(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
2021年4月1日(01.04.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/060443 A1

(51) 国際特許分類:
C08G 65/333 (2006.01)　*C07K 5/09* (2006.01)
C08G 81/00 (2006.01)　*C07K 5/093* (2006.01)
C07K 5/037 (2006.01)　*A61K 47/60* (2017.01)
C07K 5/068 (2006.01)　*A61K 47/64* (2017.01)
C07K 5/072 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2020/036199

(22) 国際出願日：　2020年9月25日(25.09.2020)

(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 2019-176251　2019年9月26日(26.09.2019)　JP

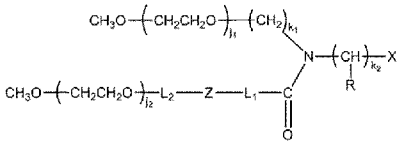
(71) 出願人: 日油株式会社(NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目２０番３号 Tokyo (JP). 国立大学法人東京工業大学(TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山２丁目１２番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 羽村 健(HAMURA, Ken); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 吉岡 宏樹(YOSHIOKA, Hiroki); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 大坂間 順規(OSAKAMA, Kazuki); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 西山 伸宏(NISHIYAMA, Nobuhiro); 〒1528550 東京都目黒区大岡山２丁目１２番１号 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 高島　一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(54) **Title:** ASYMMETRICALLY BRANCHED DEGRADABLE POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVE

(54) 発明の名称： 非対称分岐型分解性ポリエチレングリコール誘導体



(1)

(57) **Abstract:** Provided is a high-molecular-weight branched, degradable polyethylene glycol derivative which does not cause cell vacuoles. The branched, degradable polyethylene glycol derivative represented by formula (1) includes an oligopeptide that decomposes intracellularly in each molecule. (In the formula, k_1 and k_2 are independently 1–12, j_1 and j_2 are independently 45–950, R is a hydrogen atom, a substituted or unsubstituted C1-12 alkyl group, a substituted aryl group, an aralkyl group, or a heteroalkyl group, Z is an oligopeptide which is degraded by intracellular enzymes, X is a functional group which can react with a biological substance, and L_1 and L_2 are independently single bonds or divalent spacers.)

(57) 要約：細胞の空胞を引き起こさない高分子量の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を提供すること。細胞内にて分解するオリゴペプチドを分子内に有する下式（１）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。（式中、k_1およびk_2はそれぞれ独立して１～１２であり、j_1及びj_2はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～１２のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｚは細胞内の酵素で分解するオリゴペプチドであり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、L_1及びL_2はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。）

WO 2021/060443 A1

［続葉有］

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 非対称分岐型分解性ポリエチレングリコール誘導体

技術分野

[0001] 本発明は、生体関連物質を修飾する用途に使用される細胞内で分解する分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体に関する発明である。

背景技術

[0002] ホルモンやサイトカイン、抗体、酵素などの生体関連物質を用いた医薬品は、通常生体内へ投与されると腎臓における糸球体濾過や肝臓や脾臓などにおけるマクロファージによる取り込みによって、生体内から速やかに排出されてしまう。そのため血中半減期が短く、十分な薬理効果を得ることが困難であることが多い。この問題を解決するため、生体関連物質を糖鎖やポリエチレングリコールなどの親水性高分子やアルブミンなどによって化学修飾する試みが行われている。その結果、分子量の増大や水和層の形成などにより生体関連物質の血中半減期を延長することが可能となる。また、ポリエチレングリコールで修飾することで、生体関連物質の毒性や抗原性の低下、難水溶性薬剤の溶解性向上などの効果が得られることも良く知られている。

[0003] ポリエチレングリコールで修飾された生体関連物質は、ポリエチレングリコールのエーテル結合と水分子との水素結合で形成される水和層で覆われ、分子サイズが大きくなることから、腎臓における糸球体濾過を回避することができる。さらにオプソニンや各組織を構成する細胞表面との相互作用が低下し、各組織への移行が減少することが知られている。ポリエチレングリコールは生体関連物質の血中半減期を延長させる優れた素材であり、その性能は分子量が大きいほど効果が高いことが分っている。これまで、分子量４万以上の高分子量のポリエチレングリコールで修飾した生体関連物質の研究が多数行なわれており、有意にその血中半減期を延長できる結果が得られている。

[0004] ポリエチレングリコールは生体関連物質の性能改善に用いられる修飾剤の

中で至適基準とされており、現在ではポリエチレングリコール修飾製剤が複数上市され、医療現場で使用されている。一方で、2012年に欧州医薬品庁(EMA)から、分子量４万以上の高分子量のポリエチレングリコールで修飾した生体関連物質を一定の投与量以上で長期間動物に投与すると、一部の組織の細胞内に空胞が発生するとの現象が報告された(非特許文献１)。現時点において、空胞の発生自体が人体に悪影響を与えるとの報告はなく、また、先のEMAの報告において用いられた投与量は、医療現場において一般的に適用される投与量と比べて極めて高用量であること等を考慮すれば、現在製造販売されている分子量が４万以上のポリエチレングリコールで修飾された治療製剤の安全性は問題ないといえる。しかしながら、非常に特殊な疾患（例えば、小人症など）の治療においては、ポリエチレングリコール修飾製剤を高用量、且つ、長期間に患者へ投与する治療プロトコルが採用されることも想定され得る。従って、かかる特殊な状況においても適用可能な、細胞に空胞を発生させないポリエチレングリコール修飾製剤の開発には潜在的な需要があると予想される。

[0005] 非特許文献２においては、通常のポリエチレングリコール修飾製剤の投与量に比べ、大過剰量のポリエチレングリコールを単独で動物に長期間投与したところ、分子量２万では空胞は見られず、分子量４万において空胞の発生が確認されている。空胞を抑制する手段の一つとして、ポリエチレングリコールの分子量を小さくすることが考えられるが、分子量を小さくすると生体関連物質の血中半減期を十分に改善することができないという問題が生じる。

[0006] 高分子量のポリエチレングリコールを体内で低分子量のポリエチレングリコールに分解し、腎臓からの排出を促進する技術については報告例がある。特許文献１には、生体内で切断されるスルフィド結合やペプチド結合部位を有したポリエチレングリコール誘導体に関する記載がなされている。当該ポリエチレングリコール誘導体は、生体内で腎臓からの排出に適した分子量まで分解されるとの記載がある。しかし、具体的な分解に関するデータは全く

示されておらず、腎臓からの排出が促進されたというデータもない。さらに細胞の空胞に関する記載はない。

[0007] 特許文献２には、生体内の低pH環境下において加水分解可能なアセタール部位を有したポリエチレングリコール誘導体に関する記載がなされている。当該ポリエチレングリコール誘導体は、生体内で腎臓からの排出に適した分子量まで分解されるとの記載がある。しかし、具体的に腎臓からの排出が促進されたというデータは無く、さらに細胞の空胞に関する記載もない。また、これら加水分解が可能なアセタール部位は血中でも徐々に分解することが知られており、修飾した生体関連物質の血中半減期を十分に改善することができないと予想される。

[0008] 一方で、薬物を効果的にリリースするために分解性のオリゴペプチドを導入したポリエチレングリコール誘導体や体内で分解するハイドロゲルなどの報告例はある。

[0009] 非特許文献３には、酵素によって分解するオリゴペプチド部位を有したポリエチレングリコール誘導体に関する記載がなされている。ここではオリゴペプチドは抗癌剤とポリエチレングリコールの間のリンカーとして導入されており、腫瘍周辺に特異的に発現している酵素によってオリゴペプチドが分解し、効率よく抗癌剤をリリースすることが報告されている。目的は抗癌剤のリリースであり、細胞の空胞を抑制する目的でポリエチレングリコールに分解性を付与するものではない。

[0010] 非特許文献４には、酵素によって分解するオリゴペプチド部位を有した架橋分子と多分岐型のポリエチレングリコール誘導体を用いたハイドロゲルに関する記載がなされている。ここではオリゴペプチドは多分岐型のポリエチレングリコール誘導体を繋ぎ合わせる架橋分子として用いられ、さらに酵素による分解性をハイドロゲルに付与することができる。目的は分解性のハイドロゲルの調製であり、細胞の空胞を抑制する目的でポリエチレングリコールに分解性を付与するものではない。

[0011] 特許文献３には、オリゴペプチドを骨格とした分岐型のポリエチレングリ

コール誘導体に関する記載がなされている。ここではオリゴペプチドはポリエチレングリコール誘導体の基本骨格として用いられており、酵素による分解性を付与するものではない。また、オリゴペプチドにリジンやアスパラギン酸など、側鎖にアミノ基やカルボキシル基を有したアミノ酸を含むことが特徴であり、それらを反応に利用した分岐型のポリエチレングリコール誘導体を合成することが目的である。細胞の空胞を抑制する目的のポリエチレングリコール誘導体ではない。

[0012] さらに生体関連物質を修飾する用途に用いられるポリエチレングリコール誘導体においては、一般的に直鎖型と分岐型があり、非特許文献５には、直鎖型よりも分岐型のほうが有意に生体関連物質の血中半減期を延長させるとの記載がある。近年、上市されたポリエチレングリコール修飾製剤のほとんどは分岐型が採用されている。しかし、これまで当該分野において、細胞の空胞を抑制する分岐型のポリエチレングリコール誘導体に関する報告はない。

[0013] 以上のように、血中では安定で、修飾した生体関連物質の血中半減期を改善し、細胞に取り込まれた際に細胞内で特異的に分解して、細胞の空胞の発生を抑制することができる分岐型の高分子量のポリエチレングリコール誘導体が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：特表２００９－５２７５８１号公報

特許文献2：ＷＯ２００５／１０８４６３

特許文献3：ＷＯ２００６／０８８２４８

非特許文献

[0015] 非特許文献1：EMA/CHMP/SWP/647258/2012

非特許文献2：Daniel G. Rudmann, et al., Toxicol. Pathol., 41, 970－983(2013)

非特許文献3：Francesco M Veronese, et al., Bioconjugate Chem., 16, 77

5－784(2005)

非特許文献4：Jiyuan Yang, et al., Marcomol. Biosci., 10(4), 445－454(2010)

非特許文献5：Yulia Vugmeysterang, et al., Bioconjugate Chem., 23, 1452－1462(2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明の課題は、細胞の空胞を引き起こさない高分子量の分岐型ポリエチレングリコール誘導体を提供することにある。より具体的には、生体関連物質を修飾する用途に効果的に用いることができ、生体内の血中で安定であり、且つ細胞内で分解される分岐型分解性ポリエチレングリコール誘導体を、工業的に生産可能な製法にて提供することにある。

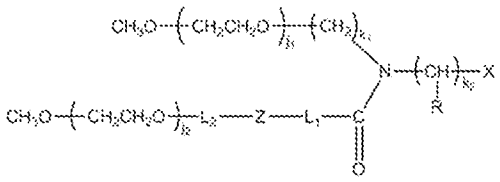
課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、細胞内にて分解するオリゴペプチドを有した分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を発明した。

[0018] 即ち、本発明は、下式（１）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を提供する。

［１］細胞内にて分解するオリゴペプチドを分子内に有する下式（１）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0019] [化1]



式（1）

[0020] （式中、ｋ$_1$およびｋ$_2$はそれぞれ独立して１～１２であり、ｊ$_1$及びｊ$_2$はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換され

ていない炭素数１～１２のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｚは細胞内の酵素で分解するオリゴペプチドであり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、$Ｌ_1$及び$Ｌ_2$はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。）

[0021] ［２］Ｚの分解性オリゴペプチドが、Ｃ末端のアミノ酸としてグリシンを有するオリゴペプチドである［１］記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0022] ［３］Ｚの分解性オリゴペプチドが、ハイドロパシー指標が２．５以上である疎水性の中性アミノ酸を少なくとも１つ有するオリゴペプチドである［１］～［２］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0023] ［４］総分子量が２０，０００以上である［１］～［３］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0024] ［５］$Ｌ_1$及び$Ｌ_2$がそれぞれ独立して、単結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、２級アミノ基、ウレア結合、またはこれらの結合および／または基を含んでいてもよいアルキレン基である［１］～［４］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

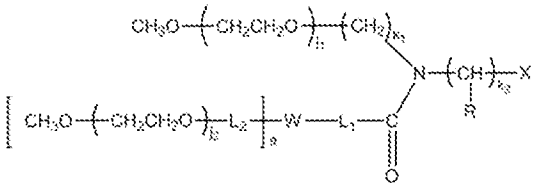
[0025] ［６］Ｘが活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレイミド基、ビニルスルホニル基、アクリル基、スルホニルオキシ基、カルボキシ基、チオール基、ジチオピリジル基、α－ハロアセチル基、アルキニル基、アリル基、ビニル基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基およびアジド基よりなる群から選択される、［１］～［５］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0026] 本発明はまた、他の態様として、下式（２）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を提供する。

［６］下式（２）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導

体。

[0027] [化2]

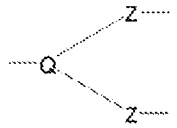


式（２）

[0028] （式中、ｋ$_1$およびｋ$_2$はそれぞれ独立して１～１２であり、ｊ$_1$及びｊ$_2$はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～４のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｗはグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造の５～４７残基のオリゴペプチドであり、ａは２～８であり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、Ｌ$_1$及びＬ$_2$はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。）

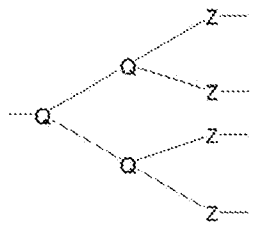
[0029] ［７］Ｗのグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造のオリゴペプチドが、以下のｗ１またはｗ２の構造を有するオリゴペプチドである［６］記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0030] [化3]



（ｗ１）

[0031] [化4]



（ｗ２）

[0032] （式中、Ｑはグルタミン酸またはリジンの残基であり、およびＺはシステインを除く中性アミノ酸からなる２～５残基の分解性オリゴペプチドである。

)

[0033] ［８］Ｚの分解性オリゴペプチドが、Ｃ末端のアミノ酸としてグリシンを有するオリゴペプチドである［７］記載の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0034] ［９］Ｚの分解性オリゴペプチドが、ハイドロパシー指標が２．５以上である疎水性の中性アミノ酸を少なくとも1つ有するオリゴペプチドである［７］または［８］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0035] ［１０］総分子量が２０，０００以上である［６］～［９］のいずれかに記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0036] ［１１］L_1およびL_2がそれぞれ独立して、単結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、２級アミノ基、ウレア結合、またはこれらの結合および／または基を含んでいてもよいアルキレン基である［６］～［１０］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0037] ［１２］Ｘが活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレイミド基、置換マレイミド基、ビニルスルホニル基、アクリル基、置換スルホネート基、スルホニルオキシ基、カルボキシ基、メルカプト基、ピリジルジチオ基、α－ハロアセチル基、アルキルカルボニル基、ヨードアセトアミド基、アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基およびアジド基からなる群より選択される、［６］～［１１］のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

発明の効果

[0038] 本発明の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、生体内の血中では安定であり、細胞内の酵素によって分解するオリゴペプチドを構造内に有している。そのため、当該分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、血中では安定であり、従来の分解性を有さないポリエチレングリコール

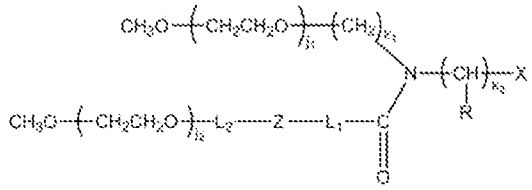
誘導体と同等の血中半減期を生体関連物質に付与することができる。さらに、当該分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、細胞内に取り込まれた場合、オリゴペプチド部位が速やかに分解されるため、これまで課題とされていた細胞の空胞の発生を抑制することができる。また、ポリエチレングリコールに導入するオリゴペプチドを、Ｃ末端のアミノ酸としてグリシンを有するオリゴペプチドなどに限定することで、製造工程中で発生する不純物を低減させ、工業的に製造することが可能となる。

発明を実施するための形態

[0039] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、下式（１）で示される。

[0040] [化5]



式（１）

[0041] 式（１）中、ｋ$_1$およびｋ$_2$はそれぞれ独立して１～１２であり、ｊ$_1$及びｊ$_2$はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～１２のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｚは細胞内の酵素で分解するオリゴペプチドであり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、Ｌ$_1$及びＬ$_2$はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。

