

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6726195号
(P6726195)

(45) 発行日 令和2年7月22日(2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年6月30日(2020.6.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 7/08	(2006.01)	C 07 K	7/08	Z N A
C07K 7/50	(2006.01)	C 07 K	7/50	
A61K 38/08	(2019.01)	A 61 K	38/08	
A61K 45/00	(2006.01)	A 61 K	45/00	
A61P 35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00	

請求項の数 14 (全 150 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-541039 (P2017-541039)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月2日(2016.2.2)
 (65) 公表番号 特表2018-507197 (P2018-507197A)
 (43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/016074
 (87) 國際公開番号 WO2016/126646
 (87) 國際公開日 平成28年8月11日(2016.8.11)
 審査請求日 平成30年11月16日(2018.11.16)
 (31) 優先権主張番号 62/111,900
 (32) 優先日 平成27年2月4日(2015.2.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 391015708
ブリストルマイヤーズ スクイブ カン
パニー
B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
B C O M P A N Y
アメリカ合衆国O 8 5 4 3 ニュージャージ
ー州 ブリンストン、ルート206アンド
・プロビンス・ライン・ロード
(74) 代理人 100100158
弁理士 鮫島 瞳
(74) 代理人 100126778
弁理士 品川 永敏
(74) 代理人 100162684
弁理士 吳 英燐

最終頁に続く

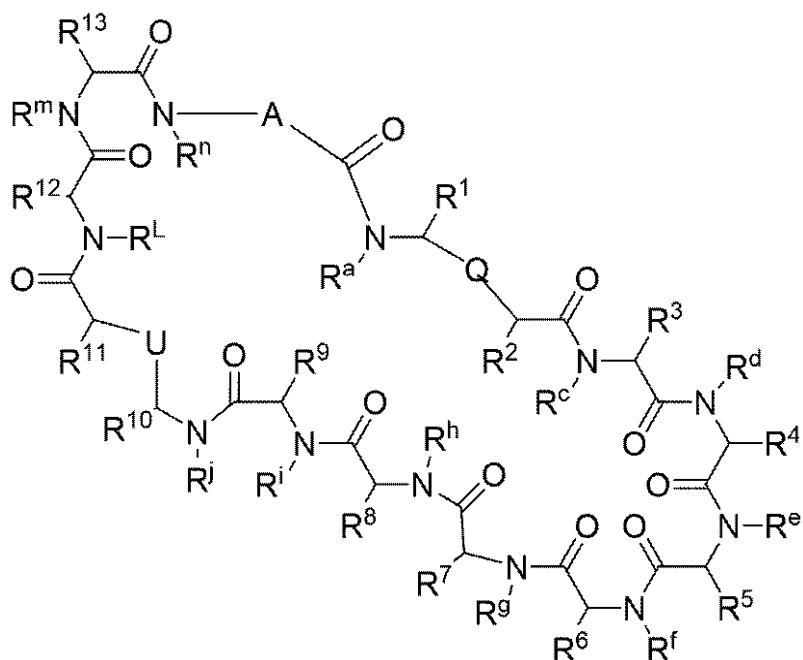
(54) 【発明の名称】免疫修飾剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(I) :

【化1】



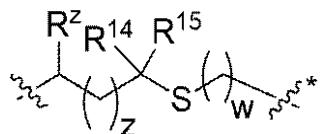
10

(I)

20

[式中、
Aは、

【化2】

であり；
ここで：

【化3】

30



は、カルボニル基の結合点を表し、

【化4】

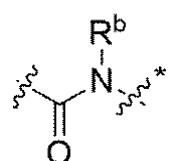


は、窒素原子との結合点を表し；

zは、0であり；wは、1であり；R¹-R⁴およびR¹-R⁵は、水素であり；R^zは-C(O)NHR¹-R⁶であり；ここでR¹-R⁶は-CHR¹-C(O)NH₂であり；ここでR¹-R⁷は水素および-CH₂OHから選択され；

Qは、

【化5】

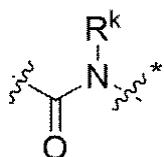


40

50

(ここでR^bは下記に規定される)、および1または2つの二重結合を含有し、かつ1、2、3、または4つの窒素原子を含有する5員環から選択され；

Uは、



(ここでR^kは、下記に規定される)、および1または2つの二重結合を含有し、かつ1、2、3、または4つの窒素原子を含有する5員環から選択され；

10

但し、少なくとも1つのQおよびUは、環である；

R^c、R^f、R^h、Rⁱ、R^m、およびRⁿは、水素であり；

R^a、R^e、R^j、およびR^kは、各々独立して水素およびメチルから選択され；

R^lは、メチルであり；

R¹は、フェニルC₁-C₃アルキルであり、ここで前記フェニルは、ヒドロキシで所望により置換されていてもよく；

R²はC₁-C₇アルキルであってかつR^bはメチルであるか、あるいはR^bおよびR²は、それらに結合している原子と一緒にになって、モルホリン環またはピペリジン環を形成しており；

R³は、-CH₂CO₂Hおよび-CH₂C(O)NH₂から選択され；

20

R⁴およびR^dは、それらが結合している原子と一緒にになって、ピロリジン環を形成してあり；

R⁵は、-CH₂NH₂および-CH₂(イミダゾリル)から選択され；

R⁶は、C₁-C₇アルキル、-CH₂CH₂C(O)NH₂、-CH₂CH₂CH₂NH₂、および-CH₂CH₂CO₂Hから選択され；

R⁷は水素でありかつR^gは水素またはメチルであるか、あるいはR⁷およびR^gはそれらが結合している原子と一緒にになって、所望によりヒドロキシ基で置換されていてもよいピロリジン環を形成してあり；

