(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 5 月 28 日(28.05.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/076312 A1

(51) 国際特許分類:
C08F 8/30 (2006.01)
A61K 31/409 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/080688

(22) 国際出願日: 2014 年 11 月 19 日(19.11.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-239222 2013 年 11 月 19 日(19.11.2013) JP

(72) 発明者; および
(71) 出願人 : 前田 浩 **(MAEDA, Hiroshi)** [JP/JP]; 〒8620909 熊本県熊本市東区湖東３丁目２１番２４号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者 : 中村 秀明 **(NAKAMURA, Hideaki)**; 〒8618064 熊本県熊本市北区八景水谷４丁目４－１５ボヌール壱番館２０１号 Kumamoto (JP). 方軍 **(FANG, Jun)**; 〒8615522 熊本県熊本市北区下硯川町２００４－１ Kumamoto (JP).

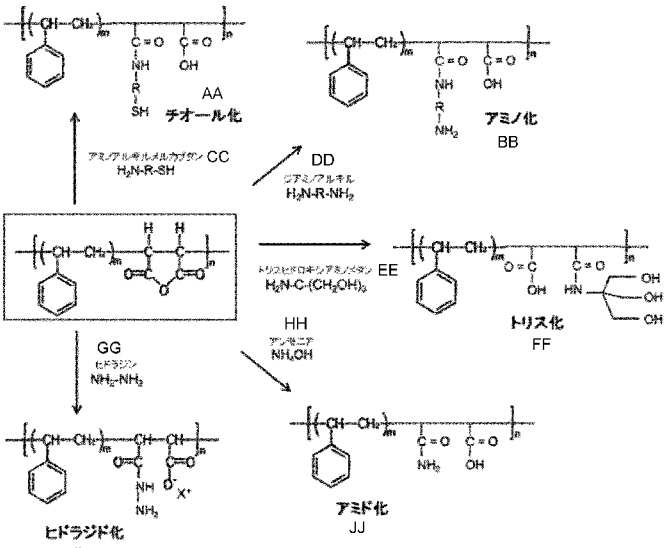
(74) 代理人: 鮫島 睦, 外 **(SAMEJIMA, Mutsumi** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) **Title**: DERIVATIVE OF STYRENE-MALEIC ACID COPOLYMER

(54) 発明の名称 : スチレン－マレイン酸共重合体の誘導体



AA Thiolation
BB Amination
CC Aminoalkylmercaptan
DD Diaminoalkyl
EE Trishydroxyaminomethane
FF Conversion to tris-form
GG Hydrazine
HH Ammonia
II Conversion to hydrazide
JJ Amidation

(57) **Abstract**: The present invention provides a novel SMA derivative and a covalent conjugate of the derivative and an active substance. More specifically, the present invention provides: an SMA derivative which contains (i) a styrene-maleic acid copolymer (SMA) and (ii) a side chain (b) that contains a functional group (a) selected from among $-NH_2$, -SH, -OH, -COOH, $-NH-(C=NH)-NH_2$ and $-C(CH_2-OH)_3$ and introduced into a carboxyl group of a maleic acid residue of the SMA via an amide bond or an ester bond, and wherein in cases where a plurality of the side chains (b) are introduced into the SMA, the side chains (b) may be the same as or different from each other; and a conjugate of this SMA derivative and an active substance.

(57) 要約: 本発明により、新規なＳＭＡ誘導体および該誘導体と活性物質との共有結合体、より詳細には、（ｉ）スチレン－マレイン酸共重合体（ＳＭＡ）と、（ｉｉ）該ＳＭＡのマレイン酸残基のカルボキシル基にアミド結合またはエステル結合を介して導入された、－ＮＨ$_2$、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$および－Ｃ（ＣＨ$_2$－ＯＨ）$_3$から選択される官能基（ａ）を含有する側鎖（ｂ）とを含み、ここで該側鎖（ｂ）がＳＭＡに複数導入される場合、該側鎖（ｂ）は同一であっても異なっていてもよい、ＳＭＡ誘導体、および該ＳＭＡ誘導体と活性物質との結合体が提供される。

WO 2015/076312 A1

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： スチレン－マレイン酸共重合体の誘導体

技術分野

[0001] 本特許出願は、日本国特許出願第２０１３－２３９２２２号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本発明は、スチレン－マレイン酸共重合体の誘導体、該誘導体と活性物質との結合体およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 発明者（前田ら）はスチレン－マレイン酸(あるいは無水マレイン酸)共重合体（以下、「ＳＭＡ」と称する。）が優れた両親媒性を有することにより、優れた医薬品のキャリアーとなることを見出し、有用な高分子結合型制癌剤ＳＭＡＮＣＳを開発した（厚労省製造承認１９９３年；特許文献１～４；および非特文献１～３）。

[0003] このＳＭＡＮＣＳは、小型タンパク質ネオカルチノスタチン（ＮＣＳ、ＭＷ１２ＫＤａ）の有する遊離のアミノ基２個（Ａｌａ１およびＬｙｓ２０）に対し、ＳＭＡ鎖上の無水マレイン酸（実際は部分半ブチルエステルに残存する２０～４５％の無水マレイン酸残基をもつもの）を反応させ、ＳＭＡ鎖をＮＣＳ上に２本結合させたものである。この反応は水にしか溶けないＮＣＳとＳＭＡ鎖上に存在する無水マレイン酸残基との結合反応であり、アルカリ性水系でのアミド結合形成反応である。これはＳＭＡ鎖上の無水マレイン酸（ＳＭＡ）残基がアルカリ性ｐＨで水という溶媒の水分子（濃度５５Ｍ）の加水分解反応と、そこに共存するＮＣＳの分子上のアミノ基（２分子）（濃度はマイクロモルμＭの範囲）とのアミド結合形成反応が考えられる。このとき、ＳＭＡ上の反応基である無水マレイン酸残基は大過剰存在する水との加水分解反応のため消費され大半が分解するので、大過剰のＳＭＡが必要となる。その結果、反応生成物の分離精製は困難となる［問題点１］。

[0004] 即ち、ＳＭＡの無水マレイン酸は水に難溶であるが、水溶液中で無水環は水により次第に加水分解（開環）されるとともに、次第に水易溶性になる。しかしながら、芳香族（アリル）アミンや、後述するプロトポルフィリンのジエチルアミン誘導体、さらにはある種のペプチド上のアミノ基などとの反応はゆるやかであり、生成物（複合体）の収率は比較的低い［問題点２］。

[0005] このように、ＳＭＡ鎖に結合した低分子化合物（ＳＭＡ複合体）は、疎水性と親水性の共重合体（ＳＭＡ）を構成成分とした高分子化合物となっており、それ自体によるミセル化が容易に生じる。つまりこのＳＭＡ化結合物は自然に自己会合型ミセルになるという、優れた性質を有することを見出した。その一つとして、本発明者らは、プロトポルフィリン（ｐｒｏｔｏｐｏｒｐｈｙｒｉｎ ＩＸ、以下、「ＰＰ」と称する。）とＳＭＡとの複合体から構成されるミセルの合成に成功した（非特許文献３～８）。

[0006] 上記ＰＰとＳＭＡとの結合反応を水溶液中で行うと、ＰＰが円盤状の会合体（ａｇｇｒｅｇａｔｅｓ）を形成し、それがしばしばＳＭＡを構成成分とするミセル（ＳＭＡミセル）中に非共有結合体として低分子薬物などを抱合した、抱合体ミセルを形成することがわかってきた（特許文献５）。すなわち、このＳＭＡ－ＰＰ抱合体ミセルはＰＰを非共有結合会合物として包含しているにもかかわらず、一見均一な正規分布をする様相を呈する。このＰＰ会合体そのものは水溶液中でＳＭＡ高分子のミセル体として挙動する。一方、ＳＭＡと共有結合したＰＰ（共有結合体）からもミセルが形成されるが、このミセルと上記の非共有結合型ＰＰを包含するミセルとが同時に存在（混在）することになるため、夫々の成分ごとに分離精製することが困難であることがわかってきた［問題点３］。

[0007] したがって、上記のようにして調製されるミセルは、ＳＭＡ－ＰＰ抱合体（ＳＭＡとＰＰ会合体との非共有結合体）のミセルと、ＳＭＡ－ＰＰ共有結合体のミセルの混合物である。そのようなものを生体内に静脈注射により投与すると、非共有結合物（ミセル）は血中でＰＰはＳＭＡミセル内から解離し、単独に遊離し、さらにそのＰＰは血漿蛋白と弱く結合しつつ、或いは遊

離ＰＰとなるため、極めて高い割合で肝臓および／または脾臓に分布することになる。その結果、特に高分子ミセルやナノメディシンに固有にみられるＥＰＲ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｔｙ　ａｎｄ　Ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ）効果（非特許文献９～１１）によって腫瘍部などの肝心の病巣部への移行および集積性が少なくなるとともに、肝機能障害等も危惧されることが明らかとなった［問題点４］。

[0008] さらに、従来のＳＭＡミセルは、ポリアニオン形ミセルであるため、その超微粒子の表面分子荷電は－４８～－５０ｍＶと、かなり強い負電荷を有することになる。この強い陰性度（強い負電荷）のため、ＳＭＡ誘導体およびそのミセル粒子の大半が肝臓および／または脾臓に集積することが明らかとなった［問題点５］。

[0009] かかる肝臓および／または脾臓への分布（集積）を抑える方法は、ＳＭＡ－誘導体に関しては今日まで開発されていない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：ＵＳ４１８２７５２

特許文献2：ＵＳ４７３２９３３

特許文献3：ＣＡ１２４１６４０

特許文献4：ＥＰ０１３６７９１

特許文献5：特許第４５２２４５２号

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ｈ．　Ｍａｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ　＆　Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ １４，８１－８７，１９７９

非特許文献2：Ｈ．　Ｍａｅｄａ，　Ａｄｖ．　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．　Ｒｅｖ．　４６，　１６９－１８５，２００１

非特許文献3：Ｋ．Ｇｒｅｉｓｈ，　Ｈ．　Ｍａｅｄａ，Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ,ｖｏｌ．１８，Ｎｏ．３，　ｐ２５４，　Ｍａｙ２００３（日本ＤＤＳ学会講演要旨）

非特許文献4：M. Regehly et al., Bioconj. Chem. (2007) vol.18,1031－1038.
非特許文献5：K. Greish, T. Sawa, et al., J. Cont. Release (2004) 97, 219－230
非特許文献6：K. Greish, A. Nagamitsu et al., Bioconj. Chem. 16, 230－236, 2005
非特許文献7：A. Iyer et al., Biomaterials (2007) vol. 10,1871－1881.
非特許文献8：A. Iyer, K. Greish, T. Seki, S. Okazaki, J. Fang, K. Takeshita, H. Maeda, J. Drug Target 2007, 15, 496－506
非特許文献9：Cancer Res. 1986, H. Maeda, Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 71－79, 2013
非特許文献10：H. Maeda, J. Cont. Release 164, 138－144, 2012
非特許文献11：H. Maeda et al., J. Cont. Release 74, 47－61, 2001)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、従来のＳＭＡ－活性物質（例えばＰＰなどの薬物）複合体における上記問題点を解消し、ＰＰなどの疎水性化合物の会合体やＳＭＡ－ＰＰ非共有結合体などのＳＭＡ－活性物質非共有結合体といった不純物を含まない、ＳＭＡ鎖と活性物質との共有結合体のみを構成成分（単一成分）とするミセルを提供することができる、新規なＳＭＡ誘導体、および該誘導体と活性物質との共有結合体、並びにその製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記問題点に鑑み、鋭意検討した結果、ＳＭＡを特定の誘

導体とし、該誘導体に活性物質を共有結合させることで、表面電荷を中性に近づけ、更に疎水性を下げることができ、その結果として肝臓および／または脾臓への集積を抑え、より強いＥＰＲ効果を発現し、水溶性を高め、腫瘍部または炎症部に対する指向性を高める医薬（高分子結合型ナノメディシン）が得られることを見出し、本発明に至った。

したがって、本発明は、以下を含む。

［１］．（ｉ）スチレン－マレイン酸共重合体（ＳＭＡ）と、

（ｉｉ）該ＳＭＡのマレイン酸残基のカルボキシル基にアミド結合またはエステル結合を介して導入された、－NH_2、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－NH_2および－Ｃ（CH_2－ＯＨ）$_3$から選択される官能基（ａ）を含有する側鎖（ｂ）とを含み、

ここで該側鎖（ｂ）がＳＭＡに複数導入される場合、該側鎖（ｂ）は同一であっても異なっていてもよい、ＳＭＡ誘導体（例えば、図１参照）。

［２］．側鎖（ｂ）が、下記式［Ａ］：

[化1]

－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－R^1－R^2　　［Ａ］

［式［Ａ］中、R^1は、単結合、アルキレン基、－ＮＨ－、－ＣＯ－、－（Ｃ＝ＮＨ）－、－Ｎ＝Ｃ（CH_3）－および－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－並びにそれらの組合せから選択される基を示し、ここで該アルキレン基は、ヒドロキシル基およびカルボキシル基で置換されていてもよく、

R^2は、水素原子、－NH_2、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－NH_2および－Ｃ（CH_2－ＯＨ）$_3$から選択される基を示し、ただし、R^2が水素原子である場合、R^1は単結合であり、

ここで、式［Ａ］で示される基がＳＭＡ誘導体中に複数存在する場合、R^1およびR^2はそれぞれ同一であっても異なっていてもよい。］

で示される、上記［１］に記載のＳＭＡ誘導体。

［３］．式［Ａ］中、R^1が、単結合、－CH_2－、－（CH_2）$_2$－、－（CH_2）$_3$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－CH_2－、－CH_2－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、

－CH_2－CH（OH）－CH_2－、－$(CH_2)_4$－、－CH（COOH）－$(CH_2)_3$－、－$(CH_2)_3$－CH（COOH）－、－$(CH_2)_3$－CO－CH（COOH）－、－CH_2－CO－$(CH_2)_2$－、－N＝C(CH_3)－$(CH_2)_2$－、－$(CH_2)_5$－、－CH（COOH）－$(CH_2)_4$－、－$(CH_2)_4$－CH（COOH）－、－$(CH_2)_4$－NH－（C＝NH）－、－（C＝NH）－NH－$(CH_2)_4$－、－CH（COOH）－$(CH_2)_3$－NH－（C＝NH）－、－（C＝NH）－NH－$(CH_2)_3$－CH（COOH）－および－$(CH_2)_6$－、並びにこれらのカルボキシル基のα、β、γ、またはδ炭素にケトン基を有するものから選択される、上記［２］に記載のＳＭＡ誘導体。

［４］．式［Ａ］中、－R^1－R^2が、以下の基：

(1) 水素原子、

(2) －NH_2、

(3) －$(CH_2)_2$－SH、

(4) －CH（COOH）－CH_2－SH、

(5) －$(CH_2)_{1\sim6}$－NH_2、

(6) －CH_2－CH（OH）－CH_2－NH_2、

(7) －CH（COOH）－$(CH_2)_4$－NH_2、

(8) －$(CH_2)_{1\sim4}$－CH（COOH）－NH_2、

(9) －$(CH_2)_{1\sim4}$－NH－（C＝NH）－NH_2、

(10) －（C＝NH）－NH－$(CH_2)_{1\sim4}$－NH_2、

(11) －CH（COOH）－$(CH_2)_3$－NH－（C＝NH）－NH_2、

(12) －（C＝NH）－NH－$(CH_2)_3$－CH（COOH）－NH_2、

(13) －C$(CH_2$－OH$)_3$、

(14) －$(CH_2)_{1\sim4}$－NH－CO－NH－NH_2、

(15) －$(CH_2)_{1\sim4}$－CO－CH_2－NH_2、

(16) －CH_2－CO－$(CH_2)_4$－NH_2、

(17) －CH_2－CO－(CH_2)－OH、

(18) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＣＯ－ＣＨＯＨ－ＣＯＯＨ、

(19) －ＣＨ$_2$－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯＨ、

(20) －Ｎ＝Ｃ（ＣＨ$_3$）－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯＨ、

(21) －（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＨ$_2$、および

(22) －（ＣＨ$_2$）$_3$－ＯＨ

から選択される基である、上記［２］または［３］に記載のＳＭＡ誘導体。

［５］．上記［１］～［４］のいずれかに記載のＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体と直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含む、結合体。

［６］．上記［１］～［４］のいずれかに記載のＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体中の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）または該側鎖（ｂ）とは異なる部分の少なくとも１つと直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含む、上記［５］に記載の結合体。

［７］．ＳＭＡ誘導体と活性物質との結合が、アミド結合、エステル結合、ヒドラゾン結合およびジスルフィド結合から選択される結合である、上記［５］または［６］に記載の結合体。

［８］．ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）と活性物質との結合が、下記式［Ｂ］：

[化2]

活性物質－Ｒ^3－Ｒ^4－Ｒ^{2a}－ＳＭＡ誘導体　　［Ｂ］

［式［Ｂ］中、Ｒ^{3}は、－ＮＨ－、－Ｏ－、カルボニル基およびアルキレン基並びにそれらの組合せから選択される基を示し、

Ｒ^{4}は、－Ｃ（ＣＨ$_3$）＝Ｎ－および－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－から選択される基を示し、Ｒ^{2a}は、－ＮＨ－を示す。］

で示される連結基－Ｒ^3－Ｒ^4－を介した結合である、上記［５］～［７］のいずれかに記載の結合体。

［９］．式［Ｂ］中の連結基－Ｒ^3－Ｒ^4－が、以下の基：

(1) －ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｃ（ＣＨ$_3$）＝Ｎ

ー、および

(2) －ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－

から選択される基である、上記［８］に記載の結合体。

［１０］．活性物質が、抗癌剤、抗生物質またはペプチドホルモンである、上記［５］～［９］のいずれかに記載の結合体。

［１１］．抗癌剤が、ピラルビシン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン、ボロノメルカプテイト、ボロノシステイン、エピルビシン、アクラルビシンおよびドキソルビシンからなる群から選択される、上記［１０］に記載の結合体。

［１２］．上記［５］～［１１］のいずれかに記載の結合体を含む、医薬。

［１３］．制癌剤である、上記［１２］に記載の医薬。

［１４］．上記［５］～［１１］のいずれかに記載の結合体と、薬理学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

［１５］．医薬としての、上記［５］～［１１］のいずれかに記載の結合体の使用。

［１６］．医薬組成物を製造するための、上記［５］～［１１］のいずれかに記載の結合体の使用。

［１７］．上記［５］～［１１］のいずれかに記載の結合体を患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

発明の効果

[0014] 本発明のＳＭＡ誘導体は、ＳＭＡ鎖に塩基性成分が付与されているものでは、それら自身（高分子）およびそれらから形成されるミセルの表面の負電荷がより少なく（例えば、もとのＳＭＡ表面のゼータ電位は－４８ｍＶ～－５０ｍＶであるが、誘導体化により約－４０～－５ｍＶに低減し得る。さらに、塩基成分がなくても、ＳＭＡのマレイン酸のカルボキシル基がアミド結合により中和される。また、アルコールなどでエステル結合になる場合も負電荷は低減することができる。後記表４参照）、また、トリス基などの親水性基を含むことにより疎水性も低減されたものである。したがって、下記に

示すように、医薬として有利に使用可能な結合体を製造するのに使用することができる。

本発明の結合体は、新規な構造を有するＳＭＡの誘導体と活性物質との共有結合体であり、

（１）水溶性中で１０ｎｍ以上３０００ｎｍの直径を有する高分子であり、ＥＰＲ効果を示し、

（２）腫瘍局所の弱酸性ｐＨで（図２参照）、或いは還元性環境下で薬物を放出し、腫瘍局所でもとの低分子薬物が拡散により腫瘍細胞によりすみやかにとり込まれ、

（３）より一層の腫瘍細胞選択的な効力を発揮する。

また、本発明の結合体においては、

（４）ＳＭＡ鎖に塩基性成分が付与されている場合はなおのこと、それら自身（高分子）およびそれらから形成されるミセルの表面の負電荷がより少なく、肝蔵および／または脾蔵への非特異的な吸着が抑えられ、さらに、水溶性が高められているので、高い血中濃度を維持しつつ、より優れたＥＰＲ効果による高い腫瘍内濃度の達成を可能とし、さらに、一般臓器への集積がないことから、毒性を低減することが可能になり、画期的なナノメディシン型制癌剤の製造が可能になった。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、スチレン－無水マレイン酸共重合体（ＳＭＡ）から、本発明の新規ＳＭＡ誘導体（ヒドラジド化ＳＭＡ、アミド化ＳＭＡ、トリス化ＳＭＡ、アミノ化ＳＭＡおよびチオール化ＳＭＡ）を合成するための反応スキームを示す。

[図2]図２は、各ｐＨ環境下でのＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ（ピラルビシン）からＴＨＰの放出速度を示す。

[図3]図３は、以下の物質の赤外吸収スペクトル／ＫＢｒを示す。Ａ：ＳＭＡ－共重合体無水マレイン酸型（未反応原体）、Ｂ：実施例２で得られたＳＭＡ－ヒドラジド誘導体、水系においてヒドラジン２モル過剰反応生成物、Ｃ

：実施例２で得られた、同５モル過剰反応生成物、Ｄ：実施例１２で得られたＳＭＡ－アミド化誘導体、アンモニア５０モル過剰反応生物、Ｅ：実施例２７で得られたＳＭＡ－トリス誘導体、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中５モル過剰反応生成物、Ｆ：実施例１８で得られたＳＭＡ－システイン誘導体、ＤＭＦ中５モル過剰反応生成物、Ｇ：実施例６で得られたＳＭＡ－ヒドラジル－ＴＨＰ（ピラルビシン）、Ｈ：ヒドラジン水和物（未反応原体）。

[図4]図４は、以下の物質のラマン吸収スペクトルを示す。Ａ：対照システイン、ＳＨのピークが顕著である。Ｂ：実施例１８で得られたＳＭＡ－システイン誘導体、Ｃ：対照シスチン、Ｓ－Ｓのピークが顕著である。

[図5]ＳＭＡ－ＴＨＰのマウスＳ－１８０に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。

[図6]ＳＭＡ－ＴＨＰによるマウスＳ－１８０治療開始からの生存率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、スチレン－マレイン酸共重合体（ＳＭＡ）と、該ＳＭＡのマレイン酸残基のカルボキシル基にアミド結合またはエステル結合を介して導入された、－NH_2、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－NH_2および－Ｃ（CH_2－ＯＨ）$_3$から選択される官能基（ａ）を含有する側鎖（ｂ）とを含み、

ここで該側鎖（ｂ）が複数導入される場合、該側鎖（ｂ）は同一であっても異なっていてもよい、ＳＭＡ誘導体（以下、「本発明のＳＭＡ誘導体」と称する）を提供する。

[0017] ある実施態様において、側鎖（ｂ）は、ＳＭＡのマレイン酸残基のカルボキシル基にアミド結合を介して導入された、－NH_2、－ＳＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－NH_2および－Ｃ（CH_2－ＯＨ）$_3$から選択される官能基（ａ）を含有するものである。

[0018] 本発明のＳＭＡ誘導体は、例えば、アンモニア、ヒドラジン、２－アミノエタンチオール、システイン、ジアミノアルキル（例えば、ジアミノエタン

、ジアミノプロパン、ジアミノヘキサン等）、ジアミノプロパノール、アミノプロパノール、リジン、グアニジルブチルアミン、アルギニン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、ケト酸（例えば、レブリン酸、δ－アミノレブリン酸等）またはその塩（ナトリウムなどのアルカリ金属塩等）から選択される修飾剤を使用して得られる。

また、これらの修飾剤は、複数を同時にまたは逐次使用してもよい。例えば、ＳＭＡのカルボキシル基をヒドラジンで修飾し、ＳＭＡにヒドラジノ基を付与した後、このヒドラジノ基（アミノ基）とレブリン酸のケトン基を反応させてレブリン酸を付与することができる。

[0019] 本発明のＳＭＡ誘導体は、好適には側鎖（ｂ）が、下記式［Ａ］：

[化3]

－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｒ^{1}－Ｒ^{2} ［Ａ］

［式［Ａ］中、Ｒ^{1}は、単結合、アルキレン基、－ＮＨ－、－ＣＯ－、－（Ｃ＝ＮＨ）－、－Ｎ＝Ｃ（ＣＨ$_{3}$）－および－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－並びにそれらの組合せから選択される基を示し、ここで該アルキレン基は、ヒドロキシル基およびカルボキシル基で置換されていてもよく、

Ｒ^{2}は、水素原子、－ＮＨ$_{2}$、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_{2}$および－Ｃ（ＣＨ$_{2}$－ＯＨ）$_{3}$から選択される基を示し、ただし、Ｒ^{2}が水素原子である場合、Ｒ^{1}は単結合であり、ここで、式［Ａ］で示される基がＳＭＡ誘導体中に複数存在する場合、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はそれぞれ同一であっても異なっていてもよい。］

で示されるものである。

[0020] 上記アルキレン基としては、例えば炭素数１～２０個の直鎖または分岐鎖のアルキレン基、例えばメチレン、ジメチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、ヘプタメチレン、オクタメチレン等が挙げられる。好適には炭素数１～６個の直鎖または分岐鎖のアルキレン基、例えばメチレン、ジメチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン等が挙げられ、特に炭素数１～４個の直鎖または

