

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年7月7日(07.07.2022)



(10) 国際公開番号

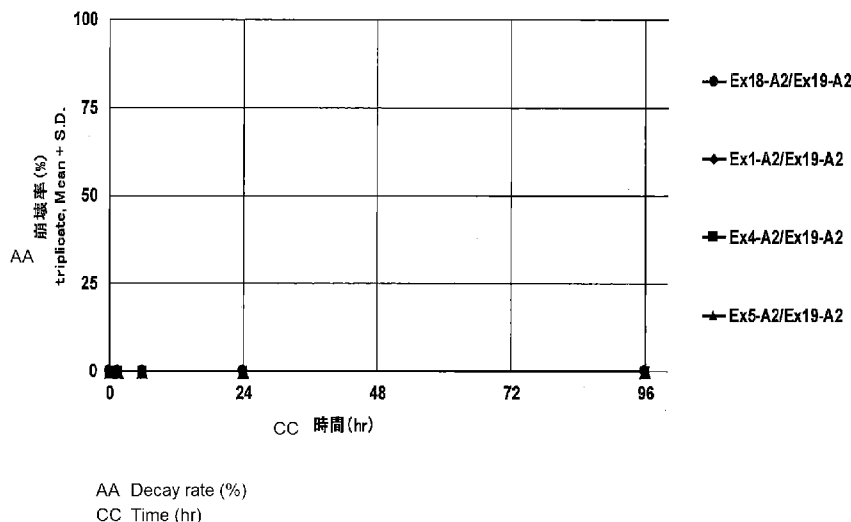
WO 2022/145419 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/44 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/048566
- (22) 国際出願日: 2021年12月27日(27.12.2021)
- (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 2020-219024 2020年12月28日(28.12.2020) JP
- (71) 出願人: 持田製薬株式会社(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 古迫 正司 (FURUSAKO Shoji); 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo (JP). 津田 直人(TSUDA Naoto); 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: MULTILAYER STRUCTURE USING CHEMICALLY CROSSLINKED ALGINIC ACID

(54) 発明の名称: 化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体

[図1]



(57) Abstract: There has been required a novel and practicable multilayer structure that has enhanced structure stability and, therefore, is improved in the enlargement of device size, easiness in processing, etc. A structure according to the present invention that comprises a core layer containing a pharmacological ingredient embedded in a chemically crosslinked alginic acid, a cationic polymer layer coating the core layer, and an anionic polymer layer coating the cationic polymer layer.

(57) 要約: 構造の安定性の向上によるデバイスの大型化や加工の容易性などが改善された、実用可能な新たな多層構造体が求められていた。化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層と、前記コア層を被覆するカチオン性ポリマー層と、前記カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマー層を含む構造体。



WO 2022/145419 A1

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体

技術分野

[0001] 本発明は、化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体に関する。より具体的には、細胞等の薬理成分を包埋した化学架橋アルギン酸を含むコア層と、前記コア層を被覆するカチオン性ポリマー層と、前記カチオン性ポリマー層を被覆する、アルギン酸、化学架橋アルギン酸等のアニオン性ポリマー層を含む構造体、およびその製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、ポリマービーズまたはポリマーカプセル内に封入した細胞等を体内に移植する技術が検討されている。例えば、移植に用いる細胞送達デバイスとして、アルギン酸を使用したマイクロカプセルが知られている。アルギン酸は、カルシウムイオンやバリウムイオンのような二価のイオン存在下で瞬時にゲル化することから、細胞をゲル内に封入するために用いられる。また、アルギン酸をカチオン性ポリマーであるポリ-L-リジン（PLL）やポリ-L-オルニチン（PLO）で被覆し、これをさらにアルギン酸で被覆した、アルギン酸／PLL又はPLO／アルギン酸の三層のアルギン酸カプセルが報告されている（例えば、非特許文献1、特許文献1）。

[0003] 非特許文献2には、三層のアルギン酸カプセルにおいて、最外層のアルギン酸が生体内で分解され、PLLが露出することにより、免疫反応を引き起こし得ることが記載されている。また、非特許文献2には、PLLの代わりにPLOで被覆されたアルギン酸カプセルの物理的特性を、PLLを使用した場合と比較した実験結果が開示されている。当該文献によれば、PLOで被覆されたアルギン酸カプセルは、PLLで被覆されたものよりも物理的強度が高く、透過選択性がより優れているとされている。非特許文献3には、PLOで被覆されたアルギン酸カプセルはPLLで被覆されたものより線維化の程度が低いことが記載されている。

[0004] このような状況の下、更に化学的に構造修飾を施した材料を用いた3層構造を有するアルギン酸カプセルが種々開発されている（例えば、特許文献2～6）。

化学的に架橋を施したアルギン酸として、例えば、Huisgen反応を用いたもの（特許文献7及び本願優先権の基礎とする出願後に公開された特許文献9）、光架橋反応を用いたものが報告されている（特許文献8）。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2001/052871号パンフレット
特許文献2：国際公開第2014/171842号パンフレット
特許文献3：国際公開第2018/151186号パンフレット
特許文献4：国際公開第98/049202号パンフレット
特許文献5：中国公開公報第105078923号
特許文献6：国際公開第2010/139061号パンフレット
特許文献7：国際公開第2019/240219号パンフレット
特許文献8：国際公開第2019/168058号パンフレット
特許文献9：国際公開第2021/125255号パンフレット

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：薬学雑誌，125巻，8号，p. 601-615，2005
非特許文献2：Biomaterials，Vol. 26，No. 34，6846-52，2005
非特許文献3：American Diabetes Association 60th Scientific Sessions，2000，Abstract，No. 448-P

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] アルギン酸をコア層に用いた従来の多層構造体では、その構造安定性の面

から、その用途がマイクロカプセル等への応用に限られていた。構造の安定性の向上によるデバイスの大型化や加工の容易性などが改善された、実用可能な新たな多層構造体が求められていた。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、以下の(1)～(7)のことを見出し、これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

(1) 化学架橋アルギン酸を用いて作製されたコア層をカチオン性ポリマー層で被覆し、さらに、アルギン酸や化学架橋アルギン酸などのアニオン性ポリマー層により被覆した構造体(以下、本発明の構造体と略す)が、コア層としてアルギン酸を使用した同様の構造体(以下、従来の構造体と略す)と比較して、2価金属イオンによるアルギン酸の分子間架橋が無い条件下でも高い物理的強度を示したこと。

(2) 本発明の構造体は、例えば、ビーズの形状として作製した場合、従来の構造体と比較してより大きなサイズのものを作製可能であること。

(3) 本発明の構造体は高い安定性を備えているため、例えば、平板やファイバーといった、大型で自由な形状の構造体の作製も可能であり、また、これらの構造体は長時間にわたり構造安定性を維持しうること。

(4) コア層に細胞を封入した本発明の構造体が実際に作製可能であり、本発明の構造体中、細胞が長時間にわたり生存することが可能であること。

(5) したがって、本発明の構造体は、その安定なコア層に細胞等を入れて保存あるいは培養するなど、広範な用途に使用可能であること。

(6) 膵β細胞由来の細胞をコア層に封入した場合、構造体を維持したまま長時間にわたりインシュリンを分泌したことから、膵島や細胞移植用デバイス細胞の移植等にも利用可能であること。

(7) 本発明の構造体は、カチオン性ポリマーを被覆する層として化学修飾アルギン酸またはアルギン酸を使用することから、生体内での使用に適し、また、前記(1)～(6)の記載の構造特性を具備しているため、細胞移植のみならず、様々な生体内での利用に応用可能であること。

なお、後述する式（H B - 1）又は式（H B - 1 1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られる化学架橋アルギン酸は、従来知られていなかった。

[0009] 本発明の例示的な態様は、以下の [1] ~ [13-9] の通りである。

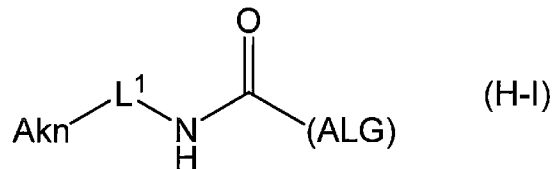
[0010] [1] 化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層と、前記コア層を被覆するカチオン性ポリマー層と、前記カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマーを含む構造体。

[0011] [2] 前記化学架橋アルギン酸が、式（H - 1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体及び式（H - 1 1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、前記両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られるものである、[1]に記載の構造体：

[式（H - 1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式（H - 1）：

[化1]

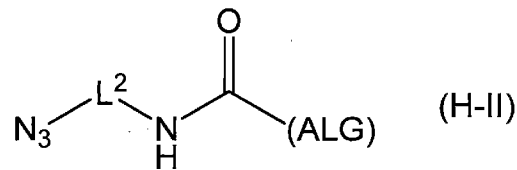


[式（H - 1）中、（ALG）は、アルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-は、環状アルキル基（Akn）と結合する2価のリンカーである]で表わされる化学修飾アルギン酸；

[式（H - 1 1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式（H - 1 1）：

[化2]



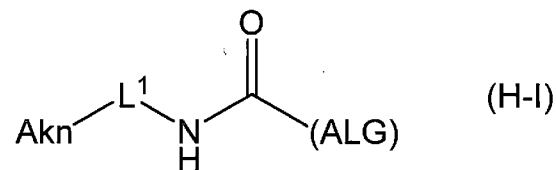
[式 (H-I-I) 中、(ALG) はアルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L²-は、アジド基と結合する2価のリンカーである] で表わされる化学修飾アルギン酸。

[0012] [2-1] 前記化学架橋アルギン酸が、式 (H-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体及び式 (H-I-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、前記両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られるものである、[1] 又は [2] に記載の構造体：

[式 (H-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

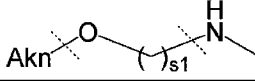
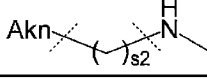
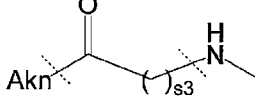
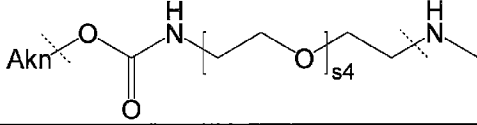
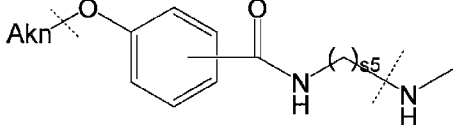
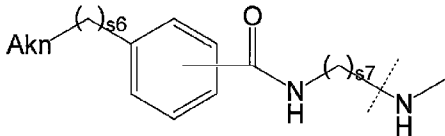
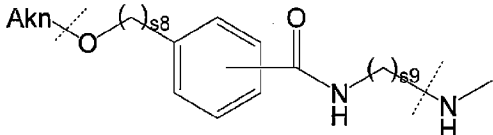
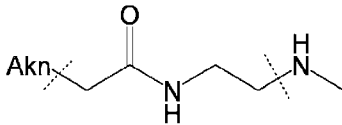
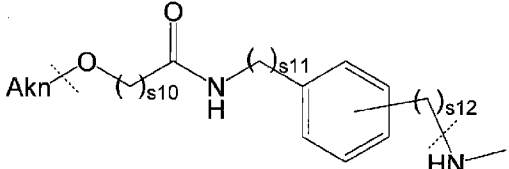
下記式 (H-I)：

[化3]

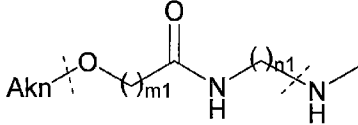
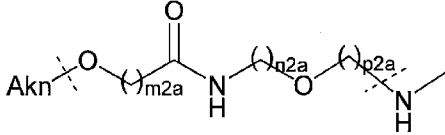
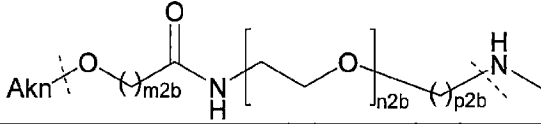
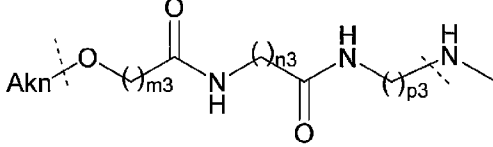
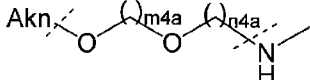
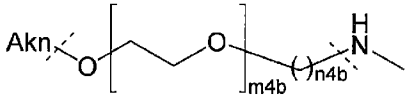
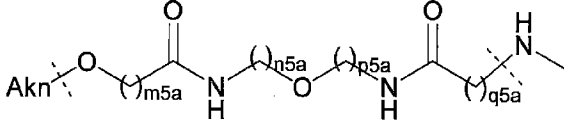
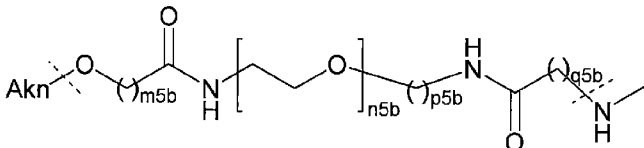
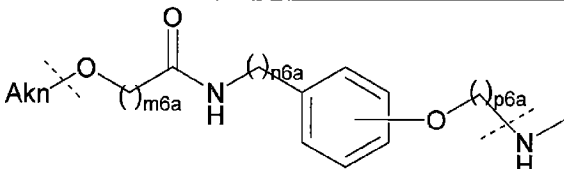


[式 (H-I) 中、(ALG) は、アルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-は、下記表：

[表1-1]

No.	-L ¹ -	
(LN-1)		s1=2-6
(LN-2)		s2=2-6
(LN-3)		s3=2-6
(LN-4)		s4=1-6
(LN-5)		s5=2-6
(LN-6)		s6=1-6 s7=2-6
(LN-7)		s8=1-6 s9=2-6
(LN-8)		
(LN-9)		s10=1-6 s11=0-6 s12=1-6

[表1-2]

No.	-L ¹ -	
(L1-1)		m1=1-6 n1=2-6
(L1-2a)		m2a=1-6 n2a=2-6 p2a=2-6
(L1-2b)		m2b=1-6 n2b=1-6 p2b=2-6
(L1-3)		m3=1-6 n3=1-6 p3=2-6
(L1-4a)		m4a=2-6 n4a=2-6
(L1-4b)		m4b=0-6 n4b=2-6
(L1-5a)		m5a=1-6 n5a=2-6 p5a=2-6 q5a=1-6
(L1-5b)		m5b=1-6 n5b=1-6 p5b=2-6 q5b=1-6
(L1-6a)		m6a=1-6 n6a=0-6 p6a=2-6

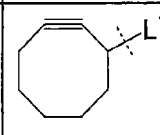
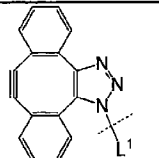
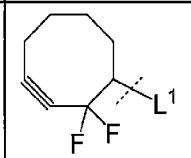
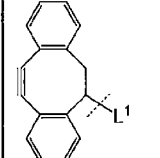
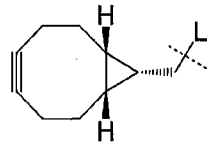
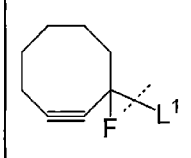
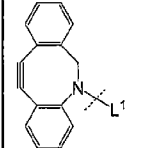
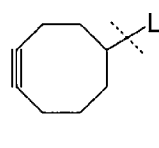
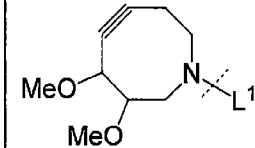
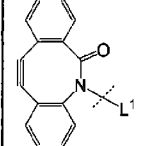
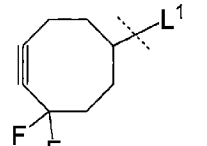
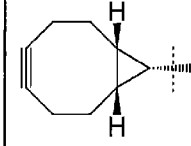
[表1-3]

(L1-6b)		m6b=1-6 n6b=1-6 p6b=2-6
(L1-7)		m7=1-6 n7=1-6
(L1-8a)		m8a=2-6 n8a=1-6 R ¹ =H, Me, Et, Bn
(L1-8b)		m8b=1-6 n8b=1-6 R ¹ =H, Me, Et, Bn
(L1-9a)		m9a=1-6 n9a=2-6 p9a=2-6
(L1-9b)		m9b=1-6 n9b=1-6 p9b=2-6
(L1-10)		m10=1-6 n10=2-6 p10=1-6 R ² =H, Me, Et, Bn

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるリンカーを表わし；

Aknは、下記表：

[表2]

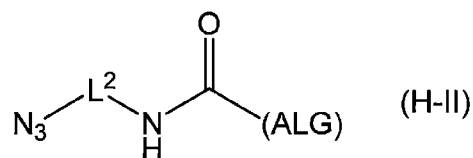
No.	A k n	No.	A k n	No.	A k n
(AK-1)		(AK-5)		(AK-9)	
(AK-2)		(AK-6)		(AK-10)	
(AK-3)		(AK-7)		(AK-11)	
(AK-4)		(AK-8)		(AK-12)	

に記載された部分構造式 [各式中、破線右側は含まない] からなる群より選択される環状アルキン基表わす] で表される化学修飾アルギン酸誘導体；

[式 (H-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

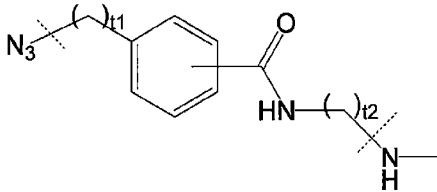
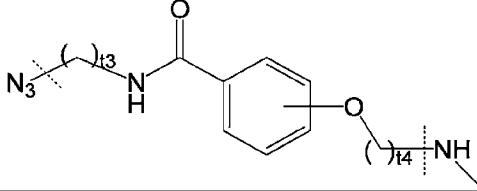
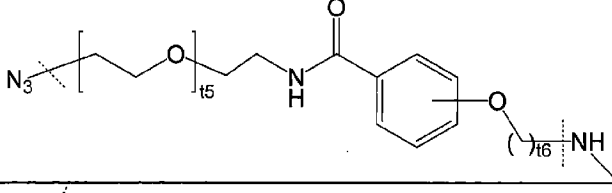
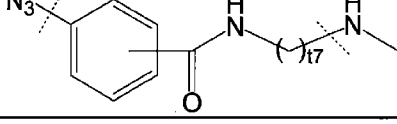
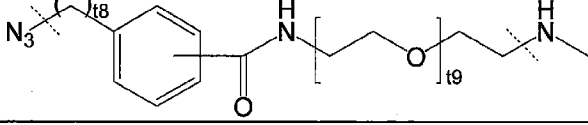
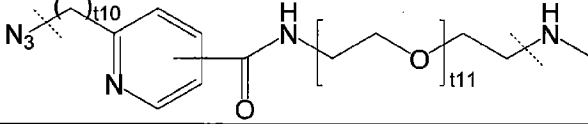
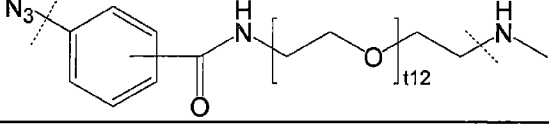
下記式 (H-11) :

[化4]



(式 (H-11) 中、(ALG) はアルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L²-は、下記表：

[表3-1]

No.	-L ² -	
(LK-1)		t1=1-6 t2=2-6
(LK-2)		t3=2-6 t4=2-6
(LK-3)		t5=1-6 t6=2-6
(LK-4)		t7=2-6
(LK-5)		t8=1-6 t9=1-6
(LK-6)		t10=1-6 t11=1-6
(LK-7)		t12=1-6

[表3-2]

No.	-L ² -	
(L2-1)		x1=2-6
(L2-2a)		x2=2-6 x2a=2-6 y2a=2-6
(L2-2b)		x2b=1-6 y2b=2-6
(L2-3)		x3=2-6 y3=1-6
(L2-4)		x4=1-6 y4=1-6 z4=1-6
(L2-5a)		x5a=0-4 y5a=2-6
(L2-5b)		x5b=0-4 y5b=1-6
(L2-6a)		x6a=1-6 y6a=2-6 z6a=2-6 v6a=1-6
(L2-6b)		x6b=1-6 y6b=1-6 z6b=2-6 v6b=1-6
(L2-7a)		x7a=1-6 y7a=1-6 z7a=2-6
(L2-7b)		x7b=1-6 y7b=1-6 z7b=1-6

[表3-3]

No.	-L ² -	
(L2-8a)		x8a=0-4 y8a=2-6 z8a=3-6
(L2-8b)		x8b=0-4 y8b=1-6 z8b=3-6
(L2-9a)		x9a=0-4 y9a=2-6 z9a=1-6
(L2-9b)		x9b=0-4 y9b=1-6 z9b=1-6

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるリンカーを表わす)で表される化学修飾アルギン酸誘導体。

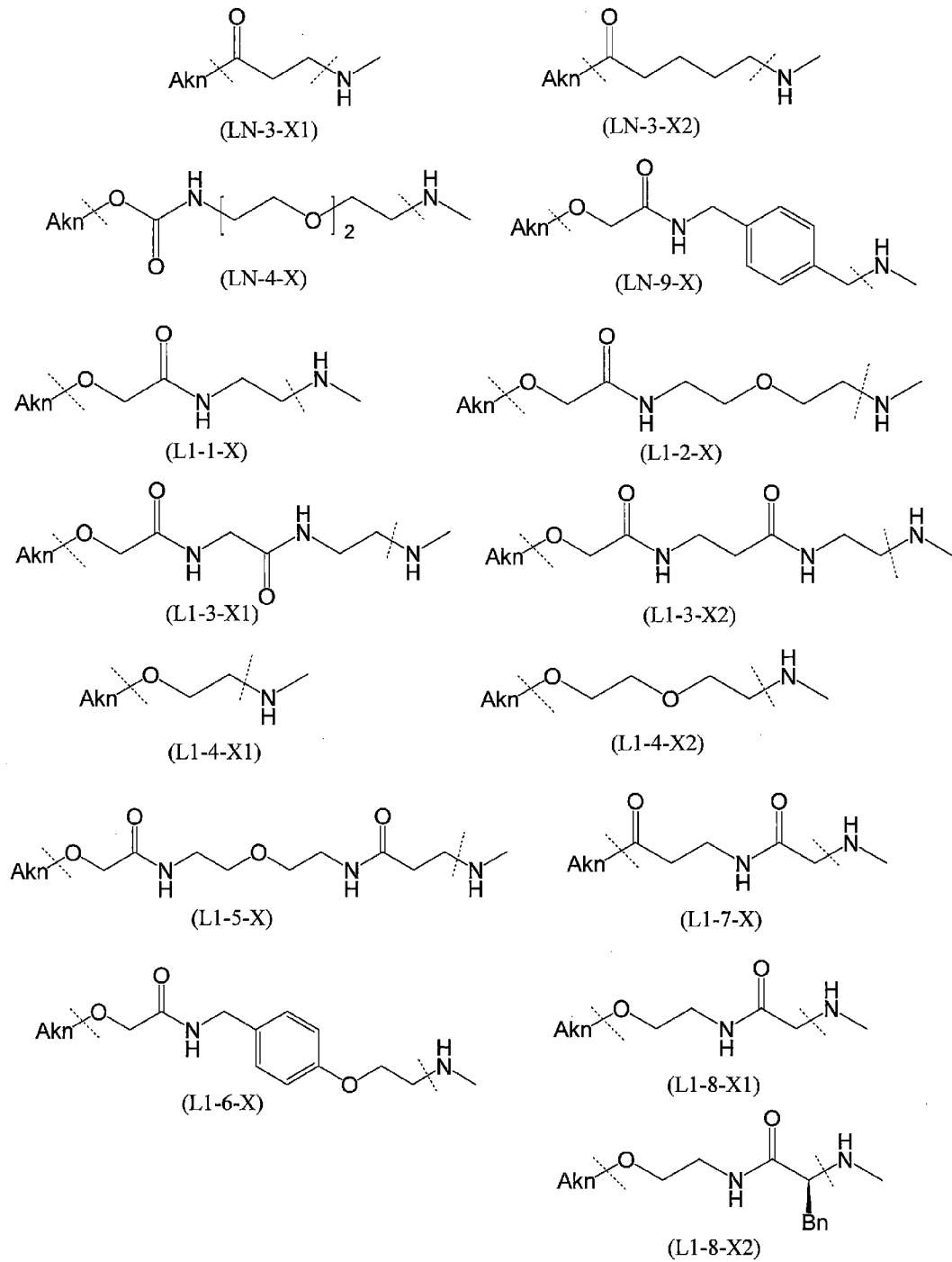
[0013] [2-2] 前記式 (H-1) 中の、Akn-L¹-の組み合わせが下表の式：

[表4]

Akn	-L ¹ -
(AK-1)	(LN-4-X), (LN-9-X), (L1-1-X), (L1-2-X), (L1-3-X1), (L1-3-X2), (L1-4-X1), (L1-4-X2), (L1-5-X), (L1-6-X), (L1-8-X1), (L1-8-X2), (LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー
(AK-3)	(LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー
(AK-6)	(LN-4-X), (LN-9-X), (L1-1-X), (L1-2-X), (L1-3-X1), (L1-3-X2), (L1-4-X1), (L1-4-X2), (L1-5-X), (L1-6-X), (L1-8-X1), (L1-8-X2), (LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー

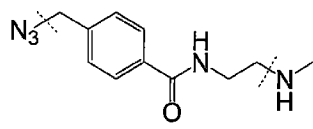
から選択されるものである化学修飾アルギン酸誘導体 (ここで、上記表中の Akn は前記 [2-1] 中の定義と同義であり、-L¹- に示される各記号は下記の部分構造式：

[化5]

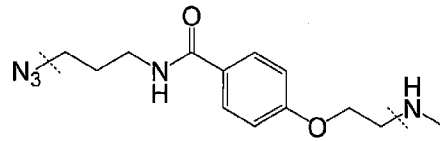


[各式中、両端の破線外側は含まない]を表す)、および、前記式(H-1)中の-L²-が下記の式:

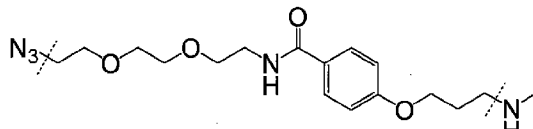
[化6]



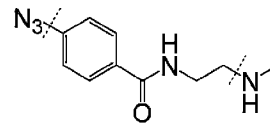
(LK-1-X)



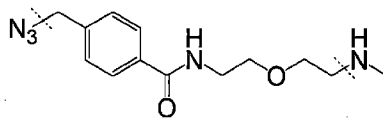
(LK-2-X)



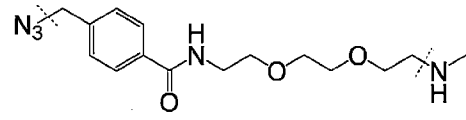
(LK-3-X)



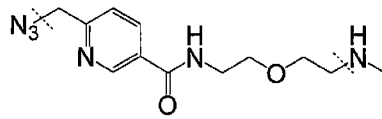
(LK-4-X)



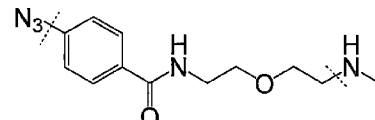
(LK-5-X1)



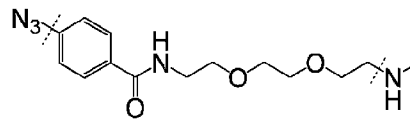
(LK-5-X2)



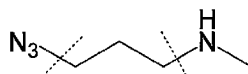
(LK-6-X)



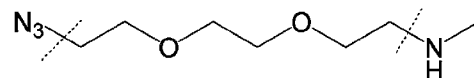
(LK-7-X1)



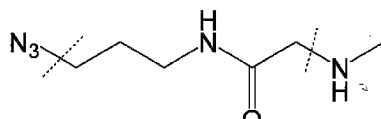
(LK-7-X2)



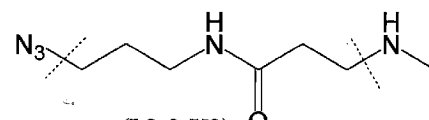
(L2-1-X)



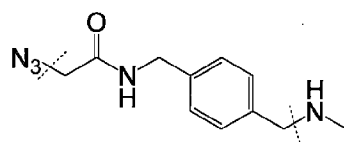
(L2-2-X)



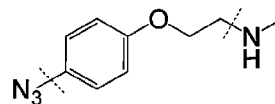
(L2-3-X1)



(L2-3-X2)



(L2-4-X)



(L2-5-X)

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものである化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られる化学架橋アルギン酸を用いて製造され

る前記 [2-1] に記載の構造体。

[0014] [2-2b] 式 (H-1) 中の Akn が (AK-1) であり、 $-L^1-$ が (LN-4-X)、(LN-9-X)、(L1-1-X)、(L1-2-X)、(L1-3-X1)、(L1-3-X2)、(L1-4-X1)、(L1-4-X2)、(L1-5-X)、(L1-6-X)、(L1-8-X1) または (L1-8-X2) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-2] に記載の構造体。

[2-2c] 式 (H-1) 中の Akn が (AK-3) であり、 $-L^1-$ が (LN-3-X1)、(LN-3-X2) または (L1-7-X) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-2] に記載の構造体。

[2-2d] 式 (H-1) 中の Akn が (AK-9) であり、 $-L^1-$ が (LN-4-X)、(LN-9-X)、(L1-1-X)、(L1-2-X)、(L1-3-X1)、(L1-3-X2)、(L1-4-X1)、(L1-4-X2)、(L1-5-X)、(L1-6-X)、(L1-8-X1) または (L1-8-X2) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-2] に記載の構造体。

[0015] [2-3] 前記式 (H-1) 中の Akn が (AK-1) または (AK-3) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-2] に記載の構造体。

[0016] [2-4] 前記式 (H-1) 中の Akn が (AK-1) であり、 $-L^1-$ が (LN-3) または (LN-9) であるか、あるいは、 Akn が (AK-3) であり、 $-L^1-$ が (LN-3) である化学修飾アルギン酸誘導体、および、前記式 (H-11) 中の $-L^2-$ が (LK-2)、(LK-4)、(LK-5) または (LK-7) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-1] に記載の構造体。特に好ましくは $-L^2-$ が (LK-2) である上記構造体。

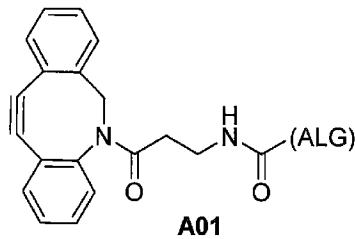
[0017] [2-4b] 式 (H-1) 中の Akn が (AK-1) であり、 $-L^1-$ が (L

N-9) であるか、あるいは、 Akn が (AK-3) であり、 $-L^1-$ が (LN-3) である化学修飾アルギン酸誘導体、および、前記式 (H-11) 中の $-L^2-$ が (LK-2)、(LK-4)、(LK-5) または (LK-7) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-4] に記載の構造体。特に好ましくは $-L^2-$ が (LK-2) である上記構造体。

[0018] [2-5] 前記式 (H-1) 中の Akn が (AK-1) であり、 $-L^1-$ が [2-2] における表中の (LN-3-X1) または (LN-9-X) であるか、あるいは、 Akn が (AK-3) であり、 $-L^1-$ が (LN-3-X1) である化学修飾アルギン酸誘導体、および、前記式 (H-11) 中の $-L^2-$ が (LK-2-X)、(LK-4-X)、(LK-5-X1) または (LK-7-X1) である化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものである前記 [2-2] に記載の構造体。特に好ましくは $-L^2-$ が (LK-2-X) である上記構造体。

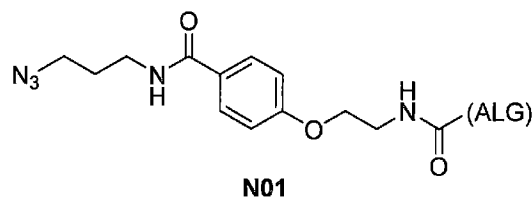
[0019] [2-6] 式 (H-1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (A01) であり、

[化7]



式 (H-11) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N01) である

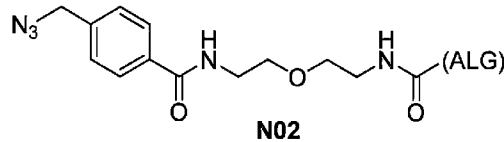
[化8]



[2 - 1] に記載の構造体。

[0020] [2 - 7] 式 (H - 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、 [2 - 6] 中の式 (A 0 1) であり、式 (H - 1 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N 0 2) である、

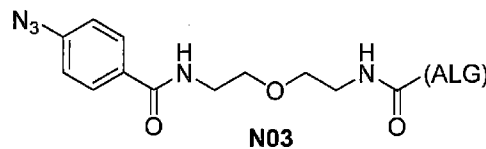
[化9]



[2 - 1] に記載の構造体。

[0021] [2 - 8] 式 (H - 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、 [2 - 6] 中の式 (A 0 1) であり、式 (H - 1 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N 0 3) である、

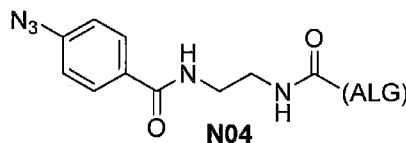
[化10]



[2 - 1] に記載の構造体。

[0022] [2 - 9] 式 (H - 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、 [2 - 6] 中の式 (A 0 1) であり、式 (H - 1 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N 0 4) である、

[化11]

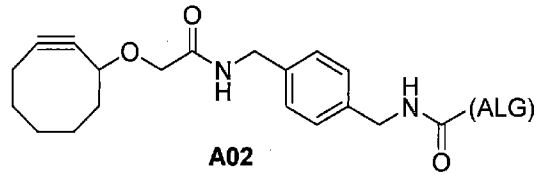


[2 - 1] に記載の構造体。

[0023] [2 - 1 0] 式 (H - 1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (A 0 2

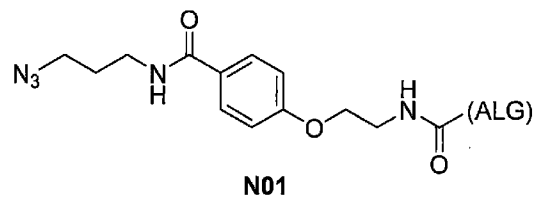
) であり、

[化12]



式 (H-11) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N01) である

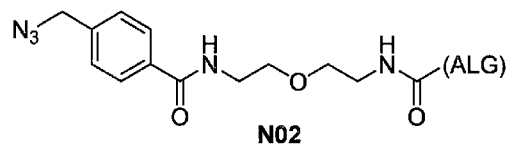
[化13]



[2-1] に記載の構造体。

[0024] [2-11] 式 (H-1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、[2-10] 中の式 (A02) であり、式 (H-11) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N02) である、

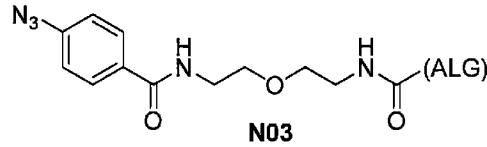
[化14]



[2-1] に記載の構造体。

[0025] [2-12] 式 (H-1) の化学修飾アルギン酸誘導体が、[2-10] 中の式 (A02) であり、式 (H-11) の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式 (N03) である、

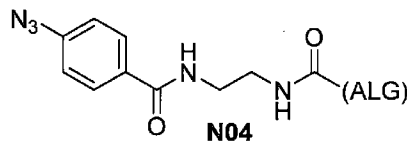
[化15]



[2-1]に記載の構造体。

[0026] [2-13]式(H-1)の化学修飾アルギン酸誘導体が、[2-10]中の式(A02)であり、式(H-11)の化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式(N04)である、

[化16]



[2-1]に記載の構造体。

[0027] [2-14]式(H-1)中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n_1}-$ (ここで、 $n_1 = 1 \sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~10個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されている)であり、

Akn が、8員環の環状アルキン基(ここで、当該環状アルキン基は、さらに1~2個のベンゼン環、シクロプロパン環、あるいは1,2,3-トリアゾール環が縮合していてもよく、縮合した環において $-L^1-$ と結合してもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が、 $-C(=O)-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NH-$ から選択される1~2の基で置き換えられた8員環基でもよく、当該アルキン基中の $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基、フッ素原子、水酸基、または C_{1-3} アルキルオキシ基から選択される1~

2個の基で置換されていてもよい) である化合物であり、

式 (H-11) 中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n_2}-$ (ここで、 $n_2 = 1 \sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~10個の基、またはベンゼン環もしくはピリジン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基で置換されていてもよい) である、前記 [2] に記載の構造体。

[0028] [2-15] 式 (H-1) 中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n_1}-$ (ここで、 $n_1 = 1 \sim 15$ (例えば、 $2 \sim 15$) であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されていてもよい) であり、

Akn が、8員環の環状アルキン基 (ここで、当該環状アルキン基は、さらに1~2個のベンゼン環が縮合していてもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が $-NH-$ で置き換えられた8員環基でもよい) である化合物であり、

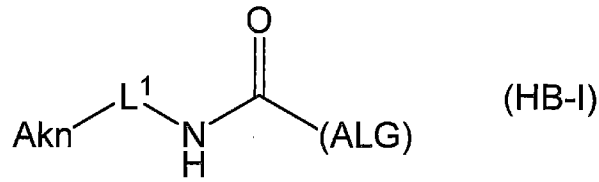
式 (H-11) 中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n_2}-$ (ここで、 $n_2 = 1 \sim 15$ (例えば、 $2 \sim 15$) であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換えられてもよい) である、前記 [2] に記載の構造体。

[0029] [3-1] 前記化学架橋アルギン酸が、式 (HB-1) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体及び式 (HB-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、前記両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られるものである、[1]、[2] 又は [2-1] に記載の構造体：

[式 (HB-1) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式 (HB-1) :

[化17]



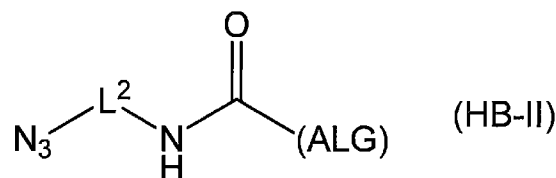
[式 (HB-I) 中、(ALG) は、アルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-は、[2-1] に記載された-L¹-の部分構造式中、(LN-3)、(LN-9)、及び、(L1-3) から (L1-10) までに記載された部分構造式 [各式中、両端の破線外側は含まない] からなる群より選択されるリンカーを表わし；

Akn は、[2-1] に記載の Akn の部分構造式に記載された部分構造式 [各式中、破線右側は含まない] からなる群より選択される環状アルキン基を表わす) で表される化学修飾アルギン酸誘導体；

[式 (HB-II) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式 (HB-II)：

[化18]



[式 (HB-II) 中、(ALG) はアルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L²-は、[2-1] に記載された-L²-の部分構造式中、(LK-2)、及び、(L2-1) から (L2-9b) までに記載された部分構造式 [各式中、両端の破線外側は含まない] からなる群より選択されるリンカーを表わす] で表される化学修飾アルギン酸誘導体。

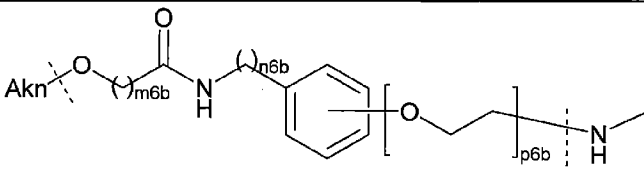
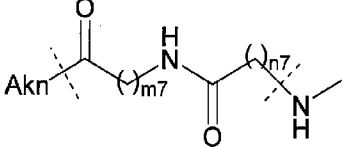
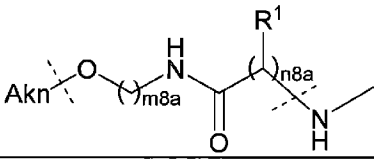
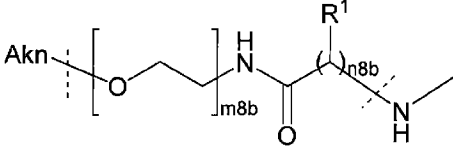
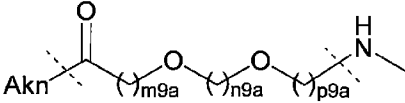
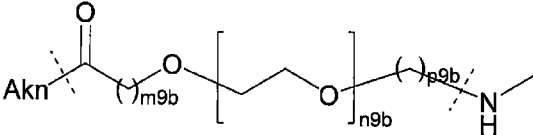
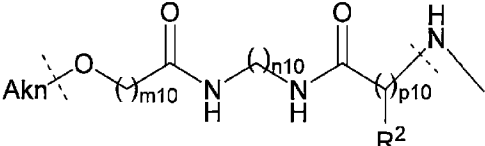
(但し、式 (HB-1) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体において $-L^1-$ が (LN-3) 又は (LN-9) の群から選択されるいずれか1つのリンカーである誘導体と、式 (HB-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体において $-L^2-$ が (LK-2) のリンカーである誘導体を用いて架橋反応を施すことにより得られる化学架橋アルギン酸は除く)。

[0030] [3-2] 前記式 (HB-1) 中の、 $-L^1-$ が下表の式：

[表5-1]

No.	-L ¹ -	
(L1-1-A)		<p>m1=5, 6 n1=2-6</p>
(L1-2a-A)		<p>m2a=1-6 n2a=2-6 p2a=2-6 (但しm2a=1, n2a=2, p2a=2の組合せは除く)</p>
(L1-2b-A)		<p>m2b=1-6 n2b=1-6 p2b=3-6</p>
(L1-3)		<p>m3=1-6 n3=1-6 p3=2-6</p>
(L1-4a)		<p>m4a=2-6 n4a=2-6</p>
(L1-4b)		<p>m4b=1-6 n4b=2-6</p>
(L1-5a)		<p>m5a=1-6 n5a=2-6 p5a=2-6 q5a=1-6</p>
(L1-5b)		<p>m5b=1-6 n5b=1-6 p5b=2-6 q5b=1-6</p>
(L1-6a)		<p>m6a=1-6 n6a=0-6 p6a=2-6</p>

[表5-2]

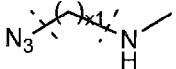
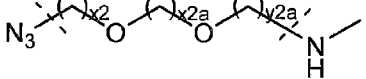
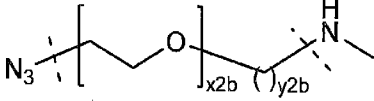
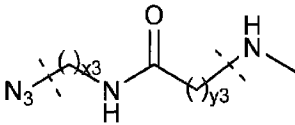
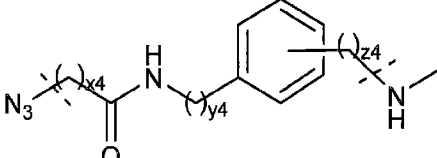
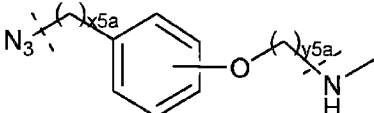
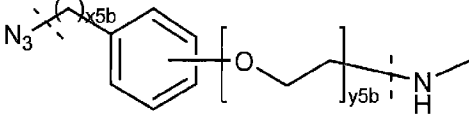
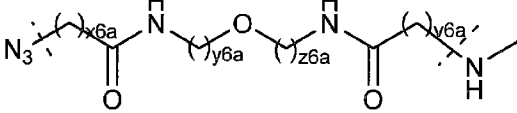
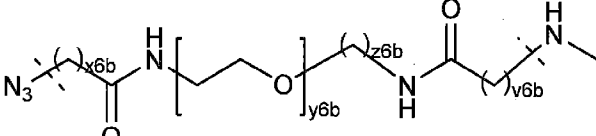
No.	-L ¹ -	
(L1-6b)		m6b=1-6 n6b=1-6 p6b=2-6
(L1-7)		m7=1-6 n7=1-6
(L1-8a)		m8a=2-6 n8a=1-6 R ¹ =H, Me, Et, Bn
(L1-8b)		m8b=1-6 n8b=1-6 R ¹ =H, Me, Et, Bn
(L1-9a)		m9a=1-6 n9a=2-6 p9a=2-6
(L1-9b)		m9b=1-6 n9b=1-6 p9b=2-6
(L1-10)		m10=1-6 n10=2-6 p10=1-6 R ² =H, Me, Et, Bn

に記載された部分構造式 [各式中、両端の破線外側は含まない] から選択されるものであり；

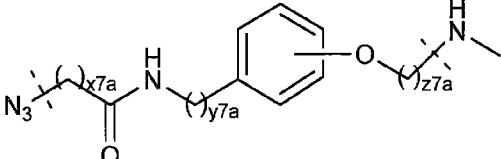
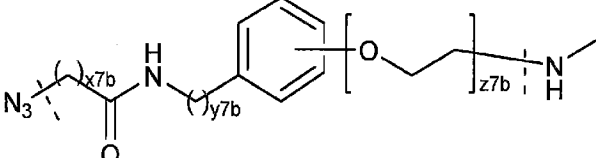
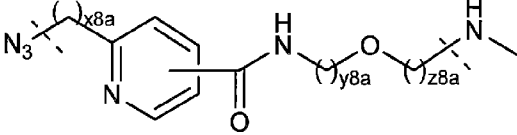
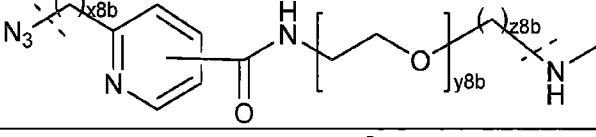
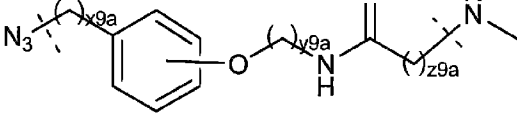
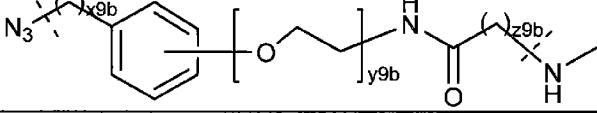
Aknが、前記 [2-1] 中のAknの表に記載された部分構造式 [各式中、破線右側は含まない] から選択されるものであり；

前記式 (HB-11) 中の、-L²-が下記表：

[表6-1]

No.	-L ² -	
(L2-1-A)		x1=2, 4, 5, 6
(L2-2a)		x2=2-6 x2a=2-6 y2a=2-6
(L2-2b-A)		x2b=1-6 y2b=2-6 但し、x2b=3, y2b=2、 x2b=6, y2b=2の 組合せは除く
(L2-3)		x3=2-6 y3=1-6
(L2-4)		x4=1-6 y4=1-6 z4=1-6
(L2-5a)		x5a=0-4 y5a=2-6
(L2-5b)		x5b=0-4 y5b=1-6
(L2-6a)		x6a=1-6 y6a=2-6 z6a=2-6 v6a=1-6
(L2-6b)		x6b=1-6 y6b=1-6 z6b=2-6 v6b=1-6

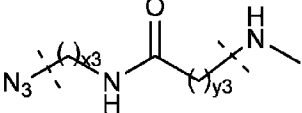
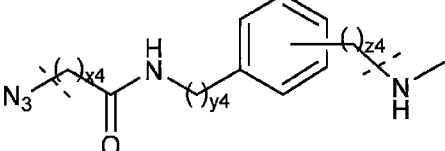
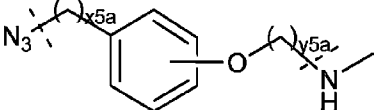
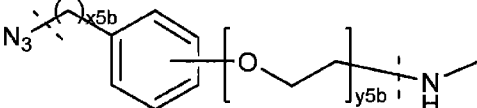
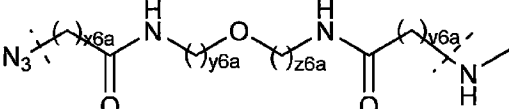
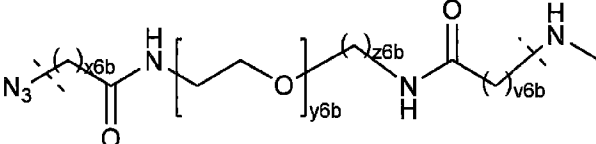
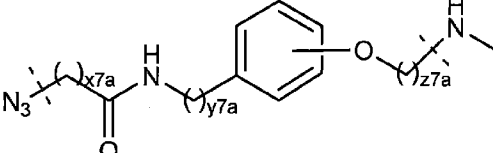
[表6-2]

No.	$-L^2-$	
(L2-7a)		x7a=1-6 y7a=1-6 z7a=2-6
(L2-7b)		x7b=1-6 y7b=1-6 z7b=1-6
(L2-8a)		x8a=0-4 y8a=2-6 z8a=3-6
(L2-8b)		x8b=0-4 y8b=1-6 z8b=3-6
(L2-9a)		x9a=0-4 y9a=2-6 z9a=1-6
(L2-9b)		x9b=0-4 y9b=1-6 z9b=1-6

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるものである前記〔3-1〕に記載の構造体。

[0031] [3-3] 前記式 (HB-11) 中の、 $-L^2-$ が下記表：

[表7-1]

No.	- L ² -	
(L2-3)		<p>x3=2-6 y3=1-6</p>
(L2-4)		<p>x4=1-6 y4=1-6 z4=1-6</p>
(L2-5a)		<p>x5a=0-4 y5a=2-6</p>
(L2-5b)		<p>x5b=0-4 y5b=1-6</p>
(L2-6a)		<p>x6a=1-6 y6a=2-6 z6a=2-6 v6a=1-6</p>
(L2-6b)		<p>x6b=1-6 y6b=1-6 z6b=2-6 v6b=1-6</p>
(L2-7a)		<p>x7a=1-6 y7a=1-6 z7a=2-6</p>

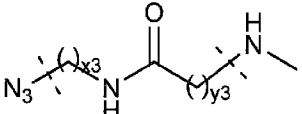
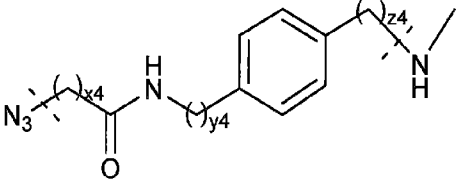
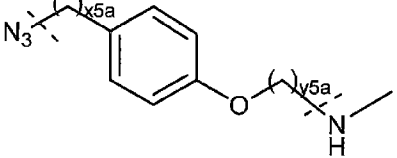
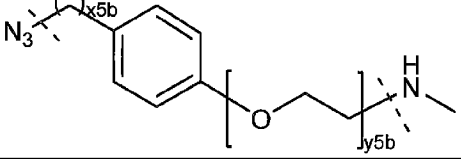
[表7-2]

No.	$-L^2-$	
(L2-7b)		x7b=1-6 y7b=1-6 z7b=1-6
(L2-8a)		x8a=0-4 y8a=2-6 z8a=3-6
(L2-8b)		x8b=0-4 y8b=1-6 z8b=3-6
(L2-9a)		x9a=0-4 y9a=2-6 z9a=1-6
(L2-9b)		x9b=0-4 y9b=1-6 z9b=1-6

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるものである前記〔3-2〕に記載の構造体。

[0032] [3-4] 前記式 (HB-11) 中の $-L^2-$ が、下記表：

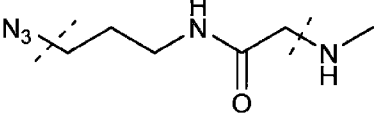
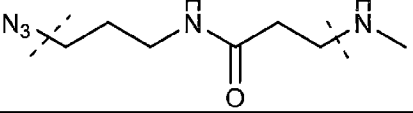
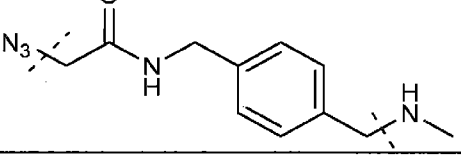
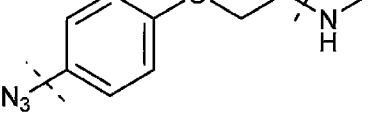
[表8]

No.	$-L^2-$	
(L2-3-1)		x3=2-4 y3=1-3
(L2-4-p2)		x4=1-3 y4=1-3 z4=1-3
(L2-5a-p2)		x5a=0-2 y5a=2-4
(L2-5b-p2)		x5b=0-2 y5b=1-3

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるものである前記〔3-3〕に記載の構造体。

[0033] [3-5] 前記式 (HB-11) 中の $-L^2-$ が、下記表：

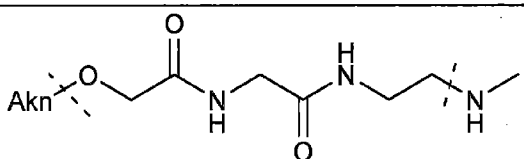
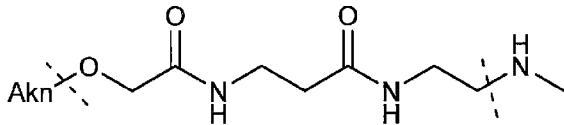
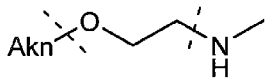
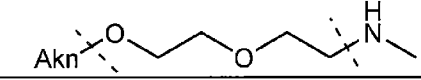
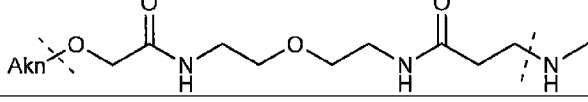
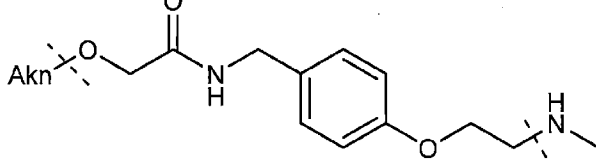
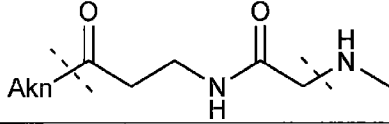
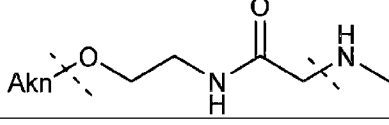
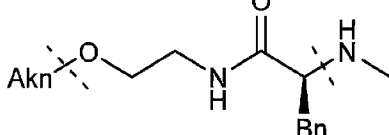
[表9]

No.	$-L^2-$
(L2-3-X1)	
(L2-3-X2)	
(L2-4-X)	
(L2-5-X)	

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるものである〔3-3〕に記載の構造体。

[0034] [3-6] 前記式 (HB-1) 中の $-L^1-$ が、下記表：

[表10]

No.	$-L^1-$
(L1-3-X1)	
(L1-3-X2)	
(L1-4-X1)	
(L1-4-X2)	
(L1-5-X)	
(L1-6-X)	
(L1-7-X)	
(L1-8-X1)	
(L1-8-X2)	

に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるものである〔3-3〕～〔3-5〕に記載の構造体。

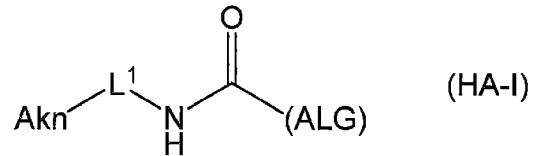
[0035] [4] 前記化学架橋アルギン酸が、式 (HA-1) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体及び式 (HA-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導

体を用いて、前記両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られるものである、[1]又は[2]に記載の構造体：

[式(HA-1)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

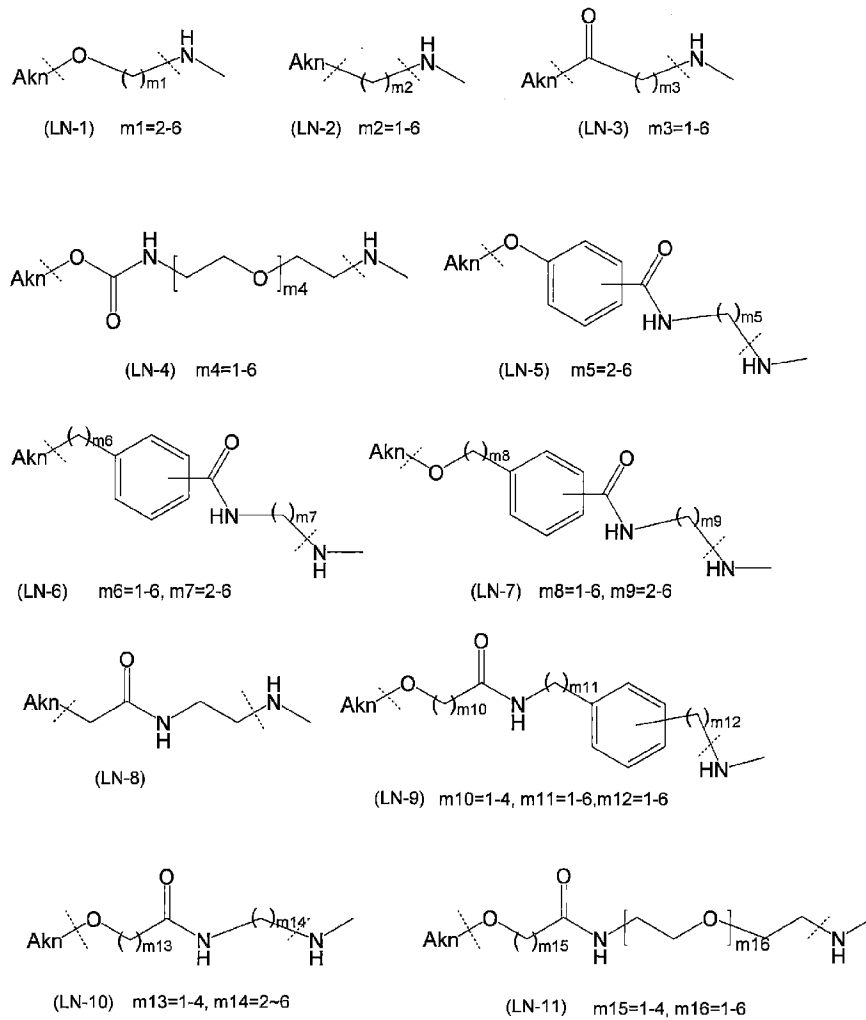
下記式(HA-1)：

[化19]