[0042] 本発明の式（１）のポリエチレングリコール誘導体の総分子量は、通常は４，０００～１６０，０００であり、好ましくは１０，０００～１２０，０００であり、更に好ましくは２０，０００～８０，０００である。本発明の１つの好ましい実施形態では、本発明の式（１）のポリエチレングリコール誘導体の総分子量は２０，０００以上である。ここでいう分子量とは数平均分子量（Ｍｎ）である。

[0043] 式（１）中のｋ$_1$およびｋ$_2$は、通常はそれぞれ独立して１～１２であり、好ましくはそれぞれ独立して１～６であり、更に好ましくはそれぞれ独立して１～２である。

[0044] 式（１）中のｊ$_1$およびｊ$_2$は、それぞれポリエチレングリコールの繰り返しユニット数であり、通常それぞれ独立して４５～９５０であり、好ましくはそれぞれ独立して１１０～６９０であり、更に好ましくはそれぞれ独立して２２０～４８０である。

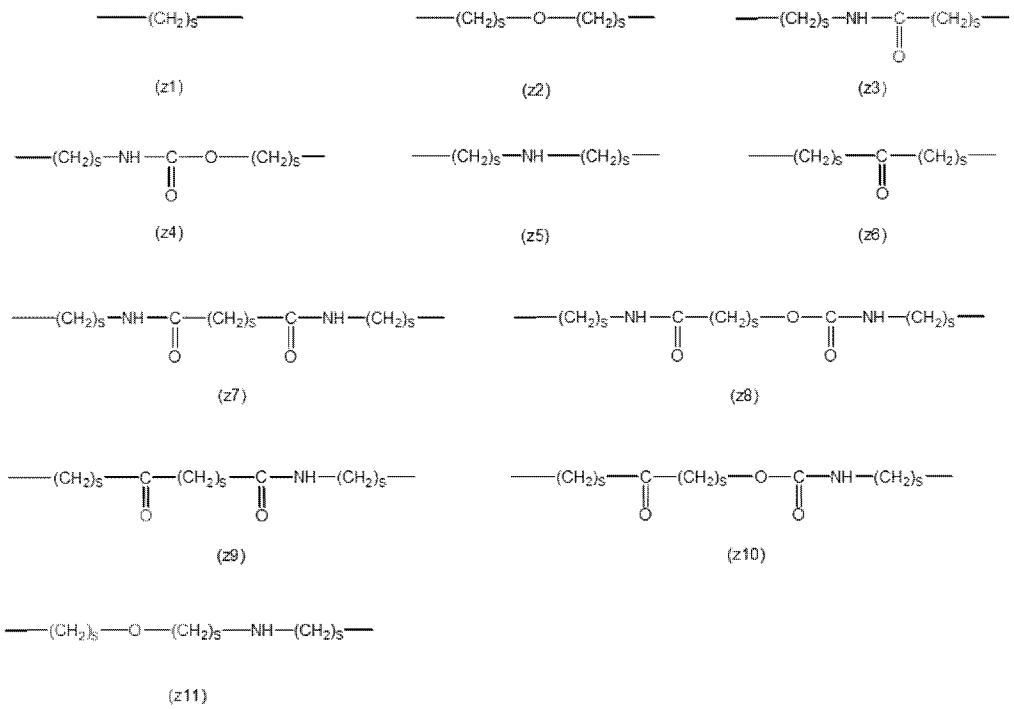
[0045] 式（１）中のＲは、水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～１２のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基である。「ヘテロアルキル基」とは、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選択される１～５個のヘテロ原子を含むアルキル基である。Ｒは、好ましくは水素原子もしくは炭素数１～３のアルキル基であり、より好ましくは水素原子、メチル基またはエチル基であり、更に好ましくは水素原子である。

[0046] 式（１）中のＬ$_1$及びＬ$_2$は、それぞれ独立して、単結合もしくは２価のスペーサーであるが、これらのスペーサーは共有結合を形成し得る基であれば特に制限は無いが、好ましくは、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、２級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、またはこれらの結合および／または基を含んでいてもよいアルキレン基であり、より好ましくは、アルキレン基、アミド結合、エーテル結合、ウレタン結合、２級アミノ基、またはカルボニル基とアルキレン基とが結合して形成される基であり、特に好ましい態様は、下記の群（Ｉ）に示されるものである。また、群（Ｉ）のスペーサーを２つから５つ組み合わせても良い。２価のスペーサーとしてエステル結合とカーボネート結合は生体内の血中で徐々に分解するため適さない。

[0047] 群（Ｉ）：

[0048]

[化6]



[0049] （ｚ１）～（ｚ１１）において、式中のｓは０～１０の整数を示し、好ましくは０～６の整数を示し、更に好ましくは０～３の整数を示す。また、（ｚ２）～（ｚ１１）において、式中のｓは同一でも、異なっていてもよい。

[0050] 式（１）中のL_1は、単結合もしくは群（Ｉ）の（ｚ２）、（ｚ３）、（ｚ４）、（ｚ６）、（ｚ７）、（ｚ８）、（ｚ９）、（ｚ１０）、（ｚ２）と（ｚ６）の組み合わせが好ましく、単結合、（ｚ３）、（ｚ６）、（ｚ９）、（ｚ１０）、（ｚ２）と（ｚ６）の組み合わせがより好ましい。

式（１）中のL_2は、群（Ｉ）の（ｚ１）、（ｚ２）、（ｚ３）、（ｚ４）、（ｚ５）、（ｚ６）、（ｚ７）、（ｚ８）、（ｚ１１）が好ましく、（ｚ３）、（ｚ５）、（ｚ１１）がより好ましい。

[0051] 式（１）中のＺは、生体内の血中で安定であり、かつ細胞内の酵素で分解するオリゴペプチドであれば特に制限はないが、システインを除く中性アミノ酸からなる２～８残基のオリゴペプチドが好ましく、システインを除く中性アミノ酸からなる２～６残基のオリゴペプチドがより好ましく、システインを除く中性アミノ酸からなる２～４残基のオリゴペプチドが更に好ましい。

[0052] また、式（１）中のＺは、側鎖にアミノ基やカルボキシル基を持つアミノ酸、具体的には、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸を含まない中性アミノ酸で構成されるオリゴペプチドであることが好ましい。ここで使用されるアミノ酸は、α－アミノ酸であり、また基本的にはＬ型である。

[0053] さらに、中性アミノ酸であるシステインはチオール基を有しており、他のチオール基とジスルフィド結合を形成するため、式（１）中のＺは、システインを含まない中性アミノ酸からなるオリゴペプチドであることが望ましい。

[0054] 加えて、式（１）中のＺは、Ｃ末端のアミノ酸としてグリシンを有するオリゴペプチドであることが好ましい。Ｃ末端のカルボキシル基とポリエチレングリコール誘導体を反応させる際は、基本的にＣ末端のカルボキシル基を縮合剤などで活性化する必要がある。この活性化の工程にて、グリシン以外のアミノ酸ではエピメリ化が起こりやすく、立体異性体が副生することが知られている。オリゴペプチドのＣ末端のアミノ酸をアキラルなグリシンとすることで、立体異性体の副生の無い、高純度な目的物を得ることができる。

[0055] さらに、式（１）中のＺは、ハイドロパシー指標が２．５以上である疎水性の中性アミノ酸、具体的には、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシンを少なくとも１つ有するオリゴペプチドであることが好ましく、フェニルアラニンを有するオリゴペプチドであることが更に好ましい。Kyte と Doolittleにより作成された、アミノ酸の疎水性を定量的に示すハイドロパシー指標(hydropathy index)は、値が大きいほど疎水的なアミノ酸であることを示す（Kyte J & Doolittle RF, 1982, J Mol Biol, 157:105－132.）。

[0056] 式（１）中のＺは、生体内の血中で安定であり、かつ細胞内の酵素で分解する性能を有し、システインを除く中性アミノ酸からなる２～８残基のオリゴペプチドであれば特に制限は無いが、具体的な例としては、グリシン－フェニルアラニン－ロイシン－グリシン、グリシン－グリシン－フェニルアラニン－グリシン、グリシン－フェニルアラニン－グリシン、グリシン－ロイ

シン－グリシン、バリン－シトルリン－グリシン、バリン－アラニン－グリシン、グリシン－グリシン－グリシン、フェニルアラニン－グリシンなどであり、好ましくはグリシン－フェニルアラニン－ロイシン－グリシン、グリシン－グリシン－フェニルアラニン－グリシン、グリシン－フェニルアラニン－グリシン、グリシン－グリシン－グリシン、バリン－シトルリン－グリシン、バリン－アラニン－グリシン、フェニルアラニン－グリシンであり、より好ましくはグリシン－フェニルアラニン－ロイシン－グリシン、グリシン－フェニルアラニン－グリシン、バリン－シトルリン－グリシン、バリン－アラニン－グリシンであり、さらにより好ましくはグリシン－フェニルアラニン－ロイシン－グリシン、バリン－シトルリン－グリシンである。

[0057] 式（１）中のＸは、化学修飾の対象となる生理活性タンパク質、ペプチド、抗体、核酸などの生体関連物質に存在する官能基と反応して共有結合を形成する官能基であれば特に制限されない。例えば、「Harris, J. M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry; Plenum Press: New York, 1992」、「Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2008」および「PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications; Veronese, F. M., Ed.; Birkhauser: Basel, Switzerland,2009」などに記載されている官能基が挙げられる。

[0058] 式（１）中のＸで示される「生体関連物質と反応可能な官能基」は、生体関連物質が有するアミノ基、メルカプト基、アルデヒド基、カルボキシ基、不飽和結合またはアジド基などの官能基と化学結合可能な官能基であれば特に制限されない。

具体的には、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、カルボキシ基、メルカプト基、マレイミド基、置換マレイミド基、ヒドラジド基、ジチオピリジル基、置換スルホネート基、ビニルスルホニル基、アミノ基、オキシアミノ基（H_2N-O-基）、ヨードアセトアミド基、アルキルカルボニル基、アルケニル基（例えば、アリル基、ビニル基）、アルキニル基、置換アルキニル基

（例えば、後記の炭素数１～５の炭化水素基で置換されたアルキニル基）、アジド基、アクリル基、スルホニルオキシ基（例えば、アルキルスルホニルオキシ基）、α－ハロアセチル基などが挙げられ、好ましくは、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレイミド基、置換マレイミド基、ビニルスルホニル基、アクリル基、スルホニルオキシ基（例えば、炭素数１～５のアルキル－スルホニルオキシ基）、置換スルホネート基、カルボキシ基、メルカプト基、ピリジルジチオ基、α－ハロアセチル基、アルキニル基、置換アルキニル基（例えば、後記の炭素数１～５の炭化水素基で置換された炭素数２～５のアルキニル基）、アリル基、ビニル基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基およびアジド基であり、より好ましくは活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、マレイミド基、オキシアミノ基およびアミノ基であり、特に好ましくは活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、マレイミド基およびオキシアミノ基である。

[0059] 別の好適な実施形態において、かかる官能基Ｘは、下記の群（ＩＩ）、群（ＩＩＩ）、群（ＩＶ）、群（Ｖ）、群（ＶＩ）および群（ＶＩＩ）に分類することができる。

[0060] 群（ＩＩ）：生体関連物質が有するアミノ基と反応可能な官能基

下記の（a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(j)、または(k)で示される基が挙げられる。

[0061] 群（ＩＩＩ）：生体関連物質が有するメルカプト基と反応可能な官能基

下記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)、または(l)で示される基が挙げられる。

[0062] 群（ＩＶ）：生体関連物質が有するアルデヒド基と反応可能な官能基

下記の(h)、(m)、(n)、または(p)で示される基が挙げられる。

[0063] 群（Ｖ）：生体関連物質が有するカルボキシル基と反応可能な官能基

下記の(h)、(m)、(n)、または(p)で示される基が挙げられる。

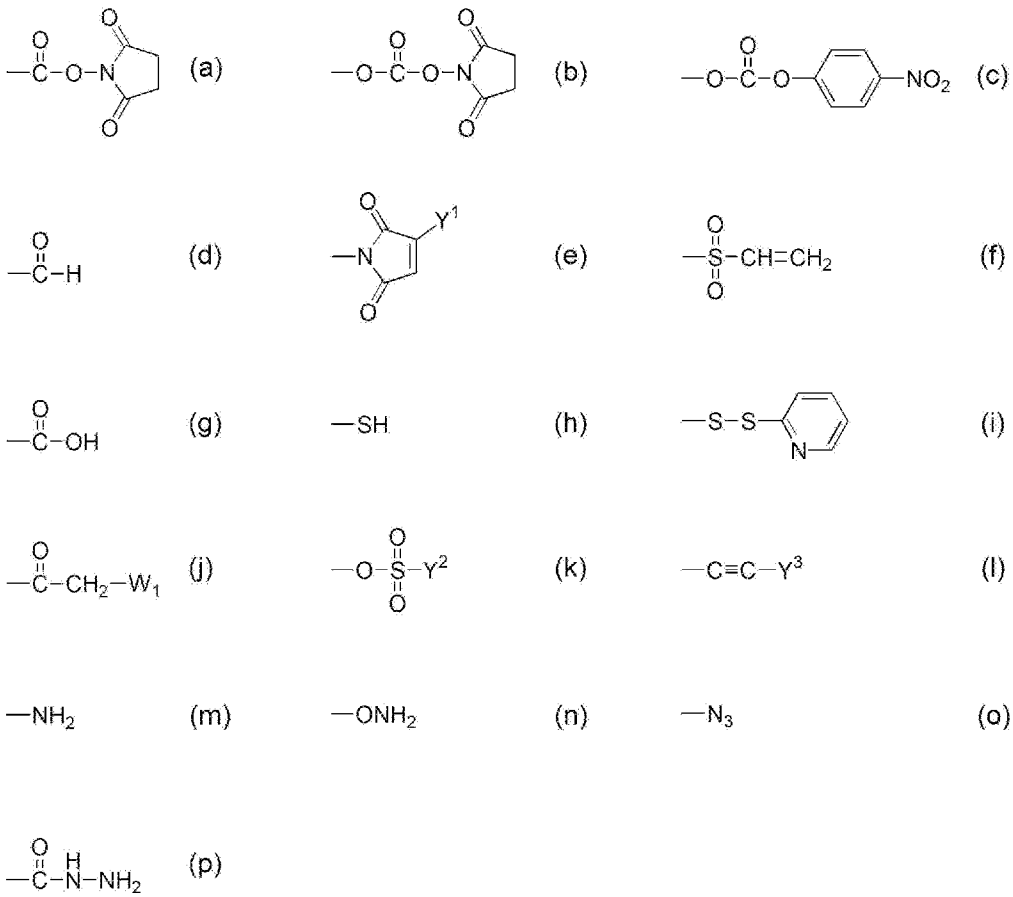
[0064] 群（ＶＩ）：生体関連物質が有する不飽和結合と反応可能な官能基

下記の(h)、(m)、または(o)で示される基が挙げられる。

[0065] 群（ＶＩＩ）：生体関連物質が有するアジド基と反応可能な官能基

下記の(l)で示される基が挙げられる。

[0066] [化7]



[0067] 官能基(j)において、式中のW_1は塩素原子（Ｃｌ）、臭素原子（Ｂｒ）またはヨウ素原子（Ｉ）などのハロゲン原子を示し、好ましくはＢｒ、またはＩ、より好ましくはＩである。

[0068] また、官能基(e)および官能基(l)において、式中のY^1、Y^3は、それぞれ独立して、水素原子または炭素数１～５の炭化水素基を示し、好ましくは炭素数１～５の炭化水素基である。炭素数１～５の炭化水素基としては、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基などが挙げられ、好ましくはメチル基、またはエチル基である。

[0069] また、官能基(k)において、式中のY^2はフッ素原子を含んでいてもよい炭素数が１～１０の炭化水素基を示し、具体的には、メチル基、エチル基、プ

ロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、４－メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、２，２，２－トリフルオロエチル基、４－（トリフルオロメトキシ）フェニル基などが挙げられ、好ましくはメチル基、ビニル基、４－メチルフェニル基、または２，２，２－トリフルオロエチル基である。

[0070] 活性エステル基とは、脱離能の高いアルコキシ基を有したエステル基である。脱離能の高いアルコキシ基としては、ニトロフェノール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、ペンタフルオロフェノールなどから誘導されるアルコキシ基が挙げられる。活性エステル基は、好ましくはＮ－ヒドロキシスクシンイミドから誘導されるアルコキシ基を有したエステル基である。