分岐鎖のアルキレン基、例えばメチレン、ジメチレン、トリメチレン、テトラメチレン等が挙げられる。

また、上記アルキレン基は、ヒドロキシル基、カルボキシル基等で置換されていてもよい。

[0021] ある実施態様において、上記式［Ａ］中、Ｒ^{1}は、単結合、アルキレン基、および－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－並びにそれらの組合せから選択される基を示し、Ｒ^{2}は、水素原子、－ＮＨ$_{2}$、－ＳＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_{2}$および－Ｃ（ＣＨ$_{2}$－ＯＨ）$_{3}$から選択される基を示す。

[0022] 上記式［Ａ］中、好ましいＲ^{1}は、単結合、－ＣＨ$_{2}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_{2}$－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_{2}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＯ－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－、－Ｎ＝Ｃ（ＣＨ$_{3}$）－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－および－（ＣＨ$_{2}$）$_{6}$－、並びにこれらのカルボキシル基のα、β、γ、またはδ炭素にケトン基を有するものから選択される。

[0023] ある実施態様において、上記式［Ａ］中、Ｒ^{1}は、単結合、－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_{2}$－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_{2}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－または－（ＣＨ$_{2}$）$_{6}$－である。

[0024] 上記式［Ａ］中、好適には、式［Ａ］中、－Ｒ^{1}－Ｒ^{2}は、以下の基：

(1) 水素原子（例えば、修飾剤としてアンモニアを使用して得られるもの）、

(2) －NH_2（例えば、修飾剤としてヒドラジンを使用して得られるもの）、

(3) －（CH_2）$_2$－SH（例えば、修飾剤として２－アミノエタンチオールを使用して得られるもの）、

(4) －CH（COOH）－CH_2－SH（例えば、修飾剤としてシステインを使用して得られるもの）、

(5) －（CH_2）$_{1\sim6}$－NH_2（例えば、修飾剤としてジアミノエタンまたはジアミノヘキサンを使用して得られるもの）、

(6) －CH_2－CH（OH）－CH_2－NH_2（例えば、修飾剤としてジアミノプロパノールを使用して得られるもの）、

(7) －CH（COOH）－（CH_2）$_4$－NH_2（例えば、修飾剤としてリジンを使用して優勢的に得られるもの）、

(8) －（CH_2）$_{1\sim4}$－CH（COOH）－NH_2（例えば、修飾剤としてリジンを使用して得られるもの）、

(9) －（CH_2）$_{1\sim4}$－NH－（C＝NH）－NH_2（例えば、修飾剤としてグアニジルブチルアミンを使用して優勢的に得られるもの）、

(10) －（C＝NH）－NH－（CH_2）$_{1\sim4}$－NH_2（例えば、修飾剤としてグアニジルブチルアミンを使用して得られるもの）、

(11) －CH（COOH）－（CH_2）$_3$－NH－（C＝NH）－NH_2（例えば、修飾剤としてアルギニンを使用して優勢的に得られるもの）、

(12) －（C＝NH）－NH－（CH_2）$_3$－CH（COOH）－NH_2（例えば、修飾剤としてアルギニンを使用して得られるもの）、

(13) －C（CH_2－OH）$_3$（例えば、修飾剤としてトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを使用して得られるもの）、

(14) －（CH_2）$_{1\sim4}$－NH－CO－NH－NH_2（例えば、修飾剤としてδ－ケト酸など使用して得られるもの）

(15) －（CH_2）$_{1\sim4}$－CO－CH_2－NH_2、

(16) －CH_2－CO－（CH_2）$_4$－NH_2、

(17) －CH_2－CO－（CH_2）－OH、

(18) －（CH_2）$_{1\sim4}$－CO－CHOH－COOH（など）

（例えば、修飾剤としてδ－アミノレブリン酸塩などのケト酸を使用して得られるもの）、

(19) －CH_2－CO－（CH_2）$_2$－COOH（例えば、修飾剤としてδ－アミノレブリン酸またはその塩を使用して得られるもの）、

(20) －N＝C（CH_3）－（CH_2）$_2$－COOH（例えば、修飾剤としてレブリン酸またはその塩を使用して得られるもの）、

(21) －（CH_2）$_3$－NH_2（例えば、修飾剤としてジアミノプロパンを使用して得られるもの）、および

(22) －（CH_2）$_3$－OH（例えば、修飾剤としてアミノプロパノールを使用して得られるもの）

から選択される基である。

[0025] より好適には、－R^1－R^2は、以下の基：

(1) 水素原子（例えば、修飾剤としてアンモニアを使用して得られるもの）、

(2) －NH_2（例えば、修飾剤としてヒドラジンを使用して得られるもの）、

(3) －（CH_2）$_2$－SH（例えば、修飾剤として２－アミノエタンチオールを使用して得られるもの）、

(4) －CH（COOH）－CH_2－SH（例えば、修飾剤としてシステインを使用して得られるもの）、

(5) －C（CH_2－OH）$_3$（例えば、修飾剤としてトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを使用して得られるもの）

(6) －（CH_2）$_{1\sim4}$－NH－CO－NH－NH_2（例えば、修飾剤としてδ－ケト酸など使用して得られるもの）

(7) －（CH_2）$_3$－NH_2（例えば、修飾剤としてジアミノプロパンを使用して得られるもの）、および

(8) －（ＣＨ$_2$）$_3$－ＯＨ（例えば、修飾剤としてアミノプロパノールを使用して得られるもの）

から選択される基である。

[0026] ある実施態様において、上記式［Ａ］中、好適には、式［Ａ］中、－Ｒ^1－Ｒ^{2}は、以下の基：

(1) 水素原子（例えば、修飾剤としてアンモニアを使用して得られるもの）、

(2) －ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてヒドラジンを使用して得られるもの）、

(3) －（ＣＨ$_2$）$_2$－ＳＨ（例えば、修飾剤として２－アミノエタンチオールを使用して得られるもの）、

(4) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_2$－ＳＨ（例えば、修飾剤としてシステインを使用して得られるもの）、

(5) －（ＣＨ$_2$）$_2$－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてジアミノエタンを使用して得られるもの）、

(6) －ＣＨ$_2$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてジアミノプロパノールを使用して得られるもの）、

(7) －（ＣＨ$_2$）$_6$－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてジアミノヘキサンを使用して得られるもの）、

(8) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてリジンを使用して優勢的に得られるもの）、

(9) －（ＣＨ$_2$）$_4$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてリジンを使用して得られるもの）、

(10) －（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてグラニジルブチルアミンを使用して優勢的に得られるもの）、

(11) －（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてグラニジルブチルアミンを使用して得られるもの）、

(12) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてアルギニンを使用して優勢的に得られるもの）、

(13) －（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてアルギニンを使用して得られるもの）、および

(14) －Ｃ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_3$（例えば、修飾剤としてトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを使用して得られるもの）

から選択される基である。

[0027] ある実施態様において、より好適には、－Ｒ^1－Ｒ^{2}は、以下の基：

(1) 水素原子（例えば、修飾剤としてアンモニアを使用して得られるもの）、

(2) －ＮＨ$_2$（例えば、修飾剤としてヒドラジンを使用して得られるもの）、

(3) －（ＣＨ$_2$）$_2$－ＳＨ（例えば、修飾剤として２－アミノエタンチオールを使用して得られるもの）、

(4) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_2$－ＳＨ（例えば、修飾剤としてシステインを使用して得られるもの）、および

(5) －Ｃ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_3$（例えば、修飾剤としてトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを使用して得られるもの）

から選択される基である。

[0028] 本発明における「スチレン－マレイン酸（無水マレイン酸を含む）共重合体」（ＳＭＡ）としては、例えば下記式［１］で示されるような、繰り返し単位としてスチレン由来の構成単位（スチレン残基）と、マレイン酸または無水マレイン酸由来の構成単位（マレイン酸残基または無水マレイン酸残基）を含む共重合体である（下記式は、無水マレイン酸残基を含むものである）。ＳＭＡは、市販品でもよく、既知の方法によって合成されたものでもよい。また、スチレンとマレイン酸または無水マレイン酸との重合形態は、特に限定されず、ランダム重合、ブロック重合、グラフト重合のいずれの形態のものでもよい。

スチレンとマレイン酸基は１：１が最も好ましいが、３:１～１：１０など任意のものを用いることができる。例えばＰｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ社の２：１のものを用いることができる。一般に、スチレンと無水マレイン酸との共

重合反応により得られる。この場合、無水マレイン酸基由来の部分は、環状の酸無水物であるが、そのままでも、あるいは使用前に加水分解して遊離酸部分としてもよい。本発明において、誘導体化するためには、無水マレイン酸の状態が好ましい。

また、共重合反応における反応溶媒としては、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、水、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）、メチルセルソルブ、酢酸エチルエステル、アセトン、アセトニトリル等を用いることができる。場合によってはメタノール、エタノール、ブタノール、プロパノールを用いることができるが、それに限定するものではない。

上記ＳＭＡは、重合度に応じて各種の分子量のものが存在するが、本発明に用いるＳＭＡとしては、好適には、例えば下記式［１］中の重合度（ｎ）が約３～２５０の繰り返し単位を有する、分子量約５００～５０，０００を有するものである。かかるＳＭＡとしては、例えば、米国Ｓａｒｔｏｍｅｒ社の商品名ＳＭＡ　Ｒｅｓｉｎｓなどが挙げられる。

[0029] 本発明のＳＭＡ誘導体は、そのマレイン酸残基または側鎖（ｂ）に存在する少なくとも１つのカルボキシル基等の酸性基あるいはアミノ基等の塩基性基が塩を形成していてもよい。このような塩としては、薬理学的に許容される塩が好ましく、例えば、無機塩基との塩（例えばアンモニウム塩；ナトリウム、カリウム、リチウム等のアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩等）；有機塩基との塩（例えばメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン等のアルキルアミンとの塩；ジシクロヘキシルアミン等のシクロアルキルアミンとの塩；エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等のアルカノールアミンとの塩；α－アミノ酸、δ－アミノレブリン酸等のアミノ酸との塩；ピリジン、ピコリン等の複素環式アミンとの塩；Ｎ，Ｎ－ジベンジルエチレンジアミン等のアルキレンジアミン誘導体との塩等）等が挙げられる。これらの塩は、従来既知の方法によって製造することができる。

[0030] 本発明のＳＭＡ誘導体は、そのマレイン酸残基または側鎖（ｂ）に存在する少なくとも１つのカルボキシル基あるいはヒドロキシル基がエステルを形成していてもよい。このようなエステルとしては、例えば、炭素数１～４のアルキル基（例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基）とのエステル、炭素数１～４のアシル基（例えばアセチル基、プロピオニル基、δ－アミノレブリン酸基）とのエステルが挙げられる。これらのエステルは、従来既知の方法によって製造することができる。また、少なくとも１つのマレイン酸残基のカルボキシル基が上記のようなアルキル基またはアシル基によってエステル化されたＳＭＡを、誘導体化に使用することで製造することもできる。

[0031] 本発明のＳＭＡ誘導体において、上記側鎖（ｂ）が複数導入される場合、それらの側鎖（ｂ）が有する官能基（ａ）は、同一であっても異なっていてもよい。例えば、本発明のＳＭＡ誘導体は、例えば、－Ｃ（CH_2－ＯＨ）$_3$に加えて、さらに、－NH_2、－ＳＨ、および／または－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－NH_2を含んでいてもよい。

[0032] 本発明のＳＭＡ誘導体は、上記ＳＭＡの（無水）マレイン酸残基に対して、種々の官能基（ａ）を導入するための修飾剤を反応させることにより製造することができる。

以下、ＳＭＡ誘導体として、（１）ヒドラジド化ＳＭＡ、（２）アミド化ＳＭＡ、（３）チオール化ＳＭＡ、（４）アミン化ＳＭＡ、（５）トリス化ＳＭＡおよび（６）アミノレブリン酸化ＳＭＡを製造する場合を例にして、本発明のＳＭＡ誘導体の製造方法を説明する（図１参照）。

[0033] （１）ヒドラジド化ＳＭＡ

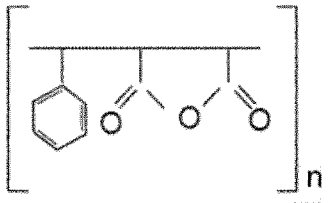
ヒドラジド化されたＳＭＡ誘導体（ヒドラジド化ＳＭＡ）は、ＳＭＡとヒドラジド化剤を反応させることにより、製造することができる。ヒドラジド化剤としては、例えばヒドラジン－１－水和物などが挙げられ、これは通常ヒドラジンと称される。

[0034] ＳＭＡのヒドラジド化は、例えば、次の反応スキームにしたがって行うこ

とができる。

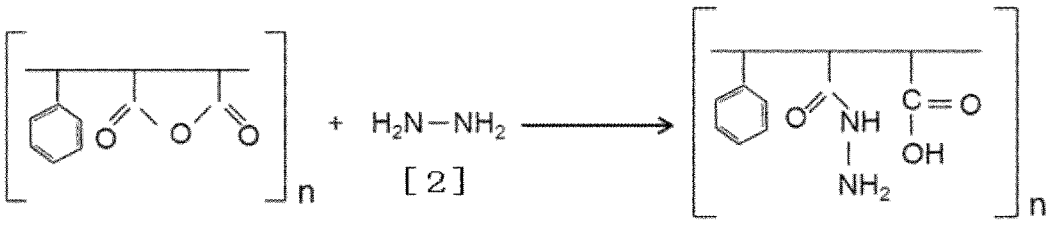
[化4]

ＳＭＡ：（スチレン－無水マレイン酸）ｎ



（但し、ｎは３～２５０）

［１］



［２］

［３］

[0035] 例えば、約３～２５０の繰り返し単位を有するスチレン－無水マレイン酸共重合体［１］の無水マレイン酸残基に対して、ヒドラジン［２］を反応させることにより、マレイン酸残基がヒドラジド化されたヒドラジド化ＳＭＡ［３］を得ることができる。

上記反応の結果、ＳＭＡ中の無水マレイン酸残基は、水系でアルカリ加水分解により生ずるジカルボン酸でなく、モノカルボン酸となり、陰性電荷は半減する。また、ヒドラジンの使用量を無水マレイン酸の当量より少なくすると、その程度に応じて無水マレイン酸残基を任意の程度に保持することができる。残留する無水マレイン酸残基は、別のアミノ基を有する化合物との結合反応に用いることができる。

[0036] 上記反応におけるヒドラジンの使用量は、ＳＭＡ中の無水マレイン酸残基に対して、例えば１～２０倍当量、好適には２～３倍当量である。通常、ヒドラジンを無水マレイン酸残基の２倍当量以上使用すれば、ＳＭＡの無水マ

レイン酸残基のすべてがヒドラジド化した誘導体を得ることができる。

上記反応は、水系または有機溶媒系のいずれの反応系でも行うことができる。

[0037] 上記反応を水系で行う場合、通常、所定量のヒドラジンを溶解した水溶液を調製し、該水溶液に所定量のＳＭＡを添加し、撹拌して反応させる。

この場合、ヒドラジンの水溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば水２０ｍｌにヒドラジン－１－水和物を０．１～１ｍｌ好適には０．１５ｍｌ（３ｍｍｏｌに）無水ＳＭＡ０．１～２ｇ、好適には０．３ｇ（１．３ｍｍｏｌ）を加え室温で反応する。反応当初は懸濁液となるが、撹拌下に次第に溶解し、反応を、好適には２４時間ほど続けるとＳＭＡ－マレイン酸のヒドラジド化物となる。ヒドラジンとの反応でヒドラジンの量を無水マレイン酸の当モル量より少なくすると、未反応の無水マレイン酸が残存するが、この場合は反応時間を１～１０時間、好適には２～３時間とする。反応系を水の代わりにジメチルホルムアルデヒド（ＤＭＦ）など有機溶媒にすることができる。有機溶媒系で行う場合、通常、所定量のＳＭＡを有機溶媒に溶解した溶液を調製し、該溶液に所定量のヒドラジンを添加し、撹拌して反応させる。この場合、使用する有機溶媒としては、例えばＤＭＦ、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）を用いられるが、好適にはＤＭＦが挙げられる。上記の反応温度は、特に室温に限定されないが、例えば１６℃～７０℃、好適には２５℃～３７℃である。また、反応時間は、特に限定されないが、例えば２～５０時間、好適には１０～２０時間である。

反応終了後、反応液に対して、従来の方法にしたがって、ＤＭＦ溶液に水を添加し、水５０％以上にし、これを５％量曹液ついで蒸留水に透析／濃縮を行い、凍結乾燥を行う。分子膜（ｃｕｔ　ｏｆｆ　ＭＷ２０００または５０００）を用い、濃縮、ろ過を行い、それら操作で未反応のヒドラジン、分解物その他の塩を除去し、あるいは塩酸によりｐＨを４以下で沈殿物となし、あるいは水溶液として凍結乾燥により、ヒドラジド化ＳＭＡの白色粉末を得

ることができる。

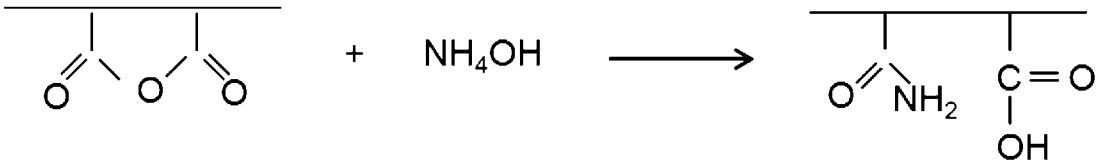
[0038] なお、上記以外のヒドラジド化剤を使用しても、同様に反応を行い、ヒドラジド化ＳＭＡを製造することができる。

[0039] （２）アミド化ＳＭＡ

アミド化されたＳＭＡ誘導体（アミド化ＳＭＡ）は、ＳＭＡとアミド化剤を反応させることにより、製造することができる。アミド化剤としては、例えば濃アンモニア水（２８～２９％NH_3）、液体アンモニア（１００％NH_3）などが挙げられ、好適には濃アンモニア水が挙げられる。

[0040] ＳＭＡのアミド化は、例えば、次の反応スキームにしたがって行うことができる。

[化5]



[0041] 例えば、ＳＭＡを水に懸濁させ、これに濃アンモニア水（反応式中NH_4OH）を添加し、ＳＭＡ中の無水マレイン酸残基（反応式中左端の構造式［化２］）を加アンモニア分解する。その結果、アミド化ＳＭＡを得ることができる。

上記反応におけるアンモニアの使用量は、無水マレイン酸残基に対して、例えば１～１００倍当量、好適には１０～２０倍当量である。通常、アンモニアを無水マレイン酸残基の５倍当量以上使用すれば、ＳＭＡの無水マレイン酸残基の９０％以上をアミド化することができる。必要によっては無水マレイン酸残基を温存するには使用するアンモニアの当量は１モル以下、好適には０．５モル当量である。

上記反応は、水系または有機溶媒系のいずれの反応系でも行うことができる。

[0042] 以上の反応を水系で行う場合、通常、所定量のＳＭＡを水に懸濁させ、該懸濁液に所定量の濃アンモニア水を添加し、撹拌して反応させる。この場合

、ＳＭＡの使用量は、特に限定されないが、水１Ｌに対して、例えば５００ｍｇ～１０ｇ、好適には５００ｍｇ～３ｇである。反応温度は、特に限定されないが、例えば１０℃～７０℃、好適には３０℃～６０℃である。反応時間は、特に限定されないが、例えば３～４８時間、好適には２０～４０時間である。また、このとき反応系のｐＨは、１０以上である。

なお、標準的には無水マレイン酸残基を完全開環するためには約４０時間反応を行う。また、無水マレイン酸残基を例えば８個中１～４残基をそのまま残存させるためには５～１０時間行い、必要に応じて時間と温度、それにアンモニアの量を変える。

有機溶媒系で行う場合、通常、所定量のＳＭＡを有機溶媒に溶解した溶液を調製し、該溶液に所定量の濃アンモニアを添加し、撹拌して反応させる。この場合、使用する有機溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）を水系と同様に行うことができる。

[0043] 別のアミド化剤として－６０℃に冷却した液体アンモニアを３００ｍｌのビーカーに１００ｍｌとり、そこに粉末の１．０～３０ｇ、好適には３ｇ～のＳＭＡを撹拌下に少量ずつ添加すると透明になる。ＳＭＡの溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば１～３０％、好適には１０～２０％である。反応温度は、特に限定されないが、例えば２０～８０℃、好適には３０～５０℃である。また、反応時間は、特に限定されないが、例えば安全に実験操作を行うには、液体アンモニウムとして存在するので、－３０℃～－６０℃、好適には－３０℃付近の沸騰下で、１０～２４時間、好適には５～６時間がよい。

反応終了後、反応液に対して、従来の方法にしたがって、ろ過、透析、濃縮などを行い、未反応のアンモニアは－３３℃で沸騰蒸発除去できる。ついで蒸留水を約２００ｍｌ加え、撹拌下溶解し、ついで０．１Ｍ塩酸を撹拌下に加え、ｐＨを５～５．０で分別沈殿する分画の未反応または低アミド化のＳＭＡ、および分解物その他の塩を除去し、残留溶解液を中性の蒸留水で透析し、凍結乾燥して、アミド化ＳＭＡを得ることができる。

[0044] なお、上記以外のアミド化剤を使用しても、同様に反応を行い、アミド化ＳＭＡを製造することができる。

[0045] （３）チオール化ＳＭＡ

チオール化されたＳＭＡ誘導体（チオール化ＳＭＡ）は、ＳＭＡとチオール化剤を反応させることにより、製造することができる（反応スキームは図１を参照）。チオール化剤としては、例えばアミノアルキルメルカプタン（例えば２－アミノエタンチオールなど）、システイン（特にＬ－システイン）、グルタチオン（還元型）などが挙げられ、好適には２－アミノエタンチオールおよびＬ－システインが挙げられる。

[0046] 例えば、チオール化剤としてＬ－システインを使用する場合、例えば、ＳＭＡをジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）などの有機溶媒に溶解させ、これにＬ－システインを添加し、無水マレイン酸残基とシステインのアミノ基を反応させることにより、チオール化ＳＭＡを得ることができる。

上記反応におけるＬ－システインの使用量は、無水マレイン酸残基に対して、例えば１～３０倍当量、好適には２～１０倍当量である。

上記反応は、有機溶媒系あるいは、水溶液中弱アルカリ性下でも行うことができる。

[0047] 通常、所定量のＳＭＡを有機溶媒に溶解した溶液を調製し、該溶液に所定量のアミノアルキルメルカプタン類化合物（図１中、$H_2N-R-SH$［式中、Ｒは任意のアルキル基であるか、または該式は、有機酸（脂肪酸）でω末端がＳＨ基のもの、例えばＬ－システインを示す。］）を添加し、撹拌して反応させる。この場合、使用する有機溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）などが挙げられ、好適にはＤＭＦ、ＤＭＡｃが挙げられる。またｐＨ８以上の水溶液（重曹緩衝液）中でも行うことができる。

[0048] ＤＭＦを１５ｍｌに対し、ＳＭＡの溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば０．０５ｇ～１．５ｇ、好適には２００～３００ｍｇである。反応温度は、特に限定されないが、例えば１０～６０℃、好適には２０～５０℃で

ある。また、反応時間は、特に限定されないが、例えば５～６４時間、好適には１０～２４時間である。

上記反応においては、触媒を適宜添加してもよく、触媒としては、例えばトリエチルアミン（ＴＥＡ）０．５ｍｌを反応液に添加し、撹拌下の反応を促進する。

反応終了後、反応液に対して、従来の方法にしたがって、ろ過、透析／濃縮などを行い、未反応のシステイン、未反応ＳＭＡ、分解物その他の塩を除去し、必要により乾燥して、チオール化ＳＭＡを得ることができる。

[0049] なお、上記以外のチオール化剤を使用しても、同様に反応を行い、チオール化ＳＭＡを製造することができる。

[0050] （４）アミン化ＳＭＡ

アミン化されたＳＭＡ誘導体（アミン化ＳＭＡ）は、ＳＭＡとアミン化剤を反応させることにより、製造することができる。アミン化剤としては、例えばジアミノアルキル（例えばジアミノエタンなど）、グアニジルブチルアミン、Ｌ－リジンなどが挙げられ、好適にはジアミノエタン、ジアミノプロパノール、ジアミノプロパンが挙げられる。

[0051] 例えば、上記ＳＭＡのチオール化反応と同様に、有機溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド）中でＳＭＡとアミン化剤との反応を行うことにより、アミン化ＳＭＡを得ることができる。

また、アミン化剤としてＬ－リジンを使用することにより、塩基性のより強いグアニジル化ＳＭＡを得ることができ、Ｌ－リジンの代わりにＬ－アルギニンを用いることにより、より塩基性のより強いグアニジル化ＳＭＡを得ることができる。

[0052] （５）トリス化ＳＭＡ

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（以下、「トリス」と称する。）化されたＳＭＡ誘導体（トリス化ＳＭＡ）は、ＳＭＡとトリス化剤を反応させることにより、製造することができる。トリス化剤としては、例えばト

リス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（例えば、和光純薬製）が挙げられる。水溶液の反応にはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの塩酸塩も考えられるが、好適にはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンが挙げられる。

[0053] 例えば、ＳＭＡをジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に溶解させ、これにトリスを添加し、無水マレイン酸残基と反応させることにより、トリス化ＳＭＡを得ることができる。

