

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年1月3日 (03.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/00734 A1

- (51) 国際特許分類: C08B 37/02, C07D 491/22, A61K 47/48, 31/4745, 47/36, A61P 35/00
- (74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.): 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05498
- (22) 国際出願日: 2001年6月27日 (27.06.2001)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (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2000-195919 2000年6月29日 (29.06.2000) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10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): 井村明弘 (IMURA, Akihiro) [JP/JP]. 野口 滋 (NOGUCHI, Shigeru) [JP/JP]. 山口達也 (YAMAGUCHI, Tatsuya) [JP/JP]. 八木 努 (YAGI, Tsutomu) [JP/JP]. 川邊武史 (KAWABE, Takefumi) [JP/JP]; 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).
- 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。

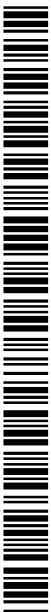
(54) Title: DDS COMPOUND AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: DDS化合物及びその製造方法

(57) Abstract: A DDS compound which comprises (1S,9S)-1-amino-9-ethyl -5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione as the drug compound and carboxymethyl dextran polyalcohol and in which the 1-position amino group of the former is bonded to the carboxyl groups of the latter through a spacer consisting of either one amino acid or 2 to 8 amino acids bonded by peptide linkages, characterized in that the amount of the drug compound residue introduced is 3.2 to 8.4 wt% and that the carboxymethyl dextran polyalcohol has an average molecular weight of 240,000 to 480,000 and a degree of carboxymethylation of 0.14 to 0.47. A process for the preparation of the DDS compound which comprises the step of adding an aqueous solution of sodium periodate to an aqueous solution of dextran at a temperature of 4°C ± 2°C to oxidize the dextran, and then adding the resulting reaction fluid to an aqueous solution of sodium borohydride at a temperature of 15°C or below to thereby obtain dextran polyalcohol.

[続葉有]

WO 02/00734 A1





(57) 要約:

医薬化合物として (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、医薬化合物残基の導入量が3.2~8.4重量%の範囲であり、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの平均分子量が240,000~480,000の範囲、カルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲であることを特徴とするDDS化合物、及びデキストランを含む水溶液に4°C±2°Cの温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を15°C以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程などを含む該DDS化合物の製造方法。

明 細 書

DDS化合物及びその製造方法

技術分野

本発明は、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体と医薬化合物とを結合させたドラッグデリバリーシステム化合物（以下、「DDS化合物」という。）及びその製造方法に関する。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓、細網内皮系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が制限される場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体の腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に広く分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用し、下痢、発熱、嘔吐、あるいは脱毛などの副作用をきわめて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、多糖誘導体を薬物担体として用い、該多糖誘導体に対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖を介して薬剤を結合させたもの（国際公開WO 94/19376号）、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基やアミド結合を介して薬剤を導入したもの（特公平7-84481号）、

ポリアルコール化多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して、さらにはペプチド鎖及びパラアミノベンジルオキシカルボニル基を介して薬剤を結合させたもの（国際公開WO 99/61061号）等が開示されている。

多糖誘導体を薬物担体として用いたDDS化合物のうち、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して医薬化合物残基を結合したDDS化合物は、腫瘍選択性が特に優れており、抗腫瘍剤としての開発が期待されている。なかでも、医薬化合物残基として(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンを結合させた該DDS化合物は、優れた腫瘍選択性及び抗腫瘍活性を発揮でき、臨床上の有用性が期待できるDDS化合物である。

もつとも、本発明者らの研究によれば、医薬化合物残基として(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンをカルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体に対してペプチドスペーサーを介して結合させた上記DDS化合物は、薬物担体である高分子キャリア一部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量の変化により安全性及び薬効域が大きく変動することが明らかとなった。この理由から、上記DDS化合物において、高い安全性と広い薬効域を与える特定のDDS化合物を選択することが望まれる。

また、本発明者らは、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造において、デキストランポリアルコールの製造時の発熱により高分子キャリアの低分子化が生じ、さらにデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化する際の発熱によりカルボキシメチル化度を十分に制御できず、一定品質の高分子キャリアを製造できないという問題に直面していた。また、上記の医薬化合物と

ペプチドスペーサーとを結合させる工程、及びペプチドスペーサーを介して医薬化合物を高分子キャリアーに結合させる工程においても、従来の方法では目的物の分離や精製が必要になるために作業が煩雑で、目的物の収率が低く良好な品質の製品を提供できないという問題があり、それらを解決する必要に迫られていた。

発明の開示

従って、本発明の目的は、上記DDS化合物において、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量を選択し、高い安全性と広い薬効域を有する上記DDS化合物を提供することにある。また、本発明の別の目的は、上記の特定のDDS化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適した方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、上記DDS化合物において高い安全性及び広い薬効域を有する化合物を選択することに成功した。より具体的には、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量についての最適化を行い、特定の条件を満たす化合物が高い安全性と広い薬効域を有することを見出した。また、上記の特定のDDS化合物を製造するにあたり、反応温度を制御するための手段、反応の進行をモニターするための手段、及び反応試薬などを選択することにより、目的のDDS化合物を一定品質で、かつ効率的に製造できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2 ~ 8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、
(1) (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒ

ドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2~8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.23~0.47の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物を提供するものである。

また、(1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2~8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物も本発明により提供される。これらのDDS化合物において、標準物質を分解法又はNMR法により測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により上記のカルボキシメチルデキスト

ランポリアルコールのカルボキシメチル化度を測定した上記DDS化合物も本発明により提供される。

さらに、本発明により、上記DDS化合物を含む医薬及び上記DDS化合物を含む抗腫瘍剤、並びに、上記医薬の製造のための上記DDS化合物の使用及び悪性腫瘍の治療方法であって、上記DDS化合物の治療有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

