

(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
2020年12月30日(30.12.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/262642 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 3/10 (2006.01) A61L 27/34 (2006.01)
A61K 35/39 (2015.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/025324

(22) 国際出願日: 2020年6月26日(26.06.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-122063 2019年6月28日(28.06.2019) JP

(71) 出願人: 持田製薬株式会社(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo (JP). 国立研究開発法人国立国際医療研究

センター(NATIONAL CENTER FOR GLOBAL HEALTH AND MEDICINE) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山1-2-1 Tokyo (JP).

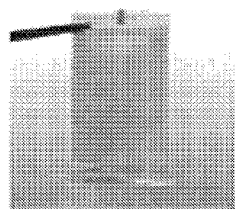
(72) 発明者: 霜田 雅之 (SHIMODA Masayuki); 〒1628655 東京都新宿区戸山1-2-1 国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 安嶋 久美子 (AJIMA Kumiko); 〒1628655 東京都新宿区戸山1-2-1 国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 古迫 正司 (FURUSAKO Shoji); 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(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).

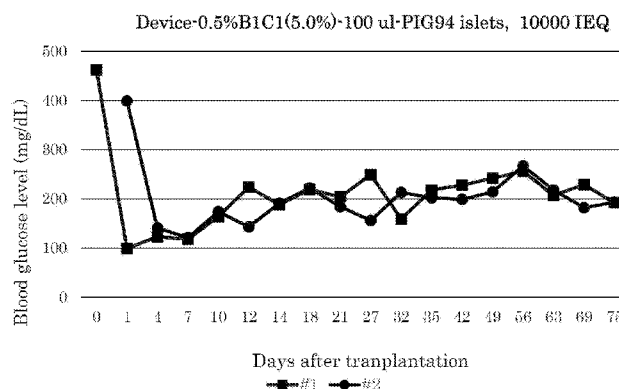
(54) Title: TRANSPLANTATION DEVICE USING CHEMICALLY CROSSLINKED ALGINIC ACID

(54) 発明の名称: 化学架橋アルギン酸を用いた移植用デバイス

[図4]



[図5-1]



(57) Abstract: Provided is a transplantation device comprising a hydrogel in which insulin-secreting cells or pancreatic islets are enclosed, wherein the hydrogel is prepared by gelatinizing an alginic acid derivative by chemical crosslinkage. Thus, a novel transplantation device is provided.

(57) 要約: ここでは、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスであって、前記ハイドロゲルがアルギン酸誘導体を化学架橋によりゲル化したものである、移植用デバイスが提供される。これにより、新規な移植用デバイスが提供される。

[続葉有]

WO 2020/262642 A1

(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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

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：化学架橋アルギン酸を用いた移植用デバイス

技術分野

[0001] 本発明は、細胞などを生体に移植するためのデバイスに関する。より具体的には、化学架橋アルギン酸を用いた移植用デバイス、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] I型糖尿病の治療法としては、従来のインスリン注射や膵臓移植の他、国内外で膵島移植も実施されてきているものの、特に国内ではドナー不足等の問題もあり、未だ少数例に限られている。ブタ膵島を用いた異種移植は、このドナー不足を解消する有効な技術にはなり得るが、同種移植も異種移植の場合も、免疫による拒絶反応は避けられず、長期に亘る免疫抑制剤の服用が必須となり、それによる合併症の危険性や残存する移植膵島の悪影響の可能性も報告されている（非特許文献1：Organ Biology, VOL 24, No. 1, 7-12頁, 2017）。

[0003] これを解決する技術として、レシピエントの免疫細胞等からは隔離可能で、栄養分やインスリン等は透過可能な高分子ゲルや半透膜等で膵島を被覆（カプセル化）し、体内に移植するバイオ人工膵臓（bioartificial pancreas（BAP）、バイオ人工膵島ともいう）の技術が以前より検討されてきている（特許文献1：特開昭55-157502号公報、特許文献2：特開昭60-258121号公報、特許文献3：国際公開第95/28480号パンフレット、特許文献4：国際公開第92/19195号パンフレット、特許文献5：特開2017-196150号公報）。

[0004] バイオ人工膵島の種類については、主に（1）個々の膵島を高分子ゲル等で被覆した「ミクロカプセル型」、（2）多数の膵島を高分子ゲルや半透膜等で被覆した「マクロカプセル型」、（3）半透膜で作製された免疫隔離デバイスや中空糸モジュール等に膵島を封入し、デバイス中に血液を灌流させ

る「血液灌流型」に分類される（非特許文献1）。

[0005] ミクロカプセル型は、免疫細胞からの隔離が可能で栄養分やインスリン等は透過可能な高分子ゲルを用いて個々の膵島をカプセル化し、通常の膵島移植と同様に体内（主として腹腔内）に移植する技術である。レシピエントの免疫細胞から隔離できる上、比較的隔離膜厚が薄いために拡散による透過時間が短く、栄養分の透過や細胞の応答が早くなるというメリットがあるが、膵島の機能が低下した際に回収することは困難である。

[0006] 血液灌流型は、膵島を半透膜で隔離した流路に血液を灌流させる技術で、人工透析やバイオ人工肝臓等の技術の蓄積を応用しており、多数の基礎研究が行われてきたが、装置サイズが大きくなることや血栓形成のリスクが大きいことが課題であり、長期使用時に血栓を作って詰まり易いという欠点があり、実用化には至っていない。

[0007] マクロカプセル型は、ミクロカプセル型の欠点、即ち、膵島の機能低下時の摘出を可能にする目的で改良された技術である。しかしながら、マクロカプセル型の異種膵島を使った膵島移植における研究では、優れた成績を示すものはまだ報告されてなく、ドナー不足、免疫抑制剤の使用、膵島の長期生着・機能維持等の膵島移植における問題点を克服する、異種膵島を用いたバイオ人工膵島は未だ見出されていない。

[0008] クリック反応を用いたアルギン酸ヒドロゲルカプセルの合成とそれらの安定性、水膨潤および拡散のイオン架橋アルギン酸塩カプセルとの比較に関する報告がある（非特許文献2：JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Part B/VOL 103B, ISSUE 5, P1120-1132 (2015)）。当該文献には、クリック反応で形成されるアルギン酸カプセルはイオン架橋（ C^{2+} ）架橋より安定であることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開昭55-157502号公報

特許文献2：特開昭60－258121号公報

特許文献3：国際公開第95／28480号パンフレット

特許文献4：国際公開第92／19195号パンフレット

特許文献5：特開2017－196150号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Organ Biology, VOL24, No. 1, 7－12頁, 2017

非特許文献2：JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Part B／VOL103B, ISSUE 5, P1120－1132 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上記のような状況において、実用可能な新たな移植用デバイスなどが求められていた。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、以下の(1)～(5)の事を見出し、これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

(1) ここで使用される新規なアルギン酸誘導体（例えば、式(1)及び式(11)のアルギン酸誘導体）は、例えば、化学架橋形成でハイドロゲル化するものであり、当該化学架橋するアルギン酸誘導体を用いて平板型に調製したアルギン酸ゲルが、生体内（健常マウスの腹腔内）に移植したところ、5週間後でも平板型ゲルのサイズに大きな変化がなく、当該ゲルが溶解せずに形状を維持し、生体内安定性に優れること。

(2) また、当該マウスの腹腔内の癒着や炎症が見られないこと。

(3) 平板型ゲル内にMin6細胞を包埋させ3～4週間培養したところ、Min6クラスターの生存が確認でき、増殖が良好で、細胞毒性はないこと

。

(4) ブタ膵島を包埋した化学架橋アルギン酸ゲルを半透膜で被覆した移植用デバイスを糖尿病モデルマウスに移植したところ、75日間に及ぶ血糖値抑制効果が示されたこと。

(5) 上記(4)において、移植後10週経過してから当該移植用デバイスを摘出したところ、癒着、血管新生、及び炎症などの障害は認められなかったこと。更に、移植用デバイス中の膵島についてジチゾン染色によりその生存を確認したところ、十分生存していることが確認されたこと。また、移植後10週間後摘出した移植用デバイスを開き、中のアルギン酸ゲルを確認したところ、その形状状態が維持されていたこと。

[0013] ここで使用される新規なアルギン酸誘導体（例えば、式(1)及び式(11)のアルギン酸誘導体）は、例えば、化学架橋形成に使用することができるものであり、即ち、化学架橋形成に用いることができる反応性基又は当該反応性基の相補的な反応性基が導入されたものである。

[0014] 前記化学架橋形成は、例えば、Huisgen反応（1,3-双極子付加環化反応）による架橋反応にて行われ、例えば、式(1)及び式(11)のアルギン酸誘導体間で行われても良く、又は、例えば、式(1)のアルギン酸誘導体とアジド基を有する他の分子間で行われても良く、又は、式(11)のアルギン酸誘導体とアルキン基を有する他の分子間で行われても良い。

[0015] ここでは、化学架橋によりゲル化されるアルギン酸誘導体を用いて調製された、細胞などを生体に移植するためのデバイス、より具体的には、例えば、インスリン分泌細胞又は膵島などが包埋された化学架橋アルギン酸ゲルと、必要に応じて当該ゲルを被覆する半透膜とを含む移植用デバイス、その製造方法などが提供される。化学架橋によりゲル化されるアルギン酸誘導体は、例えば、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基に、アミド結合及び2価のリンカーを介して環状アルキン基又はアジド基が導入された式(1)又は式(11)のアルギン酸誘導体であり、式(1)及び式(11)のアルギン酸誘導体を用いてHuisgen反応（1,3-双極子付加環化反応

）を行うことで新規な架橋アルギン酸が得られる。

例示的な態様は、以下の〔１〕～〔２３〕の通りであり得る。

[0016] 〔１〕インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスであって、前記ハイドロゲルがアルギン酸誘導体を化学架橋によりゲル化したものである、移植用デバイス。

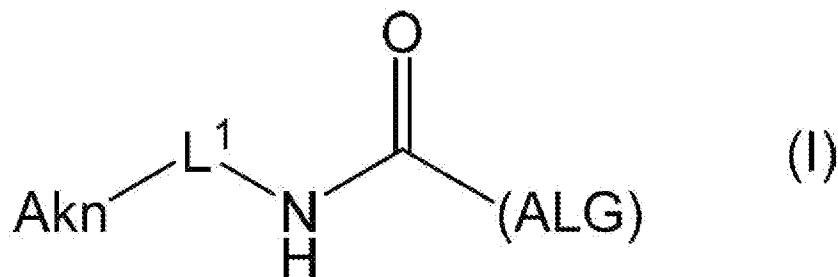
[0017] 〔２〕前記ハイドロゲルが、架橋としてH u i s g e n反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋を含む、前記〔１〕に記載の移植用デバイス。

[0018] 〔３〕前記化学架橋が、以下の（Ａ）及び（Ｂ）に記載のアルギン酸誘導体の組み合わせによる化学架橋である、前記〔１〕又は〔２〕に記載の移植用デバイス

（Ａ）：

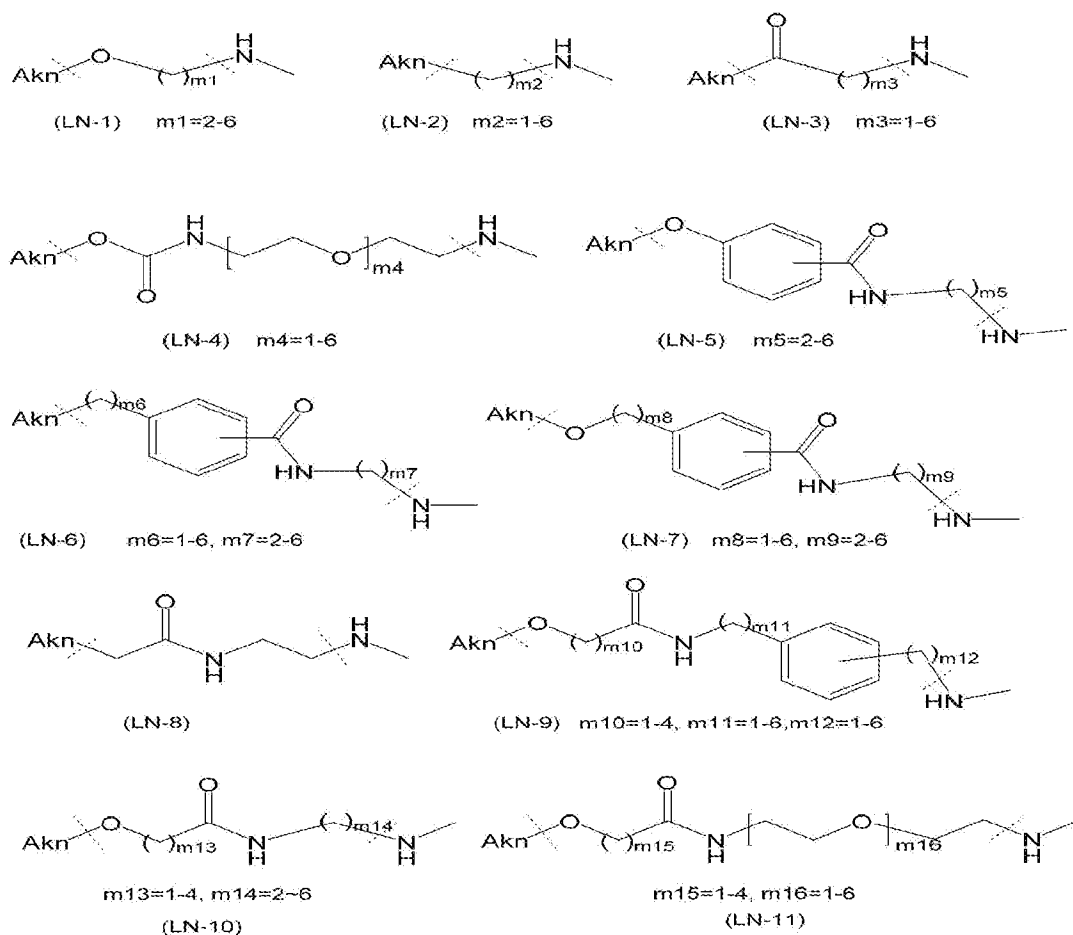
アルギン酸の任意の１つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び２価のリンカー（－L¹－）を介して、環状アルキン基（A k n）が導入された、下記式（I）：

[化1]



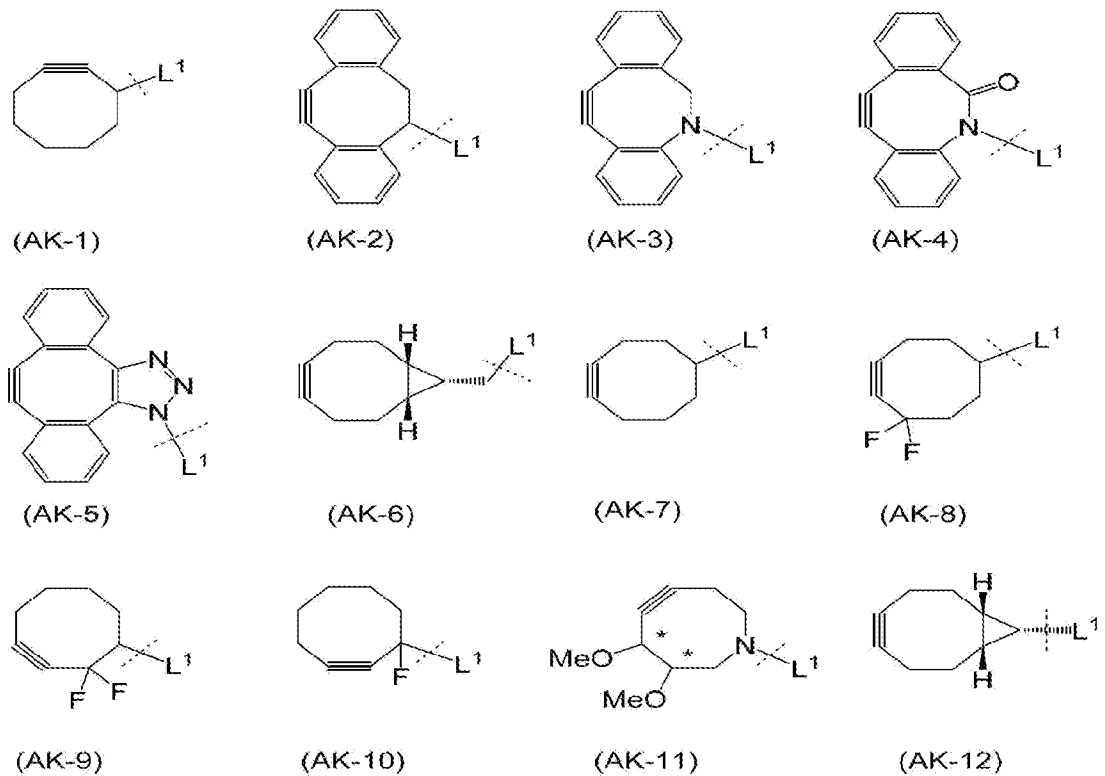
〔式（I）中、（ALG）は、アルギン酸を表わし；－NHCO－は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；－L¹－は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

[化2]



の群から選択される2価のリンカーを表わし；Aknは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

[化3]

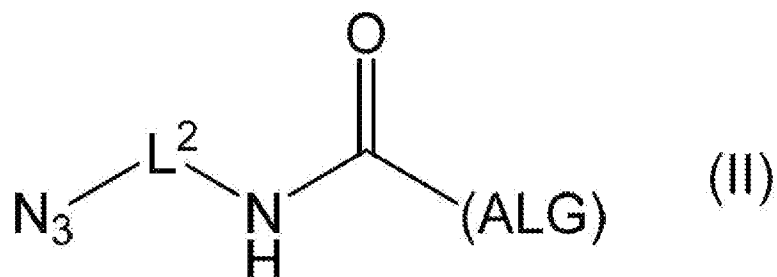


の群から選択される環状アルキン基を表わし、星印はキラル中心を表す] で表わされるアルギン酸誘導体；

(B)：

アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー(−L²−)を介して、アジド基が導入された、下記式(II)：

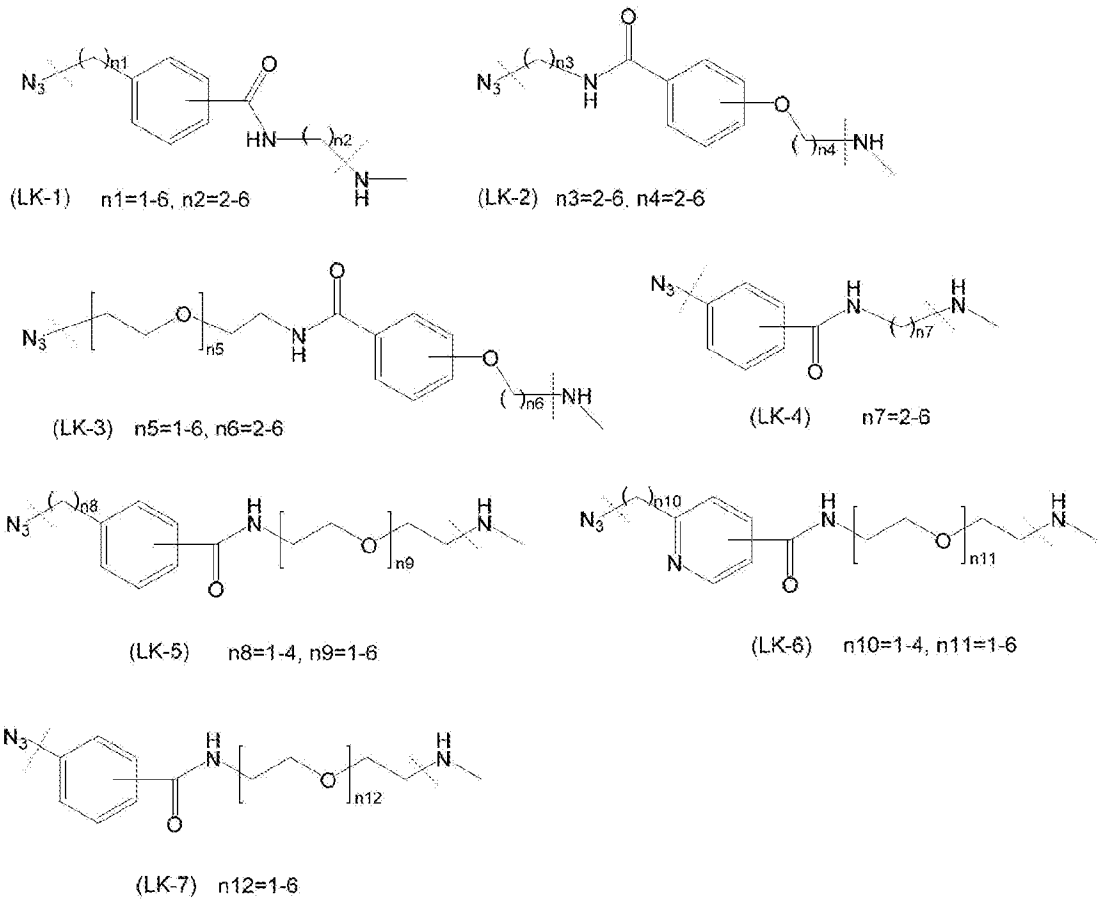
[化4]



[式(II)中、(ALG)は、アルギン酸を表わし；−NHCO−は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；−L²−は、

下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

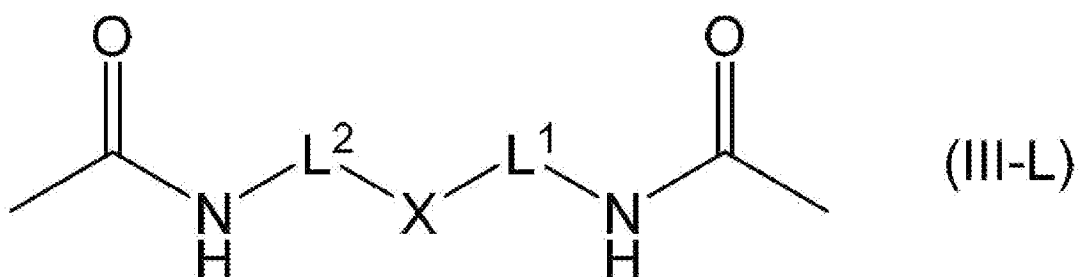
〔化5〕



の群から選択される2価のリンカーを表わす〕で表わされるアルギン酸誘導体。

〔0019〕〔4〕前記化学架橋したアルギン酸誘導体が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式（ⅠⅠ-L）：

〔化6〕



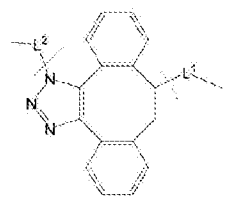
〔式（ⅠⅠⅠ-L）中、両端の-CONH-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；

-L¹-は、前記態様〔3〕中の定義と同じであり；

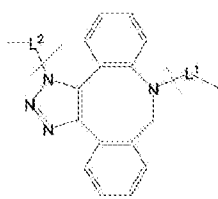
-L²-は、前記態様〔3〕中の定義と同じであり；

Xは、下記部分構造式：

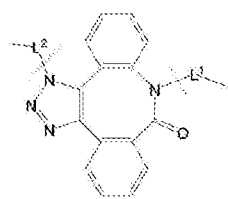
[化7]



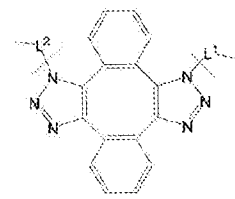
(TZ-1)



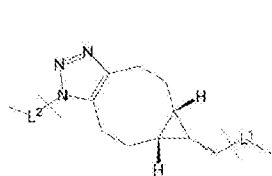
(TZ-2)



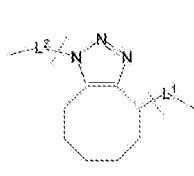
(TZ-3)



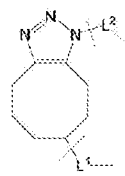
(TZ-4)



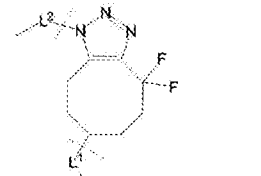
(TZ-5)



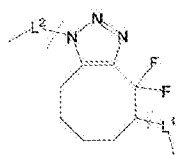
(TZ-6)



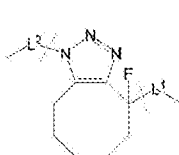
(TZ-7)



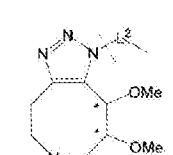
(TZ-8)



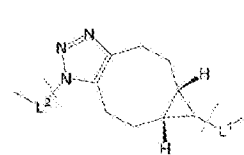
(TZ-9)



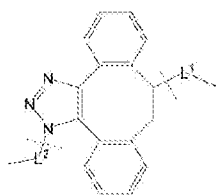
(TZ-10)



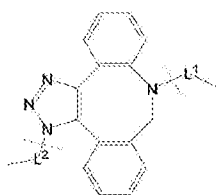
(TZ-11)



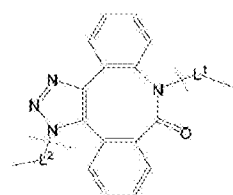
(TZ-12)



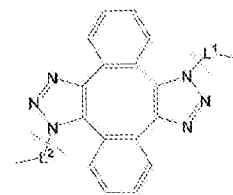
(TZ-1-r)



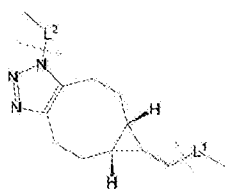
(TZ-2-r)



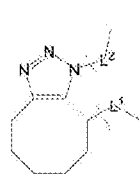
(TZ-3-r)



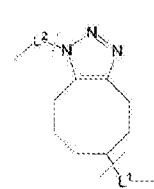
(TZ-4-r)



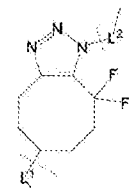
(TZ-5-r)



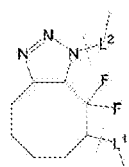
(TZ-6-r)



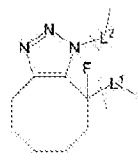
(TZ-7-r)



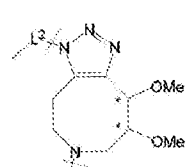
(TZ-8-r)



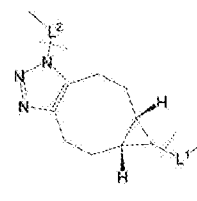
(TZ-9-r)



(TZ-10-r)



(TZ-11-r)



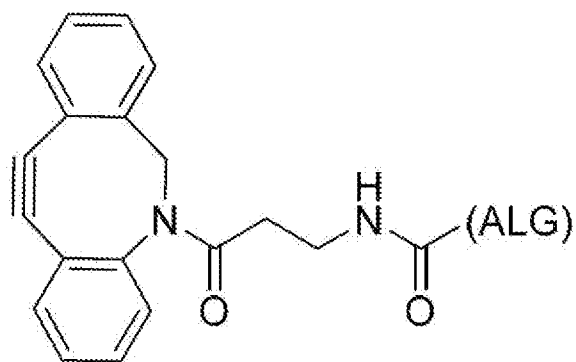
(TZ-12-r)

の群から選択される環状基であり（各式中、両端の波線外側は含まない）、
星印はキラル中心を表す]を介して結合した架橋アルギン酸である、前記〔

3)に記載の移植用デバイス。

[0020] [5] 式(1)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-1-(1)-A-2)であり、

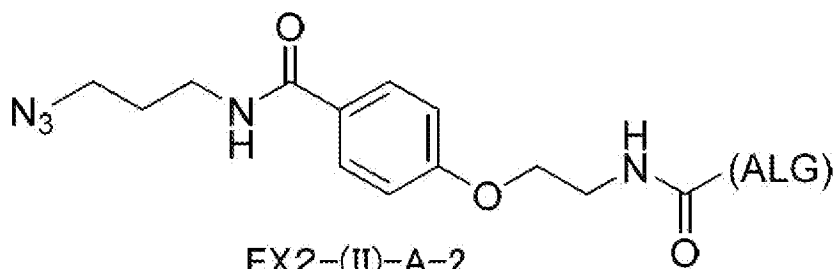
[化8]



EX1-(I)-A-2

式(11)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-2-(11)-A-2)である、

[化9]

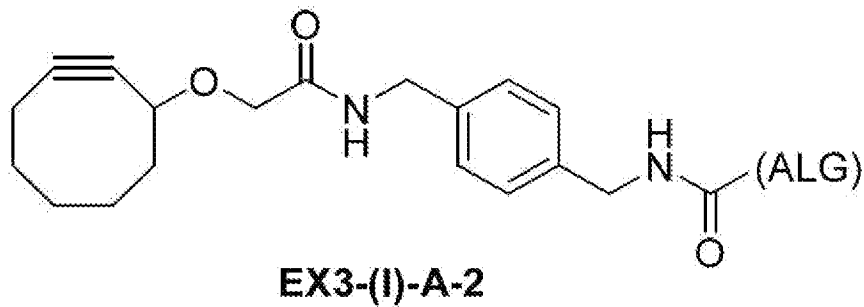


EX2-(II)-A-2

前記[3]又は[4]に記載の移植用デバイス。

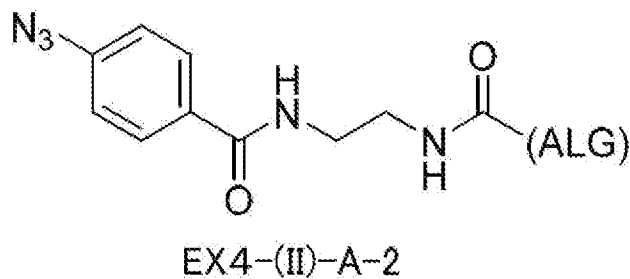
[0021] [6] 式(1)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-3-(1)-A-2)であり、

[化10]



式(11)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-4-(11)-A-2)である、

[化11]



前記〔3〕又は〔4〕に記載の移植用デバイス。

[0022] 〔7〕前記膵島が、ヒト膵島またはブタ膵島である、前記〔1〕～〔6〕いずれか1項に記載の移植用デバイス。

[0023] 〔8〕前記膵島が、ブタの成体の膵島である、前記〔7〕に記載の移植用デバイス。

[0024] 〔9〕前記膵島が、胎生期、新生児期、または周産期のブタ膵島である、前記〔7〕に記載の移植用デバイス。

[0025] 〔10〕前記ハイドロゲルが、更に半透膜で被覆された、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の移植用デバイス。

[0026] 〔11〕前記半透膜が、セルロース誘導体より形成された透析膜である。前記〔10〕に記載の移植用デバイス。

[0027] 〔12〕前記セルロース誘導体が、酢酸セルロースである、前記〔11〕に記載の移植用デバイス。

- [0028] [13] 前記移植用デバイスの移植部位が、皮下又は腹腔内である、前記[1]～[12]のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [0029] [14] 前記移植用デバイスの厚さが、0.5～5mmである、前記[1]～[13]のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [0030] [15] 前記移植用デバイスの厚さが、1～3mmである、前記[14]に記載の移植用デバイス。
- [0031] [16] 前記ハイドロゲルの厚さが、0.5～3mmである、前記前記[1]～[13]のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [0032] [17] 前記ハイドロゲルの厚さが、0.5～1mmである、前記[16]に記載の移植用デバイス。
- [0033] [18] 前記インスリン分泌細胞又は膵島を含むハイドロゲルを作製した後、半透膜で被覆した、前記[1]～[17]のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [0034] [19] 化学架橋によってハイドロゲル化するアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁し、当該インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁した溶液を半透膜中に封入した後、当該半透膜を2価金属イオンを含む溶液と接触させることで、半透膜中のアルギン酸誘導体をゲル化して得られる、前記[1]～[17]のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [0035] [20] 前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、前記[19]に記載の移植用デバイス。
- [0036] [21] 以下の工程(a)～(d)を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法。

工程(a)：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程、

工程(b)：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、

工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液に、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、厚さ0.5～5mmのゲルを作製する工程、

工程（d）：任意選択の工程として、工程（c）で得られたゲルを半透膜で被覆する工程。

[0037]〔22〕以下の工程（a）～（d）を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法。

工程（a）：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程、

工程（b）：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、

工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液を半透膜に封入する工程、

工程（d）：工程（c）で得られた半透膜を、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、半透膜中のアルギン酸誘導体の溶液をゲル化する工程。

[0038]〔23〕前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、前記〔21〕又は〔22〕に記載の移植用デバイスの製造方法。

発明の効果

[0039] 本発明により、新たな移植用デバイスが提供される。好ましくは、移植用デバイスは、少なくとも下記の効果の1つ以上を示す。

（1）生体適合性や安定性に優れ、細胞毒性も少なく、移植部位における癒着や炎症もほとんどない。

（2）ゲルの溶解が少なく形状が長期間維持される。

（3）長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能となる。

（4）長期間使用した後、半透膜中のアルギン酸ゲルは溶解しないで形状

を維持可能であり、また膵島の生存・機能維持が可能であり、長期間使用できる。

(5) 交換が可能であり、免疫隔離可能であり、癒着、炎症等も少なく、安全性の高い医療材料となる。

[0040] より好ましい態様の移植用デバイスは、移植成績や機能性に優れ、素材に関して新規であり、糖尿病患者（とりわけ、Ⅰ型糖尿病及びインスリン枯渇型Ⅱ型糖尿病）に移植することにより、長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能となる。また、ハイドロゲル内のインスリン分泌細胞又は膵島の機能が低下した場合に、回収が可能である。あるいは、定期的な交換もしくは追加移植が可能となる。また、移植用デバイスのハイドロゲルに封入するインスリン分泌細胞又は膵島として、幹細胞（iPS等）から分化させたインスリン分泌細胞、又はヒト膵島を用いることも可能である。従って、より好ましい態様のデバイスは有用である。

図面の簡単な説明

- [0041] [図1]平板型アルギン酸ゲルの写真である。（a）移植前、（b）移植後。
- [図2]平板型アルギン酸ゲルの写真である。（a）移植前、（b）移植後。
- [図3]平板型アルギン酸ゲルの写真である。（a）移植前、（b）移植後。
- [図4]作製した移植用デバイスの写真である。
- [図5-1]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（移植後day75まで）。
- [図5-2]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（移植後day305まで）。
- [図5-3]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。
- [図6-1]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（移植後day75まで）。
- [図6-2]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（移植後day305まで）。

[図6-3]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。

[図7-1]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（移植後day305まで）。

[図7-2]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。

[図8-1]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（移植後day305まで）。

[図8-2]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。

[図9-1]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（移植後day305まで）。

[図9-2]移植用デバイスを移植したマウスの血糖値変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。

[図10-1]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（移植後day305まで）。

[図10-2]移植用デバイスを移植したマウスの体重変動を示す図である（リレー移植後day26まで）。

発明を実施するための形態

[0042] [具体的な態様]

ここでは、化学架橋によりゲル化されるアルギン酸誘導体を用いて調製された、細胞などを生体に移植するためのデバイス、より具体的には、例えば、インスリン分泌細胞又は膵島などが包埋された化学架橋アルギン酸ゲルと、必要に応じて当該ゲルを被覆する半透膜とを含む移植用デバイス、その製造方法などが提供される。化学架橋によりゲル化されるアルギン酸誘導体は、例えば、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基に、アミド結合及び2価のリンカーを介して環状アルキン基又はアジド基が導入された式（I）又は式（I'）のアルギン酸誘導体であり、式（I）及び式（I'）のア

ルギン酸誘導体を用いてH u i s g e n反応（1，3－双極子付加環化反応）を行うことで新規な架橋アルギン酸が得られる。

例示的な態様は、以下の〔1〕～〔23〕の通りであり得る。

[0043] 〔1〕第1の態様は、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスであって、前記ハイドロゲルがアルギン酸誘導体を化学架橋によりゲル化したものである、移植用デバイスである。

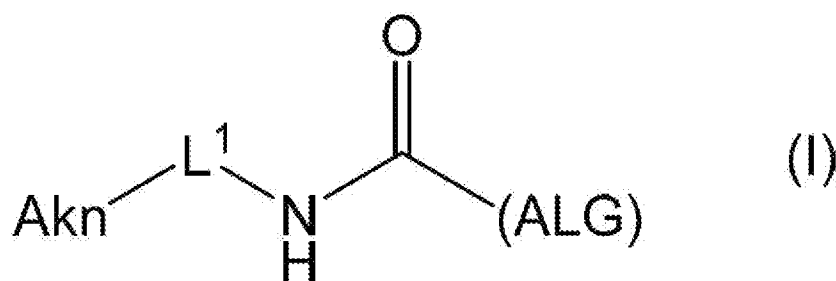
[0044] 〔2〕第2の態様は、前記ハイドロゲルが、架橋としてH u i s g e n反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋を含む、前記〔1〕に記載の移植用デバイスである。

[0045] 〔3〕第3の態様は、前記化学架橋が、以下の（A）及び（B）に記載のアルギン酸誘導体の組み合わせによる化学架橋である、前記〔1〕又は〔2〕に記載の移植用デバイスである。

（A）：

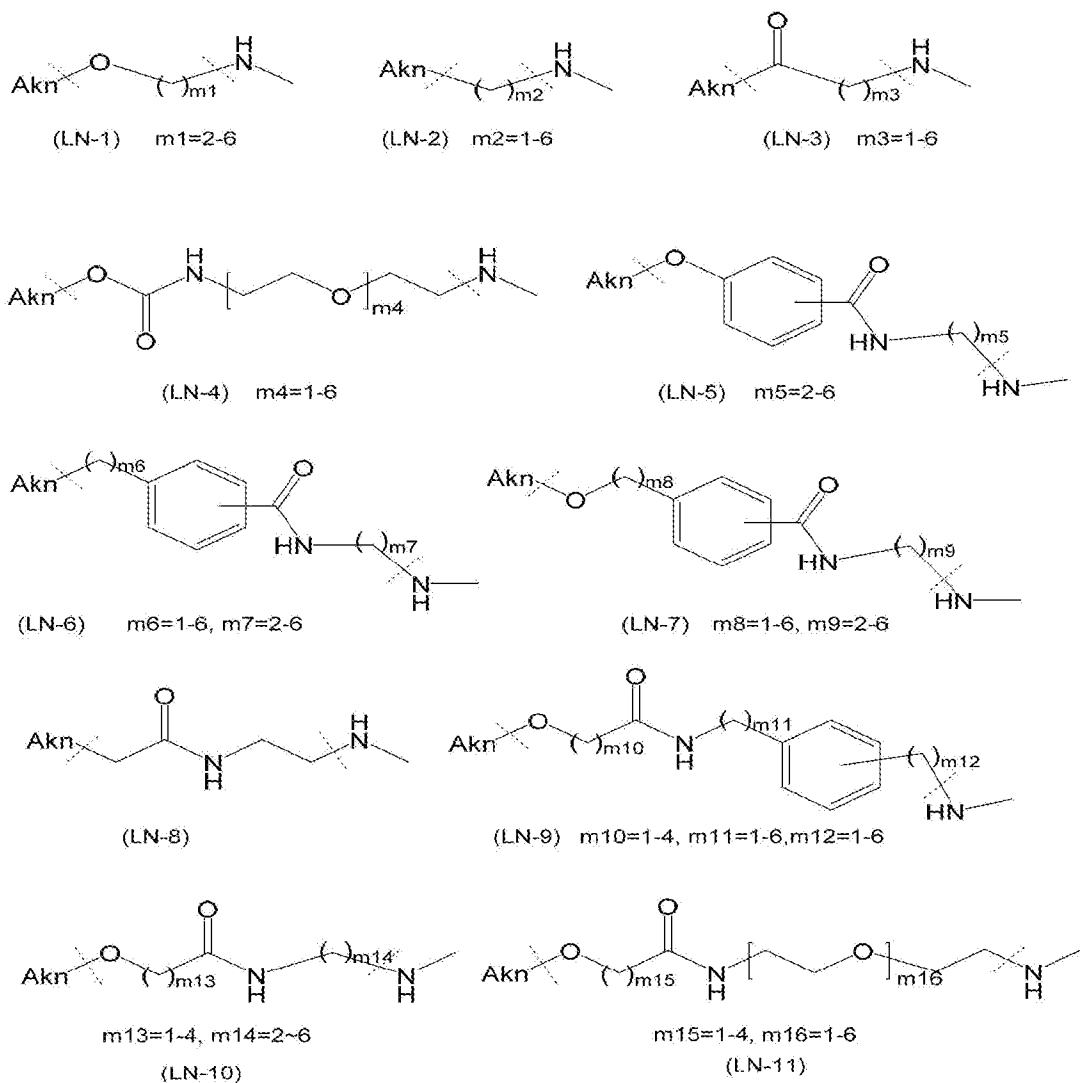
アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー（ $-L^1-$ ）を介して、環状アルキン基（A k n）が導入された、下記式（I）：

[化12]



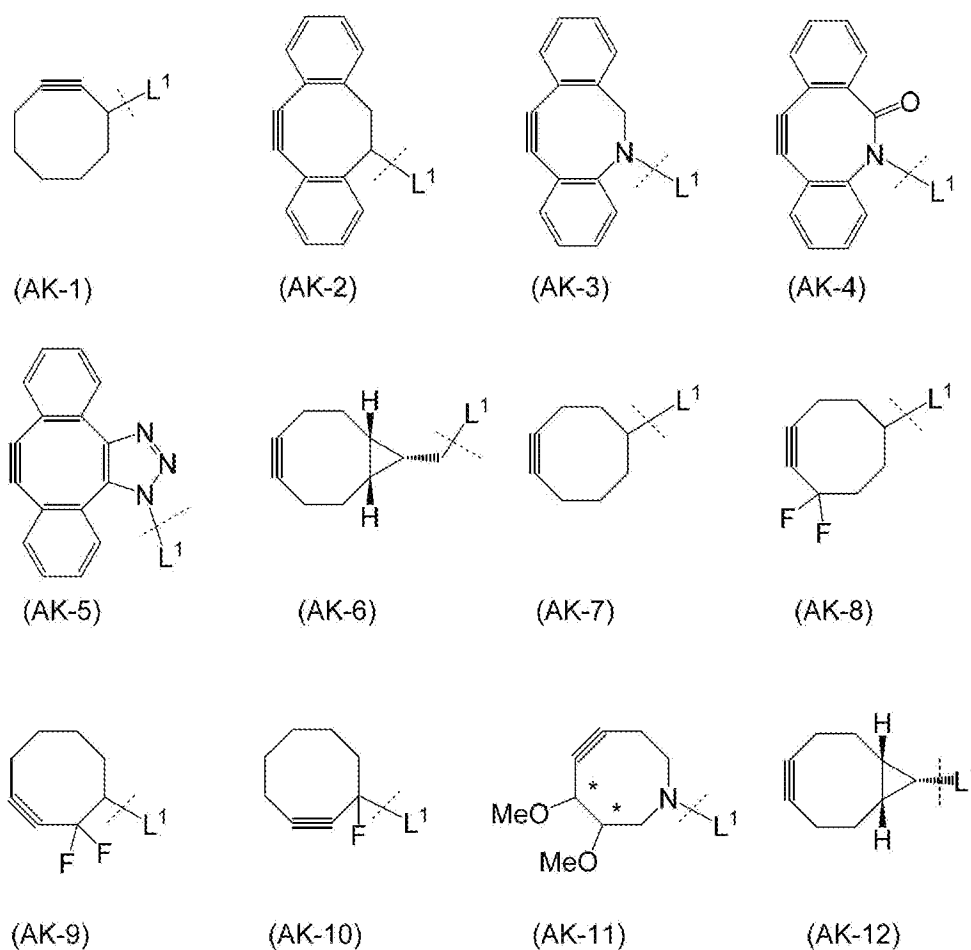
〔式（I）中、（A L G）は、アルギン酸を表わし； $-\text{NHCO}-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-L^1-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

[化13]



の群から選択される2価のリンカーを表わし；Aknは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

[化14]

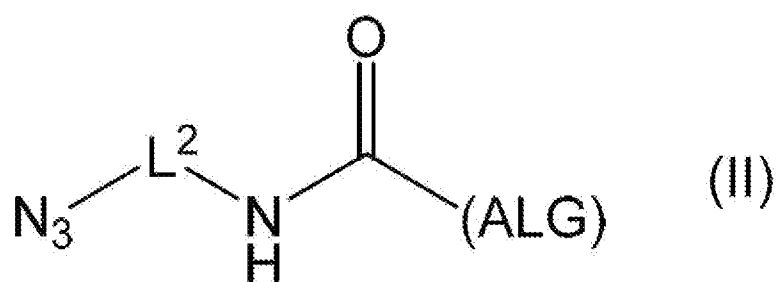


の群から選択される環状アルキン基を表わし、星印はキラル中心を表す] で表わされるアルギニン誘導体；

(B)：

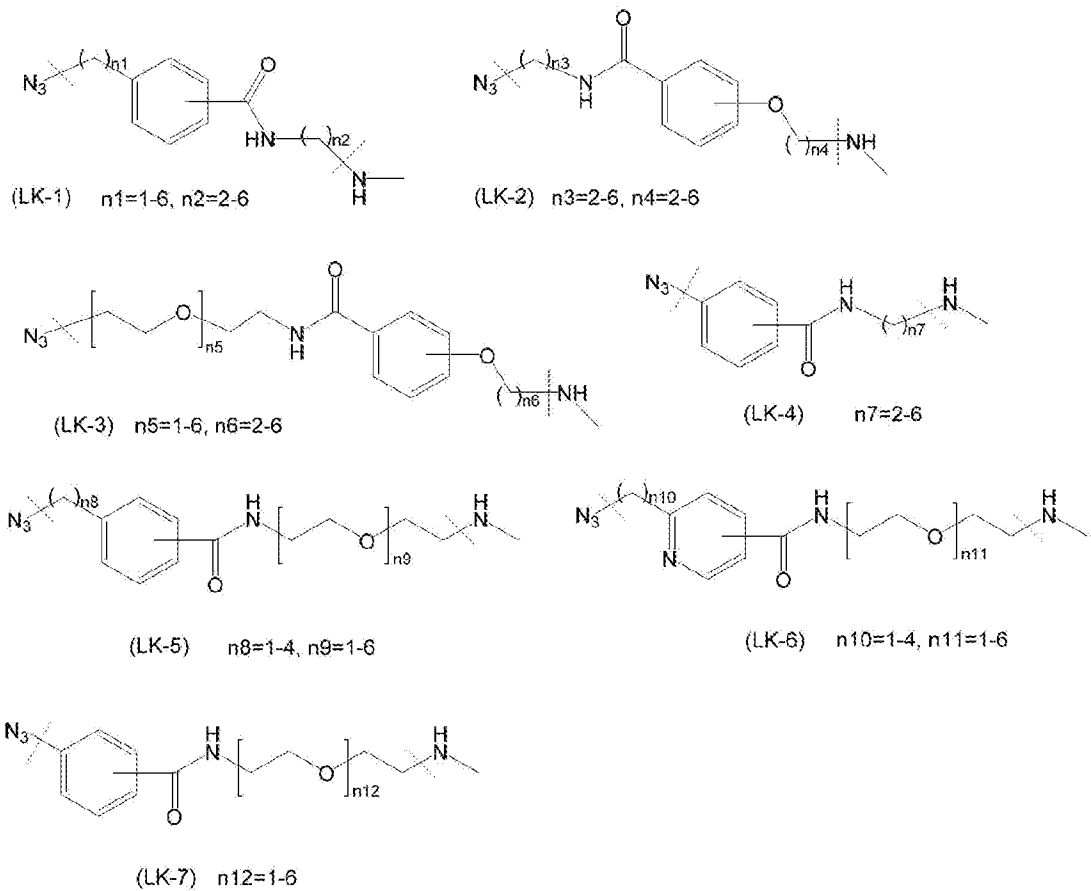
アルギニン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー(—L²—)を介して、アジド基が導入された、下記式(II)：

[化15]



〔式（ⅠⅠ）中、（ALG）は、アルギン酸を表わし； $-\text{NHCO}-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-\text{L}^2-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

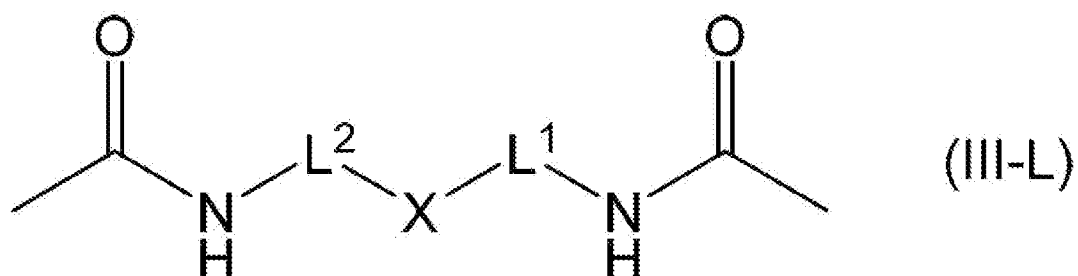
〔化16〕



の群から選択される2価のリンカーを表わす〕で表わされるアルギン酸誘導体。

〔0046〕〔4〕第4の態様は、前記化学架橋したアルギン酸誘導体が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式（ⅠⅠⅠ-L）：

[化17]



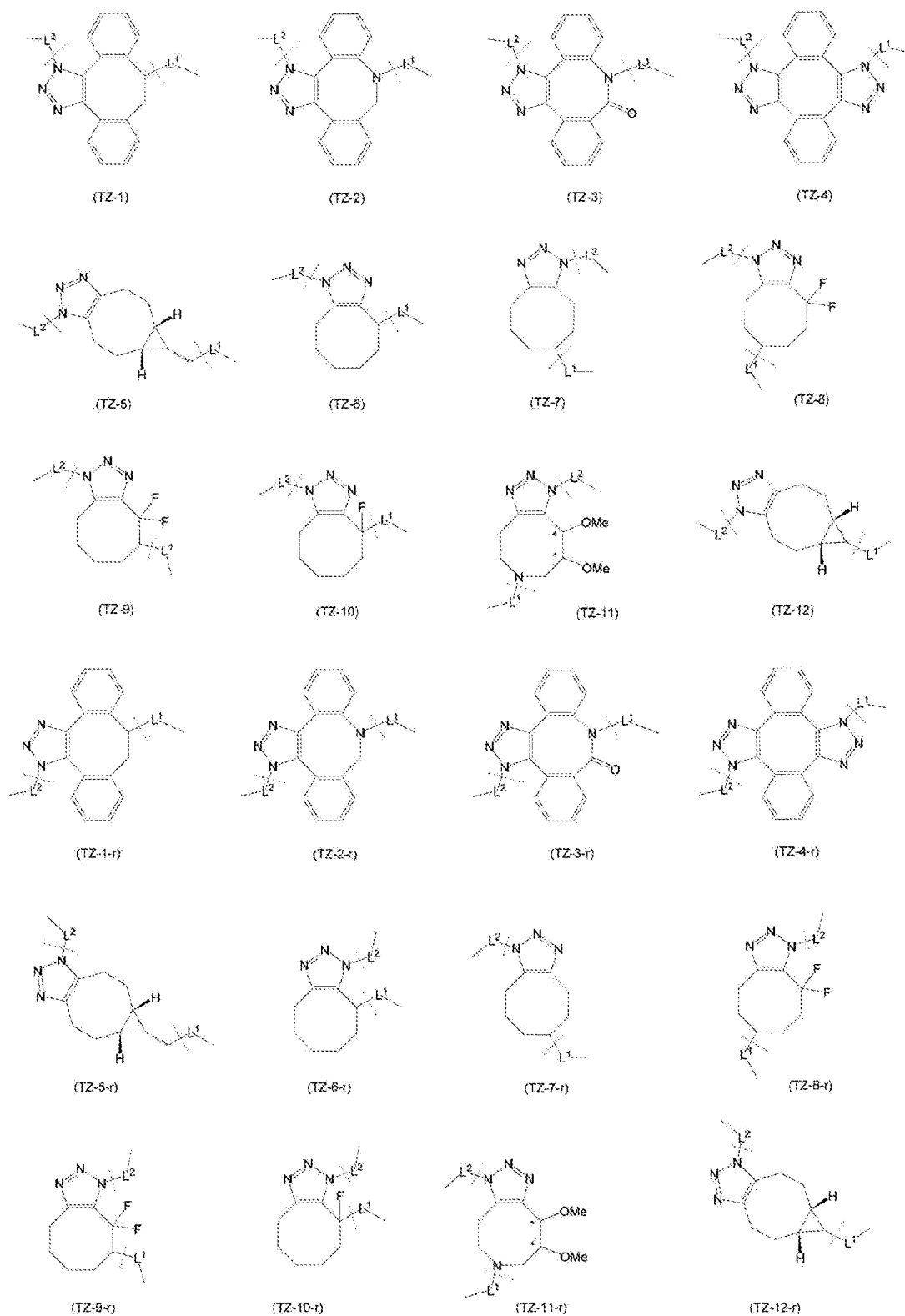
〔式（III-L）中、両端の－CONH－及び－NHCO－は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；

－L¹－は、前記態様〔3〕中の定義と同じであり；

－L²－は、前記態様〔3〕中の定義と同じであり；

Xは、下記部分構造式：

[化18]

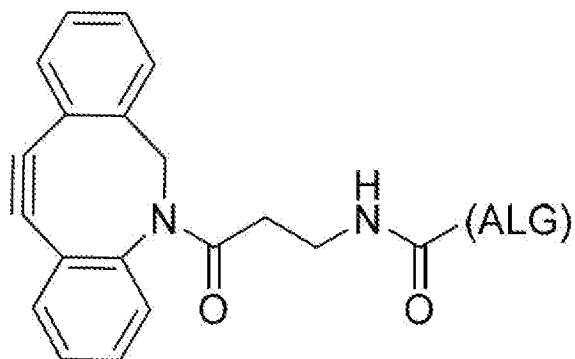


の群から選択される環状基であり（各式中、両端の波線外側は含まない）、
 星印はキラル中心を表す］を介して結合した架橋アルギニン酸である、前記〔

3]に記載の移植用デバイスである。

[0047] [5] 第5の態様は、式(1)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-1-(1)-A-2)であり、

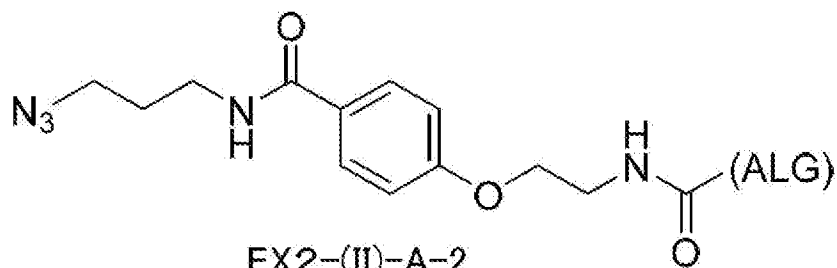
[化19]



EX1-(I)-A-2

式(11)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-2-(11)-A-2)である、

[化20]

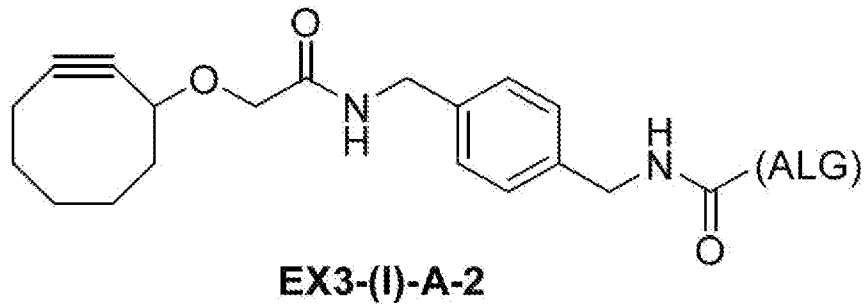


EX2-(II)-A-2

前記[3]又は[4]に記載の移植用デバイスである。

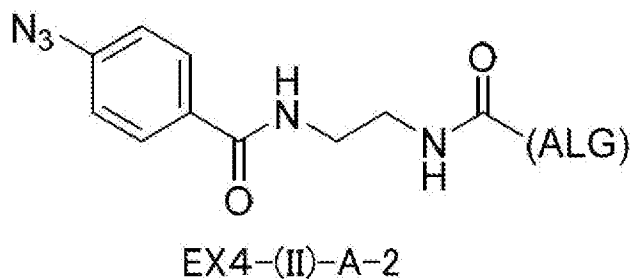
[0048] [6] 第6の態様は、式(1)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-3-(1)-A-2)であり、

[化21]



式(11)のアルギン酸誘導体が、下記式(EX-4-(11)-A-2)である、

[化22]



前記〔3〕又は〔4〕に記載の移植用デバイスである。

[0049] 〔7〕第7の態様は、前記臍島が、ヒト臍島またはブタ臍島である、前記〔1〕～〔6〕いずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0050] 〔8〕第8の態様は、前記臍島が、ブタの成体の臍島である、前記〔7〕に記載の移植用デバイスである。

[0051] 〔9〕第9の態様は、前記臍島が、胎生期、新生児期、または周産期のブタ臍島である、前記〔7〕に記載の移植用デバイスである。

[0052] 〔10〕第10の態様は、前記ハイドロゲルが、更に半透膜で被覆された、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0053] 〔11〕第11の態様は、前記半透膜が、セルロース誘導体より形成された透析膜である、前記〔10〕に記載の移植用デバイスである。

[0054] 〔12〕第12の態様は、前記セルロース誘導体が、酢酸セルロースである

、前記〔11〕に記載の移植用デバイスである。

[0055] 〔13〕第13の態様は、前記移植用デバイスの移植部位が、皮下又は腹腔内である、前記〔1〕～〔12〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0056] 〔14〕第14の態様は、前記移植用デバイスの厚さが、0.5～5mmである、前記〔1〕～〔13〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0057] 〔15〕第15の態様は、前記移植用デバイスの厚さが、1～3mmである、前記〔14〕に記載の移植用デバイスである。

[0058] 〔16〕第16の態様は、前記ハイドロゲルの厚さが、0.5～3mmである、前記〔1〕～〔13〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0059] 〔17〕第17の態様は、前記ハイドロゲルの厚さが、0.5～1mmである、前記〔16〕に記載の移植用デバイスである。

[0060] 〔18〕第18の態様は、前記インスリン分泌細胞又は膵島を含むハイドロゲルを作製した後、半透膜で被覆した、前記〔1〕～〔17〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0061] 〔19〕第19の態様は、化学架橋によってハイドロゲル化するアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁し、当該インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁した溶液を半透膜中に封入した後、当該半透膜を2価金属イオンを含む溶液と接触させることで、半透膜中のアルギン酸をゲル化して得られる、前記〔1〕～〔17〕のいずれか1項に記載の移植用デバイスである。

[0062] 〔20〕第20の態様は、前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、前記〔19〕に記載の移植用デバイスである。

[0063] 〔21〕第21の態様は、以下の工程（a）～（d）を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法である。

工程（a）：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離

する工程、

工程（b）：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、

工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液に、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、厚さ0.5～5mmのゲルを作製する工程、

工程（d）：任意選択の工程として、工程（c）で得られたゲルを半透膜で被覆する工程。

[0064]〔22〕第22の態様は、以下の工程（a）～（d）を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法である。

工程（a）：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程、

工程（b）：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、

工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液を半透膜に封入する工程、

工程（d）：工程（c）で得られた半透膜を、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、半透膜中のアルギン酸誘導体の溶液をゲル化する工程。

[0065]〔23〕第23の態様は、前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、前記〔21〕又は〔22〕に記載の移植用デバイスの製造方法である。

[0066] 以下、具体的な態様についてさらに詳細に説明する。

「移植用デバイス」とは、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイ

ドロゲルを用いたものである。当該ハイドロゲルは、アルギン酸誘導体を化学架橋によりゲル化したものである。したがって、アルギン酸誘導体としては、化学架橋によってゲル化することが可能なものを用いる。インスリン分泌細胞又は膵島が封入されているハイドロゲルの形状は、例えば平板型である。移植用デバイスにおいて、ハイドロゲルが更に半透膜で被覆されていてもよく、この場合、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルが半透膜中に挿入された状態となる。

[0067] 移植用デバイスで用いる「インスリン分泌細胞」とは、膵島を構成する細胞のうち、インスリンを分泌する β 細胞を意味する。

「膵島」とは、別名ランゲルハンス氏島とも呼ばれる、平均約2000個の膵島細胞より構成される細胞塊である。膵島は、グルカゴンを分泌する α 細胞、インスリンを分泌する β 細胞、ソマトスタチンを分泌する δ 細胞、グレリンを分泌する ϵ 細胞、及び膵ポリペプチドを分泌するPP (pancreatic polypeptide ; 膵ポリペプチド) 細胞の5種の細胞から構成される。

「インスリン分泌細胞又は膵島」とは、生物学的活性な生成物の分泌機能を有する細胞又は組織とも表現される。

[0068] 本明細書において、「膵島細胞」とは、上記の5種類の細胞うちの少なくとも1種類の細胞を含むものであればよいが、少なくとも β 細胞を含むことが好ましい。いくつかの態様では、膵島細胞としては、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、及びPP細胞の全てを含む混合物でもよく、膵島に含まれた状態のものでもよい。

また、「膵島細胞」は、分化により膵島細胞になったものであってもよい。この場合、「膵島細胞」には、例えば、iPS細胞、ES細胞、及び体性幹細胞（例えば、間葉系幹細胞）を分化させて得られた膵島細胞も含み得る。

インスリン分泌細胞又は膵島（膵島細胞を含む）としては、患者に移植した際に、患者の病的状態を回復することができる程度の生存性と機能とを有することが好ましい。インスリン分泌細胞、膵島又は膵島細胞の機能として

