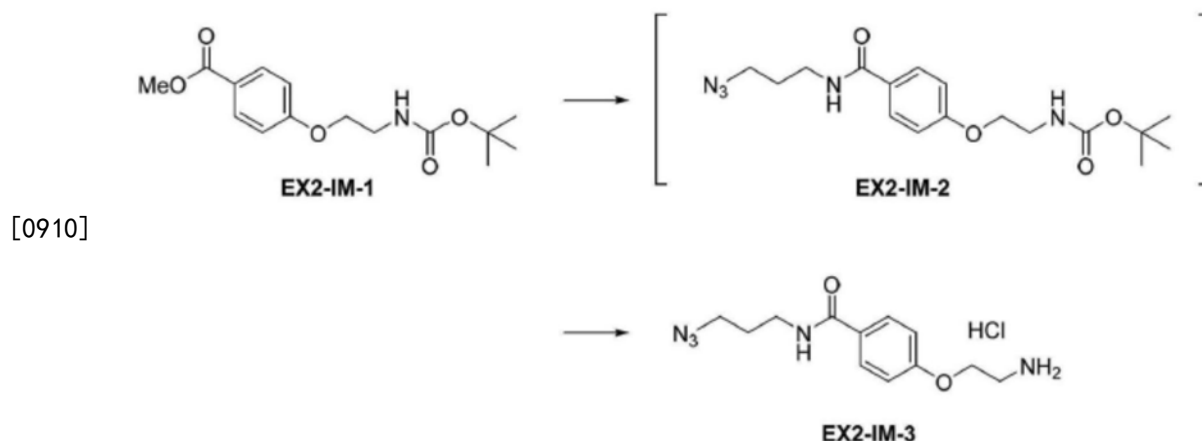


[0906] 在冰冷搅拌下,向0.96g三苯基膦的2.59mL四氢呋喃溶液中加入1.92mL偶氮二甲酸二乙酯的40%甲苯溶液,在室温下搅拌20分钟。在冰冷搅拌下,向该溶液中加入市售的0.37g 4-羟基苯甲酸甲酯[CAS:99-76-3](化合物EX2-SM)和0.39g 2-(叔丁氧羰基)乙醇胺[CAS:26690-80-2]的1.1mL四氢呋喃溶液,在室温下搅拌17小时。将反应液在减压下浓缩,残留物通过硅胶柱色谱(5%乙酸乙酯/正庚烷~40%乙酸乙酯/正庚烷)纯化,得到了化合物1和化合物2的混合物。将该混合物溶解于20mL甲基叔丁醚中,依次用5mL 1当量的氢氧化钠水溶液洗涤2次、用5mL饱和食盐水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥后,减压下馏去溶剂,得到了0.45g为粉色油状物质的化合物EX2-IM-1。

[0907] NMR数据(CDCl<sub>3</sub>) (δ:ppm): 7.98 (2H, d, J=8.8Hz), 6.90 (2H, d, J=8.8Hz), 4.97 (1H, br s), 4.07 (2H, t, J=5.2Hz), 3.88 (3H, s), 3.56 (2H, q, J=5.2Hz), 1.45 (9H, s)

[0908] <步骤2>4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰胺盐酸盐(化合物EX2-IM-3)的合成:

[0909] [化学式132]



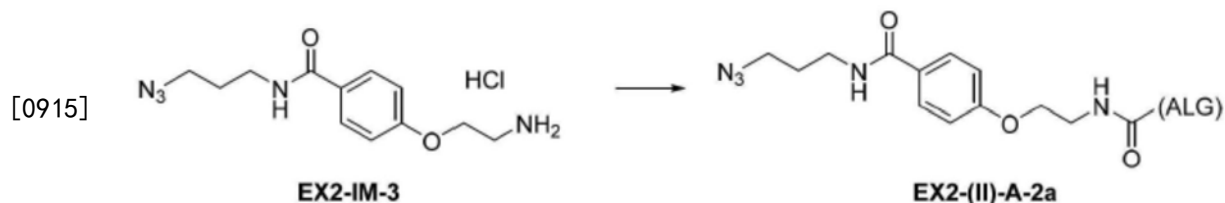
[0911] 在(实施例2)<步骤1>中得到的0.44g化合物EX2-IM-1的4.4mL甲醇溶液中加入0.25g氢氧化锂一水合物,在60℃下搅拌3小时30分钟。在反应液中加入5mL 1当量的盐酸,用10mL乙酸乙酯萃取3次。有机层用5mL水、5mL饱和食盐水依次洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压下馏去溶剂。将残留物溶解于4.4mL乙腈中,加入0.15g 3-叠氮丙烷-1-胺[CAS:88192-19-2]和0.57g 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐。然后,在冰冷搅拌下加入0.52mL N,N-二异丙基乙胺,在室温下搅拌5小时。向反应液中加入10mL水,用15mL乙酸乙酯萃取3次,有机层用无水硫酸钠干燥,减压下馏去溶剂。残留物通过硅胶柱色谱(16%乙酸乙酯/正庚烷~100%乙酸乙酯)纯化,得到了0.71g含有化合物EX2-IM-2的组

分。

[0912] 向0.71g含有化合物EX2-IM-2的组分中加入4当量的氯化氢/4.9mL 1,4-二噁烷,在室温下搅拌20分钟。在反应液中加入二异丙醚后,将析出物过滤,从而得到了0.49g为白色固体的标题化合物EX2-IM-3。NMR数据(CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ :ppm): 7.60 (2H, d, J=8.8Hz), 6.93 (2H, d, J=8.8Hz), 4.19 (2H, t, J=4.8Hz), 3.31-3.29 (6H, m), 1.77-1.71 (2H, m)。LC-MS:M(游离胺)=263、RT=0.54(分钟)、[M+H]<sup>+</sup>=264

[0913] (实施例2a) 引入了4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基的海藻酸(化合物EX2-(II)-A-2a)的合成:

[0914] [化学式133]

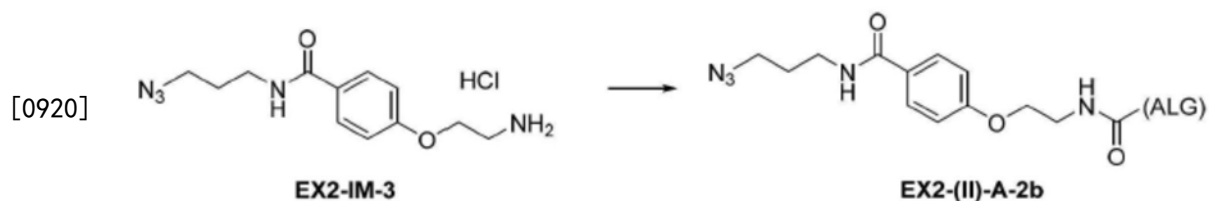


[0916] 在冰冷搅拌下,向调制成1重量%的19.6mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入50.19mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、54.37mg(实施例2)<步骤2>中得到的化合物EX2-IM-3、181.4 $\mu$ L浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在室温下搅拌5小时。加入200mg氯化钠后,加入39.2mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了198mg为白色固体的标题化合物EX2-(II)-A-2a。

[0917] 反应性取代基(4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基)的引入率为6.1mol%(NMR积分比)。

[0918] (实施例2b) 引入了4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基的海藻酸(化合物EX2-(II)-A-2b)的合成:

[0919] [化学式134]



[0921] 在冰冷搅拌下,向调制成1重量%的120mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入330mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、90mg(实施例2)<步骤2>中得到的化合物EX2-IM-3、450 $\mu$ L浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在30℃下搅拌4小时。加入1.2g氯化钠后,加入240mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.22g为白色固体的标题化合物EX2-(II)-A-2b。

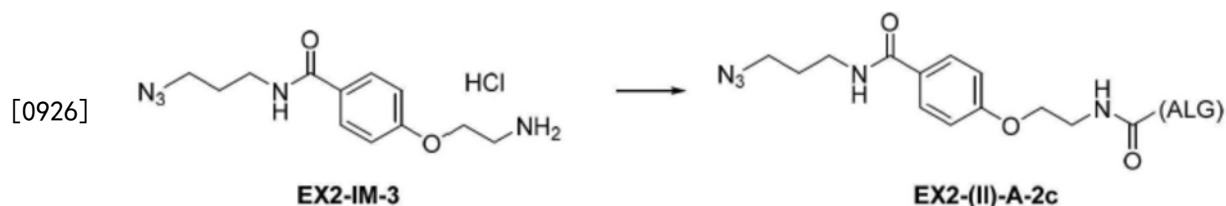
[0922] 将该白色固体溶解于80mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥23小时,得到了1.19g为白色无定形的标题化合物EX3-(II)-A-2b。

[0923] 反应性取代基(4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基)的引入率为4.9mol%(NMR积分比)。

[0924] (实施例2c) 引入了4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基的海藻酸(化

合物EX2-(II)-A-2c)的合成:

[0925] [化学式135]



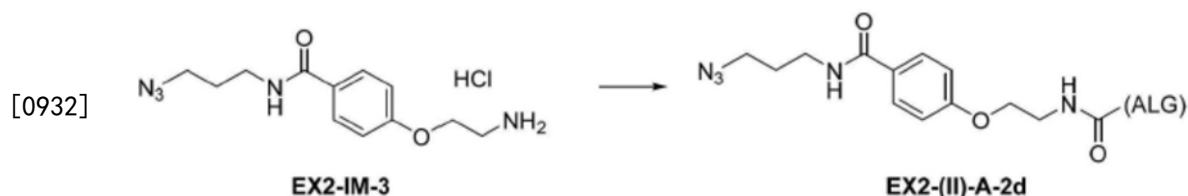
[0927] 在冰冷搅拌下,向调制成1重量%的120mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入167mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、45mg(实施例2)<步骤2>中得到的化合物EX2-IM-3、227μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在30℃下搅拌3.5小时。加入1.2g氯化钠后,加入240mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.22g为白色固体的标题化合物EX2-(II)-A-2c。

[0928] 将该白色固体溶解于80mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥22小时,得到了1.15g为白色无定形的标题化合物EX2-(II)-A-2c。

[0929] 反应性取代基(4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基)的引入率为2.3mol%(NMR积分比)。

[0930] (实施例2d)引入了4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基的海藻酸(化合物EX2-(II)-A-2d)的合成:

[0931] [化学式136]



[0933] 在调制成1重量%的220mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入307mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、83mg(实施例2)<步骤2>中得到的化合物EX2-IM-3、416μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在32℃下搅拌3小时。加入2.2g氯化钠后,加入440mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了2.13g为白色固体的标题化合物EX2-(II)-A-2d。

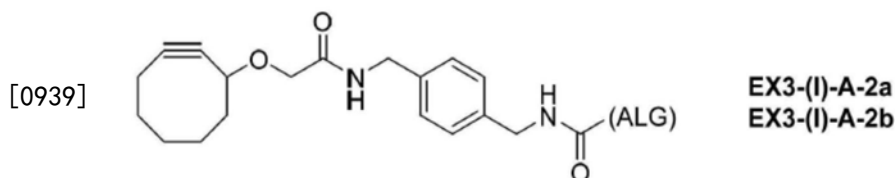
[0934] 将该白色固体溶解于130mL水中,冷冻干燥后,在室温下干燥2小时,得到了1.99g为白色无定形的标题化合物EX2-(II)-A-2d。

[0935] 反应性取代基(4-(2-氨基乙氧基)-N-(3-叠氮丙基)苯甲酰氨基)的引入率为2.3mol%(NMR积分比)。

[0936] (实施例3)

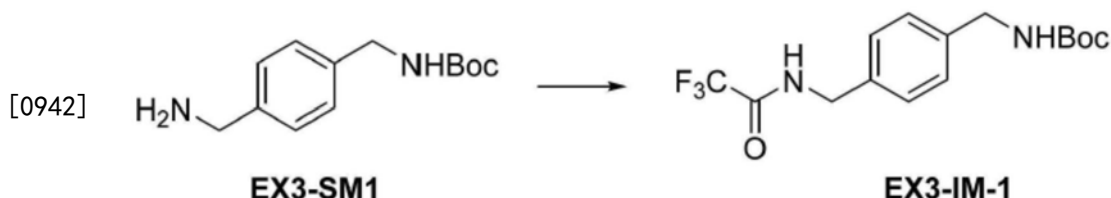
[0937] 引入了N-(4-(氨基乙基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰氨基的海藻酸(实施例3a和实施例3b)的合成:

[0938] [化学式137]



[0940] <步骤1>叔丁基 (4- (4- (2,2,2-三氟乙酰胺) 甲基) 苄基) 氨基甲酸酯 (化合物EX3-IM-1) 的合成:

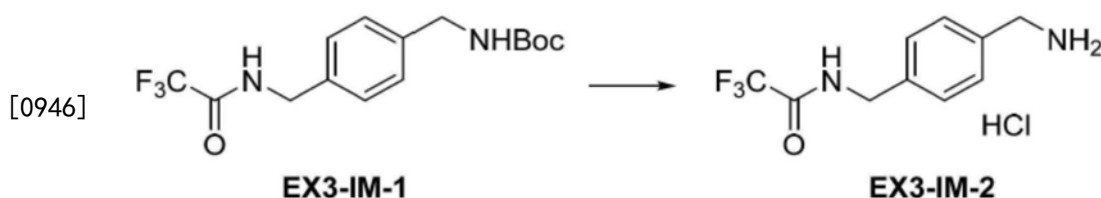
[0941] [化学式138]



[0943] 参考文献已知的方法 (Bioorganic&Medicinal Chemistry (2003) 11:4189-4206), 在冰冷搅拌下, 向由1,4-双(氨基甲基)苯 [CAS:539-48-0] 合成的0.67g叔丁基 (4-(氨基乙基)苄基)氨基甲酸酯 [CAS:108468-80-4] (EX3-SM1)、0.39mL三乙胺和6.67mL甲醇的混合物中滴加0.44mL三氟乙酸乙酯。将反应混合物升温至室温, 在该温度下搅拌5小时。用10mL水停止反应, 用10mL乙酸乙酯萃取3次。将所回收的有机层用5mL饱和食盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥。将所干燥的有机层过滤后浓缩, 得到了0.671g为淡黄色无定形的标题粗化合物EX3-IM-1。

[0944] NMR数据 (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ : ppm): 7.29 (2H, d, J=8.4Hz), 7.25 (2H, d, J=7.6Hz), 6.51 (1H, br s), 4.86 (1H, br s), 4.51 (2H, d, J=5.2Hz), 4.31 (2H, d, J=6.0Hz), 1.46 (9H, s). LC-MS: M=332, RT=0.97 (分钟), [M+Na]<sup>+</sup>=355. <步骤2>N- (4- (氨基乙基) 苄基) -2,2,2-三氟乙酰胺盐酸盐 (化合物EX3-IM-2) 的合成:

[0945] [化学式139]

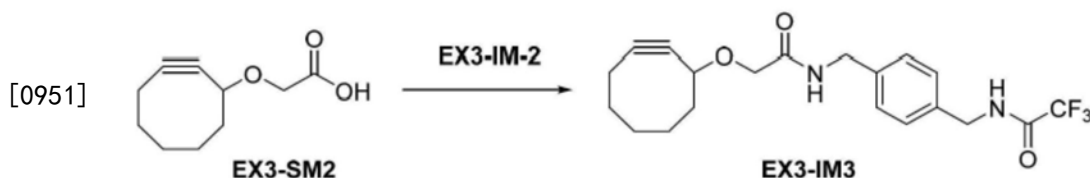


[0947] 在水冷搅拌下, 向 (实施例3) <步骤1> 中得到的0.5g化合物EX3-IM-1的3.5mL 1,4-二噁烷溶液中加入4当量的氯化氢/3.5mL 1,4-二噁烷, 在室温下搅拌3小时。在反应液中加入40mL二异丙醚后, 过滤析出物, 从而得到了0.36g为白色固体的标题化合物EX3-IM-2。

[0948] NMR数据 (D<sub>2</sub>O) ( $\delta$ : ppm): 7.29 (2H, d, J=8.0Hz), 7.25 (2H, d, J=8.4Hz), 4.38 (2H, s), 4.02 (2H, s). LC-MS: M (游离胺) = 232, RT=0.53 (分钟), [M+H]<sup>+</sup>=233.

[0949] <步骤3>N- (4- ((2- (环辛-2-炔-1-基氧基) 乙酰胺) 甲基) 苄基) -2,2,2-三氟乙酰胺 (化合物EX3-IM-3) 的合成:

[0950] [化学式140]

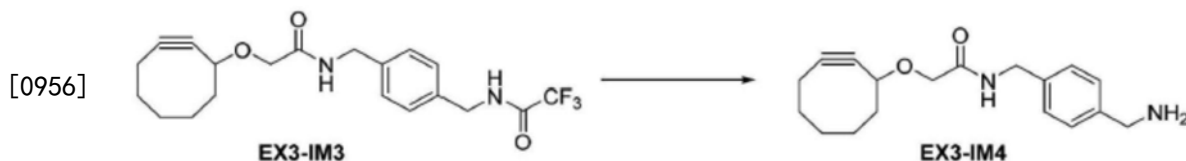


[0952] 按照文献已知的方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110), 在冰冷搅拌下, 向由环庚烯 [CAS:628-92-2] 合成的 0.17g 羧酸 [CAS:917756-42-4] (EX3-SM2) 和 0.26g 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐的 1.7mL 乙腈溶液中滴加 0.26g (实施例3) <步骤2> 中得到的 EX3-IM-2 和 0.51mL N,N-二异丙基乙胺, 在室温下搅拌 1 小时 30 分钟。加入 5mL 水使反应停止后, 用 5mL 乙酸乙酯萃取 3 次。有机层用 3mL 饱和食盐水洗涤后, 用无水硫酸钠干燥。将所干燥的有机层过滤后, 减压下馏去溶剂。通过硅胶柱色谱 (12% 乙酸乙酯/正庚烷~100% 乙酸乙酯) 纯化残留物, 得到了 0.189g 为白色无定形的标题化合物 EX3-IM-3。

[0953] NMR 数据 (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ : ppm): 7.31 (2H, d, J=8.4Hz), 7.26 (2H, d, J=8.0Hz, 与溶剂峰重叠.), 6.84 (1H, br s), 6.52 (1H, br s), 4.52 (2H, d, J=6.0Hz), 4.49 (2H, d, J=6.4Hz), 4.26-4.23 (1H, m), 4.11 (1H, d, J=15.2Hz), 3.94 (1H, d, J=15.2Hz), 2.26-2.09 (3H, m), 2.00-1.58 (6H, m), 1.48-1.44 (1H, m). LC-MS: M=396, RT=0.99 (分钟), [M+H]<sup>+</sup>=397.

[0954] <步骤4> N-(4-(氨基甲基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺 (化合物 EX3-IM-4) 的合成:

[0955] [化学式141]

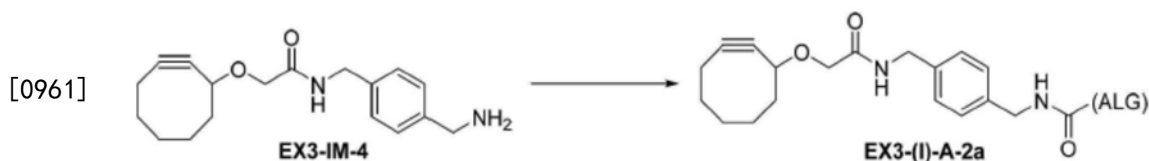


[0957] 在冰冷搅拌下, 向 (实施例3) <步骤3> 中得到的 0.18g 化合物 EX3-IM-3 和 1.8mL 甲醇的混合物中滴加 0.126g 碳酸钾的 0.9mL 水溶液, 在室温下搅拌 17 小时 30 分钟。减压下馏去甲醇, 用 5mL 乙酸乙酯萃取 3 次。有机层用 5mL 饱和食盐水洗涤后, 用无水硫酸钠干燥。过滤有机层后, 在减压下馏去溶剂, 得到了 0.13g 为淡黄色油状物的标题粗化合物 EX3-IM-4。

[0958] NMR 数据 (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ : ppm): 7.28-7.28 (4H, m), 6.80 (1H, br s), 4.48 (2H, d, J=6.0Hz), 4.26-4.21 (1H, m), 4.11 (1H, d, J=15.2Hz), 3.93 (1H, d, J=15.2Hz), 3.86 (2H, s), 2.28-2.07 (3H, m), 1.99-1.40 (7H, m, 与溶剂峰重叠.). LC-MS: M=300, RT=0.68 (分钟), [M+H]<sup>+</sup>=301.

[0959] (实施例3a) 引入了 N-(4-(氨基乙基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基的海藻酸 (EX3-(I)-A-2a) 的合成:

[0960] [化学式142]



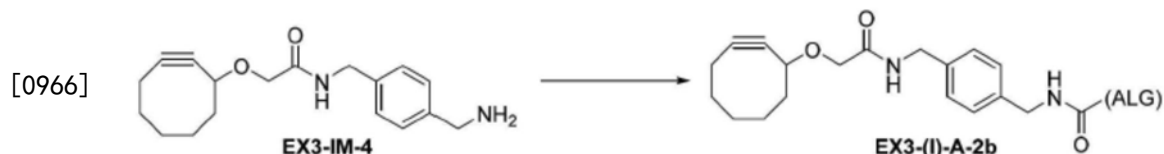
[0962] 在室温搅拌下, 向调整至 1 重量% 的 60mL 海藻酸钠 (持田制药株式会社制造、A-2)

水溶液中加入183mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)。然后,在该温度下滴加(实施例3)〈步骤4〉中得到的41.2mg化合物EX3-IM-4的5mL乙醇溶液,在40℃下搅拌4小时。冷却至室温后,加入600mg氯化钠,之后加入119mL乙醇,搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用5mL乙醇洗涤3次后,减压下干燥,得到了为白色固体的标题化合物EX3-(I)-A-2a。将该白色固体溶解于40mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥22小时,得到了597mg为白色棉状物的标题化合物EX3-(I)-A-2a。

[0963] 反应性取代基(N-(4-(氨基乙基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰氨基)的引入率为3.7mol% (NMR积分比)。

[0964] (实施例3b)引入了N-(4-(氨基乙基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰氨基的海藻酸(EX3-(I)-A-2b)的合成:

[0965] [化学式143]



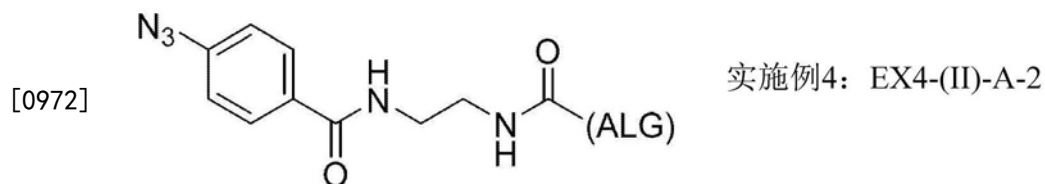
[0967] 在调整至1重量%的290mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造、A-2)水溶液中加入405mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、(实施例3)〈步骤4〉中得到的121mg化合物EX3-IM-4的29mL乙醇溶液、366μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在32℃下搅拌3小时20分钟。加入2.9g氯化钠后,加入580mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了2.67g为白色固体的标题化合物EX3-(I)-A-2b。

[0968] 将该白色固体溶解于180mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥6小时,之后暂且冷藏保存。再次于40℃下干燥5小时,得到了2.77g为白色无定形的标题化合物EX3-(I)-A-2b。

[0969] 反应性取代基(N-(4-(氨基乙基)苄基)-2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰氨基)的引入率为2.1mol% (NMR积分比)。

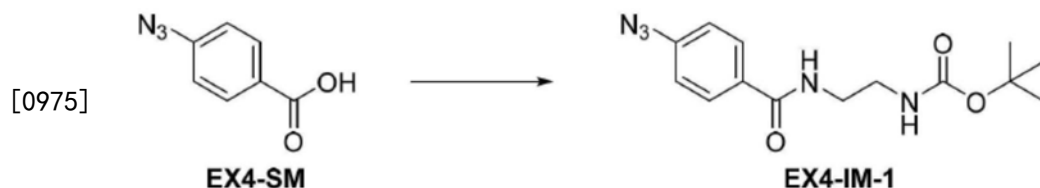
[0970] (实施例4)

[0971] 引入了N-(2-氨基乙基)-4-叠氮苯甲酰氨基的海藻酸(实施例4)的合成:[化学式144]



[0973] 〈步骤1〉叔丁基(2-(4-叠氮苯甲酰胺)乙基)氨基甲酸酯(化合物EX4-IM-1)的合成:

[0974] [化学式145]