R⁸は、-(CH₂)インドリルであり；

R⁹は、アミノメチル、ヒドロキシメチル、-CH₂CH₂NH₂、およびCH₂CH₂CH₂NH₂から選択され；

30

R¹⁰は、-(CH₂)インドリル、-(CH₂)ナフチル、および-(CH₂)ベンゾチエニルから選択され、各々-CH₂CO₂Hで所望により置換されていてもよく；

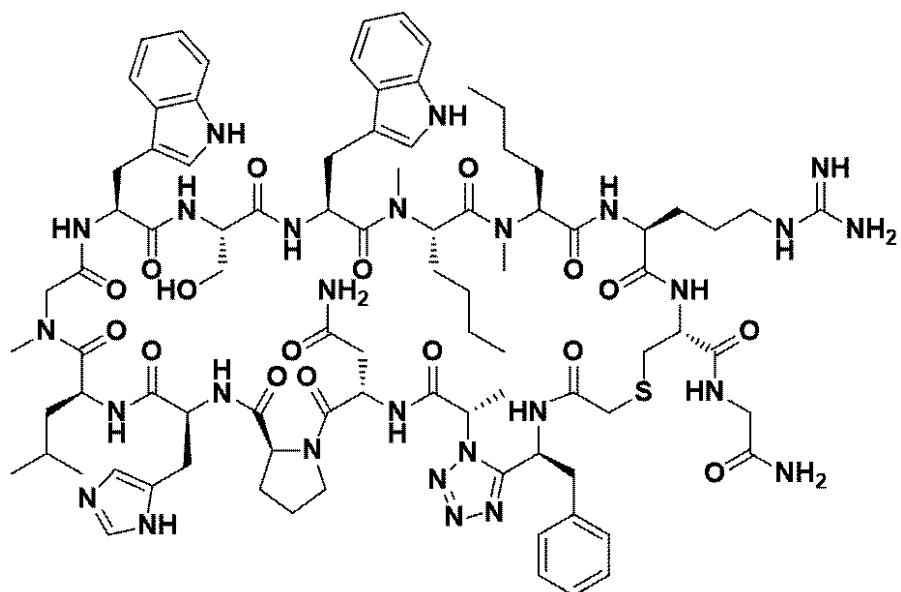
R¹¹は、C₁-C₇アルキルであり；

R¹²は、C₁-C₇アルキルであり；および

R¹³は、天然アミノ酸側鎖および非天然アミノ酸側鎖から選択される]の化合物あるいはその医薬的に許容される塩。

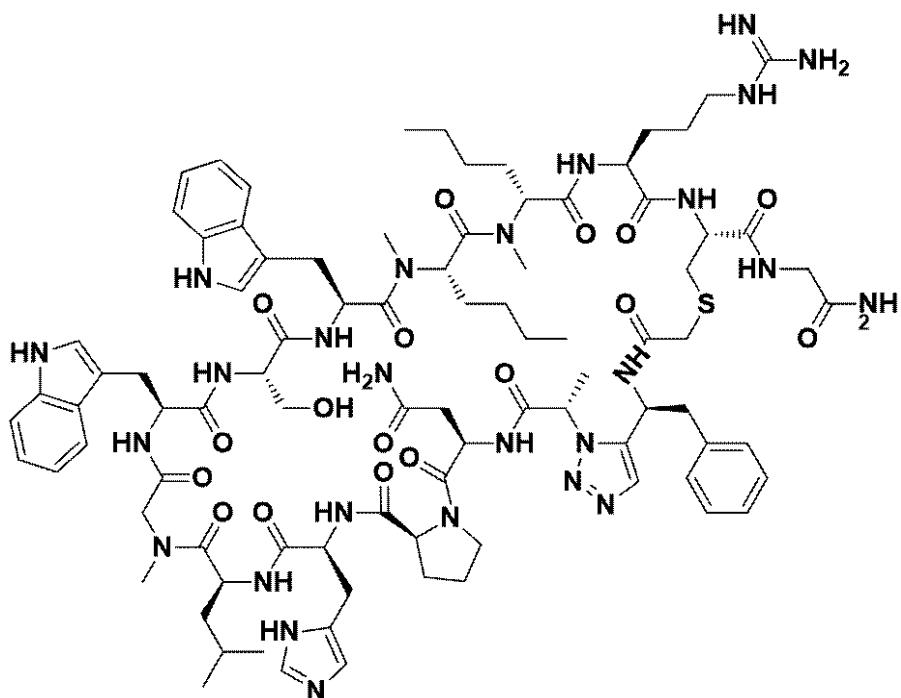
【請求項2】

【化 6】



10

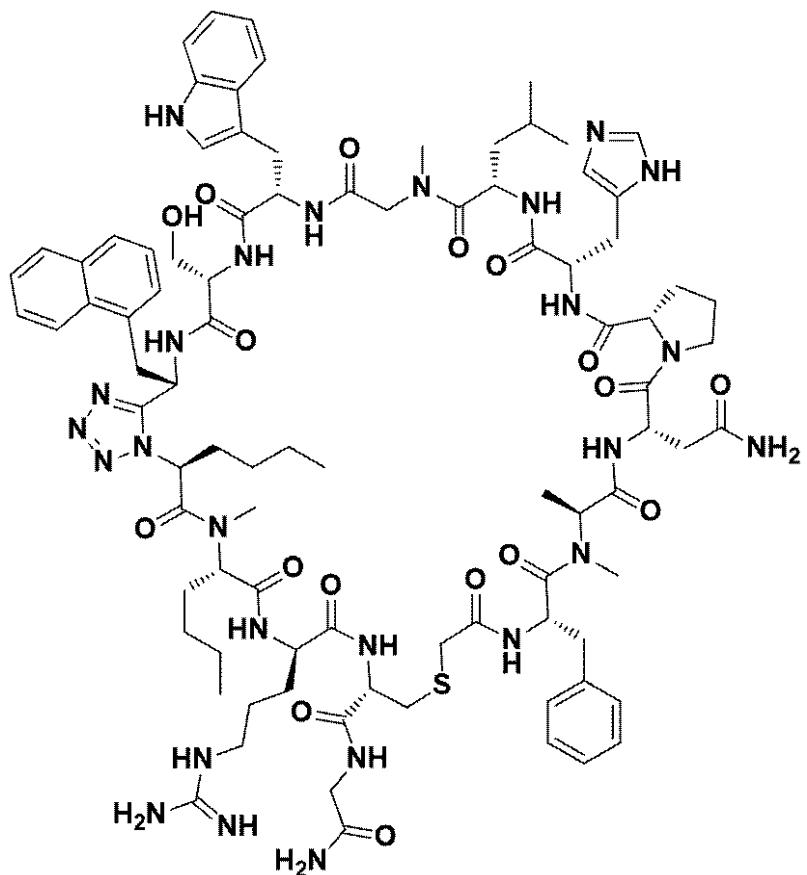
【化 7】



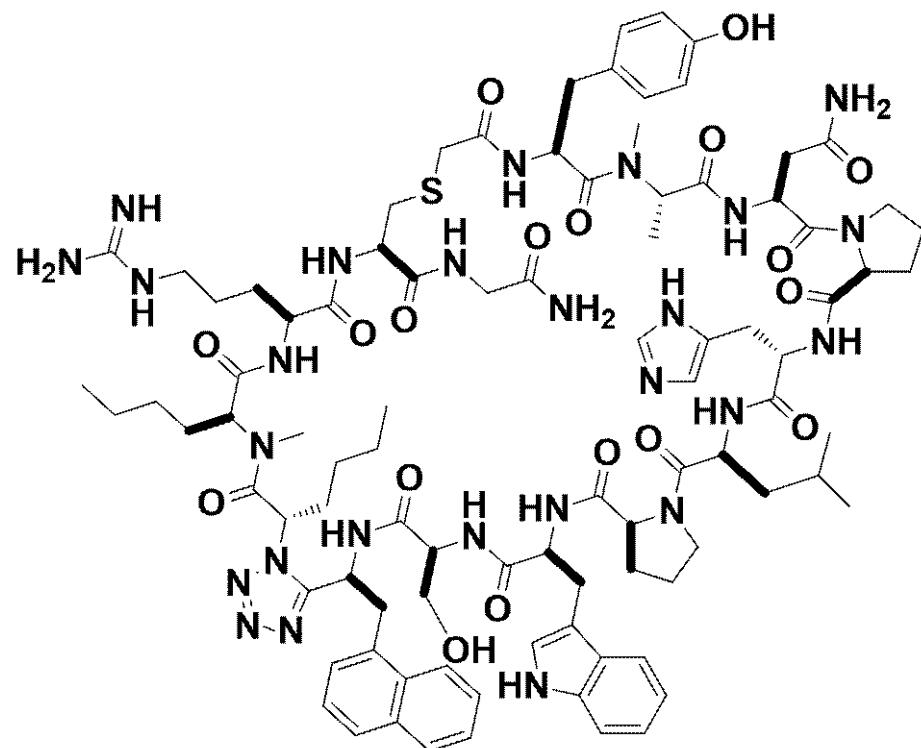
20

30

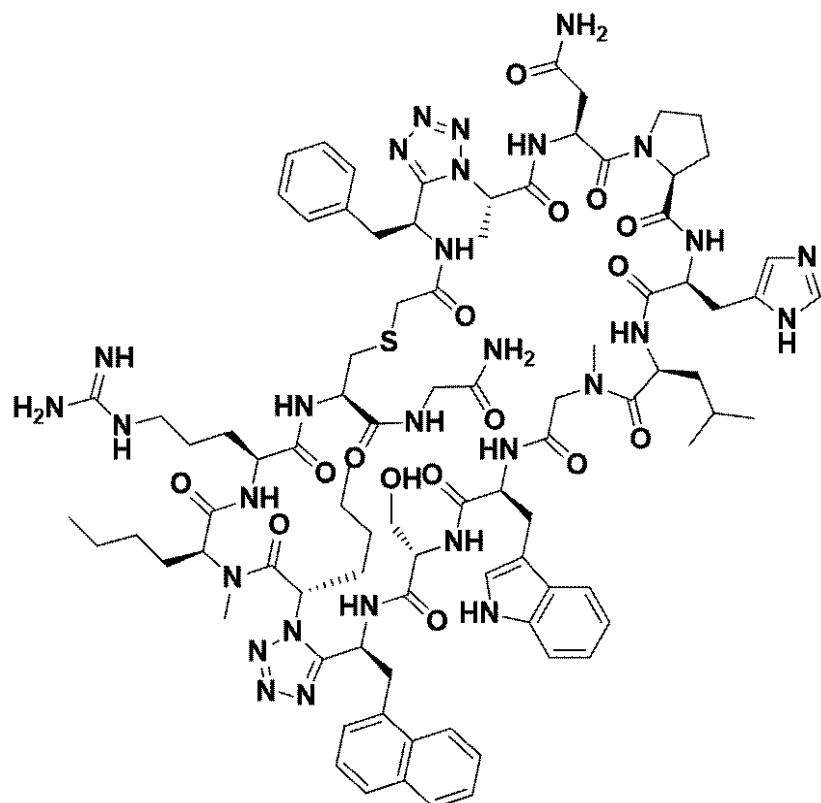
【化 8】



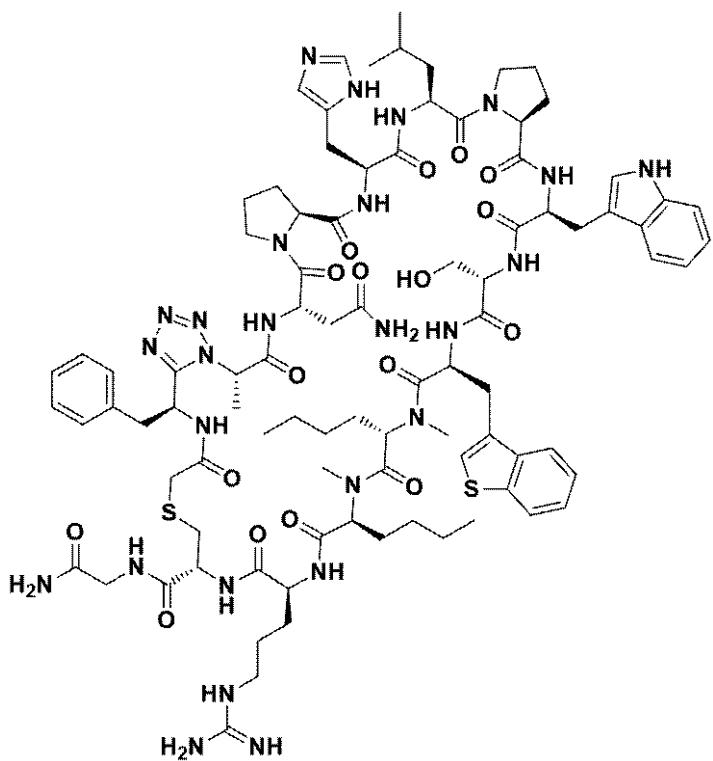
【化 9】



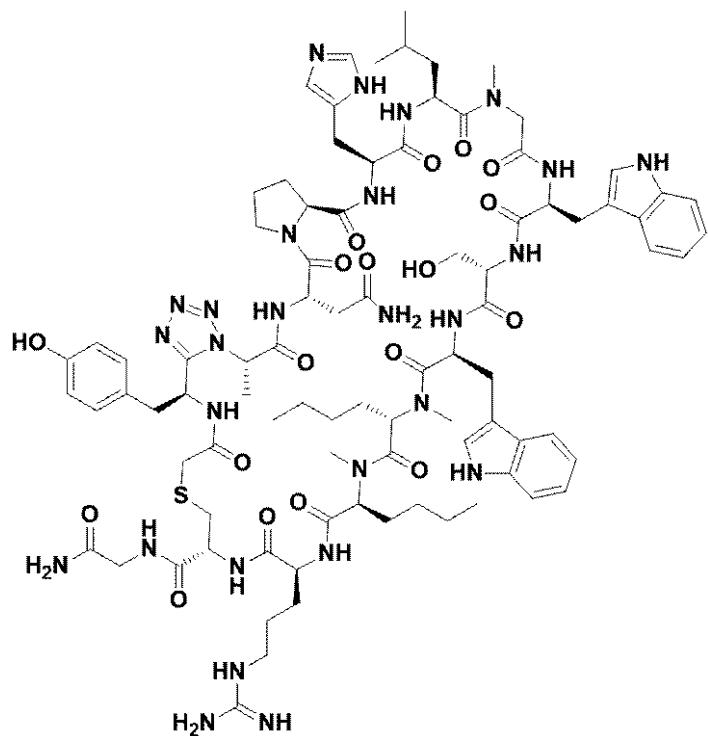
【化 1 0】



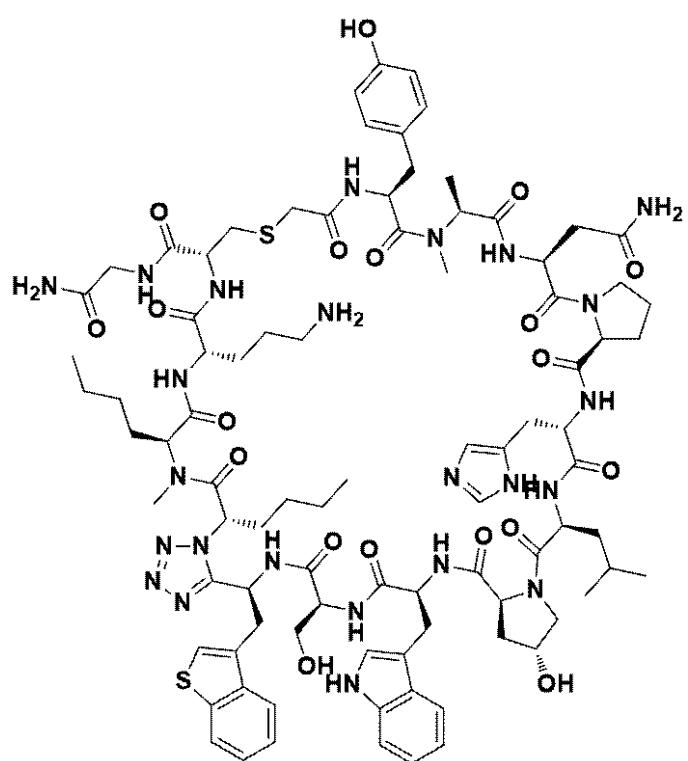
【化 1 1】



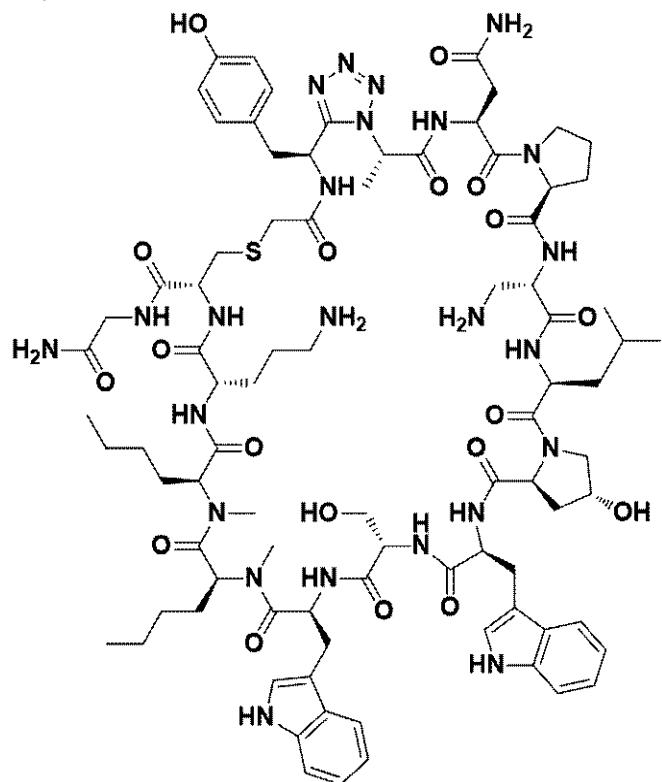
【化 1 2】



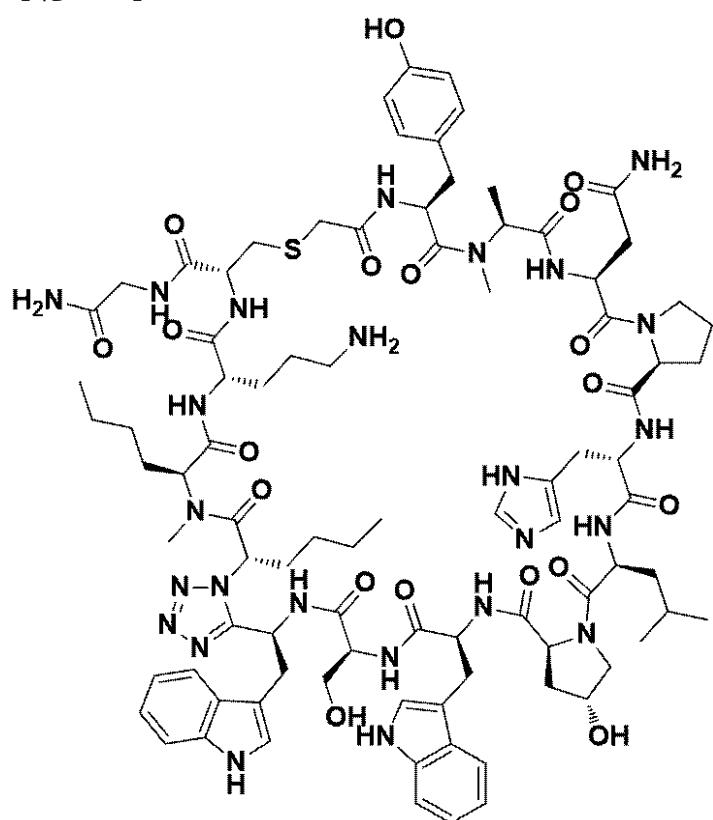
【化 1 3】



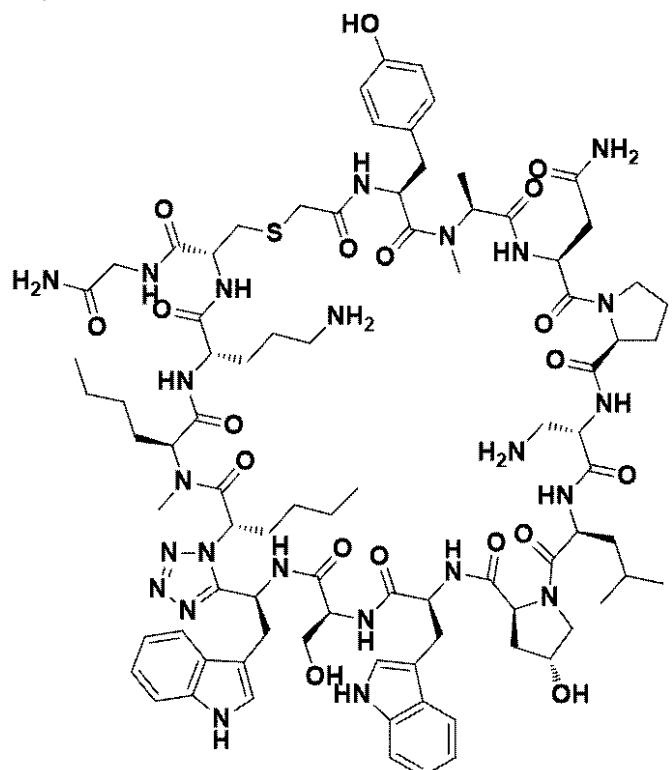
【化 1 4】



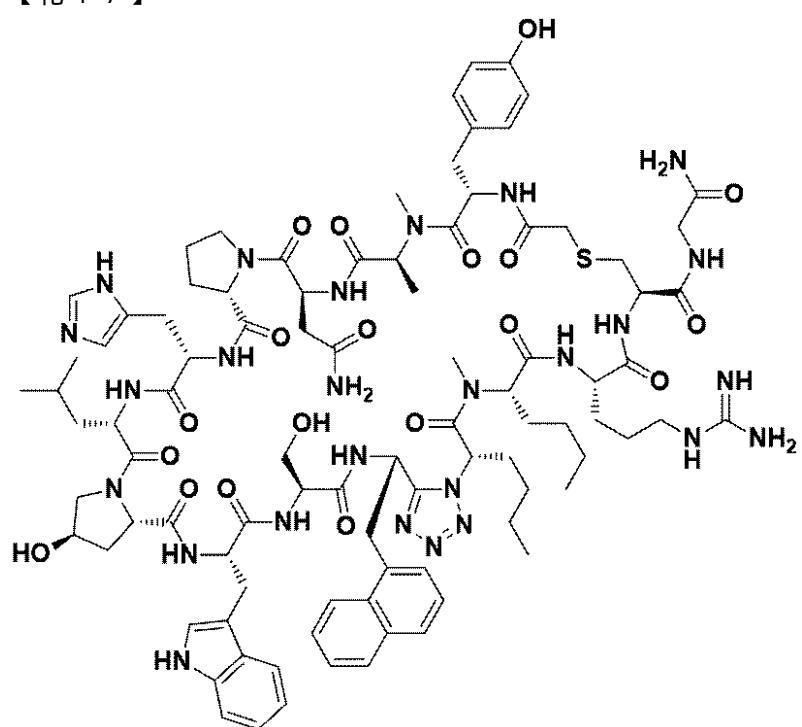
【化 1 5】



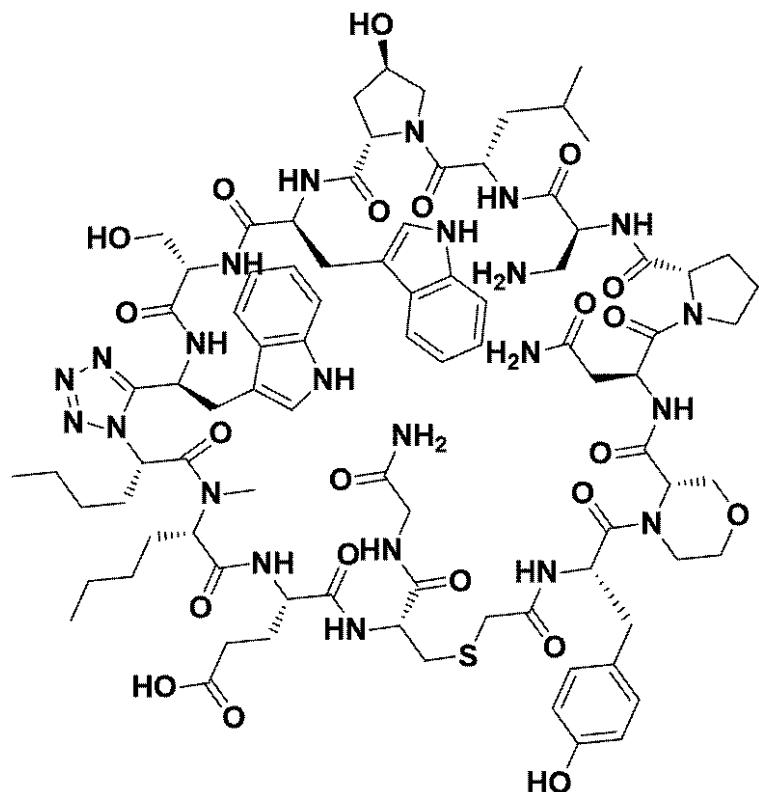
【化 1 6】



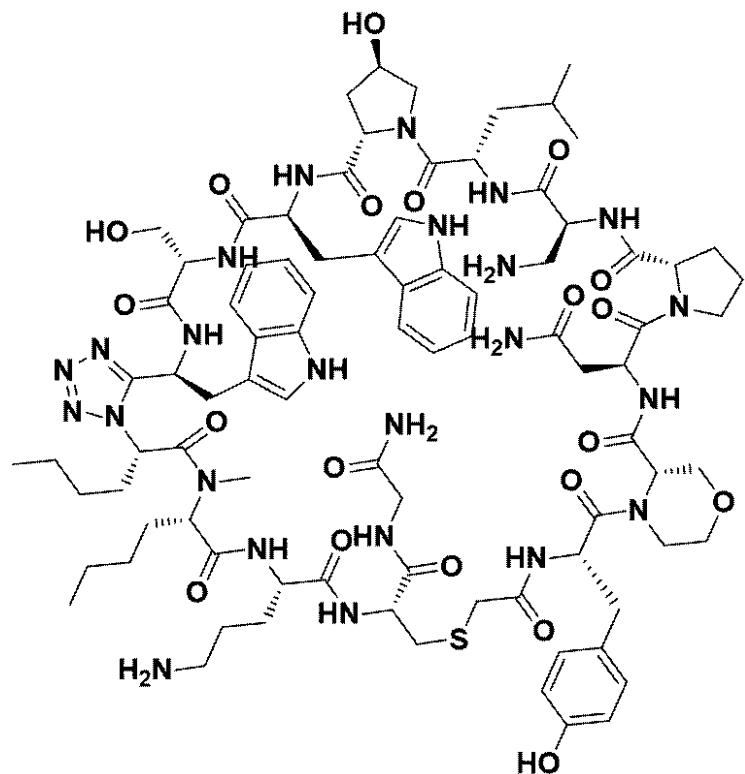
【化 1 7】



【化 18】

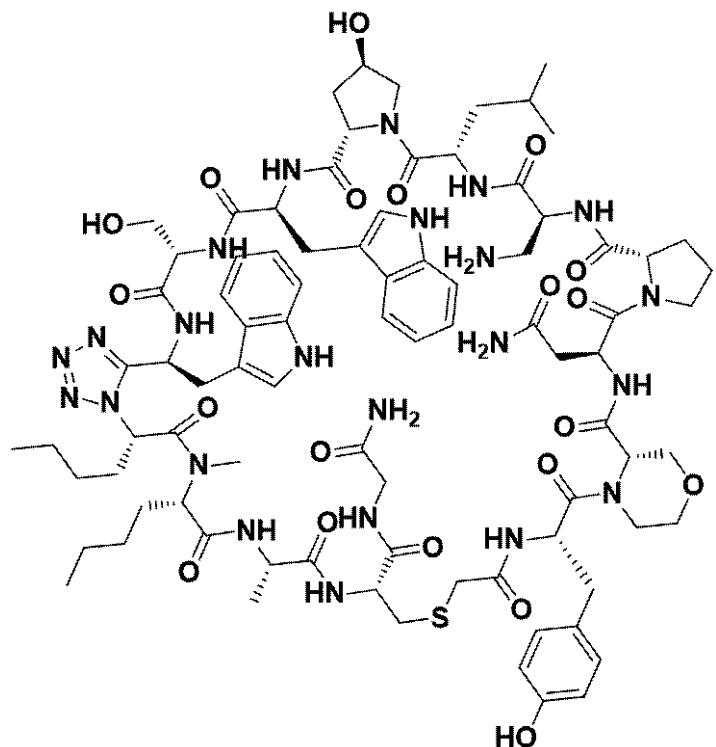


【化 19】

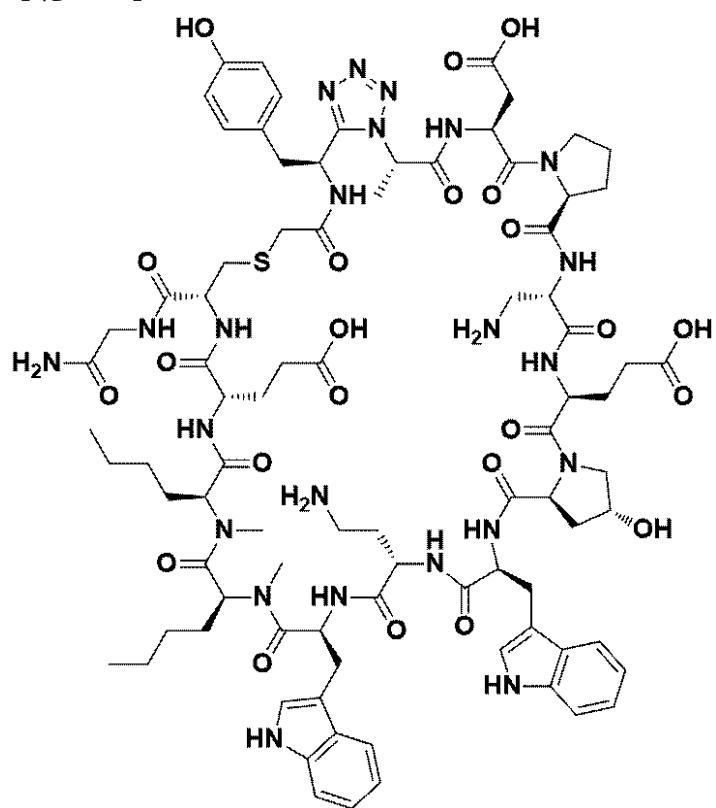


40

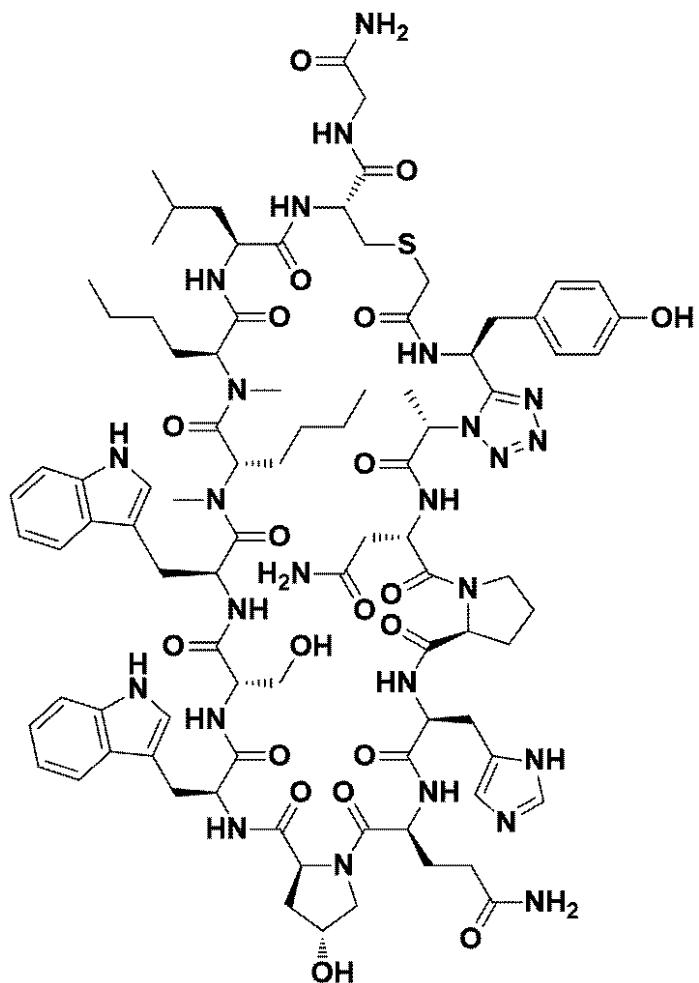
【化 2 0】



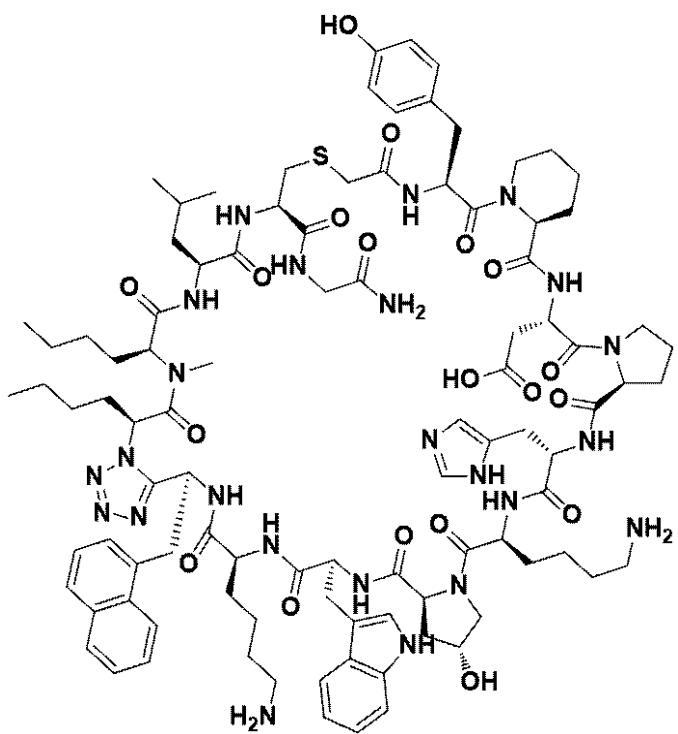
【化 2 1】



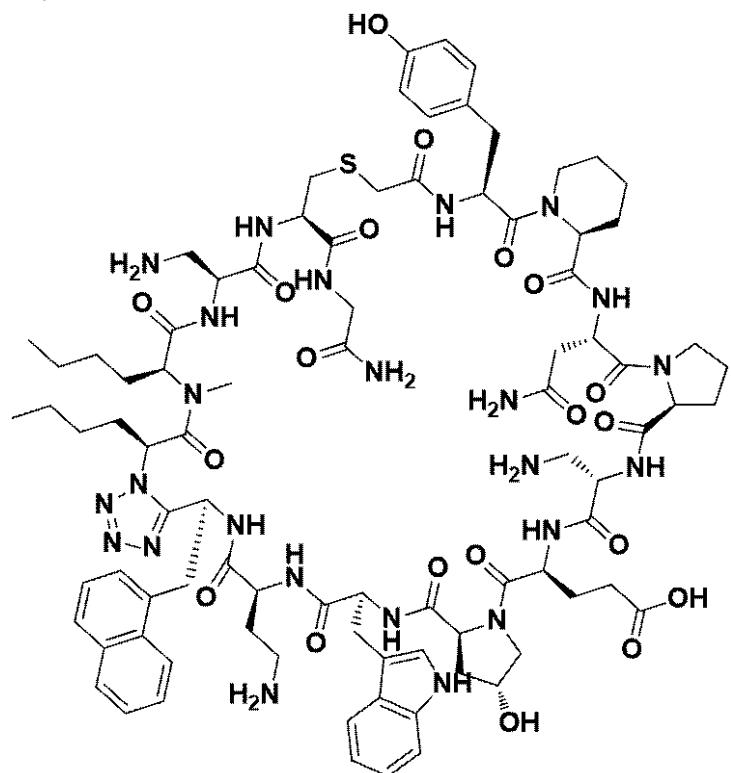
【化 2 2】



【化 2 3】



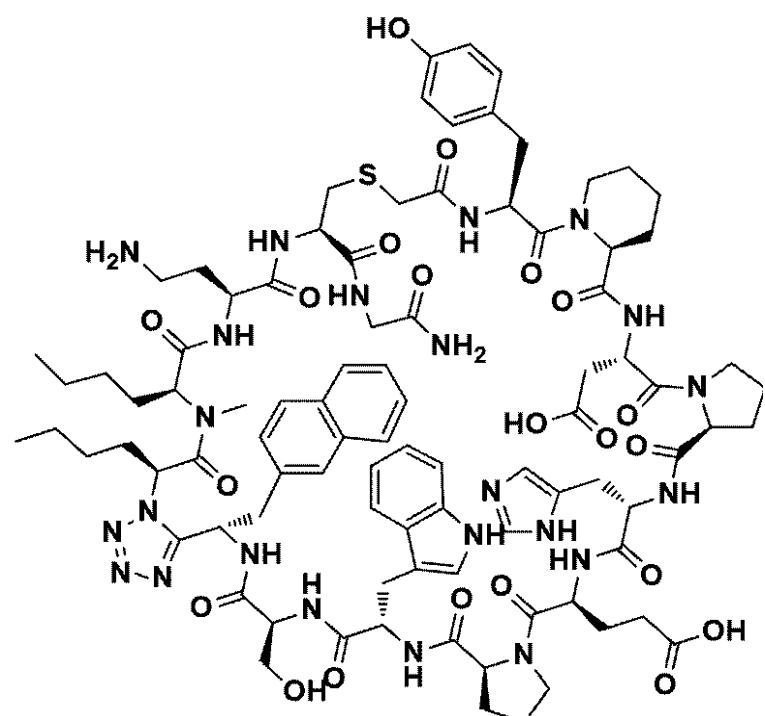
【化 24】



10

20

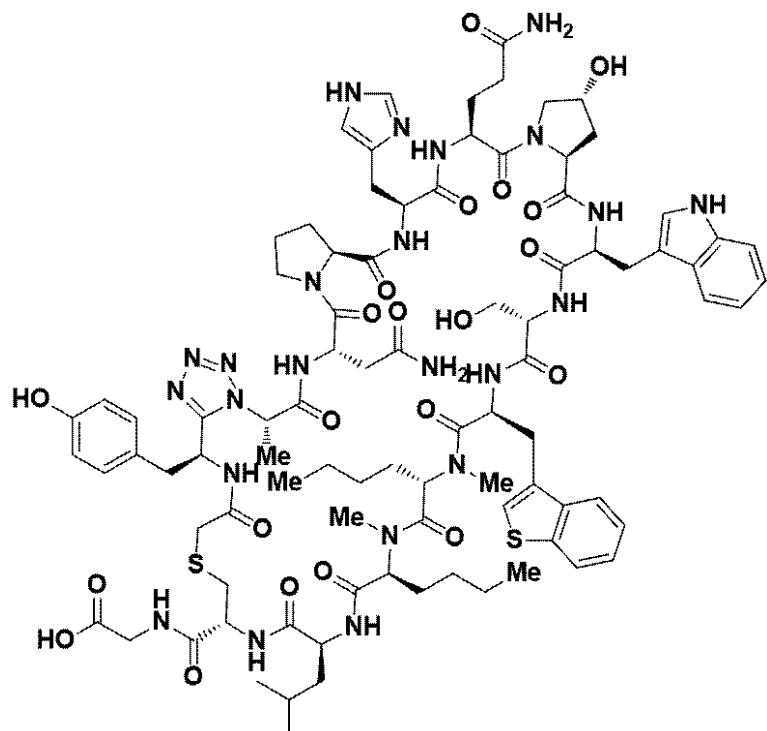
【化 25】



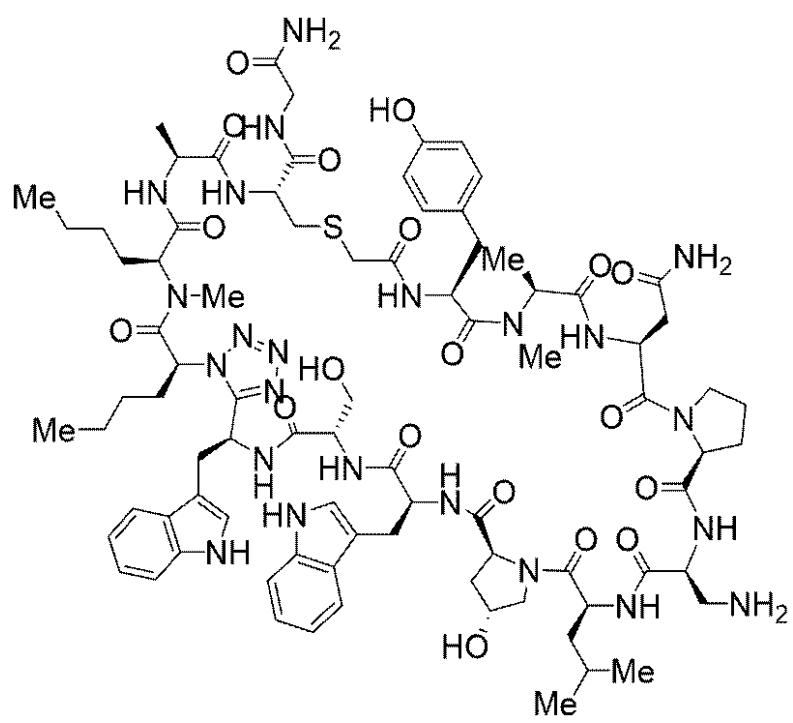
30

40

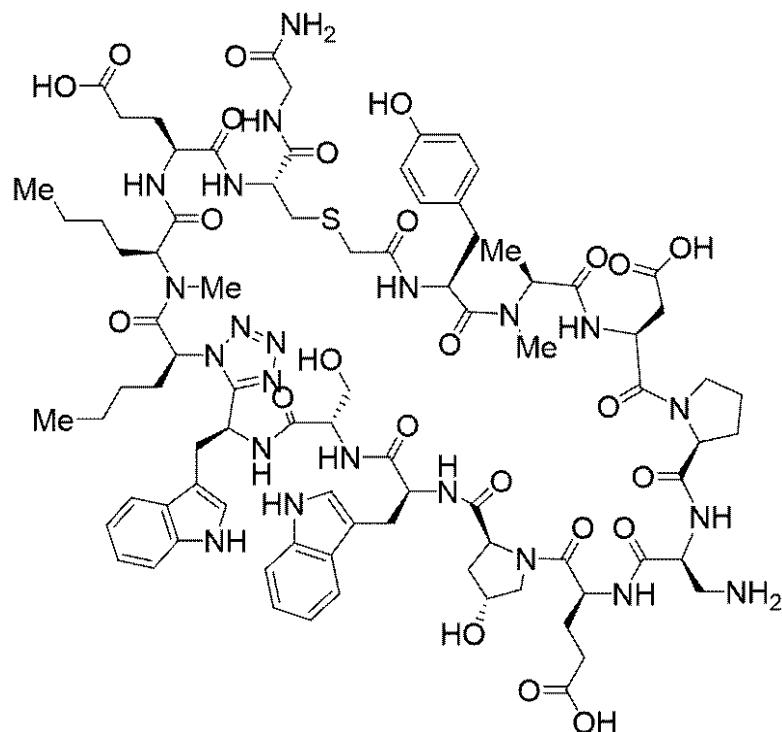
【化 2 6】



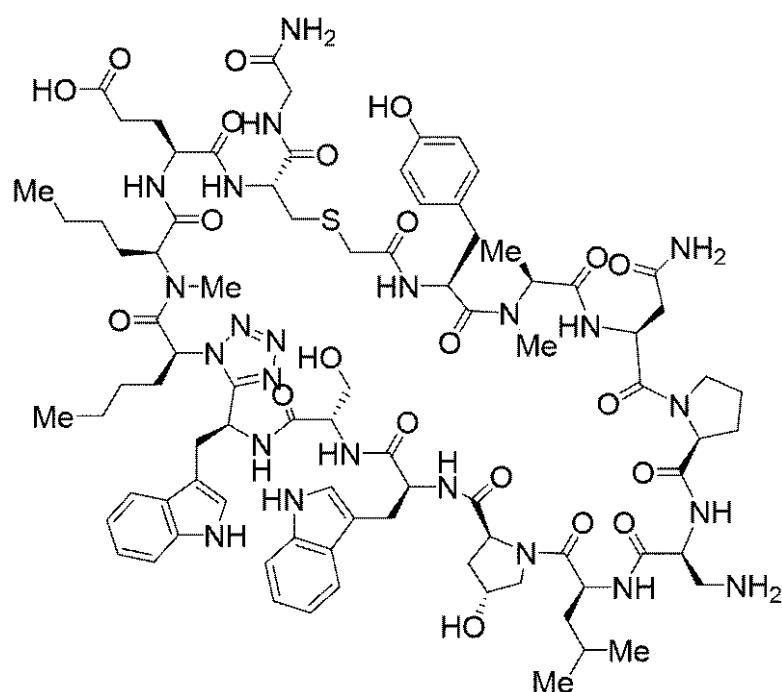
【化 2 7】



【化 2 8】

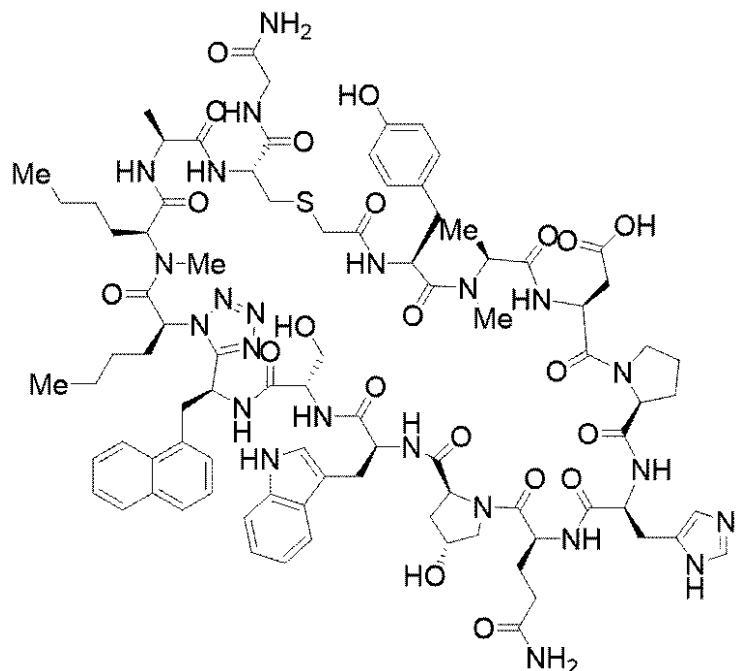


【化 2 9】



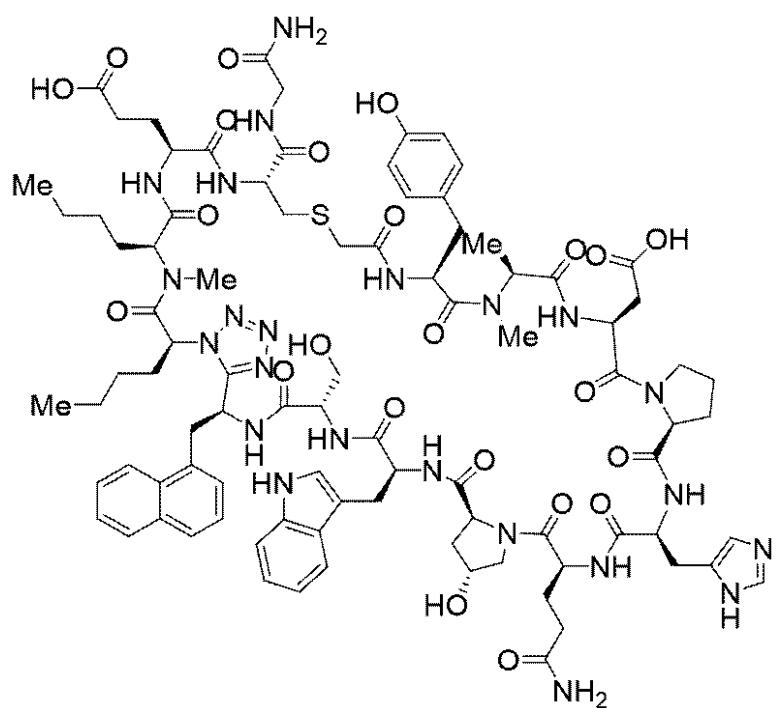
40

【化 3 0】



10

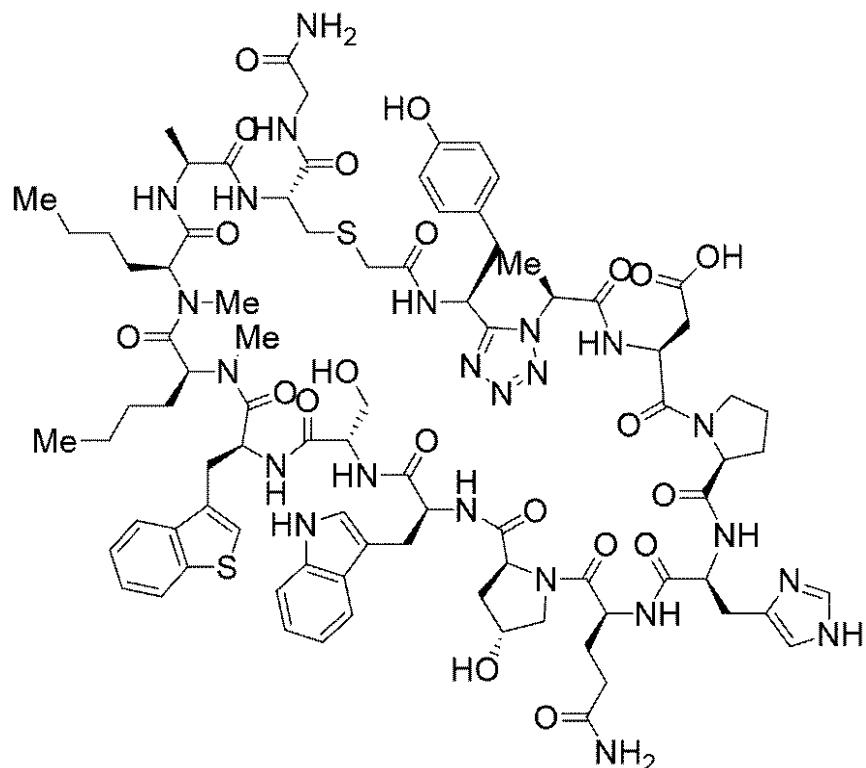
【化 3 1】



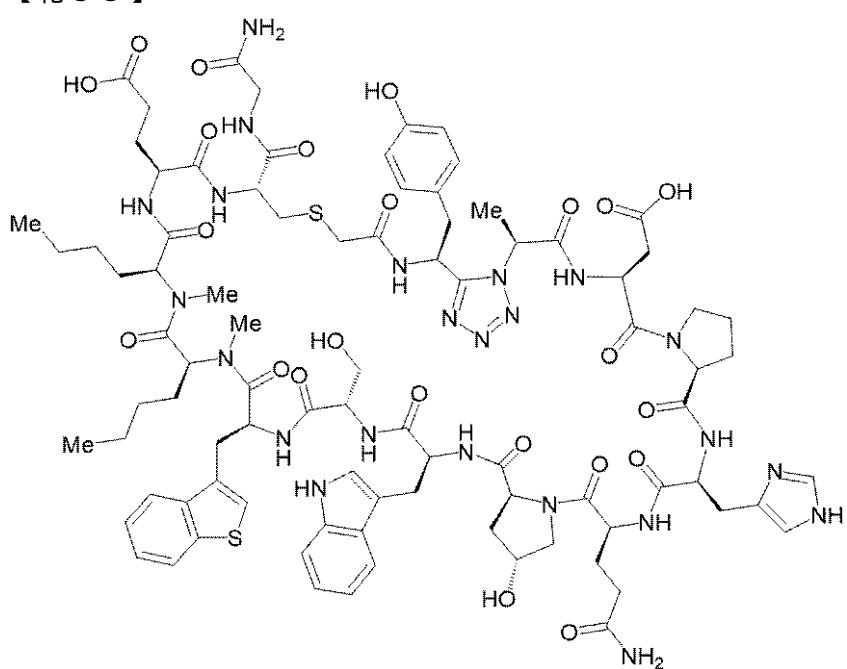
30

20

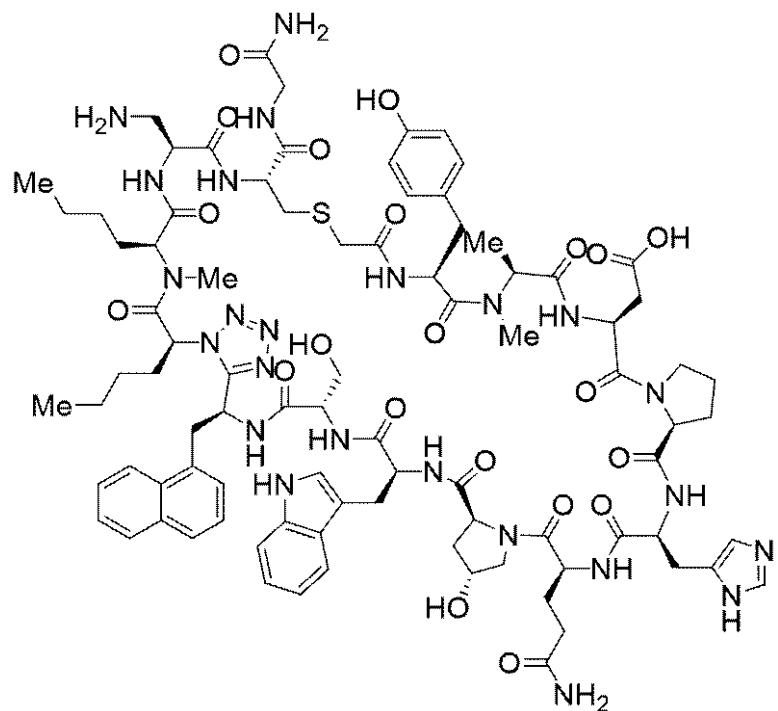
【化 3 2】



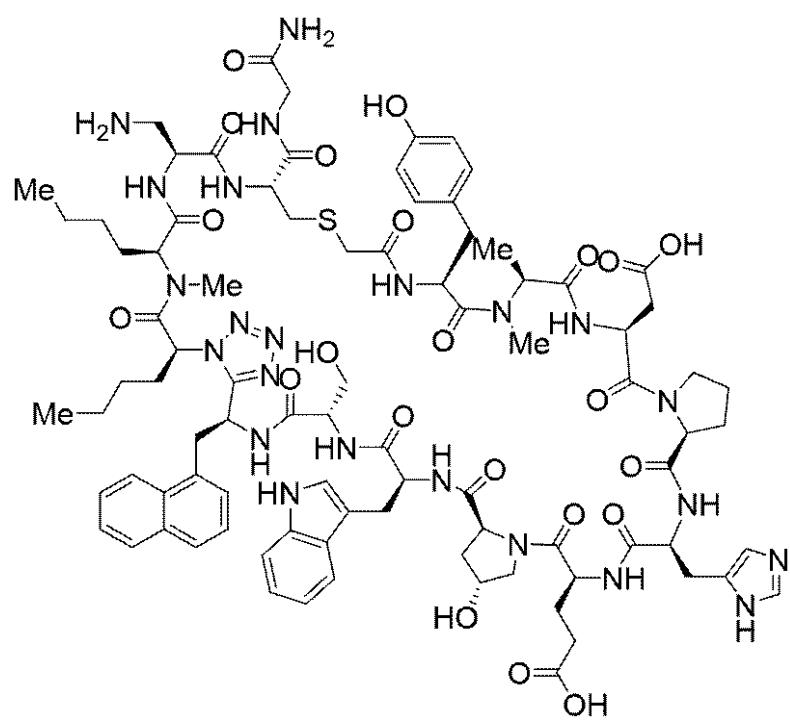
【化 3 3】



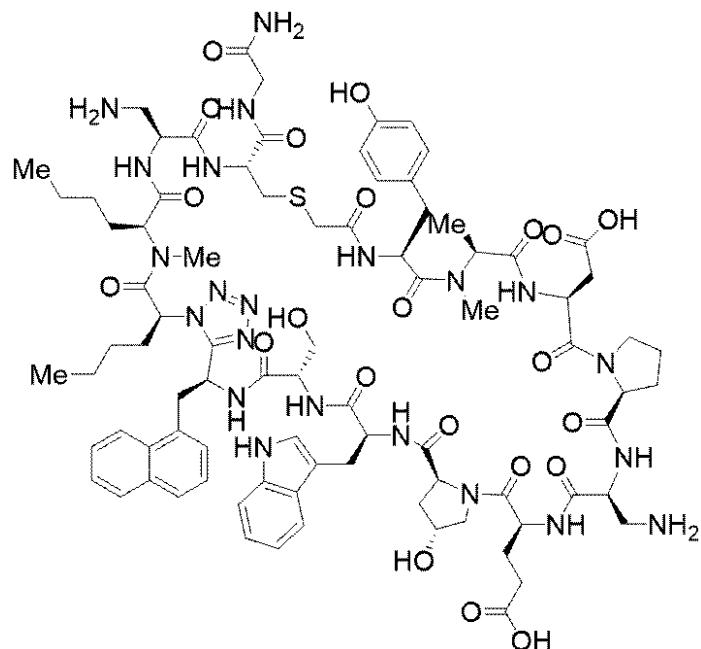
【化 3 4】



【化 3 5】

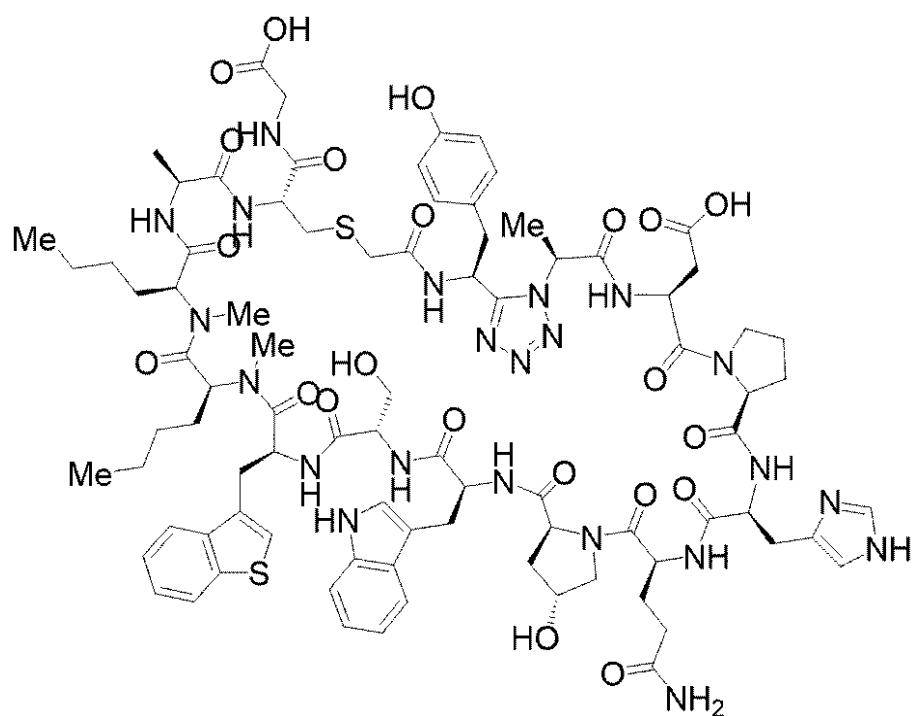


【化 3 6】



10

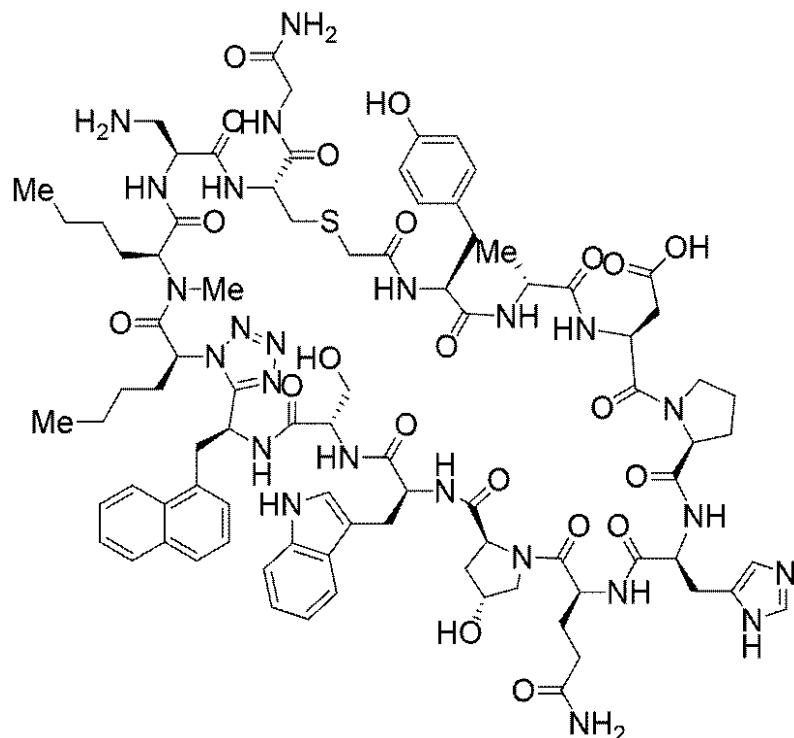
【化 3 7】



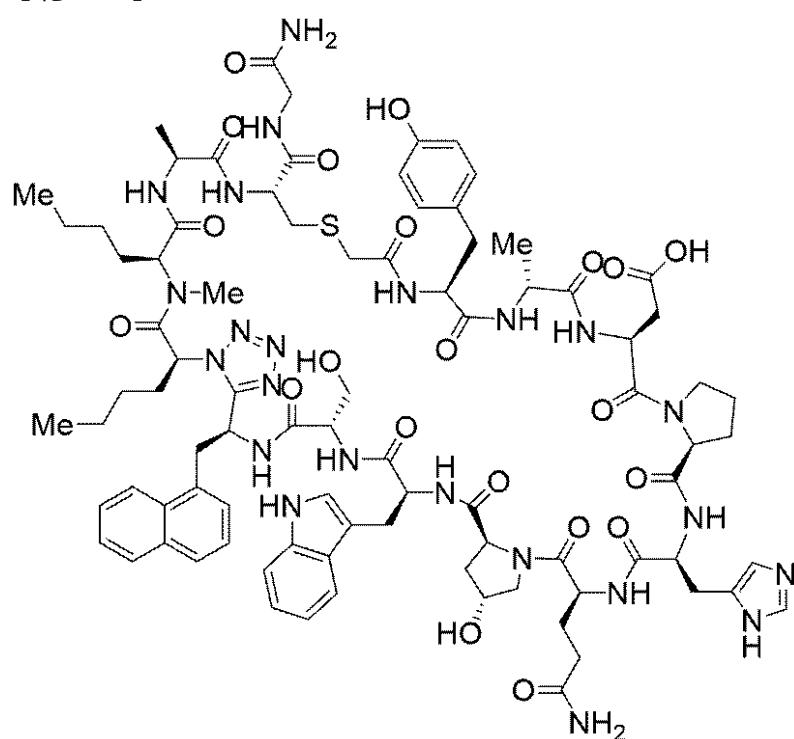
20

30

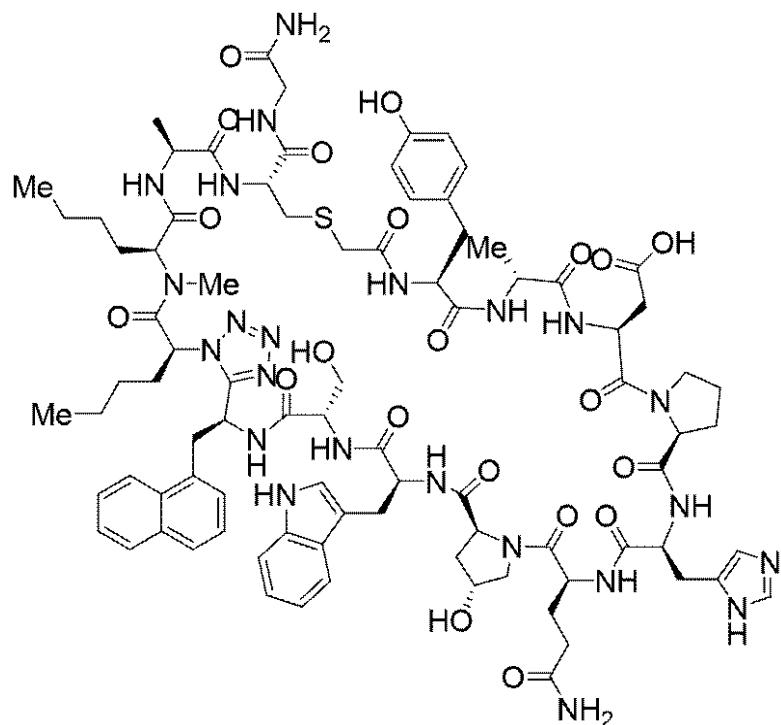
【化 3 8】



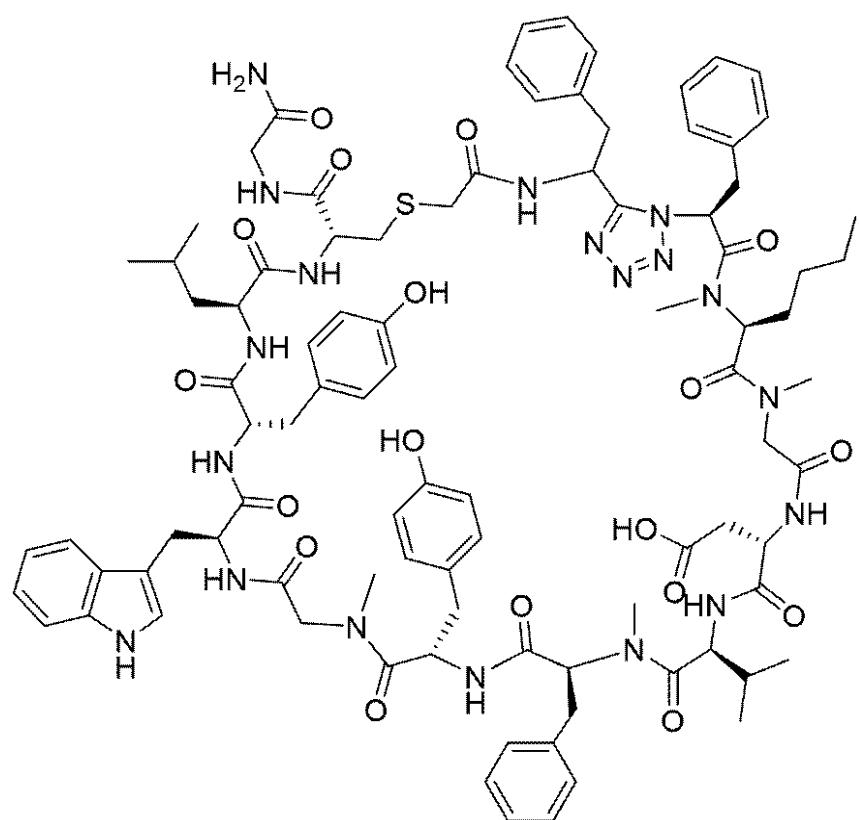
【化 3 9】



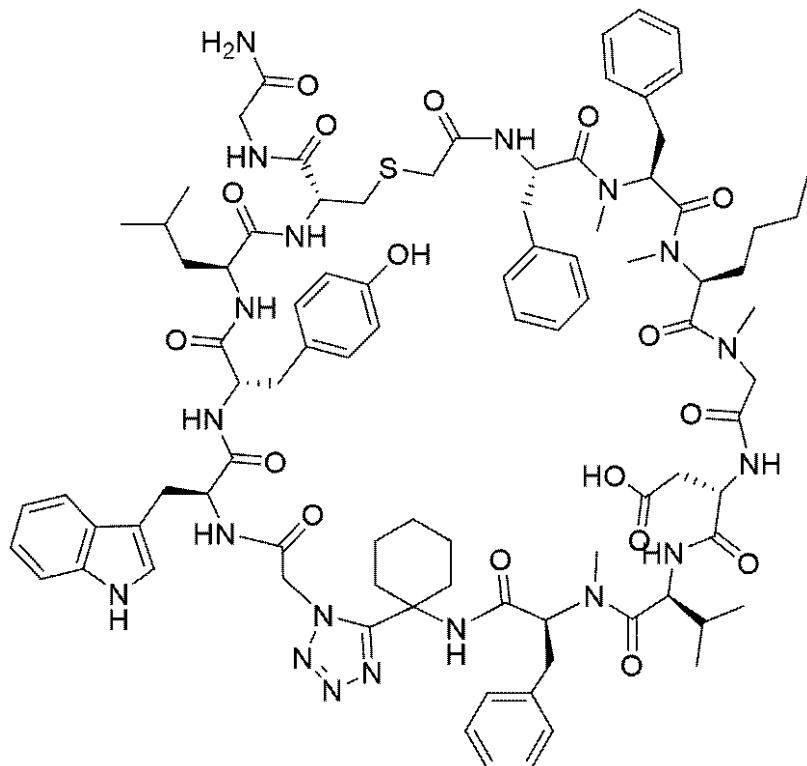
【化 4 0】



【化 4 1】

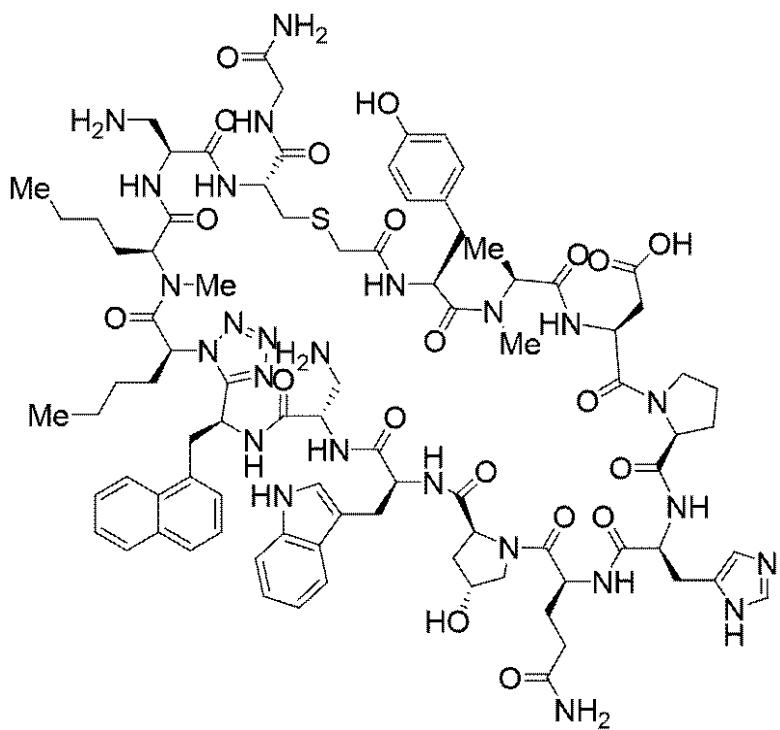


【化42】



および

【化43】



から選択される化合物、あるいはその医薬的に許容される塩。

【請求項3】

請求項1または2記載の化合物またはその治療的に許容される塩を含む、免疫応答を増強、刺激および／または上昇させるための医薬組成物。

【請求項4】

別の薬剤を、該医薬組成物の投与前、後または同時に投与することを特徴とする、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項5】

別の薬剤が、殺菌剤、抗ウイルス剤、細胞毒性剤および／または免疫応答修飾剤である、請求項4記載の医薬組成物。

【請求項6】

別の薬剤が、H D A C 阻害剤である、請求項4記載の医薬組成物。

【請求項7】

別の薬剤が、T L R 7 および／またはT L R 8 アゴニストである、請求項4記載の医薬組成物。

