

(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
2013年9月19日(19.09.2013)

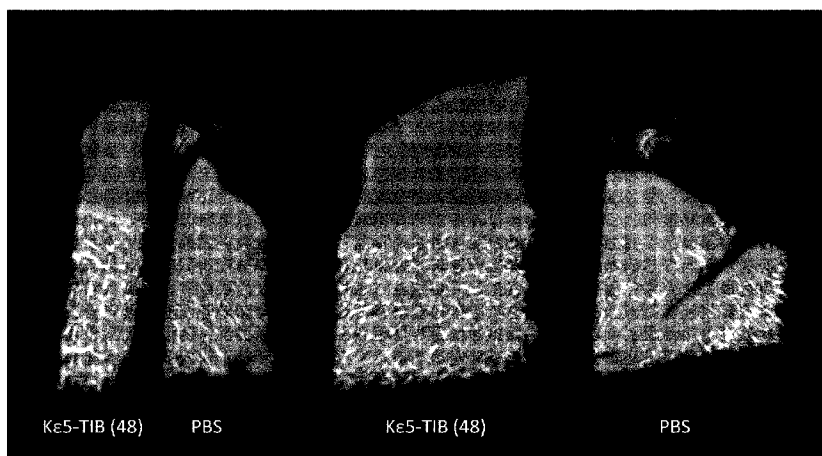


(10) 国際公開番号
WO 2013/137302 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 5/033 (2006.01) C07K 7/02 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01) 1号 グロース第2ビル セとうち国際特許事務所 Okayama (JP).
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/056974
 - (22) 国際出願日: 2013年3月13日(13.03.2013)
 - (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 2012-055511 2012年3月13日(13.03.2012) JP
 - (71) 出願人: 国立大学法人 岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
 - (72) 発明者: 大橋 俊孝(OHASHI, Toshitaka); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP). 加来田 博貴(KAKUTA, Hiroki); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP).
 - (74) 代理人: 中務 茂樹, 外(NAKATSUKASA, Shigeki et al.); 〒7000975 岡山県岡山市北区今4丁目9番
 - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: LYSINE OLIGOMER DERIVATIVE AND CARTILAGE TISSUE MARKER MADE THEREOF

(54) 発明の名称: リジンオリゴマー誘導体及びそれからなる軟骨組織マーカー



(57) Abstract: This lysine oligomer derivative is made by linking the ε-amino group and the carboxyl group of lysine by peptide linkage, and is characterized in that a group capable of generating or absorbing an electromagnetic wave is bonded to the C-terminal carboxyl group, the N-terminal amino group, and/or the α-amino group. This lysine oligomer derivative has the characteristic of specifically accumulating in the cartilage matrix and can generate or absorb an electromagnetic wave, and is thus useful as a cartilage tissue marker.

(57) 要約: リジンのε-アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されてなり、C末端カルボキシル基、N末端アミノ基及び/又はα-アミノ基に、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合されてなることを特徴とする、リジンオリゴマー誘導体である。このリジンオリゴマー誘導体は、軟骨基質に特異的に集積する性質を有するとともに、電磁波を発生又は吸収することができるので、軟骨組織マーカーとして有用である。



WO 2013/137302 A1

明 細 書

発明の名称：

リジンオリゴマー誘導体及びそれからなる軟骨組織マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、リジンオリゴマー誘導体に関する。また本発明は、軟骨基質に特異的に結合する性質を有するリジンオリゴマー誘導体からなる軟骨組織マーカーに関する。

背景技術

[0002] 軟骨組織は、膝関節等の関節において、骨相互の間に生じる摩擦を緩和し、衝撃を吸収するために存在する、軟骨細胞とそれを取り囲む基質からなる支持組織である。様々な原因によって軟骨組織を形成する軟骨基質が変性すると、含水率が低下して、その機能を維持することが難しくなり、慢性の関節炎を伴う関節疾患である変形性関節症（OA：osteoarthritis）を発症する。これは、関節の構成要素の変性により軟骨の破壊と骨及び軟骨の増殖性変化を来す疾患である。日本における変形性関節症の総患者数は、約800万人とされており、人口の高齢化とともに数はさらに増加することが予想されている。

[0003] 変形性関節症により軟骨及び骨の損傷・破壊が進行するとその後の段階ではそれらを元どおりに戻すことはできない。しかしながら、早期に発見して適切な治療を施せば、症状の進行を遅らせることは可能である。変形性関節症の症状の現れ方や進み方は人により千差万別であるため、適切な治療を選択するには、患者個々の関節軟骨の状態を早期に精密に検査し、異常を把握することが極めて重要である。これと同様に、臨床以前の問題としても、関節組織の変性に対する効果の高い治療剤を開発する上で、少なくとも実験動物の関節軟骨の変性を定性的及び定量的に、また可能な限り生きた状態（in vivo）で経時的に、評価できることも、極めて重要である。

[0004] 現在、ヒト患者における関節の検査には、単純X線撮影、関節液検査、関

節鏡検査などが一般的に行われている。単純X線検査は安価でありどの医療機関でも実施可能ではあるものの、関節軟骨の主要成分がコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸側鎖を含有するプロテオグリカンであるアグリカンと、コラーゲンとであるため、X線検査では関節軟骨自体は写らない。実験動物においても同様である。従って、X線撮影では、関節裂隙（関節における向かい合った2個の骨端間の間隙）の狭小化その他、関節周囲の骨の変化を見ることで関節破壊の程度を調べることはできても、軟骨自体の変化については間接的な評価に止まる。すなわち、X線撮影では、軟骨が現に受けている損傷や変性の程度を直接検出はできず、したがって、その定量化もできない上、症状の進んでいない状態での関節軟骨の損傷の発見が困難である。一方、他の方法である関節液検査では、関節軟骨の状態を、生理学的ないし生化学的変化を指標として用いて捉えることはできても、関節軟骨の厚みや変形等の物理的状态を知るには無力である。また、直接に関節軟骨を画像診断する方法として、関節鏡を用いた方法がある。それらは、例えば関節鏡の先端からレーザー光を照射し、軟骨組織から発生する超音波を検出することで軟骨の物性を測定する方法（特許文献1参照）、軟骨の圧縮変形に伴う吸光度の時間的変化を近赤外線水分計を用いて測定することによって、軟骨の変性の程度を初期段階から客観的に評価する方法（特許文献2参照）等であるが、何れも高度に侵襲性であり、大きな身体的負担や感染などのリスクを患者に強いという欠点がある。このためそれらの方法をヒト患者に適用するには場合が限定され、実験動物においても、そのような侵襲の影響は関節疾患に対する薬物評価に必要な経時的検査に行うのを困難にするため、利用に適さない。

[0005] これらに対し、近年、ヒト患者では軟骨イメージングにMRIが利用されるようになりつつあり、軟骨自体の質的評価を可能にする検査手段として期待されているが、MRI装置は極めて高価であるためこれを導入できる医療機関はごく限られ、しかも解像度には未だ問題を残しており、その点からも利用は困難である。

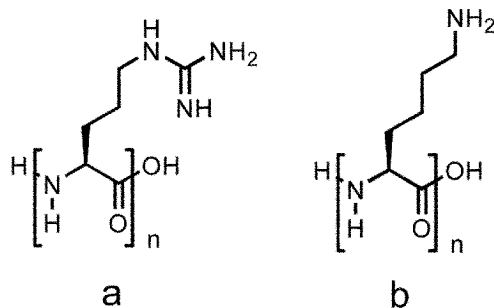
[0006] このような状況にあつて、軟骨の状態を早期に診断する方法やそのための正確な疾患マーカーの開発が進められている（特許文献3及び4参照）。

[0007] 一方、近年、生体内部組織の3次元画像を選択的に作成する技術として、蛍光分子を用いてex vivoで生体組織の光学投影断層撮影（Optical Projection Tomography：OPT）を行う蛍光イメージング装置が開発されている。これによれば、蛍光染色された生体組織に対して、励起光としてパルスレーザを照射して個々のパルス照射毎に生体組織の照射部位より発生するフォトン光電子増倍管によって増幅して検出し、これを時間相関単一光子計数法で処理して得られたデータを画像化処理に付すことにより、目的組織の任意の断面画像やその組織全体の画像（3次元画像、断面画像）を作成することができる。また、生きたラットやマウス等の小動物の体内の蛍光標識物質の位置を外部から検出して画像化することができるin vivo蛍光イメージングシステムも、近年開発され市販されている（例えばGE HEALTHCARE社製「eXplore Optix」）。これによれば、目的とする組織に特異的に集積する蛍光標識を動物に投与し、その3次元的分布を経時的に測定して画像化することができる。in vivo 蛍光イメージングは非侵襲性で行われるため安全であり、しかも高感度であることから、生きた実験動物の特定の組織やその成分をマークして経時的に画像化し、タンパク質の動態や、病変の状態変化を評価することに利用され始めており、将来的にはヒト組織について同様な利用が期待されている。

[0008] 近年、下記式で示される構造を有するポリアルギニンペプチド（a）又はポリリジンペプチド（b）が、軟骨組織に特異的に結合することを利用した軟骨マーカーが報告された（特許文献5参照）。これらのポリペプチドは、下記式に示されるように、アルギニン又はリジンの α -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されたものである。特許文献5記載の化合物は、そのN末端もしくはC末端に対して、蛍光団やX線吸収性基を結合させた軟骨組織マーカーである。

[0009]

[化1]



[0010] 特許文献5記載の化合物について、蛍光物質を導入する場合には、高感度な蛍光団を導入することにより、所望の軟骨組織の可視化が可能である。一方、X線吸収物質を用いるには、X線吸収性の原子団、たとえばヨウ素原子等を多く含ませる必要がある。しかし、ポリアルギニンペプチド又はポリリジンペプチドは分子量が大きいため、オリゴマー1分子あたりに導入しなければならないヨウ素原子数が多く必要になる。この場合、当該ポリアルギニンペプチド又はポリリジンペプチドの溶解性、また軟骨組織における当該化合物の浸透性などに影響を及ぼしうるため、その改善が要求されている。

[0011] 特許文献6には、アミノ基がウレタン結合で保護された ϵ -ポリリジンが記載されている。ここで、 ϵ -ポリリジンは、リジンの ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されたものである。特許文献6にはこのような ϵ -ポリリジンを、トイレット用品、化粧品、飼料添加物、医薬、農薬、食品添加物、電子材料などに用いることについて記載されている。しかしながら、このような ϵ -ポリリジンを生体組織のマーカに用いることについては何ら記載されておらず、 ϵ -ポリリジンに蛍光団やX線造影用の基を導入することについても何ら記載されていない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特開2004-024855号公報

特許文献2：特開2005-055224号公報

特許文献3：特開2003-225093号公報

特許文献4：特表平10-502807号公報

特許文献5：特開2009-023993号公報

特許文献6：特開2003-335857号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の目的は、軟骨組織に特異的に結合するリジンオリゴマー誘導体を提供することである。また、そのようなリジンオリゴマー誘導体からなる軟骨組織マーカーを提供することである。そして、蛍光団やX線造影用の基を結合させた軟骨組織の可視化用試薬（組成物）を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究した結果、リジンの ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されたオリゴペプチドであるリジンオリゴマーが軟骨組織マーカーとなりうることを見出した。そして、該リジンオリゴマーに電磁波を発生又は吸収し得る基を結合させることにより、軟骨を可視化することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0015] すなわち本発明は、リジンの ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されてなり、C末端カルボキシル基、N末端アミノ基及び／又は α -アミノ基に、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合されてなることを特徴とする、リジンオリゴマー誘導体である。

[0016] このとき、3～12個のリジンが連結されてなることが好ましい。また、前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、蛍光団又はX線造影用の基であることが好ましく、前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、ヨウ素原子を含むX線造影用の基であることがより好ましい。本発明の好適な実施態様は、このようなリジンオリゴマー誘導体からなる軟骨組織マーカーである。

発明の効果

[0017] 複数のリジンが、 ϵ -アミノ基とカルボキシル基とのペプチド結合により

連結されてなるオリゴペプチドは、軟骨基質に特異的に集積する性質を有する。したがって、このようなオリゴペプチドに電磁波を発生又は吸収し得る基を結合させてなる本発明のリジンオリゴマー誘導体は、軟骨組織マーカーとして有用である。

[0018] 本発明の軟骨組織マーカーによれば、実験動物における蛍光イメージング装置やX線撮影装置などによる軟骨組織の可視化システムの構築が達成される。当該システムを用いることで、軟骨の基質量の経時的且つ定量的な評価も可能となる。したがって、例えば、関節リウマチ、変形性関節症、あるいは外傷等における軟骨基質の減少や、軟骨腫瘍等における軟骨基質の増加の検出に有用である。軟骨疾患の治療後の経過観察にも有用である。また、軟骨疾患の治療剤の開発において、軟骨の状態を評価する手段としても有用である。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1]化合物A～Cを用いたときの軟骨の染色像である。
[図2]化合物26～29を用いたときの軟骨の染色像である。
[図3]化合物Dを用いたときの軟骨のX線CT撮像写真である。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明のリジンオリゴマー誘導体は、リジンの ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されてなるものである。汎用のポリリジンのように α -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されているのではなく、 ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されていることに大きな特徴がある。リジンオリゴマー誘導体がこのような構造を有することによって、軟骨組織に対して特異的に結合することができる。そのメカニズムは必ずしも明らかではないが、ペプチド結合に関与していない α -アミノ基が適当な間隔で配置されることによって、軟骨基質を構成するコンドロイチン硫酸中に含まれているスルホン酸基との相互作用が大きくなるためであると推定される。