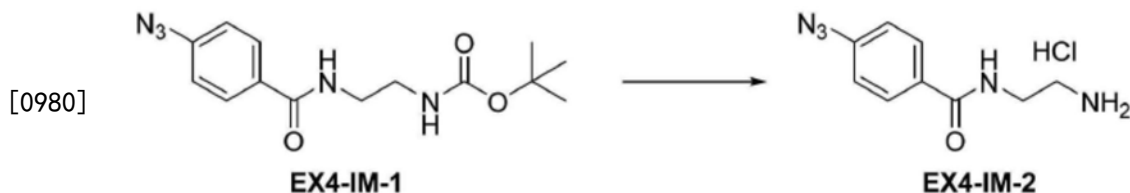


[0976] 在700mg 4-叠氮苯甲酸 (EX4-SM、[CAS:6427-66-3]) 中加入783μL亚硫酰氯、3μL N,N-二甲基甲酰胺,在70℃下搅拌1小时。减压浓缩反应液,在残余物中加入1mL二氯甲烷进行共沸,再次进行同样的操作。在冰水冷却下,向所得的淡黄色固体的3mL二氯甲烷溶液中加入825mg叔丁基(2-氨基乙基)氨基甲酸酯[CAS:57260-73-8]、1.04mL吡啶的7.0mL二氯甲烷溶液,在室温下搅拌1小时。反应液用30mL叔丁基甲醚稀释,用10mL水、5mL饱和碳酸氢钠水溶液、5mL 0.5当量的枸橼酸(2次)、5mL水、5mL饱和食盐水依次洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥,并减压浓缩。将残余物在叔丁基甲醚/庚烷中捣碎,过滤固体后,用叔丁基甲醚/庚烷洗涤,得到了1.1g为白色固体的标题化合物EX4-IM-1。

[0977] NMR数据(CDCl<sub>3</sub>) (δ:ppm): 7.83 (2H、d、J=8Hz)、7.26 (1H、brs)、7.05 (2H、d、J=8Hz)、4.97 (1H、brs)、3.55 (2H、q、J=5Hz)、3.45-3.37 (2H、m)、1.43 (9H、s)、LC-MS:M=305、RT=0.90 (分钟)、[M+H]<sup>+</sup>=306、[M+Na]<sup>+</sup>=328

[0978] <步骤2>N-(2-氨基乙基)-4-叠氮苯甲酰胺盐酸盐(化合物EX4-IM-2)的合成:

[0979] [化学式146]

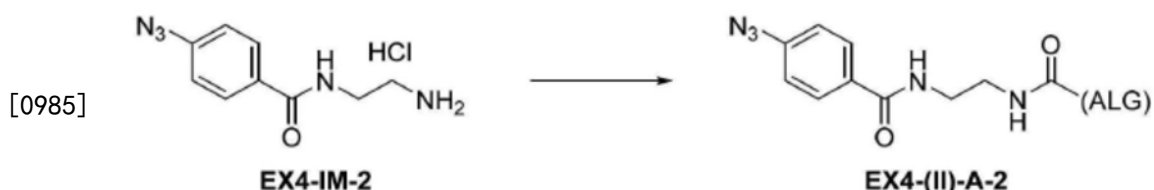


[0981] 将(实施例4)<步骤1>中得到的500mg化合物(EX4-IM-1)悬浮于1.5mL 1,4-二噁烷中。在冰水冷却下,加入4当量的氯化氢/3.5mL二噁烷溶液,在室温下搅拌2.5小时。在反应液中加入10.5mL二异丙醚,在室温下搅拌50分钟。过滤固体,用二异丙醚洗涤后减压干燥,得到了365mg为浅米黄色固体的标题化合物EX4-IM-2。

[0982] NMR数据(DMSO-d<sub>6</sub>) (δ:ppm): 8.68 (1H、t、J=6Hz)、7.93 (2H、d、J=9Hz)、7.82 (1H、brs)、7.22 (2H、d、J=9Hz)、3.49 (2H、q、J=6Hz)、2.97 (2H、t、J=6Hz)、LC-MS:M(游离胺)=205、RT=0.56 (分钟)、[M+H]<sup>+</sup>=206

[0983] <步骤3-1>引入了N-(2-氨基乙基)-4-叠氮苯甲酰胺氨基的海藻酸(EX4-(II)-A2)的合成:

[0984] [化学式147]



[0986] 在调制成1重量%的60mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入167mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、37mg(实施例4)<步骤2>中得到的化合物EX4-IM-2、227μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液,在30℃下搅拌3.5小时。加入600mg氯化钠后,加入120mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了615mg为白色粉末的标题化合物EX4-(II)-A-2。

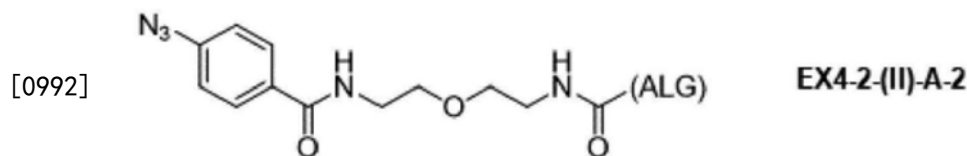
[0987] 将该白色固体溶解于40mL水中,冷冻干燥后,在40℃下干燥22小时,得到了583mg为白色无定形的标题化合物EX4-(II)-A-2。

[0988] 反应性基团 (N-(2-氨基乙基)-4-叠氮苯甲酰氨基) 的引入率为5.3mol% (NMR积分比)。

[0989] (实施例4-2)

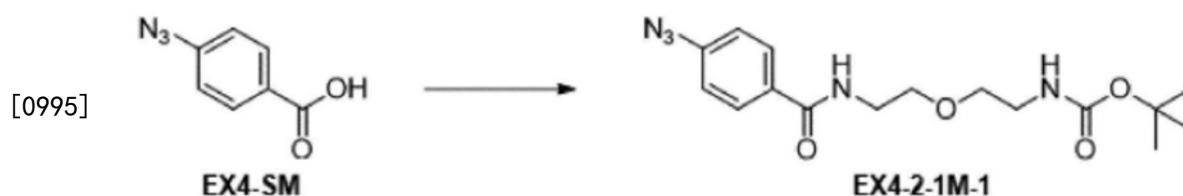
[0990] 引入了N-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-4-叠氮苯甲酰氨基的海藻酸的合成 (EX4-2-(II)-A-2)：

[0991] [化学式148]



[0993] <步骤1>叔丁基(2-(2-(4-叠氮苯甲酰胺)乙氧基)乙基)氨基甲酸酯(化合物EX4-2-IM-1)的合成：

[0994] [化学式149]

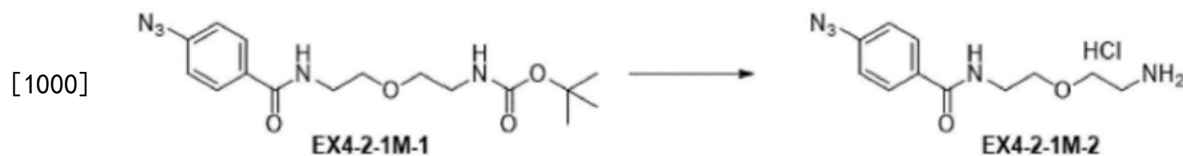


[0996] 将300mg 4-叠氮苯甲酸[CAS:6427-66-3] (EX4-SM)、376mg叔丁基(2-(2-氨基乙氧基)乙基)氨基甲酸酯[CAS:127828-22-2]溶解于6.0mL乙腈中。加入0.77g 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐、707μL二异丙基乙胺,在室温下搅拌16小时。在反应液中加入20mL乙酸乙酯、10mL水,进行分液。有机层用10mL水、5mL饱和食盐水依次洗涤,用无水硫酸钠干燥后减压浓缩。残余物通过硅胶柱色谱(20%乙酸乙酯/正庚烷~70%乙酸乙酯/正庚烷)纯化,得到了673mg为淡黄色胶状物的标题化合物EX4-2-IM-1。

[0997] NMR数据(CDCl<sub>3</sub>) (δ:ppm): 7.83 (2H、d、J=9Hz)、7.08 (2H、d、J=9Hz)、6.61 (1H、brs)、4.84 (1H、brs)、3.68-3.64 (4H、m)、3.56 (2H、t、J=5Hz)、3.34 (2H、q、J=5Hz)、1.44 (9H、s)

[0998] <步骤2>N-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-4-叠氮苯甲酰胺盐酸盐(化合物EX4-2-IM-2)的合成：

[0999] [化学式150]

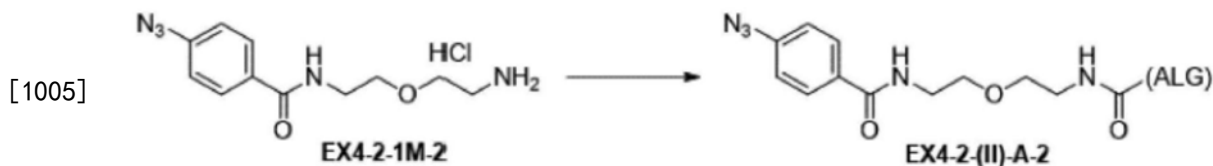


[1001] 在冰水冷却下,在(实施例4-2)<步骤1>中得到的670mg化合物 (EX4-2-IM-1) 中加入4当量的氯化氢/4.7mL 1,4-二噁烷,在室温下搅拌2小时。在反应液中加入14mL二异丙醚,搅拌30分钟。滤取所得的固体,用二异丙醚洗涤后减压干燥,得到了604mg为淡米黄色固体的标题化合物EX4-2-IM-2。

[1002] NMR数据(DMSO-d<sub>6</sub>) (δ:ppm): 8.61 (1H、t、J=6Hz)、7.95 (3H、brs)、7.93 (2H、d、J=9Hz)、7.20 (2H、d、J=9Hz)、3.62 (2H、t、J=5Hz)、3.57 (2H、t、J=6Hz)、3.46 (2H、q、J=6Hz)、3.02-2.93 (2H、m)、LC-MS (游离胺): RT=0.57 (分钟)、[M+H]<sup>+</sup>=250

[1003] <步骤3>引入了N-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-4-叠氮苯甲酰氨基的海藻酸(EX4-2-(II)-A-2)的合成:

[1004] [化学式151]



[1006] 在调制成1重量%的118mL海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液中加入366.09mg氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉(DMT-MM)、274.51μL浓度为1摩尔的碳酸氢钠水溶液。然后,在室温下加入(实施例4-2)<步骤2>中得到的78.44mg化合物EX4-2-1M-2的1mL水和1mL乙醇的溶液,在40℃下搅拌4小时。在室温下加入1.2g氯化钠后,加入237mL乙醇,在室温下搅拌30分钟。滤取所得的沉淀,用乙醇洗涤后减压干燥,得到了1.17g为白色固体的标题化合物EX4-2-(II)-A-2。

[1007] 将该白色固体溶解于80mL水中,冷冻干燥,得到了1.14g为白色棉状物的标题化合物EX4-2-(II)-A-2。

[1008] 反应性基团(N-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-4-叠氮苯甲酰氨基)的引入率为2.72mol%(NMR积分比)。

[1009] [表12]

实施例	测定波长 (nm)	分子量 (Da)	重均分子量 (Da)	引入率 (mol%)
1a	280	1万2千~265万	153万	6.9 (*)
2a	255	1万5千~253万	151万	6.1 (*)

[1011] \*:NMR积分比

[1012] [反应性基团或互补的反应性基团的引入率测定]

[1013] 反应性基团或互补的反应性基团引入率是指,向每个作为海藻酸的重复单元的糖醛酸单糖单元中引入的反应性基团或互补的反应性基团的数目以百分率表示而得的值。

[1014] 在本实施例中,反应性基团或互补的反应性基团引入率(mol%)通过<sup>1</sup>H-NMR的积分比来计算。另外,引入率的计算所需的海藻酸的量通过利用了标准曲线的咔唑硫酸法进行测定,反应性基团或互补的反应性基团的量也可通过利用了标准曲线的吸光度测定法进行测定。

[1015] [分子量的测定]

[1016] 将实施例中得到的引入了反应性基团或互补的反应性基团的海藻酸固体溶解于含有0.15mol/L NaCl的10mmol/L的磷酸缓冲液(pH7.4)中,调制0.1%的溶液,通过孔径0.22μm的聚醚砜制过滤器(Minisart High Flow Filter、Sartorius公司)去除不溶物后,作为凝胶过滤用样品。使用分光光度计DU-800(Beckman-Coulter公司)测定各样品的光谱,确定各化合物在凝胶过滤中的测定波长。对于不具有特异性吸收波长的化合物,使用差示折射计。

[1017] 将200μL凝胶过滤用样品供于Superose6 Increase10/300GL柱(GE Healthcare Sciences公司)。在凝胶过滤中,使用AKTA Explorer 10S作为色谱装置,使用含有0.15mol/

