

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5597396号
(P5597396)

(45) 発行日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(24) 登録日 平成26年8月15日(2014.8.15)

(51) Int.Cl.	F I
C O 8 B 37/16 (2006.01)	C O 8 B 37/16 C S P
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704

請求項の数 7 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2009-534446 (P2009-534446)	(73) 特許権者	508286865
(86) (22) 出願日	平成20年9月26日 (2008.9.26)		ナノデックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/067566		神奈川県藤沢市藤沢四丁目14番9号
(87) 国際公開番号	W02009/041666	(74) 代理人	110001139
(87) 国際公開日	平成21年4月2日 (2009.4.2)		S K 特許業務法人
審査請求日	平成23年9月6日 (2011.9.6)	(74) 代理人	100130328
(31) 優先権主張番号	特願2007-256527 (P2007-256527)		弁理士 奥野 彰彦
(32) 優先日	平成19年9月28日 (2007.9.28)	(74) 代理人	100130672
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 伊藤 寛之
		(72) 発明者	服部 憲治郎
			神奈川県藤沢市藤沢四丁目14番9号
		審査官	小久保 敦規

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 葉酸修飾されたシクロデキストリン化合物、その製造方法、標的指向性薬物送達システム用の薬物送達剤、医薬組成物及び造影剤

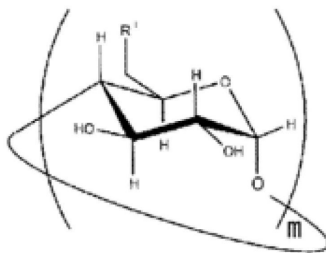
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シクロデキストリン化合物であって、下記一般式1で表される2以上の葉酸で修飾されてなるシクロデキストリン化合物。

【化1】

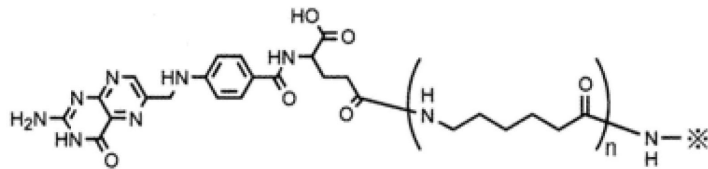
一般式1



(一般式1中、mは6～8の整数を表し、m個のR¹は、各々独立に下記一般式2で表される葉酸を有する置換基、水酸基、グリコシル基を有する置換基を表し、かつ葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも2個である。)

【化2】

一般式2



(一般式2中、 $*$ はシクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位炭素原子との結合位置を表す。また、 n は0～3の整数を表し、 n が0の場合、カルボニル炭素原子とアミノ窒素原子を結ぶ部分は単結合を表す。)

10

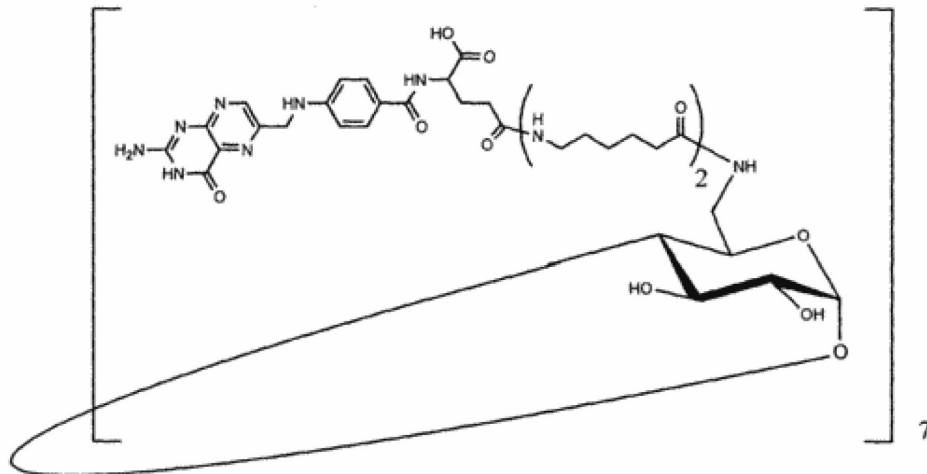
【請求項2】

葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも7個である請求項1に記載のシクロデキストリン化合物。

【請求項3】

下記式のいずれかかで表される請求項1に記載のシクロデキストリン化合物。

【化3】

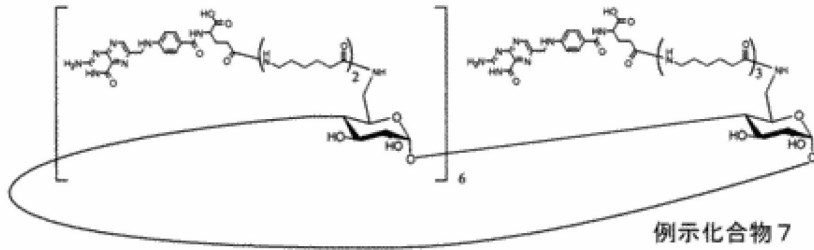


20

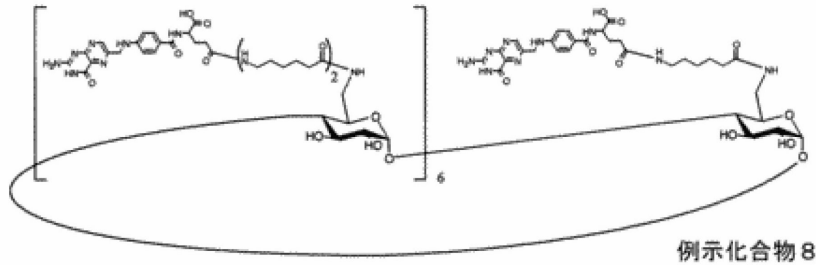
例示化合物1

30

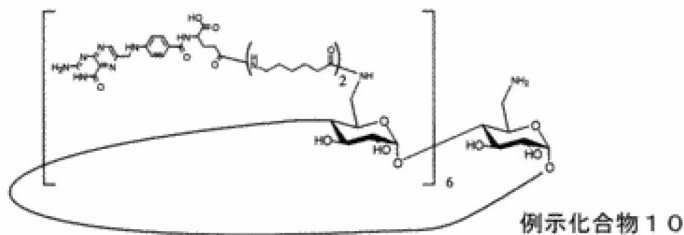
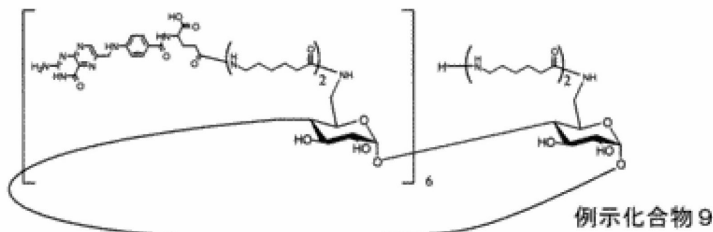
【化 4】



10



20



30

【請求項 4】

シクロデキストリン環を構成する各グルコピラノース分子の 6 位の第 1 級水酸基に、アミノ基又はアミノオリゴカプロン酸アミド基を有するシクロデキストリンと、葉酸とを縮合させることを特徴とする、葉酸修飾シクロデキストリン化合物の製造方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のシクロデキストリン化合物を含む標的指向性薬物送達剤。

40

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のシクロデキストリン化合物と薬物とを含み、前記薬物が前記シクロデキストリン化合物に包接されている標的指向性医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のシクロデキストリン化合物と造影剤とを含み、前記造影剤が前記シクロデキストリン化合物に包接されている標的指向性医造影剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、葉酸修飾されたシクロデキストリン化合物、その製造方法、および薬物送達剤に関し、特にがん細胞などの葉酸レセプターを過剰発現する標的に対する標的指向性薬物送達システム（TDDS）用の薬物送達剤として用いられるシクロデキストリン化合物（以下、単に「CD化合物」ということもある。）、及びその製造方法に関する。特に本発明は、シクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位の第1級水酸基が標的タンパク質に認識される葉酸で修飾されたシクロデキストリン化合物、その製造方法、及び前記シクロデキストリン化合物を含み、抗原とならないステルス性、がん細胞認識性、薬物運搬性に優れた標的指向システムに用いられる薬物送達剤、医薬組成物及び造影剤に関する。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

がん細胞ターゲティング薬物送達システム（以下、単に「がん細胞TDDS」という。）は、標的の有するレセプター（標的部位）のリガンド（認識タグ）、キャリア（例えば、リポソーム、シクロデキストリン）及び薬物（ドキソルビシン、タキソール、クルクミン等）から構成されてなるといえる。

がん細胞の前記認識タグとして、葉酸が実用化研究の対象としてリポソーム、高分子ミセル等に導入する研究が行われてきた。

非特許文献1及び2の二編の総説には、ビタミンの一種である葉酸は、がん細胞表面で過剰発現している葉酸レセプタータンパク（以下単に「FBP」ということもある。）に $10^{10} M^{-1}$ の会合定数で強く会合することが開示されている。また非特許文献2では、葉酸は、炎症部位の認識にも有効であると指摘されている。この文献での標的となるがん細胞の種類も子宮がん、子宮内膜がん、腎臓がん、肺がん、乳腺がん、脳がん、精巣がん、卵巣がん、骨髄がんなどが対象とされる。送達される薬物は制がん剤のほか、タンパク毒素、造影剤、アンチセンスオリゴニュークレオチド、遺伝子などである。

20

【 0 0 0 3 】

非特許文献3には、CDへの複数の認識タグ基の付与が、一定の集中した空間配置に適切になされると、細胞表面のリガンドレセプタータンパクの複数の結合サイトとの複数の相互作用を同時に起こすことができる。その1つ1つの相互作用は水素結合からなる弱い結合であるが、相互作用の数が増加するにしたがって、いわば累乗的に（指数関数的に）相互作用が強力になり、会合定数にして $10^{10} M^{-1}$ レベルの抗原抗体反応と同レベルの位置選択特異的で強力な相互作用が働くこと、いわゆる糖クラスター効果が記載されている。

30

【 0 0 0 4 】

非特許文献4、5、6では、イタリア Padova 大学の Caliceti らのグループが葉酸を用いたがん細胞への標的指向性薬物送達システム（TDDS）は、実用的に有効なものはないのが現状であるが、葉酸修飾シクロデキストリン化合物について報告している。

特に、非特許文献4では、彼らは、 α -シクロデキストリンをモノシル化して分子量700（14量体）のジアミノポリエチレングリコール化合物（以下、単に「ジアミノPEG化合物」という。）を導入し、コハク酸エステル化法により葉酸と反応させ、葉酸修飾シクロデキストリン化合物（以下、単に「CD-PEG-FA」という。）を得ている（前記CD-PEG-FAと固定化FBPの相互作用について表面プラズモン共鳴（SPR）解析法で評価している。また、共焦点レーザー走査型顕微鏡では2時間後にヒト口腔内がん細胞（KB）への取り込みも確認している。さらに新たな製造方法として β -CDにヘキサメチレンジイソシアナートを5個導入し、前記ジアミノPEG化合物を結合させ、そのうちの1つに葉酸を導入した化合物を得ている（以下、単に「CD-(C6-PEG)5-FA」という。）。該化合物について生体内分解性、 α -エストラジオール、クルクミン等の薬物の溶解性向上等々を評価している。さらに、非特許文献6では、クルクミンを担持した前記化合物についてヒト口腔内皮がん細胞（KB）とヒト肺がん細胞（MC

40

50

F) に対する標的指向性を評価している。

しかしながら、これら文献中の葉酸1置換修飾シクロデキストリンCD-PEG-FAおよびCD-(C6-PEG)5-FAは、KBがん細胞を認識しているが取り込み度合いは定性的で明確でなく、制がん剤のデリバリーについても明確でない。製造方法についても、明確でなく、上記化合物の会合定数が $10^3 M^{-1}$ 程度と弱く、実用性は低かった。

【0005】

シクロデキストリン(CD)を構成するグルコピラノースの6位には、第1級水酸基が存在し、例えば、CDを構成するグルコピラノースが6個の場合には、CD中6個の第1級水酸基が存在する。非特許文献7で本発明者らは、CD中に複数存在する前記第1級水酸基を、それぞれ、糖鎖を結合してなる糖鎖アームで置換したCD化合物の製造し、医薬ともレクチンとも非常に高い会合能、いわゆる二重認識能を有していることを報告している。

【非特許文献1】S. Wang, Philip S. Low, J. Control. Release, 53, 39-48 (1998).

【非特許文献2】Philip S. Low, Walter A. Henne, Derek D. Doorneweerd, Accounts Chem. Research, 41, 120-129 (2008).

【非特許文献3】Y. C. Lee and R. T. Acc. Chem. Res, 1995, 28

【非特許文献4】P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, T. Carofiglio, R. Fornasier, M. Fermeglia, M. Ferrone, S. Pricli, Bioconjugate Chem., 14, 899-908 (2003).

【非特許文献5】S. Salmaso, A. Semenzato, P. Caliceti, J. Hoebeker, F. Sonvico, C. Dubernet, P. Couvreur, Bioconjugate Chem., 15, 997-1004 (2004).

