

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/052463

発行日 平成29年7月20日(2017.7.20)

(43) 国際公開日 平成28年4月7日(2016.4.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO8F 293/00 (2006.01)	CO8F 293/00	4 J 0 2 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

出願番号	特願2016-552038 (P2016-552038)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/077432	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(22) 国際出願日	平成27年9月29日(2015.9.29)	(72) 発明者	長崎 幸夫 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(31) 優先権主張番号	特願2014-201992 (P2014-201992)	Fターム(参考)	4J026 HA45 HB08 HB22 HB26 HB32 HB38 HB39 HB44 HB45 HB50 HE01
(32) 優先日	平成26年9月30日(2014.9.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ(エチレングリコール) - b - ポリ(ハロメチルスチレン) 並びにその誘導体及び製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ポリ(エチレングリコール) - b - ポリ(ハロメチルスチレン) の効果的な製造方法並びにその方法により製造される新規ポリ(エチレングリコール) - b - ポリ(ハロメチルスチレン) およびその誘導体の提供

【解決手段】

ポリ(エチレングリコール) の 末端に可逆的付加連鎖移動(RAFT)重合を可能にする機能性基を導入し、それとハロメチルスチレンとの共重合により、目的の新規共重合体を提供できる。

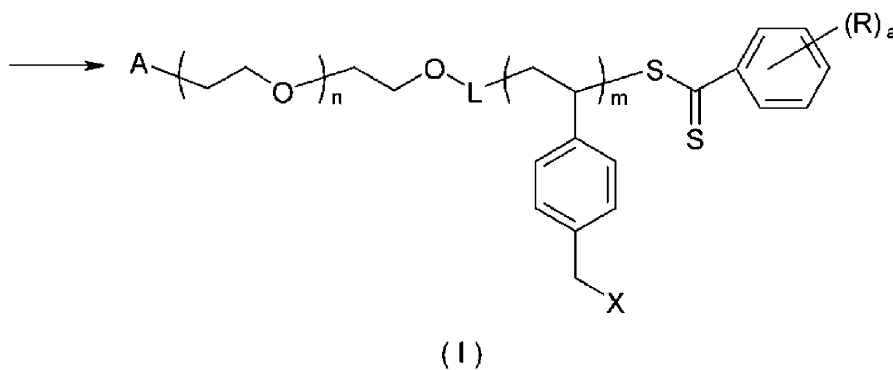
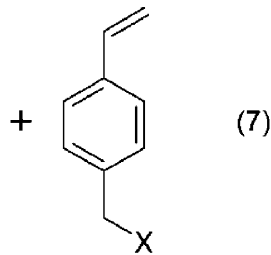
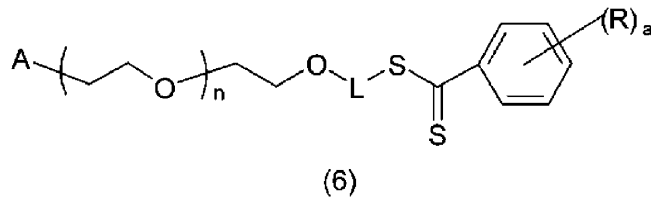
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記反応スキームに基づく式 (I) で表されるブロック共重合体または式 (I) 中の (R)_a で置換されているフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体の製造方法であって、

式 (6) で表されるポリ(エチレングリコール)誘導体及びラジカル反応開始剤を含む不活性溶媒中に式 (7) で表されるスチレン誘導体を加えて重合する工程を含んでなる、製造方法。

【化 1】



上記各式中、

A は、非置換または置換 C₁ - C₁₂アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 R₁R₂CH - 基を表し、ここで、R₁および R₂は独立して C₁ - C₄アルコキシまたは R₁と R₂は一緒になって -OCH₂CH₂O -、-O(CH₂)₃O - もしくは -O(CH₂)₄O - を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 R₃R₄B - Ph - 基を表し、ここで、R₃および R₄はヒドロキシまたは R₃と R₄は一緒になって -OC(CH₃)₂C(CH₃)₂O - を表し、Phはメチルもしくはメトキシで置換されていてもよい o - フェニレン、m - フェニレンもしくは p - フェニレンを表し、

L は、式

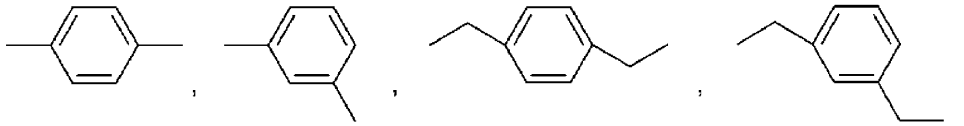
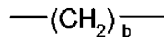
10

20

30

40

【化 2】



10

で表される基から選ばれ、 b は 2 ~ 6 の整数であり、

X は塩素、臭素又はヨウ素を表し、

R は、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、 a は 0 ~ 3 の整数であり、

m は 3 ~ 500 の整数を表し、

n は 2 ~ 10,000 の整数を表す。

【請求項 2】

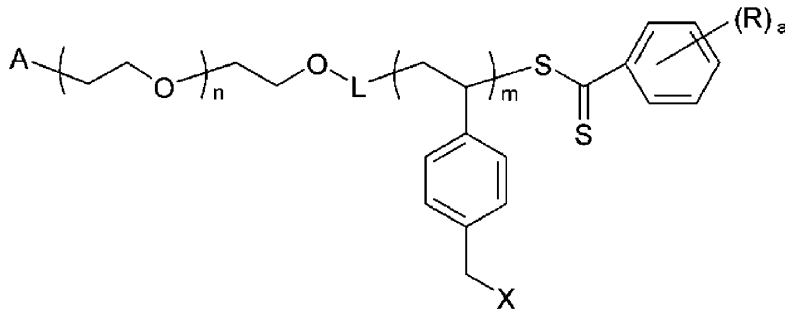
L が m -キシリレンもしくは p -キシリレンである、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

式 (I)

【化 3】

20



(I)

30

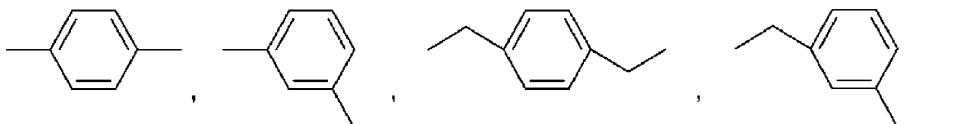
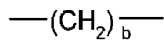
式中、

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R_1 R_2 CH -$ 基を表し、ここで、 R_1 および R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ もしくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 $R_3 R_4 B - Ph -$ 基を表し、ここで、 R_3 および R_4 はヒドロキシまたは R_3 と R_4 は一緒になって $-OC(CH_3)_2C(CH_3)_2O-$ を表し、 Ph はメチルもしくはメトキシで置換されていてもよい o -フェニレン、 m -フェニレンもしくは p -フェニレンを表し、

L は、式

40

【化 4】



で表される基から選ばれ、 b は 2 ~ 6 の整数であり、

50

Xは塩素、臭素又はヨウ素を表し、

Rは、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、aは0～3の整数であり、

mは3～500の整数を表し、

nは2～10,000の整数を表す、

で表されるブロック共重合体または式(I)中の(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体。

【請求項4】

Lがm-キシリレンもしくはp-キシリレンである、請求項3に記載のブロック共重合体。

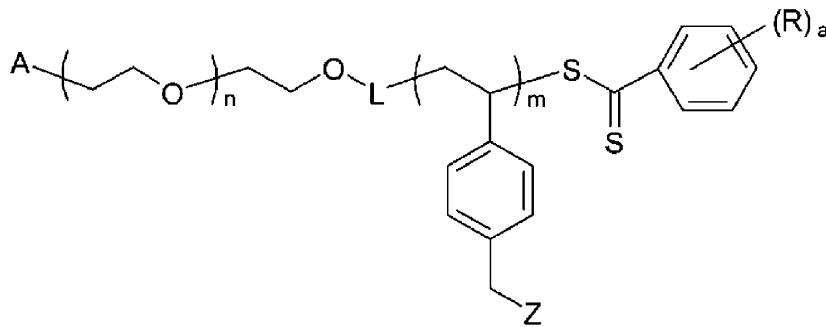
【請求項5】

式(I)の(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルがそのまま存在する、請求項3に記載のブロック共重合体。

【請求項6】

式(II)

【化5】



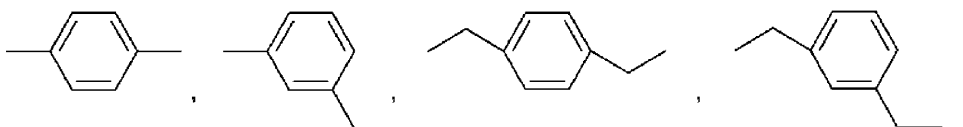
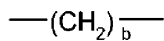
(II)

式中、

Aは、非置換または置換C₁-C₁₂アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式R₁R₂CH-基を表し、ここで、R₁およびR₂は独立してC₁-C₄アルコキシまたはR₁とR₂は一緒になって-OCH₂CH₂O-、-O(CH₂)₃O-もしくは-O(CH₂)₄O-を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式R₃R₄B-Ph-基を表し、ここで、R₃およびR₄はヒドロキシまたはR₃とR₄は一緒になって-OC(CH₃)₂C(CH₃)₂O-を表し、Phはメチルもしくはメトキシで置換されていてもよいo-フェニレン、m-フェニレンもしくはp-フェニレンを表し、

Lは、式

【化6】



で表される基から選ばれ、bは2～6の整数であり、

Rは、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、aは0～3の整数であり、

mは3～500の整数を表し、

nは2～10,000の整数を表す、

Zは-NH-または-O-を介して共有結合した式

10

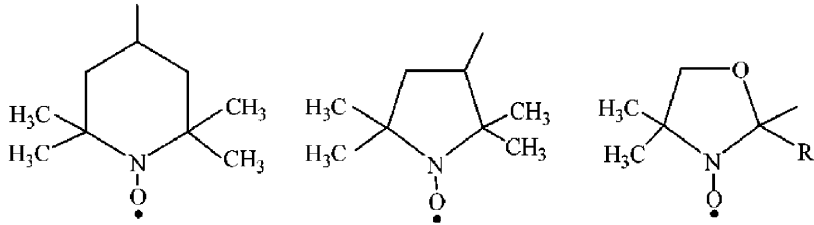
20

30

40

50

【化 7】



で表される基から選ばれるか、または

- P(=O)(OCH₂CH₃)₂もしくは - P(=O)(OH)₂を表し、
これらの基はZの総数の少なくとも60%を含み、存在する場合、残りは塩素、臭素若しくはヨウ素原子又はヒドロキシルである、

