

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-501262  
(P2019-501262A)

(43) 公表日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C08B 37/08 (2006.01)</b>	C08B 37/08 Z	4C076
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A61P 43/00 105	4C084
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4C085
<b>A61K 49/00 (2006.01)</b>	A61K 49/00	4C086
<b>A61K 49/18 (2006.01)</b>	A61K 49/18	4C090
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-533195 (P2018-533195)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月22日 (2016.12.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月17日 (2018.8.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CZ2016/050048  
 (87) 国際公開番号 WO2017/108015  
 (87) 国際公開日 平成29年6月29日 (2017.6.29)  
 (31) 優先権主張番号 PV2015-936  
 (32) 優先日 平成27年12月23日 (2015.12.23)  
 (33) 優先権主張国 チェコ (CZ)

(71) 出願人 507211897  
 コンティプロ アクチオヴァ スポレチノ  
 スト  
 チェコ, シーゼット-561 02 ドル  
 ニ ドプロチ, ドルニ ドプロチ 401  
 (74) 代理人 110002398  
 特許業務法人小倉特許事務所  
 (72) 発明者 アフベルゲロヴァ, エヴァ  
 チェコ, 75142 ムニエロヴィツェ  
 ナト ハノウ, ムニエロヴィツェ ナト  
 ハノウ 49  
 (72) 発明者 スメイカロヴァ, ダニエラ  
 チェコ, 56206 ウースチー ナト  
 オルリツィー, ナ プラニー 1346

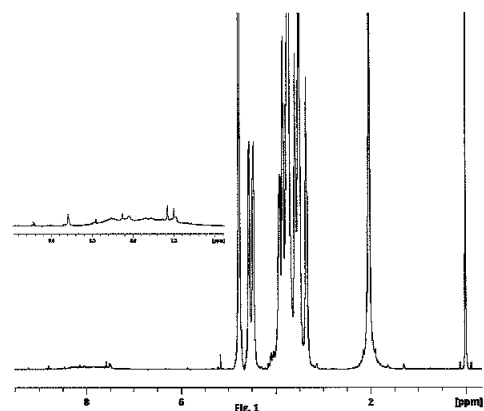
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸又はその塩の蛍光Cypate複合体、疎水化複合体、それらの調製方法及び使用

(57) 【要約】

本発明は、Cypateを含むヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体、疎水化複合体、その調製法、及びインビボイメージング及び新生物の治療のための医薬用途における使用に関する。

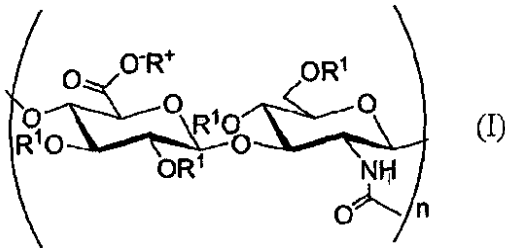
【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

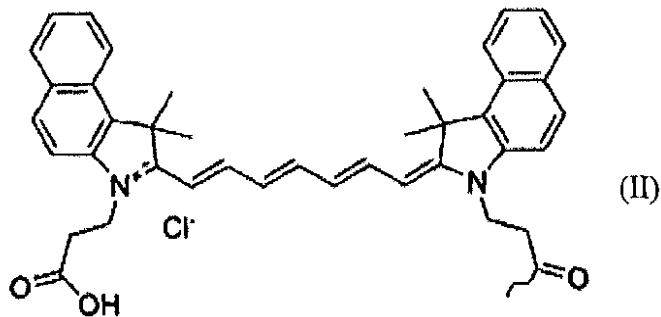
一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体：



10

(式中、 $R^+$  は  $H^+$ 、又は  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$  又は  $Ca^{2+}$  を含む群から選択される生理学的に許容される塩であり、

$R^1$  は  $-H$  又は式 II の Cypate 残基であり、ここで  $\sim$  は、式 II の Cypate 残基の共有結合の位置であり、



20

少なくとも 1 つの繰り返し単位において 1 つの  $R^1$  は式 II の Cypate 残基であり、ただし該単位に式 II の Cypate 残基である  $R^1$  が存在する場合は、該単位における他の  $R^1$  は  $H$  であり、そして

$n$  は 2 ~ 625 の範囲の整数である)。

## 【請求項 2】

一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体のグルコサミン部分の 6 位が式 II の Cypate 残基で置換されている請求項 1 記載の蛍光複合体。

30

## 【請求項 3】

一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の複合体における式 II の Cypate 残基の置換度が、0.1 ~ 2%、好ましくは 1.0% である請求項 1 又は 2 記載の蛍光複合体。

## 【請求項 4】

570 nm ~ 790 nm までの領域の光を吸収し、680 nm ~ 850 nm までの領域、好ましくは 850 nm の光を発する請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載の蛍光複合体。

## 【請求項 5】

$R^+$ 、 $R^1$  及び  $n$  は請求項 1 で定義したとおりであり、同時に、少なくとも 1 つの繰り返し単位において、少なくとも 1 つの  $R^1$  が  $C(=O)R^2$  であり、ここで  $R^2$  は  $C_xH_y$  置換基であり、 $x$  は 5 ~ 17 の範囲中の整数であり、 $y$  は 11 ~ 35 の範囲中の整数であり、それは直鎖又は分岐した飽和又は不飽和の  $C_6 - C_{18}$  脂肪鎖である請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載のヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体。

40

## 【請求項 6】

一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の複合体において置換基  $-C(=O)R^2$  の置換度が 3 ~ 70%、好ましくは 5 ~ 12% である請求項 5 記載の蛍光複合体。

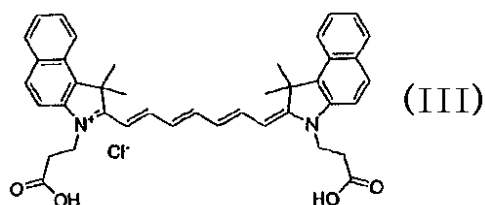
## 【請求項 7】

570 nm ~ 790 nm までの領域の光を吸収し、680 nm ~ 850 nm までの領域、好ましくは 850 nm の光を発する請求項 5 又は 6 記載の蛍光複合体。

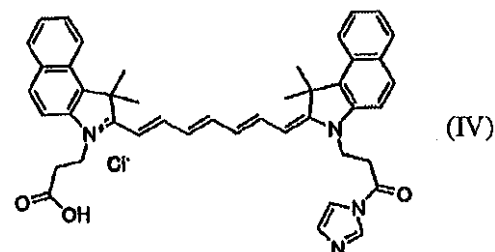
## 【請求項 8】

次式 III

50



のCypate Iを，ジメチルスルホキシド，ジメチルホルムアミド，ホルムアミド又はアセトニトリルを含む群から選択され，好ましくはジメチルスルホキシドである非プロトン性極性溶媒中で，N，N'-カルボニルジイミダゾールを用いて活性化し，次式IV



の反応性中間体モノ-イミダゾリドを生じさせ，それをイミダゾールの形態でその場で生成される有機塩基，又は反応混合物に添加される，例えば1，4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン，N，N，N'，N'-テトラメチル-1，6-ヘキサンジアミン，N-メチルモルホリン，イミダゾール，トリエチルアミン又はN，N'-ジイソプロピルエチルアミンを含む群から選択される添加される有機塩基，好ましくはその場で生成されるイミダゾール，及び上記のような極性の非プロトン性溶媒の存在下で，ヒアルロン酸又はその塩と反応させることを特徴とする請求項1～4いずれか1項記載の複合体の調製方法。

【請求項9】

前記Cypateの活性化が20～60の範囲，好ましくは22から25の範囲の温度で，10分から20時間，好ましくは0.5～2時間行われることを特徴とする請求項8記載の方法。

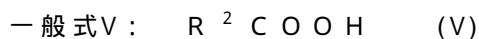
【請求項10】

複合体形成の反応が40～80，好ましくは40～60，より好ましくは60の温度で，12～48時間，好ましくは24時間行われることを特徴とする請求項8記載の方法。

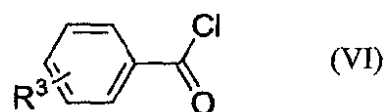
【請求項11】

Cypate I：ヒアルロン酸又はその塩：N，N'-カルボニルジイミダゾール：有機塩基のモル比が，反応混合物中で0.5：1：0.5：0.5～3.5，好ましくは重量比で0.5：1：0.5：1であることを特徴とする請求項8～10いずれか1項記載の方法。

【請求項12】

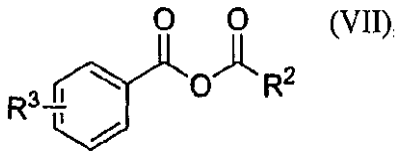


(式中， $R^2$ は $C_xH_y$ であり，ここでxは5～17の範囲の整数であり，yは11～35の範囲の整数であり， $C_xH_y$ は直鎖又は分岐した飽和又は不飽和鎖である)の脂肪酸の活性化を，一般式VI



(式中， $R^3$ はH， $-NO_2$ ， $-COOH$ ，ハロゲン化物， $C_1-C_6$ アルキルアルコキシを含んでいる群から選択され，好ましくはHである1つ以上の置換基である)の置換又は未置換の塩化ベンゾイルを用いて，1，4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン，N，N，N'，N'-テトラメチル-1，6-ヘキサンジアミン，N-メチルモルホリン

、トリエチルアミン又はN，N'-ジイソプロピルエチルアミンを含む群から選択され、好ましくはトリエチルアミンである有機塩基；及びイソプロピルアルコール、テトラヒドロフランを含む群から選択され、好ましくはイソプロピルアルコールである極性溶媒の存在下で行い、一般式VII



(R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は上記で定義したとおりである)の反応性無水物を生成させること、請求項1～3いずれか1項記載の一般式Iのヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体を、有機塩基、好ましくは1，4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン、N，N，N'，N'-テトラメチル-1，6-ヘキサジアミン、N-メチルモルホリン、イミダゾール、トリエチルアミン又はN，N'-ジイソプロピルエチルアミンを含む群から選択され、より好ましくはトリエチルアミンであるアミン；水と、イソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド又はテトラヒドロフランを含む群から選択され、好ましくはイソプロピルアルコールである水混和性極性溶媒との混合物の存在下でエステル化することを特徴とする請求項5～7いずれか1項記載の蛍光複合体の調製方法。

【請求項13】

一般式Vの脂肪酸の活性化を、0～60の範囲の温度で0.5～24時間、好ましくは0～25の温度で0.5時間行い、前記ヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体のエステル化を、22～25の範囲の温度で0.5～2時間、好ましくは2時間行うことを特徴とする請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記有機塩基の量が、前記ヒアルロン酸又はその塩の二量体当たり2～6モル当量、好ましくは4モル当量に相当し、

前記置換された又は未置換の塩化ベンゾイルの量が、前記ヒアルロン酸又はその塩の二量体当たり0.2～2.0モル当量、好ましくは0.6モル当量に相当し、

前記脂肪酸の量が、前記ヒアルロン酸又はその塩の0.2～2.0モル当量、好ましくは0.6モル当量に相当することを特徴とする請求項12又は13記載の方法。

【請求項15】

前記水と水混和性極性溶媒との混合物中の水の含有量が50～80%v/vの範囲、好ましくは50%v/vである請求項12～14いずれか1項記載の方法。

【請求項16】

好ましくは器官又は新生物のインビロイメーキングのための、複合体の分布のインビロイメーキングのための医薬の用途における使用のための請求項1～7のいずれか一項の蛍光複合体。

【請求項17】

静脈内、腹腔内又は皮下適用における使用のための請求項16記載の蛍光複合体。

【請求項18】

触診不可能な及び/又は触診可能な腫瘍のインビロイメーキングのための用途における使用のための請求項16記載の蛍光複合体。

【請求項19】

静脈内、腹腔内投与における使用のための請求項18の蛍光複合体。

【請求項20】

蛍光複合体の凝集物及び少なくとも一つ以上の非極性薬剤、好ましくは医薬及び/又はナノ粒子を含む凝集した請求項5～7いずれか1項記載の蛍光複合体をベースとする組成物。

【請求項21】

前記医薬が、細胞増殖抑制剤、好ましくはドキソルビシン又はバクリタキセルであるこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする請求項 20 記載の組成物。

【請求項 22】

前記蛍光複合体が  $R^1 - C(=O)C_{17}H_{33}$  である請求項 5 ~ 7 いずれか 1 項記載の複合体であり、かつナノ粒子が超常磁性ナノ粒子であることを特徴とする請求項 20 記載の組成物。

【請求項 23】

ヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体の重量に対して非極性化合物 2 ~ 15 重量%、好ましくは 2 ~ 6 重量% を含有することを特徴とする請求項 20 ~ 22 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 24】

新生物のインビロイメージングのための医薬用途における使用のための請求項 20 ~ 23 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 25】

新生物の治療における使用のための請求項 20 ~ 23 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

ヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体、疎水化複合体、それらの調製方法及び使用技術分野

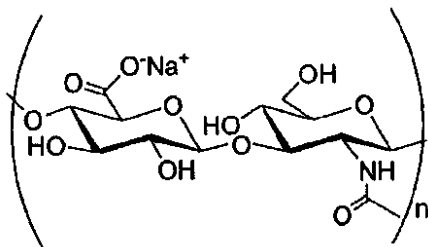
本発明は、インビロ診断可能な式 III のヘプタメチンインドシアニン染料 (Cypate)、又は 1 - [ 3 - ( 2 - カルボキシエチル ) - 1 , 1 - ジメチル - 5 , 9 b - ジヒドロベンゾ [ e ] インドール - 3 - イウム - 2 - イル ( クロリド ) ] - オクタ - 1 , 3 , 5 , 7 - テトラエニル ] - 1 , 1 - ジメチル - 2 H - ベンゾ [ e ] インドール - 3 - イル ] プロパン酸を含むヒアルロン酸又はその塩の蛍光エステル複合体に関する。さらに、疎水化複合体、その調製法、及びインビロイメージング利用及び新生物の治療のための使用が記載されている。

【0002】

発明の背景

ヒアルロン酸

ヒアルロン酸又はその塩 ( HA ) は、重要なグリコサミノグリカンの群に属する線状多糖類である。その構造に関しては、それは互いに ( 1 , 3 ) - グリコシド結合によって結合された D - グルクロン酸及び N - アセチル - D - グルコサミンから成る二糖単位の繰り返し ( ( 1 , 4 ) グリコシド結合 ) から形成された生体高分子である ( 式 1 を参照 ) 。



式 1 ヒアルロン酸

【0003】

ヒアルロン酸は、非常に親水性で高度に水和された生体高分子として、ナトリウム塩の形態で生理的環境に存在する (Schante C. E.; et al., Carbohydr. Polym. 2011, 85 (3), 469-489)。HA は、細胞外マトリックスの構造及び構成に重要な役割を果たし、また、細胞、それらの増殖、分化及び可動性に適切な環境を形成する (D' Este M.; et al., Carbohydr. Polym. 2014, 108, 239-246; Schante, C. E.; et al., F. Carbohydr. Polym. 2011, 85 (3), 469-489)。HA は、さらに脊椎動物において全ての身体の器官及び柔軟な結合組織の細胞外マトリックスに含まれている (Eenschooten, C.; et al., Carbohydr.

