

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年11月12日(12.11.2009)

PCT

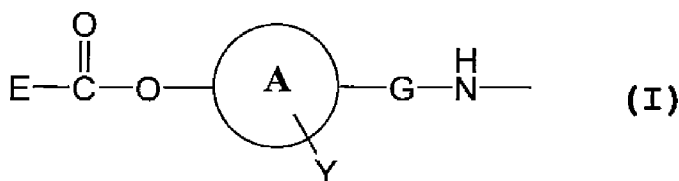
(10) 国際公開番号

WO 2009/136572 A1

- (51) 国際特許分類:
C08G 69/40 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *C08G 81/00* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/058325
- (22) 国際出願日: 2009年4月28日(28.04.2009)
- (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 2008-122233 2008年5月8日(08.05.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本化薬株式会社(NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1028172 東京都千代田区富士見一丁目11番2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): 中西 健 (NAKANISHI Takeshi) [JP/JP]; 〒1158588 東京都北区志茂3-3-1-12 日本化薬株式会社 医薬研究所内 Tokyo (JP). 原 和久 (HARA Kazuhisa) [JP/JP]; 〒1158588 東京都北区志茂3-3-1-12 日本化薬株式会社 医薬研究所内 Tokyo (JP). 瀬野 千恵子 (SENO Chieko) [JP/JP]; 〒1158588 東京都北区志茂3-3-1-12 日本化薬株式会社 医薬研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 川口 義雄, 外(KAWAGUCHI Yoshio et al.); 〒1020094 東京都千代田区紀尾井町7番1号 上智紀尾井坂ビル 川口国際特許事務所 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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(条約第21条(3))

(54) Title: POLYMER CONJUGATE OF FOLIC ACID OR FOLIC ACID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体



(57) Abstract: Disclosed is a polymer conjugate of folic acid or a folic acid derivative, wherein an amide bond is not used. The compound has chemical stability and adequate drug release rate in the living organism. Specifically disclosed is a polymer conjugate of folic acid or a folic acid derivative, wherein a substituent represented by formula (I) is bonded to a carboxy group of a block copolymer which is composed of a polyethylene glycol and a polymer having a carboxy group in a side chain, or a pharmacologically acceptable salt thereof. [In the formula, A represents a monocyclic or fused aromatic group; G represents an optionally substituted (C1-C6) alkylene group; Y represents a hydrogen atom or a substituent; and E represents a residue of folic acid or a folic acid derivative.]

(57) 要約: 【課題】葉酸または葉酸誘導体のアミド結合を用いない高分子結合体であり、化学的な安定性と適度な生体内薬剤遊離速度を有する化合物が求められていた。【解決手段】ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基に下記式(I) [式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有していてもよい(C1~C6)アルキレン基を示し、Yは水素原子または置換基を示し、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す] で表される置換基が結合している葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩を提供する。

WO 2009/136572 A1

明 細 書

発明の名称：葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体

技術分野

[0001] 本発明は葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、その製造方法及びその用途に関する。

背景技術

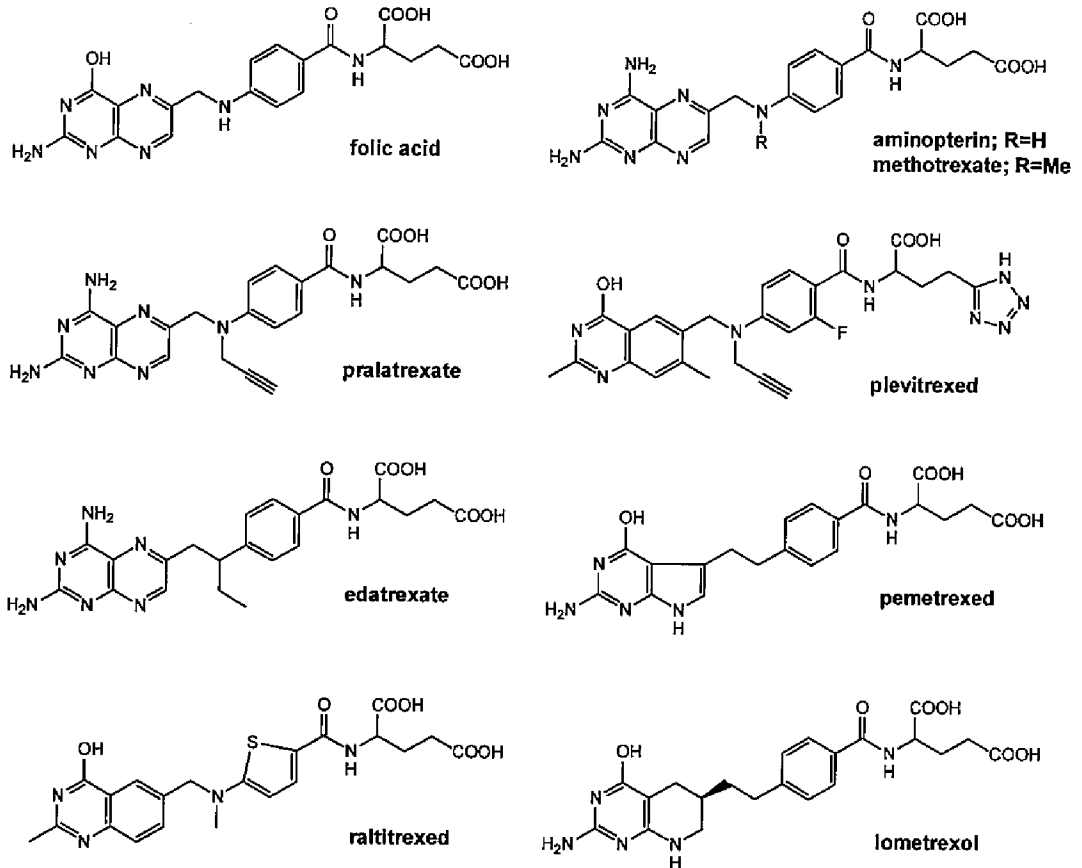
[0002] 葉酸は水溶性ビタミンの1種であり、アミノ酸や核酸の合成に必要とされる補酵素である。葉酸は体内の還元酵素でテトラヒドロ葉酸に変換された後、更に変換されてdTMP（デオキシチミジン酸）やプリン合成に使用される。葉酸誘導体には生体内での葉酸の変換を阻害し細胞分裂を停止させる作用を持つ化合物もある。これらの一群の化合物は葉酸代謝拮抗剤と呼ばれ、その代表的な化合物であるメトトレキサートは白血病、肉腫、胃癌等の治療に古くから用いられてきた。更に、メトトレキサートは免疫調節作用も持ち、関節リウマチの薬物治療には必須な薬剤となっている。

また、葉酸自身や葉酸誘導体のロイコボリン等は葉酸欠乏症やメトトレキサートの毒性を中和する薬剤としても使用されている。

[0003] このように葉酸（folic acid）や、葉酸誘導体、例えば、メトトレキサート（methotrexate）に代表される葉酸代謝拮抗剤は、医薬品として有用な化合物であり、その効果を改善することを目的に様々な誘導体研究が継続されている。これらの誘導体は、例えば以下に示すアミノプテリン（aminopterin）、プララトレキサート（pralatrexate）、プレビトレキサド（plevitrexed）、エダトレキサート（edatrexate）、ペメトレキサド（pemetrexed）、ラルチトレキサド（raltixetrexed）、ロメトレキサール（lometrexol）等がある。これらの葉酸代謝拮抗剤の作用機作は主にジヒドロフォレートリダクターゼの阻害作用であるが、新しく開発されている薬剤の中にはチミジレートシンターゼの阻害作用を持つものもあり

、更に有効な薬剤を求めて開発が進められている。例えば、ペメトレキサドは葉酸代謝系に関与している複数の酵素を阻害することを特徴としており、悪性胸膜中皮腫の治療薬として認可されている。

[0004] [化1]



[0005] 一方、低分子の薬剤の毒性軽減、効果増強を目的にした試みがドラッグデリバリーシステム（DDS）研究の一環として行われている。その方法は様々であるが、例えば、薬剤を高分子に結合させたり、ナノサイズのキャリアーに封入する等がある。葉酸誘導体を代表する化合物であるメトトレキサートにおいてもマイクロスフェア、 dendリマー、ミセルを利用したもの等が報告されている。しかし、いずれの報告もDDS研究の最終的な目的である効果の増強、副作用の軽減を十分に満足しているとはいえない。