は、例えば、インスリンを分泌することが挙げられ、移植後においてもグルコース応答性が維持されていることが好ましい。

[0069] いくつかの態様の「移植用デバイス」は、バイオ人工膵島とも呼ばれ、バイオ人工臓器の一例である。当該バイオ人工膵島の備える細胞には、例えば、インスリン分泌細胞が含まれる。インスリン分泌細胞は、ヒトあるいはブタなどから採取された膵島に含まれる細胞、あるいは幹細胞（例えば、ES細胞、iPS細胞、及び体性幹細胞（例えば、間葉系幹細胞））から分化した膵島のいずれかでもよい。

[0070] 本発明の移植用デバイスには、インスリン分泌細胞、膵島及び膵島細胞以外の細胞を用いる場合がある。

[0071] インスリン分泌細胞、膵島及び膵島細胞以外の細胞は、細胞移植に用い得るものであれば任意の細胞を使用することができ、その種類は特に限定されない。また、使用する細胞は1種でもよいし、複数種の細胞を組合せて用いてもよい。使用する細胞として、好ましくは、動物細胞、より好ましくは脊椎動物由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞を挙げることができる。脊椎動物由来細胞（特に、ヒト由来細胞）の種類は、幹細胞（例えば、万能細胞、又は体性幹細胞）、前駆細胞、又は成熟細胞の何れでもよい。万能細胞としては、例えば、胚性幹（ES）細胞、生殖幹（GS）細胞、又は人工多能性幹（iPS）細胞を使用することができる。体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（MSC）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、又は神経幹細胞を使用することができる。

[0072] 前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、皮膚、真皮、表皮、筋肉、心筋、神経、骨、軟骨、内皮、脳、上皮、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、口腔内、角膜、骨髓、臍帯血、羊膜、又は毛に由来する細胞を使用することができる。ヒト由来細胞としては、例えば、ES細胞、iPS細胞、MSC、軟骨細胞、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、間充織細胞、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞、神経細胞、肝細胞、線維芽細胞、角膜内皮細胞、血管内皮細胞、角膜上皮

細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、又は造血幹細胞を使用することができる。また、細胞の由来は、自家細胞又は他家細胞の何れでも構わない。いくつかの態様では、上記の中でも、例えば、ES細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞（MSC）を使用することができる。

[0073] 「インスリン分泌細胞、又は膵島（膵島細胞を含む）」のドナーは、ヒト又はブタなどが挙げられる。「インスリン分泌細胞、膵島又は膵島細胞」のドナーは、いくつかの態様では、ドナー不足解消の観点からブタである。「インスリン分泌細胞、又は膵島（膵島細胞を含む）」としては、膵島、あるいはES細胞またはiPS細胞から分化した膵島のいずれかでもよい。

[0074] 「インスリン分泌細胞、又は膵島（膵島細胞を含む）」がブタ由来である場合には、成体のブタ膵島、又は、胎生期、新生児期、もしくは周産期のブタ膵島が挙げられる。当該膵島は適宜培養してから使用するようにしてもよい。

[0075] 移植用デバイスの移植方法としては、切開と留置、注射、内視鏡、腹腔鏡といったものが使用可能である。

移植部位は特に限定されず、皮下、腹腔内、肝臓内、筋肉内、大網内、腎被膜下などを挙げることができるが、皮下や腹腔内に移植することが好ましい。

[0076] ここで「半透膜（はんとうまく、semipermeable membrane）」とは、一定の大きさ以下の分子またはイオンのみを透過させる膜である。半透膜を透過しない溶質と透過性を示す溶媒の系で、半透膜を介して2つの濃度の溶液を接すると、隔てて浸透圧が発生し溶媒のみが透過する性質を有する。本明細書に記載の移植用デバイスは、半透膜を含んでもよいし、あるいは半透膜は必須ではなく、すなわち半透膜を含まなくてもよい。いくつかの態様の移植用デバイスは、（例えば、インスリン分泌細胞又は膵島が封入された）ハイドロゲル単体であり、すなわち、当該ハイドロゲルが半透膜で被覆されていない。ハイドロゲルが半透膜で被覆されていない移植用デバイスは、好ましくは、生体適合性や安定性に優れ、細胞毒性も

少なく、移植部位における癒着や炎症もほとんどなく、ゲルの溶解が少なく形状が長期間維持され、より好ましくは、長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能なものである。別のいくつかの態様の移植用デバイスは、ハイドロゲルが半透膜で被覆されている。半透膜としては、例えば、透析に用いられる膜もしくはチューブなどが挙げられ、透析チューブ、コットンセルロース透析膜、再生セルロース透析膜、セルロースエステル透析膜等も使用可能であり、商品名としてはCellu-Sep Tubular Membrane (Membrane Filtration Products社)、スペクトラバイオテックメンブラン (SPECTRUM社)、スペクトラ／ポアCE透析チューブ (SPECTRUM社) 等が挙げられる。

「半透膜」としては、セルロースエステルで作製された半透膜であることが好ましい。

具体例としては、透析膜であるスペクトラ／ポアCE透析チューブ (SPECTRUM社) が挙げられる。当該セルロースエステルは酢酸セルロースの高分子であることがより好ましい。

[0077] ここで用いる半透膜は樹脂を含有する。半透膜は、例えば、少なくとも一種類以上の樹脂を溶媒に溶解させ、溶解した樹脂を凝固させることで作製することができる。かかる樹脂は特に限定されるものではない。かかる樹脂として、例えば、エチレンービニルアルコール系共重合体、ポリスルホン系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、酢酸セルロースなどのセルロース系重合体、ポリアミド系重合体、ポリカーボネート系重合体などの樹脂を用いることができる。より好ましくは、酢酸セルロースなどのセルロース系重合体である。

[0078] ここで用いられる半透膜には、「分子量カットオフ」がある。「分子量カットオフ」とは、実質的に遮断されない最大分子量の大きさを意味する。該分子量カットオフを上回る分子量を有する分子は、該半透膜を出入りすることが実質的に妨げられる。ここで用いられる半透膜の「分子量カットオフ」

としては、100kDa（キロダルトン）であるのが好ましい。例えば、セルロースエステル透析膜であるスペクトラ／ポアCE透析チューブ（SPECTRUM社）であれば、当該カットオフ値を「MWCO」として、100～500Da（ダルトン）、0.5～1kDa、3.5～5kDa、8～10kDa、20kDa、50kDa、100kDa、300kDa、1000kDa等の規格で販売されている。例えば、当該カットオフ値が、約500000ダルトンより大きい分子量カットオフを有する場合、IgGや補体のような分子はこれらの半透膜に進入できるが、免疫細胞のような宿主細胞は、当該半透膜中への進入が妨げられ、インスリンや細胞の栄養素や酸素は当該半透膜を通過できることになる。単位ダルトン記号はDa、1000Daは1kDaを意味する。

[0079] ここで、移植用デバイスの厚さの定義は、後述の通りである。いくつかの態様では、移植用デバイスの厚さは、0.5～5mmであること好ましく、1～3mmであることがより好ましい。移植用デバイスの厚さは、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されているハイドロゲルが半透膜で被覆されている場合、半透膜の厚さで0.5～5mmであること好ましく、1～3mmであることがより好ましい。

[0080] また、ハイドロゲルの厚さの定義も、後述の通りである。いくつかの態様では、ハイドロゲルの厚さは、0.5～5mmであり、0.5～3mmであるのが好ましく、0.5～1mmであるのがより好ましい。

移植用デバイスが半透膜を含む場合、半透膜中のハイドロゲルの厚さは、1～3mmであることが好ましく、1.5mm～2mmであることがより好ましい。

移植用デバイスが半透膜を含まない場合、ハイドロゲルの厚さは、0.5～5mmであり、0.5～3mmであることが好ましく、0.5～1mmであることがより好ましい。

[0081] 移植用デバイスの形状は、平板状であれば、特に限定されない。平板とは、平らな板を意味し、厚さがほぼ一定で広い面積を有する板状のことを示す

。当該板の形状として、例えば、三角形、四角形、五角形のような多角形や円形等の平らな板状が挙げられる。また、当該移植用デバイスは、前記の厚さであり、かつ、板状全体でほぼ一定の厚さであることが好ましい。板状の移植デバイスにおいて厚さのばらつきは、好ましくは±10%以内、より好ましくは±5%以内である。移植用デバイスの厚さは、移植用デバイスの最大厚の部分の厚さである。例えば、ハイドロゲルを半透膜である透析チューブ中に封入する際には、透析チューブの両端をシールすることにより、移植用デバイスの形状が、一見ラグビーボール状のような、両端がやや薄く、両端に比べ中央が厚くなる形状になることがある。そのような形状になる場合には、移植用デバイスの厚さは、その最大厚の部分である中央付近の厚さを意味する。

また、ハイドロゲルの形状も、平板状であれば、特に限定されない。平板とは、平らな板を意味し、厚さがほぼ一定で広い面積を有する板状のことを示す。当該板の形状として、例えば、三角形、四角形、五角形のような多角形や円形等の平らな板状が挙げられる。また、ハイドロゲルは、前記の厚さであり、かつ、板状全体でほぼ一定の厚さであることが好ましい。ハイドロゲルにおいて厚さのばらつきは、好ましくは±10%以内、より好ましくは±5%以内である。ハイドロゲルの厚さは、ハイドロゲルの最大厚の部分の厚さである。いくつかの態様では、平板型のハイドロゲルは、例えば、短直径が12～15mm、長直径が12～18mm、厚さが0.5～5mm程度の大きさの架橋アルギン酸のゲルであり、円形、四角形、六角形、八角形などの形状を取ることも可能である。平板型のハイドロゲルを面積で表現すると、例えば、144～270mm²とも表わすことができる。

[0082] 本明細書において、「IEQ」とは、Islet Equivalentの略号であり、膵島を球形と見立て、直径が150μmの膵島を1 IEQと定義する、膵島の量を表す国際単位である。

[0083] 日本膵・膵島移植研究会の新鮮膵島移植の基準（膵島移植実施マニュアル）によれば、新鮮膵島を移植する際の条件のひとつに、「膵島量5000 I

E Q / k g (患者体重) 以上」とあり、ここでも参考にする。移植用デバイスは、所望の治療効果が生じるよう算定された膵島数に適宜設定することができ、患者の体重、症状の度合い等により適宜適切なデバイスに設定することが可能である。

インスリン分泌細胞の量についても、膵島に準じて適宜設定できる。

[0084] 移植用デバイスの製造方法について、より詳細に説明する。

移植用デバイスの製造方法において、「工程(a)：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程」とは、工程(a)が任意選択であることであることを意味する。「生体」は、例えば、ヒト、または非ヒト哺乳動物であり、非ヒト哺乳動物としては、例えば、ブタが挙げられる。工程(a)を行う場合には、例えば、ブタ膵島の単離で言えば、当技術の公知の手順、或いは、霜田ら(Shimoda; Cell Transplantation、第21巻、501-508頁、2012年)に記載された方法、もしくはエドモントンプロトコールを用いた標準のリコルディー技術等に準じて、無菌下で成体のブタから無菌の生存可能な膵臓を得て、膵島細胞を単離することができる。その他の非ヒト哺乳動物の膵島、或いはヒトの膵島の単離も、ブタ膵島の単離に準じて行うことができる。その後、単離した膵島を、そのまま用いてもよいし、あるいは、培養して用いてもよい。膵島の培養については、例えば、野口(Noguchi)ら(Transplantation Proceedings, 42, 2084-2086 (2010))の方法に準じて、培地中(Connaught Medical Research Laboratory (CMRL)-based Miami-defined media #1 (MM1; Mediatech-Cellgro, Herndon, VA)-supplemented with 0.5% human serum albumin.)、5%CO₂/95%空気の湿潤雰囲気中で37℃で1日間培養することが可能である。

[0085] 次いで、「工程(b)：化学架橋によってハイドロゲル化することができ

るアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程」では、化学架橋によってハイドロゲル化することができるとして、例えば、前述の式（１）及び式（１１）で表わされるアルギン酸誘導体を挙げることができる。工程（ｂ）では、例えば、前記アルギン酸誘導体の０．１～５重量％の水溶液もしくは生理食塩水溶液を作製し、当該溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織（例えば、工程（ａ）で得た膵島、当該膵島から単離したインスリン分泌細胞、又は当該膵島から単離した膵島細胞を培養して得られる膵島細胞）を適宜必要量懸濁させる。

ここで、「化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液」は、例えば、前述の式（１）で表わされるアルギン酸誘導体の溶液と、前述の式（１１）で表わされるアルギン酸誘導体の溶液の２種の溶液である。この場合、工程（ｂ）では、これらの２種の溶液、およびそれらに細胞又は組織を混和した溶液は、混合せずに、別々に作製される。このとき、細胞又は組織は、２種の溶液の一方にのみ混和してもよいし、あるいは両方に混和してもよい。

[0086] 次いで、「工程（ｃ）：工程（ｂ）で得られたアルギン酸誘導体の溶液に、２価金属イオンを含む溶液と接触させて、厚さ０．５～５ｍｍのゲルを作製する工程」では、細胞又は組織（例えば、膵島）が懸濁した、工程（ｂ）で得られたアルギン酸誘導体の溶液をゲル化させる。このとき、まず、式（１）のアルギン酸誘導体の溶液と式（１１）で表わされるアルギン酸誘導体の溶液とを、各々の化学架橋基の導入率に応じて、適宜各々の用量を混合するようにしてよい。次に、その混合溶液に、２価金属イオンを含む溶液と接触させることで、イオン架橋が進むと同時に化学架橋も進み、ゲルが作製できる。ゲルは、より具体的には、後述する実施例５に記載の〔平板型アルギン酸ゲルの製造〕＜一般的な調製方法＞と同様に作製することができる。

次いで、「工程（d）：任意選択の工程として、工程（c）で得られたゲルを半透膜で被覆する工程」とは、工程（d）が任意選択であることを意味する。工程（d）を行う場合には、工程（c）で得られたゲルを、当該分野で公知の方法またはそれに準ずる方法で、半透膜で被覆する。例えば、ゲルを、半透膜（例えば、一端をシールした半透膜のチューブ）に挿入して、もう一端をシールすることで被覆する。

[0087] あるいは、「工程（c）：工程（b）で得られたのアルギン酸誘導体の溶液を半透膜に封入する工程」は、細胞又は組織（例えば、脾臓）が懸濁した、工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液を、当該分野で公知の方法またはそれに準ずる方法で、半透膜で被覆する。このとき、先ず、式（I）のアルギン酸誘導体の溶液と式（II）で表わされるアルギン酸誘導体の溶液とを、各々の化学架橋基の導入率に応じて、適宜各々の用量を混合するようにしてよい。次に、その細胞又は組織（例えば、脾臓）が懸濁した混合溶液を、半透膜（例えば、一端をシールした半透膜のチューブ）に挿入して、もう一端をシールすることで被覆する。

次いで、「工程（d）：工程（c）で得られた半透膜を、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、半透膜中のアルギン酸溶液をゲル化する工程」では、工程（c）で得られたのアルギン酸溶液を封入した半透膜を2価金属イオンを含む溶液と接触させて、半透膜中のアルギン酸溶液をゲル化する。

[0088] 工程（d）により得られたデバイスは、生理食塩水等の溶媒で洗浄してもよい。また、培地中で所定期間培養してもよい。

[0089] 移植用デバイスに用いられる「2価金属イオン」を含む溶液とは、カルシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオン等を含む溶液が挙げられる。好ましくは、カルシウムイオンまたはバリウムイオンを含む溶液であり、カルシウムイオンを含む溶液であることがより好ましい。

2価金属イオンを含む溶液は、例えば、2価金属イオンの塩を溶媒に溶解させることにより得ることができる。2価金属イオンの塩としては、塩化カルシウム、塩化バリウム、塩化ストロンチウム等が挙げられる。溶媒として

は、例えば、水、及び生理食塩水が挙げられる。

いくつかの態様では、2価金属イオンを含む溶液は、カルシウムイオンを含む溶液であり、好ましくは、塩化カルシウムを含む水溶液である。

2価金属イオンを含む溶液の使用量は、アルギン酸誘導体の使用量や分子量などに応じて適宜調節するのが望ましい。

[0090] 移植用デバイスが半透膜を有する場合、デバイス中のハイドロゲルは、アルギン酸誘導体の溶液を半透膜に封入してから、2価金属イオン溶液に接触させることで作製しても、半透膜に封入する前にゲル化させ、その後半透膜中に封入してもどちらでもよい。

ここで、「接触」とは、アルギン酸誘導体の溶液を封入した半透膜を2価金属イオン溶液に浸漬すること、アルギン酸誘導体の溶液を封入した半透膜に2価金属イオン溶液をかけることなどが挙げられる。

[0091] 移植用デバイスに用いられるハイドロゲルとは、水に不溶な三次元の網目構造をもつ高分子及びその水による膨潤体を指すものとする。ここでは、ハイドロゲルのことを単に、ゲルという場合がある。

[0092] ハイドロゲルを調製する時に使用する、高分子の濃度を変化させることにより、このゲルの網目元構造を通過できる分子の分子量を大きく自由に変化させることができる。すなわち、ゲルの網目構造は高分子の濃度の濃い場合にはメッシュが小さく、高分子の濃度が薄い場合にはメッシュが大きくなることが考えられる。網目構造のメッシュが大き過ぎると、抗体等が網目構造内に侵入する。この場合、ゲル内のインスリン分泌細胞又は膵島に対して拒絶反応が起こりやすくなる。拒絶反応はインシュリン等の必要物質の産生を阻害する。

[0093] 一般に、ハイドロゲルの材料は、以下のような高分子からなる。例えば、コラーゲン、ヒアルロナン、ゼラチン、フィブロネクチン、エラスチン、テナシン、ラミニン、ビトロネクチン、ポリペプチド、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ケラタン、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、キチン、キトサン、アルギン酸塩、アルギン酸

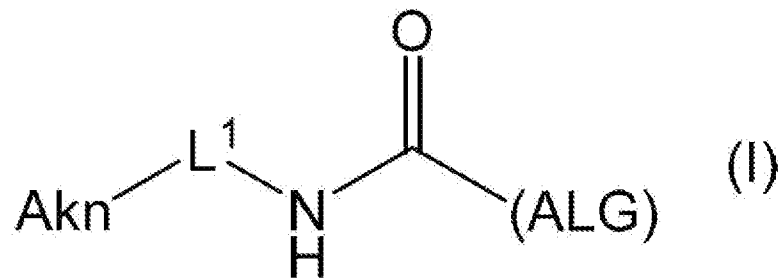
誘導体、アガロース、寒天、セルロース、メチルセルロース、カルボキシルメチルセルロース、グリコーゲン及びこれらの誘導体、加えて、フィブリン、フィブリノゲン、トロンビン、及びポリグルタミン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸－グリコール酸共重合体、ビニルアルコール系重合体、ジェランガム、キサンタンガム、ガラクトマンナン、グアガム、ローカストビーンガム及びタラガム等が挙げられる。

[0094] ここで、ハイドロゲルの材料としては、生体適合性、臍島の長期生着・機能維持等の点から、アルギン酸誘導体が好ましい。

[0095] 移植用デバイスに用いることができるアルギン酸誘導体について、以下に詳細に説明する。当該アルギン酸誘導体には、以下の態様〔1〕～〔17〕のアルギン酸誘導体が含まれる。

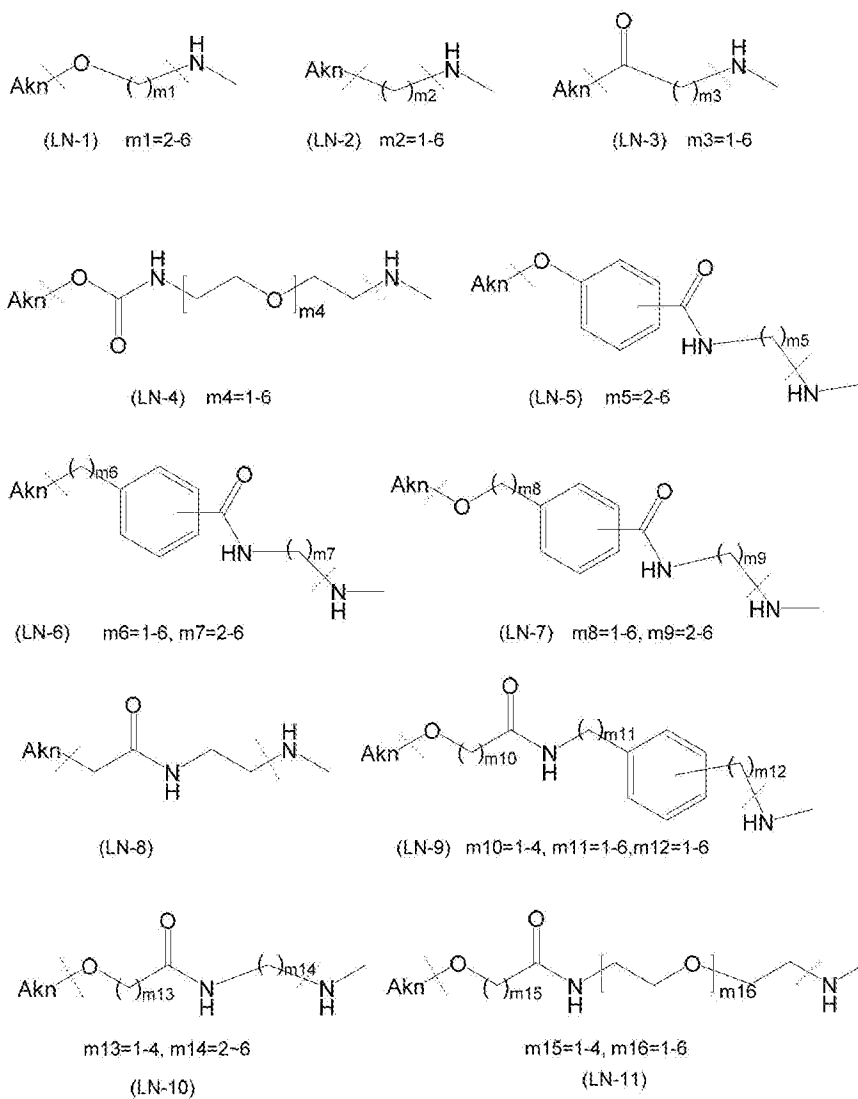
[0096] 〔1〕アルギン酸誘導体の第1の態様は、次の通りである。アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー（ $-L^1-$ ）を介して、環状アルキン基（ Akn ）が導入された、下記式（I）：

[化23]



〔式（I）中、（ALG）は、アルギン酸を表わし； $-NHCO-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-L^1-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

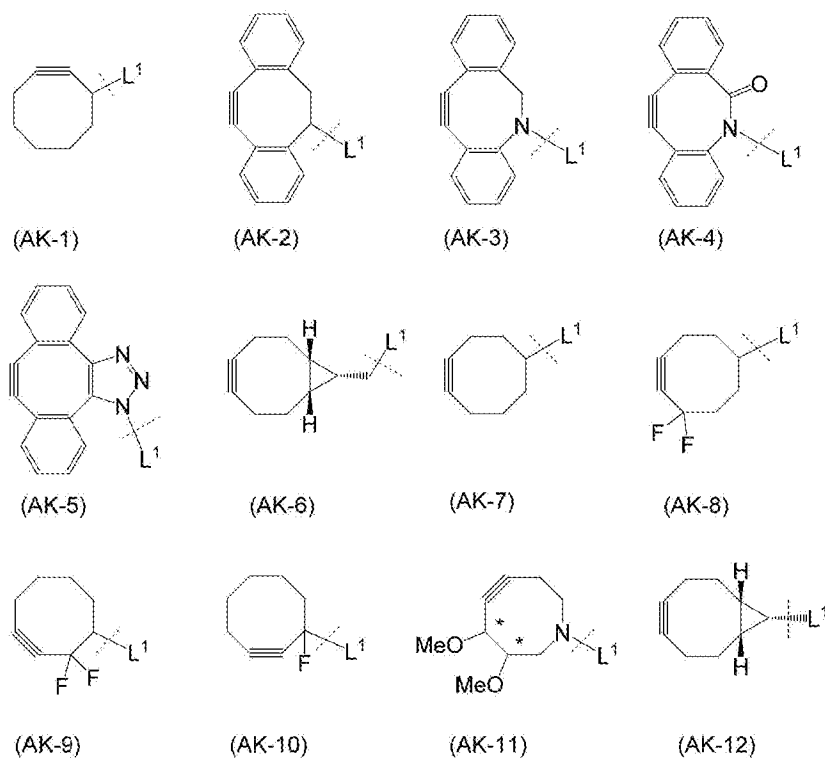
[化24]



の群から選択される2価のリンカーを表わし；

A k n は、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

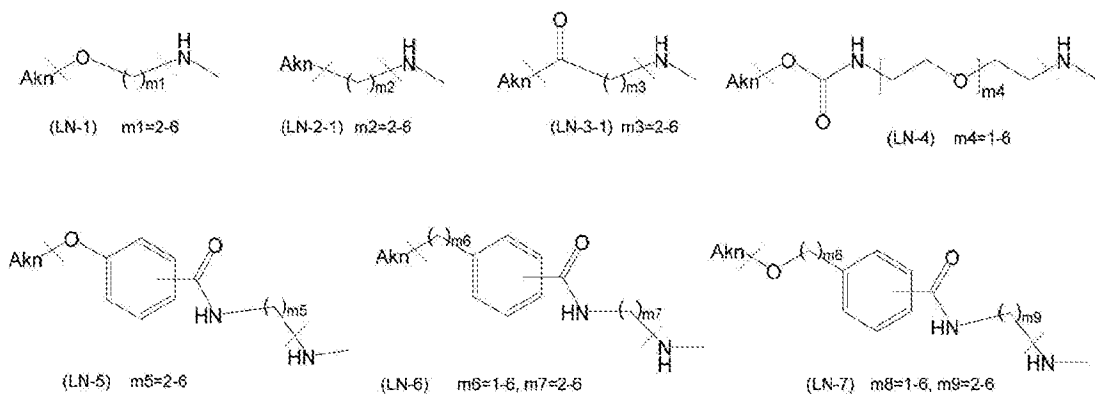
[化25]



の群から選択される環状アルキン基を表わし、星印はキラル中心を表す]で表わされるアルギン酸誘導体。

[0097] [1-1] 前記態様[1]の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、 L^1 は、好ましくは、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

[化26]

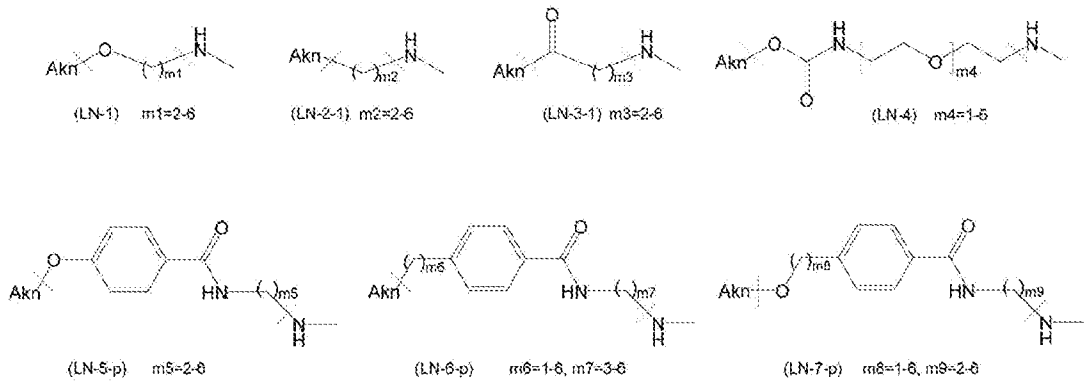


の群から選択される2価のリンカーであり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

:

[化27]

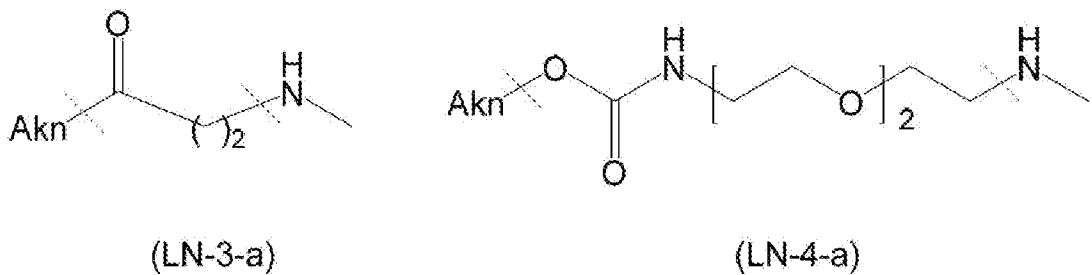


の群から選択される2価のリンカーであり；

更に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

:

[化28]

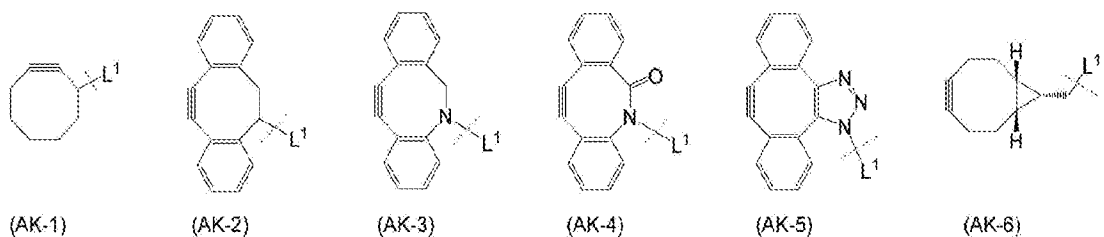


の群から選択される2価のリンカーである。

[0098] [1-2] 前記態様[1]の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、

Aknは、好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

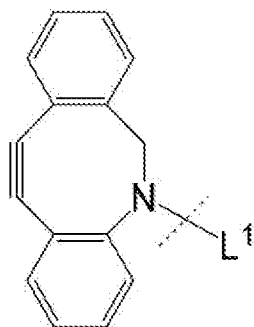
[化29]



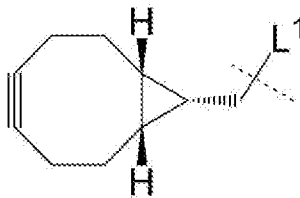
の群から選択される環状アルキン基であり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

〔化30〕



(AK-3)

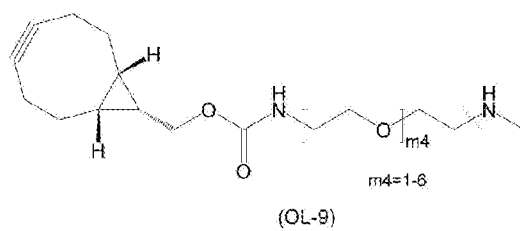
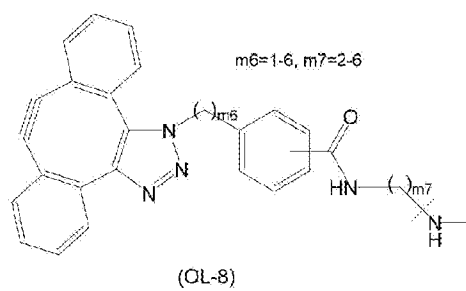
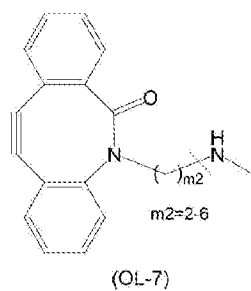
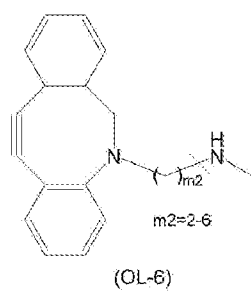
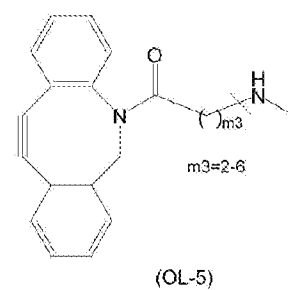
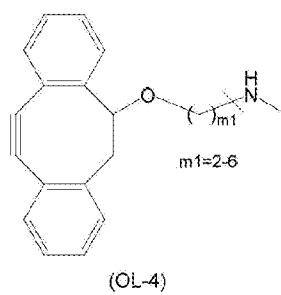
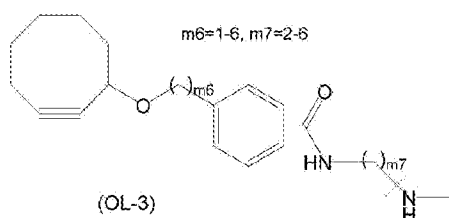
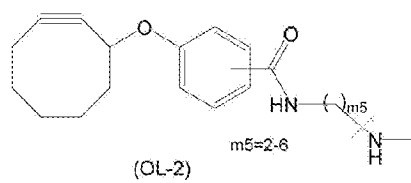
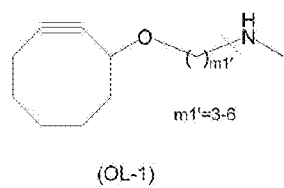


(AK-6)

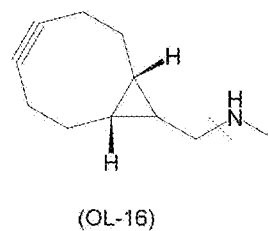
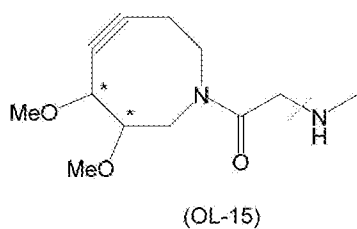
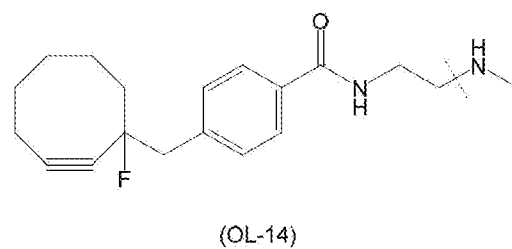
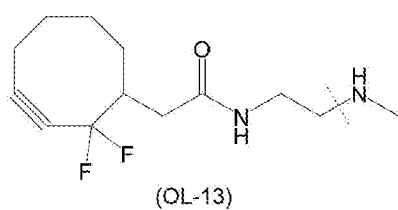
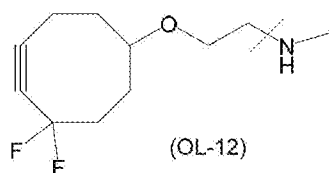
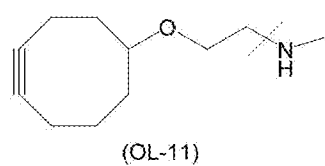
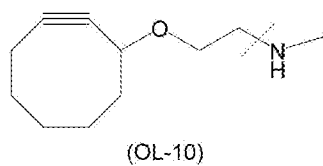
の群から選択される環状アルキン基である。

〔0099〕〔1－3〕前記態様〔1〕の前記式（1）のアルギン酸誘導体において、 A_{kn} 及び $-L^1-$ の組み合わせは、好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

[化31]



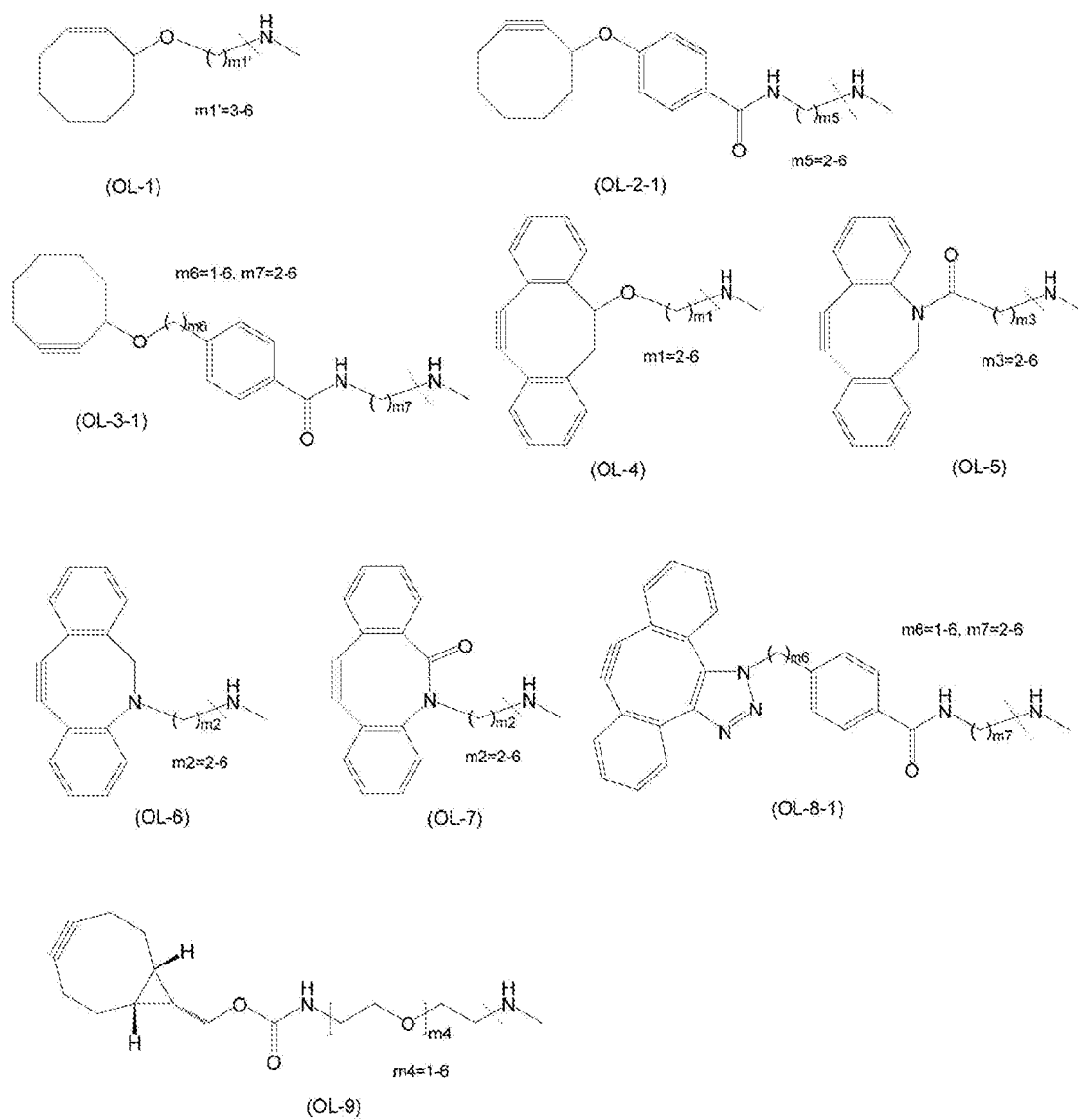
[化32]



の群から選択される基で示される通りであり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

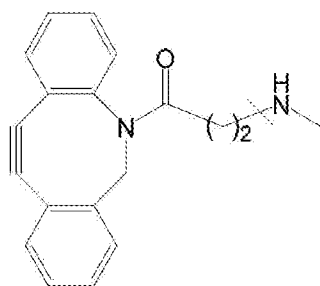
[化33]



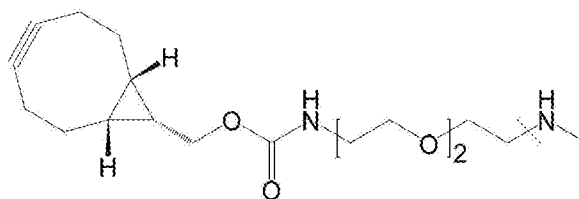
の群から選択される基で示される通りであり；

更に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

[化34]



(OL-5-1-a)

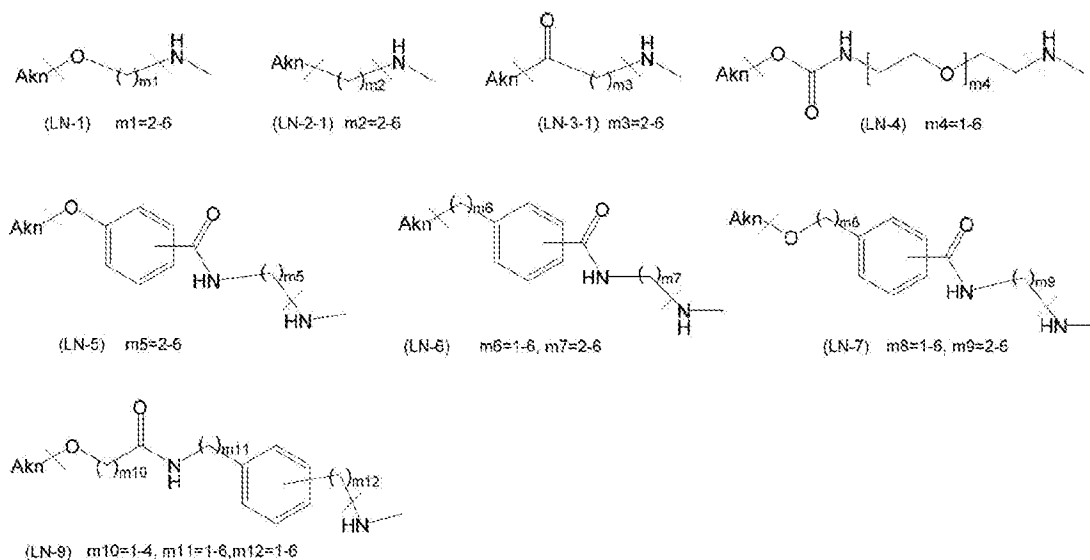


(OL-9-1-a)

の群から選択される基で示される通りである。

[0100] [1-1a] 前記態様[1]の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、
-L¹-は、好ましくは、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

[化35]

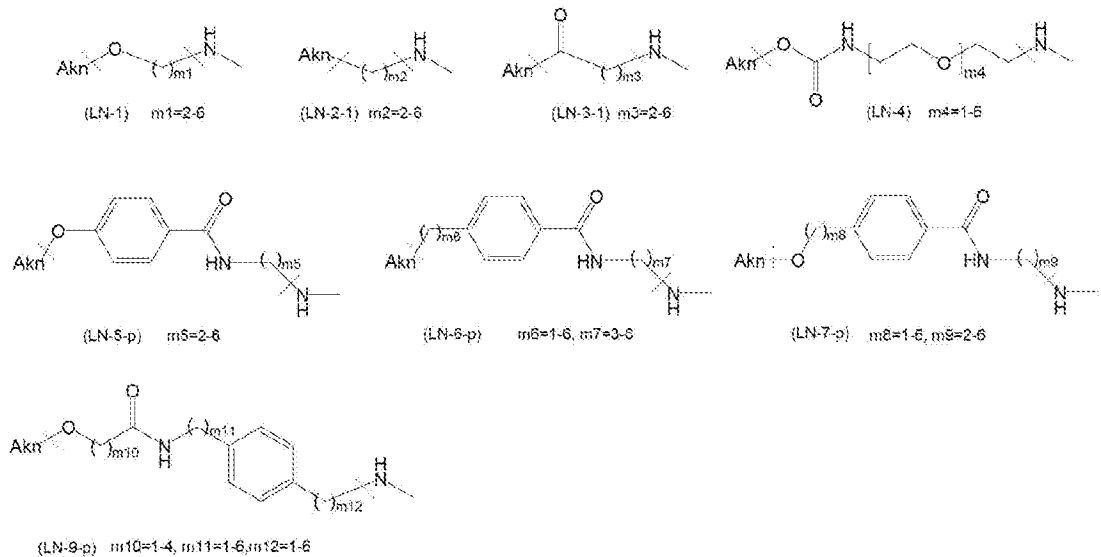


の群から選択される2価のリンカーであり；

より好ましくは、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]

：

[化36]

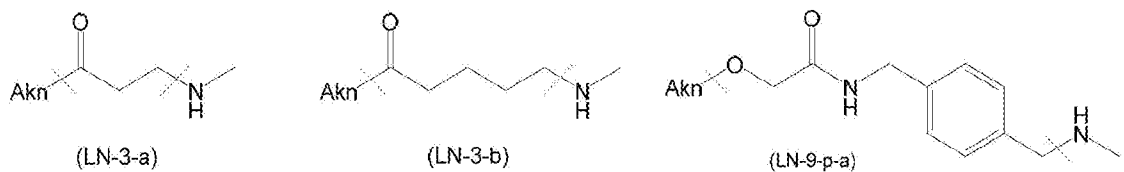


の群から選択される2価のリンカーであり；

更に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

：

[化37]

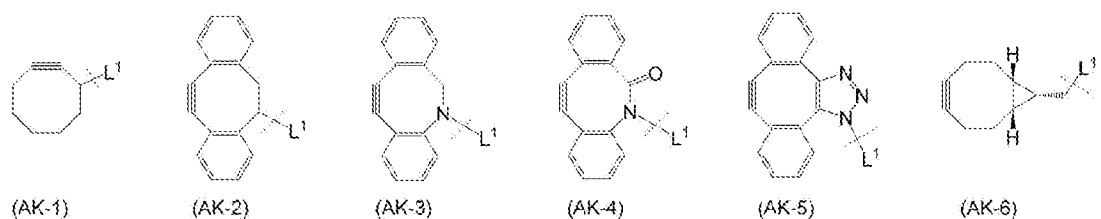


の群から選択される2価のリンカーである。

[0101] [1-2a] 前記態様〔1〕の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、

Aknは、好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

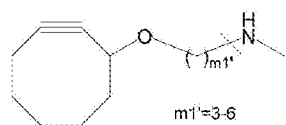
[化38]



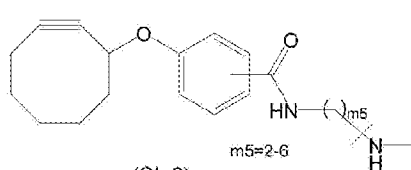
の群から選択される環状アルキン基であり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

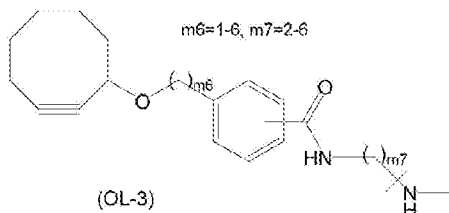
[化40]



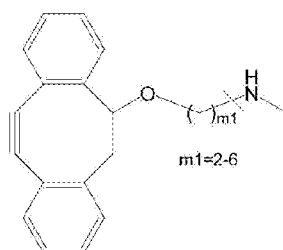
(OL-1)



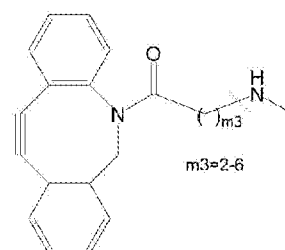
(OL-2)



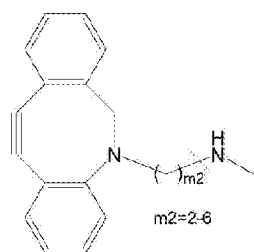
(OL-3)



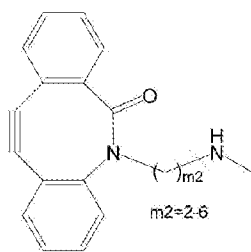
(OL-4)



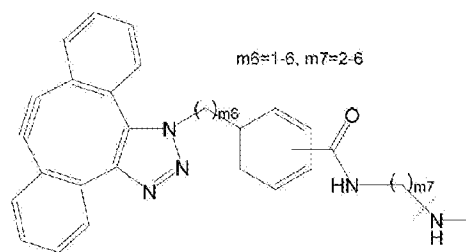
(OL-5)



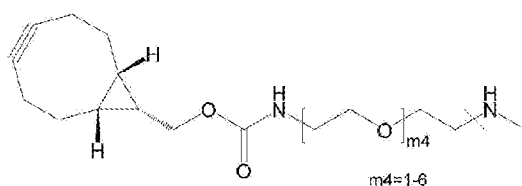
(OL-6)



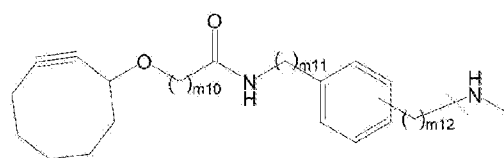
(OL-7)



(OL-8)

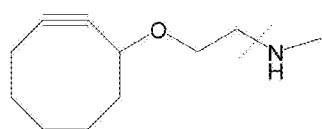


(OL-9)

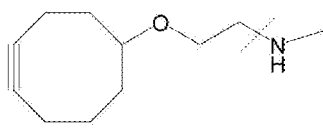


(OL-17)

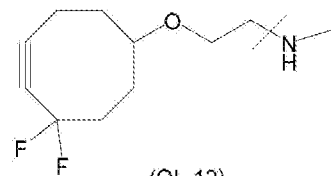
[化41]



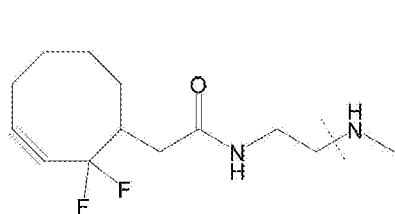
(OL-10)



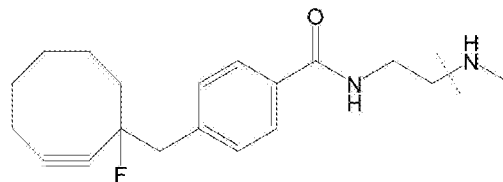
(OL-11)



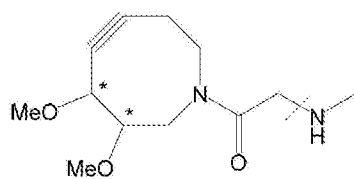
(OL-12)



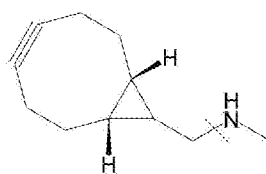
(OL-13)



(OL-14)



(OL-15)

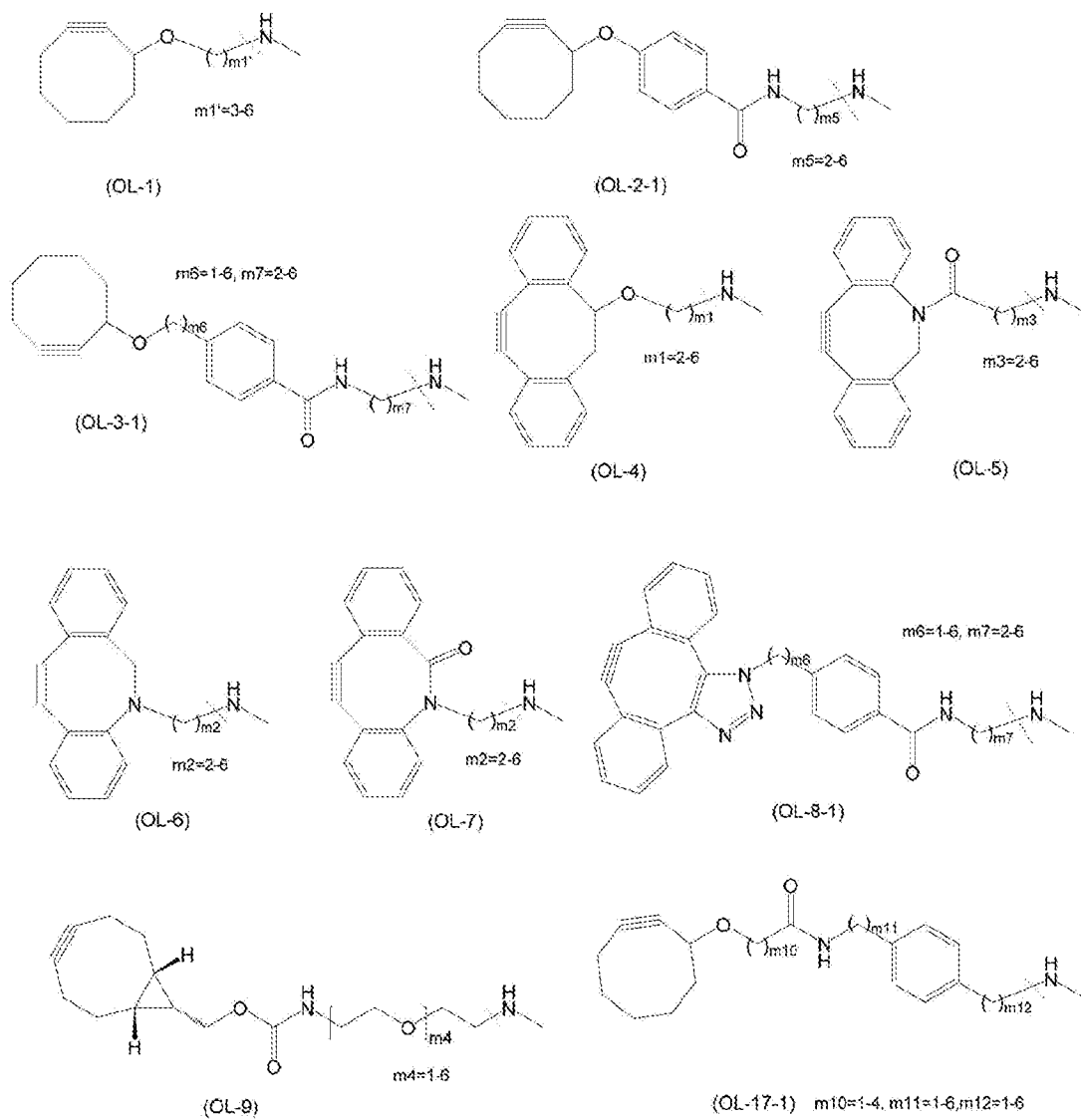


(OL-16)

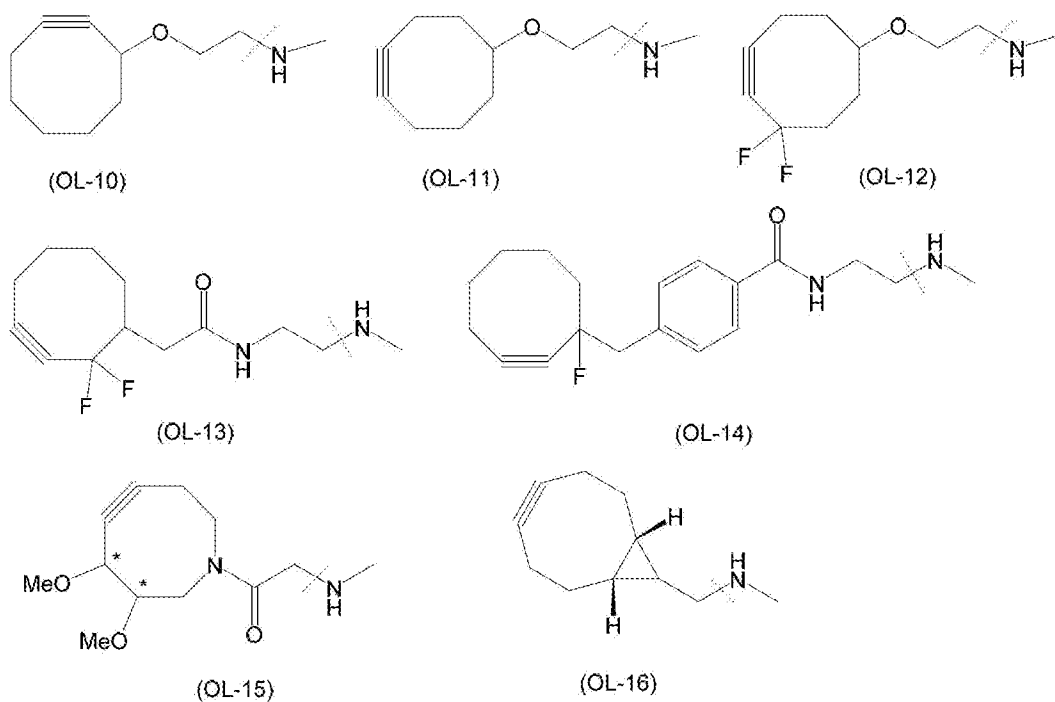
の群から選択される基で示される通りであり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

[化42]



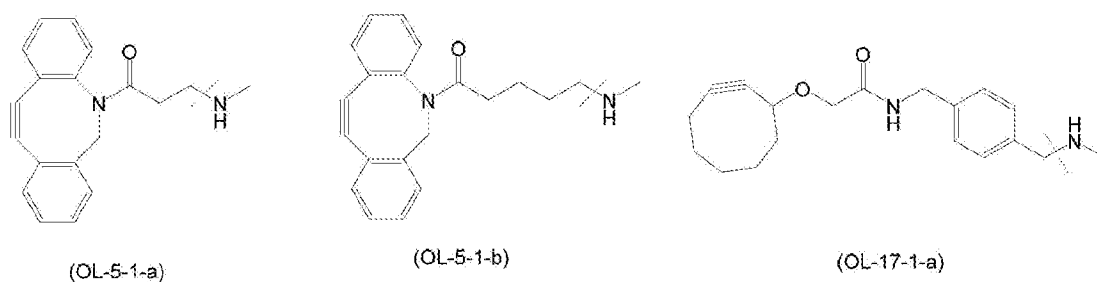
[化43]



の群から選択される基で示される通りであり；

更に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

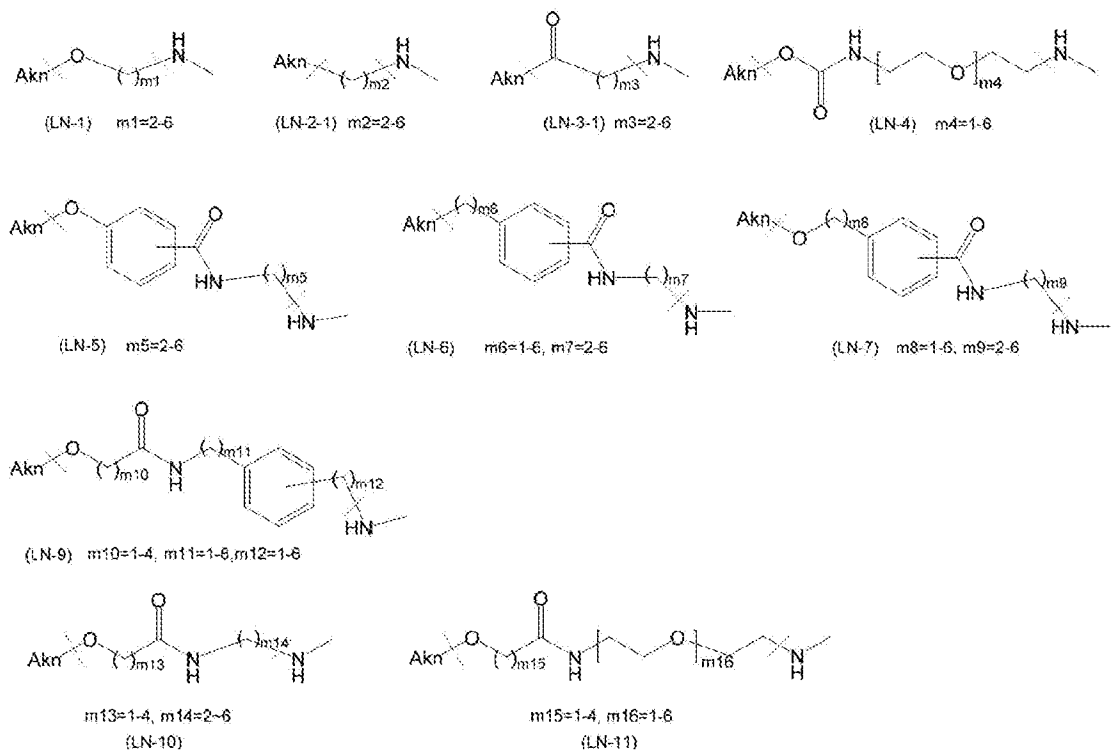
[化44]



の群から選択される基で示される通りである。

[0103] [1-1b] 前記態様〔1〕の前記式（1）のアルギニン誘導体において、
 -L¹-は、好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

[化45]

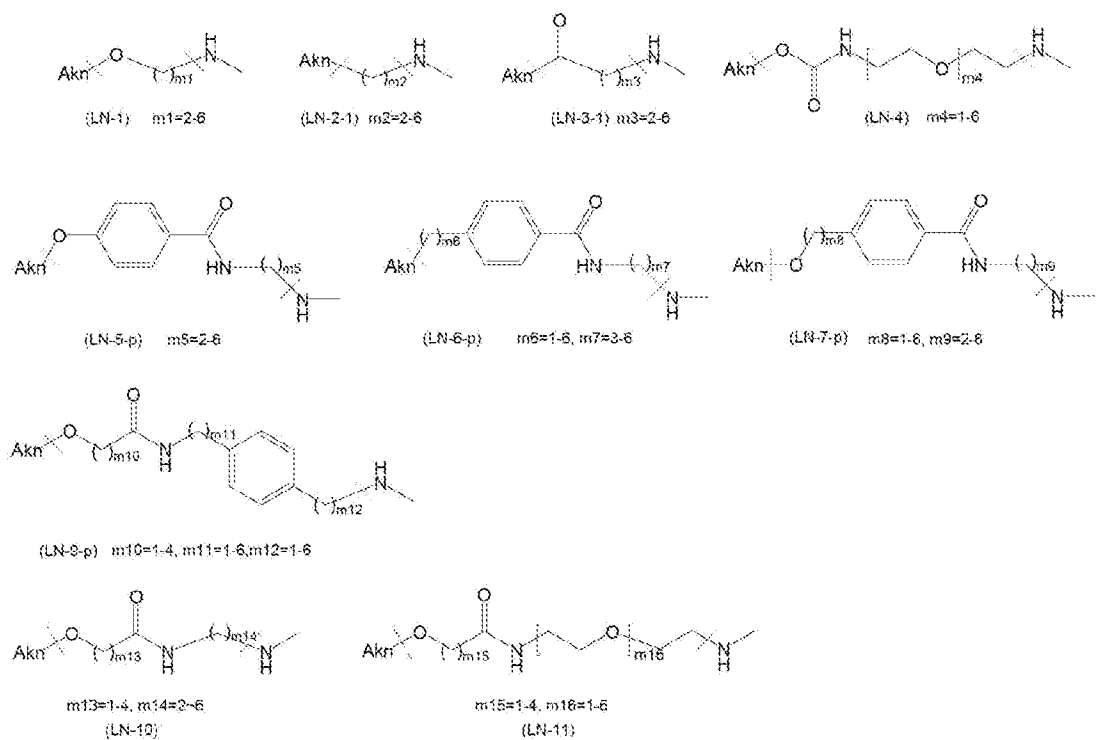


の群から選択される2価のリンカーであり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

：

[化46]

