

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年3月16日 (16.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/028110 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C08B 37/08</i> (2006.01)	<i>A61K 47/48</i> (2006.01)
<i>A61K 9/06</i> (2006.01)	<i>A61P 1/16</i> (2006.01)
<i>A61K 31/728</i> (2006.01)	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61K 47/36</i> (2006.01)	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)

史佳 (SATO, Mika) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2005/016389

(22) 国際出願日:

2005年9月7日 (07.09.2005)

(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2004-259157	2004年9月7日 (07.09.2004)	JP
特願2005-064096	2005年3月8日 (08.03.2005)	JP
特願2005-064122	2005年3月8日 (08.03.2005)	JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八杉 健司 (YASUGI, Kenji) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 中村 輝郎 (NAKAMURA, Teruo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 下房地 剛 (SHIMOBOJI, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 佐藤

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING WATER-SOLUBLE HYALURONIC ACID MODIFICATION

(54) 発明の名称: 水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法

(57) Abstract: A water-soluble HA modification practical as a drug support; and a process for producing the modification. The water-soluble hyaluronic acid modification is produced by incorporating substituents into carboxy groups of the glucuronic acid moieties in either hyaluronic acid or a derivative thereof through an amide bond with the aid of a BOP condensation agent in an aprotic polar solvent, the amount of the substituents being at least 5 mol%. This modification can reside in the blood in a prolonged period on a practical level. Crosslinking the hyaluronic acid modification gives a hyaluronic acid gel. This gel can release a drug over a far longer period than known gels even when the proportion of crosslinkable functional groups introduced is the same.

(57) 要約: 薬物担体として実用的な水溶性HA修飾物、およびその製造方法を提供する。本発明は、非プロトン性極性溶媒中で、BOP系縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基にアミド結合で置換基を下限が5モル%以上導入することにより製造される、実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長された水溶性ヒアルロン酸修飾物、およびその製造方法を提供する。さらに、そのヒアルロン酸修飾物を架橋することにより、従来知られているゲルに比べ、同じ架橋性官能基導入率でも非常に長い薬物徐放が可能となるヒアルロン酸ゲルを提供する。

WO 2006/028110 A1

明 細 書

水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は、薬物担体として有用な水溶性ヒアルロン酸修飾物、該ヒアルロン酸修飾物の製造方法、該ヒアルロン酸修飾物と薬物とのコンジュゲート、および該ヒアルロン酸修飾物から得られるゲルに関する。

背景技術

- [0002] 一般に、低分子薬物、ペプチド薬物、タンパク質薬物等の血中滞留性の向上、安定性の向上、溶解性の向上、抗原性の低減等を目的として、薬物と水溶性ポリマーとのコンジュゲーションが試みられている。特に、ポリエチレングリコール(以下、「PEG」とも称す)は、その不活性な性質と生体内でのタンパク質による薬物の吸着を防ぐ効果を有することから広く用いられており、PEGコンジュゲート化タンパク質は医薬品として既に実用化の段階に入っている。しかし、PEGは生分解性ポリマーではない為、長期投与により体内に蓄積した場合の安全性等の問題は明らかでない。更には、最近、PEGコンジュゲート化リポソームにおいて投与2回目のクリアランスが異常に早い現象(Accerelated Blood Clearance現象、以下「ABC現象」とも称す)が報告されており(非特許文献1および2を参照)、PEGコンジュゲート化医薬品の安全性、有効性は十分に確立されたとは言い難い。
- [0003] ヒアルロン酸(以下、「HA」とも称す)は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された多糖であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。HAは、D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが β (1 $\rightarrow$ 3)グリコシド結合により連結された二糖単位から成るグルコサミドグリカンの一種である。ヒアルロン酸は、その化学的および物理的構造に種差が無く、ヒトにおいてもヒアルロン酸の代謝系が存在する。さらに免疫性または毒性の点に関しても非常に安全な生体材料(Biomaterial)といえることができる。近年、細胞の接着、増殖、移動の誘導に関するヒアルロン酸の生理活性物質としての側面が注目されている。また、微生物による高分子量のヒアルロン酸の大量生産が可能となり、関節疾患治療薬などの医薬として実

用化されており、化粧品等の分野においても実用化が進んでいる。さらに、薬物をヒアルロン酸とコンジュゲートすることで、薬物の癌組織へのターゲティング(特許文献1を参照)、肝臓へのターゲティング(特許文献2を参照)、抗原性の低減(特許文献3を参照)、血中滞留時間の延長(特許文献4、5および6を参照)等が達成できるという報告がなされている。

[0004] 汎用されているPEGと比べて、薬物のコンジュゲート担体としてヒアルロン酸を用いる際の利点は、生分解性を有する点、巨大サイズ化が可能な点、さらに、1分子中に多くの反応点を持つため、複数の薬物(同一薬物を複数、或いは2種類以上の薬物)を1分子中に担持できるということである。このような利点を有するヒアルロン酸を薬物コンジュゲート担体として用いることは、ターゲティング、徐放等、より高度な薬物動態制御機能を持つコンジュゲートを設計開発する手段となる。また、ヒアルロン酸は生分解性である上に、その化学的構造に種差が無いことから、安全性という点においてもPEGよりも優れた担体であるといえる。

[0005] しかし、ヒアルロン酸自体の血中滞留時間は短く、静脈内注射(以下、「iv」とも称す)で半減期が2分間であると報告されている(非特許文献3を参照)。本発明者の検討においても、ただ単にヒアルロン酸を薬物にコンジュゲートしただけでは、薬物の血中滞留時間の大きな延長や、薬効の持続性の向上は確認されなかった。ヒアルロン酸の主代謝部位は肝臓およびリンパ腺であり、その代謝は、主にCD44、RHAMM、HARE等のヒアルロン酸に特異的に結合する細胞膜局在レセプターを介した細胞内への取り込みとそれに引き続くヒアルロニダーゼによる分解によるものである。これらの分子は共に、ヒアルロン酸の連続した遊離のカルボキシ基(6糖)を主な認識部位にしていることが報告されている(非特許文献4を参照)。

[0006] 従って、血中滞留時間が短いというヒアルロン酸の問題を克服すべく、ヒアルロン酸に置換基を導入したヒアルロン酸修飾物を薬物担体として利用する試みもある(特許文献4、5および6を参照)。一般に、ヒアルロン酸に置換基を導入すればその血中滞留時間は延長され、その程度は置換基の導入率と相関すると考えられる。ヒアルロン酸の様々な位置に置換基が導入されたヒアルロン酸修飾物が報告されている。その中でも、ヒアルロン酸におけるグルクロン酸部分のカルボキシ基に加水分解されにく

いアミド結合を介して置換基を導入することが、得られるヒアルロン酸修飾物とヒアルロン酸レセプターとの結合阻害において効果的であり、当該ヒアルロン酸修飾物は血中滞留時間の面において優れていると考えられる。

[0007] 一方、ヒアルロン酸をテトラブチルアンモニウム塩にし、ジメチルスルホキシド中で置換基と反応させることによって、ヒアルロン酸のカルボキシ基をアミド化したヒアルロン酸修飾物(特許文献7を参照)も報告されているが、この発明は架橋体調製を目的としたもので、血中滞留性延長を目指したものではない。さらに言えば、この発明においては縮合剤として1, 1-カルボニルジイミダゾール(以下、「CDI」とも称す)を用いている。我々の検討では、縮合剤としてCDIを用いても血中滞留性が十分に延長された(ヒアルロニダーゼによる分解に対して十分な耐性を持つような)ヒアルロン酸誘導体を得ることはできず、さらに、反応中にヒアルロン酸分子量が大きく低下することが確認されている。

[0008] これら以外にも、水と極性有機溶媒の混合溶媒中で、ヒアルロン酸のカルボキシ基に置換基を導入した例も報告されている(特許文献8を参照)。しかしながら、得られたヒアルロン酸修飾物について、血中滞留時間の延長が見られるかどうかについては一切触れられていない。

[0009] このように、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、特に血中滞留時間を実用的なレベルまで延長した水溶性ヒアルロン酸修飾物は知られておらず、その製造方法も知られていなかった。

[0010] 近年実用化されている薬効を持つタンパク質、ペプチドの製剤薬物は一般に血中半減期が短く、またその大部分が頻回投与の注射剤であるため、薬剤投与における患者の負担は過大なものとなっており、できるだけ少量で薬効を発揮させ且つ投与回数も少なくできる、タンパク質またはペプチド薬剤の実用的な徐放型製剤が望まれている。また、低分子化合物からなる薬物もその血中半減期の短さから持続製剤のニーズは高い。

[0011] 例えば、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(以下、「PLGA」とも称す)等の生分解性高分子を基材にした徐放製剤が試みられているが、基材の疎水性、乾燥工程、pHの低下に起因するタンパク質の変性、凝集が報告されている(非特許文献5および

6を参照)。親水性のハイドロゲルを基材に用いた徐放製剤も報告されているが、やはり実用化には至っておらず、タンパク質またはペプチドの封入率、回収率および安全性の全てにおいて、実用化レベルに達している徐放型製剤は現在のところ実現していない。

- [0012] 非抗原性、非変異原性、無毒性、生分解性を併せ持ち、安全性の面から好ましいと考えられるHAを徐放基材に用いた架橋方法、HAゲルからのタンパク質やペプチド薬物の徐放も多数報告されている。HAを化学架橋でゲル化させる方法としては、カルボジイミド法(特許文献9参照)、ジビニルスルホン法(特許文献10参照)、グリシジルエーテル法(特許文献11参照)等が知られている。一般に、ゲル中にタンパク質またはペプチドを封入する際、架橋後にタンパク質またはペプチドを導入する方法では、HAとタンパク質またはペプチドとの相溶性、静電反発等の問題でその導入率は低い。一方でタンパク質またはペプチド存在下で、in situ架橋を行うと、高封入率でタンパク質またはペプチドを担持させられる利点がある。こうしたin situ架橋により、HAゲル中にタンパク質またはペプチドを封入し、徐放させる製剤についての報告がなされている(例えば、特許文献12参照)。しかし、こうした方法を用いてタンパク質またはペプチド存在下でHAをin situ架橋すると、回収率の点で問題がある。例えば、ヒドラジド基(以下、「HZ」とも称す)を導入したHA誘導体(以下、「HA-HZ」とも称す)をN-ヒドロキシスクシンイミド(以下、「NHS」とも称す)エステルからなる架橋剤で架橋する方法(特許文献13参照)が報告されているが、生理条件下でのin situ架橋を目的としているため、pH7.4~8.5で架橋形成反応を行っているが、本発明者らによる検討では、この方法で得られるHAゲルからのタンパク質またはペプチドの回収率は低い。この原因は、架橋反応中にタンパク質またはペプチドの一部(主にアミノ基)が架橋剤と反応し、タンパク質が架橋してしまう点にある。またゲル中に残った変性したタンパク質またはペプチドは、生物活性が低下しており、むしろ抗原性発現の原因になる等の問題がある。封入した薬物が高回収率で放出されることは、医薬品として必須の条件であり、タンパク質またはペプチドを反応させずにHAを化学架橋、ゲル化させる方法は知られていない。また、高回収率でタンパク質ペプチドを封入する方法として、ポリエチレングリコール(PEG)を基材に不飽和官能基を求核

付加反応で架橋する報告もあるが(特許文献14参照)、生分解性でないPEG断片が残存する問題がある。また、こうした問題点を解決する為、タンパク質、ペプチドとの反応性を極力抑えたヒアルロン酸ゲルも報告されているが(特許文献15参照)、徐放期間は1週間程度に留まっている。

[0013] さらに、こうした薬物徐放性物質を注射可能な製剤とするには、これを微粒子化する必要がある。こうした検討にスプレードライヤーは広く使用されており、インシュリン(非特許文献7、非特許文献8参照)、rh抗IgE抗体(非特許文献9参照)を微粒子化した報告、ヒアルロン酸の微粒子中に薬物を封入した報告(特許文献16、特許文献17参照)はあるが、共に短時間に皮下で溶解してしまうため薬物徐放期間は非常に短く、徐放目的としての実用性は低い。また、スプレードライ中にキトサンの架橋反応を行い、低分子薬物を封入する報告(非特許文献10参照)もあるが、放出期間は数分と短く、架橋剤に用いるアルデヒドがアミノ基などの官能基と高い反応性を有するため、タンパク質、ペプチド、その他のアミノ基などの官能基を有する低分子薬物には使用することができない。

[0014] このように、水溶性ヒアルロン酸修飾物を基材とした実用的な徐放型製剤は知られておらず、その製造方法も知られていなかった。

特許文献1:国際公開WO92/06714号パンフレット

特許文献2:特開2001-81103号公報

特許文献3:特開平2-273176号公報

特許文献4:特開平5-85942号公報

特許文献5:国際公開WO01/05434号パンフレット

特許文献6:国際公開WO01/60412号パンフレット

特許文献7:特表2002-519481号公報

特許文献8:国際公開WO94/19376号パンフレット

特許文献9:国際公開第94/02517号パンフレット

特許文献10:特開昭61-138601号公報

特許文献11:特開平5-140201号公報

特許文献12:米国特許第5827937号明細書

特許文献13:国際公開95/15168号パンフレット

特許文献14:国際公開第00/44808号パンフレット

特許文献15:国際公開第04/046200号パンフレット

特許文献16:特許第3445283号公報

特許文献17:国際公開 WO96/18647号パンフレット

非特許文献1:Int. J. Pharm. 第255巻、第167-174頁、2003年

非特許文献2:J. Control. Rel. 第88巻、第35-42頁、2003年

非特許文献3:J. Inter. Med. 第242巻、第27-33頁、1997年

非特許文献4:Exp. Cell Res. 第228巻、第216-228頁、1996年

非特許文献5:J. Pharm. Sci. 第88巻、第166-173頁、1999年

非特許文献6:J. Microencapsulation 第15巻、第699-713頁、1998年

非特許文献7:Int. J. Pharm. 第233巻、第227-237頁、2002年

非特許文献8:J. Control. Rel. 第91巻、第385-394頁、2003年

非特許文献9:Biotech. and Bioeng. 第60巻、第301-309頁、1998年

非特許文献10:Int. J. Pharm. 第187巻、第53-65頁、1999年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0015] 発明が解決しようとする課題は、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、該ヒアルロン酸修飾物の製造方法、該ヒアルロン酸修飾物と薬物とのコンジュゲート、および該ヒアルロン酸修飾物から得られる、タンパク質、ペプチド、核酸または低分子化合物、あるいはそれらと高分子のコンジュゲートを封入し、長期間徐放できる安全性の高いヒアルロン酸ゲルを提供することにある。

課題を解決するための手段

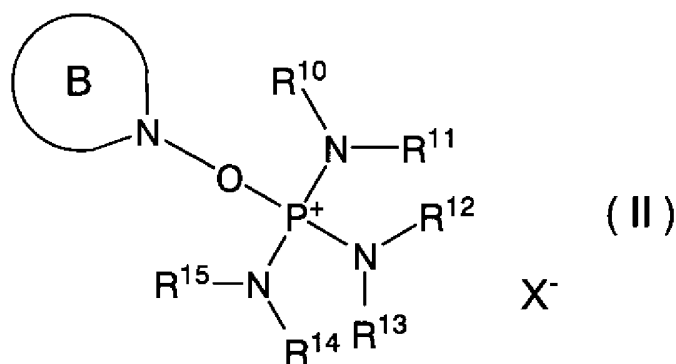
- [0016] ヒアルロン酸修飾物を合成するに際し、一般的にヒアルロン酸修飾物の合成において汎用されている方法に従って、水中での脱水縮合反応によりヒアルロン酸に置換基を導入した場合、ヒアルロン酸のカルボキシ基の修飾率は最大でも約70モル%程度である上、このヒアルロン酸のカルボキシ基を最大限修飾したヒアルロン酸修飾物であっても実用的な薬物担体としては不十分なものであった。例えば、薬物担体とし

ては大きな分子量を有するヒアルロン酸(分子量58万ダルトン(Da))を用い、そのカルボキシ基の73モル%を修飾したヒアルロン酸修飾物であっても、ラットにおける平均血中滞留時間(MRT)は16時間程度でしかなく、実用的な薬物担体としては不十分であった(本願明細書比較例5-1)。

[0017] 本発明者は、かかる問題点を解決する為に鋭意研究を進めたところ、非プロトン性極性溶媒中で、特定の縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基に置換基をアミド結合で導入することにより得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物が、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長できることを見出し、また、得られたヒアルロン酸修飾物を架橋したヒアルロン酸ゲルが従来知られている方法で架橋したゲルに比べ、同じ架橋性官能基導入率でも非常に長い徐放機能を示すことを見出し、本発明を完成させた。

[0018] 本発明の1つの側面によれば、非プロトン性極性溶媒中で、式(II)：

[0019] [化1]



[0020] [式中、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、それぞれ独立に C_{1-6} アルキル基から選択され、または R^{10} および R^{11} 、 R^{12} および R^{13} 、ならびに R^{14} および R^{15} は、それぞれ独立にそれらが結合する窒素原子と一緒になって含窒素ヘテロ環を形成してもよく、環Bは置換されていてもよい単環式または縮環式の含窒素ヘテロ環基であり、 X^- はアニオンを表す]

で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基を、5モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含

む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。

- [0021] 当該側面の1つの態様において、カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基は、少なくとも1以上の官能基を含む。ここで、前記置換基に官能基が複数存在する場合、当該官能基は同一の種類であっても異なる種類であってもよい。また、前記ヒアルロン酸修飾物に含まれる置換アミド基は全てが同一の種類であってもよく、また異なる種類の置換アミド基が前記ヒアルロン酸修飾物に含まれていてもよい。
- [0022] 置換アミド基に含まれる当該官能基は、例えば、置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、カルボキシ基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基であってもよく、好ましくは、置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、メタクリロイル基およびアクリロイル基である。ここで、当該官能基の種類は、好ましくは1または2種類であり、2種類の場合はその内の1種類が水酸基であるのが好ましい。置換アミド基1個あたりの当該官能基の総数は、例えば1～10個、好ましくは1～9個、さらに好ましくは1～4個である。置換アミド基1個あたりの当該官能基の総数が2個以上の場合、その内の1個の官能基が水酸基以外であり、その余の官能基は、全て水酸基であるか、全ての官能基が水酸基であるのが好ましい。当該置換アミド基の置換基は、例えば、アミノアルキル基(このアミノアルキル基のアルキレン鎖は1個以上、例えば1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい。以下全ての「アミノアルキル基」について、この記述が付加される。)、アミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、ヒドロキシアルキル基(このヒドロキシアルキル基のアルキレン鎖は1個以上、例えば1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい。以下全ての「ヒドロキシアルキル基」について、この記述が付加される。)、ヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、ヒドロキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メルカプトアルキル基、メルカプト(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メルカプト(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシアルキル基、メタクリロイルアミノアルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシア

ルキル基、アクリロイルアミノアルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基またはアクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基であってもよい。

[0023] より具体的には、アミノ C_{2-10} アルキル基(このアミノ C_{2-10} アルキル基のアルキレン鎖は1個以上、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい)、アミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、アミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、ヒドロキシ C_{2-10} アルキル基(このヒドロキシ C_{2-10} アルキル基のアルキレン鎖は1個以上、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい)、ヒドロキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、ヒドロキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、メルカプト C_{2-10} アルキル基、メルカプト(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、メルカプト(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシ C_{2-6} アルキル基、メタクリロイルアミノ C_{2-6} アルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ C_{2-6} アルキル基、アクリロイルアミノ C_{2-6} アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンオキシ)アルキル基またはアクリロイルオキシ(ポリ C_{2-10} アルキレンアミノ)アルキル基であってもよい。

ここで、カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の種類は、単一でも複数でもよい。複数の種類とは2～4種類、好ましくは2または3種類、さらに好ましくは2種類を意味する。カルボキシ基の変換により生じる複数種類の置換アミド基を有する本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法としては、あらかじめアミノ基を有する化合物を複数混合しておき、この混合物とヒアルロン酸およびその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基とを縮合させる方法が挙げられる。あるいは、ヒアルロン酸およびその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基が全て反応しない程度の量、例えば5～95モル%の第1のアミノ基を有する化合物を縮合させ、次いで

、残存するカルボキシ基に対し第2のアミノ基を有する化合物を縮合させ、以降必要な回数の同じ操作を繰り返してもよい。カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の種類が複数である場合は、各々の置換アミド基への変換時の修飾率を合算して、ヒアルロン酸およびその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基の修飾率とする。複数の置換アミド基の組み合わせの具体例としては、置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；水酸基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基；水酸基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；メルカプト基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；水酸基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基；置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基という組み合わせが挙げられるが、置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基、水酸基で置換されたアミド基とメルカプト基で置換されたアミド基および水酸基で置換されたアミド基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基で置換されたアミド基の組み合わせが好ましく、置換されていてもよいアミノ基で置換されたアミド基と水酸基で置換されたアミド基の組み合わせがさらに好ましい。

- [0024] より具体的には、以下のi)～iv)の4つの群について、i)とii)、i)とiii)、i)とiv)、ii)とiii)、ii)とiv)、iii)とiv)；i)とii)とiii)、i)とii)とiv)、i)とiii)とiv)、ii)とiii)とiv)；i)とii)とiii)とiv)という組み合わせを作成し、それぞれの群から任意の1つの基を選ぶことに

よって形成される組み合わせが挙げられる:

i) アミノアルキル基で置換されたアミド基、アミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基およびアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基;

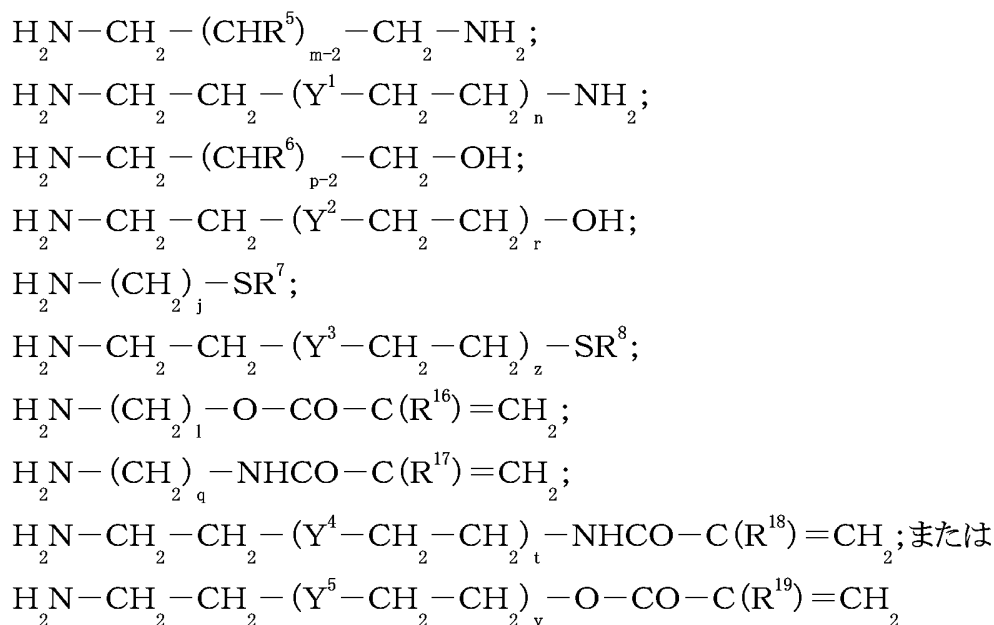
ii) ヒドロキシアアルキル基で置換されたアミド基、ヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基およびヒドロキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基;

iii) メルカプトアルキル基で置換されたアミド基、メルカプト(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基およびメルカプト(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基;および

iv) メタクリロイルオキシアルキル基で置換されたアミド基、メタクリロイルアミノアルキル基で置換されたアミド基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基、アクリロイルオキシアルキル基で置換されたアミド基、アクリロイルアミノアルキル基で置換されたアミド基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基およびアクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基で置換されたアミド基。

[0025] 中でも、i)とii)、ii)とiii)およびii)とiv)の組み合わせが好ましく、さらに、アミノアルキル基で置換されたアミド基とヒドロキシアアルキル基で置換されたアミド基、アミノアルキル基で置換されたアミド基とヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基、アミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基とヒドロキシアアルキル基で置換されたアミド基およびアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基とヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基の組み合わせが好ましく、さらにまた、アミノアルキル基で置換されたアミド基とヒドロキシアアルキル基で置換されたアミド基の組み合わせが特に好ましい。

- [0026] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の種類としては、単一であるか2種類であるのが好ましい。
- [0027] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基およびその組み合わせとしては、上記 i)、iii) およびiv) の各群中に記載された置換アミド基単独、並びに、これらと、ヒドロキシアルキル基で置換されたアミド基との組み合わせ、ヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基で置換されたアミド基との組み合わせが好ましい。
- [0028] ヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物の例には、式：



[式中、m、l、p、jおよびqは、それぞれ独立に2～10から選択される整数であり、n、r、z、tおよびyは、それぞれ独立に1～200から選択される整数であり、R⁵およびR⁶はそれぞれ独立に水素原子または水酸基であり、R⁷は、水素原子、保護基または—S—(CH₂)_j—NH₂であり、R⁸は、水素原子、保護基または—S—(CH₂—CH₂—Y³)_z—CH₂—CH₂—NH₂であり、R¹⁶、R¹⁷、R¹⁸、およびR¹⁹はそれぞれ独立して、水素原子またはメチル基であり、Y¹、Y²、Y³、Y⁴およびY⁵は、それぞれ独立して、酸素原子または—NH—である]

で表される、化合物が含まれる。

- [0029] 上記式中の—(CHR⁵)_{m-2}—においてmが4以上の場合のR⁵は水素原子または水酸基からそれぞれ独立に選択されるものであり、—(CHR⁵)_{m-2}—は例えば(m-2)個ある—CHR⁵—が任意の割合および順番で—CH₂—と—CHOH—とが混在している

状態を示す。(m-2)個ある $-\text{CHR}^5-$ が任意の割合および順番で $-\text{CH}_2-$ と $-\text{CHOH}-$ とが混在している状態には、(m-2)個の $-\text{CHR}^5-$ 全てが $-\text{CH}_2-$ および $-\text{CHOH}-$ である場合も含まれる。mが2である時は $-(\text{CHR}^5)_{m-2}-$ は単結合を意味する。

[0030] 上記式中の $-(\text{CHR}^6)_{p-2}-$ においてpが4以上の場合の R^6 は水素原子または水酸基からそれぞれ独立に選択されるものであり、 $-(\text{CHR}^6)_{p-2}-$ は例えば(p-2)個ある $-\text{CHR}^6-$ が任意の割合および順番で $-\text{CH}_2-$ と $-\text{CHOH}-$ とが混在している状態を示す。(p-2)個ある $-\text{CHR}^6-$ が任意の割合および順番で $-\text{CH}_2-$ と $-\text{CHOH}-$ とが混在している状態には、(p-2)個の $-\text{CHR}^6-$ 全てが $-\text{CH}_2-$ および $-\text{CHOH}-$ である場合も含まれる。pが2である時は $-(\text{CHR}^6)_{p-2}-$ は単結合を意味する。

[0031] R^7 および R^8 の定義に含まれる保護基は、メルカプト基の保護が可能な保護基を意味し、その具体例は、例えばT. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999に記載されている。中でも基中に1級アミノ基を有しない基が好ましく、さらにエチルチオ基およびt-ブチルチオ基等の C_{1-6} アルキルチオ基、並びに2-ニトロフェニルチオ基、2-カルボキシフェニルチオ基等の置換フェニルチオ基が好ましい。さらにまた、2-ピリジルチオ基等のヘテロアリアルチオ基も好ましい。

[0032] R^7 としては、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_j-\text{NH}_2$ および2-ピリジルチオ基が好ましく、 R^8 としては、 $-\text{S}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Y}^3)_z-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ および2-ピリジルチオ基が好ましい。

[0033] ここで、反応させる化合物の種類は、単一であっても複数であってもよい。反応させる化合物の種類としては、単一であるか2種類であるのが好ましい。

[0034] 複数の反応させる化合物の組み合わせの具体例としては、以下のi)~iv)の4つの群について、i)とii)、i)とiii)、i)とiv)、ii)とiii)、ii)とiv)、iii)とiv) ; i)とii)とiii)、i)とii)とiv)、i)とiii)とiv)、ii)とiii)とiv) ; i)とii)とiii)とiv)という組み合わせを作成し、それぞれの群から任意の1つの化合物を選ぶことによって形成される組み合わせが挙げられる：

i) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^1-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{n-1}-\text{NH}_2$;

ii) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{r-1}-\text{OH}$;

iii) $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_j-\text{SR}^7$ 、および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^3-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_z-\text{SR}^8$;
 および

iv) $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_1-\text{O}-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^{16})=\text{CH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_q-\text{NHCO}-\text{C}(\text{R}^{17})=\text{CH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^4-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NHCO}-\text{C}(\text{R}^{18})=\text{CH}_2$ 、および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_y-\text{O}-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^{19})=\text{CH}_2$ 。

[0035] 中でも、i)とii)、ii)とiii)およびii)とiv)の組み合わせが好ましく、さらに、

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{r-1}-\text{OH}$;

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^1-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{n-1}-\text{NH}_2$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$;および

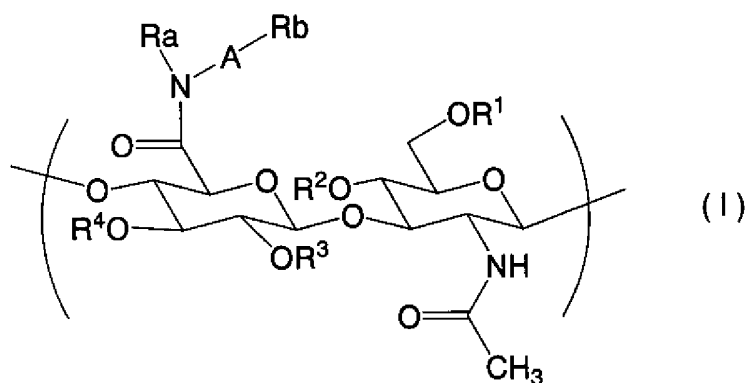
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^1-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{n-1}-\text{NH}_2$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{r-1}-\text{OH}$

の組み合わせが好ましく、さらにまた、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ の化合物の組み合わせが特に好ましい。

[0036] 反応させる化合物およびその組み合わせとしては、上記i)、iii)およびiv)の各群中に記載された化合物単独、並びに、これらと、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ との組み合わせ、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{r-1}-\text{OH}$ との組み合わせが好ましい。

[0037] 本発明の別の側面において、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が式(I):

[0038] [化2]



[0039] [式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルキルカルボニル基から選択され、

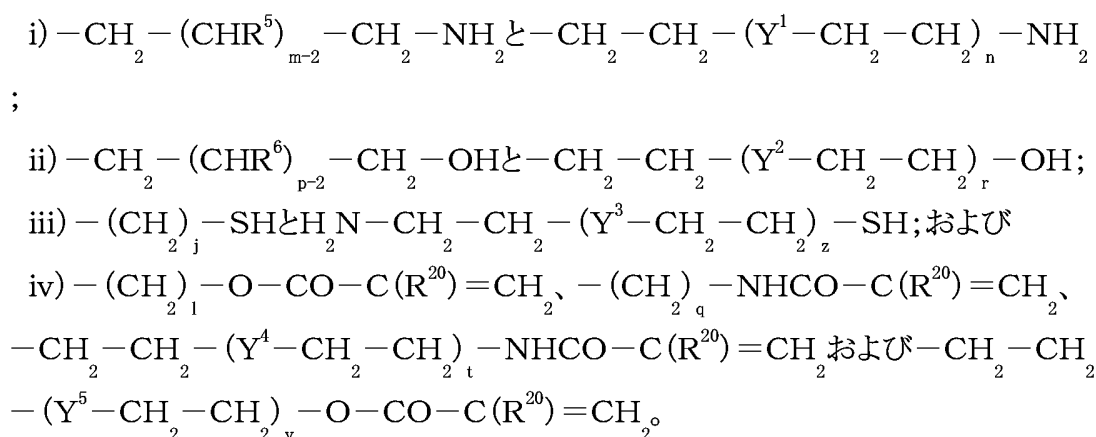
Ra は、水素原子または C_{1-6} アルキル基であり、

Rb は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基または基 $-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^{20})=\text{CH}_2$ であり、

A は、 $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^1-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_r-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_j-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^3-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_z-\text{S}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_1-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_q-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^4-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_y-\text{O}-$ であり、

ここで、 m 、 l 、 p 、 j および q は、それぞれ独立に2～10から選択される整数であり、 n 、 r 、 z 、 t および y は、それぞれ独立に1～200から選択される整数であり、 R^5 および R^6 はそれぞれ独立に水素原子または水酸基であり、 R^{20} は、水素原子またはメチル基であり、 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 および Y^5 は、それぞれ独立して、酸素原子または $-\text{NH}-$ である]で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含むものである、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。

[0040] ここで、 $-\text{A}-\text{Rb}$ の種類は、単一でも複数でもよく、 $-\text{A}-\text{Rb}$ の種類としては、単一であるか2種類であるのが好ましい。複数の $-\text{A}-\text{Rb}$ の組み合わせの具体例としては、以下のi)～iv)の4つの群について、i)とii)、i)とiii)、i)とiv)、ii)とiii)、ii)とiv)、iii)とiv) ; i)とii)とiii)、i)とii)とiv)、i)とiii)とiv)、ii)とiii)とiv) ; i)とii)とiii)とiv)という組み合わせを作成し、それぞれの群から任意の1つの化合物を選ぶことによって形成される組み合わせが挙げられる：

