

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-174755

(P2008-174755A)

(43) 公開日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl.

C08G 65/329 (2006.01)

F1

C08G 65/329

テーマコード (参考)

4J005

審査請求 有 請求項の数 37 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2008-33703 (P2008-33703)
 (22) 出願日 平成20年2月14日 (2008.2.14)
 (62) 分割の表示 特願2001-529753 (P2001-529753)
 の分割
 原出願日 平成11年10月8日 (1999.10.8)

(71) 出願人 500321438
 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
 アメリカ合衆国アラバマ州35806-2
 902, ハンツヴィル, ディスカヴァリー
 ・ドライブ 490
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘテロ二官能性ポリエチレングリコール誘導体およびその調製方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】高純度および高収率で、ポリ(エチレングリコール)または関連ポリマーのヘテロ二官能性誘導体を調製する方法を提供する。

【解決手段】クロマトグラフィー精製段階を経ることなく、一方の末端に除去可能なW基を有する、式W-ポリ-OHを有する中間体ポリマーを提供でき、まず中間体ポリマーW-ポリ-OHを、最初にOH基を第一官能基Xに変換し、次いでWを除去して、第二のヒドロキシル基を生成することにより変化させ、次いで、後者のヒドロキシル基を、第二の官能基Yに変換し得、これによって、所望のヘテロ二官能性誘導体が得られる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 $X - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n \cdot \text{CO}_2 - \text{ポリ} b - X$ を有する二官能性ポリマー誘導体の調製方法であって、前記調製にはクロマトグラフィー工程を含まず、

前記式中、ポリ a およびポリ b は、水溶性の非ペプチドポリマーであり、これは同じであっても異なってもよく、 n は 0 ~ 6 であり、 R_5 は H またはアルキルであり、 X は官能基であり、

第一ポリマーが $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O} - \text{ポリ} b - \text{U}$ および第二ポリマーが $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O} - \text{ポリ} a - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO} - \text{V}$ で表され、 R_1 および R_2 は、H、アルキルまたは Ar であり、Ar は、フェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択され、U および V は、前記第一ポリマーが前記第二ポリマーと反応して、 $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O} - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2 - \text{ポリ} b - \text{OC}(\text{R}_1)(\text{R}_2) - \text{Ar}$ のポリマーを形成できるように選択された部分である、ポリマーを提供する工程と、

前記第一ポリマーを、前記第二ポリマーと反応させて、前記 $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O} - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2 - \text{ポリ} b - \text{OC}(\text{R}_1)(\text{R}_2) - \text{Ar}$ を形成する工程と、

$\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}$ - 部分を官能基に変換する工程とを含むことを特徴とする二官能性ポリマー誘導体の調製方法。

【請求項 2】

U は -OH であり、V はハロゲンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

X は OH である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

X は、 $\text{CH}_2 = \text{CR}_5\text{CO}_2 -$ であり、ここでの R_5 は H またはアルキルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

X は $-O - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}(\text{ZR})_2$ であり、ここでの R は H またはアルキルであり、Z は O または S であり、そして n は 1 ~ 6 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

X は $\text{NHS} - \text{O}_2\text{CO} -$ であり、NHS は N - スクシニミジル基である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

式 $\text{R}_8\text{O} - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2 - \text{ポリ} b - \text{Y}$ を有する二官能性ポリマー誘導体の調製方法であって、前記調製にはクロマトグラフィー工程を含まず、

前記式中、ポリ a およびポリ b は、水溶性の非ペプチドポリマーであり、これは同じであっても異なってもよく、n は 0 ~ 6 であり、 R_5 および R_8 は H またはアルキルであり、Y は官能基であり、第一ポリマーが $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O} - \text{ポリ} b - \text{U}$ および第二ポリマーが $\text{R}_8\text{O} - \text{ポリ} a - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO} - \text{V}$ で表され、 R_8 は H またはアルキルであり、 R_1 および R_2 は H、アルキルまたは Ar であり、Ar は、フェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリールおよびヘテロ環式アリールからなる群から選択され、U および V は、前記第一ポリマーが前記第二ポリマーと反応して、 $\text{R}_8\text{O} - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2 - \text{ポリ} b - \text{OC}(\text{R}_1)(\text{R}_2) - \text{Ar}$ のポリマーを形成できるように選択された部分である、ポリマーを提供する工程と、

前記第一ポリマーを、前記第二ポリマーと反応させて、前記 $\text{R}_8\text{O} - \text{ポリ} a - O - \text{CHR}_5(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2 - \text{ポリ} b - \text{OC}(\text{R}_1)(\text{R}_2) - \text{Ar}$ のポリマーを形成する工程と、 $\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}$ - 部分を官能基に変換する工程とを含むことを特徴とする二官能性ポリマー誘導体の調製方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

U は -OH であり、V は -Cl である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

Y は OH である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

Y は、 $\text{CH}_2 = \text{CR}_5\text{CO}_2$ - であり、ここでの R_5 は H またはアルキルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

Y は、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}(\text{ZR})_2$ であり、ここでの R は H またはアルキルであり、Z は O または S であり、そして n は 1 ~ 6 である、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 12】

$\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}-\text{PEG}-\text{OH}$ と $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ の混合物中の $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ の反応性を阻害する方法であって、ここで PEG は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n'}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であり、ここでの n' は 8 から 4000 であり、Ar は、フェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択された部分を示し、ここでの R_1 および R_2 は、H、アルキルまたは上記に定義した Ar であり、

前記混合物中の $\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}-\text{PEG}-\text{OH}$ および $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ をアルキル化して、 $\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}-\text{PEG}-\text{OR}_9$ および $\text{R}_9\text{O}-\text{PEG}-\text{OR}_9$ をそれぞれ形成する工程と、

20

$\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}$ - 部分を、-OH に、酸触媒加水分解または水素化分解により変換する工程と、

$\text{R}_9\text{O}-\text{PEG}-\text{OH}$ と不活性である $\text{R}_9\text{O}-\text{PEG}-\text{OR}_9$ の新しい混合物 (R_9 は、それぞれアルキル基または Ar を表し、Ar は、フェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される) を形成する工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

前記新しい混合物中の $\text{R}_9\text{O}-\text{PEG}-\text{OH}$ を $\text{R}_9\text{O}-\text{PEG}-\text{CHO}$ に変換することをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

ポリマーを、巨大分子にコンジュゲートする方法であって、

$\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}$ - ポリ-OH で表され、Ar は、フェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリールおよびヘテロ環式アリールからなる群から選択され、 R_1 および R_2 は、H、アルキルまたは Ar であり、Ar は上記に定義した通りであり、ポリは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(アルキレンオキシド)、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、およびポリ(アクリロイルモルホリン)からなる群から選択される、ポリマーを提供する工程と、前記-OH基を化学的に変換して、第一官能基を生成する工程と、第一巨大分子を、前記第一官能基に連結する工程と、 $\text{Ar}-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)\text{O}$ - 基を除去して、新しいヒドロキシル基を生成する工程と、前記新しいヒドロキシル基を第二官能基に変換する工程と、第二巨大分子を、前記第二官能基に連結する工程とを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 15】

前記第一および第二巨大分子は、タンパク質、脂質、多糖、オリゴヌクレオチド、および薬物からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ポリは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n'}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ により示され、 n' は 8 ~ 4000 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

ポリは、エチレンオキシドとプロピレンオキシドとのコポリマーである、請求項 14 に

50

記載の方法。

【請求項 18】

前記第一官能基は、

メシレート、トシレート、トレシレート、

- O - (CH₂)_n - CO₂H、ここで n は 1 ~ 6、

- O - (CH₂)_n - CO₂R₃、ここで n は 1 ~ 6、R₃ はアルキル基、- NHR₄、ここで R₄ は H またはアルキルまたはアミン保護基、

- O - (CH₂)_n - CH(ZR₅)₂、ここで n は 1 ~ 6 の整数、Z は O または S、R₅ は H またはアルキル基、

Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂ -、ここで Ar はフェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される部分を示し、

- O - (CH₂)_n - CHO、ここで n は 1 ~ 6、および、

- O₂CCH₂CH₂CO₂R₆、ここで R₆ は H または N - スクシニミジル基、からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記第二官能基は、

メシレート、トシレート、トレシレート、

- O - (CH₂)_n - CO₂H、ここで n は 1 ~ 6、

- O - (CH₂)_n - CO₂R₃、ここで n は 1 ~ 6、R₃ はアルキル基、- NHR₄、ここで R₄ は H またはアルキルまたはアミン保護基、

- O - (CH₂)_n - CH(ZR₅)₂、ここで n は 1 ~ 6 の整数、Z は O または S、R₅ は H またはアルキル基、

Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂ -、ここで Ar はフェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される部分を示し、

CH₂ = CH - CO₂ -、

- O - (CH₂)_n - CHO、ここで n は 1 ~ 6、および、

- O₂CCH₂CH₂CO₂R₆、ここで R₆ は H または N - スクシニミジル基、からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

20

30

【請求項 20】

前記第一官能基は、Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂ - であり、前記第二官能基は、- O - (CH₂)_n - CH(ZR₅)₂ であり、ここで n は、1 ~ 6 の数であり、Z は O または S であり、R₅ は H またはアルキル基である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第一官能基は Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂ - であり、前記第二官能基は - O - (CH₂)_n - CHO であり、ここで n は 1 ~ 6 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第一官能基は - O - (CH₂)_n - CH(ZR₅)₂ であり、ここで n は 1 ~ 6 の数であり、Z は O または S であり、R₅ は H またはアルキル基であり、前記第二官能基は - O₂CCH₂CH₂CO₂R₆ であり、ここで R₆ は H または N - スクシニミジル基である、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記第一官能基は CH₂ = CH - CO₂ - であり、前記第二官能基は - O - CH₂ - CO₂CH(CH₃)CH₂CO - NHS、ここで NHS は N - スクシニミジル基である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 24】

R - O - ポリ - R' 構造を有し、ポリが水溶性の非ペプチドポリマーを示し、R がアルキル又はアリール基を示し、R' が官能基を示すポリマー誘導体と、R - O - ポリ - O -

50

R構造を有し、ポリが水溶性の非ペプチドポリマーを示し、Rがアルキル又はアリール基を示すポリマー誘導体と、
の混合物を含むことを特徴とするポリマー組成物。

【請求項25】

前記ポリが、ポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項24に記載のポリマー組成物。

【請求項26】

前記Rが、メチル基であることを特徴とする請求項24または25に記載のポリマー組成物。

【請求項27】

前記R'が、ヒドロキシル基、メシレート、トシレート、トレシレート、

- O - CO₂R₃、ここでR₃はHアルキル基又はN-スクシニミジル基、

- O - (CH₂)_n - CO₂R₃ -、ここでnは1~6、R₃はH、アルキル基又はN-スクシニミジル基、

- NHR₄、ここでR₄はH、アルキル基またはアミン保護基、

- O - (CH₂)_n - CH(ZR₅)₂、ここでnは1~6、ZはOまたはS、R₅はHまたはアルキル基、

Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂ -、ここでArはフェニル、置換フェニル、ビフェニル、置換ビフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ多環式アリールからなる群から選択される部分を示し、

- O - (CH₂)_n - CHO、ここでnは1~6、

- O₂CCH₂CH₂CO₂R₆、ここでR₆はHまたはN-スクシニミジル基、

CH₂ = CH - CO₂ -、および、

- O - CH₂ - CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂ - NHS、ここでNHSはN-スクシニミジル基

