

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年3月17日 (17.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/023906 A1

- (51) 国際特許分類: C08G 85/00, 63/91, C08B 37/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/013026
- (22) 国際出願日: 2004年9月8日 (08.09.2004)
- (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2003-315387 2003年9月8日 (08.09.2003) JP
  - 特願2003-407681 2003年12月5日 (05.12.2003) JP
  - 特願2004-259157 2004年9月7日 (07.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平倉 泰 (HIRAKURA, Tai) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 中村 輝郎 (NAKAMURA, Teruo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 下房地 剛 (SHIMOBOJI, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, ICHIO et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

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

(54) Title: HYALURONIC ACID MODIFICATION PRODUCT AND DRUG CARRIER THEREFROM

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸修飾物、及びそれを用いた薬物担体

(57) Abstract: A drug carrier having solved the problems of conventional drug carriers wherein a low molecular drug can be efficiently sealed, which drug carrier realizes long-term control of sustained-release period and control of in-blood retention, excelling in dispersion in aqueous solutions and poses no problem with respect to safety; and a drug carrier excelling in biocompatibility composed of injectable microparticles whose interparticulate agglomeration tendency is low. Such a drug carrier wherein a low molecular drug can be efficiently sealed, which drug carrier realizes long-term control of sustained-release period and control of in-blood retention, excelling in dispersion in aqueous solutions and poses no problem with respect to safety can be provided by the use of a hyaluronic acid modification product comprising hyaluronic acid or its derivative and, bonded therewith, a polymer selected from among polylactic acid, polyglycolic acid and lactic acid/glycolic acid copolymer. Further, the above drug carrier excelling in biocompatibility composed of injectable microparticles whose interparticulate agglomeration tendency is low can also be provided by the use of the hyaluronic acid modification product.

(57) 要約: 従来の薬物担体の問題点を解消した、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、血中滞留性が制御でき、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体を提供すること。また、粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体を提供すること。本発明の、ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物により、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、血中滞留性が制御でき、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体を提供される。また、本発明のヒアルロン酸修飾物により、粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体も提供される。

WO 2005/023906 A1

## 明 細 書

ヒアルロン酸修飾物、及びそれを用いた薬物担体

技術分野

[0001] 本発明は、新規なヒアルロン酸修飾物、それを用いた薬物担体に関する。

背景技術

[0002] 薬物の徐放、ターゲッティング、血中滞留性延長(ステルス効果)等、薬物の体内動態制御を目的として様々な高分子の利用が検討されている。これらの中で、体内で分解する生分解性高分子は、体内に導入後に取り除く必要が無いため、多く用いられている。実用化された生分解性高分子として良く知られたものに、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を始めとしたこれらの共重合体等がある。これらは共重合比、分子量等で分解速度を制御でき、疎水性薬物の担体に適したものであるが、インジェクタブル(injectable)な微粒子(マイクロスフィアまたはナノスフィアなど)にした際に、疎水性であるため水溶液中で凝集しやすく、投与液中での、あるいは、投与後の体内での分散性に問題がある。また、皮下で炎症、組織の黒変化を起こすなど、生体適合性の問題もある。

[0003] 変形性関節症、慢性関節リウマチ等の関節疾患においては、滑膜炎の発生が伴い、これが痛みの原因になっていることが多い。このため、ステロイドや非ステロイド系抗炎症剤等の薬物を経口、あるいは関節腔内に直接注入する治療方法も試みられているが、関節腔内のクリアランスは早く(非特許文献1および非特許文献2を参照)、1回の投与で有効薬効濃度を持続させ、炎症を長期間抑制することは難しい。そこで、抗炎症剤等の薬物を基材に封入することで徐放する試みが種々報告されている。例えば、リポソーム(非特許文献3および非特許文献4を参照。)、アルブミンマイクロスフィア(非特許文献5を参照。)、ゼラチン/コンドロイチン硫酸マイクロスフィア(非特許文献6を参照)、乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)マイクロスフィア(非特許文献7を参照)に関しての報告がなされている。

[0004] しかしながら、こうした基材そのものに起因する痛み(Crystal-Induced Pain)が引き起こされることも知られている(非特許文献8を参照)。この痛みの原因は分かっ

ていないが、マイクロスフィアのサイズ、生体適合性が関係していると思われる。サイズを小さくしたPLGAナノスフィアを用いた報告もある(非特許文献9を参照。)が、生体適合性の問題は解決されていない。

- [0005] 多糖類、コラーゲン、ゼラチン等の生体由来の高分子を用いた薬物担体も数多く報告されているが、親水性素材であるため疎水性薬物の担持には適さず、封入効率、徐放期間の点でPLA、PGA、PCL、PLGA等には劣る。例えば、デキストランとPLAとを結合させた化合物を用いたナノスフィアの報告もある(非特許文献10および非特許文献11を参照)が、PLAはデキストランとエステル結合しているため、体内での結合部の加水分解は早く(1日程度)、また、デキストランベースの素材であることから、薬物のターゲティング、徐放の目的には適さない。
- [0006] 一方、ヒアルロン酸(HA)は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された生体材料(多糖)であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。HAは、D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)グリコシド結合により連結された二糖単位から成るグルコサミドグリカンの一種である。HAは、その化学的、物理的構造に種差が無く、ヒトも代謝系を持っており、免疫性、毒性といった面でも最も安全な生体材料(Biomaterial)である。例えば、HAは関節液の主成分の1つであり、その粘弾性効果や炎症抑制効果により関節において鎮痛効果を発揮する。実際に、HAを主成分とした薬物が、変形性関節症、慢性関節リウマチ等の関節症治療薬として既に上市され用いられている(例えば、スベニール(商品名):製造販売 中外製薬株式会社)。
- [0007] HAもしくはその誘導体からなるハイドロゲル、マイクロスフィア等を薬物徐放に適用した報告も数多くある(例えば、非特許文献12、非特許文献13、特許文献1、特許文献2、特許文献3および特許文献4を参照)が、薬物放出期間は長くても数日以下であり、未だ実用化の域には至っていない。
- [0008] HAと生分解性高分子を組み合わせたHA修飾物としては、HAにPLGAをコートしたフィルム(特許文献5を参照)、PLGAマイクロスフィアとHAを混合した注射剤(特許文献6を参照)、PLGAマイクロスフィアをHAハイドロゲル中に分散させたタンパク質徐放製剤(特許文献7を参照)、カチオン性界面活性剤を用いたポリカプロラク

トン(PCL)の静電相互作用によるHAコートナノスフィア、HAをポリL-リジン側鎖に結合させたHA-PLL(非特許文献14を参照)等のバイオマテリアル、薬物徐放製剤も報告されている。

[0009] また、多糖と、PLA、PGA、PCL、PLGA等の生分解性ポリマーとをグラフト結合させた多糖誘導体、およびこの多糖誘導体を用いた微粒子も報告されており、この中で多糖としてHAを用いた例も開示されている(特許文献8を参照)が、具体的にはHAにPCLがエステル結合したものを合成したことが示されているのみであり、得られたHA誘導体の機能については何ら示されていない。

[0010] 以上のとおり、安全性、生分解性、体内安定性の全てに優れる、HAとPLA、PGAまたはPLGAとをグラフト結合したHA修飾物は具体的には知られておらず、その調製方法も知られていなかった。また、従来の薬物担体には、薬物(特に低分子薬物)の封入効率、その徐放期間、水溶液中での分散性、血中滞留性期間、或いは安全性(生体内で炎症が起きる等)に問題があった。更に、粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体も知られていなかった。

特許文献1:国際公開公報WO98/43664

特許文献2:国際公開公報WO00/78356

特許文献3:特表平11-513047号公報

特許文献4:特表平2003-525232号公報

特許文献5:特開平8-208706号公報

特許文献6:国際公開公報WO01/28591

特許文献7:国際公開公報WO97/13502

特許文献8:国際公開公報WO01/88019

非特許文献1: Eur. J. Clin. PHarmacol. 42, 301-305(1992)

非特許文献2: Clin. PHarmacol. Ther. 39, 313-317(1986)

非特許文献3: Biochem. J. 158, 473-476(1976)

非特許文献4: J. PHarm. PHarmaco. 45, 576-578(1993)

非特許文献5: Int. J. PHarmacol. 39, 129-136(1987)

非特許文献6: Arthritis Rheum. 41, 21. 85-2195(1998)

非特許文献7: Int. J. PHArm. 195, 179–188 (2000)

非特許文献8: J. Joint Surgery 11, 87–95 (1992)

非特許文献9: PHArm. Res. 19, 403–410 (2002)

非特許文献10: J. Biomed. Mater. Res. 50, 557–565 (2000)

非特許文献11: PHArm. Res. 20, 1284–1292 (2003)

非特許文献12: Drug Dev. Ind. PHArm. 25(1), 15–20 (1999)

非特許文献13: Intern. J. PHArm. 87, 21–29 (1992)

非特許文献14: Bioconj. Chem. 9, 476–481 (1998)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0011] 解決しようとする課題は、従来の薬物担体の問題点を解消した、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、血中滞留性の制御が可能であり、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体を提供することにある。また、同様に従来の薬物担体の問題点を解消した、粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体を提供することにもある。

### 課題を解決するための手段

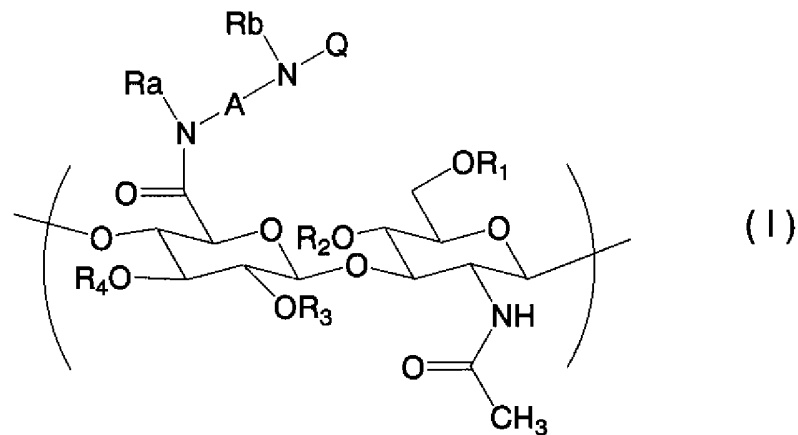
- [0012] 本発明者は、かかる課題を解決する為に鋭意研究を進めたところ、ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物が、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体となることを見出し、また、該ヒアルロン酸修飾物が粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子を形成し、生体適合性に優れた薬物担体となることを見出し、本発明を完成させた。
- [0013] すなわち、本発明の1つの側面によれば、ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物が提供される。本発明の1つの実施態様において、前記ポリマーは、ヒアルロン酸またはその誘導体の側鎖としてグラフト結合していてもよい。また別の実施態様において、前記ポリマーの大部分またはすべてが、そ

の片末端のみでヒアルロン酸またはその誘導体に結合していてもよい。また本発明の別の実施態様において、前記ポリマーは、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基に結合していてもよい。またさらに別の実施態様において、前記ポリマーは、スペーサーを介して、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基にアミド結合で結合していてもよい。

[0014] また、前記ポリマーは、スペーサーを介して、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基にアミド結合で結合していてもよい。

[0015] 本発明の他の側面によれば、式(I)：

[0016] [化1]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基および  $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基から選択され、

$R_a$  および  $R_b$  は、それぞれ独立に、水素原子および  $C_{1-6}$  アルキル基から選択され、

$Q$  は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーであり、該ポリマーは末端のカルボキシル基で窒素原子とアミド結合を形成しており、

$A$  は、単結合、 $-(CH_2)_m-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(O-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-$  または  $-\text{NHCO}-(C_2H_5)_n-\text{CONH}-$  であり、

$m$  は 1-10 の整数であり、 $n$  は 0-10 の整数である)

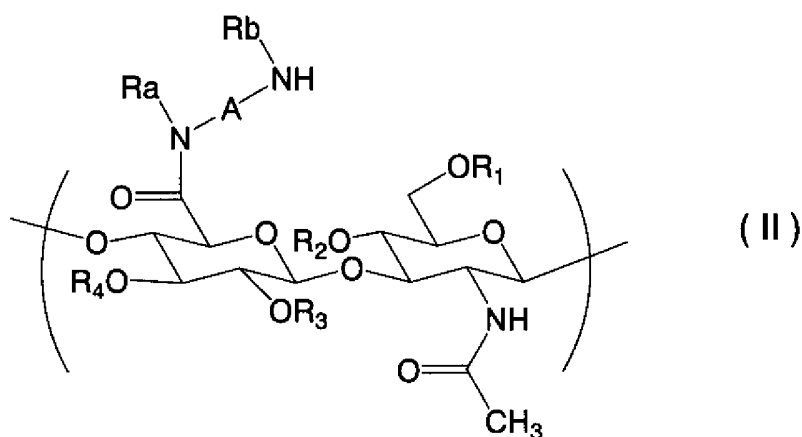
で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも 1 以上含む、ヒアルロン酸修飾物が提

供される。ここで、 $C_{1-6}$  アルキル基とは、炭素数1〜6の直鎖または分枝鎖アルキル基のことであり、具体的にはメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシルなどを含む。 $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基とは、前記 $C_{1-6}$  アルキル基を分子内に有するアルキルカルボニル基であり、具体的にはアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基などが含まれる。本発明の一つの実施態様において、 $R_a$ および $R_b$ は共に水素原子であり、 $A$ は $-(CH_2)_m-$ 、 $-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_n-$ または $-NHCO-(CH_2)_n-CONH-$ である。

[0017] 本発明の別の側面によれば、前記スペーサーが独立に置換されていてもよい2以上のアミノ基を有し、前記ポリマーの末端のカルボキシル基が前記スペーサーの1つのアミノ基とアミド結合を形成し、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基が前記スペーサーの別のアミノ基とアミド結合で結合している、ヒアルロン酸修飾物が提供される。ここでアミノ基の置換基としては、特に限定されないが、 $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルコキシアルキル基、 $C_{1-6}$  ハロアルキル基、 $C_{3-8}$  シクロアルキル基などが挙げられる。

[0018] 本発明の別の側面によれば、前記ヒアルロン酸誘導体が、式(II)：

[0019] [化2]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_a$ 、 $R_b$ および $A$ は、既に定義した通りである)

で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含む、上記のヒアルロン酸修飾

物が提供される。

[0020] 本発明の別の側面によれば、前記ヒアルロン酸誘導体および／またはヒアルロン酸修飾物自体が、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有し、例えば哺乳動物において18時間以上の平均血中滞留時間を有するヒアルロン酸誘導体が提供される。

[0021] 本発明のさらに別の側面によれば、前記ヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体もまた提供される。ここで、当該薬物担体の形状は、例えばマイクロスフィアまたはナノスフィアなどの微粒子状であってもよい。また、当該薬物担体は、水溶液中で、前記ポリマーがヒアルロン酸またはその誘導体に被覆されている構造を有しうる。また粒子径は特に限定されないが、ニードルを詰まらせずに通過できるようにするために200  $\mu$  m以下であることが好ましく、100  $\mu$  m以下であることが更に好ましい。また、関節投与の場合は、物理的に関節内でフリクションを起こし安く、これが新たな炎症を誘発するため、粒子径が5  $\mu$  m以下であることが好ましい。また、静脈注射投与の場合は、末梢血管を閉塞させないために粒子径が500nm以下であることが好ましく、200nm以下であることが更に好ましい。1つの実施態様において、当該薬物担体は、HAレセプターへのターゲティング能；ヒアルロニダーゼに対する耐性；および粘膜付着性などの特性を有しうる。また、当該薬物担体は、局所刺激性が低減された薬物担体ともなりうる。

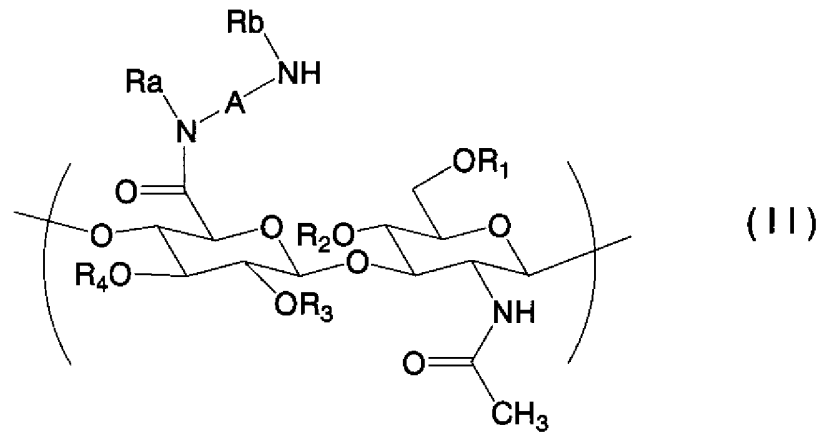
[0022] 本発明のさらに別の側面によれば、上記薬物担体および薬物を含む医薬組成物が提供される。一つの実施態様において、当該医薬組成物は、さらにポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを含んでいてもよく、好適には当該ポリマーは、ヒアルロン酸修飾物に結合しているポリマーと同種のものである。さらに一つの実施態様において、前記薬物はヒアルロン酸修飾物が形成する微粒子により封入されていてもよい。ここで、当該微粒子は、ヒアルロン酸修飾物のポリマー部分および／または前記ポリマーが形成する疎水性コアを、ヒアルロン酸部分が被覆する形状を有していてもよく、好適には、当該医薬組成物において、薬物は当該疎水性コア部分に封入されている。

[0023] 本発明のさらに別の側面によれば、末端にカルボキシル基を有するポリ乳酸、ポリ



グリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーと、式(II)：

[0024] [化3]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_a$ 、 $R_b$ および $A$ は、上記に定義した通りである)

で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含む、ヒアルロン酸誘導体とを反応させる工程を含む、ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。前記ポリマーは、 $N$ 、 $N'$ -カルボニルジイミダゾール(CDI)、 $N$ 、 $N'$ -ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、 $N$ -エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(EEDQ)、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン)-4-メチルモルホリウム(DMT-MM)、2-ベンゾトリアゾール-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム4フッ化ホウ酸塩(TBTU)、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HODhbt)、ベンゾトリアゾール-1-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム6フッ化リン酸塩(PyBOP)、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)フォスフォニウムヘキサフルオロフォスフェート(BOP)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)または $N$ -ヒドロキシスクシンイミド(NHS)等の縮合剤を単独で或いは適宜組み合わせることにより導入することができる。また、前記ポリマーの末端カルボキシル基を反応性の高いエステルまたはアミドに変換した後に導入することもできる。また、前記ポリマーは水溶液中で微粒子を形成していてもよい。

[0025] 本発明のさらに別の側面によれば、上記のヒアルロン酸修飾物を用いる、エマルション液中乾燥法、溶媒拡散法または透析法による上記薬物担体の製造方法もまた提

供される。

[0026] 1つの実施態様において、本発明の薬物担体の製造方法はエマルション液中乾燥法を用いて行われ、例えば以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む、水に混和しない有機相に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；

b) 水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；

c) 前記a工程により得られたポリマー溶液と、前記b工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、エマルションを形成させる工程；および

d) 前記c工程により得られたエマルションを液中乾燥し、薬物担体微粒子を形成させる工程、

を含んでもよく、または、以下の工程；

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和しない有機相に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；

b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を水相に混合して、エマルションを形成させる工程；

c) 前記b工程により得られたエマルションを液中乾燥し、ポリマー微粒子を形成させる工程；

d) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および

e) 前記c工程により得られたポリマー微粒子と、前記d工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成させる工程、を含んでもよい。

[0027] さらに1つの実施態様において、本発明の薬物担体の製造方法は溶媒拡散法を用いて行われ、例えば、以下の工程；

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；

b) 水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程;および

c) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、前記b工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液に滴下して、薬物担体微粒子を形成させる工程、  
を含んでもよく、または、以下の工程;

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーならびに前記ヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程;および

b) 前記a工程により得られたポリマー・ヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に滴下して薬物担体微粒子を形成させる工程、  
を含んでもよい。

[0028] さらに一つの実施態様において、溶媒拡散法による本発明の薬物担体の製造方法は、以下の工程;

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記ポリマーを溶解させる工程;

b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、水相に滴下してポリマー微粒子を形成させる工程;

c) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程;および

d) 前記b工程により得られたポリマー微粒子と、前記c工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成する工程、  
を含んでもよい。

[0029] さらに1つの実施態様において、本発明の薬物担体の製造方法は透析法を用いて行われ、例えば、以下の工程;

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記ポリマーおよび前記ヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程、および、

b) 前記a工程により得られたポリマー・ヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に対して透析して微粒子を形成させる工程、  
を含んでもよく、または、以下の工程:

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記

ポリマーを溶解させる工程；

b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、水相に対して透析してポリマー微粒子を形成させる工程；

c) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および

d) 前記b工程により得られたポリマー微粒子と、前記c工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成する工程、を含んでいてもよい。

[0030] 本発明の別の側面によれば、上記の薬物担体の製造方法を含む、医薬組成物の製造方法もまた提供される。

[0031] さらに本発明の別の側面によれば、以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、上記のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液の溶媒を、溶媒拡散法または透析法を用いて水に置換する工程、を含むヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法もまた提供される。一つの実施態様において、前記調製方法のb工程において溶媒拡散法を用いることもでき、例えば、前記調製方法は、以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、上記のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に滴下して溶媒を水に置換する工程、を含んでいてもよい。

[0032] さらに別の実施態様において、前記調製方法のb工程において透析法を用いることもでき、例えば、前記調製方法は、以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、上記のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

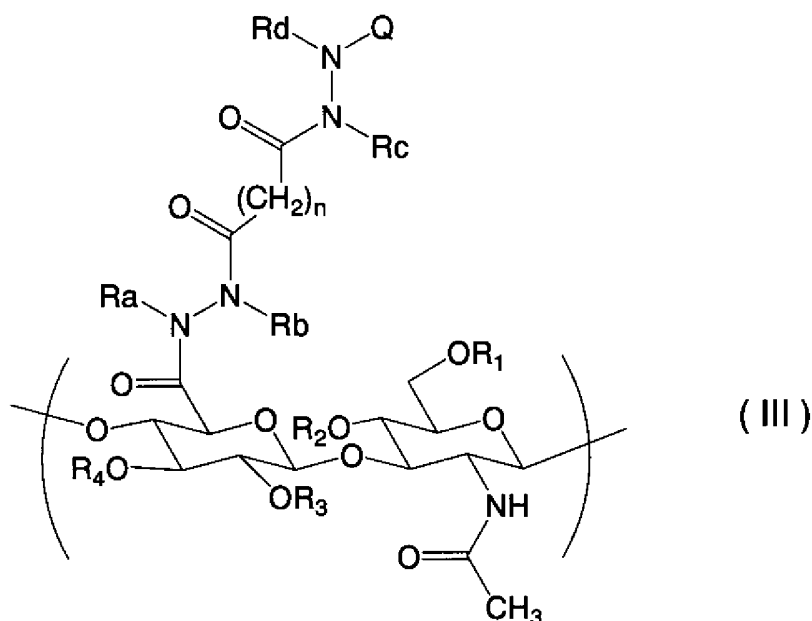
b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に対して透析して溶媒を水に置換する工程、