別の観点からは、本発明により上記DDS化合物の製造方法が提供される。本発明の方法は、上記DDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) デキストランポリアルコールにモノクロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',

4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシ基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシ基とを縮合した縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程からなる群から選ばれる1以上の工程を含んでいる。

本発明の好ましい方法は、上記(A)から(D)の工程から選ばれる2以上の工程を含み、さらに好ましい方法は上記(A)から(D)の工程から選ばれる3以上の工程を含み、特に好ましい方法は、上記(A)から(D)の全ての工程を含む。また、工程(D)において縮合反応の終点を高速液体クロマトグラフィーにより決定することが好ましい態様として提供される。

さらに本発明により、上記のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.23~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、上記のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、及び上記のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が、分解法又はNMR法で得られた検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定したカルボキシメチル化度であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールが提供される。

また、上記DDS化合物の製造のための上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの使用が本発明により提供される。

さらに、上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であっ

て、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

(B) 上記工程 (A) で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程を含む方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

日本国特願 2000-195919 号 (2000 年 6 月 29 日出願) の全ての開示を参照として本明細書の開示に含める。

本発明の DDS 化合物は、(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H)-ジオン (以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。) の 1-位の アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した DDS 化合物において、

(1) 上記医薬化合物の残基の導入量が DDS 化合物全重量に対して 3.2~8.4 重量%、好ましくは 5.6~7.6 重量% の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240,000~480,000 の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が 0.23~0.47 の範囲である

ことを特徴としている。

また、本発明により提供される他のDDS化合物は、(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオン (以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。) の1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) 上記医薬化合物の残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2~8.4重量%、好ましくは5.6~7.6重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲である

ことを特徴としている。

本明細書において、「~」で表示される数値範囲は、下限及び上限の数値を含む範囲である。

(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した薬物複合体は、国際公開WO 97/46260に開示されているが、上記の特定のDDS化合物は開示されていない。

本発明のDDS化合物において、薬物担体として機能するカルボキシメチルデキストランポリアルコールの重量平均分子量は、240,000~480,000

0の範囲である。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量は当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー法に従ってプルランを標準として測定することができる。標準とするプルランはShodex社等から購入することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は0.14～0.47の範囲又は0.23～0.47の範囲である。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、キャピラリー電気泳動法に従って測定することができる。キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を用いることができる。標準物質としては、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを調製して用いることができる。検量線は、例えば分解法又はNMR法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法とNMR法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、NMR法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて0.09程度低くなる傾向がある。従って、NMR法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が0.14～0.38の範囲であることが望ましい。

分解法では、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの酸加水分解によりそれぞれ定量的に生成するグリセロール(Gl r)、グリコールアルデヒド(GA)、カルボキシメチルグリセロール(CM-Gl r)、及びカルボキシメチルグリコールアルデヒド(CM-GA)を定量する。加水分解物中のグリセロールは塩基性条件下で高速液体クロマトグラフィーにより直接定量することができ、グリコールアルデヒドはアルデヒド標識化試薬であるダンシルヒドラジンと反応させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチルグリセロールとカルボキシメチルグリコールアルデヒドについ

ては、カルボキシメチルグリコールアルデヒドのアルデヒドを還元してカルボキシメチルエチレングリコール (CM-EG) に変換した後、それぞれカルボン酸の蛍光標識化試薬である 9-アンスリルージアゾメタンと反応させ、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチル化度は下記の式： $CM-G1r / (G1r + CM-G1r) + CM-EG / (GA + CM-EG)$ から計算することができる。

NMR法では、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用い、それらの ^{13}C -NMRを測定する。各標準物質のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのC-1位及びC-5位、並びにカルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているC-1位及びC-5位の4つのシグナルの面積強度を算出し、C-1位及びC-5位の面積強度合計のうち、カルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているC-1位及びC-5位の面積強度が占める割合により、各カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度を求める。

本発明のDDS化合物を構成するスペーサーとしては、1個のアミノ酸残基を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いることができる。該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸残基を含むオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有しており、C末端（1個のアミノ酸を含むスペーサーの場合には α -カルボキシル基）で(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基にペプチド結合する。

好ましいスペーサーは2から6個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーである。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 α -アミノ酸のほか、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような α -アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で薬物担体に近接した位置に配置されることが好ましい。

オリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが-X-Z-で表されるジペプチドの残基（Xは疎水性アミノ酸の残基を示し、Zは親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸（X）と親水性アミノ酸（Z）とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離するので、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のDDS化合物の好ましい部分構造である。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチド残基の具体例を以下の表に示すが、本発明のDDS化合物に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることなく、スペーサー種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（ペプチド配列は左側がN末端であり、

C末端(1個のアミノ酸を含むスペーサーの場合には α -カルボキシル基)で(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの1位のアミノ基にペプチド結合する)。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキシソルピシンを結合したDDS化合物のWalker 256担癌ラットに対する薬効の発現の程度、又はWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキシソルピシン濃度によって判定した。)。これらのうち、本発明のDDS化合物では、スペーサーとして-Gly-Gly-Phe-Gly-を用いることが特に好ましい。

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-
 -Pro-Gly-
 -Gly-Gly-Gly-Phe-
 (d) 遊離速度が小さいスペーサー
 -Gly-
 -D-Phe-Gly-
 -Gly-Phe-
 -Ser-Gly-
 -Gly-Gly-
 -Gly-Gly-Gly-
 -Gly-Gly-Gly-Gly-

(1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンは、特開平5-59061号公報に記載の方法により合成できる。本発明のDDS化合物における上記医薬化合物の残基の導入量は、DDS化合物の重量に対して3.2~8.4重量%であり、好ましくは5.6~7.6重量%である。上記医薬化合物の導入量は、例えば、吸光度分析により当業者が容易に確認できる。

