

(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
2023年10月26日(26.10.2023)

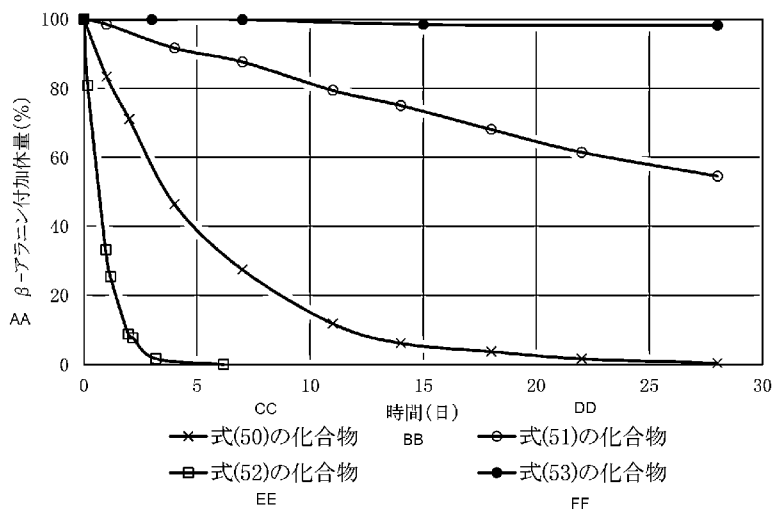


(10) 国際公開番号
WO 2023/204256 A1

- (51) 国際特許分類:
C08G 65/331 (2006.01) *A61K 47/59* (2017.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/015663
- (22) 国際出願日: 2023年4月19日(19.04.2023)
- (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 2022-070669 2022年4月22日(22.04.2022) 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).
- (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). 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). 土肥 玲菜 (DOHI Reina); 〒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). 鈴木 輝 (SUZUKI Akira); 〒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).
- (74) 代理人: 弁理士法人航栄事務所 (KOH-EI, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目7番13号 虎ノ門イーストビルディング9階 Tokyo (JP).

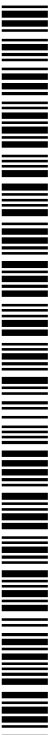
(54) Title: ACETAL-TYPE RELEASABLE POLYOXYETHYLENE DERIVATIVE, PRODUCTION METHOD THEREOF AND ACETAL-TYPE RELEASABLE POLYOXYETHYLENE CONJUGATE

(54) 発明の名称: アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体、その製造方法及びアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体



AA Amount of β -alanine adduct (%)
BB Time (days)
CC Compound of formula (50)
DD Compound of formula (51)
EE Compound of formula (52)
FF Compound of formula (53)

(57) Abstract: Provided are: an acetal-type releasable polyoxyethylene derivative that has a specific structure and cleaves under physiological conditions, said acetal-type releasable polyoxyethylene derivative being capable of releasing a bio-functional molecule at an appropriate rate under physiological conditions; a production method thereof; and an acetal-type



WO 2023/204256 A1

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

releasable polyoxyethylene conjugate.

(57) 要約 : 生理的条件下で開裂する、特定の構造を有するアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体により、生理的条件下で適切な速度で生体機能性分子を放出可能なアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体、その製造方法及びアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体を提供する。

明 細 書

発明の名称：

アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体、その製造方法及び
アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体

技術分野

[0001] 本発明は、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体、その製造方法及び生体機能性分子との結合体であるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合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、酵素などの生体機能性分子などを用いた医薬品は、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、生体機能性分子にポリオキシエチレン（PEG）などの水溶性ポリマー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機能性分子などの血中半減期を延長することが可能となる。また、これらの修飾により、生体機能性分子などの毒性や抗原性の低下、凝集性の改善などの効果が得られることも良く知られている。

[0003] しかしながら、PEGなどの水溶性ポリマーで化学修飾された生体機能性分子は、当該水溶性ポリマーによる水和層の形成や活性部位の立体的な遮蔽効果により、ターゲットとする生体内因性分子や受容体などとの相互作用が低下し、生体機能性分子本来の薬理作用の低下や、体内・細胞内動態の変化など好ましくない影響を与える場合があることが知られている。

上記のような課題に対するアプローチとして、生体機能性分子に一時的結合を介して水溶性ポリマーを化学修飾し、生体内でこの一時的結合を開裂させて化学修飾されていない生体機能性分子を放出させる方法、すなわちプロ

ドラッグ化の方法が用いられる。

[0004] 近年、水溶性ポリマーで修飾された生体機能性分子について、プロドラッグ化の方法を用いて生体機能性分子本来の薬理作用の低下や、体内・細胞内動態の変化を抑制可能な技術として、例えば特許文献1、2に記載の技術が知られている。これら特許文献1、2には、生体機能性分子であるヒト成長ホルモン（hGH）やインターロイキン2（IL-2）を非酵素依存的で生理的条件下、すなわち中性条件下、において適度な速度で分解するリンカーを介してPEGで修飾したPEG化hGHならびにPEG化IL-2がそれぞれの血中半減期を延長しつつ、リンカーの分解に伴い、生体機能性分子が放出されることでPEG化による薬理作用の低下を改善できることが報告されている。このことから、生体機能性分子の血中半減期を延長しつつ、かつ、生理的条件下において非酵素依存的に生体機能性分子を適度な速度で放出し、薬理作用を発現させるプロドラッグ化技術は重要である。

[0005] 特許文献3では、PEGで化学修飾された生体機能性分子が非酵素依存的に一時結合を開裂し、化学修飾されていない生体機能性分子を放出する化合物が報告されている。

具体的には、酸性条件下で加水分解されるアセタール構造を有するリンカーの加水分解をトリガーとして1,4-または1,6-ベンジル脱離により一時結合であるカーバメート結合を開裂し、化学修飾されていない生体機能性分子を放出することが報告されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：日本国特開2018-150311号公報
特許文献2：日本国特開2022-000043号公報
特許文献3：日本国特開2018-172648号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献3の実施例では、非酵素依存的に生体機能性分子を放出可能であり、酸性条件下で生体機能性分子を放出可能な具体的構造が例示されている。しかし、生理的条件下、すなわちpH7.4付近の中性条件下で、非酵素依存的に生体機能性分子を適度な速度で放出し、薬理作用を発現させるプロドラッグ化技術は記載されていない。

[0008] 本発明の課題は、生体機能性分子をプロドラッグ化し、生理的条件下で徐々に生体機能性分子を放出することを特徴としたアセタール構造を有するポリオキシエチレン誘導体及びその安定的な製造方法ならびにアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体を提供することである。

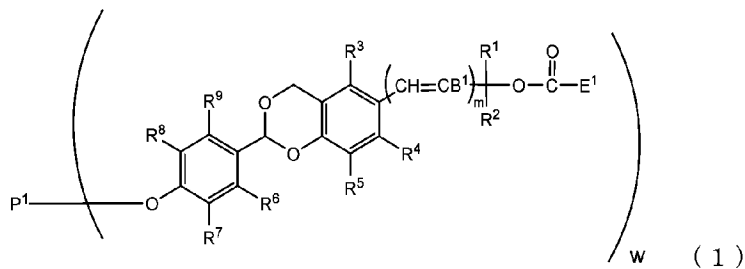
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、生体機能性分子をプロドラッグ化し、生理的条件下で徐々にアセタールを加水分解させることでベンジル脱離を誘発し、生体機能性分子を放出することを特徴としたアセタール構造を有するポリオキシエチレン誘導体及びその安定的な製造方法ならびにアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体を見出した。

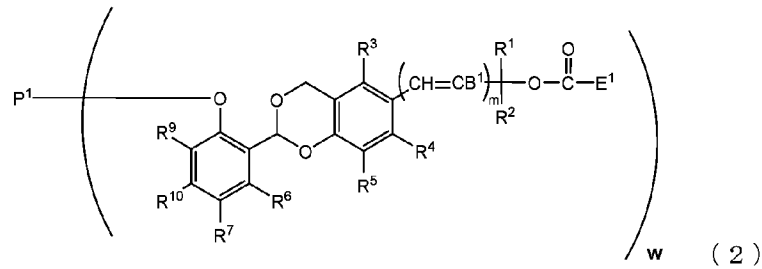
[0010] すなわち本発明は以下の[1]～[6]に関する。

[1] 下記の式(1)、式(2)、式(3)または式(4)で表され、生理的条件下で開裂することを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体。

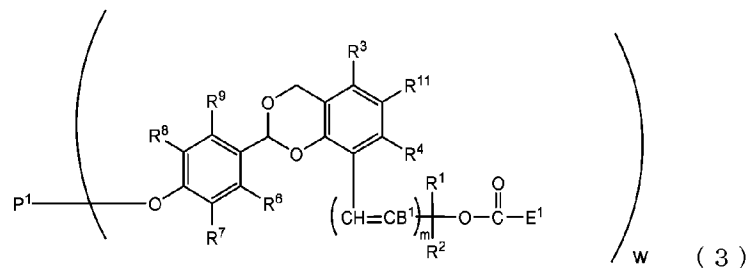
[化1]



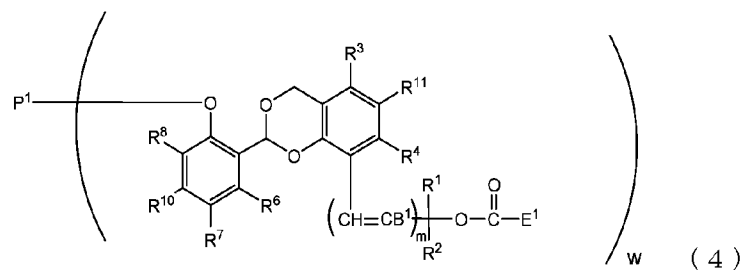
[化2]



[化3]



[化4]



[0011] (式(1)、式(2)、式(3)及び式(4)中

B¹は水素原子または-C(R¹)(R²)OC(O)E¹であり、

E¹は脱離基であり、

P¹は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体であり、

wは1～8の整数であり、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵及びR¹¹は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性置換基または水素原子であり、

mは0または1である。)

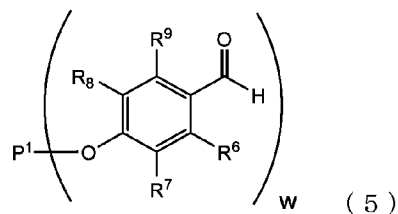
[0012] [2] mが0であり、R¹およびR²が水素原子であり、R³、R⁴、R⁵及びR¹¹がそれぞれ独立して水素原子またはメチル基であることを特徴とする、
[1]のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体。

[0013] [3] [1]または[2]に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体を製造する方法であって、

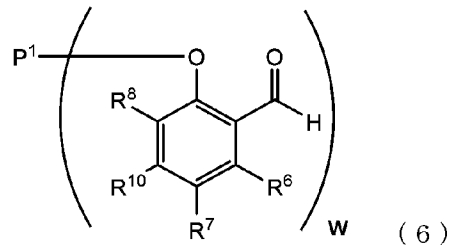
ポリオキシエチレン誘導体とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体とをカップリングさせることによって、下記式(5)または式(6)で表されるカップリング生成物を得るカップリング工程、

前記カップリング工程後に、酸性条件下で、前記式(5)または前記式(6)で表される前記カップリング生成物を、2位にヒドロキシメチル基を有し、かつ4位または6位に置換基(-CH=C B¹)_mC(R¹)(R²)-OH(B¹、m、R¹、R²は前述のとおりである)を有するフェノールと反応させることで、アセタール構造体を得るアセタール化工程、および前記アセタール化工程後に、4位または6位の前記置換基の末端に脱離基構造(-OC(O)E¹)を導入する脱離基構造導入工程を備えることを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体の製造方法。

[化5]



[化6]

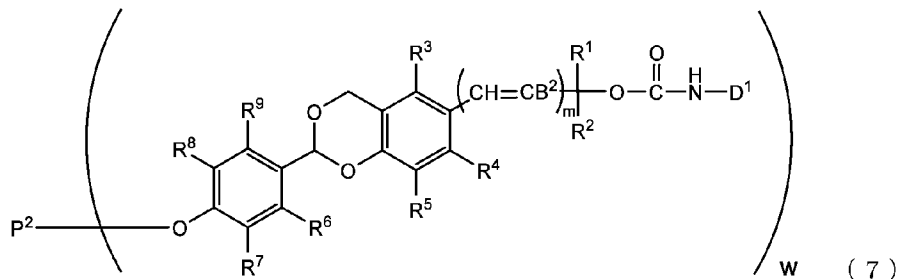


[0014] (式(5)または(6)中、 P^1 、 w 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は前述したとおりである)

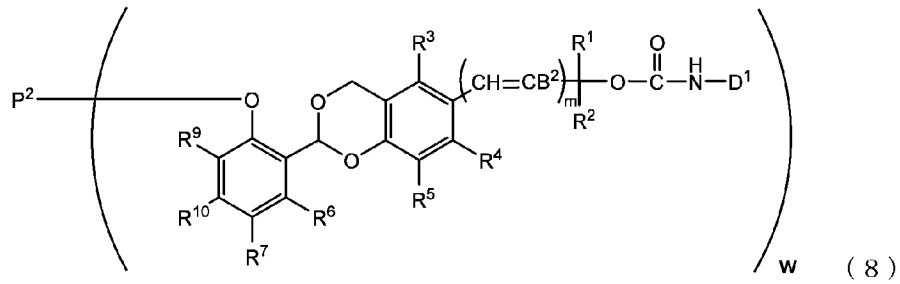
[0015] [4] 前記アセタール化工程と、前記脱離基構造導入工程との間に、前記式(5)及び(6)の前記カップリング生成物中の保護基で保護されたアミノ基の脱保護工程、及び前記脱保護工程後に脱保護されたアミノ基に生体機能性分子と反応可能な基を導入する工程を備えていることを特徴とする、[3]のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体の製造方法。

[0016] [5] 下記の式(7)、式(8)、式(9)または式(10)で表され、生理的条件下で開裂することを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体。

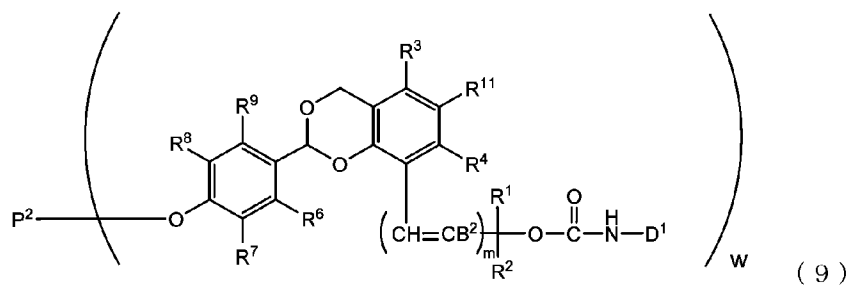
[化7]



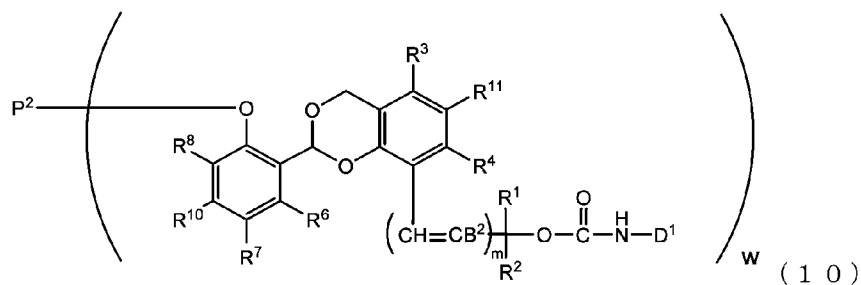
[化8]



[化9]



[化10]



[0017] (式(7)、式(8)、式(9)及び式(10)中、

B²は水素原子または-C(R¹)(R²)OC(O)NHD¹であり、

D¹は、生体機能性分子に含まれるアミノ基から、カーバメート結合を構成するアミノ基を除いた残基であり、

P²は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体、または脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体および生体機能性分子の結合体であり、

wは1～8の整数であり、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵およびR¹¹は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性置換基または水素原子であり、

mは0または1である。))

[0018] [6] [5]に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体を製造する方法であって、

[1]または[2]のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体と生体機能性分子を、水溶性の有機溶媒が含まれていてもよい中性または塩基性の緩衝液中で反応させるカップリング工程、および

前記カップリング工程後の中性または塩基性条件下での精製工程を備えることを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体の製造方法。

発明の効果

[0019] 本発明のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体は、生体機能性分子をプロドラッグ化し、生理的条件下で徐々にアセタールを加水分解させることでベンジル脱離を誘発し、生体機能性分子を徐々に放出し、ポリオキシエチレン誘導体で修飾された生理機能性分子の薬理作用を改善できる。

[0020] なお、特許文献3の実施例では、非酵素依存的に生体機能性分子を放出可能であり、酸性条件下で生体機能性分子を放出可能な具体的構造が例示されているものの、生理的条件下、すなわちpH7.4付近の中性条件下で、アセタールの加水分解をトリガーとしたベンジル脱離による生体機能性分子の放出が可能な具体的な構造は記載されていない。

ここで、特許文献3の化合物中のアセタール構造は、一般的にはジオールやカルボニル基の保護基として用いられるものであり、その脱保護は酸性条件下で行われることが知られており、中性や塩基性条件下では安定である。ゆえに、特許文献3の化合物中、生理的条件下、すなわち中性条件下で適切な速度で加水分解し、生理機能性分子を放出するような化合物の創出は示唆されていない。

[0021] また、特許文献3の製造方法では、アセタール構造を有する低分子化合物のフェノール性水酸基とPEGのヒドロキシ基とを塩基性条件下でカップリングする工程を含むが、本発明に関わるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体の製造において、特許文献3と同様のカップリング工程を経由した場合、前記低分子化合物中のアセタール構造が不安定化し、本発明に関わるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体を得ることが困難であることがわかった。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]式(50)、(51)、(52)及び(53)の化合物を用いたpD7.4の重水緩衝液中、40℃における分解試験の結果である。

[図2]実施例13に記載の精製されたPEG化RNaaseのHPLC分析の結果である。

[図3]式(75)、(76)、(77)及び(78)の化合物を用いたpD7.4の重水緩衝液中、40℃における分解試験の結果である。

[図4]TNF α 阻害活性を有するアプタマーの塩基配列である。

[図5]Aは比較例3に記載の精製されたPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)のHPLC分析結果である。Bは実施例25に記載の精製された2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)のHPLC分析結果である。

[図6]PEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)、2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)および配列番号1のアプタマーの5'末端にC6アミノリンカーが修飾したNH₂-C6

－ (A p t - T N F α) を用いた T N F α 阻害活性の評価結果である。

[図7] Aは比較例4に記載の精製された P E G (2 0 k) - O C O - N H - インスリンの H P L C 分析結果である。Bは実施例26に記載の精製された 2 M P E G (2 0 k) - O C O - N H - インスリンの H P L C 分析結果である。

[図8] Aは P E G (2 0 k) - O C O - N H - インスリンの種々の p H を有する緩衝液中の安定性評価の結果である。Bは 2 M P E G (2 0 k) - O C O - N H - インスリンの種々の p H を有する緩衝液中の安定性評価の結果である。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、生理的条件下でアセタールが加水分解し、ベンジル脱離を経て、生体機能性分子が徐々に放出されることを特徴とする。本明細書中における「生理的条件下」とは、p H 6 . 0 ~ 8 . 0 である。

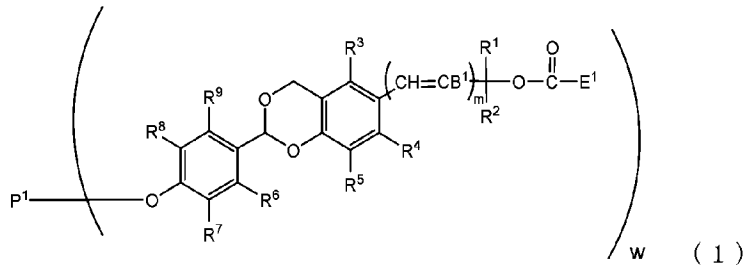
また、生理的条件下における生体機能性分子の放出速度は、p H 7 . 4 の緩衝液中でのアセタールの半減期として評価することができる。p H 7 . 4 の緩衝液中でのアセタールの半減期は、0 . 5 日 ~ 3 5 日であることが好ましい。ここで、「半減期」とはアセタールが加水分解され、1 / 2 当量がアルデヒドとなるまでに要する時間を表す。

[0024] 特許文献3の実施例に例示された、アセタールに結合したフェニル基の3位にエーテル結合を介してポリオキシエチレン誘導体が導入された化合物では、生理的条件下での前記アセタール半減期は達成できなかった。これに対して、本発明者は、アセタールに結合したフェニル基の2位もしくは4位にエーテル結合を介してポリオキシエチレン誘導体が導入された化合物であれば、生理的条件下で適用した場合に前記アセタール半減期を達成可能であることを見いだした。

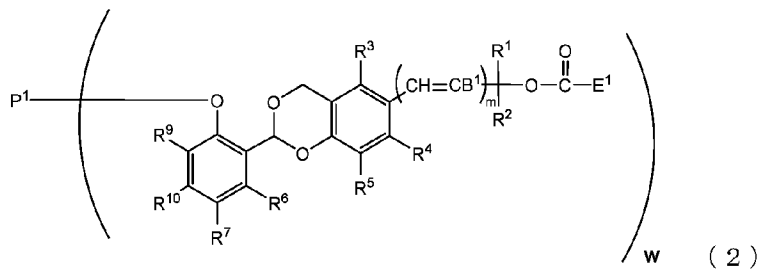
[0025] すなわち、本発明は下記式(1)、式(2)、式(3)または式(4)で表され、生理的条件下で開裂することを特徴とするアセタール型リリース