【非特許文献6】S. Salmaso, S. Sara, A. Semenzato, P. Caliceti, J. Drug Targeting, 15(6), 379-390 (2007).

【非特許文献7】K. Hattori, A. Kenmoku, T. Mizuguchi, D. Ikeda, M. Mizuno, T. Inazu, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem., 56, 9-16 (2006).

【発明の開示】

【0006】

本発明の課題は、標的に対して会合性が優れる、あるいは薬物の包接能が優れるシクロデキストリン化合物、その製造方法、前記シクロデキストリン化合物を含む標的指向性薬物送達剤、医薬組成物および標的指向性造影剤を提供することにある。特に、本発明の課題は、2以上の葉酸と葉酸結合サイトとの2以上の同時的な相互作用を有する、がん細胞に対して会合性が優れ、薬物の包接能も優れるシクロデキストリン化合物、その製造方法、前記シクロデキストリン化合物を含む標的指向性薬物送達剤、医薬組成物および標的指向性造影剤を提供することにある。

【0007】

本発明によれば、以下の手段が提供される：

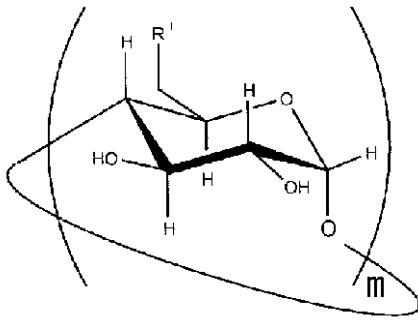
(1) シクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位の第1級水酸基の2個以上が、それぞれ、葉酸を有する置換基で置換されてなるシクロデキストリン化合物、

(2) 下記一般式1で表される2以上の葉酸で修飾されてなる(1)に記載のシクロデキストリン化合物、

【0008】

【化1】

一般式1



10

【0009】

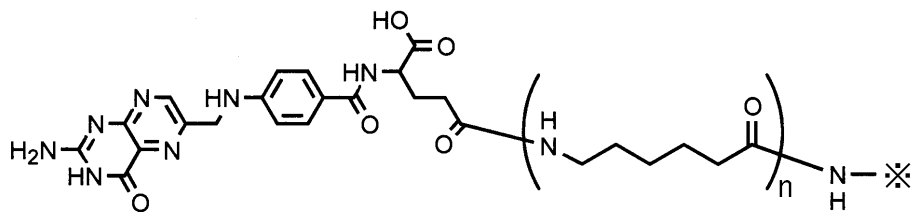
(一般式1中、 m は6～8の整数を表し、 m 個の R^1 は、各々独立に下記一般式2で表される葉酸を有する置換基、水酸基、グリコシル基を有する置換基又は親水性基を表し、かつ葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも2個である。前記シクロデキストリン化合物中の置換された前記水酸基以外の水酸基は、グリコシル基を有する置換基又は親水性基で置換されていてもよい。)

【0010】

20

【化2】

一般式2



30

【0011】

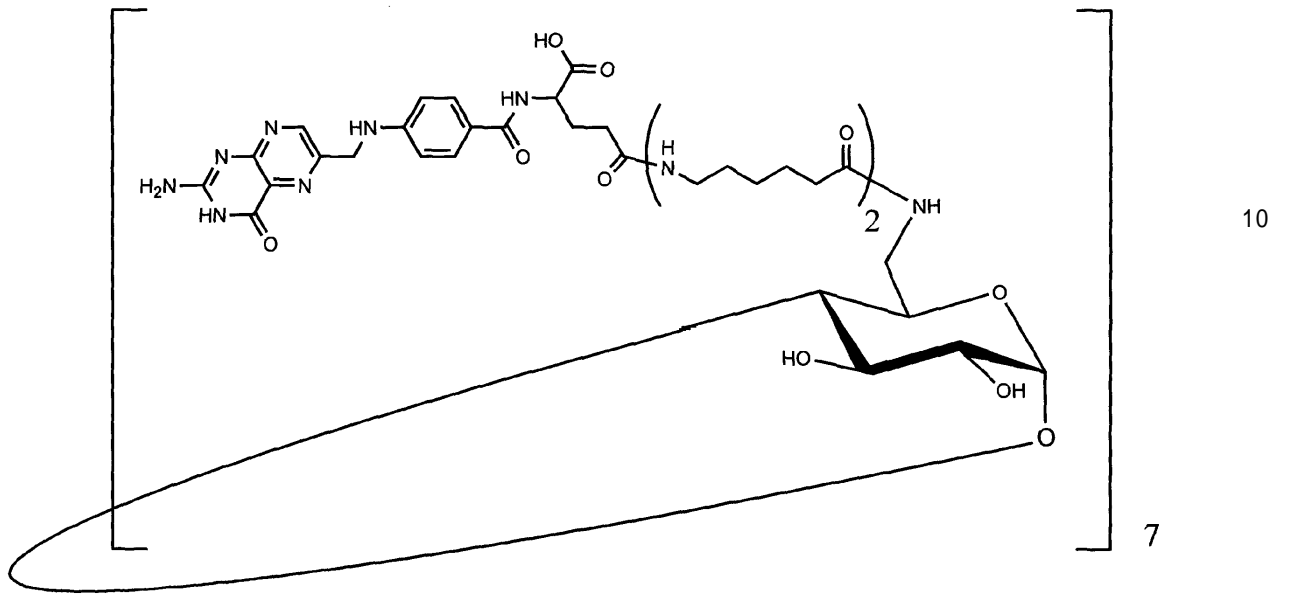
(一般式2中、 n はシクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位炭素原子との結合位置を表す。また、 n は0～3の整数を表し、 n が0の場合、カルボニル炭素原子とアミノ窒素原子を結ぶ部分は単結合を表す。)

(3) 下記式のいずれかで表される(2)に記載のシクロデキストリン化合物、

【0012】

40

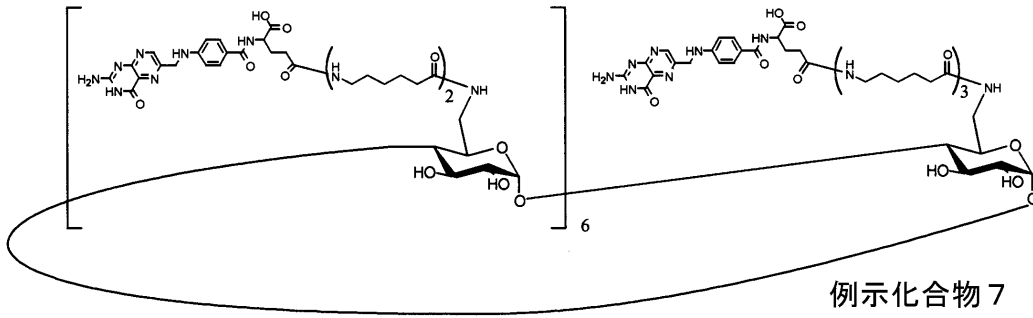
【化 3】



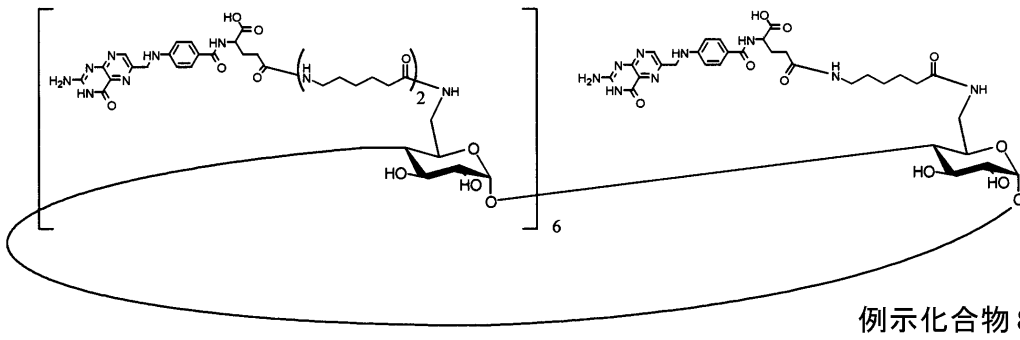
例示化合物 1

【 0 0 1 3 】

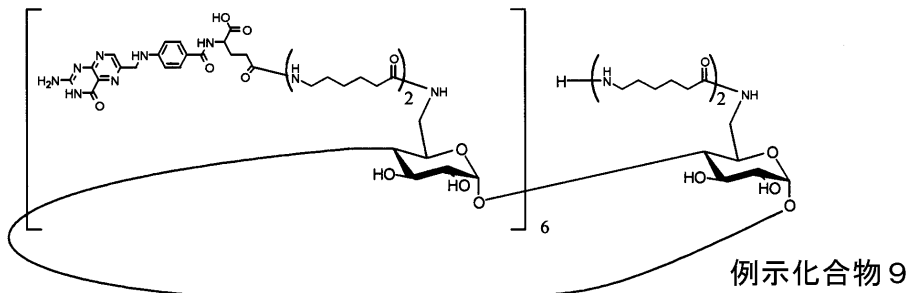
【化 4】



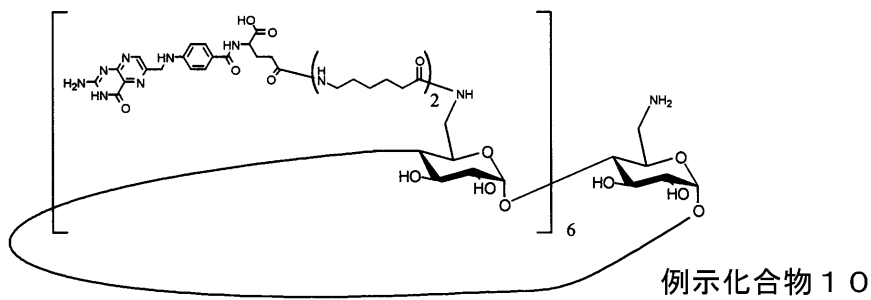
10



20



30



40

(4) シクロデキストリン環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基に、アミノ基又はアミノオリゴカプロン酸アミド基を有するシクロデキストリンと、葉酸とを縮合させることを特徴とする、葉酸修飾シクロデキストリン化合物の製造方法、

(5) 前記(1)~(3)のいずれか1項に記載のシクロデキストリン化合物を含む標的指向性薬物送達剤、

(6) 前記(1)~(3)のいずれか1項に記載のシクロデキストリン化合物と薬物とを含み、前記薬物が前記シクロデキストリン化合物に包接されている標的指向性医薬組成物、及び

(7) 前記(1)~(3)のいずれか1項に記載のシクロデキストリン化合物と薬物とを含み、前記薬物が前記シクロデキストリン化合物に包接されている標的指向性医薬組成物を提供するものである。

10

本発明の上記及び他の特徴及び利点は、適宜添付の図面を参照して、下記の記載からより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、前記例示化合物1等、比較例として、比較化合物1、2、未修飾の - C D、それぞれについての F B P 認識会合を表す S P R 測定結果を示す図である。

【図2】図2は、ヒト結腸がん細胞 C a c o - 2、ラット肝臓正常細胞それぞれに対する例示化合物1の会合性を表す S P R 測定結果を示す図である。

【図3】図3 a は、例示化合物1の C a c o - 2 腫瘍細胞に対する速度論的会合挙動を示す直線プロットである。図3 b は、例示化合物1の制がん薬物 D X R に対する速度論的会合挙動を示す直線プロットである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

まず、本発明のシクロデキストリン化合物について説明する。

本発明のシクロデキストリン化合物は、シクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位の第1級水酸基の2個以上が、それぞれ、葉酸を有する置換基で置換されてなる。

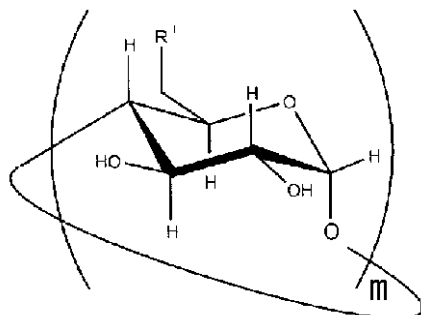
本発明のシクロデキストリン化合物は、下記一般式1で表されることがより好ましい。

【0017】

30

【化5】

一般式1



40

【0018】

一般式1中、mは6~8の整数を表し、R¹は、下記一般式2で表される葉酸を有する置換基、水酸基、グリコシル基を有する置換基又は親水性基を表し、かつ葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも2個である。

mが6の場合、C1OC(CO)C(O)C(O)C1O - シクロデキストリン環が構成され、mが7の場合、C1OC(CO)C(O)C(O)C(O)C1O - シクロデキストリン環が構成され、mが8の場合、C1OC(CO)C(O)C(O)C(O)C(O)C1O - シクロデキストリン環が構成される。mが大きいほど、シクロデキストリン環の空洞径も大きくなる。前記シクロデキストリン環は、巨

50

大分子、タンパクの封入はできず、空洞への薬物包接は疎水的な難溶性ゲスト医薬が好ましい一方、シクロデキストリン化合物はリポソームや高分子ミセル(100 nm)に比し小さく(1~5 nm)細胞表面からの浸透、組織内あるいは脳関門を動きやすい。

mは、後述するように包接すべき薬物の分子サイズを考慮して決められるが、7を表すことが好ましい。前記シクロデキストリン化合物中、葉酸を有する前記置換基の数は、2以上であり、m-1個以上が好ましく、m個が特に好ましい。