からなる群から選択されることを特徴とする請求項24、25または26に記載のポリマー組成物。

【請求項28】

前記R'が、- O - CO₂R₃または- O - (CH₂)_n - CO₂R₃であることを特徴とする請求項24ないし27のいずれかに記載のポリマー組成物。

【請求項29】

R'が、- O - (CH₂)_n - CHOであることを特徴とする請求項24ないし27のいずれかに記載のポリマー組成物。

【請求項30】

前記ポリが、ポリエチレングリコールであり、前記Rがメチル基であり、前記R'が、- O - (CH₂)_n - CHO、ここでnは1~6、であることを特徴とする請求項24に記載のポリマー組成物。

【請求項31】

R - O - ポリ - M₁構造を有し、ポリが水溶性の非ペプチドポリマーを示し、Rがアルキル又はアリール基を示し、M₁がタンパク質、ペプチド、脂質、薬物および多糖類からなる群より選択される、共役ポリマーと、

R - O - ポリ - O - R構造を有し、ポリが水溶性の非ペプチドポリマーを示し、Rがアルキル又はアリール基を示すポリマー誘導体と、
の混合物を含むことを特徴とする共役ポリマー組成物。

【請求項32】

前記M₁が、巨大分子であることを特徴とする請求項31に記載の共役ポリマー組成物。

【請求項33】

前記ポリが、ポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項31または32に共役ポリマー組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

前記 R が、メチル基であることを特徴とする請求項 3 1、3 2 または 3 3 に記載の共役ポリマー組成物。

【請求項 3 5】

請求項 1 ないし 1 1 のいずれかの方法により調製されたヘテロ二官能性ポリマー誘導体。

【請求項 3 6】

請求項 1 4 ないし 2 3 のいずれかの方法により調製された共役ポリマー。

【請求項 3 7】

R₉ の各々が、メチル基である請求項 1 2 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘテロ二官能性ポリ(エチレングリコール)誘導体およびその調整方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリ(エチレンオキシド)略称(PEO)としても知られる、親水性ポリマーポリ(エチレングリコール)略称(PEG)の、分子および表面への共有結合的付着は、バイオテクノロジーおよび医学における重要な適用を有する。その最も一般的な形では、PEGは、各末端にヒドロキシル基を有する線形ポリマーである。

20

$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ この式は、 $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ として簡潔に示すことができ、 $-\text{PEG}-$ は、末端基を有さないポリマー骨格を示すと理解される。

$-\text{PEG}- = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ PEG は、メトキシ-PEG-OH、すなわち簡潔には mPEG して一般的に使用され、ここでは、一方の末端が、比較的不活性のメトキシ基であり、一方、他方の末端は、化学修飾を受けることのできるヒドロキシル基である。

$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$

【0003】

30

ポリ(エチレングリコール)すなわち PEG なる語は、上記の全ての形およびさらには他の形も示すまたは含むと当業者により理解される。

【0004】

エチレンオキシドとプロピレンオキシドのコポリマーは、その化学において PEG に密接に関連し、それらは、その多くの適用において PEG の代替が可能である。

$\text{HO}-\text{CH}_2\text{CHR}(\text{O}(\text{CH}_2\text{CHR}(\text{O}))_n\text{CH}_2\text{CHR}-\text{OH})$ R = H および CH_3

【0005】

PEG は、水溶性、並びに、多くの有機溶媒への溶解性の特性を有する有用なポリマーである。PEG はまた、無毒性で非免疫原性である。PEG を水不溶性化合物に化学的に付着すると、得られたコンジュゲートは一般に、水溶性、並びに、多くの有機溶媒に溶解性である。PEG が付着した分子が、薬物のように生物学的に活性である場合、この活性は、PEG の付着後も一般的に保持され、コンジュゲートは薬物動態の変化を示し得る。

40

例えば、Bentley ら、Polymer Preprints, 38(1), 584(1997) は、PEG に結合すると、水不溶性アンテミシニン(antemisinin)は水溶性となり、抗マラリア活性の増加を示すことを実証した。Davis らは、米国特許第 4,179,337 号で、PEG に結合したタンパク質は、腎クリアランスの減少および免疫原性の減少から、血液循環寿命の増強を示すことを示した。PEG に毒性がないこと、および、生体からのその迅速なクリアランスは、医薬適用において有利である。

【0006】

PEG 化学の適用はより洗練されてきたので、ヘテロ二官能性 PEG、すなわち、異なる

50

る末端基を有する PEG : X - PEG - Y (ここでの X および Y は異なる基である) の需要は増加している。骨格エステル基および末端基 X および Y を有する PEG : X - PEG - CO₂ - PEG - Y は、骨格内の各 PEG 単位が非対称に置換されているので、X および Y が同じであってもヘテロ二官能性であると考えることができる。

【0007】

適切な官能基を有する前記ヘテロ二官能性 PEG を使用して、PEG を、表面または他のポリマー、例えば多糖またはタンパク質に連結し得、他の末端は、例えば、薬物、リボソーム、別のタンパク質、またはバイオセンサーに付着している。一方の末端がポリマーに結合し、他方の末端が適切な官能基に結合している場合、架橋による有用なヒドロゲルの形成が生じ得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、既存の方法を使用して、ヘテロ二官能性 PEG を高純度で調製することは困難または不可能であることが多い。例えば、以下の反応を、等モル量の各試薬を使用して、示したヘテロ二官能性 PEG アセタール生成物を調製することを目標に実施できる：

$$\text{HO-PEG-OH} + \text{ClCH}_2\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2 + \text{NaOH} \rightarrow \text{HO-PEG-OCH}_2\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2 + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$$
 しかし、実践的には、いくつかの二置換 PEG ジエチルアセタール (C₂H₅O)₂CH₂O-PEG-OCH₂CH(OC₂H₅)₂ も必然的に形成され、いくらかの未反応 PEG も残るだろう。面倒なクロマトグラフィーがこの混合物の分離に必要である。

【0009】

クロマトグラフィーアプローチを Zalipsky (Bioconjugate Chemistry, 4: 296~299, 1993) が使用し、以下のヘテロ二官能性 PEG 誘導体：HO-PEG-CONHCH₂CO₂H を、未反応 PEG および二置換カルボン酸誘導体も含む反応生成物の混合物から精製した。

【0010】

特定の適用において、最小量の HO-PEG-OH が、モノ官能性活性化 PEG の調製に使用するモノアルキル PEG に存在することが必須である。なぜなら、HO-PEG-OH の存在により、架橋生成物をもたらす、二重に活性化された PEG 誘導体を得られるか、または他の望ましくない効果を有するからである。事実、HO-PEG-OH は、モノアルキル PEG における一般的な混入物質である。トリチル (Ph₃C-誘導体) を形成し、誘導体をクロマトグラフィーにより分離し、そして CH₃O-PEG-OCPh₃ からトリチル基を除去することにより、CH₃O-PEG-OH を HO-PEG-OH から分離する、クロマトグラフィーアプローチが、米国特許第 5,298,410 号に開示されている。近年の特許出願、Suzawara (WO 第 96/35451 号) は、ベンジル PEG (C₆H₅-CH₂-OPEG-OH) を、一方の末端に標的細胞に親和性を有する基を有し、他方の末端に毒素を有する、ヘテロ二官能性 PEG の調製における中間体として開示している。しかし、ベンジル PEG は、PEG のベンジル化、次いで骨の折れる徹底的な勾配クロマトグラフィーによりベンジル PEG をジベンジル PEG および未反応 PEG から分離することにより調製した。手順は、小規模で実施し、収率は僅か 7.8% であった。従って、この方法は、商業的な製造にはほとんど有用ではない。

【0011】

二官能性 PEG を調製するための、第二の戦略である重合化アプローチは、エチレンオキシドのアニオン X-へのアニオン性重合を含み、この X-は最終的にポリマーの末端基となる。

10

20

30

40

【化 1】



この方法は、Yokoyamaら (Bioconjugate Chemistry, 3: 275~276, 1992) により、一方の末端にヒドロキシル基を有し、他方にアミノ基を有する PEG の調製に使用されている。Cammara (Bioconjugate Chemistry, 6: 226~230, 1995) は、この方法を使用して、一方の末端にアミノ基を有し、他方にヒドロキシルまたはメトキシ基を有する PEG を調製した。それは、Nagasakiら (Bioconjugate Chemistry, 6: 231~233, 1995) により、一方の末端にホルミル基を有し、他方にヒドロキシル基を有する PEG の調製に使用されている。この方法は、一般に、X が重合を開始するのに適切で望ましい基である場合にのみ有用であり；そうではない場合が多い。また、この方法の成功裡の適用には、HO-PEG-OH の形成を防ぐために厳密な水の除外が必要であり、この問題は、分子量が増加するにつれより深刻となる。また、所望の分子量の PEG 誘導体を得るためには重合度を注意深く制御することが必要である。この方法は、エチレンオキシド重合を直接薬物分子上に実施する場合には、過酷な重合条件下における多くのタイプの薬物分子の分解により制限される。この方法はまた、重合が起こり得る、2 つ以上の官能基が存在する場合には、選択性の欠如により制限される。

10

20

【0012】

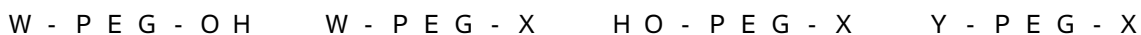
以前の方法の少なくともいくつかの問題および欠点を実質的に排除する、ヘテロ二官能性 PEG を調製するための追加の方法を提供することが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、一方の末端に除去可能な基を有する PEG 中間体を介して、ヘテロ二官能性ポリ(エチレングリコール)誘導体を調製する方法を提供する。W-PEG-OH (ここで、W は、温和な化学的方法により除去可能な基である) のクラスの PEG 誘導体が提供され、最初に、OH 基を所望の基 X に修飾し、ついで W を除去して第二のヒドロキシル基を作成することにより変化させる。次いで、後者のヒドロキシル基を、さらに第二の官能基 Y に変化させ得、よって、所望の二官能性 PEG が提供される：

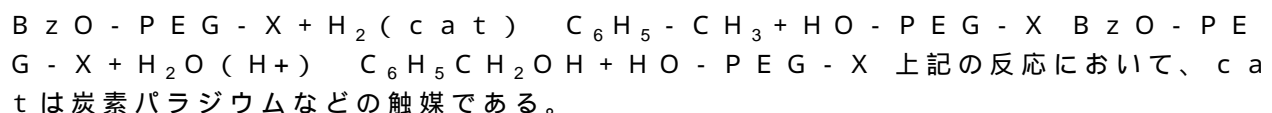
30



【0014】

好ましい除去可能な基は、ベンジルオキシ基 (C₆H₅CH₂-O-) であるが、4-メチルベンジル、3-メチルベンジル、4-クロロベンジル、4-メトキシベンジル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、または 1-ナフチルメチルを含むがこれに限定されない、他のアリールメチル基も使用し得る。ジアリールメチルおよびトリアリールメチル基でもよい。ベンジルオキシ-PEG-OH (BzO-PEG-PH) は、例えば、高純度で、エチレンオキシドの、ベンジルオキシドイオン BzO-への重合により調製し得る。注意深く制御した無水条件下で反応を実施することにより、ヘテロ二官能性誘導体生成物は、最少量の HO-PEG-OH でもって調製し得る。ベンジルおよび他のアリールメチル基の利点は、それらが、比較的温和な条件下で触媒的水素化分解により、または酸触媒加水分解により除去し得るということである。