ルポリオキシエチレン誘導体である。

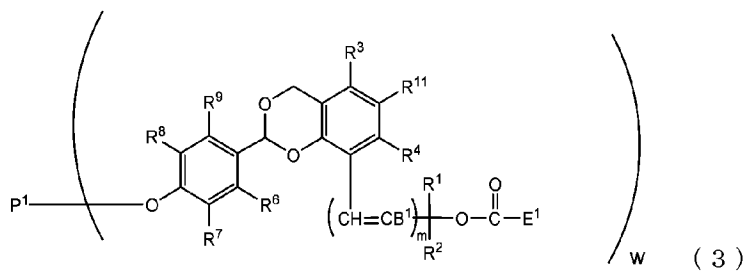
[化11]



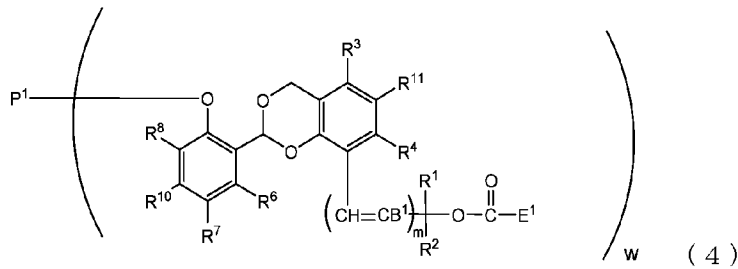
[化12]



[化13]



[化14]



[0026] 式(1)、式(2)、式(3)及び式(4)中

B¹は水素原子または-C(R¹)(R²)OC(O)E¹であり、

E¹は脱離基であり、

P¹は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体であり、

wは1～8の整数であり、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵及びR¹¹は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性の置換基または水素原子であり、

mは0または1である。

[0027] 式(1)～(4)中、R¹、R²及びE¹の詳細は後述するが、B¹は水素原子または-C(R¹)(R²)OC(O)E¹であり、好ましくは水素原子である。

[0028] 式(1)～(4)中、E¹は脱離基であり、脱離基の好適例としては、スクシンイミジルオキシ基、フタルイミジルオキシ基、4-ニトロフェノキシ基、1-イミダゾリル基、ペンタフルオロフェノキシ基、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ基及び7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ基であり、より好ましくはスクシンイミジルオキシ基、4-ニトロフェノキシ基、1-イミダゾリル基、ペンタフルオロフェノキシ基であり、更に好ましくはスクシンイミジルオキシ基または4-ニトロフェノキシ基である。

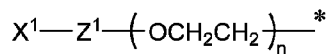
[0029] 式(1)～(4)中、P¹は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン

誘導体であり、具体的にはヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体 (P¹-OH) から、エーテル結合 (-O-) を構成するヒドロキシ基 (OH) を除いた残基である。ポリオキシエチレンは、エチレンオキシドの重合で得られる分子量分布を有するポリオキシエチレン、ならびに、単一分子量のオリゴオキシエチレンをカップリング反応で結合した単分散のポリオキシエチレンの両方を含む。

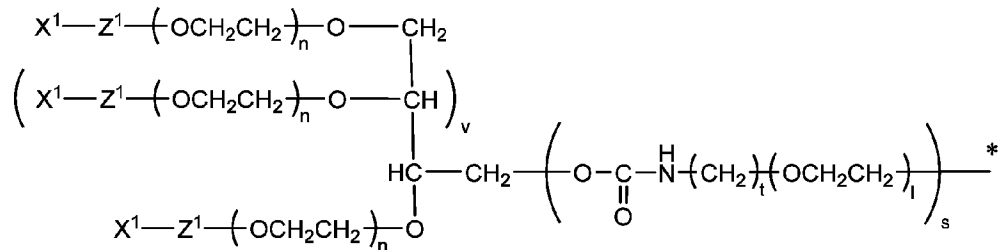
P¹の好適例は、Wの数に応じて、以下の残基であることが好ましい。

[0030] w = 1 のとき、下式 (p1) または式 (p2) で表される残基である。

[化15]



(p1)



(p2)

[0031] (X¹は炭素数1～24の炭化水素基、保護基で保護されたアミノ基または生体機能性分子と反応可能な基であり、

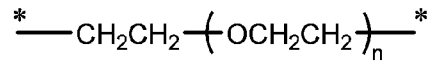
Z¹は2価のスペーサーまたは単結合であり、

n及びlはそれぞれ独立して3～20であり、

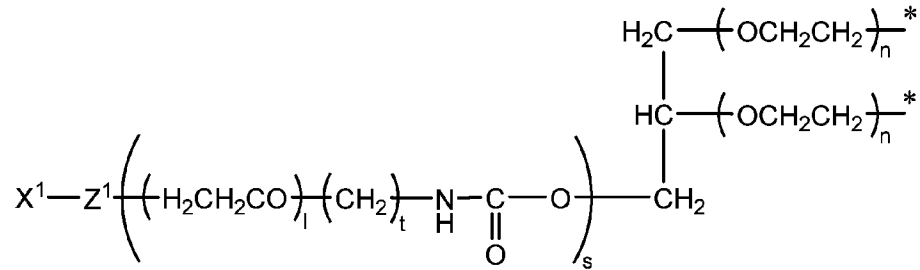
sは0または1であり、tは2または3であり、vは0または2である。)

[0032] w = 2 のとき下式 (p3) または (p4) で表される残基である。

[化16]



(p3)

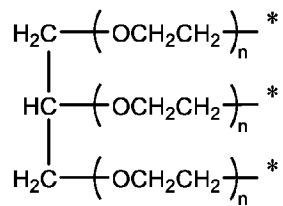


(p4)

[0033] (X¹、Z¹、n、l、s 及び t は前記と同義である。)

[0034] w = 3 のとき下式 (p 5) で表される残基である。

[化17]

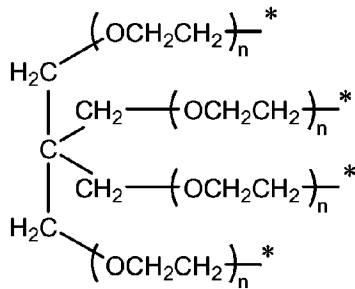


(p5)

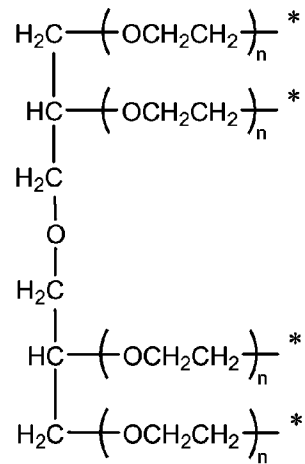
[0035] (n は前記と同義である。)

[0036] w = 4 のとき下式 (p 6)、(p 7)、(p 8) で表される残基である。

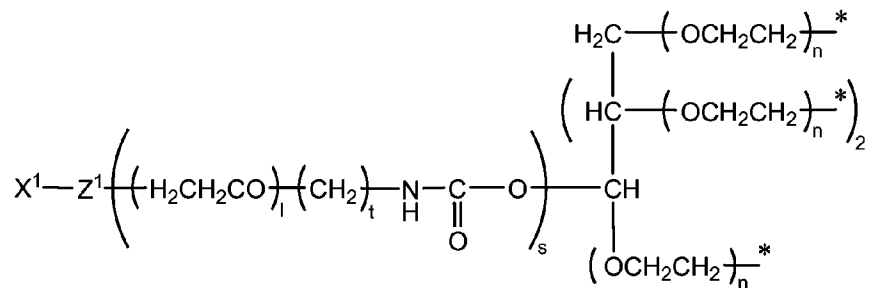
[化18]



(p6)



(p7)

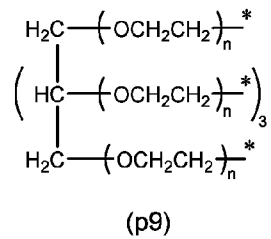


(p8)

[0037] (X¹、Z¹、n、l、s 及び t は前記と同義である。)

[0038] w = 5 のとき下式 (p 9) で表される残基である。

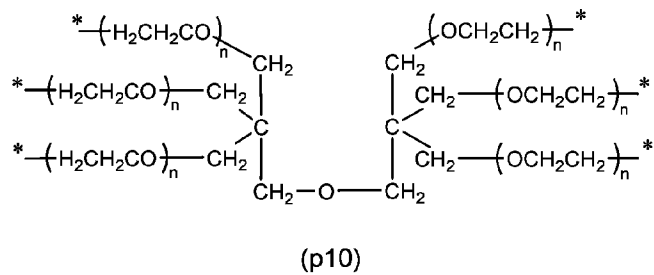
[化19]



[0039] (nは前記と同義である。)

[0040] w = 6 のとき下式 (p 1 0) で表される残基である。

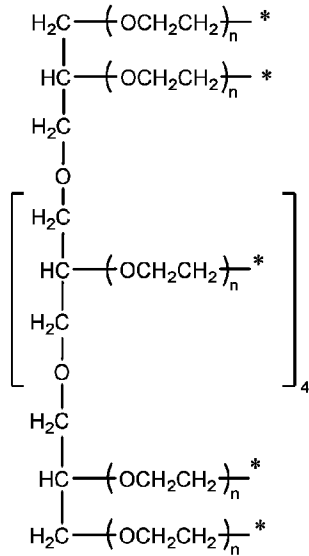
[化20]



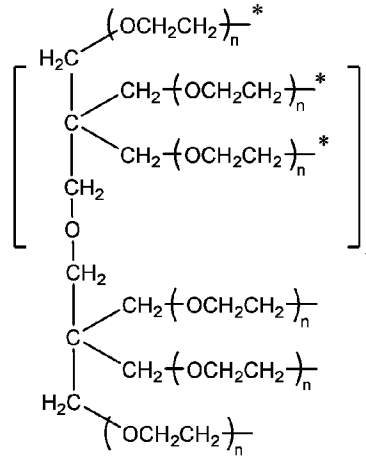
[0041] (nは前記と同義である。)

[0042] w = 8 のとき下式 (p 1 1) 、 (p 1 2) 、 (p 1 3) で表される残基である。

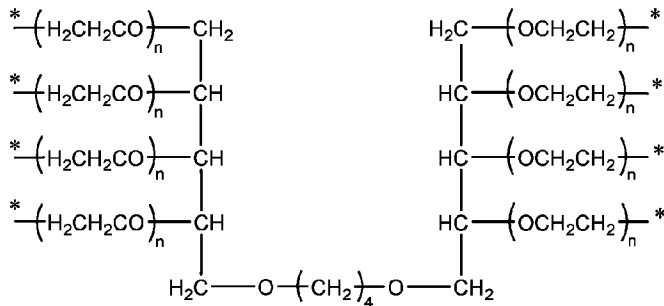
[化21]



(p11)



(p12)



(p13)

[0043] *は、酸素原子との結合点を表す。

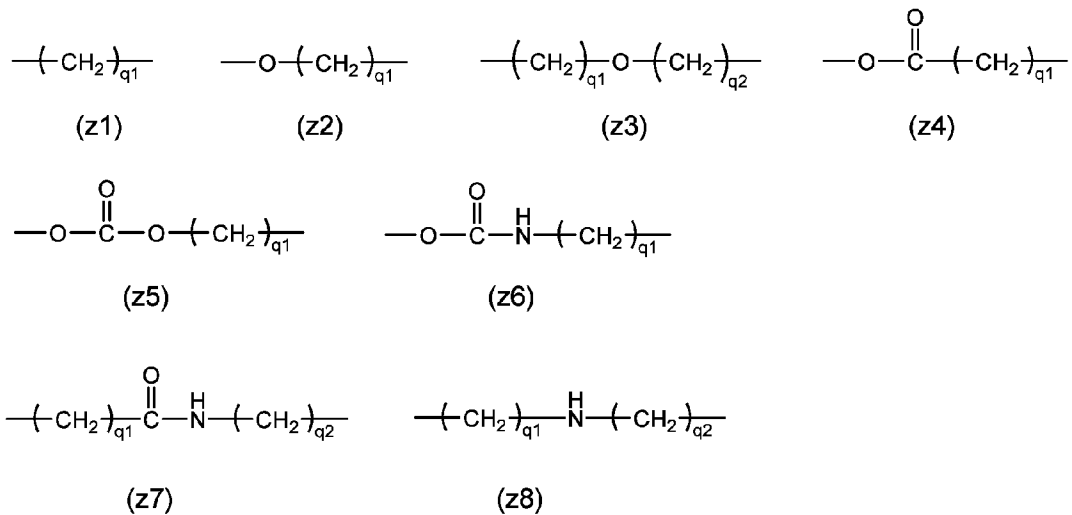
[0044] 式 (p 1) ~ (p 1 3) 中、n 及び l は - (OCH₂CH₂) - で表されるオキシエチレン基の付加モル数を表し、それぞれ独立して 3 ~ 2, 0 0 0 であり、好ましくは 2 0 ~ 1, 5 0 0 であり、より好ましくは 4 0 ~ 1, 0 0 0 であり、更に好ましくは 6 0 ~ 5 0 0 であり、サイズ排除クロマトグラフィーや質量分析法などから求められるポリオキシエチレン誘導体の数平均分子量から、- (OCH₂CH₂)_n- で表されるポリオキシエチレン鎖以外の分子に由来する分子量を引いた値を、オキシエチレン基に由来する分子量 4 4

で割ることで算出できる。

[0045] 式 (p 1) (p 2) (p 4) 及び式 (p 8) 中、Z¹はポリオキシエチレン基とX¹をつなぐ2価のスペーサーまたは単結合であり、2価のスペーサーとしてはアセタール構造よりも安定であれば特に制限は無いが、好ましくはエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、ウレタン結合、アミド結合、2級アミノ基もしくはこれらを含むアルキレン基であり、アルキレン基の炭素数は1~24であり、例えば群(1)に記載される(z1)~(z8)のスペーサーが挙げられる。

[0046] 群(1)

[化22]



[0047] 式中、q₁及びq₂はそれぞれ独立して1~12の整数であり、例えば、末端の活性カーボネート基をタンパク質内部のような疎水性環境で結合させたい場合は、q₁及びq₂は大きい方が好ましく、親水性環境で結合させたい場合は、q₁及びq₂は小さい方が好ましい。ただし、Z¹がエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、ウレタン結合、アミド結合、2級アミノ基もしくはこれらを含むアルキレン基であって、複数の同一構造単位が結合している場合における前記構造単位の数は2以下である。

[0048] 式 (p 1) (p 2) (p 4) 及び式 (p 8) 中、X¹は炭素数 1～24 の炭化水素基、保護基で保護されたアミノ基または生体機能性分子と反応可能な基である。

炭化水素基の具体的な例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基、ヘンエイコシル基、ドコシル基、トイコシル基、テトラコシル基、フェニル基、ベンジル基、クレジル基、ブチルフェニル基、ドデシルフェニル基及びトリチル基などが挙げられ、好ましくは炭素数 1～10 の炭化水素基、より好ましくはメチル基またはエチル基であり、更に好ましくはメチル基である。

[0049] 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、使用される条件及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。本発明において保護基で保護されたアミノ基としては、例えばアシル系保護基またはカルバメート系保護基で保護されたアミノ基、またはアジド基が挙げられ、アシル系保護基またはカルバメート系保護基の具体例として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及び2-(トリメチルシリル)エチルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0050] また、生体機能性分子と反応可能な基としては、ホルミル基、エポキシ基、マレイミジル基、ビニルスルホン基、アクリル基、スルホニルオキシ基、

カルボキシ基、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、またはアジド基である。

[0051] 更に具体的には、生体機能性分子のアミノ基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基は、ホルミル基、エポキシ基、マレイミジル基、ビニルスルホン基、アクリル基、スルホニルオキシ基及びカルボキシ基である。生体機能性分子のチオール基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基は、ホルミル基、エポキシ基、マレイミジル基、ビニルスルホン基、アクリル基、スルホニルオキシ基、カルボキシ基、ジチオピリジル基、 α -ハロアセチル基、アルキニル基、アリル基及びビニル基である。生体機能性分子のアルキニル基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基は、アジド基である。生体機能性分子のアジド基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基はアルキニル基及び三重結合を含む官能基である。

この態様の好適な実施形態において、生体機能性分子と反応可能な基は群 (I I)、群 (I I I)、群 (I V) または群 (V) で示される基である。なお、「**」はZ¹との結合点を表す。

[0052] 群 (I I) : 生体機能性分子のアミノ基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基

下記の (a)、(b)、(e) 及び (f)

群 (I I I) : 生体機能性分子のチオール基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基

下記の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (h)

群 (I V) : 生体機能性分子のアルキニル基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基

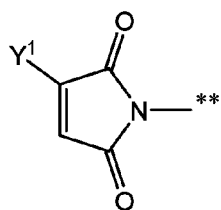
下記の (c)、(d) 及び (g)

群 (V) : 生体機能性分子のアジド基と反応して共有結合を形成することが可能な官能基

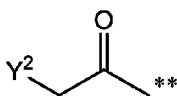
下記の (i) 及び (j)

[0053]

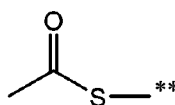
[化23]



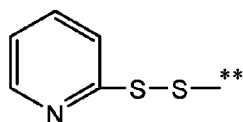
(a)



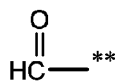
(b)



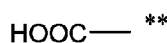
(c)



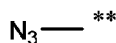
(d)



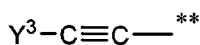
(e)



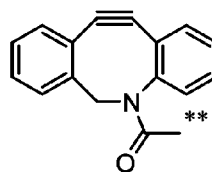
(f)



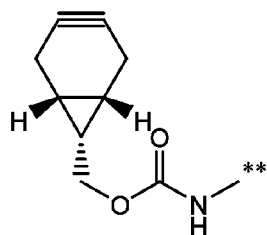
(g)



(h)



(i)



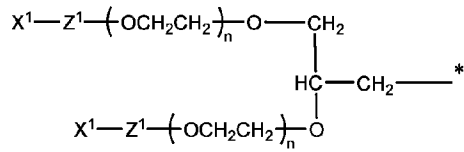
(j)

[0054] 式中、 Y^1 及び Y^3 はそれぞれ独立して水素原子または炭素数1～5の炭化水素基であり、具体的な炭化水素基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、*t*-ブチル基及びペンチル基などが挙げられる。 Y^2 は塩素原子、臭素原子及びヨウ素原子から選択されるハロゲン原子である。

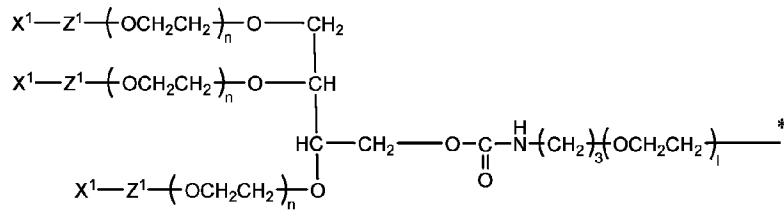
式(p2)、(p4)及び式(p8)において、 s は0または1であり、 t は2または3であり、 v は0または2であり、好ましい実施形態は、下式(

p 1 4) ~ (p 1 9) で表される残基である。

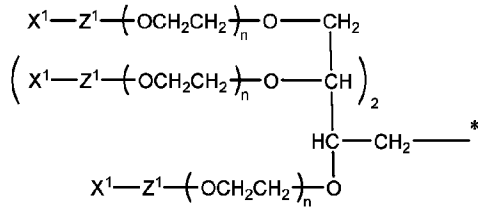
[0055] [化24]



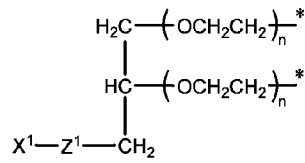
(p14)



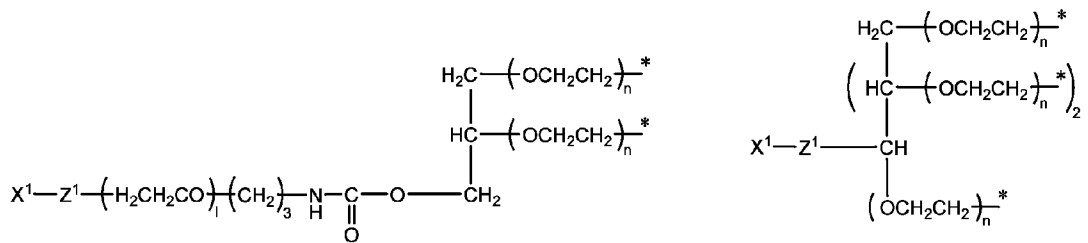
(p15)



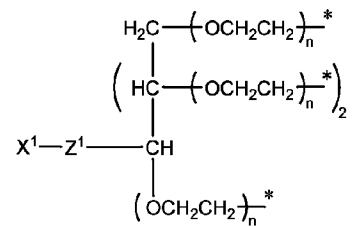
(p16)



(p17)



(p18)



(p19)

[0056] 式 (p 1 4) ~ (p 1 9) 中、X¹、Z¹、n 及び l は前述と同義である。

[0057] 式 (1) ~ (4) 中、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 及び R¹¹ は、それぞれ独立して、炭素数 1 ~ 10 の炭化水素基または水素原子であり、具体的な炭化水素基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、t-ブ

チル基、フェニル基及びベンジル基であり、水素原子またはメチル基がより好ましい。

[0058] 式(1)～(4)中、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性置換基または水素原子である。電子求引性の置換基としては、炭素数2～5のアシル基、炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数2～5のカルバモイル基、炭素数2～5のアシルオキシ基、炭素数2～5のアシルアミノ基、炭素数2～5のアルコキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、炭素数1～4のアルキルスルファニル基、炭素数1～4のアルキルスルホニル基、炭素数6～10のアリールスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基及びシアノ基であり、好ましい例としてはアセチル基、メトキシカルボニル基、メチルカルバモイル基、アセトキシ基、アセトアミド基、メトキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メチルスルファニル基、フェニルスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基及びシアノ基が挙げられる。

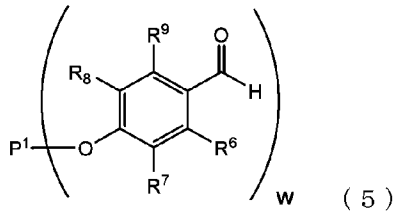
[0059] また、電子供与性の置換基としては、炭素数1～4のアルキル基であり、好ましい例としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基及び t -ブチル基が挙げられる。フェニル基のメタ位、すなわち R^7 または R^8 、では電子求引性、パラ位及びオルト位、すなわち R^6 、 R^9 または R^{10} 、では電子供与性である置換基としては、炭素数1～4のアルコキシ基、炭素数6～10のアリール基及び炭素数6～10のアリールオキシ基であり、好ましい例としてはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、 t -ブトキシ基、フェニル基及びフェノキシ基が挙げられる。