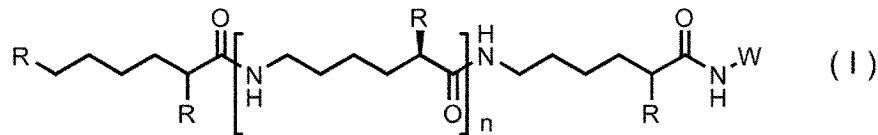
[0021] 本発明のリジンオリゴマー誘導体を構成するリジンの数は特に限定されな

いが、3～12個のリジンが連結されてなることが好ましい。リジンの数が3個未満である場合には、軟骨組織への結合性が低下するおそれがある。一方、リジンの数が12個を超える場合には、合成が困難になるし、分子量が大きくなりすぎて組織内にスムーズに拡散することが困難になるおそれがある。

[0022] そして、本発明のリジンオリゴマー誘導体は、C末端カルボキシル基、N末端アミノ基及び／又は α -アミノ基に、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合されてなるものである。このような基を結合させることによって、軟骨組織を可視化することができる。

[0023] 本発明のリジンオリゴマー誘導体の好適な化学構造は、下記式(1)に示されている通りである。

[0024] [化2]



[0025] 上記式(1)中、nは、1～10の整数である。すなわち、オリゴマーを構成するリジン単位が3～12個含まれているということである。Wは、電磁波を発生又は吸収し得る基であり、蛍光団又はX線造影用の基であることが好ましい。またRは、それぞれ独立に、アミノ基又は電磁波を発生又は吸収し得る基である。したがって、Rが、全てアミノ基であってもよいし、一部がアミノ基で一部が電磁波を発生又は吸収し得る基であってもよいし、全て電磁波を発生又は吸収し得る基であってもよい。Rは、蛍光団又はX線造影用の基であることが好ましい。

[0026] 本発明において「電磁波を発生又は吸収し得る基」とは、電磁波（電波、赤外線、可視光線、紫外線、X線、ガンマ線など）を発生又は吸収することができ、その結果、肉眼、顕微鏡、イメージング装置などにより、その存在をイメージングできる基のことをいう。ここで、電磁波を吸収し得る基としては、例えばX線造影用の基が例示され、外部から照射された電磁波の減少

分によってイメージングが可能である。また、電磁波を発生する基としては、例えば蛍光団が例示され、より高いエネルギーを吸収して蛍光を発生することによってイメージングが可能である。

[0027] X線造影用の基としては、X線を多く吸収するヨウ素原子を含む基の利用が考えられ、造影能を向上させるために、ヨードベンゼン、特にトリヨードベンゼン誘導体が好適に利用される。本発明においては、軟骨組織をなすコンドロイチン硫酸のスルホ基などのアニオン性側鎖を認識するために、リジンオリゴマーに対し導入されるヨウ素含有基が、グアニジノ基やアミノ基等のカチオン性基を含むことも望ましい。

[0028] 蛍光団としては、軟骨周囲の他の組織に強い親和性のない蛍光物質（蛍光色素等）由来のものであればよい。したがって、骨が染色されるカルセインや、細胞核のDNAが染色されるヘキストなどは避けるべきであるが、当業者に周知の他の蛍光色素を、適宜選択してよい。特に限定されるものではないが、そのような蛍光物質のうち蛍光色素の例としては、NBDなどのベンゾフラザン系色素、ローダミン系色素（例えば、ローダミン、カルボキシローダミン、カルボキシローダミン、テトラエチルローダミン、テトラメチルローダミン、ローダミンレッド、ローダミングリーン等）のほか、フルオレセイン系色素（例えば、フルオレッセイン、カルボキシナフトフルオレッセイン、テトラクロロフルオレッセイン、テトラブromoスルホンフルオレッセイン等）、シアニン系色素（例えば、Cy7、Cy5.5、Cy5、Cy3.5、Cy3その他のCy色素：GE Healthcare）、Alexa Fluor類（例えば、Alexa Fluor 790、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 405等：INVITROGEN）、VivoTag（例えば、VivoTag S750、VivoTag 680、VivoTag S680：VisEn Medical）、Atto系色素（例えば、Atto 740、Atto 725、Atto 700、Atto 680、Atto 655、Atto 647、Atto 637、Atto 635、Atto 633、Atto 620、Atto 611X、Atto 610、Atto 594、Atto 590、Atto

565、Atto 550、Atto 532、Atto 520、Atto 495、Atto 488、Atto 465、Atto 425等：ATTO-TEC GmbH）、BODIPY系色素（例えば、BODIPY 493/503、BODIPY 558/568、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TMR-X、BODIPY TR-X、BODIPY-530/550、BODIPY-FL-X）、CAL Fluor系色素（例えば、CAL Fluor-Gold 540、CAL Fluor Orange 560、CAL Fluor Red 590、CAL Fluor Red 610、CAL Fluor Red 635等）、カスケード（Cascade）ブルー、オレゴングリーン系色素（例えば、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514等）ロードル（Rhodol）グリーン、テキサスレッド等が挙げられる。また色素以外の蛍光物質の例として、Qdot [量子ドットの光子放出を利用したナノクリスタル蛍光体（数百～数千個の半導体物質の原子、例えば、セレンまたはテルルと混合したカドミウムを、硫化亜鉛のシェルで被覆したもの、更にポリマーで、次いで生体高分子でコーティングしたものが入手可能）：INVITROGEN] 等が挙げられる。

[0029] 本発明のリジンオリゴマー誘導体の化学合成方法は特に限定されない。例えば、Biopolymers, 1980, 19, 219-229に記載された方法で、又はこれに準じて適宜変更を加えた方法にしたがって行うことができる。以下に例示するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0030] (1) リジンオリゴマーの調製

例えば、 ϵ -アミノ基をZ基（ベンジルオキシカルボニル基）などで保護し、かつ α -アミノ基をBoc基（tert-ブトキシカルボニル基）で、さらにカルボキシル基をメチルエステルなどの保護したリジン誘導体を原料に、ペプチド結合形成を可能にする縮合剤を用いてペプチド形成することなどにより、 ϵ -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されたリジンオリゴマーを得ることができる。そして、得られたカルボン酸エステルを水酸化リチウム等を用いたけん化により脱保護することで、リジンオリゴマーのカルボン酸体を得ることができる。

[0031] (2) 電磁波を発生又は吸収し得る基の導入

得られたカルボン酸体に、蛍光団やX線造影用の基などを導入し、Boc

基を酸を用いて脱保護することで、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合されてなるリジンオリゴマー誘導体を得ることができる。

[0032] (3) X線造影用の基の導入

(1) 記載の脱Bocリジンオリゴマーに対し、3-ヨードもしくは3,5-ジヨード-4-(2-グアニジノエチルアミノ)安息香酸、3-ヨードもしくは3,5-ジヨード-4-(2-アミノエチルアミノ)安息香酸、2,3,5-トリヨード安息香酸などの含ヨウ素安息香酸誘導体、もしくはこれらの含ヨウ素安息香酸誘導体とジアミンとがペプチド結合してなるアミノ基含有アミドなどのX線造影剤を、一般的なペプチド合成用縮合剤の存在下で反応させ、X線撮像可能なリジンオリゴマー誘導体を得ることが出来る。また、ここで用いられるカチオン性X線造影剤は、アミノ安息香酸エステルを原料に、そのアミノ基への還元的アミノアルキル化、さらに、末端アミノ基のグアニジノ化を経て、硫酸銀存在下、メタノール中、ヨウ素と反応させることで得ることが出来る。

[0033] 本発明のリジンオリゴマー誘導体は薬学的に許容される塩であってもよい。また、異性体（例えば光学異性体、幾何異性体及び互換異性体）が存在する場合は、本発明はそれらの異性体を包含し、また溶媒和物、水和物及び種々の形状の結晶を包含するものである。本発明において、薬学的に許容される塩としては、薬理的及び製剤学的に許容される一般的な塩、特に、酸付加塩、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、過塩素酸塩等の無機酸塩を挙げることができる。

[0034] リジンのε-アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されてなるリジンオリゴマーは、軟骨組織に特異的に結合することから、軟骨組織に対するマーカーとして機能することができる。したがって、蛍光団やX線造影用の基など、電磁波を発生又は吸収し得る基が導入された、本発明のリジンオリゴマー誘導体は、蛍光顕微鏡や光学投影断層撮影、X線撮影などの方法によって、容易に検出できる軟骨組織可視化用試薬として用いることができる。

[0035] 本発明の軟骨組織マーカーを、滅菌された水性媒質（特に水又は生理食塩水、緩衝生理食塩水等）中に溶解させてなる組成物とすることにより、軟骨組織の可視化用試薬として使用することができる。組成物中の濃度は適宜であってよいが、例えば、0.01 mM～1 mMの濃度のものを適当量だけ、例えば関節腔内に投与するようにすることができるが、これに限定されない。

[0036] 以上説明したように、 ϵ -アミノ基とカルボキシル基とのペプチド結合により連結されてなるリジンオリゴマーは、軟骨に選択的に集積する。この点は、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合したリジンオリゴマー誘導体を用いて、後の実施例に示されるように実証された。したがって、このリジンオリゴマーは、軟骨を標的化してこれに薬剤を運搬するための担体として使用することができる。すなわち、 ϵ -アミノ基とカルボキシル基とのペプチド結合により連結されてなるリジンオリゴマーに対して、軟骨の治療に用いられる薬剤成分を結合させた医薬は、それを投与（例えば関節腔内に）することによって、薬剤成分を効率よく軟骨に集積させることができる。この場合、当該医薬の軟骨への集積状態を確認するために、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合していても構わないが、そのような基を有さなくてもよい。

[0037] 本発明の、 ϵ 結合で連結されたリジンオリゴマーは、軟骨組織に特異的に結合することから、これに蛍光団やX線造影用の基等の、電磁波を発生又は吸収し得る基を結合させることにより、軟骨組織を可視化することが可能となり、軟骨疾患の治療剤の開発において、軟骨の状態を評価する手段として有用である。また、当該リジンオリゴマーは軟骨に治療薬を選択的に送達するための手段としても有用である。

実施例

[0038] [リジンオリゴマー誘導体の合成]

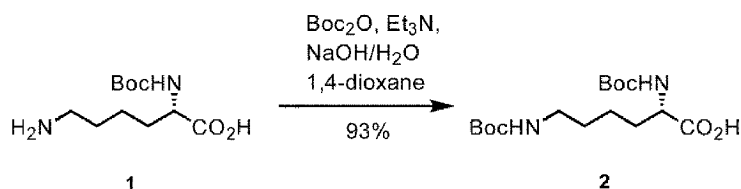
[0039] 1) 中間体2の合成

$N\alpha$ -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン(1) (985 mg、4 mmol) を無水1,4-ジオキサン(3 mL)、水(3 mL)に溶解し、ト

リエチルアミン（615 μ L、4.4 mmol）を加え、氷冷下、二炭酸ジ-tert-ブチル（960 mg、4.4 mmol）を滴下し、18時間攪拌した。TLCプレート（酢酸エチル：n-ヘキサン=5：1）で反応終了を確認し、反応液を0.5規定塩酸水溶液（80 mL）にあけ、酢酸エチル（3 \times 40 mL）で抽出し、有機層を飽和食塩水（80 mL）で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：n-ヘキサン=1：1 \rightarrow 2：1）を行い、白色固体の中間体2（1.29 g、93%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 5.21(br s, 1H), 4.62(br s, 1H), 4.28(br s, 1H), 3.14(d, 2H, $J = 6.0\text{Hz}$), 1.88(br s, 1H), 1.76(br s, 1H), 1.45-1.23(m, 22H), 0.92-0.88(m, 1H)。

[0040] [化3]

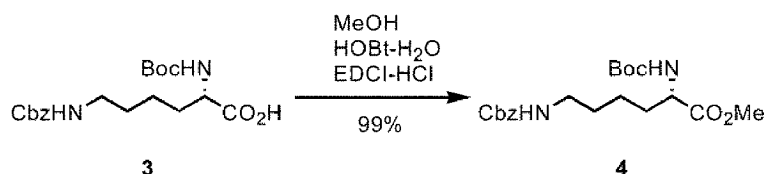


[0041] 2) 中間体4の合成

Ar雰囲気下、N α -(tert-ブトキシカルボニル)-N ϵ -(ベンジルオキシカルボニル)-L-リジン(3) (810 mg、2.1 mmol)を無水DMF(2 mL)、無水メタノール(1 mL)に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(390 mg、2.6 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(490 mg、2.6 mmol)の順に加え、氷冷し、2時間攪拌した。TLC(酢酸エチルのみ)で反応終了を確認し、反応液を水にあけ、酢酸エチル(3 \times 70 mL)で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(70 mL)、水(70 mL)、飽和食塩水(70 mL)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル：n-ヘキサン=1：4 \rightarrow 1：2)を行い、無色油状の中間体4(839 mg、99%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.36–7.33(m, 5H), 5.09(s, 2H), 5.06(s, 1H), 4.81(s, 1H), 3.73(s, 3H), 3.20(q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.77–1.67(m, 2H), 1.53–1.51(m, 2H), 1.42–1.37(m, 11H)。