本発明のDDS化合物は、所望の抗腫瘍活性を腫瘍部位特異的に発現でき、かつ、高い安全性を保持した抗腫瘍剤として用いることができる。本発明のDDS化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用又は点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調整剤、安定化剤などの当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限

定されないが、一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 $1 \sim 500 \text{ mg}$ 程度、好ましくは約 $10 \sim 100 \text{ mg}$ の範囲で一日一回投与し、 $3 \sim 4$ 週毎に繰り返すことが好ましい。

本発明のDDS化合物の製造法は特に限定されないが、本発明により提供される上記の製造方法により好適に製造することができる。本発明の方法は、上記の工程 (A) から (D) のいずれか1工程、又は2以上の工程を組み合わせて含み、最も好ましくは (A) から (D) の工程をすべて含む。以下、本発明の最も好ましい形態として、(A) から (D) の工程をすべて含む方法について説明するが、本発明の範囲はこの好ましい形態に限定されることはない。

本発明の好ましい方法は、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) 上記工程 (A) で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) 上記工程 (C) で得られた縮合体から *tert*-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程 (B) で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程を含んでいる。

工程 (A) は、デキストランからデキストランポリアルコールを得る工程である。出発原料であるデキストランの種類は特に限定されず、 α -D-1, 6-結合を任意に含んでもよい。例えば、 α -D-1, 6-結合の割合が、85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。原料として用いるデキストランとしては、デキストラン T500 (ファルマシア社製) 等の分子量が 500, 000 程度のものが好ましい。得られるデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理することが好ましい。

上記過ヨウ素酸ナトリウムを用いた酸化反応において、反応時の温度上昇により、デキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために、デキストランを含む水溶液中に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加することを特徴としている。デキストランを含む水溶液は、例えば緩衝剤を含んでもよい。過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加する際には、反応液の温度上昇が生じないように添加速度を制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。反応は数日から 20 日程度、通常は 10 日程度で完了する。反応液中のデキストランの濃度は、例えば、反応液 1 リットルあたり数グラムから 100 グラム程度、好ましくは 1 リットルあたり 10 グラム程度である。

反応の完了後、必要に応じて得られた反応液にエチレングリコールなどを加えて過剰の過酸を消費させ、さらに必要に応じて反応液の pH を中性付近 (例えば

pH 6.5程度)に調節した後、この反応液を15℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加して還元を行う。還元反応に際しても、反応時の温度上昇によりデキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために上記の酸化反応の反応液を水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に15℃以下の温度で添加することを特徴としている。添加速度は、反応液の温度上昇が生じないように制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。一般的には、添加後に反応混合物を氷冷温度で維持することにより、反応は数時間から数日、好ましくは1日程度で完了する。

得られた反応液から、所望の分子量を有するデキストランポリアルコールを分画し、次工程(B)の原料として用いることが望ましい。例えば、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。脱塩及び濃縮も限外濾過膜を用いて行うことができる。

工程(B)は、上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化して、重量平均分子量(プルラン標準)が240,000~480,000のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程である。デキストランポリアルコールのカルボキシメチル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸などのハロゲン化酢酸又はその塩、好ましくはモノクロル酢酸のナトリウム塩を反応させて、デキストランポリアルコールの水酸基を部分的にカルボキシメチル化することにより行うことができる。例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に溶解し、塩基(例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等)の存在下に、ハロゲン化酢酸又はハロゲン化酢酸の塩を添加し、氷冷下ないし100℃の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。好ましくは、20℃で数時間から1日程度反応させることができる。反応後、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子

量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて限外濾過膜を用いた脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、カルボキシメチル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化酢酸又はその塩の添加量等によりある程度の制御が可能であるが、本発明の方法では、より厳密にカルボキシメチル化の程度を0.14~0.47又は0.23~0.47の範囲内になるように制御するため、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴としている。

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) は、通常、内径100 μ m以下の熔融シリカ製のキャピラリー内で電気泳動を行う方法である (例えば、馬場嘉信、ぶんせき、342, 1995などを参照のこと)。キャピラリー電気泳動には、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)、導電クロマトグラフィー (EKC)、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) など数種の分離モードが提案されているが、本発明の方法にはこれらの分離モードのいずれを用いてもよい。好ましくは、キャピラリーゾーン電気泳動を用いることができ、キャピラリー内にリン酸、クエン酸、ホウ酸などの緩衝液を満たして分離を行うことができる。この方法により、単位分子量あたりの電荷を正確に測定することができ、上記反応液中の試料のカルボキシメチル化度を短時間に、かつ高感度に測定できる。その方法の詳細を本明細書の実施例に具体的に示したので、当業者は、上記の刊行物の一般的な説明及びその他の刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例に記載された具体的方法に従って、必要に応じてそれらを適宜修飾ないし改変することにより、カルボキシメチル化の反応終点 (カルボキシメチル化度が0.14~0.47又は0.23~0.47の範囲) を容易かつ正確に確認することが可能である。

すでに説明したとおり、キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を採用することができる。検量線は、例えば分解法又はN

MR法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法とNMR法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、NMR法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて0.09程度低くなる傾向がある。従って、NMR法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が0.14~0.38の範囲であることが望ましい。

工程(C)は、(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基を、スペーサーとして利用するオリゴペプチドのC末端カルボキシル基 (1個のアミノ酸を用いる場合には α -カルボキシル基) と縮合する工程である。スペーサーとして利用する上記オリゴペプチド又はアミノ酸は、この反応に供するためにそれぞれN末端アミノ基又は α -アミノ基をtert-ブトキシカルボニル基で保護しておく必要があるが、その手段は当業者に周知かつ慣用されている。

本発明の方法では、上記の縮合反応を行うにあたり、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EPCI)又はその塩、好ましくは1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のようなN, N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、反応操作を簡略化でき、反応時間も大幅に短縮できる。より具体的には、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間もDCCを用いた場合の約1/5程度に短縮可能である。基質濃度もDCCを用いる場合に比べて約5倍増加させることができる。特に、工業化を志向した大量合成系において、試薬削減、時間短縮等により大幅なコストダウンを図ることが可能である。