で表される共重合体または式(I I)における(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体。

【請求項 7】

Lがm-キシリレンもしくはp-キシリレンである、請求項6に記載のブロック共重合体。

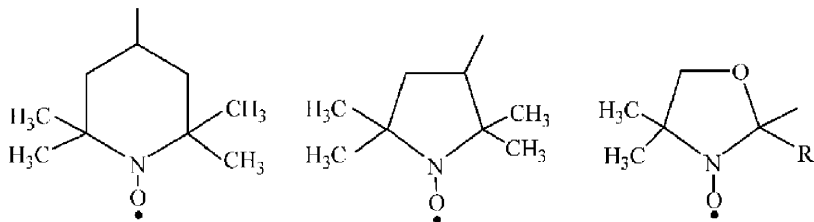
【請求項 8】

式(I)の(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルがそのまま存在する、請求項6に記載のブロック共重合体。

【請求項 9】

Zが - NH - または - O - を介して共有結合した式

【化 8】



で表される基から選ばれる、請求項6に記載のブロック共重合体。

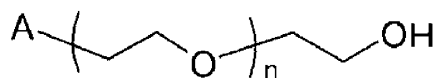
【請求項 10】

Zが - P(=O)(OCH₂CH₃)₂もしくは - P(=O)(OH)₂を表す、請求項6に記載のブロック共重合体。

【請求項 11】

式(Pre)

【化 9】



(Pre)

式中、

Aは置換C₁-C₁₂アルコキシを表し、置換基が、式R₃R₄B-Ph-基を表し、ここで、R₃およびR₄はヒドロキシまたはR₃とR₄は一緒になって - OC(CH₃)₂C(CH₃)₂O - を表し、Phはメチルもしくはメトキシで置換されていてもよいo -

10

20

30

40

50

フェニレン、m - フェニレンもしくは p - フェニレンを表し、
n は 2 ~ 10 , 000 の整数を表す、
で表されるホモポリマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

種々の生体環境下で広く使用されているポリ(エチレングリコール)(PEG)に様々な機能を付与する目的の下、PEGの末端にSH基を導入し、ラジカル連鎖移動重合により製造できるPEG-b-ポリ(クロロメチルスチレン)(PEG/PCMS)が提案されている(非特許文献1)。このブロック共重合体は、クロロメチル基を介して、アミノ基、ヒドロキシル基等を有する化合物を共有結合することができる。例えば、環状ニトロキシドラジカルを共有結合で担持させた親疎水性セグメントを含有するブロック共重合体は、水中での自己組織化によりナノ粒子を形成し、生体環境下で低分子化合物たる環状ニトロキシドラジカルを安定化でき、医療分野での利用をはじめとする多種多様な用途に向けられることが確認されている(例えば、特許文献1)。

10

【0002】

しかしながら、上記の製造方法によると、重合中に再結合が起こり、トリブロック共重合体が混入することが避けられず(例えば、特許文献1の製造例1参照)、これが血中滞留性等の性能を低下させる原因になるだけでなく、反応が煩雑でコスト高につながるという欠点があった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】再公表 JP WO 2009/133647 公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】吉富徹, 両末端に反応性官能基を有する acetal-PEG/PCMS 合成とその応用・展開, 平成19年度物質科学セミナー要旨, 2007年9月27日

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0005】

例えば、上記PEG/PCMS)から誘導された環状ニトロキシドラジカルを共有結合で担持させた親疎水性セグメントを含有するブロック共重合体であって、該ニトロキシドラジカル部分として2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルを含む共重合体は、脳、心臓、腎臓虚血後の再灌流障害、脳出血、アルツハイマー病、癌、潰瘍性大腸炎障害などの酸化ストレス性疾患に有効であることが示唆されている。そこで、かような機能を付与し得、かつ、商業的に実用化がより容易であり、大量、安定な機能性ブロック共重合体の提供に対するニーズは依然として存在する。本発明の目的は、かようなニーズに答えようとするものである。

【課題を解決するための手段】

40

【0006】

上記のPEGの末端にSH基を導入し、ラジカル連鎖移動重合によるPEG/PCMSの製造に代え、可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合を応用することで、特に医療分野での用途に適する安定、かつ、狭い分子量分布をもつ、PEGにさらなる機能を付与した共重合体を容易に製造できることを確認した。

【0007】

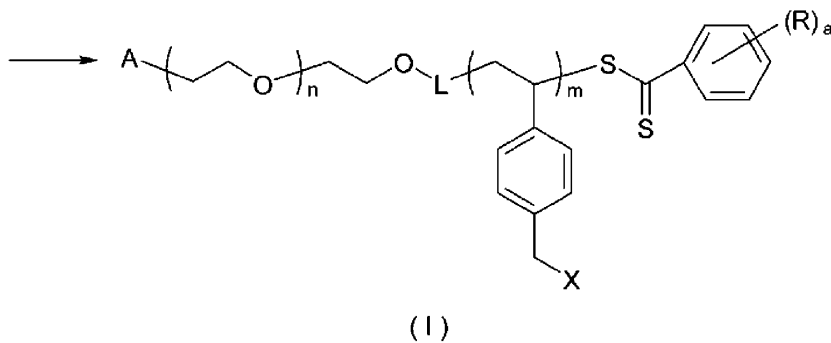
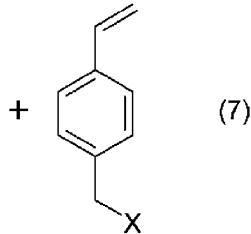
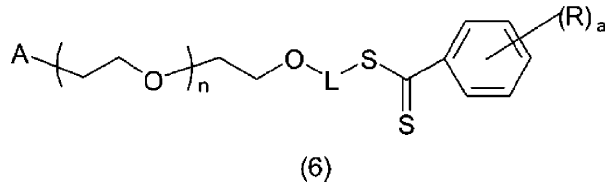
したがって、本発明によれば、下記反応スキームに基づく式(I)で表されるブロック共重合体または式(I)中の(R)_nで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体の製造方法であって、

式(6)で表されるポリ(エチレングリコール)誘导体及びラジカル反応開始剤を含む

50

不活性溶媒中に式(7)で表されるスチレン誘導体を加えて重合する工程を含んでなり、さらに必要により、接触的還元または加水分解する工程を含む、製造方法が提供される。

【化1】



10

20

【0008】

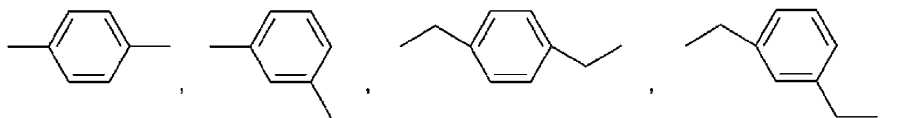
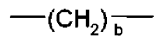
上記各式中、

Aは、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 R_1R_2CH- 基を表し、ここで、 R_1 および R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ もしくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 R_3R_4B-Ph- 基を表し、ここで、 R_3 および R_4 はヒドロキシまたは R_3 と R_4 は一緒になって $-OC(CH_3)_2C(CH_3)_2O-$ を表し、Phはメチルもしくはメトキシで置換されていてもよいo-フェニレン、m-フェニレンもしくはp-フェニレンを表し、

30

Lは、式

【化2】



40

【0009】

で表される基から選ばれ、好ましくは、最後の2つのいずれかの式で表される基が挙げられ、bは2~6の整数であり、

Xは塩素、臭素又はヨウ素を表し、

Rは、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、aは0~3の整数であり、

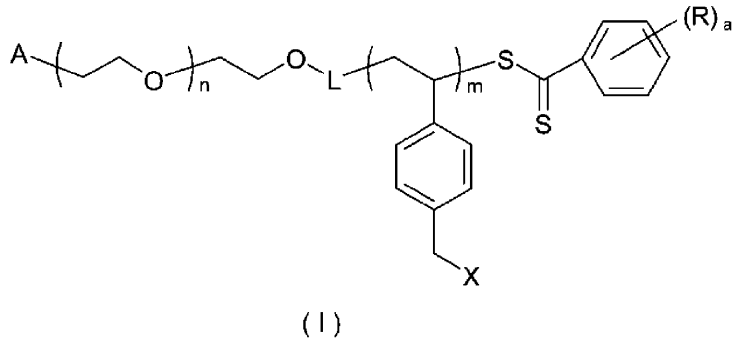
50

mは3～500の整数を表し、
nは2～10,000の整数を表す。

【0010】

また、本発明によれば、式(I)

【化3】



10

【0011】

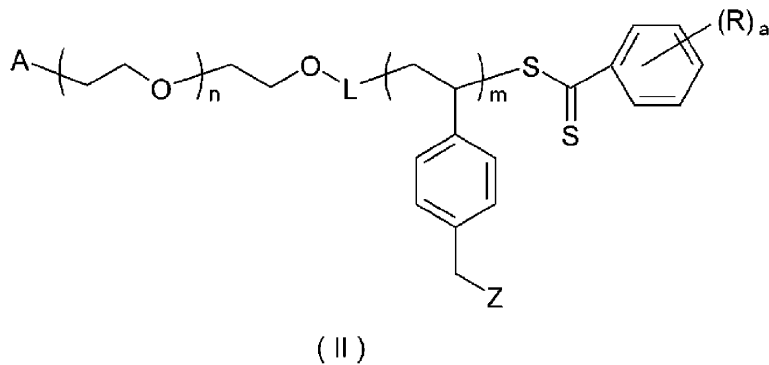
で表され、ここで、A、L、X、R、a、m及びnは上記に定義したとおりである、
のブロック共重合体または式(I)中の(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオ
カルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体も、提供される

20

【0012】

さらにまた、本発明によれば、式(II)

【化4】

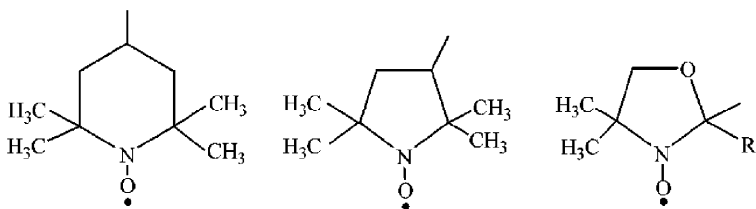


30

【0013】

で表され、ここで、A、L、R、a、mおよびnは上記に定義したとおりであり、Zは -
NH-または-O-を介して共有結合した式

【化5】



40

【0014】

で表される基から選ばれるか、または

-P(=O)(OCH₂CH₃)₂もしくは-P(=O)(OH)₂を表し、

50

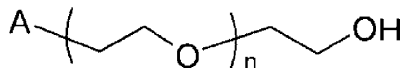
これらの基はZの総数の少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは100%含み、存在する場合、残りはハロゲン、例えば、塩素、臭素若しくはヨウ素原子又はヒドロキシルである、
で表されるか、または式(II)における(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子で置換されたブロック共重合体も、提供される。