10

20

30

40

50

Polym. 2010, 79 (3), 597-605)。

【 0 0 0 4 】

これは、水溶性多糖類の中で、比較的容易に化学修飾を受け、蛍光剤を含む他の化合物との結合に非常に適する生体分子と考えられる。H A の利点はさらに、誘導体を特異的に例えば腫瘍組織に向けるために使用できるいくつかの細胞レセプターの存在である (Garg H. G.; et al., Chemistry and biology of hyaluronan, 1st ed.; Elsevier: Netherlands, 2004)。

【 0 0 0 5 】

インビボ診断

近年、核イメージング、X線ラジオグラフィ及びコンピュータトモグラフィと並ぶ非侵襲性の診断に適する方法の一つは、蛍光による光学イメージングである。蛍光は、特にその比較的高い感度、特異性及びリアルタイムのイメージ獲得 (image gaining) のおかげで生体内診断のための有望な方法と考えられる (Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19(1), 225-234)。蛍光イメージングの利点には、さらに比較的低いコスト、実行可能性、非侵襲性及びイオン化放射線と比較しての安全性がある。この技術は腫瘍治療における検出、診断及び予防のために、さらにまた陽電子放射断層撮影法 (PET), SPECT (単一光子放射断層撮影) 又はMRI (磁気共鳴画像) を使用するイメージングの臨床適用における複雑な情報を獲得する補充方法としても、非常に大局的である (Ye, Y.; et al., Theranostics 2011, 1, 102-106)。

【 0 0 0 6 】

非侵襲性の診断法の利用において、放射線の組織への透過は吸収特性及び屈折率に大きく依存する (Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634)。近赤外線領域 (NIR) の放射線である 650 ~ 900 nm の範囲での吸収及び放出波長が最適であると考えられる。可視スペクトルのより短い波長と比較して、これらの波長の放射線はより深く浸透し、また、同時に、内因性の発蛍光団や望ましくない自己蛍光の上昇による吸収が生じない (Kobayashi, H.; et al., Chem. Rev. 2010, 110, 2620-2640, Luo, S. et al.; Biomaterials 2011, 32 (29), 7127-7138)。

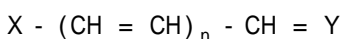
【 0 0 0 7 】

NIR 蛍光剤

近年、重要な外因性コントラスト (contrast) 剤 (造影剤) には、シアニン蛍光染料、スクアリン (squaraine) の誘導体、フタロシアニン (phthalocyanines)、ポルフィリン及びさらにホウ素 - ジピロメテン (BODIPY) (Luo, S.; et al., Biomaterials 2011, 32 (29), 7127-7138) に由来するいくつかの薬剤がある。

【 0 0 0 8 】

イメージングの光学的方法に非常によく使用される薬剤に、シアニン染料がある。構造上、それらは殆ど二つの複素環式構造に関し、これらの複素環のうちの一つが正に荷電した窒素原子を有し、そしてそれらがさらにシアニン蛍光剤の一般式：



(式中、X 及び Y は複素環式窒素構造であり、 $n = 1 \sim 3$  であり、 $n = 1$  であれば染料はトリシアニン (tricyanine) に、 $n = 2$  であればペンタシアニン (pentacyanine) に、 $n = 3$  であればヘプタシアニン (heptacyanine) 化合物に含まれる) に示されるように、ポリメチン橋により結合されている。

【 0 0 0 9 】

一般に、ポリメチン橋の長さは、その誘導体の蛍光性の特性を決定する。また、 $n$  の増加毎に、化合物の吸収と放射の波長が約 100 nm 高くなる。トリメチン染料に典型的な波長は約 500 nm、ペンタメチンについては約 600 nm、そしてヘプタメチン誘導体については近赤外線領域の最終的にはリッチな (rich) 波長である。波長の深色及び浅色移動は、やはり蛍光染料の吸収及び放射を決定する複素環式構造のタイプによってさらに部分的に影響を受ける (Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 2. ed.; Elsevier: United States of America, 2008)。

10

20

30

40

50

## 【0010】

様々な分子を有するNIR蛍光剤の複合体

従来は、非特異的イメージング、例えば血液回路及びその精製のためにのみNIR蛍光剤を単独で使用する事が可能であった(Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7(5), 626-634)。ポリメチンシアニン染料は水性環境中で凝集する傾向があり、その結果、それらの蛍光が失われ、従ってインビボ診断においては不利である(US6641798 B2)。前述の蛍光剤はさらに、まさにその回路系(circuit system)における分解の短い半減期(150~180秒)により特徴付けられ、これは試験されるターゲット、例えば、腫瘍組織における染料の蓄積を制限し、またこれによりインビボコントラストをも減少させる(Hill T. K. et al., Bioconjug Chem. 2015, ; 26(2): 294-303)。ターゲットとなる場所及び組織での造影剤の蓄積をいかに増加させるか、又は水性環境でより良好な溶解度をいかに確保するかの単純で一般的なアプローチは、それらとペプチド、タンパク質、糖類などの群からの適切なリガンドとの結合である(Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634)。キャリアポリマー又はナノ粒子への造影剤の複合化は、殆どの場合リンカーによって行なわれる。リンカーは、蛍光を確実にするため(クエンチングを防ぐため)及び/又はシステムの分解可能な状態を確保するために使用すべきである(Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634)。この解決法の欠点は、反応がより多くの工程を有しており、それが非常に困難であり、また、入れる薬剤(entering agent)の誘導体化がしばしば使用され、それが生成物の精製の点で不利であるか及び/又は反応中間体の単離が必要であり、それは更に不利であることである。ナノ粒子システムの場合には、リンカーの長さを、造影剤の蛍光クエンチングが生じないように、かつ、造影剤が生体内で検知できるように選ばなければならない(即ち、リンカーはあまり短くあってはならない)(US20110104070)。

10

20

## 【0011】

特許文献US6641798は、腫瘍の検出及び治療を増強するために調製された生物活性分子(例えばペプチド、タンパク質、抗体、糖類)とシアニン蛍光剤との低分子複合体の一般的な構造を請求している(posts the demands)。インビボ用途で使用される誘導体の重大な欠点はイメージングにおける蛍光の短い安定性(約45分間)である。

## 【0012】

文献においては、インビボ診断のための造影剤の観点からNIR蛍光剤Cypateといくつかの異なるリガンド(アミノ糖類、ペプチド、多糖類)との複合体も記載された。NIR蛍光剤Cypate自体の調製は文献WO2002032285に記載されており、さらに改善された合成が刊行物Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2005, 16, 51-61に公表された。インビボ研究のために、Yunpeng Ye.; et al. (Ye, Y.; et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7740-7741)は一つ以上のD-(+)-グルコサミン単糖ユニットが、カルボキシル基上にアミド結合によって結合された多価のプロープを調製した。示されたNIR蛍光剤は、樹状ポリマーの(dendrimeric)形成の核を形成し、同時に、それはナノ粒子用の発色団として寄与し、その生物分散が非侵襲性の光学的手法を使用して生体内で、そしてその後、生体外で調べられた。この解決法の1つの欠点は、ポリマーが複合化に使用されなかった場合の有機溶媒不存在下での水溶液中の該システムの不溶性である。

30

40

## 【0013】

腫瘍イメージング用の別のタイプの既知のナノ粒子は、アミド結合を使用して共有結合Cypate、そしてさらにメチオニン及び葉酸を有するスクシニルキトサンをベースとするデュアルターゲットポリマーミセル(a dually targeted polymer micelle)である(Chen, H.; et al., Polym. Chem. 2014, 5, 4734-4746)。この解決法の欠点は、キャリアー多糖類としてキトサンを使用することであり、キトサンは異物(body-foreign agent)であることである。別の欠点は、生理学的条件中の天然のキトサンの非常に限定された溶解度であり、従って、天然のキトサンは常に修飾される必要があり、そうでなければ静脈内の適用においてキトサンを使用することが可能ではないであろう。さらに、修飾されたキトサンは、生理学的条件において通常は限定的にしか可溶性でない。その修飾、所望の用途に

50

じてキトサンの生分解性及び生体適合性の変化をもたらす得る(Balan, V.; et al., European Polymer Journal 2014, 53, 171-188; Dumitriu, S. Polymeric Biomaterials, 2nd ed.; Marcel Dekker, Inc.: United States of America, 2002)。Pluronic F68と、また、シアニン染料(Cy5.5)と結合したキトサンが、腫瘍マウスモデルにおいて蓄積を追跡するために使用された(W. H Choi.; et al., Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2015, 11, 359-368)。ハーセプチン(herceptin)によるキャリアシステムのターゲッティングなしに、インビボでの腫瘍トラッキングイメージングが可能であったが、12時間後、NIR蛍光強度は増加し続けず、従って、このシステムでは、さらにキャリアを追加する必要なしにインビボでインビボ腫瘍疾患を長期的にトラッキングすることが可能にはならないことが想定され得る。短いイメージング時間(適用後最長1~2日)の同様の欠点は、さらにNIR染料と他のポリマー及び非ポリマーとの複合体においても知られている(D. Kokuryo; et al., Journal of Controlled Release 2013, 178, 125, Tan X.; et al., Biomaterials 2012, 33, 2230-2239)。

10

## 【0014】

文献では、光学的-放射線イメージングシステム(optical-nuclear imaging system)を形成する目的で、前述の蛍光剤のカルボキシル基の一つに陽イオン金属のキレート化成分をアミド結合で結合させる場合に、Cypateを多機能のイメージングプローブの一部として記載している。Cypateは、特定細胞をターゲットにする目的で環式のRGDペプチドにさらに結合させた(Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 225-234)。このシステムの欠点は、金属陽イオンの存在下で蛍光の状態が変化し、そしてある場合には( $Fe^{3+}$ か $Cu^{2+}$ の存在)蛍光の完全なクエンチングに至ることがあり得るといふことである(Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 225-234)。

20

## 【0015】

## ヒアルロン酸とNIR蛍光剤の複合体

出版物Choi K. (Choi, K. Y.; et al., J. Mater. Chem. 2009, 19 (24), 4102-4107及びChoi, K. Y.; et al., Biomaterials 2010, 31 (1), 106-114)には、5-コール酸を用いたヒアルロン酸の疎水化誘導体が記載された。しかしながら、5-コール酸の作用は、それらの初期段階において大腸癌の発癌を助けることになることがわかった(Bajjal, K. P.; et al., Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998, 76(12), 1095-1102)。さらに、NIR蛍光剤Cy5.5が、エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド/ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール(EDC/HOBt)及びリンカーアジピン酸ジヒドラジドを使用して、ヒアルロン酸のカルボキシル基上に結合された。欠点は多工程合成だけでなく、使用される活性化剤が、ヒアルロナン望ましくない分子内網状構造(netting)を引き起こすことがあり、そしてそれに対応して最終生成物の溶解度が減少することである(Huerta-Angeles, G.; et al., Carbohydr. Polym. 2014, 111 (13), 883-891)。アミド結合によってCy5.5と複合化させたヒアルロン酸の誘導体が、さらにヒアルロニダーゼ活性のインビボMRI/光学的検出の組み合わせのためのマルチモーダルプローブを形成する目的で、超常磁性ナノ粒子酸化鉄(SPIO)の表面処理に使用された(Lee, D.; et al., Macromol. Res. 2011, 19 (8), 861-867)。光学的手法によるインビボ診断に関して、ペンタメチン誘導体の群からの蛍光剤Cy5.5は理想的な選択ではない。ヘプタメチン誘導体とは対照的に、インビボ非侵襲性の診断に推奨されるような高い吸収及び放射波長、即ちペンタメチン誘導体を使用すると典型的な波長に達することはなく、内因性発蛍光団の望ましくない自家蛍光を生成し得る。