上記反応は、縮合剤としてEPCI又はその塩を用いる以外は、通常の縮合剤

を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。上記医薬化合物に対して *tert*-ブトキシカルボニル化アミノ酸又は *tert*-ブトキシカルボニル化オリゴペプチドを 1~1.5 当量程度用い、ジメチルホルムアミドなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から 1 日程度、好ましくは室温下に 3 時間程度で終了する。反応液中の医薬化合物の濃度は特に限定されないが、通常は 1 リットルあたり 50~200 グラム程度、好ましくは 1 リットルあたり 100~150 グラム程度である。

工程 (D) は、上記工程 (C) で得られた縮合体から *tert*-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程 (B) で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程である。*tert*-ブトキシカルボニル基を除去する方法は当業者に周知かつ慣用されているが、例えば、トリフルオロ酢酸で処理する方法が好ましい。脱保護体を精製する場合には、例えば、イソプロピルエーテルなどによる洗浄を行うことができる。

本発明の方法では、医薬化合物が結合したスペーサーの N 末端アミノ基 (1 個のアミノ酸をスペーサーとして用いる場合には α -アミノ酸) とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを結合させるにあたり、縮合剤として 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EPC I) 又はその塩、好ましくは 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) のような N, N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間も大幅な短縮が可能であることから、工業化を志向した大量合成系において大幅なコストダウンを図ることが可能である。上記反応の終点は、HPLC により決定するとよい。

上記反応は、縮合剤として EPC I を用いる以外は、通常の縮合剤を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。カルボキシメチルデキストランポリアルコール 1 重量部に対して医薬化合物を結合したアミノ酸又

はオリゴペプチドを0.1～0.2重量部程度用い、含水メタノールなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から1日程度、好ましくは室温下に2～3時間程度で終了する。

なお、本発明の方法の具体例が本明細書の実施例に示されているので、当業者は、上記の一般的な説明及び実施例の具体的説明を参照しつつ、必要に応じて適宜の修飾ないし改変を加えて、本発明の方法を行うことができる。また、反応温度や反応時間、試薬の濃度などは当業者が本発明の範囲内で適宜選択可能であることは言うまでもない。

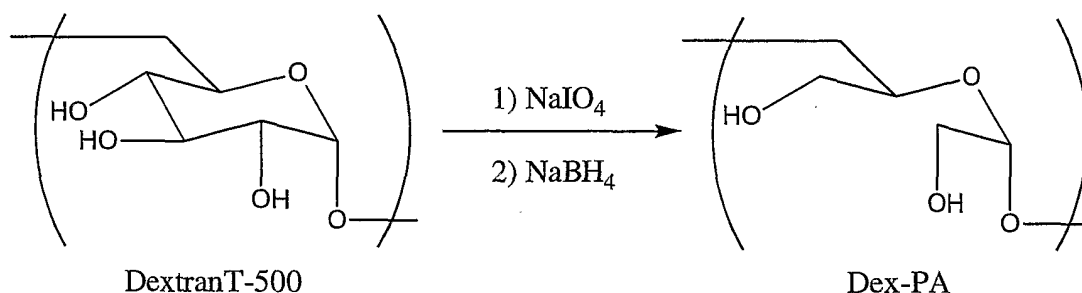
本発明のDDS化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として、腫瘍治療のための医薬として臨床に提供される。本発明のDDS化合物の腫瘍治療のための医薬としての使用に関して国際公開WO 97/46260号の開示を参照として本明細書の開示に含める。もっとも、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはなく、上記医薬の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は一日あたり体表面積1m²につき約0.1～100mg程度、好ましくは約1～30mgの範囲で非経口的に一回投与し、3～4週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。なお、実施例中、(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを「医薬化合物A」と呼ぶ場合があり、「Gly-Gly-Phе-Gly」はグリシル-グリシル-フェニルアラニル-グリシン又はその残基を意味する。また、試験例にお

いて用いたDDS化合物は、上記の医薬化合物とカルボキシメチルデキストランポリアルコールとがテトラペプチドスペーサー (G l y - G l y - P h e - G l y) を介して結合したDDS化合物であり、異なるカルボキシメチル化度及び分子量の異なる高分子キャリアーを有するように調製した。