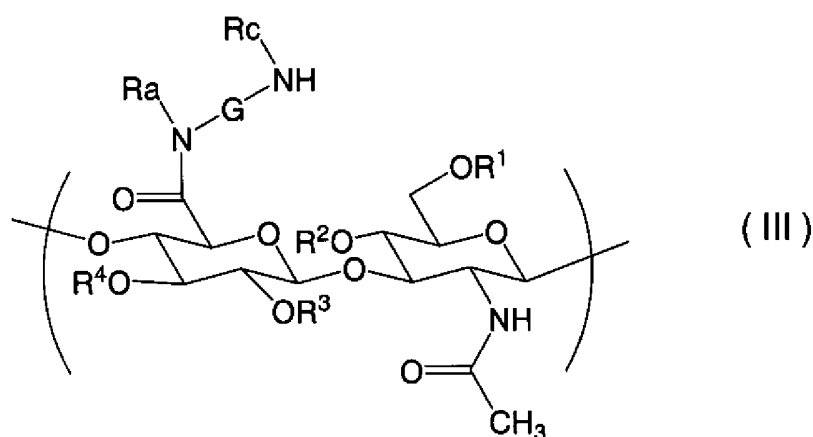


[0041] 中でも、i) と ii)、ii) と iii) および ii) と iv) の組み合わせが好ましく、さらに、 $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^5)_{m-2} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$ と $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^6)_{p-2} - \text{CH}_2 - \text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^5)_{m-2} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$ と $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{Y}^2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_r - \text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{Y}^1 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_n - \text{NH}_2$ と $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^6)_{p-2} - \text{CH}_2 - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{Y}^1 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_n - \text{NH}_2$ と $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{Y}^2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_r - \text{OH}$ の組み合わせが好ましく、さらにまた、 $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^5)_{m-2} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$ と $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^6)_{p-2} - \text{CH}_2 - \text{OH}$ の $-A-Rb$ の組み合わせが特に好ましい。

[0042] $-A-Rb$ およびその組み合わせとしては、上記 i)、iii) および iv) の各群中に記載された $-A-Rb$ の各具体例単独、並びに、これらと、 $-\text{CH}_2 - (\text{CHR}^6)_{p-2} - \text{CH}_2 - \text{OH}$ との組み合わせ、 $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{Y}^2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_r - \text{OH}$ との組み合わせが好ましい。

[0043] 当該側面の1つの態様において、上記式(I)で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含む水溶性ヒアルロン酸修飾物は、例えば、以下の式(III)：

[0044] [化3]



[0045] [式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 およびRaは、既に定義されたとおりであり、それぞれ独立に、水素原子、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルキルカルボニル基から選択され、 R^c は、水素原子または C_{1-6} アルキル基であり、 G は、 $-(CH_2)_m-$ または $-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{n'}-$ であり、 m は2～10から選択される整数であり、 n' は1～10から選択される整数である]で表される化合物であつてもよい。

[0046] 本発明の一つの態様において、修飾率は、例えば30モル%以上であり、好ましくは55モル%以上でありうる。また、別の態様において、当該修飾率は、例えば70モル%以下であり、好ましくは60モル%以下、より好ましくは30%以下でありうる。

[0047] 前記水溶性ヒアルロン酸修飾物は、例えば薬物担体として使用されてもよい。当該修飾物には、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものも含まれる。当該水溶性ヒアルロン酸修飾物の哺乳動物における平均血中滞留時間は、例えば17時間以上、好ましくは18時間以上、さらに好ましくは30時間以上である。

[0048] 本発明の別の側面によれば、式(I)の-A-Rbの末端が C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいアミノ基である水溶性ヒアルロン酸修飾物において、当該ヒアルロン酸修飾物のアミノ基をジカルボン酸でアミド化し、置換基の末端にカルボキシ基を導入する工程をさらに含む、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。ここでジカルボン酸は特に限定されないが、例えばシュウ酸、 C_{1-10} アルキレンジカルボン酸または C_{1-10} アルケレンジカルボン酸などを用いることができ、好ましいジカルボン酸は、コハク酸、マレイン酸、グルタル酸またはアジピン酸である。当該アミド化

は特に限定されないが、例えば前記ヒアルロン酸修飾物のアミノ基とジカルボン酸無水物を反応させることにより行うことができる。

- [0049] 本発明の別の側面によれば、上記の製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物が提供される。当該水溶性ヒアルロン酸修飾物は特に限定されないが、ヒアルロン酸をその構成ユニットの2糖にまで分解することができ且つ分解産物の非還元末端に $\Delta-4,5$ -グルクロン酸残基をもつ不飽和2糖分解物を生成させるヒアルロニダーゼで該水溶性ヒアルロン酸修飾物を分解し、得られる分解産物の232nmにおける吸収を測定した場合に、分解産物に由来する全ピークエリアに対する2糖に由来するピークエリアの分率が30%以下となるものが好ましい。
- [0050] 本発明の別の側面によれば、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体が提供される。当該薬物担体は、特に限定はされないが、例えば、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物により表面修飾された微粒子薬物担体であってもよい。
- [0051] 本発明のさらに別の側面によれば、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む医薬組成物が提供される。
- [0052] 本発明のさらに別の側面によれば、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物と薬物とからなる水溶性ヒアルロン酸修飾物-薬物コンジュゲートが提供される。
- [0053] さらに本発明の別の側面によれば、上記のヒアルロン酸修飾物を架橋することで得られるヒアルロン酸ゲルが提供される。当該ヒアルロン酸ゲルは、例えば、薬物の封入に使用されうる。ここで、封入できる薬物は、特に限定されないが、例えば、高分子と薬物とのコンジュゲートであってもよい。このヒアルロン酸ゲルを乾燥させることで、封入する薬物の徐放性をさらに高めることもできる。
- [0054] 本発明のさらに別の側面によれば、上記のヒアルロン酸ゲルを含む医薬組成物が提供される。
- [0055] 本発明のさらに別の側面によれば、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む、医療用デバイスが提供される。当該医療用デバイスは、特に限定されないが、例えば上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施したものであってもよい。
- [0056] さらに本発明の別の側面によれば、上記のヒアルロン酸修飾物からなるヒアルロン酸ゲル微粒子の製造方法であって、

a) 当該ヒアルロン酸修飾物を含む希薄溶液を調製する工程；
b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程を含むヒアルロン酸ゲル微粒子製造方法が提供される。ここで、前記工程b)は、特に限定はされないが、例えば前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程であってもよい。

[0057] さらに本発明の別の側面によれば、上記のヒアルロン酸修飾物からヒアルロン酸ゲル微粒子を製造する方法であって、

a) ヒアルロン酸ゲルを乾燥する工程；
b) 得られた乾燥物を凍結する工程；および
c) 得られた凍結物を粉砕する工程を含むヒアルロン酸ゲル微粒子製造方法が提供される。ここで、ヒアルロン酸ゲルは、本発明のヒアルロン酸修飾物を架橋することにより得られるものである。

[0058] また、得られる微粒子の平均粒子径は、特に限定はされないが、例えば $0.01\ \mu\text{m}$ ～ $150\ \mu\text{m}$ 、好ましくは $0.1\ \mu\text{m}$ ～ $50\ \mu\text{m}$ である。ここで、得られる微粒子は、例えば薬物担体、特に薬物徐放担体であってもよい。

[0059] 当該側面の1つの態様において、上記製造方法の架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されていてもよい。

[0060] 本発明の別の側面によれば、上記方法で製造されたヒアルロン酸ゲル微粒子、および当該ヒアルロン酸ゲル微粒子を含む医薬組成物が提供される。

発明の効果

[0061] 本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を用いることで、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長することが可能である。従って、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化すること、あるいは、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を薬物を含有した微粒子、ゲルなどの少なくとも表面近傍に局在化させることで、従来の技術では達成できなかった、実用的でかつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

[0062] また、本発明のヒアルロン酸修飾物を、架橋し、ゲル化することにより、タンパク質、

ペプチド、低分子化合物、核酸あるいはそれらと高分子のコンジュゲート等の薬物を封入、長期間徐放できる安全性の高いヒアルロン酸ゲル徐放製剤の提供を可能にする。

図面の簡単な説明

- [0063] [図1]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物をヒアルロニダーゼ処理した後のGPCデータの一例である。
- [図2]比較例の水溶性ヒアルロン酸修飾物およびヒアルロン酸をヒアルロニダーゼ処理した後のGPCデータの一例であり、縦軸方向のスケールは図1と同一である。
- [図3]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。
- [図4]CDIを用いた導入(比較例1-14)における、反応前後でのGPCデータの一例である。
- [図5]BOPの添加量によるジアミン化合物の導入率の制御に関するNMRデータの一例である(実施例2)。
- [図6]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のアミノ基を変換しカルボキシ基を導入した水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である(実施例3-2)。
- [図7]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のアミノ基を変換しカルボキシ基を導入した水溶性ヒアルロン酸修飾物のヒアルロニダーゼ処理後のGPCデータの一例である。
- [図8]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。
- [図9]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。
- [図10]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のGPCチャートの一例である。
- [図11]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。
- [図12]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物をヒアルロニダーゼ処理した後のGPCデータの一例である。
- [図13]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物をヒアルロニダーゼ処理した後のGPCデータの一例である。
- [図14]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である
- [図15]分子量の異なる蛍光標識HA修飾物HA-AM-SUCおよびHA-HZ-S

UCの血中濃度推移を示した図である。

[図16]本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。

[図17]分子量200kDaのHAから合成した、アミノ基修飾率の異なる蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を示した図である。

[図18]HA修飾物のアミノ基導入率と平均血中滞留時間(MRT)との相関およびアミノ基導入率とヒアルロニダーゼにより分解される2糖の分率との相関を示した図である。

[図19]分子量200kDa HAから合成した置換アミド基上の置換基が異なる蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を示した図である。

[図20]本発明のAEMA基導入ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。

[図21]本発明のAPMA基導入ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。

[図22]本発明のメタクリロイル基導入ヒアルロン酸修飾物のNMRデータの一例である。

[図23]HAゲルからの蛍光標識HA-HZの放出性を示した図である。

[図24]蛍光標識HA-HZを封入したHA-AEMA架橋ゲル微粒子の顕微鏡写真の一例である。

[図25]蛍光標識HA-AMを封入したHA-AEMA架橋ゲル微粒子の顕微鏡写真の一例である。

[図26]HAゲルからの蛍光標識HA-AMの放出性を示した図である。

[図27]ラットにHA-FITC標識FabコンジュゲートおよびFITC標識Fabを単回静脈内投与したときの血漿中濃度推移を示した図である。

[図28]HA-GLP-1変異体コンジュゲートをラットに静脈内投与したときの血漿中濃度推移を示した図である。

発明の実施の形態

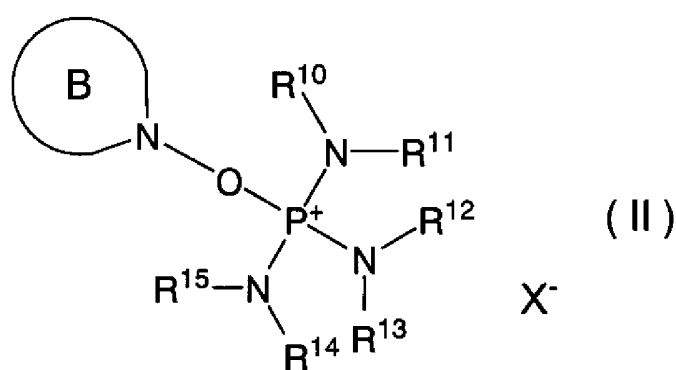
[0064] 以下、本発明を更に具体的に説明する。

[0065] 本発明は、非プロトン性極性溶媒中で、特定の縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基に置換基をアミド結合で下限が5モル%以上導入する、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法に関する。

[0066] 溶媒は極性有機溶媒でなければならず、特に非プロトン性極性溶媒が好ましい。非プロトン性極性溶媒と水との混合溶媒、あるいは、水を溶媒に使用した場合には、何れの縮合剤を用いても実用上十分な血中滞留性を付与するために必要な修飾率が得られず、また、これまでにない長期間の薬物徐放を実現する、より均一的な架橋性官能基の導入ができない。使用可能な非プロトン性極性溶媒は、ジメチルホルムアミド(以下、「DMF」とも称す)、ジメチルアセトアミド(以下、「DMAc」とも称す)、ジメチルスルホキシド(以下、「DMSO」とも称す)、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(以下、「DMI」とも称す)、スルホラン(以下、「SF」とも称す)、N-メチルピロリドン(以下、「NMP」とも称す)またはそれらの2種以上の混合溶媒等が挙げられる。好ましくは、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドンまたはそれらの2種以上の混合溶媒であり、特に好ましくは、ジメチルスルホキシドである。

[0067] 本発明の製造方法には、式(II)：

[0068] [化4]



[0069] [式中、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、環Bおよび X^- は、既に定義したとおりである]

で示される縮合剤が用いられる。ここで、環Bは、酸性プロトンを有さない含窒素ヘテロ環基であれば特に限定されず、 C_{1-6} アルキル基またはハロゲン原子などの置換基により置換されていてもよい。環Bには、例えばピロリジン-2, 5-ジオン-1-イル、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン、ベンゾトリアゾール-1-イルなどが含まれる。 X^- には、例えばフッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオンなどのハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 PF_6^- などが

含まれる。

[0070] R^{10} および R^{11} 、 R^{12} および R^{13} 、ならびに R^{14} および R^{15} が、それらが結合する窒素原子と一緒に形成する含窒素ヘテロ環としては、5～7員飽和含窒素ヘテロ環などが好ましく、具体的にはピロリジン、ピペリジン、ホモピペリジンなどが含まれる。

[0071] 好ましくは、当該縮合剤は環Bがベンゾトリアゾールー1-イルであるBOP系縮合剤である。好ましいBOP系縮合剤としては、ベンゾトリアゾールー1-イルオキシートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(以下、「BOP」とも称す)、ベンゾトリアゾールー1-イルオキシートリス(ピロリジノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(以下、「PyBOP」とも称す)、およびこれらの混合物が挙げられる。BOP系縮合剤は単独でまたは適宜組み合わせる利用することができる。

[0072] なお、上記以外の他の縮合剤、例えばN, N'-カルボニルジイミダゾール(以下、「CDI」とも称す)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(以下、「DCC」とも称す)、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(以下、「EDC」とも称す)、EDC/3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(以下、「HODhbt」とも称す)、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(以下、「EEDQ」とも称す)、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリウムクロリド n-水和物(以下、「DMT-MM」とも称す)、2-(1H-ベンゾトリアゾールー1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート(以下、「TBTU」とも称す)等では、実用上十分な血中滞留性(例えば平均血中滞留時間(以下、「MRT」とも称す)で18時間以上)を有するヒアルロン酸修飾物は得られず、またはヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を付与するために必要な高い導入率が得られない。またさらに、縮合剤としてCDIを用いた場合は、縮合反応中にHA分子量が低下してしまうため実用的ではない。さらにまた、これまでにない長期間の薬物徐放を実現する、より均一的な官能基の導入ができない。

[0073] 本発明に用いられるヒアルロン酸(HA)はHA骨格を有していれば特に限定されず、HAの一部を誘導体化したHA誘導体や、酵素、熱分解等で低分子化したHA、HA及びHA誘導体の塩(ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ア

ルミニウム塩、等)なども含まれる。本発明に用いられるHAは、どのようにして得られたHAでもよく、動物組織から抽出されたHA、発酵法で得られたHA、化学合成で得られたHAなど、その由来は限定されない。また、HAを有機溶媒に可溶化する為に、テトラブチルアンモニウム塩等の疎水性の高い対イオンにイオン交換したものを用いてもよい。

[0074] 本発明の水溶性HA修飾物において、置換アミド基に変換されているカルボキシ基の割合は、カルボキシ基修飾率として以下の式：

[0075] [化5]

$$(\text{カルボキシ基修飾率}) = \frac{(\text{各分子中の修飾されたカルボキシ基の合計数})}{(\text{各分子中のグルクロン酸の合計数})} \times 100$$

[0076] により算出される。本発明の水溶性HA修飾物のカルボキシ基修飾率の下限は5%以上であればよいが、薬物とのコンジュゲートとした時に実用的な血中滞留時間を得るためのヒアルロン酸修飾物としての観点では、修飾率の下限は30モル%以上であることが好ましく、50モル%以上であることがさらに好ましく、55モル%以上であることがさらに好ましく、60モル%以上であることがさらに好ましい。また、修飾率の上限は100モル%以下であればよい。例えば、タンパク質およびペプチドと結合させてコンジュゲートを形成するために用いられる水溶性ヒアルロン酸修飾物の修飾率の具体例としては、30～100モル%、50～100モル%および60～100モル%が挙げられる。一方、長時間の薬物徐放を実現するためのゲルとなるヒアルロン酸修飾物としての観点では、修飾率の下限は、5%モル以上が好ましく、10%モル以上がさらに好ましい。また、修飾率の上限は、皮下での分解性を維持するためには、70%モル以下が好ましく、60%モル以下がさらに好ましく、中でも40モル%以下がさらに好ましく、30モル%以下がさらにまた好ましい。例えば、タンパク質およびペプチドを封入するためのハイドロゲルの基材として用いられる水溶性ヒアルロン酸修飾物の修飾率の範囲の具体例としては、5～70モル%、5～60モル%、5～40%、5～30モル%、10～70モル%、10～60モル%、10～40%および10～30モル%が挙げられる。

[0077] ここで、カルボキシ基修飾率は、プロトンNMRで定量することができる。具体的に

は、プロトンNMRで得られるアミノ化(以下、「AM化」とも称す)またはメタクリロイル化(以下、「MA化」とも称す)されたHA誘導体中のアミノ化合物の量と、HA由来のピークとの比較から求めることができる。例えば、エチレンジアミン(以下、「EDA」とも称す)でアミノ基を導入したヒアルロン酸修飾物(以下、「HA-AM」とも称す)のプロトンNMRから得られるアミノ化合物由来のピーク(2.9~3.1ppm:測定溶媒D₂O)と、HA由来のピーク(1.8~1.9ppm:測定溶媒D₂O)の比、またはアミノエチルメタクリレート(以下、「AEMA」とも称す)でメタクリロイル基を導入したHA-AEMAのプロトンNMRから得られるメタクリロイル化合物由来のピーク(5.5~6.1, 1.8ppm)と、HA由来のピーク(1.8~1.9ppm)の比を実測する。

[0078] また、薬物とのコンジュゲートとした時に実用的な血中滞留時間を得るためのヒアルロン酸修飾物としての観点では、本発明の水溶性HA修飾物の分子量も、その体内動態を左右する。本発明の水溶性HA修飾物の血中滞留時間はHAの分子量にも依存し、分子量の大きなHA程その血中滞留時間は長い。従って、水溶性HA修飾物の分子量と水溶性HA修飾物のカルボキシ基の修飾率を変化させることで、水溶性HA修飾物の血中滞留時間を制御することが可能である。本発明に用いられる原料HAの分子量は特に制限されないが、余りに低分子量では得られた水溶性HA修飾物の血中滞留時間が短くなる。逆に、余りに高分子量になると得られた水溶性HA修飾物の粘度が非常に高くなり、高濃度での投与が難しくなる。また、本発明の水溶性HA修飾物の血中滞留時間は分子量が一定以上大きくなるとほとんど変化しなくなるので、通常、原料HAの分子量は粘度平均分子量で5000ダルトン~100万ダルトンであることが好ましく、1万ダルトン~30万ダルトンであることがより好ましく、8万ダルトン~30万ダルトンであることがさらに好ましい。

[0079] 一方、長時間の薬物徐放を実現するためのゲルの基材としてヒアルロン酸修飾物を使用される場合は、本発明に用いられる原料HAの分子量は特に限定されず、いかなる分子量の原料HAでも使用することが可能であるが、例えば5000~350万ダルトン、好ましくは1万~200万ダルトン、さらに好ましくは2万~30万ダルトンのHAを使用してもよい。

[0080] なお、HA重量平均分子量の測定方法については、例えば、中浜精一他著「エッセ

ンシャル高分子科学」(講談社発行、ISBN4-06-153310-X)に記載された、光散乱法、浸透圧法、粘度法等、各種の公知の方法を利用することができ、本明細書において示される粘度平均分子量もウベローデ粘度計を使用するなど、本発明が属する技術分野において通常用いられる方法により測定することができる。

[0081] 本発明の製造方法により得られる水溶性HA修飾物の血中滞留時間は、原料HAの血中滞留時間に比べて延長されているものであることが好ましい。ここで、血中滞留時間は、平均血中滞留時間(例えば、本明細書実施例5-3に記載のMRTとして算出される)、血中半減期(以下、「 $t_{1/2}$ 」とも称す)、血中クリアランス(以下、「Cl」とも称す)などの公知の代表的なパラメーターを利用して適宜比較することができる。本発明製造方法により得られる水溶性HA修飾物のヒトを含む哺乳動物における血中滞留時間は、実用面から平均血中滞留時間(以下、「MRT」とも称す)の下限が18時間以上のものであることが好ましく、30時間以上のものがより好ましい。上限は、薬物濃度制御の観点から、1ヶ月以下、好ましくは2週間以下である。

[0082] また、本発明の別の側面によれば、本発明の製造方法により得られる水溶性HA修飾物は、原料HAに比べてヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものであることが好ましい。ここで、「ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する」とは、原料HAと本発明の水溶性HA修飾物をそれぞれヒアルロニダーゼにより酵素分解させた際に、原料HAよりも分解速度が遅いかまたは分解が進まない性質を有することを指す。例えば、一定時間ヒアルロニダーゼ処理した際に、原料HAでは観察される2糖分解ピークが観察されなければ「分解が進まない」性質を有する(即ち、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する)と判定することができる。なお、HAの分解速度や分解状態はゲル浸透クロマトグラフィー(以下、「GPC」とも称す)などの常法を用いて観察することができる。

[0083] 本発明において、グルクロン酸部分のカルボキシ基を変換して導入されるアミド基の置換基としては、当該変換後に得られるHA修飾物が水溶性であれば特に制限されない。本発明のHA修飾物が有する置換基はどのような置換基であってもよいが、得られたHA修飾物の水溶性を保持するために、親水性の置換基または疎水性の低い置換基を導入することが好ましい。

[0084] 上記のアミド化の際にヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物の具体例は、一分子中に1種類かつ1個以上の官能基を持ち、窒素原子上に置換基を有していてもよいアミノ基を有するアミン類である。ここで、窒素原子上の置換基を有していてもよいアミノ基を除いた官能基とは置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、カルボキシ基、アルデヒド基、メタクリロイル基、アクリロイル基から選択される。その官能基の種類は好ましくは1つおよび2種類である。官能基が1種類かつ1個の場合、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基にアミド結合する化合物は、アルキレンジアミン化合物もしくはアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキルアミン化合物等の2つのアミノ基を有する化合物(以下、「ジアミン化合物」とも称す); アミノ基と水酸基を有する化合物; アミノ基とメルカプト基を有する化合物; アミノ酸、ペプチド等のアミノ基とカルボキシ基を有する化合物; アミノ基とアルデヒド基を有する化合物、アミノ基とメタクリロイル基を有する化合物; または、アミノ基とアクリロイル基を有する化合物から選択される。上記の化合物はアミノ基に置換基を有していてもよく、当該置換基には例えばC₁₋₆ アルキル基、C₁₋₆ アルキルカルボニル基などが含まれる。

[0085] なお、これらの化合物においては、化合物中の任意の炭素原子が、例えば1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい。ただし、同一炭素原子が複数の水酸基で置換されることや、既に酸素原子、窒素原子等のヘテロ原子が結合している炭素原子がさらに水酸基で置換されていることはない。

[0086] 前述の通り、アミド化の際にヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物の種類は単一であっても、複数であってもよい。すなわち、単品であっても混合品であってもよく、単品を段階的に反応させていてもよい。

[0087] また、これらの化合物で、ヒアルロン酸のカルボキシ基を変換して生じる置換アミド基の置換基としては、アミノアルキル基(このアミノアルキル基のアルキレン鎖は1個以上、例えば1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい)、アミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、ヒドロキシアルキル基(このヒドロキシアルキル基のアルキレン鎖

は1個以上、例えば1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～3個の水酸基で置換されていてもよい)、ヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、ヒドロキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メルカプトアルキル基、メルカプト(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メルカプト(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシアルキル基、メタクリロイルアミノアルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシアルキル基、アクリロイルアミノアルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基またはアクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基等が挙げられる。

[0088] 特定の実施態様において、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基にアミド結合する化合物の具体例は、

式： $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^1-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{n-1}-\text{NH}_2$ で表されるジアミン化合物；

式： $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{r-1}-\text{OH}$ で表されるアミノ基と水酸基を有する化合物；

式： $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_j-\text{SR}^7$ および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^3-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_z-\text{SR}^8$ で表されるアミノ基とメルカプト基を有する化合物；ならびに

式： $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_1-\text{O}-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^{16})=\text{CH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_q-\text{NHCO}-\text{C}(\text{R}^{17})=\text{CH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^4-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NHCO}-\text{C}(\text{R}^{18})=\text{CH}_2$ および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y}^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_y-\text{O}-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^{19})=\text{CH}_2$ で表されるアミノ基とメタクリロイル基もしくはアクリロイル基を有する化合物であり、上記式中において、 m 、 l 、 p 、 j および q は、それぞれ独立に2～10から選択される整数であり、 n 、 r 、 z 、 t および y は、それぞれ独立に1～200から選択される整数であり、 R^5 および R^6 はそれぞれ独立して水素原子または水酸基であり、かつ、 $(m-2)$ 個ある $-\text{CHR}^5-$ および $(p-2)$ 個ある $-\text{CHR}^6-$ が任意の割合および順番で $-\text{CH}_2-$ と $-\text{CHOH}-$ とが混在している状態を示しており、 R^7 は、水素原子、保護基または $-\text{S}-(\text{CH}_2)_j-\text{NH}$

H_2 であり、 R^8 は、水素原子、保護基または $-\text{S}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Y}^3)_z-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$
 H_2 であり、 R^{16} 、 R^{17} 、 R^{18} 、および R^{19} はそれぞれ独立して、水素原子またはメチル基で
 あり、 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 および Y^5 は、それぞれ独立して、酸素原子または $-\text{NH}-$ であ
 る]である。

[0089] ここで、分子中で R^5 および R^6 が水酸基である CHR^5 および CHR^6 の個数は、それぞれ0～8であるが、好ましくは0～3、さらに好ましくは0および1である。 R^5 および R^6 が水酸基である CHR^5 および CHR^6 の個数を調節することで、本発明の水溶性HA集修飾物の、水に対する溶解度を調節することができる。 R^5 がすべて水素原子の場合、 m としては2～6が好ましく、その具体例として2および6が挙げられる。 R^5 の1つが水酸基である場合、 m の具体例としては3が挙げられる。 Y^1 が酸素原子の場合、 n の具体例としては2が挙げられる。 Y^1 が $-NH-$ の場合、 n の具体例としては1が挙げられる。 l の具体例としては1が挙げられる。 p 、 q の具体例としては3が挙げられる。 r の具体例としては1および3が挙げられる。

[0090] $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{m-2}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ の好ましい具体例としては、例えば、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_7-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_8-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_9-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_3-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_3-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{HOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{2 \times 3}-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_{2 \times 4}-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{2 \times 2}-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_{2 \times 6}-\text{NH}_2$ および $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{2 \times 5}-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_{2 \times 4}-\text{NH}_2$ が挙げられ、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{2 \times 2}-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}$

H)₂—NH₂ および H₂N—CH₂—CHOH—CH₂—NH₂ が好ましい。

[0091] $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ の好ましい具体例としては、例えば、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_7-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_8-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_9-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_5-\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$ が挙げられ、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ および $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ が好ましい。

なお、これらの化合物は例えばシグマ-アルドリッチ社などから市販されており、適宜購入して利用することができる。また、文献記載の方法に従い、もしくは文献記載の方法を参考にして合成してもよい。

[0092] ヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物は、担持される薬物がタンパク質およびペプチドの時、薬物を本発明の水溶性HA修飾物から得られるゲル中に封入する場合は、アミノ基とメタクリロイル基を有する化合物、アミノ基とアクリロイル基を有する化合物、アミノ基とメルカプト基を有する化合物、アミノ基とメタクリロイル基を有する化合物およびアミノ基と水酸基を有する化合物の組み合わせ、アミノ基とアクリロイル基を有する化合物およびアミノ基と水酸基を有する化合物の組み合わせ、並びにアミノ基とメルカプト基を有する化合物およびアミノ基と水酸基を有する化合物の組み合わせが好ましい。また、薬物と本発明の水溶性HA修飾物とをコンジュゲートに

する場合は、ジアミン化合物、アミノ基とメルカプト基を有する化合物、ジアミン化合物およびアミノ基と水酸基を有する化合物の組み合わせ、並びにアミノ基とメルカプト基を有する化合物およびアミノ基と水酸基を有する化合物の組み合わせが好ましい。

- [0093] アミノ基と水酸基を有する化合物は、反応性官能基である、アミノ基、メルカプト基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基のカルボキシ基への導入率制御に用いることができる。
- [0094] 本発明において「アルキル基」とは、炭素数1以上の直鎖状、分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えば以下に定義する「C₁₋₆アルキル基」などである。
- [0095] 本発明において「C₁₋₆アルキル基」とは、炭素数1～6の直鎖状、分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、i-ブチル、t-ブチルなどの「C₁₋₄アルキル基」が含まれ、さらに、n-ペンチル、3-メチルブチル、2-メチルブチル、1-メチルブチル、1-エチルプロピル、n-ヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3-エチルブチル、および2-エチルブチルなどが含まれる。
- [0096] 本発明において「C₁₋₆アルキルカルボニル基」とは、炭素数1～6の直鎖状、分岐鎖状のアルキル基を有するアルキルカルボニル基を意味し、例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ピバロイル、バレリル、イソバレリル、ヘキサノイルなどが含まれる。
- [0097] 本発明において「アルキレンオキシ基」とは、炭素数が1以上のアルキレン鎖を含み、炭素原子と酸素原子で連結する2価の基であり、例えば以下に定義する「C₂₋₁₀アルキレンオキシ基」などである。
- [0098] 「C₂₋₁₀アルキレンオキシ基」とは、炭素数が2～10のアルキレン鎖を含む炭素原子と酸素原子で連結する2価の基であり、例えばエチレンオキシ基、プロピレンオキシ基、ブチレンオキシ基などが含まれる。
- [0099] 本発明において導入される置換基の導入量は、縮合剤のHAに対する添加量で調節することができる。
- [0100] また、本発明の水溶性HA修飾物の電荷に関して、導入された置換基がカチオン性であった場合、トータルの電荷がプラス側に振れ、血中滞留時間の短縮に繋がる

ため、本発明の水溶性HA修飾物を薬物とのコンジュゲートとして血中滞留時間を延長する場合には修飾電荷はノニオン性か、アニオン性であることが好ましい。

[0101] 本発明の水溶性HA修飾物の調製方法では、例えば、テトラブチルアンモニウム(TBA)塩化したHAをDMSOに溶解し、分子の両末端にアミノ基を1つずつ有するジアミノ系化合物を添加、HAのカルボキシ基にBOP系縮合剤で縮合させ、アミノ基を導入したHA(以下、「HA-AM」とも称す)を合成できる。

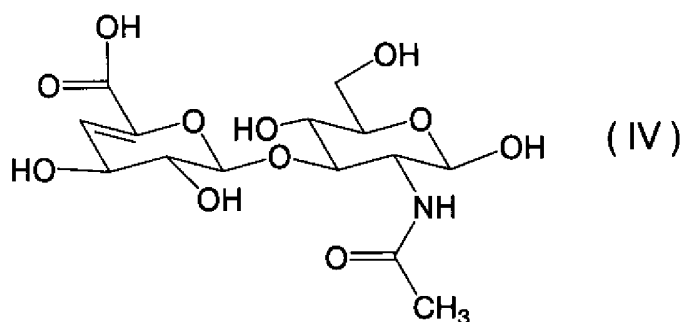
[0102] また、本発明の水溶性HA修飾物のうち、カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、置換されていてもよいアミノ基である場合、この置換されていてもよいアミノ基をさらに修飾することで、メルカプト基、アクリロイル基、メタクリル基などの官能基を導入できる。この際、残存したアミノ基は、例えば無水コハク酸、無水マレイン酸、無水グルタル酸および無水アジピン酸などのジカルボン酸無水物などで処理するか、マレイン酸、グルタル酸およびアジピン酸などのジカルボン酸を縮合剤共存下で反応させることで、末端の官能基をカルボキシ基に戻してトータル電荷をアニオン性にした方が血中滞留時間の延長には好ましい。ここで用いられる縮合剤は、特に限定されず、例えば、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ピロリジノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、N, N'-カルボニルジイミダゾール、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、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、EDC/3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリウムクロリド n-水和物、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレートならびにこれらの混合物などを使用することができる。得られるヒアルロン酸修飾物のトータル電荷の観点からは、アミノ酸またはペプチドなどのアミノ基を、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシ基と反応させた化合物、あるいはa)アミノ基;b)メルカプト基、アクリロイル基およびメタクリル基等の官能基から選択される官能基というa)とb)との両方を有するアミン類を、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシ基と反応させた化合物なども好ましい。

。

[0103] また、本発明は、上述した製造方法により得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物自体にも関する。

[0104] この水溶性ヒアルロン酸修飾物は、薬物とのコンジュゲートとした時に実用的な血中滞留時間を得るためのヒアルロン酸修飾物としての観点では、好ましくは、ヒアルロン酸をその構成ユニットの2糖にまで分解することができ且つ分解産物の非還元末端に Δ -4, 5-グルクロン酸残基をもつ不飽和2糖分解物(例えば、式IVの化合物を含む)：