L NaCl的10mmol/L的磷酸缓冲液(pH7.4)作为展开溶剂,在室温下、流速0.8mL/分钟的条件  
下实施。监测各化合物在所确定的波长的吸收,制作样品的洗脱曲线。所得色谱图利用  
Unicorn5.31软件(GE Healthcare Sciences公司)进行分析,确定峰范围。

[1018] 关于引入了反应性基团或互补的反应性基团的海藻酸的分子量,使用蓝色葡聚糖  
(分子量200万Da、SIGMA公司)、甲状腺球蛋白(分子量66.9万Da、GE Healthcare Sciences  
公司)、铁蛋白(分子量44万Da、GE Healthcare Sciences公司)、醛缩酶(分子量15.8万Da、  
GE Healthcare Sciences公司)、伴清蛋白(分子量7.5万Da、GE Healthcare Sciences公  
司)、卵清蛋白(分子量4.4万Da、GE Healthcare Sciences公司)、核糖核酸酶A(分子量1.37  
万Da、GE Healthcare Sciences公司)和抑肽酶(分子量6500Da、GE Healthcare Sciences  
公司)作为标准品,与引入了反应性基团或互补的反应性基团的海藻酸在相同条件下进行  
凝胶过滤,利用Unicorn软件确定各成分的洗脱液量。分别以该各成分的洗脱液量为横轴、  
以分子量的对数值为纵轴作图,进行直线回归,制作标准曲线。标准曲线是从蓝色葡聚糖到  
铁蛋白、从铁蛋白到抑肽酶制作2种。

[1019] 利用该标准曲线,计算之前得到的色谱图的洗脱时间*i*下的分子量(*M<sub>i</sub>*)。然后,读  
取洗脱时间*i*下的吸光度,作为*H<sub>i</sub>*。根据这些数据,由下式求出重均分子量(*M<sub>w</sub>*)。

[1020] [数学式1]

$$[1021] \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} (H_i \times M_i)}{\sum_{i=1}^{\infty} H_i}$$

[1022] (实施例5)

[1023] 平板形海藻酸凝胶的制造

[1024] [海藻酸溶液的调制]

[1025] 使用各实施例中得到的海藻酸衍生物,调制1.6重量%或3.3重量%的水溶液,使  
用Minisart High Flow(Sartorius,0.2μm,Cat.16532GUK)进行过滤灭菌。调整过滤灭菌后  
的水溶液的盐浓度,制成1.5重量%或3.0重量%的生理盐水溶液。

[1026] 实施例1(a、b、c)的海藻酸:1.5重量%的生理盐水溶液(实施例5-1a、实施5-1b、实  
施例5-1c的溶液);

[1027] 实施例2(a、b、c)的海藻酸:3.0重量%的生理盐水溶液(实施例5-2a、实施例5-2b、  
实施例5-2c的溶液);

[1028] 实施例3(a)的海藻酸:1.5重量%的生理盐水溶液(实施例5-3a的溶液);

[1029] 实施例4的海藻酸:3.0重量%的生理盐水溶液(实施例5-4的溶液)。

[1030] 或者,使用各实施例中得到的海藻酸衍生物,调制1.0重量%的生理盐水溶液,使  
用MILLEX GV 0.22μm(Millipore,0.22μm,Cat.SLGV033RS)进行过滤灭菌。

[1031] 实施例1(d)的海藻酸:1.0重量%的生理盐水溶液(实施例5-1d的溶液);

[1032] 实施例2(d)的海藻酸:1.0重量%生理盐水溶液(实施例5-2d的溶液);

[1033] 实施例3(b)的海藻酸:1.0重量%生理盐水溶液(实施例5-3b的溶液);

[1034] 实施例4-2的海藻酸:1.0重量%生理盐水溶液(实施例5-5的溶液)。

[1035] 在以下的实施例中,将这些的各海藻酸生理食盐溶液调整至适当浓度,用于试验。

[1036] 将实施例1(a、b、c)或实施例3(a)中调制海藻酸与实施例2(a、b、c)或实施例4中

调制的海藻酸组合,制作已化学交联的海藻酸凝胶。

[1037] 更具体而言,将实施例5-1(a、b、c)的溶液与实施例5-2(a、b、c)的溶液组合,将实施例5-3a的溶液与实施例5-4的溶液组合。

[1038] 另外,将实施例1(d)或实施例3(b)中调制的海藻酸与实施例2(d)或实施例4-2中调制的海藻酸组合,制作已化学交联的海藻酸凝胶。

[1039] 更具体而言,将实施例5-1d的溶液与实施例5-2d的溶液组合,将实施例5-1d的溶液与实施例5-5的溶液组合,将实施例5-3b的溶液与实施例5-2d的溶液组合,将实施例5-3b的溶液与实施例5-5的溶液组合。

[1040] [平板形海藻酸凝胶的制造]

[1041] <常规的调制方法>

[1042] 将2mL 55mmol/L的氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )水溶液装入3.5cm的培养皿中,使用P1000移液管滴加400 $\mu\text{L}$ 海藻酸溶液,静置10分钟。在此期间,经过5分钟以上凝固后,用手振荡培养皿,使海藻酸的边缘凝固。10分钟后,追加添加4mL氯化钙溶液,静置5分钟。用生理盐水洗涤3次,得到平板形海藻酸凝胶。

[1043] 这里,平板形凝胶例如是指短径为12~15mm、长径为12~18mm、厚度为0.5~5mm左右的大小的海藻酸凝胶,也可形成圆形、四边形、六边形、八边形等,没有特别限定。

[1044] (实施例6)

[1045] 海藻酸凝胶的生物适应性试验

[1046] [实施例6-1:移植用平板形海藻酸凝胶的制造]

[1047] 依据实施例5中记载的“平板形海藻酸凝胶的制造”,使用55mmol/L的氯化钙水溶液制造了平板形海藻酸凝胶。海藻酸溶液使用下述溶液:调制成1重量%的海藻酸钠(持田制药株式会社制造:B-2)水溶液、海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液、将实施例5-1b的溶液与实施例5-2b的溶液以2:1的容量比混合而得的溶液、将实施例5-1d的溶液与实施例5-2d的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液、将实施例5-1d的溶液与实施例5-5的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液、将实施例5-3b的溶液与实施例5-2d的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液、将实施例5-3b的溶液与实施例5-5的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液,调制了下述的平板形海藻酸凝胶。

[1048] 将所调制的平板形海藻酸凝胶在D-MEM培养基中培养一夜。第二天,置换成无血清D-MEM培养基,再置换成生理盐水,静置1小时以上,得到了对动物的移植用海藻酸凝胶。

[1049] 实施例6-1a:

[1050] 使用调制成1重量%的海藻酸钠(持田制药株式会社制造:B-2)水溶液,得到了短径12mm-长径15mm-厚度5mm的平板形(平板上)海藻酸凝胶。该平板形海藻酸凝胶的照片以图1(a)显示。

[1051] 实施例6-1b:

[1052] 使用将实施例5-1b的溶液与实施例5-2b的溶液以2:1的容量比混合而得的溶液,得到了短径12mm-长径12mm-厚度4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成1%的浓度。该平板形海藻酸凝胶的照片以图2(a)显示。

[1053] 实施例6-1c:

[1054] 使用将实施例5-1b的溶液与实施例5-2b的溶液以2:1的容量比混合而得的溶液,

得到了短径12mm-长径12mm-厚度4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成2%的浓度。该平板形海藻酸凝胶的照片以图3(a)显示。

[1055] 实施例6-1d:

[1056] 使用调制成1重量%的海藻酸钠(持田制药株式会社制造:A-2)水溶液,得到了短径约12mm-长径约12mm-厚度约4mm的平板形海藻酸凝胶。

[1057] 实施例6-1e:

[1058] 使用将实施例5-1d的溶液与实施例5-2d的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液,得到了短径约12mm-长径约12mm-厚度约4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成1%的浓度。

[1059] 实施例6-1f:

[1060] 使用将实施例5-1d的溶液与实施例5-5的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液,得到了短径约12mm-长径约12mm-厚度约4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成1%的浓度。

[1061] 实施例6-1g:

[1062] 使用将实施例5-3b的溶液与实施例5-2d的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液,得到了短径约12mm-长径约12mm-厚度约4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成1%的浓度。

[1063] 实施例6-1h:

[1064] 使用将实施例5-3b的溶液与实施例5-5的溶液以1:1的容量比混合而得的溶液,得到了短径约12mm-长径约12mm-厚度约4mm的平板形海藻酸凝胶。作为化学交联基,调制成1%的浓度。

[1065] [实施例6-2:平板形海藻酸凝胶对动物的移植试验]

[1066] 将实施例6-1a~c中调制的各海藻酸凝胶移植到健康小鼠C57BL/6NCr的腹腔内。5周后开腹摘出凝胶,确认凝胶的状态。另外,还确认腹腔内的粘连或炎症。

[1067] 另外,将实施例6-1d~h中调制的各海藻酸凝胶移植到健康小鼠C57BL/6NCr的腹腔内。1周、2周或4周后开腹摘出凝胶,确认凝胶的状态。另外,还确认腹腔内的粘连或炎症。

[1068] 实施例6-1a的海藻酸凝胶:所摘出的海藻酸凝胶没有维持原始形状,呈零散、且残留并可确认的凝胶的回收量也少的状态。其状态的照片以图1(b)显示。

[1069] 实施例6-1b的海藻酸凝胶:所摘出的海藻酸凝胶其凝胶尺寸没有变化。其状态的照片以图2(b)显示。

[1070] 实施例6-1c的海藻酸凝胶:所摘出的海藻酸凝胶虽然开裂,但基本维持原始形状,凝胶尺寸没有变化。其状态的照片以图3(b)显示。

[1071] 实施例6-1d的海藻酸凝胶:1周后所摘出的海藻酸凝胶没有维持原始形状,呈零散、且残留并可确认的凝胶的回收量也少的状态。

[1072] 实施例6-1f的海藻酸凝胶:1周后、2周后、4周后所摘出的海藻酸凝胶其凝胶尺寸均无变化。

[1073] 实施例6-1g的海藻酸凝胶:1周后、2周后所摘出的海藻酸凝胶其凝胶尺寸均无变化。4周后所摘出的海藻酸凝胶虽然开裂,但基本维持原始形状,凝胶尺寸没有变化。

[1074] 实施例6-1h的海藻酸凝胶:1周后、2周后所摘出的海藻酸凝胶其凝胶尺寸均无变

化。4周后所摘出的海藻酸凝胶虽然开裂,但基本维持原始形状,凝胶尺寸没有变化。

[1075] 关于实施例6-1a、实施例6-1b、实施例6-1c的海藻酸凝胶,在移植、并于5周后开腹确认时,在腹腔内脏器间没有粘连/炎症。埋入了该凝胶的大网膜或肠道膜也没有粘连、炎症。零散的凝胶所粘附的肝脏没有粘连、炎症。

[1076] 关于实施例6-1d、实施例6-1f、实施例6-1g、实施例6-1h的海藻酸凝胶,在移植、并于1周后、2周后和4周后开腹确认时,在腹腔内脏器间没有粘连、炎症。埋入了该凝胶的大网膜或肠道膜也没有粘连、炎症。零散的凝胶所粘附的肝脏没有粘连、炎症。

[1077] [实施例6-3:平板形海藻酸凝胶的细胞存活确认试验]

[1078] 将作为胰腺郎格罕氏岛 $\beta$ 细胞的细胞株的MIN6细胞( $5 \times 10^6$ 个细胞)添加至用于调制实施例6-1a、实施例6-1b、实施例6-1c、实施例6-1d、实施例6-1e、实施例6-1f、实施例6-1g、实施例6-1h的海藻酸凝胶的各海藻酸溶液后,制作海藻酸凝胶,在D-MEM培养基中培养3~4周,在显微镜下确认MIN6细胞的存活。

[1079] 实施例6-1a、实施例6-1b、实施例6-1c、实施例6-1d、实施例6-1e、实施例6-1f、实施例6-1g、实施例6-1h的海藻酸凝胶中的细胞增殖良好,在显微镜下观察到细胞充分存活。

[1080] (实施例7)

[1081] 通过对糖尿病模型小鼠进行腹腔内移植来评价移植用器件

[1082] [猪胰岛的分离]

[1083] 基于该技术的已知顺序、或者霜田等人(Shimoda;Cell Transplantation,第21卷,第501-508页,2012年)中记载的方法、或采用了埃德蒙顿方案的标准的Ricordi技术等,在无菌下由成体猪获得无菌的可存活的胰腺,分离胰岛细胞。

[1084] [分离胰岛的培养方法]