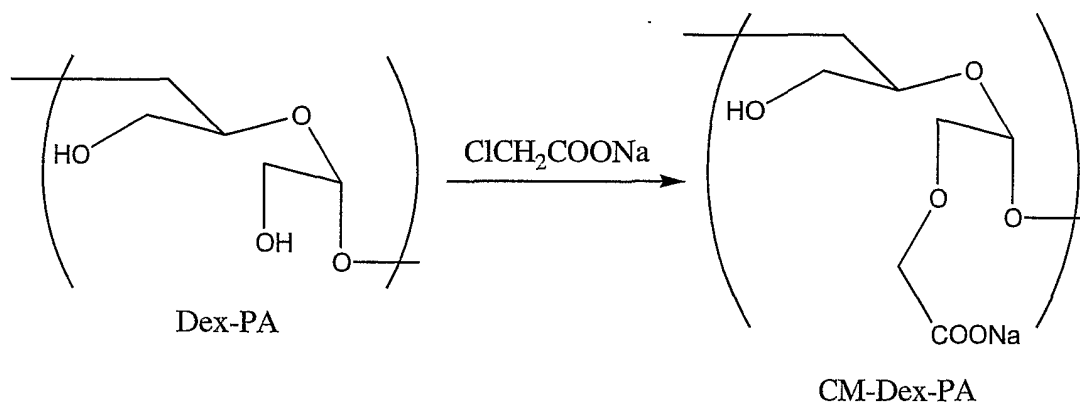
例1：デキストランポリアルコール (D e x - P A) の合成



デキストラン-T500 (ファルマシア社製、300g) をpH 5.5に調整した0.2M酢酸緩衝液(15l)、NaIO₄(990g)を純水(15l)に溶解し、低温室(約4℃)で一晩放置した。翌日、デキストラン-T500の溶液(3.5℃)にNaIO₄溶液(3.5℃)を温度上昇(7.0℃以下)が起らないように徐々に注ぎ、注入後そのまま低温室で攪拌(100rpm)した。10日間攪拌後、エチレングリコール(210ml)を加えて2時間攪拌して過酸の消失をPeroxid試験紙で確認した後、10%NaOHを用いて反応液をpH6.5に調整した。続いて、この反応液を氷冷下でNaBH₄溶液(420g、12l)に滴下した。この時、系内温度が15℃を超えないようにし、3時間かけて滴下した。その後、反応混合物を低温室で一晩攪拌し、翌日、酢酸によりpH5.5に調整した後、さらに1時間攪拌して10%NaOHでpHを7.0とした。得られた反応液をポール・フィルトロンの限外濾過膜(1000k)で処理して、微粒子及び高分子画分の除去を行った。さらにミリポアの限外濾過膜(50k)で脱塩(純水90~100l程度を使用)及び濃縮を行い、HPLCでモニターしながら1997mlまで濃縮した。この一部(1ml×3)をサ

ンプリングし凍結乾燥した結果、60.1mgであったため、収量は120gと算出された。

例2：カルボキシメチルデキストランポリアルコール（CM-Dex-PA）の合成



(A) カルボキシメチルデキストランポリアルコール（CM-Dex-PA）の合成

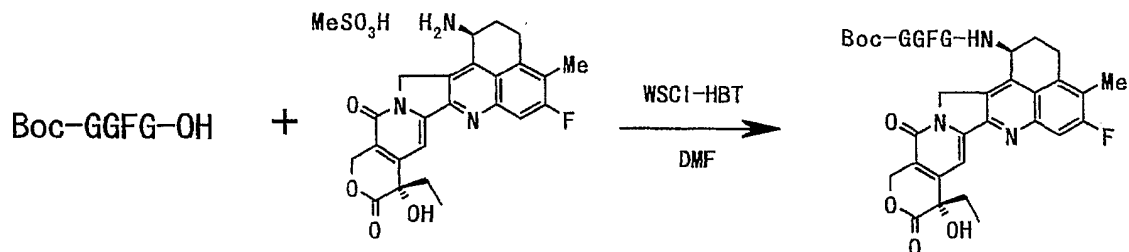
NaOH (193g) を純水 (1537ml) に溶解し、液温を25°Cに保ちつつデキストランポリアルコール水溶液を加え、系内温度を25°Cに保ちながら攪拌した。この混合物にモノクロ酢酸ナトリウムを徐々に加え、同温度で15時間攪拌した。反応の終点をキャピラリー電気泳動法にて確認後、酢酸でpH8.0程度に調整し、限外濾過を行った。最初に1000kの膜で高分子を排除し、次に50kの膜で低分子（試薬及び塩）を排除して濃縮した。その際、低分子の除去状況は随時HPLCで把握し、低分子がほぼ除去されたことを確認して限外濾過を終了した。カルボキシメチルデキストランポリアルコール溶液を3770mlまで濃縮し、その1mlを凍結乾燥したところ32.1mgであったため、収量は121gと算出された。

(B) キャピラリー電気泳動によるカルボキシメチル化度の測定—その1

キャピラリー電気泳動は、検出器としてフォトダイオードアレイ190nm—

300 nm (検出195 nm)、キャピラリーとしてヒューズドシリカ製内径75 μm、有効長500 mm、全長670 mmのものを用い、泳動液には20 mM 四ホウ酸ナトリウム水溶液を用いた。試料は0.02%アジ化ナトリウム水溶液で2 mg/mlに調製した。試料として反応時間19時間、19.5時間、及び20時間の3ロットを用いた。検量線は、分解法によりカルボキシメチル化度が0.22、0.42、及び0.62と確認された3種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて作成した。それぞれの保持時間(分)は4.496、5.442、及び6.600であった。試料の保持時間(分)は5.325、5.400、及び5.446であった。この結果から、それぞれの試料のカルボキシメチル化度は0.38、0.40、及び0.41と求められた。

例3：tert-ブトキシカルボニル(Boc)-Gly-Gly-Phe-Gly-医薬化合物Aの合成

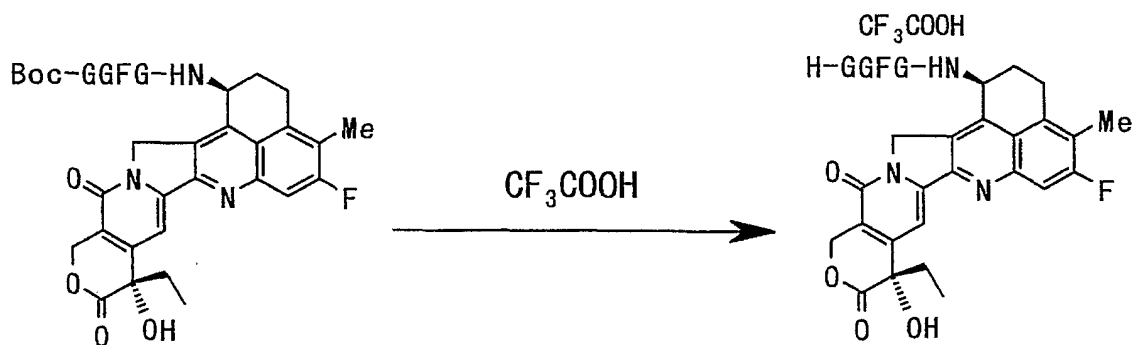


医薬化合物A・メタンスルホン酸塩(80 g)とtert-ブトキシカルボニル-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(68 g)をN,N-ジメチルホルムアミド(1200 ml)に懸濁した。氷冷攪拌下、トリエチルアミン(48 ml)、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EPCI·HCl、29.6 g)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HBT、20.8 g)を加え、室温で攪拌した。反応の終点をHPLCで確認後、氷冷攪拌下、反応液に水(800 ml)を内温が20℃以下に保たれるよう30分間で滴下し、