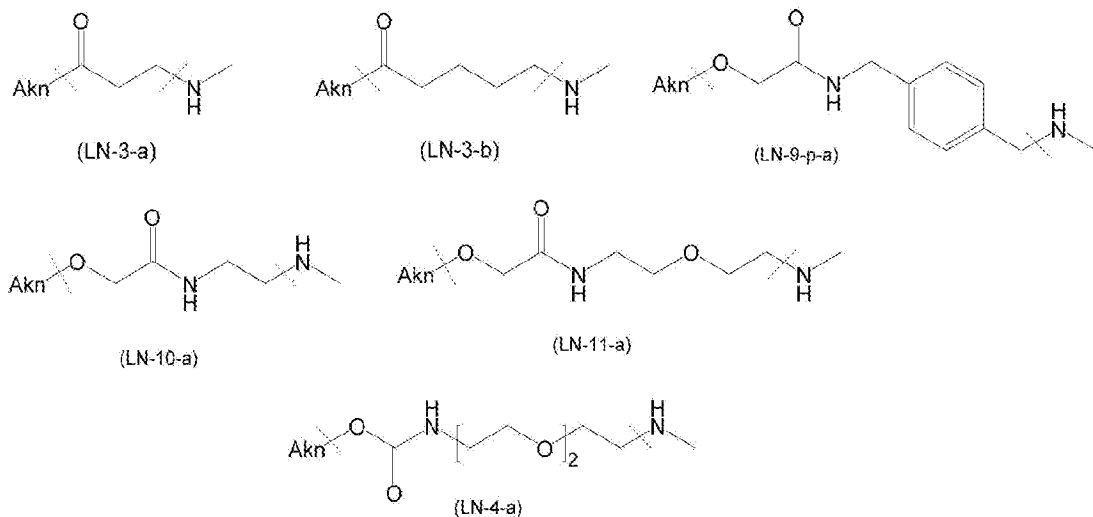


の群から選択される2価のリンカーであり；

更に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

：

[化47]

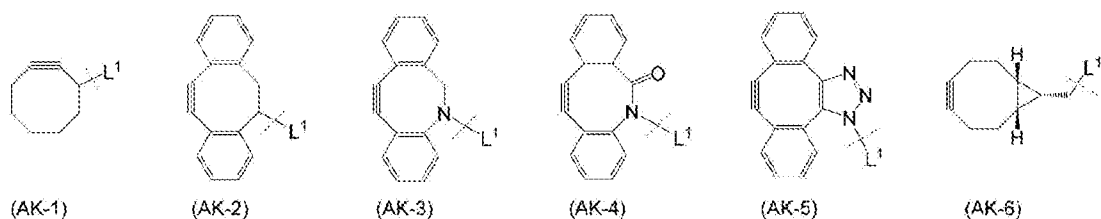


の群から選択される2価のリンカーである。

[0104] [1-2b] 前記態様[1]の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、

Aknは、好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

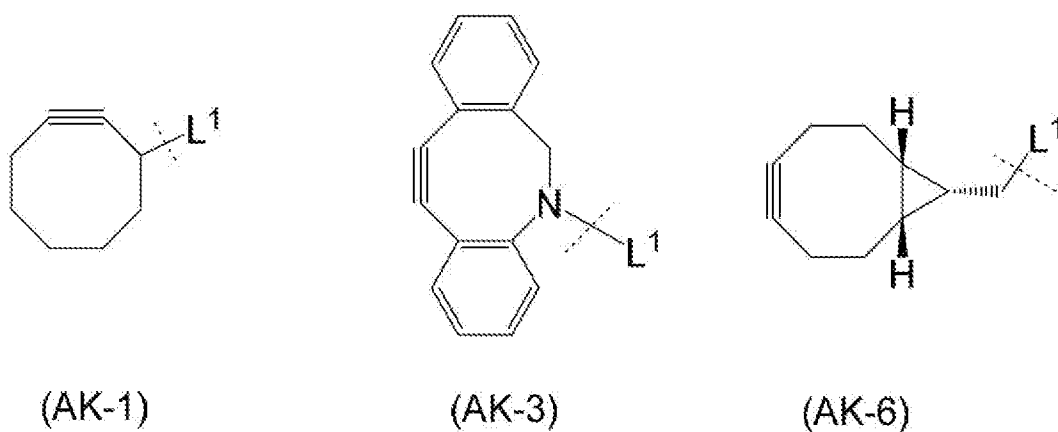
[化48]



の群から選択される環状アルキン基であり；

より好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

[化49]



の群から選択される環状アルキン基である。

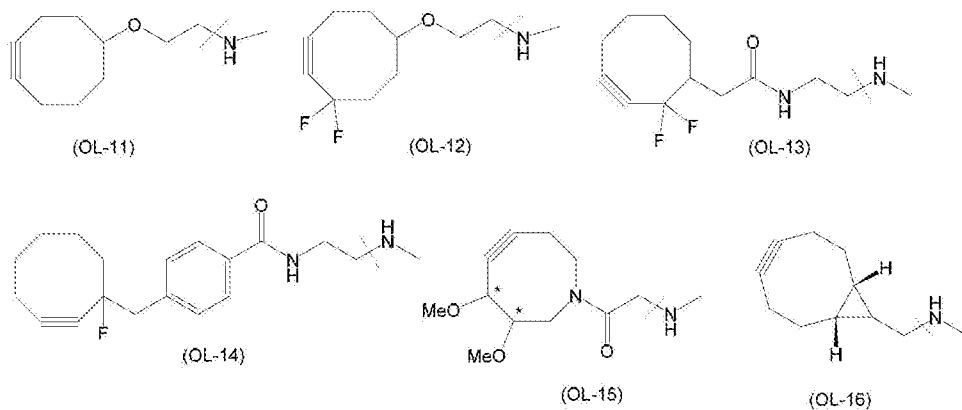
[0105] [1-3b] 前記態様[1]の前記式(1)のアルギン酸誘導体において、
Akn及び-L¹-の組み合わせは、好ましくは、下表：

[表1]

-L ¹ -	Akn	-L ¹ -	Akn
LN-1	AK-1	LN-5	AK-6
LN-1	AK-2	LN-6	AK-1
LN-1	AK-6	LN-6	AK-2
LN-2-1	AK-1	LN-6	AK-3
LN-2-1	AK-2	LN-6	AK-4
LN-2-1	AK-3	LN-6	AK-5
LN-2-1	AK-4	LN-6	AK-6
LN-2-1	AK-5	LN-7	AK-1
LN-2-1	AK-6	LN-7	AK-2
LN-3-1	AK-1	LN-7	AK-6
LN-3-1	AK-2	LN-9	AK-1
LN-3-1	AK-3	LN-9	AK-2
LN-3-1	AK-4	LN-9	AK-6
LN-3-1	AK-5	LN-10	AK-1
LN-3-1	AK-6	LN-10	AK-2
LN-4	AK-1	LN-10	AK-6
LN-4	AK-2	LN-11	AK-1
LN-4	AK-6	LN-11	AK-2
LN-5	AK-1	LN-11	AK-6
LN-5	AK-2		

のいずれかの組み合わせ（表中の $-L^1-$ 又は $A_k n$ の各式は前記態様〔1〕、〔1-1〕、〔1-1a〕、〔1-2〕、〔1-2a〕、及び〔1-1b〕に記載の通りである）、又は、下記式の群から選択される基〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕で示される通りであり；

[化50]



[0106] より好ましくは、下表：

[表2]

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

のいずれかの組み合わせ（表中の-L¹-又はAknの各式は前記態様〔1〕、〔1-1〕、〔1-1a〕、〔1-2〕、〔1-2a〕、及び〔1-1b〕に記載の通りである）で示される通りであり；

[0107] 更に好ましくは、下表：

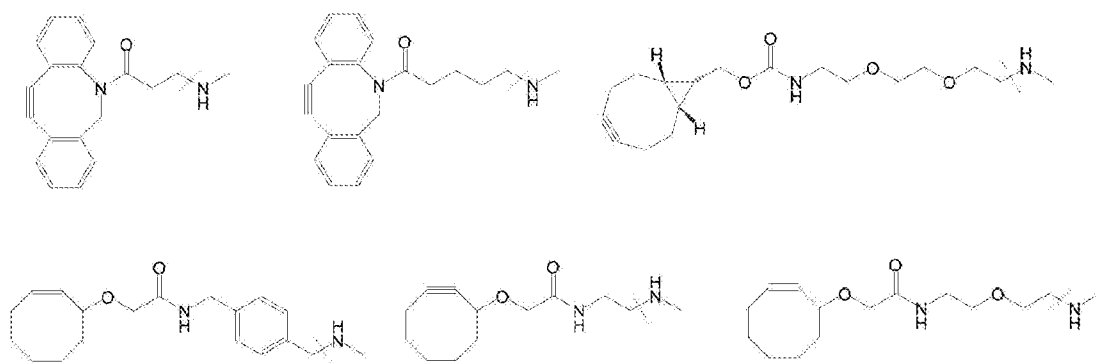
[表3]

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

のいずれかの組み合わせ（表中の $-L^1-$ 又は Akn の各式は前記態様〔1〕、〔1-1〕、〔1-1a〕、〔1-2〕、〔1-2a〕、及び〔1-1b〕に記載の通りである）で示される通りであり；

[0108] 特に好ましくは、下記部分構造式〔各式中、波線右側（イミノ基側）は含まない〕：

[化51]



の群から選択される基で示される通りである。

[0109] 前記態様〔1〕の好ましい態様、更には Akn 、及び $-L^1-$ の定義を適宜組み合わせることにより、前記態様〔1〕の前記式（1）で表されるアルギニン酸誘導体の好ましい態様を任意に形成し得る。

[0110] 〔2〕アルギニン酸誘導体の第2の態様は、次の通りである。 $Akn-L^1-NH_2$ 基（ Akn 、及び $-L^1-$ は、前記態様〔1〕中の定義と同じである）の導入率が、0.1%～30%である、前記態様〔1〕に記載の式（1）のアルギニン酸誘導体。

[0111] 〔2-1〕前記態様〔2〕において、 $Akn-L^1-NH_2$ 基の導入率は、好ましくは、2%～20%であり；より好ましくは、3～10%である。

[0112] 〔2-1a〕前記態様〔2〕において、 $Akn-L^1-NH_2$ 基の導入率は、好ましくは、0.3%～20%であり；より好ましくは、0.5～10%である。

[0113] 〔3〕アルギニン酸誘導体の第3の態様は、次の通りである。アルギニン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が、10万Da～300万Daである、前記態様〔1〕に記載の式（1）のアルギニン

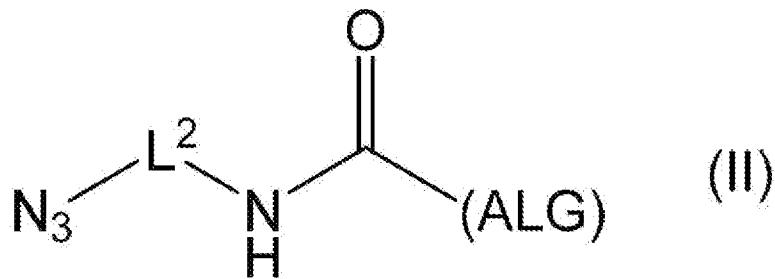
酸誘導体。

[0114] [3-1] 前記態様 [3] において、アルギン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは50万Da～200万Daである。

[0115] [3-1a] 前記態様 [3] において、アルギン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは100万Da～200万Daである。

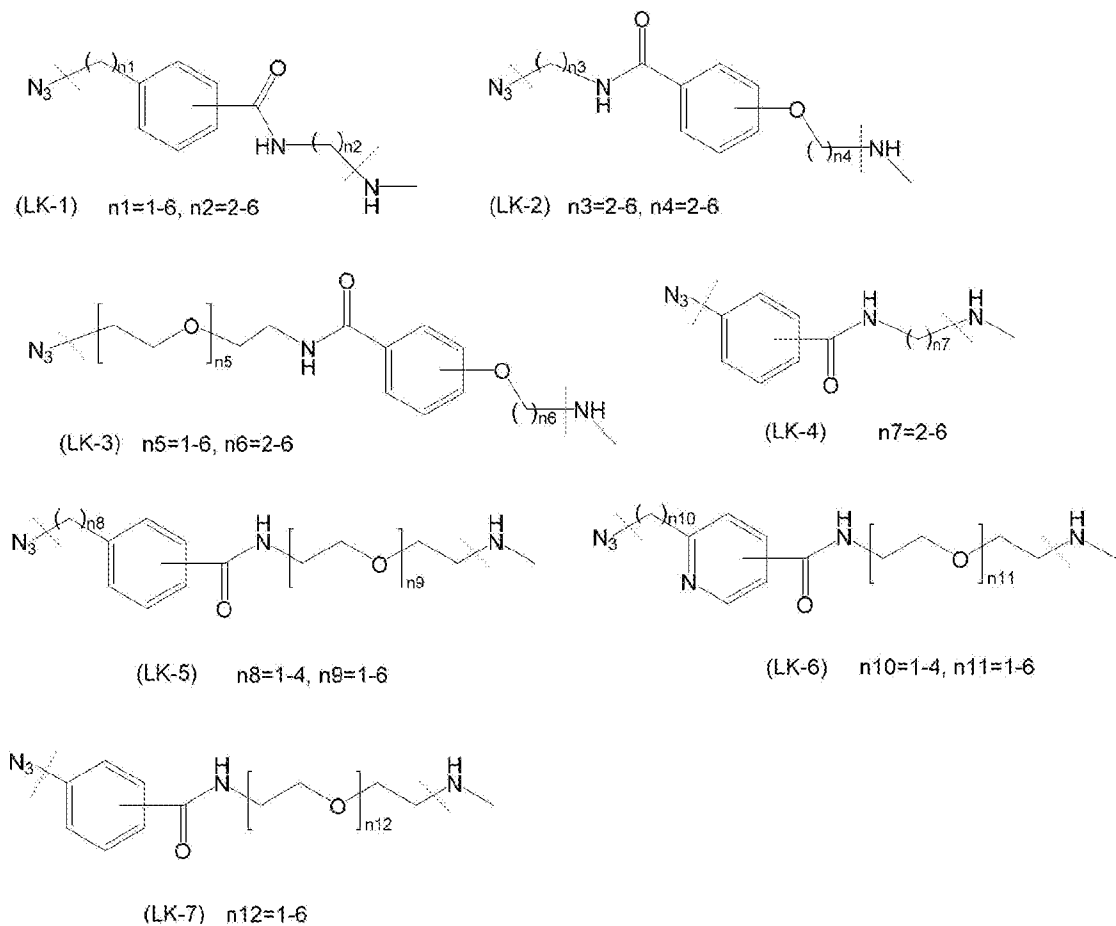
[0116] [4] アルギン酸誘導体の第4の態様は、次の通りである。アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー（ $-L^2-$ ）を介して、アジド基が導入された、下記式（II）：

[化52]



[式（II）中、（ALG）は、アルギン酸を表わし； $-NHCO-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-L^2-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

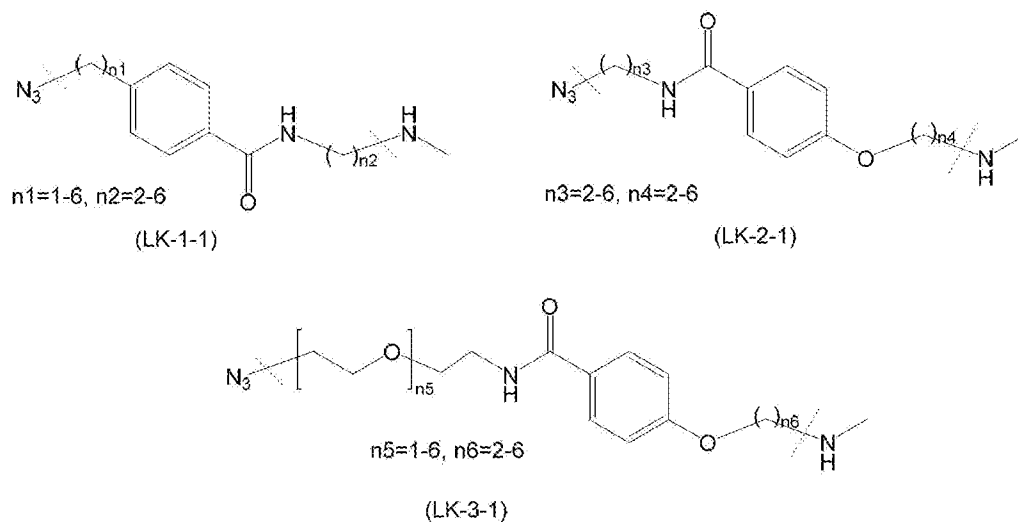
[化53]



の群から選択される2価のリンカーを表わす]で表わされるアルギン酸誘導体。

[0117] [4-1] 前記態様[4]の前記式(11)のアルギン酸誘導体において、
-L²-は、好ましくは、下記部分構造式：

[化54]

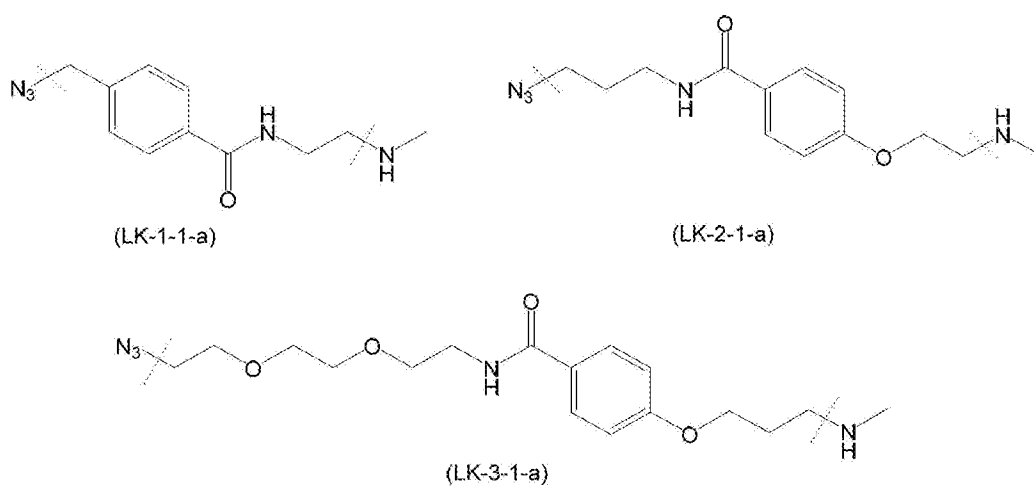


の群から選択されるリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

;

より好ましくは、下記部分構造式：

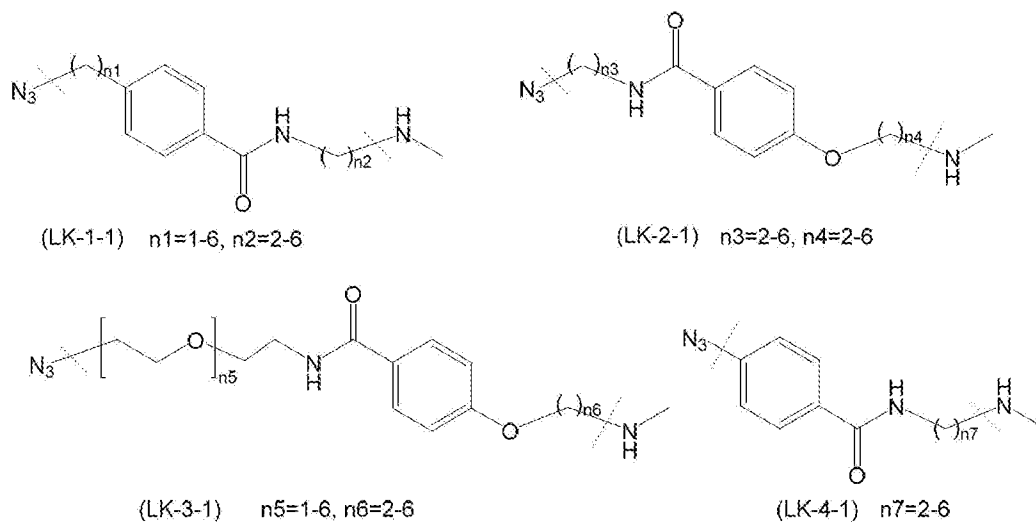
[化55]



の群から選択されるリンカーである。

[0118] [4-1a] 前記態様[4]の前記式(11)のアルギン酸誘導体において、 $-L^2-$ は、好ましくは、下記部分構造式：

[化56]

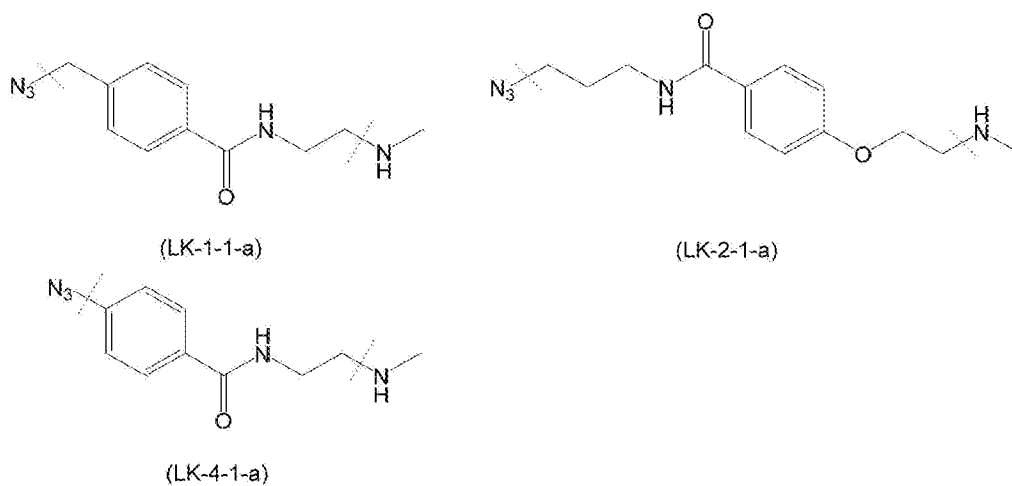


の群から選択されるリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

;

より好ましくは、下記部分構造式：

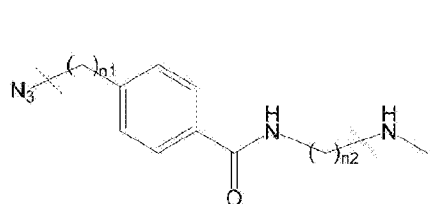
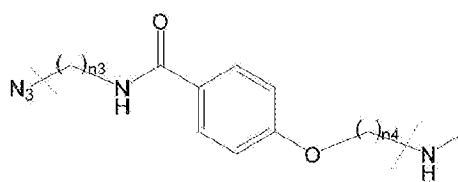
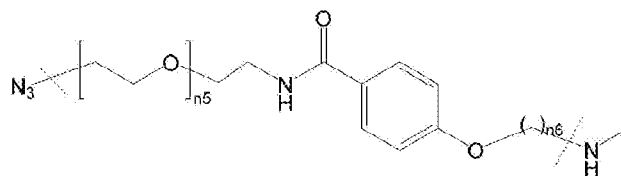
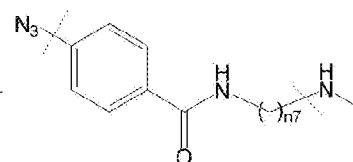
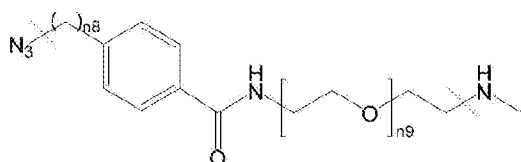
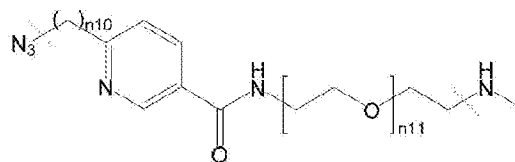
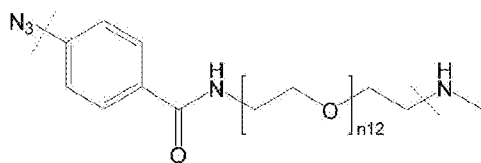
[化57]



の群から選択されるリンカーである。

〔4-1b〕前記態様〔4〕の前記式（ⅠⅠ）のアルギン酸誘導体において、 $-L^2-$ は、好ましくは、下記部分構造式：

[化58]

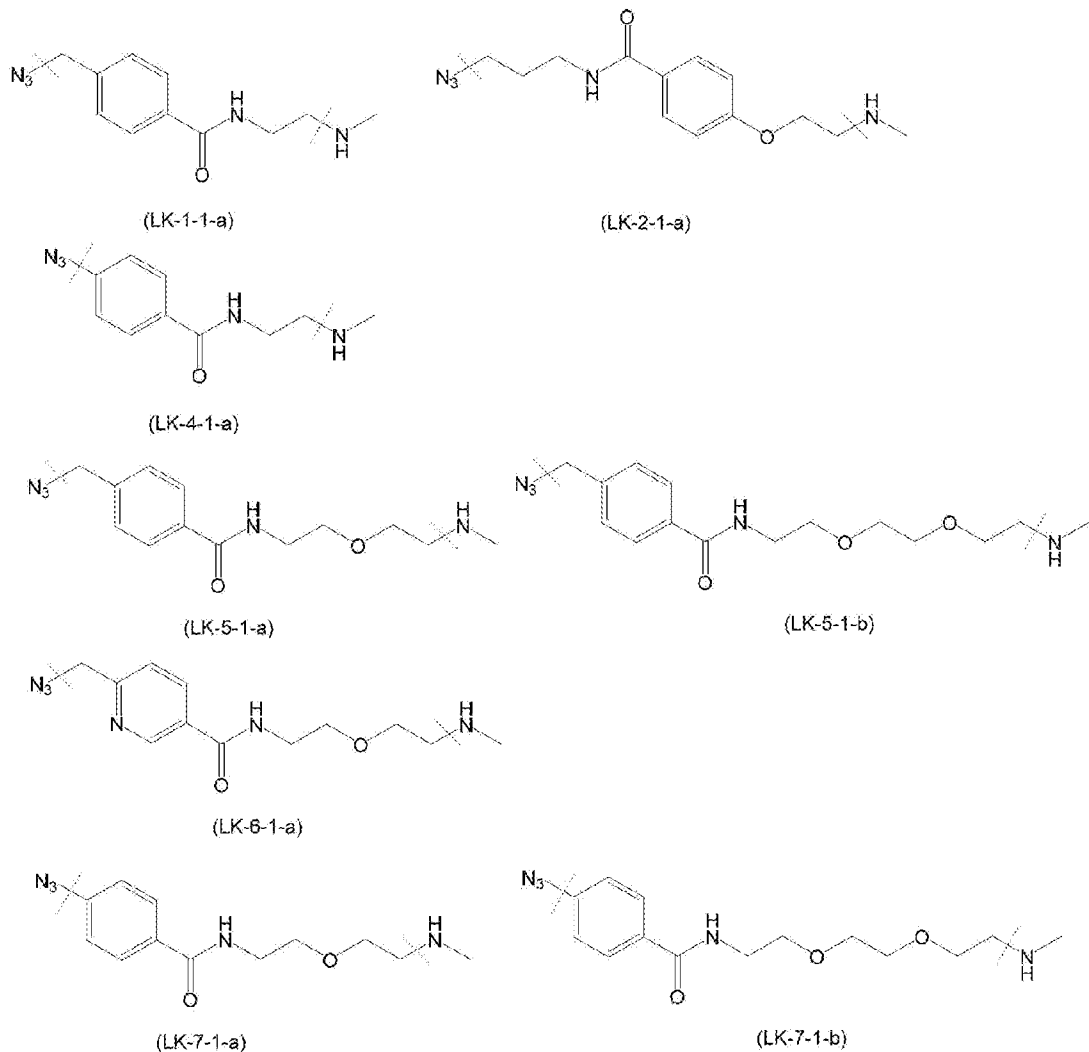
(LK-1-1) $n1=1-6$, $n2=2-6$ (LK-2-1) $n3=2-6$,
 $n4=2-6$ (LK-3-1) $n5=1-6$, $n6=2-6$ (LK-4-1) $n7=2-6$ (LK-5-1) $n8=1-4$, $n9=1-6$ (LK-6-1) $n10=1-4$, $n11=1-6$ (LK-7-1) $n12=1-6$

の群から選択されるリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

;

より好ましくは、下記部分構造式：

[化59]



の群から選択されるリンカーである〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

。

[0119] 前記態様〔4〕の好ましい態様、更にはアジド基、及び $-L^2-$ の定義を適宜組み合わせることにより、前記態様〔4〕の前記式(11)で表されるアルギン酸誘導体の好ましい態様を任意に形成し得る。

[0120] 〔5〕アルギン酸誘導体の第5の態様は、次の通りである。 $N_3-L^2-NH_2$ 基($-L^2-$ は、前記態様〔4〕中の定義と同じである)の導入率が、0.1%~30%である、前記態様〔4〕に記載の式(11)のアルギン酸誘導体

。

[0121] 〔5-1〕前記態様〔5〕において、 $N_3-L^2-NH_2$ 基の導入率は、好まし

くは、2%～20%であり；より好ましくは、3～10%である。

[0122] [5-1a] 前記態様[5]において、 $N_3-L^2-NH_2$ 基の導入率は、好ましくは、0.3%～20%であり；より好ましくは、0.5～15%である。

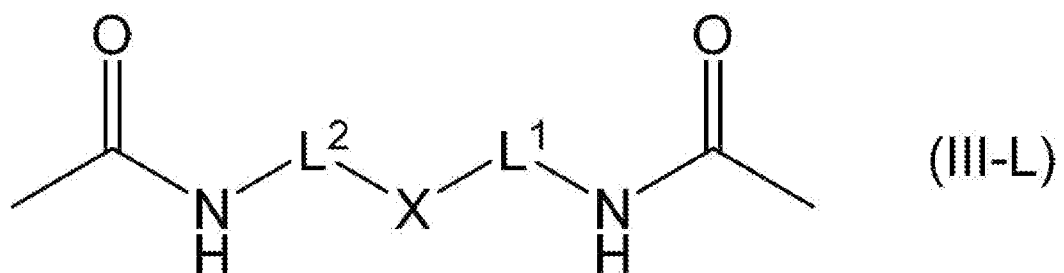
[0123] [6] アルギン酸誘導体の第6の態様は、次の通りである。アルギン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が、10万Da～300万Daである、前記態様[4]に記載の式(II)のアルギン酸誘導体。

[0124] [6-1] 前記態様[6]において、式(II)のアルギン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量は、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは50万Da～200万Daである。

[0125] [6-1a] 前記態様[6]において、式(II)のアルギン酸誘導体のゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量は、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは100万Da～200万Daである。

[0126] [7] アルギン酸誘導体の第7の態様は、次の通りである。第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式(III-L)：

[化60]



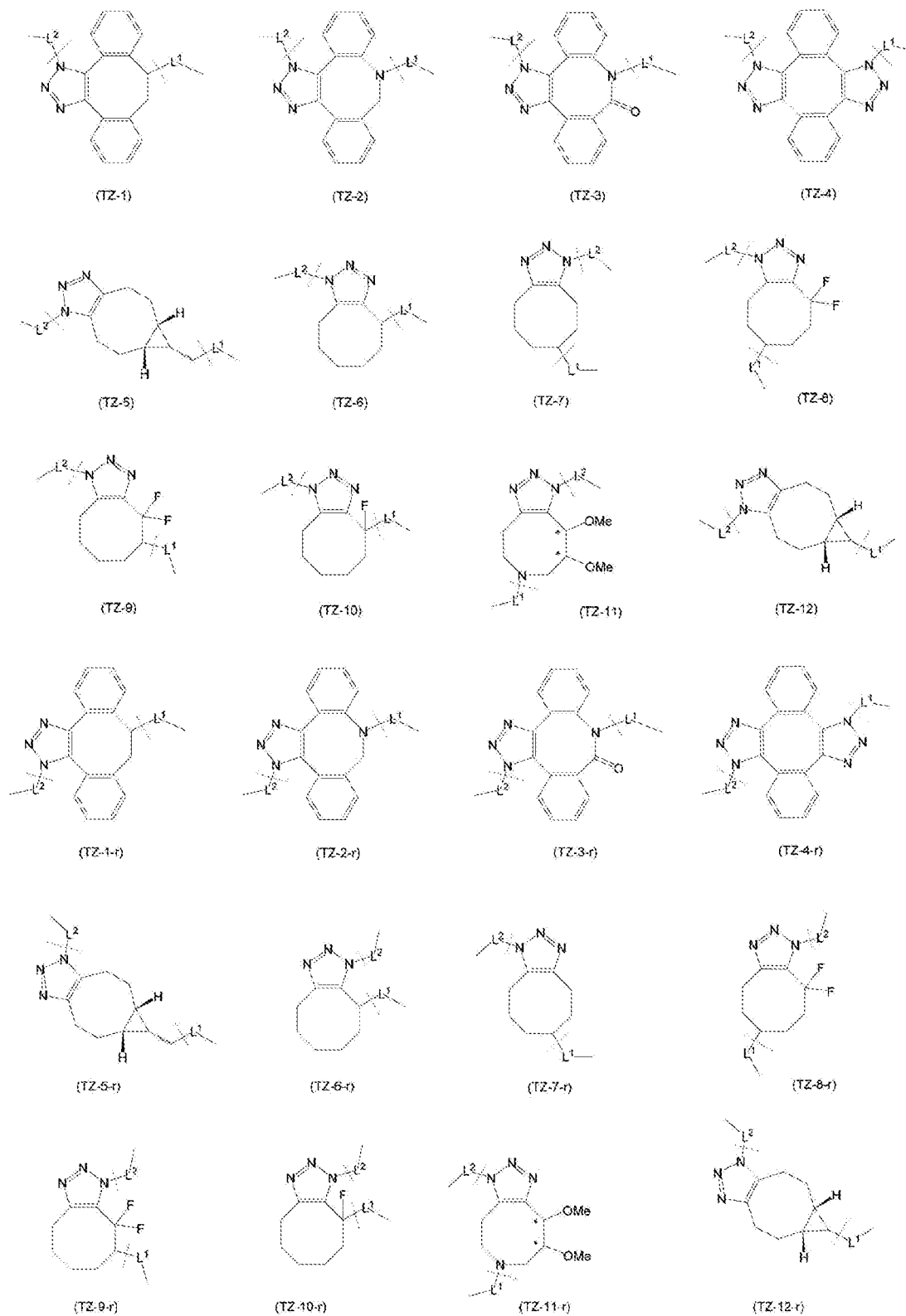
[式(III-L)中、両端の $-CONH-$ 及び $-NHCO-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；

— L^1 —は、前記態様〔1〕中の定義と同じであり；

— L^2 —は、前記態様〔4〕中の定義と同じであり；

Xは、下記部分構造式：

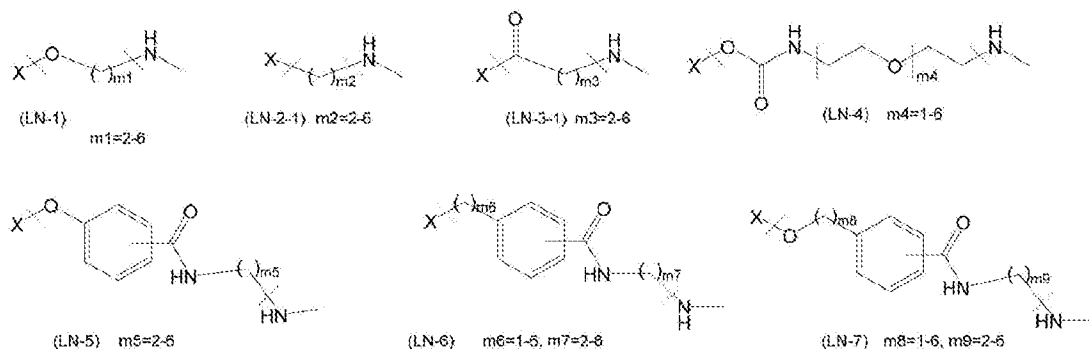
[化61]



の群から選択される環状基であり（各式中、両端の波線外側は含まない）、
 星印はキラル中心を表す] を介して結合した架橋アルギン酸。

[0127] [7-1] 前記態様 [7] の前記式 (I I I-L) において、好ましくは、
 -L¹-は、下記部分構造式 [各式中、両端の波線外側は含まない] :

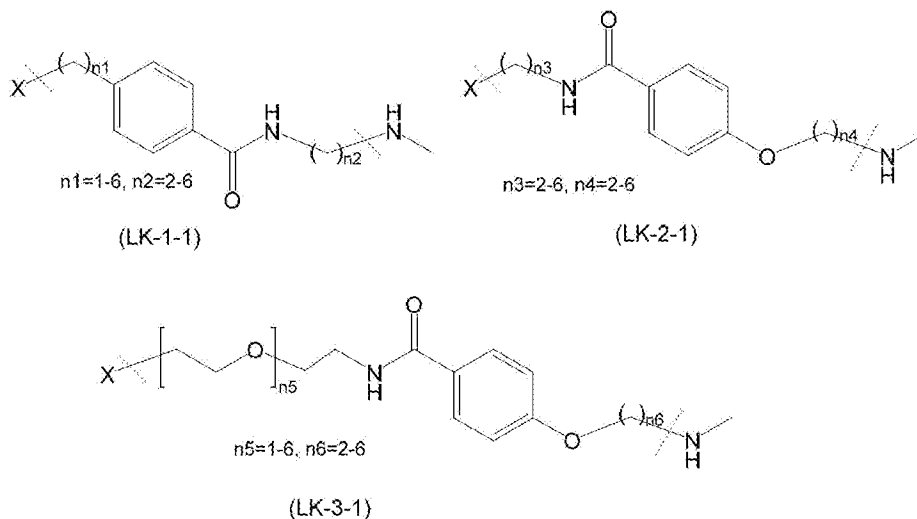
[化62]



の群から選択される 2 価のリンカーであり ;

-L²-は、下記部分構造式 :

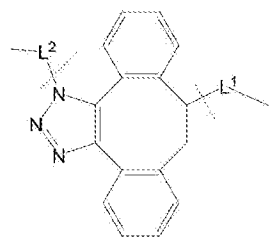
[化63]



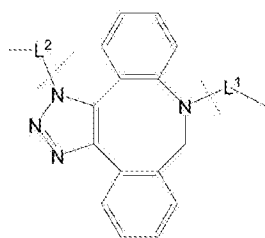
の群から選択される 2 価のリンカーであり [各式中、両端の波線外側は含まない] ;

Xは、下記部分構造式 :

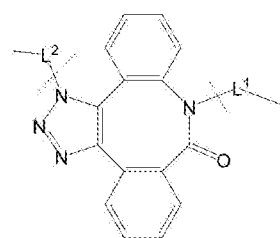
[化64]



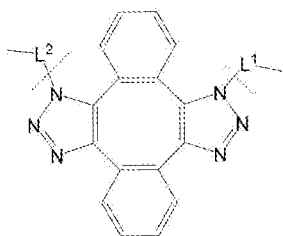
(TZ-1)



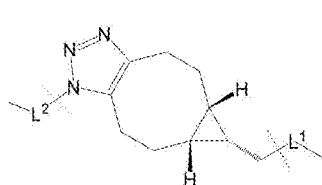
(TZ-2)



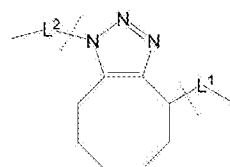
(TZ-3)



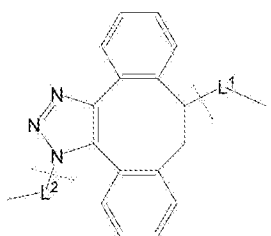
(TZ-4)



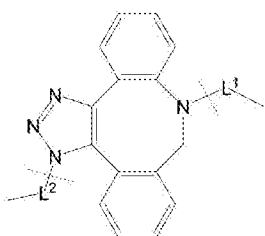
(TZ-5)



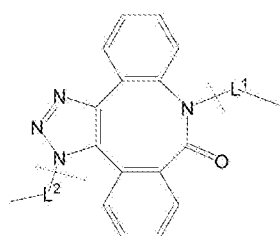
(TZ-6)



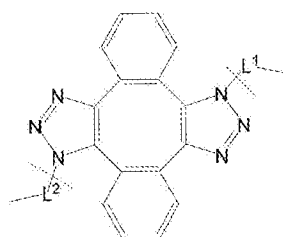
(TZ-1-r)



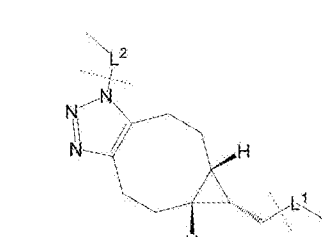
(TZ-2-r)



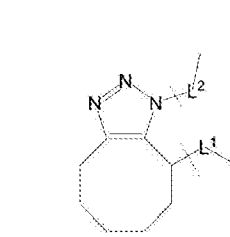
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

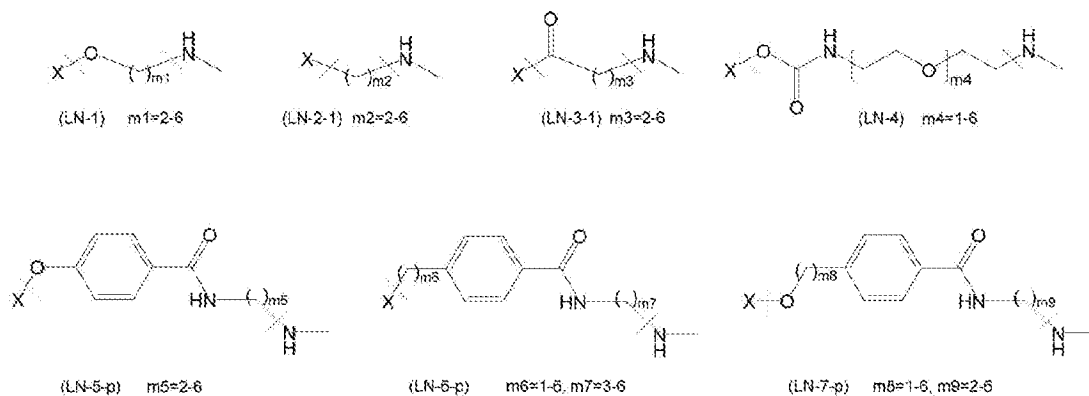


(TZ-6-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]
である。

[0128] [7-2] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、より好ましくは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

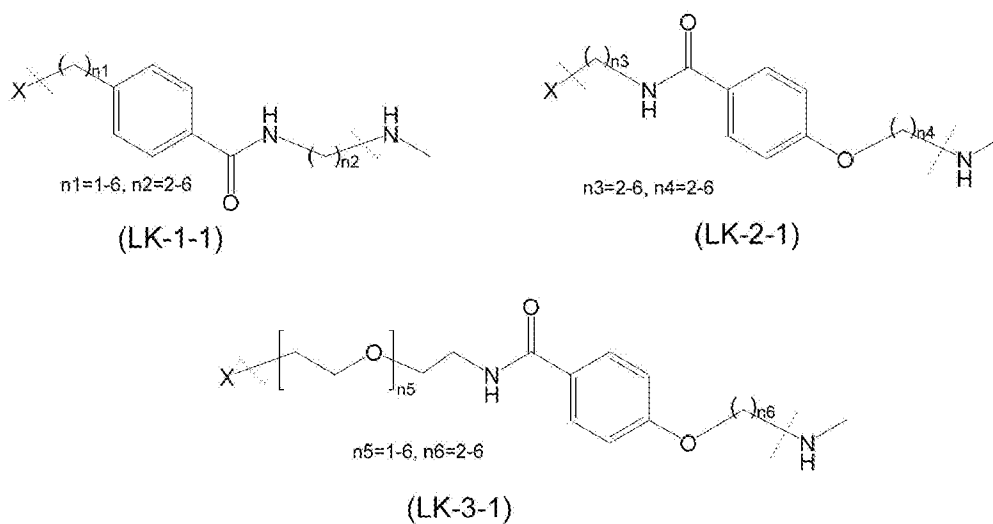
[化65]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

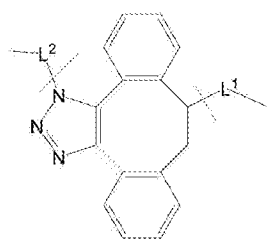
[化66]



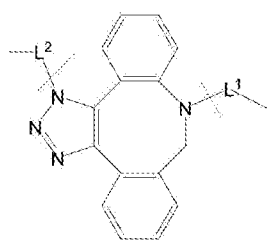
の群から選択される2価のリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕；

Xは、下記部分構造式：

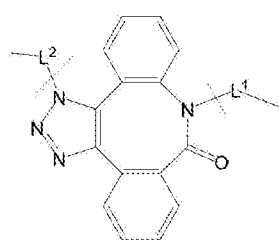
[化67]



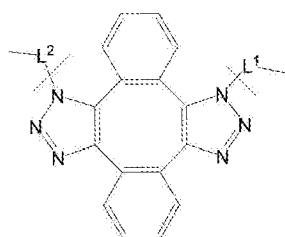
(TZ-1)



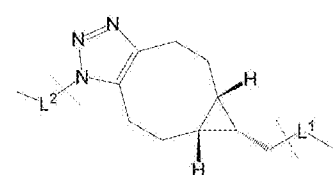
(TZ-2)



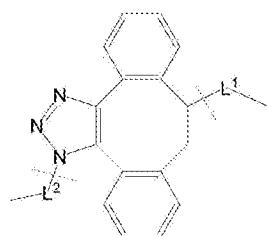
(TZ-3)



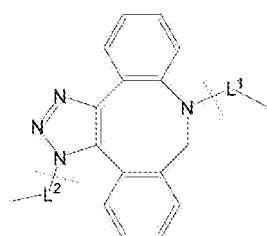
(TZ-4)



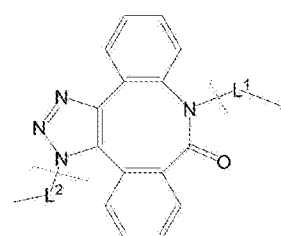
(TZ-5)



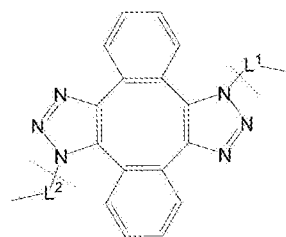
(TZ-1-r)



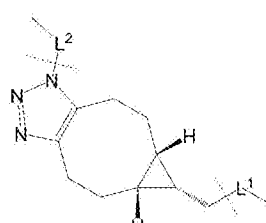
(TZ-2-r)



(TZ-3-r)



(TZ-4-r)

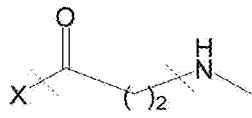


(TZ-5-r)

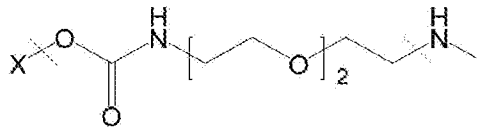
の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]
である。

[0129] [7-3] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、更に好ましくは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

[化68]



(LN-3-a)

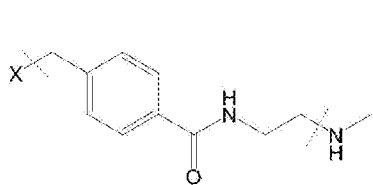


(LN-4-a)

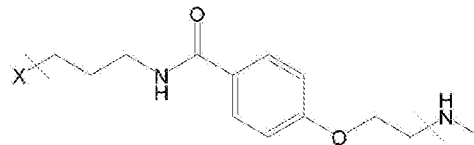
の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

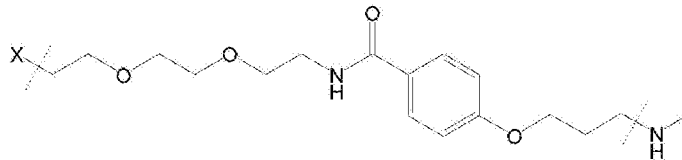
[化69]



(LK-1-1-a)



(LK-2-1-a)

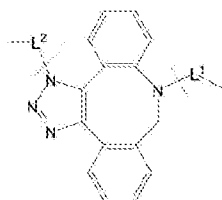


(LK-3-1-a)

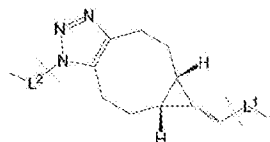
の群から選択される2価のリンカーであり（各式中、両端の波線外側は含まない）；

Xは、下記部分構造式：

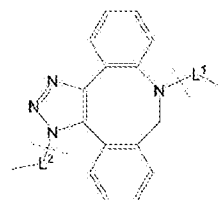
[化70]



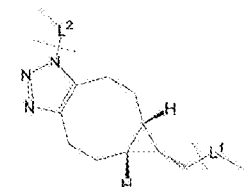
(TZ-2)



(TZ-5)



(TZ-2-r)

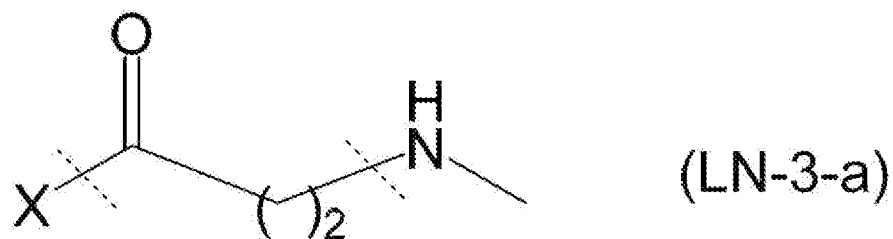


(TZ-5-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）。

[0130] [7-3-1] 前記態様[7]の前記式(ⅠⅠⅠ-L)において、特に好ましくは、—L¹—は、下記部分構造式：

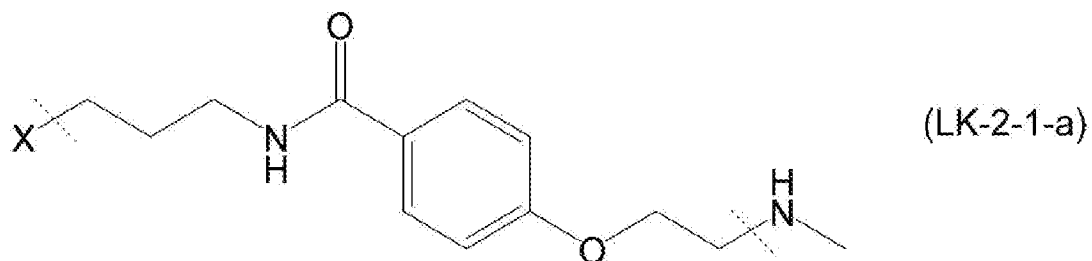
[化71]



の2価のリンカーであり（式中、両端の波線外側は含まない）；

—L²—は、下記部分構造式：

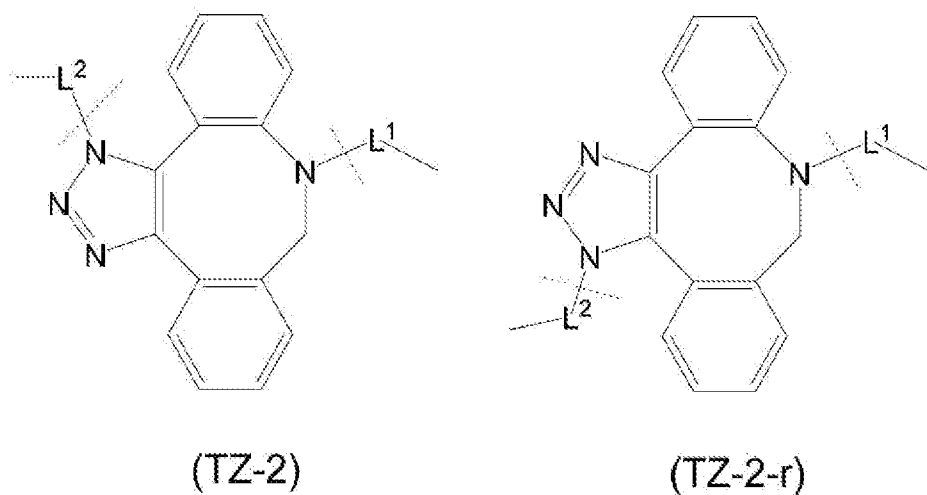
[化72]



の2価のリンカーであり（式中、両端の波線外側は含まない）；

Xは、下記部分構造式：

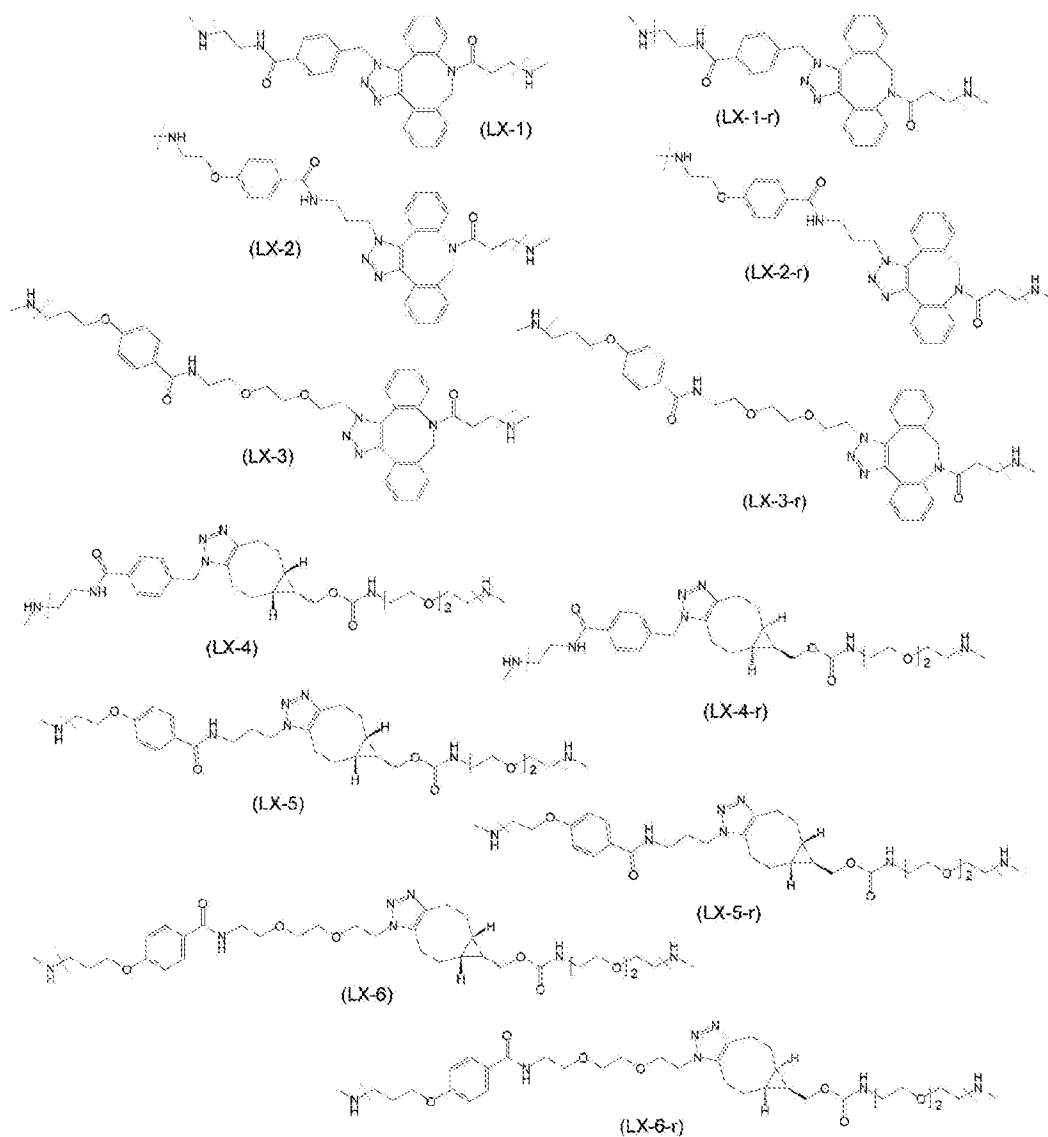
[化73]



のいずれかの環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）。

[0131] [7-4] 前記態様 [7] の前記式 (I I I-L) において、好ましくは、
 $-L^2-X-L^1-$ の組み合わせは、下記部分構造式 [各式中、両端の波線外
 側は含まない] :

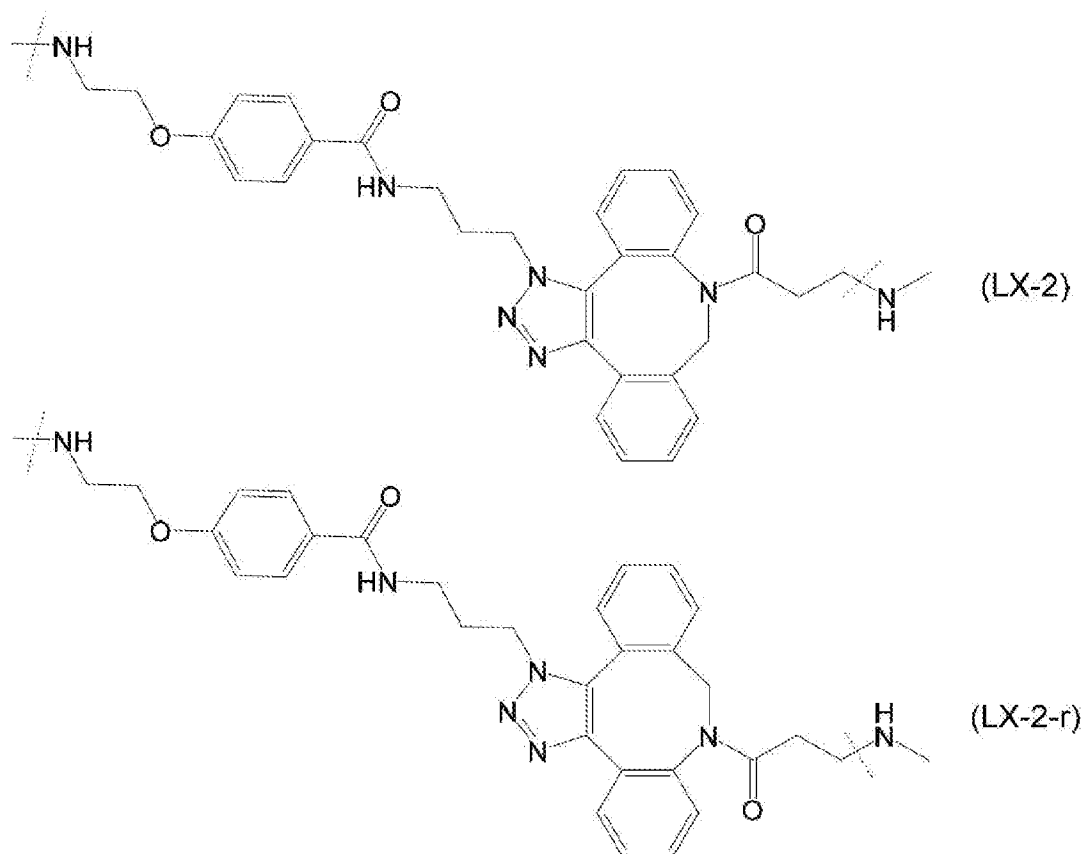
[化74]



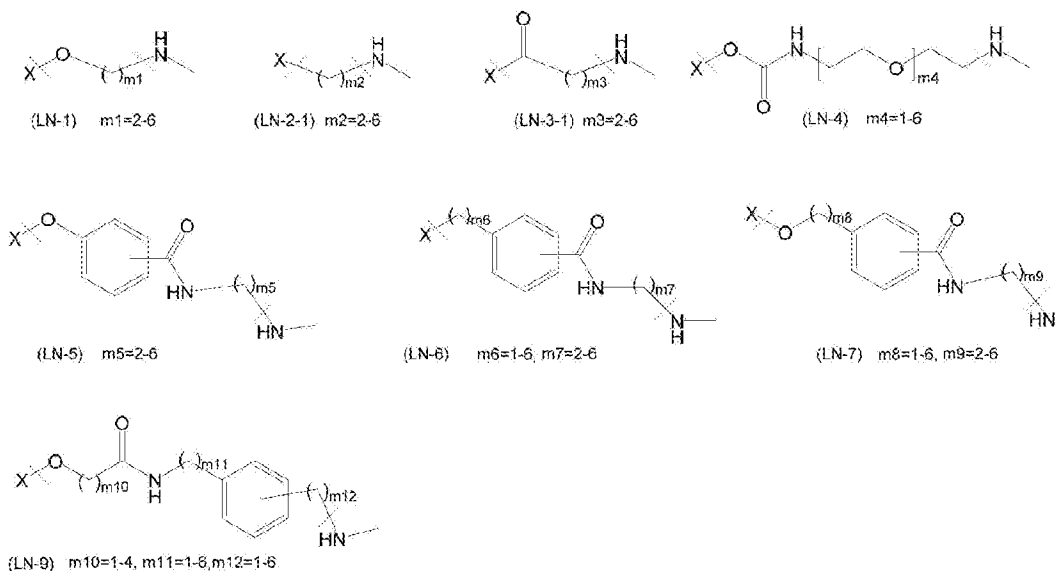
の群から選択される部分構造で示される通りであり ;

