

(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  
2019年1月3日(03.01.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/004482 A1

(51) 国際特許分類:  
C07F 5/02 (2006.01) G01N 33/84 (2006.01)  
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/024985

(22) 国際出願日: 2018年6月26日(26.06.2018)

(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:  
62/524,740 2017年6月26日(26.06.2017) US

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松元 亮 (MATSUMOTO, Akira); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 宮澤 大樹 (MIYAZAWA, Taiki); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 宮原 裕二 (MIYAHARA, Yuji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). カブラル ホラシオ (CABRAL, Horacio); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). カーン タホミナ タレク (KHAN, Thahomina Tareque); 〒1138654 東京都文京区

本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮田 完二郎 (MIYATA, Kanjiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

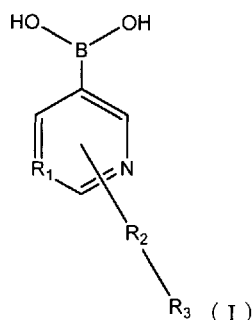
(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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.

(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).

(54) Title: HETEROCYCLIC BORONIC ACID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 複素環式ボロン酸誘導体



(57) Abstract: This heterocyclic boronic acid derivative is represented by formula I: (in the formula, R<sub>1</sub> represents a hydrogen atom or a nitrogen atom, R<sub>2</sub> represents a single bond, or a group represented by -C(O)-, -C(O)O-, -O-, -CONH-, or -NHCOO-, and R<sub>3</sub> represents a hydrogen atom, an optionally substituted hydrocarbon group, or an optionally substituted heterocyclic functional group).

(57) 要約: 次式 I: (式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は窒素原子を表し、R<sub>2</sub>は、単結合、又は -C(O)-、-C(O)O-、-O-、-CONH- 若しくは -NHCOO- で示される基を表し、R<sub>3</sub>は、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、又は置換基を有していてもよい複素環式官能基を表す。) で示される、複素環式ボロン酸誘導体。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

## 明 細 書

## [発明の名称]

複素環式ボロン酸誘導体

## [技術分野]

[0001]

本発明は、複素環式ボロン酸誘導体及び当該誘導体を用いた応用に関する。

## [背景技術]

[0002]

真核細胞は、糖タンパク質及び糖脂質を介して細胞表面に付着したグリカンとして知られる糖鎖の密な層によって取り囲まれている（図1）。糖鎖は全ての哺乳動物組織において存在しているにもかかわらず、その正確な役割は、構造が非常に多様であるため完全に解明されておらず、現在、各特定の糖鎖構造の役割を予測するための包括的な「コード」はない<sup>1</sup>。

[0003]

糖鎖構造のかなりの割合を構成することが知られている糖の1つのファミリーは、シアル酸(SA 又は N-アセチルノイラミン酸)である（図1）。SA は、最も外側(鎖末端)の配置及び独自のアニオン性極性を考慮すると、多種多様な生理学的及び病理学的細胞プロセスを媒介し得るものであり、従って、細胞事象の文脈において糖鎖の状態を伝えるためのアクセス可能な「コード」を提供し得る。例えば、シアリル化は、典型的には癌において変化し、シアリル化グリカンの発現が増加することは、いくつかの例外を除いて、癌の進行、不良な予後、及びより高い転移の可能性の一般的な徴候となる<sup>2</sup>。従って、糖鎖シアル酸の測定は、これらの癌性状態の診断に関与し得る<sup>3</sup>。

[0004]

さらに、SA 特異的に分子を認識することは、治療剤を高度にシアリル化されたエピトープ又は腫瘍細胞を標的化する能力をもたらす<sup>4</sup>。低酸素腫瘍微小環境の局在化 pH は一般的に周囲組織より低く、典型的には約 6.5 であり、一方、健

康な組織についての pH は 7.4 である<sup>5</sup>。従って、このような弱酸性条件下における SA の存在は、腫瘍及び他の癌性変化に対する高度に選択的なマーカーとなり得る。同様に、SA 特異的分子認識は、このような酸性化に依存する様式で達成される場合、高度に腫瘍特異的な化学療法及び診断の戦略をもたらす<sup>3,4</sup>。

[0005]

他方、フェニルボロン酸をリガンドとして搭載したポリマーミセルを作製し、これを固形腫瘍におけるシアル酸エピトープを標的に使用する研究も進められている<sup>4e</sup>。この研究では、フェニルボロン酸が効率的なシアル酸への結合剤として示されており、この構造が最も一般的である。

[先行技術文献]

[非特許文献]

[0006]

[非特許文献 1]

A. Varki and J. B. Lowe, Biological Roles of Glycans, in Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009;

[非特許文献 2]

A. Varki, Trends Mol. Med., 2008, 14(8), 351;

[非特許文献 3]

R. Schauer, Zool., 2004, 107(1), 49;

[非特許文献 4]

M. Fukuda, Cancer Res., 1996, 56, 2237;

[非特許文献 5]

C. R. Bertozzi and L. L. Kiessling, Science, 2001, 291, 2357;

[非特許文献 6]

R. Raman, S. Raguram, G. Venkataraman, J. C. Paulson and R. Sasisekharan, Nat. Methods, 2005, 2, 817;

[非特許文献 7]

J. E. Scott, Conn's Biological Stains. A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, J. Anat., 2003, 203(4), 433.

[非特許文献 8]

S. Hakomori, *Cancer Res.*, 1996, 56, 5309;

[非特許文献 9]

D. H. Dube and C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, 4, 477;

[非特許文献 10]

Y. Xu, A. Sette, J. Sidney, S. J. Gendler and A. Franco, *Immunol. Cell Biol.*, 2005, 83, 440;

[非特許文献 11]

L. Daniel, J. Trouillas, W. Renaud, P. Chevallier, J. Gouvernet, G. Rougon and D. Figarella-Branger, *Cancer Res.*, 2000, 60, 80;

[非特許文献 12]

L. Daniel, P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon and D. Figarella-Branger, *Oncogene*, 2001, 20, 997;

[非特許文献 13]

S. M. Elkashef, S. J. Allison, M. Sadiq, H. A. Basheer, G. R. Morais, P. M. Loadman, K. Pors and R. A. Falconer, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33026.

[非特許文献 14]

A. Matsumoto, N. Sato, K. Kataoka and Y. Miyahara, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 12022;

[非特許文献 15]

A. Matsumoto, H. Cabral, N. Sato, K. Kataoka and Y. Miyahara, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 5494.

[非特許文献 16]

G. Lemieux, K. J. Yarema, C. L. Jacobs and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 4278;

[非特許文献 17]

L. K. Mhal, N. W. Charter, K. Angata, M. Fukuda, D. E. Koshland Jr and C. R. A. Bertozzi, *Science*, 2001, 294, 380;

[非特許文献 18]

J. Frullano, J. S. Rohovec, T. Aime, T. Maschmeyer, M. I. Prata, J. J. P. D. Lima, C. F. G.

C. Geraldès and J. A. Peters, *Chem.–Eur. J.*, 2004, 10, 5205;

[非特許文献 19]

K. Djanashvili, G. A. Koning, A. J. G. M. van der Meer, H. T. Wolterbeek and J. A. Peters, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2007, 2, 35;

[非特許文献 20]

S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 15501;

[非特許文献 21]

A. Liu, S. Peng, J. C. Soo, M. Kuang, P. Chen and H. Duan, *Anal. Chem.*, 2010, 83, 1124;

[非特許文献 22]

S. G. Crich, D. Alberti, I. Szabo, S. Aime and K. Djanashvili, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, 52, 1161;

[非特許文献 23]

A. Matsumoto, K. Kataoka and Y. Miyahara, *Polym. J.*, 2014, 46, 483.

[非特許文献 24]

V. Estrella, T. A. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H. H. Cornnell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J. M. Rothberg, B. F. Sloane, J. Johnson, R. A. Gatenby and R. J. Gillies, *Cancer Res.*, 2013, 73(5), 1524;

[非特許文献 25]

Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Machata, A. Suzuki, T. Maeda and Y. Baba, *Cancer Cell Int.*, 2013, 13, 89;

[非特許文献 26]

R. A. Gatenby and R. J. Gillies, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4(11), 891.

[発明の概要]

[発明が解決しようとする課題]

[0007]

本発明は、上記フェニルボロン酸よりもさらに結合性及び特異性の高い化合物を提供することを目的とする。

[0008]

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、複素環式ボロン酸が、他のボロン酸ベースの化合物に代替できる物質であることを見出し、本発明を完成するに至った。

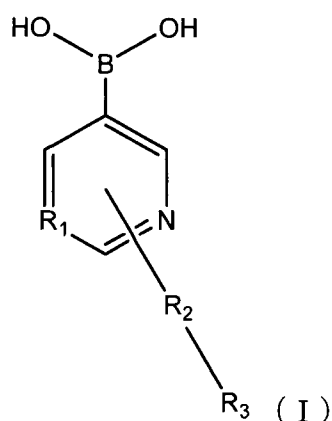
[課題を解決するための手段]

[0009]

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 次式 I :

[化 1]



(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は窒素原子を表し、R<sub>2</sub>は、単結合、又は—C(O)—、—C(O)O—、—O—、—CONH—若しくは—NHCOO—で示される基を表し、R<sub>3</sub>は、水素原子、置換基を有していてもよい鎖状又は分岐状の炭化水素基、又は置換基を有していてもよい複素環式官能基を表す。)

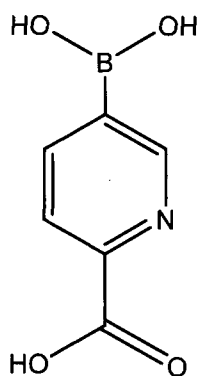
で示される、複素環式ボロン酸誘導体。

(2) R<sub>1</sub>が水素原子であり、R<sub>2</sub>が—C(O)O—又は—CONH—で示される基である、(1)に記載の複素環式ボロン酸誘導体。

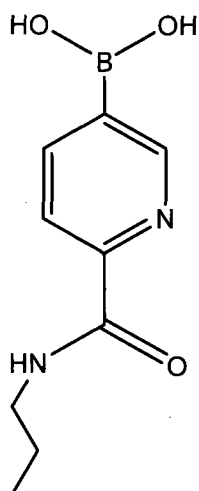
(3) R<sub>3</sub>が炭素数1～6のアルキル基である(1)又は(2)に記載の複素環式ボロン酸誘導体。

(4) 次式(11)又は(12)で示される複素環式ボロン酸誘導体。

[化 2]



(11)



(12)

(5) (1) ~ (4) のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に、機能性分子が結合された複合体。

(6) 機能性分子が、薬物、CT造影剤、MRI造影剤、PETプローブ、蛍光色素プローブ、アミノ酸、核酸、コレステロール誘導体、脂質及びポリマーからなる群から選ばれる少なくとも1つである、(5)に記載の複合体。

(7) 機能性分子がポリマーである(6)に記載の複合体。

(8) ポリマーに、さらに核酸が静電結合により結合された、(7)に記載の複合体。

(9) 複素環式ボロン酸誘導体が、機能性分子に一価で連結された、(5)~(8)のいずれか1項に記載の複合体。

(10) 複素環式ボロン酸誘導体が、機能性分子に多価で連結された、(5)~(8)のいずれか1項に記載の複合体。

(11) ポリマーが直鎖状又は分岐状のポリエチレングリコールである(6)~(10)のいずれか1項に記載の複合体。

(12) (1)~(4)のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体を含む、細胞又は組織への機能性分子送達用担体。

(13) (6)~(11)のいずれか1項に記載の複合体を含む、細胞又は組織への機能性分子送達システム。

(14) (1)~(4)のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に目的

物質を結合又は担持させ、これを酸性条件下でシアル酸を発現する細胞に接触させることを特徴とする、前記目的物質を当該細胞に輸送、送達又は結合させる方法。

(15)(1)～(4)のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に標識物質を結合又は担持させ、これを被験細胞と接触させた後に標識物質を検出することを特徴とする、シアル酸発現細胞の検出方法。

(16)(1)～(4)のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に標識物質を結合又は担持させ、これを被検細胞と接触させた後に標識物質を検出し、当該被検細胞周囲のpHを検出することを特徴とする、被検細胞周囲のpHの検出方法。

#### [発明の効果]

[0010]

本発明により、複素環式ボロン酸誘導体が提供される。本発明の誘導体は、シアル酸に対して特異的かつ強力な結合力を有する。シアル酸は細胞表面に発現していることから、本発明の誘導体を用いることで、各種機能性物質のデリバリーが可能となる。また、本発明の誘導体は、がん環境に特徴的な低酸素及び弱酸性条件下でシアル酸を特異的に認識する。従って、本発明の誘導体は例えば癌治療のためのドラッグデリバリーシステムとして有用である。

#### [図面の簡単な説明]

[0011]

[図1] 細胞における糖タンパク質と糖鎖を示す模式図である。

[図2] 本発明の誘導体と機能性分子との結合を示す模式図である。

[図3] 本発明の誘導体とブロックコポリマーにより形成されるポリマーミセルのコア領域に薬物が導入されている態様を示す図である。

[図4] 本発明の誘導体に脂質が結合した複合体により形成されるリポソームを示す図である。

[図5] 本発明の誘導体と機能性分子との結合を示す図である。

[図6] 本発明の誘導体と機能性分子との結合を示す図である。

[図 7] 種々のボロン酸への SA 結合の結合定数( $K$ ,  $M^{-1}$ )を  $B^{11}$  核磁気共鳴法 (NMR)により測定した結果を示す図である。

(A)3-ピリジルボロン酸、(B)5-ピリミジンボロン酸、(C)5-ボロノピコリン酸、(D) (6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸、(E) 3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジン、(F)3-プロピオンアミドフェニルボロン酸、(G)4-(メチルスルホニル)ベンゼンボロン酸。(B)及び(C)の値は、平均 $\pm$  S.D.( $n = 3$ )を表す。

[図 8] 4 つの代表的なボロン酸誘導体について決定した結合定数( $K$ ,  $M^{-1}$ )を示す図である。

(A)3-ピリジルボロン酸、(B)5-ピリミジンボロン酸、(C)5-ボロノピコリン酸、及び(D)(6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸は、pH の関数として様々な糖と結合する。

[図 9] 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いたボロン酸の SA 結合能の In vitro 評価を示す図である。

(A)PANC1 細胞を PBS、0.2mg/mL(3-プロピオンアミド)フェニルボロン酸及び 0.2mg/mL 5-ボロノピコリン酸と共に pH7.4 又は pH6.5 で 15 分間インキュベートした後の Sambucus Nigra レクチン(SNA、赤色)の結合。細胞核をヘキスト(Hoechst)(青色)で染色した。(B、C) (B)pH7.4 及び(C)pH6.5 での PANC1 細胞における SNA 蛍光強度の定量( $n = 100$  細胞)。

\*\*\* $p < 0001$ 、\*\* $p < 0.05$ 、スチューデント  $t$  検定で判定。

[図 10] 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いたローダミン標識 5-ボロノピコリン酸の SA 結合能の In vitro 評価を示す図である。

(A)シアリダーゼ処理が有り及び無しの際の、pH7.4 又は pH6.5 で PANC1 細胞を PBS と 5 分間インキュベートした後のローダミン標識 5-ボロノピコリン酸(赤)の結合。細胞核をヘキスト(Hoechst)(青色)で染色した。

(B)シアリダーゼ処理が有り及び無しの際の、pH7.4 及び pH6.5 の PANC1 細胞におけるローダミン標識 5-ボロノピコリン酸の発光度の定量( $n = 100$  細胞)。

\*\*\*スチューデントの  $t$  検定で  $p < 0001$ 。

[図 11] (6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸の NMR スペクトルを示す図である。

[図 12] (6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸の質量スペクトル

を示す図である。

[図 1 3] 3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジンの NMR スペクトル及び質量スペクトルを示す図である。

[図 1 4] ローダミン 6G の NMR スペクトルを示す図である。

[図 1 5] 5-ボロノピコリン酸とローダミンとのコンジュゲートの NMR スペクトルを示す図である。

[図 1 6] 5-ボロノピコリン酸とローダミンとのコンジュゲートの質量スペクトルを示す図である。

[図 1 7] 各 pH における種々の糖を含む 3-プロピオンアミドフェニルボロン酸水溶液(20mM/20mM)の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 1 8] 3-プロピオンアミドフェニルボロン酸と種々の糖との間の結合定数(K)を示す図である。図は pH の関数として表示。

[図 1 9] 各種糖を含む 3-ピリジルボロン酸水溶液(20mM/20mM)の一連の pH における  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 2 0] 各種糖を含む 3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジン水溶液(20mM/20mM)の一連の pH における  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 2 1] 3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジンと種々の糖との間の結合定数(K)を示す図である。図は pH の関数として表示。

[図 2 2] 各種糖を含む 5-ピリミジンボロン酸水溶液(20mM/20mM)の一連の pH における  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 2 3] 各種糖を含む 5-ボロノピコリン酸水溶液(20mM/20mM)の一連の pH における  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 2 4] 5-ボロノピコリン酸の NMR スペクトル、及び 5-ボロノピコリン酸の SA との結合定数を示す図である。

(a) (b) 20mM SA を含む 5-ボロノピコリン酸の 20mM 水溶液の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを、異なる塩化ナトリウム濃度(それぞれ 300mM 及び 600mM)及び pH について調べた。

(c) 5-ボロノピコリン酸と SA との間の結合定数を、異なる塩濃度について pH の関数として表示。

[図 2 5] SA を含有する(6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸の

NMR 及び結合定数を示す図である。

(a), (b), (c) 異なる塩化ナトリウム濃度(それぞれ 0mM、300mM、及び 600mM) 及び pH に対する、20mM SA を含有する(6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸の 20mM 水溶液の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル。

(d) (6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸と SA の結合定数を、異なる塩濃度について pH の関数として表示。

[図 2 6] 各種糖を含む(6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸水溶液(20mM/20mM)の一連の pH における  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す図である。

[図 2 7] 一連の pH に対する 4-(メチルスルホニル)ベンゼンボロン酸含有 SA 水溶液(20mM/20mM)の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(左)、及び 4-(メチルスルホニル)ベンゼンボロン酸と SA の結合定数(右) を示す図である。右図は、pH の関数として表示。

[図 2 8] 一連の pH に対する N-アセチルノイラミン酸メチルエステルを含む 5-ボロノピコリン酸水溶液(20mM/20mM)の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(A)、及び 5-ボロノピコリン酸と N-アセチルノイラミン酸メチルエステルの結合定数(B)を示す図である。(B)は pH の関数として表示。

[図 2 9] 一連の pH に対する 5-ボロノピコリン酸水溶液と N-グリコリルノイラミン酸水溶液(20mM/20mM)の  $^{11}\text{B}$  核磁気共鳴スペクトル(A)、及び 5-ボロノピコリン酸と N-グリコリルノイラミン酸の結合定数(B)を示す図である。(B)は pH の関数として表示。

[図 3 0] 一連の pH に対する N-アセチルノイラミン酸三量体( $\alpha$ , 2 $\rightarrow$ 8)を含む 5-ボロノピコリン酸水溶液(20mM/5.7mM)の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(A)、及び 5-ボロノピコリン酸と N-アセチルノイラミン酸三量体( $\alpha$ , 2 $\rightarrow$ 8)の結合定数(B)を示す図である。(B)は pH の関数として表示。

[図 3 1] 一連の pH に対する N-アセチルノイラミン酸五量体( $\alpha$ , 2 $\rightarrow$ 8)を含む 5-ボロノピコリン酸水溶液(20mM/5.3mM)の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(A)、及び 5-ボロノピコリン酸と N-アセチルノイラミン酸の五量体( $\alpha$ , 2 $\rightarrow$ 8)の結合定数(B)を示す図である。(B)は pH の関数として表示。

[図 3 2] 種々の pH について異なる量の 5-ボロノピコリン酸(5-Bopi)を含有する 9 $\mu\text{M}$  アリザリンレッド S(ARS)水溶液の蛍光強度(ex:468nm、em:572nm)

変化を示す図である。データは平均±標準偏差(SD)、(n = 3)として示す。

[図 3 3] 5-Bopi と ARS( $K_{ARS}$ )の結合定数を示す図である。 $K_{ARS}$  は、 $1/C_{5-Bopi}$  対  $1/\Delta F$  ( $\Delta$  蛍光強度)のプロットにおける切片及び傾きの比である。データは平均±SD(n = 3)として示す。

[図 3 4] 種々の濃度の SA(CSA)及び pH についての ARS-5-Bopi 複合体溶液の蛍光スペクトル(ex:468nm)を示す図である。

[図 3 5] シアル酸(SA)の ARS-5-Bopi 複合体溶液への滴定結果を示す図である。

SA の存在による ARS-5-Bopi 複合体の蛍光強度(ex:468nm、em:572nm)の低下が示される。 $F_0$  は溶液の初回蛍光強度、 $F$  は溶液の蛍光強度、及び  $C_{SA}$  は SA の濃度。データは平均±標準偏差(n = 3)として提示した。

[図 3 6] 種々の pH についての 5-Bopi と SA( $K_{SA}$ )の結合定数を示す図である。

$K_{SA}$  は $[S_0]/P$  を  $Q$  の関数としてプロットすることにより決定され、 $K_{SA}$  は  $K_{ARS}$  をプロット式の傾きで割ることにより計算することができる。

$P$  及び  $Q$  値は、以前の文献(Tetrahedron 58:5291-5300(2002))からの方程式によって決定した。 $S_0$  は SA の総濃度。データは平均±SD(n = 3)として示される。

[図 3 7] pH の関数としての 5-Bopi と SA( $K_{SA}$ )の結合定数を示す図である。結合定数は、 $^{11}B$  NMR 分析(黒枠の丸:図 7C 参照)から得られたものと比較して、ARS アッセイ(青枠の丸)によって測定した。データは平均±SD(n = 3)として示す。

[図 3 8] BS-X 1733Z アレイ(タイプ I: 28 グリカン) (住友ベークライト(株))上にインストールしたグリカンのタイプと構造を示す図である。

No. 3、6、21、22(赤色長方形で囲ったもの)は、SNA レクチンが特異性を有する、末端が Neu5Ac( $\alpha$ ,6)GalNAc 構造を有するものである。

[図 3 9] SNA 及び WGA レクチンのグリカン特異性アッセイを、グリカンアレイ(BS-X 1733Z: 住友ベークライト(株))によって評価した結果を示す図である。上パネル: SNA、下パネル: WGA

[図 4 0] グリカンアレイ(BS-X 1733Z: 住友ベークライト(株))上の異なる pH に対する SNA レクチンと 5-ボロノピコリン酸の競合的 SA 結合アッセイを示す図である。

[図 4 1] 5-BPA-PEG-DBCO-PEG-*b*-pGlu-Ac の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。

[図 4 2] 5-BPA-PEG-Ac (Mw 5500) の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。 $^1\text{H}$ -NMR 測定は、 $\text{D}_2\text{O}$  を用い  $25^\circ\text{C}$  で行った。

[図 4 3] 異なる濃度の 5-BPA における ARS-5BPA 複合体の蛍光スペクトル (上パネル) 及び ARS-5-BPA 複合体の溶液への SA の滴定結果を示す図である (下パネル)。下パネルは、 $\text{pH} 6.5$  における SA 濃度依存的な ARS-5BPA 複合体の蛍光強度を示す。

[図 4 4] 高分子-金属錯体化による高分子ミセルの水中での自己組織化を示す図である。

[図 4 5] 共焦点顕微鏡にて評価した pH 依存的 Alexa 647 標識ミセル(MeO, PBA, 5-BPA)の取り込み挙動を示す図である。(A)  $\text{pH} 7.4$  (B)  $\text{pH} 6.5$

[図 4 6] 各種ミセルの細胞取り込み挙動の評価を示す図である。

[図 4 7] 各種ミセルの細胞取り込み挙動の評価を示す図である。

[図 4 8] 共焦点レーザー顕微鏡により評価した B16F10 に対するミセル取り込み挙動の評価を示す図である。

[図 4 9] ボロンコンジュゲート 8-arm-PEG の NMR スペクトルを示す図である。

[図 5 0] 共焦点レーザー走査顕微鏡による C26 における Cy5 標識 5-BPA 及び PBA 修飾 8-arm-PEG (緑色) の細胞取り込み評価を示す図である。

[図 5 1] Cy5 標識 5-BPA 及び PBA 修飾 8-arm-PEG の細胞取り込み評価を示す図である。

[図 5 2] 5-BPA、及び PBA 修飾 8-arm-PEG の液滞留性評価(A)、並びに組織特異性(B)を示す図である。

[図 5 3] 5-BPA-8-arm PEG (A) 及び PBA-8-arm-PEG (B)の IVIS 画像である。

[発明を実施するための形態]

[0012]

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束される

ことはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願 62/524,740 号明細書の内容を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物は、参照として本明細書に組み込まれる。

[0013]

## 1. 概要

ボロン酸は、糖及び糖タンパク質中に見出されるジオール基と可逆的に相互作用し、その機能は周知である。しかし、この相互作用は、一般に無差別的である。本発明は、腫瘍の増殖及び癌の進行と密接に関係する糖残基であるシアル酸(SA 又は N-アセチルノイラミン酸)に対して非常に高い親和性及び選択性を示す複素環式ボロン酸の誘導体を見出したことに基づくものである。

注目すべきことに、これらの相互作用は、低酸素腫瘍微小環境に関連する弱酸性 pH 条件下で強化される。

[0014]

本発明においては、インビトロ競合結合アッセイにおいて、強力な SA 結合物質として、ボロン酸誘導体の 1 つである 5-ボロノピコリン酸を同定した。5-ボロノピコリン酸は、3-プロピオンアミドフェニルボロン酸（効率的な SA 結合物質として多数の報告で証明されているゴールドスタンダード構造である）と比較して、細胞表面の SA との相互作用が有意に高いことを明らかにした。この構造はまた、十分に保存された SA 結合能力を有するさらなる化学結合に適していることが判明した。

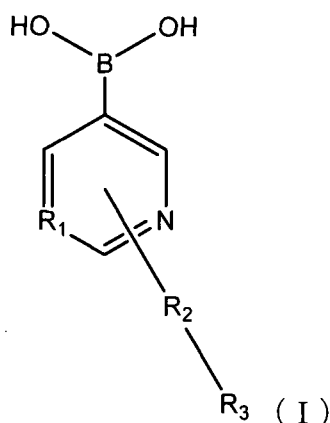
これらの知見は、腫瘍特異的化学療法及び診断を達成することを目的とした、他の研究中のボロン酸ベースの化学技術に対して魅力的な代替法となり得るものである。

[0015]

## 2. 複素環式ボロン酸誘導体

本発明、は次式 I :

[化 3]



で示される、複素環式ボロン酸誘導体を提供する。

[0016]

式 I において、 $R_1$  は水素原子又は窒素原子を表し、 $R_2$  は、単結合、又は  $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$ 、 $-CONH-$  若しくは  $-NHCOO-$  で示される基を表し、 $R_3$  は、水素原子、置換基を有していてもよい鎖状又は分岐状の炭化水素基、又は置換基を有していてもよい複素環式官能基を表す。

炭化水素基は、飽和又は不飽和の非環式又は環式であるが、飽和の非環式であることが好ましい。また炭素数は限定されるものではないが、例えば炭素数 1～20 である。炭化水素基が非環式の場合には、直鎖状でも分岐状でもよい。炭化水素基には、炭素数 1～20 ( $C_{1-20}$ ) と表記する。他の炭素数の場合も同様。) アルキル基、 $C_{2-20}$  アルケニル基、 $C_{2-20}$  アルキニル基、 $C_{4-20}$  アルキルジエニル基、 $C_{6-18}$  アリール基、 $C_{7-20}$  アルキルアリール基、 $C_{7-20}$  アリールアルキル基、 $C_{3-20}$  シクロアルキル基、 $C_{3-20}$  シクロアルケニル基、 $C_{1-20}$  アルコキシ基、 $C_{6-20}$  アリールオキシ基、 $C_{7-20}$  アルキルアリールオキシ基、 $C_{2-20}$  アルコキシカルボニル基などが含まれる。

[0017]

$C_{1-20}$  アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基等が挙げられる。

$C_{2-20}$  アルケニル基としては、例えばビニル基、アリル基、プロペニル基、イソプロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチルアリル基、2-ブテニル

基等が挙げられる。

[0018]

C<sub>2-20</sub>アルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基、ブチニル基等が挙げられる。

C<sub>4-20</sub>アルキルジエニル基としては、例えば1,3-ブタジエニル基等が挙げられる。

C<sub>6-18</sub>アリール基としては、例えばフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、インデニル基、ビフェニル基、アントリル基、フェナントリル基等が挙げられる。

[0019]

C<sub>7-20</sub>アルキルアリール基としては、例えばo-トリル基、m-トリル基、p-トリル基、2,3-キシリル基、2,5-キシリル基、o-クメニル基、m-クメニル基、p-クメニル基、メシチル基等が挙げられる。

C<sub>7-20</sub>アリールアルキル基としては、例えばベンジル基、フェネチル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基、1-フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基、フェニルペンチル基、フェニルヘキシル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、トリメチルベンジル基、エチルベンジル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基、ジエチルベンジル基等が挙げられる。

[0020]

C<sub>3-20</sub>シクロアルキル基としては、例えばシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等が挙げられる。

C<sub>3-20</sub>シクロアルケニル基としては、例えばシクロプロペニル基、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基等が挙げられる。

C<sub>1-20</sub>アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられる。

[0021]

C<sub>6-20</sub>アリールオキシ基としては、例えばフェニルオキシ基、ナフチルオキ

シ基、ビフェニルオキシ基等が挙げられる。

$C_{7-20}$ アルキルアリールオキシ基としては、例えばメチルフェニルオキシ基、エチルフェニルオキシ基、プロピルフェニルオキシ基、ブチルフェニルオキシ基、ジメチルフェニルオキシ基、ジエチルフェニルオキシ基、ジプロピルフェニルオキシ基、ジブチルフェニルオキシ基、メチルエチルフェニルオキシ基、メチルプロピルフェニルオキシ基、エチルプロピルフェニルオキシ基等が挙げられる。

[0022]

$C_{2-20}$ アルコキシカルボニル基としては、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、2-メトキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基等が挙げられる。

[0023]

$R_3$ における置換基の具体例としては、例えば、ハロゲン原子 (F, Cl, Br, I)、水酸基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシル基、アミノ基、シリル基、トリメチルシリル基、トリメトキシシリル基、メタンスルホニル基、 $C_{1-6}$ アルキル基、 $C_{2-6}$ アルケニル基、 $C_{2-6}$ アルキニル基、 $C_{3-8}$ シクロアルキル基、 $C_{6-10}$ アリール基、 $C_{1-6}$ アルコキシ基、 $C_{1-7}$ アシル基又は $C_{2-7}$ アルコキシカルボニル基などを挙げることができる。

複素環式官能基としては、例えばピロリドン基、スクシンイミジル基、フラン環、ピリジン環、モルホリン環、エポキシ環、プリン環、ピリミジン環などが挙げられる。

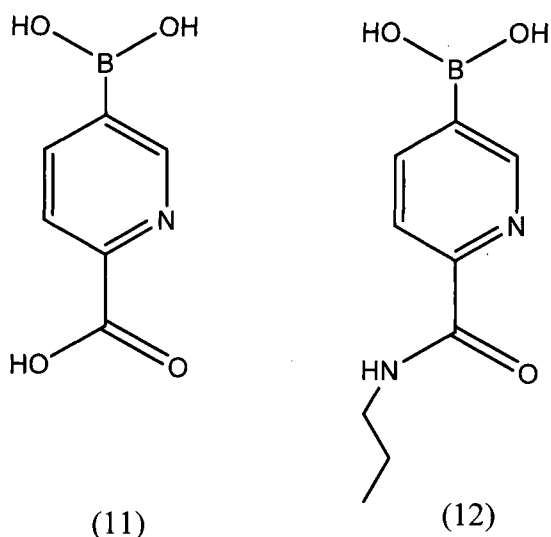
[0024]

本発明においては、例えば $R_1$ が水素原子であり、 $R_2$ が $-C(O)O-$ 又は $-CONH-$ で示される基である。

また、本発明の一態様では、 $R_3$ が炭素数1～6のアルキル基である。

本発明において好ましい誘導体としては、例えば次式(11)又は(12)で示される複素環式ボロン酸誘導体が挙げられる。

[化4]



[0025]

本発明の複素環式ボロン酸誘導体は、公知方法により合成することができる。具体的には実施例に記載の方法が挙げられる。

[0026]

### 3. 複合体

本発明は、前記複素環式ボロン酸誘導体（「本発明の誘導体」ともいう）に、機能性分子が連結された複合体（コンジュゲート）を提供する。

図2は、本発明の誘導体と機能性分子との結合を示す模式図である。図2において、「R」は機能性分子を表し、丸で囲ったアルファベット「B」は本発明の複素環式ボロン酸誘導体を表す。上パネルは、薬物を担持したポリマーと本発明の誘導体とが1価で結合した態様であり、シアル酸に対する1価ボロンリガンドとして機能する。下パネルは、薬物を担持したポリマーと本発明の誘導体とが多価で結合した態様（ポリマー-薬物コンジュゲート）であり、シアル酸に対する多価ボロンリガンドとして機能する。

[0027]

機能性分子としては、薬物、CT造影剤、MRI造影剤、PETプローブ、蛍光色素プローブ、アミノ酸、核酸、コレステロール誘導体、脂質及びポリマーなどが挙げられ、これらを単独で、又は適宜組み合わせて選択することができる。

これらの機能性分子の種類は特に限定されるものではない。例えば以下のも

のを例示することができる。

#### [0028]

薬物：アモキシシリン、ドキシサイクリン、ゲンタマイシン、バンコマイシン、シプロフロキサシン などの抗癌剤、シスプラチン、ドキソルビシン、エピルビシン、カンプトテシン、エトポシド、ゲムシタビン、シタラビン、ブレオマイシン、イリノテカン、SN-38.

CT造影剤：アミドトリゾ酸、メトリゾ酸、イオタラム酸、イオキサグリック酸

MR I 造影剤：ガドリニウムキレート、マンガンキレート、<sup>19</sup>F 誘導体、酸化鉄ナノ粒子

PETプローブ：放射性同位元素キレート

#### [0029]

蛍光色素プローブ：アクリジン色素、フルオレセイン、シアニン色素、エオシン、カルセイン、ナイルレッド、ナイルブルー、ヨウ化プロピジウム、ローダミン、スルホローダミンB、テキサスレッド

アミノ酸及びペプチド：アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、各種ペプチド（ポリペプチドを含む）

核酸：siRNA、mRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、DNA

コレステロール誘導体：コルチゾール、アルドステロン、ビタミンD

#### [0030]

脂質：アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、アナンダミド、リン脂質、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、リポ多糖類

ポリマー：ポリエチレングリコール、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（グルタミン酸）、ポリ（リシン）、ポリ（アスパラギン酸）、ポリ（オルニチン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（酸）、ポリ（サルコシン）、ポリ（グリセロール）、ポリ（ビニ

ルアルコール)、ポリ (スルホベタイン)

[0031]

本発明の誘導体と機能性分子との結合は、例えば式 I に示す  $R_3$  の置換基を CONH や COOH で置換し、アミド結合、エステル結合等により行うことができる。

[0032]

図 3 は、本発明の誘導体とブロックコポリマーとにより形成されるポリマーミセルであって、ミセルのコア領域に薬物が導入されている態様の模式図である。

上パネルは、疎水性ブロックポリマーと親水性ブロックポリマーとの共重合体に本発明の複合体を結合させた複合体を作製し、これに薬物を導入して自己組織化させるとポリマーミセルが形成することを示している。下パネルは、ブロックコポリマーの疎水性セグメントに予め薬物を導入した上で自己組織化させてミセルを形成させる態様である。

[0033]

図 4 は、本発明の誘導体に脂質が結合した複合体により形成されるリポソームの模式図であり、下パネルには薬物が導入されている態様を示す。

本発明の誘導体は、前記の通り、弱酸性 pH 条件下で SA と高度に特異的な相互作用を示す。腫瘍細胞の環境における pH は弱酸性であり、また腫瘍細胞の表面にはシアル酸が発現していることから、図 2 ～ 4 に示す複合体に担持させる薬剤を例えば抗癌剤とすることにより、これらの複合体は腫瘍細胞上のシアル酸を標的として特异的かつ強力に結合し、抗癌剤を腫瘍細胞特異的にデリバリーすることが可能となる。

[0034]

図 5 及び 6 は、1 個の本発明の誘導体と 1 個の機能性分子とが結合した態様 (1 価 (monovalent) リガンド)、及び 2 個以上の本発明の誘導体と 1 個の機能性分子とが結合した態様 (多価 (multivalent) リガンド) を示す。多価リガンドの場合、本発明の誘導体はデンドリマーの末端に結合するもの、あるいはポリマーの側鎖に結合するものがある (図 5)。本発明においては、本発明の誘導体の数に限定されるものではなく、2 個、3 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、...