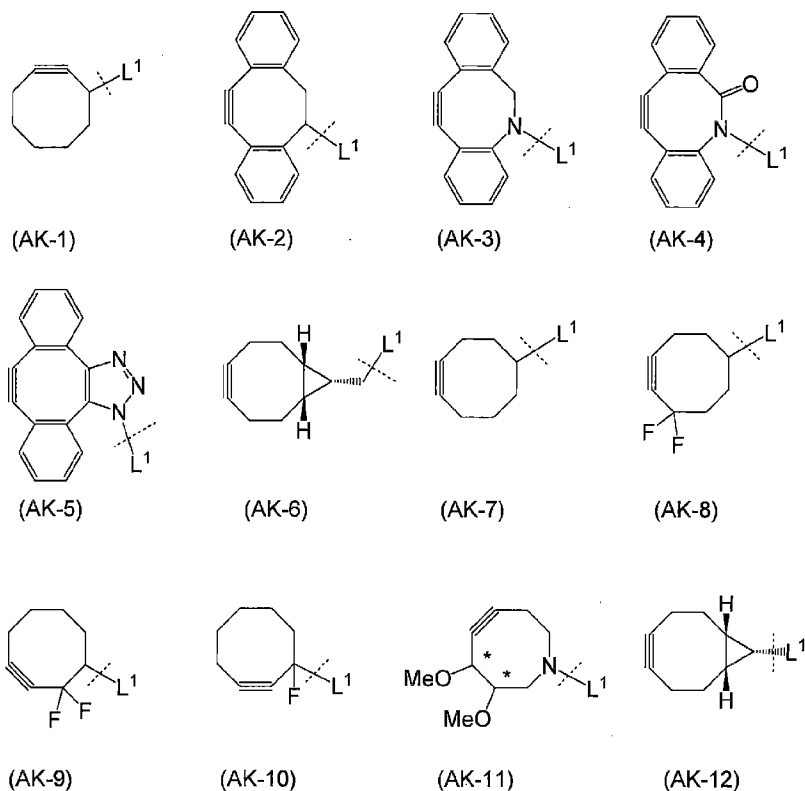
[式(HA-1)中、(ALG)は、アルギン酸を表わし；-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-は、下記部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]：

[化20]



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

[化21]

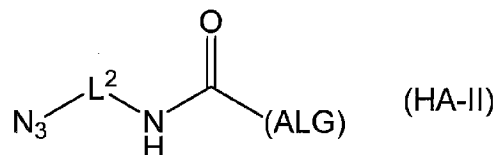


の群から選択される環状アルキン基を表わし、星印はキラル中心を表す] で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体；

[式 (HA-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

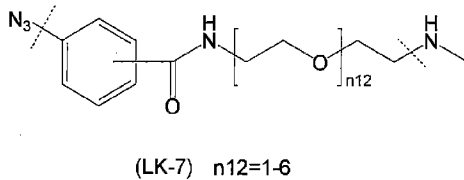
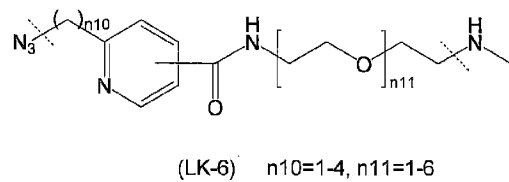
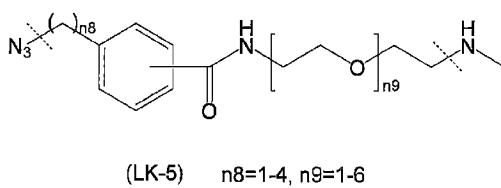
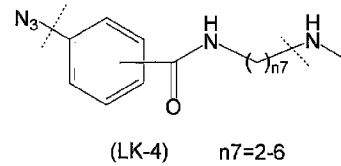
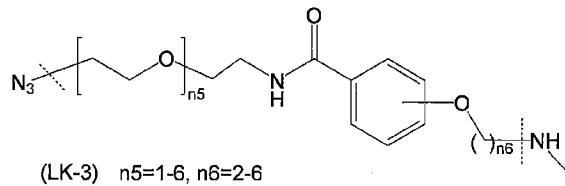
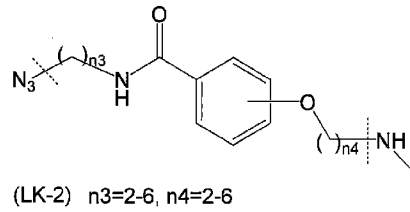
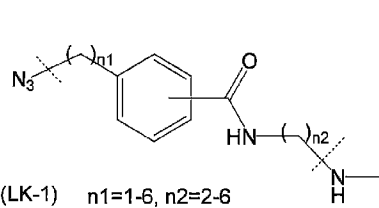
下記式 (HA-11) :

[化22]



[式 (HA-11) 中、(ALG) は、アルギン酸を表わし；-NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L²- は、下記部分構造式 [各式中、両端の破線外側は含まない] :

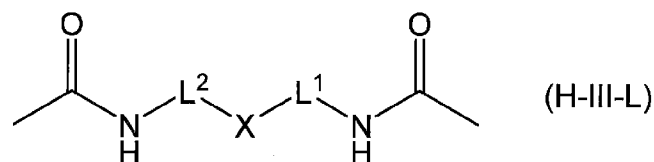
[化23]



の群から選択される2価のリンカーを表わす]で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体。

[0036] [5] 化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式(H-III-L)：

[化24]



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

-L¹-は、環状アルキン基(A_k_n)と結合する2価のリンカーであり；

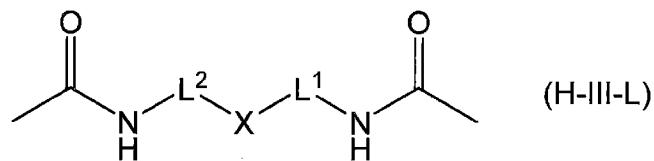
−L²−は、アジド基と結合する2価のリンカーであり；

Xは、L²に結合するアジド基、及び、L¹に結合する環状アルキン基（Akn）が3+2付加環化反応してできる環状基を有する二価基である]

で表される基を介して架橋したものである、前記[1]に記載の構造体。

[0037] [5-1] 化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式（H-III-L）：

[化25]



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

−L¹−は、[2-1]中の定義と同じであり；

−L²−は、[2-1]中の定義と同じであり；

Xは、下記表：

[表11-1]

No.	X	No.	X
(TZ-1)		(TZ-1-r)	
(TZ-2)		(TZ-2-r)	
(TZ-3)		(TZ-3-r)	
(TZ-4)		(TZ-4-r)	
(TZ-5)		(TZ-5-r)	
(TZ-6)		(TZ-6-r)	

[表11-2]

No.	X	No.	X
(TZ-7)		(TZ-7-r)	
(TZ-8)		(TZ-8-r)	
(TZ-9)		(TZ-9-r)	
(TZ-10)		(TZ-10-r)	
(TZ-11)		(TZ-11-r)	
(TZ-12)		(TZ-12-r)	

に記載された部分構造式の群から選択される環状基である（各式中、両端の破線外側は含まない）]

で表される基を介して架橋したものである、前記 [1] に記載の構造体。

[0038] [5 - 2] 化学架橋アルギン酸が、前記式 (H - I I I - L) 中、-X-L¹

一の組み合わせが下表の式：

[表12]

— X —	— L ¹ —
(TZ-6) 又は (TZ-6-r)	(LN-4-X), (LN-9-X), (L1-1-X), (L1-2-X), (L1-3-X1), (L1-3-X2), (L1-4-X1), (L1-4-X2), (L1-5-X), (L1-6-X), (L1-8-X1), (L1-8-X2), (LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー
(TZ-2) 又は (TZ-2-r)	(LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー
(TZ-5) 又は (TZ-5-r)	(LN-4-X), (LN-9-X), (L1-1-X), (L1-2-X), (L1-3-X1), (L1-3-X2), (L1-4-X1), (L1-4-X2), (L1-5-X), (L1-6-X), (L1-8-X1), (L1-8-X2), (LN-3-X1), (LN-3-X2) 又は (L1-7-X) の群から選択されるいずれか1つのリンカー

から選択されるものであり（ここで、表中の— L¹ —は前記 [2-2] 中の定義と同義であり、— X —に示される各記号は [5-1] 中の表に示される部分構造式 [各式中、両端の破線外側は含まない] と同義である）、— L² —が前記 [2-2] 中の構造式から選択されるものである、前記 [5-1] に記載の構造体。

[0039] [5-3] 前記式 (H-| | | -L) 中の— X —が (TZ-2) または (TZ-6) である、前記 [5-2] に記載の構造体。

[0040] [5-4] 前記式 (H-| | | -L) 中の— X —が (TZ-6) であり— L¹ —が (LN-3) または (LN-9) であるか、あるいは、— X —が (TZ-2) であり— L¹ —が (LN-3) であり、かつ、— L² —が [2-2] における表中の (LK-2)、(LK-4)、(LK-5) または (LK-7) である、前記 [5-1] に記載の構造体。

[0041] [5-5] 前記式 (H-| | | -L) 中の— X —が (TZ-6) であり、— L¹ —が [2-2] における表中の (LN-3-X1) または (LN-9X) であるか、あるいは、— X —が (TZ-2) であり— L¹ —が (LN-3-X1) であり、かつ、— L² —が [2-2] における表中の (LK-2-X)、(LK-4-X)、(LK-5-X1) または (LK-7-X1) である、前記 [5-2] に記載の構造体。

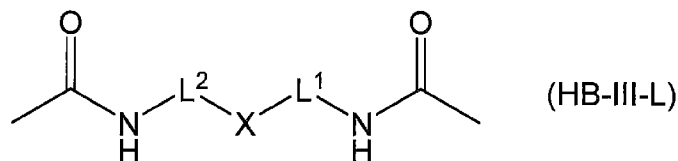
[0042] [5-6] 前記式 (H-| | | -L) 中の— L¹ —が [2-14] 中の表に記

載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものであり、 $-L^2-$ が〔2-14〕中の表に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものであり、 $-X-$ が〔5-1〕中の表に示される部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものである、前記〔5〕に記載の構造体。

[0043] 〔5-7〕前記式（ $H-I-I-L$ ）中の $-L^1-$ が〔2-15〕中の表に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものであり、 $-L^2-$ が〔2-15〕中の表に記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものであり、 $-X-$ が〔5-1〕中の表に示される部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕から選択されるものである、前記〔5〕に記載の構造体。

[0044] 〔6-1〕前記化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式（ $HB-I-I-I-L$ ）：

[化26]



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

$-L^1-$ は、〔2-1〕中の表に記載された $-L^1-$ の部分構造式中、（ $LN-3$ ）、（ $LN-9$ ）、及び、（ $L1-3$ ）から（ $L1-10$ ）までに記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるリンカーを表わし；

$-L^2-$ は、〔2-1〕中の表に記載された $-L^2-$ の部分構造式中、（ $LK-2$ ）、及び、（ $L2-1$ ）から（ $L2-9b$ ）までに記載された部分構造式〔各式中、両端の破線外側は含まない〕からなる群より選択されるリンカ

—を表わし；

—X—は、[5-1]中の表に示される部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]と同義であり、

但し、—L¹—が(LN-3)または(LN-9)であり、—L²—が(LK-2)であるものは除く]

で表される基を介して架橋したものである、前記[5-1]に記載の構造体。

[0045] [6-2]前記式(HB-| | |—L)中の—L¹—が[3-2]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものであり、—L²—が[3-2]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものであり、—X—が[5-1]中の表に示される部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものである、前記[6-1]に記載の構造体。

[0046] [6-3]前記式(HB-| | |—L)中の、—L²—が[3-3]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものである、前記[6-2]に記載の構造体。

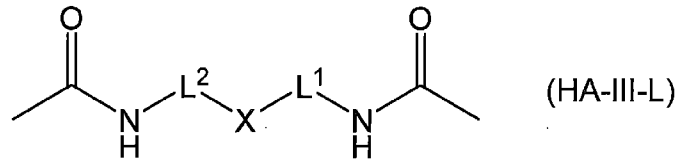
[6-4]前記式(HB-| | |—L)中の、—L²—が[3-4]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものである、前記[6-3]に記載の構造体。

[6-5]前記式(HB-| | |—L)中の、—L²—が[3-5]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものである、前記[6-3]に記載の構造体。

[6-6]前記式(HB-| | |—L)中の、—L¹—が[3-6]中の表に記載された部分構造式[各式中、両端の破線外側は含まない]から選択されるものである、前記[6-3]～[6-5]に記載の構造体。

[0047] [7]化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式(HA-| | |—L)：

[化27]



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

$-\text{L}^1-$ は、前記 [4] 中の定義と同じであり；

$-\text{L}^2-$ は、前記 [4] 中の定義と同じであり；

X は、前記 [5-1] 中の定義と同じである]

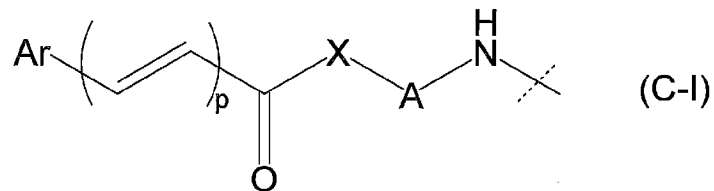
で表される基を介して架橋したものである、前記 [1] に記載の構造体。

[0048] [8-1] 化学架橋アルギン酸が、式 (C-1) で表わされる光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体に光照射することにより得られる化学架橋アルギン酸である、[1] に記載の構造体：

[式 (C-1) で表わされる光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体]

アルギン酸の任意の 1 つ以上のカルボキシル基に、下記式 (C-1) [式中、破線右外側は含まない]：

[化28]



[式 (C-1) 中、

Ar は、 $\text{C}_{6\sim 10}$ アリール基 (前記 $\text{C}_{6\sim 10}$ アリール基は、ヒドロキシル基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン原子、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル基、ハロゲン化 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル基、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルコキシ基、及び $-\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$ 基 ($-\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$ 基における、 R^{A} 及び R^{B} は、各々独立して、水素原子、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル基、 $\text{C}_{2\sim 7}$ アルカノイル基、又は $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキルスルホニル基から選択される基であり (但し、-

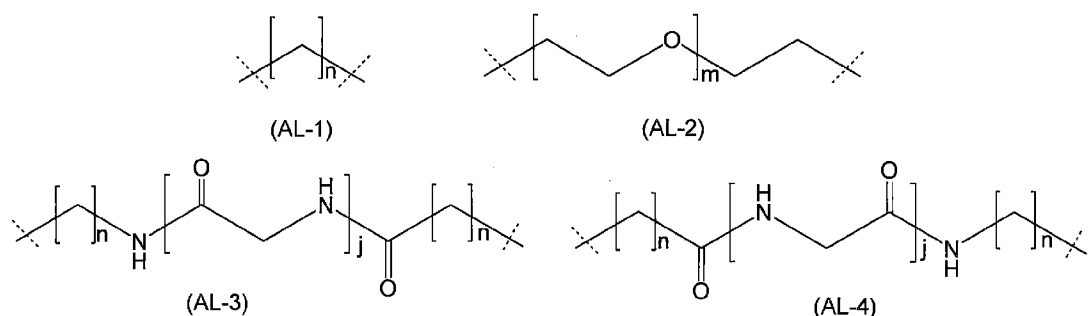
NH₂、-NH(C_{1~6}アルキル基)、及び-N(C_{1~6}アルキル基)₂は除く)から任意に選ばれる1~3個の基が環上の水素原子と置換しても良く、前記C_{6~10}アリール基に、C_{1~6}アルキル基及びC_{1~6}アルコキシ基が又は2つのC_{1~6}アルコキシ基が隣接して置換する場合、当該C_{1~6}アルキル基及びC_{1~6}アルコキシ基の各基のアルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することにより、又は、当該2つのC_{1~6}アルコキシ基の各アルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することにより、環状エーテルを形成しても良く、又は、前記C_{6~10}アリール基に、C_{1~6}アルコキシ基及び-NHR^G基(-NHR^G基におけるR^Gは、C_{2~7}アルカノイル基又はC_{1~6}アルキルスルホニル基である)が隣接して置換している場合、当該C_{1~6}アルコキシ基のアルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子と当該-NHR^G基の水素原子が1つ除かれた窒素原子が結合することにより、3-N-(C_{2~7}アルカノイル)オキサゾリジン環、3-N-(C_{1~6}アルキルスルホニル)オキサゾリジン環、4-N-(C_{2~7}アルカノイル)モルホリン環、4-N-(C_{1~6}アルキルスルホニル)モルホリン環、4-N-(C_{2~7}アルカノイル)-1,4-オキサゼパン環、又は4-N-(C_{1~6}アルキルスルホニル)-1,4-オキサゼパン環を形成しても良い)を表わし;

pは、1、又は2の整数を表わし;

-X-は、-O-を表わし;

-A-は、式(AL-1)~(AL-4) [各式中、両端の破線外側は含まない] :

[化29]



(式 (AL-1) ~ (AL-4) 中、nは、1~18の整数を表わし；mは、1~9の整数を表わし；jは、0~9の整数を表わし；式 (AL-1) ~ (AL-4) 中のメチレン基 (-CH₂-) の水素原子は、ハロゲン原子、水酸基、C_{1~6}アルキル基、ヒドロキシC_{1~6}アルキル基、チオールC_{1~6}アルキル基、C_{1~6}アルキルチオC_{1~6}アルキル基、カルボキシC_{1~6}アルキル基、-NR^aR^b基、(R^aR^bN)-C_{1~6}アルキル基、(R^aR^bN)C(=O)-C_{1~6}アルキル基（前記-NR^aR^b基、(R^aR^bN)-C_{1~6}アルキル基、又は(R^aR^bN)C(=O)-C_{1~6}アルキル基における、R^a及びR^bは、各々独立して、水素原子、C_{1~6}アルキル基、C_{2~7}アルカノイル基、又はC_{1~6}アルキルスルホニル基から選択される基であり）、グアニジノC_{1~6}アルキル基、C_{7~16}アラルキル基、ヒドロキシC_{6~10}アリールC_{1~6}アルキル基、又はヘテロアリールC_{1~6}アルキル基から選択される基で複数個（例えば、1~10個、又は1~5個）置き換えられても良く；式 (AL-1) ~ (AL-4) 中のメチレン基 (-CH₂-) の2つの水素原子がC_{1~6}アルキル基に置き換えられた場合、当該各C_{1~6}アルキル基の各アルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することによりC_{3~8}シクロアルキル環を形成しても良く；式 (AL-3) 又は式 (AL-4) 中の-NH-基は、隣接する炭素原子に置換する前記置換基と共に、非芳香族複素環を形成しても良い）]（但し、式 (C-1) において、Ar=フェニル基、p=1、-A-=式 (AL-1)、かつn=3の場合、当該Arのフェニル基では前記Ar環上の水素原子と置換しても良い置換基群から任意に選ばれる1~3個の基が前記フェニル基上の水素原子と置換する）で表される光反応性基が導入された、化学修飾アルギン酸誘導体。

[0049] [8-2] 前記式 (C-1) 中、

Arが、フェニル基（前記フェニル基は、シアノ基、フッ素原子、トリフルオロメチル基、及びメトキシ基から任意に選ばれる1~3個の基が環上の水素原子と置換しても良く、フェニル基上に、2つのメトキシ基が隣接して置換している場合には、2つのメトキシ基の各基のメチル基から任意の水素

原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することにより1, 4-ジオキサン環を形成しても良い) (但し、式(C-1)において、Ar=フェニル基、p=1、-A-=式(AL-1)、かつn=3の場合、当該Arのフェニル基では前記フェニル基上の水素原子と置換しても良い置換基群から任意に選ばれる1~3個の基が前記フェニル基上の水素原子と置換する) であり;

pが、1又は2の整数であり;

-X-が、-O-であり;

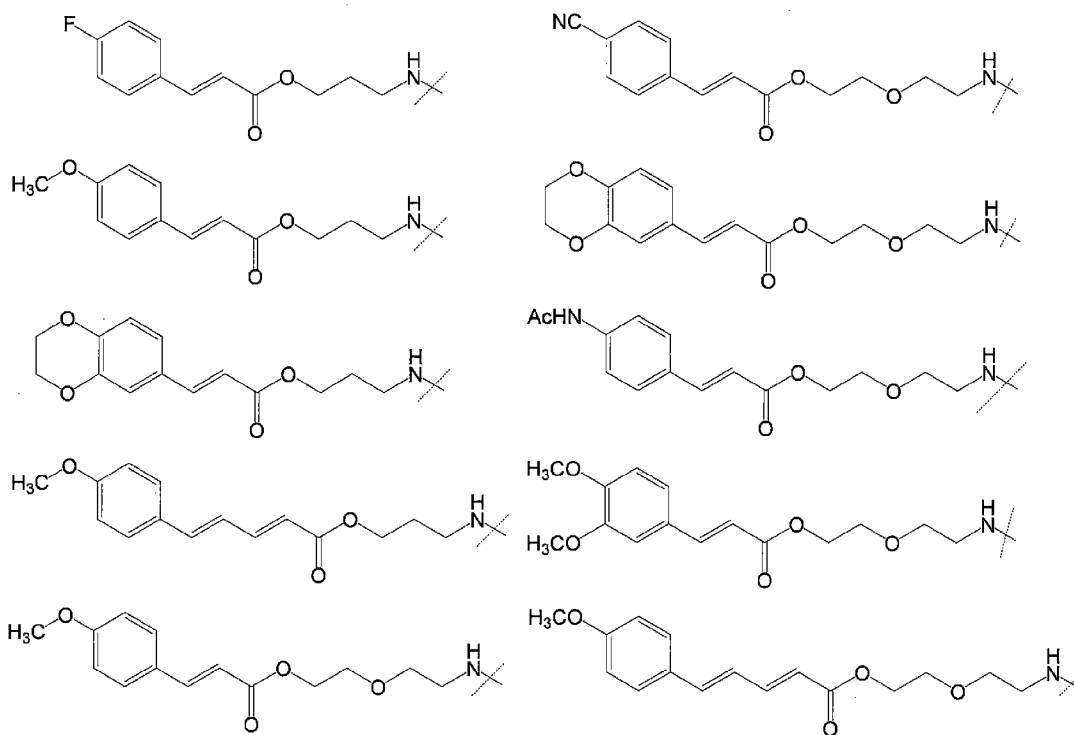
-A-が、前記態様[8-1]中の式(AL-1)又は(AL-2) [各式中、両端の破線外側は含まない]である、“光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体”に、光照射することにより得られる化学架橋アルギン酸を含む、[8-1]に記載の構造体。

[0050] [8-3] 前記式(C-1)中、

Arが、フェニル基、4-フルオロフェニル基、4-(トリフルオロメチル)フェニル基、4-メトキシフェニル基、4-シアノフェニル基、又は2, 3-ジヒドロベンゾ[b][1, 4]ジオキシニル基である“光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体”に、光照射することにより得られる化学架橋アルギン酸を含む、[8-2]に記載の構造体。

[0051] [8-4] 前記式(C-1)中、以下に示される部分構造式 [各式中、破線右側は含まない] から選択される光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体に、光照射することにより得られる化学架橋アルギン酸を含む、[8-2]に記載の構造体。

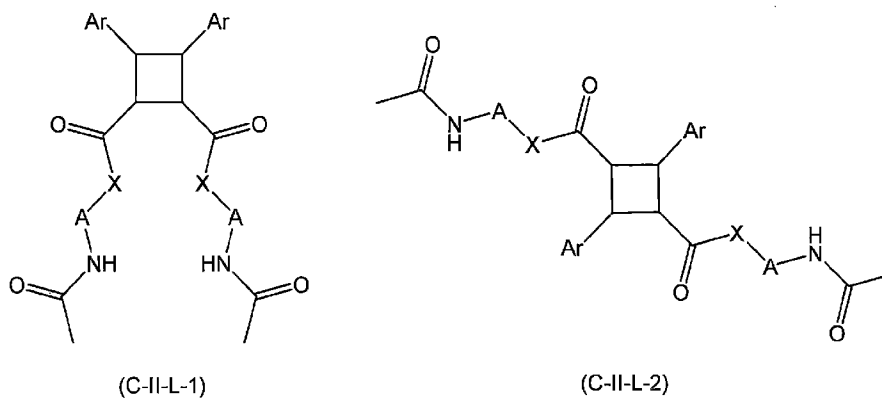
[化30]



[8-5] 照射する光が、紫外線又はLED光から選ばれる光である、[8-1] ~ [8-4] のいずれか1項に記載の構造体。

[0052] [9-1] 化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式 (C-II-L-1) 又は式 (C-II-L-2) :

[化31]



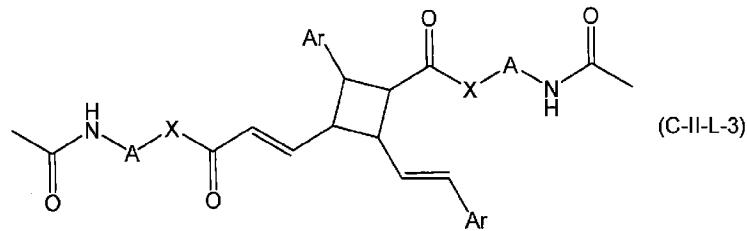
[式 (C-II-L-1) 又は式 (C-II-L-2) 中、両端の-CO-N

H-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-A-、-X-、及びArは、前記[8-1]～[8-3]中のいずれか1項に記載の定義と同じである]

で表される基を介して架橋したものである、前記[1]に記載の構造体。

[0053] [9-2] 化学架橋アルギン酸が、第1のアルギン酸の任意のカルボキシル基と、第2のアルギン酸の任意のカルボキシル基が、下記式(C-II-L-3)：

[化32]



[式(C-II-L-3)中、両端の-CONH-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-A-、-X-、及びArは、前記前記[8-1]～[8-3]中のいずれか1項に記載の定義と同じである]

で表される基を介して架橋したものである、前記[1]に記載の構造体。

[0054] [10-1] 以下の工程(a)～(c)を含む、前記[2]で示される、コア層の化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含む構造体の製造方法；

工程(a)：薬理成分を含む化学修飾アルギン酸誘導体の溶液[式(H-1)]で示される誘導体と式(H-11)で示される誘導体の混合物]を、2価金属イオンを含む溶液に接触させてゲル化する工程、

工程(b)：工程(a)で得られたゲルを、カチオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、当該ゲルをカチオン性ポリマーでコーティングする工程、

工程(c)：工程(b)で得られた製造物を、アニオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、さらにアニオン性ポリマーでコーティングする工程。

[0055] [10-2] さらに以下の工程(d)を含む、前記[10-1]に記載の構

造体の製造方法；

工程（d）：工程（c）で得られた構造体を、キレート剤を用いてキレート処理する工程。

[0056] [10-3] 構造体が、前記 [2-1] ~ [7] のいずれか1項に記載のものである [10-1] または [10-2] に記載の製造方法。

[0057] [11-1] 以下の工程（a）~（c）及び工程（a）以降のいずれかの段階で光照射を行うことを含む、化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含む構造体の製造方法；

工程（a）：薬理成分を含む化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、2価金属イオンを含む溶液に接触させてゲル化する工程、

工程（b）：工程（a）で得られたゲルを、カチオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、当該ゲルをカチオン性ポリマーでコーティングする工程、

工程（c）：工程（b）で得られた製造物を、アニオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、さらにアニオン性ポリマーでコーティングする工程。

[0058] [11-2] さらに以下の工程（d）を含む、前記 [11-1] に記載の構造体の製造方法；

工程（d）：工程（c）で得られた構造体を、キレート剤を用いてキレート処理する工程。

[0059] [11-3] 構造体が、前記 [8-1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載のものである [11-1] または [11-2] に記載の製造方法。

[0060] [12-1] アニオン性ポリマーがアルギン酸または化学架橋アルギン酸である、前記 [1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の構造体。

[12-2] アニオン性ポリマーがアルギン酸である、前記 [1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の構造体。

[12-3] アニオン性ポリマーがコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸である、前記 [1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の構造体。

[12-4] アニオン性ポリマーが前記 [1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の構造式を有する化学架橋アルギン酸から選択される、前記 [1] ~

[9-2] のいずれか1項に記載の構造体。

[0061] [12-5] コア層の化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分が細胞である、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-4]のいずれか1項に記載の構造体。ある態様としては、細胞がインスリン分泌細胞である上記構造体。別の態様としては、薬理成分が生物活性物質産生細胞である、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-4]のいずれか1項に記載の構造体であり、別の態様としては、薬理成分が生理活性物質産生細胞である、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-4]のいずれか1項に記載の構造体であり、別の態様としては、薬理成分が生理活性天然物の産生細胞である、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-4]のいずれか1項に記載の構造体である。

[12-6] カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンである、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-5]のいずれか1項に記載の構造体。

[12-7] カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンである、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-6]のいずれか1項に記載の構造体。

[12-8] 構造体の形状がビーズ、シート又はファイバーである、前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-7]のいずれか1項に記載の構造体。好ましくは、形状がビーズである前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-7]のいずれか1項に記載の構造体。別の態様としては、形状がシートである前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-7]のいずれか1項に記載の構造体。さらに別の態様としては、形状がファイバーである前記[1]～[9-2]または[12-1]～[12-7]のいずれか1項に記載の構造体。

[12-9] アルギン酸または化学修飾アルギン酸誘導体が、そのゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が10万Da～300万Daであるものを用いて製造された、前記[1]～[9-2]または[1

2-1] ~ [12-8] のいずれか1項に記載の構造体。

[12-10] 生体内で使用するための、前記[1] ~ [9-2] または [12-1] ~ [12-9] のいずれか1項に記載の構造体。

[12-11] 前記[1] ~ [9-2] または [12-1] ~ [12-9] のいずれか1項に記載の構造体に封入された薬理成分を有効成分とする医療用材料。

[12-12] 創傷被覆材、術後癒着防止材、薬剤徐放用基材、細胞移植用基材、補綴材、製剤コーティング材、またはバイオプリンタに用いるバイオインクである [12-11] 記載の医療用材料。補綴材としては、インプラント、人工臓器が好ましい。

[0062] [13-1] アニオン性ポリマーがアルギン酸または化学架橋アルギン酸である構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] のいずれか1項に記載の製造方法。

[13-2] アニオン性ポリマーがアルギン酸である構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] のいずれか1項に記載の製造方法。

[13-3] アニオン性ポリマーがコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸である構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] のいずれか1項に記載の製造方法。

[13-4] アニオン性ポリマーが、前記[1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の化学架橋アルギン酸から選択される、前記[1] ~ [9-2] のいずれか1項に記載の構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] のいずれか1項に記載の製造方法。

[0063] [13-5] コア層の化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分が細胞である構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-4] のいずれか1項に記載の製造方法。ある態様としては、細胞がインスリン分泌細胞である構造体の上記製造方法。

[13-6] カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンである構造体を製造するための、前記[10-1] ~ [11-3] ま

たは [13-1] ~ [13-5] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[13-7] カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンである構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-6] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[13-8] 構造体の形状がビーズ、シート又はファイバーである構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-7] のいずれか 1 項に記載の製造方法。好ましくは、構造体の形状がビーズである構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-7] のいずれか 1 項に記載の製造方法。別の態様としては、構造体の形状がシートである構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-7] のいずれか 1 項に記載の製造方法。さらに別の態様としては、構造体の形状がファイバーである構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-7] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[13-9] アルギン酸または化学修飾アルギン酸誘導体が、そのゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した重量平均分子量が 10 万 Da ~ 300 万 Da であるものを用いて製造された構造体を製造するための、前記 [10-1] ~ [11-3] または [13-1] ~ [13-8] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[0064] 本発明の好ましい態様の構造体としては、以下の例が挙げられる。

[14-1] 薬理成分が生物活性物質産生細胞であり、カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンであり、アニオン性ポリマーがアルギン酸またはコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸であり、構造体の形状がビーズ又はシートである前記 [1] ~ [7] 記載の構造体。

[14-2] 薬理成分が生物活性物質産生細胞であり、カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンであり、アニオン性ポリマーがアルギン酸またはコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸である

前記〔1〕～〔7〕記載の構造体に封入された、前記薬理成分を有効成分とする医療用材料。

〔14-3〕体内に留置して薬理成分の機能を発揮するために用いられる、カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンであり、アニオン性ポリマーがアルギン酸またはコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸である前記〔1〕～〔7〕記載の構造体。

〔14-4〕薬理成分が生物活性物質産生細胞であり、カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンであり、アニオン性ポリマーがアルギン酸またはコア層に用いたものと同じ化学架橋アルギン酸である前記〔1〕～〔7〕記載の構造体を体内に留置することによる、ヒトまたは動物における疾患の治療方法。特に、当該構造体が、創傷被覆、術後の癒着防止、薬剤の徐放、細胞移植、インプラントまたは人工臓器等の補綴剤として用いられることによる治療方法。

発明の効果

[0065] 本発明により、新たな構造体が提供される。好ましくは、構造体は、少なくとも下記の効果の1つ以上を示す。

[0066] (1) コア層としてアルギン酸を使用した同様の構造体（以下、従来の構造体と略す）と比較して、2価金属イオンによるアルギン酸の分子間架橋が無い条件下でも高い物理的強度を示す。

(2) 従来の構造体と比較してより大きなサイズのものを作製可能である。

(3) 平板やファイバーといった、大型で自由な形状の構造体の作製も可能であり、また、これらの構造体は長時間にわたり構造安定性を維持しうる。

(4) コア層に細胞を封入した場合、細胞を長時間にわたり生存させることが可能である。

(5) コア層に細胞等を入れて保存あるいは培養する等の目的に使用可能である。

(6) 臍島や細胞移植用デバイス細胞の移植等にも利用可能である。

(7) 生体適合性を有しているため、様々な生体内での利用に応用可能であ

る。

図面の簡単な説明

- [0067] [図1]化学架橋アルギン酸の安定性の評価を示す図である。
- [図2]化学架橋アルギン酸のEDTA下の安定性の評価を示す図である。
- [図3]化学架橋アルギン酸の安定性の評価を示す図である。
- [図4]化学架橋アルギン酸のEDTA下の安定性の評価を示す図である。
- [図5]化学架橋アルギン酸の安定性の評価を示す図である。
- [図6]化学架橋アルギン酸のEDTA下の安定性の評価を示す図である。
- [図7]化学架橋アルギン酸の透過率の評価を示す図である。
- [図8]化学架橋アルギン酸の透過率の評価を示す図である。
- [図9]化学架橋アルギン酸の生体適合性評価を示す図である。
- [図10]実施例A-6に係る構造体のキレート処理後(a)及び1日振盪後(b)の安定性の評価を示す図である。
- [図11]実施例A-3に係る構造体のキレート処理後(a)及び1日振盪後(b)の安定性の評価を示す図である。
- [図12]実施例A-2に係る構造体のキレート処理後(a)及び1日振盪後(b)の安定性の評価を示す図である。
- [図13]実施例D-1に係る構造体の1日振盪後の安定性の評価を示す図である。
- [図14]実施例D-2に係る構造体の1日振盪後の安定性の評価を示す図である。
- [図15]実施例D-3に係る構造体の1日振盪後の安定性の評価を示す図である。
- [図16]実施例D-4に係る構造体の1日振盪後の安定性の評価を示す図である。
- [図17]実施例D(2)-1および実施例D(2)-2に係る構造体の1日振盪後の安定性の評価を示す図である。

発明を実施するための形態

[0068] 以下、本発明の各態様についてより詳細に説明する。

1. 化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体

本明細書において「構造体」は、内部に薬理成分を封入することが可能な化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体である。ここで提供される構造体は、薬理成分を含むコア層と、カチオン性ポリマー層と、アニオン性ポリマー層と、を含む3層の構造体であることが好ましく、特に限定しない限り、「構造体」とは、化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層と、前記コア層を被覆するカチオン性ポリマー層と、前記カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマー層を含む構造体を意味する。

[0069] 本明細書中、「化学架橋反応を施す」又は「化学架橋反応を行う」とは、前記式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体及び前記式(H-11)、式(HA-11)又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、Huisgen反応を行うことにより、これらの化学修飾アルギン酸誘導体間で化学架橋(化学結合)が形成されること、又は、前記式(C-1)で表わされる光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体に光照射をして光環化反応を行うことにより、前記式(C-1)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体間で化学架橋(化学結合)が形成されることを意味する。

[0070] 本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸については後に詳述するが、アルギン酸の任意のカルボキシル基に反応性基を縮合した「化学修飾アルギン酸誘導体」を用いて、これらの誘導体間で架橋反応を施すことにより、化学架橋が形成されたものである。

一方、アルギン酸等の糖ポリマーは、2価金属イオンと接触することにより、2つのカルボキシル基の間でイオン架橋が形成され、ハイドロゲルを形成することが知られている。本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸も同様の性質を有する。したがって、本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸には、(i) 2価の金属イオンによる架橋(イオン架橋)が形成されていない状態(例えば、EDTA等のキレート剤を存在させることにより

、2価金属イオンとの結合を除去した状態)、及び(i i)化学架橋とイオン架橋の両方が形成されている状態、の2つの状態、ならびにこれらの併存状態が存在しうる。本発明の構造体は、イオン架橋を併用することにより、強固なゲルを作製して用いることもできるし、イオン架橋が無い状態でも安定な構造を保つことができる。本明細書中、「化学架橋アルギン酸」と表記した場合、特にことわりのない限り、いずれの状態のものをも包含する。

[0071] 1-1. 化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層

コア層に封入することができる薬理成分としては、薬理活性や生物活性を有する物質、すなわち生物活性物質に加え、細胞および微生物が挙げられる。

コア層に封入する薬理成分は、少なくとも1種類の薬理成分であればよいが、複数種の薬理成分を同時に封入してもよく、複数種の薬理成分である場合は、各々独立した活性を有する薬理成分でもよく、相互作用して活性を有する薬理成分でもよく、主成分とその活性の補助成分の組合せでもよい。また、複数種の生物活性物質の組合せ、複数種の細胞の組合せ、複数種の微生物の組合せ、又は1種類もしくは複数種の生物活性物質、細胞もしくは微生物の組合せでもよい。

コア層に封入することができる生物活性物質としては、特に制限されることは無いが、医薬品として用いられるものが好ましく、例えば、低分子医薬品、ペプチドやオリゴ核酸等の中分子医薬品およびタンパク質等のバイオ医薬品、生理活性物質などを挙げることができる。本明細書において、生理活性物質には、生体が本来有する生理活性物質(生理活性天然物)に加え、生理活性物質を修飾や改変した物質、生理活性を活性化又は阻害する物質等が挙げられ、天然に存在する物質と共に、遺伝子工学的に生産又は化学的に合成した物質も含まれ、これらのプロドラッグも含まれる。具体的には、ビタミン、補酵素、ホルモン、抗生物質、神経伝達物質、サイトカイン、酵素、成長因子、抗体、その他生体内因子、等を挙げることができ、生体内因子としてより具体的には、インスリン、ドーパミン、第VIII因子、第IX因子等を

挙げることができる。

コア層に封入することができる細胞としては、特に制限されることは無いが、生物活性物質を放出することができる細胞（生物活性物質産生細胞）が好ましく、天然の細胞に加え、人工的な改変操作を施された細胞も含まれ、複数個の細胞からなる細胞塊も含まれる。コア層に封入することができる細胞として、例えば、移植用の細胞が挙げられる。移植用の細胞として、例えば、インスリン等のホルモンを放出することができる細胞が挙げられ、具体的には、インスリン分泌細胞、膵島及び膵島細胞等を挙げることができる。また、他の生物活性物質を放出することができる細胞として、ドーパミン分泌細胞、脳下垂体細胞、成長ホルモン分泌細胞、副甲状腺細胞、神経成長因子分泌細胞、血液凝固因子分泌細胞、肝細胞、上皮小体細胞、エリスロポエチン分泌細胞、ノルエピネフリン分泌細胞等を挙げることができる。好ましくは生理活性物質を産生する細胞（生理活性物質産生細胞）である。別の態様としては、生理活性天然物の産生細胞である。

[0072] 「インスリン分泌細胞」とは、インスリンを分泌する機能を有する細胞を意味し、例えば、膵島を構成する細胞においては、インスリンを分泌する β 細胞を意味する。また、「インスリン分泌細胞」は、分化、成熟や改変などによってインスリン分泌機能を有するようになった細胞であってもよく、例えば、iPS細胞、ES細胞、又は体性幹細胞（例えば、間葉系幹細胞）等の幹細胞を分化させて得られたインスリン分泌機能を有する細胞、幼若細胞や前駆細胞を成熟させて得られたインスリン分泌機能を有する細胞、及び、遺伝子組み換えによりインスリン分泌機能を付与された細胞も含み得る。ここで、当該細胞を分化や成熟させることには、当該細胞を培養させることが含まれ、すなわち、分化又は成熟させて得られた細胞とは、培養されて得られた細胞を含み得る。

「膵島」とは、別名ランゲルハンス氏島とも呼ばれる、平均約2000個の膵島細胞より構成される細胞塊である。膵島は、グルカゴンを分泌する α 細胞、インスリンを分泌する β 細胞、ソマトスタチンを分泌する δ 細胞、グ

レリンを分泌する ϵ 細胞、及び膵ポリペプチドを分泌する P P (pancreatic polypeptide ; 膵ポリペプチド) 細胞の 5 種の細胞から構成される。

[0073] 本明細書において、「膵島細胞」とは、上記の膵島を構成する 5 種類の細胞うちの少なくとも 1 種類の細胞を含むものであればよいが、少なくとも β 細胞を含むことが好ましい。いくつかの態様では、膵島細胞としては、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、及び P P 細胞の全てを含む混合物でもよく、膵島に含まれた状態のものでもよい。

[0074] また、「膵島細胞」は、分化、成熟や改変などにより膵島細胞になったものであってもよい。この場合、「膵島細胞」には、例えば、i P S 細胞、E S 細胞、及び体性幹細胞（例えば、間葉系幹細胞）等の幹細胞を分化させて得られた膵島細胞、及び幼若細胞や前駆細胞を成熟させて得られた膵島細胞も含み得る。

[0075] 「インスリン分泌細胞」又は「膵島（膵島細胞を含む）」としては、移植用途として用いる場合は、患者に移植した際に、患者の病的状態を回復することができる程度の生存性と機能とを有することが好ましい。インスリン分泌細胞、膵島又は膵島細胞の機能としては、例えば、インスリンを分泌することが挙げられ、移植後においてもグルコース応答性が維持されていることが好ましい。

[0076] 「インスリン分泌細胞」、「膵島」又は「膵島細胞」のドナーは、動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳類であり、具体的にはヒト、ブタ、サル、ラット又はマウスなどが挙げられ、更に好ましくはヒト又はブタである。「インスリン分泌細胞」、「膵島」又は「膵島細胞」のドナーは、いくつかの態様では、ドナー不足解消の観点からブタである。「インスリン分泌細胞」、「膵島」又は「膵島細胞」としては、ドナーである動物から得られた膵島又は膵島細胞、あるいはドナー由来細胞から得られたインスリン分泌細胞又は膵島細胞のいずれかでもよく、例えば、ヒト由来の E S 細胞または i P S 細胞から分化したインスリン分泌細胞又は膵島細胞でもよい。

[0077] 「インスリン分泌細胞」、「膵島」又は「膵島細胞」がブタ由来である場

合には、成体のブタ膵島、又は、胎生期、新生児期、もしくは周産期のブタ膵島、又は当該膵島から得られたインスリン分泌細胞もしくは膵島細胞が挙げられる。当該膵島は適宜培養してから使用するようにしてもよく、胎生期、新生児期、もしくは周産期のブタ膵島を成熟させた膵島を使用してもよい。

[0078] 血液凝固因子分泌細胞としては、例えば、第VIII因子分泌細胞及び第IX因子分泌細胞を挙げることができる。

[0079] 他の移植用の細胞として、好ましくは、動物細胞、より好ましくは脊椎動物由来細胞、更に好ましくは哺乳類由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞又はブタ由来細胞を挙げることができる。脊椎動物由来細胞（特に、ヒト由来細胞）の種類は、幹細胞（例えば、多能性幹細胞（万能細胞）、又は体性幹細胞）、前駆細胞、又は成熟細胞の何れでもよい。多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹（ES）細胞、生殖幹（GS）細胞、又は人工多能性幹（iPS）細胞を使用することができる。体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（MSC）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、又は神経幹細胞を使用することができる。これらの幹細胞を分化誘導したものをを使用することもできる。

[0080] 前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、皮膚、真皮、表皮、筋肉、心筋、神経、骨、軟骨、内皮、脳、上皮、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、口腔内、角膜、骨髓、臍帯血、羊膜、又は毛に由来する細胞を使用することができる。ヒト由来細胞としては、例えば、ES細胞、iPS細胞、MSC、軟骨細胞、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、間充織細胞、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞、神経細胞、肝細胞、線維芽細胞、角膜内皮細胞、血管内皮細胞、角膜上皮細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、又は造血幹細胞を使用することができる。また、細胞の由来は、自家細胞又は他家細胞の何れでも構わない。

[0081] コア層に封入することができる薬理成分の好ましい態様としては、生体内で薬理活性や生物活性を有する物質自体、あるいはそれらを産生する細胞ま

たは微生物である。ある態様としては生物活性物質産生細胞であり、別の態様としては、生理活性物質産生細胞であり、別の態様としては、生理活性天然物の産生細胞である。

コア層に封入することができる微生物としては、特に制限されることは無いが、生物活性物質を放出することができる微生物が好ましく、例えば、好気性菌、嫌気性菌等を挙げることができる。

コア層に用いる「化学架橋アルギン酸」は、「5. 化学架橋アルギン酸（コア層及びアニオン性ポリマー層）」で詳述する。

また、本発明の一態様の構造体のコア層には、薬理成分以外の添加物を付加することも可能である。例えば、薬理成分が生物活性物質等の場合には、徐放を制御するための製剤化を行ったものや、担体に担持したものをを用いることが有効な場合がある。細胞の場合には、細胞の生存性や機能を維持するための物質を用いることが有効な場合があり、また、コア層において薬理成分を均一に分散させるような物質を加えることも挙げられる。本発明の構造体は、これらが含まれた態様および含まれていない態様の双方を包含する。薬理成分以外の添加物として、例えば、アルギン酸以外的高分子物質が挙げられ、具体的な成分としては、生体親和性のある高分子物質として、ポリ乳酸（PLA）、ポリ乳酸-ε-グリコール酸（PLGA）、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸等が挙げられる。また、例えば、薬理成分として細胞や微生物を使用する場合には、培地や培養液成分あるいは医薬品として通常用いられる製剤成分が含まれる場合もある。

[0082] 1-2. コア層を被覆するカチオン性ポリマー層

カチオン性ポリマー層は、コア層の化学架橋アルギン酸との静電的な相互作用により、コア層の表面を被覆する層である。カチオン性ポリマー層を形成するカチオン性ポリマーとしては、化学架橋アルギン酸との静電的な相互作用により膜を形成できるものであれば特に制限されないが、例えば、アミノ基又はイミノ基等の塩基性官能基を有するポリマーが挙げられる。具体的には、例えば、キトサン、グリコールキトサン等の多糖類、ポリリジン（好

ましくは、ポリ-L-リジン（PLL）、ポリオルニチン（好ましくは、ポリ-L-オルニチン（PLO））、ポリアルギニン（好ましくは、ポリ-L-アルギニン）及びポリヒスチジン（好ましくは、ポリ-L-ヒスチジン）等のポリアミノ酸、プロタミン、コラーゲン及びゼラチン等のタンパク質、ポリエチレンイミン、ポリビニルアミン、ポリビニルピリジン、ポリビニルイミダゾール及びポリアリルアミン等の合成ポリマーなどが挙げられる。カチオン性ポリマーは、好ましくは、キトサン、PLLまたはPLOであり、より好ましくはPLLまたはPLOであり、更に好ましくはPLOである。PLOは、市販品を用いることができ、例えば、ポリ-L-オルニチン塩酸塩やポリ-L-オルニチン臭化水素酸塩（SIGMA-ALDRICH）が入手可能である。

[0083] カチオン性ポリマーとしてPLOを使用する場合、PLOの重量平均分子量は、好ましくは、500～30万、より好ましくは、1000～20万、更に好ましくは5000～10万であり、ある態様としては1万～5万である。PLOの重量平均分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）によって測定することができる。

[0084] 1-3. カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマー層

アニオン性ポリマー層は、カチオン性ポリマーとの静電的な相互作用によりカチオン性ポリマー層の外側を被覆する層である。アニオン性ポリマー層を形成するアニオン性ポリマーとしては、カチオン性ポリマーとの静電的な相互作用により膜を形成できるものであれば特に制限されないが、例えば、カルボキシル基又は硫酸基等の酸性官能基を有するポリマーが挙げられる。具体的には、例えば、アルギン酸、ポリガラクトロン酸、ペクチン、ペクチン酸、カルボキシメチルセルロース、カラギーナン、ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸等の多糖類、ポリアクリル酸及びポリスチレンスルホン酸等の合成ポリマーなど、およびこれらの化学修飾体が挙げられ、これらの化学架橋体も含まれる。また、当該アニオン性ポリマーは、カチオン性ポリマーとの静電的な相互作用により膜を形成できる特性を有すればよく、全体とし

て中性を示すポリマーであってもよい。アニオン性ポリマー層は、好ましくは、生体適合性を有するアニオン性ポリマーからなる層である。また、使用用途や使用部位の環境に応じて、適切な特性を有するアニオン性ポリマー又はその化学修飾体を選択するのがよく、例えば、癒着が懸念される場合は、細胞接着性又は細胞増殖性が低いアニオン性ポリマーを選択することができる。

[0085] いくつかの態様では、アニオン性ポリマー層は、アルギン酸又は化学架橋アルギン酸である。ここでいう「アルギン酸」は、後述する「2. アルギン酸（化学修飾アルギン酸誘導体を合成する際に用いる原料のアルギン酸、及びアニオン性ポリマー層に用いられるアルギン酸について）」で述べるアルギン酸（例えば、アルギン酸ナトリウム）である。また、「化学架橋アルギン酸」は、後述する「5. 化学架橋アルギン酸（コア層及びアニオン性ポリマー層）」で述べる化学架橋アルギン酸である。アニオン性ポリマー層は、好ましくは、アルギン酸である。

[0086] 1-4. 構造体の形状等

ここで提供される構造体は、種々の形状のものが挙げられる。構造体の形状は、例えば、ビーズ、シート、ファイバー等であってもよく、これらの形状を組み合わせた形状や、立体的に変形させた形状でもよい。また、3Dプリンターなどで自由な形状を造形させたものでもよい。

構造体の大きさは、形状を維持できる大きさであれば特に制限されないが、その使用用途や使用部位等に応じて、適切な大きさを選択するのがよい。構造体のコア層の径は、構造体の外径未満であって50%以上であることが好ましい。

また、構造体におけるカチオン性ポリマー層の厚さは、層を形成し維持できる厚さであれば特に制限されないが、カチオン性ポリマーの種類又は構造体の使用用途や使用部位等に応じて、適切な厚さを選択するのがよい。ある態様としては0.01~1000 μm であり、別の態様としては0.1~200 μm であり、更に別の態様としては1~100 μm である。例えば、カ

チオン性ポリマーとしてP L Oを使用する場合、カチオン性ポリマー層の厚さは、ある態様として0. 1 ~ 2 0 0 μ mであり、別の態様としては1 ~ 1 0 0 μ mである。

また、構造体におけるアニオン性ポリマー層の厚さは、層を形成し維持できる厚さであれば特に制限されないが、アニオン性ポリマーの種類又は構造体の使用用途や使用部位等に応じて、適切な厚さを選択するのがよい。ある態様としては、0. 0 1 ~ 1 0 0 0 μ mであり、別の態様としては0. 1 ~ 2 0 0 μ mであり、更に別の態様としては1 ~ 1 0 0 μ mである。例えば、アニオン性ポリマーとしてアルギン酸又は化学修飾アルギン酸を使用する場合、アニオン性ポリマー層の厚さは、ある態様として0. 1 ~ 2 0 0 μ mであり、別の態様としては1 ~ 1 0 0 μ mである。

[0087] 構造体をビーズの形状とする場合、構造体の形状は、球状であれば、特に限定されず、カプセルと言う場合もある。形状がビーズとは、対称構造の球体に限定されるものではなく、非対称構造や変形させた形状でもよく、例えば、楕円体、長球（長楕円体）、ビーンズ状やおはじき状のものも含まれる。

構造体をビーズの形状とする場合、その直径（以下、非球体の場合は、長径又は最大径）は、0. 0 1 ~ 2 0 m mであることが好ましく、0. 1 ~ 1 0 m mであることがより好ましい。ある態様としては、1 ~ 8 m mであり、1 ~ 6 m mである。別の態様としては、2 ~ 6 m mであり、3 ~ 6 m mであり、4 ~ 6 m mである。

[0088] また、構造体をビーズの形状とする場合、コア層の直径は、0. 0 1 ~ 2 0 m mであることが好ましく、0. 1 ~ 1 0 m mであることがより好ましい。ある態様としては、1 ~ 8 m mであり、1 ~ 6 m mである。また、コア層の直径は、構造体の直径未満であって5 0 %以上であることが好ましい。

[0089] また、構造体をビーズの形状とする場合、カチオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0. 1 ~ 2 0 0 μ mであり、別の態様としては1 ~ 1 0 0 μ mである。

- [0090] また、構造体をビーズの形状とする場合、アニオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0.1～200 μm であり、別の態様としては1～100 μm である。
- [0091] 構造体をシートの形状とする場合、構造体の形状は、平板状であれば、特に限定されない。平板とは、平らな板を意味し、厚さがほぼ一定で広い面積を有する板状のことを示すが、構造体としてのシートの形状、すなわち平板状とは、厚さは均一でなくてもよく、例えば、一方が厚くて他方が薄い傾斜構造であってもよい。また、シートの形状とは、平板状の構造体を変形させた形状でもよく、例えば、メッシュ状、ハチの巣状、穴あけがあるもの、筒状に丸めたものも含まれる。当該シートの形状として、例えば、三角形、四角形、五角形のような多角形や円形等の平板状が挙げられる。なお、本明細書において、構造体をシートの形状とする場合の3層構造とは、コア層、カチオン性ポリマー層、アニオン性ポリマー層をこの順番で単に積層したしたものではなく、コア層の上面、下面及び側面をカチオン性ポリマー層で被覆し、さらにカチオン性ポリマー層の上面、下面及び側面をアニオン性ポリマー層で被覆したものであるが、このように被覆することで得られたシート形状の構造体を切断して造形したものも、構造体に含まれる。
- [0092] 構造体をシートの形状とする場合、その厚さは、0.1～10mmであることが好ましく、0.2～5mmであることがより好ましい。
- [0093] また、構造体をシートの形状とする場合、コア層の厚さは、0.1～10mmであることが好ましく、0.2～5mmであることがより好ましい。また、コア層の厚さは、構造体の厚さ未満であって50%以上であることが好ましい。
- [0094] また、構造体をシートの形状とする場合、カチオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0.1～200 μm であり、別の態様としては1～100 μm である。
- [0095] また、構造体をシートの形状とする場合、アニオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0.1～200 μm であり、別の態様としては1～10

0 μ mである。

[0096] なお、ここでいうカチオン性ポリマー層及びアニオン性ポリマー層の厚さとは、シート形状の構造体の上面又は下面のいずれか一方の厚さを指す。

[0097] また、シート形状の構造体は、板状全体でほぼ一定の厚さであることが好ましい。板状の構造体において厚さのばらつきは、好ましくは $\pm 20\%$ 以内である。

[0098] いくつかの態様では、シート状の構造体は、例えば、平板上の形状を、縦 \times 横 \times 厚さで表すと、縦が1 \sim 200 mm、横が1 \sim 200 mm、厚さが0.2 \sim 5 mmである。別のいくつかの態様では、シート状の構造体は、例えば、縦 \times 横で示される面積が1 \sim 40000 mm²、厚さが0.2 \sim 5 mmである。これらの態様において、構造体は、円形、四角形、六角形、八角形などの形状を取ることも可能である。

[0099] 構造体をファイバーの形状とする場合、構造体の形状は、繊維状の細長い形状であれば、特に限定されない。形状がファイバーとは、中心軸に対する垂直方向の断面形状が円形であるものに限定されるものではなく、非対称構造や変形させた形状でもよく、例えば、断面が、三角形、四角形、五角形のような多角形のものや楕円形も含まれる。好ましくは、円形の断面形状である。また、ファイバーの両端を連結してリング状に造形したのものや、そのリングを複数連結しチェーン状にしたものも含まれ、ファイバーを束にしたものや、シート状に連結させたものも含まれる。

構造体をファイバーの形状とする場合、その断面の直径（以下、非円形の場合は、長径又は最大径）は、0.01 \sim 20 mmであることが好ましく、0.1 \sim 10 mmであることがより好ましく、0.2 \sim 5 mmであることが更に好ましく、0.2 \sim 2 mmであることが特に好ましい。

また、構造体をファイバーの形状とする場合、コア層の断面の直径は、0.01 \sim 20 mmであることが好ましく、0.1 \sim 10 mmであることがより好ましく、0.2 \sim 5 mmであることがさらに好ましく、0.2 \sim 2 mmであることが特に好ましい。また、コア層の断面の直径は、構造体の断面の

直径未満であって50%以上であることが好ましい。

また、構造体をファイバーの形状とする場合、カチオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0.1~200 μm であり、別の態様としては1~100 μm である。

また、構造体をファイバーの形状とする場合、アニオン性ポリマー層の厚さは、ある態様としては0.1~200 μm であり、別の態様としては1~100 μm である。

また、構造体をファイバーの形状とする場合、長さは限定されるものではないが、例えば、ある態様としては10mm~50mであり、別の態様としては10mm~30cm未満であり、さらに別の態様としては30cm~50mである。

[0100] なお、本明細書中、「~」を用いて示された数値範囲は、「~」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0101] 2. アルギン酸（化学修飾アルギン酸誘導体を合成する際に用いる原料のアルギン酸、及びアニオン性ポリマー層に用いられるアルギン酸について）

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

[0102] アルギン酸は、褐藻類の海藻から抽出し、精製して製造される天然多糖類

の一種であり、D-マンヌロン酸（M）とL-グルロン酸（G）が重合したポリマーである。アルギン酸のD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の構成比（M/G比）、すなわちゲル強度は、主に海藻等の由来となる生物の種類によって異なり、また、その生物の生育場所や季節による影響を受け、M/G比が約0.2の高G型からM/G比が約5の高M型まで高範囲にわたる。アルギン酸のM/G比、MとGの配列の仕方等によってアルギン酸の物理化学的性質が異なり、また好ましい用途が異なる場合がある。アルギン酸類のゲル化能力および生成したゲルの性質は、M/G比によって影響を受け、一般的に、G比率が高い場合にはゲル強度が高くなることが知られている。M/G比は、その他にも、ゲルの硬さ、もろさ、吸水性、柔軟性などにも影響を与える。したがって、本発明で使用するアルギン酸は、その最終使用用途に応じて、適切なM/G比や適切な粘度のものをを用いるのがよい。