[0105] [化6]



[0106] を生成させるヒアルロニダーゼで該水溶性ヒアルロン酸修飾物を分解し、得られる分解産物の232nmにおける吸収を測定した場合に、分解産物に由来する全ピークエリアに対する2糖に由来するピークエリアの分率の上限が30%以下であるという特徴を有する。このピークエリアの分率の上限は、好ましくは20%以下、さらに好ましくは13%以下である。また、下限は0%以上であればよい。当該測定は、通常の高速度液体クロマトグラフィーを用いて当該技術分野において通常用いられる方法により行うことができ、例えばGPCカラム(例えばSuperdex200 10/300 GL、Superdex75 HR 10/30およびSuperdex PeptideHR 10/30(いずれもアマシャムバイオサイエンス株式会社製)など)を使用することができる。また使用する溶離液は特に限定されないが、例えばPBS(例えば、シグマ-アルドリッチ社製Phosphate Buffered Saline Tablets 2錠をとり、精製水400mLに溶解させて得たもの)を使用することができる。

[0107] ここで、分解産物に由来する全ピークエリアに対する2糖に由来するピークエリアの

分率は、以下の式：

[0108] [化7]

$$\text{2糖分率 (\%)} = \frac{\text{2糖のピークエリア}}{(\text{分解液の全ピークエリア}) - (\text{酵素非添加時全ピークエリア})} \times 100$$

[0109] で求めることができる。また、ヒアルロニダーゼとしては、例えばヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)等を使用することができる。

[0110] 薬物とのコンジュゲートとした時に実用的な血中滞留時間を得るためのヒアルロン酸修飾物としての観点では、本発明の水溶性HA修飾物は、特に限定はされないが、例えば10mg/mL～1000mg/mLの水に対する溶解度を有する。実際に治療を目的として投与される時のHA修飾物の濃度は10～500mg/mL程度であるので、本発明の水溶性HA修飾物の溶解度は、好ましくは室温において生理食塩水に対して10mg/mL以上である。

[0111] 本発明の水溶性HA修飾物は、薬物担体として用いることができる。担持される薬物は特に限定されず、低分子化合物、タンパク質、ペプチドおよび核酸等を用いることが可能である。また、薬物を担持させるにおいては、公知の各種の方法を用いることができ、薬物を本発明の水溶性HA修飾物から得られるゲル中に封入してもよく、薬物と本発明の水溶性HA修飾物とをコンジュゲートにしてもよい。

[0112] 本発明の水溶性HA修飾物と薬物とからなるコンジュゲートの調製方法は、既知のポリマーの、薬物とのコンジュゲート化で使用されている方法を用いることができる。例えば、水溶性HA修飾物のアミノ基と、薬物のカルボキシ基との脱水縮合反応；薬物のアミノ基と、水溶性HA修飾物のカルボキシ基との脱水縮合反応；水溶性HA修飾物のアミノ基と、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、N-ヒドロキシコハク酸イミド(以下、「NHS」とも称す)エステルおよびエポキシドなどとして修飾基が導入された薬物との反応；薬物のアミノ基と、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、NHSエステルおよびエポキシドなどとして修飾基が導入された水溶性HA修飾物との反応；水溶性HA修飾物のアミノ基と、アルデヒドおよびケトンなどのカルボニル化合物として修飾基が導入された薬物とのシッフ塩基形成ならびに還元アミノ化反応；薬物のアミ

ノ基と、アルデヒドおよびケトンなどのカルボニル化合物として修飾基が導入された水溶性HA修飾物とのシッフ塩基形成ならびに還元アミノ化反応；

水溶性HA修飾物に導入したメルカプト基と、マレイミド、アクリルエステル、アクリルアミド、メタクリルエステル、メタクリルアミド、アリール化合物、ビニルスルホンおよびメルカプト化合物などとして修飾基が導入された薬物との反応；薬物に導入したメルカプト基と、マレイミド、アクリルエステル、アクリルアミド、メタクリルエステル、メタクリルアミド、アリール化合物、ビニルスルホンおよびメルカプト化合物などとして修飾基が導入された水溶性HA修飾物との反応；

水溶性HA修飾物に導入したアビジンと、薬物に導入したビオチンとの結合；薬物に導入したアビジンと、水溶性HA修飾物に導入したビオチンとの結合；

などを利用することができる。水溶性HA修飾物あるいは薬物へ、これらの修飾基（アビジンおよびビオチン由来の基を含む）を導入するには、これらの修飾基およびカルボキシ基（このカルボキシ基はNHSエステルなどの活性エステルとなっていてよい）から任意に選ばれる2つ以上、好ましくは2つの基を分子内に有する化合物が用いられ、この化合物においては、これらの基以外の分子内の構造は、コンジュゲートを調製するまでの間に不都合な反応が進行しないものであれば、特に限定されない。該化合物は試薬として入手可能であるか、または文献公知の方法を参考にして合成してもよい。

[0113] 具体的には、置換アミド基の置換基が、アミノ基を含む本発明の水溶性HA修飾物を合成し、ここで、アミノ基の一部をN-スクシンイミジル 3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート（N-Succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]propionate; SPDP）と反応させ、メルカプト基を導入したHA（以下、「HA-SH」とも称す）を調製する。

[0114] この際、余剰のアミノ基は、例えば無水コハク酸等で処理、カルボキシ基に戻してトータル電荷をアニオン性にした方が好ましい。一方で、タンパク質にメルカプト基と特異的に反応する修飾基を導入して、マレイミド、ビニルスルホンなどとする。これをHA-SHと反応させコンジュゲートを調製してもよい。また逆に、例えば、置換アミド基の置換基が、アミノ基を含む本発明の水溶性HA修飾物のアミノ基をマレイミドブチロキシルホサクシンイミドと反応させてマレイミド基が導入された水溶性HA修飾物（

以下、「HA-AM-MI」とも称する)とし、さらに、メルカプト基含有タンパク質またはペプチド等の薬物と反応させコンジュゲートを調製してもよい。あるいは、置換アミド基の置換基が、アミノ基を含む本発明の水溶性HA修飾物のアミノ基の一部をSulfo-KMUS (同仁化学社、PIERCE (ピアス) 社等により販売) 等のマレイミド基含有化合物と反応させHA-AM-MIとし、余剰のAM基は、例えば無水コハク酸等で処理する。一方でタンパク質にシステインを導入するか、またはメルカプト基を有するリンカーを反応させておき、これをHA-AM-MIと反応させコンジュゲートを調製してもよい。

- [0115] ここで、当該コンジュゲートの生物活性を有効に保つためには、薬物と水溶性HA修飾物主鎖間のスペーサーの長さを調節すること、または部位特異的なコンジュゲートとすることもできる。
- [0116] また、本発明は、上記の水溶性ヒアルロン酸修飾物を架橋することで得られるヒアルロン酸ゲルにも関する。本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を用いた薬物徐放ゲルは、例えば、薬物共存下の溶液中でメタクリロイル基またはアクリロイル基を導入したヒアルロン酸誘導体をメルカプト基含有化合物で架橋することにより、薬物を封入できる。ここで架橋とは、共有結合による、分子間または分子内架橋を含むものであり、同時に分子間および分子内架橋を有する場合もある。
- [0117] 架橋時のpHは特に限定されないが、タンパク質またはペプチドを変性させずに不飽和基とメルカプト基の選択的反応を優先させ、タンパク質またはペプチド含有アミノ基との反応を防ぐpHが好ましい。そのようなpHは当業者が適宜選択することが可能であるが、例えばpH6.0～9.5、好ましくはpH7.0～9.5である。
- [0118] HAにメタクリロイル基を導入した本発明の水溶性HA修飾物に用いられる架橋剤としては、不飽和結合と求核付加反応で反応するメルカプト基を2つ以上同一分子に含む化合物が用いられる。例えば、ジチオトレイトール(以下、「DTT」とも称す)、ブタンジチオール、ポリエチレングリコールジチオール、システインを2つ以上含むペプチド等が挙げられる。
- [0119] 薬物を共存させる溶液における溶媒としては、本発明のHA修飾物および封入する薬物が溶解し、かつ封入する薬物に変性しない溶媒であればよく、例えば、水、エタ

ノール、アセトン、イソプロピルアルコールおよびアセトニトリルならびにこれらの混合溶媒が挙げられ、好ましくは水とエタノールとの混合溶媒および水等が挙げられる。

[0120] メルカプト基の不飽和結合を有する基に対する比率は特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能であるが、タンパク質、ペプチドとの反応を最小にし、且つ、不飽和基のゲル中の残存を防ぎ、且つ、速やかに反応させるため、メルカプト基：不飽和結合を有する基＝3：1～1：3が好ましい。更に好ましくは、2：1～1：2である。

[0121] また、架橋反応時のタンパク質またはペプチドの安定性向上、反応速度の向上の為にトリエタノールアミン等の塩基性化合物を添加することが好ましい。この際好ましい濃度としては、10～20 μ L/mLである。

[0122] さらに、本発明は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるヒアルロン酸ゲル微粒子にも関する。本発明のヒアルロン酸修飾物を用いて、架橋ヒアルロン酸ゲル微粒子を製造する方法としては、

- a) 本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸修飾物の架橋反応を進行させる工程を含む製造方法が好ましい。当該製造方法の工程a)における希薄溶液は、架橋反応に必要な基質および試薬などを含む溶液であるが溶媒により高度に希釈されているために反応が進行しないかまたは進行が極めて遅い溶液であり、その濃度は特に限定はされないが、例えば0.1%～5%、好ましくは0.2%～3%である。また本発明に用いる溶媒としては、当該技術分野において通常用いられている溶媒またはそれらの混合物を用いることができ、特に限定はされないが、例えば水、DMSO、エタノール、N-メチルピロリドン、超臨界炭酸液などである。この製造方法で得られた架橋ヒアルロン酸ゲル微粒子は、好ましくは、インジェクタブルなものである。

[0123] 上記製造方法の工程b)の希薄溶液を微粒子状の液滴に分散する方法には、当該技術分野で通常用いられる方法であれば特に限定されないが、当該希薄溶液を噴霧する方法、当該希薄溶液を別の液体と混合することによりエマルジョンを形成する方法などが含まれ、当該希薄溶液を噴霧する方法が好ましい。ここで微粒子状の液

滴は、特に限定されないが例えば $0.01\ \mu\text{m}\sim 1.5\text{mm}$ 、好ましくは $0.1\ \mu\text{m}\sim 500\ \mu\text{m}$ の平均粒子径を有することができる。

- [0124] 上記製造方法の工程c)における溶液の濃縮の方法は、架橋反応の進行をより早める濃度まで濃縮することができる手段であれば特に限定されない。また当該濃縮には、例えば、当該架橋反応が固相反応として進行するような溶媒が完全に除去された状態も含まれる。
- [0125] 本発明の架橋ヒアルロン酸ゲル微粒子は、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸修飾物を含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に架橋することにより製造することができる。また、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸修飾物と薬物とを含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に架橋反応を起こさせ、架橋反応と乾燥を同時に行うことで薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子とすることを特徴とする。
- [0126] さらに具体的には、本発明の架橋ヒアルロン酸ゲル微粒子の製造方法としては、微粒子の溶媒留去による乾燥と架橋反応が同時に進行する製造方法であればよい。例えば、液体を噴霧乾燥するスプレードライヤーを用い、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸修飾物と薬物とを含む溶液を噴霧乾燥することで、濃縮乾燥中にヒアルロン酸修飾物を架橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ればよい。スプレードライを用いる場合は、薬物の変性を防ぐために、乾燥温度は 100°C 以下であることが好ましい。
- [0127] このようにして、架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されている、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を基材としたヒアルロン酸ゲル微粒子を得ることができる。
- [0128] あるいは、架橋反応可能なHA修飾物(テトラブチルアンモニウム塩)と薬物をDMSOなどの極性有機溶媒に溶かしておき、二酸化炭素等の超臨界液体の添加により極性有機溶媒を抽出しヒアルロン酸修飾物を濃縮することにより、ヒアルロン酸修飾物の架橋反応を生じさせて微粒子を得ても良い。これらの微粒子化方法を用いる時は、Tween-20、Tween-80等の界面活性剤を添加(1%~2%程度)することで、

生成された微粒子の回収率を上げることができる。当該製造方法においては、濃縮前のヒアルロン酸修飾物の溶液は架橋反応を起こさない程度の濃度である必要があり、具体的にはヒアルロン酸修飾物の濃度は0.1%～5%が好ましい。

[0129] また、別法としては、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸修飾物と薬物を含む水溶液を脱水性を有する液体(例えば、分子量400ダルトンのポリエチレングリコール等)の中にエマルジョン化することで、脱水濃縮中にヒアルロン酸を架橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ることもできる。この方法を用いる時は、封入効率を上げるため、カチオン性かアニオン性の薬物が好ましい。

[0130] また、微粒子形成後に熱処理をすることでさらに含水率を低下させ、架橋反応を完全に終了させたほうが好ましい。この場合、架橋密度も上がり、徐放期間の延長も期待できる。

[0131] また、
a) 本発明のヒアルロン酸修飾物を架橋し、ヒアルロン酸ゲルを得る工程；
b) 得られたヒアルロン酸ゲルを乾燥する工程；
c) 得られた乾燥物を凍結する工程；および
d) 得られた凍結物を粉砕する工程を含む製造方法により、架橋ヒアルロン酸ゲル微粒子を製造することができる。

[0132] 当該製造方法の工程a)における架橋時に薬物を封入することにより、薬物担持ゲルを得ることができ、当該ゲルを使用することにより、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持ゲル微粒子を得ることもできる。

[0133] 当該製造方法の工程b)における乾燥方法としては、例えば通風乾燥、日光照射による乾燥、恒温槽中での乾燥、減圧下での乾燥、熱風循環式乾燥などが挙げられ、ゲル中に封入する薬物の性質などを考慮して適宜選択される。風速、乾燥時間、温度、圧力は、本発明のヒアルロン酸ゲルが分解や変質を生じない範囲で適宜選択されるが、恒温槽中での乾燥の場合、温度は、30～60℃が好ましく、30～45℃がさらに好ましい。工程b)により、工程a)で得られたヒアルロン酸ゲルの徐放性をさらに高めることもできる。

- [0134] 当該製造方法の工程c)における凍結方法は、乾燥されたヒアルロン酸ゲルの凍結が達成できる方法であれば特に限定されないが、例えば、ドライアイス、液体窒素、液体酸素、液体ヘリウムと接触させる方法を挙げることができ、また、これらで冷却された金属と接触させてもよい。接触させる時間は特に限定されないが、3～30分間が好ましく、10～15分間がさらに好ましい。
- [0135] 当該製造方法の工程d)における粉碎方法としては、乳棒と乳鉢を用いる粉碎やミルを用いる粉碎が挙げられるが、ミルを用いる粉碎が好ましい。ミル粉碎装置としては、遠心式粉碎機(日本精機製作所)およびインパクトミル(株式会社ダルトン)等の回転円板型の粉碎装置、アトマイザー(東京アトマイザー製造株式会社)、サンプルミル(東京アトマイザー製造株式会社)、バンタムミル(東京アトマイザー製造株式会社)、およびSKミル(トッケン)等のスクリーンミルの粉碎装置、超微量ラボジェットミル(AーOジェットミル、セイシン企業)等のジェット粉碎装置、並びに、超低温での粉碎が可能なリンレックスミル(リキッドガス株式会社)等が挙げられるが、SKミルおよびリンレックスミルが好ましい。
- [0136] さらに、工程c)の凍結と工程d)の粉碎の工程を、2～10回、好ましくは3～5回繰り返してもよい。
- [0137] これらの方法に従って得られたヒアルロン酸ゲル微粒子の微粒子径は、用途によって最適化すればよいが、インジェクタブルにするために通常、 $0.01\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ が好ましい。経皮投与の時は、 $0.01\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ が好ましく、経鼻、経肺投与の時は、 $0.01\mu\text{m}$ ～ $5\mu\text{m}$ が吸入効率の点で好ましく、静注投与の時には、 $0.01\mu\text{m}$ ～ $0.2\mu\text{m}$ 程度が血中動態の点から好ましい。
- [0138] また、本発明の水溶性HA修飾物は薬物とのコンジュゲート以外にも、高分子ミセル、リポソーム、ナノ微粒子等の微粒子性薬物キャリアーにおいて、その血中滞留時間の延長を目的として、表面修飾に用いることもできる。ここで表面修飾とは他の合成高分子、天然高分子、脂質、金属、セラミックスあるいはそれらの複合体などからなる物質の表面に、本発明の水溶性HA修飾物を化学的に結合または物理的に吸着させ、あるいは化学的に結合または物理的に吸着させた本発明の水溶性HA修飾物をさらに架橋することで、当該物質の最表面に本発明の水溶性HA修飾物あるいは

その架橋体が存在している状態を指す。例えば、本発明の水溶性HA修飾物とPLGA等の疎水性高分子を結合させた化合物を含む高分子ミセルや、本発明の水溶性HA修飾物をリン脂質に結合させたリポソーム、あるいは、本発明の水溶性HA修飾物に疎水性分子を結合させ、疎水性相互作用で疎水性微粒子表面をコートした微粒子、あるいは前記コート後さらに架橋した微粒子薬物担体等が挙げられる。

[0139] また、本発明のヒアルロン酸ゲル微粒子は、本発明のヒアルロン酸修飾物と同様、薬物担体としても用いることができる。ここで、本発明のヒアルロン酸ゲル微粒子からなる薬物担体とは、疾患の治療または診断のために用いられる微粒子状の薬物担体を意味する。当該担体の粒径は特に限定はされないが、例えば1nm～200 μ mである。

[0140] 本発明のヒアルロン酸ゲル微粒子は、好ましくは、薬物徐放担体である。

[0141] 担持される薬物の徐放性能は、架橋された本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の架橋密度に大きく依存するため、カルボキシ基修飾率を制御することで、薬物の徐放性能を制御することができる。

[0142] また、本発明の水溶性HA修飾物およびそれを架橋して得られるHAゲルを、外科手術後の癒着防止剤などの医療用デバイスの成分とすることもできる。本発明における医療用デバイスとは、疾患の治療または診断、あるいはそれらの補助に用いられるデバイスであれば特に限定されず、例えば人工臓器、インプラント、カテーテル、薬物内包ゲル、薬物内包ペレットなどが含まれる。

[0143] 上記医療用デバイスの具体例としては、本発明の水溶性HA修飾物で表面修飾を施した医療用デバイスが挙げられる。

[0144] なお、本発明のヒアルロン酸修飾物と結合させる薬物および本発明のヒアルロン酸ゲルに封入する薬物(低分子化合物、タンパク質、ペプチド、および核酸)の例としては、以下のものを挙げることができる。

[0145] 低分子化合物の例としては、例えば、制癌剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等)、免疫抑制剤、抗炎症剤(ステロイド剤、非ステロイド剤系抗炎症剤、等)、抗リウマチ剤、抗菌剤(β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルフ

ア剤、等)などを挙げることができる。

- [0146] タンパク質、ペプチドの例としては、例えば、エリスロポエチン(EPO)、グラニューロサイトコロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン- α 、 β 、 γ 、(INF- α 、 β 、 γ)、トロンボポエチン(TPO)、シリアリーニュートロフィクファクター(CNTF)、チューマーネクロシスファクター(TNF)、チューマーネクロシスファクター結合タンパク質(TNFBp)、インターロイキン-10(IL-10)、FMS類似チロシンカイネース(Flt-3)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1(IGF-1)、血小板由来成長因子(PDGF)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)、ブレイン由来ニューロトロフィクファクター(BDNF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、幹細胞因子(SCF)、メガカリオサイト成長分化因子(MGDF)、オステオプロテゲリン(OPG)、レプチン、副甲状腺ホルモン(PTH)、塩基性フィブロblast成長因子(b-FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、グルカゴン様ペプチド-1(以下、「GLP-1」とも称す)、抗体、ダイアボディー、ミニボディー、断片化抗体等を挙げることができる。
- [0147] 核酸の例としては、例えば、DNA、RNA、アンチセンス、デコイ、リボザイム、small interfering RNA等を挙げることができる。
- [0148] また、本発明のヒアルロン酸ゲルに封入する薬物としては、上述の薬物と高分子とのコンジュゲートが好ましい。この場合に用いられる高分子としては、特に限定されないが、例えば、PEG、HA、HA修飾物、デキストラン、プルラン、ポリグルタメート、ポリシアル酸等が挙げられる。
- [0149] 本発明の水溶性HA修飾物、ヒアルロン酸ゲル、およびヒアルロン酸ゲル微粒子は、薬物とのコンジュゲートとして、または薬物を封入して、1種もしくはそれ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩衝剤、結合剤、安定剤等を含む医薬組成物として、目的とする投与経路に応じ、適当な任意の形態にして投与することができる。投与経路は非経口的経路であっても経口的経路であってもよい。
- [0150] 本発明により、従来の方法では得られない、実用的なレベルまで血中滞留時間が

延長された水溶性HA修飾物を製造することが可能となる。さらに本発明により提供される水溶性HA修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化することで、従来の技術では達成できなかった、実用的でかつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

- [0151] さらに、本発明の水溶性HA修飾物を用いることで、従来のHA修飾物では得られない、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子化合物、あるいはそれらと高分子とのコンジュゲートを封入し、長期間徐放できる安全性の高いヒアルロン酸ゲル 徐放製剤、医薬組成物を提供することが可能である。

実施例

- [0152] 以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

- [0153] NMR測定は、核磁気共鳴装置 JNM-ECA500(日本電子株式会社製)を用いて測定した。NMRの測定条件を以下に示す。

- [0154] NMR測定条件

Data point:16384

Spectral width(X sweep):15ppm

Acquisition time(X acq time):1.749s

Pulse delay(Relaxation delay):30s

Transients(Scans):64

温度:室温

測定溶媒:D₂O

また、以下の記載中のHAユニットとは、ヒアルロン酸中のN-アセチルグルコサミン-グルクロン酸の繰り返し単位(1ユニット)を意味する。

[実施例1] 非プロトン性極性溶媒中でのヒアルロン酸修飾物の合成(縮合剤、溶媒混合比率、酵素分解性)

非極性溶媒中における様々な合成条件を検討し、各条件で得られたヒアルロン酸修飾物の酵素耐性の評価を行った。

(実施例1-1)

テトラブチルヒドロオキサイド(シグマーアルドリッチ社製)でテトラブチルアンモニウム(TBA)塩化したDOWEX 50WX8-400(シグマーアルドリッチ社製)を用いて、分子量200kDaのヒアルロン酸ナトリウム(HA;電気化学工業株式会社製)をTBA塩化した。得られたテトラブチルアンモニウム塩化ヒアルロン酸(以下、「HA-TBA」とも称す)29.1mgを2.0mg/mL濃度となるようDMSO(和光純薬株式会社製)に溶解した。HAユニット/BOP(和光純薬株式会社製)/エチレンジアミン(以下、「EDA」とも称す;シグマーアルドリッチ社製)=1/2.5/100(mol/mol/mol)の当量比でEDA、BOPの順で添加し、室温で一晩反応させた。その後、1M NaCl水溶液を10mL加えた後、5N HClを加えてpHを3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(以下、「MWCO」とも称す):12k-14kDa)、限外ろ過後(YM-10、MILLIPORE社製)、凍結乾燥して標題のアミノ基が導入されたヒアルロン酸(以下、「HA-AM」とも称す)25.8mgを得た。

(実施例1-2)

エチレンジアミンの代わりに2, 2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)(以下、「EDOBEA」とも称す;シグマーアルドリッチ社製)を用い、HA-TBA 35.1mgを用い、HAユニット/BOP/EDOBEA=1/2.5/50(mol/mol/mol)の当量比で反応させたこと以外は実施例1-1と同様の方法で行い、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)27.2mgを得た。

(実施例1-3)

EDOBEAの代わりにヘキサメチレンジアミン(HMDA;シグマーアルドリッチ社製)を用い、HA-TBA 62.0mgを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で行い、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)41.1mgを得た。

(実施例1-4)

BOPの代わりにPyBOP(国産化学株式会社製)を用い、HA-TBA 51.8mgを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)39.0mgを得た。

(比較例1-1)

DMSOの代わりに水を用い、BOPの代わりにEDC(シグマ-アルドリッチ社製)を用い、50.0mgのHA(ナトリウム塩)を1.0mg/mL濃度とし、HAユニット/EDC/エチレンジアミン・2HCl(以下、「EDA・2HCl」とも称す;和光純薬株式会社製)=1/4/100(mol/mol/mol)の当量比にした。pHは7.0に調整し一晩反応させた。それ以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)36.1mgを得た。

(比較例1-2)

DMSOの代わりに水/エタノール(90/10)を用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)36.0mgを得た。

(比較例1-3)

DMSOの代わりに水/エタノール(70/30)を用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)38.3mgを得た。

(比較例1-4)

EDCの代わりにEDC/HODhbt(渡辺化学工業株式会社製)を用い、HAユニット/EDC/HODhbt/EDA・2HCl=1/4/4/100(mol/mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)49.3mgを得た。

(比較例1-5)

DMSOの代わりに水/DMSO(60/40)を用い、HAユニット/EDC/EDA・2HCl=1/2/50(mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)44.0mgを得た。

(比較例1-6)

EDCの代わりにBOPを用いたこと以外は比較例1-5と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)42.1mgを得た。

(比較例1-7)

EDA・2HClの代わりにヘキサメチレンジアミン・2HCl(HMDA・2HCl;東京化成工業株式会社製)を用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)35.2mgを得た。

(比較例1-8)

EDA・2HClの代わりにHMDA・2HClを用いたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33. 3mgを得た。

(比較例1-9)

EDA・2HClの代わりにHMDA・2HClを用い、水/エタノール(60/40)を用いたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33. 6mgを得た。

(比較例1-10)

EDA・2HClの代わりにHMDA・2HClを用い、水/エタノール(60/40)を用いたこと以外は比較例1-4と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 48. 4mgを得た。

(比較例1-11)

水/DMSO(60/40)の代わりに水/DMSO(50/50)を用い、51. 9mgのHAを用いたこと以外は比較例1-5と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 47. 5mgを得た。

(比較例1-12)

BOPの代わりにDCC(和光純薬株式会社製)を用い、69. 9mgのHA-TBAを4. 0mg/mL濃度とし、HAユニット/DCC/EDOBEA=1/4/100 (mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 54. 5mgを得た。

(比較例1-13)

BOPの代わりにDCCを用い、54. 1mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 40. 7mgを得た。

(比較例1-14)

BOPの代わりにCDI(シグマ-アルドリッチ社製)を用い、50. 0mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 31. 6mgを得た。

(比較例1-15)

BOPの代わりにEDCを用い、46.4mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 30.4mgを得た。

(比較例1-16)

BOPの代わりにEEDQ(和光純薬株式会社製)を用い、58.4mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 39.5mgを得た。

(比較例1-17)

EEDQの代わりにDMT-MM(和光純薬株式会社製)を用い、53.5mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33.2mgを得た。

(比較例1-18)

DMT-MMの代わりにTBTU(和光純薬株式会社製)を用い、56.0mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 30.0mgを得た。

(試験例1)酵素分解性評価

実施例1-1~1-4および比較例1-1~1-18で得られたHA-AMを2mg/mL濃度に蒸留水(ミリQ水)に溶解した。この溶液55 μ Lに0.2Mリン酸緩衝液(pH6.2)132 μ Lおよび水77 μ Lを加え、ヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)1U/mL溶液(0.01%BSAを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH6.2))44 μ Lを加えて37°Cで24時間インキュベートした。各サンプル100 μ Lを分取し、50mM酢酸溶液を720 μ L加え反応を停止させた。対照として酵素非添加群も同様に行った(データ省略)。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(以下、「GPC」とも称す)に供してHA-AMの分子量の変化、分解産物の生成パターンを観察した(232nmの吸収)。GPCの条件を以下に示す。

GPCの測定条件

GPC Column: Superdex200 10/300 GL、Superdex75HR 10/30、S

uperdex PeptideHR 10/30 (アマシャムバイオサイエンス株式会社製) (3本連結)

Eluent: PBS (pH7.4)

Flow Rate: 0.4 mL/min

Injection Volume: 50 μ L

Detection: UV (232 nm)

2糖分解ピーク (Retention Time: 130分) が観察されたものを×、観察されなかったものを○で評価し、表1に示す。また、典型的なGPCデータを図1および図2に示す (実施例1-1~1-4、比較例1-3、1-5、1-6、1-14、参考例)。

[0155] また、実施例1-1~1-4のアミノ基導入率をプロトンNMR法で定量した (HA: N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9 ppm、AM: エチレンジアミン部分のメチレンプロトン、2.9~3.1 ppm)。プロトンNMRデータを図3に示す。アミノ基導入率はそれぞれ97.5、75.5、88.3、84.5%だった。

[0156] なお、CDIを用いた導入 (比較例1-14) における、反応前後でのゲル浸透クロマトグラムを図4に示す。また、以下にGPC条件を示す。

[0157] GPCの測定条件

GPC Column: TSKgel G6000PW_{XL} (TOSOH社製)

Eluent: PBS (pH7.4)

Flow Rate: 0.5 mL/min

Injection Volume: 50 μ L

Detection: UV (210 nm)

縮合剤としてCDIを用いた場合、明らかな分解が観察され、CDIを用いる縮合ではHAの分子量が極端に低下したことが確認された。さらに、ヒアルロニダーゼによる分解に対する耐性が得られなかったため、HAへのアミノ化合物の導入には不向きであることが明らかとなった。

[0158] さらに、本試験例においては、a) 溶媒としてDMSO単独を用いる、b) 縮合剤としてBOPまたはPyBOPを用いる、という条件の両方を満たさない場合も、ヒアルロニダーゼによる分解に対する耐性が得られなかったため、HAへのアミノ化合物の導入には

不向きであることが明らかとなった。

[0159] [表1]

表1. 合成結果

置換基	溶媒	縮合剤	有機溶媒%	HA 濃度	HydaseSD アッセイ	HA : 縮合剤	HA : 置換基	
EDA 2HCl	H ₂ O	EDC	0%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-1
	H ₂ O/EtOH	EDC	10%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-2
	H ₂ O/EtOH	EDC	30%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-3
	H ₂ O/EtOH	EDC/HOBt	30%	1mg/mL	×	1 : 4 : 4	1 : 100	比較例 1-4
	H ₂ O/DMSO	EDC	40%	1mg/mL	×	1 : 2	1:50	比較例 1-5
	H ₂ O/DMSO	BOP	40%	1mg/mL	×	1 : 2	1:50	比較例 1-6
EDA	DMSO	DCC	-	2mg/mL	×	1 : 2.5	1 : 100	比較例 1-13
	DMSO	CDI	-	2mg/mL	×	1 : 1.2	1:50	比較例 1-14
	DMSO	BOP	-	2mg/mL	○	1 : 2.5	1 : 100	実施例 1-1
	DMSO	EDC	-	2mg/mL	×	1 : 2.5	1:50	比較例 1-15
	DMSO	ESDQ	-	2mg/mL	×	1 : 2.5	1:50	比較例 1-16
	DMSO	DMT-MM	-	2mg/mL	×	1 : 2.5	1:50	比較例 1-17
	DMSO	TUTB	-	2mg/mL	×	1 : 2.5	1:50	比較例 1-18
	DMSO	PyBOP	-	2mg/mL	○	1 : 2.5	1:50	実施例 1-4
HMDA 2HCl	H ₂ O	EDC	0%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-7
	H ₂ O/EtOH	EDC	30%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-8
	H ₂ O/EtOH	EDC	40%	1mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-9
	H ₂ O/EtOH	EDC/HOBt	40%	1mg/mL	×	1 : 4 : 4	1 : 100	比較例 1-10
	H ₂ O/DMSO	EDC	50%	1mg/mL	×	1 : 2	1:50	比較例 1-11
	DMSO	BOP	-	2mg/mL	○	1 : 2.5	1:50	実施例 1-3
EDOBEA	DMSO	BOP	-	2mg/mL	○	1 : 2.5	1:50	実施例 1-2
	DMSO	DCC	-	4mg/mL	×	1 : 4	1 : 100	比較例 1-12

[実施例2] BOPの添加率によるジアミン化合物の導入率制御

[0160] [実施例2] BOPの添加率によるジアミン化合物の導入率制御

ジアミン化合物の導入率の制御を行うために、様々な比率で縮合剤を添加し、酵素耐性評価を行った。

[0161] HA (200kDa) - TBAを2.0mg/mLでDMSOに溶解した溶液を3つ用意し、各溶液にHAユニット/エチレンジアミン(EDA) = 1/50 (mol/mol) の当量比でEDAを加え、BOP試薬をHAユニットに対しそれぞれ1.08、1.5または2.0の当量比で加え、一晩反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加えた後、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、限外ろ過後(YM-10、MILLIPORE社製)、凍結乾燥を行った。

[0162] また、HA (23kDa) - TBAを2.0mg/mLでDMSOに溶解した溶液を3つ用意し、各溶液にHAユニット/2, 2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン) (EDOBE

A) = 1/50 (mol/mol) の当量比で EDOBEA を加え、BOP 試薬を HA ユニットに対しそれぞれ 1.0、1.5 または 2.0 の当量比で加え、一晚反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の 1M NaCl 水溶液を加えた後、5N HCl にて pH を 3 まで低下させた後、2N NaOH にて中和を行った。その後大過剰量の蒸留水 (ミリQ 水) に対して透析精製し (スペクトラポア 4、分画分子量 (MWCO) : 12k-14kDa)、限外ろ過後 (YM-10、MILLIPORE 社製)、凍結乾燥を行った。