99 個、100 個のようにすることができる。後述の実施例では、多価リガンドとして、8 アームのポリエチレングリコールに本発明の誘導体を結合させた例を示した（実施例 3）。

[0035]

また、側鎖に本発明の誘導体を結合したポリマー末端にカチオン性ポリマーを連結すると、アニオン性の核酸などを非共有結合的に静電結合させることができる（いわゆるポリイオンペアリング）。図 6 に示すように本発明の誘導体自体、又は本発明の誘導体に薬物を結合させた複合体は、中性子捕捉療法（BNCT）用組成物として使用することができる。

[0036]

本発明において、多価リガンドを作製する場合は、機能性分子としてポリマーを使用することができ、ポリエチレングリコールであることが好ましい。

ここで、多価リガンドは、一般的にデンドリマーを作製する方法に準じて作製することができる。デンドリマーの合成法としては、例えばダイバージェント法（発散的合成）、コンバージェント法（収束的合成）のほか、クリックケミストリーを利用することができる。市販のポリ（アミドアミン）（PAMAM）を使用することもできる。

このようにして設計された複素環式ボロン酸誘導体は、機能性分子を目的細胞に送達するための担体又はリガンドとして使用される。また、本発明の複合体は、細胞又は組織への機能性分子送達システムとして使用される。

[0037]

本発明の誘導体をリガンドとして用いる場合、酸性条件下で目的物質をシアル酸発現細胞に輸送（結合）させることができる。すなわち、本発明は、所望の目的物質を結合又は担持した本発明の誘導体を、酸性条件下でシアル酸を発現する細胞と接触させることを特徴とする、前記目的物質を当該細胞に輸送、送達又は結合させる方法を提供する。ここで酸性条件とは、pH が 7 未満であることを意味し、弱酸性も含まれる。例えば pH が 6.9 以下、6.5 以下又は 6.0 以下であるが、例えば pH は 3.0～6.9、3.0～6.5、3.0～6.0 の範囲である。また目的物質としては、前記機能性物質が挙げられる。また、「接触」とは、本発明の誘導体が被験細胞と接触できる条件下におくことを意味し、例えば、被験細胞を有

する容器（培養容器、チューブ等）に本発明の誘導体を添加する方法、被験細胞を本発明の誘導体の存在下で培養する方法などが挙げられる。

本発明によれば、本発明の誘導体は抗がん剤などの薬剤を酸性環境に存在するがん細胞などに輸送する方法に用いることができる。

#### [0038]

また、本発明の誘導体に標識物質を結合させることにより、pH 感応性シアル酸発現細胞を検出することができる。すなわち、本発明は、標識物質を結合又は担持した本発明の誘導体を、被験細胞と接触させ、標識物質を検出することを特徴とする、シアル酸発現細胞の検出方法を提供する。「接触」の定義は前記と同様である。

検出手段としては、本明細書に記載の標識物質（例えば前記蛍光色素プローブ）を用いることができる。

#### [0039]

さらに、本発明の誘導体は、pH 依存的に細胞指向性を有するため、使用する誘導体により、シアル酸発現細胞が存在する周囲の pH を検知することもできる。すなわち、本発明は、標識物質を結合又は担持した本発明の誘導体を、被験細胞と接触させ、標識物質を検出することを特徴とする、細胞周囲の pH の検出方法を提供する。例えば、本発明の誘導体としてボロノピコリン酸を使用して細胞に結合させると、その細胞周囲の pH は、がん細胞などの弱酸性環境であると判断することができる。

#### [0040]

##### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

##### [実施例 1]

#### [0041]

##### 複素環式ボロン酸の合成及びシアル酸への選択的結合試験

##### 材料及び方法

3-ピリジルボロン酸(和光純薬工業)、5-ピリミジンボロン酸(和光純薬工業)、6-メトキシピリジン-3-ボロン酸(和光純薬工業)、2-フルオロ-3-ピリミジンボロン酸

(和光純薬工業)、ピラゾール-4-ボロン酸(Sigma-Aldrich)、ピラゾール-5-ボロン酸(Sigma-Aldrich)、5-ボロノピコリン酸(Santa Cruz Biotechnology)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5- トリアジン-2-イル)-4- メチルモルホリニウム塩化物 n-水和物(DMT-MM)(和光純薬工業)及び N-(6-アミノヘキシル)ローダミン 6G-アミドビス(トリフルオロアセテート)(Sigma-Aldrich)はすべて、さらに精製せずに使用した。

[0042]

3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジンは以前に報告された方法で合成した<sup>8c</sup>。糖(N-アセチルノイラミン酸、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース及びキシロース)は全て和光純薬工業から購入し、さらに精製することなく使用した。

[0043]

<sup>1</sup>H 核磁気共鳴(NMR)スペクトルは全て Bruker 500MHz 分光計で取得し、全ての質量スペクトル(高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析: HRESIMS)を収集し、Bruker マイクロ TOF 分光計で分析した。

[0044]

(6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸の合成 (図 11、12)

DMF(30mL)中の 5-ボロノピコリン酸(500mg、3mmol)及びプロピルアミン(200mg、3.1mmol)の溶液に、DMT-MM(1.2g、約 4mmol)を添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去し、粗黄色油状物を 0.1M HCl 水溶液(10 mL/mmol)に溶解し、次いでロータリーエバポレーターで蒸発させた。次いで、得られた淡黄色着色固体をアセトン中で攪拌して、白色結晶性沈殿物(660mg、94%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  8.86 (s, 1H), 8.68 (d, 1H), 8.21 (d, 1H), 3.32 (t, 2H), 1.55 (sext, 2H), 0.84 (t, 3H); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 96 MHz):  $\delta$  171.24, 170.15, 154.45, 149.38, 143.97, 124.25, 44.20, 24.88, 13.53; HRESIMS m/z calculated for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> (M + H<sup>+</sup>) 209.11, found 209.08.

[0045]

3-ボロノ-1-(カルボキシメチル)ピリジンの同定 (図 13)

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  8.83 (d, 1H), 8.79-8.75 (m, 2H), 8.03 (t, 1H), 5.42 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  174.73, 151.21, 149.11, 144.47, 129.09, 112.02, 51.74; HRESIMS m/z calculated for C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>BNO<sub>4</sub><sup>-</sup> (M + OH<sup>-</sup>) 196.09, found 196.09.

## 5-ボロノピコリン酸のローダミンコンジュゲート化 (図 14-16)

DMF(10mL)中の 5-ボロノピコリン酸(15mg、90 $\mu$ mol)及び N-(6-アミノヘキシル)ローダミンの 6G-アミドビス(トリフルオロアセテート)(50mg、70 $\mu$ mol)に DMT-MM(30mg、約 100 $\mu$ mol)及びトリエチルアミン(10mg、100 $\mu$ mol)を加えた。混合物を室温で 3 時間攪拌した。溶媒を除去し、粗生成物をクロロホルムに分散させ、ブラインで数回洗浄した。有機層を蒸発させ、真空中で乾燥させて赤色固体(55mg、89%)を得た。

$^1\text{H}$  NMR (MeOD 400 MHz):  $\delta$  8.74 (s, 1H),  $\delta$  8.03 (d, 1H),  $\delta$  7.92 (d, 1H),  $\delta$  7.89 (t, 1H),  $\delta$  7.55 (t, 2H),  $\delta$  7.07 (t, 1H),  $\delta$  6.23 (s, 2H),  $\delta$  6.03 (s, 2H),  $\delta$  3.11 (t, 4H),  $\delta$  1.95 (s, 6H),  $\delta$  1.26 (t, 8H),  $\delta$  1.10 (s, 6H); HRESIMS  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{BN}_7\text{O}_5^+$  ( $\text{M} + \text{NH}_4 + \text{CH}_3\text{CN}$ ) $^+$  720.40, found 720.43.

修飾体の収率は、ピーク面積積分比に基づいて 84%と計算された: 23-24 チャート上の対比 1-4。

[0046]

ホウ素核磁気共鳴( $^{11}\text{B}$  NMR)

NMR 用の試料溶液は、糖及びボロン酸化合物の両方を脱イオン蒸留水に室温で攪拌しながら溶解させることにより調製した。各化合物の濃度は、特に明記しない限り 20mM であった。溶液の pH は、塩酸及びナトリウムのヒドロキシドで調整した。溶液を調製した直後に NMR スペクトルを記録した。 $\text{B}^{11}$  NMR スペクトルは、96MHz で JEOL EX 300 分光計で収集し、その化学シフトは三フッ化ホウ素-ジエチルエーテレート(0 ppm)の化学シフトを基準とした。測定は、ガラス中に混入されたホウ素不純物によるノイズの出現を避けるために、ポリテトラフルオロエチレン製のチューブ中で行った。データは、Delta NMR Processing and control software、バージョン 5.0.4.4 を用いて処理した。

[0047]

$^{11}\text{B}$  NMR は一般に、観察された化学シフトがホウ素核のハイブリダイゼーション状態、すなわち三角形 (trigonal) 又は四面体 (tetrahedral) に感受性であるボロン酸-ジオール相互作用を解明するために使用される。(Duin, M. V.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P.G.; Bekkum, H. V. *Tetrahedron* 1984, 40, 2901/Berg, R. V.D.; Peters, J.

A.;Bekkum, H. V. Carbohydr. Res. 1994, 253, 1)

[0048]

典型的には四面体状態又はボロネートが約 0ppm で化学シフトを示し、一方、三方状態(ボロン酸)は有意なダウンフィールド共鳴(significant downfield resonance)を生じる。結合標的の非存在下では 2 つのハイブリダイゼーション状態間の急速な相互変換のために、所定の pH における 2 つの状態の比に対応する場に 1 つのシグナルのみが現れ、その結果、化学シフトは目的のボロン酸の pKa 値の範囲にわたる pH の減少を伴うダウンフィールドシフトを受ける。ジオールと錯体を形成させると、自由状態と錯体状態との間の交換速度は  $^{11}\text{B}$  NMR 時間スケールに対して遅いので、スペクトルは 2 つのピークからなる。遊離ボロン酸/ボロン酸塩のピークは化学シフトが上記と同様の pH 低下を伴うダウンフィールドシフトを示し、より高い電界(0ppm 付近)で錯体に起因するピークを示す。一連の pH のスペクトル上の各ピークに、元素の割り当てを行った。必要に応じて、重複したピークを、上記のソフトウェアを用いた分析の前にデコンボリューションを行った。

[0049]

安定性定数は錯体及び遊離状態に割り当てられたピーク面積を積分し、それらを以下の式に当てはめることによって計算した(ここで、糖及びホウ素酸の初期濃度は同一(すなわち、20mM)であるため、全ての値が既知である。)

[数 1]

$$K_{\text{Stability}} = \frac{[\text{BA:Diol}_{\text{complex}}]}{[\text{BA}_{\text{Free}}][\text{Diol}_{\text{Free}}]}$$

[0050]

文献レベルで pKa 値を入手できなかった、図 7 に提示されたいくつかの誘導体(5-ピリミジンボロン酸、ピラゾール-5-ボロン酸及び 5-ボロノピコリン酸)について、 $^{11}\text{B}$  NMR 滴定を行った。

すなわち、種々の pH についてケミカルシフトの各重心値をプロットして滴定曲線を求め、その変曲点を pKa とした(表 1)。

[0051]

表1は、種々の pKa を有する一連のボロン酸誘導体に対する SA 結合の安定性定数(pH6)の比較であり、 $^{11}\text{B}$  NMR により測定した結果を示す。

[表1]

| Boronic Acid                                              | Boronic Stability     |        |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------|--------|
|                                                           | Acid Constants<br>pKa | @ pH 6 |
| 5-Boronopicolinic acid                                    | 4.2                   | 645    |
| (6-Propylcarbamoyl)pyridine-3-boronic acid                | 4.2                   | 499    |
| 3-Pyridyl boronic acid                                    | 4.4                   | 182    |
| 3-Borono-1-(carboxymethyl)pyridine                        | 4.4                   | 61     |
| 5-Pyrimidine boronic Acid                                 | 6.2                   | 490    |
| 2-Fluoro-3-pyridyl boronic acid                           | 6.3                   | 419    |
| Pyrazole-5-boronic acid                                   | 6.65                  | 358    |
| 4-(2-acrylamidoethylcarbamoyl)-3-fluorophenylboronic acid | 7.2                   | 100    |
| 6-Methoxypyridin-3-boronic acid                           | 7.99                  | 34     |
| 3-Propionamidophenylboronic acid                          | 8.3                   | 40     |

[0052]

ARS アッセイ。

アリザリンレッド S(ARS)(和光純薬工業)を購入し、そのまま使用した。結合実験に使用した水を二重蒸留し、Milli-Q 濾過システムでさらに精製した。蛍光光度計(Tecan Microplate Reader: Tecan infinite 200)を全ての蛍光及び吸光度試験に使用し、96 ウェルプレート形式で行った(図 32)。方法及びデータ分析は特に明記しない限り、Springsteen 及び Wang<sup>9a</sup> によって概説されたとおりに行った。

[0053]

In vitro アッセイ。

ヒト膀胱癌上皮細胞(PANC1)をアッセイに用いた。 $2.5 \times 10^5$  細胞/ml を Iwaki 35mm ガラスベースプレート上に播き、37°Cで 48 時間インキュベートした。実験は、pH7.4、生理的 pH、及び腫瘍内部で見出される最も低い pH である pH6.5で行った。細胞は、最初に 10mg/ml の Hoechst(PromoCell GmbH)で染色し、次い

で、室温でプレート当たり 200 $\mu$ g/ml の各々のボロン酸と共に 20 分間インキュベートし、最後に、プレート当たり 100 $\mu$ g/ml の Fluorescein 標識 Sambucus Nigra(SNA, EBL)レクチン(Vector Laboratories, Inc.)を用いて 25 分間、4°C で染色した。対照のプレートは、Hoechst 及び SNA-レクチンのみで染色した。

[0054]

最後に、共焦点レーザー走査顕微鏡及び imageJ ソフトウェアを用いて蛍光強度を測定し、計算した。5-ボロノピコリン酸のローダミンコンジュゲートを用いた特異性試験は以下のように行った。

[0055]

2.0 $\times 10^4$  細胞/200 $\mu$ l を、Chambered #1.0 Brosilicate Coverglass system (Thermo Scientific)上に播いた。細胞を 48 時間インキュベートし、次いで Hoechst で染色した。洗浄後、培地を PBS (pH6.5 及び pH7.4; 190 $\mu$ l)に置き換えた。次いで、細胞を、DMSO(200 $\mu$ g/ml)に溶解した 10 $\mu$ l のローダミンコンジュゲートと共に、4°C で 15 分間インキュベートした。細胞を再び PBS (pH 6.5 及び pH 7.4)で洗浄した後、画像化した。

[0056]

陰性対照試験は、細胞を 1 $\mu$ l のシアリダーゼ(*Clostridium perfringens* 由来のノイラミニダーゼ(1U/50 $\mu$ l 25mM Tris 緩衝液 pH7.5); Roche Diagnostics GmbH)と共に 37°Cで 40 分間インキュベートすることによって実施した。次いで、細胞を洗浄し、Hoechst で染色し、最後にローダミンコンジュゲートと共にインキュベートし、上記と同様に分析した。

[0057]

グリカンアレイ。

グリカンアレイ実験は、住友ベークライト(株)の製品 BS-X 1733Z(タイプ I:28 グリカン)を用いて、商業的分析サービスを利用した。各ウェルに固定化された 28 の異なるグリカンの構造の詳細を、図 38 に示す。ビオチン化 Sambucus Nigra(SNA, EBL)レクチン (Vector Laboratories, Inc.) 及びビオチン化 Wheat Germ Agglutinin(WGA)レクチン(Vector Laboratories, Inc.)を、市販の標識キット (HiLyte FluorTM 555 Labeling Kit-NH2 (Dojindo Molecular Technology, Inc.)) を用いて、Cy3 標識ストレプトアビジン(Sigma-Aldrich)とコンジュゲートさせた。

[0058]

特異性試験については、 $1\mu\text{g/mL}$  の Cy3 標識 SNA レクチン及び  $100\mu\text{g/mL}$  の Cy3 標識 WGA レクチンをアレイに適用し、比較した(図 39)。競合アッセイについては、最初に、ウェルを、 $4\text{mM}$  5-ボロノピコリン酸を含む及び含まない  $70\mu\text{L}$  PBS 溶液( $\text{pH}7.4$  又は  $6.5$  のいずれかに調整)を用い、室温で 20 分間、平衡化した。その後、各ウェルの半分( $35\mu\text{L}$ )容量を、 $100\text{ng/mL}$  の Cy3 標識 SNA を含む同容量溶液で交換した。反応物を室温で 90 分間放置し、エバネッセント光スキャナー装置(BIO-REX SCAN 200(Rexxam Co., Ltd.))を用いて光学分析を行った(図 40)。

[0059]

## 2. 結果と考察

ボロン酸は、シアル酸 ( $\text{SA}^{3,4,7}$  を含む糖<sup>6</sup> と可逆的に共有結合の相互作用を示す化合物である。本発明者は、複素環式ボロン酸誘導体が、弱酸性 pH 条件下で SA と高度に特異的な相互作用を示し、腫瘍部位に関与することを見出した。この相互作用は pH 依存性であり、pH が低下すると、SA と誘導体との間の相互作用が有意に増加し、従来知られている結合定数よりも数桁高い結合定数を生じた。

[0060]

最近、ピリジン構造に基づくボロン酸の複素環式クラスについて、いくつかの報告がある<sup>8</sup>。これらの化合物の多くを、 $\text{B}^{11}$  NMR によってそれらの糖結合活性についてスクリーニングする一方で、興味深く、そして本発明者の知る限りではこれまで記載されていなかったが、pH 依存性の SA との相互作用が認められた。pH が低下するにつれて、SA と本発明の誘導体との間の相互作用は有意に増加し、以前に報告されたものより数桁高い結合定数を生じた(図 7)。

[0061]

SA とメタアミド置換フェニルボロン酸(図 7F)との間の結合定数は上述の治療及び診断応用<sup>3,4d-g</sup>のための効率的な SA バインダーであることが証明されたゴールドスタンダード構造であり、最大で  $40\text{M}^{-1}$  であったのに対し<sup>7c</sup>、図 7 に示された誘導体のいくつかは、これまでに報告された最高レベルの  $1000\text{M}^{-1}$  をはるかに超える値を示している。また、4-(メチルスルホニル)ベンゼンボロン酸(図 7G)は、文献にて報告されている全ての構造の中で、従来、最も強い SA 相互作用を

有する構造として知られていたものである (図 27 も参照)。しかし、4-(メチルスルホニル)ベンゼンボロン酸による相互作用の程度は、本発明の複素環誘導体について観察されたもの(図 7A-D)よりもはるかに低く、さらには、本発明の複素環式誘導体のように酸性化依存性の SA 相互作用の増大(図 7A-D)は認められなかった。

#### [0062]

SA との相互作用の前例のないレベルを示すこの特別なクラスの誘導体の同定に続いて、本発明者らはさらに、これらの化合物が、生物学的サンプルにおいて一般的に見出される他のグリカンに存在する糖と、一連の pH 条件下でどのように相互作用するかを調べた(図 8)。

これらの糖との相互作用は、他の十分に立証されたタイプの(フェニル)ボロン酸について観察されたものに典型的であることが明らかになった。すなわち、本発明の誘導体は、従来十分に検証されているフェニルボロン酸に観察された相互作用と同じであり、シアル酸以外の糖との結合においては、その pH 依存性が「右上がり」となることが分かった。また、ボロン酸-糖の相互作用は平衡反応であるが、PH 条件によりその平衡がどちらか (フリー又はコンプレックス) に偏っていた<sup>7f</sup>。

#### [0063]

結果として、本発明の複素環式ボロン酸は、酸性条件下で SA に対して高度に選択的であり、生物学的サンプル中に存在する他の一般的な糖からの干渉はほとんど受けないと考えられる。しかし、通常の生理学的条件下では、SA の結合は大幅に減少した。これらの相互作用のいくつかを、アリザリンレッド S(ARS)<sup>9</sup> を用いる色素置換検定によっても評価した。その結果、ボロン NMR による評価及び ARS アッセイの 2 つの独立した方法の間の pH 依存性の量及び傾向の両方において良好な一致を確認した(図 32-37)。

#### [0064]

この独特の挙動を考慮して、本発明の誘導体をコンジュゲート (複合体化) する方法を検討した結果、本発明の誘導体は医学的適用(例えば、ポリマーコンジュゲーションを介して)に対するそれらの適合性について評価できるものであり、そしてまた、観察された相互作用のメカニズムを解明し得るものである。

## [0065]

調べたすべての化合物の中で、最も成功した構造は 5-ボロノピコリン酸(図 7C)とそのプロピルアミン共役((6-プロピルカルバモイル)ピリジン-3-ボロン酸(図 7D)であることがわかった。コンジュゲートは親化合物の高結合定数を維持し、pH6.5 でほとんど変化しないままであることが見出され(図 7C 及び D)、これは、上記のような腫瘍微小環境に関連する。したがって、本発明の誘導体の構造は、薬物及びポリマーとコンジュゲートさせるための合理的な候補となるものであり、さらなる化学的改良を行う余地を提供する。さらに、本発明の誘導体に関する一連の研究により、相互作用が起こるメカニズムを明らかにすることができた。

## [0066]

従って、 $B^{11}$  NMR によって確認されるように、観察される相互作用は常にボロン酸(又はボロン酸)-エステル形成を含み、各ボロン酸 pKa と SA 結合強度との間には緩い相関関係がある(表 1)。しかしながら、以前に得られた結果は、化合物中の窒素種が複合体の安定化において重要な役割を果たさなければならないことを示唆している<sup>7c,f,10</sup>。実際、N-置換 3-ピリジルボロン酸は、この置換がボロン酸塩自身に無視できるほどの電子的影響、すなわち pKa の変化を引き起こさないにもかかわらず<sup>8a</sup>、その親構造(図 7A)と比較して SA 結合強度の劇的な低下(図 7E)を示した。

## [0067]

本発明者らは、これらのボロン酸塩-SA 相互作用は、塩濃度が 600mM に達するほど過剰に増加しても妨害されないことを見出した(図 24 及び 25)。したがって、結合の安定性の増大は芳香族窒素と SA カルボキシル基との間の水素結合(静電相互作用ではない)によるものであると仮定し、2つの基の間の立体的に妨害された接近性は、上記の知見を説明することができる(図 7E)。また、5-ボロノピコリン酸と、転移性腫瘍細胞に関与する誘導体である N-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)のメチルのエステルの誘導体との相互作用を調べた(図 28 及び 29)<sup>2d-f</sup>。

## [0068]

SA カルボキシル基をもはや利用できない 5-ボロノピコリン酸の場合、結合安定性は劇的に減少したが、構造中に依然として利用可能なカルボキシル基を有す

る Neu5Gc の場合では、依然として Neu5Ac で観察されたものに匹敵するボロネート結合安定性が明らかになった。さらに、本発明者らは SA のオリゴマー(三量体及び五量体)にわたって相互作用が優勢であることを確認し、興味深いことに、結合強度は SA 繰り返し単位の数とは無関係であり(図 30 及び 31)、立体的に制限されないカルボキシル基を有する末端 SA が主に健全な相互作用に関与することを示唆した。

[0069]

図 7 及び 8 で得られた異常な pH 依存性 SA 結合プロフィールについては疑問が残る。各ボロン酸 pKa より明らかに低い酸性 pH 値における SA 結合安定性の増加はボロン酸のいくらかの画分(ボロン酸塩とは対照的に)も複合体に関与し、これは観察された B11 NMR 化学シフト(図 17-27)及び以前の報告と一致すると思われる。

[0070]

これらのプロフィールは電荷平衡機構(「電荷規則」)、すなわち、錯体と遊離状態種との間の電荷の合計(「平衡」)を、系中の所与の pH についての各々の存在量の決定因子として考慮する理論に関して解釈され得る<sup>11</sup>。実際、ボロン酸(ボロン酸とは対照的に)が錯体に関与する場合、この理論は図 7 及び 8 の場合のように、ボロン酸 pKa より低い pH での錯体の最大集団の発生を予測する。

[0071]

ボロン酸(又はボロン酸塩)と SA との間の立体因子も、それらの多部位結合性のために、この関係を完全に説明するように考慮されなければならない。しかし、包括的なメカニズムは依然として解明されていない。我々の知見を医学的応用のための有意性に転換するために、次に、我々は、単糖レベル認識を超えて、5-ボロノピコリン酸がシアリル化複合糖質と結合する能力を評価した。この目的のために、ヒト膵臓類上皮癌細胞(PANC1)を SA に富む腫瘍標的のモデルとして利用した(図 9)。

[0072]

5-ボロノピコリン酸の SA 結合能を、SA 特異的サンブカス・ニグラ(*Sambucus Nigra*)(SNA)レクチンと競合して、多くの報告において有効な SA 結合剤として以前に検証された 3-プロピオンアミドフェニルボロン酸<sup>3,4d-h</sup>の結合能と比較し

た(図 9、38-40)。

[0073]

ボロン酸の非存在下では、細胞表面はレクチンで十分に染色される(図 9A、PBS、赤色)。しかし、細胞がこれらの誘導体と共に予備インキュベートされる場合、恐らくそれらの SA ブロッキング作用のために、pH7.4 での 2 つの誘導体間により小さくかつ類似した程度まで(図 9B)、及び pH6.5、すなわち腫瘍内 pH で 5-ボロノピコリン酸で処理される場合、より大きな程度まで、着色は劇的に弱められる(図 9C)。弱酸性条件下での 5-ボロノピコリン酸による増強された SA 遮断効果は、図 7 及び 8 に示される結果と一致する。

[0074]

この競合的ブロッキングアッセイは種々の分子的に規定されたグリカン構造(図 40)をインストールしたグリカンアレイフォーマットでさえも再現可能であり、さらに、ボロン酸塩化合物が生物学的に関連するシアリル化グリココンジュゲートと結合できることを、単糖類濃度の識別を超えて証明した。より直接的なエビデンスのために、5-ボロノピコリン酸のローダミン修飾版も調製し、レクチンを使用せずに細胞染色に対するその能力を試験した。

[0075]

図 10 から明らかなように、シアリダーゼで処置した場合、著しく pH 依存性で劇的なサイレンシング挙動が達成され、SA 特異性についての直接的な証拠が提供される。総合すると、これらの知見は、全ての関連する腫瘍標的化及び診断適用における改善された結果を得るために有用である。

[0076]

注目すべきことに、本発明者らは以前に、腫瘍特異的化学療法を得るための経路として、抗癌剤を封入する高分子ミセルをインストールした 3-プロピオンアミドフェニルボロン酸(SA に対するリガンドとして)を報告した<sup>4c</sup>。メラノーマの同所性及び肺転移モデルの両方の成長速度を(非リガンド対照と比較して)効果的に低下させることを達成する一方で、本発明者らはまた、静脈内注射されたミセルが対照(リガンドなし)系と顕著な類似性を伴って、長期の血液循環を保持し、これは、ミセルと、血管系における赤血球及び内皮細胞との相互作用の低下を示すことも観察した。

[0077]

相互作用の減少は血漿中のグルコースによる干渉(～pH7.4)に起因し、正常なグルコースレベルは～5mM であり、一方、赤血球中の SA の濃度は～0.2  $\mu$ M(20nmol/10<sup>9</sup>細胞)であった。腫瘍に入ると、グルコース濃度は、拡散及び癌細胞における乳酸への持続的な代謝のために減少する。さらに、この嫌氣的解糖の代謝産物は腫瘍内腔の酸性化(約 pH6.5)を引き起こし<sup>5</sup>、グルコースの結合定数を減少させ、逆に SA の結合定数を増加させる。

[0078]

したがって、ボロネートと糖との間のこのような可逆的かつ pH 依存的な結合の性質のために、血液循環中の他の競合糖(主にグルコース)は、ある種の適用については関心事ではないかもしれない。このことを念頭に置いて、複素環式のボロン酸のクラスで本明細書に明らかにされた糖結合のパターンは、興味深い意味合いを提供するはずである。

[0079]

#### 結論

レクチンと比較して比較的「弱い」が可逆的な濃度依存性分子認識ボロン酸ケミストリーは、バイオアプリケーションツールの特殊な部類である。このような動的な相互作用モードは、連続的なモニタリング、及び生体分子の時間的、可逆的、及び振動的挙動が関心事である、環境に敏感で生体相互作用の応用などの他の困難な課題に対処することができる。本発明では、複素環式ボロン酸誘導体が以前に報告されたものよりも数桁高い結合定数で、SA 特異的な相互作用を呈することを見出した。特筆すべきことに、これらの誘導体の結合強度及び SA 特異性の両者は、弱酸性 pH 条件下で、腫瘍性微小環境に密接に関連する範囲で強化される。この特性はまた、健康な部位における他のグリカンエピトープとの非特異的相互作用を予防するのに役立つはずである。本発明の誘導体、なかでも 5-ボロノピコリン酸の使用は、十分に保存された SA 結合能を有するさらなる化学結合に適していることが判明した。

[0080]

In vitro アッセイは単糖レベルの認識を超えて、生物学的に適切なシアリル化複合糖質と結合するその能力を実証し、SA 特異性の確かな証拠を提供した。また、

優れた水溶性がこれらの誘導体で一般に見出され、それは、さもなければ(例えば、フェニルボロン酸)しばしば、医療用途の範囲を制限する問題であることにも言及する価値がある<sup>7a,b</sup>。

[0081]

まとめると、本発明において得られた知見は、腫瘍特異的化学療法及び診断を達成することを目的とした、現在進行中の多くのボロン酸化学法の魅力的な代替法を提供することが可能である。

[実施例 2]

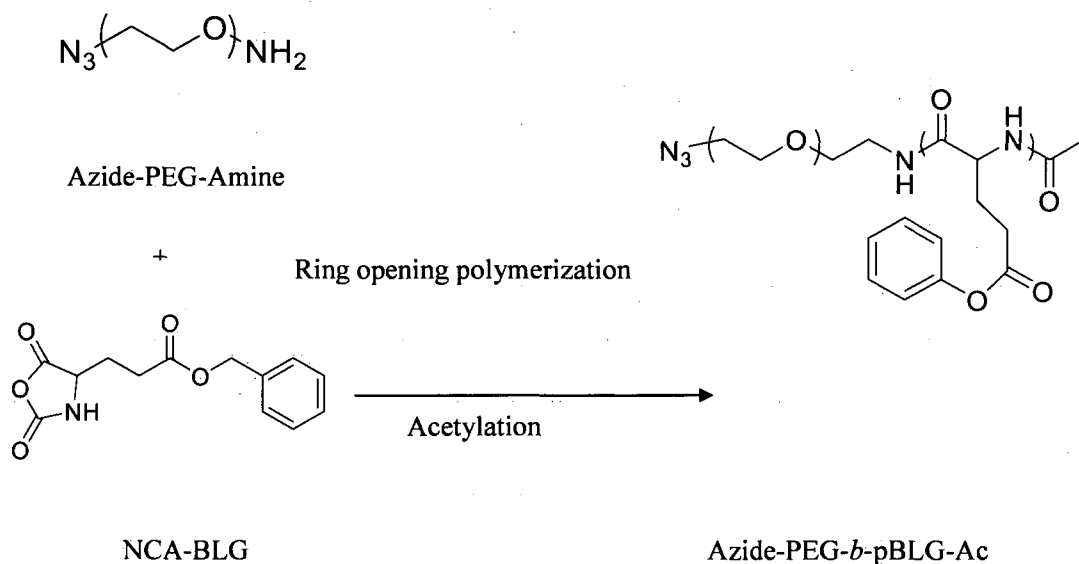
[0082]

1) Azide-PEG-b-pBLG の合成

Azide-PEG-b-pBLG は既報 [7] に従い合成した。γ-benzyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride 重合 (BLG-NCA 重合) は Azide-PEG-NH<sub>2</sub> を開始剤とし、乾燥 DMF 中で行った (スキーム 1)。

スキーム 1 :

[化 5]



[0083]

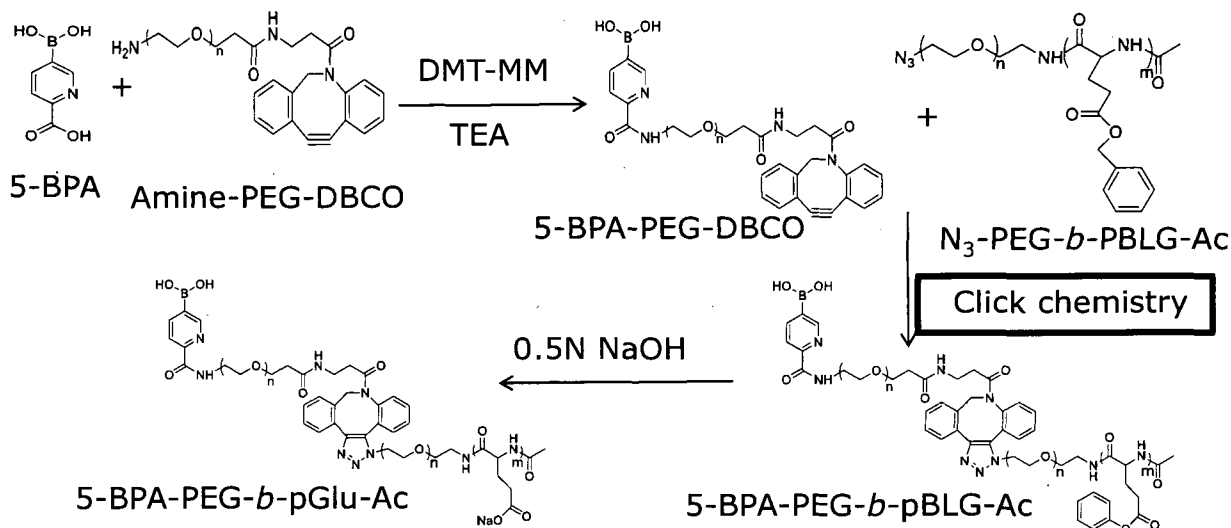
2) 5-BPA-PEG-b-poly(glutamic acid)-Ac (5-BPA-PEG-b-P(Glu)-Ac)の合成

$N_3$ -PEG-*b*-pBLG-Ac に対して 10 当量の 5-Boronopicolinic acid (5-BPA) を 10 当量の DMT-MM によって DMF 中で活性化し、5 当量の DBCO-PEG-NH<sub>2</sub> を加えて TEA とともに終夜撹拌することで 5-BPA-PEG-DBCO を作製した(スキーム 2)。反応溶液に 1 当量の  $N_3$ -PEG-*b*-pBLG-Ac を添加して 24 時間撹拌した。反応溶液をイオン交換水中で透析することによって精製し、凍結乾燥することによって 5-BPA-PEG-*b*-PBLG-Ac を得た。5-BPA-PEG-*b*-PBLG-Ac を 0.5 規定水酸化ナトリウム水溶液で撹拌することによって Bz 基を脱保護し、透析後に凍結乾燥することによって 5-BPA-PEG-*b*-poly(glutamic acid)-Ac (5-BPA-PEG-*b*-P(Glu)-Ac) を得た。<sup>1</sup>H-NMR 測定によって反応の有意な進行を確認した (スキーム 2、図 41)。

[0084]

スキーム 2 :

[化 6]



[0085]

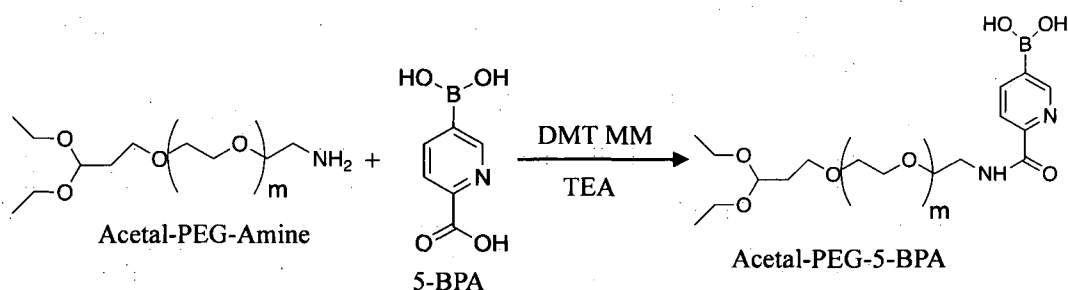
### 3) Acetal-PEG-5-BPA の合成

Acetal-PEG-Amine に対してそれぞれ 2 当量の 5-Boronopicolinic acid (5-BPA) と DMT-MM を DMF 中で TEA とともに終夜撹拌した(スキーム 3)。反応溶液をイオン交換水中にて透析し、凍結乾燥することによって Acetal-PEG-5-BPA を得た。(NMR: 図 42)

