

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/157584

発行日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)

(43) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014. 10. 2)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
<b>C08G 65/333</b>	<b>(2006.01)</b>	C08G 65/333	4C050
<b>C07D 403/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C07D 403/06	CSP 4C063
<b>C07D 487/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C07D 487/04	ISO 4C085
<b>A61K 49/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 49/00	4J005
<b>A61K 51/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 49/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

出願番号 特願2015-508736 (P2015-508736)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2014/059034  
 (22) 国際出願日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-70277 (P2013-70277)  
 (32) 優先日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 507219686  
 静岡県公立大学法人  
 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号  
 (74) 代理人 100093230  
 弁理士 西澤 利夫  
 (72) 発明者 赤井 周司  
 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号 静岡県立大学内  
 (72) 発明者 奥 直人  
 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号 静岡県立大学内  
 Fターム(参考) 4C050 AA01 AA07 BB10 CC06 EE04  
 FF01 GG01 HH04  
 4C063 AA01 BB04 CC20 DD04 EE10

最終頁に続く

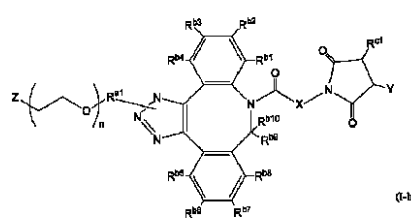
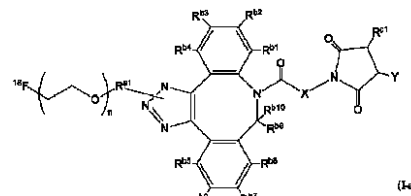
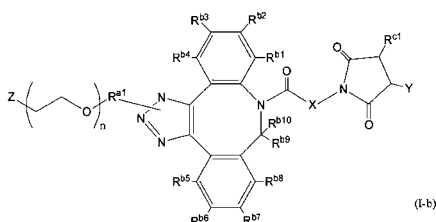
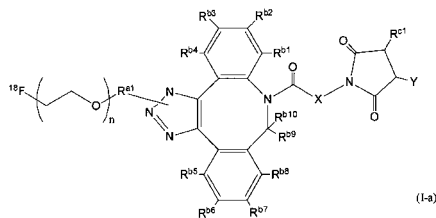
(54) 【発明の名称】 [18F] Fまたは蛍光色素で標識されたPEG化生物活性物質の製造方法、ならびにその体内動態解析

(57) 【要約】

非侵襲的に高感度・リアルタイムで薬物の時空間的な体内動態の定量化を可能とする新規な技術手段を提供する。

次式 (1-a) および (1-b) :

【化19】

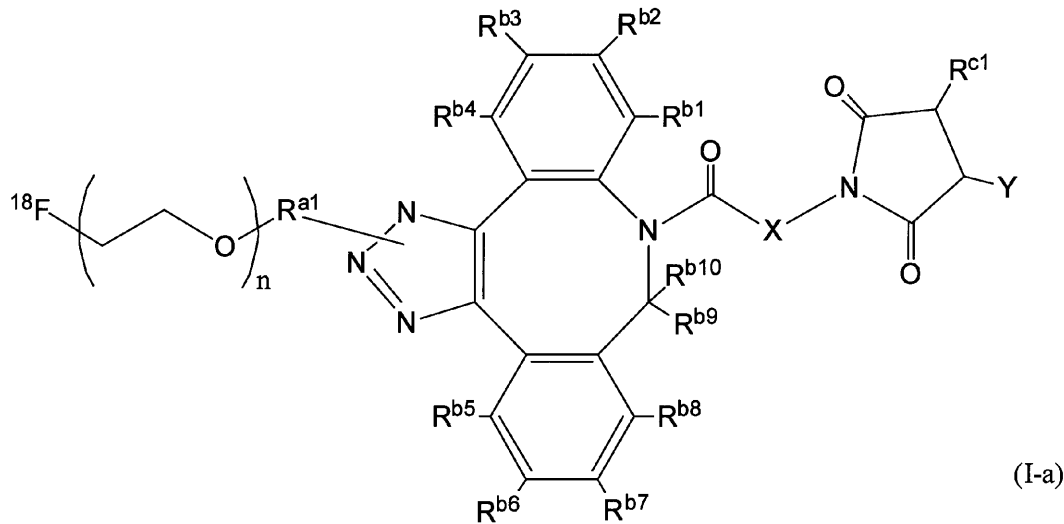


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次式 (I-a) :

## 【化 1】



10

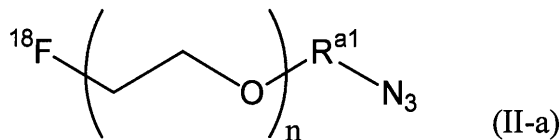
(式中、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。 $R^{a1}$ は $-N_3$ -の3つの窒素原子のうち両端のいずれか一方の窒素原子に結合している。) で表わされる、 $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質。

20

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のPEG化生物活性物質を製造する方法であって、次式 (II-a) :

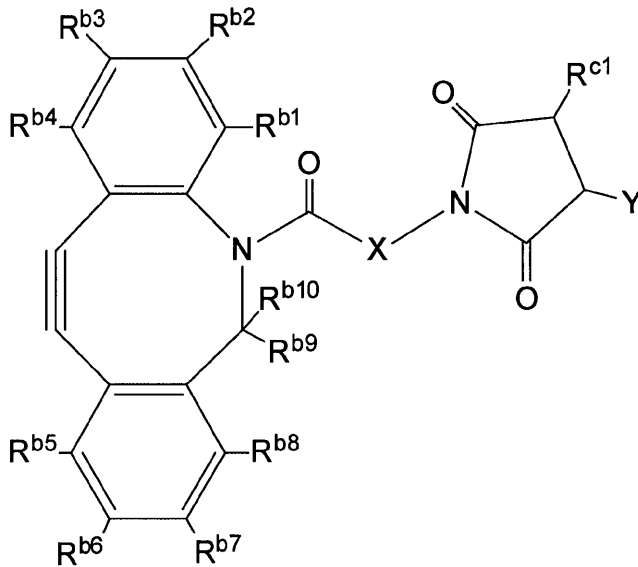
## 【化 2】



30

(式中、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) で表わされる $[^{18}F]$ フルオロPEG化合物と、次式 (III) :

## 【化3】



10

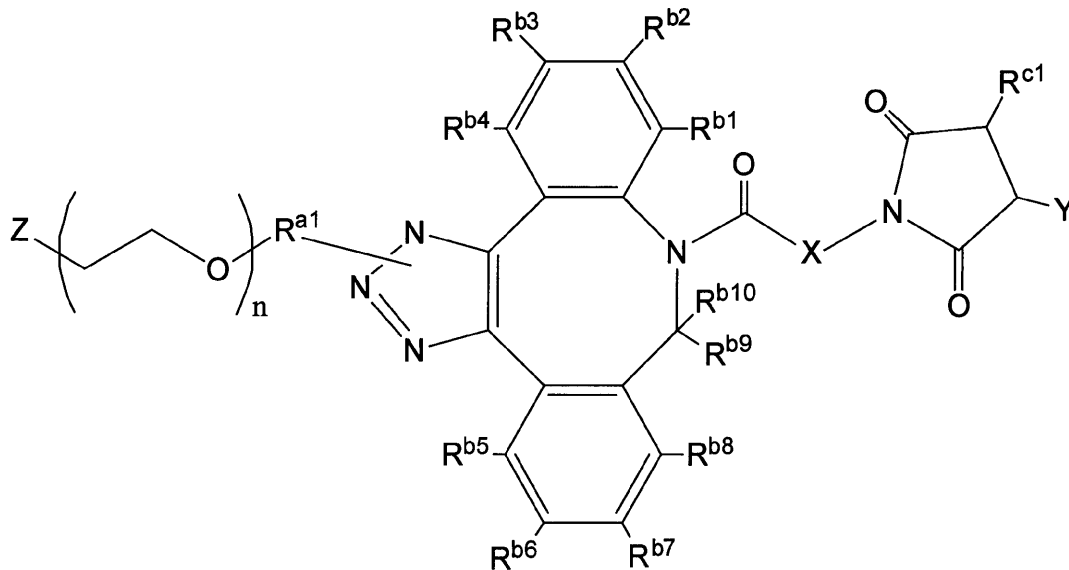
(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}$  ( $R^{d1}$ は $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または2価の $C_1 \sim C_{12}$ アミド基またはカルバミン酸エステル基含有炭化水素基、 $R^{d2}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa  $\sim$  40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物とを、生理的条件下(水溶液中、室温、かつ銅触媒の不存在下)に反応させ、前記式(1-a)で表わされるPEG化生物活性物質を合成することを特徴とする、 $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質の製造方法。

20

## 【請求項3】

次式(1-b)：

## 【化4】



30

40

(式中、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa  $\sim$  40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基、 $Z$ は蛍光色素を含む1価の基、 $n$ は分子量換算

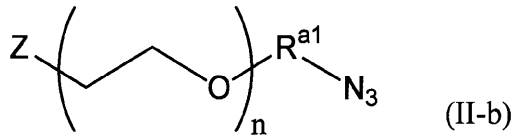
50



## 【請求項 7】

次式 (II-b) :

## 【化 8】



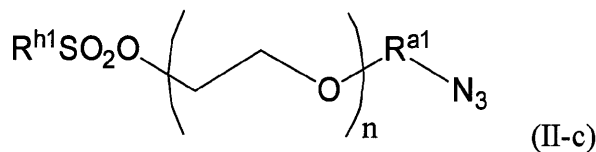
(式中、Zは蛍光色素を含む1価の基、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、nは分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) で表される蛍光色素含有PEG化合物。

10

## 【請求項 8】

次式 (II-c) :

## 【化 9】



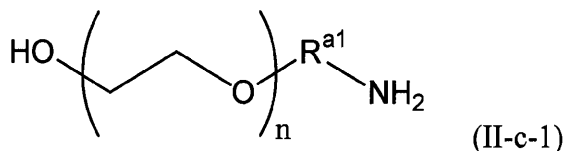
(式中、 $\text{R}^{h1}$ はハロゲン原子で置換されていてもよい1価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、またはヘテロ原子もしくはハロゲン原子を含んでいてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 有機基で置換されていてもよいフェニル基、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、nは分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) で表されるスルホニル化PEG化合物。

20

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載のスルホニル化PEG化合物の製造方法であって、次式 (II-c-1) :

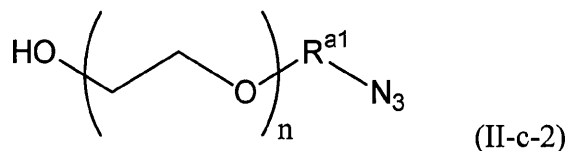
## 【化 10】



30

(式中、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、nは分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) で表わされる化合物と、ジアゾ転送試薬のスルホニルアジド化合物とを溶媒中で反応させて次式 (II-c-2) :

## 【化 11】



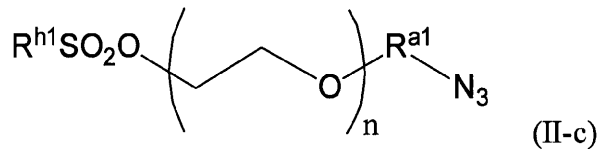
(式中、 $\text{R}^{a1}$ およびnは前記と同義である。) を合成し、次いで得られた式 (II-c-2) で表わされる化合物と、スルホニル化試薬とを溶媒中で反応させて前記式 (II-c) で表わされるスルホニル化PEG化合物を合成することを特徴とするスルホニル化PEG化合物の製造方法。

40

## 【請求項 10】

請求項 6 に記載のデオキシフルオロPEG化合物の製造方法であって、次式 (II-c) :

## 【化 1 2】



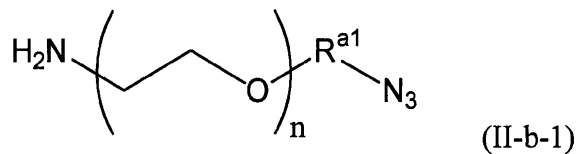
(式中、 $\text{R}^{\text{h}1}$ はハロゲン原子で置換されていてもよい1価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、またはヘテロ原子もしくはハロゲン原子を含んでいてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 有機基で置換されていてもよいフェニル基、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)で表されるスルホニル化PEG化合物と、 $[^{18}\text{F}]$ 標識フッ素化試薬とを溶媒中で反応させて、 $[^{18}\text{F}]$ で標識された前記式(II-a')で表わされるデオキシフルオロPEG化合物を合成することを特徴とするデオキシフルオロPEG化合物の製造方法。

10

## 【請求項 1 1】

請求項 7 に記載の蛍光色素含有PEG化合物の製造方法であって、次式(II-b-1)：

## 【化 1 3】



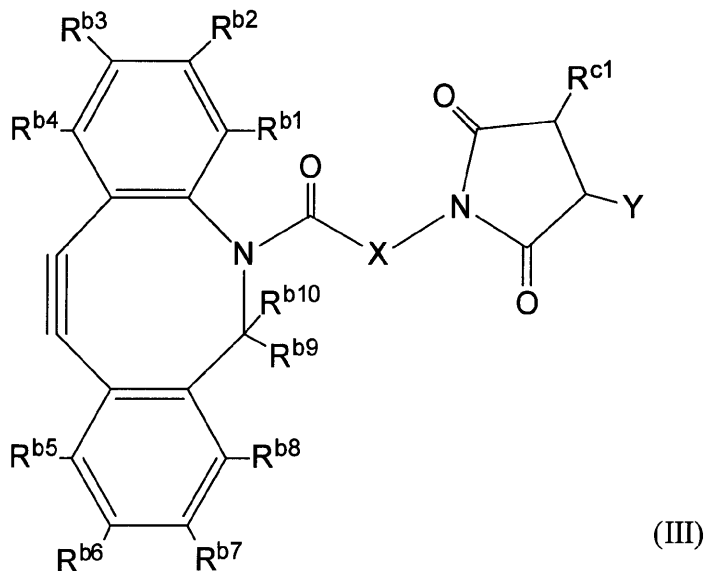
(式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)で表される化合物と、この式(II-b-1)で表される化合物のアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素とを反応させて、前記式(II-b)で表される蛍光色素含有PEG化合物を合成することを特徴とする蛍光色素含有PEG化合物の製造方法。

20

## 【請求項 1 2】

次式(III)：

## 【化 1 4】



30

40

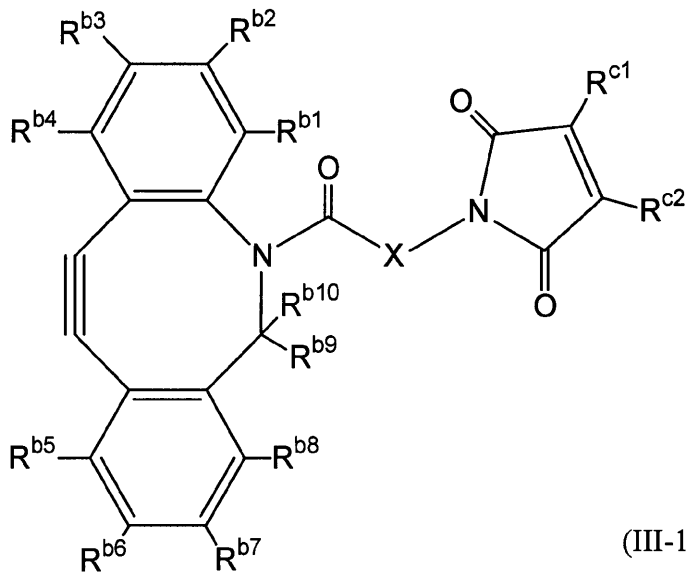
(式中、 $\text{R}^{\text{b}1} \sim \text{R}^{\text{b}10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $\text{R}^{\text{c}1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $\text{X}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基または $-\text{R}^{\text{d}1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{R}^{\text{d}2}-$ ( $\text{R}^{\text{d}1}$ はアミド基または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、 $\text{R}^{\text{d}2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $\text{Y}$ は生物活性物質を含む1価の基を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物。

## 【請求項 1 3】

50

次式 (III-1) :

【化 1 5】



10

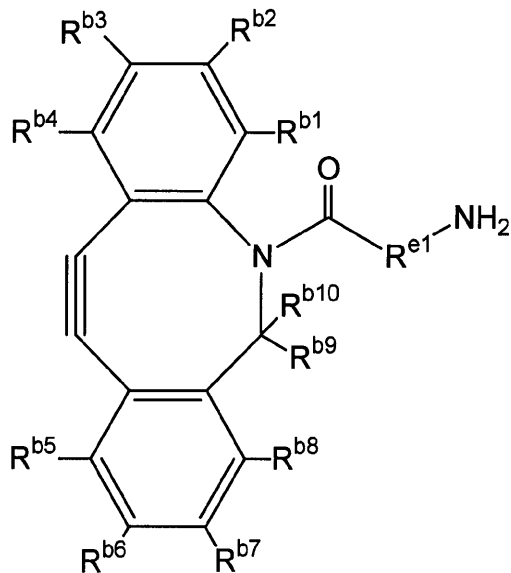
(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_m R^{d2}$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物。

20

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の環状アセチレン化合物の製造方法であって、次式 (III-1-1) :

【化 1 6】

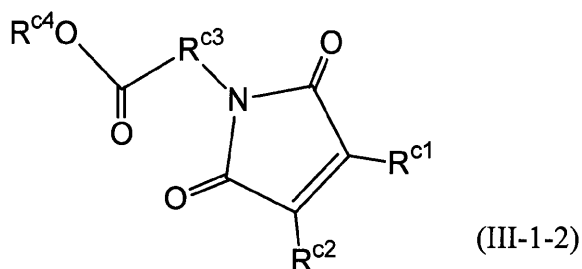


30

40

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{e1}$ は2価の $C_1 \sim C_5$ 炭化水素基を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物と、次式 (III-1-2) :