[0163] 実施例 2 のアミノ基導入率をプロトン NMR 法で定量した (HA : N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM : EDA 部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm、EDOB EA 部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm)。プロトン NMR データを図 5 に示す。また、各 HA 修飾物のヒアルロニダーゼ耐性は試験例 1 と同様の方法で評価した。アミノ基導入率およびヒアルロニダーゼ耐性評価の結果を表 2 に示す。アミノ基の導入率は BOP の仕込みで制御可能であり、非プロトン極性有機溶媒中で BOP 系試薬を縮合剤として用いることにより、均一的にかつ高導入率までの導入が可能であることが明らかとなった。

[0164] [表 2]

表 2. アミノ基の導入率およびヒアルロニダーゼ耐性評価

置換基	HA 分子量	反応時間	HydaseSD アッセイ	HA : 縮合剤	導入率 (%) (NMR)
EDA	200kDa	一晚	○	100 : 107.8	68.0
	200kDa	一晚	○	100 : 150	84.5
	200kDa	一晚	○	100 : 200	88.0
EDOB EA	23kDa	9h	○	100 : 100	58.0
	23kDa	9h	○	100 : 150	69.0
	23kDa	9h	○	100 : 200	71.0

[0165] HA は水中で分子内水素結合と、分子内および分子外の疎水性相互作用により、2 次構造、3 次構造を形成していることが知られており (The Biology of Hyaluronan. Chiba Foundation Symposium 第 143 巻, 第 6-14 頁 (1989 年))、均一な化学修飾が難しくなっていると考えられる。このため、水中で HA のカルボキシ基の多くを修飾しても、HA レセプターに認識されうる連続した 4-6 糖の未修飾ドメインが一部残存しており、ここが体内の HA レセプターに結合してしまうことで比較的短期間に血中からクリアされてしまうと予想される。

[0166] 非プロトン性極性溶媒中ではHAの水素結合、疎水性相互作用が減弱されることでHAの高次構造が壊され、高次構造形成に基づくカルボキシ基周辺環境の不均一性が解消され、より均一的な化学修飾が達成され、酵素耐性が得られるものと考えられる。

〔実施例3〕カルボン酸変換したHA修飾物のヒアルロニダーゼ耐性評価

酵素耐性をより詳細に評価するために、導入した一級アミンをカルボン酸に変換したHA修飾物(HA-AM-SUC)の合成を行い、得られたHA修飾物の酵素耐性の評価を行った。

(実施例3-1)HA-AMの合成

HA(200kDa)-TBAを4.0mg/mLでDMSOに溶解した溶液を6つ用意し、各溶液にHAユニット/EDOBEA=1/50(mol/mol)の当量比で2,2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)(EDOBEA)を加え、BOP試薬をHAユニットに対し、0.4、0.6、1.0、1.5、1.85または2.5の当量比で加え、一晩反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加え、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後0.3M NaCl水溶液に対して透析を行い、次に大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行い、EDOBEA導入HA修飾物を得た。

(実施例3-2)一級アミンのカルボン酸への変換

上記(実施例3-1)で得られたサンプルを蒸留水(ミリQ水)で20.0mg/mLの溶液とし、これに0.2M炭酸緩衝液(pH9.0)を加え、10.0mg/mLとした。この溶液にHAのユニット(1ユニット=繰り返し単位であるN-アセチルグルコサミン-グルクロン酸)に対して20モル倍の無水コハク酸(和光純薬株式会社製)をHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えて室温で30分間攪拌した。その後0.3M NaCl水溶液に対して透析を行い、次に大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行ない、HA-AM-SUCを得た。NMRスペクトルを図6に示した。アミノ基の隣のメチレンのピーク(2.9~3.1)が完全に消失し、新たにコハク酸由来のピーク(2.4~2.6

ppm)が観察され、アミノ基がカルボン酸へ変換されていることが明らかとなった。

(実施例3-3)酵素分解性評価

実施例3-2で得られたHA-AM-SUCを4mg/mL濃度で蒸留水(ミリQ水)に溶解した。この溶液25 μ Lに0.1Mリン酸緩衝液(pH6.2)200 μ Lおよび水25 μ Lを加え、ヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)1U/mL溶液(0.2Mリン酸緩衝液;pH6.2)50 μ Lを加えて37℃で24時間インキュベートした。各サンプル100 μ Lを分取し、50mM酢酸溶液を700 μ L加え反応を停止させた。対照として酵素非添加群も同様に行った(データ省略)。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(以下、「GPC」とも称す)に供してHA-AM-SUCの分子量の変化、分解産物の生成パターンを観察した(232nmの吸収)。結果を図7および表3に示す。また、GPCの条件を以下に示す。

GPCの測定条件

GPC Column:Superdex200 10/300 GL、Superdex PeptideHR 10/30(アマシャムバイオサイエンス株式会社製)(2本連結)

Eluent:PBS(pH7.4)

Flow Rate:0.4mL/min

Injection Volume:50 μ L

Detection:UV(232nm)

[0167] [表3]

表3. アミノ基修飾率とヒアルロニダーゼ耐性の相関

導入率	全ピークエリアに対する2糖のピークエリアの割合(%)
18.0	88.9
30.0	52.5
45.5	22.5
56.5	11.9
66.5	12.9
94.5	0.0
96.0	0.0

[0168] ここで分解産物のうちの2糖分率は溶媒由来のピーク(Retention Time:90分)を除いた範囲で $100 \times (2\text{糖のピークエリア}) / (\text{全ピークエリア} - \text{酵素非添加時全ピ$

ークエリア)(%)として算出した。酵素耐性はアミンの導入率、すなわちHAのカルボン酸の修飾率に対応して酵素耐性が上がることが明らかとなった。

〔実施例4〕様々な官能基を導入したHA修飾物の合成と二成分の官能基の導入率制御

様々な官能基の導入の検討を行った。また長期間の血中滞留性を維持し、反応性官能基の導入率の制御を行うため二つの化合物の導入を行った。

(実施例4-1)水酸基を導入したHA修飾物(HA-OH)の合成

(実施例4-1-1)アミノエタノール(AEtOH)導入HA修飾物の合成

HA(200kDa)-TBAをDMSOに溶解して5.0mg/mLの溶液を調製し、そこにHAユニット/一級アミン=1/50(mol/mol)の当量比でアミノエタノール(以下、「AEtOH」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)を添加し、さらにBOP試薬をHAユニットに対し2.5の当量比で添加し一晩攪拌した。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加えた後、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の0.3M NaCl水溶液、蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行った。得られたサンプルのNMRチャートを図8に示した。

(実施例4-1-2)2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール(AEAEtOH)を導入したHA修飾物の合成

AEtOHの代わりに2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール(以下、「AEAEtOH」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)を用いたこと以外は実施例4-1-1と同様の方法で行った。得られたサンプルのNMRチャートを図8に示した。

[0169] 実施例4-1-1および4-1-2におけるサンプルの¹H-NMR測定では、それぞれにおいて新たなピークが観察され目的の変換が達成されたことが確認された。しかし、導入化合物のピークがHA由来のピークと重なるためAEtOHおよびAEAEtOHの導入率の算出はできなかった。

(実施例4-2)二級アミンおよび水酸基を有するアミン化合物の導入

(実施例4-2-1)ジエチレントリアミン(DETA)を有するHA修飾物の合成

HA(200kDa)-TBAをDMSOに溶解して5.0mg/mLの溶液を調製し、そこに

ジエチレントリアミン(以下、「DETA」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)をHAユニット/ジエチレントリアミン=1/100(mol/mol)の当量比で添加し、さらにBOP試薬をHAユニットに対し1.5の当量比で添加し3時間攪拌した。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加え、5N HClにてpHを3まで低下させ、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の0.3M NaCl水溶液、蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行った。導入率はプロトンNMR法で定量した。(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM:ジエチレントリアミン部分の3つのメチレンプロトン、2.6~3.1ppm)導入率は89.8%であった。得られたサンプルのNMRチャートを図8に示した。

(実施例4-2-2)1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン(DAHP)を有するHA修飾物の合成

DETAの代わりに1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン(以下、「DAHP」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)を用い、DAHPをHAユニット/DAHP=1/50(mol/mol)の当量比で添加し、さらにBOP試薬をHAユニットに対し2.5の当量比で添加し一晩攪拌したこと以外は実施例4-2-1と同様の方法で行った。導入率はプロトンNMR法で定量した。(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM:1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン部分のメチンプロトン、2.6~2.8ppm)導入率は99.0%であった。得られたサンプルのNMRチャートを図8に示した。

[0170] 実施例4-2-1および4-2-2における¹H-NMR測定によりアルキルに水酸基が付加したジアミン化合物、および二級アミンを有するアミン化合物も導入可能であることが明らかとなった。

(実施例4-3)水酸基およびアミノ基を導入した(HA-AM/OH)の合成

(実施例4-3-1)3-アミノプロパン-1-オールおよび1,3-ジアミノプロパンを導入したHA修飾物の合成

HA(200kDa)-TBAを5.0mg/mLの濃度にDMSOに溶解した溶液を5つ用意した。反応試薬は3-アミノプロパン-1-オール(以下、「APrOH」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)、1,3-ジアミノプロパン(以下、「DAP」とも称す;シグマ-アルドリッチ

社製)を用い、HAユニット／反応試薬のアミノ基($\text{APrOH} + \text{DAP}$) = 1／50 (mol／mol) の当量比で固定し、 $\text{APrOH} : \text{DAP}$ (mol:mol) が 100:0、95:2.5、90:5、80:10、0:100 のモル比となるように各溶液に添加した。その後、BOP試薬をHAユニットに対し2.5の当量比で各溶液に添加した。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加え、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の0.3M NaCl水溶液、蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行った。アミノ基および水酸基の導入率はプロトンNMR法で定量した。NMRチャートを図9に示す(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm;AM:ジアミノプロパン部分のメチレンプロトン、1.7~1.8、2.9~3.0ppm;OH:アミノプロパノールのメチレンプロトン、1.55~1.65ppm)。

[0171] それぞれ導入率は100:0($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 100モル%、95:2.5($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 88.4:10.7モル%、90:5($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 78.9:19.2モル%、80:10($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 63.8:36.0モル%、0:100($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 93.2モル%であった(以下、導入率が0:100($\text{APrOH} : \text{DAP}$) = 93.2モル%であるHA修飾物を、「HA-DAP」とも称す)。また、GPCチャートを図10に示した(対照:200kDaのヒアルロン酸ナトリウム(HA-Na))。イオン性基でない官能基を導入することにより、GPCチャート上でピークが低分子側にシフトし見かけ上の分子量が低下する現象が観察され、静電的もしくは水素結合的な分子内の相互作用が変化した可能性が示唆された。また、AMの導入に従いカラムとの相互作用によりピークが低分子量側へシフトすることが観察された。実施例4-3-1により、アミノ基と水酸基とを有する水溶性HA修飾物の合成が可能であり、その導入率が制御可能であることが明らかとなった。

(実施例4-3-2) (2-アミノエトキシ)エタノール(AEEtOH)およびエチレンジアミン(EDA)を導入したHA修飾物の合成

反応試薬であるアミノプロパノール(APrOH)、ジアミノプロパン(DAP)の代わりに(2-アミノエトキシ)エタノール(以下、「AEEtOH」とも称す;シグマ-アルドリッチ社製)、エチレンジアミン(EDA;シグマ-アルドリッチ社製)を用い、HAユニット／反応

試薬のアミノ基(AEEtOH+EDA)=1/50(mol/mol)の当量比で固定し、AEEtOH:EDA(mol:mol)が95:2.5、90:5、80:10のモル比となるように各溶液に添加し、反応させた以外は実施例4-3-1と同様の方法で行った。アミノ基の導入率はプロトンNMR法で定量した。NMRチャートを図11に示す。(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM:エチレンジアミン部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm)それぞれAM(EDA)の導入率は95:2.5(AEEtOH:EDA)=13.0モル%、90:5(AEEtOH:EDA)=20モル%、80:10(AEEtOH:EDA)=33.0モル%であった。また、GPCチャートを図10に示した。実施例4-3-1と同様にイオン性基でない官能基を導入することにより、GPCチャート上でピークが低分子側にシフトし見かけ上、分子量が低下する減少が観察され、静電的もしくは水素結合的な分子内の相互作用が変化した可能性が示唆された。また、AMの導入に従いカラムとの相互作用によりピークが低分子量側へシフトすることが観察された。

(実施例4-4)酵素分解性評価

実施例4-1および4-3で得られたサンプルを4mg/mLの濃度で蒸留水(ミリQ水)に溶解した以外は実施例3-3と同様に行った。また、解析に関してはAM基の影響があるために2糖分率の評価は行わなかった。結果を図12、13に示す。

- [0172] 全てのサンプルにおいて、2糖の分解物は観察されず、電荷および反応性官能基の導入率制が可能な酵素耐性を有するHA修飾物が合成可能であることが示唆された。なお、2糖の分解物が観察されなかったということは、ヒアルロニダーゼで分解して得られる分解産物の232nmにおける吸収を測定した場合、分解産物に由来する全ピークエリアに対する2糖に由来するピークエリアの分率が30%以下であったことを意味する。

[実施例5]ヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)の分子量と血中滞留時間との相関(分子量依存性)

ヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)の血中滞留性を分子量の観点から解析するために、23k、100kおよび200kDaのHAからHA修飾物を合成し、蛍光色素であるFITCを導入したサンプルを調製し、それぞれの血中滞留性を観察した。

(実施例5-1)HA-AMの合成

HA (23kDa) - TBAを2mg/mLの濃度でDMSOに溶解し、またHA (100kDa) - TBAおよびHA (200kDa) - TBAを4mg/mLの濃度でDMSOに溶解した溶液を調製した。HAユニット/BOP/2, 2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)(EDOBEA) = 1/2.5/50 (mol/mol/mol)の当量比でEDOBEA、BOPの順で各溶液に添加し、室温で一晩反応させた。その後、反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加えた後、5N HClを加えてpHを3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、限外ろ過後(YM-10、MILLIPORE社製)、凍結乾燥して標題のアミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)を得た。アミノ基導入率はプロトンNMR法で定量した。NMRチャートを図14に示す(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM:EDOBEA部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm)。それぞれ導入率は23kDa:87モル%、100kDa:92.5モル%、200kDa:93.5モル%であった。

(実施例5-2)蛍光標識HA修飾物の合成

上記(実施例5-1)で得られたHA-AMを蒸留水(ミリQ水)で溶解し20.0mg/mLの溶液とし、これに0.2M炭酸緩衝液(pH9.0)を加え、濃度を10.0mg/mLとした。この溶液にHAのユニット(1ユニット=繰り返し単位であるN-アセチルグルコサミン-グルクロン酸)に対して0.07モル倍のフルオレセインイソチオシアネート(以下、「FITC」とも称す;ピラス社製)をHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えて室温で1時間攪拌した。その後、HAのユニットに対して40モル倍の無水コハク酸(和光純薬株式会社製)をHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えて室温で30分間攪拌した。PD-10カラム(アムシャムバイオサイエンス株式会社製)によるゲル濾過で粗精製した後、大過剰量の0.5M NaCl水溶液に対して透析精製した(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)。透析外液を蒸留水(ミリQ水)に置換してさらに透析精製し、得られた水溶液を凍結乾燥して蛍光標識HA-AM-SUCを得た。

[0173] ここで得られた各蛍光標識HA-AM-SUCを0.25mg/mL濃度で50mM炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、その溶液の494nmにおける吸光度からFITC由来のN

ーフルオロセイニルチオカルバモイル基のモル濃度を定量し、以下の式に従って各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA修飾物中のHA由来の重量分率算出を行った。

[0174] 未修飾 HAユニット: $x \text{ } \mu\text{mol/mL}$

HA-AM-SUCユニット: $y \text{ } \mu\text{mol/mL}$ (AMが無水コハク酸処理されたユニット)

と定義し、以下の式より算出した。

[0175] [化8]

$$\text{式1: } (401.3 \times x) + (631.58 \times y) + (544.97 \times (\text{残存 AM conc.})) + (898.9 \times (\text{FITC conc.})) = 250 \text{ mg}$$

$$\text{式2: } x / (y + (\text{残存 AM conc.}) + (\text{FITC conc.})) = (100 - \text{AM}(\%)) / \text{AM}(\%)$$

[0176] なお、式中の残存AM conc. とは未反応のアミノ基を有するユニットのモル濃度を意味し、FITC conc. とはFITC基を有するユニットのモル濃度を意味する。

[0177] 得られた結果を表4にまとめた。

[0178] [表4]

表4. 薬物動態試験用FITC標識HA-AM-SUC

分子量 (kDa)	AM (%) NMR	残存 AM (%) TNBS	HA-AM-FITC ユニット (モル%)	HA-AM-SUC ユニット (モル%)	未修飾HA ユニット (モル%)	HA (重量%)
23	87.0	-	1.0	86.0	13.0	63.7
100	92.5	-	0.9	91.6	7.5	62.3
200	93.5	1.5	0.7	91.3	6.5	62.9

- : 定量限界以下

[0179] (比較例5-1) 蛍光標識HA-HZ-SUCの合成

580kDaのヒアルロン酸ナトリウム(電気化学工業株式会社製)を0.25%濃度(w/v)で蒸留水に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調整した。1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)とアジピン酸ジヒドラジド(以下、「ADH」とも称す)を、HAのユニット:EDC:ADH=1:5:40のモル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール水溶液、蒸留水(ミリQ水)に対して順に透

析(スペクトラポア7、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)し、凍結乾燥してヒドロ
 ジド基が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)を得た。HA-HZ中のHZ導入率をA
 DH導入率としてプロトンNMR法で定量したところ、HAのカルボキシ基の73%であ
 った。

[0180] このHA-HZを蒸留水(ミリQ水)に溶解させた後、等量の100mM炭酸緩衝液(pH9.0)を加えて終濃度を1mg/mLに調整した。これにFITC/HAのユニット=3.0mol/molの仕込比で、HA-HZ溶液の1/10容量のDMSOに溶解させたFITCを添加し、室温、遮光下に1時間反応させた。反応溶液25mLを予め50mM炭酸緩衝液(pH9.0)で平衡化したPD-10カラム(10本)に投入し、未反応のFITCを除去した。この粗精製した溶液に無水コハク酸/HZ=250mol/molの仕込比で、DMSOに溶解させた無水コハク酸を添加し(3.5mL)、同様に反応させた。反応混合物を大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し、凍結乾燥してHA-HZをFITC標識した蛍光標識HA-HZ-SUCを得た。

[0181] 得られた各蛍光標識HA-HZを0.25mg/mL濃度で50mM炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、その溶液の494nmにおける吸光度からFITC濃度を定量し、以下の式に従って各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA修飾物中のHA由来の重量分率算出を行った。

[0182] 未修飾 HAユニット: $x \text{ } \mu\text{mol/mL}$

HA-HZ-SUCユニット: $y \text{ } \mu\text{mol/mL}$ (HZが無水コハク酸処理されたユニット)と定義し、以下の式より算出した。

[0183] [化9]

$$\text{式1: } (379.3 \times x) + (635.57 \times y) + (924.88 \times (\text{FITC conc.})) = 250 \text{ mg}$$

$$\text{式2: } x / (y + (\text{FITC conc.})) = (100 - \text{HZ} (\%)) / \text{HZ} (\%)$$

[0184] なお、式中FITC conc. とはFITC基を有するユニットのモル濃度を意味する。得られた結果を表5にまとめた。

[0185] [表5]

表5. 薬物動態試験用FITC標識HA-HZ-SUC

残存 HZ (%)	HA-FITC HZ (%)	HA-SUC ユニット (モル %)	未修飾 HA ユニット (モル %)	HA (重量 %)
NMR	TNBS			
73	-	1.1	71.9	27.0
				67.8

- : 定量限界以下

[0186] (実施例5-3)血中滞留時間評価

HA投与ラット血漿サンプル

実施例5-2および比較例5-1の蛍光標識HA修飾物を10mg/kgの用量でラット静脈内(iv)および皮下(sc)に単回投与し、投与前および投与後0.0833、0.25、0.5、1.2、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、168時間に採血(ヘパリン処理)し、遠心分離により血漿を得た。(0.25、1.2、6、10、12は比較例5-1のサンプルについてのみ)この血漿サンプルは測定まで-20℃以下で凍結保存した。

[0187] 測定方法

GPCにより検量線用標準試料および測定用試料の分析を行った。以下に条件を示す。

[0188] GPC Column:TSKgel G6000PW_{XL} (TOSOH社製)

Mobile phase:PBS (pH7.4)

Elution mode:Isocratic

Flow rate:0.5mL/min

Injection volume:40 μL

Detection:Fluorescence(EX:494nm, EM:518nm)

測定試料の調製

・検量線用試料;

各蛍光標識HA修飾物をPBS (pH7.4)を用いて希釈し、1、5、10、50、100、500 μg/mLおよび0 μg/mL(対照、PBS (pH7.4))の標準液を調製した。この標準液に等容量の正常ラット血漿を添加し検量線用試料を調製した。

・測定用試料の調製;

HA修飾物投与ラット血漿サンプルに等容量のPBS (pH7. 4)を添加して測定用試料を調製した。

・血漿中のHA修飾物濃度の算出；

解析ソフトMillenium Ver 3. 21 (Waters社製)を用いてピーク面積を算出した。各標準試料のピーク面積から得られた検量線より血漿中のHA修飾物濃度を算出した。

[0189] 薬物動態データ

実施例5－2および比較例5－1の蛍光標識HA修飾物の蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 4. 0. 1 (Pharsight社製)で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の最終測定点3点のデータを用いてモデル非依存的解析を行い、半減期($t_{1/2}$)、平均血中滞留時間(MRT)を算出した。また、皮下投与後のBA (Bioavailability)は皮下投与後の血漿中濃度下面積(AUC_{sc})と静脈内投与後の血漿中濃度下面積(AUC_{iv})から以下の式に従い算出した。

[0190] [化10]

$$BA (\%) = AUC_{sc} / AUC_{iv} \times 100$$

[0191] 蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を図15に示し、算出した薬物動態学的パラメーターを表6に示す。

[0192] [表6]

表6. FITC標識化HA修飾物の薬物動態学的パラメーター

分子量 (kDa)	AM (HZ) (% : NMR)	Cl (mL/hr/kg)	BA (%)	MRT (h)	$t_{1/2}$
23 (iv)	87.0	2.44	—	86.0	47.3
100 (iv)	92.5	0.76	—	91.6	49.3
200 (iv)	93.5	0.87	—	91.3	44.7
23 (sc)	87.0	5.40	46.4	83.9	50.8
100 (sc)	92.5	2.18	37.2	101.4	56.5
200 (sc)	93.5	3.76	23.3	98.7	57.6
580 (iv)	73.0 (HZ)	2.52	—	16.3	11.2

[0193] 蛍光標識HA修飾物を用いた薬物動態試験により、非プロトン極性有機溶媒中で

合成した本発明のHA修飾物(実施例5-2)はHAおよびこれまで報告されたHA誘導体(特許文献4、5および6を参照)と比較して、ラット単回静脈内投与後の血中滞留時間が大幅に改善されることが確認された。また、比較例5-1(分子量580kDaのHA修飾物(73モル%修飾(HZ))のラット単回静脈内投与後の平均血中滞留時間(MRT)は16時間程度であるが、これに対しても本発明のHA修飾物は血中滞留性が5.5倍程度延長されていることが明らかとなった。23kDa HA修飾物に関しては、初期段階で血中濃度が減少する傾向が観察され、一部低分子HA修飾物が腎排泄されている可能性が示唆された。100kDaおよび200kDaのHA修飾物に関しては、血中滞留性に関する特性(CL、MRT、 $t_{1/2}$)はほぼ同様の値となった。しかしながら、分子量依存的に、皮下投与後のBA(Bioavailability)は減少し高分子量のHA修飾物ほど血中への移行がされにくい結果となった。

[実施例6]ヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)の修飾率と血中滞留時間との関係

ヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)の血中滞留性を修飾率の観点から解析するために、200kDaのHAから様々な修飾率のHA修飾物を合成し、蛍光色素であるFITCを導入したサンプルを調製し、それぞれの血中滞留性を観察した。

(実施例6-1)HA-AMの調製

HA(200kDa)-TBAを4.0mg/mLの濃度でDMSOに溶解した溶液を5つ調製し、各溶液にHAユニット/EDOBEA=1/50(mol/mol)の当量比でEDOBEAを添加し、BOP試薬をHAユニットに対し、0.25、0.5、0.75、1.0、または1.5の当量比でそれぞれの溶液に加え、一晚反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加え、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、限外ろ過後(YM-10、MILLIPORE社製)、凍結乾燥を行った。アミノ基導入率はプロトンNMR法で定量した。NMRチャートを図16に示す。(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9 ppm、AM:EDOBEA部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm)それぞれ導入率はBOP試薬比率0.25:20.0モル%、0.5:36.5モル%、0.75:54.5モル%、1.0

:69.0モル%、1.5:90.5モル%であった。

(実施例6-2) 蛍光標識HA修飾物の合成

上記(実施例6-1)で得られたHA-AMのそれぞれを、蒸留水(ミリQ水)で20.0 mg/mLの濃度に溶解し、これに0.2M炭酸緩衝液(pH9.0)を加え濃度を10.0 mg/mLとした。これらの溶液にHAのユニット(1ユニット=繰り返し単位であるN-アセチルグルコサミン-グルクロン酸)に対して0.07モル倍(69%および90.5%アミン修飾HAの溶液)、0.175モル倍(54.5%アミン修飾HAの溶液)、0.28モル倍(36.5%アミン修飾HAの溶液)および0.63モル倍(20.0%アミン修飾HAの溶液)のフルオレセインイソチオシアネートをHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加え、室温で1時間攪拌した。その後、HAのユニット(1ユニット=繰り返し単位であるN-アセチルグルコサミン-グルクロン酸)に対して40モル倍の無水コハク酸をHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加え、室温でさらに30分間攪拌した。20%アミン修飾物は大過剰量DMSOへ透析を行った後、またその他のサンプルは直接、大過剰量の25%EtOH水溶液に対して透析し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、その後、0.5M NaCl水溶液に対して透析精製した。透析外液を蒸留水(ミリQ水)に置換してさらに透析精製し、得られた水溶液を凍結乾燥して蛍光標識HA-AM-SUCを得た。

[0194] ここで得られた各蛍光標識HA-AM-SUCを0.25mg/mL濃度で50mM炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、その溶液の494nmにおける吸光度からFITC濃度を定量し、以下の式に従って各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA修飾物中のHA由来の重量分率算出を行った。

[0195] 未修飾 HAユニット: $x \mu\text{mol/mL}$

HA-AM-SUCユニット: $y \mu\text{mol/mL}$ (AMが無水コハク酸処理されたユニット)

と定義し、以下の式より算出した。

[0196] [化11]

$$\text{式1: } (401.3 \times x) + (631.58 \times y) + (544.97 \times (\text{残存 AM conc.})) + (898.9 \times (\text{FITC conc.})) = 250 \text{ mg}$$

$$\text{式2: } x / (y + (\text{残存 AM conc.}) + (\text{FITC conc.})) = (100 - \text{AM}(\%)) / \text{AM}(\%)$$

[0197] なお、式中FITC conc. とはFITC基を有するユニットのモル濃度を意味する。得られた結果を表7にまとめた。

[0198] [表7]

表7. 薬物動態試験用FITC標識HA-AM-SUC

BOP比率 (BOPモル/ HAユニットモル)	AM (%) NMR	残存 AM (%) TNBS	HA-AM-FITC ユニット (モル%)	HA-AM-SUC ユニット (モル%)	未修飾HA ユニット (モル%)	HA (重量%)
0.25	20.0	1.6	0.3	18.1	80.0	87.2
0.50	36.5	2.4	0.9	33.2	63.5	81.7
0.75	54.5	2.4	1.6	50.5	45.5	75.6
1.00	69.0	-	0.6	68.4	31.0	68.2
1.50	90.5	-	0.9	89.6	9.5	62.8

-: 定量限界以下

[0199] (実施例6-3) 血中滞留時間評価

HA投与ラット血漿サンプル

実施例6-2の蛍光標識HA修飾物を10mg/kgの用量でラット静脈内に単回投与し、投与前および投与後0.5、2、4、8、24、48、72、96、および168時間で採血(ヘパリン処理)し、遠心分離により血漿を得た。この血漿サンプルは測定まで-20℃以下で凍結保存した。

[0200] 測定方法

96穴プレートに検量線用標準試料および測定用試料を分注しマイクロプレートリーダーを用いて分析を行った。以下に条件を示す。

[0201] マイクロプレートリーダー: SPECTRA MAX GEMINI (Molecular Devices社製)

Sample volume: 100 μL/well

Detection: Fluorescence (EX: 485nm, EM: 538nm)

測定試料の調製

・検量線用試料;

各蛍光標識HA修飾物をPBS (pH7. 4)を用いて希釈し、1、5、10、50、100、500 $\mu\text{g/mL}$ および0 $\mu\text{g/mL}$ (対照、PBS (pH7. 4))の標準液を調製した。この標準液に等容量の正常ラット血漿を添加し検量線用試料を調製した。

・測定用試料の調製；

HA修飾物投与ラット血漿サンプルに等容量のPBS (pH7. 4)を添加して測定用試料を調製した。

・血漿中のHA修飾物濃度の算出；

解析ソフトSOFTmax PRO (Molecular Devices社製)を用いて各標準試料の蛍光強度から得られた検量線より血漿中のHA修飾物濃度を算出した。

[0202] 薬物動態データ

実施例6-2の蛍光標識HA修飾物の蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 4. 0. 1 (Pharsight社製)で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の血漿中濃度推移についてモデル非依存的解析を行い、平均血中滞留時間 (MRT) を算出した。半減期 ($t_{1/2}$) は各個体の測定可能な最終3点のデータを用いて算出した。蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を図17に示し、AM導入率とMRTの関係を図18に示す。また、算出した薬物動態学的パラメーターを表8に示す。

[0203] [表8]

表8. FITC標識化HA修飾物の薬物動態学的パラメーター

AM (% : NMR)	Cl (mL/h r/kg)	MRT (h)	$t_{1/2}$
20.0	16.37	2.81	1.95
36.5	12.96	2.90	1.62
54.5	10.47	4.26	2.76
69.0	1.20	49.6	36.7
90.5	0.97	60.6	44.5

[0204] 図18に示されるAMの修飾率とMRTとの関係から、修飾率が50%の後半から急激にMRTの増加すなわち血中滞留性の延長が起こることが示唆された。すなわち修飾率が55モル%以上、好ましくは65モル%以上、さらに好ましくは69モル%以上の場合、18時間以上のMRTを有する血中滞留時間の面において好ましいHA修飾

物が得られる可能性が高い結果となった。

[0205] 酵素耐性を獲得したHA修飾物は、CD44への認識も大きく低下しているため長期間の血中滞留性が得られるものと考えられる。

[実施例7] 様々な化合物で修飾したヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間

ヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)の血中滞留性における修飾の影響を解析するために、200kDaのHAを様々なジアミン化合物で修飾し、さらに蛍光色素であるFITCを導入したHA修飾物のサンプルを調製し、それぞれの血中滞留性を観察した。

(実施例7-1) 蛍光標識HA修飾物の合成

実施例4-2および4-3-1で得られたHA-DETA、HA-DAHP、HA-DAPを蒸留水(ミリQ水)に溶解して20.0mg/mLの溶液を調製し、これに0.2M炭酸緩衝液(pH9.0)を加え、濃度を10.0mg/mLとした。この溶液にHAのユニットに対して0.07モル倍のフルオレセインイソチオシアネートをHA修飾物溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えて室温で1時間攪拌した。その後、HAのユニットに対して40モル倍の無水コハク酸をHA-AM溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えて室温で30分間攪拌した。各サンプルは大過剰量の0.5M NaCl水溶液に対して透析精製した後、透析外液を蒸留水(ミリQ水)に置換してさらに透析精製を行った。(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)得られた水溶液を凍結乾燥して蛍光標識HA修飾物を得た。

[0206] ここで得られた各蛍光標識HA-AM-SUCの濃度0.25mg/mLでの494nmにおける吸光度からFITC濃度を定量し、以下の式に従って各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA修飾物中のHA由来の重量分率算出を行った。

未修飾 HAユニット: $x \text{ } \mu\text{mol/mL}$

HA-AM-SUCユニット: $y \text{ } \mu\text{mol/mL}$ (AMが無水コハク酸処理されたユニット)

HA-AM-SUCユニット分子量: $M_1 \text{ g/mol}$

HA-AM-FITCユニット分子量: $M_2 \text{ g/mol}$

と定義し以下の式より算出を行った。

[0207] [化12]

$$\text{式1 : } (401.3 \times x) + (M_1 \times y) + (M_2 \times (\text{FITC conc.})) = 250 \text{ mg}$$

$$\text{式2 : } x / (y + (\text{FITC conc.})) = (100 - \text{AM}(\%)) / \text{AM}(\%)$$

[0208] なお、式中FITC conc. とはFITC基を有するユニットのモル濃度を意味する。また、
 DETA: $M_1 = 586.5$ 、 $M_2 = 853.9$ 、DAHP: $M_1 = 573.5$ 、 $M_2 = 840.8$ 、
 DAP: $M_1 = 557.5$ 、 $M_2 = 824.8$ で算出を行った。

[0209] 得られた結果を表9にまとめた。

[0210] [表9]

表9. 薬物動態試験用FITC標識HA修飾物

導入化合物	AM (%)	HA-AM-FITC ユニット (モル%)	HA-AM-SUC ユニット (モル%)	未修飾HA ユニット (モル%)	HA (重量%)
AM	NMR				
DETA	89.8	0.9	88.9	10.2	67.4
DAP	93.2	0.9	92.3	6.8	70.0
DAHP	99.0	0.8	98.2	1.0	66.9