[0086]

スキーム 3 :

[化 7]



[ 0 0 8 7 ]

## 4) Acetal-PEG-5-BPA の結合定数の測定

5-BPA とシアル酸間の相互作用強度をアリザリンレッド法にて算出した[5,6]。

実験1) アリザリンレッド(ARS)水溶液9 (μM)を、5-BPA水溶液(2 mM)をそれぞれ調製した (図43)。

[ 0 0 8 8 ]

## 5) 5-BPA-installed Cisplatin (CDDP)-loaded micellesの作製

CDDP封入ミセルを既報[7]に従って作製した(図44)。CDDP(5.556 mM) を超純水に溶解して50 °Cで攪拌し、0.22 μm 経のフィルターでろ過精製を行った。ここに5-BPA-PEG-Azide-PEG-b-pGlu (final Glu conc. =5mM)を添加し、37°Cで120時間攪拌した。反応溶液を分子量分画100000の透析膜を用いて透析することで、CDDP封入ミセル(5-BPA-CDDP/m)溶液を調整した(図44)。

[ 0 0 8 9 ]

## 6) Micelle Characterization

作製した 5-BPA-CDDP/m の粒径分布を DLS 測定装置にて測定した(Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a He-Ne ion laser (at wave length 532 nm) with detection angle equal to 90° at 37 °C)。CDDP 封入率については inductively couple plasma mass spectrometry (ICP-MS: [Agilent Technologies, California, USA); RF power: 1200 W; peripump:0.16 rps; monitoring mass: m/z 195 (Pt); integrating interval; 0.1 sec; sampling period:0.3 sec])にて評価した。

[ 0 0 9 0 ]

## 7) In-vitro cellular uptake evaluation

B16F10 を 8 Chambered # 1.0 Borosilicate Cover glass system (Lab Tek) 上に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種した(培地: DMEM media containing 10% FBS and 1% Penicillin)。高分子ミセルの細胞への取り込み挙動について、Alexa 647 修飾 MeO ミセル、PBA ミセル、5-BPA ミセルを調製し、1 時間後と 6 時間後の細胞中における蛍光強度を定量することによって評価した。また、比較対象群として、細胞表面のシアル酸を除去するために  $1\mu\text{L}$  のシアリターゼ添加群でも同様に試験を行った。評価の際、Hoechst を用いて核染色を行い、その後共焦点顕微鏡にて評価を行った (図 45-48)。

[0091]

8) シアル酸過剰発現 B16F10 細胞株に対する蛍光標識ミセルの取り込み挙動は共焦点顕微鏡を用いて評価した。蛍光標識ミセルの作製手法は Alexa Fluor 647 carboxylic acid succinimidyl ester を MeO-PEG-b-pGlu. の  $\omega$ -アミノ酸に対して付加した。この蛍光標識ポリマーを種々のミセル調製の際に任意の割合で混ぜることにより、蛍光ミセルを作製した。

[0092]

## 9) 結果

本発明のボロン酸誘導体をシアル酸リガンドとして搭載した高分子ミセルを調製し、そのシアル酸特異的な細胞取り込み能の向上を実 in vitro で証明した。

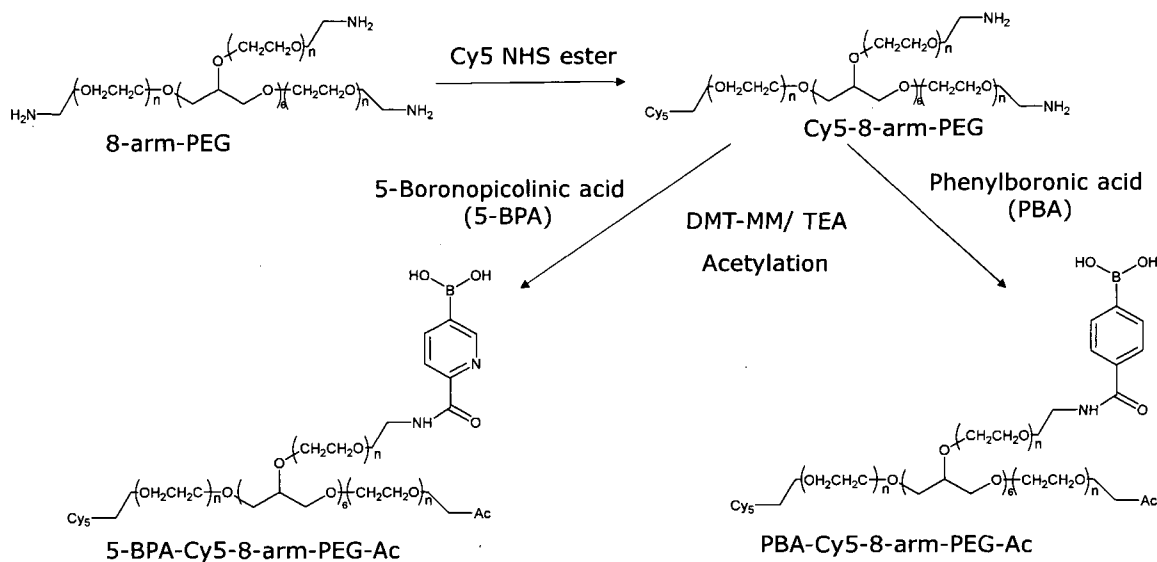
## [実施例 3]

[0093]

## 1) ボロンコンジュゲート 8-arm-PEG の合成

8-arm-PEG は以下のスキームに従って合成した。

[化 8]



[0094]

合成されたボロンコンジュゲート 8-arm-PEG の NMR スペクトルを図 49 に示す。

[0095]

## 2) ボロンコンジュゲート 8-arm-PEG

マウス結腸がん細胞株 C26 に対する Cy5 標識を行った 5-BPA、及び PBA 修飾 8-arm-PEG の取り込み挙動を評価した。8-arm-PEG のアミンに対して 10 当量の NHS-OH と EDC、TEA を DMF 中で室温、35 時間反応させた。未反応の蛍光試薬を透析にて除去した後、凍結乾燥することで個体を得た。得られた高分子と 10 当量の DMT-MM、5-Boronopicolinic acid、3-carboxy phenylboronic acid を DMF 中で一晩反応させ、透析、凍結乾燥によって Boron conjugated 8-arm-PEG を得た。

[0096]

## 3) ボロンコンジュゲート 8-arm-PEG の In vitro での細胞内取込み

C26 を 8 Chambered # 1.0 Borosilicate Cover glass system (Lab Tek)上に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種した(培地: DMEM media containing 10% FBS and 1% Penicillin)。培地を低グルコース培地に変え、種々の pH(pH= 6.5 及び 7.4)に調節した条件で boron conjugated fluorescent 8-arm-PEG を添加し、1 時間後に共焦点顕微鏡にて像観察を行った。

[0097]

## 4) ボロンコンジュゲート 8-arm-PEG の腫瘍内蓄積及びバイオ分布

皮下 C-26 腫瘍モデルを有する Balb/c マウスを調製した。次に、マウスを 2 つの群 (群 n = 4) に分け、Cy5 修飾 5-BPA 及び PBA 修飾 8-arm-PEG をマウスに投与した。24 時間後、インビボイメージングシステム (励起光 : 640nm; 放射光 : 720nm; 曝露時間 : 3 秒) によって生体内での腫瘍を画像化した。次に、マウスの尾部より血液を回収することで各種ミセルの血液滞留時間を評価した。

[0098]

5) 結果を図 50-53 に示す。

本発明のボロン酸誘導体をシアル酸リガンドとして搭載した 8-arm-PEG システムにおいて、*in vitro* でのシアル酸特異的な細胞取り込み能の向上、ならびに、*in vivo* におけるがん集積性の向上を証明した。

[0099]

#### 参考文献

- 1 (a) A. Varki and J. B. Lowe, Biological Roles of Glycans, in Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009;
- (b) A. Varki, Trends Mol. Med., 2008, 14(8), 351;
- (c) R. Schauer, Zool., 2004, 107(1), 49;
- (d) M. Fukuda, Cancer Res., 1996, 56, 2237;
- (e) C. R. Bertozzi and L. L. Kiessling, Science, 2001, 291, 2357;
- (f) R. Raman, S. Raguram, G. Venkataraman, J. C. Paulson and R. Sasisekharan, Nat. Methods, 2005, 2, 817;
- (g) J. E. Scott, Conn's Biological Stains. A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, J. Anat., 2003, 203(4), 433.
- 2 (a) S. Hakomori, Cancer Res., 1996, 56, 5309;
- (b) D. H. Dube and C. R. Bertozzi, Nat. Rev. Drug Discovery, 2006, 4, 477;
- (c) Y. Xu, A. Sette, J. Sidney, S. J. Gendler and A. Franco, Immunol. Cell Biol., 2005, 83, 440;
- (d) L. Daniel, J. Trouillas, W. Renaud, P. Chevallier, J. Gouvernet, G. Rougon and D. Figarella-Branger, Cancer Res., 2000, 60, 80;
- (e) L. Daniel, P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon and D. Figarella-Branger, Oncogene, 2001, 20, 997;

- (f) S. M. Elkashef, S. J. Allison, M. Sadiq, H. A. Basheer, G. R. Morais, P. M. Loadman, K. Pors and R. A. Falconer, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33026.
- 3 (a) A. Matsumoto, N. Sato, K. Kataoka and Y. Miyahara, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 12022;
- (b) A. Matsumoto, H. Cabral, N. Sato, K. Kataoka and Y. Miyahara, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 5494.
- 4 (a) G. Lemieux, K. J. Yarema, C. L. Jacobs and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 4278;
- (b) L. K. Mhal, N. W. Charter, K. Angata, M. Fukuda, D. E. Koshland Jr and C. R. A. Bertozzi, *Science*, 2001, 294, 380;
- (c) J. Frullano, J. S. Rohovec, T. Aime, T. Maschmeyer, M. I. Prata, J. J. P. D. Lima, C. F. G. C. Geraldies and J. A. Peters, *Chem.–Eur. J.*, 2004, 10, 5205;
- (d) K. Djanashvili, G. A. Koning, A. J. G. M. van der Meer, H. T. Wolterbeek and J. A. Peters, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2007, 2, 35;
- (e) S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 15501;
- (f) A. Liu, S. Peng, J. C. Soo, M. Kuang, P. Chen and H. Duan, *Anal. Chem.*, 2010, 83, 1124;
- (g) S. G. Crich, D. Alberti, I. Szabo, S. Aime and K. Djanashvili, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, 52, 1161;
- (h) A. Matsumoto, K. Kataoka and Y. Miyahara, *Polym. J.*, 2014, 46, 483.
- 5 (a) V. Estrella, T. A. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H. H. Cornnell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J. M. Rothberg, B. F. Sloane, J. Johnson, R. A. Gatenby and R. J. Gillies, *Cancer Res.*, 2013, 73(5), 1524;
- (b) Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda and Y. Baba, *Cancer Cell Int.*, 2013, 13, 89;
- (c) R. A. Gatenby and R. J. Gillies, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4(11), 891.
- 6 (a) J. P. Lorand and J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, 1959, 24, 769;
- (b) A. B. Foster, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1957, 12, 81;

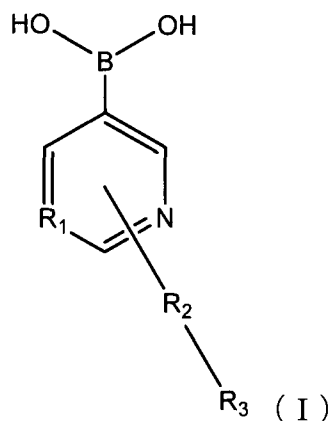
- (c) J. Boeseken, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1949, 4, 189;
- (d) S. Aronoff, T. C. Chen and M. Cheveldayoff, *Carbohydr. Res.*, 1975, 40, 299;
- (e) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake and S. Shinkai, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1996, 35(17), 1910;
- (f) R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James and J. S. Fossey, *Chem. Commun.*, 2011, 47(4), 1106;
- (g) C. Lu, H. Li, H. Wang and Z. Liu, *Anal. Chem.*, 2013, 85(4), 2361.
- 7 (a) M. Takeuchi, M. Yamamoto and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, 1997, 1731;
- (b) M. Yamamoto, M. Takeuchi and S. Shinkai, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3125;
- (c) H. Otsuka, E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 3493;
- (d) K. Djanashvili, L. Frullano and J. A. Peters, *Chem.–Eur. J.*, 2005, 11, 4010;
- (e) D. G. Hall, *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis, medicine and materials*, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd completely rev edn, 2011;
- (f) J. A. Peters, *Coord. Chem. Rev.*, 2014, 268, 1;
- (g) E. Uchimura, H. Otsuka, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 72, 307.
- 8 (a) S. Iwatsuki, Y. Kanamitsu, H. Ohara, E. Watanabe and K. Ishihara, *J. Phys. Org. Chem.*, 2012, 25(9), 760;
- (b) Y. J. Huang, Y. B. Jiang, J. S. Fossey, T. D. James and F. Marken, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20(38), 8305;
- (c) M. Sanjoh, D. Iizuka, A. Matsumoto and Y. Miyahara, *Org. Lett.*, 2015, 17(3), 588.
- 9 (a) G. Springsteen and B. H. Wang, *Chem. Commun.*, 2001, 1608;
- (b) G. Springsteen and B. H. Wang, *Tetrahedron*, 2002, 58(26), 5291.
- 10 M. Regueiro-Figueroa, K. Djanashvili, D. Esteban-Gomez, T. Chauvin, E. Toth, A. de Blas, T. Rodriguez-Blas and C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.*, 2010, 49(9), 4212.
- 11 (a) M. van Duin, J. A. Peters, A. P. G. Kieboom and H. van Bekkum, *Tetrahedron*, 1984, 40, 2901;
- (b) J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter and B. Wang, *Tetrahedron*, 2004, 60, 11205;

(c) M. A. Mart'inez-Aguirre, R. Villamil-Ramos, J. A. Guerrero-Alvarez and A. K. Yatsimirsky, J. Org. Chem., 2013, 78, 4674.

## 請求の範囲

1. 次式 I :

[化 9]



(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は窒素原子を表し、R<sub>2</sub>は、単結合、又は-C(O)-、-C(O)O-、-O-、-CONH-若しくは-NHCOO-で示される基を表し、R<sub>3</sub>は、水素原子、置換基を有していてもよい鎖状又は分岐状の炭化水素基、又は置換基を有していてもよい複素環式官能基を表す。)

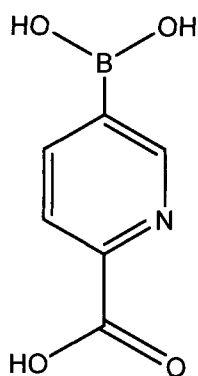
で示される、複素環式ボロン酸誘導体。

2. R<sub>1</sub>が水素原子であり、R<sub>2</sub>が-C(O)O-又は-CONH-で示される基である、請求項1に記載の複素環式ボロン酸誘導体。

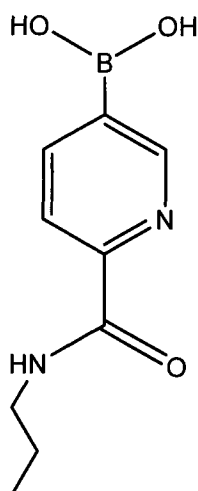
3. R<sub>3</sub>が炭素数1～6のアルキル基である請求項1又は2に記載の複素環式ボロン酸誘導体。

4. 次式(11)又は(12)で示される複素環式ボロン酸誘導体。

[化10]



(11)



(12)

5. 請求項1～4のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に、機能性分子が結合された複合体。

6. 機能性分子が、薬物、CT造影剤、MRI造影剤、PETプローブ、蛍光色素プローブ、アミノ酸、核酸、コレステロール誘導体、脂質及びポリマーからなる群から選ばれる少なくとも1つである、請求項5に記載の複合体。

7. 機能性分子がポリマーである請求項6に記載の複合体。

8. ポリマーに、さらに核酸が静電結合により結合された、請求項7に記載の複合体。

9. 複素環式ボロン酸誘導体が、機能性分子に一価で連結された、請求項5～8のいずれか1項に記載の複合体。

10. 複素環式ボロン酸誘導体が、機能性分子に多価で連結された、請求項5～8のいずれか1項に記載の複合体。

11. ポリマーが直鎖状又は分岐状のポリエチレングリコールである請求項

6～10のいずれか1項に記載の複合体。

12. 請求項1～4のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体を含む、細胞又は組織への機能性分子送達用担体。

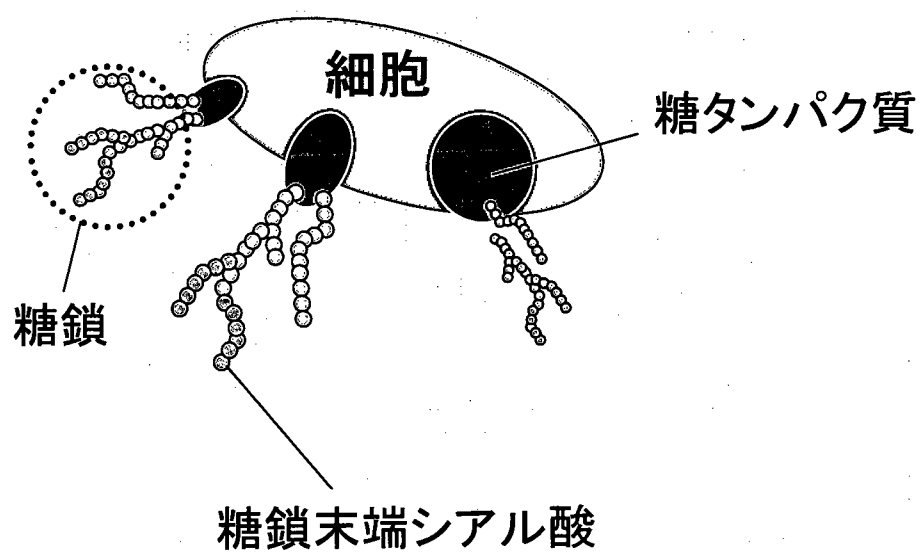
13. 請求項6～11のいずれか1項に記載の複合体を含む、細胞又は組織への機能性分子送達システム。

14. 請求項1～4のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に目的物質を結合又は担持させ、これを酸性条件下でシアル酸を発現する細胞に接触させることを特徴とする、前記目的物質を当該細胞に輸送、送達又は結合させる方法。

15. 請求項1～4のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に標識物質を結合又は担持させ、これを被験細胞と接触させた後に標識物質を検出することを特徴とする、シアル酸発現細胞の検出方法。

16. 請求項1～4のいずれか1項に記載の複素環式ボロン酸誘導体に標識物質を結合又は担持させ、これを被検細胞と接触させた後に標識物質を検出し、当該被検細胞周囲のpHを検出することを特徴とする、被検細胞周囲のpHの検出方法。

図1



**R-ⓑ** R:薬物, CT造影剤, MRI造影剤, PETプローブ, 蛍光プローブ, アミノ酸, ヌクレオチド, コレステロール誘導体, 合成ポリマー等



ポリマー-薬物コンジュゲート  
(1価ポリリガンド)

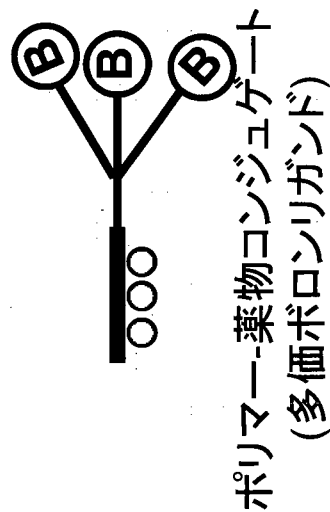
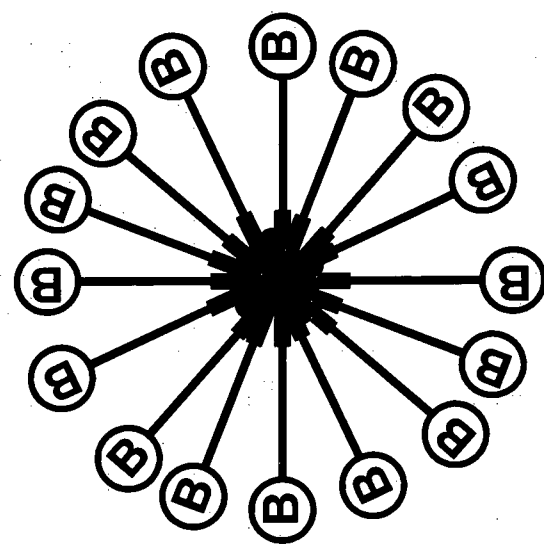
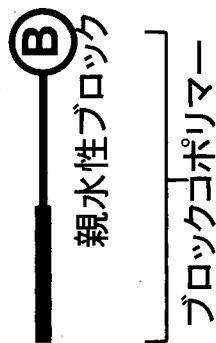


図2



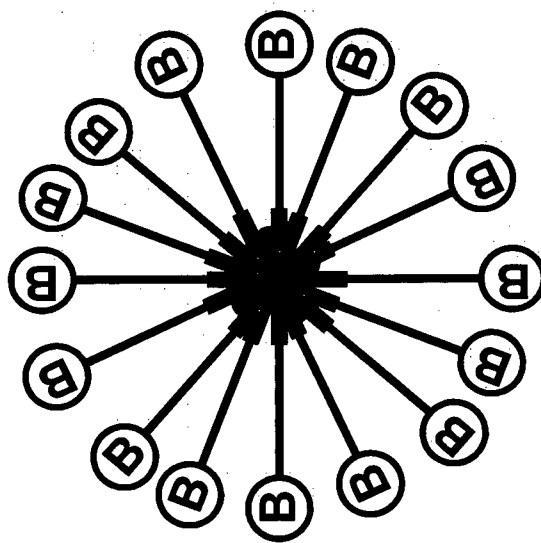
● 薬物  
自己組織化

疎水性ブロック



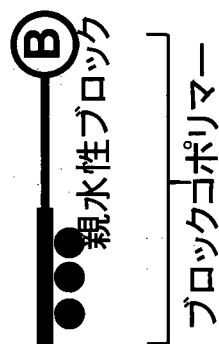
薬物導入ポリリガンドがインストールされたポリマーミセル

図3



自己組織化

薬物が導入されたブロック



薬物導入ポリリガンドがインストールされたポリマーミセル

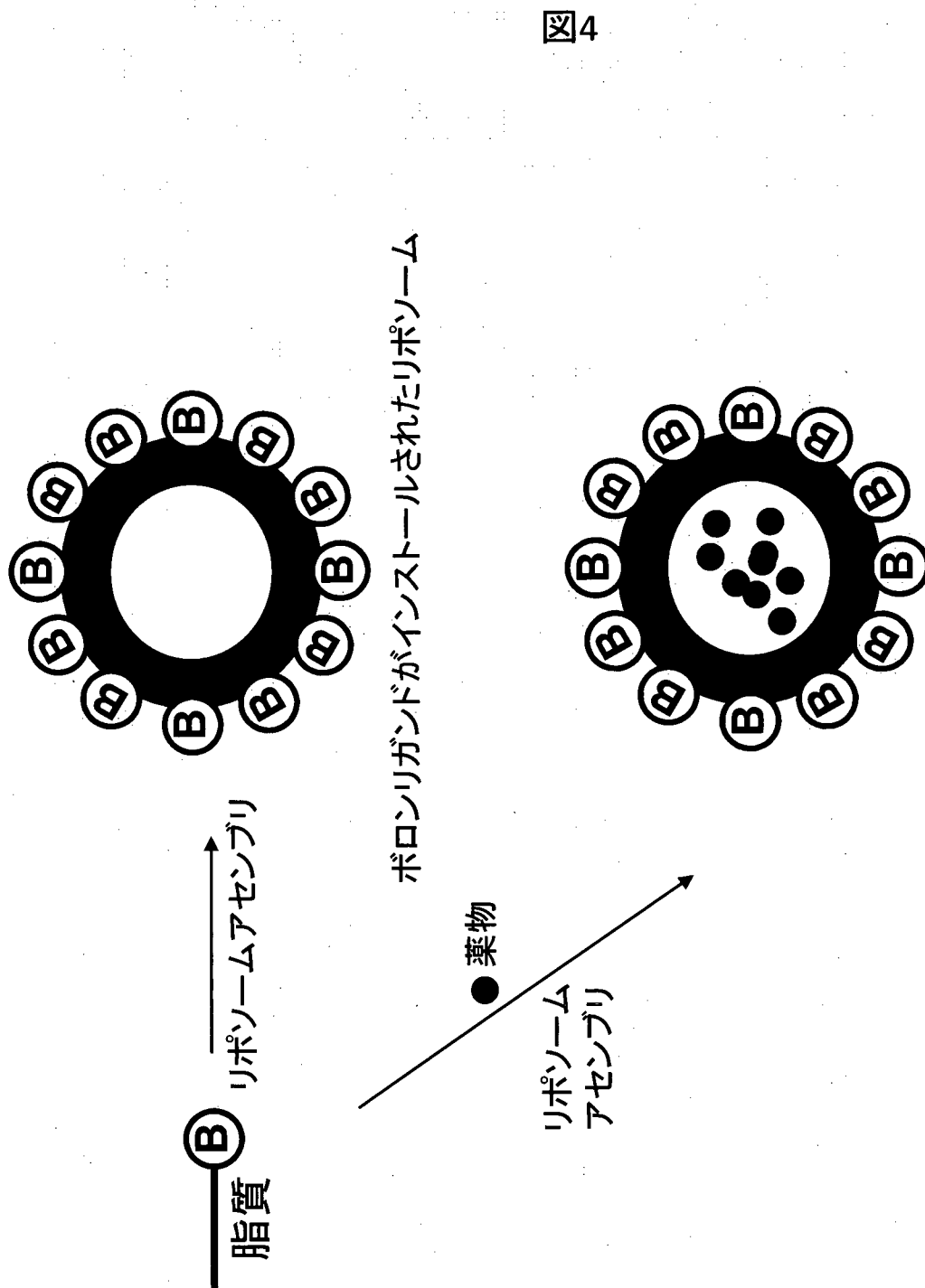


図4

薬物を導入したボロンリガンドがインストールされたリポソーム

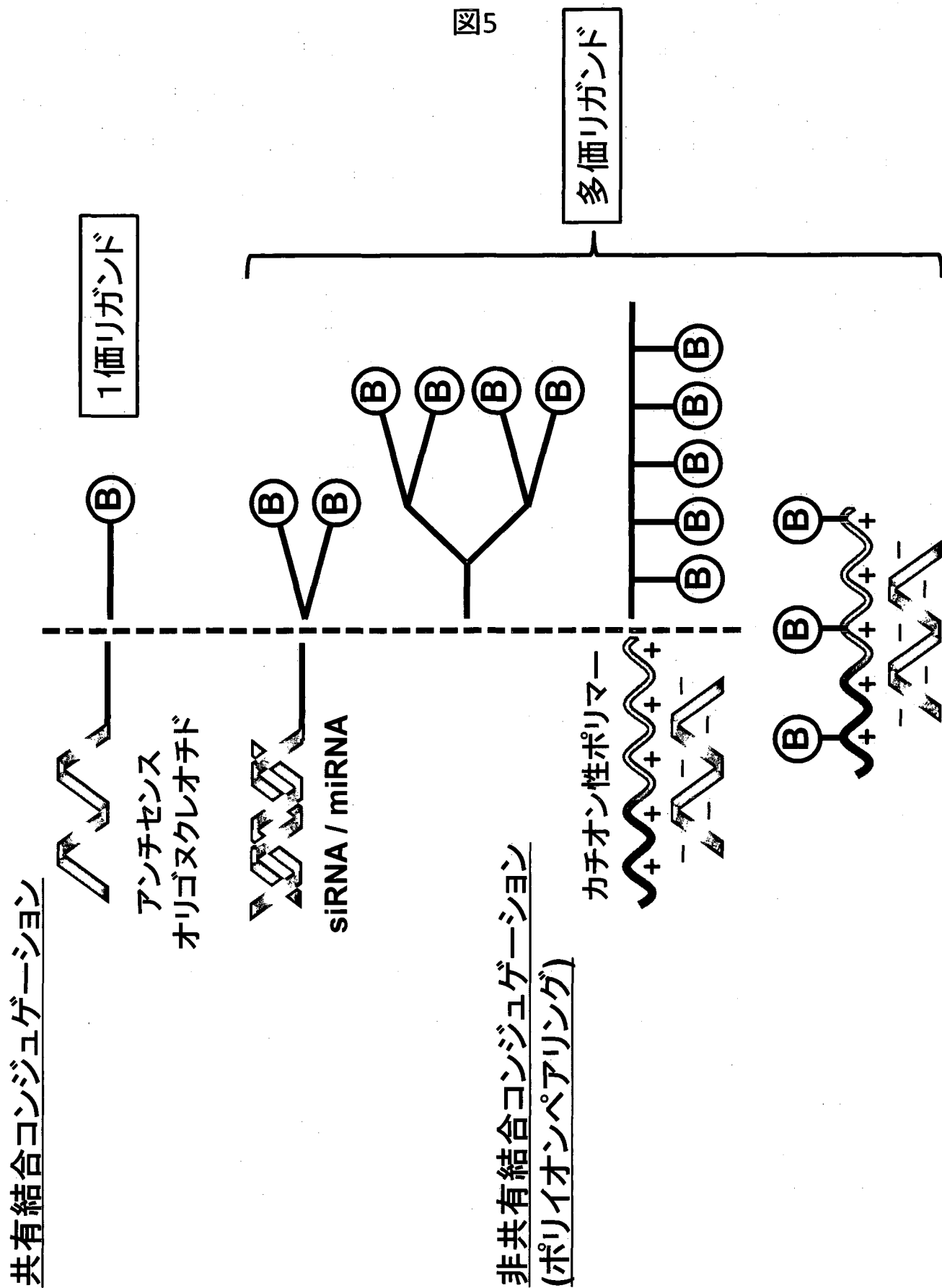
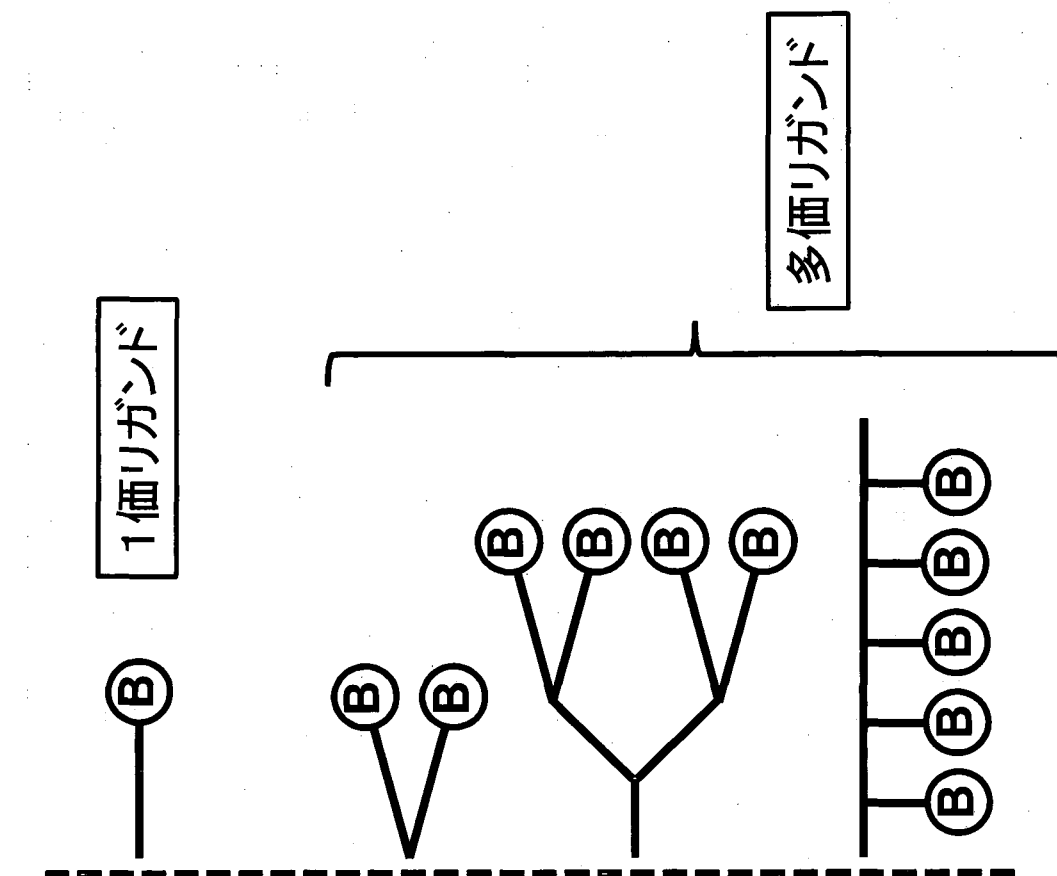