[1085] 然后,依据野口(Noguchi)等人(Transplantation Proceedings,42,2084-2086(2010))的方法,将所分离的胰岛在培养基中(Connaught Medical Research Laboratory (CMRL)-based Miami-defined media#1(MM1;Mediatech-Cellgro,Herndon,VA)-补充0.5%的人血清白蛋白.)、在5%CO<sub>2</sub>/95%空气的潮湿气氛中、于37℃下培养1天。将所培养的胰岛用于移植用器件的制作。

[1086] [移植用器件的调制]

[1087] 利用交联基的引入率为5.0mol%的实施例1b和引入率为4.9mol%的实施例2b,分别调整1.5重量%的实施例5-1b的生理盐水溶液和3.0重量%的实施例5-2b的生理盐水溶液。

[1088] 通过将实施例5-1b的溶液与实施例5-2b的溶液以2:1的容量比混合,可调制交联基的引入率相当于5mol%的2重量%的海藻酸溶液。

[1089] 将实施例5-1b和实施例5-2b的溶液稀释至2倍和4倍来调制溶液,分别以2:1的容量比混合,调制溶液。

[1090] 以2倍稀释的溶液的混合溶液作为实施例7-1的溶液,以4倍稀释的溶液的混合溶液作为实施例7-2的溶液。

[1091] 另外,以同样的方法将实施例5-1c的溶液和实施例5-2c的溶液以2:1的容量比混合,以4倍稀释的溶液的混合液作为实施例7-3的溶液。

[1092] 分别使用100 $\mu$ L、200 $\mu$ L的实施例7-1和实施例7-2的溶液、以及100 $\mu$ L、200 $\mu$ L的实施例

例7-3的溶液调制的移植用器件如下。

[1093] <移植用器件>

[1094] 实施例7-1a:使用100 $\mu$ L的实施例7-1的溶液调制的移植用器件;

[1095] 实施例7-1b:使用200 $\mu$ L的实施例7-1的溶液调制的移植用器件;

[1096] 实施例7-2a:使用100 $\mu$ L的实施例7-2的溶液调制的移植用器件;

[1097] 实施例7-2b:使用200 $\mu$ L的实施例7-2的溶液调制的移植用器件;

[1098] 实施例7-3a:使用100 $\mu$ L的实施例7-3的溶液调制的移植用器件;

[1099] 实施例7-3b:使用200 $\mu$ L的实施例7-3的溶液调制的移植用器件。

[1100] 为了制作100 $\mu$ L或200 $\mu$ L的含猪胰岛的0.5重量%~1.0重量%的海藻酸溶液,将分注到1个器件中的胰岛颗粒悬浮于实施例5-1b的海藻酸溶液(B1),之后与实施例5-2b的海藻酸溶液(C1)混合,作为悬浮有猪胰岛的实施例7-1a、实施例7-1b、实施例7-2a和实施例7-2b的溶液。根据每1个器件的猪胰岛量10000IEQ的颗粒量(10~30 $\mu$ L),使用生理盐水对实施例5-1b的海藻酸溶液(B1)和实施例5-2b的海藻酸溶液(C1)进行浓度调节。

[1101] 另外,为了制作100 $\mu$ L或200 $\mu$ L的含猪胰岛的0.5重量%~1.0重量%的海藻酸溶液,将分注到1个器件中的胰岛颗粒悬浮于实施例5-1c的海藻酸溶液(B1),之后与实施例5-2c的海藻酸溶液(C1)混合,作为悬浮有猪胰岛的实施例7-3a和实施例7-3b的溶液。根据每1个器件的猪胰岛量10000IEQ的颗粒量(10~30 $\mu$ L),使用生理盐水对实施例5-1c的海藻酸溶液(B1)和实施例5-2c的海藻酸溶液(C1)进行浓度调节。

[1102] 作为实施例7-1a、实施例7-2a、实施例7-2b和实施例7-3b而调制的含猪胰岛的海藻酸溶液被迅速地封入半透膜(SPECTRUM公司制造的透析管“Spectra/Por CE(分馏分子量10万)”)中(将半透膜的一端热封后,装入海藻酸溶液,用钛夹子封口),在55mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液中浸渍10~15分钟,使器件中的海藻酸溶液凝胶化。

[1103] 凝胶化后,该移植用器件用生理盐水洗涤3分钟,在移植用培养基(M199-烟酰胺-FBS+P/S)中培养一夜。然后,在移植用无血清培养基(M199+P/S)中浸渍30分钟,之后用移植前洗涤用生理盐水+P/S浸渍30分钟进行洗涤,作为对小鼠的移植用器件。所制作的移植用器件的照片见图4。

[1104] • 移植用器件的大小:纵10mm×横26mm×厚度约2mm;

[1105] • 培养条件:M199+烟酰胺+胎牛血清+青霉素/链霉素(P/S)、0/N;

[1106] • 洗涤条件:1) 移植用无血清培养基(M199+P/S)、30分钟、r.t.;

[1107] 2) 生理盐水(盐水+P/S)、30分钟、r.t.

[1108] [表13]

移植用器件	海藻酸溶液	海藻酸
实施例7-1 (a、b)	相当于实施例5-1b和实施例5-2b的溶液的2倍稀释	实施例1b和实施例2b的海藻酸
实施例7-2 (a、b)	相当于实施例5-1b和实施例5-2b的溶液的4倍稀释	实施例1b和实施例2b的海藻酸
实施例7-3 (a、b)	相当于实施例5-1c和实施例5-2c的溶液的4倍稀释	实施例1c和实施例2c的海藻酸

[1110] [移植用器件的评价(移植试验)]

[1111] 使用动物:

[1112] 野生型免疫正常小鼠 (C57BL/6Ncr) 的糖尿病模型小鼠。13~17 周龄、雄性、25~35g。通过链脲霉素溶液的尾静脉注射、110mg/kg、单次给药,约1周制作了糖尿病模型。以随时血糖值为300mg/dL以上且600mg/dL以下的个体作为糖尿病模型。

[1113] 给药方法/移植方法:

[1114] 通过腹腔内给予0.25~0.3mL的三种混合麻醉药(美托咪啶 (Domitor)/咪达唑仑 (Midazolam)/布托啡诺 (Vetorphale)) 进行麻醉,在麻醉下进行腹部剃毛,消毒后将腹部正中切开约2cm,将洗涤后的移植用器件单纯留置在腹腔内进行移植,没有固定。移植后闭腹,皮下注射0.25~0.3mL美托咪定拮抗剂 (Antisedan) 将其唤醒。手术是在热垫上对小鼠保温来进行。未给予免疫抑制剂。也未给予补液、抗生素、抗炎药等。

[1115] 血糖值/体重测定法:

[1116] 移植前和移植后第1天起间隔数天于白天定时测定随时血糖值。用手术刀切开尾,从伤口处取1滴血,使用Glutest Neo Alpha和Glutest Neo传感器测定血糖值。在即将测定随时血糖值之前利用电子秤测量体重。以器件移植小鼠的随时血糖值小于300mg/dL的小鼠作为糖尿病已痊愈的个体。

[1117] 在使用实施例7-2a的移植器件时,直至移植后75天的血糖值变化见图5-1、体重变化见图6-1。另外,直至移植后第305天的血糖值变化见图5-2、体重变化见图6-2。再于移植后第305天取出移植用器件,将其移植到另一个糖尿病模型小鼠体内(这里,将器件移植到糖尿病模型小鼠体内,经过规定期间后取出所移植的器件,将所取出的器件移植到另一个糖尿病模型小鼠体内,以上操作称为“中继移植”)、直至中继移植后第26天的血糖值变化见图5-3、体重变化见图6-3。图5-1~3和图6-1~3中,#1和#2分别是指识别所移植的小鼠个体的编号。

[1118] 体重变化未见异常,血糖值75天均维持在正常值。另外,移植后305天和进一步中继移植后26天体重变化未见异常,血糖值维持正常。

[1119] 在使用实施例7-2b的移植器件时,血糖值的变化与实施例7-2a同样,体重变化未见异常,血糖值75天均维持在正常值。

[1120] 另外,在使用实施例7-2b的移植用器件时,直至移植后第305天的血糖值变化见图7-1、体重变化见图8-1。进一步在移植后第305天取出移植用器件,将其移植到另一个糖尿病模型小鼠体内,直至中继移植后第26天的血糖值变化见图7-2、体重变化见图8-2。

[1121] 移植后305天和进一步中继移植后26天,体重变化未见异常,血糖值维持正常。

[1122] 在使用实施例7-3b的移植器件时,血糖值的变化与实施例7-2a同样,体重变化未见异常,血糖值75天均维持在正常值。

[1123] 另外,在使用实施例7-3b的移植用器件时,直至移植后第305天的血糖值变化见图9-1、体重变化见图10-1。再于移植后第305天取出移植用器件,将其移植到另一个糖尿病模型小鼠体内,直至中继移植后第26天的血糖值变化见图9-2、体重变化见图10-2。需要说明的是,#2和#3是指中途摘出器件,试验结束。

[1124] 移植后305天和进一步中继移植后26天,体重变化未见异常,血糖值维持正常。

[1125] 在上述移植用器件的制作中,制作了未使用海藻酸衍生物、而将胰岛封入半透膜内的移植用器件。在按照与上述的[移植用器件的评价(移植试验)]同样的方法移植到小鼠

体内时,没有观察到糖尿病小鼠的血糖抑制效果。

[1126] 组织反应性的评价:

[1127] 组织反应性的评价如下进行。

[1128] 在移植后的几周后、或随时血糖值上升后,使用三种混合麻醉药将器件移植小鼠麻醉,在麻醉下进行腹部消毒,将腹部正中切开约4cm,从腹腔内脏器间寻找移植器件。在脏器间看到一部分器件后,用镊子慢慢地取出,研究是否以单体取出器件。观察所取出的器件的表面状况。

[1129] <观察项目>

[1130] 1.研究在器件表面是否有血管生成。如果有血管生成,观察是生长至毛细血管水平还是生长为粗血管。

[1131] 2.接下来,观察是否与脏器或腹膜、大网膜等粘连、或者是相连。研究脏器是否可钝性剥离、还是需要锐性剥离。

[1132] 3.在与脏器直接粘连的情况下,确认是哪个脏器与器件的哪个部分(整个面、一部分、边、器件折痕部分或密封部分等)粘连。

[1133] 4.确认脏器侧是否有炎症等。

[1134] ※摘出器件后,闭腹,皮下注射拮抗剂将其唤醒。手术是在热垫上对小鼠保温来进行。

[1135] 在使用实施例7-1a的移植器件时,移植10周后摘出器件,观察组织反应性,结果如下:(1)器件表面没有血管生成;(2)器件未与脏器或腹膜、大网膜等粘连;(3)脏器可钝性剥离,未与脏器直接粘连;(4)在脏器侧没有观察到炎症等。

[1136] 对于所摘出的器件内的存活胰岛细胞的状况,在进行如下所述的染色、即(a)使用双硫脲进行的胰岛细胞染色、(b)使用双硫脲进行的胰岛细胞染色、(c)使用FDA进行的活细胞的荧光染色、(d)使用PI进行的死细胞的荧光染色后,在显微镜下观察未染色而分散在海藻酸凝胶中的胰岛细胞。其结果,可确认到胰岛细胞在器件中充分存活。

[1137] 将移植后的10周后所摘出的器件打开,确认器件中的海藻酸凝胶的形状。其结果,判明了:长期放置在生物体内的移植用器件中的海藻酸凝胶的形状得到维持。

[1138] 由以上判明:优选方案的移植用器件至少显示下述的1个以上的效果。

[1139] (1)生物适应性或稳定性优异,细胞毒性也少,在移植部位也几乎没有粘连或炎症。

[1140] (2)凝胶的溶解少,长期维持形状。

[1141] (3)可使降血糖作用长期持续而调节血糖。

[1142] (4)长期使用后,半透膜中的海藻酸凝胶没有溶解,可维持形状,还可使胰岛存活、维持功能,可长期使用。

[1143] (5)可交换,可免疫隔离,粘连、炎症等也少,成为安全性高的医疗材料。

[1144] 更优选的方案移植用器件,其移植成效或功能性优异,原材料是新型的,通过移植到糖尿病患者(特别是I型糖尿病和胰岛素耗竭型II型糖尿病)体内,可使降血糖作用长期持续而调节血糖。另外,在水凝胶内的胰岛素分泌细胞或胰岛的功能降低的情况下可回收。或者,可定期交换或追加移植。另外,作为封入至移植用器件的水凝胶内的胰岛素分泌细胞或胰岛,也可使用由干细胞(iPS等)分化而得的胰岛素分泌细胞、或人胰岛。因此,更优