上記反応におけるトリスの使用量は、無水マレイン酸残基に対して、完全トリス化には無水マレイン酸の当量以上、例えば５～１００倍当量、好適には５～１０倍当量である。

上記反応は、有機溶媒系ならびに水溶系で行うことができる。

[0054] 通常、所定量のＳＭＡを有機溶媒に溶解した溶液を調製し、該溶液に所定量のトリスの粉末を添加し、撹拌して反応させる。この場合、使用する有機溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）が好適である。２００ｍｌのビーカーにＤＭＦを２５ｍｌとり、それにＳＭＡ（無水マレイン酸残基含有）を０．１ｇ～３ｇ、より好適には０．２ｇ～０．６ｇのＳＭＡを撹拌下に加え、溶解する。ＳＭＡの溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば０．５ｇ（２％Ｗ／Ｖ）加える。好適には０．５ｇ（２ｍｍｏｌ）である。これにトリスを０．０５ｇ～１０ｇ、無水マレイン酸残基の５０％（半モル当量）残基をトリス化するためには０．１３ｇ（１ｍｍｏｌ）を加え、反応させる。反応温度は、特に限定されないが、室温で、例えば１０時間～３０時間、好適には２０時間反応させる。また、反応液は当初濃黄色～橙色、ついで淡黄色となる。マレイン酸残基に対し、より完全にトリス化を行うためには約０．３ｇ以上必要であり、好適には０．５ｇ～１ｇ以上の添加が必要である。

反応終了後、反応液に対して、上述の方法にしたがって、ｐＨを酸性（＜ｐＨ４）にし、反応生成物を沈殿し、分離する。さらにろ過、透析、濃縮などを行い、上記アミド化反応と同様、分別沈殿などを加味して未反応のトリ

ス、未反応ＳＭＡ、分解物その他の塩を除去し、必要により凍結乾燥により乾燥して、トリス化ＳＭＡを得ることができる。

[0055] なお、上記以外のトリス化剤を使用しても、同様に反応を行い、トリス化ＳＭＡを製造することができる。

[0056] （６）アミノレブリン酸化ＳＭＡ

アミノレブリン酸化されたＳＭＡ誘導体（アミノレブリン酸化ＳＭＡ）は、既知のアミド化反応に基づき、ＳＭＡのカルボキシル基とδ－アミノレブリン酸のアミノ基を反応させることにより、製造することができる。例えば、上記（４）アミン化ＳＭＡの反応と同様の条件で行うことができる。

[0057] 本発明のＳＭＡ誘導体は、低減された表面電荷（ゼータ電位）を有する。誘導体化前のＳＭＡ表面のゼータ電位は、通常、－４８ｍＶ～－５０ｍＶであるが、本願発明のＳＭＡ誘導体および結合体は、通常－４０ｍＶ～－５ｍＶ、好適には－３０ｍＶ～－５ｍＶである。

本発明のＳＭＡ誘導体のゼータ電位が上記範囲内であることで、肝蔵および／または脾蔵への非特異的な吸着が抑制され、より優れたＥＰＲ効果による高い腫瘍内濃度の達成が可能になる。

また、本発明のＳＭＡ誘導体のゼータ電位が上記範囲内であることで、後述する本発明の結合体において、上記範囲内のゼータ電位が達成され得る。

なお、本明細書におけるゼータ電位は、ゼータ電位測定装置（大塚電子株式会社製、Ｐｈｏｒｔａｌ　Ｍｏｄｅｌ　ＥＬＳＺ－２）を使用し、試料の濃度を３～１０ｍｇ／ｍｌとした０．１５Ｍ　ＮａＣｌ溶液（ｐＨ７．４）中で測定した値を意味する。

[0058] したがって、本発明のＳＭＡ誘導体は、低減された表面電荷を有し、中性ｐＨでは＋荷電を有することになるので、ＳＭＡ鎖が弱酸性～中性～陽性の広範囲の荷電を有する結合体を製造することが可能になる。

また、トリス化ＳＭＡは、ＳＭＡポリマーの側鎖（ｂ）に親水性が大きく付与され、さらにＣＯＯＨ基がブロックされ、さらに、アミン成分が付与されているため、その表面荷電はより中性である。その結果として、ＳＭＡ（

ミセル）の肝臓および／または脾臓への取り込みを抑制することができる。

[0059] 本発明のＳＭＡ誘導体は、上述した修飾剤の他に、必要に応じて、Ｄ－/Ｌ－アミノ酸、タウリン、オルニチン、シトルリンなどのアミノ酸類；グルコサミン、マンノース、マンニトール、グルクロン酸などから構成される糖鎖；ジマレイミドメタン；グルタールアルデヒド；ジアミノカプロン酸、クエン酸、シナピン酸、脂肪酸などの有機酸などの修飾剤、さらには、その他の既知の架橋剤などを結合させることができる。これらの修飾剤または架橋剤のＳＭＡ誘導体との結合方法は、従来既知の方法を使用することができる。

例えば、さらなる修飾剤として、グルコサミンなどの糖鎖による付加を修飾した場合、ＳＭＡポリマーに親水性を付与することができる。

[0060] また、本発明は、上記ＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体と直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含む、結合体を提供する。

本発明の結合体において、活性物質は、上記ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の部分において、あるいは該側鎖（ｂ）とは異なる部分（例えば、ＳＭＡの無水マレイン酸残基）において、ＳＭＡ誘導体に結合することができる。例えば、活性物質がNH_2基を有する場合、該基とＳＭＡ誘導体中に残留する無水マレイン酸残基とを反応させることにより、アミド結合を介してＳＭＡ誘導体に活性物質を共有結合させることができる。

[0061] 好適には、本発明の結合体は、上記ＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体中の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）または該側鎖（ｂ）とは異なる部分の少なくとも１つと直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含むものである。

また、上記ＳＭＡ誘導体は、２種以上の官能基（例えばアミノ基とＳＨ基）（ａ）を有するものであってもよい。

[0062] 本発明の結合体は、好適には、ＳＭＡ誘導体と活性物質との結合が、アミド結合、ヒドラゾン結合、エステル結合およびジスルフィド結合から選択される結合であるものである。

[0063] ここで、活性物質は、ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）または該

側鎖（ｂ）とは異なる部分（例えば無水マレイン酸残基）とともに共有結合を形成可能な基を有する場合、ＳＭＡ誘導体と活性物質とを直接共有結合させることができる。しかしながら、活性物質が、上記共有結合を形成可能な基を有しない場合、あるいは必要に応じて、連結基を介して、ＳＭＡ誘導体と活性物質とを間接的に共有結合させることもできる。

[0064] したがって、本発明の結合体において、ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）と活性物質との結合は、下記式［Ｂ］：

[化6]

活性物質－R^3－R^4－R^{2a}－ＳＭＡ誘導体　　［Ｂ］

［式［Ｂ］中、R^3は、－ＮＨ－、－Ｏ－、カルボニル基およびアルキレン基並びにそれらの組合せから選択される基を示し、

R^4は、－Ｃ（CH_3）＝Ｎ－および－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－から選択される基を示し、R^{2a}は、－ＮＨ－を示す。］

で示される連結基－R^3－R^4－を介した結合であり得る。

ここで、R^{2a}は、ＳＭＡ誘導体の官能基（ａ）であるヒドラジド基の残基である。

上記ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）がヒドラジド基であり、連結基を形成する部分が－R^3－Ｃ（CH_3／ベンジル）＝Ｏである場合、ＳＭＡ誘導体と活性物質との連結基を介した結合は、例えば、次のように形成される。

[化7]

活性物質－R^3－Ｃ（CH_3／ベンジル）＝Ｏ　＋　NH_2－ＮＨ－ＳＭＡ誘導体
→　活性物質－R^3－Ｃ（CH_3）＝Ｎ－ＮＨ－ＳＭＡ誘導体

[0065] 上記式［Ｂ］中の連結基－R^3－R^4－は、好適には以下の基：

(1) －ＮＨ－（CH_2）$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－（CH_2）$_2$－Ｃ（CH_3）＝Ｎ－（例えば、ＢＯＣ－エチレンジアミンおよびレブリン酸由来の基）、および

(2) －ＮＨ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－（CH_2）$_2$－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－（例え

ば、アミノレブリン酸ベンジルエステル由来の基）から選択される基である。

[0066] 本発明における「活性物質」とは、生理活性などの活性（薬効）を示す物質であれば特に限定されず、例えば抗癌剤、ペプチドホルモン、抗生物質、抗炎症剤等の薬物等が挙げられる。

好適には抗癌剤、抗生物質およびペプチドホルモンが挙げられ、特に好ましくは抗癌剤が挙げられる。

[0067] 上記抗癌剤としては、例えば、ピラルビシン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン、ボロノメルカプテイト、ボロノシステイン（但し、硼素誘導体を用いた癌治療には、熱中性子の照射を要する）、エピルビシン、アクラルビシン、ドキソルビシンなどが挙げられ、好適にはピラルビシン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン、ボロノメルカプテイト、ボロノシステイン、エピルビシンが挙げられる。

上記抗生物質としては、例えば、ストレプトマイシン、アミカシン、アミノベンジルペニシリン、バンコマイシン等が挙げられる。

上記ペプチドホルモンとしては、例えば、カルシトニン、エンドルフィン、エンケファリン、プロラクチン、ラクトジェニックホルモン、パラサイロイドホルモン、プロラクチン放出ホルモン、インシュリン、副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）等が挙げられる。

[0068] 本発明の結合体は、上記ＳＭＡ誘導体中の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）の少なくとも１つに対して、活性物質の官能基を反応させることにより、活性物質をＳＭＡ誘導体に共有結合させることにより製造することができる。

また、本発明の結合体には、上記ＳＭＡ誘導体の官能基（ａ）以外の部分（例えば無水マレイン酸残基）に対して活性物質の官能基（例えば、アミノ基）を反応させ、アミド結合を介してＳＭＡ誘導体に活性物質が結合したものも含まれる。

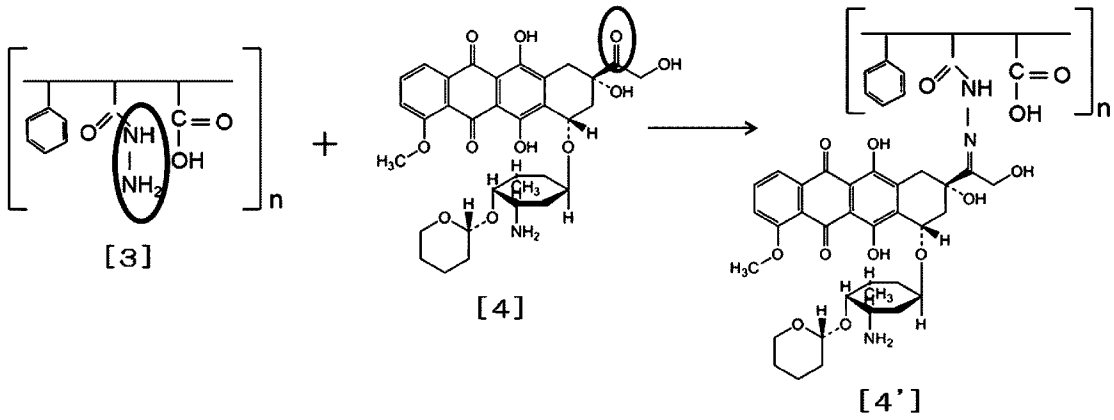
以下、本発明の結合体として、（１）ＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ、（２）ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル－ＺｎＰＰ、（３）ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－活

性物質、および（４）ＳＭＡ－ＴＨＰ／－トリスを製造する場合を例として、本発明の結合体の製造方法を説明する。

[0069] （１）ＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ

ＳＭＡ誘導体としてヒドラジド化ＳＭＡを使用し、薬物としてピラルビシン（ＴＨＰ）を使用する場合、以下の反応スキームで示されるようにして、ヒドラジド化ＳＭＡ［３］のヒドラジド残基に対し、ＴＨＰ分子上のカルボニル基［４］の楕円部を反応させ、シッフ塩基同様の結合体［４’］を形成させ、ＳＭＡ鎖へＴＨＰが付加した結合体［式４’］を得ることができる。

[化8]



[0070] 上記反応は、好適にはメタノール中で行うが、必ずしもそれに限るものではない。例えばＤＭＦ、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、水などの溶液中で進行する。また、この反応を促進するため、温度は１０～７０℃、好適には１５～３７℃に必要に応じて超音波照射下で行う。また、反応は撹拌下に１～５０時間、好適には１０～２０時間で満足すべき反応物が得られる。

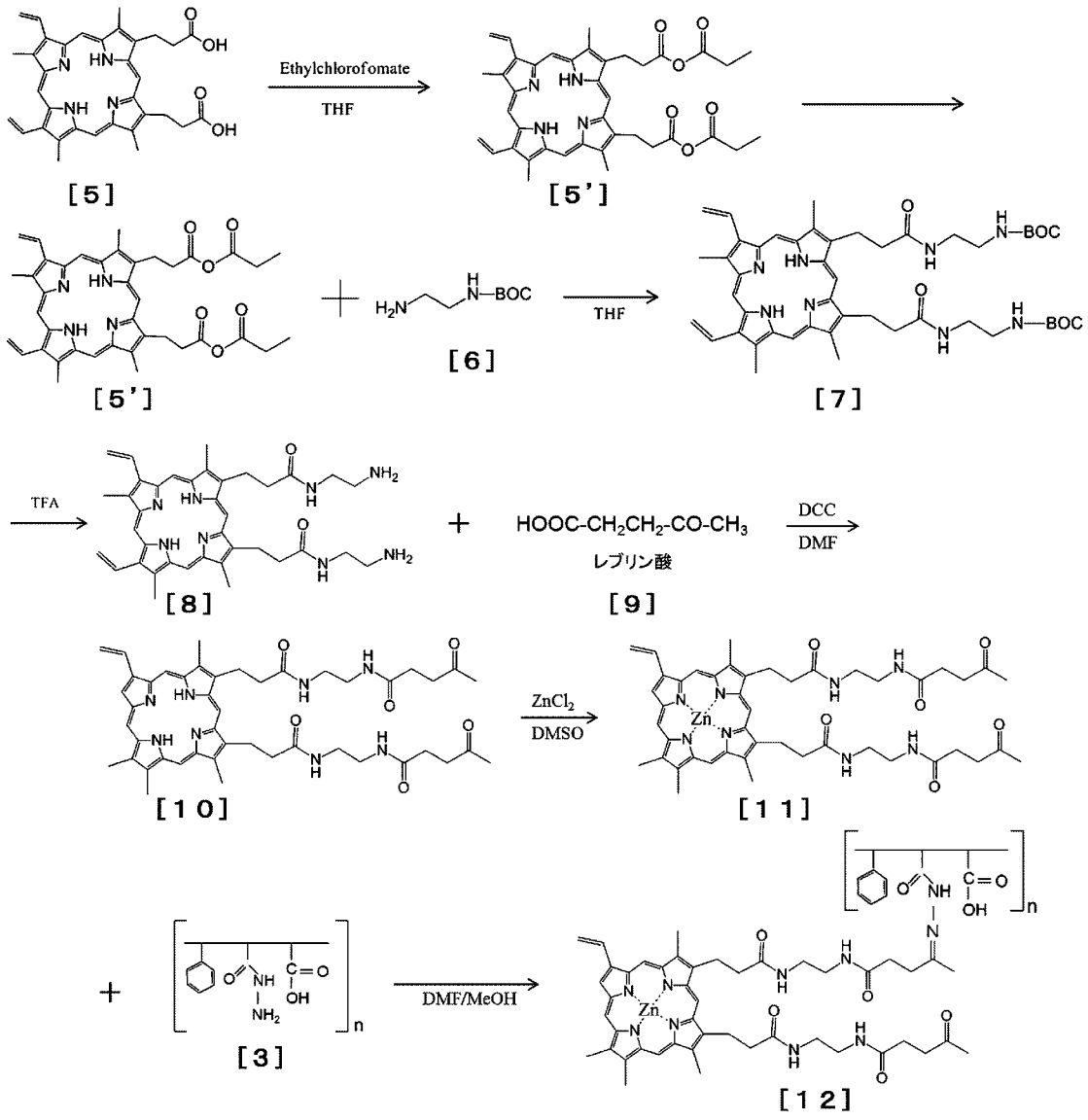
[0071] 上記結合体［式４’］の生成において、［３］のヒドラジド基と［４］のＴＨＰの量比は１モル：０．２モルでよいが、［４］を［３］に対し過剰倍加えると反応生成物（ＳＭＡ－ＴＨＰ）中のＴＨＰのＬｏａｄｉｎｇを増加させることができる。好適にはＳＭＡのヒドラジン化率を低目にした２０～５０％であり、それにより充分な溶解性を保つことができる。また、導入されたヒドラジンに対して５０～１００％の割合でＴＨＰを添加することで、

２０％以上のＴＨＰ含有率のＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰが作成できる。

[0072] （２）ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル－ＺｎＰＰの製造

ＳＭＡ誘導体としてヒドラジド化ＳＭＡを使用し、薬物として亜鉛プロトポルフィリン（ＺｎＰＰ）を使用する場合、連結基を介してヒドラジド化ＳＭＡとＺｎＰＰとを結合させることができる。この場合、例えば、プロトポルフィリン（ＰＰ）［５］のジアミノ基誘導体［７］の合成、そのレブリン酸誘導体［９］の合成、亜鉛の導入（［１０］→［１１］）、ＺｎＰＰとヒドラジド化ＳＭＡとの結合を経て、ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル－ＺｎＰＰ［１２］を得ることができる。

[化9]



[0073] 上記反応は第一段階として、プロトポルフィリン（ＰＰ）の２個のカルボキシル基を活性エステル化（ＰＰのクロロホルメート）［5’］を行う。この反応は、例えば、アルミホイルで遮光した１００ｍＬのナス型フラスコに１００ｍｇのプロトポルフィリンを入れ、２０ｍＬのテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）を加え懸濁溶解させる。そのＰＰ／ＴＨＦ懸濁液をマグネチックスターラーにより撹拌下に約１０倍のモル当量の０．２５ｍＬ（１．７９ｍｍｏｌ）のトリエチルアミンを滴下により加える。あらかじめ０℃に冷やしたクロロギ酸エチルを０．３４ｍＬ（３．５６ｍｍｏｌ）を、ＰＰとトリエチルアミンの反応溶液に約１０分間かけゆっくりと加え、撹拌下に氷上で２０分間反応させ、さらに室温（２５℃）で１０分間反応させる。

必要に応じトリエチルアミンなど触媒を加える。ＢＯＣエチレンジアミンはプロトポルフィリンのカルボキシル基に対して１．５～３倍量、エチレンジアミンはプロトポルフィリンのカルボキシル基に対して１０～１００倍量を加える。この反応は、室温で３０分～６０分間行う。

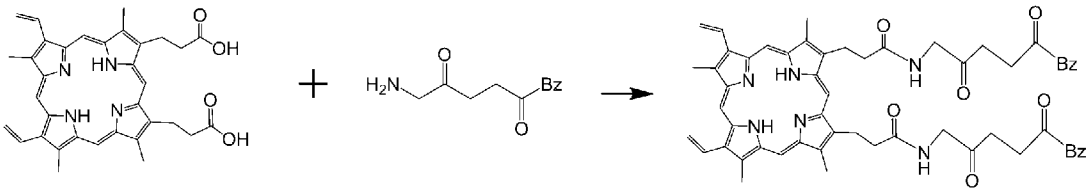
[0074] 第２段階としてＰＰＥＤ［８］に導入したエチレンジアミンのアミノ基にレブリン酸［９］のカルボキシル基の付加反応を行う。この反応は、ＤＭＦに溶解したＰＰＥＤに、２～２０倍モル量のレブリン酸、触媒としてＤＣＣを加え、２５℃～５０℃で６～２４時間反応させる。

続いて、第３段階としてＰＰに付加したレブリン酸上のケトン基に対し、ＳＭＡ－ヒドラジド［３］を、シッフ塩基対様結合形成反応を介して結合させる。この反応は、ＳＭＡヒドラジドをＤＭＦやＤＭＳＯなどの溶媒に溶解し、２～２０倍モル量のレブリニルＰＰＥＤ［１０］、酢酸またはトリフルオロ酢酸を触媒量加える。室温～４０℃で、１２時間～２４時間反応を行う。

[0075] ＰＰに対しレブリン酸付加のための別の方法としては、アミノレブリン酸エステルを用い、そのアミノ基をＰＰ上のカルボキシル基と反応させる方法が挙げられる（下記反応式参照）。下記反応式は、アミノレブリン酸ベンジルエステル（アミノレブリネートＣｂｚ）［１３］を用いて、プロトポルフ

ィリン（ＰＰ）レブリネート［１３’］を合成する反応を示している。この反応はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）など溶媒中で縮合剤ＥＤＡＣなどを添加し、常法により行うことができる。レブリン酸の代わりにアセトーアセテートやブトキシエタノールを用いることも可能である。この反応は、次のように進行する。

[化10]



［5］ ［13］ ［13'］

［式中、Ｂｚは、ベンジル基を示す。］

[0076] アミノレブリン酸ベンジルエステル（アミノレブリネートＣｂｚ）［１３］を用いて合成したプロトポルフィリン（ＰＰ）レブリネート［１３’］と、ヒドラジド化ＳＭＡとの結合反応は、上記ＰＰレブリン酸とヒドラジド化ＳＭＡとの結合反応と同様に行うことができる。

[0077] また、ＳＭＡ－ヒドラジンの代わりに、ＳＭＡ－ヒドラゾン／トリスを用いることにより、ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル－ＺｎＰＰ／トリスを製造することもできる（後記［１８’］も参照）。

[0078] （３）ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－活性物質

一般に水溶液中でＳＨ基を含む蛋白質（アルブミンなど）とＳＨ化合物（Ｒ）は、下記の反応式Ａで示されるように、酸化的ＳＳ形成反応することが知られている。

［反応式Ａ］

[化11]

Ⓟ－ＳＨ ＋ Ｒ－ＳＨ → Ⓟ－Ｓ－Ｓ－Ｒ

[式中、Ⓟは、ＳＨ基を含む蛋白質、ペプチド、ＳＭＡポリマーなどを示す。]

但し、酸素分圧は大気圧あるいはその付近で、ｐＨは弱アルカリ性、温度は０℃～４０℃でとくに４～５℃で撹拌下に数～数十時間を要する。必要に応じて触媒に硫酸銅等を数ｍモルになるように添加すると好都合である。

[0079] ＳＭＡにＳＨ基を導入したＳＭＡ誘導体（ＳＭＡ－ＳＨ）は、そのＳＨ基に対してボロノチオール化合物（ボロノメルカプテイト、$Na_2B_{12}H_{11}SH$、略称「ＢＳＨ」）またはボロノシステイン（ＢＣｙＳＨ）と水溶液中で空気酸化によりＳ－Ｓ形成反応を行うことができ、その結果、高分子結合体ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－薬物を得ることもできる。

ここでは図１上のメルカプト化ＳＭＡを使用し、活性物質としてボロノメルカプテイト（$Na_2B_{12}H_{11}SH$、以下、「ＢＳＨ」と称する。）を使用する場合を例にして説明する。

［反応式Ｂ］

[化12]

SMA-SH ＋ BSH → SMA－S－S－B

[14] [15] [16]

［式中、Ｂは、硼素１２個を有する籠状（ｃａｇｅ）化合物がボロノメルカプテイトである。］

[0080] 上記－Ｓ－Ｓ－形成反応を利用して、ＢＳＨの他にボロノシステイン、その他のチオール化合物（Ｒ－ＳＨ）を、次のようにＳＭＡ鎖上に－Ｓ－Ｓ－結合を介して、ペンダント式にＳＭＡに付加することができる（下記反応式Ｃ参照）。

この反応は、上記反応式Ａに準じて進行する。

［反応式Ｃ］

[化13]

$$nSMA\text{-}SH + mR\text{-}SH \rightarrow mSMA\text{-}S\text{-}S\text{-}R + (n-m)\,SMA\text{-}SH$$

[16]

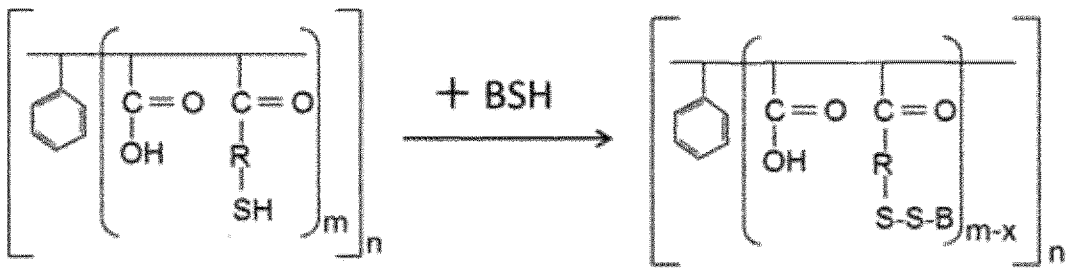
[式中、Ｒは活性物質を示し、ｍはｍモル数であり、ＳＭＡ（MW約１２００の場合）中に１～６モルのＳＨ基を示し、ｎはスチレンマレイン酸の重合度のｎモル当量であることを示す。ｎ＞ｍ]