## 【化 1 7】

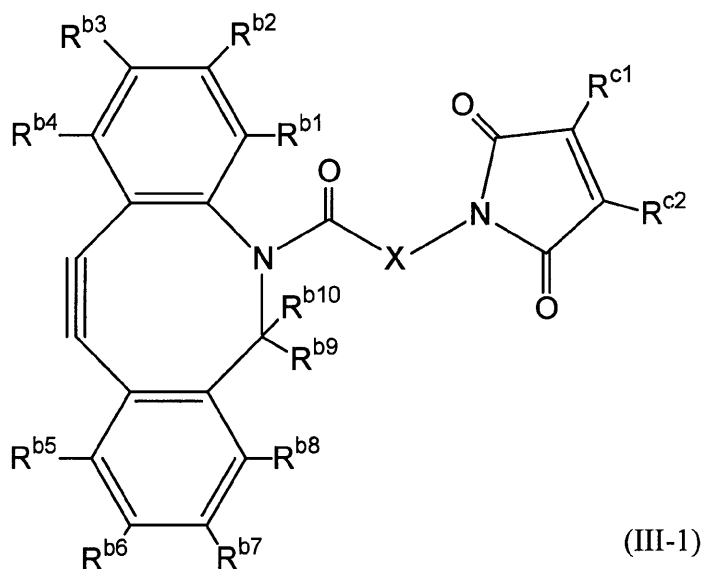


(式中、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c3}$ は $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $-R^{d3}(OCH_2CH_2)_mR^{d4}$ - ( $R^{d3}$ は2価の $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $OCH_2CH_2$ 、 $R^{d4}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $OR^{c4}$ は前記(III-1)で表される蛍光色素含有PEG化合物のアミノ基との反応により脱離する脱離基を示す。)で表わされるマレイミド化合物とを反応させて、前記式(III-1)で表される蛍光色素含有PEG化合物を合成することを特徴とする環状アセチレン化合物の製造方法。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 2 に記載の環状アセチレン化合物の製造方法であって、次式(III-1)：

## 【化 1 8】



(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}$ - ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物と、この式(III-1)で表される環状アセチレン化合物のマレイミド基と反応する官能基を有する生物活性物質とを反応させて、前記式(III)で表される環状アセチレン化合物を合成することを特徴とする環状アセチレン化合物の製造方法。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 に記載の $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質の体内動態をポジトロン断層法(PET)によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析する方法。

## 【請求項 1 7】

請求項 3 に記載の蛍光標識されたPEG化生物活性物質の体内動態を蛍光検出法によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析する方法。



## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、PEG化生物活性物質の体内動態の解析等のために、生物活性物質をPEG化する技術と $[^{18}\text{F}]\text{F}$ や蛍光色素によって標識する技術に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

タンパク質性医薬品に長鎖ポリエチレングリコール（PEG、分子量5,000～40,000程度）を結合すると薬効の持続、副作用の軽減などが期待できるため、PEG化は創薬研究で活発に利用されている。すでに、PEG化インターフェロン（C型肝炎治療薬）やPEG化エリスロポエチン（腎性貧血治療薬）などが市販され、また、低分子の医薬品候補化合物のPEG化研究も盛んに行われている。

10

## 【0003】

一方、2008年に厚労省から「マイクロドーズ臨床試験」の実施ガイダンスが発表された。これは、医薬品開発の効率化と安全性向上を目指すために、臨床開発の初期段階で、ヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量の1/100を超えない用量または100 $\mu\text{g}$ のいずれか少ない用量の被験物質を、健康な被験者に単回投与することにより、その薬物動態に関する情報を得る試験である。そのために、非侵襲的に高感度・リアルタイムで薬物の時空間的な体内動態を定量化する技術が必要となる。

## 【0004】

このような時代の要請に応えるべく、本発明者らは数年前より $[^{18}\text{F}]\text{F}$ で標識した新規なPEG化合物を創製し、体内動態解析への応用研究を行ってきた。すなわち、 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ で標識した新規なPEG含有低分子化合物（分子量360）を創製した。これによってリポソームをラベル化し、ラットにおける体内動態をポジトロン断層法（PET）によって可視化/定量化する新技術を開発した（特許文献1、非特許文献1）。

20

## 【0005】

また $[^{18}\text{F}]\text{F}$ で標識した長鎖PEG（分子量2,000と10,000）を合成した。この長鎖PEGを用い、ラットにおけるPEG自身の体内動態を、PETを用いて可視化/定量化することに成功した（非特許文献2）。

## 【先行技術文献】

30

## 【特許文献】

## 【0006】

【特許文献1】特許第4989241号（平成24年5月11日登録）

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】J. Med. Chem. 2007, 50, 6454-6457.

【非特許文献2】Mol. Pharmaceutics 2011, 8, 302-308.

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

上記の技術では $[^{18}\text{F}]\text{F}$ をPEGに導入する工程を80～120℃で行ってきたが、この加熱条件をPEG化ペプチドに適用するとペプチドが変成してしまう。更に、 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ の半減期が110分であるために、 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ 標識化は迅速に行う必要がある。

40

## 【0009】

本発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、非侵襲的に高感度・リアルタイムでPEG化生物活性物質の時空間的な体内動態の可視化/定量化を可能とする新規な技術手段を提供することを課題としている。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

上記の課題を解決するために、本発明は以下のことを特徴としている。

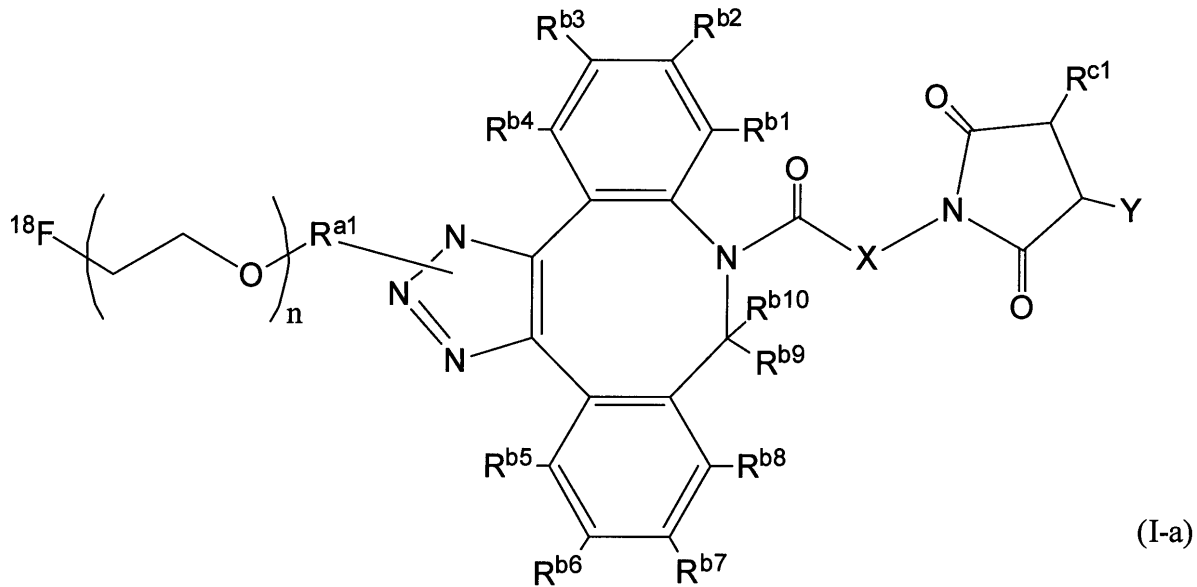
50

【 0 0 1 1 】

本発明の $[^{18}\text{F}]\text{F}$ で標識されたPEG化生物活性物質は、次式(I-a)：

【 0 0 1 2 】

【化1】



10

20

【 0 0 1 3 】

(式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $\text{R}^{\text{b}1} \sim \text{R}^{\text{b}10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $\text{R}^{\text{c}1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $\text{X}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基または $-\text{R}^{\text{d}1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{R}^{\text{d}2}$ - ( $\text{R}^{\text{d}1}$ はアミド基または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、 $\text{R}^{\text{d}2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $\text{Y}$ は生物活性物質を含む1価の基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。 $\text{R}^{\text{a}1}$ は $-\text{N}_3$ -の3つの窒素原子のうち両端のいずれか一方の窒素原子に結合している。)で表わされる。

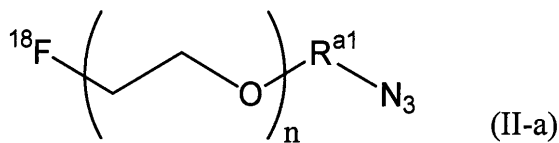
30

【 0 0 1 4 】

本発明の $[^{18}\text{F}]\text{F}$ で標識されたPEG化生物活性物質の製造方法は、前記式(I-a)で表わされるPEG化生物活性物質を製造する方法であって、次式(II-a)：

【 0 0 1 5 】

【化2】



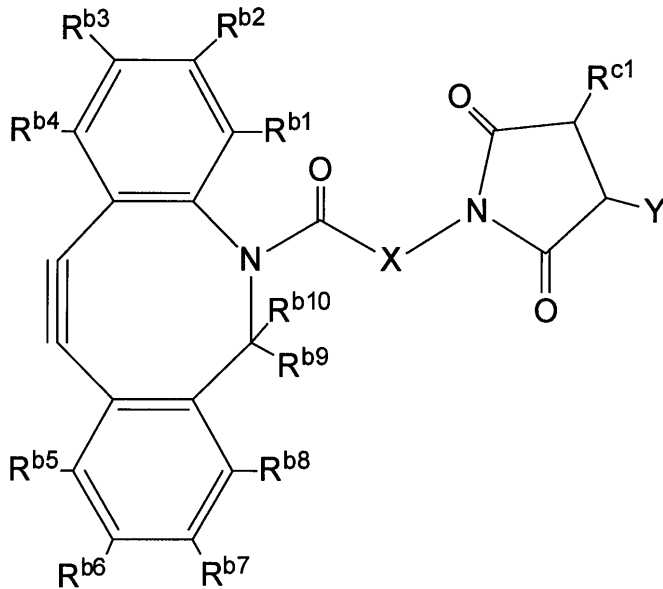
40

【 0 0 1 6 】

(式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)で表わされる $[^{18}\text{F}]\text{F}$ フルオロPEG化合物と、次式(III)：

【 0 0 1 7 】

## 【化3】



10

## 【0018】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$ ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物とを、生理的条件下(水溶液中、室温、かつ銅触媒の不存在下)に結合(Huisgen反応)させ、前記式(I-a)で表わされるPEG化生物活性物質を合成することを特徴とする。

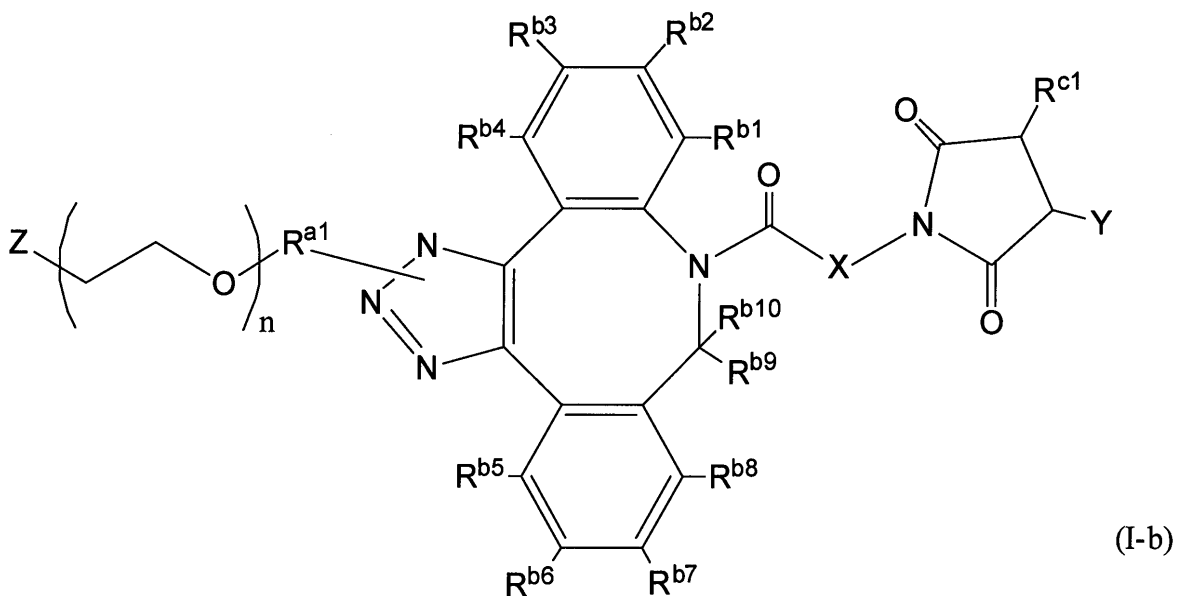
20

## 【0019】

本発明の蛍光標識されたPEG化生物活性物質は、次式(I-b)：

## 【0020】

## 【化4】



40

## 【0021】

(式中、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ

50

素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基、 $Z$ は蛍光色素を含む1価の基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。 $R^{a1}$ は $-N_3-$ の3つの窒素原子のうち両端のいずれか一方の窒素原子に結合している。) で表わされる。

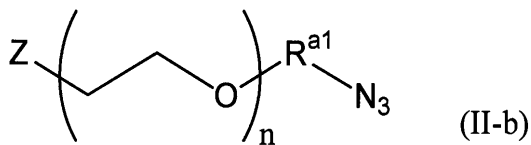
【0022】

本発明の蛍光標識されたPEG化生物活性物質の製造方法は、前記式(1-b)のPEG化生物活性物質を製造する方法であって、次式(II-b)：

10

【0023】

【化5】



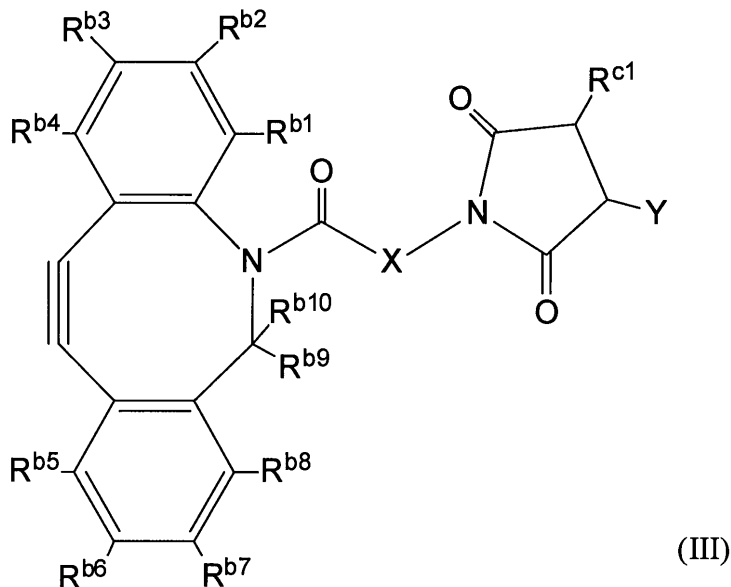
【0024】

(式中、 $Z$ は蛍光色素を含む1価の基、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) で表わされる蛍光色素含有PEG化合物と、次式(III)：

20

【0025】

【化6】



30

【0026】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。) 、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基を示す。) で表わされる環状アセチレン化合物とを、生理的条件下(水溶液中、室温、かつ銅触媒の不存在下)に結合(Huisgen反応)させ、前記式(1-b)で表わされるPEG化生物活性物質を合成することを特徴とする。

40

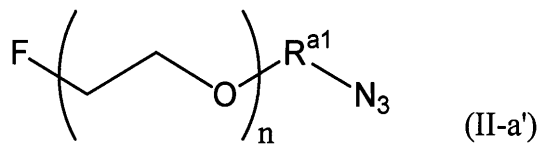
【0027】

本発明のデオキシフルオロPEG化合物は、次式(II-a')：

50

【 0 0 2 8 】

【 化 7 】



【 0 0 2 9 】

(式中、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)で表される。このデオキシフルオロPEG化合物において、式(II-a')のFは、例えば $^{18}\text{F}$ である。

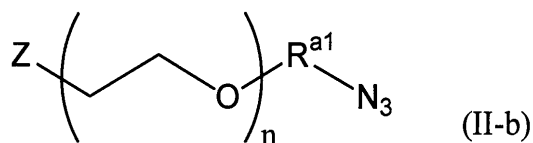
10

【 0 0 3 0 】

本発明の蛍光色素含有PEG化合物は、次式(II-b)：

【 0 0 3 1 】

【 化 8 】



20

【 0 0 3 2 】

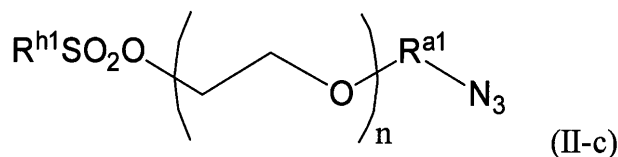
(式中、Zは蛍光色素を含む1価の基、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)で表される。

【 0 0 3 3 】

本発明のスルホニル化PEG化合物は、次式(II-c)：

【 0 0 3 4 】

【 化 9 】



30

【 0 0 3 5 】

(式中、 $\text{R}^{h1}$ はハロゲン原子で置換されていてもよい1価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、またはヘテロ原子もしくはハロゲン原子を含んでもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 有機基で置換されていてもよいフェニル基、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)で表される。

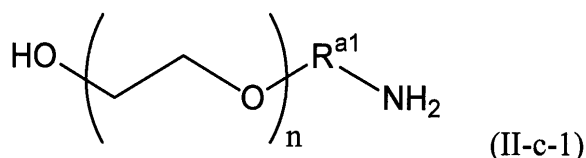
【 0 0 3 6 】

本発明のスルホニル化PEG化合物の製造方法は、前記式(II-c)で表わされるスルホニル化PEG化合物の製造方法であって、次式(II-c-1)：

40

【 0 0 3 7 】

【 化 1 0 】



【 0 0 3 8 】

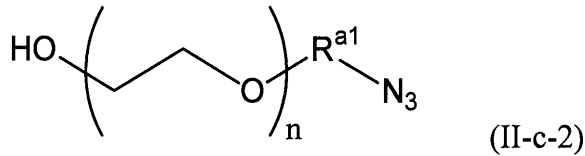
(式中、 $\text{R}^{a1}$ は2価の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)で表わされる化合物と、ジアゾ転送試薬のスルホニルアジド化合物とを溶媒中で反

50

応させて次式 (II-c-2) :

【 0 0 3 9 】

【 化 1 1 】



【 0 0 4 0 】

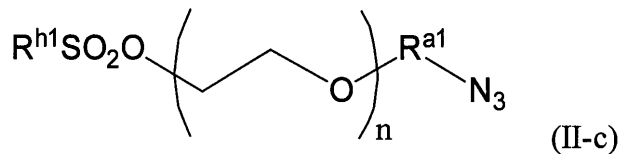
(式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ および $n$ は前記と同義である。)を合成し、次いで得られた式 (II-c-2) で表わされる化合物と、スルホニル化試薬とを溶媒中で反応させて前記式 (II-c) で表わされるスルホニル化PEG化合物を合成することを特徴とする。

【 0 0 4 1 】

本発明のデオキシフルオロPEG化合物の製造方法は、前記式 (II-a') で表わされるデオキシフルオロPEG化合物の製造方法であって、次式 (II-c) :