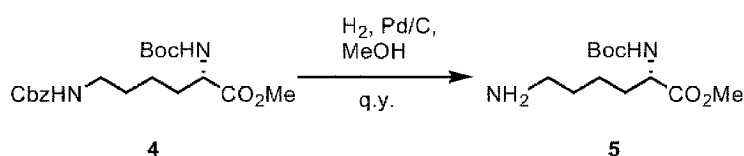
[0042] [化4]



[0043] 3) 中間体 5 の合成

中間体 4 (839 mg、2.1 mmol) をメタノール (15 mL) に溶解し、Pd/C (触媒量) を加え、水素雰囲気下、室温で 40 分攪拌した。TLC プレート (酢酸エチル : n-ヘキサン = 2 : 1) で反応終了を確認し、反応液をセライト濾過し、減圧下で溶媒留去後、無色油状の中間体 5 (563 mg、q. y.) を得、そのまま次の反応に用いた。

[0044] [化5]



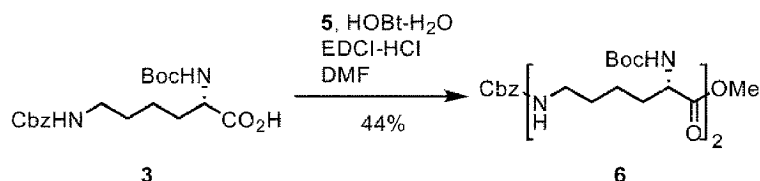
[0045] 4) 中間体 6 の合成

Ar 雰囲気下、中間体 5 (560 mg、2.2 mmol)、N α -(tert-ブトキシカルボニル)-N ϵ -(ベンジルオキシカルボニル)-L-リジン (837 mg、2.2 mmol) (3) を無水 DMF (10 mL) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物 (337 mg、2.2 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (423 mg、2.2 mmol) の順に加え、氷冷し、5.5 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル : n-ヘキサン = 3 : 1) で反応終了を確認し、反応液を水にあけ、酢酸エチル (3 \times 70 mL) で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (70 mL)、水 (70 mL)、飽和食塩水 (70 mL) で

洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、白色固体の中間体 6 (596 mg、44%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.36(br s, 5H), 6.18(br s, 1H), 5.19(br s, 2H), 5.10(s, 2H), 4.90(br s, 1H), 4.25(br s, 1H), 4.00(br s, 1H), 3.73(s, 3H), 3.21(br s, 4H), 1.83(br s, 2H), 1.44(d, 18H, $J = 3.0\text{Hz}$)。

[0046] [化6]

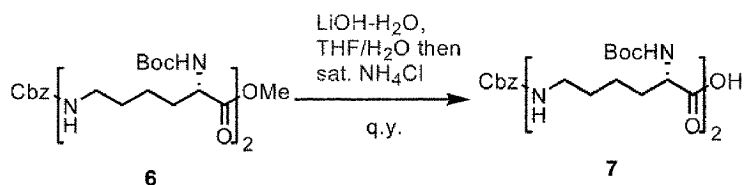


[0047] 5) 中間体 7 の合成

中間体 6 (790 mg、1.3 mmol) を THF : 水 = 3 : 2 (32 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (161 mg、3.8 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (2 × 50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、無色粘性の中間体 7 (840 mg、q. y.) を得、そのまま次の反応に用いた。

$R_f = 0.48$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 1 : 2$); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.34(br s, 5H), 5.14(br s, 1H), 5.09(s, 2H), 4.16–3.84(m, 3H), 3.18(br s, 3H), 1.97–1.90(m, 1H), 1.77(br s, 2H), 1.63–1.21(m, 5H), 1.51(s, 4H), 1.44–1.40(m, 18H)。

[0048] [化7]

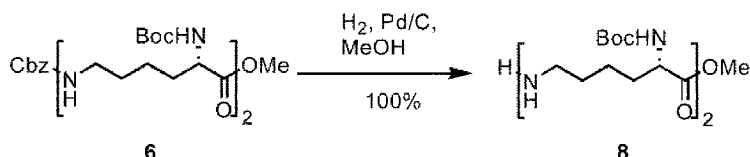


[0049] 6) 中間体 8 の合成

中間体 6 (595 mg、1.0 mmol) をメタノール (13 mL) に溶

解し、Pd/C（触媒量）を加え、水素雰囲気下、室温で7.5時間攪拌した。TLCプレート（酢酸エチル）で反応終了を確認し、反応液をセライト濾過し、減圧下で溶媒留去後、白色固体の中間体8（469mg、q.y.）を得、そのまま次の反応に用いた。

[0050] [化8]



[0051] 7) 中間体9の合成

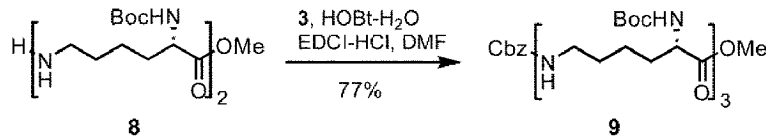
Ar雰囲気下、中間体8（376mg、0.77mmol）、N α -（tert-ブトキシカルボニル）-N ϵ -（ベンジルオキシカルボニル）-L-リジン（3）（293mg、0.77mmol）を無水DMF（5mL）に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物（141mg、0.92mmol）、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（176mg、0.92mmol）の順に加え、氷冷し、4時間攪拌した。TLC（酢酸エチルのみ）で反応終了を確認し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50mL）にあげ、酢酸エチル（3×50mL）で抽出し、有機層を飽和食塩水（100mL）で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：n-ヘキサン = 1：3）を行い、白色泡状固体の中間体9（504mg、77%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.35(br s, 5H), 6.47(br s, 2H), 5.37-5.05(m, 6H), 4.23(br s, 1H), 4.00(br s, 2H), 3.73(s, 3H), 3.21(t, J = 6.5 Hz, 6H), 1.80(br s, 3H), 1.71-1.24(m, 13H), 1.43(d, J = 3.5 Hz, 27H)

。

[0052]

[化9]

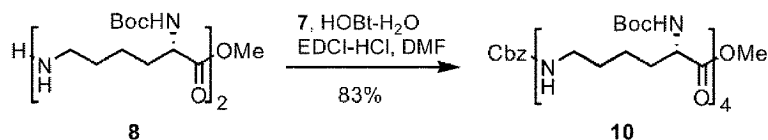


[0053] 8) 中間体 10 の合成

A r 雰囲気下、中間体 8 (255 mg、0.52 mmol)、中間体 7 (319 mg、0.52 mmol) を無水 DMF (5 mL) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (96 mg、0.62 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (119 mg、0.62 mmol) の順に加え、氷冷し、2 時間攪拌した。TLC プレート (塩化メチレン：メタノール = 9：1) で反応終了を確認し、反応液を水 (50 mL) にあけ、酢酸エチル (3×50 mL) で抽出し、有機層を水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：n-ヘキサン = 9：1) を行い、白色固体の中間体 10 (464 mg、83%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.42–7.29(m, 5H), 6.59(br s, 1H), 6.50(br s, 1H), 5.61–5.17(m, 4H), 5.10(s, 2H), 4.24(br s, 1H), 4.00(br s, 3H), 3.73(s, 3H), 3.32(br s, 2H), 3.27–3.17(m, 6H), 1.79–1.35(m, 24H), 1.45–1.41(m, 36H)。

[0054] [化10]



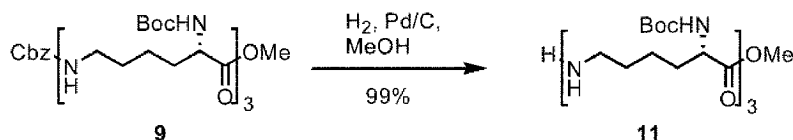
[0055] 9) 中間体 11 の合成

中間体 9 (504 mg、0.6 mmol) をメタノール (5 mL) に溶解し、Pd/C (触媒量) を加え、水素雰囲気下、室温で 1.5 時間攪拌した。

TLCプレート（酢酸エチル）で反応終了を確認し、反応液をセライト濾過し、減圧下で溶媒留去後、白色泡状固体の中間体11（421mg、99%）を得、そのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.57(br s, 1H), 6.50(br s, 1H), 5.44(br s, 1H), 5.26(br s, 2H), 4.23(br s, 1H), 4.07–3.93(m, 2H), 3.73(s, 3H), 3.24(d, $J = 5.0$ Hz, 4H), 2.71(t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.81(br s, 3H), 1.65(br s, 3H), 1.59–1.46(m, 7H), 1.44–1.43(m, 27H), 1.40–1.39(m, 7H)。

[0056] [化11]

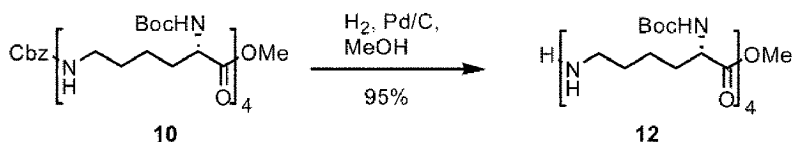


[0057] 10) 中間体12の合成

中間体10（446mg、0.41mmol）をメタノール（5mL）に溶解し、Pd/C（触媒量）を加え、水素雰囲気下、室温で0.5時間攪拌した。TLCプレート（酢酸エチル）で反応終了を確認し、反応液をセライト濾過し、減圧下で溶媒留去後、白色泡状固体の中間体12（392mg、95%）を得、そのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.97(br s, 1H), 5.60–5.49(m, 3H), 4.22(br s, 1H), 4.16–3.98(m, 3H), 3.73(s, 3H), 3.23(br s, 5H), 2.74(br s, 2H), 1.82(br s, 20H), 1.70–1.22(m, 7H), 1.44–1.43(m, 36H)。

[0058] [化12]



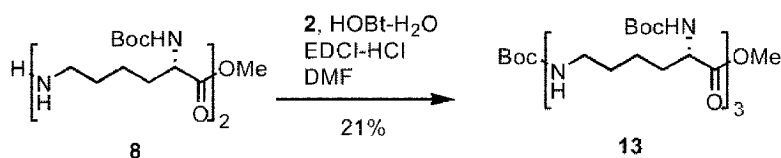
[0059] 11) 中間体13の合成

Ar雰囲気下、中間体8（469mg、1.0mmol）、中間体2（360mg、1.0mmol）を無水DMF（8mL）に溶解し、1-ヒドロキ

シベンゾトリアゾール水和物 (176 mg、1.2 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (220 mg、1.2 mmol) の順に加え、氷冷し、13時間攪拌した。TLCプレート (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を水にあげ、酢酸エチル (3×90 mL) で抽出し、有機層を水 (2×90 mL)、飽和食塩水 (90 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 2 : 1 → 1 : 0) を行い、黄色固体の中間体 13 (166 mg、21%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.45–6.37(m, 2H), 5.27(br s, 1H), 4.71(br s, 1H), 4.25(br s, 1H), 4.90(br s, 1H), 4.25(br s, 1H), 4.01(br s, 2H), 3.74(s, 3H), 3.25(br s, 3H), 3.12(br s, 2H), 1.80(br s, 3H), 1.69–1.64(m, 4H), 1.45(s, 36H)。

[0060] [化13]



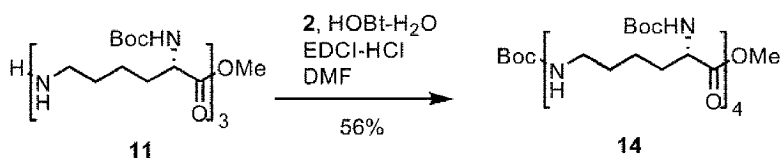
[0061] 12) 中間体 14 の合成

Ar 雰囲気下、中間体 11 (143 mg、0.2 mmol)、中間体 2 (69 mg、0.2 mmol) を無水 DMF (3 mL) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (37 mg、0.24 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (46 mg、0.24 mmol) の順に加え、氷冷し、14時間攪拌した。TLCプレート (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を水 (50 mL) にあげ、酢酸エチル (3×30 mL) で抽出し、有機層を水 (70 mL)、飽和食塩水 (70 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 19 : 1) を行い、白色固体の中間体 14 (118 mg、56%) を得た。

$R_f = 0.57$ (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.47(br

s, 1H), 4.24(br s, 1H), 4.00(br s, 2H), 3.31–3.17(m, 7H), 1.81(br s, 4H), 1.61–1.43(m, 14H), 1.43(d, J = 3.5 Hz, 45H)。

[0062] [化14]