より好ましくは、 $-L^2-X-L^1-$ の組み合わせは、下記部分構造式 [式
 中、両端の波線外側は含まない] :

[化75]



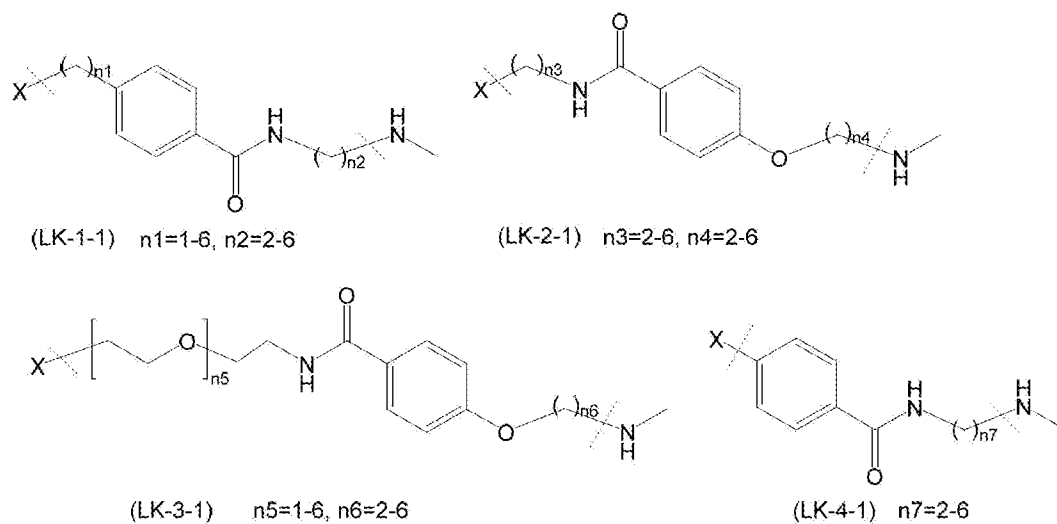
[化76]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

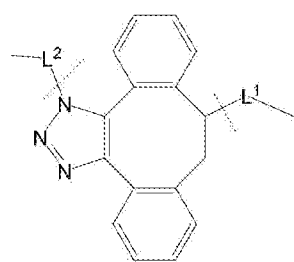
[化77]



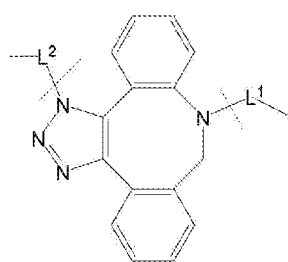
の群から選択される2価のリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕；

Xは、下記部分構造式：

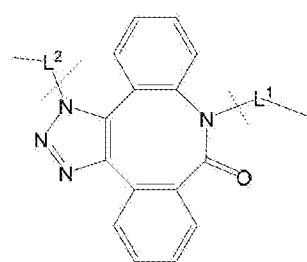
[化78]



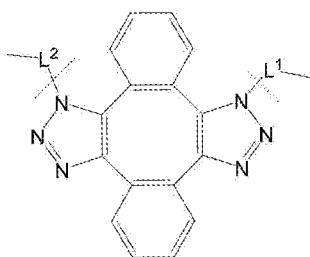
(TZ-1)



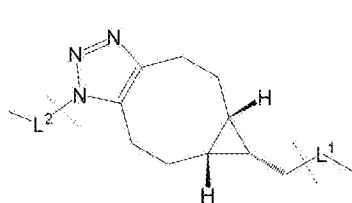
(TZ-2)



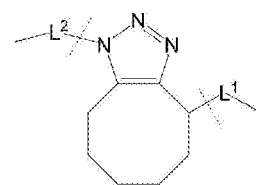
(TZ-3)



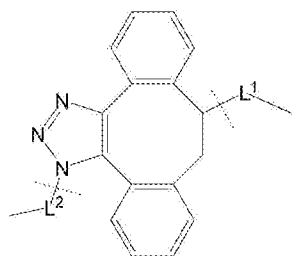
(TZ-4)



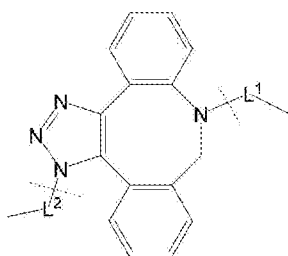
(TZ-5)



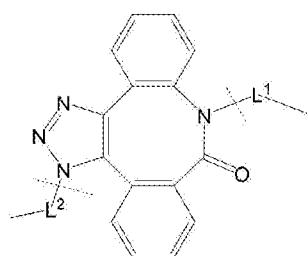
(TZ-6)



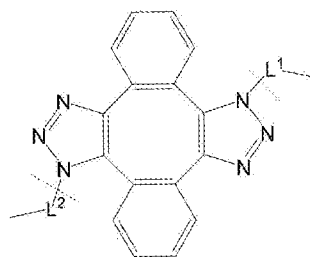
(TZ-1-r)



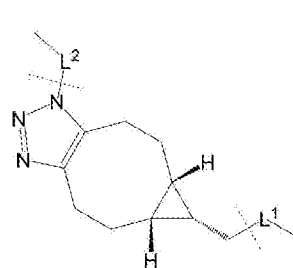
(TZ-2-r)



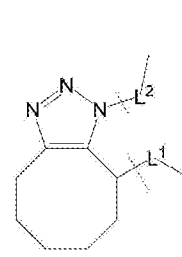
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

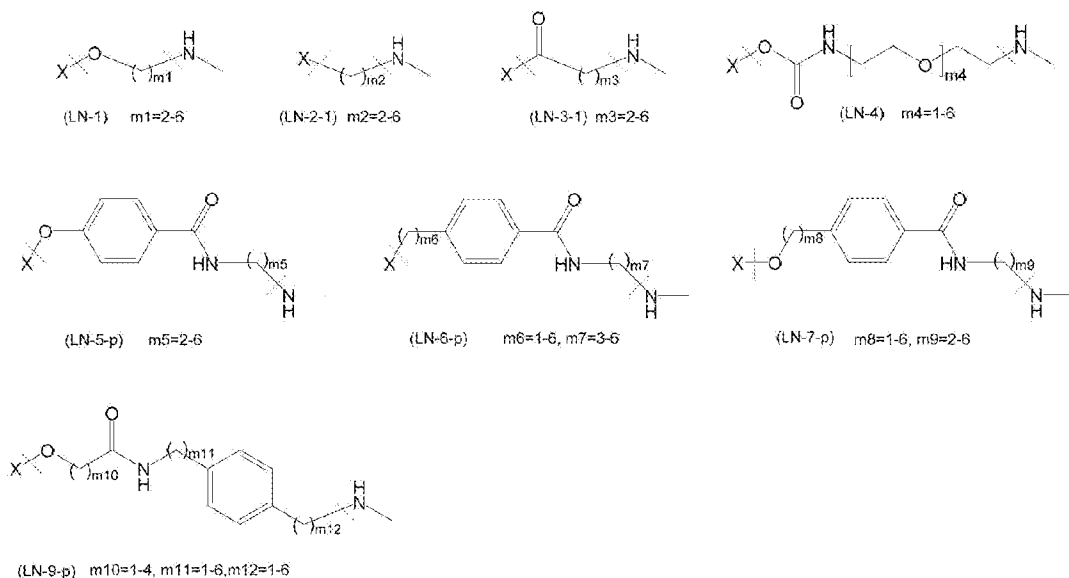


(TZ-6-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]
である。

[0133] [7-2a] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、より好ましくは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

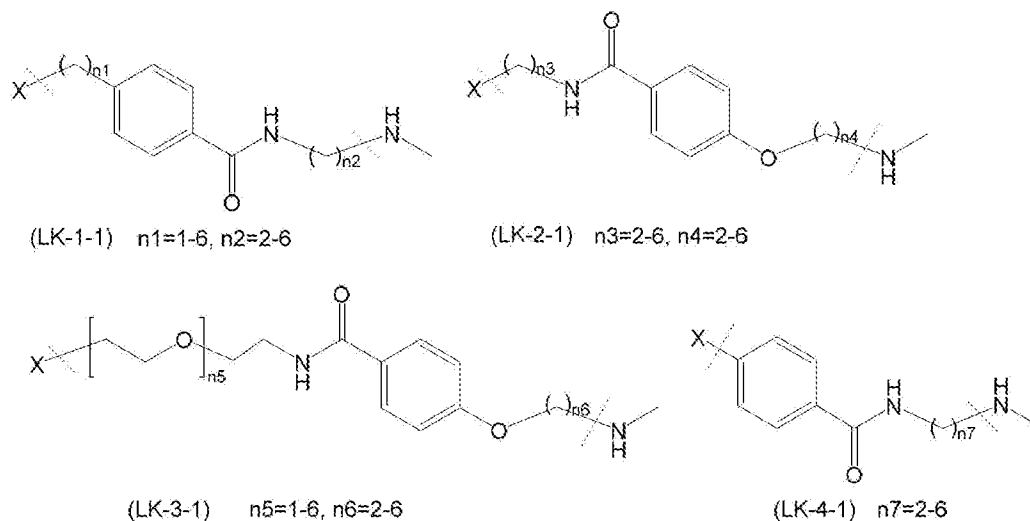
[化79]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

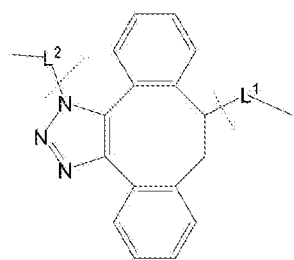
[化80]



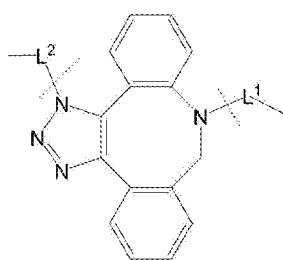
の群から選択される2価のリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕；

Xは、下記部分構造式：

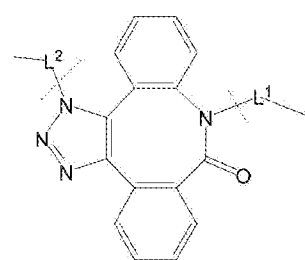
[化81]



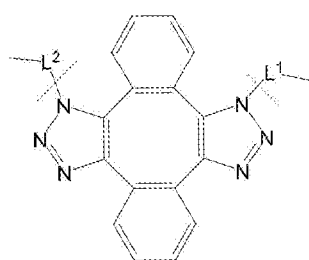
(TZ-1)



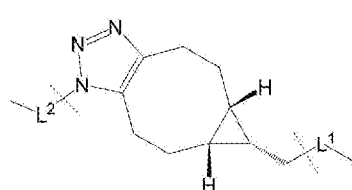
(TZ-2)



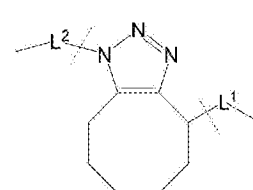
(TZ-3)



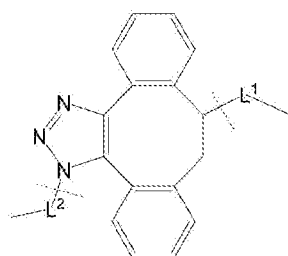
(TZ-4)



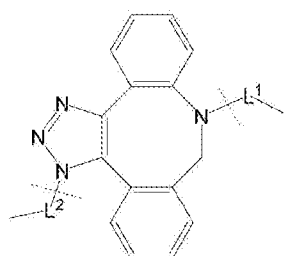
(TZ-5)



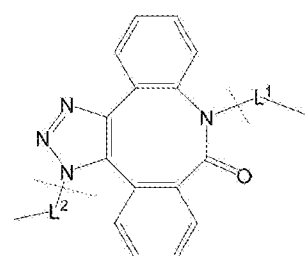
(TZ-6)



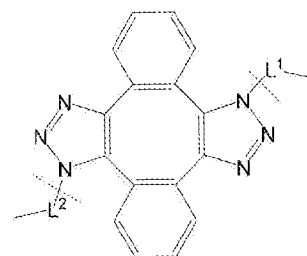
(TZ-1-r)



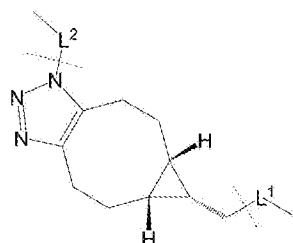
(TZ-2-r)



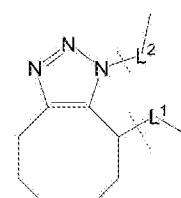
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

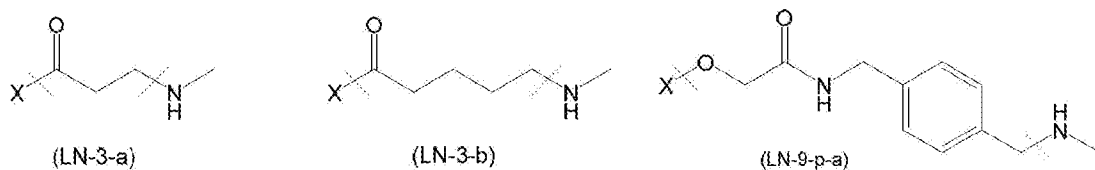


(TZ-6-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]である。

[0134] [7-3a] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、更に好ましくは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

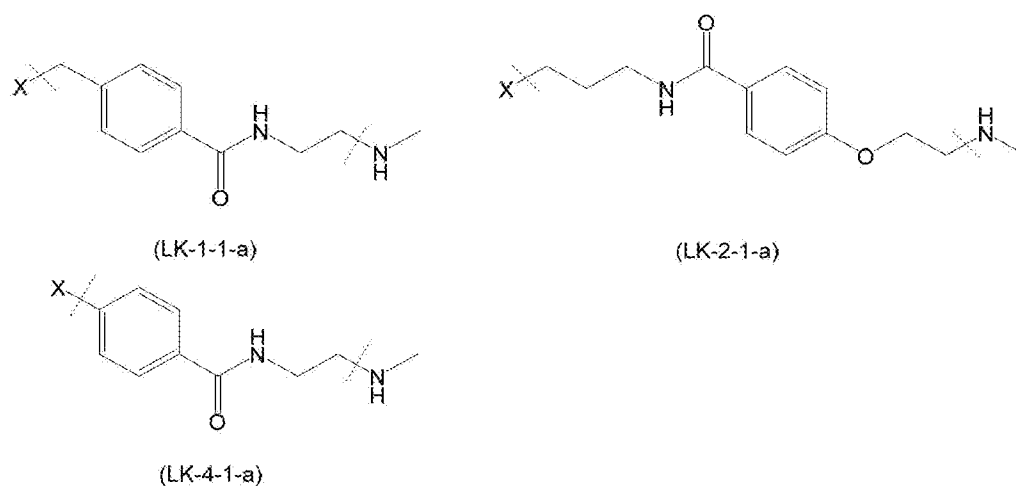
[化82]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

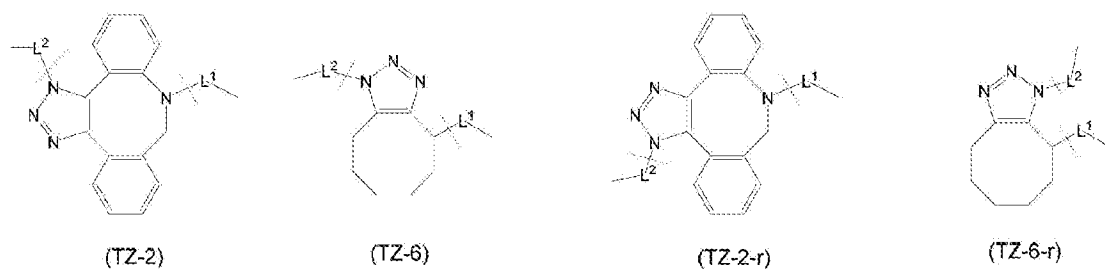
[化83]



の群から選択される2価のリンカーであり（各式中、両端の波線外側は含まない）；

Xは、下記部分構造式：

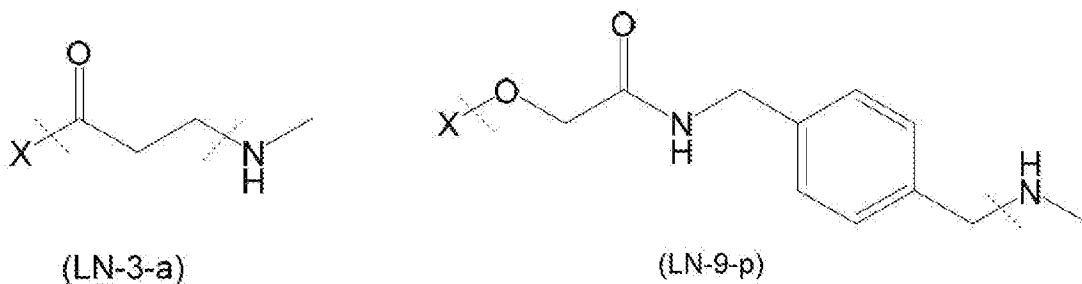
[化84]



の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）。

[0135] [7-3a-1] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、特に好ましくは、—L¹—は、下記部分構造式：

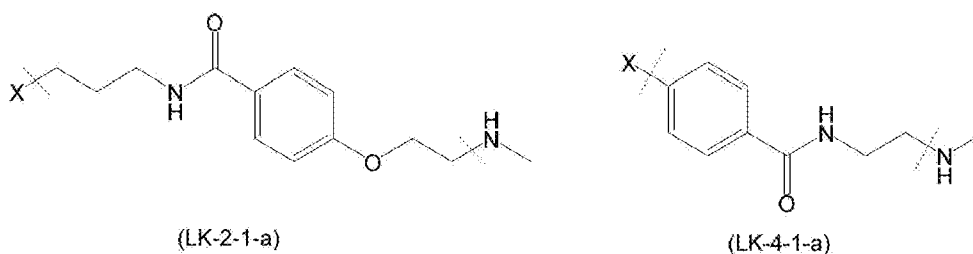
[化85]



の群から選択される 2 価のリンカーであり（式中、両端の波線外側は含まない）；

—L²—は、下記部分構造式：

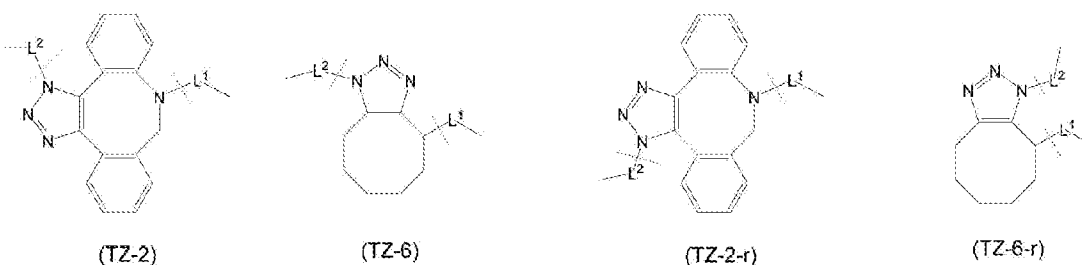
[化86]



の群から選択される 2 価のリンカーであり（式中、両端の波線外側は含まない）；

Xは、下記部分構造式：

[化87]



の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）。

[0136] [7-4a] 前記態様 [7] の前記式 (I I I-L) において、好ましくは、—L²—X—L¹—の組み合わせは、下表の式：

[表4]

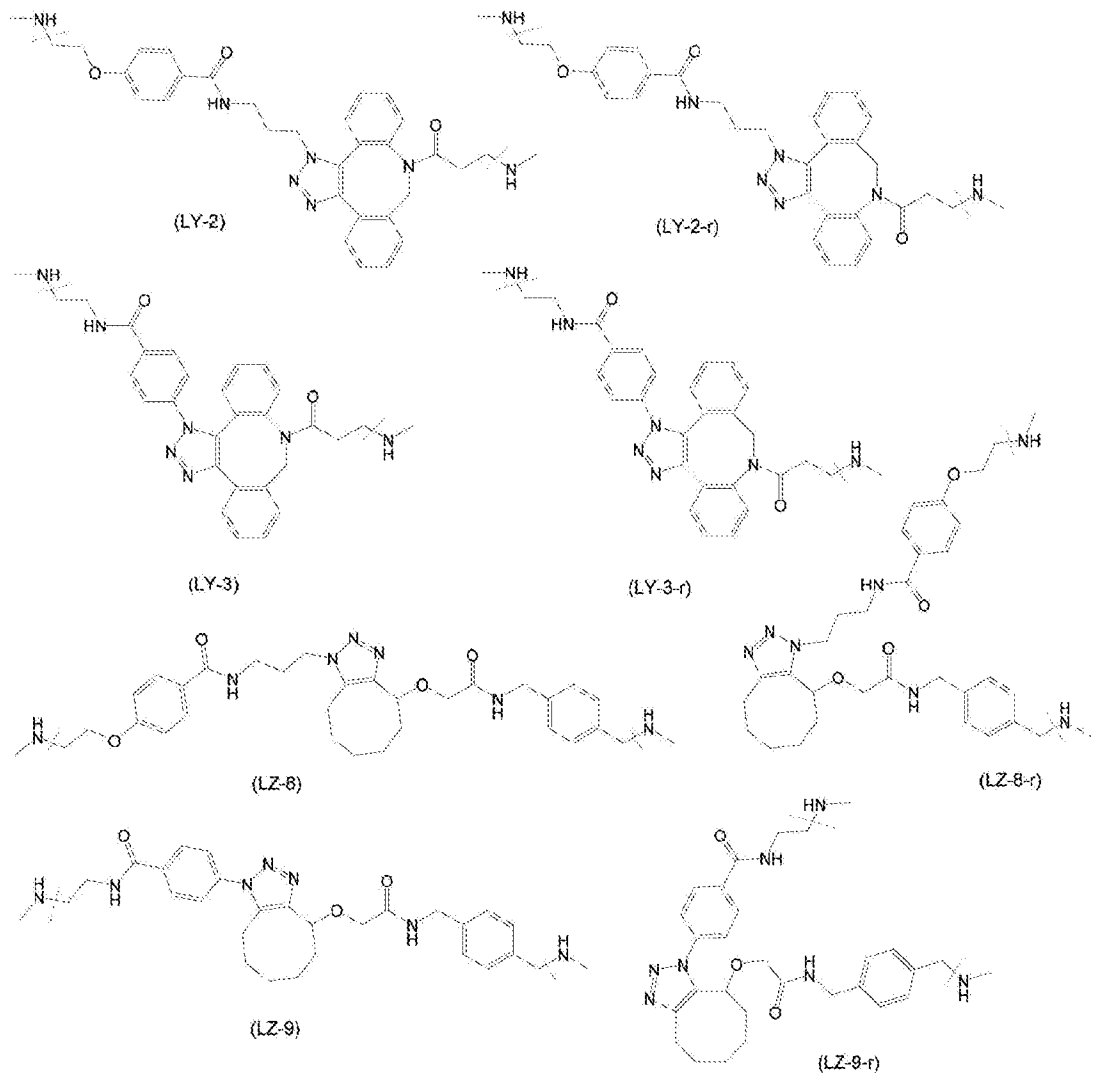
	$-L^2-$	$-X-$	$-L^1-$
(LY-1)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-2)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-3)	(LK-4-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-a)
(LY-4)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-5)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-6)	(LK-4-1-a)	(TZ-2)	(LN-3-b)
(LY-7)	(LK-1-1-a)	(TZ-2)	(LN-9-p)
(LY-8)	(LK-2-1-a)	(TZ-2)	(LN-9-p)
(LY-9)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

の群から選択される部分構造で示される通りであり（表中の $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 又は $-X-$ の各式は前記態様 [1]、[1-1]、[1-1 a]、[1-1 b]、[4]、[4-1]、[4-1 a]、[4-1 b]、[7]、[7-1]、[7-2]、[7-3]、[7-3-1]、[7-1 a]、[7-

2 a]、[7-3 a]、及び[7-3 a-1]に記載の通りである)；

より好ましくは、 $-L^2-X-L^1-$ の組み合わせは、下記部分構造式〔式中、両端の波線外側は含まない〕：

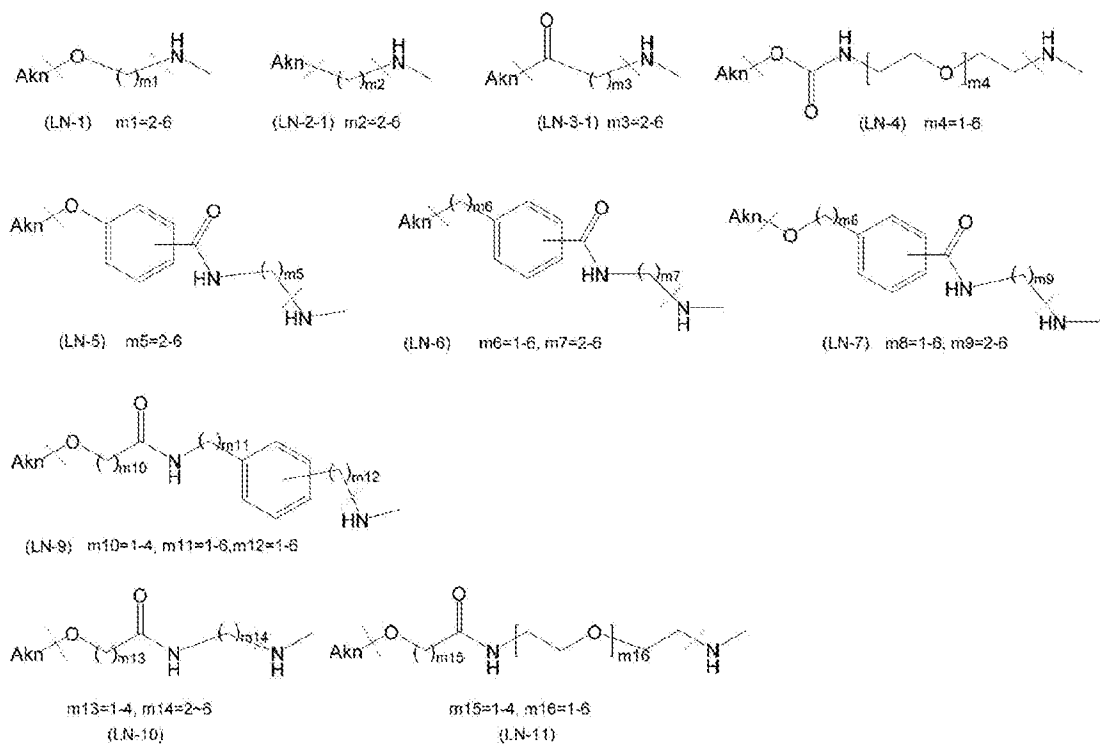
[化88]



の群から選択される部分構造で示される通りである。

[0137] [7-1 b] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、好ましくは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

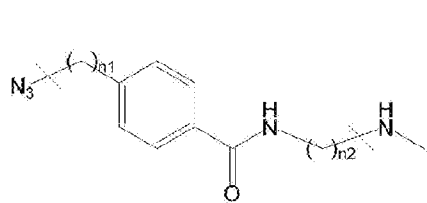
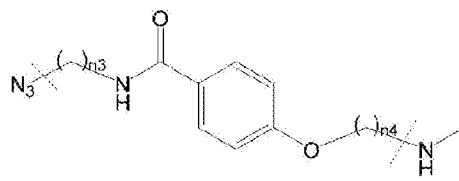
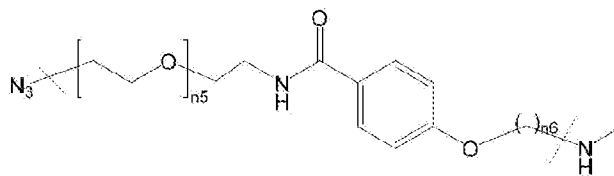
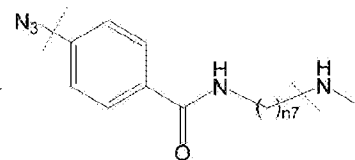
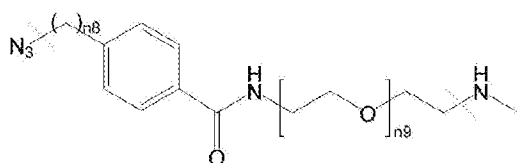
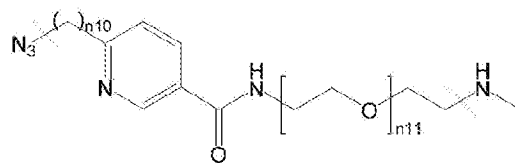
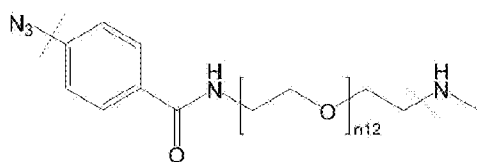
[化89]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

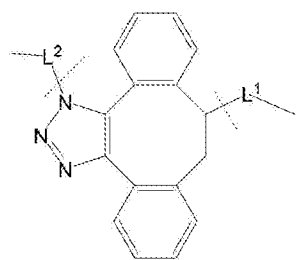
[化90]

(LK-1-1) $n1=1-6$, $n2=2-6$ (LK-2-1) $n3=2-6$,
 $n4=2-6$ (LK-3-1) $n5=1-6$, $n6=2-6$ (LK-4-1) $n7=2-6$ (LK-5-1) $n8=1-4$, $n9=1-6$ (LK-6-1) $n10=1-4$, $n11=1-6$ (LK-7-1) $n12=1-6$

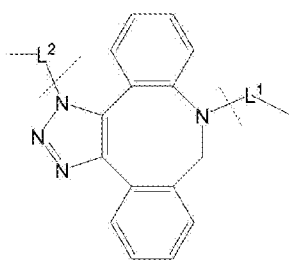
の群から選択される2価のリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕；

Xは、下記部分構造式：

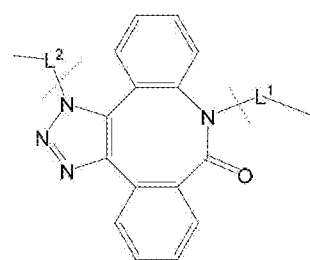
[化91]



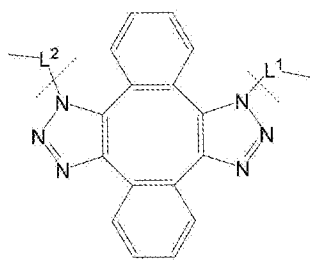
(TZ-1)



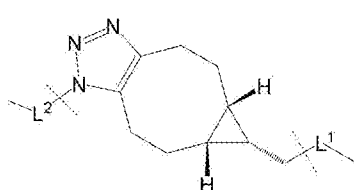
(TZ-2)



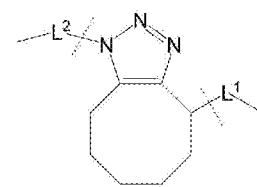
(TZ-3)



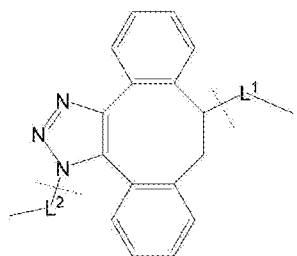
(TZ-4)



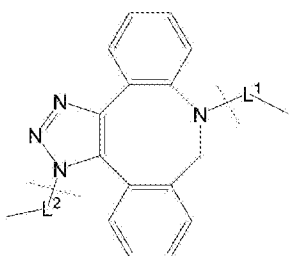
(TZ-5)



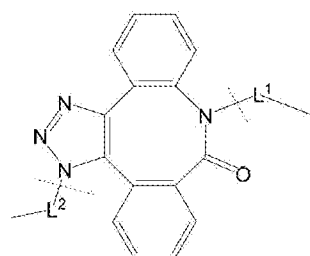
(TZ-6)



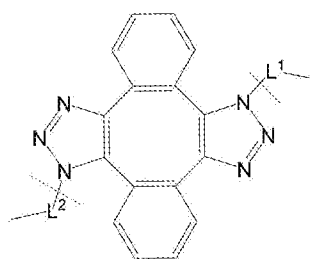
(TZ-1-r)



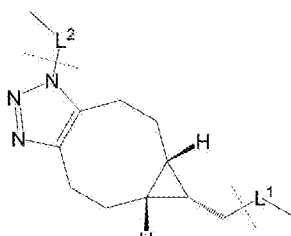
(TZ-2-r)



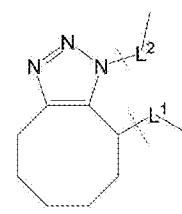
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

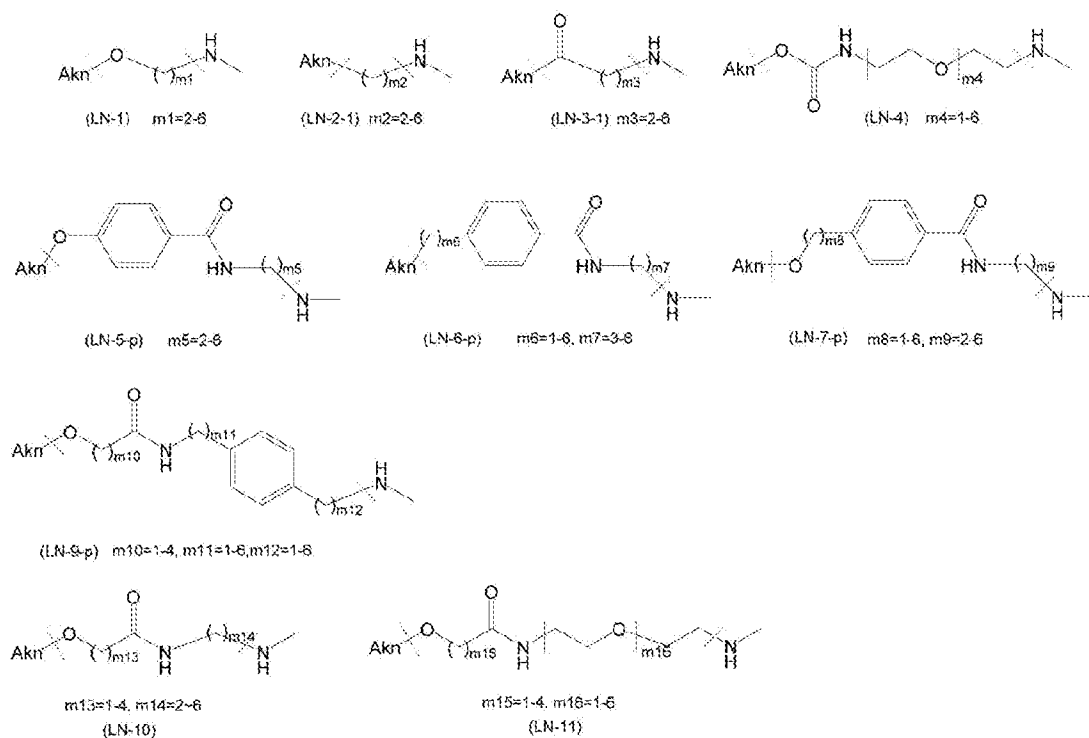


(TZ-6-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]
である。

[0138] [7-2b] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、より好ましくは、-L¹-は、下記部分構造式[各式中、両端の波線外側は含まない]：

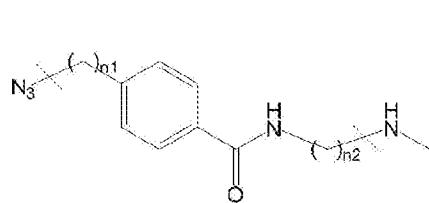
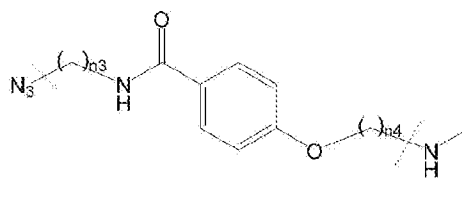
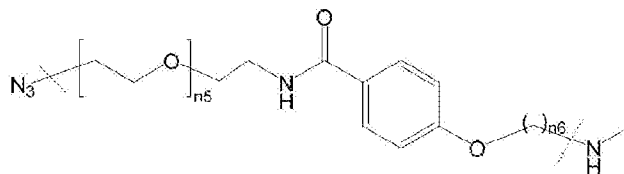
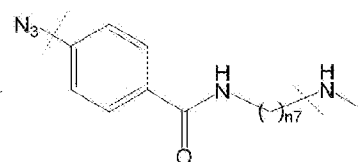
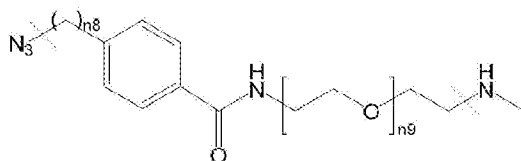
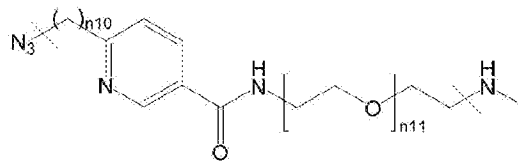
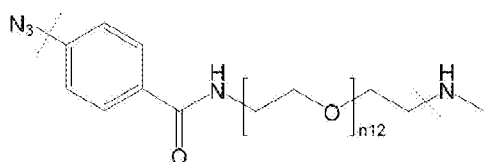
[化92]



の群から選択される2価のリンカーであり；

—L²—は、下記部分構造式：

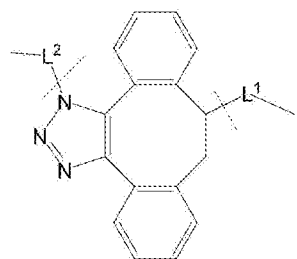
[化93]

(LK-1-1) $n1=1-6$, $n2=2-6$ (LK-2-1) $n3=2-6$,
 $n4=2-6$ (LK-3-1) $n5=1-6$, $n6=2-6$ (LK-4-1) $n7=2-6$ (LK-5-1) $n8=1-4$, $n9=1-6$ (LK-6-1) $n10=1-4$, $n11=1-6$ (LK-7-1) $n12=1-6$

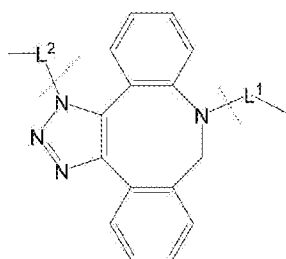
の群から選択される2価のリンカーであり〔各式中、両端の波線外側は含まない〕；

Xは、下記部分構造式：

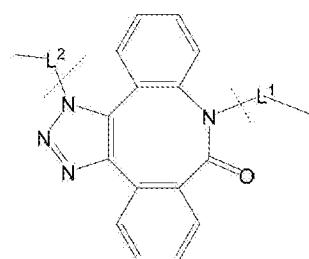
[化94]



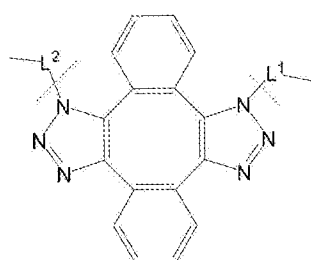
(TZ-1)



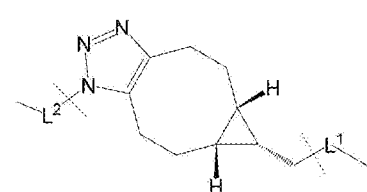
(TZ-2)



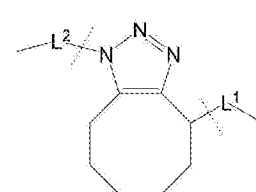
(TZ-3)



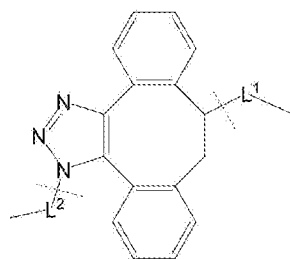
(TZ-4)



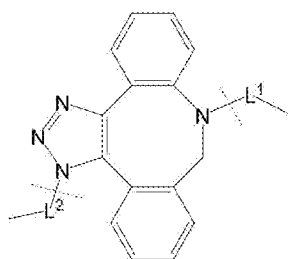
(TZ-5)



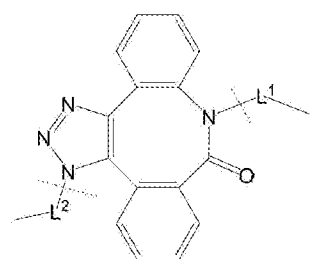
(TZ-6)



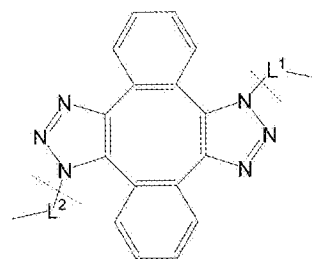
(TZ-1-r)



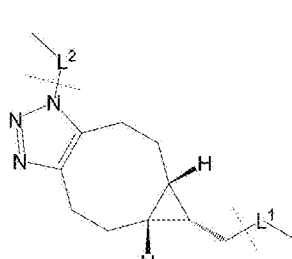
(TZ-2-r)



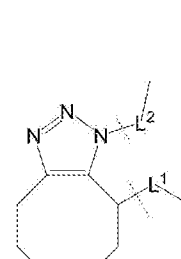
(TZ-3-r)



(TZ-4-r)



(TZ-5-r)

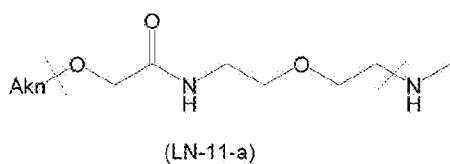
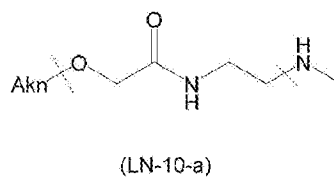
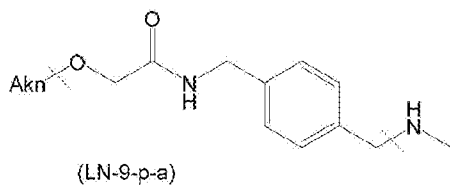
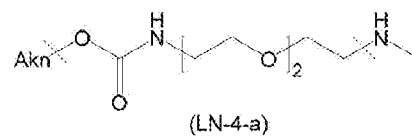
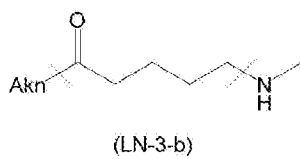
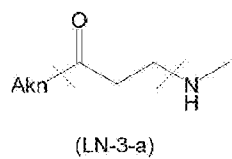


(TZ-6-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）]
である。

[0139] [7-3b] 前記態様[7]の前記式(III-L)において、更に好まし

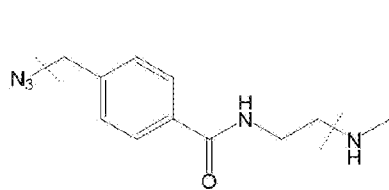
くは、 $-L^1-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：
[化95]



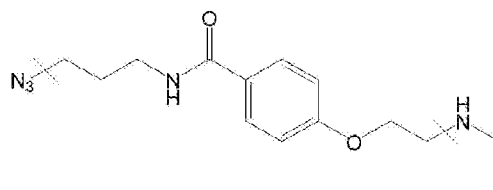
の群から選択される2個のリンカーであり；

$-L^2-$ は、下記部分構造式：

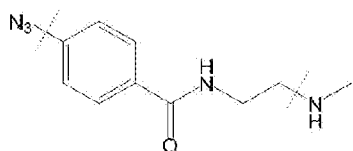
[化96]



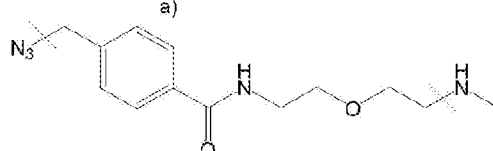
(LK-1-1-a)



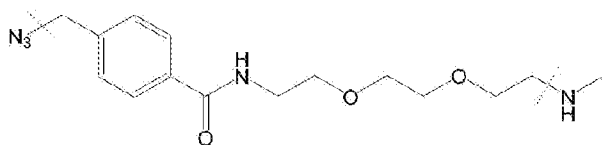
(LK-2-1-a)



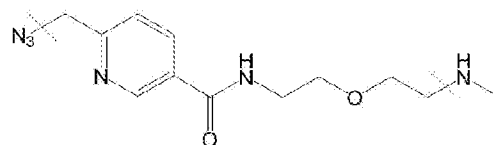
(LK-4-1-a)



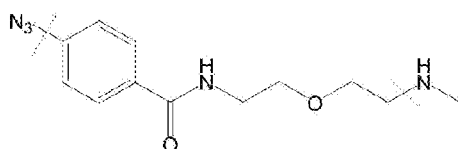
(LK-5-1-a)



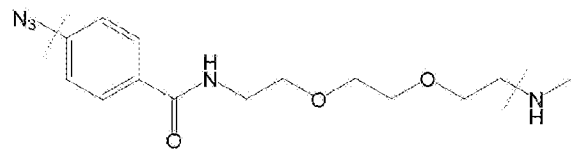
(LK-5-1-b)



(LK-6-1-a)



(LK-7-1-a)

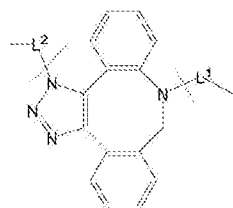


(LK-7-1-b)

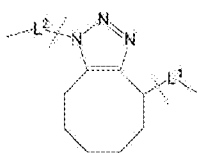
の群から選択される2価のリンカーであり（各式中、両端の波線外側は含まない）；

Xは、下記部分構造式：

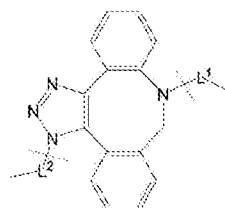
[化97]



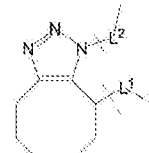
(TZ-2)



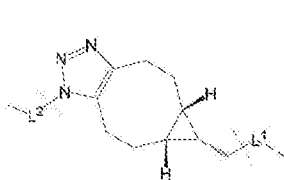
(TZ-6)



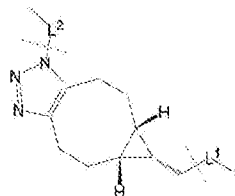
(TZ-2-r)



(TZ-6-r)



(TZ-5)



(TZ-5-r)

の群から選択される環状基である（各式中、両端の波線外側は含まない）。

[0140] [7-4 b] 前記態様 [7] の前記式 (I I I-L) において、好ましくは、 $-L^1-X-L^2-$ の組み合わせは、下表の式：

[表5-1]

$-L^1-$	$-X-$	$-L^2-$	$-L^1-$	$-X-$	$-L^2-$
LN-3-a	TZ-2	LK-1-1-a	LN-3-b	TZ-2	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-2-r	LK-1-1-a		TZ-2-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5	LK-1-1-a		TZ-5	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5-r	LK-1-1-a		TZ-5-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-6	LK-1-1-a		TZ-6	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a

[表5-2]

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

[表5-3]

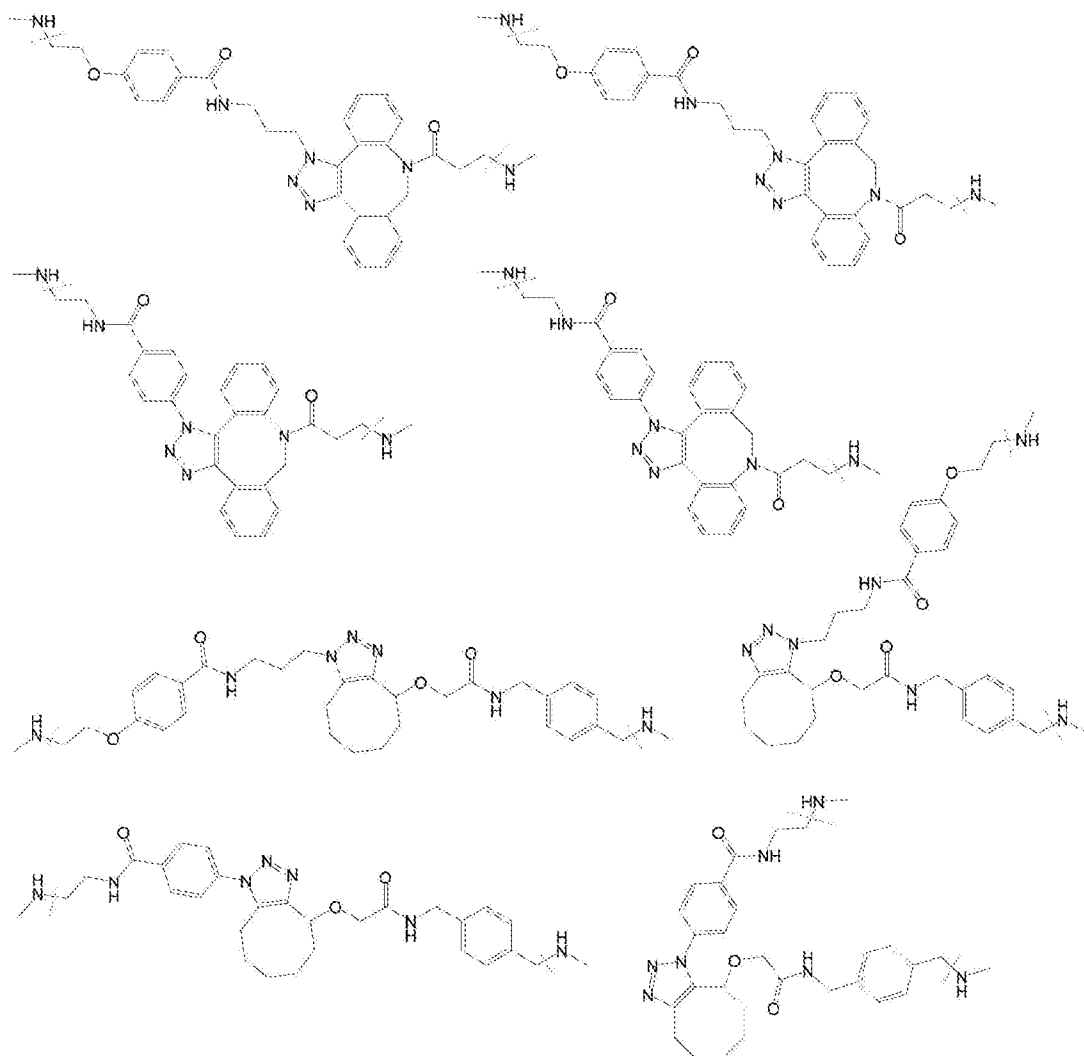
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a			LK-7-1-a
		LK-7-1-b			LK-7-1-b
	TZ-5-r	LK-1-1-a		TZ-5-r	LK-1-1-a
		LK-2-1-a			LK-2-1-a
		LK-4-1-a			LK-4-1-a
		LK-5-1-a			LK-5-1-a
		LK-5-1-b			LK-5-1-b
		LK-6-1-a			LK-6-1-a
		LK-7-1-a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

の組合わせの群から選択される部分構造で示される通りであり（表中の $-L^1$ 、 $-L^2$ 又は $-X$ の各式は前記態様 [1]、[1-1]、[1-1a]、[1-1b]、[1-1b]、[4]、[4-1]、[4-1a]、[4-1b]、[7] [7-1]、[7-2]、[7-3]、[7-3-1]、[7-1a]、[7-2a]、[7-3a]、[7-3a-1]、[7-1

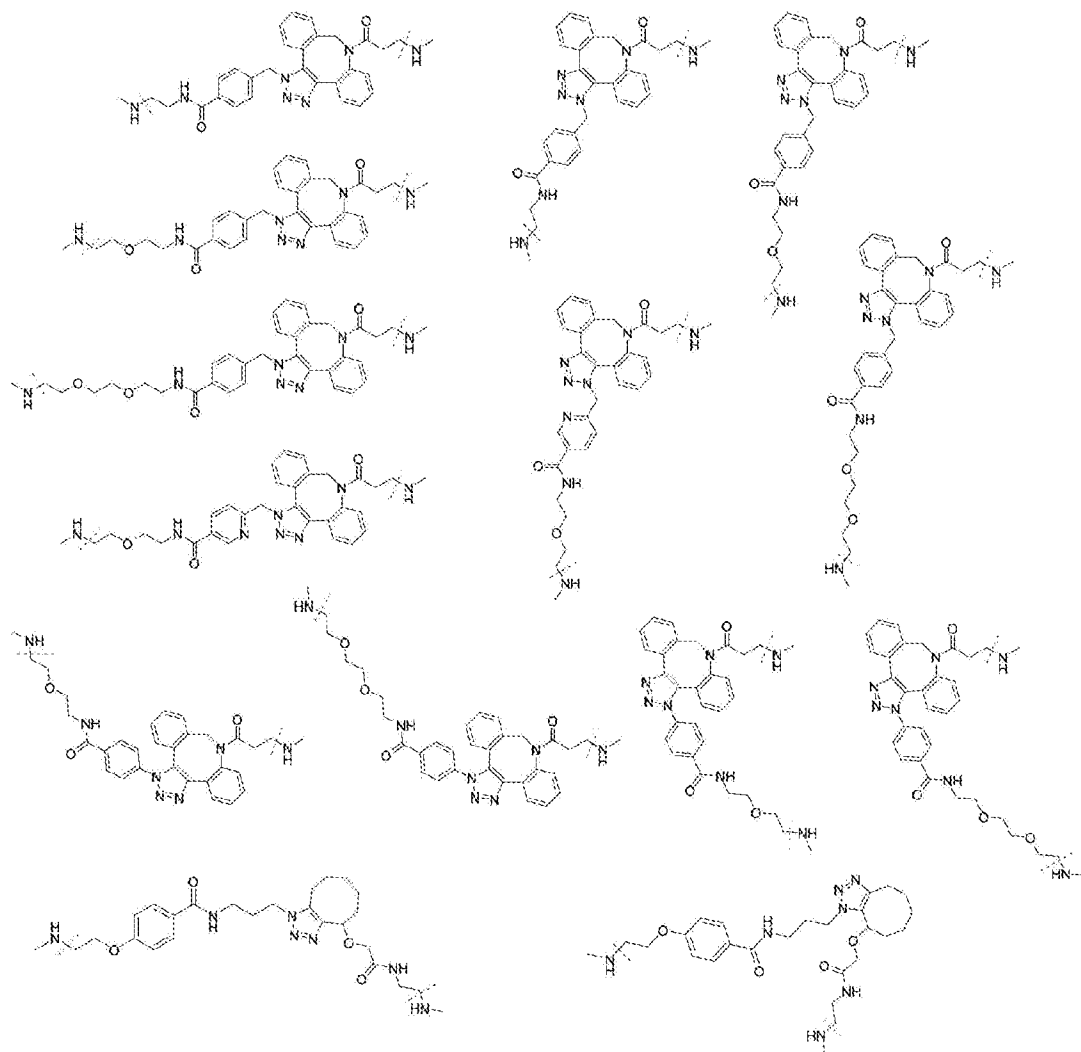
b]、[7-2b]、及び[7-3b]に記載の通りである)；

より好ましくは、 $-L^2-X-L^1-$ の組み合わせは、下記部分構造式〔式中、両端の波線外側は含まない〕：

[化98]



[化99]



の群から選択される部分構造で示される通りである。

[0141] 態様〔7〕の好ましい態様、更には $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、及びXの定義を適宜組み合わせることにより、前記態様〔7〕の架橋アルギン酸の好ましい態様を任意に形成し得る。

[0142] 〔8〕アルギン酸誘導体の第8の態様は、次の通りである。前記態様〔1〕に記載の式(Ⅰ)のアルギン酸誘導体と前記態様〔4〕に記載の式(Ⅱ)のアルギン酸誘導体とを混合してHuisgen反応を行うことで、前記態様〔7〕に記載の架橋アルギン酸を得ることを含む、架橋アルギン酸を製造する方法。

[0143] 〔8-1〕第8-1の態様は、次の通りである。架橋としてHuisgen

反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋、及びカルシウムイオンにより部分的に形成されるイオン架橋を含む、架橋アルギン酸。

[0144] [9] アルギン酸誘導体の第9の態様は、次の通りである。前記態様[1]に記載の式(1)のアルギン酸誘導体及び前記態様[4]に記載の式(11)のアルギン酸誘導体を混合したアルギン酸誘導体の混合溶液を、塩化カルシウム溶液中に滴下することで得られる架橋アルギン酸構造体。

[0145] [10] アルギン酸誘導体の第10の態様は、次の通りである。架橋としてHuisgen反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋、及びカルシウムイオンにより部分的に形成されるイオン架橋を含む、前記態様[9]に記載の架橋アルギン酸構造体。

[0146] [11] アルギン酸誘導体の第11の態様は、次の通りである。前記態様[1]に記載の式(1)のアルギン酸誘導体と前記態様[4]に記載の式(11)のアルギン酸誘導体とを混合したアルギン酸誘導体の混合溶液を、塩化カルシウム溶液中に滴下して、前記態様[9]又は[10]に記載の架橋アルギン酸構造体を得ることを含む、架橋アルギン酸構造体を製造する方法。

[0147] [12] アルギン酸誘導体の第12の態様は、次の通りである。平板型のゲルである、前記態様[9]又は[10]に記載の架橋アルギン酸構造体。

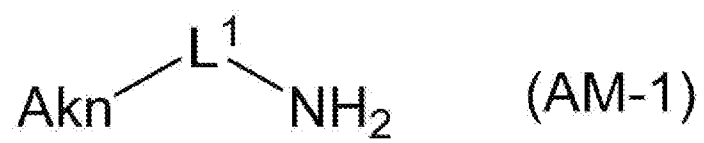
[0148] [13] アルギン酸誘導体の第13の態様は、次の通りである。前記態様[9]、[10]および[12]のいずれか1項に記載の架橋アルギン酸構造体を含む医療用材料。

[0149] [14] アルギン酸誘導体の第14の態様は、次の通りである。平板型のゲルである、前記態様[13]に記載の医療用材料。

[0150] [15] アルギン酸誘導体の第15の態様は、次の通りである。生体適合性がある、前記態様[1]～[6]のいずれか1項に記載のアルギン酸誘導体、前記態様[7]又は[8-1]に記載の架橋アルギン酸、及び前記態様[9]、[10]および[12]のいずれか1項に記載の架橋アルギン酸構造体。

[0151] [16] 第16の態様は、次の通りである。下記式(AM-1)：

[化100]



[式 (AM-1) 中、 $-\text{L}^1-$ 及びA k nの組み合わせが、下表：

[表6-1]

Akn	$\sim L^1 \sim$	Akn	$\sim L^1 \sim$
AK-1	LN-1 (但し、 $m1=2$ を除く)	AK-5	LN-6
AK-2	LN-1 (但し、 $m1=2$ を除く)	AK-6	LN-6
AK-6	LN-1	AK-7	LN-6
AK-7	LN-1 (但し、 $m1=2$ を除く)	AK-8	LN-6
AK-8	LN-1	AK-9	LN-6
AK-9	LN-1	AK-10	LN-6 (但し、 p 置換、 $m6=1, m7=2$ を除く)
AK-10	LN-1	AK-11	LN-6
AK-12	LN-1	AK-12	LN-6
AK-1	LN-2	AK-1	LN-7
AK-2	LN-2	AK-2	LN-7
AK-3	LN-2	AK-6	LN-7
AK-4	LN-2	AK-7	LN-7
AK-5	LN-2	AK-8	LN-7
AK-6	LN-2	AK-9	LN-7
AK-7	LN-2	AK-10	LN-7
AK-8	LN-2	AK-12	LN-7
AK-9	LN-2	AK-1	LN-8
AK-10	LN-2	AK-2	LN-8
AK-11	LN-2	AK-3	LN-8
AK-12	LN-2 (但し、 $m2=1$ を除く)	AK-4	LN-8
AK-1	LN-3	AK-5	LN-8
AK-2	LN-3 (但し、 $m3=2$ を除く)	AK-6	LN-8
AK-3	LN-3 (但し、 $m3=1, 2, 3, 5$ を除く)	AK-7	LN-8
AK-4	LN-3 (但し、 $m3=1$ を除く)	AK-8	LN-8
AK-5	LN-3	AK-10	LN-8
AK-6	LN-3	AK-11	LN-8
AK-7	LN-3	AK-12	LN-8
AK-8	LN-3	AK-1	LN-9
AK-9	LN-3	AK-2	LN-9

[表6-2]

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

のいずれかの組み合わせである（各式は前記態様〔1〕の定義と同じである）]で表されるアミノ化合物、又は製薬学的に許容されるその塩、又はそれらの溶媒和物。

[0152] [16-1] 前記態様〔16〕の前記式（AM-1）において、好ましくは、 Ak_n-L^1 の組み合わせは、下表：

[表7]