[0006] 特許文献1、特許文献3には両親媒性高分子が形成するミセルを担体とする水溶性高分子化医薬製剤が記載されており、特許文献1には疎水性セグメ

ントの例としてメトトレキサートが結合した高分子担体の記載があるが、メトトレキサートと両親媒性高分子はアミド結合しているものである。特許文献3には葉酸若しくは葉酸誘導体を結合した高分子結合体について記載されていない。

特許文献2には高分子化合物とカンプトテシン類をフェニルエステル結合で結合させることによって、化学的な安定性と生体内での薬剤遊離効率を同時に達成したことが報告されている。しかしながら、この方法をそのままメトトレキサートに代表される葉酸誘導体（葉酸自身も含む）のカルボキシ基に用いることはできない。

[0007] また、非特許文献1、非特許文献2には、メトトレキサートのカルボキシ基を用いて両親媒性高分子とアルキルエステル結合させた高分子結合体が記載されているが、薬剤の遊離速度が遅く、薬剤の効果が発揮されるか疑問がある。また、高分子結合体からの薬剤の遊離を生体内の酵素に依存する場合、該酵素活性は個人差があるため薬剤遊離速度にばらつきを生じ、結果として薬効がばらつく恐れがある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開平2-300133号公報

特許文献2：国際公開第2004/039869号パンフレット

特許文献3：国際公開第2003/000771号パンフレット

非特許文献

[0009] 非特許文献1：「コロイド アンド サーフェスB：バイオインターフェース」、1999年、第16巻、217-226頁

非特許文献2：「ファーマシューティカル リサーチ」、2000年、第17巻、607-611頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 特許文献 1 における薬剤と両親媒性高分子との結合はアミド結合であるが、アミド結合は化学的に安定であり、該高分子結合体を生体内に投与した場合、薬剤の遊離速度がかなり遅く実用的ではない。

薬剤を高分子結合体とすることで薬理効果を向上させるためには薬剤が適度な速度で高分子結合体から遊離する必要があり、単純に高分子化合物に結合させるだけでは不十分である。薬剤と高分子化合物との結合が弱い場合、高分子結合体が不安定となり製剤化が極めて難しくなるばかりではなく、薬剤の遊離が速くて高分子化合物と結合させることによる薬物動態等の改良が期待できない。また、結合が強すぎる場合、薬物動態は改良されたとしても薬剤が高分子結合体から遊離されず薬理効果の発揮が困難となる。

[0011] 葉酸または葉酸誘導体のアミド結合を用いない高分子結合体であり、化学的な安定性と適度な生体内薬剤遊離効率を有する化合物が求められていた。

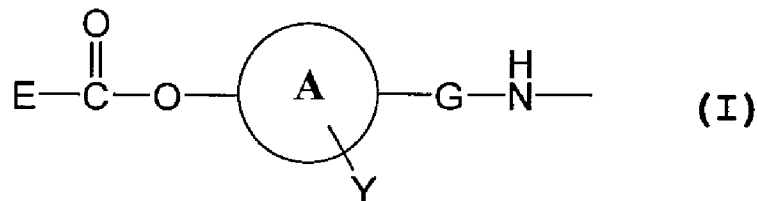
課題を解決するための手段

[0012] 本発明者等は前記したような課題を解決すべく鋭意努力した結果、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボン酸を有するポリマーからなるブロック共重合体と、葉酸または葉酸誘導体が特定のリンカー分子を介して結合した高分子結合体を見出し、本発明に到達した。

[0013] 即ち、本発明は以下の (1) ~ (11) に関する。

(1) ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基に下記式 (I)

[化2]



[式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有してもよい(C1~C6)アルキレン基を示し、Yは水素原子または置換基を示

し、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す]

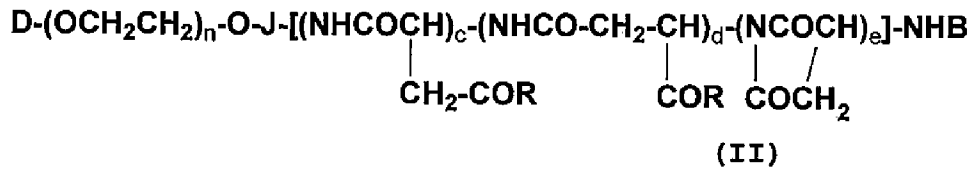
で表される置換基が結合している葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

[0014] (2) 側鎖にカルボキシ基を有するポリマーがポリ酸性アミノ酸である上記(1)に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

(3) ポリ酸性アミノ酸がポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸である上記(2)に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

[0015] (4) 下記式 (I I)

[化3]



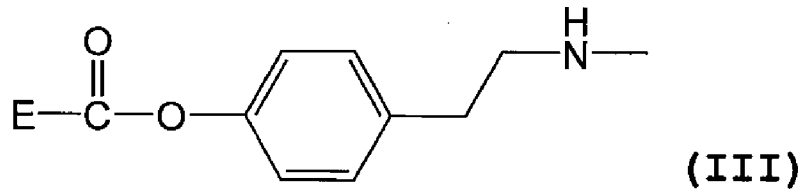
[式中、Dは水素原子または置換基を有していてもよい(C1~C6)アルキル基を示し、nの平均値は5~11500であり、Jは(C2~C6)アルキレン基を示し、c+d+eの平均値は3~200であり、c+dは正数であり、Rは水酸基または式(I)で表される置換基を示し、1分子中少なくとも1個のRは式(I)で表される置換基であり、Bは水素原子または(C1~C6)アシル基を示す]

で表される上記(1)~(3)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[0016] (5) Dが無置換の(C1~C6)アルキル基であり、nの平均値が50~1000であり、c+d+eの平均値が5~100であり、Bが(C1~C6)アシル基である上記(4)記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

(6) 式(I)で表される置換基が下記式(III)

[化4]



[式中、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す]

で表される置換基である上記(1)～(5)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[0017] (7) 葉酸の誘導体がメトトレキサートである上記(1)～(6)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

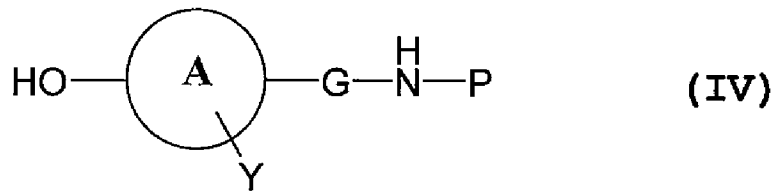
(8) 葉酸の誘導体がペメトレキセドである上記(1)～(6)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[0018] (9) 上記(1)～(8)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩を有効成分とする抗癌剤。

(10) 上記(1)～(8)のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩を有効成分とする炎症疾患治療薬。

[0019] (11) 葉酸若しくは葉酸誘導体と式(IV)で表される化合物のフェノール性水酸基とをエステル結合させ、アミノ基の保護基を除去し、続いて、得られた脱保護体と、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基とを脱水縮合してアミド結合を生成することを特徴とする葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体の製造方法。

[化5]



[式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキレン基を示し、Pはアミノ基の保護基を示し、Yは水素原子または置換基を示す]

発明の効果

[0020] 一般的に高分子化合物は分子量や組成に分散を有し、単一の分子ではないため厳密な化学分析が難しく、また、葉酸または葉酸誘導体は複数のアミノ基とカルボキシ基を有しているためその結合様式が複数存在する。しかし、本発明では、葉酸または葉酸誘導体とリンカー分子を縮合した後に分離精製を行うことができ、且つ、得られた化合物とブロック共重合体との縮合反応は比較的容易に進行することから、得られる葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体の品質を一定にすることができる。

また、本発明で得られる高分子結合体は薬剤とリンカー分子がフェニルエステル結合しているので、実用的な化学的安定性と優れた生体内薬剤遊離効率を同時に達成することが可能であり、薬理効果を増強し、副作用を軽減することが可能となる。

更に、本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体から薬剤の遊離速度をリンカー部分の置換基を変えたり、結合する薬剤のカルボキシ基を選ぶことにより制御することができる。加えて、これらの遊離速度の異なる高分子結合体を混合することでも薬剤の放出速度を調整することができるため、より広い応用が可能である。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]試験例1における加水分解酵素非存在下での薬剤遊離速度を高分子結合体に結合している全薬剤量に対する比として示したものである。