[0071] 活性カーボネート基とは、脱離能の高いアルコキシ基を有したカーボネート基である。脱離能の高いアルコキシ基としては、ニトロフェノール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、ペンタフルオロフェノールなどから誘導されるアルコキシ基が挙げられる。活性カーボネート基は、好ましくはニトロフェノールまたはＮ－ヒドロキシスクシンイミドから誘導されるアルコキシ基を有したカーボネート基である。

[0072] 置換マレイミド基とは、マレイミド基の二重結合の片方の炭素原子に炭化水素基が結合しているマレイミド基である。炭化水素基は、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基などが挙げられ、好ましくはメチル基、またはエチル基である。

[0073] 置換スルホネート基とは、スルホネート基の硫黄原子にフッ素原子を含んでいてもよい炭化水素基が結合しているスルホネート基である。フッ素原子を含んでいてもよい炭化水素基としては、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、４－メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、２，２，２－トリフルオロエチル基、４－（トリフルオロメトキシ）フェニル基などが挙げられ、好ましくはメチル基、ビニル基、４－メチルフェニル基、または２，２，２－トリフルオロエチル基である。

[0074] 本発明の式（１）の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体の好適な例としては、以下の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体が挙げられる。

［分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体（１－１）］

k_1およびk_2が、それぞれ独立して１～２であり；

j_1およびj_2が、それぞれ独立して２２０～４８０であり；

Ｒが、水素原子であり；

Ｚが、システインを除く中性アミノ酸からなる２～８残基のオリゴペプチド（例、フェニルアラニン－グリシン）であり；

Ｘが、活性エステル基（例、Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル基）、アルデヒド基（例、Ｎ－（ホルミルエチル）カルバモイル基）、カルボキシル基、マレイミド基（例、Ｎ－（Ｎ－マレイミジルエチルカルボニルアミノエチル）カルバモイル基）およびアミノ基（例、Ｎ－（アミノエチル）カルバモイル基）よりなる群から選択され；

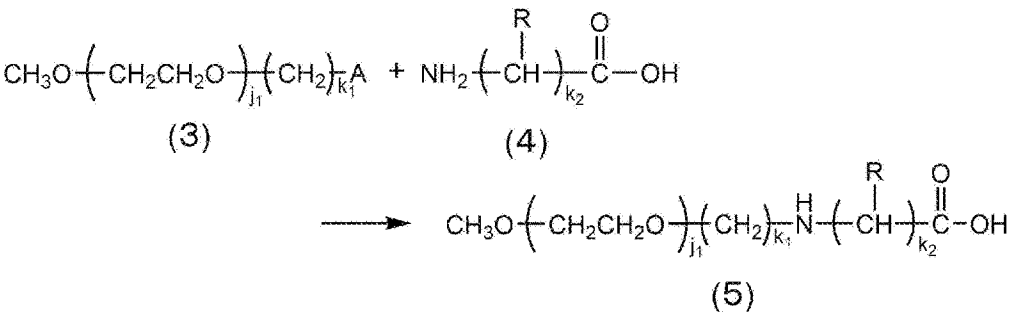
L_1およびL_2が、それぞれ独立して、２級アミノ基および／またはカルボニル基を含んでいてもよいアルキレン基（例、プロピレン基）である；

式（１）の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0075] 式（１）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、例えば、次のような工程で製造することができる。

[0076] 反応１

[0077] [化8]



[0078] 反応１中のＡは脱離基であり、Ｒ、j_1、k_1、k_2は前記と同義である。

[0079] 式（３）におけるＡは、脱離基であり、カップリング反応において反応性

を有する脱離基であれば特に制限はないが、例えば、クロロ基、ブロモ基、ヨード基、メシラート基、トシラート基、クロロメタンスルホナート基などが挙げられる。

[0080] 反応１は、式（３）で表されるポリエチレングリコール誘導体と式（４）で表される化合物を無水溶媒中、強塩基触媒存在下でカップリング反応させ、式（５）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。

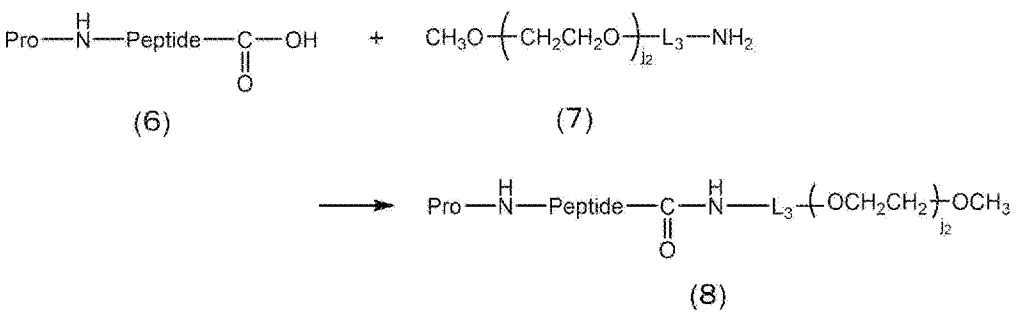
[0081] 前記カップリング反応における強塩基触媒としては、反応が進行する強塩基触媒であれば特に制限は無いが、例えば水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシドなどが挙げられる。

前記カップリング反応における無水溶媒としては、式（３）および式（４）で表される化合物と反応しない溶媒であれば特に制限は無いが、例えば、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ＤＭＦ、ジクロロメタン、クロロホルム等の非プロトン性極性溶媒、及びこれらの混合物が挙げられる。

反応で副生した不純物、また反応で消費されずに残存した化合物、強塩基触媒の精製除去を行うのが好ましい。精製は特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0082] 反応２

[0083] [化9]



[0084] 反応２中のＰｒｏは保護基であり、Ｐｅｐｔｉｄｅはオリゴペプチドであり、L_3は前記L_1およびL_2と同義の単結合もしくは２価のスペーサーであり、およびj_2は前記と同義である。

[0085] 反応２中のＰｒｏは、保護基であり、ここで保護基とは、ある反応条件下

で分子中の特定の化学反応可能な官能基の反応を防止または阻止する成分である。保護基は、保護される化学反応可能な官能基の種類、使用される条件および分子中の他の官能基もしくは保護基の存在により変化する。保護基の具体的な例は多くの一般的な成書に見出すことができるが、例えば「Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protective Groups in Organic Synthesis, 4th ed.; Wiley－Interscience: New York, 2007」に記載されている。また、保護基で保護された官能基は、それぞれの保護基に適した反応条件を用いて脱保護、すなわち化学反応させることで、元の官能基を再生させることができる。保護基の代表的な脱保護条件は前述の文献に記載されている。

[0086] 反応２は、式（６）で表されるＮ末端のアミノ基が保護基で保護されたオリゴペプチドのカルボキシル基と、式（７）で表される片末端がメトキシ基であるポリエチレングリコール誘導体のアミノ基を縮合反応にて結合させ、式（８）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。

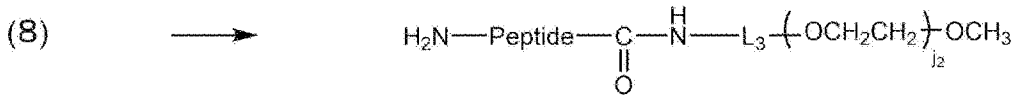
[0087] オリゴペプチドのＮ末端のアミノ基の保護基は、特に制限は無いが、例えばアシル系保護基およびカーバメート系保護基が挙げられ、具体的にはトリフルオロアセチル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ）、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0088] 縮合反応としては、特に制限は無いが、縮合剤を用いる反応が望ましい。縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）などのカルボジイミド系の縮合剤を単独で使用しても良く、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）などの試薬と併用しても良い。また、より反応性の高いＨＡＴＵやＨＢＴＵ、ＴＡＴＵ、ＴＢＴＵ、ＣＯＭＵ、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ｎ水和物（ＤＭＴ－ＭＭ）などの縮合剤を使用しても良い。また反応を促進するため、トリエチルアミンやジメチルアミノピリジンなどの塩基を用いても良い。

[0089] 反応で副生した不純物、または反応で消費されず残存したオリゴペプチドや縮合剤などは、精製除去を行うのが好ましい。精製は、特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0090] 脱保護３

[0091] [化10]



(9)

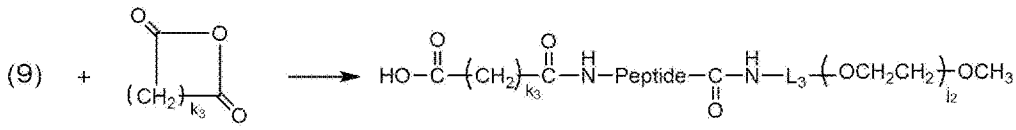
[0092] Ｐｅｐｔｉｄｅ、L_3およびj_2は前記と同義である。

[0093] 脱保護３は、反応２で得られた式（８）で表されるポリエチレングリコール誘導体の保護基を脱保護して、式（９）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。脱保護反応としては、従来公知の方法を用いることができるが、オリゴペプチドやL_3の２価のスペーサーが分解しない条件を用いる必要がある。また、本工程は、反応２の工程の一環として実施することも可能である。

[0094] 脱保護反応で副生した不純物などは、精製除去を行うのが好ましい。精製は、特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0095] 反応４

[0096] [化11]



(10) (11)

[0097] 反応４中のk_3は１～６の整数であり、Ｐｅｐｔｉｄｅ、j_2、およびL_3は前記と同義である。

[0098] 式（８）中のk_3は１～６の整数であり、好ましくは２～４の整数である。

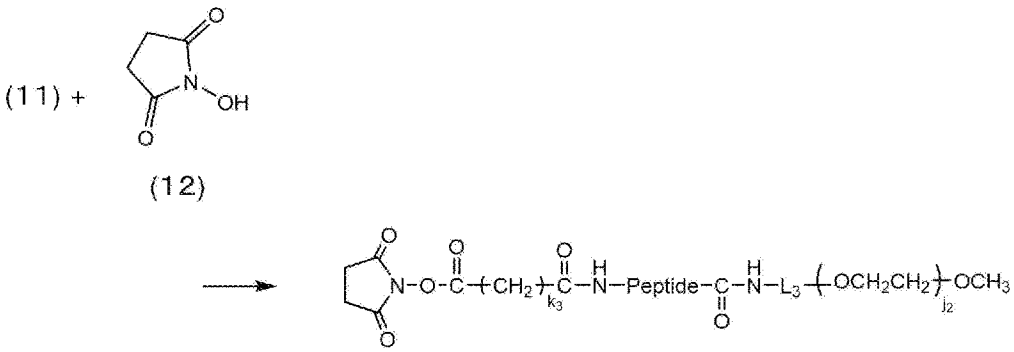
[0099] 反応４は脱保護３で得られた式（９）で表されるポリエチレングリコール

誘導体の末端のアミノ基を塩基触媒存在下で式（１０）で表される化合物と反応させカルボキシル基に変換する工程である。

[0100] 反応４で副生した不純物などは、精製除去を行うのが好ましい。精製は、特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0101] 反応５

[0102] [化12]



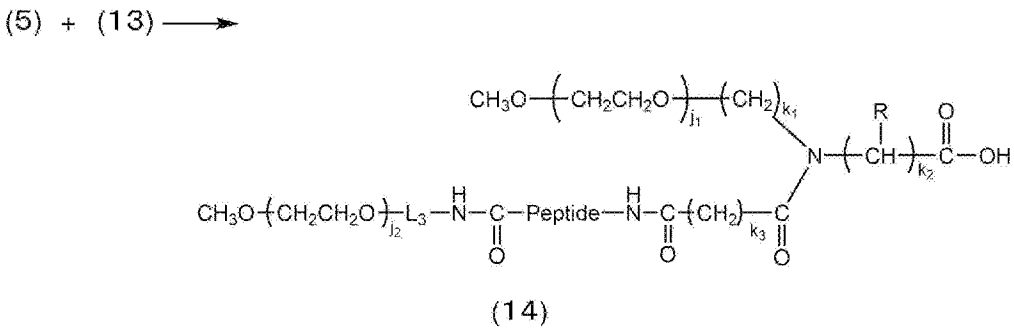
(11) + (12) ⟶ (13)

[0103] 反応５中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$、ｋ$_3$、およびｊ$_2$は前記と同義である。

[0104] 反応５は反応４で得られた式（１１）で表されるポリエチレングリコール誘導体に式（１２）で表される化合物を塩基触媒存在下で反応させ、活性エステル基を導入した式（１３）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程であり、本工程は反応４の工程の一環として実施することも可能である。

[0105] 反応６

[0106] [化13]



(5) + (13) ⟶ (14)

[0107] 反応６中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｒ、Ｌ$_3$、ｊ$_1$、ｊ$_2$、ｋ$_1$、ｋ$_2$、およびｋ$_3$は

前記と同義である。

[0108] 反応６は反応１で得られた式（５）で表されるポリエチレングリコール誘導体のアミノ基と反応５で得られた式（１３）で表されるポリエチレングリコール誘導体の活性エステル基を反応で結合させ、式（１４）で表される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。

[0109] 反応で副生した不純物、または反応で消費されず残存したポリエチレングリコール誘導体などは、精製除去を行うのが好ましい。精製は特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0110] 式（１４）で表されるポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基を他の官能基に変換する工程について、典型的な例を以下に説明するが、変換方法はこれに限定されるものではない。

[0111] 例えば、式（１５）で表されるポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基をマレイミド基に変換したい場合は、Ｎ－（２－アミノエチル）マレイミドと塩基触媒存在下で縮合反応させることで、目的物を得ることができる。

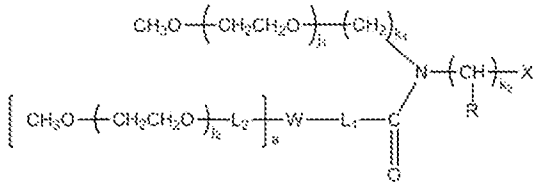
[0112] 例えば、式（１４）で表されるポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基をアミノ基に変換したい場合は、Ｎ－（９－Ｈ－フロオレン－９－イルメトキシカルボニル）－１、２－エタンジアミンと塩基触媒存在下で縮合反応させた後、脱保護反応させることで得ることができる。

[0113] これらの反応試薬は、低分子量の試薬であり、高分子量ポリマーであるポリエチレングリコール誘導体とは大きく溶解性が異なるため、抽出や晶析などの一般的な精製方法にて容易に除去可能である。

[0114] 本発明のさらに他の態様として、下式（２）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を提供する。

[0115]

[化14]



式（２）

[0116] 式（２）中、ｋ$_1$およびｋ$_2$はそれぞれ独立して１～１２であり、ｊ$_1$及びｊ$_2$はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～４のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｗはグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造の５～４７残基のオリゴペプチドであり、ａは２～８であり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、Ｌ$_1$及びＬ$_2$はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。

[0117] 本発明の式（２）のポリエチレングリコール誘導体の総分子量は、通常は４，０００～１６０，０００であり、好ましくは１０，０００～１２０，０００であり、更に好ましくは２０，０００～８０，０００である。本発明の１つの好ましい実施形態では、本発明の式（２）のポリエチレングリコール誘導体の総分子量は２０，０００以上である。ここでいう分子量とは数平均分子量（Ｍｎ）である。

[0118] 式（２）中のｋ$_1$およびｋ$_2$は、通常はそれぞれ独立して１～１２であり、好ましくはそれぞれ独立して１～６であり、更に好ましくはそれぞれ独立して１～２である。

[0119] 式（２）中のｊ$_1$およびｊ$_2$は、それぞれポリエチレングリコールの繰り返しユニット数であり、通常それぞれ独立して４５～９５０であり、好ましくはそれぞれ独立して１１０～６９０であり、更に好ましくはそれぞれ独立して２２０～４８０である。

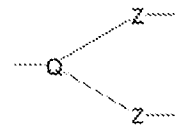
[0120] 式（２）中のＷは、グルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造の５～４７残基、好ましくは５～２７残基、より好ましくは５～１９残基のオリゴペプチドであり、生体内の血中で安定であり、かつ細胞内の酵素で分解す

るオリゴペプチドであれば特に制限はないが、オリゴペプチドを構成するアミノ酸としては、中心部分を構成するグルタミン酸またはリジン以外は、システインを除く中性アミノ酸からなることが好ましい。ここでいうグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造のオリゴペプチドとは、グルタミン酸のα位のカルボキシル基とγ位のカルボキシル基またはリジンのα位のアミノ基とε位のアミノ基に同一のペプチドが結合した化合物を意味し、グルタミン酸またはリジンを中心に対となるペプチドが対称構造をとるオリゴペプチドである。当該オリゴペプチド中の中性アミノ酸とグルタミン酸またはリジンの数の構成比（中性アミノ酸の数／グルタミン酸の数）としては、通常は２～１０であり、好ましくは２～８であり、更に好ましくは２～６である。Ｗを構成するアミノ酸は基本的にはＬ型である。