[0211] (実施例7-2) 血中滞留時間評価

HA投与ラット血漿サンプル

実施例7-1の蛍光標識HA修飾物を10mg/kgの用量でラット静脈内に単回投与し、投与前および投与後0.5、2、4、8、24、48、72、96および168時間で採血(ヘパリン処理)し、遠心分離により血漿を得た。この血漿サンプルは測定まで-20℃以下で凍結保存した。

[0212] 測定方法

96穴プレートに検量線用標準試料および測定用試料を分注しマイクロプレートリーダーを用いて分析を行った。以下に条件を示す。

[0213] マイクロプレートリーダー: SPECTRA MAX GEMINI (Molecular Devices 社製)

Sample volume: 100 μ L / well

Detection: Fluorescence (EX: 485nm, EM: 538nm)

測定試料の調製

・検量線用試料;

各蛍光標識HA修飾物をPBS (pH7. 4)を用いて希釈し、1、5、10、50、100、500 $\mu\text{g/mL}$ および0 $\mu\text{g/mL}$ (対照、PBS (pH7. 4))の標準液を調製した。この標準液に等容量の正常ラット血漿を添加し検量線用試料を調製した。

・測定用試料の調製;

HA修飾物投与ラット血漿サンプルに等容量のPBS (pH7. 4)を添加して測定用試料を調製した。

・血漿中のHA修飾物濃度の算出;

解析ソフトSOFTmax PRO (Molecular Devices社製)を用いて各標準試料の蛍光強度から得られた検量線より血漿中のHA修飾物濃度を算出した。

[0214] 薬物動態データ

実施例7-1の蛍光標識HA修飾物の蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 4. 0. 1 (Pharsight社製)で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の血漿中濃度推移についてモデル非依存的解析を行い、平均血中滞留時間 (MRT) を算出した。半減期 ($t_{1/2}$) は各個体の測定可能な最終3点のデータを用いて算出した。蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を図19に示した。また、算出した薬物動態学的パラメーターを表10に示す。

[0215] [表10]

表10. FITC標識化HA修飾物の薬物動態学的パラメーター

導入化合物 (AM)	C l (mL / h r / k g)	MRT (h)	t 1 / 2
DETA	2. 5	45. 0	51. 5
DAP	1. 3	34. 8	24. 5
DAHP	1. 1	62. 8	50. 1

[0216] 実施例5に示されるヒアルロン酸誘導体の修飾と同様にMRTの増加すなわち血中滞留性の延長が起こることが示唆された。様々なアミノ基含有化合物での修飾に関し

ても同様に18時間以上のMRTを有しており、用途により導入するアミノ基含有化合物を変化させることが可能であることが明らかとなった。〔実施例8〕メタクリロイル基を導入したHA修飾物の合成

ゲル調製用の基材としてメタクリロイル基を有するHA修飾物の合成を行った。

(実施例8-1) HA-AEMAの合成

分子量200kDaのヒアルロン酸ナトリウム(HA;電気化学工業株式会社製)をテトラブチルハイドロオキシライド(シグマーアルドリッチ社製)でテトラブチルアンモニウム(TBA)塩化したDOWEX 50WX8-400(シグマーアルドリッチ社製)を用いてTBA塩化し、得られたテトラブチルアンモニウム塩化ヒアルロン酸(HA-TBA)を2.0mg/mL濃度となるようDMSO(和光純薬株式会社製)に溶解した溶液を2つ調製した。HAユニット/BOP(和光純薬株式会社製)/アミノエチルメタクリレート(AEMA;シグマーアルドリッチ社製)=1/2.5/50(mol/mol/mol)の当量比および1/0.5/50(mol/mol/mol)の当量比でAEMA、BOPの順でそれぞれの溶液に添加し、室温下で一晩反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加えた後、5N HClを加えてpHを3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の0.3M NaCl水溶液、続いて蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)した後、凍結乾燥して標題のメタクリロイル基が導入されたヒアルロン酸(HA-AEMA)を得た。

[0217] 得られたHA-AEMA中のAEMA導入率をプロトンNMR法で定量したところ、それぞれ、56.5%(BOP:2.5倍当量)、38.0%(BOP:0.5倍当量)がAEMA化されていた(HAおよびHA-AEMAのN-アセチル基、(1.9~2.1ppm)(3H)、HA-AEMAのメタクリロイル基由来部分、5.5~6.1ppm(各2H)を比較、図20を参照)。

[0218] (実施例8-2) HA-APMAの合成

AEMAの代わりにアミノプロピルメタクリルアミド(APMA;ポリサイエンス社製)を用い、HAユニット/BOP(和光純薬株式会社製)/APMA=1/2.0/5(mol/mol/mol)の当量比で反応させた。それ以外は実施例8-1と同様の方法でHA-APMAを得た。

[0219] 得られたHA-APMA中のAPMA導入率をプロトンNMR法で定量したところ、47.5%がAPMA化されていた(HAおよびHA-APMAのN-アセチル基、(1.9~2.1ppm)(3H)、HA-APMAのメタクリロイル基由来部分、5.2~5.8ppm(各2H)を比較、図21を参照)。

[実施例9] BOP添加量によるメタクリロイル基導入制御

メタクリロイル基の導入率の制御を行うために、様々な比率で縮合剤を添加し合成を行い、導入率の解析を行った。

[0220] HA(200kDa)-TBAを5.0mg/mL(AEMA用)もしくは4.0mg/mL(APMA用)でDMSOに溶解した溶液を調製し、HAユニット/AEMA(ポリサイエンス社製)もしくはAPMA(ポリサイエンス社製)=1/5(mol/mol)の当量比でAEMAもしくはAPMAを添加し、BOP試薬をHAユニットに対し、0.2、0.25、0.4、または1.0の当量比で添加し一晩反応させた。その後反応混合物の容量の半分量の1M NaCl水溶液を加え、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後、大過剰の0.3M NaCl水溶液、続いて蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥を行った。

[0221] メタクリロイル基導入率をプロトンNMR法で定量した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、MA:メタクリロイル基由来、5.5~6.1ppm(AEMA)、5.2~5.8ppm(APMA))。プロトンNMRデータを図22に示す。メタクリロイル基導入率を表11に示す。メタクリロイル基の導入率はBOPの仕込みで制御可能であることが分かった。

[0222] [表11]

表 1 1. BOPの添加量とメタクリロイル基の導入率の関係

置換基	HA : 縮合剤	導入率 (%) (NMR)
AEMA	100 : 20	9.7
	100 : 25	11.0
	100 : 40	19.0
	100 : 100	48.0
APMA	100 : 20	9.0
	100 : 40	12.0
	100 : 100	45.0

[0223] [実施例10] 蛍光標識HA-HZ合成

ゲル内封サンプルとして使用するために、蛍光標識化したHA-HZの合成を行った。

(実施例10-1) HA-HZの合成

分子量200kDaのヒアルロン酸(HA;電気化学工業株式会社製)を0.5%濃度で蒸留水(ミリQ水)に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調整した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)とアジピン酸ジヒドラジド(ADH)を、HAユニット/EDC/ADH=1/0.05/40(mol/mol/mol)のモル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に保ちながら室温で攪拌下2時間反応させた。100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール水溶液、続いて蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、凍結乾燥してヒドラジドが導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)を得た。

[0224] 得られたHA-HZ中のHZ導入率をプロトンNMR法で定量したところ、それぞれ、HAのカルボン酸の3.75%がHZ化されていた(HAおよびHA-HZのN-アセチル基、2.1ppm(3H)、HA-HZのアジピン酸由来部分のメチレン基、1.7ppm、2.4ppm(各2H)を比較)。

(実施例10-2) HA-HZの蛍光標識化

上記(実施例10-1)で得られたHA-HZを蒸留水(ミリQ水)で20.0mg/mLの

濃度に溶解し、これに0.25M炭酸緩衝液(pH9.0、4.84mL)および101.3mg/mLのFITCのDMSO溶液(2.42mL)を加えて遮光下、室温で1時間、穏やかに振とうした。その後、大過剰量のPBSに対して透析精製した。透析外液を蒸留水(ミリQ水)に置換してさらに透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kDa)、得られた水溶液を凍結乾燥して蛍光標識HA-HZ(227.63mg)を得た。

[実施例11] 蛍光標識HA-HZ封入HA-AEMA架橋ゲル調製

メタクリロイル基を導入したHA修飾物を用い、メタクリロイル基とメルカプト基とのマイケル付加反応を利用し、蛍光標識したHA-HZを内封したバルク状のゲルを作成し、その徐放性の評価を行った。

[0225] 実施例8-1で得られたAEMAの導入率が56.5%であるHA-AEMA 3.97mgと、実施例10-2で得られた蛍光標識HA-HZ(107 μ g)を蒸留水(ミリQ水、60 μ L)に溶かした。これにトリエタノールアミン(TEA、1.3 μ L)、ジチオトレイトール(DTT)溶液(9.25mg/mL 200mMリン酸緩衝液(pH8.3)、40 μ L)を加えた。遮光下、37°Cで1時間反応させるとゲルになった。

[0226] また、BOP試薬をHAユニットに対し0.4の当量比で添加し一晚反応させた以外は実施例9と同様に合成した導入率18.8%のHA-AEMA(3.92mg)と、実施例5-2で得られた蛍光標識HA-AM-SUC(410 μ g)を蒸留水(ミリQ水、60 μ L)に溶かした。これにジチオトレイトール(DTT)溶液(9.25mg/mL 200mMリン酸緩衝液(pH8.3)、40 μ L)を加えた。遮光下、37°Cで1時間反応させるとゲルになった(HA-AEMA4%gel)。ここで、HA-AEMA4%gelとは、水分量100 μ Lにつき4mgのHA-AEMAが含まれているゲルであることを意味する。

(比較例11-1) 比較対照用のゲル基材合成(HA-HZ-SH)およびゲル調製

実施例10-1と同様の方法でHAユニット/EDC/ADH=1/0.2/40(mol/mol/mol)のモル比合成したHZの導入率が26.0%のHA-HZ(369.81mg)を蒸留水(ミリQ水)で20.0mg/mLの濃度に溶解し、2-イミノチオラン塩酸塩(ITL; ピアス社製)をHZ/ITL=1/2モル比になるよう200mMリン酸緩衝液(pH8.3)に溶解、添加し、室温で攪拌下2時間反応させた。エタノールで沈殿、3回洗浄し、乾燥させメルカプト基が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ-SH、321.68mg)を得た。

。得られたHA-HZ-SH中のSH基導入率をプロトンNMR法で定量した結果、HAのカルボン酸の22.0%がSH化されていた。(HAおよびHA-HZ-SHのN-アセチル基(1.9ppm、3H)、HA-HZ-SHのITL由来部分のメチレン基(2.1ppmと2.7ppm、各2H)を比較)。次に、ここで合成したHA-HZ-SHを1.99mg(HA-HZ-SH2%gel)および4.08mg(HA-HZ-SH4%gel)と実施例10-2の蛍光標識HA-HZを98 μ gおよび105 μ gとを蒸留水(ミリQ水、60 μ L)に溶かした。これに四チオン酸ナトリウム二水和物(以下、「STT」とも称す)/SH=0.1/1モル比になるようにSTT溶液(200mMリン酸緩衝液(pH8.3)、40 μ L)を添加し、遮光下、37℃で1時間反応させるとゲルになった。ここで、HA-HZ-SH2%gelとは、水分量100 μ Lにつき2mgのHA-HZ-SHが含まれているゲルであることを意味する。HA-HZ-SH4%gelとは、HA-HZ-SH2%gelにおけるHA-HZ-SHが4mgであることを意味する。

(比較例11-2)比較対照用のゲル基材合成(HA-HZ-MA)とゲル調製

HA/EDC/ADH=1/5/40(mol/mol/mol)のモル比にした以外は実施例10-1と同様に合成し、HAのカルボン酸が63%HZ化したHA-HZを得た。次に得られたHA-HZ(207.46mg)を蒸留水(ミリQ水、9mL)に溶解した後に、1Mリン酸緩衝液(pH8.8)を添加し、HA濃度20mg/mLに調整した。メタクリル酸無水物をHZの20倍当量を滴下して添加し、室温で4時間反応させた。テトラヒドロフランで沈殿後、回収し乾燥させた。沈殿物を蒸留水(ミリQ水)に溶解し、再びテトラヒドロフランで沈殿、乾燥させた後、乾燥物を蒸留水(ミリQ水)に溶解し、凍結乾燥してHA-HZ-MAを得た。得られたHA-HZ-MA中のMA基導入率をプロトンNMR法で定量した結果、HAのカルボン酸の17.0%がMA化されていた(HA:N-アセチル基のメチルプロトン(1.8~1.9ppm)、MA:メタクリロイル基のCH₂= (5.5~6.1ppm)を比較)。次に、ここで合成したHA-HZ-MAを4.07mg(HA-HZ-MA4%gel)と実施例10-2で得られた蛍光標識HA-HZを99 μ gとを蒸留水(ミリQ水、60 μ L)に溶かした。これにトリエタノールアミン(TEA、1.3 μ L)とDTT溶液(2.71mg/ml200mMリン酸緩衝液(pH8.3)、40 μ L)を加えた。遮光下、37℃で一晩反応させるとゲルになった。

[0227] (試験例2) HA-AEMA架橋ゲルからの蛍光標識HA-HZ徐放性能評価

実施例11、比較例11-1および比較例11-2で得られたゲルを1mLのPBS中、37°Cでインキュベートし、経時的に全量サンプリングした。GPCでバッファー中に放出された蛍光標識HA-HZを定量した。GPCの測定条件は下記に示す。ゲル中に封入した蛍光標識HA-HZを100%とした時のゲルからの蛍光標識HA-HZ放出性を図23に示す。なお、比較例11-1および比較例11-2で得られたゲルは5週間後までサンプリングし、実施例11で得られたHA-AEMAゲルについてはおよそ10週間後にヒアルロニダーゼを0.25Uを添加し分解させた全ての内封物を放出させた。

[0228] GPC Column: TSKgel G6000PW_{XL} (TOSOH社製)

Mobile phase: PBS (pH7.4)

Elution mode: Isocratic

Flow rate: 1mL/min

Injection volume: 25 μ L

Detection: UV (494nm)

図23よりHA-AEMAから作成したゲルはAEMAの導入率に関わらず、放出挙動は大きく変化せず、反応する官能基は18.8%程度でも同様の放出プロファイルを取り、十分長期の徐放が可能であることが示唆された。また、本発明のHA-AEMAから作製したゲルはジスルフィド形成によるゲル(比較例11-1)に比べて非常に長期間の徐放が可能であることが明らかとなった。また、メタクリル酸を直接アミド結合で導入したHA-HZ-MA(比較例11-2)と比較しても同様に長期間の徐放が可能となった。メタクリロイル基の結合様式に起因する反応性の違いや修飾官能基の均一性等による結果と考えられ、エステルによるメタクリル酸の結合様式を有するAEMAのHA修飾物を用いることにより、より長期の徐放が可能なゲルの調製が可能になった。

[実施例12] スプレードライヤーによる蛍光標識HA-HZ封入HA-AEMA架橋ゲル微粒子調製

HA-AEMAを用い、スプレードライヤーを用いて注射可能なマイクロゲルの調製を調製を行った。

[0229] 実施例9および実施例8-1で得られたAEMA基の導入率が11モル%、19モル%、38モル%であるHA-AEMAのそれぞれ50mgと、実施例10-2で得られた蛍光標識HA-HZ5mgを蒸留水(ミリQ水、5mL)に溶かした(一晚)。これにDTTをAEMA/SH=1/1モル比になるようにDTT溶液(200mMリン酸緩衝液(pH8.3) 250 μ L)を添加し、以下の条件でスプレードライし、微粒子を得た。得られた微粒子の粒子径は1~3 μ mであった。各試料の粒子をプレパラート上に置き、乾燥状態およびPBS(pH7.4)を添加して膨潤させた状態を顕微鏡で観察した。顕微鏡写真を図24に示す。PBSを添加した際にAEMA基の導入率が11モル%、19モル%の微粒子は溶解した。これらの微粒子は、50℃恒温槽(ヤマト科学社製 DN-42)でキュアリングし、72時間後にサンプリングした。これらの微粒子をプレパラート上に置き、これにpH7.4のPBSを添加してその粒子状態を顕微鏡で観察したところ、微粒子はPBSに溶解しなかった。以上の操作によりAEMA基の導入率が11モル%、19モル%、38モル%の蛍光標識HA-HZ封入HA-AEMA架橋ゲル微粒子が得られた(図24を参照)。

[0230] スプレードライ条件

スプレードライヤー:ビュッヒ社製、ミニスプレードライヤー B-191

Solution feed rate:0.5mL/min(Tygon tube, Pump speed=15%)

Feed solution conc.:10mg/mL

Atomizing air flow rate:650L/hr

Drying air flow rate:40kL/hr(Aspiration speed=100%)

Inlet temp.:90℃

Outlet temp.:55~65℃

[実施例13]凍結粉碎による蛍光標識HA-AM封入HA-AEMA架橋ゲル微粒子調製

HA-AEMAを用い、凍結粉碎法により注射可能なマイクロゲルの調製を行った。

[0231] 実施例9で得られたAEMA基の導入率が19モル%であるHA-AEMA 4mgと、実施例5-2で得られた蛍光標識HA-AM-SUC 0.4mgを蒸留水(ミリQ水、50 μ L)に溶かした(一晚)。これにAEMA/SH=1/1モル比になるようにDTT溶液(

200mMリン酸緩衝液(pH8.3)、50 μ L)を添加し、遮光下、37°Cで1時間反応させるとゲルになった。このゲルを37°C恒温槽(ヤマト科学社製 Incubator IS42)で乾燥させ、蛍光標識HA-AM-SUC封入HA-AEMA架橋乾燥ゲル(以下、「乾燥ゲル」とも称す)が得られた。更にここで得られた乾燥ゲルを液体窒素で凍結、SKミル(トッケン製 SK-100)で粉碎を繰り返した。以上の操作により蛍光標識HA-AM-SUC封入HA-AEMA架橋凍結粉碎ゲル微粒子(以下、「凍結粉碎ゲル」とも称す)が得られた。各試料の粒子をプレパラート上に置き、乾燥状態を顕微鏡で観察した。顕微鏡写真を図25に示す。得られた凍結粉碎ゲルの粒子径は2~6 μ mであった。

(試験例3) HA-AEMA架橋ゲルからの蛍光標識HA-AM徐放性能評価

実施例13で得られた乾燥ゲルおよび凍結粉碎ゲルを1mLのPBS中、37°Cでインキュベートし、経時的に200 μ Lサンプリングを行った。GPCでバッファー中に放出された蛍光標識HA-AM-SUCを定量した。GPCの測定条件は試験例2と同様である。ゲル中に封入した蛍光標識HA-AM-SUCを100%とした時のゲルからの蛍光標識HA-AM-SUC放出性を図26に示す。

[0232] 図26より本発明の乾燥ゲルは、長期間の徐放が可能であることが明らかとなった。また、凍結粉碎ゲルは、乾燥ゲルに比べ、微粒子化による表面積の増大により初期バーストが大きくなる傾向が見られるものの、十分に長期間の徐放が可能であることが明らかとなり、注射可能な微粒子で長期の徐放が可能なマイクロゲルの調製が可能であることが明らかとなった。

〔実施例14〕 水溶性HA修飾物-FabコンジュゲートおよびFabの調製

(実施例14-1) IgG Fabの調製

リン酸緩衝液に溶解されたIgG溶液(54.0mg/mL、0.85mL)にPBS(1.445mL)を加えて希釈した。この液の0.5mLについて、IgG Fab調製キット(Immuno Pure(登録商標)Fab Preparation kit、消化酵素としてPapainを含む、PIERCE(ピアス)社製)に供し、添付文書記載の通り操作して、Protein Aカラム(調製キットに含有)による非吸着画分を得た。なお、Papainによる消化は37°Cで15時間行った。得られた溶液を遠心式限外ろ過器(Amicon Ultra-4、アミコン製)を用いて濃

縮後、PBSで再希釈し、最終的に約1.5mLとした。また、IgG Fab調製キットによる操作から濃縮までの操作は同一条件で計4回行った。4回の調製で得られた液を混合して、約11.8mgのIgG Fab(以下、「Fab」とも称す)(1.96mg/mL、6.0mL)を得た。なお、Fabの濃度定量は紫外可視吸光度測定法により決定した。

(実施例14-2) FabのFITC標識

実施例14-1で得られたFab PBS溶液(1.96mg/mL、6.0mL)のうちの5mLを脱塩カラム(PD-10、アマシャムバイオサイエンス株式会社製)で150mM NaClおよび10mM EDTA含有50mM 炭酸緩衝液(pH9.5、以下「FITCバッファー」とも称す)(7mL)に溶媒置換した。遠心式限外濾過(Centricon-30、アミコン製)で約5mLに濃縮し、このうちの4.78mLに、FITC濃度が2mg/mLである1%DM SO含有FITCバッファー溶液(342 μ L)を加えて室温、遮光下に2時間反応させた。反応溶液を4°C、遮光下に1LのPBSに対して透析精製(Slide-A-Lyzer MW CO:10000、ピアス社製)した。透析外液は2、4、6、15時間後に全量交換し、更に室温、遮光下に2時間透析した後にFITC標識Fab溶液を回収した。脱塩カラムでFITCバッファーに溶媒置換し、遠心式限外濾過(Centricon-30)で約4.5mLに濃縮して、FITC標識FabのFITCバッファー溶液とした。

(実施例14-3) ファーマコカイネティクス(PK)試験用FITC標識Fab溶液の調製

実施例14-2で得られたFITC標識FabのFITCバッファー溶液約4.5mLのうちの約1.75mLを脱塩カラム(PD-10)でPBS(3.5mL)に溶媒置換した。遠心式限外濾過(Centricon-30)で約0.5mLまで濃縮して、PK試験用FITC標識Fab溶液を得た。得られた溶液から2.5 μ L取りPBSで40倍希釈して280および495nmの吸光度を測定した。以下の2つの式でFab濃度およびFITC/Fab比を算出したところ、Fab:5.97mg/mL、FITC/Fab:3.24(mol/mol)であった。

[0233] [化13]

$$\text{式1: Fab (mg/mL)} = \{(\text{Abs. at 280 nm}) - 0.35 \times (\text{Abs. at 495 nm})\} / 1.48$$

$$\text{式2: FITC / Fab (mol/mol)} = 1.01 \times (\text{Abs. at 495 nm}) / \{(\text{Abs. at 280 nm}) - (0.35 \times (\text{Abs. at 495 nm}))\}$$

[0234] (実施例14-4) メルカプト基を導入したFITC標識Fab (FITC標識Fab-SH) の調製

実施例14-2で得られたFITC標識Fab溶液約4.5mLのうちの2.75mLに2-イミノチオラン塩酸塩 (2-Iminothiolane·HCl; ITL; ピアス社製) FITCバッファー溶液 (2mg/mL, 283 μ L) を加え、室温、遮光下に30分間反応させた。脱塩カラム (PD-10) で未反応低分子量成分を除去するとともに1mM EDTA含有PBSに溶媒置換した。得られた溶液を遠心式限外濾過 (Centricon-30) で約1.2mLに濃縮して、FITC標識Fab-SH溶液とした。得られたFITC標識Fab-SH溶液から2.5 μ L取り、PBSで40倍希釈して280および495nmの吸光度を測定した。実施例14-3と同様にFab-SH濃度およびFITC/Fab-SH比を算出したところ、Fab-SH: 1.05mg/mL、FITC/Fab-SH: 3.20 (mol/mol) であった。また、得られた液から15 μ L取り、Ellman試薬でメルカプト基を定量した。メルカプト基およびFab-SH濃度からメルカプト基導入率を算出したところ、メルカプト基/Fab-SH: 1.97 (mol/mol) であった。以下にEllman試薬によるメルカプト基の定量法を示す。

[0235] エルマン (Ellman) 試薬を用いたメルカプト基の定量方法

[試薬]

反応溶媒: 1mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH8.0)

エルマン試薬溶液: エルマン試薬 40mg/mL DMSO溶液を反応溶媒で10倍希釈

[標準物質]

システイン塩酸塩一水和物 (以下、「Cys」とも称す) を反応溶媒に溶かして10.54 mg/mL (60mM) に調製した。

[0236] この液100 μ Lを反応溶媒で10倍希釈し、さらに希釈された液200 μ Lを反応溶媒で5倍希釈した (終濃度Cys 1.2mM)。

[0237] Cys 1.2mM溶液から2倍希釈列を調製した (濃度8点: 0.0094~1.2mM)。

[定量]

反応溶媒 150 μ Lにエルマン試薬溶液3 μ Lを加えた。エルマン試薬を含む反応溶媒に標準物質あるいは試料溶液15 μ Lを加えて攪拌混和した。室温で15分間静

置した後に412nmにおける吸光度を測定した。標準物質の測定値から検量線を作成し、試料溶液中のメルカプト基を定量した。

(実施例14-5) HA-AM-MI/SUCの調製

BOP試薬をHAユニットに対し2.5とした以外は実施例3-1と同様にして得たHA-AM(EDOBEA導入率:95.5%)水溶液(10mg/mL、8.5mL)に0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0、10.625mL)を加えた。N-[κ -マレイミドウンデカノイルオキシ]-スルホスクシンイミド エステル(N-[κ -Maleimidoundecanoyloxy]-sulfosuccinimide ester; Sulfo-KMUS; ピアス社製)のDMSO溶液(1.074mg/mL、2.125mL)を加え、室温で30分間振とうした。無水コハク酸DMSO溶液(283.95mg/mL、2.125mL)を加えて更に室温で1.5時間振とうした。4°Cで大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラポア4、MWCO:12k-14kDa)、得られた溶液を凍結乾燥してHA-AM-MI/SUC(98.15mg)を得た。

(実施例14-6) PK試験用HA-FITC標識Fabコンジュゲート溶液の調製

実施例14-5で得られたHA-AM-MI/SUC水溶液(20mg/mL、2.2mL)に実施例14-4で得られたFITC標識Fab-SH溶液約1.2mLのうちの1.1mLおよび1mM EDTA含有PBS(1.1mL)を加えて37°Cで2時間インキュベートした。ヨード酢酸の1mM EDTA含有PBS溶液(55.8 μ g/mL、1.1mL)を加えて、更に1時間インキュベートした。反応混合液を下記の条件でGPCに供してコンジュゲート画分を分取した。GPC条件を下記に示す。分取した溶液に1/10容量の10mMグリシン含有PBSを加え、遠心式限外濾過(Vivaspin20、MWCO:50000、フナコシ株式会社製)で約3.0mLまで濃縮して、HA-FITC標識Fabコンジュゲート溶液とした。得られたHA-FITC標識Fabコンジュゲート溶液から10 μ Lを取り、PBSで10倍希釈して280および495nmにおける吸光度を測定した。実施例14-4で測定したFITC標識Fab-SHの(495nmにおける吸光度)/(280nmにおける吸光度)比を用いてFab濃度を算出したところ、Fab:1.05mg/mLであった。

GPC条件

System:FPLCあるいはAKTA explorer(ともに、アマシャムバイオサイエンス株式会社製)

GPC Column: HiLoad 16/60 Superdex 200prep grede (アマシャムバイオサイエンス株式会社製)

Mobile phase: PBS (pH 7.4)

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: UV (280 nm)

[試験例4] ラットにHA-FITC標識FabコンジュゲートおよびFITC標識Fabを単回静脈内投与したときの血漿中濃度推移

雄性ラット (slc:SD、日本エスエルシー(株)) に、実施例14-6で得られたHA-FITC標識Fabコンジュゲート溶液および実施例14-3で得られたPK試験用FITC標識Fab溶液 (いずれも、10 mM グリシン含有PBSで希釈して、Fab濃度 1 mg/mL とした) を 3 mg/kg で単回尾静脈内投与した (n=3)。投与15、30分、1、2、4、6、8、24時間後に頸静脈よりヘパリン処理した25G注射針付テルモシリンジを用いて採血した。また、HA-FITC標識Fabコンジュゲート投与群に関しては、投与48、72、96および168時間後にも採血した。採取した血液は直ちに4℃、15,000 rpmで5分間遠心し、血漿を分離した。

[0238] 血漿試料 50 μ L に Tween 20 0.05% 含有 PBS 50 μ L を添加後、溶液の蛍光強度を蛍光検出器にて測定した。また、投与液を用いて標準曲線を作成し、それを基に総蛍光強度に基づく血漿中濃度を算出した。蛍光強度測定後、血漿試料を下記の条件でGPCに供し、総蛍光強度に対するHA-FITC標識FabコンジュゲートおよびFITC標識Fabの蛍光強度の割合を測定した。総蛍光強度に基づく血漿中濃度に上記割合を乗じて血漿中HA-FITC標識FabコンジュゲートおよびFITC標識Fab濃度を算出した。

[0239] HA-FITC標識FabコンジュゲートおよびFITC標識Fab投与群ともに血漿中濃度は二相性で減少した (図27)。FITC標識Fabの消失相の半減期は1.50時間であり、FITC標識Fabは素早く循環血より消失したのに対し、HA-FITC標識Fabコンジュゲートの半減期は38.89時間であり、HA-FITC標識Fabコンジュゲートの血中滞留性の大幅な延長が確認された。

GPC条件

System: LC-10A(島津製作所)あるいはWaters 600S(Waters)

蛍光検出器: L-7480(日立製作所)あるいはWaters 474(Waters)

GPC Column: TSKgel G6000PW_{XL} (TOSOH社製)

Mobile phase: Tween 20 0.05%含有PBS

Flow rate: 0.5mL/min

Detection: 490nm励起による518nmの蛍光強度

[実施例15] 水溶性HA修飾物-GLP-1コンジュゲートの調製

(実施例15-1) HA-AM-MI/SUCの調製

BOP試薬をHAユニットに対し2.5の等量比とした以外は実施例3-1と同様にし
て得たHA-AM(EDOBEA導入率:95.5%)水溶液(10mg/mL、17.66mL)
に0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0、22.075mL)を加えた。N-[κ -マレイミドウンデ
カノイルオキシ]-スルホスクシンイミド エステル(Sulfo-KMUS;ピアス社製)のD
MSO溶液(0.573mg/mL、4.415mL)を加え、室温で30分間振とうした。無水
コハク酸DMSO溶液(283.95mg/mL、4.415mL)を加えて、更に室温で1.5
時間振とうした。4℃で大過剰量の蒸留水(ミリQ水)に対して透析精製し(スペクトラ
ポア4、MWCO:12k-14kDa)、得られた溶液を凍結乾燥して、マレイミド基および
コハク酸が導入されたヒアルロン酸修飾物(以下、「HA-AM-MI/SUC」とも称
す、177.80mg)を得た。

(実施例15-2) HA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液の調製

天然型のGLP-1(Human、7-37;特表平7-504679号公報記載)の2番目(8
位)のアラニングリシンに、31番目(37位)のグリシンをシステインに変更した変異
体(以下、「GLP-1変異体」とも称す)を固相法ペプチド合成法で得た(ペプチド研
究所社(株)製)。GLP-1変異体の0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0)の溶液(2.0mg
/mL)にトリス[2-カルボキシエチル]ホスフィン塩酸塩(以下、「TCEP」とも称す)
水溶液(20mM)を1/20容量加えた。このTCEPを含むGLP-1変異体溶液(1.3
263mL)を実施例15-1で得たHA-AM-MI/SUC水溶液(20mg/mL、1.2
mL)に加え、37℃で2時間インキュベートした。同じTCEPを含むGLP-1変異体溶
液(1.3263mL)を再度添加し、同様にインキュベートした。システイン塩酸塩一水

和物の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)の溶液(3.6mg/mL、0.3853mL)を加え、更に37℃で1時間インキュベートした。反応混合液を3回に分けて下記の条件でGPCに供してコンジュゲート画分を分取した。分取した画分を遠心式限外濾過(Vivaspin20、MWCO:50000、フナコシ株式会社製)で約4.85mLまで濃縮して、標題のHA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液を得た。GLP-1変異体を使用せずに本実施例と同様の操作を行なって得られた試料を対照として補正に用い、得られたHA-GLP-1変異体溶液の280nmにおける吸光度とカルバゾール-硫酸法で、GLP-1変異体濃度、HA-AM-MI/SUC濃度およびGLP-1変異体導入率を算出した。GLP-1変異体が42.6nmol/mL、HA-AM-MI/SUCが3.54mg/mL、GLP-1変異体が3.7/HA(mol/mol)であった。

GPC条件

System:FPLC(アマシャムバイオサイエンス株式会社製)

GPC Column:HiLoad 16/60 Superdex 200prep grede(アマシャムバイオサイエンス株式会社製)

Mobile phase:PBS(pH7.4)

Flow rate:1.0mL/min

Detection:UV(280nm)

カルバゾール-硫酸法によるHA修飾物定量方法

[試薬]

硫酸溶液: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の硫酸溶液(25mM)

カルバゾール溶液:カルバゾールのエタノール溶液(1.25mg/mL:0.125%)

[標準物質]

N-[κ -マレイミドウンデカノイルオキシ]-スルホスクシンイミド エステルのDMSO溶液を加えないこと以外は実施例15-1と同様にして、HA-AMに無水コハク酸のみが導入されたヒアルロン酸修飾物(HA-AM-SUC)を調製し、PBSに溶解して0.5mg/mLとした。この0.5mg/mLのHA-AM-SUC溶液から2倍希釈列を調製した(濃度5点:0.03125~0.5mg/mL)。

[定量]