図6

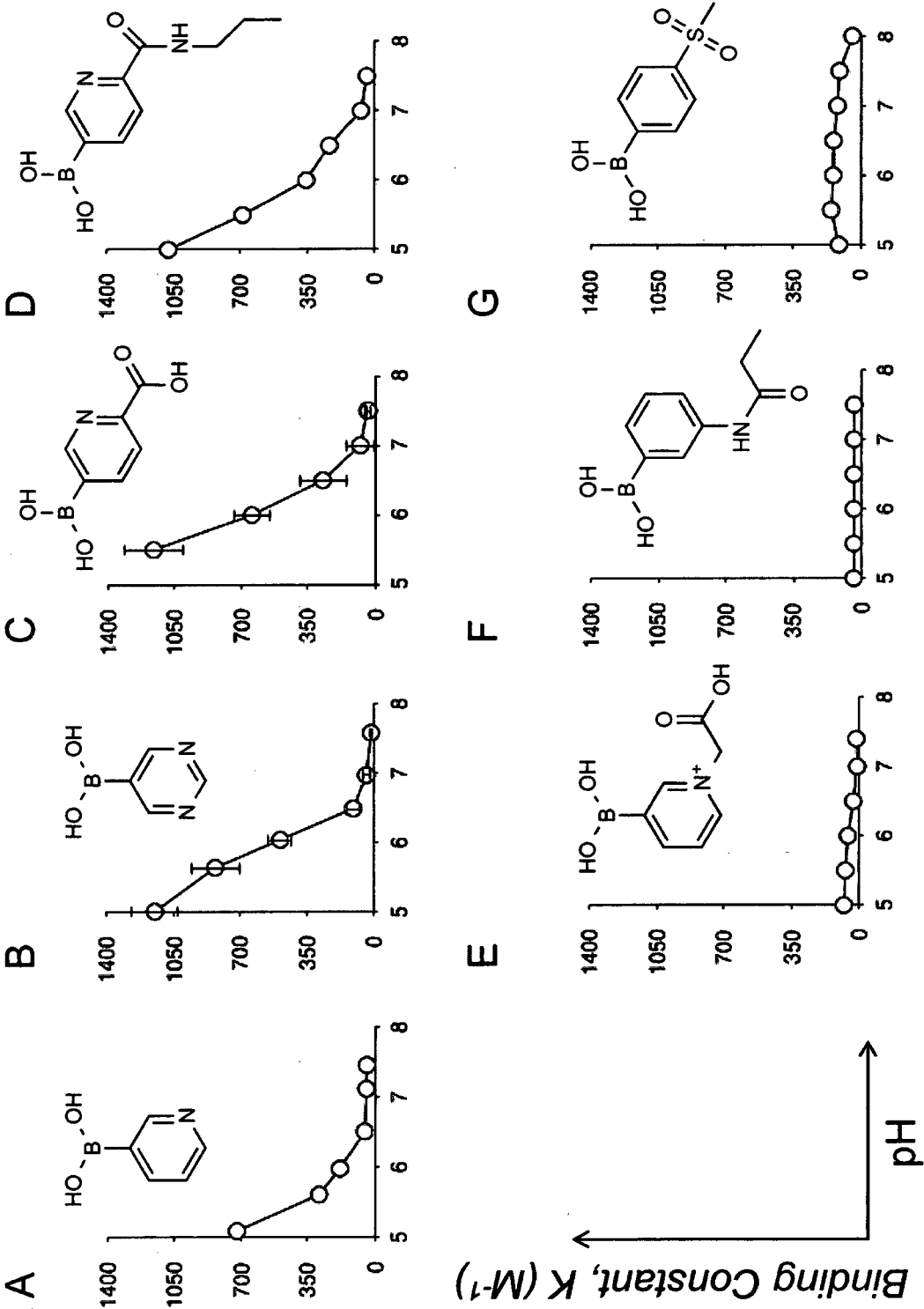


R

共有結合又は非共有結合  
コンジュゲーション

R: 薬物, CT造影剤, MRI造影剤,  
PETプローブ, 蛍光プローブ, アミノ酸,  
ヌクレオチド, コレステロール誘導体,  
合成ポリマー等

図7



8

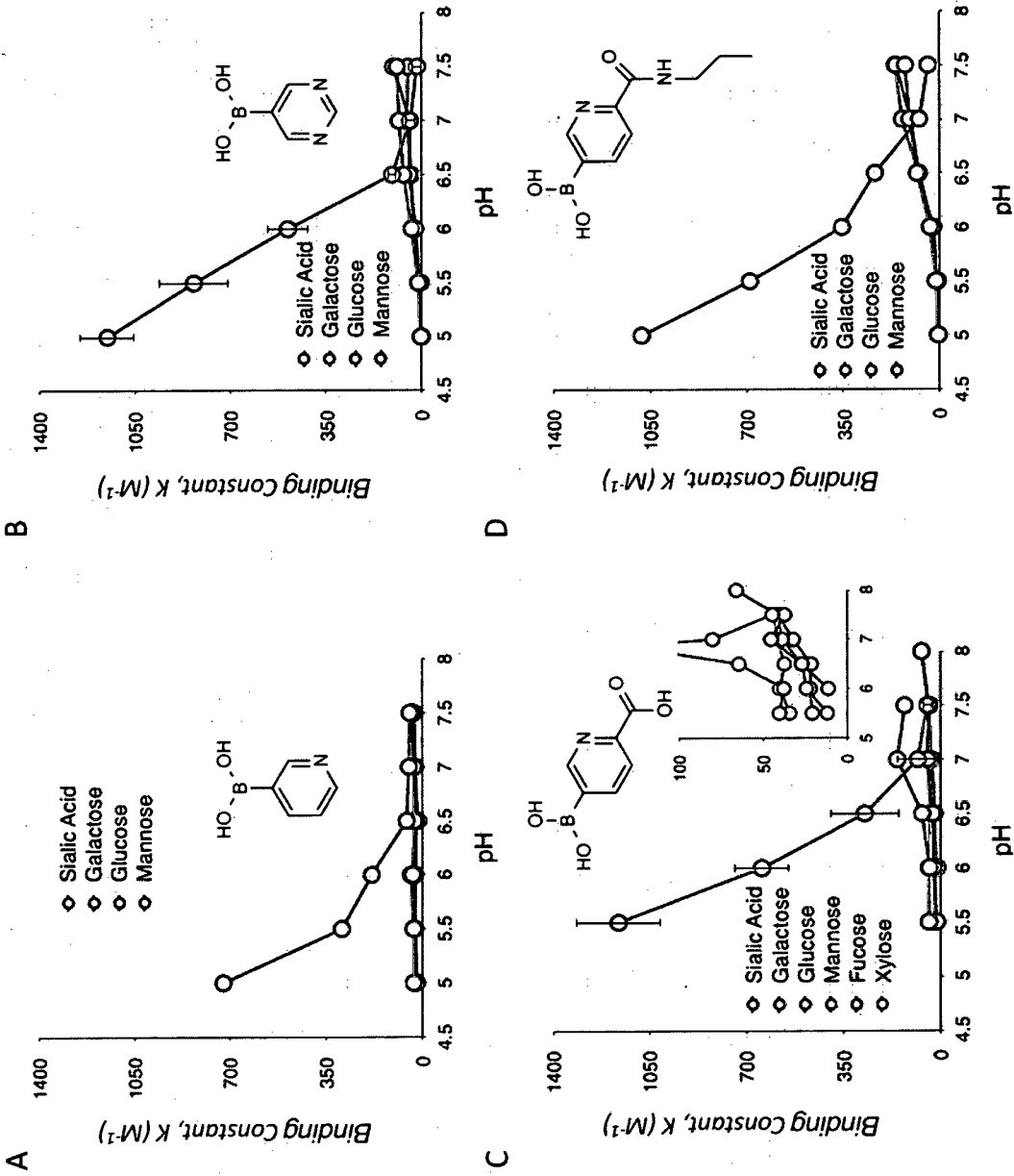


図9

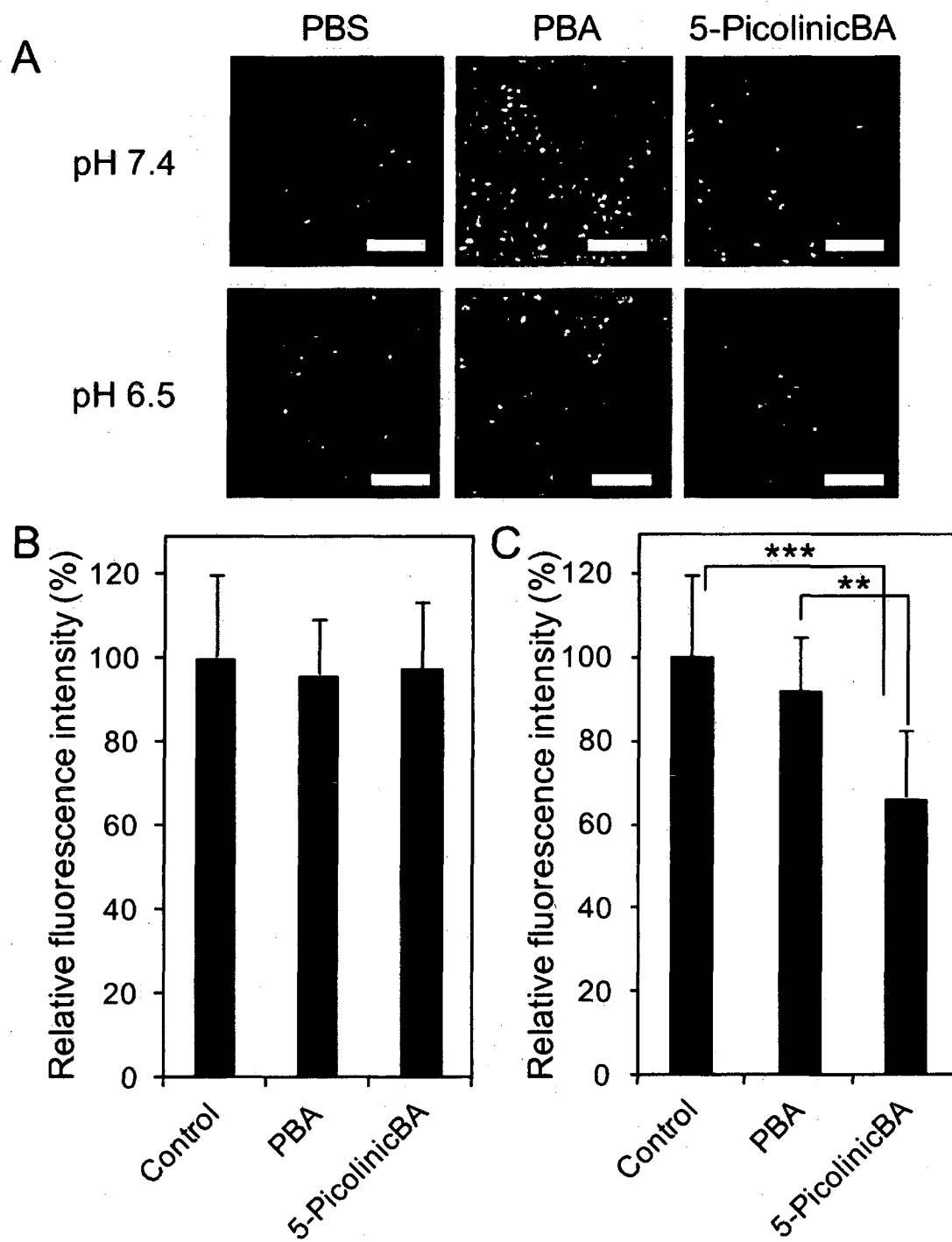


図10

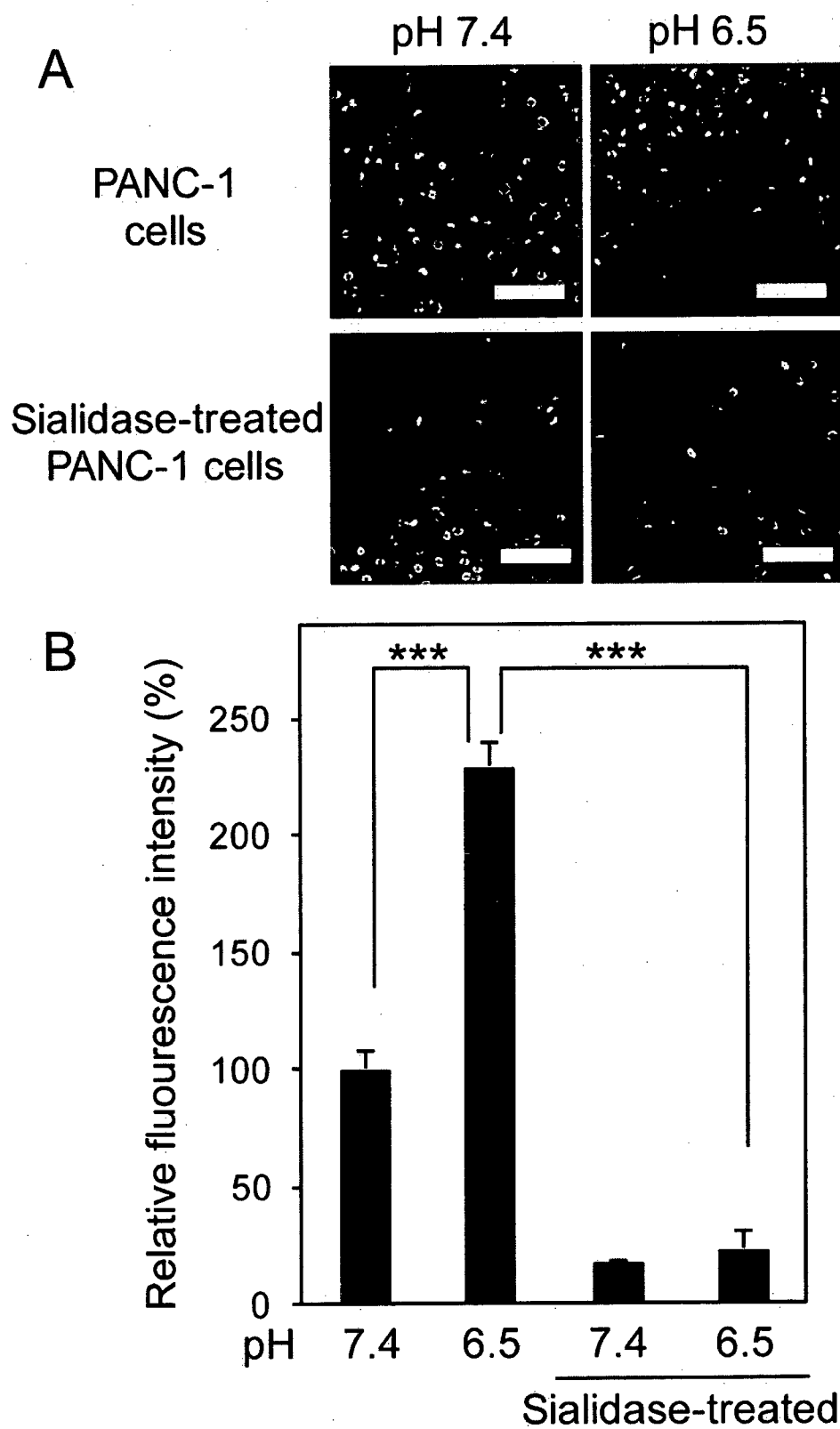


図11

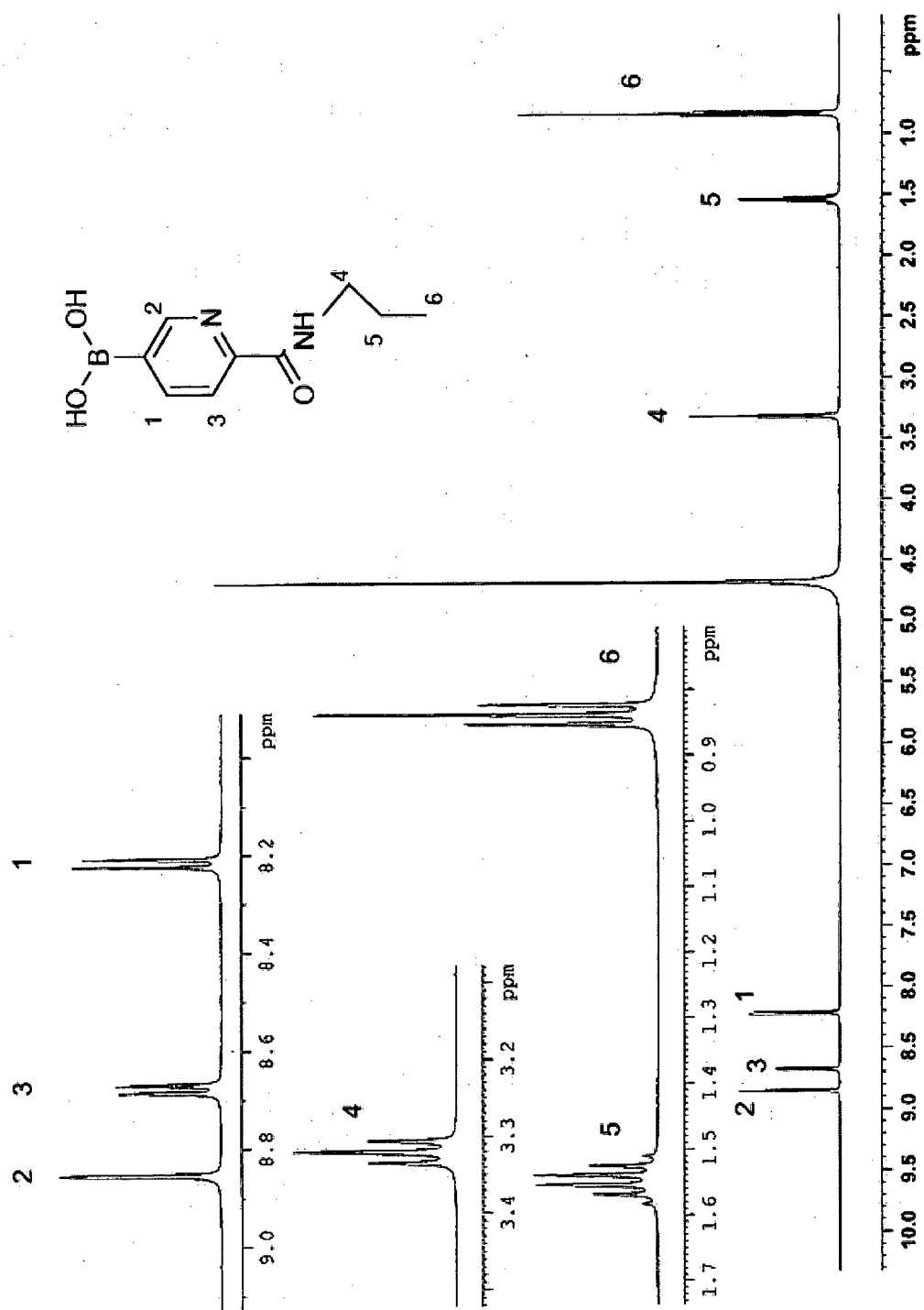
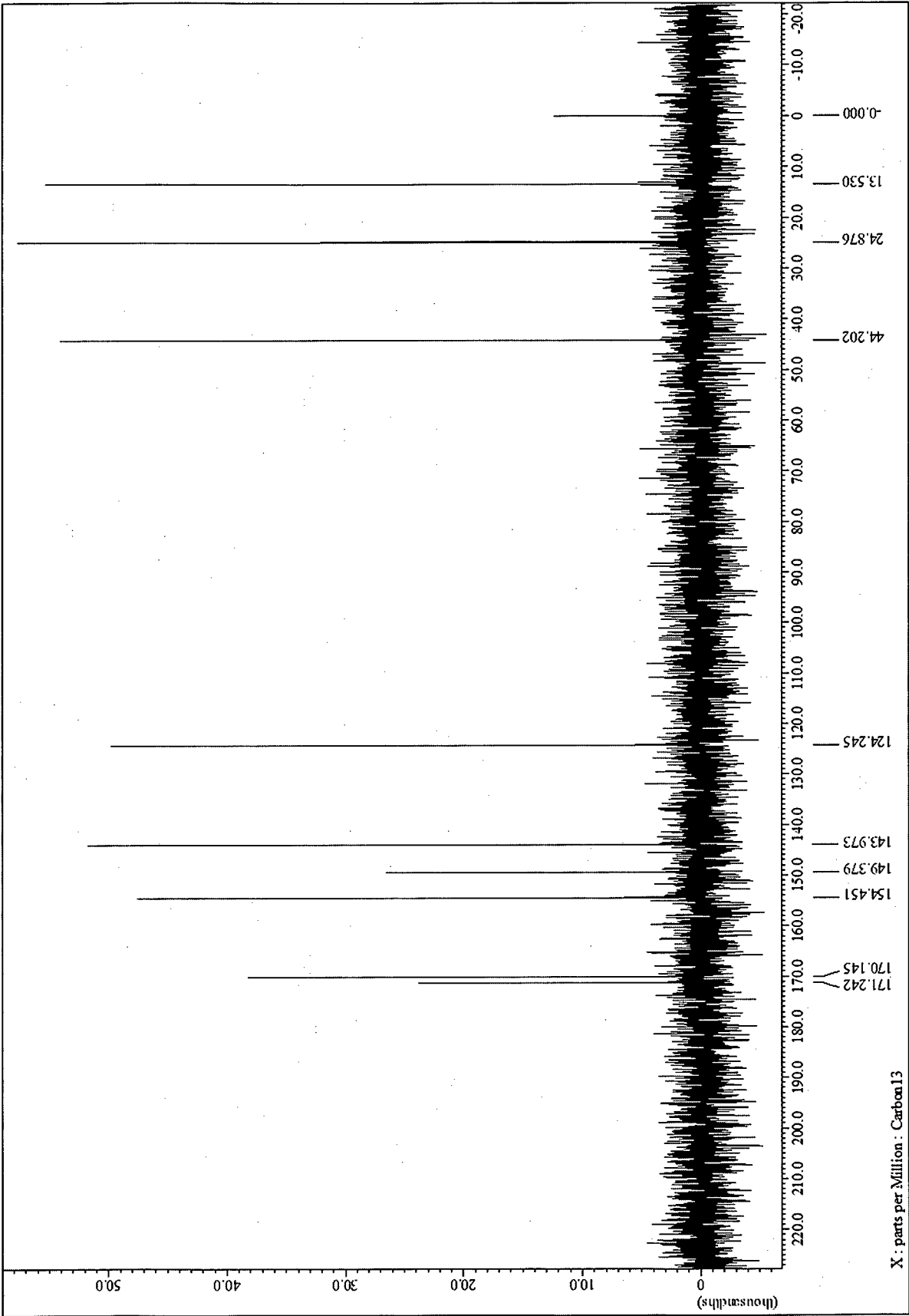


図 1 2



図の12の続き

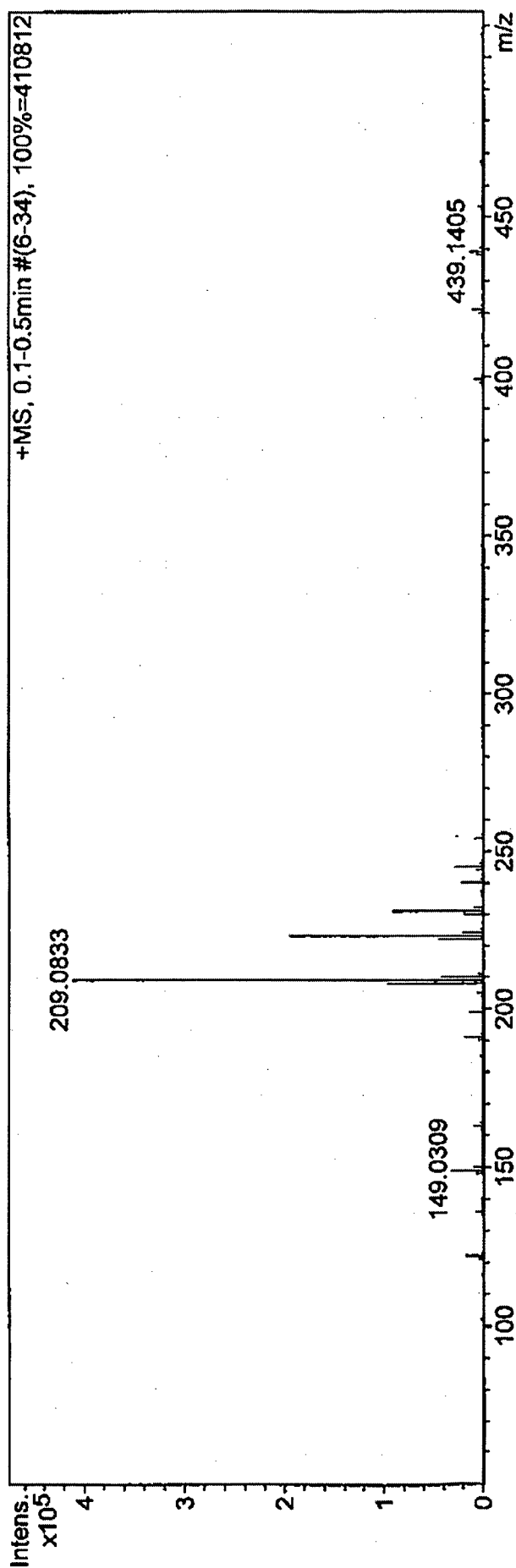


図 13

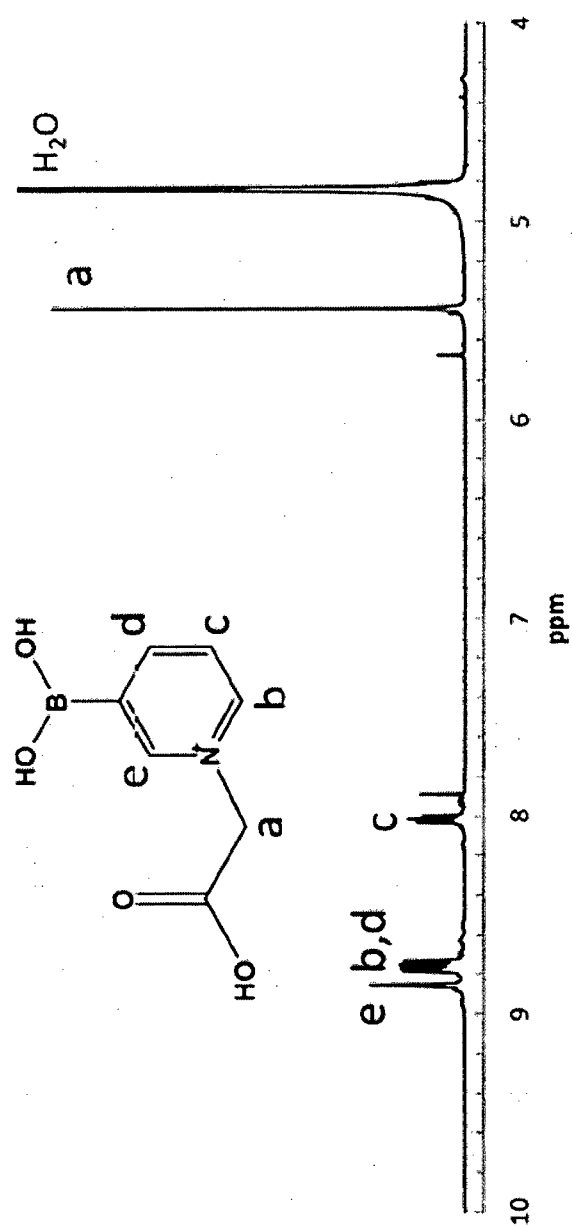


図13の続き

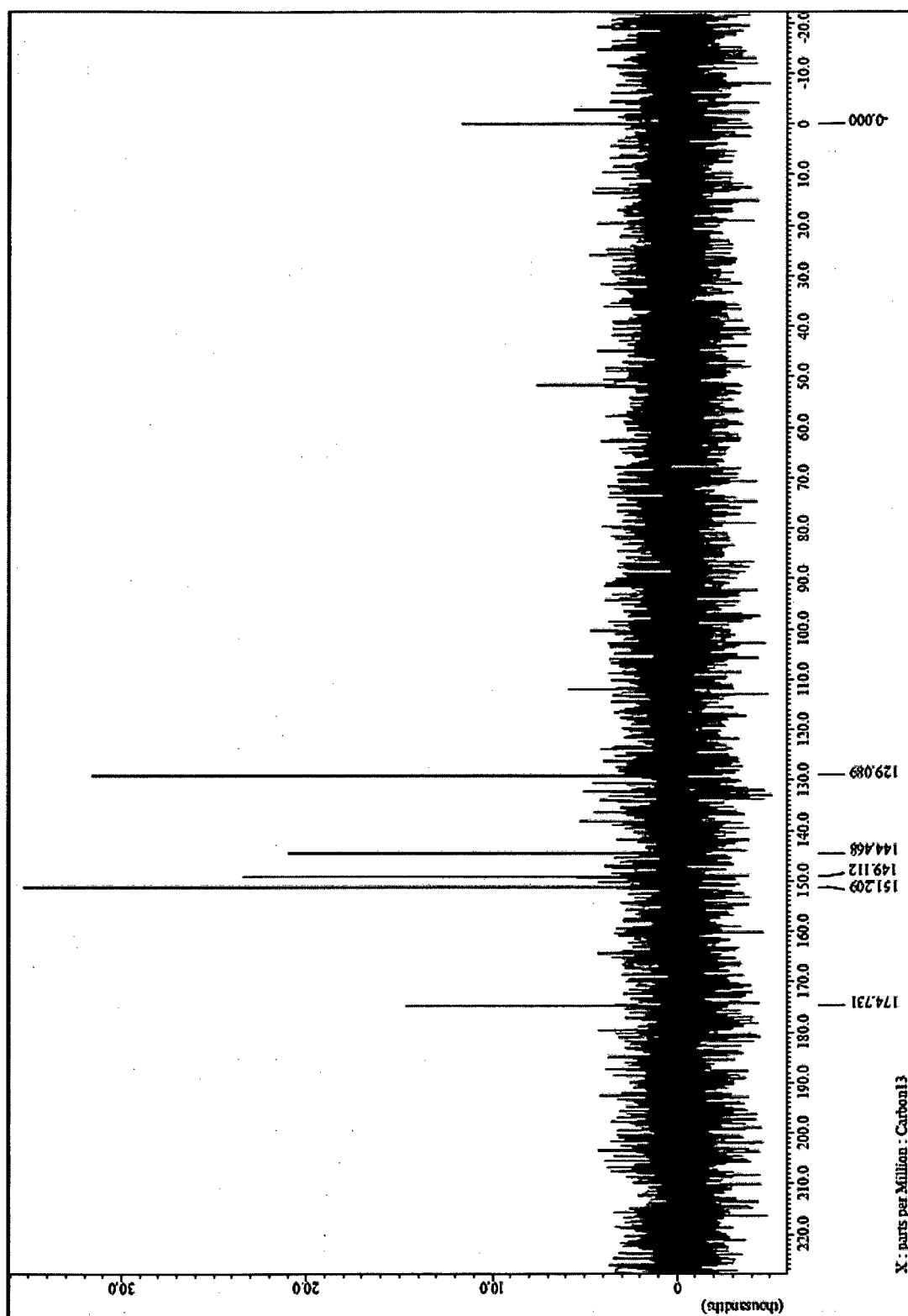


図13の続き

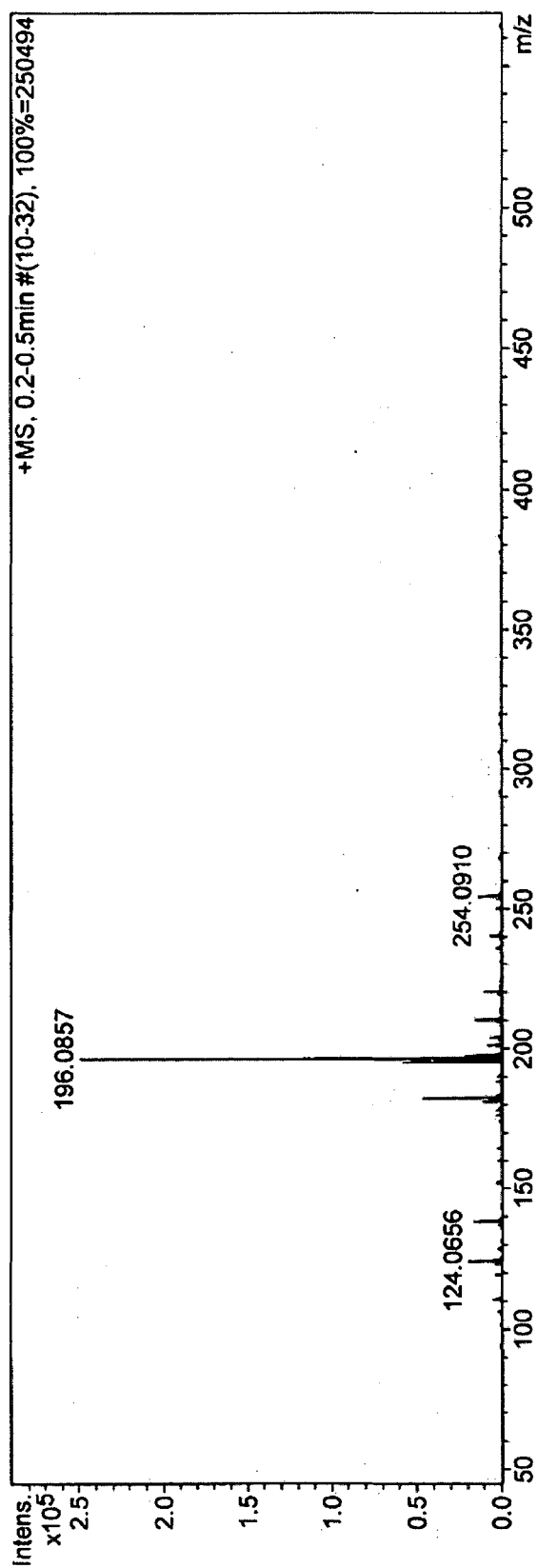


图 14

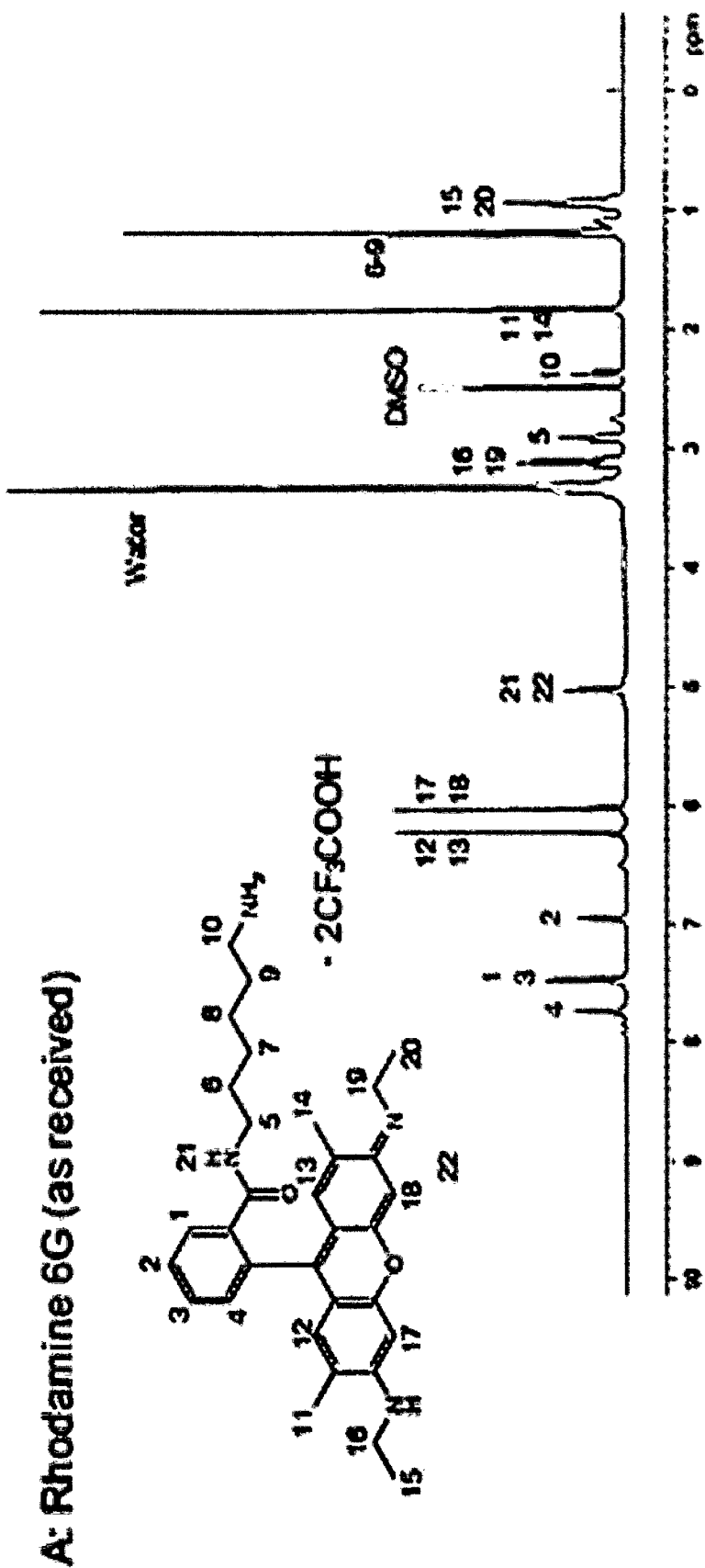


図 15

B: Rhodamine conjugate with 5-boronopicolinic acid

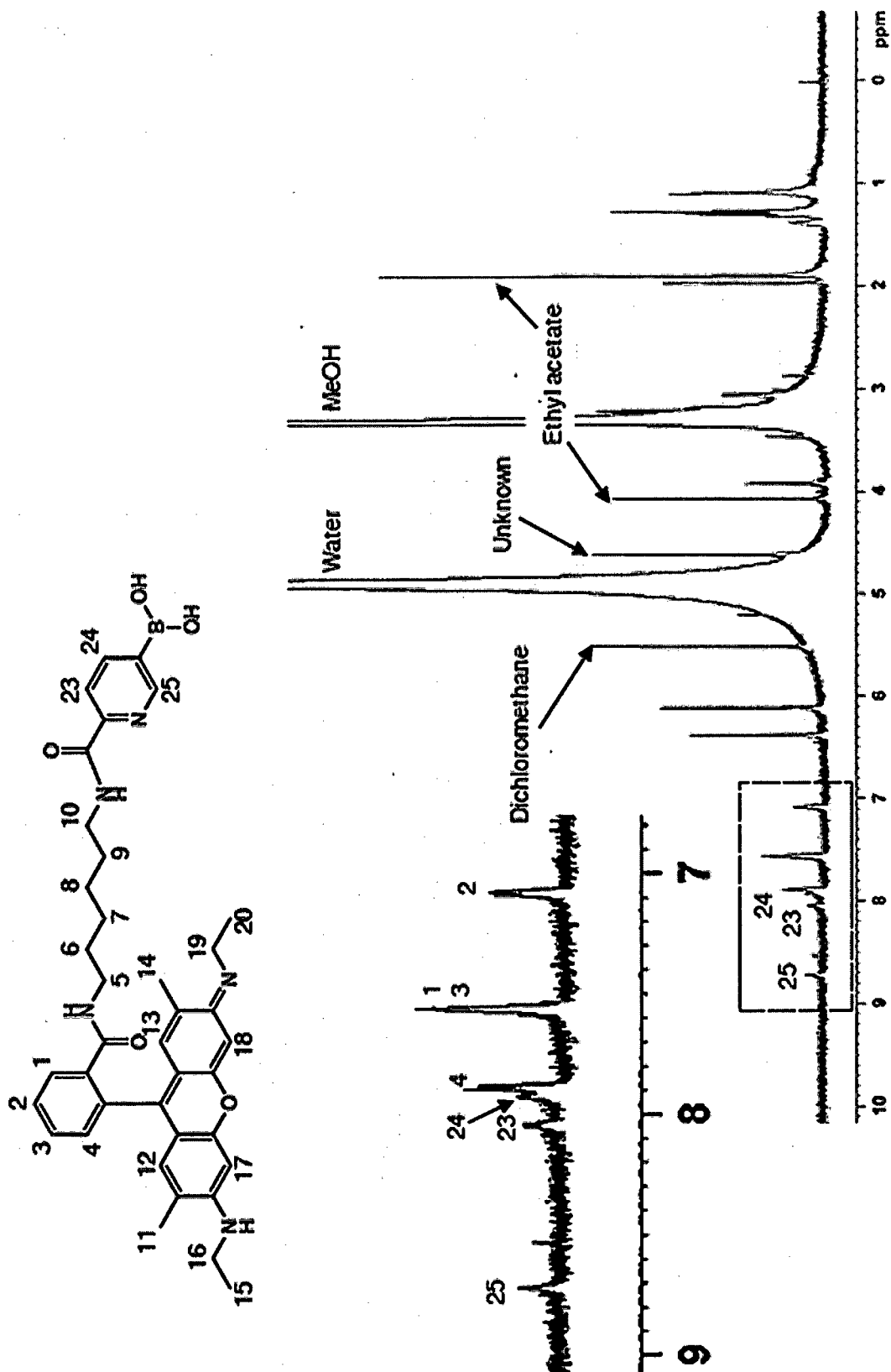
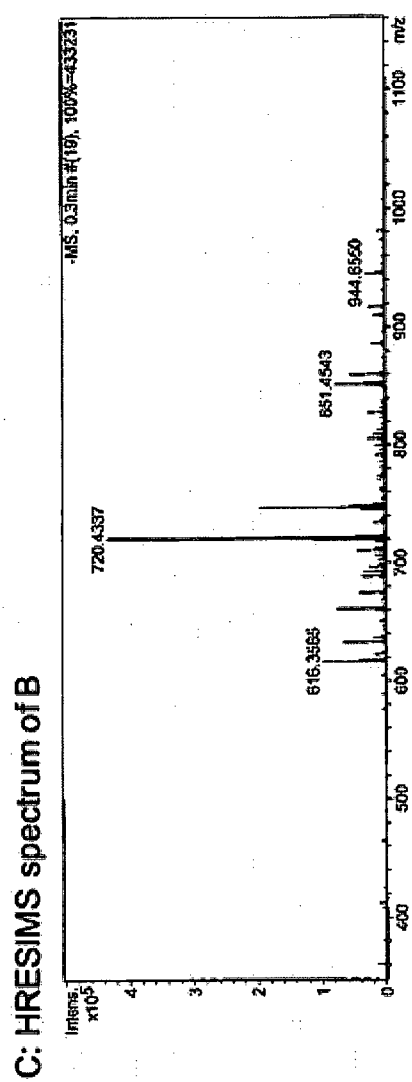