【 0 0 4 2 】

【 化 1 2 】



【 0 0 4 3 】

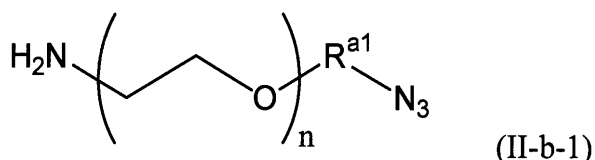
(式中、 $\text{R}^{\text{h}1}$ はハロゲン原子で置換されていてもよい1個の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 炭化水素基、またはヘテロ原子もしくはハロゲン原子を含んでいてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 有機基で置換されていてもよいフェニル基、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2個の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)で表されるスルホニル化PEG化合物と、 $[^{18}\text{F}]$ 標識フッ素化試薬とを溶媒中で反応させて、 $[^{18}\text{F}]$ で標識された前記式 (II-a') で表わされるデオキシフルオロPEG化合物を合成することを特徴とする。

【 0 0 4 4 】

本発明の蛍光色素含有PEG化合物の製造方法は、前記式 (II-b) で表される蛍光色素含有PEG化合物の製造方法であって、次式 (II-b-1) :

【 0 0 4 5 】

【 化 1 3 】



【 0 0 4 6 】

(式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は2個の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 炭化水素基、 $n$ は分子量換算で1kDa ~ 40kDaの範囲内の整数を示す。)で表される化合物と、この式 (II-b-1) で表される化合物のアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素とを反応させて、前記式 (II-b) で表される蛍光色素含有PEG化合物を合成することを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

本発明の環状アセチレン化合物は、次式 (III) :

【 0 0 4 8 】

10

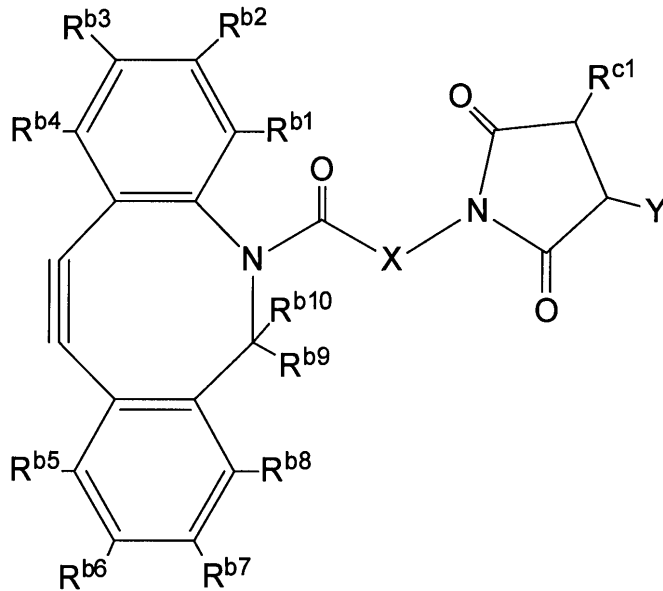
20

30

40

50

【化14】



(III)

10

【0049】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基を示す。)で表わされる。

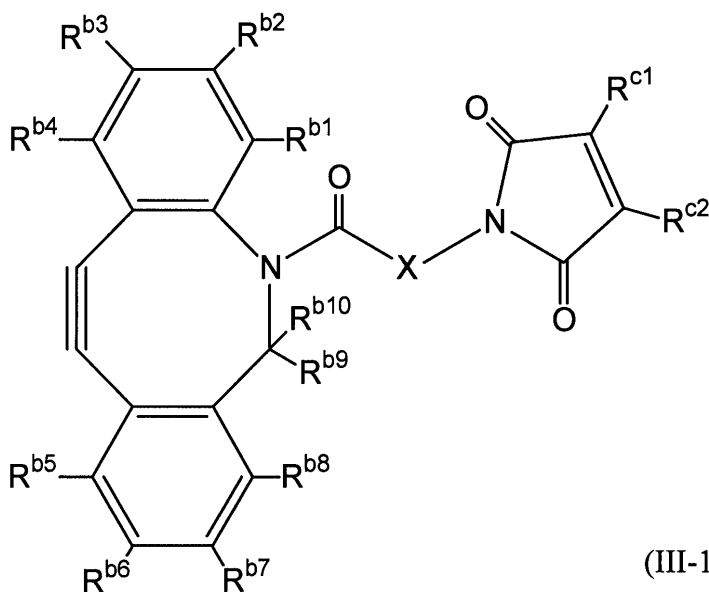
20

【0050】

本発明の環状アセチレン化合物は、次式(III-1)：

【0051】

【化15】



(III-1)

30

40

【0052】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸

50

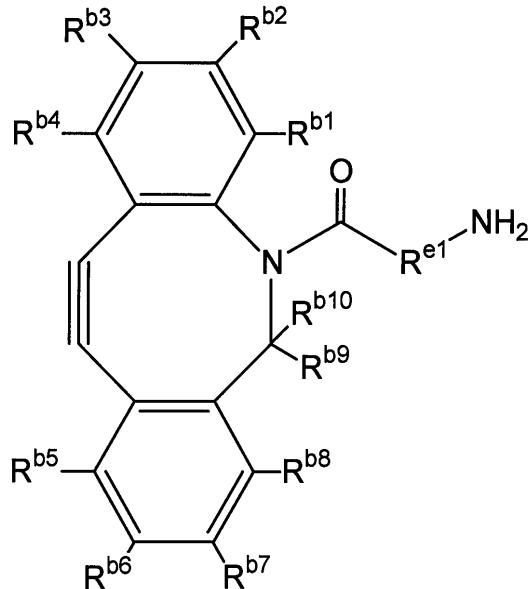
エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)を示す。)で表わされる。

【0053】

本発明の環状アセチレン化合物の製造方法は、前記式(III-1)で表わされる環状アセチレン化合物の製造方法であって、次式(III-1-1)：

【0054】

【化16】

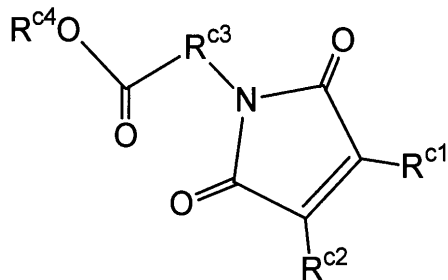


【0055】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{e1}$ は2価の $C_1 \sim C_5$ 炭化水素基を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物と、次式(III-1-2)：

【0056】

【化17】



【0057】

(式中、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c3}$ は $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $-R^{d3}(OCH_2CH_2)_mR^{d4}-$ ( $R^{d3}$ は2価の $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $OCH_2CH_2$ 、 $R^{d4}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa～40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $OR^{c4}$ は前記(III-1)で表される蛍光色素含有PEG化合物のアミノ基との反応により脱離する脱離基を示す。)で表わされるマレイミド化合物とを反応させて、前記式(III-1)で表される蛍光色素含有PEG化合物を合成することを特徴とする。

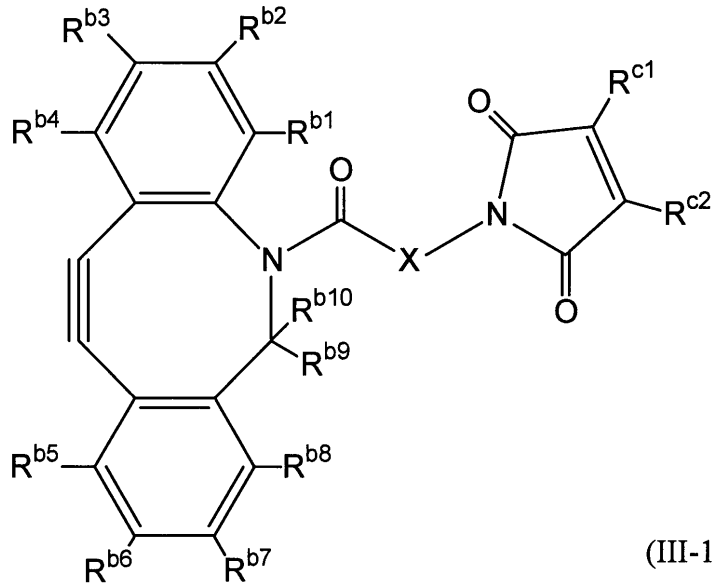
【0058】

本発明の環状アセチレン化合物の製造方法は、前記式(III)で表わされる環状アセチレン化合物の製造方法であって、次式(III-1)：

【0059】



## 【化18】



10

## 【0060】

(式中、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_m R^{d2}$  ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $m$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)を示す。)で表わされる環状アセチレン化合物と、この式(III-1)で表される環状アセチレン化合物のマレイミド基と反応する官能基を有する生物活性物質とを反応させて、前記式(III)で表される環状アセチレン化合物を合成することを特徴とする。

20

## 【0061】

本発明によれば、前記の $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質の体内動態をポジトロン断層法(PET)によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析する方法が提供される。

30

## 【0062】

本発明によれば、前記の蛍光標識されたPEG化生物活性物質の体内動態を蛍光検出法によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析する方法が提供される。

## 【0063】

分子量数千以上の長鎖PEGの $[^{18}F]F$ 標識化は本発明者らの報告(非特許文献2)以外に例は無い。タンパク質は熱や化学薬品などで容易に変成するため、分子量数千以上の長鎖PEGが結合したタンパク質の $[^{18}F]F$ 標識化は更に困難で、前例は全く無い。従って、本発明の新規性は明瞭である。

## 【0064】

医薬品候補としてのPEG化タンパク質やPEG化抗体の開発は世界的に活発に研究されているが、その体内動態を生体で解析した例は全く無い。タンパク質を結合した長鎖PEGと、 $[^{18}F]F$ 標識化長鎖PEGの合成条件が全く異なるために、本発明によれば、予め各ユニットを別々に合成し、その後生理的条件下のHuisgen反応で両者を結合することによって、初めて分子量数千以上の長鎖PEGが結合したタンパク質の $[^{18}F]F$ 標識化が可能になる。本発明によれば、種々の $[^{18}F]F$ -PEG化合物の体内動態がPETによってリアルタイムに可視化/定量化できる。

40

## 【0065】

リンカー $-X$ にPEG(分子量2kDa~40kDa)を用いて式(I-a)や式(I-b)のPEG化生物活性物質を合成すれば、式(II-a)や式(II-b)由来のPEGと併せた分子量4kDa~80kDaの長鎖

50

PEG鎖の中程にHuisgen反応連結部分が収まる。このために、連結部分が分子全体に及ぼす影響を軽減することができる。それによって、実際のPEG化生物活性物質の体内動態と殆ど変わらない結果を得ることができると考えられる。

【0066】

蛍光色素を結合した式(1-b)の化合物の利用は、PETよりも簡便に可視化、定量化できる利点がある。

【0067】

本発明者らの方法では式(II-c)から式(II-a)への反応は20分以内で完了する。式(II-a)と式(III)の連結も20分程度以内に終了できれば、半減期110分の $[^{18}\text{F}]\text{F}$ でも、式(1-a)の放射活性が十分量確保できる。また、リンカー部はPEG部に比べて格段に小さいため、分子全体に及ぼす影響は殆どないことがFeringa, B. et al., Angew.Chem.2011などに記されている。

10

【0068】

PETは極めて高感度であるため、ごく微量のPEG化医薬品候補化合物を使って、ヒトで安全に動態の情報が得られる。本発明は、マイクロドーズ臨床試験を推進する極めて有力な手法を提供できる。これは、創薬研究に画期的な手法を提供し、その波及効果は非常に大きい。本発明は、世界中の製薬企業や創薬研究者が使う基本的なツールとなり得る。

【0069】

疾患に特異的なバイオマーカー(抗体、ペプチド、核酸、低分子化合物など)を長鎖 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ -PEGに結合してPETプローブ化すれば、各種疾患の診断に利用される。 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ -FDG (fluorodeoxyglucose)を用いるPETによる癌診断が普及しているように、非侵襲的な全身スキャン・可視化に有効なPETのインフラ整備は進んでいる。 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ -PEGを活用する診断薬の充実は、近い将来、早期医療を支える1つの柱になるであろう。

20

【0070】

PEG化タンパク質やPEG化抗体は生化学研究の試薬としても汎用されているので、 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ -PEGや蛍光色素を結合したPEGを活用すれば、その用途は更に広がる。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】実施例3において化合物64とAlexa Fluor 750 Carboxylic Acid Succinimidyl Esterとの反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

30

【図2A】実施例4において化合物64とAlexa Fluor 647 Carboxylic Acid Succinimidyl Esterとの反応混合物(粗生成物)をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図2B】実施例4において化合物64とAlexa Fluor 647 Carboxylic Acid Succinimidyl Esterとの反応混合物(粗生成物)をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図3】実施例9において化合物83と化合物56の反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図4A】実施例11において化合物83と化合物56aの反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図4B】実施例11において化合物83と化合物56aの反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

40

【図5】実施例12において化合物84と化合物56の反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図6】実施例13において化合物84をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図7A】実施例13において化合物84と化合物56aの反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図7B】実施例13において化合物84と化合物56aの反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図8A】実施例14において、A549ヒト肺がん細胞移植マウスに対照化合物(86a)を尾静脈に投与後、その体内動態をAlexa647の蛍光によってin vivoイメージングした結果を示す。

50

【図8B】実施例14において、A549ヒト肺がん細胞移植マウスにRGDfC-PEG(85a)を尾静脈に投与後、その体内動態をAlexa647の蛍光によってin vivoイメージングした結果を示す。

【図9】実施例14において、投与3時間後にマウスを解剖し、血液、各臓器、および腫瘍への対照化合物(86a)とRGDfC-PEG(85a)の分布をIVISにてex vivoイメージングした結果を示す。

【図10】実施例15において化合物83と化合物52の反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図11A】実施例16において化合物81と化合物52の反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【図11B】実施例16において化合物81と化合物52の反応混合物をHPLCで分析した結果を示すチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0072】

以下に、本発明について詳細に説明する。

(デオキシフルオロPEG化合物)

本発明のデオキシフルオロPEG化合物は、前記式(II-a')で表される。このデオキシフルオロPEG化合物は、次のようにして合成することができる。

【0073】

最初に、出発原料として前記式(II-c-1)で表わされる化合物 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-NH}_2$ を用いて、ジアゾ転送試薬のスルホニルアジド化合物と反応させて前記式(II-c-2)で表わされる化合物 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-N}_3$ を合成する。

【0074】

出発原料の $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-NH}_2$ は、nが分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内のもので、例えば、分子量に分布はあるがその大部分がこの範囲内である市販のものが使用できる。

【0075】

nは、分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内、好ましくは2kDa~40kDaの範囲内、より好ましくは2kDa~30kDaの範囲内である。

【0076】

$\text{R}^{\text{a}1}$ は、2価の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 炭化水素基を示す。好ましくは2価の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキレン基、より好ましくは2価の $\text{C}_2\sim\text{C}_4$ アルキレン基である。

【0077】

スルホニルアジド化合物 $\text{R-SO}_2\text{N}_3$ は、ジアゾ転送試薬として知られているが、中でも貯蔵安定性が良く、結晶で取り扱い性も良く安全性の高いイミダゾール-1-スルホニルアジド塩酸塩が好ましい。

【0078】

イミダゾール-1-スルホニルアジド塩酸塩を用いた第一級アミンのアジドへの変換は、Ethan D. Goddard-Borger, Robert V. Stick, Org. Lett. 2007, 9, 3797-3800.に記載されている。

【0079】

例えば、 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-NH}_2$ を1当量、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ を2当量、および触媒量の $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ をメタノールに溶解し、室温でイミダゾール-1-スルホニルアジド塩酸塩1.5当量を加えて24時間攪拌して反応させた後、濃塩酸などで酸性とし、有機溶媒で抽出し、有機層を無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥後、溶媒を減圧留去して目的物を得ることができる。

【0080】

次に、この反応によって得られた $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-N}_3$ をスルホニル化試薬と溶媒中で反応させて、上記式(II-c)で表わされる化合物 $\text{R}^{\text{h}1}\text{SO}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^{\text{a}1}\text{-N}_3$ を合成する。

【0081】

ここで $\text{R}^{\text{h}1}$ は、フッ素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよい1価の $\text{C}_1\sim\text{C}_{12}$ 炭化

10

20

30

40

50

水素基、またはヘテロ原子もしくはハロゲン原子を含んでいてもよい $C_1 \sim C_4$ 有機基（例えば、メチル基等）で置換されていてもよいフェニル基を示す。

【0082】

この反応は、好ましくは有機塩基の存在下で行われる。有機塩基としては、例えば、 $Et_3N$ 、 $RNMe_2$ などを用いることができる。ここで $RNMe_2$ のRとしては、炭素数1~6のアルキル基、炭素数7~12のアリールアルキル基などが挙げられる。中でも、メチル基が好ましい。また、 $RNMe_2$ 触媒は、例えばHCl塩などの適当な塩の形態で用いてもよく、特に $Me_3N$ の場合はHCl塩として用いることが好ましい。

【0083】

スルホニル化試薬としては、例えば、p-トルエンスルホニルクロライド ( $TsCl$ )、メタンスルホニルクロリド ( $MsCl$ )、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 ( $Tf_2O$ )、ノナフルオロブタンスルホン酸フルオリド ( $NfF$ )などを用いることができる。

10

【0084】

このスルホニル化反応に用いる溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、トリフルオロトルエン、アセトニトリル、トルエンなどが挙げられる。

【0085】

このスルホニル化反応は、例えば、原料の $HO(CH_2CH_2O)_n-R^{a1}-N_3$ に対してスルホニル化試薬を1~10当量、 $Et_3N$ を1~10当量、 $RNMe_2$ を0.05~1当量の範囲で用いて行うことができる。

【0086】

このスルホニル化反応は、例えば、反応温度 $-20 \sim 60$ 、反応時間1~24時間の範囲で行うことができる。

20

【0087】

反応後の精製は、目的物のPEG化合物はその極性の高さから分液操作や順相カラムクロマトグラフィーによる精製が困難であり、未反応のスルホニル化試薬や副生する $Et_3N \cdot$ スルホン酸を除去することが困難である。これに対して、強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120および強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400を用いると（参考文献：Shuji Akai, Sho Ishida, Kentaro Hatanaka, Takayuki Ishii, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Naoto Oku, Molecular Pharmaceutics, 2011, 8, 302-308.）これらの不純物を効果的に除去することができる。

30

【0088】

次に、得られた $R^{h1}SO_2O(CH_2CH_2O)_n-R^{a1}-N_3$ を、フッ素化試薬と溶媒中で反応させて上記式(II-a')で表されるデオキシフルオロPEG化合物 $F(CH_2CH_2O)_n-R^{a1}-N_3$ を合成する。