を含んでいてもよい。

[0033] 本発明のさらに別の側面によれば、上記のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法を含む、医薬組成物の製造方法もまた提供される。

[0034] 本発明のさらに別の側面によれば、式(III)：

[0035] [化4]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基および  $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基から選択され、

$R_a$ 、 $R_b$ 、 $R_c$  および  $R_d$  は、それぞれ独立に、水素原子および  $C_{1-6}$  アルキル基から選択され、

$Q$  は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトンまたはこれらの共重合体から選択されるポリマーであり、該ポリマーは末端のカルボキシル基で窒素原子と結合しており、

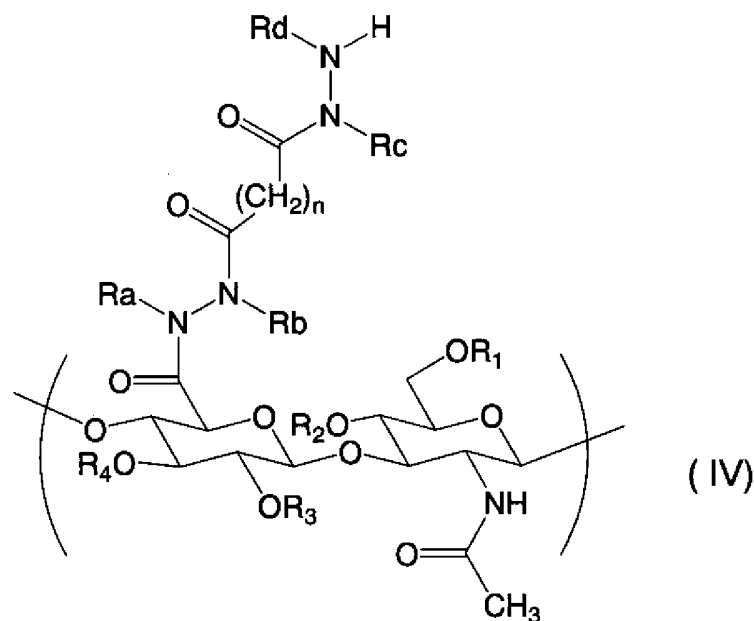
$n$  は、0-6の整数である)

で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含む、ヒアルロン酸修飾物が提供される。

[0036] 本発明のさらに別の側面によれば、末端にカルボキシル基を有するポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトンまたはこれらの共重合体から選択されるポリマーと、

式(IV):

[0037] [化5]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、Ra、Rb、Rc、Rdおよびnは、既に定義した通りである)で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含む、ヒアルロン酸誘導体とを反応させる工程を含む、上記のヒアルロン酸修飾物の製造方法もまた提供される。

[0038] 以下、本発明を更に具体的に説明する。

[0039] 本発明のヒアルロン酸修飾物は、ヒアルロン酸(HA)またはその誘導体と、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)または乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)から選択される1以上のポリマーとが結合したものである。

[0040] 本発明において、ヒアルロン酸(HA)またはその誘導体とポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)または乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)から選択されるポリマーとは、静電相互作用等の物理的相互作用による結合でなく、化学的に共有結合されている。このため、投与後の塩濃度変化、pH変化等の環境変化によっても、HAまたはその誘導体から前記ポリマーが脱離することはない。HAまたはその誘導体と前記ポリマーとが結合するに際しては、結合を制御しやすくするため、スペーサー部分を介して結合していてもよい。また、HA誘導体がポリマーとの結合のためのスペーサー部分を含んでいてもよい。例えば、複数のアミノ基を有する化合物(ジヒドラジド化

合物、ジアミン化合物、ヒドラジン化合物など)をヒアルロン酸中のグルクロン酸部分のカルボキシル基と反応させることにより、ヒドラジド基やアミノ基を有するスペーサー部分を導入することができる。特定の実施態様においては、式  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  (式中、 $n$ は0-10の整数である。)、式  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  (式中、 $n$ は0-10の整数である。)で表されるジアミン化合物、式  $\text{H}_2\text{N}-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CONHNH}_2$  (式中、 $n$ は0-10の整数である。)で表されるジヒドラジド化合物、或いは、式  $\text{NH}(\text{R}_{10})-\text{NH}(\text{R}_{11})$  (式中、 $\text{R}_{10}$  および  $\text{R}_{11}$  は独立して水素原子または  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基である)で表されるヒドラジン化合物などをスペーサー部分として導入することができる。

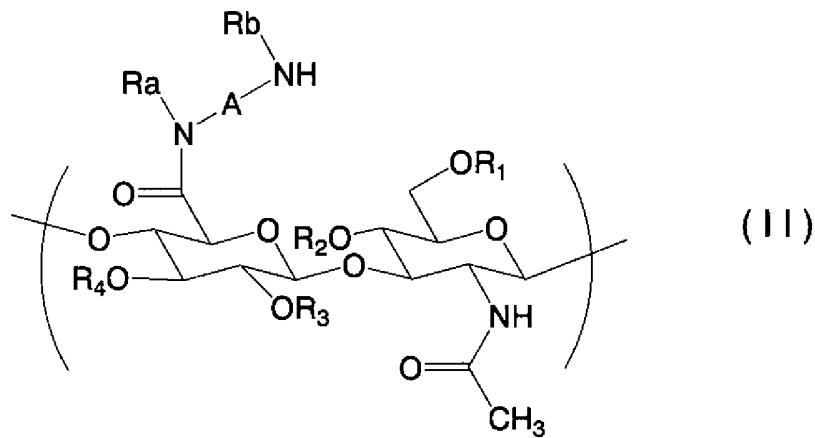
- [0041] HA誘導体にスペーサー部分を導入した後にポリマーを導入する方法を用いる場合、スペーサーによるカルボン酸の修飾率と、ポリマーによるスペーサーの修飾率を独立して制御することができる。
- [0042] HAまたはその誘導体に前記ポリマーが結合する部位としては、HAまたはその誘導体の末端であってもよく、或いは、前記ポリマーがHAまたはその誘導体の側鎖として導入されていてもよい。HAは水溶液中で非常に嵩高い分子であるため、一般的に前記ポリマーが末端に結合したHAまたはその誘導体を用いて生体分解性微粒子を作成する場合はHA層の厚みを厚くなる。また、前記ポリマーが側鎖としてグラフト結合したHAまたはその誘導体を用いる場合は、HAまたはその誘導体はループ状で生分解性微粒子表面にコートされ、HA層の厚みを小さくできる。このうち、前記ポリマーがHAまたはその誘導体の側鎖にグラフト結合しているのが好ましい。
- [0043] 前記ポリマーまたはスペーサー部分の、修飾されるHAまたはその誘導体への導入位置としては、HA分子内の水酸基とカルボキシル基が挙げられる。このうち、水酸基に導入する場合は、活性化したカルボキシル基などと当該水酸基を反応させカルボン酸エステルを形成することにより導入することができ、また、イソシアネート基などと当該水酸基を反応させカルバミン酸エステルを形成することによっても導入することができる。
- [0044] カルボキシル基に導入する場合は、アミド基、ヒドラジド基、ジアシルヒドラジド基、カルボン酸エステル基を形成することにより、前記ポリマーまたはスペーサー部分を導

入することができる。

- [0045] 前記ポリマーまたはスペーサー部分を導入する上述の方法のうち、カルボン酸エステルを形成して前記ポリマーまたはスペーサー部分を導入したHA修飾物は、投与液内、生体内での加水分解による前記ポリマーの脱離が比較的短時間で生じる。従って、一般的には、加水分解速度の遅いカルバミン酸エステル、もしくはアミド基、ヒドラジド基などを介して修飾するほうが好ましい。
- [0046] このうち、前記ポリマーが、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基に結合しているのが更に好ましく、その中でも、前記ポリマーがアミド基、ヒドラジド基などを介して、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基にアミド結合により結合しているのが特に好ましい。
- [0047] HAまたはその誘導体の末端にポリマーを結合させる方法としては、例えば、HAまたはその誘導体の還元末端のアルデヒドと、前記ポリマーおよびスペーサー部分の末端に導入したヒドラジド(HZ)基、アミノ(AM)基などのアルデヒド基と反応性をもつ官能基とにより形成するシッフ塩基を、水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaBH}_4$ )等の還元剤で処理することにより導入する方法が挙げられる。
- [0048] HAまたはその誘導体の側鎖としてポリマーを化学的にグラフト結合させる方法としては、例えば、ヒドラジド(HZ)基、アミノ(AM)基等、活性エステルと反応性をもつ官能基を含むスペーサー部分を導入したHA誘導体を、テトラブチルアンモニウム(TBA)塩にイオン交換し、ジメチルスルホキシド(DMSO)中で、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)/N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)でカルボキシル基を活性化したポリマーと反応させる方法を用いることができる。本発明の一つの実施態様においては、スペーサーを導入したHA誘導体は、式(II)：



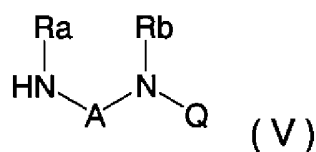
[0049] [化6]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_a$ 、 $R_b$ および $A$ は、上記に定義した通りである)  
の繰り返し構造を分子内に含みうる。

[0050] あるいは他の導入方法として、予めポリマーの末端カルボキシル基をEDC/NHSで活性化し、これとジアミン、ジヒドラジド等とを反応させることでアミノ基、ヒドラジド基末端を持つポリマーを合成し、これを直接HAまたはその誘導体のカルボキシル基にEDC/NHS等の縮合剤で結合させる方法を用いることができる。本発明の一つの実施態様においては、アミノ基、ヒドラジド基末端を持つポリマーとして、式(V)：

[0051] [化7]



(式中、 $R_a$ 、 $R_b$ 、 $Q$ および $A$ は、上記に定義した通りである)  
の化合物を用いることができる。

[0052] 本発明のHAまたはその誘導体においては、前記ポリマーの大部分が、その片末端のみでHAまたはその誘導体に結合していることが望ましい。ここで、「片末端で結合している」とは、前記ポリマーの末端反応基のうちの1箇所結合している状態を指す。また、この「大部分」とは、特に限定されないが、具体的には、その片末端のみで

HAまたはその誘導体と結合しているポリマーの量が、結合している全ポリマーの量に対して70%w/w以上である状態を指し、好ましくは85%w/w以上である状態を指し、特に好ましくは95%w/w以上である状態を指す。なお、何れの場合においても、ポリマーの両末端がHAまたはその誘導体に導入されている率は、HAまたはその誘導体中のグルクロン酸当たり5モル%以下であり、好ましくは3モル%以下であり、特に好ましくは1モル%以下である。当然のことながら、本発明ヒアルロン酸修飾物は、前記ポリマーが、その片末端のみでHAまたはその誘導体に結合しているヒアルロン酸修飾物のみで構成されていてもよい。

[0053] 片末端のみでHAまたはその誘導体と結合している前記ポリマーの量の、結合している前記ポリマーの両末端がHAまたはその誘導体に導入されている率を定量する方法としては、プロトンNMRで得られる前記ポリマーの導入量と、これらポリマーを結合させることによるポリマー導入前のヒドラジド(HZ)化もしくはアミノ(AM)化されたHA誘導体中のヒドラジド基、またはアミノ基の実際の減少量との比較から求めることができる。例えば、アジピン酸ジヒドラジドでヒドラジド基を導入したHA-HZのプロトンNMRから得られる遊離のヒドラジド基由来のピーク(2.2-2.3ppm:測定溶媒DMSO-d<sub>6</sub>)、またはエチレンジアミンでアミノ基を導入したHA-AMのプロトンNMRから得られる遊離のアミノ基由来のピーク(2.9-3.1ppm:測定溶媒DMSO-d<sub>6</sub>)は、これらのポリマーの導入率に比例して減少するはずであるから、このピークとHA由来のピーク(1.8-1.9ppm:測定溶媒DMSO-d<sub>6</sub>)の比を実測する(X)。一方で、これらポリマーの導入が100%片末端であると仮定して、ポリマー導入率から比例的に計算される遊離のヒドラジド基またはアミノ基のピークの、HA由来のピークに対する比を計算する(Y)。この実測値の比が理論値の比より小さくなった割合が両末端で結合したポリマーの割合になる。グルクロン酸に対するポリマーの導入率をZ%、HA-HZのヒドラジド基導入率またはHA-AMのアミノ基導入率をH%とすると、片末端のみでHAまたはその誘導体と結合しているポリマーの量の結合している全ポリマーの量に対する割合は、 $1 - (HZ) / Z(1 - X / Y)$ で、両末端がHAまたはその誘導体に導入されている率は、グルクロン酸当たり、 $(HZ) \times (1 - X / Y)$ で表される。

[0054] 本発明に用いられるヒアルロン酸(HA)またはその誘導体とは、HAまたはその薬

学的に許容される塩、或いはそれらを誘導体化したものであってもよい。

- [0055] HAまたはその薬学的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩を挙げることができ、特に好ましい塩は、医薬品として繁用されているナトリウム塩である。HAまたはその薬学的に許容される塩は、鶏冠や豚皮下等の生物由来のものを抽出する方法や生物発酵法等の各種公知の方法を用いて製造することができ、あるいは市販のものを購入して(例えば、電気化学工業株式会社、株式会社資生堂、生化学工業株式会社等から)入手することも可能である。
- [0056] HAまたはその薬学的に許容される塩を誘導体化したHA誘導体としては、そのグルクロン酸のカルボキシル基を化学的に修飾したものが挙げられる。この際、グルクロン酸のカルボキシル基の修飾状態によって、体内動態を制御することも可能である。
- [0057] HA誘導体のグルクロン酸部分のカルボキシル基修飾率が低ければ(例えば10モル%以下)、炎症部位や腫瘍部位に大量に発現しているCD44を始めとするHAレセプターや、HAの主な代謝系である肝臓、リンパ系組織へのターゲティング効果を期待できる。例えば、変形性関節症やリウマチ患者の炎症を起こした滑膜細胞へのターゲティング、レセプター依存型のエンドサイトーシスによる細胞内への取り込み、細胞内での薬物放出による炎症治癒が期待できる。
- [0058] また、HA誘導体のグルクロン酸部分のカルボキシル基修飾率が高ければ、HAレセプターへの結合が抑制され、体内でステルス効果をもつ滞留性の長い薬物担体微粒子となる。この場合、EPR効果を利用した腫瘍細胞へのターゲティング効果も期待できる。更に、一定時間経過後にカルボキシル基の修飾が切れ、修飾基がHAから脱離するように結合様式を設計しておけば(例えばエステルやアミド結合)、EPR効果で腫瘍組織に受動的ターゲティングした後、HAレセプターを介した能動的ターゲティングで腫瘍細胞内に薬物の入った本発明の微粒子を高い効率でデリバリーすることもできる。
- [0059] HAまたはその誘導体のグルクロン酸部分のカルボキシル基を修飾する方法としては、特に限定されないが、例えば、ポリマーの修飾前にHAまたはその誘導体のカルボキシル基を、N, N'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(

EEDQ)、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン)-4-メチルモルホリウム(DMT-MM)、2-ベンゾトリアゾール-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム4フッ化ホウ酸塩(TBTU)、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HODhbt)、ベンゾトリアゾール-1-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウム6フッ化リン酸塩(PyBOP)、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)フォスフォニウムヘキサフルオロフォスフェート(BOP)または1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)またはN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)等の縮合剤を単独でまたは適宜組み合わせて利用して活性エステル化し、これをヒドラジド基、アミノ基等の活性エステルと反応性をもつ官能基を結合させたHA誘導体と反応させ、化学的に結合させる方法が挙げられる。なお、先にHAまたはその誘導体をポリマーで修飾し、得られたヒアルロン酸修飾物の残存しているカルボキシル基を、同様に反応させ修飾してもよい。

[0060] 本発明に用いられるHAまたはその誘導体の分子量は、特に限定はされないが、HAまたはその誘導体分子自体の水溶液中での大きさが他の分子に比べて非常に大きい(例えば、粘度平均分子量200万ダルトンのHAは200~300nmのサイズがある)ため、粒子系の小さなナノスフィア等の調製には分子量の小さな(例えば、粘度平均分子量で30万ダルトン以下、例えば5000~10万ダルトン)HAまたはその誘導体を使用することが好ましい。

[0061] 本発明に用いられるポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)または乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)から選択されるポリマーの分子量は、特に限定はされないが、HAまたはその誘導体との反応効率の面から、通常、粘度平均分子量10万ダルトン以下のもの、例えば1000~5万ダルトンのものを使用することが好ましい。これらのポリマーは、Alkermes、BirmingHAM Polymers, Inc、和光純薬工業株式会社などから購入することも可能であるし、無触媒脱水重縮合法(特開昭61-28521号公報)あるいは、環状ジエステル化合物からの触媒を用いた開環重合法(Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A Materials, Vol. 2, Marcel Dekker, Inc. (1995))を用いて製造することもできる。

[0062] 本発明に用いられるポリマーの選択は、例えば、ターゲティングを目的とした薬物

担体の場合は、ターゲット部位に到達するまでの生体内での薬物放出は最小限に抑制したいため、PLA等の分解速度(即ち、薬物放出速度)の遅いポリマーを選択する方が好ましい。また、体内での薬物徐放を目的とする場合は、目的に応じた薬物放出速度を実現するため、これらの共重合体を用いて薬物放出速度を制御することができる。

- [0063] 本発明において、HAまたはその誘導体とPLA、PGAまたはPLGAから選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物およびその塩は、導入したポリマー(PLA、PGAまたはPLGA)の重量比に依らず、DMSO、DMAc、DMFなどの有機溶媒、およびこれらに十分な割合で混和する溶媒(例えば、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノールなど)との混合溶媒には可溶性であるが、例えばアセトニトリル、アセトン、塩化メチレン、酢酸エチルなどの有機溶媒にほとんど溶解しない。
- [0064] 本発明において、HAまたはその誘導体とPLA、PGAまたはPLGAから選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物およびその塩をそのまま水に溶解または分散させる際には、共有結合によって導入するポリマー(PLA、PGAまたはPLGA)の重量比は、50%以下、好ましくは30%以下になるように調節されたヒアルロン酸修飾物を用いることが好ましい。
- [0065] 本発明において、HAまたはその誘導体とPLA、PGAまたはPLGAから選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物およびその塩は、導入したポリマー(PLA、PGAまたはPLGA)の重量比に依らず、いったんDMSO、DMAc、DMFなどの有機溶媒、またはこれらに十分な割合で混和する溶媒との混合溶媒に溶解させ、その後、透析法や溶媒拡散法などにより溶媒を水に置換することで、水に溶解もしくは分散させることが可能である。特に限定はされないが、その際ヒアルロン酸修飾物は、自発的に疎水性ポリマー部分をコア部分として集積させ、親水性のHAまたはその誘導体部分を表面に向けた状態で水中に存在すると考えられる。
- [0066] 本発明のヒアルロン酸修飾物は、薬物担体として用いることができる。常法に従い、本発明ヒアルロン酸修飾物に、薬物を封入、包含、担持および/または分散させればよい。
- [0067] 本発明に用いられる薬物は、生分解性高分子に担持可能な薬物であれば特に限

定されず、低分子化合物、タンパク質、ペプチド等を用いることが可能である。

- [0068] 低分子化合物の例としては、例えば、制癌剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等)、免疫抑制剤、抗炎症剤(ステロイド剤、非ステロイド剤系抗炎症剤、等)、抗リウマチ剤、抗菌剤( $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤、等)などを挙げることができる。
- [0069] タンパク質、ペプチドの例としては、例えば、エリスロポエチン(EPO)、グラニューロサイトコロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、(INF $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、トロンボポエチン(TPO)、シリアリーニュートロフィクファクター(CNTF)、チューマーネクロシスファクター(TNF)、チューマーネクロシスファクター結合タンパク質(TNFBp)、インターロイキン-10(IL-10)、FMS類似チロシンカイネース(Flt-3)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1(IGF-1)、血小板由来成長因子(PDGF)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)、ブレイン由来ニューロトロフィクファクター(BDNF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、幹細胞因子(SCF)、メガカリオサイト成長分化因子(MGDF)、オステオプロテゲリン(OPG)、レプチン、副甲状腺ホルモン(PTH)、塩基性フィブロblast成長因子(b-FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、抗体、ダイアボディー、ミニボディー、断片化抗体等を挙げることができる。
- [0070] 本発明の最も好ましい態様として、薬物担体が微粒子状に形成されているものが挙げられる。本願ヒアルロン酸修飾物は、HAまたはその誘導体部分が親水性であり、ポリマーが疎水性であることから、水溶液中では、ポリマーの表面をHAまたはその誘導体が被覆する構造をとり、微粒子状となる。この微粒子中に薬物を封入、包含、担持および/または分散することができる。この薬物担体は、粒子表面が親水性のHAまたはその誘導体で被覆されているため、投与水溶液内、生体内での粒子の凝集、フリクションを防ぎ、且つ、生体適合性の高いHA表面を有するため、コア部分のポリマーが生体組織に直接接触する事が無く、炎症等の問題が緩和される。

- [0071] 微粒子状の本発明薬物担体の粒子径は、ニードルを詰まらせずに通過できるようにするために200  $\mu$  m以下であることが好ましく、100  $\mu$  m以下であることが更に好ましい。また、関節投与の場合は、物理的に関節内でのフリクションが生じやすく、これが新たな炎症を誘発するため、粒子径が5  $\mu$  m以下であることが好ましい。また、静脈注射投与の場合は、末梢血管を閉塞させないために粒子径が500nm以下であることが好ましく、200nm以下であることが更に好ましい。
- [0072] また、本発明の微粒子は生体適合性が良く、炎症性が無く、ヒアルロン酸自体に粘膜炎付着性があることから、粒子径を制御することで、経鼻、経肺、経口等の非侵襲投与用途にも使用可能である。粘膜炎付着性は、HAのカルボン酸の量で調節することが可能で、その量は多い方が好ましく、スパーサーやポリマーなどによる修飾率は低いほうが好ましい。
- [0073] 本発明の微粒子調製方法は、例えば、エマルション液中乾燥法、あるいは、溶媒拡散法(J. Contr. Rel. 83, 365-375(2002))、透析法等が挙げられる。具体的には、ポリマー微粒子調製後にその表面にHAまたはその誘導体を化学結合させポリマー微粒子をコートする方法、HAまたはその誘導体の末端や側鎖にポリマーを化学的に結合させたヒアルロン酸修飾物を予め合成し、これを用いてエマルション液中乾燥法、溶媒拡散法、透析法などによる微粒子調製の際、微粒子生成時に自発的にHAで被覆する方法、微粒子調製後に自発的にHAで被覆する方法が挙げられる。
- [0074] ポリマー微粒子調製後にその表面にHAまたはその誘導体を化学結合させポリマー微粒子をコートする場合は、常法に従いポリマーからなる微粒子を調製した後、粒子表面のカルボキシル基を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)等の縮合剤で活性エステル化し、これをヒドラジド(HZ)基、アミノ(AM)基等の活性エステルと反応性をもつ官能基を含むスパーサーを導入したHAまたはその誘導体と反応させ、化学的に結合を形成することにより本願ヒアルロン酸修飾物からなる微粒子を製造することができる。
- [0075] 本発明の別の実施態様において、エマルション液中乾燥法によりさらにPLA、PGAまたはPLGAから選択される1以上のポリマーを含む、ヒアルロン酸修飾物で被覆