図16



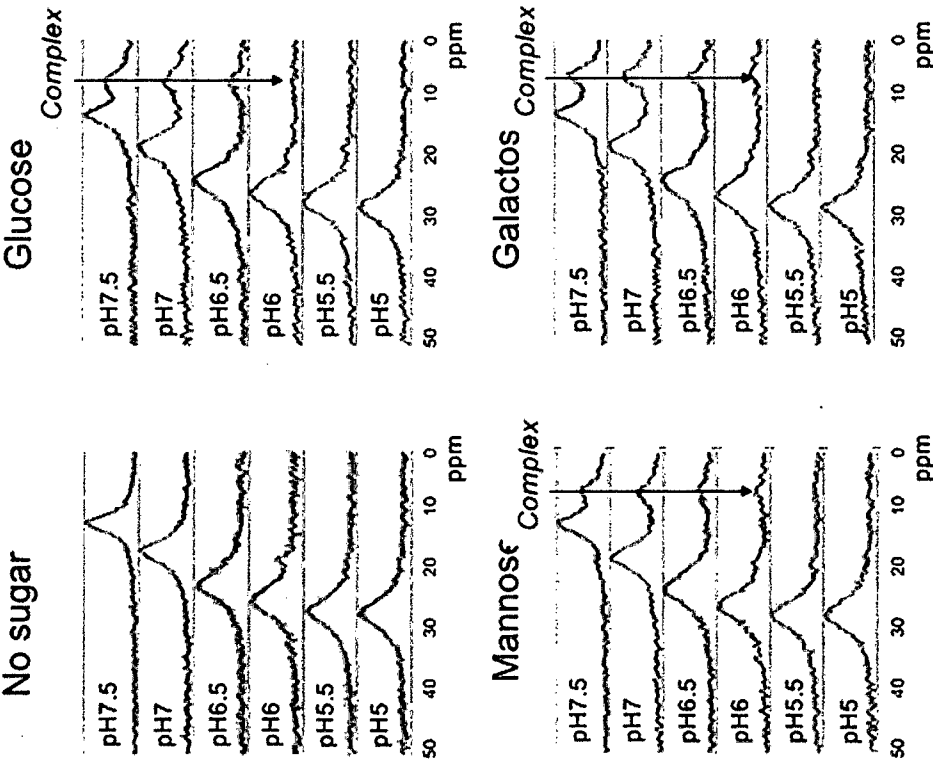
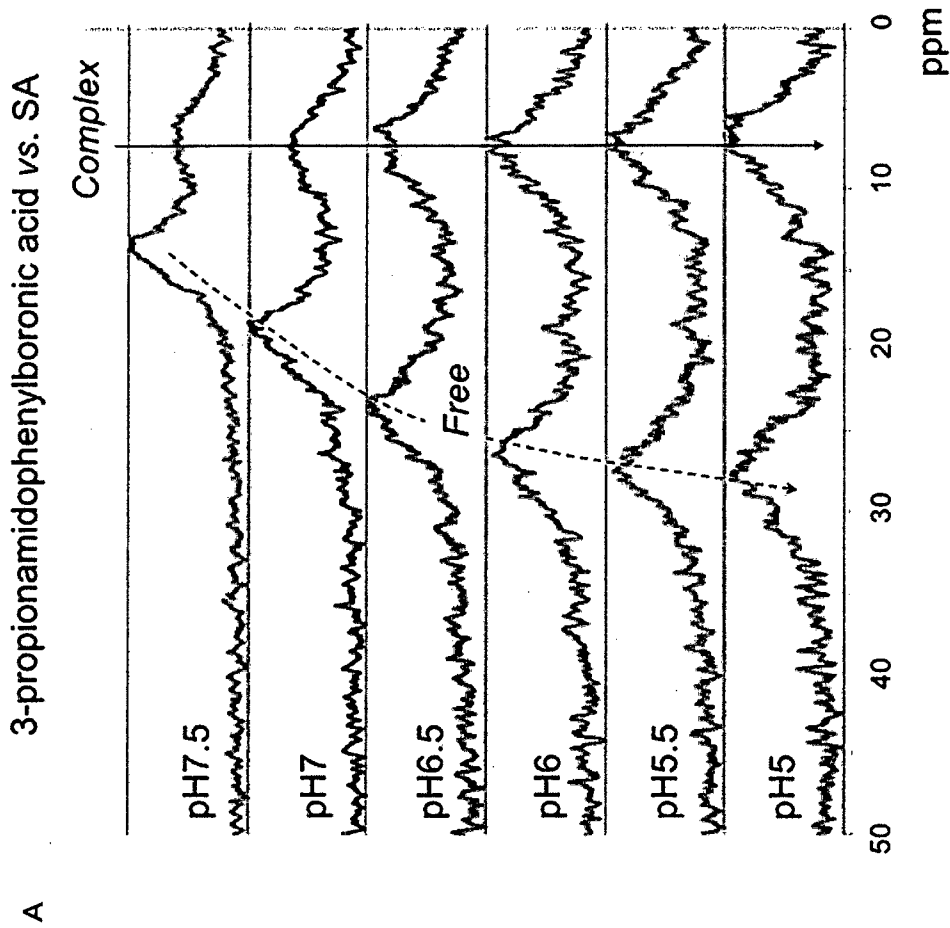


図18

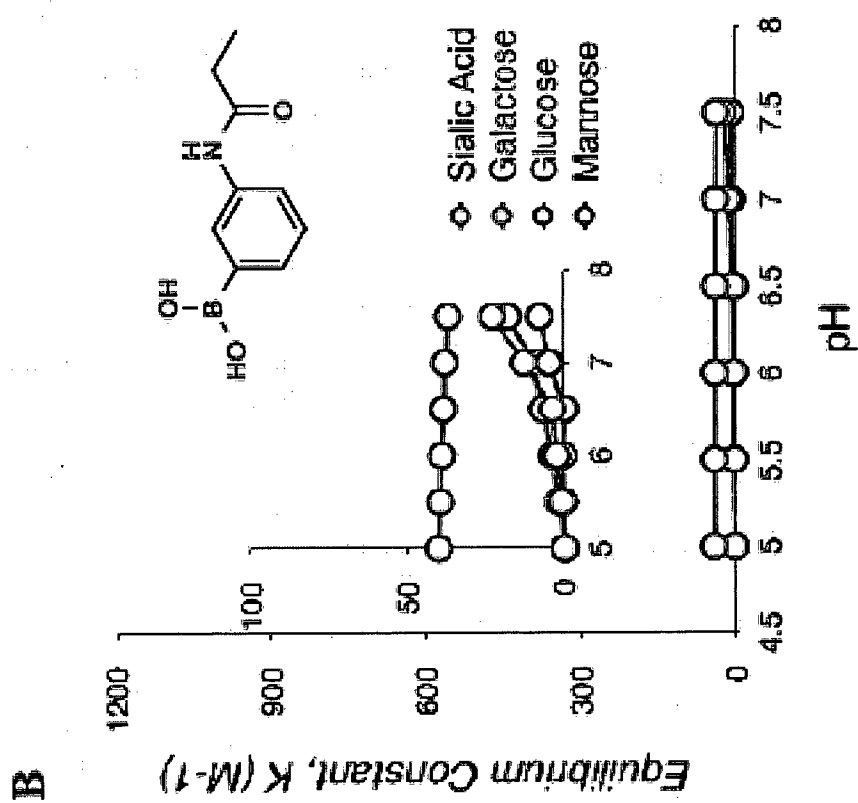
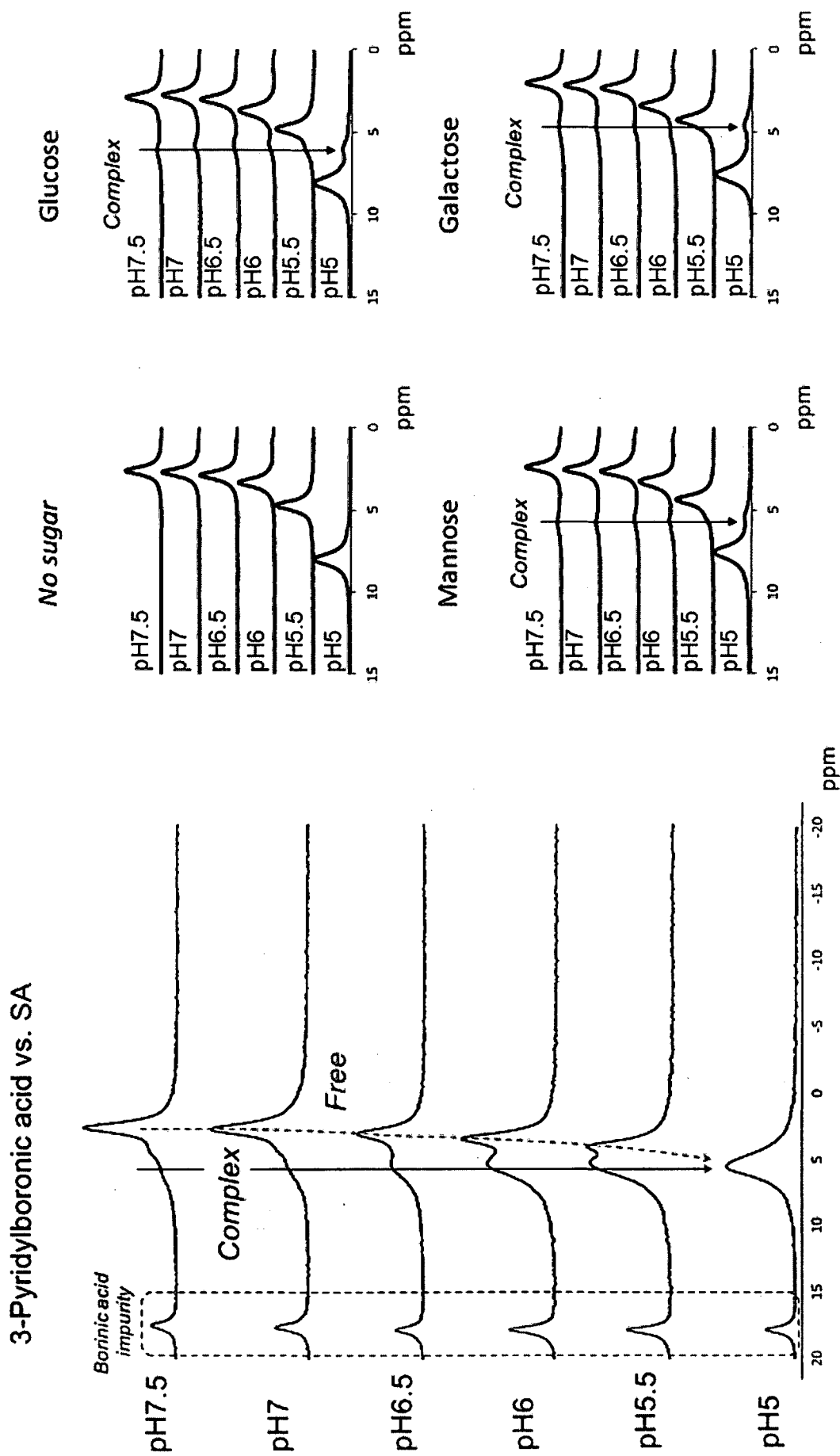


図 19



A

3-Borono-1-(carboxymethyl)pyridine vs. SA

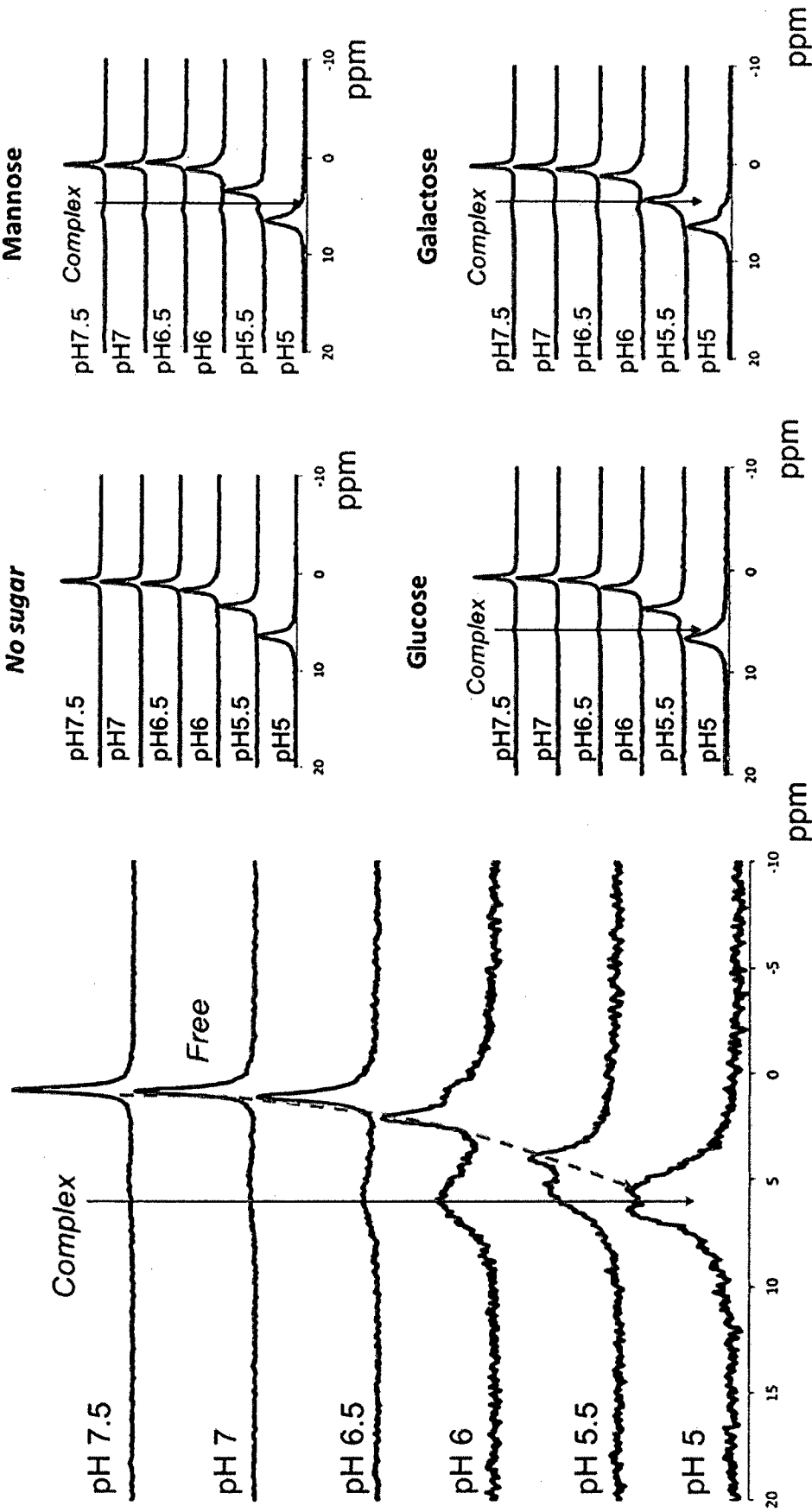


図21

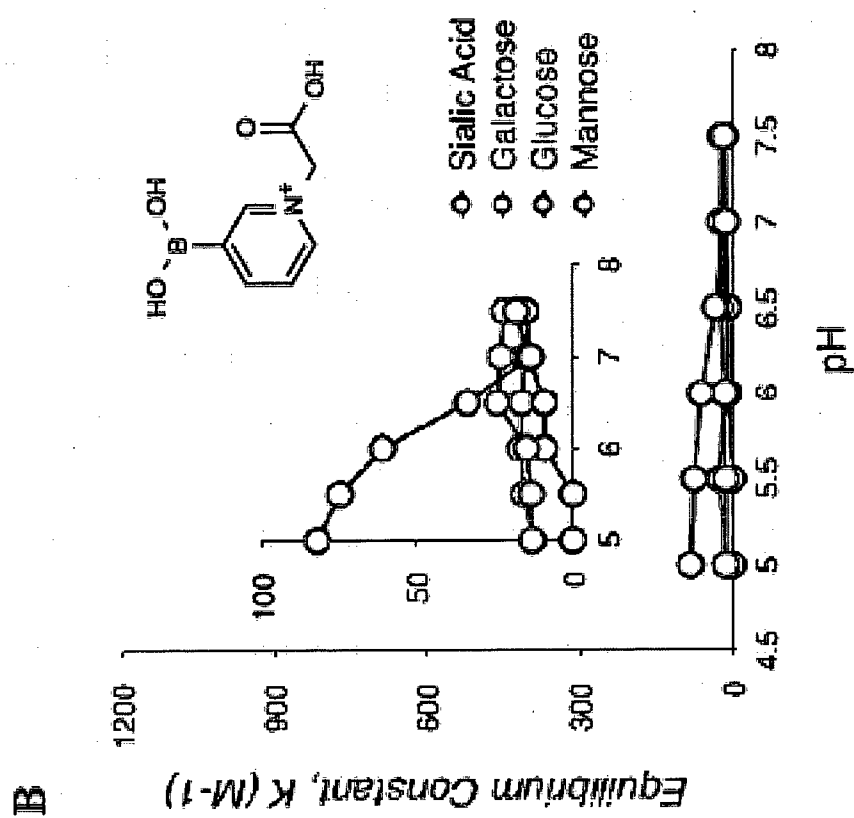
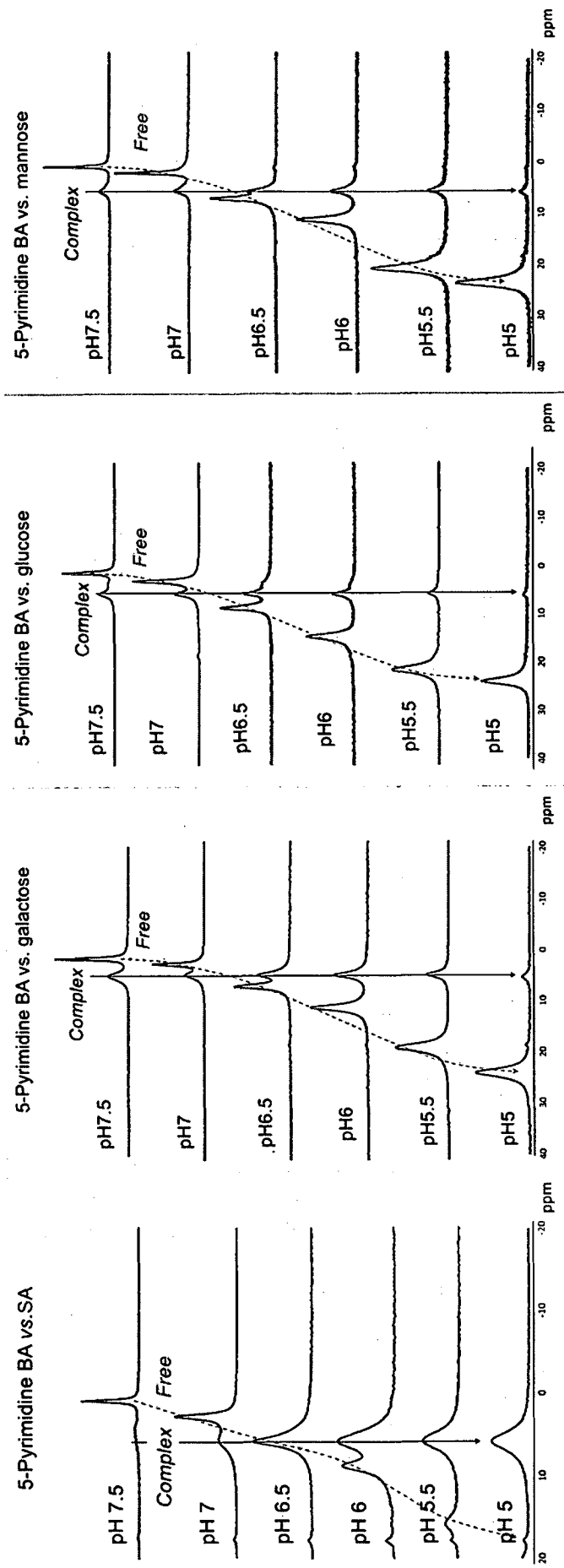
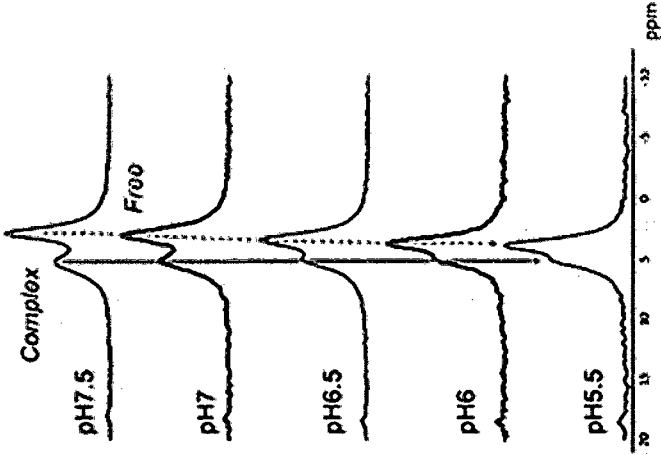


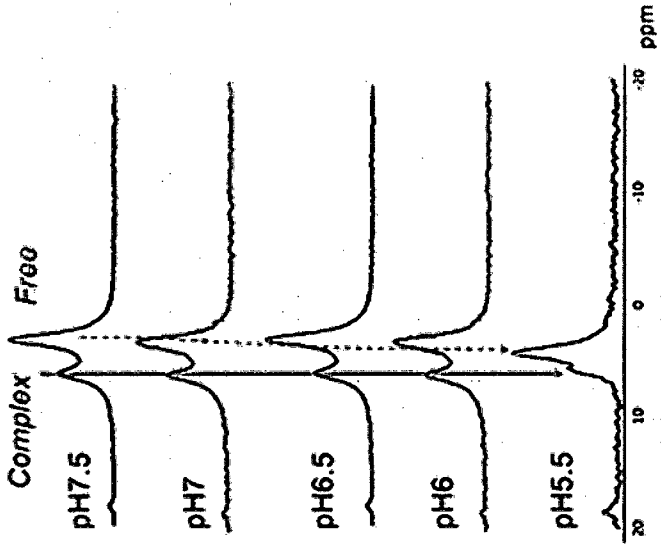
図 2 2



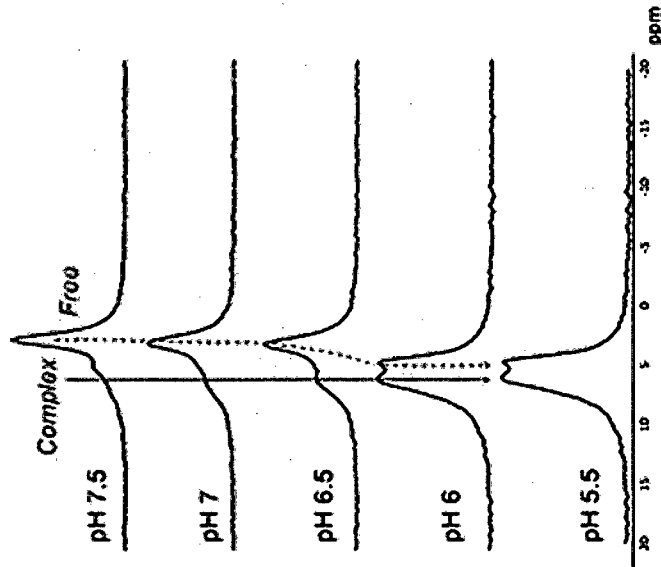
5-Boronopicolinic acid vs. galactose



5-Boronopicolinic acid vs. glucose



5-Boronopicolinic acid vs. SA



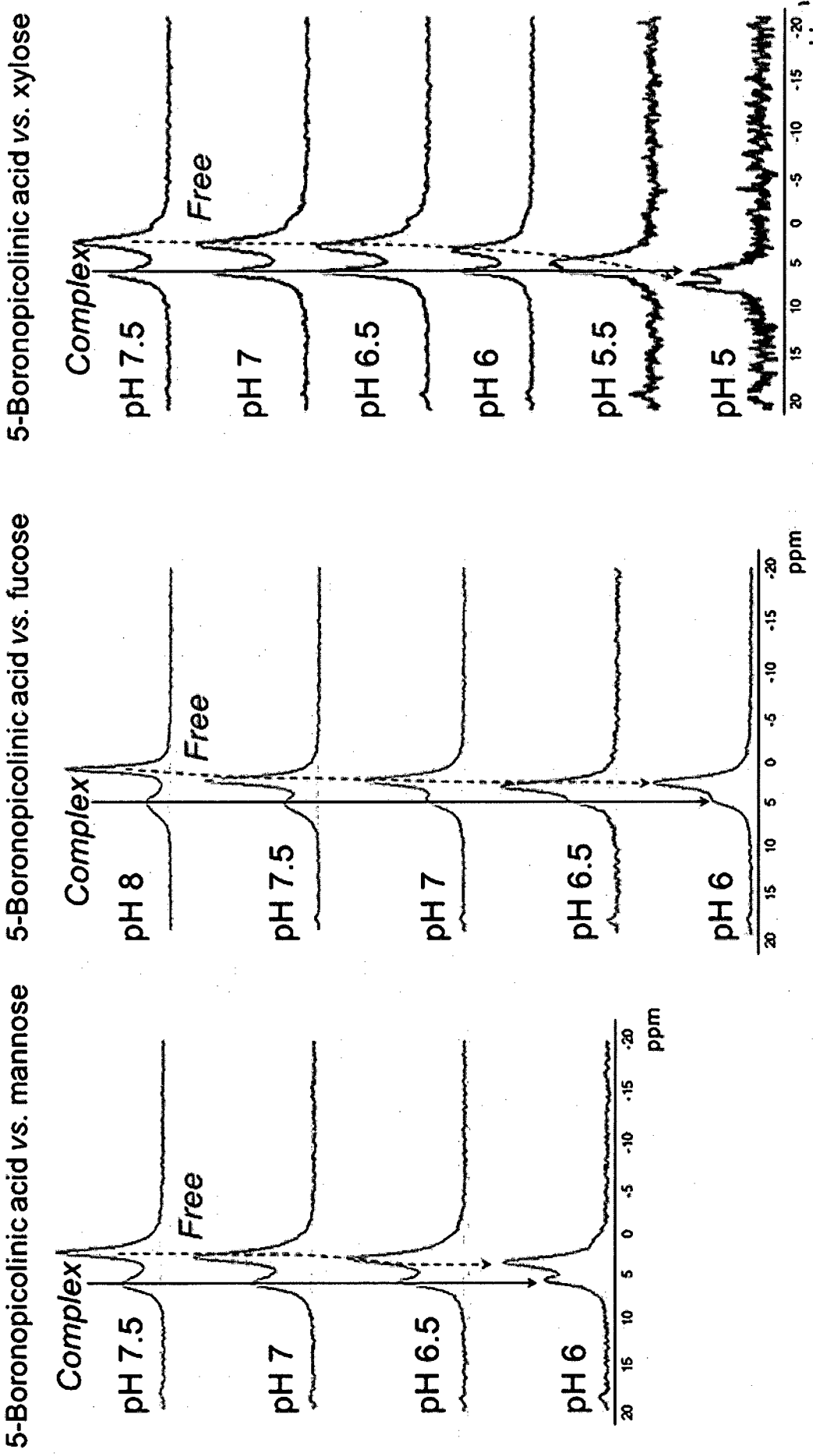
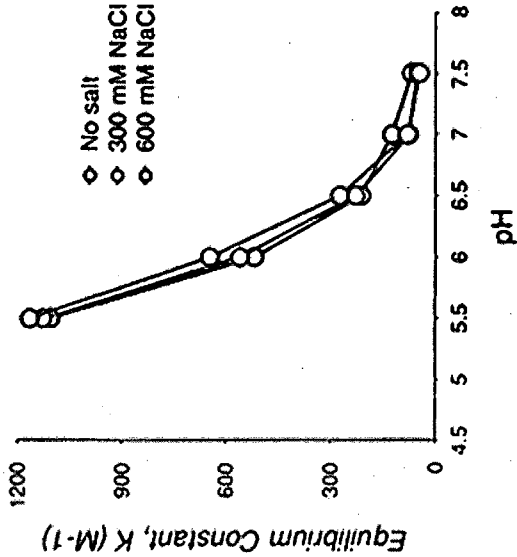


図 2 4



(C)