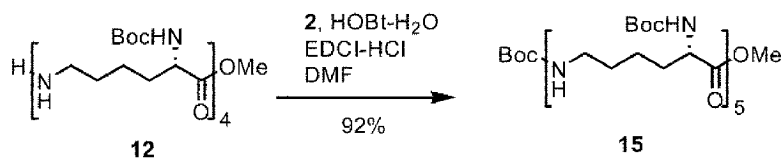


[0063] 13) 中間体15の合成

Ar雰囲気下、中間体12 (189 mg、0.20 mmol)、中間体2 (69.3 mg、0.20 mmol) を無水DMF (3 mL) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (36.8 mg、0.24 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (46.0 mg、0.24 mmol) の順に加え、氷冷し、20時間攪拌した。TLCプレート (塩化メチレン：メタノール = 9：1) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) にあけ、酢酸エチル (3×50 mL) で抽出し、有機層を水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) を行い、白色固体の中間体15 (235 mg、92%) を得た。

$R_f = 0.51$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.14(s, 1H), 6.79(s, 1H), 6.58(s, 1H), 5.75(br s, 1H), 5.51(br s, 2H), 5.41(br s, 1H), 4.89(br s, 1H), 4.21(br s, 3H), 4.01(br s, 2H), 3.41(br s, 3H), 3.22(br s, 3H), 3.11(d, J = 6.0 Hz), 1.77–0.90(m, 35H), 1.43(t, J = 2.0 Hz, 36H), 1.42(s, 18H)。

[0064] [化15]

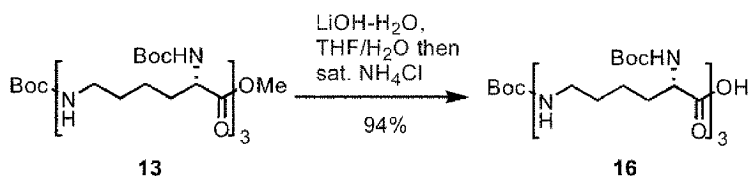


[0065] 14) 中間体16の合成

中間体 13 (90 mg、0.11 mmol) を THF : 水 = 3 : 1 (5.5 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (28 mg、0.66 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、無色粘性の中間体 16 (83 mg、94%) を得、そのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.45 (br s, 2H), 4.84 (br s, 1H), 4.23–3.84 (m, 3H), 3.17 (br s, 5H), 1.94–0.19 (m, 14H), 1.80 (br s, 2H), 1.43 (s, 36H). FAB-MS m/e : 804 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0066] [化16]



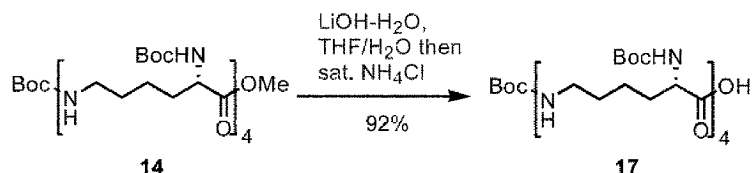
[0067] 15) 中間体 17 の合成

中間体 14 (180 mg、0.17 mmol) を THF : 水 = 3 : 2 (1 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (43 mg、1.0 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を 0.5 規定塩酸水溶液 (40 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 40 mL) で抽出し、有機層を水 (2 × 40 mL)、飽和食塩水 (40 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、白色固体の中間体 17 (160 mg、92%) を得、そのまま次の反応に用いた。

$R_f = 0.49$ (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.39 (br s, 2H), 4.05 (br s, 2H), 3.10 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 1.80 (br s, 5H), 1.56 (br s, 7H), 1.44–1.24 (m, 9H), 1.44 (d, $J = 4.0$ Hz, 45H)。

[0068]

[化17]

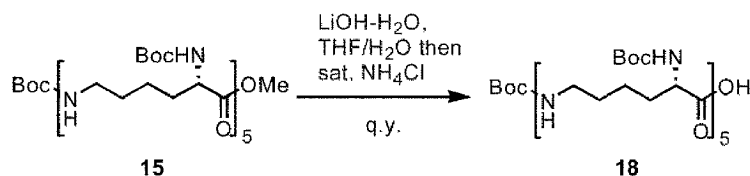


[0069] 16) 中間体18の合成

中間体15 (190 mg、0.15 mmol) を THF : 水 = 3 : 2 (18 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (89 mg、2.1 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。TLC (酢酸エチル) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 50 mL) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (2 × 50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、無色粘性の中間体18 (210 mg、q. y.) を得、そのまま次の反応に用いた。

$R_f = 0.48$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 1 : 2$); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.61-5.50(m, 2H), 4.36-3.68(m, 6H), 3.48(d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.09(br s, 6H), 2.26-0.86(m, 29H), 1.43(br s, 54H)。

[0070] [化18]



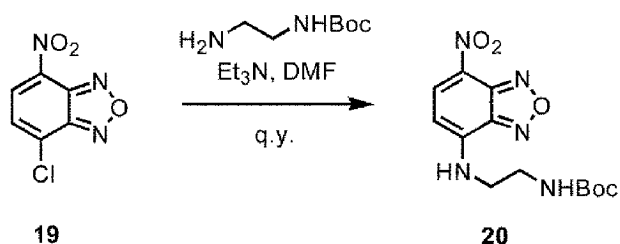
[0071] 17) 中間体20の合成

Ar 雰囲気下、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD-Cl : 19) (99.4 mg、0.5 mmol) を無水DMF (3 mL) に溶解し、トリエチルアミン (69 μL 、0.5 mmol)、N-(tert-ブトキシカルボニル)-1,2-ジアミノエタン (87 μL 、0.6 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。TLC (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 1) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を水 (50 mL)、飽和食塩水 (

50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、茶緑色油状の中間体 20 (171 mg、q. y.) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.51(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.70(br s, 1H), 6.17(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.08(br s, 1H), 3.61(br s, 4H), 1.47(s, 9H)。

[0072] [化19]

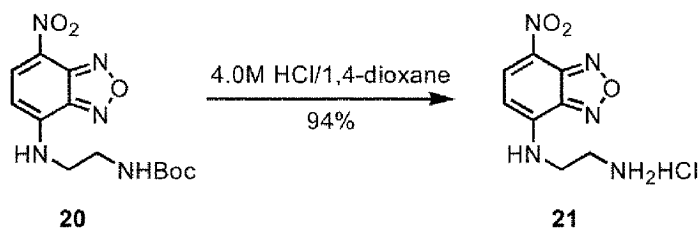


[0073] 18) 中間体 21 の合成

Ar 雰囲気下、中間体 20 (90 mg、0.28 mmol) を 4.0 規定塩化水素 1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に溶解し、遮光し、5.5 時間攪拌した。TLC プレート (塩化メチレン : メタノール = 29 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、赤褐色固体の中間体 21 (68 mg、94%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.56(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 6.46(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 3.87(t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.34(br s, 2H)。

[0074] [化20]



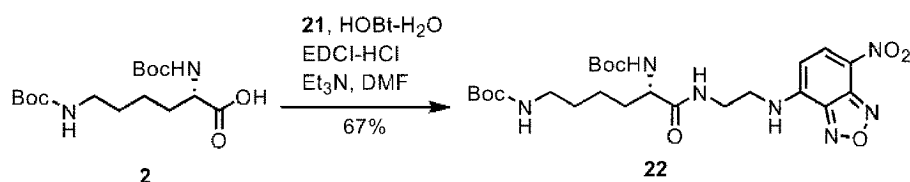
[0075] 19) 中間体 22 (K ϵ 1-Boc) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 2 (100 mg、0.3 mmol) を無水 DMF に溶解し、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (55 mg、0

、36 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(69 mg、0.36 mmol)、中間体21(78 mg、0.30 mmol)の順に加え、遮光し、室温に戻し2時間攪拌した。TLC(塩化メチレン:メタノール=9:1)で反応終了を確認し、反応液を0.5M塩酸水溶液(40 mL)にあげ、酢酸エチル(3×40 mL)で抽出し、有機層を水(2×40 mL)、飽和食塩水(40 mL)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:酢酸エチル=1:1→1:5)を行い、黄色固体の中間体22(110 mg、67%)を得た。

¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ: 6.43(d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.90(br s, 1H), 3.66(br s, 2H), 3.55(br s, 2H), 2.97(t, J = 5.5 Hz, 2H), 1.63(br s, 1H), 3.66(br s, J = 2.0 Hz, 18H).

[0076] [化21]



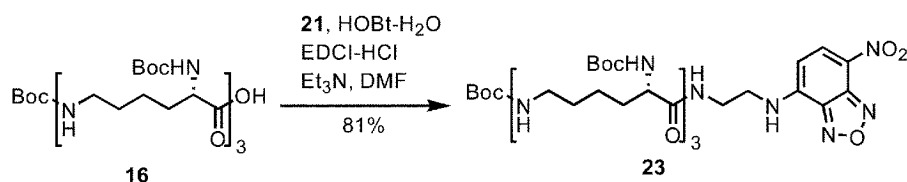
[0077] 20) 中間体23 (Kε3-Boc)の合成

Ar雰囲気下、中間体16(73.9 mg、0.092 mmol)を無水DMFに溶解し、トリエチルアミン(26 μL、0.184 mmol)を加え、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物(16.8 mg、0.110 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(21.1 mg、0.110 mmol)、中間体21(23.9 mg、0.092 mmol)の順に加え、遮光し、室温に戻し20時間攪拌した。TLC(塩化メチレン:メタノール=9:1)で反応終了を確認し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(30 mL)にあげ、酢酸エチル(3×30 mL)で抽出し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液(50 mL)、飽和食塩水(50 mL)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し

た。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（塩化メチレン：n-ヘキサン：酢酸エチル：メタノール = 9 : 5 : 4 : 1）を行い、橙色泡状固体の中間体 23（74.8 mg、81%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.51(d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.12(br s, 1H), 7.66(br s, 1H), 6.65(br s, 1H), 6.44(br s, 1H), 6.21(d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 5.60(br s, 1H), 5.48(br s, 2H), 4.75(br s, 1H), 4.00(br s, 2H), 3.67(br s, 3H), 3.26(br s, 1H), 1.82(br s, 3H), 1.43(s, 36H)。

[0078] [化22]



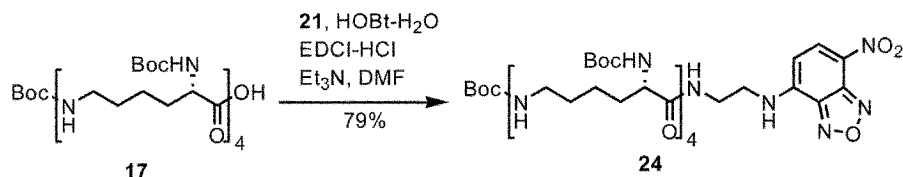
[0079] 21) 中間体 24 (K ϵ -4-Boc) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 17（119 mg、0.12 mmol）、中間体 21（31 mg、0.12 mmol）を無水 DMF（3 mL）に溶解し、トリエチルアミン（33 μL 、0.24 mmol）を加え、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（21 mg、0.14 mmol）、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（27 mg、0.14 mmol）の順に加え、遮光し、室温に戻し 8 時間攪拌した。TLC（塩化メチレン：メタノール = 19 : 1）で反応終了を確認し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL）にあげ、酢酸エチル（3 \times 50 mL）で抽出し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液（50 mL）、水（50 mL）、飽和食塩水（50 mL）で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール = 29 : 1 \rightarrow 9 : 1）を行い、橙色泡状固体の中間体 24（113.4 mg、79%）を得た。

$R_f = 0.55$ (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.49(d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.13(br s, 1H), 6.90(br s, 1H), 6.49(br s, 1H), 6.19(d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.78(br s, 1H), 5.41(br s, 1H), 4.76(br s, 1H),

4.23-4.02(m, 1H), 3.67(br s, 3H), 3.48(br s, 3H), 3.10(br s, 3H), 1.79(q, J = 12.5 Hz, 45H), 1.71-1.17 (m, 32H), 1.41(br s, 2H) ; $[\alpha]_D^{+14}$.4° (c = 1.0083, MeOH)。

[0080] [化23]



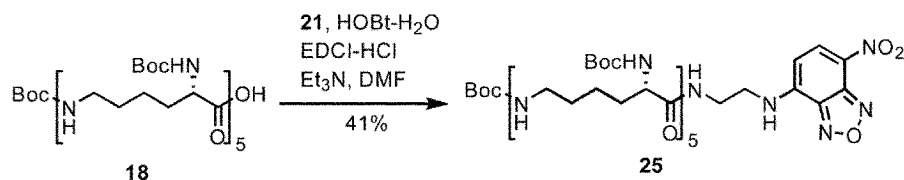
[0081] 2 2) 中間体 2 5 (K ε 5-Boc) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 1 8 (1 6 8 m g、0. 1 3 m m o l)、中間体 2 1 (3 4. 6 m g、0. 1 3 m m o l) を無水 DMF (3 m L) に溶解し、トリエチルアミン (3 6 μ L、0. 2 6 m m o l) を加え、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (2 4. 5 m g、0. 1 6 m m o l)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (3 0. 7 m g、0. 1 6 m m o l) の順に加え、遮光し、室温に戻し 1 7. 5 時間攪拌した。T L C (塩化メチレン：メタノール = 1 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 0 m L) にあけ、酢酸エチル (3 × 5 0 m L) で抽出し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液 (5 0 m L)、水 (5 0 m L)、飽和食塩水 (5 0 m L) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン：メタノール = 2 9 : 1 → 9 : 1) を行い、橙色泡状固体の中間体 2 5 (7 7. 4 m g、4 1 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.49(d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.22(br s, 1H), 6.19(d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.81(br s, 1H), 4.05(br s, 5H), 3.68(br s, 4H), 3.49(br s, 4H), 3.10(br s, 6H), 1.83-1.11(m, 28H), 1.42(t, J = 5.0 Hz, 54H); $[\alpha]_D^{+21.7}$ ° (c = 1.0108, MeOH)。