[0121] Ｗの特に好ましい態様は、下記の群（ＶＩＩＩ）に示されるものである。

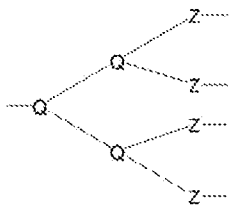
群（ＶＩＩＩ）：

[0122] [化15]



（ｗ１）

[0123] [化16]



（ｗ２）

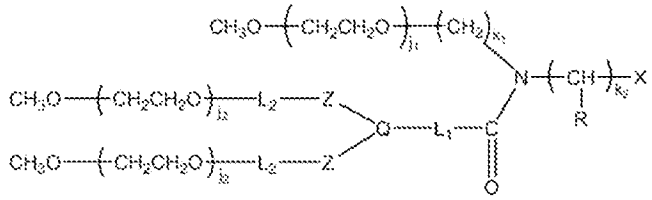
[0124] （式中、Ｑはグルタミン酸またはリジンの残基であり、Ｚはシステインを除く中性アミノ酸からなる２～５残基の分解性オリゴペプチドである。）

[0125] 式（２）中のａは、Ｗで示されるオリゴペプチドと結合しているポリエチレングリコール鎖の本数であり、通常は２～８であり、好ましくは２または４または８であり、更に好ましくは２または４である。

[0126] なお、R、X、L_1、L_2及び（ｗ１）～（ｗ２）中のＺの好ましい態様は、前記の式（１）について説明した通りである。

[0127] 式（２）の好ましい態様の１つは、Wがｗ１であり、ａ＝２の下式（１５）で示される３分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である。

[0128] [化17]

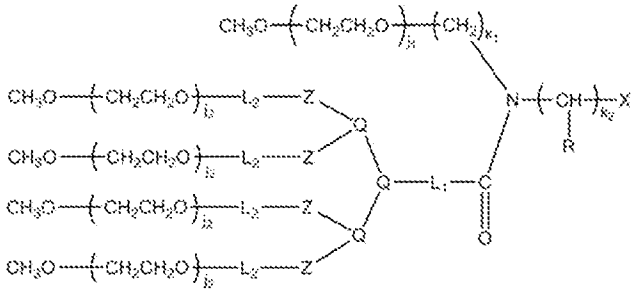


式（１５）

[0129] （式中、Q、Z、R、k_1、k_2、j_1、j_2、X、L_1及びL_2は、前記と同義である。）

[0130] 式（２）の好ましい態様の１つは、Wがｗ２であり、ａ＝４の下式（１６）で示される５分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である。

[0131] [化18]



式（１６）

[0132] （式中、Q、R、Z、k_1、k_2、j_1、j_2、X、L_1及びL_2は、前記と同義である。）

[0133] 本発明の式（２）の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体の好適な例としては、以下の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体が挙げられる。

［分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体（２－１）］

k_1およびk_2が、それぞれ独立して１～２であり；

j_1およびj_2が、それぞれ独立して２２０～４８０であり；

Ｒが、水素原子であり；

Ｗが、グルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造の５～９残基のオリゴペプチド（例、グリシン－フェニルアラニン－グルタミン酸－フェニルアラニン－グリシン）であり；

ａが、２または４であり；

Ｘが、カルボキシル基であり；

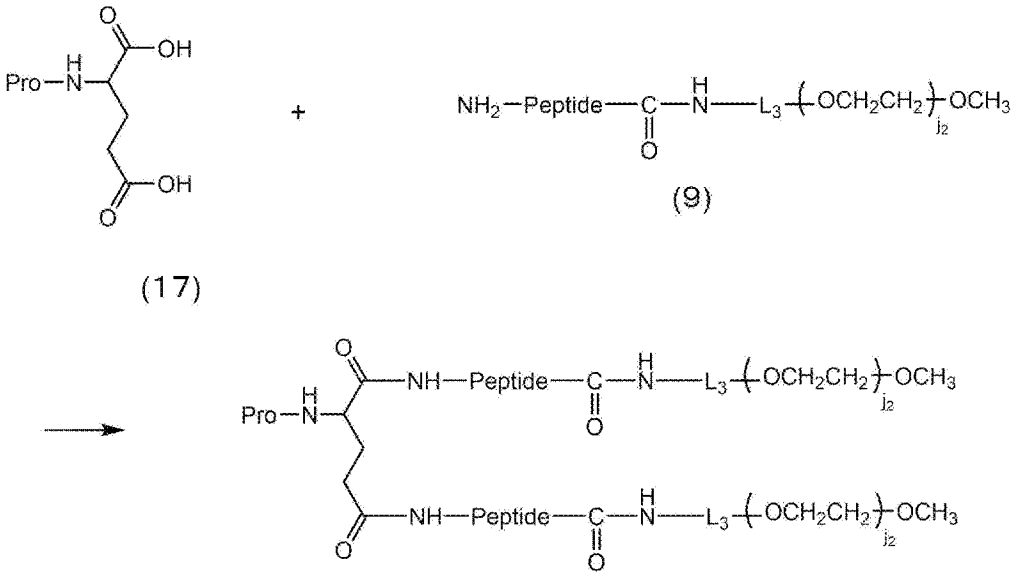
L_1およびL_2が、それぞれ独立して、エーテル結合、２級アミノ基および／またはカルボニル基を含んでいてもよいアルキレン基（例、プロピレン基、ペンチレン基）である；

式（２）の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[0134] 本発明の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、Ｑがグルタミン酸の残基の場合に、例えば、次のような工程で製造することができる。

[0135] 反応７

[0136] [化19]



[0137] 反応７中のＰｒｏ、Ｐｅｐｔｉｄｅ、L_3およびj_2は前記と同義である。

[0138] 反応７は、脱保護３で得られた式（９）で表されるポリエチレングリコール誘導体のアミノ基と、式（１７）で表されるアミノ基が保護基で保護されたグルタミン酸誘導体の二つのカルボキシル基を縮合反応で結合させ、２本

の分解性ポリエチレングリコール鎖がグルタミン酸残基で繋がれた構造である式（１８）で表される分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。

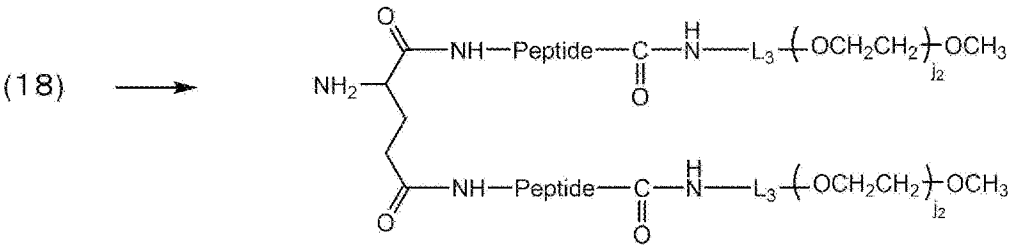
前記反応２と同様に、縮合剤を用いた反応が望ましく、反応を促進するため、トリエチルアミンやジメチルアミノピリジン等の塩基を用いても良い。

グルタミン酸のアミノ基の保護基は、特に制限は無いが、例えばアシル系保護基およびカーバメート系保護基が挙げられ、具体的にはトリフルオロアセチル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基およびｔ－ブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

反応で副生した不純物、または反応で消費されず残存したポリエチレングリコール誘導体などは、精製除去を行うのが好ましい。精製は、特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等で精製することができる。

[0139] 脱保護８

[0140] [化20]



(19)

[0141] 脱保護８中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$およびｊ$_2$は前記と同義である。

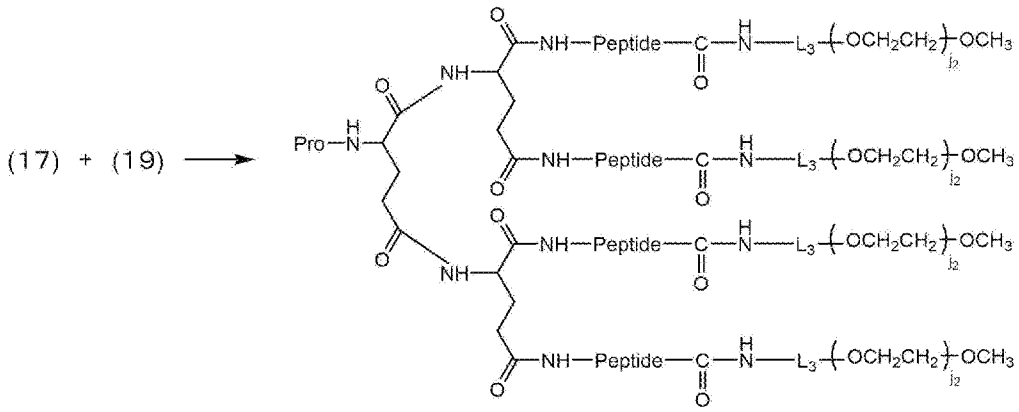
[0142] 脱保護８は、反応７で得られた式（１８）で表されるポリエチレングリコール誘導体の保護基を脱保護して、式（１９）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。前記脱保護３と同条件で反応と精製が可能である。

式（１９）で表されるポリエチレングリコール誘導体の中から、分子量や官能基の異なるポリエチレングリコール不純物を除去する手法としては、特開２０１４－２０８７８６、特開２０１１－７９９３４に記載の精製技術を

用いることができる。

[0143] 反応９

[0144] [化21]



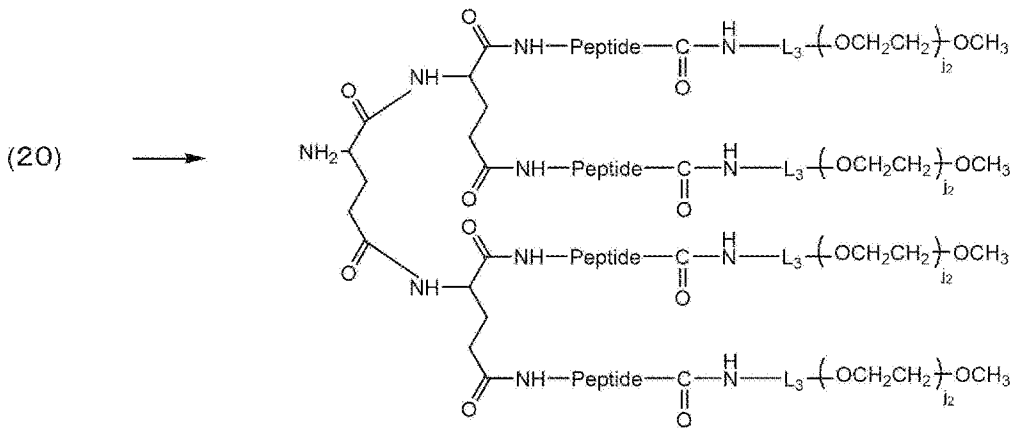
(20)

[0145] 反応９中のＰｒｏ、Ｐｅｐｔｉｄｅ、L_3およびj_2は前記と同義である。

[0146] 反応９は、脱保護８で得られた式（１９）で表されるポリエチレングリコール誘導体のアミノ基と、式（１７）で表されるアミノ基が保護基で保護されたグルタミン酸誘導体の二つのカルボキシル基を縮合反応で結合させ、４本の分解性ポリエチレングリコール鎖がグルタミン酸残基で繋がれた構造である式（２０）で表される分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。前記反応２と同条件で反応と精製が可能である。

[0147] 脱保護１０

[0148] [化22]



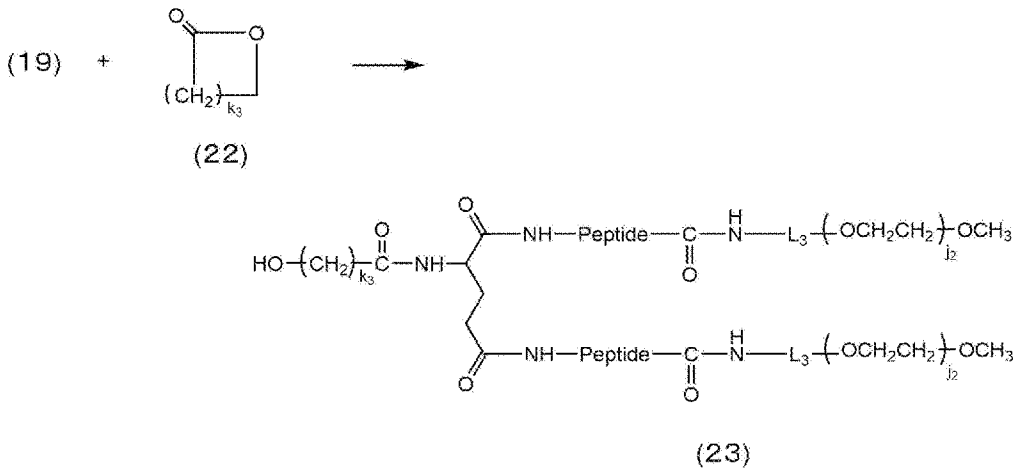
(21)

[0149] 脱保護１０中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$およびｊ$_2$は前記と同義である。

[0150] 脱保護１０は、反応９で得られた式（２０）で表されるポリエチレングリコール誘導体の保護基を脱保護して、式（２１）で表されるポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。前記脱保護８と同条件で反応と精製が可能である。また、本工程は、反応９の一連の工程にて実施することも可能である。

[0151] 反応１１

[0152] [化23]



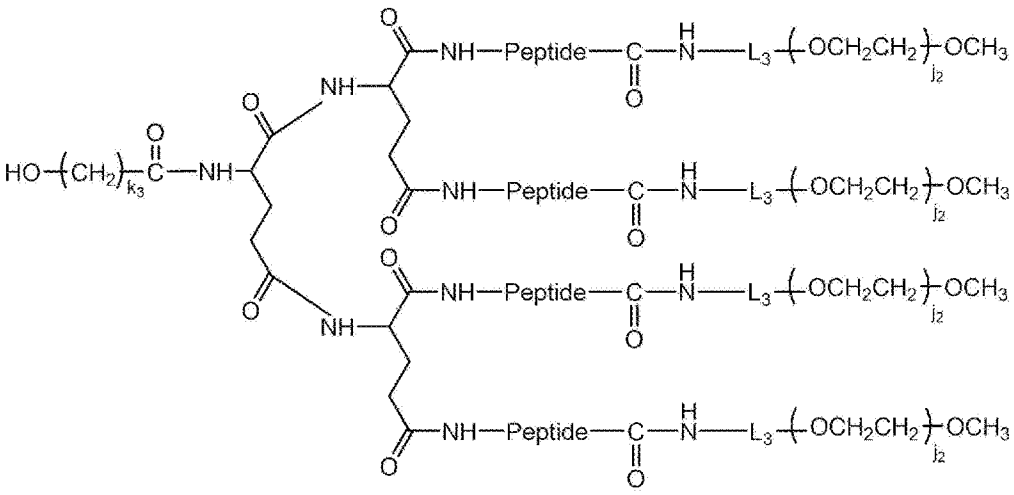
[0153] 反応１１中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$、ｊ$_2$およびｋ$_3$は前記と同義である。

[0154] 反応１１は脱保護８で得られた式（１９）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体の末端のアミノ基を塩基触媒存在下で式（２２）で表される化合物と反応させ水酸基に変換し、式（２３）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得る工程である。前記反応４と同条件で反応と精製が可能である。

[0155] さらに、反応１１中の式（１９）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体の代わりに脱保護１０で得られた式（２１）で表される４分岐型のポリエチレングリコール誘導体を原料とすることで、下式（２４）で表される４分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得ることができる。

[0156]

[化24]