[0060] 本発明のより好ましい様態として、式(1)～(4)中、 m が0であり、 R^1 及び R^2 が水素原子であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^{11} が水素原子または炭素数1のメチル基であり、 R^3 、 R^4 及び R^5 が水素原子であり、 R^{11} がメチル基であることがより好ましい。

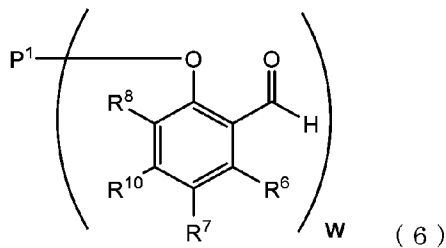
[0061] 次に、本発明におけるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導

体の製造方法について説明する。本発明におけるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体を製造するには、ポリオキシエチレン誘導体とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体とをカップリングさせることによって、下記式（５）または式（６）で表されるカップリング生成物を得るカップリング工程、前記カップリング工程後に、酸性条件下で、前記式（５）または前記式（６）で表される前記カップリング生成物を、２位にヒドロキシメチル基を有し、かつ４位または６位に置換基（ $-\text{CH}=\text{CB}^1$ ）_mC（R¹）（R²）-OH（B¹、m、R¹、R²は前述のとおりである）を有するフェノールと反応させることで、アセタール構造体を得るアセタール化工程、および前記アセタール化工程後に、４位または６位の前記置換基の末端に脱離基構造（ $-\text{OC}(\text{O})\text{E}^1$ ）を導入する脱離基構造導入工程を実施する。

[0062] [化25]



[化26]



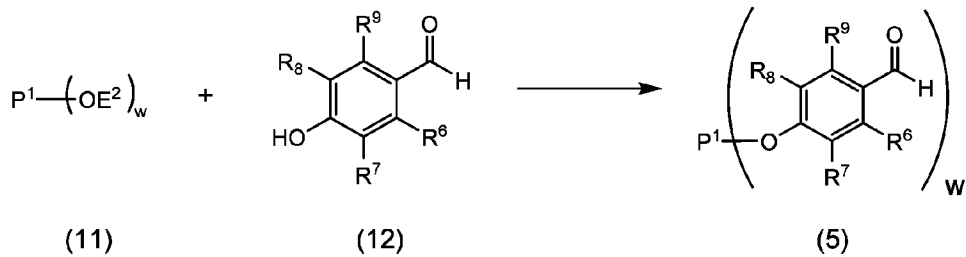
[0063] (式（５）または（６）中、P¹、w、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰は前述したとおりである)

[0064] ポリオキシエチレン誘導体とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体とのカッ

プリング工程とは、反応 1-1 または反応 1-2 で表される反応工程を経て式 (5) または (6) のカップリング生成物を得る工程であり、反応工程後に精製工程があってもよい。

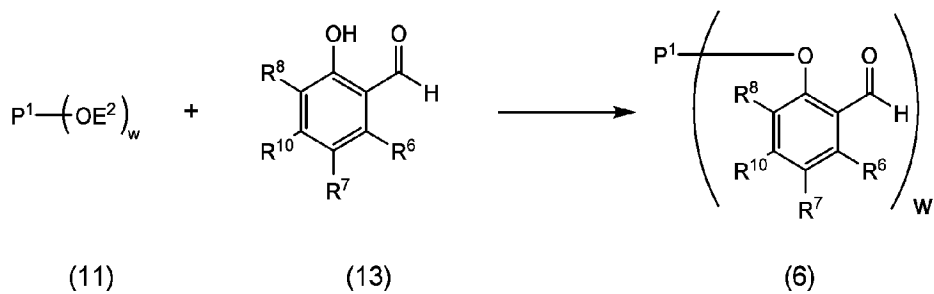
[0065] (反応 1-1)

[化27]



[0066] (反応 1-2)

[化28]



[0067] カップリング反応に用いるポリオキシエチレン誘導体とは、式 (11) で表される化合物であり、式 (11) 中、 P^1 及び w の詳細な説明は前述と同義であり、 E^2 は、脱離基または水素原子である。脱離基としてはカップリング反応において反応性を有する基であれば特に制限は無いが、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、メシラート基またはトシラート基が好ましく、メシラート基がより好ましい。ヒドロキシベンズアルデヒド誘導体とは式 (1

2) または式(13)で表される化合物であり、式中 $R^6 \sim R^{10}$ の詳細な説明は前述と同義である。

[0068] 反応1-1及び反応1-2の式(11)中、 E^2 が脱離基の場合、式(11)の化合物とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体をトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドまたはジメチルアセトアミドなどの非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、トリエチルアミン、*N*-メチルモルホリン、*t*-ブトキシカリウムまたはヘキサメチルジシラザンナトリウムなどの有機塩基、もしくは炭酸カリウム、水酸化カリウムまたは水素化ナトリウムなどの無機塩基の存在下でカップリングする反応である。ヒドロキシベンズアルデヒド誘導体、有機塩基、無機塩基の使用割合は、特に制限はないが、式(11)の化合物の化学反応可能な官能基に対して等モル以上が好ましい。また、有機塩基を溶媒として用いてもよい。

[0069] 反応1-1及び反応1-2の式(11)中、 E^2 が水素原子の場合、テトラヒドロフラン、ジオキサンまたはジクロロメタンなどの有機溶媒中、アゾジカルボン酸ジエチルまたはアゾジカルボン酸ジイソプロピルなどのアゾ試薬及びトリフェニルホスフィン、トリー n -オクチルホスフィンまたはトリブチルホスフィンなどのホスフィン存在下で式(11)とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体をカップリングする反応である。ヒドロキシベンズアルデヒド誘導体、アゾ試薬、ホスフィンの使用割合は、特に制限はないが、式(11)の化合物の化学反応可能な官能基に対して等モル以上が好ましい。

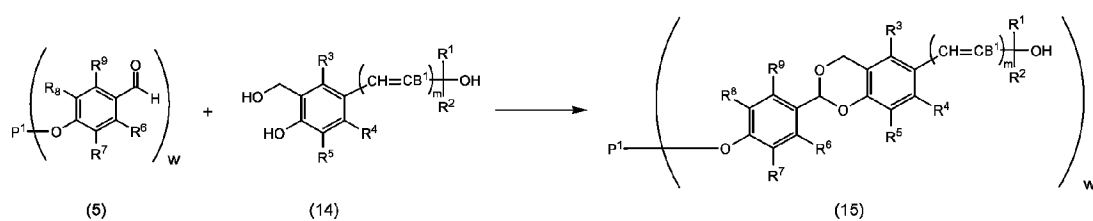
[0070] 反応1-1及び反応1-2の反応工程後、反応で副生した不純物、また反応で消費されずに残存した化合物、塩基触媒を精製工程で除去を行うのが好ましく、精製方法は特に制限されないが、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出などで精製することができる。

[0071] 前記カップリング工程後に酸性条件下で式(5)または式(6)で表されるカップリング生成物を、2位にヒドロキシメチル基を有し、かつ4位また

は6位に置換基 $(-CH=CB^1)_m C(R^1)(R^2)-OH$ (B^1 、 m 、 R^1 、 R^2 は前述のとおりである) を有するフェノールと反応させるアセタール化工程とは、反応2-1~2-4のいずれかで表される反応工程を経て式(15)、(16)、(18)または式(19)で表されるアセタール構造体を得る工程であり、反応工程後に精製工程があってもよい。

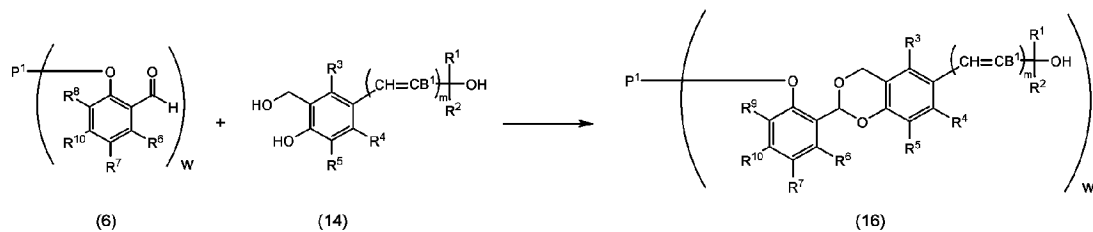
[0072] (反応2-1)

[化29]



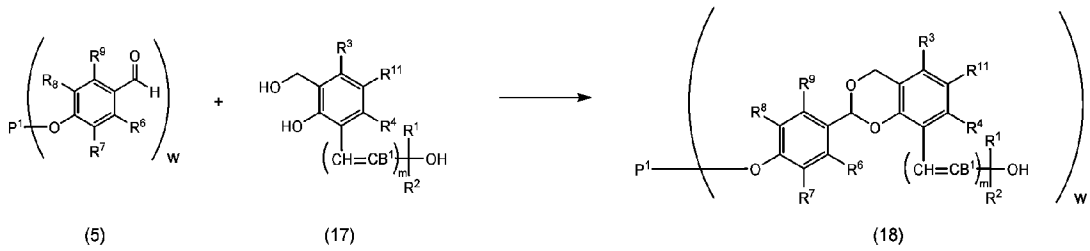
[0073] (反応2-2)

[化30]



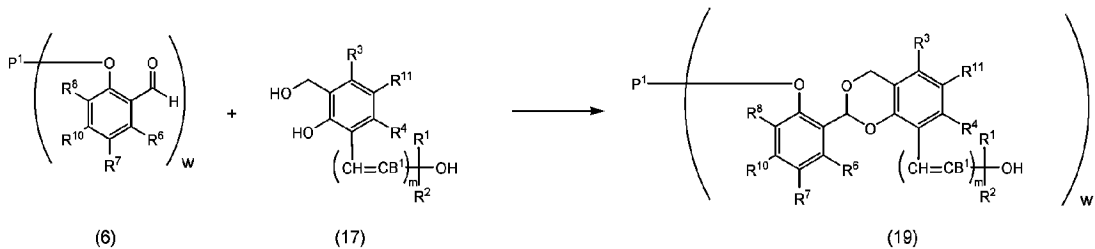
[0074] (反応2-3)

[化31]



[0075] (反応 2 - 4)

[化32]



[0076] 式 (14) ~ (19) 中、P¹、B¹、m、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 及び R¹¹の詳細は前記アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体中の説明と同義である。

[0077] 反応 2 - 1 ~ 2 - 4 は、式 (5) または式 (6) で表されるカップリング生成物と式 (14) または式 (17) で表される前記フェノールをトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、t-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドまたはジメチルアセトアミドなどの非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、酸触媒存在下で反応させて式 (15)、(16)、(18) または式 (19) のアセタール構造体を得る工程である。酸触媒は有機酸または無機酸のいずれでもよく、特に制限は無いが、具体的な例を挙げれば p-トルエンスルホン酸、p-トルエンス

ルホン酸ピリジニウム、メタンスルホン酸、10-カンファースルホン酸、塩化水素、ヨウ素、塩化アンモニウム、シュウ酸及び三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体などである。さらに、反応で生じる水分子を排除するために反応系中に脱水剤を加えてもよく、脱水剤の種類としては、反応の妨げにならない脱水剤であれば特に制限は無いが、例えば硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、アルミナ、シリカゲルまたはモレキュラーシーブなどがあり、好ましくはモレキュラーシーブである。

[0078] 反応2-1~2-4の反応工程後、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、塩基触媒を精製工程で除去を行うのが好ましく、精製方法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。

[0079] 特に前記アセタール化工程と、前記ヒドロキシ基に脱離基構造を導入する工程との間に、式(5)及び(6)中のカップリング生成物中の保護基で保護されたアミノ基の脱保護工程及び前記脱保護工程後に脱保護されたアミノ基への生体機能性分子との反応可能な基を導入する工程を備えていてもよい。前記保護基の脱保護工程及び脱保護されたアミノ基への生体機能性分子との反応可能な基を導入する工程の条件は、多くの一般的な成書に見出すことができ、脱保護工程は、例えば「Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; Wiley-Interscience: New York, 2007」に従って行うことができ、脱保護されたアミノ基へ生体機能性分子との反応可能な基を導入する工程は、例えば「Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.」に従って行うことができる。

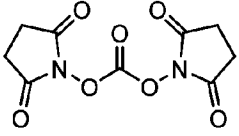
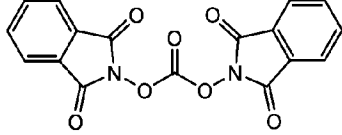
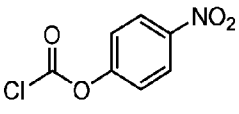
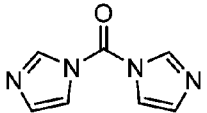
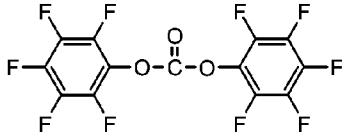
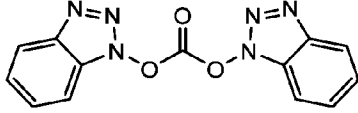
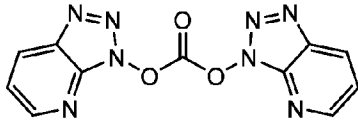
[0080] 前記アセタール化工程または前記脱保護されたアミノ基への生体機能性分子と反応可能な基を導入する工程後に、末端ヒドロキシ基の代わりに脱離基構造を導入する脱離基構造導入工程とは、式(15)、(16)、(18)及び式(19)で表されるポリオキシエチレン誘導体中のヒドロキシ基をス

クシンイミジルオキシカルボニルオキシ基、フタルイミジルオキシカルボニルオキシ基、4-ニトロフェノキシカルボニルオキシ基、1-イミダゾリルカルボニルオキシ基、ペンタフルオロフェノキシカルボニルオキシ基、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシカルボニルオキシ基または7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシカルボニルオキシ基に変換する工程であり、反応工程後に精製工程があってもよい。

[0081] ヒドロキシ基の変換は、式(15)、(16)、(18)または式(19)で表されるポリオキシエチレン誘導体と、例えば表1に記載されたそれぞれの脱離基へ変換するための試薬をトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドまたはジメチルアセトアミドなどの非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、トリエチルアミン、*N*-メチルモルホリン、ピリジンまたは4-ジメチルアミノピリジンなどの有機塩基、もしくは炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウムまたは炭酸カリウムなどの無機塩基の存在下で縮合することである。表1記載の試薬、塩基触媒の使用割合は、特に制限はないが、式(15)、(16)、(18)または式(19)のポリオキシエチレン誘導体のヒドロキシ基に対して等モル以上が好ましい。また、表1に記載の試薬は市販品を使用してもよく、公知の反応を使用して製造してもよい。

[0082]

[表1]

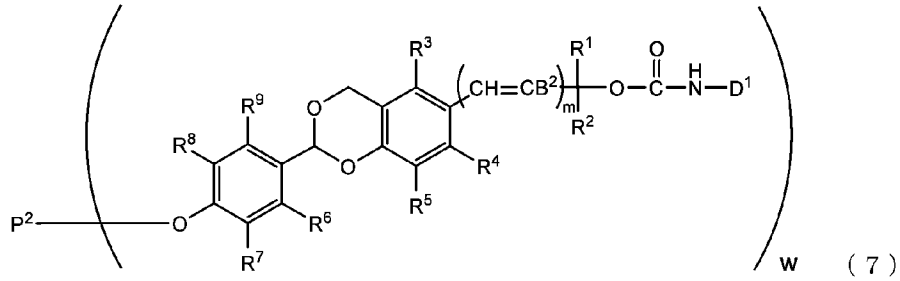
脱離基構造 (−OC(O)E ¹)	試薬
スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ基	
フタルイミジルオキシカルボニルオキシ基	
4-ニトロフェノキシカルボニルオキシ基	
1-イミダゾリルカルボニルオキシ基	
ペンタフルオロフェノキシカルボニルオキシ基	
ベンゾトリアゾール-1-イルオキシカルボニルオキシ基	
7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシカルボニルオキシ基	

[0083] 脱離基構造導入工程における反応工程後、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、塩基触媒を精製工程で除去を行うのが好ましく、精製方法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。

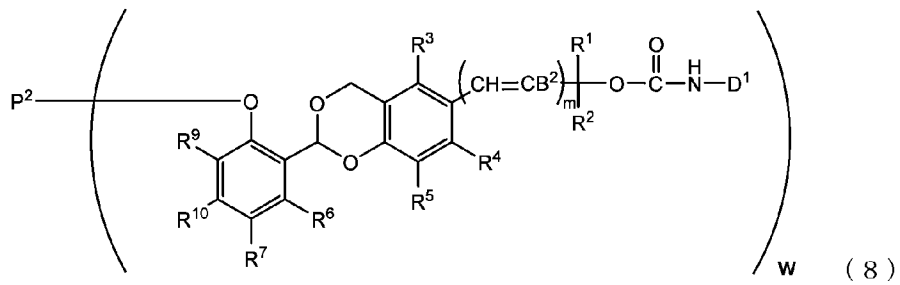
[0084] 本発明におけるアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体は、前記アセタール型リリーサブルポリエチレングリコール誘導体の−OC(O)

) E¹基と生体機能性分子に含まれるアミノ基とを反応させて得られ、下式(7)、(8)、(9)または(10)で表される。

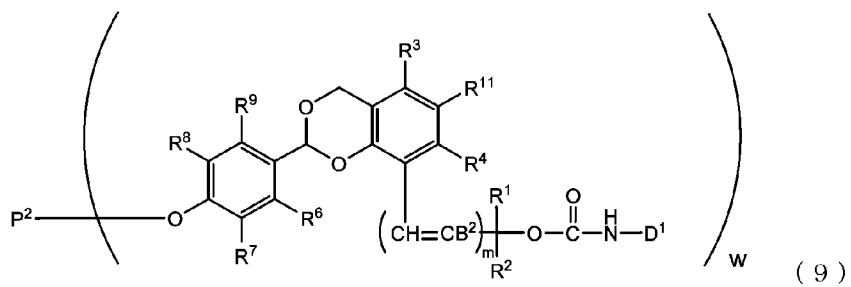
[化33]



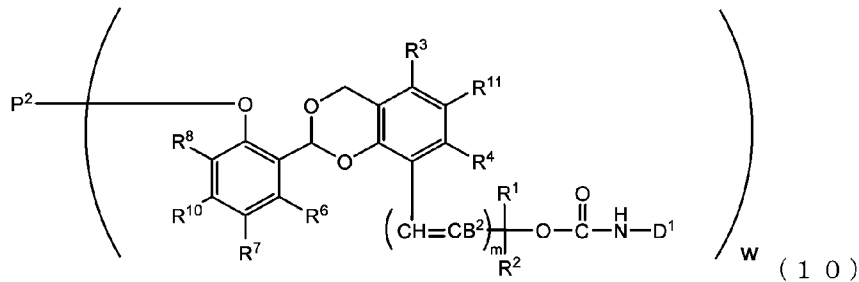
[化34]



[化35]



[化36]



[0085] 式(7)、(8)、(9)及び式(10)中、

B^2 は水素原子または $-C(R^1)(R^2)OC(O)NHD^1$ であり、

D^1 は、生体機能性分子に含まれるアミノ基から、カーバメート結合を構成するアミノ基を除いた残基であり、

P^2 は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体、または脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体および生体機能性分子の結合体であり、

w は1～8の整数であり、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^{11} は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は、それぞれ独立して、電子求引性または電子供与性の置換基または水素原子であり、

m は0または1である。

[0086] 式(7)～(10)中、 R^1 ～ R^{11} 、及び m の詳細は前述と同義である。

式(7)～(10)中、 B^2 は水素原子または $-C(R^1)(R^2)OC(O)NHD^1$ であり、好ましくは水素原子である。

[0087] 式(7)～(10)中、 D^1 は生体機能性分子に含まれるアミノ基のうち、カーバメート結合を構成するアミノ基を除いた残基である。

生体機能性分子としては、特に制限は無いが、ヒト又は他の動物の疾患の診断、治療、緩和、治療または予防に関わる物質である。具体的にはタンパ

ク質、ペプチド、核酸、細胞、ウィルスなどを含み、好適なタンパク質またはペプチドとしては、ホルモン、サイトカイン、抗体、アプタマー、酵素などが挙げられる。

[0088] より具体的には、サイトカインとしては、免疫を調整するインターフェロンタイプⅠ、タイプⅡ、タイプⅢや、インターロイキンや腫瘍壊死因子、それらの受容体アンタゴニストなどが挙げられる。成長因子としては、造血因子であるエリスロポエチンや刺激因子である顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）などが挙げられ、血液凝固因子としては、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子、第ⅩⅠⅠ因子などが挙げられる。ホルモンとしては、カルシトニンやインスリン、そのアナログやエキセナチド、GLP-1、そしてソマトスタチンやヒト成長ホルモンなどが挙げられる。抗体としては、完全長抗体、また抗体フラグメントとして、FabやsvFVなどが挙げられ、アプタマーとしては、DNAアプタマー、RNAアプタマーなどが挙げられ、酵素としては、スーパーオキシドディスムターゼやウリカーゼなどが挙げられる。

[0089] 好適なタンパク質としては、インターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、GCSF、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、ヒト成長ホルモン、抗体フラグメントなどが挙げられ、より好ましくは、ヒト成長ホルモン、インターフェロン、GCSF、エリスロポエチン、または抗体フラグメント（特にFab）が挙げられる。

[0090] 好適なペプチドとしては、インスリン、ビバリルジン、テリパラチド、エキセナチド、エンフビルチド、デガレリクス、ミファミルチド、ネシリチド、ゴセレリン、グラチラマー、オクトレオチド、ランレオチド、イカチバン、ジコチニド、プラムリンチド、ロミプロスチム、カルシトニン、オキシトシン、リュープロレリン、グルカゴンが挙げられ、より好ましくは、インスリン、エキセナチド、カルシトニン（特にサーモンカルシトニン）が挙げられる。