【0089】

フッ素化試薬としては、例えば、フッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム ( $nBu_4NF$  : TBAF)、KF-Kryptofix- [2.2.2]、CsFなどが挙げられる。

【0090】

ここで、フッ素化試薬として、 $[^{18}F]$ 標識フッ素化試薬を用いると、式(II-a')で表される化合物を $^{18}F$ で標識することができる。 $^{19}F$ が $^{18}F$ に変わっても反応性への影響はほとんどない。ただし、 $[^{18}F]$ 標識フッ素化試薬を用いた反応は、放射線の影響を避けるために自動合成装置で行われる（非特許文献2）。

40

【0091】

$^{18}F$ は半減期が110分と短いため、 $[^{18}F]F$ 標識化反応は短時間で進行させる必要がある。そのため $[^{18}F]$ 標識フッ素化試薬と溶媒の選択が重要になる。

【0092】

溶媒としては、例えば、アセトニトリル ( $MeCN$ )、ジメチルホルムアミド ( $DMF$ )、ジメチルスルホキシド ( $DMSO$ )などが挙げられる。また、t-ブタノール ( $t-BuOH$ )はCsFや $nBu_4NF$ を用いるフッ素化において反応性や選択性を向上させる溶媒として知られている（Kim, D. W.; Jeong, H. J.; Lim, S. T.; Sohn, M. H.; Katzenellenbogen, J. A.; Chi, D. Y. Facile Nucleophilic Fluorination Reactions Using tert-Alcohols as a Reacti

50

on Medium: Significantly Enhanced Reactivity of Alkali Metal Fluorides and Improved Selectivity. J. Org. Chem. 2008, 73, 957-962.)。

## 【0093】

$[^{18}\text{F}]$ 標識フッ素化試薬と溶媒の組み合わせとしては、例えば、 $[^{18}\text{F}]\text{nBu}_4\text{NF}/\text{DMF}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{KF-Kryptofix- [2.2.2]}/\text{MeCN}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{nBu}_4\text{NF}/\text{MeCN}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{KF-Kryptofix- [2.2.2]}/\text{t-BuOH}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{nBu}_4\text{NF}/\text{t-BuOH}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{CsF}/\text{t-BuOH}$ などが挙げられるが、 $[^{18}\text{F}]\text{F}$ の半減期が110分と短いため、放射活性が十分量確保できるように迅速に標識化すること、例えば20分間で反応を終了することを考慮すると、 $[^{18}\text{F}]\text{nBu}_4\text{NF}/\text{DMF}$ が効果的である。

## 【0094】

この標識化反応は、例えば、アルゴンなどの不活性ガス雰囲気下、 $\text{R}^{\text{h}}\text{SO}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-X-N}_3$ に対して $[^{18}\text{F}]$ 標識フッ素化試薬を用いて、50~150で行うことができる。

10

## 【0095】

反応後の精製は、強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120および強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400を用いて行うことができる。

(蛍光色素含有PEG化合物)

前記式(II-b)で表わされる蛍光色素含有PEG化合物は、前記式(II-b-1)で表される化合物と、この式(II-b-1)で表される化合物のアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素とを反応させることで合成することができる。

## 【0096】

式(II-b)において、Zは蛍光色素を含む1価の基である。蛍光色素としては、特に限定されないが、例えば、フルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(Integrated DNA Technologies社製)、ポリハロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)、ヘキサクロロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)、クマリン・ファミリーの蛍光色素(インビトロジェン(株)製)、ローダミン・ファミリーの蛍光色素(GEヘルスケア バイオサイエンス(株)製)、シアニン・ファミリーの蛍光色素、インドカルボシアニン・ファミリーの蛍光色素、オキサジン・ファミリーの蛍光色素、チアジン・ファミリーの蛍光色素、スクアライン・ファミリーの蛍光色素、キレート化ランタニド・ファミリーの蛍光色素、BODIPY(登録商標)・ファミリーの蛍光色素(インビトロジェン(株)製)、ナフタレンスルホン酸・ファミリーの蛍光色素、ピレン・ファミリーの蛍光色素、トリフェニルメタン・ファミ

20

30

リ-の蛍光色素、Alexa Fluor(登録商標)色素シリーズ(インビトロジェン(株)製)などが挙げられる。これらファミリーに含まれる代表的な蛍光色素の吸収波長(nm)および発光波長は、例えば、450~850nmの範囲内である。

## 【0097】

$\text{R}^{\text{a}1}$ は、2価の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 炭化水素基を示す。好ましくは2価の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキレン基、より好ましくは2価の $\text{C}_2\sim\text{C}_4$ アルキレン基である。

## 【0098】

nは、分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内、好ましくは2kDa~40kDaの範囲内、より好ましくは2kDa~30kDaの範囲内である。

## 【0099】

前記式(II-b-1)で表される化合物のアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素としては、例えば、アミノ基と反応する官能基として $-\text{COOR}^{\text{f}1}$ ( $\text{OR}^{\text{f}1}$ は優れた脱離能を有する基を示し、例えば、 $\text{HOR}^{\text{f}1}$ としてN-ヒドロキシスクシミドが挙げられる)を有する蛍光色素等が挙げられる。

40

## 【0100】

前記式(II-b)で表わされる蛍光色素含有PEG化合物は、例えば、前記式(II-b-1)で表される化合物と、この式(II-b-1)で表される化合物のアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素とを $\text{DMF}/\text{NaHCO}_3$  aq等の溶媒中、室温付近で反応させることで合成することができる。

(環状アセチレン化合物)

50

前記式(III)で表わされる環状アセチレン化合物は、前記式(III-1-1)で表わされる環状アセチレン化合物と、前記式(III-1-2)で表わされるマレイミド化合物とを反応させて合成することができる。

【0101】

式(III)で表わされる環状アセチレン化合物において、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子、 $R^{c1}$ は水素原子またはフッ素原子を示す。

【0102】

Xは2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$ ( $R^{d1}$ はアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基(ここで $C_1 \sim C_{12}$ にはアミド基またはカルバミン酸エステル基の炭素原子を含まない。)、 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基(ここで $C_1 \sim C_6$ にはアミド基の炭素原子を含まない。)、mは分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)を示す。

10

【0103】

Xの2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基は、好ましくは2価の $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン基、より好ましくは2価の $C_1 \sim C_6$ アルキレン基である。

【0104】

Xの $R^{d1}$ がアミド基またはカルバミン酸エステル基を含まない2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基の場合、好ましくは2価の $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン基、より好ましくは2価の $C_1 \sim C_6$ アルキレン基である。Xの $R^{d1}$ がアミド基または $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成されてもよいカルバミン酸エステル基を有する2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基の場合、例えば、 $-R^{g1}NHCOR^{g2}-$ ( $R^{g1}$ 、 $R^{g2}$ はそれぞれ独立に $C_1 \sim C_5$ アルキレン基を示す。)、 $-R^{g1}NHCOOR^{g2}-$ ( $R^{g1}$ 、 $R^{g2}$ はそれぞれ独立に $C_1 \sim C_5$ アルキレン基を示す。)、 $-R^{g1}NHCOO-$ ( $R^{g1}$ は $C_1 \sim C_5$ アルキレン基を示し、 $NHCOO-$ は $(OCH_2CH_2)_m$ の酸素原子と共に構成される。)等が挙げられる。 $R^{d2}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基であり、好ましくは $C_1 \sim C_4$ アルキル基または $-R^{g3}NHCOR^{g4}-$ ( $R^{g3}$ 、 $R^{g4}$ はそれぞれ独立に $C_1 \sim C_5$ アルキレン基を示す。)である。mは、分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内、好ましくは2kDa~40kDaの範囲内、より好ましくは2kDa~30kDaの範囲内である。

20

【0105】

またYは生物活性物質を含む1価の基を示す。生物活性物質は、生物に対して生理作用ないしは薬理作用を発現する物質単体および化合物群であり、自然界から適切な方法で得られるものであっても、遺伝子工学的手法その他の人工的手法で製造される天然と同一の物質であってもよく、さらに、これらの改変型であってもよい。具体的には、例えば、ペプチド、核酸関連物質、低分子化合物、抗原、抗体、受容体、接着分子、サイトカイン、ホルモン、多糖、オリゴ糖、オリゴペプチド、酵素、抗生物質、酵素阻害剤、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニストなどが挙げられる。

30

【0106】

前記式(III)で表わされる環状アセチレン化合物は、前記式(III-1)で表わされる環状アセチレン化合物と、この式(III-1)で表される環状アセチレン化合物のマレイミド基と反応する官能基を有する生物活性物質とをDMF/ $NaHCO_3$  aq等の溶媒中、室温付近で反応させることで合成することができる。

40

【0107】

この生物活性物質における式(III-1)で表される環状アセチレン化合物のマレイミド基と反応する官能基としては、例えば、チオール基等が挙げられる。

【0108】

前記式(III-1)で表わされる環状アセチレン化合物は、前記式(III-1-1)で表わされる環状アセチレン化合物と、前記式(III-1-2)で表わされるマレイミド化合物とを、ジクロロメタンやTHF/aq等の溶媒中で、必要に応じて $NaHCO_3$ や $Et_3N$ 等の塩基を添加して反応させることで合成することができる。

【0109】

50

式(III-1-1)において、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示す。 $R^{e1}$ は2価の $C_1 \sim C_5$ 炭化水素基、好ましくは $C_1 \sim C_5$ アルキレン基である。

【0110】

式(III-1-2)において、 $R^{c1}$ 、 $R^{c2}$ はそれぞれ独立に水素原子またはフッ素原子を示す。 $R^{c3}$ は $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $-R^{d3}(OCH_2CH_2)_mR^{d4}$  ( $R^{d3}$ は2価の $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基または $OCH_2CH_2$ 、 $R^{d4}$ はアミド基を有していてもよい2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基(ここで $C_1 \sim C_6$ にはアミド基の炭素原子を含まない。))、 $m$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $OR^{c4}$ は前記(II-b-1)で表される蛍光色素含有PEG化合物のアミノ基との反応により脱離する脱離基 $OR^{f1}$ と同様の基を示す。

【0111】

$R^{c3}$ の $C_1 \sim C_8$ 炭化水素基は、好ましくは2価の $C_1 \sim C_8$ アルキレン基、より好ましくは2価の $C_1 \sim C_6$ アルキレン基である。

【0112】

$R^{c3}$ の $-R^{d3}(OCH_2CH_2)_mR^{d4}$ -において、 $R^{d3}$ は2価の $C_1 \sim C_8$ アルキレン基、より好ましくは2価の $C_1 \sim C_6$ アルキレン基である。 $R^{d4}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基であり、好ましくは $C_1 \sim C_4$ アルキル基である。 $m$ は、分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内、好ましくは2kDa~40kDaの範囲内、より好ましくは2kDa~30kDaの範囲内である。

( $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質)

前記式(I-a)で表わされる、 $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質は、前記式(II-a)で表わされる $[^{18}F]$ フルオロPEG化合物と、前記式(III)で表わされる環状アセチレン化合物とを、生理的条件下(水溶液中、室温、かつ銅触媒の不存在下)に反応させることで合成することができる。

【0113】

本発明の $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質には、式(I-a)のリンカー-XにPEG(分子量2kDa~40kDa)を用いたものが含まれる。このような化合物の合成が実施可能であることは、後述の実施例の結果と、既に当業者に知られている技術常識より明らかであることが理解されるであろう。そしてこのような式(II-a)由来のPEGとリンカー-X由来のPEGとを有する長鎖PEG化合物の合成は、前述したように、予めタンパク質を結合した長鎖PEGと、 $[^{18}F]F$ 標識化長鎖PEGの合成条件が全く異なるために、各ユニットを別々に合成し、その後生理的条件下のHuisgen反応で両者を結合することによって、初めて分子量数千以上の長鎖PEGが結合したタンパク質の $[^{18}F]F$ 標識化が可能ではないかと着想し、後述の実施例で実施可能な程度に裏付けられたことによる。このような長鎖PEG化合物によれば、式(II-a)由来のPEGと併せた分子量4kDa~80kDaの長鎖PEG鎖の中程にHuisgen反応連結部分が収まるために、連結部分が分子全体に及ぼす影響を軽減することができる。

【0114】

この $[^{18}F]F$ で標識されたPEG化生物活性物質を用いることで、その体内動態をポジロン断層法(PET)によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析することが可能となる。

【0115】

なお、このアジドとアルキンのHuisgen環化付加反応は、アジドおよびアルキンが高い化学的安定性を有し、かつほぼ無極性で水素結合を形成しにくい性質のため生体分子の構造特性を大きく変化させることはないという特徴がある。しかし無触媒では反応速度が非常に遅く、通常は長時間の加熱が必要であった。2002年にMeldalおよびSharplessらによって銅触媒を用いる手法が報告され、銅触媒がアルキンを活性化することで迅速かつ穏和な条件での反応が可能になった。

【0116】

しかし、本発明では高反応性の式(III)で表わされる環状アセチレン化合物を用いることで、銅触媒を用いずとも、銅触媒を用いる手法と同程度の速度で反応が進行する。銅イオンは細胞毒性を有しているため、これが不要になることは大きな利点であり、上記のPETによる体内動態解析や、下記の蛍光色素による体内動態解析などの応用にも適してい

10

20

30

40

50

る。

( 蛍光標識されたPEG化生物活性物質 )

前記式 ( I-b ) で表わされる、蛍光標識されたPEG化生物活性物質は、前記式 ( II-b ) で表わされる蛍光色素含有PEG化合物と、前記式 ( III ) で表わされる環状アセチレン化合物とを、生理的条件下 ( 水溶液中、室温、かつ銅触媒の不存在下 ) に反応させることで合成することができる。

【 0 1 1 7 】

この蛍光標識されたPEG化生物活性物質を用いることで、その体内動態を種々の蛍光検出法によってリアルタイムに非侵襲的かつ定量的に解析することが可能となる。

【 実施例 】

【 0 1 1 8 】

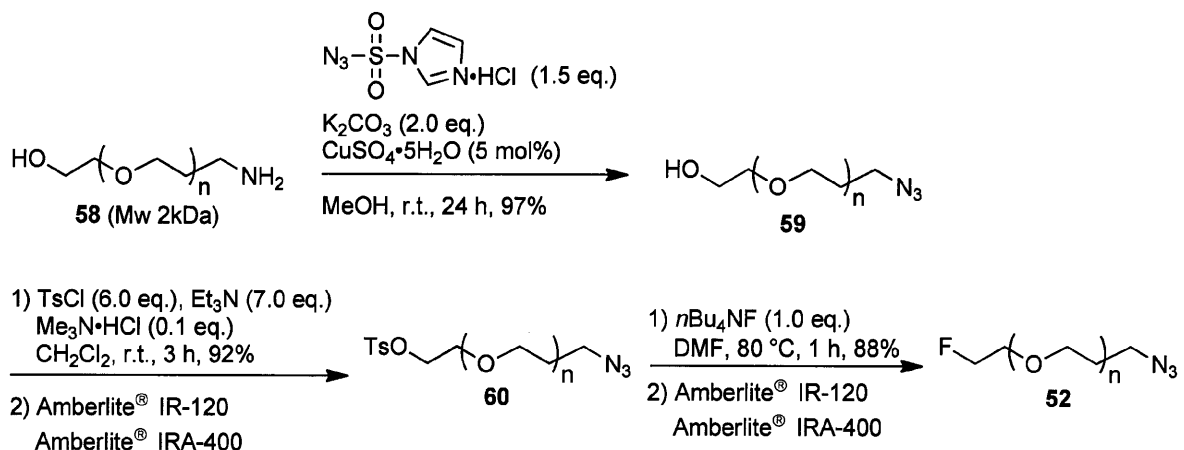
以下に、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

< 実施例 1 ~ 3 > アジド基を有する官能基化された新規PEGの合成

市販されている末端にアミノ基を有するPEG (2kDa, 58) を出発原料とし、Goddard-Borge rらの手法を用いて末端アミノ基をアジド化し59を得た。続いて末端水酸基をトシル化し60を得た。なお、本発明者らが開発した陽イオン及び陰イオン交換樹脂を用いるPEGの精製法を応用することで極性の高いPEG誘導体60でも効率よく単離することができた。最後に  $n\text{Bu}_4\text{NF}$  を用いてフッ素化することで目的とするPEG 52を3工程79%の収率で得た。精製は同様にイオン交換樹脂を用いた。

【 0 1 1 9 】

【 化 1 9 】



30

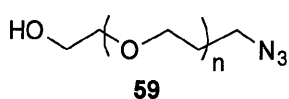
【 0 1 2 0 】

< 実施例 1 >

化合物59の合成

【 0 1 2 1 】

【 化 2 0 】



40

【 0 1 2 2 】

$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$  (58, 平均分子量: 2 kDa, 0.40 g, 0.20 mmol)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  (55 mg 0.40 mmol)、 $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.5 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) を  $\text{MeOH}$  (2.0 ml) に溶かし、室温で *Imidazole-1-sulfonyl azide*  $\cdot \text{HCl}$  (63 mg, 0.30 mmol) を加え24時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣に1N  $\text{HCl}$  (5 ml) を加え  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) で3回抽出した。有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧留去し、59 (0.38 g, 97%) を得た。

50



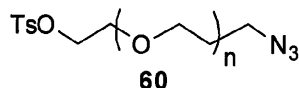
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.85 (2 H, quint,  $J = 6.5$  Hz), 3.39 (2 H, t,  $J = 6.5$  Hz), 3.48-3.79 (ca.200 H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 29.0, 48.4, 61.4, 67.8, 70.1, 70.3, 70.4, 70.5, 72.8. IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 2099  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{89}\text{H}_{179}\text{N}_3\text{O}_{44}\text{K}$  [ $\text{M}$  ( $n=43$ ) +  $\text{K}$ ] $^+$ : 2033.1499, found: 2033.2044.

化合物60の合成

【 0 1 2 3 】

【 化 2 1 】



10

【 0 1 2 4 】

59 (0.19 g, 95  $\mu\text{mol}$ )、TsCl (0.11 g, 0.57 mmol)、 $\text{Me}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$  (1.0 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 ml) に溶かし、室温で $\text{Et}_3\text{N}$  (0.10 ml, 0.67 mmol) を加え3時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、 $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN (1:1, 20 ml) に溶かした。活性化した強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120 (3.0 g) および活性化した強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400 (3.0 g) を加え約20分間激しく攪拌し、濾過した。濾液を減圧濃縮し、60 (0.19 g 92%) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.84 (2 H, quint,  $J = 6.5$  Hz), 2.44 (3 H, s), 3.38 (2 H, t,  $J = 6.5$  Hz), 3.48-3.78 (ca.200 H, m), 4.14 (2 H, t,  $J = 5.0$  Hz), 7.33 (2 H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.78 (2 H, d,  $J = 8.0$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 21.6, 29.1, 48.4, 67.8, 68.6, 69.2, 70.3, 70.5, 70.7, 127.9, 129.8, 132.9, 144.7. IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 2099  $\text{cm}^{-1}$ .