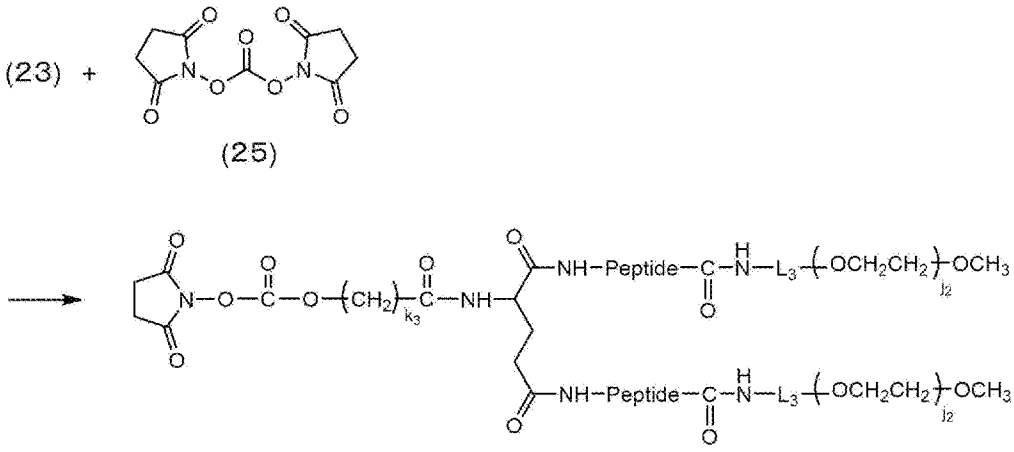


(24)

[0157] 式（２４）のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$、ｊ$_2$およびｋ$_3$は前記と同義である。

[0158] 反応１２

[0159] [化25]



(25)

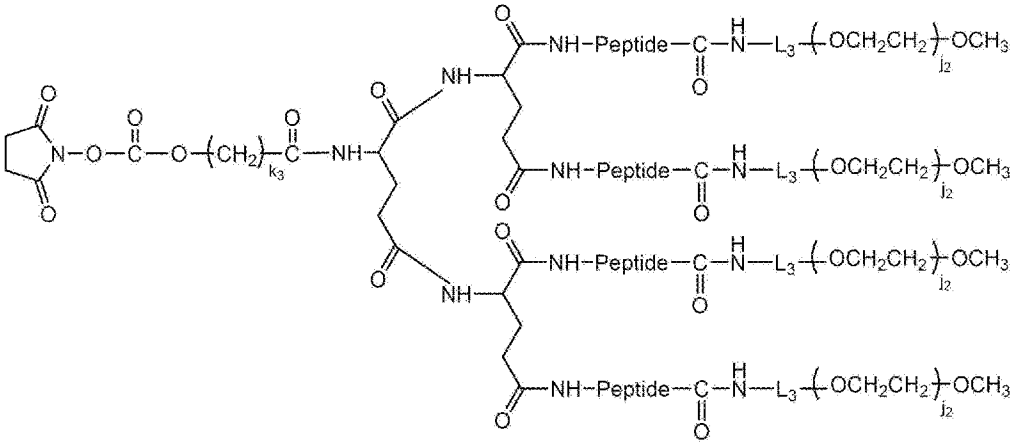
(26)

[0160] 反応１２中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｌ$_3$、ｊ$_2$およびｋ$_3$は前記と同義である。

[0161] 反応１２は反応１１で得られた式（２３）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体の水酸基と式（２５）で表される化合物を反応させ、活性カーボネート基を導入した式（２６）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得る工程であり、本工程は反応１１の肯定の一環として実施することも可能であり、前記反応５と同条件で反応と精製が可能である。

[0162] さらに、反応１２中の式（２３）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体の代わりに式（２４）で表される４分岐型のポリエチレングリコール誘導体を原料とすることで、下式（２７）で表される４分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得ることができる。

[0163] [化26]

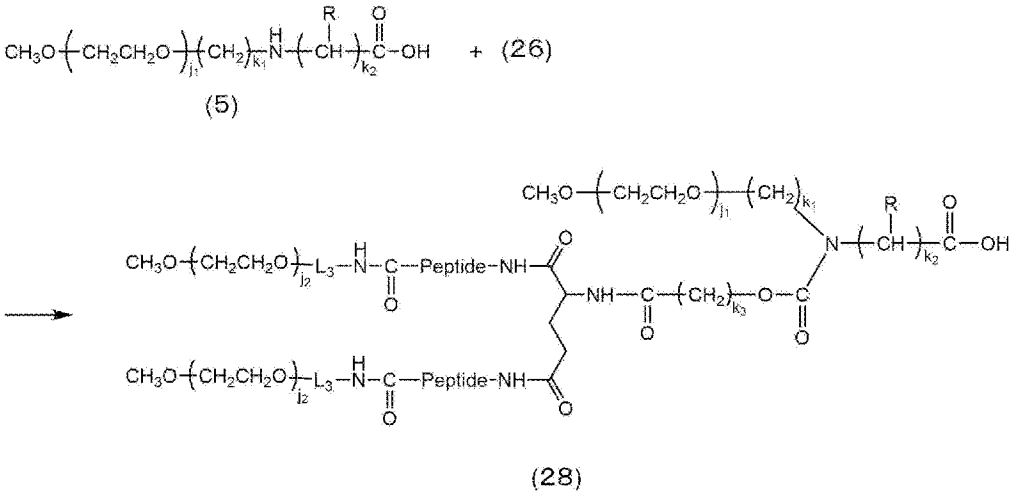


(27)

[0164] 式（２７）のＰｅｐｔｉｄｅ、L_3、j_2およびk_3は前記と同義である。

[0165] 反応１３

[0166] [化27]



(28)

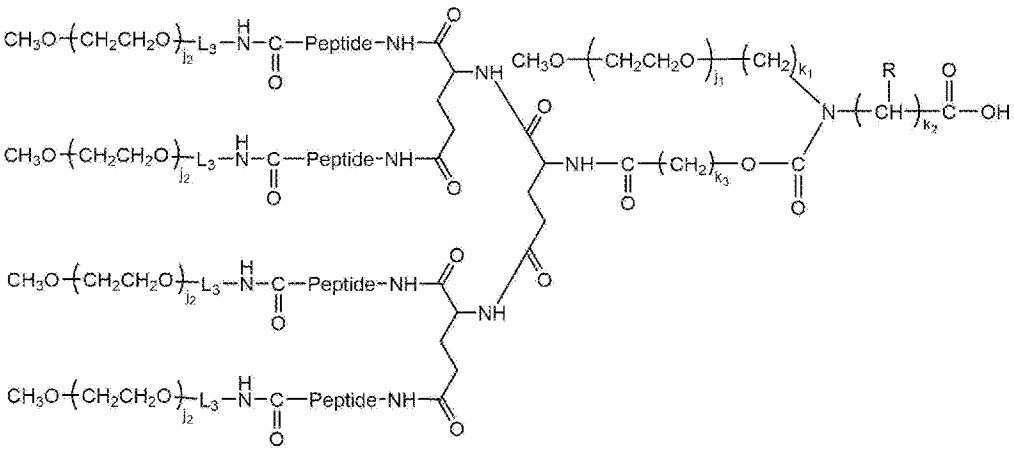
[0167] 反応１３中のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｒ、L_3、j_1、j_2、k_1、k_2およびk_3は前記と同義である。

[0168] 反応１３は反応１で得られた式（５）で表されるポリエチレングリコール

誘導体のアミノ基と反応１２で得られた式（２６）で表されるポリエチレングリコール誘導体の活性エステル基を反応で結合させ、式（２８）で表される３分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を得る工程であり、前記反応６と同条件で反応と精製が可能である。

[0169] さらに、反応１３中の式（２６）で表される２分岐型のポリエチレングリコール誘導体の代わりに式（２７）で表される４分岐型のポリエチレングリコール誘導体を原料とすることで、下式（２９）で表される５分岐型のポリエチレングリコール誘導体を得ることができる。

[0170] [化28]



(29)

[0171] 式（２９）のＰｅｐｔｉｄｅ、Ｒ、L_3、j_1、j_2、k_1、k_2およびk_3は前記と同義である。

[0172] 式（２８）または式（２９）で表される分岐型のポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基を他の官能基に変換する工程について、典型的な例を以下に説明するが、変換方法はこれに限定されるものではない。

[0173] 例えば、式（２８）または式（２９）で表される分岐型のポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基をマレイミド基に変換したい場合は、Ｎ－（２－アミノエチル）マレイミドと塩基触媒存在下で縮合反応させることで、目的物を得ることができる。

[0174] 例えば、式（２８）または式（２９）で表されるポリエチレングリコール誘導体の末端カルボキシル基をアミノ基に変換したい場合は、Ｎ－（９－Ｈ

－フロオレン－９－イルメトキシカルボニル）－１、２－エタンジアミンと塩基触媒存在下で縮合反応させた後、脱保護反応させることで得ることができる。

[0175] これら反応試薬は、低分子量の試薬であり、高分子量のポリマーであるポリエチレングリコール誘導体とは大きく溶解性が異なるため、抽出や晶析等の一般的な精製方法にて容易に除去が可能である。

[0176] 以上のような工程を経て、得られた分岐型の分解性ポリエチレングリコールは、血中で安定であり、細胞内でのみ分解する性能を有することが求められる。その性能を適切に評価するため、例えば、以下に示すような試験を実施し、分岐型の分解性ポリエチレングリコールの血中での安定性、そして細胞内での分解性を評価することができる。

なお、これらの評価においてポリエチレングリコール誘導体が有する官能基の種類による影響を考慮し、評価試料はすべて、アミノ基を１つ有したポリエチレングリコール誘導体に統一して試験を実施した。

[0177] 分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体の血中での安定性を評価するための試験方法については、特に制限は無いが、例えば、マウス、ラット、ヒトなどの血清を用いた試験等が挙げられる。具体的には、ポリエチレングリコール誘導体を１～１０ｍｇ／ｍＬの濃度になるように血清に溶解し、３７℃で９６時間インキュベート後、血清中に含まれるポリエチレングリコール誘導体を回収し、ＧＰＣを測定することで分解率を評価することができる。分解率は、安定性試験前のポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％と、安定性試験後のポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％から算出する。具体的には以下の式を用いる。

分解率　＝　（試験前のピーク面積％　－　試験後のピーク面積％）　÷　試験前のピーク面積％　×　１００

例えば、安定性試験前の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％が９５％であり、試験後のＧＰＣ

メインフラクションのピーク面積％が９０％だったとすると、分解率は以下のように算出される。

分解率　＝　（９５－９０）÷９５×１００　＝　５．２６（％）

分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、血中で分解してしまうと、目的とする血中半減期を得ることができないため、安定性試験において、９６時間後の分解率は、１０％以下が好ましく、５％以下がさらに好ましい。

[0178] 分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体の細胞内での分解性を評価するための試験方法については、特に制限は無いが、例えば、分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体を含有した培地を用いて、細胞を培養させる試験等が挙げられる。ここで使用する細胞や培地については、特に制限は無いが、具体的には、ポリエチレングリコール誘導体を１～２０ｍｇ／ｍＬの濃度になるように培地であるＲＰＭＩ－１６４０に溶解し、この培地を用いて、マクロファージ細胞ＲＡＷ２６４．７を３７℃で９６時間培養後、細胞中のポリエチレングリコール誘導体を回収し、ＧＰＣを測定することで分解率を評価することができる。分解率は、安定性試験と同様に、試験前後のポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％を用いて算出する。

例えば、細胞を用いた分解性試験前の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％が９５％であり、試験後のＧＰＣメインフラクションのピーク面積％が５％だったとすると、分解率は以下のように算出される。

分解率　＝　（９５－５）÷９５×１００　＝　９４．７（％）

分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、細胞内で効率よく分解されないと、目的とする細胞の空胞を抑制できないため、分解性試験において、９６時間後の分解率は、９０％以上が好ましく、９５％以上がさらに好ましい。

[0179] 非特許文献２では、高分子量のポリエチレングリコールによる細胞の空胞

化は、ポリエチレングリコールの組織への蓄積と関係があるとの記載がある。分解性ポリエチレングリコール誘導体の細胞への蓄積性を評価するための試験方法については、特に制限は無いが、上記の細胞内での分解性により評価することができる。

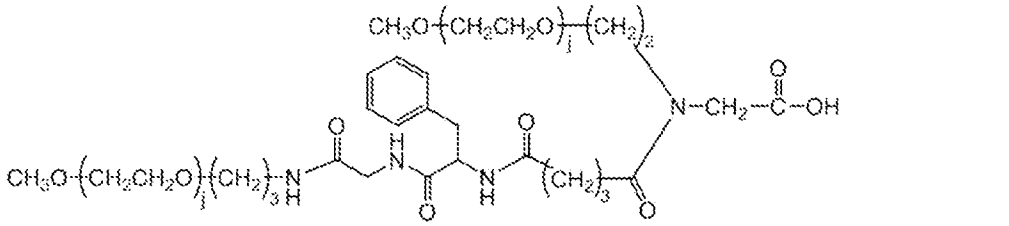
実施例

[0180] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限られるものではない。

[0181] 下記実施例で得られた^{1}Ｈ－ＮＭＲは、日本電子データム（株）製ＪＮＭ－ＥＣＰ４００またはＪＮＭ－ＥＣＡ６００から得た。測定にはφ５ｍｍチューブを用い、重水素化溶媒には、D_2Oまたは内部標準物質としてテトラメチルシラン（ＴＭＳ）を含有する$CDCl_3$およびd_6－ＤＭＳＯを用いた。得られたポリエチレングリコール誘導体の分子量および末端官能基純度は、液体クロマトグラフィー（ＧＰＣおよびＨＰＬＣ）を用いて算出した。液体クロマトグラフィーのシステムは、ＧＰＣには東ソー（株）製「ＨＬＣ－８３２０ＧＰＣ　ＥｃｏＳＥＣ」を用い、ＨＰＬＣにはＷＡＴＥＲＳ社製「ＡＬＬＩＡＮＣＥ」を用いた。

[0182] ［実施例１］

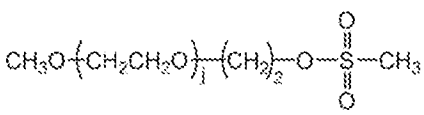
[0183] [化29]



ｊ＝約４８０（ｐ７）

[0184] ［実施例１－１］

[0185] [化30]



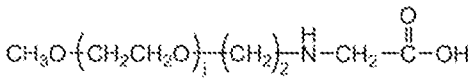
ｊ＝約４８０（ｐ１）

[0186] 平均分子量＝２０，０００、日油株式会社製「ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ ＭＥＨ－２０Ｔ」）（１０ｇ）をトルエン（４０ｇ）に溶解し、１１０℃で１時間還流脱水した後、４０℃まで冷却してトリエチルアミン（８０ｍｇ）、塩化メタンスルホニル（８４ｍｇ）を添加し、４０℃で３時間反応させた。反応終了後、トルエン（１００ｇ）で希釈した後、ヘキサン（１００ｇ）を加えて、室温にて３０分攪拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、酢酸エチル（２００ｇ）に溶解し、ヘキサン（１００ｇ）を加えて室温にて１５分攪拌して生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ヘキサン（１００ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して化合物（ｐ１）を得た。収量８．９ｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）：３．０８ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－Ｏ－ＳＯ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$）３．３８ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－（Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$）$_{j}$－Ｏ－ＣＨ$_{3}$）、３．６４ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－（Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$）$_{j}$－Ｏ－ＣＨ$_{3}$）

[0187] ［実施例１－２］

[0188] [化31]



ｊ＝約４８０（ｐ２）

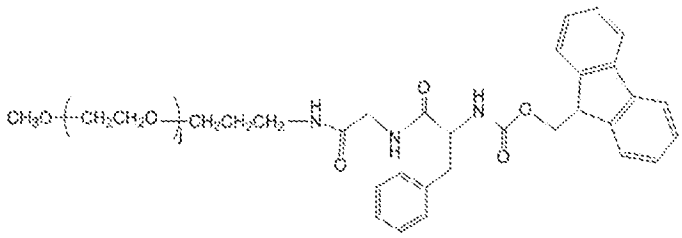
[0189] 塩酸グリシン（５ｇ）を、イオン交換水（５０ｇ）に溶解した。ＮａＯＨ（３．０ｇ）を、前記グリシン水溶液に加え、ｐＨを１０．８に調整した。その後、実施例１－１で得られた化合物（ｐ１）（８ｇ）を前記水溶液に添加し、その溶液を４０℃で７２時間反応させた。反応後、塩酸溶液で反応液のｐＨを約７に中和した。中和後、クロロホルム（５０ｇ）を添加し、室温で１５分攪拌した後、有機層を回収した。有機層を濃縮し、酢酸エチル（１００ｇ）に再溶解してヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温で１５分攪拌して生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して