された微粒子を調製することができる。すなわち、塩化メチレン、酢酸エチルなどの水に混和しない有機溶媒またはこれらに十分な割合で混和する溶媒との混合溶媒にPLA、PGAまたはPLGAを溶解させておき、一方、本発明のヒアルロン酸修飾物は水相に溶解もしくは分散させ、エマルジョン調製後、液中乾燥することにより本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子を調製することができる。特に限定はされないが、この調製方法において、本発明のヒアルロン酸修飾物は疎水部と親水部を一分子内に持つ両親媒性分子であるため、界面活性作用を示すと考えられる。

[0076] 本発明の別の実施態様において、溶媒拡散法によりさらにPLA、PGAまたはPLGAから選択される1以上のポリマーを含む、ヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子を調製することができる。すなわち、アセトン、アセトニトリルなどの水に混和する有機溶媒またはこれらに十分な割合で混和するエタノール、メタノールなどの有機溶媒との混合溶媒にPLA、PGAまたはPLGAを溶解させておき、水相に混合すると有機溶媒が拡散するとともに微粒子が生成するが、その水相に本発明のヒアルロン酸修飾物を溶解もしくは分散させて用いることができ、微粒子生成時に、その微粒子を本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆することができる。

[0077] 溶媒拡散法や透析法を用いる場合で、DMSO、DMAc、DMFなどの有機溶媒、またはこれらに十分な割合で混和する溶媒との混合溶媒を使用する場合、本発明のヒアルロン酸修飾物は有機相に溶解させて用いることもできる。有機相に溶解させた本発明のヒアルロン酸修飾物もしくはPLA、PGAまたはPLGAから選択されるポリマーとの混合物は、水相に対して透析もしくは滴下されることによって溶媒が水へと置換される際に、疎水性ポリマーの集積による微粒子の形成とともに、親水性のHA部分は微粒子表面に集積することで微粒子を本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆することができる。また、溶媒拡散法や透析法を用いる場合で、DMSO、DMAc、DMFなどの有機溶媒、またはこれらに十分な割合で混和する溶媒との混合溶媒を使用する場合、本発明のヒアルロン酸修飾物を水相に溶解もしくは分散させて用いることもでき、微粒子生成時に、その微粒子を本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆することができる。

[0078] 微粒子調製方法に依らず、PLA、PGAまたはPLGAから成る微粒子表面は疎水



性であることから、これらの微粒子を本発明のヒアルロン酸修飾物を溶解もしくは分散させた水溶液に混合することで、疎水性相互作用による微粒子表面への吸着が起こり、親水性の本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子を調製することができる。

[0079] 本発明の微粒子調製において用いる水相は、水のみからなっているとしてもよく、水に十分な割合で混和する溶媒との混合溶媒になっっているとしてもよい。また所望により、当該技術分野で通常用いられる添加物、例えば界面活性剤、pH調整剤や緩衝剤など含んでいてもよく、pHや塩濃度を適宜調節されていてもよい。

[0080] 本発明のヒアルロン酸修飾物のみを用いて微粒子を形成することができるが、当該技術分野で通常用いられる添加物、例えば界面活性剤、pH調整剤、酸化防止剤などととも、本発明のヒアルロン酸修飾物を含む微粒子を形成することもできる。本発明の一つの実施態様において、本発明のヒアルロン酸修飾物を含む微粒子は、そのコア部分にPLA、PGAまたはPLGAから選択されるHAが結合していないポリマーを含むことができる。前記添加物や当該ポリマーを添加することにより、微粒子の粒径および薬物担持能力を調節することができる。

[0081] 本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子のうち、特にCD44をはじめとするHAレセプターへのターゲティングを目的とした微粒子を調製する場合、その粒子サイズは $5\mu\text{m}$ 以下、例えば $1\text{nm}$ ～ $5\mu\text{m}$ であることが好ましく、その調製法は透析法、溶媒拡散法、エマルション液中乾燥法などを用いることができる。この際に用いるヒアルロン酸修飾物は、HAレセプターへの結合が抑制されないように、HAのグルクロン酸部分のカルボン酸の修飾率が10モル%以下、例えば0.1～10%であることが好ましい。

[0082] 本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子のうち、特に血中滞留性延長、腫瘍組織、炎症組織への集積性を目的とした微粒子を調製する場合、その粒子サイズは $200\text{nm}$ 以下、例えば $1\text{nm}$ ～ $200\text{nm}$ であることが好ましく、その調製法は透析法、溶媒拡散法、エマルション液中乾燥法などを用いることができる。この際に用いるヒアルロン酸修飾物は、HAレセプターへの結合が抑制されるようにHAのグルクロン酸部分のカルボン酸が、30～100%、好ましくは50～90%の修飾率で修飾されたも

のをを用いることが好ましい。

- [0083] 本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子のうち、局所刺激性の低減を目的とした微粒子を調製する場合、その粒子サイズは $200\ \mu\text{m}$ 以下、例えば $1\text{nm}$ ～ $200\ \mu\text{m}$ であることが好ましく、その調製法は透析法、溶媒拡散法、エマルション液中乾燥法を用いることができる。
- [0084] 本発明のヒアルロン酸修飾物で被覆された微粒子のうち、粘膜付着性を持ち非侵襲投与用途を目的とした微粒子を調製する場合、その粒子サイズは $200\ \mu\text{m}$ 以下、例えば $1\text{nm}$ ～ $200\ \mu\text{m}$ であることが好ましく、その調製法は透析法、溶媒拡散法、エマルション液中乾燥法を用いることができる。用いるヒアルロン酸修飾物は、粘膜付着性を持つようにHAのカルボン酸の修飾率は低いものが好ましい。
- [0085] 薬物のこれら微粒子への封入方法は、通常、薬物をポリマーに封入する方法が用いられる。例えば、微粒子調製時にポリマーをDMSO等の有機溶媒に溶解した時に薬物も共存させておき、そのまま微粒子を調製すればよい。薬物の水溶性が高い場合等には、薬物を水に対する溶解性の低い塩に変更したり、W/O/Wエマルション法を用いたりすることで封入効率を上げることができる。
- [0086] 調製した微粒子が凍結乾燥後に再分散しにくい場合は、トレハロース、マンニトール等の分散剤を共存させて凍結乾燥を行うこともできる。
- [0087] 本発明ヒアルロン酸修飾物の用途に合わせて、本発明ヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間は、HA自体の血中滞留時間に比べて延長されているものであってもよい。ここで、血中滞留時間が延長された本発明ヒアルロン酸修飾物を得るために、原料として血中滞留時間が延長されたヒアルロン酸誘導体を用いることができる。血中滞留時間は、平均血中滞留時間(以下、MRTとも称す)、血中半減期(以下、 $t_{1/2}$ とも称す)、血中クリアランス(以下、Clとも称す)などの公知の代表的なパラメーターを利用して適宜比較することができる。本発明のヒアルロン酸修飾物にステルス効果を期待する場合、ヒトを含む哺乳類における血中滞留時間は、実用面から平均血中滞留時間(MRT)が18時間以上のものであることが好ましく、30時間以上のものがより好ましい。
- [0088] また、別の側面によれば、本発明ヒアルロン酸修飾物は、その用途に合わせて、H

A自体に比べてヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものであってもよい。ここで、HA自体に比べてヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する本発明ヒアルロン酸修飾物を得るために、原料としてHA自体に比べてヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するヒアルロン酸誘導体を用いることができる。「ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する」とは、HA自体と本発明ヒアルロン酸修飾物または原料であるヒアルロン酸誘導体をそれぞれヒアルロニダーゼにより酵素分解させた際に、HA自体よりも分解速度が遅いかまたは分解が進まない性質を有することを指す。例えば、一定時間ヒアルロニダーゼ処理した際に、HA自体では観察される2糖分解ピークが観察されなければ「分解が進まない」性質を有する(即ち、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する)と判定することができる。なお、HAの分解速度や分解状態はゲル浸透クロマトグラフィー(以下、GPCとも称す)などの常法を用いて観察することができる。

### 発明の効果

[0089] 本発明により、ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物が提供される。当該ヒアルロン酸修飾物を用いて、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、血中滞留性を制御でき、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体が提供される。さらに、本発明のヒアルロン酸修飾物により、粒子間の凝集が少なく、粒子径の制御が可能でしかもインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体も提供される。

### 図面の簡単な説明

[0090] [図1]図1は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるマイクロスフィアをSEMで撮影した写真の一例である。

[図2]図2は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるマイクロスフィアを3Dレーザー顕微鏡で撮影した写真の一例である。

[図3]図3は、比較例としてのPLGAマイクロスフィアをSEMで撮影した写真の一例である。

[図4]図4は、比較例としてのPLGAマイクロスフィアを3Dレーザー顕微鏡で撮影した

写真の一例である。

[図5]図5は、本発明のヒアルロン酸修飾物を、GPCにて測定した結果の一例である。

[図6]図6は、本発明のヒアルロン酸修飾物を、NMRにて測定した結果の一例である。

[図7]図7は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液(HA(25kダルトン)-PLAナノスフィア)を、1ヶ月4°Cで保存した後の写真の一例である。

[図8]図8は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液(HA(190kダルトン)-PLAナノスフィア)を、1ヶ月4°Cで保存した後の写真の一例である。

[図9]図9は、PLAナノスフィアの分散溶液(比較例)を、1ヶ月4°Cで保存した後の写真の一例である。

[図10]図10は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液(HA(25kダルトン)-PLAナノスフィア)を、1ヶ月4°Cで保存した後のSEM写真の一例である。

[図11]図11は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液(HA(190kダルトン)-PLAナノスフィア)を、1ヶ月4°Cで保存した後のSEM写真の一例である。

[図12]図12は、PLAナノスフィアの分散溶液(比較例)を、1ヶ月4°Cで保存した後のSEM写真の一例である。

[図13]図13は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液の水溶液中でのプロトンNMRスペクトルの一例である。

[図14]図14は、本発明のヒアルロン酸修飾物からなるナノスフィアの分散溶液の水溶液中でのプロトンNMRスペクトルの一例である。

[図15]図15は、実施例4-1において得られたHA-HZのNMRスペクトルの一例である。

[図16]図16は、実施例4-1において得られたHA-HZについてのヒアルロニダーゼSDに対する分解性試験結果および、未修飾HAを同条件でヒアルロニダーゼSD処理した場合の結果の一例である。

[図17]図17は、実施例5-1において得られたHA-AMのプロトンNMRスペクトルの一例である。

[図18]図18は、実施例5-1〜5-3において得られたHA-AMについてのヒアルロニダーゼSDに対する分解性試験結果および、未修飾HAを同条件でヒアルロニダーゼSD処理した場合の結果の一例である。

[図19]図19は、実施例6-2で得たHA-HZ-PLAのGPCクロマトグラムの一例である。

[図20]図20は、実施例6-2で得たHA-HZ-PLAのプロトンNMRスペクトルの一例である。

[図21]図21は、実施例6-3で得たHA-HZ-PLAのGPCクロマトグラムである。

[図22]図22は、実施例6-3で得たHA-HZ-PLAのプロトンNMRスペクトルの一例である。

[図23]図23は、実施例7-7で得たHA-AM-PLAのプロトンNMRスペクトルの一例である。

## 実施例

[0091] 以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下においては、結合様式を問わず、HAとPLAとが結合したものを総称してHA-PLAと称する。また、スペーサー分子としてジヒドラジド化合物を含む場合は、HA-HZ-PLA、ジアミン化合物を含む場合はHA-AM-PLAと称する場合もある。

[0092] トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によるアミノ基の定量は、「学会出版センター 生物化学実験法12 蛋白質の化学修飾<上> 初版」37ページに記載の方法(TNBS法)に従った。ただし、TNBS溶液は0.5Mに調製し、ヒドラジド基を定量するために500nmの吸光度を測定した。

[0093] なお、NMR測定はNMR分光計としてJNM-ECA500(500MHz分光計)を使用し、以下の条件(パラメーター)で測定を行なった。

[0094] NMR条件

Data points(X point): 16384

Spectral width(X sweep): 15ppm

Acquisition time(X acq time): 1.749s

Pulse delay(Relaxation delay): 30s

Transients(Scans): 64

温度: 室温

[実施例1]ヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製

(実施例1-1)ヒドラジド基(HZ)が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)の合成

分子量 $2.5 \times 10^4$ ダルトンのヒアルロン酸(HA) (電気化学工業株式会社製) 100 mgを1%濃度で蒸留水に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調製した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC) (シグマアルドリッチ社製) とアジピン酸ジヒドラジド(ADH) (シグマアルドリッチ社製) を、用いるヒアルロン酸に含まれるグルクロン酸(カルボキシル基)に対してモル比で5倍のEDCおよび40倍のADHを添加し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。100mM塩化ナトリウム水溶液、25%エタノール水溶液で透析(スペクトラポア7、分画分子量(MWCO): 12k-14kダルトン)し、凍結乾燥して標題のヒドラジド基(HZ)が導入されたヒアルロン酸誘導体(HA-HZ) 88mgを得た。

[0095] 得られたHA-HZ中のHZ導入率をプロトンNMR法(測定溶媒: $D_2O$ )で定量したところ、HAのカルボン酸の65%がHZ化されていた(HA:N-アセチル基、2.1ppm、HZ:アジピン酸部分のメチレン基、1.7ppm、2.4ppm)。また、TNBS法で定量したところ、34.9%であった。

(実施例1-2)PLGAマイクロスフィアの調製

PLGA7510(和光純薬工業:分子量1万ダルトン)を塩化メチレン(純正化学) 10mLを加えて溶解させ10%(w/v)の溶液を調製した。これを1%ポリビニルアルコール、(87-89% hydrolyzed、分子量13000-26000)水溶液(PVA水溶液) 90mLに1:9(v/v)となるように混合し、スターラーで約700rpmにて攪拌させてoil-in-water(O/W)エマルジョンを得た。このエマルジョンを1%PVA水溶液900mL中に入れて約200rpmにて一晩攪拌し、溶媒を留去させることでマイクロスフィアの懸濁液を得た。この懸濁液を1000rpm、4°Cにて10分間遠心させ上澄みを除去し、水に

て十分洗浄を行い、凍結乾燥したものをマイクロスフィアとして回収した。SEM画像解析による粒径測定の結果、30～80  $\mu\text{m}$ 程度の粒子径のマイクロスフィアが得られた。

#### (実施例1-3)ヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製

実施例1-2のPLGAマイクロスフィアの表面カルボン酸をEDCおよびSulfo-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)(ピアス社製)を用いて活性化し(PLGA/EDC/Sulfo-NHS=1/5/5モル比、100mMリン酸緩衝液(pH5.8)中で室温で1時間攪拌)、実施例1-1のHA-HZ水溶液(0.1%、100mMリン酸緩衝液(pH7.0))に投入、室温で2時間攪拌後、100mMリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄し、ヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアを得た。得られたヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの、SEMおよび3Dレーザー顕微鏡の写真を図1および図2に示す。SEM写真(乾燥状態)(図1)によれば、HAコートによりPLGAマイクロスフィア表面が滑らかなったことが分かる。3Dレーザー顕微鏡写真(図2)によれば、水溶液中では、得られたヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアは、PLGA粒子がHAのゲル状のシエルに被覆されていることが分かる。

#### [実施例2]ヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

##### (実施例2-1)PLAが導入されたヒアルロン酸(HA-PLA)の合成

実施例1-1と同様の方法で得られたHA-HZ100mgを20mLの水に溶かし(0.5%濃度)、H型にしたカチオン交換樹脂(Dowex 50WX8-400、4.8meq/g)4mLを添加(HAのカルボキシル基の100倍のイオン交換能)室温で3日放置した。上澄みを回収、0.22  $\mu\text{m}$ フィルターを通し、1M TBA-OH(テトラ-N-ブチルアンモニウムヒドロキシド)溶液を150  $\mu\text{L}$ 添加、pH8に調整した後、凍結乾燥した。凍結乾燥したHA-HZ-TBAに含まれるグルクロン酸(カルボキシル基)に対して、それぞれモル比で5倍となる量のPLA0005(分子量5000ダルトン)、EDC、NHSを10mLのDMSOに溶かし、室温で2時間放置、PLAのカルボキシル基を活性エステル化した。一方でHA-HZ-TBAを20mLのDMSOに溶かし、これらを混合、室温で1晩放置した。この反応液をDMSOに対して透析(MWCO:25000、室温、10日間)することで活性化試薬を除去し、次に水に対して透析(MWCO:12000-14000、室温

、3日間)を行い、得られた白濁溶液(25KダルトンのHA由来のHA-PLAを含むナノスフィア分散溶液)を凍結乾燥した(なお、得られた白濁溶液についてGPCで定量したところHA-PLA:PLAはおよそ1:9であった。)。未反応のPLAを除去するために、この凍結乾燥品をアセトン中に投入し不溶物をアセトン洗浄、乾燥しHA-PLAを得た。ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)の測定データ(溶媒:DMSO)を図5に示す。ピーク位置からHA-TBAをスタンダードに分子量を見積もると、PLAの結合により、分子量が当初の25Kダルトンから97Kダルトンになっていることが確認された。得られたHA-PLAのプロトンNMRを図6に示す。HA-PLA中のPLA導入率をプロトンNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ、HAのカルボン酸の43モル%がPLA化されていた(HA:N-アセチル基、1.5-1.9ppm、PLA:PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0-5.6ppm)。

#### GPC条件

溶出液: DMSOまたは5mmol/L NaNO<sub>3</sub>を含むDMSO

流速: 1.0mL/分

検出器: RI、UV(280nm)

カラム: TOSOH TSKgel GMH<sub>HR</sub>-H

カラム温度: 40°C

サンプル室温: 25°C

サンプル濃度: 10mg/mL、50 $\mu$ L

(実施例2-2)ヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの透析法による調製

実施例2-1の手順において、水に対しての透析後に得られる白濁溶液を、25KダルトンのHA由来のHA-PLAを含むナノスフィア分散溶液として使用した。

[0096] 一方、分子量が190KダルトンのHAを用い、当該HAを0.5%濃度で蒸留水に溶解した以外は実施例1-1と同様の方法によりHA-HZを調製し、実施例2-1と同様の方法で調製したDMSO透析後の反応液を水に対して透析(MWCO:25000、室温、3日間)し、190KダルトンのHA由来のHA-PLAを含むナノスフィア分散溶液を調製した。

[0097] 得られた分散溶液は、どちらも精製操作後は白濁していた(沈殿物は見られなかつ



た)。これを100倍希釈してDLS (Nicomp370)によって粒径を測定したところ、190 kダルトンのHAを用いたもので263. 8nm、25kダルトンのHAを用いたもので243. 8nmであった。得られた分散溶液を4℃で1ヶ月間保存しても凝集沈殿物はほとんど無かった。保存1ヵ月後の写真を図7および図8にSEM写真を図10および図11に示す。

#### (実施例2-3)ヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの溶媒拡散法による調製

実施例2-1の25kダルトンのHAを用いたもののうち、アセトン再沈殿による精製前の分散溶液(HA-PLA:PLAがおおよそ1:9)を凍結乾燥したもの、およびアセトン再沈殿後のHA-PLAをそれぞれ20mgを秤取し、1. 0mLのDMSOに溶解させた。これを4. 0mLの水に攪拌しながら滴下したところ、ともに薄い白色半透明溶液になった。この混合溶液を透析チューブ(MWCO:12000-14000、Spectra/Por4)に移し、水に対して透析を行った(室温、3日間)。得られたナノスフィア分散溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行ったところナノスフィアの粒径は精製前のもので17. 6nm、製精後のもので15. 2nmであった。また、このナノスフィア分散溶液をD<sub>2</sub>Oに対して透析を行い(4℃、2日間)、プロトンNMR測定(JNM-ECP500 FT NMR SYSTEM、JOEL、測定溶媒:D<sub>2</sub>O)を行ったところ(精製前:図13、精製後:図14)、ともにHA-HZ由来のプロトンピークが確認されたことから、ナノスフィアの表面がHA分子によって被覆されていることが示唆された。

#### [実施例3]ジクロフェナック封入ヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

##### (実施例3-1)調製方法

##### ・溶媒拡散法

実施例2-2と同様の操作により調製した、25kダルトンのHA由来のHA-PLAを含むナノスフィア分散溶液(HA-PLA:PLAがおおよそ1:9)を凍結乾燥したもの40mg、ジクロフェナック(シグマ社より購入したものを塩酸再沈でH型にイオン交換し、純水で洗浄、乾燥したもの)10mgをそれぞれ秤取し、1. 0mLのDMSOに溶解させた。これを4. 0mLの水に攪拌しながら滴下したところ薄い白色半透明溶液になった。この混合溶液を透析チューブ(MWCO:12000-14000、Spectra/Por 4)に移し、水に対して透析を行った(3日、室温)。得られた水溶液を遠心(1000rpm×10

分)によって沈殿と上澄みを分離、上澄みを回収し、凍結乾燥した。

#### ・透析法

実施例2-2と同様の操作により調製した、25KダルトンのHA由来のHA-PLAを含むナノスフィア分散溶液(HA-PLA:PLAがおおよそ1:9)を凍結乾燥したもの40mg、ジクロフェナック10mgをそれぞれ秤取し、1.0mLのDMSOに溶解させた。これを透析チューブ(MWCO:12000-14000、Spectra/Por 4)に移し、水に対して透析を行ったところ、すぐに白濁し沈殿も生じた(3日、室温)。得られた水溶液を遠心(1000rpm×10分)によって沈殿と上澄みを分離、上澄みを回収し、凍結乾燥した。

(実施例3-2) ナノスフィア中のジクロフェナック定量

#### ・標準溶液の調製

ジクロフェナック、5.13mg/mL-アセトニトリルの2倍希釈液(6列)を調製した(A)。内部標準(IS)溶液として、n-ヘプチル 4-ヒドロキシベンゾエート、2.60mg/mL-アセトニトリル溶液を調製した(B)。200 $\mu$ L(A)と20 $\mu$ L(B)を混合し、ジクロフェナック定量用の標準溶液とした(C)。

#### ・ナノスフィアからのジクロフェナックの抽出・サンプル調製

溶媒拡散法・透析法によって調製したナノスフィアをそれぞれ4.91mg、5.45mg秤取し、1.0mLのアセトニトリルに溶解した。充分攪拌した後、遠心(1500rpm×5分)することで、サンプル中のジクロフェナックを抽出し、上澄みを回収した(D)。200 $\mu$ L(D)と20 $\mu$ L(B)を混合し、ジクロフェナック定量サンプルとした(E)。

#### ・RPHPLCによるジクロフェナックの定量

(C)および(E)についてRPHPLC測定を行い、IS法によるジクロフェナックの定量を行った。

#### HPLC条件

溶出液: 0.1%TFA 60%MeCNaq

検出器: UV(280nm)