20

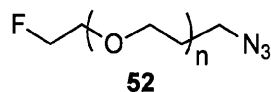
MS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{94}\text{H}_{181}\text{N}_3\text{O}_{45}\text{SK}$  [ $\text{M}$  ( $n=42$ ) +  $\text{K}$ ] $^+$ : 2143.1325, found: 2143.3302.

< 実施例 2 >

化合物52の合成

【 0 1 2 5 】

【 化 2 2 】



30

【 0 1 2 6 】

アルゴン雰囲気下、60 (40 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) を無水DMF (0.5 ml) に溶かし、 $\text{nBu}_4\text{NF}$  (1.0 M THF solution, 30  $\mu\text{l}$ , 0.30  $\mu\text{mol}$ ) を加え、80  $^\circ\text{C}$  で20分間攪拌した。 $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN (1:1, 20 ml) に溶かした後、活性化した強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120 (2.0 g) および活性化した強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400 (2.0 g) を加え約20分間激しく攪拌し、濾過した。濾液を減圧濃縮し、52 (35 mg 88%) を得た。

40

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.84 (2 H, quint,  $J = 6.5$  Hz), 3.38 (2 H, d,  $J = 6.5$  Hz), 3.47-3.78 (ca.200 H, m), 4.55 (2 H, td,  $J = 4.5, 52.0$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 29.1, 48.4, 67.8, 70.3, 70.5, 70.7, 83.1 (d,  $J = 168$  Hz).  $^{19}\text{F}$  NMR (470 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : -223 (tt,  $J = 29, 47$  Hz)

IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 2099  $\text{cm}^{-1}$

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{89}\text{H}_{178}\text{N}_3\text{O}_{43}\text{FK}$  [ $\text{M}$  ( $n=43$ ) +  $\text{K}$ ] $^+$ : 2035.1455, found: 2035.2070.

< 実施例 3 >

化合物64の合成

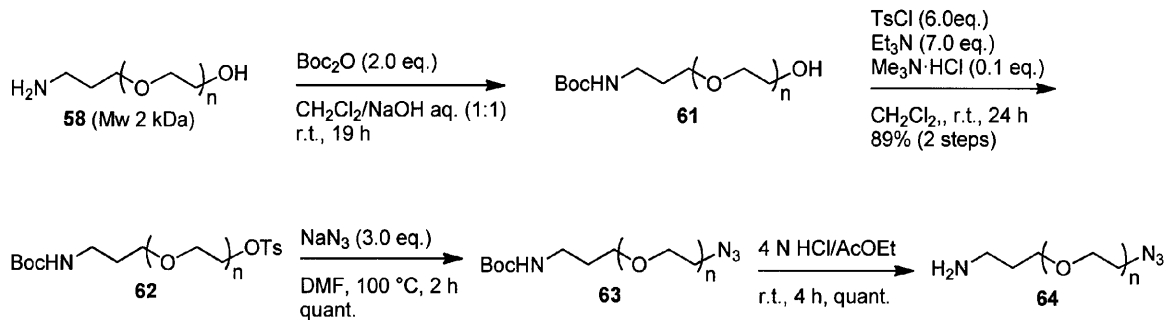
市販されている58のアミノ基を保護し、水酸基をトシル化することで62を2工程89%の収

50

率で得た。続いて求核的にアジドを導入し、アミノ基を脱保護することで目的のPEG 64を定量的に得た。なお、各工程における精製はイオン交換樹脂や低極性溶媒による洗浄を行うことで精製困難なPEGを効率よく単離した。

【 0 1 2 7 】

【化 2 3】



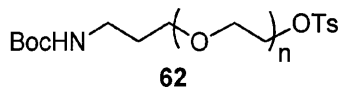
10

【 0 1 2 8 】

化合物62の合成

【 0 1 2 9 】

【化 2 4】



20

【 0 1 3 0 】

HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (58, 平均分子量: 2kDa, 0.10 g, 50 μmol)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-1M NaOH水 (1:1, 1.0 ml)に溶かし、室温でBoc<sub>2</sub>O(23 μl, 0.10 mmol)を加え19時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1.0 ml)に溶かし、TsCl (57 mg, 0.30 mmol)、Me<sub>3</sub>N·HCl (1.0 mg, 10 μmol)、Et<sub>3</sub>N (49 μl, 0.35 mmol)を加え室温で24時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、H<sub>2</sub>O-MeCN (1:1, 20 ml)に溶かした後、活性化した強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120(2.0 g)および活性化した強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400 (2.0 g)を加え約20分間激しく攪拌し、濾過した。濾液を減圧濃縮し、62 (0.10 g, 89%)を得た。

30

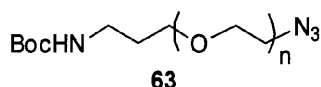
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (9 H, s), 1.72 (2 H, quint, J = 6 Hz), 2.42 (3 H, s), 3.18 (2 H, dd, J = 12, 6 Hz), 3.47-3.78 (ca.200 H, m), 4.12 (2 H, t, J = 5 Hz), 7.32 (2 H, d, J = 8 Hz), 7.76 (2 H, d, J = 8 Hz).

HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for C<sub>101</sub>H<sub>195</sub>NO<sub>48</sub>SK [M (n=43) + K]<sup>+</sup>: 2261.2206, found: 2261.2132.

化合物63の合成

【 0 1 3 1 】

【化 2 5】



40

【 0 1 3 2 】

62(0.10 g, 44 μmol)をDMF(0.5 ml)に溶かし、室温でNaN<sub>3</sub>(8.6 mg, 0.13 mmol)を加え100 °Cで2時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、H<sub>2</sub>O-MeCN (1:1, 20 ml)に溶かした後、活性化した強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120(2.0 g)および活性化した強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA-400 (2.0 g)を加え約20分間激しく攪拌し、濾過した。濾液を減圧濃縮し、63 (0.10 g, quant.)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.41 (9 H, s), 1.73 (2 H, quint, J = 6 Hz), 3.19 (2 H, dd, J = 13, 6 Hz), 3.37 (2 H, t, J = 5 Hz), 3.47-3.78 (ca.200 H, m)

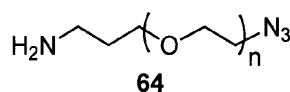
50

HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $C_{94}H_{188}N_4O_{45}K [M (n=43) + K]^+$ : 2132.2183, found: 2132.2180.

化合物64の合成

【 0 1 3 3 】

【化 2 6 】



【 0 1 3 4 】

63(0.10 g, 44  $\mu$ mol)を4N HCl/EtOAc(1.0 ml)に溶かし、室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をhexaneで洗浄し、64(94mg, quant.)を得た。

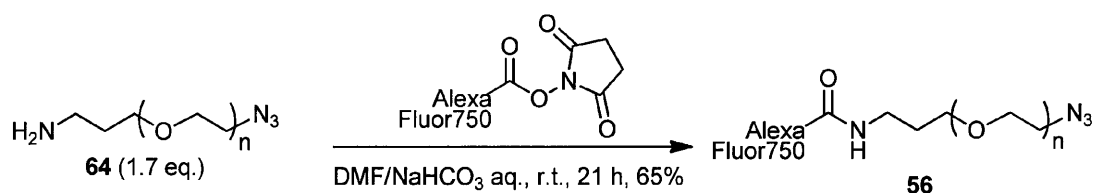
$^1H$  NMR (500 MHz,  $D_2O/CDCl_3$ ): 2.00-2.10 (2 H, m), 3.19 (2 H, t,  $J = 5$  Hz), 3.39 (2 H, t,  $J = 5$  Hz) 3.47-3.78 (ca.200 H, m).

HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $C_{89}H_{180}N_4O_{43}K [M (n=43) + K]^+$ : 2032.1658, found: 2032.1563.

続いて64と775nmに最大蛍光発光を持つAlexa Fluor 750を結合した。

【 0 1 3 5 】

【化 2 7 】



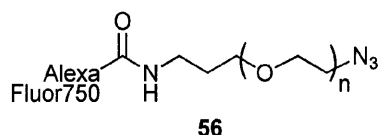
MS (ESI):  $m/z$ : calcd: 1000.4973  $[M+3NH_4]^{3+}$ ;  
found: 1000.5096  
calcd: 994.8299  $[M+H+2NH_4]^{3+}$ ;  
found: 994.8341

【 0 1 3 6 】

化合物56の合成

【 0 1 3 7 】

【化 2 8 】



【 0 1 3 8 】

64(0.30 mg, 1.5  $\mu$ mol)とAlexa Fluor 750 Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester (90  $\mu$ g)をDMF (50  $\mu$ l)、NaHCO<sub>3</sub>水(0.15M, 50  $\mu$ l)に溶かし、室温で21時間攪拌した。逆相HPLC(MeCN-H<sub>2</sub>O, 7:3)で精製し、56 (65%)を得た。反応液はHPLCで分析し、700nmで検出した(図1)。通常この領域に吸収をもつ化合物はない。そのため、吸収ピークは全てAlexa Fluor由来のものであると考えられ、目的とする反応が進行したことが示唆された。また、ピーク面積を基に収率を算出した。なお、これ以降反応剤の量が極めて少ない場合はHPLCによる反応追跡を行った。

< 実施例 4 >

64と647nmに最大蛍光発光を持つAlexa Fluor 647を結合し、56aを合成した。

【 0 1 3 9 】

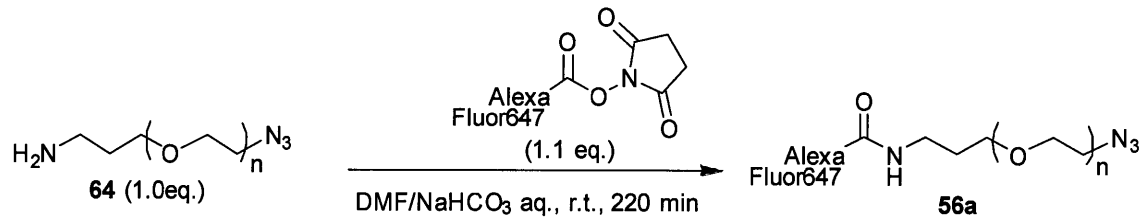
10

20

30

40

## 【化29】



## 【0140】

64 (0.17  $\mu\text{mol}$ )を $\text{NaHCO}_3$ aq. (0.1 M, 100  $\mu\text{l}$ )に溶かしAlexa Fluor 647 Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester (0.18  $\mu\text{mol}$ )のDMF溶液(100  $\mu\text{l}$ )を加えた。室温で220分間攪拌した。反応粗生成物をHPLC (5C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6 × 250 mm, MeCN:H<sub>2</sub>O = 5 : 95 (0 min) 5 : 95 (5 min) 50 : 50 (15 min) 50 : 50 (25 min) 95 : 5 (30 min) 100 : 0 (35 min), 流速1.0 mL min<sup>-1</sup>, 検出: UV 650 nm及びコロナ荷電化粒子検出器)で分析した(図2A, B)。粗生成物(HPLC 1)および、Alexa 647 Carboxylic Acid, Succinimidyl Esterと粗生成物との混合物(HPLC 2)の比較により、保持時間21 minに現れた新しいピーク(目的化合物56a)を含む粗生成物を次の反応に用いた。

10

## &lt;実施例5、6&gt; 高反応性シクロオクチンの合成

側鎖末端にマレイミド基を有する高反応性シクロオクチンを合成した。

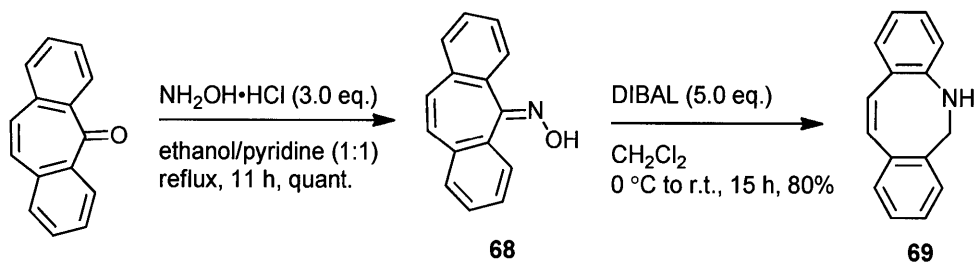
## &lt;実施例5&gt;

20

側鎖末端にマレイミド基を有する高反応性シクロオクチン(72, 79)を合成した。まず、dibenzosuberoneに塩酸ヒドロキシルアミンを反応させオキシム68を定量的に得た。続いて徳山らのDIBALを過剰に用いるBeckman転位及びアミドの還元反応(Cho, H.; Iwama, Y.; Sugimoto, K.; Mori, S.; Tokuyama, H.J. Org. Chem. 2010, 75, 627-636.)を68に適用し、8員環アミン69を80%の収率で得た。

## 【0141】

## 【化30】



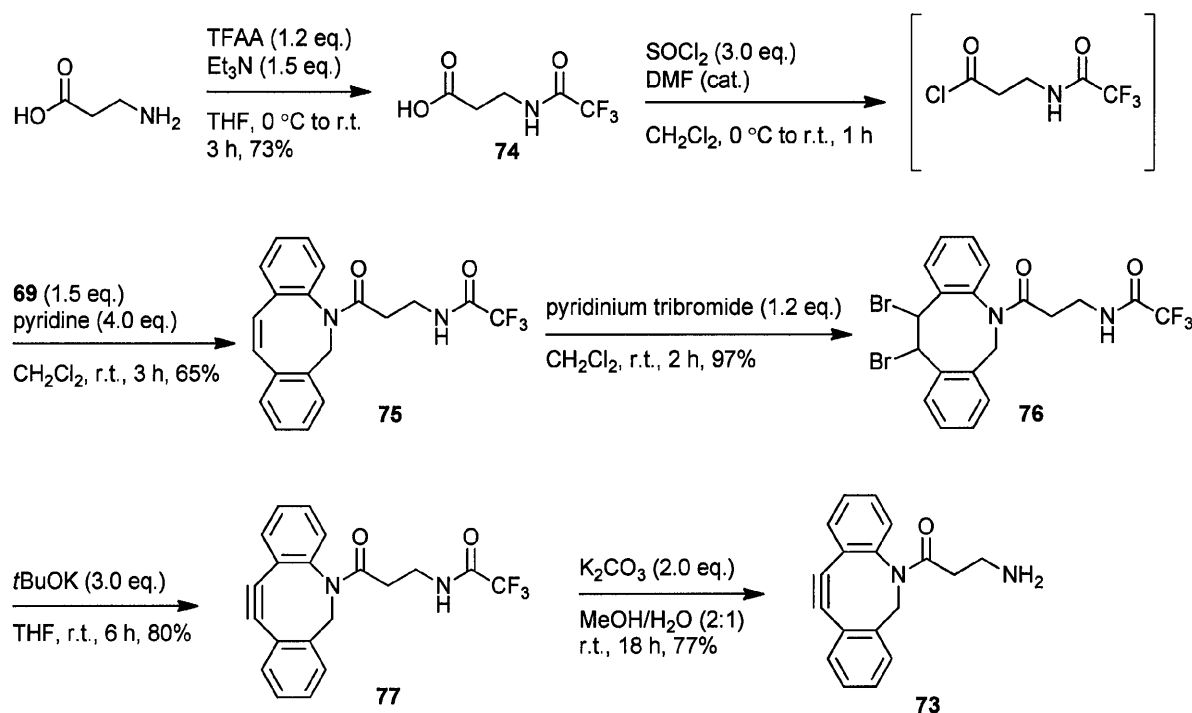
30

## 【0142】

-アラニンならびに化合物69を原料にして73を合成した。

## 【0143】

## 【化 3 1】



10

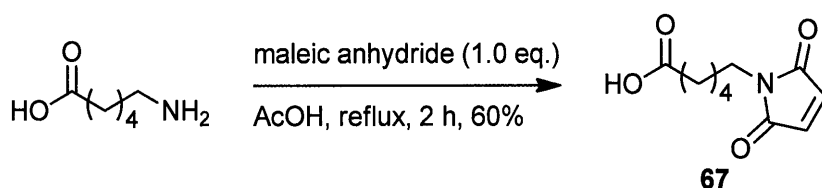
20

## 【 0 1 4 4 】

次に、マレイミドユニット67を文献(Figueiredo, R. M.; Oczipka, P.; Frohlich, R.; Christmann, M. *Synthesis*2008, 8, 1316-1318.)に従い合成した。

## 【 0 1 4 5 】

## 【化 3 2】



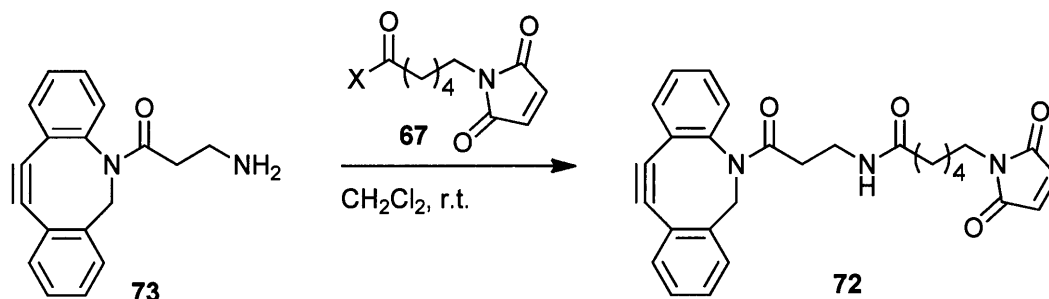
30

## 【 0 1 4 6 】

次に、マレイミドユニット67 (X = OH)と化合物73の縮合反応を検討した。その結果、縮合剤EDCを用いた場合、72が生じたが収率は最高でも20%であったが(Entries 1-3)、67を酸クロリドへと変換した後反応させると高反応性シクロオクチン72を40%の収率で得ることができた(Entry 4)。

## 【 0 1 4 7 】

## 【化33】



conditions	isolated yield of 72 (%)
X = OH (2.0 eq.), EDC (2.0 eq.)	6
X = OH (2.0 eq.), EDC (2.0 eq.), HOBT (2.0 eq.), Et <sub>3</sub> N (2.0 eq.)	20
X = OH (2.0 eq.), EDC (2.0 eq.), DMAP (0.1 eq.), Et <sub>3</sub> N (2.0 eq.)	complex mixture
X = Cl (3.0 eq.), pyridine (4.0 eq.)	40

10

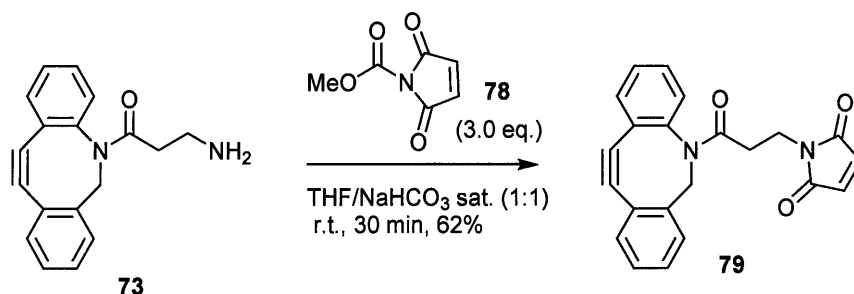
## 【0148】

また、73と78から、別の高反応性シクロオクチン79を合成した。

20

## 【0149】

## 【化34】



30

## 【0150】

## 化合物79の合成

73(212 mg, 0.623 mmol)、78(290 mg, 1.87 mmol)をTHF(5.5 ml)及びNaHCO<sub>3</sub>水(5.5 ml)の混合液に溶かし、室温で30分間撹拌した。NH<sub>4</sub>Cl sat.を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(hexane-EtOAc, 1:1)で精製し79(139 mg, 62%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.18-2.31 (1 H, m), 2.46-2.55 (1 H, m), 3.64 (1 H, d, J = 14 Hz), 3.54-3.63 (1 H, m), 3.68-3.80 (1 H, m), 5.14 (1 H, d, J = 14 Hz), 6.53 (1H, s), 7.22-7.41 (7 H, m), 7.69 (1 H, d, J = 7 Hz).

HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 379.1053, found: 379.1052.

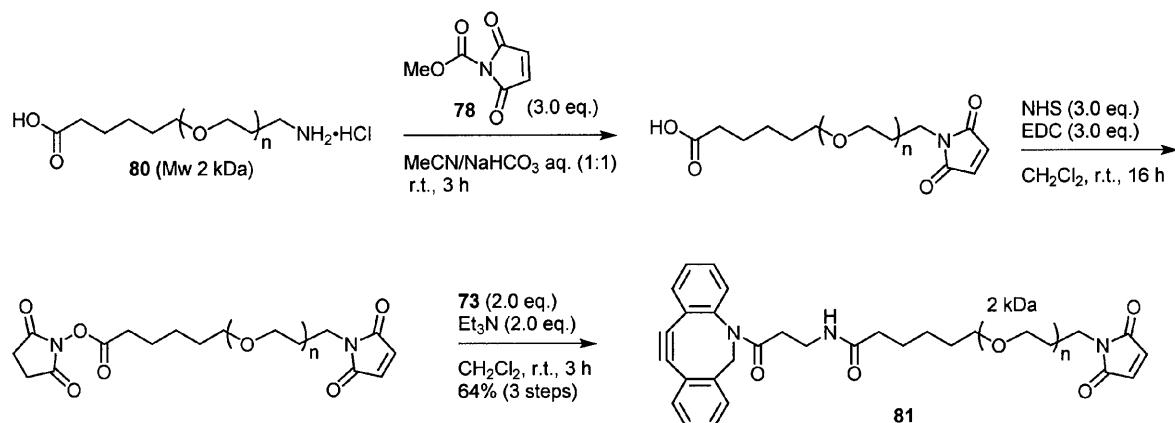
## &lt; 実施例 6 &gt;

PEG (Mw 2kDa)を導入したシクロオクチン81を合成した。すなわち、末端にカルボキシル基とアミノ基を有する市販のPEG 80を出発原料とし、先ほどと同様にしてマレイミド基を導入した。続いてカルボキシル基をNHSで活性エステルとし、アミン73と反応させ81を3工程64%の収率で得た。

## 【0151】

40

## 【化35】



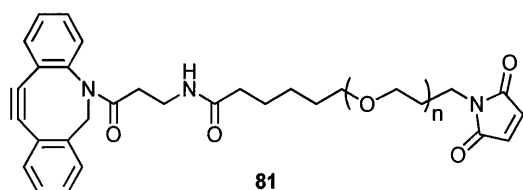
10

## 【0152】

化合物81の合成

## 【0153】

## 【化36】



20

## 【0154】

80(0.10 g, 46  $\mu\text{mol}$ )、78(22 mg, 0.14 mmol)をMeCN(0.5 ml)及びNaHCO<sub>3</sub> 水(0.5 ml)に溶かし、室温で3時間攪拌した。1M HCl 水を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で3回抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1.0 ml)に溶かし、NHS(16 mg, 0.14 mmol)、EDC(27 mg, 0.14 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。H<sub>2</sub>Oを加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で3回抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1.0 ml)に溶かし、73(25 mg, 92  $\mu\text{mol}$ )、Et<sub>3</sub>N (13  $\mu\text{l}$ , 92  $\mu\text{mol}$ )を加え3時間攪拌した。1M HCl 水を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で3回抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, 10:1)で精製した。その後、逆相HPLC (MeCN-H<sub>2</sub>O, 7:3)で精製し、81(72mg, 64%)を得た。

30

<実施例7~11> PEG化ペプチドの体内動態を可視化する分子の合成

<実施例7>

化合物82の合成

最初に、前記において合成したアジドPEG 52とアルキン79を用いてHuisgen反応を検討した。

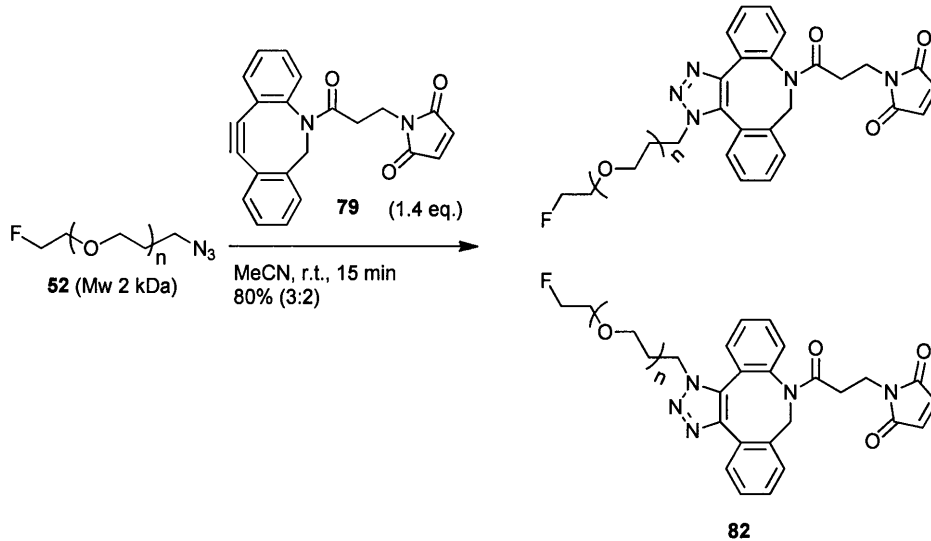
## 【0155】

79(4.9 mg, 14  $\mu\text{mol}$ )をMeCN(0.3 ml)に溶かし、室温で52(20 mg, 10  $\mu\text{mol}$ )を加え室温で15分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を逆相HPLC(MeCN-H<sub>2</sub>O, 95:5)で精製し、82(20mg, 80%, 2種の位置異性体3:2の混合物)を得た。2種の位置異性体のどちらが主生成物であるかは決定していない。

40

## 【0156】

## 【化37】



10

## 【0157】

## &lt; 実施例 8 &gt;

## 化合物83の合成

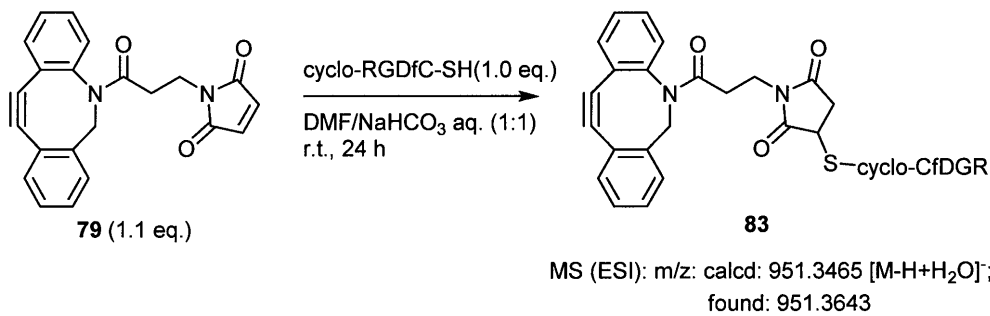
79 (0.2 mg, 0.56  $\mu\text{mol}$ )、cyclo-RGDfC-SH (0.50  $\mu\text{mol}$ )をDMF(70  $\mu\text{l}$ )とNaHCO<sub>3</sub>水(0.10 M, 70  $\mu\text{l}$ )の混合液に溶かし、室温で24時間攪拌した。HPLC (5C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6  $\times$  250 mm, MeCN : H<sub>2</sub>O = 1 : 1, 流速1.0 mLmin<sup>-1</sup>, 検出: UV 254 nm)にて分析し、79ならびにcyclo-RGDfC-SHとは異なる新しいピーク(保持時間3.3分)を分取して化合物83を得た。

20

HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for C<sub>46</sub>H<sub>51</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>S [M + H]<sup>+</sup>: 935.3505, found: 935.3492.

## 【0158】

## 【化38】



30

## 【0159】

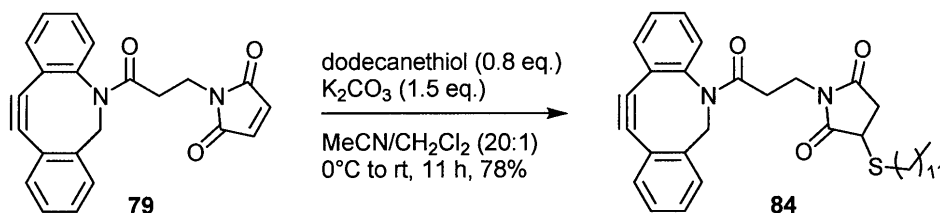
## &lt; 実施例 9 &gt;

対照化合物として、cyclo-RGDfC-SHの代わりにドデカンチオールを導入した84を同様に合成した。

40

## 【0160】

## 【化39】



## 【0161】

50



79(7.0 mg, 20  $\mu\text{mol}$ )をMeCN(0.2 ml)と $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10  $\mu\text{l}$ )の混合液に溶かし、0 でドデカンチオール(3.8  $\mu\text{l}$ , 15.7  $\mu\text{mol}$ )、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (4.1 mg, 29  $\mu\text{mol}$ )を加え、室温で11時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー(hexane-EtOAc, 1:1)で精製し、84(6.8 mg, 78%)を得た。

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (3 H, t,  $J = 7$  Hz), 1.21-1.37 (18 H, m), 1.44-1.70 (2 H, m), 2.19 (1 H, sext,  $J = 8$  Hz), 2.36 (1 H, dt,  $J = 19, 3$  Hz), 2.42-2.84 (3 H, m), 2.94 (1 H, ddd,  $J = 22, 19, 9$  Hz), 3.46-3.75 (3 H, m), 3.64 (1 H, d,  $J = 14$  Hz), 5.14 (1 H, d,  $J = 14$  Hz), 7.26-7.41 (7 H, m), 7.69 (1 H, d,  $J = 7$  Hz)

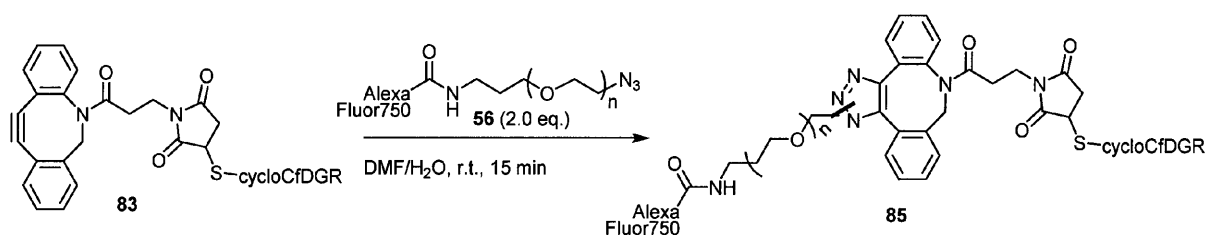
HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 559.2989, found: 559.2989.

< 実施例10 >

83と56のHuisgen反応による結合を試みた。その結果、83は速やかに消失し、化合物85が得られた(図3)。

【0162】

【化40】

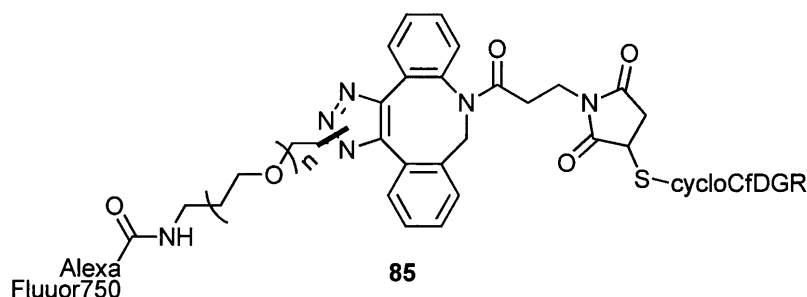


【0163】

化合物85の合成

【0164】

【化41】



【0165】

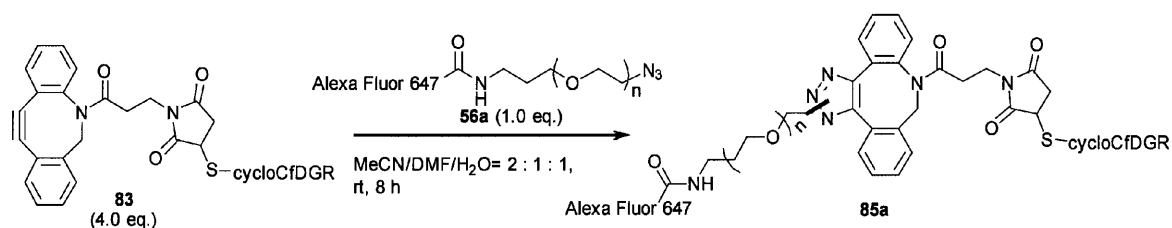
83(30 nmol)、56(45 nmol)をDMF(50  $\mu\text{l}$ )、 $\text{H}_2\text{O}$ (50  $\mu\text{l}$ )に溶かし、室温で15分間攪拌した。

< 実施例11 >

83と56aのHuisgen反応を行い、化合物85aを得た。

【0166】

【化42】



【0167】

10

20

30

40

50

83 (32 nmol) を DMF と NaHCO<sub>3</sub> 水の 1 : 1 混合液 (8.0 μl) に溶解し、56a (8 nmol) の DMF 溶液 (12.5 μl) と MeCN (20 μl) の混合液を加えた。反応液を室温で 8 時間攪拌した。HPLC (5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 250 mm, MeCN:H<sub>2</sub>O = 5 : 95 (0 min) 5 : 95 (5 min) 50 : 50 (15 min) 50 : 50 (25 min) 95 : 5 (30 min) 100 : 0 (35 min), 流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>, 検出: UV 254 nm, 650 nm 及び コロナ荷電化粒子検出器、図 4 A, B 参照) の保持時間 (21 分) のピークを分取し、85a を得た。

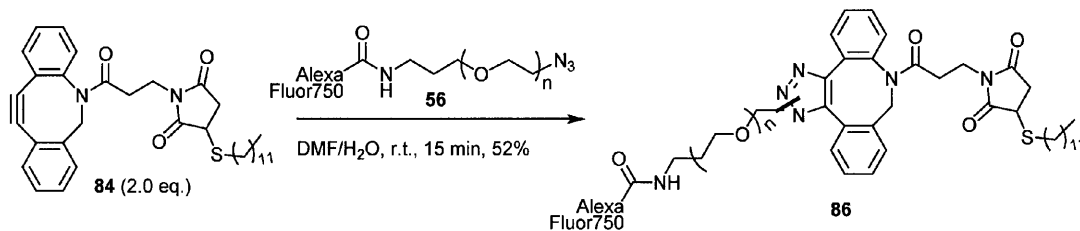
< 実施例 12 >

バックグラウンド用として 84 と 56 の Huisgen 反応により 86 を合成した。700 nm で検出したところ 56 が消失し、保持時間 11.5 分の新しいピークが Alexa Fluor 付加体 86 であると考えられる (図 5)。また、ピーク面積を基に収率は 52% と推定した。

10

【 0 1 6 8 】

【 化 4 3 】



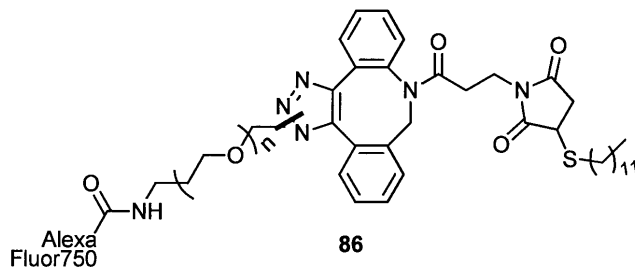
【 0 1 6 9 】

化合物 86 の合成

20

【 0 1 7 0 】

【 化 4 4 】



30

【 0 1 7 1 】

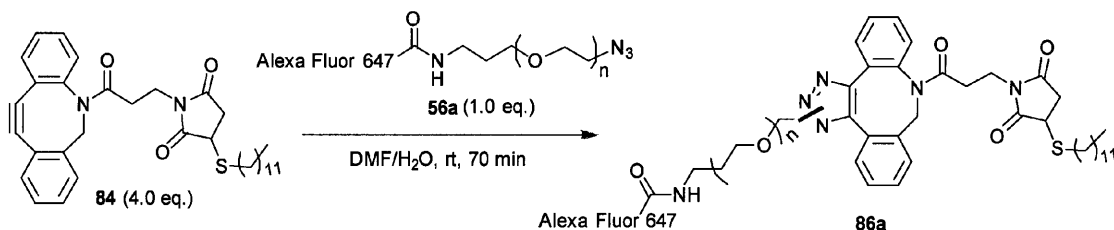
84 (60 nmol)、56 (30 nmol) を DMF (50 μl)、H<sub>2</sub>O (50 μl) に溶かし、室温で 15 分間攪拌した。逆相 HPLC (MeCN-H<sub>2</sub>O, 30:70 100:0) で分析し、86 (52%) を得た。