【請求項8】

請求項1または2記載の化合物またはその治療的に許容される塩を含む、癌細胞の成長、細胞増殖または転移を阻害するための医薬組成物。

10

【請求項9】

癌が、黒色腫、腎細胞癌、扁平非小細胞性肺癌(N S C L C)、非扁平N S C L C、結腸直腸癌、去勢抵抗性前立腺癌、卵巣癌、胃癌、肝細胞癌、膵臓癌、頭頸部の扁平上皮細胞癌、食道、消化管および乳房の癌ならびに造血器腫瘍から選択される、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項10】

請求項1または2記載の化合物またはその治療的に許容される塩を含む、感染性疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項11】

感染性疾患がウイルスを原因とする、請求項1記載の医薬組成物。

20

【請求項12】

ウイルスが、H I V、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ヘルペスウイルスおよびインフルエンザから選択される、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項13】

請求項1または2記載の化合物またはその治療的に許容される塩を含む、敗血症性ショックを治療するための医薬組成物。

【請求項14】

請求項1または2記載の化合物またはその治療的に許容される塩を含む、P D - L 1とP D - 1および／またはC D 8 0の相互作用を遮断するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【関連出願】

【0 0 0 1】

(関連出願に対する相互参照)

本出願は、2015年2月4日に提出した米国仮出願番号第62/111,900号に対する優先権を主張するものであって、その全てを参照により本明細書に組み込むものである。

【0 0 0 2】

本発明は、P D - 1 / P D - L 1 および C D 8 0 / P D - L 1 タンパク質／タンパク質相互作用を阻害し、それゆえに、癌および感染症を含む種々の疾患の改善に有用である新規大環状ペプチドを提供する。

40

【背景技術】

【0 0 0 3】

タンパク質プログラム細胞死1(P D - 1)は、C D 2 8、C T L A - 4、I C O S およびB T L Aも含む受容体のC D 2 8 ファミリーの阻害性メンバーである。P D - 1は活性化B細胞、T細胞および骨髄球性細胞上に発現される(Agata et al., supra; Okazaki et al., Curr. Opin. Immunol., 14: 779-782(2002); Bennett et al., J. Immunol., 170: 711-718(2003))。

【0 0 0 4】

P D - 1 タンパク質は、I g 遺伝子スーパーファミリーの一部である55 kDa I型膜貫通型タンパク質である(Agata et al., Int. Immunol., 8: 765-772(1996))。P D -

50

1は、膜近位免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITYM)および膜遠位チロシンベーススイッチモチーフ(ITSIM)(Thomas, M.L., *J. Exp. Med.*, 181: 1953-1956(1995); Vivier, E. et al., *Immunol. Today*, 18: 286-291(1997))を含む。PD-1は、CTLA-4と構造は類似するが、CD80 CD86(B7-2)結合に重要なMYPPYモチーフを欠く。PD-1に対する2個のリガンドであるPD-L1(B7-H1)およびPD-L2(b7-DC)が同定されている。PD-1を発現するT細胞の活性化は、PD-L1またはPD-L2を発現する細胞との相互作用により下方制御されることが示されている(Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192: 1027-1034(2000); Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2: 261-268(2001); Carter et al., *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-643(2002))。PD-L1およびPD-L2のいずれも、PD-1に結合するB7タンパク質ファミリーメンバーであるが、他のCD28ファミリーメンバーとは結合しない。PD-L1リガンドは多様なヒトの癌で豊富である(Dong et al., *Nat. Med.*, 8: 787-789(2002))。PD-1とPD-L1の相互作用は、腫瘍浸潤性リンパ球の減少、T細胞受容体仲介増殖の減少および癌細胞による免疫回避の減少をもたらす(Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81: 281-287(2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54: 307-314(2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10: 5094-5100(2004))。免疫抑制は、PD-1とPD-L1の局所相互作用の阻害により逆転でき、PD-1とPD-L2の相互作用が同様に遮断されたとき、この効果は相加的である(Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 12293-12297(2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170: 1257-1266(2003))。