[図2] 試験例2のラットコラーゲン関節炎モデルを用いた抗炎症評価結果を示したものである。

[図3] 試験例3のラットコラーゲン関節炎モデルを用いた抗炎症評価結果を示したものである。

発明を実施するための形態

[0022] 本発明は、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基に上記式 (I) [式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキレン基を示し、Yは水素原子または置換基を示し、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す] で表される置換基が結合している葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩である。

[0023] ポリエチレングリコール類としては、両末端または片末端が修飾されたポリエチレングリコールも含まれ、両末端の該修飾基は同一でも異なってもよい。末端の修飾基としては置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキル基が挙げられ、好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ベンジル基、ジメトキシエチル基、ジエトキシエチル基、アミノメチル基、アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基等が挙げられる。

ポリエチレングリコール類部分の分子量は、通常300~50000程度であり、好ましくは500~10000程度、更に好ましくは1000~5000程度である。なお、本発明における分子量とはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC法) で測定したピークトップ分子量である。

[0024] 側鎖にカルボキシ基を有するポリマーとしては側鎖にカルボキシ基を有する構成成分を含有するポリマーであればよく、側鎖にカルボキシ基を有する構成成分としては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられ、側鎖にカルボキシ基を有するポリマーとしては、例えば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリリンゴ酸、

ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸等が挙げられ、中でもポリ酸性アミノ酸が好ましく、例えば、ポリアスパラギン酸やポリグルタミン酸等が好ましく、特にポリアスパラギン酸が好ましい。

本発明におけるブロック共重合体 1 分子当たりのカルボキシ基の数は、3 ~ 200 個程度が好ましく、5 ~ 100 個程度がより好ましい。

[0025] 本発明におけるブロック共重合体としては、末端に官能基を有するポリエチレングリコール類と末端に官能基を有するポリカルボン酸類とを結合した化合物や、特許文献 1 や特許文献 3 等に記載されている末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール類で重合を開始するアミノ酸活性化物の重合反応によって得られる化合物等が挙げられる。

[0026] 上記式 (I) の A は単環または縮合した芳香族基であり、特に限定されないが、異項原子を含まない (C6 ~ C18) 芳香族基が好ましく、例えば、フェニル基、ナフチル基、アントリル基等が挙げられ、中でもフェニル基が特に好ましい。フェノール性水酸基とアミノアルキル基の置換位置は特に限定されない。

[0027] 上記式 (I) の A における Y とは、単環または縮合した芳香族基に結合している水素原子または置換基であり、該置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基等の (C1 ~ C3) アルキル基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基等の (C1 ~ C3) アルコキシ基、塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子、ホルミル基、アセチル基等の (C1 ~ C3) アシル基、ニトロ基、シアノ基、水酸基等が挙げられる。

葉酸若しくは葉酸誘導体とリンカー分子の結合の強さは、リンカー分子が開裂した際のフェノール性水酸基の酸性度に大きく影響され、Y を変えることによりその酸性度を変化させると葉酸若しくは葉酸誘導体とリンカー分子の結合の強さも変化する。例えば、A がフェニル基の場合、葉酸若しくは葉酸誘導体の遊離を早めるためには電子吸引基であるシアノ基、ニトロ基、ハロゲン原子等が好ましく、葉酸若しくは葉酸誘導体の遊離を遅らせるには電子供与基であるアルキル基等が好ましい。Y の置換数は置換可能な数であれ

ば特に限定されない。

Yが置換基である場合、その置換位置は、遊離速度に対する影響を考慮する必要はあるが、特に限定されない。

[0028] 上記式 (I) のGとは、置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキレン基であり、例えば、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、メチルエチレン基、ジメチルエチレン基、メトキシエチレン基、エトキシエチレン基、クロロエチレン基、ブロモエチレン基、メチルトリメチレン基、ジメチルトリメチレン基、メトキシトリメチレン基、エトキシトリメチレン基、クロロトリメチレン基、ブロモトリメチレン基等が挙げられ、中でもメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基等の直鎖アルキレン基が好ましく、エチレン基が特に好ましい。

上記式 (I) のEとしては、 $E-CO_2H$ で葉酸若しくは葉酸誘導体を意味する葉酸若しくは葉酸誘導体の残基であり、葉酸若しくはカルボキシ基を有する葉酸誘導体であれば特に限定されず、例えば、 $E-CO_2H$ として上記の葉酸、メトトレキサート、アミノプテリン、プララトレキセート、プレビトレキセド、エダトレキセート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、ロメトレキソール等が挙げられ、中でもメトトレキサート、ペメトレキセド等が好ましい。

[0029] 本発明の高分子結合体として、例えば、上記式 (II) で表される化合物が挙げられる。

式 (II) のDにおける置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*s*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、ベンジル基、ジメトキシエチル基、ジエトキエチル基、アミノメチル基、アミノエチル基、3-アミノプロピル基、4-アミノブチル基等が挙げられる。Dとしては無置換 (C1~C6) アルキル基が好ましく、中でもメチル基が特に好ましい。

上記式 (II) 中、*n*の平均値は5から11500程度であり、好ましく

は50～1000程度であり、より好ましくは100～300程度である。

[0030] 上記式 (I I) のJにおける(C2～C6)アルキレン基としては、例えば、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ヘキサメチレン基等の直鎖アルキレン基が挙げられ、中でもトリメチレン基が好ましい。

上記式 (I I) 中、 $c + d + e$ は高分子結合体1分子中の全アスパラギン酸数を表し、その平均値は3～200程度であり、好ましくは5～100程度であり、より好ましくは6～60程度である。ポリアスパラギン酸の各構成単位はランダムに結合していてもブロックを形成して結合していてもよいが、 $c + d$ は正数であり、 e は0でもよい。

また、全アスパラギン酸数 ($c + d + e$) に対する α -アミノ酸型構成単位 (c) の割合は好ましくは10～100%であり、特に好ましくは20～100%である。この割合は、例えば、特許文献1等に準じた製造方法の工程中、ポリアスパラギン酸の保護基の脱保護条件等を選ぶことにより適宜変えることが可能である。

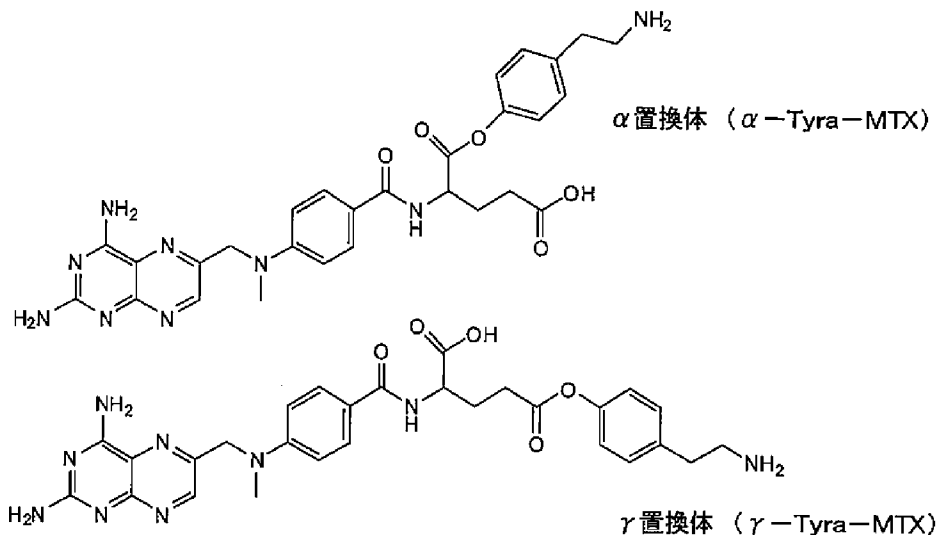
[0031] 上記式 (I I) のBにおける(C1～C6)アシル基としては、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基またはヘキサノイル基等が挙げられる。Bとしては(C2～C4)アシル基、例えば、アセチル基またはプロピオニル基等が好ましく、アセチル基が特に好ましい。

[0032] 上記式 (I I) のRとしては水酸基または上記式 (I) で表される置換基が挙げられ、1分子中少なくとも1個のRは式 (I) で表される置換基である。式 (I) で表される置換基とは上記した通りであり、好ましくは上記式 (I I I) で表される置換基である。式 (I I I) におけるEとしては上記式 (I) におけるEと同じ意味であり、好ましい化合物も同様である。

[0033] 次に本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体について、葉酸誘導体がメトトレキサート、リンカー分子がチラミン (Tyramine: 4-アミノエチルフェノール) の場合にて説明するが、本発明がこの化合物に限定されることはない。