カラム: Intakt Cadenza CD-C18

流速: 1.0mL/分

サンプル注入量: 10  $\mu$  L

この結果、ジクロフェナック封入率は、溶媒拡散法で、4.9重量%、透析法で1.4重量%であった。

#### [比較例1]PLAナノスフィアの調製

##### (比較例1-1)PLAナノスフィアの調製

PLAをDMSOに溶かし(0.316g/mL DMSO)、実施例2-3と同様の方法で水に対して透析した。白濁水溶液が得られたが、沈殿物も確認された。分散溶液の粒径を測定した結果、273.3nmであった。4°Cで1ヶ月間保存したが、保存1日後でほとんどが凝集沈殿した。保存1ヵ月後の写真を図9に、同SEM写真を図12に示す。粒子が凝集していることが分かる。

#### [実施例4]ヒドラジド基の導入によるステルス性ヒアルロン酸修飾物の合成および機能評価

##### (実施例4-1)HZ基が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)の合成

HA(電気化学工業株式会社:粘度平均分子量25kダルトン)840mgを、0.1%濃度で蒸留水/EtOH=50/50に溶解した。HAのユニット:EDC:ADH=1:4:40モル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7-4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析(MWCO:12000-14000)し、凍結乾燥してヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)86.6mgを得た。得られたHA-HZのD<sub>2</sub>O中でのNMRスペクトル測定結果を図15に示す。HZ基導入率をADH導入率としてプロトンNMR法で定量したところ、HAユニット(2糖)に対して63.0%であった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm、HZ:ADH由来の4つのメチレンプロトン、1.5、2.1および2.25ppm)。

##### (実施例4-2)HA-HZの酵素耐性評価

実施例4-1で得られたHA-HZを0.5mg/mL濃度に0.1Mリン酸緩衝液(pH6.2)に溶解した。この溶液80  $\mu$  LにヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)0.5U/mL溶液32  $\mu$  Lを加えて37°Cで24時間インキュベートした。対照として酵素非添加群も同様に行った(データ省略)。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(以下

、GPCとも称す)に供してHA-HZの分子量の変化、分解産物の生成パターンを観察した。GPCの条件を以下に示す。

#### GPC条件

GPCカラム: Superdex 200 10/300 GL、Superdex 75 HR 10/30、Superdex Peptide HR 10/30(全てアマシャムバイオサイエンス株式会社製)  
(3本連結)

移動相: PBS (pH7.4)

溶出モード: Isocratic

流速: 0.4mL/分

サンプル注入量: 50  $\mu$ L

検出器: UV、Abs. at 232nm

酵素分解産物のGPCプロファイルを図16に示した。検討におけるGPC条件下、HA-HZのピークトップは保持時間およそ75分に、酵素分解産物である2糖は保持時間およそ130分に観察される。

[0098] 実施例4-1で得られた試料は、酵素分解による分子量の低下が著しく抑制されたことが示された。

(実施例4-3)薬物動態試験のためのFITC化HA-HZの合成

実施例4-1で得られたHA-HZ(38.9mg)を、2.0mg/mLの濃度で50mM炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解した。HAのユニットに対して0.15モル倍のフルオレセインイソチオシアネート(以下、FITCとも称す)(ピアス社製)をHA-HZ溶液の1/10容量のジメチルスルホキシド(以下、DMSOとも称す)溶液として加えて室温で1時間攪拌した。脱塩カラムPD-10(アマシャムバイオサイエンス社製)で未反応のFITCを除去した後、HAのユニットに対して40モル倍の無水コハク酸(和光純薬工業社製)をPD-10で粗精製した溶液の1/10容量のDMSO溶液として加えた。室温で1時間攪拌して反応させた後、大過剰量の水に対して透析して精製し、凍結乾燥して実施例4-1のHA-HZをFITC標識した蛍光標識HA-HZ(380mg)を得た。

[0099] こうして得られた蛍光標識HA-HZを0.25mg/mLの濃度で50mM炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、その溶液の494nmにおける吸光度からFITC濃度を定量し、

以下の連立方程式を解いて各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA修飾物中のHA由来の重量分率算出を行った。

[0100] 未修飾HAユニット:  $x$  nmol/mL

HA-SUCユニット:  $y$  nmol/mL (残存HZが無水コハク酸処理されたユニット)

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

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

実施例4-3の蛍光標識HA-HZは、HZ 63%、FITC 1.5%の導入率であることが示された。

(実施例4-4)薬物動態試験によるステルス性評価

#### ・HA投与ラット血漿サンプル

実施例4-3の蛍光標識HA誘導体をヒアルロン酸換算10mg/kgの用量でラット静脈内に単回投与し、投与前および投与後0.25、1、2、4、6、8、10、12、24、30、54時間に採血(ヘパリン処理)し、遠心分離により血漿を得た。この血漿サンプルは測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。

#### ・測定方法

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

#### GPC条件

GPCカラム: TSKgel G6000PWXL

移動相: PBS (pH7.4)

溶出モード: Isocratic

流速: 0.5mL/分

サンプル注入量: 40  $\mu\text{L}$

検出器: 蛍光 (EX:490, EM:518)

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

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

・血漿中のHA修飾物濃度の算出： 解析ソフトMilleniumを用いてピーク面積を算出した。各標準試料のピーク面積から得られた検量線より血漿中のHA修飾物濃度を算出した。

### 薬物動態データ

実施例4-3の蛍光標識HA誘導体の血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 3. 3 (Pharsight社) で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の最終測定点3点のデータを用いてモデル非依存的解析を行い、半減期 ( $t_{1/2}$ )、平均血中滞留時間 (MRT) を算出した。算出した薬物動態学的パラメーターを表1に示す。

[0101] [表1]

表1. FITC標識化HA誘導体の薬物動態学的パラメーター

	HAMw (kダルトン)	HZ (%:NMR)	Cl (mL/hr/kg)	MRT(h)	$t_{1/2}$ (h)
実施例4-3	25	63	4.03 ± 0.3	32.8 ± 1.7	25.2 ± 2.0

蛍光標識HA誘導体を用いた薬物動態試験により、ヒドラジド基を導入したHA誘導体は、未修飾のHAと比較して、ラット単回静脈内投与後の血中滞留時間が改善されることが確認された。未修飾のHAの血中半減期 ( $t_{1/2}$ ) は数分程度であるのに対して、ヒドラジド基を導入することで血中半減期が25. 2 ± 2. 0 (時間) となった。

[実施例5] アミノ基の導入によるステルス性ヒアルロン酸修飾物の合成・機能評価  
(実施例5-1) AM基が導入されたヒアルロン酸 (HA-AM) の合成-1

テトラブチルアンモニウム (TBA) 塩化したDOWEX 50WX8-400 (アルドリッチ社製) を用いてTBA塩化したHA-TBA (HA: 電気化学工業株式会社: 粘度平均分子量19kダルトン) 305. 2mgを、2mg/mL濃度でDMSOに溶解した。HAのユニット: BOP (和光純薬工業社製) : エチレンジアミン (EDA) (シグマ-アルドリッチ社製) = 1:1. 1:50モル比になるようにEDA、BOPの順に添加し、室温で一晩反応させた。その後80mLを分取し、1M NaCl水溶液を1/2量の40mL加えた後、5N

HClにてpH3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の水に対して透析精製し(スペクトラポア7、MWCO:12000-14000ダルトン)、限外ろ過後、凍結乾燥して標題のアミノ基が導入されたヒアルロン酸110mgを得た。得られたHA-AMのD<sub>2</sub>O中でのNMRスペクトル測定結果を図17に示す。

[0102] HZ基導入率をAM導入率としてプロトンNMR法で定量したところ、HAユニット(2糖)に対して94.0%であった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm、AM:EDA由来の1つのメチレンプロトン、2.98ppm)。なお、NMR測定はNMR分光計としてJNM-ECA500(500MHz分光計)を使用し、実施例4-1と同様の条件(パラメーター)で測定を行なった。

#### (実施例5-2) AM基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)の合成-2

TBA塩化したHA-TBA(HA:電気化学工業株式会社:粘度平均分子量200kダルトン)を用い、HAのユニット:BOP:エチレンジアミン(EDA)=1:1.08:50のモル比以外は実施例5-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)を得た。プロトンNMR法(測定溶媒:D<sub>2</sub>O)で定量したところ、HAユニット(2糖)に対して68.0%であった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.89ppm、HZ:AM由来の1つのメチレンプロトン、3.00ppm)。

#### (実施例5-3) AM基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)の合成-3

HAのユニット:BOP:2,2-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)(EDOBEA)(シグマ-アルドリッチ社製)=1:1.0:50のモル比以外は実施例5-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)を得た。プロトンNMR法(測定溶媒:D<sub>2</sub>O)で定量したところ、HAユニット(2糖)に対して58.0%であった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.89ppm、HZ:AM由来の1つのメチレンプロトン、3.05ppm)。

#### (実施例5-4) HA-AMの酵素耐性評価

実施例5-1-5-3で得られたHA-AMを2mg/mL濃度に水に溶解した。この溶液55μLに0.2Mリン酸緩衝液(pH6.2)132μLおよび水77μLを加え、ヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)1U/mL溶液(0.01%BSAを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH6.2))44μLを加えて37°Cで24時間インキュベートした。対象と

して酵素非添加群も同様に行った(データ省略)。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(以下、GPCとも称す)に供してHA-AMの分子量の変化、分解産物の生成パターンを観察した。なお、GPCは実施例4-2と同様の条件(パラメーター)で測定を行った。

[0103] 酵素分解産物のGPCプロファイルを図18に示した。本検討におけるGPC条件下、酵素分解産物である2糖は、保持時間およそ130分に観察される。実施例5-1-5-3で得られた試料は、酵素分解による分子量の低下が著しく抑制されたことが示された。

[実施例6]PLAが導入されたヒアルロン酸の合成・溶解性評価

(実施例6-1)HZ基の導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)のTBA塩化

実施例4-1と同様の方法で得られたHA-HZ 1000mgを1000mLの蒸留水に溶かし(0.1%濃度)、H型にしたカチオン交換樹脂(Dowex 50WX8-400、2.1 meq/g)37.5mLを添加(HAのカルボキシル基の100倍のイオン交換能)室温で1晩放置した。上澄みを回収、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過した後、40wt% TBA-OH水溶液を1.85 $\mu$ L添加することで、pH7.0に調整し、得られた水溶液を凍結乾燥することでTBA塩化HA-HZの白色粉末を得た。収量は932.8mgであった。

(実施例6-2)PLA(粘度平均分子量5kダルトン)が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ-PLA)の合成

PLA濃度25mg/mL、PLA/EDC/NHS=1/1/1(モル比)となるように、PLA-0005(和光純薬工業:粘度平均分子量5kダルトン、数平均分子量2.83kダルトン)、EDC、NHSを無水DMSOに溶かし、密栓下、室温で3時間攪拌することで、PLAの末端カルボキシル基を活性エステル化した。一方で、実施例6-1で調製したTBA塩化HA-HZを5mg/mLになるように無水DMSOに溶かした。TBA塩化HA-HZ溶液に無水DMSO、活性エステル化PLA溶液を表2(a-j)に示す割合で順に添加し(最終的なTBA塩化HA-HZ濃度、1.5mg/mL)、これらを混合、密栓下、室温で1晩攪拌した。この反応液を蒸留水に対して透析(MWCO:12000-14000、室温、3日間)を行い、得られた白濁溶液を凍結乾燥した。この凍結乾燥物を過剰のアセトンで洗浄、次に過剰のエタノールで洗浄し不溶物を減圧乾燥しHA-HZ-P



LAの白色粉末を得た。DMSOを溶媒にした時のGPCクロマトグラムを図19に示す。GPCの条件は以下に示す通りである。

#### GPC条件

GPCカラム: GMHHR-H(TOSOH製)

移動相: 10mM NaNO<sub>3</sub> (pH7.4)

溶出モード: Isocratic

流速: 1.0mL/分

サンプル注入量: 50  $\mu$ L

検出器: UV、Abs. at 280nm

サンプル濃度: 5.0mg/mL

ピーク位置が高分子側にシフトしていたことからPLAが導入されたことで分子量が増加したことが示唆された。得られたHA-HZ-PLAのDMSO-d<sub>6</sub>中でのプロトンNMRを図20に示す。HA-HZ-PLA中のPLA導入率をNMR法で定量したところ表3に示すように、PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニット(2糖)に対して1.0~46.1%であった。またHA-HZ-PLA分子中のPLAの重量比は5.7~73.4%w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0~5.6ppm)。

[0104] [表2]

表2. 実施例6-2におけるHA-HZ-PLAの合成条件

サンプル	当量比 (PLA/HA unit)	TBA HA-HZ 溶液使用量 (mL)	無水DMSO 使用量(mL)	活性化PLA溶液 使用量(mL)
a	1.3	6.0	13.92	0.08
b	2.6	6.0	13.84	0.16
c	6.5	6.0	13.61	0.39
d	13.0	6.0	13.21	0.79
e	26.0	6.0	12.42	1.58
f	39.0	6.0	11.64	2.36
g	52.0	6.0	10.85	3.15
h	65.0	6.0	10.06	3.94
i	130.0	6.0	6.12	7.88
j	195.0	6.0	2.18	11.82

[0105] [表3]

表3. 実施例6-2で得たHA-HZ-PLAの合成結果

サンプル	収量(mg)	PLA導入率(%)	PLA重量比(%w/w)
a	15.3	1.0	5.7
b	15.8	2.0	10.6
c	19.6	4.1	19.6
d	22.2	7.3	30.0
e	25.8	12.5	42.5
f	28.3	13.6	44.6
g	26.9	17.1	50.4
h	29.8	20.8	55.3
i	32.6	35.4	67.9
j	35.3	46.1	73.4

(実施例6-3)PLA(粘度平均分子量20kダルトン)が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ-PLA)の合成

実施例6-2のPLA-0005をPLA-0020(和光純薬工業:粘度平均分子量20kダルトン、数平均分子量8.73kダルトン)に変更、TBA塩化HA-HZ溶液と無水DMSO、活性エステル化PLA溶液の混合比を表4(k-t)に変更し、その他は実施例6-2と同様の方法でHA-HZ-PLAの白色粉末を得た。このときのGPCクロマトグラムを図21に、プロトンNMRを図22に示す。HA-HZ-PLA中のPLA導入率をNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ表5に示すように、PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニット(2糖)に対して0.9-12.8%であった。またHA-HZ-PLA分子中のPLAの重量比は13.5-69.9% w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0-5.6ppm)。

[0106] [表4]

表4. 実施例6-3におけるHA-HZ-PLAの合成条件

サンプル	当量比 (PLA/HA unit)	TBA HA-HZ 溶液使用量 (mL)	無水DMSO 使用量(mL)	活性化PLA溶液 使用量(mL)
k	1.3	12.0	27.52	0.48
l	2.6	12.0	27.04	0.96
m	6.5	12.0	25.59	2.41
n	13.0	12.0	23.18	4.82
o	19.5	12.0	20.77	7.23
p	26.0	12.0	18.37	9.63
q	32.5	12.0	15.96	12.04
r	39.0	12.0	13.55	14.45
s	52.0	12.0	8.73	19.27
t	65.0	12.0	3.92	24.08

[0107] [表5]

表5. 実施例6-3で得たHA-HZ-PLAの収量、PLA導入率、PLA重量比

サンプル	収量(mg)	PLA導入率(%)	PLA重量比(%w/w)
k	40.2	0.9	13.5
l	25.2	1.1	17.2
m	44.1	1.7	23.4
n	48.0	2.7	33.2
o	52.2	3.9	41.2
p	55.4	4.9	47.2
q	58.7	5.5	49.9
r	62.1	6.6	54.5
s	57.7	9.7	63.7
t	75.3	12.8	69.9

(実施例6-4) HA-HZ-PLAの水およびDMSOにおける分散性または溶解性

実施例4-1と同様の方法で得られたHA-HZ、実施例6-2、および実施例6-3において合成したHA-HZ-PLAの白色粉末をそれぞれ約5mg秤取し、5mg/mLになるように蒸留水を添加し、室温で一晩攪拌した。攪拌を停止し、その後3日間室温において静置したときの外観を目視によって確認した結果を表6に示す。この結果、HA-HZ-PLAはPLAの重量比5.7~19.6%w/wの範囲において、水へ均一に分散しやすく、これ以上のPLA重量比においては、水に分散しにくいことが示唆された。さらに、沈殿物が見られなかったものについては、それぞれの溶液を遠心(1500g、10分)したところHA-HZ水溶液を除いて、全て白色の沈殿物が見られた。この結果、HA-HZ-PLAは実施例6-2および6-3で実施した範囲(PLAの重量比5.7~73.4%w/w)において水中に溶解しにくく、また分散してもその分散安定性は低いことが示唆された。

[0108] 次に、実施例4-1と同様の方法で得られたHA-HZ、実施例6-2、および実施例6-3において合成したHA-HZ-PLAの白色粉末をそれぞれ約5mg秤取し、5mg/mLになるようにDMSOを添加し、室温で一晩攪拌した。そのときの溶解性を目視に

よって確認した結果を表6に示す。その結果、HA-HZ-PLAは、少なくともPLAの重量比5.7-73.4%w/wの範囲においてDMSOに溶解性を持つことが示唆された。

[0109] [表6]

表6. 実施例6-2および6-3で得たHA-HZ-PLAの溶液または分散液の外観

サンプル	PLA重量比 (%w/w)	水溶液(5mg/mL) 外観(攪拌後、静置)	水溶液(5mg/mL) 外観(遠心後)	DMSO溶液(5mg/mL) 外観
HA-HZ	0.0	無色透明	無色透明	無色透明
a	5.7	薄白色	薄白色(白色沈殿有り)	無色透明
b	10.6	薄白色	薄白色(白色沈殿有り)	無色透明
c	19.6	薄白色	薄白色(白色沈殿有り)	無色透明
d	30.0	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
e	42.5	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
f	44.6	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
g	50.4	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
h	55.3	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
i	67.9	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
j	73.4	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
k	13.5	薄白色	薄白色(白色沈殿有り)	無色透明
l	17.2	薄白色	薄白色(白色沈殿有り)	無色透明
m	23.4	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
n	33.2	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
o	41.2	薄白色(白色沈殿有り)	-	無色透明
p	47.2	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
q	49.9	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
r	54.5	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
s	63.7	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明
t	69.9	無色透明(白色沈殿有り)	-	無色透明

(実施例6-5) 溶媒置換によるHA-HZ-PLAの水への可溶化

実施例4-1と同様の方法で得られたHA-HZ、実施例6-2、および実施例6-3において合成したHA-HZ-PLAの白色粉末をそれぞれ約5mg秤取し、5mg/mLになるようにDMSOに溶解した。このDMSO溶液0.6mLを2.4mLの蒸留水に混合し、さらに蒸留水に対して透析(MWCO:12000-14000、室温、3日間)したところ、得られた水溶液はすべて無色透明溶液であった。この水溶液を遠心(40000g、10分)したところ沈殿物は見られなかった。この結果、HA-HZ-PLAはPLAの重量比5.7-73.4%w/wの範囲において、いったんDMSOに溶解させ、その後溶媒を水に置換することで水に溶解させることができることが示唆された。

[実施例7]ヒアルロン酸被覆PLA(PLGA)微粒子調製法検討のためのPLAが導入されたヒアルロン酸修飾物の合成

(実施例7-1)インタクトHAの機能を残存させたHA-HZの合成

HA(電気化学工業株式会社:粘度平均分子量23kダルトン)1012.7mgを、0.1%濃度で蒸留水/EtOH=50/50に溶解した。HAのユニット:EDC:ADH=1:0.1:40モル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7-4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析(MWCO:12000-14000)した。HZ基導入率測定用に10mLほど凍結乾燥した。HZ基導入率をADH導入率としてプロトンNMR法(測定溶媒: $D_2O$ )で定量したところ、HAユニット(2糖)に対して、9.0%であった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm、HZ:ADH由来の4つのメチレンプロトン、1.5、2.1および2.25ppm)。

(実施例7-2)インタクトHAの機能を残存させたHA-HZのTBA塩化

実施例7-1で調製したHA-HZ水溶液(約0.1%濃度)に、H型にしたカチオン交換樹脂(Dowex 50WX8-400、2.1meq/g)50mLを添加、室温で1晩放置した。上澄みを回収、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過した後、40wt% TBA-OH水溶液を1150 $\mu$ L添加することで、pH7.0に調整し、得られた水溶液を凍結乾燥することでTBA塩化HA-HZの白色粉末を得た。収量は1113.6mgであった。

(実施例7-3)PLA(5kダルトン)が導入されたインタクトHAの機能を残存させたヒアルロン酸(HA-HZ-PLA)の合成

実施例7-2で調製したTBA塩化HA-HZを用い、実施例6-2のTBA塩化HA-HZ溶液と無水DMSO、活性エステル化PLA溶液の混合比を表7に変更し、その他は実施例6-2と同様の方法でHA-HZ-PLAの白色粉末を得た。HA-HZ-PLA中のPLA導入率をNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ、PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニット(2糖)に対して8.0%であった。またHA-HZ-PLA分子中のPLAの重量比は36.7%w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0-5.6ppm)。

(実施例7-4)PLA(20kダルトン)が導入されたインタクトHAの機能を残存させたヒアルロン酸(HA-HZ-PLA)の合成

実施例7-2で調製したTBA塩化HA-HZを用い、実施例6-2のPLA-0005をPLA-0020に変更、TBA塩化HA-HZ溶液と無水DMSO、活性エステル化PLA溶液の混合比を表7に変更し、その他は実施例6-2と同様の方法でHA-HZ-PLAの白色粉末を得た。HA-HZ-PLA中のPLA導入率をNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ、PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニット(2糖)に対して1.9%であった。またHA-HZ-PLA分子中のPLAの重量比は29.5%w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0-5.6ppm)。

(実施例7-5)PLA(5kダルトン)が低い導入率で導入されたステルス性ヒアルロン酸(HA-HZ-PLA)の合成

実施例6-1と同様の方法で調製したTBA塩化HA-HZを用い、実施例6-2のTBA塩化HA-HZ溶液と無水DMSO、活性エステル化PLA溶液の混合比を表7に変更し、その他は実施例6-2と同様の方法でHA-HZ-PLAの白色粉末を得た。HA-HZ-PLA中のPLA導入率をNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ、PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニット(2糖)に対して4.5%であった。またHA-HZ-PLA分子中のPLAの重量比は21.1%w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カル

ボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0–5.6ppm)。  
 (実施例7–6)PLA(5kダルトン)が高い導入率で導入されたステルス性ヒアルロン酸  
 (HA–HZ–PLA)の合成

実施例6–1と同様の方法で調製したTBA塩化HA–HZを用い、実施例6–2のTB  
 A塩化HA–HZ溶液と無水DMSO、活性エステル化PLA溶液の混合比を表7に変  
 更し、その他は実施例6–2と同様の方法でHA–HZ–PLAの白色粉末を得た。HA  
 –HZ–PLA中のPLA導入率をNMR法(測定溶媒:DMSO-d<sub>6</sub>)で定量したところ、  
 PLAの分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HAユニッ  
 ト(2糖)に対して30.9%であった。またHA–HZ–PLA分子中のPLAの重量比は6  
 5.1%w/wであった(HA:N–アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カル  
 ボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0–5.6ppm)。