【0005】

PD-L1はCD80と相互作用することも示されている(Butte, MJ. et al., *Immunity*, 27: 111-122(2007))。発現する免疫細胞上でのPD-L1 / CD80相互作用は、阻害的であることが示されている。この相互作用の遮断は、この阻害相互作用を抑止することが示されている(Paterson, AM. et al., *J. Immunol.*, 187: 1097-1105(2011); Yang, J. et al., *J. Immunol.*, Aug 1; 187(3): 1113-9(2011))。

【0006】

PD-1発現T細胞が、そのリガンドを発現する細胞と接触したとき、増殖、サイトカイン分泌および細胞毒性を含む抗原性刺激に対する応答における機能活性が低下する。PD-1 / PD-L1またはPD-L2相互作用は、感染または腫瘍の回復期または自己耐容性の発達期の免疫応答を下方制御する(Keir, M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26: Epub(2008))。腫瘍疾患または慢性感染の期間に起こるような慢性抗原刺激は、高レベルのPD-1を発現し、慢性抗原に対する活性に関して機能障害性のT細胞を生じる(Kim et al., *Curr. Opin. Imm.*(2010)を参照されたい)。これは、“T細胞消耗”と呼ばれる。B細胞もPD-1 / PD-リガンド抑制および“消耗”を示す。

【0007】

PD-L1に対する抗体を使用したPD-1 / PD-L1ライゲーションの遮断は、多くの系におけるT細胞活性化を回復させ、増強させることができている。進行型の癌を有する患者は、PD-L1に対するモノクローナル抗体での処置により利益を得る(Brahmer et al., *New Engl. J. Med.*(2012))。腫瘍および慢性感染の前臨床的動物モデルは、モノクローナル抗体によるPD-1 / PD-L1経路の遮断により、免疫応答を増強し、腫瘍拒絶または感染の制御をもたらし得ることを示している。PD-1 / PD-L1の遮断による抗腫瘍免疫治療は、多くの組織学的に異なる腫瘍に対する治療的免疫応答を増強することができる(Dong, H. et al., “B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity”, *J. Mol. Med.*, 81(5): 281-287(2003); Dong, H. et al., “Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion”, *Nat. Med.*, 8(8): 793-800(2002))。

【0008】

PD-1 / PD-L1相互作用の妨害は、慢性感染を有する系におけるT細胞活性を増強できる。PD-L1の遮断は、慢性リンパ球性脈絡膜炎ウイルス感染マウスにおけるウイルスクリアランスの改善および免疫回復をもたらす(Barber, D.L. et al., “Restor

10

20

30

40

50

ing function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature*, 439(7077) : 682-687(2006))。HIV-1に感染したヒト化マウスは、ウイルス血症に対する保護の増強およびCD4+T細胞のウイルス枯渇を示す(Palmer et al., *J. Immunol.* (2013))。PD-L1に対するモノクローナル抗体によるPD-1/PD-L1の遮断は、HIV患者(Day, *Nature*(2006); Petrovas, *J. Exp. Med.*(2006); Trautman, *Nature Med.*(2006); D'Souza, *J. Immunol.*(2007); Zhang, *Blood*(2007); Kaufmann, *Nature Imm.*(2007); Kasu, *J. Immunol.*(2010); Porichis, *Blood*(2011))、HCV患者(Golden-Mason, *J. Virol.*(2007); Jeung, *J. Leuk. Biol.*(2007); Urbani, *J. Hepatol.*(2008); Nakamoto, *PLoS Path.*(2009); Nakamoto, *Gastroenterology*(2008))およびHBV患者(Boni, *J. Virol.*(2007); Fisicaro, *Gastro.*(2010); Fisicaro et al., *Gastroenterology*(2012); Boni et al., *Gastro.*(2012); Penna et al., *J. Hep.*(2012); Raziorrough, *Hepatology*(2009); Liang, *World J. Gastro.*(2010); Zhang, *Gastro.*(2008))からのT細胞に対するインピトロ抗原特異的機能性を回復できる。
10

【0009】

PD-L1/CD80相互作用の遮断は、免疫を刺激することも示されている(Yang, J. et al., *J. Immunol.*, Aug 1; 187(3) : 1113-9(2011))。PD-L1/CD80相互作用の遮断により生じる免疫刺激は、さらなるPD-1/PD-L1またはPD-1/PD-L2相互作用の遮断との組み合わせにより増強することが示されている。

【0010】

免疫細胞表現型の変更は、敗血症性ショックにおける重要な因子であるとの仮説がある(Hotchkiss et al., *Nat. Rev. Immunol.*(2013))。これらは、PD-1およびPD-L1のレベル増加を含む(Guignant, et al., *Crit. Care*(2011))。PD-1およびPD-L1レベルが上昇した敗血症性ショック患者からの細胞は、T細胞アポトーシスのレベル増加を示す。PD-L1に対する抗体は免疫細胞アポトーシスのレベルを低減できる(Zhang et al., *Crit. Care*(2011))。さらに、PD-1の発現欠失マウスは、野生型マウスよりも敗血症性ショック症状に対して抵抗性である(Yang, J. et al., *J. Immunol.*, Aug 1; 187(3) : 1113-1119(2011))。抗体を使用したPD-L1の相互作用の遮断が、不適切な免疫応答を抑制できること、および疾患徵候を回復できることが研究により示されている。
20

【0011】

慢性抗原に対して増強した免疫学的応答に加えて、PD-1/PD-L1経路の遮断は、慢性感染の状況における治療的ワクチン接種を含むワクチン接種に対する応答の増強も示す(Ha, S.J. et al., "Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection", *J. Exp. Med.*, 205(3) : 543-555(2008); Finnefrock, A.C. et al., "PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination", *J. Immunol.*, 182(2) : 980-987(2009); Song, M.-Y. et al., "Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1", *J. Immunother.*, 34(3) : 297-306(2011))。
30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本明細書に記載する分子は、生化学的実験系および細胞実験系の両系において、PD-L1とPD-1の相互作用を遮断する能力を示す。これらの結果は、治療用ワクチンを含む、癌または慢性感染における免疫を増強するための治療的投与の可能性と一致する。
40

【0013】

本明細書に記載する大環状ペプチドは、PD-L1とPD-1との相互作用およびCD80との相互作用を阻害できる。これらの化合物は、高度に効果的なPD-L1への結合、PD-L1とPD-1またはCD80のいずれかとの相互作用の遮断を示し、強化されたT細胞機能的活性の促進が可能であり、それゆえ、これらは非経腸製剤、経口製剤、肺製剤、経鼻製剤、バッカル製剤および徐放製剤の候補となる。

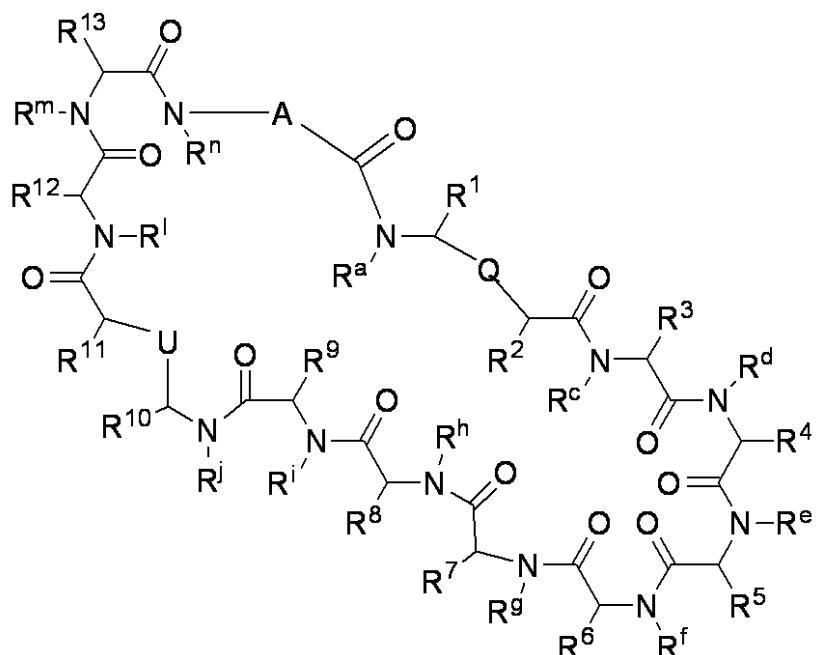
【課題を解決するための手段】

50

【0014】

第一実施形態において、本開示は、式(I)：

【化1】

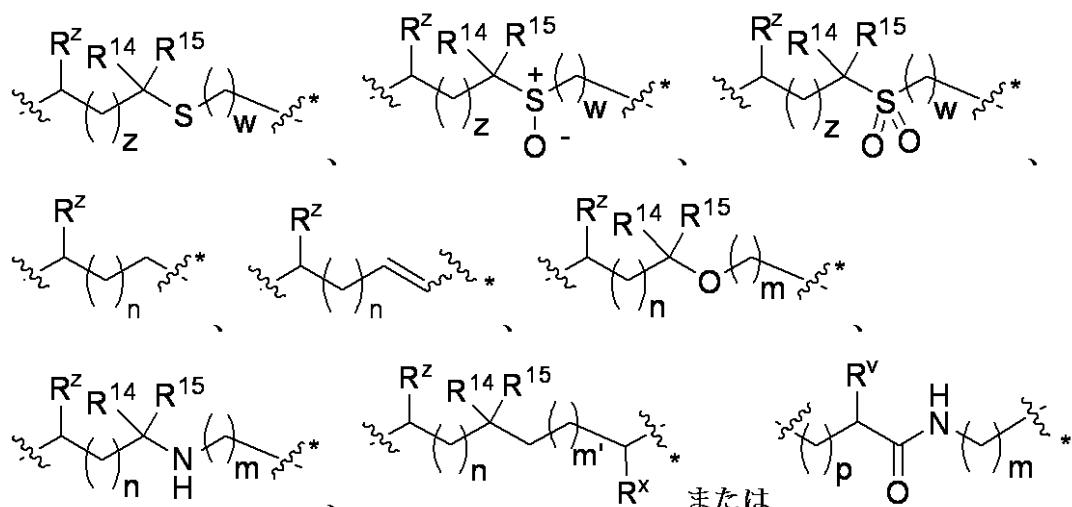


(I)

[式中、

A は、結合、

【化2】



または

から選択され；

ここで、

【化3】



は、カルボニル基との結合点を表し、

【化4】



は、窒素原子との結合点を表し；

10

20

30

40

50

z は、0、1または2であり；

w は、1または2であり；

n は、0または1であり；

m' は、0または1であり；

p は、0、1または2であり；

R^x は、水素、アミノ、ヒドロキシおよびメチルから選択され；

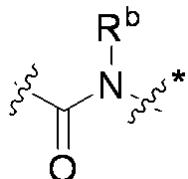
R^{1-4} および R^{1-5} は、水素およびメチルから独立して選択され；

R^z は、水素および $-C(O)NH R^{1-6}$ から選択され；ここで R^{1-6} は、水素、 $-CH R^{1-7} C(O)NH_2$ 、 $-CH R^{1-7} C(O)NHCHR^{1-8} C(O)NH_2$ および $-CH R^{1-7} C(O)NHCHR^{1-8} C(O)NHCH_2 C(O)NH_2$ から選択され；ここで R^{1-7} は、水素および $-CH_2 OH$ から選択され；ここで R^{1-8} は、水素およびメチルから選択され；

R^v は、水素または天然アミノ酸側鎖であり；

Q は、

【化5】



10

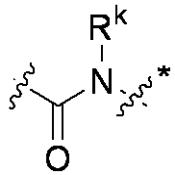
20

から選択され、

ここで R^b は、下記に規定されるもので、1、2または3つの二重結合を含有しており、かつ所望により窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1、2または3つのヘテロ原子を含有していてもよい5または6員環であり、ここで該環は、所望により、 $C_1 - C_6$ アルコキシカルボニル、 $C_1 - C_3$ アルキル、アミノ、 $C_1 - C_3$ アルキルアミノ、カルボキシ、 $C_1 - C_3$ ジアルキルアミノ、ハロおよびハロ $C_1 - C_3$ アルキルから独立して選択される1、2、3または4つの置換基で所望により置換されていてもよい；

U は、

【化6】



30

から選択され、

[式中、

R^k は、下記に規定されるもので、1、2または3つの二重結合を含有しており、かつ所望により窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1、2または3個のヘテロ原子を含有していてもよい5または6員環であって、ここで該環は、所望により、 $C_1 - C_6$ アルコキシカルボニル、 $C_1 - C_3$ アルキル、アミノ、 $C_1 - C_3$ アルキルアミノ、カルボキシ、 $C_1 - C_3$ ジアルキルアミノ、ハロおよびハロ $C_1 - C_3$ アルキルから独立して選択される1、2、3または4つの置換基で置換されていてもよい；

40

但し、少なくとも1つの Q および U は、1、2または3つの二重結合を含有しており、かつ窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1、2または3つのヘテロ原子を含有している5または6員環であり；

R^c 、 R^f 、 R^h 、 R^i 、 R^m および R^n は水素であり；

R^a 、 R^e 、 R^j および R^k は、各々独立して水素およびメチルから選択され；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} および R^{13} は、天然アミノ酸側鎖または非天然アミノ酸側鎖から独立して選択されるか、

50

あるいは以下に記載した対応する近接 R 基と共に環を形成しており；

R^e および R^k は、対応する隣接 R 基およびそれらが結合している原子と共に、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を各々形成でき；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロおよびヒドロキシから独立して選択される 1 ~ 4 つの基で所望により置換されていてもよい；

R^b はメチルであるか、R^b および R² は、それらに結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成しており；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロおよびヒドロキシから独立して選択される 1 ~ 4 つの基で所望により置換されていてもよく；

R^d は、水素またはメチルであるか、あるいは R^d および R⁴ は、それらが結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成することが可能であり；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、ヒドロキシおよびフェニルから独立して選択される 1 ~ 4 つの基で所望により置換されていてもよく；

R^g は、水素またはメチルであるか、あるいは R^g および R⁷ は、それらに結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成することが可能であり；ここで各環は、アミノ、ハロ基で所望により置換されていてもよいベンジル、ベンジルオキシ、シアノ、シクロヘキシル、メチル、ハロ、ヒドロキシ、メトキシ基で所望により置換されていてもよいイソキノリニルオキシ、ハロ基で所望により置換されていてもよいキノリニルオキシおよびテトラゾリルから独立して選択される 1 ~ 4 つの基で所望により置換されていてもよく；ここで該ピロリジンおよびピペリジン環は、所望によりシクロヘキシル、フェニルまたはインドール基と縮合されていてもよく；ならびに

R¹ はメチルであるか、あるいは R¹ および R^{1~2} は、それらが結合している原子と一緒にになって、アゼチジンおよびピロリジンから選択される環を形成しており、ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロおよびヒドロキシから独立して選択される 1 ~ 4 つの基で所望により置換されていてもよい】

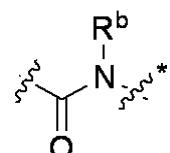
の化合物、あるいはその医薬的に許容される塩を提供する。

【0015】

第一態様の第一実施形態において、本開示は、

Q が、

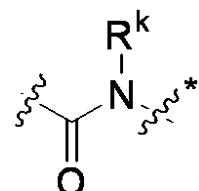
【化7】



ならびに 1 または 2 つの二重結合を含有しており、かつ 1、2、3 または 4 個の窒素原子を含有している 5 員環から選択され；

U が、

【化8】



ならびに 1 または 2 つの二重結合を含有しており、かつ 1、2、3 または 4 個の窒素原子を含有している 5 員環から選択される、式(I)の化合物あるいはその医薬的に許容される

10

20

30

40

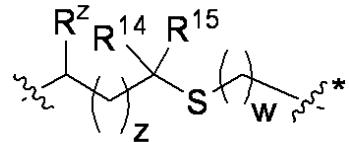
50

塩を提供する。

【0016】

第二実施形態において、Aは、

【化9】



である。

10

【0017】

第三実施形態において、

zおよびwは、各々1であり；

R¹⁴およびR¹⁵は、水素であり；ならびに

R^zは、-C(O)NHR¹⁶であり；ここでR¹⁶は、-CHR¹⁷C(O)NH₂である。

【0018】

第四実施形態において、R¹は、フェニルC₁-C₃アルキルであり、ここで該フェニルは、所望によりヒドロキシで置換されていてもよい；

R²は、C₁-C₇アルキルであるか、あるいはR^bおよびR²は、それらに結合している原子と一緒にになって、モルホリンまたはピペリジン環を形成しており；

R³は、-CH₂CO₂Hおよび-CH₂C(O)NH₂から選択され；

R⁴およびR^dは、それらに結合している原子と一緒にになって、ピロリジン環を形成している；

R⁵は、-CH₂NH₂および-CH₂(イミダゾリル)から選択され；

R⁶は、C₁-C₇アルキル、-CH₂CH₂C(O)NH₂、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂および-CH₂CH₂CO₂Hから選択され；

R⁷は、水素であるか、あるいはR⁷およびR^gは、それらが結合している原子と一緒にになって、所望によりヒドロキシ基で置換されていてもよいピロリジン(pyridolinedine)環を形成しており；

30

R⁸は、-(CH₂)インドリルであり；

R⁹は、アミノメチル、ヒドロキシメチル、-CH₂CH₂NH₂およびCH₂CH₂CH₂NH₂から選択され；

R¹⁰は、-(CH₂)インドリル、-(CH₂)ナフチルおよび-(CH₂)ベンゾチエニルから選択され、これらは-CH₂CO₂Hにより各々所望により置換されていてもよい；

R¹¹は、C₁-C₇アルキルであり；ならびに

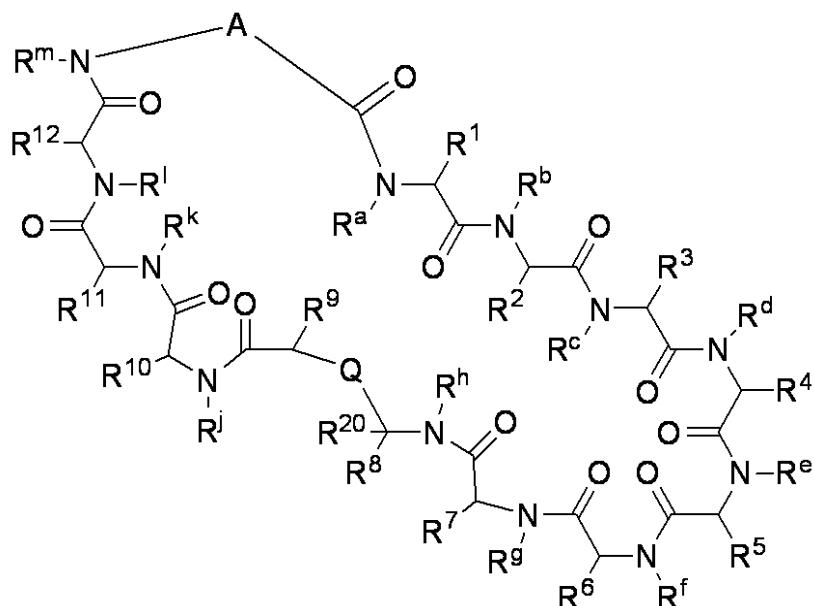
R¹²は、C₁-C₇アルキルである。

【0019】

第二局面において、本開示は、式(II)：

40

【化10】

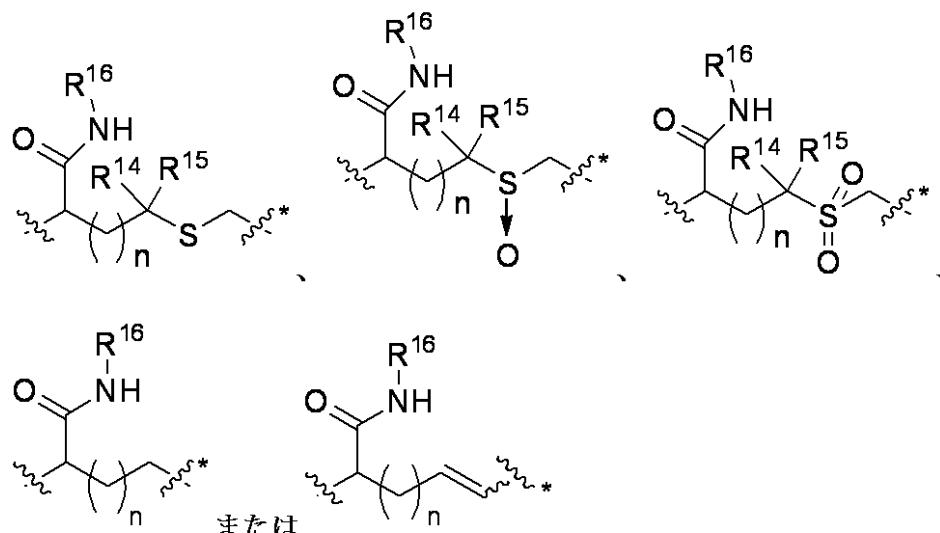


10

[式中、

A は、結合、

【化11】



20

30

から選択され；

ここで：

【化12】



は、カルボニル基との結合点を表し、

【化13】



は、窒素原子との結合点を表し；

n は、0 または 1 であり；

R^{1~4} および R^{1~5} は、水素およびメチルから独立して選択され；

40

50

R^{1~6}は、水素、-CH_{1~7}C(O)NH₂、-CH_{1~7}C(O)NHCHR_{1~8}C(O)NH₂および-CH_{1~7}C(O)NHCHR_{1~8}C(O)NHCH₂C(O)NH₂から選択され；ここでR^{1~7}は、水素および-CH₂OHから選択され、R^{1~8}は、水素およびメチルから選択される；

Qは、1、2または3つの二重結合を含有しており、かつ窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1、2または3つのヘテロ原子を所望により含有していてもよい5または6員環であり、ここで該環は、所望により、C₁-C₆アルコキシカルボニル、C₁-C₃アルキル、アミノ、C₁-C₃アルキルアミノ、カルボキシ、C₁-C₃ジアルキルアミノ、ハロおよびハロC₁-C₃アルキルから独立して選択される1、2、3または4つの置換基で所望により置換されていてもよい；

R^a、R^f、R^j、R^k、R^lおよびR^mは、水素であり；

R^bおよびR^cは、メチルであり；

R^gは、水素およびメチルから選択され；

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁹、R¹⁰、R¹¹およびR¹²は、天然アミノ酸側鎖または非天然アミノ酸側鎖から独立して選択されるか、あるいは以下に記載した対応する近接R基と共に環を形成しており；

R^{2~0}は、水素であり；

R⁸は、天然アミノ酸側鎖、非天然アミノ酸側鎖から選択されるか、または以下に記載した対応する近接R基と共に環を形成しているか、あるいはR⁸は、R^{2~0}と共に3~6員炭素環式環を形成することができ；

R^dは、水素およびメチルから選択されるか、あるいはR^dおよびR⁴は、それらが結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成しており；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、ハロメチルおよびヒドロキシから独立して選択される1~4つの基で所望により置換されていてもよく；

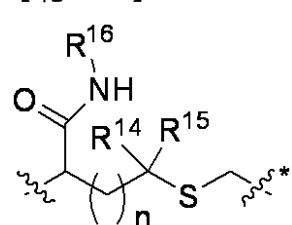
R^eは、水素およびメチルから選択されるか、あるいはR^eおよびR⁵は、それらに結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成しており；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、ハロメチルおよびヒドロキシから独立して選択される1~4つの基で所望により置換されていてもよく；ならびに

R^hは、水素およびメチルから選択されるか、あるいはR^hおよびR⁸は、それらが結合している原子と一緒にになって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジンおよびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成しており；ここで各環は、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、ハロメチルおよびヒドロキシから独立して選択される1~4つの基で所望により置換されていてもよい]

の化合物あるいはその医薬的に許容される塩を提供する。

【0020】

第二局面の第一実施形態において、本開示は、Qが、1または2つの二重結合を含有しており、かつ1、2、3または4個の窒素原子を含有している5員環である、式(II)の化合物あるいはその医薬的に許容される塩を提供する。第二実施形態において、Aは、
【化14】



である。

【0021】

第三実施形態において：

10

20

30

40

50

R¹ および R² は、フェニルC₁ - C₃ アルキルであり；
 R³ は、C₁ - C₇ アルキルであり；
 R⁴ は、水素であり；
 R⁵ は、カルボキシメチルであり；
 R⁶ は、C₁ - C₇ アルキルであり；
 R⁷ は、フェニルC₁ - C₃ アルキルであり；
 R⁸ は、フェニルC₁ - C₃ アルキルであり、該フェニルは、ヒドロキシで置換されているか、あるいはR⁸ およびR²⁰ は6員炭素環式環を形成しており；
 R⁹ は、水素であり；
 R¹⁰ は、-(CH₂)インドリルであり；
 R¹¹ は、ヒドロキシで置換されたフェニルC₁ - C₃ アルキルであり；ならびに
 R¹² は、C₁ - C₇ アルキルである。

【0022】

別の実施態様において、本明細書は、治療上の有効量の式(I)の化合物またはその治療的に許容される塩を対象に投与することを特徴とする、その必要のある対象において免疫応答を増強、刺激および/または上昇させる方法を提供する。別の実施態様において、この方法は、式(I)の化合物またはその医薬的に許容される塩を投与する前、後または同時に別の薬剤をさらに投与することを特徴とする。別の実施態様において、別の薬剤は、殺菌剤、抗ウイルス剤、細胞毒性剤および/または免疫応答修飾剤である。第三実施形態において、別の薬剤は、H D A C 阻害剤である。別の実施態様において、別の薬剤は、T L R 7 および/またはT L R 8 アゴニストである。

【0023】

別の実施態様において、本明細書は、その必要のある対象において増殖、細胞増殖または癌細胞の転移を阻害する方法を提供するものであり、前記方法は、治療上の有効量の式(I)の化合物またはその医薬的に許容される塩を対象に投与することを特徴とする。前記阻害は直接的または間接的であり得ることを理解されねばならない。別の実施態様において、癌は、メラノーマ、腎臓細胞癌、扁平上皮非小細胞肺癌(N S C L C)、非扁平上皮N S C L C、結腸直腸癌、性腺摘除 - 耐性前立腺癌、卵巣癌、胃癌、肝細胞癌、膵臓癌、頭頸部の扁平上皮癌、食道癌、胃腸管および乳房、ならびに血液学的悪性癌から選択される。

【0024】

別の実施態様において、本明細書は、その必要のある対象において感染症を治療する方法を提供し、この方法は、治療上の有効量の式(I)の化合物またはその医薬的に許容される塩を対象に投与することを特徴とする。別の実施態様において、感染症は、ウイルスを原因とする。別の実施形態において、ウイルスは、H I V、肝炎A、肝炎B、肝炎C、ヘルペスウイルスおよびインフルエンザから選択される。