< 実施例 13 >

対照化合物として、cyclo-RGDfC の代わりにドデカンチオールが結合した 86a を同様に合成した。

【 0 1 7 2 】

【 化 4 5 】



40

【 0 1 7 3 】

化合物 86a の合成

84 (図 6) (32 nmol) と 56a (8 nmol) の DMF (12.5 μl) 溶液を室温で 70 分間攪拌した。HPLC (5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 250 mm, MeCN:H<sub>2</sub>O = 5 : 95 (0 min) 5 : 95 (5 min) 50 : 50 (15 min) 50 : 50 (25 min) 95 : 5 (30 min) 100 : 0 (35 min), 流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>, 検出: UV 254 nm, 650 nm 及び コロナ荷電化粒子検出器、図 4 A, B 参照) の保持時間 (21 分) のピークを分取し、85a を得た。

50

50 (15 min) 50 : 50 (25 min) 95 : 5 (30 min) 100 : 0 (35 min), 流速1.0 mL min<sup>-1</sup>, 検出: UV 254 nm, 650 nm及びコロナ荷電化粒子検出器、図7A, B参照)の保持時間(21分)のピークを分取し、86aを得た。

<実施例14>

RGDfC-PEG(85a)のin vivoイメージング

### 1. 実験材料

各サンプル: RGDfC-PEG(85a), control-PEG(86a)

クロロフィルを含まないマウス飼育用飼料: オリエンタル酵母工業(株)

イソフルラン(エスカイン<登録商標>): メルク製薬(株)

insuflon<登録商標>: Unomedical

10

### 2. 実験方法

(がん細胞の培養)

移植がん細胞としてA549ヒト肺がん細胞株を用いた。培養培地としては、D-MEM/Ham's F-12にペニシリンG(100 unit/mL)、ストレプトマイシン溶液(100 µg/mL)を加えたものに、非働化ウシ胎児血清(Fetal bovine serum: FBS)を加えて調製した10% FBS D-MEM/Ham's F-12 (P/S+)を用いた。インキュベーター内で5% CO<sub>2</sub>存在下37°Cで培養し、コンフルエント時には、0.25% Trypsin/EDTA-PBS(-)溶液で細胞を剥離し、継代を行った。

(担がんマウスの作製)

実験動物には5週齢の雄性BALB/c nu/nu マウス(日本SLC)を用いた。マウスは、クロロフィルを含まない飼料を与えて飼育し、イメージング時のバックグラウンドを低減した。

20

【0174】

A549細胞の懸濁液(1.0 × 10<sup>7</sup> cells / 0.2 mL / mouse)をマウスの左腹側部に移植し、腫瘍径が約10 mmに到達した時点でイメージングに用いた。

(サンプル調製)

各サンプル[RGDfC-PEG(85a), control-PEG(86a)]を10 nmol / mLとなるように、適量の生理食塩水にて用時溶解した。

(in vivoイメージング)

担がんマウスの尾静脈内にカニューレ(insuflon<登録商標>)を挿入後、専用チャンパー内でイソフルラン(エスカイン<登録商標>)を用いてマウスを麻酔した。マウスをIVIS Lumina Imaging System(Xenogen社)の装置内に固定後、調製した各サンプル(2 nmol / 0.2 mL / mouse)を尾静脈内投与した。投与直後から各サンプルに含まれるAlexa647の蛍光を非侵襲的にイメージングした。投与3時間後にマウスを解剖し、血液、各臓器、および腫瘍への85a, 86aの分布をIVISにてex vivoイメージングした。

30

### 3. 実験結果

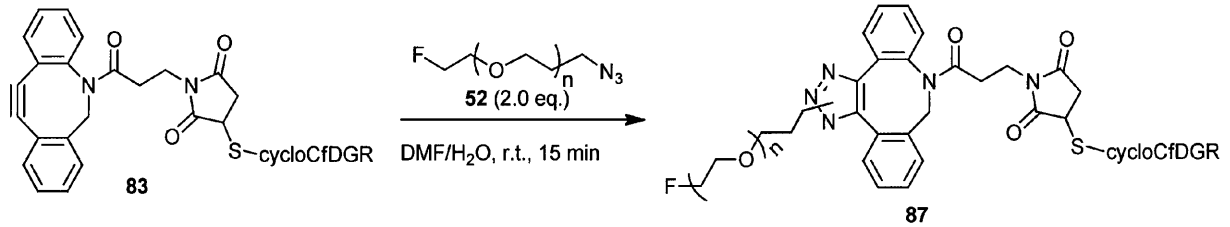
A549ヒト肺がん細胞移植マウスに投与したcontrol-PEG(86a)あるいはRGDfC-PEG(85a)の体内動態をAlexa647の蛍光によってin vivoイメージングした結果を図8A, Bに示す。いずれのサンプルにおいても腎臓から膀胱へと移行していく様子が観察された。投与3時間後にマウスを解剖し、血液、各臓器、および腫瘍への86a, 85aの分布をIVISにてex vivoイメージングした結果を図9に示す。この結果から、RGDfC-PEG(85a)の腎臓および腫瘍への顕著な集積が観察された。したがって、RGDfC-PEG(85a)は腫瘍のイメージングに有用であることが示唆された。

40

<実施例15>

【0175】

## 【化46】



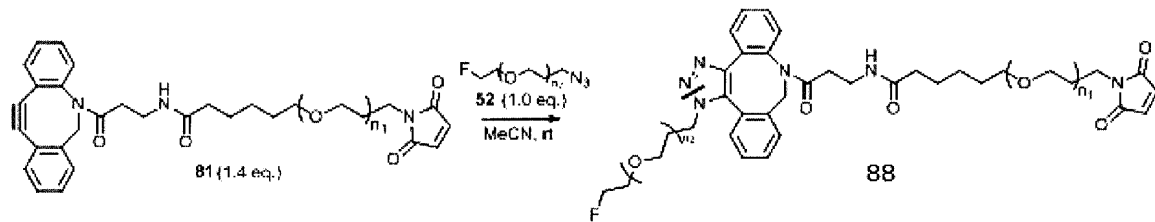
## 【0176】

83 (25 nmol)、52 (Mw 2 kDa, 50 nmol) を DMF (50  $\mu$ l)、H<sub>2</sub>O (50  $\mu$ l) に溶かし、室温で15分間攪拌した。逆相HPLCで分析し、87を得た (図10)。

< 実施例16 >

## 【0177】

## 【化47】



## 【0178】

化合物88の合成

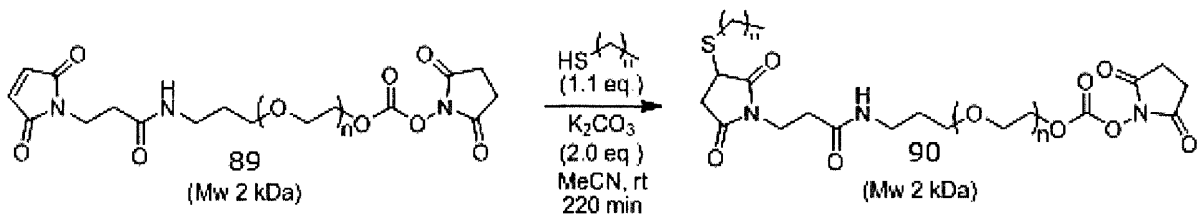
81 (0.26  $\mu$ mol) を MeCN (0.5ml) に溶解し、52 (0.19  $\mu$ mol) を加えて室温で120分間攪拌した。HPLC (5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6  $\times$  250 mm, MeCN:H<sub>2</sub>O = 1 : 1, 流速 0.4 mL min<sup>-1</sup>, 検出: UV 254 nm 及び コロナ荷電化粒子検出器、図11A, B 参照) の保持時間 (14分) のピークを分取し、88を得た。なお、HPLCでは81は8min, 52と88はいずれも14minに現れる。88と52が重なり、反応の終点を判断することはできなかったため、念のために120分間、反応を行った。

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for C<sub>200</sub>H<sub>371</sub>N<sub>6</sub>O<sub>88</sub>FNa [M (n<sub>1</sub> = n<sub>2</sub> = 42) + Na]<sup>+</sup>: 4307.4622, found: 4307.3684.

< 実施例17 >

## 【0179】

## 【化48】



## 【0180】

化合物90の合成

89 (2.2  $\mu$ mol) の MeCN (0.4ml) 溶液に K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.6 mg, 4.4  $\mu$ mol) を加えた後、dodecanethiol の MeCN 溶液 (24 mM) を 0.1 ml 加え、反応液を室温で220分間攪拌した。粗生成物 (化合物90) はそのまま次の反応に用いた。

HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for C<sub>111</sub>H<sub>211</sub>N<sub>3</sub>O<sub>50</sub>SK [M (n = 42) + K]<sup>+</sup>: 2457.3413, found: 2457.3437.

< 実施例18 >

## 【0181】

10

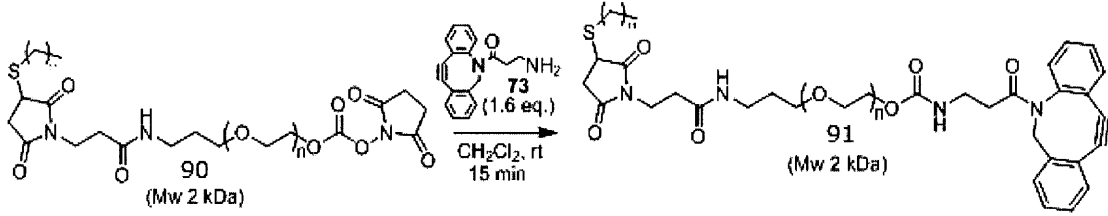
20

30

40

50

【化49】



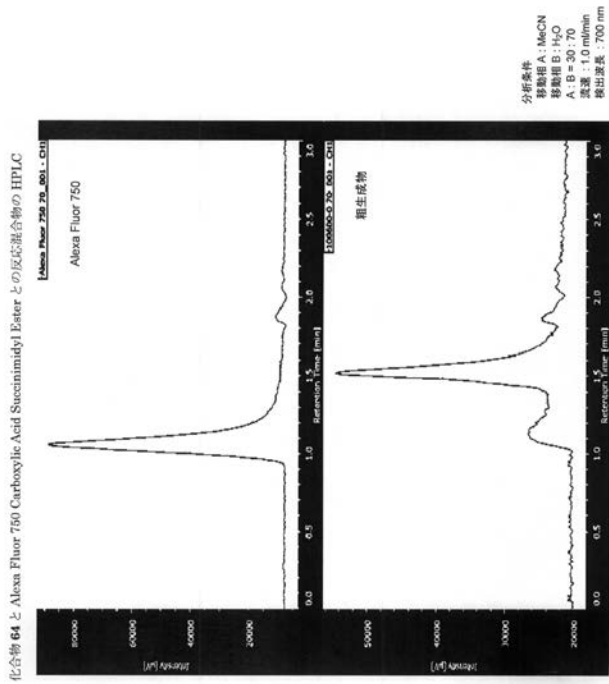
【0182】

化合物91の合成

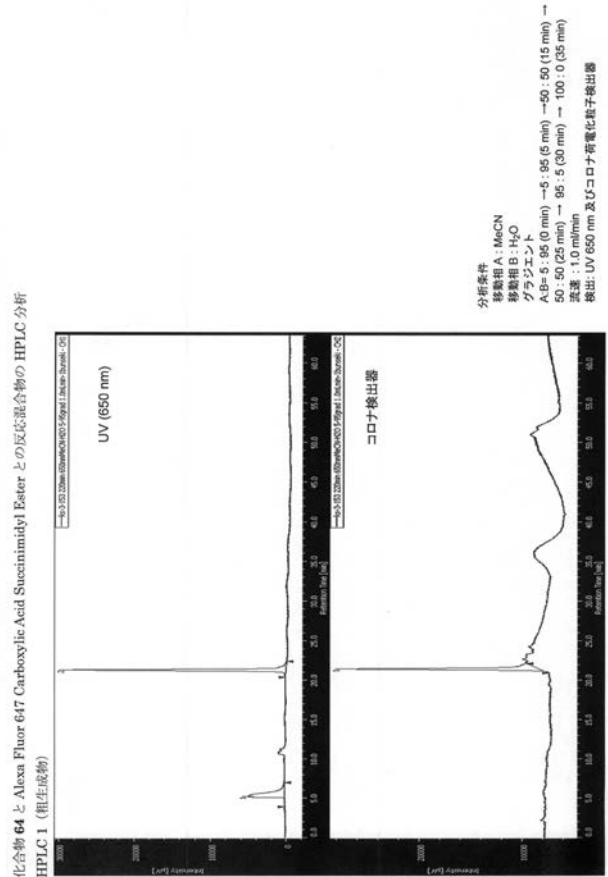
90 ( $4.0 \times 10^2 \mu\text{mol}$ ) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 ml) 溶液に 73 の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 (36 mM) を 17.5  $\mu\text{l}$  加え、室温で15分間攪拌し、化合物91を得た。

HRMS (MALDI-TOF):  $m/z$  calcd for C<sub>127</sub>H<sub>226</sub>N<sub>4</sub>O<sub>49</sub>SK [M (n = 43) + K]<sup>+</sup>: 2662.4668, found: 2662.4610.

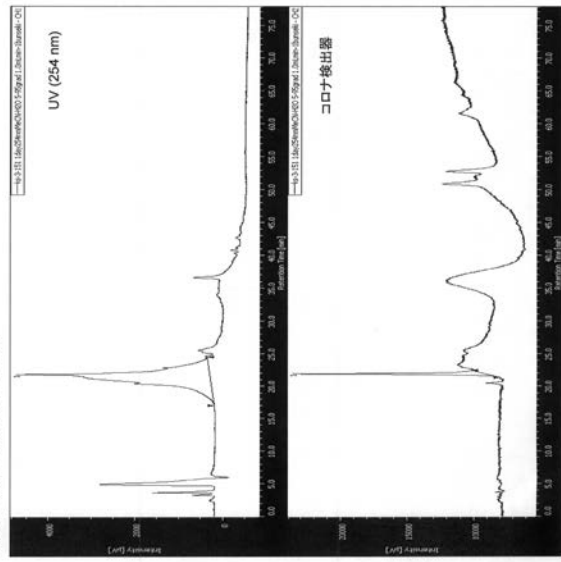
【図1】



【図2A】

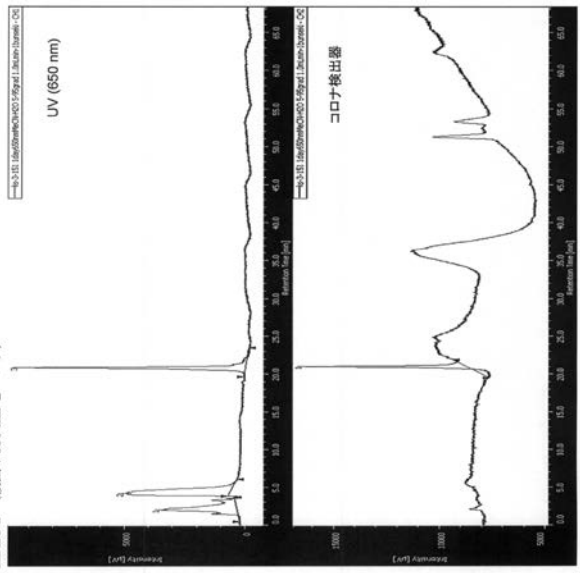


化合物 83 と化合物 56a の反応混合物の HPLC 分析  
HPLC 1 (検出: 254 nm とコロナ)



分析条件  
 移動相 A: MeCN  
 移動相 B: H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 A:B = 5:95 (0 min) → 5:95 (5 min) → 50:50 (15 min)  
 → 50:50 (25 min) → 95:5 (30 min) → 100:0 (35 min)  
 流速: 1.0 ml/min  
 検出: UV 254 nm, 650 nm 及びコロナ荷電化電子検出器

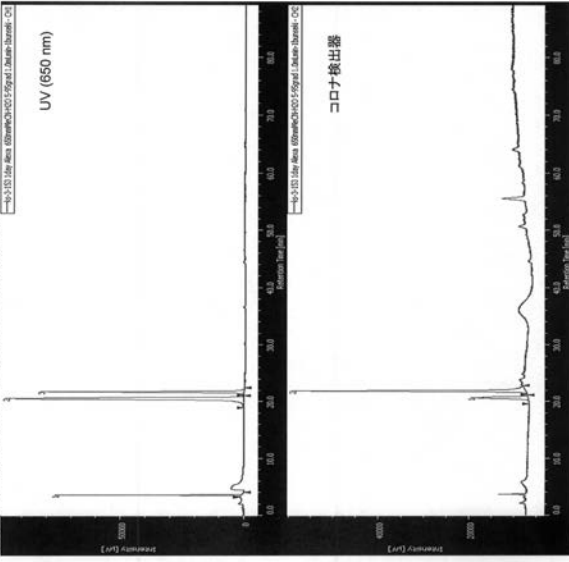
化合物 83 と化合物 56a の反応混合物の HPLC 分析  
HPLC 2 (検出: 650 nm とコロナ)



分析条件  
 移動相 A: MeCN  
 移動相 B: H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 A:B = 5:95 (0 min) → 5:95 (5 min) → 50:50 (15 min)  
 → 50:50 (25 min) → 95:5 (30 min) → 100:0 (35 min)  
 流速: 1.0 ml/min  
 検出: UV 254 nm, 650 nm 及びコロナ荷電化電子検出器

【 図 4 A 】

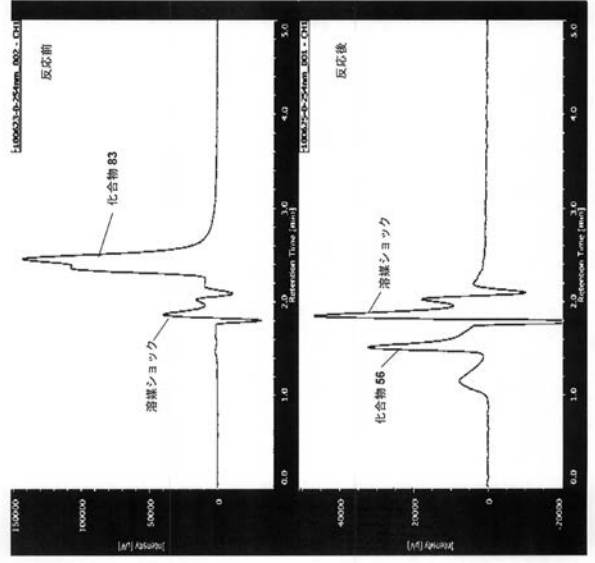
化合物 64 と Alexa Fluor 647 Carboxylic Acid Succinimidy Ester との反応混合物の HPLC 分析  
HPLC2 ( Alexa 647 Carboxylic Acid, Succinimidy Ester と反応生成物との混合物)