40



【0015】

50

本発明の1つの実施形態において、この方法は、PEGまたは関連ポリマーを、タンパク質、脂質、多糖または他のポリマーなどの巨大分子または表面にコンジュゲートするのに使用する。最初に、即座のBzO-PEG-OHのヒドロキシル基を、第一の反応性官能基に変換する。この反応性官能基により、BzO-PEG-の巨大分子への付着が可能となる。次いで、ベンジル基を、巨大分子に化学的に影響を及ぼすことなく、水素化分解または加水分解により除去し、従って、PEG誘導体上に新しい末端ヒドロキシル基が利用可能となる。この新しいヒドロキシル基を直接使用して、PEG誘導体の末端を、同じまたは別の巨大分子に付着し得る。別法として、ヒドロキシル基は、さらに、第二の反応性官能基に変換し得、次いでこれを使用してPEG誘導体を巨大分子に連結する。第二の反応性官能基が別のポリマーに連結されると、ヒドロゲルとして有用な架橋ポリマーを作成し得る。反応スキームは、以下のように一般的な形で説明され得る：

- (1) BzO-PEG-OH BzO-PEG-X (X = 反応性官能基)
 (2) BzO-PEG-X BzO-PEG-M1 (M1 = 巨大分子、例えば表面、薬物、タンパク質、またはポリマー)
 (3) BzO-PEG-M1 + H₂ (Pd/C) BzH + HO-PEG-M1 または BzO-PEG-M1 + H₂O / H⁺ BzOH + HO-PEG-M1 (4) HO-PEG-M1 M2-PEG-M1 (M2 = 巨大分子、例えば表面、薬物、タンパク質、またはポリマー、またはM1上の異なる部位)

【0016】

所望であれば、反応の配列順序を、水素化または加水分解に感受性の化学基の破壊を回避するように操作できる。

- (1) Bz-PEG-OH Bz-PEG-X (2) BzO-PEG-X BzO-PEG-M2 (M2 = 薬物、表面、ポリマー、または、水素化または加水分解に感受性でない他の基)
 (3) BzO-PEG-M2 + H₂ (Pd/C) BzH (またはBzOH) + HO-PEG-M2 BzO-PEG-M2 + H₂O / H⁺ BzH (またはBzOH) + HO-PEG-M2 (4) HO-PEG-M2 M1-PEG-M2 (M1 = 薬物、表面、ポリマー、または、水素化または加水分解に感受性である他の基)

【0017】

本発明の別の実施形態において、W-O-PEG-OHとHO-PEG-OHの混合物中のHO-PEG-OHの反応性を阻害する方法が開示される。このアプローチでは、HO-PEG-OHを含むW-O-PEG-OHのアルキル化は、W-O-PEG-ORとRO-PEG-ORの混合物を生じ、ここでのRはアルキル基である。

BzO-PEG-OH + HO-PEG-OH + R-X BzO-PEG-OR + RO-PEG-OR + HX Xは、メシレートまたはトシレートなどの脱離基である。

触媒的水素化により、BzO-PEG-ORはRO-PEG-OHに変換される。

BzO-PEG-OR + RO-PEG-OR + H₂ (Pd/C) RO-PEG-OH + RO-PEG-OR + BzH 従って、RO-PEG-OHとRO-PEG-ORの混合物が生じる。

HO-PEG-OHとは異なり、RO-PEG-ORは不活性で非反応性である。従って、この混合物は、大半の化学反応でRO-PEG-OHの純粋な生成物に等価である。

【0018】

前記および本発明の他の目的、利点および特徴、並びにそれを行なう方法は、以下の本発明の詳細な説明を考慮すれば、より容易に明らかとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は、高純度で高収率のポリ(エチレングリコール)または関連ポリマーのヘテロ二官能性誘導体を提供する。本方法ではクロマトグラフィーでの精製工程は必要ない。本発明の方法によれば、一方に除去可能な基Wを保有するW-ポリ-OHを有する中間体ポリマーが得られる。中間体ポリマーW-ポリ-OHは、最初にOH基の第1の官能基Xへ

10

20

30

40

50

の改変後、Wが除去されて第2の水酸基が得られる。後者の水酸基を、第2の官能基Yにさらに変換することができるので、所望のヘテロ二官能性誘導体が得られる。



【0020】

以下の考察では、Polyは、しばしば便宜上PEGまたはポリ（エチレングリコール）という。しかし、他の関連ポリマーもまた本発明の実施に有用であり、用語PEGまたはポリ（エチレングリコール）に含まれるが、この点では含まれないと理解すべきである。

【0021】

ポリ（エチレングリコール）またはPEGは、非常に望ましい性質を有し、一般に生物学または生物工学への適用が一般に承認されているために生物学への適用に有用である。PEGは典型的には、無色透明、水溶性、熱安定性、多数の化学薬品に不活性で、加水分解または変質せず、無毒である。ポリ（エチレングリコール）は、生体適合性を示す（すなわちPEGは生きている組織または器官と害を与えず共存できる）と考えられている。より詳細には、PEGは免疫原性を示さない（すなわち、PEGは体内で免疫応答を起こす傾向がない）。体内でいくつかの所望の機能を有する部分と結合した場合、PEGはその部分をマスクする傾向があり、器官がその部分の存在に耐性を示すように任意の免疫応答を減少または消滅させることができる。したがって、本発明のヘテロ二官能性誘導体は、実質的に無毒であり、免疫応答も凝固または他の望ましくない効果も実質的に起こさないはずである。

【0022】

式 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ （式中、nは約8～4000である）を有するPEGは、本発明の実施における有用なポリマーの1つである。PEG以外の他の二官能価で水溶性の非ペプチドポリマーもまた本発明に有用である。これらの他のポリマーには、ポリ（ビニルアルコール）（「PVA」）；他のポリ（アルキレンオキシド（ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）など）；およびポリ（オキシエチル化ポリオール（ポリ（オキシエチル化グリセロール）、ポリ（オキシエチル化ソルビトール）、およびポリ（オキシエチル化グルコース）など）が含まれる。ポリマーは、ホモポリマーまたは無作為もしくはブロックコポリマーおよび上記ポリマーのモノマーを基本単位とする直鎖もしくは分岐ターポリマーであり得る。

【0023】

適切なさらなるポリマーの特定の例には、ポリ（オキサゾリン）、二官能価ポリ（アクリロイルモルホリン）（「PACM」）、およびポリ（ビニルピロリドン）（「PVP」）が含まれる。PVPおよびポリ（オキサゾリン）は当該分野で周知のポリマーであり、その調製は当業者に容易であるはずである。PACMおよびその合成ならびに使用は米国特許第5,629,384号および同第5,631,322号（その内容全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

【0024】

用語「基」、「官能基」、「部分」、「活性部分」、および「活性部位」は全て化学分野で幾らか同義語であり、当該分野で使用されており、本明細書中では分子の識別および定義可能な部分および幾らかの機能または活性を示す単位をいい、他の分子または分子の一部と反応性を示す。

【0025】

用語「結合」は、通常化学反応の結果として形成される基をいうために使用し、典型的には共有結合である。

【0026】

「薬物」は、ヒトおよび他の動物の実感の診断、治癒、緩和、治療、または予防を意図するか身体または精神の健康を向上させる任意の物質と理解すべきである。

【0027】

10

20

30

40

50

用語「高分子」を、脂質、多糖類、タンパク質、ヌクレオチド配列、薬物、ポリマーなどを含むがこれらに限定されない巨大分子を意味するために使用する。しばしば上記ポリマーとこのような高分子とを包含することが望ましい。

【0028】

本発明によれば、除去可能な基Wを、穏やかな化学反応によってポリマーW - Poly - Xから除去することができる。ポリマーW - Poly - Xの他の部分（特に、第1の官能基X）望ましくない改変を起こさない条件下でこのような化学反応を行うことができる。好ましくは、Wは式Ar - C(R1)(R2) - O - (式中、Arは、フェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される部分を示し、R1およびR2はH、アルキル、または上記定義のArである)を有する。したがって、除去可能な基Wの例には、ベンジルオキシ基(C₆H₅CH₂O)および他のアリールメチルオキシ基(4-メチルベンジルオキシ、3-メチルベンジルオキシ、4-クロロベンジルオキシ、4-メトキシベンジルオキシ、ジフェニルメチルオキシ、トリフェニルメチルオキシ、および1-ナフチルメチルオキシが含まれるこれらに限定されない)が含まれるが、これらに限定されない。アリールメチルオキシ基を、触媒による水素化分解または酸触媒加水分解によって比較的穏やかな条件下でポリマーから除去することができる。

10

【0029】

本発明によれば、W - ポリ - OHを例えば、適切なポリマーのモノマーのアリールメチルオキシドへの重合に異よって合成することが望ましい。例えば、ベンジルオキシ - PEG - OH(BzO - PEG - OH)を、エチレンオキシドのベンジルオキシイオンBzO⁻への重合によって高純度および高収率で調製することができる。好ましくは、無水条件下で重合反応を行う。本発明のこの態様によれば、HO - PEG - OHの生成は最小である。広範な勾配クロマトグラフィー精製は必要ではなく、BzO - PEG - OHの収率は高い。これは、PEGのベンジル化後の骨の折れる広範囲勾配のクロマトグラフィーを行うコスト高および低収率を回避不可能な量産価値のほとんどない方法である先行技術とは対照的である。

20

【0030】

本発明によれば、ポリ(エチレングリコール)または関連ポリマーのヘテロ二官能性誘導体の最終生成物は式Y - Poly - Xを有する。第1の官能基Xおよび第2の官能基YはPEG誘導体が例えば他の高分子(タンパク質、脂質、他党、および他のポリマーが含まれるが、これらに限定されない)と包含することが望ましい他の分子と反応することができる反応部分である。第1の官能基Xの例には、メシレート；トシレート；トレシレート、O(CH₂)_nCO₂H(式中、n = 1 ~ 6)、O(CH₂)_nCO₂R₃(式中、n = 1 ~ 6であり、R₃はアルキル基である)、NHR₄(式中、R₄はHまたはアルキルまたはt - BocおよびFmocなどのアミン保護基)；O(CH₂)_nCH(ZR₅)₂(式中、nは1 ~ 6の数字であり、ZはOまたはSであり、R₅はHまたはアルキル基である)；Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂(式中、Arは、フェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される部分を示す)；- O - (CH₂)_n - CHOおよび - O₂CCH₂CH₂CO₂R₆(式中、R₆はHまたはNスクシニミジルを示すNHSである)が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0031】

第2の官能基Yの例には、水酸基；メシレート；トシレート；トレシレート、O(CH₂)_nCO₂H(式中、n = 1 ~ 6)、O(CH₂)_nCO₂R₃(式中、n = 1 ~ 6であり、R₃はアルキル基である)、NHR₄(式中、R₄はHまたはアルキルまたはt - BocおよびFmocなどのアミン保護基)；O(CH₂)_nCH(ZR₅)₂(式中、nは1 ~ 6の数字であり、ZはOまたはSであり、R₅はHまたはアルキル基である)；Ar - CH = CH - CH = CH - CO₂(式中、Arは、フェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる

50

群から選択される部分を示す) ; $-O-(CH_2)_n-CHO$ および $-O_2CCH_2CH_2CO_2R_6$ (式中、 R_6 は H または N スクシニミジルを示す NHS である) ; および $CH_2=CH-CO_2-$ が含まれるが、これらに限定されない。式 $Y-Poly-X$ のポリ(エチレングリコール)誘導体では、第1の官能基 X および第2の官能基 Y は互いに異なることが好ましいので、ヘテロ二官能価であることが裏付けられている。

【0032】

X が $Ar-CH=CHCH=CH-CO_2$ (Ar は上記のように定義) であり、Y が $-O-(CH_2)_n-CHO$ または $O(CH_2)_nCH(ZR_5)_2$ (式中、 n は 1 ~ 6 の数字であり、Z は O または S であり、 R_5 は H またはアルキル基である) であることが好ましい。X が $O(CH_2)_nCH(ZR_5)_2$ (式中、 n は 1 ~ 6 の数字であり、Z は O または S であり、 R_5 は H またはアルキル基である) である場合、Y は $-O_2CCH_2CH_2CO_2R_6$ (式中、 R_6 は H または NHS である) であることが好ましい。X が $OCH_2CO_2CH(CH_3)CH_2CONHS$ である場合、第2の官能基 Y は $CH_2=CHCO_2$ であることが好ましい。