化合物（ｐ２）を得た。収量６．８ｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｄ$_{6}$－ＤＭＳＯ）：２．７２ｐｐｍ（ｔ、２Ｈ、－ＮＨ－$\underline{CH_2}$－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_j$－Ｏ－CH_3）３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_j$－Ｏ－$\underline{CH_3}$）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－$\underline{CH_2}$－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－（Ｏ－$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$）$_j$－Ｏ－CH_3）、５．５２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ、－$\underline{NH}$－CH_2－ＣＯＯＨ）

[0190] ［実施例１－３］

[0191] [化32]



ｊ＝約４８０（ｐ３）

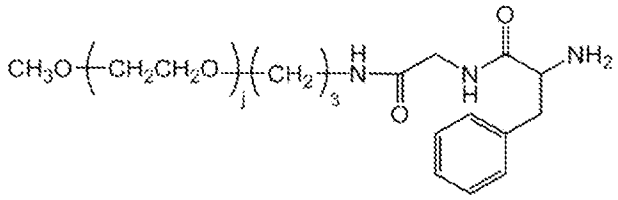
[0192] Ｎ末端を９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ基）で保護したＬ－フェニルアラニル－グリシン（Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ）（０．４４ｇ）と平均分子量＝２０，０００、日油株式会社製「ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＭＥＰＡ－２０Ｔ」（１０ｇ）にアセトニトリル（４０ｇ）を添加して溶解した。その後、ジイソプロピルエチルアミン（１．５６ｇ）と４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリドｎ水和物（ＤＭＴ－ＭＭ）（０．２２ｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で１時間反応させた。反応終了後、４０℃にて濃縮し、濃縮物にトルエン（１００ｇ）を添加して均一になるように攪拌した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液にヘキサン（１００ｇ）を加えて、室温にて１５分攪拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、再度トルエン（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（１００ｇ）を加えて、室温にて１５分攪拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ヘキサン（５０ｇ）で洗浄し

、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ３）を得た。収量８．６ｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｄ$_6$－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－<u>ＣＨ$_2$</u>－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、２．８０ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－<u>ＣＨ$_2$</u>－Ｃ$_6$Ｈ$_5$）、３．０４ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－<u>ＣＨ$_2$</u>－Ｃ$_6$Ｈ$_5$）、３．１０ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－<u>ＣＨ$_2$</u>－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－<u>ＣＨ$_3$</u>）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（<u>ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$</u>－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、４．２０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ）、７．３３ｐｐｍ（ｍ、９Ｈ）、７．６６ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、Ａｒ）、７．８８ｐｐｍ（ｄ、２Ｈ、Ａｒ）、８．２７ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）

[0193] ［実施例１－４］

[0194] [化33]



ｊ＝約４８０（ｐ４）

[0195] 化合物（ｐ３）（８．０ｇ）をアセトニトリル（４０ｇ）に溶解した。その後、ピペリジン（０．８６ｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。反応終了後、２０％食塩水（８０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌して洗浄を行った。有機層と水層を分離後、再度、有機層に２０％食塩水（８０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌して洗浄を行い、有機層を回収した。得られた有機層を４０℃にて濃縮し、濃縮物にトルエン（２００ｇ）、硫酸マグネシウム（１０ｇ）を添加し、室温にて３０分攪拌して脱水した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液にヘキサン（１００ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用い

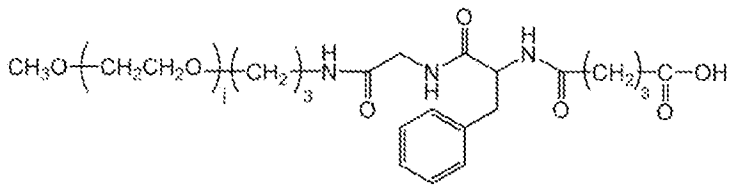
て吸引ろ過し、析出物を回収した後、ヘキサン（１００ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ４）を得た。収量７．２ｇ。

ＨＰＬＣ：アミン純度９２％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、３．１０ｐｐｍ（ｑ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0196] ［実施例１－５］

[0197] [化34]



ｊ＝約４８０（ｐ５）

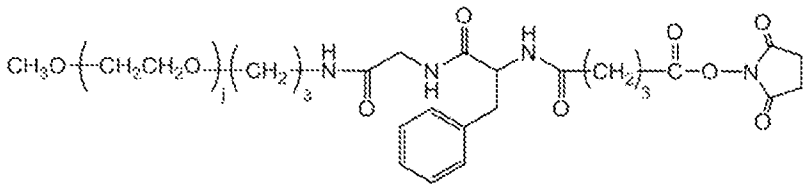
[0198] 実施例１－４で得られた化合物（ｐ４）（６．０ｇ）、酢酸ナトリウム（４９ｍｇ）、無水グルタル酸（５１ｍｇ）をトルエン（２５ｇ）に溶解し、窒素雰囲気下で４０℃にて７時間反応させた。反応終了後、トルエン（２０ｇ）で希釈し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、得られたろ液にヘキサン（３０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した。得られた析出物を酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生

成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収し、ヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ５）を得た。収量４．８ｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｄ$_6$－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＯＯＨ）２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＯＯＨ）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ$_6$Ｈ$_5$）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ$_6$Ｈ$_5$）、３．１０ｐｐｍ（ｑ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_3$）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ$_6$Ｈ$_5$、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0199] ［実施例１－６］

[0200] [化35]



ｊ＝約４８０（ｐ６）

[0201] 実施例１－５で得られた化合物（ｐ５）（４．５ｇ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（１０３ｍｇ）をトルエン（２５ｇ）に溶解した。その後、ジシクロヘキシルカルボジイミド（１３９ｍｇ）を添加し、４０℃にて窒素雰囲気下で３時間反応させた。反応終了後、トルエン（５０ｇ）を添加して希釈し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、得られたろ液にヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用い

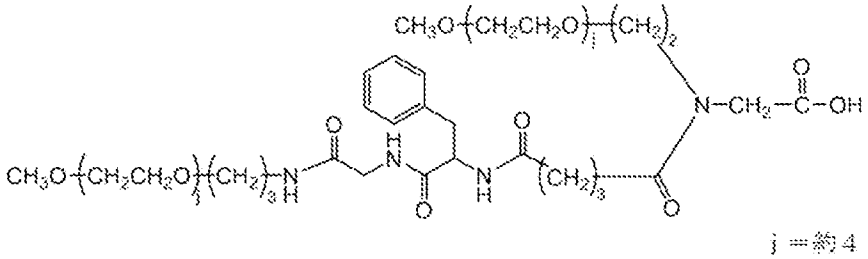
て吸引ろ過し、析出物を回収した後、酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ６）を得た。収量３．５ｇ。

活性エステル純度は９８％（^{1}Ｈ－ＮＭＲ）。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、２．７２ｐｐｍ（ｓ、４Ｈ、－ＣＯ－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、３．１０ｐｐｍ（ｑ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約１，９００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0202] ［実施例１－７］

[0203] [化36]



ｊ＝約４８０（ｐ７）

[0204] 実施例１－２で得られた化合物（ｐ２）（３．０ｇ）と実施例１－６で得

られた化合物（ｐ６）（３．０ｇ）をジクロロメタン（６０ｇ）に溶解した後、トリエチルアミン（９５ｍｇ）を添加して室温にて８時間反応させた。反応後、２０％食塩水（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、反応液を洗浄した後、有機層を回収した。有機層に硫酸マグネシウム（１０ｇ）を添加し、室温で１５分攪拌した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液を濃縮後、濃縮物を酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、再度、酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、２，６－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル－ｐ－クレゾール（ＢＨＴ）（１０ｍｇ）を含有したヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ７）を得た。収量４．２ｇ。

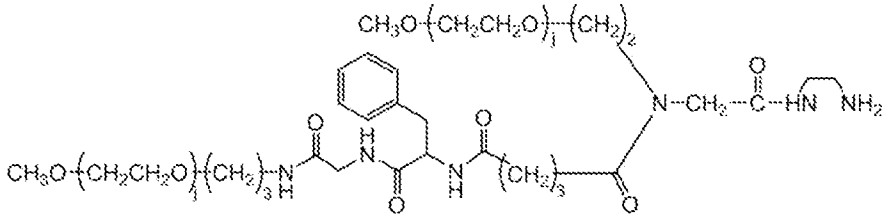
ＨＰＬＣ：カルボン酸純度は９５％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－ＣＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－$\underline{CH_3}$）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CH_2－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$）ｊ－Ｏ－CH_3）、４．６１ｐｐｍ（－$\underline{CH_2}$－ＣＯＯＨ）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－$\underline{C_6H_5}$、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ））

[0205] ［実施例２］

[0206]

[化37]



j＝約４８０（ｐ８）

[0207] 実施例１－７で得られた化合物（ｐ７）（２．０ｇ）とＮ－Ｆｍｏｃ－エチレンジアミン（３２ｍｇ）をアセトニトリル（５．０ｇ）に溶解した。その後、ジイソプロピルエチルアミン（１６ｍｇ）とＤＭＴ－ＭＭ（４１５ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。その後、ピペリジン（１０７ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。反応終了後、濃縮し、濃縮物をクロロホルム（５０ｇ）に再溶解し、２０％食塩水（２５ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌して洗浄を行い、有機層を回収した。得られた有機層に硫酸マグネシウム（１０ｇ）を添加し、室温にて３０分攪拌して脱水した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液を４０℃にて濃縮し、濃縮物にトルエン（１００ｇ）を添加して溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴを６ｍｇ含有したヘキサン（３０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ８）を得た。収量１．３ｇ。

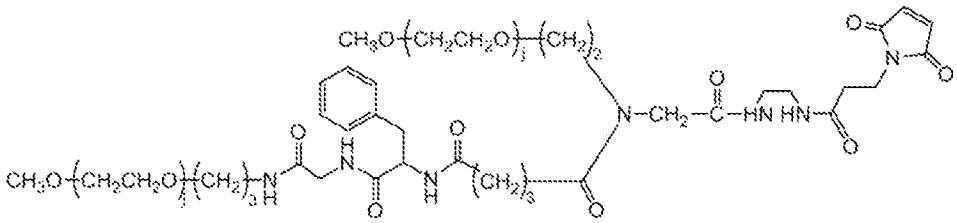
ＨＰＬＣ：アミン純度は９３％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－ＣＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、２．７６ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－NH_2）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－

CH_2-CH_2）j－O－$\underline{CH_3}$）、３．４８ｐｐｍ（m、約３，８００H、－$CH_2-NH-CH_2-CH_2-$（O－$\underline{CH_2-CH_2}$）j－O－CH_3）、７．２４ｐｐｍ（m、６H、－NH－CO－CH－$CH_2-\underline{C_6H_5}$、－NH－）、７．７３ｐｐｍ（t、１H）、７．８０ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１H）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１H）

[0208] ［実施例３］

[0209] [化38]



j＝約４８０（ｐ９）

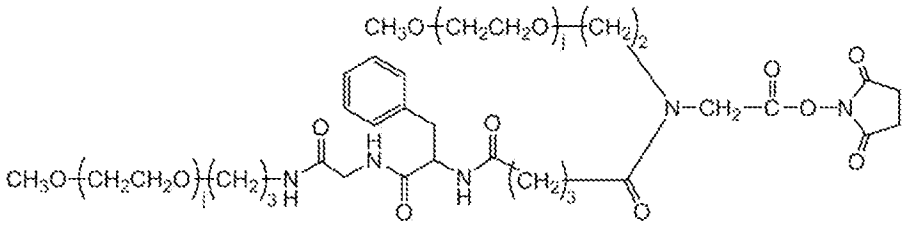
[0210] 実施例１－７で得られた化合物（ｐ７）（３００ｍｇ）をアセトニトリル（２ｇ）に溶解した。その後、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（６ｍｇ）とジシクロヘキシルカルボジイミド（６ｍｇ）を添加し、４０℃にて窒素雰囲気下で３時間反応させた。その後、トリエチルアミン（３ｍｇ）とＮ－（２－アミノエチル）マレイミド塩酸塩（５ｍｇ）を添加し、４０℃にて窒素雰囲気下で３時間反応させた。反応終了後、濃縮し、濃縮物を酢酸エチル（５０ｇ）に溶解し、ヘキサン（３０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌して生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、再度酢酸エチル（５０ｇ）に溶解し、ヘキサン（３０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過紙、析出物を回収した後、ＢＨＴ（６ｍｇ）を含有したヘキサン（３０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ９）を得た。収量２６４ｍｇ。マレイミド純度は９２％（^{1}Ｈ－ＮＭＲ）。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（m、２H、CO－NH－$CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-O-$（$CH_2-CH_2-O$）j－$CH_3$）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１H）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２H、－NH－CO－$CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-CO-$）、２．３０ｐｐｍ（m、４H、－NH－CO

－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－CO－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、２．６６ｐｐｍ（ｔ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－Ｍａｌｅｉｍｉｄｅ）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－$\underline{CH_3}$）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CH_2－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$）ｊ－Ｏ－CH_3）、４．７６ｐｐｍ（ｔ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－Ｍａｌｅｉｍｉｄｅ）、６．９８ｐｐｍ（ｓ、２Ｈ、－ＣＯ－$\underline{CH－CH}$－ＣＯ－）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－$\underline{C_6H_5}$、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、７．８０ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、８．０１ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ，１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0211] ［実施例４］

[0212] [化39]



ｊ＝約４８０（ｐ１０）

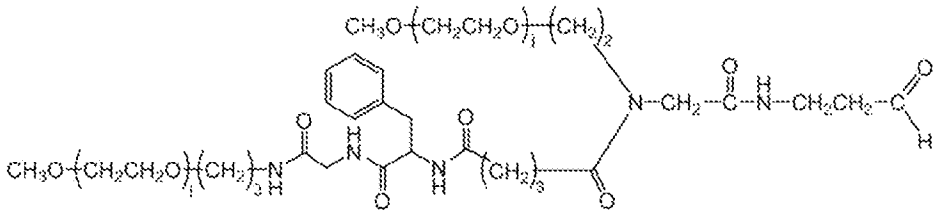
[0213] 実施例１－７で得られた化合物（ｐ７）（１．２ｇ）にトルエン（６ｇ）を添加し、４０℃で加温溶解した。その後、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（２４ｍｇ）とジシクロヘキシルカルボジイミド（２４ｍｇ）を添加し、４０℃にて窒素雰囲気下で３時間反応させた。反応終了後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、得られたろ液を酢酸エチル（１００ｇ）で希釈し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて３０分攪拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（１０ｍｇ）を含有したヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１０）を得た。収量１．０ｇ。活性エステル純度は９１％（^{1}Ｈ

－ＮＭＲ）。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、２．７２ｐｐｍ（ｓ、４Ｈ、－ＣＯ－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－CH_3）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CH_2－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－CH_3）、４．６１ｐｐｍ（－CH_2－ＯＣＯ－Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ）、７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0214] ［実施例５］

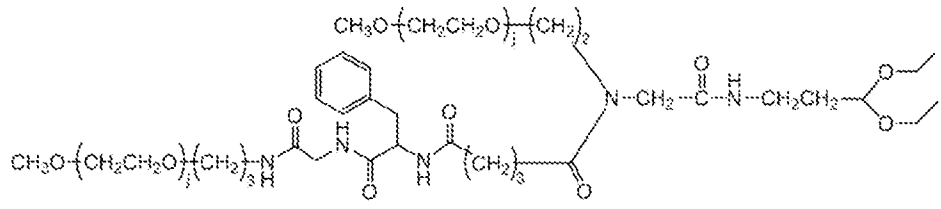
[0215] [化40]



ｊ＝約４８０（ｐ１２）

[0216] ［実施例５－１］

[0217] [化41]



ｊ＝約４８０（ｐ１１）

[0218] 実施例１－７で得られた化合物（ｐ７）（８００ｍｇ）をトルエン（７ｇ

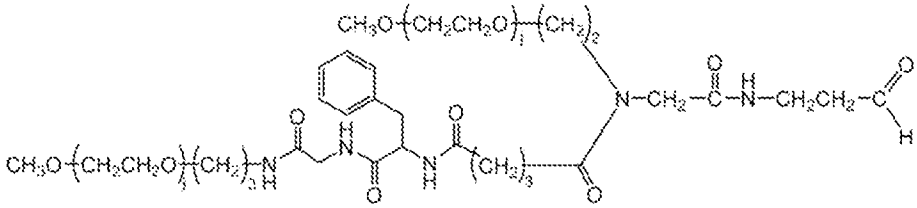
）に４０℃にて加温溶解した後、３－アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタール（９ｍｇ）を添加し、５０℃にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。反応終了後、酢酸エチル（１００ｇ）を添加し、均一になるまで攪拌し、ヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌して生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（１０ｍｇ）を含有したヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１１）を得た。収量６８４ｍｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．２０ｐｐｍ（ｔ、６Ｈ（CH_3－CH_2－Ｏ）$_2$－ＣＨ－）１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、１．８５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－ＣＨ－（Ｏ－CH_2－CH_3）$_2$）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－CH_3）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CH_2－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－CH_3）、３．９１ｐｐｍ（－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－ＣＨ－（Ｏ－CH_2－CH_3）$_2$）、４．５５ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ、－ＣＨ－（Ｏ－CH_2－CH_3）$_2$）７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0219] ［実施例５－２］