Akn	-L ¹ -	Akn	-L ¹ -
AK-1	LN-1 (但し、m1=2を除く)	AK-3	LN-6
AK-2	LN-1 (但し、m1=2を除く)	AK-4	LN-6
AK-6	LN-1	AK-5	LN-6
AK-1	LN-2-1	AK-6	LN-6
AK-2	LN-2-1	AK-1	LN-7
AK-3	LN-2-1	AK-2	LN-7
AK-4	LN-2-1	AK-6	LN-7
AK-5	LN-2-1	AK-1	LN-8
AK-6	LN-2-1	AK-2	LN-8
AK-1	LN-3-1	AK-3	LN-8
AK-2	LN-3-1 (但し、m3=2を除く)	AK-4	LN-8
AK-3	LN-3-1 (但し、m3=2, 3, 5を除く)	AK-5	LN-8
AK-4	LN-3-1	AK-6	LN-8
AK-5	LN-3-1	AK-1	LN-9
AK-6	LN-3-1	AK-2	LN-9
AK-1	LN-4 (但し、m4=2, 3を除く)	AK-6	LN-9
AK-2	LN-4 (但し、m4=2, 4を除く)	AK-1	LN-10
AK-6	LN-4 (但し、m4=2, 3, 4を除く)	AK-2	LN-10 (但し、m13=1, m14=2を除く)
AK-1	LN-5	AK-6	LN-10
AK-2	LN-5	AK-1	LN-11
AK-6	LN-5	AK-2	LN-11 (但し、m15=1, m16=2を除く)
AK-1	LN-6	AK-6	LN-11
AK-2	LN-6		

のいずれかの組み合わせであり（各式は前記態様〔1-1〕、〔1-2〕、〔1-1 a〕、〔1-2 a〕、〔1-1 b〕、及び〔1-2 b〕に記載の通りである）；

より好ましくは、下表：

[表8]

Akn	-L ¹ -	Akn	-L ¹ -
AK-1	LN-1 (但し、m1=2 を除く)	AK-1	LN-6-p
AK-6	LN-1	AK-3	LN-6-p
AK-1	LN-2-1	AK-6	LN-6-p
AK-3	LN-2-1	AK-1	LN-7-p
AK-6	LN-2-1	AK-6	LN-7-p
AK-1	LN-3-1	AK-1	LN-9-p
AK-3	LN-3-1 (但し、m3=2, 3, 5 を除く)	AK-6	LN-9-p
AK-6	LN-3-1	AK-1	LN-10
AK-1	LN-4 (但し、m4=2, 3 を除く)	AK-6	LN-10
AK-6	LN-4 (但し、m4=2, 3, 4 を除く)	AK-1	LN-11
AK-1	LN-5-p	AK-6	LN-11
AK-6	LN-5-p		

のいずれかの組み合わせであり（各式は前記態様 [1-1]、[1-2]、
[1-1 a]、[1-2 a]、[1-1 b]、及び [1-2 b] の定義と同じである）；

更に好ましくは、下表：

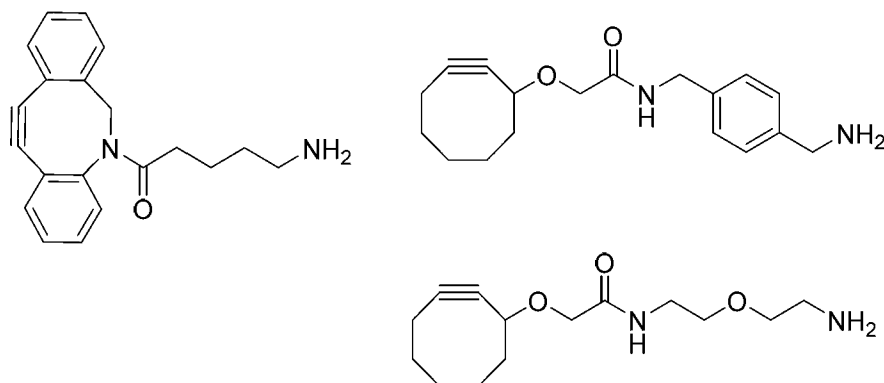
[表9]

Akn	-L ¹ -	Akn	-L ¹ -
AK-1	LN-1 (但し、m1=2 を除く)	AK-6	LN-9-p-a
AK-6	LN-1	AK-1	LN-10
AK-1	LN-3-a	AK-6	LN-10
AK-3	LN-3-1 (但し、m3=2, 3, 5 を除く)	AK-1	LN-11
AK-6	LN-3-a	AK-6	LN-11
AK-1	LN-9-p-a		

のいずれかの組み合わせであり（各式は前記態様 [1-1]、[1-2]、
[1-1 a]、[1-2 a]、[1-1 b]、及び [1-2 b] の定義と同じである）；

例えば、下記構造式：

[化101]

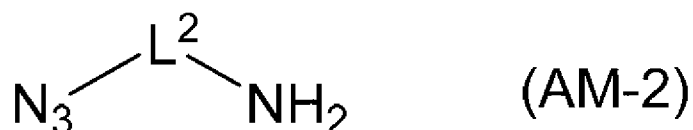


でのいずれかの構造式で示される通りである。

[0153] 態様 [16] の好ましい態様、更には $A_k n$ 、及び $-L^1-$ の定義を適宜組み合わせることにより、前記態様 [16] のアミノ化合物、又は製薬学的に許容されるその塩、又はそれらの溶媒和物の好ましい態様を任意に形成し得る。

[0154] [17] 第17の態様は次の通りである。下記式 (AM-2) :

[化102]



[式 (11) 中、 $-L^2-$ は、式 (LK-1) (但し、式中フェニル環の置換様式が p 置換であり、 $n_1 = 1$ 及び $n_2 = 3$ は除く)、式 (LK-2)、式 (LK-3)、式 (LK-4) (但し、式中フェニル環の置換様式が m 置換であり、 $n_7 = 3$ 、及び式中フェニル環の置換様式が p 置換であり、 $n_7 = 2, 3, 4, 6$ は除く)、式 (LK-5) (但し、式中フェニル環の置換様式が p 置換であり、 $n_8 = 1$ 及び $n_9 = 2$ は除く)、式 (LK-6)、及び式 (LK-7) である [各式は前記態様 [4] の定義と同じである]] で表されるアミノ化合物、又は製薬学的に許容されるその塩、又はそれらの溶媒和物。

[0155] [17-1] 前記態様 [17] の前記式 (AM-2) において、好ましくは、 $-L^2-$ は、式 (LK-1-1) (但し、式中 $n_1 = 1$ 及び $n_2 = 3$ は除く)、式 (LK-2-1)、式 (LK-3-1)、式 (LK-4-1) (但し、 $n_7 = 2, 3, 4, 6$ は除く)、式 (LK-5-1) (但し、式中 $n_8 = 1$ 及び $n_9 = 2$ は除く)、式 (LK-6-1)、及び式 (LK-7-1) [各式は前記態様 [4-1]、[4-1a] 又は [4-1b] の定義と同じである] であり；

より好ましくは、式 (LK-1-1-a)、式 (LK-2-1-a)、式 (LK-3-1-a)、式 (LK-5-1-a)、式 (LK-6-1-a)、式 (LK-7-1-a) 及び式 (LK-7-1-b) [各式は前記態様 [4-1]、[4-1a] 又は [4-1b] の定義と同じである] である。

[0156] 態様 [17] の好ましい態様、更にはアジド基及び $-L^2-$ の定義を適宜組み合わせることにより、前記態様 [17] のアミノ化合物、又は製薬学的に許容されるその塩、又はそれらの溶媒和物の好ましい態様を任意に形成し得る。

[0157] 以下、アルギン酸誘導体の各態様についてより詳細に説明する。

[0158] 1. アルギン酸

本明細書中、アルギン酸と記載する場合、アルギン酸、アルギン酸エステル、及びそれらの塩（例えば、アルギン酸ナトリウム）からなる群から選択される少なくとも1種のアルギン酸（「アルギン酸類」という場合がある）を意味する。用いられるアルギン酸は、天然由来でも合成物であってもよいが、天然由来であるのが好ましい。好ましく用いられるアルギン酸類は、レソソニア、マクロシスティス、ラミナリア、アスコフィラム、ダービリア、カジカ、アラメ、コンブなどの褐藻類から抽出される生体内吸収性の多糖類であって、D-マンヌロン酸 (M) とL-グルロン酸 (G) という2種類のuron酸が直鎖状に重合したポリマーである。より具体的には、D-マンヌロン酸のホモポリマー画分 (MM画分)、L-グルロン酸のホモポリマー画分 (GG画分)、およびD-マンヌロン酸とL-グルロン酸がランダムに配

列した画分（M／G画分）が任意に結合したブロック共重合体である。

[0159] 本明細書中、アルギン酸は、アルギン酸を（ALG）として、アルギン酸の任意のカルボキシル基の1つを —COOH として、（ALG） —COOH と表記する場合がある。

[0160] いくつかの態様では、アルギン酸は、アルギン酸ナトリウムである。アルギン酸ナトリウムは、市販品のアルギン酸ナトリウムを用いることができる。ここで、後述の実施例では、アルギン酸ナトリウムは、下表に記載したA－1、A－2、A－3、B－1、B－2、及びB－3のアルギン酸ナトリウム（発売元 持田製薬株式会社）を用いている。各アルギン酸ナトリウムの1 w／w％の水溶液の粘度、重量平均分子量及びM／G比を下記の表に示す。

[0161] [表10]

アルギン酸ナトリウム	1 w/w％の粘度 (mPa・s)	重量平均分子量		M／G比
		GPC	GPC-MALS	
A－1	10～40	300,000 ～ 700,000	60,000 ～ 130,000	0.5～1.8
A－2	50～150	700,000 ～ 1,400,000	130,000 ～ 200,000	
A－3	300～600	1,400,000 ～ 2,000,000	200,000 ～ 400,000	
B－1	10～40	150,000 ～ 800,000	60,000 ～ 130,000	0.1～0.5
B－2	70～150	800,000 ～ 1,500,000	130,000 ～ 200,000	
B－3	400～600	1,500,000 ～ 2,500,000	200,000 ～ 350,000	

[0162] 前記アルギン酸ナトリウムA－1、A－2、A－3、B－1、B－2、及びB－3の各物性値は、下記の各種方法により測定した。測定方法は、当該方法に限定されるものではないが、測定方法により各物性値が上記のものと異なる場合がある。

[0163] [アルギン酸ナトリウムの粘度測定]

日本薬局方（第16版）の粘度測定法に従い、回転粘度計法（コーンプレ

ート型回転粘度計)を用いて測定した。具体的な測定条件は以下のとおりである。試料溶液の調製は、MilliQ水を用いて行った。測定機器は、コーンプレート型回転粘度計(粘度粘弾性測定装置レオストレスRS600 (Thermo Haake GmbH) センサー: 35/1)を用いた。回転数は、1 w/w%アルギン酸ナトリウム溶液測定時は1 rpmとした。読み取り時間は、2分間測定し、開始1分から2分までの平均値とした。3回の測定の平均値を測定値とした。測定温度は20℃とした。

[0164] [アルギン酸ナトリウムの重量平均分子量測定]

(1) ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)と、(2) GPC-MALSの2種類の測定法で測定した。測定条件は以下のとおりである。

[0165] [前処理方法]

試料に溶離液を加え溶解後、0.45 µmメンブランフィルターろ過したものを測定溶液とした。

(1) ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)測定

[測定条件(相対分子量分布測定)]

カラム: TSK gel GMPW-XL×2 + G2500PW-XL (7.8 mm I.D. × 300 mm × 3本)

溶離液: 200 mM硝酸ナトリウム水溶液

流量: 1.0 mL/min

濃度: 0.05%

検出器: RI検出器

カラム温度: 40℃

注入量: 200 µL

分子量標準: 標準プルラン、グルコース

[0166] (2) GPC-MALS測定

[屈折率増分(dn/dc)測定(測定条件)]

示差屈折率計: Optilab T-rEX

測定波長: 658 nm

測定温度：40℃

溶媒：200mM硝酸ナトリウム水溶液

試料濃度：0.5～2.5mg/mL（5濃度）

[0167] [測定条件（絶対分子量分布測定）]

カラム：TSKgel GMPW-XL×2+G2500PW-XL（7.8mm ID×300mm×3本）

溶離液：200mM硝酸ナトリウム水溶液

流量：1.0mL/min

濃度：0.05%

検出器：RI検出器、光散乱検出器（MALS）

カラム温度：40℃

注入量：200μL

[0168] 本明細書中、アルギン酸、アルギン酸誘導体、架橋アルギン酸、及び架橋アルギン酸の分子量において、単位としてDa（ダルトン）を付記する場合がある。

[0169] アルギン酸類のD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の構成比（M/G比）は、主に海藻等の由来となる生物の種類によって異なり、また、その生物の生育場所や季節による影響を受け、M/G比が約0.2の高G型からM/G比が約5の高M型まで高範囲にわたる。アルギン酸類のゲル化能力および生成したゲルの性質は、M/G比によって影響を受け、一般的に、G比率が高い場合にはゲル強度が高くなることが知られている。M/G比は、その他にも、ゲルの硬さ、もろさ、吸水性、柔軟性などにも影響を与える。用いるアルギン酸類および／またはその塩のM/G比は、通常、0.2～4.0であり、より好ましくは、0.4～3.0、さらに好ましくは0.5～3.0である。

[0170] 本明細書中、「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0171] 本明細書中、用いられる「アルギン酸エステル」、「アルギン酸塩」とは

、特に限定されないが、架橋剤と反応させるため、架橋反応を阻害する官能基を有していないことが必要である。アルギン酸エステルとしては、好ましくは、アルギン酸プロピレングリコール、等が挙げられる。

[0172] 本明細書中、アルギン酸塩としては、例えば、アルギン酸の1価の塩、アルギン酸の2価の塩が挙げられる。アルギン酸の1価の塩としては、好ましくは、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、等が挙げられ、より好ましくは、アルギン酸ナトリウムまたはアルギン酸カリウムであり、特に好ましくは、アルギン酸ナトリウムである。アルギン酸の2価の塩としては、好ましくは、アルギン酸カルシウム、アルギン酸マグネシウム、アルギン酸バリウム、アルギン酸ストロンチウム、等が挙げられる。

[0173] アルギン酸は、高分子多糖類であり、分子量を正確に定めることは困難であるが、一般的に重量平均分子量で1000～1000万、好ましくは1万～800万、より好ましくは2万～300万の範囲である。天然物由来の高分子物質の分子量測定では、測定方法により値に違いが生じることが知られている。

[0174] 例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）又はゲルろ過クロマトグラフィー（これらを合わせてサイズ排除クロマトグラフィーともいう）により測定した重量平均分子量は、好ましくは10万以上、より好ましくは50万以上であり、また好ましくは、500万以下、より好ましくは300万以下である。その好ましい範囲は、10万～500万であり、より好ましくは15万～300万である。

[0175] また、例えば、GPC-MALS法によれば、絶対重量平均分子量を測定することができる。GPC-MALS法により測定した重量平均分子量(絶対分子量)は、好ましくは1万以上、より好ましくは5万以上、さらに好ましくは6万以上であり、また好ましくは、100万以下、より好ましくは80万以下、さらに好ましくは70万以下、とりわけ好ましくは50万以下である。その好ましい範囲は、1万～100万であり、より好ましくは5万～80

万であり、さらに好ましくは6万～70万、とりわけ好ましくは6万～50万である。

[0176] 通常、高分子多糖類の分子量を上記のような手法で算出する場合、10%～20%の測定誤差を生じうる。例えば、40万であれば32万～48万、50万であれば40万～60万、100万であれば80万～120万程度の範囲で値の変動が生じうる。

[0177] アルギン酸類の分子量の測定は、常法に従い測定することができる。

[0178] 分子量測定にゲルろ過クロマトグラフィーを用いる場合の代表的な条件は、後述の本明細書の実施例に記載のとおりである。カラムは、例えば、Superose 6 Increase 10/300 GLカラム（GEヘルスケアサイエンス社）を用いることができ、展開溶媒として、例えば、0.15 mol/L NaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）を使用することができ、分子量標準としてブルーデキストラン、チログロブリン、フェリチン、アルドラゼ、コンアルブミン、オブアルブミン、リボヌクレアーゼAおよびアプロチニンを用いることができる。

[0179] 本明細書中で用いられるアルギン酸の粘度は、特に限定されないが、1 w/w%のアルギン酸類の水溶液として粘度を測定した場合、好ましくは、10 mPa・s～1000 mPa・s、より好ましくは、50 mPa・s～800 mPa・sである。

[0180] アルギン酸の水溶液の粘度の測定は、常法に従い測定することができる。例えば、回転粘度計法の、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計（ブルックフィールド型粘度計）、円すい－平板形回転粘度計（コーンプレート型粘度計）等を用いて測定することができる。好ましくは、日本薬局方（第16版）の粘度測定法に従うことが望ましい。より好ましくは、コーンプレート型粘度計を用いる。

[0181] アルギン酸類は、褐藻類から抽出された当初は、分子量が大きく、粘度が高めだが、熱による乾燥、精製などの過程で、分子量が小さくなり、粘度は低めとなる。製造工程の温度等の条件管理、原料とする褐藻類の選択、製造

工程における分子量の分画などの手法により分子量の異なるアルギン酸類を製造することができる。さらに、異なる分子量あるいは粘度を持つ別ロットのアルギン酸類と混合することにより、目的とする分子量を有するアルギン酸類とすることも可能である。

[0182] 本明細書中で用いられるアルギン酸は、いくつかの態様においては、低エンドトキシン処理されていないアルギン酸であり、又は別のいくつかの態様においては、低エンドトキシン処理されたアルギン酸である。低エンドトキシンとは、実質的に炎症、または発熱を惹起しない程度にまでエンドトキシンレベルが低いことをいう。より好ましくは、低エンドトキシン処理されたアルギン酸類であることが望ましい。

[0183] 低エンドトキシン処理は、公知の方法またはそれに準じる方法によって行うことができる。例えば、ヒアルロン酸ナトリウムを精製する、菅らの方法（例えば、特開平9-324001号公報など参照）、 β 1,3-グルカン（例えば、特開平9-324001号公報など参照）、 β 1,3-グルカン（例えば、特開平8-269102号公報など参照）、アルギネート、ゲランガム等の生体高分子塩を精製する、ウィリアムらの方法（例えば、特表2002-530440号公報など参照）、ポリサッカライドを精製する、ジェームスらの方法（例えば、国際公開第93/13136号パンフレットなど参照）、ルイスらの方法（例えば、米国特許第5589591号明細書など参照）、アルギネートを精製する、ハーマンフランクらの方法（例えば、Appl Microbiol Biotechnol (1994) 40:638-643など参照）等またはこれらに準じる方法によって実施することができる。低エンドトキシン処理は、それらに限らず、洗浄、フィルター（エンドトキシン除去フィルターや帯電したフィルターなど）によるろ過、限外ろ過、カラム（エンドトキシン吸着アフィニティーカラム、ゲルろ過カラム、イオン交換樹脂によるカラムなど）を用いた精製、疎水性物質、樹脂または活性炭などへの吸着、有機溶媒処理（有機溶媒による抽出、有機溶剤添加による析出・沈降など）、界面活性剤処理（例えば、特開2005-036036号公報など参照）など公知の方法によ

って、あるいはこれらを適宜組合せて実施することができる。これらの処理の工程に、遠心分離など公知の方法を適宜組み合わせてもよい。アルギン酸の種類に合わせて適宜選択するのが望ましい。

[0184] エンドトキシンレベルは、公知の方法で確認することができ、例えば、リムルス試薬（LAL）による方法、エンドスピー（登録商標）ES-24Sセット（生化学工業株式会社）を用いる方法などによって測定することができる。

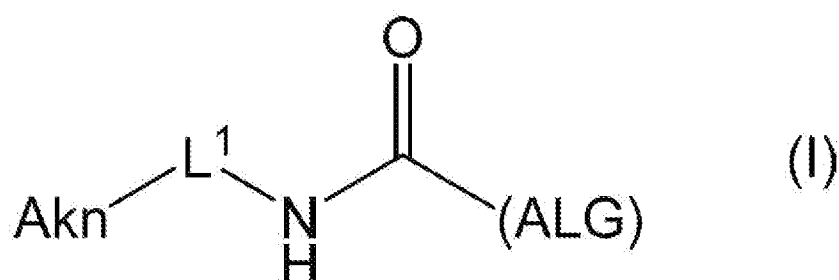
[0185] 用いられるエンドトキシンの処理方法は特に限定されないが、その結果として、アルギン酸類のエンドトキシン含有量が、リムルス試薬（LAL）によるエンドトキシン測定を行った場合に、500エンドトキシン単位（EU）/g以下であることが好ましく、さらに好ましくは、100EU/g以下、とりわけ好ましくは、50EU/g以下、特に好ましくは、30EU/g以下である。低エンドトキシン処理されたアルギン酸ナトリウムは、例えば、Sea Matrix（登録商標）（持田製薬株式会社）、PRONOVATM UPLVG（FMCBioPolymer）など市販品により入手可能である。

[0186] 2. アルギン酸誘導体

本明細書中、新規なアルギン酸誘導体が提供される。本明細書中、アルギン酸誘導体としては、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカーを介して、Huisgen反応における反応性基又は当該反応性基の相補的な反応性基が導入されたものである。

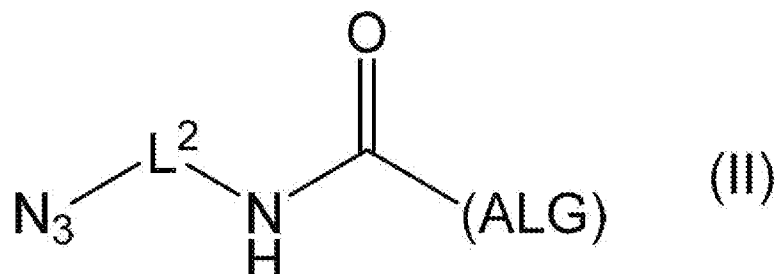
より具体的には、下記式（I）：

[化103]



[式 (I) 中、(ALG)、 $-L^1-$ 、 Akn の定義は、前述の第 1 の態様中の定義と同じである] で表されるアルギン酸誘導体、及び下記式 (II) :

[化104]



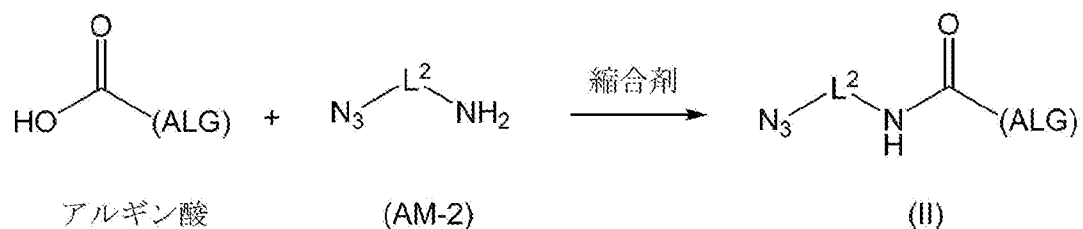
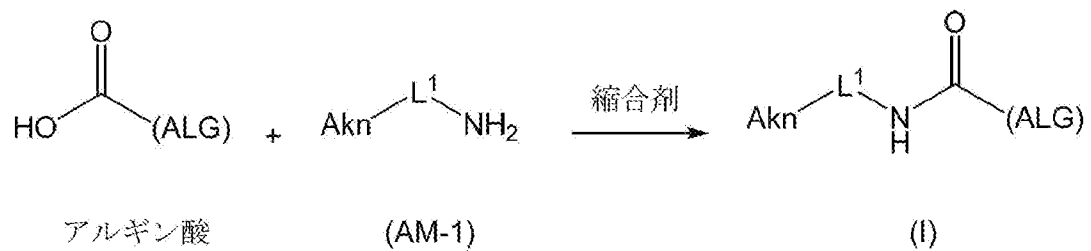
[式 (II) 中、(ALG)、 $-L^2-$ の定義は、前述の第 4 の態様中の定義と同じである] で表されるアルギン酸誘導体である。

[0187] 前記の 2 価のリンカー ($-L^1-$ 又は $-L^2-$) は、反応性基と当該反応性基と相補的な反応性基との反応を阻害しない限り、任意の直鎖状基の使用が可能である。具体的には、直鎖のアルキレン基 ($-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $n=1\sim 30$) (当該基中の $-\text{CH}_2-$ は、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、ベンゼン環、複素環 (ピリジン環、ピペリジン環、ピペラジン環、等の 5～6 員芳香族複素環又は 5～6 員非芳香族複素環)、等の基で複数個 (例えば、1～10 個、又は 1～5 個) 置き換えられても良く、当該 $-\text{CH}_2-$ の水素原子は、オキソ基 ($=\text{O}$)、 C_{1-6} アルキル基 (例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、*iso*-プロピル基、等の基)、ハロゲン原子 (例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、等)、水酸基 ($-\text{OH}$)、等の基から選択される基で複数個 (例えば、1～10 個、又は 1～5 個) 置換されていても良い) が挙げられる。

[0188] 本明細書における新規なアルギン酸誘導体である式 (I) 及び式 (II) で表わされるアルギン酸誘導体は、例えば、下記式の方法 (詳細は、後述の一般的製造方法を参照) により製造することが可能である。

[0189]

[化105]



[0190] 本明細書の式 (I) 又は式 (II) で表わされるアルギン酸誘導体の重量平均分子量は、10万Da～300万Daであり、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは50万Da～200万Daである。当該両アルギン酸誘導体の分子量は、後述する方法により求めることができる。

[0191] 本明細書中、式 (I) の $\text{Akn}-\text{L}^1-\text{NH}-$ 基は、アルギン酸構成単位 of 全てのカルボキシル基に結合している必要はなく、又、式 (II) の $\text{N}_3-\text{L}^2-\text{NH}-$ 基は、アルギン酸構成単位 of 全てのカルボキシル基に結合している必要はない。

[0192] 本明細書中、式 (I) の $\text{Akn}-\text{L}^1-\text{NH}-$ 基を反応性基と言う場合、式 (II) の $\text{N}_3-\text{L}^2-\text{NH}-$ 基が相補的な反応性基となる。又、逆に式 (II) の $\text{N}_3-\text{L}^2-\text{NH}-$ 基を反応性基と言う場合、式 (I) の $\text{Akn}-\text{L}^1-\text{NH}-$ 基が相補的な反応性基となる。

[0193] 本明細書中、反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、各々、0.1%～30%又は1%～30%であり、好ましくは2%～20%であり、より好ましくは3%～10%である。

[0194] 前記反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、アルギン酸類の繰り返し単位であるウロン酸単糖単位のうち、各反応性基が導入されたウロン酸単糖

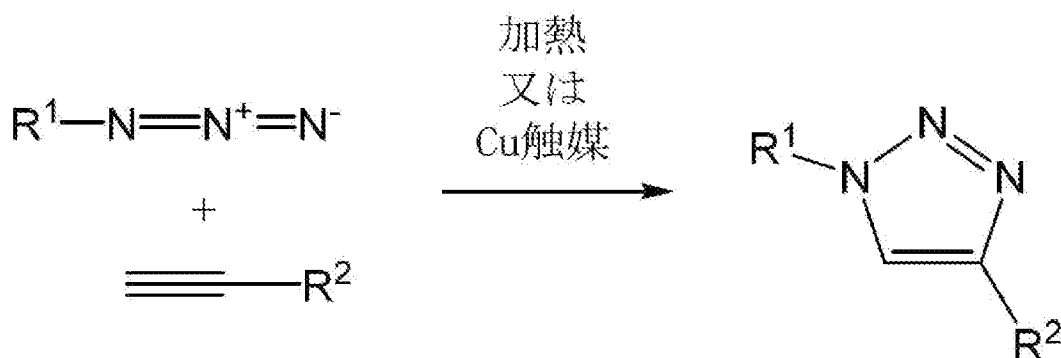
単位の数をも百分率で表した値である。本明細書中、特に断らない限り、アルギン酸誘導体（式（Ⅰ）または式（ⅠⅠ））における反応性基又は相補的な反応性基の導入率に用いられる％は、 $\text{mol}\%$ を意味する。各反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、後述の実施例に記載の方法により求めることができる。

[0195] 本明細書中、式（Ⅰ）中の環状アルキン基（ Ak_n ）及び式（ⅠⅠ）中のアジド基が、Huisgen反応によりトリアゾール環を形成し、これにより架橋が形成される。

[0196] 3. Huisgen反応

Huisgen反応（1, 3-双極子付加環化反応）は、下記式に示される様に末端アジド基及び末端アルキン基を有する化合物間の縮合反応である。反応の結果、二置換1, 2, 3-トリアゾール環が収率良く得られ、余計な副生成物が生じないという特徴を有している。当該反応は、1, 4-又は1, 5-二置換トリアゾール環が生成し得ると考えられるが、銅触媒を用いることで位置選択的にトリアゾール環を得ることが可能である。

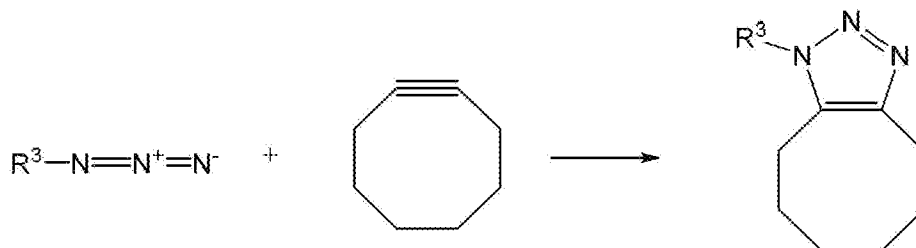
[0197] [化106]



[0198] 又、銅触媒を用いないHuisgen反応がWittigとKrebsにより報告がなされている。即ち、シクロオクチンとフェニルアジドを混合するだけで環化付加体が得られる反応である（下記式中、 R^3 =フェニルである）。本反応は、シクロオクチンの三重結合が大きく歪んでいるため、フェニルアジドとの反応による歪みの解消が駆動力となり、反応が自発的に進行す

ることにより、触媒が不要となった。

[0199] [化107]



[0200] 以上の様に、H u i s g e n 反応は、置換された 1 級アジド、2 級アジド、3 級アジド、芳香族アジド、等を有するアジド化合物、及びアジド基の相補的な反応性基である末端又は環状アルキン基を有する化合物を用いることができる。又、H u i s g e n 反応では、ほぼアジド基及びアルキン基のみが反応することから、反応基質中に種々の官能基（例えば、エステル基、カルボキシル基、アルケニル基、水酸基、アミノ基、等）を置換させることが可能である。

[0201] いくつかの態様では、望ましくない副生成物を生じさせず、銅触媒による細胞毒性を回避させる為に銅触媒を用いずに、短時間、容易に、且つ効率的に 1, 2, 3-トリアゾール環による架橋をアルギン酸分子間に形成させる為に、H u i s g e n 反応のアルキン基としては、例えば、前記態様 [1] に記載した環状アルキン基（シクロオクチル基）を用いる。

[0202] 好ましい態様のアルギン酸誘導体の架橋方法においては、当該反応（H u i s g e n 反応）にて望ましくない副生成物がほとんど形成されない。この場合、アルギン酸を用いた新規な形態の生体適合性材料の作製、及びアルギン酸ヒドロゲルの形成において、種々の生物活性分子を取込むこと、又、再建外科用又は遺伝子療法用のアルギン酸ヒドロゲルにて、細胞物質を取込むことが可能となる。

[0203] 4. 架橋アルギン酸

架橋アルギン酸は、(i) 2 価の金属イオン結合を介したものと、(i i) 化学結合を介したものと、又は (i i i) 2 価の金属イオン結合及び化学

結合の両方を介したものがある。何れの架橋アルギン酸は、ゲル状から半固体、場合によってはスポンジ様の形態を形成する特性を有している。

[0204] 2価の金属イオン結合を介した架橋アルギン酸は、超高速にて反応が進行し、可逆的であるのに対して、化学結合を介した架橋アルギン酸は、比較的温和な条件でゆっくり反応が進行し、非可逆的である。架橋アルギン酸の物性は、例えば、使用する2価金属イオンが含まれる水溶液（例えば、塩化カルシウム水溶液）の濃度、若しくは、アルギン酸に導入された反応性基の導入率を変化させる等の方法で、調整が可能である。

[0205] 前記の架橋反応を利用することで、種々のアルギン酸構造体を作製することが可能となる。例えば、イオン架橋反応により、アルギン酸溶液から瞬時に特定の構造体を作ることができ、当該構造体の構造強化（例えば、長期安定性の獲得、等）の為に、化学結合による架橋反応を利用すること可能である。又、例えば、2価の金属イオン結合及び化学結合の両方を介した架橋アルギン酸構造体において、イオン架橋により取り込まれた2価金属イオンは可逆的に放出されて、化学結合による架橋のみが残った構造体を作ることにも可能である。

なお、好ましい態様のアルギン酸誘導体を用いた架橋アルギン酸構造体は、化学結合による架橋を含むため安定性を有し、アルギン酸ナトリウムを用いたイオン架橋のみの架橋アルギン酸構造体と比較して、形状を長期間維持することができ、有利である。

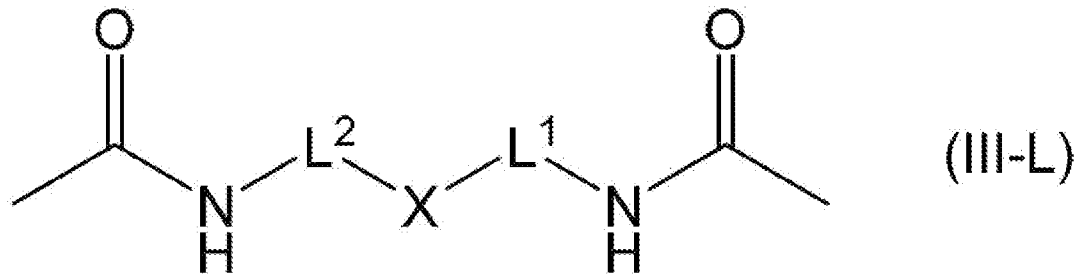
[0206] ある態様の架橋アルギン酸は、前記式（I）及び前記式（II）のアルギン酸誘導体を混合してHuisgen反応を行うことにより、得ることができる。

[0207] ある態様の架橋アルギン酸は、化学架橋（アルキン基及びアジド基から形成されるトリアゾール環による架橋）を介して三次元の網目構造を形成する。好ましいアルギン酸誘導体は、架橋後の架橋アルギン酸の安定性が改善したものである。

[0208] いくつかの態様の架橋アルギン酸は、第1のアルギン酸の任意のカルボキ

シル基と第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基間が下記式（III-L））：

[化108]



〔式（III-L）中、両端の -CONH- 及び -NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $\text{-L}^1\text{-}$ 、 $\text{-L}^2\text{-}$ 、及び X は、前記第7の態様中の定義と同じである〕を介してアミド結合した架橋アルギン酸である。

[0209] いくつかの態様にて、架橋アルギン酸を調製する際の、式（I）のアルギン酸誘導体と、式（II）のアルギン酸誘導体の混合比は、式（I）の誘導体と式（II）誘導体の重量比にて、例えば、 $1 \sim 1.5 : 1$ 、好ましくは、 $1.2 \sim 1.5 : 1$ 、または $1 \sim 1.2 : 1$ 、より好ましくは $1 : 1$ である。

[0210] いくつかの態様にて、架橋アルギン酸を調製する際の、式（II）のアルギン酸誘導体と、式（I）のアルギン酸誘導体の混合比は、式（II）の誘導体と式（I）誘導体の重量比にて、例えば、 $1 \sim 4.0 : 1$ 、好ましくは $1.5 \sim 4.0 : 1$ 、または $1.2 \sim 1.5 : 1$ 、または $1 \sim 1.2 : 1$ 、より好ましくは $1 : 1$ である。

[0211] いくつかの態様にて、架橋アルギン酸を調製する際の、式（I）のアルギン酸誘導体と、式（II）のアルギン酸誘導体の混合比は、より好ましくは式（I）のアルギン酸誘導体と式（II）のアルギン酸誘導体の反応性基の導入率（mol%）比にて、例えば、 $1 \sim 1.5 : 1$ 、好ましくは、 $1.2 \sim 1.5 : 1$ 、または $1 \sim 1.2 : 1$ 、より好ましくは $1 : 1$ である。

[0212] いくつかの態様にて、架橋アルギン酸を調製する際の、式（II）のアル

ギン酸誘導体と、式（１）のアルギン酸誘導体の混合比は、より好ましくは式（１１）のアルギン酸誘導体と式（１）のアルギン酸誘導体の反応性基の導入率（mol%）比にて、例えば、１～４．０：１、好ましくは１．５～４．０：１、または１．２～１．５：１、または１～１．２：１、より好ましくは１：１である。

[0213] 尚、前記混合比において、式（１）のアルギン酸誘導体を式（１１）のアルギン酸誘導体に、式（１１）のアルギン酸誘導体を式（１）の誘導体に、それぞれ置き換えることも可能である。

[0214] 架橋アルギン酸は、アルギン酸の構成単位の全てのカルボキシル基が上記式（１１１－Ｌ）の架橋を有している必要はない。架橋アルギン酸における、上記式（１１１－Ｌ）で表わされる架橋の導入率（架橋率とも言う）は、例えば、０．１～８０％、０．３～６０％、０．５～３０％、または１．０～１０％の範囲である。

[0215] 架橋アルギン酸を得るためのHuisgen反応における式（１）又は式（１１）のアルギン酸誘導体の濃度は、通常１～５００mg/mLであり、好ましくは５～１００mg/mLの範囲である。

[0216] Huisgen反応の反応温度は、通常、外温４～６０℃であり、好ましくは外温１５～４０℃の範囲である。

[0217] 架橋アルギン酸（ヒドロゲル）を形成させる為の攪拌時間は、例えば、数秒～２４時間、数秒～１２時間、数秒～３０分間、又は、数秒～１０分間である。

[0218] Huisgen反応に用いる反応溶媒又は反応溶液は、特に限定はされないが、例えば、水道水、純水（例えば、蒸留水、イオン交換水、RO水、RO-EDI水、等）、超純水、細胞培養用培地、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、及び生理食塩水等が挙げられ、好ましくは超純水である。

[0219] いくつかの態様の架橋アルギン酸は、架橋としてHuisgen反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋、及びカルシウムイオンにより部分的に形成されるイオン架橋を含む、架橋アルギン酸である。

[0220] 5. 架橋アルギン酸構造体

架橋アルギン酸構造体は、前記アルギン酸誘導体に架橋反応を施すことを含む方法により得ることができる。例えば、以下の方法によって調製することが可能だが、これらに限定されるものでない。

[0221] [混和法]

式(1)のアルギン酸誘導体及び式(11)のアルギン酸誘導体を混和して得られるアルギン酸誘導体の混合溶液を、2価金属イオンを含む溶液中に滴下することで、化学架橋(Huisgen反応によりアルキン基及びアジド基から形成されるトリアゾール環による架橋)及びイオン架橋(2価金属イオンにより部分的に形成される架橋)が形成された、特定の構造体である、架橋アルギン酸構造体を得ることができる。

[0222] [コーティング法]

式(1)のアルギン酸誘導体を含む溶液を、2価金属イオンを含む溶液中に滴下する等して部分的に架橋された特定の構造体を得られる。前記で得られた、例えばゲル等の構造体を、前述の式(11)のアルギン酸誘導体を含む溶液に添加することにより、前記構造体の表面等にさらなる架橋反応(Huisgen反応)を施すことにより、架橋アルギン酸構造体を得ることができる。尚、この方法は、式(1)のアルギン酸誘導体を式(11)のアルギン酸誘導体に、式(11)のアルギン酸誘導体を式(1)のアルギン酸誘導体に、それぞれ置き換えて実施することも可能である。

[0223] 前記方法にて用いる2価金属イオンとしては、特に限定されないが、例えば、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオン、亜鉛イオン等が挙げられ、好ましくはカルシウムイオンである。

[0224] 前記方法にて用いるカルシウムイオンを含む溶液としては、特に限定されないが、例えば、塩化カルシウム水溶液、炭酸カルシウム水溶液、グルコン酸カルシウム水溶液、等の水溶液が挙げられ、好ましくは塩化カルシウム水溶液である。

[0225] 前記方法にて用いるカルシウムイオンを含む溶液のカルシウムイオン濃度は、特に限定されないが、例えば、1 mM～1 Mが挙げられ、好ましくは、5 mM～500 mMであり、より好ましくは、10 mM～300 mMである。

[0226] 前記方法にて用いる溶媒または溶液も特に限定されないが、例えば、水道水、純水（例えば、蒸留水、イオン交換水、RO水、RO-EDI水、等）、超純水、細胞培養用培地、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、及び生理食塩水等が挙げられ、好ましくは超純水である。

[0227] 特定の架橋アルギン酸構造体としては、例えば、繊維状構造体、ファイバー、ビーズ、ゲル、略球形のゲル、等が挙げられる。好ましい架橋アルギン酸構造体は、安定性が改善したものである。又、架橋アルギン酸構造体は、その内部に内容物を保持する能力（内容物保持性）を有していてもよい。

[0228] アルギン酸ゲルの物性は、硬さ、弾性、反発力、断裂力、破断時応力、等の物性値により調節することが可能である。

[0229] 6. アルギン酸誘導体、光架橋アルギン酸誘導体の生体適合性

本明細書において、アルギン酸誘導体、又は光架橋アルギン酸構造体は、生体適合性を有する。本明細書において、生体適合性とは、生体用材料（ここでは、式（1）で表わされる光反応性基が導入されたアルギン酸誘導体、及び当該アルギン酸誘導体を用いて製造された光架橋アルギン酸構造体のことを言う）と生体間の相互作用、前記生体用材料に隣接する組織の局所的反応、又は全身的反応等の反応を引き起こさない性質を、生体適合性（*biocompatibility*）を有するという。

[0230] 本明細書において、アルギン酸誘導体、又は光架橋アルギン酸構造体の生体適合性に関しては、後述する生体適合性に関する実施例にて確認する。

[0231] 7. 架橋アルギン酸構造体の安定性

架橋アルギン酸構造体の安定性は、例えば、ゲル安定性を測定すること、透過性はゲル透過率を測定することなどで確認することができる。

[0232] [ゲル安定性の測定法]

容器に入れた架橋アルギン酸構造体ゲルにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を添加し、PBS中に漏出したアルギン酸の濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を測定する。測定したアルギン酸濃度を、架橋アルギン酸構造体ゲルを分解することで得た全アルギン酸濃度で除した値を百分率で示した値を、崩壊率とする。ゲル安定性は、具体的には、後述の実施例に記載の方法により求めることができる。

[0233] 本明細書中、架橋アルギン酸構造体のゲル崩壊率は、好ましくは0%～90%であり、より好ましくは0%～70%であり、更に好ましくは0%～50%である。架橋アルギン酸構造体の安定性は、水溶液中に漏出するアルギン酸の濃度が低いほど、すなわちゲル崩壊率が低いほど、安定性が高いことを意味する。

[0234] [ゲル透過率の測定法]

フルオレセインイソチオシアネートデキストランを内包した架橋アルギン酸構造体ゲルを作製し、容器に入れた前記ゲルに生理食塩水を添加し、生理食塩水中に漏出したデキストラン濃度を測定する。測定したデキストランの濃度を、フルオレセインイソチオシアネートデキストラン内包架橋アルギン酸構造体ゲルを分解することで得た全デキストラン濃度で除した値を百分率で示した値がゲル透過率である。ゲル透過率は、具体的には、後述の実施例に記載の方法により求めることができる。

[0235] 架橋アルギン酸の生理食塩水添加24時間後のゲル透過率は、例えば、分子量200万のデキストランを内包した場合、好ましくは0%～90%であり、より好ましくは0%～70%であり、更に好ましくは0%～50%である。又、分子量15万のデキストランを内包した場合、例えば、当該架橋アルギン酸構造体ゲルの使用目的がたんぱく質や抗体の放出・産生であるならば、好ましくは1%～100%であり、より好ましくは10%～100%であり、更に好ましくは30%～100%である。又、使用目的が免疫隔壁であるならば、好ましくは0%～90%であり、より好ましくは0%～70%であり、更に好ましくは0%～50%である。

[0236] 架橋アルギン酸構造体の透過性は、透過率が低いほど、内容物やゲル外物質の透過性が低いことを意味し、透過率が高いほど、内容物やゲル外物質の透過性が高いことを意味する。

[0237] ゲルの透過率は、使用するアルギン酸の分子量、濃度、アルギン酸に導入する架橋基の種類や導入率、ゲル化に用いる2価金属イオンの種類や濃度、またはこれらの組み合わせによって調整することが可能である。

[0238] [内容物が内包した架橋アルギン酸構造体ゲルの調製方法]

例えば、内容物としてフルオレセインイソチオシアナートーデキストランを内包した架橋アルギン酸構造体ゲルは以下の方法にて調製できる。

[0239] (1) 式(1)で表わされるアルギン酸誘導体の溶液とフルオレセインイソチオシアナートーデキストラン溶液を混和する。

(2) (1)で得られた混合溶液に、式(11)で表わされるアルギン酸誘導体の溶液を混和する。

((1)の式(1)を式(11)に変更する場合、(2)の式(11)は式(1)に変更することになる)

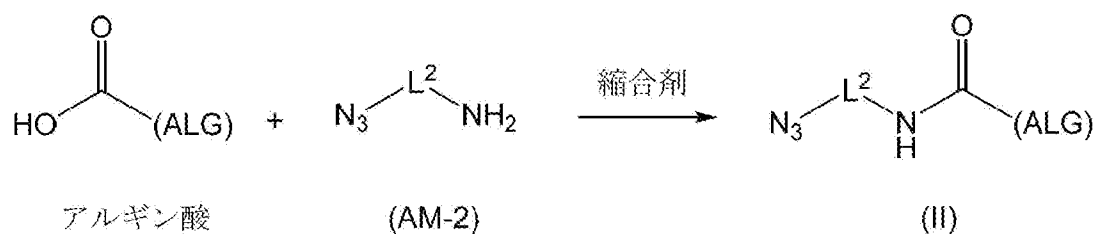
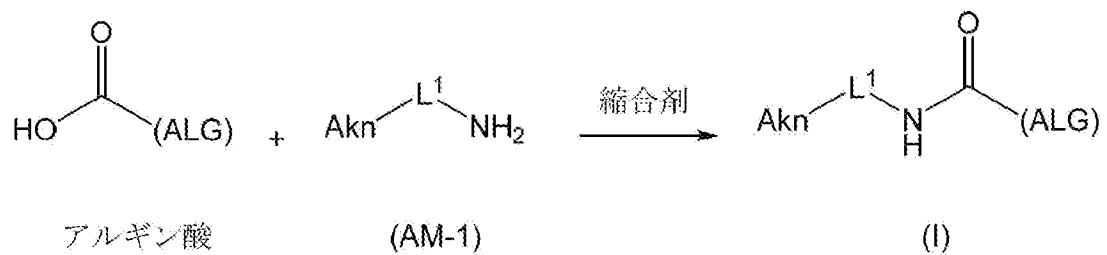
(3) (2)で得られた混合溶液を、カルシウムイオンを含む溶液中に滴下し得られたゲルが、溶液中で、化学架橋及びイオン架橋を形成することにより、フルオレセインイソチオシアナートーデキストラン内包の架橋アルギン酸構造体ゲルが得られる。

[0240] 8. アルギン酸誘導体の合成方法

本明細書において、式(1)又は式(11)で表わされるアルギン酸誘導体は、各々、 H_2N-L^1-Akn (式中、 L^1 及び Akn は、前記態様[1]中の定義と同じである)で表わされるアミン誘導体(AM-1)、又は、 $H_2N-L^2-N_3$ (式中、 L^2 は、前記態様[4]中の定義と同じである)で表わされるアミン誘導体(AM-2)を、アルギン酸類の任意のカルボキシル基とを、縮合剤を用いる縮合反応により製造することができる。

[0241]

[化109]



[0242] [式 (I) のアルギン酸誘導体の製法]

0.5重量%～1重量%のアルギン酸水溶液及び式 (AM-1) で表わされるアミンを用いて、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版 16、有機化合物の合成Ⅴ、カルボン酸および誘導体、エステル類、p 35-70、酸アミドおよび酸イミド、p 118-154、アミノ酸・ペプチド、p 258-283、2007年、丸善』等に記載された方法に準じて、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (WSC・HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェイト (BOP試薬)、ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル) ホスフィニククロリド (BOP-Cl)、2-クロロ-1, 3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェイト (ClP)、又は4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM)、等から選択される縮合剤の存在下、アルギン酸が析出しない程度の、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン等のエーテル系溶媒、メタノール、エタノール、2-プロパノール、等のアルコール系溶媒、N, N-ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等から選択される溶媒と水との混合溶媒中、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナ

トリウム等の無機塩基、又はトリエチルアミン、ピリジン等の有機塩基の存在下又は非存在下にて、0℃から50℃間の温度で縮合反応を行うことにより、式(1)のアルギン酸誘導体を製造することができる。

[0243] [式(11)のアルギン酸誘導体の製法]

0.5重量%~1重量%のアルギン酸水溶液及び式(AM-2)で表わされるアミンを用いて、前述の[式(1)のアルギン酸誘導体の製法]に準じて反応をおこなうことにより、式(11)のアルギン酸誘導体を製造することができる。

[0244] 前記、式(1)のアルギン酸誘導体又は式(11)のアルギン酸誘導体の製法において、式(AM-1)又は式(AM-2)のアミンの導入率は、当該アミンの性質等を考慮することで、下記(i)~(v)等の反応条件を適宜選択して組み合わせることにより調節が可能になる。(i)縮合剤の等量の増減、(ii)反応温度の上昇・下降、(iii)反応時間の延長・短縮、(iv)反応基質のアルギン酸の濃度の調整、(v)式(AM-1)又は式(AM-2)のアミンの溶解度を上げる為に水に混和する有機溶媒を添加する、等。

[0245] 以下に、式(AM-1)又は式(AM-2)で表わされるアミンのうち、より具体的なアミンの製造方法を示す。

[0246] 尚、以下の各製造方法中、R^A=メチル基、エチル基、等のC_{1~6}アルキル基であり；P¹は-C(O)O-tertBu基、-C(O)O-Bn基、-C(O)CH₃基、-C(O)CF₃基、等から選択されるアミノ基の保護基であり；P²は-C(O)O-tertBu基、-C(O)O-Bn基、-C(O)CH₃基、-C(O)CF₃基、-SO₂Ph、-SO₂PhMe基、-SO₂Ph(NO₂)基、等から選択されるアミノ基の保護基であり；E=ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、等)、-OTs基、-OMs基、等の脱離基である。

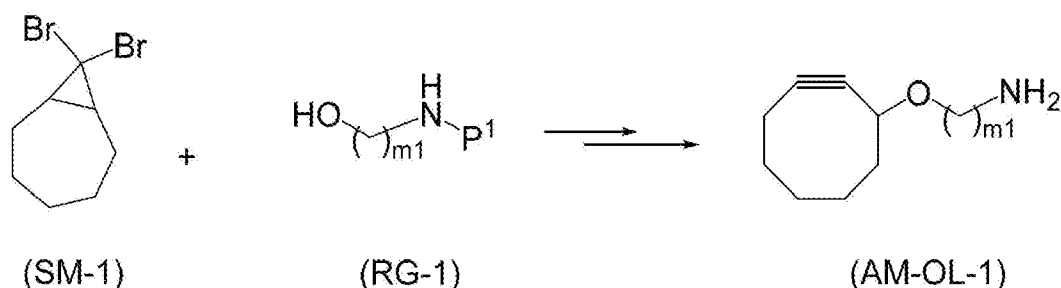
[0247] 又、以下の各製造方法中、保護基P¹及びP²の保護・脱保護は、文献公知の方法、例えば、『プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シ

ンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis 4th Edition) 第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons)、グリーン (Greene) ら』の成書に記載された脱保護の方法に準じて、保護・脱保護を行うことができる。

[0248] [製造方法A]

式 (AM-OL-1) で表されるアミンの製造方法：

[化110]

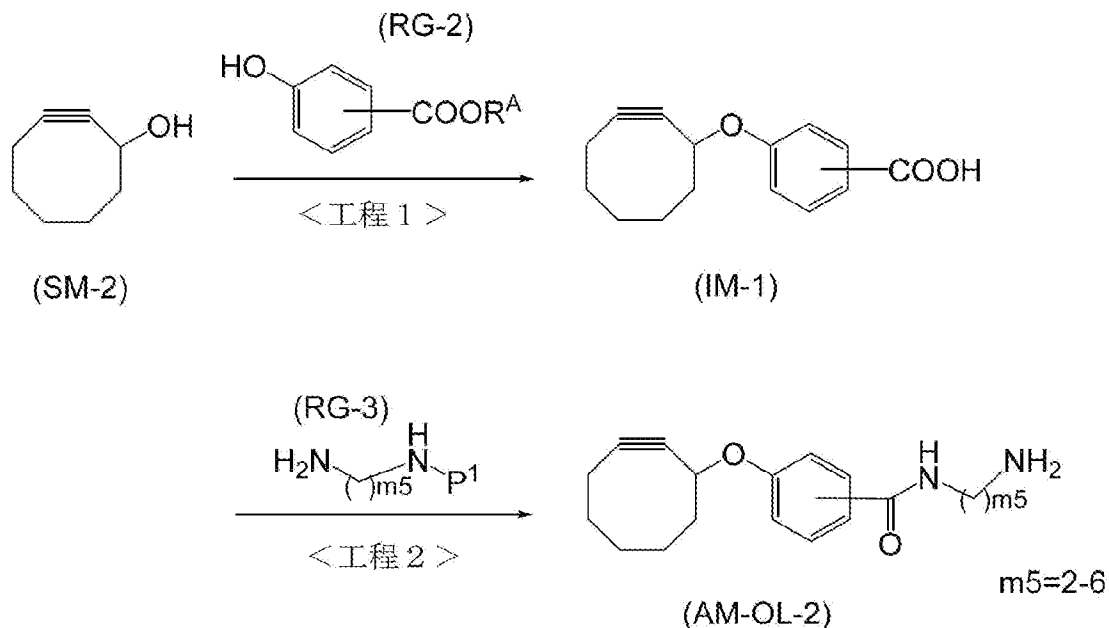


[0249] 式 (SM-1) の化合物 [式 (SM-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] 及び式 (RG-1) の化合物 [式 (RG-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m1 = 2 \sim 6$ の整数である] を用いて、文献公知の方法、例えば、『Carbohydrate Polymers、169、p332-340、2017年』等に記載された方法に準じて、(i) AgO_3SCF_3 存在下、トルエン等の反応に関与しない溶媒中 (RG-1) を置換させ、続いて (ii) DBU を用いて脱臭素化反応を行うことでアルキン基を形成し、更に (iii) 保護基 P^1 を脱保護することにより式 (AM-OL-1) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-OL-1) の塩として製造することができる。

[0250] [製造方法B]

式 (AM-OL-2) で表されるアミンの製造方法：

[化111]



[0251] <工程 1>

式 (SM-2) の化合物 [式 (SM-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] 及び式 (RG-2) [式 (RG-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『European Journal of Organic Chemistry, 2014 (6), p1280-1286; 2014年』等に記載された方法に準じて、(i) PPh_3 、及び $\text{N}_2(\text{C}_2\text{O}_2\text{CHMe}_2)_2$ の試薬存在下、テトラヒドロフラン等の反応に関与しない溶媒中、光延反応を行い、続いて (ii) 水酸化ナトリウム等の塩基存在下、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、水等の反応に関与しない溶媒若しくはそれらの混合溶媒中、加水分解を行うことにより式 (IM-1) で表される化合物を製造することができる。

[0252] <工程 2>

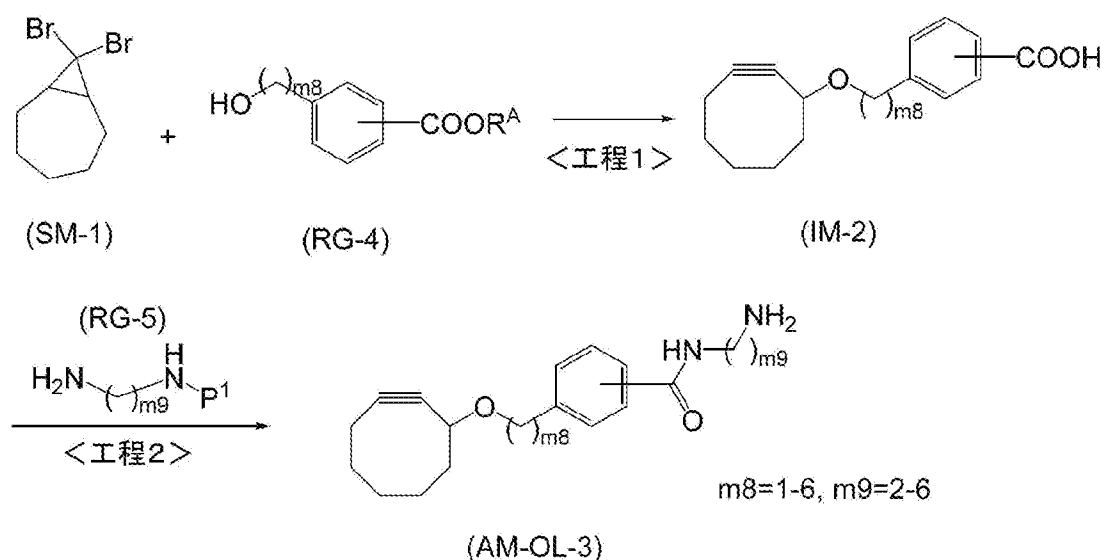
[製造方法 B] <工程 1>により得られる式 (IM-1) の化合物及び式 (RG-3) [式 (RG-3) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文

献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m5 = 2 \sim 6$ の整数である]の化合物を用いて、(iii) 前記[式(1)のアルギン酸誘導体の製法]と同様な縮合反応を行い、続いて(iv) 保護基 P^1 を脱保護することにより式(AM-OL-2)で表されるアミン化合物、又は式(AM-OL-2)の塩として製造することができる。

[0253] [製造方法C]

式(AM-OL-3)で表されるアミンの製造方法：

[化112]



[0254] <工程1>

式(SM-1)の化合物及び式(RG-4)の化合物[式(RG-4)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m8 = 1 \sim 6$ の整数である]を用いて、文献公知の方法、例えば、『Journal of the American Chemical Society, 126(46)、p15046-15047、2004年』等に記載された方法に準じて、(i) $AgClO_4$ 存在下、トルエン等の反応に関与しない溶媒中、式(RG-4)の化合物を置換させ、続いて(ii) $NaOMe$ を用いて脱臭素化反応を行うことによりアルキン基を形成し、(iii) 水酸化リチウム、水酸化ナトリウム等の塩基存在下、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、水等の反応に関与しない溶媒

若しくはそれらの混合溶媒中、加水分解を行うことにより式（IM-2）で表される化合物を製造することができる。

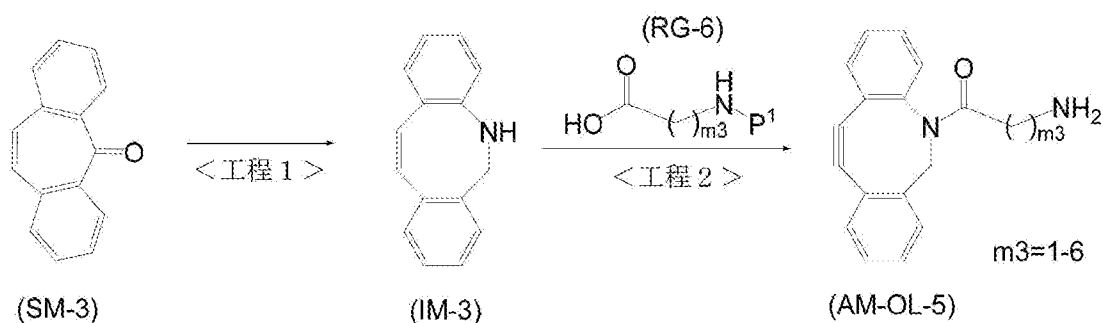
[0255] <工程 2>

〔製造方法C〕<工程 1>により得られる式（IM-2）の化合物及び式（RG-5）の化合物〔式（RG-5）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m_9 = 2 \sim 6$ の整数である〕を用いて、前記〔式（I）のアルギン酸誘導体の製法〕と同様な縮合反応を行い、続いて保護基 P^1 を脱保護することにより式（AM-OL-3）で表されるアミン化合物、又は式（AM-OL-3）の塩として製造することができる。

[0256] 〔製造方法D〕

式（AM-OL-5）で表されるアミンの製造方法：

[化113]



[0257] <工程 1>

式（SM-3）の化合物〔式（SM-3）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり〕を用いて、文献公知の方法、例えば、『Faming Zhuanli Shenqing, 104529898, 22 Apr 2015年』等に記載された方法に準じて、（i）ピリジン等の塩基存在下、エタノール等の反応に関与しない溶媒中、 $H_2NOH-HCl$ を反応させオキシムを形成させ、続いて（ii） P_2O_5 、メタンスルホン酸中、五酸化ニリンを反応させ、ベックマン転移を行うことにより8員環ラクタムを形成させる、続いて（iii）

ジエチルエーテル等の反応に関与しない溶媒中、 BH_3 、 LiAlH_4 等の還元剤を用いてアミド基の還元を行くことにより、式(1M-3)で表される化合物を製造することができる。