[0103] アルギン酸の工業的な製造方法には、酸法とカルシウム法などがあるが、本発明ではいずれの製法で製造されたものも使用することができる。精製により、HPLC法による定量値が80～120質量%の範囲に含まれるものが好ましく、90～110質量%の範囲に含まれるものがより好ましく、95～105質量%の範囲に含まれるものがさらに好ましい。本発明においては、HPLC法による定量値が前記の範囲に含まれるものを高純度のアルギン酸と称する。本発明で使用するアルギン酸又はその塩は、高純度アルギン酸であることが好ましい。市販品としては、例えば、キミカアルギンシリーズとして、（株）キミカより販売されているもの、好ましくは、高純度食品・医薬品用グレードのものを購入して使用することができる。市販品を、さらに適宜精製して使用することも可能である。例えば、低エンドトキシン処理することが好ましい。精製法や低エンドトキシン処理方法は、例えば特開2007-75425号公報に記載されている方法を採用することができる。

本明細書中、用いられる「アルギン酸エステル」、「アルギン酸塩」とは、特に限定されないが、イオン架橋や化学架橋を行うための反応試薬と反応

させるため、これらの反応を阻害する官能基を有していないことが必要である。アルギン酸エステルとしては、好ましくは、アルギン酸プロピレングリコール、等が挙げられる。

[0104] 本明細書中、アルギン酸塩としては、例えば、アルギン酸の1価の塩、アルギン酸の2価の塩が挙げられる。アルギン酸の1価の塩としては、アルギン酸のD-マンヌロン酸またはL-グルロン酸のカルボン酸の水素イオンを、 Na^+ や K^+ などの1価金属イオンとイオン交換することで行われる塩である。好ましくは、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、等が挙げられ、より好ましくは、アルギン酸ナトリウムまたはアルギン酸カリウムであり、特に好ましくは、アルギン酸ナトリウムである。アルギン酸の2価の塩としては、好ましくは、アルギン酸カルシウム、アルギン酸マグネシウム、アルギン酸バリウム、アルギン酸ストロンチウム、等が挙げられる。

[0105] アルギン酸塩を本発明の構造体の構成成分として使用する場合、ある態様としてはアルギン酸カルシウムであり、別の態様としてはアルギン酸ナトリウムである。

アルギン酸塩を本発明の化学修飾アルギン酸誘導体の製造原料として、あるいは本発明の構造体を製造する過程において用いる場合、「アルギン酸の1価金属塩」が好適に用いられる場合がある。アルギン酸の1価金属塩としては、具体的には、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウムなどを挙げることができるが、特に、アルギン酸ナトリウムが好ましい。

[0106] 本明細書中、アルギン酸は、アルギン酸を(ALG)として、アルギン酸の任意のカルボキシル基の1つを $-\text{COOH}$ として、 $(\text{ALG})-\text{COOH}$ と表記する場合がある。

[0107] 本発明で使用するアルギン酸は、その最終使用用途に応じて、適切な重量平均分子量のものをを用いるのがよい。例えば、重量平均分子量が1万~1,000万のものをを用いるのが好ましく、より好ましくは10万以上500万以下、さらに好ましくは15万以上300万以下である。

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

[0108] [表13]

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

前記アルギン酸ナトリウムA-1、A-2、A-3、B-1、B-2、及びB-3の各物性値は、下記の各種方法により測定した。測定方法は、当該方法に限定されるものではないが、測定方法により各物性値が上記のものと異なる場合がある。本発明の構造体の製造に用いるアルギン酸ナトリウムの限定されない一つの好ましい態様としては「A-2、A-3、B-2及びB-3」であり、別の態様としては「A-2及びB-2」である。構造体をキレート処理する場合のある態様としては「A-2及びA-3」であり、さらに別の態様としては「A-2」である。

[0109] [アルギン酸ナトリウムの粘度測定]

日本薬局方（第16版）の粘度測定法に従い、回転粘度計法（コーンプレート型回転粘度計）を用いて測定した。具体的な測定条件は以下のとおりである。試料溶液の調製は、MilliQ水を用いて行った。測定機器は、コーンプレート型回転粘度計（粘度粘弾性測定装置レオストレスRS600（Thermo Haake

GmbH) センサー : 35 / 1) を用いた。回転数は、1 w / w % アルギン酸ナトリウム溶液測定時は 1 r p m とした。読み取り時間は、2 分間測定し、開始 1 分から 2 分までの平均値とした。3 回の測定の平均値を測定値とした。測定温度は 20 °C とした。

[0110] [アルギン酸ナトリウムの重量平均分子量測定]

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

[0111] [前処理方法]

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

[0112] (1) ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 測定

[測定条件 (相対分子量分布測定)]

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

溶離液 : 200 mM 硝酸ナトリウム水溶液

流量 : 1.0 mL / min

濃度 : 0.05 %

検出器 : RI 検出器

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 200 μL

分子量標準 : 標準プルラン、グルコース

[0113] (2) GPC-MALS 測定

[屈折率増分 (dn/dc) 測定 (測定条件)]

示差屈折率計 : Optilab T-rEX

測定波長 : 658 nm

測定温度 : 40 °C

溶媒 : 200 mM 硝酸ナトリウム水溶液

試料濃度 : 0.5 ~ 2.5 mg / mL (5 濃度)

[0114] [測定条件（絶対分子量分布測定）]

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

溶離液：200mM硝酸ナトリウム水溶液

流量：1.0mL/min

濃度：0.05%

検出器：RI検出器、光散乱検出器（MALS）

カラム温度：40℃

注入量：200μL

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

[0115] アルギン酸類のD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の構成比（M/G比）

は、主に海藻等の由来となる生物の種類によって異なり、また、その生物の生育場所や季節による影響を受け、M/G比が約0.2の高G型からM/G比が約5の高M型まで高範囲にわたる。アルギン酸類のゲル化能力および生成したゲルの性質は、M/G比によって影響を受け、一般的に、G比率が高い場合にはゲル強度が高くなることが知られている。M/G比は、その他にも、ゲルの硬さ、もろさ、吸水性、柔軟性などにも影響を与える。用いるアルギン酸類および/またはその塩のM/G比は、通常、0.1～4.0であり、ある態様では、0.1～3.0であり、ある態様では、0.1～2.0であり、ある態様では0.5～1.8であり、ある態様では0.8～1.2である。又、別の態様では、0.1～0.5である。

[0116] アルギン酸は、高分子多糖類であり、分子量を正確に定めることは困難であるが、一般的に重量平均分子量で1000～1000万、好ましくは1万～800万、より好ましくは2万～300万の範囲である。天然物由来の高分子物質の分子量測定では、測定方法により値に違いが生じることが知られている。

- [0117] 本明細書において化学修飾アルギン酸誘導体またはアルギン酸又はその塩の分子量を特定する場合は、特段のことわりがない限り、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により算出される重量平均分子量である。本発明で使用するアルギン酸又はその塩としても、その最終使用用途に応じて、適切な分子量分布のものをを用いることが望ましい。
- [0118] 例えば、後記実施例に記載したゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）又はゲルろ過クロマトグラフィー（これらを合わせてサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）ともいう）の測定条件にて、好ましくは、10万～500万であり、より好ましくは15万～300万である。また、ある態様では、50万～300万の範囲であり、より好ましくは、100万～250万であり、さらに好ましくは、100万～200万の範囲である。
- [0119] また、例えば、GPC-MALS（SEC-MALS）法によれば、絶対重量平均分子量を測定することができる。GPC-MALS法により測定した重量平均分子量（絶対分子量）は、好ましくは1万以上、より好ましくは5万以上、さらに好ましくは6万以上であり、また好ましくは、100万以下、より好ましくは80万以下、さらに好ましくは70万以下、とりわけ好ましくは50万以下である。その好ましい範囲は、1万～100万であり、より好ましくは5万～80万であり、さらに好ましくは6万～50万である。
- [0120] 通常、高分子多糖類の分子量を上記のようなSEC、SEC-MALSを用いた手法で算出する場合、約10%～約30%の測定誤差を生じうる。例えば、50万であれば35万～65万、100万であれば70万～130万程度の範囲で値の変動が生じうる。本明細書中、分子量測定の記載において「約」と記載した場合、当該数値の±10%迄、ある態様では当該数値の±20%迄の値も含み得るものである。
- [0121] ここで、一般に天然物由来の高分子物質は、単一の分子量を持つのではなく、種々の分子量を持つ分子の集合体であるため、ある一定の幅を持った分子量分布として測定される。代表的な測定手法はゲルろ過クロマトグラフィーである。ゲルろ過クロマトグラフィーにより得られる分子量分布の代表的

な情報としては、重量平均分子量（ M_w ）、数平均分子量（ M_n ）、分散比（ M_w/M_n ）があげられる。

[0122] 分子量の大きい高分子の平均分子量への寄与を重視したのが重量平均分子量であり、下記式で表される。

$$[0123] \quad M_w = \frac{\sum (W_i M_i)}{W} = \frac{\sum (H_i M_i)}{\sum (H_i)}$$

数平均分子量は、高分子の総重量を高分子の総数で除して算出される。

$$[0124] \quad M_n = \frac{W}{\sum N_i} = \frac{\sum (M_i N_i)}{\sum N_i} = \frac{\sum (H_i)}{\sum (H_i / M_i)}$$

ここで、 W は高分子の総重量、 W_i は*i*番目の高分子の重量、 M_i は*i*番目の溶出時間における分子量、 N_i は分子量 M_i の個数、 H_i は*i*番目の溶出時間における高さである。

[0125] 天然物由来の高分子物質の分子量測定では、測定方法により値に違いが生じることが知られている（ヒアルロン酸の例：Chikako YOMOTA et. al. Bull. Natl. Health Sci., Vol. 117, pp135-139 (1999)、Chikako YOMOTA et. al. Bull. Natl. Inst. Health Sci., Vol. 121, pp30-33 (2003)）。アルギン酸の分子量測定については、固有粘度（Intrinsic viscosity）から算出する方法、SEC-MALLS（Size Exclusion Chromatography with Multiple Angle Laser Light Scattering Detection）により算出する方法が記載された文献がある（ASTM F2064-00 (2006)、ASTM International発行）。本発明においては、重量平均分子量は、上記文献に示されるような常法にて、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により分子量を測定し、プルランを標準物質として用いた校正曲線により算出した値とすることができる。

[0126] 又、本発明においては、重量平均分子量は、上記文献に示されるような常

法にて、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）—MALSにより測定した絶対分子量とすることができる。

アルギン酸類の分子量の測定は、常法に従い測定することができる。

[0127] 本明細書中においてアルギン酸又はその塩の分子量を特定する場合は、特段のことわりがない限り、ゲルろ過クロマトグラフィーにより算出される重量平均分子量である。分子量測定にゲルろ過クロマトグラフィーを用いる場合の代表的な条件は、例えば、後述する本実施例の条件を採用することができる。カラムは、例えば、Superose 6 Increase 10/300 GLカラム（GEヘルスケアサイエンス社）を用いることができ、展開溶媒として、例えば、0.15 mol/L NaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）を使用することができ、分子量標準としてブルーデキストラン、チログロブリン、フェリチン、アルドラーゼ、コンアルブミン、オブアルブミン、リボヌクレアーゼAおよびアプロチニンを用いることができる。

[0128] 本明細書中で用いられるアルギン酸の粘度は、特に限定されないが、1 w/w%のアルギン酸類の水溶液として粘度を測定した場合、好ましくは、10 mPa·s～1000 mPa·s、より好ましくは、50 mPa·s～800 mPa·sである。

[0129] アルギン酸の水溶液の粘度の測定は、常法に従い測定することができる。例えば、回転粘度計法の、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計（ブルックフィールド型粘度計）、円すい—平板形回転粘度計（コーンプレート型粘度計）等を用いて測定することができる。好ましくは、日本薬局方（第16版）の粘度測定法に従うことが望ましい。より好ましくは、コーンプレート型粘度計を用いる。

[0130] アルギン酸類は、褐藻類から抽出された当初は、分子量が大きく、粘度が高めだが、熱による乾燥、精製などの過程で、分子量が小さくなり、粘度は低めとなる。製造工程の温度等の条件管理、原料とする褐藻類の選択、製造工程における分子量の分画などの手法により分子量の異なるアルギン酸類を

製造することができる。さらに、異なる分子量あるいは粘度を持つ別ロットのアルギン酸類と混合することにより、目的とする分子量を有するアルギン酸類とすることも可能である。

[0131] 本明細書中で用いられるアルギン酸は、いくつかの態様においては、低エンドトキシン処理されていないアルギン酸あり、又は別のいくつかの態様においては、低エンドトキシン処理されたアルギン酸である。低エンドトキシンとは、実質的に炎症、または発熱を惹起しない程度にまでエンドトキシンレベルが低いことをいう。より好ましくは、低エンドトキシン処理されたアルギン酸類であることが望ましい。

[0132] 低エンドトキシン処理は、公知の方法またはそれに準じる方法によって行うことができる。例えば、ヒアルロン酸ナトリウムを精製する、菅らの方法（例えば、特開平9-324001号公報など参照）、 β 1,3-グルカン（例えば、特開平8-269102号公報など参照）、アルギネート、ゲランガム等の生体高分子塩を精製する、ウィリアムらの方法（例えば、特表2002-530440号公報など参照）、ポリサッカライドを精製する、ジェームスらの方法（例えば、国際公開第93/13136号パンフレットなど参照）、ルイスらの方法（例えば、米国特許第5589591号明細書など参照）、アルギネートを精製する、ハーマンフランクらの方法（例えば、Appl Microbiol Biotechnol (1994) 40:638-643など参照）等またはこれらに準じる方法によって実施することができる。低エンドトキシン処理は、それらに限らず、洗浄、フィルター（エンドトキシン除去フィルターや帯電したフィルターなど）によるろ過、限外ろ過、カラム（エンドトキシン吸着アフィニティーカラム、ゲルろ過カラム、イオン交換樹脂によるカラムなど）を用いた精製、疎水性物質、樹脂または活性炭などへの吸着、有機溶媒処理（有機溶媒による抽出、有機溶剤添加による析出・沈降など）、界面活性剤処理（例えば、特開2005-036036号公報など参照）など公知の方法によって、あるいはこれらを適宜組合せて実施することができる。これらの処理

の工程に、遠心分離など公知の方法を適宜組み合わせてもよい。アルギン酸の種類に合わせて適宜選択するのが望ましい。

[0133] エンドトキシンレベルは、公知の方法で確認することができ、例えば、リムルス試薬（LAL）による方法、エンドスペシー（登録商標）ES-24Sセット（生化学工業株式会社）を用いる方法などによって測定することができる。

[0134] 用いられるエンドトキシンの処理方法は特に限定されないが、その結果として、アルギン酸類のエンドトキシン含有量が、リムルス試薬（LAL）によるエンドトキシン測定を行った場合に、500エンドトキシン単位（EU）/g以下であることが好ましく、さらに好ましくは、100EU/g以下、とりわけ好ましくは、50EU/g以下、特に好ましくは、30EU/g以下である。本発明において、「実質的にエンドトキシンを含まない」とは、日局エンドトキシン試験により測定したエンドトキシン値が前記の数値範囲にあるものを意味する。低エンドトキシン処理されたアルギン酸ナトリウムは、例えば、Sea Matrix（登録商標）（持田製薬株式会社）、PRONOVA™ UPLVG（FMCBioPolymer）など市販品により入手可能である。

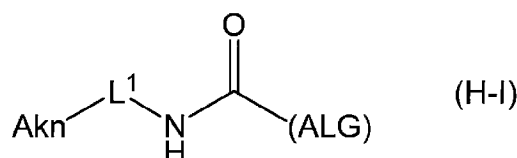
[0135] 3. 化学修飾アルギン酸誘導体

3-1. 化学修飾アルギン酸誘導体（Huisgen型）

いくつかの態様において、本明細書中の化学修飾アルギン酸誘導体は、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基にアミド結合及び2価のリンカーを介して、Huisgen反応における反応性基又は当該反応性基の相補的な反応性基が導入されたものである。

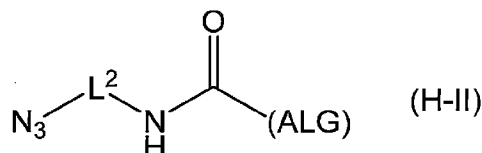
より具体的には、下記式（H-1）：

[化33]



[式 (H-I) 中、(ALG) はアルギン酸を表わし；-NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹- は、環状アルキン基 (Akn) と結合する 2 価のリンカーである] で表される化学修飾アルギン酸誘導体、及び下記式 (H-II) :

[化34]



[式 (H-II) 中、(ALG) はアルギン酸を表わし；-NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L²- は、アジド基と結合する 2 価のリンカーである] で表される化学修飾アルギン酸誘導体である。

前記の 2 価のリンカー (-L¹- 又は -L²-) は、反応性基と当該反応性基と相補的な反応性基との反応を阻害しない限り、任意の直鎖状基の使用が可能である。具体的には、例えば、直鎖のアルキレン基 (-CH₂)_n-、n = 1 ~ 30 (当該基中の -CH₂- は、-C(=O)-、-CONH-、-O-、-NH-、-S-、ベンゼン環、複素環 (ピリジン環、ピペリジン環、ピペラジン環、等の 5 ~ 6 員芳香族複素環又は 5 ~ 6 員非芳香族複素環)、等の基で複数個 (例えば、1 ~ 10 個、又は 1 ~ 5 個) 置き換えられても良く、当該 -CH₂- の水素原子は、オキソ基 (=O)、C₁₋₆ アルキル基 (例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基、等の基)、ハロゲン原子 (例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、等)、水酸基 (-OH)、等の基から選択される基で複数個 (例えば、1 ~ 10 個、又は 1 ~ 5 個) 置換されていても良い) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0136] 環状アルキン基 (Akn) としては、7 ~ 10 員の飽和炭化水素環基であって、当該環を構成する 1 つの結合が三重結合となったものであり、好ましくは 8 員環の環状アルキン基である。環状アルキン基は、さらにベンゼン環

、3～8員の炭化水素環、あるいはピリジン環等の芳香族複素環から選択される1～2の環基が縮合していてもよく、また、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-C(=O)-$ 、 $-CONH-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、から選択される1～2の基で置き換えられてもよい。また、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、オキソ基(=O)、 C_{1-6} アルキル基(例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、*iso*-プロピル基、等の基)、ハロゲン原子(例えば、フッ素原子や塩素原子)、水酸基($-OH$)、等の基から選択される1～2個の基で置換されていてもよい。但し、これらに限定されるものではない。

[0137] 前記態様[2]の構造体を製造する際に用いる化学修飾アルギン酸誘導体の、ある態様としては、前記式(H-1)中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n_1}-$ (ここで、 $n_1=1\sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-OCONH-$ 、 $-NHCOO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1～10個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されていてもよい)であり、

Akn が、8員環の環状アルキン基(ここで、当該環状アルキン基は、さらに1～2個のベンゼン環、シクロプロパン環、あるいは1,2,3-トリアゾール環が縮合していてもよく、縮合した環において $-L^1-$ と結合してもよく、また、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-C(=O)-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NH-$ から選択される1～2の基で置き換えられてもよく、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基、フッ素原子、水酸基、 C_{1-3} アルキルオキシ基等の基から選択される1～2個の基で置換されていてもよい)である化合物であり、

前記式(H-11)中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n_2}-$ (ここで、 $n_2=1\sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1～10個の基、またはベンゼン環もしくはピリジン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキ

ル基で置換されていてもよい) である化合物である。

[0138] ここに、上記化合物中、 n_1 の好ましい態様としては1~20であり、より好ましい態様としては1~15 (例えば、2~15) である。また、 $-L^1-$ の好ましい態様としては、 $-(CH_2)_{n_1}-$ 中、 $-CH_2-$ が、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-O-CO-NH-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個、より好ましくは1~3個の基で置き換えられても良い基である。 Akn として好ましくは、1~2個のベンゼン環が縮合していてもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が $-NH-$ で置き換えられていてもよい8員環の環状アルキン基である。 n_2 の好ましい態様としては1~20であり、より好ましい態様としては1~15 (例えば、2~15) である。また、 $-L^2-$ の好ましい態様としては、 $-(CH_2)_{n_2}-$ 中、 $-CH_2-$ が、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個、より好ましくは1~3個の基で置き換えられても良い基である。

[0139] 前記態様[2]の構造体を製造する際に用いる化学修飾アルギン酸誘導体の、好ましい態様としては、式(H-1)中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n_1}-$ (ここで、 $n_1=1\sim 15$ (例えば、2~15) であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-O-CO-NH-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されていてもよい) であり、

Akn が、8員環の環状アルキン基 (ここで、当該環状アルキン基は、さらに1~2個のベンゼン環が縮合していてもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が $-NH-$ で置き換えられた8員環基でもよい) である化合物であり、

前記式(H-1)中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n_2}-$ (ここで、 $n_2=1\sim 15$ (例えば、2~15) であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-$

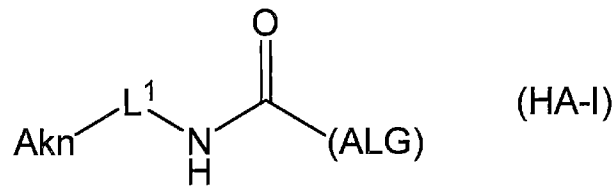
NHCO-、-O-及び-NH-から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良い)である化合物である。

[0140] 化学修飾アルギン酸誘導体の、ある態様としては、前記式(H-I)中、 $-L^1-$ 、 Akn の各定義が、前述の態様[2-1]~[2-5]中のいずれかの定義と同じである化合物である。

また、化学修飾アルギン酸誘導体の、ある態様としては、前記式(H-II)中、 $-L^2-$ の定義が、前述の態様[2-1]~[2-5]中のいずれかの定義と同じである化合物である。

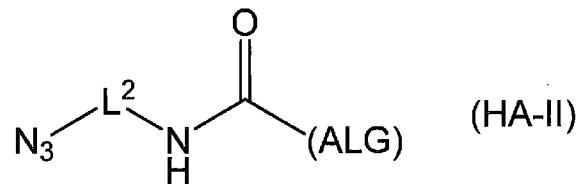
[0141] また、いくつかの態様では、下記式(HA-I) :

[化35]



[式(HA-I)中、(ALG)、 $-L^1-$ 、 Akn の定義は、前述の態様[4]中の定義と同じである]で表される化学修飾アルギン酸誘導体、及び下記式(HA-II) :

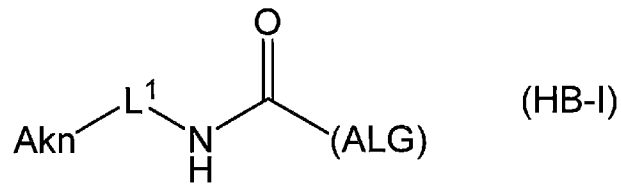
[化36]



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

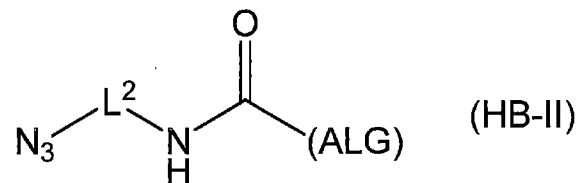
[0142] また、いくつかの態様では、下記式(HB-I) :

[化37]



[式 (HB-I) 中、(ALG)、 $-\text{L}^1-$ 、Akn の定義は、前述の態様 [3-1] ~ [3-6] 中のいずれかの定義と同じである] で表される化学修飾アルギン酸誘導体、及び下記式 (HB-II) :

[化38]



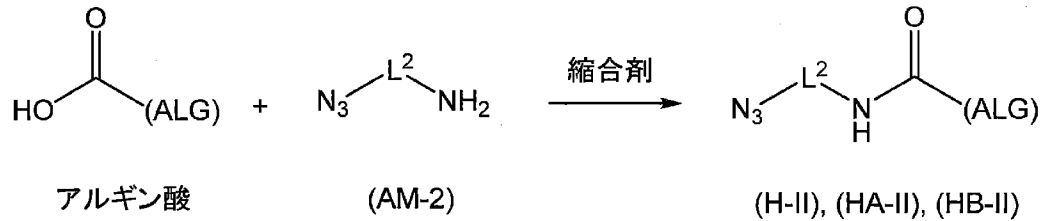
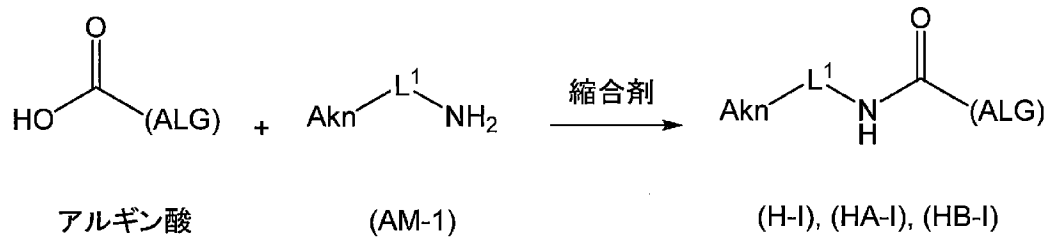
[式 (HB-II) 中、(ALG)、 $-\text{L}^2-$ の定義は、前述の態様 [3-1] ~ [3-6] 中のいずれかの定義と同じである] で表される化学修飾アルギン酸誘導体である。

[0143] 前記式 (H-I) ~ 式 (HB-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の $-\text{NH}-\text{CO}-$ 基における、イミノ基 ($-\text{NH}-$) の水素原子をメチル基に置換し $-\text{N}(\text{Me})-\text{CO}-$ 基とすることが可能である。

[0144] 前記式 (H-I) ~ 式 (HB-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体における、リンカー ($-\text{L}^1-$ 、 $-\text{L}^2-$) と化学修飾アルギン酸の結合様式は、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 結合、又は $-\text{N}(\text{Me})-\text{CO}-$ があり; 好ましくは、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 結合である。

[0145] 本明細書における化学修飾アルギン酸誘導体である式 (H-I) ~ 式 (HB-II) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体は、例えば、下記式の方法により製造することが可能である (詳細は、4. 化学修飾アルギン酸誘導体の合成方法を参照)。

[化39]



[0146] 本明細書の式(H-I)～式(HB-II)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の重量平均分子量は、10万Da～300万Daであり、好ましくは30万Da～250万Daであり、より好ましくは50万Da～200万Daである。当該両アルギン酸誘導体の分子量は、後述する方法により求めることができる。

[0147] 本明細書中、式(H-I)、式(HA-I)又は式(HB-I)のAkn-L¹-NH-基は、アルギン酸構成単位の全てのカルボキシル基に結合している必要はなく、又、式(H-II)、式(HA-II)又は式(HB-II)のN₃-L²-NH-基は、アルギン酸構成単位の全てのカルボキシル基に結合している必要はない。

[0148] 本明細書中、式(H-I)、式(HA-I)又は式(HB-I)のAkn-L¹-NH-基を反応性基と言う場合、式(H-II)、式(HA-II)又は式(HB-II)のN₃-L²-NH-基が相補的な反応性基となる。又、逆に式(H-II)、式(HA-II)又は式(HB-II)のN₃-L²-NH-基を反応性基と言う場合、式(H-I)、式(HA-I)又は式(HB-I)のAkn-L¹-NH-基が相補的な反応性基となる。

[0149] 本明細書中、反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、各々、0.1%～30%又は1%～30%であり、好ましくは2%～20%であり、より好

ましくは3%~10%である。

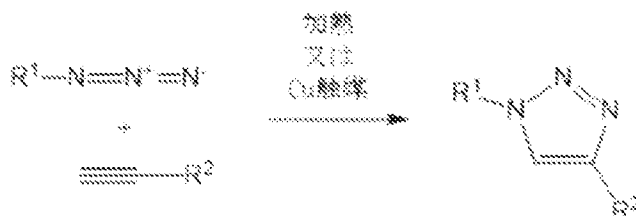
[0150] 前記反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、アルギン酸類の繰り返し単位であるウロン酸単糖単位のうち、各反応性基が導入されたウロン酸単糖単位の数を百分率で表した値である。本明細書中、特に断らない限り、化学修飾アルギン酸誘導体（式（H-1）~式（HB-11））における反応性基又は相補的な反応性基の導入率に用いられる%は、mol%を意味する。各反応性基又は相補的な反応性基の導入率は、後述の実施例に記載の方法により求めることができる。

[0151] 本明細書中、式（H-1）、式（HA-1）又は式（HB-1）中の環状アルキン基（Ak_n）及び式（H-11）、式（HA-11）又は式（HB-11）中のアジド基が、Huisgen反応によりトリアゾール環を形成し、これにより架橋が形成される。

[0152] 3-1-1. Huisgen反応

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

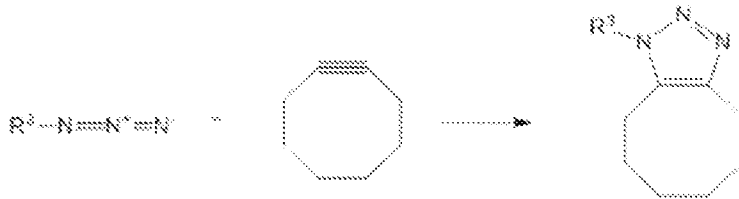
[化40]



又、銅触媒を用いないHuisgen反応がWittigとKrebsにより報告がなされている。即ち、シクロオクチンとフェニルアジドを混合するだけで環化付加体得られる反応である（下記式中、 R^3 =フェニルである）。本反応は、シクロオクチンの三重結合が大きく歪んでいるため、フェニ

ルアジドとの反応による歪みの解消が駆動力となり、反応が自発的に進行することにより、触媒が不要となった。

[化41]



[0153] 以上の様に、H u i s g e n 反応は、置換された 1 級アジド、2 級アジド、3 級アジド、芳香族アジド、等を有するアジド化合物、及びアジド基の相補的な反応性基である末端又は環状アルキン基を有する化合物を用いることができる。又、H u i s g e n 反応では、ほぼアジド基及びアルキン基のみが反応することから、反応基質中に種々の官能基（例えば、エステル基、カルボキシル基、アルケニル基、水酸基、アミノ基、等）を置換させることが可能である。

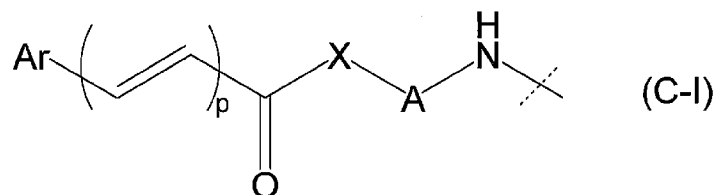
[0154] いくつかの態様では、望ましくない副生成物を生じさせず、銅触媒による細胞毒性を回避させる為に銅触媒を用いずに、短時間、容易に、且つ効率的に 1, 2, 3-トリアゾール環による架橋をアルギン酸分子間に形成させる為に、H u i s g e n 反応のアルキン基としては、例えば、環状アルキン基（シクロオクチル基、等）を用いる。

[0155] 好ましい態様の化学修飾アルギン酸誘導体の架橋方法においては、当該反応（H u i s g e n 反応）にて望ましくない副生成物がほとんど形成されない。したがって、本発明の構造体のコア層に、細胞や生物活性物質等、種々の薬理成分を取込むことが可能となる。

[0156] 3-2. 化学修飾アルギン酸誘導体（桂皮酸型）

光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体とは、アルギン酸のカルボキシル基の一部が下記式（C-1）〔式中、破線右側は含まない〕：

[化42]



[Ar、p、-X-、-A-の定義は、後述の通りであり、例えば態様 [8-1] 中の定義と同じであり、好ましくは [8-2] 又は [8-3] 中に記載の光反応性基で置換されたもの、すなわち、アルギン酸のカルボキシル基の一部に光反応性基を有するものである。特に好ましい態様としては、[8-3] 中に記載の化学修飾アルギン酸誘導体である。光反応性基（「光架橋基」という場合がある）は、光反応において環化が進行する部分（光反応性部分）を含む。光反応性部分は、光照射によって二量化反応（環化反応）または重合反応を生じる部分であればよく、具体例としては、桂皮酸部分、置換桂皮酸部分、フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、置換フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、又は、ヘテロ環置換アクリル酸部分などが挙げられる。なお、式 (C-1) 中のアルケン部位は、一形態としてトランス体として記載しているが、光照射によって二量化反応（環化反応）または重合反応が進行する結合様式であれば良く、 $p=1$ の場合、トランス体でもシス体でも良く、 $p=2$ 場合、トランス体及びシス体を組み合わせた結合様式でも良く、前記を満たすものは式 (C-1) に含まれるものとする。

[0157] これら光反応性部分の中でも、二量化反応によりシクロブタン環を形成可能なビニレン基を有する部分が好ましく、例えば、桂皮酸部分、置換桂皮酸部分、フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、置換フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、およびヘテロ環置換アクリル酸部分が好ましい。

[0158] また、光反応性基は、光反応性部分とアルギン酸の両方に結合して両者を一定の距離に保つためのスペーサーが結合していてもよい。桂皮酸部分、置

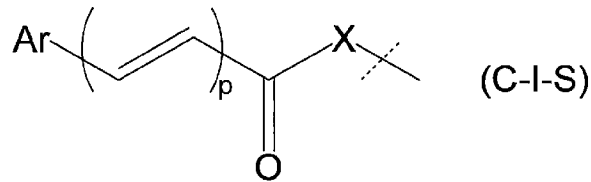
換桂皮酸部分、フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、置換フェニルペンタ-2,4-ジエノイック酸部分、ヘテロ環置換アクリル酸部分などの光反応性部分にスペーサーが結合した誘導体が、光反応性基（光架橋基）としては最も好ましい。

[0159] ここで、「光反応性基が導入された」とは、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基が、光反応性基におけるリンカーの末端アミノ基とアミド結合を形成することにより、アルギン酸の任意の1つ以上のカルボキシル基と光反応性基がリンカーを介して結合することを意味する。

[0160] 3-2-1. 光反応性部分およびリンカー

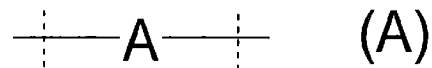
ここで、光反応性基である前記式（C-I）中、部分構造式（C-I-S））〔式中、破線右側は含まない〕：

[化43]



を「光反応性部分」という場合があり、また、下記式-A-〔式中、破線外側は含まない〕：

[化44]



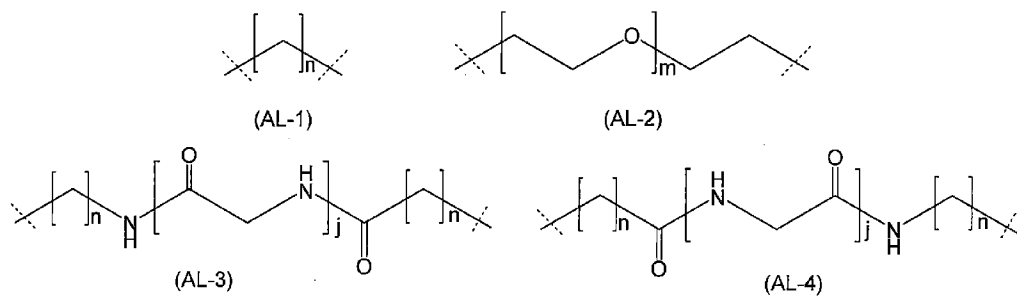
を「リンカー」という場合がある。

[0161] 光反応性部分において、Arは、C_{6~10}アリール基（前記C_{6~10}アリール基は、ヒドロキシル基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン原子、C_{1~6}アルキル基、ハロゲン化C_{1~6}アルキル基、C_{1~6}アルコキシ基、及び-NR^AR^B基（-NR^AR^B基における、R^A及びR^Bは、各々独立して、水素原子、C_{1~6}アルキル基、C_{2~7}アルカノイル基、又はC_{1~6}アルキルスルホニル基から選択

される基であり（但し、 $-NH_2$ 、 $-NH$ （ $C_{1\sim6}$ アルキル基）、及び $-N$ （ $C_{1\sim6}$ アルキル基）₂、及び $-N$ （ $C_{1\sim6}$ アルキル基）₂は除く））から任意に選ばれる1～3個の基が環上の水素原子と置換しても良く、前記 $C_{6\sim10}$ アリアル基に、 $C_{1\sim6}$ アルキル基及び $C_{1\sim6}$ アルコキシ基が又は2つの $C_{1\sim6}$ アルコキシ基が隣接して置換する場合、当該 $C_{1\sim6}$ アルキル基及び $C_{1\sim6}$ アルコキシ基の各基のアルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することにより、又は、当該2つの $C_{1\sim6}$ アルコキシ基の各アルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することにより、環状エーテルを形成しても良く、又は、前記 $C_{6\sim10}$ アリアル基に、 $C_{1\sim6}$ アルコキシ基及び $-NHR^G$ 基（ $-NHR^G$ 基における R^G は、 $C_{2\sim7}$ アルカノイル基又は $C_{1\sim6}$ アルキルスルホニル基である）が隣接して置換している場合、当該 $C_{1\sim6}$ アルコキシ基のアルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子と当該 $-NHR^G$ 基の水素原子が1つ除かれた窒素原子が結合することにより、3- N -（ $C_{2\sim7}$ アルカノイル）オキサゾリジン環、3- N -（ $C_{1\sim6}$ アルキルスルホニル）オキサゾリジン環、4- N -（ $C_{2\sim7}$ アルカノイル）モルホリン環、4- N -（ $C_{1\sim6}$ アルキルスルホニル）モルホリン環、4- N -（ $C_{2\sim7}$ アルカノイル）-1, 4-オキサゼパン環、又は4- N -（ $C_{1\sim6}$ アルキルスルホニル）-1, 4-オキサゼパン環を形成しても良い））である。

[0162] 前記のリンカー（ $-A-$ ）は、光反応性部分の光反応を阻害しない限り、任意の直鎖状基の使用が可能である。具体的には、下記式（AL-1）～（AL-4）〔各式中、両端の破線外側は含まない〕：

[化45]



(式 (AL-1) ~ (AL-4) 中、nは、1~18の整数を表わし；mは、1~9の整数を表わし；jは、0~9の整数を表わし；式 (AL-1) ~ (AL-4) 中のメチレン基 (-CH₂-) の水素原子は、ハロゲン原子、水酸基、C_{1~6}アルキル基、ヒドロキシC_{1~6}アルキル基、チオールC_{1~6}アルキル基、C_{1~6}アルキルチオC_{1~6}アルキル基、カルボキシC_{1~6}アルキル基、-NR^aR^b基、(R^aR^bN)-C_{1~6}アルキル基、(R^aR^bN)C(=O)-C_{1~6}アルキル基（前記-NR^aR^b基、(R^aR^bN)-C_{1~6}アルキル基、又は(R^aR^bN)C(=O)-C_{1~6}アルキル基における、R^a及びR^bは、各々独立して、水素原子、C_{1~6}アルキル基、C_{2~7}アルカノイル基、又はC_{1~6}アルキルスルホニル基から選択される基であり）、グアニジノC_{1~6}アルキル基、C_{7~16}アラルキル基、ヒドロキシC_{6~10}アリールC_{1~6}アルキル基、又はヘテロアリールC_{1~6}アルキル基等の基から選択される基で複数個（例えば、1~10個、又は1~5個）置き換えられても良く；式 (AL-1) ~ (AL-4) 中のメチレン基 (-CH₂-) の2つの水素原子がC_{1~6}アルキル基に置き換えられた場合、当該各C_{1~6}アルキル基から任意の水素原子が1つ除かれた炭素原子間で結合することによりC_{3~8}シクロアルキル環を形成しても良く；式 (AL-3) 又は式 (AL-4) 中の-NH-基は、隣接する炭素原子に置換する前記置換基と共に、非芳香族複素環を形成しても良い）。但し、式 (C-1) において、Ar=フェニル基、p=1、-A-=式 (AL-1)、かつn=3の場合、当該Arのフェニル基では前記フェニル基上の水素原子と置換しても良い置換基群から任意に選ばれる1~3個の基が前記フェニル基上の水素原子と置換する。

[0163] 前記の-X-は、-O-、-NH-、又は-N(C_{1~6}アルキル)-を表わし、好ましくは-O-である。

前記のpは、1、又は2の整数を表わす。

[0164] 本明細書中、特に断りのない限り、「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子、等が挙げられる。本明細書中、特に断りのない限り、「ハロゲン化C_{1~6}アルキル基」等におけ

る「ハロゲン化」とは、置換基として数個の、好ましくは1～5個の前記「ハロゲン原子」を有することを意味する。

[0165] 本明細書中、特に断りのない限り、「C_{1~6}アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、又はヘキシル、等の基が挙げられる。

[0166] 本明細書中、特に断りのない限り、「ハロゲン化C_{1~6}アルキル基」とは、前記「C_{1~6}アルキル」が数個の、好ましくは1～5個のハロゲン原子で任意に置換されている基を意味し、例えば、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、1, 1, 2, 2-テトラフルオロエチル、又はペンタフルオロエチル、等の基が挙げられる。

[0167] 本明細書中、特に断りのない限り、「C_{1~6}アルコキシ基」とは、前記「C_{1~6}アルキル」が酸素原子に結合したアルコキシを表し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、又はヘキシルオキシ、等の基が挙げられる。

[0168] 本明細書中、特に断りのない限り、「C_{6~10}アリール基」としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、インダニル、インデニル、又は1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル、等の基が挙げられる。

[0169] 本明細書中、特に断りのない限り、「C_{3~8}シクロアルキル環」とは、炭素数が3～8の環状の飽和炭化水素環（単環式又は多環式を含む）を意味し、例えば、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロペンタン、又はシクロオクタン、等環が挙げられる。

[0170] 本明細書中、特に断りのない限り、「非芳香族複素環」とは、「3～14員の飽和もしくは不飽和の非芳香族複素環」を意味する。

[0171] 本明細書中、特に断りのない限り、「3～14員の飽和もしくは不飽和の非芳香族複素環」とは、酸素原子、硫黄原子及び窒素原子から選ばれるヘテ

口原子を1～4個含有する3～14員の飽和もしくは不飽和の複素環を意味する。

[0172] 本明細書中、特に断りのない限り、「非芳香族複素環」としては、例えば、アジリジン、アゼチジン、ピロリジン、ピラゾリジン、オキサゾリジン、チアゾリジン、イソオキサゾリジン、イソチアゾリジン、イミダゾリジン、ペリリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、オキサゼパン、ジアゼパン、チアゼパン、オキサゾカン、ジアゾカン、チアゾカン、又はオキサジン、等の環が挙げられる。

本明細書中、特に断りのない限り、「5～6員非芳香族複素環」としては、上記の「非芳香族複素環」中、5員または6員のものであり、ある態様としては、ピペリジン又はピペラジンである。

[0173] 本明細書中、特に断りのない限り、「ヘテロアリアル」及び「芳香族複素環」基とは、窒素原子、硫黄原子、及び酸素原子からなる群から選ばれるヘテロ原子を1～5個、好ましくは1～3個含有する、単環式、多環式又は縮合環式（但し、多環式又は縮合環式の場合には部分的に水素化されていてもよい）の5～14員、好ましくは5～8員、より好ましくは5～7員、更に好ましくは5～6員のヘテロアリアルを意味する。

[0174] 本明細書中、特に断りのない限り、「5～6員ヘテロアリアル」及び「5～6員芳香族複素環」基とは、窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれるヘテロ原子を1～4個含有する5～6員ヘテロアリアルであり、「5～6員ヘテロアリアル」とは、特に断りのない限り、当該ヘテロアリアル環から任意の水素原子を除いてできる1価の基を意味する。例えば、ピロリル、フリル、チエニル、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、1, 2, 3-トリアゾリル、1, 2, 4-トリアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、フラザニル、1, 2, 3-チアジアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、1, 3, 4-チアジアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、1, 2

、3-トリアジニル、1, 2, 4-トリアジニル、1, 3, 5-トリアジニル、2H-1, 2, 3-チアジアジニル、4H-1, 2, 4-チアジアジニル、6H-1, 3, 4-チアジアジニル、ピリダジン-3(2H)-オン、ピリミジン-2(1H)-オン、ピラジン-2(1H)-オン、又はピリジン-2(1H)-オン等の基が挙げられる。

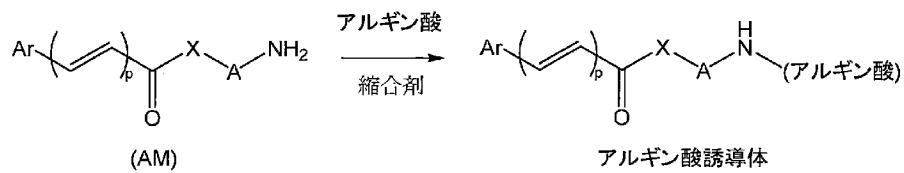
[0175] 本明細書中、特に断りのない限り、「ヘテロアリールC_{1~6}アルキル基」とは、前記「ヘテロアリール基」の任意の水素原子が、前記「C_{1~6}アルキル基」で置換した基を意味し、例えば、2-ピリジルメチル基、4-イミダゾイルメチル基、又は3-インドリルメチル基、等の基が挙げられる。

[0176] いくつかの態様において、光反応性基（光架橋基部分）は、光（例えば、波長が180~650nm付近）を吸収し、二量化（例えば、トルキシル酸誘導体に二量化）する光二量化性を有する。

[0177] また、リンカーを導入することで、光反応性基（光架橋基）の導入率が低い場合でも光架橋反応が進行する。光架橋反応により、化学修飾アルギン酸誘導体は、光架橋基を介して三次元の網目構造を形成する。好ましい化学修飾アルギン酸誘導体は、光架橋後の安定性が改善したものとなる。

[0178] 本明細書における、式(C-1)で表わされる光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体は、光反応性基をアルギン酸類のカルボキシル基の一部と置換することによりアルギン酸類に導入され、例えば、下記式の方法により製造することが可能である。なお、本明細書中、「(ALG)」及び「(アルギン酸)」はいずれもアルギン酸を表すものであり、構造式中、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合(-NHCO-)の表記が「(ALG)」及び「(アルギン酸)」の場合でそれぞれ異なることがあるが、いずれも場合も、リンカーとアルギン酸の間には共通して前記アミド結合が存在する。すなわち、-NHCO-(ALG)と-NH-(アルギン酸)は、同じ構造を表す。

[化46]



[0179] 本明細書の、式 (C-1) で表わされる光反応性基が導入された新規な化学修飾アルギニン酸誘導体の重量平均分子量は、10万Da~300万Daであり、好ましくは30万Da~250万Daであり、より好ましくは50万Da~200万Daである。当該アルギニン酸誘導体の分子量は、前述のアルギニン酸類と同様の方法により求めることができる。

[0180] 本明細書中、式 (C-1) で表わされる光反応性基は、アルギニン酸構成単位の全てのカルボキシル基に結合している必要はない。

[0181] 本明細書中、化学修飾アルギニン酸誘導体における式 (C-1) で表わされる光反応性基の導入率は、好ましくは0.5%~30%であり、より好ましくは0.5%~20%であり、更に好ましくは1.0%~15%である。

[0182] 式 (C-1) で表わされる光反応性基の導入率は、アルギニン酸類の繰り返し単位であるウロン酸単糖単位のうち、式 (C-1) で表わされる光反応性基が導入されたウロン酸単糖単位の数を百分率で表した値である。本明細書中、特に断らない限り、化学修飾アルギニン酸誘導体における式 (C-1) で表わされる光反応性基の導入率に用いられる%は、mol%を意味する。式 (C-1) で表わされる光反応性基の導入率は、後述の実施例に記載の方法により求めることができる。

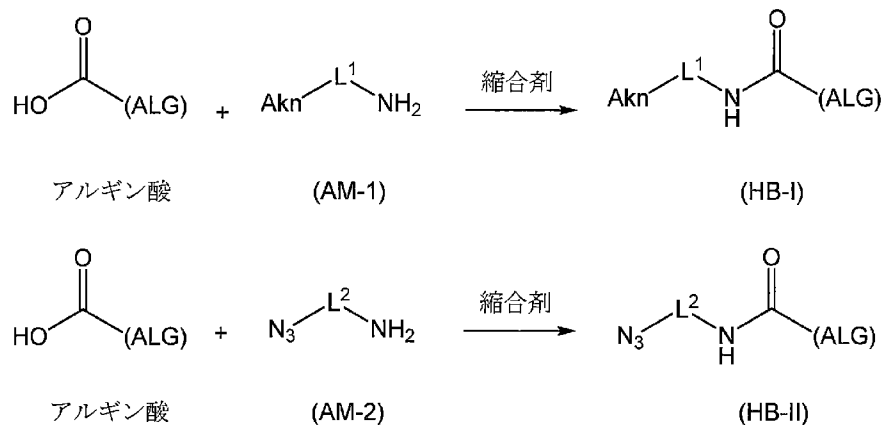
[0183] 4. 化学修飾アルギニン酸誘導体の合成方法

式 (HA-1) 又は式 (HA-11) で表わされる化学修飾アルギニン酸誘導体 (Huisgen型) は、PCT/JP2019/023478 (2019年6月13日出願) を参照することで製造することができる。また、式 (C-1) で表わされる化学修飾アルギニン酸誘導体 (桂皮酸型) は、PCT/JP2019/007655 (2019年2月27日出願) を参照するこ

とで製造することができる。

[0184] 式 (HB-I) 又は式 (HB-II) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体 (Huisgen型 (B)) は、各々、 H_2N-L^1-Akn (式中、 L^1 及び Akn は、前記態様 [3-1] 中の定義と同じである) で表わされるアミン誘導体 (AM-1)、又は、 $H_2N-L^2-N_3$ (式中、 L^2 は、前記態様 [3-1] 中の定義と同じである) で表わされるアミン誘導体 (AM-2) を、アルギン酸類の任意のカルボキシル基とを、縮合剤を用いる縮合反応により製造することができる。

[化47]



[0185] [式 (HB-I) の化学修飾アルギン酸誘導体の製法]

0.5重量%~1重量%のアルギン酸水溶液及び式 (AM-1) で表わされるアミンを用いて、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版 16、有機化合物の合成Ⅴ、カルボン酸および誘導体、エステル類、p35-70、酸アミドおよび酸イミド、p118-154、アミノ酸・ペプチド、p258-283、2007年、丸善』等に記載された方法に準じて、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (WSC·HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェイト (BOP試薬)、ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィニッククロリド (BOP-Cl)、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェイト (ClP)

、又は4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)、等から選択される縮合剤の存在下、アルギン酸が析出しない程度の、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン等のエーテル系溶媒、メタノール、エタノール、2-プロパノール、等のアルコール系溶媒、N,N-ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等から選択される溶媒と水との混合溶媒中、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム等の無機塩基、又はトリエチルアミン、ピリジン等の有機塩基の存在下又は非存在下にて、0℃から50℃間の温度で縮合反応を行うことにより、式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体を製造することができる。

[0186] [式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体の製法]

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

[0187] 前記、式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体の製法において、式(AM-1)又は式(AM-2)のアミンの導入率は、当該アミンの性質等を考慮することで、下記(i)~(v)等の反応条件を適宜選択して組み合わせることにより調節が可能になる。(i)縮合剤の当量の増減、(ii)反応温度の上昇・下降、(iii)反応時間の延長・短縮、(iv)反応基質のアルギン酸の濃度の調整、(v)式(AM-1)又は式(AM-2)のアミンの溶解度を上げる為に水に混和する有機溶媒を添加する、等。

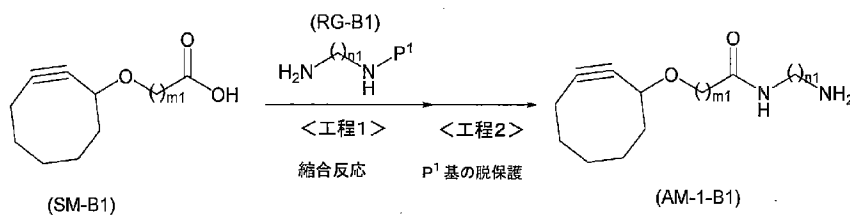
[0188] 以下に、式(AM-1)又は式(AM-2)で表わされるアミンのうち、より具体的なアミンの製造方法を示す。

[0189] 尚、以下の各製造方法中、m1、n1、m2a、n2a、p2a、m2b、n2b、p2b、m3、n3、p3、m4a、n4a、m4b、n4b、m5a、n5a、p5a、q5a、m5b、n5b、p5b、q5b、m6a、n6a、p6a、m6b、n6b、p6b、m7、n7、m8a、n8

a、m8b、n8b、m9a、n9a、p9a、m9b、n9b、p9b、m10、n10、p10、x1、x2、x2a、y2a、x2b、y2b、x3、y3、x4、y4、z4、x5a、y5a、x5b、y5b、x6a、y6a、z6a、v6a、x6b、y6b、z6b、v6b、x7a、y7a、z7a、x7b、y7b、z7b、x8a、y8a、z8a、x8b、y8b、z8b、x9a、y9a、z9a、x9b、y9b及びz9bの定義は前記態様 [3-1] 中の記載と同じ定義であり；P¹は-C(O)O-tertBu基、-C(O)O-Bn基、-C(O)CH₃基、-C(O)CF₃基、-SO₂Ph、-SO₂PhMe基、-SO₂Ph(NO₂)基、等から選択されるアミノ基の保護基であり；E=ハロゲン原子（フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、等）、-OTs基、-OMs基、等の脱離基である。

[0190] 又、以下の各製造方法中、保護基P¹の保護・脱保護は、文献公知の方法、例えば、『プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis 4th Edition) 第4版、2007年、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons)、グリーン (Greene) ら』の成書に記載された脱保護の方法に準じて、保護・脱保護を行うことができる。

[0191] [製造方法AM-A] 式 (AM-1-B1) で表されるアミンの製造方法：
[化48]

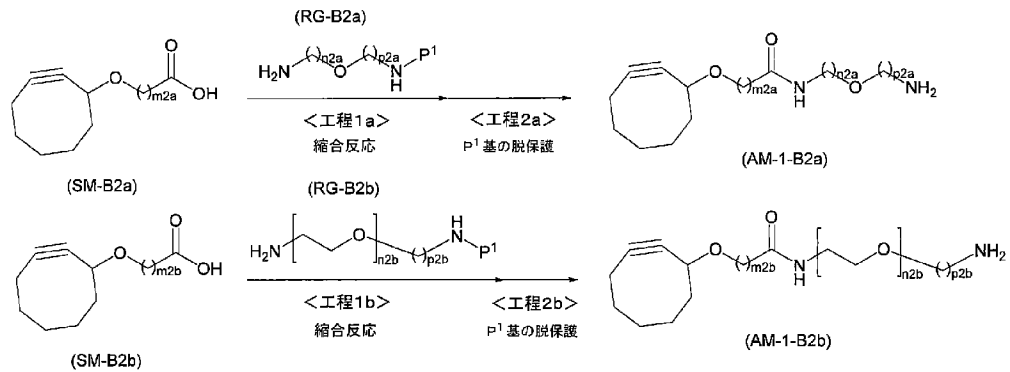


式 (SM-B1) の化合物及び式 (RG-B1) の化合物 [式 (SM-B1) の化合物及び式 (RG-B1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、前記 [式

〔HB-1〕の化学修飾アルギン酸誘導体の製法〕と同様な縮合反応を行い、続いて保護基P¹を脱保護することにより式(AM-1-B1)で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0192] 〔製造方法AM-B〕式(AM-1-B2a)及び式(AM-1-B2b)で表されるアミンの製造方法：

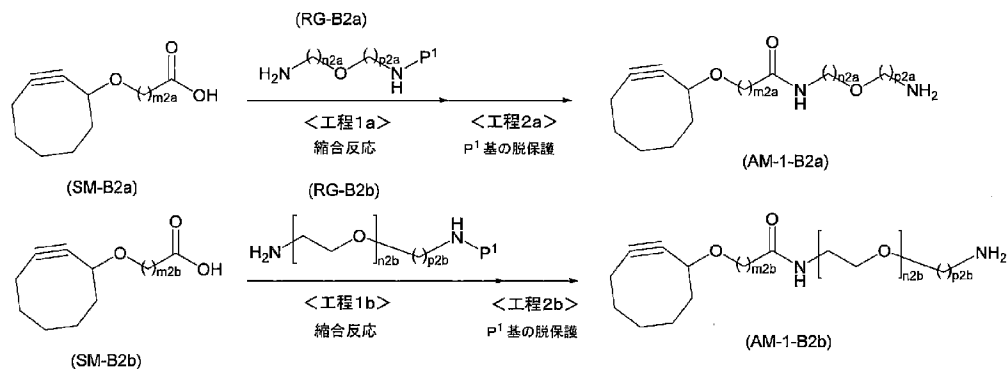
[化49]



式(SM-B2a)の化合物及び式(RG-B2a)の化合物〔式(SM-B2a)の化合物及び式(RG-B2b)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である〕を用いて、〔製造方法AM-A〕と同様にして、反応させることで式(AM-1-B2a)で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。同様にして、式(SM-B2b)の化合物及び式(RG-B2b)の化合物〔式(SM-B2b)の化合物及び式(RG-B2b)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である〕を用いて同様に反応を行うことで、式(AM-1-B2b)で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0193] 〔製造方法AM-C〕式(AM-1-B3)で表されるアミンの製造方法：