[0081] 上記反応により得られるＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－Ｒはナノメディシンとして挙動し、ＥＰＲ効果を示し、静脈注射後、数時間経つと腫瘍部によく集積する。これに熱中性子を照射するとＥＰＲ効果により腫瘍部に集積した［１６］の硼素からアルファ線／Ｌｉ核が発生し、腫瘍選択的に殺腫瘍薬効を発揮する。硼素集積のない正常組織では、熱中性子は細胞傷害作用（副作用）を示さず好都合である。従ってこのＢ含有ミセルは腫瘍選択的な集積があり理想的な抗腫瘍効果を示す。

[0082] また、ＳＭＡ－ＳＨを用いる反応の代わりに、もとのＳＭＡの無水マレイン酸鎖残基にボロノフェニルアラニンのアミノ基を直接反応させることによってペンダント型に硼素の導入することもできる。

[0083] 以下、ボロノシステインであるボロノメルカプテイト（ＢＳＨ）の場合を表現する。

[化14]



SMA-SH

[式中、Ｂはボロノメルカプテイトであり、ｎ＞ｍであり、ｍ－ｘはＢの置換数である。]

[0084] なお、ＳＭＡ－ＳＨの合成において、ＳＭＡ－ＳＨ同士が分子内架橋して

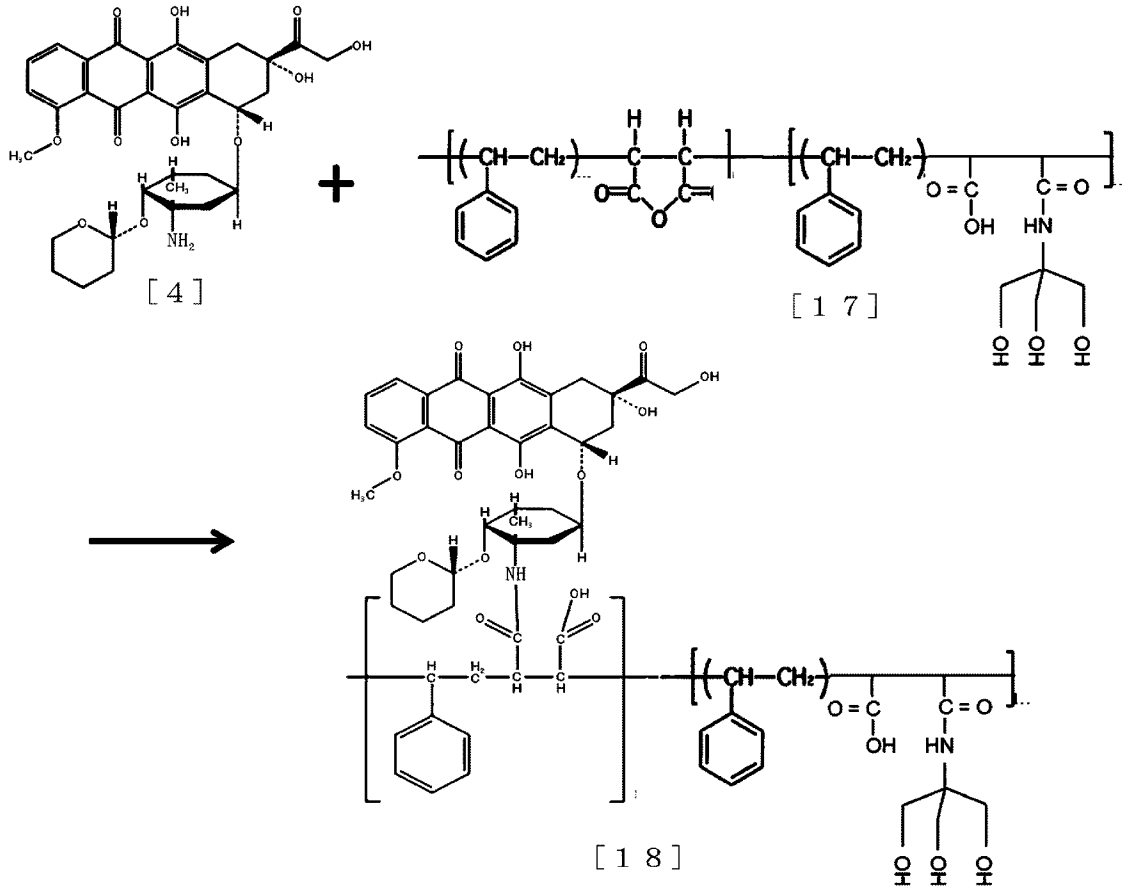
ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－ＳＭＡを形成する場合がある。該副生成物は不溶物となり易いので、該副生成物が生じた場合、必要に応じてテトラヒドロ硼酸ナトリウム（$NaBH_4$）等の還元剤を約１ｍＭ程度の濃度（１Ｌの反応液に約３０～３００ｍｇの粉末を添加）になるようにN_2で空気遮断下に撹拌しつつ添加し、より完全にＳＭＡ－ＳＨとなし、上記［反応式Ｂ］を開始する。

[0085] （４）ＳＭＡ－ＴＨＰ／－トリス

上記にて合成した無水マレイン酸残基を約５０％含有するトリス化ＳＭＡに対し、ＴＨＰの遊離アミノ基に対し、直接無水マレイン酸残基とアミド結合形成反応を、あるいは開環したマレイン酸のＣＯＯＨとＴＨＰのアミノ基の間にアミドを形成するため、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド）あるいはＷＳＣＩ（水溶性カルボジイミド：例ＥＤＡＣ；エチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド）などの縮合反応剤とトリエチルアミンなどの触媒を加え、ＳＭＡ－トリス－ＴＨＰ結合物を合成することができる。

より詳しい反応は、以下に記す。なお、各々の反応物の使用量はここに記載するのは一例である。ＤＭＦ１５ｍｌに上記ＳＭＡ－トリス約３００ｍｇ（無水マレイン基約０．６ｍｍｏｌ）を溶解し、これにＴＨＰ（前述、メルシャンＫＫ製、ＭＷ６２７．６４）１００ｍｇ（約０．１６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２時間撹拌後、トリエチルアミン０．５ｍｌ（前述）を加え、室温にて１７時間撹拌反応を行う。反応終了後、蒸留水を同量～３倍加え、アミコンＬａｂ．Ｓｃａｌｅ装置等の分子ふるい膜濃縮／透析装置（ｃｕｔｏｆｆ ＭＷ ２０００）を用い、濃縮、透析し、さらに蒸留水を加える。透析を２～４回行い、未反応物、反応分解物、その他低分子から合成した高分子のＴＨＰ－ＳＭＡの結合物を除き、凍結乾燥を行いＳＭＡ－ＴＨＰ／－トリスを得る。ＴＨＰに基づく収量は約８０％。

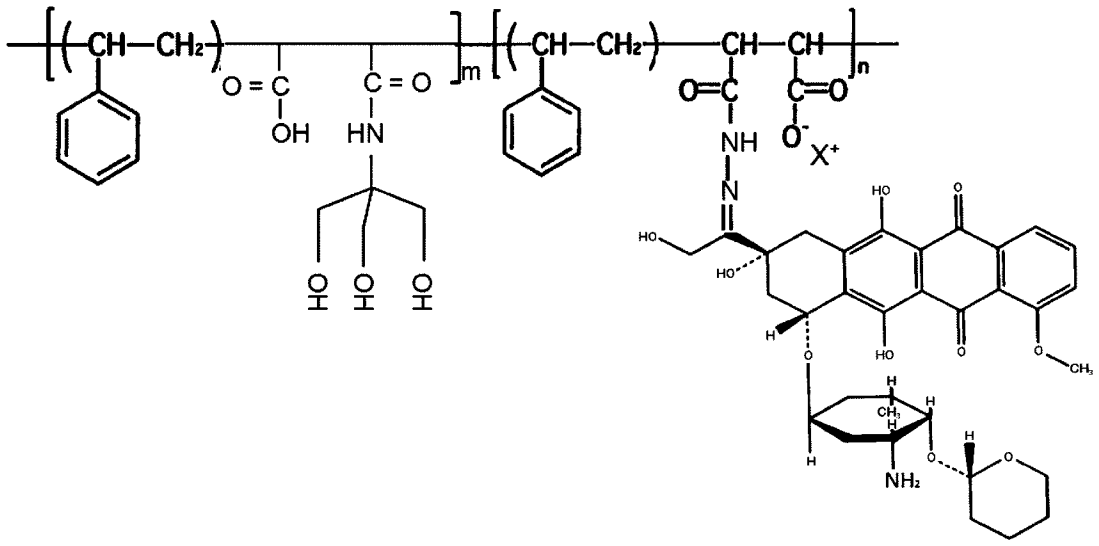
[化15]



[４] [１７] [１８]

[0086] 上記反応を、ＳＭＡ－トリス－ヒドラジンとＴＨＰとを用いて行うと、次の別のＳＭＡ－ＴＨＰ結合体ができる。この場合、上記［１８］のアミド結合の代わりにヒドラゾン結合でＳＭＡと結合していることである。これは［４’］に類似しているが、ＳＭＡ－ヒドラジンとＳＭＡ－トリスのバックボーンであり、アミド結合ではなくヒドラジン側鎖（ｂ）にＴＨＰがペンダント式にぶらさがっているものである［１８’］。

[化16]



［１８’］

[0087] 本発明の結合体は、従来のＳＭＡ－活性物質複合体または結合体に比べて、多くの利点を有する。

例えば、ヒドラゾン結合により活性物質（薬物）がＳＭＡに結合した結合体（ＳＭＡ－ヒドラゾン－薬物結合体）は、その化学結合が腫瘍病巣などの酸性局所のｐＨで容易に解裂するため、ＳＭＡ鎖に結合した薬物は、病巣部の低ｐＨ域でもとの薬物が遊離し（図２参照）、生体組織内で自由拡散により、標的細胞や細胞内標的分子に結合できるようになる。一方、このヒドラゾンによる結合は正常の組織や血液の中性ｐＨ下では解裂しないため、上記結合体は、高分子として挙動するので、ＥＰＲ効果がみられない健常の生体組織への分布が抑えられ、その結果、健常の生体組織では薬物が接触しないため薬物との反応（副作用）は抑えられる。すなわち、該結合体は、第2の腫瘍選択性が用いるヒドラゾン結合が腫瘍に固有の環境の酸性ｐＨで切断され、腫瘍局所でより選択的に薬効を発揮する優れた機能を有するばかりでなく、さらに副作用も低減されるものである。

また、ジスルフィド結合により活性物質（薬物）がＳＭＡに結合した結合

体（ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－薬物結合体）は、ＥＰＲ効果により腫瘍選択的な集積性を示すばかりでなく、さらに細胞に取り込まれると細胞内のグルタチオン（ＧＳＨ）の濃度は通常１ｍＭと高いので、この結合体はＳＳ還元反応で薬物を放出する。すなわち、ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－Ｒの該結合体は、細胞内で初めてＳＳ結合が切断され、活性型低分子の薬物－ＳＨを生成させ、薬効を発現させることができる（下記反応式参照）。

[化17]

ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－薬物　＋　２ＧＳＨ（細胞内で過剰）　→
ＳＭＡ－ＳＨ　＋　薬物－ＳＨ　＋　Ｇ－Ｓ－Ｓ－Ｇ

[0088] 本発明の結合体には、血液などの懸濁液中でミセル構造を取り得るものも含まれる。本発明の結合体がミセルを形成する場合、水溶液中では、見かけ上の分子量が化学構造式上の分子量よりも大きくなり、例えば、分子量が５万以上になると、ＥＰＲ効果により、腫瘍選択性（デリバリー）が増強され、薬効が改善するなどの点で有利となる。

[0089] 本発明の結合体は、生体内で活性物質を遊離することができるため、使用した活性物質に基づく各種の生理活性を発揮することができる。したがって、活性物質として薬物を使用した場合、該薬物の生理活性に基づく医薬として使用することができる。

また、本発明の結合体は、従来のＳＭＡ－活性物質複合体または結合体における血中での活性物質の放出を抑え、表面電荷の負電荷の減少による肝臓および／または脾臓への逸脱的集積を低減させるなどの問題を解消したものであり、より優れたＥＰＲ効果による高い腫瘍内濃度を達成できるので、活性物質として抗癌剤を使用した場合、制癌剤、すなわち、癌の予防または治療剤、癌の増殖阻害剤、癌
の転移抑制剤、アポトーシス促進剤等として非常に有利に使用することができる。

したがって、本発明は、本発明の結合体を含む、医薬（特に制癌剤）を提供する。

[0090] また、本発明の結合体は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）に安全に投与することができ、使用する活性物質（薬物、特に抗癌剤）の生理活性に基づいて患者（哺乳動物）における各種疾患（特に癌）の予防または治療に用いることができる。

したがって、本発明は、本発明の結合体を患者に投与することを含む、各種疾患（特に癌）の治療または予防方法を提供する。

[0091] 本発明の結合体は、通常、薬理学的に許容される担体と組み合わせて医薬組成物として、経口的または非経口的に哺乳動物に投与することができる。本発明の結合体を経口投与する場合の剤形としては、例えば、錠剤（糖衣錠、舌下錠、バッカル錠等）、油剤（油性化製剤）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、口腔粘膜貼付剤などが挙げられる。また、本発明の結合体を非経口投与する場合の剤形としては、注射剤（静脈注射剤、動脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、動脈注射剤（油剤化物を含む）等）、注入剤、点滴剤、デポ剤等が挙げられる。

したがって、本発明は、本発明の結合体と薬理学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

[0092] 本発明の結合体を上記の剤形に製造する方法としては、必要に応じて製剤分野で通常使用される添加剤、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、界面活性剤、懸濁化剤、乳化剤等を適量使用して、例えば日本薬局方に記載の方法など、その剤形を製造する際に製剤分野で一般的に用いられている既知の製造方法を適用することができる。

例えば、本発明の結合体を使用して注射剤を調製する場合、本発明の結合体を、薬理学的に許容される担体としての無菌の水性液または油性（油溶化）液に溶解、懸濁または乳化することによって、それぞれ水性製剤または油性製剤として調製される。同様にして、経口投与剤、腸内デポ剤等の油性製剤も製造することができる。

また、例えば、本発明の結合体を錠剤、丸剤、顆粒剤等を製造する場合、

賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を用いることができ、シロップ剤等を製造する場合、甘味剤等を用いることができ、乳剤、懸濁剤等を製造する場合、懸濁化剤、界面活性剤、乳化剤等を用いることができる。

[0093] ここで、水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖等の補助薬を含む等張液等が挙げられ、これに溶解補助剤として、例えば、アルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０等）等を添加することができる。

油性液としては、ゴマ油、大豆油、中鎖脂肪酸、リピオドール等が挙げられ、これに溶解補助剤として、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を添加することができる。

また、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（ベンジルアルコール、フェノール等）等をさらに配合してもよい。

さらに、必要に応じて、その他の製剤分野で一般的に使用される添加剤を添加してもよい。

また、賦形剤の例としては、水、上記水性液、上記油性液、乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、蔗糖、微結晶セルロース、カンゾウ末、マンニトール、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム等が挙げられる。

結合剤の例としては、デンプンのり、アラビアゴム、ゼラチン、トラガント、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、グリセリン等が挙げられる。

崩壊剤の例としては、デンプン、炭酸カルシウム等が挙げられる。

滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、タルク等が挙げられる。

甘味剤の例としては、ブドウ糖、果糖、転化糖、ソルビトール、キシリト

ール、グリセリン、単シロップ、サッカリン等が挙げられる。

したがって、本発明は、医薬組成物の製造における本発明の結合体の使用を提供する。

[0094] 上記医薬組成物中の本発明の結合体の含有量は、結合体に使用した薬物、剤形等に応じて変動するが、通常、医薬組成物全体に対して約０．０１～９９重量％、好適には約３．０～６０重量％である。

[0095] 本発明の結合体の投与量は患者の状態、体重、結合体に使用した薬物の種類、投与経路等によって異なるが、例えば、癌治療目的で注射剤の形で投与する場合、その１回投与量は、例えば、注射剤の形にして、通常体重１ｋｇあたり、原薬として約１．０～６０ｍｇ、好ましくは約２．０～５０ｍｇを静脈注射または点滴により投与するのが好都合であるが、高分子化されたものとしては100mg～10g あるいはそれ以上のものも可能である。これらは必ずしも毎日ではなく例えば1～3週に1回でもよい。

実施例

[0096] 以下、実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。

（実施例１）ヒドラジド化ＳＭＡの合成（ＳＭＡ／ヒドラジン比＝１）

蒸留水２０ｍｌにヒドラジン一水和物（$H_2N-NH_2\cdot H_2O$）（ＭＷ５０．０６）（和光純薬、大阪）０．１３ｍｌ（NH_2-NH_2として２．６ｍｍｏｌｅ）を加え、次にＳＭＡ（無水マレイン酸として３００ｍｇ）［米国Ｓａｒｔｏｍｅｒ社製、Ｅｘｔｏｎ、ＰＡ、ＵＳＡ、商品名：ＳＭＡ－ベースレジン　ＳＭＡ１０００、平均分子量１０００～１５００］を２６３ｍｇ（無水マレイン酸残基として合計１．３ｍｍｏｌｅ当量）を加え、室温で５～４０時間、好適には２４時間マグネチックスターラーで撹拌し、反応させた。ＳＭＡ添加直後は白濁していたが、数時間後には透明になり、ｐＨは約９．０を示した。反応２４時間後、反応液をガラスフィルターでろ過後、蒸留水を１００ｍｌ加え、撹拌しながら希釈および溶解し、次いでロータリーエバポレーターでろ液を３０～４０℃に加温し、減圧下に水をとばし、１／４容まで濃縮し、それにさらに蒸留水を２００ｍｌ加え希釈し水溶液とし、カ

ットオフ分子量１０００の分子ふるい透析膜で１日～２日透析および濃縮の操作を１／５容になるまで操作を繰り返し行った（アミコン・ラボスケール装置使用）。未反応のヒドラジン、未反応物、分解物その他の塩を除去し、凍結乾燥を行い、白色～微黄色粉末を得た（約２１２ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0097] （実施例２）ヒドラジド化ＳＭＡの合成（ＳＭＡ／ヒドラジン＝１／２）：無水マレイン酸残基に対し２倍モル当量のヒドラジンを添加し、水で反応させる系［無水環：ヒドラジン＝１：２（モル比）］

水２０ｍｌにヒドラジン一水和物（和光純薬、大阪）１２７μｌ（NH_2NH_2として２．６１ｍｍｏｌ）を加えて混合し、次いでＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）を加え、室温にて２３時間、マグネチックスターラーで撹拌した。別に、いずれもＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）とヒドラジン一水和物１２７μｌ（NH_2NH_2として２．６１ｍｍｏｌ）で同様の反応を３バッチ行った。反応２３時間後、それぞれをろ過（ガラスフィルターＮ０５Ｂ）してロータリーエバポレーターで濃縮し、４バッチをまとめた。蒸留水を加えて希釈し、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約６７６．９ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0098] （実施例３～６）ヒドラジド化ＳＭＡの合成

ヒドラジン添加量を無水マレイン酸残基の５倍量（実施例３）、１０倍量（実施例４）、２０倍量（実施例５）、５０倍量（実施例６）とした以外は実施例２と同様の系でＳＭＡ－ヒドラジドを得た。その結果、元素分析値は表１とほぼ同じであり、ＳＭＡの無水マレイン酸残基のすべてがヒドラジド化した誘導体が定量的に得られた。

[0099] （実施例７）ヒドラジド化ＳＭＡの合成：無水マレイン酸残基に対し１／４倍モル当量のヒドラジンを添加し、水で反応させる系［無水環：ヒドラジン

＝１：１／４（モル比）］

水２０ｍｌにヒドラジン一水和物（和光純薬、大阪）１５．９μｌ（NH_2NH_2として０．３３ｍｍｏｌ）を加えて混合し、次いでＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応開始時から常に白濁した状態の反応液に蒸留水を加えて希釈し、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２３８．３ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0100] （実施例８）ヒドラジド化ＳＭＡの合成：無水マレイン酸残基に対し１／２倍モル当量のヒドラジンを添加し、水で反応させる系［無水環：ヒドラジン＝１：１／２（モル比）］

水２０ｍｌにヒドラジン一水和物（和光純薬、大阪）３２．１μｌ（NH_2NH_2として０．６６ｍｍｏｌ）を加えて混合し、次いでＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応開始時から常に白濁した状態の反応液に蒸留水を加えて希釈し、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約１８５．９ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0101] （実施例９）ヒドラジド化ＳＭＡの合成：無水マレイン酸残基に対し１倍モル当量のヒドラジンを添加し、水で反応させる系［無水環：ヒドラジン＝１：１（モル比）］

水２０ｍｌにヒドラジン一水和物（和光純薬、大阪）６３．７μｌ（NH_2NH_2として１．３１ｍｍｏｌ）を加えて混合し、次いでＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応開始時から常に白濁した状態の反応液に蒸留水を加えて希釈し、そのまま分子量

１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２４０．２ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0102] 以上のとおり、ヒドラジンの量を加減すれば任意の量でヒドラジン基を導入することができる。また、ヒドラジン添加量を無水マレイン酸残基の１／４、１／２、１倍当量加えた場合は、ヒドラジン由来の窒素含量は減少した（表１）。

[0103] （実施例１０）ヒドラジド化ＳＭＡの合成：無水マレイン酸残基に対し２倍モル当量のヒドラジンを添加し、有機溶媒ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：ヒドラジン　＝１：２（モル比）］

ＤＭＦ１５ｍｌにＳＭＡ無水マレイン酸３００ｍｇ（無水環１．３１ｍｍｏｌ）をとかし、ヒドラジン１水和物（$NH_2-NH_2-H_2O$、０．１２７μｌ；２．６ｍｍｏｌ）を加え、室温で４８時間撹拌下に反応させる。ヒドラジン投入直後より白濁した。４８時間後も白濁していたが、ロータリーエバポレーターで濃縮後、０．１ＭＮａＯＨを１～３ｍｌ加えると溶解した。さらに２４時間反応後、ロータリーエバポレーターで１／３～１／４ｖｏｌ.に濃縮後、中性にし、透析、ＭＷ１０００カットオフメンブレンで透析、凍結乾燥した。元素分析により表１の結果を得た。

[0104] （実施例１１）ヒドラジド化ＳＭＡの合成：無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のヒドラジンを添加し、有機溶媒で反応させる系［無水環：ヒドラジン　＝１：５（モル比）］上記同様に、但しヒドラジンを０．３１８ｍｌ（６．５４ｍｍｏｌ）を加え、撹拌した。投入直後に上部がゾル化したが、撹拌により白濁した。そのまま反応を撹拌下に４８時間継続、ついでエバポレーターにより濃縮（１／３～１／４ｖｏｌ．）、上記と同様、蒸留水に対して透析に、凍結乾燥を行った。元素分析により表１の結果を得た。

[表1-1]

新規SMA誘導体	反応系	触媒	実施例番号	無水マレイン酸残基に対する修飾反応化合物の添加倍率	未反応の無水マレイン酸残基の状態 (a:無水環, b:カルボン酸塩)	元素分析値 (wt%) N	C	S	H	C/N	S/N	SMAへの導入率 (%)
SMAヒドラジド誘導体	水溶系	—	7	1/4倍	a	1.4	70.8	—	5.5	51.6	—	
						1.4	71.6	—	5.5	52.3	—	11
		—	8	1/2倍	a	5.7	67.7	—	5.7	11.8	—	
						5.7	68.0	—	5.9	11.9	—	48
		—	1	1倍	a	7.7	66.9	—	5.8	8.7	—	
						7.7	66.3	—	6.0	8.6	—	66
		—	2	2倍	a	11.9	63.1	—	6.2	5.3	—	
						11.1	63.5	—	6.3	5.7	—	100
		—	3	5倍	a	11.6	63.1	—	6.2	5.4	—	
						11.1	63.5	—	6.3	5.7	—	100
		—	4	10倍	a	11.9	63.2	—	6.2	5.3	—	
						11.1	63.5	—	6.3	5.7	—	100
		—	5	20倍	a	11.3	64.1	—	6.1	5.7	—	
						11.1	63.5	—	6.3	5.7	—	100
		—	6	50倍	a	11.5	64.3	—	6.2	5.6	—	
						11.1	63.5	—	6.3	5.7	—	100
	有機溶媒系 (DMF)	—	10	2倍	b	9.8	58.4	—	6.1	6.0	—	
						9.8	58.3	—	5.4	6.0	—	96
		—	11	5倍	b	9.8	58.6	—	6.1	6.0	—	
						9.8	58.3	—	5.4	5.9	—	95

[表1-2]