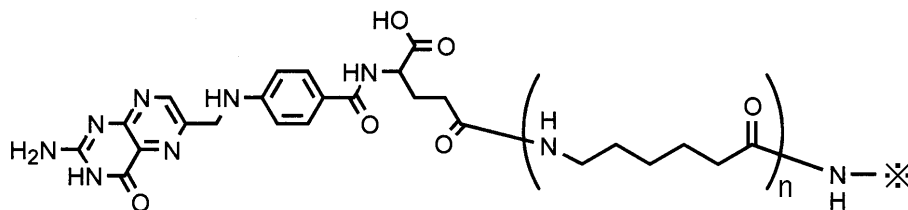
前記シクロデキストリン化合物中の置換された前記水酸基以外の水酸基は、グリコシル基を有する置換基又は親水性基で置換されていてもよい。

前記親水性置換基としては、本発明のシクロデキストリン化合物に親水性を付与する観点から、ヒドロキシ酢酸とエステル化反応して得られるヒドロキシメチルカルボニル基(-O-C(=O)-CH₂-OH)、グルコン酸とエステル化反応して得られるグルコン酸エステル基等が挙げられる。

【0019】

【化6】

一般式2



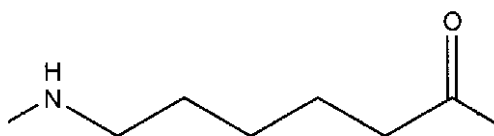
【0020】

一般式2中、 \ast はシクロデキストリンを構成するグルコピラノースの6位炭素原子との結合位置を表す。また、nは0~3の整数を表し、nが0の場合、カルボニル炭素原子とアミノ窒素原子を結ぶ部分は単結合を表す。後述するように、nは1又は2を表すことが好ましく、2を表すことが特に好ましい。

一般式2中、下記式で表される部分は、後述するようにスペーサーアームとしてのアミノカプロン酸に由来する繰り返しユニットである。

【0021】

【化7】



【0022】

よって、本明細書において、以下、単に、前記式で表される部分を「cap」で表すこともある。したがって、前記一般式2は下記のように表すこともできる。

10

20

30

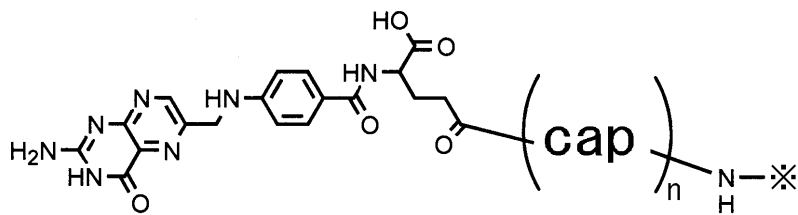
40

50

【 0 0 2 3 】

【 化 8 】

一般式 2



10

【 0 0 2 4 】

前記一般式 2 中の 及び n は前述のとおりである。

本明細書において、 n が 2 の場合、単に cap_2 といい、 n が 1 の場合、単に cap_1 ということもある。

なお、 n が 0 の場合、 cap は式中のカルボニル炭素原子とアミノ窒素原子を結ぶ単結合を表す。

20

このスペーサーアームとしてのアミノカプロン酸に由来する繰り返しユニットは、下記 1) 及び 2) の観点から好ましい。

1) 複数の葉酸と複数の葉酸レセプター (例えば、がん細胞表面) との同時的な会合、いわゆる「ナノクラスター効果」を達成するために適切な長さを提供することができる。

2) ペンタメチレン部分が疎水性であり、イソギンチャク効果により薬物の包接作用を増強することができる。

なお、葉酸レセプターの高次構造について、葉酸を阻害剤とする酵素グリシン N - メルトランスフェラーゼの結晶構造解析から、その 4 量体のサブユニット間に 2 個の葉酸結合サイトを有することが報告されている (例えば、Z. Luka, S. Pakhomov, L. V. Loukachevitch, M. Egli, M. E. Newcomer, C. Wagner, J. Biol. Chem., 282, 4069 - 4075 (2007). 参照。)。したがって、がん細胞での葉酸レセプターも生物学的同源性から、糖クラスター効果と同様な構造が予測され、複数の葉酸が結合サイトとの複数の同時的な相互作用を発揮しているものと考えられる。このような効果は、糖鎖の空間配置とレセプターのトポロジー効果、すなわち糖クラスター効果になぞらえて、「ナノクラスター効果」ということができる。

30

また、複数個のアームを修飾したシクロデキストリンでは、イソギンチャク効果 (K. Hattori, A. Kenmoku, T. Mizuguchi, D. Ikeda, M. Mizuno, T. Inazu, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem., 56, 9 - 16 (2006). 参照。) により薬物の包接が十分に強く、目標の $10^6 M^{-1}$ を十分に超えており、薬物の送達が効率良くなされる。

40

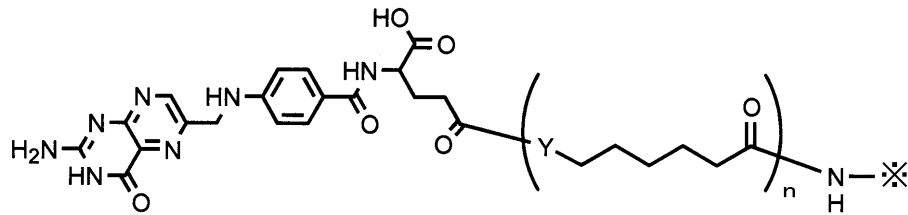
【 0 0 2 5 】

また、本発明の前記一般式 1 で表されるシクロデキストリン化合物において、 R^1 が、下記一般式 3 で表される葉酸を有する置換基であってもよい。葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも 2 個であることは前述の通りである。

【 0 0 2 6 】

【化 9】

一般式 3



【 0 0 2 7 】

10

一般式 3 中、Y は酸素原子又は硫黄原子を表す。及び n は前述のとおりである。

スペーサーアームとしての繰り返しユニットであるアミノカプロン酸の代わりに、Y が酸素原子の場合は 6 - ヒドロキシカプロン酸を用いることにより、Y が硫黄原子の場合はメルカプトカプロン酸を用いることにより製造することができる。

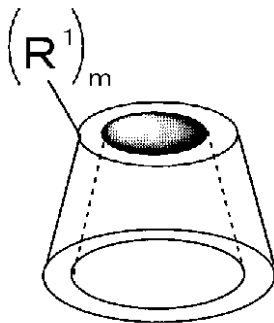
本明細書において、前記一般式 1 で表される本発明のシクロデキストリン化合物は、単に下記一般式 a で表すこともできる。

【 0 0 2 8 】

【化 1 0】

一般式 a

20



30

【 0 0 2 9 】

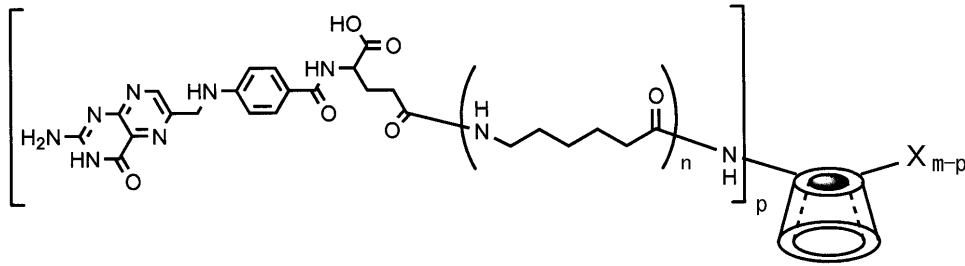
前記一般式 a 中、R¹ 及び m は前述のとおりであり、m 個の R¹ は、各々独立に前記一般式 2 で表される葉酸を有する置換基、水酸基、グリコシル基を有する置換基又は親水性基を表し、かつ葉酸を有する前記置換基が前記シクロデキストリン化合物中少なくとも 2 個である。

本発明のシクロデキストリン (CD) 化合物は下記一般式 b で表される化合物であることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

【化 1 1】

一般式 b



10

【0031】

前記一般式 b 中 m、n は前述のとおりである。p は 2 以上かつ m 以下の数であり、m - p 個の X は、各々独立に水酸基、グリコシル基を有する置換基又は親水性基を表す。

前記グリコシル基を有する置換基は、本発明のシクロデキストリン (CD) 化合物において親水性を付与する。

20

また、前記置換基中のグリコシル基は、特定の標的疾患 (肝臓がん、大腸がん、炎症等) の標的タンパク質によって特異的に認識されるものであることが好ましく、入手の容易性および合成の容易性の点から、好ましくはオリゴ糖 (糖 1 ~ 4 個の糖) ないしは糖鎖であり、より好ましくは単糖、すなわち、標的指向性薬物送達システム (TDDS) の標的疾患 (肝臓がん、大腸がん、炎症等) に合わせて、ガラクトシル基、フコシル基、グルコシル基およびマンノシル基等であることが好ましい。

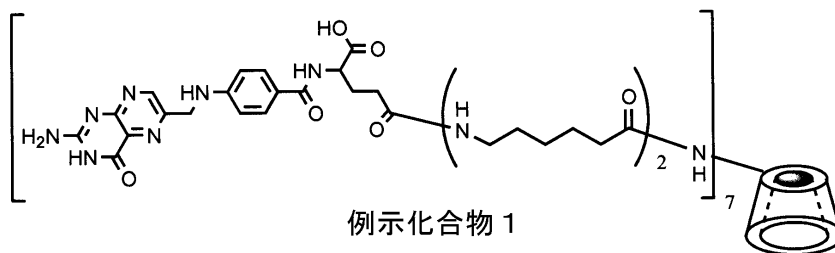
前記グリコシル基を有する置換基としては、1 - グリコシル - オキシプロピルチオエチルアミド基、スペーサーアームとしての前記 cap を有する、1 - グリコシル - オキシプロピルチオエチルアミドヘキサノイルアミド基 (以下、「1 - グリコシル - オキシプロピルチオエチルアミド - cap 1 基」ということもある。)、1 - グリコシル - オキシプロピルチオエチルアミドヘキサノイルアミドヘキサノイルアミド基 (以下、「1 - グリコシル - オキシプロピルチオエチルアミド - cap 2 基」ということもある。) 等が挙げられる。前記置換基中のグリコシル基が、- D - ガラクトシル、- L - フコシル、- D - マンノシル又は - D - グルコシルであることが好ましい。