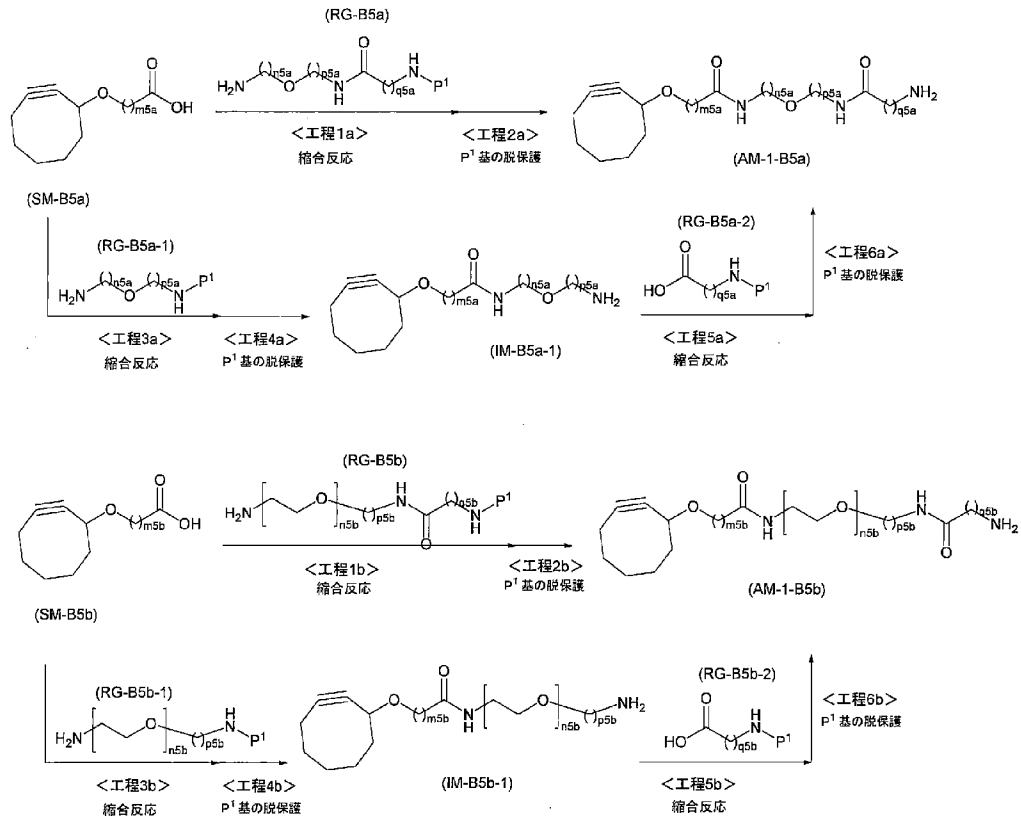
[化50]



[0194] 式 (SM-B3) の化合物 [式 (SM-B3) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、上記合成スキームに従い反応を行うことで (各工程の反応は [製造方法 AM-A] に記載の反応に準じる)、式 (AM-1-B3) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式 (RG-B3)、式 (RG-B3-1)、及び式 (RG-B3-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0195] [製造方法 AM-D] 式 (AM-1-B5a) 及び式 (AM-1-B5b) で表されるアミンの製造方法：

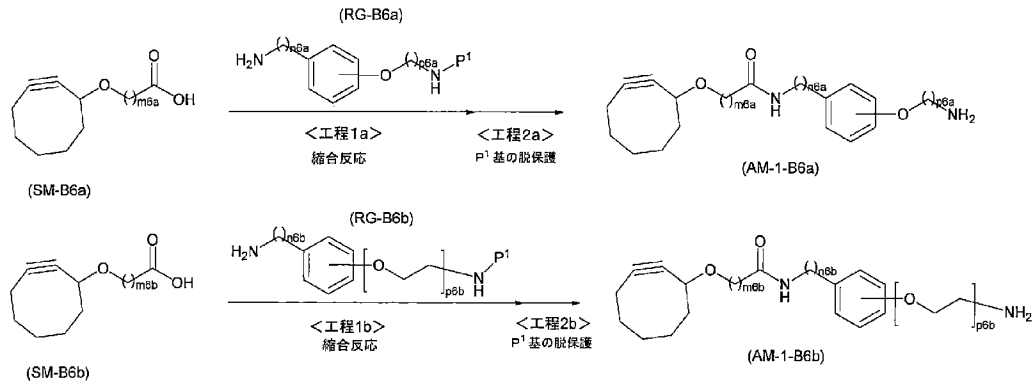
[化51]



[0196] 上記合成スキームに従い反応を行うことで（各工程の反応は〔製造方法AM-A〕に記載の反応に準じる）、式（AM-1-B5a）及び式（AM-1-B5b）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式（SM-B5a）、式（RG-B5a）、式（RG-B5a-1）、式（RG-B5a-2）、式（SM-B5b）、式（RG-B5b）、式（RG-B5b-1）、及び式（RG-B5b-2）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0197] [製造方法AM-E] 式（AM-1-B6a）及び式（AM-1-B6b）で表されるアミンの製造方法：

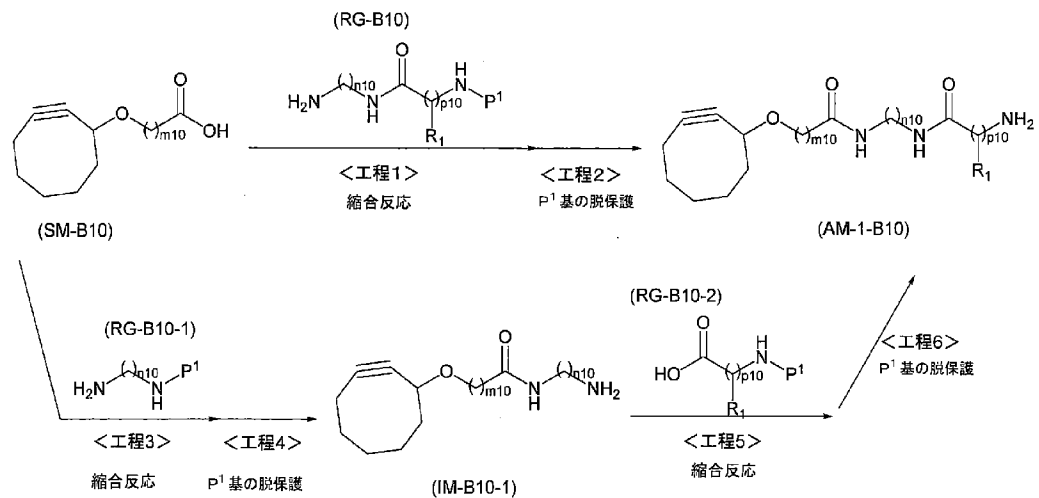
[化52]



[0198] 上記合成スキームに従い反応を行うことで（各工程の反応は〔製造方法A M-A〕に記載の反応に準じる）、式（AM-1-B6a）及び式（AM-1-B6b）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式（SM-B6a）、式（RG-B6a）、式（SM-B6b）、及び式（RG-B6b）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0199] [製造方法AM-F] 式（AM-1-B10）で表されるアミンの製造方法：

[化53]

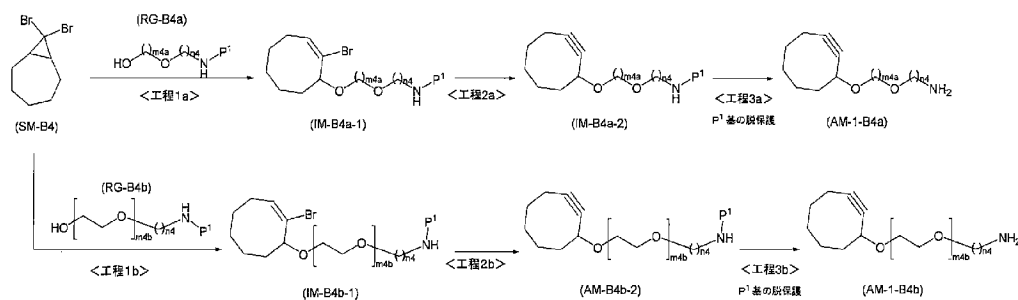


[0200] 上記合成スキームに従い反応を行うことで（各工程の反応は〔製造方法A M-A〕に記載の反応に準じる）、式（AM-1-B10）で表されるアミ

ン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式 (SM-B 1 0)、式 (RG-B 1 0)、式 (RG-B 1 0-1)、及び式 (RG-B 1 0-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0201] [製造方法AM-G] 式 (AM-1-B 4 a) 及び式 (AM-1-B 4 b) で表されるアミンの製造方法：

[化54]

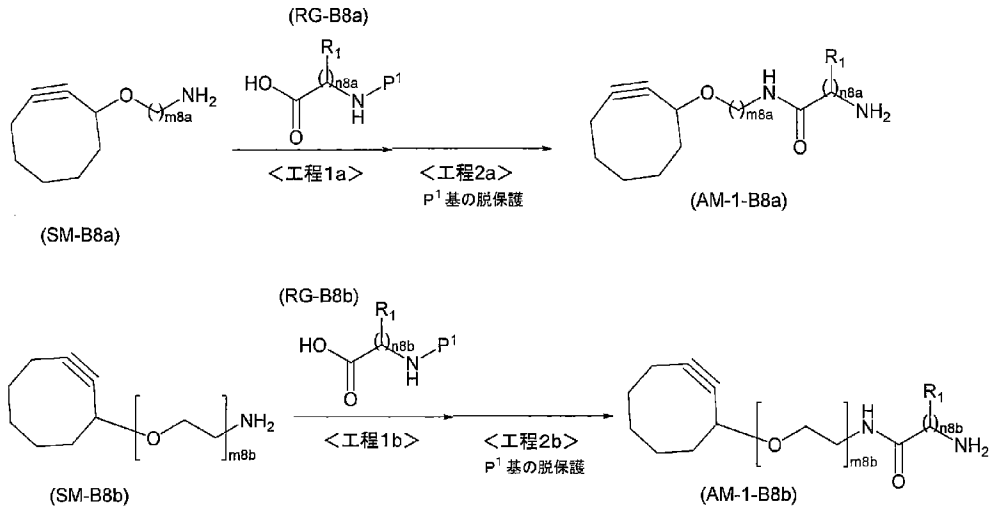


[0202] 式 (SM-B 4) の化合物及び式 (RG-B 4 a) の化合物 [式 (SM-B 4) の化合物及び式 (RG-B 4 a) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、文献公知の方法、例えば、『Journal of the American Chemical Society、126 (46)、p15046-15047、2004年』等に記載された方法に準じて、<工程1a>トリフルオロメタンスルホン酸銀、AgClO₄等の試薬存在下、トルエン、ジクロロメタン等の反応に関与しない溶媒中反応させることで、式 (IM-B 4 a-1) の化合物が得られ、<工程2a>続いて水素化ナトリウム、NaOMe等の塩基を用いて脱臭素化反応を行うことにより式 (IM-B 4 a-2) の化合物が得られ、<工程3a>更に、保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-1-B 4 a) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0203] 同様にして、式 (RG-B 4 a) の代わりに、式 (RG-B 4 b) を用いて、上記スキームに従い反応を行うことにより式 (AM-1-B 4 b) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0204] [製造方法AM-H] 式 (AM-1-B8a) 及び式 (AM-1-B8b) で表されるアミンの製造方法：

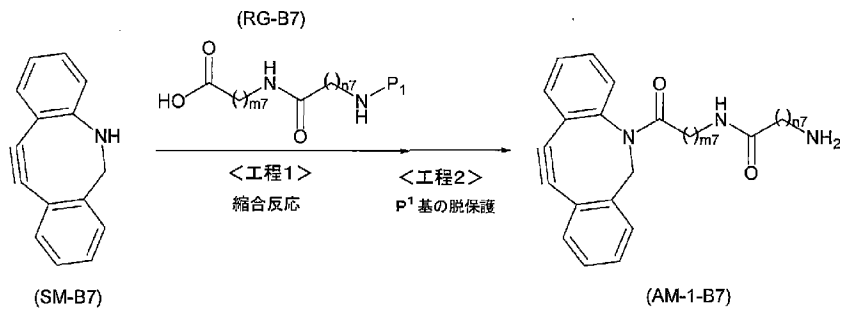
[化55]



[0205] 上記合成スキームに従い反応を行うことで（各工程の反応は〔製造方法AM-A〕に記載の反応に準じる）、式 (AM-1-B8a) 及び式 (AM-1-B8b) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式 (SM-B8a) 又は式 (SM-B8b) は、市販化合物又は〔製造方法AM-G〕に記載の反応に準じて製造ができる化合物であり、式 (RG-B8a) 又は式 (RG-B8b) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0206] [製造方法AM-J] 式 (AM-1-B7) で表されるアミンの製造方法：

[化56]

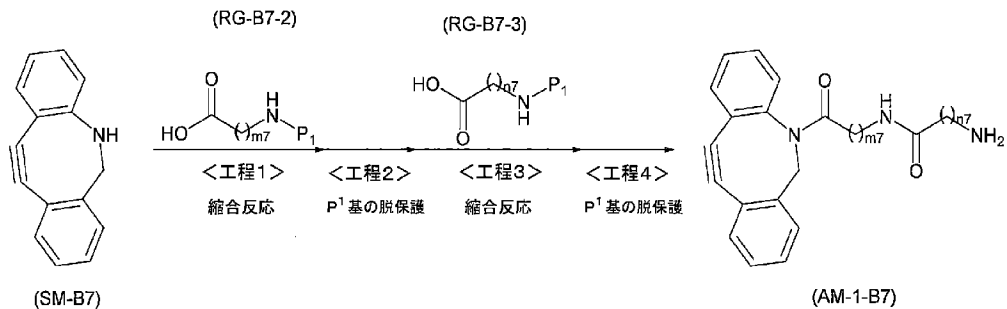


[0207] 式 (SM-B7) の化合物及び式 (RG-B7) の化合物 [式 (SM-B

7) の化合物及び式 (RG-B7) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、前記 [式 (HB-1) の化学修飾アルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行い、続いて保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-1-B7) で表されるアミン、又はその塩として製造することができる。

[0208] [製造方法 AM-J-2] 式 (AM-1-B7) で表されるアミンの製造方法：

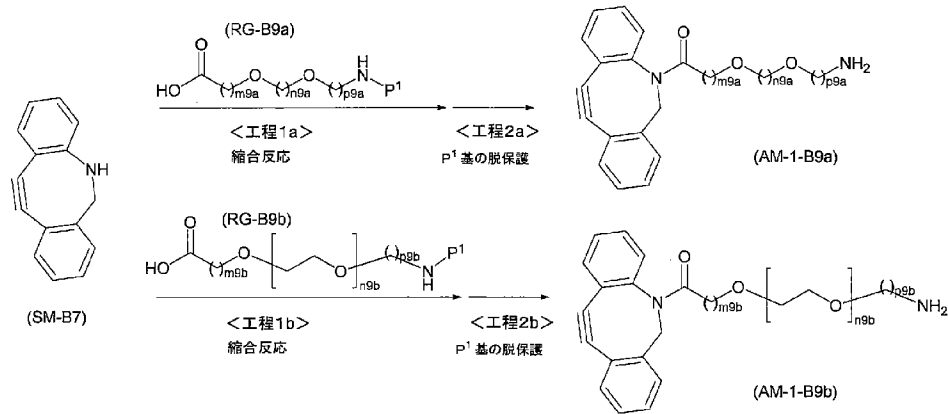
[化57]



[0209] 式 (SM-B7) の化合物及び式 (RG-B7-2) の化合物 [式 (SM-B7) の化合物及び式 (RG-B7-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、前記 [式 (HB-1) の化学修飾アルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行い (<工程1>及び<工程2>)、続いて保護基 P¹ を脱保護し、続いて、式 (RG-B7-3) の化合物 (市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である) を用いて、前記<工程1>と同様な縮合反応を行い、続いて保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-1-B7) で表されるアミン、又はその塩として製造することができる。

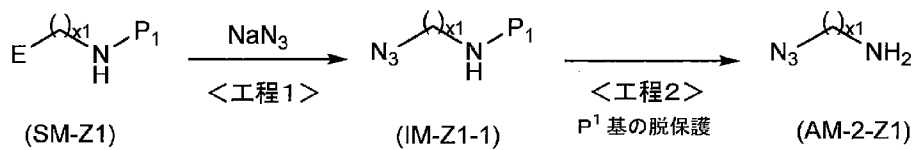
[0210] [製造方法 AM-K] 式 (AM-1-B9a) 及び式 (AM-1-B9b) で表されるアミンの製造方法：

[化58]



[0211] 上記合成スキームに従い反応を行うことで（各工程の反応は〔製造方法AM-J〕に記載の反応に準じる）、式（AM-1-B9a）及び式（AM-1-B9b）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。上記スキーム中、式（SM-B7）、式（RG-B9a）又は式（RG-B9b）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である。

[0212] [製造方法AM-L] 式（AM-2-Z1）で表されるアミンの製造方法：
 [化59]



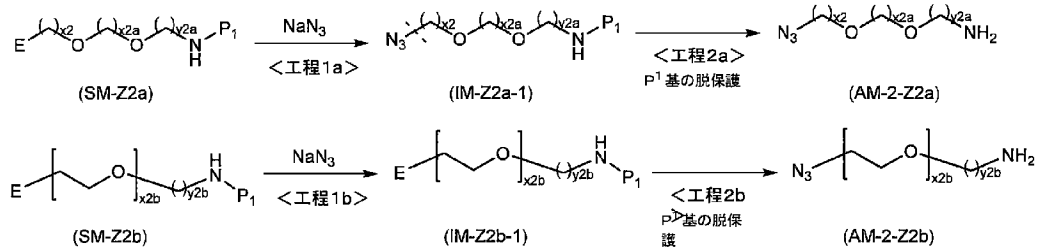
[0213] 式（SM-Z1）の化合物〔式（SM-Z1）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である〕を用いて、文献公知の方法、例えば、『Organometallics, 29 (23), p 6619-6622; 2010年』等に記載された方法に準じて、ジメチルスルホキシド等の反応に関与しない溶媒中、NaN₃を反応させアジド基を導入した後、保護基P¹を脱保護することにより式（AM-2-Z1）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0214] 尚、式（AM-2-Z1）で表されるアミン、又はその塩は、市販化合物

として入手可能なものもある。

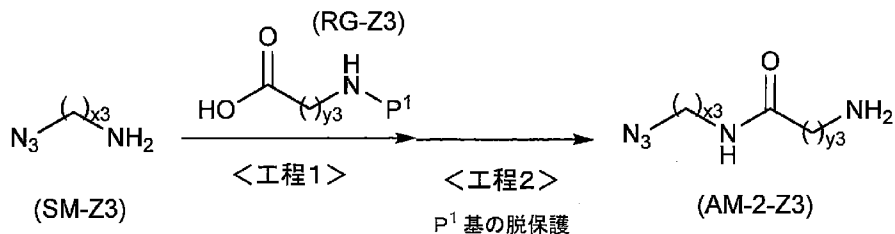
[0215] [製造方法AM-M] 式 (AM-2-Z 2 a) 及び式 (AM-2-Z 2 b) で表されるアミンの製造方法：

[化60]



[0216] 式 (SM-Z 2 a) の化合物又は式 (SM-Z 2 b) の化合物 [式 (SM-Z 2 a) の化合物及び式 (SM-Z 2 b) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、[製造方法AM-L]と同様にして、NaN₃を反応させアジド基を導入した後、保護基P¹を脱保護することにより式 (AM-2-Z 2 a) 又は式 (AM-2-Z 2 b) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。尚、式 (AM-2-Z 2 a) 又は式 (AM-2-Z 2 b) で表されるアミン、又はその塩は、市販化合物として入手可能なものもある。

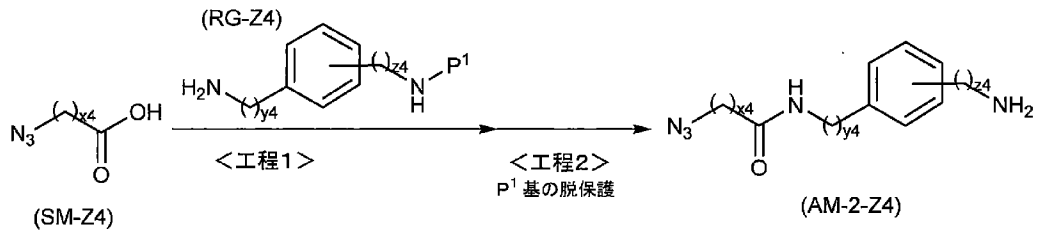
[0217] [製造方法AM-N] 式 (AM-2-Z 3) で表されるアミンの製造方法：
 [化61]



[0218] 式 (SM-Z 3) の化合物及び式 (RG-Z 3) の化合物 [式 (SM-Z 3) の化合物及び式 (RG-Z 3) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] の化合物を用いて、前記 [式 (HB-1) の化学修飾アルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反

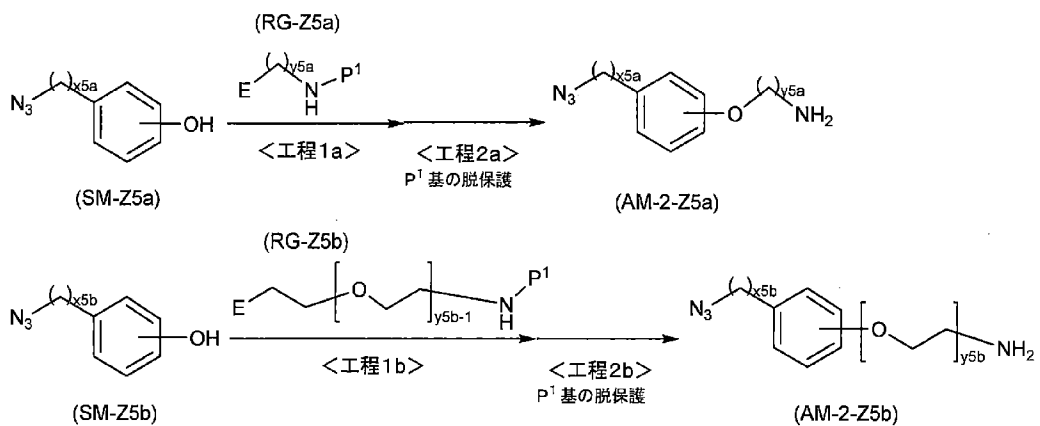
応を行い、続いて保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-2-Z3) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0219] [製造方法 AM-O] 式 (AM-2-Z4) で表されるアミンの製造方法：
[化62]



[0220] 式 (SM-Z4) の化合物及び式 (RG-Z4) の化合物 [式 (SM-Z4) の化合物及び式 (RG-Z4) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、前記 [式 (HB-1) の化学修飾アルギン酸誘導体の製法] と同様な縮合反応を行い、続いて保護基 P¹ を脱保護することにより式 (AM-2-Z4) で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0221] [製造方法 AM-P] 式 (AM-2-Z5a) 及び式 (AM-2-Z5b) で表されるアミンの製造方法：
[化63]



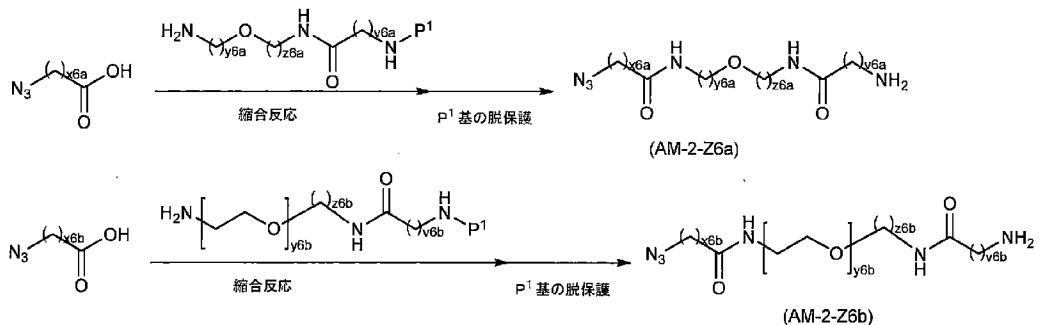
[0222] 式 (SM-Z5a) の化合物及び式 (RG-Z5a) の化合物 [式 (SM-Z5a) の化合物及び式 (RG-Z5a) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、水素

化ナトリウム、炭酸カリウム等の塩基存在下、テトラヒドロフラン、N，N－ジメチルホルムアミド、N－メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、等の反応に関与しない溶媒中で反応させることで、側鎖が導入された化合物が得られる。続いて保護基P¹を脱保護することにより、式（AM－2－Z5a）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

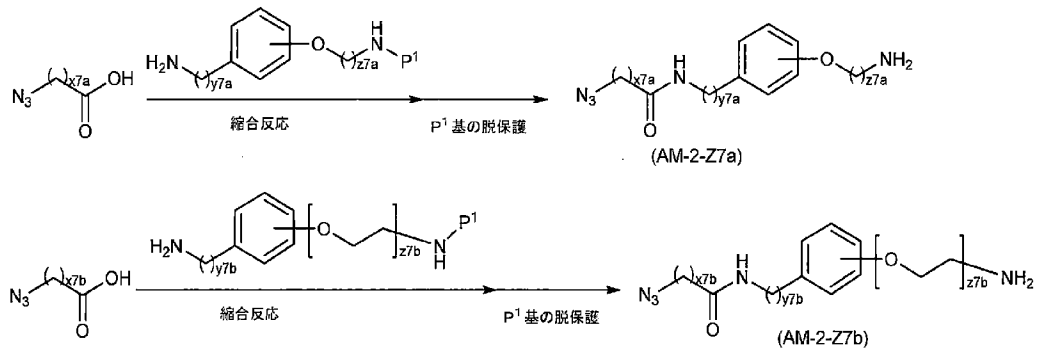
[0223] 同様にして、式（SM－Z5b）の化合物及び式（RG－Z5b）の化合物〔式（SM－Z5b）の化合物及び式（RG－Z5b）の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である〕を用いて同様に反応を行うことで、式（AM－2－Z5b）で表されるアミン、又はその塩を製造することができる。

[0224] 式（AM－2－Z6a）、式（AM－2－Z6b）、式（AM－2－Z7a）、式（AM－2－Z7b）、式（AM－2－Z8a）、式（AM－2－Z8b）、式（AM－2－Z9a）、及び式（AM－2－Z9b）で表わされるアミン、又はそれらの塩は、前記〔製造方法AM－A〕～〔製造方法AM－P〕に準じて、下記スキームに示す製造方法により製造することができる。

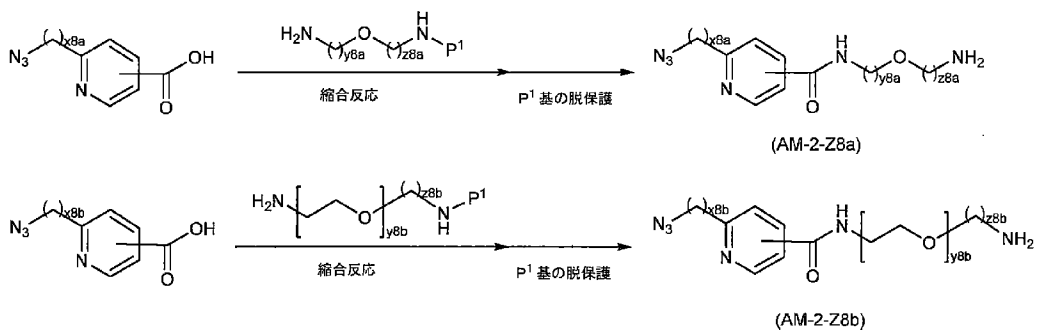
[化64]



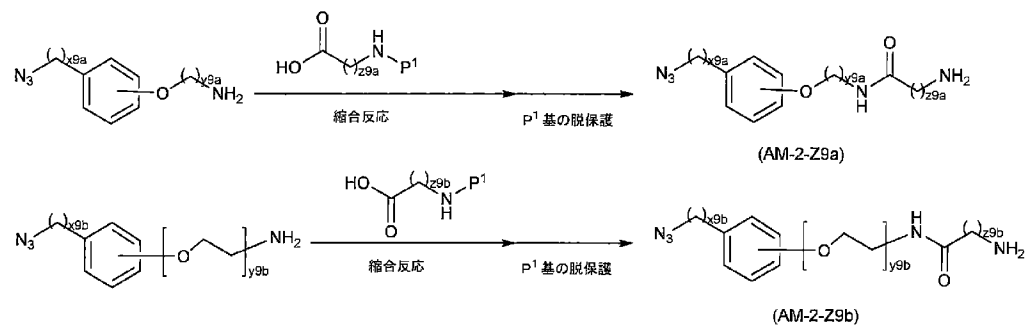
[化65]



[化66]



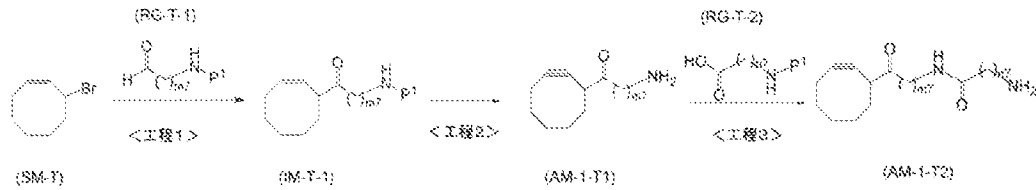
[化67]



[0225] [製造方法AM-T]

式(AM-1-T1)及び式(AM-1-T2)で表されるアミンの製造方法:

[化68]



[0226] <工程1>式 (SM-T) の化合物および式 (RG-T-1) の化合物 [式 (SM-T) の化合物および式 (RG-T-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、文献公知の方法、例えば、WO2004/035017等に記載された方法に準じて、グリニャール反応を行い、続いて酸化反応を行うことで、式 (IM-T-1) の化合物を得る。

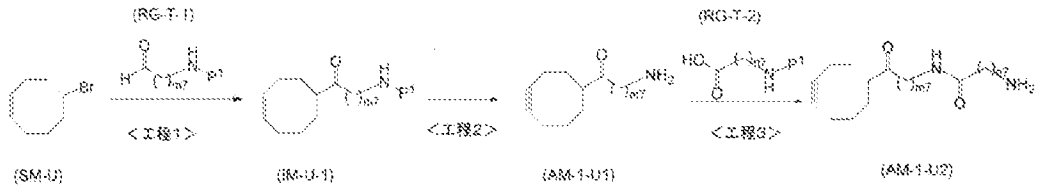
[0227] <工程2>式 (IM-T-1) の化合物のカルボニル基を保護した後 (例えば、アセタール基等)、シクロオクテン環に臭素を付加させた後、tert-BuOK等の塩基を用いて脱臭素化反応を行い、続いてカルボニル基の保護基及び保護基P¹を脱保護することで、式 (AM-1-T1) で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0228] <工程3>式 (AM-1-T1) のアミン又はその塩と式 (RG-T-2) の化合物 [式 (RG-T-2) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] を用いて、縮合反応を行い、保護基P¹を脱保護することにより、式 (AM-1-T2) で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0229] [製造方法AM-U]

式 (AM-1-U1) 及び式 (AM-1-U2) で表されるアミンの製造方法：

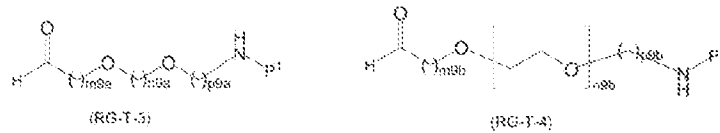
[化69]



[0230] 前記 [製造方法 AM-T] において、式 (SM-T) の化合物を式 (SM-U) の化合物 [式 (SM-U) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] に置き換えて、[製造方法 AM-T] に記載の方法に準じて反応を行うことにより、式 (AM-1-U1) 及び式 (AM-1-U2) で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0231] 前記 [製造方法 AM-T] 及び [製造方法 AM-U] の<工程1>で用いるアルデヒドを、下記式 (RG-T-3) または式 (RG-T-4) のアルデヒド [式 (RG-T-3) の化合物及び式 (RG-T-4) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である] に置き換えて行うことにより、対応するリンカーを有するアミン、又はその塩を製造する。

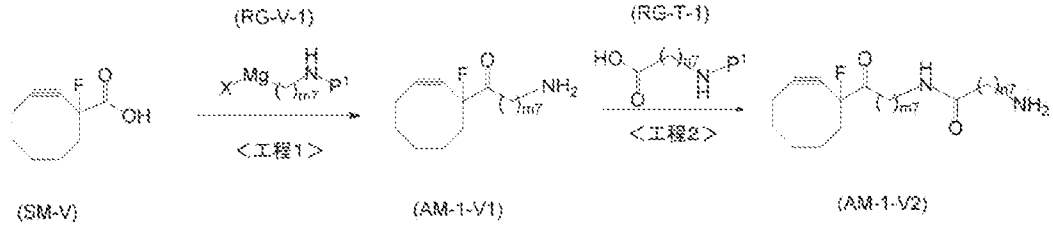
[化70]



[0232] [製造方法 AM-V]

式 (AM-1-V1) 及び式 (AM-1-V2) で表されるアミンの製造方法：

[化71]

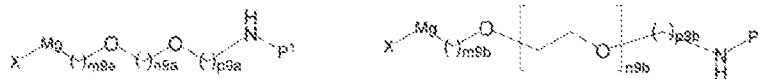


[0233] <工程1>式 (SM-V) の化合物 [式 (SM-V) の化合物は市販化合物又は文献公知の方法、例えば、Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23 (22), p7150-7157, 2015年等に記載された方法により製造できる] を用いて、常法に従い酸クロライドに変換した後、式 (RG-V-1) の化合物 [式 (RG-V-1) の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物であり] を用いてグリニャール反応を行い、続いて保護基 P¹ を脱保護することで、式 (AM-1-V1) で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0234] <工程2>式 (AM-1-V1) のアミン又はその塩と式 (RG-T-1) の化合物を用いて、縮合反応を行い、保護基 P¹ を脱保護することにより、式 (AM-1-V2) で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0235] 前記 [製造方法 AM-V] の<工程1>で用いる化合物を、下記式の化合物 [各化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる] に置き換えて反応を行うことにより対応するリンカーを有するアミン、又はその塩を製造する。

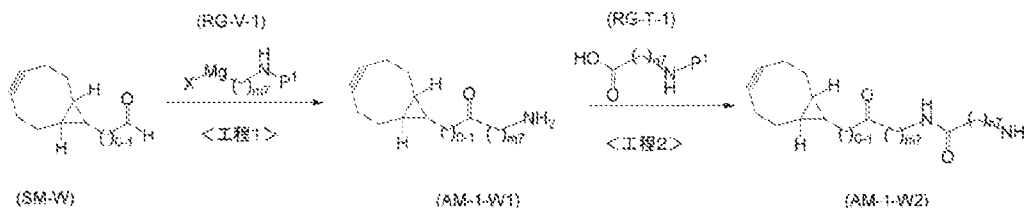
[化72]



[0236] [製造方法 AM-W]

式 (AM-1-W1) 及び式 (AM-1-W2) で表されるアミンの製造方法:

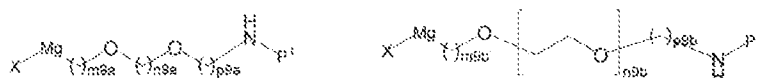
[化73]



[0237] 前記〔製造方法AM-V〕において、式(SM-V)の化合物を式(SM-W)の化合物〔式(SM-W)の化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる化合物である〕に置き換えて、〔製造方法AM-V〕に記載の方法に準じて反応を行うことにより、式(AM-1-W1)及び式(AM-1-W2)で表されるアミン、又はその塩を製造する。

[0238] 前記〔製造方法AM-W〕の<工程1>で用いる化合物を、下記式の化合物〔各化合物は市販化合物又は市販化合物から文献公知の製造方法により製造できる〕に置き換えて反応を行うことにより対応するリンカーを有するアミン、又はその塩を製造する。

[化74]



[0239] 式(HB-I)又は式(HB-II)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を製造する為に用いられる、アルキン基が導入されたアミン($Alk_n-L^1-NH_2$)又はアジド基が導入されたアミン($N_3-L^2-NH_2$)については、前記〔製造方法AM-A〕～〔製造方法AM-P〕等に記載される各反応、文献公知の方法、例えば、『実験化学講座 第5版、各本、2007年、丸善』、『Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations, 3rd Edition (Edited by Richard C. Larock), 2018年』、『Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis, (Edited by Laszlo Kurti, Barbara Czako), Academic Press, 2005年

』等に記載の方法を適宜組み合わせることにより、所望のアミンを製造することができる。

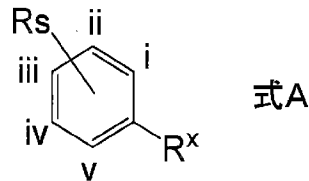
[0240] 本明細書中、式 (AM-1) 又は式 (AM-2) で表わされるアミン (各々の式の下位の式も含む) は、製薬学的に許容される塩 (例えば、酸付加塩) を形成する場合がある。かかる塩としては、製薬学的に許容し得る塩であれば特に限定されないが、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、よう化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、エナント酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、乳酸、ソルビン酸、マンデル酸等の脂肪族モノカルボン酸等との塩、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、酒石酸等の脂肪族ジカルボン酸との塩、クエン酸等の脂肪族トリカルボン酸との塩、安息香酸、サリチル酸等の芳香族モノカルボン酸との塩、フタル酸等の芳香族ジカルボン酸の塩、桂皮酸、グリコール酸、ピルビン酸、オキシル酸、サリチル酸、N-アセチルシステイン等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸類との酸付加塩が挙げられる。酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。

[0241] 前記塩は、常法に従い、例えば、本発明の化合物と適量の酸もしくは塩基を含む溶液を混合することにより目的の塩を形成させた後に分別濾取するか、もしくは該混合溶媒を留去することにより得ることができる。塩に関する総説として、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Stahl & Wermuth (Wiley-VCH, 2002) が出版されており、本書に詳細な記載がなされている。

[0242] 本明細書中、式 (AM-1) 又は式 (AM-2) で表わされるアミン (各々の式の下位の式も含む) 又はその塩は、水、エタノール、グリセロール等の溶媒と溶媒和物を形成し得る。

[0243] 本明細書中、特に断りのない限り、環状基に可変置換基が置換している場合、該可変置換基は環状基の特定の炭素原子に結合されていない事を意味する。例えば、下記式 A における可変置換基 R_s は、該式 A における炭素原子 i、ii、iii、iv 又は v の何れかに置換する事ができる事を意味する。

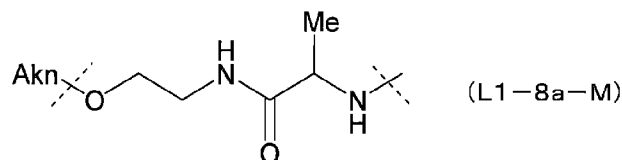
[化75]



[0244] 本明細書中、式 (HB-1) 又は式 (HB-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体中のリンカー ($-L^1-$ 又は $-L^2-$) において不斉炭素が存在する場合には、その各光学異性体も包含されることを意味する。

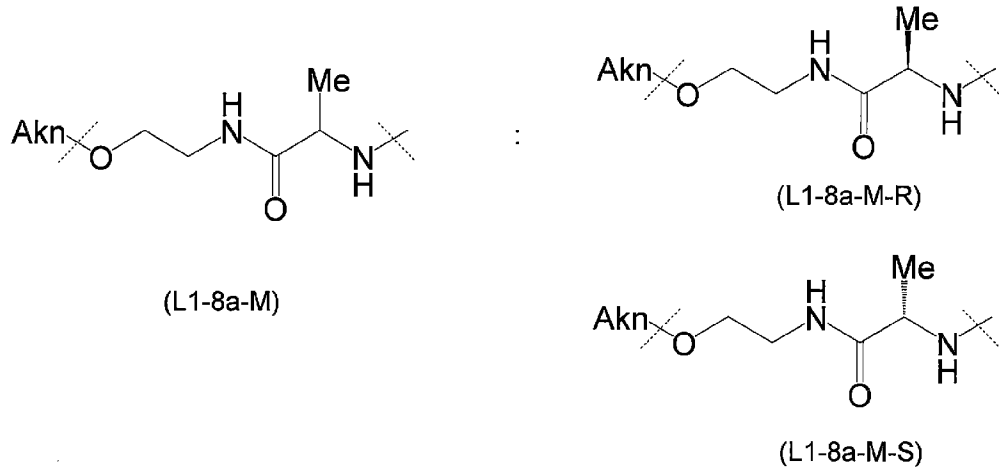
[0245] 例えば、式 (HB-1) 中の $-L^1-$ が、式 (L1-8a) であり、 $m_{8a} = 2$ 、 $n_{8a} = 1$ 、 $R^1 = Me$ の場合の下記式 (L1-8a-M) (式中、破線両外側は含まない) :

[化76]



である場合、 R^1 基が置換する炭素の立体配置が S 体である下記式 (L1-8a-M-S) 及びベンジル基が置換する炭素の立体配置が R 体である下記式 (L1-8a-M-R) (いずれの式中、破線両外側は含まない) :

[化77]



で表わされるリンカーが含まれることを意味する。

[0246] 式 (HB-1) 又は式 (HB-11) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体中のリンカー (−L¹−又は−L²−) において不斉炭素が存在する場合 (光学活性体である場合) には、式 (HB-1) 又は式 (HB-11) に対応するアミン誘導体 (AM-1) を合成する工程において、そのラセミ体から通常の光学分割手段 (分離手法) により、各光学活性体に分離することが可能であり、又、式 (HB-1) に対応するアミン誘導体である式 (AM-1) 又は式 (AM-2) を合成する工程において、不斉合成を用いることで光学異性体の一方を選択的に合成でき、各光学活性体を合成することが可能である。

[0247] 5. 化学架橋アルギン酸 (コア層及びアニオン性ポリマー層)

本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸のうち、コア層に用いられるもの及びアニオン性ポリマー層に用いられるものとしては「3. 化学修飾アルギン酸誘導体」の項に記載の化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、化学架橋反応を施すことにより製造されるものが挙げられる。具体的には、前記態様の[1]～[9-2]に示す構造体の製造に用いた化学架橋アルギン酸である。アニオン性ポリマー層に化学架橋アルギン酸が用いられる場合、コア層に用いられる化学架橋アルギン酸と同一の構造であっても異なってもよい。例えば、コア層に用いられる化学架橋アルギン酸として、前記態様の[2

[]～[7]に示す構造体の製造に使用したH u i s g e n型反応によって架橋したものを、アニオン性ポリマー層に用いられる化学架橋アルギン酸として、前記態様の[8 - 1]～[9 - 2]に示す構造体の製造に使用した光架橋アルギン酸（経皮酸型）によって架橋したものを、用いることもできる。別の態様として、コア層に用いられる化学架橋アルギン酸及びアニオン性ポリマー層に用いられる化学架橋アルギン酸として、共に前記態様の[2]～[7]に示す構造体の製造に使用したH u i s g e n型反応によって架橋したものを、用いる場合、コア層とアニオン性ポリマー層で異なる構造の化学架橋アルギン酸を用いることもでき、例えば、架橋反応の速度が異なるものを各々の層で選択することができる。

[0248] 本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸としては、「1. 化学架橋アルギン酸を用いた多層構造体」で述べたように、(i) 2価の金属イオンによる架橋（イオン架橋）が形成されていない状態（例えば、EDTA等のキレート剤を存在させることにより2価金属イオンとの結合を除去した状態）、及び(i i) 化学架橋とイオン架橋の両方が形成されている状態、のいずれの状態も使用しうる。例えば、化学架橋とイオン架橋の両方が形成されている状態は構造安定性が高いため、生体に埋設する際に有利な場合がある。この場合、2価金属イオンとしては、特に限定されないが、例えば、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオン、亜鉛イオン等が挙げられ、好ましくはカルシウムイオン又はバリウムイオンであり、より好ましくはカルシウムイオンである。別の好ましい態様としてはバリウムイオンである。

[0249] 2価金属イオンを含む溶液としては、特に限定されないが、例えば、カルシウムイオンを含む溶液（例えば、塩化カルシウム水溶液、炭酸カルシウム水溶液、グルコン酸カルシウム水溶液、等の水溶液）、バリウムイオンを含む溶液（例えば、塩化バリウム水溶液等の水溶液）が挙げられ、好ましくは塩化カルシウム水溶液である。2価金属イオンを含む溶液の2価金属イオン濃度（例えば、カルシウムイオン又はバリウムイオン濃度）は、特に限定さ

れないが、例えば、1 mM～1 Mの範囲、又は5 mM～500 mMの範囲であり、より好ましくは20 mM～100 mMである。本明細書では2価金属イオン水溶液を、単に2価金属イオン溶液ということがあり、特に記載がない場合、2価金属イオン溶液は水溶液のことである。

[0250] 化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を調製する際に用いる溶媒、又は、2価金属イオンを含む溶液等を調製する際に用いる溶媒は、特に限定されないが、それぞれ独立して、例えば、水道水、純水（例えば、蒸留水、イオン交換水、RO水、RO-EDI水、等）、超純水（MilliQ水）、培地（すなわち、細胞培養用培地（または培養液））、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、及び生理食塩水等が挙げられ、好ましくは超純水である。

[0251] 化学架橋アルギン酸がイオン架橋を伴うものである場合、イオン架橋反応は瞬時かつ可逆的であるのに対して、化学架橋の反応は、比較的温和な条件でゆっくり反応が進行して得られ、非可逆的である。この性質を利用して、化学架橋とイオン架橋を適切に組み合わせることにより、本発明の構造体を効率的に作製することが可能となる。例えば、イオン架橋反応により、化学修飾アルギン酸誘導体の混合溶液から瞬時にビーズ又はシート状の構造体を作ることが容易となる。一方、本発明では当該構造体の構造強化（例えば、長期安定性の獲得、等）の為に、化学架橋（Huisugen反応）を利用しているため、化学架橋とイオン架橋の両方を介して本発明の構造体を作製したのち、化学架橋アルギン酸の、イオン架橋により取り込まれた2価金属イオンが徐々に可逆的に放出されて、化学結合による架橋のみが残った場合においても、安定に継続して利用することが可能である。

[0252] 5-1. 化学架橋アルギン酸（Huisugen型）

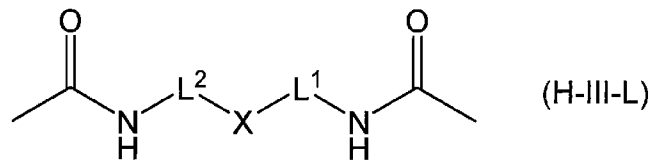
ある態様の化学架橋アルギン酸は、前記式（H-1）及び前記式（H-11）の化学修飾アルギン酸誘導体を混合してHuisugen反応を行うことにより、得ることができる。別のいくつかの態様の化学架橋アルギン酸は、前記式（HA-1）及び前記式（HA-11）の化学修飾アルギン酸誘導体を混合してHuisugen反応を行うことにより、得ることができる。別の

いくつかの態様の化学架橋アルギン酸は、前記式（HB-I）及び前記式（HB-II）の化学修飾アルギン酸誘導体を混合してHuisgen反応を行うことにより、得ることができる。

[0253] ある態様の化学架橋アルギン酸は、化学架橋（アルキン基及びアジド基から形成されるトリアゾール環による架橋）を介して三次元の網目構造を形成する。好ましい化学修飾アルギン酸誘導体は、架橋後の化学架橋アルギン酸の安定性を改善するものである。なお、化学架橋アルギン酸の物性は、例えば、原料として用いる化学修飾アルギン酸における反応性基の導入率によって調整することが可能である。

[0254] いくつかの態様の化学架橋アルギン酸は、下記式（H-III-L）：

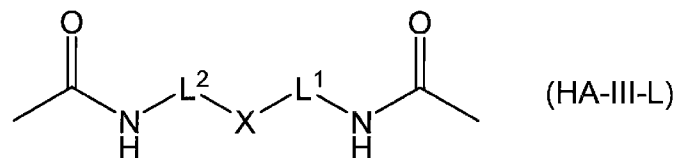
[化78]



[式（H-III-L）中、両端の-CONH-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-、-L²-、及びXは、各々、前記態様[5]～[5-7]のいずれかの組み合わせと同じである]で表わされる基を介して架橋された化学架橋アルギン酸である。

[0255] いくつかの態様の化学架橋アルギン酸は、下記式（HA-III-L）：

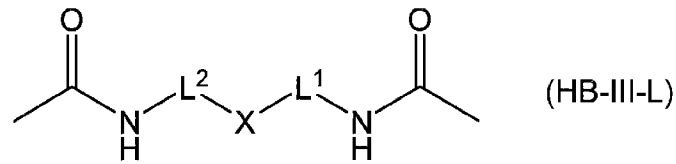
[化79]



[式（HA-III-L）中、両端の-CONH-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-、-L²-、及びXは、前記態様[7]の定義と同じである]で表わされる基を介して架橋された化学架橋アルギン酸である。

[0256] また、いくつかの態様の化学架橋アルギン酸は、下記式（HB-III-L）：

[化80]



〔式（HB-III-L）中、両端の-CONH-及び-NHCO-は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹-、-L²-、及びXは、各々、前記態様[6-1]～[6-6]のいずれかの組み合わせと同じである〕で表わされる基を介して架橋された化学架橋アルギン酸である。

[0257] ある態様では、式（H-III-L）、式（HA-III-L）及び式（HB-III-L）の化学架橋アルギン酸は、各々、式（H-I）と式（H-II）、式（HA-I）と式（HA-II）、式（HB-I）と式（HB-II）の化学修飾アルギン酸誘導体を混合することにより製造することができる。

[0258] いくつかの態様にて、化学架橋アルギン酸を調製する際の、式（H-I）、式（HA-I）又は式（HB-I）の化学修飾アルギン酸誘導体と、式（H-II）、式（HA-II）又は式（HB-II）の化学修飾アルギン酸誘導体の混合比は、式（H-I）、式（HA-I）又は式（HB-I）の誘導体と式（H-II）、式（HA-II）又は式（HB-II）の誘導体の重量比にて、例えば、1：1.0～4.0、又は1：1.0～3.0、又は1：1.0～2.0、又は1：1.0～1.5、又は1：1であり；好ましくは1：1.0～3.0である。

[0259] いくつかの態様にて、化学架橋アルギン酸を調製する際の、式（H-II）、式（HA-II）又は式（HB-II）の化学修飾アルギン酸誘導体と、式（H-I）、式（HA-I）又は式（HB-I）の化学修飾アルギン酸誘導体の混合比は、式（H-II）、式（HA-II）又は式（HB-II）

)の誘導体と式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の誘導体の重量比にて、例えば、1:1.0~4.0、又は1:1.0~3.0、又は1:1.0~2.0、又は1:1.0~1.5、又は1:1である。

[0260] いくつかの態様にて、化学架橋アルギン酸を調製する際の、式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体と、式(H-11)、式(HA-11)又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体の混合比は、より好ましくは式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体と式(H-11)、式(HA-11)又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体の反応性基の導入率(mol%)比にて、例えば、1:1.0~4.0、又は1:1.0~3.0、又は1:1.0~2.0、又は1:1.0~1.5、又は1:1であり；好ましくは1:1.0~3.0である。

[0261] いくつかの態様にて、化学架橋アルギン酸を調製する際の、式(H-11)、式(HA-11)又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体と、式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体の混合比は、より好ましくは式(H-11)、式(HA-11)又は式(HB-11)の化学修飾アルギン酸誘導体と式(H-1)、式(HA-1)又は式(HB-1)の化学修飾アルギン酸誘導体の反応性基の導入率(mol%)比にて、例えば、1:1.0~4.0、又は1:1.0~3.0、又は1:1.0~2.0、又は1:1.0~1.5、又は1:1である。

[0262] 化学架橋アルギン酸は、アルギン酸の構成単位の全てのカルボキシル基が上記式(HA-111-L)又は式(HB-111-L)の架橋を有している必要はない。化学架橋アルギン酸における、上記式(HA-111-L)又は式(HB-111-L)で表わされる架橋の導入率(架橋率とも言う)は、例えば、約0.1~約80%、約0.3~約60%、約0.5~約30%、または約1.0~約10%の範囲である。

[0263] 化学架橋アルギン酸を得るためのHuisgen反応における前記式(H-1)~式(HB-11)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の濃度は

、通常約1～500mg/mLであり、好ましくは約5～100mg/mLの範囲である。ある態様としては、5～50mg/mLの範囲のものであり、別の態様としては、5～20mg/mLの範囲のものである。

[0264] Huisgen反応の反応温度（化学架橋アルギン酸を作製する際の温度）は、通常、外温約4～約60℃であり、好ましくは外温約15～約37℃の範囲である。

[0265] 5-2. 光架橋アルギン酸（桂皮酸型）

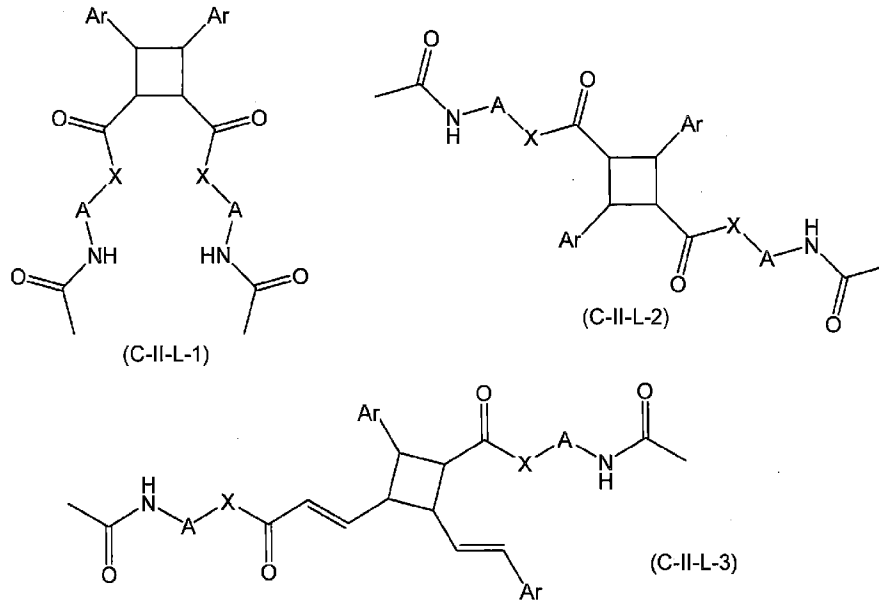
本発明の構造体を構成する化学架橋アルギン酸のいくつかの態様は、光反応性基（光架橋基）が導入された化学修飾アルギン酸誘導体、例えば、前記式（C-1）で表わされる基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体に光照射することにより得られる化学架橋アルギン酸（光架橋アルギン酸ともいう）である。光架橋アルギン酸は、化学修飾アルギン酸誘導体が光架橋基（光反応により形成されるシクロブタン環による架橋）を介して三次元の網目構造を形成する。好ましい化学修飾アルギン酸誘導体は、架橋後の化学架橋アルギン酸の安定性を改善するものである。

[0266] 照射する光は、光反応性基（光架橋基）に作用し、例えば重合、二量化などの反応（好ましくは光二量化反応（光環化反応））を起こさせる限り特に限定はされない。照射する光には、例えば、紫外線、LED光（LED=Light Emitting Diode：発光ダイオード）、可視光、赤外線、電子線、等を用いることができる。これらの照射光の内、好ましくは、可視光、LED光、又は紫外線であり、より好ましくは、紫外線である。使用する光源の光波長は、好ましくは、180～650nmの範囲であり、より好ましくは、300～410nmの範囲である。

[0267] いくつかの態様では、光架橋反応を起こすための具体的な光量および波長は、次の通りである。すなわち、HLR100T-2（セン特殊光源株式会社製）の照度は、170 mW/cm²（光源から50 mmの距離）、主な波長は、365 nm、であり、照射時間は、10分である。光源から100 mmの距離での照射で、露光量は、25 J/cm²である。

[0268] いくつかの態様では、光架橋アルギン酸は、式 (C-I) で表わされる光反応性基の光反応部分 (アルケン部部分) が光環化反応により二量化し、例えば、下記式 (C-II-L-1) ~ (C-II-L-3) :

[化81]



[式 (C-II-L-1) ~ (C-II-L-3) 中、両端の -CONH- 及び -NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし; -A-, -X-, 及び Ar は、前記態様 [9-1] 及び [9-2] 中の定義と同じである] で表わされるシクロブタン環 (トルキシル酸誘導体) が形成された化学架橋を有している。

[0269] 光架橋アルギン酸は、アルギン酸の構成単位の全てのカルボキシル基が上記の架橋を有している必要はない。化学架橋アルギン酸における、上記式で表わされる架橋の導入率 (架橋率とも言う) は、例えば、0.1~80%、0.3~60%、0.5~30%、または 1.0~10% の範囲である。

[0270] 光架橋アルギン酸を得るための化学修飾アルギン酸誘導体の濃度は、例えば、1~500 mg/mL、または 5~100 mg/mL の範囲である。

[0271] 光架橋反応を行う温度は、通常、室温 (約 0°C から約 35°C) である。

[0272] 光架橋反応に用いる反応溶媒又は反応溶液は、特に限定はされないが、例

例えば、水道水、純水（例えば、蒸留水、イオン交換水、RO水、RO-EDI水、等）、超純水（MilliQ水）、培地（すなわち、細胞培養用培地（または培養液））、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、及び生理食塩水等が挙げられ、好ましくは超純水である。

[0273] 6. 構造体（化学架橋アルギン酸をコア層に用いた多層構造体）の製造方法
本発明は、構造体の製造方法にも関する。本明細書中、以下の工程（a）～（c）を含む、コア層に化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含む構造体の製造方法が提供される。

工程（a）：薬理成分を含む化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、2価金属イオンを含む溶液に接触させてゲル化する工程、

工程（b）：工程（a）で得られたゲルを、カチオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、当該ゲルをカチオン性ポリマーでコーティングする工程、

工程（c）：工程（b）で得られた製造物を、アニオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、をさらにアニオン性ポリマーでコーティングする工程。

[0274] 構造体の製造方法において、「工程（a）：薬理成分を含む化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、2価金属イオンを含む溶液に接触させてゲル化する工程」では、薬理成分が懸濁した化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、2価金属イオン溶液と接触させることにより、ゲル化させる。前記化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を2価金属イオンを含む溶液と接触させることで、イオン架橋が進むと同時に化学架橋も進み、ゲルが作製できる。工程（a）では、具体的には、まず上記「1-1. 化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層」で説明した各種の薬理成分を、化学修飾アルギン酸誘導体を含む溶液に懸濁または溶解させる。この際、薬理成分以外の添加物を付加することも可能であり、例えば、生物活性物質等の場合には、徐放を制御するための製剤化を行ったものや、担体に担持したものをを用いることが有効な場合がある。細胞の場合には、細胞の生存性や機能を維持するための物質を用いることが有効な場合があり、また、コア層において薬理成分を均一に分散させるような物質を加えることも挙げられる。薬理成分以外の添加物とし

て、例えば、アルギン酸以外的高分子物質が挙げられ、具体的には、生体親和性のある高分子物質として、ポリ乳酸（PLA）、ポリ乳酸-ε-グリコール酸（PLGA）、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸等が挙げられる。例えば、薬理成分として細胞や微生物を使用する場合には培地や培養液成分あるいは医薬品として通常用いられる製剤成分が含まれる場合もある。