5-Boronopicolinic acid vs. SA with high salt

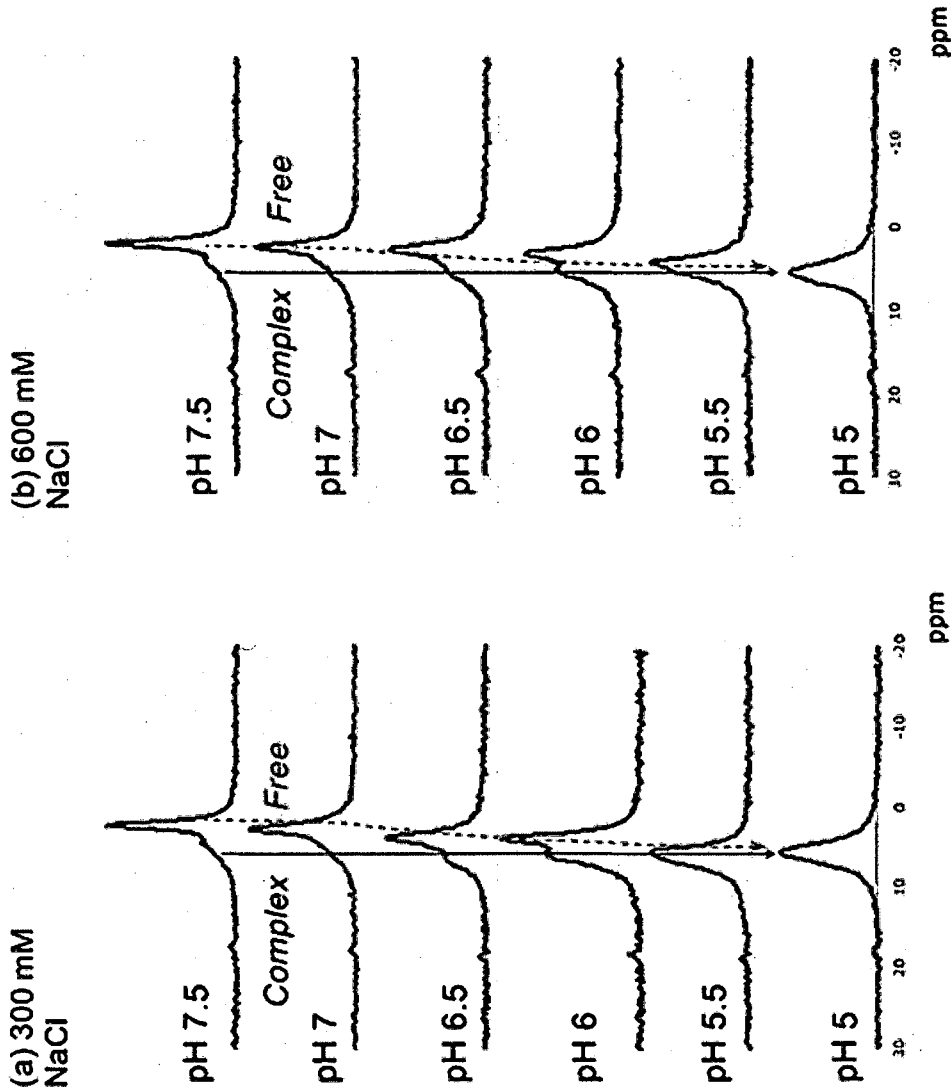


図 25

(6-propylcarbamoyl)pyridine-3-)boronic acid vs. SA, with and without salt

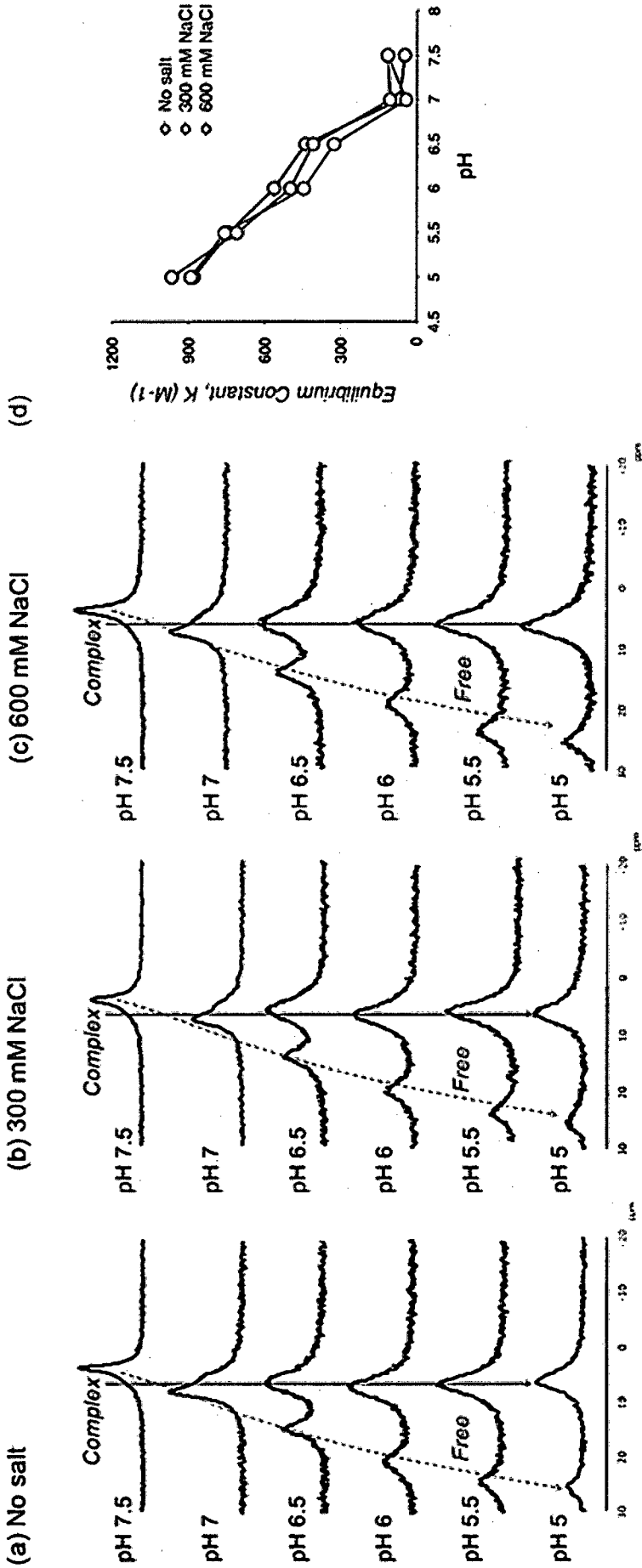


図 26

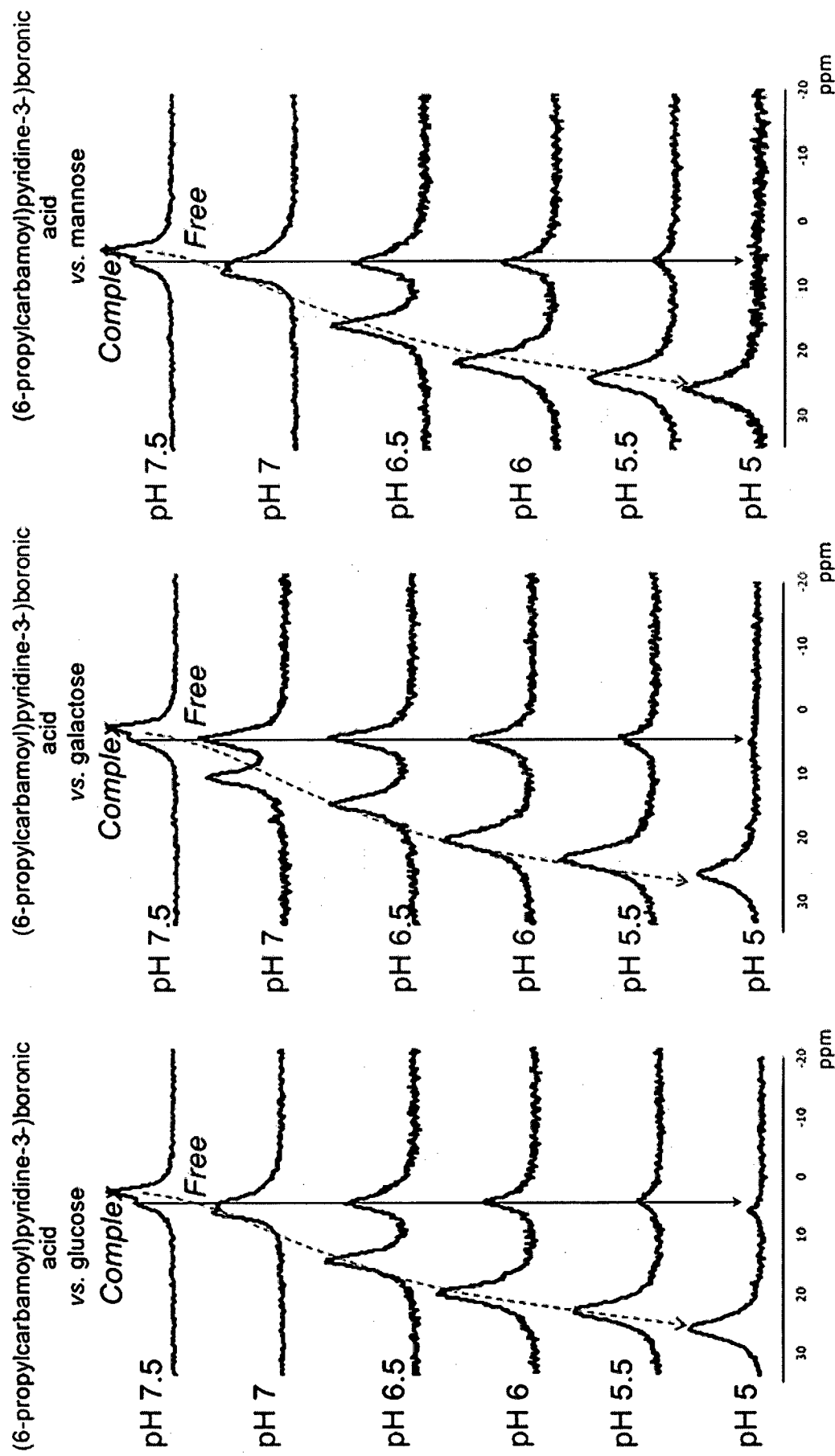


図27

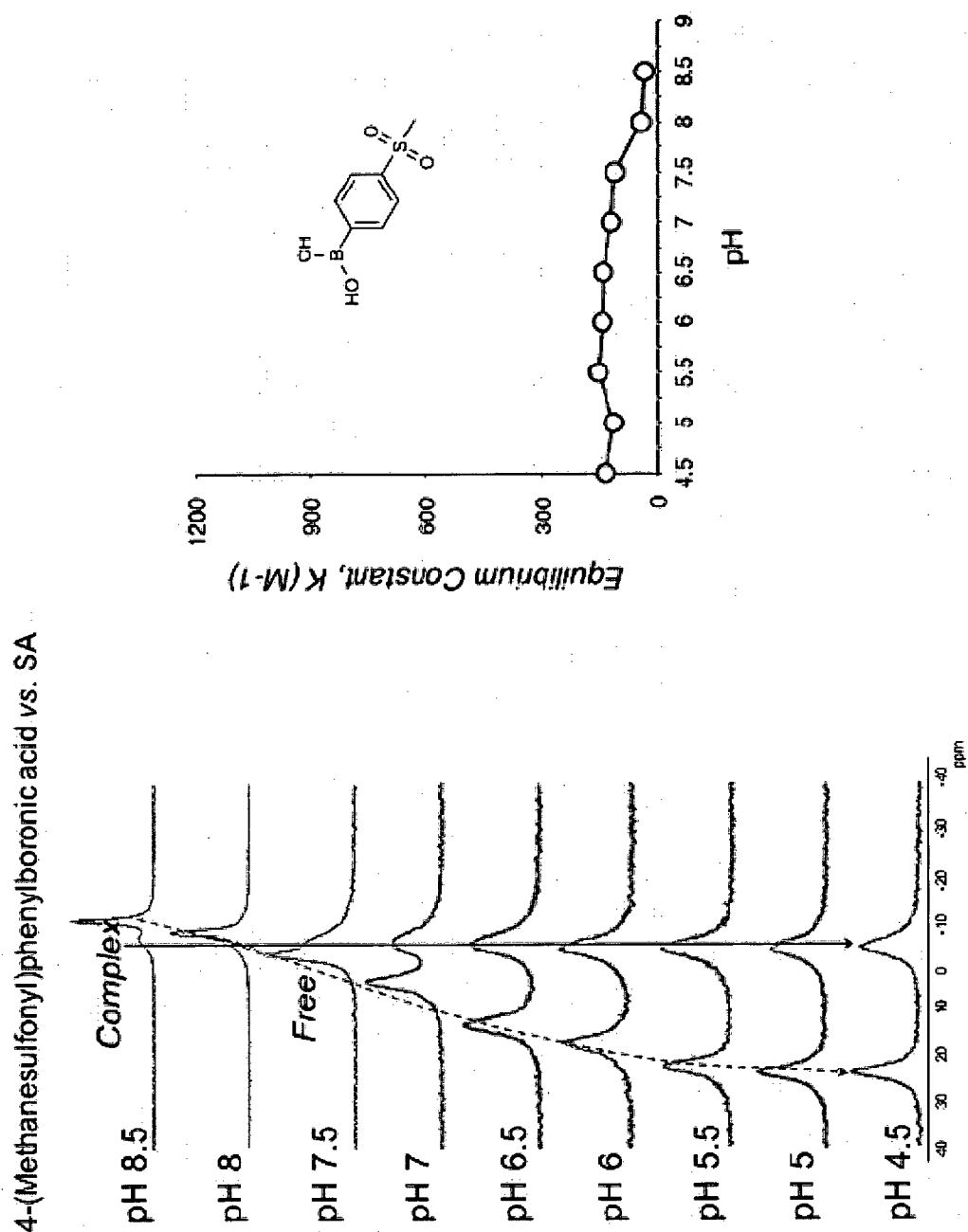


図28

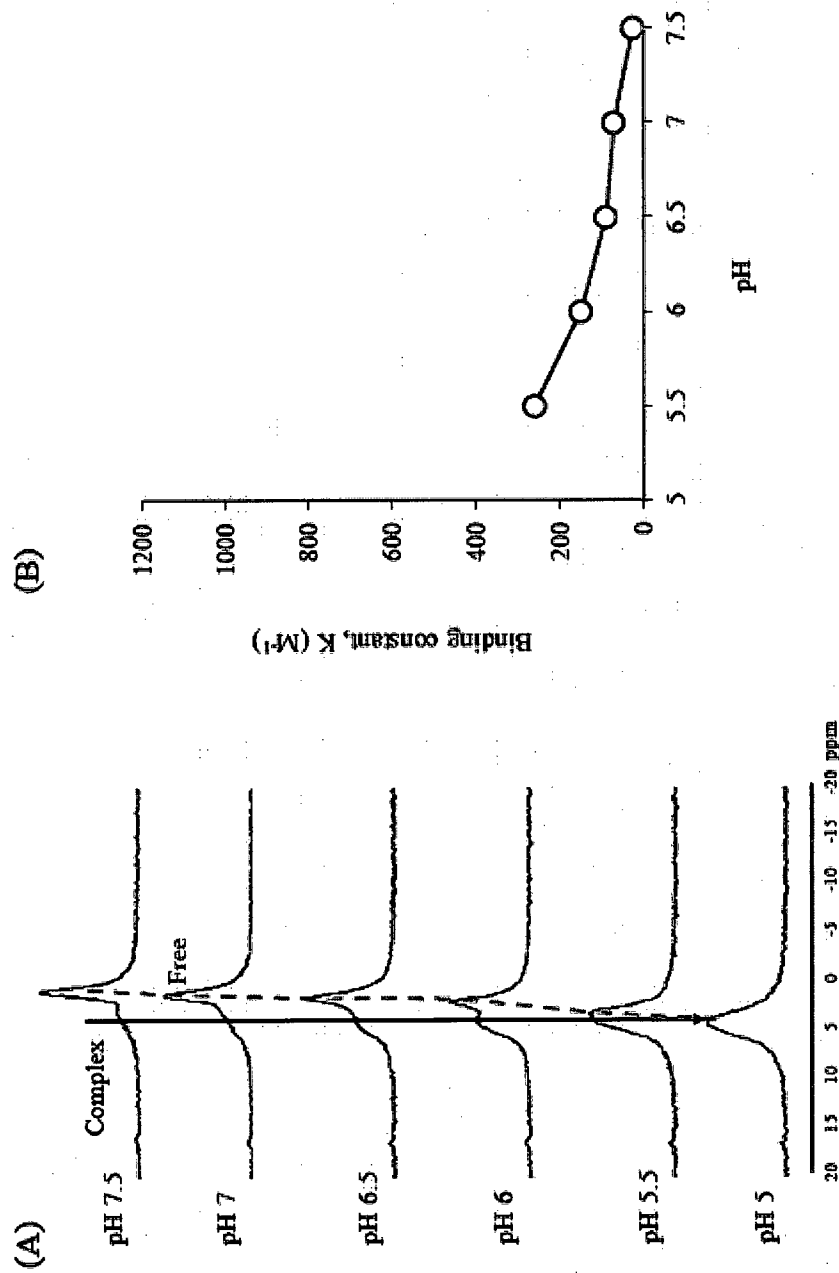


図29

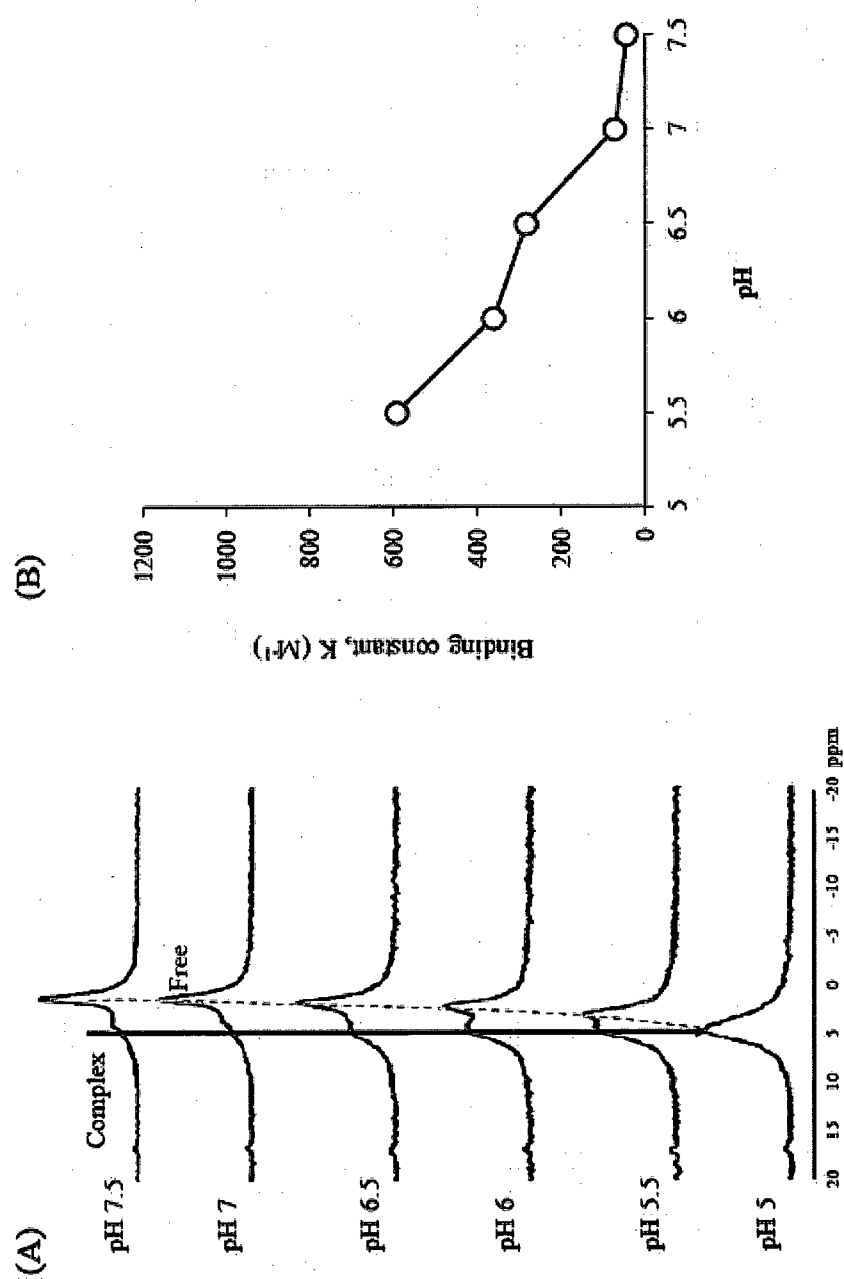


図 30

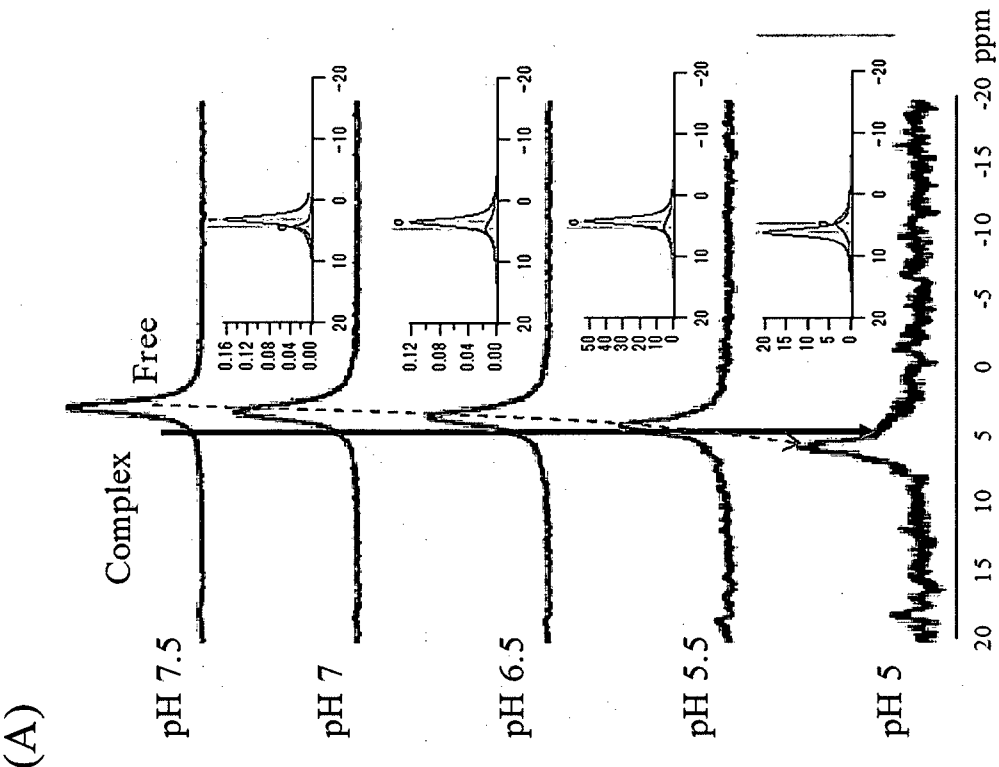
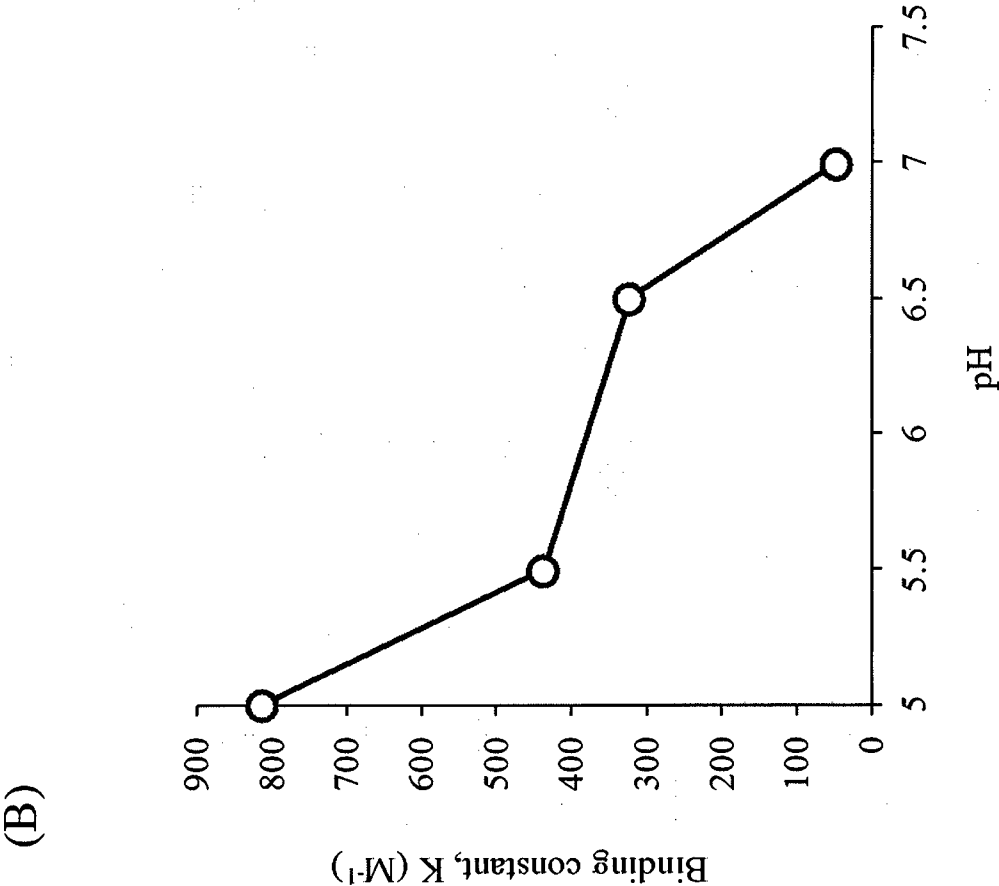


図 3 1

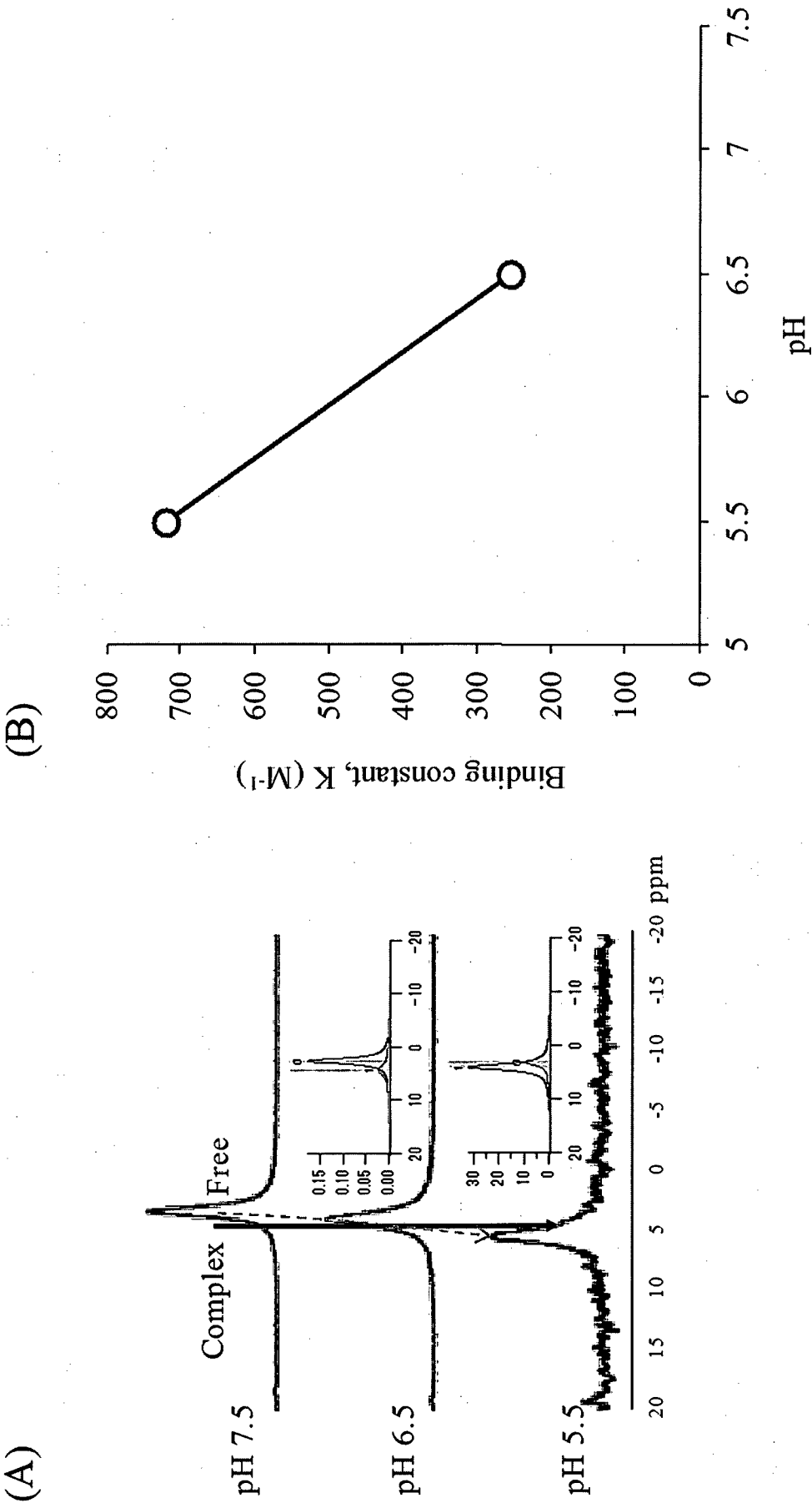
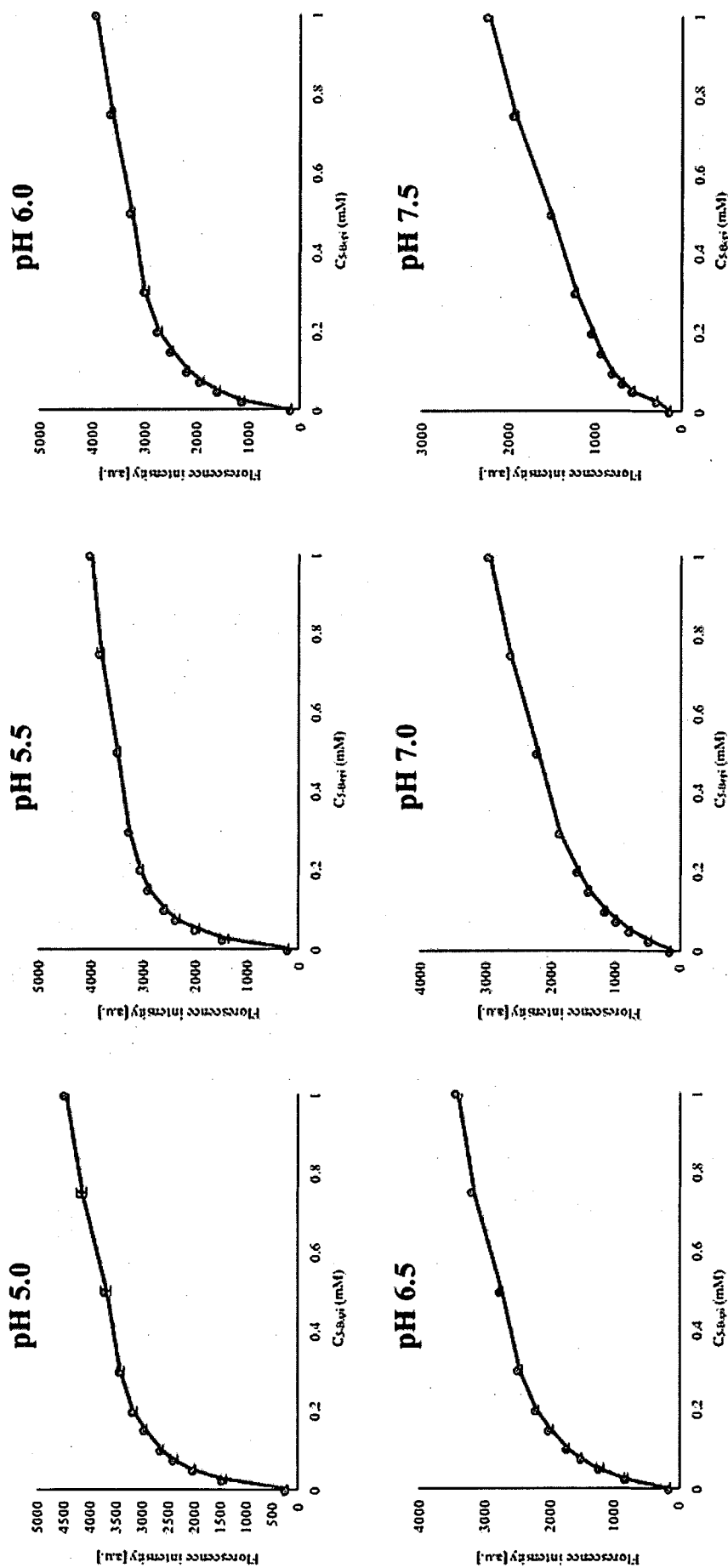


図 3 2



3 3

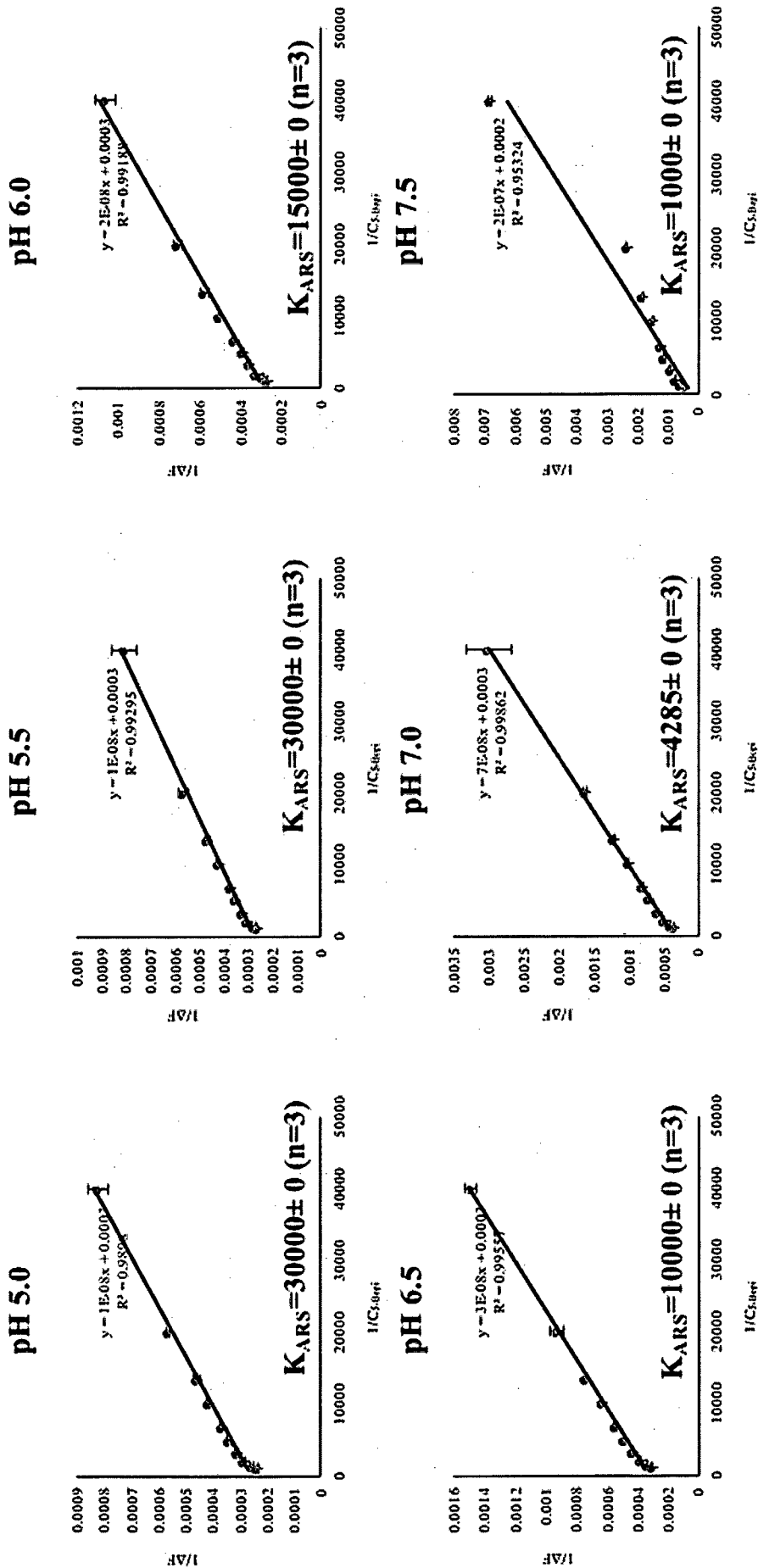


図 3 4

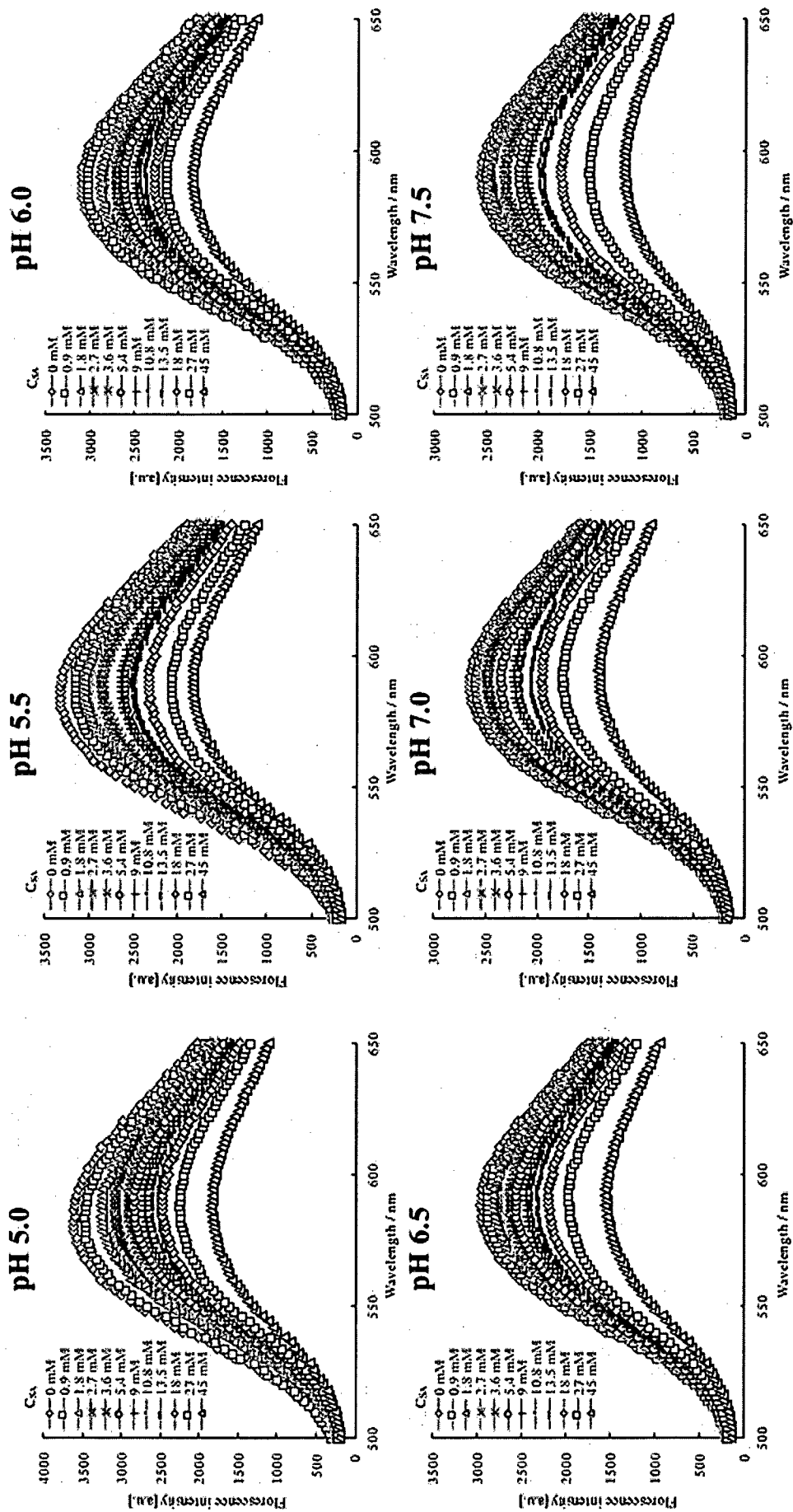
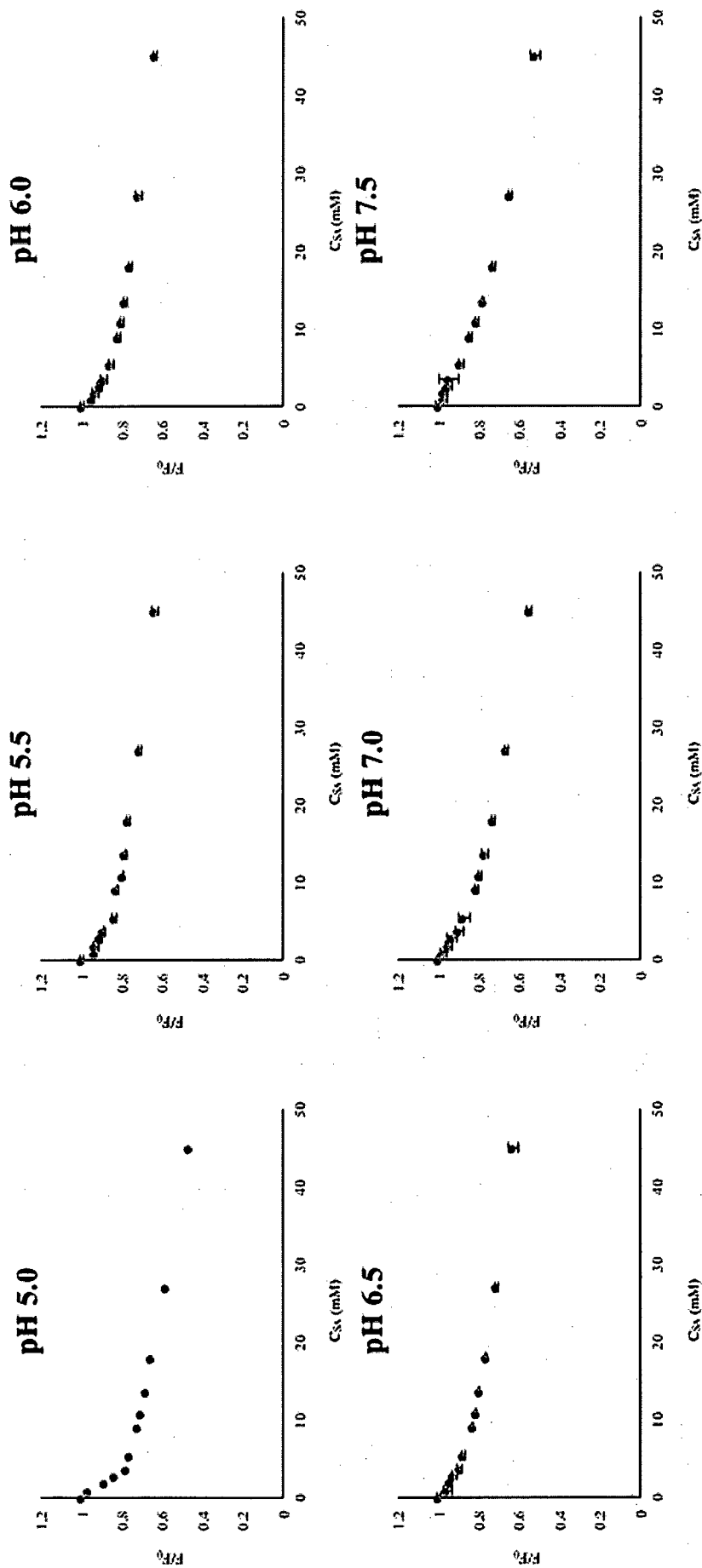