[0110] [表7]

表7. 実施例7–3から7–6におけるHA–HZ–PLAの合成条件

サンプル	HZ (%)	PLA 分子量 (kダルトン)	当量比 (PLA/HA unit)	TBA HA–HZ 溶液 (mL)	無水 DMSO (mL)	活性化PLA 溶液(mL)
実施例 7–3	9.0	5	10.0	80.0	179.5	7.5
実施例 7–4	9.0	20	10.0	80.0	164.2	22.8
実施例 7–5	63.0	5	6.5	100.0	226.4	6.6
実施例 7–6	63.0	5	130.0	100.0	101.7	131.3

[0111] [表8]



表 8. 実施例 7-3 から 7-6 の HA-HZ-PLA の合成結果

サンプル	収量 (mg)	PLA導入率(%)	PLA重量比(%w/w)
実施例 7-3	331.6	8.0	36.7
実施例 7-4	313.1	1.9	29.5
実施例 7-5	420.1	4.5	21.1
実施例 7-6	750.0	30.9	65.1

(実施例 7-7) PLA (5kダルトン) が高い導入率で導入されたステルス性ヒアルロン酸 (HA-AM-PLA) の合成

実施例 5-1 と同様の方法で得られた HA-AM の DMSO 溶液を DMSO 1L に対して透析を 4 回行い (MWCO: 12000-14000、室温) 未反応 EDA、BOP 等の不純物を除去した。

- [0112] また、PLA 濃度 10mg/mL、PLA/EDC/NHS = 1/1/1 (モル比) となるように、PLA-0005 (和光純薬工業: 粘度平均分子量 5kダルトン、数平均分子量 2.83kダルトン)、EDC、NHS を無水 DMSO に溶かし、室温で 20 分攪拌することで、PLA の末端カルボキシル基を活性エステル化した。
- [0113] この活性エステル溶液を HA-AM のアミノ基に対してカルボン酸が 2 倍量となるように添加し、室温で 1 晩攪拌した。
- [0114] この反応液を DMSO に対して透析 (MWCO: 12000-14000、室温、2 日間) を 4 回、水に対して 5 回行い、得られた白濁溶液を凍結乾燥した。この凍結乾燥物を過剰のアセトンで洗浄、次に過剰のエタノールで洗浄し不溶物を減圧乾燥し HA-AM-PLA の白色粉末 365.1mg を得た。
- [0115] 得られた HA-AM-PLA の DMSO-d<sub>6</sub> 中でのプロトン NMR を図 23 に示す。HA-AM-PLA 中の PLA 導入率を NMR 法 (測定溶媒: DMSO-d<sub>6</sub>) で定量したところ、PLA の分子量分布が原料と導入されたもので変わらないと仮定した場合、HA ユニット (2糖) に対して 87.2% であった。また HA-AM-PLA 分子中の PLA の重量比は 8

6. 1%w/wであった(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.85ppm;PLA:カルボニル基の $\alpha$ 位のメチンプロトン(ただし、OH末端は除く)、5.0-5.6ppm)。

[実施例8]ヒアルロン酸被覆PLA(PLGA)微粒子調製法検討のためのHA-HZ-PLA水溶液の調製

(実施例8-1)HA-HZ-PLA水溶液の調製

実施例7-3において合成したHA-HZ-PLAを250mg秤取し、40mg/mLになるように蒸留水を添加し、室温で一晩攪拌することで、溶解させた。得られた水溶液はうっすら白色を呈した透明溶液であった。

(実施例8-2)DMSO溶媒拡散法によるHA-HZ-PLA水溶液の調製-1

実施例7-4で合成したHA-HZ-PLAを250mg秤取し、5.0mg/mLになるようにDMSOを添加し、溶解させた。これを加えたDMSOの4倍量の蒸留水に対して混合した後、蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、1日間)した。得られた水溶液は無色透明溶液であった。この水溶液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過した後、限外濾過(Vivaspin20 MWCO:10000、Vivascience)により濃縮した。濃度定量は、得られた濃縮溶液200 $\mu$ Lを凍結乾燥し、乾燥粉末の重量を測定することによって行ったところ5.7mg/mLであり、さらに2.0mg/mLになるように蒸留水を添加し、よく混合した。

(実施例8-3)DMSO溶媒拡散法によるHA-HZ-PLA水溶液の調製-2

実施例7-5で合成したHA-HZ-PLAを150mg秤取し、5.0mg/mLになるようにDMSOを添加し、溶解させた。これを加えたDMSOの4倍量の蒸留水に対して混合した後、蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。得られた水溶液は無色透明溶液であった。この水溶液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過した後、限外濾過(Vivaspin20 MWCO:10000、Vivascience)により濃縮した。濃度定量は、得られた濃縮溶液200 $\mu$ Lを凍結乾燥し、乾燥粉末の重量を測定することによって行ったところ、7.2mg/mLであり、さらに2.0mg/mLになるように蒸留水を添加し、よく混合した。

(実施例8-4)DMSO溶媒拡散法によるHA-HZ-PLA水溶液の調製-3

実施例7-6で合成したHA-HZ-PLAを150mg秤取し、5.0mg/mLになるよう

にDMSOを添加し、溶解させた。これを加えたDMSOの4倍量の蒸留水に対して混合した後、蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。得られた水溶液は無色透明溶液であった。この水溶液を5.0  $\mu$ mのフィルターで濾過した後、限外濾過(Vivaspin20 MWCO:10000、Vivascience)により濃縮した。濃度定量は、得られた濃縮溶液200  $\mu$ Lを凍結乾燥し、乾燥粉末の重量を測定することによって行ったところ、6.5mg/mLであり、さらに2.0mg/mLになるように蒸留水を添加し、よく混合した。

#### (実施例8-5) DMSO溶媒拡散法によるHA-AM-PLA水溶液の調製

実施例7-7で合成したHA-AM-PLAを20mg秤取し、5.0mg/mLになるようにDMSOを添加し、溶解させた。これを加えたDMSOの4倍量の蒸留水に対して混合した後、蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。得られた水溶液は無色透明溶液であった。この水溶液を5.0  $\mu$ mのフィルターで濾過した後、限外濾過(Vivaspin20 MWCO:10000、Vivascience)により濃縮した。濃度定量は、得られた濃縮溶液200  $\mu$ Lを凍結乾燥し、乾燥粉末の重量を測定することによって行ったところ、10.4mg/mLであり、さらに2.0mg/mLになるように蒸留水を添加し、よく混合した。

#### [実施例9] CD44へのターゲティングを目的としたヒアルロン酸被覆PLA(PLGA)微粒子の調製

##### (実施例9-1) DMSO透析法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製

実施例7-4で合成したHA-HZ-PLAを12mg、PLA-0005を108mg秤取し、3mLのDMSOに溶解させた。これを蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を32  $\mu$ mのふるいにかけて凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は53.2mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は153  $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.29%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観

察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。

(実施例9-2) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-1

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を $5.0 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は140mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は $60 \mu\text{g}$ (微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.43%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicom 370)を行い、粒径の測定値は225.3nmであった。

(実施例9-3) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-2

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。透析液を $5.0 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は23.9mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は $22 \mu\text{g}$ (微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.09%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicom 370)を行い、粒径の測定値は308.9nmであった。

(実施例9-4) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-3

実施例7-4で合成したHA-HZ-PLAを4mg、PLA-0005を36mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混

合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)し、透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は3.7mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は70 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、1.89%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は288.2nmであった。

#### (実施例9-5) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-4

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は16.7mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は1 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.01%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は220.2nmであった。

#### (実施例9-6) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-5

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は26.3mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(

HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は7 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.03%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は196.9nmであった。

(実施例9-7)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-1

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は14.5mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は104 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.72%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は367.8nmであった。

(実施例9-8)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-2

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は20.1mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は99 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.49%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は336.9nmであった。

(実施例9-9)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-3

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0  $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は20.9mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は18  $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.09%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は328.3nmであった。

(実施例9-10)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLA微粒子の調製-4

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0  $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は22.9mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は27  $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.12%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は328.1nmであった。

(実施例9-11)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の調製-1

PLGA-7520(和光純薬工業:粘度平均分子量20kダルトン、Lactide比75%mol/mol)を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、回転式ホモジナイザー(ポリトロ

ン PT3100)を用いて乳化(10000rpm、5分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。32  $\mu$  mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は62.1mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は675  $\mu$  g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、1.09% w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $2.7 \pm 1.1 \mu$  mであった。

#### (実施例9-12)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の調製-2

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1% w/v PVA水溶液と混合し、回転式ホモジナイザー(ポリロン PT3100)を用いて乳化(10000rpm、5分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。32  $\mu$  mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は61.3mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は140  $\mu$  g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.23% w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $1.2 \pm 0.2 \mu$  mであった。



(実施例9-13) エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の調製-3

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、回転式ホモジナイザー(ポリロン PT3100)を用いて乳化(10000rpm、5分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。32 $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は55.0mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は251 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.46%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、3.0 $\pm$ 1.2 $\mu$ mであった。

(実施例9-14) エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の調製-4

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、回転式ホモジナイザー(ポリロン PT3100)を用いて乳化(10000rpm、5分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。32 $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8-2において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は56.3mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は608 $\mu$ g(微粒

子中のHA-HZ-PLA比、1.08%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $1.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった。

#### [比較例2] PLGA微粒子の調製

##### (比較例2-1) エマルション液中乾燥法によるPLGA微粒子の調製

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを18mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、回転式ホモジナイザー(ポリロン PT3100)を用いて乳化(10000rpm、5分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。32 $\mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は57.3mgであった。粒径の測定は、PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $1.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であった。

[0116] [表9]

表9. 実施例9において調製した微粒子の調製方法、調製条件、調製結果

実施例	微粒子調製方法	有機相	HA-HZ-PLA重量比 (%w/w)	HA被覆方法 (HA-HZ-PLAの使用方法)	微粒子平均粒径	HA-HZ-PLA含量 (%w/w)
実施例9-1	透析法	DMSO	29.5	有機相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	1.0 $\mu$ m	0.29
実施例9-2	溶媒拡散法	DMSO	36.7	水相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	225.3 nm	0.43
実施例9-3	溶媒拡散法	DMSO	36.7	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	303.9 nm	0.09
実施例9-4	溶媒拡散法	DMSO	29.5	有機相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	283.2 nm	1.89
実施例9-5	溶媒拡散法	DMSO	29.5	水相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	220.2 nm	0.01
実施例9-6	溶媒拡散法	DMSO	29.5	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	196.9 nm	0.03
実施例9-7	溶媒拡散法	アセトン	36.7	水相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	367.8 nm	0.72
実施例9-8	溶媒拡散法	アセトン	36.7	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	336.9 nm	0.49
実施例9-9	溶媒拡散法	アセトン	29.5	水相にHA-HZ-PLAを溶解、微粒子生成時に自発的に被覆	328.3 nm	0.09
実施例9-10	溶媒拡散法	アセトン	29.5	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	328.1 nm	0.12
実施例9-11	エマルション液中乾燥法	塩化メチレン	36.7	水相にHA-HZ-PLAを溶解、エマルション生成時に自発的に被覆	2.7 $\mu$ m	1.09
実施例9-12	エマルション液中乾燥法	塩化メチレン	36.7	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	1.2 $\mu$ m	0.23
実施例9-13	エマルション液中乾燥法	塩化メチレン	29.5	水相にHA-HZ-PLAを溶解、エマルション生成時に自発的に被覆	3.0 $\mu$ m	0.46
実施例9-14	エマルション液中乾燥法	塩化メチレン	29.5	微粒子調製後、HA-HZ-PLA水溶液を添加	1.7 $\mu$ m	1.08

[実施例10] 血中滞留性延長、腫瘍組織、炎症組織への集積性を目的としたヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

(実施例10-1) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

-1

実施例7-6で合成したHA-HZ-PLAを4mg、PLA-0005を36mg秤取し、1mL

のDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)し、透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は27.8mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は2178 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、7.82%w/w)であった。粒径の測定は、透析液についてDLS測定(Nicomp370)することによって行ったところ、304.0nmであった。

(実施例10-2) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製  
-2

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は240mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は1257 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、5.24%w/w)であった。粒径の測定は、透析液についてDLS測定(Nicomp370)することによって行ったところ、166.9nmであった。

(実施例10-3) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製  
-3

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴

下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は26.6mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は841 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、3.16%w/w)であった。粒径の測定は、透析液についてDLS測定(Nicom370)することによって行ったところ、198.3nmであった。

(実施例10-4) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製-4

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は35.0mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は3581 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、10.23%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicom370)を行い、粒径の測定値は183.5nmであった。

(実施例10-5) DMSO溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製-5

PLA-0005を40mg秤取し、1mLのDMSOに溶解させた。これをスターラー攪拌下、4mLの蒸留水に対して滴下・混合し、得られた混合溶液を蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)した。透析液を5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液4mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は28.2mgであった。この白色粉末を

過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は342 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、1.21%w/w)であった。透析液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は70.4nmであった。

(実施例10-6)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製  
-1

PLA-0005を10mg秤取し、2mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は7.9mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は882 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、11.15%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は198.3nmであった。

(実施例10-7)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製  
-2

PLA-0005を10mg秤取し、2mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、2mLの蒸留水に対して滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は36mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は137 $\mu$ g(微粒子中のHA-

HZ-PLA比、3.83%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は195.6nmであった。

(実施例10-8)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

-3

PLA-0005を10mg秤取し、2mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は7.2mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は1063 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、14.85%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は163.1nmであった。

(実施例10-9)アセトン溶媒拡散法によるヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアの調製

-4

PLA-0005を10mg秤取し、2mLのアセトンに溶解させた。これをスターラー攪拌下、2mLの蒸留水に対して滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。5.0 $\mu$ mのフィルターで濾過し凝集塊を除去した後、実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、遠心(40000g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は7.9mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は398 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、5.04%w/w)であった。エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)を行い、粒径の測定値は182.1nmであった。

[0117] [表10]

表10. 実施例10において調製した微粒子の調製方法、調製条件および調製結果

実施例	微粒子調製方法	有機相	HA-HZ-PLA PLA重量比 (%w/w)	HA被覆方法 (HA-HZ-PLAの使用方 法)	微粒子 平均粒径	HA-HZ-PLA 含量 (%w/w)
実施例 10-1	溶媒拡散法	DMSO	65.1	有機相にHA-HZ-PLAを 溶解、微粒子生成時に自発 的に被覆	301.0 $\mu\text{m}$	7.82
実施例 10-2	溶媒拡散法	DMSO	21.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的 に被覆	166.9 $\mu\text{m}$	5.24
実施例 10-3	溶媒拡散法	DMSO	21.1	微粒子調製後、HA-HZ- PLA水溶液を添加	198.3 $\mu\text{m}$	3.16
実施例 10-4	溶媒拡散法	DMSO	65.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的 に被覆	183.5 $\mu\text{m}$	10.23
実施例 10-5	溶媒拡散法	DMSO	65.1	微粒子調製後、HA-HZ- PLA水溶液を添加	70.4 $\mu\text{m}$	1.21
実施例 10-6	溶媒拡散法	アセトン	21.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的 に被覆	198.3 $\mu\text{m}$	11.15
実施例 10-7	溶媒拡散法	アセトン	21.1	微粒子調製後、HA-HZ- PLA水溶液を添加	195.6 $\mu\text{m}$	3.83
実施例 10-8	溶媒拡散法	アセトン	65.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的 に被覆	163.1 $\mu\text{m}$	14.85
実施例 10-9	溶媒拡散法	アセトン	65.1	微粒子調製後、HA-HZ- PLA水溶液を添加	182.1 $\mu\text{m}$	5.04

[実施例11]局所刺激低減を目的としたヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製

(実施例11-1)透析法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-1

実施例9-1と同様の手順で調製した。

(実施例11-2)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-1

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった



洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は52.4mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は28 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.05%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、6.8 $\pm$ 3.6 $\mu$ mであった。

(実施例11-3)エマルジョン液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-2

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8-1において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は58.8mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は188 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.32%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、7.4 $\pm$ 2.7 $\mu$ mであった。

(実施例11-4)エマルジョン液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-3

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8

−2において調製したHA−HZ−PLA水溶液8mLと混合し、メカニカルスターラー (EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300  $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は55.4mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA−HZ−PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は83  $\mu$ g(微粒子中のHA−HZ−PLA比、0.15%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、6.8  $\pm$  3.3  $\mu$ mであった。

#### (実施例11−5)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製−4

PLGA−7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、メカニカルスターラー (EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300  $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8−2において調製したHA−HZ−PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は60.8mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA−HZ−PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は83  $\mu$ g(微粒子中のHA−HZ−PLA比、0.14%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および

標準偏差を求めたところ、 $7.8 \pm 5.4 \mu\text{m}$ であった。

(実施例11-6)透析法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-1

実施例7-6で合成したHA-HZ-PLAを12mg、PLA-0005を108mg秤取し、3 mLのDMSOに溶解させた。これを蒸留水に対して透析(MWCO:10000、室温、3日間)、透析液を $32 \mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は91.7mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は $2560 \mu\text{g}$ (微粒子中のHA-HZ-PLA比、2.79%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $1.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった。

(実施例11-7)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-5

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。 $300 \mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は580mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は $261 \mu\text{g}$ (微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.45%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $6.1 \pm 6.2 \mu\text{m}$ であった。

(実施例11-8) エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-6

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8-3において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は58.6mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は158 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.27%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $7.7 \pm 5.7 \mu\text{m}$ であった。

(実施例11-9) エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-7

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu$ mのふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は57.5mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は3068 $\mu$ g(微粒子中のHA-HZ-PLA

比、5.34%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $6.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$ であった。

(実施例11-10)エマルション液中乾燥法によるヒアルロン酸被覆PLGAマイクロスフィアの調製-8

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを8mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物として得られたPLGA微粒子と実施例8-4において調製したHA-HZ-PLA水溶液8mLと混合し、15分ほど攪拌した後、再度、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返し、沈殿物(ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は65.0mgであった。この白色粉末を過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し不溶物(HA-HZ-PLA)を減圧乾燥したところ、その重量は390 $\mu\text{g}$ (微粒子中のHA-HZ-PLA比、0.60%w/w)であった。粒径の測定は、ヒアルロン酸被覆PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $5.6 \pm 2.3 \mu\text{m}$ であった。

[比較例3]PLGAマイクロスフィアの調製

(比較例3-1)エマルション液中乾燥法によるPLGAマイクロスフィアの調製

PLGA-7520を80mg秤取し、2mLの塩化メチレンに溶解させた。これを18mLの1%w/v PVA水溶液と混合し、メカニカルスターラー(EYEL4, MAZERA Z)を用いて乳化(400rpm、15分)した。この乳濁液を開放系で一晩スターラーで攪拌することで、塩化メチレンを除去した。300 $\mu\text{m}$ のふるいをかけ凝集塊を除去した後、遠心(1500g、10分)、上澄み除去、蒸留水添加、といった洗浄操作を3回ほど繰り返

し、沈殿物(PLGA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は53.9mgであった。こ粒径の測定は、PLGA微粒子の白色粉末を蒸留水に対して再分散させ、光学顕微鏡観察により無作為に50個の微粒子を抽出し画像解析することによって、その平均値および標準偏差を求めたところ、 $5.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$ であった。

[0118] [表11]

表11. 実施例11において調製した微粒子の調製方法、調製条件および調製結果

実施例	微粒子調製方法	有機相	HA-HZ-PLA PLA重量比 (%w/w)	HA被覆方法 (HA-HZ-PLAの使用方 法)	微粒子 平均粒径	HA-HZ-PLA 含量 (%w/w)
実施例 11-1	透析法	DMSO	29.5	有機相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	1.0 $\mu\text{m}$	0.29
実施例 11-2	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	36.7	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	6.8 $\mu\text{m}$	0.05
実施例 11-3	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	36.7	微粒子調製後、HA-HZ-PL A水溶液を添加	7.4 $\mu\text{m}$	0.32
実施例 11-4	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	29.5	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	6.8 $\mu\text{m}$	0.15
実施例 11-5	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	29.5	微粒子調製後、HA-HZ-PL A水溶液を添加	7.8 $\mu\text{m}$	0.14
実施例 11-6	透析法	DMSO	65.1	有機相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	1.6 $\mu\text{m}$	2.79
実施例 11-7	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	21.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	6.1 $\mu\text{m}$	0.45
実施例 11-8	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	21.1	微粒子調製後、HA-HZ-PL A水溶液を添加	7.7 $\mu\text{m}$	0.27
実施例 11-9	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	65.1	水相にHA-HZ-PLAを溶 解、微粒子生成時に自発的に 被覆	6.9 $\mu\text{m}$	5.34
実施例 11-10	エマルション 液中乾燥法	塩化メチレン	65.1	微粒子調製後、HA-HZ-PL A水溶液を添加	5.6 $\mu\text{m}$	0.60

[実施例12]ヒアルロン酸被覆PLAナノスフィアへのパクリタキセル(PTX)封入

(実施例12-1)アセトン溶媒拡散法による調製-1

パクリタキセル(以下、PTXとも称す)(Natural Pharmaceuticals, Inc. Lot No. 150206602-1)10mgを秤取し2mLのアセトンに溶解させた。PLA-0005を9.0mg秤取し、PTXのアセトン溶液に添加して溶解させた。これをスターラー攪拌

下、実施例7-6と同様の方法で合成し実施例8-4と同様の方法で得たHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトン除去した。その後、脱塩カラム(PD-10)による精製を行い、遠心(40000g、10分)、沈殿物(PTX封入ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は8.3mgであった。粒径の測定は、エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)することによって行ったところ、 $99.0 \pm 41.3$ nmであった。得られた白色粉末6.8mgを秤取し、過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し減圧乾燥したところ、その重量は1.3mg(微粒子中のHA-HZ-PLA比、19.1%w/w)であった。

[0119] PTXの定量は、逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いた内標準物質(IS)法によって行った。IS溶液は、約0.7mg/mL n-ヘキシル-p-ヒドロキシベンゾエートのアセトニトリル溶液を調製した。検量線作成のための標準溶液は10mg/mLのPTXアセトニトリル溶液の5倍希釈列(8列)を調製した。また、PTX封入ヒアルロン酸被覆PLA微粒子の白色粉末を1.5mg秤取し、1mLのアセトニトリルを添加、よく攪拌した後、遠心(10000g、10分)、上澄みをPTX濃度定量用溶液として用いた。標準溶液およびPTX濃度定量用溶液400 $\mu$ Lに対してIS溶液25 $\mu$ Lの割合で混合し、RP-HPLC測定を行ったところ、ナノスフィア中のPTX含量は9.9%w/wであった。RP-HPLCの測定条件を以下に示す。

#### RP-HPLC条件

カラム: Cadenza-C-18C (Imtakt)

流速: 0.75mL/分

溶出液:

A: MeCN、B: 超純水 (MilliQ水)