メトトレキサートはカルボキシ基を2個有していることから、チラミンとメトトレキサートがエステル結合している化合物にも2つの位置異性体が存在する。以下に示すように、メトトレキサートの部分構造であるグルタミン酸の α -カルボキシ基がチラミンと結合したものを α 置換体、 γ -カルボキシ基がチラミンと結合したものを γ 置換体と呼ぶ。

[化6]



[0034] これらの化合物の製造方法について説明する。

まず、チラミンのアミノ基をエステル結合生成後に除去可能な保護基で保護する。該保護基としては、一般的なアミノ基の保護基であれば特に問わないが、チラミンとメトトレキサートのエステル結合が安定である脱保護条件、即ち、中性若しくは酸性条件で脱保護できる保護基が望ましく、例えば、ベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル (Boc) 基、アリルオキシカルボニル基等が挙げられる。

[0035] 次いで、アミノ基が保護されたチラミンを、有機溶媒中メトトレキサートと脱水縮合剤を用いて脱水縮合する。

脱水縮合反応の反応温度は、通常4～60℃、好ましくは15～50℃であり、反応時間は1時間～数日、好ましくは4～48時間である。

該有機溶媒としては反応が進行する限り特に限定されないが、例えば、ト

ルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、塩化メチレン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタン、ジエチレングリコールジメチルエーテル等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類、1, 3-ジメチルイミダゾリジノン等のウレア類または前記溶媒の混合溶媒等が挙げられ、好ましくはアミド類またはウレア類であり、より好ましくはジメチルホルムアミドまたは1, 3-ジメチルイミダゾリジノンである。

[0036] 該脱水縮合剤としてはアミン類とカルボキシル基の縮合反応が進行する限り特に限定されないが、好ましくはジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、クロロ蟻酸イソブチル、ピバリン酸クロリド、DMT-MM (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)、TFFH (テトラメチルフルオロホルムアミジニウム ヘキサフルオロホスフェート)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキシキノリン (EEDQ) またはBOP (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスフォニウム ヘキサフルオロホスフェート) である。

[0037] 脱水縮合反応の際、反応助剤を用いてもよい。該反応助剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ジメチルアミノピリジンまたは2, 6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルピリジン等が挙げられる。

脱水縮合反応を行った後、必要に応じて適当な精製処理を行い、チラミンのアミノ基が保護された上記の α 置換体と γ 置換体の混合物若しくは分離された各異性体を得る。更に、アミノ基の保護基を適当な処理を行い脱保護し、上記のメトトレキサートとチラミンの縮合体 (α 置換体、 γ 置換体、若しくはその混合体) を得る。

[0038] 本発明には上記の葉酸若しくは葉酸誘導体と上記式（I V）で表される化合物のフェノール性水酸基とをエステル結合させ、アミノ基の保護基を除去し、続いて、得られた脱保護体と、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基とを脱水縮合してアミド結合を生成することを特徴とする葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体の製造方法も含まれる。

続いて該製造方法について説明する。

[0039] 上記で得られた置換体と、特許文献3等に記載の方法に準じて製造されたメトキシポリエチレングリコールーポリアスパラギン酸ブロック共重合体またはメトキシポリエチレングリコールーポリグルタミン酸ブロック共重合体とを有機溶媒中、脱水縮合剤を用いて脱水縮合する。

脱水縮合反応の反応温度は、通常4～60℃、好ましくは15～50℃であり、反応時間は1時間～数日、好ましくは4～48時間である。

[0040] 該有機溶媒としては、上記のメトトレキサートとアミノ基を保護したチラミンの縮合反応における有機溶媒と同様な有機溶媒が挙げられ、好ましい有機溶媒も同様である。

該脱水縮合剤としては、上記のメトトレキサートとアミノ基を保護したチラミンの縮合反応における脱水縮合剤と同様な脱水縮合剤が挙げられる。

脱水縮合反応の際には反応助剤を用いてもよく、該反応助剤としては、上記のメトトレキサートとアミノ基を保護したチラミンの縮合反応における反応助剤と同様な反応助剤が挙げられる。

[0041] ただし、上記で得られた置換体には遊離のカルボキシ基が残っていることから、ブロック共重合体の側鎖カルボキシ基を最初に活性化し、その後、上記置換体のアミノ基と反応させることが望ましい。

活性化の方法としては、通常ペプチド結合製造の際に用いられる方法が適用可能であり、例えば、上記の試薬を使用した方法が挙げられる。即ち、カルボン酸類とN-ヒドロキシスクシンイミド等の反応助剤を上記の脱水縮合剤で縮合し、活性エステル体として単離した後にアミン類を加えてアミドを

得る方法等である。

[0042] 本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体において、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体にリンカーを介して結合している葉酸及び葉酸誘導体の結合量は、薬効を示す量であれば特に限定されないが、通常該ポリマーの総カルボキシ基数の1～100%、好ましくは10～90%である。

葉酸及び葉酸誘導体の結合量は、例えば、紫外線吸収スペクトルの強度から求めることができる。また、本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体をアルカリ加水分解することにより遊離する葉酸または葉酸誘導体を、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等を用いて定量することによっても求めることができる。

[0043] 本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体において、リンカー分子が結合していない側鎖カルボキシ基やエステルになっていない葉酸及び葉酸誘導体のカルボキシ基は遊離型でも塩型でもよい。遊離型で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって目的とする塩に変換することができ、塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により遊離型または目的とする他の塩に変換することができる。

該塩としては、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩またはトリエチルアンモニウム塩等が挙げられる。

[0044] 本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体は、水中でポリエチレングリコール類を外殻とするミセルを形成してもよい。ミセルを形成することにより良好な水溶性、水溶液中での安定性、薬効の増強が期待される。

[0045] 本発明には上記の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体を薬効成分とする抗癌剤、炎症疾患治療剤、または抗リウマチ剤も含まれる。該葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体は、そのまま投与することも、また、医薬上許容される物質と混合した薬学的組成物として投与することもできる。該薬学的組成物の剤形は注射剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、坐剤等いかなるものでも

よい。また、これらの製剤は医薬用に用いられる種々の補助剤、即ち、担体やその他の助剤、例えば、安定剤、防腐剤、無痛化剤、乳化剤等の添加剤を含有していてもよい。

該製剤中における葉酸及び葉酸誘導体の高分子結合体の含量は製剤により種々異なるが、通常0.1～100重量%、好ましくは1～98重量%である。

実施例

[0046] 以下に、参考例、実施例及び試験例を示し、本発明を更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。

[0047] 参考例1 Boc-Tyramineの合成

Tyramine (5.49 g) をジオキサン110 mL、水110 mL に溶解し、(Boc)₂O (ジ-*t*-ブチルジカーボネート: 9.60 g) を加えた。室温で4時間攪拌した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン-酢酸エチル) で精製し、目的物の画分を減圧濃縮することでBoc-Tyramine (9.05 g) を得た。

[0048] 参考例2 Boc-Tyramine-MTXの合成

MTX (メトトレキサート: 8.18 g)、Boc-Tyramine (8.54 g)、DMAP (ジメチルアミノピリジン: 4.40 g) をDMF (ジメチルホルムアミド: 164 mL) に溶解した後、ジイソプロピルカルボジイミド (5.64 mL) を加えた。室温で4時間攪拌した後、酢酸エチル (1.64 L)、水 (1.64 L) で抽出した。水層に20 mMクエン酸緩衝液 (pH 4.6) 2.9 Lを加え、生成した沈殿を桐山ロートでろ過した。得られた沈殿を塩化メチレン-メタノール混合溶媒 (1:1) に溶解させ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムで精製し、2種のMTXモノエステル体 (α -モノエステル体 1.711 g、 γ -モノエステル体 1.332 g) を得た。 α -モノエステル体と γ -モノエステル体はHPLC条件1において保持時間がそれぞれ

れ13.3分、13.7分であった。

[0049] HPLC条件1

カラム：Inertsil ODS-3 (5 μ m) 4.6x150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

溶離液：A液 0.1%リン酸水溶液、B液 アセトニトリル

グラジエント

時間 (分) 0 30 35 35.1 45

B液 (%) 10 90 90 10 10

流速：1.0mL/分

検出器：UV (254nm)