30

本発明のシクロデキストリン化合物の具体例として下記例示化合物 1 ~ 10 を示すが、本発明はこれらに制限されるものではない。

【0032】

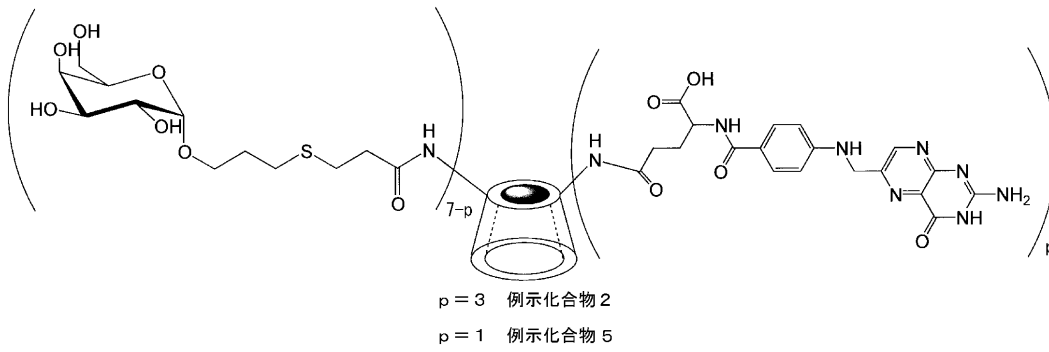
【化 1 2】



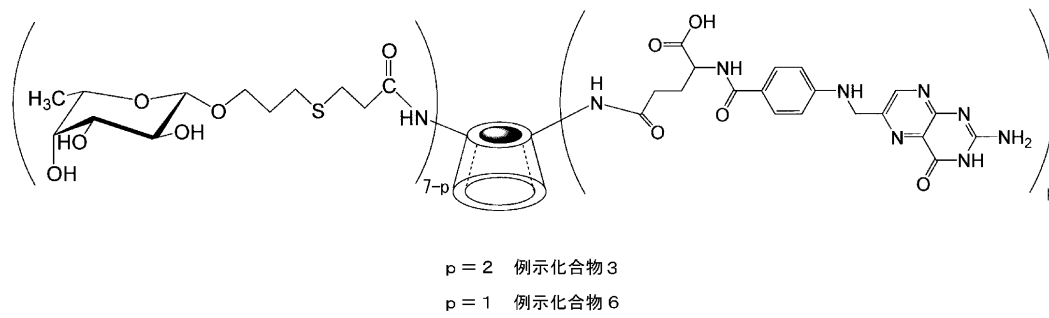
40

50

【 0 0 3 3 】
【 化 1 3 】

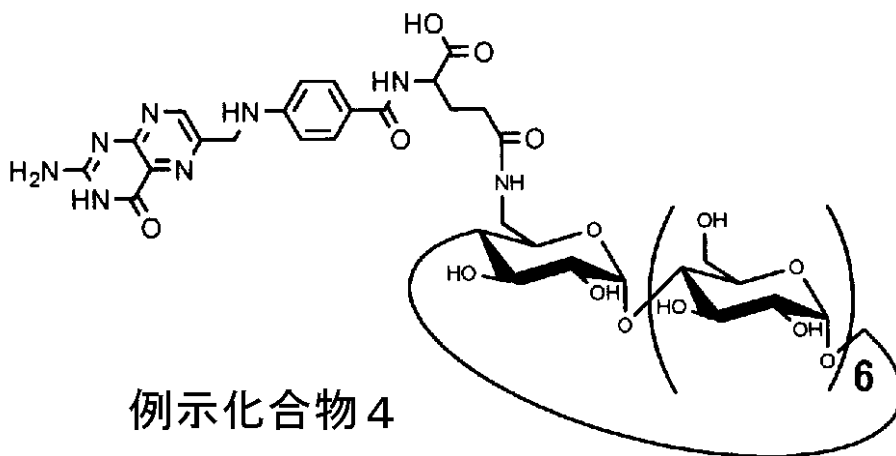


10



20

【 0 0 3 4 】
【 化 1 4 】

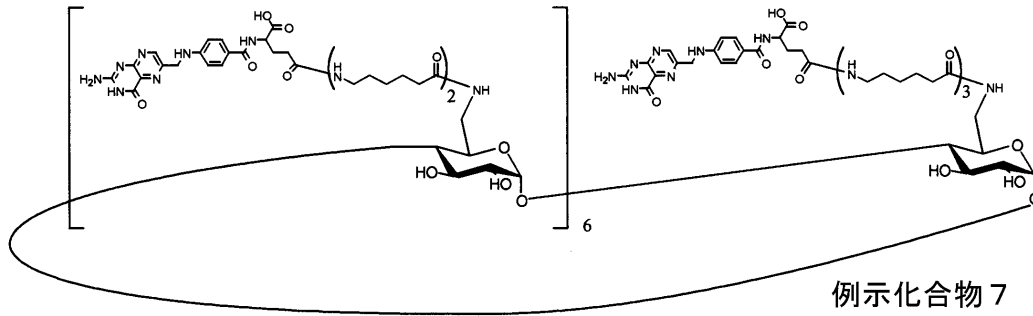


30

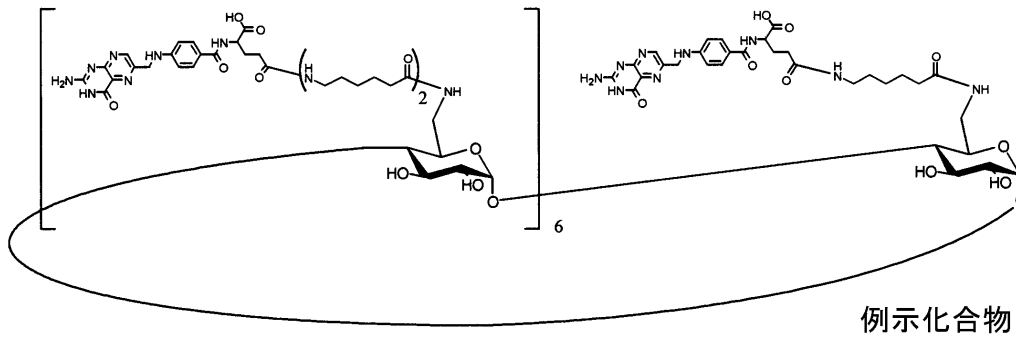
【 0 0 3 5 】

40

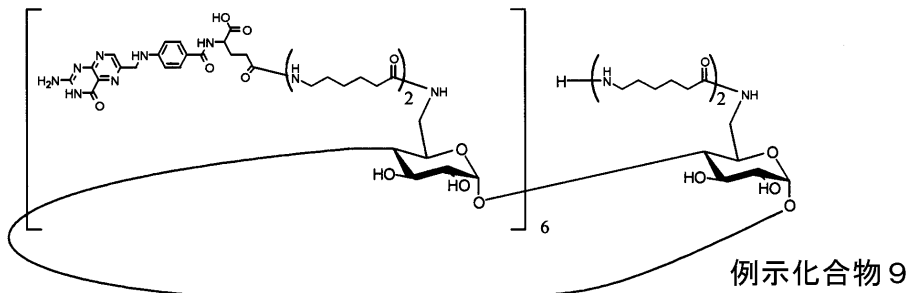
【化 1 5】



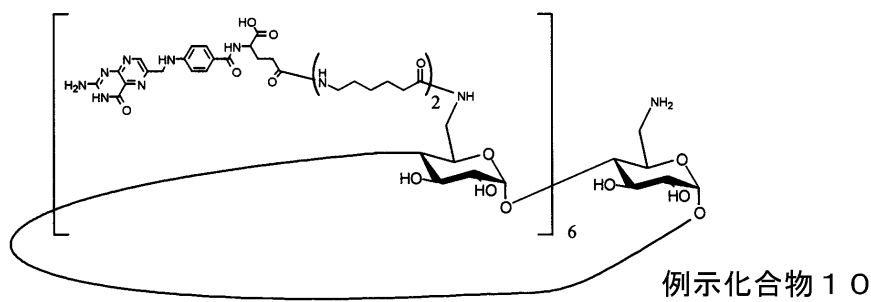
10



20



30



40

【 0 0 3 6 】

50

次に、本発明に原料として用いられるシクロデキストリン(CD)について説明する。

本発明に原料として用いられるCDは、シクロデキストリンの基本骨格を有している限り、特に制限はないが、 α -CD、 β -CDおよび γ -CDが挙げられる。これらのCDは環を構成しているグルコピラノースの数が異なり(α : 6個; β : 7個; γ : 8個)、その数にしたがってその空洞径も異なる(α : 0.45 nm; β : 0.70 nm; γ : 0.85 nm)。たとえば、 α -CDは、ベンゼン環が充分に入る大きさであり、トリクレン、パークレン等を包接することができる。また、 β -CDは、ナフタレン環が入る大きさであり、 γ -CDはアントラセンやナフタレン環2個が入る大きさである。したがって、包接すべき薬物の分子サイズを考慮して最適の空洞径を有するCDを当業者が適宜選択することができる。

10

【0037】

次に、本発明のシクロデキストリン(CD)化合物の製造方法について説明する。

本発明のCD化合物の製造方法は、シクロデキストリン環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基に、アミノ基又はアミノオリゴカブロン酸アミド基を有するシクロデキストリンと、葉酸とを縮合させることを特徴とする。好ましくは、本発明のCD化合物の製造方法は、葉酸と、官能基を有するCD又はCD環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てに、スペーサーアーム(CD環と葉酸の間に適切な距離を持たせるための構造体)を有するCDとを、縮合剤の存在下または非存在下で反応させることを特徴とする。

【0038】

前記製造方法に用いられる前記官能基を有するシクロデキストリン(CD)について説明する。

本発明において、官能基を有するCDは、CD環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てが、官能基で置換されてなることが好ましい。CDへの前記官能基の導入は、当業者における任意の方法によって行うことができる。

CD環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基に官能基を有するCDの官能基は、アミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボキシル基、アジド基、p-トルエンスルホニル基、エポキシド基、不飽和基、チオール基、アセトキシ基、フェノキシ基、およびヨウ素、臭素および塩素のハロゲン基等が挙げられるが、アミノ基が葉酸との確実な反応性を持つのでより好ましい。

20

30

【0039】

具体例として、シクロデキストリン(CD)環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てを、アミノ基で置換したヘプタキス-6-アミノ- α -シクロデキストリン(下記式1)(以下、単に「パーアミノ化CD」ということもある。)は、当業界における任意の方法で、各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てをクロロ化(いわゆるパークロロ化)し、パーアジド化した後にパーアミノ化することにより得られる。

【0040】

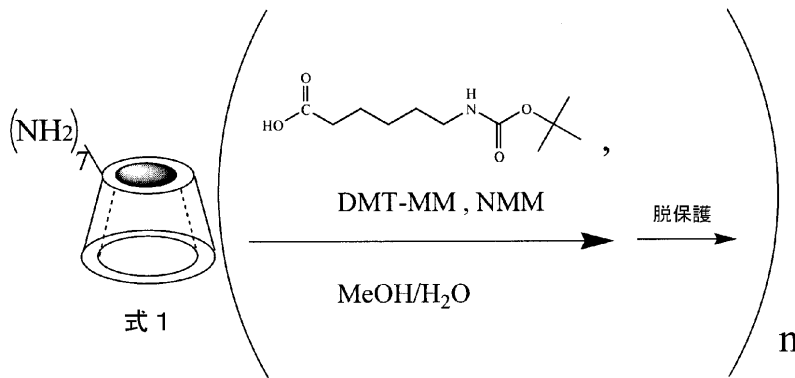
次に、前述のシクロデキストリン(CD)環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てにスペーサーアームを有するCDについて説明する。

前記スペーサーアームを有するCDは、前記CD環を構成する各グルコピラノース分子の6位の第1級水酸基全てに官能基を有するCDに、スペーサーアームとして1又は2以上(好ましくは1又は2)のアミノカブロン酸を縮合反応することにより構築することができる。前記縮合反応は下記スキームのように表される。

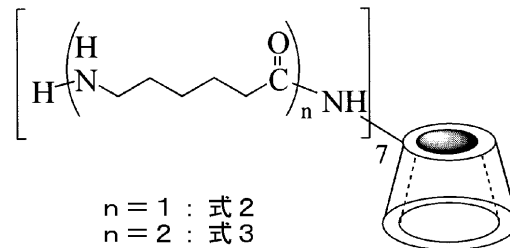
40

【0041】

【化 1 6】



10



20

【 0 0 4 2】

具体的には、メタノール/水の混合溶媒等の反応溶媒中、ヘプタキス - 6 - アミノ - シクロデキストリン (前記式 1) に対し、アミノ基がテトラ - ブチルオキシカルボニル (Boc) 基で保護されたアミノカプロン酸 8 ~ 40 当量を室温 (20) で 2 時間 ~ 150 時間 (好ましくは反応の迅速終了の点で 2 時間 ~ 24 時間) 縮合反応させた後、任意の脱保護 (脱 Boc 化) 反応することが好ましい。縮合剤の選択および反応溶媒の選択は、すべて当業者が適宜行うことができるが、縮合剤としては、後述する 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が好ましく、反応溶媒としては、トリエチルアミン (TEA) あるいは N - メチルモルホリン (NMM) 等の塩基性化合物が存在するメタノール/水の混合溶媒が好ましい。

30

前記縮合反応と脱保護反応とを n 回繰り返すことにより、シクロデキストリン (CD) 環を構成する各グルコピラノース分子の 6 位の第 1 級水酸基全てに、スペーサーアームとしてのアミノカプロン酸を n 個有する CD を構築することができる。後述のように n は 1 又は 2 であることが好ましい。

以下、n = 1 の場合の上記式 2 で表される - CD は、単に「ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 1 - - CD」ということもあり、n = 2 の場合の上記式 3 で表される - CD は、単に「ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - - CD」ということもある。

40

2 以上の葉酸と葉酸結合サイトとの 2 以上の同時的な相互作用を発揮するように、前記スペーサーアームの長さを調節することで、本発明のシクロデキストリン化合物中の葉酸の空間配置を調節することができる。

前記スペーサーアームは、2 以上の葉酸と葉酸結合サイトとの 2 以上の同時的な相互作用を発揮するのに十分な長さおよび構造を有する観点から n は 1 又は 2 であることが好ましい。前記スペーサーアームは、末端に縮合反応のための官能基を有する。

【 0 0 4 3】

本発明の製造方法において、前記パーアミノ化 CD (式 1)、前記ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 1 - - CD (式 2) 又は前記ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - - CD (式 3) と、上記の葉酸とを一緒にして縮合反応により結合させ、目的の CD 化合物を

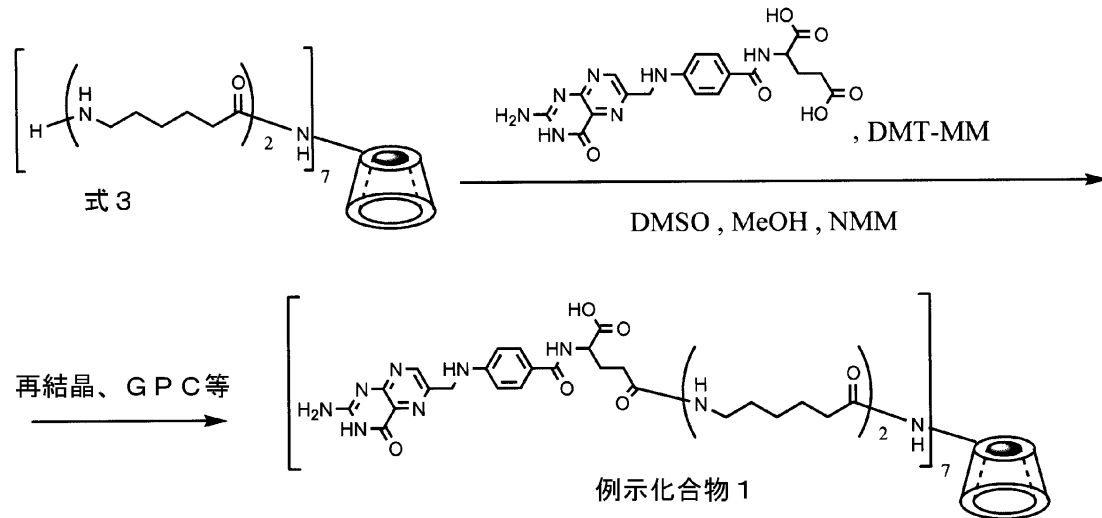
50

製造することができる。

前記縮合反応は、前記ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - - CD (式 3) を例にすると下記スキームのように表される。