A:B=

50:50(0-10分、isocratic)

50:50→0:100(10-12分、linear gradient)

0:100(12-19分、isocratic)

0:100→50:50(19–20分、linear gradient)

50:50(20–25分、isocratic) 計25分

検出器: UV(230nm)

カラム温度: 40°C

サンプル温度: 4°C

サンプル注入量: 10  $\mu$ L

#### (実施例12-2)アセトン溶媒拡散法による調製-2

PTX10mgを秤取し2mLのアセトンに溶解させた。PLA-0005を9.0mg秤取し、PTXのアセトン溶液に添加して溶解させた。これをスターラー攪拌下、2mLの蒸留水に対して滴下・混合し、15分ほど攪拌した後、得られた混合溶液をエバポレーションすることによってアセトンを除去した。その後、実施例7-6と同様の方法で合成し実施例8-4と同様の方法で得たHA-HZ-PLA水溶液2mLに滴下・混合、15分ほど攪拌した後、脱塩カラム(PD-10)による精製を行い、遠心(40000g、10分)、沈殿物(PTX封入ヒアルロン酸被覆PLA微粒子)を回収し凍結乾燥した。得られた白色粉末の収量は8.4mgであった。粒径の測定は、エバポレーション後の溶液についてDLS測定(Nicomp370)することによって行ったところ、 $142.7 \pm 44.4$ nmであった。得られた白色粉末6.9mgを秤取し、過剰のアセトンでよく洗浄した後、遠心(10000g、10分)、上澄みを除去し減圧乾燥したところ、その重量は0.7mg(微粒子中のHA-HZ-PLA比、10.7%w/w)であった。PTXの定量は、実施例12-1と同様の方法で行ったところナノスフィア中のPTX含量は9.9%w/wであった。

#### 産業上の利用可能性

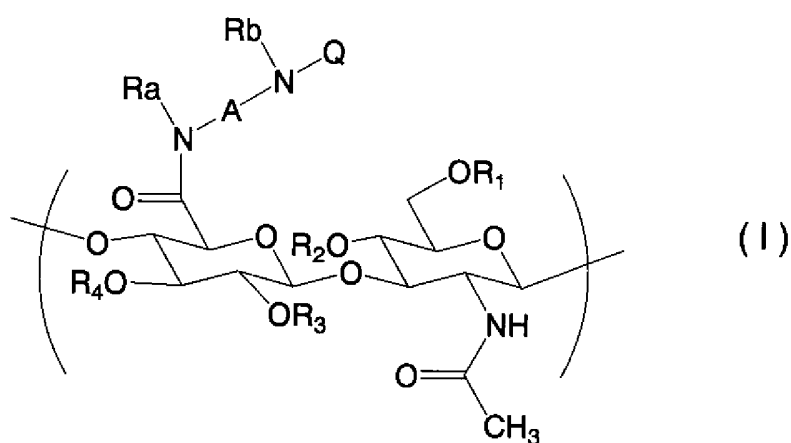
[0120] 本発明の、ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物により、低分子薬物を効率良く封入し、長期に徐放期間を制御でき、血中滞留性が制御でき、水溶液中での分散性が良く、安全性に問題の無い薬物担体が提供される。また、本発明ヒアルロン酸修飾物により、粒子間の凝集の少ないインジェクタブルな微粒子からなる生体適合性に優れた薬物担体が提供される。



## 請求の範囲

- [1] ヒアルロン酸またはその誘導体と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーとが結合したヒアルロン酸修飾物。
- [2] 前記ポリマーが、ヒアルロン酸またはその誘導体に側鎖としてグラフト結合している請求項1に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [3] 前記ポリマーの大部分が、その片末端のみでヒアルロン酸またはその誘導体に結合している請求項1または2に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [4] 前記ポリマーが、その片末端のみでヒアルロン酸またはその誘導体に結合している請求項1または2に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [5] 前記ポリマーが、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基に結合している請求項1～4のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [6] 前記ポリマーが、スペーサーを介して、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基にアミド結合で結合している請求項5に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [7] 前記スペーサーが独立に置換されていてもよい2以上のアミノ基を有し、前記ポリマーの末端のカルボキシル基が前記スペーサーの1つのアミノ基とアミド結合を形成し、ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基が前記スペーサーの別のアミノ基とアミド結合で結合している、請求項6に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [8] 式(I):

[化1]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基および  $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基から選択され、

$R_a$  および  $R_b$  は、それぞれ独立に、水素原子および  $C_{1-6}$  アルキル基から選択され、

$Q$  は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーであり、該ポリマーは末端のカルボキシル基で窒素原子とアミド結合を形成しており、

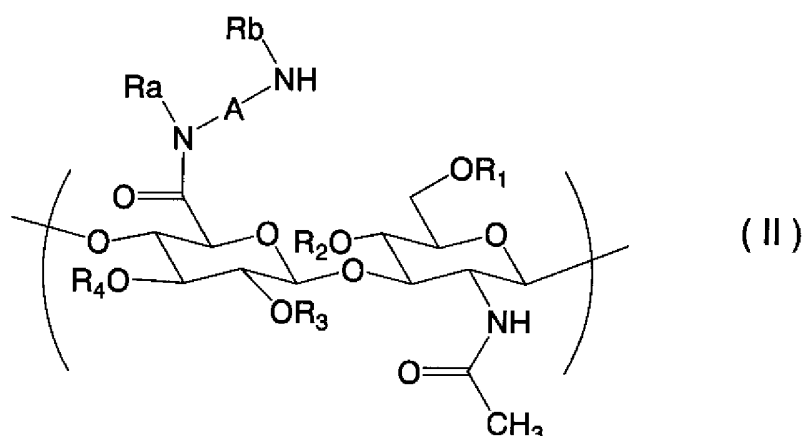
$A$  は、単結合、 $-(CH_2)_m-$ 、 $-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_m-$  または  $-NHCO-(CH_2)_n-CONH-$  であり、

$m$  は 1-10 の整数であり、 $n$  は、0-10 の整数である)

で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも 1 以上含む、請求項 7 に記載のヒアルロン酸修飾物。

- [9]  $R_a$  および  $R_b$  が共に水素原子であり、 $A$  が  $-(CH_2)_m-$ 、 $-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_m-$  または  $-NHCO-(CH_2)_n-CONH-$  である、請求項 8 に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [10] ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する、請求項 1-9 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [11] 哺乳動物において 18 時間以上の平均血中滞留時間を有する、請求項 1-10 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [12] 前記ヒアルロン酸誘導体が、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものである請求項 1-9 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [13] 前記ヒアルロン酸誘導体が、哺乳動物において 18 時間以上の平均血中滞留時間を有する、請求項 1-9 および 12 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸修飾物。
- [14] 前記ヒアルロン酸誘導体が、式 (II) :

[化 2]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_a$ 、 $R_b$ および $A$ は、請求項8に定義した通りである)  
 で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物。

- [15] 請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体。
- [16] 微粒子状である請求項15に記載の薬物担体。
- [17] 粒子径が $200 \mu\text{m}$ 以下である請求項16に記載の薬物担体。
- [18] HAレセプターへのターゲティング能を有する請求項15～17のいずれか1項に記載の薬物担体。
- [19] ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する請求項15～18のいずれか1項に記載の薬物担体。
- [20] 局所刺激性が低減されている請求項15～19のいずれか1項に記載の薬物担体。
- [21] 粘膜付着性を有する請求項15～20のいずれか1項に記載の薬物担体。
- [22] 請求項15～21のいずれか1項に記載の薬物担体および薬物を含む医薬組成物。
- [23] さらにポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを含む、請求項22に記載の医薬組成物。
- [24] 前記ポリマーが、ヒアルロン酸修飾物に結合しているポリマーと同種のものである請求項23に記載の医薬組成物。
- [25] 前記薬物が、前記ヒアルロン酸修飾物が形成する微粒子により封入されている請求項22～24のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [26] 水溶液中で前記ヒアルロン酸修飾物のポリマー部分が形成する疎水性コアを、ヒア

ルロン酸部分が被覆する形状の微粒子を含む、請求項22～25のいずれか1項に記載の医薬組成物。

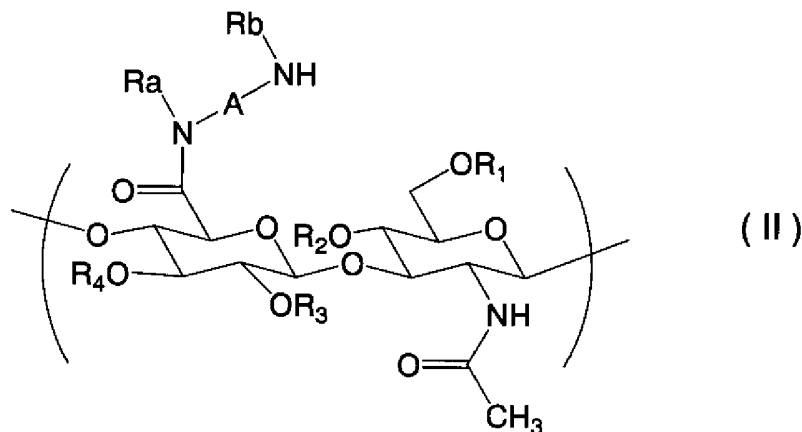
[27] 前記薬物が、前記のヒアルロン酸修飾物のポリマー部分により形成される疎水性コア部分に封入されている、請求項26に記載の医薬組成物。

[28] 水溶液中で前記ヒアルロン酸修飾物のポリマー部分および／または前記ポリマーが形成する疎水性コアを、ヒアルロン酸部分が被覆する形状の微粒子を含む、請求項22～25のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[29] 前記薬物が、前記のヒアルロン酸修飾物のポリマー部分および／またはポリマーにより形成される疎水性コア部分に封入されている請求項28に記載の医薬組成物。

[30] 末端にカルボキシル基を有するポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択されるポリマーと、式(II)：

[化3]



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、Ra、RbおよびAは、請求項8に定義した通りである)

で表される繰り返し構造を分子内に少なくとも1以上含むヒアルロン酸誘導体とを反応させる工程を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物の製造方法。

[31] 請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物を用いる、エマルション液中乾燥法、溶媒拡散法または透析法による請求項15～21のいずれか1項に記載の薬物担体の製造方法。

[32] エマルション液中乾燥法を用いる、請求項31に記載の薬物担体の製造方法。

- [33] 請求項32に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程：
- a) 1以上の有機溶媒を含む、水に混和しない有機相に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；
  - b) 水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；
  - c) 前記a工程により得られたポリマー溶液と、前記b工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、エマルションを形成させる工程；および
  - d) 前記c工程により得られたエマルションを液中乾燥し、薬物担体微粒子を形成させる工程、
- を含む薬物担体の製造方法。
- [34] 請求項32に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程；
- a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和しない有機相に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；
  - b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を水相に混合して、エマルションを形成させる工程；
  - c) 前記b工程により得られたエマルションを液中乾燥し、ポリマー微粒子を形成させる工程；
  - d) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および
  - e) 前記c工程により得られたポリマー微粒子と、前記d工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成させる工程、
- を含む薬物担体の製造方法。
- [35] 溶媒拡散法を用いる、請求項31に記載の薬物担体の製造方法。
- [36] 請求項35に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程；
- a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーを溶解させる工程；
  - b) 水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および

c) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、前記b工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液に滴下して、薬物担体微粒子を形成させる工程、を含む薬物担体の製造方法。

[37] 請求項35に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程；

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および乳酸・グリコール酸共重合体から選択される1以上のポリマーならびに前記ヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

b) 前記a工程により得られたポリマー・ヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に滴下して薬物担体微粒子を形成させる工程、を含む薬物担体の製造方法。

[38] 請求項35に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程；

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記ポリマーを溶解させる工程；

b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、水相に滴下してポリマー微粒子を形成させる工程；

c) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および

d) 前記b工程により得られたポリマー微粒子と、前記c工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成する工程、を含む薬物担体の製造方法。

[39] 透析法を用いる、請求項31に記載の薬物担体の製造方法。

[40] 請求項39に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記ポリマーおよび前記ヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程、および、

b) 前記a工程により得られたポリマー・ヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に対して透析して微粒子を形成させる工程、を含む薬物担体の製造方法。

[41] 請求項39に記載の薬物担体の製造方法であって、以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む水に混和する有機相(ただし、水は含まない)に、前記

ポリマーを溶解させる工程；

b) 前記a工程により得られたポリマー溶液を、水相に対して透析してポリマー微粒子を形成させる工程；

c) 別の水相に、前記ヒアルロン酸修飾物を溶解または分散させる工程；および

d) 前記b工程により得られたポリマー微粒子と、前記c工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液または分散液とを混合して、薬物担体微粒子を形成する工程、を含む薬物担体の製造方法。

[42] 請求項31～41のいずれか1項に記載された薬物担体の製造方法を含む、医薬組成物の製造方法。

[43] 以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液の溶媒を、溶媒拡散法または透析法を用いて水に置換する工程、を含むヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法。

[44] 前記b工程で溶媒拡散法を用いる、請求項43に記載のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法。

[45] 以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に滴下して溶媒を水に置換する工程、を含む請求項43に記載のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法。

[46] 前記b工程で透析法を用いる、請求項43に記載のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法。

[47] 以下の工程：

a) 1以上の有機溶媒を含む有機相(ただし、水は含まない)に、請求項1～14のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物を溶解させる工程；および

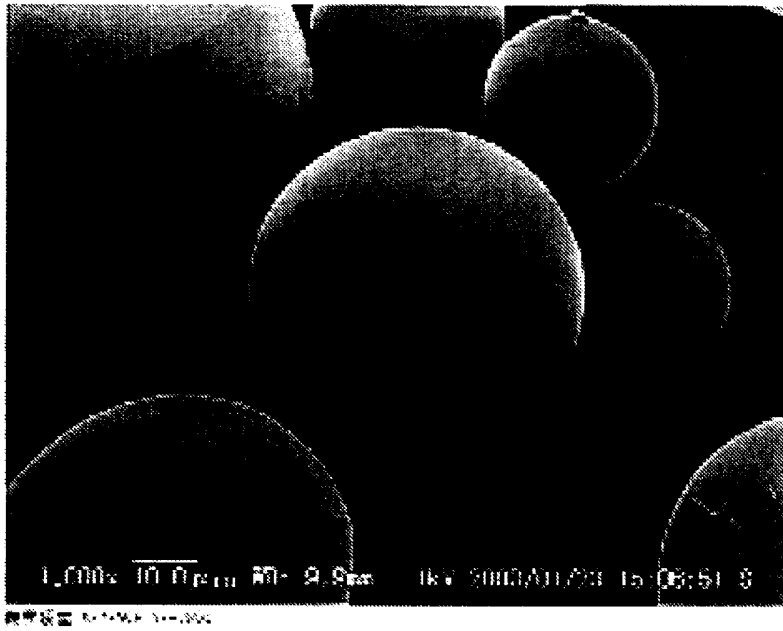
b) 前記a工程により得られたヒアルロン酸修飾物溶液を、水相に対して透析して溶媒を水に置換する工程、

を含む請求項43に記載のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法。

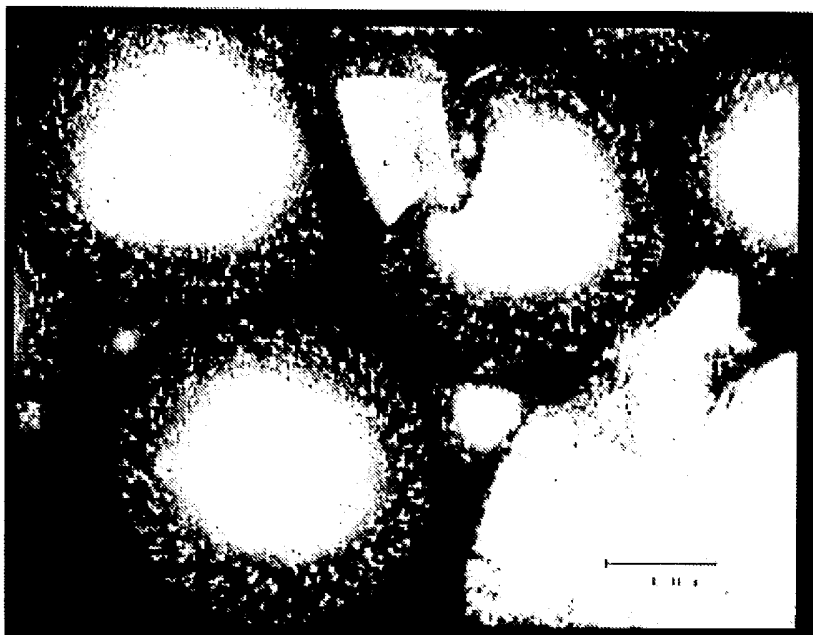
[48] 請求項43～47のいずれか1項に記載のヒアルロン酸修飾物水溶液または分散液の調製方法を含む、医薬組成物の製造方法。



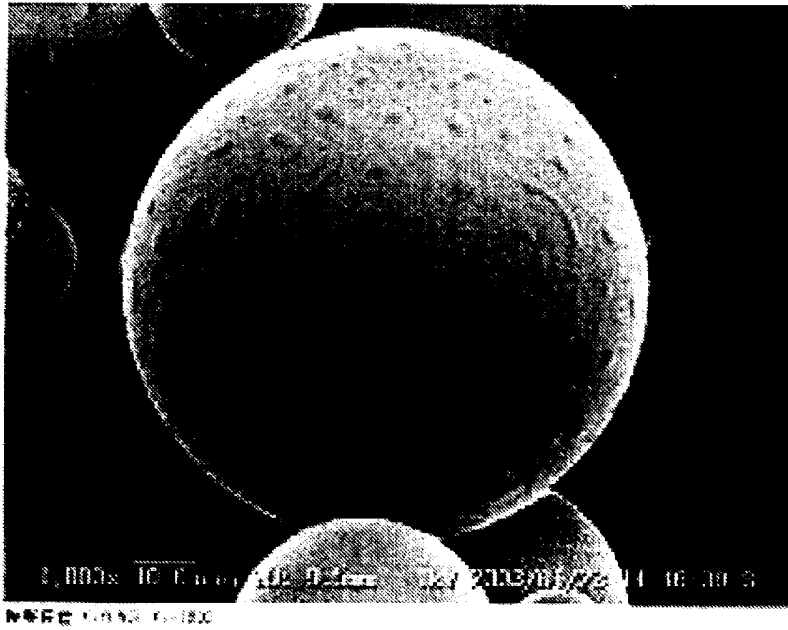
[図1]



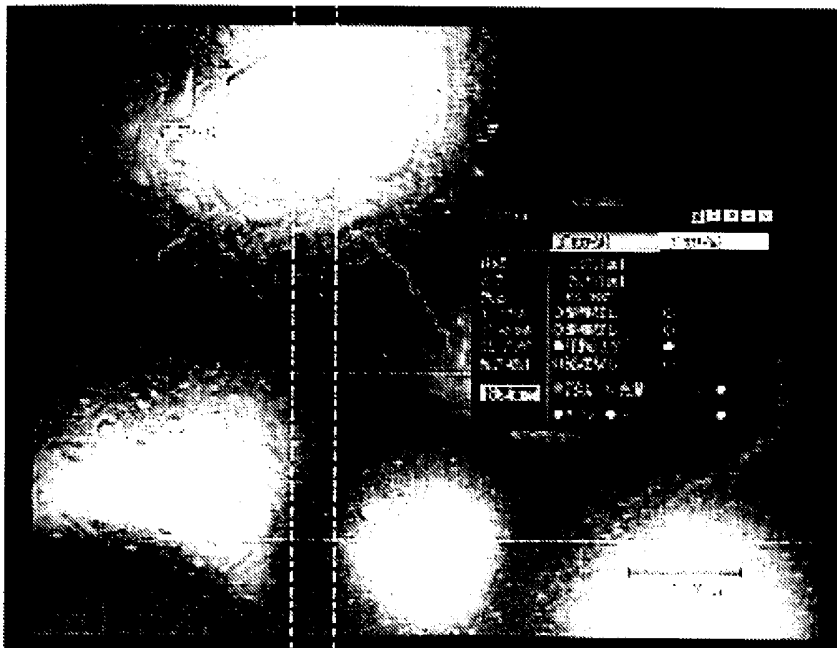
[図2]



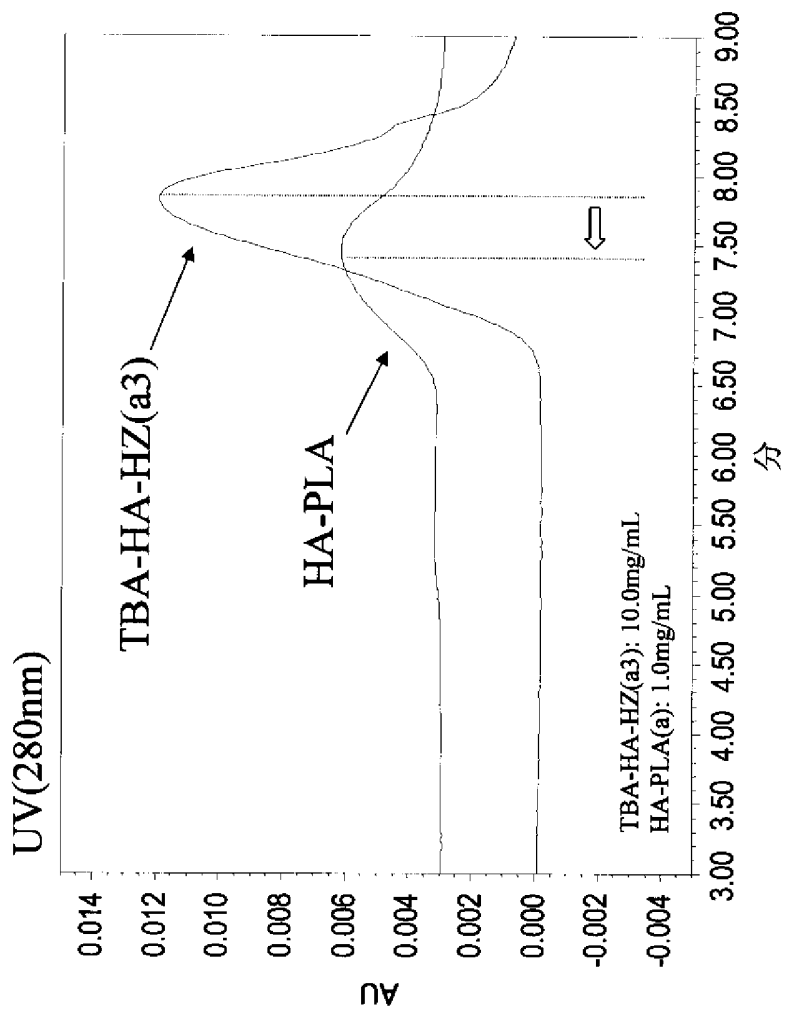
[図3]