化学修飾アルギン酸誘導体として、例えば、前述の式（H-1）及び式（H-11）で表わされる化合物、前述の式（HA-1）及び式（HA-11）で表わされる化合物、前述の式（HB-1）及び式（HB-11）で表わされる化合物、又は前述の式（C-1）で表わされる化合物を挙げることができる。工程（a）では、例えば、前記化学修飾アルギン酸誘導体の0.1～5重量%の水溶液もしくは生理食塩水溶液を作製し、当該溶液に、前記各種の薬理成分を適宜必要量懸濁する。

[0275] なお、工程（a）では、前述の式（H-1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液及び式（H-11）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体式の溶液を組合せて使用することができる。いくつかの態様では、前述の式（HA-1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液及び式（HA-11）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を組合せて使用することができる。別のいくつかの態様では、前述の式（HB-1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液及び式（HB-11）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を組合せて使用することができる。これらの溶液、及びそれらに薬理成分を混和した溶液は、混合せずに、別々に作製される。前述の各組合せの溶液を使用する場合、薬理成分は、一方にのみ混和してもよいし、あるいは両方に混和してもよい。

[0276] ここで、「接触」とは、ある溶液（例えば、化学修飾アルギン酸誘導体の溶液）を別の溶液（例えば、2価金属イオンを含む溶液）に浸漬または添加すること、ある溶液（例えば、化学修飾アルギン酸誘導体の溶液）に別の溶液（例えば、2価金属イオンを含む溶液）を噴霧する、吹きかける等が挙げられる。

- [0277] 構造体に用いられる「2価金属イオン」を含む溶液としては、例えば、カルシウムイオン、バリウムイオン、亜鉛イオン、ストロンチウムイオン等を含む溶液が挙げられる。好ましくは、カルシウムイオンまたはバリウムイオンを含む溶液であり、より好ましくはカルシウムイオンを含む溶液である。好ましくは塩化カルシウム水溶液である。別の好ましい態様としては塩化バリウム水溶液である。
- [0278] 2価金属イオンを含む溶液は、例えば、2価金属イオンの塩を溶媒に溶解させることにより得ることができる。2価金属イオンの塩としては、塩化カルシウム、塩化バリウム、塩化ストロンチウム等が挙げられる。溶媒としては、例えば、水、及び生理食塩水が挙げられる。
- [0279] 2価金属イオンを含む溶液の使用量は、化学修飾アルギン酸誘導体の使用量や分子量などに応じて適宜調節するのが望ましい。
- [0280] 本発明の構造体は、成形の際の自由度が従来のアルギン酸を用いた構造体と比較して高い点に特徴の一つがあるが、例えば、以下のような方法により、様々な形状の構造体を製造することが可能になる。なお、体積の多くを占めるコア層の形状が構造体全体の形状に最も影響する。
- 例えば、球状の構造体を作製するためには、薬理成分を混和した化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、塩化カルシウム水溶液などの2価金属イオン溶液に滴下する方法が用いられる。この際、滴下させる導管の径や滴下速度を変えることにより、様々な大きさの球状体を製造することが可能になる。
- [0281] ファイバー状の構造体を作製する方法の一つとしては、薬理成分を混和した化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、注射器等の先端に装着した導入菅を通じて2価金属イオン溶液中にゆっくりと放出する。この際、放出された溶液が順次、ゲル化していくことにより、糸状の構造物を製造することができる。導入菅のサイズを変更したり、放出速度をシリンジポンプ等を用いて制御することにより、様々なサイズの構造体を製造することが可能になる。
- [0282] その他、鋳型と半透膜を使用することにより、任意の形状の構造体の製造も可能となる。例えば、平板状のものを製造したい場合、シリコンゴム等の

、反応に影響せず、加工が容易な素材を用いて鋳型を作製し、そこへ薬理成分を混和した化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を流し込む。この鋳型の一部に半透膜を使用することにより、2価金属イオン溶液をこの半透膜を通じて鋳型の内部へ浸潤させ、内容物がゲル状となる。この方法では、鋳型を希望の形状に設計することにより、様々な形状の構造体の製造が可能となる。

また、3Dプリンターを使用することによって、自由な形状を造形させることも可能であり、例えば、薬理成分を混和した化学修飾アルギン酸誘導体の溶液をバイオインクとして用い、2価金属イオン溶液と接触させる方法が用いられる。

[0283] 本発明の構造体における成形の自由度の高さは、構造体の高い強度を維持しつつ、簡便に製造可能な化学架橋アルギン酸を用いることにより達成されたものである。

[0284] 次いで、「工程（b）：工程（a）で得られたゲルを、カチオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、当該ゲルをカチオン性ポリマーでコーティングする工程」では、工程（a）で得られたゲルに、例えば、PLLやPLO等のカチオン性ポリマーを含む溶液を接触させる。好ましくは、工程（a）で得られたゲルに、PLOを含む溶液を接触させる。これにより、化学架橋アルギン酸とカチオン性ポリマーとの相互作用により、工程（a）で得られた成形物の表面がカチオン性ポリマーでコーティングされる。カチオン性ポリマーとしては、前記「1-2. コア層を被覆するカチオン性ポリマー層」で述べたものが好適に用いられる。

[0285] コア層の化学架橋アルギン酸と反応させる際のカチオン性ポリマーの濃度は、カチオン性ポリマーとしてPLOを使用する場合、例えば、0.02～0.2w/w%、又は、0.05～0.1w/w%である。

[0286] また、コア層の化学架橋アルギン酸ゲルとカチオン性ポリマーとを反応させる際の温度は、例えば、室温である。反応時間は、例えば、1分～45分、又は、1分～30分である。

[0287] 次いで、「工程（c）：工程（b）で得られた製造物を、アニオン性ポリ

マーを含む溶液に接触させて、さらにアニオン性ポリマーでコーティングする工程」では、工程（b）で得られた製造物を、前記アニオン性ポリマーを含む溶液に接触させる。好ましくは、工程（b）で得られた製造物に、「1-3. カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマー層」で述べたアニオン性ポリマーを含む溶液を接触させ、より好ましくは、工程（b）で得られた製造物に化学修飾アルギン酸誘導体又はアルギン酸を接触させ、更に好ましくは、アルギン酸を接触させる。ここでいう「化学修飾アルギン酸誘導体」は、上記「2. 化学修飾アルギン酸誘導体」で述べた化学修飾アルギン酸である。また、「アルギン酸」は、上記「2. アルギン酸（化学修飾アルギン酸誘導体を合成する際に用いる原料のアルギン酸、及びアニオン性ポリマー層に用いられるアルギン酸について）」で述べたアルギン酸（例えば、アルギン酸ナトリウム）である。これにより、カチオン性ポリマーでコーティングされた製造物の表面が、さらに化学修飾アルギン酸誘導体又はアルギン酸でコーティングされる。

ここで、アニオン性ポリマーとして化学修飾アルギン酸誘導体を使用する場合、コア層に用いている化学修飾アルギン酸誘導体と同一のものを使用しても、異なるものを使用してもよい。また、工程（c）の処理条件は、前記工程（b）に用いられるものと同様の条件が用いられる。

カチオン性ポリマー層と反応させる際のアニオン性ポリマーの濃度は、アニオン性ポリマーとしてアルギン酸又は化学修飾アルギン酸誘導体を使用する場合、例えば、0.01～4 w/w%である。

[0288] いくつかの態様では、次いで、工程（d）を含んでもよい。「工程（d）：工程（c）で得られた構造体を、キレート剤を用いてキレート処理する工程」では、工程（c）までの操作により製造された構造体にキレート剤を加えることにより、イオン架橋している2価金属イオンをキレート剤の方へ移動させる。キレート剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等が挙げられる。キレート剤の使用量は、化学修飾アルギン酸誘導体の使用量などに応じて適宜調節するのが望ましい。

- [0289] 本発明の構造体のうち、化学架橋アルギン酸が光架橋アルギン酸（経皮酸型）であるものは、前記「工程（a）～（c）を含む、化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含む構造体の製造方法」中、工程（a）において、化学修飾アルギン酸誘導体の溶液として、式（C-1）で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を使用するとともに、工程（a）以降のいずれかの段階で化学修飾アルギン酸誘導体に光照射をして化学架橋反応を施すことを含む。
- [0290] より具体的には、例えば、前記式（C-1）で表わされる光反応性基が導入された化学修飾アルギン酸誘導体の溶液を、2価金属イオンを含む溶液中に滴下することで、イオン架橋（2価金属イオンにより部分的に形成される架橋）が形成された特定の構造体を得る。続いて、当該構造体に光照射をして光架橋（化学架橋：シクロブタン環（トルキシル酸誘導体））を施すことにより、特定の構造体である、光架橋アルギン酸を得ることができる。光照射は、工程（a）以降のいずれの段階で行ってもよく、前記工程（c）の後に行うこともできる。
- [0291] 照射する光は、光反応性基（光架橋基）に作用し、例えば重合、二量化などの反応（好ましくは光二量化反応（光環化反応））を起こさせる限り特に限定はされない。照射する光には、例えば、紫外線、LED光（LED=Light Emitting Diode：発光ダイオード）、可視光、赤外線、電子線、等を用いることができる。これらの照射光の内、好ましくは、可視光、LED光、又は紫外線であり、より好ましくは、紫外線である。使用する光源の光波長は、好ましくは、180～650nmの範囲であり、より好ましくは、300～410nmの範囲である。
- [0292] いくつかの態様では、光架橋反応を起こすための具体的な光量および波長は、次の通りである。すなわち、HLR100T-2（セン特殊光源株式会社製）の照度は、170 mW/cm²（光源から50 mmの距離）、主な波長は、365 nm、であり、照射時間は、10分である。光源から100 mmの距離での照射で、露光量は、25 J/cm²である。

[0293] 7. 本発明の構造体（多層構造体）及び化学架橋アルギン酸の物性

[構造体の安定性の確認法]

本発明の構造体の安定性は、例えば、以下の試験法により確認することができる。より具体的には、後記実施例に記載の方法で確認することができる。

(1) キレート処理：本発明の構造体に、「6. 構造体（化学架橋アルギン酸をコア層に用いた多層構造体）の製造方法」で述べた工程（d）、すなわち、「工程（c）で得られた構造体を、キレート剤を用いてキレート処理する工程」を施すことにより、化学架橋アルギン酸あるいはアルギン酸内のイオン架橋を解除する。具体的には、本発明の構造体を、クエン酸ナトリウムやエチレンジアミン四酢酸（EDTA）の水溶液で処理した場合、構造体の形状を保持できているものを「安定な構造体」として確認することができる。本発明の構造体は、イオン架橋が存在しない条件でも、コア層の化学架橋アルギン酸の化学架橋、並びに、コア層－カチオン性ポリマー層－アニオン性ポリマー層の各層間の静電的相互作用により、その形状を保持することができる。本試験により、例えば、生体内に留置した場合の長期安定性を確認することができる。

[0294] (2) 振盪試験：上記のキレート処理を行った構造体をリン酸緩衝生理食塩水中（PBS）に懸濁させ、これを一定時間、振盪させたのち、構造が維持できるものと不可能なものを確認することにより、その物理的な強度を測定することができる。具体的な試験方法としては、例えば、後記実施例に記載の方法が挙げられる。

[0295] 本発明の構造体の有利な点のいくつかは、これを構成する化学架橋アルギン酸が、本発明の構造体の機能にとって最適な性質を有していることに起因する。例えば、本発明で用いる化学架橋アルギン酸は、高い物理的安定性（ゲル安定性と略す）を有する一方で、薬理成分をコア層から放出するため、ゲル状においても適切な透過性を有する。このゲル透過性は、以下のようにゲル透過率を測定することなどで確認することができる。

[0296] [ゲル安定性の測定法]

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

[0297] 本明細書中、化学架橋アルギン酸のゲル崩壊率は、好ましくは0%~90%であり、より好ましくは0%~70%であり、更に好ましくは0%~50%である。化学架橋アルギン酸の安定性は、水溶液中に漏出するアルギン酸の濃度が低いほど、すなわちゲル崩壊率が低いほど、安定性が高いことを意味する。

[0298] [ゲル透過率の測定法]

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

[0299] 化学架橋アルギン酸の生理食塩水添加24時間後のゲル透過率は、例えば、分子量200万のデキストランを内包した場合、好ましくは0%~90%であり、より好ましくは0%~70%であり、更に好ましくは0%~50%である。又、分子量15万のデキストランを内包した場合、例えば、当該化学架橋アルギン酸の使用目的がたんぱく質や抗体の放出・産生であるならば、好ましくは1%~100%であり、より好ましくは10%~100%であり、更に好ましくは30%~100%である。又、使用目的が免疫隔壁であるならば、好ましくは0%~90%であり、より好ましくは0%~70%であり、更に好ましくは0%~50%である。

[0300] 化学架橋アルギン酸の透過性は、透過率が低いほど、内容物やゲル外物質の透過性が低いことを意味し、透過率が高いほど、内容物やゲル外物質の透過性が高いことを意味する。

[0301] ゲルの透過率は、使用するアルギン酸の分子量、濃度、アルギン酸に導入する架橋基の種類や導入率、ゲル化に用いる2価金属イオンの種類や濃度、またはこれらの組み合わせによって調整することが可能である。

[0302] 8. 構造体の生体適合性

本明細書において、生体適合性とは、構造体と生体間の相互作用、構造体に隣接する組織の局所的反応、又は全身的反応等の反応を引き起こさない性質を意味し、このような性質を有することを生体適合性 (biocompatibility) を有するという。本発明の構造体を構成する化学修飾アルギン酸誘導体や、化学架橋アルギン酸は、アルギン酸と同様、良好な生体適合性を有していることが確認されている (例えば、化学架橋アルギン酸については、前記PCT/JP2019/023478及びPCT/JP2019/007655参照)。

[0303] また、化学架橋アルギン酸のうち、式(HB-1)及び式(HB-11)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて製造されるものについては、後述する生体適合性に関する実施例にて確認することができる。

[0304] 9. 構造体の用途

構造体の好ましい用途としては、創傷被覆材、術後癒着防止材、薬剤徐放用基材、細胞移植用基材、補綴材 (インプラント、人工臓器等)、製剤コーティング材等の医療用材料が挙げられる。また、バイオプリンタに用いるバイオインクとして使用し、造形した構造体を前記用途に用いることが挙げられる。構造体として、好ましくは、生体内で使用する。

[0305] 10. 構造体の使用方法

構造体を生体内に移植する方法としては、切開と留置、注射、内視鏡、腹腔鏡といったものが使用可能である。

移植部位は特に限定されず、皮下、腹腔内、肝臓内、筋肉内、大網内、腎

被膜下などを挙げるができるが、皮下や腹腔内に移植することが好ましい。

[0306] 尚、本明細書において引用した全ての文献、及び公開公報、特許公報、その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

[0307] また、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を実施できる。発明を実施するための最良の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

実施例

[0308] 次に、本発明をさらに詳細に説明するために実施例、試験例をあげるが、これらの例は単なる実施例、試験例であって、本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0309] 核磁気共鳴スペクトル (NMR) の測定には、J E O L J N M - E C X 4 0 0 F T - N M R (日本電子) を用いた。液体クロマトグラフィー-質量分析スペクトル (L C - M a s s) は以下の方法で測定した。[U P L C] W a t e r s A Q U I T Y U P L C システムおよび B E H C 1 8 カラム (2. 1 m m × 5 0 m m, 1. 7 μ m) (W a t e r s) を用い、アセトニトリル : 0. 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液 = 5 : 9 5 (0 分) ~ 9 5 : 5 (1. 0 分) ~ 9 5 : 5 (1. 6 分) ~ 5 : 9 5 (2. 0 分) の移動相およびグラジエント条件を用いた。

[0310] ¹H-NMR データ中、NMR シグナルのパターンで、s はシングレット、d はダブルット、t はトリプレット、q はカルテット、m はマルチプレット、b r はブロード、J はカップリング定数、H z はヘルツ、C D C l ₃ は重クロロホルム、D M S O - d ₆ は重ジメチルスルホキシド、D ₂O は重水を意味する。¹H-NMR データ中、水酸基 (O H) 、アミノ基 (N H ₂) 、カルボキ

シル基 (COOH) のプロトン等、ブロードバンドであるため確認ができないシグナルについては、データに記載していない。

[0311] LC-Massデータ中、Mは分子量、RTは保持時間、 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ は分子イオンピークを意味する。

[0312] 実施例中の「室温」は、通常約0℃から約35℃の温度を示すものとする。

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

[0313] 実施例において、反応性基又は相補的な反応性基が導入される前のアルギン酸ナトリウムは、前記表13に記される物性値を示すアルギン酸ナトリウムを用いた。

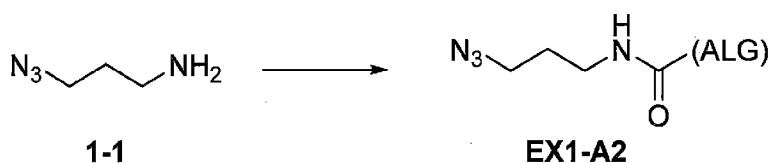
[0314] 表15には、(実施例1) ~ (実施例20) で得られた、反応性基が導入されたアルギン酸誘導体の物性値 (具体的には、反応性基導入率 (mol%)、分子量、及び重量平均分子量 (万Da)) を示す。

表16-1 ~ 表16-5には、(実施例1) ~ (実施例20) 中の中間体の ^1H-NMR が、表17には、(実施例1) ~ (実施例20) 中の中間体のLCM-Massを示す。

[0315] (実施例1)

3-アジドプロピルアミノ基導入アルギン酸 (EX1-A2) の合成:

[化82]



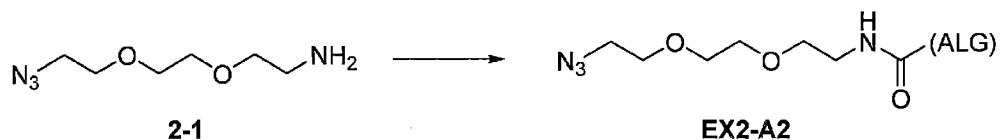
[0316] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (20 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリ

アジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (56 mg)、市販の3-アジドプロピルアミン [CAS REGISTRY NO. : 88192-19-2] (1-1, 5.1 mg) のエタノール (2 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (50 μ L) を加えた。30°C で3時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.2 g)、エタノール (40 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX1-A2 (187 mg) を白色固体として得た。

[0317] (実施例2)

2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX2-A2) の合成:

[化83]

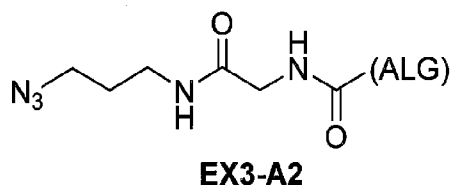


[0318] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (10.9 mL) に、氷冷攪拌下、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (55.83 mg) 及び1モル濃度-重曹水 (252.17 μ L) を加えた。続いて、市販の2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エタン-1-アミン [CAS REGISTRY NO. : 166388-57-4] (2-1, 26.36 mg) のエタノール (1 mL) 及び水 (1 mL) 溶液を加え、室温で15時間攪拌した後、塩化ナトリウム (100 mg)、エタノール (21.8 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、標記化合物 EX2-A2 (99 mg) を白色固体として得た。

[0319] (実施例3)

2-アミノ-N-(3-アジドプロピル)アセタミド基導入アルギン酸 (EX3-A2) の合成:

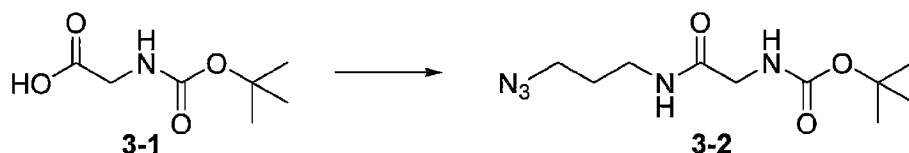
[化84]



[0320] <工程 1>

tert-ブチル (2-((3-アジドプロピル)アミノ)-2-オキソエチル)カルバメート (3-2) の合成:

[化85]

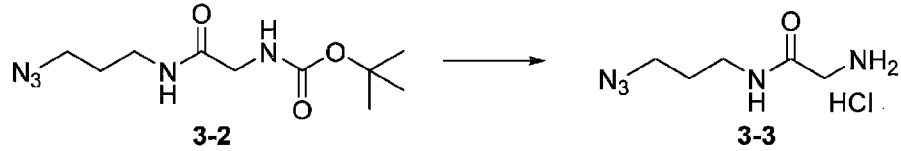


市販の3-アジドプロピルアミン [CAS REGISTRY NO. : 88192-19-2] (1-1、41 μ L)、N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシン [CAS REGISTRY NO. : 4530-20-5] (3-1、100 mg) のエタノール (2 mL) 溶液に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (197 mg) を加え、室温で18時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた油状物をメチル-tert-ブチルエーテル (10 mL) に溶解し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、標記化合物3-2 (95 mg) を無色油状物として得た。

[0321] <工程 2>

2-アミノ-N-(3-アジドプロピル)アセタミド 塩酸塩 (3-3)
の合成:

[化86]

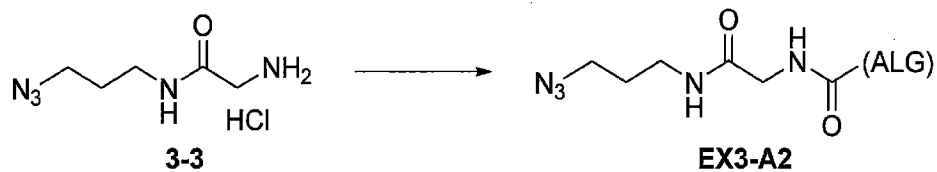


[0322] (実施例3) <工程1>で得られた化合物(3-2、95 mg)に、氷水冷下4規定-塩化水素/1、4-ジオキサン(665 μ L)を加えた後、室温で1時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル(2.0 mL)を加え、減圧濃縮した。得られた油状物を、メチル-tert-ブチルエーテルでデカント洗浄後、減圧濃縮して、標記化合物3-3(62 mg)を無色ガム状物として得た。

[0323] <工程3>

2-アミノ-N-(3-アジドプロピル)アセタミド基導入アルギン酸(EX3-A2)の合成:

[化87]



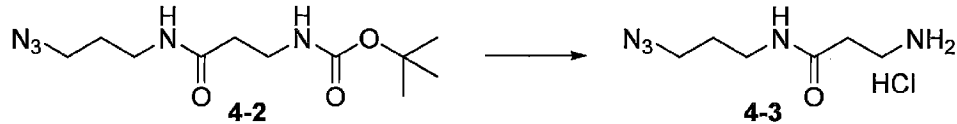
[0324] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2)水溶液(20 mL)に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(56 mg)、(実施例3)<工程2>で得られた化合物(3-3、10.6 mg)のエタノール(2 mL)溶液、1モル濃度-重曹水(76 μ L)を加えた。30°Cで3時間攪拌した後、塩化ナトリウム(0.2 g)、エタノール(40 mL)を順次加え、30分間室温で攪拌した。得ら

て得た。

[0328] <工程 2>

3-アミノ-N-(3-アジドプロピル)プロパンアミド 塩酸塩 (4-3) の合成:

[化90]

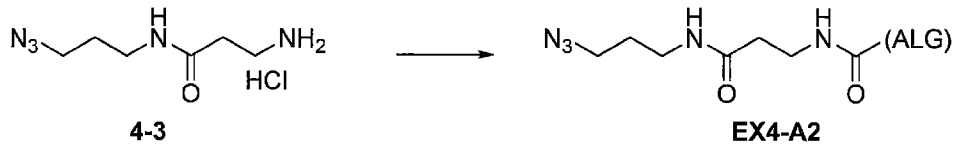


[0329] (実施例 4) <工程 1>で得られた化合物 (4-2、124 mg) に、氷水冷下 4 規定-塩化水素 / 1, 4-ジオキサン (868 μ L) を加えた後、室温で 1 時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル (2.6 mL) を加え、減圧濃縮した。得られた油状物を、メチル-tert-ブチルエーテルでデカント洗浄後、減圧濃縮して、標記化合物 4-3 (93 mg) を無色ガム状物として得た。

[0330] <工程 3>

3-アミノ-N-(3-アジドプロピル)プロパンアミド基導入アルギン酸 (EX4-A2) の合成:

[化91]



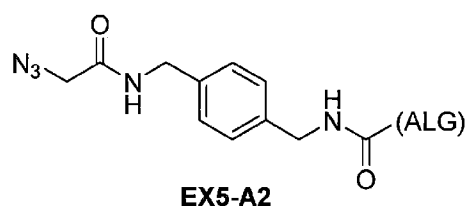
[0331] 1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (20 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (56 mg)、(実施例 4) <工程 2>で得られた化合物 (4-3、12.6 mg) のエタノール (2 mL) 溶液、1 モル濃度-重曹水 (76 μ L) を加えた。30°C で 3 時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.2 g)、エタノール (40 mL) を順次加え、30 分間室温で攪拌した。得ら

れた沈殿をろ取り、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX 4 - A 2 (2 1 1 m g) を白色固体として得た。

[0332] (実施例 5)

N - (4 - (アミノメチル) ベンジル) - 2 - アジドアセタミド基導入アルギニン酸 (EX 5 - A 2) の合成 :

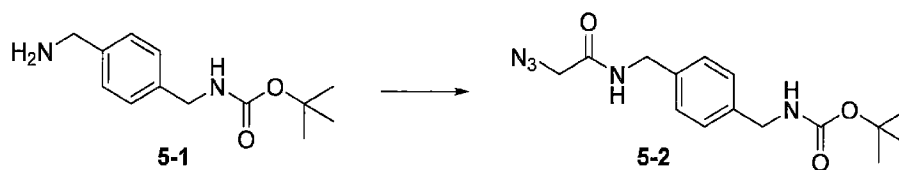
[化92]



[0333] <工程 1 >

t e r t - ブチル (4 - ((2 - アジドアセタミド) メチル) ベンジル) カルバメート (5 - 2) の合成 :

[化93]



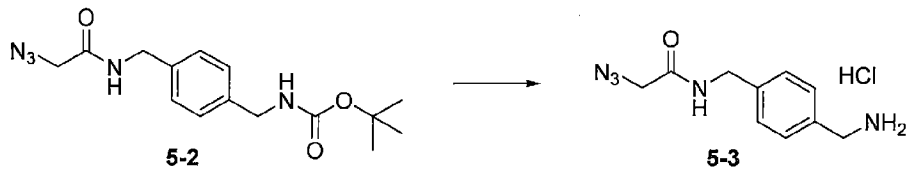
[0334] 市販の 2-アジド酢酸 [CAS REGISTRY NO. : 18523-48-3] (4 1 μ L) から、Organic Letters (2 0 1 7) , 1 9 (2 3) , 6 4 0 0 - 6 4 0 3 に記載の方法と同様に調製したアジド酢酸クロリドの塩化メチレン (1 . 0 m L) 溶液を、市販の 1 - (N - t e r t - ブチトキシカルボニル - アミノメチル) - 4 - (アミノメチル) ベンゼン [CAS REGISTRY NO. : 108468-00-4] (5 - 1 , 1 0 0 m g) 、トリエチルアミン (1 1 8 μ L) の塩化メチレン (1 . 0 m L) 溶液に、氷水冷下で加え、室温で 2 . 5 時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル (2 0 m L) 、水 (5 m L) を加え、分

液後、有機層を水、飽和重曹水、水、飽和食塩水で順次洗浄した。不溶物をろ去し、ろ液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をメチル-tert-ブチルエーテル/n-ヘプタンでトリチュレートした。得られた固体をろ取り、標記化合物5-2 (91 mg) を薄いベージュ固体として得た。

[0335] <工程2>

N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-アジドアセタミド 塩酸塩 (5-3) の合成:

[化94]

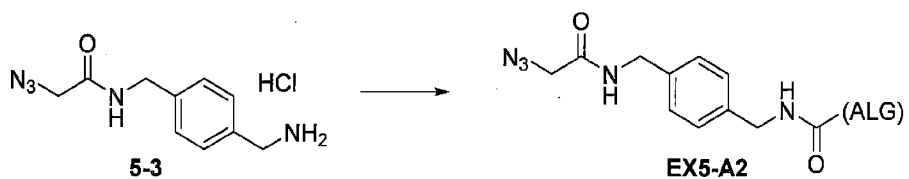


[0336] (実施例5) <工程1>で得られた化合物(5-2、91 mg)に、氷水冷下4規定-塩化水素/1,4-ジオキサン(637 μL)を加えた後、1,4-ジオキサン(627 μL)を追加した後、室温で3.5時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル(3.8 mL)を加え、10分間攪拌した。得られた固体をろ過して、標記化合物5-3(62 mg)をベージュ固体として得た。

[0337] <工程3>

N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-アジドアセタミド基導入アルギン酸(EX5-A2)の合成:

[化95]



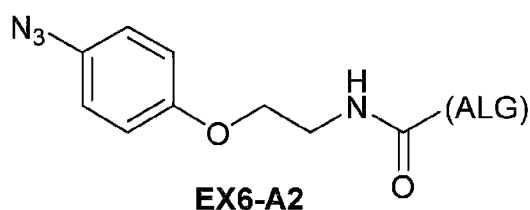
[0338] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2

) 水溶液 (25 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (70 mg)、(実施例5) <工程2> で得られた化合物 (5-3, 16.1 mg)、1モル濃度-重曹水 (95 μ L) を加えた。30°Cで3時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.25 g)、エタノール (50 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX5-A2 (239 mg) を白色固体として得た。

[0339] (実施例6)

2-(4-アジドフェノキシ)エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX6-A2) の合成:

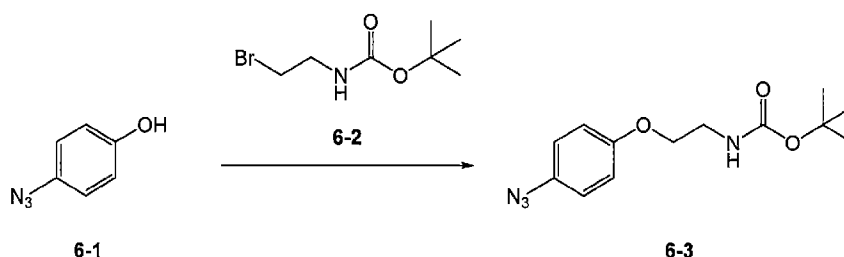
[化96]



[0340] <工程1>

tert-ブチル (2-(4-アジドフェノキシ)エチル)カルバメート (6-3) の合成:

[化97]



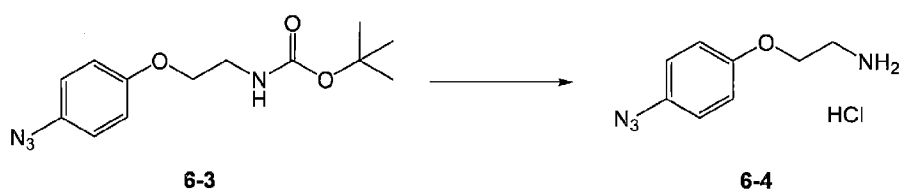
[0341] 市販の4-アジドフェノール [CAS REGISTRY NO. : 24541-43-3] (6-1, 0.3 g)、市販のtert-ブチル (

2-ブロモエチル)カルバメート [CAS REGISTRY NO. : 39684-80-5] (6-2、0.6 g) 及びN-メチルピロリドン (3 mL) の混合物に対し、室温で炭酸カリウム (0.61 g) を加えた。反応混合物を80℃で6時間30分攪拌し、室温まで冷却した後、水 (10 mL) 及びメチル tert-ブチルエーテル (20 mL) を加えた。生じた懸濁液をセライトろ過し、残留物をメチル tert-ブチルエーテル (5 mL) で2回洗浄した。ろ液を分離し、有機層を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。この粗生成物をメチル tert-ブチルエーテル (20 mL) に溶解させ、1規定-水酸化ナトリウム水溶液 (5 mL) で2回、水 (5 mL) で2回、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層をろ過後、減圧下で濃縮することで標記化合物6-3 (0.411 g) を紫色の油状物として得た。

[0342] <工程2>

2-(4-アジドフェノキシ)エタン-1-アミン 塩酸塩 (6-4) の合成：

[化98]

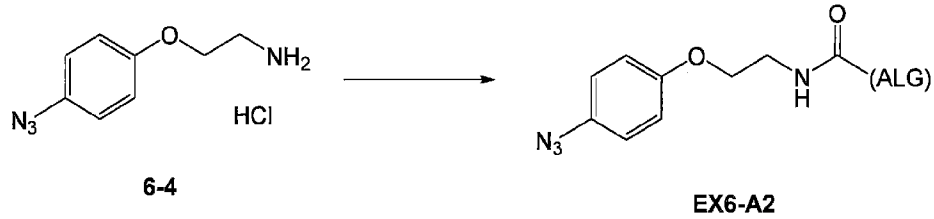


[0343] (実施例6) <工程1>で得られた化合物 (6-3、0.41 g) 及び1,4-ジオキサン (2.87 mL) の混合物に対し、水冷攪拌下、4規定-塩化水素 / 1,4-ジオキサン (2.87 mL) を加えた後、室温で18時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル (40 mL) を加え、懸濁液を室温で30分攪拌した。析出物をろ過し、回収した固体を減圧乾燥して、標記化合物6-4 (0.2834 g) を淡い紫色固体として得た。

[0344] <工程3>

2-(4-アジドフェノキシ)エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX6-A2) の合成:

[化99]

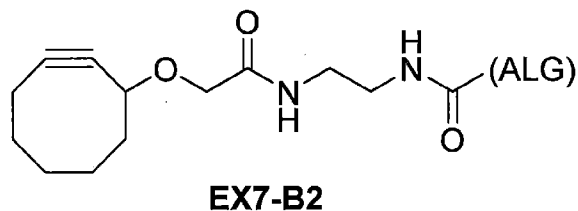


1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (29.66 mL) に、室温で4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (91.52 mg) 及び1モル濃度-重曹水 (68.63 μ L) を加えた。続いて、(実施例6) <工程2>で得られた化合物 (6-4, 14.73 mg) の水 (1 mL) 及びエタノール (1 mL) 溶液を室温にて加え、同温で42時間攪拌した後、塩化ナトリウム (300 mg)、エタノール (59.3 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX6-A2 (269 mg) をピンク色固体として得た。

[0345] (実施例7)

N-(2-アミノエチル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド基導入アルギン酸 (EX7-B2) の合成:

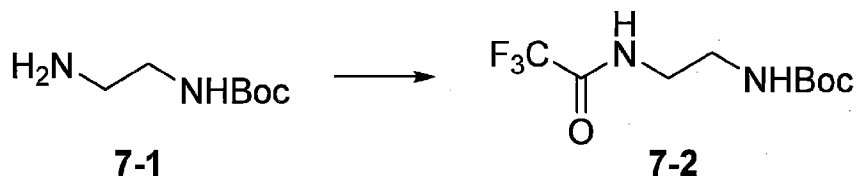
[化100]



[0346] <工程1>

tert-ブチル (2-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)エチル)カルバメート (7-2) の合成:

[化101]

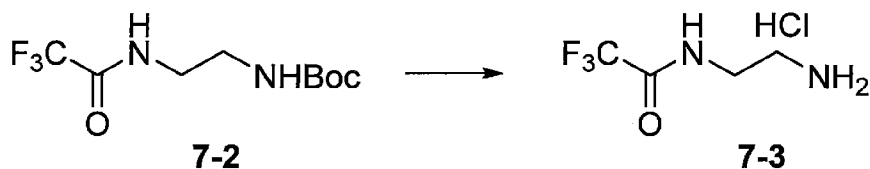


[0347] 市販の *tert*-ブチル (2-アミノエチル)カルバメート (7-1、3.00 g、[CAS REGISTRY NO. : 57260-73-8]) のテトラヒドロフラン (12.0 mL) 溶液に、トリフルオロ酢酸エチル (2.24 mL) を滴下した。反応混合物を、室温で14.5時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣に *tert*-ブチルメチルエーテル (5 mL) とヘプタン (25 mL) を加え、トリチュレートした。固体をろ取後、ヘプタンで洗浄して、標記化合物7-2 (4.36 g) を白色固体として得た。

[0348] <工程2>

N-(2-アミノエチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド 塩酸塩 (7-3) の合成:

[化102]



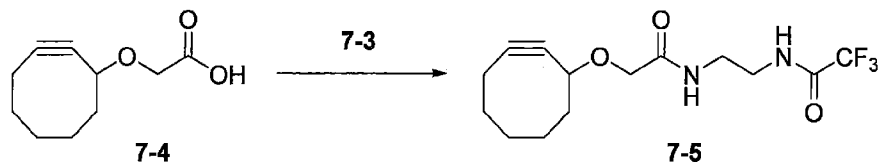
[0349] (実施例7) <工程1>で得られた化合物7-2 (0.50 g) を、1,4-ジオキサン (3.0 mL) に懸濁した。氷水冷下、4規定-塩化水素/1,4-ジオキサン (7.0 mL) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル (30.0 mL) を加え、室温で50分間攪拌した。固体をろ取し、ジイソプロピルエーテルで洗浄後、減圧乾燥

して、標記化合物 7-3 (0.70 g) を白色固体として得た。

[0350] <工程 3>

N-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (7-5) の合成:

[化103]

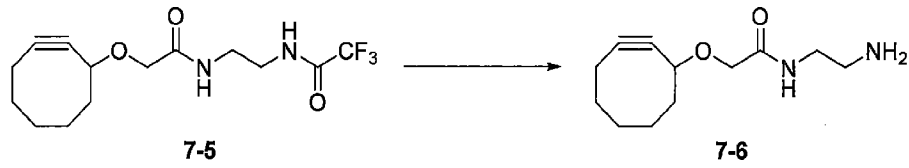


[0351] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したカルボン酸 (7-4、300 mg) のエタノール (2 mL) 溶液に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (1.09 g)、(実施例 7) <工程 2> で得られた化合物 7-3 (380 mg)、トリエチルアミン (321 μ L) を加え、30°C で 3 時間攪拌後、トリエチルアミン (229 μ L) を追加し、同温で 1 時間攪拌した。さらに室温で 15.5 時間攪拌後、水 (10 mL) と酢酸エチル (50 mL) を加え、分液し、水層を酢酸エチル (10 mL) で抽出した。有機層を 0.5 規定-クエン酸、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣に tert-ブチルメチルエーテルを加え、不溶物をろ去し、ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10%-酢酸エチル/n-ヘプタン~40%酢酸エチル/n-ヘプタン) で精製して、標記化合物 7-5 (322 mg) を白色固体として得た。

[0352] <工程 4>

N-(2-アミノエチル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド (7-6) の合成:

[化104]

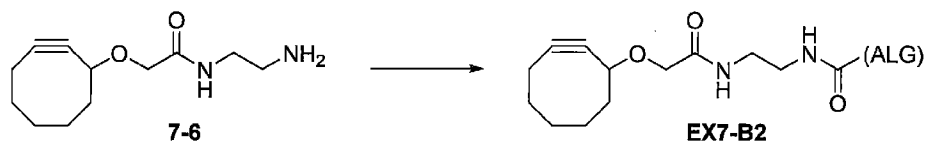


[0353] (実施例7) <工程3>で得られた化合物7-5 (322 mg) のメタノール (4.8 mL) 溶液に、炭酸カリウム (278 mg) の水 (1.6 mL) 溶液を加え、室温で7.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、水 (3 mL) を加えた後、塩化ナトリウムで飽和させた。水層を酢酸エチル (30 mL, 10 mL \times 3) で抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、標記化合物7-6 (238 mg) を無色油状物として得た。

[0354] <工程5>

N-(2-アミノエチル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド基導入アルギン酸 (EX7-B2) の合成:

[化105]



[0355] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: B-2) 水溶液 (120 mL) に、室温攪拌下、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (335 mg)、(実施例7) <工程4>で得られた化合物7-6 (68 mg) のエタノール (12 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (303 μ L) を順次加え、30度で3時間攪拌した。反応液に、塩化ナトリウム (1.2 g) を加えた後、エタノール (240 mL) を加え、1.5時間攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノール (20 mL \times 5) で洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶かし、凍結乾燥して

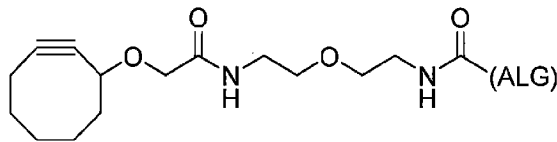
、標記化合物 EX7-B2 (1.16 g) を白色固体として得た。

[0356] (実施例 8)

N-(2-(2-アミノエトキシ)エチル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド基導入アルギン酸の合成 (EX8-A2)

:

[化106]

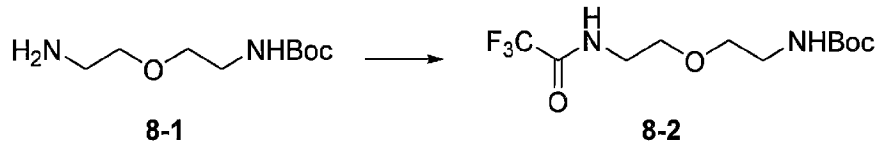


EX8-A2

[0357] <工程 1>

tert-ブチル (2-(2-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)エトキシ)エチル)カルバメート (8-2) の合成:

[化107]

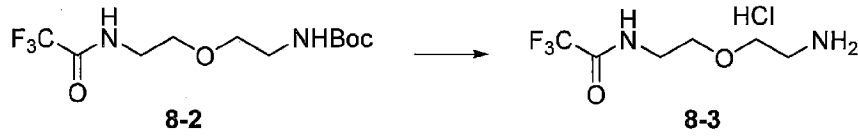


[0358] tert-ブチル (2-(2-アミノエトキシ)エチル)カルバメート (8-1、1.0 g、[CAS REGISTRY NO. : 127828-22-2]) のテトラヒドロフラン (4.0 mL) 溶液に、トリフルオロ酢酸エチル (0.6 mL) を滴下した。反応混合物を室温で、3.5 時間攪拌し、減圧濃縮して、標記粗化合物 8-2 (1.5 g) を無色油状物として得た。

[0359] <工程 2>

N-(2-(2-アミノエトキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド 塩酸塩 (8-3) の合成:

[化108]

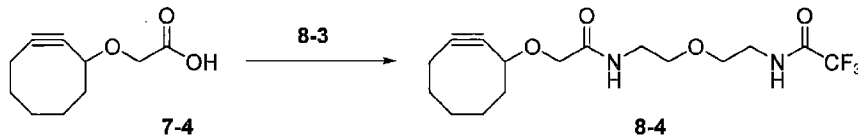


[0360] (実施例8) <工程1>で得られた化合物8-2 (1.5 g) に、氷水冷下、4規定-塩化水素/1,4-ジオキサン溶液 (10.3 mL) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル (30 mL) を加え、30分間室温で攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、ジイソプロピルエーテルで共沸した後、減圧乾燥して、標記化合物8-3 (1.3 g) を無色油状物として得た。

[0361] <工程3>

N-(2-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)エトキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (8-4) の合成:

[化109]



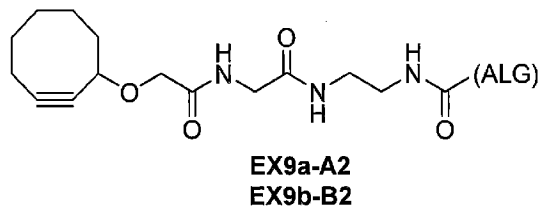
[0362] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したカルボン酸 (7-4、300 mg)、(実施例8) <工程2>で得られた化合物8-3 (443 mg) をアセトニトリル (6.0 mL) に溶解した。O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.75 g)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (920 μ L) を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル (20 mL)、水 (10 mL) を加え、分液した。有機層を、水 (10 mL)、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで

MT-MM) (112 mg)、(実施例8) <工程4>で得られた化合物8-5 (30 mg) のエタノール (4, 0 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (101 μL) を順次加え、30℃で3時間攪拌した。反応液に、塩化ナトリウム (0.4 g) を加えた後、エタノール (80 mL) を加え、30分間攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶かし、凍結乾燥して、標記化合物EX8-A2 (410 mg) を白色固体として得た。

[0367] (実施例9a、9b)

N-(2-アミノエチル)-2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)アセタミド基導入アルギン酸 (EX9a-A2、EX9b-B2) の合成:

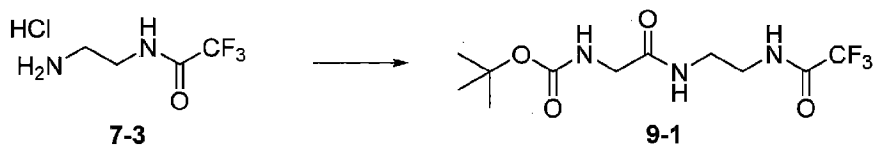
[化112]



[0368] <工程1>

tert-ブチル (2-オキソ-2-((2-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)エチル)アミノ)エチル)カルバメート (9-1) の合成:

[化113]



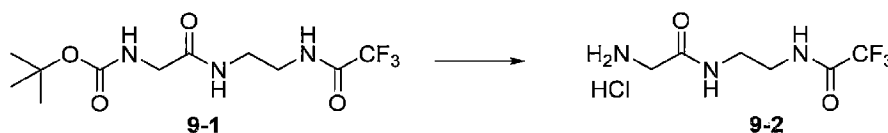
[0369] N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシン (91 mg、[CAS REGISTRY NO. : 4530-20-5])、(実施例7) <工程2>で得られた化合物 (7-3、100 mg) をアセトニトリル (3.0

mL) に溶解した。O- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (217 mg)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (281 μ L) を加え、室温で3.5時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル (15 mL)、水 (5 mL) を加え、分液後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 40%酢酸エチル/n-ヘプタン \rightarrow 酢酸エチル) で精製し、標記化合物9-1 (180 mg) を薄いベージュアモルファスとして得た。

[0370] <工程2>

N- (2- (2-アミノアセタミド) エチル) -2, 2, 2-トリフルオロアセタミド 塩酸塩 (9-2) の合成:

[化114]



[0371] (実施例9) <工程1>で得られた化合物 (9-1、180 mg) に、氷水冷下4規定-塩化水素/1, 4-ジオキサン (1.2 mL) を加えた後、室温で0.8時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル (3.6 mL) を加え、30分間攪拌した。得られた固体をろ過して、標記化合物9-2 (114 mg) を白色固体として得た。

[0372] <工程3>

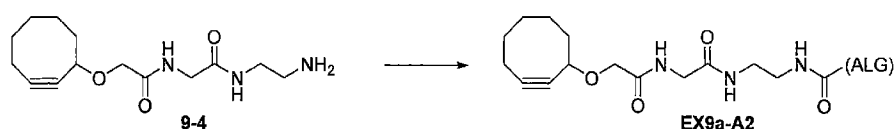
N- (2- (2- (2- (シクロオクト-2-イン-1-イロキシ) アセタミド) アセタミド) エチル) -2, 2, 2-トリフルオロアセタミド (9-3) の合成:

液を減圧濃縮して、標記化合物 9-4 (49 mg) を無色ガム状物として得た。

[0376] <工程 5-1>

N-(2-アミノエチル)-2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)アセタミド基導入アルギン酸 (EX9a-A2) の合成:

[化117]

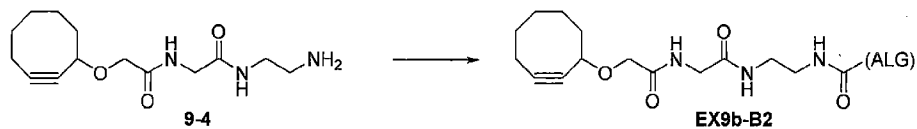


[0377] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (38 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (106 mg)、(実施例 9) <工程 4> で得られた化合物 (9-4, 30.3 mg) のエタノール (3.8 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (96 μL) を加えた。30°Cで3.2時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.38 g)、エタノール (76 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX9a-A2 (381 mg) を白色固体として得た。

[0378] <工程 5-2>

N-(2-アミノエチル)-2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)アセタミド基導入アルギン酸 (EX9b-B2) の合成:

[化118]

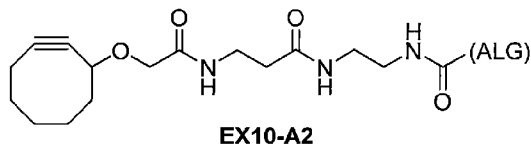


[0379] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：B-2）水溶液（38 mL）に、4-（4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（64 mg）、（実施例9）＜工程4＞で得られた化合物（9-4, 18.2 mg）、1モル濃度-重曹水（58 μ L）を加えた。30°Cで3.2時間攪拌した後、塩化ナトリウム（0.38 g）、エタノール（76 mL）を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物EX9b-B2（366 mg）を白色固体として得た。

[0380]（実施例10）

N-（2-アミノエチル）-3-（2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセタミド）プロパンアミド基導入アルギン酸（EX10-A2）の合成：

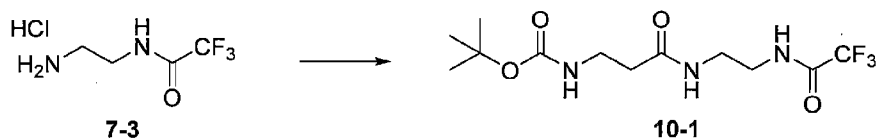
[化119]



[0381] ＜工程1＞

tert-ブチル（3-オキソ-3-（（2-（2,2,2-トリフルオロアセタミド）エチル）アミノ）プロピル）カルバメート（10-1）の合成：

[化120]



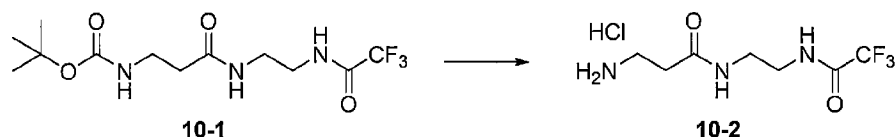
[0382] 市販のN-（tert-ブトキシカルボニル）- β -アラニン（113 mg、[CAS REGISTRY NO. : 3303-84-2]）、（実

施例7) <工程2>で得られた化合物(7-3、110 mg)をアセトニトリル(3.3 mL)に溶解した。O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(261 mg)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(319 μ L)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル(15 mL)、水(5 mL)を加え、分液後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮し、tert-ブチルメチルエーテル(20 mL)でトリチュレートした。固体をろ取り、酢酸エチル(20 mL)に溶解した。有機層を、1規定クエン酸、水、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をtert-ブチルメチルエーテル(10 mL)でトリチュレートした後、固体をろ取り、標記化合物10-1(80 mg)を白色固体として得た。

[0383] <工程2>

3-アミノ-N-(2-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)エチル)プロパンアミド 塩酸塩(10-2)の合成:

[化121]



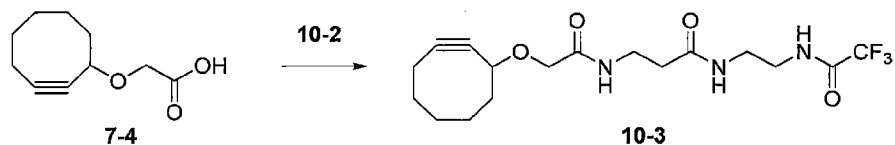
[0384] (実施例10) <工程1>で得られた化合物(10-1、80 mg)に、氷水冷下4規定塩化水素/1,4-ジオキサン(1.1 mL)を加えた後、室温で2時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル(3.4 mL)を加え、1.5時間攪拌した。得られた固体をろ過して、標記化合物10-2(61 mg)を白色固体として得た。

[0385] <工程3>

3-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)-N-(2-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)エチル)プロパンアミド(

10-3) の合成 :

[化122]

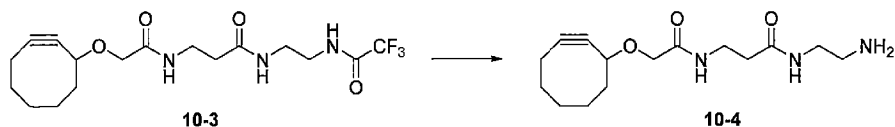


[0386] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したカルボン酸 (7-4、44 mg)、(実施例10) <工程2> で得られた化合物 (10-2、61 mg) に、エタノール (1.2 mL)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (115 mg)、トリエチルアミン (39 μ L) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液に、水 (3.7 mL) を加え、酢酸エチル (15 mL, 5 mL) で抽出した。有機層を、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた固体に、tert-ブチルメチルエーテル (10 mL) を加え、トリチュレートし、ろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (80%酢酸エチル/n-ヘプタン \rightarrow 酢酸エチル \rightarrow 20%メタノール/酢酸エチル) で精製して、標記化合物 10-3 (60 mg) を淡黄色固体として得た。

[0387] <工程4>

N-(2-アミノエチル)-3-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)プロパンアミド (10-4) の合成 :

[化123]



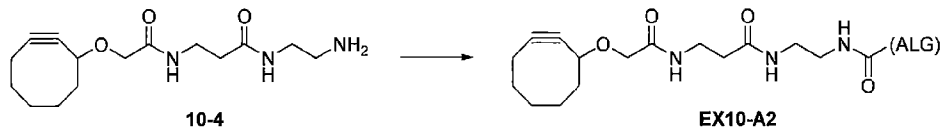
[0388] (実施例10) <工程3> で得られた化合物 (10-3、60 mg) のメタノール (3.0 mL) 溶液に、炭酸カリウム (42 mg) の水 (0

、 3 mL) 溶液を加え、室温で3時間攪拌後、さらに、炭酸カリウム (42 mg) の水 (0.3 mL) 溶液を加え、室温で16.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、飽和食塩水 (2 mL) を加え、さらに塩化ナトリウムで飽和させた。酢酸エチル (15 mL, 10 mL × 4) で抽出し、抽出層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチル (5 mL) と数滴のメタノールを加え、不溶物をろ去した。得られたろ液を減圧濃縮して、標記化合物 10-4 (31 mg) を無色油状物として得た。

[0389] <工程5>

N-(2-アミノエチル)-3-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)プロパンアミド基導入アルギン酸 (EX10-A2) の合成:

[化124]



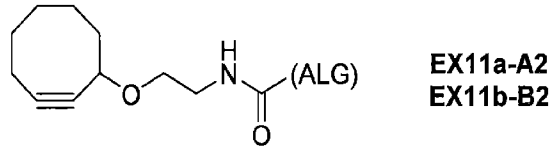
[0390] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (41 mL) に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (114 mg)、(実施例10) <工程4>で得られた化合物 (10-4、30.5 mg) のエタノール (4.1 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (103 μ L) を加えた。30°Cで3時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.41 g)、エタノール (82 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX10-A2 (406 mg) を白色固体として得た。

[0391] (実施例11a、11b)

2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エタン-1-アミノ基導入

アルギン酸 (EX11a-A2、EX11b-B2) の合成：

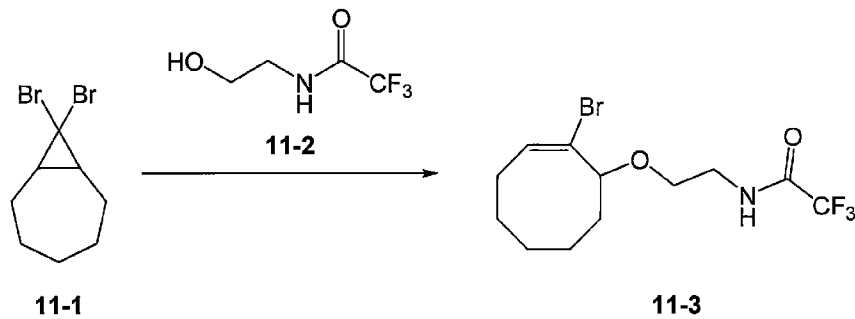
[化125]



[0392] <工程 1 >

(E)-N-(2-(2-(2-ブロモシクロオクト-2-エン-1-イル)オキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (11-3) の合成：

[化126]



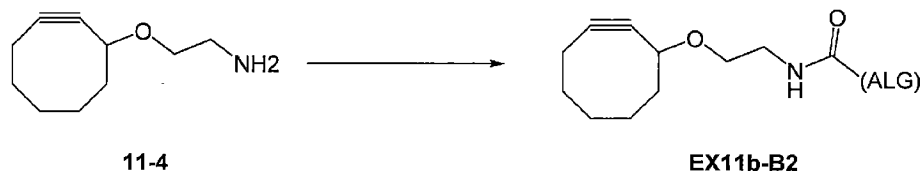
[0393] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したジブロモ体 (11-1、1 g) 及び文献公知の方法 (国際公開第2015/140807号パンフレット) に従い合成したアルコール体 (11-2、5.28 g) の混合物に対し、室温でジクロロメタン (2 mL) を加えた。内温を室温に保ちながら、反応容器をアルミホイルで包み、光から保護した。続いて、室温でトリフルオロメタンスルホン酸銀 (1.92 g) を一度に加え、同温にて1時間攪拌した。攪拌後、氷冷下で飽和食塩水 (5 mL) を加え、析出した銀塩をセライトろ過により除去し、残留物をメチル tert-ブチルエーテル (10 mL) で洗浄した。ろ液を分離し、有機層を水 (5 mL) で2回洗浄した。その後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧下で濃縮

) 水溶液 (69.2 mL) に、室温で 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (213.55 mg) を加えた。続いて、(実施例 11) <工程 2> で得られた化合物 (11-4, 26.78 mg) の水 (1 mL) 及びエタノール (1 mL) 溶液を室温にて加え、同温で 24 時間攪拌した後、塩化ナトリウム (700 mg)、エタノール (138.4 mL) を順次加え、30 分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX11a-A2 (661 mg) を白色固体として得た。

[0398] <工程 3-2>

2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ) エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX11b-B2) の合成:

[化129]

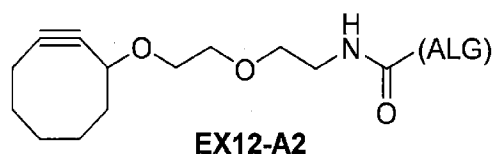


[0399] 1 重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: B-2) 水溶液 (70.1 mL)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (216.4 mg) 及び (実施例 11) <工程 2> で得られた化合物 (11-4, 27.14 mg) を用い、(実施例 11) <工程 3-1> と同様の操作を行い、標記化合物 EX11b-B2 (648 mg) を白色固体として得た。

[0400] (実施例 12)

2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エトキシ)エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX12-A2) の合成:

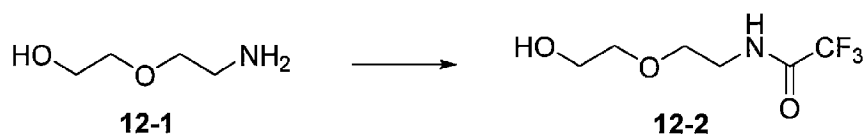
[化130]