10

【0033】

本方法の反応スキームは上記で式： $W-Poly-OH$ $W-Poly-X$ H
 $O-Poly-X$ $Y-Poly-X$ と示しているにもかかわらず、式中の任意の2つの生成物の間に1つを超える化学反応工程が存在し得ると理解すべきである。例えば、 $W-Poly-OH$ の末端の水酸基を第1の官能基 X に変換するためにいくつかの連続反応が起こり得る。同様に、いくつかの反応工程を行って、 $HO-Poly-X$ の新規の水酸基を改変して第2の官能基 Y を得ることができる。

20

【0034】

さらに、本発明の1つの実施形態では、除去可能な基 W の除去工程前に、ポリマー $Y-Poly-X$ を高分子表面上で第1の反応性官能基 X と適切な部分との間で形成された結合によって高分子または表面に結合することができる(したがって、ポリマーの $W-Poly-$ 部分と高分子との抱合： $W-Poly-M_1$ (M_1 は、タンパク質、ペプチド、脂質、薬物、多糖類、もしくは他のポリマー、または物質(例えば、微生物)の表面などの高分子))。抱合体 $W-Poly-M_1$ 中の除去可能な基 W は、その後穏やかな化学反応(例えば、触媒による水素化分解または酸触媒加水分解など)によって除去される。得られた $-OH$ は、例えば、別の高分子 M_2 (など、タンパク質、ペプチド、脂質、薬物、多糖類、もしくは他のポリマー、または物質(例えば、微生物)の表面など)と直接反応して、 $M_2-Poly-M_1$ を形成することができる。別の高分子への抱合が好ましい場合、 $-OH$ 基は任意選択的に例えばアルキル化によってキャップされた不活性の非反応性基に変換することができる。あるいは、得られた OH 基を上記の反応性官能基 Y に変換することができる： $Y-Poly-M_1$ 。次いで、官能基 Y を M_2 と反応させて $M_2-Poly-M_1$ を形成することができる。

30

(1) $WPolyOH \rightarrow WPolyX$ (X = 反応性官能基)

(2) $WPolyX \rightarrow WPolyM_1$ (M_1 = 例えば、表面、薬物タンパク質、またはポリマーなどの高分子)

(3) $WPolyM_1 + H_2(Pd/C) \rightarrow WH + HOPolyM_1$ または $WPolyM_1 + H_2O/H^+ \rightarrow WOH + HOPolyM_1$

40

(4) $HOPolyM_1 + Y_2 \rightarrow Y_2PolyM_1$

(5) $YPolyM_1 + M_2 \rightarrow M_2PolyM_1$ (M_2 = 例えば、表面、薬物、タンパク質、もしくはポリマーなどの高分子または M_1 上の異なる部位)

【0035】

本方法において、PEG 関連ポリマー $Poly$ による複数の異なる高分子の架橋によってヒドロゲルを作製することができる。しかし、本発明により、2つの官能基 X および Y を同一の高分子に結合させることができ、これにより高分子上での PEG 関連ポリマーの抱合により高分子上にポリマーの殻を形成できると理解すべきである。

【0036】

50

本発明の別の実施形態では、上記のように作製されたPEGまたは関連ポリマーのヘテロ二官能性誘導体 $Y - Poly - X$ は、高分子または他の物質上での官能基 X および Y ならびに反応部分を介して高分子または他の分子と反応することができる。例えば、 X および Y を、異なる型の高分子または他の物質がそれぞれ X および Y に結合するように選択することができる。同一の型の高分子と反応するように X および Y を選択することも可能である。

【0037】

本発明の別の態様によれば、ポリ(エチレングリコール)または関連ポリマーのヘテロ二官能性誘導体を得られる。このようなポリマーを、式 $Y - Poly - X$ (式中、 $Poly$ は、上記定義のポリ(エチレングリコール)または関連化合物を示す)と示す。 X および Y は、メシレート; トシレート; トレシレート、 $O(CH_2)_nCO_2H$ (式中、 $n = 1 \sim 6$)、 $O(CH_2)_nCO_2R_3$ (式中、 $n = 1 \sim 6$ であり、 R_3 はアルキル基である)、 NHR_4 (式中、 R_4 は H またはアルキルまたは $t - Boc$ および $Fmoc$ などのアミン保護基); $O(CH_2)_nCH(ZR_5)_2$ (式中、 n は $1 \sim 6$ の数字であり、 Z は O または S であり、 R_5 は H またはアルキル基である); $Ar - CH = CH - CH = CH - CO_2$ (式中、 Ar は、フェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールからなる群から選択される部分を示す); $-O - (CH_2)_n - CHO$ および $-O_2CCH_2CH_2CO_2R_6$ (式中、 R_6 は H または NHS であり、 n は $1 \sim 6$ である) からなる群から選択される反応性官能基である。好ましくは、 X と Y は異なる。

10

20

【0038】

いくつかの実施形態では、 X が $Ar - CH = CH - CH = CH - CO_2$ (Ar は上記のように定義)である場合、 Y は $-O - (CH_2)_n - CHO$ または $O(CH_2)_nCH(ZR_5)_2$ (式中、 n は $1 \sim 6$ の数字であり、 Z は O または S であり、 R_5 は H またはアルキル基である)であることが好ましく、 X が $O(CH_2)_nCH(ZR_5)_2$ (式中、 n は $1 \sim 6$ の数字であり、 Z は O または S であり、 R_5 は H またはアルキル基である)である場合、 Y は $-O_2CCH_2CH_2CO_2R_6$ (式中、 R_6 は H または NHS である)であることが好ましく、 X が $OCH_2CO_2CH(CH_3)CH_2CONHS$ である場合、第2の官能基 Y は $CH_2 = CHCO_2$ であることが好ましい。

30

【0039】

さらに別の態様では、式 $XPolyaOCHR_5(CH_2)_nCO_2PolybX$ (式中、 $Polya$ および $Polyb$ は、上記の $Poly$ によって示される同一の型のポリマーを示し、 n は $0 \sim 6$ であり、 R_5 は H またはアルキルであり、 X は反応性官能基である)を有するポリ(エチレングリコール)または関連ポリマーの調製法を提供する。ヘテロ二官能性誘導体の実質的に純粋な形態を、クロマトグラフィー精製工程に依存することなく高純度且つ高収率で作製することができる。

【0040】

本方法では、式 $ArC(R_1)(R_2)OPolybU$ の第1のポリマーおよび式 $ArC(R_1)(R_2)OPolya - CHR_5(CH_2)_nCO - V$ の第2のポリマー(式中、 R_1 および R_2 は H 、アルキル、または Ar (Ar は、フェニル、置換フェニル、ピフェニル、置換ピフェニル、多環式アリール、置換多環式アリール、およびヘテロ環式アリールである)であり、 U および V は第1のポリマーが第2のポリマーと反応して $ArC(R_1)(R_2)OPolyaOCHR_5(CH_2)_nCO_2PolybOC(R_1)(R_2) - Ar$ のポリマーを形成するように選択した部分である)が得られる。上記のように、第1のポリマーおよび第2のポリマーを、アリルメチルオキシドイオン $ArC(R_1)(R_2)O -$ から生成物 $ArC(R_1)(R_2)O - Poly - OH$ または $ArC(R_1)(R_2)O - Polyb - OH$ と $Polyb$ および $Polya$ との個別の反応、および任意選択的に2つのポリマーが例えばエステル結合によって結合するようなその後の末端水酸基の部分 U および V への個別の改変によって作製することができる。次いで、結合したポリマーを、触媒による水素化分解または酸触媒加水分解による $ArC(R_1)(R_2)O -$ 部分の除去により改

40

50

変することができる。得られたOH基を、任意選択的に他の反応性官能基に変換することができる。反応性官能基Xの例には、 $-OH$ ； $CH_2 = CR_5CO_2$ （式中、 R_5 はHまたはアルキルである）； $O(CH_2)_nCH(ZR)_2$ （式中、 R_5 はHまたはアルキルであり、ZはOまたはSであり、nは1～6である）； $NHS-O_2CO-$ （式中、 NHS はN-スクシニミジルを示す）が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、Uは $-OH$ であり、Vは $-Cl$ などのハロゲン基である。

【0041】

本発明のさらに別の態様では、式 $R_8OPolyOCHR_5(CH_2)_nCO_2PolybY$ （式中、 $Polya$ 、 $Polyb$ 、 n 、 R_5 は、上記定義の通りであり、 R_8 はHまたはアルキル基である）を有するポリ（エチレングリコール）または関連ポリマーの調製法を提供する。Yは反応性官能基である。本方法は、クロマトグラフィー工程が必要ない。本方法では、上記のように $ArC(R_1)(R_2)OPolybU$ の第1のポリマーが得られる。10
 $R_8OPolya-CHR_5(CH_2)_nCO-V$ （ R_8 はHまたはアルキル基であるか、 Ar （式中、 Ar は上記定義の通り））の第2のポリマーも得られる。第1のポリマーが第2のポリマーと結合して $R_8OPolyaOCHR_5(CH_2)_nCO_2PolybOC(R_1)(R_2)-Ar$ のポリマーを形成するように、部分UおよびVは互いに反応して、例えば、エステル結合を形成することができる。次いで、 $ArC(R_1)(R_2)O-$ 部分を、所望の官能基に変換することができる。好ましくは、Uは $-OH$ であり、Vは $-Cl$ などのハロゲン基である。Yは、 $-OH$ ； $CH_2 = CR_5CO_2$ （式中、 R_5 はHまたはアルキルである）； $O(CH_2)_nCH(ZR)_2$ （式中、 R はHまたはアルキルであり、ZはOまたはSであり、nは1～6である）；および $-O-(CH_2)_n-CO_2H$ （式中、nは1～6である）などの官能基であり得る。20

【0042】

本発明のさらに別の態様によれば、 $HO-Poly-OH$ の反応性を有するポリマーの汚染のない $R_9O-Poly-OH$ のポリマーの作製法を提供する。 $Poly$ は上記に定義した通りであり、 R_9 アルキル基またはアリアル基である。は当該分野で開示のように、PEG誘導体の調製由来の $HO-PEG-OH$ などの $HO-Poly-OH$ の除去には、通常、例えばクロマトグラフィーを使用した広範で骨の折れる精製工程が必要である。本発明の方法は、その必要がない。本方法では、 $ArCR_1R_2OPolyOH$ を、最初にアリールメチルオキシオン $ArCR_1R_2O-$ 上へのポリマー $Poly$ の形成によって合成する。30
 次いで、 $ArCR_1R_2OPolyOH$ をアルキル化してポリマー $Ar-CR_1R_2-OPEGOR_9$ に変換する。 $HO-Poly-OH$ の任意の不純物を、アルキル化の際に $R_9OPEGOR_9$ に変換する。次の工程は、酸触媒加水分解または水素化分解によって $ArCR_1R_2O$ 部分を $-OH$ に変換し、 $R_9O-PEG-OH$ と $R_9O-PEG-OR_9$ との新規の混合物を形成することである。 $R_9O-PEG-OR_9$ はほとんどの化学反応に不活性であるので、混合物は、純粋な $R_9O-PEG-OH$ と化学的に等価である。任意選択的に、 $R_9O-PEG-OH$ を $R_9O-PEG-CHO$ にさらに変換することができる。