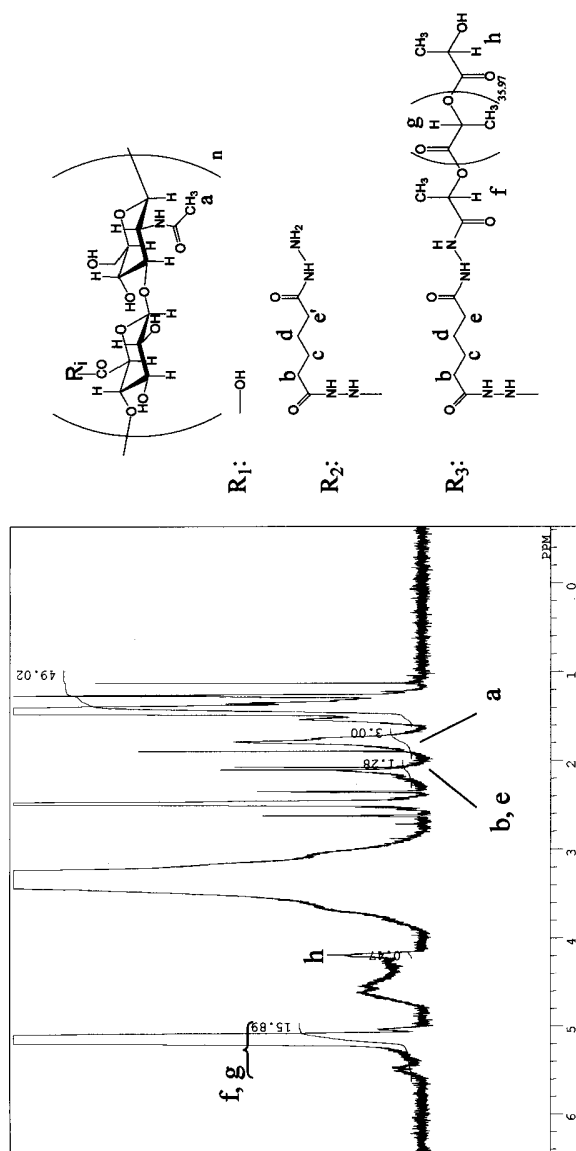
[図4]



[図5]



[図6]



[図7]



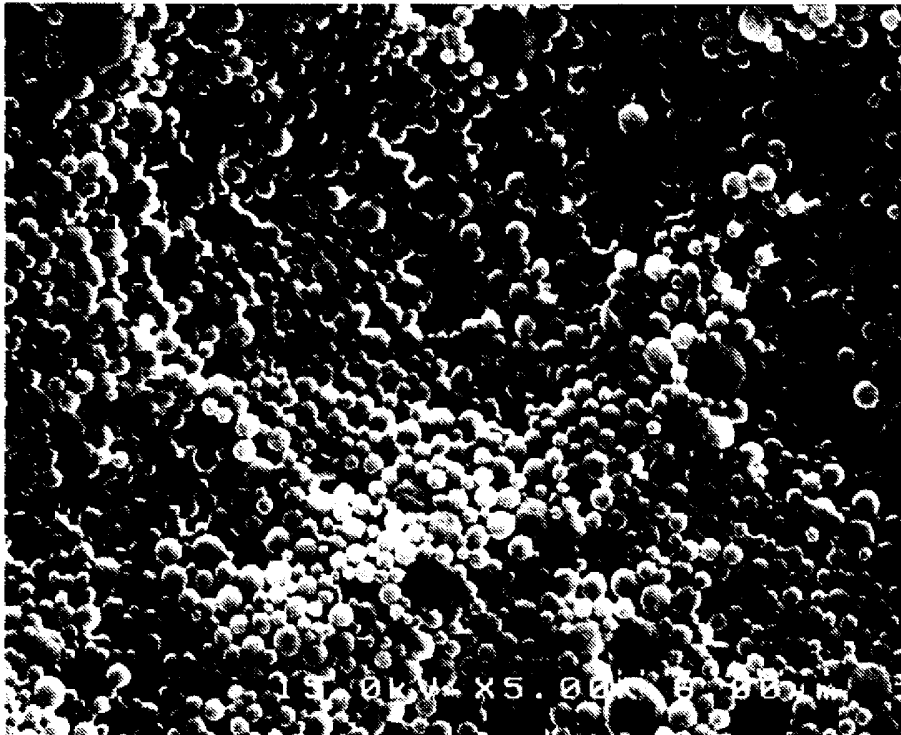
[図8]



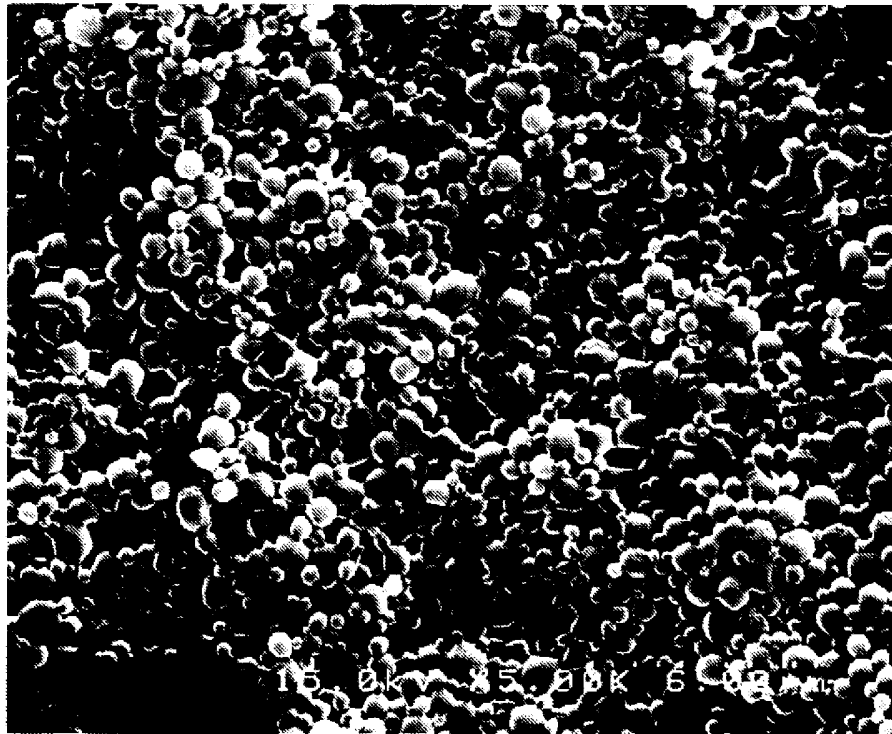
[図9]



[図10]



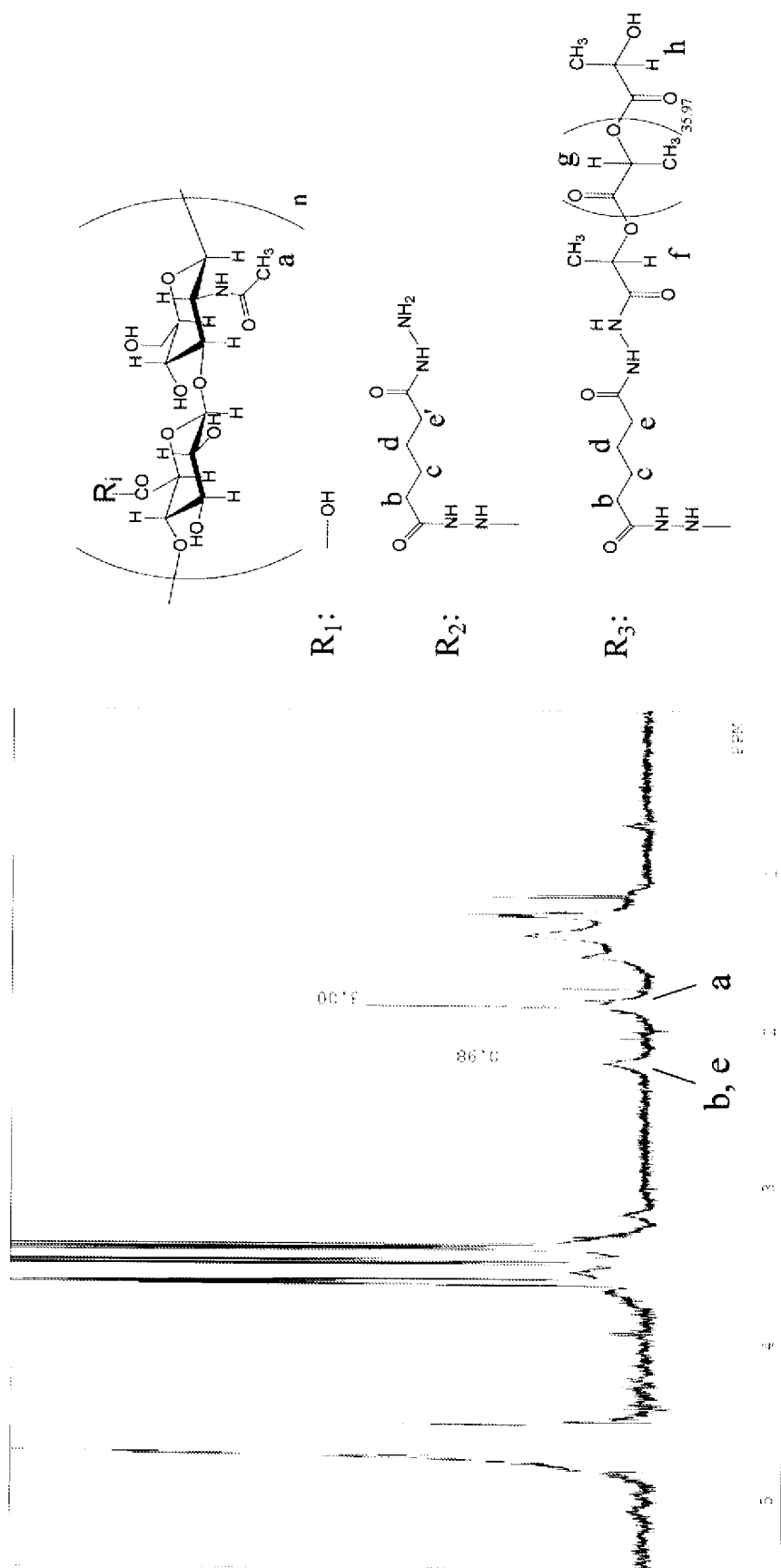
[図11]



[図12]



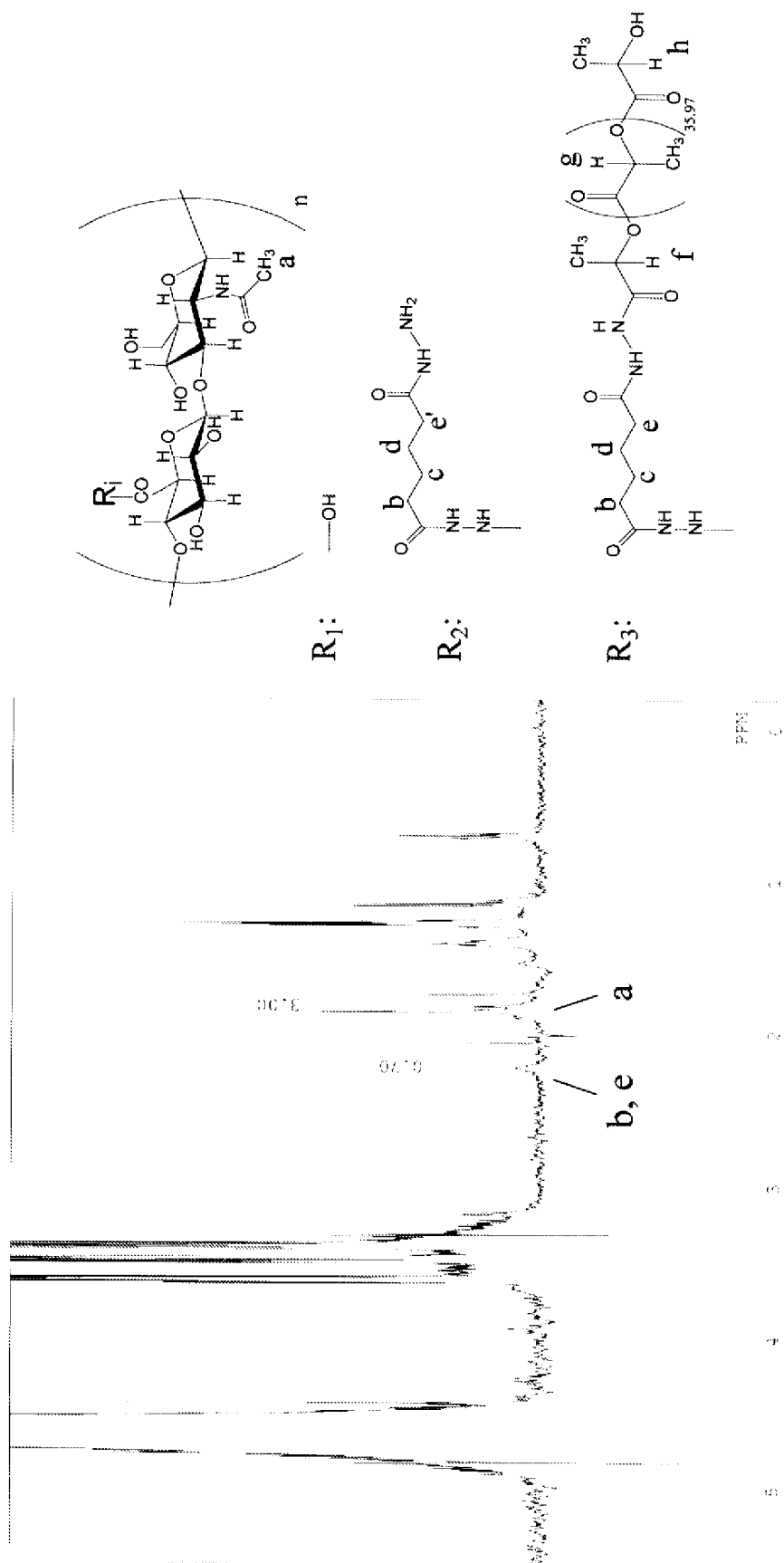
[図13]



HA-PLANS (D<sub>2</sub>O)

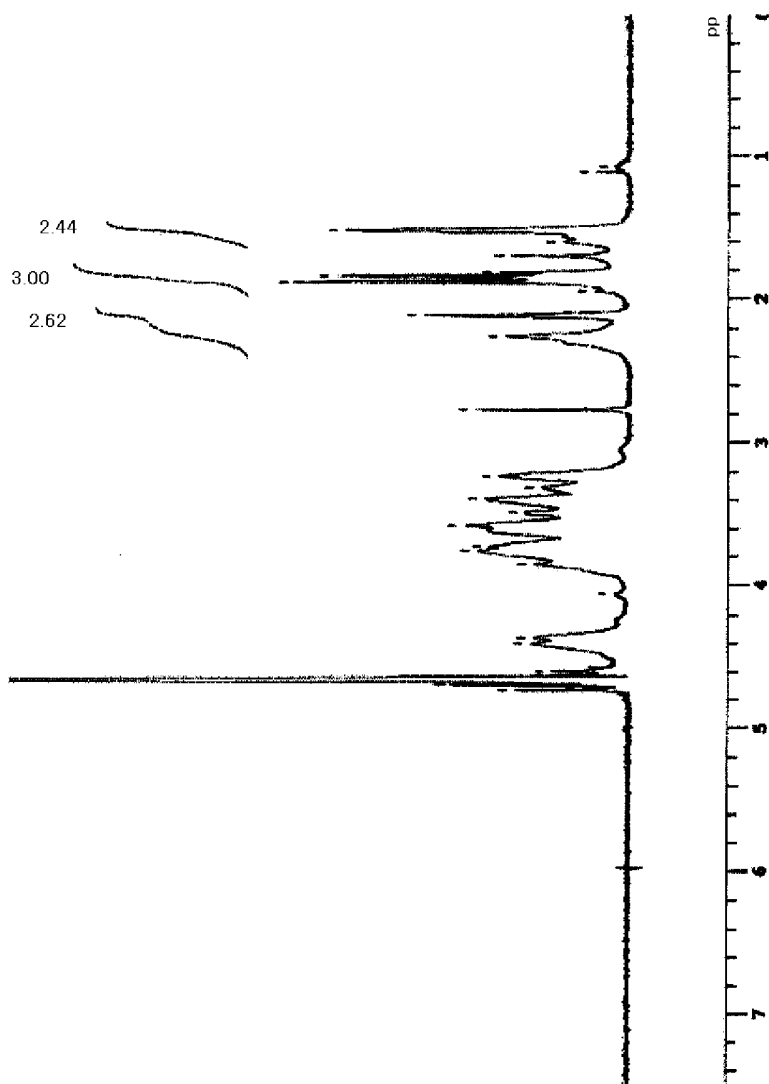


[図14]

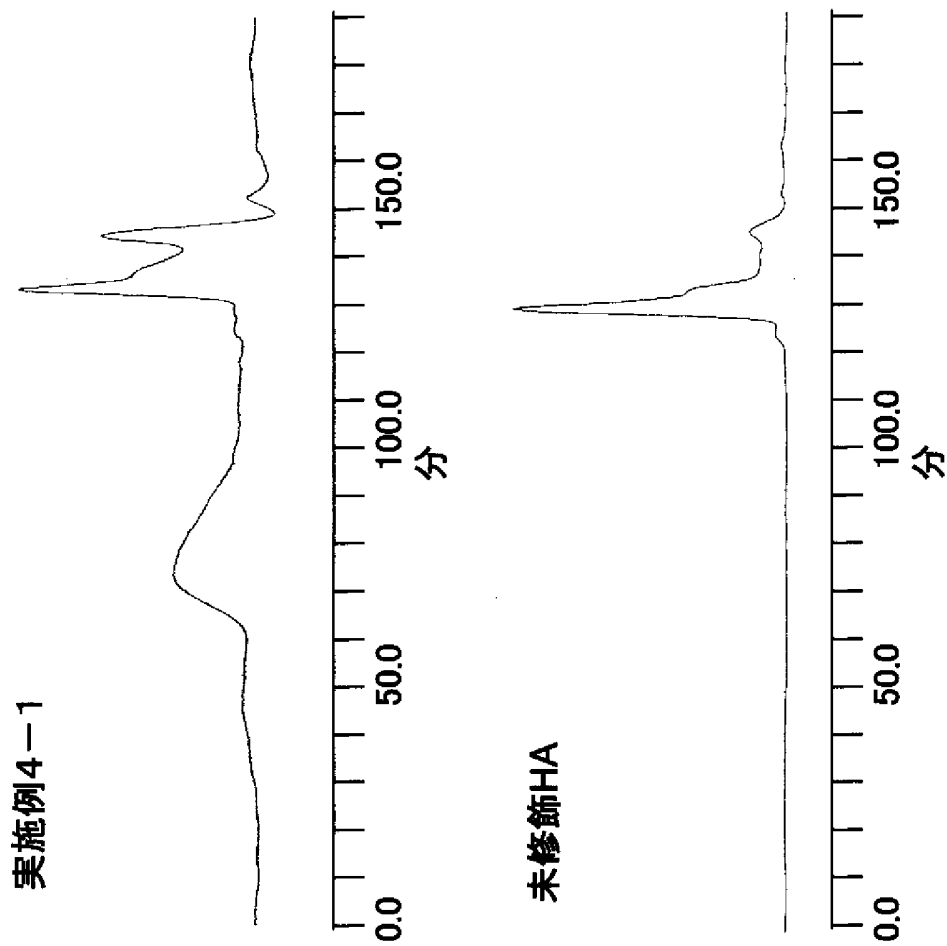


HA-PLA/PLANS (D<sub>2</sub>O)

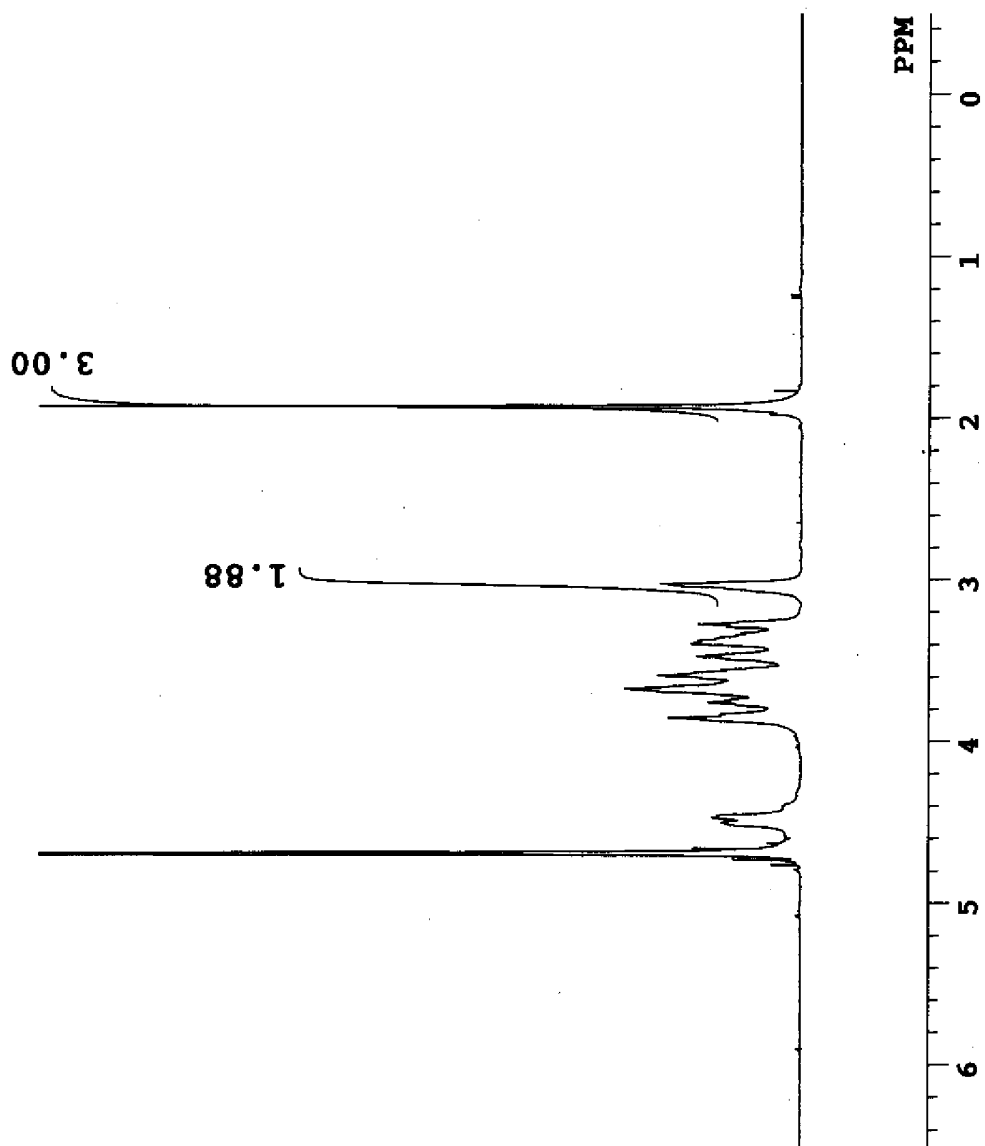
[図15]