【0015】

また、Aが置換C₁-C₁₂アルコキシを表し、置換基が、式R₃R₄B-Ph-基を表し、ここで、R₃およびR₄はヒドロキシまたはR₃とR₄は一緒になって-O-C(CH₃)₂-C(CH₃)₂-O-を表し、Phはメチルもしくはメトキシで置換されていてもよいo-フェニレン、m-フェニレンもしくはp-フェニレンを表す場合には、次式

10

【化6】



(Pre)

【0016】

で表されるホモポリマーは、本発明者等の知る限り、従来技術文献未載の式化合物であるのかような新規ポリマーも提供される。かようなホモポリマーは上記の式(I)または式(II)で表される共重合体の合成前駆体としても使用でき、また、それ自体医療品等の改質に使用できる。

20

【0017】

上記の式(I)で表されるブロック共重合体の製造方法によれば、特許文献1に記載の方法と異なり、単峰性で、分子量分布の狭いブロック共重合体が効率よく得られる。また、こうして得られる式(I)で表される該ブロック共重合体のハロゲン化メチル基のハロゲン原子は、アミノ化、ヒドロキシル化、エステル化、エーテル化等に効率よく利用できる。

【0018】

例えば、かようなアミノ化またはエーテル化により得られる式(II)で表される修飾ブロック共重合体は、特許文献1に記載されている一般式(II)で表され、かつ、製造例2に記載された「アセタール-PEG-b-PCMS-N-TEMPO」又は製造例3に記載された「メトキシ-PEG-b-PCMS-O-TEMPO」と実質的に同様の生物学的活性を示す。また、Zが-P(=O)(OCH₂CH₃)₂または-P(=O)(OH)₂で表される修飾ブロック共重合体は金属酸化物、ステンレス、ポリカチオン等の、例えば、表面改質に有用である。

30

【0019】

<本発明の詳細な記述>

式(I)で表されるブロック共重合体の製造方法において用いる、ラジカル開始剤は、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)、過酸化ベンゾイル等であることができ、不活性溶媒はトルエン、キシレン、テトラヒドロフラン(THF)、ベンゼン等であることができ、スチレンの重合に通常用いられる条件下で反応を進行させることができる。最適な反応温度は用いる溶媒により変動するが、室温から沸点までの温度であり、反応時間はPEGの使用量に対して式(7)で表されるスチレン誘導体の使用量の割合を選択し、反応温度及び反応時間を選択することにより、スチレン誘導体に由来する分子量をある程度制御できる因子であるが、通常、反応時間は数時間(2、3時間)~20時間であることができる。生成物の単離、精製は反応混合液を未反応原料等に対しては良溶媒であるが、生成物(1)に対しては貧溶媒に投入し、沈殿を生じさせる操作を、必要により繰り返せばよい。

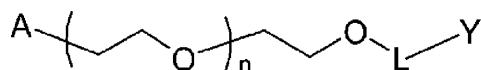
40

【0020】

50

式(6)で表される化合物は、限定されるものでないが、式(4)

【化7】



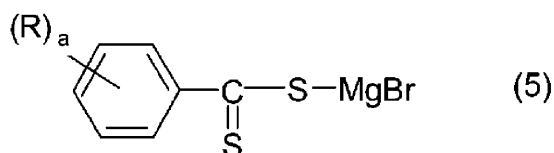
(4)

【0021】

で表される化合物と式(5)

10

【化8】



【0022】

で表される化合物の反応により効率よく得ることができる。上式中、Yは塩素、臭素又はヨウ素原子であることができ、他のA、L、R、a及びnは上記に定義したとおりである。この反応は、式(4)で表される化合物と式(5)で表される化合物を、モル比で、0.1~10対10~0.1の割合でテトラヒドロフラン(THF)やジオキサン等のエーテル溶媒中、5~50にて12~24時間の条件下で完了することができる。式(5)で表される化合物は、二硫化炭素と臭化フェニルマグネシウムを同様な溶媒中、モル比で、0.1~10対10~0.1の割合で、室温下で0.1~5時間反応させることで生成することができる。

20

【0023】

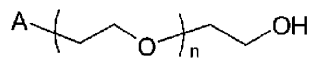
さらに、式(4)で表される化合物は、式(1)で表される片末端にA基を有するポリ(エチレングリコール)と式(3)Y-L-Y(Yは、独立して上記に定義したとおりである。)で表されるジハロゲン化物を、ブチルリチウムの存在下で反応させることにより得ることができる。典型的な反応条件は、後述する実施例1~3を参照することができる。

30

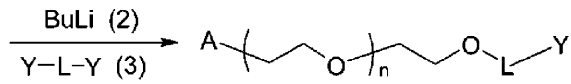
【0024】

したがって、本発明に従えば、式(I)で表されるブロック共重合体は、限定されるものでないが、次の一連の反応スキームに従って、最も効率よく製造できる。

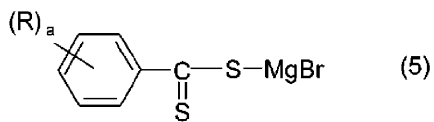
【化9】



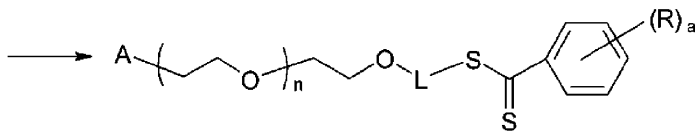
(1)



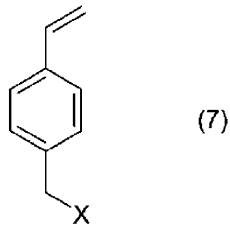
(4)



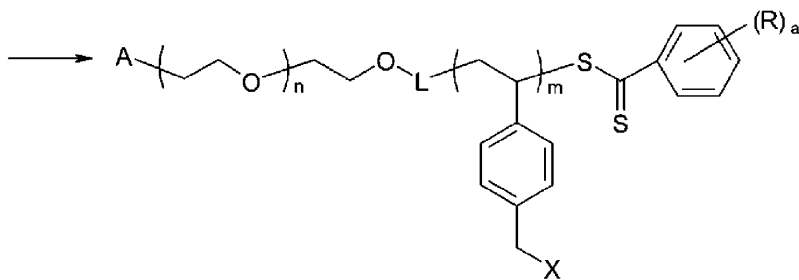
(5)



(6)



(7)



(I)

【0025】

上記、各工程は、前述した条件下で、また、後述する実施例に記載の方法及びそれらの方法を当該技術分野で周知の方法に準じて改変した方法により実施できる。

【0026】

こうして得られる、式(I)で表されるブロック共重合体の中、好ましいものとしては、式(I-a)

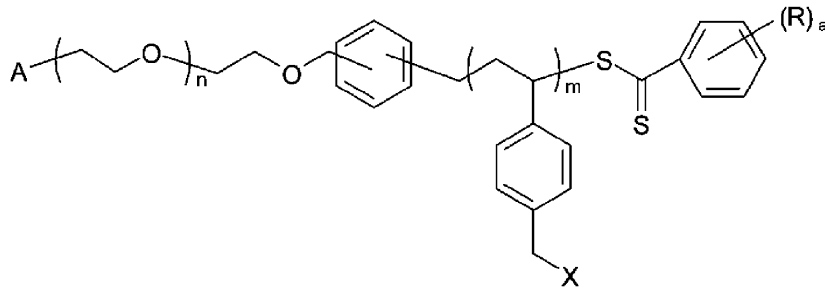
10

20

30

40

【化10】



(I-a)

10

【0027】

式中、A、R、a、mおよびnは上記に定義したとおりであり、Xは好ましくは、塩素または臭素原子であり、より好ましくは塩素原子であり、mは好ましくは、3～250、より好ましくは5～150、特に好ましくは8～100の整数を表し、nは、一般的には2～10、000好ましくは、12～5,000、より好ましくは14～1,000、特に好ましくは20～1,000の整数を表し、aは好ましくは0または1であり、存在する場合のRは好ましくはメチル基であり、より好ましくは0である。また、主鎖中のキシリレン部がm-又はp-キシリレンであり、p-キシリレンが好ましい。

【0028】

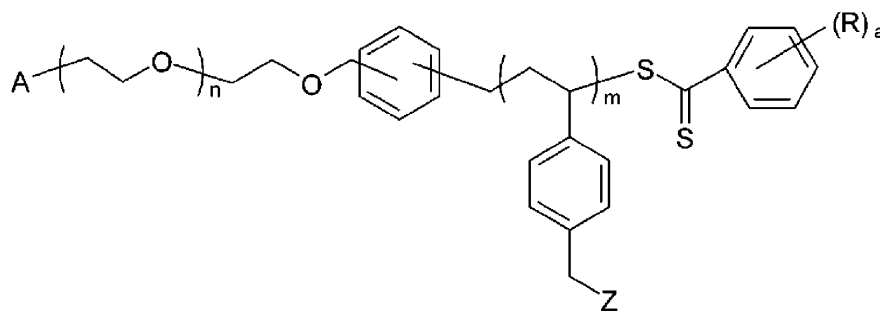
式(I)又は式(I-a)で表されるブロック共重合体は、そのスチレン誘導体(モノマー)に由来する反復単位中の、ハロメチル基が、前述したとおり、所望のアミノ化反応、エーテル化反応又はエステル化反応に利用でき、このような利用の態様の具体例としては、前述したとおり、式(II)で表される化合物を例示することができる。

20

【0029】

式(II)で表されるまたは式(II)における(R)aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子で置換されたブロック共重合体の好ましいものとしては、式(II-a)

【化11】



(II-a)

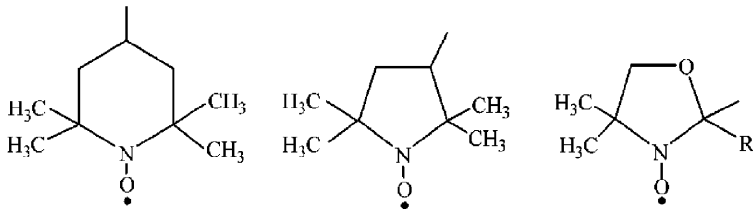
30

【0030】

式中、A、R、a、mおよびnは、好ましい態様も含めて、上記に定義したとおりであり、Zは-NH-または-O-を介して共有結合した式

40

【化 1 2】



【 0 0 3 1】

10

で表される基から選ばれるか、または

- P(=O)(OCH₂CH₃)₂もしくは - P(=O)(OH)₂を表す、

で表される修飾ブロック共重合体を挙げることができる。これらの態様の共重合体は、特に製造が容易であり、一定の安定な性質を有する。

【 0 0 3 2】

かような共重合体は、例えば特許文献 1 に記載の製造例 2 又は 3 に記載の方法にしたがって、式 (I) 又は (I - a) で表されるブロック共重合体と、対応する、アミノ基又はヒドロキシル基を有する環状ニトロキシドラジカル化合物との反応によるか、また、亜リン酸ジエチル (ホスホン酸ジエチル) のリチウム化物やナトリウム化物との反応により得ることができる。