选的方案移植用器件是有效的。

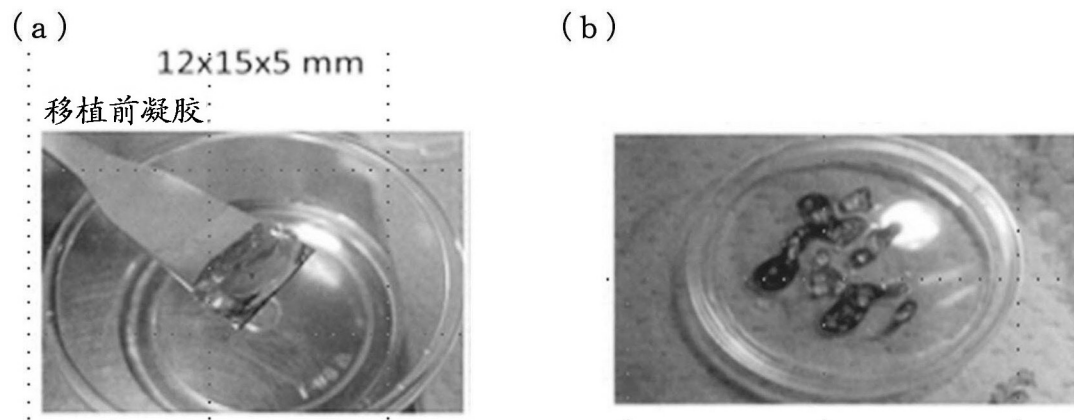


图 1

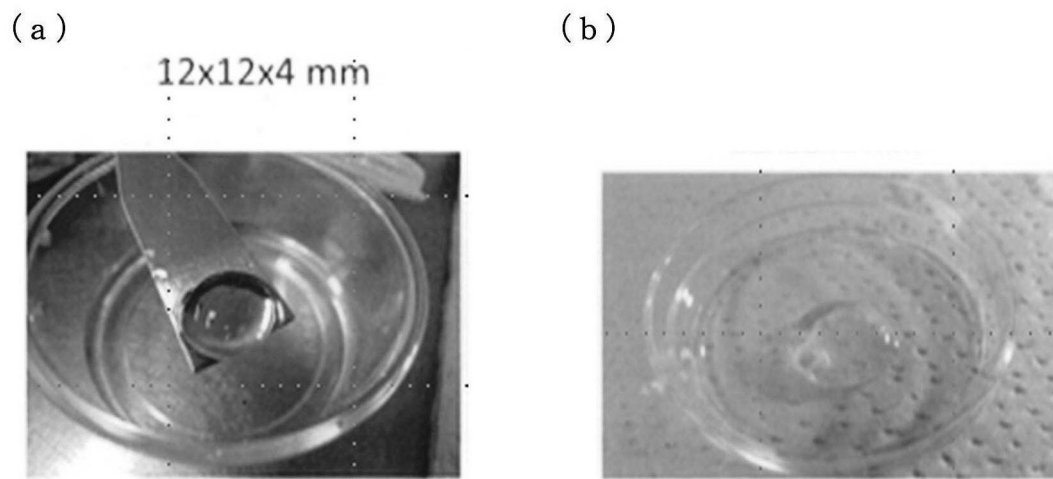


图 2

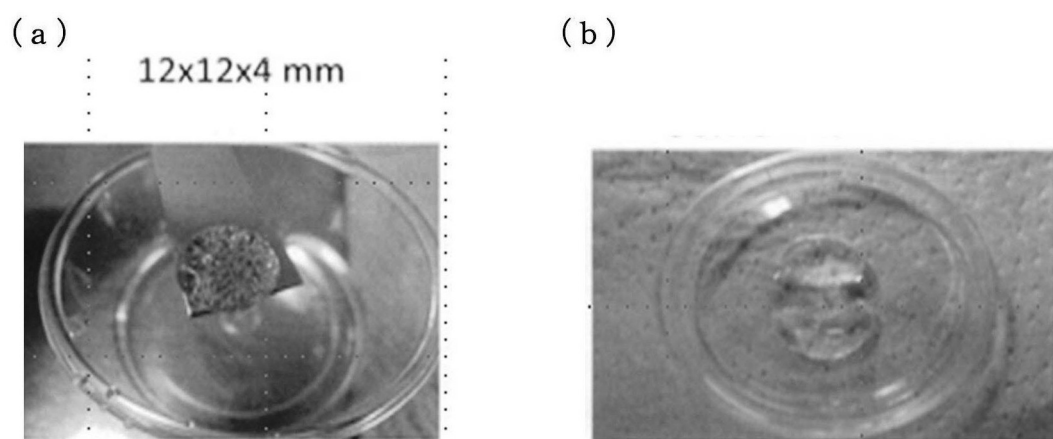


图 3

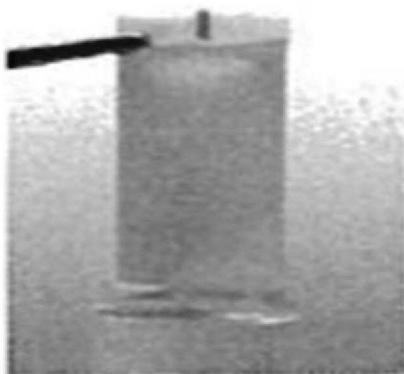


图 4

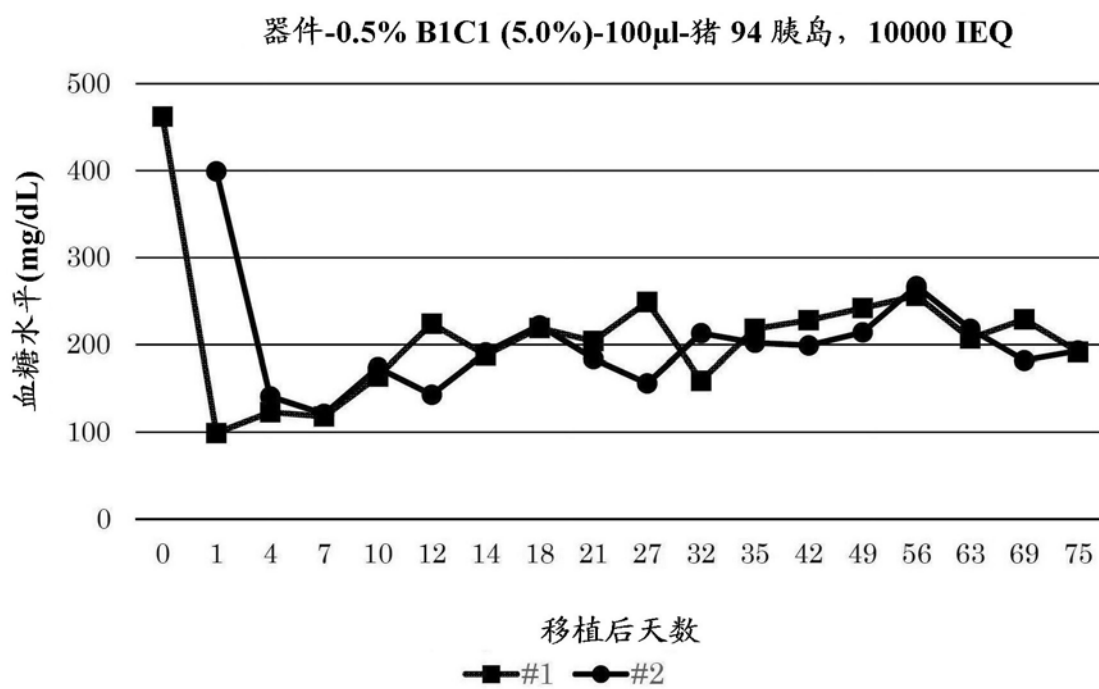


图 5-1

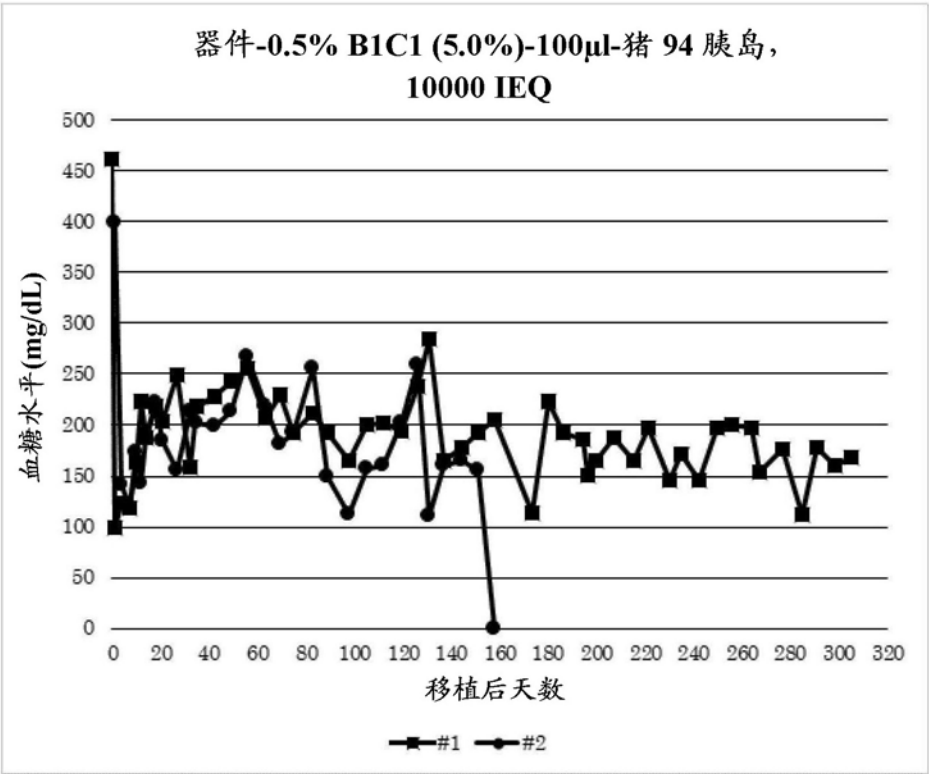