【実施例】

【0043】

以下の実施例は本発明を例示するために記載するが、本発明の限定と解釈すべきではない。40

実施例1． $HOPEGNH^{3+}Cl-$ の合成

実施例2． $HOPEG OCH_2CO_2H$ の合成

実施例3． $Cl-H_3N+PEGOCH_2CO_2H$ の合成

実施例4． $Cl-H_3N+PEGOCH_2CH_2CO_2H$ の合成

実施例5． $C_6H_5CH=CHCH=CHCO_2PEGOCH_2CH(OC_2H_5)_2$ の合成

実施例6． $NHSO_2COPEGOCH_2CO_2PEGO_2CO_2NHS$ （ $NHS = Nsuccinimidy l$ ）の合成

実施例7． $CH_2=CHCO_2PEGOCH_2CO_2PEGO_2CCH=CH_2$ の合成

実施例8． $CH_3OPEGOCH_2CH_2CO_2PEGOH$ の合成

10

20

30

40

50

実施例 9 . $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{COOPEGOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ の合成

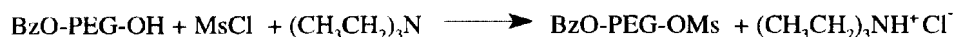
実施例 10 . $\text{CH}_2=\text{CHCO}_2\text{PEGOCH}_2\text{CO}_2\text{PEGOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_2$ の合成

実施例 11 . BzOPEGOH と HOPEGOH との混合物から HOPEGOH を含まない CH_3OPEGOH を調製するためのアルキル化の適用

【0044】

実施例 1 $\text{HOPEGNH}_3^+\text{Cl}^-$ の調製反応：

【化2】



10



【0045】

a) BzOPEGOM の調製： BzOPEGOH ($\text{MW} = 3400$, 34g , 10mmol) の 150ml のトルエン溶液を、窒素下で2時間共沸し、溶液を室温に冷却した。この溶液に 40ml の乾燥塩化メチレンおよび 2.1ml の乾燥トリエチルアミン (15mmol) を添加した。溶液を氷浴中で冷却し、 1.2ml の乾燥メシルクロリド (15mmol) を滴下した。溶液を窒素下、室温で一晩攪拌し、 2ml の無水エタノールの添加によって反応を停止させた。混合物を減圧蒸発させて特にトルエン以外の溶媒を除去し、濾過し、再び減圧濃縮し、 100ml のエチルエーテル中で沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。収量は 34g (100%) であった。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): (3.5 (br m, PEG), 4.31 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$), 7.49 (s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$), 7.33 (s + complex mult., $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$))。

20

【0046】

b) BzOPEGNH_2 の調製： BzOPEGOMs (25g , 7.35mmol) を、 5g の塩化アンモニウムを含む 500ml のアンモニア水に溶解し、溶液を室温で72時間攪拌した。次いで、溶液を塩化メチレンで3回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧濃縮し、生成物を 100ml のエチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。収量： 23g (92%)。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): (3.5 (br m, PEG), 2.9 (t, CH_2NH_2), 4.49 (s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$), 7.33 (s + complex mult., $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$))。

30

【0047】

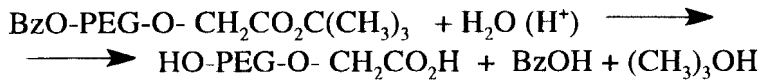
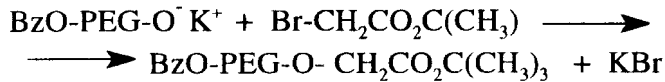
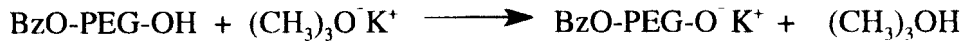
c) $\text{HOPEGNH}_3^+\text{Cl}^-$ の調製： BzOPEGNH_2 (46g , 14mmol) の 200ml 濃 HCl (12M) 溶液を、室温で44時間攪拌した。次いで、これを水で 1200ml に希釈し、 NaCl を添加して 15% 溶液とした。水溶液を塩化メチレンで3回抽出し、合わせた抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧濃縮し、エーテルの添加によって生成物を沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥した。収量： 42g (95%)。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): (2.96 (t, CH_2N), 3.5 (br m, PEG), 4.6 (br, OH), 7.9 (br, NH_3^+))。

40

【0048】

実施例 2 $\text{HOPEGOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ の調製反応

【化3】



10

【0049】

a) BzOPEG OCH₂CO₂C(CH₃)₃の調製: BzOPEG OH (MW = 3400, 40g, 11.7mmole)を、N₂下で250mlのトルエンと共沸した。2時間後、溶液を室温に冷却した。上記PEG溶液に90mlのtert-ブタノールおよび90mlのトルエンに溶解したカリウムtert-ブトキシド(2.8g, 23.5mmole)を添加した。混合物を室温で2時間攪拌した。tert-ブチルプロモ酢酸(4ml, 26.3mmole)を添加し、溶液をN₂下の室温で一晩攪拌した。溶液を濾過し、減圧濃縮し、300mlのエーテル中で沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥した。¹H nmr (DMSO-d₆): (1.5 (s, tBu), 3.51 (m, PEG), 3.98 (s, OCH₂CO₂), 4.49 (s, C₆H₅CH₂O), 7.33 (s + comp. mult., C₆H₅CH₂O-))。

20

【0050】

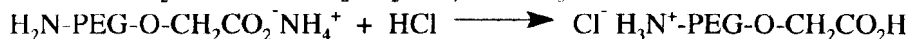
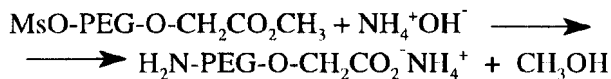
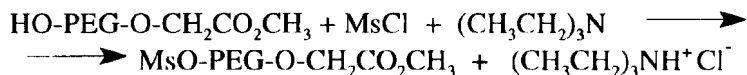
b) HOPEG OCH₂CO₂Hの調製: BzOPEG OCH₂CO₂C(CH₃)₃(10g)を、100mlの塩酸(37%)に溶解し、溶液を室温で48時間攪拌した。溶液を1リットルの蒸留水で希釈し、1Nの水酸化ナトリウムでpHを2に調整した。次いで、溶液を塩化メチレンで3回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過して塩を除去し、減圧濃縮し、エーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥した。収量: 8.5g (85%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (3.51 (br m, PEG), 4.01 (s, -PEG OCH₂COOH))。

30

【0051】

実施例3 C₁H₃N + PEG OCH₂CO₂Hの調製

【化4】



40

【0052】

a) HOPEG₃₄₀₀OCH₂CO₂CH₃の調製: 実施例2で調製したHOPEG OCH₂CO₂H (15g)を75mlのメタノールに溶解し、得られた溶液に3mlの濃H₂SO₄を添加した。溶液を室温で1.5時間攪拌し、180mlの5%NaHCO₃水溶液を慎重に添加した。次いで、塩化ナトリウム(25g)を添加し、得られた溶液のpHを5%Na₂HPO₄で7に調整した。溶液を塩化メチレンで抽出し、合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥した。次いで、塩化メチレン溶液を20mlに蒸発させ、生成物を300mlの冷エチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥して13.5gの生成物を獲得し、これはGPCによって純度100%であることが示された

50

。

【0053】

b) MsOPEG₃₄₀₀OCH₂CO₂CH₃の調製：HOPEG₃₄₀₀OCH₂CO₂CH₃ (13.5 g)を、400 mlのCHCl₃に溶解し、約200 mlの溶媒を蒸留した。残りの溶液を室温に冷却し、トリエチルアミン(0.72 ml)を添加後、0.38 mlのMsClを添加した。反応混合物をN₂下の室温で一晩攪拌し、2 mlのエタノールを添加し、得られた混合物を15分間攪拌した。減圧下(55 °Cの浴)での溶媒の蒸発後、得られた沈殿を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥した。収量は14 gであり、¹H nmrスペクトルにより、100%メシル化が示された。

【0054】

c) H₂NPEG₃₄₀₀CO₂-NH⁴⁺の調製：MsO-PEG-OCH₂CO₂CH₃ (13 g)を、70 mlのH₂Oに溶解し、pHを12に調整した。pH12を維持しながら1.5時間攪拌後、5%NH₄Clを含む250 mlのNH₄OH溶液を添加した。次いで、反応混合物を約40時間攪拌し、NaClを添加して濃度を約8%にした。得られた溶液をCH₂Cl₂で抽出し、Na₂SO₄で乾燥した。CH₂Cl₂層を約20 mlに蒸発させ、約300 mlの冷エチルエーテルで沈殿させた。沈殿した生成物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥した。収量は12.5 gであった。純度は¹H nmrでは97%であり、GPCでは95%であった。

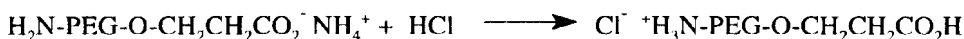
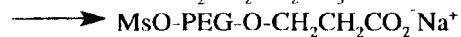
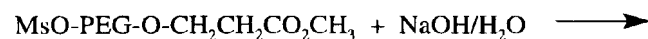
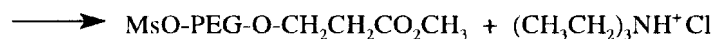
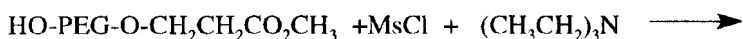
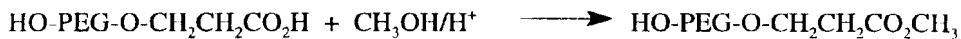
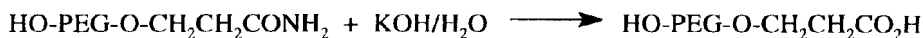
【0055】

d) Cl-H₃N⁺-PEG₃₄₀₀OCH₂CO₂Hの調製：H₂NPEGCO₂-NH₄⁺ (12 g)を15%NaClを含むH₂O(50 ml)に溶解した。1N HClでpHを3.0に調整し、得られた溶液をCH₂Cl₂で抽出した。CH₂Cl₂抽出物をNa₂SO₄で乾燥し、約20 mlに蒸発させ、約300 mlのエチルエーテルで生成物を沈殿させ、室温で減圧乾燥した。¹H nmrでの純度は95%であった。

【0056】

実施例4 Cl-H₃N+PEG₃₄₀₀OCH₂CH₂CO₂Hの調製

【化5】



【0057】

a) HOPEG₃₄₀₀OCH₂CH₂CO₂Hの調製：BzOPEG₃₄₀₀OH (100 g)を、100 mlのH₂Oに溶解し、得られた溶液に5 mlの40%のKOH水溶液を添加し、混合物を1時間攪拌した。次いで、溶液を0 °Cに冷却し、アルゴン下で50 mlのアクリロニトリルを添加した。3時間の攪拌後、20%NaCl水溶液を添加し、10%NaH₂PO₄でpHを7.0に調整した。ついで、溶液をCH₂Cl₂で抽出し、抽出物をNa₂SO₄で乾燥した。溶媒の減圧蒸発後、残渣を500 mlの濃HClに溶解し、室温で6

0時間攪拌した。次いで、240gのNaOHの1.2l水溶液に溶液を添加し、NaClを添加して8%溶液を作製し、pHを7.0に調整した。溶液をCH₂Cl₂で抽出し、抽出物をNa₂SO₄で乾燥し、減圧蒸発によって乾燥した。残渣を1.5lの8%KOH中で20時間攪拌し、180mlの濃HClおよびNaCl(8%)を添加した。pHを3.0に調整し、生成物を塩化メチレンで抽出した。抽出物をNa₂SO₄で乾燥し、蒸発させ、生成物をエチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥して、GPCによって収率91%のHOPEGOCH₂CH₂CO₂Hを含む90gの生成物が得られた。