[0050] 参考例3 Boc-Tyramine-PEMの合成

J. Med. Chem., 1992, 35, p4450-4454に記載されている方法で得られたペメトレキセド (PEM: 624mg)、Boc-Tyramine (693mg)、DMAP (357mg) をDMF (12.5mL) に溶解した後、ジイソプロピルカルボジイミド (457 μ L) を加えた。室温で45分攪拌した後、酢酸 (334 μ L) を加えた。HPLC条件2で精製を行い、Boc-Tyramine-PEM (α 、 γ -モノエステルの混合体：約1:1) 277mgを得た。 α -エステルと γ -エステルはHPLC条件1において保持時間がそれぞれ18.0分、18.3分であった。

HPLC条件2

カラム：Inertsil ODS-3 (5 μ m) 20x250mm

カラム温度：室温

溶離液：A液 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液、B液 アセトニトリル

グラジエント

時間 (分) 0 4.9 5 13 13.1 20 20.1 30

B液 (%) 10 10 20 20 40 40 10 10

流速：20mL/分

検出器：UV（254nm）

[0051] 参考例4 α -Tyramine-MTXの合成

参考例2で得られた α -Boc-Tyramine-MTX（100mg）に酢酸エチル（1.5mL）を加え懸濁させたのち、4N HCl/EtOAc（0.5mL）を加え、室温で1時間攪拌した。沈殿を桐山ロートでろ過し、真空乾燥して α -Tyramine-MTX（111mg）を得た。回収率から3塩酸塩であると考えられる。

[0052] 参考例5 γ -Tyramine-MTXの合成

参考例2で得られた γ -Boc-Tyramine-MTX（100mg）に酢酸エチル（1.5mL）を加え懸濁させたのち、4N HCl/EtOAc（0.5mL）を加え、室温で1時間攪拌した。沈殿を桐山ロートでろ過し、真空乾燥して γ -Tyramine-MTX（108mg）を得た。回収率から3塩酸塩であると考えられる。

[0053] 参考例6 Tyramine-PEM（ α 、 γ 混合体）の合成

参考例3で得られたBoc-Tyramine-PEM（ α 、 γ 混合体）100mgに酢酸エチル（1.5mL）を加え懸濁させたのち、4N HCl/ジオキサン（0.5mL）を加え、室温で1時間攪拌した。沈殿を桐山ロートでろ過し、真空乾燥してTyramine-PEM（ α 、 γ 混合体）93mgを得た。回収率から2塩酸塩であると考えられる。

[0054] 参考例7 PEG-Asp33（OSu）-Acの合成

特許文献3に記載の方法に準じて合成したPEG-Asp33-Ac（片末端メチル片末端アミノプロピルポリエチレングリコールポリアスパラギン酸（33ユニット）のブロック共重合体N-アセチル体：485mg）、HOSu（N-ヒドロキシスクシンイミド：115mg）をDMF（9.7mL）に溶解し33°Cのオイルバスで加温した。DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド：206mg）を添加して1時間攪拌した。生成したウレアを桐山ロートでろ過し、得られたろ液に酢酸エチル（39mL）を加え希釈した後に、ヘキサン（58mL）を添加し結晶を析出させた。15分攪拌した

後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（3：2）を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥してPEG-Asp33（OSu）-Ac（454mg）を得た。

[0055] 実施例1 PEG-Asp33（ α -Tyramine-MTX）-Acの合成

参考例7で得られたPEG-Asp33（OSu）-Ac（150mg）と参考例4で得られた α -Tyramine-MTX（113mg）をDMF（1.5mL）に溶解し、トリエチルアミン（69 μ L）を添加した。室温で4時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）100mL中に滴下した。10分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶（261mg）を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒（1：1）52mLに溶解し、イオン交換樹脂 Muramac（登録商標）C1002（2.61g）、Muramac（登録商標）A203T（2.61g）（共に、ムロマテテクノス（株）製）を加え、不純物を吸着精製した。樹脂をろ過した後、ろ液を減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp33（ α -Tyramine-MTX）-Ac（172mg）を得た。この高分子結合体のMTX含有率は19.6%（w/w）であった。薬剤（MTX）含有率は、得られた高分子結合体を水酸化ナトリウム水溶液で加水分解させ、遊離してきた薬剤（MTX）をHPLCで分析することで算出した。以下の高分子結合体でも同様である。

[0056] 実施例2 PEG-Asp33（ γ -Tyramine-MTX）-Acの合成

参考例7で得られたPEG-Asp33（OSu）-Ac（146mg）と参考例5で得られた γ -Tyramine-MTX（110mg）をDMF（1.5mL）に溶解し、トリエチルアミン（67 μ L）を添加した。室温で4時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）100

mL中に滴下した。10分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶(270mg)を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒(1:1)54mLに溶解し、イオン交換樹脂 Muramac (登録商標) C1002 (2.70g)、Muramac (登録商標) A203T (2.70g)を加え、不純物を吸着精製する。樹脂をろ過した後、ろ液を減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp33 (γ -Tyramine-MTX)-Ac (170mg)を得た。この高分子結合体のMTX含有率は25.0% (w/w)であった。

[0057] 参考例8 PEG-Asp40 (OSu)-Acの合成

特許文献3に記載の方法に準じて合成したPEG-Asp40-Ac (片末端メチル片末端アミノプロピルポリエチレングリコールポリアスパラギン酸(40ユニット)のブロック共重合体N-アセチル体:420mg)、HOSu (115mg)をDMF (8.4mL)に溶解し37°Cのオイルバスで加温した。DCC (206mg)を添加して1時間攪拌した。生成したウレアを桐山ロートでろ過し、得られたろ液に酢酸エチル(34mL)を加え希釈した後に、ヘキサン(50mL)を添加し結晶を析出させた。40分攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)を追加し攪拌する。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥してPEG-Asp40 (OSu)-Ac (424mg)を得た。

[0058] 実施例3 PEG-Asp40 (α -Tyramine-MTX)-Acの合成

参考例8で得られたPEG-Asp40 (OSu)-Ac (220mg)と参考例4で得られた α -Tyramine-MTX (177mg)をDMF (2.2mL)に溶解し、トリエチルアミン(109 μ L)を添加した。室温で4時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)100mL中に滴下した。70分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)を追加し攪拌した。桐山ロート

で沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶（413mg）を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒（1：1）83mLに溶解し、イオン交換樹脂 Muramac（登録商標）C1002（4.13g）、Muramac（登録商標）A203T（4.13g）を加え、不純物を吸着精製した。樹脂をろ過した後、ろ液を減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp40（ α -Tyramine-MTX）-Ac（263mg）を得た。この高分子結合体のMTX含有率は23.6%（w/w）であった。

[0059] 実施例4 PEG-Asp40（ γ -Tyramine-MTX）-Acの合成

参考例8で得られたPEG-Asp40（OSu）-Ac（100mg）と参考例5で得られた γ -Tyramine-MTX（81mg）をDMF（1.0mL）に溶解し、トリエチルアミン（49 μ L）を添加した。室温で4時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）100mL中に滴下した。25分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶（189mg）を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒（1：1）38mLに溶解し、イオン交換樹脂 Muramac（登録商標）C1002（1.89g）、Muramac（登録商標）A203T（1.89g）を加え、不純物を吸着精製した。樹脂をろ過した後、減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp40（ γ -Tyramine-MTX）-Ac（126mg）を得た。この高分子結合体のMTX含有率は28.6%（w/w）であった。

[0060] 実施例5 PEG-Asp40（ α 、 γ -Tyramine-PEM）-Acの合成

参考例8で得られたPEG-Asp40（OSu）-Ac（129mg）と参考例6で得られたTyramine-PEM（ α 、 γ 混合体：93mg）をDMF（1.3mL）に溶解し、トリエチルアミン（42 μ L）を添加した。室温で2.5時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒（4

: 1) 130 mL中に滴下した。10分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶(246 mg)を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒(1:1)50 mLに溶解し、イオン交換樹脂 Murmac (登録商標) C1002 (2.5 g)、Murmac (登録商標) A203T (2.5 g)を加え、不純物を吸着精製した。樹脂をろ過した後、ろ液を減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp40 (α 、 γ -Tyramine-PEM)-Ac (150 mg)を得た。この高分子結合体のPEM含有率は22.1% (w/w)であった。