分析条件  
 移動相 A: MeCN  
 移動相 B: H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 A:B = 5:95 (0 min) → 5:95 (5 min) → 50:50 (15 min)  
 → 50:50 (25 min) → 95:5 (30 min) → 100:0 (35 min)  
 流速: 1.0 ml/min  
 検出: UV 650 nm 及びコロナ荷電化電子検出器

【 図 4 B 】

化合物 83 と化合物 56 の反応混合物の HPLC 分析



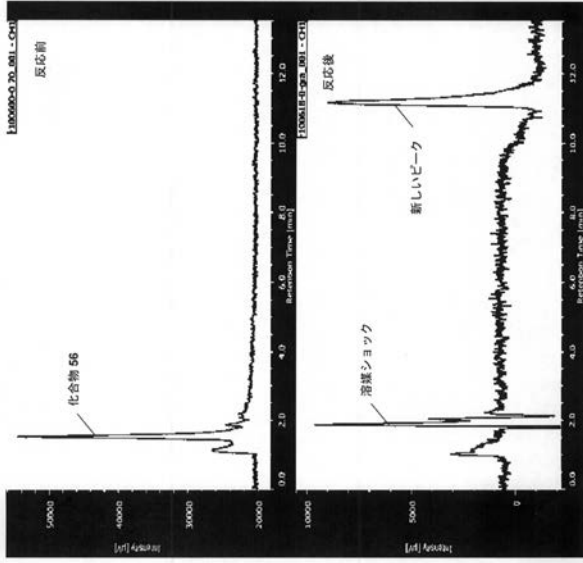
分析条件  
 移動相 A: MeCN, 移動相 B: H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 0-3 min A: B = 30:70  
 3-8 min A: B = 30:70 to 100:0  
 流速: 1.0 ml/min  
 検出波長: 254 nm

【 図 2 B 】

【 図 3 】

【 5 】

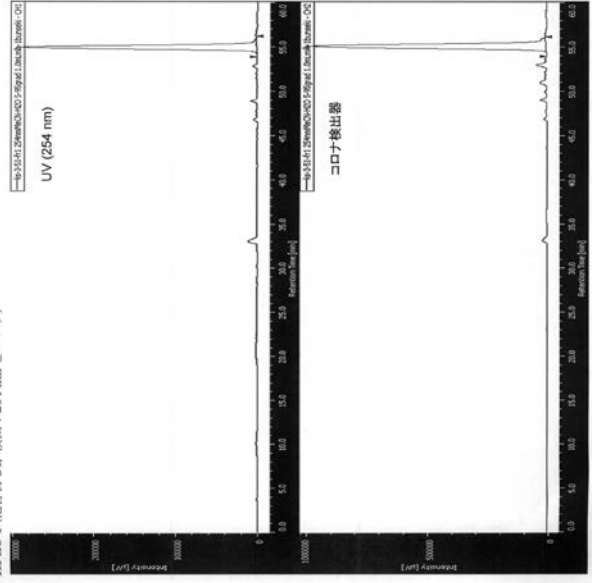
化合物 84 と化合物 56 の反応混合物の HPLC



分析条件  
 移動相 A : MeCN  
 グラジエント  
 0-3 min A : B = 30 : 70  
 3-8 min A : B = 30 : 70 to 100 : 0  
 8-10 min A : B = 100 : 0  
 流速 : 1.0 ml/min  
 検出波長 : 700 nm

【 6 】

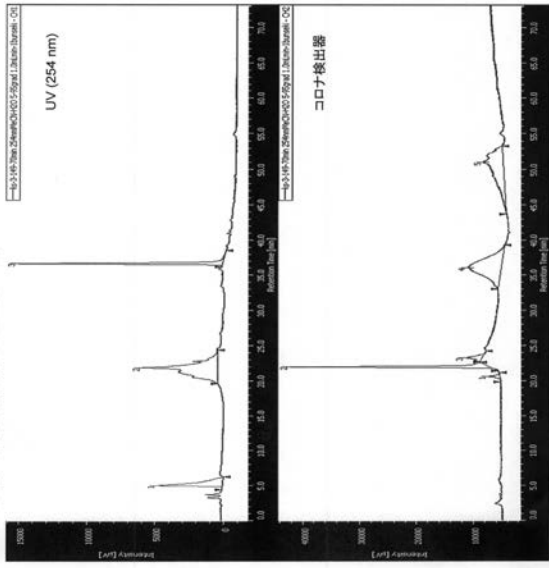
化合物 84 の HPLC 分析  
HPLC 1 (化合物 84, 検出 : 254 nm とコロナ)



分析条件  
 移動相 A : MeCN  
 移動相 B : H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 0-5.50 (0 min) → 5.95 (5 min) → 50.50 (15 min) →  
 50.50 (25 min) → 95.5 (30 min) → 100.0 (35 min)  
 流速 : 1.0 ml/min  
 検出 : UV 254 nm 及びコロナ背電化電子検出器

【 7 A 】

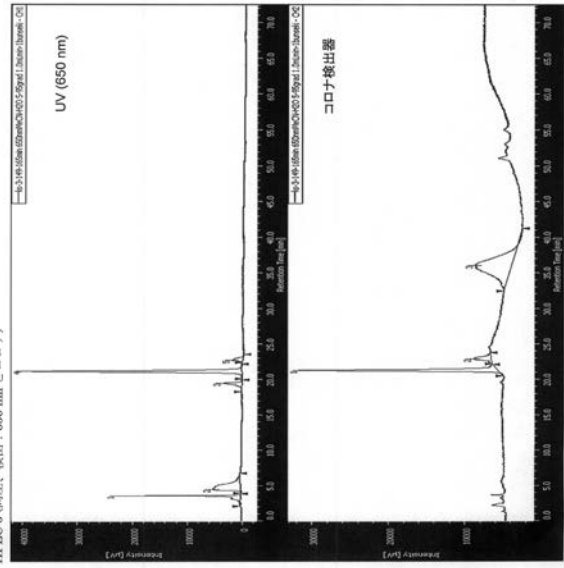
化合物 84 と化合物 56a の反応混合物の HPLC 分析  
HPLC 2 (70 分後の反応混合物, 検出 : 254 nm とコロナ)



分析条件  
 移動相 A : MeCN  
 移動相 B : H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 A:B= 5 : 95 (0 min) → 5 : 95 (5 min) → 50 : 50 (15 min)  
 → 50 : 50 (25 min) → 95 : 5 (30 min) → 100 : 0 (35 min)  
 流速 : 1.0 ml/min  
 検出 : UV 254 nm, 650 nm 及びコロナ背電化電子検出器

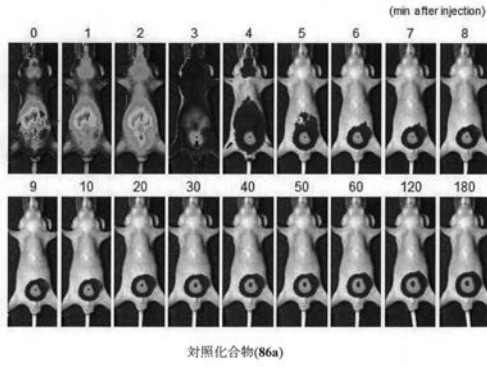
【 7 B 】

化合物 84 と化合物 56a の反応混合物の HPLC 分析  
HPLC 3 (同左、検出 : 650 nm とコロナ)

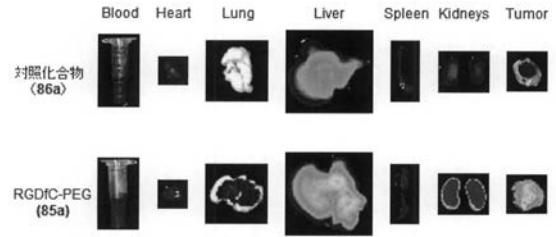


分析条件  
 移動相 A : MeCN  
 移動相 B : H<sub>2</sub>O  
 グラジエント  
 A:B= 5 : 95 (0 min) → 5 : 95 (5 min) → 50 : 50 (15 min)  
 → 50 : 50 (25 min) → 95 : 5 (30 min) → 100 : 0 (35 min)  
 流速 : 1.0 ml/min  
 検出 : UV 254 nm, 650 nm 及びコロナ背電化電子検出器

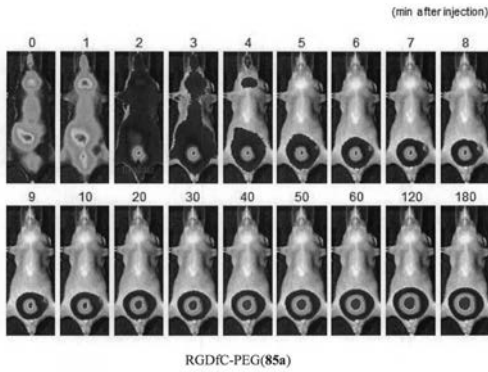
【 図 8 A 】



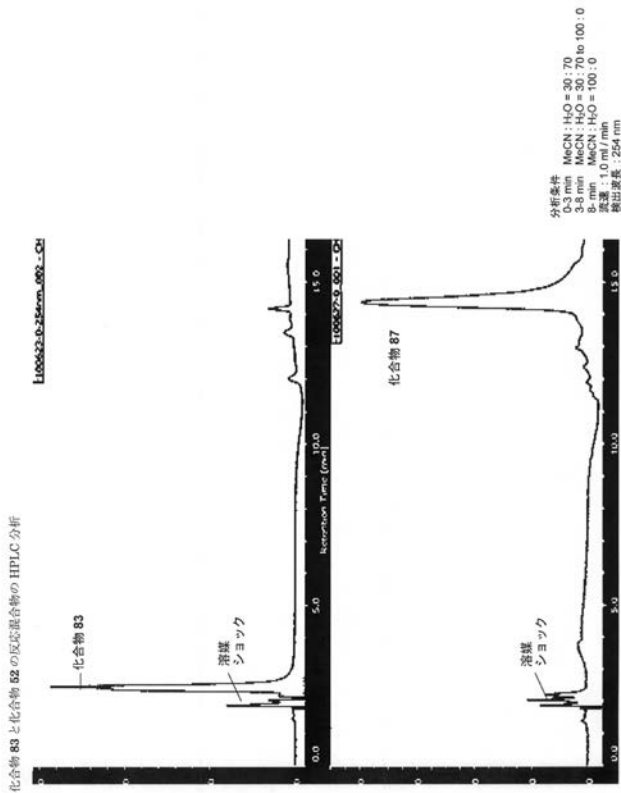
【 図 9 】



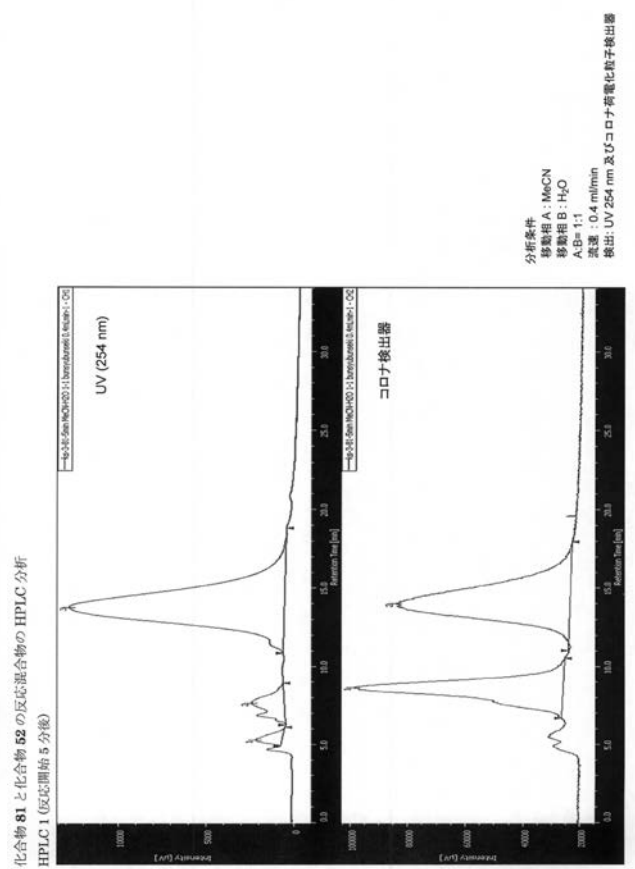
【 図 8 B 】



【 図 1 0 】



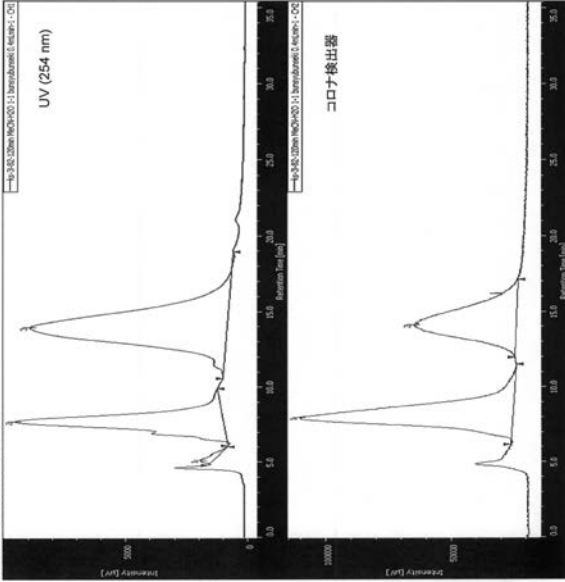
【 図 1 1 A 】





【 1 1 B 】

化合物 81 と化合物 52 の反応混合物の HPLC 分析  
HPLC 2 (反応開始 120 分後)



分析条件  
移動相 A: MeCN  
移動相 B: H<sub>2</sub>O  
A:B= 1:1  
流速: 0.4 ml/min  
検出: UV 254 nm 及びコロナ検出器

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/059034
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C08G65/333(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, C07D403/06(2006.01)i, C07D487/04(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08G65/00-67/04, C07D401/00-421/14, C07D487/00-491/22, A61K39/00-39/44, A61K49/00-49/04, A61K51/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CPlus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sachin K. et al., F-18 Labeling Protocol of Peptides Based on Chemically Orthogonal Strain-Promoted Cycloaddition under Physiologically Friendly Reaction Conditions, Bioconjugate Chemistry, 2012, Vol.23, p.1680-1686	1-17
A	Akai S. et al., Synthesis of Long-Chain [18F] Deoxyfluoropoly(ethylene glycol) Methyl Ethers and Their Noninvasive Pharmacokinetic Analysis by Positron Emission Tomography, molecular pharmaceuticals, 2011, Vol.8, No.1, p.302-308	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 June, 2014 (04.06.14)		Date of mailing of the international search report 17 June, 2014 (17.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/059034

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-504507 A (University of Georgia Research Foundation, Inc.), 10 February 2011 (10.02.2011), claims; examples & US 2010/0297250 A1 & EP 2222341 A1 & WO 2009/067663 A1 & CN 101925366 A	1-17
A	Libe D. et al., Selective Targeting of Fluorescent Nanoparticles to Proteins Inside Live Cells, <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 2011, Vol. 50, p.9352-9355	1-17
A	Guo Y. et al., The PEG-Fluorochrome Shielding Approach for Targeted Probe Design, <i>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY</i> , 2012, Vol.134, p.19338-19341	1-17
A	Washington-Hughes C.L. et al., In Vivo Virus- Based Macrofluorogenic Probes Target Azide- Labeled Surface Glycans in MCF-7 Breast Cancer Cells, <i>molecular pharmaceutics</i> , 2012.09.21, Vol.10, p.43-50	1-17
P,A	JP 2013-528593 A (Prolynx LLC), 11 July 2013 (11.07.2013), claims; examples 40, 41 & US 2013/0116407 A1 & EP 2566335 A1 & WO 2011/140393 A1 & CN 103025165 A	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 9 0 3 4	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C08G65/333(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, C07D403/06(2006.01)i, C07D487/04(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C08G65/00-67/04, C07D401/00-421/14, C07D487/00-491/22, A61K39/00-39/44, A61K49/00-49/04, A61K51/00,			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	Sachin K. et al., F-18 Labeling Protocol of Peptides Based on Chemically Orthogonal Strain-Promoted Cycloaddition under Physiologically Friendly Reaction Conditions, Bioconjugate Chemistry, 2012, Vol.23, p.1680-1686	1-17	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 04.06.2014		国際調査報告の発送日 17.06.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松本 淳	4 J 4 6 7 5
		電話番号 03-3581-1101 内線 3457	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 9 0 3 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Akai S. et al., Synthesis of Long-Chain [18F]Deoxyfluoropoly(ethylene glycol) Methyl Ethers and Their Noninvasive Pharmacokinetic Analysis by Positron Emission Tomography, molecular pharmaceuticals, 2011, Vol.8, No.1, p.302-308	1-17
A	JP 2011-504507 A (ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リサーチ・ファウンデーション・インコーポレイテッド) 2011.02.10, 特許請求の範囲、実施例 & US 2010/0297250 A1 & EP 2222341 A1 & WO 2009/067663 A1 & CN 101925366 A	1-17
A	Libe D. et al., Selective Targeting of Fluorescent Nanoparticles to Proteins Inside Live Cells, Angew. Chem. Int. Ed., 2011, Vol.50, p.9352-9355	1-17
A	Guo Y. et al., The PEG-Fluorochrome Shielding Approach for Targeted Probe Design, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2012, Vol.134, p.19338-19341	1-17
A	Washington-Hughes C.L. et al., In Vivo Virus-Based Macrofluorogenic Probes Target Azide-Labeled Surface Glycans in MCF-7 Breast Cancer Cells, molecular pharmaceuticals, 2012.09.21, Vol.10, p.43-50	1-17
P,A	JP 2013-528593 A (プロリンクス リミテッド ライアビリティ カンパニー) 2013.07.11, 特許請求の範囲、実施例40、41 & US 2013/0116407 A1 & EP 2566335 A1 & WO 2011/140393 A1 & CN 103025165 A	1-17

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C085 HH03 HH11 KA27 KA29 KB20 KB56  
4J005 AA04 AA14 BD05 BD06

## 【要約の続き】

(式中、 $R^{a1}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基、 $R^{b1} \sim R^{b10}$ は水素原子等、 $R^{c1}$ は水素原子等を示し、 $X$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基または $-R^{d1}(OCH_2CH_2)_mR^{d2}-$ ( $R^{d1}$ は2価の $C_1 \sim C_{12}$ 炭化水素基等、 $R^{d2}$ は2価の $C_1 \sim C_6$ 炭化水素基等、 $m$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)、 $Y$ は生物活性物質を含む1価の基、 $Z$ は蛍光色素を含む1価の基、 $n$ は分子量換算で1kDa~40kDaの範囲内の整数を示す。)で表わされる $[^{18}F]F$ 標識または蛍光標識PEG化生物活性物質。

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。