20

【 0 0 3 3】

また、式 (II) 又は式 (II - a) で表される修飾ブロック共重合体の末端に見られるジチオエステル部は、場合により、当該反応行程中自動的に加水分解してメルカプト基に転化され得るが、必要があれば、積極的に加水分解又は接触還元することにより、メルカプト基もしくは水素原子に転化できる。

【 0 0 3 4】

式 (I)、式 (I - a)、式 (II) 及び式 (II - a) のいずれのブロック共重合体も、水性媒体 (水又は必要により水溶性有機溶媒を含む溶媒系) において、分子が会合して分子集合体又は自己組織化した高分子ミセルを形成する。したがって、かような特性を利用して各種薬剤の DDS の構築に利用できる。

30

【 0 0 3 5】

式 (Pre) で表されるホモポリマーは、前述したとおり新規化合物であると思われるが、都合よくは、実施例 27 に記載の方法に準じて製造でき、こうして得られるホモポリマーは、前記 (1) のポリマーに該当し、以下、前記反応スキームに従い、(1) のポリマーから出発し、順次、ポリマー (4)、ポリマー (6) を経て式 (I) のブロック共重合体、さらには式 (II) の修飾ブロック共重合体を得ることができる。A が置換 C₁ - C₁,₂ アルコキシを表し、置換基が、式 R₃ R₄ B - Ph - 基を表し、ここで、R₃ および R₄ がヒドロキシを表すポリマーまたは共重合体は、R₃ と R₄ は一緒になって - OC(CH₃)₂ C(CH₃)₂ O - を表すポリマーまたは共重合体から、それらのピナコール型エステルを、例えば、J. Sun et al., J. Org. Chem., 2011, 76(9), 3571 - 3575 に記載の方法に従い加水分解することにより提供できる。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 6】

【図 1】 CH₃O - (CH₂CH₂O)_n CH₂ Ph CH₂ Cl (1) のサイズ分画クロマトグラム (SEC)

【図 2】 CH₃O - (CH₂CH₂O)_n CH₂ Ph CH₂ Cl (1) のプロトン核磁気共鳴スペクトル (¹H - NMR)

【図 3】 CH₃O - (CH₂CH₂O)_n CH₂ Ph CH₂ Cl (1) のマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI - TOF - MS) スペクトル

50

- 【図4】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{Br}$ (2) のサイズ分画クロマトグラム (SEC)
- 【図5】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{Br}$ (2) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図6】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{Br}$ (2) のマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI - TOF - MS) スペクトル
- 【図7】 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{Cl}$ (3) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図8】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (4) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$) 10
- 【図9】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (4) のマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI - TOF - MS) スペクトル
- 【図10】 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (5) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図11】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{Cl}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (6) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図12】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{NH} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (7) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$) (ヒドラジン添加還元後)
- 【図13】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{O} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (8) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$) (ヒドラジン添加還元後) 20
- 【図14】 newRNP^{N} ($m = 13$) の動的光散乱 (DLS) スペクトル
- 【図15】 newRNP^{N} ($m = 13$) の電子スピン共鳴スペクトル
- 【図16】 newRNP^{N} ($m = 30$) 及び newRNP^{O} ($m = 30$) の経口投与による血中濃度の時間変化
- 【図17】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するプロトンピン時間
- 【図18】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 産生量
- 【図19】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するアルブミン産生量 30
- 【図20】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 産生量
- 【図21】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するアラントランスアミナーゼ (ALT) 産生量
- 【図22】 newRNP^{N} ($m = 13$) 経口投与に対するアルカリフォスファターゼ (ALP) 産生量
- 【図23】 newRNP^{N} 、 newRNP^{O} の静脈注射に対する血中濃度変化
- 【図24】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{P}(=\text{O}))(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2)_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (9) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$) 40
- 【図25】 $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{P}(=\text{O}))(\text{OH})_2)_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (10) のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図26】実施例1で得られたブロック共重合体(1)のGPCチャート
- 【図27】4, 4, 5, 5 - テトラメチル - 1, 3, 2 - ジオキサボラノフェニルメトキシ - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{OH}$ (Pre) のサイズ分画クロマトグラム (SEC)
- 【図28】4, 4, 5, 5 - テトラメチル - 1, 3, 2 - ジオキサボラノフェニルメトキシ - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{OH}$ (Pre) のプロトン核磁気共鳴スペクトラム ($^1\text{H} - \text{NMR}$)
- 【図29】4, 4, 5, 5 - テトラメチル - 1, 3, 2 - ジオキサボラノフェニルメトキシ 50

シ - (CH₂CH₂O)_nOH (Pre) のカーボン核磁気共鳴スペクトラム (¹³C - NMR)

【実施例】

【0037】

以下、本発明について、より具体的に説明する。

【0038】

実施例1：CH₃O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂Cl (1) の合成

(なお、式中：Phはベンゼン環を表す)

500 mL フラスコ中に市販の片末端メトキシ、他末端水酸基を有するポリエチレングリコール (CH₃O - (CH₂CH₂O)_nH、分子量 5,000、Fluka) を 50 g、
テトラヒドロフラン 200 mL、市販のブチルリチウムを 10 mL (1.6 M、ヘキサン溶液) 加えた後、a, a' - ジクロロ - p - キシリレン (ClCH₂PhCH₂Cl) を 25 g 加え、60 °C、24 時間反応させた。反応混合液を 500 mL の冷 2 - プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4 °C、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (1) のサイズ分画クロマトグラム、NMR および MALDI - TOF 型質量スペクトルをそれぞれ図 1、2、3 に示す。収量 50 g、収率 97 %。また、ゲル浸透クロマトグラフ (GPC) を図 26 に示す。

10

【0039】

実施例2：CH₃O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂Br (2) の合成

a, a' - ジクロロ - p - キシリレンの代わりに a, a' - ジブromo - p - キシリレン (BrCH₂PhCH₂Br) を用いた以外は実施例 1 と同様に合成した。得られた (2) のサイズ分画クロマトグラム、NMR および MALDI - TOF 型質量スペクトルをそれぞれ図 4、5、6 に示す。収量 50 g、収率 97 %

20

【0040】

実施例3：(CH₃CH₂O)₂CHCH₂CH₂O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂Cl (3) の合成

500 mL フラスコ中に THF 100 mL、市販の 1, 1 - ジエトキシプロパノールを (0.9 g, 6 mmol)、カリウムナフタレン (12 mL, 0.5 M) を加え、カリウム 3, 3 - ジエトキシプロパノキシドを生成せしめた後、エチレンオキシド 20 g (0.45 mol) を加えて室温、2 日間重合させた。重合後、a, a' - ジクロロ - p - キシリレン (ClCH₂PhCH₂Cl) を 25 g 加え、60 °C、24 時間反応させた。反応混合液を 500 mL の冷 2 - プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4 °C、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (3) の NMR を図 7 に示す。収量 20 g、収率 95 %。

30

【0041】

実施例4：CH₃O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂SC(=S)Ph (4) の合成

100 mL フラスコに THF 50 mL、市販の二硫化炭素 5 mL および臭化フェニルマグネシウム 10 mL (3 M THF 溶液) を加え、ジチオ安息香酸プロモマグネシウム (PhC(=S)SMgBr) を作製させる。別途 500 mL フラスコ中に実施例 1 で合成した (1) 50 g、THF 200 mL を加え、上で作製したジチオ安息香酸プロモマグネシウムの THF 溶液を加え、40 °C、24 時間反応させた。反応混合液を 500 mL の冷 2 - プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4 °C、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (4) の NMR および MALDI - TOF 型質量スペクトルをそれぞれ図 8、9 に示す。収量 50 g、収率 97 %。

40

【0042】

実施例5：(CH₃CH₂O)₂CHCH₂CH₂O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂SC(=S)Ph (5) の合成

(1) に代えて (3) を 20 g 使った以外実施例 4 と同様の方法で (5) の合成を行った。得られた (5) の NMR を図 10 に示す。収量 20 g、収率 97 %。

【0043】

50

実施例 6 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{Cl}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(6)$ の合成

500 mL フラスコに (4) を 20 g、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) 120 mg、m, p-クロロメチルスチレン (CMS) 60 mL、トルエン 200 mL を加え、窒素ガスを 3 分間フローした後、70 で 12 時間重合を行った。反応混合液を 500 mL の冷 2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (6) の NMR を図 11 に示す。収量 40 g。PCMS セグメントの重合度 $m = 30$

【0044】

実施例 7 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{Cl}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(6)$ の合成 (その 2)

10

CMS を 30 mL 使用した以外実施例 6 と同様に方法で合成を行った。収量 32 g。PCMS セグメントの重合度 $m = 13$

【0045】

実施例 8 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{Cl}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(6)$ の合成 (その 3)

CMS を 120 mL 使用した以外実施例 6 と同様に方法で合成を行った。収量 50 g。PCMS セグメントの重合度 $m = 42$

【0046】

実施例 9 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{NH} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(7)$ の合成 (TEMPO は 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルを表す)

20

500 mL フラスコ中、実施例 6 で合成した (6) を 10 g、ジメチルフォルムアミド (DMF) を 100 mL、4-アミン-TEMPO を 20 g 加え、2 日間室温で反応させた。反応混合液を 500 mL の冷 2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (7) の NMR を図 12 に示す。収量 10 g。TEMPO 置換度 80%

【0047】

実施例 10 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{NH} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(7)$ の合成 (その 2)

30

実施例 6 で合成した (6) の代わりに実施例 7 で合成した (6) を用いた以外、実施例 9 と同様の方法で合成した。収量 10 g。TEMPO 置換度 80%

【0048】

実施例 11 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{NH} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(7)$ の合成 (その 3)

実施例 6 で合成した (6) の代わりに実施例 8 で合成した (6) を用いた以外、実施例 9 と同様の方法で合成した。収量 10 g。TEMPO 置換度 80%

【0049】

実施例 12 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{O} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(8)$ の合成

40

200 mL フラスコに 50 mL の THF、4-日ドロキシ TEMPO を 10 g およびブチルリチウム 40 mL を加えて攪拌し、LiO-TEMPO を調製した。500 mL フラスコ中、実施例 6 で合成した (6) を 10 g、ジメチルフォルムアミド (DMF) を 100 mL、上で調製した LiO-TEMPO 溶液を加え、2 日間室温で反応させた。反応混合液を 500 mL の冷 2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離 (4、9000 rpm、2 分) 後、減圧乾燥した。得られた (8) の NMR を図 13 に示す。収量 10 g。TEMPO 置換度 80%