結晶を析出させた。その後、さらに水（1200 ml）を滴下した。つぎに、酢酸により溶液の pH を 7 に調整した。析出した固体を濾過し水洗し、得られた結晶を減圧下乾燥して表題の化合物（120.4 g、定量的）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm) : 0.97 (3H, m), 1.11 (2H, d, $J=6.3\text{ Hz}$), 1.41 (9H, s), 1.91 (2H, m), 2.05 (1H, m), 2.33 (4H, m), 2.95–3.10 (4H, m), 3.58–3.72 (2H, m), 3.8 (1H, m), 4.03 (1H, m), 4.34 (1H, m), 4.74 (1H, m), 5.13 (1H, m), 5.33 (1H, m), 5.58 (2H, m), 7.18 (5H, m), 7.49 (2H, m)

例 4 : H-G l y - G l y - P h e - G l y - 医薬化合物 A ・トリフルオロ酢酸塩の合成

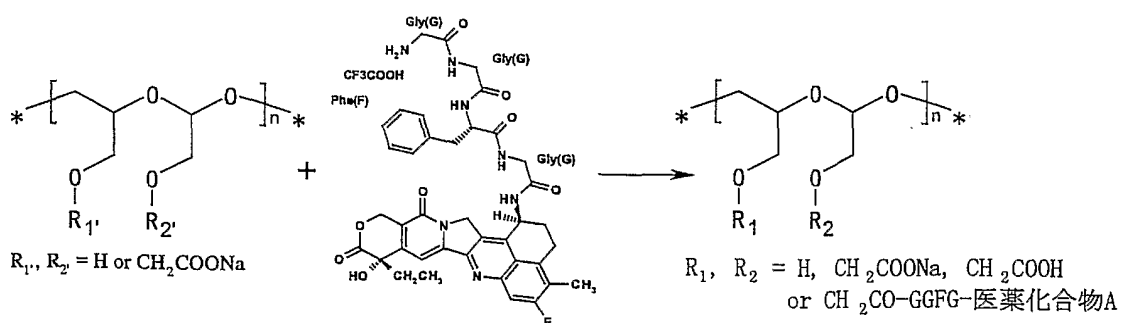


上記の例 3 で得た tert-ブトキシカルボニル-G l y - G l y - P h e - G l y - 医薬化合物 A (120 g) にトリフルオロ酢酸 (360 ml) を氷冷下滴下した。tert-ブトキシカルボニル-G l y - G l y - P h e - G l y - 医薬化合物 A を完全に溶解した後、HPLC で脱 tert-ブトキシカルボニル反応の終了を確認した。この反応液にメタノール (360 ml) 及びイソプロピルエーテル (720 ml) を内温が 0°C ~ 15°C の間となるように滴下した。析出した結晶を濾取して酢酸エチル (500 ml) で 3 回洗浄し、得られた結晶

を、内温 50℃以下で 20%含水メタノール (400 ml) に溶解し、その後、酢酸エチル (400 ml) 次いでイソプロピルエーテル (800 ml) を加えて再結晶した。この結晶を濾取して含水メタノール (400 ml) に溶解し、活性炭 (4.4 g) を加えて脱色処理を行なった。上記溶液を濾過し、濾液に酢酸エチル (400 ml)、次いでイソプロピルエーテル (800 ml) を 55℃以下で加えて再結晶した。濾過した結晶を減圧下乾燥し、H-Gly-Gly-Phe-Gly-医薬化合物A (111.8 g、医薬化合物Aから換算して 90%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆/TMS) δ (ppm) : 0.87 (3H, m), 1.87 (2H, m), 2.17 (2H, m), 2.37 (3H, m), 2.74 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.16 (1H, m), 3.58 (2H, s), 3.65-3.91 (4H, m), 4.48 (1H, m), 5.2 (2H, s), 5.39 (2H, m), 5.58 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.21 (5H, m), 7.75 (1H, d, J=10.9 Hz), 8.06 (2H, s), 8.28 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.49 (1H, m), 8.52 (1H, m)

例 5 : 本発明の DDS 化合物の合成



カルボキシメチルデキストランポリアルコール (800 g) を含む水溶液にカ

ルボキシメチルデキストランポリアルコール水溶液分と合わせて321となるように純水を加え、さらにメタノール(601)を加えた。この混合液に例4で得たH-Gly-Gly-Phe-Gly-医薬化合物A(133g)とヒドロキシベンゾトリアゾール(23.4g)を溶解した20%含水メタノール(41)を添加した。1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(33.1g)を加え、1N NaOHにてpHを6.8~7.2に調整した。この混合物を室温(23°C±5°C)で、2~3時間反応させた。さらに1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(8.1g)を添加し、1N HClにてpHを6.8~7.2に調整し、引続き2~3時間程度反応させた。さらに1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(5.6g)を添加し、1N HClにてpHを6.8~7.2に調整し、引続き1時間程度反応させた。反応終了後、1N NaOHにて反応液のpHを8.7~9.2に調整し、10°C以下で保存した。その後、限外濾過膜(50k)にて溶液を脱塩及び濃縮した。次にメンブランフィルターで精密濾過し、得られた溶液を凍結乾燥し、本発明のDDS化合物(880g)を得た。

例6:デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響(酸化反応)

基質濃度1%、20gスケールで例1に従いデキストランの酸化反応を行った。反応温度を4、8、12、15°Cに設定し、反応時間を変化させた時の生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表1に示すように、反応温度12°C及び15°Cの場合には、6日目には低分子化による明らかな保持時間の遅れが確認された。8°Cにおいても、10日目には、明らかな保持時間の遅れが確認できた。