[0220]

[化42]



j＝約４８０（ｐ１２）

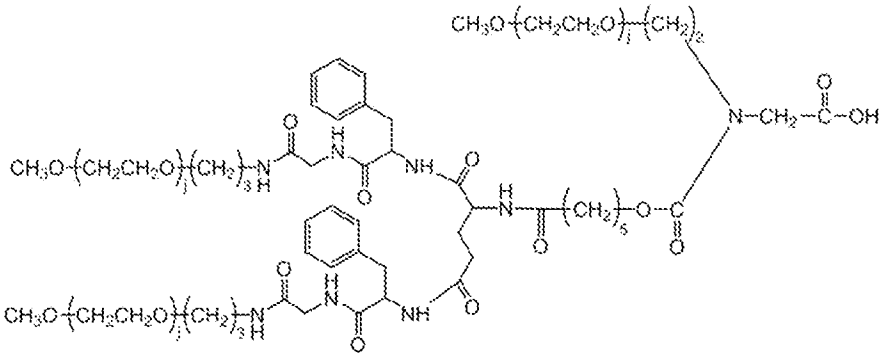
[0221] 実施例５－１で得られた化合物（ｐ１１）（６００ｍｇ）をｐＨ１．９０に調整したりん酸緩衝液（６．０ｇ）に溶解し、室温にて窒素雰囲気下で３時間反応させた。反応後、０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液を添加し、ｐＨ６．５に調整した後、塩化ナトリウム（１．５ｇ）を添加し溶解した。得られた溶液に０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液を添加し、ｐＨを７．１０に調整した後、ＢＨＴ（２ｍｇ）含有のクロロホルム（１０ｇ）を添加して室温にて２０分攪拌し、有機層に生成物を抽出した。有機層と水層を分離し、有機層を回収した後、水層に再度ＢＨＴ（４ｍｇ）含有のクロロホルム（２０ｇ）を添加して、室温で２０分攪拌し、有機層に生成物を抽出した。抽出１回目と２回目で得られた有機層を合わせて４０℃で濃縮し、得られた濃縮物を酢酸エチル（５０ｇ）に溶解し、ヘキサン（３０ｇ）を加えて室温にて１５分攪拌して生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（６ｍｇ）を含有したヘキサン（３０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１２）を得た。収量４５７ｍｇ。アルデヒド純度は９０％（^{1}Ｈ－ＮＭＲ）。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．６２ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－CH_3）、１．６４ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、２．０５ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－ＣＯ－）、２．３０ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－ＣＯ－）、２．５９ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、２．６６ｐｐｍ（ｄｄ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－ＣＨＯ）、２．９８ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、３Ｈ、－ＮＨ－CH_2－CH_2

－（Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$）ｊ－Ｏ－ＣＨ$_3$）、３．４８ｐｐｍ（ｍ、約３，８０Ｈ、－ＣＨ$_2$－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－（Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$）ｊ－Ｏ－ＣＨ$_3$）、３．９１ｐｐｍ（ｓ、２Ｈ、－ＣＨ$_2$－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨＯ）７．２４ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ－ＣＨ$_2$－Ｃ$_6$Ｈ$_5$、－ＮＨ－）、７．７３ｐｐｍ（ｔ、１Ｈ）、８．１２ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、９．７２ｐｐｍ（ｓ、１Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨＯ）

[0222] ［実施例６］

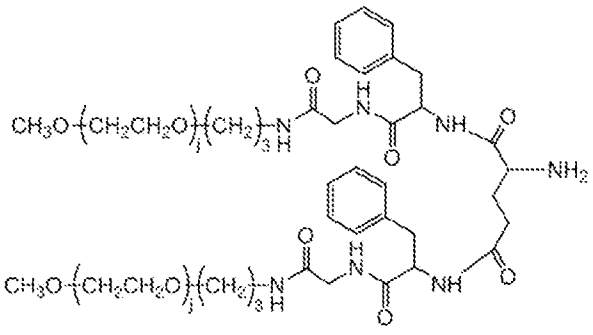
[0223] [化43]



ｊ＝約４８０（ｐ１６）

[0224] ［実施例６－１］

[0225] [化44]



ｊ＝約４８０（ｐ１３）

[0226] Ｎ末端を９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ基）で保護したＬ－グルタミン酸（Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ－ＯＨ）（１６．０ｍｇ）と実施例１－４で得られた化合物（ｐ４）（２．０ｇ）にアセトニトリル（１０ｇ）を添加し、３０℃で加温溶解した。その後、ジイソプロピルエチルアミン（１５ｍｇ）とＤＭＴ－ＭＭ（３９．０ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰

囲気下で１時間反応させた。その後、ピペリジン（１１１ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。反応終了後、反応液をトルエン（８０ｇ）で希釈した後、ヘキサン（４０ｇ）を加えて、室温にて１５分撹拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、再度トルエン（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を加えて、室温にて１５分撹拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（１０ｍｇ）を含有したヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１３）を得た。収量１．６ｇ。

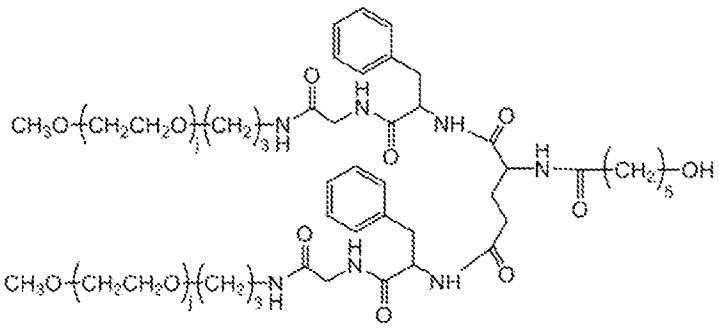
ＨＰＬＣ：アミン純度９２％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．５４ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ（NH_2）－$\underline{CH_2}$－CH_2－）、１．６２ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－）、１．９７ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ（NH_2）－CH_2－$\underline{CH_2}$－）、２．７４ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、２．８１ｐｐｍ（ｄｄ、１Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－$\underline{CH_2}$－C_6H_5）、３．１１ｐｐｍ（ｍ、１１Ｈ）、３．２４ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－$\underline{CH_3}$）、３．６４ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$－Ｏ）ｊ－CH_3）、４．４９ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－$\underline{CH}$－CH_2－C_6H_5）、４．５７ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－$\underline{CH}$－CH_2－C_6H_5）、７．２５ｐｐｍ（ｍ、１０Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－CH_2－$\underline{C_6H_5}$）、７．７４ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ）、８．４４ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ）、８．６１ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ）

[0227] ［実施例６－２］

[0228]

[化45]



j＝約４８０（ｐ１４）

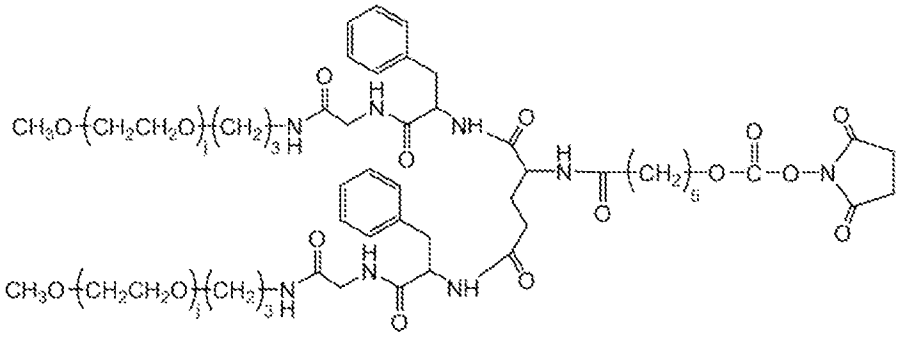
[0229] ε－カプロラクトン（１１４ｍｇ）を１Ｎ　ＮａＯＨ（０．８ｍＬ）に溶解し２時間反応させ、６－ヒドロキシカプロン酸水溶液（０．８８Ｍ）を調製した。また、実施例６－１で得られた化合物（ｐ１３）（１．５ｇ）をアセトニトリル（６ｇ）に溶解した。その後、上記６－ヒドロキシカプロン酸水溶液（８０μＬ）とジイソプロピルエチルアミン（１５ｍｇ）とＤＭＴ－ＭＭ（１６ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で１時間反応させた。反応終了後、反応液を４０℃にて濃縮し、得られた濃縮物にクロロホルム（３０ｇ）を添加して溶解した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（１５ｇ）を添加し、室温にて１５分撹拌して洗浄を行った。水層と有機層を分離後、再度、有機層に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（１５ｇ）を添加し、室温にて１５分撹拌して洗浄を行い、有機層を回収した。得られたクロロホルム溶液に硫酸マグネシウム（５ｇ）を添加し、３０分撹拌して脱水した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過を行った。得られたろ液を４０℃にて濃縮し、濃縮物に酢酸エチル（５０ｇ）を添加して均一になるように撹拌した後、ヘキサン（２５ｇ）を加えて、室温にて１５分撹拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、再度酢酸エチル（５０ｇ）に溶解し、ヘキサン（２５ｇ）を加えて、室温にて１５分撹拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（１０ｍｇ）含有のヘキサン（５０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１４）を得た。収量１．２ｇ。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）：１．３７ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、ＨＯ－Ｃ$Ｈ_{2}$－ＣＨ

$_2$－$\underline{CH_2}$－CH_2－CH_2－CO－NH－）、１．５５ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、HO－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－CO－NH－）、１．７７ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－CO－NH－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－O－（CH_2－CH_2－O）ｊ－CH_3）、１．８５ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、２．０１ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、HO－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－$\underline{CH_2}$－CO－NH－）、３．０１ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、３．２４ｐｐｍ（ｍ、８Ｈ）、３．３８ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－CO－NH－CH_2－CH_2－CH_2－O－（CH_2－CH_2－O）ｊ－$\underline{CH_3}$）、３．６４ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CO－NH－CH_2－CH_2－CH_2－O－（$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$－O）ｊ－CH_3）、４．０３ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ）、４．１４ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、４．４８ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－CO－NH－$\underline{CH}$－CH_2－C_6H_5）、６．９５ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．００ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．２６ｐｐｍ（ｍ、１０Ｈ、－CO－NH－CH－CH_2－$\underline{C_6H_5}$）、７．６６ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、８．２９ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0230] ［実施例６－３］

[0231] [化46]



ｊ＝約４８０（ｐ１５）

[0232] 実施例６－２で得られた化合物（ｐ１４）（５００ｍｇ）をジクロロメタン（３．５ｇ）に溶解した。その後、炭酸ジ（Ｎ－スクシンイミジル）（５１ｍｇ）とピリジン（２０ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で８時間反応させた。反応終了後、５％食塩水（５ｇ）で反応液を洗浄し硫酸マグネシウム（０．１ｇ）を加えて、２５℃で３０分撹拌した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過を行った。得られたろ液を濃縮後、濃縮物に酢酸エチル（１００

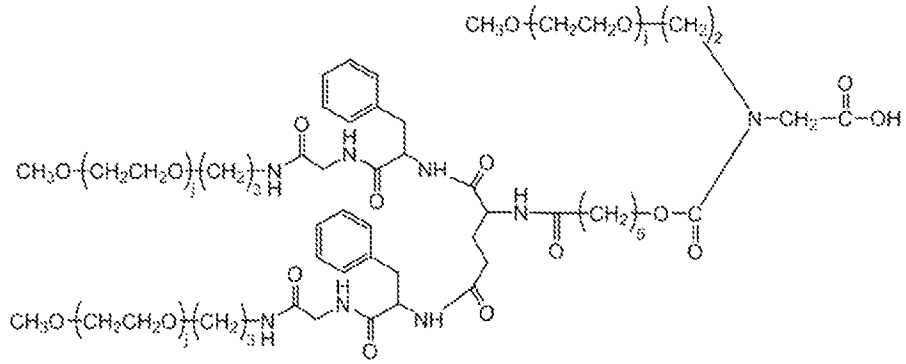
ｇ）を添加して溶解した後、ヘキサン（５０ｇ）を加えて室温にて１５分攪拌し生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（５ｍｇ）含有のヘキサン（２５ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１５）を得た。収量２８６ｍｇ。活性カーボネート純度は９１％（^{1}Ｈ－ＮＭＲ）

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）：１．３８ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ＯＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－ＮＨ－）、１．５９ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ＯＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－ＮＨ－）、１．７５ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ）、１．８５ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、２．１３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ＯＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－ＮＨ－）、２．８３ｐｐｍ（ｓ、４Ｈ、－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－）、３．０１ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、３．１９ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ）、３．３８ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－（ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_{3}$）、３．６４ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－（ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ）ｊ－ＣＨ$_{3}$）、４．０３ｐｐｍ（ｍ、３Ｈ）、４．１８ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、４．３１ｐｐｍ（ｔ、２Ｈ、Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ＯＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－ＮＨ－）、４．５０ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$_{6}$Ｈ$_{5}$）、６．９８ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．１５ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．２６ｐｐｍ（ｍ、１０Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$_{6}$Ｈ$_{5}$）、７．８１ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、８．３７ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0233] ［実施例６－４］

[0234]

[化47]



j＝約４８０（ｐ１６）

[0235] 実施例１－２で得られた化合物（ｐ２）（１２５ｍｇ）と実施例６－３で得られた化合物（ｐ１５）（２５０ｍｇ）をジクロロメタン（５０ｇ）に溶解した後、トリエチルアミン（０．５ｇ）を添加して室温にて８時間反応させた。反応後、２０％食塩水（２０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、反応液を洗浄した後、有機層を回収した。有機層に硫酸マグネシウム（５ｇ）を添加し、室温で１５分攪拌した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液を濃縮後、濃縮物を酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（４ｍｇ）を含有したヘキサン（２０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１６）を得た。収量２４２ｍｇ。

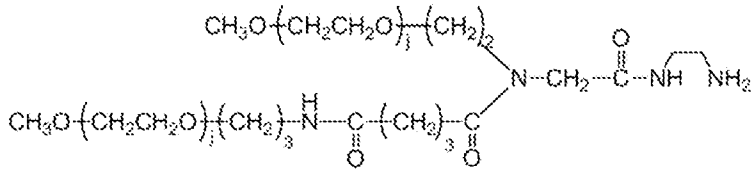
ＨＰＬＣ：カルボン酸純度は９０％

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．２９ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－CH_2－ＯＣＯ－）、１．５８ｐｐｍ（ｍ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－ＯＣＯ－）、１．７５ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ）、１．８５ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、２．１３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－ＯＣＯ－）、３．０１ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、３．１９ｐｐｍ（ｍ、６Ｈ）、３．３８ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－（CH_2－CH_2－Ｏ）ｊ－$\underline{CH_3}$）、３．６４ｐｐｍ（ｍ、約５，７００Ｈ、－ＣＯ－Ｎ

H－CH_2－CH_2－CH_2－O－（CH_2－CH_2－O）j－CH_3）、３．９０ｐｐｍ（ｔ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－ＯＣＯ－）４．０３ｐｐｍ（ｍ、３Ｈ）、４．１８ｐｐｍ（ｍ、１Ｈ）、４．３７ｐｐｍ（ｓ、２Ｈ、－CH_2－ＣＯＯＨ）４．５０ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、６．９８ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．１５ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、７．２６ｐｐｍ（ｍ、１０Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ－CH_2－C_6H_5）、７．８１ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）、８．３７ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ）

[0236] ［比較例１］

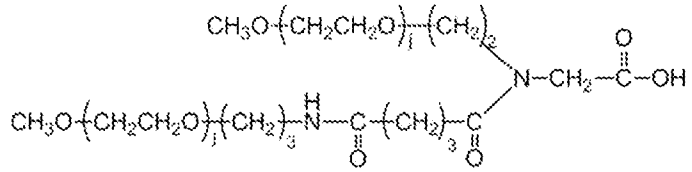
[0237] [化48]



ｊ＝約４８０（ｐ１８）

[0238] ［比較例１－１］

[0239] [化49]