[0401] <工程 1 >

2, 2, 2-トリフルオロ-N-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチル)アセタミド(12-2)の合成:

[化131]

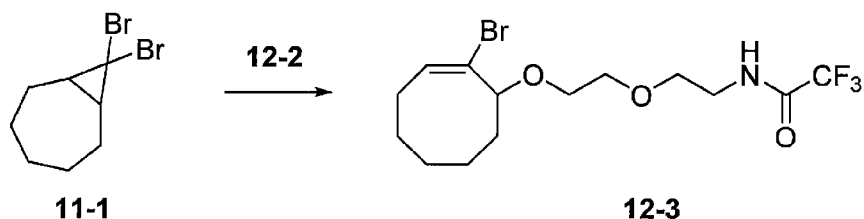


[0402] 市販の2-(2-アミノエトキシ)エタノール [CAS REGISTRY NO. : 929-06-6] (12-1, 2.0 mL) のテトラヒドロフラン (8.0 mL) 溶液に、2, 2, 2-トリフルオロ酢酸エチル (2.5 mL) を、5分かけて滴下した後、室温で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (30 mL)、水 (10 mL) を加え、分液した。水層を酢酸エチル (10 mL) で抽出し、合わせた有機層を、水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、標記化合物12-2 (3.7 g) を無色油状物として得た。

[0403] <工程 2 >

(E)-N-(2-(2-(2-(2-(2-ブロモシクロオクト-2-エン-1-イル)オキシ)エトキシ)エチル)-2, 2, 2-トリフルオロアセタミド(12-3)の合成:

[化132]

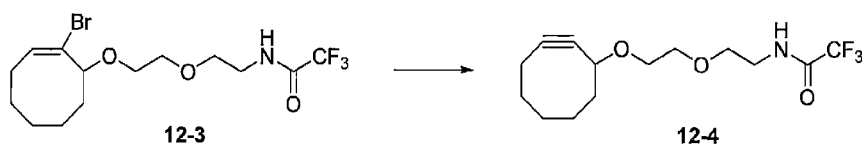


[0404] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したジブロモ体 (11-1、0.30 g) を塩化メチレン (0.54 mL) に溶解し、アルミホイル遮光下、(実施例12) <工程1> で得られた化合物 (12-2、1.86 g)、トリフルオロメタンスルホン酸銀 (0.52 g) を加えた。遮光下、室温で1.5時間攪拌後、反応液に、氷水冷下、飽和重曹水 (2.0 mL)、飽和食塩水 (3.0 mL) を順次加えた。固体をセライトにてろ去し、tert-ブチルメチルエーテル (10 mL×3) で洗浄した。ろ液を分液し、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、標記化合物 12-3 (424 mg) を薄い茶色油状物として得た。

[0405] <工程3>

N-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エトキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (12-4) の合成:

[化133]



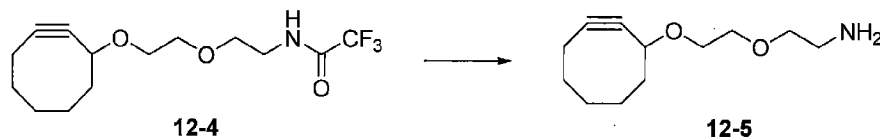
[0406] (実施例12) <工程2> で得られた化合物 (12-3、100 mg) を、テトラヒドロフラン (0.7 mL)、N,N-ジメチルホルムアミド (0.7 mL) に溶解した。60%水素化ナトリウム (21 mg) を、氷水下で加え、同温で3時間攪拌した。60%水素化ナトリウム (10 m

g) を加え、室温で1時間、さらに60%水素化ナトリウム (10 mg) を加え、室温で20時間攪拌した。水 (3 mL) を加え、酢酸エチル (15 mL、10 mL) で抽出し、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (n-ヘプタン→50%酢酸エチル/n-ヘプタン) で精製して、標記化合物12-4 (37 mg) を無色油状物として得た。

[0407] <工程4>

2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エトキシ)エタン-1-アミン (12-5) の合成:

[化134]

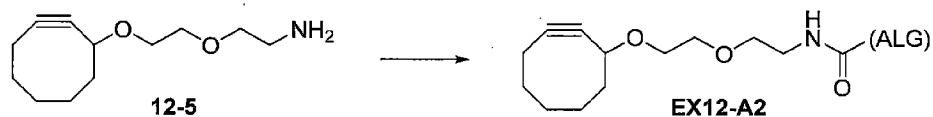


[0408] (実施例12) <工程3>で得られた化合物 (12-4、37 mg) のメタノール (555 μ L) 溶液に、炭酸カリウム (50 mg) の水 (185 μ L) 溶液を加え、室温で17時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、水 (1 mL) を加え、塩化ナトリウムで飽和させた。酢酸エチル (10 mL \times 4) で抽出し、抽出層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチル (10 mL) と数滴のメタノールを加え、不溶物をろ去した。得られたろ液を減圧濃縮して、標記化合物12-5 (30 mg) を無色油状物として得た。

[0409] <工程5>

2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エトキシ)エタン-1-アミノ基導入アルギン酸 (EX12-A2) の合成:

[化135]

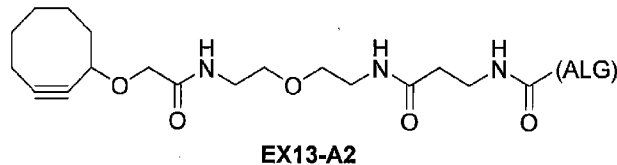


[0410] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（52 mL）に、4-（4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（145 mg）、（実施例12）＜工程4＞で得られた化合物（12-5、29 mg）のエタノール（5.2 mL）溶液、1モル濃度-重曹水（131 μ L）を加えた。30℃で3.2時間攪拌した後、塩化ナトリウム（0.52 g）、エタノール（104 mL）を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物EX12-A2（522 mg）を白色固体として得た。

[0411]（実施例13）

3-アミノ-N-（2-（2-（2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセタミド）エトキシ）エチル）プロパンアミド基導入アルギン酸（EX13-A2）の合成：

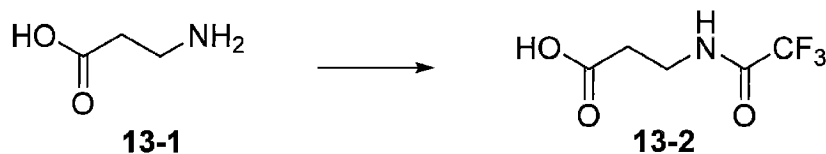
[化136]



[0412] <工程1>

3-（2,2,2-トリフルオロアセタミド）プロパン酸（13-2）の合成：

[化137]



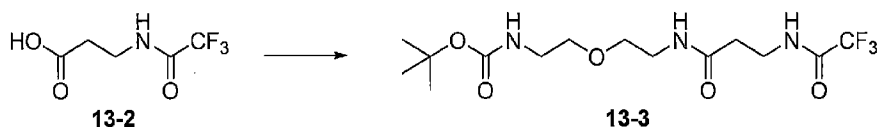
[0413] 市販の β -アラニン [CAS REGISTRY NO. : 107-95-9]（13-1、2.0 g）をメタノール（40.0 mL）に溶解し

、トリエチルアミン（3.3 mL）を加えた。水冷下で2, 2, 2-トリフルオロ酢酸エチル（3.4 mL）を5分間で滴下後、室温で20.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、水（20 mL）を加え、1規定塩酸でpH4に調整した。酢酸エチル（100 mL×2、50 mL）で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、標記化合物13-2（2.9 g）を白色固体として得た。

[0414] <工程2>

tert-ブチル（2-（2-（3-（2, 2, 2-トリフルオロアセタミド）プロパンアミド）エトキシ）エチル）カルバメート（13-3）の合成：

[化138]



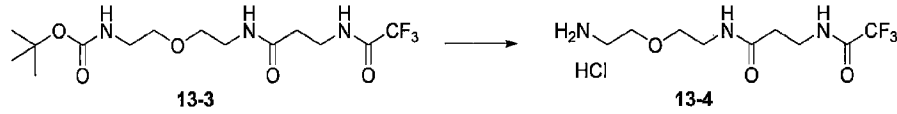
[0415] （実施例13）<工程1>で得られた化合物（13-2、400 mg）、tert-ブチル（2-（2-アミノエトキシ）エチル）カルバメート（8-1、441 mg、[CAS REGISTRY NO. : 127828-22-2]）のエタノール（4.0 mL）溶液に、4-（4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（897 mg）を加え、3.5時間攪拌した。反応液に、水（5 mL）を加え、酢酸エチル（20 mL、10 mL）で抽出後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー（30%酢酸エチル/n-ヘプタン→酢酸エチル）で精製して、標記化合物13-3（451 mg）を無色油状物として得た。

[0416] <工程3>

N-（2-（2-アミノエトキシ）エチル）-3-（2, 2, 2-トリフル

オロアセタミド) プロパンアミド 塩酸塩 (13-4) の合成:

[化139]

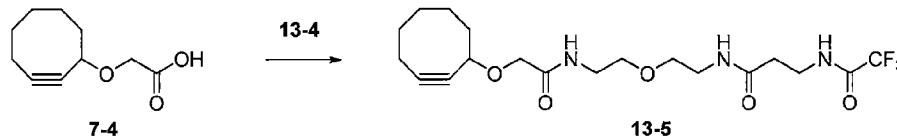


[0417] (実施例13) <工程2>で得られた化合物(13-3、451 mg)に、氷水冷下4規定-塩化水素/1, 4-ジオキサン(3.16 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に、ジイソプロピルエーテル(6.4 mL)を加え、減圧濃縮して、標記化合物13-4(433 mg)を無色ガム状物として得た。

[0418] <工程4>

N-(2-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)エトキシ)エチル-3-(2, 2, 2-トリフルオロアセタミド)プロパンアミド(13-5)の合成:

[化140]



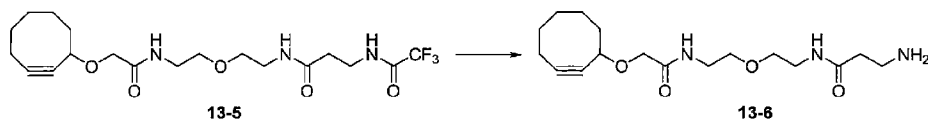
[0419] 文献公知の方法(Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110)に従い合成したカルボン酸(7-4、111 mg)、(実施例13) <工程3>で得られた化合物(13-4、215 mg)に、エタノール(1.7 mL)、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(253 mg)、トリエチルアミン(102 μL)を加え、室温で21時間攪拌した。反応液に、水(5 mL)を加え、酢酸エチル(15 mL)で抽出した。有機層を、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(30%酢酸エチル/n-ヘプタン→酢酸エチル→15%メタノー

ル／酢酸エチル)で精製して、標記化合物13-5 (35 mg)を無色油状物として得た。

[0420] <工程5>

3-アミノ-N-(2-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)エトキシ)エチル)プロパンアミド(13-6)の合成:

[化141]

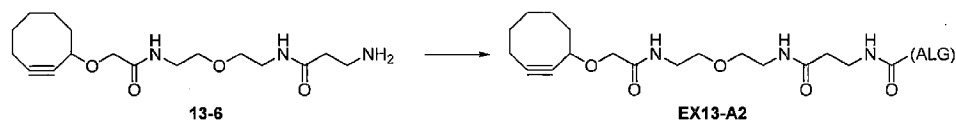


[0421] (実施例13) <工程4>で得られた化合物(13-5、35 mg)のメタノール(700 μL)溶液に、炭酸カリウム(33 mg)の水(175 μL)溶液を加え、室温で16.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、水(2 mL)を加え、塩化ナトリウムで飽和させた。酢酸エチル(10 mL×5)で抽出し、抽出層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチル(10 mL)と数滴のメタノールを加え、不溶物をろ去した。得られたろ液を減圧濃縮して、標記化合物13-6(24 mg)を無色ガム状物として得た。

[0422] <工程6>

3-アミノ-N-(2-(2-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)エトキシ)エチル)プロパンアミド基導入アルギン酸(EX13-A2)の合成:

[化142]



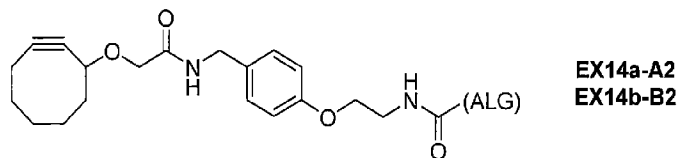
[0423] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2)水溶液(28 mL)に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリ

アジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (78 mg)、(実施例13) <工程5>で得られた化合物 (13-6、24 mg) のエタノール (2.8 mL) 溶液、1モル濃度-重曹水 (71 μ L) を加えた。30°Cで3.5時間攪拌した後、塩化ナトリウム (0.28 g)、エタノール (56 mL) を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物 EX13-A2 (272 mg) を白色固体として得た。

[0424] (実施例14)

N-(4-(2-アミノエトキシ)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド基導入アルギン酸 (EX14a-A2、EX14b-B2) の合成:

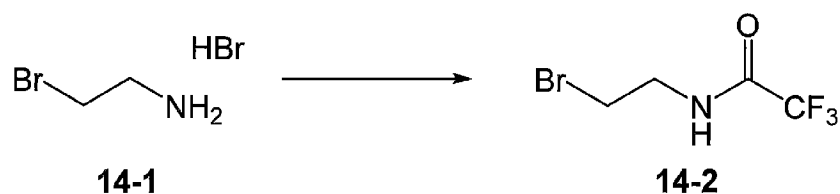
[化143]



[0425] <工程1>

N-(2-ブロモエチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (14-2) の合成:

[化144]



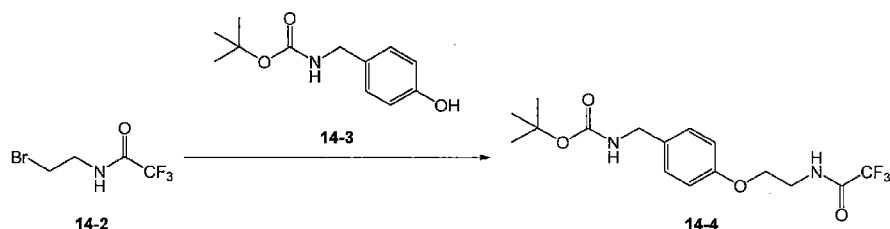
[0426] 市販の2-ブロモエチルアミン臭化水素酸塩 [CAS REGISTRY NO. : 2576-47-8] (14-1、3 g) のメタノール (30 mL) 溶液に対し、氷冷攪拌下、トリエチルアミン (4.29 mL) を

加えた。この混合物に対し、同温でトリフルオロ酢酸エチル（1.92 mL）を徐々に加え、室温で42時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮し、水（10 mL）を加えた。酢酸エチル（10 mL）で3回抽出し、有機層を水（5 mL）、飽和食塩水（5 mL）で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧下で濃縮することで、標記化合物14-2（2.457 g）を淡い褐色固体として得た。

[0427] <工程2>

tert-ブチル（4-（2-（2,2,2-トリフルオロアセタミド）エトキシ）ベンジル）カルバメート（14-4）の合成：

[化145]

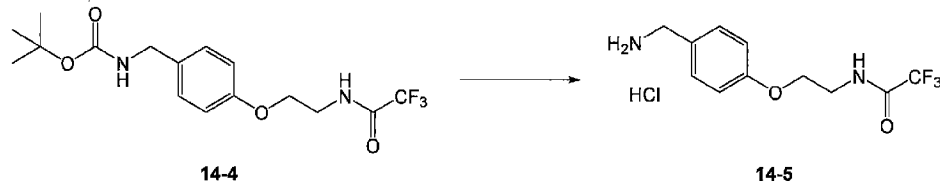


[0428] 市販のtert-ブチル（4-ヒドロキシベンジル）カルバメート [CAS REGISTRY NO. : 149505-94-2]（14-3、0.36 g）、（実施例14）<工程1>で得られた化合物（14-2、0.46 g）、ヨウ化カリウム（0.35 g）及びN-メチルピロリドン（3.6 mL）の混合物に対し、室温で炭酸カリウム（0.45 g）を加え、140℃で5時間攪拌した。反応終了後、室温まで冷却し、水（10 mL）で希釈した。メチル tert-ブチルエーテル（10 mL）で3回抽出し、有機層を1規定-水酸化ナトリウム水溶液（5 mL）で2回、水（5 mL）、飽和食塩水（5 mL）で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層をろ過後、減圧下で濃縮することで、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（n-ヘプタン/酢酸エチル）で精製し、標記化合物14-4（0.202 g）を白色アモルファスとして得た。

[0429] <工程 3>

N-(2-(4-(アミノメチル)フェノキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド 塩酸塩 (14-5) の合成:

[化146]

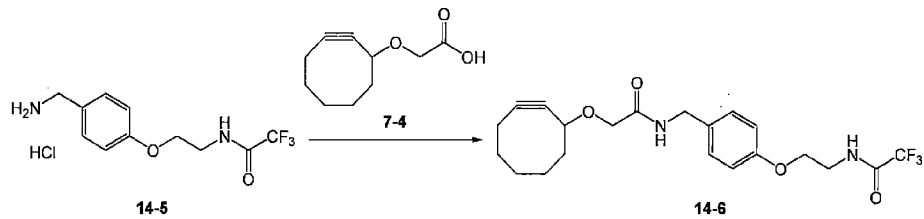


[0430] (実施例 14) <工程 2> で得られた化合物 (14-4、0.2 g) を用い、(実施例 6) <工程 2> と同様の操作を実施することで、標記化合物 14-5 (0.147 g) を白色固体として得た。

[0431] <工程 4>

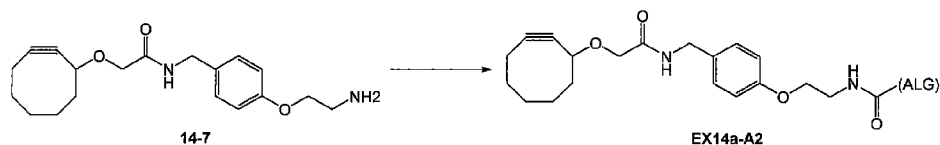
N-(2-(4-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド)メチル)フェノキシ)エチル)-2,2,2-トリフルオロアセタミド (14-6) の合成:

[化147]



[0432] 文献公知の方法 (Org. Process Res. Dev. (2018) 22:108-110) に従い合成したカルボン酸 (7-4、50 mg)、(実施例 14) <工程 3> で合成した化合物 (14-5、81.96 mg) 及びエタノールの混合物に対し、氷冷攪拌下、4-(4,6-ジメトキシー-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (137.22 mg) 及びトリエチルアミン (38.25 μ L) を加え、室温で 1 時間 30 分攪拌した。反応終了後、

[化149]

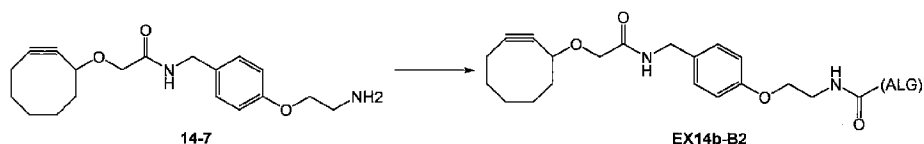


[0436] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（49.44 mL）、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-M）（152.54 mg）及び（実施例14）＜工程5＞で得られた化合物（14-7、37.79 mg）を用い、（実施例11）＜工程3-1＞と同様の操作を行い、標記化合物EX14a-A2（479 mg）を白色固体として得た。

[0437] <工程6-2>

N-（4-（2-アミノエトキシ）ベンジル）-2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセタミド基導入アルギン酸（EX14b-B2）の合成：

[化150]

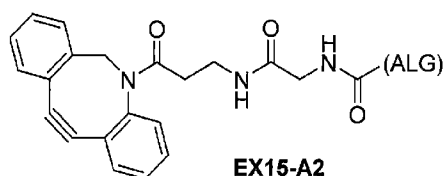


[0438] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：B-2）水溶液（40.08 mL）、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-M）（123.66 mg）及び（実施例14）＜工程5＞で得られた化合物（14-7、30.64 mg）を用い、（実施例11）＜工程3-1＞と同様の操作を行い、標記化合物EX14b-B2（356 mg）を白色固体として得た。

[0439] （実施例15）

2-アミノ-N-[3-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-3-オキソプロピル]アセタミド基導入アルギニン酸(EX15-A2)の合成:

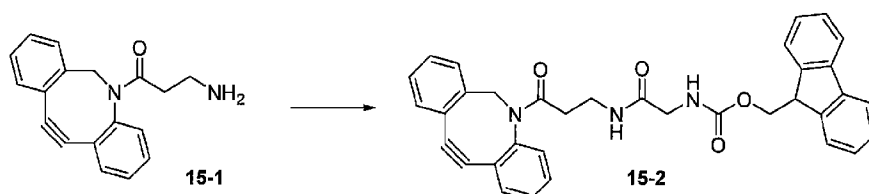
[化151]



[0440] <工程1>

(9H-フルオレン-9-イル)メチル-N-[3-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-3-オキソプロピル]アセタミド-2-カルバメート基(15-2)の合成:

[化152]



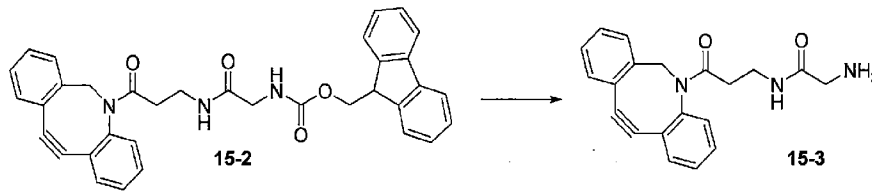
[0441] 市販の3-アミノ-1-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-1-プロパノン[CAS REGISTRY NO. : 1255942-06-3](15-1、50 mg)、N-(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニルグリシン[CAS REGISTRY NO. : 29022-11-5](54 mg)をアセトニトリル(1.5 mL)に溶解した。O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(76 mg)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(70 μ L)を加え、室温で4.5時間攪拌した。反応液に、酢酸エチル(15 mL)、水(5 mL)を加え、分液後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮し、カラムクロマ

トグラフィーで精製して、標記化合物 15-2 (63 mg) を薄いベージュアモルファスとして得た。

[0442] <工程 2>

2-アミノ-N-[3-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アズシン-5(6H)-イル)-3-オキソプロピル]アセタミド(15-3)の合成:

[化153]

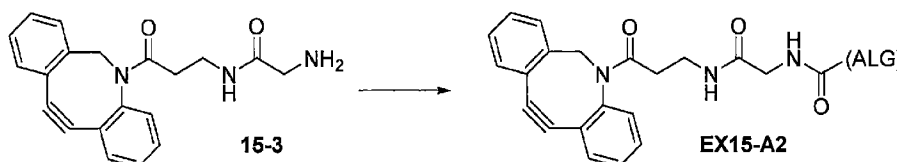


[0443] (実施例 15) <工程 1>で得られた化合物(15-2、63 mg)に、ピペリジン(56 μL)のN,N-ジメチルホルムアミド(315 μL)溶液を加え、室温で30分間拡販した。反応液に、酢酸エチル(15 mL)、水(5 mL)を加え、分液後、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた固体に、tert-ブチルメチルエーテル(5 mL)を加え、トリチュレートした後、ろ取り、標記化合物15-3(10 mg)を薄いベージュ固体として得た。ろ液から回収し、追加で、標記化合物15-3(11 mg)を淡黄色ガム状物として得た。

[0444] <工程 3>

2-アミノ-N-[3-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アズシン-5(6H)-イル)-3-オキソプロピル]アセタミド基導入アルギン酸(EX15-A2)の合成:

[化154]

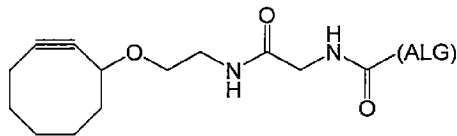


[0445] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（19 mL）に、4-（4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（106 mg）、（実施例15）＜工程2＞で得られた化合物（15-3、21 mg）のエタノール（1.9 mL）溶液、1モル濃度-重曹水（48 μ L）を加えた。30℃で3時間攪拌した後、塩化ナトリウム（0.19 g）、エタノール（38 mL）を順次加え、30分間室温で攪拌した。得られた沈殿をろ取し、エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体を水に溶解後凍結乾燥して、標記化合物EX15-A2（188 mg）を白色固体として得た。

[0446]（実施例16）

2-アミノ-N-（2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）エチル）アセタミド基導入アルギン酸（EX16-A2）の合成：

[化155]

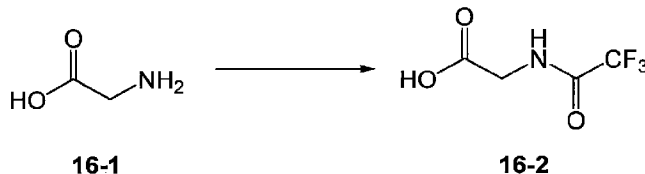


EX16-A2

[0447] ＜工程1＞

（2,2,2-トリフルオロアセチル）グリシン（16-2）の合成：

[化156]



16-1

16-2

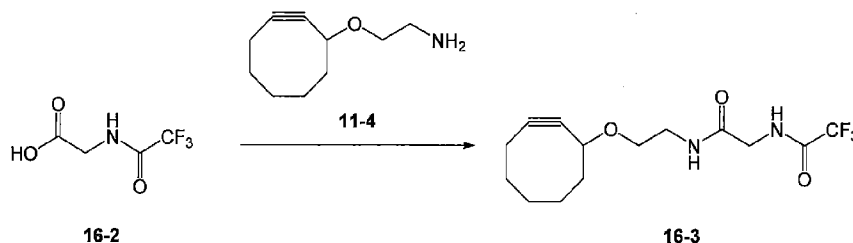
[0448] グリシン（16-1、2 g）をメタノール（10 mL）に懸濁させ、4℃まで冷却した。同温にて、トリフルオロ酢酸エチル（3.5 mL）及びトリエチルアミン（3.71 mL）を加え、室温で23時間攪拌した。

反応終了後、1規定塩酸（20 mL）をpH2になるまで徐々に加え、酢酸エチル（10 mL）で3回抽出し、水（5 mL）及び飽和食塩水（5 mL）で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧下で濃縮し、淡黄色油状物を得た。得られた油状物を酢酸エチル（20 mL）に溶解させ、n-ヘプタン（10 mL）を加えた。この溶液を減圧下で濃縮することで標記化合物16-2（3.22 g）を白色アモルファスとして得た。

[0449] <工程2>

N-（2-（（2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）エチル）アミノ）-2-オキソエチル）-2,2,2-トリフルオロアセタミド（16-3）の合成：

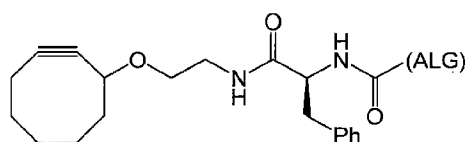
[化157]



[0450] 化合物11-4（80 mg）及び（実施例16）<工程1>で得られた化合物（16-2、81.83 mg）の混合物に対し、氷冷攪拌下、エタノール（1600 μL）及び4-（4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（239.21 mg）を加え、室温で3時間攪拌した。水（2 mL）を加え反応を停止させ、メチル tert-ブチルエーテル（5 mL）で3回抽出した。有機層を水（5 mL）、飽和食塩水（5 mL）で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層をろ過後、減圧下で濃縮することで、粗生成物を得た。この粗生成物をn-ヘプタン（10 mL）でトリチュレートし、ろ過及び減圧下で乾燥させることで標記化合物16-3（95.1 mg）を白色固体として得た。

(2S) - 2 - アミノ - N - (2 - (シクロオクト - 2 - イン - 1 - イロキシ) エチル) - 3 - フェニルプロパンアミド基導入アルギン酸 (EX 17 - A 2) の合成 :

[化160]

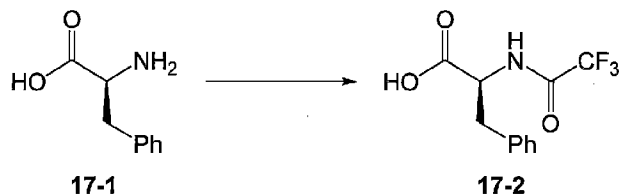


EX17-A2

[0456] <工程 1 >

(2, 2, 2 - トリフルオロアセチル) - L - フェニルアラニン (17 - 2) の合成 :

[化161]

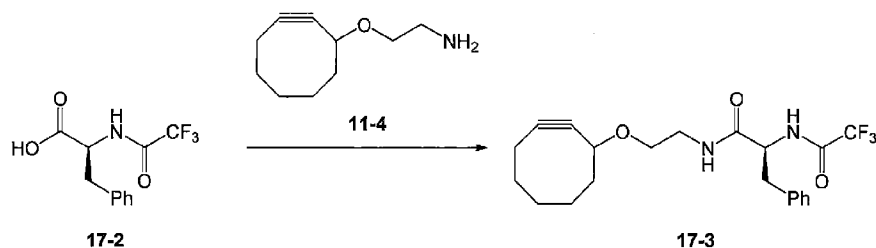


[0457] L - フェニルアラニン [CAS REGISTRY NO. : 63 - 91 - 2] (17 - 1, 2 g) をメタノール (10 mL) に溶解させ、4℃まで冷却した。続いて、同温にて、トリフルオロ酢酸エチル (1.59 mL) 及びトリエチルアミン (1.69 mL) を加え、室温で16時間攪拌した。反応終了後、1規定塩酸 (10 mL) をpH1になるまで徐々に加え、懸濁液を30分攪拌した。懸濁液をろ過し、回収した固体を減圧下で乾燥させることで標記化合物17-2 (2.53 g) を白色固体として得た。

[0458] <工程 2 >

(2 S) - N - (2 - (シクロオクト - 2 - イン - 1 - イロキシ) エチル) - 3 - フェニル - 2 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセタミド) プロパンアミド (17 - 3) の合成 :

[化162]

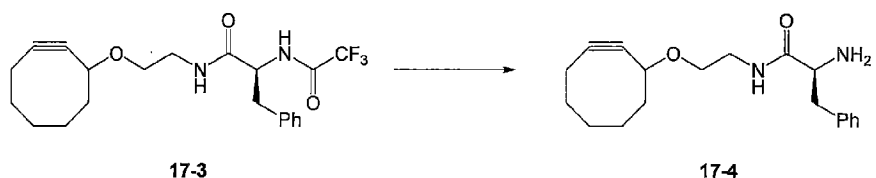


[0459] 化合物 11-4 (60 mg) 及び (実施例 17) <工程 1> で得られた化合物 (17-2、93.7 mg) の混合物に対し、氷冷下、エタノール (1200 μ L) 及び 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (179.41 mg) を加え、室温で 3 時間攪拌した。水 (2 mL) を加え反応を停止させ、メチル tert-ブチルエーテル (5 mL) で 3 回抽出した。有機層を水 (5 mL)、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層をろ過後、減圧下で濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘプタン/酢酸エチル) で精製することで、標記化合物 17-3 (57 mg) を白色アモルファスとして得た。

[0460] <工程 3>

(2S)-2-アミノ-N-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エチル)-3-フェニルプロパンアミド (17-4) の合成:

[化163]



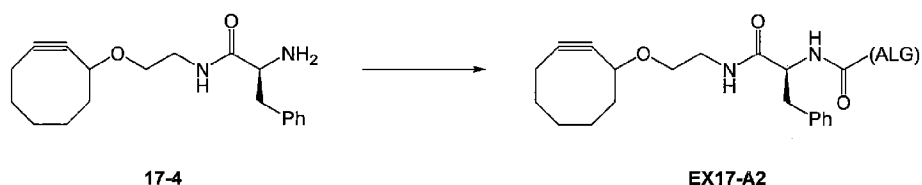
[0461] (実施例 17) <工程 2> で得られた化合物 (17-3、57 mg)、メタノール (855 μ L)、炭酸カリウム (38.39 mg) 及び水 (285 μ L) を用い、(実施例 14) <工程 5> と同様の操作を実施する

ことで、標記化合物 17-4 (35 mg) を淡黄色油状物として得た。

[0462] <工程 4>

(2S)-2-アミノ-N-(2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)エチル)-3-フェニルプロパンアミド基導入アルギン酸 (EX17-A2) の合成:

[化164]

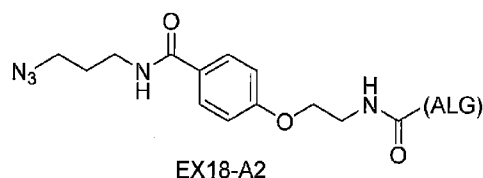


[0463] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム (持田製薬株式会社製: A-2) 水溶液 (47.46 mL)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-M) (146.44 mg) 及び (実施例 17) <工程 3> で得られた化合物 (17-4、34.53 mg) を用い、(実施例 11) <工程 3-1> と同様の操作を行い、標記化合物 EX17-A2 (383 mg) を白色固体として得た。

[0464] (実施例 18)

4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基導入アルギン酸 (EX18-A2) の合成:

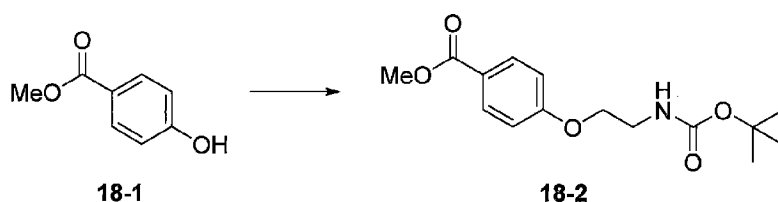
[化165]



[0465] <工程 1>

メチル 4-(2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)エトキシ)ベンゾエート (18-2) の合成:

[化166]

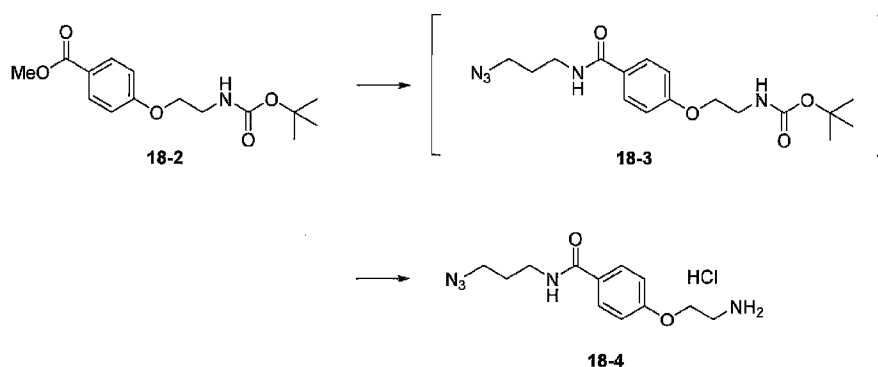


[0466] トリフェニルホスフィン (0.96 g) のテトラヒドロフラン (2.59 mL) 溶液に、氷冷攪拌下、アゾジカルボン酸ジエチル (40%トルエン溶液, 1.92 mL) 溶液を加え、室温で20分間攪拌した。この溶液に対し、氷冷攪拌下、市販の4-ヒドロキシ安息香酸 (化合物18-1、0.37 g) 及び2-(tert-ブトキシカルボニル) エタノールアミン (0.39 g) のテトラヒドロフラン (1.1 mL) 溶液を加え、室温で17時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5%酢酸エチル/n-ヘプタン~40%酢酸エチル/n-ヘプタン) により精製し、化合物18-1と化合物18-2の混合物を得た。この混合物をメチル tert-ブチルエーテル (20 mL) に溶解させ、1規定-水酸化ナトリウム水溶液 (5 mL) で2回、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下で溶媒を留去し、標記化合物18-2 (0.45 g) をピンク色のオイル状物質として得た。

[0467] <工程2>

4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル) ベンズアミド塩酸塩 (化合物18-4) の合成:

[化167]



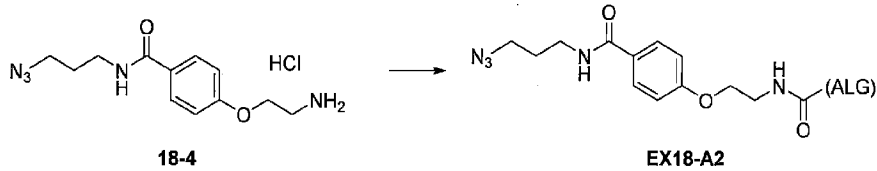
[0468] (実施例18) <工程1>で得られた化合物18-2 (0.44 g) のメタノール (4.4 mL) 溶液に水酸化リチウム一水和物 (0.25 g) を加え、60℃で3時間30分撹拌した。反応液に1規定塩酸 (5 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL) で3回抽出した。有機層を水 (5 mL)、飽和食塩水 (5 mL) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で溶媒を留去した。残留物をアセトニトリル (4.4 mL) に溶解させ、3-アジドプロパン-1-アミン (0.15 g) とO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.57 g) を加えた。続いて、氷冷撹拌下、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.52 mL) を加え、室温で5時間撹拌した。反応液に対し水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (15 mL) で3回抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (16%酢酸エチル/n-ヘプタン~100%酢酸エチル) により精製し、化合物18-3 (0.71 g) を含む画分を得た。

[0469] 化合物18-3を含む画分 (0.71 g) に対し、4規定塩化水素/1,4-ジオキサン (4.9 mL) を加え、室温で20分間撹拌した。反応液にジイソプロピルエーテルを加えた後、析出物を濾過することで、標記化合物18-4 (0.49 g) を白色固体として得た。

[0470] <工程3>

4-(2-アミノエトキシ)-N-(3-アジドプロピル)ベンズアミド基導入アルギン酸(化合物EX18-A2)の合成:

[化168]

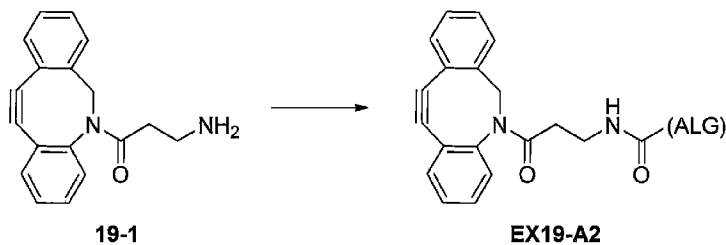


[0471] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2)水溶液(19.6 mL)に、氷冷攪拌下、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(50.19 mg)、(実施例18)<工程2>で得られた化合物18-4(54.37 mg)、1モル濃度-重曹水(181.4 μ L)を用い、(実施例11)<工程3-1>と同様の操作を行い、標記化合物EX18-A2(198 mg)を白色固体として得た。

[0472] (実施例19)

3-アミノ-1-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-1-プロパノン基導入アルギン酸(EX19-A2)の合成:

[化169]



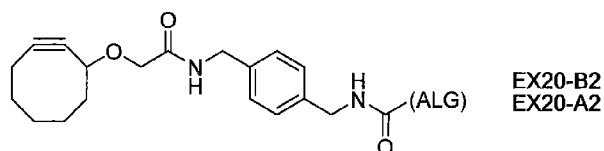
[0473] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:A-2)水溶液(43.6 mL)に、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)(111.7 mg)、1モル濃度-重曹水(403.5 μ L)、市

販の3-アミノ-1-(11,12-ジデヒドロジベンズ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-1-プロパノン[CAS REGISTRY NO.: 1255942-06-3] (19-1, 83.6 mg) を用い、(実施例11) <工程3-1>と同様の操作を行い、標記化合物EX19-A2 (376 mg) を淡黄色固体として得た。

[0474] (実施例20)

N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド基導入アルギン酸(EX20-B2、EX20-A2)の合成:

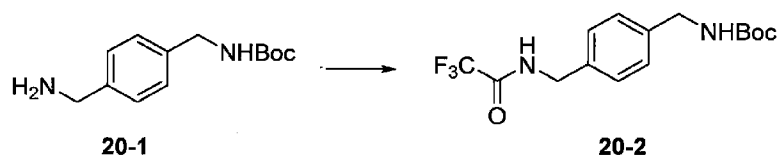
[化170]



[0475] <工程1>

tert-ブチル(4-(2,2,2-トリフルオロアセタミド)メチル)ベンジル)カルバメート(化合物20-2)の合成:

[化171]



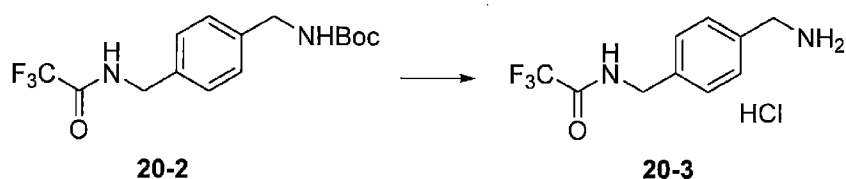
[0476] 文献公知の方法(Bioorganic & Medicinal Chemistry (2003) 11:4189-4206)を参考に合成したtert-ブチル(4-(アミノメチル)ベンジル)カルバメート(20-1, 0.67 g)、トリエチルアミン(0.39 mL)及びメタノール(6.67 mL)の混合物に対し、氷冷攪拌下、トリフルオロ酢酸エチル(0.44 mL)を滴下した。反応混合物を室温に昇温し、同温で5時

間攪拌した。反応を水（10 mL）で停止し、酢酸エチル（10 mL）で3回抽出した。回収した有機層を飽和食塩水（5 mL）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥させた有機層を濾過後、濃縮し、標記粗化合物20-2（0.67 g）を淡黄色アモルファスとして得た。

[0477] <工程2>

N-（4-（アミノメチル）ベンジル）-2,2,2-トリフルオロアセタミド塩酸塩（化合物20-3）の合成：

[化172]

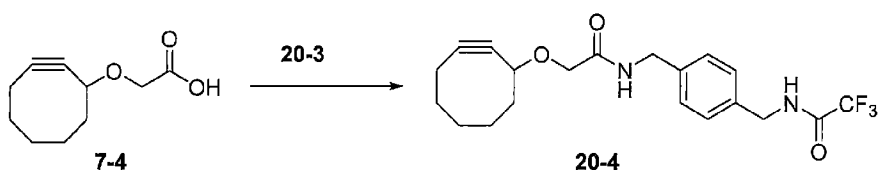


[0478] （実施例20）<工程1>で得られた化合物20-2（0.5 g）の1,4-ジオキサン溶液（3.5 mL）に対し、水冷攪拌下、4規定-塩化水素/1,4-ジオキサン（3.5 mL）を加え、室温で3時間攪拌した。反応液にジイソプロピルエーテル（40 mL）を加えた後、析出物を濾過することで、標記化合物20-3（0.4 g）を白色固体として得た。

[0479] <工程3>

N-（4-（（2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセタミド）メチル）ベンジル）-2,2,2-トリフルオロアセタミド（化合物20-4）の合成：

[化173]



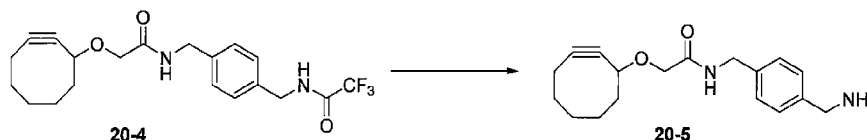
[0480] 文献公知の方法（Org. Process Res. Dev.（2018）22：108-110）に従い合成したカルボン酸（7-4、0.1

7 g) 及び O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.26 g) のアセトニトリル (1.7 mL) 溶液に対し、氷冷攪拌下、(実施例 20) <工程 2> で得られた化合物 20-3 (0.26 g) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.51 mL) を滴下し、室温で 1 時間 30 分攪拌した。水 (5 mL) を加え反応を停止させた後、酢酸エチル (5 mL) で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水 (3 mL) で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥させた有機層を濾過後、減圧下で溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (12% 酢酸エチル/n-ヘプタン~100% 酢酸エチル) により精製し、標記化合物 20-4 (0.19 g) を白色アモルファスとして得た。

[0481] <工程 4>

N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン-1-イロキシ)アセタミド (化合物 20-5) の合成:

[化174]

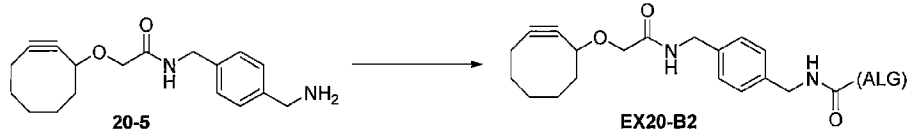


[0482] (実施例 20) <工程 3> で得られた化合物 20-4 (0.18 g) 及びメタノール (1.8 mL) の混合物に対して、氷冷攪拌下、炭酸カリウム (0.13 g) 水溶液 (0.9 mL) を滴下し、室温で 17 時間 30 分攪拌した。メタノールを減圧下で留去し、酢酸エチル (5 mL) で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水 (5 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を濾過後、減圧下で溶媒を留去し、標記粗化合物 20-5 (0.13 g) を淡黄色油状物として得た。

[0483] <工程 5>

N-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-(シクロオクト-2-イン

－1－イロキシ）アセタミド基導入アルギン酸（EX20-B2）の合成：
[化175]



[0484] 1重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：B-2）水溶液（50.9 mL）、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（0.12 g）、（実施例20）＜工程4＞で得られた化合物20-5（35 mg）のエタノール（3 mL）溶液を用い、（実施例11）＜工程3-1＞と同様の操作を行い、標記化合物EX20-B2（521 mg）を白色固体として得た。

[0485] <工程5-2>

N-（4-（アミノメチル）ベンジル）-2-（シクロオクト-2-イン-1-イロキシ）アセタミド基導入アルギン酸（EX20-A2）の合成：
[化176]



[0486] 2重量%に調製したアルギン酸ナトリウム（持田製薬株式会社製：A-2）水溶液（250 mL）、4-（4、6-ジメトキシ-1、3、5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）（279 mg）、1モル濃度一重曹水（252 μL）、（実施例20）＜工程4＞で得られた化合物20-5（84 mg）のエタノール（25 mL）溶液を用い、（実施例11）＜工程3-1＞と同様の操作を行い、標記化合物EX20-A2（4.57 g）を白色固体として得た。

[0487] （実施例P1～P7）

下記表に示される（実施例P1）～（実施例P7）のアルギン酸誘導体を前記実施例に示される方法に準じて、対応するアミノ化合物（製薬学的に許容されるその塩、又はそれらの溶媒和物であっても良い）とアルギン酸を用いて製造する。

[表14]

実施例	アルギン酸誘導体	対応アミノ化合物
P1		
P2		
P3		
P4		
P5		
P6		
P7		

[0488] 化学修飾アルギン酸誘導体の物性データ

[表15]

化合物	測定波長 (nm)	分子量 (Da)	重量平均分子量 (Da)	反応性基の導入率 (mol%) (NMR積分比)
EX1-A2	示差屈折計	1.4万～266万	137万	3.2
EX2-A2	示差屈折計	2.2万～276万	148万	3.1
EX3-A2	示差屈折計	1.2万～249万	134万	4.9
EX4-A2	示差屈折計	1.3万～261万	135万	4.0
EX5-A2	220	7千～265万	142万	3.6
EX6-A2	250	7千～273万	141万	4.7
EX7-B2	示差屈折計	1.3万～259万	179万	4.2
EX8-A2	示差屈折計	1.3万～364万	140万	3.2
EX9a-A2	示差屈折計	1.3万～266万	137万	5.0
EX9b-B2	示差屈折計	1.7万～254万	138万	2.4
EX10-A2	示差屈折計	1.4万～272万	137万	4.3
EX11a-A2	示差屈折計	1.5万～253万	135万	3.4
EX11b-B2	示差屈折計	1.4万～258万	136万	2.8
EX12-A2	示差屈折計	1.3万～270万	136万	3.6
EX13-A2	示差屈折計	1.3万～258万	135万	4.4
EX14a-A2	220	8千～265万	142万	4.6
EX14b-B2	220	5千～268万	140万	4.1
EX15-A2	290	1千～269万	126万	4.3
EX16-A2	示差屈折計	1.3万～266万	135万	3.5
EX17-A2	示差屈折計	1.3万～253万	135万	4.4
EX18-A2	255	1.5万～252万	152万	6.1
EX19-A2	280	1.2万～264万	153万	6.9
EX20-B2	215	1.9万～283万	138万	4.5
EX20-A2	示差屈折計	3.6万～252万	138万	0.7

[0489] 中間体化合物のNMRデータ

[表16-1]

化合物	NMR ¹ データ(δ : ppm)
3-2	CDCl ₃ : 6.30(1H, brs), 5.07(1H, brs), 3.77(2H, d, J = 6 Hz), 3.40-3.35(4H, m), 1.84-1.77(2H, m), 1.46(9H, s)
3-3	DMSO-d ₆ : 8.47(1H, t, J = 5 Hz), 8.06(3H, brs), 3.52(2H, q, J = 6 Hz), 3.39(2H, t, J = 7 Hz), 3.18(2H, q, J = 6 Hz), 1.71-1.64(2H, m)
4-2	CDCl ₃ : 5.97(1H, brs), 5.12(1H, brs), 3.43-3.33(6H, m), 2.41(2H, t, J = 6 Hz), 1.83-1.76(2H, m), 1.44(9H, s)
4-3	DMSO-d ₆ : 8.23(1H, t, J = 6 Hz), 7.94(3H, brs), 3.36(2H, t, J = 7 Hz), 3.12(2H, q, J = 6 Hz), 3.01-2.92(2H, m), 2.47(2H, t, J = 7 Hz), 1.69-1.63(2H, m)
5-2	CDCl ₃ : 7.31-7.20(4H, m), 6.57(1H, brs), 4.84(1H, brs), 4.45(2H, d, J = 6 Hz), 4.30(2H, d, J = 6 Hz), 4.05(2H, s), 1.46(9H, s)
5-3	DMSO-d ₆ : 8.69(1H, t, J = 6 Hz), 8.20(3H, brs), 7.41(2H, d, J = 8 Hz), 7.30(2H, d, J = 8 Hz), 4.31(2H, d, J = 6 Hz), 4.04-3.96(2H, m), 3.90(2H, s)
6-3	CDCl ₃ : 6.95 (2H, d, J = 9 Hz), 6.87 (2H, d, J = 9 Hz), 4.97 (1H, brs), 3.99 (2H, t, J = 5 Hz), 3.52 (2H, q, J = 5 Hz), 1.45 (9H, s)
6-4	DMSO-d ₆ : 8.11 (3H, brs), 7.09 (2H, d, J = 9 Hz), 7.03 (2H, t, J = 9 Hz), 4.15 (2H, t, J = 5 Hz), 3.22-3.16 (2H, m)
7-2	CDCl ₃ : 7.80(1H, brs), 4.93(1H, brs), 3.45(2H, q, J = 5 Hz), 3.41-3.34(2H, m), 1.44(9H, s)
7-3	DMSO-d ₆ : 9.56(1H, brs), 8.00(3H, brs), 3.45(2H, d, J = 6 Hz), 2.95(2H, d, J = 6 Hz)
7-5	CDCl ₃ : 7.95(1H, brs), 6.95(1H, brs), 4.28-4.23(1H, m), 4.08(2H, d, J = 15 Hz), 3.91(1H, d, J = 15 Hz), 3.56-3.50(4H, m), 2.31-2.12(3H, m), 2.03-1.78(4H, m), 1.75-1.61(2H, m), 1.52-1.42(1H, m)
7-6	CDCl ₃ : 6.82(1H, brs), 4.28-4.22(1H, m), 4.06(1H, d, J = 15 Hz), 3.90(1H, d, J = 15 Hz), 3.40-3.31(2H, m), 2.86(2H, t, J = 6 Hz), 2.31-2.12(3H, m), 2.02-1.78(4H, m), 1.75-1.57(2H, m), 1.52-1.41(1H, m)
8-2	CDCl ₃ : 7.01(1H, brs), 4.84 (1H, brs), 3.62-3.51(6H, m), 3.31(2H, q, J = 5 Hz), 1.45(9H, s)
8-3	DMSO-d ₆ : 9.55(1H, brs), 8.05(3H, brs), 3.61(2H, t, J = 5 Hz), 3.54(2H, t, J = 6 Hz), 3.39(2H, q, J = 6 Hz), 3.00-2.91(2H, m)
8-4	DMSO-d ₆ : 9.45(1H, brs), 7.61(1H, t, J = 6 Hz), 4.29-4.25(1H, m), 3.87(2H, d, J = 15 Hz), 3.75(1H, d, J = 15 Hz), 3.50(2H, t, J = 6 Hz), 3.43(2H, t, J = 6 Hz), 3.37-3.31(2H, m), 3.24(2H, q, J = 6 Hz), 2.27-2.03(3H, m), 1.96-1.69(4H, m), 1.67-1.50(2H, m), 1.43-1.35(1H, m)

[表16-2]

化合物	NMRシフト (δ : ppm)
8-5	CDCl ₃ : 6.89(1H, brs)、4.27-4.22(1H, m)、4.07(1H, d, J = 15 Hz)、3.88(1H, d, J = 15 Hz)、3.58-3.47(6H, m)、2.87(2H, t, J = 5 Hz)、2.31-2.10(3H, m)、2.03-1.77(4H, m)、1.73-1.59(2H, m)、1.51-1.43(1H, m)
9-1	DMSO-d ₆ : 9.39(1H, brs)、7.93(1H, brs)、6.92(1H, t, J = 6 Hz)、3.49(2H, d, J = 6 Hz)、3.25-3.17(4H, m)、1.38(9H, s)
9-2	DMSO-d ₆ : 9.50(1H, brs)、8.54(1H, brs)、8.01(3H, brs)、3.49(2H, s)、3.28-3.24(4H, m)
9-3	DMSO-d ₆ : 9.41(1H, brs)、8.03(1H, t, J = 6 Hz)、7.78(1H, t, J = 6 Hz)、4.35-4.29(1H, m)、3.93(1H, d, J = 15 Hz)、3.79(1H, d, J = 15 Hz)、3.68(2H, dd, J = 6, 2 Hz)、3.27-3.16(4H, m)、2.28-2.05(3H, m)、1.99-1.69(4H, m)、1.65-1.54(2H, m)、1.46-1.36(1H, m)
9-4	DMSO-d ₆ : 7.83(1H, t, J = 6 Hz)、7.78(1H, t, J = 6 Hz)、4.33-4.29(1H, m)、3.92(1H, d, J = 15 Hz)、3.79(1H, d, J = 15 Hz)、3.69(2H, dd, J = 6, 2 Hz)、3.05(2H, q, J = 6 Hz)、2.55(2H, t, J = 6 Hz)、2.28-2.05(3H, m)、1.99-1.69(4H, m)、1.63-1.56(2H, m)、1.46-1.36(1H, m)
10-1	DMSO-d ₆ : 9.39(1H, t, J = 5 Hz)、8.00(1H, t, J = 6 Hz)、6.74(1H, t, J = 6 Hz)、3.21(2H, t, J = 6 Hz)、3.17(2H, t, J = 6 Hz)、3.14-3.07(2H, m)、2.20(2H, t, J = 7 Hz)、1.37(9H, s)
10-2	DMSO-d ₆ : 9.47(1H, brs)、8.27(1H, t, J = 6 Hz)、7.74(3H, brs)、3.27-3.17(4H, m)、2.96(2H, t, J = 7 Hz)、2.43(2H, t, J = 7 Hz)
10-3	DMSO-d ₆ : 9.40(1H, t, J = 5 Hz)、8.04(1H, t, J = 6 Hz)、7.68(1H, t, J = 6 Hz)、4.29-4.23(1H, m)、3.85(1H, d, J = 15 Hz)、3.73(1H, d, J = 15 Hz)、3.32-3.13(6H, m)、2.25(2H, t, J = 7 Hz)、2.23-2.03(3H, m)、1.95-1.70(4H, m)、1.66-1.50(2H, m)、1.43-1.35(1H, m)
10-4	DMSO-d ₆ : 7.85(1H, t, J = 6 Hz)、7.68(1H, t, J = 6 Hz)、4.30-4.25(1H, m)、3.86(1H, d, J = 15 Hz)、3.74(1H, d, J = 15 Hz)、3.32-3.25(2H, m)、3.04(2H, q, J = 6 Hz)、2.55(2H, t, J = 6 Hz)、2.27(2H, t, J = 7 Hz)、2.25-2.04(3H, m)、1.96-1.71(4H, m)、1.67-1.51(2H, m)、1.45-1.35(1H, m)
11-4	CDCl ₃ : 4.20-4.16(1H, m)、3.61-3.56(1H, m)、3.38-3.33(1H, m)、2.88-2.82(2H, m)、2.30-2.09(3H, m)、2.01-1.41(7H, m)
12-2	CDCl ₃ : 7.28(1H, brs)、3.80-3.75(2H, m)、3.66-3.56(6H, m)、2.42(1H, brs)
12-3	CDCl ₃ : 7.04(1H, brs)、6.20(1H, dd, J = 11, 4 Hz)、3.90(1H, dd, J = 10, 5 Hz)、3.71-3.55(7H, m)、3.51-3.44(1H, m)、2.80-2.69(1H, m)、2.34-2.27(1H, m)、2.09-1.82(4H, m)、1.79-1.67(1H, m)、1.55-1.44(1H, m)、1.35-1.23(1H, m)、0.87-0.76(1H, m)

[表16-3]