[0061] 参考例9 PEG-Asp44 (OSu)-Acの合成

特許文献3に記載の方法に準じて合成したPEG-Asp44-Ac (片末端メチル片末端アミノプロピルポリエチレングリコールポリアスパラギン酸(44ユニット)のブロック共重合体N-アセチル体:582 mg)、HOSu (173 mg)をDMF (11.6 mL)に溶解し37°Cオイルバスで加温した。DCC (309 mg)を添加して1時間攪拌した。生成したウレアを桐山ロートでろ過した。得られたろ液に酢酸エチル(46 mL)を加え希釈した後に、ヘキサン(70 mL)を添加し結晶を析出させた。30分攪拌した後に攪拌をとめて上澄みを除去し、更にヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥してPEG-Asp44 (OSu)-Ac (543 mg)を得た。

[0062] 実施例6 PEG-Asp44 (γ -Tyramine-MTX)-Acの合成

参考例9で得られたPEG-Asp44 (OSu)-Ac (100 mg)と参考例5で得られた γ -Tyramine-MTX (57 mg)をDMF (2 mL)に溶解し、トリエチルアミン(35 μ L)を添加した。室温で4時間攪拌したのち、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒(4:1)100 mL中に滴下した。15分間攪拌した後に攪拌をとめ上澄みを除去し、更にヘキサ

ン-酢酸エチル混合溶媒（4：1）を追加し攪拌した。桐山ロートで沈殿をろ過し、真空乾燥して目的化合物の粗結晶（158mg）を得た。

この粗結晶をアセトニトリル-水混合溶媒（1：1）32mLに溶解し、イオン交換樹脂 Muramac（登録商標）C1002（1.58g）、Muramac（登録商標）A203T（1.58g）を加え、不純物を吸着精製した。樹脂をろ過した後、ろ液を減圧濃縮、凍結乾燥してPEG-Asp44（ γ -Tyramine-MTX）-Ac（109mg）を得た。この高分子結合体のMTX含有率は22.7%（w/w）であった。

[0063] 試験例1 薬剤遊離速度の測定（加水分解酵素非存在下における薬剤放出）

サンプル約5mgを秤量し、アセトニトリル（250 μ L）、水（250 μ L）に溶解させた（溶液A）。溶液A（100 μ L）に0.1N水酸化ナトリウム溶液（900 μ L）を加えて1時間室温で静置した。この溶液50 μ Lをサンプリングし、0.1N塩酸50 μ Lで中和後、PBS溶液（400 μ L）で希釈した。この溶液をHPLCで分析しサンプルに含まれる総薬剤量の基準とした。

一方、溶液A（200 μ L）をPBS溶液（1800 μ L）で希釈後、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽中に静置し、経時的にサンプリングしてHPLCで分析を行った。薬剤のピーク面積を上記総薬剤量の基準ピーク面積と比較して各経時点における薬剤放出率を計算し、得られた結果を図1に示す。

[0064] 図1中、MTX__A-33は実施例1で得られたPEG-Asp33（ α -Tyramine-MTX）-Acを、MTX__G-33は実施例2で得られたPEG-Asp33（ γ -Tyramine-MTX）-Acを、MTX__G-44は実施例6で得られたPEG-Asp44（ γ -Tyramine-MTX）-Acを、MTX__G-40は実施例4で得られたPEG-Asp40（ γ -Tyramine-MTX）-Acを、MTX__A-40は実施例3で得られたPEG-Asp40（ α -Tyramine-MTX）-Acを、PEM__G-40は実施例5で得られたPEG-Asp40（ α 、 γ -Tyramine-PEM）-Acを示す。

[0065] 図1から明らかなように、本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体は酵素の非存在下で薬剤を遊離することができ、その薬剤遊離速度は薬剤分子のカルボン酸の酸性度に依存し、 α 置換体の遊離速度が γ 置換体の遊離速度より早い。PEM_G-40については α 、 γ の混合体が結合していることから、遊離速度が α 置換体、 γ 置換体の中間となっている。このことは α 置換体、 γ 置換体を適当な割合で混合することにより薬剤遊離速度の制御ができることを示している。

[0066] 試験例2 マウス結腸癌Colon26移植マウスに対する抗腫瘍効果

BALB/cマウスの皮下で継代したマウス結腸癌Colon26を約2mm角のブロックにし、套管針を用いてCDF1マウスの背側部皮下に移植した。腫瘍移植後7日目に実施例3で得られた本発明の高分子結合体MTX_A-40 (PEG-Asp40 (α -Tyramine-MTX)-Ac、実施例6で得られたMTX_G-44 (PEG-Asp44 (γ -Tyramine-MTX)-Acと比較対照物質としてのMTXを尾静脈に投与した。本発明の高分子結合体は注射用水に溶解し単回投与した。対照としたMTXは蒸留水で溶解・希釈して、1日1回、5日間連日投与した。投与後、腫瘍の長径(Lmm)及び短径(Wmm)を定期的に測定し、腫瘍体積を $(L \times W^2) / 2$ により算出した。投与開始日の腫瘍体積を1.0とし、投与開始後12日目を判定日として各投与群の相対腫瘍体積を求めた。その結果を表1に示す。本発明の化合物の用量はMTX換算である。

[0067]

[表1]

[表1] マウス結腸癌Colon26移植に対する抗腫瘍効果

化合物	投与 スケジュール	1回投与量	総投与量	相対腫瘍体積*	毒性死/n
		mg/kg/day	mg/kg	mean ± SD	
無処置群	-	-	-	12.3 ± 4.9	0/5
MTX	5日間連投	20	100	-	3/3
		15	75	12.2 ± 8.1	0/3
MTX_A-40	単回	50	50	4.8 ± 2.8	1/3
		25	25	6.8 ± 0.7	0/3
MTX_G-44	単回	50	50	0.4 ± 0.1	1/3
		25	25	2.3 ± 1.1	1/3
		12.5	12.5	8.2 ± 1.0	0/3

*投与開始日の腫瘍体積を1.0としたときの投与開始後12日目の平均相対腫瘍体積

[0068] 無処置群の判定日の相対腫瘍体積は12.3であった。

MTXの20mg/kgを5日間連日投与すると動物は全匹毒性により死亡した。15mg/kgの相対腫瘍体積は12.2と無処置群の相対腫瘍体積とほとんど変わらず、抗腫瘍効果は見られなかった。

一方、本発明の高分子結合体MTX_A-40はMTXとして50mg/kgでは1匹が毒性によって死亡したが、相対腫瘍体積は4.8であった。同じく25mg/kgの相対腫瘍体積は6.8であり、投与量に依存して腫瘍増殖を抑制している。MTX_G-44はMTXとして25mg/kgでは1匹が毒性によって死亡したが、相対腫瘍体積は2.3であった。同じく12.5mg/kgの相対腫瘍体積は8.2であり投与量に依存して腫瘍増殖を抑制している。

以上、本発明のMTXの高分子結合体(MTX_A-40、MTX_G-44)は単回投与において腫瘍の増殖を強く抑制し、その効果は連投したMTXを大きく上回るものであり、抗癌剤として有用である。

[0069] 試験例3 ラットコラーゲン関節炎モデルを用いた抗炎症評価

DA/SiCラットの背部にウシII型コラーゲンIIとFreund's incomplete adjuvantとの乳濁液を背部皮内4箇所合計0.4mL皮内投与(感作)し、関節炎を誘発した。実施例3で得られたMTX_A-40(PEG-Asp40(α-Tyramine-MT

X) - Ac) と比較対照物質MTXは5 mg/mL水溶液を調製し投与に用いた。陽性対象物質のレフロノミドはカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 水溶液で懸濁させて投与に用いた。MTX_A-40の2.5 mg/kg投与群 (MTX換算; 高用量群) は感作後1日目に、MTX_A-40の1.25 mg/kg投与群 (MTX換算; 低用量群) とMTXの2.5 mg/kg投与群は1日目と8日目に尾静脈内に投与した。また、レフロノミド (10 mg/kg) は感作日から28日間連続して強制経口投与した。感作後、ラット左足蹠を観察し発症した関節炎をスコア化し、結果を図2に示す。スコア化には表2の関節炎スコア基準を用いた。

[表2]

[表2]

点数	関節炎の状態
0	正常である
1	発赤が見られる
2	足指に発赤及び軽度な浮腫がみられる
3	足指から足全体に浮腫が進展する
4	強度の浮腫が見られる
5	関節の変形が見られる

[0070] 図2から明らかなように、MTX投与群は対照群とほぼ同時期に炎症が発症しており抗炎症効果はみられない。

一方、MTX_A-40投与群はMTXと比べ総投与量が1/2であるにも関わらず炎症の発症時期を遅延させており、MTXの高分子結合体はMTXの抗炎症作用を増強、持続させていることが確認され、本発明の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体は炎症疾患治療薬として有用であることを示している。