氷冷した硫酸溶液(1mL)に、PBS(対照)および標準物質(各0.2mL)、ならびに実施例15-2で得られたHA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液をPBSで19.8倍希釈して得た溶液(0.2mL)を加え、混合した。熱水浴中で25分間加熱した後、流水で室温まで冷却した。それぞれにカルバゾール溶液(40 μ L)を加えて混合した。再度熱水浴中で約30分間加熱した後、流水で室温まで冷却した。530nmにおける吸光度を測定し、対照および標準物質の吸光度から検量線を作成し、試料溶液に含まれるHA修飾物の濃度を定量した。

[試験例5] HA-GLP-1変異体コンジュゲートの血中滞留時間評価

HA-GLP-1変異体コンジュゲート投与ラット血漿サンプル

実施例15-2で得られたHA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液をTween 80を0.05%含有するPBS(pH7.4;以下、「溶媒Z」とも称す)で希釈し、50 μ g/kgの用量でラット静脈内に単回投与し、投与後1、4、8、24、48、72、96、および168時間で採血(ヘパリン処理)し、遠心分離により血漿を得た。この血漿サンプルは測定まで-20℃以下で凍結保存した。

測定方法

GLP-1(Active)ELISA KIT(Linco Research, Inc. America;以下、「キットW」とも称す)の96穴プレートに検量線用標準試料および測定用試料を分注し、マイクロプレートリーダーを用いて分析を行った。以下に条件を示す。

[0240] マイクロプレートリーダー:SPECTRA MAX GEMINI (Molecular Devices 社製)

Detection:Fluorescence(EX:355nm, EM:460nm)

測定試料の調製

・検量線用試料;

実施例15-2で得られたHA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液を溶媒ZおよびキットWに同封されたAssay Bufferを用いて希釈し、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μ g/mLおよび0 μ g/mLの標準液を調製した。この標準液に5 μ Lの正常ラット血漿を添加し、検量線用試料を調製した。

・測定用試料の調製;

HA-GLP-1変異体コンジュゲート投与ラット血漿サンプルに、キットWに同封されたAssay Bufferを添加して測定用試料を調製した。

・血漿中のHA修飾物濃度の算出；

解析ソフトSOFTmax PRO(Molecular Devices社製)を用いて各標準試料の蛍光強度から得られた検量線より血漿中のHA-GLP-1変異体コンジュゲート濃度を算出した。

薬物動態データ

投与したHA-GLP-1変異体コンジュゲートの血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 4.0.1(Pharsight社製)で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の血漿中濃度推移についてモデル非依存的解析を行い、平均血中滞留時間(MRT)を算出した。半減期($t_{1/2}$)は各個体の測定可能な最終3点のデータを用いて算出した。HA-GLP-1変異体コンジュゲートの血中濃度推移を図28に示す。また、算出した薬物動態学的パラメーターを表12に示す。

[0241] [表12]

表12 HA-GLP-1変異体コンジュゲートをラットに静脈内投与したときの薬物動態学的パラメーター

	平均値	標準偏差	
半減期	23.6	3.1	(hr)
トータルクリアランス	1.8	0.1	(mL/hr/kg)
平均血中滞留時間	30.2	4.3	(hr)
分布容積	53.4	4.9	(mL/kg)

[0242] 天然型のGLP-1および天然型のGLP-1の2番目のアラニンをグリシンに変更した変異体を、ヒトおよびブタに静脈内投与したときの半減期が1～5分であることが報告されている(Current Medicinal Chemistry、第10巻、第2471-2483頁、2003年およびDiabetologia、第41巻、第271-278頁、1998年)。図28および表12から、HA-GLP-1変異体コンジュゲートをラットに静脈内投与したときの半減期は、23.6時間、MRTは30.2時間となり、天然型のGLP-1などと比較して大幅に血中滞留性の延長が起きたことが示唆された。

[試験例5]経口糖負荷試験

8週齢の雄性BKS. Cg-⁺ Lepr^{db}/+ Lepr^{db}/Jclマウス(日本クレア株式会社製)を一晩絶食した後、実施例15-2で得られたHA-GLP-1変異体コンジュゲート溶液を溶媒Zで希釈したもの(ペプチド量として、1.5 μg/kg、15 μg/kgまたは150 μg/kg)または溶媒Zを静脈内投与し、静脈内投与1分後に50%グルコース溶液((株)大塚製薬工場)を3g/kgになるように経口投与した。同様にGLP-1(Human、7-37;株式会社ペプチド研究所製)を溶媒Zで希釈したもの(150 μg/kgまたは1500 μg/kg)または溶媒Zを静脈内投与し、静脈内投与1分後に50%グルコース溶液を3g/kgになるように経口投与した。

- [0243] グルコース投与前(0時間の値とする)、グルコース投与0.5、1、2、および4時間後に尾部より血液を採取し、血糖値を酵素法(ヘキソキナーゼ法、オートセラS GLU(第一化学薬品(株));機器名:BioMajesty JCA-BM1250(日本電子(株)))にて測定した。

以下の式より血糖降下率を算出した。

- [0244] [化14]

$$\text{血糖降下率 (\%)} = \frac{\text{溶媒投与群の血糖上昇値のAUCの平均値} - \text{各個体の血糖上昇値のAUC}}{\text{溶媒投与群の血糖上昇値のAUCの平均値}} \times 100$$

- [0245] ここで、血糖上昇値のAUCとは、横軸にグルコース投与後の時間、縦軸に各個体の血糖値をプロットし、各点を直線で結んで得られるグラフの曲線下面積から、各個体のグルコース投与前の血糖値がグルコース投与4時間後まで変化無く一定であったとした場合のグラフの曲線下面積を減算したものである。具体的には、 A^1 =グルコース投与前の血糖値、 B^1 =グルコース投与30分後の血糖値、 C^1 =グルコース投与1時間後の血糖値、 D^1 =グルコース投与2時間後の血糖値、 E^1 =グルコース投与4時間後の血糖値としたとき、血糖上昇値のAUCは、以下の式:

- [0246] [化15]

$$\text{AUC} = 0.5 \times \frac{A^1 + B^1}{2} + 0.5 \times \frac{B^1 + C^1}{2} + 1 \times \frac{C^1 + D^1}{2} + 2 \times \frac{D^1 + E^1}{2} - 4 \times A^1$$

- [0247] から求めることができる。

- [0248] 算出された血糖降下率から、各群ごとに平均値及び標準偏差を算出し、表13およ

び表14に示した。HA-GLP-1変異体コンジュゲートでは、GLP-1 (Human、7-37)と比較して、血糖降下作用が大幅に増大し、糖尿病治療剤としての有用性が示唆された。

[0249] [表13]

表13 GLP-1 (Human、7-37) 投与時の血糖降下率 (%)

投与量	平均値	標準偏差
150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	15.3	35.6
1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	59.6	42.4

[0250] [表14]

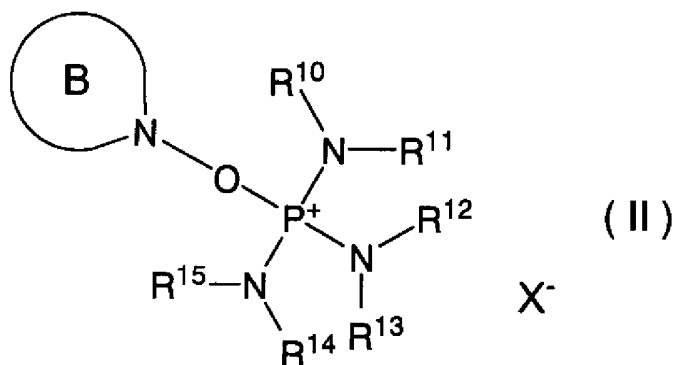
表14 HA-GLP-1変異体コンジュゲート投与時の血糖降下率 (%)

投与量	平均値	標準偏差
1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.0	28.1
15 $\mu\text{g}/\text{kg}$	60.1	51.4
150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	120.3	35.6

請求の範囲

[1] 非プロトン性極性溶媒中で、式(II)：

[化1]



[式中、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、それぞれ独立に C_{1-6} アルキル基から選択され、または R^{10} および R^{11} 、 R^{12} および R^{13} 、ならびに R^{14} および R^{15} は、それぞれ独立にそれらが結合する窒素原子と一緒にあって含窒素ヘテロ環を形成してもよく、環Bは置換されていてもよい単環式または縮環式の含窒素ヘテロ環基であり、 X^- はアニオンを表す]

で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基を、5モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

[2] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、少なくとも1以上の官能基を含み、当該官能基が、置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、カルボキシ基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基から選択される、請求項1に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

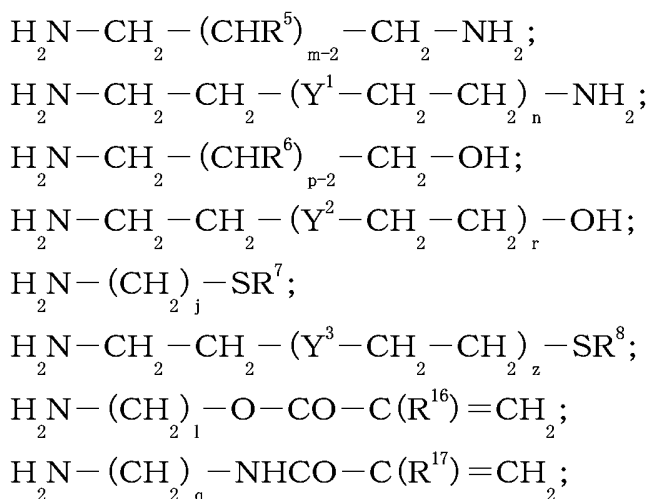
[3] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、カルボキシ基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基から選択される1つの官能基を含む、請求項1に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

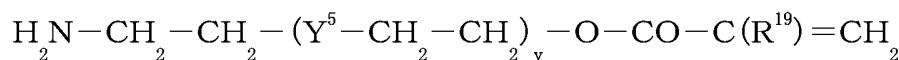
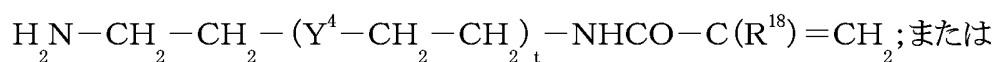
[4] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、置換されていてもよいアミノ基、水酸基、メルカプト基、メタクリロイル基またはアクリロイル基から選択される1ま

たは2種類の官能基を各置換基中に1～9個含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

- [5] 各置換アミド基中の官能基数が1～4個である、請求項4に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [6] カルボキシ基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、アミノアルキル基(このアミノアルキル基のアルキレン鎖は1以上の水酸基で置換されていてもよい)、アミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、ヒドロキシアルキル基(このヒドロキシアルキル基のアルキレン鎖は1以上の水酸基で置換されていてもよい)、ヒドロキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、ヒドロキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メルカプトアルキル基、メルカプト(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メルカプト(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシアルキル基、メタクリロイルアミノアルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、メタクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシアルキル基、アクリロイルアミノアルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基、アクリロイルアミノ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基、アクリロイルオキシ(ポリアルキレンオキシ)アルキル基またはアクリロイルオキシ(ポリアルキレンアミノ)アルキル基である、請求項4に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

- [7] ヒアルロン酸またはその誘導体と、以下の式:





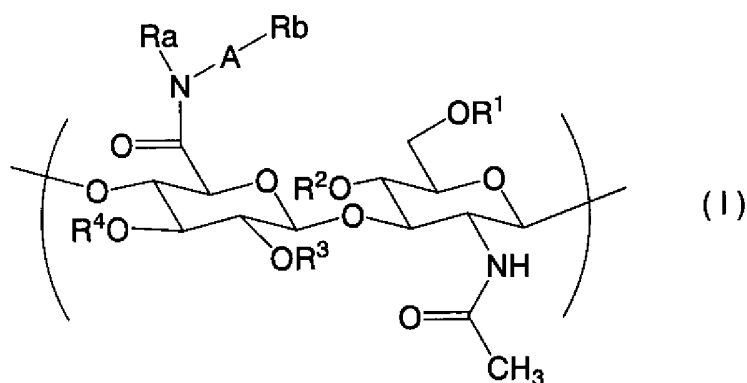
[式中、m、l、p、jおよびqは、それぞれ独立に2～10から選択される整数であり、n、r、z、tおよびyは、それぞれ独立に1～200から選択される整数であり、R⁵およびR⁶はそれぞれ独立に水素原子または水酸基であり、R⁷は、水素原子、保護基または—S—(CH₂)_j—NH₂であり、R⁸は、水素原子、保護基または—S—(CH₂—CH₂—Y³)_z—CH₂—CH₂—NH₂であり、R¹⁶、R¹⁷、R¹⁸、およびR¹⁹はそれぞれ独立して、水素原子またはメチル基であり、Y¹、Y²、Y³、Y⁴およびY⁵は、それぞれ独立して、酸素原子または—NH—である]

から選択される1以上の化合物と反応させることにより置換アミド基を形成する、請求項1～4および6のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

[8] 水溶性ヒアルロン酸修飾物が2以上の種類の置換アミド基を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

[9] 前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が式(I)：

[化2]



[式中、R¹、R²、R³およびR⁴は、それぞれ独立に、水素原子、C₁₋₆アルキル基またはC₁₋₆アルキルカルボニル基から選択され、

Raは、水素原子またはC₁₋₆アルキル基であり、

Rbは、水素原子、C₁₋₆アルキル基または基—CO—C(R²⁰)=CH₂であり、

Aは、—CH₂—(CHR⁵)_{m-2}—CH₂—NH—、—CH₂—(CHR⁶)_{p-2}—CH₂—O—、—(CH₂)_j—S—、—CH₂—CH₂—(Y³—CH₂—CH₂)_z—S—、—CH₂—CH₂—(Y⁴—C

$H_2-CH_2)_t-NH-$ または $-CH_2-CH_2-(Y^5-CH_2-CH_2)_y-O-$ であり、

ここで、m、p、およびjは、それぞれ独立に2～10から選択される整数であり、z、tおよびyは、それぞれ独立に1～200から選択される整数であり、 R^5 および R^6 はそれぞれ独立に水素原子または水酸基であり、 R^{20} は、水素原子またはメチル基であり、 Y^3 、 Y^4 および Y^5 は、それぞれ独立して、酸素原子または $-NH-$ である]

で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含むものである、請求項1～8のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

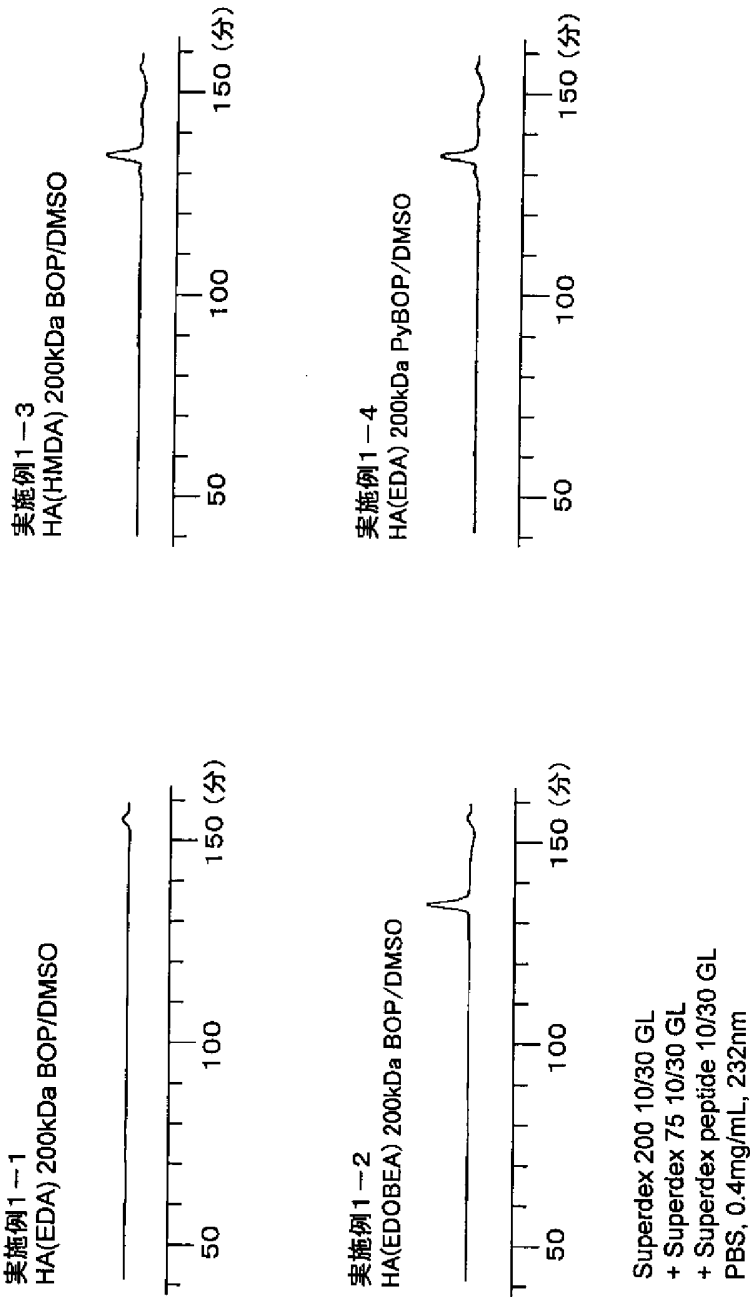
- [10] 前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が薬物担体として使用される、請求項1～9のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [11] 前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものである、請求項1～10のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [12] 前記水溶性ヒアルロン酸修飾物の哺乳動物における平均血中滞留時間が18時間以上である、請求項1～11のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [13] 非プロトン性極性溶媒が、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、1, 3-ジメチルー2-イミダゾリジノン、スルホラン、N-メチルピロリドンまたはこれらの2種以上の混合溶媒から選択される請求項1～12のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [14] 非プロトン性極性溶媒がジメチルスルホキシドである、請求項13に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [15] 式(II)において、環Bがベンゾトリアゾール-1-イルである、請求項1～14のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [16] 前記縮合剤が、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ピロリジノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、およびこれらの混合物から選択されるBOP系縮合剤である、請求項1～15のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

- [17] 修飾率が30モル%以上である、請求項1～16に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [18] 修飾率が70モル%以下である、請求項1～17に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。
- [19] 請求項1～18のいずれか1項に記載の製造方法により得ることができる水溶性ヒアルロン酸修飾物。
- [20] 請求項19に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物であって、ヒアルロン酸をその構成ユニットの2糖にまで分解することができ且つ分解産物の非還元末端に $\Delta-4, 5$ -グルクロン酸残基をもつ不飽和2糖分解物を生成させるヒアルロニダーゼで該水溶性ヒアルロン酸修飾物を分解し、得られる分解産物の232nmにおける吸収を測定した場合に、分解産物に由来する全ピークエリアに対する2糖に由来するピークエリアの分率が30%以下である、水溶性ヒアルロン酸修飾物。
- [21] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体。
- [22] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物により表面修飾された微粒子薬物担体。
- [23] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む医薬組成物。
- [24] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物および薬物を含んでなる水溶性ヒアルロン酸修飾物-薬物コンジュゲート。
- [25] 請求項19または20に記載のヒアルロン酸修飾物を架橋することで得ることができるヒアルロン酸ゲル。
- [26] 請求項25に記載のヒアルロン酸ゲルを乾燥させることで得ることができるヒアルロン酸ゲル。
- [27] 薬物の封入に使用される、請求項25または26に記載のヒアルロン酸ゲル。
- [28] 封入できる薬物が、高分子と薬物とのコンジュゲートである、請求項25～27のいずれか1項に記載のヒアルロン酸ゲル。
- [29] 請求項27または28に記載のヒアルロン酸ゲルを含む医薬組成物。
- [30] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む、医療用デバイス。
- [31] 請求項19または20に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施した、請

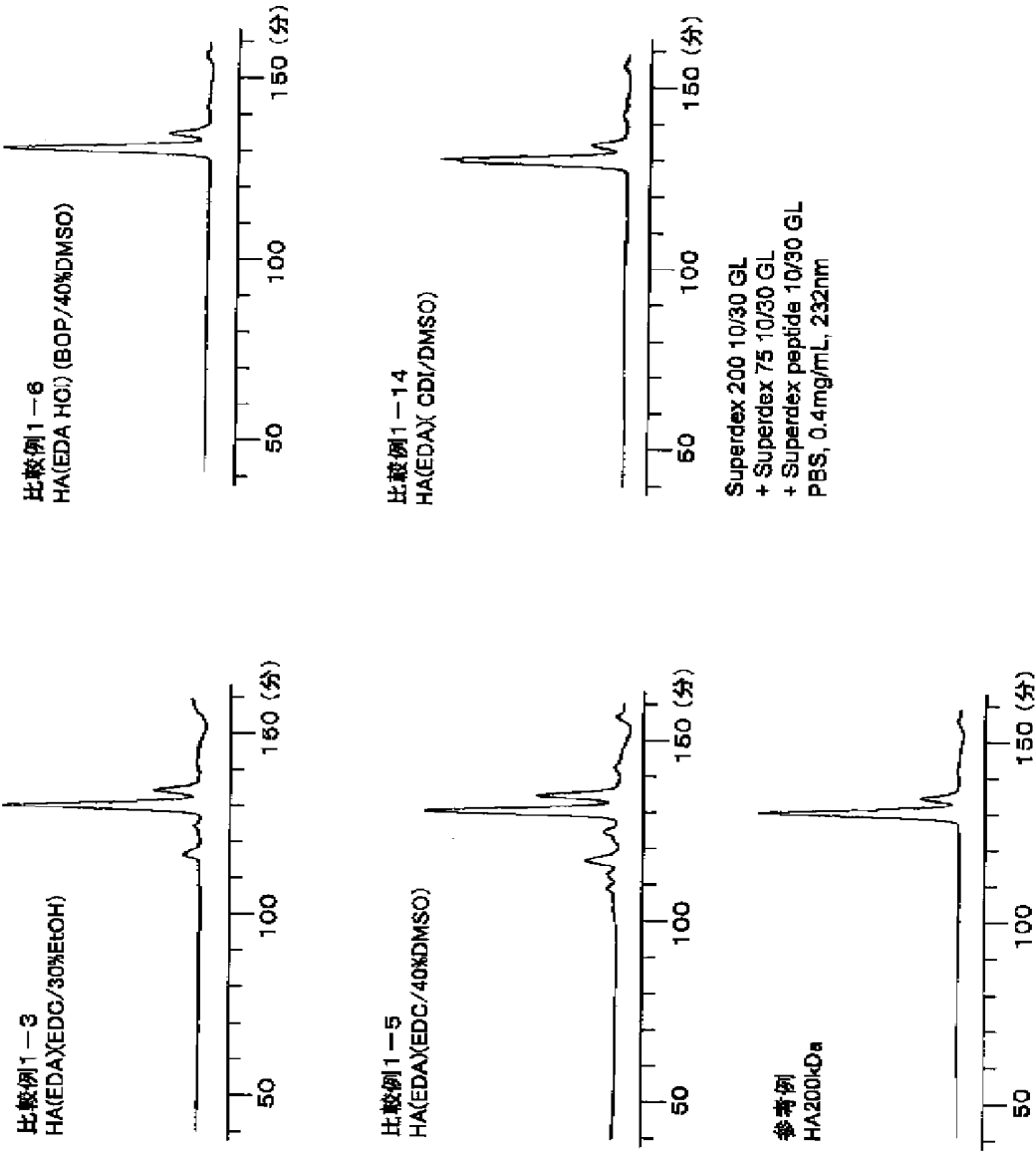
求項30に記載の医療用デバイス。

- [32] 請求項19または20に記載のヒアルロン酸修飾物からヒアルロン酸ゲル微粒子を製造する方法であって、
- a) 請求項19または20に記載のヒアルロン酸修飾物を含む希薄溶液を調製する工程；
 - b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
 - c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸修飾物の架橋反応を進行させる工程を含むヒアルロン酸ゲル微粒子製造方法。
- [33] 前記工程b)が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、請求項32に記載の製造方法。
- [34] 請求項19または20に記載のヒアルロン酸修飾物からヒアルロン酸ゲル微粒子を製造する方法であって、
- a) 請求項25に記載のヒアルロン酸ゲルを乾燥する工程；
 - b) 得られた乾燥物を凍結する工程；および
 - c) 得られた凍結物を粉砕する工程を含むヒアルロン酸ゲル微粒子製造方法。
- [35] 得られる微粒子の平均粒子径が $0.01\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ である、請求項32～34のいずれか1項に記載の製造方法。
- [36] 得られる微粒子が薬物担体である、請求項32～35のいずれか1項に記載の製造方法。
- [37] 得られる微粒子が薬物徐放担体である、請求項32～36のいずれか1項に記載の製造方法。
- [38] 架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されている、請求項32、33、および35～37のいずれか1項に記載の製造方法。
- [39] 請求項32～38のいずれか1項に記載の方法で得ることができるヒアルロン酸ゲル微粒子。
- [40] 請求項39に記載のヒアルロン酸ゲル微粒子を含む医薬組成物。

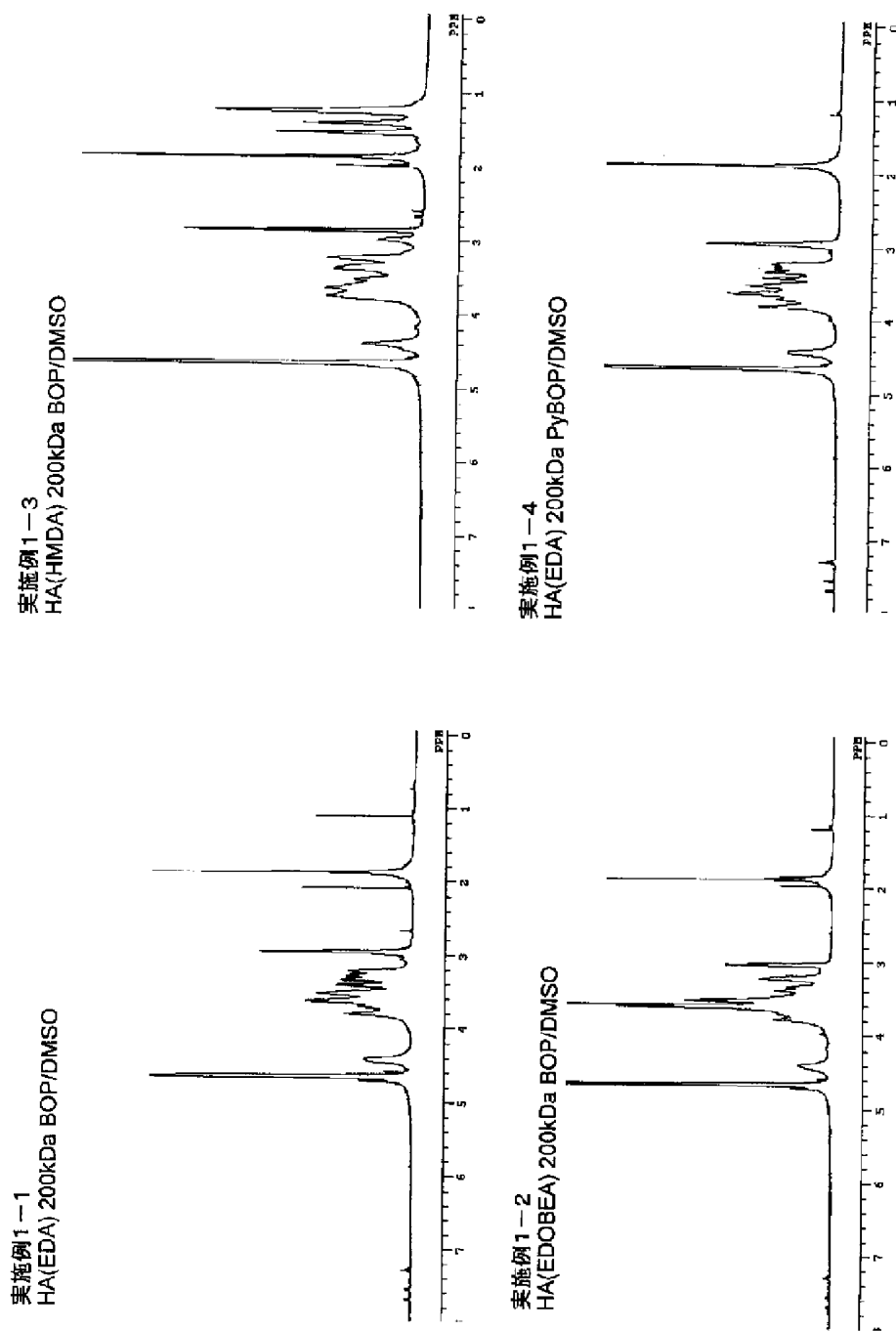
[図1]



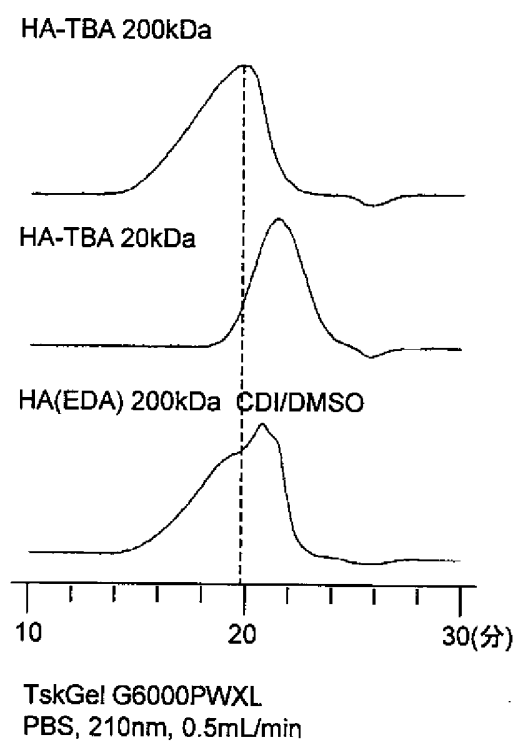
[図2]



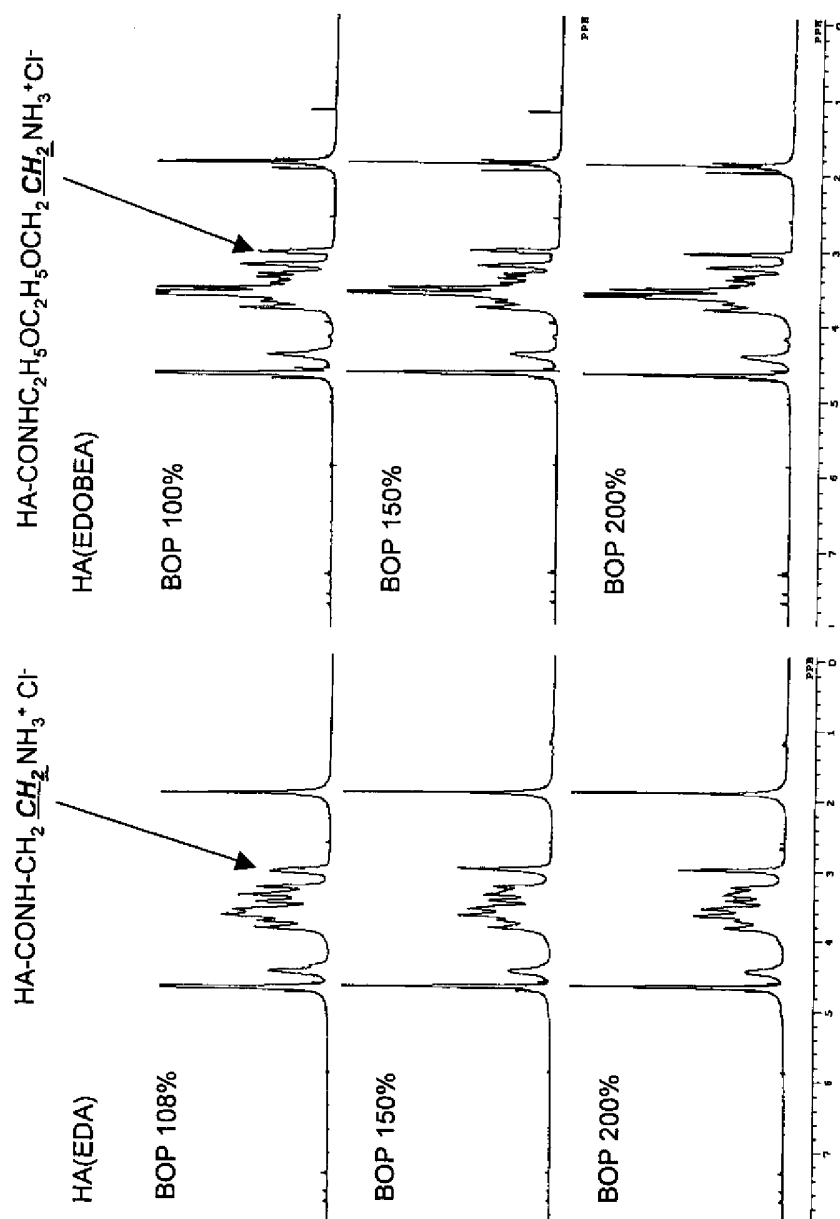
[図3]



[図4]