【 0 0 4 4 】

【 化 1 7 】



10

20

【 0 0 4 5 】

具体的には、前記パーアミノ化シクロデキストリン (CD) (式 1)、前記ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 1 - - CD (式 2) 又は前記ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - - CD (式 3) に対し、10 ~ 100 当量の葉酸を反応溶媒に溶解し、トリエチルアミン (TEA) あるいは N - メチルモルホリン (NMM) 等の塩基性化合物存在下、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) 等の縮合剤との反応を室温 (30) で 2 時間 ~ 150 時間行うことが好ましく、12 時間 ~ 60 時間行うことがより好ましい。

反応溶媒としては、化合物の溶解性に応じて、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF)、水、メタノール、イソプロピルアルコール、t - ブチルアルコール、N - メチルピロリジノン (NMP) 等を使用することができる。縮合剤の選択および反応溶媒の選択は、すべて当業者が適宜行うことができる。

上記縮合反応において使用しうる縮合剤としては、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 (以下「DMT - MM」という)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (以下「DCC」という)、水溶性カルボジイミド (以下「WSC」という) 等の当業界で任意の縮合剤が挙げられる。当業者は、選択した官能基や反応溶媒の種類に応じて適切な縮合剤を選択することができる。たとえば、上記縮合反応においてシクロデキストリン上の官能基がアミノ基である場合に、葉酸のカルボキシル基と反応させる場合、前記縮合剤 DMT - MM を用いることが効率の点で好ましい。

DMT - MM は、カルボン酸と反応して活性エステルを生成し、その後アミンと反応してアミド結合を生成する。反応もエタノール、メタノール、i - プロパノール、水等の様々な溶媒中で進行し、かつ定量的に反応が進行するという報告があり、注目されている (例えば、M. Kunishima, C. Kawachi, J. Morita, K. Terao, F. Iwasaki, S. Tani, Tetrahedron, 55, 13159 - 13170 (1999) 参照。)。

【 0 0 4 6 】

たとえば、脱塩酸剤として葉酸と等しいモル当量の N - メチルモルホリン (NMM)、あるいはトリエチルアミンを使用し、縮合剤として等倍ないし 5 倍モル当量の DMT - M

30

40

50

Mを使用することができる。

生成物はアセトン再沈処理による未反応物の除去のあと、ゲルろ過クロマトグラフィー（GPC）により生成物を精製・単離することが好ましい。

GPCに用いるゲルは、Bio gel、Sephadex、TOSO-PW gel（いずれも商品名）などが用いられるが、分離精製の観点から、Bio gel（例えば、P4、P6）が好ましい。

溶出溶媒としては、水、アンモニア水等が挙げられ、未反応の葉酸等の夾雑物との分離性の観点から水であることが好ましい。

製造された目的のシクロデキストリン化合物の構造確認は、当業界における任意の方法によって行うことができる。

【0047】

次に、本発明の標的指向性薬物送達剤および標的指向性医薬組成物について説明する。

本発明の標的指向性薬物送達剤は、前記シクロデキストリン化合物を含み、特に、本発明の標的指向性薬物送達剤は、2以上の葉酸によるナノクラスター効果に基づく、前記シクロデキストリン化合物を含む、がん細胞、炎症等に対する標的指向性薬物送達システム（TDDS）用の薬物送達剤である。また、本発明の標的指向性医薬組成物は、前記シクロデキストリン化合物と、薬物とを含む。本発明の標的指向性医薬組成物は、薬物と等しいモル当量のシクロデキストリン化合物を含むことが好ましい。

本発明の標的指向性薬物送達剤および標的指向性医薬組成物は、前記シクロデキストリン化合物のうち1種類を含んでもよく、2種類以上を含んでもよい。シクロデキストリン化合物と薬物とを共存させることで、薬物はシクロデキストリン化合物に内包（包接）されると考えられる。

ここで、標的指向性薬物送達システム（TDDS）とは、薬物の投与形態（剤形、添加剤など）を工夫することで薬物の体内動態を精密に制御することにより、薬物を標的細胞に選択的かつ局所的に送達することをいう。本発明によると、葉酸レセプターを発現する標的細胞または標的組織に、目的の薬物をより選択的に送達することができる。特に、本発明によると、葉酸レセプターを過剰発現する標的細胞または標的組織に、目的の薬物をさらに選択的に送達することができる。本発明を好適に適用できる標的には、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患などの疾患の疾患組織および疾患部位が含まれる。

【0048】

本発明を好適に適用できる癌には、上皮性悪性腫瘍、脊髄由来の造血器悪性腫瘍などが含まれ、特に、卵巣癌（非粘液性卵巣癌など）、子宮癌、子宮内膜癌、乳癌、乳腺癌、前立腺癌、精巣癌（睾丸絨毛上皮癌など）、脳癌（上衣腫など）、咽喉癌、肺癌、肺腺癌、腎臓癌（腎細胞癌など）、肝癌、大腸癌（結腸癌など）、胸膜中皮腫、肉腫、慢性および急性骨髄性白血病、肺転移癌などの各種転移癌などが含まれる。

本発明を好適に適用できる自己免疫疾患および/または炎症性疾患には、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、クレーン病、乾癬、潰瘍性大腸炎、肺線維症、移植片対宿主病などが含まれる。

本発明の標的指向性医薬組成物は、疾患組織および疾患部位において、葉酸を発現する疾患、好ましくは葉酸を過剰発現する疾患の治療に用いることができる。本明細書において、「治療」とは、疾患に罹患するおそれがあるか又は罹患した哺乳動物において、当該疾患を治癒又は改善させることのみならず、当該疾患の病態の進行を阻止又は緩和することも含み、治療的処置のみならず予防的処置をも含む広い意味として使用される。また、本発明を好適に適用できる薬物は、対象とする疾患等に応じて、適宜選択することができる。好ましくは、薬物は制がん剤（抗癌剤、癌転移抑制剤を含む）のほか、タンパク毒素、造影剤、アンチセンスオリゴニュークレオチド、遺伝子などを含む。

本発明の標的指向性医薬組成物は、液剤および固形剤のいずれでもよい。具体的には、標的指向性医薬組成物は、液剤として、注射剤、特に皮下、筋肉内、関節内、静脈内用注射剤とすることができる。液剤とする場合、標的指向性医薬組成物には、薬物およびCD化合物に加えて、必要により任意にpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を加える

10

20

30

40

50

ことができる。また、標的指向性医薬組成物は、固形剤として、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤等の経口用固形剤、又は噴霧剤、坐剤、注射剤、外用剤、点滴剤等の非経口用固形剤とすることができる。固形剤とする場合、標的指向性医薬組成物には、薬物および前記CD化合物に加えて、必要により任意に、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤等を加えることができ、さらに必要により任意に、糖衣、ゼラチン衣その他のコーティングを施すことができる。

【0049】

本発明の標的指向性医薬組成物は、上記疾患に罹患するおそれがあるか又は罹患した哺乳動物（好ましくはヒト）に投与することができる。投与量は、対象の年齢、体重、疾患種類、症状の程度、薬物の種類等により著しく異なるが、通常成人1日当たり約1mg ~ 100mgの薬物を1日1~数回にわけて投与することができる。

10

本発明の標的指向性薬物送達剤は、前記グリコシル基を有する置換基中の前記グリコシル基がガラクトシルであるシクロデキストリン（CD）化合物の場合には、肝実質細胞表面を好適に標的とすることができ、肝癌疾患に対して用いることができる。

また、前記グリコシル基がフコシルであるCD化合物の場合には、大腸表面細胞を好適に標的とすることができ、大腸癌疾患に対して用いることができる。前記グリコシル基を有する置換基中の前記グリコシル基が、マンノシル又はグルコシルであるCD化合物の場合には、マクロファージを介して癌疾患に対して用いることができる。

【0050】

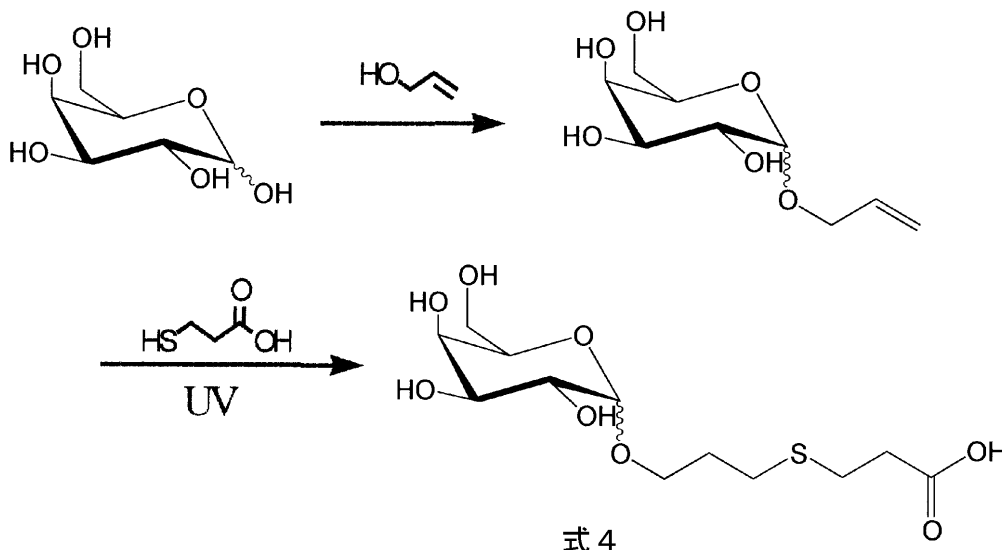
次に、前記グリコシル基を有する置換基の構築について説明する。

20

前記グリコシル基を有する置換基は、グリコシドがガラクトシドの場合を例にすると下記反応スキームのように構築できる。

【0051】

【化18】



30

40

【0052】

前記グリコシル基を有する置換基は、酸触媒存在下、アリルアルコールによる糖ないしは糖鎖のオキシプロペン化、炭素数2~7のメルカプト脂肪酸を用いて光付加反応することにより構築できる。前記メルカプト脂肪酸としては、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプト酪酸等が好ましい。

具体的には、糖ないしは糖鎖をアリルアルコールに溶解し、酸触媒を加えて窒素気流下97で還流してアリルグリコシドが合成できる。得られたアリルグリコシドに、3-メルカプトプロピオン酸等のメルカプト脂肪酸を光付加反応することにより糖アームユニッ

50

トを構築できる。

【0053】

前記アリルグリコシドとメルカプト脂肪酸との反応は、窒素、アルゴン等の不活性気体雰囲気紫外線を照射することで進行する。

照射する紫外線は200nm～400nmの範囲で用いられるが、340～380nmが好ましい。照射時間は1～20時間が用いられるが、3～7時間が好ましい。反応スケール、反応装置に応じて適宜変えられる。反応溶媒はDMF、メタノール、水等が用いられる。

生成物はSephadex G10によるGPCにより精製できる。

【0054】

次に、薬物および標的タンパクとの会合評価について説明する。

CDに包接される薬物としては、制癌医薬品ドキソルビシン(DXR)等が挙げられる。

本発明の標的指向性医薬組成物は、CD空洞部分に包接会合される薬物を標識化合物とすることにより標的指向性の造影剤とすることができる。具体的には、前記包接会合される標識化合物をL [^3H]メチルチロシン(^3H MT)とすることによりポジトロン・エミッション・トモグラフィー(PET)に用いる標的指向性の造影剤とすることができる。

また、前記包接会合される標識化合物を蛍光色素化合物(例えば、フルオレセイン)とすることにより蛍光/内視鏡に用いる標的指向性の造影剤とすることができる。

さらに、前記包接会合される標識化合物をガドリニウム(Gd)化合物(例えば、ガドリニウムキレート芳香族化合物)とすることにより核磁気共鳴映像法(MRI)に用いる標的指向性の造影剤とすることができる。

さらに、前記包接会合される標識化合物をバリウム化合物、又はヨウ素ないしはヨウ素化合物(例えば、1,3,5-トリヨードベンゼン)とすることによりX線コンピュータ断層撮影法(X線CT)に用いる標的指向性の造影剤とすることができる。

【0055】

前記シクロデキストリン(CD)化合物の二重認識能を評価する方法としては、表面プラズモン共鳴法により得られた、前記CD化合物の薬物に対する包接会合定数、及び前記CD化合物の標的タンパク質に対する認識会合定数からなる二次元プロットを用いて行える。