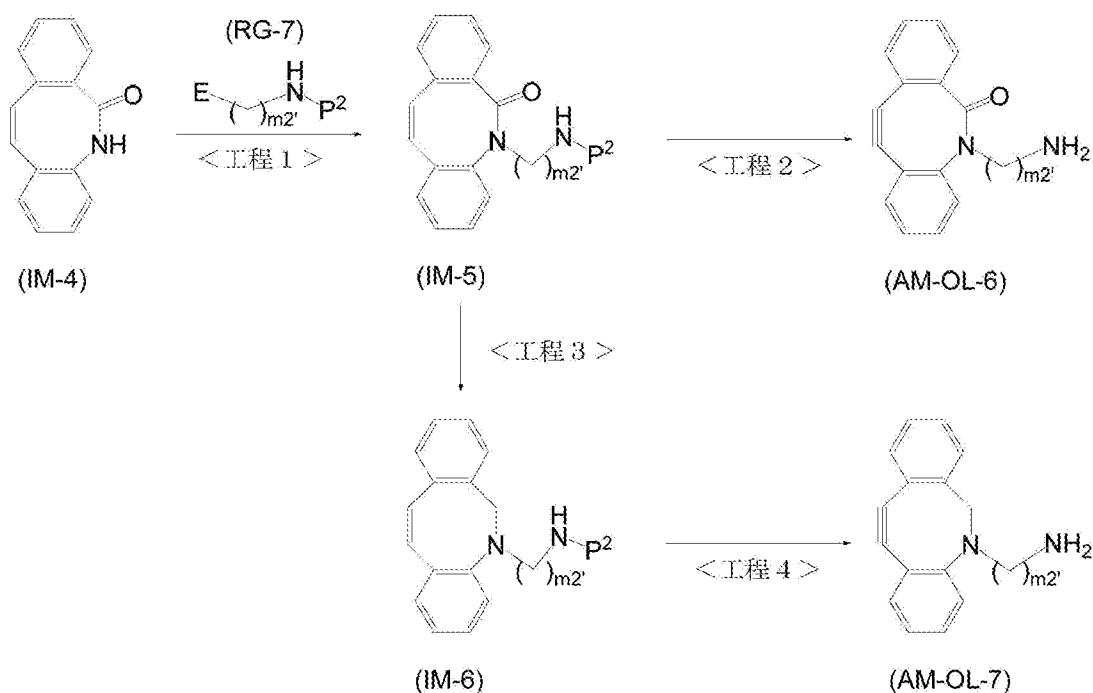
[0258] <工程2>

[製造方法D] <工程1>により得られる式(1M-3)及び式(RG-6) [式(RG-6)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m_3 = 1 \sim 6$ の整数である]の化合物を用いて、(iv)前記[式(1)のアルギン酸誘導体の製法]と同様な縮合反応を行い縮合体が得られる、続いて(v)臭素を付加させて後、 tert-BuOK を用いて脱臭素化反応を行うことによりアルキン基を形成し、続いて(vi)保護基 P^1 を脱保護することにより式(AM-OL-5)で表されるアミン化合物、又は式(AM-OL-5)の塩として製造することができる。

[0259] [製造方法E]

式(AM-OL-6)及び式(AM-OL-7)で表されるアミンの製造方法：

[化114]



[0260] <工程 1>

[製造方法 D] <工程 1>の (i i) で得られる式 (IM-4) の化合物及び式 (RG-7) の化合物 [式 (RG-7) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $m2' = 2 \sim 6$ の整数である] を用いて、文献公知の方法、例えば、『*Synthesis*、46 (5)、p 669-677、2014 年』等に記載された方法に準じて、水酸化ナトリウム等の塩基及びテトラブチルアンモニウムブロマイド等の相間移動触媒の存在下、トルエン等の反応に関与しない溶媒中で、反応することにより式 (IM-5) で表される化合物を製造することができる。

[0261] <工程 2>

[製造方法 E] <工程 1>で得られる式 (IM-5) の化合物に、臭素を付加させて後、*tert*-BuOK 等の塩基を用いて脱臭素化反応を行うことによりアルキン基を形成し、続いて保護基 P^2 を脱保護することにより式 (AM-OL-6) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-OL-6) の塩として製造することができる。

[0262] <工程 3>

[製造方法 E] <工程 1>で得られる式 (IM-5) の化合物を用いて、[製造方法 D] <工程 1>の (i i i) の還元法に準じて反応を行うことで、式 (IM-6) の化合物を製造することができる。

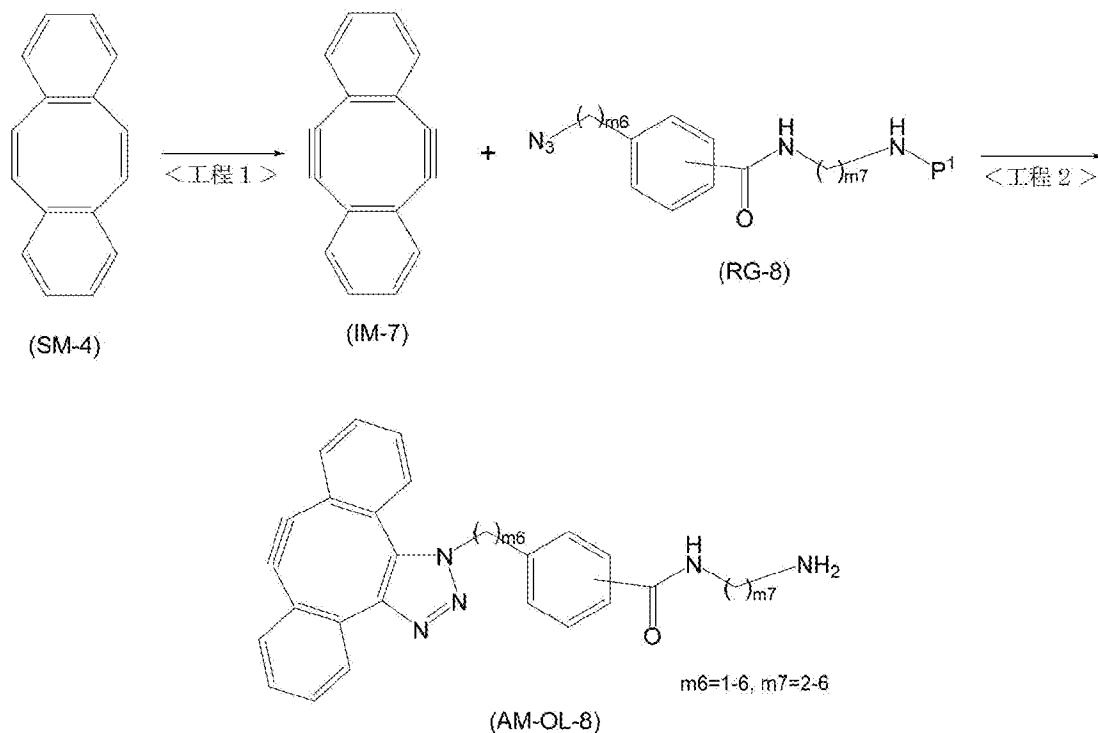
[0263] <工程 4>

[製造方法 E] <工程 3>で得られる式 (IM-6) の化合物を用いて [製造方法 E] <工程 2>と同様に反応を行うことにより式 (AM-OL-7) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-OL-7) の塩として製造することができる。

[0264] [製造方法 F]

式 (AM-OL-8) で表されるアミンの製造方法：

[化115]



[0265] <工程 1>

式 (SM-4) の化合物 [式 (SM-4) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり] を用いて、文献公知の方法、例えば、『Synthesis, (9), p1191-1194; 2002年』等に記載された方法に準じて、臭素を付加させた後、tert-BuOKを用いて脱臭素化反応を行うことによりアルキン基を形成することで、式 (IM-7) で表される化合物を製造することができる。

[0266] <工程 2>

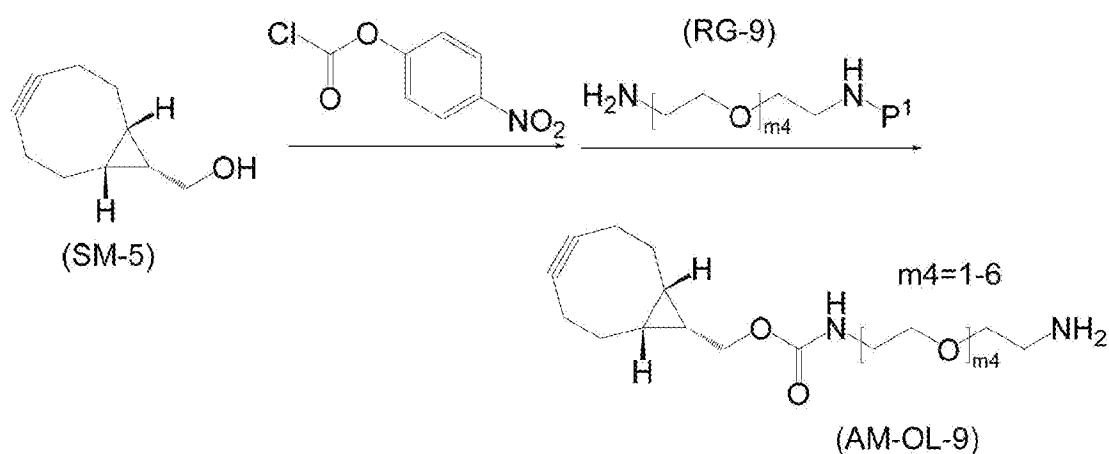
[製造方法F] <工程 1>で得られる式 (IM-7) の化合物及び式 (RG-8) の化合物 [式 (RG-8) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり (詳細は後述の製造方法Hを参照); $m_6=1\sim6$ の整数であり; $m_7=2\sim6$ の整数である] を用いて、文献公知の方法、例えば、『Journal. American. Chemical. Society., 126, p15046-15047

、2004年』又は『Chem. Ber., 94, p3260-3275、1961年』等に記載された方法に準じて、Huisgen反応を行い、続いて保護基P¹を脱保護することにより式(AM-OL-8)で表されるアミン化合物、又は式(AM-OL-8)の塩として製造することができる。

[0267] [製造方法G]

式(AM-OL-9)で表されるアミンの製造方法：

[化116]

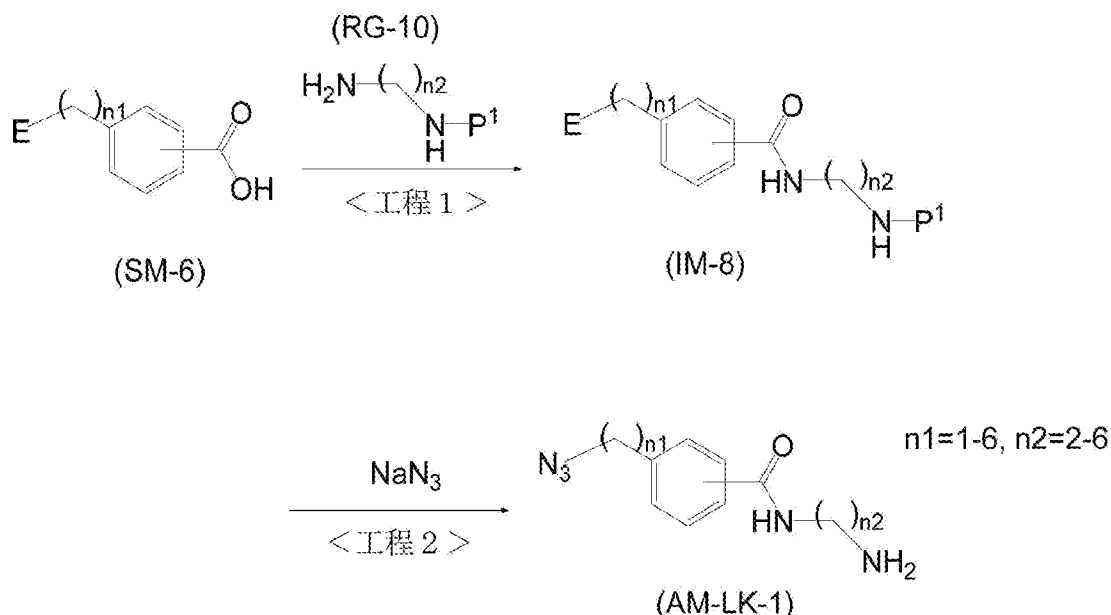


[0268] 式(SM-5)の化合物[式(SM-5)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり]を用いて、文献公知の方法、例えば、『米国特許出願公開2013-0137861号明細書』等に記載された方法に準じて、ジクロロメタン等の反応に関与しない溶媒中で、ピリジン等の塩基存在下／非存在下、クロロギ酸p-ニトロフェニルを反応させることでカーボネート体を得られる。続いて、トリエチルアミン存在下、N、N-ジメチルホルムアミド溶媒中、式(RG-9)の化合物[式(RG-9)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり；m₄=1～6の整数である]を反応させることでカルバモイル体を得られる。更に、保護基P¹を脱保護することにより式(AM-OL-9)で表されるアミン化合物、又は式(AM-OL-9)の塩として製造することができる。

[0269] [製造方法H]

式 (AM-LK-1) で表されるアミンの製造方法 [式 (AM-LK-1) のうち、 $n_1 = 1$, $n_2 = 3$ の p 置換アミンは、国際公開第 2016/152980 号パンフレット等に記載された方法に準じて、製造することもできる。] :

[化117]



[0270] <工程 1>

式 (SM-6) の化合物 [式 (SM-6) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n_1 = 1 \sim 6$ の整数である] 及び式 (RG-10) の化合物 [式 (RG-10) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n_2 = 2 \sim 6$ の整数である] を用いて、前記 [式 (I) のアルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-8) を製造することができる。

[0271] <工程 2>

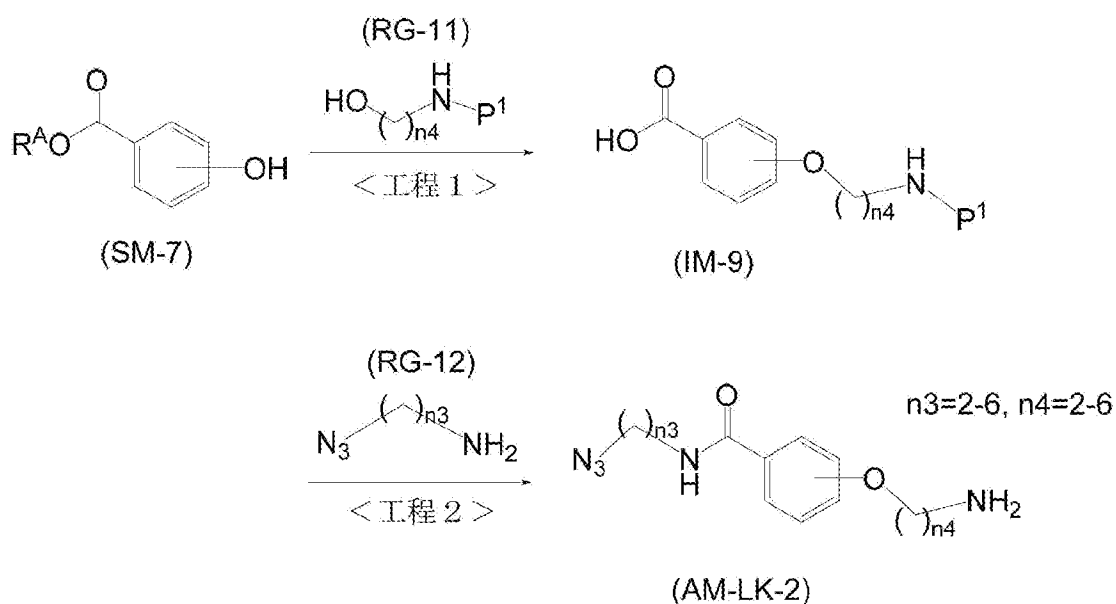
[製造方法 H] <工程 1> で得られる式 (IM-8) の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『Organometallics, 29 (23), p 6619-6622; 2010 年』等に記載された方法に準じて、ジメチルスルホキシド等の反応に関与しない溶媒中、 NaN_3 を反応させアジド

基を導入した後、保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-LK-1) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-LK-1) の塩として製造することができる。

[0272] [製造方法 J]

式 (AM-LK-2) で表されるアミンの製造方法：

[化118]



[0273] <工程 1>

式 (SM-7) の化合物 [式 (SM-7) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] 及び式 (RG-11) の化合物 [式 (RG-11) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり；n₄=2~6の整数である] を用いて、[製造方法 B] <工程 1> に準じる光延反応を行い、続いて水酸化ナトリウム等の塩基存在下、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、水等の反応に関与しない溶媒若しくはそれらの混合溶媒中、エステル基の加水分解を行うことにより、式 (IM-9) で表される化合物を製造することができる。

[0274] <工程 2>

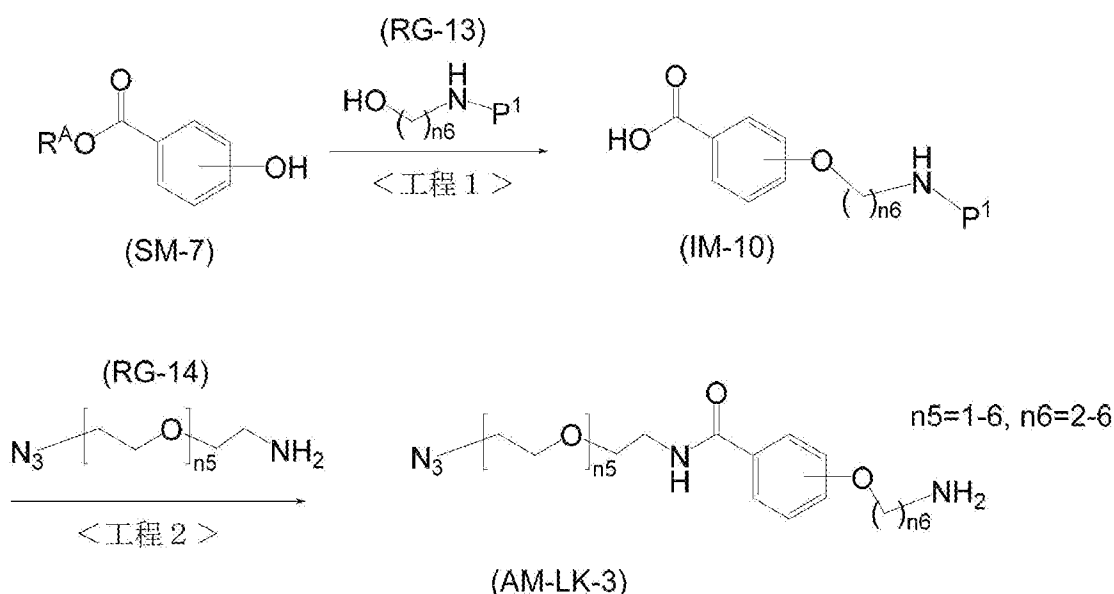
[製造方法 J] <工程 1> で得られる式 (IM-9) の化合物及び式 (R

G-12) [式(RG-12)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり; $n3 = 2 \sim 6$ の整数である]の化合物を用いて、前記[式(1)のアルギン酸誘導体の製法]と同様な縮合反応を行うことにより縮合体が得られ、続いて保護基P¹を脱保護することにより式(AM-LK-2)で表されるアミン化合物、又は式(AM-LK-2)の塩として製造することができる。

[0275] [製造方法K]

式(AM-LK-3)で表されるアミンの製造方法:

[化119]



[0276] <工程 1>

[製造方法J] <工程 1>の式(SM-7)の化合物及び式(RG-13)の化合物[式(RG-13)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり; $n6 = 2 \sim 6$ の整数である]を用いて、[製造方法B] <工程 1>に準じる光延反応を行い、続いて水酸化ナトリウム等の塩基存在下、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、水等の反応に関与しない溶媒若しくはそれらの混合溶媒中、エステル基の加水分解を行うことにより、式(IM-10)で表される化合物を製造することができる。

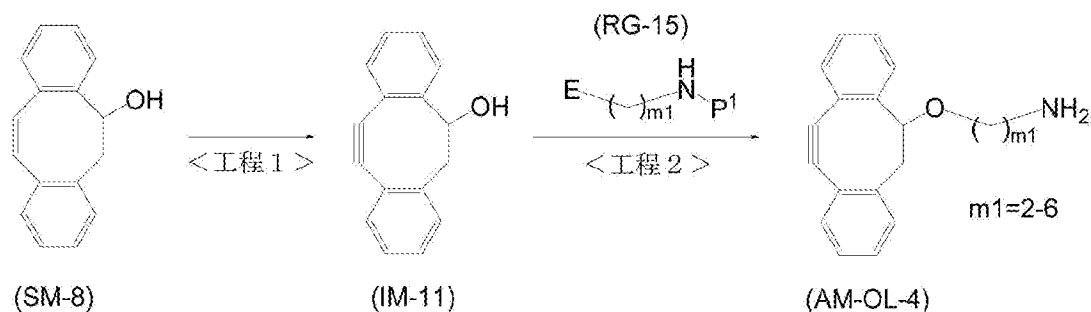
[0277] <工程 2>

〔製造方法 K〕 <工程 1> で得られる式 (IM-10) の化合物及び式 (RG-14) [式 (RG-14) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n5 = 1 \sim 6$ の整数である] の化合物を用いて、前記 [式 (I) のアルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行うことにより縮合体が得られ、続いて保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-LK-3) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-LK-3) の塩として製造することができる。

[0278] [製造方法 L]

式 (AM-OL-4) で表されるアミンの製造方法 :

[化120]



[0279] <工程 1>

式 (SM-8) の化合物 [式 (SM-8) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり] を用いて、文献公知の方法、例えば、『国際公開第 2009/067663 号パンフレット』等に記載された方法に準じて、臭素を付加させて後、LiN(i-Pr)₂ を用いて脱臭素化を行うことで式 (IM-11) の化合物を製造することができる。

[0280] <工程 2>

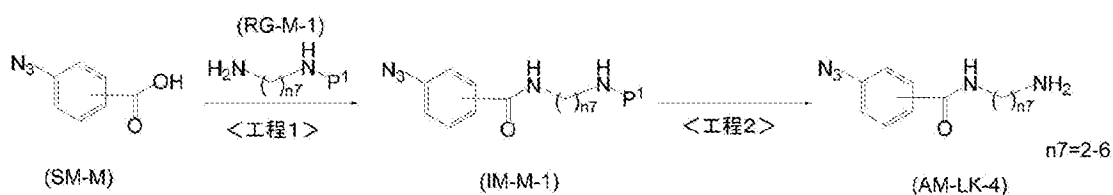
〔製造方法 L〕 <工程 1> で得られる式 (IM-11) の化合物及び式 (RG-15) で表わされる化合物 [式 (RG-15) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; m

1 = 2 ~ 6 の整数である] を用いて、水素化ナトリウム等の塩基存在下、テトラヒドロフラン等の反応に関与しない溶媒中で反応させることで、側鎖が導入された化合物が得られる。続いて保護基 P¹ を脱保護することにより、式 (AM-O L-4) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-O L-4) の塩として製造することができる。

[0281] [製造方法M]

式 (AM-L K-4) で表されるアミンの製造方法：

[化121]



[0282] <工程1>

式 (SM-M) の化合物及び式 (RG-M-1) の化合物 [式 (SM-M) の化合物及び式 (RG-M-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり；n7 = 2 ~ 6 の整数である] を用いて、前記 [式 (I) のアルギニン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-M-1) で表わされる化合物を製造することができる。

[0283] また、式 (SM-M) で表されるカルボン酸を、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版 16、カルボン酸および誘導体、酸ハロゲン化物、酸無水物、99-118頁、2007年、丸善』、等に記載された方法に準じて、酸ハロゲン化物や酸無水物に変換し、式 (RG-M-1) の化合物を用いて、トリエチルアミン、ピリジン等の塩基の存在下、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、トルエン、ベンゼン等の芳香族炭化水素系溶媒、N, N-ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等から選択される溶媒中、0℃から溶媒が還流する温度で反応させることにより、式 (IM-M-1) の化

合物を同様に製造することができる。

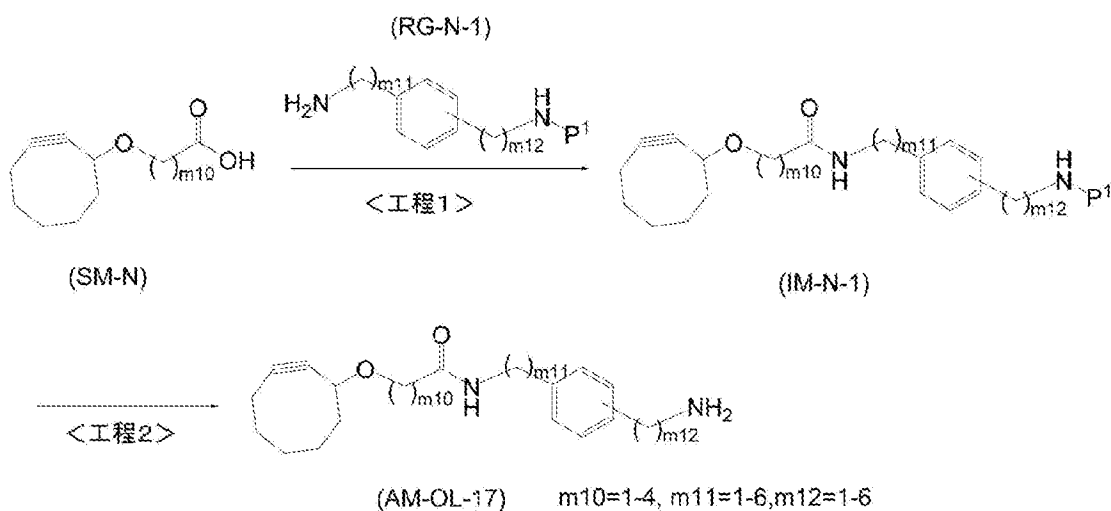
<工程 2>

〔製造方法M〕 <工程 1>で得られる式 (IM-M-1) の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『グリーン (Greene) らの『プロテクトィブ・グループス・イン・オルガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis) 第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons)』の成書に記載の方法により、保護基の種類により適宜脱保護法を選択して反応を行うことで、式 (AM-LK-4) で表わされる化合物、又は式 (AM-LK-4) の塩として製造することができる。

[0284] 〔製造方法N〕

式 (AM-OL-17) で表されるアミンの製造方法：

[化122]



[0285] <工程 1>

式 (SM-N) の化合物及び式 (RG-N-1) の化合物〔式 (SM-N) の化合物及び式 (RG-N-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m_{10}=1\sim 4$ 、 $m_{11}=1\sim 6$ 、 $m_{12}=1\sim 6$ の整数である〕を用いて、前記〔製造方法M〕<工程 1>と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-N-1) で表わ

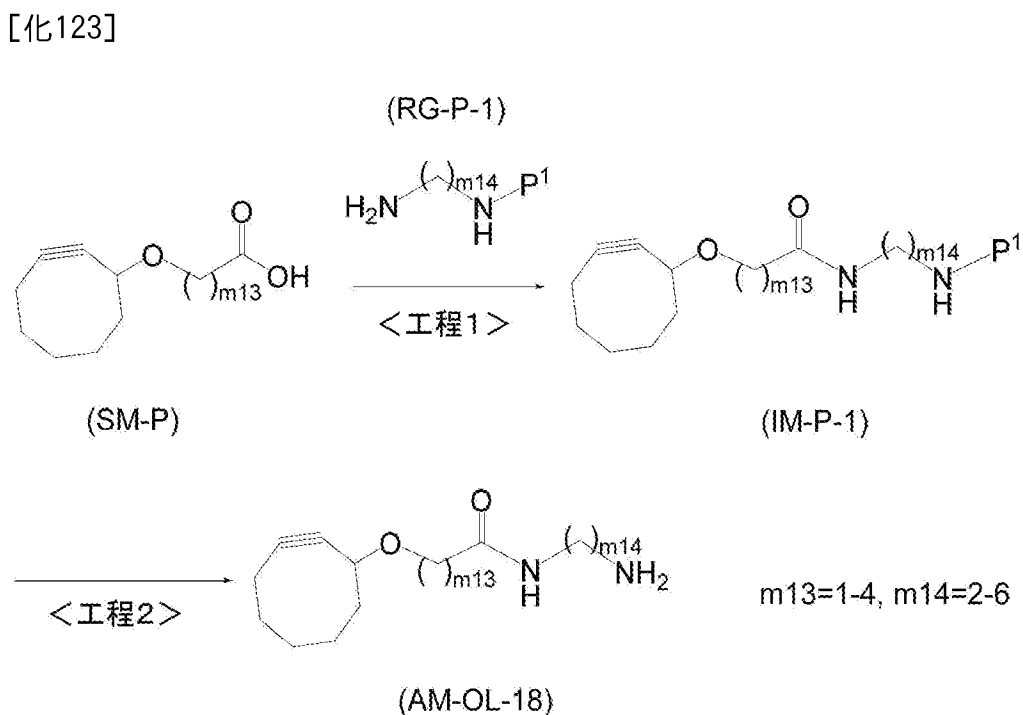
される化合物を製造することができる。

[0286] <工程 2>

[製造方法 N] <工程 1>で得られる式 (IM-N-1) の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『グリーン (Greene) らの『プロテクトィブ・グループス・イン・オルガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis) 第 4 版、2007 年、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons)』の成書に記載の方法により、保護基の種類により適宜脱保護法を選択して反応を行うことで、式 (AM-OL-17) で表わされる化合物、又は式 (AM-OL-17) の塩として製造することができる。

[0287] [製造方法 P]

式 (AM-OL-18) で表されるアミンの製造方法 [式 (AM-OL-18) のうち、 $m13=1$ 、 $m14=2$ のアミンは、国際公開第 2015/143092 号パンフレット等に記載された方法に準じて、製造することもできる。] :



[0288] <工程 1>

式 (SM-P) の化合物及び式 (RG-P-1) の化合物 [式 (SM-P) の化合物及び式 (RG-P-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $m_1 = 1 \sim 4$ 、 $m_2 = 2 \sim 6$ の整数である] を用いて、前記 [製造方法M] <工程 1> と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-P-1) で表わされる化合物を製造することができる。

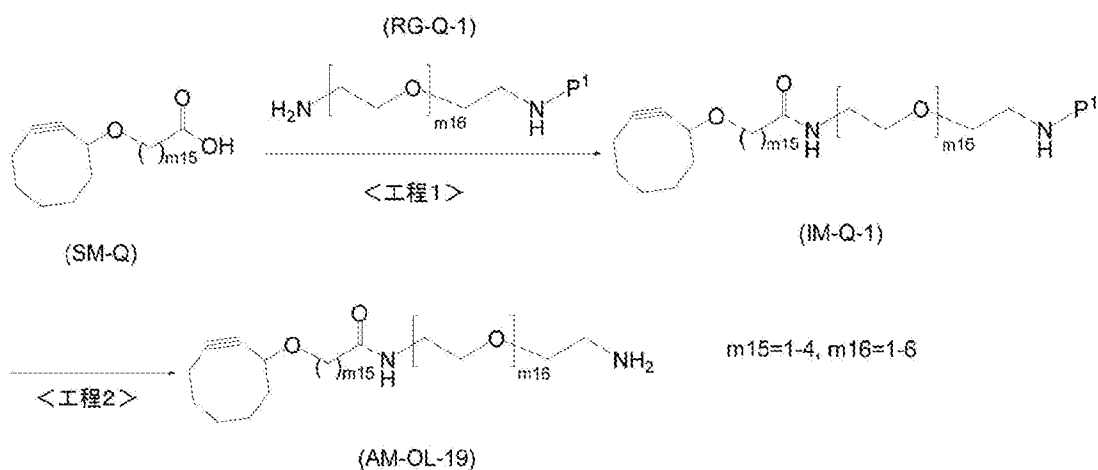
[0289] <工程 2>

〔製造方法P〕＜工程1＞で得られる式（IM-P-1）の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『グリーン（Greene）らの『プロテクトィブ・グループス・イン・オルガニック・シンセシス（Protective Groups in Organic Synthesis） 第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ（John Wiley & Sons）』の成書に記載の方法により、保護基の種類により適宜脱保護法を選択して反応を行うことで、式（AM-OL-18）で表わされる化合物、又は式（AM-OL-18）の塩として製造することができる。

[0290] [製造方法Q]

式 (AM-OL-19) で表されるアミンの製造方法:

[化124]



[0291] <工程 1>

式 (SM-Q) の化合物及び式 (RG-Q-1) の化合物「式 (SM-Q

）の化合物及び式（RG-Q-1）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $m15 = 1 \sim 4$ 、 $m16 = 1 \sim 6$ の整数である］を用いて、前記〔製造方法M〕＜工程1＞と同様な縮合反応を行うことにより式（IM-Q-1）で表わされる化合物を製造することができる。

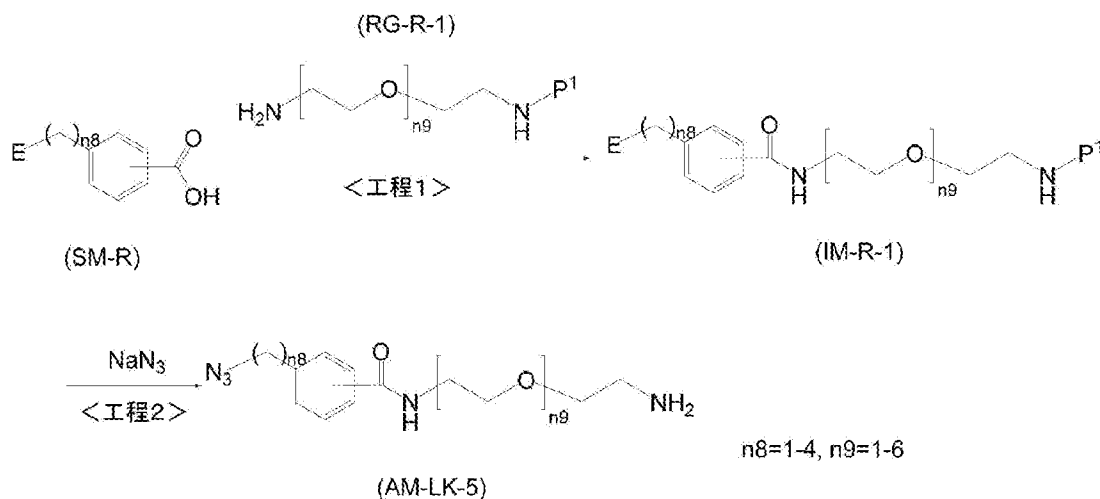
[0292] ＜工程2＞

〔製造方法Q〕＜工程1＞で得られる式（IM-Q-1）の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『グリーン（Greene）らの『プロテクトィブ・グループス・イン・オルガニック・シンセシス（Protective Groups in Organic Synthesis）第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ（John Wiley & Sons）』の成書に記載の方法により、保護基の種類により適宜脱保護法を選択して反応を行うことで、式（AM-OL-19）で表わされる化合物、又は式（AM-OL-19）の塩として製造することができる。

[0293] 〔製造方法R〕

式（AM-LK-5）で表されるアミンの製造方法〔式（AM-LK-5）のうち、 $n8 = 1$ 、 $n9 = 2$ のアミンは、国際公開第2016/152980号パンフレット等に記載された方法に準じて、製造することもできる。〕：

[化125]



[0294] <工程 1>

式 (SM-R) の化合物 [式 (SM-R) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n_8 = 1 \sim 4$ の整数である] 及び式 (RG-R-1) の化合物 [式 (RG-R-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n_9 = 1 \sim 6$ の整数である] を用いて、前記 [製造方法 M] <工程 1>と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-R-1) で表わされる化合物を製造することができる。

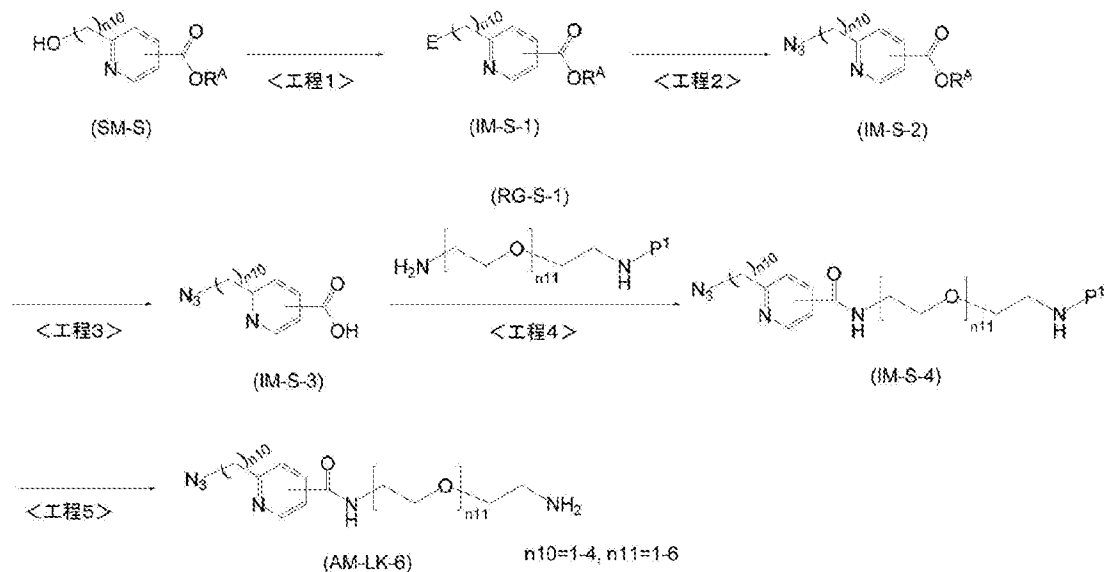
[0295] <工程 2>

[製造方法 R] <工程 1>で得られる式 (IM-R-1) の化合物を用いて、前記 [製造方法 H] <工程 2>と同様に NaN_3 を反応させアジド基を導入した後、保護基 P^1 を脱保護することにより式 (AM-LK-5) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-LK-5) の塩として製造することができる。

[0296] [製造方法 S]

式 (AM-LK-6) で表されるアミンの製造方法 :

[化126]



[0297] <工程 1>

[E = OTs 基又はOMs 基の場合] :

式 (SM-S) の化合物 [式 (SM-S) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり ; $n+1=1 \sim 4$ の整数である] 及びメタンスルホン酸クロライド、トシル酸クロライド、無水トシル酸等の試薬を用いて、文献公知の方法、例えば、『Journal of the American Chemical Society, 136(29), p10450-10459, 2014年』等に記載された方法に準じて、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン等の塩基存在下、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1, 2-ジメトキシエタン、1, 4-ジオキサン等のエーテル系溶媒、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒など反応に関与しない溶媒、もしくはこれらの混合溶媒を用いて又は無溶媒にて、 -78°C から溶媒が還流する温度で反応を行い、式 (IM-S-1) で表される化合物を製造することができる。

[0298] [E = ハロゲン (塩素、臭素、ヨウ素の場合)] :

式 (SM-S) の化合物を用い、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第4版 19、有機合成 I、炭化水素・ハロゲン化合物、363-482頁、1992年、丸善』等に記載された方法に準じて、下記に示す各種ハロゲン化剤 (塩素化剤、臭素化剤、ヨウ素化剤) 及び反応に関与しない溶媒を適宜選択し、 0°C から溶媒が還流する温度で反応を行うことで、式 (IM-S-1) で表わされるハロゲン化合物 (E = 塩素、臭素、ヨウ素) を製造することができる。

<E = 塩素の場合>

塩素化剤として、塩化水素/塩化亜鉛 (HCl/ZnCl_2)、塩化水素/ヘキサメチルリン酸トリアミド (HCl/HMPA)、塩化チオニル (SOCl_2)、四塩化炭素/トリフェニルホスフィン ($\text{CCl}_4/\text{PPh}_3$)、トリホスゲン/トリフェニルホスフィン ($(\text{CCl}_3)_2\text{CO}/\text{PPh}_3$)、トリホスゲン/N, N-ジメチルホルムアミド (POCl_3/DMF) 等の試薬を用いることで、所望の塩素化物を製造することができる。

<X = 臭素の場合>

臭素化剤として、48%臭化水素酸(48% HBr)、48%臭化水素酸/硫酸(48% HBr/H₂SO₄)、臭化水素/臭化リチウム(HBr/LiBr)、臭化ナトリウム/硫酸(NaBr/H₂SO₄)、三臭化リン(PBr₃)等の試薬を用いることで、所望の塩素化物を製造することができる。また、式(IM-S-1)において、E=OTs又はOMsの化合物に、臭化ナトリウム(NaBr)を反応させることでも、所望の臭素化物を製造することができる。

<X = ヨウ素の場合>

ヨウ素化剤として、ヨウ化水素酸(HI)、ヨウ素/トリフェニルホスフィン(I₂/PPh₃)等の試薬を用いることで、所望のヨウ素化物を製造することができる。また、式(IM-S-1)において、E=OTs又はOMsの化合物に、ヨウ化ナトリウム(NaI)を反応させることでも、所望のヨウ素化物を製造することができる。

[0299] <工程2>

[製造方法S] <工程1>で得られる式(IM-S-1)の化合物を用いて、前記[製造方法H] <工程2>と同様にNaN₃を反応させることで、式(IM-S-2)の化合物を製造することができる。

<工程3>

[製造方法S] <工程2>で得られる式(IM-S-2)の化合物を用いて、前記[製造方法B] <工程1>のエステル基の加水分解反応と同様にして、加水分解を行うことで、式(IM-S-3)の化合物を製造することができる。

[0300] <工程4>

[製造方法S] <工程3>で得られる式(IM-S-3)及び式(RG-S-1)の化合物[式(RG-S-1)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり; n₁₁=1~6の整数である]を用いて、前記[製造方法M] <工程1>と同様な縮合反応を

行うことにより式 (IM-S-4) で表わされる化合物を製造することができる。

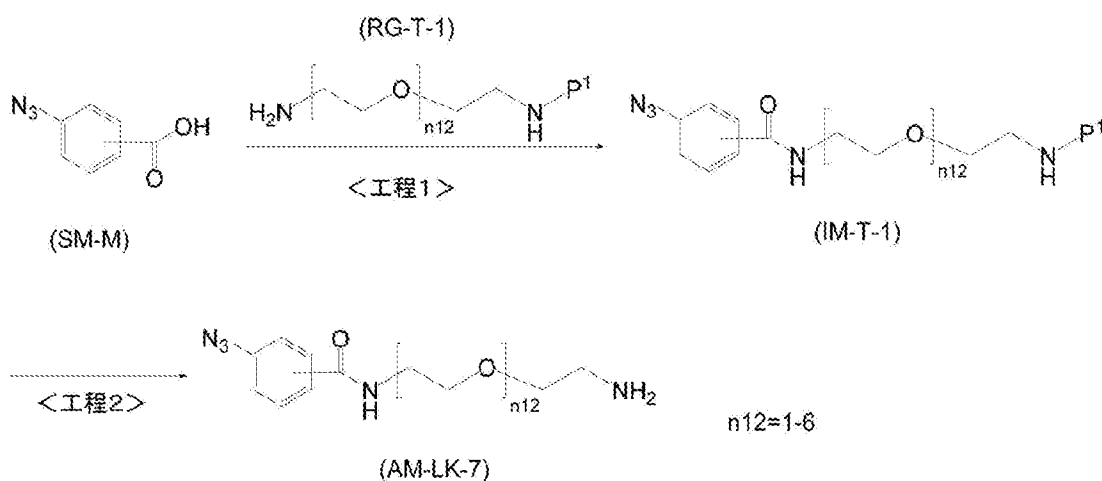
<工程 5>

[製造方法 S] <工程 4> で得られる式 (IM-S-4) の化合物の保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-LK-6) で表されるアミン化合物、又は式 (AM-LK-6) の塩として製造することができる。

[0301] [製造方法 T]

式 (AM-LK-7) で表されるアミンの製造方法：

[化127]



[0302] <工程 1>

式 (SM-M) の化合物及び式 (RG-T-1) の化合物 [式 (SM-M) の化合物及び式 (RG-T-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり； $n_{12} = 1 \sim 6$ の整数である] を用いて、前記 [製造方法 M] <工程 1> と同様な縮合反応を行うことにより式 (IM-T-1) で表わされる化合物を製造することができる。

[0303] また、式 (SM-M) で表されるカルボン酸を、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版 16、カルボン酸および誘導体、酸ハロゲン化物、酸無水物、99-118頁、2007年、丸善』、等に記載された方法に準じて、酸ハロゲン化物や酸無水物に変換し、式 (RG-T-1) の化合

物を用いて、トリエチルアミン、ピリジン等の塩基の存在下、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、トルエン、ベンゼン等の芳香族炭化水素系溶媒、N, N-ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等から選択される溶媒中、0℃から溶媒が還流する温度で反応させることにより、式(1M-T-1)の化合物を同様に製造することができる。

<工程2>

[製造方法T] <工程1>で得られる式(1M-T-1)の化合物を用いて、文献公知の方法、例えば、『グリーン(Greene)らの『プロテクトィブ・グループス・イン・オルガニック・シンセシス(Protective Groups in Organic Synthesis) 第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ(John Wiley & Sons)』の成書に記載の方法により、保護基の種類により適宜脱保護法を選択して反応を行うことで、式(AM-LK-7)で表わされる化合物、又は式(AM-LK-7)の塩として製造することができる。

[0304] 式(1)又は式(11)で表わされるアルギン酸誘導体を製造する為に用いられる、アルキン基が導入されたアミン($Ak_n-L^1-NH_2$)又はアジド基が導入されたアミン($N_3-L^2-NH_2$)については、前記[製造方法A]～[製造方法N]及び[製造方法P]～[製造方法T]に記載される各反応、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版、各本、2007年、丸善』、『Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations, 3rd Edition (Edited by Richard C. Larock), 2018年』、『Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis, (Edited by Laszlo Kurti, Barbara Czako), Academic Press, 2005年』等に記載の方法を適宜組み合わせることにより、所望のアミンを製造することができる。なお、下記の表中のアミンについては、表中に記載の先行技術文献に記載の方法によっても、製造することができる。

[0305]

[表11]

アミン (Akn-L1-NH ₂)	Akn	L1	条件	先行技術文献
AM-K2N4	AK-2	LN-4	m4=2	国際公開第2009/067663号パンフレット
AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=2	国際公開第2011/136645号パンフレット
AM-K12N2	AK-12	LN-2	m2=1	国際公開第2013/036748号パンフレット
AM-K1N1	AK-1	LN-1	m1=2	国際公開第2015/020206号パンフレット
AM-K2N1	AK-2	LN-1	m1=2	
AM-K7N1	AK-7	LN-1	m1=2	
AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=1	
AM-K4N3	AK-4	LN-3	m3=1	
AM-K9N8	AK-9	LN-8	*	
AM-K10N6	AK-10	LN-6	p位、m6=1, m7=2	
AM-K11N3	AK-11	LN-3	m3=1	国際公開第2015/112014号パンフレット
AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=2	
AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=4	国際公開第2016/054315号パンフレット
AM-K6N4	AK-6	LN-4	m4=3	国際公開第2016/168766号パンフレット
AM-K2N3	AK-2	LN-3	m3=2	Macromolecular Rapid Communications, 39(1), 2018年.
AM-K2N4	AK-2	LN-4	m4=4	Journal of the American Chemical Society, 133(18), P 7054-7064, 2011年.
AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=3	Bioconjugate Chemistry, 23(8), p1680-1686, 2012年.
AM-K3N3	AK-3	LN-3	m3=5	ACS Medicinal Chemistry Letters, 2(12), 885-889, 2011年.
AM-K1N10	AK-1	LN-10	m13=1, m14=2	国際公開第2015/143092号パンフレット
73N (N3-L2-NH ₂)	L1	置換位置	条件	先行技術文献
AM-LK1(p)	LK-1	p位	n1=1, n2=3	国際公開第2016/152980号
AM-LK4(m)	LK-4	m位	n7=3	Journal of Medicinal Chemistry (2011), 54(18), 6319-6327.
AM-LK4(p)	LK-4	p位	n7=2, 3, 4, 6	n7=2, 3, 4: Journal of Medicinal Chemistry, (2011), 54(18), P6319-6327. n7=6: Experientia, 39(10), P1063-72.
AM-LK5(p)	LK-5	p位	n8=1, n9=2	国際公開第2016/152980号パンフレット

[0306] 本明細書中、式(AM-1)又は式(AM-2)で表わされるアミン化合物(各々の式の下位の式も含む)は、製薬学的に許容される塩(例えば、酸付加塩)を形成する場合がある。かかる塩としては、製薬学的に許容し得る塩であれば特に限定されないが、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、酸

性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、よう化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、エナント酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、乳酸、ソルビン酸、マンデル酸等の脂肪族モノカルボン酸等との塩、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、酒石酸等の脂肪族ジカルボン酸との塩、クエン酸等の脂肪族トリカルボン酸との塩、安息香酸、サリチル酸等の芳香族モノカルボン酸との塩、フタル酸等の芳香族ジカルボン酸の塩、桂皮酸、グリコール酸、ピルビン酸、オキシル酸、サリチル酸、N-アセチルシステイン等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸類との酸付加塩が挙げられる。酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。

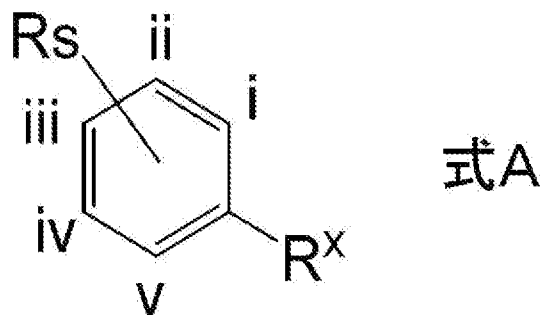
[0307] 前記塩は、常法に従い、例えば、前記化合物と適量の酸もしくは塩基を含む溶液を混合することにより目的の塩を形成させた後に分別濾取するか、もしくは該混合溶媒を留去することにより得ることができる。塩に関する総説として、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use、Stahl & Wermuth (Wiley-VCH、2002) が出版されており、本書に詳細な記載がなされている。

[0308] 本明細書中、式(AM-1)又は式(AM-2)で表わされるアミン化合物(各々の式の下位の式も含む)又はその塩は、水、エタノール、グリセロール等の溶媒と溶媒和物を形成し得る。

[0309] 本明細書中、特に断りのない限り、環状基に可変置換基が置換している場合、該可変置換基は環状基の特定の炭素原子に結合されていない事を意味する。例えば、下記式Aにおける可変置換基R_sは、該式Aにおける炭素原子

i、ii、iii、iv又はvの何れかに置換する事ができる事を意味する。

[化128]



[0310] 9. アルギン酸誘導体、架橋アルギン酸構造体の用途

アルギン酸誘導体は、前述の通り、移植用デバイスを作製するのに用いることができる。移植用デバイス以外にも、アルギン酸誘導体は、食品、医療、化粧品、繊維、製紙などの幅広い分野で、従来のアルギン酸の代わりに用いることができる。アルギン酸誘導体または光架橋アルギン酸構造体の好ましい用途としては、具体的には、創傷被覆材、術後癒着防止材、薬剤徐放用基材、細胞培養用基材、細胞移植用基材等の医療用材料が挙げられる。

[0311] 医療用材料として用いる場合の架橋アルギン酸構造体の形状として、チューブ状、繊維状、ファイバー、ビーズ、ゲル、略球形のゲル等が挙げられ、ビーズ、ゲルまたは略球形のゲルとすることが好ましく、略球形のゲルとすることがより好ましい。

[0312] アルギン酸誘導体を用いる特に好ましい態様の移植用デバイスは、生体適合性や安定性に優れ、細胞毒性も少なく、移植部位における癒着や炎症もほとんどなく、（半透膜の有無に関わらず）ゲルの溶解が少なく形状が長期間維持され、長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能となる。

[0313] なお、本明細書に記載した全ての文献及び刊行物は、その目的にかかわらず参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、本願の優先権主張の基礎となる日本特許出願No. 2019-12206

3（2019年6月28日出願）の特許請求の範囲、明細書、及び図面の開示内容を参照して組み込むものとする。

[0314] また、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を実施できる。発明を実施するための最良の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

実施例

[0315] 次に、本発明をさらに詳細に説明するために実施例、試験例をあげるが、これらの例は単なる実施例、試験例であって、本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0316] 核磁気共鳴スペクトル（NMR）の測定には、J E O L J N M - E C X 4 0 0 F T - N M R（日本電子）を用いた。液体クロマトグラフィー質量分析スペクトル（L C - M a s s）は以下の方法で測定した。[U P L C] W a t e r s A Q U I T Y U P L CシステムおよびB E H C 1 8カラム（2.1mm×50mm、1.7μm）（W a t e r s）を用い、アセトニトリル：0.05%トリフルオロ酢酸水溶液＝5：95（0分）～95：5（1.0分）～95：5（1.6分）～5：95（2.0分）の移動相およびグラジエント条件を用いた。

[0317] ¹H-NMRデータ中、NMRシグナルのパターンで、sはシングレット、dはダブルット、tはトリプレット、qはカルテット、mはマルチプレット、b rはブロード、Jはカップリング定数、H zはヘルツ、C D C l ₃は重クロロホルム、D M S O - d ₆は重ジメチルスルホキシド、D ₂Oは重水を意味する。¹H-NMRデータ中、水酸基（O H）、アミノ基（N H ₂）、カルボキシル基（C O O H）のプロトン等、ブロードバンドであるため確認ができないシグナルについては、データに記載していない。

[0318] LC-Massデータ中、Mは分子量、RTは保持時間、 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ は分子イオンピークを意味する。

[0319] 実施例中の「室温」は、通常約0℃から約35℃の温度を示すものとする。

実施例中の反応性置換基導入率（モル％）は、 ^1H-NMR （ D_2O ）から算出されたアルギン酸を構成する単糖（グルロン酸およびマンヌロン酸）単位の数に対する導入された反応性置換基のモル数の割合を示すものとする。

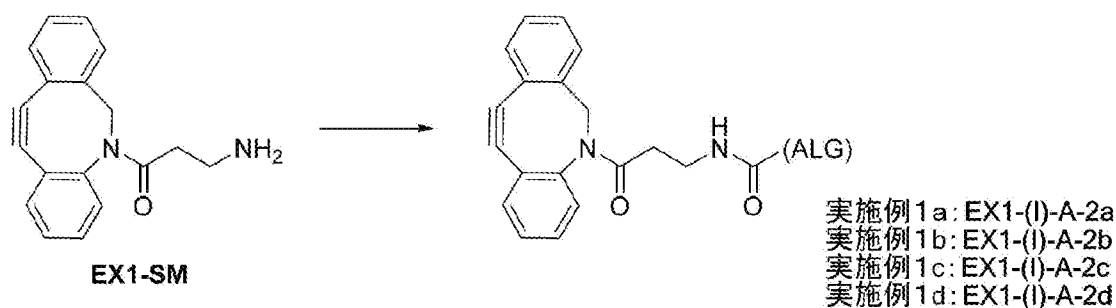
[0320] 実施例において、反応性基又は相補的な反応性基が導入される前のアルギン酸ナトリウムは、前記表10に記される物性値を示すアルギン酸ナトリウムを用いた。

[0321] 表12には、（実施例1）～（実施例4-2）で得られた、反応性基が導入されたアルギン酸誘導体（実施例1a、実施例2a）の、物性値（具体的には、反応性基導入率(mol%)、分子量、及び重量平均分子量（万Da））を示す。

[0322] （実施例1）

ジベンゾシクロオクチン-アミン基導入アルギン酸（実施例1a、実施例1b、実施例1c、及び実施例1d）の合成：

[化129]



[0323] （実施例1a）ジベンゾシクロオクチン-アミン基導入アルギン酸（EX1-(I)-A-2a）の合成：

1重量％に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2

）水溶液（43.6 mL）に、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（111.65 mg）、1モル濃度-重曹水（403.5 μ L）を加えた。この溶液に、市販のジベンゾシクロオクチン-アミン [CAS: 1255942-06-3]（EX1-SM、83.62 mg）のエタノール溶液（2 mL）を滴下し、室温で18時間攪拌した。塩化ナトリウム（400 mg）を加えた後、エタノール（87.2 mL）を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX1-（I）-A-2a（376 mg）を淡黄色固体として得た。

[0324] 反応性置換基（ジベンゾシクロオクチン-アミノ基）の導入率は6.9 mol %（NMR積分比）であった。

[0325] （実施例1b）ジベンゾシクロオクチン-アミノ基導入アルギン酸（EX1-（I）-A-2b）の合成：

1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（120 mL）に、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（330 mg）、1モル濃度-重曹水（300 μ L）を加えた。この溶液に、市販のジベンゾシクロオクチン-アミン [CAS: 1255942-06-3]（EX1-SM、80 mg）のエタノール溶液（12 mL）を滴下し、30℃で4時間攪拌した。塩化ナトリウム（1.2 g）を加えた後、エタノール（240 mL）を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX1-（I）-A-2b（1.19 g）を白色固体として得た。

当該白色固体を80 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で23時間乾燥して、標記化合物EX1-（I）-A-2b（1.2 g）を白色アモルファスとして得た。

[0326] 反応性置換基（ジベンゾシクロオクチン-アミノ基）の導入率は5.0 mol %

○ 1 % (NMR 積分比) であった。

[0327] (実施例 1 c) ジベンゾシクロオクチン-アミン基導入アルギン酸 (EX 1 - (1) - A - 2 c) の合成 :

1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製 : A - 2) 水溶液 (120 mL) に、4 - (4, 6 - ジメトキシ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) - 4 - メチルモルホリニウムクロリド (DMT - MM) (167 mg)、1 モル濃度 - 重曹水 (151 μ L) を加えた。この溶液に、市販のジベンゾシクロオクチン-アミン [CAS : 1255942 - 06 - 3] (EX 1 - SM、42 mg) のエタノール溶液 (12 mL) を滴下し、30℃で3.5時間攪拌した。塩化ナトリウム (1.2 g) を加えた後、エタノール (240 mL) を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物 EX 1 - (1) - A - 2 c (1.2 g) を白色固体として得た。

当該白色固体を80 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で23時間乾燥して、標記化合物 EX 1 - (1) - A - 2 c (1.15 g) を白色アモルファスとして得た。

[0328] 反応性置換基 (ジベンゾシクロオクチン-アミノ基) の導入率は2.3 m
○ 1 % (NMR 積分比) であった。

[0329] (実施例 1 d) ジベンゾシクロオクチン-アミン基導入アルギン酸 (EX 1 - (1) - A - 2 d) の合成 :

1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製 : A - 2) 水溶液 (201 mL) に、4 - (4, 6 - ジメトキシ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) - 4 - メチルモルホリニウムクロリド (DMT - MM) (281 mg)、1 モル濃度 - 重曹水 (253 μ L) を加えた。この溶液に、市販のジベンゾシクロオクチン-アミン [CAS : 1255942 - 06 - 3] (EX 1 - SM、70 mg) のエタノール溶液 (20 mL) を滴下し、32℃で3時間攪拌した。塩化ナトリウム (2.01 g) を加えた後、エタノール (402 mL) を加え、30分間室温で攪拌した。

得られた沈殿をろ取り、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物 EX 1 - (I) - A - 2 d (1 . 9 4 g) を白色固体として得た。

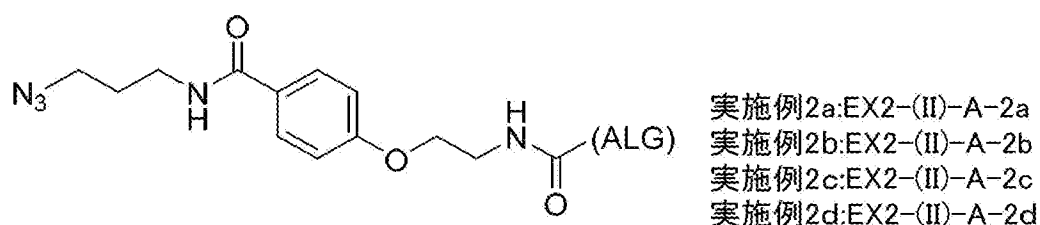
当該白色固体を 1 3 0 mL の水に溶解し、凍結乾燥後、室温で 2 時間乾燥して、標記化合物 EX 1 - (I) - A - 2 d (1 . 8 4 g) を白色アモルファスとして得た。

[0330] 反応性置換基（ジベンゾシクロオクチン-アミノ基）の導入率は 2 . 4 m o l % （NMR 積分比）であった。

[0331] （実施例 2）

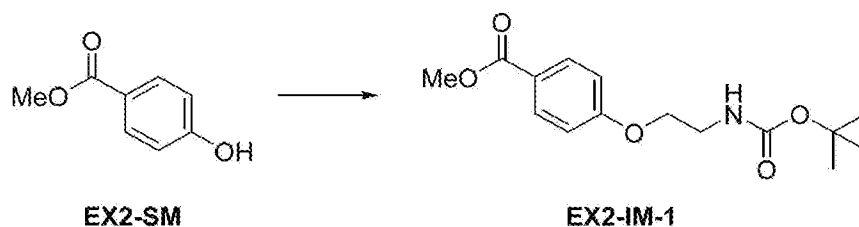
4 - (2 - アミノエトキシ) - N - (3 - アジドプロピル) ベンズアミド基導入アルギン酸（実施例 2 a、実施例 2 b、実施例 2 c、及び実施例 2 d）の合成：

[化130]



[0332] <工程 1>メチル 4 - (2 - ((t e r t - ブトキシカルボニル) アミノ) エトキシ) ベンゾエート（化合物 EX 2 - I M - 1 ）の合成：

[化131]