30

40

## 【0016】

シアニンのヘプタメチン誘導体の場合には、市販のNIRの蛍光性IR-783とヒアルロン酸の複合体と、結果としてIR-783-S-Ph-COOHが得られる改変された4ステップ合成が知られており、ここでこの誘導体はアミド結合によってヒアルロン酸に結合されている。この誘導体は、HAのインビボでの薬物動態学、その分解、及び生理的及び病理学的条件における役割のより深い理解の研究のために調製された(Wang, W.; Cameron, A. G.; Shi, K. Molecules 2012, 17, 1520-1534)。不運にも、この非常に複雑な合成は、経済の観点か

50

ら、又は非常に低い収量の観点からさらに工業規模へ変換することができない(Wang, W.; Cameron, A. G.; Shi, K. *Molecules* 2012, 17, 1520-1534)。

【 0 0 1 7 】

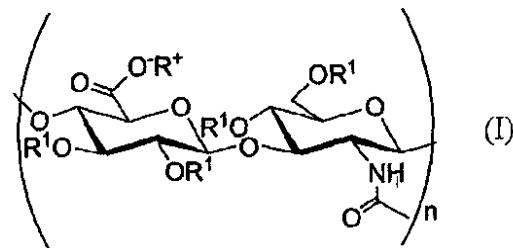
この種の蛍光剤の他の代表例に、インドシアニングリーン(ICG)がある。インドシアニングリーン及びポリエチレングリコール(PEG)と結合させたH Aは水性環境において凝集粒子を作り、光学的手法及び光音響検出を用いた腫瘍のインビボデュアルイメージング(dual imaging)の可能性を有する(Miki, K.; et al., *Biomacromolecules* 2015, 16, 219-227)。インビボでインドシアニンググリーンを使用することの大きな不利益は肝胆道(hepatobiliary)毒性及び肝臓によるこの染料の速い除去である(G. R. Cherrick, et al. *J. Clinical Investigation*, 1960, 39, 592-600)。H AのN I R 蛍光剤による誘導体の欠点は、それらがヒアルロン酸のカルボキシル基に結合する場合に起こるものであり、その結果、生体高分子の本来の負電荷の中和をもたらし、さらに生理的環境中でのH Aの溶解度に影響を及ぼし得ること、そして結局は細胞受容体によるH Aの認識を乱すことである(Mero, A.; et al., *Carbohydr. Polym.* 2010, 79 (3), 597-605)。

10

【 0 0 1 8 】

発明の要約

前述の先行技術の欠点は、一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体によって克服される。

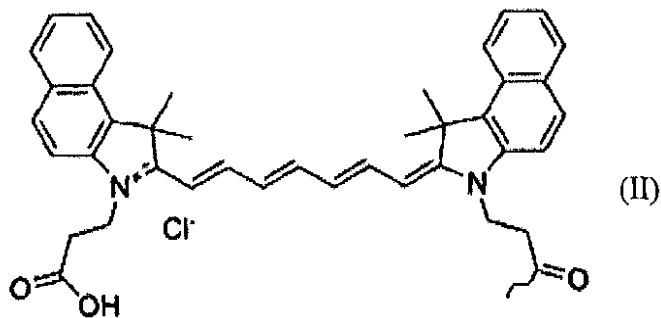


20

(式中、R<sup>+</sup>はH<sup>+</sup>、又はNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>又はCa<sup>2+</sup>を含む群から選択される生理学的に許容される塩であり、

R<sup>1</sup>は-H又は式IIのCypate残基であり、ここで~は、式IIのCypate残基の共有結合の位置であり、

30



少なくとも1つの繰り返し単位において1つのR<sup>1</sup>は式IIのCypate残基であり、ただし該単位に式IIのCypate残基であるR<sup>1</sup>が存在する場合は、該単位における他のR<sup>1</sup>はHであり、そして

40

nは2~625の範囲の整数である。)

【 0 0 1 9 】

本発明の好ましい実施例によれば、一般式 I のヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体のグルコサミン部分の6位が式IIのCypate残基で置換されている。

【 0 0 2 0 】

Cypate I は活性化後にヒアルロン酸の水酸基に結合され(下記のスキーム1及び2参照)、それは、特にヒアルロン酸の生物学的特性を維持する点で、またその生理的環境における溶解度の点で有利である。本発明の複合体の溶解度は生理学的溶液100µL当たり1~3mgである。本発明の蛍光複合体は570nm~790nmの範囲で励起され、光を吸

50

収し，680nm～850nmの範囲，好ましくは850nmの光を発する。

【0021】

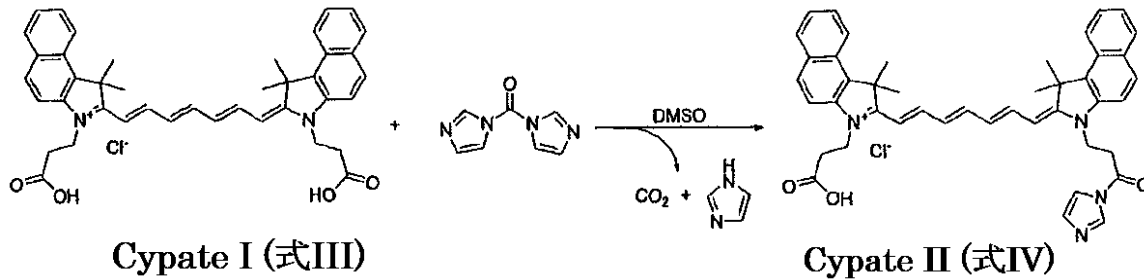
一般式Iのヒアルロン酸又はその塩の複合体に結合した式IIのCypate残基の置換度は，0.1～2%，好ましくは1.0%である。HAの構造を著しく変えることなくインピボでの複合体の画像分布(image distribution)を可能にできるので，本発明の複合体におけるCypate残基の置換度は低いのが好ましい。

【0022】

該複合体の調製自体は，蛍光剤:Cypateの合成，さらに該蛍光剤のカルボキシル基の活性化，そして続いてのヒアルロン酸のエステル化にある。

【0023】

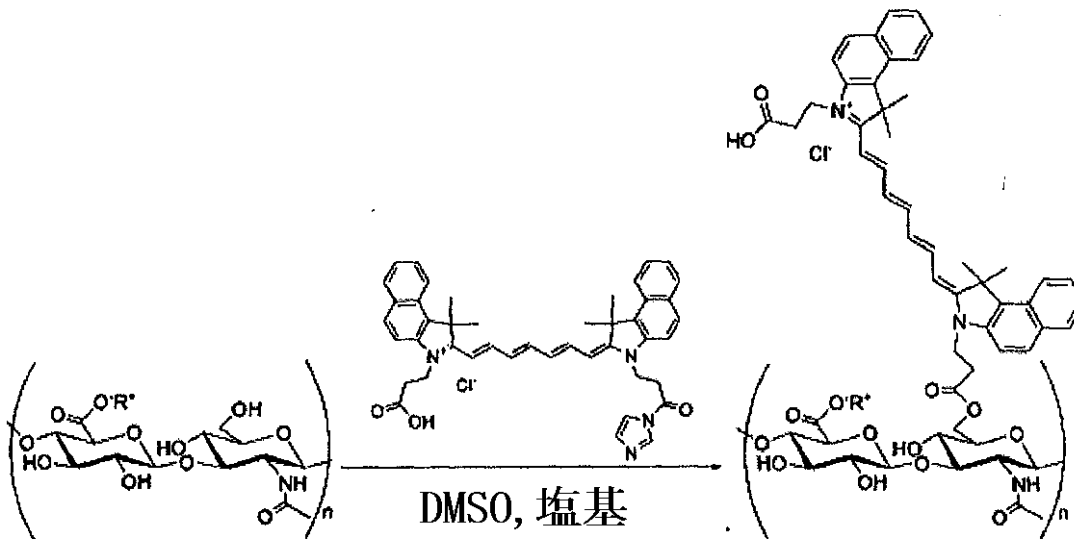
式IIIのCypate Iのカルボキシル基の活性化は，好ましくはジメチルスルホキシド(DMSO)，ジメチルホルムアミド(DMF)，ホルムアミド又はアセトニトリルを含む群から選択され，より好ましくはDMSOである非プロトン性極性溶媒中で，N，N'-カルボニルジイミダゾールを用いて行われる(下記のスキーム1を参照)。この活性化は穏やかな反応条件下でも非常に有効であり，そこでは該カルボキシル基とN，N'-カルボニルジイミダゾール(CDI)との反応により反応中間体モノ-イミダゾリド(式IVのCypate II)が生じ，該反応は二酸化炭素及びイミダゾールの放出により進む(下記のスキーム1を参照)。該活性化反応は，10分～24時間，好ましくは0.5～2時間進行する。その反応温度は20～60の範囲，好ましくは22～25の範囲であり得る。



スキーム1：CDIを使用するCypateのカルボキシル基の活性化

【0024】

ヒアルロン酸自体のエステル化において，スキーム2(R<sup>+</sup>は上記の定義のとおりである)で示されるように，スキーム1のCypate IIからイミダゾールが消失され，そしてヒアルロン酸の少なくとも1つの水酸基と式IVのCypateの間のエステル結合が形成される。



スキーム2：活性化されたCypateのヒアルロン酸との反応

【0025】

該複合体の調製については，好ましくはヒアルロン酸の酸型又は有機溶媒(DMSO)中での

10

20

30

40

50

ヒアルロン酸の可溶化に使用される他の有機塩，例えばテトラブチルアンモニウム(TBA)(スキーム2)が使用される。所定の反応についてのヒアルロン酸の酸型又は他の有機塩に適する分子量は，5,000~250,000g/molの範囲，好ましくは(10,000~32,000g/mol)である。HA又はHA塩の異なる分子量は反応の障害にはならない。さらに，CDI(N,N'-カルボニルジイミダゾール)により活性化されたカルボキシル基を有する蛍光剤の添加によって，非プロトン性極性溶媒中のHAの水酸基のエステル化が行われる。この反応は，イミダゾールの形態でその場で生成される有機塩基，又は例えばDABCO(1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン)，N,N,N',N'-テトラメチル-1,6-ヘキサンジアミン，N-メチルモルホリン，イミダゾール，トリエチルアミン(TEA)又はN,N'-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)を含む群から選択される添加される有機塩基，好ましくはその場で生成されるイミダゾール，及び上記に定義したような極性非プロトン性溶媒の存在下で行われる。この複合体形成の反応は40~80℃，好ましくは40~60℃，より好ましくは60℃の温度で，12~48時間，好ましくは24時間行われる。より綿密な研究は，該蛍光剤によるHAの置換度がCypate1の当量に依存し，そしてさらにそれは，1当量の有機塩基の存在によって確実に影響を受け，好ましい組み合わせはCypate1 0.5モル当量：HA 1モル当量：N,N'-カルボニルジイミダゾール 0.5モル当量：有機塩基 0.5~3.5モル当量，より好ましくは有機塩基 1モル当量であることを明らかにした。従って，Cypate1：ヒアルロン酸又はその塩：N,N'-カルボニルジイミダゾール：有機塩基の分子比は，反応混合物中で0.5：1：0.5：0.5~3.5，好ましくはモル比は0.5：1：0.5：1である。有機塩基がその場で生成する場合には，Cypate1：ヒアルロン酸又はその塩：N,N'-カルボニルジイミダゾールのモル比は，0.1：1：0.15~0.7：1：0.8，好ましくは0.5：1：0.5であることが適用される。

#### 【0026】

好ましくは一般式Iのヒアルロナンとヘプタメチンインドシアニン蛍光剤(即ちCypate1)の複合体をさらに変化させ，疎水化させた本発明の一般式Iの蛍光複合体を形成する。ここで，R<sup>+</sup>，R<sup>1</sup>及びnは上記で定義したとおりであり，同時に，少なくとも1つの繰り返し単位において，少なくとも1つのR<sup>1</sup>はC(=O)R<sup>2</sup>であり，ここでR<sup>2</sup>はC<sub>x</sub>H<sub>y</sub>置換基であり，xは5~17の範囲中の整数で，yは11~35の範囲中の整数であり，それは直鎖又は分岐した，飽和又は不飽和のC<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>脂肪鎖である。

#### 【0027】

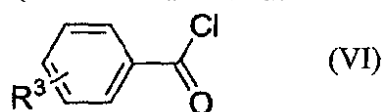
一般式Iのヒアルロン酸又はその塩の複合体において置換基-C(=O)R<sup>2</sup>の置換度は1~70%，好ましくは5~12%である。本発明の疎水化された蛍光複合体は570nm~790nmの範囲の波長で励起され，光を吸収し，680~850nmの範囲，好ましくは850nmの光を発する。

#### 【0028】

C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>アシル鎖は，HAの少なくとも一つの水酸基にエステル結合により結合された脂肪酸鎖である。それは，好ましくはエステル化に一般に適している第一水酸基に結合する(スキーム3を参照)。脂肪酸は短い(SCFA)，中間(MCFA)，又は長い(LCFA)脂肪鎖を有することができる。また，それは必須又は非必須である。

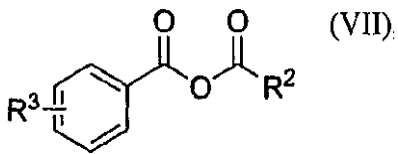
一般式V  $R^2COOH$  (V)