ここで、「二重認識」とは、本発明のCD化合物が、その糖鎖部分によって標的タンパク質に会合する一方、CD空洞部分によって薬物を包接会合することをいう。

標的タンパク質としては、がん細胞表面等に存在するレセプタータンパク質等が挙げられる。

DXR等の薬物、または葉酸レセプタータンパク(FBP)等の標的タンパク質を固定化した表面プラズモン共鳴(SPR)光学バイオセンサーを用いて、各会合定数を求め、二次元プロットすることにより、前記標的指向性薬物送達剤として有望なCD化合物をスクリーニングできる。

前述の二重認識能を評価する方法において、動物実験や臨床実験を経ずして、医薬品および対応する細胞表面のレセプタータンパクとの会合定数を、それぞれ求め、各対数を横軸、縦軸にプロットして二重認識を評価し、右上に上がれば上がるほど、薬剤包接能及び標的タンパク質との会合能いずれにも優れる標的指向性薬物送達システム(TDDS)用の薬物送達剤とすることができる。

【0056】

次に、表面プラズモン共鳴(SPR)光学バイオセンサーの原理について説明する。

SPR光学バイオセンサー(例えば、IAsys)を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)法は、生体高分子の分子間相互作用を測定することができる。

本発明のCD化合物の、標的タンパク質に対する会合測定、及び薬剤包接会合測定はいずれも、SPR法により行うことができる。

10

20

30

40

50

具体的には、リガンド（例えば、葉酸結合タンパク質）をキュベット上に固定化し、緩衝溶液に溶解させたアナライト（例えば、本発明のシクロデキストリン（CD）化合物）を前記キュベットに注入する。そして、プリズムに全反射角以下の入射角でレーザーを入射するとき生じるエバネッセント波と表面プラズモン波が表面プラズモン共鳴（SPR）を起こすときの入射角を測定する。600 nmのエバネッセントフィールド内の質量に応じて、SPRを生じる入射角が変化する。その変化量を観測でき、このときの変化量をレスポンス（R）という。この入射角が会合した分子の質量に比例する。すなわち、これらの質量変化から会合解離相互作用を観測できる。

【0057】

本発明のシクロデキストリン化合物は、それが有するシクロデキストリン空洞部分によって薬物を包接会合することができる一方で、認識タグ基である葉酸の空間的集中配置による前述のナノクラスター効果を発揮し、がん細胞等の標的のレセプター等における葉酸結合サイトとの会合性に優れる。

本発明のシクロデキストリン化合物は、側鎖の長さにもよるが、おおよそ10 nm以下、多くの場合はおおよそ5 nm以下と小さく、細胞膜透過性に優れ、安定なシクロデキストリン環を有する一方、該シクロデキストリン環はグリコシド結合の加水分解による生分解性で、生体内での安全性に優れる。

本発明のシクロデキストリン化合物は、分子内の水酸基を、ガラクトシル基、フコシル基等の各種グリコシル基を有する置換基でさらに置換することによりターゲット臓器/細胞特異性（がん細胞、肝臓、大腸、マクロファージなど）をさらに有することができる。

本発明のシクロデキストリン化合物の製造方法は、前述のような優れた特性を有するシクロデキストリン化合物を煩雑な工程を要することなく製造できる。

本発明の標的指向性薬物送達剤は、糖であるシクロデキストリンで主に構成されており抗原性少なく、ステルス性を有する。ここでステルス性とは -グロブリン抗体による生体防御のための免疫攻撃を受けず、抗原性を発揮しないで生体内を移動することを意味する。

本発明の標的指向性医薬組成物は、前記シクロデキストリン化合物を含むので、制がん薬物のためのがん細胞ターゲティングキャリアあるいは炎症部位ターゲティングキャリア、がん組織の造影剤のターゲティング、遺伝子などのデリバリーなどに用いることができる。具体的には、癌、肝癌、大腸癌等の疾患に対するターゲティングドラッグデリバリーシステム（TDDS、標的指向性薬物送達システム）、がん組織等への標的指向性の造影剤として好適に用いることができる。

【実施例】

【0058】

以下、本発明を実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0059】

参考例1 ヘプタキス-6-アミノ- -CD（前記式1）の製造

（1）ヘプタキス-6-クロロ- -CDの製造

二口フラスコに -シクロデキストリン（CD）3.0274 g入れ、エタノールにて4回共沸させ脱水後、真空乾燥（40）を20時間行った。真空乾燥後、フラスコ内をN₂置換してから取り出し、 -CD 2.75 g（2.42 × 10⁻³ mol）を得た。これに、予めCaH₂で脱水したジメチルホルムアミド（DMF）23 mlを入れて溶解させ、N₂気流下に置いた。さらに、メタンシルホニルクロライド2.9 ml（37 × 10⁻³ mol）を穏やかに滴下した。その後、油浴温度80で4時間30分反応させた。室温まで冷ました後、反応を停止させるためにエタノール5 mlを入れて30分攪拌し、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液約12 mlで中和させて（pH 7~8）、16時間20分攪拌した。

これをエバポレーターにて濃縮乾固し、プフナー漏斗に移してメタノールおよび水により生成物を洗浄した。真空乾燥（40）24時間20分後、収量2.5886 g、収率

10

20

30

40

50

85%を得た。生成物は薄層クロマトグラフィー (TLC) およびレーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) にて確認した。TLCは、展開溶媒1-ブタノール:エタノール:水=5:4:3、呈色試薬アニスアルデヒドを用い、 R_f 値0.83を示した。

【0060】

(2) ヘプタキス-6-アジド- -CDの製造

ナスフラスコ中、ヘプタキス-6-クロロ- -CD 1.2630 g (9.9930×10^{-4} mol) をジメチルアセトアミド (DMAc) : 水 = 60 ml : 8 ml で溶解し、アジ化ナトリウム 1.4232 g (218.9×10^{-4} mol) を加えた。油浴温度 110 で 24 時間反応後、反応溶液が室温に下がるまで 1 時間攪拌した。溶液を約 700 ml の水にピペットを用いて滴下し、生成物を沈殿化させ、不純物である濾液を除去した。濾物は、ブフナー漏斗に移して水により洗浄した。真空乾燥 (40) 13 時間後、収量 1.1562 g、収率 88% を得た。生成物は薄層クロマトグラフィー (TLC) およびレーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) にて確認した。TLCは、展開溶媒1-ブタノール:エタノール:水=5:4:3、呈色試薬アニスアルデヒドを用い、 R_f 値0.77を示した。

10

【0061】

(3) ヘプタキス-6-アミノ- -CD (前記式1) の製造

ナスフラスコ中、ヘプタキス-6-アジド- -CD 1.0015 g (7.6446×10^{-4} mol)、トリフェニルホスフィン 3.1962 g (121.86×10^{-4} mol) を DMAc 73 ml で溶解させ、室温にて 1 時間反応後、25% アンモニア水 30 ml (4000×10^{-4} mol) を加えて 22 時間 30 分攪拌した。反応後、エバポレーターにて濃縮し、エタノール 500 ml を加えて生成物を沈殿化させ不純物である濾液を除去した。濾物は、ブフナー漏斗に移してエタノールにより洗浄した。真空乾燥 (40) 19 時間 50 分後、収量 0.8321 g、収率 96% を得た。生成物は薄層クロマトグラフィー (TLC) およびレーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) にて確認した。TLCは、展開溶媒1-ブタノール:エタノール:水=5:4:3、呈色試薬アニスアルデヒドおよびニンヒドリンを用いた。

20

【0062】

参考例2 ヘプタキス-6-アミノ-cap1- -CD (前記式2) の製造

ヘプタキス-6-アミノ- -CD (前記式1) (1.71 g) ヘアミノカプロン酸を導入するため、アミノ基が Boc 基で保護されたアミノカプロン酸 (10 当量, 3.51 g) を用いて、メタノール/水混合溶媒 (1:1 v/v, 20 ml : 20 ml) 中で Nメチルモルホリン (NMM) (10 当量, 1.67 ml) を加えた後、縮合剤 (DMT-MM) (10 当量, 4.2 g) を一気に加え、室温で 48 時間反応させた。反応後エバポレーターにて濃縮し、純水により生成物を再沈させた。ろ液を除去後、メタノールへ溶解させ、ろ物を乾固してヘプタキス-6-Boc-アミノ-cap1- -CDを得た。

30

ヘプタキス-6-Boc-アミノ-cap1- -CDへ、4M-HCl/ジオキサン溶液約 4 ml を加えて、氷冷下で 3 時間攪拌し、脱 Boc 化を行い、ヘプタキス-6-アミノ-cap1- -CD (前記式2) を得た。収量 2.17 g、収率 74.6% であった。生成物の確認は MALDI-TOF MS を用いた。

40

MALDI-TOF MS: 計算値 1920.55 [M]⁺, 1943.54 [M+Na]⁺, 1959.65 [M+K]⁺; 実測値 m/z 1919.50, 1956.81

【0063】

参考例3 ヘプタキス-6-アミノ-cap2- -CD (前記式3) の製造

前記ヘプタキス-6-アミノ-cap1- -CD (1.0 g) へ更にアミノカプロン酸を導入するためアミノ基が Boc 基で保護されたアミノカプロン酸 (20 当量, 2.4 g) を用いて、メタノール溶媒 (100 ml) 中で NMM (20 当量, 1.15 ml) を加えた後、DMT-MM (20 当量, 2.88 g) を一気に加え、室温で 48 時間反応させ

50

た。反応後エバポレーターにて濃縮し、純水により生成物を再沈させた。ろ液を除去後、メタノールへ溶解させ、ろ物を乾固してヘプタキス - 6 - Boc - アミノ - cap 2 - CDを得た。

ヘプタキス - 6 - Boc - アミノ - cap 2 - CDへ4 M - HCl / ジオキサン溶液約4 mlを加えて、氷冷下で3時間攪拌し、脱Boc化を行い、ヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - CD (前記式3)を得た。収量1.46 g、収率103.4%であった。生成物の確認はMALDI - TOF MSを用いた。

MALDI - TOF MS : 計算値 2712.3 [M]⁺, 2735.29 [M+Na]⁺, 2751.4 [M+K]⁺ ; 実測値 m/z 2711.45, 2732.78, 2748.80

【0064】

実施例1 例示化合物1及び7~10の製造

100 mlの反応容器にヘプタキス - 6 - アミノ - cap 2 - CD (前記式3)を53.3 mg (2×10^{-5} mol)、葉酸276.9 mg (60×10^{-5} mol)を入れ、DMSO 20 mlにて100 で溶解させた。続いて、NMM 66 μ l (60×10^{-5} mol)、DMT-MM (60×10^{-5} mol)、メタノール20 mlを加え、油浴中30、45時間攪拌した。

(a) 反応終了後、アセトン再沈、吸引ろ過後、濾物を1 Mアンモニア水にてナスフラスコに溶かし出し、凍結乾燥した。精製はBio - Gel - P6によるGPCにて行った。GPCカラム条件は以下の通りである。4 cm x 92 cm, 溶出速度0.25 ml / 分, サンプル濃度294 mg / 4 ml (アンモニア水) Bio - Gel - P6処理後、収量55.5 mg、収率49.8%で生成物を得た。

【0065】

前記(a)の分離精製後、生成物のNMR測定の結果、値(ppm)の8.66~8.69、7.61~7.70、6.60~6.71の各々のマルチプレットのシグナルが、例示化合物1の葉酸部分のシグナルと、微量の夾雑物である未反応の葉酸のシグナルとから構成されており、それら各シグナルの積分値から平均した置換度として6.4が算出され、例示化合物1から葉酸が1つ遊離した化合物(葉酸6置換シクロデキストリン化合物)が微量共存していることが分かった。そこで、下記(b)の分離精製工程により例示化合物1を精製・単離した。

(b) 反応終了後、アセトン再沈させ、吸引ろ過後、ロータリーエバポレーターで揮発性成分を留去し乾固した。ろ過物100 mgを水に分散させて、50~60 に加熱し超音波をかけて溶解させた。不溶物をメンブレンフィルター(0.45 μ ポリプロピレンフィルター、ワットマンジャパン社製)でろ過してからBio - Gel - P4ゲル(バイオラド・ラボラトリーズ社製)によるGPCをガラスカラム 4 cm x 60 cmに充填し、2.0 ml / 分流速で17 atm加圧下にて行った。水を溶出液としてフラクションコレクターにより目的化合物のフラクションを集め、エバポレーターで乾固の後、少量の水に溶かして、凍結乾燥し例示化合物1を得た(18.3 mg、収率44.4%)。

また、例示化合物7~10も同時に得られ、それぞれ単離した。

例示化合物1及び7~10の確認はTLC(Rf値0.48; 展開溶媒1 - ブタノール : エタノール : 水 : 25%アンモニア水 = 5 : 4 : 3 : 5, 呈色試薬 : アニスアルデヒド及びヨウ素)、MALDI - TOF MS (M = C₂₅₉H₃₅₀O₇₇N₇₀; [M+H]⁺ : 計算値5676.98、実測値5674.10; [M+Na]⁺ : 計算値5698.96、実測値5697.97; [M+K]⁺ : 計算値5715.07、実測値5716.21)、¹H NMRおよび¹H - ¹H COSYにてNMRピークの帰属を行った。

¹H NMR (500 MHz, DMSO - d₂O) (ppm) : 1.24 (28 H, s) 1.40 (28 H, s) 1.49 (28 H, s) 1.93~1.97 (14 H, m) 2.06 (28 H, s) 2.26~2.28 (14 H, t) 3.03 (28 H, s) 4.20 (7 H, t) 4.53 (14 H, s) 4.86 (7 H, s) 6.