[0091] 式（7）～（10）中、P²は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレ

ン誘導体、または脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体および生体機能性分子の結合体である。

[0092] 脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体の詳細な説明は、前記アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体のP¹と同義である。

[0093] また、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体および生体機能性分子の結合体とは、前記アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体のP¹のX¹をD²とした基であり、D²は生体機能性分子と反応可能な基と生体機能性分子との反応によって形成された基である。生体機能性分子と反応可能な基の詳細は、前記アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体のX¹の説明と同義であり、生体機能性分子は、特に制限は無いが、ヒト又は他の動物の疾患の診断、治癒、緩和、治療または予防に関わる物質である。具体的にはタンパク質、ペプチド、核酸、細胞、ウィルスなどを含み、好適なタンパク質またはペプチドとしては、ホルモン、サイトカイン、抗体、アプタマー、酵素などが挙げられる。

[0094] D²中の生体機能性分子の好適例は、標的志向性のある生体機能性分子であり、例えば抗体やアプタマーなどがあり、抗体としては抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab')₂等が挙げられ、アプタマーとしてはペプチドアプタマー、RNAアプタマーまたはDNAアプタマーが挙げられる。

[0095] 本発明のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体の製造方法について説明する。本発明におけるポリオキシエチレン結合体を製造するには、前記アセタール型ポリオキシエチレン誘導体と生体機能性分子をアセトニトリル、ジメチルスルホキシドやN,N-ジメチルホルムアミドなどの水溶性の有機溶媒が含まれていてもよい中性または塩基性の緩衝液中で反応させて前記ポリオキシエチレン結合体を得るカップリング工程および前記カップリング工程後に塩基性条件下で未反応の前記ポリオキシエチレン誘導体、生体機能性分子または副生成物を除去する精製工程を実施する。中性または塩基性とは、pH 6.5～pH 11.0であり、好ましくはpH 7.0～pH

10.5であり、より好ましくはpH7.0～pH10.0であり、特に好ましくはpH7.0～pH9.0である。

[0096] 中性または塩基性の緩衝液とは、外から少量の酸や塩基を加えても、また、希釈して濃度を変えても、その影響を緩和してpH（水素イオン指数）をほぼ一定の中性または塩基性に保つ緩衝作用をもつ水溶液である。

緩衝液には、水溶性の有機溶媒を添加することもできる。この場合、水溶性の有機溶媒は、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、トリエチルアミン、ピリジンまたはヘキサメチルリン酸トリアミドがあげられ、好ましくはメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドまたはN,N-ジメチルホルムアミドであり、より好ましくはアセトニトリル、ジメチルスルホキシドまたはN,N-ジメチルホルムアミドである。

[0097] 前記カップリング工程後に実施する精製工程の具体的な方法としては、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーまたはアフィニティクロマトグラフィーなどがあげられる。

[0098] 前記精製工程では前記アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体中のアセタール構造が加水分解されにくい中性または塩基性条件下で未反応の前記ポリオキシエチレン誘導体、生体機能性分子または副生成物を除去でき、中性または塩基性条件とは、pH6.5～pH11.0であり、好ましくはpH7.0～10.5であり、より好ましくはpH7.0～10.0であり、特に好ましくはpH7.0～9.0である。

実施例

[0099] 以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限られるものではない。

[0100] 下記実施例で得られた¹H-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 ϕ 5mm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 $CDCl_3$ 、 d_6 -DMSOを用いた。得られたアセタール型リリーサブポリオキシエチレン結合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Thermo Fisher Scientific社製「Thermo Ultimate 3000」を用いた。

[0101] (実施例1-1)

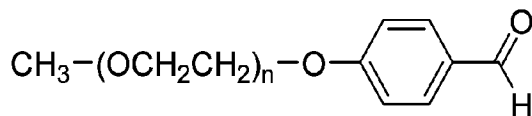
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに、日油社製SUNBRIGHT MEH-20T(40g, 2.0mmol)、トルエン(120g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(8mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45°Cへ冷却し、クロロホルム(200g)を仕込んだ後、25°Cまで冷却し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド(977mg, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.10g, 8.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35°C度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.51g, 7.0mmol)を3分割して加えた。25°Cにて1時間反応を行った後、メタノール(224mg, 7.0mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(16g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(20)の化合物を得た。

[0102] 1H -NMR($CDCl_3$, 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(OCH_2CH_2)_nOCH_3$), 3.52-4.23(m, $-(OCH_2CH_2)_n-$), 7.03(2H, d, arom.H), 7.83(2H, d, arom.H), 9.89(1H, s, $-COH$)

数平均分子量(Mn): 20,451

[化37]



n=約 4 5 5 (20)

[0103] (実施例 1 - 2)

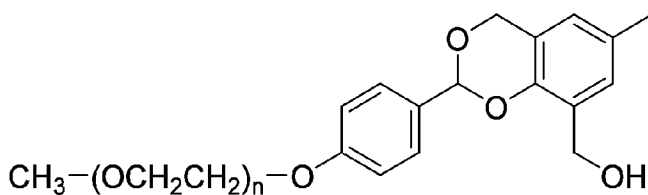
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(20)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(11.4mg, 0.06mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(21)の化合物を得た。

[0104] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.27(1H, t, -OH), 2.36(3H, s, -CH₃), 3.38(3H, s, -(OCH₂CH₂)_nOC H₃), 3.52-4.17(m, -(OCH₂CH₂)_n-), 4.68 (2H, dd, -CH₂OH), 4.94(1 H, d, -CH₂O-), 5.15(1H, d, -CH₂O-), 5.96(1H, s, -CH<), 6.77(1H, s, arom.H), 6.97(2H, d, arom.H), 7.04(1H, s, arom.H), 7.50(2H, d, arom. H)

数平均分子量(Mn): 20,435

[化38]



n=約 4 5 5 (2 1)

[0105] (実施例 1 - 3)

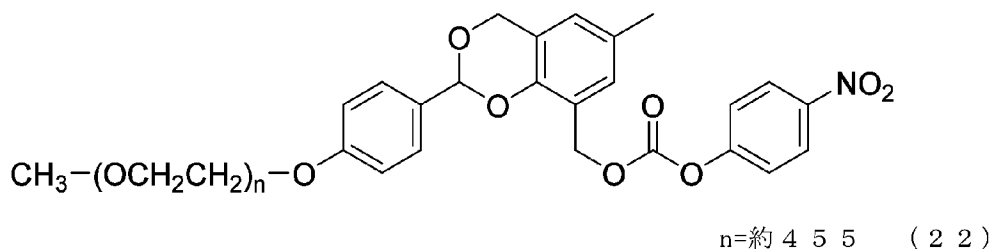
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(21)の化合物(250mg, 0.0125mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(23.7mg, 0.30mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(40.3mg, 0.20mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し、一部の不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(22)の化合物を得た。

[0106] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.31(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.98(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(1H, s, arom.H) 6.94(2H, d, arom.H), 7.11(1H, s, arom.H), 7.26-7.29(2H, m, arom.H), 7.52(2H, d, arom.H), 8.24(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn): 20,204

[化39]



[0107] (実施例 2 - 1)

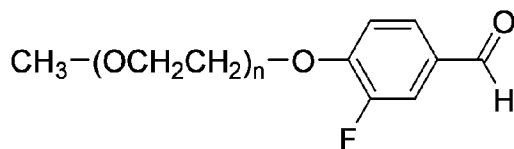
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT MEH-20T(40g, 2.0mmol)、トルエン(120g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(8mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45°Cへ冷却し、クロロホルム(200g)を仕込んだ後、25°Cまで冷却し、3-フルオロ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド(1.12g, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.62g, 10.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35°C度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.84g, 8.6mmol)を3分割して加えた。25°Cにて2時間反応を行った後、メタノール(276mg, 8.6mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(23)の化合物を得た。

[0108] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.30(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 7.13(1H, t, $-\text{CH}<$), 7.60-7.65(2H, m, arom.H), 9.86(1H, s, $-\text{COH}$)

数平均分子量(Mn): 20,201

[化40]



n=約 4 5 5 (23)

[0109] (実施例 2 - 2)

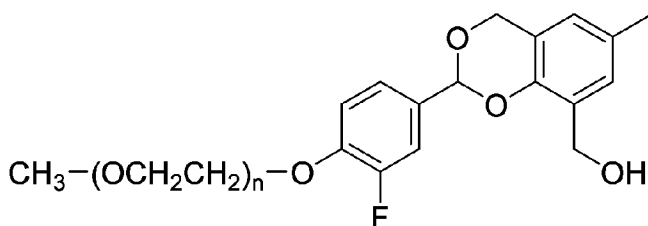
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(23)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(11.4mg, 0.06mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(24)の化合物を得た。

[0110] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.20(1H, t, -OH), 2.29(3H, s, -CH₃), 3.38(3H, s, -(OCH₂CH₂)_nOC H₃), 3.52-4.24(m, -(OCH₂CH₂)_n-), , 4.68(2H, dd, -CH₂OH), 4.94(1H, d, -CH₂O-), 5.14(1H, d, -CH₂O-), 5.93(1H, s, -CH<), 6.77(1H, s, arom.H), 7.04(1H, t, arom.H), 7.06(1H, s, arom.H), , 7.34-7.26(2H, m, arom.H)

数平均分子量(Mn): 20,445

[化41]



n=約 4 5 5 (2 4)

[0111] (実施例 2 - 3)

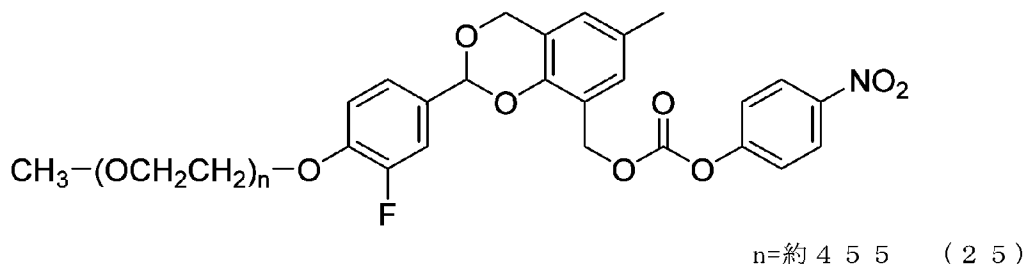
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(24)の化合物(180mg, 0.009mmol)およびジクロロメタン(2.4g)を仕込み、溶解後、ピリジン(17.1mg, 0.216mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(29.0mg, 0.144mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(1.8g)を用いて水洗を繰り返し、一部の不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(25)の化合物を得た。

[0112] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.32(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.24(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.34(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.96(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(1H, s, arom.H), 7.01(1H, t, arom.H), 7.12(1H, s, arom.H), 7.26-7.36(4H, m, arom.H), 8.26(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn): 20,298

[化42]



[0113] (実施例3-1)

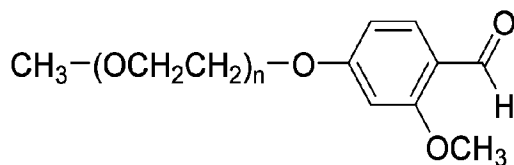
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT MEH-20T(40g, 2.0mmol)、トルエン(120g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(8mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45°Cへ冷却し、クロロホルム(200g)を仕込んだ後、25°Cまで冷却し、4-ヒドロキシ-2-メトキシベンズアルデヒド(1.22g, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.62g, 10.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35°C度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.84g, 8.6mmol)を3分割して加えた。25°Cにて2時間反応を行った後、メタノール(276mg, 8.6mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(26)の化合物を得た。

[0114] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.21(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.50(1H, d, arom.H), 6.55(1H, dd, arom.H), 7.79(2H, d, arom.H), 10.3(1H, s, $-\text{COH}$)

数平均分子量(Mn): 20,216

[化43]



n=約 4 5 5 (26)

[0115] (実施例 3 - 2)

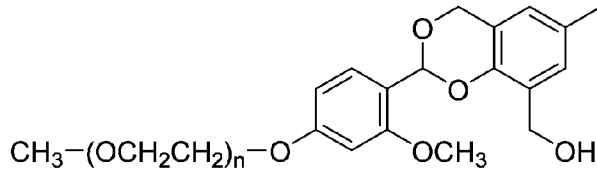
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(26)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(11.4mg, 0.06mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行い、一部の低分子不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(27)の化合物を得た。

[0116] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.84(1H, dd, $-\text{OH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.47(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.75(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.98(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.17(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.20(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.57-6.55(2H, m, arom.H), 6.78(1H, s, arom.H), 6.97(1H, s, arom.H), 7.58(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn): 20,215

[化44]



n=約 4 5 5 (2 7)

[0117] (実施例 3 - 3)

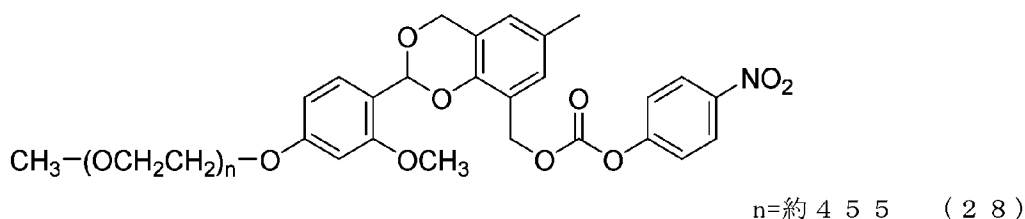
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(27)の化合物(300mg, 0.015mmol)およびジクロロメタン(4.0g)を仕込み、溶解後、ピリジン(28.5mg, 0.360mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(48.4mg, 0.240mmol)を仕込んで、25℃にて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(3.0g)を用いて水洗を繰り返し、一部の低分子不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(28)の化合物を得た。

[0118] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.31(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.93(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.18(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.33(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 6.26(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.52-6.54(2H, m, arom.H), 6.87(1H, s, arom.H), 7.10(1H, s, arom.H), 7.26-7.27(2H, m, arom.H), 7.59(1H, d, arom.H), 8.22(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn): 20,315

[化45]



[0119] (実施例4-1)

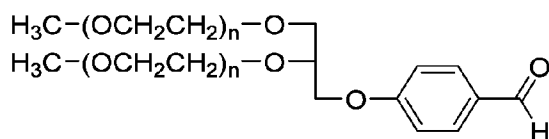
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT GL2-400H0(10g, 0.25mmol)、トルエン(30g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(2mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45°Cへ冷却し、クロロホルム(50g)を仕込んだ後、25°Cまで冷却し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド(244mg, 2.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(524mg, 2.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35°C度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(376mg, 1.75mmol)を3分割して加えた。25°Cにて2時間反応を行った後、メタノール(56mg, 1.75mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(80g)に溶解し、ヘキサン(60g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(16mg)を添加した酢酸エチル(80g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(40g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(40g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(29)の化合物を得た。

[0120] ¹H-NMR(CDCl₃, 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(6H, s, -(OCH₂CH₂)_n OCH₃), 3.52-3.92(m, -(OCH₂CH₂)_n-), 4.13(1H, dd, -CH₂O-), 4.21(1H, dd, -CH₂O-), 7.03(2H, d, arom.H), 7.83(2H, d, arom.H), 9.89(1H, s, -COH)

数平均分子量(Mn): 38,947

[化46]



n=約 4 5 5 (29)

[0121] (実施例4-2)

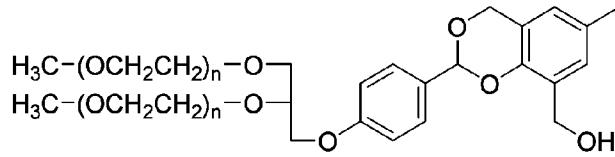
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(29)の化合物(1.0g, 0.025mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1 mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(17.1mg, 0.09mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(20g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(20g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(30)の化合物を得た。

[0122] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.35(1H, t, $-\text{OH}$), 3.38(6H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OC}$
 H_3), 3.52-3.91(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.07(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.14(1H
, dd, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.68 (2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.94(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$)
, 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.96(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.77(1H, s, arom
.H), 6.97(2H, d, arom.H), 7.04(1H, s, arom.H), 7.50(2H, d, a
rom.H)

数平均分子量(Mn): 39,110

[化47]



n=約 4 5 5 (30)

[0123] (実施例 4 - 3)

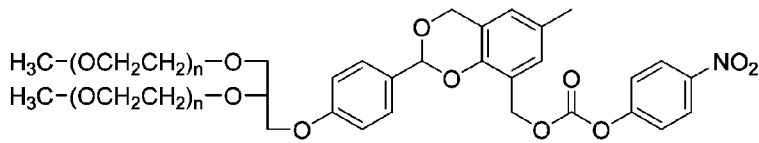
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(30)の化合物(250mg, 0.00625mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(11.9mg, 0.15mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(20.3mg, 0.10mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し、一部の不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(9mg)を添加した酢酸エチル(45g)に残渣を溶解し、ヘキサン(33g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(9mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(33g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(31)の化合物を得た。

[0124] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(6H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-3.91(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.07(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.14(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.94(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.98(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(1H, s, arom.H) 6.94(2H, d, arom.H), 7.11(1H, s, arom.H), 7.26-7.29(2H, m, arom.H), 7.52(2H, d, arom.H), 8.24(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn): 39,456

[化48]



n=約 4 5 5 (3 1)

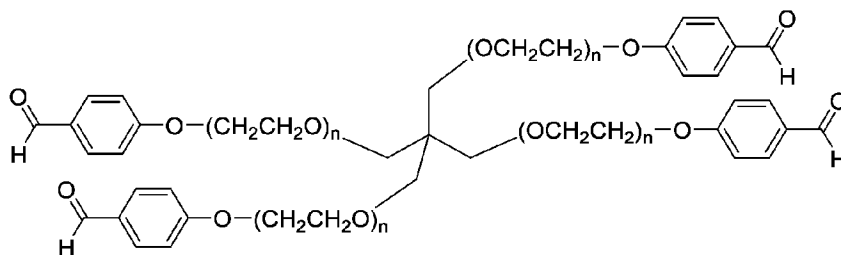
[0125] (実施例 5 - 1)

温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT PTE-200H0(10g, 0.5mmol)、トルエン(30g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(2mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45℃へ冷却し、クロロホルム(50g)を仕込んだ後、25℃まで冷却し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド(977mg, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.10g, 8.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35℃度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.51g, 7.0mmol)を3分割して加えた。25℃にて1時間反応を行った後、メタノール(224mg, 7.0mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(80g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ろ過後に得られた結晶をヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(32)の化合物を得た。

[0126] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.41-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 7.03(8H, d, arom.H), 7.83(8H, d, arom.H), 9.89(4H, s, $-\text{COH}$)

[化49]



n=約 1 1 4 (32)

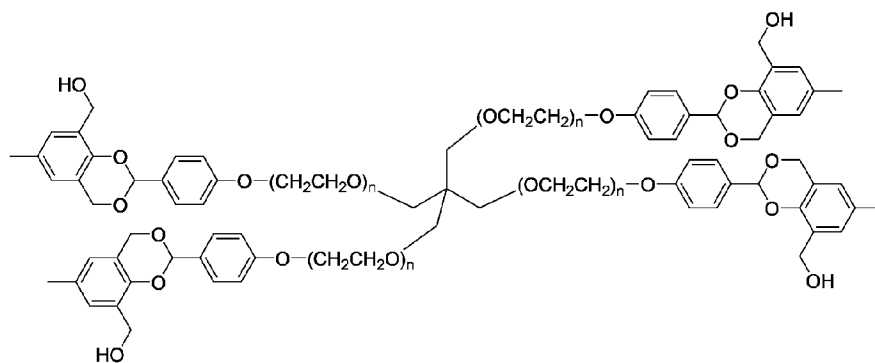
[0127] (実施例5-2)

温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(32)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(1.34g, 8mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(45.6mg, 0.24mmol)を加えて、40°Cにて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(48.4mg, 0.48mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(360g)に残渣を溶解し、ヘキサン(264g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢酸エチル(360g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(264g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(33)の化合物を得た。

[0128] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.27(4H, t, $-\text{OH}$), 2.36(12H, s, $-\text{CH}_3$), 3.41-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.68(8H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.94(4H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(4H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.96(4H, s, $-\text{CH}<$), 6.77(4H, s, arom.H), 6.97(8H, d, arom.H), 7.04(4H, s, arom.H), 7.50(8H, d, arom.H)

[化50]



n=約 1 1 4 (33)

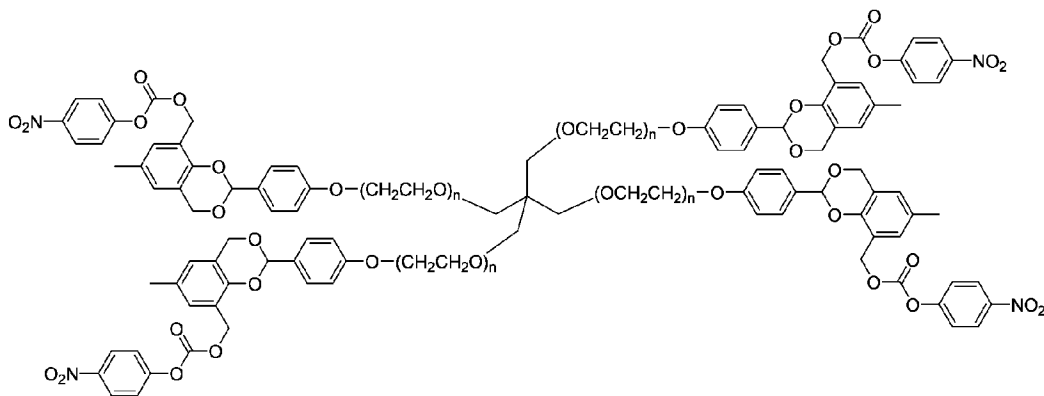
[0129] (実施例5-3)

温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(33)の化合物(250mg, 0.0125mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(94.8mg, 1.20mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(161mg, 0.80mmol)を仕込んで、25℃にて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し行い、一部の低分子不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢酸エチル(360g)に残渣を溶解し、ヘキサン(264g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢酸エチル(360g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(264g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(34)の化合物を得た。