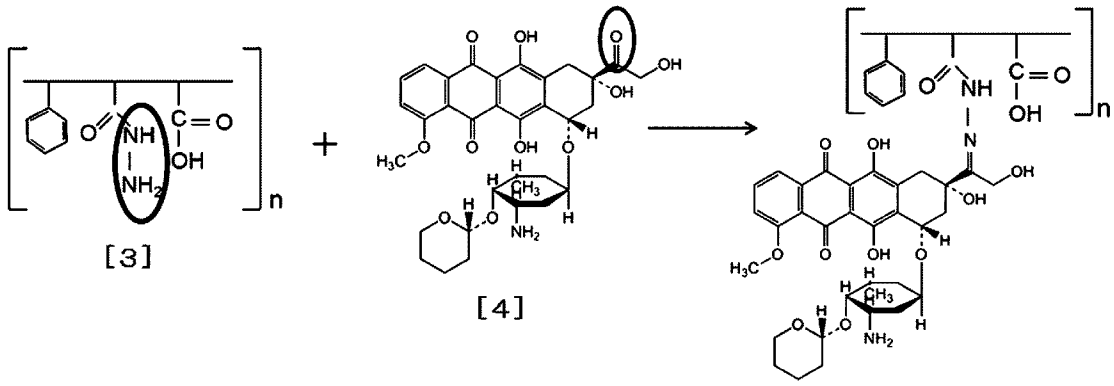
新規SMA誘導体	反応系	触媒	実施例番号	無水マレイン酸残基に対する修飾反応化合物の添加倍率	未反応の無水マレイン酸残基の状態 (a:無水環, b:カルボン酸塩)	元素分析値 (wt%) N	C	S	H	C/N	S/N	SMAへの導入率 (%)
SMAアミド誘導体	水溶系	—	12	167倍	a	7.1	60.3	—	6.7	8.5	—	(但し、一部アンモニウム塩)
						5.9	67.5	—	6.3	11.4	—	100
	有機溶媒系 (DMF)	—	18	1倍	a	2.6	66.9	—	6.1	25.6	—	
						2.6	70.4	—	5.8	27.0	—	43
		—	19	5倍	a	5.2	63.1	—	6.6	12.1	—	
						5.2	68.1	—	6.2	13.0	—	87
		—	20	10倍	a	5.5	62.7	—	6.7	11.3	—	
						5.5	67.8	—	6.2	12.2	—	93
		—	17	50倍	a	5.4	63.9	—	6.6	11.8	—	
						5.4	68.0	—	6.2	12.6	—	90
SMAトリス誘導体	有機溶媒系 (DMF)	—	32	1/2倍	a	2.4	60.9	—	6.5	25.1	—	
						2.4	65.8	—	6.2	27.1	—	48
		—	33	1倍	a	3.5	57.3	—	6.8	16.5	—	
						3.5	62.8	—	6.5	18.1	—	78
		—	31	5倍	a	3.9	56.3	—	7.0	14.3	—	
						3.9	61.5	—	6.7	15.6	—	94
		—	34	5倍	b	3.8	55.4	—	6.9	14.6	—	
						3.8	63.3	—	4.1	16.7	—	86
SMAメルカプト誘導体 [エタンチオール]	有機溶媒系 (DMF)	—	21,22	5倍	a	6.8	54.3	15.5	6.7	8.0	2.3	(S-S結合)
						4.7	61.9	10.8	6.4	13.1	2.3	100
		TEA使用	23	5倍	a	6.8	54.0	15.6	6.6	8.0	2.3	(S-S結合)
						4.7	61.9	10.8	6.4	13.1	2.3	100
[L-システイン]	有機溶媒系 (DMF)	—	24	5倍	a	0.7	63.8	1.6	5.8	93.8	2.3	
						0.7	70.2	1.6	5.4	101.7	2.3	11
		—	25	5倍	b	2.9	42.8	6.0	5.2	14.7	2.1	
						2.9	52.1	6.7	4.3	17.9	2.3	74
						2.6	52.5	6.0	4.3	20.0	2.3	66
		TEA使用	26	5倍	a	3.8	57.2	7.7	5.9	15.1	2.0	
						3.8	58.6	8.7	5.5	15.5	2.3	88
	有機溶媒系 (DMAc)	—	27	5倍	a	1.3	62.7	2.8	5.8	47.2	2.1	
						1.3	67.8	3.1	5.4	51.0	2.3	24
						1.2	68.2	2.8	5.4	55.9	2.3	21
		—	28	5倍	b	3.0	44.2	5.9	5.3	14.8	2.0	
						3.0	51.9	6.8	4.4	17.4	2.3	77
						2.6	52.6	5.9	4.3	20.2	2.3	64
		TEA使用	29	5倍	a	3.6	56.9	7.6	5.6	15.9	2.1	
						3.6	59.5	8.2	5.5	16.7	2.3	81
						3.3	60.4	7.6	5.5	18.1	2.3	73

[0105] なお、表１中、元素分析は、エレメンタール（Ｅｌｅｍｅｎｔａｒ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｈａｎａｕ市、ドイツ）社製Ｍｏｄｅｌ Ｖａｒｉｏ Ｍ

ＩＣＲＯ　Ｃｕｂｅにより、同社仕様マニュアルに準じて行った。

[0106]（実施例１２）ＳＭＡ－ヒドラゾン－ピラルビシン結合体の合成

[化18]



実施例１で調製した各ヒドラジド化ＳＭＡ５００ｍｇを１５０ｍｌのビーカーにとり、メタノールまたはジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）５０ｍｌに溶かし、それにピラルビシン（テトラヒドロピラニルドキソルビシン、メルシャンＫＫ製、東京、以下、「ＴＨＰ」と称する。）［４］１００ｍｇを加え、３７℃で遮光下にマグネチックスターラーで撹拌し、室温で一夜、反応を行った。

反応物を減圧下にロータリーエバポレーターによりメタノールをとばし、オレンジ色の粉末を得る。これに蒸留水５０ｍｌを加え、このものを撹拌下、室温下、間隙的に超音波処理により溶解し、必要に応じこのものをＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－５０、Ｇ－７０などカラムクロマトを用いて常法通り結合体のピークを得る。或いはその水溶液を、アミコン社ラボスケールを用いて上記実施例１と同様に未反応の低分子或いは分解物の夾雑物を除去しつつ透析濃縮し、次いで凍結乾燥した。ＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ［式４’］の粉末を得た（収量：ＴＨＰに対して約８５％）。

[0107]（試験例１）

上記実施例１２により合成したＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ共有結合体（以下、「ＳＭＡ－ＴＨＰ」と称する。）について、マウス大腸癌（Ｃ２６）モデルにおいて、抗腫瘍効果を調べた。そのＬＤ$_{50}$は１５０ｍｇ／ｋｇ以上で

、もとのＴＨＰのＬＤ$_{50}$の１４．４ｍｇ／ｋｇより１０分の１以上毒性が減少した。さらにマウスＳ１８０のデータとして、腫瘍サイズの抑制は１０ｍｇおよび３０ｍｇ／ｋｇ２回投与で著しく抑えられた。

またＣ２６大腸癌の背移植の肺転移では３０ｍｇ／ｋｇ１回投与で完全に抑え、１００％生存した（表２）。一方、１０ｍｇおよび０ｍｇでは投与量に比例して効果は減弱した（表２）。

[0108] ＳＭＡ－ＴＨＰおよびピラルビシン（ＴＨＰ）を、それぞれ表２に示した投与量を、癌移植１０日目にマウスに静脈内投与し、抗腫瘍効果を５０日目に評価した。その結果、Ｂａｌｂマウスに大腸癌（Ｃ２６）５×１０^{5}個を背部に移植し、約７～９日目の腫瘍サイズが５～６ｍｍとなったモデルにおいて治療を行った。通常では４０～６０日後に容易に検出できる肺転移癌（娘結節という）を３０ｍｇ／ｋｇの静脈内投与１回で、完全に抑えることができた（表２）。ＳＭＡ－ＴＨＰの最大耐量は１２０ｍｇ／ｋｇで、この投与量（３０ｍｇ／ｋｇ）では全く毒性がみられなかった。これに対して、もとのＴＨＰは最大耐量の３ｍｇ／ｋｇで、この転移癌にはほとんど無効であった（表２）。また、このような転移癌に効く制癌剤はこれまで知られていない。

[0109] 表２．大腸癌（Ｃ２６）の肺転移癌結節に対する抗腫瘍効果

[表2]

		転移癌結節数*／マウス		
薬物	投与量 (mg/kg)	転移なし (−)	(1～5) (+)	(＞ 6)† (++)
対照(薬物なし)	0	0/5	1/5	4/5
SMA-THP	10	2/5	2/5	1/5
	30	5/5	0/5	0/5
THP	3#	0/5	2/5	3/5

＊ 分母は使用マウス1群当りのマウス数、分子は転移のあるマウス数。
†1匹当りの腫瘍結節数の多寡。結節多寡別。
MTD量。

[0110] （試験例２）

上記実施例１２により合成したＳＭＡ－ＴＨＰの細胞毒性を、マウス大腸癌Ｃ２６細胞を用いて試験した。常法によりＭＴＴアッセイで癌細胞の生存

率で評価した。処理時間は３７℃培地中に４８～７２時間処理を行った。ｐＨ７．４ではＳＭＡ－ＴＨＰはその毒力は約１／２０と減弱したが、これは、一般の高分子結合型薬剤にみられる現象である。しかしながら、薬剤を、ｐＨを６．９、６．５、６．０、５．５と低いところで処理するとその毒力は増強した。腫瘍環境と同じｐＨのｐＨ６．５以下ではｆｒｅｅ　ＴＨＰと同様の毒力を示した。このことは、即ちヒドラゾン結合が開裂して、遊離のＴＨＰが生じ、それがトランスポーターによって効率よく細胞内に運ばれ薬効を発揮することを示している。さらにまた正常組織のｐＨでは毒力が約２０分の１と低く、好都合な薬剤であるといえる。

その結果、表３に示したように、正常組織の中性ｐＨではフリーのＴＨＰと比較し細胞毒性が１／２０に低下したが、酸性ｐＨ条件（例えば６．５）では著明な細胞毒性の上昇が見られた。

[0111] 表３　マウス大腸癌細胞（Ｃ２６）に対するＳＭＡ－ＴＨＰのＩｎ ｖｉｔｒｏ細胞毒性評価

[表3]

テスト薬物／処理条件	大腸がん細胞 C26 の In vitro 培養系での細胞生残率 （%生細胞、薬剤なしを 100%とする） （50%抑制率、free drug equiv.）	コントロール生残率
なし	IC_{50} (μg/ml)	100%
Free THP	1.2	↑
SMA-THP（ヒドラゾン結合体）		
pH7.4	23.2	
pH6.9	9.4	50%
pH6.5	2.1	
pH6.0	1.8	
pH5.5	1.0	↓
（各 pH 下 48 時間処理）		

MTT 法による生残率の分光学的手法による（Maeda et al.未発表データ）。

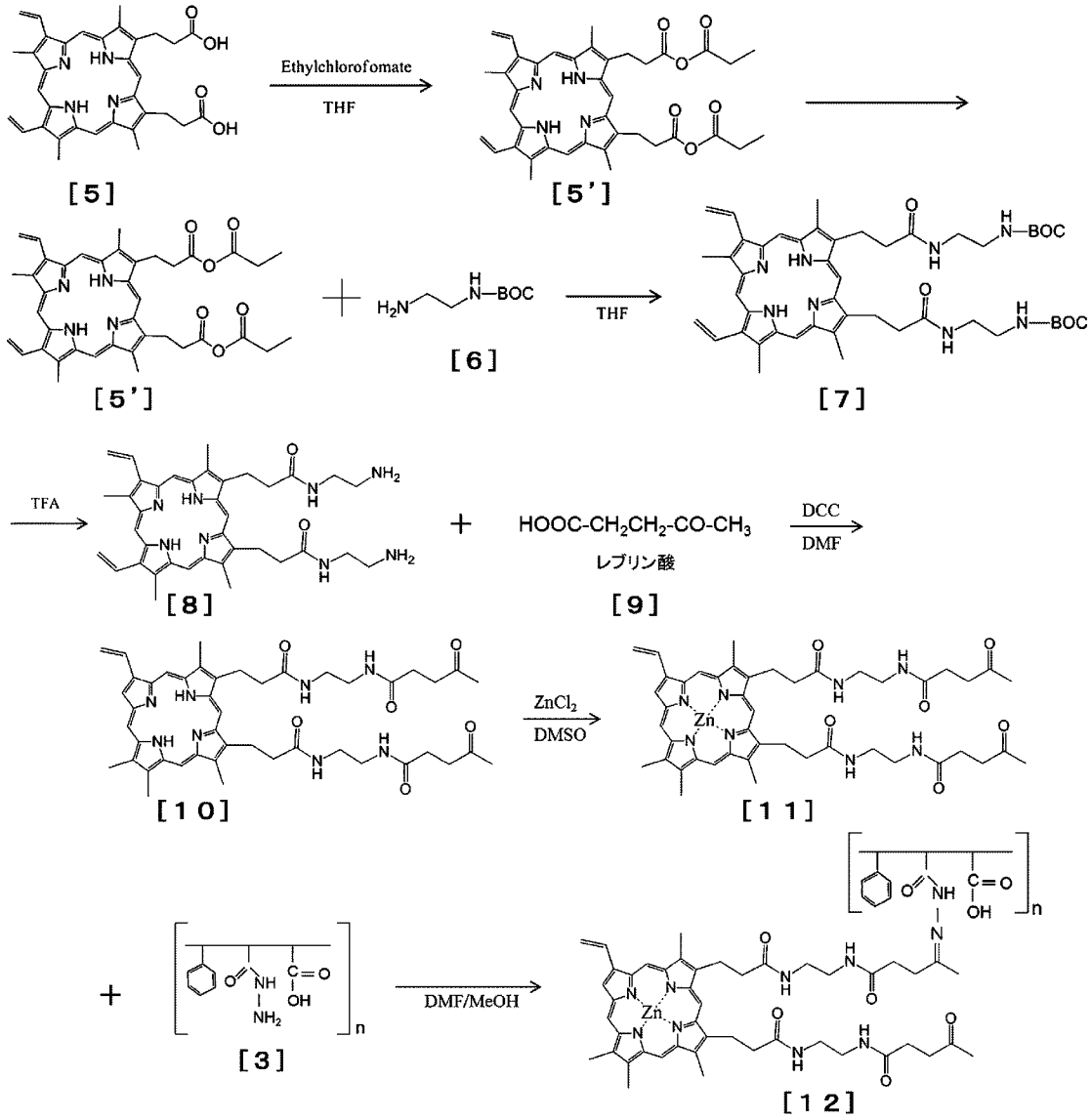
[0112] 次にこのＳＭＡ－ＴＨＰを用いた動物（マウス）Ｓ－１８０腫瘍に対するｉｎ ｖｉｖｏの抗腫瘍活性を図５および図６に示す。ＳＭＡ－ＴＨＰは３０ｍｇ／ｋｇ静脈注射２回で、４０日目にはほぼ完全に腫瘍増殖抑制効果を示し、そのまま１２０日以上飼育でも、１０ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ両群（１０匹／１群）とも６０％以上生存を示した。対象群のマウスは１０匹全例８０日までに死亡し、ＳＭＡ－ＴＨＰの有効性は明らかであった（図５および図６）。

[0113] 図５．ｄｄＹマウス背部皮下に５×１０^{5}個のＳ－180腫瘍細胞を移植し、腫瘍サイズが６～７ｍｍになったところ（ｄａｙ１２）と、ｄａｙ１６に薬液（ＳＭＡ－ＴＨＰ）を１０ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇあるいは対照として生理食塩水をそれぞれ０．１ｍｌ静脈投与し、背部移植癌の容積（Ｖ）を２日ごとに計測した。Ｖは腫瘍（長径×短径×短径）／２。

[0114] 図６．図５の実施例に関し、各群のマウスの生存率を表示したものである。１０ｍｇおよび３０ｍｇともに薬剤なしと比べ長期間にわたり、生存率が大幅に改善した。

[0115] （実施例１３）ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル化亜鉛プロトポルフィリン結合体の合成

[化19]



[0116] （実施例１３－１）ＰＰ－ＥＤ－ＢＯＣ（ｔ－ブトキシカルボニル）の合成の実施例：エチレンジアミンによるＰＰのアミノエチル化

ＰＰ（プロトポルフィリンＩＸ）（シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ＭＯ、ＵＳＡ）１００ｍｇ、［５］を１００ｍｌのビーカーにとり、２０ｍｌのテトラヒドロフランを加え溶解させた。０．２５ｍｌのトリエチルアミン（和光純薬）および０．３４ｍｌのクロロギ酸エチル（東京化成（株）、東京）を攪拌下、氷冷下に加え、１０分間反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下、２０～５０℃にてテトラヒドロフランおよびク

ロロギ酸エチルを除去し、２０ｍｌのテトラヒドロフランを加え、活性エステル化［フォルミルエステル化］ＰＰを再溶解させた。攪拌下にＢＯＣ－エチレンジアミン塩酸塩（ＥＤ－ＢＯＣ、ＢＯＣ－アミノエチルアミン、１０５ｍｇ、東京化成（株）製）を加え、室温で１～２時間反応させＰＰＥＤ－ＢＯＣを得た。上記と同様にロータリーエバポレーターにてテトラヒドロフランを除去し、氷冷した５０ｍｌの蒸留水を加え懸濁・洗浄後、遠心分離により沈澱として、ＰＰＥＤ－ＢＯＣを得た。

[0117] （実施例１３－２）ＰＰＥＤ－ＢＯＣからＰＰＥＤの合成：ＢＯＣの（ｔ－ブトキシカルボニル基）離脱反応

５０ｍｌのビーカーにトリフロロ酢酸（和光純薬製）５ｍｌをとり、それに、ＰＰＥＤ－ＢＯＣ（ｔ－ブトキシカルボニル）［６］（１００ｍｇ）を室温で撹拌下に加え、１０～６０分間反応させることで脱ＢＯＣ化反応を行った。ロータリーエバポレーターにより、トリフロロ酢酸を除去することでＰＰＥＤ（正確にはＰＰ－ｂｉｓ（アミノエチルアミン）［８］）を得た。

[0118] （実施例１３－３）ＰＰＥＤ－ＬＡの合成

上記実施例１３－１の反応と同様にＰＰＥＤ（１００ｍｇ）上のアミノ基とレブリン酸［９］（５０ｍｇ、東京化成（株））のカルボキシル基の縮合反応を１０ｍｌジメチルホルムアミド中で行った。詳細はＰＰのＰＰＥＤＢＯＣ化（実施例１３－１参照）と同様である。攪拌下にＤＣＣまたはＥＤＡＣ（９４ｍｇ）、次いでレブリン酸（５０ｍｇ）［東京化成（株）、東京］を加え、４０℃で６～１２時間反応させた。蒸留水１００ｍｌを加えることで、沈澱としてＰＰＥＤ－レブリン酸結合体（レブリニルＰＰＥＤ）［１０］を得た。このものを０．０５Ｍ　ＮａＯＨ　３０ｍｌに溶かし、蒸留を３００ｍｌ加え、アミコンの限外ろ過装置でカットオフ分子量５０００または１０００の分子ふるい膜で蒸留水によって透析、濃縮（１／５容）を３回繰り返した。次いで凍結乾燥した。

[0119] （実施例１３－４）亜鉛型ＺｎＰＰＥＤ－ＬＡ［１１］の合成：ＰＰの亜鉛キレート化

レブリニルＰＰＥＤ（１００ｍｇ）［１０］を１０ｍｌのＤＭＳＯに溶解した。攪拌下、６０℃において、塩化亜鉛（１ｇ、和光純薬）を加え３～６時間Ｚｎのキレート化反応を行い、レブリニル化ＺｎＰＰＥＤ［１１］を得た。氷冷した蒸留水５００ｍｌを加えＺｎＰＰＥＤを沈澱として得た。ＺｎＰＰＥＤを５０ｍｌの氷冷した蒸留水で３回洗浄して過剰の塩化亜鉛を除去し、凍結乾燥によりＺｎＰＰＥＤ［１１］（約９５ｍｇ）を得た。ＰＰが亜鉛をキレートした証拠は紫外－可視吸光光度スペクトルにより測定する（λｍａｘ　４０６ｎｍから４２２ｎｍに変化）。

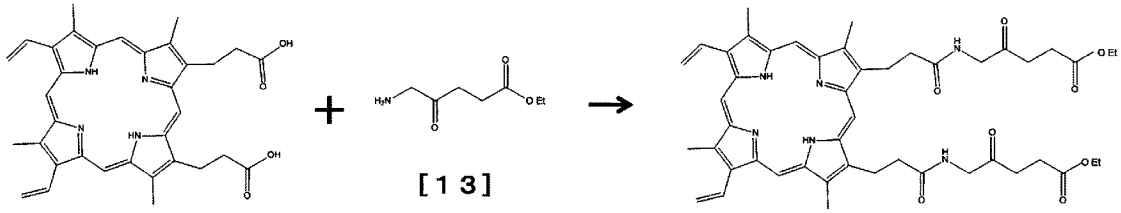
[0120] （実施例１３－５）レブリニル化亜鉛プロトポルフィリンとヒドラジド化ＳＭＡの結合反応

この反応は実施例６のＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰの合成に準ずる。ＳＭＡ鎖上のヒドラジドと、レブリニルＰＰ上のカルボニル基の反応で、メタノール中室温でこの結合反応（シッフ塩様結合を形成）を１～１０時間、好適には５時間進行させた。この反応物に蒸留水を撹拌下に１００～２００ｍｌ加え、次いで、上記アミコンのラボテク装置で１／１０容までの濃縮、透析を繰り返した。すなわち、蒸留水を１００～２００ｍｌ添加、濃縮および透析の操作を３～４回繰り返し、濃縮水溶液に置換し、この５０ｍｌの濃縮物をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ１０またはセファデックスＧ－１００カラム（Φ３×８０ｃｍ）などによりゲルろ過を行い、ＳＭＡ－レブニル［Ｚｎ］ＰＰを得た。その４５０ｎｍの吸収をもつフラクションを回収し、凍結乾燥することにより求めるＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル化［Ｚｎ］ＰＰを得た（収量約４５０ｍｇ、ヒドラシド化ＳＭＡに対して９０％、［Ｚｎ］ＰＰとして９５ｍｇ、収率約９０％）。

[0121] （実施例１４）

ＰＰ－アミノレブリネート（ＰＰ－ＡＬＡ－Ｅｔ）の合成は、実施例１３－１に示したＰＰからＰＰＥＤの合成法に準じて行った。

[化20]



[5] [13] [13']

[0122] ビーカー（１５０ｍｌ）にＰＰ［５］（１００ｍｇ）をとり、２０ｍｌのテトラヒドロフランを加え溶解させた。上記実施例１３－１のＰＰＥＤ－ＢＯＣ合成の縮合反応と同じく、０．２５ｍｌのトリエチルアミンおよび０．３４ｍｌのクロロギ酸エチルを攪拌下、氷冷下に加え、１０分間反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下、２０－５０℃でテトラヒドロフランおよびクロロギ酸エチルを除去し、２０ｍｌのテトラヒドロフランを加え、活性エステル化ＰＰを再溶解させた。攪拌下にアミノレブリン酸エチルエステル（ＡＬＡ－Ｅｔ）［１３］（７０ｍｇ）を加え、３０～６０分間反応させることで、ＰＰ－ＡＬＡ－Ｅｔを得た。ロータリーエバポレーターにてテトラヒドロフランを除去し、５０ｍｌの蒸留水を加え懸濁・洗浄後、遠心分離により沈澱として、ＰＰ－ＡＬＡ－Ｅｔを得た。

反応は高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により確認した。すなわち、ＨＰＬＣ（カラム：ＧＦ－３１０ＨＱ、Ｓｈｏｄｅｘ）、分離溶媒：ＤＭＳＯ／ＭｅＯＨ＝３０／７０に対し、さらに１０μｌ／Ｌになるようにトリフルオロ酢酸を加える]により確認した。（溶出時間約１２分）。

[0123] （実施例１５）プロトポルフィリン（ＰＰ）レブリネートとヒドラジド化ＳＭＡの結合反応

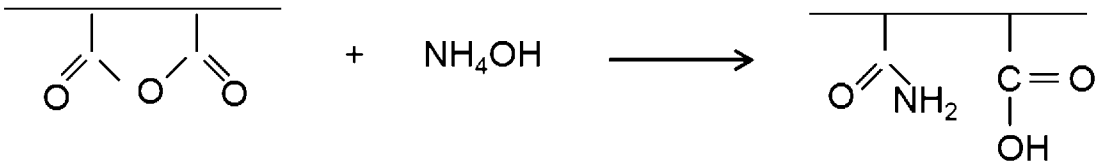
上記プロトポルフィリン（ＰＰ）レブリネートとＳＭＡ－ヒドラジドとの結合反応は、具体的には次のように行った。

両成分をＤＭＦあるいはメタノールに溶解させ、室温で１～１２時間、好適には３～５時間マグネチックスターラーで撹拌下に反応させた。ＰＰ－レブリネート６５０ｍｇ（１ｍｍｏｌ）に対し、ＳＭＡ－ヒドラジド化合物３

００ｍｇを混合した。なお、ＳＭＡに対するヒドラジンの導入率、ＳＭＡ鎖の鎖長によりクロスリンクされるＰＰ－レブリネートは変動する。反応後、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、中性～弱アルカリ性の水に対して透析し、凍結乾燥し、ＳＭＡ－ヒドラゾン－レブリニル化［Ｚｎ］ＰＰを得た（収量約５８０ｍｇ、ＳＭＡヒドラシド物に対して８５％、［Ｚｎ］ＰＰとして約５６０ｍｇ、収率約８０％）。

[0124] （実施例１６）水溶系におけるアミド化ＳＭＡの合成

[化21]