表 1

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4°C	10.46分	10.44分	10.53分
8°C	10.52分	10.63分	10.83分
12°C	10.45分	10.63分	—
15°C	10.59分	10.92分	—

例 7 : デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響 (酸化反応)

例 6 の結果に基づき、さらに温度範囲を細かく設定 (4°C、1°C、6.5°C) して同様の実験を行った。表 2 に示すように、すべての温度範囲において、低分子化が起こることなく反応は進行したが、1°C で反応させた場合には、反応系中の塩の析出が多くなった。以上の結果から、この反応の温度の安全域は 2~6°C と判断された。

表 2

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4°C	10.40分	10.39分	10.49分
1°C	10.42分	10.39分	10.45分
6.5°C	10.40分	10.36分	10.39分

例 8 : デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響 (還元反応)

例 1 に従い、デキストランの酸化反応に引き続く還元反応を行った。反応温度を 10、15、20、30°C に設定し、12~24 時間反応させた後、生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表 3 に示すように、反応温度が 15°C を超えると明らかな低分子化が認められた。

表 3

反応温度	ゲル濾過クロマトグラフィーによる判定
10℃	低分子化なし
15℃	若干の低分子化
20℃	低分子化
30℃	顕著な低分子化

例 9 : カルボキシメチル化度の測定方法の違いによる DDS 化合物のカルボキシメチル化度の測定値変動

3 種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて分解法及び NMR 法により検量線を作成した。この検量線を用いて例 2 (B) と同様にして、DDS 化合物 (3 ロット) のカルボキシメチル化度を測定した。結果を以下に示す。NMR で求めた検量線を用いると、いずれのロットについてもカルボキシメチル化度の測定値が分解法で求めた場合よりも 0.09 減少していた。

表 4 標準物質 (カルボキシメチルデキストランポリアルコール) のカルボキシメチル化度

	標準物質 No. 1	標準物質 No. 2	標準物質 No. 3
分解法	0.333	0.439	0.584
NMR 法	0.248	0.360	0.523

表 5 DDS 化合物のカルボキシメチル化度

	ロット 1	ロット 2	ロット 3
分解法	0.36	0.37	0.37
NMR 法	0.27	0.28	0.28
差異	$\Delta 0.09$	$\Delta 0.09$	$\Delta 0.09$

以下、試験例を示すが、試験例中に示したカルボキシメチル化度は分解法により求めた値である。

試験例 1

(A) 方法

動物は6週齢の雄のBALB/cマウス(日本SLC株式会社)を市販の飼料及び水を自由に摂取させ、1週間の馴化後に試験に供した。腫瘍細胞はマウス腫瘍細胞Meth A線維肉腫を同系マウスであるBALB/cの腹腔内にて1週間毎に継代維持した。エンドトキシン濃度50 pg/ml以下のハンクス培地(HBSS、Gibco-BRL)を用いてマウスの腹腔内より腫瘍細胞を採取し、数回の遠心操作(約600 rpm、5-10分、4℃)で洗浄した後、HBSS培地に浮遊して $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ /マウスの割合でマウスの腹腔内に移植した。

抗腫瘍試験では、Meth A細胞を $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ /マウスの割合でマウスの右鼠径部に皮下移植し(day 0)、移植後7又は12日にノギスで測定した腫瘍の長径(L)及び短径(W)から算出した推定腫瘍重量($ETW = L \times W^2 / 2 \text{ mg}$)の群平均が約100 mgになるようにマウスを6又は7匹に群分けし、検体を単回あるいは4日毎4回の用法で静脈内投与した。マウスを腫瘍移植後21日又は26日に頸椎脱臼により屠殺し、腫瘍を摘出してその重量を測定した。腫瘍増殖抑制効果(IR)は、 $IR = (1 - TW_t / TW_c) \times 100$ (%)の式を用いて腫瘍重量値から算出した(TW_t、TW_cはそれぞれ検体投与群及び対照群の平均腫瘍重量)。IRが58%以上の場合に抗腫瘍効果を有効と判断した。対照群と検体投与群の腫瘍重量の有意差検定はダネット法により行った。

さらに、検体の副作用の強さを評価するために、体重減少率(BWL)及び使用マウス数に対する毒性死したマウス数との比(D/U)を毒性パラメーターとして設定した。BWLは $BWL = (1 - BW_n / BW_s) \times 100$ (%)の式を

用い、投与開始時におけるマウスの平均体重 (BW_s) 及び n 日目のマウスの平均体重 (BW_n) より算出した。この BWL の最大値を BWL_{max} とした。ただし、投与開始日に比較し体重減少が認められない場合は BWL_{max} を 0 以下 (< 0) として示した。なお、検体は日本薬局方注射用生理食塩水に溶解し、投与液量 10 又は 20 ml / kg にて静脈内投与した。

(B) 結果

カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 48,000~457,000 である DDS 化合物 (カルボキシメチル化度 0.37~0.46、薬物導入量 4.6~6.4 重量%) について単回投与での試験を行ったところ、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 200,000~300,000 では、低用量で安定して 58% 以上の有意な抗腫瘍効果が確認されたが、分子量が 200,000 未満では最小有効量が増大した。また、分子量が 50,000 未満の場合には、毒性及び抗腫瘍効果が減弱し、尿排泄を受けているものと考えられた。したがってカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 200,000 以上であれば、低用量でも安定した抗腫瘍効果を得ることができる結論された。一方、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 500,000 を超えると、粘性のために物理的傷害に対する安定性が悪いなどの問題が生じた。これらの結果から、DDS 化合物におけるカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量は 50,000~500,000 の範囲であることが必要であり、所望の抗腫瘍効果を達成し、かつ安定な製品を製造するためにはカルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240,000~480,000 の範囲であることが望ましいと結論された。