[0130] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.31(12H, s, $-\text{CH}_3$), 3.41-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(4H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(4H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(8H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.98(4H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(4H, s, arom.H), 6.94(8H, d, arom.H), 7.11(4H, s, arom.H), 7.26-7.29(8H, m, arom.H), 7.52(8H, d, arom.H), 8.24(8H, d, arom.H)

[化51]



n=約 1 1 4 (34)

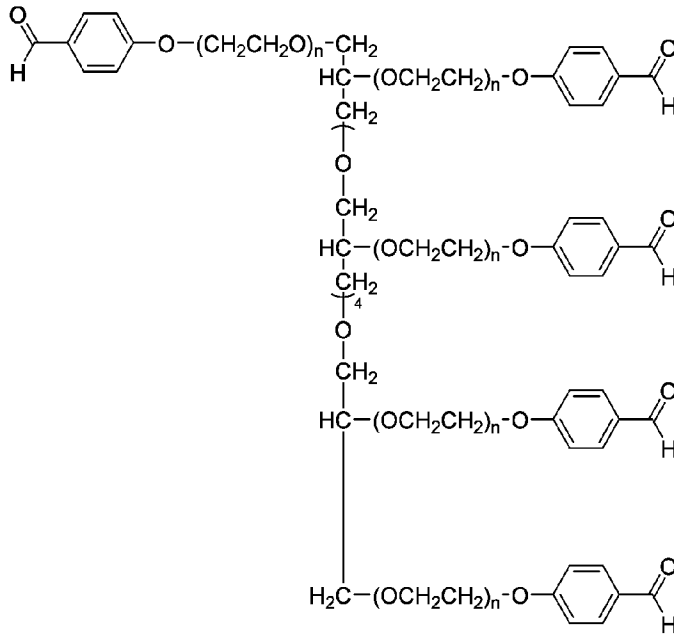
[0131] (実施例 6 - 1)

温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT HGE0-400H0(10g, 0.25mmol)、トルエン(30g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(2mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45℃へ冷却し、クロロホルム(50g)を仕込んだ後、25℃まで冷却し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド(977mg, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.10g, 8.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35℃度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.51g, 7.0mmol)を3分割して加えた。25℃にて1時間反応を行った後、メタノール(224mg, 7.0mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(35)の化合物を得た。

[0132] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.98-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 7.03(16H, d, arom.H), 7.83(16H, d, arom.H), 9.89(8H, s, $-\text{COH}$)

[化52]



n=約 1 1 4 (3 5)

[0133] (実施例 6 - 2)

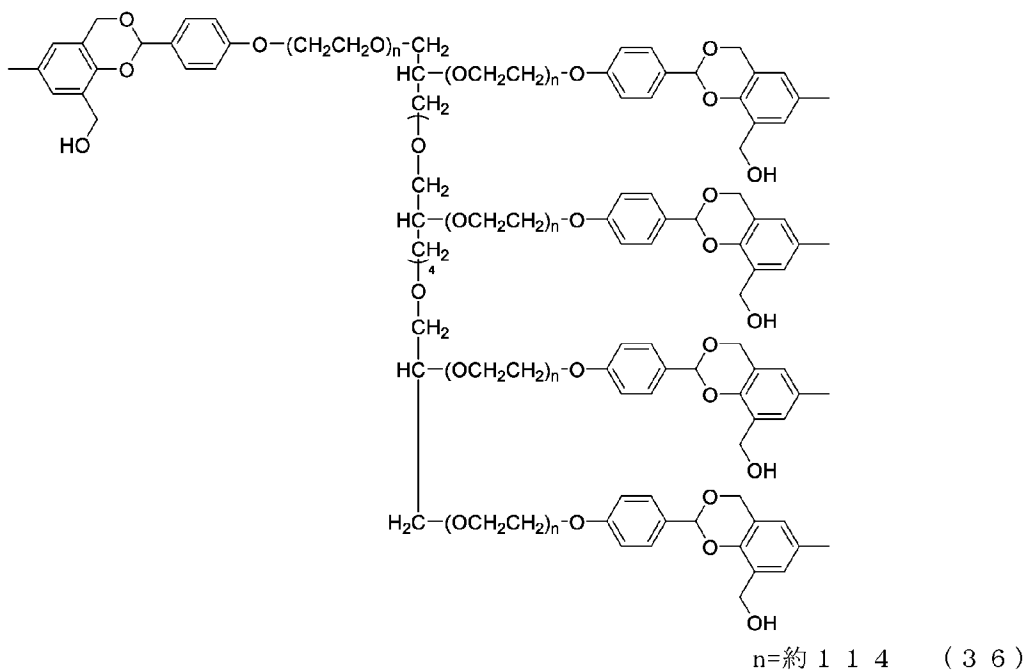
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(35)の化合物(1.0g, 0.025mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(1.34g, 8.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(45.6mg, 0.24mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(48.4mg, 0.48mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行い、一部の低分子不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢酸エチル(360g)に残渣を溶解し、ヘキサン(264g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢酸エチル(360g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(264g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(36)

の化合物を得た。

[0134] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.27(8H, t, $-\text{OH}$), 2.36(24H, s, $-\text{CH}_3$), 2.98-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.68 (16H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.94(8H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(8H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.96(8H, s, $-\text{CH}$), 6.77(8H, s, arom.H), 6.97(16H, d, arom.H), 7.04(8H, s, arom.H), 7.50(16H, d, arom.H)

[化53]



[0135] (実施例 6-3)

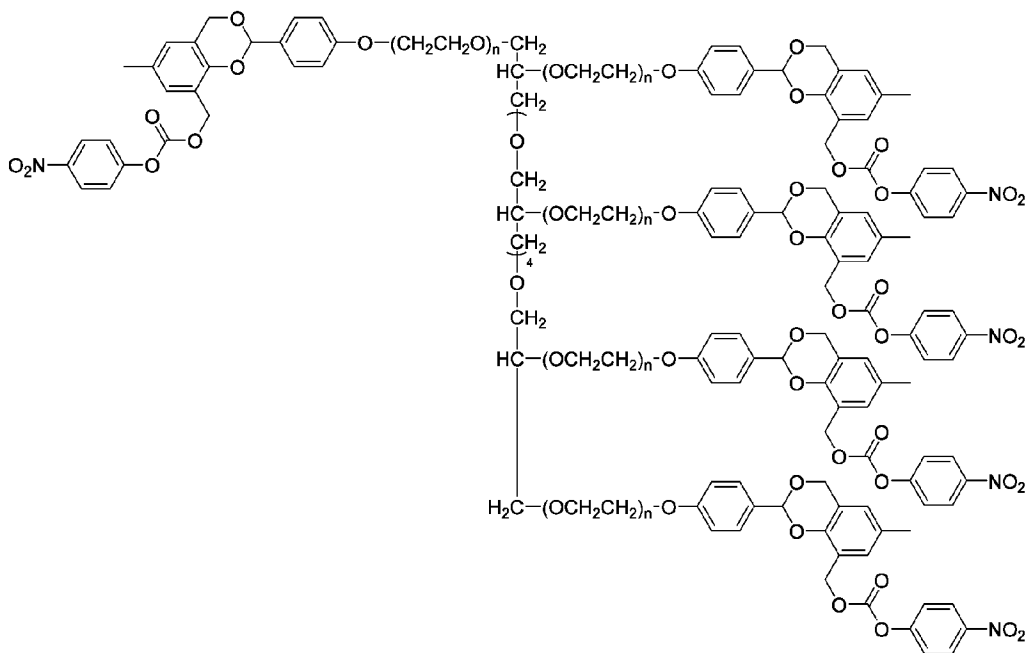
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(36)の化合物(250mg, 0.00625mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(94.8mg, 1.20mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(161.2mg, 0.80mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し行い、一部の低分子不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72 mg)を添加した酢酸エチル(360g)に残渣を溶解し、ヘキサン(264g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(72mg)を添加した酢

酸エチル(360g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(263g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(37)の化合物を得た。

[0136] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.31(24H, s, $-\text{CH}_3$), 2.98-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(8H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(8H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(16H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.98(8H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(8H, s, arom.H), 6.94(16H, d, arom.H), 7.11(8H, s, arom.H), 7.26-7.29(16H, m, arom.H), 7.52(16H, d, arom.H), 8.24(16H, d, arom.H)

[化54]



$n = \text{約 } 114 \quad (37)$

[0137] (実施例7-1)

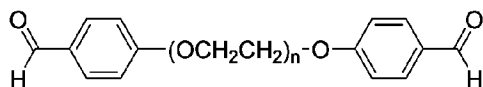
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT DKH-20T(20g, 1.0mmol)、トルエン(60g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(4mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45℃へ冷却し、クロロホルム(100g)を仕込んだ後、25℃まで冷却し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド(977mg, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.10g, 8.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させ

た後、内温が35℃度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.51g, 7.0mmol)を3分割して加えた。25℃にて1時間反応を行った後、メタノール(224mg, 7.0mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(38)の化合物を得た。

[0138] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 7.03(4H, d, arom.H), 7.83(4H, d, arom.H), 9.89(2H, s, $-\text{COH}$)

[化55]



n=約 4 5 5 (38)

[0139] (実施例7-2)

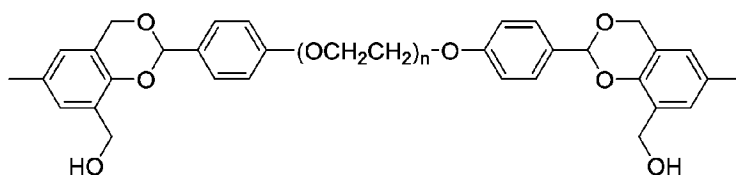
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(38)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(672mg, 4.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(22.8mg, 0.12mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(24.2mg, 0.24mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH 12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(36mg)を添加した酢酸エチル(180g)に残渣を溶解し、ヘキサン(132g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(36mg)を添加した酢酸エチル(180g)に得られた結晶

を溶解後、ヘキサン(132g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(39)の化合物を得た。

[0140] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.27(2H, t, $-\text{OH}$), 2.36(6H, s, $-\text{CH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.68(4H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.94(2H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(2H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.96(2H, s, $-\text{CH}<$), 6.77(2H, s, arom.H), 6.97(4H, d, arom.H), 7.04(2H, s, arom.H), 7.50(4H, d, arom.H)

[化56]



n=約 4 5 5 (39)

[0141] (実施例 7-3)

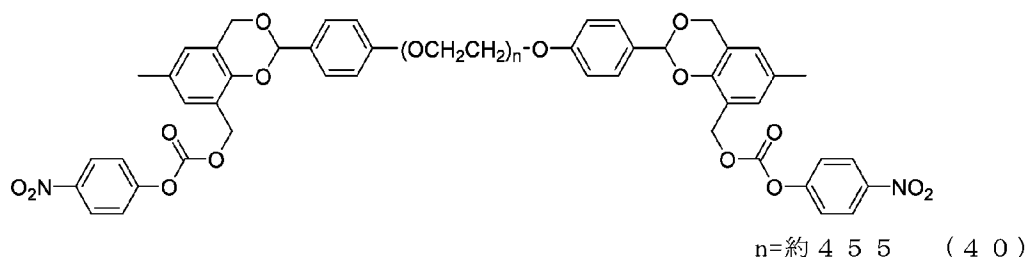
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(39)の化合物(250mg, 0.0125mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(47.4mg, 0.60mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(80.6mg, 0.40mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(36mg)を添加した酢酸エチル(180g)に残渣を溶解し、ヘキサン(132g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(36mg)を溶解添加した酢酸エチル(180g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(132g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(40)の化合物を得た。

[0142] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.31(6H, s, $-\text{CH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(2H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(2H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(4H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.98(2H, s, $-\text{CH}<$), 6.87(2H, s, arom.H), 6.94(4H, d, arom.H), 7.11

(2H, s, arom.H), 7.26–7.29(4H, m, arom.H), 7.52(4H, d, arom.H), 8.24(4H, d, arom.H)

[化57]



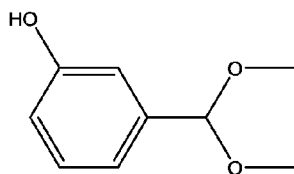
[0143] (比較例 1 – 1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの三口フラスコに3-ヒドロキシベンズアルデヒド (2.00g, 16.4mmol)、オルトギ酸トリメチル (3.48g, 32.8mmol)、メタノール (17g) を仕込み、pトルエンスルホン酸一水和物 (0.312mg, 1.64mmol) を加えて25℃にて2時間反応を行った。水酸化ナトリウムを加えてしばらく攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をジクロロメタンに溶解し、5wt%炭酸水素ナトリウム水溶液、25wt%食塩水の順で洗浄した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧留去して式(41)の化合物を得た。

[0144] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準TMS); δ (ppm):

3.33(6H, s, $-\text{OCH}_3$), 5.35(1H, s, $-\text{CH}$), 6.81(1H, d, arom.H), 6.95(1H, d, arom.H), 7.23–7.26(1H, m, arom.H)

[化58]



(41)

[0145] (比較例 1 – 2)

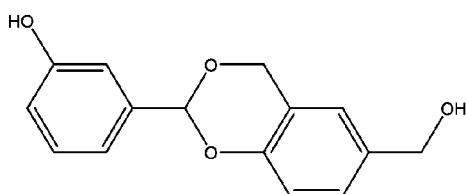
温度計、窒素吹き込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの三口フラスコに文献 (Freeman, J. H.; JAm. Chem. Soc. 1952, 74, 6257–6

260) に従い合成した2,4-ジ(ヒドロキシメチル)フェノール(50.0mg, 0.324mmol)、式(41)の化合物(217mg, 1.29mmol)、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(7.14mg, 0.0324mmol)、無水硫酸ナトリウム(1g)およびジクロペンチルメチルエーテル(10g)を仕込み、p-トルエンスルホン酸一水和物(4.10mg, 0.0212mmol)を加えて40°Cにて2時間反応を行った。N-メチルモルホリンを加えてしばらく攪拌した後、濾過を行った。10wt%食塩水で洗浄した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧留去して式(42)の化合物を得た。

[0146] $^1\text{H-NMR}$ (d6-DMSO, 内部標準TMS); δ (ppm):

4.42(2H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.93(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.10(1H, t, $-\text{CH}_2\text{OH}$),
5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.01(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.80-7.21(7H, m, arom.H), 9.53(1H, bs, $>\text{C}-\text{OH}$)

[化59]



(42)

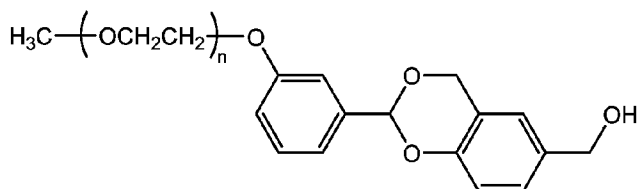
[0147] (比較例1-3)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの三口フラスコに式(42)の化合物(37.0mg, 0.141mmol)、日油社製ME-200MS(α -メチル- ω -[(メチルスルホニル)オキシ]ポリ(オキシエチレン), 705mg, 0.0353mmol)、炭酸カリウム(97.0mg, 0.705mmol)およびアセトニトリル(3.5g)を仕込み、80°Cにて4時間反応を行った。濾過後、溶媒を減圧留去し、残渣をジクロロメタンに溶解した。10wt%食塩水で洗浄した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧留去し、残渣をトルエン(50g)に溶解した。ヘキサン(50g)を添加して晶析を行い、濾過後、減圧乾燥して式(43)の化合物を得た。

[0148] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.52-4.18(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.62(2H, s, $-\text{CH}_2\text{O}$ H), 4.98(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.18(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.95(1H, s, $-\text{CH}$ <), 6.87-7.34(7H, m, arom.H)

[化60]



n=約 4 5 5 (4 3)

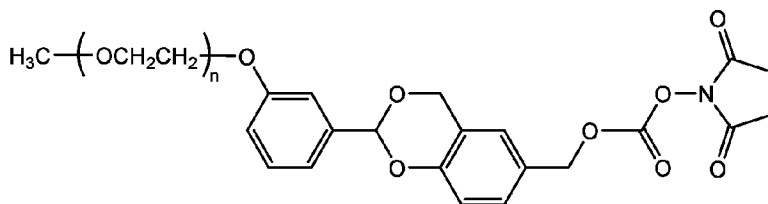
[0149] (比較例 1 - 4)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの三口フラスコに式(43)の化合物(300mg, 0.0150mmol)、炭酸ジ(N-スクシンイミジル)(46.0mg, 0.180 mmol)、トリエチルアミン(21.0mg, 0.208mmol)およびジクロロメタン(5g)を仕込み、25°Cにて12時間反応を行った。濾過後、5wt%食塩水で洗浄し、有機層の溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(6g)に溶解し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、濾過を行った。酢酸エチル(44g)を加えた後、ヘキサン(50g)を添加して晶析を行い、濾過後、減圧乾燥して式(44)の化合物を得た。

[0150] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準TMS); δ (ppm):

2.85(4H, s, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.38(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.52-4.18(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 5.00(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$ <), 5.18(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.25(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.97(1H, s, $-\text{CH}$ <), 6.96-7.35(7H, m, arom.H)

[化61]



n=約 4 5 5 (4 4)

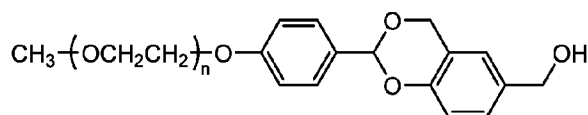
[0151] (実施例 8-1)

温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(20)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、文献 (Freeman, J. H.; JAm. Chem. Soc. 1952, 74, 6257-6260) に従い合成した2,4-ジ(ヒドロキシメチル)フェノール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(11.4mg, 0.06mmol)を加えて、40℃にて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(45)の化合物を得た。

[0152] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.62(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 5.00(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.18(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.25(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.97(1H, s, $-\text{CH}$), 6.96-7.35(7H, m, arom H)

[化62]



n=約 4 5 5 (4 5)

[0153] (実施例 8-2)

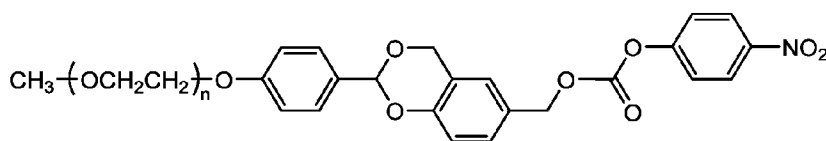
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(45)の化合物(250mg, 0.0125mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、

溶解後、ピリジン(23.7mg, 0.30mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(40.3mg, 0.20mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し、一部の不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(46)の化合物を得た。

[0154] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.62(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 5.00(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.18(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.25(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.97(1H, s, $-\text{CH}$), 6.96-7.35(11H, m, arom. H)

[化63]



n=約 4 5 5 (46)

[0155] (実施例9-1)

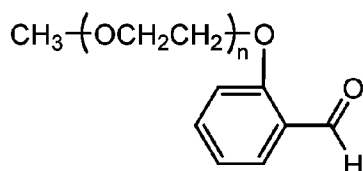
温度計、窒素吹込み管、攪拌機およびDean-stark管および冷却管を装備した300mLの4つ口フラスコに日油社製SUNBRIGHT MEH-40T(40g, 2.0mmol)、トルエン(120g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(8mg)を仕込み、水をトルエンで共沸除去した。45°Cへ冷却し、クロロホルム(200g)を仕込んだ後、25°Cまで冷却し、2-ヒドロキシベンズアルデヒド(977mg, 8.0mmol)、および、トリフェニルホスフィン(2.10g, 8.0mmol)を仕込んだ。しばらく攪拌させた後、内温が35°C度を越えないように、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(1.51g, 7.0mmol)を3分割して加えた。25°Cにて1時間反応を行った後、

メタノール(224mg, 7.0mmol)を添加し、30分攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(320g)に溶解し、ヘキサン(240g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(64mg)を添加した酢酸エチル(320g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(160g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した。ヘキサン(160g)を用いて結晶洗浄し、ろ過後、減圧乾燥して式(47)の化合物を得た。

[0156] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 9.89(1H, s, $-\text{COH}$)

[化64]



$n \approx 909$ (47)

[0157] (実施例9-2)

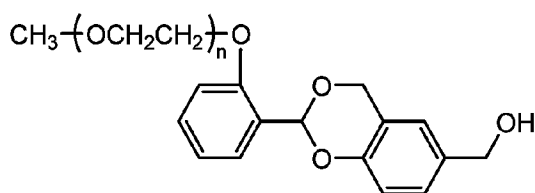
温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した50mLの3つ口フラスコに式(47)の化合物(1.0g, 0.05mmol)、文献(Freeman, J. H.; JAm. Chem. Soc. 1952, 74, 6257-6260)に従い合成した2,4-ジ(ヒドロキシメチル)フェノール(336mg, 2.0mmol)、テトラヒドロフラン(5.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(1.1mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(1.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(11.4mg, 0.06mmol)を加えて、40°Cにて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(12.1mg, 0.12mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、クロロホルム(10g)を用いてろ液を希釈した。pH12の20%食塩水(10g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,

6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析する操作を繰り返し行い、低分子不純物を除去した後、減圧乾燥して式(48)の化合物を得た。

[0158] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.25(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 5.97(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.96-7.35(7H, m, arom.H)

[化65]



n=約909 (48)

[0159] (実施例9-3)

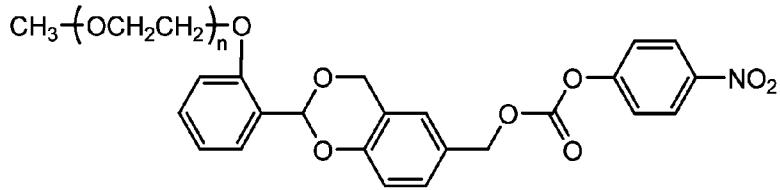
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの3つ口フラスコに式(48)の化合物(250mg, 0.0125mmol)およびジクロロメタン(3.6g)を仕込み、溶解後、ピリジン(23.7mg, 0.30mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(40.3mg, 0.20mmol)を仕込んで、25°Cにて3時間反応を行った。pH12の20%食塩水(2.5g)を用いて水洗を繰り返し、一部の不純物を除去した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に残渣を溶解し、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行った後、吸引ろ過して結晶を得た。さらに、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(18mg)を添加した酢酸エチル(90g)に得られた結晶を溶解後、ヘキサン(66g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(49)の化合物を得た。