蒸留水２０ｍｌを５０ｍｌのビーカーにとり、それにＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末（１００ｍｇ、無水マレイン酸残基として０．５ｍｍｏｌｅ、平均分子量１０００－１５００）をとり、５０～６０℃で、マグネチックスターラーで撹拌下に懸濁液のまま濃アンモニア水（２５％、約５ｍｌ）を加え、加アンモニア分解を５時間～５日間行う。標準的には無水マレイン酸を完全開環するためには５６℃、約４０時間行う。無水マレイン酸を１～４残基そのまま残存させるためには５～１０時間行い、必要に応じて時間と温度を室温前後とし、さらにアンモニアの量を８０％モル当量など適宜少なめにする。

次いで、室温にて冷却した。０．５Ｍ　ＨＣｌをゆっくり撹拌下に滴下し、ｐＨが５～３になったところで、白濁する。白濁沈殿が生じたところで約６時間、４～６℃で放置し、アミド化ＳＭＡの白色沈殿物を得る。ガラスフィルターにて沈澱をろ過し、さらに氷冷０．０１Ｍ　ＨＣｌ　３０ｍｌで沈殿物を３回洗浄し、これに蒸留水２０ｍｌを数回加え、沈澱を１００ｍｌのビーカーに集め、次に５％重曹５０ｍｌでｐＨを８前後とし、撹拌溶解し、蒸留水に透析し凍結乾燥した（収量９５ｍｇ）。

[0125] （実施例１７）有機溶媒系におけるアミド化ＳＭＡの合成

２００ｍｌのビーカーに上記Ｓａｒｔｏｍｅｒ社のＳＭＡ無水マレイン酸共重合体の粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．５ｍｍｏｌｅ当量）をとり、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いで２５％アンモニア水（濃アンモニア）を４．４６ｍｌ（NH_3として６５．５ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌下に加アンモニア分解（アミド化）を行った。ロータリーエバポレーターでアンモニアをとばし、蒸留水を１００ｍｌ加え、再溶解し、限外ろ過装置（アミコンラボスケール）により１／４容に濃縮し、次いで水５倍量を加え、さらに１／４まで濃縮した。この操作をさらに２～３回繰り返し、水溶液の凍結乾燥を行い、ＳＭＡ－アミド化物を得た（収量３１６ｍｇ）。

[0126] 実施例１６および１７ともに、ＳＭＡのマレイン酸のアミド化物はほぼ定量的に得られた。それらの元素分析のデータを表１に示す。

[0127] （実施例１８）

実施例１７の有機溶媒系において、アンモニア添加量を１モル／無水環当量加えたこと以外は同様の反応条件にしたがってＳＭＡ－アミド化物を得た。その結果、得られたＳＭＡ－アミド化物のアミドＮは、実施例１７で得られたＳＭＡ－アミド化物の約半分であり、約５０％の無水マレイン酸残基が残存した（ＩＲピーク値（１８５０cm^{-1}）による）。

[0128] （実施例１９～２０）

実施例１７の有機溶媒系において、アンモニア添加量を５モル／無水環当量（実施例１９）または１０モル／無水環当量（実施例２０）加えたこと以外は同様の反応条件にしたがってＳＭＡ－アミド化物を得た。その結果、得られたＳＭＡ－アミド化物の無水マレイン酸環は９０％以上アミド化されていた（表１）。

[0129] （実施例２１）チオール化ＳＭＡ誘導体の合成

ＳＭＡ無水マレイン酸共重合体２００ｍｇ（無水マレイン酸として約１ｍｍｏｌｅ当量）を３００ｍｌのビーカーにとり、０．１Ｍ　$NaHCO_3$／０．１Ｍ　Na_2CO_3　緩衝液またはトリス・ＨＣｌ緩衝液によりｐＨ８．０

－９．５、好適にはｐＨ８．５のもの５０ｍｌを入れ、マグネチックスターラーで撹拌し、それに２－アミノエタンチオール（$H_2N-CH_2CH_2-SH$）の粉末を２００ｍｇ（約１ｍｍｏｌｅ当量）加え、ＳＭＡ上の無水マレイン酸とアミノ基の反応を進めた。この反応を室温で３～５０時間、好適には８時間続け、次に蒸留水を２００ｍｌ加え、アミコン・ラボスケールでカットオフ分子量１０００Ｄａの分子ふるい膜で透析、濃縮し（１／５容まで）、さらに蒸留水を２００ｍｌ加え、同じ操作を４回繰り返し、凍結乾燥により反応生成物を得た（収量２２０ｍｇ）。メルカプトＳＭＡ中の硫黄含有量からメルカプタン（ＳＨ）の導入率を算出したところ、無水マレイン酸６個に対し、約１残基のエチルメルカプタンが導入されていた。

[0130] （実施例２２）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量の２－アミノエタンチオールを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：２－アミノエタンチオール＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いで２－アミノエタンチオール（和光純薬、大阪）５０５．３ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応２４時間後、白濁した液を減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行った。透析内液および析出物をデカンテーションで分離し、析出物を凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２２１．９ｍｇ）。もとのＳＭＡのｃｏｎｊｕｇａｔｅとしての収量７０．３％であった。元素分析により表１の結果を得た。

[0131] （実施例２３）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量の２－アミノエタンチオールを添加し、触媒下でＤＭＦ中で反応させる系［無水環：２－アミノエタンチオール　＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いで２－アミノエタンチオール（和光純薬、大阪）５０５．３ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加えた。２～３分間マグネチッククーラーで撹拌後、トリエチルアミン（和光純薬、大阪）５００μｌを加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応２４時間後、白濁した液を減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行った。透析内液および析出物をデカンテーションで分離し、析出物を凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２４８．１ｍｇ）。もとのＳＭＡのｃｏｎｊｕｇａｔｅとしての収量約８０％であった。元素分析により表１の結果を得た。

[0132] （実施例２４）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて１９時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１９時間後、白濁した液を減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た。収量は約８５％（使用ＳＭＡに基づく）。元素分析により表１の結果を得た。

[0133] （実施例２５）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン＝１：５（モル

比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて１９時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１９時間後、白濁した液をそのままロータリーエバポレーターで濃縮し、水酸化ナトリウム水溶液を加えながら、ｐＨが安定するまでｐＨ試験紙で確認しつつ、室温にて４日間撹拌して無水マレイン酸の開環を行った。無色澄明液となった反応液を分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２４５．３ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0134] （実施例２６）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、触媒下でＤＭＦ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加えた。室温にて２時間マグネチッククーラーで撹拌後、トリエチルアミン（和光純薬、大阪）５００μｌを加え、室温にて１７時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１７時間後、減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約３６０．５ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0135] （実施例２７）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、５０℃でＤＭＡｃ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン＝１

：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、５０℃にて１９時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１９時間後、白濁した液を減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約３２０．７ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0136] （実施例２８）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、５０℃でＤＭＡｃ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン　＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、５０℃にて１９時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１９時間後、白濁した液をそのままロータリーエバポレーターで濃縮し、水酸化ナトリウム水溶液を加えながら、ｐＨが安定するまでｐＨ試験紙で確認しつつ、室温にて４日間撹拌して無水マレイン酸の開環を行った。無色澄明液となった反応液を分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約２８６．５ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0137] （実施例２９）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のＬ－システインを添加し、触媒下で５０℃でＤＭＡｃ中で反応させる系［無水環：Ｌ－システイン＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡｃ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでＬ－システイン（シグマ・アルドリッチ社）７９３．６ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加えた。５０℃にて２時間マグネチッククーラーで撹拌後、トリエチルアミン（和光純薬、大阪）５００μｌを加え、５０℃にて１７時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応１７時間後、減圧ろ過（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈すると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析（２～３回）を行い、凍結乾燥して、白色粉末を得た（約３８３．３ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0138] （実施例３０）ＢＳＨ（ボロノメルカプテイト、$Na_2B_{12}H_{11}SH$、ＢＳＨと略）とメルカプトＳＭＡの－Ｓ－Ｓ－交換反応によるＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－Ｘの合成

上記実施例２１または実施例２２で調製したＳＭＡ－ＳＨとＳＨ化合物、例えばこの場合、硼素化水素（$B_{12}SH$、ボロノメルカプテイト）は次のように反応する。

[化22]

ＳＭＡ－ＳＨ　＋　ＢＳＨ　→　ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－Ｂ
［１４］　　［１５］　　［１６］

［式中、Ｂは硼素１２個を有する籠状（ｃａｇｅ）化合物であるボロノメルカプテイトを示す。］

[0139] ＳＭＡ－ＳＨを１５０ｍｌのビーカーに１００ｍｇとり、ｐＨ７～１１、好適にはｐＨ８．５付近の重曹或いはトリス緩衝液（５０ｍｌ）中で、この系にＢＳＨを１０－５０ｍｇ加え、１～１００時間、室温でＢ－ＳＨ基の酸化反応を行う触媒として、$CuSO_4$を０．１～１０ｍＭになるように加える。好適には１～２ｍＭ$CuSO_4$存在下にＳＨのＳＳへの酸化反応を行う。さらに反応混合物の溶液に撹拌下に空気を１分間に約５０～１００ｍｌ、気泡

としてビニールチューブで導入し、エアレーション下に上記反応式で示されるＳＳ形成酸化反応を促進させた。１０～４０時間、室温での反応終了後、約２０ｍｌに濃縮し、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　２００のカラム（Φ２．５×１００ｃｍ）で蒸留水により溶出し、生成物を精製分離する。２６０ｎｍの吸収のピークをプールし、そのフラクションを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥によって生成物ＳＭＡ－Ｓ－Ｓ－Ｂを得る（収量１０９ｍｇ）。

[0140] （実施例３１）ＳＭＡ－トリス誘導体の合成

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．５ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、ＭＯ、ＵＳＡ以下、「トリス」と称する。）７９３．５ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて４８時間、マグネチッククーラーで撹拌した。反応４８時間後、反応液をろ過し、ロータリーエバポレーターでろ液を濃縮後、１ｍｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液２０ｍｌを加え、ｐＨが安定するまでｐＨ試験紙で確認しながら室温にて２４時間撹拌し、無水マレイン酸の開環を行った。再度ロータリーエバポレーターで濃縮し、蒸留水を加えて希釈し、カットオフ分子量１０００の透析膜で透析後、凍結乾燥を行い、白色粉末を得た（約３６９ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0141] （実施例３２－１）無水マレイン酸残基に対し１／２倍モル当量のトリスを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：トリス　＝１：１／２（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末５００ｍｇ（無水マレイン酸として２．２ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）２５ｍｌを加え溶解し、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（シグマ・アルドリッチ社、以下、「トリス」と称する。）１３２．７ｍｇ（１．１ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。別に、ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末５００ｍｇ（無水マレイン酸として２．

２ｍｍｏｌｅ当量）とトリス１３２．７ｍｇ（１．１ｍｍｏｌ）、ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末５００ｍｇ（無水マレイン酸として２．２ｍｍｏｌｅ当量）とトリス１３２．６ｍｇ（１．１ｍｍｏｌ）でも同様の反応を行った。反応２４時間後、３バッチをまとめてロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えると析出したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥を行い、白色粉末を得た（約１７９５．１ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

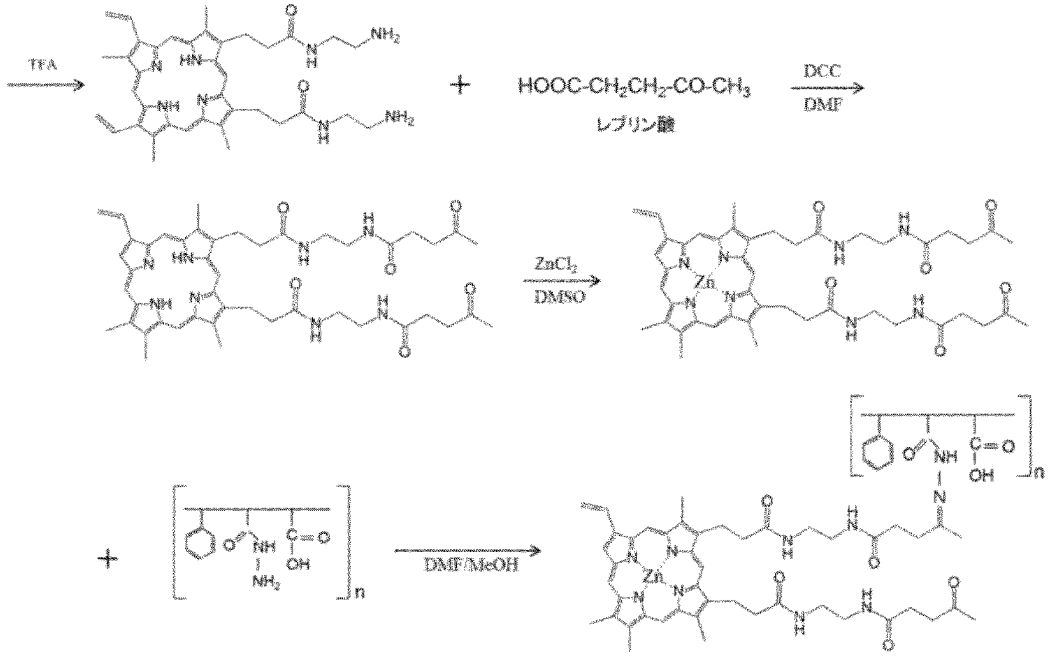
[0142] （実施例３２－２）ＳＭＡ－トリス－ヒドラジン誘導体の合成ならびにそのＺｎＰＰ結合体の合成

実施例３２－１で合成したＳＭＡ－トリス誘導体には約半数の無水マレイン酸が残存する。この無水マレイン酸に対し、ヒドラジンを加える（実施例１に準ずる）とＳＭＡ－トリスにさらにヒドラゾン残基を導入することができる。即ち、ＳＭＡ－トリス－ヒドラジンを得ることができる。

[0143] ＳＭＡ－トリス－ヒドラジンは、水溶性もＤＭＳＯやＤＭＦでの溶解度もよく、ケトンとの反応性を有するので、実施例１３と同様にＺｎＰＰのＳＭＡ化に用いることができる。この生成物はＳＭＡ－ｔｒｉｓ－ｈｙｄｒａｚｙｌ　ＺｎＰＰを得ることができる。

[0144] ＳＭＡ－トリス－ヒドラジンを用いて、ＴＨＰあるいはレブニルＺｎＰＰなどの結合物の合成が可能となる。具体的には例３２－１のＳＭＡトリス３００ｍｇを２０ｍｌの水に溶かし、無水マレイン酸残基１モルに対し、ヒドラジン１水和物を２～２０モル倍量（例えば０．６ｍｌ）を加え、室温で２４時間撹拌下にヒドラゾン化を行う。反応終了後、ロータリーエバポレーターで３０～４０℃で濃縮後、室温で透析、凍結乾燥標本を得る（収量約２９０ｍｇ、収量９５％、得られたものの化学構造は下記反応スキーム参照）。

[化23]



[0145] （実施例３３）無水マレイン酸残基に対し１倍モル当量のトリスを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：トリス ＝１：１（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末５００ｍｇ（無水マレイン酸として２．２ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）２５ｍｌを加え溶解し、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（シグマ・アルドリッチ社、以下、「トリス」と称する。）２６５．３ｍｇ（２．２ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。既に溶解したＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末５００ｍｇ（無水マレイン酸として２．２ｍｍｏｌｅ当量）とトリス２６５．３ｍｇ（２．２ｍｍｏｌ）を撹拌下反応２４時間後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えるとごく僅かに微白濁したが、そのまま分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、凍結乾燥を行い、白色粉末を得た（約６３９．４ｍｇ、透析時の漏出により収量減）。元素分析により表１の結果を得た。

[0146] （実施例３４）無水マレイン酸残基に対し５倍モル当量のトリスを添加し、ＤＭＦ中で反応させる系［無水環：トリス＝１：５（モル比）］

ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３０４ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）にジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）１５ｍｌを加え溶解し、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（シグマ・アルドリッチ社、以下、「トリス」と称する。）７９６．４ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２４時間、マグネチッククーラーで撹拌した。別に、ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）とトリス７９２．８ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）、ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末２９９ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）とトリス７９４．０ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）、ＳＭＡ－無水マレイン酸共重合体粉末３００ｍｇ（無水マレイン酸として１．３ｍｍｏｌｅ当量）とトリス７９２．４ｍｇ（６．６ｍｍｏｌ）でも同様の反応を行った。反応２４時間後、４バッチをまとめてろ過後（ガラスフィルターＮｏ．５Ｃ）、ロータリーエバポレーターで濃縮した。蒸留水を加えて希釈し、分子量１０００のカットオフをもつ透析膜［Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製］で透析後（２～３回）、その可溶性溶液を凍結乾燥して、白色粉末を得た（約５２０．１ｍｇ）。元素分析により表１の結果を得た。

[0147]（試験例３）

上記実施例１２で得られたＳＭＡ－ヒドラゾン－ＴＨＰ（ピラルビシン）からのＴＨＰの各ｐＨ環境下での放出速度を以下のように測定した。

ＳＭＡ－ｈｙｄ－ＴＨＰを１ｍｇ／ｍｌに溶かし、生理食塩０．１５ＭＮａＣｌ入りリン酸緩衝液のｐＨ５．５、６．８および７．４にてインキュベートし、高分子から遊離するｆｒｅｅのＴＨＰを高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で分離し、４７０ｎｍの収量で定量した。ＨＰＬＣは島津製、カラムはアサヒパックＧＦ３１０ＨＱ（Ｓｈｏｗａ　Ｄｅｎｋｏ、Ｔｏｋｙｏ　ＯＨＰａｋ、ＳＢ－８０４：ＨＱカラム　３００ｍｍ×８．０ｍｍ）。溶出はジメチルスルホキシドで０．５ｍｌ／ｍｉｎで行った。中性のｐＨ７．４に比べｐＨ５．５では約１０倍の早い速度でヒドラジン結合が切断し、ＴＨＰを放出した。その結果を、図２に示す。

[0148] （試験例４）

上記実施例１、３１、その他で得られたＳＭＡ誘導体および上記実施例１２で得られたＳＭＡ－薬物結合体の表面電荷（ゼータ電位）の変化を測定した。測定は、以下のように行った。

ゼータ電位測定装置（大塚電子株式会社製、Ｐｈｏｒｔａｌ　Ｍｏｄｅｌ　ＥＬＳＺ－２）を使用して、下欄表に記した条件で測定した。各試料の濃度は３～１０ｍｇ／ｍｌである。その結果を、表４に示す。

[0149] 表４　ＳＭＡ誘導体およびＳＭＡ－薬物結合体の表面電荷（ゼータ電位）の変化

[表4]

実施例	SMA誘導体	特徴	ゼータ電位(mV)＊
	スチレン－マレイン酸共重合体(SMA)	原体	－48～－50
1	SMA－ヒドラジド誘導体	ヒドラジン	－32～－27
12	SMA－ヒドラゾン－THP	SMA－THPアダクト	－24～－10
16	SMA－アミド誘導体	アミン	－30～－20
21	SMA－システイン誘導体	システイン	－20
13－5	SMA－ヒドラゾン－ZnPP	ZnPP	－20～－10
31	SMA－トリス誘導体	水溶性増大	－38

＊２５℃、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ中のｐＨ７．４で測定した。

[0150] （試験例５）

上記実施例１、１６、３１等で得られたＳＭＡ誘導体および上記実施例１２、１３－５で得られたＳＭＡ－薬物結合体の赤外吸収スペクトル／ＫＢｒを測定した。測定は、以下のように行った。

日本分光製赤外分光器ＦＴ－ＩＲ－６２００を用い常法によりＫＢｒ　ｄｉｓｋを作製した。無水（マレイン酸）環の消失は１８６０ｃｍ$^{-1}$と１７８０ｃｍ$^{-1}$を特徴とする。その結果を、図３に示す。

[0151] （試験例６）

上記実施例２１で得られたＳＭＡ誘導体および上記実施例２６，２８で得られたＳＭＡ－薬物結合体のラマン吸収スペクトルを測定した。測定は、以下

のように行った。

即ち、標品の粉末をスライドグラスに１０－１００ｍｇ載せ、日本分光社製ＮＲＳ－５１００により行った。ＳＳ基は５００ｃｍ$^{-1}$付近に、ＳＨ基は２５９０ｃｍ$^{-1}$付近に固有のピークを示す。その結果を、図４に示す。

請求の範囲

[請求項1] （ｉ）スチレン－マレイン酸共重合体（ＳＭＡ）と、

（ｉｉ）該ＳＭＡのマレイン酸残基のカルボキシル基にアミド結合またはエステル結合を介して導入された、－ＮＨ$_2$、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$および－Ｃ（ＣＨ$_2$－ＯＨ）$_3$から選択される官能基（ａ）を含有する側鎖（ｂ）とを含み、ここで該側鎖（ｂ）がＳＭＡに複数導入される場合、該側鎖（ｂ）は同一であっても異なっていてもよい、ＳＭＡ誘導体。

[請求項2] 側鎖（ｂ）が、下記式［Ａ］：

[化1]

－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｒ^1－Ｒ^2 ［Ａ］

［式［Ａ］中、Ｒ^{1}は、単結合、アルキレン基、－ＮＨ－、－ＣＯ－、－（Ｃ＝ＮＨ）－、－Ｎ＝Ｃ（ＣＨ$_3$）－および－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－並びにそれらの組合せから選択される基を示し、ここで該アルキレン基は、ヒドロキシル基およびカルボキシル基で置換されていてもよく、

Ｒ^{2}は、水素原子、－ＮＨ$_2$、－ＳＨ、－ＯＨ、－ＣＯＯＨ、－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$および－Ｃ（ＣＨ$_2$－ＯＨ）$_3$を示し、ただし、Ｒ^{2}が水素原子である場合、Ｒ^{1}は単結合であり、

ここで、式［Ａ］で示される基がＳＭＡ誘導体中に複数存在する場合、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はそれぞれ同一であっても異なっていてもよい。］

で示される、請求項１に記載のＳＭＡ誘導体。

[請求項3] 式［Ａ］中、Ｒ^{1}が、単結合、－ＣＨ$_2$－、－（ＣＨ$_2$）$_2$－、－（ＣＨ$_2$）$_3$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－ＣＨ$_2$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－、－（ＣＨ$_2$）$_4$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_3$－、－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－ＣＨ$_2$－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_2$－、－Ｎ＝Ｃ（ＣＨ$_3$）－（ＣＨ$_2$）$_2$－、－（ＣＨ$_2$）$_5$－

、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_4$－、－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－、－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_4$－、－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－、－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－および－（ＣＨ$_2$）$_6$－、並びにこれらのカルボキシル基のα、β、γ、またはδ炭素にケトン基を有するものから選択される、請求項２に記載のＳＭＡ誘導体。

[請求項4] 式［Ａ］中、－Ｒ^1－Ｒ^{2}が、以下の基：

(1) 水素原子、

(2) －ＮＨ$_2$、

(3) －（ＣＨ$_2$）$_2$－ＳＨ、

(4) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＣＨ$_2$－ＳＨ、

(5) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim6}$－ＮＨ$_2$、

(6) －ＣＨ$_2$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－ＮＨ$_2$、

(7) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ$_2$、

(8) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＮＨ$_2$、

(9) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$、

(10) －（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＮＨ$_2$、

(11) －ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＨ－（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$、

(12) －（Ｃ＝ＮＨ）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－ＮＨ$_2$、

(13) －Ｃ（ＣＨ$_2$－ＯＨ）$_3$、

(14) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＮＨ－ＣＯ－ＮＨ－ＮＨ$_2$、

(15) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＣＯ－ＣＨ$_2$－ＮＨ$_2$、

(16) －ＣＨ$_2$－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＮＨ$_2$、

(17) －ＣＨ$_2$－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）－ＯＨ、

(18) －（ＣＨ$_2$）$_{1\sim4}$－ＣＯ－ＣＨＯＨ－ＣＯＯＨ、

(19) －CH_2－CO－（CH_2）$_2$－COOH、

(20) －N＝C（CH_3）－（CH_2）$_2$－COOH、

(21) －（CH_2）$_3$－NH_2、および

(22) －（CH_2）$_3$－OH

から選択される基である、請求項２または３に記載のＳＭＡ誘導体。

[請求項5] 請求項１～４のいずれかに記載のＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体と直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含む、結合体。

[請求項6] 請求項１～４のいずれかに記載のＳＭＡ誘導体と、該ＳＭＡ誘導体中の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）または該側鎖（ｂ）とは異なる部分の少なくとも１つと直接または間接的に共有結合を形成して結合した活性物質とを含む、請求項６に記載の結合体。

[請求項7] ＳＭＡ誘導体と活性物質との結合が、アミド結合、エステル結合、ヒドラゾン結合およびジスルフィド結合から選択される結合である、請求項５または６に記載の結合体。

[請求項8] ＳＭＡ誘導体の側鎖（ｂ）の官能基（ａ）と活性物質との結合が、下記式［Ｂ］：

[化2]

活性物質－R^3－R^4－R^{2a}－ＳＭＡ誘導体 ［Ｂ］

［式［Ｂ］中、R^3は、－ＮＨ－、－Ｏ－、カルボニル基およびアルキレン基並びにそれらの組合せから選択される基を示し、

R^4は、－Ｃ（CH_3）＝Ｎ－および－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－から選択される基を示し、R^{2a}は、－ＮＨ－を示す。］

で示される連結基－R^3－R^4－を介した結合である、請求項５～７のいずれかに記載の結合体。

[請求項9] 式［Ｂ］中の連結基－R^3－R^4－が、以下の基：

(1) －ＮＨ－（CH_2）$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－（CH_2）$_2$－Ｃ（CH_3）＝Ｎ－、および