图 5-2

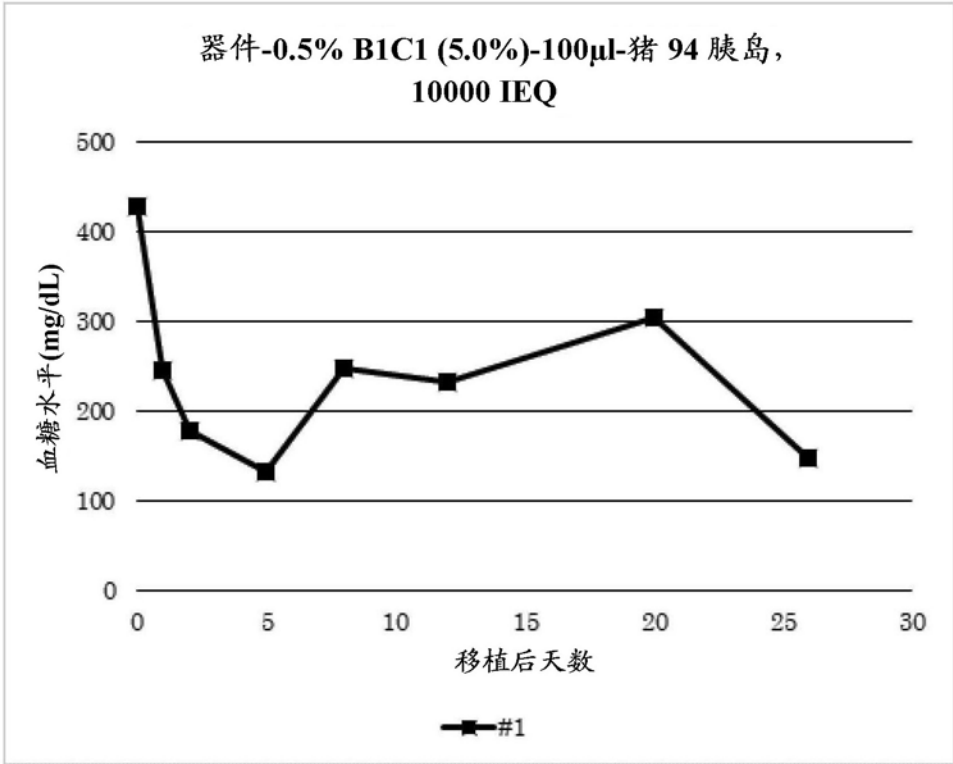


图 5-3

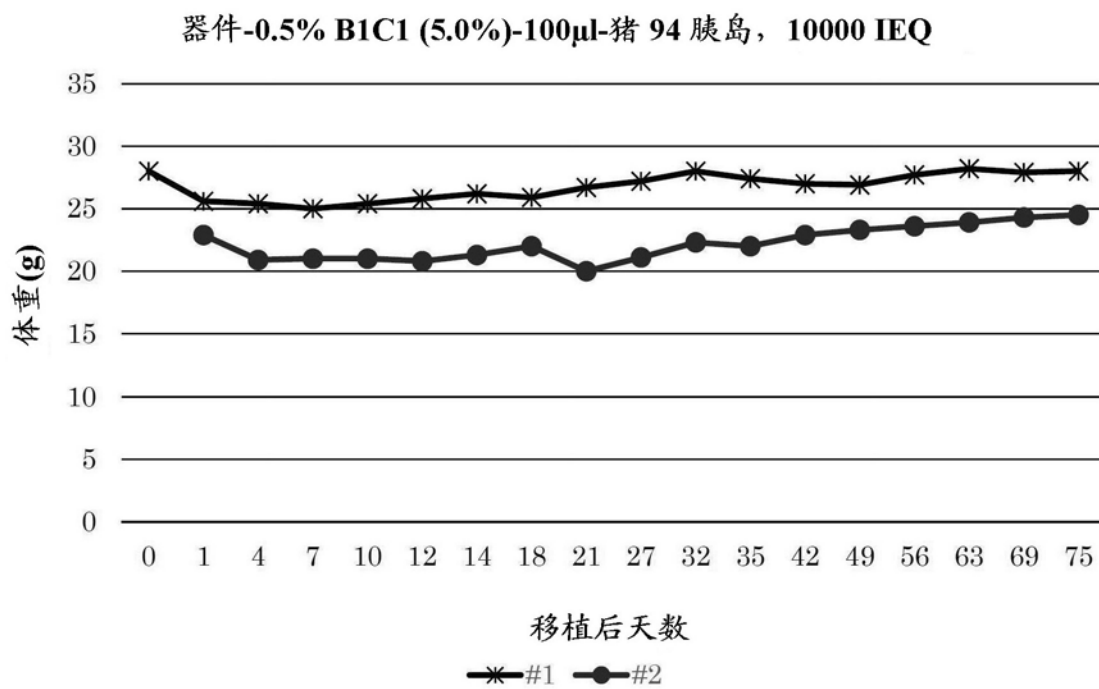


图 6-1

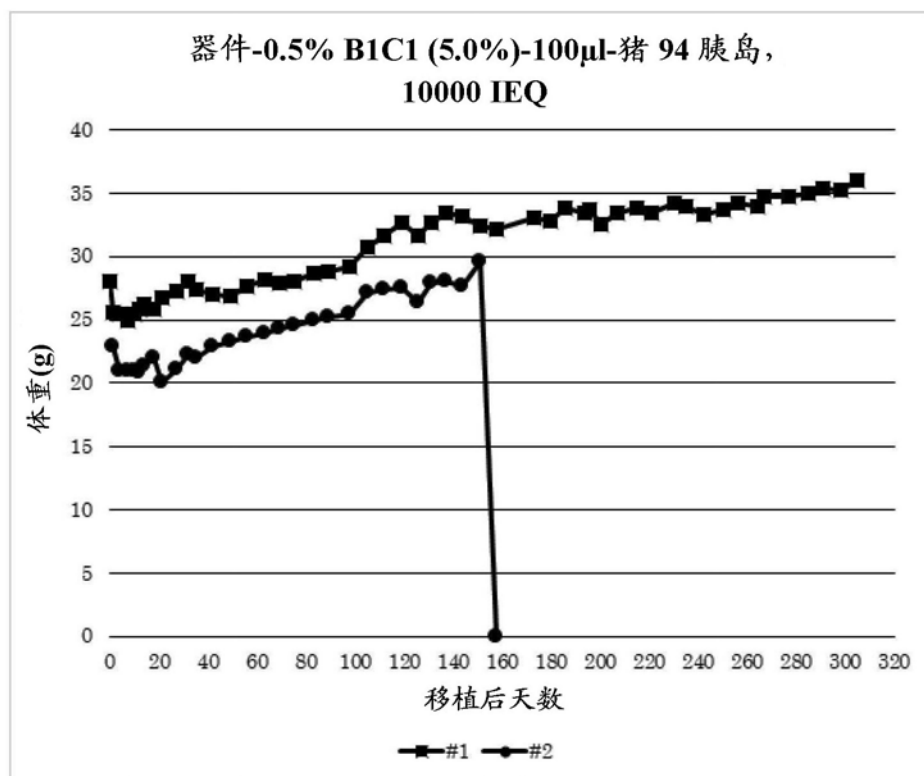


图 6-2

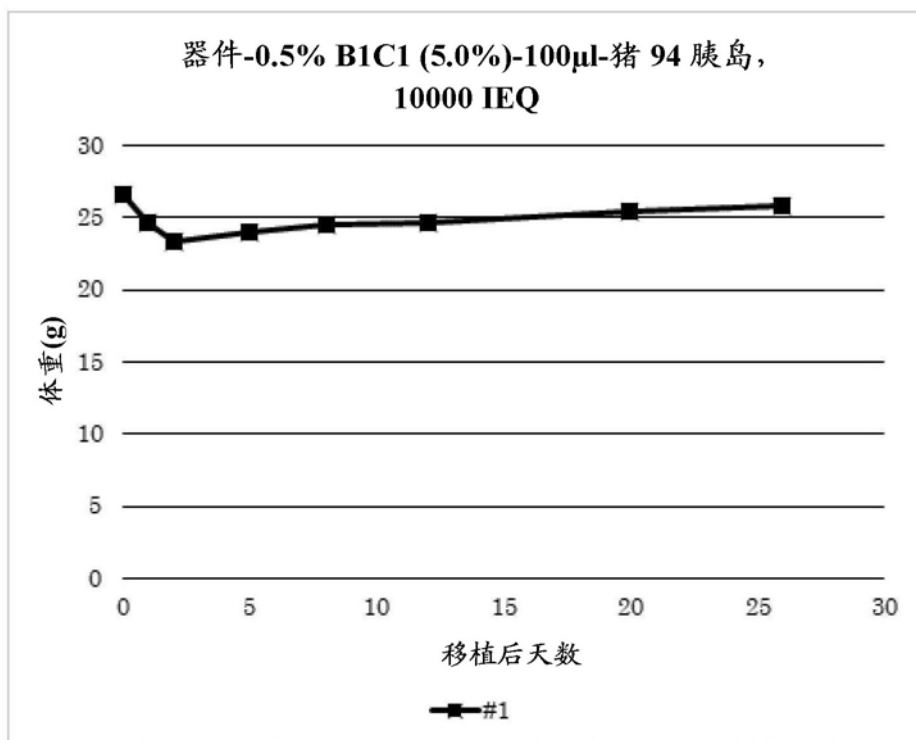


图 6-3

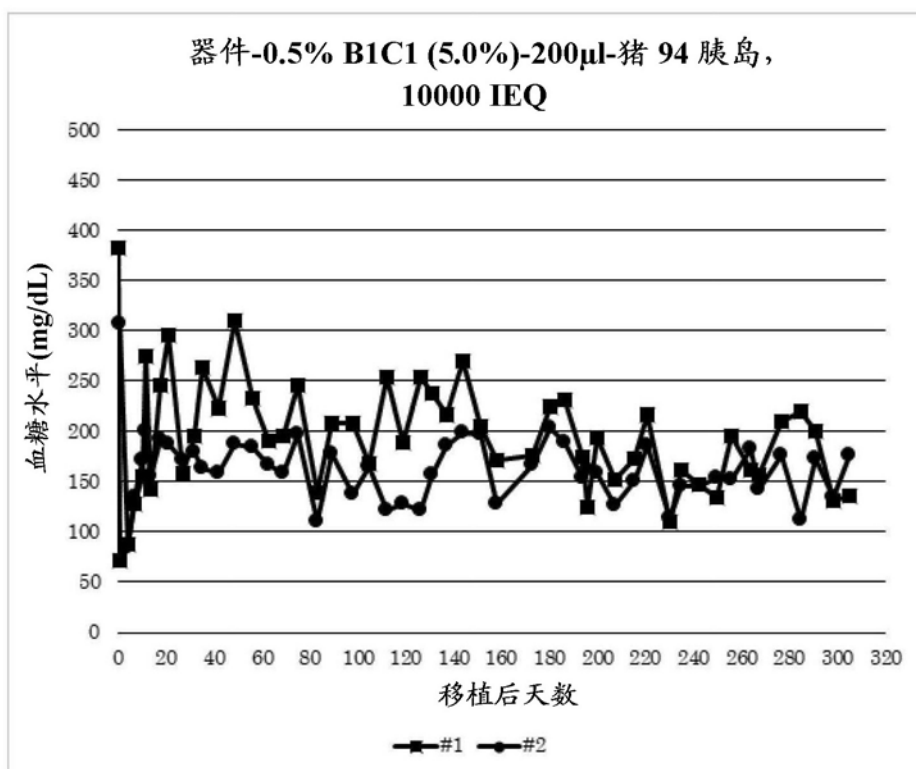


图 7-1

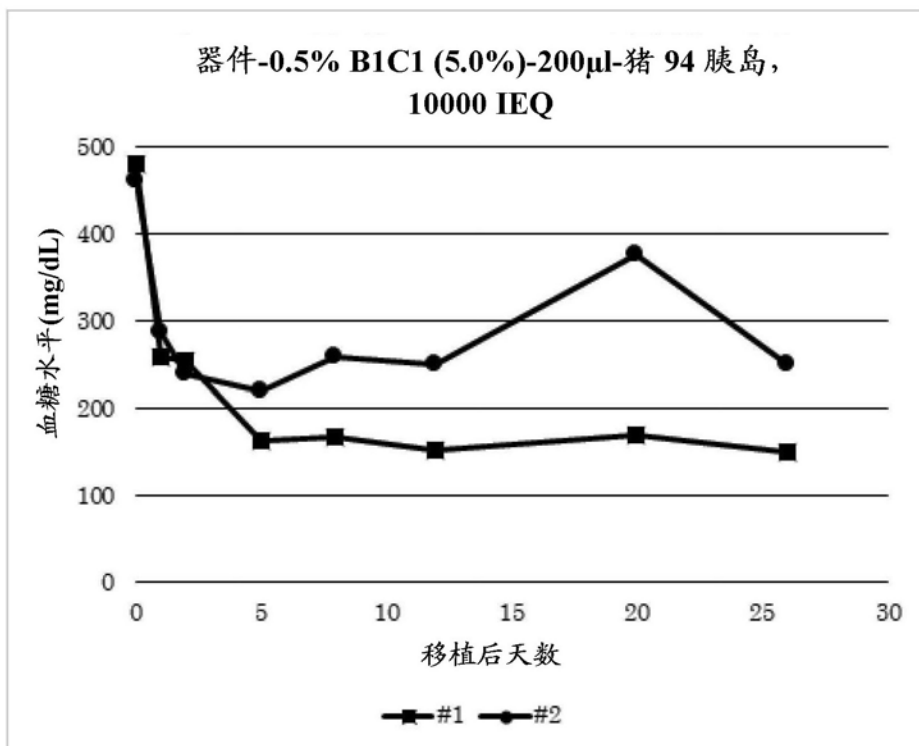


图 7-2