[0071] 試験例4 ラットコラーゲン関節炎モデルを用いた抗炎症評価2

実施例4で得られたMTX_G-40 (PEG-Asp40 (γ-Tyr amine-MTX) -Ac) と比較対照物質MTXの5 mg/mL水溶液を調製し投与に用い、試験例3と同様に行った。陽性対象物質のレフロノミ

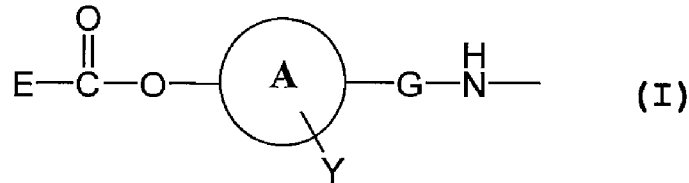
ドはカルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）水溶液で懸濁させて投与に用いた。MTX_G-40の1.00mg/kg（MTX換算）、1.25mg/kg（MTX換算）投与群とMTXの2.5mg/kg投与群は感作後1日目、8日目、15日目、22日目に尾静脈内に投与した。また、レフロノミド（10mg/kg）は感作日から28日間連続して強制経口投与した。感作後、ラット左足蹠を観察し、発症した関節炎を上記表2を用いてスコア化し、結果を図3に示す。

[0072] 図3から明らかなように、本試験ではMTX投与群は対照群と比べて炎症の発症時期を遅延させた。一方、MTX_G-40はMTXよりも低投与量である1.00mg/kgの投与で、MTXよりも更に炎症の発症時期を遅延させ、1.25mg/kg投与群では観察した28日間炎症の発症を完全に抑制し、MTXの高分子結合体はMTXの抗炎症作用を増強、持続させていることが確認された。

請求の範囲

[請求項1] ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基に下記式 (I)

[化7]



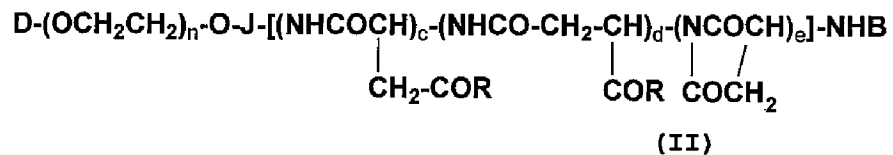
[式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキレン基を示し、Yは水素原子または置換基を示し、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す] で表される置換基が結合している葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

[請求項2] 側鎖にカルボキシ基を有するポリマーがポリ酸性アミノ酸である請求項1に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

[請求項3] ポリ酸性アミノ酸がポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸である請求項2に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、またはその薬理的に許容される塩。

[請求項4] 下記式 (II)

[化8]



[式中、Dは水素原子または置換基を有していてもよい (C1~C6) アルキル基を示し、nの平均値は5~11500であり、Jは (C2~C6) アルキレン基を示し、c+d+eの平均値は3~200であり、c+dは正数であり、Rは水酸基または式 (I) で表される置

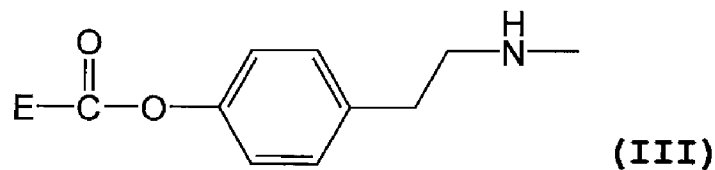
換基を示し、1分子中少なくとも1個のRは式(I)で表される置換基であり、Bは水素原子または(C1~C6)アシル基を示す]

で表される請求項1~3のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[請求項5] Dが無置換(C1~C6)アルキル基であり、nの平均値が50~1000であり、c+d+eの平均値が5~100であり、Bが(C1~C6)アシル基である請求項4に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[請求項6] 式(I)で表される置換基が下記式(III)

[化9]



[式中、Eは葉酸若しくは葉酸誘導体の残基を示す]

で表される置換基である請求項1~5のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[請求項7] 葉酸の誘導体がメトトレキサートである請求項1~6のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

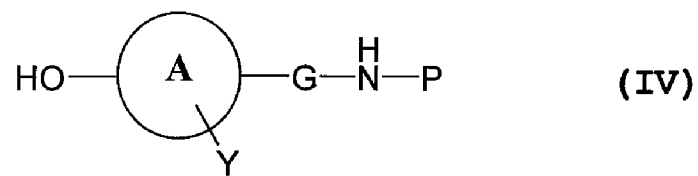
[請求項8] 葉酸の誘導体がペメトレキセドである請求項1~6のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩。

[請求項9] 請求項1~8のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩を有効成分とする抗癌剤。

[請求項10] 請求項1~8のいずれか一項に記載の葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体、または薬理的に許容される塩を有効成分とする炎症疾患治療薬。

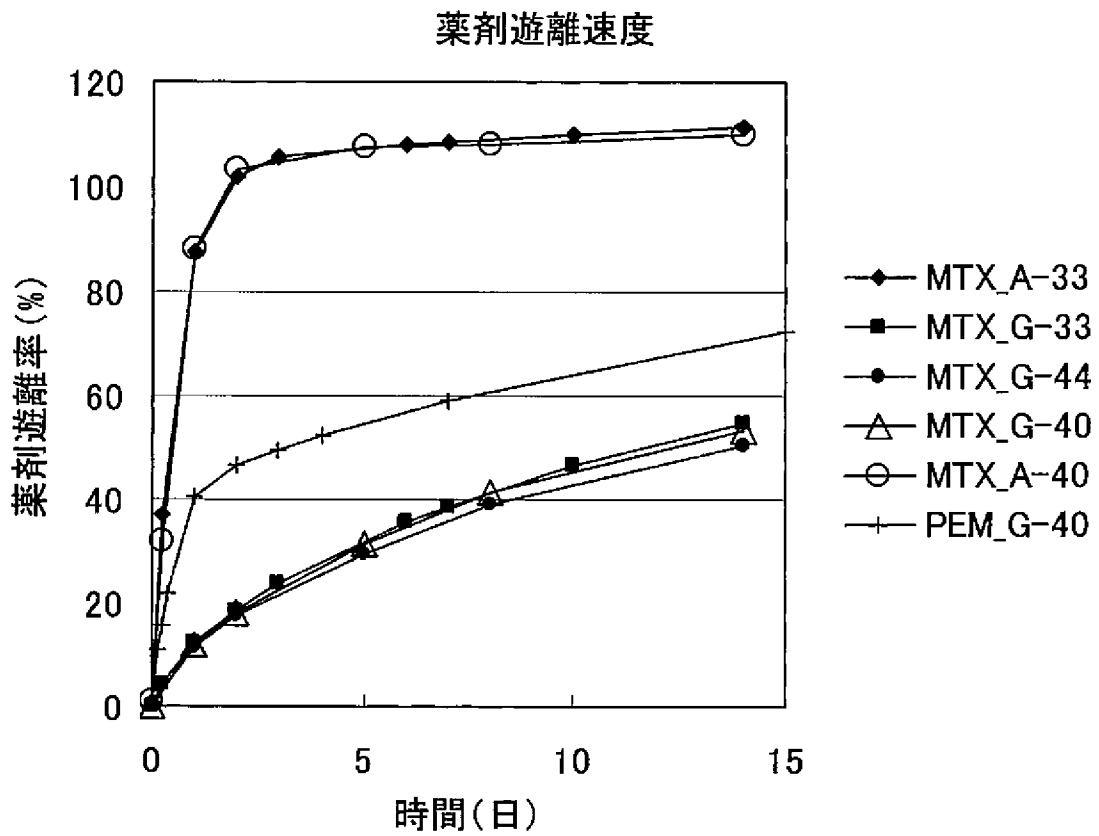
[請求項11] 葉酸若しくは葉酸誘導体と下記式（IV）で表される化合物のフェノール性水酸基とをエステル結合させ、アミノ基の保護基を除去し、続いて、得られた脱保護体とポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシ基を有するポリマーからなるブロック共重合体の該カルボキシ基とを脱水縮合してアミド結合を生成することを特徴とする葉酸若しくは葉酸誘導体の高分子結合体の製造方法。

[化10]