10

20

30

40

50

6.0 ~ 6.71 (14H, m) 7.61 ~ 7.70 (14H, m) 8.66 ~ 8.69 (7H, m)。通常の融点測定装置を用いて測定したところ、188 ~ 189 で分解した。

【0066】

例示化合物7 計算値：5812.12 [M+Na]⁺；実測値：5812.03 [M+Na]⁺

例示化合物8 計算値：5585.81 [M+Na]⁺；実測値：5586.03 [M+Na]⁺

例示化合物9 計算値：5275.58 [M+Na]⁺；実測値：5275.40 [M+Na]⁺

例示化合物10 計算値：5065.37 [M+K]⁺；実測値：5065.27 [M+K]⁺

【0067】

実施例2 例示化合物2及び6の製造

(1) 1-D-ガラクトシル-オキシプロペンの製造

二口フラスコにガラクトース5.0138gを入れ、エタノールにて4回共沸させ脱水後、真空乾燥後、フラスコ内をN₂置換してから取り出し、アリアルアルコール50mlを入れて溶解させ、N₂気流下に置いた。これに、Dowex 50W-X8 1.5091gを酸触媒として加え、加熱し2時間還流した。その後、吸引濾過によりDowex 50W-X8を除き、二口フラスコに移して濃縮乾固した。凍結乾燥後、収量6.22g、粗収率101%で生成物を得た。

【0068】

(2) 1-D-ガラクトシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸(前記式4)の製造

二口フラスコ中、1-D-ガラクトシル-オキシプロペン6.22gをメタノール25mlに溶解しアルゴン気流下においた。その後、3-メルカプトプロピオン酸2.7mlを加え、アルゴン気流を止めて蓋を付け、攪拌しながら紫外線照射を5時間行った。

濃縮乾固、凍結乾燥後、精製はSephadex G 10のGPCにて行った。収量7.06g、収率77%を得た。

計算値：349.35 [M+Na]⁺、365.46 [M+K]⁺；実測値：350.04, 365.97

(3) 例示化合物2及び5の製造

参考例1で製造した前記ヘプタキス-6-アミノ-CD 4.5mgと、葉酸1.8mg(前記ヘプタキス-6-アミノ-CDに対して1当量)をメタノール1.0mlとDMSO 1.0ml(1:1)で溶解し、縮合剤であるDMT-MM(ヘプタキス-6-アミノ-CDに対して1当量)を加え、室温で30分間攪拌し、反応させた。その後、D-ガラクトシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸39.6mg(ヘプタキス-6-アミノ-CDに対して30当量)をメタノール0.5mlで溶解し、縮合剤であるDMT-MM(ヘプタキス-6-アミノ-CDに対して30当量)を加え、室温で13日間攪拌し、反応させた。DMT-MMは合計で34.7mg使用した。

MALDI-TOF MSで生成物を確認後、10倍量のアセトン溶液にパスツールピペットを用いて、少量ずつ加えて行き、生成物と未反応の葉酸を析出させた。これを吸引る過後、析出した物質のうち水に溶ける成分をナスフラスコに流し込み、凍結乾燥し、例示化合物2及び5からなる混合物として収量10.5mg、収率76%で得た。

例示化合物2 (C₁₄₇H₂₀₈O₇₁N₂₈S₄) 計算値：3670.73 [M+K]⁺；実測値：3671.04 [M+K]⁺

例示化合物5 (C₁₃₃H₂₁₄O₇₅N₁₄S₆) 計算値：3440.66 [M+K]⁺；実測値：3432.68 [M+K]⁺

前述のように、上記MSスペクトル等で全く別の分子ピークとして測定され、かつその分子量の差によりGPCで溶出時間が異なることから、例示化合物2及び5は、それぞれ

10

20

30

40

50

Bio-Gel-P4によるGPCにて常法により単離・精製される。

【0069】

実施例3 例示化合物3及び6の製造

(1) 1-L-フコシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸の製造

実施例2において前述した1-D-ガラクトシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸(前記式4)の製造と同様な手順により1-L-フコシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸を製造した。

計算値: 333.35 [M+Na]⁺、349.46 [M+K]⁺; 実測値: 334.09 [M+Na]⁺、350.08 [M+K]⁺

(2) 例示化合物3及び6の製造

次に、100ml容器中に、前記1-L-フコシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸118.8mg (3.82×10^{-4} mol)、葉酸157.5mg (3.56×10^{-4} mol)を入れ、DMSO6mlに溶解し、参考例1で製造した前記ヘプタキス-6-アミノ--CD13.6mg (1.20×10^{-5} mol)、DMT-MM201.3mg、メタノール12mlを入れ、13日間攪拌した。その後、アセトン再沈をし、吸引濾過により1-L-フコシル-オキシプロピルチオエチルカルボン酸、葉酸、DMT-MMを除き、水に溶ける成分をナスフラスコに移して(グラスフィルター内の残りをナスフラスコに移す際は超純水で)濃縮乾固した。例示化合物3及び6からなる混合物として収量11.1mg、収率26.8%であった。

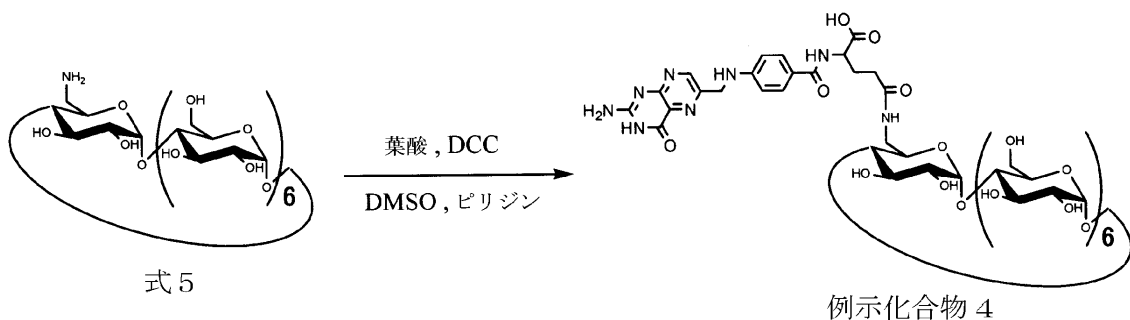
例示化合物3 (C₁₄₀H₂₁₁O₆₈N₂₁S₅) 計算値: 3475.70 [M+K]⁺; 実測値: 3478.85 [M+K]⁺

例示化合物6 (C₁₃₃H₂₁₄O₆₉N₁₄S₆) 計算値: 3344.66 [M+K]⁺; 実測値: 3347.65 [M+K]⁺

前述のように、上記MSスペクトル等で全く別の分子ピークとして測定され、かつその分子量の差によりGPCで溶出時間が異なることから、例示化合物3及び6は、それぞれBio-Gel-P4によるGPCにて常法により単離・精製される。

【0070】

【化19】



【0071】

実施例4 例示化合物4の製造

既知の方法(たとえば、Aoki, R. Arai, K. Hattori, J. Incl usion Phenom., 50, 115-120(2004))で合成したモノ-6-アミノ--CD(式5; 0.17g)、葉酸(0.07g)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC; 0.03g)をDMSO5mL、ピリジン(10μL)に溶解させて室温(24℃)で24時間攪拌した。反応後、エバポレーターにて濃縮し、Sephadex G-10カラム(3cm×20cm)を用いたゲルろ過を行った。分取した溶液をエバポレーターで濃縮乾固し、少量の水に溶かし凍結乾燥を行い、例示化合物4を得た。収量0.11g、収率45%

¹H NMR(500MHz, D₂O) (ppm): 1.80~2.32(4H, m)、4.95~5.00(7H, d)、6.72~6.76(2H, d)、7.53~7.

57 (2H、d)、MALDI-TOF MS ($C_{61}H_{89}O_{39}N_8$) 計算値: 1558.39 [M+H]⁺; 実測値: 1559.13 [M+H]⁺

【0072】

実施例5 例示化合物1等の葉酸結合タンパク質(FBP)に対する会合評価

< FBPの固定化 >

固定化に用いた試薬類は下記のようにして得た。

・ 1 mM BS^3 溶液: ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート (BS^3) 2.9 mg を 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) 5 mL に溶かして得た。

・ FBP 固定化液: FBP 1 mg (SIGMA社製) を 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) 1 mL に溶かして得た。

10

【0073】

前記 I A s y s (表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置) を用いて下記 (1) ~ (8) の操作で FBP を固定化した。

(1) SPR 光学バイオセンサーキュベット表面上のアミノシラン基にレクチンタンパクのアミノ基と反応させるためのリンカー剤として、前記 1 mM BS^3 溶液を注入し予め反応させ、レスポンスが平衡するまで 15 分ほど放置した。

(2) 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) を前記キュベットに注入しレスポンスが安定するまで待った。

(3) 前記 (1)、(2) をレスポンスが変化しにくくなるまで複数回 (例えば、4 回) 繰り返した。

20

(4) 未反応のアミノシラン基を不活性化させ、ブロッキングする為、無水酢酸 酢酸溶液 (混合体積比 1:1) をキュベットに注入した。

(5) 洗浄のため、10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) を注入し、その後 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) を注入して溶媒置換した。

(6) 前記 FBP 固定化液を注入し、反応させ、平衡になるまで放置した。

(7) 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2) を注入して安定するまで待った。

(8) キュベット上のバックグラウンドの影響を考慮し、未反応の BS^3 末端のコハク酸アミドエステル基を不活性化させ、ブロッキングするため、1 M エタノールアミン溶液を注入し 5 分間ほど放置した。

FBP の固定化については、(6) の注入時に測定される FBP のレスポンス (R) の変化量が 1081.4 arc sec であったので、 $R = 600 \text{ arc sec}$ のとき 1 ng/mm^2 で 1 nm^2 あたり 1 本のアミノシラン基が存在しているものとして、 1.80 ng/mm^2 で固定化された。

30

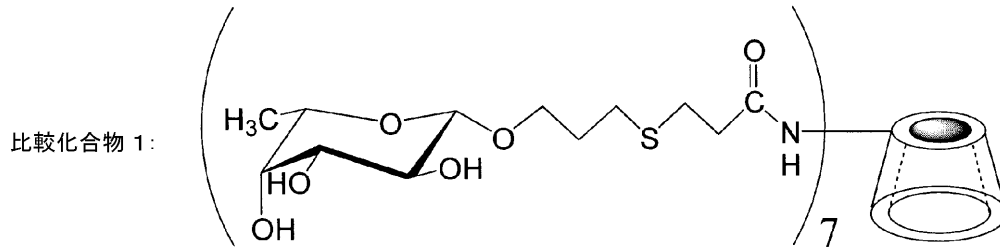
< FBP に対する前記例示化合物 1 等の会合評価 >

FBP を固定化したキュベットに、10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.3; 0.85% NaCl 含有) に溶解した前記例示化合物 1 ($1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) を $200 \mu\text{l}$ 注入したところ、図 1 に示した飽和曲線が得られた (測定温度 25.0)。実施例 2 で得られた例示化合物 2 及び 5 からなる混合物、実施例 3 で得られた例示化合物 3 及び 6 からなる混合物、比較例として、比較化合物 1、2、未修飾の -CD についてもいずれも $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ の濃度で例示化合物 1 と同様な手法により SPR 測定を行い、FBP に対する会合性を評価した。

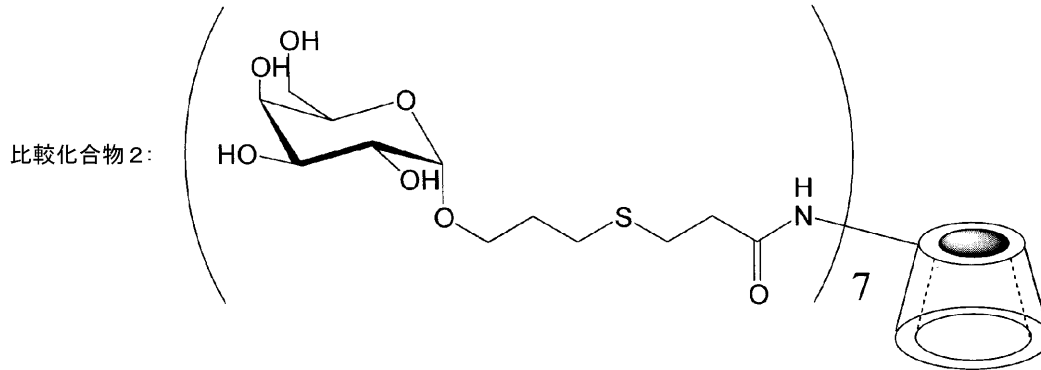
40

【0074】

【化 2 0】



10



20

【 0 0 7 5】

図 1 は、前記例示化合物 1 (図中 1)、例示化合物 2 及び 5 からなる前記混合物 (図中 2)、例示化合物 3 及び 6 からなる前記混合物 (図中 3)、比較例として、比較化合物 1 (図中 4)、比較化合物 2 (図中 5)、未修飾の - C D (図中 6)、それぞれについての F B P 認識会合を表す S P R 測定結果を示す図である。