[0160] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.35(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$)

), 5.97(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.96–7.35(11H, m, arom.H)

[化66]



n=約 9 0 9 (4 9)

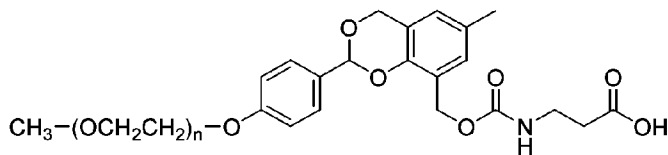
[0161] (実施例 1 0)

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝溶液(pH8.5)を用い、 β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液を調製した。温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの三口フラスコに式(22)の化合物(70mg, 0.0035mmol)および β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液(1.5g)を仕込み、溶解後、25°Cにて6時間反応を行った。食塩(500mg)を溶解させた後、クロロホルム(3.0g)を用いて抽出を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過した。酢酸エチル(45g)を用いてろ液を希釈後、ヘキサン(33g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(50)の化合物を得た。

[0162] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.48(2H, t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.39–3.45(2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 3.52–4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.92(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.08(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCONH}-$), 5.96(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.79(1H, s, arom.H), 6.96(2H, d, arom.H), 7.04(1H, s, arom.H), 7.50(2H, d, arom.H),

[化67]



n=約 4 5 5 (5 0)

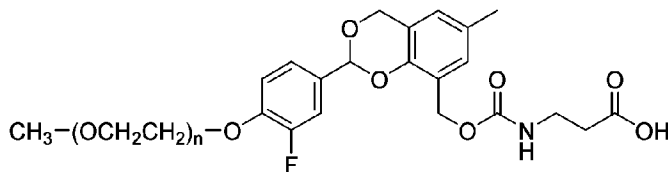
[0163] (実施例 1 1)

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝溶液(pH8.5)を用い、 β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液を調製した。温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの三口フラスコに式(25)の化合物(70mg, 0.0035mmol)および β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液(1.5g)を仕込み、溶解後、25°Cにて6時間反応を行った。食塩(500mg)を溶解させた後、クロロホルム(3.0g)を用いて抽出を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過した。酢酸エチル(45g)を用いてろ液を希釈後、ヘキサン(33g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(51)の化合物を得た。

[0164] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.50(2H, t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.25(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 3.41-3.45(2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 4.91(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.08(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.14(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCONH}-$), 5.94(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.79(1H, s, arom.H), 7.03-7.06(2H, m, arom.H), 7.30-7.34(2H, m, arom.H)

[化68]

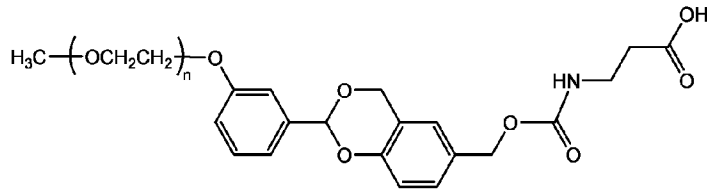


n=約 4 5 5 (51)

[0165] (実施例12)

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝溶液(pH8.5)を用い、 β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液を調製した。温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した50mLの三口フラスコに式(28)の化合物(14 mg, 0.0072mmol)および β -アラニンの20mg/mL緩衝溶液(3.0g)を仕込み、溶解後、25°Cにて6時間反応を行った。食塩(750mg)を溶解させた後、クロロホルム(4.5g)を用いて抽出を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過した。酢酸エチル(45g)を用いてろ液を希釈後、ヘキサン(33g)を添加して晶析を行い、ろ過後、減圧乾燥して式(52)の化合物を得た。

[化70]



n = 約 4 5 5 (5 3)

[0169] (分解性試験)

式(50)、(51)、(52)および(53)の化合物(20mg)をそれぞれpD 7.4のリン酸ナトリウム重水緩衝液(0.7mL)に溶解後、40°Cの恒温槽で静置し、任意のタイミングでNMR測定を行った。図1は、静置0時間のβアラニン付加体量を100%とした時の任意のタイミングにおけるβアラニン付加体量を表す。グラフの近似式をもとに計算式

[数1]

$$t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$$

[0170] (lnはネイピア数を底とする対数であり、λは近似式中のネイピア数の冪指数と-1の積である。)

から算出した半減期 ($t_{1/2}$) は、式(50)の化合物は3.6日、式(51)の化合物は31.5日、式(52)の化合物は0.55日、式(53)の化合物は231日であり、式(50)、(51)および(52)で表される本発明の化合物は先行発明である式(53)で表される特許文献3に例示の化合物と比較して生理条件下で目的とした半減期を有することが示された。

[0171] (実施例13)

式(22)の化合物を用い、RNase A (Roche製、RNase A from bovine pancreas、Mw=13,700)の修飾を行った。0.1Mホウ酸緩衝液(pH=8.5)を用い、RNase Aの10mg/mL緩衝溶液を調製し、RNase Aの10mg/mL緩衝溶液(636.3 μL)および0.1Mホウ酸緩衝液(863.7 μL)を混合後、式(22)の化合物(6.0mg)を加え、20°Cで20時間反応を行った。反応溶液をフィルターろ過後、下記条件にて陽イオン交換カラムを用いたHPLC測定を実施した。UV

にて溶出液をモニターしながら分取し、式(22)の化合物が1か所修飾された純度96.1%のmono PEG RNase Aを得た。図2は分取したmono PEG RNase AのHPLC測定結果である。

- ・HPLC装置：Thermo Ultimate3000
- ・カラム：TSKgel SP-5PW (7.5x75mm, 10um; 東ソー株式会社)
- ・流速：1mL/分
- ・分析時間：25分(平衡化含む)
- ・カラム温度：25°C
- ・注入量：20 μL
- ・検出器：PDA (測定波長：280nm)
- ・移動相A：5mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.5)
- ・移動相B：5mM リン酸ナトリウム緩衝液+0.5mol/L NaCl (pH8.5)
- ・グラジエントプログラム(A/B)：100/0(-15分)→100/0(0分)→33/67(10分)

[0172] (実施例14-1)

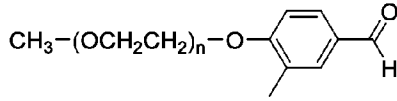
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した4つ口フラスコに日油社製 ME-200MS(α -メチル- ω -[(メチルスルホニル)オキシ]ポリ(オキシエチレン), 10g, 0.5mmol)、3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド(272mg, 2mmol)、炭酸カリウム(0.69g, 5mmol)およびアセトニトリル(50g)を仕込み80°Cにて6時間反応を行った。反応後、ろ過、濃縮し、ジクロロメタン(80g)に再溶解した。その後、1重量%の炭酸カリウムおよび10重量%の食塩を含む水溶液を加え、窒素雰囲気下、25°Cで10分間攪拌した。攪拌後、10分間静置し、有機層を回収した。回収した有機層に硫酸マグネシウムを加え窒素雰囲気下、25°Cで10分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液を濃縮した後、酢酸エチルに溶解し、ヘキサンを加えて窒素雰囲気下、25°Cで結晶を析出させた。析出した結晶を吸引ろ過で回収し、減圧乾燥して式(54)の化合物を得た。

[0173] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.93(1H, d, arom.H), 7.69(2H, d, arom.H), 9.85(

1H, s, -CHO)

[化71]



n = 約 4 5 5 (5 4)

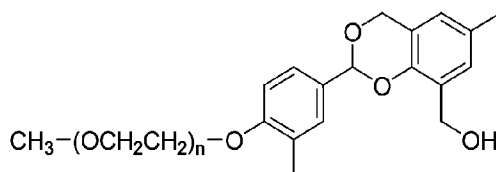
[0174] (実施例 1 4 - 2)

温度計、窒素吹込み管、攪拌機および冷却管を装備した3つ口フラスコに式(54)の化合物(3.0g, 0.15mmol)、2,4-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール(1.0g, 6.0mmol)、テトラヒドロフラン(15.0g)および2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(3.3mg)を仕込み、溶解後、モレキュラーシーブ5A(3.0g)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(34.2mg, 0.18mmol)を加えて、40°Cにて4時間反応を行った。N-メチルモルホリン(36.4mg, 0.36 mmol)を加えてしばらく攪拌し、ろ過後、トルエン(33.0g)を用いてろ液を希釈した。pH12の20%食塩水(30g)を用いて水洗を繰り返し行った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、溶媒を減圧留去した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾールを添加したトルエンに残渣を溶解し、ヘキサンを添加して晶析を行った後、吸引ろ過し、減圧乾燥して式(55)の化合物を得た。

[0175] ¹H-NMR(CDCl₃, 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.23(3H, s, -CH₃), 2.28(3H, s, -CH₃), 3.38(3H, s, -(OCH₂CH₂)_nOCH₃), 3.52-4.17(m, -(OCH₂CH₂)_n-), 4.62(2H, s, -CH₂OH), 4.95(1H, d, -CH₂OCH<), 5.16(1H, d, -CH₂O-), 5.92(1H, s, -CH<), 6.8-7.3(5H, arom.H)

[化72]



n = 約 4 5 5 (5 5)

[0176] (実施例 1 4 - 3)

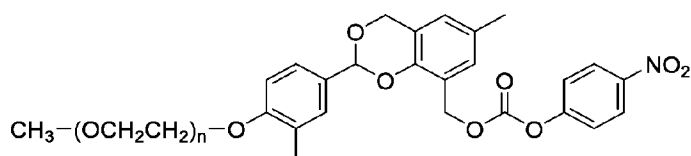
温度計、窒素吹込み管および攪拌機を装備した3つ口フラスコに式(55)の化合物(500mg, 0.025mmol)、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(0.5mg)およびトルエン(6.0g)を仕込み、溶解後、トリエチルアミン(38mg, 0.375mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(50.4mg, 0.25mmol)を仕込んで、60°Cにて3時間反応を行った。反応後、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(20mg)を添加した酢酸エチル(100g)とアセトニトリル(1.25g)の混合溶媒で希釈し、ヘキサン(50g)を添加して結晶を析出させた後、吸引ろ過して結晶を得た。得られた結晶を減圧乾燥して式(56)の化合物を得た。

[0177] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.23(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.31(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.24(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.96(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.34(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 5.96(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.8-7.4(5H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn) : 20,223

[化73]



$n = \text{約 } 4 \ 5 \ 5 \ (5 \ 6)$

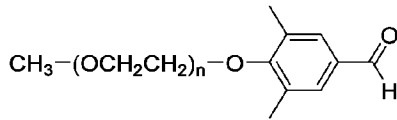
[0178] (実施例 1 5 - 1)

実施例 1 4 - 1 の3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドの代わりに4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルベンズアルデヒド(300mg, 2.0mmol)を用いた以外は同様にして、式(57)で表される化合物を得た。

[0179] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.36(6H, s), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 7.54(2H, s, arom.H), 9.88(1H, s, $-\text{CHO}$)

[化74]



n = 約 4 5 5 (5 7)

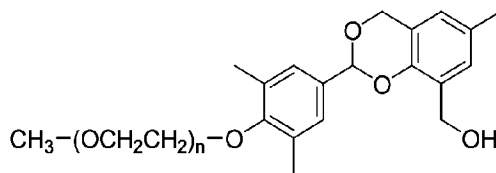
[0180] (実施例 1 5 - 2)

実施例 1 4 - 2 の式 (5 4) の化合物の代わりに式 (5 7) の化合物(3.0g, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式 (5 8) で表される化合物を得た。

[0181] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.36(6H, s), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.68(2H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.89(1H, s, $-\text{CH}$), 6.8-7.3(4H, arom.H)

[化75]



n = 約 4 5 5 (5 8)

[0182] (実施例 1 5 - 3)

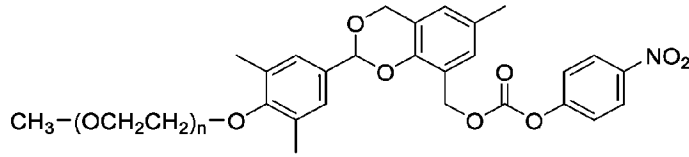
実施例 1 4 - 3 の式 (5 5) の化合物の代わりに式 (5 8) の化合物(500mg, 0.025mmol)を用いた以外は同様にして、式 (5 9) で表される化合物を得た。

[0183] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.36(6H, s), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.68(2H, s, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.89(1H, s, $-\text{CH}$), 6.8-7.3(4H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn) : 20,072

[化76]



n = 約 4 5 5 (5 9)

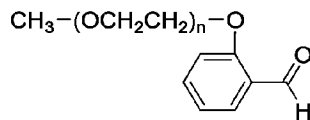
[0184] (実施例 1 6 - 1)

実施例 1 4 - 1 の 3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドの代わりに 2-ヒドロキシベンズアルデヒド(244mg, 2.0mmol)を用いた以外は同様にして、式(60)で表される化合物を得た。

[0185] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.9-7.8(4H, arom.H), 10.52(1H, s, $-\text{COH}$)

[化77]



n = 約 4 5 5 (6 0)

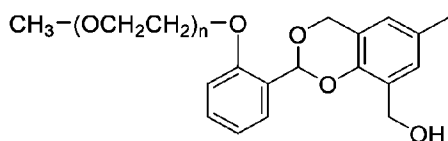
[0186] (実施例 1 6 - 2)

実施例 1 4 - 2 の式(54)の化合物の代わりに式(60)の化合物(3.0g, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式(61)で表される化合物を得た。

[0187] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.49(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.78(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.99(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.19(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.32(1H, s, $-\text{CH}$), 6.8-7.7(6H, arom.H)

[化78]



n = 約 4 5 5 (6 1)

[0188] (実施例 1 6 - 3)

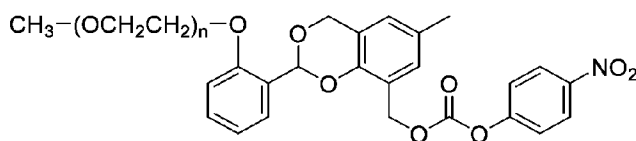
実施例 1 4 - 3 の式 (5 5) の化合物の代わりに式 (6 1) の化合物 (500mg, 0.025mmol) を用いた以外は同様にして、式 (6 2) で表される化合物を得た。

[0189] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.22(2H, m, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}<$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.37(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.8-7.3(8H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn) : 19,942

[化79]



n = 約 4 5 5 (6 2)

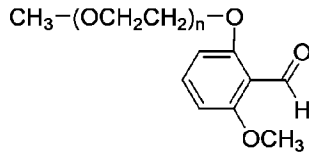
[0190] (実施例 1 7 - 1)

実施例 1 4 - 1 の3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドの代わりに2-ヒドロキシ-6メトキシベンズアルデヒド(304mg, 2.0mmol)を用いた以外は同様にして、式 (6 3) で表される化合物を得た。

[0191] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.6-7.8(3H, arom.H), 10.53(1H, s, $-\text{COH}$)

[化80]



n = 約 4 5 5 (6 3)

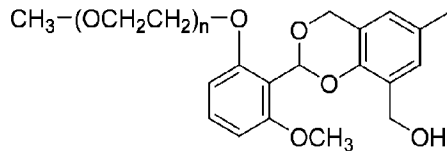
[0192] (実施例 1 7 - 2)

実施例 1 4 - 2 の式 (5 4) の化合物の代わりに式 (6 3) の化合物(3.0g, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式 (6 4) で表される化合物を得た。

[0193] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.49(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.78(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.90(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.8-7.7(5H, arom.H)

[化81]



n = 約 4 5 5 (6 4)

[0194] (実施例 1 7 - 3)

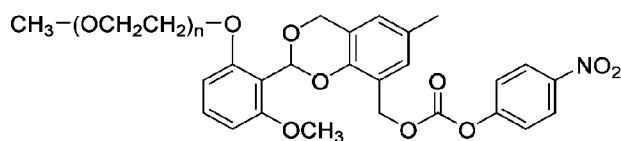
実施例 1 4 - 3 の式 (5 5) の化合物の代わりに式 (6 4) の化合物(500mg, 0.025mmol)を用いた以外は同様にして、式 (6 5) で表される化合物を得た。

[0195] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.30(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.22(2H, m, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.6-7.1(5H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn) : 20,915

[化82]



n = 約 4 5 5 (6 5)

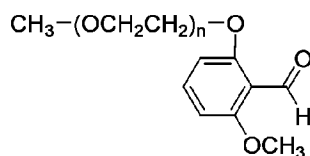
[0196] (実施例 1 8 - 1)

実施例 1 7 - 1 の日油社製ME-200MSの代わりに日油社製ME-050MS(2.5g, 0.5mmol)を用いた以外は同様にして、式(66)で表される化合物を得た。

[0197] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.6-7.8(3H, arom.H), 10.53(1H, s, $-\text{COH}$)

[化83]



n = 約 1 1 4 (6 6)

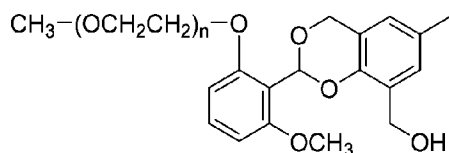
[0198] (実施例 1 8 - 2)

実施例 1 7 - 2 の化合物(63)の代わりに式(66)の化合物(0.75g, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式(67)で表される化合物を得た。

[0199] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.49(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.78(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.90(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.8-7.7(5H, arom.H)

[化84]



n = 約 1 1 4 (6 7)

[0200] (実施例 18-3)

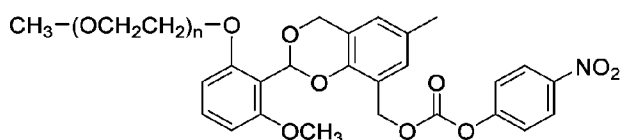
実施例 17-3 の化合物 (64) の代わりに式 (67) で表される化合物 (125mg, 0.025mmol) を用いた以外は同様にして式 (68) で表される化合物を得た。

[0201] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.30(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.22(2H, m, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}<$), 5.16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.6-7.1(5H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量(Mn) : 5,400

[化85]



n = 約 1 1 4 (68)

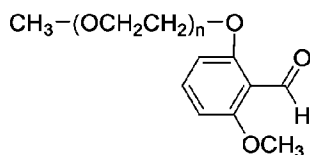
[0202] (実施例 19-1)

実施例 17-1 の日油社製ME-200MSの代わりに日油社製ME-020MS(1g, 0.5 mmol)を用いた以外は同様にして、式 (69) で表される化合物を得た。

[0203] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.6-7.8(3H, arom.H), 10.53(1H, s, $-\text{COH}$)

[化86]



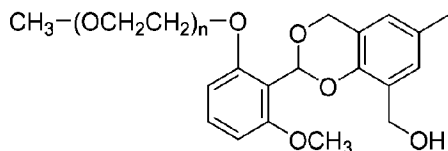
n = 約 4 6 (69)

[0204] (実施例 19-2)

実施例 17-2 の化合物 (63) の代わりに式 (69) の化合物(300mg, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式 (70) で表される化合物を得た。

[0205] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):
 2.29(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m,
 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.49(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.78(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.90(1H
 , d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.15(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.8-7.7(5H, arom.H)

[化87]



$n = \text{約 } 4 \sim 6 \text{ (70)}$

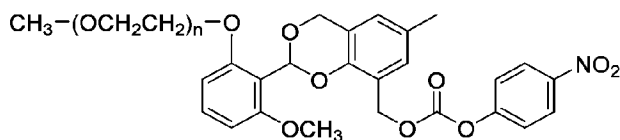
[0206] (実施例 19-3)

実施例 17-3 の化合物 (64) の代わりに式 (70) で表される化合物 (50mg, 0.025mmol) を用いた以外は同様にして式 (71) で表される化合物を得た。

[0207] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):
 2.30(3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m,
 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.22(2H, m, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.95(1H, d, $-\text{CH}_2\text{OCH}$), 5.
 16(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.6-7.1(5H, arom.H), 8.23(2H, d, arom.H)

数平均分子量 (Mn) : 2,615

[化88]



$n = \text{約 } 4 \sim 6 \text{ (71)}$

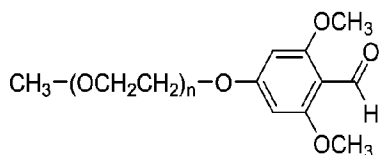
[0208] (実施例 20-1)

実施例 14-1 の 3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドの代わりに 4-ヒドロキシ-2,6ジメトキシベンズアルデヒド (364mg, 2.0mmol) を用いた以外は同様にして、式 (72) で表される化合物を得た。

[0209] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.23(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 6.12(2H, arom.H), 10.35(1H, s, $-\text{COH}$)

[化89]



n = 約 4 5 5 (7 2)

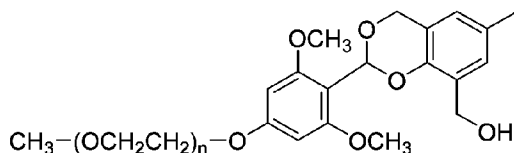
[0210] (実施例 20-2)

実施例 14-2 の式 (54) の化合物の代わりに式 (72) の化合物(3.0g, 0.15mmol)を用いた以外は同様にして、式 (73) で表される化合物を得た。

[0211] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.84(1H, dd, $-\text{OH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.17(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.47(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.75(1H, dd, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.98(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.17(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.20(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.57-6.55(2H, m, arom.H), 6.78(1H, s, arom.H), 6.97(1H, s, arom.H), 7.58(2H, d, arom.H)

[化90]



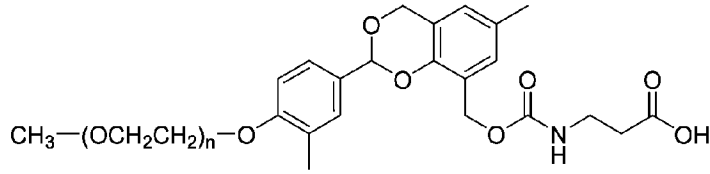
n = 約 4 5 5 (7 3)