【0058】

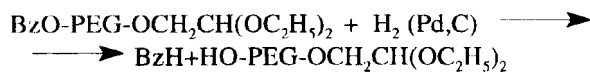
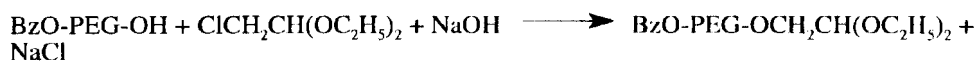
b) Cl- + H₃NPEGOCH₂CH₂CO₂Hの調製：実施例3のHOPEGOCH₂CO₂HのCl- H₃N+PEG₃₄₀₀OCH₂CO₂Hへの変換と同一の手順によって、HOPEGOCH₂CH₂CO₂HをCl- + H₃NPEGOCH₂CH₂CO₂Hに変換した。

10

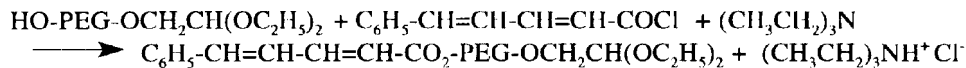
【0059】

実施例5 C₆H₅CH=CHCH=CHCO₂PEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂の調製反応：

【化6】



20



【0060】

a) BzOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂の調製：500mlの丸底三口フラスコに300mlのジオキサンおよび14gのBzOPEGOH(MW=3400, 0.0040 moles)を入れた。ついで、得られた溶液を130mlの溶媒とN₂下で共沸させた。溶液の冷却後、微粉末NaOH(0.8g, 0.02 moles)およびClCH₂CH(OC₂H₅)₂(3ml, 0.02 moles)をN₂下で添加し、得られた懸濁液を24時間還流しながら急速に攪拌した。次いで、30mlのジオキサンを蒸留によって除去し、急速に攪拌した溶液をN₂下でさらに24時間還流した。次いで、懸濁液を冷却し、Celite(商品名)の添加によって濾過した。濾過物を減圧蒸発し、残渣のオイルに200mlのエチルエーテルを添加した。得られた沈殿を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥して黄褐色粉末(13.6g)を得た。粉末をCH₂Cl₂(35ml)に溶解し、500mlの冷エチルエーテルの添加によって再沈殿させた。沈殿物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥して白色粉末として13.0gのBzOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂を得た(1H nmrによれば純度94.98%)。1H nmr(DMSO d6): (1.11(t, OCH₂CH₃); 3.51(br m, O-CH₂CH₂O), 4.48(s, C₆H₅CH₂O); 4.55(t, CH(OC₂H₅)₂), 7.32(s, C₆H₅))。

30

40

【0061】

b) HOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂の調製：BzOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂(13g)を150mlの95%エタノールに溶解し、N₂下で6.5gの10%炭素担持Pd触媒を添加した。懸濁液をH₂下(40psi)で70時間震盪し、懸濁液を濾過した。残りの触媒を2×25mlのボイルクロホルムで洗浄し、洗浄物をエタノールと合わせ、濾過し、減圧濃縮して、無色透明のオイルを得た。オイルに400mlの冷エチルエーテルを添加し、得られた沈殿物を濾過によって回収し、室温での減圧乾燥後に白色粉末として11.3gのHOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂を得た(1H nmrによれば純度92%)。1H nmr(DMSO d6): (1.10, (t, OCH₂CH₃))

50

, 3.51 (br m, OCH₂CH₂O), 4.55, (m, HO + CH(OCH₂CH₃)₂).

【0062】

c) C₆H₅CH=CHCH=CHCO₂PEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂の調製：シンナミリデン酢酸(1.7g, 0.01 moles)および塩化チオニル(3 ml, 0.04 moles)の50 mlヘキサン溶液を、N₂下で4時間還流し、濾過して少量の暗色固体を除去し、濾過物を減圧蒸発させた。残渣を室温で一晩減圧乾燥して、黄色固体として1.5gのシンナミリデンアセチルククロリド(融点51-52)を得た。

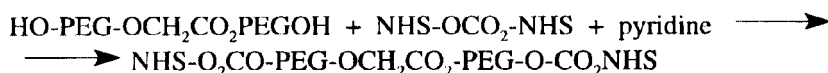
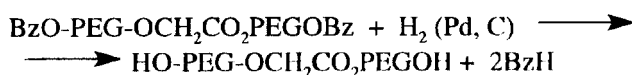
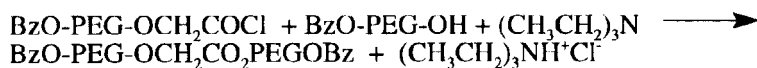
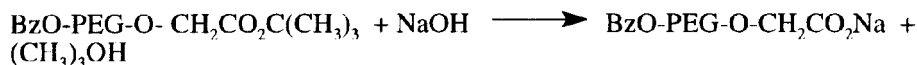
【0063】

HOPEG-OCH₂CH(OC₂H₅)₂(3.4g, 1.0 mmole)のトルエン溶液(50 ml)を、窒素下で2時間共沸して微量の水を除去し、室温に冷却した。窒素下でKOHからトリエチルアミンを蒸留し、窒素下でHOPEGOCH₂CH(OC₂H₅)₂のトルエン溶液に0.28 ml(2 mmole)の新鮮な蒸留物を注入した。室温および窒素下で得られた溶液を急速に攪拌しながらシンナミリデンアセチルククロリド(C₆H₅CH=CHCH=CHCOCl)を滴下した。同一の条件下で攪拌を3日間継続し、白色沈殿を濾過によって取り出した。濾過物を減圧下で20 mlに蒸発させ、300 mlの冷エーテルを添加した。淡黄色沈殿を濾過によって回収し、減圧乾燥して、3.4gの淡黄色粉末を得た。粉末を塩化メチレンに溶解し、50 mlの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回抽出し、水で1回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、25 mlに蒸発させ、300 mlの冷エーテルを攪拌しながら添加した。得られた沈殿物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥して淡黄色粉末として3.05g(86%)のC₆H₅CH=CHCH=CHCO₂PEG-OCH₂CH(OC₂H₅)₂を得た。¹H nmr(DMSO-d₆): 1.11 ppm(t, CH₃CH₂O-, 3.51 ppm(m, PEGOCH₂CH₂O + CH₃CH₂O); 4.20 ppm(t, CH₂O₂C), 4.52 ppm(t, CH(OC₂H₅)₂), 6.11(d, =CH), 7.57-7.12(comp. mult., C₆H₅ + =CH) nmrによる純度: 89-96%。

【0064】

実施例6 NHSO₂COPEGOCH₂CO₂PEGO₂NHS(NHS=Nスクシニミジル)の調製反応:

【化7】



【0065】

a) BzOPEGOCH₂CO₂Hの調製：BzOPEGOCH₂CO₂C(CH₃)₃(20g)を蒸留水に溶解し、1N NaOH溶液でpHを12.0に調整した。NaOHの継続的添加により溶液をpH12.0に2時間維持し、溶液を一晩攪拌した。1N NaOH溶液の添加により溶液のpHを2.5に調整し、溶液を塩化メチレンで3回抽出した。合わせた有機塩化メチレン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濾過物を減圧濃縮し

、エチルエーテルで生成物を沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥した。収量は1.8 g (90%)であった。 ^1H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 4.01 (s, PEGOCH₂COOH), 4.49 (s, C₆H₅CH₂OPEG), 7.33 (s + com, C₆H₅CH₂OPEG)。

【0066】

b) BzOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OBzの調製: 100 mlの丸底フラスコに、BzOPEG₂OCH₂CO₂H (MW = 3400, 3.4 g, 1 mmol)のトルエン溶液を共沸によって乾燥した。塩化チオニル(2 M, 4 ml, 8 mmole)の塩化メチレン溶液を注入し、混合物をN₂下で一晩攪拌した。溶媒を回転式蒸発器で濃縮し、P₂O₅粉末と共にシロップを約4時間真空乾燥した。残渣に5 mlの無水塩化メチレンを添加し、トルエン中(20 ml)でBzOPEG₂OH (MW = 3400, 2.55 g, 0.75 mmol)を共沸により乾燥させた。BzOPEG₂OCH₂COClの溶解後、新たに蒸留したトリエチルアミン(0.6 ml)を添加し、混合物を一晩攪拌した。トリエチルアミン塩を濾過によって取り出し、生成物をエチルエーテルでの沈殿によって回収した。これを水への溶解および塩化メチレンでの抽出によってさらに精製した。生成物のゲル浸透クロマトグラフィーにより、100%のBzOPEG₂OHがエステルに変換されたことが示された。次いで、混合物をイオン交換カラム(DEAEセファローソフトフロー、Pharmacia)でクロマトグラフィーを行ってBzOPEG₂OCH₂CO₂Hを取り出し、純粋なBzOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OBzを得た。収量: 4.1 g (80%)。 ^1H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 4.14 (s, PEGOCH₂COOPEG), 4.18 (t, PEGO-CH₂COOCH₂CH₂OPEG), 4.48 (s, ArCH₂O) 7.32 (s, C₆H₅)。

10

20

【0067】

c) HOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OHの調製: BzOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OBz (MW = 6800, 2 g, 0.59 mmole)の1, 4-ジオキサン溶液(20 ml)をH₂(2 atm)および1 gのPd/C(10%)で一晩水素化分解した。濾過によって触媒を除去し、回転式蒸発器でほとんどの溶媒を沈殿させた後に生成物をエチルエーテルに沈殿させた。濾過によって純粋なHOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂-OHを回収し、室温で減圧乾燥して1.5 g (75%)のHOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OHを得た。 ^1H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 4.14 (s, PEGOCH₂COOPEG), 4.18 (t, PEGOCH₂COOCH₂CH₂OPEG)。

30

【0068】

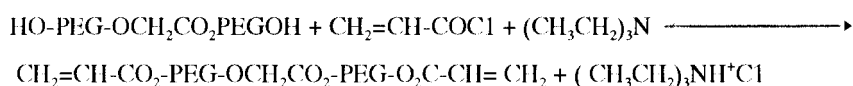
d) NHSO₂COPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OCO₂NHSの調製: HOPEG₂OCH₂CO₂PEG₂OH (2 g, 0.29 mmole)を100 mlのアセトニトリルと共沸し、ゆっくりと室温に冷却した。得られた溶液にジスクシニミジルカーボネート(621 mg, 1.17 mmole)およびピリジン(0.3 ml)を添加し、溶液を室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を除去し、残渣に35 mlの乾燥塩化メチレンを添加した。不溶性固体を濾過によって取り出し、濾過物をpH 4.5の塩化ナトリウム飽和酢酸緩衝液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を除去した。エチルエーテルを添加し、沈殿を濾過によって回収し、減圧乾燥した。収量: 1.8 g (90%)。 ^1H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 4.14 (s, PEGOCH₂COOPEG), 4.18 (t, PEGOCH₂COOCH₂CH₂OPEG), 4.45 (t, PEGOCH₂CH₂OC₂H₅), 2.81 (s, NHS)。

40

【0069】

実施例7 CH₂=CHCO₂PEG₂OCH₂CO₂PEG₂O₂CCH=CH₂の調製反応:

【化8】



50

【0070】

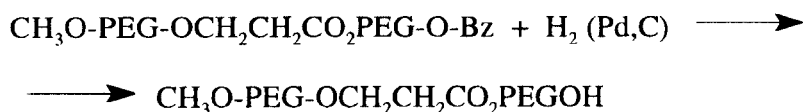
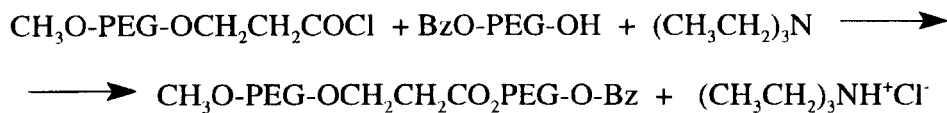
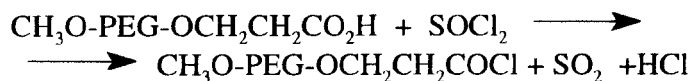
CH₂=CHCO₂PEGOCH₂CO₂PEGO₂CCH=CH₂の調製：HOPEGOCH₂CO₂PEGOH (M.W.=6800, 1.5g, 0.44mmole 末端基)を、100mlのトルエンで2時間共沸乾燥した。溶液をN₂下で室温に冷却し、25mlの塩化メチレンおよびトリエチルアミン(TEA, 0.56mmole)を添加した。溶液を氷浴中で冷却し、溶液にアクリロイルクロリド(1.5mmole)のCH₂Cl₂溶液を滴下した。アクリロイルクロリドの添加後、氷浴を取り除き、溶液を室温で一晩攪拌した。1mlのエタノールを添加して過剰量のアクリロイルクロリドを消費し、塩化メチレンを減圧濃縮した。濾過によって塩を除去し、残りの溶液を100mlのエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。生成物を50mlのクロロホルムに溶解し、炭酸ナトリウム(1.3g)を添加した。混合物を室温で一晩激しく攪拌した。塩を濾過によって除去し、溶媒を減圧下で除去した。残渣を5mlの塩化メチレンに溶解し、100mlエチルエーテルに溶液を添加した。得られた沈殿を濾過によって回収し、20mlの2-プロパノールで洗浄し、40mlのエーテルで洗浄した。最後に、生成物を真空乾燥した。収量1.35g(90%)。¹H nmr (DMSO d₆): 3.5 (br m, PEG), 4.14 (t, PEGOCH₂COOPEG), 4.18 (t, PEGOCH₂COOCH₂CH₂OPEG), 4.21 (t, CH₂=CHCOOCH₂CH₂OPEG, 4H), 5.85-6.45 (m, CH₂=CHCOOPEG)。

10

【0071】

実施例8 CH₃OPEGOCH₂CH₂CO₂PEGOHの調製反応：
【化9】

20



30

【0072】

a) CH₃OPEGOCH₂CH₂CO₂PEGOBzの調製：100mlの丸底フラスコ中で、CH₃OPEGOCH₂CH₂CO₂H (MW=2000, 2g, 1mmole)溶液をトルエンに溶解し、2時間共沸乾燥した。ゆっくりと室温に冷却後、チオニルクロリド(3ml, 6mmole)の塩化メチレン溶液にこの溶液を添加し、N₂下で一晩攪拌した。次いで、回転式蒸発器によって溶媒を除去し、残ったシロップをP₂O₅粉末と共に約4時間真空乾燥した。固体に5mlの無水塩化メチレンおよび共沸乾燥BzOPEGOH (MW=3400, 2.04g, 0.60mmole)のトルエン溶液(20ml)を添加した。得られた溶液に0.6mlの新たに蒸留したトリエチルアミンを添加し、溶液を一晩攪拌した。トリエチルアミン塩を濾過によって除去し、粗生成物をエチルエーテルで沈殿させ、濾過によって回収した。次いで、混合物をイオン交換クロマトグラフィー(DEAEセファロースfast flowカラム, Pharmacia)によって精製した。純粋なCH₃OPEGOCH₂CH₂CO₂PEGOBzが得られた。収量：2.6g(80%)。¹H nmr (DMSO d₆): (3.5 (br. mult., PEG), 3.24 (s, CH₃OPEG), 4.48 (s, -PEGOCH₂C₆H₅), 7.33 (s + comp. mult., PEGOCH₂C₆H₅), 2.55 (t, OCH₂CH₂CO₂PEG), 4.13 (t, PEGCO₂CH₂CH₂OPEG)。

40

50

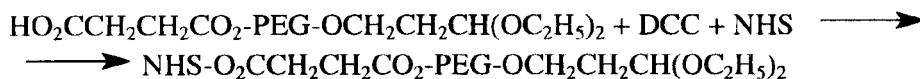
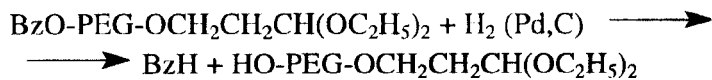
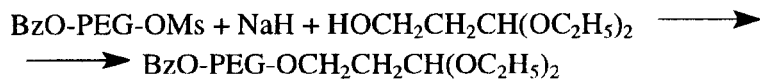
【0073】

b) $\text{CH}_3\text{OPEG}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{PEG}\text{OH}$ の調製：2gの $\text{CH}_3\text{OPEG}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{PEG}\text{OBz}$ の1,4-ジオキサン溶液を1グラムのPd/C(10%)上で H_2 (2atm)で一晩水素化分解した。濾過によって触媒を除去し、溶媒を減圧濃縮し、エチルエーテルに溶液を添加した。生成物を濾過によって回収し、室温で減圧乾燥して、1.5g(75%)の $\text{CH}_3\text{OPEG}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{PEG}\text{OH}$ を得た。 $^1\text{H nmr}$ (DMSO-d6)：(3.5(br.mult.PEG), 3.24(s, CH_3OPEG), 2.55(t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{PEG}$), 4.13(t, $\text{PEGCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPEG}$)。

【0074】

実施例9 $\text{NH}\text{SO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{COOPEG}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ の調製反応：

【化10】



【0075】

a) BzOPEGOMs の調製： BzOPEGOH (MW=3400, 25g、7.35mmol)の150mlトルエン溶液を、窒素下で1時間共沸し、溶液を室温に冷却した。溶液に20mlの乾燥塩化メチレン、1.14mlの乾燥トリエチルアミン(8.16mmol)、および0.61mlの乾燥メシルクロリド(7.86mmol)を滴下した。溶液を窒素下、室温で一晩攪拌し、5mlの無水エタノールの添加により反応を停止させた。混合物を減圧濃縮し、濾過し、再度減圧濃縮し、エチルエーテル中で沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。収量：23g(100%)。 $^1\text{H nmr}$ (DMSO-d6)：(3.5(br.m, PEG), 4.31(t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$), 4.49(s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$), 7.33(s+comp.m., $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OPEG}$)。

【0076】

b) $\text{BzOPEG}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ の調製：3,3-ジエトキシプロパノール(9.806g、66.2mmol)を窒素下の90mlのトルエン中で1時間共沸した。室温に冷却後、水素化ナトリウム(60%鉱物油液、2.75g、68.7mmol)の50ml無水トルエン分散物に溶液を添加した。35に穏やかに加熱しながら溶液を2時間混合し、濾過した。 BzOPEGOMs (23g、6.76mmol)の150mlトルエン共沸溶液に、濾過物を添加した。混合物を125の窒素雰囲気下で20時間濃縮し、残渣を80mlの塩化メチレンに溶解した。溶液を濾過し、生成物を1リットルの冷イソプロピルアルコールで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。粉末を100mlの脱イオン水に溶解し、200mlの塩化メチレンで3回抽出した。混合物を減圧濃縮し、濾過し、エチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって

10

20

30

40

50

回収し、真空乾燥した。収量 19 g (100%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (1.10 (t, -CH(OCH₂CH₃)₂), 1.73 (q, OCH₂CH₂CH), 3.5 (br m, PEG), 4.49 (s, C₆H₅CH₂OPEG), 4.56 (m, CH(OCH₂CH₃)₂), 7.33 (s + comp m, C₆H₅CH₂OPEG)。

【0077】

c) HOPEG OCH₂CH₂CH(OC₂H₅)₂の調製: BzOPEG OCH₂CH₂CH(OC₂H₅)₂ (10 g, 2.94 mmol) を 100 ml の 96% エタノールに溶解し、窒素下で 5.0 g の 10% 炭素担持 Pd 触媒を添加した。懸濁液を H₂ (40 psi) 下で 48 時間震盪し、懸濁液を濾過した。残渣を塩化メチレンで洗浄した。塩化メチレンとエタノールとの合わせた濾過物中の生成物を減圧濃縮し、濾過した。粘性溶液を冷エチルエーテルで沈殿させ、生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。収量: 15 g。¹H nmr (DMSO-d₆): (1.10 (t, CH(OCH₂CH₃)₂), 1.72 (q, -OCH₂CH₂CH), 3.5 (br m, PEG), 4.55 (m, CH(OCH₂CH₃)₂)。 10

【0078】

d) HO₂CCH₂CH₂CO₂PEG OCH₂CH₂CH(OCH₂CH₃)₂の調製: HOP EGOCH₂CH₂CH(OC₂H₅)₂ (3 g, 0.88 mmol) および BHT (5 mg) を、20 ml の無水トルエンに溶解し、窒素下、120 °C で 1 時間共沸した。溶液を 75 °C に冷却後、ピリジン (0.36 ml) および無水コハク酸 (0.353 g) を添加し、75 °C で 24 時間攪拌した。溶液を減圧濃縮し、濾過し、冷エチルエーテルに沈殿させた。沈殿物を濾過によって回収し、真空乾燥した。粉末を 50 ml の脱イオン水中で再構成し、1 M の水酸化ナトリウムを滴下して pH を 7.2 に 1 時間維持した。1 N HCl を即座に滴下して、pH 3.0 とし、その後すぐに 100 ml の塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層中の生成物を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、冷エチルエーテルで沈殿させ、濾過によって回収し、真空乾燥した。収量: 2.0 g (88%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (1.10 (t, CH(OCH₂CH₃)₂), 1.72 (q, OCH₂CH₂CH), 3.5 (br m, PEG), 4.12 (t, CO₂CH₂), 4.55 (t, CH(OCH₂CH₃)₂)。 20

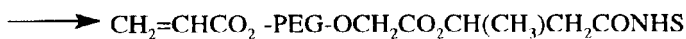
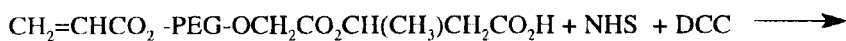
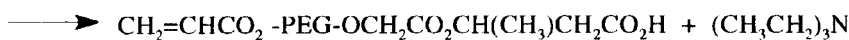
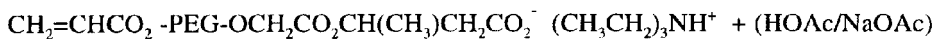
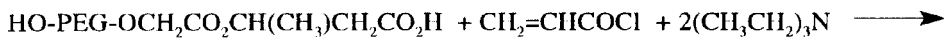
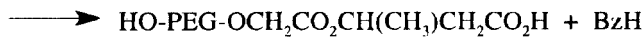
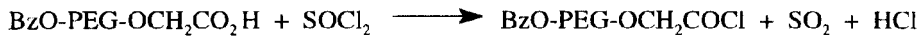
【0079】

e) NHSO₂CCH₂CH₂CO₂PEG OCH₂CH₂CH(OCH₂CH₃)₂の調製: H O₂CCH₂CH₂CO₂PEG OCH₂CH₂CH(OCH₂CH₃)₂ (2.0 g, 0.56 mmol) を窒素雰囲気下で 20 ml の無水塩化メチレンに溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド (105 mg, 0.91 mmol) を、最初に溶液に添加し、その後ジシクロヘキシルカルボジイミド (174 mg, 0.84 mmol) を添加した。溶液を窒素雰囲気下の室温で一晩攪拌した。生成物を減圧濃縮し、濾過し、冷エチルエーテルに沈殿させ、濾過によって回収し、真空乾燥した。収量: 1.5 g (99%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (1.10 (t, CH(OCH₂CH₃)₂), 1.72 (q, OCH₂CH₂CH), 2.80 (s, NHS), 3.5 (br m, PEG), 4.12 (t, CO₂CH₂), 4.55 (t, CH(OCH₂CH₃)₂)。 30