【0050】

実施例 13 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{O} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}(8)$ の合成 (その 2)

50

実施例 6 で合成した (6) の代わりに実施例 7 で合成した (6) を用いた以外、実施例 1 1 と同様の方法で合成した。収量 1 0 g。TEMPO 置換度 8 0 %

【 0 0 5 1 】

実施例 1 4 : $\text{CH}_3\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{PhCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{PhCH}_2\text{O} - \text{TEMPO}))_m\text{SC}(=\text{S})\text{Ph}$ (8) の合成 (その 3)

実施例 6 で合成した (6) の代わりに実施例 1 1 で合成した (6) を用いた以外、実施例 1 1 と全く同様の方法で合成した。収量 1 0 g。TEMPO 置換度 8 0 %

【 0 0 5 2 】

実施例 1 5 : pH 低下にしたがって崩壊するレドックスナノ粒子 new RNP^N の調製 (その 1)

ガラス容器に実施例 9 で合成した (7) を 1 0 g 取り、4 0 0 m L のメタノールに溶解させ、分画分子量 3 , 0 0 0 のホローファイバー型透析モジュール (m P E S M i d i k r o s (登録商標) M o d u l e s 3 k D I C 0 . 5 m m D 0 6 - E 0 0 3 - 0 5 - N) で 1 0 L の水に対して透析した (2 5 m g / m L) 。得られた粒子溶液の光散乱スペクトルおよび電子スピン共鳴をそれぞれ図 1 4 、 1 5 に示す。

【 0 0 5 3 】

実施例 1 6 : pH 低下で崩壊するレドックスナノ粒子 new RNP^N の調製 (その 2)

実施例 9 で合成した (7) を用いる代わりに実施例 1 0 で合成した (7) を用いる以外実施例 1 5 と同様の方法で調製した。 (2 5 m g / m L)

【 0 0 5 4 】

実施例 1 7 : pH 低下で崩壊するレドックスナノ粒子 new RNP^N の調製 (その 3)

実施例 9 で合成した (7) を用いる代わりに実施例 1 1 で合成した (7) を用いる以外実施例 1 5 と同様の方法で調製した。 (2 5 m g / m L)

【 0 0 5 5 】

実施例 1 8 : pH 低下で崩壊しないレドックスナノ粒子 new RNP^O の調製 (その 1)

実施例 9 で合成した (7) を用いる代わりに実施例 1 2 で合成した (8) を用いる以外実施例 1 5 と同様の方法で調製した。 (2 5 m g / m L)

【 0 0 5 6 】

実施例 1 9 : pH 低下で崩壊しないレドックスナノ粒子 new RNP^O の調製 (その 2)

実施例 9 で合成した (7) を用いる代わりに実施例 1 3 で合成した (8) を用いる以外実施例 1 5 と同様の方法で調製した。 (2 5 m g / m L)

【 0 0 5 7 】

実施例 2 0 : pH 低下で崩壊しないレドックスナノ粒子 new RNP^O の調製 (その 3)

実施例 9 で合成した (7) を用いる代わりに実施例 1 4 で合成した (8) を用いる以外実施例 1 5 と同様の方法で調製した。 (2 5 m g / m L)

【 0 0 5 8 】

実施例 2 1 : ブランクミセルの調製

実施例 6 (m = 3 0) で合成した P E G - b - P C M S 1 g をメタノール 1 6 0 m L に溶解させ、分画分子量 3 , 0 0 0 のホローファイバー型透析モジュール (m P E S M i d i k r o s (登録商標) M o d u l e s 3 k D I C 0 . 5 m m D 0 6 - E 0 0 3 - 0 5 - N) で 1 0 L の水に対して透析した (6 . 2 5 m g / m L) 。

【 0 0 5 9 】

実施例 2 2 : new RNP^N の経口投与による血中取り込み評価と安全性

実施例 9 (m = 3 0) で作製した new RNP^N の経口投与による評価を行った。

【 0 0 6 0 】

3 8 g ~ 4 1 g の 1 0 週齢 I G S マウスを一群 5 匹 (入荷から本実験終了までの期間中、室温 2 3 C (± 1) 、湿度 5 0 % 、1 2 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させた) で下記のように new RNP^N を投与した。

10

20

30

40

50

群 1 : 自由水投与

群 2 : new RNP^N水溶液を、ゾンデを用いて胃内に 1 日 1 回強制投与した (1 日目 : 10 mg / mL を 1 mL 投与、2 日目以降 : 20 mg / mL を 1 mL 投与) 。

群 3 : 水の代わりに 5 mg / mL の new RNP^N水溶液を摂水瓶にて自由摂取した。

群 4 : 水の代わりに 10 mg / mL の new RNP^N水溶液を摂水瓶にて自由摂取した。

群 5 : 水の代わりに 20 mg / mL の new RNP^N水溶液を摂水瓶にて自由摂取した。

群 6 : 水の代わりに 20 mg / mL の new RNP^O水溶液を摂水瓶にて自由摂取した。

10

【 0 0 6 1 】

群 1 と群 3 ~ 6 の摂水量は表 1 に示すように変わりなかった。

【 0 0 6 2 】

【 表 1 】

表 1 : 摂水量の比較

群 日	1	2	3	4	5	6	7
1	65	40	40	45	40	40	50
3	72.5	40	40	45	45	35	60
4	65	40	40	40	40	40	55
5	85	40	40	50	50	50	55
6	80	40	40	40	45	45	55

20

注 1 : 5 匹/ケージごとの摂水量 (mL / d / c a g e)

【 0 0 6 3 】

血中への取り込みを電子スピン共鳴スペクトルによって調べたところ、投与群 6 の new RNP^Oは血中に全く取り込まれないことが確認された。一方、ゾンデで強制投与した群 3 は 4 日まで血中濃度が増加し、一定に達した。自由摂水群では濃度依存的に血中濃度が増加する傾向が見られ、10 mg / mL 以上で 6 日後に強制投与群と同レベルに達した (図 1 6 参照) 。

30

【 0 0 6 4 】

実施例 2 3 : アセトアミノフェン誘起肝毒性に対する効果

実施例 1 6 (m = 1 3) で作製した new RNP^Nの経口投与による評価を行った。

【 0 0 6 5 】

38 g ~ 41 g の 10 週齢 I G S マウスを一群 6 匹 (入荷から本実験終了までの期間中、室温 23 (± 1)、湿度 50 %、112 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させた) で下記のように new RNP^Nを投与した。

40

群 1 : 無処理コントロール (この群だけ 4 匹)

群 2 : 実験開始 7 日目にアセトアミノフェンを 3 mg / k g 経口投与

群 3 : 実施例 2 1 で合成したブランクミセル (6 . 2 5 mg / mL、160 mg / k g) 1 mL を 1 日 1 回ゾンデによる強制投与を行い、7 日目にアセトアミノフェンを 3 mg / k g 経口投与した。

群 4 : 実施例 1 6 (m = 1 3) で合成した new RNP^N (6 . 2 5 mg / mL、160 mg / k g) 1 mL を 1 日 1 回ゾンデによる強制投与を行い、7 日目にアセトアミノフェンを 3 mg / k g 経口投与した。

群 5 : 4 - アミノ - T E M P O 170 mg / k g を 1 日 1 回ゾンデによる強制投与を行い、7 日目にアセトアミノフェンを 3 mg / k g 経口投与した。

50

群6：アセチルシステイン600mg/kgを1日1回ゾンデによる強制投与を行い、7日目にアセトアミノフェンを3mg/kg経口投与した。

【0066】

この実験条件でアセトアミノフェン投与前後のマウス生存数を表2に示す。IGSマウスに対するアセトアミノフェン3mg/kgでは肝障害効果が強すぎるため、2/3が1日以内に死亡した(群2)。ブランクミセル(群3)、4-アミノ-TEMPO(群5)およびアセチルシステイン(群6)でも同様の傾向にある。一方newRNP^Nではすべてのマウスが生存していた(群4)。

【0067】

【表2】

表2：アセトアミノフェン投与前後のマウス生存数

群	実験前	実験後
1	4	4
2	6	2
3	6	3
4	6	6
5	6	2
6	6	4

10

20

【0068】

肝機能の指標を示すプロトロンビン時間は4-アミノ-TEMPOおよびアセチルシステインでは延長が認められるものの、newRNP^Nでは対照群と同一レベルであった(図17)。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)産生量を定量した結果、アセトアミノフェン投与群および他の押薬物投与群が著しい低下をしているものの、newRNP^N投与群では対照群と同一レベルであった(図18)。

30

【0069】

肝機能指標のアルブミン量、AST、ALT、ALP酵素レベルを測定したところ、低分子4-アミノ-TEMPOは極めて高い毒性を示すのに対し、newRNP^Nでは極めて低肝毒性を示した(図19~22)。

【0070】

このように本発明のnewRNP^Nは肝毒性を示さず、アセトアミノフェン誘起肝障害を抑えることが示された。

【0071】

実施例24：newRNP^NおよびnewRNP^Oの血中滞留性

実施例15~20で作製したnewRNP^NおよびnewRNP^Oを静脈投与し、血中滞留性評価を行った。38~41gの10週齢IGSマウスを一群5匹(入荷から本実験終了までの期間中、室温23(±1)、湿度50%、12時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させた)で下記のようにnewRNP^NおよびnewRNP^O血中滞留性評価を行った。

40

群1：4-アミノ-TEMPO(10mg/mLを200μL尾静注投与、50mg/kg)

群2：newRNP^N(実施例15(m=30)の試料を25mg/mLを200μL尾静注投与、125mg/kg)

群3：newRNP^N(実施例16(m=13)の試料を25mg/mLを200μL尾静注投与、125mg/kg)

50

群4: newRNP^N (実施例17 (m = 42) の試料を50 mg/mLに濃縮後、200 μL尾静注投与、250 mg/kg)

群5: newRNP^O (実施例18 (m = 30) の試料を50 mg/mLに濃縮後、250 μL尾静注投与、312.5 mg/kg)

群6: newRNP^O (実施例19 (m = 13) の試料を50 mg/mLに濃縮後、200 μL尾静注投与、250 mg/kg)

群7: newRNP^O (実施例20 (m = 42) の試料を50 mg/mLに濃縮後、200 μL尾静注投与、250 mg/kg)

【0072】

投与後5分、15分、30分、1時間、4時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間に血液を採取し、遠心分離後上清にフェリシアン化カリウムを加えてXバンド電子スピン共鳴装置にて定量した。