[0082]

[化24]

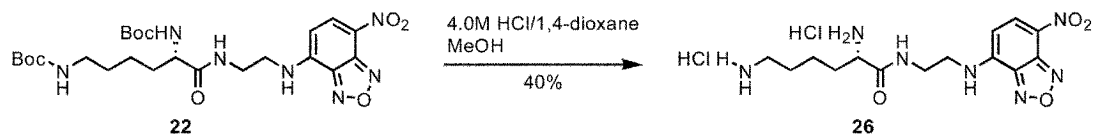


[0083] 2 3) 目的化合物 2 6 (K ε 1-NBD) の合成

A r 雰囲気下、中間体 2 2 (83 mg、0.15 mmol) を無水メタノール (2 mL)、4.0 規定塩酸 1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に溶解し、遮光し、2 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン：メタノール = 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、赤色固体の目的化合物 2 6 (K ε 1-NBD) (25 mg、40%) を得た。

m.p. 151.4–153.9°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.55(d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.49(d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.87(t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.68–3.58(m, 4H), 2.91(t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.89–1.78(m, 2H), 1.71–1.61(m, 2H), 1.50–1.41(m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 170.7, 146.5, 145.8, 145.3, 138.4, 123.3, 100.3, 54.3, 52.1, 40.3, 39.0, 32.0, 28.0, 23.0; $\text{Abs}_{\text{max}}/\text{Em}_{\text{max}}$ (PBS): 475 nm/539 nm; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +21.1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ ($c = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ in MeOH); Elemental Anal. calcd (%) for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O} \cdot 1/2\text{CH}_3\text{OH}$: C 38.76, H 5.83, N 21.82, found: C 38.46, H 5.50, N 21.59; MALDI-TOFMS m/z : 352 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0084] [化25]



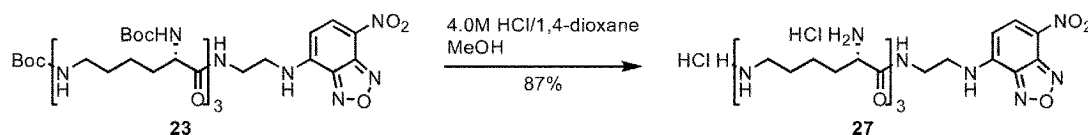
[0085] 2 4) 目的化合物 2 7 (化合物 A) (K ε 3-NBD) の合成

A r 雰囲気下、中間体 2 3 (71.5 mg、0.071 mmol) を無水メタノール (1 mL)、4.0 規定塩酸 1,4-ジオキサン溶液 (1 mL) に溶解し、遮光し、5.5 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン：メタノール

ル = 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、橙色固体の目的化合物 27 (化合物 A) (K ϵ -3-NBD) (46.3 mg、87%) を得た。

Mp 183.3–184.7°C; ¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ : 8.56(d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.51(d, 1H, J = 9.0 Hz), 3.94–3.77(m, 6H), 3.54–3.49(m, 2H), 3.24–3.10(m, 3H), 2.97(t, 2H, J = 7.75 Hz), 1.96–1.81(m, 5H), 1.76–1.68(m, 4H), 1.65–1.60(m, 2H), 1.55–1.38(m, 9H)。MALDI-TOF/MS; 608.319 [M+H] (化合物 27 : C₂₆H₄₅N₁₁O₆ = 607.36)

[0086] [化26]

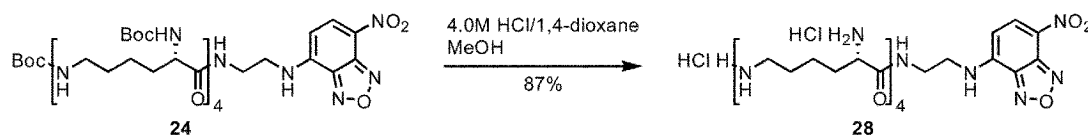


[0087] 25) 目的化合物 28 (K ϵ -4-NBD) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 24 (102.8 mg、0.083 mmol) を無水メタノール (2 mL)、4.0規定塩酸 1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に溶解し、遮光し、2時間攪拌した。TLC (塩化メチレン : メタノール = 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、橙色固体の目的化合物 28 (K ϵ -4-NBD) (66.2 mg、87%) を得た。

¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ : 8.56(d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.50(d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87–3.78(m, 7H), 3.55–3.52(m, 1H), 3.21–3.10(m, 5H), 2.96(t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.94–1.37(m, 26H); Abs_{max}/Em_{max}(PBS): 476 nm/540 nm; Anal. calcd for C₃₂H₆₂Cl₅N₁₃O₇ · 3H₂O: C 39.53, H 7.05, N 18.73, found: C 39.57, H 6.82, N 18.58。

[0088] [化27]

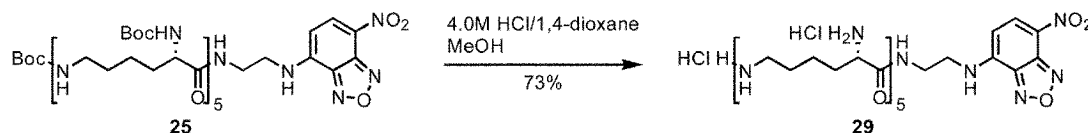


[0089] 26) 目的化合物 29 (Kε5-NBD) の合成

A r 雰囲気下、中間体 25 (76.4 mg、0.052 mmol) を無水メタノール (2 mL)、4.0 規定塩酸 1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に溶解し、遮光し、1 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン:メタノール = 9:1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、橙色固体の目的化合物 29 (Kε5-NBD) (41.4 mg、73%) を得た。

¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ : 8.56(d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.51(d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.00–3.68 (m, 8H), 3.57–3.48(m, 1H), 3.34–3.07(m, 7H), 2.97(t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.92–1.82(m, 8H), 1.79–1.68(m, 4H), 1.61(t, J = 6.5 Hz, 7H), 1.46(br s, 12H); Abs_{max}/Em_{max}(PBS): 476 nm/539 nm; Anal. calcd for C₃₈H₆₉N₁₅O₈ · 4H₂O · CH₃OH: C 39.46, H 7.39, N 17.70, found: C 39.44, H 7.00, N 17.55。

[0090] [化28]



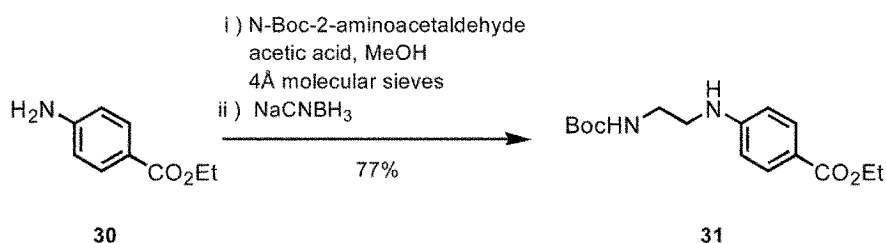
[0091] 27) 中間体 31 の合成

無水メタノール (60 mL) に、活性化したモレキュラーシーブス 4A と 4-アミノ安息香酸エチル (30) (1.7 g、10 mmol)、酢酸 (0.63 mL、11 mmol)、N-tert-ブトキシカルボニル-2-アミノアセトアルデヒド (1.9 g、12 mmol) を加え、A r 雰囲気下室温で 29 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル:n-ヘキサン:塩化メチレン = 1:2:3) で反応終了を確認した後、シアノ水素化ほう素ナトリウム (0.6 g、10 mmol) を加え、室温で 14 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル:n-ヘキサン:塩化メチレン = 1:2:3) で反応終了を確認後、反応液に水 (10 mL) を加え、酢酸エチルでセライト濾過し、濾液を 2 規定塩酸水溶液 (50 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)、

飽和食塩水（100 mL）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：n-ヘキサン：塩化メチレン = 1：5：4）を行い、白色固体の中間体 31（2.38 g、77%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.88(d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 6.56(d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 4.81(s, 1H), 4.68(s, 1H), 4.32(q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.40(t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.31(br s, 2H), 1.46(s, 9H), 1.36(t, 3H, $J = 7.0$ Hz)。

[0092] [化29]



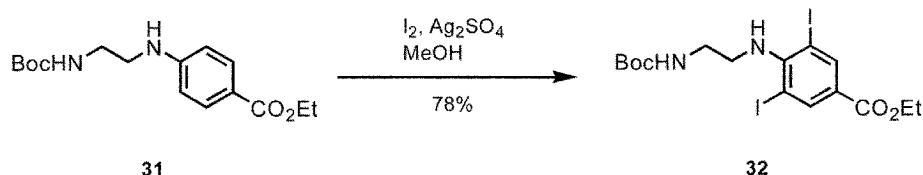
[0093] 28) 中間体 32 の合成

中間体 31（806 mg、2.6 mmol）、ヨウ素（1.32 g、5.2 mmol）、硫酸銀（1.78 g、5.7 mmol）を無水メタノール（10 mL）に溶解し、遮光、Ar 雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。TLC（酢酸エチル：n-ヘキサン = 1：3）で反応終了を確認した後、反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルでセライト濾過した。濾液を水（50 mL）にあけ、酢酸エチル（3×50 mL）で抽出し、有機層を水（50 mL）、飽和食塩水（50 mL）で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：n-ヘキサン = 1：7）を行い、白色固体の中間体 32（1.14 g、78%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.41(s, 2H), 4.84(br s, 1H), 4.35(q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.07(br s, 1H), 3.41(br s, 4H), 1.45(s, 9H), 1.38(t, 3H, $J = 7.1$ Hz)。

[0094]

[化30]

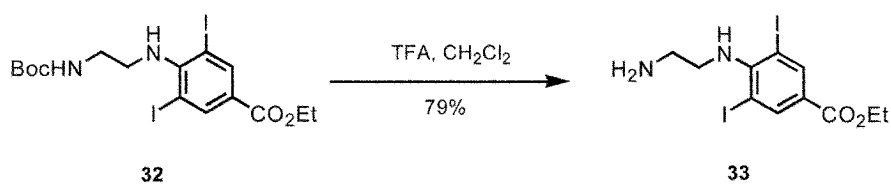


[0095] 29) 中間体33の合成

中間体32 (562 mg、1.0 mmol) を無水塩化メチレン (5 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (2 mL) を加え、遮光、室温下1.5時間攪拌した。TLC (酢酸エチル：n-ヘキサン = 1 : 1) で反応終了を確認し、反応液を水 (10 mL) にあけ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) を加え、酢酸エチル (3 × 50 mL) で抽出し、有機層を水 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、黄色粘性の中間体33 (364 mg、79%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.41 (s, 2H), 4.35 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.40 (br s, 2H), 3.04 (br s, 2H), 2.05 (br s, 2H), 1.38 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz)。

[0096] [化31]

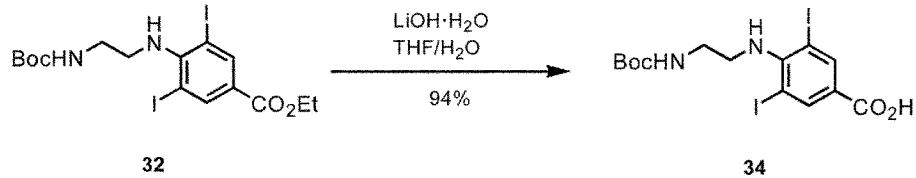


[0097] 30) 中間体34の合成

中間体32 (560 mg、1.0 mmol) をTHF (3.0 mL)、水 (1.0 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (62.9 mg、1.5 mmol) を加え、40°Cで13時間攪拌した。TLC (酢酸エチル：n-ヘキサン = 1 : 3) で反応終了を確認し、反応液に0.1規定塩酸水溶液 (20 mL) を加え、析出した固体をろ取し、水で洗浄し、白色固体の中間体34 (498 mg、94%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.38(s, 2H), 6.72(br s, 1H), 3.41(t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 1.43(s, 9H)。

[0098] [化32]

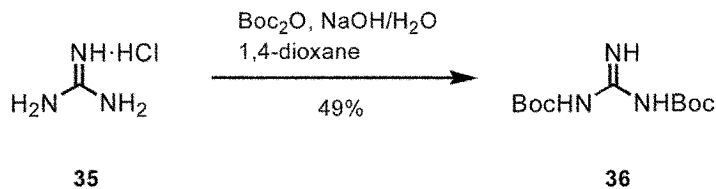


[0099] 3 1) 中間体 3 6 の合成

グアニジン塩酸塩(35)(1.45g、15mmol)を無水1,4-ジオキサン(25mL)に溶解し、氷冷下、4.5規定水酸化ナトリウム水溶液(12.5mL)を滴下した後、二炭酸ジ-tert-ブチル(7.2mL、32mmol)を滴下し、24時間攪拌した。TLC(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:4)で反応終了を確認し、反応液を水(50mL)にあけ、酢酸エチル(3×70mL)で抽出し、有機層を水(2×50mL)、飽和食塩水(2×50mL)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン:塩化メチレン=1:6:1)を行い、白色固体の中間体36(1.93g、49%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.45(br s, 1H), 8.48(br s, 2H), 1.40(s, 18H)。

[0100] [化33]



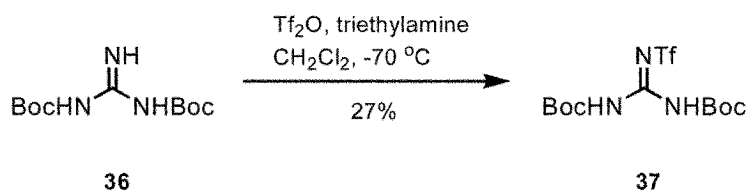
[0101] 3 2) 中間体 3 7 の合成

中間体36(1.93g、7.4mmol)、トリエチルアミン(2.1mL、14.8mmol)をAr雰囲気下、無水塩化メチレン(15mL)に溶かし、 -78°C に冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸無水物(1.