(R<sup>2</sup>は上記で定義したとおり)の脂肪酸の活性化は，例えば一般式VI



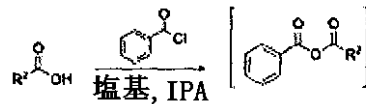
(式中，R<sup>3</sup>はH，-NO<sub>2</sub>，-COOH，ハロゲン化物，C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルアルコキシを含む群から選択され，好ましくはHである1つ以上の置換基である)の置換又は未置換塩化ベンゾイルによって，例えばDABCO(1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン，N,N,N',N'-テトラメチル-1,6-ヘキサンジアミン，N-メチル

モルホリン，トリエチルアミン（TEA），N，N'-ジイソプロピルエチルアミン（DIEEA）を含む群から選択される有機塩基，好ましくはTEAの存在下で行なわれる。活性化の例はスキーム3Aに示される。反応環境はイソプロピルアルコール（IPA），テトラヒドロフラン（THF）からなる群から選択される極性溶媒，好ましくはイソプロピルアルコールにより作られ，一般式VII

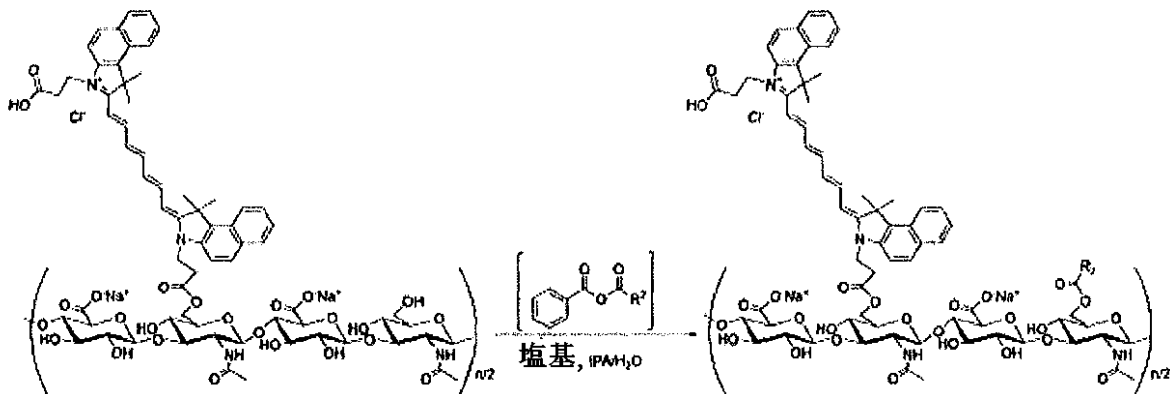


（R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は上記で定義したとおりである）

の反応性無水物が形成され，これにより本発明の一般式Iのヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体がエステル化される（例えばスキーム3Bに示される）。



(B)



スキーム3(A) 脂肪酸のカルボキシル基の活性化。(B) ヒアルロン酸と飽和又は不飽和脂肪酸の蛍光複合体の疎水化。n及びR<sup>2</sup>の定義は上記のとおりである。

【0029】

エステル化は，水と水混和性の極性有機溶媒，例えばイソプロピルアルコール（IPA），ジメチルスルホキシド（DMSO），又はテトラヒドロフラン（THF），好ましくはイソプロピルアルコールとの混合物中で，脂肪酸の活性化されたカルボキシル基を用いて行われる。このエステル化は，水含有量が50～80%v/vの範囲，好ましくは50%v/vの水と水混和性の極性溶媒との混合物中で行われる。

【0030】

該反応はまた，有機塩基，好ましくは例えばDABCO（1，4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン，N，N，N'，N'-テトラメチル-1，6-ヘキサジアミン，N-メチルモルホリン，イミダゾール，トリエチルアミン（TEA），又はN，N'-ジイソプロピルエチルアミン（DIEEA）を含む群から選択されるアミン，より好ましくは，トリエチルアミンの存在下で行われる。本発明の疎水化複合体の調製法において，一般式Vの脂肪酸の活性化は，0～60の範囲の温度で0.5～24時間，好ましくは0～25の温度で0.5時間行われ，そしてヒアルロン酸又はその塩の蛍光複合体のエステル化は，室温で，即ち22～25の範囲の温度で，0.5～2時間，好ましくは2時間行なわれる。

【0031】

本発明の疎水化複合体の調製法の好ましい実施態様によれば，有機塩基の量はヒアルロン酸又はその塩の二量体当たり2～6モル当量，好ましくは4モル当量に相当する。置換された又は未置換の塩化ベンゾイルの量は，ヒアルロン酸又は塩の二量体当たり0.2～

10

20

30

40

50

2.0モル当量，好ましくは0.6モル当量に相当する。脂肪酸の量は，ヒアルロン酸又はその塩の二量体当たり0.2～2.0モル当量，好ましくは0.6モル当量に相当する。より綿密な研究により，本発明のヒアルロン酸又はその塩の疎水化複合体の脂肪酸による置換度は，活性化された脂肪酸の当量に依存し，そしてさらに有機塩基の存在によって確実に影響を受ける。

#### 【0032】

好ましくは，本発明の一般式Iのヒアルロナンとヘプタメチンインドシアニン蛍光剤（Cypate）との疎水化複合体は，非極性薬剤(nonpolar agent)，好ましくは医薬品又は疎水性表面を有するナノ粒子のカプセル封入（非共有結合）に使用することができる。該疎水化複合体は，凝集して，それらの挙動を有するポリマーミセルと類似したシステムを形成することができる。従って，本発明の凝集した疎水化蛍光複合体をベースとして，疎水化蛍光複合体の凝集物と，少なくとも一つ以上の非極性薬剤，好ましくは医薬品，より好ましくは細胞増殖抑制剤，最も好ましくはドキソルビシン又はパクリタキセル，及び/又はナノ粒子，好ましくは超常磁性ナノ粒子（即ちSPION）を含む組成物が形成される。SPIONは好ましくは組成中の鉄の量が0.3～3重量%好ましくは1～1.5重量%である酸化鉄（ $Fe_2O_3$ ， $Fe_3O_4$ ）をベースとする。超常磁性ナノ粒子の大きさは4～6nm，好ましくは5nmである。好ましい実施態様では，該組成物は， $R^1-C(=O)C_{17}H_{33}$ である本発明の凝集した疎水化蛍光複合体と，ナノ粒子，好ましくは酸化鉄（ $Fe_2O_3$ ， $Fe_3O_4$ ）をベースとする超常磁性のナノ粒子を含む。そのような組成物は好ましくはさらに細胞増殖抑制剤，好ましくはドキソルビシン又はパクリタキセルを含むことができる。

10

20

#### 【0033】

本発明の別の実施態様によれば，該組成物は，本発明のヒアルロン酸又はその塩の疎水化蛍光複合体の質量に対して非極性薬剤を2～15重量%，好ましくは2～6重量%を含有する。

#### 【0034】

本発明の組成物は，腫瘍のインビボイメージングのための，又は腫瘍の治療のための医薬の用途に使用することができる。

#### 【0035】

これまでに記載されたヒアルロン酸とシアニン蛍光剤の複合体の調製方法と比較して，本発明に記載された複合体の調製法はいくつかの利点をもたらす。刊行物に記載された技術とは対照的に，それはリンカーもヒアルロン酸又は蛍光剤の予めの修飾も使用しない直接合成に関する。活性化中には，毒性がなく容易に反応混合物から取り除くことができるイミダゾール及び $CO_2$ の放出が生じる。イミダゾールの放出は，さらに複合体の調製において，その場で生成される有機塩基として使用することができ，従って反応の進行に必要な他の有機塩基として添加する必要がない。ヒアルロン酸のエステル化は有機溶媒，例えばDMSO中で進行する。Cypateの活性化剤はCDIである。CDIは中間体の単離の必要なしにCypateのHAへの複合化に使用することができる。この場合の利点は，HAの第2の水酸基が保護されていない場合にさえHAの第一水酸基の選択的な修飾が起こり，また，DMSO中でのHAの酸化のような望ましくない反応（Pfitzner-Moffatt反応）が生じないことである。

30

40

#### 【0036】

Cypateの構造は2つの官能性カルボキシル基を含んでいるが，驚くべきことに，最終生産物の溶解度の減少をもたらすHAの蛍光複合体の網状構造は生じない（図3～図5を参照）。

#### 【0037】

同様のHAのエステル誘導体は，他の方法，又は塩化ベンゾイル（BC）及び2，4，6-トリクロロベンゾイルクロリド（TBC）のような活性化剤を用いて得るのは容易ではない(WO2014082609)。また，発色団（Cypate）の分解及び蛍光特性の損失を導くので，カルボキシル基を活性化することができるエチルクロロホルミエート（ethyl chloroform

50

iate) (WO2012034544)も使用することができない。有機溶媒中のヒアルロنانのカルボキシル基の別の活性化剤として、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)がしばしば使用されているが、その大きな欠点はこれが強いアレルギーンとして指摘されており(Derm Beruf. Umwelt. 1986; 34(4):110-1.)、毒性が高いことである(Macrom. Rapid Commun. 2004, 25, 916-920)。

【0038】

本発明の一般式Iのヒアルロン酸とCypateの複合体、及びその疎水化複合体は、好ましくは570nm~790nmの範囲で励起することができ、680~850nmで発光し、従って、本発明の複合体の分布のインビボイメージングのため、好ましくは例えば肝臓、皮膚を含む群から選択される器官のインビボイメージングのため；又は静脈内、腹腔内又は皮下適用後の腫瘍のイメージングのための医薬の用途に使用するのに適している。

10

【0039】

これらの複合体は、静脈内又は腹腔内投与の後に腫瘍組織(つまり新生物)の中に、好ましくは触診可能な腫瘍、及び/又は非常に小さな(触診不可能な)腫瘍の中に浸透することができ、従って、疾病、特に腫瘍疾患の診断に対するイメージングに適している。ペントメチン化合物と比較して、ヒアルロنانのヘプタメチンシアニン複合体は蛍光性の特性、特に放射浸透(radiation penetration)がより深く、また望ましくない自己蛍光のさらなる制限に関して有利である。腫瘍疾患の診断は、好ましくは低分子のヒアルロنانを選択的に取り込む腫瘍組織(例えばより高いCD44の発現を有する組織)に適用可能である。本発明の疎水化複合体の溶解度は、生理食塩水100µl当たり1~3mgである。

20

【0040】

本発明の疎水化複合体は、蛍光特性の点で非常に安定であり、静脈内投与後少なくとも15日間複合体の再投与の必要なしに好ましくイメージングできる。本発明の複合体は、小さな(触診による検出不可能な)腫瘍にさえ非常に容易に集まる。本発明の疎水化複合体の別の利点は、抗癌剤(細胞増殖抑制剤)との非共有結合の可能性、そしてそれによるセラノスティクス、即ち診断・治療の機能を同時に備えたキャリアーの構築のための使用である。セラノスティクスとしての本発明の疎水化複合体の主な利点は、腫瘍組織(特に乳房腫瘍中)に蓄積する能力の使用、長期イメージング、及び腫瘍の治療自体への利用である。

30

【0041】

用語の定義：

Cypateは、一般式IIIの構造(Cypate I)、又は1-[3-(2-カルボキシエチル)-1,1-ジメチル-5,9b-ジヒドロベンゾ[e]インドール-3-イウム-2-イル(クロリド)]-オクタ-1,3,5,7-テトラエニル]-1,1-ジメチル-2H-ベンゾ[e]インドール-3-イル]プロパン酸、ヘプタメチンインドシアニン染料を含む。

SS = 置換度 = ヒアルロナン二糖単位100個あたりのヒアルロنانの修飾された二糖単位のパーセンテージ(100%は、ヒアルロنانの二糖単位100個あたり100個の修飾単位が検出されたことを示す)。

40

用語「室温」は、22~25の範囲の部屋の温度を意味する。

当量(eqv.)は、ヒアルロン酸の二量体に関し、特記しない限りモル当量を意味する。

結合能力は、特記しない限り、重量百分率で表した結合された薬剤の量である。

用語「非極性薬剤」は、荷電が対称分布した化合物を意味する。それは、有機溶媒、特にアルコールに可溶で水に不溶性の薬剤を指す。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】<sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O)複合体HA-Cypate。

【図2】DOSY NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O)複合体HA-Cypate。

【図3】SEC-MALLS(HA-Cypate 14,000g/mol)複合体HA-Cypate(実施例3)のクロマ

50

トグラム記録。

【図4】SEC-MALLS(HA-Cypate 14,000g/mol)複合体HA-Cypate(実施例7)のクロマトグラム記録。

【図5】SEC-MALLS(HA-Cypate 58,000g/mol)複合体HA-Cypate(実施例8)のクロマトグラム記録。

【図6】SEC-MALLS(HA-Cypate 72,000g/mol)複合体HA-Cypate(実施例9)のクロマトグラム記録。

【図7】650, 660, 665及び670nmでの励起における水溶液中の複合体HA-Cypateの蛍光の発光スペクトル。

【図8】フィルタートランスミットिंगなしでの $\lambda = 632.8$ nmのレーザーでの励起による(左パネル),  $\lambda = 635$ nmを超えるフィルタートランスミットिंग波長と組み合わせた(右パネル)水溶液中の複合体の蛍光発光。

【図9】インビボ蛍光イメージング: HA-Cypate皮下適用。適用の場所は文字Sで示されている。図は,異なる励起及び放射フィルターを使用した発光の検出を示す。

【図10】HA-Cypateの腹腔内適用後のインタイム(in time)インビボ蛍光イメージング。

【図11】HA-Cypate-C18:1の静脈内投与後のインタイム(in time)インビボ蛍光イメージング。

【図12】HA-Cypate-C18:1の静脈内適用後のインタイム(in time)インビボ蛍光イメージング(腫瘍を有するマウス, 化学発光ルシフェラーゼで示された腫瘍細胞)。