10

【0073】

図23にRNPの血中濃度変化を示す。わかりやすくするため、WO2009/133647試験例4のデータを図23に加えて比較データとした。図に示されるように、本発明で調製したnewRNPは旧来型のRNPに比べてABA型のブロック共重合体を含まないため、その血中滞留性が極めて向上していることが確認された。特にnewRNP^Oでは静脈投与後4日以上も滞留していることが確認された。

【0074】

実施例25: CH₃O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂(CH₂CH(PhCH₂P(=O)(OCH₂CH₃))₂)_mSC(=S)Ph(9)の合成

20

200 mLフラスコに20 mLのTHF、亜リン酸ジエチルを1.3 gおよびブチルリチウム6.5 mL (10 mmol)を加えて攪拌し、LiP(=O)(OCH₂CH₃)₂を調製する。500 mLフラスコ中、実施例6で合成した(6)を3 g、ジメチルフォルムアミド(DMF)を50 mL、上で調製したLiP(=O)(OCH₂CH₃)₂溶液を加え、2日間室温で反応させた。反応混合液を500 mLの冷2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離(4℃、9000 rpm、2分)後、減圧乾燥した。得られた(9)のNMRを図24に示す。収量3 g。リン酸ジエチル置換度80%

【0075】

実施例26: CH₃O - (CH₂CH₂O)_nCH₂PhCH₂(CH₂CH(PhCH₂P(=O)(OH))₂)_mSC(=S)Ph(10)の合成

30

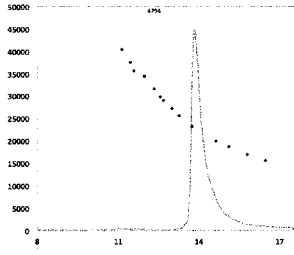
100 mLフラスコに20 mLのCHCl₃、(9)を2 g、臭化トリメチルシリル2 mを加え、45℃、2時間反応させた後、クロロホルムを留去し、80 mLのメタノールを加えて15時間室温で反応させた。溶液を水に対して透析し、減圧乾燥した。得られた(10)NMRを図25に示す。収量1.5 g。リン酸ジエチルの加水分解度90%。

実施例27: 4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボラノフェニルメトキシ - (CH₂CH₂O)_nOH(Pre)の合成

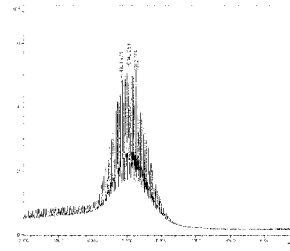
100 mLフラスコ中にTHF 50 mL、市販の2-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボランを1.67 g (7.1 mmol)、カリウムナフタレン(8.0 mL, 0.9 M)を加え、2-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボランのカリウムアルコールを生成せしめた後、エチレンオキシド31 g (0.7 mol)を加えて室温下、2日間重合させた。重合後、反応混合液を700 mLの冷2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離(4℃、9000 rpm、2分)後、減圧乾燥した。得られた(Pre)のSEC、¹H-NMRおよび¹³C-NMRを、それぞれ図27、図28、図29に示す。収量28 g、収率90%。