9 mL、11.6 mmol) を10分かけて滴下し、室温にて20時間攪拌した。TLC (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 4) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (100 mL) にあけ、塩化メチレン (3 × 50 mL) で抽出し、有機層を水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 10) を行い、白色固体の中間体37 (786 mg、27%) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.09 (br s, 2H), 1.45 (s, 18H)。

[0102] [化34]



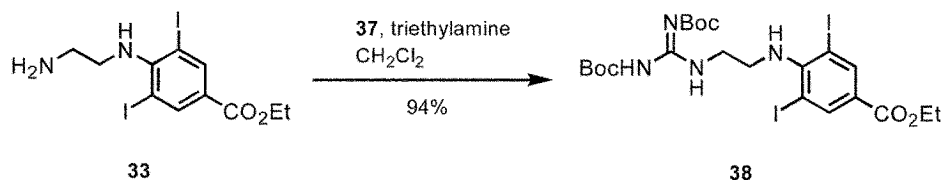
[0103] 33) 中間体38の合成

Ar雰囲気下、中間体37 (364 mg、0.8 mmol)、中間体33 (318 mg、0.8 mmol) を無水塩化メチレン (5 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.44 mL、3.2 mmol) を加え、室温で16.5時間攪拌した。TLCプレート (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 2) で反応終了を確認し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を水 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン : 塩化メチレン = 2 : 75 : 50) を行い、白色泡状固体の中間体38 (524 mg、94%) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 11.49 (s, 1H), 8.63 (br s, 1H), 8.41 (s, 2H), 4.34 (q, 2H, J = 7.25 Hz), 3.72 (q, 2H, J = 5.75 Hz), 3.54 (q, 2H, J = 5.75 Hz), 1.51 (s, 9H), 1.49 (s, 9H), 1.38 (t, 3H, J = 7.25 Hz)。

[0104]

[化35]

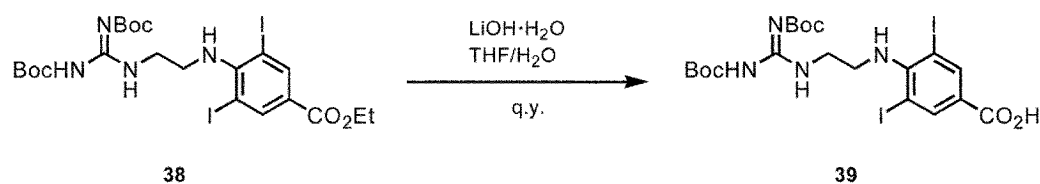


[0105] 34) 中間体39の合成

中間体38 (518 mg、0.7 mmol) を THF (6.0 mL)、水 (2.0 mL) に溶解し、水酸化リチウム一水和物 (111 mg、2.6 mmol) を加え、40°C で23時間攪拌した。TLC (酢酸エチル：n-ヘキサン = 1:2) で反応終了を確認し、反応液を0.1規定塩酸水溶液 (20 mL) にあけ、酢酸エチル (3×50 mL) で抽出し、有機層を水 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、白色泡状固体の中間体39 (503 mg、q. y.) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 11.49 (br s, 1H), 8.62 (br s, 1H), 8.45 (s, 2H), 3.72 (q, 2H, $J = 5.75$ Hz), 3.60 (t, 2H, $J = 5.75$ Hz), 1.51 (s, 9H), 1.49 (s, 9H)。 FAB-MS m/e : 675 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0106] [化36]



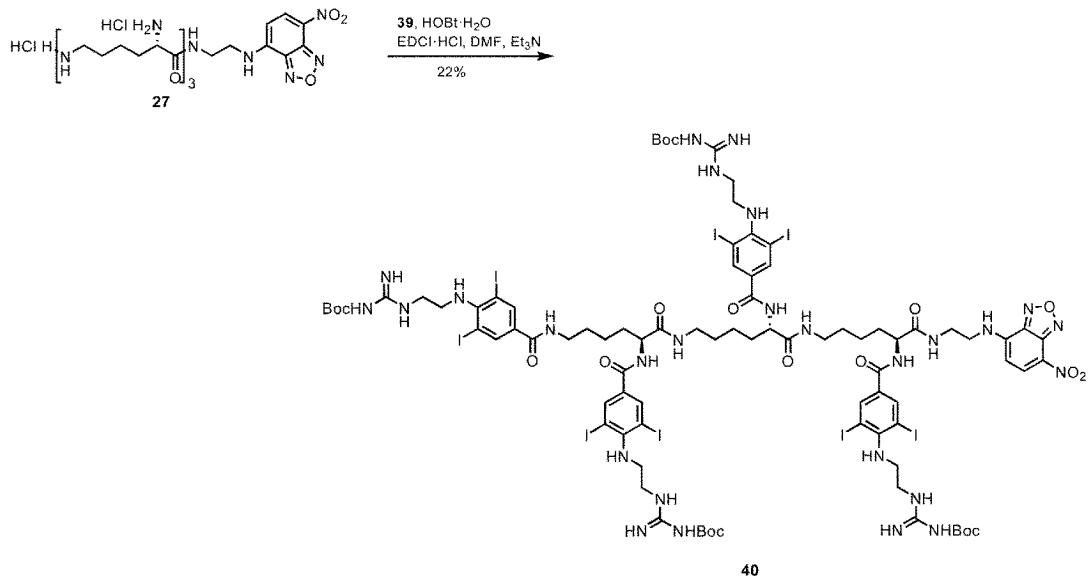
[0107] 35) 中間体40の合成

Ar雰囲気下、遮光し、化合物27 (化合物A) (17.4 mg、0.023 mmol)、中間体39 (74.5 mg、0.110 mmol) を無水DMF (3 mL) に溶解し、トリエチルアミン (29 μL 、0.207 mmol) を加え、氷冷下、HOBt \cdot H_2O (18.3 mg、0.119 mmol)、EDCI \cdot HCl (22.3 mg、0.116 mmol) の順に加え、室温に戻し27.5時間攪拌した。TLCプレート (酢酸エチル：塩化メ

チレン = 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を水 (20 mL) にあけ、塩化メチレン (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 9 : 1) を行い、褐色粘性の中間体 40 (16.3 mg、22%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 11.50 (s, 4H), 8.46 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.26 (s, 2H), 8.21 (s, 4H), 8.15 (s, 2H), 6.11 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 4.53 (br s, 3H), 3.99 (br s, 3H), 3.67–3.63 (m, 7H), 3.44 (br s, 10H), 1.49 (s, 80H)。

[0108] [化37]



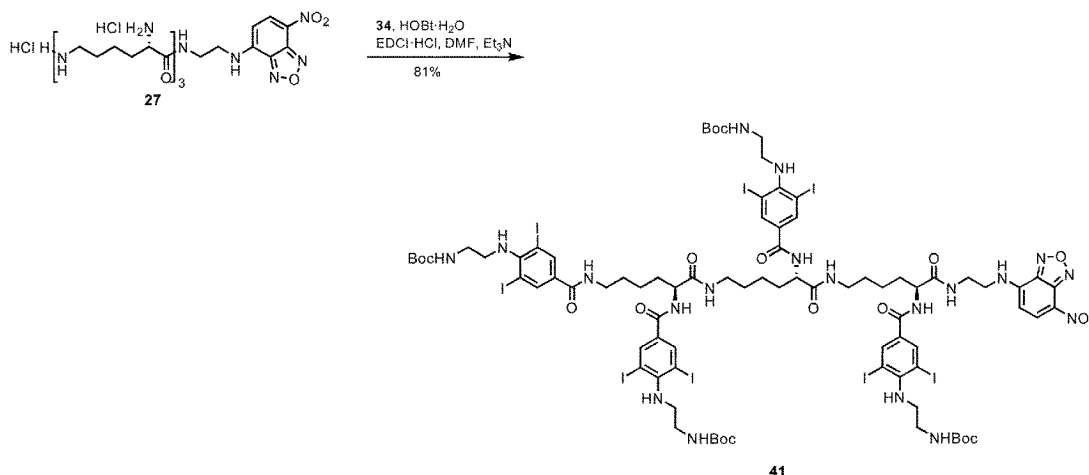
[0109] 36) 中間体 41 の合成

Ar 雰囲気下、遮光し、化合物 27 (化合物 A) (13.0 mg、0.017 mmol)、中間体 34 (51.0 mg、0.096 mmol) を無水 DMF (3 mL) に溶解し、トリエチルアミン (21 μL 、0.153 mmol) を加え、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物 (13.5 mg、0.088 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (16.3 mg、0.085 mmol) の順に加え、室温に戻し 20 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン : メタノール = 9

: 1) で反応終了を確認し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL) にあけ、酢酸エチル (3 × 30 mL) で抽出し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : n-ヘキサン : 酢酸エチル : メタノール = 9 : 5 : 4 : 1) を行い、橙色泡状固体の中間体 41 (74.8 mg、81%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.42(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.42–8.20(m, 8H), 8.16(br s, 1H), 8.10(br s, 1H), 6.71(br s, 3H), 6.33(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 4.43–4.35(m, 3H), 3.63(br s, 3H), 3.56–3.53(m, 3H), 1.78(br s, 6H), 1.43(s, 36H)。

[0110] [化38]

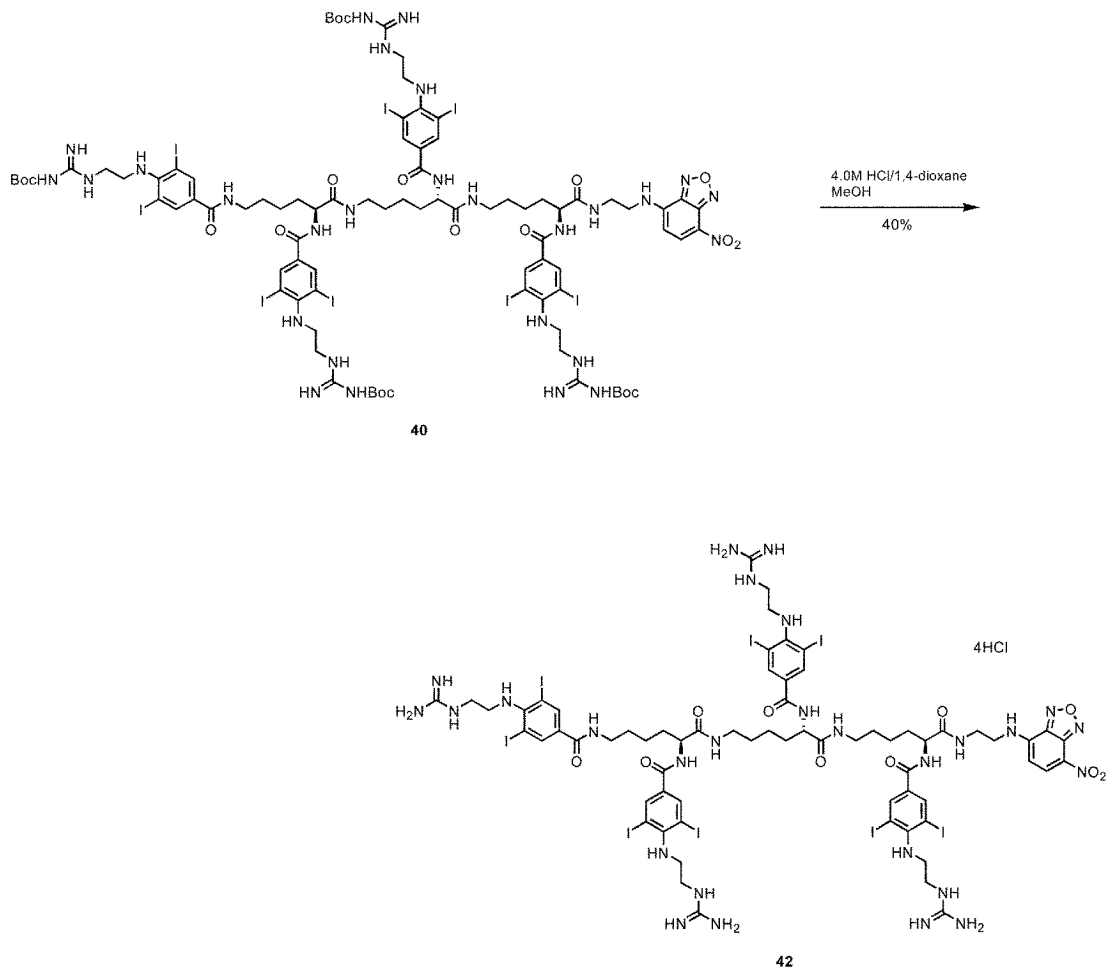


[0111] 37) 目的化合物 42 (化合物 B) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 40 (15.7 mg、4.1 μmol) を無水メタノール (0.5 mL)、無水塩化メチレン (0.5 mL)、4.0 規定塩酸 1,4-ジオキサン (1.0 mL) に溶解し、遮光し、11.5 時間攪拌した。TLC プレート (塩化メチレン : メタノール = 9 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、橙色固体の目的化合物 42 (化合物 B) (4.2 mg、40%) を得た。