【図13】(i)HA-Cypate-C18:1(=HA cyp), (ii)HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシン(=HA cyp dox), (iii)HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシン+spion(=HA cyp dox+spions)の投与の後の腫瘍のインビボルミネセンスの評価。

【図14】(i)HA-Cypate-C18:1(=HA cyp)投与後, (ii)HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシン(=HA cyp dox)投与後, (iii)HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシン+spion(=HA cyp dox+spions)投与後の脾臓及び肝臓の重量の比較。

【図15】HA-Cypate-C18:1(発光ルシフェラーゼで示された腫瘍と腫瘍細胞を備えたマウス)の腹腔内適用後のインタイムインビボ蛍光イメージング。

【図16】ヒアルロナンリナーゼによる複合体HA-Cypateの酵素分解により得られた二量体HA-Cypateの質量スペクトル。

【0043】

本発明の実施態様の実施例

器具の説明

NMRスペクトルは500.13MHz( $^1\text{H}$ )の周波数でBRUKER AVANCE 500に記録した。実験データの処理については, Bruker TOPSPIN 1.2によるソフトウェア又はソフトウェアSpinWorks 3.1を使用した。NMR分析からのスペクトルの解釈については, 略語: s(シングレット), d(ダブルット), t(トリプレット), m(マルチプレット)を用いた。波長領域190~800nmのUV/VISスペクトル測定については, UV/VIS分光光度計Varian Cary 100を使用した。蛍光スペクトルは装置PTI Quantmaster 400に記録した。CypateのESI-MS分析は, エレクトロスプレーのイオン化源及び四重極型質量分析計を備えた, イオントラップを有する質量分光光度計amazon X(BrukerDaltonics)で行った。測定は正及び負のモードで行った。HA-Cypate複合体の構造は, ヒアルロナンリナーゼによる酵素開裂の後の該複合体のLC-MS分析を用いて確認された。オリゴ糖類の混合物は, カラムKinetex 1.7  $\mu\text{m}$  F5 100A(Phenomenex)で $\text{H}_2\text{O}$ 及びアセトニトリル中の勾配0.1% $\text{HCOOH}$ を用いて分離した。検出は, エレクトロスプレーによるイオン化を用いる負の分解モードでのSynapt G2-Si上で行なわれた。最初のヒアルロナンのサンプル及び質量分析は, UV/VIS 2489及び屈折率測定検出器RID2414及び光散乱検出器miniDAWN TREOSによりSEC-MALLS法(HPLC Alliance)を使用して測定した。データはソフトウェアAstraバージョン5.3.4.20(Wyatt Technology Europe GmbH)を使用して処理された。インビボイメージング分析は全て, 装置IVIS Luminia XRシリーズIIIにより, Balb/c系

10

20

30

40

50

実験室マウスについて行った。

【0044】

実施例1：3-(2-カルボキシエチル)-1,2,2-トリメチル-1H-ベンゾ[e]インドリウム-プロミドの合成

2.0g(9.6ミリモル)の1,1,2-トリメチル-1H-ベンズインドール及び2.2g(14.3ミリモル)の3-プロモプロパン酸を10mlの1,2-ジクロロベンゼンに溶解し、常時攪拌しながら115で16時間加温した。粗反応混合物を、室温に冷却し、結果として生じた沈殿を、1,2-ジクロロメタン(10×50ml)で洗浄した。最終生産物を濾過により分離し、ロータリーエバポレータ(RE)で真空下で乾燥させ、それは淡い灰色の結晶粉末の形態で得られた(収量2.2g(64%))。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz): 8.38 (d,  $J = 8.35$ ,  $1\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.29 (d,  $J = 9.00$ ,  $1\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.23 (d,  $J = 8.35$ ,  $1\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.18 (d,  $J = 9.00$ ,  $1\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.80-7.71 (m,  $2\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.79 (t,  $J = 6.95$ ,  $2\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.05 (t,  $J = 6.95$ ,  $2\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.98 (s,  $3\text{H}$ ,  $-\text{CH}_3$ ), 1.76 (s,  $6\text{H}$ ,  $-\text{CH}_3$ ) ppm

ESI-MS:  $^+\text{MS} [\text{M}]^+ = 282$

【0045】

実施例2：Cypateの調製

0.8g(2.8ミリモル)のグルタコン酸ジアルデヒドジアニン(dianiline)塩酸塩を8mlの1,2-ジクロロメタンに溶解し0~5に調節した。少量の2-ジクロロメタン(dichloromethan)(0.5ml)中の無水酢酸521 $\mu\text{l}$ (5.5ミリモル)及び481 $\mu\text{l}$ (2.8ミリモル)及びDIPEAを該溶液へ滴加し、該反応混合物を冷却及び攪拌しながら放置し、3時間反応させた。一方、15mlの量の溶剤アセトニトリル/常水95/5の混合物中の実施例1で調製された3-(2-カルボキシエチル)-1,2,2-トリメチル-1H-ベンゾ[e]インドリウムプロミド2g(5.5ミリモル)、酢酸ナトリウム0.9g(11.0ミリモル)を還流させ、最初の反応混合物を滴下した。その反応は暗所で還流下で18時間進行させた。粗反応混合物を、酢酸エチル400ml及び1MのHCl400mlで洗浄し、室温に冷却し、生成物を濾過し、減圧下で乾燥させた。結果として生じる生成物は、1.62g(88%)の収量の濃緑色の結晶粉末の形態で得られた。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz): 8.25 (d,  $J = 8.75$ ,  $2\text{H}$ ), 8.07-7.97 (m,  $6\text{H}$ ), 7.82 (t,  $J = 12.65$ ,  $1\text{H}$ ), 7.73 (d,  $J = 8.75$ ,  $2\text{H}$ ), 7.69-7.62 (m,  $2\text{H}$ ), 7.54-7.48 (m,  $2\text{H}$ ), 6.60 (t,  $J = 12.65$ ,  $2\text{H}$ ), 6.47 (d,  $J = 13.75$ ,  $2\text{H}$ ), 4.43 (bt,  $4\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.77 (t,  $J = 6.9$ ,  $4\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 1.92 (s,  $12\text{H}$ ,  $-\text{CH}_3$ ) ppm

ESI-MS:  $^+\text{MS} [\text{M}]^+ = 625$ ;  $^-\text{MS} [\text{M}-2\text{H}]^- = 623$  m/z

UV/Vis:  $_{\text{abs. max}} = 782$  nm (MeOH)

【0046】

実施例3：複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate87mg(0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し、22mg(0.13ミリモル, 0.5当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し、常時攪拌しながら室温で二時間活性化させた。一方、100mg(0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv14,000g/molをDMSOに60で溶解させた。その後、15 $\mu\text{l}$ (0.13ミリモル, 0.5当量)のN-メチルモルホリン及び前もって単離していない最初の反応混合物を該溶液に添加した。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。所望の生成物の析出が生じた時、反応混合物の初期量の10倍の体積の100%イソプロピルアルコール(AIPA)及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させた。その粗生成物を5×100ml AIPAで精製し、50mlの脱イオン水に溶かし、透析管へ移した。HAのプロトン型を、第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し、さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は、重量89mg(87%)の緑色の凍結乾燥体として得られた。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Fig. 1): cypate: 8.80 (s,  $2\text{H}$ ), 8.50-8.47 (m,  $2\text{H}$ ), 8.46-8.43 (

m, 2H), 8.29 -8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08 -7.89 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH<sub>3</sub>, H A のシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.39 (m, 2H アノマー), 4.01-3.28 (m, 10H 骨格の(skeletal)), 2.02 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm  
DOSY (D<sub>2</sub>O): (図 2)

SS = 1.5 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (図 3)

蛍光光度計:  $\lambda_{em,max} = 695$  nm (at  $\lambda_{exc} = 665$  nm; H<sub>2</sub>O); (図 7)

波長 = 632.8 nmのレーザー光で励起された複合体の蛍光 (図 8)

ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup> = 984 m/z (図 16, 複合体のリアーゼによる酵素分解の後に検出された二量体)

10

【0047】

実施例 4 : 複合体 H A -Cypateの調製

実施例 2 からのCypate 87mg (0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し, 22mg (0.13ミリモル, 0.5当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し, 常時攪拌しながら室温で30分間活性化させた。DMSO中の60の酸形態のヒアルロン酸(Mv14, 000g/mol)100mg (0.27ミリモル, 1当量)を添加した。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。反応混合物の初期量の10倍の体積の100%イソプロピルアルコール(AIPA)及びNaClの飽和溶液の添加により該反応を停止させると, 所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5×1000mlのAIPAで精製し, 50mlの脱イオン水に溶かし, 透析管へ移した。HAのプロトン型を, 第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し, さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は, 重量89mg (87%)の緑色の凍結乾燥体として得られた。

20

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) (Fig. 1): cypate: 8.80 (s, 2H), 8.50-8.47 (m, 2H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.29 -8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08-7.89 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH<sub>3</sub>, H A のシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.39 (m, 2H アノマー), 4.01-3.28 (m, 10H 骨格の), 2.02 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

30

SS = 1 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\lambda_{em,max} = 695$  nm (at  $\lambda_{exc} = 665$  nm; H<sub>2</sub>O)

【0048】

実施例 5 : 複合体 H A -Cypateの調製

実施例 2 からのCypate 17mg (0.03ミリモル, 0.1当量)を1mlのDMSOに溶解し, 6mg (0.04ミリモル, 0.15当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し, 常時攪拌しながら室温で30分間活性化させた。DMSO中の100mg (0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv14, 000g/molを60で溶解させた。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。反応混合物の初期量の10倍の体積の100%イソプロピルアルコール(AIPA)及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると, 所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5×1000mlのAIPAで精製し, 50mlの脱イオン水に溶かし, 透析管へ移した。HAのプロトン型を, 第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し, さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は, 重量92mg (90%)の緑色の凍結乾燥体として得られた。

40

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 8.80 (s, 2H), 8.50-8.47 (m, 2H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.29-8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08-7.89 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH<sub>3</sub>, H A のシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.39 (m, 2H アノ

50

マー), 4.01-3.28 (m, 10H 骨格の), 2.02 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm  
 SS = 0.7 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計: em.max = 695 nm (at exc. = 665 nm; H<sub>2</sub>O)

【0049】

#### 実施例6: 複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate 122mg (0.19ミリモル, 0.7当量)を1mlのDMSOに溶解し, 34mg (0.21ミリモル, 0.8当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し, 常時攪拌しながら室温で30分間活性化させた。DMSO中の100mg (0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv14, 000g/molを60で溶解させた。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。反応混合物の初期量の10倍の体積の100%イソプロピルアルコール(AIPA)及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると, 所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5×100ml AIPAで精製し, 50mlの脱イオン水に溶かし, 透析管へ移した。HAのプロトン型を, 第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し, さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は, 重量85mg (88%)の緑色の凍結乾燥体として得られた。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 8.80 (s, 2H), 8.50-8.47 (m, 2H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.29-8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08-7.89 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH<sub>3</sub>, HAのシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.39 (m, 2H アノマー), 4.01-3.28 (m, 10H 骨格の), 2.02 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

SS = 1.3 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計: em.max = 695 nm (at exc. = 665 nm; H<sub>2</sub>O)

【0050】

#### 実施例7: 複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate 87mg (0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し, 22mg (0.13ミリモル, 0.5当量)のCDIを添加し, 常時攪拌しながら室温で二時間活性化させた。一方, 100mg (0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv14, 000g/molをDMSOに60で溶解させた。その後, 138μl (0.79ミリモル(3当量)のDIPA及び最初の反応混合物を該溶液に添加した。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。

反応混合物の初期量の10倍の体積のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると, 所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5×100ml AIPAで精製し, 50mlの脱イオン水に溶かし, 透析管へ移した。HAのプロトン型を, 第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し, さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は, 重量86mg (84%)の凍結乾燥体として得られた。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 8.81 (s, 2H), 8.50-8.47 (m, 2H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.29-8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08-7.89 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH<sub>3</sub>, HAのシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.38 (m, 2H アノマー), 4.01-3.26 (m, 10H 骨格の), 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

SS = 1.5 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (図4)

蛍光光度計: em.max = 695 nm (at exc.max = 665 nm; H<sub>2</sub>O)

【0051】

#### 実施例8: 複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate 87mg (0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し, 22mg (0.13ミリモル, 0.5当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾール

ルを添加し、常時攪拌しながら室温で2時間活性化させた。DMSO中の100mg(0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv( $5.8 \times 10^4$  g/mol)を60で溶解させた。その後、15 $\mu$ l(0.13ミリモル, 0.5当量)のN-メチルモルホリン及び前もって精製していない最初の反応混合物を該溶液に添加した。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。反応混合物の初期量の10倍の体積のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると、所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5 $\times$ 100ml AIPAで精製し、50mlの脱イオン水に溶かし、透析管へ移した。HAのプロトン型を、第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5% NaHCO<sub>3</sub>中で中和し、さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は、重量95mg(93%)の緑色の凍結乾燥体として得られた。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 9.2 (m, 2H), 8.82-8.77 (m, 2H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.29-8.19 (m, 2H), 8.16-8.10 (m, 2H), 8.08-7.89 (m, 2H), 7.89-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH<sub>3</sub>, HAのシグナルとの重なり), HA: 4.64-4.38 (m, 2H アノマー), 4.04-3.21 (m, 10H 骨格の), 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