【0025】

別の実施態様において、本明細書は、その必要のある対象において敗血症ショックを治療する方法を提供するものであり、この方法は、本明細書において記述された治療上の有効量の1以上の大環状ペプチドを対象に投与することを特徴とする。

【0026】

別の実施態様において、本明細書は、対象においてP D - L 1とP D - 1および/またはC D 8 0との相互作用を遮断する方法を提供するものであり、前記方法は、本明細書において記述された治療上の有効量の1以上の大環状ペプチドを対象に投与することを特徴とする。

【0027】

式(I)の化合物において、式中のR側鎖は、メチルで置換されている環の一部であって、前記メチル基は、大環状親構造の一部である炭素を含めた環内の置換可能なあらゆる炭素原子上に存在していてよいと理解される。本開示の化合物において、水素以外の4つの置換基を有しており、式(I I)：

10

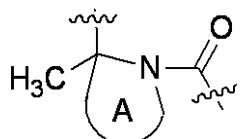
20

30

40

50

【化15】



(II)

(式中、Aは、請求項に記載された環であり、大環状構造の残余部への結合点を示す)
の -メチル置換された環ではない環の骨格上に少なくとも1つの炭素が存在している。

10

【0028】

式(I)の化合物において、好ましいR¹側鎖は、次の通りである：フェニルアラニン、チロシン、3-チエン-2-イル、4-メチルフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、3-メトキシフェニルアラニン、イソトリプトファン、3-メチルフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、3,4-ジフルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、3,4-ジメトキシフェニルアラニン、3,4-ジクロロフェニルアラニン、4-ジフルオロメチルフェニルアラニン、2-メチルフェニルアラニン、2-ナフチルアラニン、トリプトファン、4-ピリジニル、4-プロモフェニルアラニン、3-ピリジニル、4-トリフルオロメチルフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、4-メトキシフェニルアラニン、ビフェニルアラニンおよび3-クロロフェニルアラニン；および2,4-ジアミノブタンである。

20

【0029】

式(I)の化合物において、式中のR²は環の一部ではない、好ましいR²側鎖は次の通りである：アラニン、セリンおよびグリシン。

【0030】

式(I)の化合物において、好ましいR³側鎖は次の通りである：アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、セリン、オルニチン、リシン、ヒスチジン、スレオニン、ロイシン、アラニン、2,3-ジアミノプロパンおよび2,4-ジアミノブタン。

【0031】

式(I)の化合物において、式中のR⁴は環の一部ではない、好ましいR⁴側鎖は次の通りである：バリン、アラニン、イソロイシンおよびグリシン。

30

【0032】

式(I)の化合物において、好ましいR⁵側鎖は次の通りである：アミノメタン、ヒスチジン、アスパラギン、2,3-ジアミノプロパン、セリン、グリシン、2,4-ジアミノブタン、スレオニン、アラニン、リシン、アスパラギン酸、アラニンおよび3-チアゾリルアラニン。

【0033】

式(I)の化合物において、好ましいR⁶側鎖は次の通りである：ロイシン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、リシン、3-シクロヘキサン、スレオニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン、アラニン、アルギニンおよびオルニチン(COCH₃)。

40

【0034】

式(I)の化合物において、式中のR⁷は環の一部ではない、好ましいR⁷側鎖は次の通りである：グリシン、2,4-ジアミノブタン、セリン、リシン、アルギニン、オルニチン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、アラニンおよび2,4-ジアミノブタン(C(O)シクロブタン)。

【0035】

式(I)の化合物において、好ましいR⁸側鎖は、トリプトファンおよび1,2-ベンゾイソチアゾリニルアラニンである。

【0036】

50

式(I)の化合物において、好ましいR⁹側鎖は次の通りである：セリン、ヒスチジン、リシン、オルニチン、2,4-ジブチルアミン、スレオニン、リシン、グリシン、グルタミン酸、バリン、2,3-ジアミノプロパン、アルギニン、アスパラギン酸およびチロシン。

【0037】

式(I)の化合物において、好ましいR¹⁰側鎖は次の通りである：所望により置換されてもよいトリプトファン、ベンゾイソチアゾリルアラニン、1-ナフチル(naphthyl)アラニンおよびメチオニン。

【0038】

式(I)の化合物において、好ましいR¹¹側鎖は次の通りである：ノルロイシン、ロイシン、アスパラギン、フェニルアラニン、メチオニン、エトキシメタン、アラニン、トリプトファン、イソロイシン、フェニルプロパン、グルタミン酸、ヘキサンおよびヘプタン。

【0039】

式(I)の化合物において、式中のR¹²は、環の一部ではない、好ましいR¹²側鎖は次の通りである：ノルロイシン、アラニン、エトキシメタン、メチオニン、セリン、フェニルアラニン、メトキシエタン、ロイシン、トリプトファン、イソロイシン、グルタミン酸、ヘキサン、ヘプタンおよびグリシン。

【0040】

式(I)の化合物において、好ましいR¹³側鎖は次の通りである：アルギニン、オルニチン、アラニン、2,4-ジアミノブタン、2,3-ジアミノプロパン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、リシン、スレオニン、シクロプロピルメタン、グリシン、バリン、イソロイシン、ヒスチジンおよび2-アミノブタンである。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本開示に従い、我々は、PD-L1と特異的に結合して、PD-L1とPD-1との、およびPD-L1とCD80との相互作用を阻害できるペプチドを発見した。これらの大環状ペプチドは、インビトロ免疫調節効力を示し、癌および感染症を含む種々の疾患の治療のための治療剤候補となる。

【0042】

用語“特異的結合”または“特異的な結合”は、タンパク質と、化合物またはリガンドのような結合分子の間の相互作用をいう。相互作用は、結合分子により認識されるタンパク質の特定の構造(すなわち、酵素結合部位、抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存する。例えば、化合物がタンパク質結合部位“A”に特異的結合を示すならば、結合部位Aを含むタンパク質およびタンパク質結合部位Aに特異的結合する標識ペプチドを含む反応中の化合物の存在は、標識ペプチドがタンパク質に結合する量を減少させる。対照的に、化合物のタンパク質への非特異的結合は、標識ペプチドのタンパク質からの濃度依存的置換をもたらさない。

【0043】

本発明は、本化合物に存在する原子の全ての同位体を含むことを意図する。同位体は、同じ原子番号を有するが、質量数が異なる原子を含む。一般的な例として、限定する意図はなく、水素の同位体は重水素およびトリチウムを含む。炭素の同位体は¹³Cおよび¹⁴Cを含む。同位体標識した本発明の化合物は、一般に当業者に知られる慣用の技術によるか、または本明細書に記載するものに順ずる方法により、他に用いた非標識反応材に代えて、適当な同位体標識した反応材を用いることにより製造できる。このような化合物は、例えば標準物および生物学的活性を測定するための試薬として、多様な用途の可能性を有し得る。安定な同位体の場合、このような化合物は、生物学的、薬理学的または薬物動態特性を好ましく修飾する可能性を有し得る。

【0044】

本明細書に記載する主題の他の面は、リガンド結合アッセイの開発のための、またはイ

10

20

30

40

50

ンビボ吸着、代謝、分布、受容体結合または占有または化合物の体内動態のモニタリングのための、放射性標識リガンドとして開示したペプチドの使用である。例えば、本明細書に記載する大環状ペプチドを、放射性同位体¹⁻²⁻⁵Iを使用して製造してよく、得られた放射性標識ペプチドを結合アッセイの開発または代謝試験に使用してよい。別の目的および同じ目的で、本明細書に記載する大環状ペプチドを、当業者に知られる方法を使用した触媒的トリチウム標識により放射性標識形態に変換し得る。

【0045】

本発明の大環状ペプチドは、当業者に知られる方法を使用した放射性トレーサーの付加によりPET造影剤としても使用できる。

【0046】

好みしいペプチドは、本明細書において提供する大環状ペプチドの少なくとも1個を含み、これらのペプチドは医薬組成物および組み合わせに包含され得る。

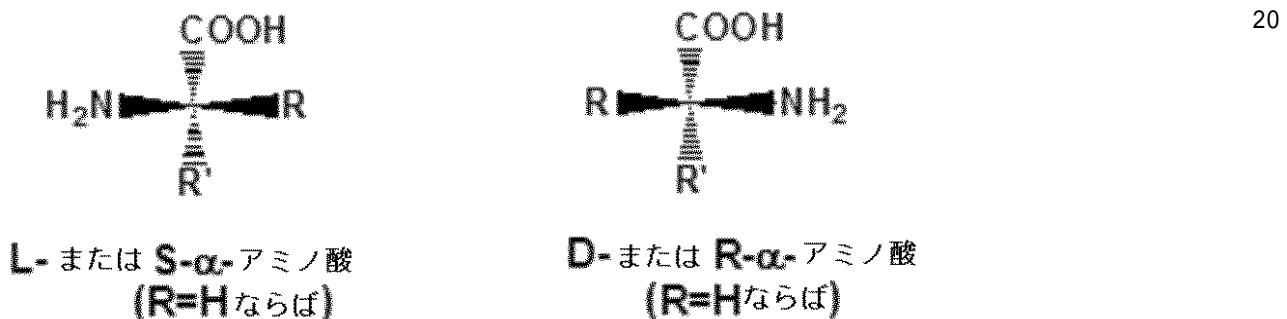
【0047】

本明細書において提供される定義は、限定しないが、他に具体的な状況で限定がない限り、本明細書を通して使用されるようなその用語に適用される。

【0048】

アミノ酸およびペプチド化学分野の当業者は、アミノ酸が、次の一般構造により表される化合物が含まれることを認識している。

【化16】



(式中、RおよびR'は本明細書に記載するとおりである)。

【0049】

別段の記載が無ければ、単独で、または他の基の一部として、本明細書で使用する用語“アミノ酸”は、“ ”炭素と呼ばれる同じ炭素に結合したアミノ基およびカルボキシル基を含み、式中、Rおよび/またはR'は、水素を含めた天然または非天然側鎖であり得るが、これらに限定されない。“ ”炭素における絶対“S”配置は、一般に“L”または“天然”配置と呼ばれる。“R”および“R'”(主要)置換基が水素であるとき、アミノ酸はグリシンであり、キラルではない。

【0050】

本明細書で使用する用語“天然アミノ酸側鎖”および“天然型アミノ酸側鎖”は、通常S配置(すなわち、L-アミノ酸)である天然型アミノ酸(すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン)のいずれかの側鎖をいう。

【0051】

本明細書で使用する用語“非天然アミノ酸側鎖”および“非天然型アミノ酸側鎖”は、通常R配置(すなわち、D-アミノ酸)の天然型アミノ酸のいずれかの側鎖または次のものから選択されるRまたはS配置(すなわち、それぞれD-またはL-アミノ酸)の天然型アミノ酸側鎖以外の基を意味する：

C₂-C₇アルケニル、C₁-C₃アルコキシC₁-C₃アルキル、C₁-C₆アルコキシカルボニルC₁-C₃アルキル、C₁-C₇アルキル、C₁-C₃アルキルスルファ

10

20

30

40

50

ニル C₁ - C₃ アルキル、アミド C₁ - C₃ アルキル、アミノ C₁ - C₃ アルキル、アザインドリル C₁ - C₃ アルキル、ベンゾチアゾリル C₁ - C₃ アルキル、ベンゾチエニル C₁ - C₃ アルキル、ベンジルオキシ C₁ - C₃ アルキル、カルボキシ C₁ - C₃ アルキル、C₃ - C₁⁴ シクロアルキル C₁ - C₃ アルキル、ジフェニルメチル、フラニル C₁ - C₃ アルキル、イミダゾリル C₁ - C₃ アルキル、ナフチル C₁ - C₃ アルキル、ピリジニル C₁ - C₃ アルキル、チアゾリル C₁ - C₃ アルキル、チエニル C₁ - C₃ アルキル；

ビフェニル C₁ - C₃ アルキル：前記ビフェニルは、メチル基で所望により置換されていてもよい；

ヘテロサイクリル：これは、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₃ アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノ C₁ - C₃ アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロ C₁ - C₃ アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH₂)₂、ニトロおよび-OPO(O)(OH)₂ から独立して選択される 1、2、3、4 または 5 つの基で所望により置換されていてもよい；

インドリル C₁ - C₃ アルキル：前記インドリル部分は、C₁ - C₃ アルキル、カルボキシ C₁ - C₃ アルキル、ハロ、ヒドロキシおよびフェニルから選択される 1 つの基で所望により置換されていてもよい、ここで前記フェニルは、C₁ - C₃ アルコキシ、C₁ - C₃ アルキルおよびハロから独立して選択される 1、2 または 3 つの基により所望により更に置換されていてもよく；

1、2、3、4 または 5 つの基で所望により置換されていてもよいフェニルは、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₃ アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノ C₁ - C₃ アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロ C₁ - C₃ アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH₂)₂、ニトロおよび-OPO(O)(OH)₂ から独立して選択される；

NR^a'R^b'(C₁ - C₇ アルキル)、ここで R^a' および R^b' は、水素、C₂ - C₄ アルケニルオキシカルボニル、C₁ - C₃ アルキル、C₁ - C₃ アルキルカルボニル、C₃ - C₆ シクロアルキルカルボニル、フラニルカルボニルおよびフェニルカルボニルから独立して選択される。アルキルリンカーが、1 以上の炭素を含有する場合、追加の NR^a'R^b' 基は鎖上に存在することができる。

NR^c'R^d'カルボニル C₁ - C₃ アルキル、ここで R^c' および R^d' は、水素、C₁ - C₃ アルキルおよびトリフェニルメチルから独立して選択される；

フェニル C₁ - C₃ アルキル：前記フェニル部分は、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₃ アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノ C₁ - C₃ アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロ C₁ - C₃ アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH₂)₂、ニトロおよび-OPO(O)(OH)₂ から独立して選択される 1、2、3、4 または 5 つの基で所望により置換されていてもよい；および

フェノキシ C₁ - C₃ アルキル：前記フェニルは、C₁ - C₃ アルキル基で所望により置換されていてもよい。

【0052】

本明細書で使用する用語“C₂ - C₄ アルケニル”は、少なくとも 1 個の炭素 - 炭素二重結合を含む、2 ~ 4 個の炭素原子の直鎖または分枝鎖の基をいう。

【0053】

本明細書で使用する用語“C₂ - C₇ アルケニル”は、少なくとも 1 個の炭素 - 炭素二重結合を含む、2 ~ 7 個の炭素原子の直鎖または分枝鎖の基をいう。

【0054】

本明細書で使用する用語“C₂ - C₄ アルケニルオキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合している C₂ - C₄ アルケニル基をいう。

【0055】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃ アルコキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合している C₁ - C₃ アルキル基をいう。

10

20

30

40

50

【0056】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₄アルコキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₄アルキル基をいう。

【0057】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₆アルコキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₆アルキル基をいう。

【0058】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルコキシカルボニル”は、C₁ - C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルコキシ基をいう。

【0059】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₆アルコキシカルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₆アルコキシ基をいう。

【0060】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₆アルコキシカルボニルC₁ - C₃アルキル”は、C₁ - C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₆アルコキシカルボニル基をいう。

【0061】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキル”は、1～3個の炭素原子を含む、直鎖または分枝鎖飽和炭化水素から得られる基をいう。

【0062】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₄アルキル”は、1～4個の炭素原子を含む、直鎖または分枝鎖飽和炭化水素から得られる基をいう。

【0063】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₆アルキル”は、1～6個の炭素原子を含む、直鎖または分枝鎖飽和炭化水素から得られる基をいう。

【0064】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルアミノ”は、-NHR¹(式中、R¹がC₁ - C₃アルキル基である)をいう。

【0065】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルカルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルキル基をいう。

【0066】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルスルファニル”は、硫黄原子を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルキル基をいう。

【0067】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルスルファニルC₁ - C₃アルキル”は、C₁ - C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルキルスルファニル基をいう。

【0068】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルスルホニル”は、スルホニル基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルキル基をいう。

【0069】

本明細書で使用する用語“C₁ - C₃アルキルスルホニルアミノ”は、アミノ基を介して親分子部分に結合しているC₁ - C₃アルキルスルホニル基をいう。

【0070】

本明細書で使用する用語“アミド”は、-C(O)NH₂をいう。

【0071】

本明細書で使用する用語“アミドC₁ - C₃アルキル”は、C₁ - C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、アミド基をいう。

本明細書で使用する用語“アミノ”は、-NH₂をいう。

10

20

30

40

50

【0072】

本明細書で使用する用語“アミノC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、アミノ基をいう。

【0073】

本明細書で使用する用語“アミノスルホニル”は、スルホニル基を介して親分子部分に結合している、アミノ基をいう。

【0074】

本明細書で使用する用語“アザインドリルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、アザインドリル基をいう。アザインドリル基は、該基の任意の置換可能な原子を介してアルキル部分に結合できる。

10

【0075】

本明細書で使用する用語“ベンゾチアゾリルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、ベンゾチアゾリル基をいう。ベンゾチアゾリル基は、該基の任意の置換可能な原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0076】

本明細書で使用する用語“ベンゾチエニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、ベンゾチエニル基をいう。ベンゾチエニル基は、該基の任意の置換可能な原子を介してアルキル部分に結合できる。

20

【0077】

本明細書で使用する用語“ベンジルオキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合している、ベンジル基をいう。

【0078】

本明細書で使用する用語“ベンジルオキシC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合している、ベンジルオキシ基をいう。

【0079】

本明細書で使用する用語“ビフェニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているビフェニル基をいう。ビフェニル基は、前記基の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0080】

本明細書で使用する用語“カルボニル”は、-C(O)-をいう。

30

本明細書で使用する用語“カルボキシ”は、-CO₂Hをいう。

【0081】

本明細書で使用する用語“カルボキシC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているカルボキシ基をいう。

本明細書で使用する用語“シアノ”は、-CNをいう。

【0082】

本明細書で使用する用語“C₃-C₁₋₄シクロアルキル”は、3~14個の炭素原子および0個のヘテロ原子を有する飽和单環式、二環式または三環式の炭化水素環系をさす。二環式および三環式環は、縮合環、スピロ環または架橋環であってもよい。シクロアルキル基の代表的な例には、シクロプロピル、シクロペンチル、ビシクロ[3.1.1]ヘプチルおよびアダマンチルが含まれるが、これに限定するものではない。

40

【0083】

本明細書で使用する用語“C₃-C₁₋₄シクロアルキルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合されたC₃-C₁₋₄シクロアルキル基をいう。

【0084】

本明細書で使用する用語“C₃-C₁₋₄シクロアルキルカルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合されたC₃-C₁₋₄シクロアルキル基をいう。

【0085】

本明細書で使用する用語“C₁-C₃ジアルキルアミノ”は、-NR¹R²(式中、R

50

¹ および R² は、各々、1～3 個の炭素原子を含有しているアルキル基である)をいう。この基は、同一または異なるものであってもよい。

【0086】

本明細書で使用する用語“フラニル C₁ - C₃ アルキル”は、C₁ - C₃ アルキル基を介して親分子部分に結合しているフラニル基をいう。フラニル基は、前記基の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0087】

本明細書で使用する用語“フラニルカルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合しているフラニル基をいう。

【0088】

本明細書で使用する用語“ハロ”および“ハロゲン”は、F、Cl、Br または I をいう。

10

【0089】

本明細書で使用する用語“ハロ C₁ - C₃ アルキル”は、1 個、2 個または 3 個のハロゲン原子で置換された C₁ - C₃ アルキル基をいう。

【0090】

本明細書で使用する用語“ハロメチル”は、1 個、2 個または 3 個のハロゲン原子で置換されたメチル基をいう。

【0091】

本明細書で使用する用語“複素環”は、窒素、酸素および硫黄から独立して選択される 1、2 または 3 つのヘテロ原子を含有する 5、6 または 7 員環をいう。5 員環は、0～2 つの二重結合を有しており、かつ 6 員および 7 員環が、0～3 つの二重結合を有する。用語“複素環”は、二環式基も包含するものであって、前記複素環式環は、4～6 員芳香族性または非芳香族炭素環式環または別の単環式複素環式基と縮合される。本開示の複素環基は、その基内の炭素原子を介して親分子部分に結合している。複素環基の例示には、ベンゾチエニル、フリル、イミダゾリル、インドリニル、インドリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、モルホリニル、オキサゾリル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラゾリル、ピリジニル、ピロリジニル、ピロロピリジニル、ピロリル、チアゾリル、チエニルおよびチオモルホリニルが挙げられるが、これに限定するものではない。

20

【0092】

本明細書で使用する用語“ヒドロキシ”は、-OH をいう。

30

【0093】

本明細書で使用する用語“イミダゾリル C₁ - C₃ アルキル”は、C₁ - C₃ アルキル基を介して親分子部分に結合しているイミダゾリル基をいう。イミダゾリル基は、前記基の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0094】

本明細書で使用する用語“インドリル C₁ - C₃ アルキル”は、C₁ - C₃ アルキル基を介して親分子部分に結合しているインドリル基をいう。インドリル基は、前記基の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0095】

40

本明細書で使用する用語“ナフチル C₁ - C₃ アルキル”は、C₁ - C₃ アルキル基を介して親分子部分に結合しているナフチル基をいう。ナフチル基は、前記基の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。

【0096】

本明細書で使用する用語“ニトロ”は、-NO₂ をいう。

【0097】

本明細書で使用する用語“NR^a'R^b'”は、2 つの基 R^a' および R^b' を指し、これは窒素原子を介して親分子部分に結合されている。R^a' および R^b' は、水素、C₂ - C₄ アルケニルオキシカルボニル、C₁ - C₃ アルキルカルボニル、C₃ - C₆ シクロアルキルカルボニル、フラニルカルボニルおよびフェニルカルボニルから独立して選択

50

される。

【0098】

本明細書で使用する用語“NR^a'R^b'(C₁-C₃)アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合するNR^a'R^b'基をいう。

【0099】

本明細書で使用する用語“NR^c'R^d'”は、2つの基であるR^c'およびR^d'を指し、これは窒素原子を介して親分子部分と結合されている。R^c'およびR^d'は、水素、C₁-C₃アルキルおよびトリフェニルメチルから独立して選択される。

【0100】

本明細書で使用する用語“NR^c'R^d'カルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合しているNR^c'R^d'基をいう。10

【0101】

本明細書で使用する用語“NR^c'R^d'カルボニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているNR^c'R^d'カルボニル基をいう。

【0102】

本明細書で使用する用語“フェノキシ”は、酸素原子を介して親分子部分に結合しているフェニル基をいう。

【0103】

本明細書で使用する用語“フェノキシC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているフェノキシ基をいう。20

【0104】

本明細書で使用する用語“フェニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているフェニル基をいう。

【0105】

本明細書で使用する用語“フェニルカルボニル”は、カルボニル基を介して親分子部分に結合しているフェニル基をいう。

【0106】

本明細書で使用する用語“ピリジニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているピリジニル基をいう。ピリジニル基は、前記基のあらゆる置換可能な原子を介してアルキル部分に結合できる。30

【0107】

本明細書で使用する用語“スルファニル”は、-S-をいう。

【0108】

本明細書で使用する用語“スルホニル”は、-SO₂-をいう。

【0109】

本明細書で使用する用語“チアゾリルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているチアゾリル基をいう。チアゾリル基は、前記基内の置換可能なあらゆる原子を介して、アルキル部分に結合できる。

【0110】

本明細書で使用する用語“チエニルC₁-C₃アルキル”は、C₁-C₃アルキル基を介して親分子部分に結合しているチエニル基をいう。チエニル基は、前記基内の置換可能なあらゆる原子を介してアルキル部分に結合できる。40

【0111】

用語“処置”は、(i)疾患、障害および/または症状の素因があるが、まだそれを有していると診断されていない患者における該疾患、障害または症状の発症を予防すること；(ii)疾患、障害または症状を阻止する、すなわち、その発症を停止させること；および(iii)疾患、障害または症状を軽減すること、すなわち、疾患、障害および/または症状および/または疾患、障害および/または症状を伴う症候を回復させることを含む。

【0112】

大環状ペプチドのPD-L1への結合は、例えば、均一時間分解蛍光測定(HTRF)、50

表面プラズモン共鳴法(S P R)、等温滴定熱量測定(I T C)、核磁気共鳴スペクトロスコピー(N M R)などの方法により測定できる。さらに、大環状ペプチドの細胞表面上に発現するP D - L 1への結合は、本明細書に記載するとおり細胞結合アッセイで測定できる。

【 0 1 1 3 】

本明細書に記載する治療剤の投与は、治療上の有効量の治療剤の投与を含むが、これに限定されない。本明細書で使用する用語“治療上の有効量”とは、本明細書に記載するP D - 1 / P D - L 1 結合阻害剤の組成物の投与により処置可能な状態の処置または予防のための治療剤の量をいうが、これに限定されない。この量は、検出可能な治療的または予防的または寛解性効果を示すのに十分な量である。効果は、例として、限定しないが、本明細書に挙げた症状の処置または予防を含み得る。対象に対する厳密な有効量は、対象の体格および健康症状、処置すべき状態の性質および程度、処置医の推奨および投与のために選択した治療剤または治療剤の組み合わせによる。それゆえに、正確な有効量を前もって特定するのは有用ではない。10

【 0 1 1 4 】

別の局面において、本発明は、本発明の大環状ペプチドを使用する対象における腫瘍細胞の増殖を阻止する方法にも関する。本明細書に示されるとおり、本発明の大環状ペプチドは、P D - L 1と結合して、P D - L 1とP D - 1の相互作用を妨害し、P D - L 1と、P D - 1との相互作用を阻止することが知られる抗P D - 1モノクローナル抗体との結合と競合し、C M V特異的T細胞I F N 分泌を増強させて、H I V特異的T細胞I F N 分泌を増強することができる。その結果、本発明の大環状ペプチドは、免疫応答の修飾、癌または感染性疾患のような疾患の処置、保護的自己免疫応答の刺激または抗原特異的免疫応答の刺激(例えば、P D - L 1遮断ペプチドと目的の抗原の共投与による)に有用である。20

【 0 1 1 5 】

本発明がより容易に理解され得るために、ある特定の用語を最初に定義する。さらなる定義は、詳細な記載をとおして示される。

【 0 1 1 6 】

用語“プログラム死リガンド1”、“プログラム細胞死リガンド1”、“タンパク質P D - L 1”、“P D - L 1”、“P D L 1”、“P D C D L 1”、“h P D - L 1”、“h P D - L I”、“C D 2 7 4”および“B 7 - H 1”は、相互交換可能的に使用し、P D - L 1と少なくとも1個の共通するエピトープを有する異型、アイソフォーム、ヒトP D - L 1の種ホモログおよびアナログを含む。完全P D - L 1配列は、GENBANK(登録商標)Accession No. NP_054862に見ることができる。30

【 0 1 1 7 】

用語“プログラム死1”、“プログラム細胞死1”、“タンパク質P D - 1”、“P D - 1”、“P D 1”、“P D C D 1”、“h P D - 1”および“h P D - I”は、相互交換可能に使用し、P D - 1と少なくとも1個の共通するエピトープを有する異型、アイソフォーム、ヒトP D - 1の種ホモログおよびアナログを含む。完全P D - 1配列は、GENBANK(登録商標)Accession No. U64863に見ることができる。