Mp 189.4–191.5°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.53–8.47(m, 6H), 8.36–8.31(m, 7H), 8.25–8.13(m, 10H), 6.33(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 4.36(br s, 3 H), 3.66–3.62(m, 4H), 3.48–3.40(m, 25H), 1.85–1.76(m, 9H), 1.65–1.43(m, 21H); MALDI-TOF/MS m/e :2431.913[M+H] (化合物 4 2 : $\text{C}_{66}\text{H}_{85}\text{I}_8\text{N}_{27}\text{O}_{10}$ =2430.93)

[0112] [化39]



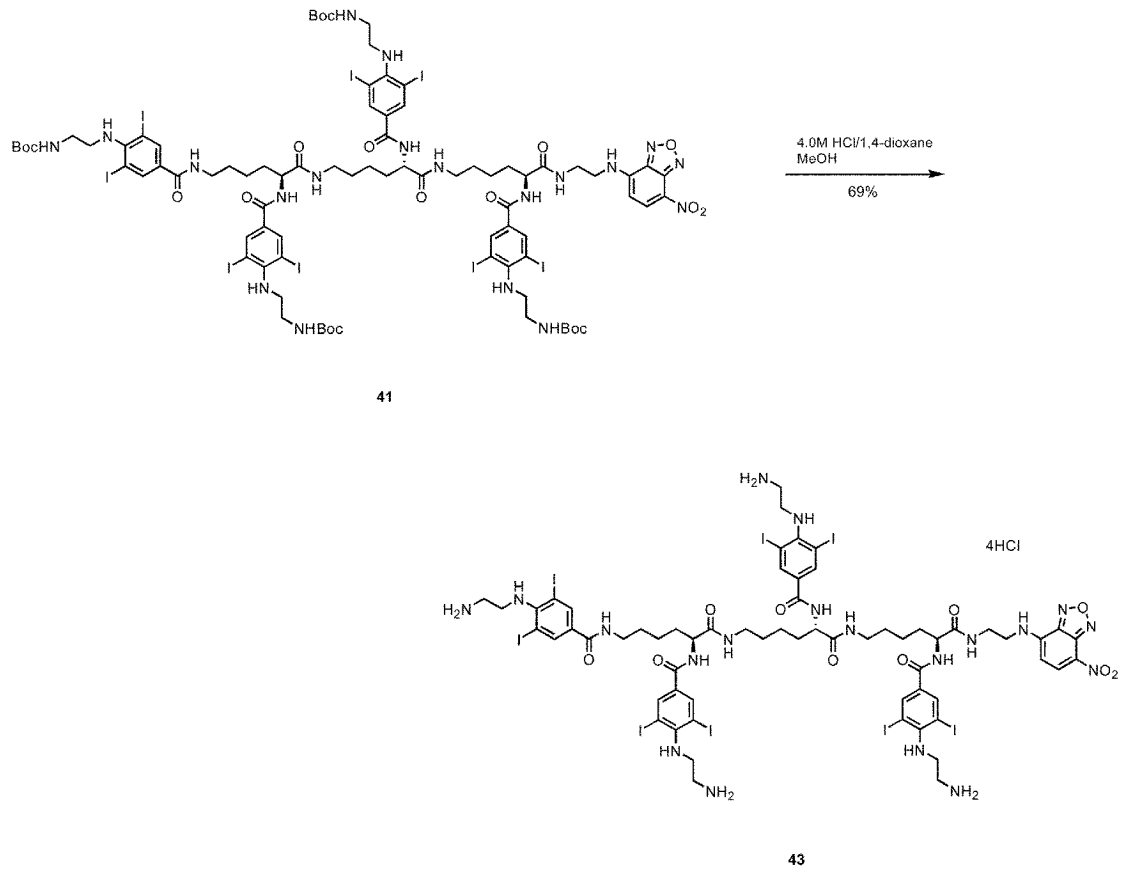
[0113] 38) 化合物 4 3 (化合物 C) の合成

Ar 雰囲気下、中間体 4 1 (3.9 mg、1.5 μmol) を無水メタノール (0.5 mL)、4.0 規定塩酸 1,4-ジオキサン溶液 (0.5 mL) に溶解し、遮光し、10.5 時間攪拌した。TLC プレート (塩化メチレン : メタノール = 19 : 1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、橙色固体の化合物

43 (化合物C) (2.5 mg, 69%) を得た。

Mp 192.9–195.7°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.43–8.23(m, 9H), 6.33(d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 4.38(br s, 4H), 3.66(br s, 7H), 1.79(br s, 8H), 1.49(br s, 18H); MALDI-TOF/MS; 2301.939 [M+HCl+H] (化合物43: $\text{C}_{62}\text{H}_{77}\text{I}_8\text{N}_{19}\text{O}_{10}$ = 2262.85)

[0114] [化40]



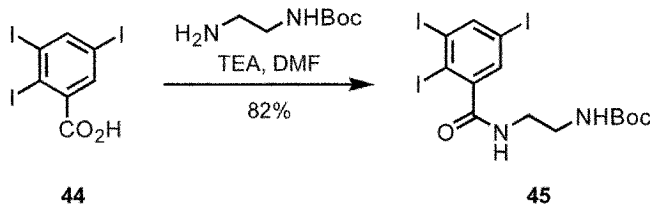
[0115] 39) 中間体45の合成

Ar雰囲気下、2, 3, 5-トリイodob安息香酸(44) (100 mg, 0.2 mmol)、N-(tert-ブトキシカルボニル)-1, 2-ジアミノエタン (32 μL , 0.2 mmol) を無水DMF (3 mL) に溶解し、氷冷し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物 (37 mg, 0.24 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (46 mg, 0.24 mmol) の順に加え、室温で13.5時間撹拌した。TLCプレート (n-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1) で反応終了

を確認し、反応液を水（30 mL）にあげ、酢酸エチル（3 × 30 mL）で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL）、飽和食塩水（50 mL）で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、*n*-ヘキサン/酢酸エチルで再結晶を行い、白色固体の中間体45（106 mg、82%）を得た。

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 8.22(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.53(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.50(br s, 1H), 4.91(br s, 1H), 3.53(q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.40(br s, 2H), 1.44(s, 9H).

[0116] [化41]

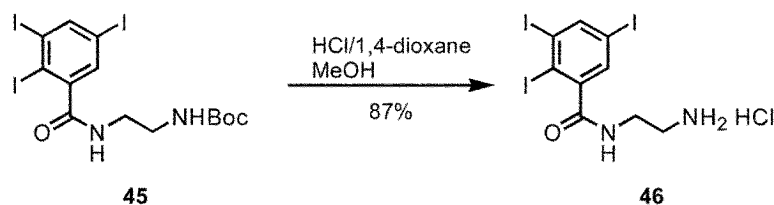


[0117] 40) 中間体46の合成

Ar雰囲気下、中間体45（415 mg、0.65 mmol）を無水メタノール（10 mL）、4.0規定塩酸1,4-ジオキサン溶液（6 mL）に溶解し、2時間攪拌した。TLC（*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1）で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、白色固体の中間体46（326.2 mg、87%）を得た。

¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ : 8.34(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.71(d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.60(t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.17 (t, J = 6.5 Hz, 2H); MALDI-TOF MS m/z: 543 [M+H]⁺.

[0118] [化42]

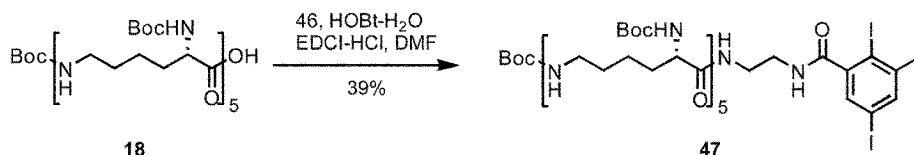


[0119] 4 1) 中間体 4 7 の合成

A r 雰囲気下、中間体 1 8 (289 mg、0.23 mmol)、中間体 4 6 (133 mg、0.23 mmol) を無水 DMF (8 mL) に溶解し、氷冷下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (43 mg、0.28 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (54 mg、0.28 mmol) の順に加え、室温に戻し 2 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン：メタノール = 9：1) で反応終了を確認し、反応液を水 (70 mL) にあけ、酢酸エチル (3×70 mL) で抽出し、有機層を水 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン：メタノール = 19：1) を行い、白色固体の中間体 4 7 (158 mg、39%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.63(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.94(br s, 5H), 3.44(br s, 3H), 3.20-3.07(m, 10H), 3.02(d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.71(br s, 5H), 1.51(d, $J = 6.5$ Hz, 21H), 1.44-1.42 (m, 54H).

[0120] [化43]

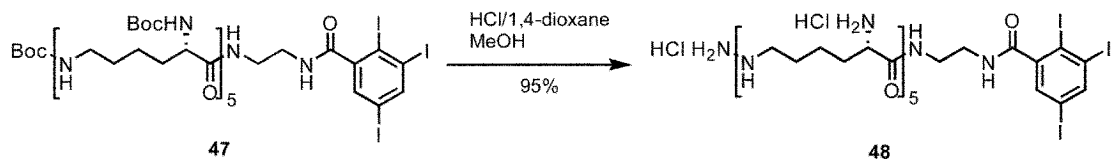
[0121] 4 2) 目的化合物 4 8 (化合物 D) (K ϵ 5-TIB) の合成

A r 雰囲気下、中間体 4 7 (100 mg、0.056 mmol) を無水メタノール (2 mL)、4.0 規定塩酸 1, 4-ジオキサン溶液 (1 mL) に溶解し、1 時間攪拌した。TLC (塩化メチレン：メタノール = 9：1) で反応終了を確認し、反応液を風乾し、減圧下で溶媒留去後、メタノール/酢酸エチルで再結晶を行い、白色固体の目的化合物 4 8 (化合物 D) (74 mg、95%) を得た。

m. p. 208.0-209.5°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.32(d, $J = 2.0$ Hz, 1

H), 7.66(d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.96–3.85(m, 5H), 3.59–3.47(m, 1H), 3.24 (br s, 6H), 2.97(t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.87(br s, 10H), 1.74(br s, 2H), 1.60(d, J = 6.5 Hz, 9H), 1.48(br s, 11H); ^{13}C -NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 171.5, 170.6, 170.2, 170.1, 148.7, 147.9, 136.3, 113.2, 107.7, 97.2, 95.0, 61.6, 54.5, 54.3, 50.0, 40.4, 40.1, 32.3, 32.2, 29.8, 28.0, 23, 4, 23.1, 20.9, 14.5.; $[\alpha]_D^{21} = +19.9 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ (c = 1.0 g cm^{-3} in MeOH); Elemental Anal. calcd (%) for $\text{C}_{39}\text{H}_{75}\text{Cl}_6\text{I}_3\text{N}_{12}\text{O}_6 \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$: C 32.79, H 5.50, N 11.77, found: C 33.01, H 5.52, N 11.41; MALDI-TOFMS m/z: 1183 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0122] [化44]



[0123] [正常マウス大腿骨遠位端の軟骨組織可視化用試薬溶液への浸漬及びex vivo 検出]

正常なC57B6/J系マウス（8週齢、雌）2匹を用意し、エーテルにて深麻酔殺後大腿骨遠位端を得、これをリジンオリゴマー誘導体の0.1 mM溶液100 μL に室温1時間浸漬した。1時間後、緩衝生理食塩水にて2回洗浄した。これを4%CMCコンパウンド内に包埋し、液体窒素とヘキサンで凍結して、硬組織切片用のタンゲステンカーバイド製ブレードTC-65（Leica製）とCryofilm（Leica製）を用いて、脱灰せずにクライオスタットで7 μm の厚さに薄切した。切片を室温に10秒置いて解凍し、100%エタノールに約30秒間浸漬し、4%パラホルムアルデヒド（PFA）内にしばらく保存した後、水道水で洗浄し、蛍光顕微鏡撮影を行った。蛍光フィルターとしては、GFPフィルターを用いた。リジンペプチドは蛍光剤NBDで標識されているので、そのシグナルが検出された。