[0212] (実施例 20-3)

実施例 14-3 の式 (55) の化合物の代わりに式 (73) の化合物(500mg, 0.025mmol)を用いた以外は同様にして、式 (74) で表される化合物を得た。

[0213] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

[化92]



n = 約 4 5 5 (7 5)

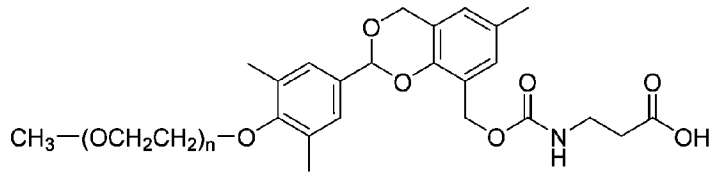
[0216] (実施例 2 2)

実施例 2 1 の式 (5 6) の化合物の代わりに式 (5 9) の化合物 (74mg, 0.0037mmol) を用いた以外は同様にして、式 (7 6) の化合物を得た。

[0217] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.31(6H, s), 2.52(2H, t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.21(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 3.93-3.97(2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 4.92(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.09(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.13(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCONH}-$), 5.89(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.8-7.2(4H, arom.H)

[化93]



n = 約 4 5 5 (7 6)

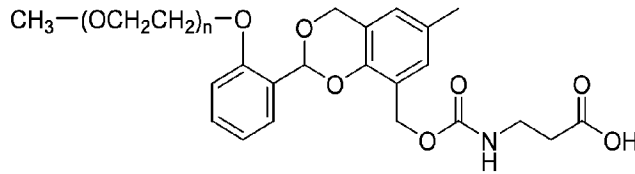
[0218] (実施例 2 3)

実施例 2 1 の式 (5 6) の化合物の代わりに式 (6 2) の化合物 (74mg, 0.0037mmol) を用いた以外は同様にして、式 (7 7) の化合物を得た。

[0219] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.43(2H, t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.37-3.43(2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 3.52-4.21(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.92(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.97(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.19(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCONH}-$), 6.32(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.8-7.7(6H, arom.H)

[化94]



n = 約 4 5 5 (7 7)

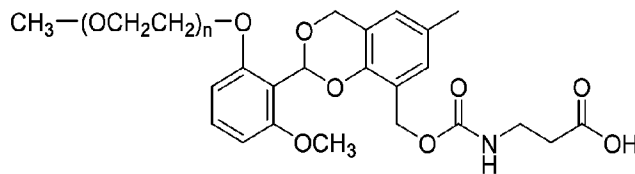
[0220] (実施例 2 4)

実施例 2 1 の式 (5 6) の化合物の代わりに式 (6 5) の化合物 (74mg, 0.0037mmol) を用いた以外は同様にして、式 (7 8) の化合物を得た。

[0221] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS); δ (ppm):

2.28(3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.47(2H, t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.38(3H, s, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), 3.52-4.21(m, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$), 4.89(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 5.03(2H, dd, $-\text{CH}_2\text{OCONH}-$), 5.14(1H, d, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 6.53(1H, s, $-\text{CH}<$), 6.8-7.7(5H, arom.H)

[化95]



n = 約 4 5 5 (7 8)

[0222] (分解性試験 2)

式 (7 5)、(7 6)、(7 7) および (7 8) の化合物 (20mg) をそれぞれ pH 7.4 のリン酸ナトリウム重水緩衝液 (0.7mL) に溶解後、40°C の恒温槽で静置し、任意のタイミングで NMR 測定を行った。図 3 は、静置 0 時間の β アラニン付加体量を 100% とした時の任意のタイミングにおける β アラニン付加体量を表す。

グラフの近似式をもとに分解性試験に記載した計算式 [数 1] から算出した半減期 ($t_{1/2}$) は、式 (7 5) の化合物は 2.3 日、式 (7 6) の化合物は 30.1 日、式 (7 7) の化合物は 23.1 日、式 (7 8) の化合物は 1.4 日であり、本発明の化合物は、先行発明である式 (5 3) で表される特許文献 3 に例示の化合物と比較して、生理条件下で目的とした半減期を有することが示された。

[0223] (比較例3)

日油社製SUNBRIGHT MENP-20T (22.5mg, 1.13mmol)および国際公開2019/203904号でTNF α 阻害活性を有し、かつPEG化によりTNF α 阻害活性が低下することが報告されている配列番号1で表されるアプタマーの5'末端にC6アミノリンカーを持つ化合物NH₂-C6-(Apt-TNF α) (1.8mg, 141.8nmol)を100mM重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH8.3) 125 μ Lに溶解し、窒素雰囲気下、40°Cで24時間反応させた。反応後、反応溶液をフィルターを通過後、下記条件にて逆相カラムを用いたHPLC測定を実施した。260nmにて溶出液をモニターしながら分取した溶液を限外ろ過にてPBSに置換し、純度98.9%、GPCのピークトップ分子量33,101の式(28)の化合物がApt-TNF α と1:1のモル比で結合したPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)を得た。図5(A)は分取したPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)のHPLC測定結果である。

・HPLC装置: Thermo Ultimate3000

・カラム: Xbridge Oligonucleotide BEH C18 (4.6x50mm, 2.5 μ m, Waters社)

・流速: 1mL/分

・分析時間: 25分(平衡化含む)

・カラム温度: 35°C

・注入量: 30 μ L

・検出器: UV (測定波長: 260nm)

・移動相A: 25mMヘキサフルオロイソプロパノール-15mMジブチルアミン/水

・移動相B: 25mMヘキサフルオロイソプロパノール-15mMジブチルアミン/メタノール

・グラジエントプログラム(A/B): 70/30(0分)→10/90(20分)→10/90(30分)

[0224] (実施例25)

比較例3の日油社製SUNBRIGHT MENP-20Tの代わりに式

(28)の化合物(22.5mg, 1.13mmol)を用いた以外は同様にして、純度84.7%、GPCのピークトップ分子量30,632の式(28)の化合物がApt-TNF α と1:1のモル比で結合した2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)を得た。図5(B)は分取した2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)のHPLC測定結果である。

[0225] (PEG化アプタマーのTNF α 阻害活性の評価)

生細胞濃度が 4×10^5 cells/mLのNF-kB Reporter, Luciferase, HEK293細胞(BPS Bioscience Inc.)を96ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific)の各ウェルに80 μ L添加し、22時間培養した。その後、それぞれのウェルに5 μ M NH₂-C6-(Apt-TNF α)溶液、500nM PEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)溶液または500nM 2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)溶液を独立したウェルそれぞれに10 μ L添加した。添加後、50ng/mL TNF α 溶液を10 μ Lずつ添加し、0.5時間培養後、ルシフェラーゼ活性をBio-Glo Luciferase Assay System(Promega)にて測定した。

活性は、TNF α 処理なしの系を0%、TNF α 処理ありの系を100%として相対値として算出した。

結果は、平均値 \pm 標準誤差として表され、P値はスチューデントのt検定によって計算し、両側P値が0.05未満であることを統計的に有意差があると定義した。

評価の結果、NH₂-C6-(Apt-TNF α)および2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)ではTNF α 阻害活性を確認できた一方で、PEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)ではTNF α 阻害活性を確認できなかった。このことから、本発明の2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)は既

存技術であるPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)と比較して、生理機能性物質を徐放でき、薬理活性を改善し得ることが示された。

図6はPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)、2MPEG(20k)-OCO-NH-C6-(Apt-TNF α)およびNH₂-C6-(Apt-TNF α)を用いたTNF α 阻害活性の評価結果である。

[0226] (比較例4)

0.2Mホウ酸緩衝液(pH10.5)に溶解した29mg/mLインスリン溶液0.25mLをアセトニトリルに溶解した100mg/mLの日油社製SUNBRIGHT MENP-20T溶液0.25mLに添加し、窒素雰囲気下、25℃で3時間反応させた。反応後、限外ろ過により溶液を10mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)に交換した後、下記条件にて陰イオン交換クロマトグラフィーによりPEG(20k)-OCO-NH-インスリンを得た。図7(A)は精製したPEG(20k)-OCO-NH-インスリンのHPLC分析結果である。

- ・HPLC装置：Nexera(株式会社島津製作所)
- ・カラム：Asahipack ES-502N 7C (7.5x100mm, 9 μ m, 昭和電工)
- ・流速：1mL/分
- ・分析時間：30分
- ・カラム温度：25℃
- ・注入量：50 μ L
- ・検出器：PDA(測定波長：280nm)
- ・移動相A：10mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH8.5)
- ・移動相B：0.25M硫酸アンモニウム含有10mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH8.5)
- ・グラジエントプログラム(A/B)：100/0(0分)→67/33(20分)→0/100(30分)

[0227] (実施例26)

比較例4の日油社製SUNBRIGHT MENP-20Tの代わりに式(28)の化合物を用いた以外は同様にして2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリンを得た。図7(B)は精製した2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリンのHPLC分析結果である。

[0228] (PEG化インスリンの安定性評価)

比較例4で調製した0.5mg/mLのPEG(20k)-OCO-NH-インスリン100 μ Lまたは実施例26で調製した0.5mg/mLの2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリン100 μ Lを100mMリン酸緩衝液(pH6.0)100 μ L、100mMリン酸緩衝液(pH7.0)100 μ L、100mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)100 μ Lまたは100mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)100 μ Lと混合した後、25 $^{\circ}$ Cで静置し、任意のタイミングでHPLC分析を行った。

PEG(20k)-OCO-NH-インスリンは、いずれの測定pHにおいても時間経過に伴うPEG(20k)-OCO-NH-インスリンの減少は確認できなかった。一方で、2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリンは、すべての測定pHにおいて時間経過にともない2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリンが減少し、特にpH6.0では減少速度が大きく、インスリンの顕著な増加が確認された。以上から、本発明の2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリンは時間経過によりアセタールが加水分解して、インスリンを放出することが示された。さらに、アセタール構造の加水分解は中性～塩基性条件で抑制できることが示された。

図8(A)は静置0時間のPEG(20k)-OCO-NH-インスリン量を100%とした時の任意のタイミングにおけるPEG(20k)-OCO-NH-インスリン量を表し、図8(B)は2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリン量を100%とした時の任意のタイミングにおける2MPEG(20k)-OCO-NH-インスリン量を表す。

産業上の利用可能性

[0229] 本発明のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体は、生理的

条件下でアセタール構造が加水分解し、生体機能性分子を徐々に放出することが可能となり、ポリオキシエチレン誘導体で修飾された生体機能性分子の薬理作用を改善し得る。

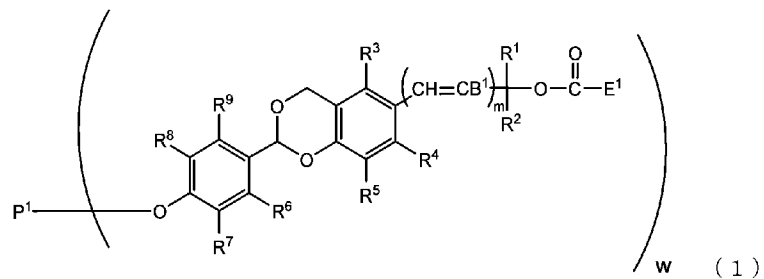
[0230] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2022年4月22日出願の日本特許出願（特願2022-070669）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

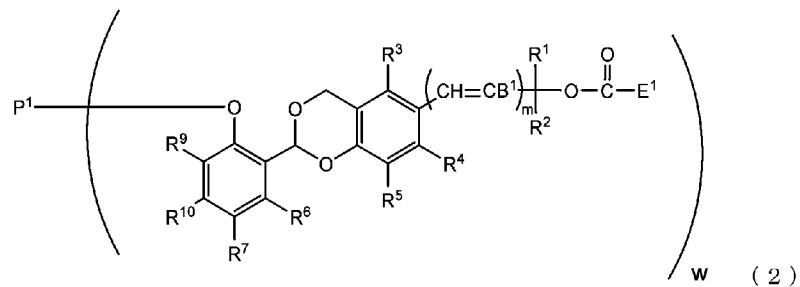
請求の範囲

[請求項1] 下記の式(1)、式(2)、式(3)または式(4)で表され、生理的条件下で開裂することを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体。

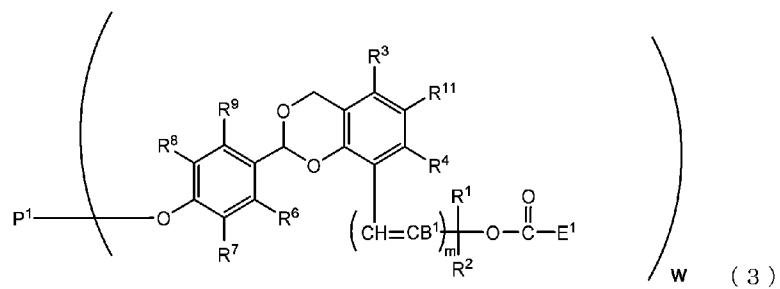
[化1]



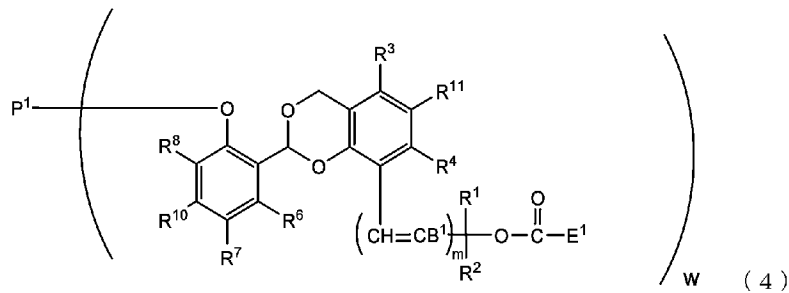
[化2]



[化3]



[化4]



(式(1)、式(2)、式(3)及び式(4)中

B^1 は水素原子または $-C(R^1)(R^2)OC(O)E^1$ であり、

E^1 は脱離基であり、

P^1 は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体であり、

、

w は1～8の整数であり、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^{11} は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性置換基または水素原子であり、

m は0または1である。))

[請求項2]

m が0であり、 R^1 および R^2 が水素原子であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^{11} がそれぞれ独立して水素原子またはメチル基であることを特徴とする、請求項1に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体。

[請求項3]

請求項1または2に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体を製造する方法であって、

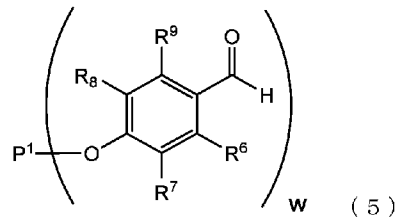
ポリオキシエチレン誘導体とヒドロキシベンズアルデヒド誘導体とをカップリングさせることによって、下記式(5)または式(6)で表されるカップリング生成物を得るカップリング工程、

前記カップリング工程後に、酸性条件下で、前記式(5)または前

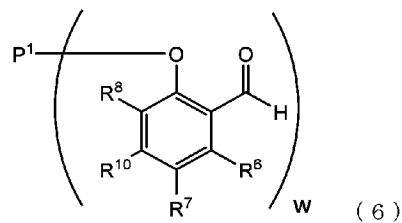
記式（６）で表される前記カップリング生成物を、２位にヒドロキシメチル基を有し、かつ４位または６位に置換基（ $-\text{CH}=\text{CB}^1$ ）_m C（R¹）（R²）-OH（B¹、m、R¹、R²は前述のとおりである）を有するフェノールと反応させることで、アセタール構造体を得るアセタール化工程、および

前記アセタール化工程後に、４位または６位の前記置換基の末端に脱離基構造（ $-\text{OC}(\text{O})\text{E}^1$ ）を導入する脱離基構造導入工程を備えることを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体の製造方法。

[化5]



[化6]



（式（５）または（６）中、P¹、w、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰は前述したとおりである）

[請求項4]

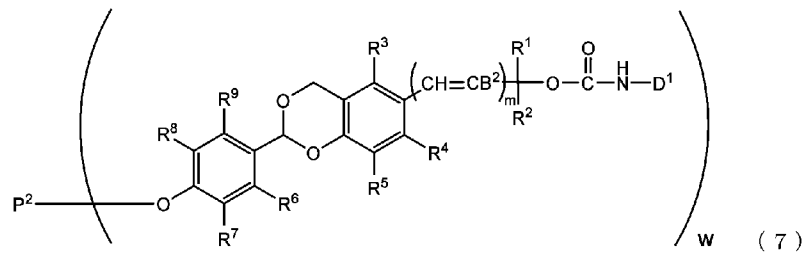
前記アセタール化工程と、前記脱離基構造導入工程との間に、前記式（５）及び（６）の前記カップリング生成物中の保護基で保護されたアミノ基の脱保護工程、及び前記脱保護工程後に脱保護されたアミノ基に生体機能性分子と反応可能な基を導入する工程を備えているこ

とを特徴とする、請求項3に記載のアセタール型リリーサブポリオキシエチレン誘導体の製造方法。

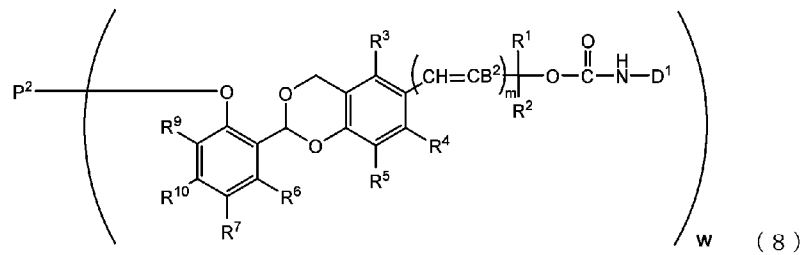
[請求項5]

下記の式(7)、式(8)、式(9)または式(10)で表され、生理的条件下で開裂することを特徴とする、アセタール型リリーサブポリオキシエチレン結合体。

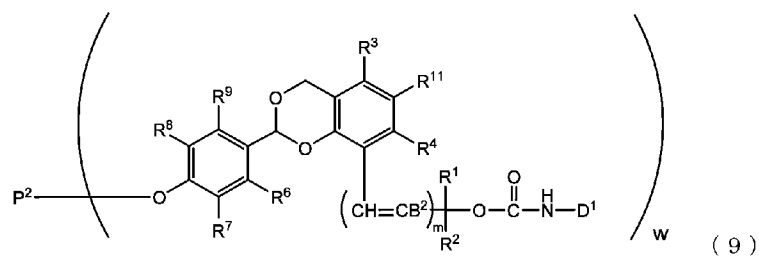
[化7]



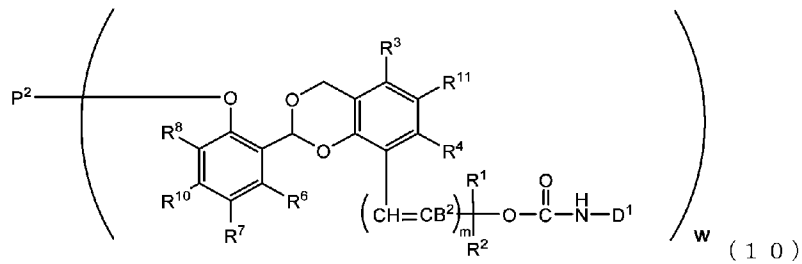
[化8]



[化9]



[化10]



(式(7)、式(8)、式(9)及び式(10)中、

B^2 は水素原子または $-C(R^1)(R^2)OC(O)NHD^1$ であり、

D^1 は、生体機能性分子に含まれるアミノ基から、カーバメート結合を構成するアミノ基を除いた残基であり、

P^2 は、脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体、または脱ヒドロキシ基を有するポリオキシエチレン誘導体および生体機能性分子の結合体であり、

w は1～8の整数であり、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^{11} は、それぞれ独立して、炭素数1～10の炭化水素基または水素原子であり、

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は、それぞれ独立して、電子求引性置換基、電子供与性置換基または水素原子であり、

m は0または1である。))

[請求項6]

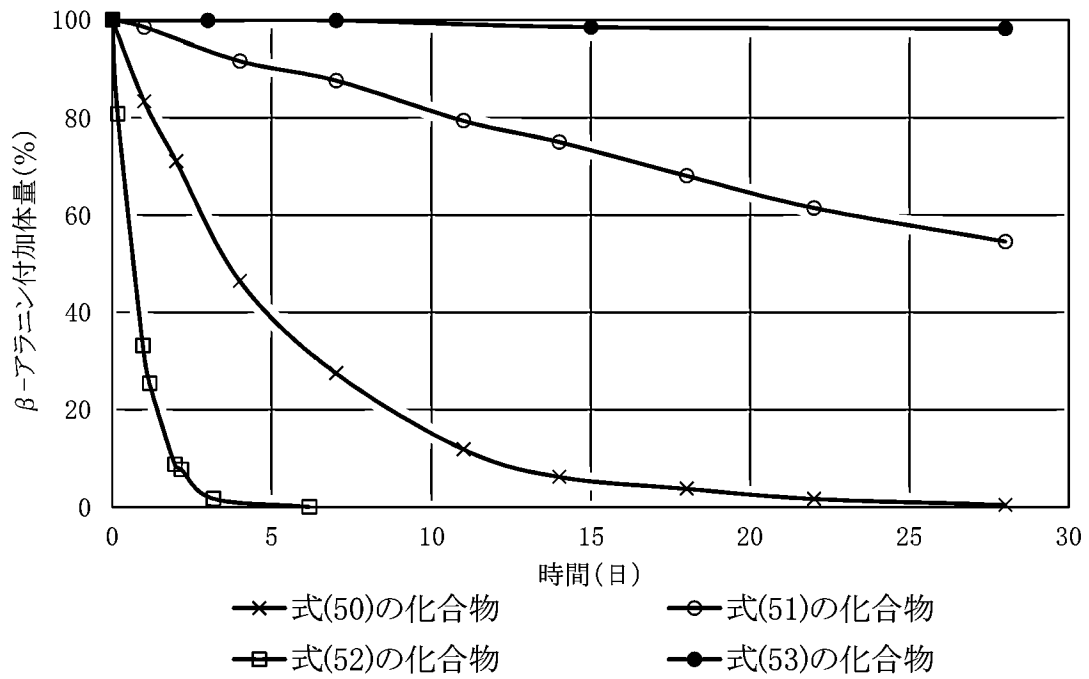
請求項5に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体を製造する方法であって、