40

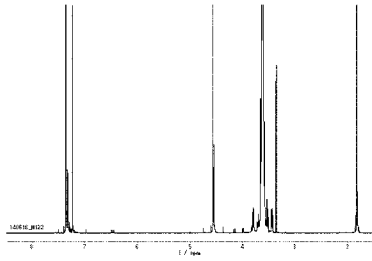
【 図 1 】



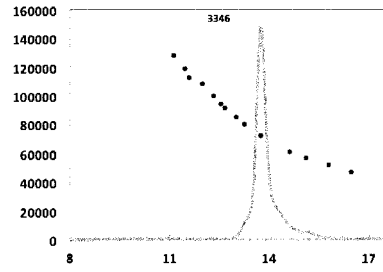
【 図 3 】



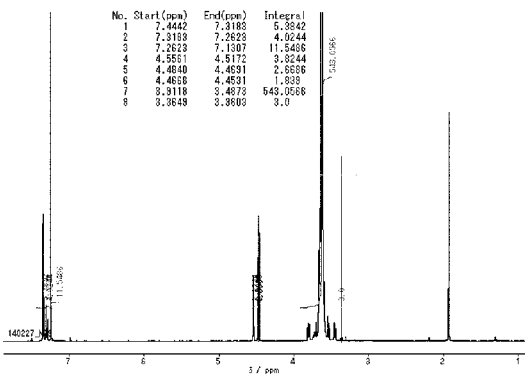
【 図 2 】



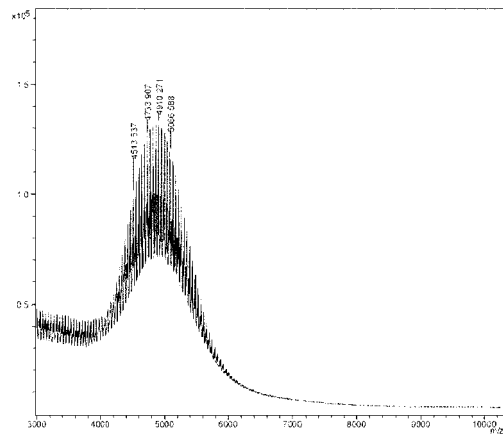
【 図 4 】



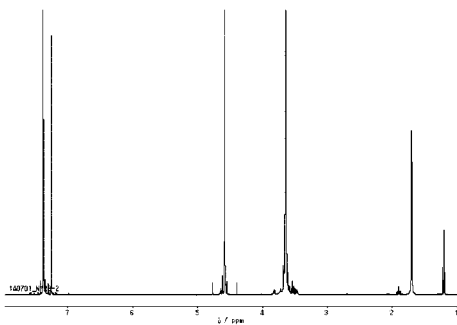
【 図 5 】



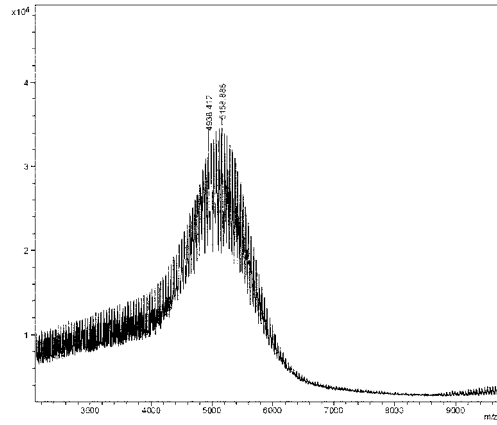
【 図 6 】



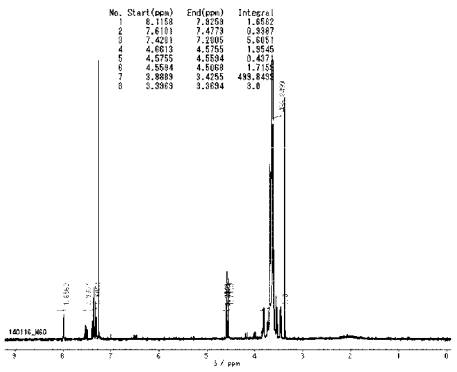
【 図 7 】



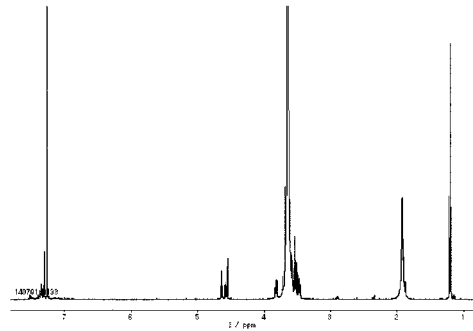
【 図 9 】



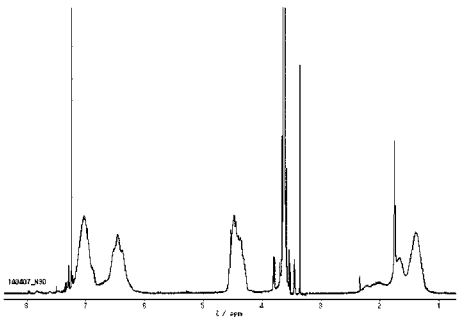
【 図 8 】



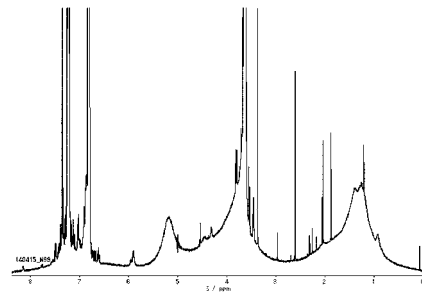
【 図 10 】



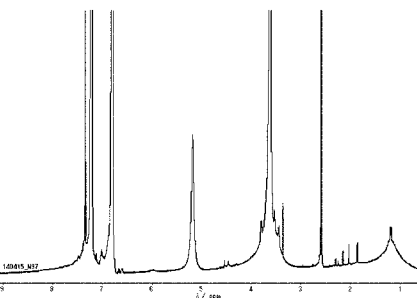
【 図 11 】



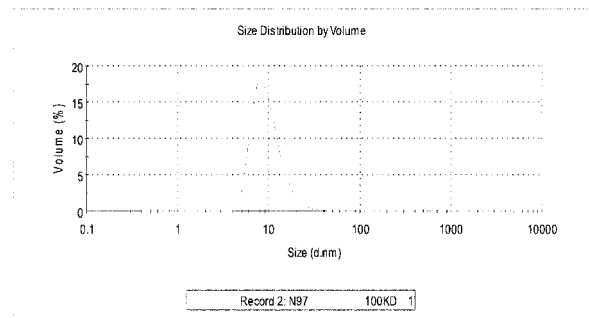
【 図 13 】



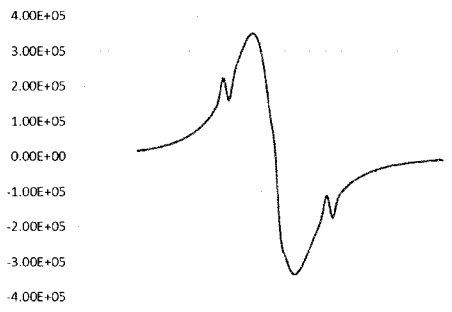
【 図 12 】



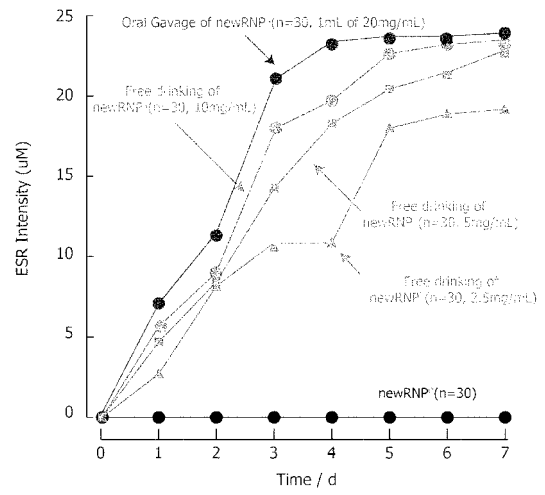
【 図 14 】



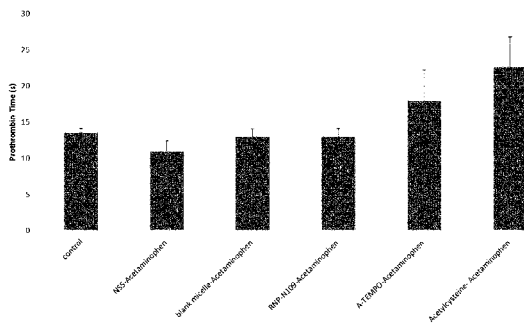
【 図 1 5 】



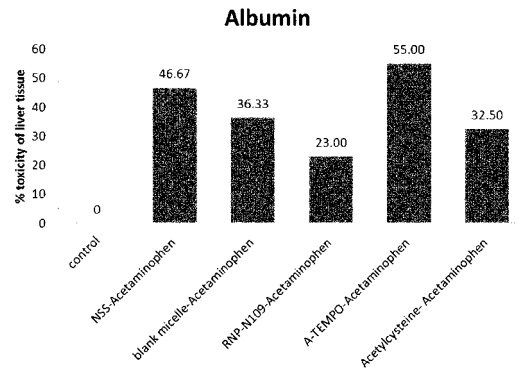
【 図 1 6 】



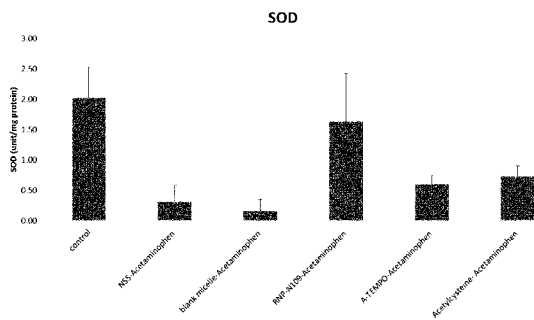
【 図 1 7 】



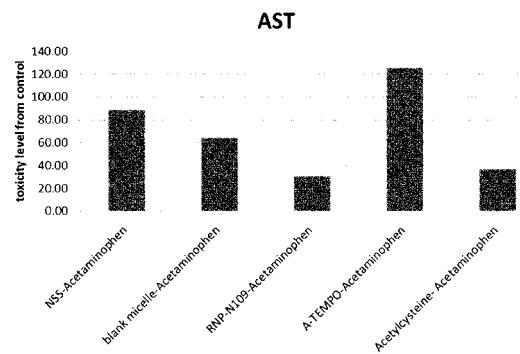
【 図 1 9 】



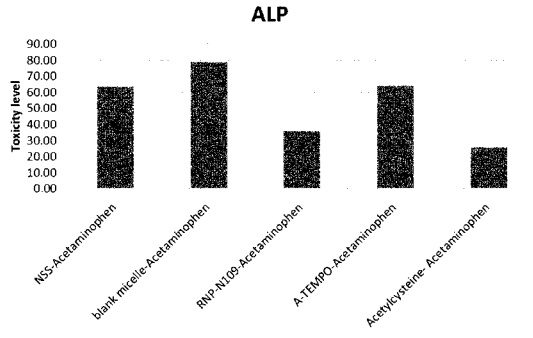
【 図 1 8 】



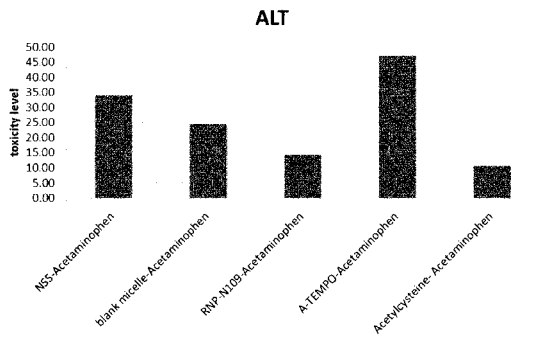
【 図 2 0 】



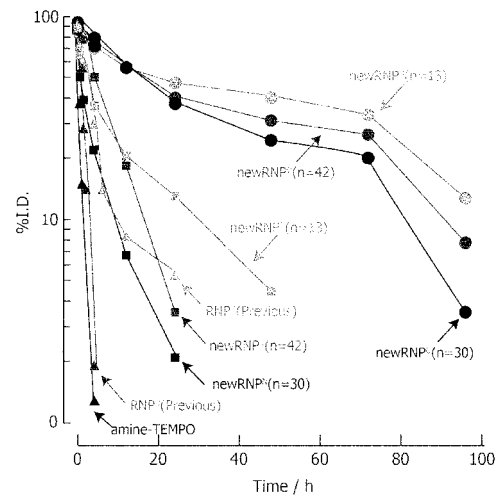
【 図 2 1 】



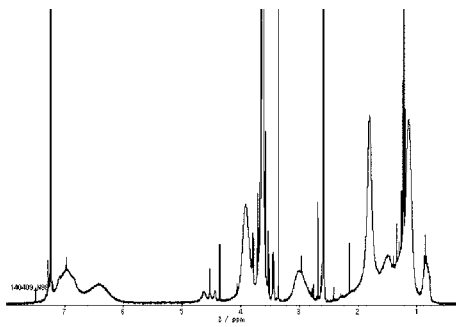
【 図 2 2 】



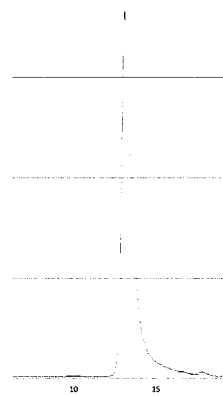
【 図 2 3 】



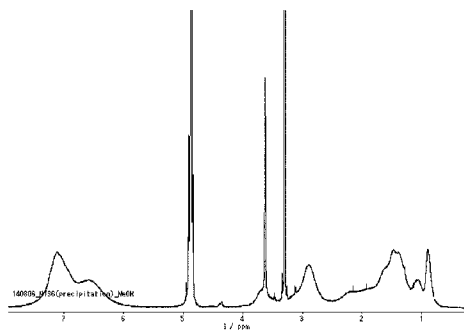
【 図 2 4 】



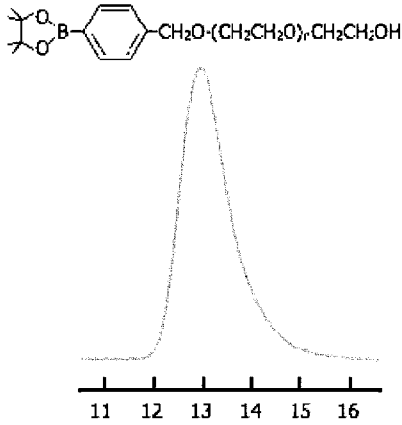
【 図 2 6 】



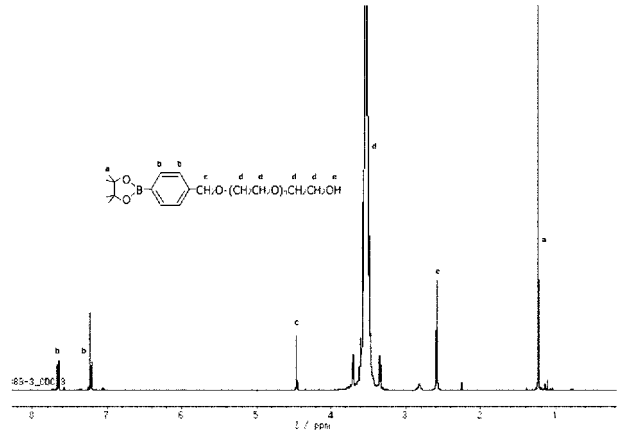
【 図 2 5 】



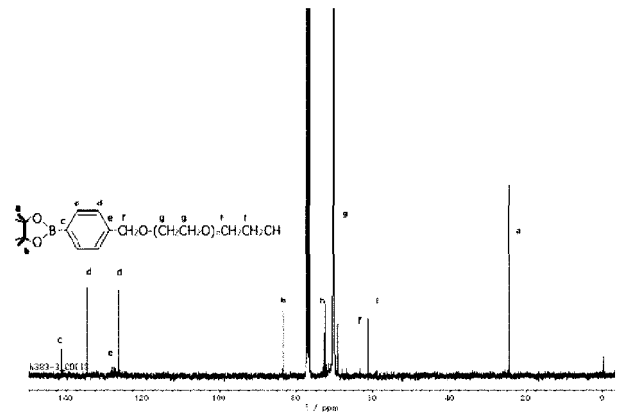
【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年2月23日(2016.2.23)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

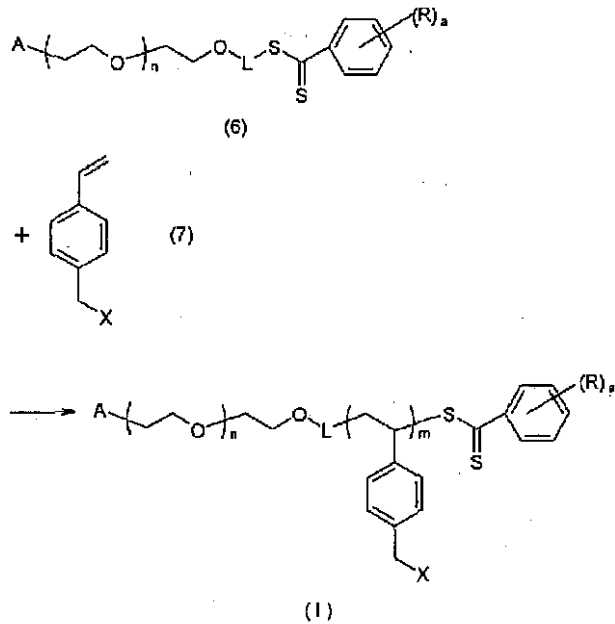
【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

下記反応スキームに基づく式(Ⅰ)で表されるブロック共重合体または式(Ⅰ)中の(R)_aで置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体の製造方法であって、

式(6)で表されるポリ(エチレングリコール)誘導体及びラジカル反応開始剤を含む不活性溶媒中に式(7)で表されるスチレン誘導体を加えて重合する工程を含んでなる、製造方法。