[0124] リジンオリゴマー誘導体として以下のA～Cの3種類を用いたときの軟骨の染色像を図1に示す。このときのリジンオリゴマー誘導体溶液の溶媒は2

5%のエタノールを含有する生理食塩水であった。図1は、大腿骨遠位端膝関節の矢状断面の関節軟骨部分の拡大写真である。破線は軟骨と石灰化軟骨層との境界面であるタイドマークを示す。蛍光シグナル（カラー写真では緑色）は、軟骨層の表層からタイドマークまで認められ、リジンオリゴマー誘導体は石灰化軟骨層には結合していないことがわかる。化合物A及びBには軟骨組織の染色が認められるが、化合物Cではその染色が表面組織に限定されることが分かる。

A：化合物27

B：化合物42

C：化合物43

[0125] また、リジンオリゴマー誘導体として、以下の4種類を用いたときの軟骨の染色像を図2に示す。このときのリジンオリゴマー誘導体溶液の溶媒は生理食塩水であった。図2は、大腿骨遠位端膝関節の矢状断面の関節軟骨部分の拡大写真である。蛍光シグナルは、軟骨層の表層からタイドマークまで認められ、リジンオリゴマー誘導体は石灰化軟骨層には浸入していないことがわかる。化合物26～29のいずれにも軟骨組織の染色が認められた。しかしながら、リジン単位を1個しか含まない化合物26の染色はわずかであった。一方、リジン単位を3個含む化合物27は、十分に染色されることがわかり、リジン単位を4個又は5個含む化合物28及び29は、さらに濃く染色されることがわかった。軟骨層における白色（カラー写真では緑色）部分が化合物による染色部位である。また、円形白色部（カラー写真では青色）の一部は、ヘキストによる核染部位で、石灰化層にも見られる。

K ϵ 1-NBD：化合物26

K ϵ 3-NBD：化合物27

K ϵ 4-NBD：化合物28

K ϵ 5-NBD：化合物29

[0126] [豚膝関節軟骨のX線造影用試薬溶液への浸漬及びX線CT撮像評価]

農協にて購入した豚膝関節軟骨片を、カミソリを用いて、約1.0×0.

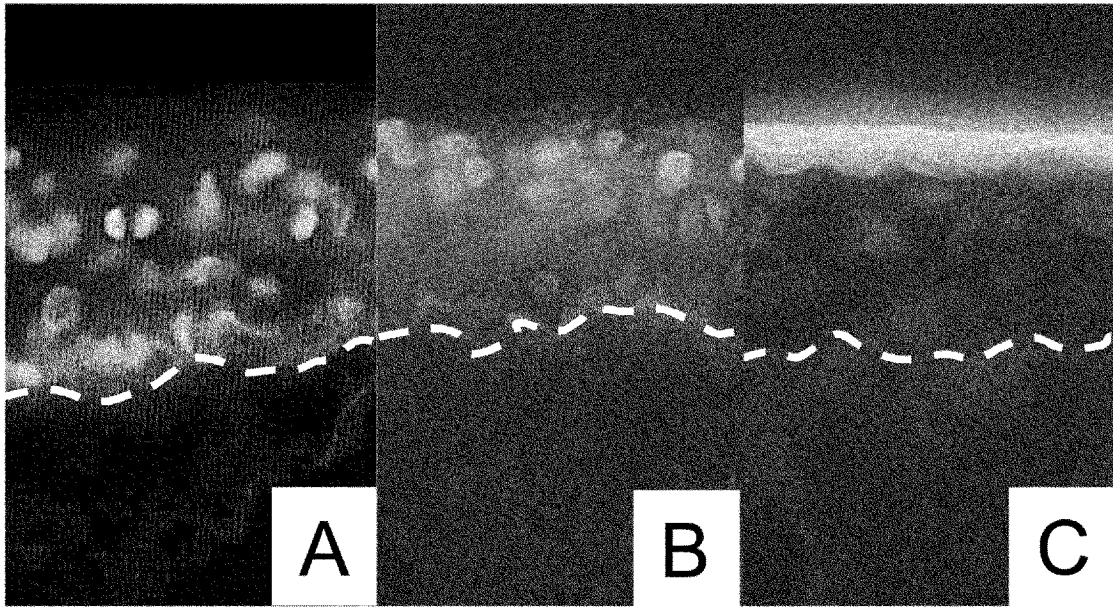
5×0.2 cmの大きさにカットした。この軟骨片を化合物D（化合物48：Kε5-TIB）の200 mMのリン酸緩衝液およびリン酸緩衝液のみに30分間浸漬した。30分後、いずれの軟骨片もリン酸緩衝液ですすぎ、洗浄した後、キムワイプで余分な水分を拭き取った。いずれの軟骨片サンプルもマイクロCT分析システム（SkyScan 1174, SkyScan, Aartseelaar, Belgium）を用いて、10.7 μm等方ボクセルにて、撮像、画像再構築を行った。その電子データを容積測定再構築ソフトウェア（NRecon, CTAn, CTvol・CTVox, SkyScan）を用いてさらに精査し、CT撮像画像を得た。

[0127] 得られたX線CT画像を図3に示す。図3中、「Kε5-TIB」が化合物48を含む水溶液に浸漬した試料であり、「PBS」がリン酸緩衝液のみに浸漬した試料である。それぞれ2個ずつあるのは、向きを変えて撮影したものである。写真中、軟骨撮像画像の網目状部分は石灰化層であり、その上部に軟骨層が位置している。PBSのみのものは軟骨層が写っていないのに対し、化合物D溶液に浸漬したものは軟骨層が白く撮像された。濃淡も十分に観察されるので、軟骨層の厚さだけでなく、その中に含まれるコンドロイチン硫酸の濃度などについても知見を得ることができる。

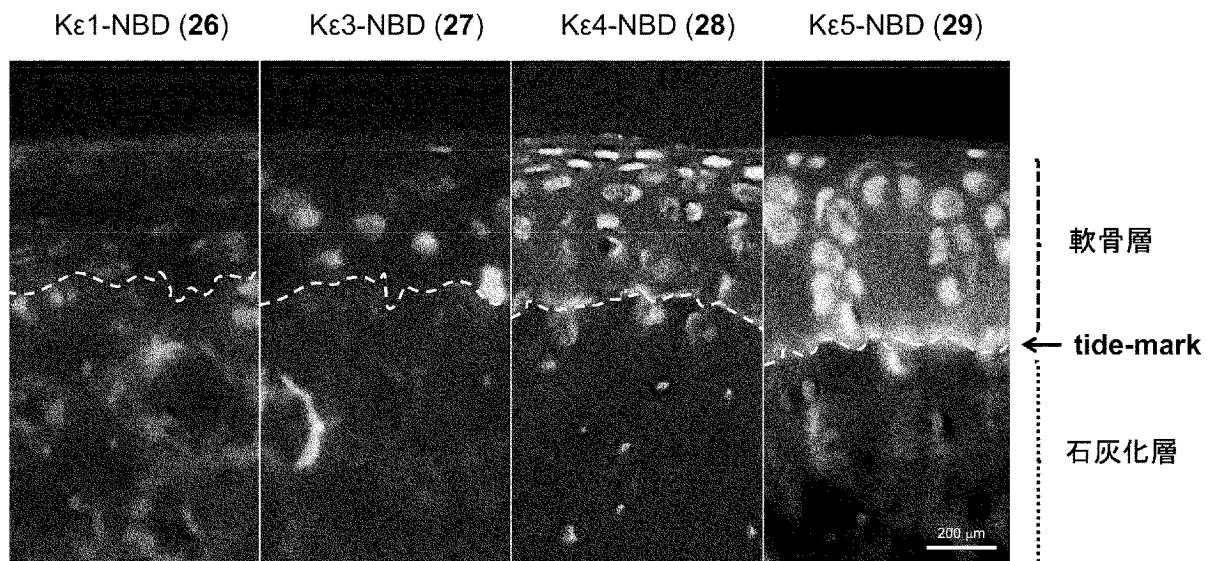
請求の範囲

- [請求項1] リジンの ε -アミノ基とカルボキシル基とがペプチド結合で連結されてなり、C末端カルボキシル基、N末端アミノ基及び／又は α -アミノ基に、電磁波を発生又は吸収し得る基が結合されてなることを特徴とする、リジンオリゴマー誘導体。
- [請求項2] 3～12個のリジンが連結されてなる請求項1に記載のリジンオリゴマー誘導体。
- [請求項3] 前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、蛍光団又はX線造影用の基である請求項1又は2に記載のリジンオリゴマー誘導体。
- [請求項4] 前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、ヨウ素原子を含むX線造影用の基である請求項3に記載のリジンオリゴマー誘導体。
- [請求項5] 請求項1に記載のリジンオリゴマー誘導体からなる軟骨組織マーカー。
- [請求項6] 3～12個のリジンが連結されてなる請求項5に記載の軟骨組織マーカー。
- [請求項7] 前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、蛍光団又はX線造影用の基である請求項5又は6に記載の軟骨組織マーカー。
- [請求項8] 前記電磁波を発生又は吸収し得る基が、ヨウ素原子を含むX線造影用の基である請求項7に記載の軟骨組織マーカー。

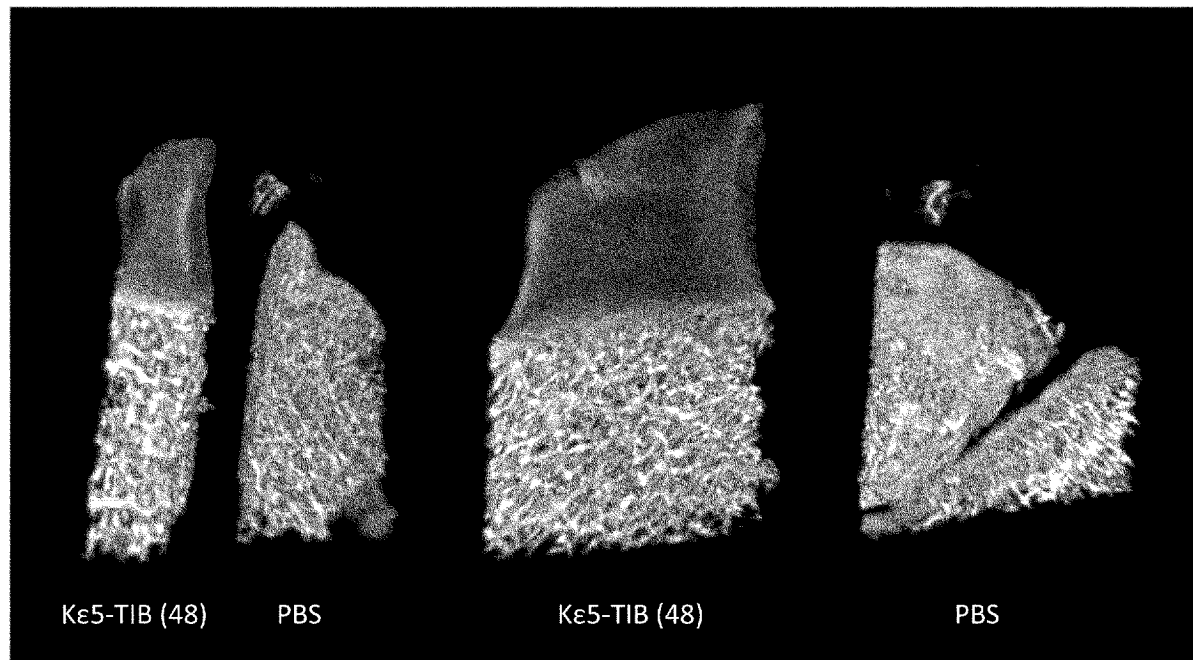
[圖1]



[圖2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K5/033(2006.01)i, A61K49/04(2006.01)i, C07K7/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K5/033, A61K49/04, C07K7/02

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-023993 A (Okayama University), 05 February 2009 (05.02.2009), entire text (Family: none)	1-8
Y	JP 2003-335857 A (Chisso Corp.), 28 November 2003 (28.11.2003), entire text (Family: none)	1-8
Y	Manabu YOSHITANI et al., "Kansetsu Nankotsu ni Tokuiteki ni Ketsugo suru X Sen Zoeika Imaging Probe no Soshutsu Kenkyu", 05 March 2012 (05. 03.2012), The Pharmaceutical Society of Japan Dai 132 Nenkaishu 2, page 271, 30P2- pm134, entire text	1-8

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May, 2013 (17.05.13)Date of mailing of the international search report
28 May, 2013 (28.05.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K5/033(2006.01)i, A61K49/04(2006.01)i, C07K7/02(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. C07K5/033, A61K49/04, C07K7/02

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 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), PubMed

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
Y	JP 2009-023993 A (国立大学法人岡山大学) 2009.02.05, 全文 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2003-335857 A (チッソ株式会社) 2003.11.28, 全文 (ファミリーなし)	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17.05.2013	国際調査報告の発送日 28.05.2013
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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B 3963

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
Y	芳谷学, et al., 関節軟骨に特異的に結合するX線造影化イメージングプローブの創出研究, 2012 Mar. 5, 日本薬学会第132年会要旨集2, p.271 30P2-pm134 全文	1-8