レスポンスの変化量は、会合した化合物の質量に比例することから、レスポンスが大きいほど会合定数が大きく、優れた会合性があるといえる。

30

図 1 から明らかのように、認識タグ基である葉酸を有しない比較化合物 1、2、未修飾の - C D は、全く会合性を示さなかった。一方、例示化合物 2 及び 5 からなる前記混合物、例示化合物 3 及び 6 からなる前記混合物はいずれも F B P に対して会合性をしめした。さらに、葉酸基を 7 つ有する前記例示化合物 1 は前述のナノクラスター効果に基づき最も強く会合した。会合定数は $5.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。

なお、例示化合物 4 についても同様な S P R 測定を行った結果、葉酸基を 7 つ有する前記例示化合物 1 に比べ弱い会合性を示した。会合定数は概算値として $7.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。

【 0 0 7 6】

実施例 6 例示化合物 1 の C a c o - 2 腫瘍細胞及びラット肝臓正常細胞に対する会合比較評価

40

例示化合物 1 について、上述と同様な手法によりヒト結腸がん由来細胞である C a c o - 2 細胞及び比較標的細胞としてラット肝臓正常細胞に対する S P R 測定を行い、認識相互作用を比較評価した。

試験 6 - 1 . C a c o - 2 腫瘍細胞に対する S P R 測定

F B P 固定化液の代わりに C a c o - 2 細胞固定液として C a c o - 2 細胞の適量濃度液 (リン酸緩衝溶液 (p H 7 . 3) + 0 . 8 5 % N a C l) (C O R N I N G 社製) を用いた以外は、実施例 1 0 の < F B P の固定化 > と同様な手順により C a c o - 2 細胞の固定化を行った。さらに、C a c o - 2 細胞を固定化したキュベットに、リン酸緩衝溶液 (p H 7 . 3) + 0 . 8 5 % N a C l に溶解した前記例示化合物 1 ($1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$

50

)を200 μ l注入し、SPR測定を行った。

試験6-2. ラット肝臓正常細胞に対するSPR測定

F B P 固定化液の代わりにラット肝臓正常細胞固定液としてラット肝臓正常細胞の適量濃度液(生理食塩水)(コスモバイオ(RKL)社製)を用いた以外は、実施例5の<F B Pの固定化>と同様な手順によりラット肝臓正常細胞の固定化を行った。さらに、ラット肝臓正常細胞を固定化したキュベットに、生理食塩水(1mM CaCl₂ NaCl含有)に溶解した前記例示化合物1(1.0 \times 10⁻¹⁰M)を200 μ l注入し、SPR測定を行った。

【0077】

図2に試験6-1及び6-2で得られた結果を示す。図2は、Caco-2腫瘍細胞(図中7)、ラット肝臓正常細胞(図中8)それぞれに対する例示化合物1の会合性を表すSPR測定結果を示す図である。

上述のように、レスポンスが大きいほど会合定数が大きく、優れた会合性があるといえるから、図2から明らかなように、例示化合物1は、ラット肝臓正常細胞にはほとんど会合しないのに対し、Caco-2腫瘍細胞と強力に会合していることが分かり、がん細胞に対し特異的に認識会合するといえる。

【0078】

実施例7 例示化合物1のCaco-2腫瘍細胞及び制がん薬物DXRに対する会合評価
ヒト結腸がん由来細胞であるCaco-2細胞を用いて、認識相互作用を評価した。

試験7-1. Caco-2腫瘍細胞に対する認識会合測定

F B P 固定化液の代わりにCaco-2腫瘍細胞固定液としてCaco-2細胞を適量の濃度にて(リン酸緩衝溶液(pH7.3)+0.85%NaCl)を用いた以外は、実施例5の<F B Pの固定化>と同様な手順によりCaco-2腫瘍細胞の固定化を行い、さらに、直線プロット法によりF B Pに対する会合定数を求めるため、複数の濃度に変化させた前記例示化合物1を含む溶液を、Caco-2腫瘍細胞を固定化したキュベットに注入して、SPR測定を行った。

【0079】

図3aは、Caco-2腫瘍細胞に対する速度論的会合挙動を示す直線プロットである。

図3aから明らかなように、Caco-2腫瘍細胞との会合測定の結果、例示化合物1の会合定数は5.1 \times 10⁹M⁻¹であった。

特異的反応の典型例である抗原抗体反応の会合定数は、10¹⁰M⁻¹前後であるが、例示化合物1がCaco-2細胞に対してそれに匹敵するほどの会合定数を有する結果となったことから、例示化合物1はがん細胞に対し十分に特異的に認識会合するといえる。また、この会合能の強さは、前述のナノクラスター効果によるものといえる。

【0080】

試験7-2. 薬物DXRの包接能の測定

薬物として制癌抗生物質であるドキソルビシン(Doxorubicin;以下「DXR」という。)を用い、試験例1と同様の方法で本発明のCD化合物の包接能を評価した。

1)DXRの固定化

DXRの光学バイオセンサーキュベット表面への固定化は、薬物を溶解させる緩衝溶液としてpHの異なるものを用いたことを除き、上述したF B Pの固定化と同様の操作方法で行った。

キュベット表面のアミノシラン基にDXRのアミノ基と反応させるためのリンカー剤として、1mM BS³溶液/10mMリン酸緩衝溶液、pH6.5を反応させた。これを、光学バイオセンサーのレスポンスが変化しなくなるまで数回繰り返し、無水酢酸-酢酸溶液(混合体積比1:1)を加えることで未反応のアミノシラン基を不活性化させ、ブロッキングした。

ブロッキング後、pH5.3の10mM-酢酸緩衝溶液に置換し、DXR溶液(2mg

10

20

30

40

50

DXR / 10 mM - 酢酸緩衝溶液、pH 5.3) を加え、反応させた。その後、キュベット上のバックグラウンドの影響を考慮し、1 M エタノールアミン水溶液、pH 8.5 でコハク酸アミドエステル基のブロックングを行った。

【0081】

DXRの固定化については、DXRのレスポンスの変化量が186.1 arc secであったので、 $R = 600 \text{ arc sec}$ のとき 1 ng/mm^2 で 1 nm^2 あたり1本のアミノシラン基が存在しているものとして、 0.31 ng/mm^2 で固定化された。

2) 測定

上記で作製したDXR固定化キュベットを用い、試験1と同様にして前記例示化合物1とDXRとの速度論的会合挙動を測定した。図2bに得られた結果を示す。図2bは、DXRに対する速度論的会合挙動を示す直線プロットである。

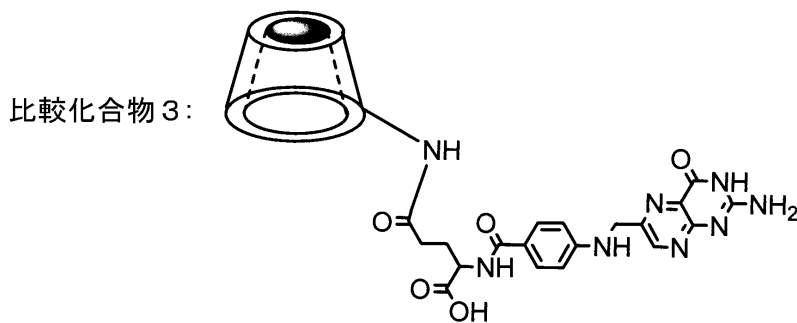
図3bに示した直線プロットから明らかなように、例示化合物1のDXRに対する包接会合定数は $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。シクロデキストリンの包接作用としては、会合定数として 10^6 M^{-1} 以上あれば、薬物送達剤として十分に強く包接できることが知られているが、それを上回る会合定数が得られた。これは葉酸部分が疎水性であるために、DXRを包接したときに、イソギンチャク効果 (K. Hattori, A. Kenmoku, T. Mizuguchi, D. Ikeda, M. Mizuno, T. Inazu, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chemistry, 56, 9-16 (2006) 参照。) が強く作用したためと考えられる。

なお、例示化合物4についても例示化合物1と同様な手法により制がん医薬DXRに対する会合定数を測定したところ、前記例示化合物4のDXRに対する会合定数は、葉酸基を7つ有する前記例示化合物1に比べ弱く、 $1.72 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。

シクロデキストリンを構成するグルコピラノースのうちの1つの3位の水酸基が、葉酸で置換された下記比較化合物3についてもCaco-2腫瘍細胞及びDXRに対する会合試験を行った。例示化合物1及び4の結果とともに下記表1に示す。

【0082】

【化21】



【0083】

【表1】

化合物	レセプター	会合定数 K_a (M^{-1})	薬物	会合定数 K_a (M^{-1})
例示化合物1	Caco-2	5.1×10^9	DXR	3.5×10^7
例示化合物4	FBP	7.8×10^5 (概算値)	DXR	1.7×10^5
比較化合物3	Caco-2	1.8×10^4	DXR	2.5×10^3

【0084】

表1に示した結果から明らかなように、葉酸基を7つ有する例示化合物1は前述のナノ

クラスター効果により葉酸基を1つしか有さない例示化合物4や比較化合物3に対しおよそ 10^4 倍のレセプター会合能を示した。一方、葉酸基を7つ有する例示化合物1は前述のイソギンチャク効果により葉酸基を1つしか有さない例示化合物4や比較化合物3に対し 10^2 倍以上のDXR包接能を示した。

以上の結果より本発明のシクロデキストリン化合物は、がん細胞及び薬物に対して優れた二重認識能を有することから、がん細胞に対するターゲティング ドラッグ デリバリー システム (TDDS) の送達剤として応用できることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明のシクロデキストリン化合物は、制がん薬物のためのがん細胞ターゲティングキャリアあるいは炎症部位ターゲティングキャリア、がん組織の造影剤のターゲティング、遺伝子などのデリバリーに用いることができる。

10

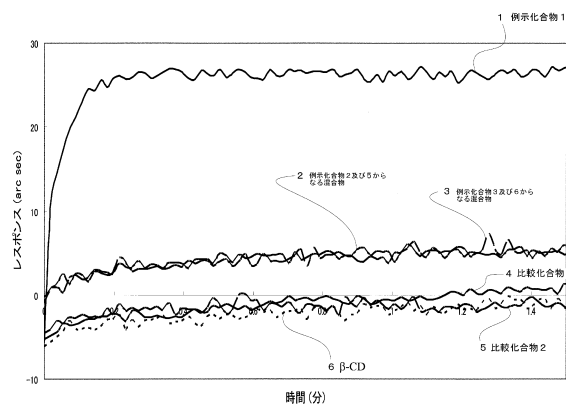
本発明の標的指向性薬物送達剤及び標的指向性医薬組成物は、癌、肝癌、大腸癌等の疾患に対するターゲティングドラッグデリバリーシステム (TDDS、標的指向性薬物送達システム) に好適に用いることができ、癌、肝癌、大腸癌等の疾患に対する標的指向性の造影剤として好適に用いることができる。

本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであるとする。

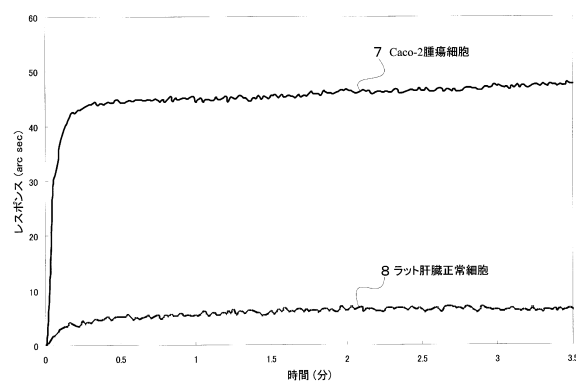
20

本願は、2007年9月28日に日本国で特許出願された特願2007-256527に基づく優先権を主張するものであり、これはここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

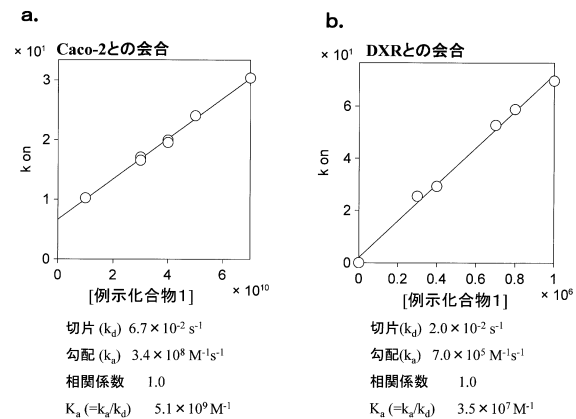
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2002-519482(JP,A)

Caliceti, P. et. al., Synthesis and Physicochemical Characterization of Folate-Cyclodextrin Bioconjugate for Active Drug D, Bioconjugate Chem., 2003年, Vol.14, No.5, 899-908

Journal of Drug Targeting, Vol.15, No.6, p.379-390 (2007)., July 2007

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 37/16

CAPLUS/REGISTRY(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

JCHEM(JDREAMIII)

JSTCHINA(JDREAMIII)