化合物	NMRデータ (δ : ppm)
12-4	CDCl ₃ : 7.04(1H, brs)、4.24-4.19(1H, m)、3.75-3.68(1H, m)、3.67-3.61(4H, m)、3.58-3.49(3H, m)、2.30-2.11(3H, m)、2.00-1.66(5H, m)、1.63-1.54(1H, m)、1.47-1.38(1H, m)
12-5	CDCl ₃ : 4.25-4.21(1H, m)、3.76-3.70(1H, m)、3.64-3.61(2H, m)、3.55-3.49(3H, m)、2.87(2H, t, J = 5 Hz)、2.30-2.10(3H, m)、2.02-1.55(6H, m)、1.47-1.38(1H, m)
13-2	DMSO-d ₆ : 12.30(1H, brs)、9.47(1H, brs)、3.37(2H, q, J = 7 Hz)、2.49(2H, t, J = 7 Hz)
13-3	CDCl ₃ : 7.73(1H, brs)、6.40(1H, brs)、4.86(1H, brs)、3.64(2H, q, J = 6 Hz)、3.56-3.50(4H, m)、3.47-3.43(2H, m)、3.30(2H, q, J = 5 Hz)、2.53-2.50(2H, m)、1.45(9H, s)
13-4	DMSO-d ₆ : 9.50(1H, t, J = 5 Hz)、8.15(1H, t, J = 6 Hz)、8.01(3H, brs)、3.58(2H, t, J = 5 Hz)、3.43(2H, t, J = 6 Hz)、3.38(2H, q, J = 7 Hz)、3.24(2H, q, J = 6 Hz)、3.00-2.92(2H, m)、2.39(2H, t, J = 7 Hz)
13-5	CDCl ₃ : 7.80(1H, brs)、6.80(1H, brs)、6.58(1H, brs)、4.29-4.23(1H, m)、4.06(1H, d, J = 15 Hz)、3.89(1H, d, J = 15 Hz)、3.64(2H, q, J = 6 Hz)、3.60-3.55(4H, m)、3.52-3.46(2H, m)、3.44(2H, q, J = 5 Hz)、2.52(2H, t, J = 6 Hz)、2.31-2.11(3H, m)、2.02-1.78(4H, m)、1.76-1.61(2H, m)、1.51-1.42(1H, m)
13-6	CDCl ₃ : 7.33(1H, brs)、6.82(1H, brs)、4.28-4.23(1H, m)、4.06(1H, d, J = 15 Hz)、3.90(1H, d, J = 15 Hz)、3.56(4H, t, J = 5 Hz)、3.51-3.44(4H, m)、3.01(2H, t, J = 6 Hz)、2.35(2H, t, J = 6 Hz)、2.31-2.12(3H, m)、2.02-1.79(4H, m)、1.77-1.60(2H, m)、1.50-1.42(1H, m)
14-2	CDCl ₃ : 6.66(1H, brs)、3.80(2H, q, J = 6 Hz)、3.53(2H, t, J = 6 Hz)
14-4	CDCl ₃ : 7.22(2H, d, J = 8 Hz)、6.85(2H, d, J = 8 Hz)、6.74(1H, brs)、4.79(1H, brs)、4.25(2H, d, J = 6 Hz)、4.09(2H, t, J = 5 Hz)、3.78(2H, q, J = 5 Hz)、1.46(9H, s)
14-5	DMSO-d ₆ : 9.67(1H, brs)、8.14(3H, brs)、7.38(2H, d, J = 9 Hz)、6.98(2H, d, J = 9 Hz)、4.10(2H, t, J = 6 Hz)、3.94(2H, brs)、3.57(2H, q, J = 6 Hz)
14-6	CDCl ₃ : 7.23(2H, d, J = 9 Hz)、6.94(1H, brs)、6.85(2H, d, J = 9 Hz)、6.80-6.77(1H, m)、4.42(2H, d, J = 6 Hz)、4.25-4.21(1H, m)、4.11-4.05(3H, m)、3.92(1H, d, J = 15 Hz)、3.78(2H, q, J = 5 Hz)、2.28-2.05(3H, m)、1.99-1.55(6H, m)、1.48-1.39(1H, m)
14-7	CDCl ₃ : 7.22(2H, d, J = 9 Hz)、6.87(2H, d, J = 9 Hz)、6.75(1H, brs)、4.42(2H, d, J = 6 Hz)、4.25-4.20(1H, m)、4.10(1H, d, J = 15 Hz)、4.03-3.90(3H, m)、3.08(2H, t, J = 5 Hz)、2.28-2.07(3H, m)、1.99-1.55(6H, m)、1.48-1.40(1H, m)

[表16-4]

化合物	NMR τ - ν (δ : ppm)
15-2	DMSO-d ₆ : 7.88(2H, d, J = 8 Hz), 7.73-7.66(3H, m), 7.61-7.57(2H, m), 7.50-7.29(11H, m), 5.02(1H, d, J = 14 Hz), 4.29-4.18(3H, m), 3.62(1H, d, J = 14 Hz), 3.46(2H, d, J = 6 Hz), 3.18-3.08(1H, m), 3.02-2.89(1H, m), 2.47-2.39(1H, m), 1.85-1.74(1H, m)
15-3	DMSO-d ₆ : 7.73(1H, brs), 7.64-7.58(2H, m), 7.51-7.29(6H, m), 5.04(1H, d, J = 14 Hz), 3.63(1H, d, J = 14 Hz), 3.18-3.06(1H, m), 3.04-2.95(1H, m), 2.95(2H, s), 2.47-2.39(1H, m), 1.87-1.78(1H, m)
16-2	CDCl ₃ : 6.80(1H, brs), 4.21(2H, d, J = 5 Hz).
16-3	CDCl ₃ : 6.03(1H, brs), 4.20-4.16(1H, m), 4.05-4.01(2H, m), 3.64-3.60(1H, m), 3.54-3.44(3H, m), 2.29-2.09(3H, m), 1.98-1.67(6H, m), 1.48-1.40(1H, m)
16-4	CDCl ₃ : 7.43(1H, brs), 4.21-4.17(1H, m), 3.66-3.62(1H, m), 3.55-3.41(3H, m), 3.36(2H, s), 2.30-2.08(3H, m), 2.01-1.77(4H, m), 1.72-1.59(2H, m), 1.50-1.42(1H, m)
17-2	CDCl ₃ : 7.35-7.28(3H, m), 7.14-7.12(2H, m), 6.69(1H, d, J = 7 Hz), 4.96-4.91(1H, m), 4.64(1H, brs), 3.31(1H, dd, J = 14, 6 Hz), 3.22(1H, dd, J = 14, 6 Hz)
17-3	CDCl ₃ : 7.35-7.26(4H, m), 7.22-7.20(2H, m), 5.71-5.63(1H, m), 4.59-4.53(1H, m), 4.11-3.99(1H, m), 3.54-3.14(5H, m), 3.07-2.96(1H, m), 2.27-2.12(2H, m), 2.10-1.64(6H, m), 1.60-1.55(1H, m), 1.46-1.37(1H, m)
17-4	CDCl ₃ : 7.51-7.47(1H, m), 7.33-7.30(2H, m), 7.24-7.21(3H, m), 4.17-4.13(1H, m), 3.63-3.58(2H, m), 3.51-3.38(3H, m), 3.30-3.25(1H, m), 2.71-2.65(1H, m), 2.29-2.05(3H, m), 1.98-1.76(4H, m), 1.70-1.41(3H, m)
18-2	CDCl ₃ : 7.98(2H, d, J = 9 Hz), 6.90(2H, d, J = 9 Hz), 4.97(1H, brs), 4.07(2H, t, J = 5 Hz), 3.88(3H, s), 3.56(2H, q, J = 5 Hz), 1.45(9H, s)
18-4	D ₂ O: 7.60(2H, d, J = 9 Hz), 6.93(2H, d, J = 9 Hz), 4.19(2H, t, J = 5 Hz), 3.31-3.29(6H, m), 1.77-1.71(2H, m)

[表16-5]

化合物	NMR τ - ν (δ : ppm)
20-2	CDCl ₃ : 7.29(2H, d, J = 8 Hz), 7.25(2H, d, J = 8 Hz), 6.51(1H, brs), 4.86(1H, brs), 4.51(2H, d, J = 5 Hz), 4.31(2H, d, J = 6 Hz), 1.46(9H, s)
20-3	D ₂ O: 7.29(2H, d, J = 8 Hz), 7.25(2H, d, J = 8 Hz), 4.38(2H, s), 4.02(2H, s)
20-4	CDCl ₃ : 7.31(2H, d, J = 8 Hz), 7.26(2H, d, J = 8 Hz), 6.84(1H, brs), 6.52(1H, brs), 4.52(2H, d, J = 6 Hz), 4.49(2H, d, J = 6 Hz), 4.26-4.23(1H, m), 4.11(1H, d, J = 15 Hz), 3.94(1H, d, J = 15 Hz), 2.26-2.09(3H, m), 2.00-1.58(6H, m), 1.48-1.44(1H, m)
20-5	CDCl ₃ : 7.31-7.26(4H, m), 6.80(1H, brs), 4.48(2H, d, J = 6 Hz), 4.26-4.21(1H, m), 4.11(1H, d, J = 15 Hz), 3.93(1H, d, J = 15 Hz), 3.86(2H, s), 2.28-2.07(3H, m), 1.99-1.40(7H, m)

[0490] 中間体化合物のLC-Massデータ

[表17]

化合物	MS-ESI(m/z) [M+H] ⁺	保持時間 (分)
6-3	279	1.13
6-4	179	0.63
8-5	269	0.60
9-3	378	0.84
9-4	282	0.62
10-3	392, *414	0.83
10-4	296	0.62
12-2	*410, *412	1.15
12-3	*330	1.03
13-5	436, *458	0.82
13-6	340	0.64
14-5	*285	0.59
14-6	427	1.02
14-7	331	0.72
15-3	334, *356	0.74
16-3	*343	0.90
17-3	411	1.10
17-4	315	0.77
18-4	264	0.54
20-2	*355	0.97
20-3	233	0.53
20-4	397	0.99
20-5	301	0.68

* : [M+N a]

[0491] [反応性基又は相補的な反応性基の導入率測定]

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

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

[0492] [分子量の測定]

実施例で得られた反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸

固体を0.15 mol/LのNaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し0.1%又は0.2%溶液を調製し、孔径0.22 μm のポリエーテルスルホン製ろ過フィルター (Minisart High Flow Filter、Sartorius社) を通し不溶物を除いた後、ゲルろ過用サンプルとした。各サンプルのスペクトルを分光光度計DU-800 (Beckman-Coulter社) により測定し、各化合物のゲルろ過における測定波長を決定した。特異的な吸収波長を持たない化合物に関しては、示差屈折計を用いた。

[0493] ゲルろ過用サンプルの200 μL をSuperose 6 Increase 10/300 GLカラム (GEヘルスケアサイエンス社) に供した。ゲルろ過は、クロマトグラフ装置としてAKTA Explorer 10Sを、展開溶媒として0.15 mol/L NaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) を使用し、室温で流速0.8 mL/minの条件で実施した。サンプルの溶出プロファイルは、各化合物で決定した波長の吸収をモニターし作製した。得られたクロマトグラムは、Unicorn 5.31ソフトウェア (GEヘルスケアサイエンス社) にて解析し、ピーク範囲を決定した。

[0494] 反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸の分子量は、ブルーデキストラン (分子量200万Da、SIGMA社)、チログロブリン (分子量66.9万Da、GEヘルスケアサイエンス社) フェリチン (分子量44万Da、GEヘルスケアサイエンス社) アルドラーゼ (分子量15.8万Da、GEヘルスケアサイエンス社)、コンアルブミン (分子量7.5万Da、GEヘルスケアサイエンス社)、オブアルブミン (分子量4.4万Da、GEヘルスケアサイエンス社)、リボヌクレアーゼA (分子量1.37万Da、GEヘルスケアサイエンス社) 及びアプロチニン (分子量6500Da、GEヘルスケアサイエンス社) を標準品として用い、反応性基又は相補的な反応性基が導入されたアルギン酸と同じ条件でゲルろ過を行い、各成分の溶出液量をUnicornソフトウェアにて決定した。この各成分の

溶出液量を横軸に、分子量の対数値を縦軸にそれぞれプロットし、直線回帰し、検量線を作成した。検量線は、ブルーデキストランからフェリチンまで、フェリチンからアプロチニンまでの2種類を作成した。

[0495] この検量線を用いて、先に得られたクロマトグラムの溶出時間 i における分子量 (M_i) を計算した。次いで、溶出時間 i における吸光度を読み取り H_i とした。これらのデータから重量平均分子量 (M_w) を以下の式から求めた。

[0496] [数1]

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

[0497] [ゲル安定性の測定]

(ゲル安定性の測定 (1)) : PBS 中安定性

実施例 1、4、5 及び 19 にて得られた、(E x 1-A 2)、(E x 4-A 2)、(E x 5-A 2) 及び (E x 19-A 2) の各アルギン酸誘導体を、濃度が 1.0% となるよう水に溶かしてそれぞれアルギン酸水溶液 (1-1)、(4-1)、(5-1)、(19-1) を得た。これらをそれぞれ、(1-1) と (19-1)、(4-1) と (19-1)、(5-1) と (19-1) の組み合わせで等量混和し、18 ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速 1 mL/分に設定したシリンジポンプに設置し、濃度が 30 mmol/L の塩化カルシウム溶液に 30 秒間滴下し、5 分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを 10 mL の PBS で 1 度洗浄し、PBS 中、37°C で 10 分間静置して化学架橋を行い、ゲル状の化学架橋アルギン酸を得た。(E x 18-A 2) / (E x 19-A 2) で作製された化学架橋アルギン酸 (ビーズ) もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に 19.5 mL の PBS を添加し、37°C で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の PBS を補充した。試験終了後、

試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、319-08261）を10 μ L添加し、37°Cで3時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度および試験終了後のアルギン酸濃度から算出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0498] 図1の結果が得られた。前記化学架橋アルギン酸（ビーズ）は、96時間を経過しても崩壊せず、ゲルの安定性が確認できた。すなわち、Huisgen反応による化学架橋が形成されたことにより、作製された化学架橋アルギン酸は、長期に渡りその構造が維持されることが示唆された。

[0499]（ゲル安定性の測定（2））：EDTA下安定性

（ゲル安定性の測定（1））で得たアルギン酸水溶液をそれぞれ、（1-1）と（19-1）、（4-1）と（19-1）、（5-1）と（19-1）の組み合わせで等量混和し、18ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速1 mL/分に設定したシリンジポンプに設置し、濃度が30 mmol/Lの塩化カルシウム溶液に30秒間滴下し、5分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。（Ex18-A2）/（Ex19-A2）で作製された化学架橋アルギン酸（ビーズ）もこれらと同様に調製した。このゲルを10 mLの生理食塩水で1度洗浄し、生理食塩水中、37°Cで10分間静置して化学架橋を行い、化学架橋アルギン酸を得た。得られた化学架橋アルギン酸に19.5 mLの5 mMエチレンジアミン四酢酸二カリウム塩二水和物（EDTA・2K）/生理食塩水を添加し、37°Cで振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の5 mM EDTA・2K/生理食塩水を補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、319-08261）を10 μ L添加し、37°Cで3時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度および試験終了後のアルギン酸濃度から算

出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0500] 結果を図2に示した。前記化学架橋アルギン酸（ビーズ）は、24時間を経過した後の、崩壊率が2%以下であった。すなわち、Huisgen反応による架橋形成がなされることにより、作製された化学架橋アルギン酸は、カルシウムイオンのない溶液（生体にとっての生理的濃度以下）条件下でも、構造が維持されることが示唆された。

[0501]（ゲル安定性の測定（3））：PBS中安定性

実施例3、5、6、9、10、12及び18にて得られた、(E x 3-A 2)、(E x 5-A 2)、(E x 6-A 2)、(E x 9 a-A 2)、(E x 10-A 2)、(E x 12-A 2)及び(E x 18-A 2)の各アルギン酸誘導体を、濃度が1.0%となるよう水に溶かしてそれぞれアルギン酸水溶液(3-1)、(5-1)、(6-1)、(9-1)、(10-1)、(12-1)、(18-1)を得た。これらをそれぞれ、(6-1)と(9-1)、(3-1)と(10-1)、(5-1)と(10-1)、(18-1)と(12-1)の組み合わせで等量混和し、18ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速1 mL/分に設定したシリンジポンプに設置し、濃度が30 mmol/Lの塩化カルシウム溶液に30秒間滴下し、5分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを10 mLのPBSで1度洗浄し、PBS中、37℃で10分間静置して化学架橋を行い、化学架橋アルギン酸を得た。(E x 18-A 2) / (E x 19-A 2)で作製された化学架橋アルギン酸ゲル（ビーズ）もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に19.5 mLのPBSを添加し、37℃で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量のPBSを補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、319-08261）を10 μL添加し、37℃で3時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度お

よび試験終了後のアルギン酸濃度から算出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0502] 図3の結果が得られた。前記化学架橋アルギン酸（ビーズ）は、96時間を経過しても崩壊せず、ゲルの安定性が確認できた。すなわち、Huisgen反応による化学架橋が形成されたことにより、作製された化学架橋アルギン酸は、長期に渡りその構造が維持されることが示唆された。

[0503]（ゲル安定性の測定（4））：EDTA下安定性

（ゲル安定性の測定（3））で得たアルギン酸水溶液をそれぞれ、（6-1）と（9-1）、（3-1）と（10-1）、（5-1）と（10-1）、（18-1）と（12-1）の組み合わせで等量混和し、18ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速1 mL/分に設定したシリジポンプに設置し、濃度が30 mmol/Lの塩化カルシウム溶液に30秒間滴下し、5分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを10 mLの生理食塩水で1度洗浄し、生理食塩水中、37℃で10分間静置して化学架橋を行い、化学架橋アルギン酸を得た。（Ex18-A2）/（Ex19-A2）で作製された化学架橋アルギン酸（ビーズ）もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に19.5 mLの5 mMエチレンジアミン四酢酸二カリウム塩二水和物（EDTA・2K）/生理食塩水を添加し、37℃で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の5 mM EDTA・2K/生理食塩水を補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、319-08261）を10 μL添加し、37℃で3時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度および試験終了後のアルギン酸濃度から算出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0504] 結果を図4に示した。前記化学架橋アルギン酸（ビーズ）は、24時間を経過した後の、崩壊率が4%以下であった。すなわち、Huisgen反応

による架橋形成がなされることにより、作製された化学架橋アルギン酸は、カルシウムイオンのない溶液（生体にとっての生理的濃度以下）条件下でも、構造が維持されることが示唆された。

[0505]（ゲル安定性の測定（５））：PBS中安定性

実施例４、９、１６、１８及び２０にて得られた、（E x 4-A 2）、（E X 9 a-A 2）、（E x 1 6-A 2）、（E x 1 8-A 2）及び（E x 2 0-B 2）の各アルギン酸誘導体を、濃度が１．０％となるよう水に溶かしてそれぞれアルギン酸水溶液（４－１）、（９－１）、（１６－１）、（１８－１）、（２０－１）を得た。これらをそれぞれ、（４－１）と（２０－１）、（１８－１）と（９－１）、（１８－１）と（１６－１）の組み合わせで等量混和し、１８ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速１ mL／分に設定したシリンジポンプに設置し、濃度が３０ mmol／Lの塩化カルシウム溶液に３０秒間滴下し、５分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを１０ mLのPBSで１度洗浄し、PBS中、３７℃で１０分間静置して化学架橋を行い、化学架橋アルギン酸を得た。（E x 1 8-A 2）／（E x 1 9-A 2）で作製された化学架橋アルギン酸（ビーズ）もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に１９．５ mLのPBSを添加し、３７℃で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量のPBSを補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、３１９－０８２６１）を１０μL添加し、３７℃で３時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度および試験終了後のアルギン酸濃度から算出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0506] 結果を図５に示した。前記方法で作製された化学架橋アルギン酸は、９６時間を経過しても約１２％以下の崩壊率であった。すなわち、H u i s g e n反応による化学架橋が形成されたことにより、作製された化学架橋アルギ

ン酸は、その構造が維持されることが示唆された。

[0507] (ゲル安定性の測定 (6)) : EDTA 下安定性

(ゲル安定性の測定 (5)) で得たアルギン酸水溶液をそれぞれ、(4-1) と (20-1)、(18-1) と (9-1)、(18-1) と (16-1) の組み合わせで等量混和し、18 ゲージの注射針を装着した注射筒に入れ、この注射筒を流速 1 mL/分に設定したシリンジポンプに設置し、濃度が 30 mmol/L の塩化カルシウム溶液に 30 秒間滴下し、5 分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを 10 mL の生理食塩水で 1 度洗浄し、生理食塩水中、37°C で 10 分間静置して化学架橋を行い、化学架橋アルギン酸を得た。(Ex 18-A2) / (Ex 19-A2) で作製された化学架橋アルギン酸 (ビーズ) もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に 19.5 mL の 5 mM エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩二水和物 (EDTA · 2K) / 生理食塩水を添加し、37°C で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の 5 mM EDTA · 2K / 生理食塩水を補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ (ニッポンジーン、319-08261) を 10 μL 添加し、37°C で 3 時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のアルギン酸濃度をカルバゾール硫酸法により測定し、各時点までの溶出アルギン酸量を、全時点のアルギン酸濃度および試験終了後のアルギン酸濃度から算出した総アルギン酸量で除した値を百分率で表した値を崩壊率とし、ゲル安定性の指標とした。

[0508] 図 6 の結果が得られた。前記化学架橋アルギン酸 (ビーズ) は、24 時間を経過した後の、崩壊率が 18% 以下であった。すなわち、Huisgen 反応による架橋形成がなされることにより、作製された化学架橋アルギン酸は、カルシウムイオンのない溶液 (生体にとっての生理的濃度以下) 条件下でも、構造が維持されることが示唆された。

[0509] [ゲル透過性の測定]

(ゲル透過性の測定 (1))

実施例 1、3、4、5 及び 18 にて得られた、(E x 1-A 2)、(E x 3-A 2)、(E x 4-A 2)、(E x 5-A 2) 及び (E x 18-A 2) の各アルギン酸誘導体を、濃度が 2.0% となるよう水に溶かしてアルギン酸水溶液を調製し、このアルギン酸水溶液に 2/5 容量の 1 mg/mL に調製した分子量 15 万のフルオレセインイソチオシアナートーデキストラン (シグマアルドリッチ、FD 150 S)、及び 3/5 容量の水を加え、0.2 mg/mL フルオレセインイソチオシアナートーデキストラン含有 1.0% アルギン酸水溶液 (1-2)、(3-2)、(4-2)、(5-2)、(18-2) を得た。

[0510] さらに実施例 10、12 及び 19 にて得られた、(E x 10-A 2)、(E x 12-A 2) 及び (E x 19-A 2) の各アルギン酸誘導体を、濃度が 1.0% となるよう水に溶かしてそれぞれアルギン酸水溶液 (10-1)、(12-1)、(19-1) を得た。

[0511] これらをそれぞれ、(1-2) と (19-1)、(4-2) と (19-1)、(5-2) と (19-1)、(3-2) と (10-1)、(18-2) と (12-1) の組み合わせで等量混和し、濃度が 30 mmol/L の塩化カルシウム溶液を 40 mL 添加し、5 分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを 10 mL の生理食塩水で 1 度洗浄し、生理食塩水中、37°C で 10 分間静置して化学架橋を行い、フルオレセインイソチオシアナートーデキストラン内包化学架橋アルギン酸を得た。(E x 18-A 2) / (E x 19-A 2) で作製されたフルオレセインイソチオシアナートーデキストラン内包化学架橋アルギン酸もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に 19.5 mL の生理食塩水を添加し、37°C で振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の生理食塩水を補充した。試験終了後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ (ニッポンジーン、319-08261) を 10 µL 添加し、37°C で 3 時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のデキストラン濃度を蛍光定量法 (励起光: 485 nm、蛍光: 535 nm) により測定し、各時点までのデ

キストラン量を試験終了後の総デキストラン量で除した値を百分率で表した値を透過率とした。

[0512] 図7の結果が得られた。24時間後の透過率は、25%~40%の範囲であった。

[0513] (ゲル透過性の測定(2))

実施例4、5、6及び18にて得られた、(E x 4-A 2)、(E x 5-A 2)、(E x 6-A 2)及び(E x 18-A 2)の各アルギン酸誘導体を、濃度が2.0%となるよう水に溶かしてアルギン酸水溶液を調製し、このアルギン酸水溶液に2/5容量の1 mg/mLに調製した分子量15万のフルオレseinイソチオシアナートーデキストラン(シグマアルドリッチ、FD 150S)、及び3/5容量の水を加え、0.2 mg/mLフルオレseinイソチオシアナートーデキストラン含有1.0%アルギン酸水溶液(4-2)、(5-2)、(6-2)、(18-2)を得た。

[0514] さらに実施例9、10、16及び20にて得られた、(E X 9a-A 2)、(E x 10-A 2)、(E x 16-A 2)及び(E x 20-B 2)の各アルギン酸誘導体を、濃度が1.0%となるよう水に溶かしてそれぞれアルギン酸水溶液(9-1)、(10-1)、(16-1)、(20-1)を得た。

[0515] これらをそれぞれ、(4-2)と(20-1)、(5-2)と(10-1)、(6-2)と(9-1)、(18-2)と(9-1)、(18-2)と(16-1)の組み合わせで等量混和し、濃度が30 mmol/Lの塩化カルシウム溶液を40 mL添加し、5分間攪拌してアルギン酸ゲルを得た。このゲルを10 mLの生理食塩水で1度洗浄し、生理食塩水中、37°Cで10分間静置して化学架橋を行い、フルオレseinイソチオシアナートーデキストラン内包化学架橋アルギン酸を得た。(E x 18-A 2)/(E x 19-A 2)で作製されたフルオレseinイソチオシアナートーデキストラン内包化学架橋アルギン酸もこれらと同様に調製した。得られた化学架橋アルギン酸に19.5 mLの生理食塩水を添加し、37°Cで振盪して、経時的に水溶液を回収し、回収した量と同量の生理食塩水を補充した。試験終了

後、試験溶液にアルギン酸リアーゼ（ニッポンジーン、319-08261）を10 μ L添加し、37°Cで3時間以上振盪させてゲルを全て崩壊させ、水溶液を回収した。回収した水溶液中のデキストラン濃度を蛍光定量法（励起光：485 nm、蛍光：535 nm）により測定し、各時点までのデキストラン量を試験終了後の総デキストラン量で除した値を百分率で表した値を透過率とした。

[0516] 図8の結果が得られた。24時間後の透過率は、25%~30%の範囲であった。

[0517] [化学架橋アルギン酸の生体適合性評価]

実施例4、5、12、16、18、19及び20にて得られた、(EX4-A2)、(EX5-A2)、(EX12-A2)、(EX16-A2)、(EX18-A2)、(EX19-A2)及び(EX20-B2)の各化学修飾アルギン酸誘導体を、水に溶かして反応性基導入アルギン酸溶液とした（本明細書ではアルギン酸水溶液を単にアルギン酸溶液と表現することがあり、特に記載のない限り、アルギン酸溶液とは該当するアルギン酸、化学修飾アルギン酸誘導体あるいはそれらの混合物の水溶液のことを示す）。これをミニザルトハイフロー（ザルトリウス、16532GUK）で濾過滅菌した後、1.0%反応性基導入アルギン酸/生理食塩水溶液を調製した。細胞濃度 5×10^3 cells/wellとなるよう96wellプレートに播種した後1日培養したHeLa細胞に、1.0%反応性基導入アルギン酸/生理食塩水溶液を(EX18-A2)と(EX19-A2)、(EX5-A2)と(EX19-A2)、(EX4-A2)と(EX20-B2)、(EX18-A2)と(EX12-A2)あるいは(EX16-A2)の組み合わせで終濃度0.1%となるよう添加し、1日培養後に細胞毒性の指標としてATP活性をCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7571)で評価した。

[0518] 図9の結果が得られた。前記方法にて評価した全ての化学架橋アルギン酸

においてATP活性が確認できたことより、化学架橋アルギン酸に細胞毒性が無いことが示唆されており、Huisgen反応により化学架橋が形成された化学架橋アルギン酸が生体適合性を有していることが示唆された。

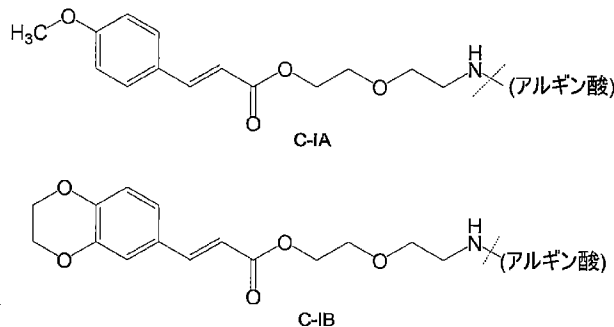
[0519] [アルギン酸三層構造体の作製]

前記の化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、以下に示す方法で本発明の構造体をビーズ、ディスク及びファイバーの形状に成型し、それらの強度を天然型のアルギン酸を用いたものと比較した。また、実際に薬理成分として細胞を封入した場合に細胞が構造体中で生存し、その機能を発揮できることを確認した。

[0520] (化学修飾アルギン酸誘導体溶液の調製)

後記の各実施例で使用する化学修飾アルギン酸誘導体の水溶液を、以下の方法で調製した。Huisgen反応により化学架橋アルギン酸を製造する各実施例においては、前記、実施例18、実施例19及び実施例20 (EX20-A2) の化学修飾アルギン酸誘導体の水溶液を各々調製した。また、光架橋反応により化学架橋アルギン酸を製造する実施例においては、PCT/JP2019/007655 (2019年2月27日出願) に記載の方法に準じて、下記式で表される化学修飾アルギン酸誘導体 (C-1A及びC-1B) を準備し、これらの水溶液を調製した。これらの溶液を、各々、実施例18の溶液、実施例19の溶液、実施例20の溶液、実施例C-1Aの溶液及び実施例C-1Bの溶液と略す。

[化177]



[上記式中、破線左側の窒素原子が破線右側のアルギン酸のカルボキシル基に結合（持田製薬株式会社製：A-2を原料として製造）]

[0521] <実施例A～Cに用いる水溶液>

実施例18～20の方法で製造した化学修飾アルギン酸誘導体、並びに上記の化合物C-1A及びC-1Bについて、各々、1重量%の生理食塩水溶液を調製した。

[0522] <実施例Dに用いる水溶液の調製>

実施例18～20の方法で製造した化学修飾アルギン酸誘導体について、各々、MilliQ水を用いて3重量%の水溶液を調製した。

[0523] <実施例Eに用いる水溶液の調製>

実施例18及び実施例20の方法で製造した化学修飾アルギン酸誘導体について、各々、2.6重量%の生理食塩水溶液を調製し、これをミニザルトハイフロー（ザルトリウス，0.2 μ m，Cat. 16532GUK）を用いて滅菌ろ過した。ろ過滅菌後の水溶液の塩濃度を調整し、2.4重量%の生理食塩水溶液とした。

以下の実施例において、特に記載のない限り、各工程で用いる各溶液は生理食塩水を用いて調製した。

[0524] [実施例A] アルギン酸三層構造体の作製（ビーズ）

本試験は、本発明の構造体をビーズ状に成型した場合、天然アルギン酸を使用した従来型のものと比較してより大型のサイズのもので作成可能であることを検証したものである。

<工程1a>アルギン酸ビーズの作製（1mmビーズ）

以下の方法で、直径約1mmのアルギン酸ビーズを作製した。当該ビーズの作製には、市販のカプセル化装置（日本ビュッヒ製、Encapsulator B-390）を使用した。

まず、カプセル化装置のノズルの下にマグネチックスターラーを置き、その上に直径95mm×高さ55mmの結晶皿を置き、100mmol/Lの塩化カルシウム溶液100mLと攪拌子を入れ、300rpmで攪拌した。次いで、圧力ビンに1重

量%に調製したアルギン酸ナトリウム(持田製薬株式会社製:AL100[表13のA-2に対応する])の水溶液(アルギン酸ナトリウム溶液であり、適宜AL100の溶液という。以下同じ)を入れ、オイルレスエアーコンプレッサーの圧力を1.5~2 barに調整したのちに装置本体の圧力調整システムで空気圧を700mbar程度に設定した。ストロボライトで照らされた水流を観察しながら、一定間隔の液滴が連続する流量や振動周波数を、ノズル下3~5 cmの地点から連続水流が一定間隔の液滴に分断し数cmに渡って確認できるようになるまで調整した。静電分散ユニットを500 Vから作動し、電圧を100Vずつ変えて、電極を通過して3~10 cmでカプセル球の流れが円錐形に分散する状態にした。左右対称で安定した円形分散が得られたら、ビーズを塩化カルシウム溶液中に滴下し、30分間攪拌した。

[0525] <工程1b>アルギン酸ビーズの作製(5mmビーズ)

以下の方法で、直径約5 mmのアルギン酸ビーズを作製した。まず、1重量%に調製した各種アルギン酸溶液を12ゲージの注射針と接続した注射筒に充填した。100 mmol/Lの塩化カルシウム溶液40mLを、前記ニードルの先端から液面までの距離が8 mmになるようセットし、マグネチックスターラーを用いて400rpmで攪拌した。そこへ、アルギン酸溶液をシリンジポンプを使用して流速1 mL/minで30秒間滴下し、30分間攪拌した。

ここで作製したアルギン酸ビーズに使用したアルギン酸溶液は、以下のとおりである。

- ・AL100の溶液
- ・実施例18の溶液と実施例19の溶液を1:1(容量比)で混合した溶液(以下、実施例18/19の溶液ともいう)
- ・実施例18の溶液と実施例20の溶液を1:1(容量比)で混合した溶液(以下、実施例18/20の溶液ともいう)
- ・実施例C-1Aの溶液

[0526] <工程1c>PL0コーティング

工程1a又は工程1bで得られたアルギン酸ビーズの入ったプラスチックシャ

ーレに0.1重量%に調製したポリ-L-オルニチン(SIGMA-ALDRICH、P2533、MW:15,000~30,000)溶液(以下、特に断りのない限り、ポリ-L-オルニチン溶液は100mmol/L塩化カルシウム含有生理食塩水溶液を用いて調製)を5mL加え、37°Cで10分間静置した。その後、一旦溶液を除いたのちに、0.05重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を5mL加え、37°Cで6分間静置し、生理食塩水10mLを使用して2回洗浄した。

[0527] <工程1d>アルギン酸コーティング

工程1cにて得られたPL0コーティングビーズの入ったプラスチックシャーレに0.15重量%に調製したアルギン酸溶液を5mL加え、37°Cで10分間静置し、生理食塩水10mLを使用して2回洗浄した。なお、使用したアルギン酸溶液は、工程1bと同様である。

[0528] <工程1e>光照射

工程1b及び工程1dにて光照射により架橋反応するアルギン酸溶液(実施例C-1の溶液)を使用したビーズについては、工程1dの終了後にUV照射装置(Sen Lights corp.製、HB100A-1)にて10分間UV照射を行った。

[0529] <工程1f>キレート処理及び安定性評価

前記各工程を経て得られたビーズの入ったプラスチックシャーレに55mMのクエン酸ナトリウム溶液20mLを加えた。工程1a又は1bで作製したAL100溶液由来のアルギン酸ビーズが速やかに溶解したことを確認し、工程1d又は1eで作製したアルギン酸ビーズを20mLのリン酸緩衝液が入ったチューブ中にて、37°Cで1日振盪(ウォーターバスシェーカー(TAITEC製、personal II)、180rpm)し、形状を観察した。観察結果を下記表18に示す。アルギン酸ビーズの安定性は、以下の指標に基づき目視で評価した。なお、各指標の参考として、「3」と評価した実施例A-6を図10に、「2」と評価した実施例A-3を図11(b)に、「1」と評価した実施例A-2を図12(b)に、それぞれ写真で示す。

安定性評価の指標：

- 3 : ビーズの崩壊/溶解/変形等が全く認められない
- 2 : ビーズの一部に大きな崩壊/溶解/変形等が認められる
- 1 : ビーズに明らかな崩壊/溶解/変形等が認められ、構造体の機能を保てていない

[0530] [表18]

実施例	工程					安定性評価 (スコア)	
	工程1a	工程1b	工程1c	工程1d	工程1e	キレート処理後	振盪後
A-1	AL100	-	実施	AL100	-	3	3
A-2	-	AL100	実施	AL100	-	3	1
A-3	-	AL100	実施	実施例 18 / 19	-	3	2
A-4	-	AL100	実施	実施例 18 / 20	-	3	3
A-5	-	実施例 18 / 19	実施	AL100	-	3	3
A-6	-	実施例 18 / 20	実施	AL100	-	3	3
A-7	-	実施例 18 / 19	実施	実施例 18 / 19	-	3	3
A-8	-	実施例 18 / 20	実施	実施例 18 / 20	-	3	3
A-9	-	AL100	実施	AL100	実施	3	1
A-10	-	AL100	実施	実施例 C-I A	実施	3	1
A-11	-	実施例 C-I A	実施	AL100	実施	3	3
A-12	-	実施例 C-I A	実施	実施例 C-I A	実施	3	3

[0531] AL100をコア層に用いて作成されたビーズでは、直径約1mmのものは安定な三層構造体が作成できたが（実施例A-1）、直径約5mmのものでは、キレート処理時点では形状を保っていたが（図12（a））、振盪後にビーズは崩壊した（図12（b）、実施例A-2）。一方、Huisgen型の化学修飾アルギン酸誘導体から製造した本発明の構造体（実施例A-5～A-8）では、いずれも振盪後にその形状を保っていた（実施例A-6の振盪後の写真を図10（b）に例示する）。なお、アニオン性ポリマー層に化学修飾アルギン酸誘導体を使用した場合（実施例A-3及びA-4）、A-2と比較して安定であったが、振盪後に変形が認められており（実施例A-3の振盪後の写真を図11（b）に例示する）、十分な強度を示さなか

った。同様の傾向は、化学修飾アルギン酸誘導体として光架橋型のものを用いた場合にも認められた（実施例A-9～A-12）。このように、本発明の構造体は、従来よりも大型のビーズでも良好な安定性を示した。

[0532] [実施例B] アルギン酸三層構造体の作製（直径20mm(2mm厚)ディスク（シート））

本発明の構造体は、鋳型を使用して任意の形状に成型可能である。本試験は、ディスク（平板）状のものを作製可能であり、その強度が、天然アルギン酸を使用した従来型のものと比較して良好であることを検証したものである。

〈工程2a〉アルギン酸ディスクの作製

以下の方法で、アルギン酸ディスクを作製した。まず、5cm四方にした半透膜（Repligen製, カタログ番号132670）を100mmol/Lの塩化カルシウム溶液に浸漬し、30分以上なじませておいた。その後、直径20mmの円盤状にくり抜いたシリコンゴム型枠を、キムワイプで表面の水分を拭った半透膜の上にのせ、アルギン酸溶液を1.3 mL流し込み、表面の水分を拭った半透膜を上部から重ね、クリップを用いて半透膜とシリコンゴム型を固定した。これを100mmol/Lの塩化カルシウム溶液に終夜浸漬したのちに、アルギン酸ディスクを型枠から外した。なお、使用したアルギン酸溶液は、工程1bと同様である。

[0533] 〈工程2b〉PL0コーティング

工程2aで得られたアルギン酸ディスクの入った60 mmプラスチックシャーレに、0.1重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を10mL加え、37°Cで10分間静置した。その後、一旦溶液を除いたのちに、0.05重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を10mL加え、37°Cで6分間静置し、生理食塩水20mLを使用して2回洗浄した。

[0534] 〈工程2c〉アルギン酸コーティング

工程2bにて得られたPL0コーティングディスクの入ったプラスチックシャーレに0.15重量%に調製したアルギン酸溶液を10mL加え、37°Cで10分間静置し、生理食塩水20mLを使用して2回洗浄した。なお、使用したアルギン酸溶液は、

実施例 B-9 ~ 実施例 B-11 において実施例 C-I B の溶液を使用した以外は工程 1b と同様である。

[0535] <工程 2d> 光照射

工程 2a 及び工程 2c にて光照射により架橋反応するアルギン酸溶液（実施例 C-I B の溶液）を使用したディスクについては、工程 2c の終了後に UV 照射装置 (Sen Lights corp. 製、HB100A-1) にて 10 分間 UV 照射を行った。

[0536] <工程 2e> キレート、安定性評価

前記各工程を経て得られたディスクの入ったプラスチックシャーレに 55 mM のクエン酸ナトリウム溶液 40 mL を加えた。工程 2a で作製した AL100 溶液由来のアルギン酸ディスクが溶解したことを確認できた時点で、残りのディスクについて形状を観察した。観察結果を下記表 19 に示す。アルギン酸ディスクの安定性は、アルギン酸ビーズの安定性と同様の指標に基づき目視で評価した。

[0537] [表 19]

実施例	工程				安定性評価 (スコア)
	工程 2a	工程 2b	工程 2c	工程 2d	キレート処理後
B-1	AL100	実施	AL100	-	1
B-2	AL100	実施	実施例 18 / 19	-	1
B-3	AL100	実施	実施例 18 / 20	-	1
B-4	実施例 18 / 19	実施	AL100	-	3
B-5	実施例 18 / 20	実施	AL100	-	3
B-6	実施例 18 / 19	実施	実施例 18 / 19	-	3
B-7	実施例 18 / 20	実施	実施例 18 / 20	-	3
B-8	AL100	実施	AL100	実施	1
B-9	AL100	実施	実施例 C-I B	実施	1
B-10	実施例 C-I B	実施	AL100	実施	3
B-11	実施例 C-I B	実施	実施例 C-I B	実施	3

[0538] その結果、コア層として、Huisgen 型の化学修飾アルギン酸誘導体を用いた場合（実施例 B-4 ~ B-7）も、光架橋型の化学修飾アルギン酸

誘導体を用いた場合（実施例B-10及びB-11）も、ビーズの場合と同じように安定な三層構造体が作製可能であった。これに対し、AL100をコア層に用いた場合、及び、化学架橋アルギン酸をアニオン性ポリマー層のみに用いた場合（実施例B-1～B-3、実施例B8及びB9）のいずれも、キレート処理時点で構造体の形状を保てなかった。このように、本発明の構造体は、ディスク状に成型した場合も顕著な安定性を示した。

[0539] [実施例C] アルギン酸三層構造体の作製（直径50mm(2mm厚)ディスク（シート））

本試験は、前記実施例Bと同様の手法でディスク状の構造体を作成した場合、より大きな径のものを作製可能であることを検証したものである。

<工程3a>アルギン酸ディスクの作製

以下の方法で、アルギン酸ディスクを作製した。まず、5cm四方にした半透膜（Repligen製、カタログ番号132670）を100mmol/Lの塩化カルシウム溶液に浸漬し、30分以上なじませておいた。その後、直径50mmの円盤状にくり抜いたシリコンゴム型枠を、キムワイプで表面の水分を拭った半透膜の上へのせ、アルギン酸溶液を5.65 mL流し込み、表面の水分を拭った半透膜を上部から重ね、クリップを用いて半透膜とシリコンゴム型を固定した。これを100mmol/Lの塩化カルシウム溶液に終夜浸漬したのちに、アルギン酸ディスクを型枠から外した。なお、使用したアルギン酸溶液は、工程1bと同様である。

[0540] <工程3b>PL0コーティング

工程3aで得られたアルギン酸ディスクの入った100 mmプラスチックシャーレに0.1重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を20mL加え、37°Cで10分間静置した。その後、一旦溶液を除いたのちに、0.05重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を20mL加え、37°Cで6分間静置し、生理食塩水40mLを使用して2回洗浄した。

[0541] <工程3c>アルギン酸コーティング

工程3bにて得られたPL0コーティングディスクの入ったプラスチックシャーレに0.15重量%に調製したアルギン酸溶液を20mL加え、37°Cで10分間静置し、

生理食塩水40mLを使用して2回洗浄した。なお、使用したアルギン酸溶液は、AL100の溶液、実施例18/19の溶液及び実施例18/20の溶液である。

[0542] <工程3d>キレート、安定性評価

前記各工程を経て得られたディスクの入ったプラスチックシャーレに 55 m Mのクエン酸ナトリウム溶液 200 mLを加えた。工程3aで作製したAL100溶液由来のアルギン酸ディスクが溶解したことを確認できた時点で、残りのディスクについて形状を観察した。観察結果を下記表20に示す。アルギン酸ディスクの安定性は、アルギン酸ビーズの安定性と同様の指標に基づき目視で評価した。

[0543] [表20]

実施例	工程			安定性評価 (スコア)
	工程3a	工程3b	工程3c	キレート処理後
C-1	AL100	実施	AL100	1
C-2	実施例 18 / 19	実施	実施例 18 / 19	3
C-3	実施例 18 / 20	実施	実施例 18 / 20	3

その結果、H u i s g e n型の化学修飾アルギン酸誘導体をコア層に用いた場合（実施例C-2及びC-3）は、安定な三層構造体が作成可能であったのに対し、AL100をコア層に用いた場合（実施例C-1）は、キレート処理時点で構造体の形状を保てなかった。このように、本発明の構造体は、直径50mmの大きさのディスク状に成型した場合も顕著な安定性を示した。

[0544] [実施例D] アルギン酸三層構造体の作製（ファイバー）

本試験は、本発明の構造体をファイバー状に成型することが可能であり、その強度が、天然アルギン酸を使用した従来型のものと比較して良好であることを検証したものである。

<工程4a>アルギン酸ファイバーの作製

3.0重量%に調製したアルギン酸溶液及び20mg/mLのブルーデキストラン（Cytiva製、Blue Dextran 2000、コード番号17036001）含有1.8重量%食塩水を等

量混合し、ハミルトンシリンジに充填した。シリンジに金属ニードル（武蔵エンジニアリング製、SNA-19G-B）、シリコンチューブ（アズワン製、 $\phi 1 \times \phi 2$ ）及びガラスキャピラリー（ナリシゲ製、G-1）を順次接続し、シリンジポンプにセットした。ガラスキャピラリーの先端を100 mmol/Lの塩化カルシウム溶液（MilliQ水にて調製）に浸漬し、流速250 μ L/minで1分間送液した。回収したアルギン酸ファイバーは、同濃度の塩化カルシウム溶液（10 mL）中で30分間静置した。なお、使用したアルギン酸溶液は、AL100の溶液及び実施例18/20の溶液である。

[0545] <工程4b>PL0コーティング

工程4aで得られたアルギン酸ファイバーを含む塩化カルシウム溶液から、セルストレーナーを用いてアルギン酸ファイバーを分離した。分離したアルギン酸ファイバーを、0.1重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液（MilliQ水にて調製した100mmol/L塩化カルシウム溶液を用いて調製）（5 mL）に添加し、37°C、125 rpmで20分間振とう攪拌した。その後、セルストレーナーを用いてポリ-L-オルニチン溶液からアルギン酸ファイバーを分離し、生理食塩水5mLを使用して2回洗浄した。

[0546] <工程4c>アルギン酸コーティング

工程4bで得られたPL0コーティングアルギン酸ファイバーを0.15重量%に調製したアルギン酸溶液（5 mL）に添加し、37°C、125 rpmで20分間振とう攪拌した。その後、セルストレーナーを用いてアルギン酸溶液からアルギン酸ファイバーを分離し、生理食塩水5mLを使用して2回洗浄した。なお、使用したアルギン酸溶液は、AL100の溶液及び実施例18/20の溶液である。

[0547] <工程4d>キレート処理

工程4cで得られたアルギン酸ファイバーを20mMのEDTA・2K/生理食塩水（5mL）に添加し、37°C、125 rpmで20分間振とう攪拌した。その後、セルストレーナーを用いてEDTA・2K/生理食塩水からアルギン酸ファイバーを分離し、生理食塩水5mLを使用して2回洗浄した。回収したアルギン酸ファイバーは、安定性評価試験の実施まで5mL生理食塩水に浸漬した。

[0548] <工程4e>安定性評価

工程4dで得られたアルギン酸ファイバーを5mLのPBS溶液を加えた15mL遠沈管に移し、37°Cで1日振盪した。その後、当該ファイバーを10mLのPBS溶液を加えた25mL遠沈管に移し、37°Cでさらに1時間振盪した。観察結果を下記表21に示す。アルギン酸ファイバーの安定性は、以下の指標に基づき目視で評価した。工程4e終了後の各実施例に係るアルギン酸ファイバーの写真を図13～16に示す。

安定性評価（スコア）：

- 3：ファイバーの崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が全く認められない
- 2：ファイバーの一部に崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が認められる
- 1：ファイバーに明らかな崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が認められ、構造体の機能を保てていない

[表21]

実施例	工程			安定性評価（スコア）	
	工程4a	工程4b	工程4c	キレート処理後	振盪後
D-1	AL100	実施	AL100	2	1
D-2	AL100	実施	実施例18/20	3	2
D-3	実施例18/20	実施	AL100	3	3
D-4	実施例18/20	実施	実施例18/20	3	3

[0549] AL100をコア層に用いた実施例D-1では、図13に示すとおり、キレート処理後にファイバーの崩壊が始まり、振盪後には構造体の明らかな崩壊に伴い染色剤のブルーデキストランが完全に流出していた。同じコア層を用いた実施例D-2では、アニオン性ポリマー層に実施例18/20の化学架橋アルギン酸を用いたが、図14に示すとおり、構造体の崩壊が認められた。これに対し、実施例D-3及び実施例D-4では、図15及び16に示

すとおりに、コア層として実施例18／20の化学架橋アルギン酸を用いたところ、アニオン性ポリマー層の種類にかかわらず、構造体の崩壊は認められなかった。このように、本発明の構造体はファイバー状に成型した場合であっても、良好な安定性を示した。

[0550] [実施例D(2)] アルギン酸三層構造体の作製（バリウムイオンファイバー）

本発明の構造体は、コア層を形成する際に使用する2価金属イオンとして、塩化カルシウムの代わりに塩化バリウムを用いても、同様に製造することが可能である。

すなわち、前記、実施例Dの<工程4a>において、塩化カルシウム溶液の代わりに塩化バリウム溶液（濃度：20 mmol/L、生理食塩水にて調製）を用い、<工程4b>において、ポリ-L-オルニチン溶液は20mmol/L塩化バリウム含有生理食塩水溶液を用いて調製し、<工程4a>～<工程4e>と同様の試験を行った。<工程4e>の安定性評価は、41時間振盪を実施した。

観察結果を表22に示す。アルギン酸ファイバーの安定性は、以下の指標に基づき目視で評価した。工程4e終了後の各実施例に係るアルギン酸ファイバーの写真を図17に示す。

[0551] 安定性評価（スコア）：

3：ファイバーの崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が全く認められない

2：ファイバーの一部に崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が認められる

1：ファイバーに明らかな崩壊/溶解/変形/ブルーデキストランの溶出等が認められ、構造体の機能を保てていない

[表22]

実施例	工程			安定性評価（スコア）	
	工程4a	工程4b	工程4c	キレート処理後	振盪後
D(2)-1	AL100	実施	AL100	3	2
D(2)-2	実施例18／20	実施	AL100	3	3

表22に示すとおり、天然アルギン酸のファイバー（実施例D(2)-1）において、キレート処理後に構造体の破壊は認められず、カルシウムイオンに代わりバリウムイオンを用いることで安定性が高まることが確認された。しかしながら、PBS溶液中で振盪を長期間続けると、実施例D(2)-1ではファイバーの破断が生じた。これに対し、コア層に化学架橋アルギン酸を用いた実施例D(2)-2では、構造体の崩壊は認められなかった。このように、本試験においても実施例Dと同様の結果が得られ、コア層を形成する際の2価金属イオンとして、カルシウムイオンの代わりにバリウムイオンを用いた場合であっても、得られた本発明の構造体が良好な安定性を有することが確認できた。

以上の試験により、本発明の構造体は、様々な形状・大きさに加工できる自由度を有している上、従来の天然アルギン酸をコア層に用いた構造体に比べ、良好な安定性を有していることが確認できた。

[0552] [実施例E] コア層に細胞を含むアルギン酸三層構造体の作製（Min6細胞含有ビーズ）

本試験は、本発明の構造体のコア層に、生物活性物質を放出しうる細胞を封入した場合、構造体中で細胞が生存し、その機能が維持されていることを検証したものである。

<工程5a>アルギン酸ビーズの作製

膵臓ランゲルハンス島β細胞の株化細胞であるMin6細胞を含むアルギン酸ビーズを作製した。まず、Min6細胞(AddexBio製)を細胞数が 9.17×10^6 cells/mLとなるように懸濁した実施例18/20のアルギン酸溶液を12ゲージの注射針と接続した注射筒に充填した。100 mmol/Lの塩化カルシウム溶液 40 mLを、前記ニードルの先端から液面までの距離が 10 mmになるようセットし、マグネチックスターラーを用いて200rpmで攪拌した。そこへ、アルギン酸溶液をシリンジポンプを使用して流速 1 mL/minで15秒間滴下し、90秒間攪拌した。

[0553] <工程5b>PL0コーティング

工程5aで得られたアルギン酸ビーズの入ったミニカップに0.1重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を5mL加え、37°Cで10分間静置した。その後、一旦溶液を除いたのちに、0.05重量%に調製したポリ-L-オルニチン溶液を5mL加え、37°Cで6分間静置し、生理食塩水20mLを使用して1回洗浄した。

[0554] <工程5c>アルギン酸コーティング

工程5bにて得られたPL0コーティングビーズの入ったミニカップに0.15重量%に調製したAL100のアルギン酸溶液を5mL加え、37°Cで10分間静置し、生理食塩水20mLを使用して1回洗浄した。

[0555] <工程5d>キレート処理

工程5cにて得られたビーズの入ったミニカップに 55 mMのクエン酸ナトリウム溶液 40 mLを加え、室温で2分間静置し、生理食塩水30mLを使用して2回洗浄した。

[0556] <工程5e>培養

工程5dで得られたMin6細胞含有ビーズを、下記表23の組成である培地5mLを含む6穴プレートで培養した。また、コントロールとして、未処理のMin6細胞(細胞数はMin6細胞含有ビーズと同じである)も、同じ培地5mLを含む6穴プレートで培養した。

[表23]

培地組成： optimized DMEM 培地に下表の各種添加物を加え調製した。

	Sample	メーカー	添加量 (mL)	終濃度
培地	Optimized DMEM	AddexBio	420	
添加物	牛胎児血清 (FBS)	NICHIREI	75	15%
	Penicillin Streptomycin	Gibco	5	1%
	2-mercaptoethanol	Gibco	0.455	0.05 mM

[0557] <工程5f>インスリン分泌能評価

工程5eで9日間培養した、アルギン酸ビーズのコア層に含まれるMin6細胞及び未処理のMin6細胞のインスリン分泌能を評価した。Min6細胞含有ビーズ及び未処理のMin6細胞を低グルコース溶液(2 mM glucose/KRBH/0.1% BSA)10mL中で2時間培養し、高グルコース溶液(20 mM glucose/KRBH/0.1% BSA)10mLへ溶液を交換したのちにさらに2時間培養した。その後、再び前記低グルコース

溶液10mLへ溶液を交換して2時間培養した。各工程の終了時に、溶液中のインスリン濃度を超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所製）を使用して測定した。結果を表24に示す。

[表24]

	低グルコース溶液 (1)	高グルコース溶液	低グルコース溶液 (2)
インスリン濃度 (ng/mL)	3.3	27	3.7

[0558] <工程5g>ATP定量

工程5eで10日間培養した、アルギン酸ビーズのコア層に含まれるMin6細胞及び未処理のMin6細胞のATPを定量評価した。定量評価は、CellTiter-Glo（登録商標）3D Cell Viability Assay(Promega製)を使用して実施した。結果を表25に示す。表25に示されるように、アルギン酸ビーズのコア層に含まれるMin6細胞のATP量は、未処理のMin6細胞と同程度であった。

[表25]

	ビーズ中のMin6細胞	未処理のMin6細胞
発光シグナル量 (RLU)	339967	297092

[0559] 実施例18と実施例20を組み合わせで作製した構造体にMin6細胞を封入し、9日培養後にインシュリン分泌能を測定した結果、表24に示すとおり、当該細胞はグルコース濃度依存的にインシュリンを分泌することを確認した。また、10日間培養後、Min6のATP産生量を測定した結果、表25に示すとおり、構造体に封入しない未処理のMin6と同程度であることが確認された。

以上の結果より、本発明の構造体は生細胞を封入した場合、生存に適した環境であり、構造体から生物活性物質を放出可能であることが確認された。

請求の範囲

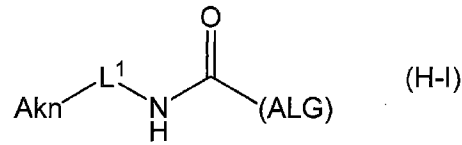
[請求項1] 化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分を含むコア層と、前記コア層を被覆するカチオン性ポリマー層と、前記カチオン性ポリマー層を被覆するアニオン性ポリマー層を含む構造体。

[請求項2] 化学架橋アルギン酸が、式 (H-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体及び式 (H-II) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体を用いて、前記両アルギン酸誘導体間に架橋を形成することにより得られるものである、請求項1に記載の構造体：

[式 (H-I) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式 (H-I)：

[化178]

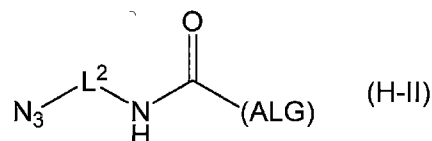


[式 (H-I) 中、(ALG) は、アルギン酸を表わし；-NHCO- は、アルギン酸の任意のカルボキシル基を介したアミド結合を表わし；-L¹- は、環状アルキン基 (Akn) と結合する2価のリンカーである] で表わされる化学修飾アルギン酸；

[式 (H-II) で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体]

下記式 (H-II)：

[化179]



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

し； $-L^2-$ は、アジド基と結合する2価のリンカーである]で表わされる化学修飾アルギン酸。

[請求項3]

式(H-1)中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n1}-$ (ここで、 $n1 = 1 \sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CONH-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~10個の基、またはベンゼン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されていてもよい)であり、

Akn が、8員環の環状アルキン基(ここで、当該環状アルキン基は、さらに1~2個のベンゼン環、シクロプロパン環、あるいは1, 2, 3-トリアゾール環が縮合していてもよく、縮合した環において $-L^1-$ と結合してもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が、 $-C(=O)-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NH-$ から選択される1~2の基で置き換えられた8員環基でもよく、当該アルキン基中の $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基、フッ素原子、水酸基、または C_{1-3} アルキルオキシ基から選択される1~2個の基で置換されていてもよい)である化合物であり、

式(H-11)中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n2}-$ (ここで、 $n2 = 1 \sim 50$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~10個の基、またはベンゼン環もしくはピリジン環で置き換えられても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基で置換されていてもよい)である、請求項2に記載の構造体。

[請求項4]

式(H-1)中、 $-L^1-$ が、 $-(CH_2)_{n1}-$ (ここで、 $n1 = 2 \sim 15$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-CONH-$ 、 $-NHCO-O-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換え

られても良く、当該 $-CH_2-$ の水素原子は、 C_{1-3} アルキル基またはフェニル基で置換された C_{1-3} アルキル基により、置換されていてもよい)であり、