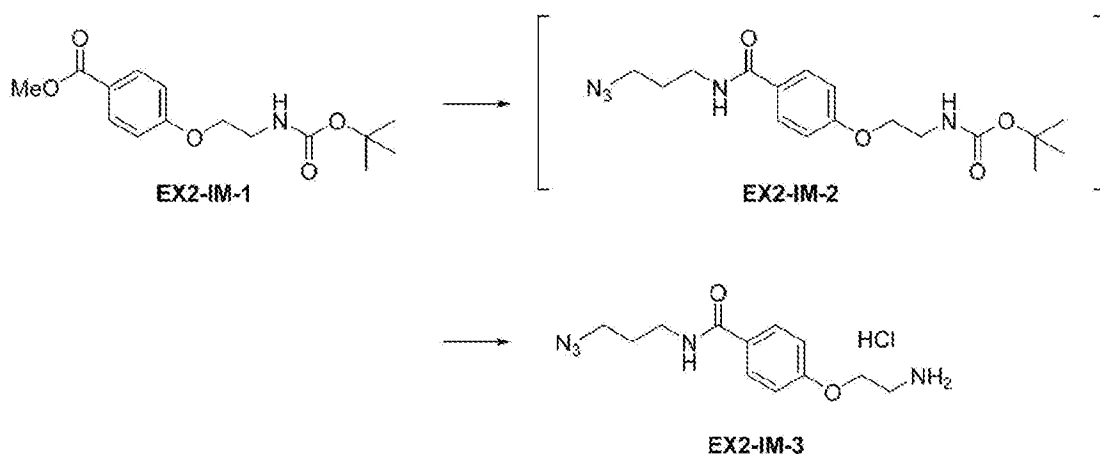
[0333] トリフェニルホスフィン (0 . 9 6 g) のテトラヒドロフラン (2 . 5 9 mL) 溶液に、氷冷攪拌下、アゾジカルボン酸ジエチル (4 0 % トルエン溶液, 1 . 9 2 mL) 溶液を加え、室温で 2 0 分間攪拌した。この溶液に対し、氷冷攪拌下、市販の 4 - ヒドロキシ安息香酸 メチル [C A S : 9

9-76-3] (化合物EX2-SM、0.37 g) 及び2-(tert-ブトキシカルボニル)エタノールアミン [CAS: 26690-80-2] (0.39 g) のテトラヒドロフラン (1.1 mL) 溶液を加え、室温で17時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5%酢酸エチル/n-ヘプタン~40%酢酸エチル/n-ヘプタン) により精製し、化合物1と化合物2の混合物を得た。この混合物をメチル tert-ブチルエーテル (20 mL) に溶解させ、1規定-水酸化ナトリウム水溶液 (5 mL) で2回、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下で溶媒を留去し、化合物EX2-IM-1 (0.45 g) をピンク色のオイル状物質として得た。

[0334] NMRデータ (CDCl₃) (δ : ppm): 7.98 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.97 (1H, br s), 4.07 (2H, t, J = 5.2 Hz), 3.88 (3H, s), 3.56 (2H, q, J = 5.2 Hz), 1.45 (9H, s)

[0335] <工程2> 4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド塩酸塩 (化合物EX2-IM-3) の合成:

[化132]



[0336] (実施例2) <工程1>で得られた化合物EX2-IM-1 (0.44

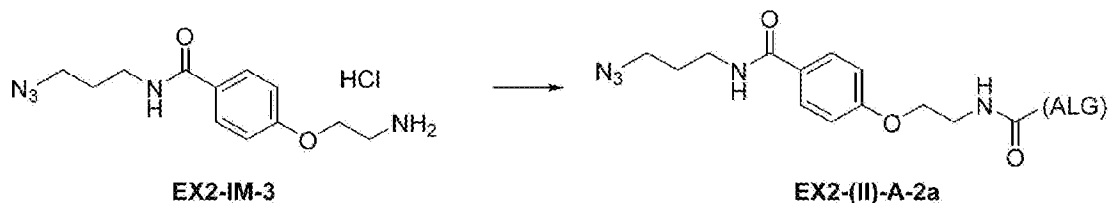
g) のメタノール (4.4 mL) 溶液に水酸化リチウム一水和物 (0.25 g) を加え、60℃で3時間30分撹拌した。反応液に1規定塩酸 (5 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL) で3回抽出した。有機層を水 (5 mL)、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で溶媒を留去した。残留物をアセトニトリル (4.4 mL) に溶解させ、3-アジドプロパン-1-アミン [CAS: 88192-19-2] (0.15 g) とO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.57 g) を加えた。続いて、氷冷撹拌下、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.52 mL) を加え、室温で5時間撹拌した。反応液に対し水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (15 mL) で3回抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (16%酢酸エチル/n-ヘプタン~100%酢酸エチル) により精製し、化合物EX2-IM-2 (0.71 g) を含む画分を得た。

[0337] 化合物EX2-IM-2を含む画分 (0.71 g) に対し、4規定塩化水素/1,4-ジオキサン (4.9 mL) を加え、室温で20分間撹拌した。反応液にジイソプロピルエーテルを加えた後、析出物を濾過することで、標記化合物EX2-IM-3 (0.49 g) を白色固体として得た。

[0338] NMRデータ (CDCl₃) (δ : ppm): 7.60 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.93 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.19 (2H, t, J = 4.8 Hz), 3.31-3.29 (6H, m), 1.77-1.71 (2H, m). LC-MS: M (free amine) = 263、RT=0.54 (分)、[M+H]⁺=264

[0339] (実施例2a) 4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基導入アルギン酸 (化合物EX2-(11)-A-2a) の合成:

[化133]

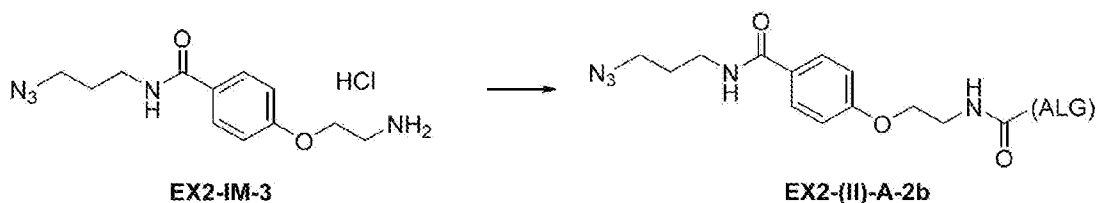


[0340] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（19.6 mL）に、氷冷撹拌下、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（50.19 mg）、（実施例2）＜工程2＞で得られた化合物EX2-IM-3（54.37 mg）、1モル濃度-重曹水（181.4 μ L）を加え、室温で5時間撹拌した。塩化ナトリウム（200 mg）を加えた後、エタノール（39.2 mL）を加え、30分間室温で撹拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX2-(II)-A-2a（198 mg）を白色固体として得た。

[0341] 反応性置換基（4-（2-アミノエトキシ）-N-（3-アジドプロピル）ベンズアミド基）の導入率は6.1mol%（NMR積分比）であった。

[0342] （実施例2b） 4-（2-アミノエトキシ）-N-（3-アジドプロピル）ベンズアミド基導入アルギン酸（化合物EX2-(II)-A-2b）の合成：

[化134]



[0343] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（120 mL）に、氷冷撹拌下、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（

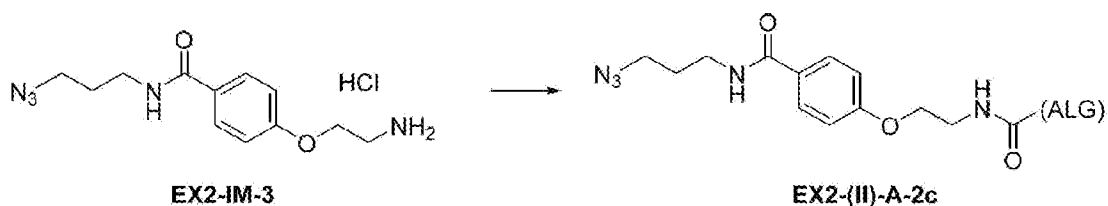
DMT-MM) (330 mg)、(実施例2) <工程2>で得られた化合物EX2-IM-3 (90 mg)、1モル濃度一重曹水 (450 μ L) を加え、30℃で4時間攪拌した。塩化ナトリウム (1.2 g) を加えた後、エタノール (240 mL) を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX2-(II)-A-2b (1.22 g) を白色固体として得た。

当該白色固体を80 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で23時間乾燥して、標記化合物EX3-(II)-A-2b (1.19 g) を白色アモルファスとして得た。

[0344] 反応性置換基 (4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル) ベンズアミド基) の導入率は4.9mol% (NMR積分比) であった。

[0345] (実施例2c) 4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル) ベンズアミド基導入アルギン酸 (化合物EX2-(II)-A-2c) の合成：

[化135]



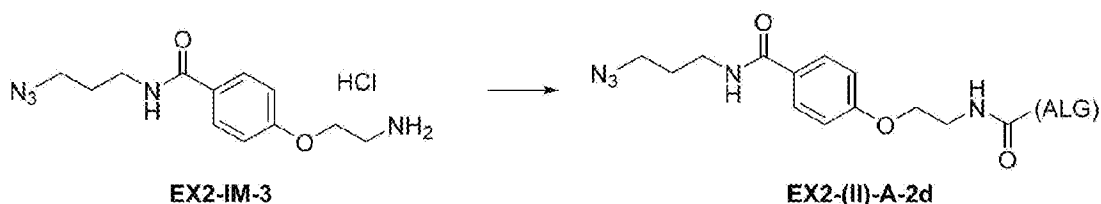
[0346] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製：A-2) 水溶液 (120 mL) に、氷冷攪拌下、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジノー-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (167 mg)、(実施例2) <工程2>で得られた化合物EX2-IM-3 (45 mg)、1モル濃度一重曹水 (227 μ L) を加え、30℃で3.5時間攪拌した。塩化ナトリウム (1.2 g) を加えた後、エタノール (240 mL) を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX2-(II)-A-2c (1.22 g) を白色固体として得た。

当該白色固体を80 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で22時間乾燥して、標記化合物EX2-(I)-A-2c(1.15 g)を白色アモルファスとして得た。

[0347] 反応性置換基(4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基)の導入率は2.3mol%(NMR積分比)であった。

[0348] (実施例2d) 4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基導入アルギン酸(化合物EX2-(I)-A-2d)の合成:

[化136]



[0349] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2)水溶液(220 mL)に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジノー2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(307 mg)、(実施例2)<工程2>で得られた化合物EX2-IM-3(83 mg)、1モル濃度一重曹水(416 μL)を加え、32℃で3時間攪拌した。塩化ナトリウム(2.2 g)を加えた後、エタノール(440 mL)を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取り、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX2-(I)-A-2d(2.13 g)を白色固体として得た。

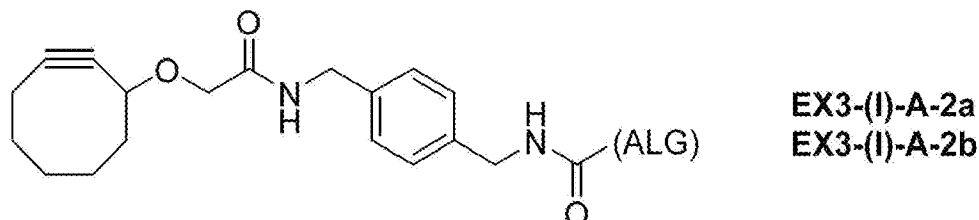
当該白色固体を130 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、室温で2時間乾燥して、標記化合物EX2-(I)-A-2d(1.99 g)を白色アモルファスとして得た。

[0350] 反応性置換基(4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基)の導入率は2.3mol%(NMR積分比)であった。

[0351] (実施例3)

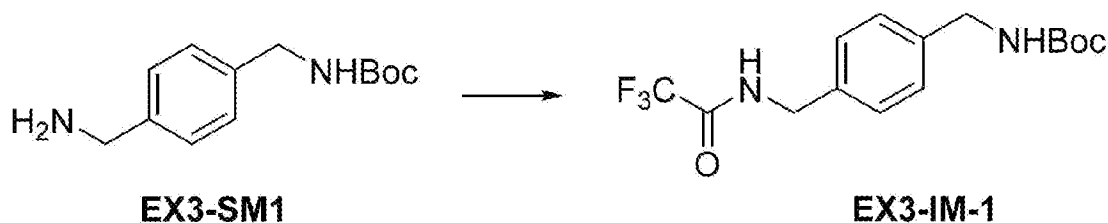
N－（４－（アミノエチル）ベンジル）－２－（シクロオクト－２－イン－１－イロキシ）アセトアミド基導入アルギン酸（実施例３ a、および実施例３ b）の合成：

[化137]



[0352] <工程１> tert-ブチル（４－（４（（２，２，２－トリフルオロアセトアミド）メチル）ベンジル）カルバメート（化合物EX3-IM-1）の合成：

[化138]



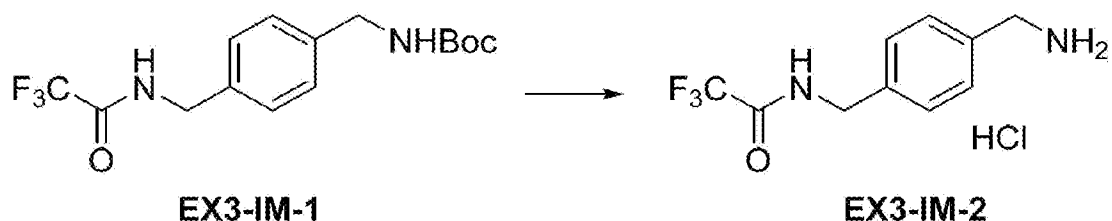
[0353] 文献公知の方法（Bioorganic & Medicinal Chemistry（2003）11：4189－4206）を参考に、１，４－ビス（アミノメチル）ベンゼン〔CAS：539－48－0〕から合成したtert-ブチル（４－（アミノエチル）ベンジル）カルバメート〔CAS：108468－80－4〕（EX3-SM1、0.67 g）、トリエチルアミン（0.39 mL）及びメタノール（6.67 mL）の混合物に対し、氷冷撹拌下、トリフルオロ酢酸エチル（0.44 mL）を滴下した。反応混合物を室温に昇温し、同温で５時間撹拌した。反応を水（10 mL）で停止し、酢酸エチル（10 mL）で３回抽出した。回収した有機層を飽和食塩水（5 mL）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥させた有機層を濾過後、濃縮し、標記粗化合物EX3-IM-1（0.67

1 g) を淡黄色アモルファスとして得た。

[0354] NMRデータ (CDCl₃) (δ : ppm): 7.29 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.25 (2H, d, J = 7.6 Hz), 6.51 (1H, br s), 4.86 (1H, br s), 4.51 (2H, d, J = 5.2 Hz), 4.31 (2H, d, J = 6.0 Hz), 1.46 (9H, s). LC-MS: M = 332, RT = 0.97 (分), $[M+Na]^+ = 355$.

[0355] <工程2> N-(4-(アミノエチル)ベンジル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド塩酸塩 (化合物EX3-IM-2) の合成:

[化139]



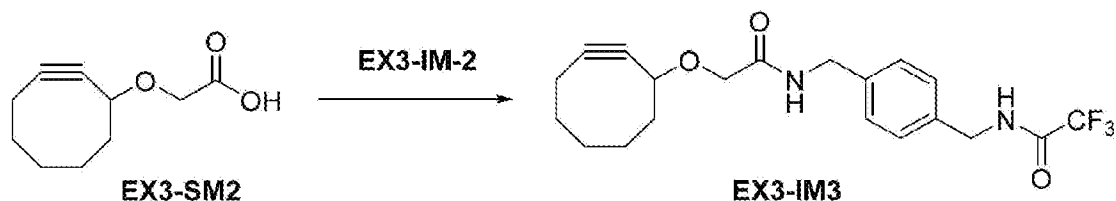
[0356] (実施例3) <工程1>で得られた化合物EX3-IM-1 (0.5 g) の1,4-ジオキサン溶液 (3.5 mL) に対し、水冷撹拌下、4規定塩化水素/1,4-ジオキサン (3.5 mL) を加え、室温で3時間撹拌した。反応液にジイソプロピルエーテル (40 mL) を加えた後、析出物を濾過することで、標記化合物EX3-IM-2 (0.36 g) を白色固体として得た。

[0357] NMRデータ (D₂O) (δ : ppm): 7.29 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.25 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.38 (2H, s), 4.02 (2H, s). LC-MS: M (free amine) = 232, RT = 0.53 (分), $[M+H]^+ = 233$.

[0358] <工程3> N-(4-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ

）アセトアミド）メチル）ベンジル）－2，2，2－トリフルオロアセトアミド（化合物EX3-IM-3）の合成：

[化140]



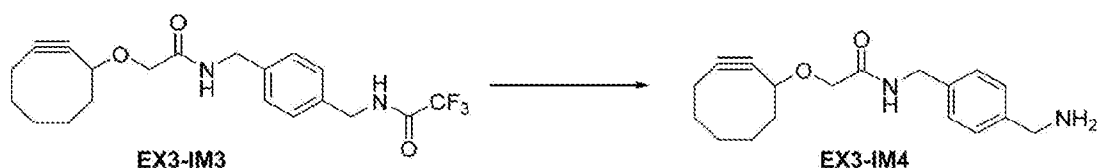
[0359] 文献公知の方法（Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110）に従い、シクロヘプテン [CAS:628-92-2] から合成したカルボン酸 [CAS:917756-42-4]（EX3-SM2、0.17 g）及びO-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N，N，N'，N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（0.26 g）のアセトニトリル（1.7 mL）溶液に対し、氷冷撹拌下、（実施例3）＜工程2＞で得られたEX3-IM-2（0.26 g）及びN，N-ジイソプロピルエチルアミン（0.51 mL）を滴下し、室温で1時間30分撹拌した。水（5 mL）を加え反応を停止させた後、酢酸エチル（5 mL）で3回抽出した。有機層を飽和食塩水（3 mL）で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥させた有機層を濾過後、減圧下で溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（12%酢酸エチル／n-ヘプタン～100%酢酸エチル）により精製し、標記化合物EX3-IM-3（0.189 g）を白色アモルファスとして得た。

[0360] NMRデータ（CDCl₃）（ δ : ppm）： 7.31（2H，d，J = 8.4 Hz），7.26（2H，d，J = 8.0 Hz，Overlapped with solvent peak.），6.84（1H，br s），6.52（1H，br s），4.52（2H，d，J = 6.0 Hz），4.49（2H，d，J = 6.4 Hz），4.26-4.23（1H，

m), 4.11 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 3.94 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 2.26–2.09 (3H, m), 2.00–1.58 (6H, m), 1.48–1.44 (1H, m). LC-MS: $M = 396$, $RT = 0.99$ (分), $[M+H]^+ = 397$.

[0361] <工程4> N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセトアミド(化合物EX3-IM-4)の合成:

[化141]

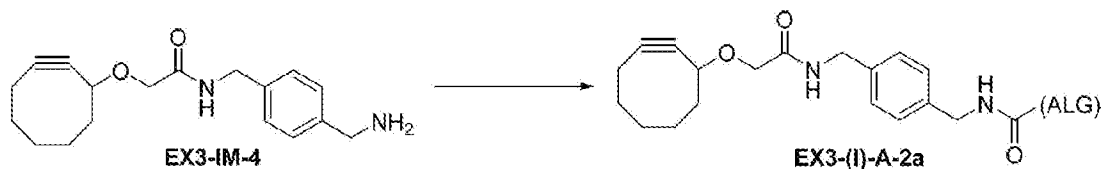


[0362] (実施例3) <工程3>で得られた化合物EX3-IM-3 (0.18 g) 及びメタノール (1.8 mL) の混合物に対して、氷冷撹拌下、炭酸カリウム (0.126 g) 水溶液 (0.9 mL) を滴下し、室温で17時間30分撹拌した。メタノールを減圧下で留去し、酢酸エチル (5 mL) で3回抽出した。有機層を飽和食塩水 (5 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を濾過後、減圧下で溶媒を留去し、標記粗化合物EX3-IM-4 (0.13 g) を淡黄色油状物として得た。

[0363] NMRデータ (CDCl₃) (δ : ppm): 7.28–7.28 (4H, m), 6.80 (1H, br s), 4.48 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.26–4.21 (1H, m), 4.11 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 3.93 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 3.86 (2H, s), 2.28–2.07 (3H, m), 1.99–1.40 (7H, m, Overlapped with solvent peak.). LC-MS: $M = 300$, $RT = 0.68$ (分), $[M+H]^+ = 301$.

[0364] (実施例3a) N-(4-(アミノエチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセトアミド基導入アルギン酸(EX3-(I)-A-2a)の合成:

[化142]

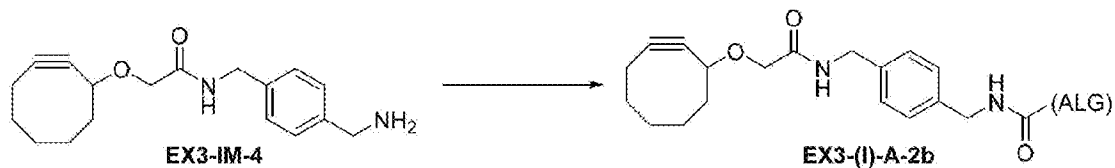


[0365] 1重量%に調整したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製、A-2)水溶液(60 mL)に、室温撹拌下、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(183 mg)を加えた。続いて、(実施例3)<工程4>で得られた化合物EX3-IM-4(41.2 mg)のエタノール(5 mL)溶液を同温で滴下し、40度で4時間撹拌した。室温に冷却後、塩化ナトリウム(600 mg)を加えた後、エタノール(119 mL)を加え、30分間撹拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノール(5 mL)で3回洗浄後、減圧下乾燥し、標記化合物EX3-(I)-A-2aを白色固体として得た。当該白色固体を40 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で22時間乾燥して、標記化合物EX3-(I)-A-2a(597 mg)を白色綿状物として得た。

[0366] 反応性置換基(N-(4-(アミノエチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセトアミド基)の導入率は3.7mol%(NMR積分比)であった。

[0367] (実施例3b) N-(4-(アミノエチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセトアミド基導入アルギン酸(EX3-(I)-A-2b)の合成:

[化143]



[0368] 1重量％に調整したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製、A-2）水溶液（290 mL）に、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（405 mg）、（実施例3）＜工程4＞で得られた化合物EX3-IM-4（121 mg）のエタノール（29 mL）溶液、1モル濃度-重曹水（366 μ L）を加え、32℃で3時間20分攪拌した。塩化ナトリウム（2.9 g）を加えた後、エタノール（580 mL）を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX3-(I)-A-2b（2.67 g）を白色固体として得た。

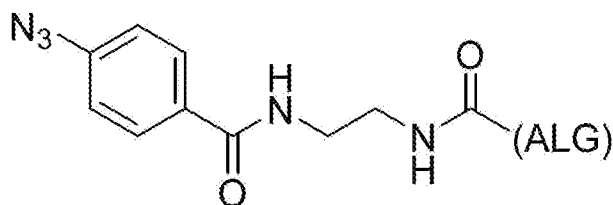
当該白色固体を180 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で6時間乾燥後、一度冷蔵保存した。再度40℃で5時間乾燥して、標記化合物EX3-(I)-A-2b（2.77 g）を白色アモルファスとして得た。

[0369] 反応性置換基（N-（4-（アミノエチル）ベンジル）-2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセトアミド基）の導入率は2.1mol％（NMR積分比）であった。

[0370] （実施例4）

N-（2-アミノエチル）-4-アジドベンザミド基導入アルギン酸（実施例4）の合成：

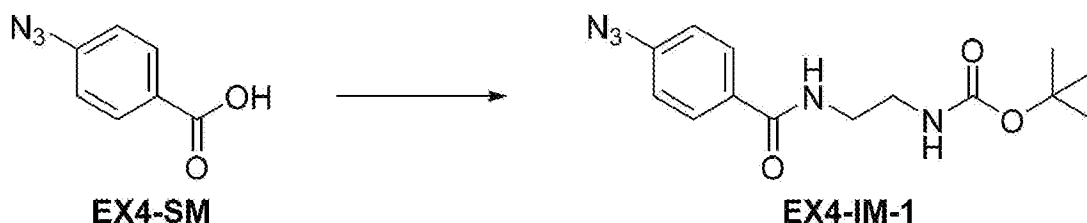
[化144]



実施例4:EX4-(II)-A-2

[0371] <工程1> tert-ブチル(2-(4-アジドベンザミド)エチル)カルバメート(化合物EX4-IM-1)の合成:

[化145]



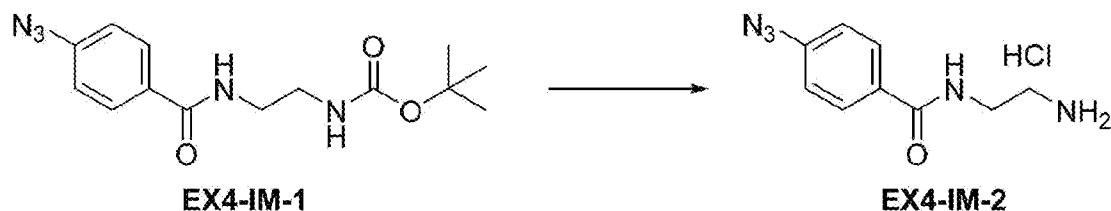
[0372] 4-アジド安息香酸(EX4-SM、[CAS: 6427-66-3] 700 mg)に、塩化チオニル(783 μ L)、N,N-ジメチルホルムアミド(3 μ L)を加え、70℃で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残さに塩化メチレン(1 mL)を加えて共沸し、同様の操作を再度行った。得られた淡黄色固体の塩化メチレン(3 mL)溶液に対して、tert-ブチル(2-アミノエチル)カルバメート[CAS: 57260-73-8](825 mg)、ピリジン(1.04 mL)の塩化メチレン(7.0 mL)溶液に氷水冷下で加え、室温で1時間攪拌した。反応液をtert-ブチルメチルエーテル(30 mL)で希釈し、水(10 mL)、飽和重層水(5 mL)、0.5規定クエン酸(5 mLで2回)、水(5 mL)、飽和食塩水(5 mL)で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残さをtert-ブチルメチルエーテル/ヘプタンでトリチュレートし、固体をろ過した後、tert-ブチルメチルエーテル/ヘプタンで洗浄して、標記化合物EX4-IM-1(1.1 g)を白色固体として得た。

[0373] NMRデータ(CDCI₃) (δ : ppm): 7.83 (2H、d、J = 8 Hz)、7.26 (1H、brs)、7.05 (2H、d、J = 8 Hz)、4.97 (1H、brs)、3.55 (2H、q、J = 5 Hz)、3.45-3.37 (2H、m)、1.43 (9H、s)、LC-MS: M=305、RT=0.90 (分)、[M+H]⁺=306、[M+

$[Na]^+ = 328$

[0374] <工程2> N-(2-アミノエチル)-4-アジドベンザミド 塩酸塩 (化合物EX4-IM-2) の合成:

[化146]

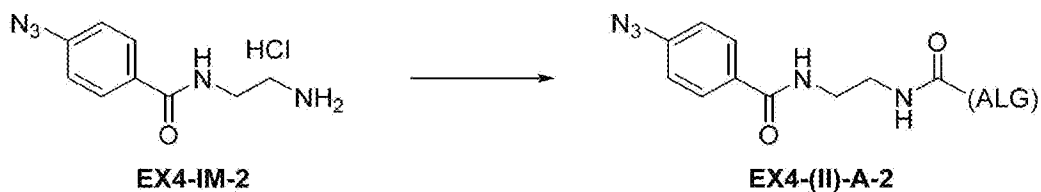


[0375] (実施例4) <工程1>で得られた化合物 (EX4-IM-1、500 mg) を、1,4-ジオキサン (1.5 mL) に懸濁した。氷水冷下4 既定-塩化水素/ジオキサン溶液 (3.5 mL) を加え、室温で2.5時間 攪拌した。反応液にジイソプロピルエーテル (10.5 mL) を加え、室 温で50分間攪拌した。固体をろ過し、ジイソプロピルエーテルで洗浄後、 減圧乾燥して、標記化合物EX4-IM-2 (365 mg) を淡ベージュ 色固体として得た。

[0376] NMRデータ (DMSO- d_6) (δ : ppm): 8.68 (1H、t、J = 6 Hz)、7.93 (2H、d、J = 9 Hz)、7.82 (1H、brs)、7.22 (2H、d、J = 9 Hz)、3.49 (2 H、q、J = 6 Hz)、2.97 (2H、t、J = 6 Hz)、LC-MS: M (free amine) = 205、RT=0.56 (分)、 $[M+H]^+ = 206$

[0377] <工程3-1> N-(2-アミノエチル)-4-アジドベンザミド基導入 アルギン酸 (EX4-(11)-A2) の合成:

[化147]



[0378] 1重量％に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（60 mL）に、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（167 mg）、（実施例4）＜工程2＞で得られた化合物EX4-IM-2（37 mg）、1モル濃度-重曹水（227 μ L）を加え、30℃で3.5時間攪拌した。塩化ナトリウム（600 mg）を加えた後、エタノール（120 mL）を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX4-(I)-A-2（615 mg）を白色粉末として得た。

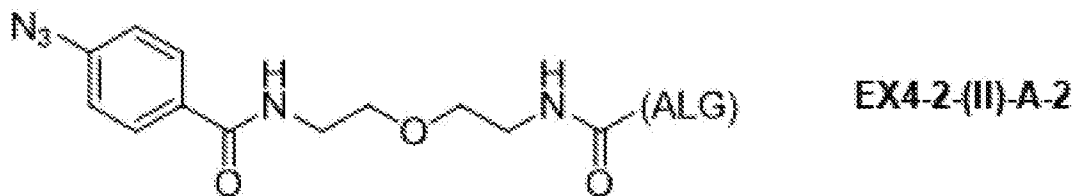
当該白色固体を40 mLの水に溶解し、凍結乾燥後、40℃で22時間乾燥して、標記化合物EX4-(I)-A-2（583 mg）を白色アモルファスとして得た。

[0379] 反応性基（N-（2-アミノエチル）-4-アジドベンザミド基）の導入率は、5.3mol％（NMR積分比）であった。

[0380] （実施例4-2）

N-（2-（2-アミノエトキシ）エチル）-4-アジドベンズアミド基導入アルギン酸の合成（EX4-2-(I)-A-2）：

[化148]



[0381] <工程1> tert-ブチル (2- (2- (4-アジドベンザミド) エトキシ) エチル) カルバメート (化合物EX4-2-1M-1) の合成:

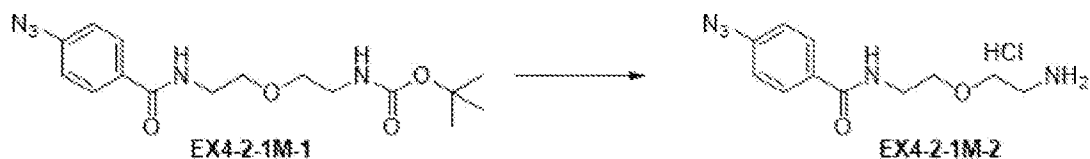
[化149]

[0382] 4-アジド安息香酸 [CAS: 6427-66-3] (EX4-SM、300 mg)、tert-ブチル (2- (2-アミノエトキシ) エチル) カルバメート [CAS: 127828-22-2] (376 mg) をアセトニトリル (6.0 mL) に溶解した。O- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.77 g)、ジイソプロピルエチルアミン (707 μ L) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル (20 mL)、水 (10 mL) を加え、分液した。有機層を、水 (10 mL)、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残さを、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (20%酢酸エチル/n-ヘプタン~70%酢酸エチル/n-ヘプタン) で精製して、標記化合物EX4-2-IM-1 (673 mg) を淡黄色ガム状物として得た。

[0383] NMRデータ (CDCl₃) (δ : ppm): 7.83 (2H、d、J = 9 Hz)、7.08 (2H、d、J = 9 Hz)、6.61 (1H、brs)、4.84 (1H、brs)、3.68–3.64 (4H、m)、3.56 (2H、t、J = 5 Hz)、3.34 (2H、q、J = 5 Hz)、1.44 (9H、s)

[0384] <工程2> N-(2-(2-アミノエトキシ)エチル)-4-アジドベン
ザミド 塩酸塩 (化合物EX4-2-1M-2) の合成:

[化150]

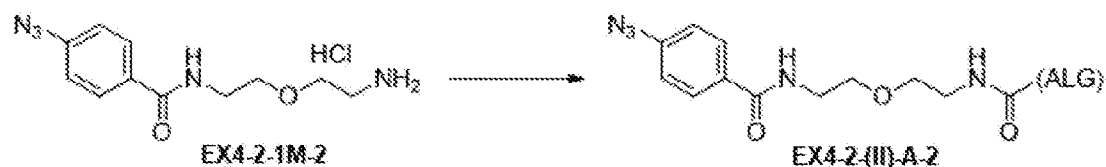


[0385] (実施例4-2) <工程1>で得られた化合物 (EX4-2-1M-1、670 mg) に、氷水冷下、4 既定-塩化水素 / 1, 4-ジオキサン (4.7 mL) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液にジイソプロピルエーテル (14 mL) を加え、30分間攪拌した。得られた固体をろ取し、ジイソプロピルエーテルで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物 EX4-2-1M-2 (604 mg) を淡ベージュ色固体として得た。

[0386] NMRデータ (DMSO- d_6) (δ : ppm) : 8.61 (1H、t、 J = 6 Hz)、7.95 (3H、brs)、7.93 (2H、d、 J = 9 Hz)、7.20 (2H、d、 J = 9 Hz)、3.62 (2H、t、 J = 5 Hz)、3.57 (2H、t、 J = 6 Hz)、3.46 (2H、q、 J = 6 Hz)、3.02-2.93 (2H、m)、LC-MS (free amine) : RT=0.57 (分)、 $[M+H]^+ = 250$

[0387] <工程3> N-(2-(2-アミノエトキシ)エチル)-4-アジドベンザミド基導入アルギン酸 (EX4-2-(II)-A-2) の合成:

[化151]



[0388] 1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (118 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (366.09 mg)、1モル濃度-重曹水 (274.51 μ L) を

加えた。続いて、（実施例4-2）＜工程2＞で得られた化合物EX4-2-1M-2（78.44 mg）の水（1 mL）及びエタノール（1 mL）溶液を室温にて加え、40℃で4時間攪拌した。塩化ナトリウム（1.2 g）を室温で加えた後、エタノール（237 mL）を加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥して、標記化合物EX4-2-（11）-A-2（1.17 g）を白色固体として得た。

当該白色固体を80 mLの水に溶解し、凍結乾燥して、標記化合物EX4-2-（11）-A-2（1.14 g）を白色綿状物として得た。

[0389] 反応性基（N-（2-（2-アミノエトキシ）エチル）-4-アジドベンザミド基）の導入率は、2.72 mol%（NMR積分比）であった。

[0390] [表12]

実施例	測定波長 (nm)	分子量 (Da)	重量平均分子量 (Da)	導入率 (mol%)
1a	280	1万2千～265万	153万	6.9(*)
2a	255	1万5千～253万	151万	6.1(*)

(*)NMR積分比

[0391] [反応性基又は相補的な反応性基の導入率測定]

反応性基又は相補的な反応性基導入率は、アルギン酸の繰り返し単位であるウロン酸単糖単位あたりに導入された反応性基又は相補的な反応性基の数を百分率で表した値を意味する。

本実施例においては、反応性基又は相補的な反応性基導入率（mol%）は、¹H-NMRの積分比により計算した。又、導入率の算出に必要なアルギン酸の量は、検量線を利用したカルバゾール硫酸法により測定し、反応性基又は相補的な反応性基の量は、検量線を利用した吸光度測定法により測定することもできる。

[0392] [分子量の測定]

実施例で得られた反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸固体を0.15 mol/LのNaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝

液 (pH 7.4) に溶解し 0.1% 溶液を調製し、孔径 0.22 μm のポリエーテルスルホン製ろ過フィルター (Minisart High Flow Filter、Sartorius 社) を通し不溶物を除いた後、ゲルろ過用サンプルとした。各サンプルのスペクトルを分光光度計 DU-800 (Beckman-Coulter 社) により測定し、各化合物のゲルろ過における測定波長を決定した。特異的な吸収波長を持たない化合物に関しては、示差屈折計を用いた。

[0393] ゲルろ過用サンプルの 200 μL を Superose 6 Increase 10/300 GL カラム (GEヘルスケアサイエンス社) に供した。ゲルろ過は、クロマトグラフ装置として AKTA Explorer 10S を、展開溶媒として 0.15 mol/L NaCl を含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を使用し、室温で流速 0.8 mL/min の条件で実施した。サンプルの溶出プロファイルは、各化合物で決定した波長の吸収をモニターし作製した。得られたクロマトグラムは、Unicorn 5.31 ソフトウェア (GEヘルスケアサイエンス社) にて解析し、ピーク範囲を決定した。

[0394] 反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸の分子量は、ブルーデキストラン (分子量 200 万 Da、SIGMA 社)、チログロブリン (分子量 66.9 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社) フェリチン (分子量 44 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社) アルドラゼ (分子量 15.8 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社)、コンアルブミン (分子量 7.5 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社)、オブアルブミン (分子量 4.4 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社)、リボヌクレアーゼ A (分子量 1.37 万 Da、GEヘルスケアサイエンス社) 及びアプロチニン (分子量 6500 Da、GEヘルスケアサイエンス社) を標準品として用い、反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸と同じ条件でゲルろ過を行い、各成分の溶出液量を Unicorn ソフトウェアにて決定した。この各成分の溶出液量を横軸に、分子量の対数値を縦軸にそれぞれプロットし、直線回帰

し、検量線を作成した。検量線は、ブルーデキストランからフェリチンまで、フェリチンからアプロチニンまでの2種類を作成した。

[0395] この検量線を用いて、先に得られたクロマトグラムの溶出時間 i における分子量 (M_i) を計算した。次いで、溶出時間 i における吸光度を読み取り H_i とした。これらのデータから重量平均分子量 (M_w) を以下の式から求めた。

[0396] [数1]

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

[0397] (実施例5)

平板型アルギン酸ゲルの製造

[0398] [アルギン酸溶液の調製]

各実施例で得られたアルギン酸誘導体を用いて、1.6重量%もしくは3.3重量%の水溶液を調製し、ミニザルトハイフロー（ザルトリウス, 0.2 μ m、Cat. 16532GUK）を用いてろ過滅菌する。濾過滅菌後の水溶液の塩濃度を調整し、1.5重量%又は3.0重量%の生理食塩水溶液とした。

実施例1 (a, b, c) のアルギン酸：1.5重量%生理食塩水溶液
(実施例5-1a、実施例5-1b、実施例5-1cの溶液)

実施例2 (a, b, c) のアルギン酸：3.0重量%生理食塩水溶液
(実施例5-2a、実施例5-2b、実施例5-2cの溶液)

実施例3 (a) のアルギン酸：1.5重量%生理食塩水溶液 (実施例5-3aの溶液)

実施例4のアルギン酸：3.0重量%生理食塩水溶液 (実施例5-4の溶液)

あるいは、各実施例で得られたアルギン酸誘導体を用いて、1.0重量%の生理食塩水溶液を調製し、MILLEX GV 0.22 μm (Millipore, 0.22 μm 、Cat. SLGV033RS) を用いてろ過滅菌する。

実施例1 (d) のアルギン酸：1.0重量%生理食塩水溶液 (実施例5-1 dの溶液)

実施例2 (d) のアルギン酸：1.0重量%生理食塩水溶液 (実施例5-2 dの溶液)

実施例3 (b) のアルギン酸：1.0重量%生理食塩水溶液 (実施例5-3 bの溶液)

実施例4-2のアルギン酸：1.0重量%生理食塩水溶液 (実施例5-5の溶液)

以下の実施例では、これらの各アルギン酸生理食塩溶液を、適宜濃度調整して試験に用いた。

実施例1 (a, b, c) 又は実施例3 (a) で調製したアルギン酸と実施例2 (a, b, c) 又は実施例4で調製したアルギン酸とを組み合わせ、化学架橋したアルギン酸ゲルを作製する。

より具体的には、実施例5-1 (a, b, c) の溶液と実施例5-2 (a, b, c) の溶液とを組み合わせ、実施例5-3 aの溶液と実施例5-4の溶液とを組み合わせる。

また、実施例1 (d) 又は実施例3 (b) で調製したアルギン酸と実施例2 (d) 又は実施例4-2で調製したアルギン酸とを組み合わせ、化学架橋したアルギン酸ゲルを作製する。

より具体的には、実施例5-1 dの溶液と実施例5-2 dの溶液とを組み合わせ、実施例5-1 dの溶液と実施例5-5の溶液とを組み合わせ、実施例5-3 bの溶液と実施例5-2 dの溶液とを組み合わせ、実施例5-3 b

の溶液と実施例 5-5 の溶液とを組み合わせる。

[0399] [平板型アルギン酸ゲルの製造]

<一般的な調製方法>

3. 5 cm 培養皿に 55 mm o l / L 塩化カルシウム (CaCl_2) 水溶液を 2 mL いれ、400 μL のアルギン酸溶液を P1000 ピペットで滴下し、10 分間静置する。この間、5 分以上経って固まりだしたら、手で培養皿を振盪させてアルギン酸の縁を固める。10 分後、塩化カルシウム溶液を 4 mL 追加で添加し、5 分静置する。生理食塩水で 3 回洗浄し、平板型のアルギン酸ゲルを得る。

ここで、平板型ゲルとは、例えば、短直径が 12 ~ 15 mm、長直径が 12 ~ 18 mm、厚さが 0.5 ~ 5 mm 程度の大きさのアルギン酸ゲルであり、円形、四角形、六角形、八角形などを取ることも可能であり、特に限定されない。

[0400] (実施例 6)

アルギン酸ゲルの生体適合性試験

[0401] [実施例 6-1 : 移植用の平板型アルギン酸ゲルの製造]

実施例 5 に記載の「平板型アルギン酸ゲルの製造」に準じて、55 mm o l / L の塩化カルシウム水溶液を用いて、平板型アルギン酸ゲルを製造した。アルギン酸溶液は、1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：B-2）水溶液、アルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液、実施例 5-1 b の溶液と実施例 5-2 b の溶液とを 2 : 1（容量比）で混和して得られる溶液、実施例 5-1 d の溶液と実施例 5-2 d の溶液とを 1 : 1（容量比）で混和して得られる溶液、実施例 5-1 d の溶液と実施例 5-5 の溶液とを 1 : 1（容量比）で混和して得られる溶液、実施例 5-3 b の溶液と実施例 5-2 d の溶液とを 1 : 1（容量比）で混和して得られる溶液、実施例 5-3 b の溶液と実施例 5-5 の溶液とを 1 : 1（容量比）で混和して得られる溶液を用いて、下記の平板型アルギン酸ゲルを調製した。

調製した平板上アルギン酸ゲルをD-MEM培地で終夜培養した。翌日、無血清D-MEM培地に置換し、さらに、生理食塩水中へ置換し、1時間以上静置して、動物への移植用のアルギン酸ゲルを得た。

[0402] 実施例6-1a:

1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：B-2）水溶液を用いて、短直径（12mm）-長直径（15mm）-厚さ（5mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。この平板型アルギン酸ゲルの写真を図1（a）として示した。

[0403] 実施例6-1b:

実施例5-1bの溶液と実施例5-2bの溶液を2:1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（12mm）-長直径（12mm）-厚さ（4mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては1%濃度に調製した。この平板型アルギン酸ゲルの写真を図2（a）として示した。

[0404] 実施例6-1c:

実施例5-1bの溶液と実施例5-2bの溶液を2:1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（12mm）-長直径（12mm）-厚さ（4mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては2%濃度に調製した。この平板型アルギン酸ゲルの写真を図3（a）として示した。

[0405] 実施例6-1d:

1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液を用いて、短直径（約12mm）-長直径（約12mm）-厚さ（約4mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。

[0406] 実施例6-1e:

実施例5-1dの溶液と実施例5-2dの溶液を1:1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（約12mm）-長直径（約12mm）-厚さ（約4mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては1%濃度に調製した。

[0407] 実施例 6－1 f：

実施例 5－1 d の溶液と実施例 5－5 の溶液を 1：1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（約 12 mm）－長直径（約 12 mm）－厚さ（約 4 mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては 1％濃度に調製した。

[0408] 実施例 6－1 g：

実施例 5－3 b の溶液と実施例 5－2 d の溶液を 1：1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（約 12 mm）－長直径（約 12 mm）－厚さ（約 4 mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては 1％濃度に調製した。

[0409] 実施例 6－1 h：

実施例 5－3 b の溶液と実施例 5－5 の溶液を 1：1（容量比）で混合した溶液を用いて、短直径（約 12 mm）－長直径（約 12 mm）－厚さ（約 4 mm）の平板上アルギン酸ゲルを得た。化学架橋基としては 1％濃度に調製した。

[0410] 〔実施例 6－2：平板型アルギン酸ゲルの動物への移植試験〕

実施例 6－1 a～c で調製した各アルギン酸ゲルを健常マウス C57BL／6N Cr の腹腔内に移植した。5 週間後開腹してゲルを摘出し、ゲルの状態を確認した。また腹腔内の癒着や炎症も確認した。

また、実施例 6－1 d～h で調製した各アルギン酸ゲルを健常マウス C57BL／6N Cr の腹腔内に移植した。1，2 又は 4 週間後開腹してゲルを摘出し、ゲルの状態を確認した。また腹腔内の癒着や炎症も確認した。

[0411] 実施例 6－1 a のアルギン酸ゲル：摘出したアルギン酸ゲルは元の形状を維持しておらず、バラバラで、残存して確認できるゲルの回収量も少ない状態であった。その状態の写真を図 1（b）として示した。

実施例 6－1 b のアルギン酸ゲル：摘出したアルギン酸ゲルは、ゲルのサイズ変化はなかった。その状態の写真を図 2（b）として示した。

実施例 6－1 c のアルギン酸ゲル：摘出したアルギン酸ゲルは、割れてはいるが、元の形状はほぼ維持しており、ゲルのサイズ変化はなかった。その状態の写真を図 3（b）として示した。

[0412] 実施例 6－1 d のアルギン酸ゲル：1 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは元の形状を維持しておらず、バラバラで、残存して確認できるゲルの回収量も少ない状態であった。

実施例 6－1 f のアルギン酸ゲル：1 週間後、2 週間後、4 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは、いずれもゲルのサイズ変化はなかった。

実施例 6－1 g のアルギン酸ゲル：1 週間後、2 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは、いずれもゲルのサイズ変化はなかった。4 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは、割れてはいるが、元の形状はほぼ維持しており、ゲルのサイズ変化はなかった。

実施例 6－1 h のアルギン酸ゲル：1 週間後、2 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは、いずれもゲルのサイズ変化はなかった。4 週間後に摘出したアルギン酸ゲルは、割れてはいるが、元の形状はほぼ維持しており、ゲルのサイズ変化はなかった。

[0413] 実施例 6－1 a、実施例 6－1 b、実施例 6－1 c のアルギン酸ゲルについては、移植し、5 週間後に開腹し確認したところ、腹腔内臓器の間で癒着・炎症はなかった。当該ゲルが埋もれていた大網や腸管膜も癒着・炎症はなかった。バラバラになったゲルが接着していた肝臓に癒着・炎症はなかった。

[0414] 実施例 6－1 d、実施例 6－1 f、実施例 6－1 g、実施例 6－1 h のアルギン酸ゲルについては、移植し、1 週間後、2 週間後、及び 4 週間後に開腹し確認したところ、腹腔内臓器の間で癒着・炎症はなかった。当該ゲルが埋もれていた大網や腸管膜も癒着・炎症はなかった。バラバラになったゲルが接着していた肝臓に癒着・炎症はなかった。

[0415] [実施例 6－3：平板型アルギン酸ゲルの細胞生存確認試験]

膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の株化細胞である MIN 6 細胞 (5×10^6

c e l l s) を、実施例 6-1 a、実施例 6-1 b、実施例 6-1 c、実施例 6-1 d、実施例 6-1 e、実施例 6-1 f、実施例 6-1 g、実施例 6-1 h のアルギン酸ゲルの調製に用いた各アルギン酸溶液に添加し後、アルギン酸ゲルを作製し、D-MEM 培地で 3~4 週間培養して、M I N 6 細胞の生存を顕微鏡で確認した。

実施例 6-1 a、実施例 6-1 b、実施例 6-1 c、実施例 6-1 d、実施例 6-1 e、実施例 6-1 f、実施例 6-1 g、実施例 6-1 h のアルギン酸ゲル中における細胞増殖は良好であり、顕微鏡下で十分細胞が生存していることが観察された。

[0416] (実施例 7)

糖尿病モデルマウスへの腹腔内移植による移植用デバイスの評価

[0417] [ブタ膵島の単離]

当技術の公知の手順、或いは、霜田ら (S h i m o d a ; Cell Transplantation、第 21 巻、501-508 頁、2012 年) に記載された方法、もしくはエドモントンプロトコールを用いた標準のリコルディー技術等に準じて、無菌下で成体のブタから無菌の生存可能な膵臓を得て、膵島細胞を単離した。

[0418] [単離膵島の培養方法]

次いで、単離した膵島を、野口 (N o g u c h i) ら (Transplantation Proceedings, 42, 2084-2086 (2010)) の方法に準じて、培地中 (Connaught Medical Research Laboratory (CMRL)-based Miami-defined media #1 (MM1; Mediatech-Cellgro, Herndon, VA)-supplemented with 0.5% human serum albumin.)、5%CO₂ / 95%空気の湿潤雰囲気中で 37℃で 1 日間培養した。培養した膵島を移植用デバイスの作製に使用した。

[0419] [移植用デバイスの調製]

架橋基の導入率 5.0mol% の実施例 1 b と導入率 4.9mol% の実施例 2 b とを用いて、各々、1.5 重量% の実施例 5-1 b の生理食塩水溶液及び 3.0 重量% の実施例 5-2 b の生理食塩水溶液を調整する。

実施例 5-1 b の溶液と実施例 5-2 b の溶液を 2 : 1（容量比）で混合することで、架橋基の導入率が 5 m o l % 相当の 2 重量%のアルギン酸溶液が調製できる。

実施例 5-1 b と実施 5-2 b の溶液を 2 倍、及び 4 倍に希釈した溶液を調製し、各々 2 : 1（容量比）で混合し、溶液を調製する。

2 倍希釈した溶液の混合溶液を実施例 7-1 の溶液、4 倍希釈した溶液の混合溶液を実施例 7-2 の溶液とする。

また、同様な方法で、実施例 5-1 c の溶液と実施例 5-2 c の溶液とを 2 : 1（容量比）で混合し、4 倍希釈した溶液の混合液を実施例 7-3 の溶液とする。

[0420] 実施例 7-1 及び実施例 7-2 の溶液（100 μ L、200 μ L）、並びに実施例 7-3 の溶液（100 μ L、200 μ L）で各々調製した移植用デバイスは以下の通りである。

<移植用デバイス>

実施例 7-1 a : 実施例 7-1 の溶液を 100 μ L 用いて調製した移植用デバイス

実施例 7-1 b : 実施例 7-1 の溶液を 200 μ L 用いて調製した移植用デバイス

実施例 7-2 a : 実施例 7-2 の溶液を 100 μ L 用いて調製した移植用デバイス

実施例 7-2 b : 実施例 7-2 の溶液を 200 μ L 用いて調製した移植用デバイス

実施例 7-3 a : 実施例 7-3 の溶液を 100 μ L 用いて調製した移植用デバイス

実施例 7-3 b : 実施例 7-3 の溶液を 200 μ L 用いて調製した移植用デバイス

[0421] 100 μ L または 200 μ L のブタ脾島含有 0.5 重量%~1.0 重量%アルギン酸溶液を作製するため、実施例 5-1 b のアルギン酸溶液（B1）に

デバイス1個分に分注した膵島ペレットを懸濁後、実施例5-2bのアルギン酸溶液(C1)と混合し、ブタ膵島を懸濁させた実施例7-1a、実施例7-1b、実施例7-2a、及び実施例7-2bの溶液とした。1デバイスあたりのブタ膵島量10000 I.E.Qのペレット量(10~30 μ L)に応じて、実施例5-1bのアルギン酸溶液(B1)および実施例5-2bのアルギン酸溶液(C1)は、生理食塩水にて濃度調製を行った。

また、100 μ Lまたは200 μ Lのブタ膵島含有0.5重量%~1.0重量%アルギン酸溶液を作製するため、実施例5-1cのアルギン酸溶液(B1)にデバイス1個分に分注した膵島ペレットを懸濁後、実施例5-2cのアルギン酸溶液(C1)と混合し、ブタ膵島を懸濁させた実施例7-3a及び実施例7-3bの溶液とした。1デバイスあたりのブタ膵島量10000 I.E.Qのペレット量(10~30 μ L)に応じて、実施例5-1cのアルギン酸溶液(B1)および実施例5-2cのアルギン酸溶液(C1)は、生理食塩水にて濃度調製を行った。

[0422] 実施例7-1a、実施例7-2a、実施例7-2b及び実施例7-3bとして調製したブタ膵島含有アルギン酸溶液は、迅速に半透膜(スペクトラム社製透析チューブ「スペクトラ/ポアCE(分画分子量10万)」)に封入(半透膜の一端をヒートシーリングした後、アルギン酸溶液を入れて、チタンクリップで封入)し、55 mmol/L CaCl_2 溶液中に10~15分間漬し、デバイス中のアルギン酸溶液をゲル化した。

[0423] ゲル化後、当該移植用デバイスは、生理食塩水にて3分洗浄し、移植用培地(M199-ニコチンアミド-FBS+P/S)で終夜培養した。次いで、移植用無血清培地(M199+P/S)に30分浸してから、移植前洗浄用の生理食塩水+P/Sで30分浸して洗浄して、マウスへの移植用デバイスとした。作製した移植用デバイスの写真を図4に示した。

[0424] ・移植用デバイスの大きさ：縦10 mm×横26 mm×厚さ約2 mm

・培養条件：M199+Nicotinamide+Fetal bovine serum+ Penicillin/Streptomycin (P/S), 0/N

- ・洗浄条件：１）移植用無血清培地（M199+P/S），30min, r.t.
- ２）生理食塩水（saline+P/S），30min, r.t.