【 0 1 1 8 】

用語“細胞毒性Tリンパ球関連抗原-4”、“C T L A - 4”、“C T L A 4”、“C T L A - 4抗原”および“C D 1 5 2”(例えば、Murata, Am. J. Pathol., 155: 453 - 460(1999)参照)は、相互交換可能なように使用され、C T L A - 4と少なくとも1個の共通するエピトープを有する異型、アイソフォーム、ヒトC T L A - 4の種ホモログおよびアナログを含む(例えば、Balzano, Int. J. Cancer Suppl., 7: 28 - 32(1992)参照)。完全C T L A - 4核酸配列は、GENBANK(登録商標)Accession No. L15006に見ることができる。

【 0 1 1 9 】

用語“免疫応答”は、例えば、侵入した病原体、病原体に感染した細胞または組織、癌細胞、あるいは自己免疫的または病理学的炎症の場合には、正常なヒト細胞または組織の40

選択的損傷、破壊または体内からの除去をもたらす、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球および上記細胞または肝臓で產生される可溶性巨大分子(例えば、大環状ペプチド、サイトカインおよび補体)の作用をいう。

【0120】

本明細書で使用する“有害事象”(A E)は、医学的処置の使用と関係する、あらゆる好ましくない一般に意図されない、より望ましくない、徵候(検査所見の異常を含む)、症状または疾患である。例えば、有害事象は、処置に応答した免疫系の活性化または免疫系細胞(例えば、T細胞)の増大と関係し得る。医学的処置は、一つ以上のA Eと関係することがあり、各A Eの重症度は同一または異なり得る。“有害事象を変える”ことができる方法なる言及は、異なる処置レジメンの使用と関係する、1つ以上のA Eの発生率および/または重症度を減少する処置レジメンを意味する。10

【0121】

本明細書で使用する“過増殖性疾患”は、細胞増殖が正常レベルを超えて増加した状態をいう。例えば、過増殖性疾患または障害は、悪性疾患(例えば、食道癌、結腸癌、胆道癌)および非悪性疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症、良性過形成および良性前立腺肥大)を含む。

【0122】

本明細書で使用する“約”または“を本質的に含む”なる用語は、当業者により測定される特定の値に対する許容される誤差範囲内を意味し、いかにして値を測定または決定したかに幾分依存する、すなわち、測定系の限度に依存する。例えば、“約”または“を本質的に含む”は、当分野の経験に従い、1以内または1を超える標準偏差を意味し得る。あるいは、“約”または“を本質的に含む”は、20%までの範囲を意味し得る。さらに、特に生物学的系または過程に関して、本用語は、1桁までの振れ幅または5倍までの値を意味し得る。特定の値を本明細書および特許請求の範囲に記載するとき、別段の記載が無ければ、その特定の値についての許容される誤差範囲内であるとして、“約”または“を本質的に含む”的意味を考慮すべきである。20

【0123】

本明細書に記載する、あらゆる濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲または整数範囲は、別段の記載が無ければ、列挙した範囲内のあらゆる整数の値と、適当な場合には、その分数(例えば整数の1/10および1/100)を含むと理解すべきである。30

【0124】

競合アッセイ

本発明は、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%および少なくとも約100%まで、参照抗P D - L 1抗体(MDX - 1105)の結合と競合できる大環状ペプチドにも関する。このような大環状ペプチドは、P D - L 1と特異的に結合する限り、変異体、保存的置換、機能的置換および欠失形態を含み、1個以上の本明細書に開示する大環状ペプチドと構造相同性であり得る。例えば、大環状ペプチドがP D - L 1の参照抗P D - L 1抗体と同じ領域に実質的に結合するならば、大環状ペプチドは、抗P D - L 1モノクローナル抗体が結合するP D - L 1エピトープと少なくとも重複するP D - L 1のエピトープと結合するはずである。重複領域は、アミノ酸残基から数百アミノ酸残基の範囲であり得る。そうであれば、大環状ペプチドは、抗P D - L 1モノクローナル抗体のP D - L 1への結合と競合および/または遮断し、それにより抗P D - L 1モノクローナル抗体のP D - L 1への結合を、競合アッセイにおいて好ましくは少なくとも約50%減少させるはずである。40

【0125】

競合アッセイのための参照抗体として使用し得る抗P D - L 1抗体は当分野で知られる。例えば、次の代表的抗P D - L 1抗体を使用し得る：MDX - 1105(BMS)；L 01 X - C(Serono)、L 1 X 3(Serono)、M S B - 0 0 1 0 7 1 8 C(Serono)およびP D - L 1 P r o b o d y(CytomX)および共用WO 2007 / 005874に開示のP D - L 150

抗体。

【0126】

競合アッセイのための参考抗体として使用し得る抗 P D - 1 抗体は当分野で知られる。例えば、次の代表的抗 P D - 1 抗体を使用し得る：ニボルマブ(BMS)；各々共用米国特許番号 8,008,449 (BMS) に開示する 17D8、2D3、4H1、4A11、7D3 および 5F4、MK-3475 (Merck、米国特許番号 8,168,757 に開示) および米国特許番号 7,488,802 に開示の抗体。

【0127】

医薬組成物

別の局面において、本発明は、本発明の 1 個または大環状ペプチドを組み合わせて含み、医薬的に許容される担体と共に製剤された組成物、例えば、医薬組成物を提供する。このような組成物は、本発明の 1 個または複数の(2 以上の異なる)大環状ペプチドまたは免疫コンジュゲートまたは二重特異性分子を含み得る。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するか、または相補的活性を有する、大環状ペプチド(または免疫コンジュゲートまたは二重特異性物質)の組み合わせを含み得る。

【0128】

本発明の医薬組成物は、治療と組み合わせて、すなわち、他剤と組み合わせても投与し得る。例えば、組み合わせ治療は、少なくとも 1 種の他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせた大環状ペプチドを含み得る。組み合わせ治療で使用できる治療剤の例は、本発明の大環状ペプチドの使用についての章にさらに詳述する。

【0129】

本明細書で使用する“医薬的に許容される担体”は、生理学的に適合性である任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経腸、脊髄または上皮投与に適する(例えば、注射または点滴による)。投与経路によって、活性化合物、すなわち、大環状ペプチド、免疫コンジュゲートまたは二重特異性分子を、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護するための物質でコーティングし得る。

【0130】

本発明の医薬化合物は、1 個以上の医薬的に許容される塩を含み得る。“医薬的に許容される塩”または“治療的に許容される塩”は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望まない中毒学的效果を与えない塩をいう(例えば、Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., 66: 1 - 19(1977) 参照)。このような塩の例は、酸付加塩および塩基付加塩を含む。酸付加塩は、非毒性無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸など、ならびに非毒性有機酸、例えば脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸など由来のものを含む。塩基付加塩は、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど、ならびに非毒性有機アミン、例えば N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなど由来のものを含む。

【0131】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される抗酸化剤も含み得る。医薬的に許容される抗酸化剤の例は、(1)水可溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システィン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油可溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ - トコフェロールなど；および(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含む。

【0132】

本発明の医薬組成物で用い得る適切な水性および非水性担体の例は、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールな

10

20

30

40

50

ど)およびこれらの適当な混合物、植物油、例えばオリーブ油および注射可能有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含む。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング物質の使用により、分散の場合には、必要な粒子径の維持および界面活性剤の使用により維持できる。

【0133】

これらの組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤のようなアジュバントを含み得る。微生物の存在の予防は、上記滅菌工程および種々の抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの導入の両者により確実にし得る。等張剤、例えば糖、塩化ナトリウムなどを組成物に導入することも望ましい。さらに、注射可能医薬形態の長期吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる薬剤を入れることにより達成し得る。10

【0134】

医薬的に許容される担体は、無菌水溶液または分散および無菌注射可能溶液または分散の即時調製のための無菌粉末を含む。薬学的に活性物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当分野では知られている。何らかの慣用の媒体または薬剤が、活性化合物と不適合でない限り、本発明の医薬組成物におけるその使用が意図される。補足の活性化合物も組成物に包含させ得る。

【0135】

治療的組成物は、典型的に無菌であり、製造および保存条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは抗薬物濃度に適する他の整然とした構造として製剤できる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)およびこれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング物質の使用により、分散剤の場合には必要な粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持できる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを組成物に添加するのが好ましい。注射可能組成物の長期吸収は、モノステアリン酸塩およびゼラチンのような吸収を遅延させる薬剤を導入することにより達成し得る。20

【0136】

無菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を、上に列挙した成分の1個または組み合わせを有する適当な溶媒に取り込み、必要に応じて、その後殺菌微量濾過することにより製造できる。一般に、分散剤は、活性化合物を、基本的な分散媒体および上に列挙したものからの必要な他の成分を含む無菌媒体に取り込むことにより製造できる。無菌注射可能溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい製造方法は、活性成分と先に無菌濾過した溶液からのさらなる所望の成分の粉末を產生する、真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。30

【0137】

一投与量形態を製造するために担体物質と組み合わせ得る活性成分の量は、処置対象および特定の投与方法による。一投与量形態を製造するために担体物質と組み合わせ得る活性成分の量は、一般に治療的效果を生じる組成物の量である。一般に、100パーセントの内で、この量は、医薬的に許容される担体と組み合わせて、活性成分が約0.01パーセント～約99パーセントの範囲であり、好ましくは約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント～約30パーセントの活性成分である。40

【0138】

投与レジメンは、最適な所望の応答(例えば、治療的応答)をもたらすよう調節する。例えば、単回ボーラスを投与するか、数回分割量を経時的に投与するか、または投与量を治療的状況の緊急事態に適応するよう、比例的に減少または増加してもよい。投与の容易性および投与量の均一性のために、投与量単位で非経腸組成物を製剤することが特に有利である。ここで使用する投与量単位形態は、処置対象への単位投与に適する物理的に分離した単位をいい、各単位は、必要な医薬担体と共に、所望の治療的效果を生じるよう計算さ50

れた所定量の活性化合物を含む。本発明の投与量単位形態の明細は、(a)活性化合物の固有の特徴および達成すべき特定の治療的効果、および(b)個々の感受性の処置のためのこのような活性化合物の配合の分野に内在性の限度により指示され、直接依存する。

【0139】

大環状ペプチドの投与のために、投与量は、宿主体重あたり約0.0001~100mg/kg、より一般的には0.01~5mg/kgの範囲である。例えば、投与量は0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重または10mg/kg体重であるか、または1~10mg/kgの範囲である。処置レジメンの例は、1日1回、1日2回、週に2回、週に3回、毎週、2週毎、3週毎、4週毎、月1回、3ヶ月に1回または3~6ヶ月毎に1回の投与を必要とする。本発明の大環状ペプチドのための好ましい投与レジメンは、静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、大環状ペプチドは、次の投与スケジュールのいずれか一つを使用して投与される：(i)4週毎を6回投与、その後3ヶ月毎；(ii)3週毎；(iii)3mg/kg体重を1回、その後3週間毎に1mg/kg体重。

【0140】

ある方法において、異なる結合特異性を有する2個以上の大環状ペプチドを同時に投与し、この場合投与する化合物の投与量は記載した範囲内に入る。化合物は、通常複数の機会に投与する。一回投与の間の間隔は、例えば、毎週、毎月、3ヶ月毎または毎年であり得る。間隔は、患者における標的抗原に対する大環状ペプチドの血中濃度の測定により示されるとおり、不規則でもあり得る。ある方法において、投与量を調節して、約1~1000μg/ml、ある方法において約25~300μg/mlの血漿抗体濃度を達成する。

【0141】

あるいは、大環状ペプチドを、投与頻度の減少が求められる場合には徐放製剤として投与できる。投与量および投与頻度は、処置が予防的であるか治療的であるかにより変わり得る。予防的適用において、長期間にわたり、比較的低投与量を、比較的頻度の少ない間隔で投与する。患者が死ぬまで処置を受けることがある。治療的適用において、相対的に短い間隔での相対的に高投与量が、疾患の進行が減少するまで、または終わるまで、好ましくは患者が疾患症状の部分的または完全改善を示すまで、必要な場合がある。その後、患者に予防レジメンで投与し得る。

【0142】

本発明の医薬組成物における活性成分の実際の投与量は、患者に対して毒性ではなく、特定の患者、組成物および投与方法について所望の治療的応答を達成するのに有効である活性成分を得るために変更され得る。選択した投与量は、用いる特定の本発明の組成物またはそのエステル、塩またはアミドの活性、投与経路、投与の時間、用いる特定の化合物の排出率、処置期間、用いる特定の組成物と組み合わせて使用する他の薬物、化合物および/または物質、処置する患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態および先の病歴および医学分野で周知の同等な因子を含む、多様な薬物動態因子による。

【0143】

本発明の大環状ペプチドの“治療上の有効量”は、好ましくは疾患症状の重症度低下、無疾患症状期間の頻度および期間の延長または疾患苦痛による機能障害または身体障害の予防をもたらす。例えば、腫瘍の処置のために、“治療上の有効量”は、好ましくは細胞増殖または腫瘍増殖を、非処置対象に対して少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらに好ましくは少なくとも約60%、なお好ましくは少なくとも約80%阻害する。化合物が腫瘍増殖および/またはHIVを阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性またはウイルス有効性の予測である動物モデル系で評価できる。あるいは、組成物のこの特性を、当業者に知られるインビトロ阻止アッセイにより、化合物の阻止能力を試験することにより評価できる。治療用化合物の治療上の有効量は、対象における腫瘍サイズの縮小、ウイルス負荷の低下、その他諸症状の改善をもたらす。当業者は、対象の体格、対象の症状の重症度および選択した特定の組成物または投与経路のような因子により、このような量を決定できる。

【0144】

10

20

30

40

50

他の面において、本発明は、本明細書に記載する大環状ペプチドおよび別の免疫修飾剤を含む、複数部分からなる医薬用キットを提供する。キットは、過増殖性疾患(例えば、本明細書に記載する癌)および/または抗ウイルス疾患の処置における使用のための指示書もさらに含み得る。

【0145】

本発明の組成物は、当分野で知られる多様な方法の一つ以上を使用して、一つ以上の経路により投与できる。当業者には認識されるとおり、投与経路および/または方法は所望の結果により変わる。本発明の大環状ペプチドのための好ましい投与経路は、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経腸投与経路、例えば注射または点滴を含む。本明細書で使用する用語“非経腸投与”は、経腸および局所投与以外の、通常注射による投与方法を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および点滴を含むが、これらに限定されない。10

【0146】

あるいは、本発明の大環状ペプチドは、非経腸経路より、例えば局所に、上皮または粘膜投与経路により、例えば、鼻腔内、経口、陰、直腸、舌下または局所的に投与できる。

【0147】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤のような、急速な放出に対して化合物を保護する担体と製剤できる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸のような生分解性、生体適合性ポリマーを使用できる。このような製剤を製造するための多くの方法が、特許となっており、または一般に当業者に知られている。例えば、Robinson, J.R., ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York(1978)を参照のこと。20

【0148】

治療的組成物を、当分野で知られる医療機器で投与し得る。例えば、好ましい態様において、本発明の治療的組成物を、無針皮下注射器、例えば、米国特許番号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824または4,596,556を開示されているデバイスで投与できる。本発明に有用な周知のインプラントおよびモジュールは、制御された速度で薬剤を分配するためのインプラント可能微量注入ポンプを開示する米国特許番号4,487,603；皮膚を介する薬物の投与のための治療的デバイスを開示する米国特許番号4,486,194；正確な注入速度で薬剤を送達するための薬剤注入ポンプを開示する米国特許番号4,447,233；連続薬物送達のための可変流速インプラント可能注入装置を開示する米国特許番号4,447,224；複数のチャンバー部分を有する浸透性薬物送達系を開示する米国特許番号4,439,196；および浸透性薬物送達系を開示する米国特許番号4,475,196を含む。これらの特許は、引用により本明細書に包含させる。多くの他のこののようなインプラント、送達系およびモジュールは当業者に知られる。30

【0149】

ある態様において、本発明の大環状ペプチドは、インピボでの適切な分布を確実にするために製剤できる。例えば、血液脳関門(BBB)は、多くの高度に親水性の化合物を排除する。本発明の治療的化合物が、BBBを通過することを確実にするために(望むならば)、例えば、リポソームに製剤できる。リポソームの製造方法に関しては、例えば、米国特許番号4,522,811、5,374,548および5,399,331を参照のこと。リポソームは、特異的細胞または臓器へ選択的に輸送される1個以上の部分を含むことができ、それにより標的化薬物送達を増強する(例えば、Ranade, V.V., J. Clin. Pharmacol., 29: 685(1989)参照)。標的化部分の例は、葉酸またはビオチン(例えば、Low et al.の米国特許番号5,416,016参照)；マンノシド(Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153: 1038(1988))；大環状ペプチド(Bloeman, P.G. et al., FEBS Lett., 357: 140(1995)；Owais, M. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 39: 180(1995))；4050

界面活性剤タンパク質A受容体(Briscoe et al., Am. J. Physiol., 1233 : 134(1995)) ; p 120 (Schreier et al., J. Biol. Chem., 269 : 9090(1994))を含み、Keinanen, K. et al., FEBS Lett., 346 : 123(1994); Killion, J.J. et al., Immunomethods 4 : 273(1994)も参照のこと。

【0150】

本発明の使用および方法

本発明の大環状ペプチド、組成物および方法は、例えば、PD-L1検出またはPD-L1遮断による免疫応答を含む、多くのインビトロおよびインビオ有用性を有する。例えば、これらの分子を、培養細胞に、インビトロまたはエクスピボで、またはヒト対象に、例えば、インビオで投与し、多様な状況での免疫を増強する。したがって、一つの面において、本発明は、本発明の大環状ペプチドを、対象における免疫応答が修飾されるように対象に投与することを特徴とする、対象における免疫応答を修飾する方法を提供する。好みしくは、応答は、増強、刺激または上方制御される。他の点において、大環状ペプチドは、抗カニクイザル、抗マウスおよび/または抗マーモット結合および治療活性を有し得る。

【0151】

本明細書で使用する用語“対象”は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、マーモット、両生類および爬虫類を含むが、非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシおよびウマのような哺乳動物が好ましい。好みしい対象は、免疫応答の増強が必要であるヒト患者を含む。本方法は特にT細胞仲介免疫応答の増強により処置できる障害を有するヒト患者の処置に特に適する。具体的な態様において、本方法は、特にインビオでの癌細胞の処置に適する。免疫の抗原特異的増強を達成するために、大環状ペプチドを目的の抗原と共に投与できる。PD-L1に対する大環状ペプチドを他の薬剤と共に投与するとき、2剤をいずれの順序で投与しても、同時に投与してもよい。

【0152】

本発明は、さらに、サンプルおよび対照サンプルと、ヒト、マーモット、カニクイザルおよび/またはマウスPD-L1に特異的に結合する参照大環状ペプチドを、大環状ペプチドと、ヒト、マーモット、カニクイザルおよび/またはマウスPD-L1の複合体を形成させる条件下で接触させることを含む、サンプルにおけるヒト、マーモット、カニクイザルおよび/またはマウスPD-L1抗原の存在を検出するか、あるいはヒト、マーモット、カニクイザルおよび/またはマウスPD-L1抗原の量を測定する方法を提供する。複合体の形成を、その後測定するが、ここで対照サンプルと比較して異なるサンプルの複合体形成は、サンプルにおけるヒト、マーモット、カニクイザルおよび/またはマウスPD-L1抗原の指標である。

【0153】

本発明の大環状ペプチドのCD28、ICOSおよびCTLA-4と比較したPD-L1への特異的結合を考慮して、本発明の大環状ペプチドは、細胞表面上のPD-L1発現の特異的検出に使用でき、さらに免疫親和性精製によるPD-L1の精製に使用できる。

【0154】

癌

大環状ペプチドによるPD-1の遮断は、患者における癌細胞に対する免疫応答を増強できる。PD-1に対するリガンドであるPD-L1は、正常なヒトの細胞では発現されないが、多様なヒトの癌において多く存在する(Dong et al., Nat. Med., 8 : 787 - 789(2002))。PD-1とPD-L1の相互作用は、腫瘍浸潤性リンパ球減少、T細胞受容体仲介増殖減少および癌細胞の免疫回避をもたらす(Dong et al., J. Mol. Med., 81 : 281 - 287(2003); Blank et al., Cancer Immunol. Immunother., 54 : 307 - 314(2005); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10 : 5094 - 5100(2004))。免疫抑制は、PD-1とPD-L1の局所相互作用の阻害により逆転され得て、PD-1とPD-L2の相互作用が同様

に遮断されたとき、この効果は相加的である(Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99 : 12293 - 12297(2002); Brown et al., J. Immunol., 170 : 1257 - 1266(2003))。先の研究では、T細胞増殖が、PD-L1のPD-L1への相互作用の阻害により回復できることが示されているが、PD-L1 / PD-L1相互作用の遮断によるインビボ癌腫瘍増殖に対する直接の効果についての報告はない。一つの面において、本発明は、癌性腫瘍の増殖が阻害されるように大環状ペプチドを使用するインビボでの対象の処置に関する。大環状ペプチドを、癌性腫瘍増殖阻害のために単独で使用してもよい。あるいは、大環状ペプチドを、下に記載するとおり、他の免疫原性剤、標準的癌処置または他の大環状ペプチドと組み合わせて使用してもよい。

【0155】

10

したがって、一つの態様において、本発明は、対象に治療上の有効量の大環状ペプチドを投与することを特徴とする、対象における腫瘍細胞増殖の阻害方法を提供する。

【0156】

本発明の大環状ペプチドを使用して癌の増殖を阻害し得る好ましい癌は、典型的に免疫治療に応答性の癌を含む。処置のための好ましい癌の非限定的例は、黒色腫(例えば、転移悪性黒色腫)、腎細胞癌(例えば、明細胞癌)、前立腺癌(例えば、ホルモン難治性前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌)、乳癌、結腸直腸癌および肺癌(例えば、扁平上皮および非扁平上皮非小細胞性肺癌)を含む。さらに、本発明は、本発明の大環状ペプチドを使用して増殖を阻害し得る難治性または反復性悪性腫瘍を含む。

【0157】

20

本発明の方法を使用して処置し得る他の癌の例は、骨の癌、脾臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、肛門部の癌、胃 / 胃体癌、精巣癌、子宮癌、卵管の癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膿の癌、外陰の癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎の癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、慢性または急性白血病、例えば急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、急性リンパ球性白血病および慢性リンパ球性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管の癌、腎孟癌、中枢神経系(CNS)の新生物、一次CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸椎腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、T細胞リンパ腫、アスペストにより誘発される疾患を含めた環境誘発性の癌および該癌の組み合わせを含む。本発明は、転移癌、特にPD-L1を発現する転移癌の処置にも有用である(Iwai et al., Int. Immunol., 17 : 133 - 144(2005))。

30

【0158】

40

所望により、PD-L1に対する大環状ペプチドを、免疫原性剤、例えば、癌細胞、精製腫瘍抗原(組み換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む)、細胞および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞と組み合わせて投与し得る(He et al., J. Immunol., 173 : 4919 - 4928(2004))。使用できる腫瘍ワクチンの非限定的例は、黒色腫抗原のペプチド、例えばgp100、MAGE抗原、Trp-2、 MART1および/またはチロシナーゼのペプチドまたはサイトカインGM-CSFを発現するようにトランスフェクトした腫瘍細胞(さらに下に開示)を含む。

【0159】

ヒトにおいて、黒色腫のような幾つかの腫瘍は、免疫原性であることが示されている。PD-L1の遮断によりT細胞活性化の閾値を上げることにより、宿主における腫瘍応答が期待できると仮説が立てられる。

【0160】

50

PD-L1の遮断は、ワクチン接種プロトコルと組み合わせたとき、最も有効である可能性がある。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている(Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring : 60 - 62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring : 300 - 302(2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring : 414 - 428(2000); Foon, K., ASCO Educational Book S

pring : 730 - 738(2000); see also Restifo, N. et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023 - 3043, in DeVita, V. et al., eds., Cancer : Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition(1997)参照)。これらの戦略の一つにおいて、ワクチンを、自己または同種腫瘍細胞を使用して製造する。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入されたとき、最も有効であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力なアクトィベーターであることが示されている(Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 3539 - 3543(1993))。

【0161】

種々の腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究により、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義が導かれている(Rosenberg, S.A., Immunity, 10 : 281 - 287(1999))。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍および腫瘍が生じた細胞に発現される分化抗原、例えばメラニン形成細胞抗原gp100、MAGE抗原およびTrp-2である。更に重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主に見られる腫瘍特異的T細胞の標的であり得ることが示されている。PD-L1遮断を、これらのタンパク質に対する免疫応答を発生させるために、腫瘍において発現されている組み換えタンパク質および/またはペプチドのコレクションと共に使用し得る。これらのタンパク質は、通常自己抗原として免疫系により監視され、それゆえに、それらに耐容性である。腫瘍抗原は、染色体のテロメアの合成に必要であるタンパク質テロメラーゼも含んでもよく、これはヒトの癌では85%を超えて発現されており、体性組織ではわずかな限られた数である(Kim, N. et al., Science, 266 : 2011 - 2013(1994))(これらの体性組織は、種々の手段により免疫攻撃から保護され得る)。腫瘍抗原は、タンパク質の配列を変異させるか、または2個の非関連配列の融合タンパク質を創製する(すなわち、フィラデルフィア染色体におけるbcr-abl)、体性変異のために癌細胞で発現される“新抗原”であるか、あるいはB細胞腫瘍由来のイディオタイプであってもよい。

【0162】

他の腫瘍ワクチンは、ヒトパピローマウイルス(HPV)、肝炎ウイルス(HBVおよびHCV)およびカポジヘルペス肉腫ウイルス(KHSV)のようなヒトの癌と関係するウイルスからのタンパク質を含み得る。PD-L1遮断と共に使用し得る腫瘍特異的抗原の他の形態は、腫瘍組織それ自体から単離した精製熱ショックタンパク質(HSP)である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞からのタンパク質フラグメントを含み、これらのHSPは腫瘍免疫の誘発のための抗原提示細胞の送達に高度に効率的である(Suot, R. et al., Science, 269 : 1585 - 1588(1995); Tamura, Y. et al., Science, 278 : 117 - 120(1997))。

【0163】

樹状細胞(DC)は、主要抗原特異的応答に使用できる強力な抗原提示細胞である。DCは、エクスピボで産生でき、種々のタンパク質およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物を積載できる(Nestle, F. et al., Nat. Med., 4 : 328 - 332(1998))。DCは、これらの腫瘍抗原を同様に発現するために遺伝的手段によっても形質導入され得る。DCは、免疫化を目的として、腫瘍細胞と直接融合されてもいる(Kugler, A. et al., Nat. Med., 6 : 332 - 336(2000))。ワクチン接種の方法として、DC免疫化は、より強力な抗腫瘍応答を活性化するために、PD-L1遮断と効果的に組み合わせ得る。

【0164】

PD-L1遮断は、標準的癌処置とも組み合わせてもよい。PD-L1遮断は、化学療法レジメと効果的に組み合わせ得る。これらの場合、投与する化学療法剤の量を減らすことが可能であり得る(Mokyr, M. et al., Cancer Res., 58 : 5301 - 5304(1998))。このような組み合わせの例は、黒色腫の処置のためにダカルバジンと組み合わせた大環状ペプチドである。このような組み合わせの他の例は、黒色腫の処置のためにインターロイキン-2(IL-2)と組み合わせた大環状ペプチドである。PD-L1遮断および化学療法を組み合わせて使用する背景にある科学的原理は、殆どの化学療法化合物の細胞毒性活性の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルを増加させるためである。細