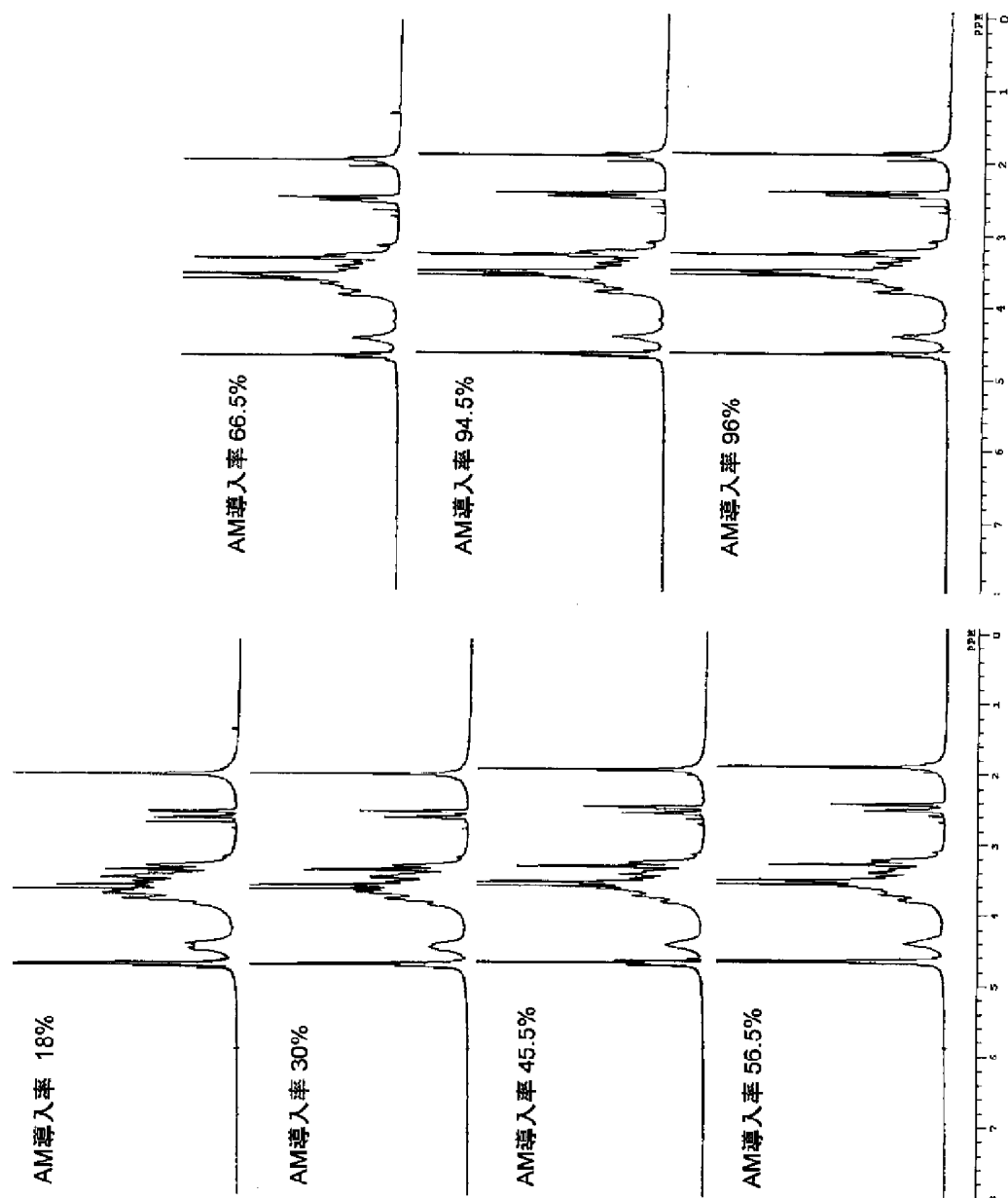


[図5]

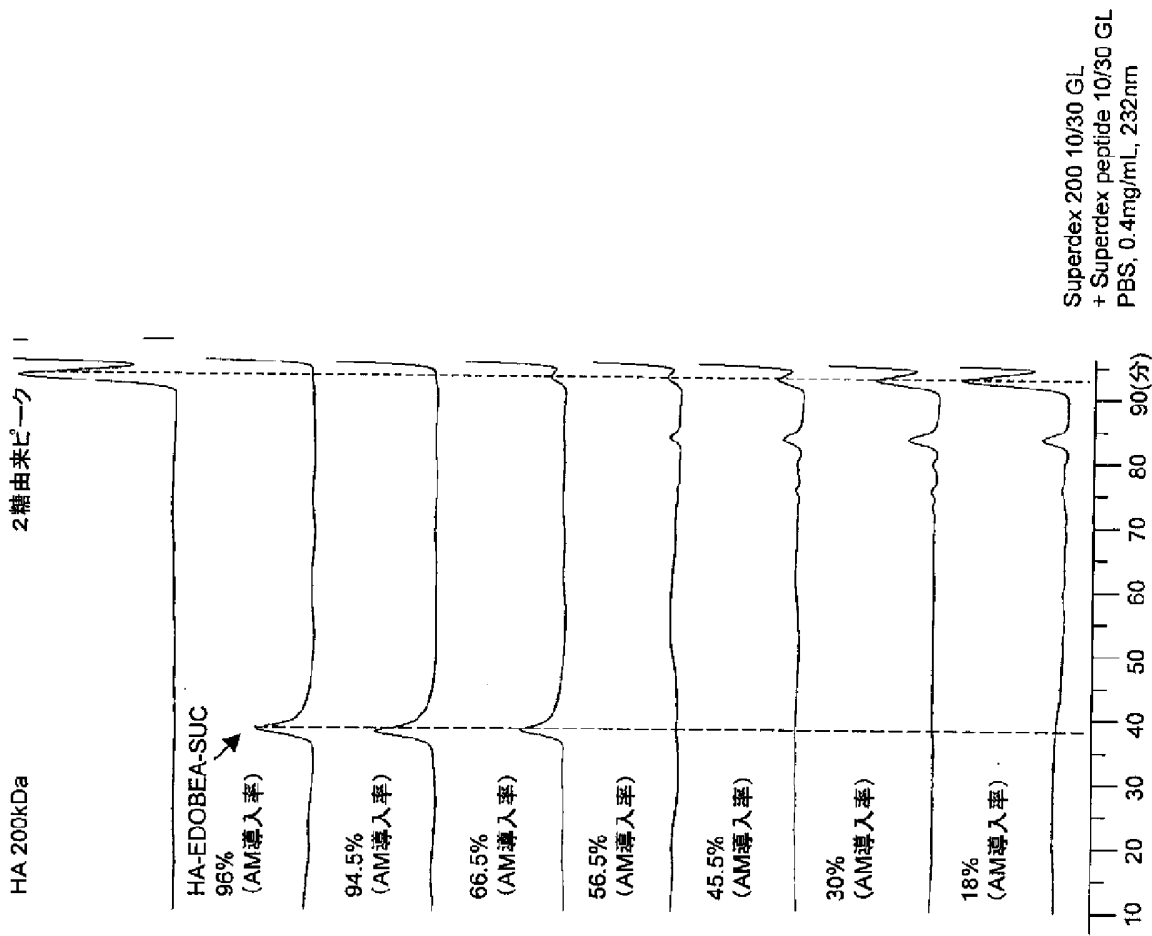


[図6]

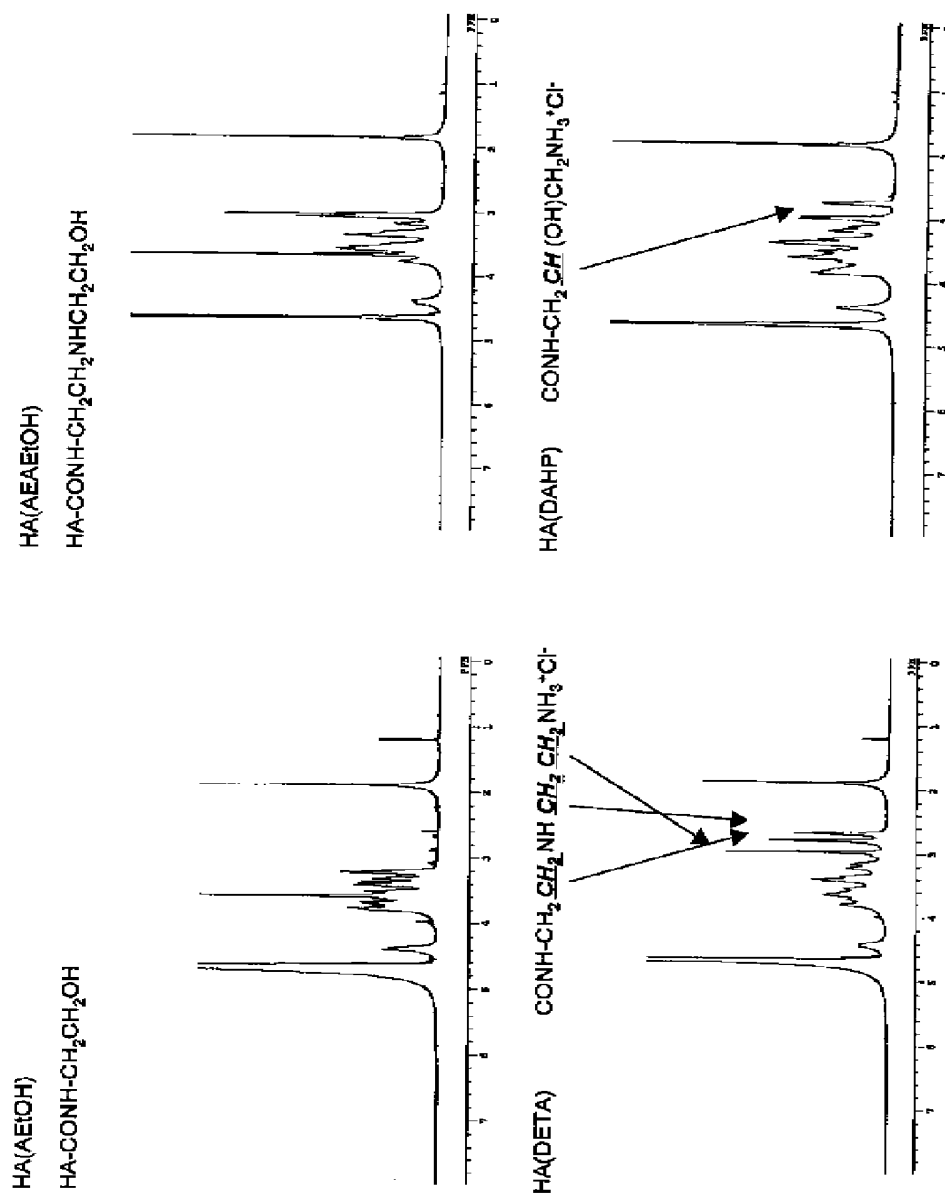
HA-EDBEA-SUC



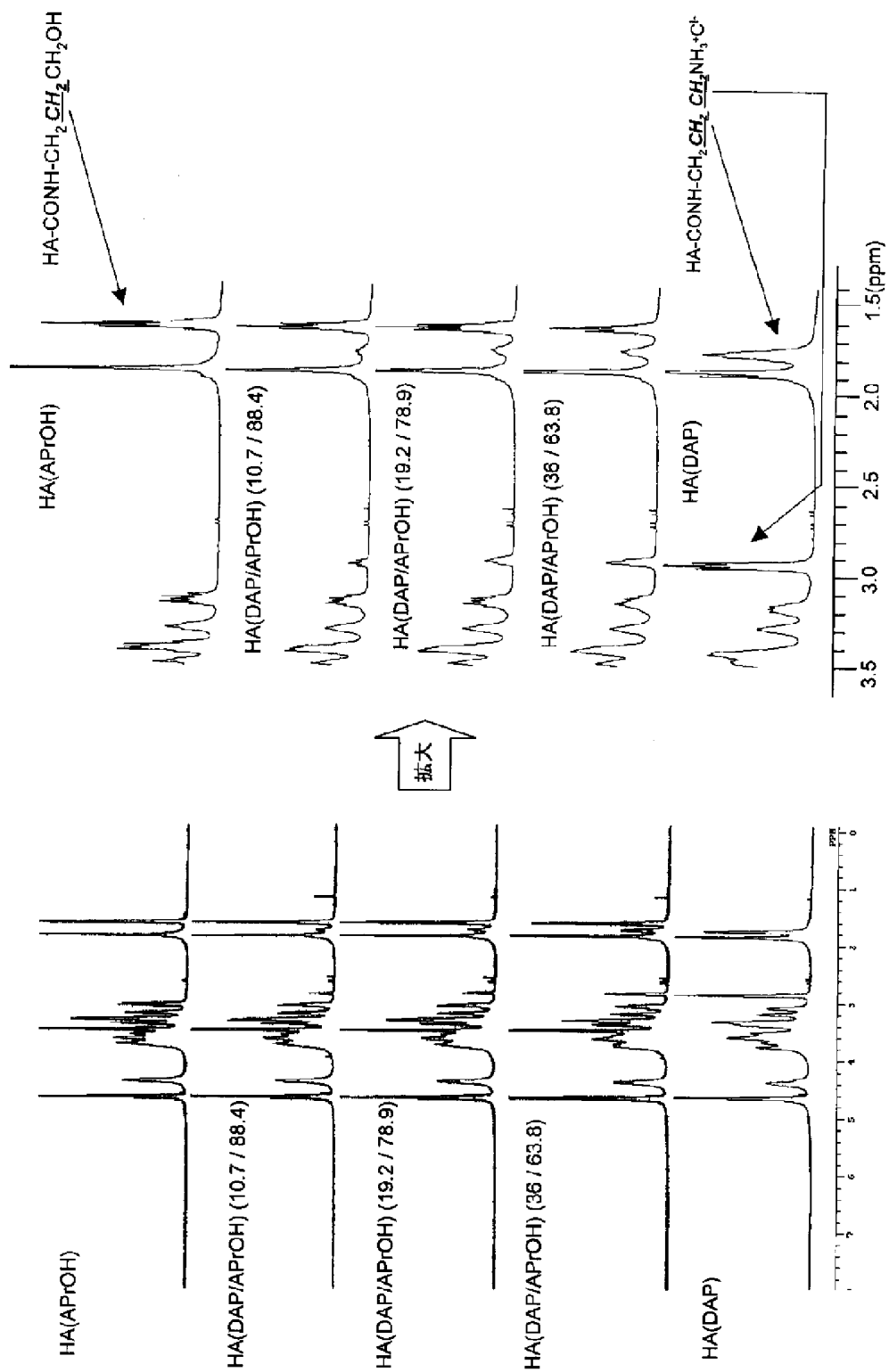
[図7]



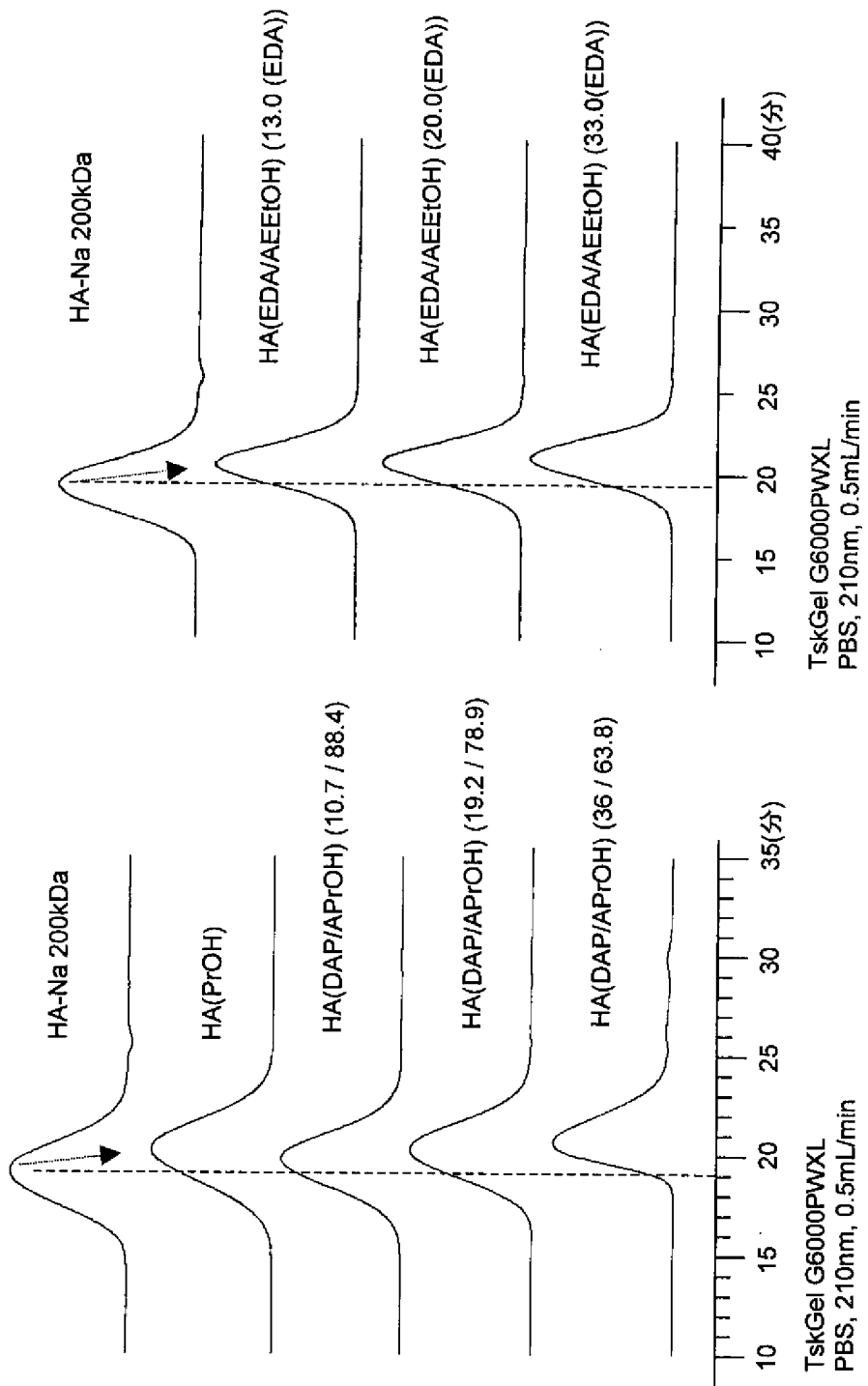
[図8]



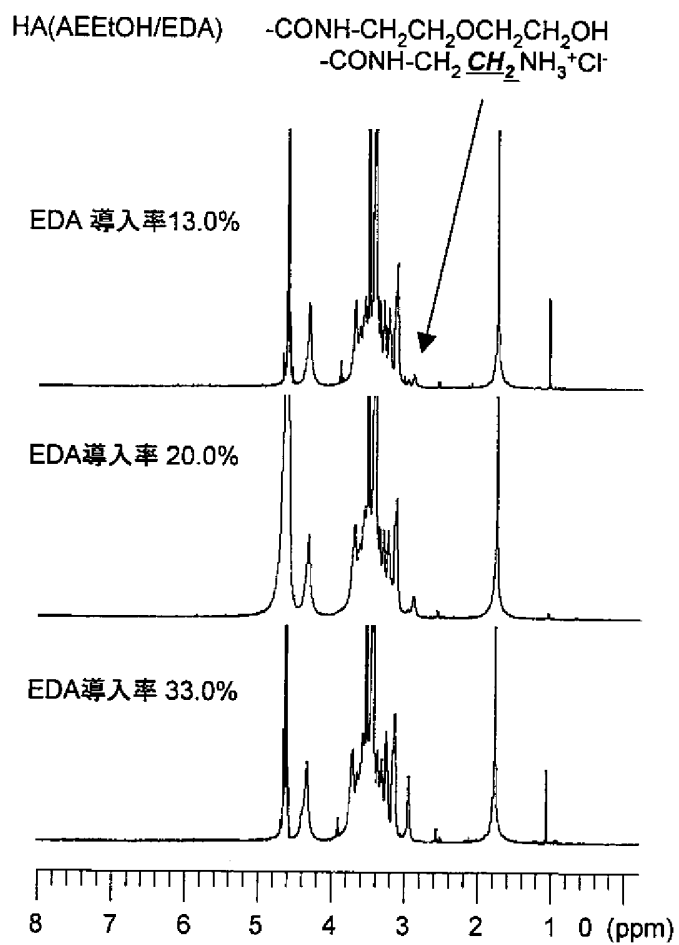
[図9]



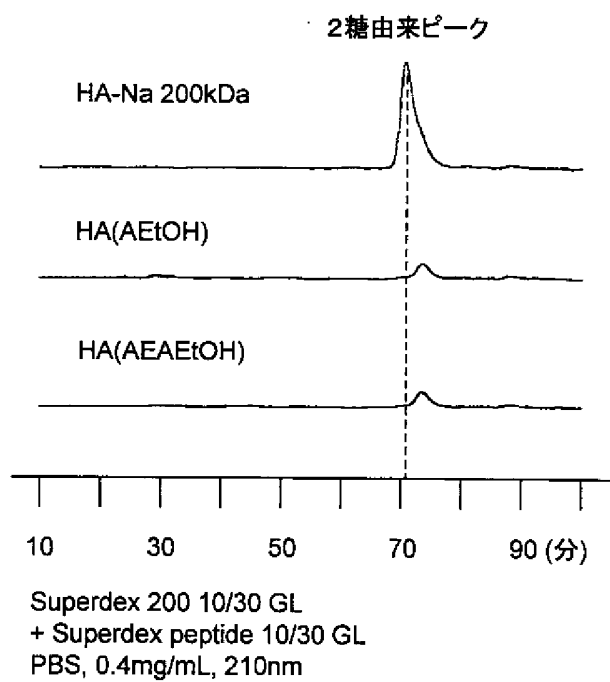
[図10]



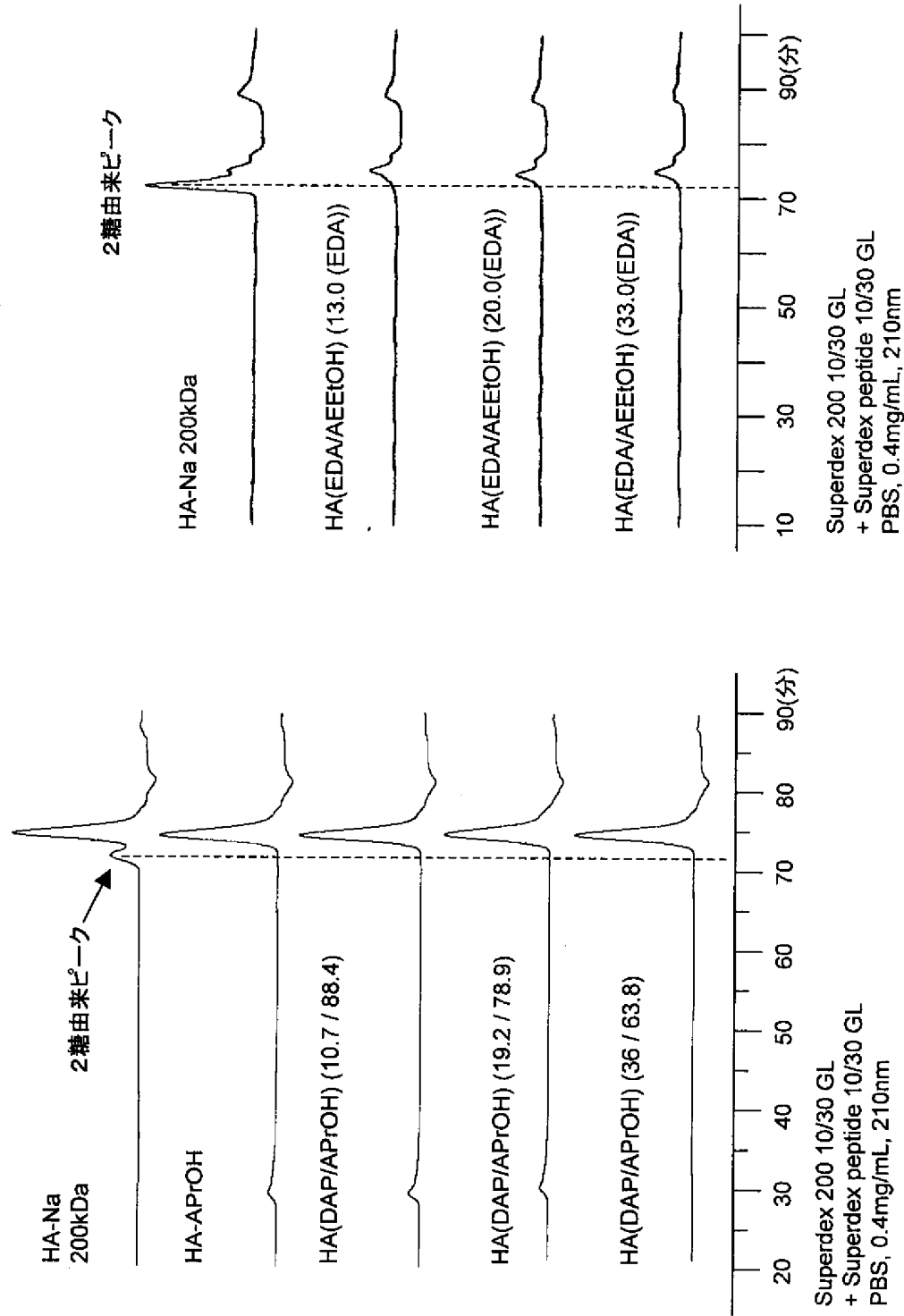
[図11]



[図12]



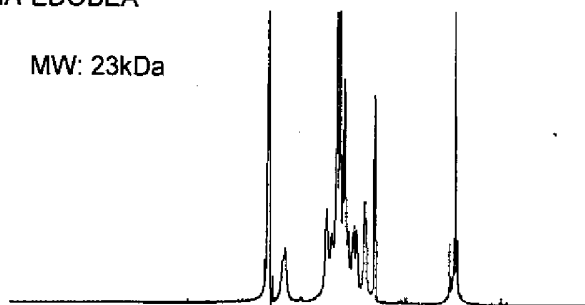
[図13]



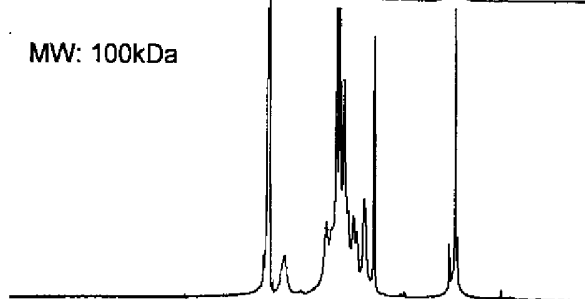
[図14]

HA-EDBEA

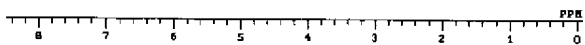
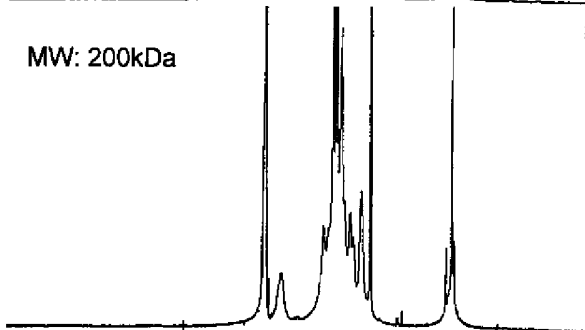
MW: 23kDa



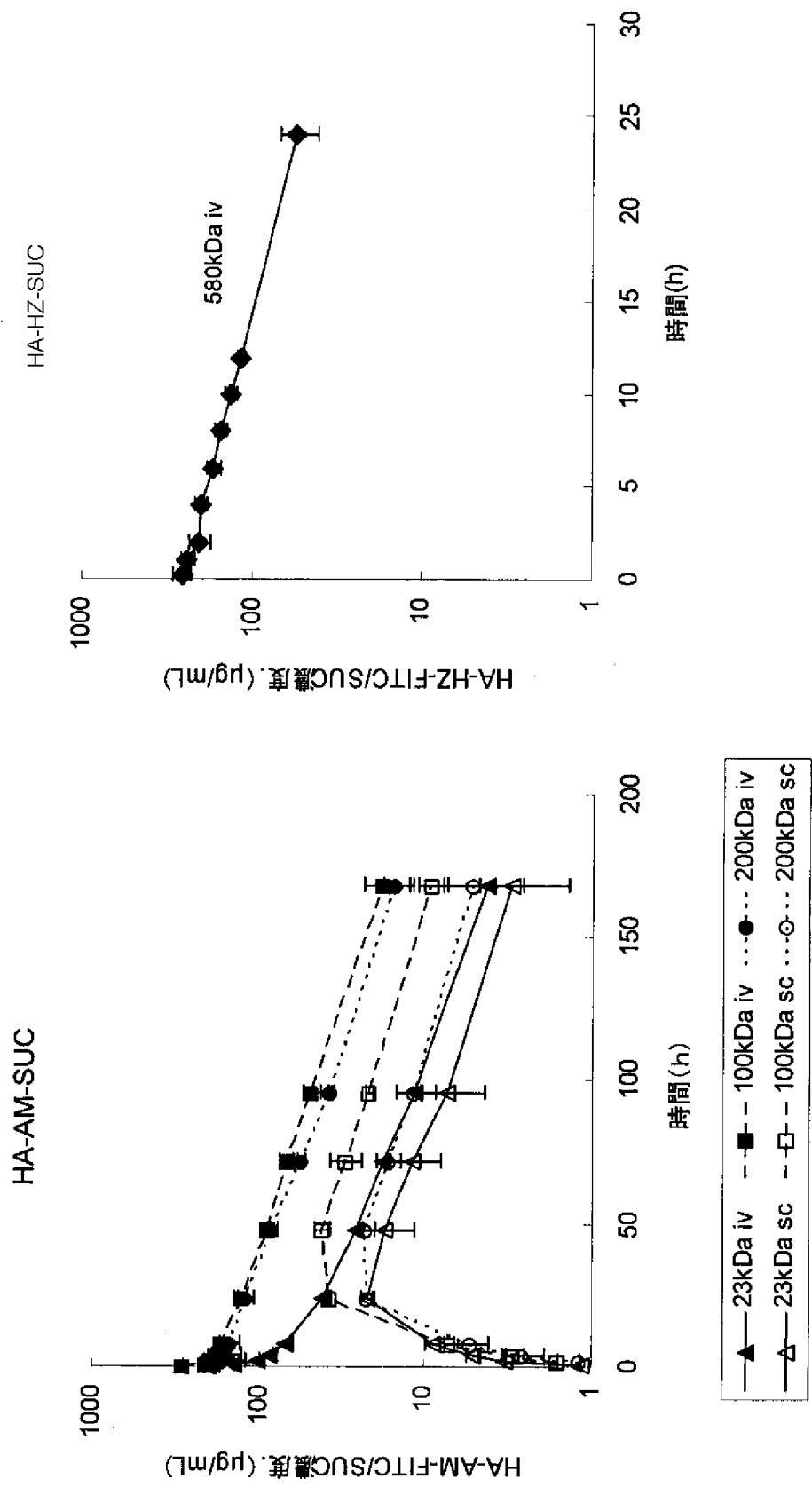
MW: 100kDa



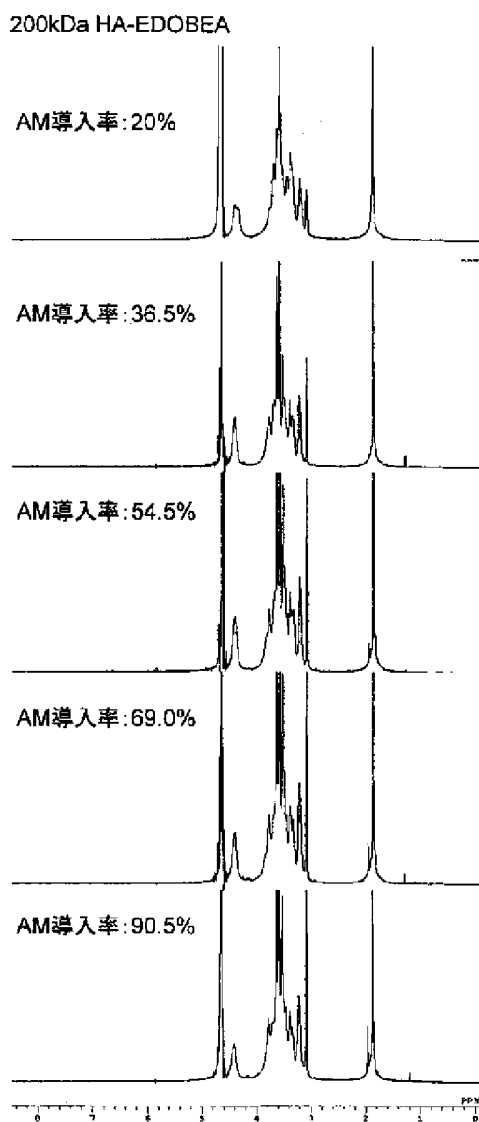
MW: 200kDa



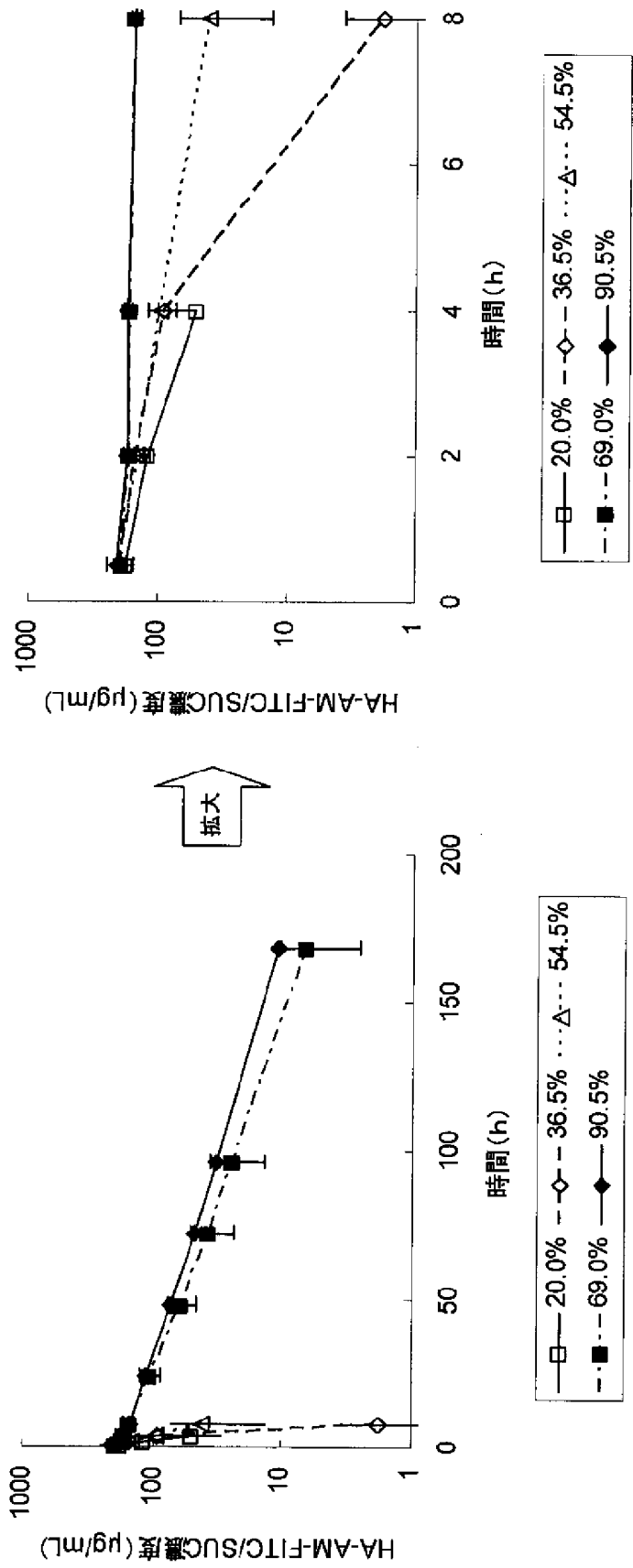
[図15]