図 3 5



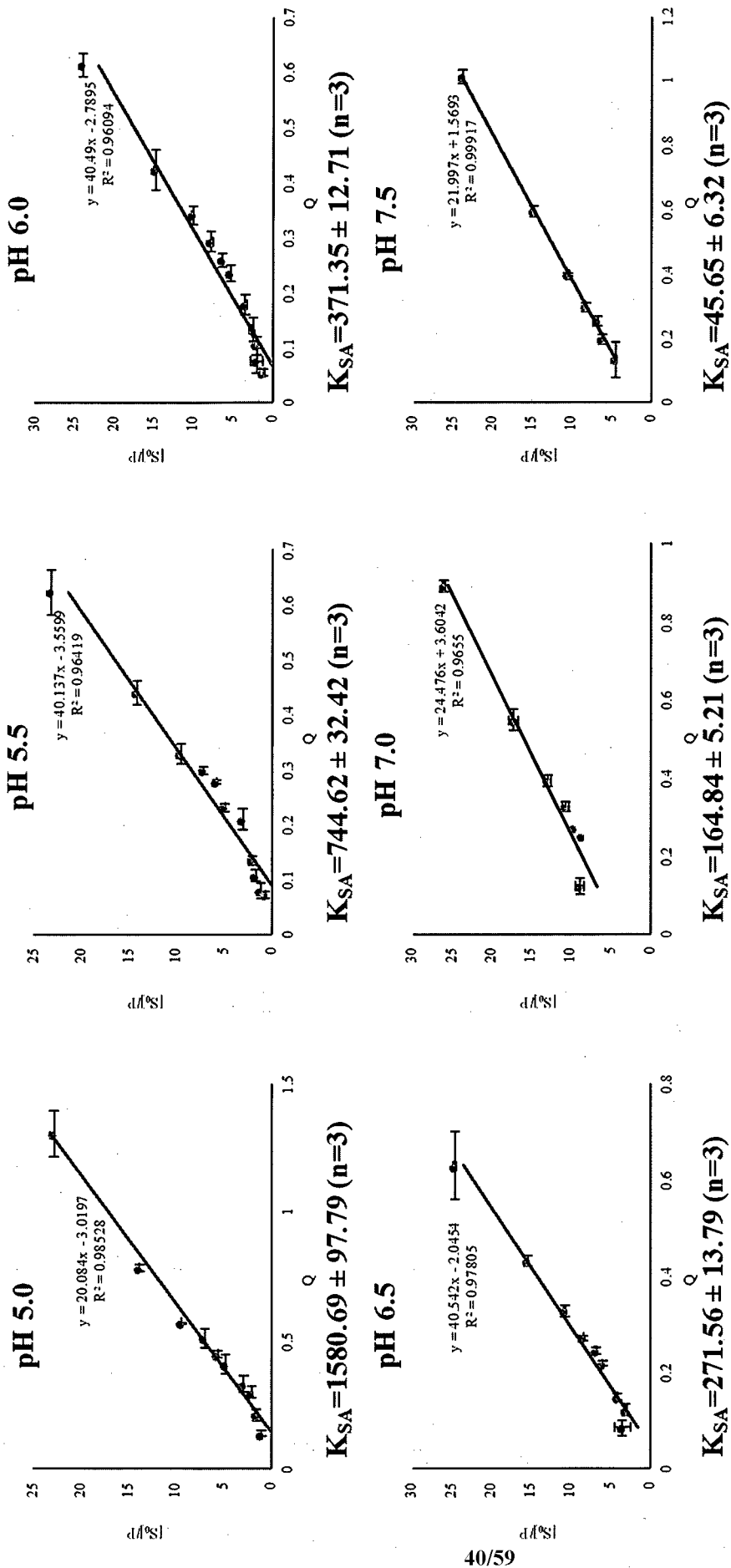
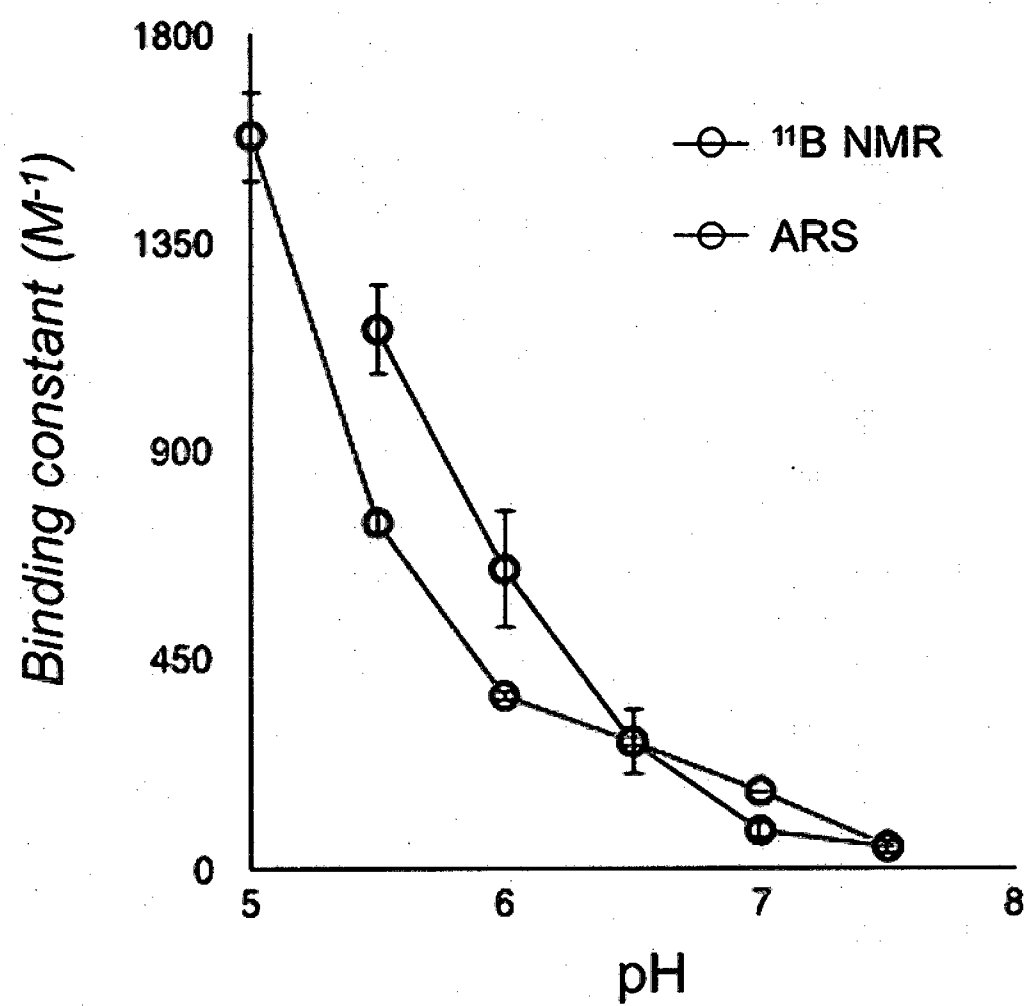


図37



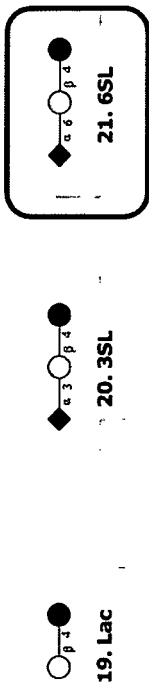
GAG

- 10. Heparin
- 11. De2S Hep: Iduronate C2-desulfated heparin
- 12. De6S Hep: Glucosamine C6-desulfated heparin
- 13. DeNS Hep: N-Desulfated heparin
- 14. DeNS / Ac Hep: N-acetylated DeNS Hep

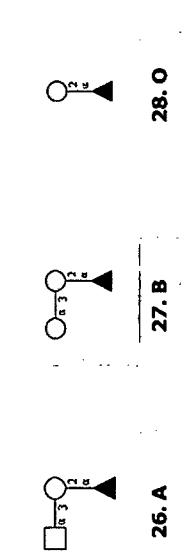
Lewis



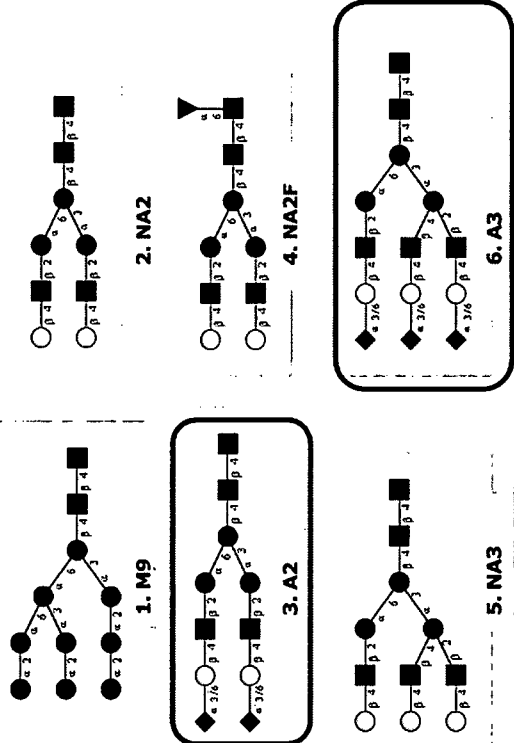
Lac



ABO



N-Glycan



O-Glycan



|     |     |     |        |        |        |     |
|-----|-----|-----|--------|--------|--------|-----|
| Man | Gal | Glc | GalNAc | GlcNAc | Neu5Ac | Fuc |
| ●   | ○   | ●   | □      | ■      | ◆      | ▼   |

|     |     |     |        |        |        |     |
|-----|-----|-----|--------|--------|--------|-----|
| Man | Gal | Glc | GalNAc | GlcNAc | Neu5Ac | Fuc |
| ●   | ○   | ●   | □      | ■      | ◆      | ▼   |

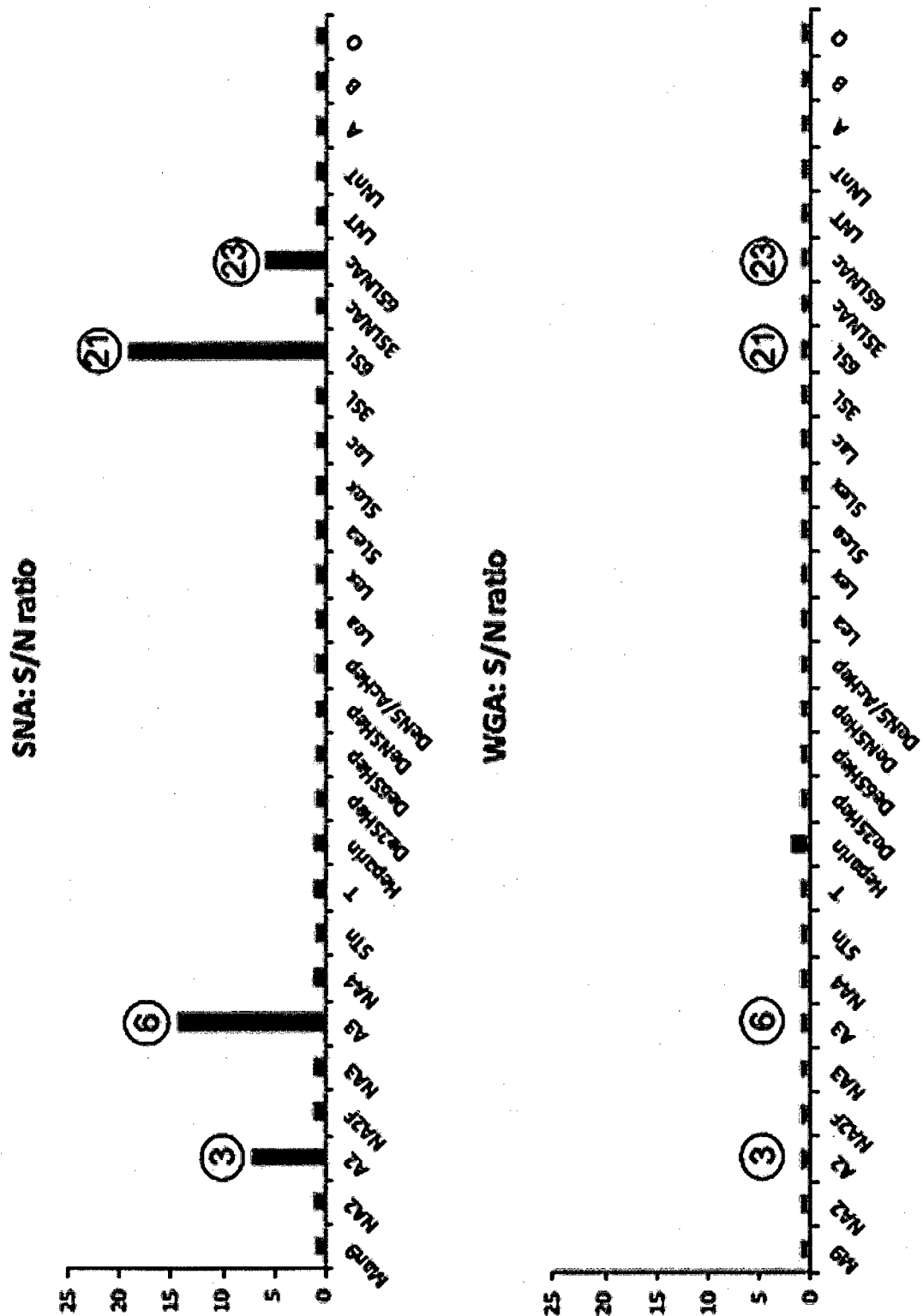


図 40

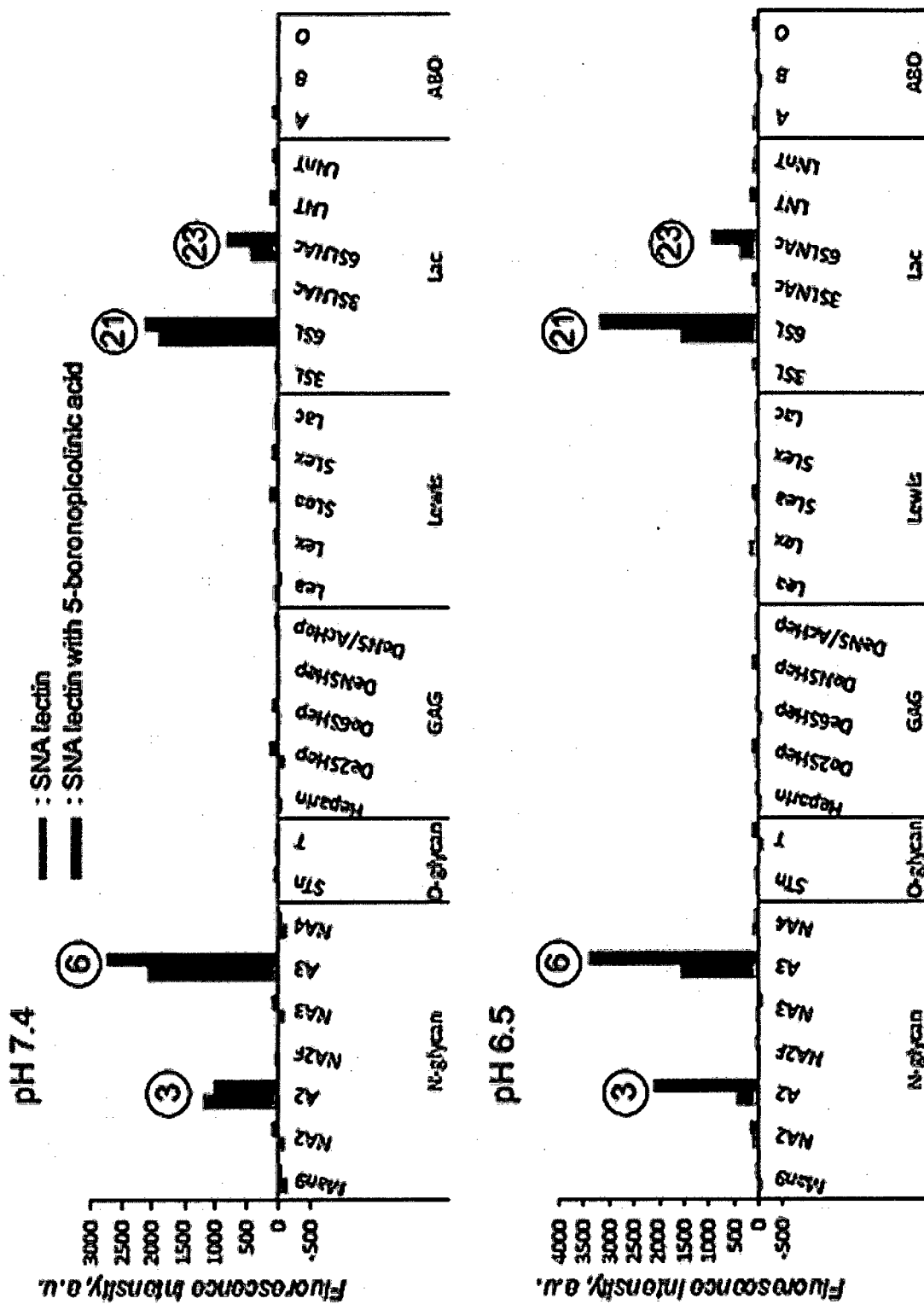


図 4 1

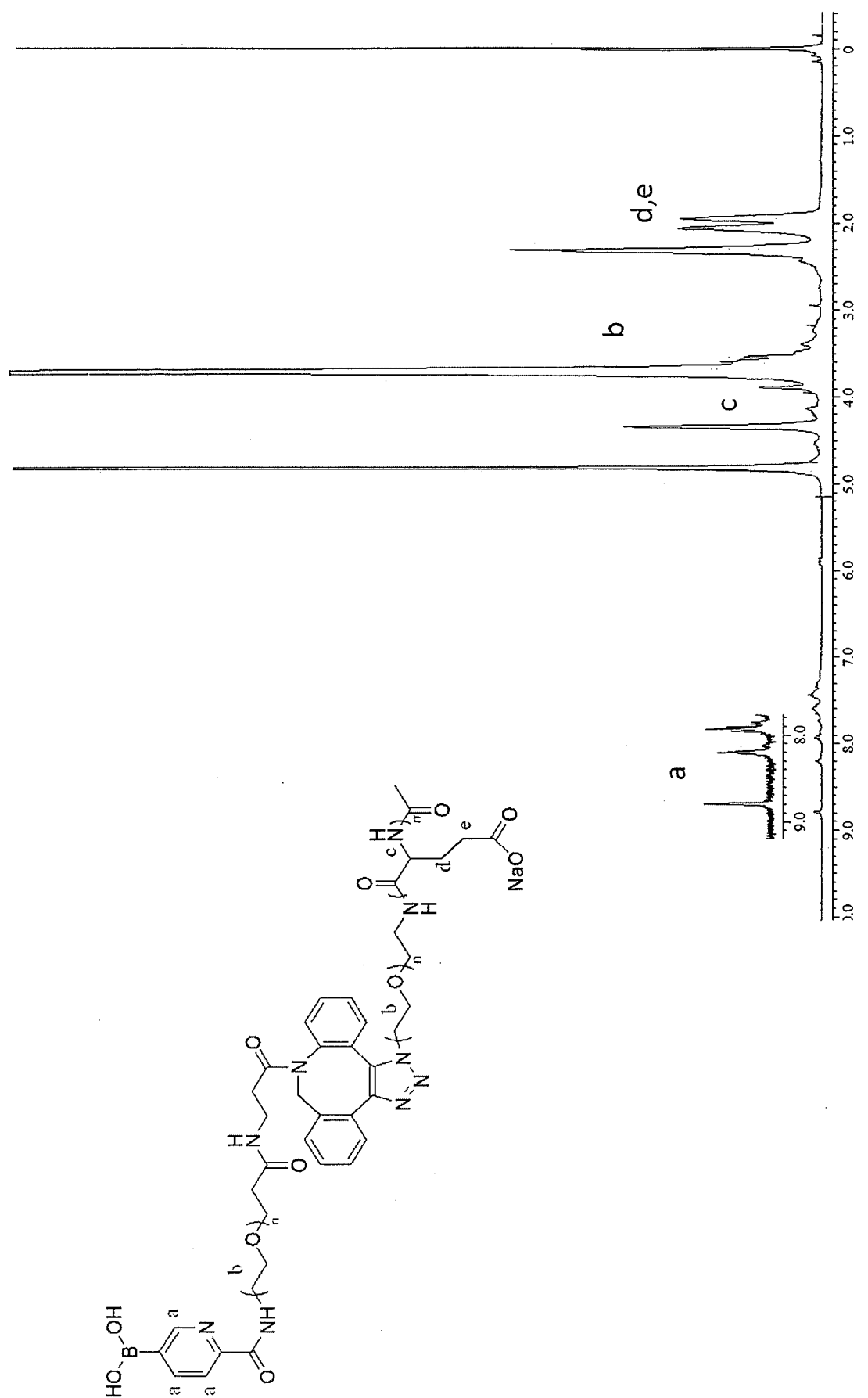


図42

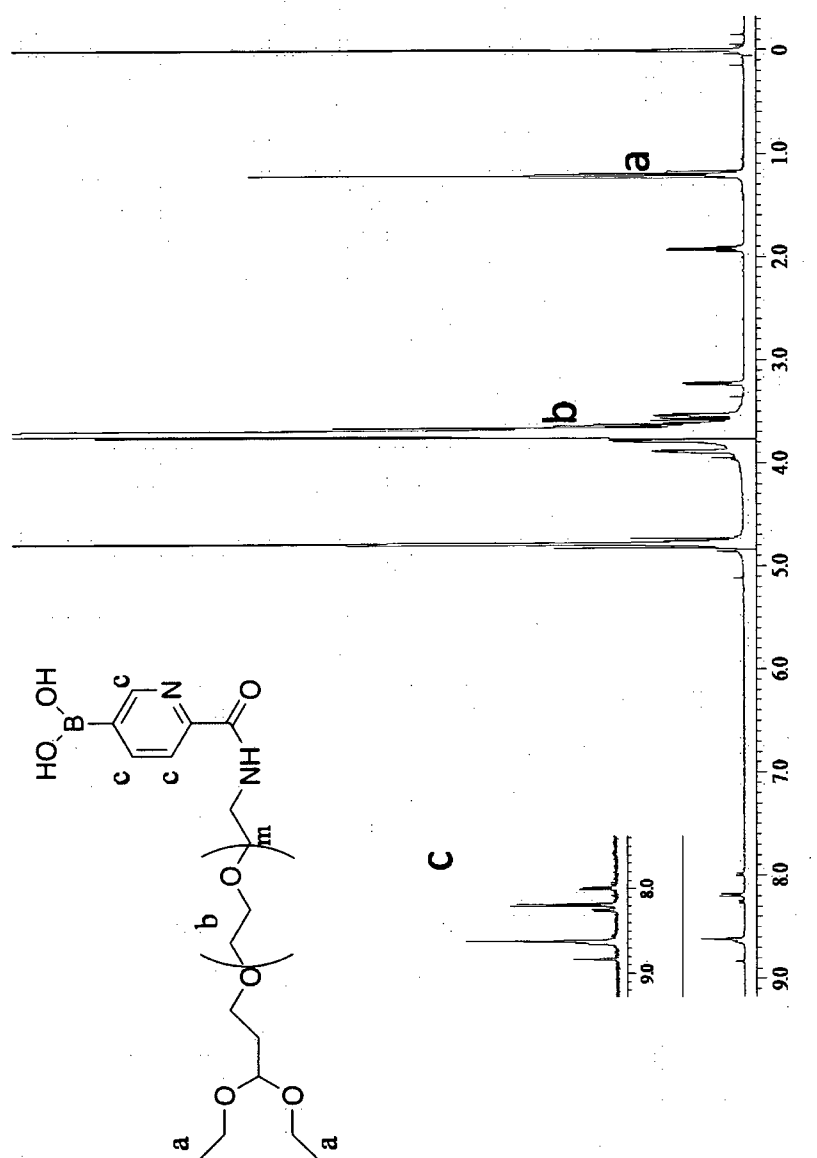
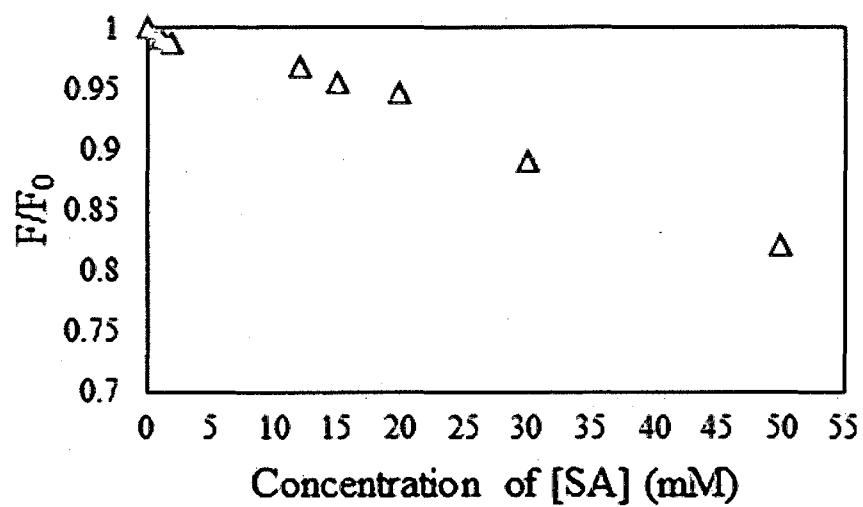
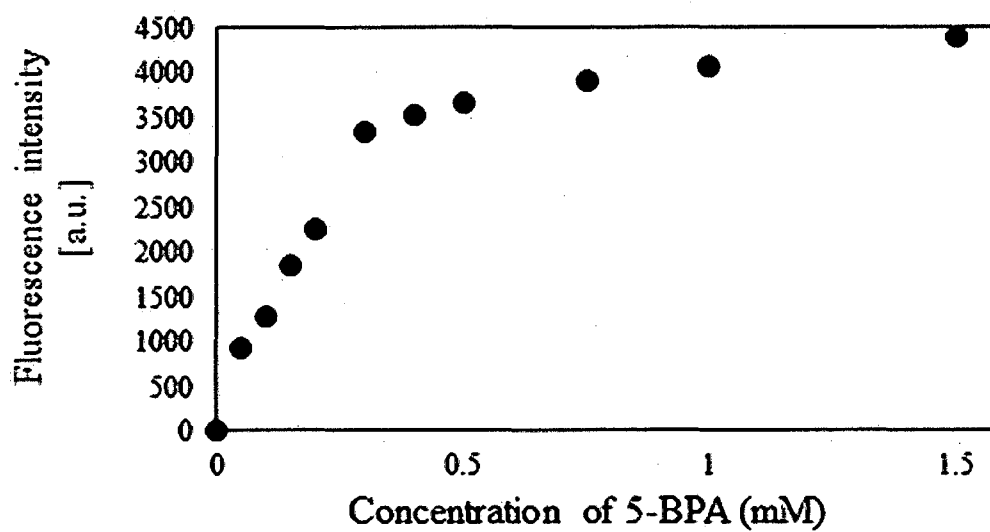
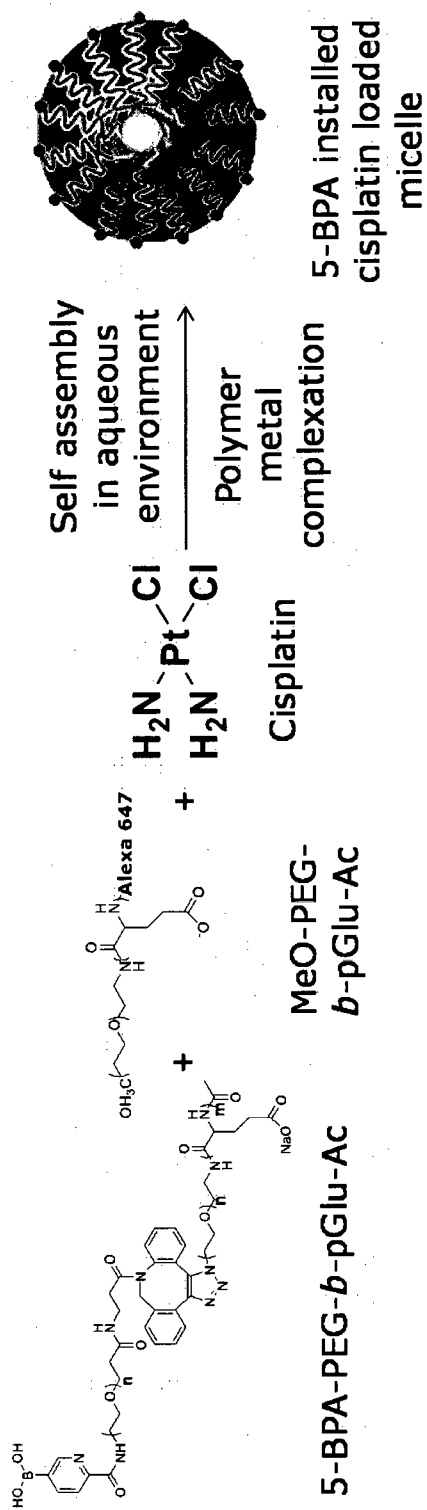


図43



44



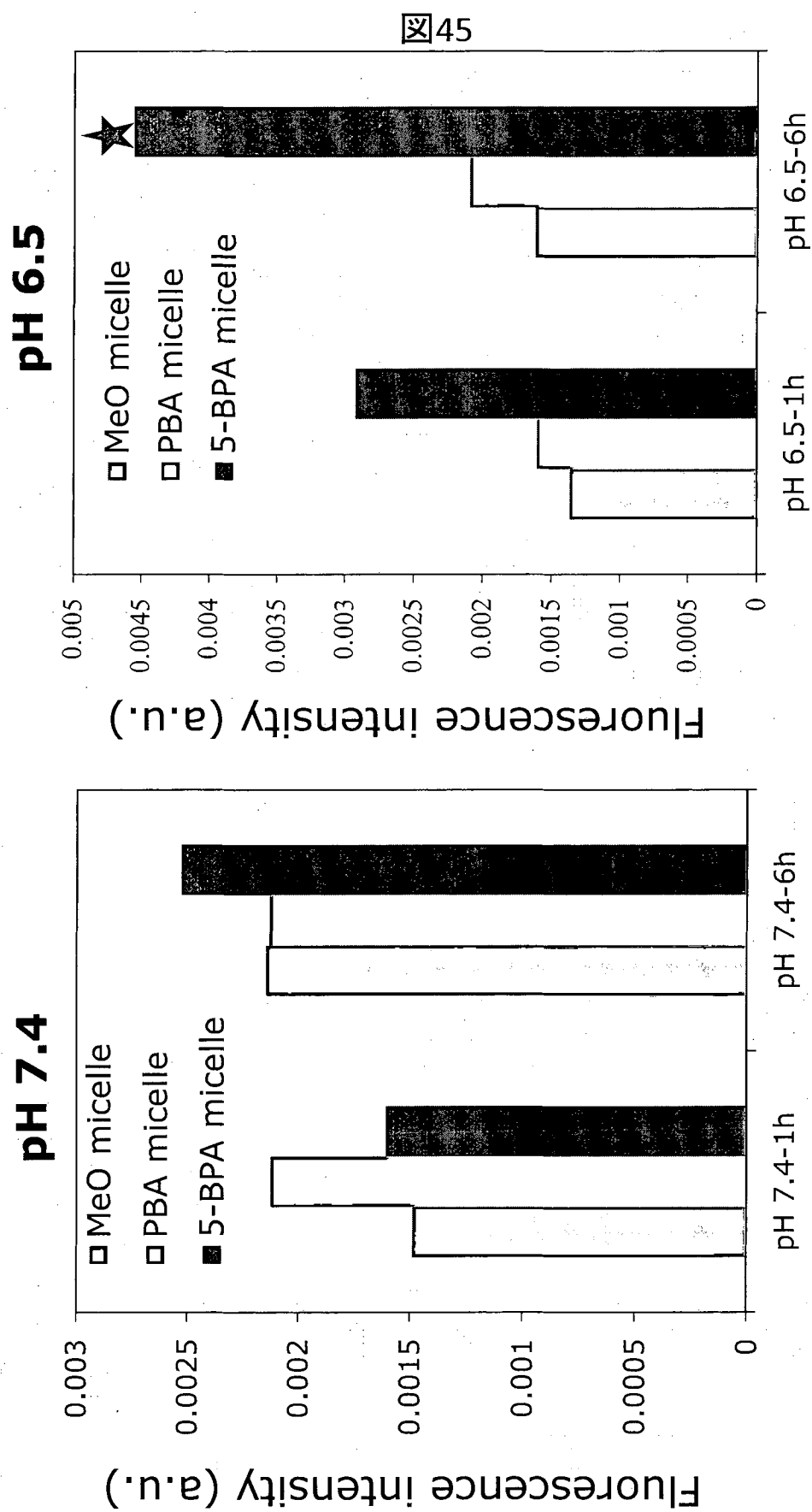


図46

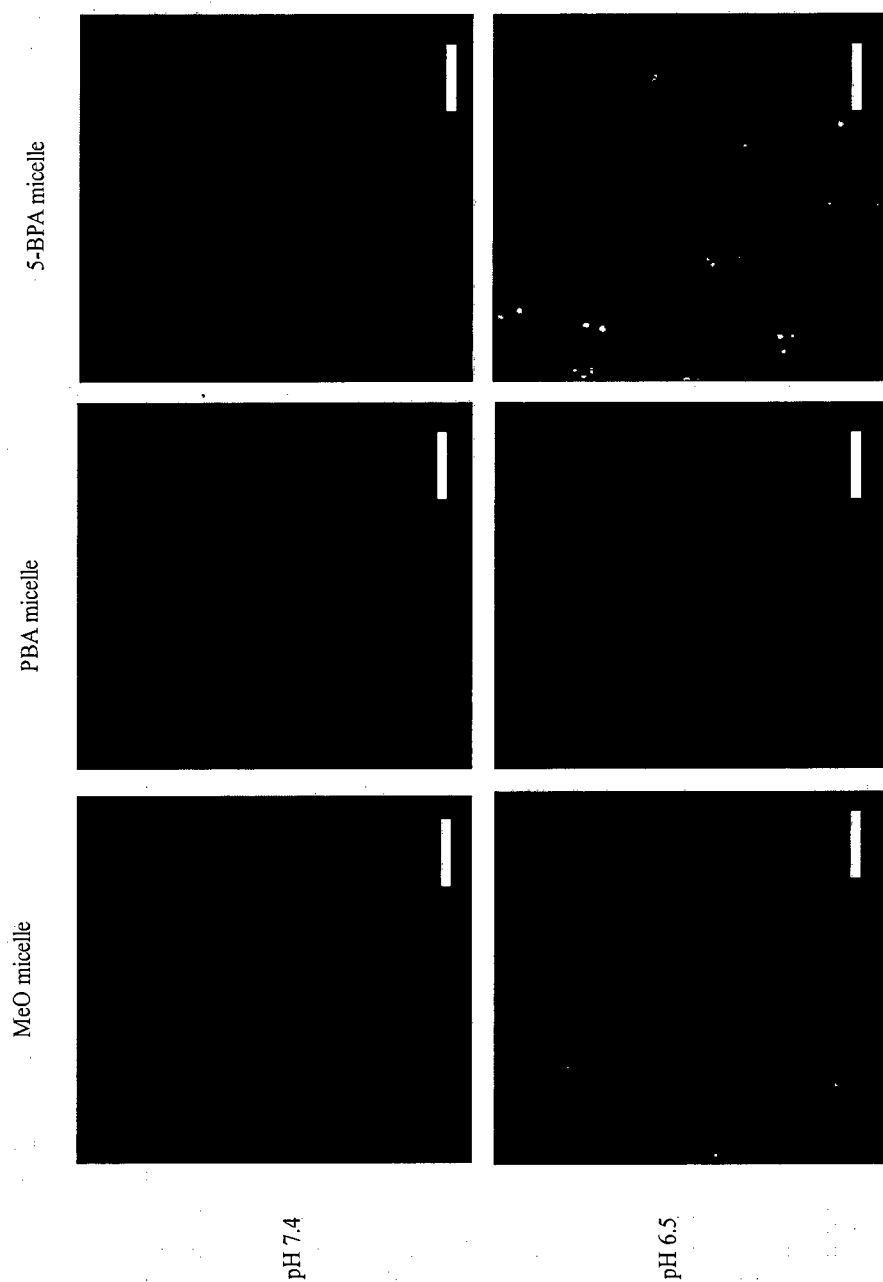
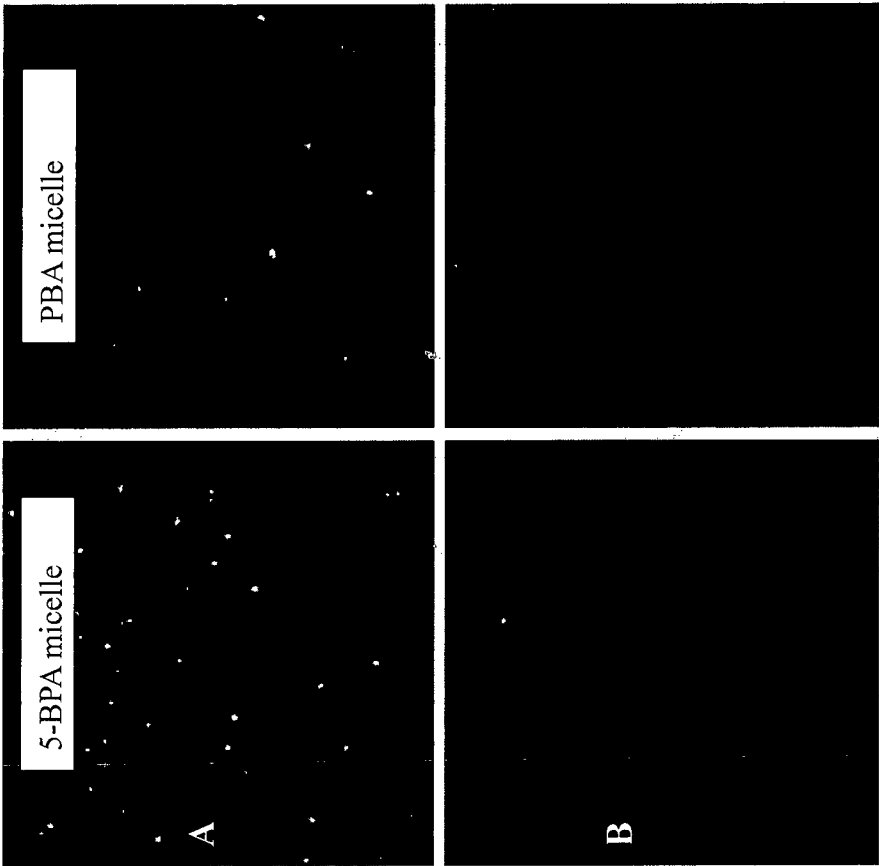