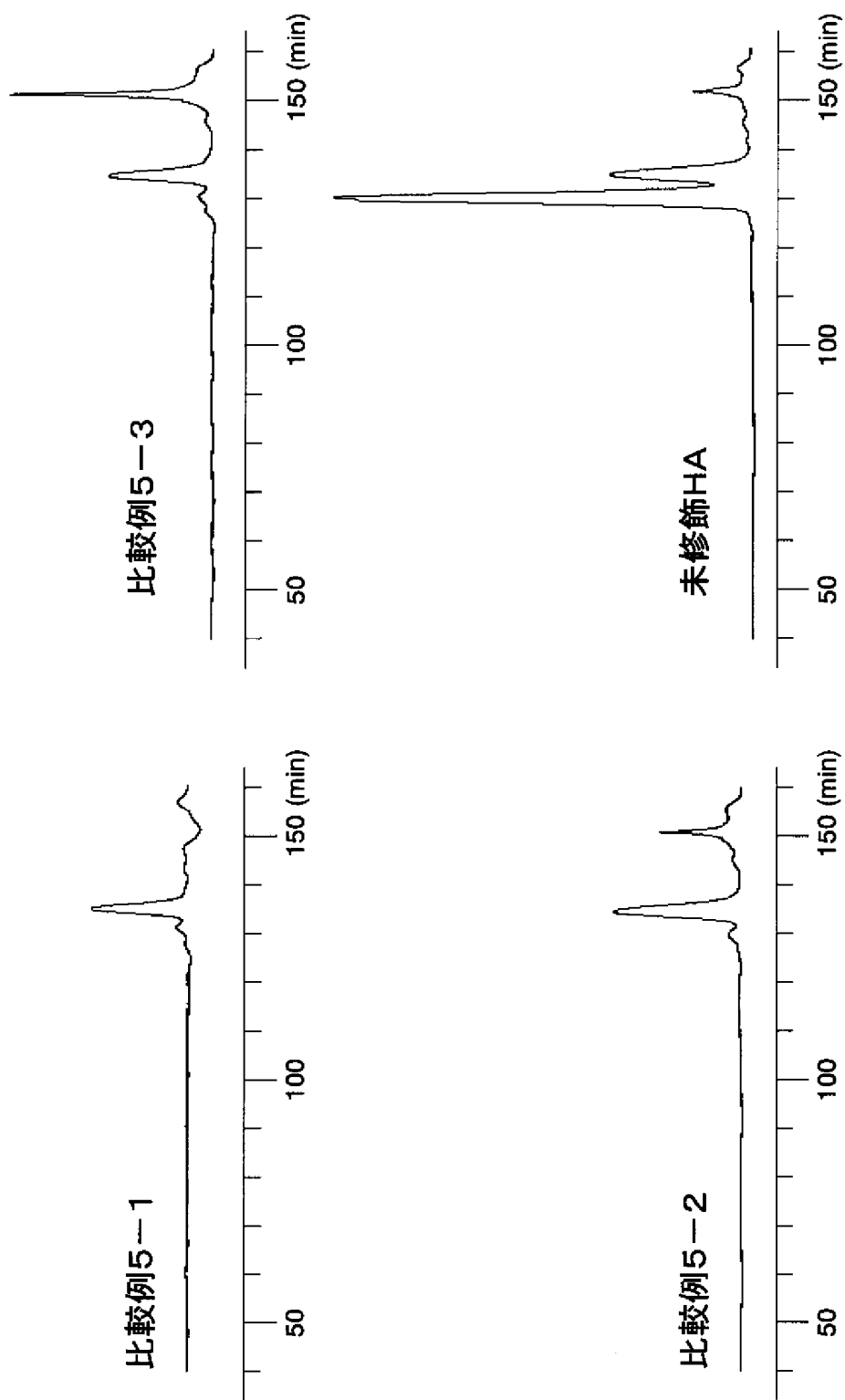
[図16]



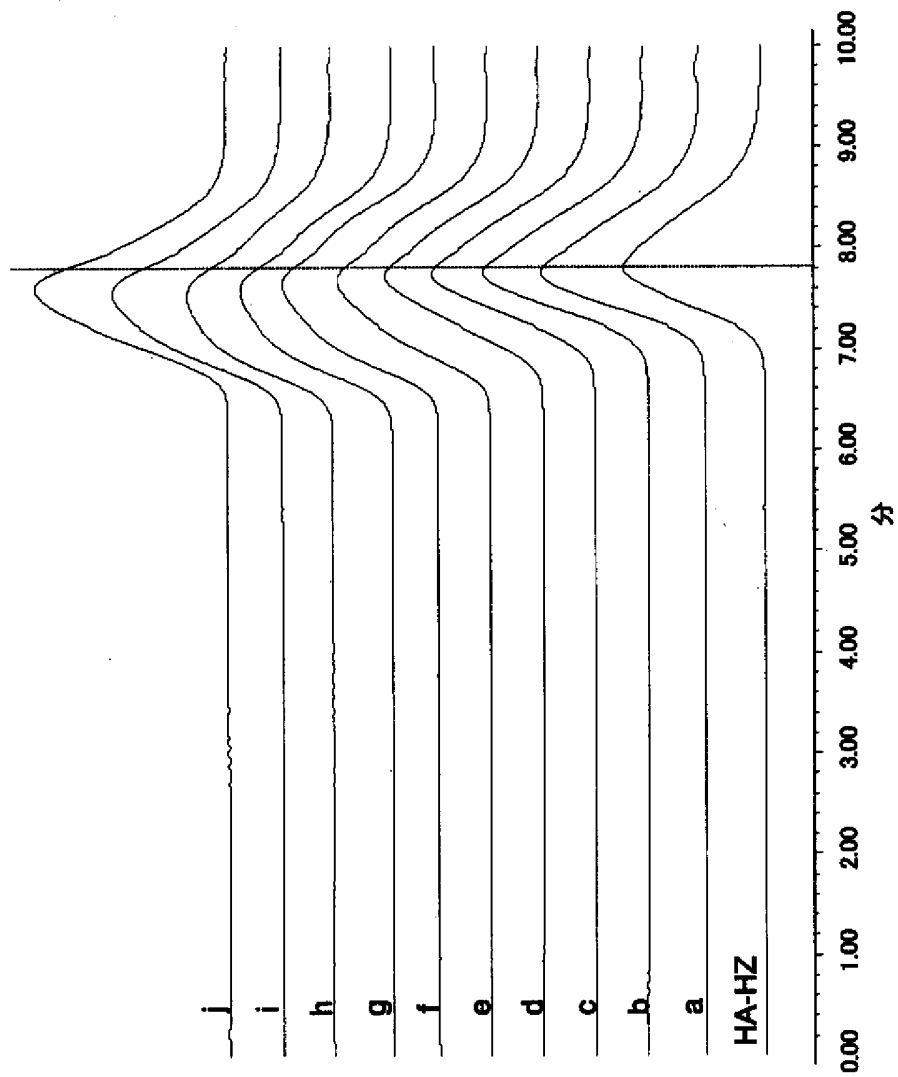
[図17]



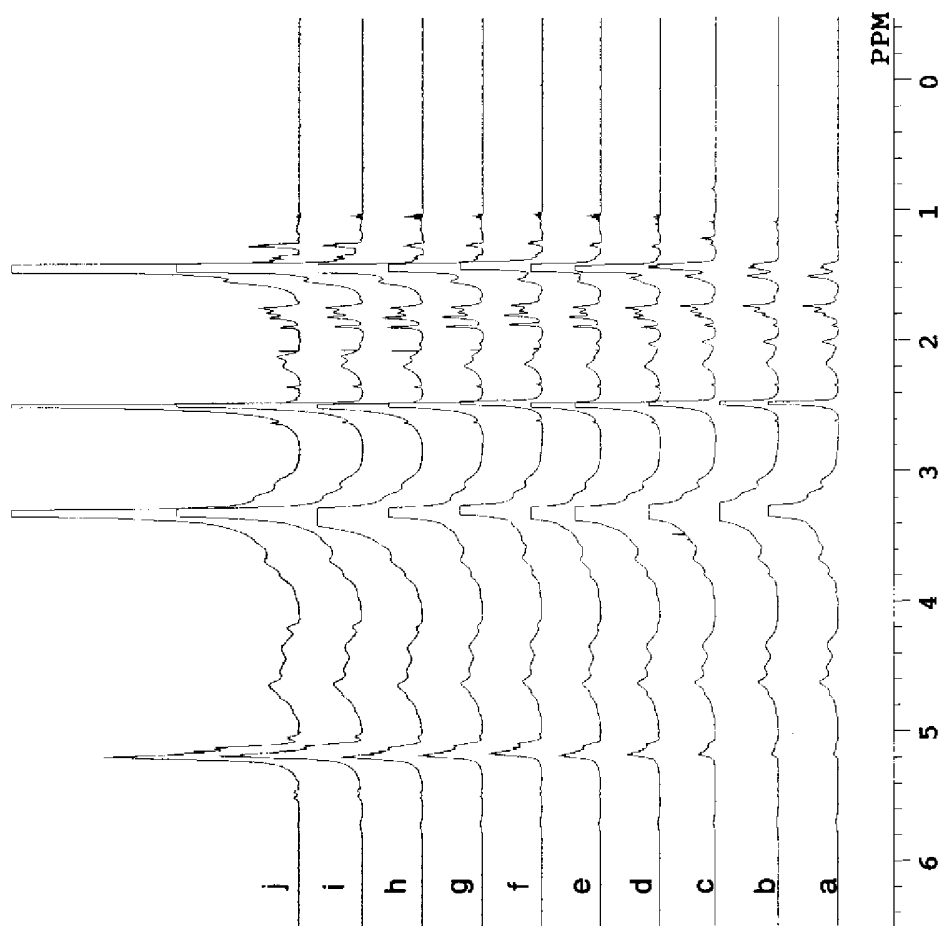
[図18]



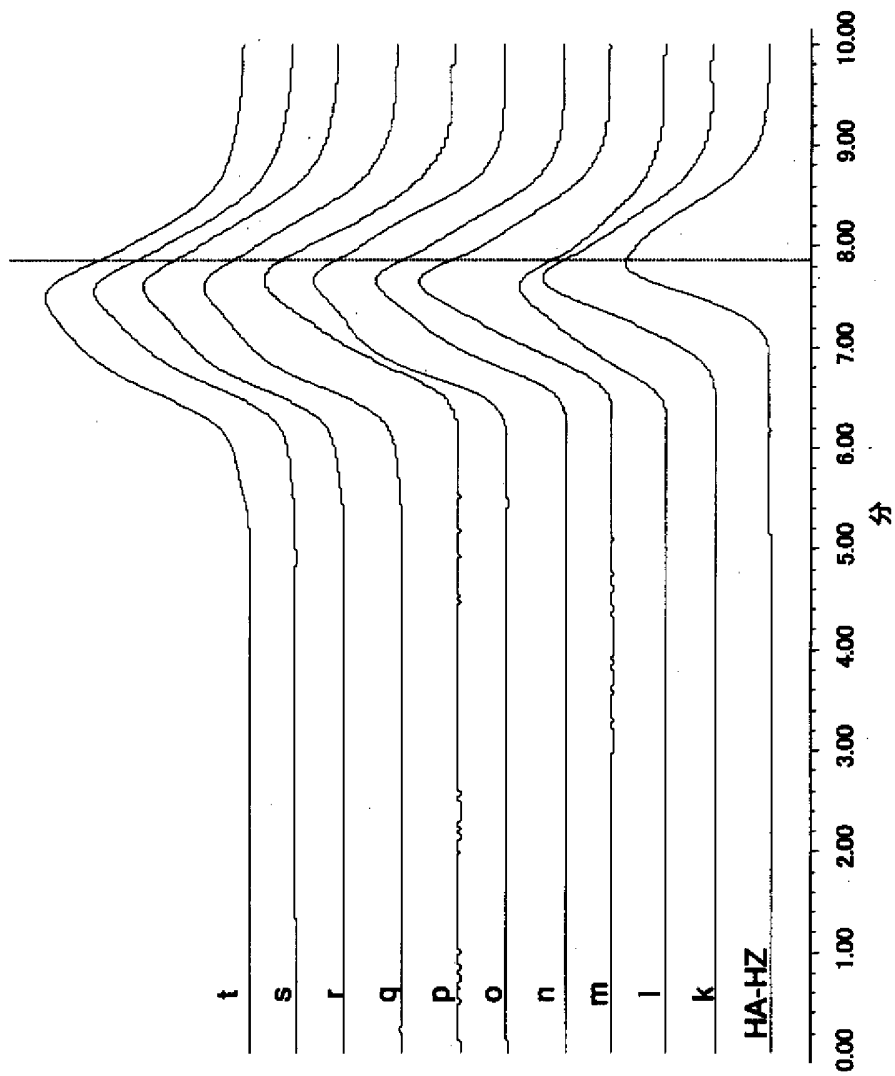
[圖]19



[図20]

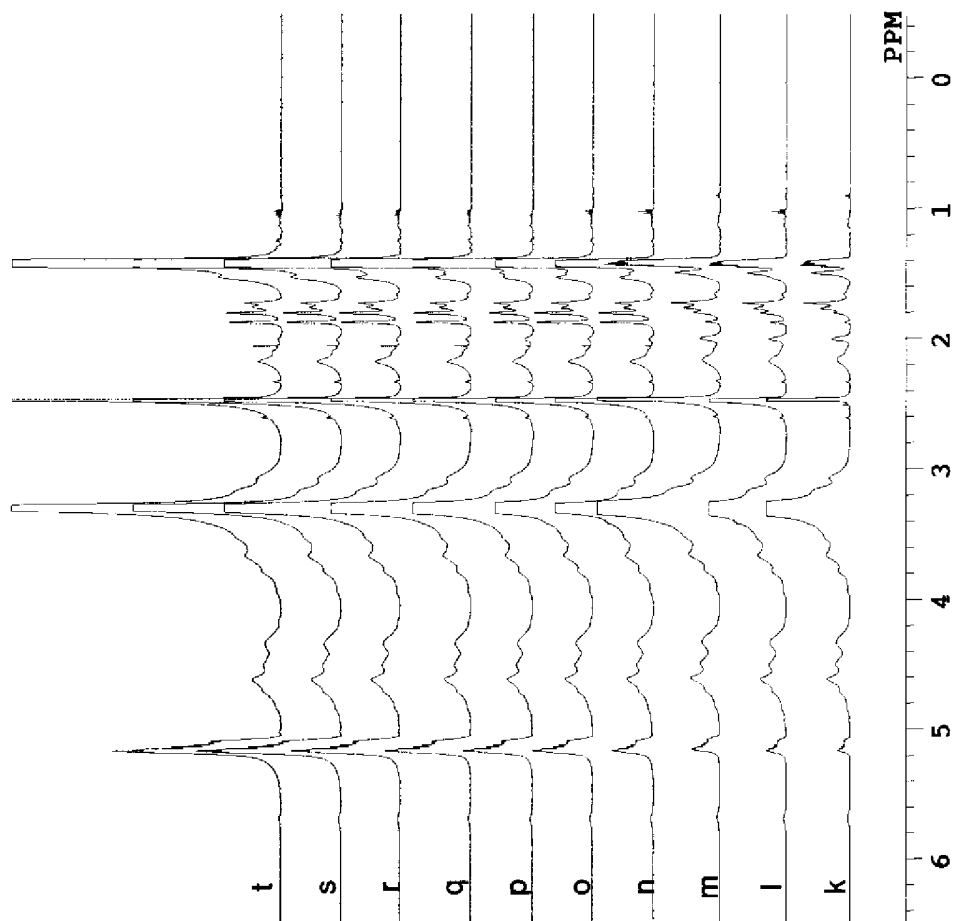


[図21]

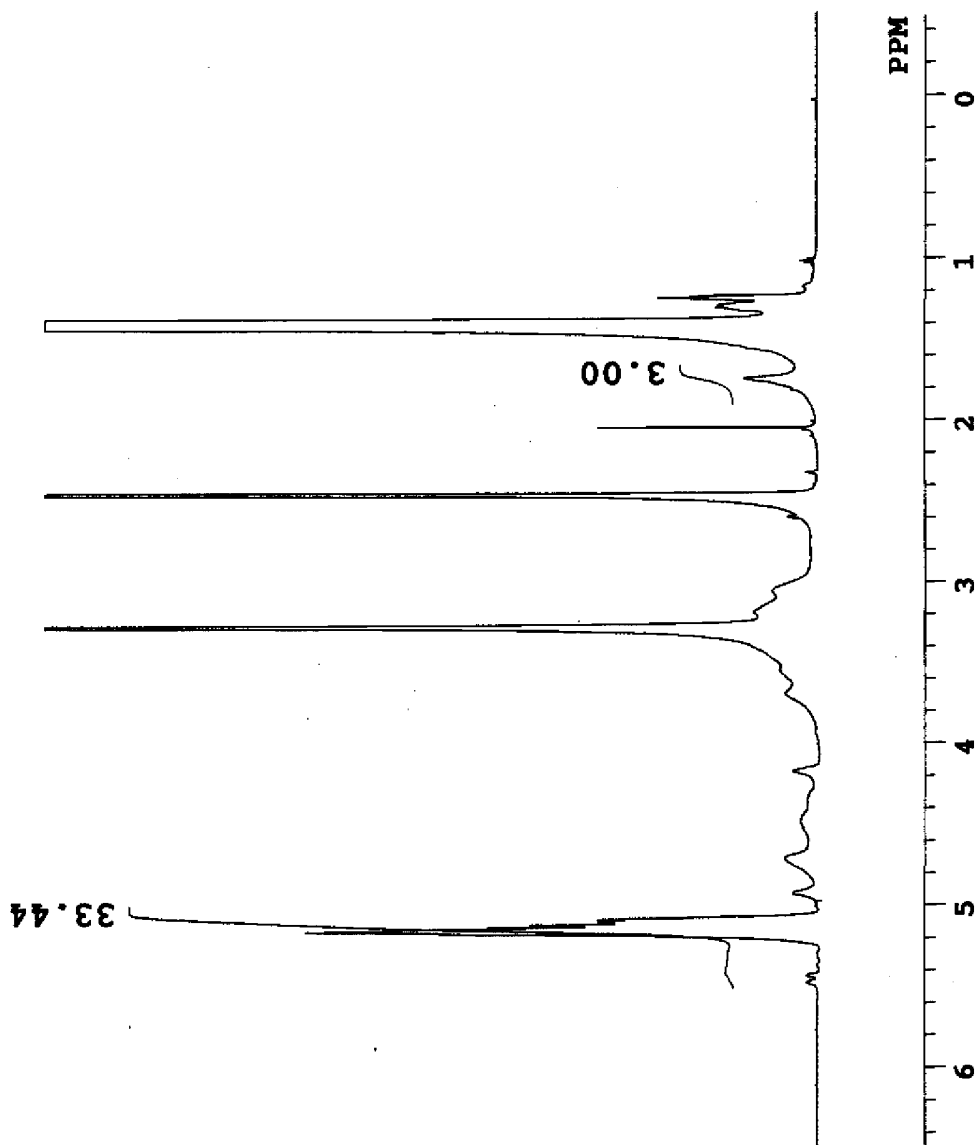




[図22]



[]23



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/013026

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C08G85/00, C08G63/91, C08B37/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C08G85/00, C08G63/91, C08B37/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho                      1926-1996      Jitsuyo Shinan Toroku Koho      1996-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho              1971-2004      Toroku Jitsuyo Shinan Koho      1994-2004		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA, REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  A	WO 2001/088019 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), 22 November, 2001 (22.11.01), Claims; page 8, lines 17 to 27; page 10, lines 22 to 31; page 13, lines 11 to 24; page 16, lines 28 to 30 & JP 2004-521152 A Page 9, Par. No. [0004]; page 10, Par. Nos. [0051] to [0052]; page 11, Par. No. [0070]; page 13, Par. No. [0080] & AU 200162427 A                      & EP 1285021 A1 & FR 2809112 A1                      & US 2004/0013626 A1	1-5, 10-13, 15-29, 31-48 6-9, 14, 30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 25 October, 2004 (25.10.04)		Date of mailing of the international search report 09 November, 2004 (09.11.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013026

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 09-188705 A (Seikagaku Corp.), 22 July, 1997 (22.07.97), Claims; page 4, Par. No. [0014]; page 5, Par. No. [0025]; page 6, Par. No. [0028] (Family: none)	1-48
A	EP 815853 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 07 January, 1998 (07.01.98), Claims; page 8, line 53 to page 9, line 3; page 11, line 35 to page 12, line 4; page 12, line 56 to page 13, line 5 & JP 10-072375 A Page 9, Par. No. [0018]; page 12, Par. Nos. [0028] to [0029]; page 13, Par. No. [0032] & CA 2208802 A & DE 69727262 E & US 2001/0038854 A1	1-48
A	EP 668073 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 23 August, 1995 (23.08.95), Claims & JP 07-278018 A & JP 07-278277 A & CA 2143044 A & DE 69508985 E & US 5594091 A	1-48
A	WO 2000/001733 A1 (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.), 13 January, 2000 (13.01.00), Claims & JP 2002-519481 A & AU 9946397 A & EP 1095064 A1	1-48

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C08G85/00 C08G63/91 C08B37/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C08G85/00 C08G63/91 C08B37/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA, REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 2001/088019 A1 (CENTRE NATION AL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 2001. 11. 22, 特許請求の範囲, 第8頁第17-27行, 第10頁第22-31行, 第13頁第11-24行, 第16頁第2 8-30&JP 2004-521152 A, 第9頁【004 0】, 第10頁【0051】-【0052】, 第11頁【007 0】, 第13頁【0080】&AU 200162427 A&EP 1285021 A1&FR 2809112 A1&US 200 4/0013626 A1	1-5, 10-13, 15-29, 31-48 6-9, 14, 30
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「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	「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	
「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)	「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	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日 25. 10. 2004	国際調査報告の発送日 09.11.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 天野 宏樹	4 J   9272
	電話番号 03-3581-1101 内線 3456	

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 09-188705 A (生化学工業株式会社) 1997. 07. 22, 特許請求の範囲, 第4頁【0014】, 第5頁【0025】, 第6頁【0028】 (ファミリーなし)	1-48
A	EP 815853 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1998. 01. 07, 特許請求の範囲, 第8頁第53行-第9頁第3行, 第11頁第35行-第12頁第4行, 第12頁第56行-第13頁第5行&JP 10-072375 A, 第9頁【0018】, 第12頁【0028】-【0029】, 第13頁【0032】&CA 2208802 A&DE 69727262 E&US 2001/0038854 A1	1-48
A	EP 668073 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1995. 08. 23, 特許請求の範囲&JP 07-278018 A&JP 07-278277 A&CA 2143044 A&DE 69508985 E&US 5594091 A	1-48
A	WO 2000/001733 A1 (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S. R. L.) 2000. 01. 13, 特許請求の範囲&JP 2002-519481 A&AU 9946397 A&EP 1095064 A1	1-48