[図16]

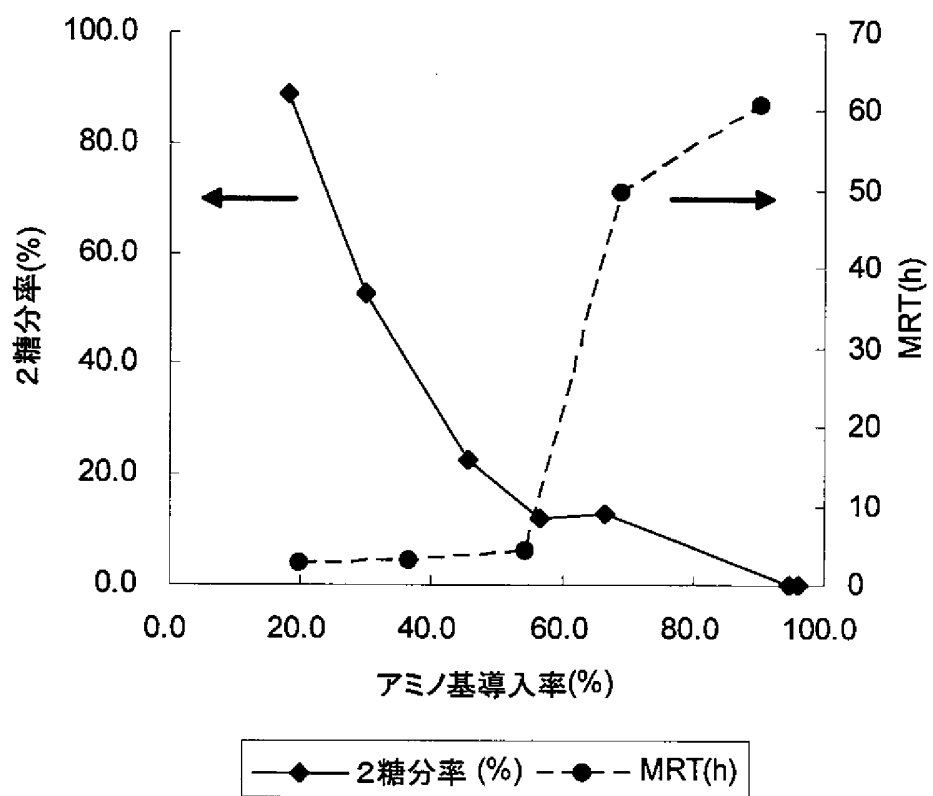


[図17]

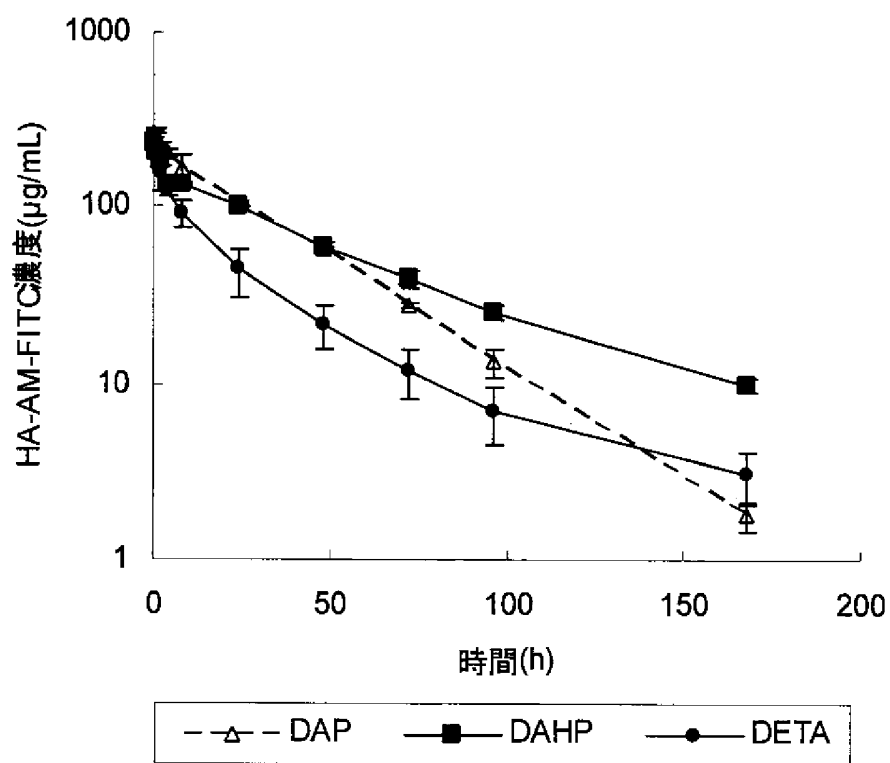


拡大図

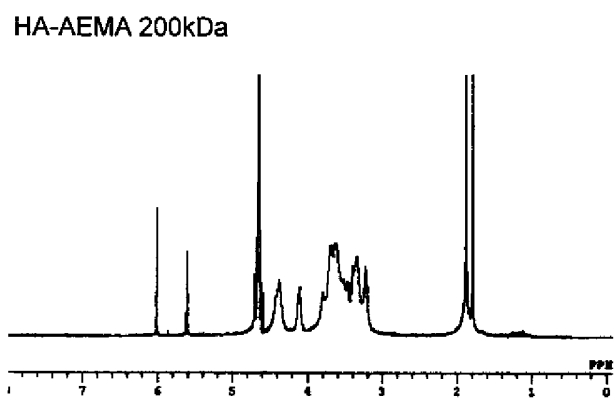
[図18]



[図19]

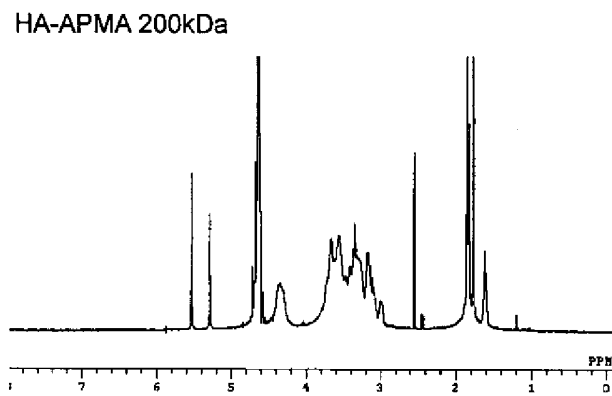


[図20]



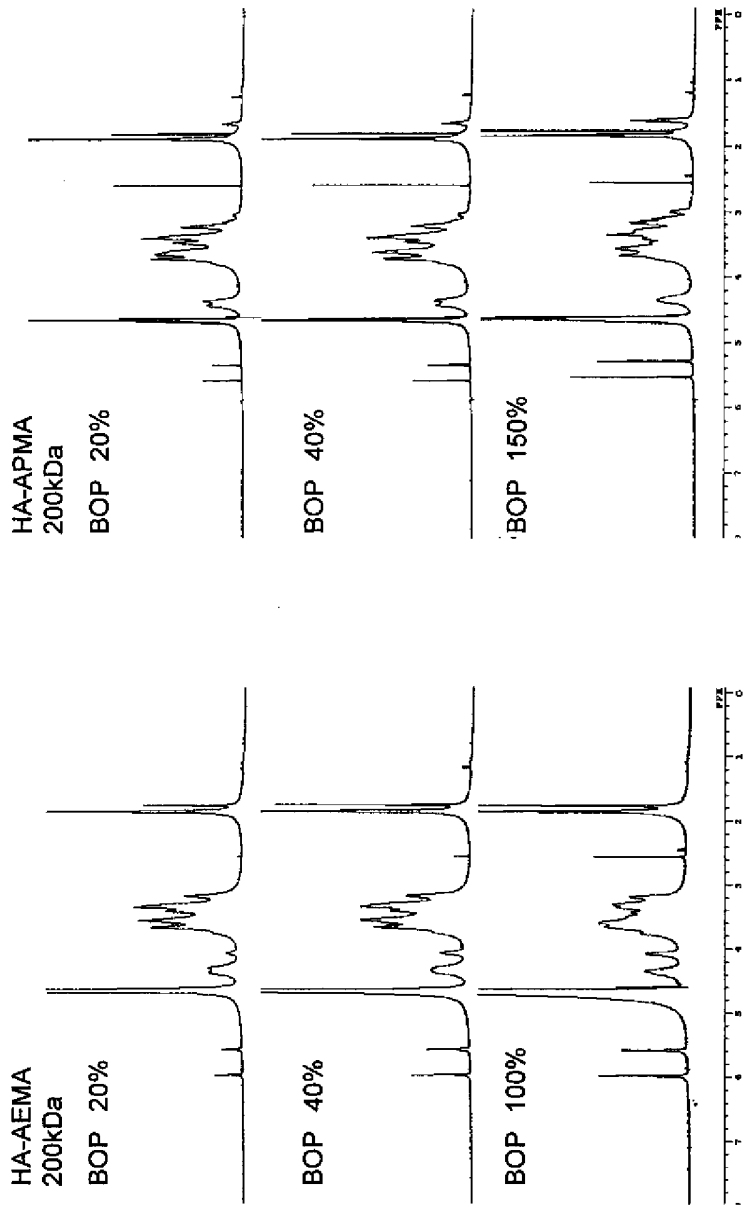
(実施例8-1)

[図21]

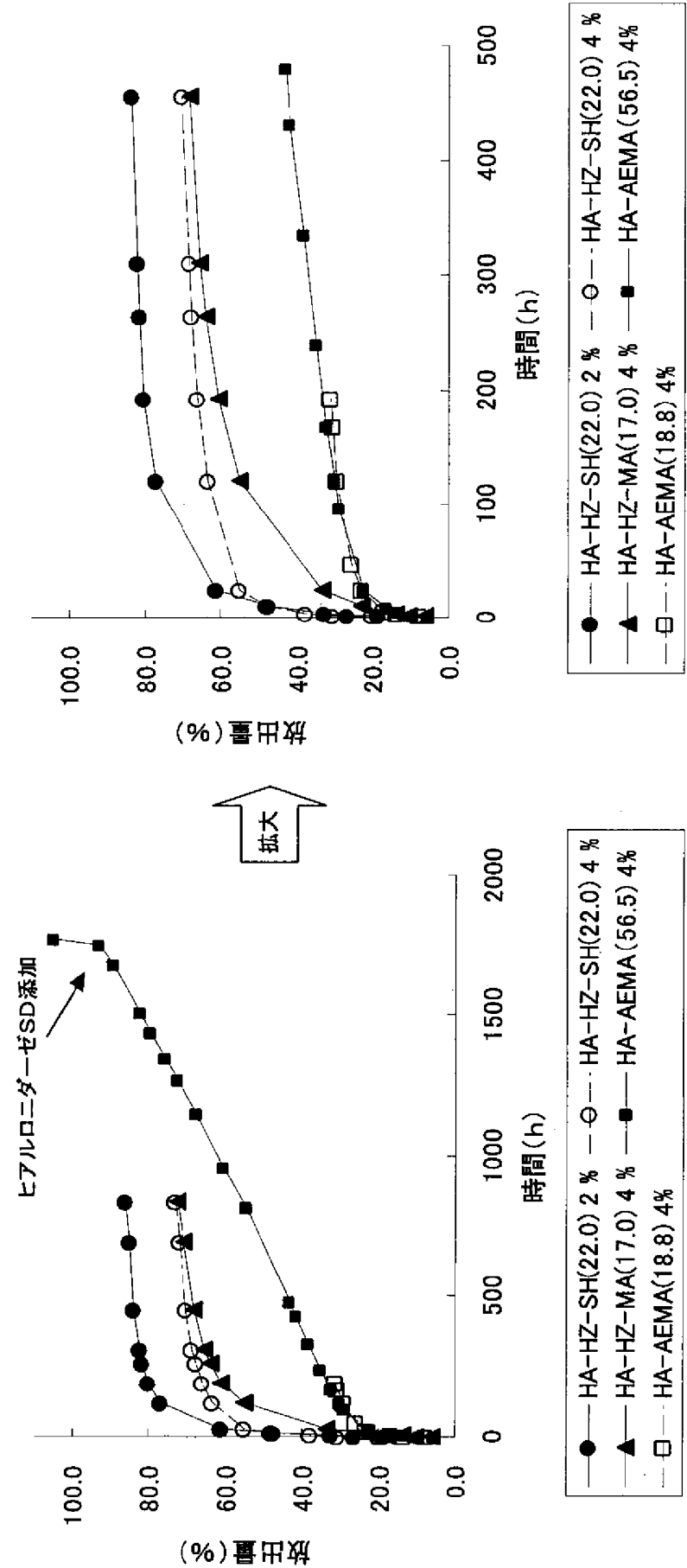


(実施例8-2)

[図22]

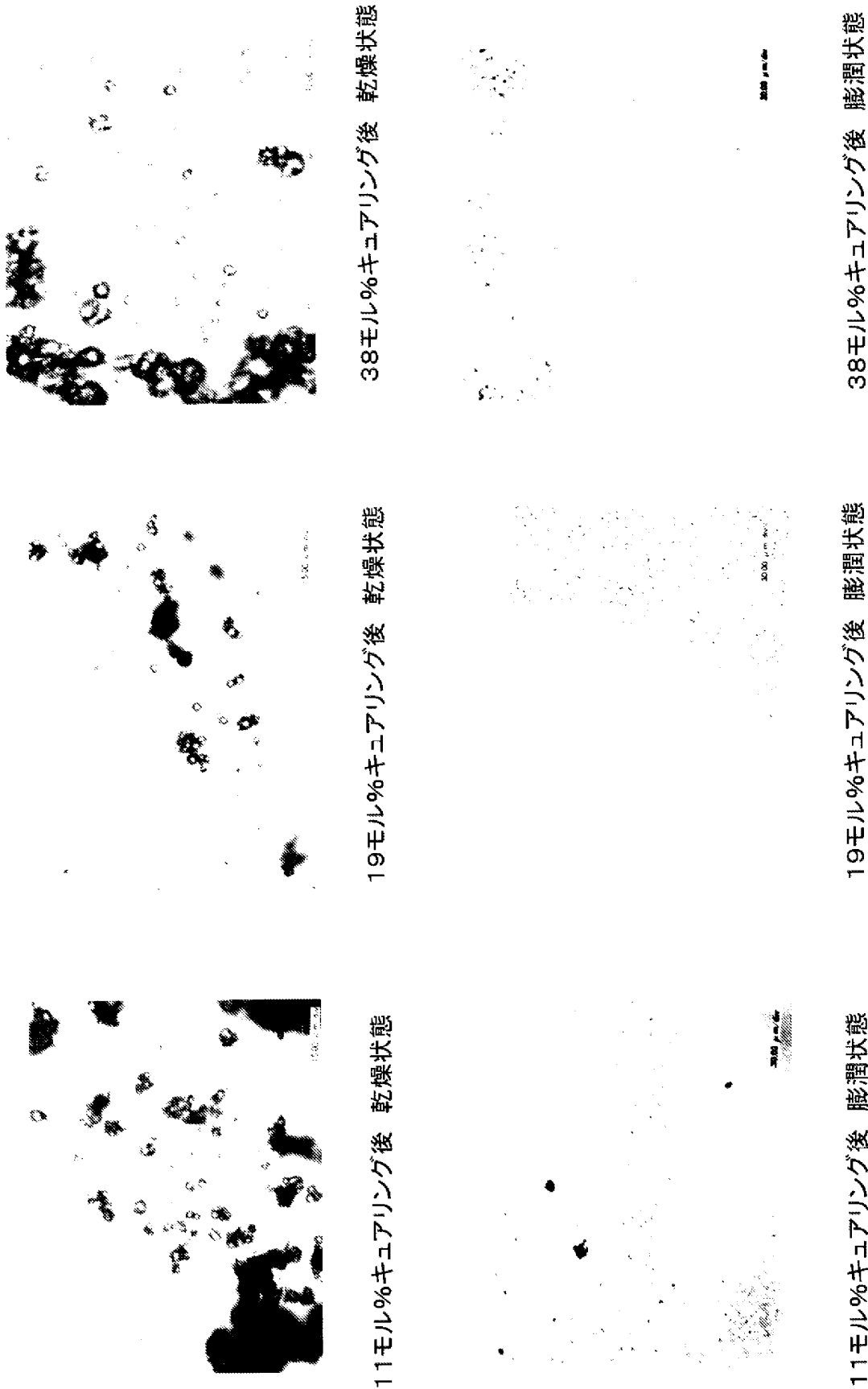


[図23]

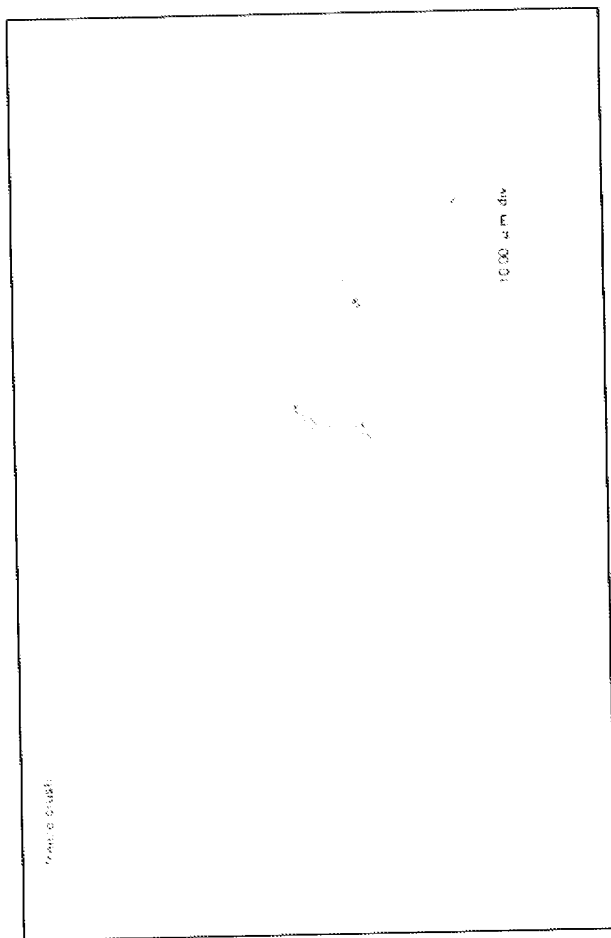


拡大図

[図24]

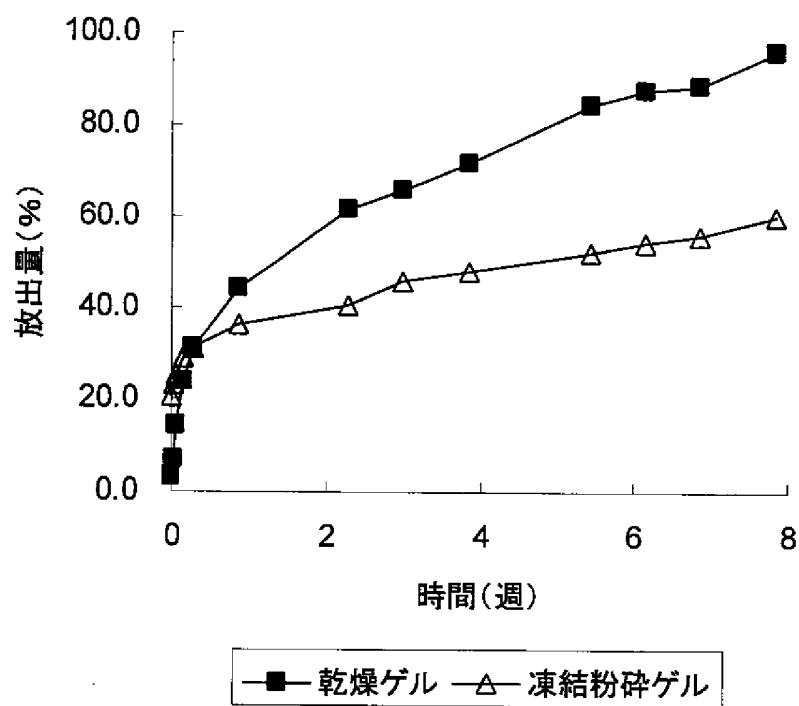


[図25]

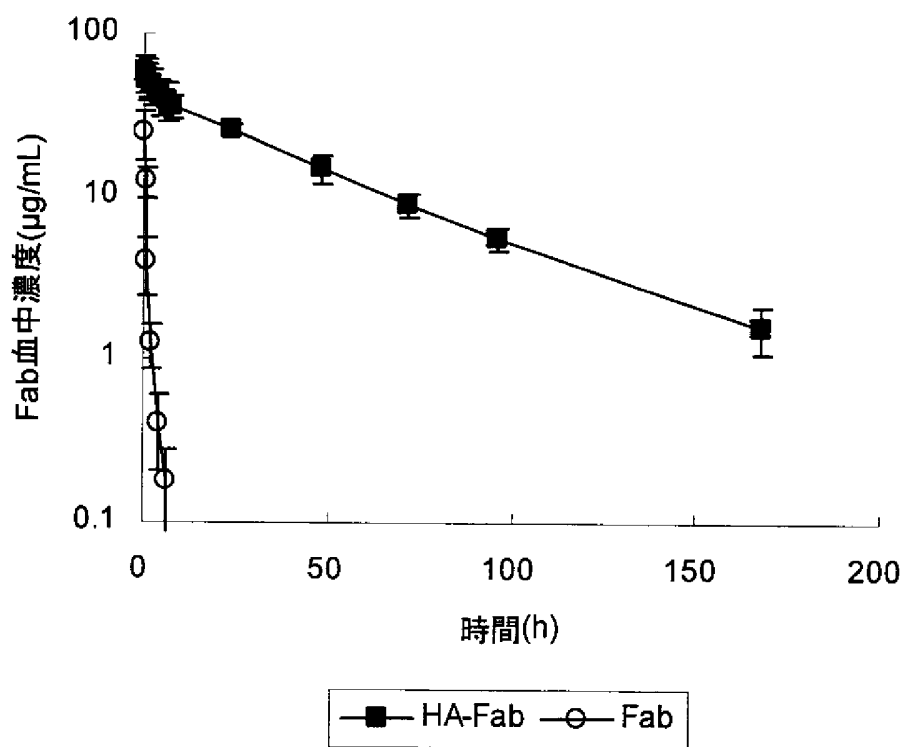


凍結粉砕ゲル 乾燥状態

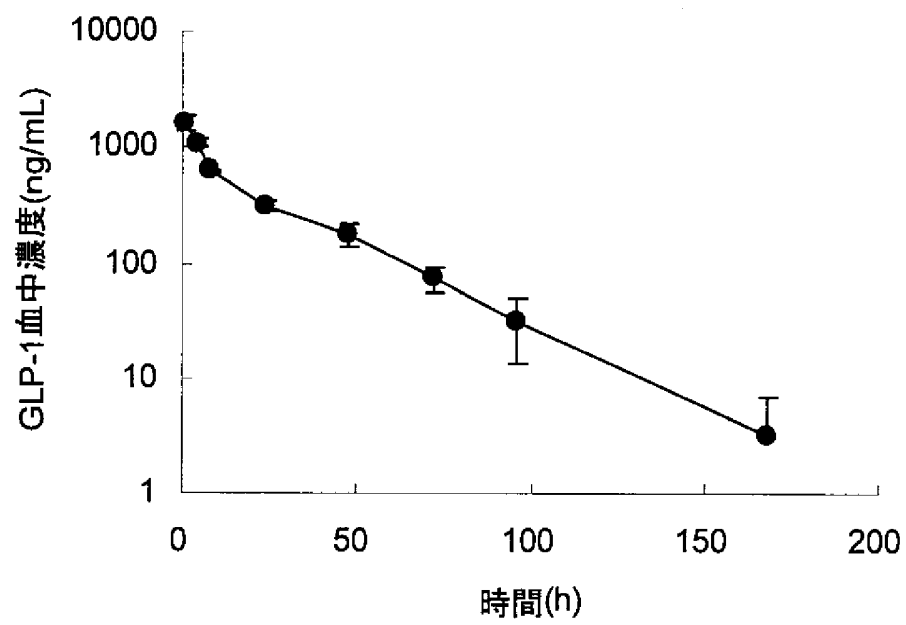
[図26]



[図27]



[図28]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B37/08 (2006.01), **A61K9/06** (2006.01), **A61K31/728** (2006.01), **A61K47/36** (2006.01), **A61K47/48** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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)

C08B37/08 (2006.01), **A61K9/06** (2006.01), **A61K31/728** (2006.01), **A61K47/36** (2006.01), **A61K47/48** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

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

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 2005/054302 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 June, 2005 (16.06.05), Full text (Family: none)	1-40
P,X	WO 2005/054301 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 June, 2005 (16.06.05), Full text (Family: none)	1-40
P,X	WO 2005/023906 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 March, 2005 (17.03.05), Full text (Family: none)	1-40

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 December, 2005 (06.12.05)

Date of mailing of the international search report
20 December, 2005 (20.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016389

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-529550 A (Aquisitio S.p.A.), 10 September, 2002 (10.09.02), Full text & WO 2000/027887 A2 & EP 1144459 A2 & US 6831172 B1	19-24, 30, 31 1-20, 25-29, 32-40
X Y	WO 2004/046200 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 June, 2004 (03.06.04), Full text & EP 1564220 A1	19, 20, 25-29, 32-40 1-18
X Y	WO 2003/087019 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 October, 2003 (23.10.03), Full text & JP 2003-583978 A & EP 1496037 A1 & US 2005/164980 A1	19, 20 1-18
Y	JP 2002-256075 A (CENTMED Inc.), 11 September, 2002 (11.09.02), Full text (Family: none)	1-18
Y	JP 2001-524156 A (Chitogenics, Inc.), 27 November, 2001 (27.11.01), Full text & WO 1998/050050 A1 & EP 1003526 A1 & US 5888988 A	1-18
Y	JP 8-143604 A (Seikagaku Corp.), 04 June, 1996 (04.06.96), Full text & EP 713859 A2 & US 6025444 A	19, 20, 25-29, 32-40
Y	PARK, Y.D. et al., Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, Biomaterials, 2003, Vol.24, pages 893 to 900	19, 20, 25-29, 32-40
A	JP 2004-18750 A (Seikagaku Corp.), 22 January, 2004 (22.01.04), Full text (Family: none)	1-40
A	JP 9-188705 A (Seikagaku Corp.), 22 July, 1997 (22.07.97), Full text (Family: none)	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016389

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-508169 A (Genzyme Corp.), 14 September, 1994 (14.09.94), Full text & WO 1992/020349 A1 & EP 587715 A1 & US 5760200 A	1-40
A	WO 2003/053413 A2 (ELAN DRUG DELIVERY LTD.), 03 July, 2003 (03.07.03), Full text & JP 2005-513098 A & EP 1450765 A2 & US 2005/84537 A1	32-40
A	WO 2004/060404 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 July, 2004 (22.07.04), Full text (Family: none)	1-40
A	WO 2004/050712 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 June, 2004 (17.06.04), Full text & AU 2003/284484 A1	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016389

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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

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

The special technical feature common among claims 1-18, 19-20, 21, 22, 23, 24, 25-28, 29, 30-31, 32-38, 39, and 40 is a water-soluble hyaluronic acid modification in which 5 mol% or more of the carboxy groups contained in the glucuronic acid moieties have been converted to substituted amide groups. However, such compound is known as apparent from the fact that it is described in JP 2002-529500 A. The feature is hence not considered to exceed the scope of the prior art.

Consequently, there is no technical relationship among claims 1-18, 19-20, 21, 22, 23, 24, 25-28, 29, 30-31, 32-38, 39, and 40 which involves an identical (continued to extra sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016389

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

or corresponding special technical feature. The claims 1-18, 19-20, 21, 22, 23, 24, 25-28, 29, 30-31, 32-38, 39, and 40 are hence not considered to be inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C08B37/08** (2006.01), **A61K9/06** (2006.01), **A61K31/728** (2006.01), **A61K47/36** (2006.01), **A61K47/48** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C08B37/08** (2006.01), **A61K9/06** (2006.01), **A61K31/728** (2006.01), **A61K47/36** (2006.01), **A61K47/48** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

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

CAplus (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (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 請求の範囲の番号
P, A	WO 2005/054302 A1 (中外製薬株式会社) 2005.06.16, 全文 (ファ ミリーなし)	1-40
P, X	WO 2005/054301 A1 (中外製薬株式会社) 2005.06.16, 全文 (ファ ミリーなし)	1-40
P, X	WO 2005/023906 A1 (中外製薬株式会社) 2005.03.17, 全文 (ファ ミリーなし)	1-40

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.12.2005

国際調査報告の発送日

20.12.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4 C

3544

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-529550 A (アクイジティオ ソチエタ ペル アツィオニ) 2002. 09. 10, 全文 & WO 2000/027887 A2 & EP 1144459 A2 & US 6831172 B1	19-24, 30, 31 1-20, 25-29, 32-40
X Y	WO 2004/046200 A1 (中外製薬株式会社) 2004. 06. 03, 全文 & EP 1564220 A1	19, 20, 25-29, 32-40 1-18
X Y	WO 2003/087019 A1 (中外製薬株式会社) 2003. 10. 23, 全文 & JP 2003-583978 A & EP 1496037 A1 & US 2005/164980 A1	19, 20 1-18
Y	JP 2002-256075 A (株式会社セントメド) 2002. 09. 11, 全文 (ファ ミリーなし)	1-18
Y	JP 2001-524156 A (キトジェニックス インコーポレイテッド) 2001. 11. 27, 全文 & WO 1998/050050 A1 & EP 1003526 A1 & US 5888988 A	1-18
Y	JP 8-143604 A (生化学工業株式会社) 1996. 06. 04, 全文 & EP 713859 A2 & US 6025444 A	19, 20, 25-29, 32-40
Y	PARK, Y. D. et al., Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, Biomaterials, 2003, Vol. 24, pages 893-900	19, 20, 25-29, 32-40
A	JP 2004-18750 A (生化学工業株式会社) 2004. 01. 22, 全文 (ファ ミリーなし)	1-40
A	JP 9-188705 A (生化学工業株式会社) 1997. 07. 22, 全文 (ファミ リーなし)	1-40
A	JP 6-508169 A (ジェンザイム、コーポレーション) 1994. 09. 14, 全 文 & WO 1992/020349 A1 & EP 587715 A1 & US 5760200 A	1-40
A	WO 2003/053413 A2 (ELAN DRUG DELIVERY LIMITED) 2003. 07. 03, 全 文 & JP 2005-513098 A & EP 1450765 A2 & US 2005/84537 A1	32-40
A	WO 2004/060404 A1 (中外製薬株式会社) 2004. 07. 22, 全文 (ファ ミリーなし)	1-40

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2004/050712 A1 (中外製薬株式会社) 2004.06.17, 全文 & AU 2003/284484 A1	1-40

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☐ 請求の範囲_____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲_____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求の範囲1-18、19-20、21、22、23、24、25-28、29、30-31、32-38、39及び40に記載される発明の間に共通する特別な技術的特徴は、グルクロン酸部分に含まれるカルボキシ基を5モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換した水溶性ヒアルロン酸修飾物であるものの、斯かる化合物は、JP2002-529500 Aに記載されているように公知であるから、先行技術の域を超えているとは認められない。

したがって、請求の範囲1-18、19-20、21、22、23、24、25-28、29、30-31、32-38、39及び40に記載される発明の間には、同一の又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係が存在しないから、請求の範囲1-18、19-20、21、22、23、24、25-28、29、30-31、32-38、39及び40に記載される発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。