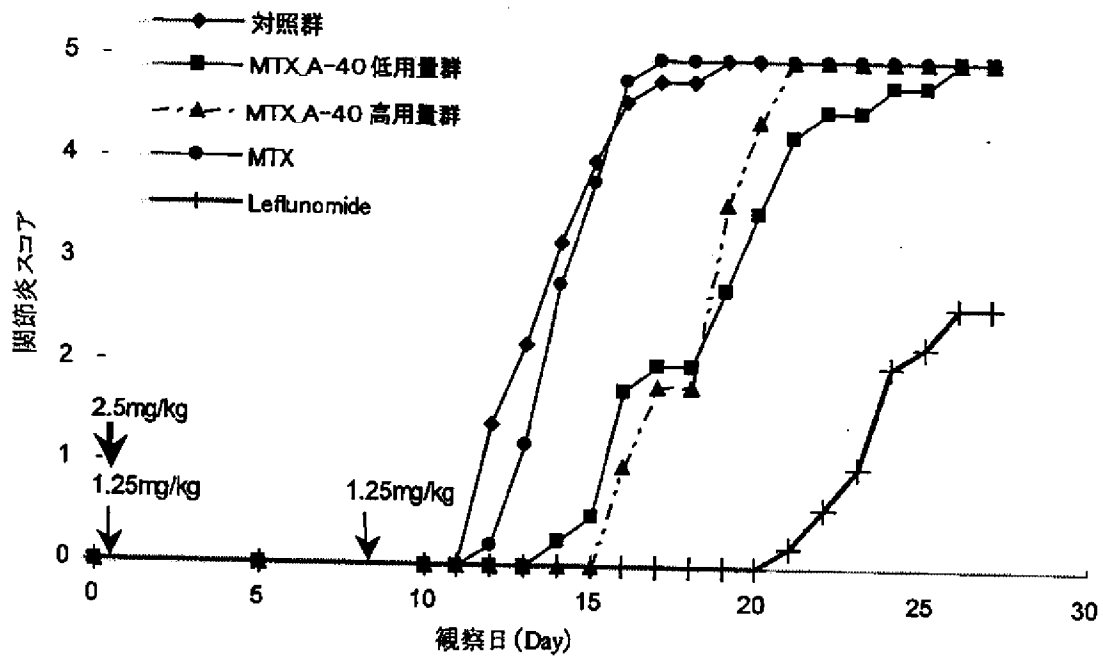


[式中、Aは単環または縮合した芳香族基を示し、Gは置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキレン基を示し、Pはアミノ基の保護基を示し、Yは水素原子または置換基を示す]

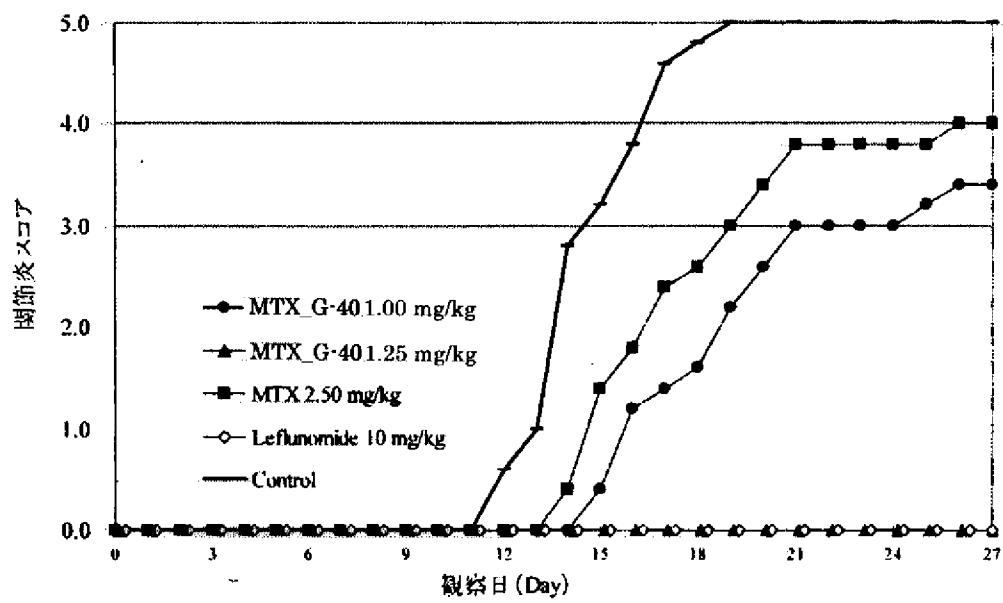
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/058325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08G69/40(2006.01) i, A61K31/517(2006.01) i, A61K31/519(2006.01) i,
A61K47/48(2006.01) i, A61P29/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, C08G81/00
(2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08G69/40, A61K31/517, A61K31/519, A61K47/48, A61P29/00, A61P35/00,
C08G81/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/041610 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 10 April, 2008 (10.04.08), Claims & TW 200835510 A	1-11
A	WO 2008/010463 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 24 January, 2008 (24.01.08), Claims & TW 200813115 A & EP 2042195 A1 & KR 2009031597 A	1-11
A	WO 2007/135910 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 29 November, 2007 (29.11.07), Claims & EP 2019122 A1 & TW 200811225 A	1-11

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 July, 2009 (09.07.09)	Date of mailing of the international search report 21 July, 2009 (21.07.09)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058325

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/111211 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 04 October, 2007 (04.10.07), Claims & KR 2008106254 A & TW 200812572 A	1-11
A	WO 2006/095668 A1 (Toray Industries, Inc.), 14 September, 2006 (14.09.06), Claims & EP 1857489 A1 & AU 2006221448 A1 & CN 101137700 A & KR 2007117564 A & US 2008/145432 A1	1-11
A	WO 2004/039869 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 13 May, 2004 (13.05.04), Claims & AU 2003280592 A1 & EP 1580216 A1 & TW 200418906 A & US 2006/067910 A1 & CN 1708540 A & KR 2005070103 A & CN 1309763 C & RU 2315782 C2 & US 7495099 B2	1-11
A	WO 2006/115293 A1 (The University of Tokyo), 02 November, 2006 (02.11.06), Claims; Par. No. [0013] (Family: none)	1-11
A	WO 2007/022493 A2 (ENDOCYTE, INC.), 22 February, 2007 (22.02.07), Claims; page 24, lines 11 to 30; pages 45 to 64, examples & WO 2007/022493 A3 & EP 1948240 A2 & US 2008/280937 A1 & JP 2009-504783 A	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08G69/40(2006.01)i, A61K31/517(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C08G81/00(2006.01)i

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. C08G69/40, A61K31/517, A61K31/519, A61K47/48, A61P29/00, A61P35/00, C08G81/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2008/041610 A1 (日本化薬株式会社)2008.04.10, 特許請求の範囲 & TW 200835510 A	1-11
A	WO 2008/010463 A1 (日本化薬株式会社)2008.01.24, 特許請求の範囲 & TW 200813115 A & EP 2042195 A1 & KR 2009031597 A	1-11
A	WO 2007/135910 A1 (日本化薬株式会社)2007.11.29, 特許請求の範囲 & EP 2019122 A1 & TW 200811225 A	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.07.2009

国際調査報告の発送日

21.07.2009

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)

佐々木 秀次

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

8930

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 請求項の番号
A	WO 2007/111211 A1 (日本化薬株式会社)2007. 10. 04, 特許請求の範囲 & KR 2008106254 A & TW 200812572 A	1-11
A	WO 2006/095668 A1 (東レ株式会社)2006. 09. 14, 特許請求の範囲 & EP 1857489 A1 & AU 2006221448 A1 & CN 101137700 A & KR 2007117564 A & US 2008/145432 A1	1-11
A	WO 2004/039869 A1 (日本化薬株式会社)2004. 05. 13, 特許請求の範囲 & AU 2003280592 A1 & EP 1580216 A1 & TW 200418906 A & US 2006/067910 A1 & CN 1708540 A & KR 2005070103 A & CN 1309763 C & RU 2315782 C2 & US 7495099 B2	1-11
A	WO 2006/115293 A1 (国立大学法人東京大学)2006. 11. 02, 特許請求の 範囲, 段落[0013] (ファミリーなし)	1-11
A	WO 2007/022493 A2 (ENDOCYTE, INC.)2007. 02. 22, 特許請求の範囲, 24 頁 11-30 行, 45 頁-64 頁の実施例 & WO 2007/022493 A3 & EP 1948240 A2 & US 2008/280937 A1 & JP 2009-504783 A	1-11