【0080】

実施例 10 CH₂=CHCO₂PEG OCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂NHS の調製反応: 40

【化 1 1】



10

【0081】

20

a) BzOPEG OCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂Hの調製: BzOPEG OCH₂CO₂H (MW = 3400, 15 g, 4.4 mmole)を、N₂下で60 mlのトルエンと共沸した。2時間後、溶液をゆっくりと室温に冷却した。この溶液に、チオニルクロリド(18 ml, 36 mmole)を添加した。得られた溶液を一晩攪拌し、溶媒を回転式蒸発器で濃縮し、シロップをP₂O₅粉末と共に約4時間真空乾燥した。3-ヒドロキシ酪酸(1.45 g, 13.5 mmole)を70 mlの1,4-ジオキサソールと共沸乾燥し、乾燥BzOPEG OCH₂COClに添加した。PEGアクリルクロリドを溶解後、4.5 mlの乾燥トリエチルアミンをこの系に注入し、溶液を一晩攪拌した。濾過によって塩を除去し、濾過物を55の回転式蒸発器で濃縮し、真空乾燥した。次いで、粗生成物を100 mlの蒸留水に溶解し、溶液のpHを3.0に調整した。水層を全部で80 mlの塩化メチレンで3回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、回転式蒸発器で濃縮し、100 mlのエチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、室温で真空乾燥した。収量: 14 g (93%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 2.58 (d, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COOH), 5.14 (h, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COOH), 1.21 (d, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COOH), 4.055 (s, PEGOCH₂COO), 4.49 (s, C₆H₅CH₂OPEG), 7.33 (s + comp. mult., C₆H₅CH₂OPEG)。

30

【0082】

b) HOPEG OCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂Hの調製: BzOPEG OCH₂CO₂OCH(CH₃)CH₂CO₂H (8 g)のベンゼン(50 ml)溶液を室温で48時間4グラムのPd/C(10%)上でH₂(2 atm)で水素化分解した。濾過によって触媒を除去し、溶媒を濃縮し、溶液をエチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過によって回収し、室温で真空乾燥した。収量: 6.6グラム(83%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 2.51 (d, PEGCO₂CH(CH₃)CH₂CO₂H), 5.16 (h, PEGCO₂CH(CH₃)CH₂CO₂H), 1.22 (ds PEGCO₂CH(CH₃)CH₂CO₂H), 4.06 (s, PEGOCHCO₂CH(CH₃)) -。

40

【0083】

c) CH₂=CHCO₂PEG OCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂Hの調製: HOPE

50

GOCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂H (3 g, 0.88 mmole) を、約 15 ml の溶液となるまで N₂ 下で 40 ml のトルエンと共沸した。次いで、溶液を N₂ 下で室温に冷却し、25 ml の塩化メチレンおよびトリエチルアミン (1.5 mmole) を添加した。溶液を氷浴中で冷却し、アクリロイルクロリド (2 mmole) を滴下した。アクリロイルクロリドの添加後、氷浴を取り除き、溶液を室温で一晩攪拌した。次いで、塩化メチレンを減圧下で部分的に除去し、塩を濾過によって除去し、100 ml のエーテルに濾過物を添加した。沈殿した生成物を濾過によって回収し、真空乾燥した。次いで、生成物を酢酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M, pH 5.5) に溶解し、30 分間攪拌し、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、100 ml のエチルエーテル中で沈殿させた。沈殿物を濾過によって回収し、室温で真空乾燥した。収量: 2.4 g (80%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 2.51 (d, CH₂CO₂H), 5.16 (h, CH(CH₃)), 1.22 (d, CH(CH₃)), 4.06 (s, PEGOCH₂CO₂PEG), 4.21 (t, CO₂CH₂CH₂O), 5.856.45 (m, CH₂=CH)。

10

【0084】

d) CH₂=CHCO₂PEGCOCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂NHS の調製: CH₂=CHCO₂PEGCOCH₂CO₂CH(CH₃)CH₂CO₂H (1.4 g, 約 0.4 mmole) および N-ヒドロキシスクシンイミド (51 mg, 0.43 mmole) を、30 ml の乾燥塩化メチレンに溶解した。この溶液に、ジシクロヘキシルカルボジイミド (95 mg, 0.45 mmole) の 5 ml の乾燥塩化メチレン溶液を添加した。溶液を窒素下で一晩攪拌し、溶媒を回転式蒸発器によって除去した。得られたシロップを、10 ml の乾燥トルエンに溶解し、不溶性固体を濾過によって除去した。100 ml の乾燥エチルエーテルに濾過物を添加し、沈殿した生成物を濾過によって回収し、室温で真空乾燥した。収量 0.94 g (94%)。¹H nmr (DMSO-d₆): (3.5 (br m, PEG), 3.03.2 (m, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COONHS), 5.26 (h, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COONHS), 1.3 (d, PEGCOOCH(CH₃)CH₂COONHS), 4.10 (s, PEGOCH₂COO(CM)), 2.81 (s, NHS), 4.21 (t, CH₂=CHCOOCH₂CH₂OPEG, 4H), 5.856.45 (m, CH₂=CHCOOPEG)。

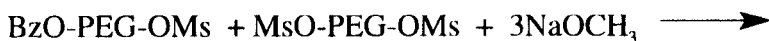
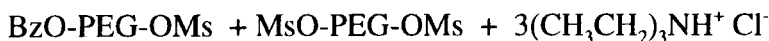
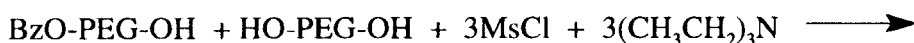
20

【0085】

30

実施例 11 BzOPEGOH と HOPEGOH との混合物由来の HOPEGOH を含まない CH₃OPEGOH の調製法反応:

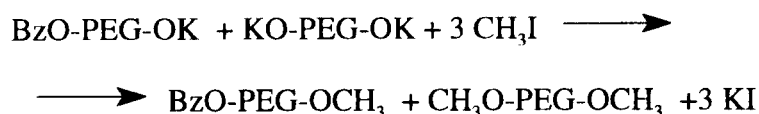
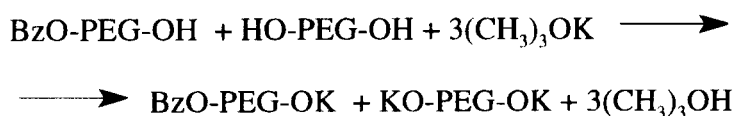
【化 12】



40

BzOPEGCH₃ + CH₃OPEGCH₃ の別の合成

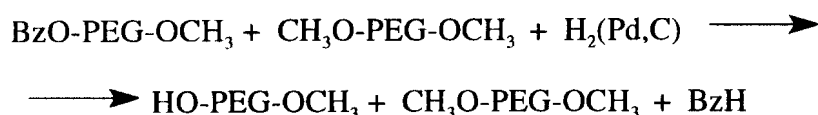
【化13】



10

いずれかの経路由来の生成物が水素化分解される。

【化14】



【0086】

a) BzOPEGOMsの調製：6重量%のHOPEGOHを含むBzOPEGOH (MW = 5000, 50g、10mmoles)をトルエンに溶解し、溶液を窒素下で2時間共沸乾燥し、室温に冷却した。この溶液に50mlの無水塩化メチレンおよび2.1mlの無水トリエチルアミン(15mmoles)を添加した。得られた溶液を氷浴中で冷却し、1.2mlのメシルクロリド(15mmoles)を滴下した。次いで、溶液を室温で一晩攪拌し、2mlの無水エタノールの添加によって反応を停止させた。混合物を減圧濃縮して100mlの溶媒を除去し、濾過し、800mlの冷エーテルに添加した。沈殿した生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥した。収量48.3g(96.6%)。¹H nmr (DMSO-d₆) : (3.5 (br m, PEG), 4.31 (t, OCH₂CH₂OMs), 4.49 (s, C₆H₅CH₂OPEG), 7.33 (s + complex mult., C₆H₅CH₂OPEG))。

20

30

【0087】

b) MsOPEG OCH₃の調製：6重量%のMsOPEGOMs (MW = 5078, 45g、8.86mmoles)を含むBzOPEGOMsの250mlのトルエン溶液を2時間共沸乾燥した。得られた溶液に25重量%のナトリウムメトキシド(11.5g、53.2mmoles, 6倍過剰)のメタノール溶液を添加し、得られた溶液を窒素下、120~122で20時間加熱した。次いで、得られた溶液を室温に冷却し、2mlの水を添加し、混合物を15分間攪拌した。次いで、混合物を減圧濃縮して100mlの溶媒を除去し、濾過し、700mlの冷エーテルに濾過物を添加した。沈殿した生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥した。収量：42.8g。¹H nmr (DMSO-d₆) : (3.24 (s, PEG), 3.51 (br. mult., PEG), 4.49 (s, C₆H₅CH₂OPEG), 7.33 (s + comp. mult., C₆H₅CH₂OPEG))。

40

【0088】

c) BzOPEGOHからのBzOPEG OCH₃の調製：6重量%のHOPEGOH (MW = 10,000, 50g、5.0mmoles)を含むBzOPEGOHの250mlのトルエン溶液を窒素下で2時間共沸し、溶液を室温に冷却した。カリウムtert-ブトキシド(1.0Mのtert-ブタノール溶液、25ml、25mmole)を添加し、混合物を15分間攪拌した。次いで、ヨウ化メチル(7.1g、50mmole)を添加し、混合物を暗所で室温の窒素下で20時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を100mlの塩化メチレンに溶解し、800mlの冷エーテルに添加した。沈殿した生成物を濾過によって回収し、減圧乾燥した。収量：46.8g。¹H nmr (DMSO-d₆

50

) : (3 . 2 4 (s , C H ₃ O P E G) , 3 . 5 1 (b r . m u l t . , P E G) , 4 . 4 9 (s , C ₆ H ₅ C H ₂ O P E G) , 7 . 3 3 (s + c o m p . m u l t . , C ₆ H ₅ C H ₂ O P E G) 。

【 0 0 8 9 】

d) H O P E G O H を含まない C H ₃ O P E G O H の調製 : 6 重量 % の C H ₃ O P E G O C H ₃ (4 0 g 、 M W = 1 0 , 0 0 0 , m m o l e s) を含む B z O P E G O C H ₃ を 4 0 0 m l のエタノールに溶解し、4 g の活性炭担持 P d 触媒 (1 0 % P d) を添加した。混合物を室温で水素化分解した (8 0 0 p s i) 。次いで、混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。収量 : 3 7 . 1 g 。 ¹H n m r (D M S O d 6) : ((s , C H ₃ O P E G) , 3 . 5 1 (b r . m u l t . , P E G) , 4 . 5 8 (t , O H) 。

10

【 0 0 9 0 】

本発明を特定の実施形態に記載している。しかし、上記は本発明を例示の実施形態に限定することを意図せず、上記の明細書中に記載の本発明の範囲および目的の範囲内で変形形態を行うことができることが当業者に認識されるはずである。それに対して、本発明は、すべての変更形態、修正形態、および等価物を含み、これは、特許請求の範囲によって定義される本発明の目的および範囲内に含めることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 ベントリー, マイケル・デイヴィッド

アメリカ合衆国アラバマ州35801, ハンツヴィル, ノレン・アヴェニュー 4017

(72)発明者 ハリス, ジェイ・ミルトン

アメリカ合衆国アラバマ州35801, ハンツヴィル, ハイランド・プラザ 3119

(72)発明者 コズロウスキー, アントーニ

アメリカ合衆国アラバマ州35816, ハンツヴィル, スパークマン・ドライブ 1500-13
ディー

Fターム(参考) 4J005 AA03 BD02 BD04