請求項1または2に記載のアセタール型リリーサブルポリオキシエチレン誘導体と生体機能性分子を、水溶性の有機溶媒が含まれていてもよい中性または塩基性の緩衝液中で反応させるカップリング工程、および

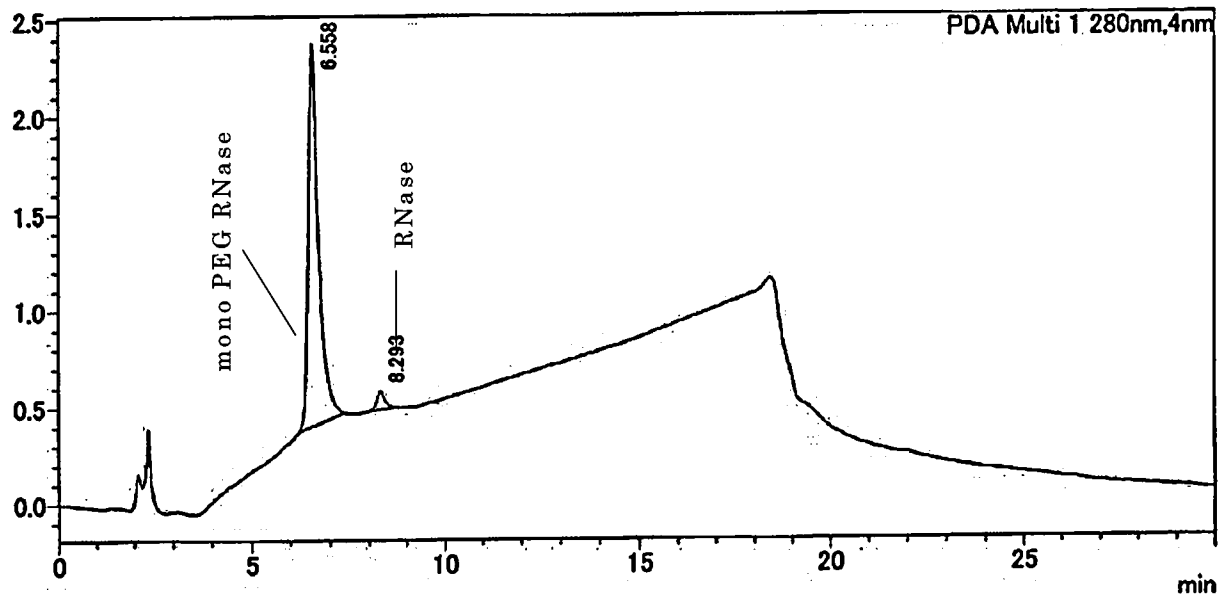
前記カップリング工程後の中性または塩基性条件下での精製工程

を備えることを特徴とする、アセタール型リリーサブルポリオキシエチレン結合体の製造方法。

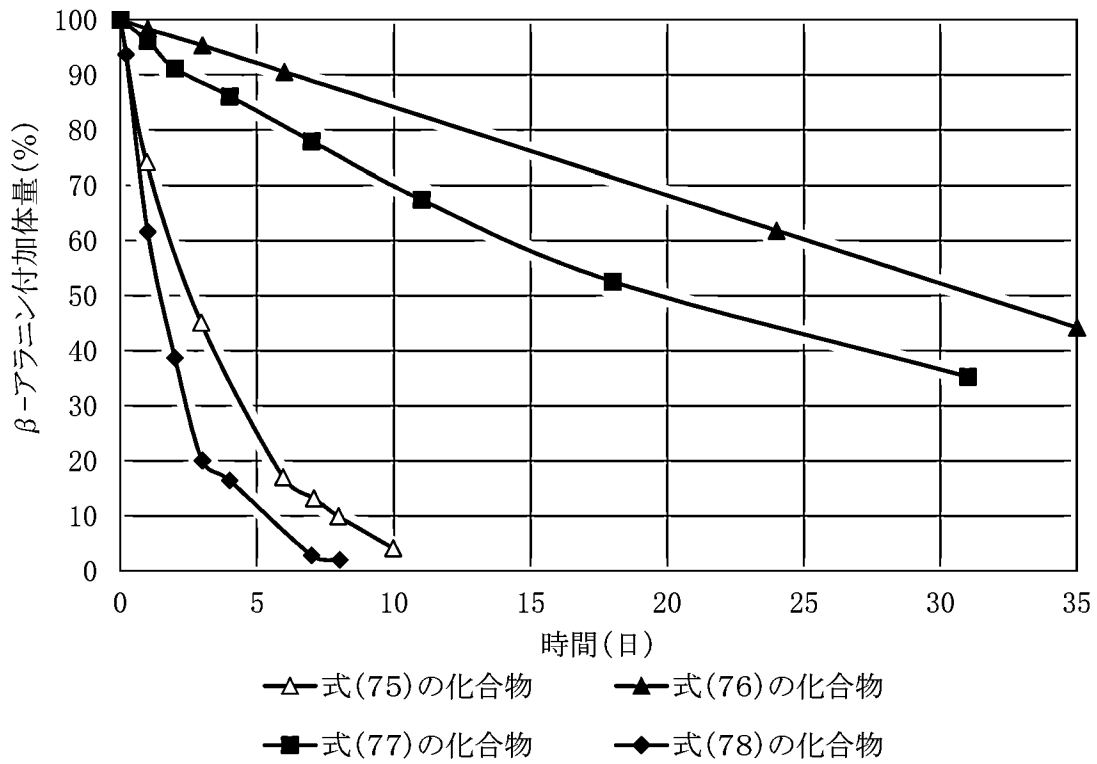
[図1]



[図2]



[図3]



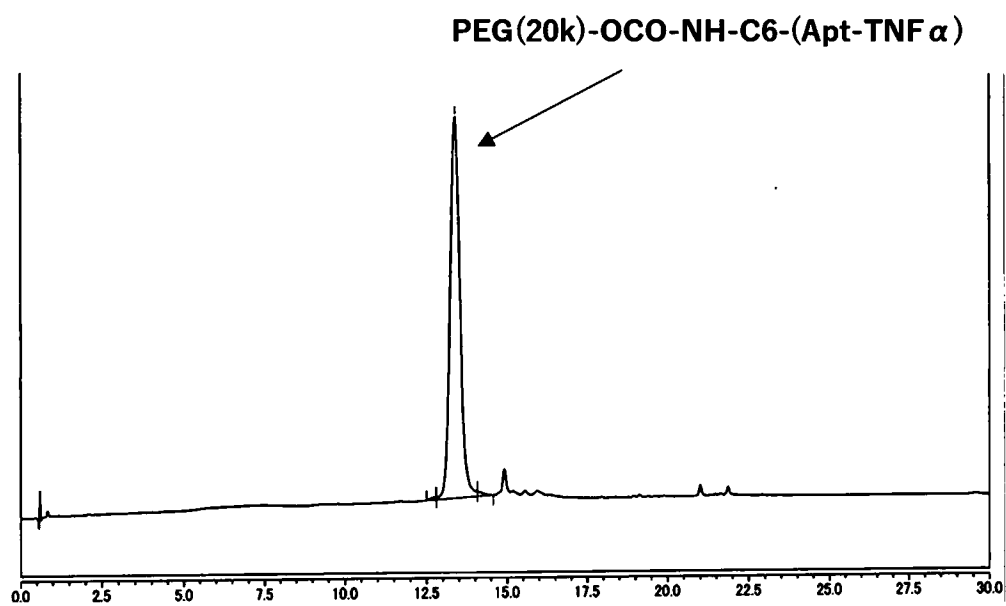
[図4]

TNF α 阻害活性を有するアプタマーの塩基配列 (配列番号 1)

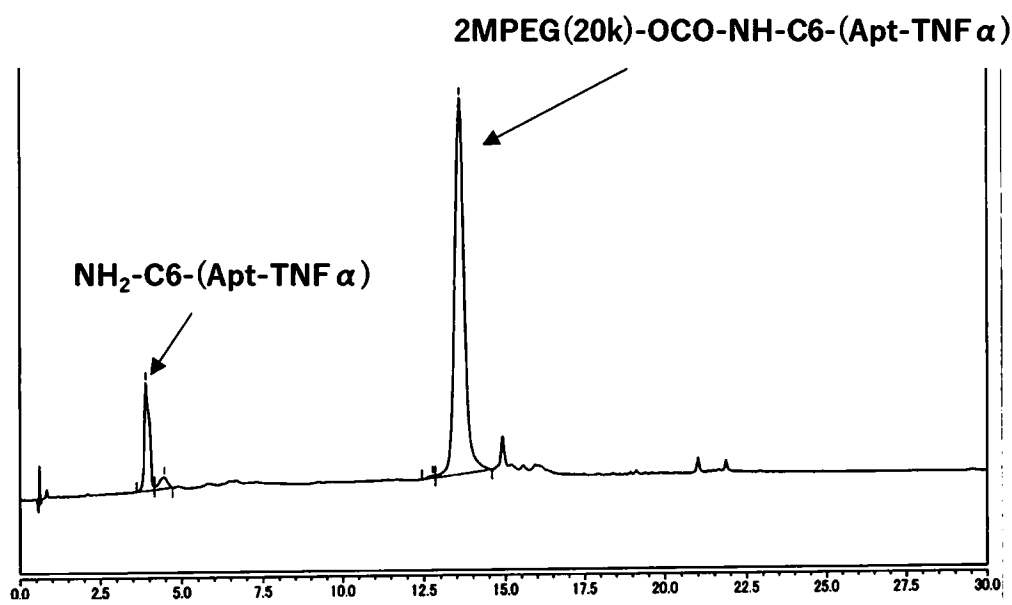
5'-GCGCCACTACAGGGGAGCTGCCATTCGAATAGGTGGGCCGC-3'

[図5]

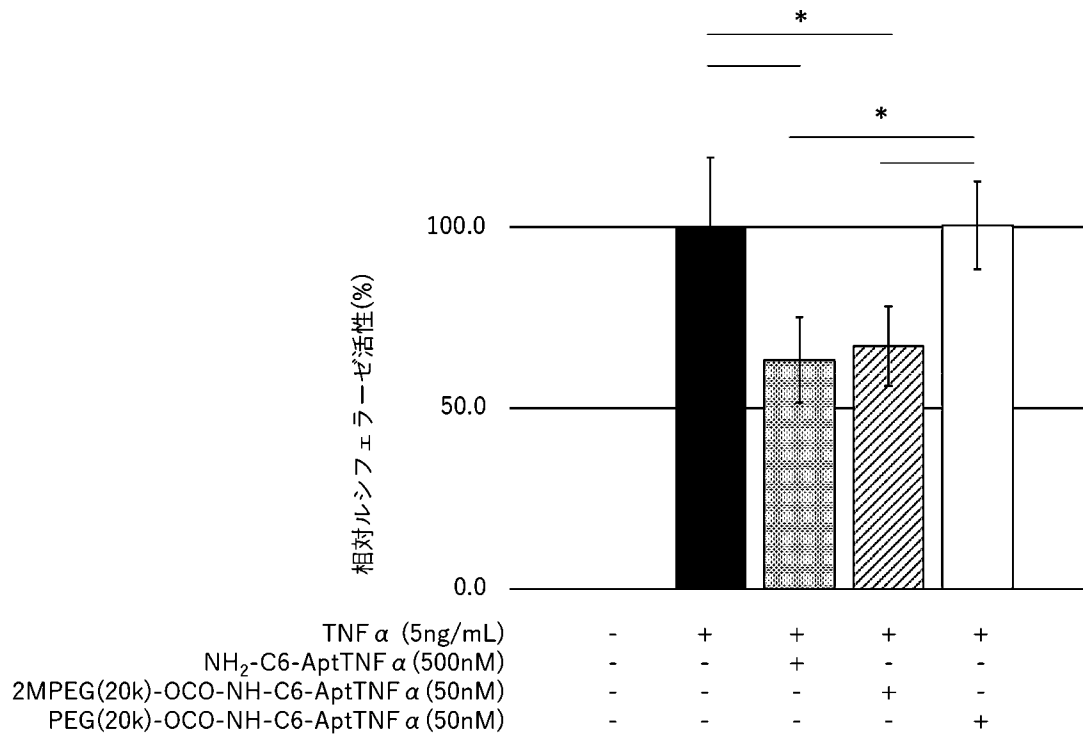
(A)



(B)

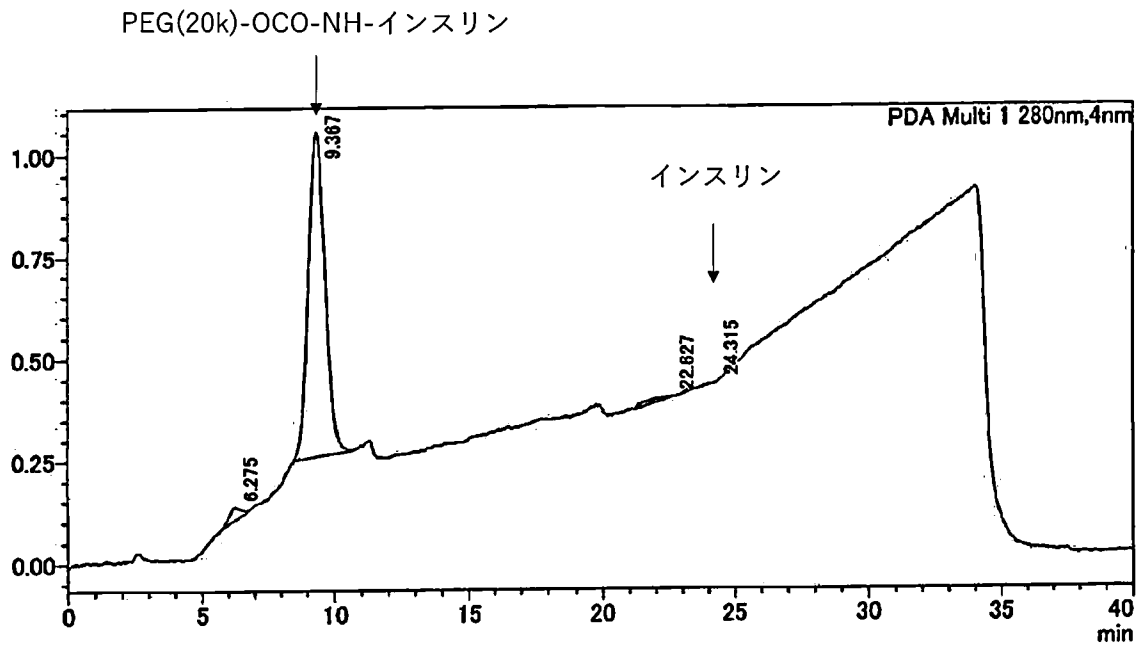


[図6]

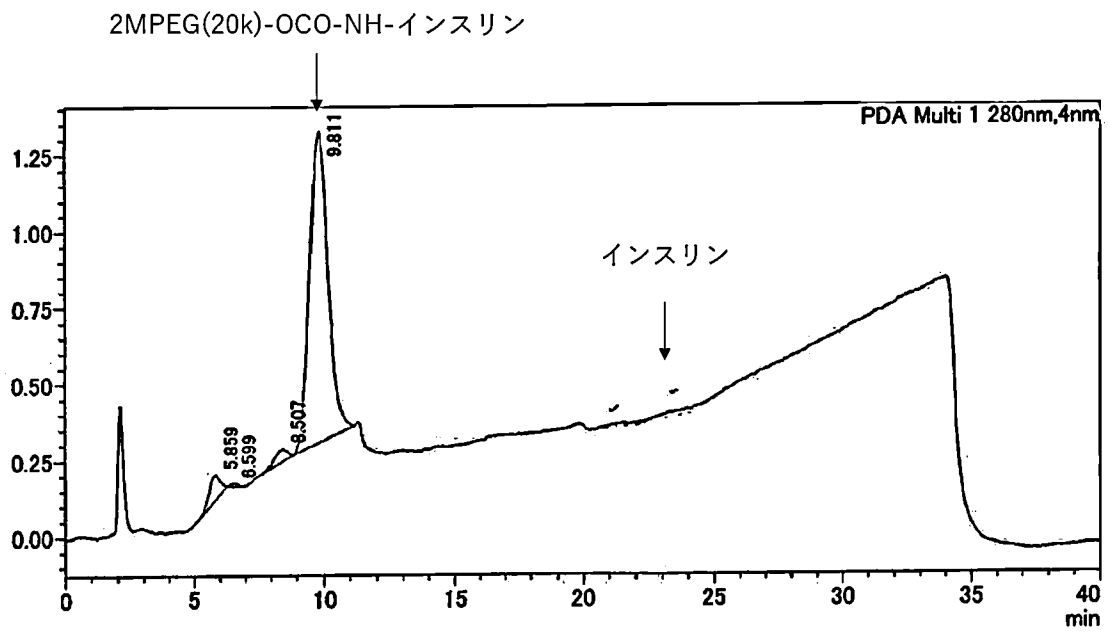


[図7]

(A)

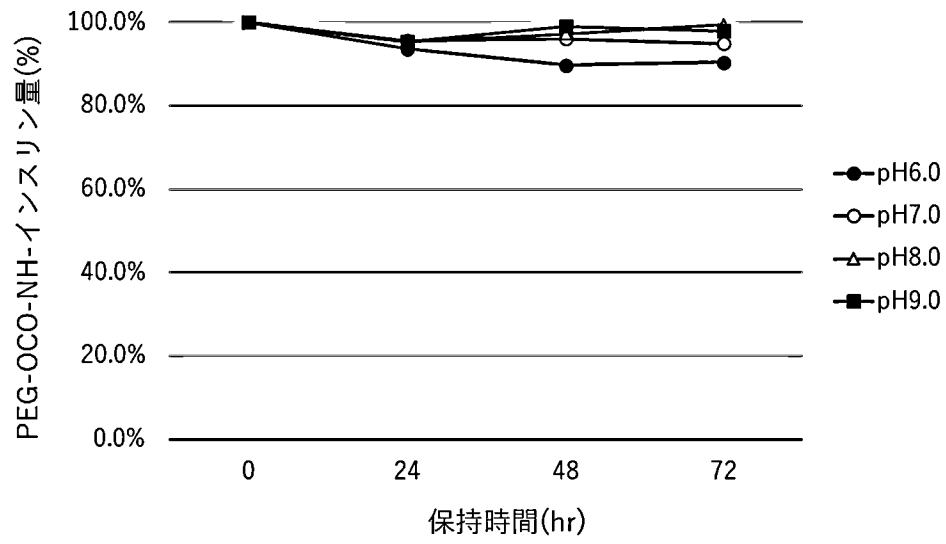


(B)

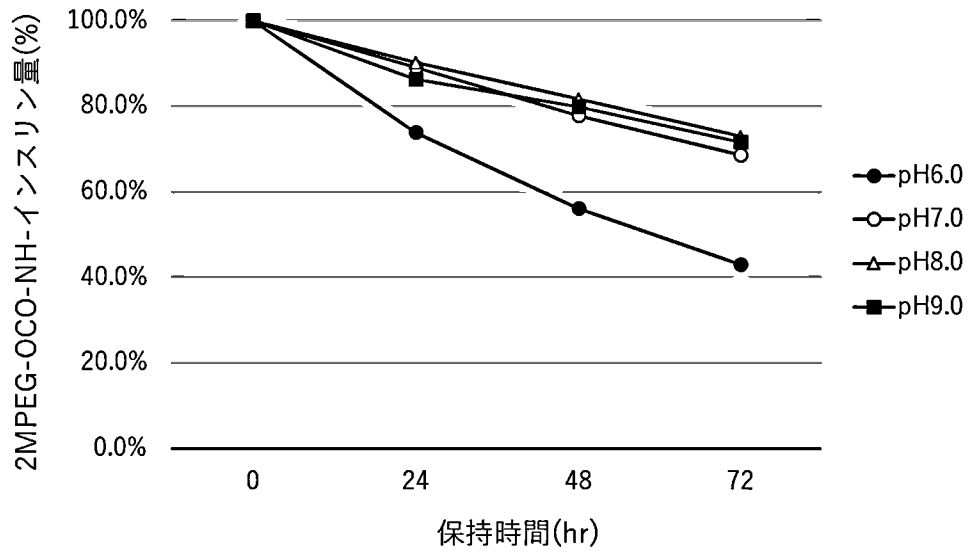


[図8]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/015663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C08G 65/331</i> (2006.01)i; <i>A61K 47/59</i> (2017.01)i FI: C08G65/331; A61K47/59 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08G65/331; A61K47/59		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
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.
X	WO 2018/180914 A1 (NOF CORP) 04 October 2018 (2018-10-04) claims 1, 2, 14, paragraphs [0057], [0096]-[0102], examples 1-7	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 27 June 2023		Date of mailing of the international search report 11 July 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/015663

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018/180914	A1	04 October 2018	US	2020/0010620	A1	
				claims 1, 2, 14, paragraphs [0045], [0069]-[0075], examples 1-7			
				EP	3604384	A1	
				JP	2018-172648	A	
<hr/>							

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C08G 65/331(2006.01)i; A61K 47/59(2017.01)i FI: C08G65/331; A61K47/59		
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）） C08G65/331; A61K47/59 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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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
X	WO 2018/180914 A1 (日油株式会社) 04.10.2018 (2018-10-04) 請求項1, 2, 14, [0057], [0096]-[0102], 実施例1-7	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “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 27.06.2023	国際調査報告の発送日 11.07.2023	
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） 今井 督 4J 5812 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/JP2023/015663

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/180914 A1	04.10.2018	US 2020/0010620 A1 請求項1, 2, 14, [0045], [0069]-[0075], 実施例1-7 EP 3604384 A1 JP 2018-172648 A	