10

20

30

40

50

胞死による P D - L 1 遮断と相乗作用し得る他の組み合わせ治療には、放射線、手術およびホルモン欠乏がある。これらのプロトコルのいずれも、宿主における腫瘍抗原の供給源を創製する。血管形成阻害剤は、P D - L 1 遮断と組み合わせてもよい。血管形成の阻害により、宿主抗原提示経路中に腫瘍抗原を供給し得る腫瘍細胞死をもたらす。

【 0 1 6 5 】

P D - L 1 遮断大環状ペプチドは、F c アルファまたはF c ガンマ受容体発現エクター細胞を腫瘍細胞への標的とする二重特異性大環状ペプチドと組み合わせても使用できる(例えば、米国特許番号5,922,845および5,837,243を参照)。二重特異性大環状ペプチドを使用して、2つの別々の抗原を標的とし得る。例えば、抗F c 受容体/抗腫瘍抗原(例えば、H e r - 2 / n e u)二重特異性大環状ペプチドは、マクロファージを腫瘍の部位に標的化させるのに使用されている。このターゲティングは、腫瘍特異的応答をさらに効果的に活性化し得る。これらの応答のT細胞アームは、P D - L 1 遮断物質の使用により増強される。あるいは、抗原を、腫瘍抗原および樹状細胞特異的細胞表面マーカーに結合する二重特異性大環状ペプチドの使用により、D C に直接送達させ得る。

10

【 0 1 6 6 】

腫瘍は、多種多様な機構により宿主免疫監視を逃れる。これらの機構の多くは、腫瘍により発現され、かつ免疫抑制性であるタンパク質の不活性化により克服され得る。これらは、特にT G F - ベータ(Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163 : 1037 - 1050(1986))、I L - 1 0 (Howard, M. et al., Immunology Today, 13 : 198 - 200(1992))およびF a s リガンド(Hahne, M. et al., Science, 274 : 1363 - 1365(1996))を含む。これらの各々に対する大環状ペプチドを、抗P D - L 1 と組み合わせて使用して、免疫抑制性因子の効果を抑制して、宿主による腫瘍免疫応答を促進できる。

20

【 0 1 6 7 】

宿主免疫応答性を活性化するために使用し得る他の大環状ペプチドを、抗P D - L 1 と組み合わせて使用できる。これらは、D C 機能および抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子を含む。抗C D 4 0 大環状ペプチドは、T細胞ヘルパー活性を効果的に代理でき(Ridge, J. et al., Nature, 393 : 474 - 478(1998))、P D - 1 抗体と組み合わせて使用できる(Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5) : 527 - 540(2000))。C T L A - 4 (例えば、米国特許番号5,811,097)、O X - 4 0 (Weinberg, A. et al., Immunol., 164 : 2160 - 2169(2000))、4 - 1 B B (Melero, I. et al., Nat. Med., 3 : 682 - 685(1997))およびI C O S (Hutloff, A. et al., Nature, 397 : 262 - 266(1999))のようなT細胞同時刺激分子に対する大環状ペプチドの活性化は、T細胞活性化のレベル増加のためにも提供され得る。

30

【 0 1 6 8 】

骨髄移植は、造血起源の多様な腫瘍の処置のために現在使用されている。移植片対宿主病は、この処置の結果ではあるが、治療的利点を、移植片対腫瘍応答から得ることができる。P D - L 1 遮断は、ドナー生着腫瘍特異的T細胞の効果を増加させるために使用できる。

【 0 1 6 9 】

抗原特異的T細胞のエクスピボ活性化および増大ならびに抗原特異的T細胞を腫瘍に向けさせるためのレシピエントへのこれらの細胞の養子移植が関与するいくつかの実験的治療プロトコルがある(Greenberg, R. et al., Science, 285 : 546 - 551(1999))。これらの方法は、C M V のような感染因子に対するT細胞応答の活性化にも使用し得る。大環状ペプチド存在下のエクスピボ活性化は、養子移入されたT細胞の頻度および活性を高めることが期待され得る。

40

【 0 1 7 0 】

感染症

本発明の他の方法は、特定の毒素または病原体に曝されている患者の処置に使用される。したがって、本発明の他の面は、対象の感染性疾患が処置されるように、対象に本発明の大環状ペプチドを投与することを特徴とする、対象における感染性疾患の処置方法を提

50

供する。

【0171】

上記した腫瘍への適用と同様にして、P D - L 1 遮断を、病原体、毒素および自己抗原に対する免疫応答を刺激するために、単独でまたはアジュバントとして、ワクチンと組み合わせて使用できる。この治療手段が特に有用であり得る病原体の例には、現在有効なワクチンがない病原体または慣用のワクチンが完全に効果的とはいえない病原体が挙げられる。これらは、H I V、肝炎(A型、B型およびC型)、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア属、マラリア(Butler, N.S. et al., *Nature Immunology*, 13 : 188 - 195(2012); H afalla, J.C.R., et al., *PLOS Pathogens*(February 2, 2012))、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌、綠膿菌を含むが、これらに限定されない。P D - L 1 遮断は、感染中に変化した抗原を提示する、H I Vのような因子による確立された感染に対して特に有効である。これらの新規エピトープは、抗ヒトP D - L 1 投与の投与時に外来物として認識され、それゆえP D - L 1 を介する負のシグナルにより削がれない強いT細胞応答を誘発する。
10

【0172】

本発明の方法により処置可能な感染の原因となる病原性ウイルスのいくつかの例は、H I V、肝炎(A、BまたはC)、ヘルペスウイルス(例えば、V Z V、H S V - 1、H A V - 6、H S V - I I およびC M V、エプスタイン・バーウイルス)、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウィルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器多核体ウイルス、ムンプスウイルス、口タウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、H T L Vウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、J Cウイルスおよびアルボウイルス脳炎ウイルスを含む。
20

【0173】

本発明の方法により処置可能な感染の原因となる病原性細菌のいくつかの例は、クラミジア属、リケッチア性細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュードモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、桿菌、コレラ、テタヌス、ボツリヌス、炭疽、ペスト、レブトスピラ症およびライム病細菌を含む。

【0174】

本発明の方法により処置可能な感染の原因となる病原性真菌の例は、カンジダ属(アルビカンズ、クルゼイ、グラブラタ、トロピカリシスなど)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス、アスペルギルス属(フミガーツス、ニガーなど)、ケカビ目(無コール属、アブシディア属、クモノスカビ属)、スプロトリックス・シェンキイ、プラストミセス・デルマチチジス、南アメリカ分芽菌、コクシジオイデス・イミチスおよびヒストプラズマ・カプスラーツムを含む。
30

【0175】

本発明の方法により処置可能な感染の原因となる病原性寄生虫の例は、赤痢アメーバ、大腸バランチジウム、フォーラーネグレリア、アカントアメーバ属、ランブル鞭毛虫、クリプトスピリジウム属、ニューモシスチス・カリニ、三日熱マラリア原虫、ネズミバベシア、ブルセイトリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ドノバンリーシュマニア、トキソプラズマ原虫およびブラジル鉤虫を含む。
40

【0176】

上記方法の全てにおいて、P D - L 1 遮断を、腫瘍抗原の強化された提示のために提供されるサイトカイン処置(例えば、インターフェロン、V E G F活性またはV E G F - 受容体を標的とする薬剤、G M - C S F、G - C S F、I L - 2)または二重特異性抗体治療のような他の形態の免疫治療と組み合わせ得る(例えば、Holliger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 6444 - 6448(1993); Poljak, Structure, 2 : 1121 - 1123(1994)参照)。

【0177】

自己免疫性反応

大環状ペプチドは自己免疫応答を誘発および増幅する。実際、腫瘍細胞およびペプチド
50

ワクチンを使用した抗腫瘍応答の誘発は、多くの抗腫瘍応答が抗自己反応性を含むことを明らかにする(van Elsas et al., supraにおける抗 C T L A - 4 + G M - C S F 修飾 B 1 6 黒色腫で観察される色素脱失；T r p - 2 ワクチン接種マウスにおける色素脱失(Overwijk, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 2982 - 2987(1999))；T R A M P 腫瘍細胞ワクチンにより誘発される自己免疫性前立腺炎(Hurwitz, A., supra(2000))、ヒト臨床試験において見られる黒色腫ペプチド抗原ワクチン接種および白斑症(Rosenberg, S. A. et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1) : 81 - 84(1996))。

【 0 1 7 8 】

それゆえに、疾患処置のために、種々の自己タンパク質を、これらの自己タンパク質に対する免疫応答を効果的に生じさせるためのワクチン接種プロトコルを考案するために、抗 P D - L 1 遮断と組み合わせて使用することを考慮することが可能である。例えば、アルツハイマー病は、脳内のアミロイド沈着物への A_β ペプチドの不適切な蓄積が原因であり、アミロイドに対する抗体応答が、これらのアミロイド沈着物を排除できる(Schenk et al., Nature, 400 : 173 - 177(1999))。

【 0 1 7 9 】

他の自己タンパク質は、アレルギーおよび喘息の処置のための I g E およびリウマチ性関節炎のための T N F アルファのような標的としても使用し得る。最後に、種々のホルモンに対する抗体応答は、本明細書に開示する大環状分子の使用により誘発され得る。生殖性ホルモンの抗体応答中和を避妊のために使用し得る。ホルモンおよび特定の腫瘍の増殖に必要である他の可溶性因子に対する抗体応答の中和は、可能性のあるワクチン接種標的としても考慮し得る。

【 0 1 8 0 】

抗 P D - L 1 大環状分子の使用について上記したものと類似する方法を、アルツハイマー病における A_β を含むアミロイド沈着物、T N F アルファおよび I g E のようなサイトカインのような他の自己抗原の不適切な沈着を有する患者の治療的自己免疫応答誘発のために使用できる。

【 0 1 8 1 】

ワクチン

大環状ペプチドを、抗 P D - 1 大環状分子と目的の抗原(例えば、ワクチン)の共投与により抗原特異的免疫応答を刺激するために使用し得る。従って、他の面において、本発明は、対象における抗原に対する免疫応答を増強する方法であって、対象に(i)抗原；および(ii)対象における抗原に対する免疫応答が増強されるような抗 P D - 1 大環状分子を投与することを特徴とする、方法が提供される。抗原は、例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原または病原体からの抗原であり得る。このような抗原の非限定的例は、上記の腫瘍抗原(または腫瘍ワクチン)または上記のウイルス、細菌または他の病原体からの抗原を含む。

【 0 1 8 2 】

インピボおよびインピトロで本発明の組成物(例えば、大環状ペプチド、多特異性および二重特異性分子およびイムノコンジュゲート)を投与するための適切な経路は、当分野で周知であり、当業者が選択できる。例えば、組成物は注射(例えば、静脈内または皮下)により投与できる。使用する分子の適切な投与量は、対象の年齢および体重および組成物の濃度および/または製剤に依拠する。

【 0 1 8 3 】

先に記載するとおり本発明の大環状ペプチドを 1 種以上の他の治療剤、例えば、細胞毒性剤、放射性毒性薬物または免疫抑制剤と共に投与し得る。ペプチドを薬剤に連結でき(免疫複合体として)または別々に薬剤から投与できる。後者(別々の投与)の場合、ペプチドを他の既知治療、例えば、抗癌治療、例えば、放射線の前に、後にまたは同時に投与してもよく、または共投与してよい。このような治療剤は、とりわけ、抗新生物剤、例えばドキソルビシン(アドリアマイシン)、シスプラチンブレオマイシンスルフェート、カルムスチン、クロラムブシリ、ダカルバジンおよびシクロホスファミドヒドロキシ尿素を含み、

10

20

30

40

50

これらは、それら自体、患者に毒性であるか、または準毒性である濃度でしか有効ではない。シスプラチニンは、4週毎に100mg / 投与で静脈内投与し、アドリアマイシンは21日毎に60 ~ 75mg / ml投与量で静脈内投与する。本発明の大環状ペプチドと化学療法剤の共投与は、ヒト腫瘍細胞に対する細胞毒性効果を生じる異なる作用機序で働く2種の抗癌剤を提供する。このような共投与は、ペプチドに対して非反応性とし得る薬剤に対する耐性の発生または腫瘍細胞の抗原性の変化による問題を解決し得る。

【0184】

また本発明の範囲内に包含されるのは、本発明の組成物(例えば、大環状ペプチド、二重特異性または多特異性分子または免疫コンジュゲート)および使用のための指示書を含むキットである。キットは、さらに少なくとも1種のさらなる薬または1以上のさらなる本発明の大環状ペプチド(例えば、大環状分子と異なるPDL1抗原におけるエピトープと結合する相補的活性を有するヒト抗体)を含み得る。キットは、キットの中身の意図される使用を示すラベルを一般的には含む。ラベルなる用語は、キット上にまたはキットと共に提供されるか、または他の方法でキットに付属するあらゆる書面または記録媒体を含む。

10

【0185】

組み合わせ治療

本発明の大環状ペプチドと他のPDL1アンタゴニストおよび/または別の免疫修飾剤の組み合わせは、過増殖性疾患に対する免疫応答の増強に有用である。例えば、これらの分子を、インビトロまたはエクスピリオで培養中の細胞またはヒト対象に、例えばインビリオで投与して、多様な状況における免疫を増強する。したがって、一つの面において、本発明は、本発明の大環状ペプチドを、対象における免疫応答が修飾されるように対象に投与することを特徴とする、対象における免疫応答を修飾する方法を提供する。好ましくは、応答は、増強、刺激または上方制御される。他の態様において、本発明は、対象に本発明の大環状ペプチドおよび別の免疫修飾剤の治療以下の投与量を投与することを特徴とする、免疫刺激性治療剤での過増殖性疾患の処置と関係する有害事象を変える方法を提供する。

20

【0186】

大環状ペプチドによるPDL1の遮断は、患者における癌細胞に対する免疫応答を増強できる。本発明の大環状ペプチドを使用して増殖を阻害し得る癌は、典型的に免疫治療に応答性の癌を含む。本発明の組み合わせ治療での処置のための癌の代表例は、黒色腫(例えば、転移悪性黒色腫)、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸癌および肺癌を含む。本発明の方法で処置し得る他の癌の例は、骨癌、脾臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膿瘍、外陰癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性または急性白血病、小児固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎盂癌、中枢神経系(CNS)新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸椎腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、T細胞リンパ腫、アスペストにより誘発される疾患を含む環境誘発性の癌およびこれらの癌の組み合わせを含む。本発明は転移癌の処置にも有用である。

30

【0187】

ある態様において、本明細書に開示する大環状ペプチドの少なくとも1個を含む治療剤の組み合わせを、医薬的に許容される担体中の単一組成物として同時に、または各薬剤を連続的に投与する別々の組成物として一緒に投与し得る。例えば、第二の免疫修飾剤および本発明の大環状ペプチドを、第二の免疫修飾剤を最初に投与し、大環状ペプチドを2番目に投与するか、または大環状ペプチドを最初に投与し、第二の免疫修飾剤を2番目に投与するように、逐次的に投与できる。さらに、1投与量を超える組み合わせ治療を逐次的に投与するならば、逐次投与の順番は各投与時に逆転しても同じ順番でもよく、逐次投与

40

50

を同時投与またはその任意の組み合わせと組み合わせてもよい。例えば、第二の免疫修飾剤および大環状ペプチドの最初の投与は同時であってよく、2回目の投与は第二の免疫修飾剤が最初で大環状ペプチドが2番目の逐次であってよく、3回目の投与は大環状ペプチドが最初で第二の免疫修飾剤が2回目などであってよい。他の代表的投与スキームは、大環状ペプチドが最初で第二の免疫修飾剤が2番目である最初の投与を含んでよく、その後の投与は同時であってよい。

【0188】

所望により、大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤の組み合わせを、さらに免疫原性剤、例えば、癌細胞、精製腫瘍抗原(組み換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む)、細胞および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞と組み合わせて投与し得る(He et al., J. Immunol., 173 : 4919 - 4928(2004))。使用できる腫瘍ワクチンの非限定的例は、黒色腫抗原のペプチド、例えば g p 1 0 0、M A G E 抗原、T r p - 2、M A R T 1 および / またはチロシナーゼのペプチドまたはサイトカインG M - C S F を発現するようにトランスフェクトした腫瘍細胞(さらに下に開示)を含む。

10

【0189】

組み合わせたP D - L 1 大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤は、さらにワクチン接種プロトコルと組み合わせ得る。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている(Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring : 60 - 62(2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring : 300 - 302(2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring : 414 - 428(2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring : 730 - 738(2000); see also Restifo et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023 - 3043 in DeVita et al., eds., Cancer : Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition(1997)参照)。これらの戦略の一つにおいて、ワクチンを、自己または同種腫瘍細胞を使用して製造する。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞がG M - C S F を発現するように形質導入された時に、最も有効であることが示されている。G M - C S F は、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力なアクティベーターであることが示されている(Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 3539 - 3543(1993))。

20

【0190】

種々の腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究により、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義が導かれている(Rosenberg, Immunity, 10 : 281 - 287(1999))。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍および腫瘍が生じた細胞に発現される分化抗原、例えばメラニン形成細胞抗原g p 1 0 0、M A G E 抗原およびT r p - 2 である。より重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主に見られる腫瘍特異的T細胞の標的であり得ることが示されている。ある態様において、本明細書に記載する抗体組成物を使用する組み合わせたP D - L 1 大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤を、これらのタンパク質に対する免疫応答を誘起させるために、腫瘍において発現されている組み換えタンパク質および / またはペプチドのコレクションと共に使用し得る。これらのタンパク質は、通常自己抗原として免疫系により監視されているため、それらに耐容性である。腫瘍抗原は、染色体のテロメアの合成に必要とされるタンパク質テロメラーゼも含んでよく、これは85%を超えるヒトの癌で発現され、体性組織ではわずかな限られた数である(Kim et al., Science, 266 : 2011 - 2013(1994))(これらの体性組織は、種々の手段により免疫攻撃から保護され得る)。腫瘍抗原は、タンパク質配列を変異させるか、または2個の非関連配列の融合タンパク質を創製する(すなわち、フィラデルフィア染色体におけるb c r - a b 1)体性変異のために癌細胞で発現される“新抗原”であるか、あるいはB細胞腫瘍由來のイディオタイプであってよい。

40

【0191】

他の腫瘍ワクチンは、ヒトパピローマウイルス(H P V)、肝炎ウイルス(H B V およびH C V)およびカポジヘルペス肉腫ウイルス(K H S V)のようなヒトの癌と関係するウイ

50

ルスからのタンパク質を含み得る。P D - L 1 大環状ペプチド遮断と組み合わせて使用し得る腫瘍特異的抗原の他の形態は、腫瘍組織それ自体から単離した精製熱ショックタンパク質(H S P)である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞由来のタンパク質フラグメントを含んでおり、これらのH S Pは、腫瘍免疫を賦活させために抗原提示細胞への送達効率が高い(Suot et al., Science, 269 : 1585 - 1588(1995); Tamura et al., Science, 278 : 117 - 120(1997))。

【 0 1 9 2 】

樹状細胞(D C)は、主要抗原特異的応答に使用できる強力な抗原提示細胞である。D Cはエクスピボで産生でき、種々のタンパク質およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物を積載できる(Nestle et al., Nat. Med., 4 : 328 - 332(1998))。D Cは、これらの腫瘍抗原を同様に発現するために遺伝的手段によっても形質導入され得る。またD Cは、免疫化の目的で腫瘍細胞と直接融合されている(Kugler et al., Nat. Med., 6 : 332 - 336(2000))。ワクチン接種の方法として、D C免疫化は、強力な抗腫瘍応答を活性化するために、組み合わせた抗P D - L 1 大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤とを効果的に組み合わせ得る。

【 0 1 9 3 】

抗P D - L 1 大環状ペプチドと別の免疫修飾剤の組み合わせは、さらに標準的な癌の治療とも組み合わせ得る。例えば、組み合わせ大環状ペプチドおよび第二の免疫修飾剤は、化学療法レジメンと効果的に組み合わせ得る。これらの場合、大環状ペプチドおよび第二の免疫修飾剤の組み合わせに見られるとおり、本発明の組み合わせと共に投与する他の化学療法剤の量を減らすことが可能であり得る(Mokyr et al., Cancer Res., 58 : 5301 - 5304(1998))。このような組み合わせの例は、黒色腫の処置のためにダカルバジンとさらに組み合わせた大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤の組み合わせである。他の例は、黒色腫の処置のためにインターロイキン - 2 (I L - 2)とさらに組み合わせた大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤の組み合わせである。P D - L 1 大環状ペプチドおよび別の免疫調節剤と化学療法の組み合わせ使用の背景にある科学的原理は、殆どの化学療法化合物の細胞毒性活性の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルの増加をもたらすことが理由である。細胞死により抗P D - L 1 大環状ペプチドと別の免疫修飾剤との組み合わせが、相乗作用をもたらし得る別の組み合わせ治療は、放射線、手術およびホルモン欠乏である。これらのプロトコルのいずれも、宿主における腫瘍抗原の供給源を創製する。血管形成阻害剤は、組み合わせたP D - L 1 と第二の免疫修飾剤と組み合わされてもよい。血管形成阻害は、宿主抗原提示経路中に腫瘍抗原を供給し得る腫瘍細胞死を生じる。

【 0 1 9 4 】

P D - L 1 と別の免疫修飾剤の組み合わせは、F c アルファまたはF c ガンマ受容体発現エフェクター細胞を腫瘍細胞への標的とする二重特異性大環状ペプチドと組み合わせても使用できる(例えば、米国特許番号5,922,845および5,837,243参照)。二重特異性大環状ペプチドを使用して、2つの別々の抗原を標的とし得る。例えば、抗F c 受容体 / 抗腫瘍抗原(例えば、H e r - 2 / n e u)二重特異性大環状ペプチドは、マクロファージを腫瘍の部位に標的化させるのに使用されている。このターゲティングは、腫瘍特異的応答をさらに効果的に活性化し得る。これらの応答のT細胞アームは、組み合わせたP D - 1 と第二の免疫修飾剤の使用により増強される。あるいは、抗原を、腫瘍抗原および樹状細胞特異的細胞表面マーカーに結合する二重特異性大環状ペプチドの使用により、D Cに直接送達させ得る。

【 0 1 9 5 】

他の例において、大環状ペプチドと第二の免疫修飾剤の組み合わせを、抗新生物大環状財、例えばリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)、ハーセプチソウ(登録商標)(トラスツマブ)、ベキサール(登録商標)(トシツモマブ)、ゼヴァリソマブ(登録商標)(イブリツモマブ)、キヤンパス(登録商標)(アレムツズマブ)、リンホシド(Lymphocide)(エプラツズマブ)、アバストン(登録商標)(ベバシズマブ)およびタルセバ(登録商標)(エルロチニブ)などと組み合わせ得る。例として、理論に縛られることを望まないが、抗癌抗体または毒素とコンジ

10

20

30

40

50

ユゲートした抗癌抗体を用いる処置は、癌細胞死(例えば、腫瘍細胞)を起こし得て、これは、第二の免疫修飾剤または大環状ペプチドが介在する免疫応答を増強する。例示的態様において、過増殖性疾患(例えば、癌性腫瘍)の処置は、大環状ペプチドおよび第二の免疫修飾剤と同時または逐次的またはその任意の組み合わせにて組み合わせた抗癌抗体を含み、宿主による抗腫瘍免疫応答を増強し得る。

【0196】

腫瘍は、多種多様な機構により宿主免疫監視を逃れる。これらの機構の多くは、腫瘍により発現され、免疫抑制性であるタンパク質の不活性化により克服され得る。これらは、特に TGF - ベータ(Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163 : 1037 - 1050(1986))、IL - 10 (Howard, M. et al., Immunology Today, 13 : 198 - 200(1992))および Fas リガンド(Hahne, M. et al., Science, 274 : 1363 - 1365(1996))を含む。別の例において、これらの各々に対する抗体を、大環状ペプチドおよび別の免疫修飾剤とさらに組み合わせて、免疫抑制性剤の効果を抑制して、宿主による腫瘍免疫応答を促進することができる。10

【0197】

宿主免疫応答性を活性化するために使用し得る他の薬剤を、本発明の大環状ペプチドとさらに組み合わせて使用できる。これらは、DC 機能および抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子を含む。抗 CD40 大環状ペプチドは、T 細胞ヘルパー活性を効果的に代理でき(Ridge, J. et al., Nature, 393 : 474 - 478(1998))、本発明の大環状ペプチドと併せて、単独で、または抗 CTLA - 4 と組み合わせて使用できる(Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5) : 527 - 540(2000))。OX - 40 (Weinberg, A. et al., Immunol., 164 : 2160 - 2169(2000))、4 - 1BB (Melero, I. et al., Nat. Med., 3 : 682 - 685(1997) および ICOS (Hutloff, A. et al., Nature, 397 : 262 - 266(1999)))のような T 細胞同時刺激分子に対する大環状ペプチドの活性化は、T 細胞活性化のレベル増加のために提供され得る。20

【0198】

骨髄移植は、造血起源の多様な腫瘍の処置のために現在使用されている。移植片対宿主病は、この処置の結果ではあるが、治療的利点を、移植片対腫瘍応答から得ることができる。本発明の大環状ペプチドは、単独でまたは免疫修飾剤と組み合わせて、ドナー生着腫瘍特異的 T 細胞の効果を増加させるために使用できる。

【0199】

抗原特異的 T 細胞を腫瘍に向けさせるために、抗原特異的 T 細胞のエクスピボ活性化および増大ならびにこれらの細胞のレシピエントへの養子移植が関与するいくつかの実験的処置プロトコルがある(Greenberg, R. et al., Science, 285 : 546 - 551(1999))。これらの方法は、CMV のような感染因子に対する T 細胞応答の活性化にも使用し得る。本発明の大環状ペプチド単独または別の免疫調節剤との組み合わせの存在下でのエクスピボ活性化は、養子移入された T 細胞の頻度および活性を高めることが期待され得る。30

【0200】

ある態様において、本発明は、対象に本発明の大環状ペプチドを別の免疫調節剤の治療以下の投与量と組み合わせて投与することを特徴とする、免疫刺激剤での過増殖性疾患の処置と関係する有害事象を変更する方法を提供する。例えば、本発明の方法は、患者に非吸収性ステロイドを投与することにより、免疫刺激性の治療抗体誘発性大腸炎または下痢の発生率を減少させる方法を提供する。免疫刺激性の治療抗体を受けていたるあらゆる患者が、このような処置により誘発される大腸炎または下痢のリスクがあるため、この全患者集団が、本発明の方法に従う治療に適する。ステロイド類は炎症性腸疾患(IBD)の処置および IBD の悪化予防に投与されているが、IBD と診断されていない患者における IBD の予防(発生率の減少)には使用されていない。非吸収性ステロイド類でさえ、ステロイド類が関与する相当な副作用により、予防的使用が阻まれてきた。40

【0201】

さらなる態様において、本発明の大環状ペプチドは、単独または別の免疫調節剤と組み合わせて、非吸収性ステロイドのいずれかの使用とさらに組み合わせ得る。本明細書にお50