【化 1】



上記各式中、

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R_1 R_2 CH -$ 基を表し、ここで、 R_1 および R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ もしくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 $R_3 R_4 B - Ph -$ 基を表し、ここで、 R_3 および R_4 はヒドロキシまたは R_3 と R_4 は一緒になって $-OC(CH_3)_2C(CH_3)_2O-$ を表し、Ph はメチルもしくはメトキシで置換されていてもよい *o*-フェニレン、*m*-フェニレンもしくは *p*-フェニレンを表し、

L は、*m*-キシリレンもしくは *p*-キシリレンであり、

X は塩素、臭素又はヨウ素を表し、

R は、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、 a は 0 ~ 3 の整数であり、

m は 3 ~ 500 の整数を表し、

n は 2 ~ 10,000 の整数を表す。

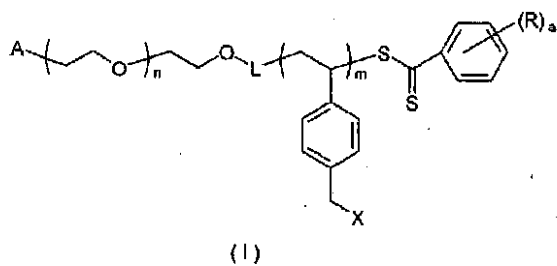
【請求項 2】

(削除)

【請求項 3】

式 (I)

【化 3】



式中、

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R_1 R_2 CH -$ 基を表し、ここで、 R_1 および R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$

$_3O$ - もしくは $-O(CH_2)_4O$ - を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 R_3R_4B-Ph - 基を表し、ここで、 R_3 および R_4 はヒドロキシまたは R_3 と R_4 は一緒になって $-OC(CH_3)_2C(CH_3)_2O$ - を表し、 Ph はメチルもしくはメトキシで置換されていてもよい *o*-フェニレン、*m*-フェニレンもしくは *p*-フェニレンを表し、

L は、*m*-キシリレンもしくは *p*-キシリレンであり、

X は塩素、臭素又はヨウ素を表し、

R は、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、 a は 0 ~ 3 の整数であり、

m は 3 ~ 500 の整数を表し、

n は 2 ~ 10,000 の整数を表す、

で表されるブロック共重合体または式 (I) 中の $(R)_a$ で置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体。

【請求項 4】

(削除)

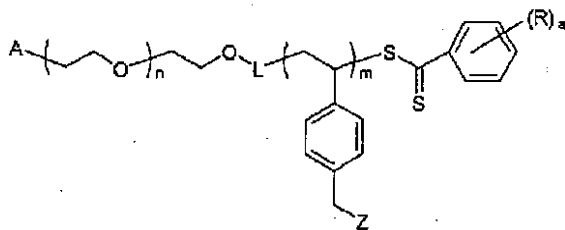
【請求項 5】

式 (I) の $(R)_a$ で置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルがそのまま存在する、請求項 3 に記載のブロック共重合体。

【請求項 6】

式 (II)

【化 5】



(II)

式中、

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 R_1R_2CH - 基を表し、ここで、 R_1 および R_2 は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R_1 と R_2 は一緒になって $-OCH_2CH_2O$ -、 $-O(CH_2)_3O$ - もしくは $-O(CH_2)_4O$ - を表し、或いは、置換されている場合の置換基は、式 R_3R_4B-Ph - 基を表し、ここで、 R_3 および R_4 はヒドロキシまたは R_3 と R_4 は一緒になって $-OC(CH_3)_2C(CH_3)_2O$ - を表し、 Ph はメチルもしくはメトキシで置換されていてもよい *o*-フェニレン、*m*-フェニレンもしくは *p*-フェニレンを表し、

L は、*m*-キシリレンもしくは *p*-キシリレンであり、

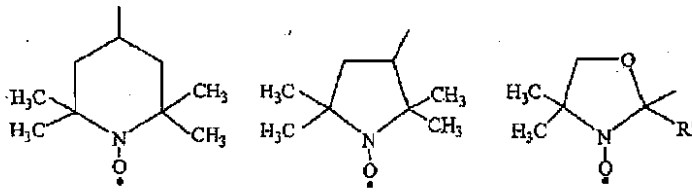
R は、各、独立してメチルまたはメトキシを表し、 a は 0 ~ 3 の整数であり、

m は 3 ~ 500 の整数を表し、

n は 2 ~ 10,000 の整数を表す、

Z は $-NH-$ または $-O-$ を介して共有結合した式

【化 7】



で表される基から選ばれるか、または

- P (= O) (O C H ₂ C H ₃) ₂ もしくは - P (= O) (O H) ₂ を表し、
これらの基は Z の総数の少なくとも 60 % を含み、存在する場合、残りは塩素、臭素若しくはヨウ素原子又はヒドロキシルである、

で表される共重合体または式 (I I) における (R) _a で置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルが水素原子もしくはメルカプトで置換されたブロック共重合体。

【請求項 7】

(削除)

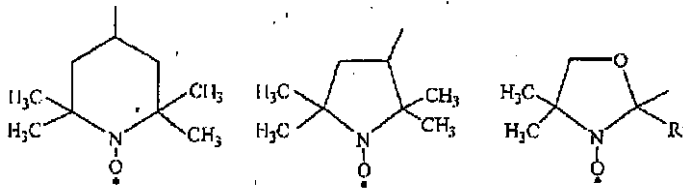
【請求項 8】

式 (I) の (R) _a で置換されていてもよいフェニルジチオカルボニルがそのまま存在する、請求項 6 に記載のブロック共重合体。

【請求項 9】

Z が - N H - または - O - を介して共有結合した式

【化 8】



で表される基から選ばれる、請求項 6 に記載のブロック共重合体。

【請求項 10】

Z が - P (= O) (O C H ₂ C H ₃) ₂ もしくは - P (= O) (O H) ₂ を表す、請求項 6 に記載のブロック共重合体。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/077432
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C08F297/00(2006.01)i, C08G65/28(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) C08F, C08G65 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Caplus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-111700 A (University of Tsukuba), 14 June 2012 (14.06.2012), claims; paragraphs [0004], [0005] (Family: none)	1-9
Y	WO 2009/133647 A1 (University of Tsukuba), 05 November 2009 (05.11.2009), claims; preparation example 1 & JP 5737705 B & US 2011/0142787 A1	1-9
Y	JP 2014-1159 A (University of Tsukuba), 09 January 2014 (09.01.2014), claims; paragraphs [0025] to [0028] (Family: none)	1-8, 10
<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 08 December 2015 (08.12.15)		Date of mailing of the international search report 22 December 2015 (22.12.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/077432

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/01478 A1 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND CO.), 15 January 1998 (15.01.1998), claims; examples & JP 2000-515181 A & US 2004/0171777 A1 & US 2008/0139836 A1 & US 2008/0139764 A1 & EP 910587 A1 & KR 10-2000-0023688 A & CN 1228787 A & CN 1500813 A	1-10
Y	JP 2003-321524 A (Kaneka Corp.), 14 November 2003 (14.11.2003), claims; paragraphs [0038] to [0057] (Family: none)	1-10
Y	CN 103819390 A (Nanjing Tech University), 28 May 2014 (28.05.2014), claims; paragraphs [0007] to [0026]; examples (Family: none)	1-10
A	JP 2012-530279 A (Bausch & Lomb Inc.), 29 November 2012 (29.11.2012), claims & US 2010/0315588 A1 & WO 2010/147864 A2 & EP 2443482 A1 & CN 102460223 A	1-10
A	WO 2013/111801 A1 (University of Tsukuba), 01 August 2013 (01.08.2013), claims; examples & US 2014/0356315 A1 & EP 2808349 A1	1-10
A	Macromolecules, 2014.01.14, Vol.47, No.1, 130-136	1-10
P,A	WO 2015/118993 A1 (University of Tsukuba), 13 August 2015 (13.08.2015), claims (Family: none)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/077432

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The inventions of claims 1-11 are classified into the following two invention groups. Claims 1-10 Claim 11 A technical feature common between these invention groups is a compound having polyethylene glycol as a partial structure. However, such compound is so well known that no citation is necessary (for example, WO 09/133647 A1). Said technical feature cannot hence be considered to be a special technical feature. (Continued to extra sheet)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/077432

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Consequently, it is not considered that the above-said two invention groups are so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 7 4 3 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C08F297/00(2006.01)i, C08G65/28(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. C08F, C08G65											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 2012-111700 A (国立大学法人筑波大学) 2012.06.14, 特許請求の範囲、[0004][0005] (ファミリーなし)	1-9									
Y	WO 2009/133647 A1 (国立大学法人筑波大学) 2009.11.05, 請求の範囲、製造例1 & JP 5737705 B & US 2011/0142787 A1	1-9									
Y	JP 2014-1159 A (国立大学法人筑波大学) 2014.01.09, 特許請求の範囲、[0025]-[0028] (ファミリーなし)	1-8, 10									
<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 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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 08.12.2015		国際調査報告の発送日 22.12.2015									
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) 渡辺 陽子 電話番号 03-3581-1101 内線 3457	4 J 9 2 7 9								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/077432

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	WO 98/01478 A1 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 1998.01.15, claims, examples & JP 2000-515181 A & US 2004/0171777 A1 & US 2008/0139836 A1 & US 2008/0139764 A1 & EP 910587 A1 & KR 10-2000-0023688 A & CN 1228787 A & CN 1500813 A	1-10
Y	JP 2003-321524 A (鐘淵化学工業株式会社) 2003.11.14, 特許請求の範囲、[0038]-[0057] (ファミリーなし)	1-10
Y	CN 103819390 A (南京工業大学) 2014.05.28, claims、[0007]-[0026]、examples (No Family)	1-10
A	JP 2012-530279 A (ボーシュ アンド ローム インコーポレイテッド) 2012.11.29, 特許請求の範囲 & US 2010/0315588 A1 & WO 2010/147864 A2 & EP 2443482 A1 & CN 102460223 A	1-10
A	WO 2013/111801 A1 (国立大学法人筑波大学) 2013.08.01, 請求の範囲、実施例 & US 2014/0356315 A1 & EP 2808349 A1	1-10
A	Macromolecules, 2014.01.14, Vol.47, No.1, 130-136	1-10
P A	WO 2015/118993 A1 (国立大学法人筑波大学) 2015.08.13, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 7 4 3 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。
請求項1～11に係る発明は、以下の2つの発明群に区分される。

請求項1-10

請求項11

これらの発明群において、共通する技術的特徴は、ポリエチレングリコールを部分構造として有する化合物であるが、かかる化合物は文献を示すまでもなく周知である (例えばWO 09/133647 A1) から、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴とはいえない。

してみれば、上記2つの発明群は、単一の一般的な発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1-10

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

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, ST, 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, 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

(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。