[0425] [表13]

移植用デバイス	アルギン酸溶液	アルギン酸
実施例 7-1 (a, b)	実施例 5-1 b 及び実施例 5-2 b の溶液の 2 倍希釈に相当	実施例 1 b と実施例 2 b のアルギン酸
実施例 7-2 (a, b)	実施例 5-1 b 及び実施例 5-2 b の溶液の 4 倍希釈に相当	実施例 1 b と実施例 2 b のアルギン酸
実施例 7-3 (a, b)	実施例 5-1 c 及び実施例 5-2 c の溶液の 4 倍希釈に相当	実施例 1 c と実施例 2 c のアルギン酸

[0426] [移植用デバイスの評価（移植試験）]

使用動物：

野生型免疫正常マウス（C57BL/6Ncr）の糖尿病モデルマウス。13～17週齢、雄、25 ～35 g。Streptozocin溶液の尾静注、110 mg/kg、単回投与にて約1週間で糖尿病モデルを作製した。随時血糖値が300 mg/dL以上、600 mg/dL以下の個体を糖尿病モデルとした。

[0427] 投与方法・移植方法：

三種混合麻酔薬（ドミツール/ミダゾラム/ベトルファール）を0.25～0.3 mL腹腔内投与にて麻酔し、麻酔下にて腹部剃毛、消毒後、腹部を約 2cm正中切開し、洗浄後の移植用デバイスを腹腔内に単純留置、固定無しで移植した。移植後、閉腹しメデトミジン拮抗薬（アンチセダン）を0.25～0.3 mL皮下注射し覚醒させた。手術はヒートパッド上でマウスを保温して行った。免疫抑制剤の投与無し。補液・抗生剤・抗炎症剤等の投与も無し。

[0428] 血糖値・体重測定法：

移植前及び、移植後day1から数日置きに日中定時に随時血糖値を測定した。メスによる尾の切創からの血液1滴で、グルテストNeoアルファおよびグルテストNeoセンサーを使用し血糖値を測定した。体重は随時血糖値測定直前に電子天秤にて測定した。デバイス移植マウスの随時血糖値は、300 mg/dL未満のものを糖尿病が治癒した個体とした。

実施例 7-2 a の移植デバイスを用いた際の移植後 day75までの血糖値変

動を図5-1、体重の変動を図6-1に示した。また、移植後 day 305までの血糖値変動を図5-2、体重の変動を図6-2に示した。さらに、移植後 day 305で移植用デバイスを取り出し、別の糖尿病モデルマウスへ移植し（ここで、糖尿病モデルマウスへデバイスを移植し、移植したデバイスを所定期間経過後に取り出し、取り出したデバイスを別の糖尿病モデルマウスへ移植することを「リレー移植」と呼ぶ）、リレー移植後 day 26までの血糖値変動を図5-3、体重の変動を図6-3に示した。図5-1～3及び図6-1～3中、#1及び#2は各々移植したマウス固体を識別する番号を意味する。

体重変動には異常はなく、血糖値は75日間正常値に維持された。また、移植後305日間及び更なるリレー移植後26日間、体重変動には異常はなく、血糖値は正常に維持された。

[0429] 実施例7-2bの移植デバイスを用いた際の血糖値変動は、実施例7-2aと同様に、体重変動には異常はなく、血糖値は75日間正常値に維持された。

また、実施例7-2bの移植用デバイスを用いた際の移植後 day 305までの血糖値変動を図7-1、体重の変動を図8-1に示した。さらに、移植後 day 305で移植用デバイスを取り出し、別の糖尿病モデルマウスへ移植し、リレー移植後 day 26までの血糖値変動を図7-2、体重の変動を図8-2に示した。

移植後305日間及び更なるリレー移植後26日間、体重変動には異常はなく、血糖値は正常に維持された。

[0430] 実施例7-3bの移植デバイスを用いた際の血糖値変動は、実施例7-2aと同様に、体重変動には異常はなく、血糖値は75日間正常値に維持された。

また、実施例7-3bの移植用デバイスを用いた際の移植後 day 305までの血糖値変動を図9-1、体重の変動を図10-1に示した。さらに、移植後 day 305で移植用デバイスを取り出し、別の糖尿病モデルマウスへ移植し、リレー移植後 day 26までの血糖値変動を図9-2、体重の変動を図10-2

に示した。なお、# 2 及び # 3 は途中でデバイスを摘出し、試験を終了している。

移植後 305 日間及び更なるリレー移植後 26 日間、体重変動には異常はなく、血糖値は正常に維持された。

[0431] 前記移植用デバイスの作製において、アルギン酸誘導体を用いないで脾臓を半透膜に封入した移植用デバイスを作製した。前記の「移植用デバイスの評価（移植試験）」と同様の方法でマウスに移植したところ、糖尿病マウスの血糖抑制効果は認められなかった。

[0432] 組織反応性の評価：

組織反応性の評価は以下のように行った。

移植後数週後、または随時血糖値上昇後、デバイス移植マウスを三種混合麻酔薬にて麻酔し、麻酔下にて腹部消毒、腹部を約 4 cm 正中切開し、移植デバイスを腹腔内臓器の間から探した。臓器間にデバイスの一部が見られたら鑷子にてゆっくりと取り出し、単体でデバイスが取り出せるかどうかを調べる。取り出したデバイスの表面の状況を観察する。

<観察項目>

1. デバイス表面に、血管新生しているかどうかを調べる。血管新生があれば、毛細血管レベルか太い血管までできているか観察する。
2. 次に、臓器や腹膜、大網等と癒着しているか、繋がっているか観察する。臓器が鈍的に剥離が可能か、鋭的に剥離が必要か調べる。
3. 臓器と直接癒着している場合は、どの臓器とデバイスのどの部分（面全体か、一部か、辺か、デバイス折り目部分やシーリング部分か等。）が癒着しているか、確認する。
4. 臓器側に炎症等があるかどうかを確認する。

※ デバイス摘出後、閉腹。拮抗薬を皮下注射し覚醒させる。手術はヒートパッド上でマウスを保温して行う。

[0433] 実施例 7-1 a の移植デバイスを用いた際の、移植 10 週後デバイスを摘出し、組織反応性を観察した結果、（1）デバイス表面に、血管新生してお

らず、(2) デバイスが臓器や腹膜、大網等と癒着しておらず、(3) 臓器が鈍的に剥離が可能であり、臓器と直接癒着しておらず、(4) 臓器側に炎症等は認められなかった。

[0434] 摘出したデバイス内の生存膵島細胞のようすを、以下のような染色、すなわち、(a) D i t h i z o n e による膵島細胞の染色、(b) D i t h i z o n e による膵島細胞の染色、(c) F D A による生細胞の蛍光染色、(d) P I による死細胞の蛍光染色を行った後、また、染色せずアルギン酸ゲル中に分散した膵島細胞を顕微鏡で観察した。その結果、デバイス中に膵島細胞が十分生存していることが確認できた。

[0435] 移植後 10 週後摘出したデバイスを開き、デバイス中のアルギン酸ゲルの形状を確認した。その結果、生体内に長期間置かれた移植用デバイス中のアルギン酸ゲルの形状は維持されていることが明らかとなった。

[0436] 以上ことから、好ましい態様の移植用デバイスは、少なくとも下記の効果の 1 つ以上を示すことが明らかとなった。

(1) 生体適合性や安定性に優れ、細胞毒性も少なく、移植部位における癒着や炎症もほとんどない。

(2) ゲルの溶解が少なく形状が長期間維持される。

(3) 長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能となる。

(4) 長期間使用した後、半透膜中のアルギン酸ゲルは溶解しないで形状を維持可能であり、また膵島の生存・機能維持が可能であり、長期間使用できる。

(5) 交換が可能であり、免疫隔離可能であり、癒着、炎症等も少なく、安全性の高い医療材料となる。

[0437] より好ましい態様の移植用デバイスは、移植成績や機能性に優れ、素材に関して新規であり、糖尿病患者（とりわけ、Ⅰ型糖尿病及びインスリン枯渇型Ⅱ型糖尿病）に移植することにより、長期間にわたり、血糖降下作用を持続させ、血糖を調節することが可能となる。また、ハイドロゲル内のイン

スリン分泌細胞又は膵島の機能が低下した場合に、回収が可能である。あるいは、定期的な交換もしくは追加移植が可能となる。また、移植用デバイスのハイドロゲルに封入するインスリン分泌細胞又は膵島として、幹細胞（iPS等）から分化させたインスリン分泌細胞、又はヒト膵島を用いることも可能である。従って、より好ましい態様の移植用デバイスは有用である。

請求の範囲

【請求項1】 インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスであって、前記ハイドロゲルがアルギン酸誘導体を化学架橋によりゲル化したものである、移植用デバイス。

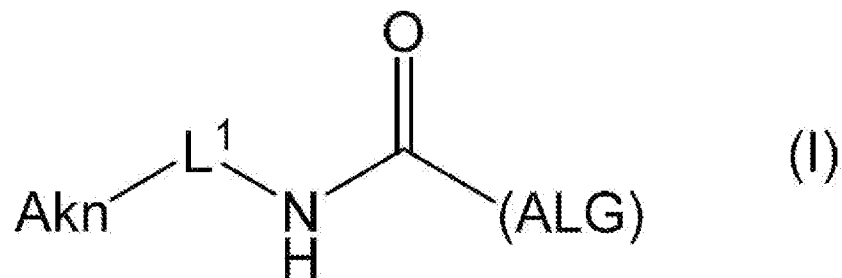
【請求項2】 前記ハイドロゲルが、架橋としてH u i s g e n反応により形成されるトリアゾール環による化学架橋を含む、請求項1に記載の移植用デバイス。

【請求項3】 前記化学架橋が、以下の（A）及び（B）に記載のアルギン酸誘導体の組み合わせによる化学架橋である、請求項1又は2に記載の移植用デバイス

（A）：

アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー（ $-L^1-$ ）を介して、環状アルキン基（A k n）が導入された、下記式（I）：

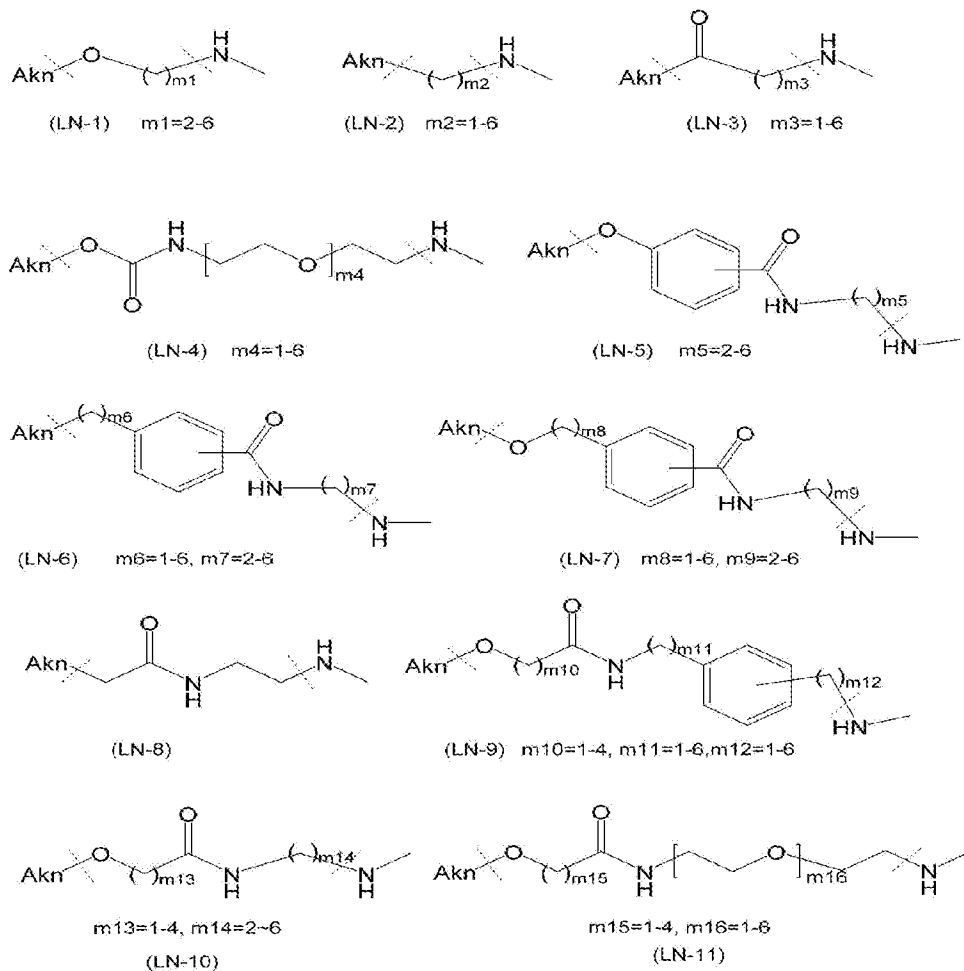
[化152]



〔式（I）中、（A L G）は、アルギン酸を表わし； $-\text{NHCO}-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-L^1-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕

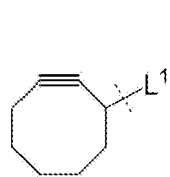
：

[化153]

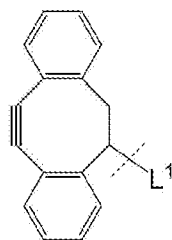


の群から選択される2価のリンカーを表わし；Aknは、下記部分構造式〔各式中、波線右側は含まない〕：

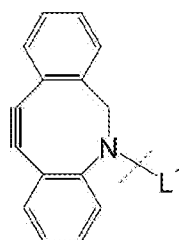
[化154]



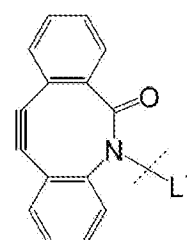
(AK-1)



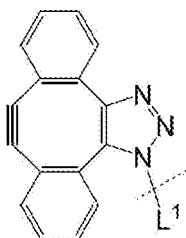
(AK-2)



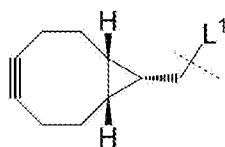
(AK-3)



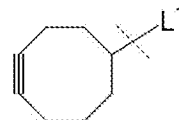
(AK-4)



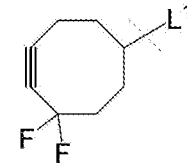
(AK-5)



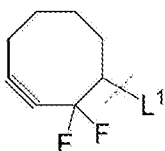
(AK-6)



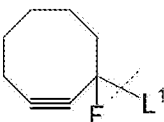
(AK-7)



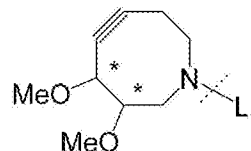
(AK-8)



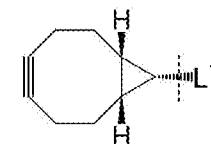
(AK-9)



(AK-10)



(AK-11)



(AK-12)

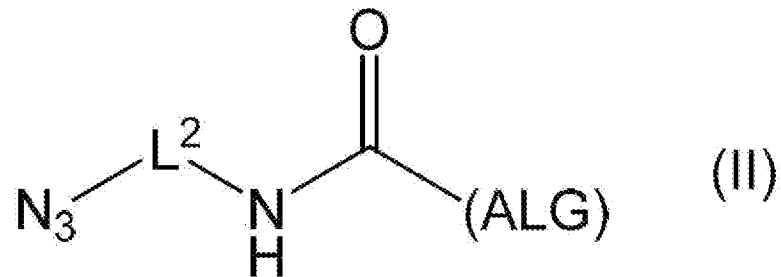
の群から選択される環状アルキン基を表わし、星印はキラル中心を表す] で表わされるアルギン酸誘導体；

(B)：

アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカー(—L²—)を介して、アジド基が導入された、下記式

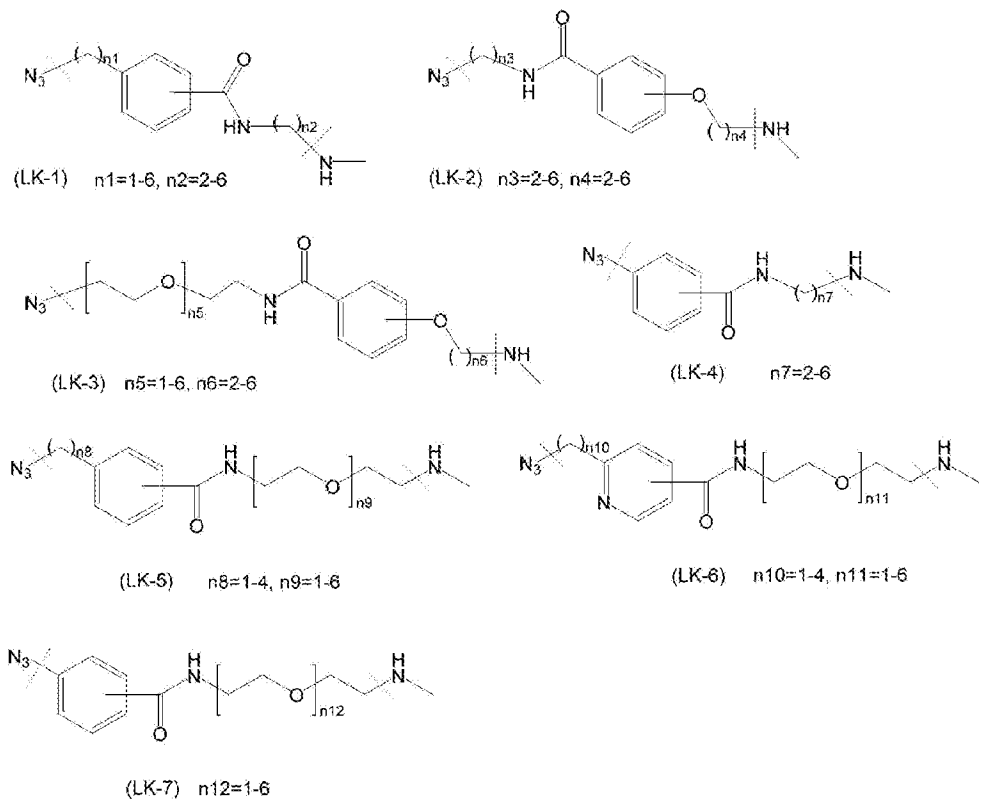
(I I)：

[化155]



[式 (I I) 中、(ALG) は、アルギン酸を表わし； $-\text{NHCO}-$ は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし； $-\text{L}^2-$ は、下記部分構造式〔各式中、両端の波線外側は含まない〕：

[化156]



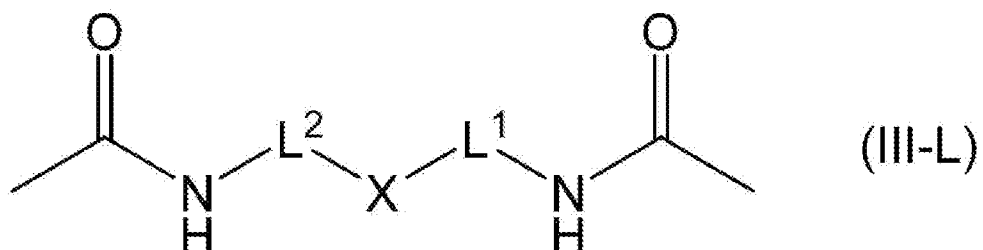
の群から選択される 2 価のリンカーを表わす〕で表わされるアルギン酸誘導体。

[請求項4]

前記化学架橋したアルギン酸誘導体が、第 1 のアルギン酸の任意の

カルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式（III-L）：

[化157]



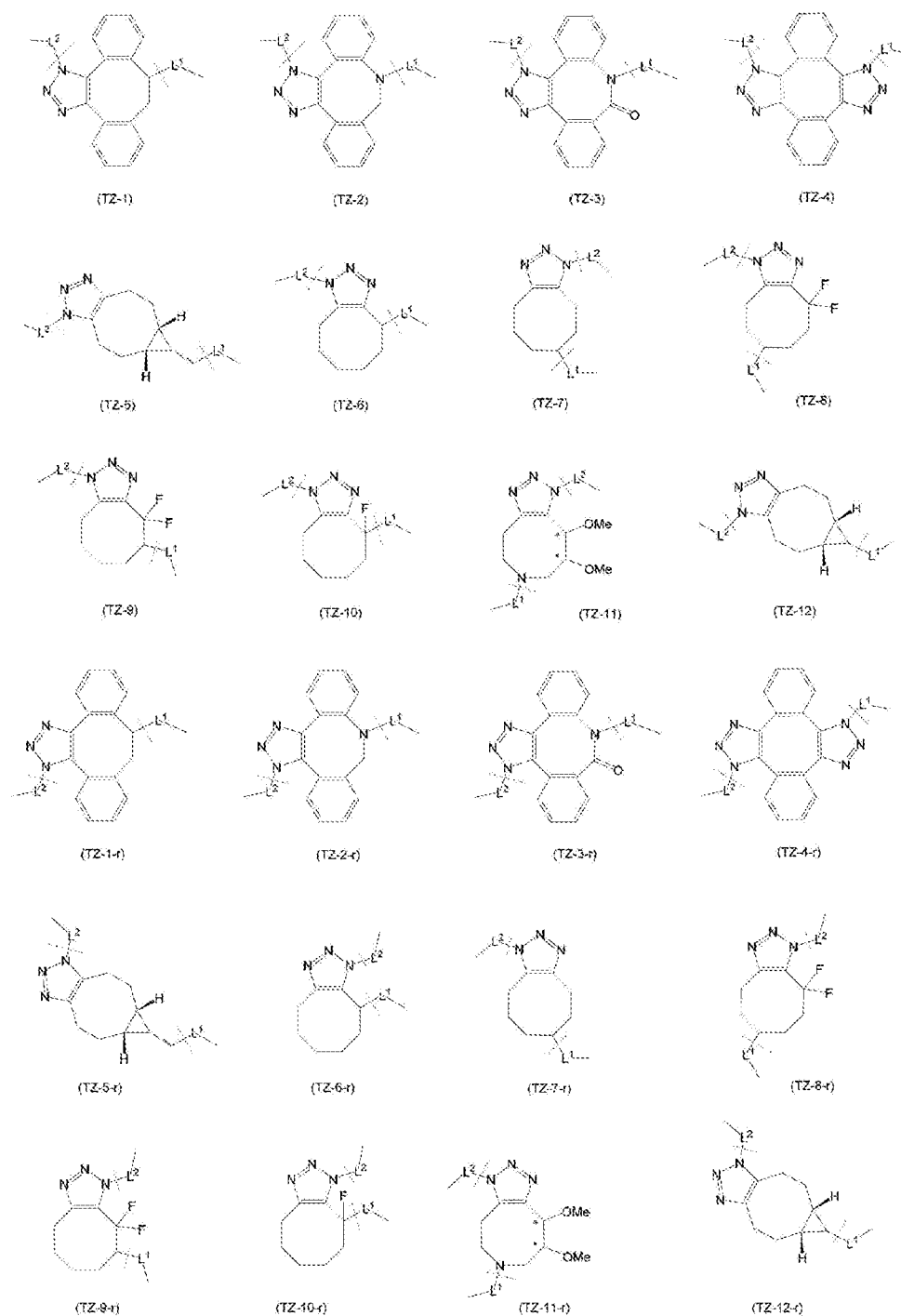
[式（III-L）中、両端の－CONH－及び－NHCO－は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；

－L¹－は、前記請求項3中の定義と同じであり；

－L²－は、前記請求項3中の定義と同じであり；

Xは、下記部分構造式：

[化158]



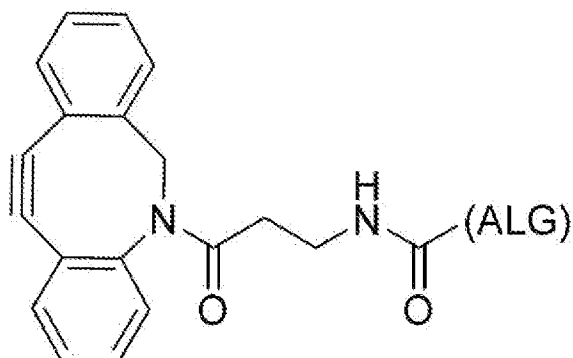
の群から選択される環状基であり（各式中、両端の波線外側は含まない）、星印はキラル中心を表す]を介して結合した架橋アルギン酸である、請求項3に記載の移植用デバイス。

[請求項5]

式 (1) のアルギン酸誘導体が、下記式 (EX-1-(1)-A-

2) であり、

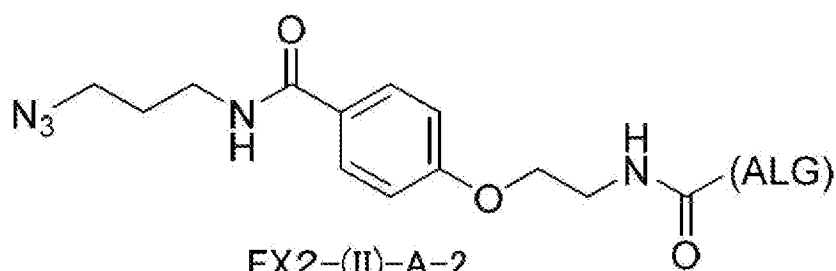
[化159]



EX1-(I)-A-2

式 (11) のアルギン酸誘導体が、下記式 (EX-2-(11)-A-2) である、

[化160]



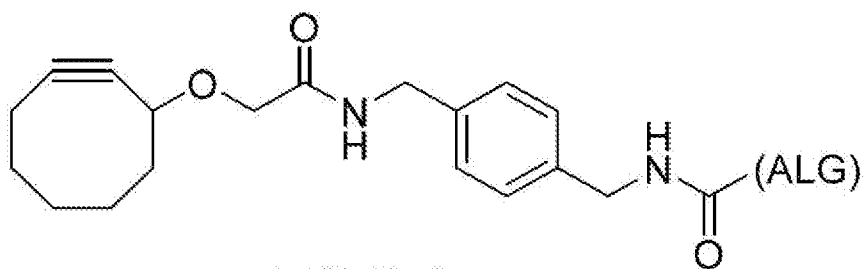
EX2-(II)-A-2

請求項3又は請求項4に記載の移植用デバイス。

[請求項6]

式 (1) のアルギン酸誘導体が、下記式 (EX-3-(1)-A-2) であり、

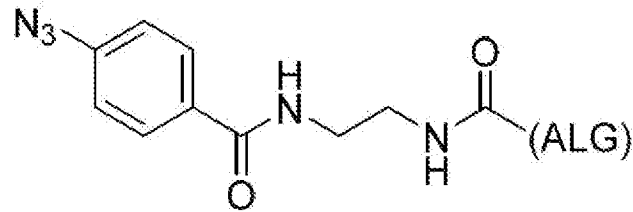
[化161]



EX3-(I)-A-2

式 (I I) のアルギン酸誘導体が、下記式 (E X - 4 - (I I) - A - 2) である、

[化162]



EX4-(II)-A-2

請求項 3 又は請求項 4 に記載の移植用デバイス。

[請求項7] 前記脾臓が、ヒト脾臓またはブタ脾臓である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の移植用デバイス。

[請求項8] 前記脾臓が、ブタの成体の脾臓である、請求項 7 に記載の移植用デバイス。

[請求項9] 前記脾臓が、胎生期、新生児期、または周産期のブタ脾臓である、請求項 7 に記載の移植用デバイス。

[請求項10] 前記ハイドロゲルが、更に半透膜で被覆された、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の移植用デバイス。

[請求項11] 前記半透膜が、セルロース誘導体より形成された透析膜である、請求項 10 に記載の移植用デバイス。

[請求項12] 前記セルロース誘導体が、酢酸セルロースである、請求項 11 に記載の移植用デバイス。

[請求項13] 前記移植用デバイスの移植部位が、皮下又は腹腔内である、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の移植用デバイス。

[請求項14] 前記移植用デバイスの厚さが、0.5 ～ 5 mm である、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の移植用デバイス。

[請求項15] 前記移植用デバイスの厚さが、1 ～ 3 mm である、請求項 14 に記載の移植用デバイス。

- [請求項16] 前記移植用デバイスのハイドロゲルの厚さが、0.5～3 mmである、請求項1～13のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [請求項17] 前記ハイドロゲルの厚さが、0.5～1 mmである、請求項16に記載の移植用デバイス。
- [請求項18] 前記インスリン分泌細胞又は膵島を含むハイドロゲルを作製した後、半透膜中で被覆した、請求項1～17のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [請求項19] 化学架橋によってハイドロゲル化するアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁し、当該インスリン分泌細胞又は膵島を懸濁した溶液を半透膜中に封入した後、当該半透膜を2価金属イオンを含む溶液と接触させることで、半透膜中のアルギン酸誘導体をゲル化して得られる、請求項1～17のいずれか1項に記載の移植用デバイス。
- [請求項20] 前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、請求項19に記載の移植用デバイス。
- [請求項21] 以下の工程（a）～（d）を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法。
- 工程（a）：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程、
- 工程（b）：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、
- 工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液に、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、厚さ0.5～5 mmのゲルを作製する工程、
- 工程（d）：任意選択の工程として、工程（c）で得られたゲルを半透膜で被覆する工程。

[請求項22] 以下の工程（a）～（d）を含む、インスリン分泌細胞又は膵島が封入されたハイドロゲルを含む移植用デバイスの製造方法。

工程（a）：任意選択の工程として、生体から膵臓を摘出し、膵島を分離する工程、

工程（b）：化学架橋によってハイドロゲル化することができるアルギン酸誘導体の溶液に、インスリン分泌細胞、膵島、培養されて得られた膵島細胞、および幹細胞より分化させて得られた膵島細胞からなる群より選択される細胞又は組織を混和する工程、

工程（c）：工程（b）で得られたアルギン酸誘導体の溶液を半透膜に封入する工程、

工程（d）：工程（c）で得られた半透膜を、2価金属イオンを含む溶液と接触させて、半透膜中のアルギン酸溶液をゲル化する工程。

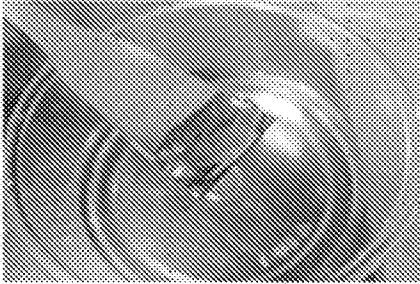
[請求項23] 前記2価金属イオンを含む溶液が、カルシウムイオンを含む溶液である、請求項21又は請求項22に記載の移植用デバイスの製造方法。

[図1]

(a)

12×15×5 mm

移植前ゲル



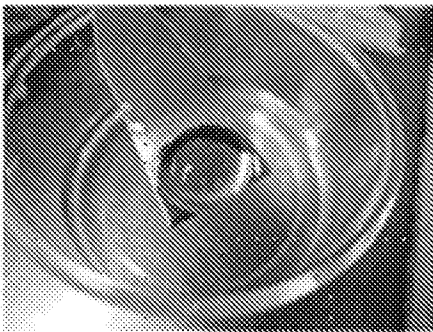
(b)



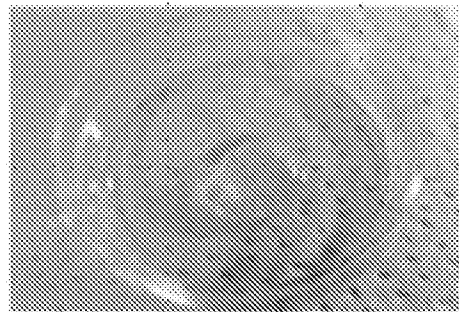
[図2]

(a)

12×12×4 mm



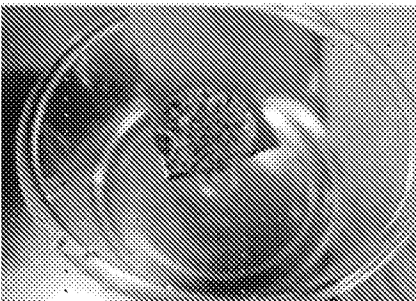
(b)



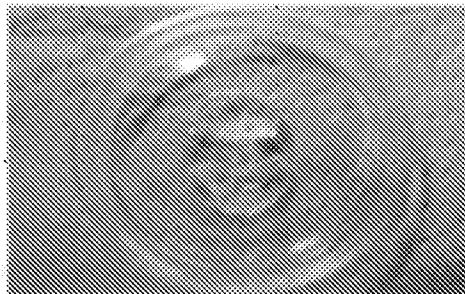
[図3]

(a)

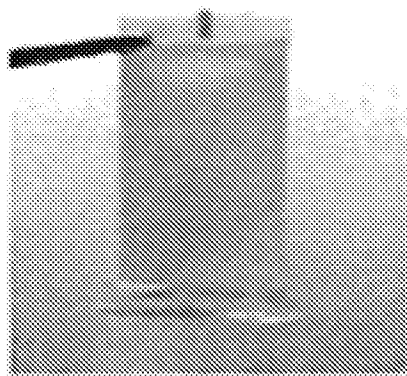
12×12×4 mm



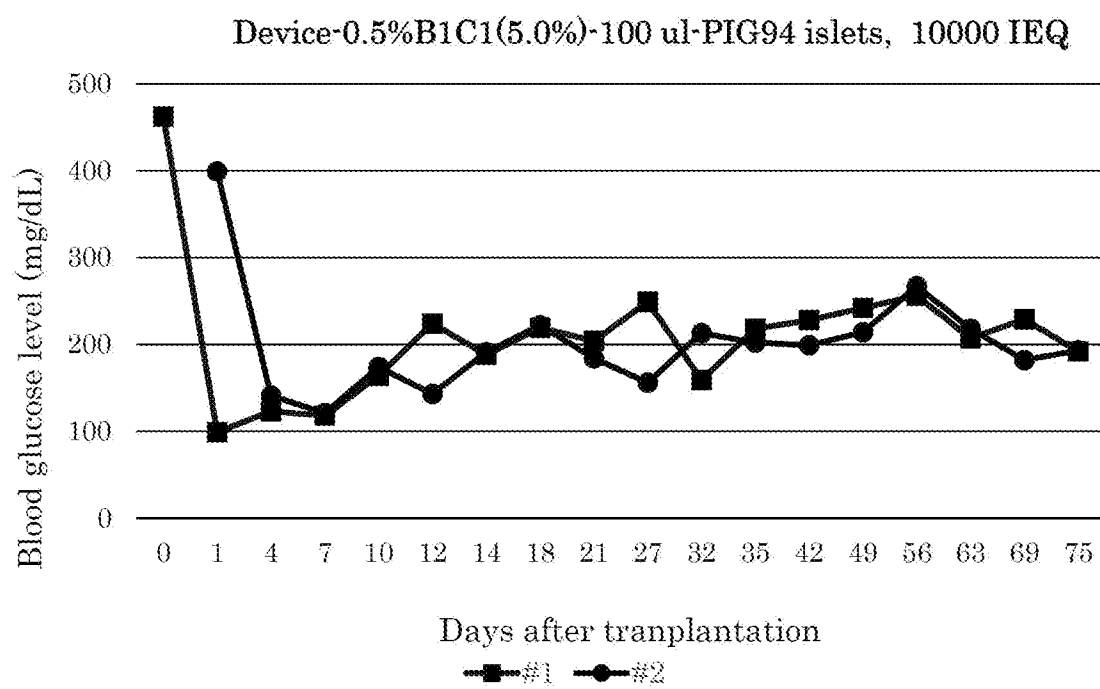
(b)



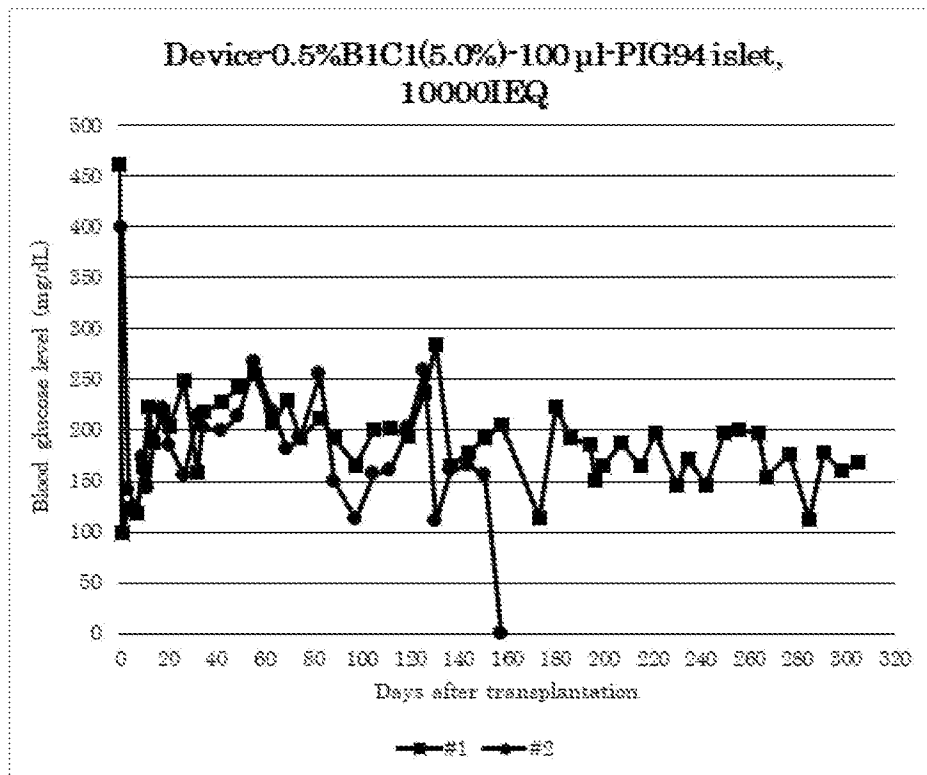
[図4]



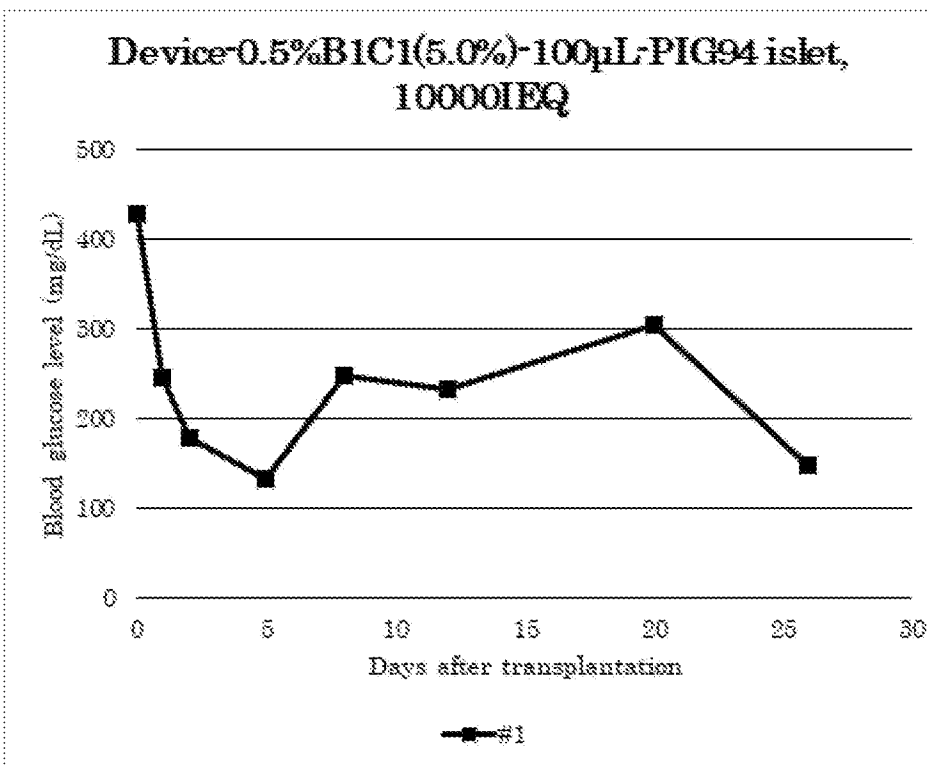
[図5-1]



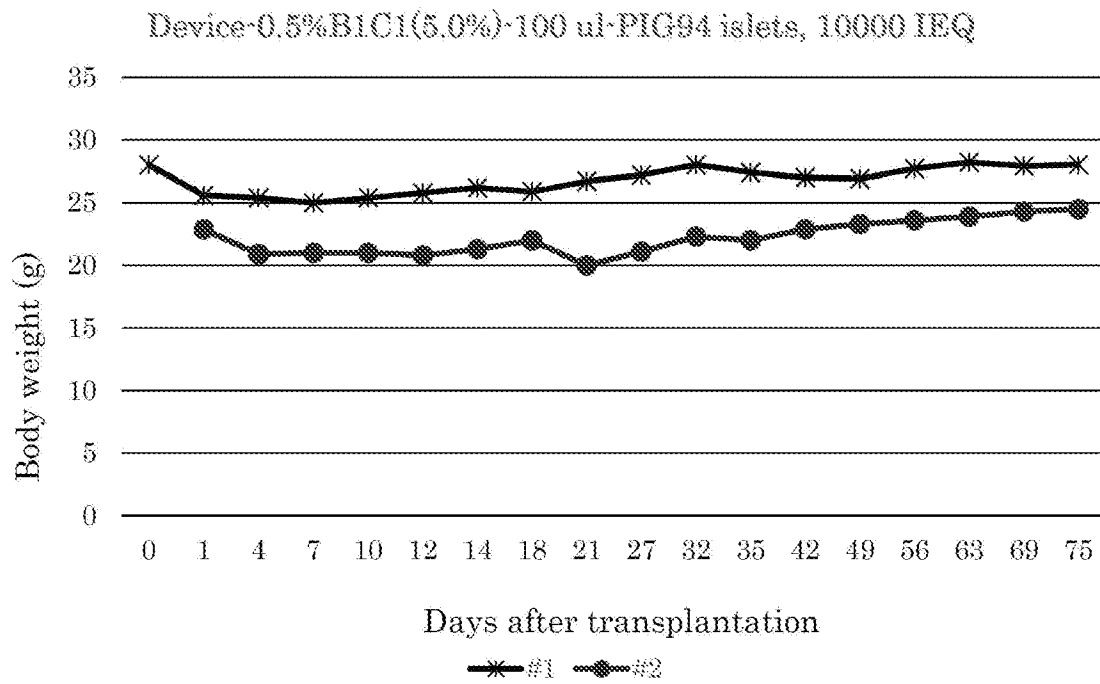
[図5-2]



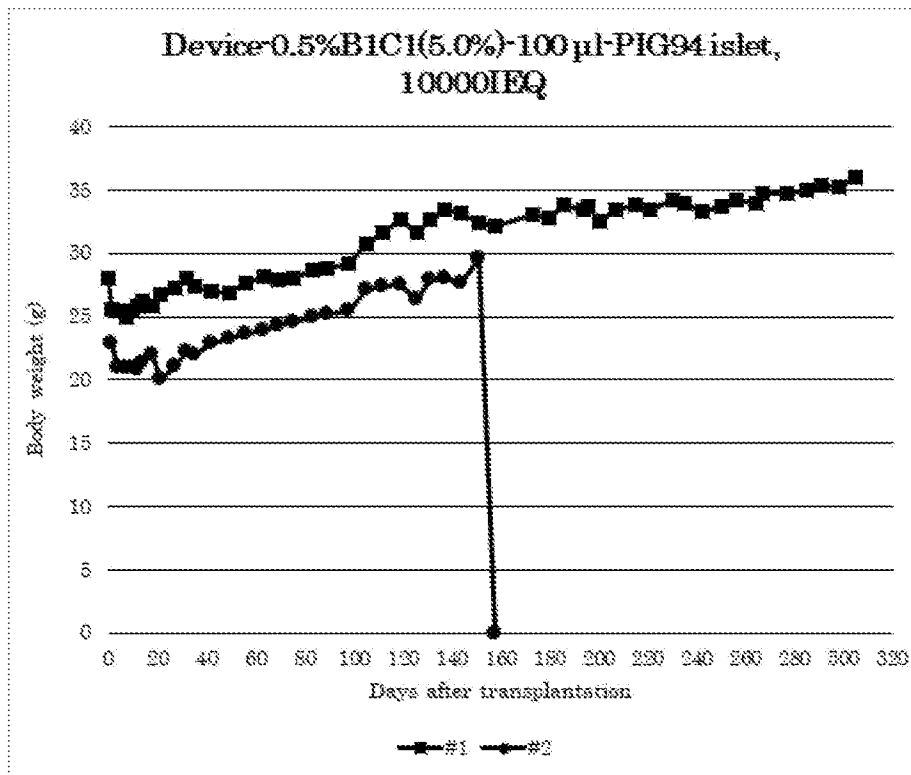
[図5-3]



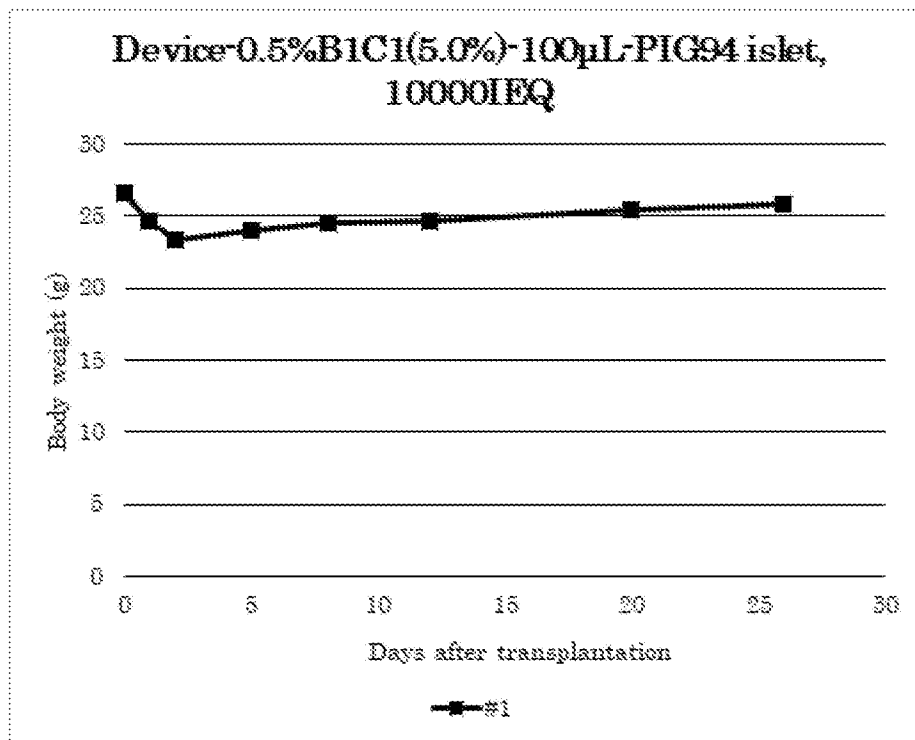
[図6-1]



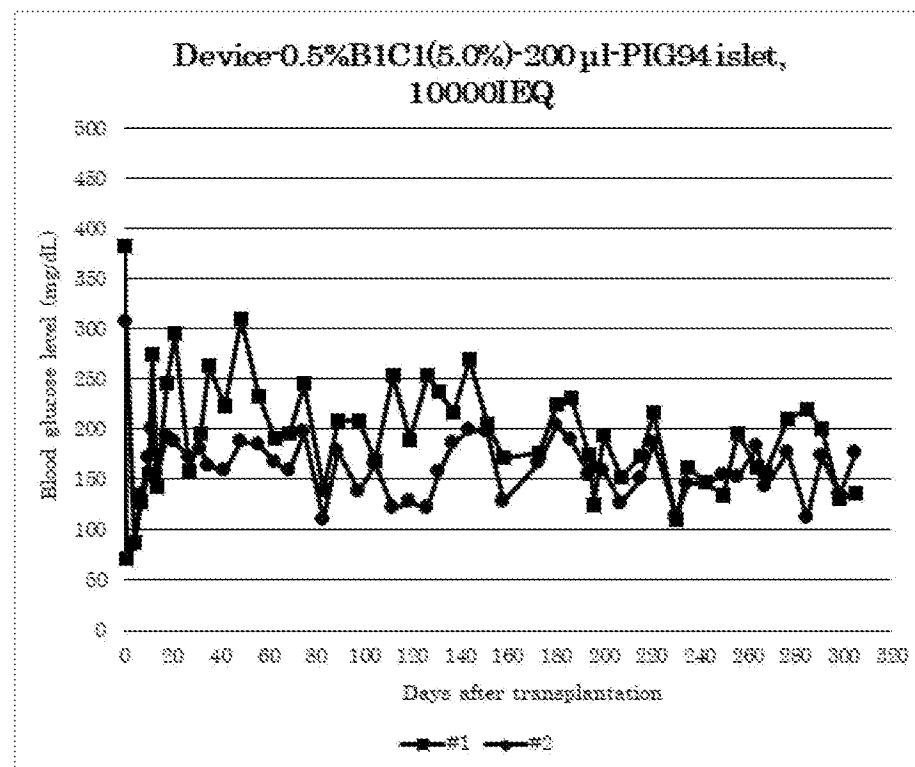
[図6-2]



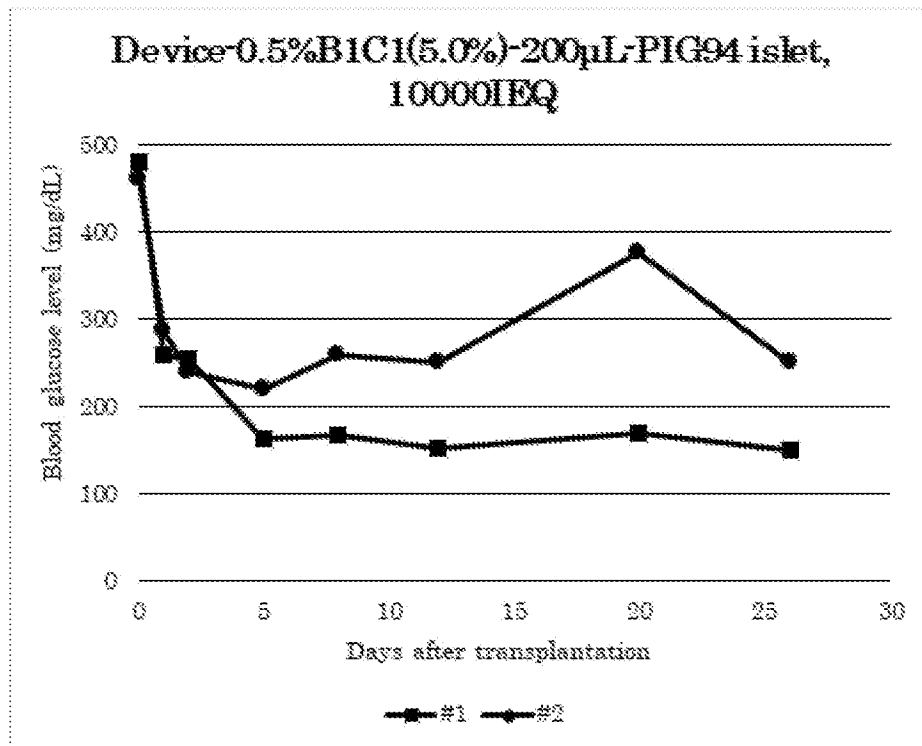
[図6-3]



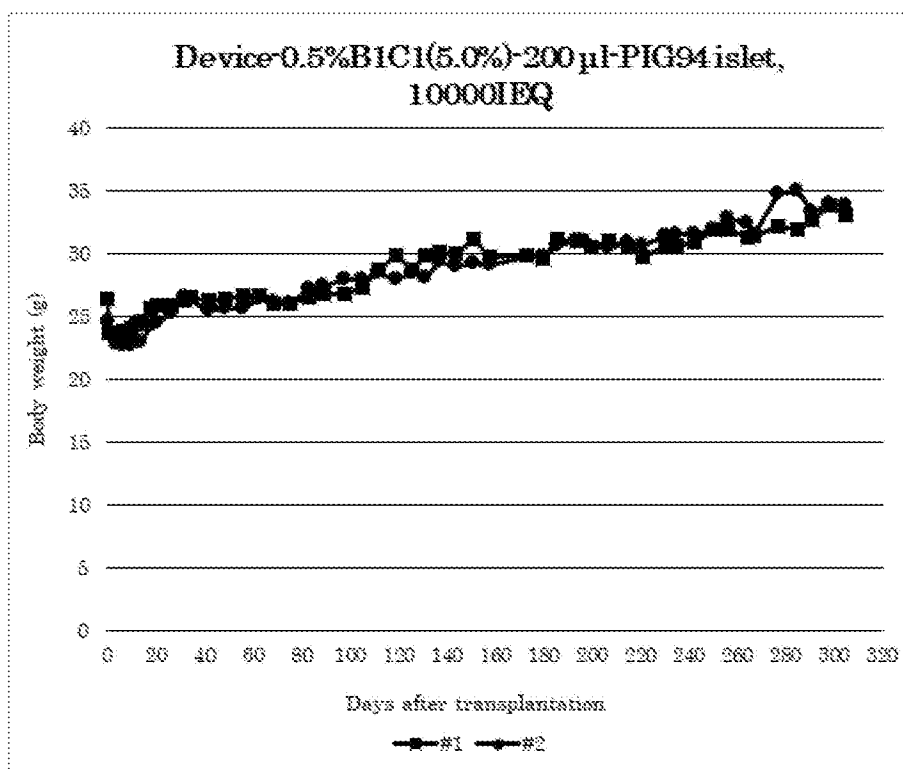
[図7-1]



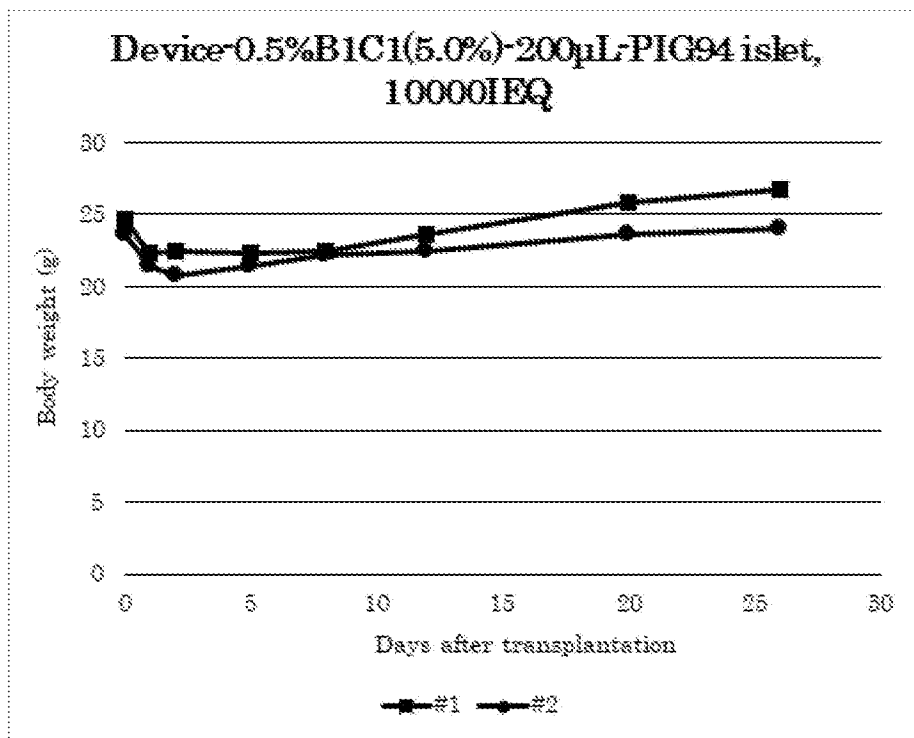
[図7-2]



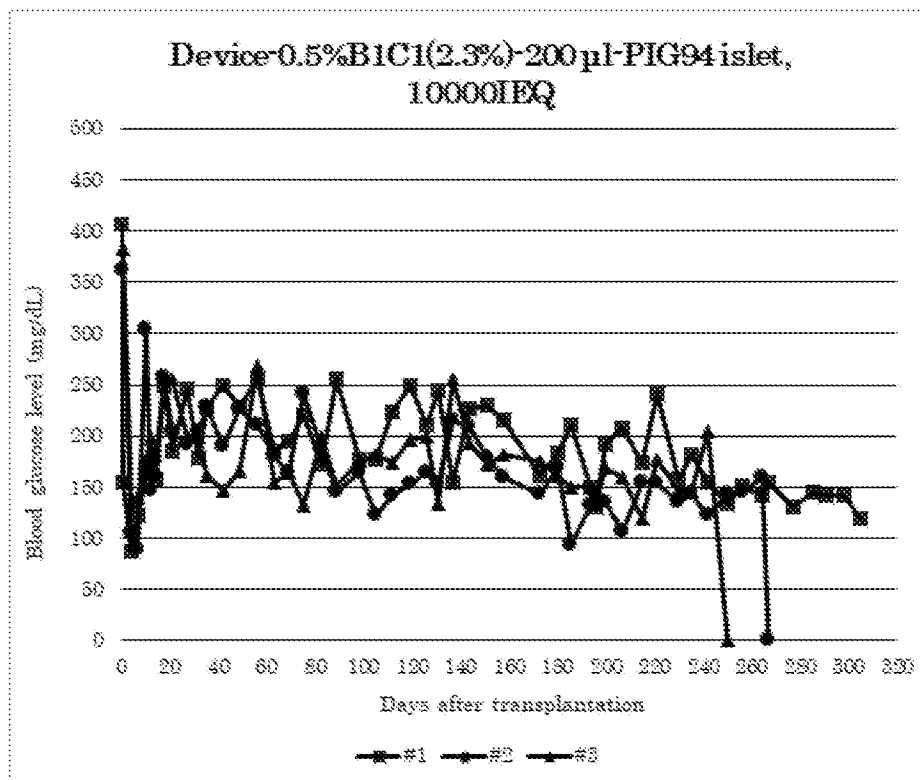
[図8-1]



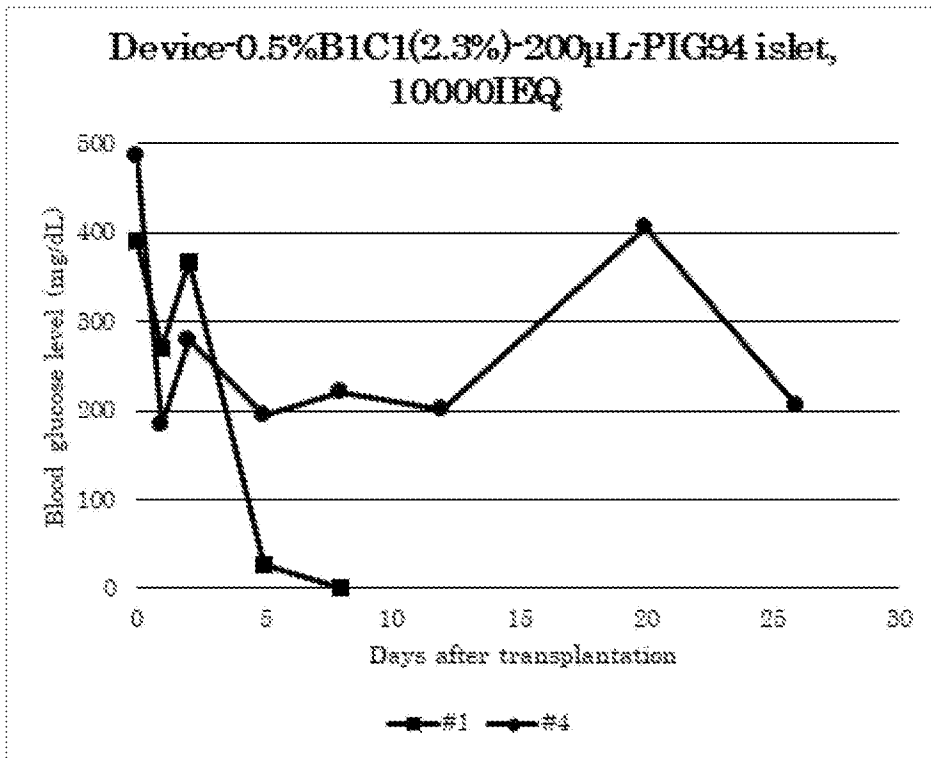
[図8-2]



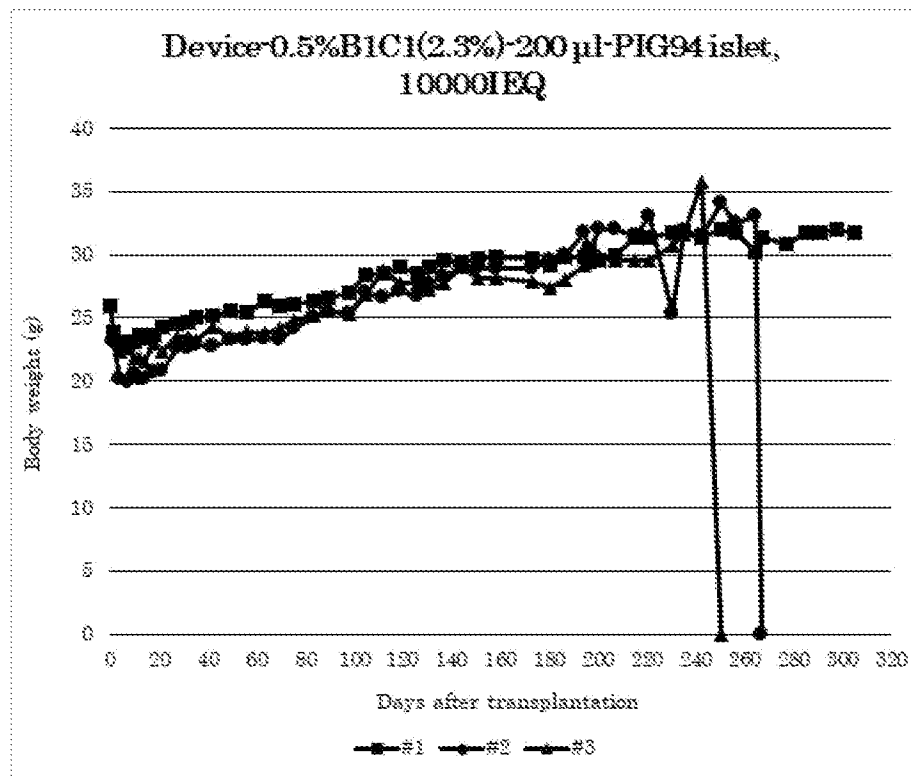
[図9-1]



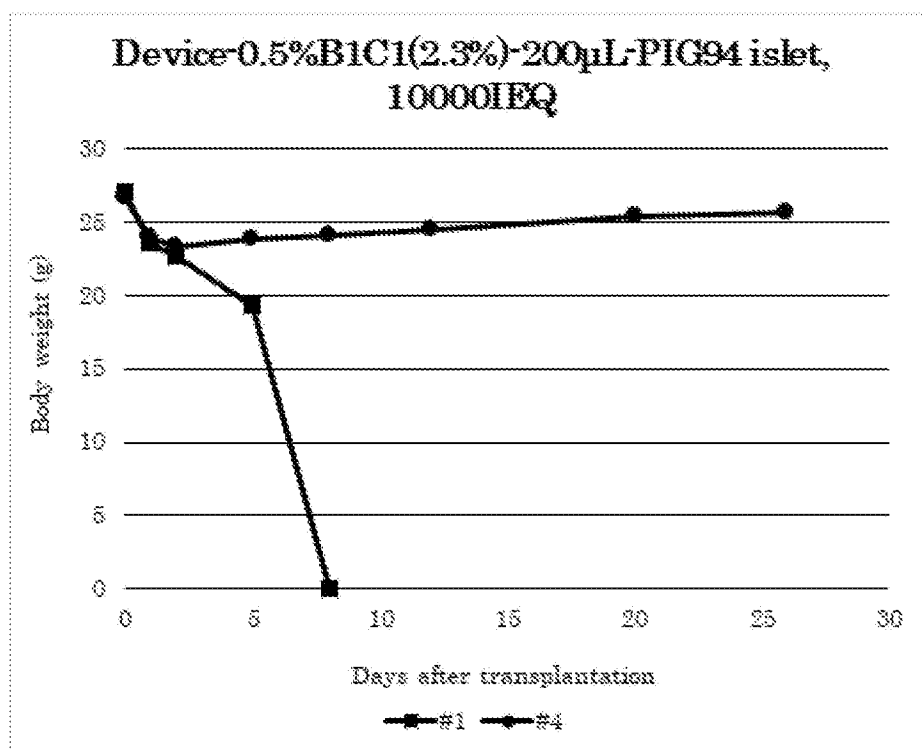
[図9-2]



[図10-1]



[図10-2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/025324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P 3/10 (2006.01)i; A61K 35/39 (2015.01)i; A61L 27/20 (2006.01)i; A61L 27/34 (2006.01)i; A61L 27/52 (2006.01)i; A61L 27/54 (2006.01)i
 FI: A61L27/20; A61L27/52; A61L27/34; A61K35/39; A61P3/10; A61L27/54
 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)

A61P3/10; A61K35/39; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/52; A61L27/54

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105078923 A (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST)	1-2, 7-10, 13,
Y	25.11.2015 (2015-11-25) paragraphs [0003], [0062]-	18-20
Y	[0068], claim 7	11-12, 14-17,
A		21-23
		7-9, 13
		3-6
X	JP 2019-512522 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS,	1-2, 10, 18-20
Y	INC.) 16.05.2019 (2019-05-16) paragraphs [0006]-	7-9, 11-17,
A	[0012], [0101], examples 3-4	21-23
		3-6
Y	JP 2000-507202 A (ENCELLE, INC.) 13.06.2000 (2000-	11-12, 14-17,
A	06-13) page 5, line 8 to page 7, line 8, examples	21-23
	2, 8	1-10, 13, 18-
		20



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

"I"

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

07 August 2020 (07.08.2020)

Date of mailing of the international search report

01 September 2020 (01.09.2020)

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/JP2020/025324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/146677 A1 (KOC UNIVERSITESI) 25.09.2014 (2014-09-25) page 2, lines 16-19	11-12, 14-17, 21-23
A		1-10, 13, 18-20
A	DESAI, R. M. et al, "Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine-norbornene chemistry", Biomaterials, 2015, vol. 50, pp. 30-37 entire text	1-23
A	JP 2011-504507 A (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 10.02.2011 (2011-02-10) entire text	1-23
A	JP 2013-525425 A (SYNAFFIX B.V.) 20.06.2013 (2013-06-20) entire text	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/025324

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105078923 A	25 Nov. 2015	(Family: none)	
JP 2019-512522 A	16 May 2019	US 2019/0100628 A1 paragraphs [0006]- [0012], [0107], examples 3-4	
JP 2000-507202 A	13 Jun. 2000	EP 3433282 A1 US 5830492 A Background of the invention, examples 2, 8	
WO 2014/146677 A1	25 Sep. 2014	EP 865288 A1 CA 2239498 A	
JP 2011-504507 A	10 Feb. 2011	(Family: none) US 2010/0297250 A1 WO 2009/067663 A1	
JP 2013-525425 A	20 Jun. 2013	EP 2907525 A2 US 2013/0137763 A1 WO 2011/136645 A1 EP 2894142 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61P 3/10(2006.01)i; A61K 35/39(2015.01)i; A61L 27/20(2006.01)i; A61L 27/34(2006.01)i; A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i FI: A61L27/20; A61L27/52; A61L27/34; A61K35/39; A61P3/10; A61L27/54		
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）） A61P3/10; A61K35/39; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/52; A61L27/54		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利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） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y Y A	CN 105078923 A (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST) 25.11.2015 (2015-11-25) [0003], [0062]-[0068], Claim7	1-2, 7-10, 13, 18-20 11-12, 14-17, 21-23 7-9, 13 3-6
X Y A	JP 2019-512522 A (ミレニアム ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 16.05.2019 (2019-05-16) [0006]-[0012], [0101], 実施例3-4	1-2, 10, 18-20 7-9, 11-17, 21-23 3-6
Y A	JP 2000-507202 A (エンセル インコーポレイテッド) 13.06.2000 (2000-06-13) 第5頁第8行-第7頁第8行, 実施例2, 実施例8	11-12, 14-17, 21-23 1-10, 13, 18-20
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.08.2020		国際調査報告の発送日 01.09.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 飯濱 翔太郎 4C 5571 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2014/146677 A1 (KOC UNIVERSITESI) 25.09.2014 (2014 - 09 - 25) 第2頁第16-19行	11-12, 14-17, 21-23 1-10, 13, 18-20
A	DESAI,R.M. et al, Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine-norbornene chemistry, Biomaterials, 2015, Vol.50, P.30-37 全文	1-23
A	JP 2011-504507 A (ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リサーチ・ファウンデイ ション・インコーポレイテッド) 10.02.2011 (2011 - 02 - 10) 全文	1-23
A	JP 2013-525425 A (シンアフィックス ビー. ブイ.) 20.06.2013 (2013 - 06 - 20) 全文	1-23

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/025324

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
CN	105078923	A	25.11.2015	(ファミリーなし)	
JP	2019-512522	A	16.05.2019	US 2019/0100628 A1	
				[0006]-[0012], [0107],	
				Ex.3-4	
				EP 3433282 A1	
JP	2000-507202	A	13.06.2000	US 5830492 A	
				Background of the	
				invention, Ex.2, Ex.8	
				EP 865288 A1	
				CA 2239498 A	
WO	2014/146677	A1	25.09.2014	(ファミリーなし)	
JP	2011-504507	A	10.02.2011	US 2010/0297250 A1	
				WO 2009/067663 A1	
				EP 2907525 A2	
JP	2013-525425	A	20.06.2013	US 2013/0137763 A1	
				WO 2011/136645 A1	
				EP 2894142 A1	