図47



Control

Sialidase treated  
cells

図 4 8

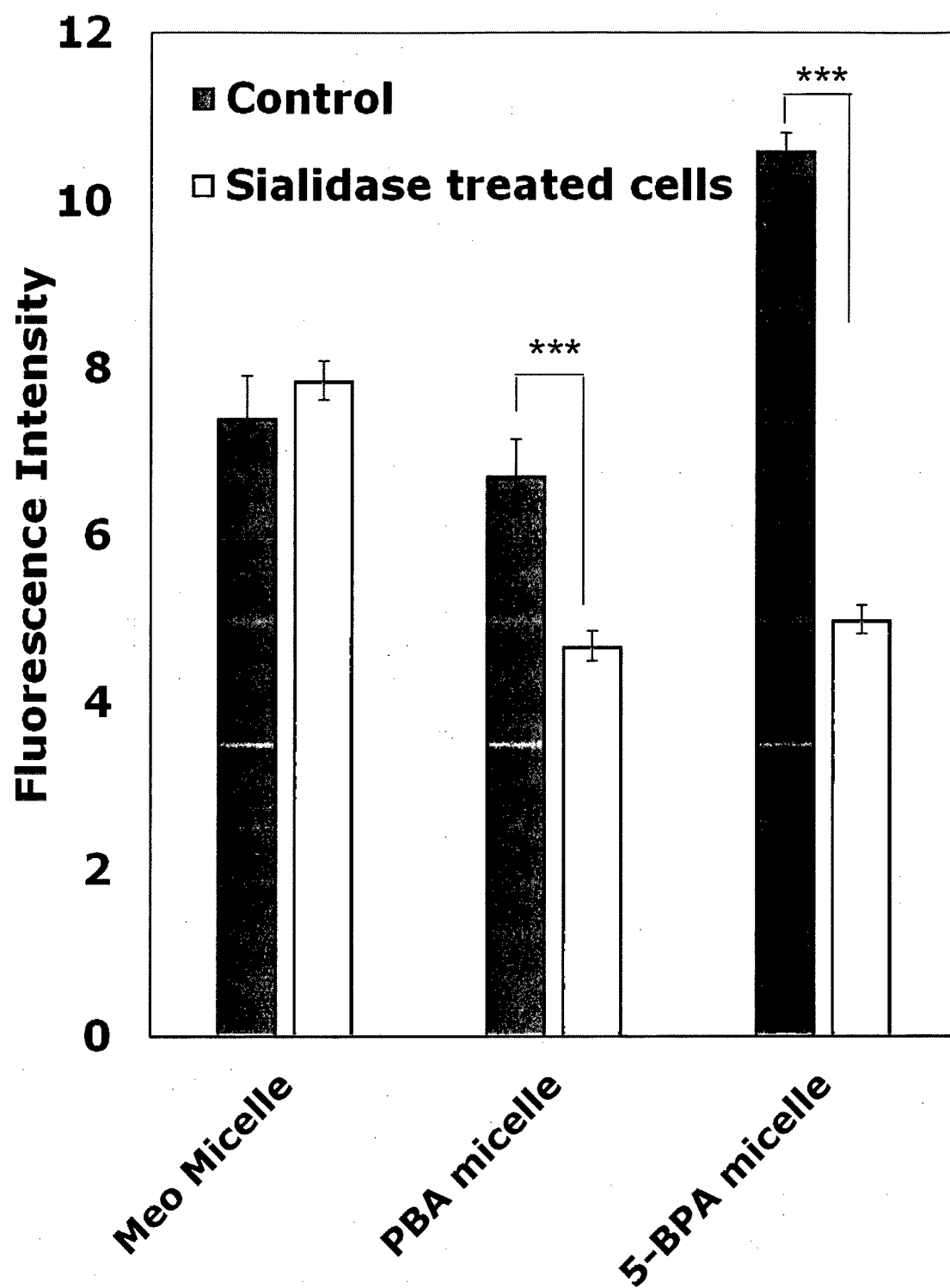
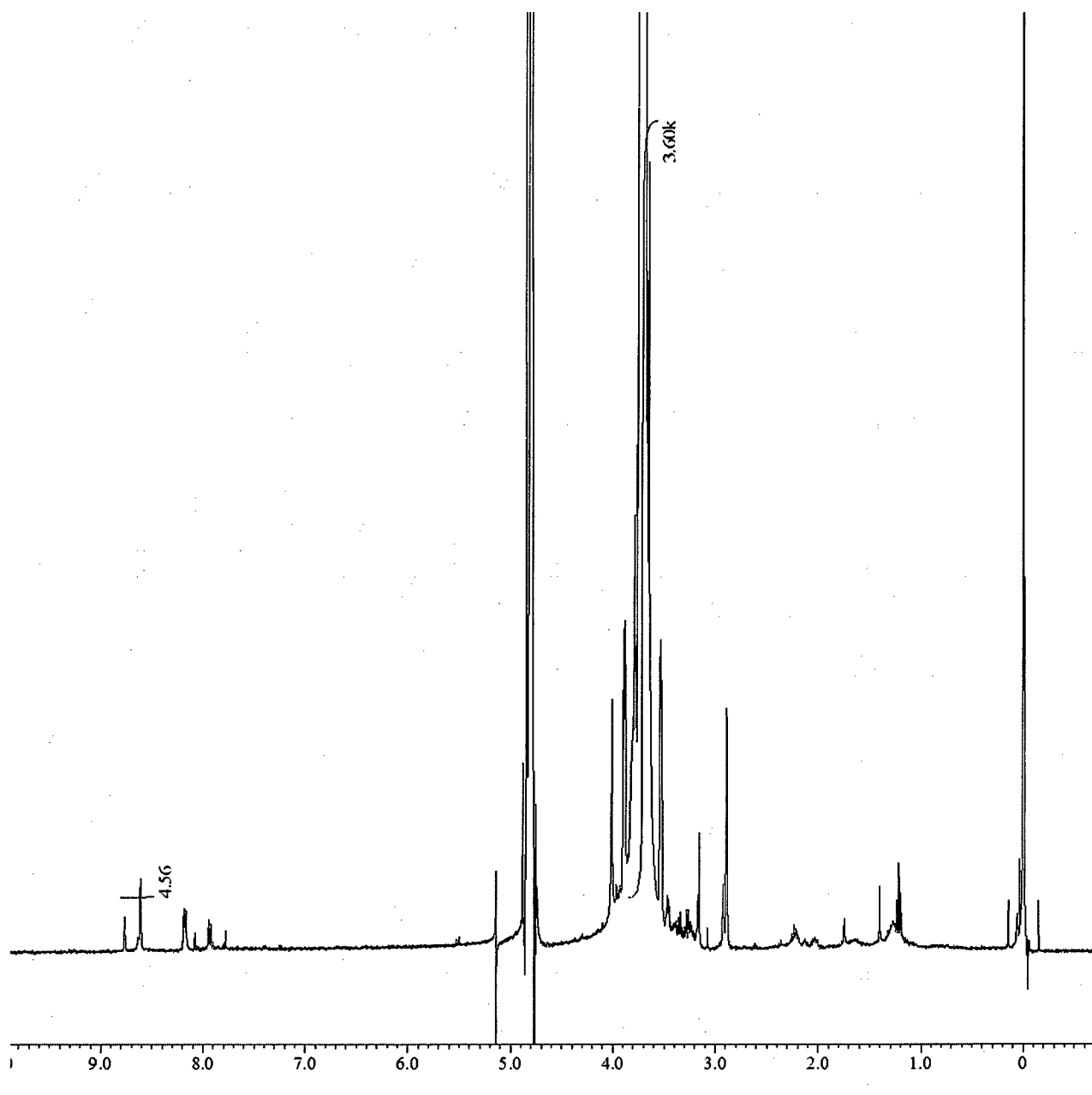
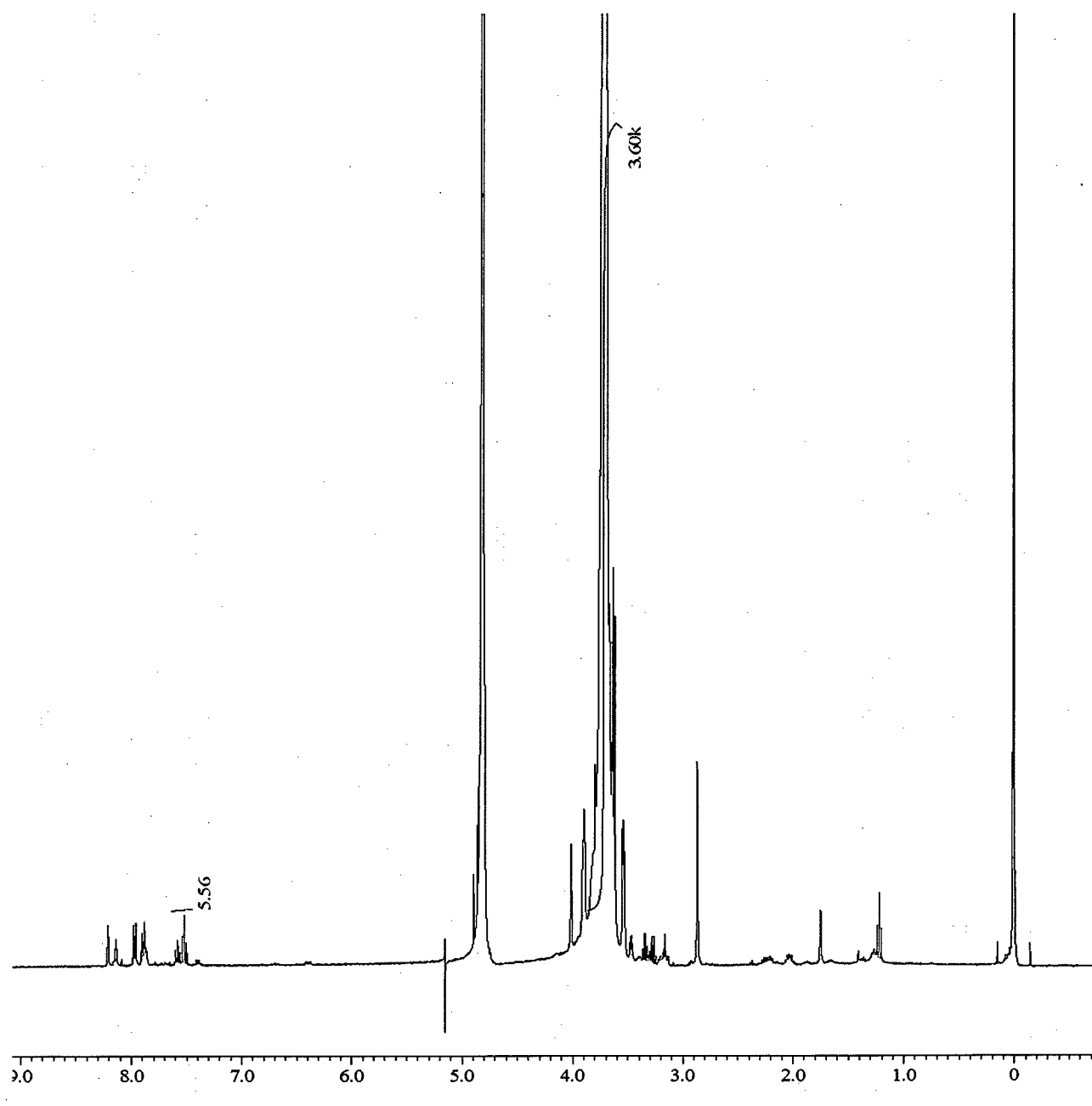


図 4 9



NMR of 5-BPA-PEG-Cy5-Amine



NMR of PBA-PEG-Cy5-Amine

図50

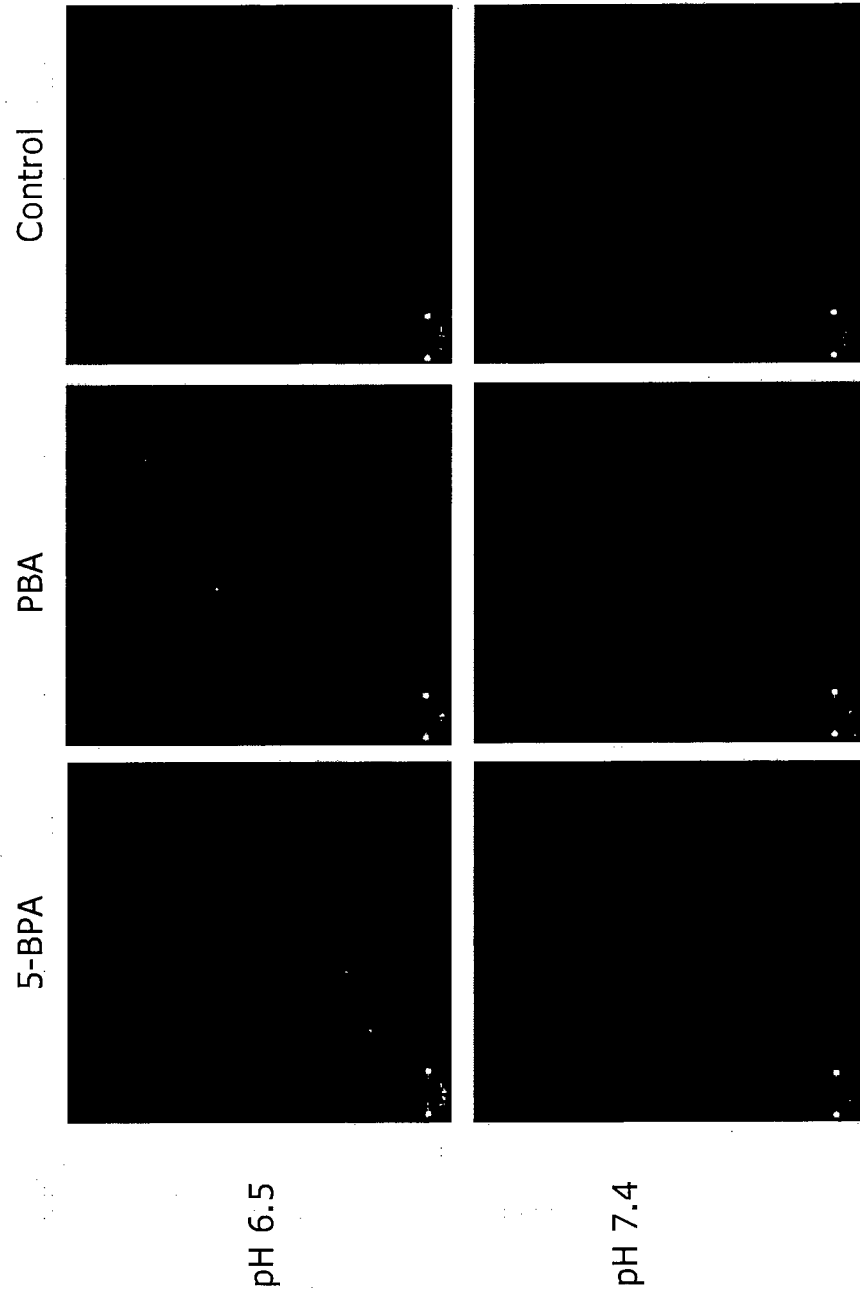
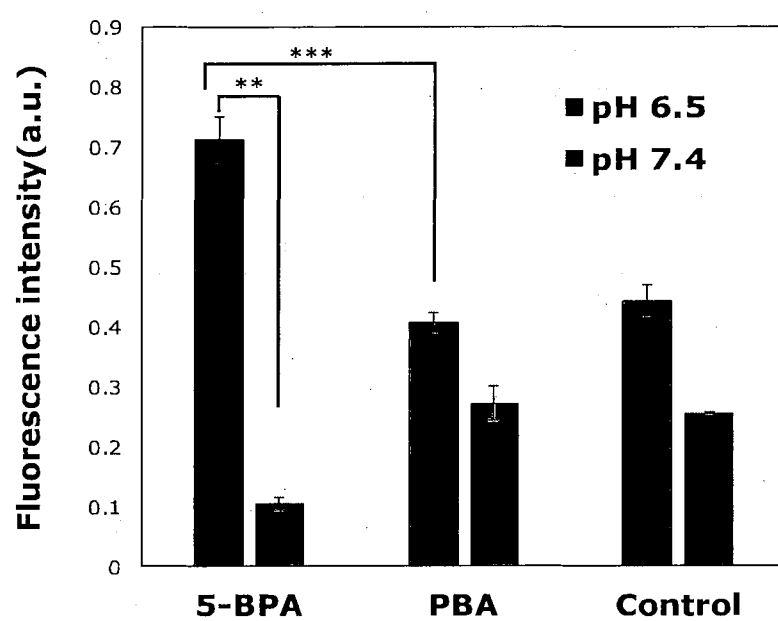


図51



\*\*\*p < 0.05, \*\*p < 0.05 determined by Student's t-test.

図52

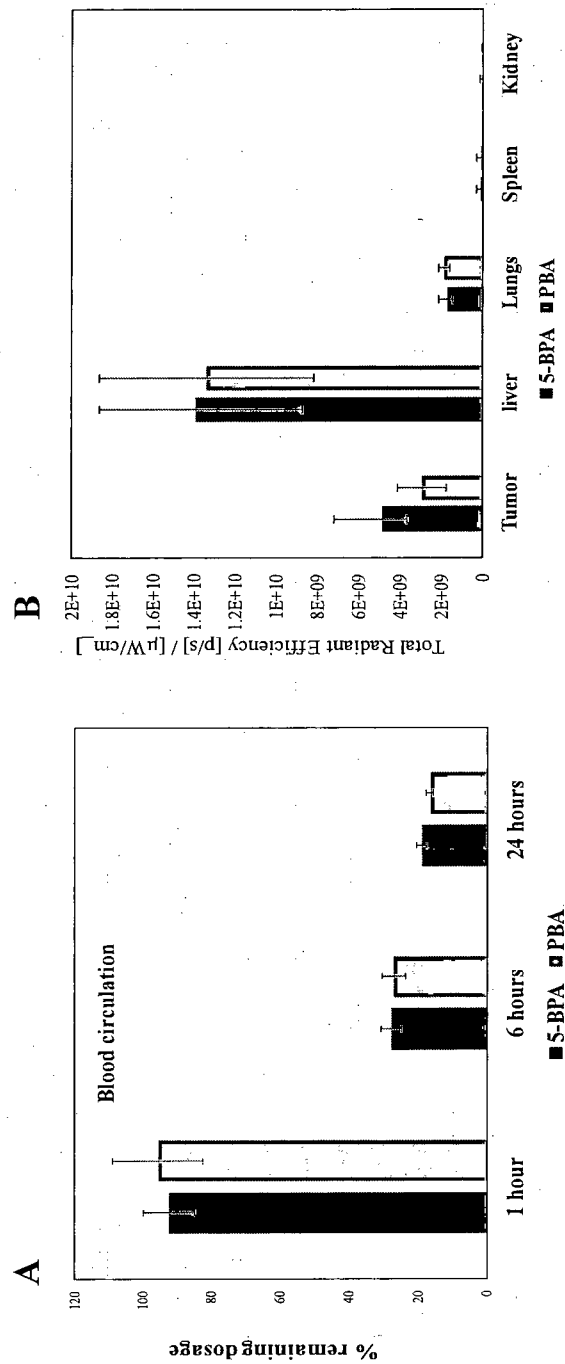
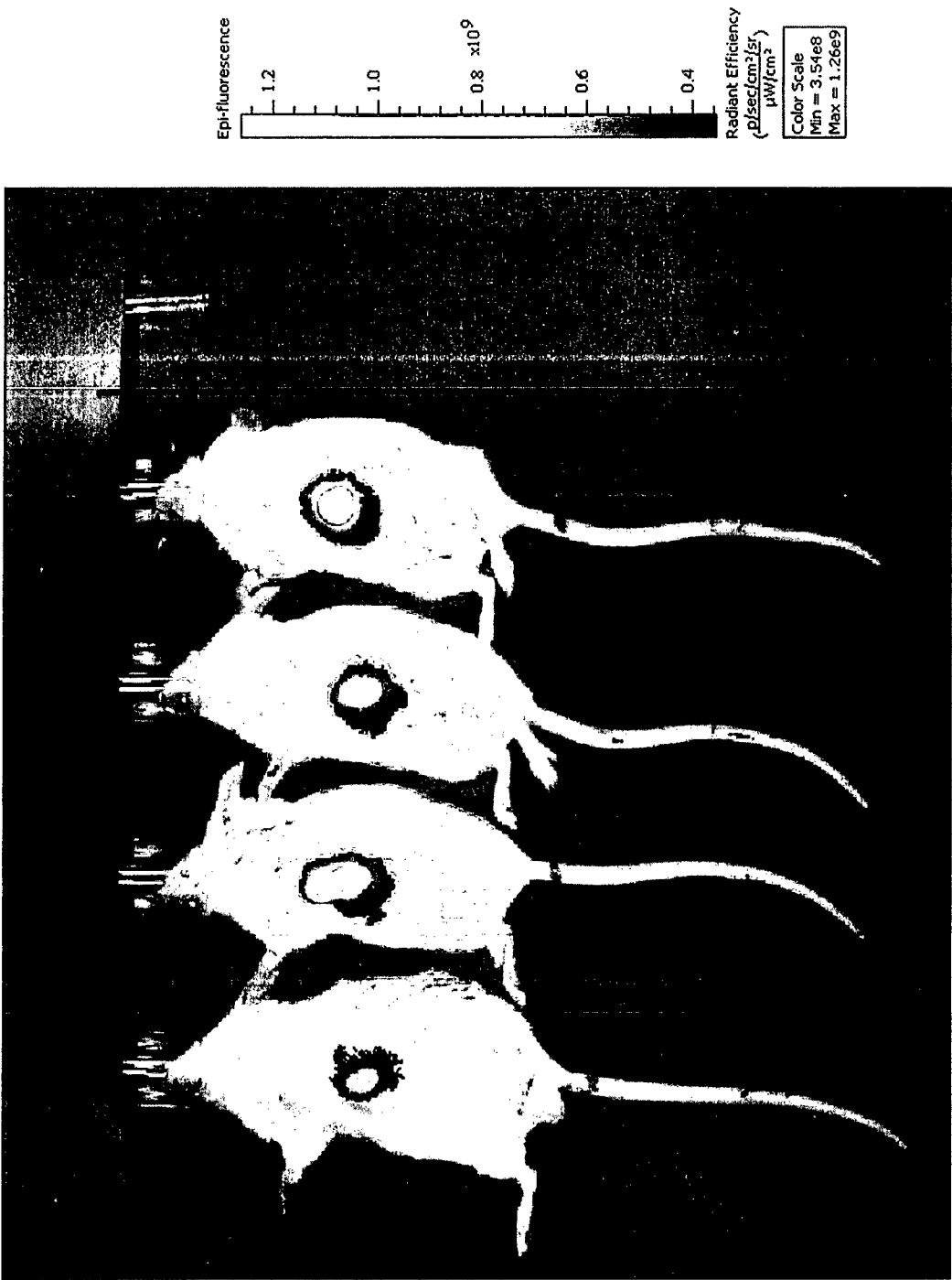


図 5 3





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024985

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07F5/02 (2006.01) i, G01N33/48 (2006.01) i, G01N33/84 (2006.01) i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C07F5/02, G01N33/48, G01N33/84

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

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2018 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2018 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>A    | WO 2016/124304 A1 (MERCK PATENT GMBH) 11 August 2016, page 113, S82, S94, page 213, line 8 from the bottom<br>& US 2018/0026209 A1 & KR 10-2017-0110668 A & JP 2018-510903 A & CN 107207550 A | 1-4<br>5-16           |
| X<br>A    | SMITH, G. R. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, vol. 22, pp. 3754-3757                                                                                                   | 1-3<br>4-16           |



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

22.08.2018

Date of mailing of the international search report

04.09.2018

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/JP2018/024985

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                         | Relevant to claim No.                   |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| X<br>Y      | LU, C. et al., Anal. Chem., 2013, vol. 85, pp. 2361-2369                                                                                                                                                                                   | 1-5<br>1-16                             |
| X<br>A      | SANJOH, M. et al., Org. Lett., 2015, vol. 17, pp. 588-591                                                                                                                                                                                  | 1, 3, 5, 6<br>2, 4, 7-16                |
| X<br>Y<br>A | IWATSUKI, S. et al., J. Phys. Org. Chem., 2012, vol. 25, pp. 760-768                                                                                                                                                                       | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| X<br>Y<br>A | YAN, J. et al., Tetrahedron, 2004, vol. 60, pp. 11205-11209                                                                                                                                                                                | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| X<br>Y<br>A | SPRINGSTEEN, G. et al., Tetrahedron, 2002, vol. 58, pp. 5291-5300                                                                                                                                                                          | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| Y           | 前島雪絵 等, 高分子学会予稿集, 2013, vol. 62, no. 1, p. 1284 (no. 3K18) (MAEJIMA, Yukie et al., Polymer Preprints)                                                                                                                                      | 1-16                                    |
| Y           | 前島雪絵 等, 高分子学会予稿集, 2012, vol. 61, no. 1, p. 1601 (no. 2G23) (MAEJIMA, Yukie et al., Polymer Preprints)                                                                                                                                      | 1-16                                    |
| Y           | JP 2015-520197 A (GU, F.) 16 July 2015, examples, table 2, fig. 9<br>& US 2014/0005379 A1 & US 2015/0320694 A1 & US 2016/0243189 A1 & WO 2013/188979 A1, examples, table 2, fig. 9 & CA 2877051 A1 & CN 104507458 A & KR 10-2015-0023042 A | 1-16                                    |
| Y           | MATSUMOTO, A. et al., Polymer Journal, 2014, vol. 46, pp. 483-491                                                                                                                                                                          | 1-16                                    |
| Y           | DESHAYES, S. et al., Journal of the American Chemical Society, 2013, vol. 135, pp. 15501-15507                                                                                                                                             | 1-16                                    |
| Y<br>A      | 小澤りみ子 等, J. Ion Exchange, 2007, vol. 18, no. 3, pp. 124-133, non-official translation (OZAWA, Rimiko et al.)                                                                                                                               | 1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/024985

(Subject to be searched)

Claim 1 recites a heterocyclic boronic acid derivative represented by formula I.

$R_1$  in formula I is defined to "represent a hydrogen atom or a nitrogen atom". However, the "hydrogen atom" cannot be present at the position of  $R_1$  and thus, the definition clearly contradicts with the fact.

Thus, the structure of the heterocyclic boronic acid derivative represented by formula I cannot be specified.

Table 1 of the examples in the specification shows specific compounds of the heterocyclic boronic acid derivative.

However, the specification indicates that commercially available compounds or compounds synthesized by the methods which have been reported are used as compounds other than (6-propylcarbamoyl)pyridine-3-boronic acid among the compounds described in Table 1 of the examples. That is, the description demonstrates that the applicant acknowledges all of the compounds described in Table 1 of the examples other than (6-propylcarbamoyl)pyridine-3-boronic acid lack novelty, and it cannot be understood which corresponds to the heterocyclic boronic acid derivative represented by formula I among the compounds specifically described in the examples.

Thus, even considering the specification, the invention cannot be clearly identified from the recitation of claim 1.

Therefore, claim 1 and claims 2, 3, and 5-16 from which claim 1 depends do not comply with the requirements as to clarity defined in PCT Article 6.

Accordingly, a meaning search was not conducted for compounds other than a boronic acid derivative having pyridine or a pyrimidine ring (the compound represented by formula I, where  $R_1$  represents a "carbon atom" or a "nitrogen atom") and a complex between the boronic acid derivative and a functional molecule among the compounds specifically described in Table 1 of the examples in the specification.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C07F5/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/84(2006.01)i

## 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. C07F5/02, G01N33/48, G01N33/84

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 | 1971-2018年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X<br>A          | WO 2016/124304 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2016.08.11, 第113頁<br>のS82, S94, 第213頁下から第8行<br>& US 2018/0026209 A1 & KR 10-2017-0110668 A & JP 2018-510903 A<br>& CN 107207550 A | 1-4<br>5-16    |
| X<br>A          | SMITH, G. R. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,<br>2012, Vol. 22, p. 3754-3757                                                                           | 1-3<br>4-16    |

☑ 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

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.2018

国際調査報告の発送日

04.09.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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）

松澤 優子

4 P

3036

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                         |                                         |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号                          |
| X<br>Y                | LU, C. et al., Anal. Chem., 2013, Vol. 85, p. 2361-2369                                                                                                                                                                                 | 1-5<br>1-16                             |
| X<br>A                | SANJOH, M. et al., Org. Lett., 2015, Vol. 17, p. 588-591                                                                                                                                                                                | 1, 3, 5, 6<br>2, 4, 7-16                |
| X<br>Y<br>A           | IWATSUKI, S. et al., J. Phys. Org. Chem., 2012, Vol. 25, p. 760-768                                                                                                                                                                     | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| X<br>Y<br>A           | YAN, J. et al., Tetrahedron, 2004, Vol. 60, p. 11205-11209                                                                                                                                                                              | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| X<br>Y<br>A           | SPRINGSTEEN, G. et al., Tetrahedron, 2002, Vol. 58, p. 5291-5300                                                                                                                                                                        | 1<br>1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16 |
| Y                     | 前島雪絵 等, 高分子学会予稿集, 2013, Vol. 62, No. 1, p. 1284<br>(No. 3K18)                                                                                                                                                                           | 1-16                                    |
| Y                     | 前島雪絵 等, 高分子学会予稿集, 2012, Vol. 61, No. 1, p. 1601<br>(No. 2G23)                                                                                                                                                                           | 1-16                                    |
| Y                     | JP 2015-520197 A (フランク・グー) 2015.07.16,<br>実施例, Table2, 図9<br>& US 2014/0005379 A1 & US 2015/0320694 A1 & US 2016/0243189 A1<br>& WO 2013/188979 A1, EXAMPLES, Table2, Fig. 9 & CA 2877051 A1 & CN<br>104507458 A & KR 10-2015-0023042 A | 1-16                                    |
| Y                     | MATSUMOTO, A. et al., Polymer Journal, 2014, Vol. 46, p. 483-491                                                                                                                                                                        | 1-16                                    |
| Y                     | DESHAYES, S. et al., JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,<br>2013, Vol. 135, p. 15501-15507                                                                                                                                        | 1-16                                    |
| Y<br>A                | 小澤りみ子 等, J. ION EXCHANGE, 2007, Vol. 18, No. 3, p. 124-133                                                                                                                                                                              | 1, 5, 6, 9, 10<br>2-4, 7, 8, 11-16      |

### ＜調査の対象について＞

請求項 1 には、式 I で示される複素環式ボロン酸誘導体が記載されている。

しかしながら、当該式中の  $R_1$  の定義には「水素原子又は窒素原子を表し」と記載され、「水素原子」は  $R_1$  の位置には存在し得ないから、明らかに矛盾する。

このため、式 I で示される複素環式ボロン酸誘導体の構造を特定できない。

そこで、明細書の記載をみると、実施例の表 1 には、複素環式ボロン酸誘導体として、具体的に化合物が列挙されている。

しかしながら、実施例の表 1 に記載された化合物のうち、(6-propylcarbamoyl) pyridine-3-boronic acid 以外の化合物については、市販のものを使用したか、以前に報告された方法で合成したものを使用した旨、明細書に記載されている。すなわち、当該記載は、(6-propylcarbamoyl) pyridine-3-boronic acid を除く、実施例の表 1 に記載された化合物の全てが新規性を有さないことを、出願人自身が認めるものであって、実施例に具体的に記載された化合物のうち、どれが式 I で示される複素環式ボロン酸誘導体に相当するものなのかが理解できない。

このため、明細書の記載を参酌しても、請求項 1 の記載から、発明を明確に把握することができない。

したがって、請求項 1 および請求項 1 を引用する請求項 2、3、5～16 は、PCT 第 6 条に規定される明確性に関する要件を満たしていない。

よって、明細書の実施例の表 1 に具体的に記載された化合物のうち、ピリジンまたはピリミジン環を有するボロン酸誘導体（請求項 1 に記載の式 I 中の  $R_1$  が「炭素原子」か「窒素原子」である化合物）、および、当該ボロン酸誘導体と機能分子との複合体以外については、有意義な調査を行うことができないため、調査を行わなかった。