試験例 2

7 週齢の BALB/c 系雄マウス 69 匹 (日本エスエルシー株式会社) を 1 週間馴化し、1 群 5 匹としてカルボキシメチル化度の異なる DDS 化合物 (薬物導

入量 5.3～6.3 重量%、分子量 270,000～330,000) を投与した。投与時の平均体重は 21.1 から 25.4 g であった。動物は、室温 (23 ± 2℃)、湿度 (55 ± 20%)、照明時間 12 時間 (8:00～20:00) に設定された室内でアルミ製ケージに 5 匹ずつ収容し、市販の固形飼料 (F2、船橋農場製) 及び塩素添加上水道水を自由に摂取させて飼育した。DDS 化合物は日本薬局方生理食塩水に溶解し、1.02～1.36 mg/ml の濃度として 1 ml/kg の液量で尾静脈内に投与した。

動物の症状を 1 日 1 回、投与日を含めて 15 日間観察し、投与前並びに投与後 3、7、10、及び 14 日に体重を測定した。死亡例は死亡発見後速やかに剖検し、生存例は投与後 14 日にエーテル麻酔下に腹大動脈切断により放血屠殺し、全身諸臓器を肉眼的に観察した。体重データは群平均値 ± 標準偏差を算出し、その後、有意水準 5% で統計学的解析を行った。その結果、カルボキシメチル化度が 0.38、0.43、及び 0.47 の DDS 化合物の最大耐用量 (MTD) はそれぞれ 11.7、11.7、及び 10.3 mg/kg であり、カルボキシメチル化度が 0.43 を上回ると毒性が強くなる傾向が示唆された。また、カルボキシメチル化度が 0.53 の DDS 化合物を用いて同様に毒性を評価したところ、10 mg/kg 投与群で 6 匹中 3 匹が死亡し、体重減少及び致死毒性が顕著に増強された。一方、カルボキシメチル化度が 0.23 の DDS 化合物の MTD はカルボキシメチル化度が 0.38 の DDS 化合物と同等であった。従って、安全性の面から DDS 化合物のカルボキシメチル化度は 0.23～0.47 の範囲が好ましいと結論された。

試験例 3

上記試験例 2 と同様にして、医薬化合物残基の導入量が 3.2～15 重量% の DDS 化合物 (カルボキシメチル化度 0.37～0.40、分子量 260,000～320,000) について抗腫瘍試験を実施した。この結果、1.25 mg/kg 投与群では導入率 3.2～7.3 重量% の範囲で IR 80% 以上と薬効が

認められたものの、導入率が8.4重量%を上回ると(～15%の範囲まで)薬効がこれらよりも明らかに低下する傾向が認められた。また、導入率8.4重量%を上回る場合には、2.5又は5mg/kg投与群において他の複合体と同等の薬効を示したものの、10mg/kg投与群において致死毒性の増強が認められた。これらの結果から、所望の抗腫瘍効果を達成し、安全性の高いDDS化合物を提供するためには、医薬化合物残基の導入量を3.2～8.4重量%の範囲とすることが望ましいと結論された。

産業上の利用可能性

本発明のDDS化合物は高い安全性と広い薬効域を有しており、抗腫瘍剤として臨床上極めて有用である。また、本発明の方法は、上記DDS化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適している。

請求の範囲

1. (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの 1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2 ~ 8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した DDS 化合物において、

(1) (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの残基の導入量が DDS 化合物全重量に対して 3.2 ~ 8.4 重量% の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240,000 ~ 480,000 の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が 0.23 ~ 0.47 の範囲である

ことを特徴とする DDS 化合物。

2. (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの 1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2 ~ 8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した DDS 化合物において、

(1) (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15

H) ージオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2～8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14～0.47の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物。

3. (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13 (9H, 15H) ージオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13 (9H, 15H) ージオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2～8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14～0.38の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物。

4. 上記(3)におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のDDS化合

物。

5. 上記(3)におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第1項に記載のDDS化合物。

6. 上記(3)におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第3項に記載のDDS化合物。

7. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物を含む抗腫瘍剤。

8. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) デキストランポリアルコールにモノクロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチド

のC末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

からなる群から選ばれる1以上の工程を含む方法。

9. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

(A) デキストランを含む水溶液に4°C±2°Cの温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を15°C以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) 上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15

H) ージオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシ基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシ基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) 上記工程(C)で得られた縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程を含む方法。

10. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.23~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

11. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

12. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14~0.38の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

13. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第10項ないし第12項のいずれか1項に記載のカルボキシメチルデキ

ストランポリアルコール。

14. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第10項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

15. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第12項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

16. 請求の範囲第10項ないし第15項のいずれか1項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であって、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

(B) 上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程を含む方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/46260 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., et al.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 916348 A	1-16

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 31 July, 2001 (31.07.01)	Date of mailing of the international search report 14 August, 2001 (14.08.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00</p>								
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00</p>								
<p>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</p>								
<p>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)</p> <p style="text-align: center;">CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)</p>								
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:65%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>WO 97/46260 A (第一製薬株式会社ほか) 11. 12 月. 1997 (11. 12. 97) & EP 916348 A</td> <td style="text-align: center;">1-16</td> </tr> </tbody> </table>			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	WO 97/46260 A (第一製薬株式会社ほか) 11. 12 月. 1997 (11. 12. 97) & EP 916348 A	1-16
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	WO 97/46260 A (第一製薬株式会社ほか) 11. 12 月. 1997 (11. 12. 97) & EP 916348 A	1-16						
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>								
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>				
<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>							
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">31. 07. 01</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14.08.01</p>							
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">内藤 伸一</p>	<p style="text-align: center;">4 P 8615</p> <p style="text-align: center;">電話番号 03-3581-1101 内線 3492</p>						