ｊ＝約４８０（ｐ１７）

[0240] 実施例１－２で得られた化合物（１ｇ）と平均分子量が２０，０００である日油株式会社製「ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＭＥ－２００ＧＳ３」（１ｇ）をジクロロメタン（２０ｇ）に溶解した後、トリエチルアミン（０．２ｇ）を添加して室温にて８時間反応させた。反応後、２０％食塩水（１０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し、反応液を洗浄した後、有機層を回収した。有機層に硫酸マグネシウム（３ｇ）を添加し、室温で１５分攪拌した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ液を濃縮後、濃縮物を酢酸エチル（１００ｇ）に溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加し、室温にて１５分攪拌し

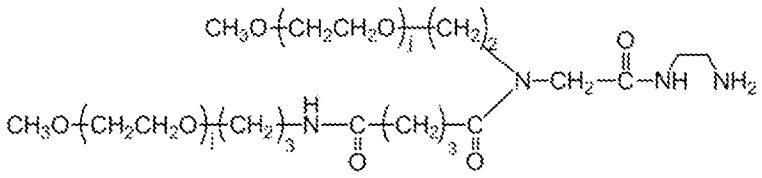
、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴ（６ｍｇ）を含有したヘキサン（３０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ１７）を得た。収量１．２ｇ。

ＨＰＬＣ：カルボン酸純度は９３％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｄ$_{6}$－ＤＭＳＯ）：１．７３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－（Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$）ｊ－）、２．０３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｎ－）、２．３４ｐｐｍ（ｔ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｎ－）、３．４０ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－（Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$）ｊ－Ｏ－ＣＨ$_{3}$）、３．５５ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－ＣＨ$_{2}$－（Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$）ｊ－Ｏ－ＣＨ$_{3}$）、４．６１ｐｐｍ（ｓ、２Ｈ、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯＯＨ）、７．７０ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ、－ＣＨ$_{2}$－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－）

[0241] ［比較例１－２］

[0242] [化50]



ｊ＝約４８０（ｐ１８）

[0243] 比較例１－１で得られた化合物（ｐ１７）（１．０ｇ）とＮ－Ｆｍｏｃ－エチレンジアミン（１６ｍｇ）をアセトニトリル（２．５ｇ）に溶解した。その後、ジイソプロピルエチルアミン（８ｍｇ）とＤＭＴ－ＭＭ（２０８ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。その後、ピペリジン（１０７ｍｇ）を添加し、室温にて窒素雰囲気下で２時間反応させた。反応終了後、濃縮し、濃縮物をクロロホルム（５０ｇ）に再溶解し、２０％食塩水（２５ｇ）を添加し、室温にて１５分撹拌して洗浄を行い、有機層を回収した。得られた有機層に硫酸マグネシウム（１０ｇ）を添加し、室温にて３０分撹拌して脱水した後、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過した。得られたろ

液を４０℃にて濃縮し、濃縮物にトルエン（１００ｇ）を添加して溶解し、ヘキサン（５０ｇ）を添加して室温にて１５分攪拌し、生成物を析出させた。５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、析出物を回収した後、ＢＨＴを６ｍｇ含有したヘキサン（３０ｇ）で洗浄し、５Ａろ紙を用いて吸引ろ過し、真空乾燥して上記化合物（ｐ８）を得た。収量５８１ｍｇ。

ＨＰＬＣ：アミン純度は９０％。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（d_6－ＤＭＳＯ）：１．７３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－）、２．０３ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－$\underline{CH_2}$－CH_2－ＣＯ－Ｎ－）、２．３４ｐｐｍ（ｔ、４Ｈ、－ＮＨ－ＣＯ－$\underline{CH_2}$－CH_2－$\underline{CH_2}$－ＣＯ－Ｎ－）、２．７６ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－$\underline{CH_2}$－NH_2）、３．４０ｐｐｍ（ｓ、６Ｈ、－（Ｏ－CH_2－CH_2）ｊ－Ｏ－$\underline{CH_3}$）、３．５５ｐｐｍ（ｍ、約３，８００Ｈ、－CH_2－（Ｏ－$\underline{CH_2}$－$\underline{CH_2}$）ｊ－Ｏ－CH_3）、３．６６ｐｐｍ（ｍ、２Ｈ、－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－$\underline{CH_2}$－CH_2－NH_2）、３．９１ｐｐｍ（ｓ、２Ｈ、－Ｎ－$\underline{CH_2}$－ＣＯ－ＮＨ－）、７．７０ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ、－CH_2－$\underline{NH}$－ＣＯ－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯ－）、７．８３ｐｐｍ（ｂｒｏａｄ、１Ｈ、－CH_2－ＣＯ－$\underline{NH}$－CH_2－CH_2－NH_2）

[0244] ［実施例８］

血清中での安定性試験

１．５mLのエッペンドルフチューブに、マウスまたはヒト血清１ｍＬを加え、実施例２で得られた分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ８）、比較例１－２で得られた非分解性ポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ１８）、およびメトキシＰＥＧアミン４０ｋＤａをそれぞれ５．０ｍｇ／ｍＬの濃度になるように添加した。３７℃で９６時間インキュベーション後、２００μＬをサンプリングし、そこにアセトニトリルを添加し、ボルテックスにて１分間撹拌し、血清中のたんぱく質を析出させ、遠心分離後、上清を回収した。次に脂肪酸等の疎水性物質を除去する

ため、回収液にヘキサンを添加し、ボルテックスにて１分間撹拌し、遠心分離後、下層を回収した。この溶液を真空条件にて濃縮し、血清中からポリエチレングリコール誘導体の回収を行った。その後、ＧＰＣ分析を行い、分解性ポリエチレングリコール誘導体の分解率を算出した。

分解率は以下の式にて算出した。

分解率　＝　（試験前の40kDaのピーク面積％　－　試験後の40kDaのピーク面積％）　÷　（試験前の40kDaのピーク面積％）　×　１００

結果を表１に示す。

[0245] [表1]

	サンプル名	マウス血清中分解率	ヒト血清中分解率
実施例２	化合物（ｐ８）	１％	1%
比較例１	化合物（ｐ１８）	0%	1%
非分解性	メトキシPEGアミン40kDa	0%	0%

[0246] 表１によれば、分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ８）は、非分解性のポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ１８）、メトキシＰＥＧアミン４０ｋＤａと同様に、血清中において分解はみられなかった。つまり、当該分解性ポリエチレングリコール誘導体が血中では安定であることが示された。

[0247] ［実施例９］

細胞を用いた分解性試験

培地ＲＰＭＩ－１６４０（１０％ＦＢＳ　Ｐｎ／Ｓｔ）１０ｍＬを用いて、１００ｍｍディッシュにＲＡＷ２６４．７を１０×１０６ｃｅｌｌ播種し、３７℃で２４時間培養後、実施例２で得られた分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ８）、比較例１－２で得られた非分解性のポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ１８）およびメトキシＰＥＧアミン４０ｋＤａを１０ｍｇ／ｍＬの濃度になるよう溶解した培地にそれぞれ交換し、３７℃で９６時間培養した。培養後、細胞を１％ＳＤＳ溶液にて溶解し、ＰＢＳにて希釈し、そこにアセトニトリルを添加し、ボルテ

ックスにて１分間撹拌し、細胞溶解液中のたんぱく質を析出させ、遠心分離後、上清を回収した。次に脂肪酸等の疎水性物質を除去するため、回収液にヘキサンを添加し、ボルテックスにて１分間撹拌し、遠心分離後、下層を回収した。この溶液を真空条件にて濃縮し、細胞内からポリエチレングリコール誘導体の回収を行った。

また、細胞培養に使用した培地中での分解を確認するため、各種ポリエチレングリコール誘導体を１０ｍｇ／ｍＬの濃度になるよう溶解した培地のみで３７℃で９６時間培養し、上記と同操作にてポリエチレングリコール誘導体の回収を行った。

その後、回収した各種ポリエチレングリコール誘導体のＧＰＣ分析を行い、実施例８と同じ計算式にて分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体の分解率を算出した。

結果を表２に示す。

[0248] [表2]

	サンプル名	培地での分解率	細胞内での分解率
実施例２	化合物（ｐ８）	0%	99%
比較例１	化合物（ｐ１８）	0%	0%
非分解性	メトキシPEGアミン40kDa	0%	0%

[0249] 表２によれば、分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ８）は、細胞内にて効果的に分解し（分解率９９％）、分子量４万から２万に分解することが確認できた。分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、細胞培養で用いた培地では分解しないことから、細胞内で特異的に分解されたことが確認できた。一方で、非分解性のポリエチレングリコール誘導体である化合物（ｐ１８）およびメトキシＰＥＧアミン４０ｋＤａにおいては、いずれも細胞内での分解はみられなかった。

産業上の利用可能性

[0250] 本発明の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体は、細胞の空胞を引き起こさない高分子量のポリエチレングリコール誘導体であり、生体関連

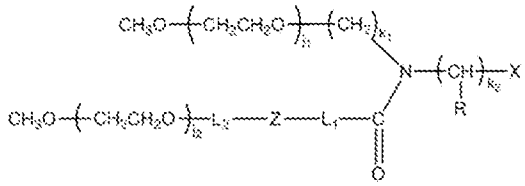
物質を修飾する用途に効果的に用いることができ、生体内の血中で安定であり、且つ細胞内で分解される。

[0251] 本出願は、日本で出願された特願２０１９－１７６２５１を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] 細胞内にて分解するオリゴペプチドを分子内に有する下式（１）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[化1]



式（1）

（式中、ｋ$_1$およびｋ$_2$はそれぞれ独立して１～１２であり、ｊ$_1$及びｊ$_2$はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～１２のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｚは細胞内の酵素で分解するオリゴペプチドであり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、Ｌ$_1$及びＬ$_2$はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。）

[請求項2] Ｚのオリゴペプチドが、システインを除く中性アミノ酸からなる２～８残基の分解性オリゴペプチドである請求項１記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項3] Ｚのオリゴペプチドが、Ｃ末端のアミノ酸にグリシンを有するペプチドである請求項１～２のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項4] Ｚのオリゴペプチドが、ハイドロパシー指標が２．５以上である疎水性のアミノ酸を少なくとも1つ有するオリゴペプチドである請求項１～３のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

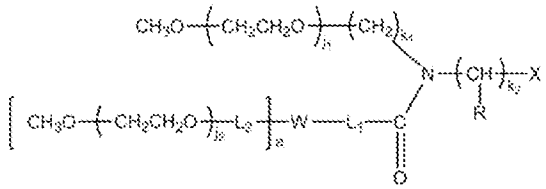
[請求項5] Ｌ$_1$及びＬ$_2$がそれぞれ独立して、単結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、２級アミノ基、ウレア結合、またはこれら結合および／または基を含んだアルキレン基である請

求項１～４のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項6] Ｘが活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレイミド基、ビニルスルホニル基、アクリル基、スルホニルオキシ基、カルボキシ基、チオール基、ジチオピリジル基、α－ハロアセチル基、アルキニル基、アリル基、ビニル基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基およびアジド基よりなる群から選択される、請求項１～５のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項7] 下式（２）で示される分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[化2]

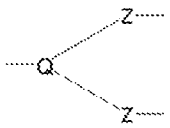


式（２）

（式中、k_1およびk_2はそれぞれ独立して１～１２であり、j_1及びj_2はそれぞれ独立して４５～９５０であり、Ｒは水素原子、置換もしくは置換されていない炭素数１～４のアルキル基、置換アリール基、アラルキル基またはヘテロアルキル基であり、Ｗはグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造の５～４７残基のオリゴペプチドであり、ａは２～８であり、Ｘは生体関連物質と反応可能な官能基であり、L_1及びL_2はそれぞれ独立して単結合もしくは２価のスペーサーである。）

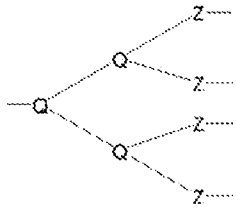
[請求項8] Ｗのグルタミン酸またはリジンを中心とした対称構造のオリゴペプチドが、以下のｗ１またはｗ２の構造を有するオリゴペプチドである請求項７記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[化3]



（ｗ１）

[化4]



（ｗ２）

（式中、Ｑはグルタミン酸またはリジンの残基であり、Ｚはシステインを除く中性アミノ酸からなる２～５残基の分解性オリゴペプチドである。）

[請求項9] Ｚの分解性オリゴペプチドが、Ｃ末端のアミノ酸としてグリシンを有するオリゴペプチドである請求項８の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項10] Ｚの分解性オリゴペプチドが、ハイドロパシー指標が２．５以上である疎水性の中性アミノ酸を少なくとも１つ有するオリゴペプチドである請求項８～９のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項11] L_1及びL_2がそれぞれ独立して、単結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、２級アミノ基、ウレア結合、またはこれらの結合および／または基を含んでいてもよいアルキレン基である請求項７～１０のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

[請求項12] Ｘが活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレイミド基、ビニルスルホニル基、アクリル基、スルホニルオキシ基、カルボキシ基

、チオール基、ジチオピリジル基、α－ハロアセチル基、アルキニル基、アリル基、ビニル基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基およびアジド基よりなる群から選択される、請求項７～１１のいずれか１項記載の分岐型の分解性ポリエチレングリコール誘導体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/036199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08G65/333(2006.01)i; C08G81/00(2006.01)i; C07K5/037(2006.01)i; C07K5/068(2006.01)i; C07K5/072(2006.01)i; C07K5/09(2006.01)i; C07K5/093(2006.01)i; A61K47/60(2017.01)i; A61K47/64(2017.01)i
FI: C08G65/333; C08G81/00; A61K47/60; A61K47/64; C07K5/037; C07K5/068; C07K5/072; C07K5/09; C07K5/093

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08G65/333; C08G81/00; C07K5/037; C07K5/068; C07K5/072; C07K5/09; C07K5/093; A61K47/60; A61K47/64

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-527581 A (NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION) 30 July 2009 (2009-07-30)	1-12
A	WO 2005/108463 A1 (NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION) 17 November 2005 (2005-11-17)	1-12
A	WO 2006/088248 A1 (NIPPON OIL & FATS CO., LTD.) 24 August 2006 (2006-08-24)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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	Date of mailing of the international search report
02 December 2020 (02.12.2020)	15 December 2020 (15.12.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/036199

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2009-527581 A	30 Jul. 2009	US 2010/0010158 A1	
		EP 2319542 A2	
		CA 2642905 A	
		KR 10-2008-0094961 A	
		CN 101420984 A	
		AU 2007216998 A	
		MX 2008010841 A	
		CN 103030801 A	
WO 2005/108463 A1	17 Nov. 2005	US 2008/0299069 A1	
WO 2006/088248 A1	24 Aug. 2006	US 2009/0023859 A1	
		EP 1857462 A1	
		NO 20074770 L	
		AT 536364 T	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/036199

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C08G 65/333(2006.01)i; C08G 81/00(2006.01)i; C07K 5/037(2006.01)i; C07K 5/068(2006.01)i; C07K 5/072(2006.01)i; C07K 5/09(2006.01)i; C07K 5/093(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i
FI: C08G65/333; C08G81/00; A61K47/60; A61K47/64; C07K5/037; C07K5/068; C07K5/072; C07K5/09; C07K5/093

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））

C08G65/333; C08G81/00; C07K5/037; C07K5/068; C07K5/072; C07K5/09; C07K5/093; A61K47/60; A61K47/64

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

CAplus/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	関連する請求項の番号
A	JP 2009-527581 A (ネクター セラピューティックス エイエル, コーポレイション) 30.07.2009 (2009-07-30)	1-12
A	WO 2005/108463 A1 (NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION) 17.11.2005 (2005-11-17)	1-12
A	WO 2006/088248 A1 (日本油脂株式会社) 24.08.2006 (2006-08-24)	1-12

☐ 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、一般的技術水準を示すもの
“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“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	国際調査報告の発送日
02.12.2020	15.12.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
中落　臣諭 4J 1202
電話番号 03-3581-1101 内線 3457

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/036199

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-527581 A	30.07.2009	US 2010/0010158 A1	
		EP 2319542 A2	
		CA 2642905 A	
		KR 10-2008-0094961 A	
		CN 101420984 A	
		AU 2007216998 A	
		MX 2008010841 A	
		CN 103030801 A	
WO 2005/108463 A1	17.11.2005	US 2008/0299069 A1	
WO 2006/088248 A1	24.08.2006	US 2009/0023859 A1	
		EP 1857462 A1	
		NO 20074770 L	
		AT 536364 T	