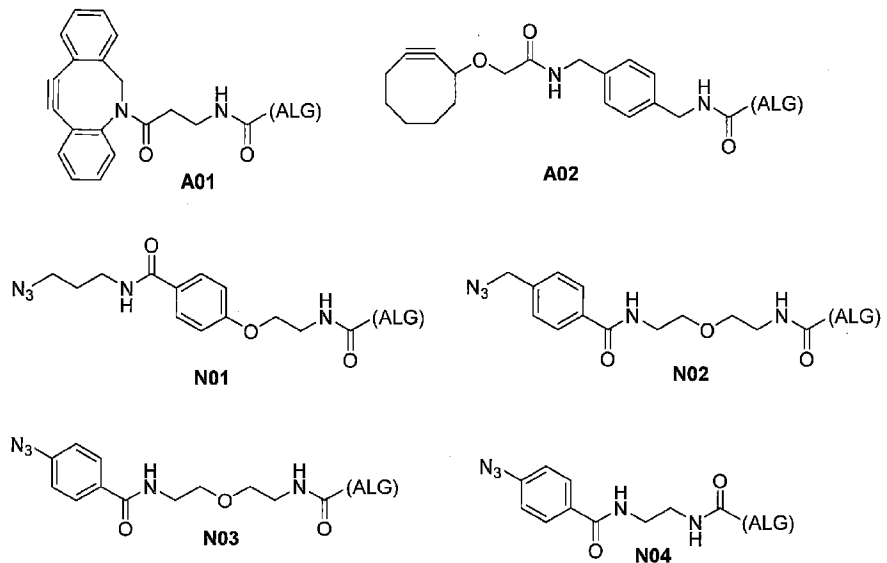
Aknが、8員環の環状アルキン基(ここで、当該環状アルキン基は、さらに1~2個のベンゼン環が縮合していてもよく、また、当該8員環の環状アルキン基中の $-CH_2-$ が $-NH-$ で置き換えられた8員環基でもよい)である化合物であり、

式(H-11)中、 $-L^2-$ が $-(CH_2)_{n2}-$ (ここで、 $n2=2\sim 15$ であり、当該基中の $-CH_2-$ は、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-O-$ 及び $-NH-$ から選択される1~5個の基、またはベンゼン環で置き換えられてもよい)である、請求項3に記載の構造体。

[請求項5]

式(H-1)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式(A01)または(A02)であり、式(H-11)で表わされる化学修飾アルギン酸誘導体が、下記式(N01)、(N02)、(N03)または(N04)である、請求項4に記載の構造体。

[化180]



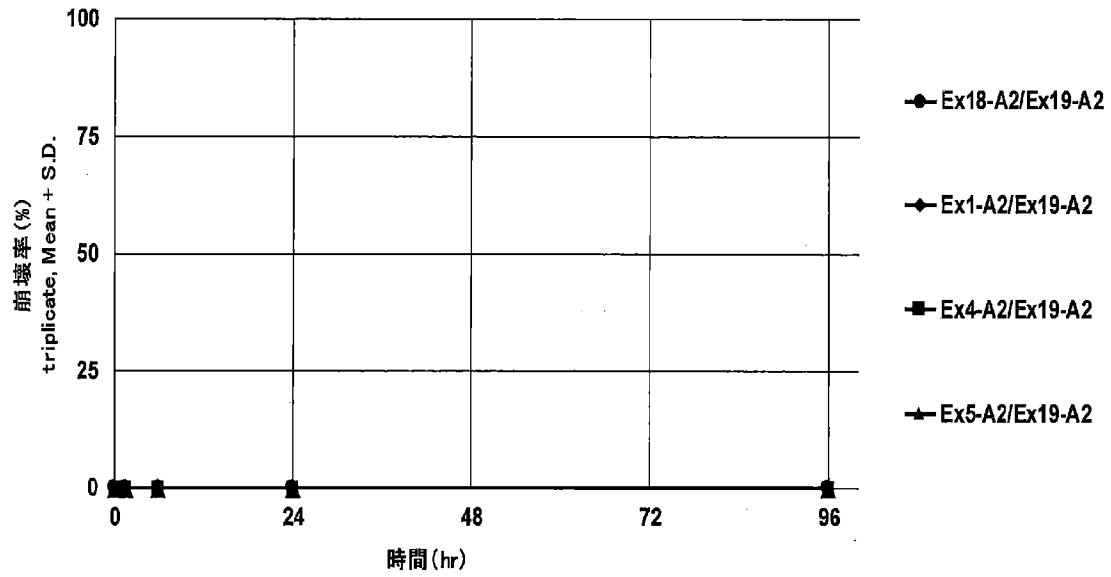
[請求項6]

アニオン性ポリマーがアルギン酸または化学架橋アルギン酸である、請求項1~5のいずれか1項に記載の構造体。

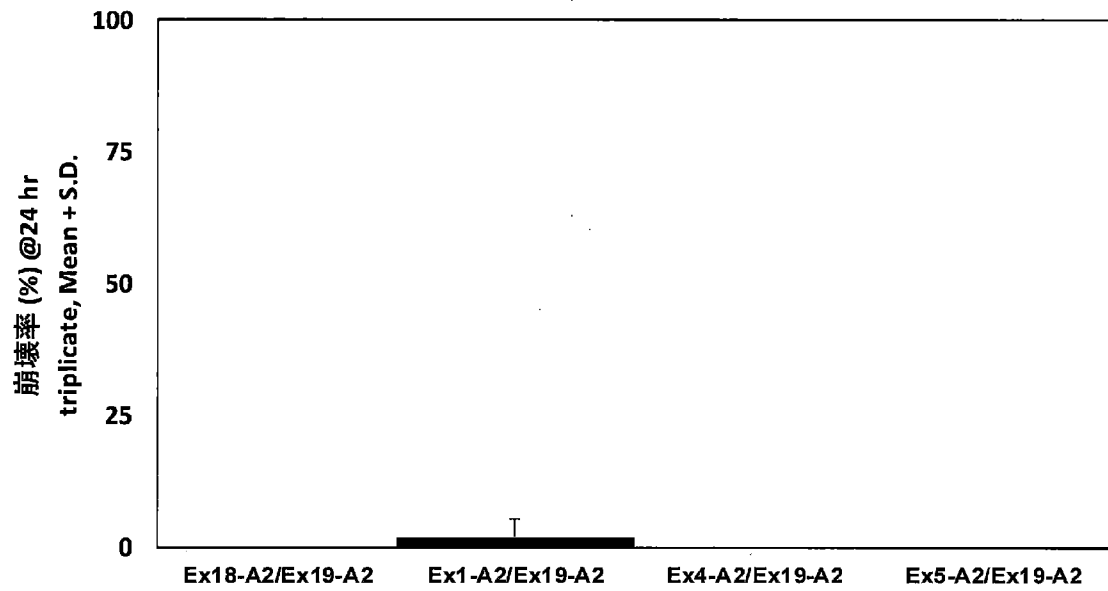
- [請求項7] コア層の化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分が細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項8] コア層の化学架橋アルギン酸に包埋された薬理成分が生物活性物質産生細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項9] カチオン性ポリマーがポリ-L-オルニチンまたはポリ-L-リジンである、請求項1～8のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項10] 構造体の形状がビーズ、シート又はファイバーである、請求項1～9のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項11] 生体内で使用するための、請求項1～10のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項12] 請求項1～10のいずれか1項に記載の構造体に封入された薬理成分を有効成分とする医療用材料。
- [請求項13] 創傷被覆材、術後癒着防止材、薬剤徐放用基材、細胞移植用基材、補綴材、製剤コーティング材、またはバイオプリンタに用いるものである、請求項12に記載の医療用材料。
- [請求項14] 以下の工程(a)～(c)を含む、請求項1～11に記載の構造体の製造方法；
工程(a)：薬理成分を含む化学修飾アルギン酸誘導体の溶液〔式(H-1)で示される誘導体と式(H-11)で示される誘導体の混合物〕を、2価金属イオンを含む溶液に接触させてゲル化する工程、
工程(b)：工程(a)で得られたゲルを、カチオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、当該ゲルをカチオン性ポリマーでコーティングする工程、
工程(c)：工程(b)で得られた製造物を、アニオン性ポリマーを含む溶液に接触させて、さらにアニオン性ポリマーでコーティングする工程。
- [請求項15] さらに以下の工程(d)を含む、請求項14に記載の構造体の製造方法；

工程（d）：工程（c）で得られた構造体を、キレート剤を用いてキレート処理する工程。

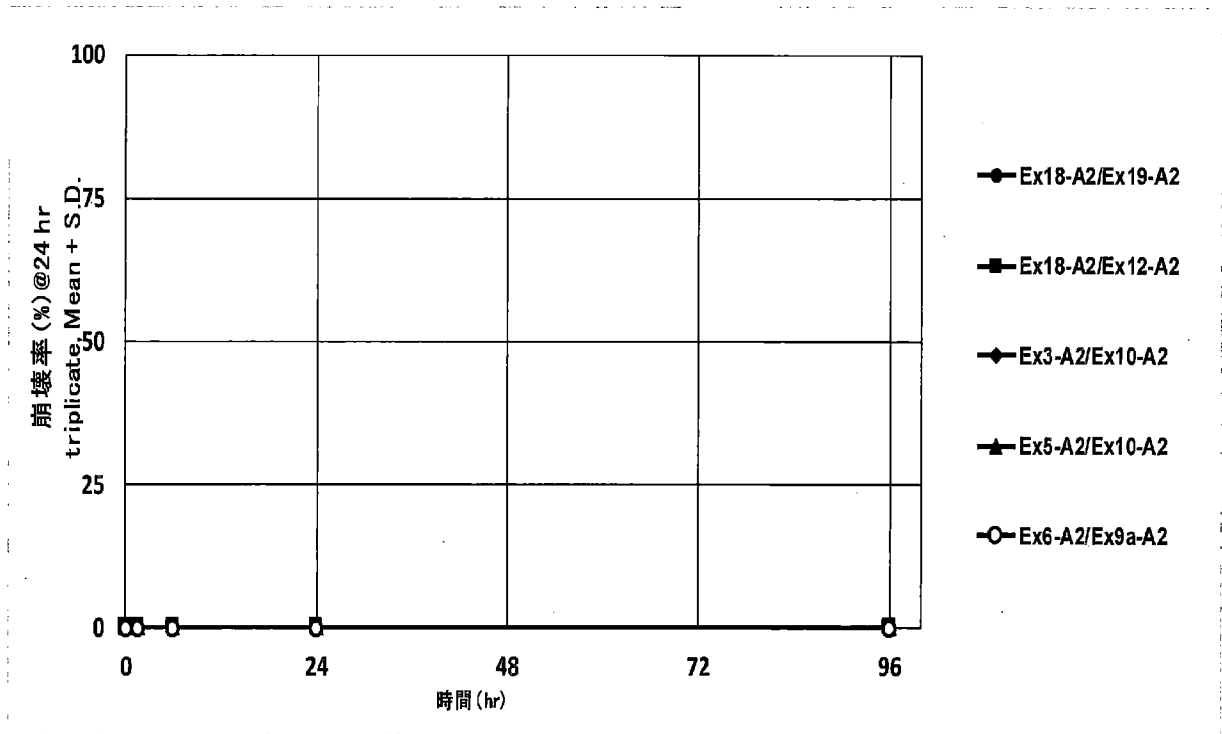
[圖1]



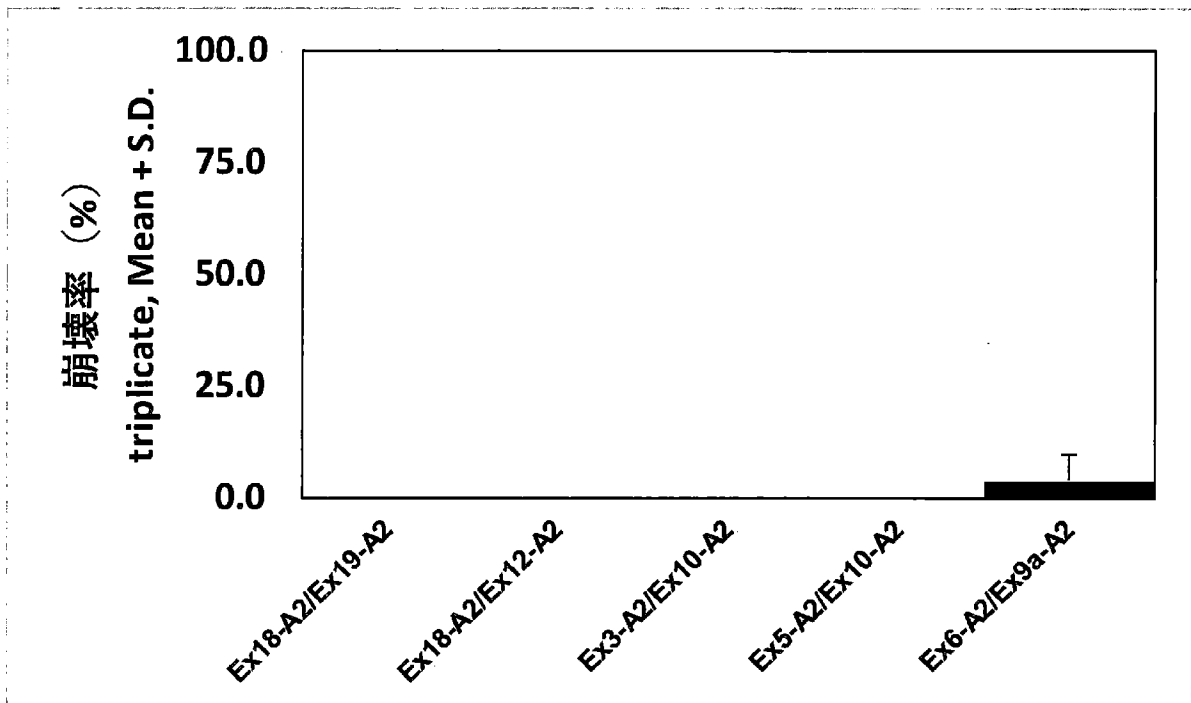
[圖2]



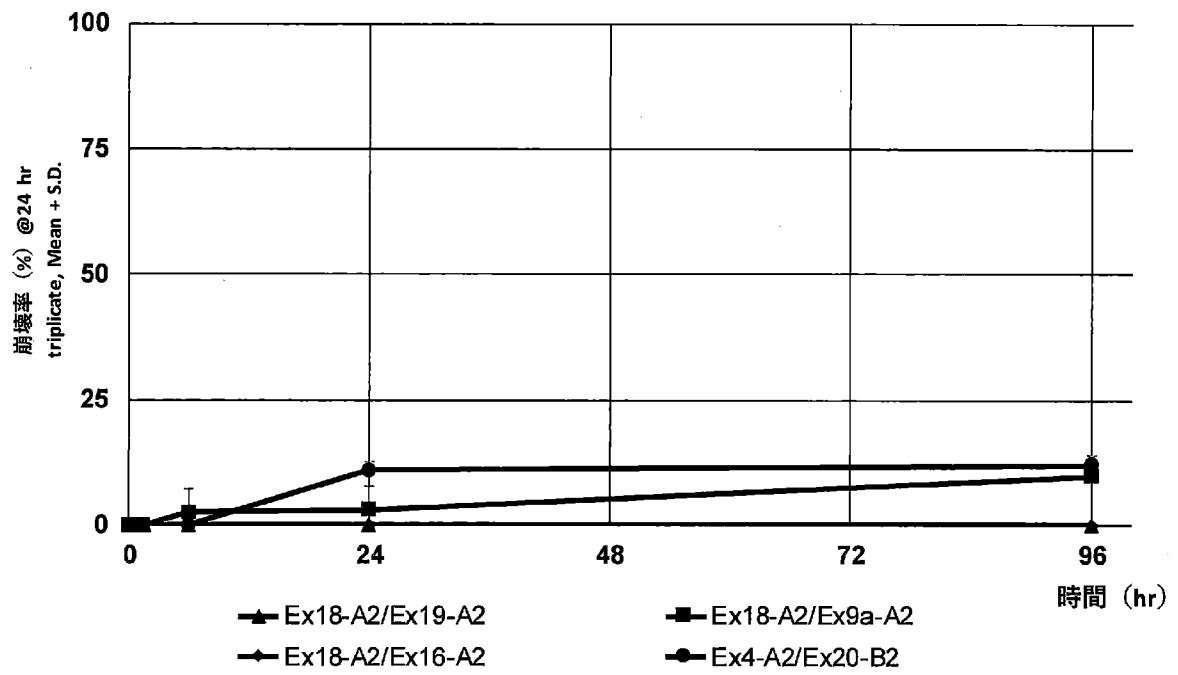
[図3]



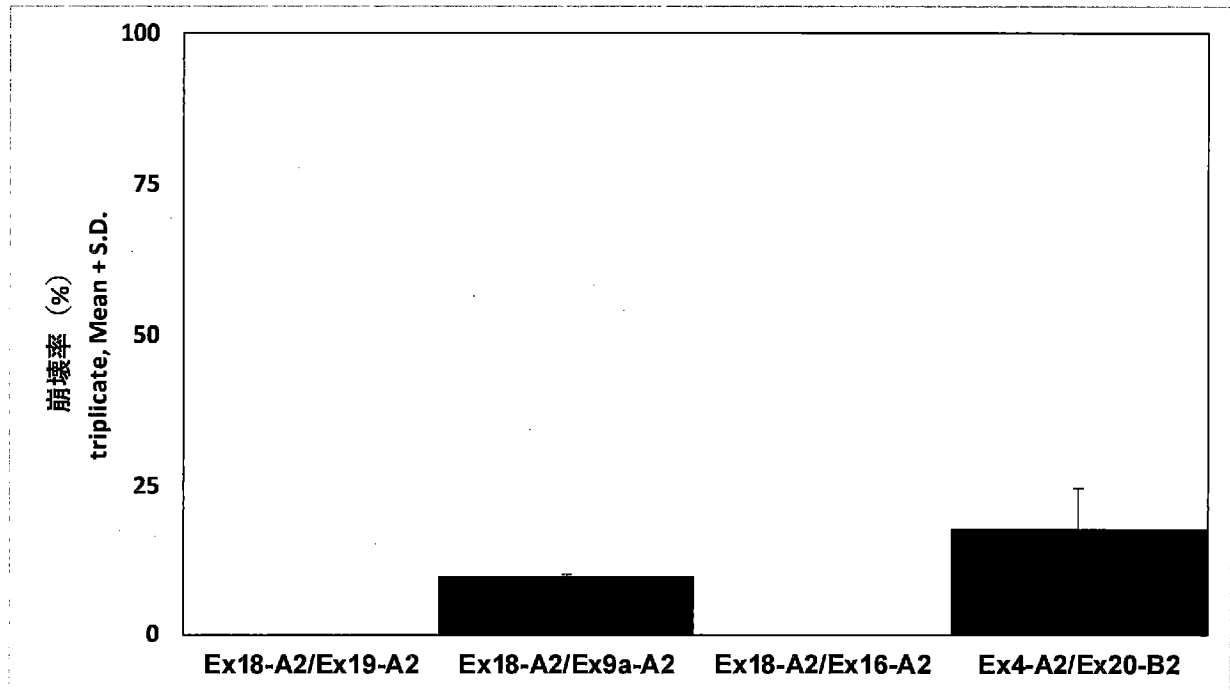
[図4]



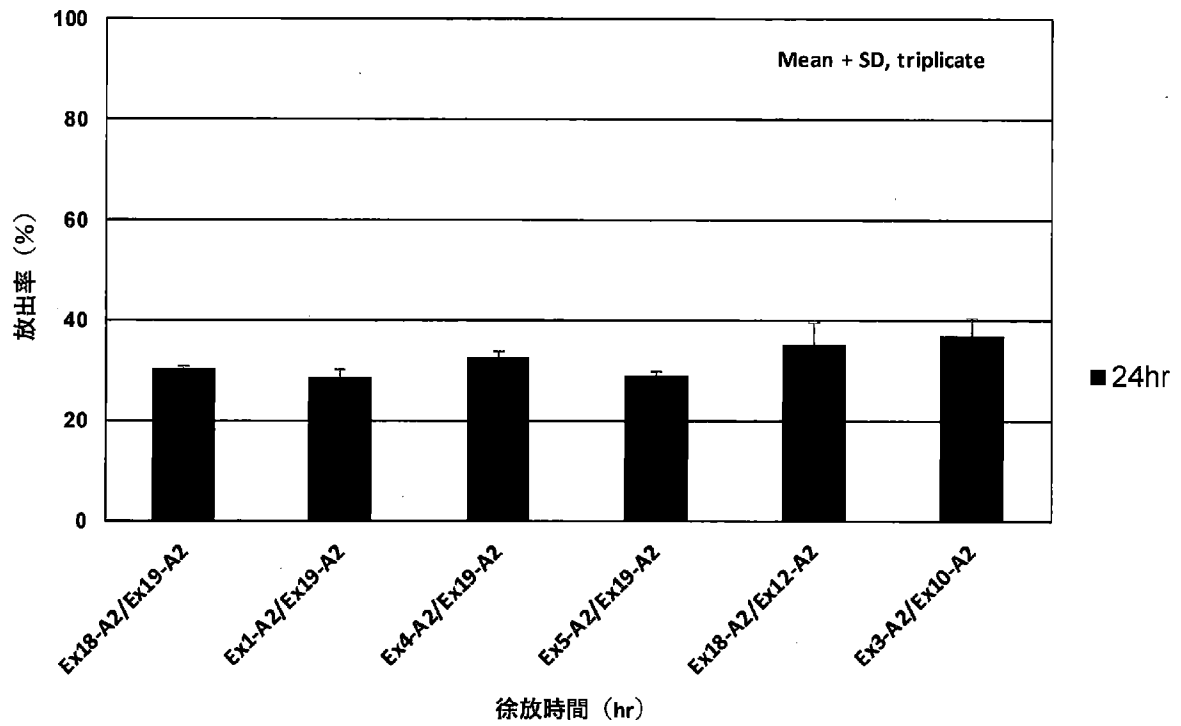
[図5]



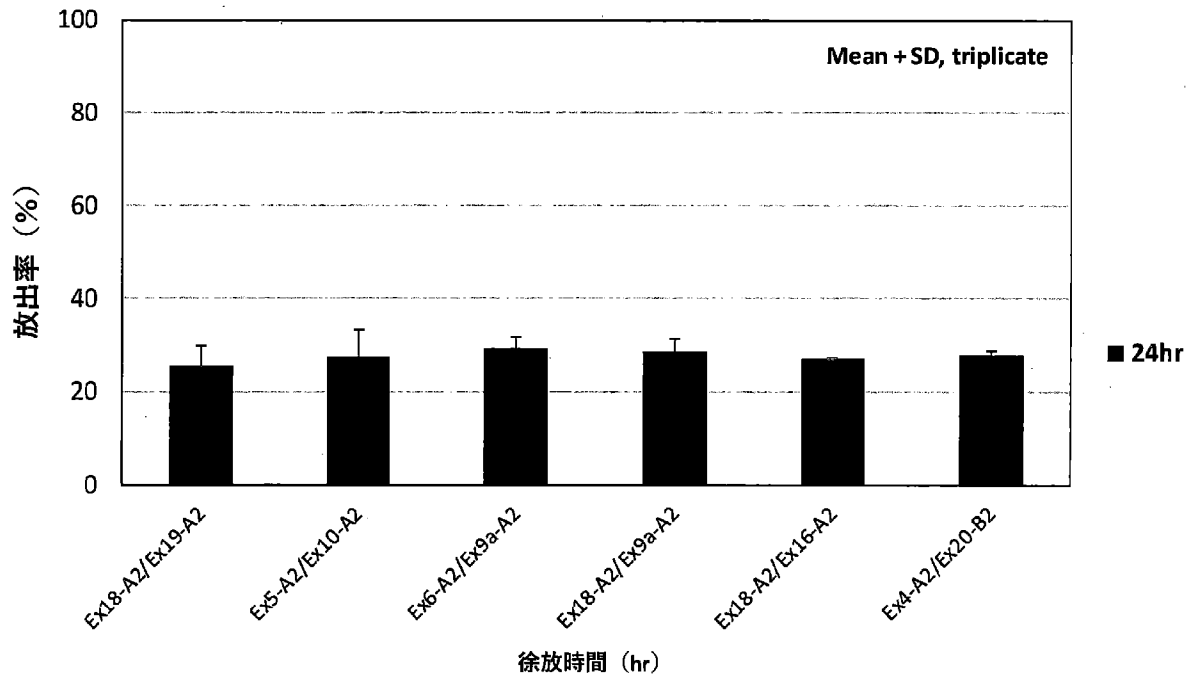
[図6]



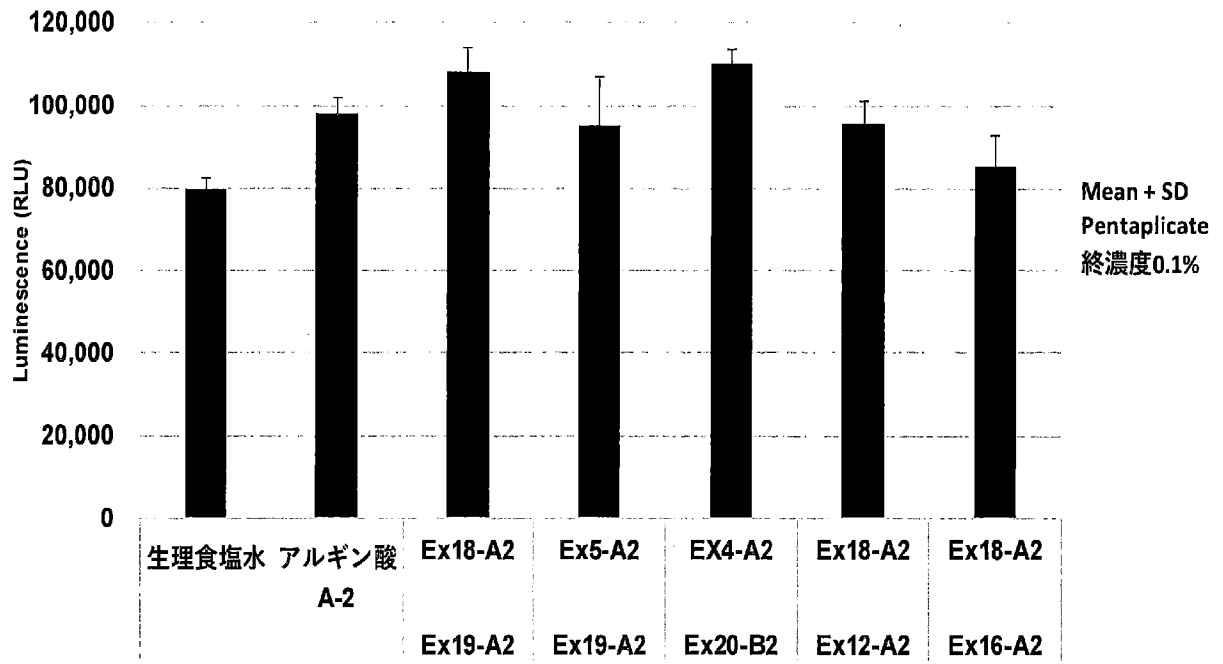
[図7]



[図8]

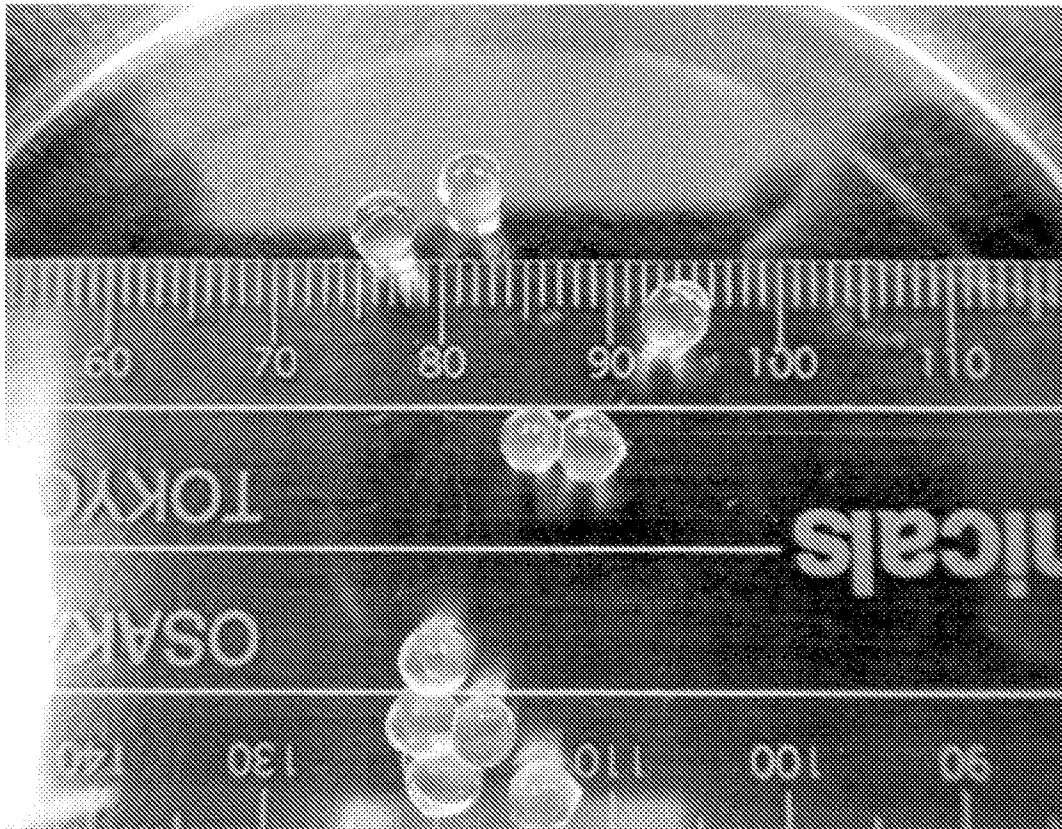


[図9]

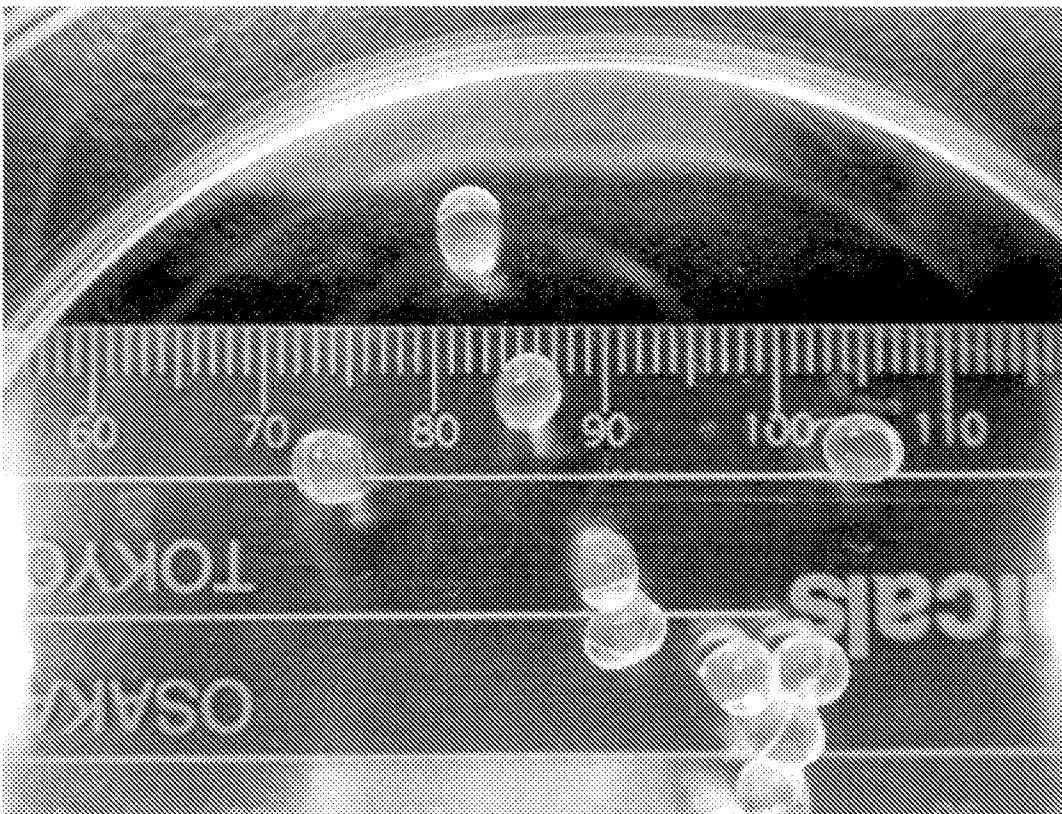



[図10]

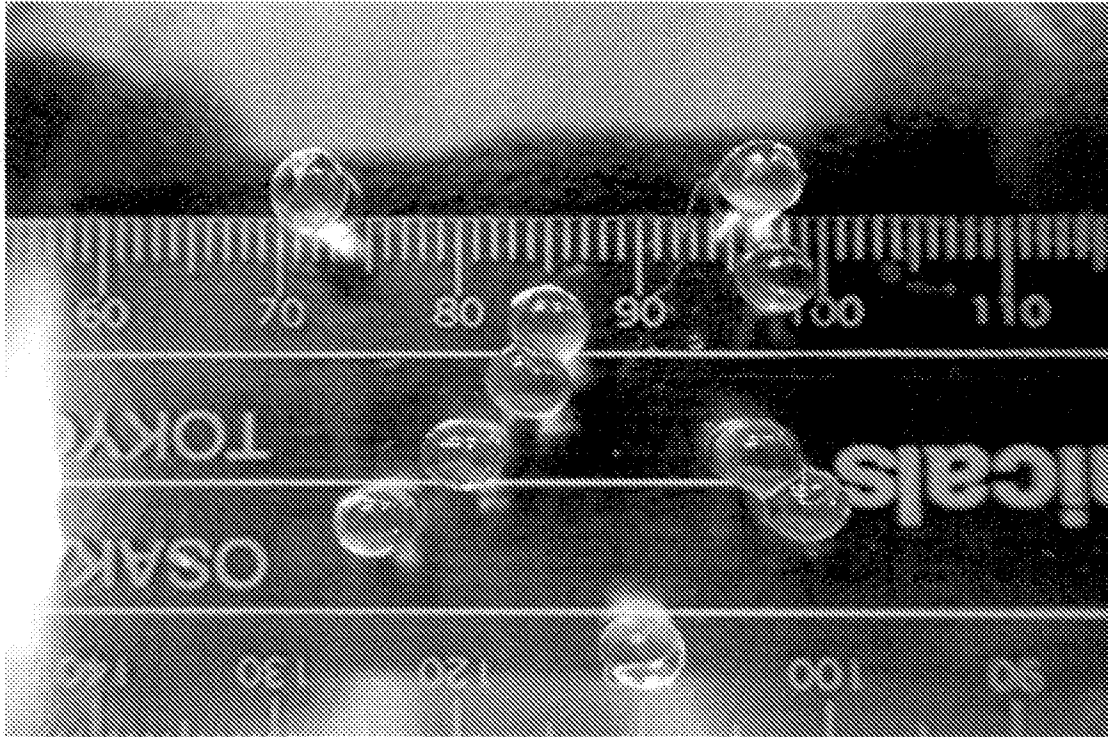
(a)



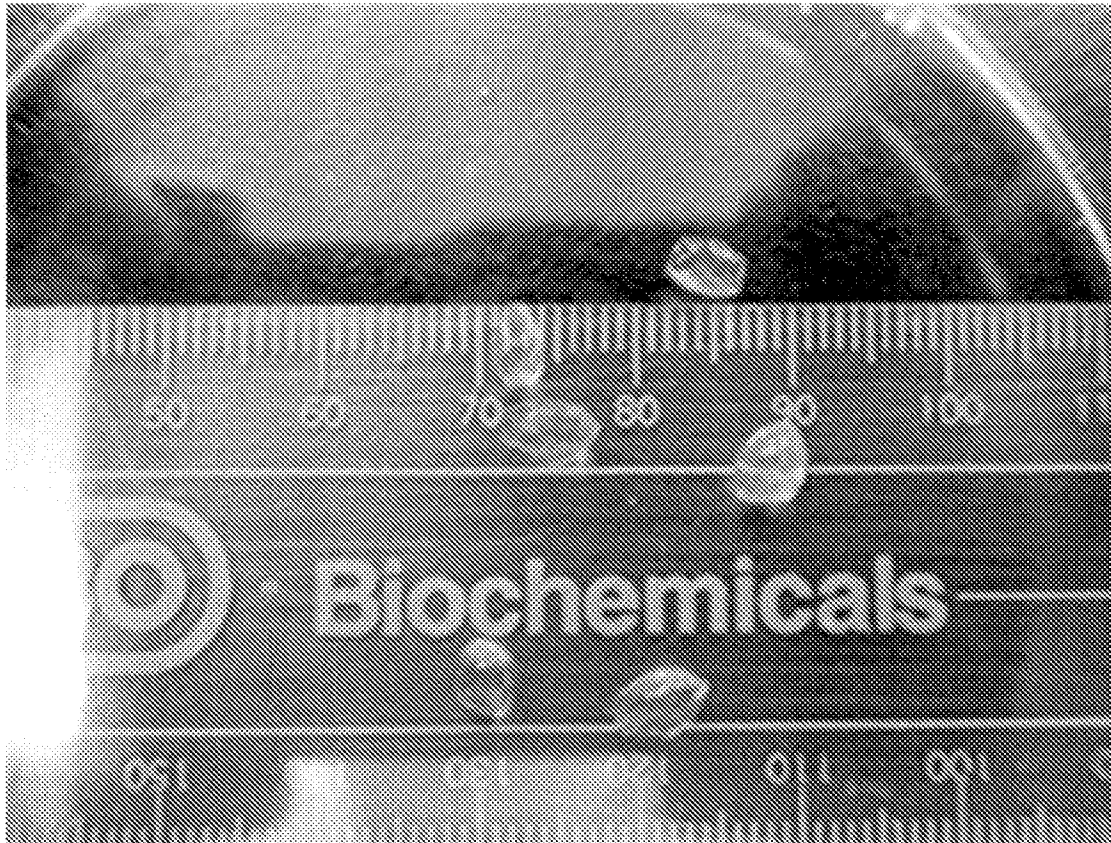
(b)



[11]
(a)

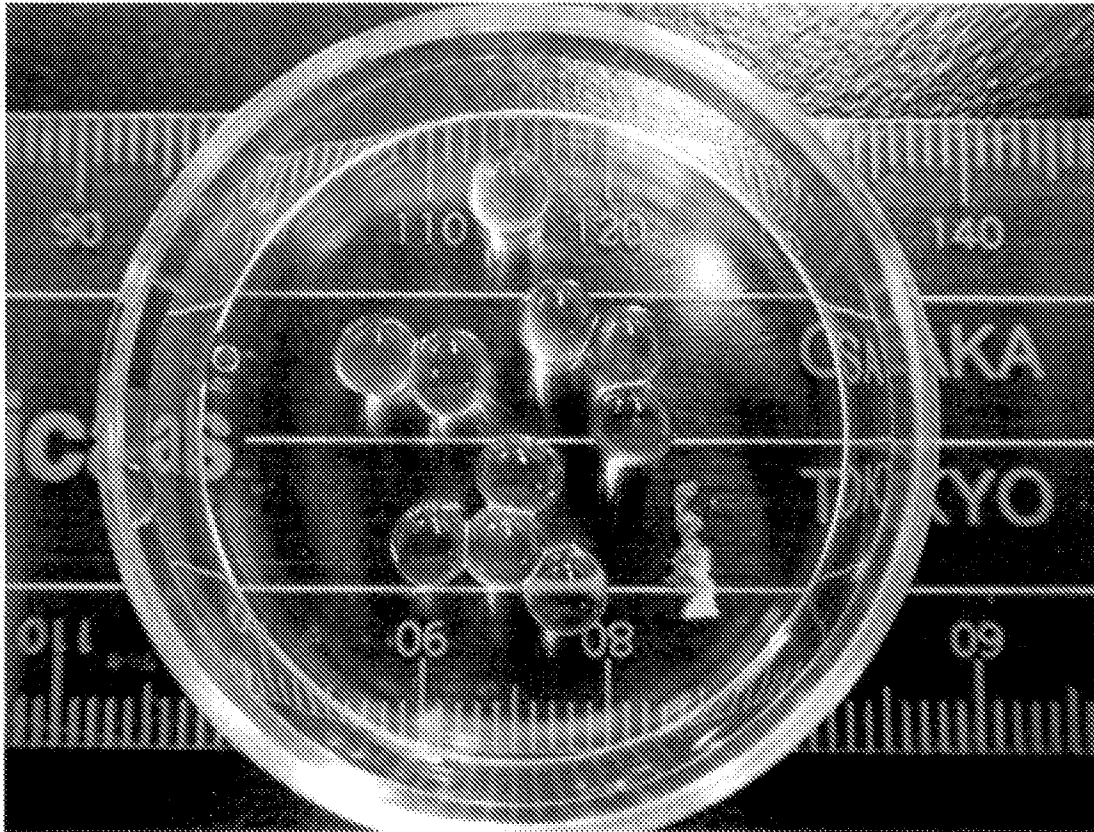


(b)

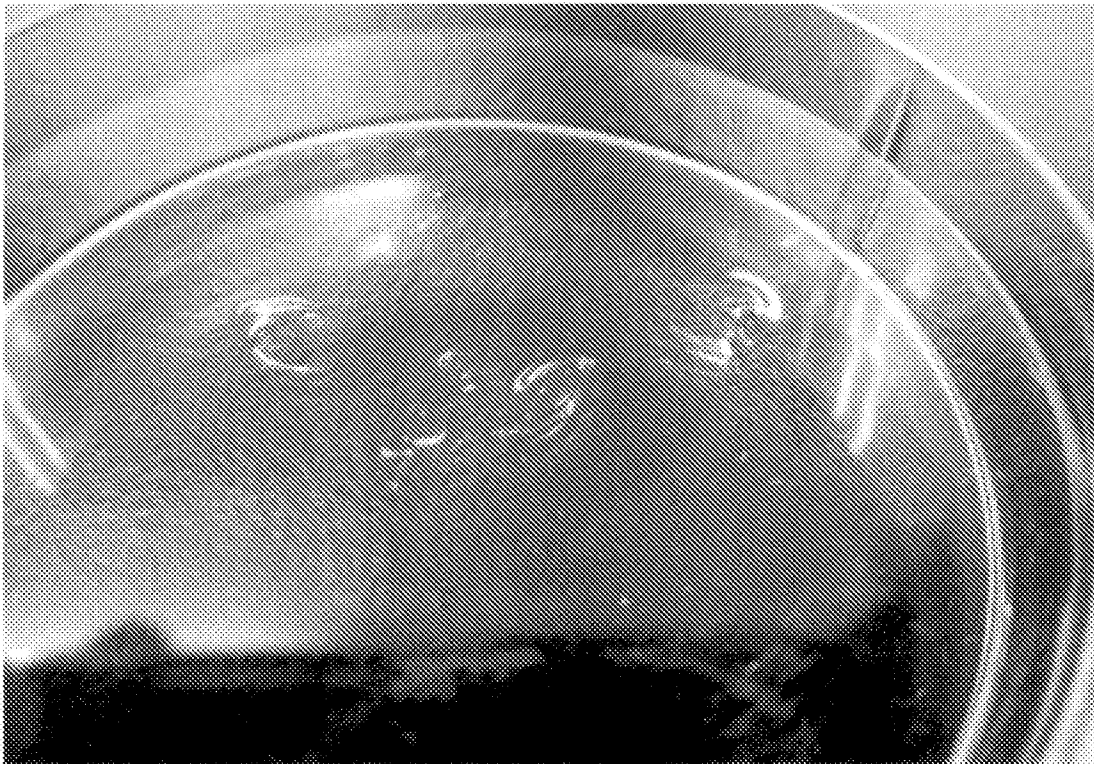


[図12]

(a)



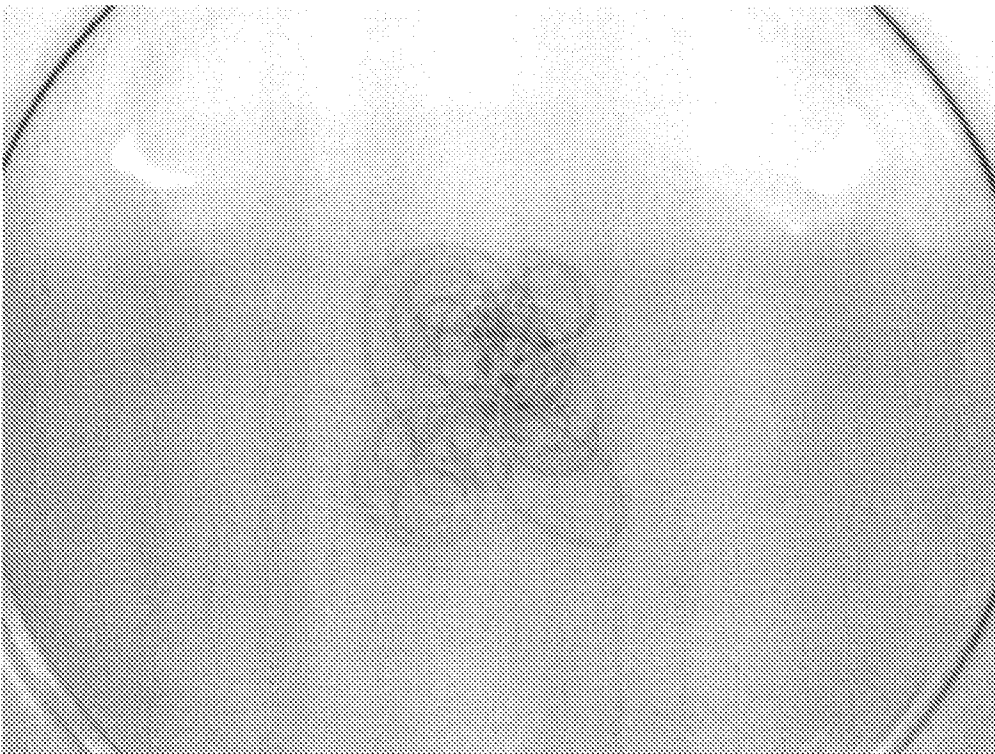
(b)



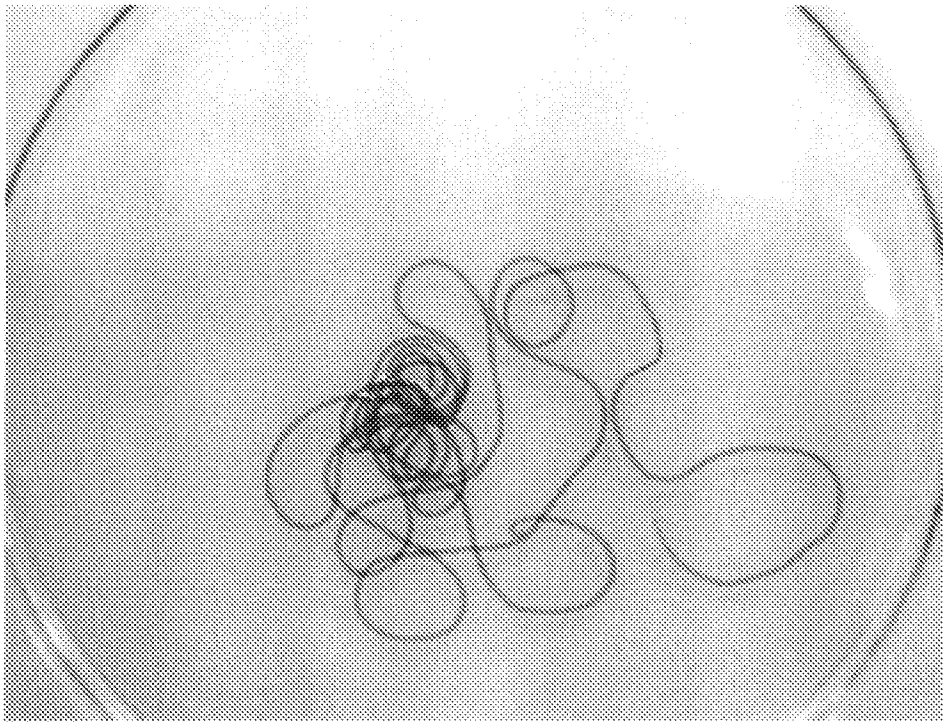
[図13]



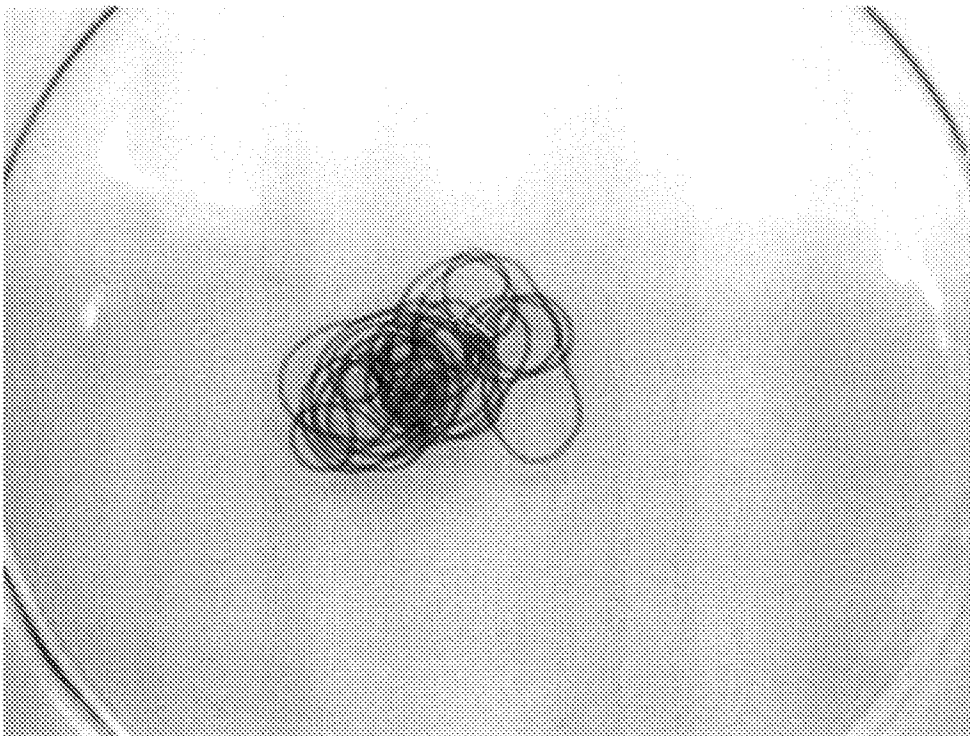
[図14]



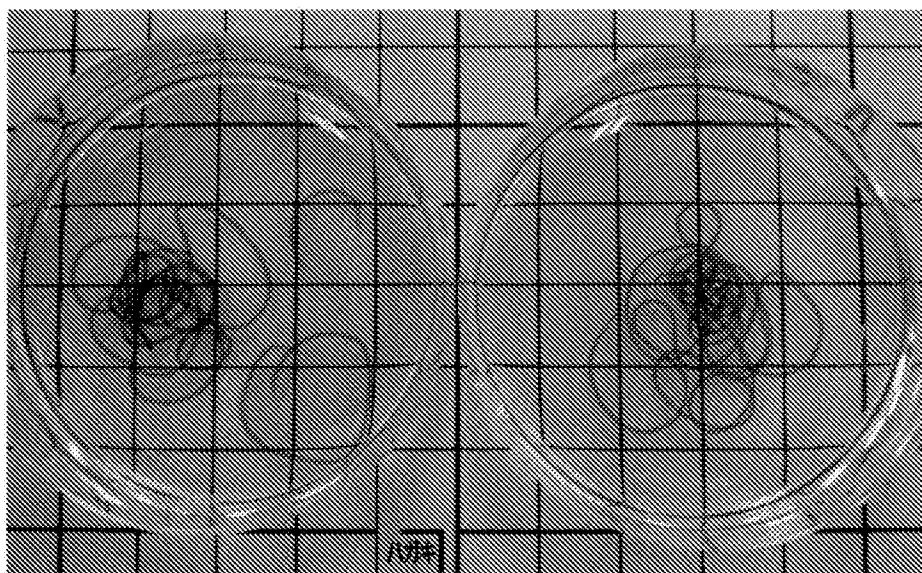
[图15]



[图16]



[図17]



左：実施例 D(2)-1

右：実施例 D(2)-2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/048566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>A61L 27/44</i>(2006.01)i; <i>A61K 35/12</i>(2015.01)i; <i>A61L 27/20</i>(2006.01)i; <i>A61L 27/34</i>(2006.01)i; <i>A61L 27/38</i>(2006.01)i; <i>A61L 27/50</i>(2006.01)i; <i>A61L 27/58</i>(2006.01)i FI: A61L27/44; A61K35/12; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/38; A61L27/50; A61L27/58</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L27/44; A61K35/12; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/38; A61L27/50; A61L27/58		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/240219 A1 (MOCHIDA PHARM CO LTD) 19 December 2019 (2019-12-19) claims 1-9, 11-15, paragraphs [0018], [0257], [0268], [0309], [0361], [0375], [0424], [0466], [0513]-[0516], [0530]-[0531], [0542]-[0555]	1-15
Y	ULUDAG, H. et al. Technology of mammalian cell encapsulation. Advanced Drug Delivery Reviews. 2000, vol. 42, pp. 29-64 title, abstract, p. 33, right column, line 3 to p. 34, left column, line 20	1-15
Y	JP 2019-520837 A (ETH ZURICH) 25 July 2019 (2019-07-25) paragraphs [0102], [0136]	1-15
Y	JP 2014-506926 A (WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES) 20 March 2014 (2014-03-20) claims, paragraphs [0015]-[0018]	1-15
Y	JP 2016-508369 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 22 March 2016 (2016-03-22) paragraphs [0078], [0093]	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 January 2022		Date of mailing of the international search report 15 February 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/048566

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/240219	A1	19 December 2019	US 2021/0095053 A1 claims, paragraphs [0029], [0410], [0423], [0463], [0515], [0529], [0577], [0619], [0669]-[0673], [0693]-[0696], [0708]-[0725] EP 3808783 A1 CN 112236457 A KR 10-2021-0019441 A	
JP	2019-520837	A	25 July 2019	US 2019/0282710 A1 paragraphs [0116], [0162] WO 2018/015330 A1 EP 3272877 A1 KR 10-2019-0026786 A CN 109563487 A	
JP	2014-506926	A	20 March 2014	US 2014/0127308 A1 claims, paragraphs [0023]-[0026] WO 2012/121874 A1 EP 2680862 A1	
JP	2016-508369	A	22 March 2016	US 2015/0190427 A1 paragraphs [0183], [0224] WO 2014/121758 A1 CN 103981147 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61L 27/44(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61L 27/20(2006.01)i; A61L 27/34(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; A61L 27/58(2006.01)i FI: A61L27/44; A61K35/12; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/38; A61L27/50; A61L27/58</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>A61L27/44; A61K35/12; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/38; A61L27/50; A61L27/58</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> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <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>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019/240219 A1 (持田製薬株式会社) 19.12.2019 (2019 - 12 - 19) 請求項1~9、11~15、[0018]、[0257]、[0268]、[0309]、[0361]、[0375]、[0424]、[0466]、[0513]~[0516]、[0530]~[0531]、[0542]~[0555]</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ULUDAG H. et al., Technology of mammalian cell encapsulation, Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, Vol.42, pp.29-64 表題、アブストラクト部分、第33頁右欄第3行~第34頁左欄第20行</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2019-520837 A (イーティーエイチ・チューリッヒ) 25.07.2019 (2019 - 07 - 25) [0102]、[0136]</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2014-506926 A (ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ・ヘルス・サイエンシズ) 20.03.2014 (2014 - 03 - 20) 請求の範囲、[0015]~[0018]</td> <td>1-15</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 請求項の番号	Y	WO 2019/240219 A1 (持田製薬株式会社) 19.12.2019 (2019 - 12 - 19) 請求項1~9、11~15、[0018]、[0257]、[0268]、[0309]、[0361]、[0375]、[0424]、[0466]、[0513]~[0516]、[0530]~[0531]、[0542]~[0555]	1-15	Y	ULUDAG H. et al., Technology of mammalian cell encapsulation, Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, Vol.42, pp.29-64 表題、アブストラクト部分、第33頁右欄第3行~第34頁左欄第20行	1-15	Y	JP 2019-520837 A (イーティーエイチ・チューリッヒ) 25.07.2019 (2019 - 07 - 25) [0102]、[0136]	1-15	Y	JP 2014-506926 A (ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ・ヘルス・サイエンシズ) 20.03.2014 (2014 - 03 - 20) 請求の範囲、[0015]~[0018]	1-15
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	WO 2019/240219 A1 (持田製薬株式会社) 19.12.2019 (2019 - 12 - 19) 請求項1~9、11~15、[0018]、[0257]、[0268]、[0309]、[0361]、[0375]、[0424]、[0466]、[0513]~[0516]、[0530]~[0531]、[0542]~[0555]	1-15															
Y	ULUDAG H. et al., Technology of mammalian cell encapsulation, Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, Vol.42, pp.29-64 表題、アブストラクト部分、第33頁右欄第3行~第34頁左欄第20行	1-15															
Y	JP 2019-520837 A (イーティーエイチ・チューリッヒ) 25.07.2019 (2019 - 07 - 25) [0102]、[0136]	1-15															
Y	JP 2014-506926 A (ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ・ヘルス・サイエンシズ) 20.03.2014 (2014 - 03 - 20) 請求の範囲、[0015]~[0018]	1-15															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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				
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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																
“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	“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																
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																
“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																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>31.01.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>15.02.2022</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>長谷川 茜 4C 3228</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>																

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2016-508369 A (シャanghai インスティテューツ フォー バイオロジカル サ イエンシズ、 チャイニーズ アカデミー オブ サイエンシズ) 22.03.2016 (2016-03-22) [0078]、[0093]	1-15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/048566

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/240219 A1	19.12.2019	US 2021/0095053 A1 請求の範囲、[0029]、[0410]、[0423]、[0463]、[0515]、[0529]、[0577]、[0619]、[0669]～[0673]、[0693]～[0696]、[0708]～[0725] EP 3808783 A1 CN 112236457 A KR 10-2021-0019441 A	
JP 2019-520837 A	25.07.2019	US 2019/0282710 A1 [0116]、[0162] WO 2018/015330 A1 EP 3272877 A1 KR 10-2019-0026786 A CN 109563487 A	
JP 2014-506926 A	20.03.2014	US 2014/0127308 A1 請求の範囲、[0023]～[0026] WO 2012/121874 A1 EP 2680862 A1	
JP 2016-508369 A	22.03.2016	US 2015/0190427 A1 [0183]、[0224] WO 2014/121758 A1 CN 103981147 A	