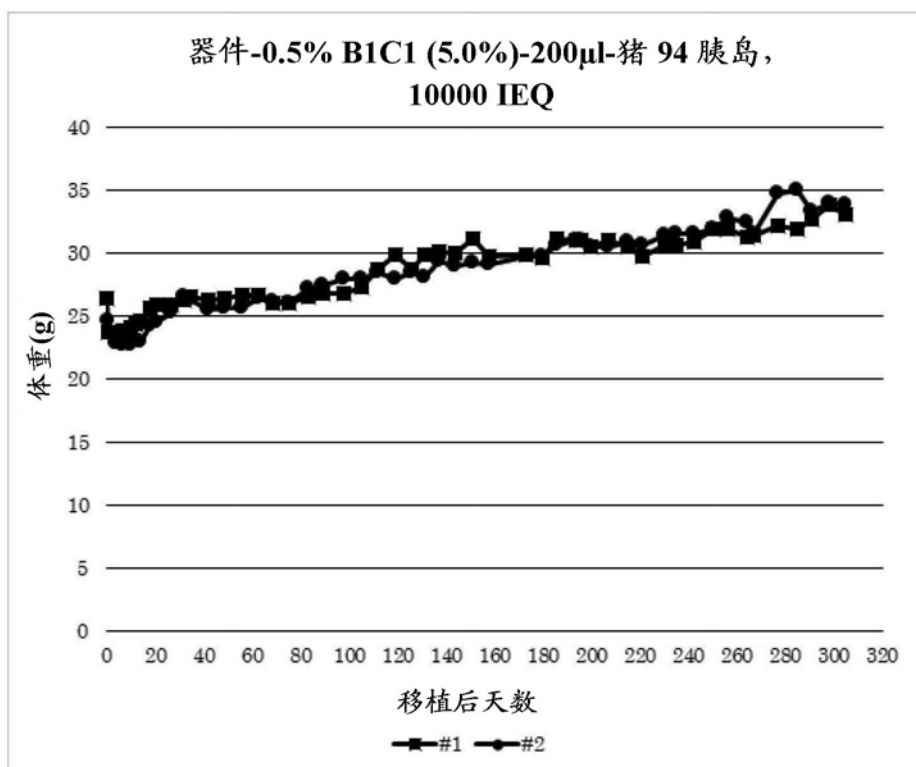


图 8-1

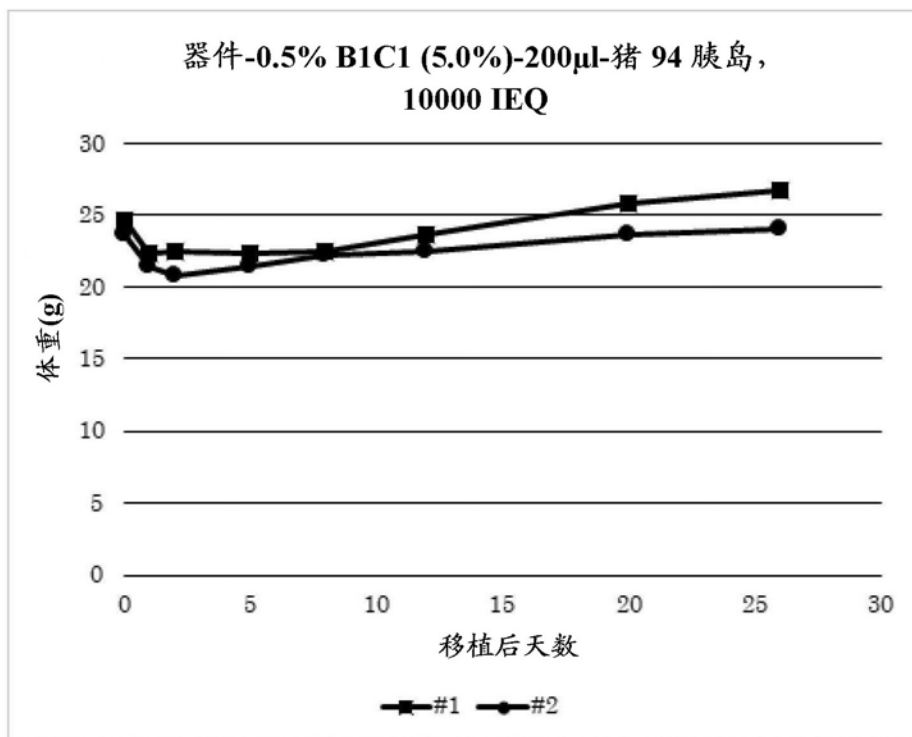


图 8-2

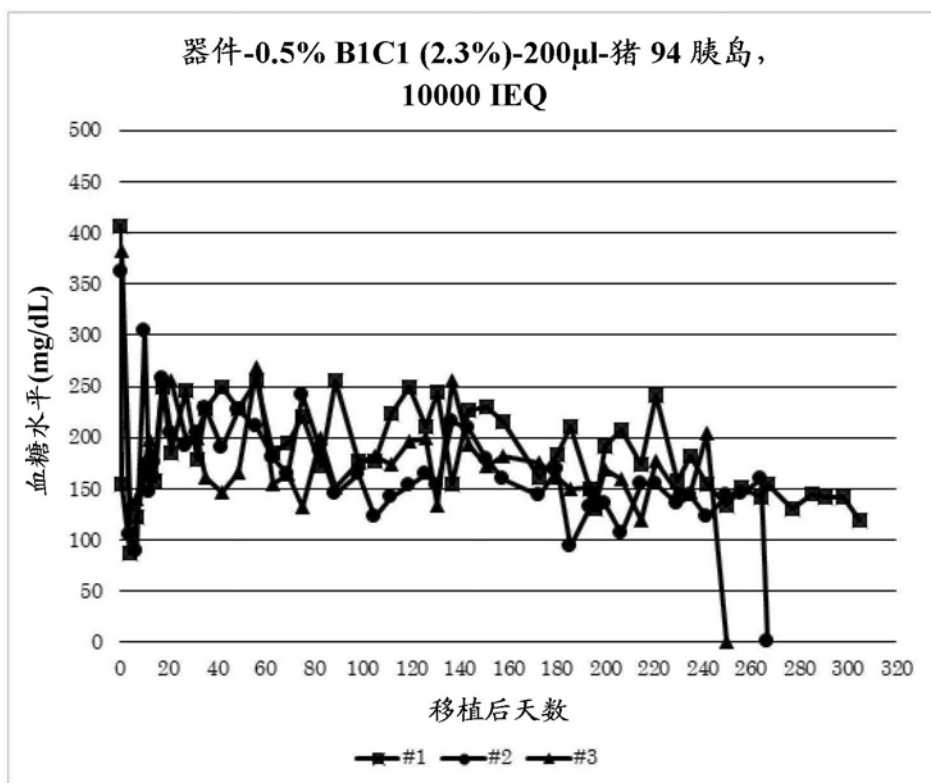


图 9-1

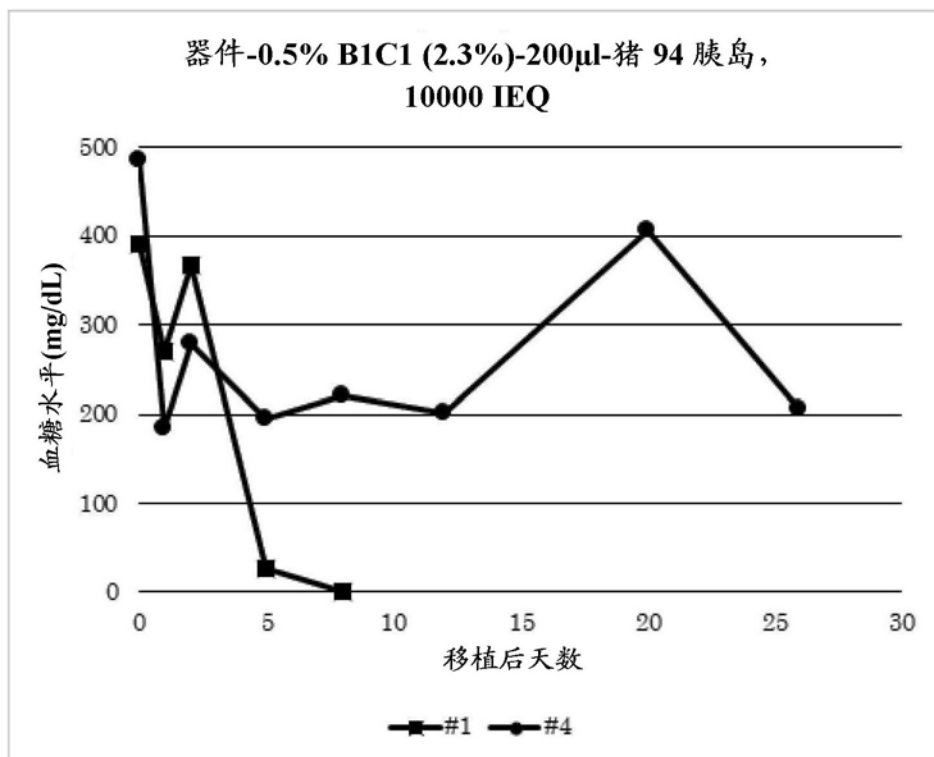


图 9-2

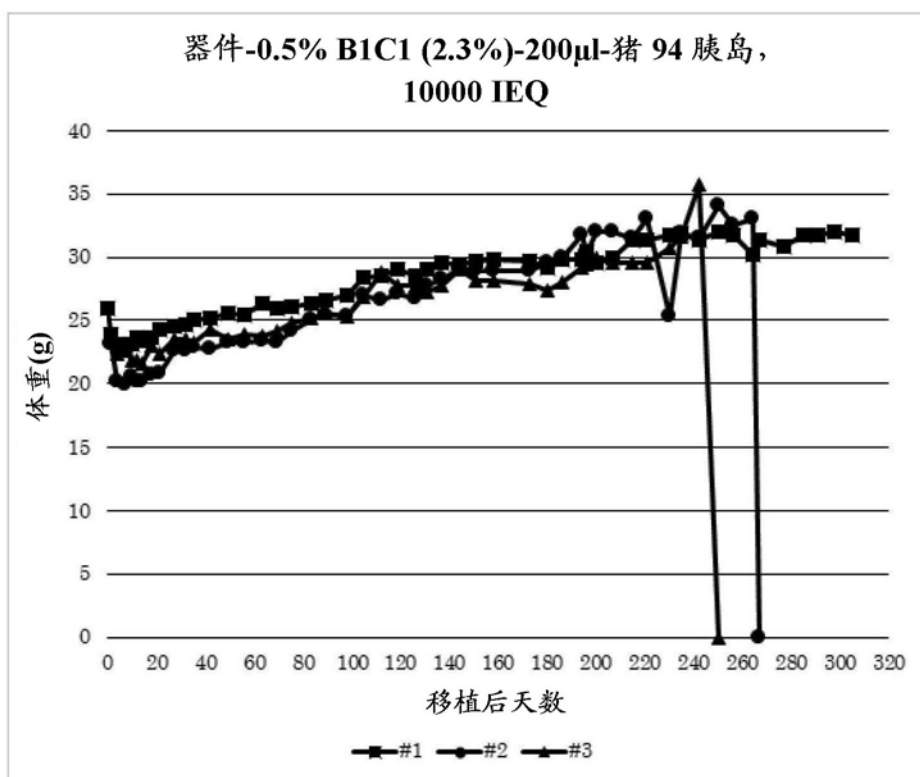


图 10-1

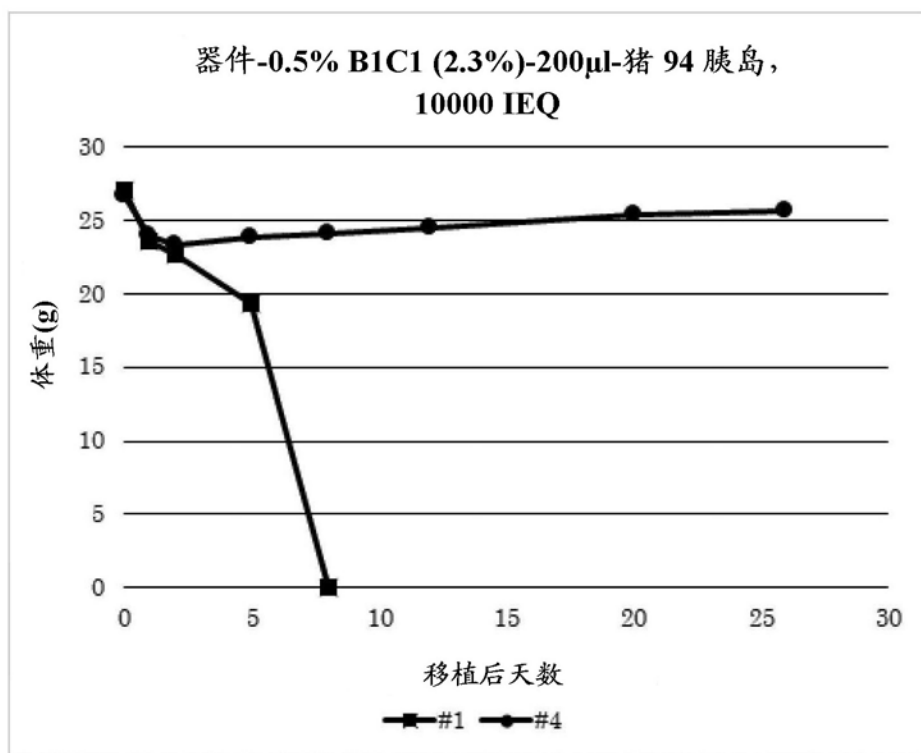


图 10-2