(2) －ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｃ（ベンジル）＝Ｎ－

から選択される基である、請求項８に記載の結合体。

[請求項10] 活性物質が、抗癌剤、抗生物質またはペプチドホルモンである、請求項５～９のいずれかに記載の結合体。

[請求項11] 抗癌剤が、ピラルビシン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン、ボロノメルカプテイト、ボロノシステイン、エピルビシン、アクラルビシンおよびドキソルビシンからなる群から選択される、請求項１０に記載の結合体。

[請求項12] 請求項５～１１のいずれかに記載の結合体を含む、医薬。

[請求項13] 制癌剤である、請求項１２に記載の医薬。

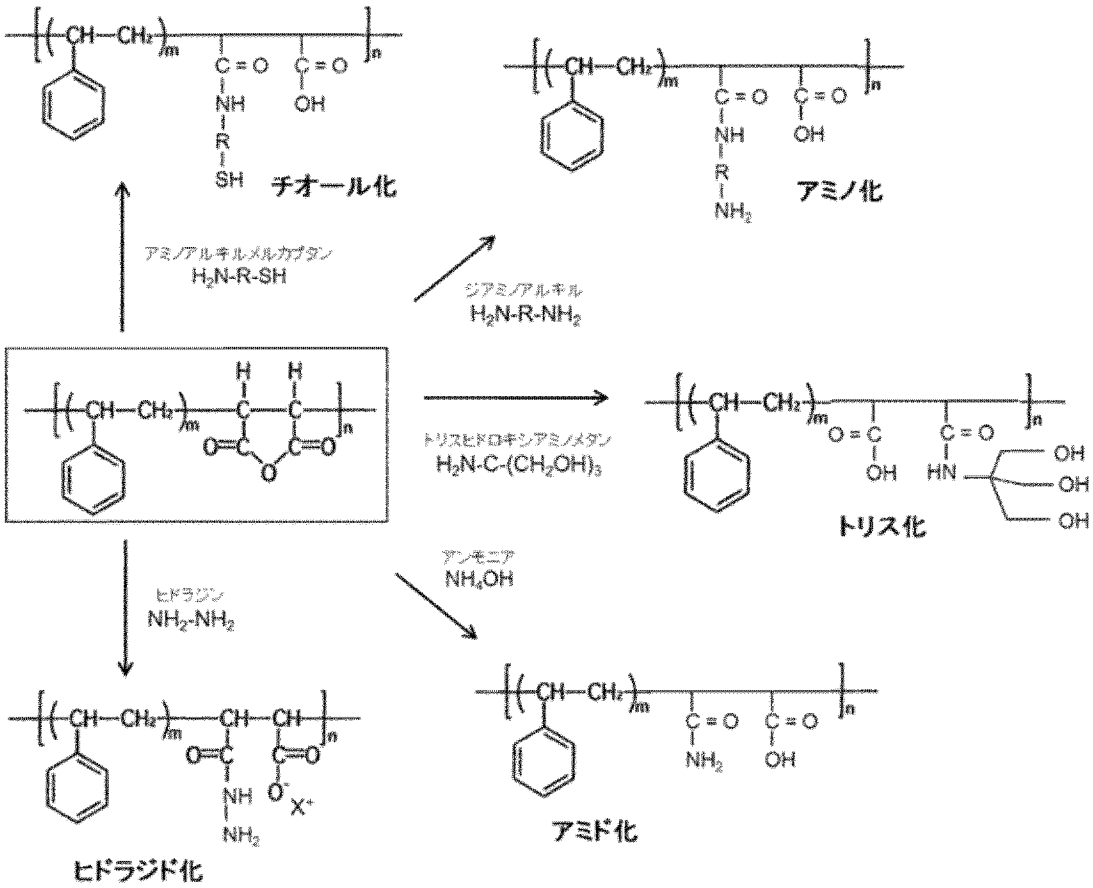
[請求項14] 請求項５～１１のいずれかに記載の結合体と、薬理学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

[請求項15] 医薬としての、請求項５～１１のいずれかに記載の結合体の使用。

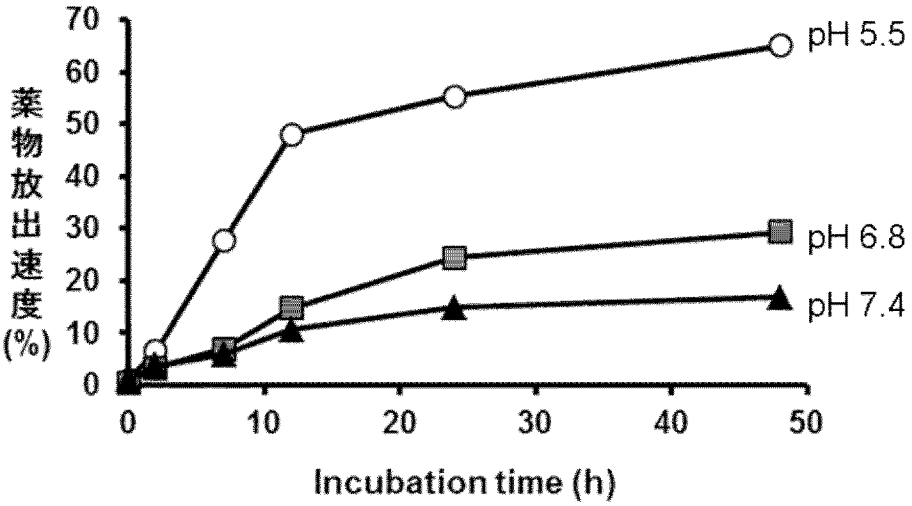
[請求項16] 医薬組成物を製造するための、請求項５～１１のいずれかに記載の結合体の使用。

[請求項17] 請求項５～１１のいずれかに記載の結合体を患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

[図1]

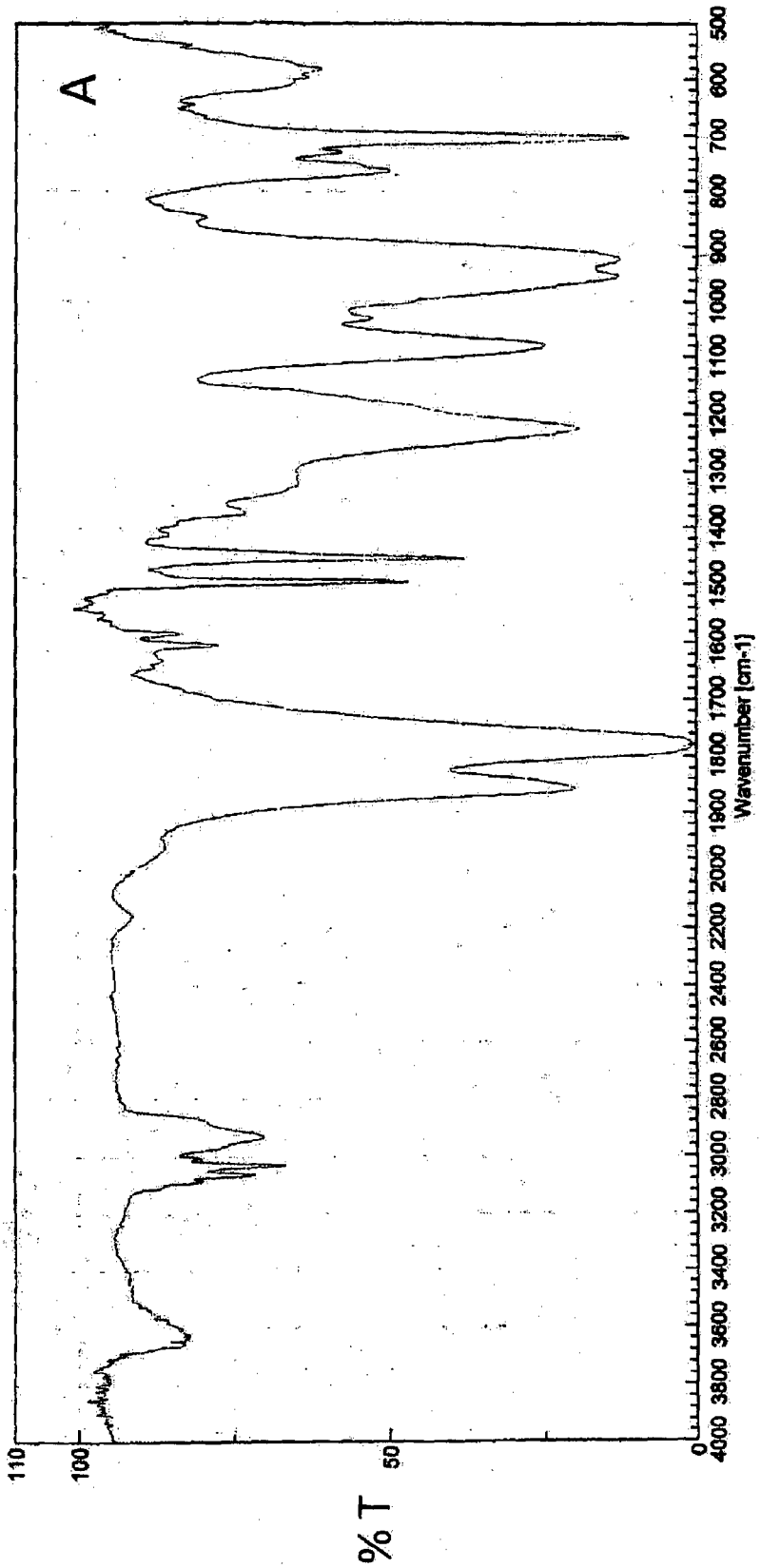

チオール化
アミノ化
アミノアルキルメルカプタン
H_2N-R-SH
ジアミノアルキル
H_2N-R-NH_2
トリスヒドロキシアミノメタン
H_2N-C-$(CH_2OH)_3$
トリス化
ヒドラジン
NH_2-NH_2
アンモニア
NH_4OH
ヒドラジド化
アミド化

[図2]

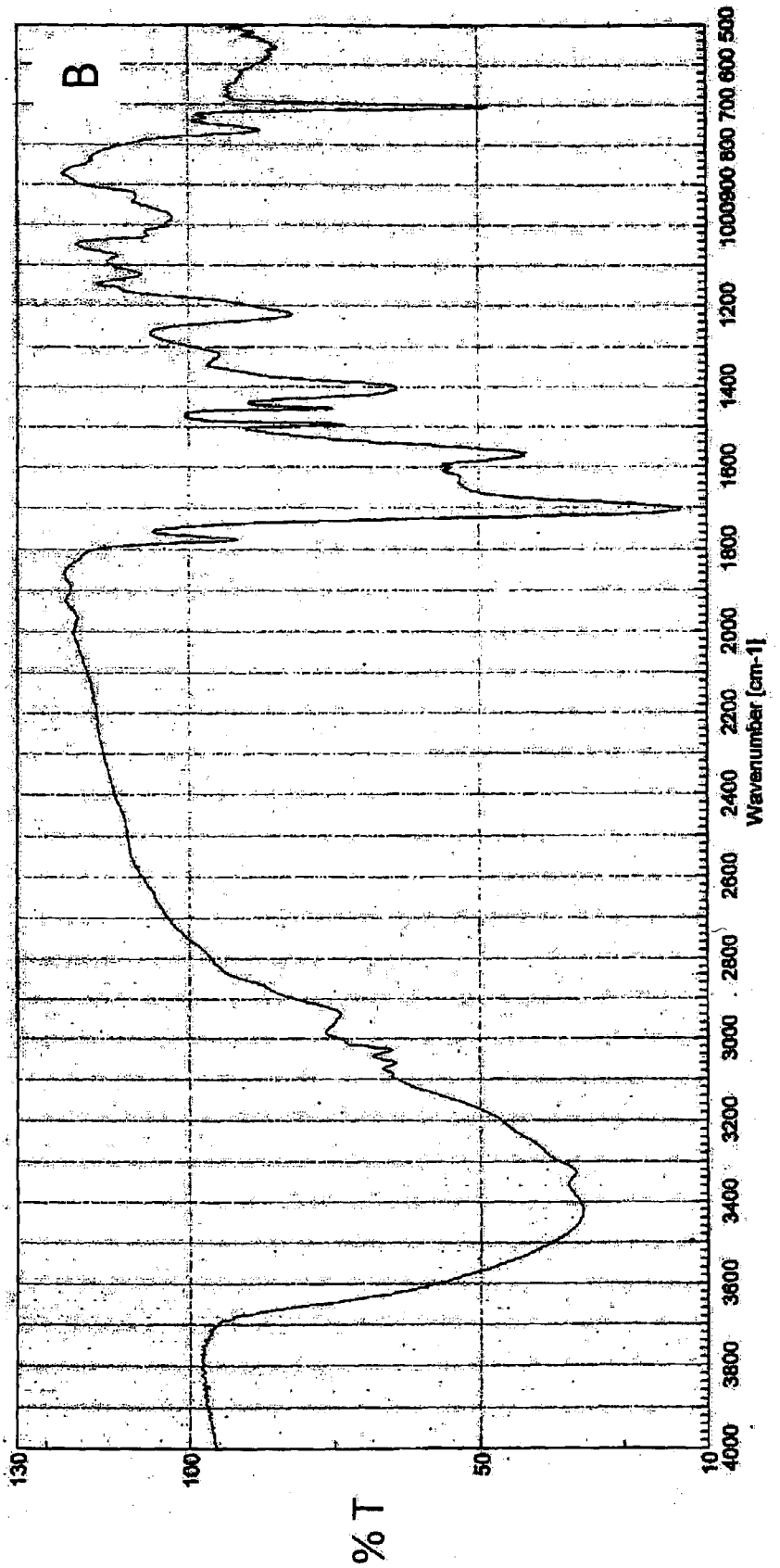

薬物放出速度(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
Incubation time (h)
pH 5.5
pH 6.8
pH 7.4

[図3]

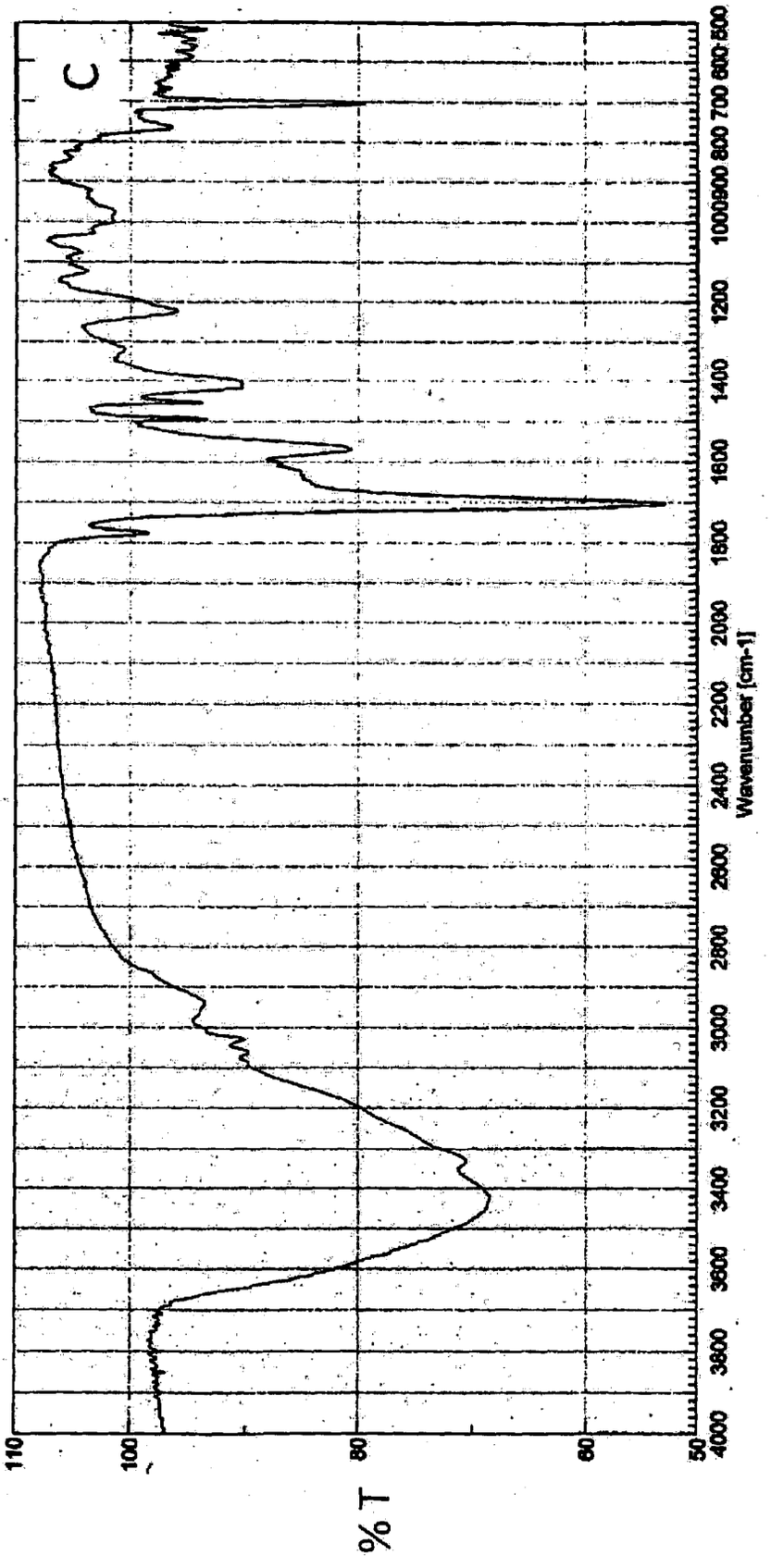
赤外吸収スペクトル／KBr



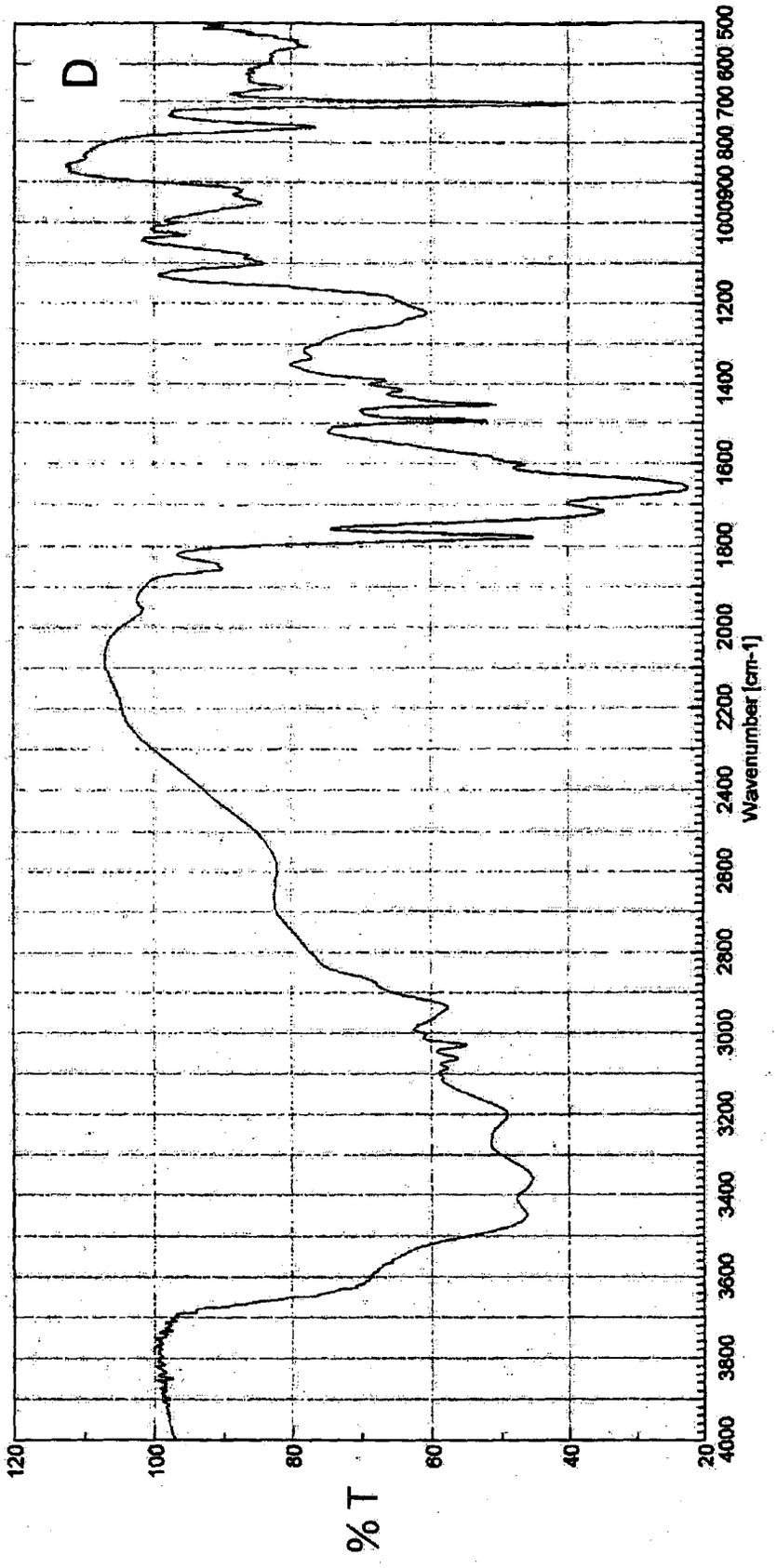
[図3]


B
130
100
50
10
%T
4000
3800
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
900
800
700
600
500
Wavenumber [cm-1]

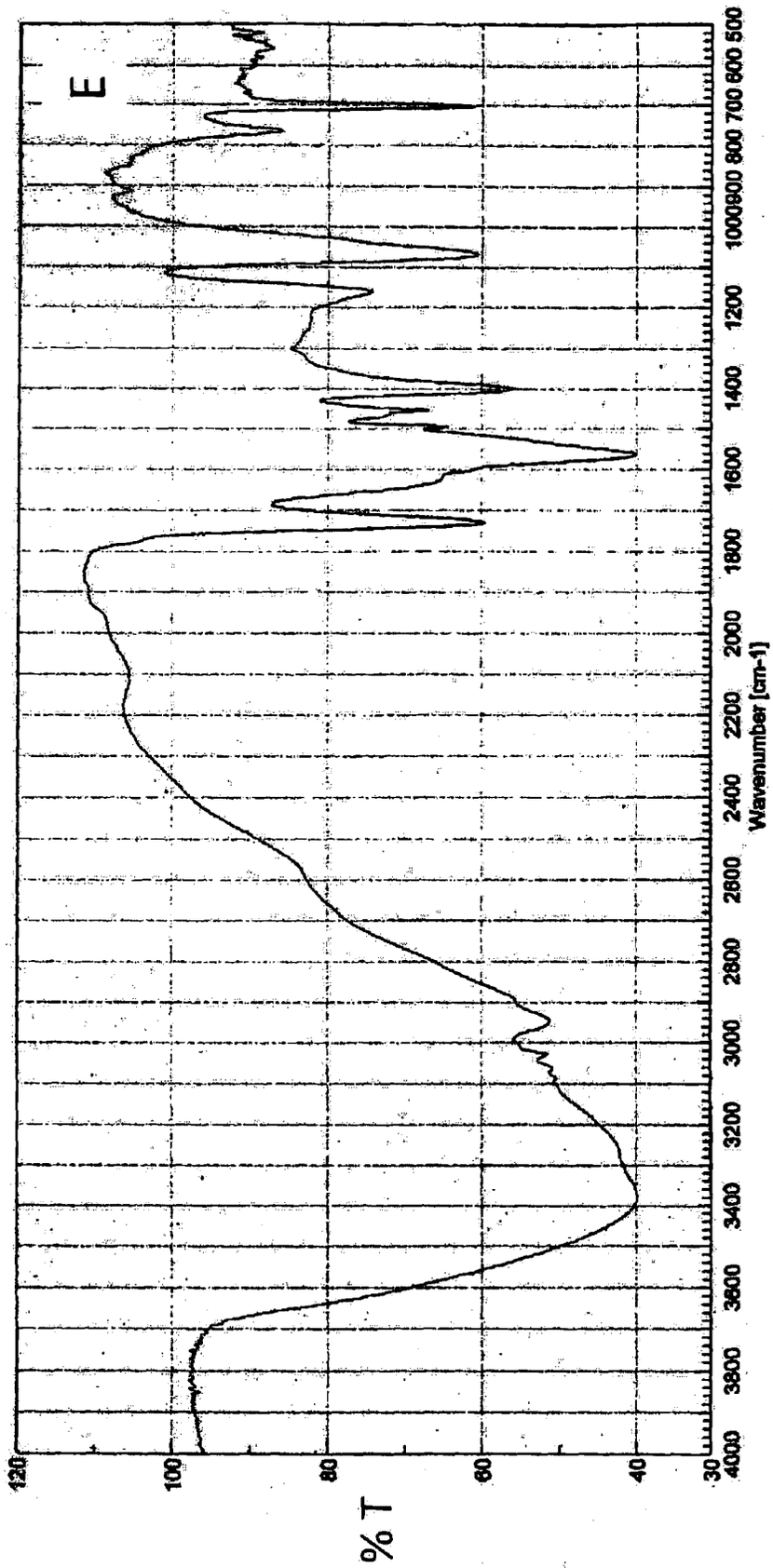
[図3]