[SS = 1.0% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (図5)

蛍光光度計:  $\text{em. max} = 695 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 665 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O))

【0052】

実施例9: 複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate 87mg(0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し、22mg(0.13ミリモル, 0.5当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し、常時攪拌しながら室温で2時間活性化させた。100mg(0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv( $7.2 \times 10^4$  g/mol)をDMSOに60で溶解させた。その後、15 $\mu$ l(0.13ミリモル, 0.5当量)のN-メチルモルホリン及び最初の反応混合物を該溶液に添加した。その反応は60で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。

反応混合物の初期量の10倍の体積のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると、所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5 $\times$ 100mlの100%AIPAで精製し、50mlの脱イオン水に溶かし、透析管へ移した。プロトン型(protonized form)のHAを、第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5% NaHCO<sub>3</sub>中で中和し、さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は、重量96mg(94%)の凍結乾燥体として得られた。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 9.2 (m, 2H), 8.83-8.5 (m, 2H), 8.45-8.43 (m, 2H), 8.30-8.18 (m, 2H), 8.16-7.99 (m, 2H), 7.99-7.89 (m, 2H), 7.89-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH<sub>3</sub>, HAのシグナルとの重なり), HA: 4.64-4.38 (m, 2H アノマー), 4.04-3.21 (m, 10H 骨格の), 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

SS = 1.0% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (Fig. 6)

蛍光光度計:  $\text{em. max} = 695 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 665 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O))

【0053】

実施例10: 複合体HA-Cypateの調製

実施例2からのCypate 87mg(0.13ミリモル, 0.5当量)を2mlのDMSOに溶解し、22mg(0.13ミリモル, 0.5当量)のN,N'-カルボニルジイミダゾールを添加し、常時攪拌しながら室温で2時間活性化させた。100mg(0.27ミリモル, 1当量)の酸形態のヒアルロン酸Mv( $2.5 \times 10^5$  g/mol)をDMSOに40で溶解させた。その後、15 $\mu$ l(0.13ミリモル, 0.5当量)のN-メチルモルホリン及

び最初の反応混合物を該溶液に添加した。その反応は40 で暗所で常時攪拌下で24時間進行した。

反応混合物の初期量の10倍の体積のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加により反応を停止させると、所望の生成物の析出が生じた。その粗生成物を5×100ml AIPAで精製し、50mlの脱イオン水に溶かし、透析管へ移した。HAのプロトン型を、第一日目にNaClの0.5%溶液及び0.5%NaHCO<sub>3</sub>中で中和し、さらに第二日目及び第三日目に脱イオン水中で透析を行った。管の内容物を冷凍し凍結乾燥した。生じたヒアルロン酸型生成物は、重量93mg(92%)の凍結乾燥体として得られた。

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): cypate: 9.2 (m, 2H), 8.83-8.5 (m, 2H), 8.45-8.43 (m, 2H), 8.30-8.17 (m, 2H), 8.16-7.99 (m, 2H), 7.99-7.89 (m, 2H), 7.89-7.81 (m, 2H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51-7.42 (m, 2H), 5.16, -5.14 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH<sub>3</sub>, HAのシグナルとの重なり), HA: 4.62-4.38 (m, 2H アノマー), 4.01-3.26 (m, 10H 骨格の), 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm

SS = 0.5% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計: em.max = 695 nm (at exc. = 665 nm; H<sub>2</sub>O)

【0054】

実施例11: ヘキサン酸によるHA-Cypateのエステル化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体300mg(0.73ミリモル, 1当量)を15mlのdemi水及び13mlのAIPAに溶解し、その後382μl(2.20ミリモル, 3当量)のDIPEA及び4.5mg(0.04ミリモル, 0.05当量)のDMAPを添加した。165μl(1.32ミリモル, 1.8当量)のヘキサン酸を2mlのAIPAに溶解し、255μl(1.46ミリモル, 2当量)のDIPEA153μl(1.32ミリモル, 1.8当量)の塩化ベンゾイルを添加し、0 で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後、全てを最初の反応混合物に定量的に移し、その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると、生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4×200mlのAIPAで洗浄し、さらに脱イオン水に溶解させ、透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>, 0.5%のNaClに対して24時間、そしてさらに脱イオン水中で8時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ、収量は230mg(73%)であった。

実施例3と比較した<sup>1</sup>H NMRの更なるシグナル (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): 2.4 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 0.8 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 70% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計: em.max = 700 nm (at exc. = 665 nm; H<sub>2</sub>O)

【0055】

実施例12: HA-Cypateのパルミチン酸によるエステル化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体300mg(0.73ミリモル, 1当量)を15mlのdemi水に溶解し、その後306μl(2.20ミリモル, 3当量)のTEA及び4.5mg(0.04ミリモル, 0.05当量)のDMAPを添加した。一方、3mlのTHFに溶解した94mg(0.37ミリモル, 0.5当量)のヘキサデカン酸, 153μl(1.10ミリモル, 1.5当量)のTEA, 43μl(0.37ミリモル, 0.5当量)の塩化ベンゾイルを添加し、室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後、全てを最初の反応混合物に定量的に移し、その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると、生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4×200mlのAIPAで洗浄し、さらに脱イオン水に溶解させ、透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>及び0.5%のNaClに対して24時間、そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ、収量は189mg(61%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMRの更なるシグナル (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): 2.76-2.66 (m, 2H,

10

20

30

40

50

CH<sub>2</sub>), 1.64-1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.31-1.08 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.98-0.78 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS アシル化 = 7 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\epsilon_{em,max} = 710 \text{ nm}$  (at  $\epsilon_{exc.} = 685 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O)

【0056】

実施例13: HA-CypateのPALMITIC酸によるESTER化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体200mg(0.49ミリモル, 1当量)を10mlのdemi水に溶解し, その後136 $\mu$ l(0.98ミリモル, 2当量)のTEA及び3mg(0.02ミリモル, 0.04当量)のDMAPを添加した。3mlのTHFに溶解した38mg(0.16ミリモル, 0.3当量)のPALMITIC酸, 68 $\mu$ l(0.48ミリモル, 1当量)のTEA, 17 $\mu$ l(0.16ミリモル, 0.3当量)の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4 $\times$ 200mlのAIPAで洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>, 0.5%のNaClに対して24時間, そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は76mg(37%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 2.76-2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.64-1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.31-1.08 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.98-0.78 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 5 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\epsilon_{em,max} = 710 \text{ nm}$  (at  $\epsilon_{exc.} = 685 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O)

【0057】

実施例14: HA-CypateのPALMITIC酸によるESTER化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体200mg(0.49ミリモル, 1当量)を10mlのdemi水に溶解し, その後255 $\mu$ l(1.47ミリモル, 3当量)のDIPA E A及び3mg(0.02ミリモル, 0.04当量)のDMAPを添加した。38mg(0.15ミリモル, 0.3当量)のPALMITIC酸を3mlのTHFに溶解し, 85 $\mu$ l(0.4~9ミリモル, 1当量)のDIP E A, 17 $\mu$ l(0.15ミリモル, 0.3当量)の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4 $\times$ 200mlのAIPAで洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>, 0.5%のNaClに対して24時間, そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は93mg(45%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 2.76-2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.64-1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.31-1.08 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.98-0.78 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 5 % (determined from <sup>1</sup>H NMR)

蛍光光度計:  $\epsilon_{em,max} = 710 \text{ nm}$  (at  $\epsilon_{exc.} = 685 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O)

【0058】

実施例15: HA-CypateのOLEIC酸によるESTER化

実施例3からのHA-Cypate複合体300mg(0.73ミリモル, 1当量)を15mlのdemi水及び13mlのAIPAに溶解し, その後306 $\mu$ l(2.20ミリモル, 3当量)のTEA及び4.5mg(0.04ミリモル, 0.05当量)のDMAPを添加した。2mlのAIPAに溶解した186 $\mu$ l(0.59ミリモル, 0.8当量)のシス-9-オクタデセン酸, 306 $\mu$ l(2.20ミリモル, 3当量)のTEA, 68 $\mu$ l(0.59ミリモル, 0.8当量)の塩化ベンゾイルを添加し, 全てを室温で常時攪拌しながら30分間反

応させた。時間の経過後，全てを最初の反応混合物に定量的に移し，その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると，生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4×200mlのAIPAで洗浄し，さらに脱イオン水に溶解させ，透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>，0.5%のNaClに対して24時間，そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ，収量は210mg(66%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, C H=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,-CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 10 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\text{em. max} = 710 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 685 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O)

【0059】

実施例16: HA-Cypateのオレイン酸によるエステル化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体300mg(0.73ミリモル, 1当量)を15mlのdemi水及び13mlのAIPAに溶解し，その後306μl(2.20ミリモル, 3当量)のTEA及び4.5mg(0.04ミリモル, 0.05当量)のDMAPを添加した。2mlのAIPAに溶解した116μl(0.36ミリモル, 0.5当量)のシス-9-オクタデセン酸, 153μl(1.08ミリモル, 1.5当量)のTEA, 43μl(0.36ミリモル, 0.5当量)の塩化ベンゾイルを添加し，室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後，全てを最初の反応混合物に定量的に移し，その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると，生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4×200mlのAIPAで洗浄し，さらに脱イオン水に溶解させ，透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>，0.5%のNaClに対して24時間，そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ，収量は205mg(73%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, CH=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,-CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 8 % (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\text{em. max} = 710 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 685 \text{ nm}$ ; H<sub>2</sub>O)

【0060】

実施例17: HA-Cypateのオレイン酸によるエステル化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体300mg(0.73ミリモル, 1当量)を15mlのdemi水及び13mlのAIPAに溶解し，その後382μl(2.20ミリモル, 3当量)のDIPEA及び4.5mg(0.04ミリモル, 0.05当量)のDMAPを添加した。2mlのAIPAに溶解した139μl(0.45ミリモル, 0.6当量)のシス-9-オクタデセン酸, 229μl(1.32ミリモル, 1.8当量)のDIPEA, 51μl(0.44ミリモル, 0.6当量)の塩化ベンゾイルを添加し，0で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後，全てを最初の反応混合物に定量的に移し，その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると，生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4×200mlのAIPAで洗浄し，さらに脱イオン水に溶解させ，透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>，0.5%のNaClに対して24時間，そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ，収量は204mg(65%)であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, C H=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,-CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

10

20

30

40

50

SS (アシル化) = 12 % ( $^1\text{H}$  NMRから測定)

蛍光光度計:  $\text{em. max.} = 710 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 685 \text{ nm}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ )

【0061】

実施例 18: H A-Cypateのオレイン酸によるエステル化

実施例 3 により調製された H A-Cypate複合体 300 mg (0.73 ミリモル, 1 当量) を 15 ml の d e m i 水及び 11 ml の A I P A に溶解し, その後 306  $\mu\text{l}$  (2.20 ミリモル, 3 当量) の T E A 及び 4.5 mg (0.04 ミリモル, 0.05 当量) の D M A P を添加した。2 ml の A I P A に溶解した 231  $\mu\text{l}$  (0.73 ミリモル, 1 当量) のシス-9-オクタデセン酸, 204  $\mu\text{l}$  (1.46 ミリモル, 2 当量) の T E A, 85  $\mu\text{l}$  (0.73 ミリモル, 1 当量) の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら 30 分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で 2 時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰の A I P A 及び N a C l の飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を 4 x 200 ml の A I P A で洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は 0.5 % の N a H C O<sub>3</sub>, 0.5 % の N a C l に対して 24 時間, そしてさらに脱イオン水中で 48 時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は 226 mg (70 %) であった。

実施例 3 に対する  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, CH=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 12 % ( $^1\text{H}$  NMRから測定)

蛍光光度計:  $\text{em. max.} = 710 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 685 \text{ nm}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ )

【0062】

実施例 19: オレイン酸による H A-Cypateのエステル化

実施例 3 により調製された H A-Cypate複合体 300 mg (0.73 ミリモル, 1 当量) を 15 ml の d e m i 水及び 11 ml の A I P A に溶解し, その後 375  $\mu\text{l}$  (1.76 ミリモル, 2.4 当量) の N, N, N', N' - テトラメチル - 1, 6 - ヘキサンジアミン及び 4.5 mg (0.04 ミリモル, 0.05 当量) の D M A P を添加した。2 ml の A I P A に溶解した 139  $\mu\text{l}$  (0.44 ミリモル, 0.6 当量) のシス-9-オクタデセン酸, 375  $\mu\text{l}$  (1.76 ミリモル, 2.4 当量) の N, N, N', N' - テトラメチル - 1, 6 - ヘキサンジアミン, 51  $\mu\text{l}$  (0.44 ミリモル, 0.6 当量) の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら 30 分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で 2 時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰の A I P A 及び N a C l の飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を 4 x 200 ml の A I P A で洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は 0.5 % の N a H C O<sub>3</sub>, 0.5 % の N a C l に対して 24 時間, そしてさらに脱イオン水中で 48 時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は 217 mg (70 %) であった。

実施例 3 に対する  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, CH=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm

SS (アシル化) = 6 % ( $^1\text{H}$  NMRから測定)

蛍光光度計:  $\text{em. max.} = 710 \text{ nm}$  (at  $\text{exc.} = 685 \text{ nm}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ )

【0063】

実施例 20: オレイン酸による H A-Cypateのエステル化

実施例 3 により調製された H A-Cypate複合体 300 mg (0.73 ミリモル, 1 当量) を 15 ml の d e m i 水及び 11 ml の A I P A に溶解し, その後 241  $\mu\text{l}$  (2.20 ミリモル, 3 当量) の N - メチルモルホリン及び 4.5 mg (0.04 ミリモル, 0.05 当量) の D M A P を添加した。2 ml の A I P A に溶解した 139  $\mu\text{l}$  (0.44 ミリモル, 0.6 当量) のシス-9-オクタデセン酸, 193  $\mu\text{l}$  (1.76 ミリモル, 2.4 当量) の

N - メチルモルホリン, 51  $\mu$ l (0.44 ミリモル, 0.6 当量) の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4  $\times$  200 mlのAIPAで洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>, 0.5%のNaClに対して24時間, そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は264 mg (82%) であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, CH=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm 10

SS (アシル化) = 12% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\epsilon_{em,max}$  = 710 nm (at  $\epsilon_{exc}$  = 685 nm; H<sub>2</sub>O)

【0064】

実施例21: オレイン酸によるHA-Cypateのエステル化

実施例3により調製されたHA-Cypate複合体300 mg (0.73 ミリモル, 1 当量)を15 mlのdemi水及び11 mlのAIPAに溶解し, その後246 mg (2.20 ミリモル, 3 当量)のDABCO及び4.5 mg (0.04 ミリモル, 0.05 当量)のDMAPを添加した。2 mlのAIPAに溶解した139  $\mu$ l (0.44 ミリモル, 0.6 当量)のシス-9-オクタデセン酸, 148 mg (1.32 ミリモル, 1.8 当量)のDABCO, 51  $\mu$ l (0.44 ミリモル, 0.6 当量)の塩化ベンゾイルを添加し, 室温で常時攪拌しながら30分間反応させた。時間の経過後, 全てを最初の反応混合物に定量的に移し, その後室温で2時間エステル化を進行させた。

その反応を高過剰のAIPA及びNaClの飽和溶液の添加によって停止させると, 生成物の沈殿が生じた。粗生成物を4  $\times$  200 mlのAIPAで洗浄し, さらに脱イオン水に溶解させ, 透析管に移した。透析は0.5%のNaHCO<sub>3</sub>及び0.5%のNaClに対して24時間, そしてさらに脱イオン水中で48時間行われた。該生成物は緑色の凍結乾燥体の形態で得られ, 収量は183 mg (60%) であった。

実施例3に対する<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)の更なるシグナル: 5.41-5.34 (m, 2H, CH=CH), 2.48-2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 1.68-1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-), 1.40-1.23 (m, 24 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 0.91-0.68 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm 30

SS (アシル化) = 3% (<sup>1</sup>H NMRから測定)

蛍光光度計:  $\epsilon_{em,max}$  = 710 nm (at  $\epsilon_{exc}$  = 685 nm; H<sub>2</sub>O)

【0065】

実施例22: 疎水化HA-Cypateへの非極性化合物の担持

実施例16によって調製されたHA-Cypateのアシル化複合体150 mgを, マグネチックスターラーで常時攪拌しながらdemi水15 mlに2時間溶解した。その後, 2 mlのククロホルム中の10 mgのパクリタキセルを徐々に添加し, 得られた混合物を蒸発乾固させ (RE), demi水 (15 ml) で水和した。未結合のパクリタキセルを1.0  $\mu$ mのガラスフィルターで濾過することにより除去し, 得られた生成物を凍結乾燥した。

未結合のパクリタキセルの量 (HPLC測定) の量: 4.2% (重量)

【0066】

実施例23: 疎水化HA-Cypateへの非極性化合物の担持

実施例18によって調製されたHA-Cypateのアシル化された複合体150 mgを, マグネチックスターラーで常時攪拌しながらdemi水15 mlに2時間溶解した。その後, 2 mlのククロホルム中の15 mgのドキシソルピシンを徐々に添加し, 得られた混合物をまず均一な混合物に達するまで超音波で処理し (パルス音波処理cca 15分, 200 W, 振幅65%, サイクル0.5秒), その後蒸発乾固させ (RE), そしてdemi水 (15 ml) で水和した。未結合のドキシソルピシンを1.0  $\mu$ mのガラスフィルターで濾過することにより除去し, 得られた生成物を凍結乾燥した。

未結合のパクリタキセルの量(HPLC測定)の量: 7.5%(重量)

【0067】

実施例24: 疎水化HA-Cypateへの非極性化合物の担持

実施例18によって調製されたHA-Cypateのアシル化された複合体150mgを、マグネチックスターラーで常時攪拌しながら脱イオン水15mlに2時間溶解した。その後、5mlのクロロホルム中の鉄( $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$ ) (5mm)及び20mgのドキシソルピシンを徐々に添加し、得られた混合物をまず均一な混合物に達するまで超音波で処理し(パルス音波処理cca 15分, 200W, 振幅65%, サイクル0.5秒), その後蒸発乾固させ(RE), そしてdemi水(15ml)で水和した。未結合のドキシソルピシンを1.0 $\mu$ mのガラスフィルターで濾過することにより除去し、得られた生成物を凍結乾燥した。

10

未結合のパクリタキセルの量(HPLC測定)の量: 6.5%(重量), 未結合のSpion: 2%(重量)

【0068】

実施例25: インビボ実験 - 複合体HA-Cypateの蛍光

インビボ実験のために、実施例3により調製されたHA-Cypateを生理食塩水に溶解し( $c = 100 \mu$ l溶液中3.8mgの誘導体), その後濾過(0.22 $\mu$ m)によって滅菌した。50 $\mu$ l(図9)及び/又は腹腔内に150 $\mu$ l(図10)の所定の誘導体の無菌液を、皮下麻酔中のBalb/cタイプのマウスに適用した。蛍光は異なる励起波長及び発光フィルターの組み合わせを使用して検知した。

図9及び図10は、インビボイメージングのための皮下・腹腔内適用の後の誘導体の十分な蛍光強度を示す。イメージングは様々な励起波長(530~745nm)及び発光のためのフィルタ(ICG, Cy5.5)を使用して行なうことができる。フィルターDsRedは使用することができない。図10から、この誘導体の発光光団としての安定性は、腹腔内投与の後でもさらに明らかである。

20

【0069】

実施例26: インビボ実験 - 複合体HA-Cypate-C18:1の蛍光

実施例15によって調製されたHA-Cypate-C18:1(SS=10%)を、燐酸緩衝液に溶解し( $c = 100 \mu$ l溶液中3.6mgの複合体), その後濾過(0.22 $\mu$ m)によって滅菌した。そのように調製した溶液100 $\mu$ lを2匹のモデルマウスBalb/c(麻酔中の)に静脈内適用し、蛍光をインビボで7日間観察した(図11)。

30

図11は、HA-Cypate-C18:1が、健常なマウスに静脈投与した後に特に肝臓に分布することを示す。複合体の蛍光はインビボイメージングに十分であり、複合体の蛍光はさらに非常に安定であり、一回投与後2週間イメージングを行うことができる。

【0070】

実施例27: インビボ実験 - 複合体HA-Cypate-C18:1の蛍光

実施例15によって調製されたHA-Cypate-C18:1(SS=10%)を、生理食塩水に溶解し( $c = 100 \mu$ l溶液中1.8mgの複合体), その後濾過(0.22 $\mu$ m)によって滅菌した。そのように調製した溶液100 $\mu$ lを、触診不可能な乳房腫瘍(同所性投与(orthotopic administration)4T1 luc細胞, ルシフェリンの腹腔内注射後にルシフェラーゼ活性の検出を化学ルミネセンス検出によって表示することができる)を有する3匹のモデルマウスBalb/c(麻酔中)に静脈内投与し、蛍光をインビボで72時間観察した(図12)。

40

図12は、HA-Cypate-C18:1が、静脈内投与後に肝臓に分布し、さらに24時間後に非常に小さな(触診不可能な)腫瘍に分布することを示す。腫瘍では、経時的に増加するHA-Cypate-C18:1の蓄積があり、そして腫瘍中の複合体の存在は複合体投与後15日でも非常に顕著である。インビボでの該複合体の蛍光はこのように非常に安定しており、該複合体は、非常に小さな腫瘍のイメージング、及び経時的な腫瘍観察に使用することができる。図の左パネルには、発光イメージング(ルシフェラーゼ活性の検出)による腫瘍のコントロール画像がある。

【0071】

実施例28: インビボ実験 - 複合体HA-Cypate-C18:1の蛍光

50

4T1 luc細胞（ルシフェリンの腹腔内適用後にルシフェラーゼ活性の検出を化学ルミネセンス検出によって表示することができる）を9匹のモデルマウスBalb/c(麻酔中)に同所性投与し、乳房腫瘍を14日間増大させた。14日目に、マウスを3つの群（1群 = 3動物）に分けた。全ての群に、14日目、21日目及び28日目に、100 µl 燐酸緩衝液中の選択された複合体1mgを静脈内適用し、その後：第1群には、実施例15で調製されたHA-Cypate-C18:1を、第2群には実施例23で調製されたドキシソルピシンが担持されたHA-Cypate-C18:1を、第3群には実施例24で調製されたドキシソルピシンとspionが担持されたHA-Cypate-C18:1を適用した。放射は、35日間インビボで評価された(図13)。

次に、マウスを屠殺し、個々の群の中の腫瘍と脾臓の重量を比較した(図14)。

図13は、HA-Cypateのみを投与された群で腫瘍の増大が最も遅いことを示す。HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシンが投与された群と比較して、HA-Cypate-C18:1+ドキシソルピシン+spionが投与された群ではより遅い増大が見られた。

図14は、第1(未処理)群が最も高い脾臓及び腫瘍重量を有することを示す。与えられたモデルでは、増大した脾臓は、疾病の進行を示す(duPre et al., Experimental and Molecular Pathology 2007, 82, 12-24)。第2(処理された)群及び第3(処理された)群では第1群に比べて脾臓は著しく小さくなり、腫瘍も小さくなった。最も小さな腫瘍サイズは第3群で見られた。従って、このキャリアシステムはイメージングできるだけでなく、腫瘍を治療することもでき、またセラノスティクスの機能を満たす。

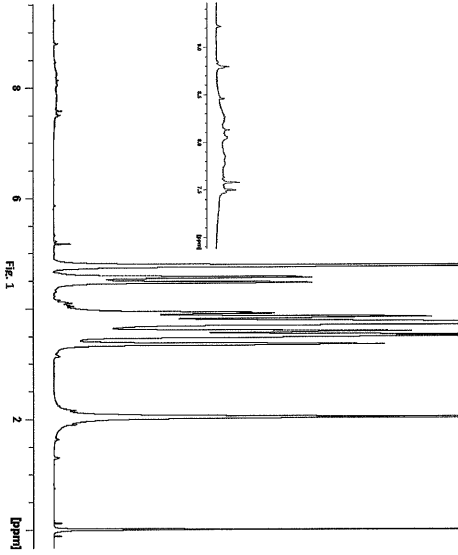
#### 【0072】

実施例29： インビボ実験 - 複合体HA-Cypate-C18:1の蛍光

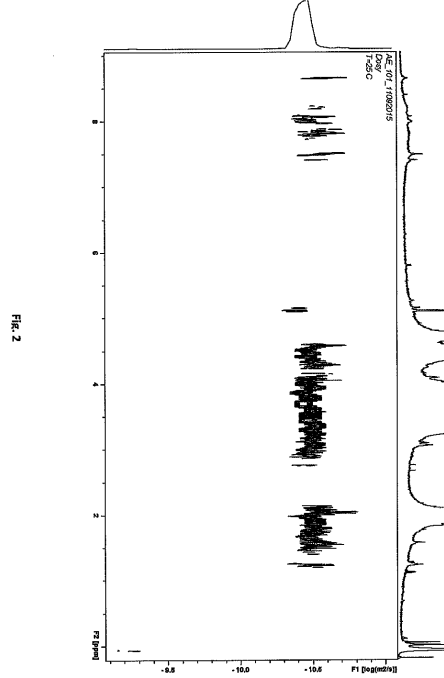
実施例15によって調製されたHA-Cypate-C18:1(SS = 10%)を、生理食塩水に溶解し(c = 100 µl 溶液中0; 0.625; 1.25; 2.5mgの複合体)、その後濾過(0.22 µm)によって滅菌した。そのように調製した溶液100 µlを乳房腫瘍(4T1 luc細胞の同所性投与後35日目、ルシフェリンの腹腔内注射後にルシフェラーゼ活性の検出を化学ルミネセンスによって表示することができる)を4匹のモデルマウスBalb/c(麻酔中)に腹腔内適用し、7日間その蛍光をインビボで観察した(図15)。

図15は、HA-Cypate-C18:1が腹腔投与後に腫瘍と肝臓に分布することを示す。該腫瘍は、使用された全ての濃度において複合体の投与後最低でも7日間、何の問題もなくインビボで表示することができる。図の左パネルには、発光イメージング(ルシフェラーゼの検出)による腫瘍のコントロール画像がある。図の右パネルには誘導体の溶液を投与された4匹のマウスを示す - 左から右に向かって濃度が高くなる(100 µl 溶液中、投与された複合体が0; 0.625; 1.25; 2.5mg)。

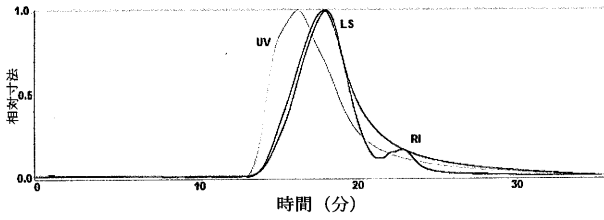
【 図 1 】



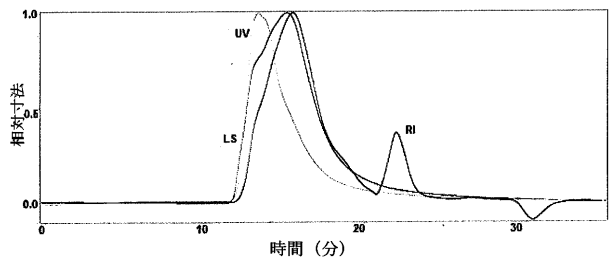
【 図 2 】



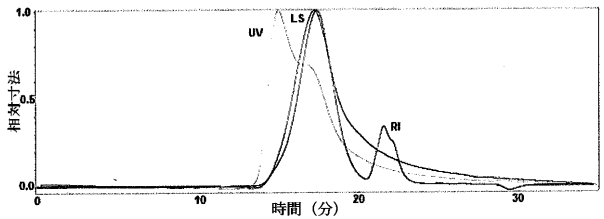
【 図 3 】



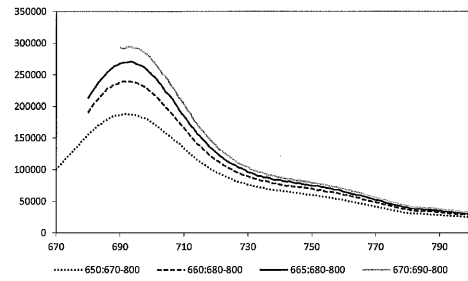
【 図 6 】



【 図 4 】



【 図 7 】



【 図 5 】

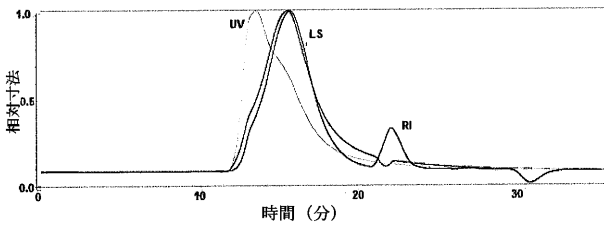


Fig. 7

【 図 8 】

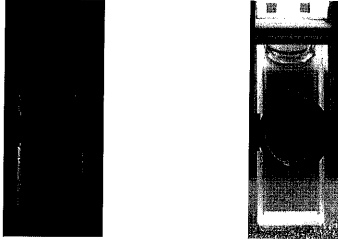


Fig. 8

【 図 9 】

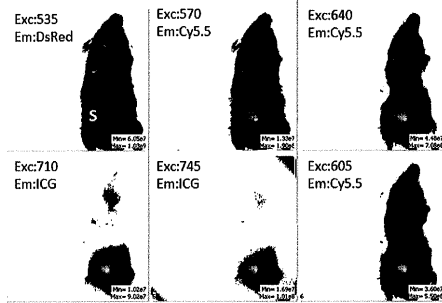
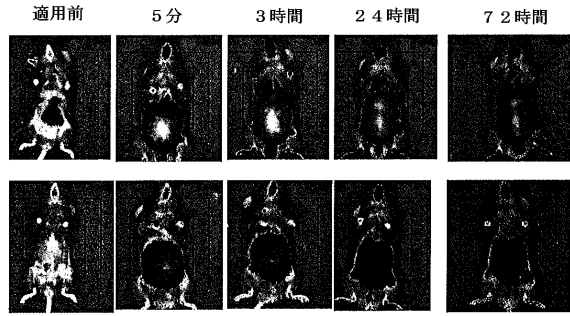
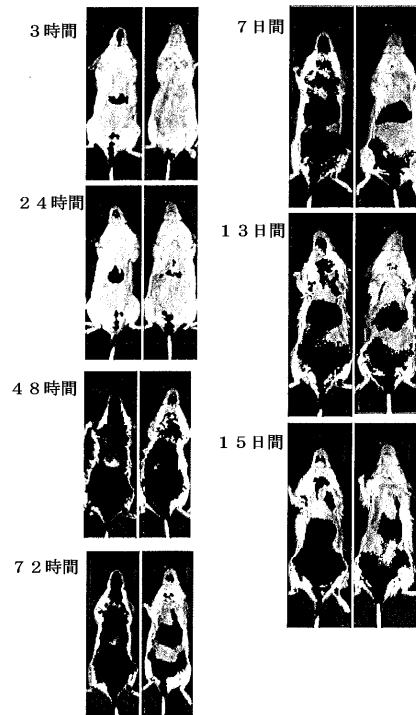


Fig. 9

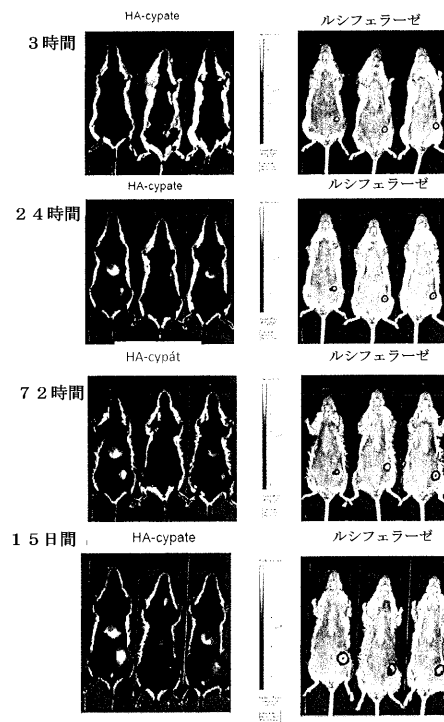
【 図 1 0 】



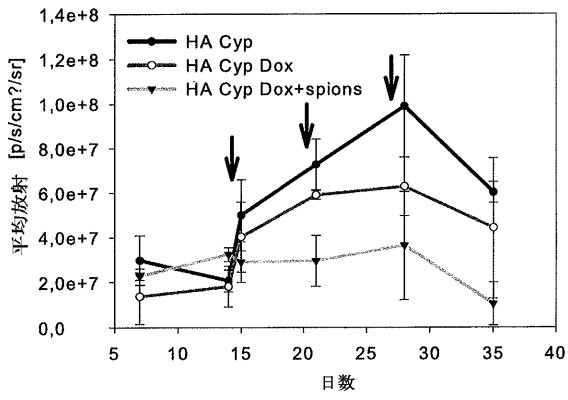
【 図 1 1 】



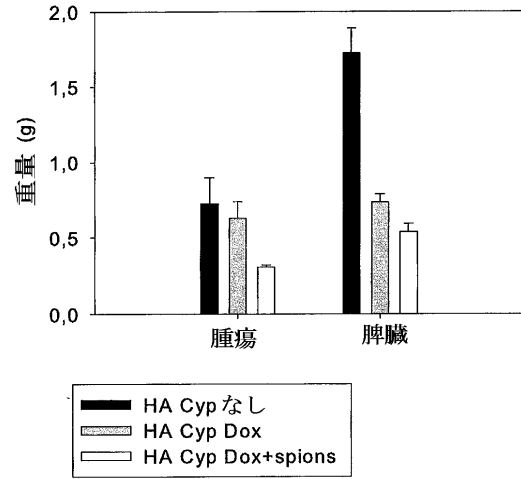
【 図 1 2 】



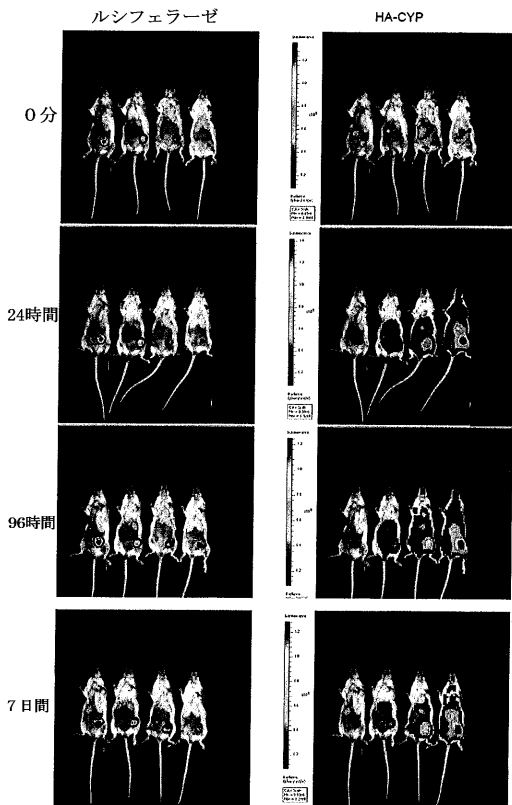
【 図 1 3 】



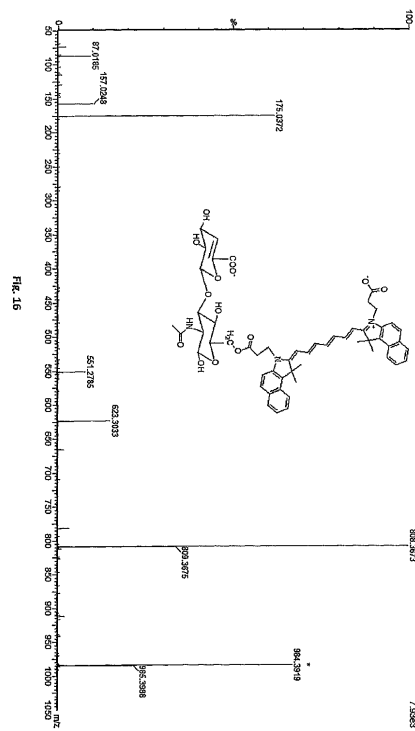
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/CZ2016/050048
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K49/00 A61K47/54 A61K9/107 A61K49/18 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOJI MIKI ET AL: "Near-Infrared Dye-Conjugated Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives as a Dual Contrast Agent for In Vivo Optical and Photoacoustic Tumor Imaging", BIOMACROMOLECULES, vol. 16, no. 1, 12 January 2015 (2015-01-12), pages 219-227, XP055366080, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm501438e cited in the application abstract figure 1 scheme 2  -----  -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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
21 April 2017		03/05/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Villard, Anne-Laure

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CZ2016/050048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI            Week 201381            Thomson Scientific, London, GB;            AN 2013-M47637            XP002769418,            &amp; KR 2013 0085294 A (UNIV IND &amp; ACADEMIC            COOP IN CHUNGNAM NAT)            29 July 2013 (2013-07-29)            abstract</p> <p>-----</p>	1-25
A	<p>US 2009/028788 A1 (ACHILEFU SAMUEL [US])            29 January 2009 (2009-01-29)            figures 11C,11D</p> <p>-----</p>	1-25
A	<p>WO 2014/082609 A1 (CONTIPRO BIOTECH SRO            [CZ]) 5 June 2014 (2014-06-05)            cited in the application            examples 18,27</p> <p>-----</p>	1-25
A	<p>EENSCHOOTEN C ET AL: "Preparation and            structural characterisation of novel and            versatile amphiphilic octenyl succinic            anhydride-modified hyaluronic acid            derivatives",            CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE            PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB,            vol. 79, no. 3,            11 February 2010 (2010-02-11), pages            597-605, XP026806649,            ISSN: 0144-8617            [retrieved on 2009-09-19]            cited in the application            page 598, left-hand column, last paragraph            - right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/CZ2016/050048

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 20130085294 A	29-07-2013	NONE	
-----			
US 2009028788 A1	29-01-2009	US 2009028788 A1	29-01-2009
		WO 2006078914 A1	27-07-2006
-----			
WO 2014082609 A1	05-06-2014	CZ 304654 B6	20-08-2014
		EP 2934592 A1	28-10-2015
		JP 2016500130 A	07-01-2016
		KR 20150088848 A	03-08-2015
		RU 2015125076 A	13-01-2017
		US 2015320873 A1	12-11-2015
		WO 2014082609 A1	05-06-2014
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 0 6
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
C 0 7 C 63/06 (2006.01)	C 0 7 C 63/06	
C 0 7 C 51/56 (2006.01)	C 0 7 C 51/56	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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

(72) 発明者 フェルタ - アンジェレス, グロリア

チェコ, 5 6 0 0 2 チェスカ トレボヴァ, ベズジェコフ 1 3 4 3

(72) 発明者 ソウチェク, カレル

チェコ, 6 6 6 0 3 マロストヴィツェ, マロストヴィツェ 2 6 6

(72) 発明者 ヘルマンノヴァ, マルチナ

チェコ, 5 6 4 0 1 ジャンベルク, ヴェルキー ハーイェク 1 5 5 2

(72) 発明者 ヴェレブニー, ヴラディミル

チェコ, 5 6 4 0 1 ジャンベルク, サドヴァ 1 4 6 6

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA22 AA29 BB11 BB13 BB16 CC27 DD23 DD23D DD29  
 EE37 EE37A EE37E EE37F FF06 FF15 FF16  
 4C084 AA17 MA23 MA43 MA66 NA02 NA11 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262  
 4C085 HH01 HH07 HH11 JJ02 JJ03 KA27 KA28 KA36 KB08 KB79  
 LL18  
 4C086 AA01 AA02 BA02 EA10 GA16 MA02 MA03 MA05 MA23 MA43  
 MA66 NA02 NA11 ZB21 ZB26  
 4C090 AA02 AA05 BA67 BB53 BB62 BB65 BB71 BB77 BB94 BD14  
 BD36 CA38 DA09 DA25  
 4H006 AA02 AC47 BJ50