C
110
100
80
60
50
%T
4000
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
900
800
700
600
500
Wavenumber [cm-1]

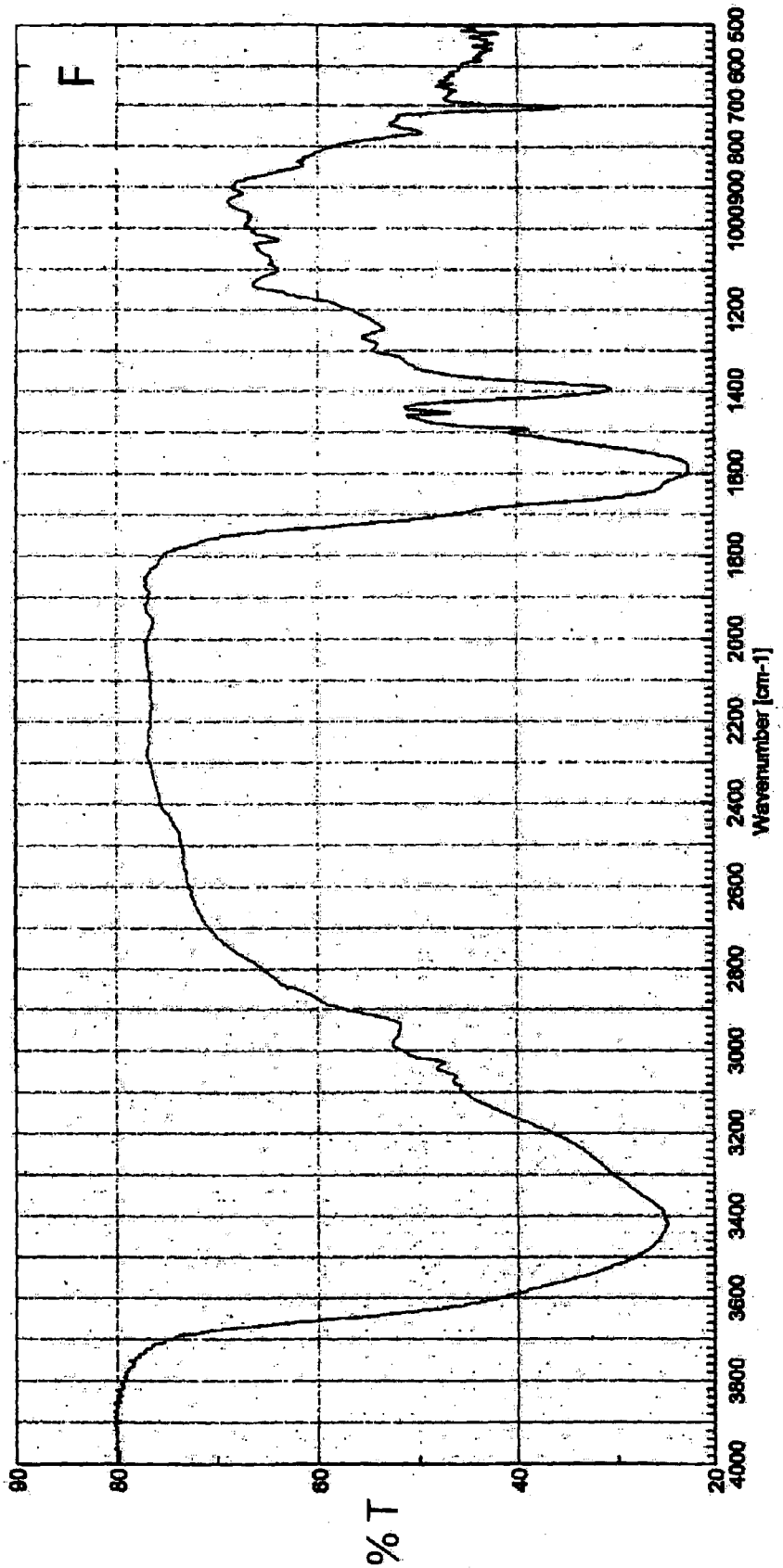
[図3]


D
%T
120
100
80
60
40
20
4000
3800
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
900
800
700
600
500
Wavenumber [cm-1]

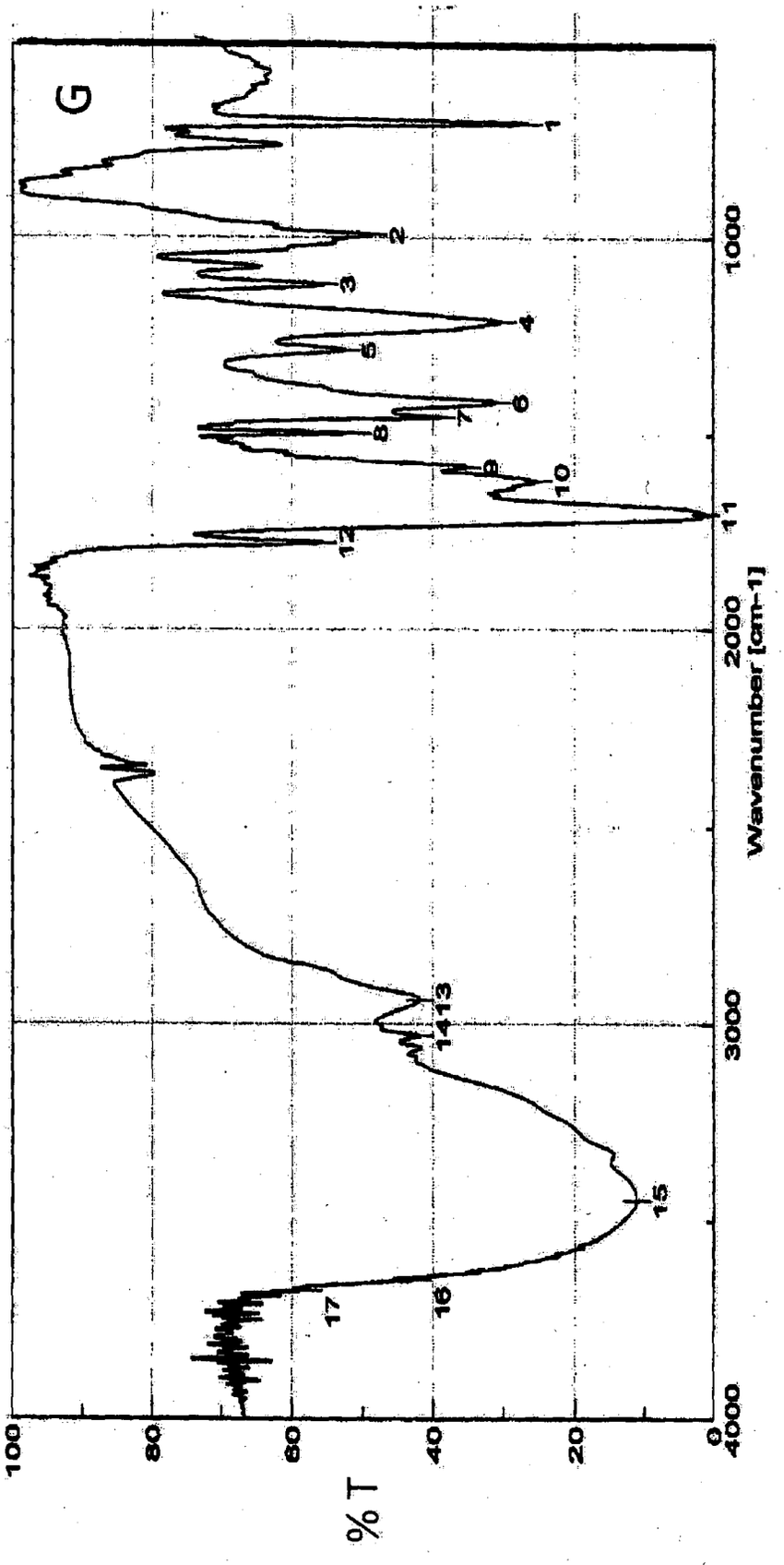
[図3]


E
120
100
80
60
40
%T
4000
3800
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
700
600
500
Wavenumber [cm-1]

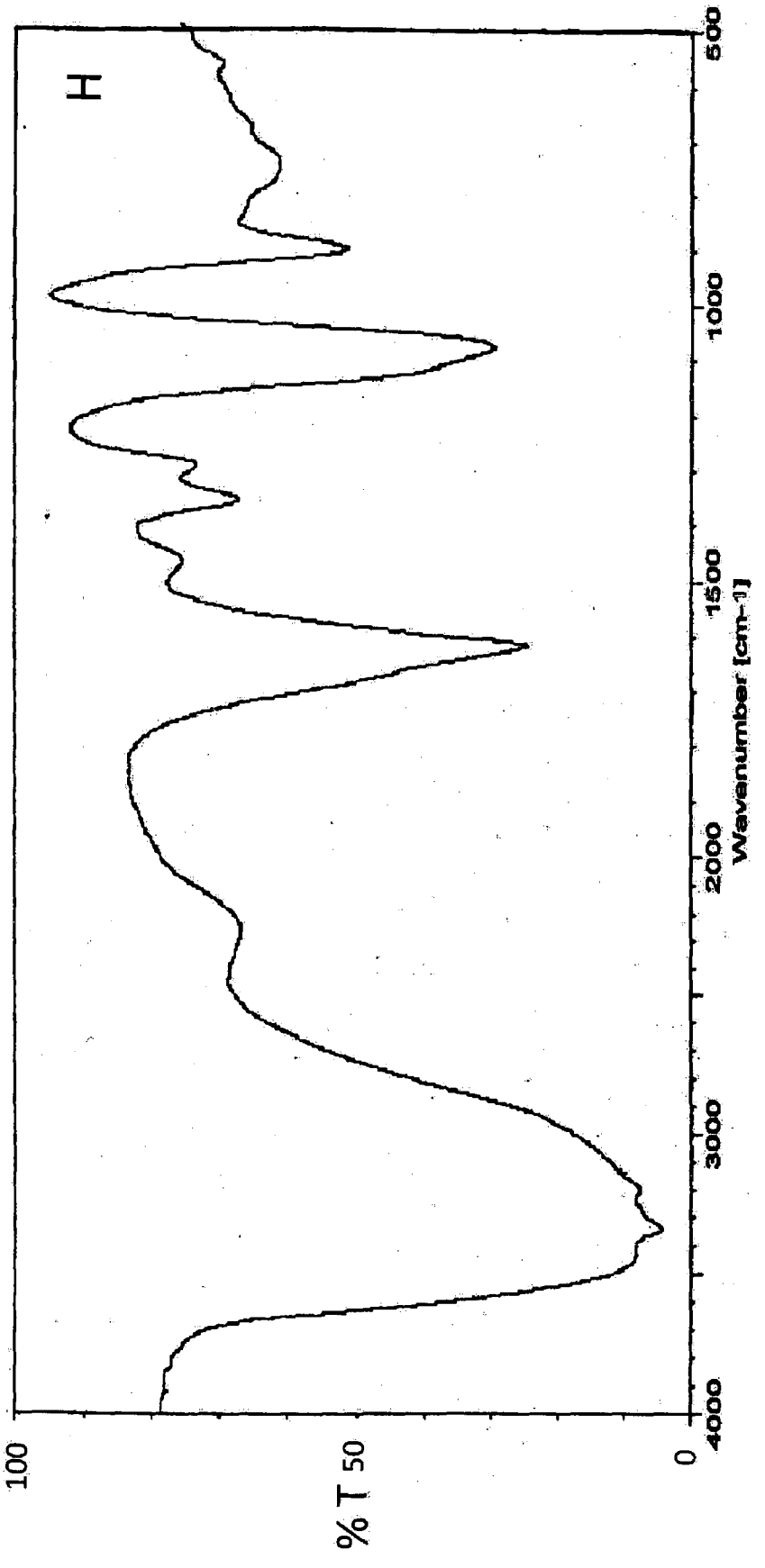
[図3]


F
%T
100
80
60
40
20
4000
3800
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
900
800
700
600
500
Wavenumber [cm-1]

[図3]

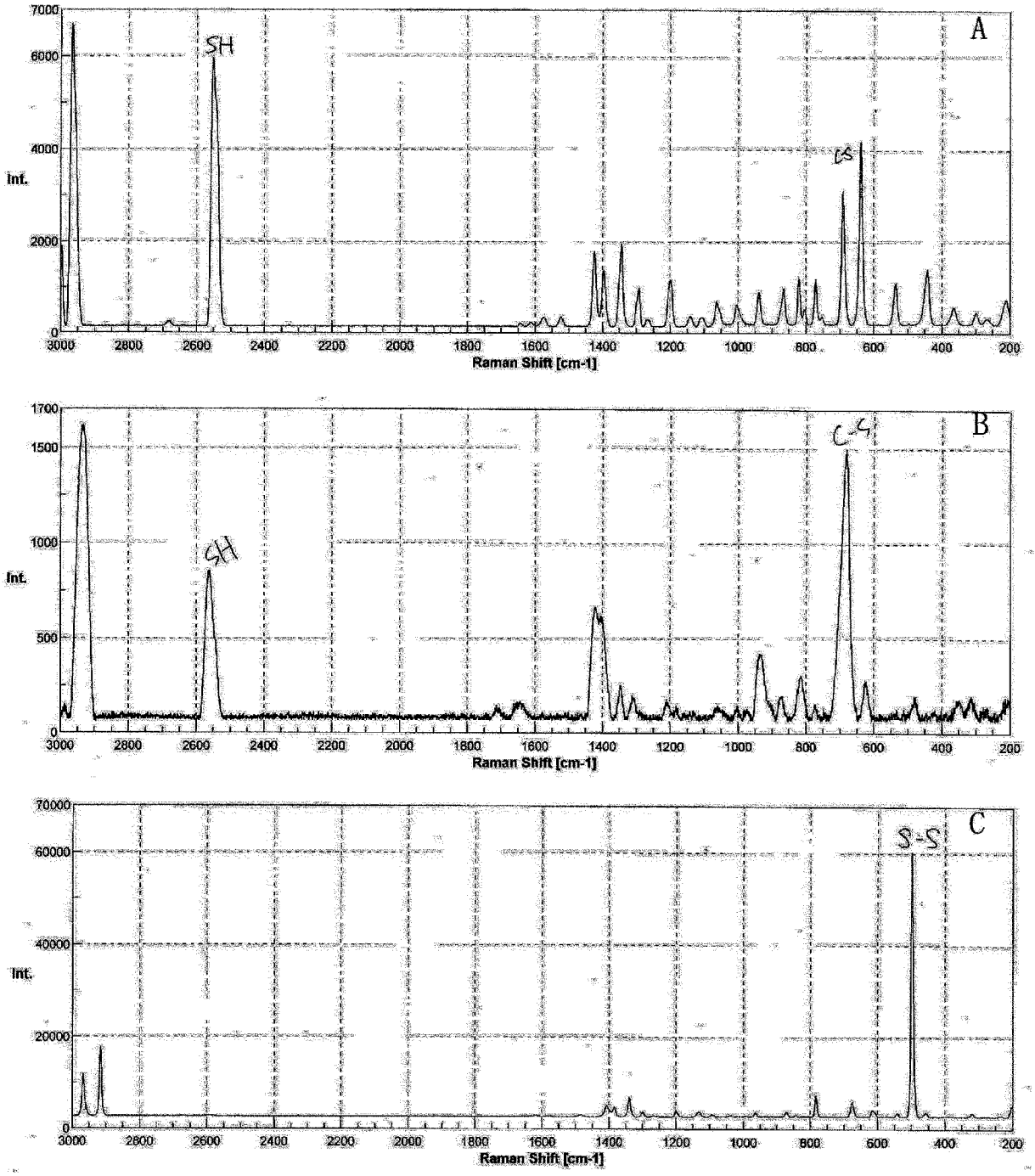

G
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
1413
15
16
17
100
80
60
40
20
0
%T
4000
3000
2000
1000
Wavenumber [cm-1]

[図3]



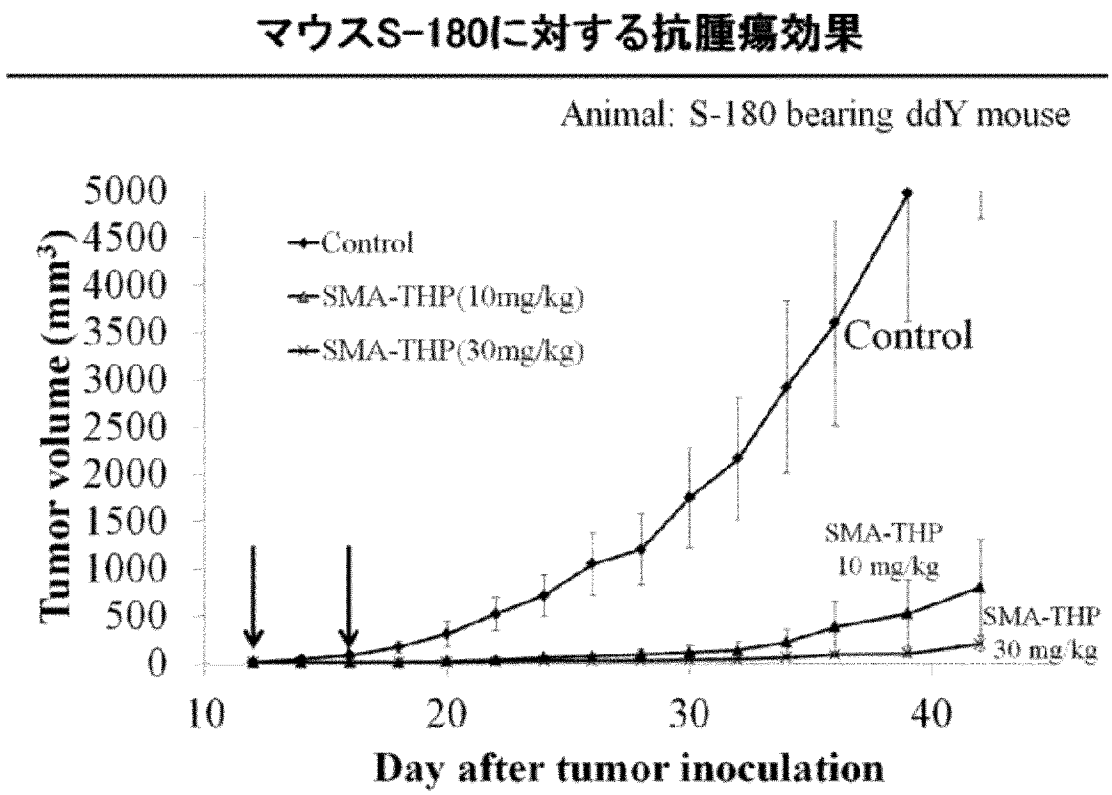
[図4]

ラマン吸収スペクトル

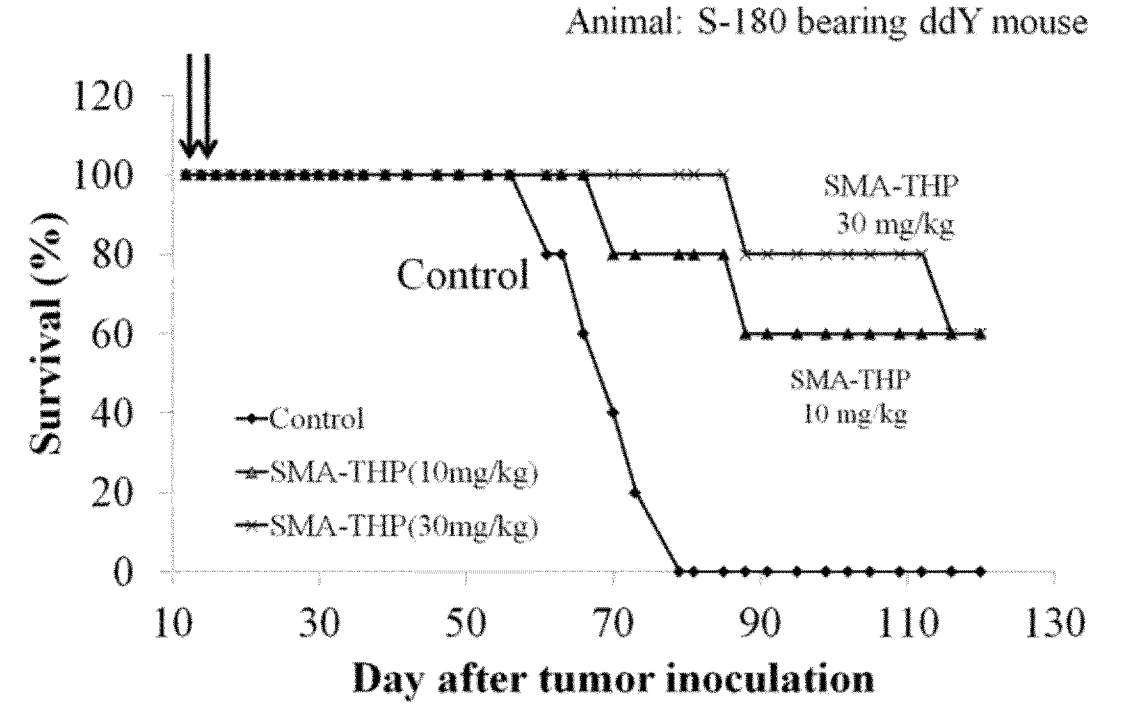


[図5]

ＳＭＡ－ＴＨＰのマウスｉｎ ｖｉｖｏでの抗腫瘍活性



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/080688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08F8/00-8/50, A61K31/409, A61K31/555, A61K31/69, A61K31/704, A61K31/7048, A61K38/22, A61K45/00, A61K47/48, A61P5/00, A61P31/04, A61P35/00, C07K14/575

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 4-279527 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 October 1992 (05.10.1992), claims; examples (Family: none)	1-4 5-16
X	JP 47-611 B1 (Omi Kenshi Boseki Kabushiki Kaisha), 08 January 1972 (08.01.1972), claims; examples 1 to 2 (Family: none)	1-4
X	JP 43-6233 B1 (L'Oreal), 07 March 1968 (07.03.1968), claims; example 9 & US 3472820 A & GB 1095838 A & FR 87224 E & DE 1595064 A1	1-4

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 February 2015 (13.02.15)	24 February 2015 (24.02.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/080688

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-503474 A (Smith & Nephew PLC), 03 February 2005 (03.02.2005), claims; paragraphs [0035] to [0048]; examples 4, 7, 8 & US 2005/0032929 A1 & EP 1436334 A1 & WO 2003/027154 A1 & CA 2461504 A1	1,5-7,12, 14-16
X A	JP 2007-517776 A (Spherix Inc.), 05 July 2007 (05.07.2007), claims; paragraphs [0026] to [0059] & US 2005/0201974 A1 & EP 1697481 A2 & WO 2005/056708 A2	1 2-16
A	JP 53-117095 A (Hiroshi MAEDA, Nakao ISHIDA), 13 October 1978 (13.10.1978), claims; examples & US 4182752 A & GB 1565794 A & DE 2813017 A1 & FR 2384811 A1	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/080688

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C08F8/30(2006.01)i, *A61K31/409*(2006.01)i, *A61K31/555*(2006.01)i, *A61K31/69*(2006.01)i, *A61K31/704*(2006.01)i, *A61K31/7048*(2006.01)i, *A61K38/22*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K47/48*(2006.01)i, *A61P5/00*(2006.01)i, *A61P31/04*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K14/575*(2006.01)n

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/080688

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claim 17 pertains to a method for treatment or prevention of diseases including administration of a conjugate to patients, and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０８０６８８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C08F8/00-8/50, A61K31/409, A61K31/555, A61K31/69, A61K31/704, A61K31/7048, A61K38/22, A61K45/00, A61K47/48, A61P5/00, A61P31/04, A61P35/00, C07K14/575

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	JP 4-279527 A (大塚製薬株式会社) 1992.10.05, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-4 5-16
X	JP 47-611 B1 (近江絹絲紡績株式会社) 1972.01.08, 特許請求の範囲, 実施例 1-2 (ファミリーなし)	1-4

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１３．０２．２０１５	２４．０２．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｊ　９５５２
藤本　保
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５７

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 43-6233 B1（ロレアル）1968.03.07, 特許請求の範囲,例9 & US 3472820 A & GB 1095838 A & FR 87224 E & DE 1595064 A1	1-4
X	JP 2005-503474 A（スミス　アンド　ネフェー　ピーエルシー） 2005.02.03, 特許請求の範囲,[0035]-[0048],実施例4,7,8 & US 2005/0032929 A1 & EP 1436334 A1 & WO 2003/027154 A1 & CA 2461504 A1	1,5-7,12,14-16
X	JP 2007-517776 A（スフェリックス,　インコーポレイテッド） 2007.07.05, 特許請求の範囲,[0026]-[0059] & US 2005/0201974 A1 & EP 1697481 A2 & WO 2005/056708 A2	1 2-16
A	JP 53-117095 A（前田浩；石田名香雄）1978.10.13, 特許請求の範囲,実施例 & US 4182752 A & GB 1565794 A & DE 2813017 A1 & FR 2384811 A1	1-16

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　１７　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項１７は、結合体を患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法に係るものであり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類
C08F8/30(2006.01)i, A61K31/409(2006.01)i, A61K31/555(2006.01)i, A61K31/69(2006.01)i, A61K31/704(2006.01)i, A61K31/7048(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P5/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/575(2006.01)n