いて使用する“非吸収性ステロイド”は、肝臓での代謝後のステロイドのバイオアベイラビリティが低い(すなわち、約20%未満)相当な初回通過代謝を示すグルココルチコイドである。本発明の一つの態様において、非吸収性ステロイドはブデソニドである。ブデソニドは局所作用性グルココルチコステロイドであり、経口投与後、主に肝臓により相当代謝される。エントコート(登録商標)EC(Astra-Zeneca)は、回腸および結腸全体への薬物送達を最適化するよう開発されたブデソニドのpHおよび時間依存型経口製剤である。エントコート(登録商標)ECは、回腸および/または上行結腸が関与する軽度から中程度のクローン病の処置について米国で承認されている。クローン病処置のためのエントコート(登録商標)ECの通常の経口投与量は6~9mg/日である。エントコート(登録商標)ECは吸収される前に腸で吸収され、腸粘膜に保持される。腸粘膜標的組織を通過したら、エントコート(登録商標)ECは、肝臓のチトクロムP450系で、無視できるグルココルチコイド活性を有する代謝物にまで殆ど代謝される。それゆえに、バイオアベイラビリティは低い(約10%)。ブデソニドの低いバイオアベイラビリティは、初回通過代謝の程度が低い他のグルココルチコイドと比較して治療指数が改善されている。ブデソニドは、その結果全身作用性コルチコステロイドよりも少ない視床下部-下垂体抑制を含み、副作用が少ない。しかしながら、エントコート(登録商標)ECの慢性投与は、副腎皮質ホルモン過剰症および副腎抑制のような全身性グルココルチコイド効果を生じ得る。Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610(2004)を参照されたい。

【0202】

さらなる態様において、組み合わせたPD-L1と別の免疫調節剤と非吸収性ステロイドの組み合わせを、さらにサリチレートと組み合わせ得る。サリチレートは、ASA剤、例えばスルファサラジン(アザルフィジン(登録商標), Pharmacia & Upjohn); オルサラジン(DIPENTUM(登録商標), Pharmacia & Upjohn); バルサラジド(COLAZAL(登録商標), Salix Pharmaceuticals, Inc.); およびメサラミン(アサコール(登録商標), Procter & Gamble Pharmaceuticals; ペンタサ(登録商標), Shire US; CANASA(登録商標), Axcan Sandipharm, Inc.; ROWASA(登録商標), Solvay)を含む。

【0203】

投与量および製剤

適切な式Iのペプチドまたはより具体的に本明細書に記載する大環状ペプチドを、化合物の単独および/または許容される担体との混合物で医薬製剤の形態で糖尿病および他の関連疾患の処置のために患者に投与できる。糖尿病処置の当業者は、このような処置を必要とするヒトを含む哺乳動物への化合物の投与量および投与経路を容易に決定できる。投与経路は、経口、口腔内、直腸、経皮、バッカル、鼻腔内、肺、皮下、筋肉内、皮内、舌下、結腸内、眼内、静脈内または腸管投与を含むが、これらに限定されない。化合物を、認可された調剤行為に基づき、投与経路に従って製剤する(Fingl et al., in The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Chapter 1, p.1(1975); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA(1990))。

【0204】

本明細書に記載する医薬的に許容されるペプチド組成物を、錠剤、カプセル剤(この各々は徐放性または持効性製剤を含む)、丸剤、粉末剤、顆粒剤、エリキシル剤、インサイチュゲル剤、マイクロスフェア剤、結晶複合体、リポソーム剤、マイクロエマルジョン剤、チンキ剤、懸濁液剤、シロップ剤、エアロゾルスプレー剤およびエマルジョン剤のような多種の投与形態で投与できる。本明細書に記載する組成物は、経口、静脈内(ボーラスまたは点滴)、腹腔内、皮下、経皮または筋肉内形態でも投与でき、全て医薬分野で当業者に周知の投与形態を使用する。組成物は単独で投与してよいが、一般に選択した投与経路および標準的薬務に基づき選択した医薬担体と共に投与する。

【0205】

本明細書に記載する組成物の投与レジメンは、当然、特定の薬剤の薬力学的特徴およびその投与方法および投与経路; 受け手の種、年齢、性別、健康状態、医学的状態および体重; 症状の性質および程度; 同時処置の種類; 処置頻度; 投与経路、患者の腎臓および肝

10

20

30

40

50

臓機能および望む効果により変わる。医師または獣医師は、疾患状態の予防、対抗または進行停止に必要な薬物の有効量を決定し、処方できる。

【0206】

一般的な指標として、活性成分の1日経口投与量は、目的とする効果のために使用するとき、1日あたり約0.001～1000mg/kg体重、最も好ましくは約0.01～100mg/kg体重、最も好ましくは約0.6～20mg/kg/日の範囲である。静脈内で、活性成分の1日投与量は、目的とする効果のために使用するとき、一定速度の点滴の間で0.001ng～100.0ng/分/Kg体重の範囲である。このような定速静脈内点滴は、好ましくは0.01ng～50ng/分/Kg体重で、最も好ましくは0.01ng～10.0mg/分/Kg体重で投与できる。本明細書に記載する組成物を、1日に単回にて投与してよく、または総1日投与量を1日に2回、3回または4回に分けて投与してよい。本明細書に記載する組成物は、所望により日/週/月の期間にわたり薬物の徐放が可能なデポー製剤でも投与できる。10

【0207】

本明細書に記載する組成物は、適切な鼻腔内媒体を使用する局所使用で鼻腔内形態または経皮皮膚パッチを使用して経皮経路で投与できる。経皮送達系の形で投与するとき、この投与量の投与は、当然、投与レジメンの期間中、間欠性ではなくむしろ連続的である。

【0208】

組成物は、典型的に、経口錠剤、カプセル、エリキシル、噴射剤を用いてまたは用いずに製造したエアロゾルスプレーおよびシロップである意図する投与形態を参照し、慣用の薬務に一致して適切に選択した適切な医薬希釈剤、添加物または担体(ここでは集合的に医薬担体と呼ぶ)との混合物で、投与する。20

【0209】

例えば、錠剤またはカプセルの形態での経口投与において、活性薬物成分を、経口の、非毒性の医薬的に許容される不活性担体、例えば、これらに限定されないがラクトース、デンプン、スクロース、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、マンニトールおよびソルビトールと組み合わせることができる;液体経口での経口投与のためには、経口薬物成分を、エタノール、グリセロールおよび水のような、あらゆる経口の非毒性、医薬的に許容される不活性担体と組み合わせることができる。さらに、所望の場合または必要な場合には、適切な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤を混合物に組み込んでもよい。適切な結合剤は、例えばデンプン、ゼラチン、グルコースまたはベータ-ラクトースなどの天然糖、トウモロコシ甘味剤、アカシア、トラガカントまたはアルギン酸ナトリウムのような天然および合成ガム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコールおよび蠍を含むが、これらに限定されない。これらの投与形態で使用される滑沢剤は、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムを含む。崩壊剤は、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイトおよびキサンタンゴムを含むが、これらに限定されない。30

【0210】

本明細書に記載する組成物は、混合ミセルまたはリポソーム送達系、例えば小分子单層リポソーム、大分子单層リポソームおよび多層リポソームの形でも投与できる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンのような様々なリン脂質から製造できる。浸透エンハンサーを、薬物吸収を増強するために添加してよい。40

【0211】

プロドラッグが、医薬組成物の多くの所望の品質を高めることができているため(すなわち、溶解度、バイオアベイラビリティ、製造など)、本明細書に記載する化合物をプロドラッグ形態で送達されてもよい。それゆえに、本明細書に記載する主題は、本願請求項の化合物のプロドラッグ、その送達方法およびそれを含む組成物を包含することを意図する。

【0212】

本明細書に記載する組成物は、標的化可能薬物担体として可溶性ポリマーとも結合されてもよい。このようなポリマーは、ポリビニル・ピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピル・メタクリルアミド・フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミドフェノールまたはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシド・ポリリシンを含み得る。さらに、本明細書に記載する組成物を、薬物の制御放出を達成するために有用な生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロビラン、ポリシアノアシレートおよびヒドログルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーと組み合わせてもよい。

【0213】

10

投与に適する投与形態(医薬組成物)は、投与量単位あたり約0.01mg～約500mgの活性成分を含む。これらの医薬組成物において、活性成分は、通常、組成物の総重量に基づき約0.5～95重量%の量で存在し得る。

【0214】

ゼラチンカプセルは、活性成分および粉末担体、例えばラクトース、デンプン、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸を含み得る。類似の希釈剤を使用して圧縮錠剤を製造できる。錠剤およびカプセルのいずれも、長期間にわたる薬剤の連続的放出を提供するために徐放製品として製造できる。圧縮錠剤を、何らかの不快な味をマスクして、大気から錠剤を保護するために糖コーティングまたはフィルムコーティングまたは消化管での選択的崩壊のために腸溶性コーティングしてもよい。

20

【0215】

経口投与用の液体投与形態は、患者による許容性を高めるために着色剤および風味剤を含み得る。

【0216】

一般に、水、適切な油、食塩水、水性デキストロース(グルコース)および関連糖溶液およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールが、非経腸溶液のための適切な担体である。非経腸投与のための溶液は、好ましくは活性成分の水可溶性塩、適切な安定化剤および必要であれば、緩衝物質を含む。重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸のような抗酸化剤は、単独でまたは組み合わせで、適切な安定化剤となる。また、クエン酸およびその塩およびナトリウムEDTAも使用される。さらに、非経腸溶液は、塩化ベンザルコニウム、メチル-またはプロピル-パラベンおよびクロロブタノールのような防腐剤を含み得る。

30

【0217】

適切な医薬担体は、この分野の標準的参考書であるRemington : The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company(1995)に記載されている。

【0218】

本明細書に記載する化合物の投与のための代表的な有用な医薬投与形態は、次のとおり説明できる。

【0219】

40

カプセル

多数の単位カプセルを、100mgの粉末活性成分、150mgのラクトース、50mgのセルロースおよび6mgのステアリン酸マグネシウムを、標準的な2ピースの硬ゼラチンカプセルに注入することにより製造できる。

【0220】

軟ゼラチンカプセル

ダイズ油、綿実油またはオリーブ油のような消化可能油中の活性成分の混合物を製造し、ゼラチンに陽圧式排出ポンプにより注入して、100mgの活性成分を含む軟ゼラチンカプセルを製造する。カプセルは、洗浄および乾燥されるべきである。

【0221】

50

錠剤

錠剤を、投与量単位が、例えば100mgの活性成分、0.2mgのコロイド状二酸化ケイ素、5mgのステアリン酸マグネシウム、275mgの微結晶セルロース、11mgのデンプンおよび98.8mgのラクトースであるように、慣用の方法で製し得る。嗜好性を高めるため、または吸収を遅延するために適当なコーティングを施してよい。

【0222】

注射剤

本明細書に記載するペプチド組成物の注射可能製剤は、規制機関により承認されているような添加物の使用を必要としても、または必要としない可能性がある。これらの添加物は、溶媒および共溶媒、可溶化、乳化または濃化剤、キレート剤、抗酸化剤および還元剤、抗微生物防腐剤、緩衝液およびpH調節剤、充填剤、保護剤および張性調節剤および特殊な添加物を含むが、これらに限定されない。注射可能製剤は、無菌、無発熱物質、溶液の場合、無粒状物質でなければならない。

10

【0223】

注射による投与に適する非経腸組成物は、例えば、1.5重量%の活性成分を、医薬的に許容される緩衝液(共溶媒または他の添加物を含んでいても、含まなくてもよい)と攪拌することにより製造し得る。溶液は、塩化ナトリウムを用いて等張化し、滅菌されなければならない。

【0224】

懸濁液

20

水性懸濁液を、例えば、各々5mLが100mgの微粉化活性成分、20mgのナトリウムカルボキシメチルセルロース、5mgの安息香酸ナトリウム、1.0gのソルビトール溶液、U.S.P.および0.025mLのバニリンまたは別の味の良い風味剤を含む、経口および/または非経腸投与用として製造できる。

【0225】

生分解性微粒子

注射による投与に適する徐放性非経腸組成物は、例えば、適切な生分解性ポリマーを溶媒に溶解し、活性剤をポリマー溶液に添加して導入し、溶媒をマトリクスから除去し、それによりマトリクス中に活性剤が分散したポリマーのマトリクスを形成させることにより製造され得る。

30

【0226】

ペプチド合成

本明細書の記述は、化学結合の法則および原理に即して解釈されるべきである。本開示に含まれる化合物は、医薬剤として使用するために適切で安定なものであると理解されるべきである。当業者は、化学結合および安定性についての一般原理に基づいて、化合物が安定であるもの、および安定でないものを知っている。

【0227】

本発明の大環状ペプチドの化学合成は、段階的固相合成、配座的に支援される再ライゲーションを経るペプチドフラグメントの半合成、クローン化または合成ペプチドセグメントの酵素ライゲーションおよび化学ライゲーションを含めた様々な当該技術分野において承認されている方法を使用して合成できる。本明細書に記載する大環状ペプチドおよびそのアナログの好ましい合成方法は、Chan, W.C. et al., eds., Fmoc Solid Phase Synthesis, Oxford University Press, Oxford(2000); Barany, G. et al., The Peptides : Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2 : "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3 - 284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, New York(1980) ; および Stewart, J.M. et al., Solid - Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, IL(1984)に記載されているような、種々の固相技術を使用する化学合成である。好ましいストラテジーは、-アミノ基を一時的に保護するためのFmoc(9-フルオレニルメチルメチル-オキシカルボニル)基と、アミノ酸側鎖を一時的に保護するためのtert-ブチル基の組み合わせである(例えば、Atherton, E. et al., "The

40

50

e Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", in The Peptides : Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9 : "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1 - 38, Udenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego(1987)).

【0228】

ペプチドは、不溶性ポリマー支持体(“樹脂”とも呼ぶ)上で段階的方法において、ペプチドのC末端から開始して合成できる。合成は、ペプチドのC末端アミノ酸を、アミドまたはエステル結合の形成を介して樹脂に付加することから開始する。これは、得られるペプチドをC末端のアミドまたはカルボン酸として、最終段階で遊離させ得る。

【0229】

C末端アミノ酸および合成に使用する全ての他のアミノ酸は、-アミノ保護基が合成中に選択的に除去され得るように、特異的に保護された-アミノ基および側鎖官能基(存在するならば)を有することを必要とする。アミノ酸のカップリングを、活性エステルとしてそのカルボキシル基の活性化および樹脂に結合したN末端アミノ酸の非遮断-アミノ基との反応により実施する。一連の-アミノ基の脱保護およびカップリングを、全ペプチド配列が組立てられるまで繰り返す。次いで、通常、副反応を制限するための適当なスカベンジャーの存在下で、ペプチドを樹脂から遊離し、同時に側鎖官能性の脱保護を行う。得られたペプチドを最終的に逆相HPLCで精製する。

【0230】

最終ペプチドの前駆体として必要なペプチジル-樹脂の合成は、市販の架橋ポリスチレンポリマー樹脂(Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA)を利用する。好ましい固体支持体は、C末端カルボキサミドのための4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)-フェノキシアセチル-p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂(RinkアミドMBHA樹脂); 9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-Merrifield樹脂(Sieberアミド樹脂); 4-(9-Fmoc)アミノメチル-3,5-ジメトキシフェノキシ)バレリル-アミノメチル-Merrifield樹脂(PAL樹脂)である。第一および後続するアミノ酸のカップリングは、夫々、DIC/HOBt、HBTU/HOBt、BOP、PyBOPから、あるいはDIC/6-C1-HOBt、HCTU、DIC/HOAtまたはHATUから製造されたHOBt、6-C1-HOBtまたはHOAt活性エステルを使用して達成できる。好ましい固体支持体は、保護ペプチドフラグメントの2-クロロトリチルクロライド樹脂および9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-Merrifield樹脂(Sieberアミド樹脂)である。第一のアミノ酸の2-クロロトリチルクロライド樹脂への付加は、Fmoc保護アミノ酸とジクロロメタンおよびDIEAにおける樹脂との反応により最も良好に達成される。必要であれば、アミノ酸の溶解を促進するために少量のDMFを添加してよい。

【0231】

本明細書に記載するペプチドアナログの合成は、単または多チャンネルペプチド合成器、例えばCEMリバティーマイクロウェーブ合成器あるいはPrelude(6チャネル)、Symphony(12チャネル)またはSymphony-X(12または24チャネル)合成器(Protein Technologies, Inc.)を使用して実施できる。

【0232】

各ペプチドのためのペプチジル-樹脂前駆体を、任意の標準法を使用して、開裂および脱保護し得る(例えば、King, D.S. et al., Int. J. Peptide Protein Res., 36: 255 - 266(1990)参照)。所望の方法は、水およびスカベンジャーとしてのTIS存在下のTFAの使用である。典型的に、ペプチジル-樹脂をTFA / 水 / TIS(94:3:3, v:v:v; 1mL / 100mgのペプチジル樹脂)中、2~6時間、室温で攪拌する。使用した樹脂を濾取し、TFA溶液を濃縮または減圧下に乾燥する。得られた粗製ペプチドを、沈殿させて、Et₂Oで洗浄するか、または直接分取HPLCで精製するためにDMSOまたは50%酢酸水溶液に再溶解する。

【0233】

10

20

30

40

50

所望の純度のペプチドを、例えば、Watersモデル4000またはShimadzuモデルLC - 8A液体クロマトグラフでの分取HPLCを使用して精製し得る。粗製ペプチドの溶液を、YMC S5 ODS(20 × 100 mm)カラムに充填し、いずれも0.1%TFAで緩衝化したMeCNの水溶液の直線グラジェントで、14～20 mL/分の流速を使用し、220 nmでのUV吸光度により溶離液をモニタリングしながら溶出する。精製ペプチドの構造をエレクトロスプレーMS分析で確認できる。

【実施例】

【0234】

実施例

特に説明スキームおよび実施例に含まれる本出願で使用した略語は、当業者には既知である。使用された幾つかの略語は、次のとおりである：分としてminまたはmins；時間としてhまたはhrまたはhrs；室温または保持時間(文脈により決まる)としてRTまたはrt；飽和としてsat.；トリフルオロ酢酸としてTFA；N,N-ジメチルホルムアミドとしてDMF；ジクロロメタンとしてDCM；9-フルオレンイルメチルオキシカルボニルとしてFmoc；(1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩)としてHTU；ジイソプロピルエチルアミンとしてDIEAまたはDIPA；N-メチルピロリドンとしてNMP；1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとしてEDC；ジメチルスルホキシドとしてDMSO；メタノールとしてMeOH；酢酸エチルとしてEtOAc；トリエチルアミンとしてEt₃N；アセトニトリル：としてMeCNまたはACN；ジエチルアゾジカルボキシレートとしてDAD；ならびにトリメチルシリルヨウ化物としてTMSI。

10

【0235】

分析データ：

質量スペクトル分析法：“ESI-MS(+)”とは、ポジティブイオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-MS(-)”とは、ネガティブイオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-HRMS(+)”とは、ポジティブイオンモードで実施された高分解エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-HRMS(-)”とは、ネガティブイオンモードで実施した高分解エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は、“m/z”単位表記に従って報告された。1000より大きい精密質量を有する化合物は、二重電荷イオンまたは三重電荷イオンとして高頻度で検出された。

20

【0236】

分析LCMS条件A：

カラム：BEH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：水(0.05%TFAを含む)；移動相B：アセトニトリル：(0.05%TFAを含む)；温度：50；グラジェント：2分かけて2%B～98%B、次いで98%Bで0.5分間保持；流量：0.8 mL/min；検出：220 nmのUV。

30

【0237】

分析LCMS条件B：

カラム：BEH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：5：95アセトニトリル：水(0.05%TFAを含む)；移動相B：95：5アセトニトリル：水(0.05%TFAを含む)；温度：50；グラジェント：3分かけて0～100%B、次いで100%Bで0.75分間保持；流量：1.11 mL/min.

40

【0238】

分析LCMS条件C：

カラム：BEH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：水(0.2%ギ酸および0.01%TFAを含む)；移動相B：アセトニトリル：(0.2%ギ酸および0.01%TFAを含む)；温度：50；グラジェント：2分かけて2%B～80%B、0.1分かけて80

50

% B ~ 9 8 % B、次いで、9 8 % Bで0.5分間保持；流量：0.8 mL / min；検出：220 nmのUV。

【0239】

分析LCMS条件D：

カラム：Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：5 : 95
アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；温度：50；グラジエント：3分かけて0 ~ 100 % B、次いで100 % Bで0.75分間保持；流量：1.11 mL / min；検出：220 nmのUV。

【0240】

10

分析LCMS条件E：

カラム：Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：5 : 95
アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；移動相B：95 : 5アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；温度：50；グラジエント：3分かけて0 ~ 100 % B、次いで100 % Bで0.75分間保持；流量：1.11 mL / min；検出：220 nmのUV。

【0241】

分析LCMS条件F：

カラム：Waters Xbridge C18, 2.1 x 50 mm；移動相A：5 : 95アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；温度：35；グラジエント：4分かけて0 ~ 100 % B、次いで100 % Bで1分間保持；流量：4 mL / min；検出：220 nmのUV。

20

【0242】

分析LCMS条件G：

Finnigan LTQ Mass Spectrometer；カラム：Phenomenex Jupiter C4, 1 x 50 mm；移動相A：1%ギ酸/水；移動相B：0.1%ギ酸/アセトニトリル；温度：30；グラジエント：1% Bで1分間保持；3分間かけて1 ~ 95 % B、次いで3分間95 % Bで保持；流量：0.15 mL / min.

【0243】

分析LCMS条件H：

30

カラム：Waters BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：5 : 95アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；温度：50；グラジエント：3分かけて0 ~ 100 % B、次いで100 % Bで0.5分保持；流量：1.0 mL / min；検出：220 nmのUV。

【0244】

分析LCMS条件I：

カラム：Waters BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7 μm粒子；移動相A：5 : 95メタノール：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5メタノール：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；温度：50；グラジエント：3分かけて0 ~ 100 % B、次いで0.5分間100 % Bで保持；流量：0.5 mL / min；検出：220 nmのUV。

40

【0245】

分析HPLC条件A：

カラム：YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A：水(0.1%TFAを含む)；移動相B：アセトニトリル(0.1%TFAを含む)；温度：60；グラジエント：25分かけて35 % B ~ 80 % B；流量1 mL / min；検出：217 nmでUV。

【0246】

分析HPLC条件B：

カラム：YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A：水(0.1%TFAを含む)；移動相B：アセトニトリル(0.1%TFAを含む)；温度：60；グラジエント：25分か

50

けて 25% B ~ 75% B ; 流量 1 mL / min ; 検出 : 217 nmでUV。

【0247】

分析HPLC条件C :

カラム : YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A : 水(0.1% TFAを含む) ; 移動相B : アセトニトリル(0.1% TFAを含む) ; 温度 : 60 ; グラジエント : 25分かけて 20% B ~ 70% B ; 流量 1 mL / min ; 検出 : 217 nmでUV。

【0248】

分析HPLC条件D :

カラム : YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A : 水(0.1% TFAを含む) ; 移動相B : アセトニトリル(0.1% TFAを含む) ; 温度 : 60 ; グラジエント : 25分かけて 15% B ~ 65% B ; 流量 1 mL / min ; 検出 : 217 nmでUV。

10

【0249】

分析HPLC条件E :

カラム : YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A : 水(0.1% TFAを含む) ; 移動相B : アセトニトリル(0.1% TFAを含む) ; 温度 : 60 ; グラジエント : 20分かけて 25% B ~ 60% B ; 流量 : 1.25 mL / min ; 検出 : 217 nmでUV。

【0250】

分析HPLC条件F :

カラム : YMC Pack ODS-AQ 3um 150 x 4.6mm 移動相A : 水(0.1% TFAを含む) ; 移動相B : アセトニトリル(0.1% TFAを含む) ; 温度 : 60 ; グラジエント : 20分かけて 25% B ~ 65% B ; 流量 : 1.25 mL / min ; 検出 : 217 nmでUV。

20

【0251】

分析HPLC条件G :

カラム : Sunfire C18 3.5um, 3.0 x 150mm ; 移動相A : 5 : 95 アセトニトリル : 水(0.05% トリフルオロ酢酸を含む) ; 移動相B : 95 : 5 アセトニトリル : 水(0.05% トリフルオロ酢酸を含む) ; 温度 : 50 ; グラジエント : 12分かけて 10 ~ 100% B 、次いで 100% B で 3 分間保持 ; 流量 1 mL / min ; 検出 : 220 nmのUV。

【0252】

分析HPLC条件H :

カラム : Xbridge フェニル 3.5 x 150um ; 移動相A : 5 : 95 アセトニトリル : 水(0.05% トリフルオロ酢酸を含む) ; 移動相B : 95 : 5 アセトニトリル : 水(0.05% トリフルオロ酢酸を含む) ; 温度 : 50 ; グラジエント : 12分かけて 10 ~ 100% B 、次いで 100% B で 3 分間保持 ; 流量 1 mL / min ; 検出 : 220 nmのUV.

30

【0253】

分析HPLC条件I :

カラム : Phenomenex Luna 5u C18(2) 150 x 4.6mm ; 移動相A : 水(0.1% トリフルオロ酢酸)、移動相B : アセトニトリル(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)、グラジエント 20分かけて 5 ~ 100% B 、次いで 5 分間 100% B で保持 ; 流量 1 mL / min 、検出 : UV 220。

【0254】

40

分析HPLC条件J :

カラム : Phenomenex Luna 5u C18(2) 150 x 4.6mm ; 移動相A : 水(0.1% トリフルオロ酢酸)、移動相B : アセトニトリル(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)、20分かけてグラジエント 10 ~ 100% B 、次いで 5 分間 100% B で保持 ; 流量 1 mL / min 、検出 : UV 220。

【0255】

一般方法 :

Prelude方法A :

全ての操作を、Preludeペプチド合成器(Protein Technologies)上のオートメーション下において実施した。別段の記載が無ければ、全ての方法を、底部フリットを取り

50

付けた 10 または 45 mL ポリプロピレンチューブ内で行った。チューブは、チューブの底部および上部の双方を介して Prelude ペプチド合成器に連結している。DMF および DCM を、チューブ上部から加えて、チューブ側面を均等に洗い落とすことができる。残りの試薬を、チューブ底部から加えて、フリットを通過させて、樹脂に接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌”とは、底部フリットからの N₂ ガスの短いパルスをいう；このパルスは、おおよそ 5 秒間継続させて、30 秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから 3 週間を過渡しては使用しない。DMF = ジメチルホルムアミド；DIC = N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド；HOAt = 1-ヒドロキシ 7-アザベンゾトリアゾール；Sieber = Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、この“3-イルオキシ”的場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、Sieber リンカー(窒素で Fmoc 保護された)を有する Merrifield ポリマー(ポリスチレン)；100 ~ 200 メッシュ、1% DVB、0.71 mmol/g ローディングである。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-Arg(Pbf)-OH ; Fmoc-Asn(Trt)-OH ; Fmoc-Asp(OtBu)-OH ; Fmoc-Bzt-OH ; Fmoc-Cys(Trt)-OH ; Fmoc-Dab(Boc)-OH ; Fmoc-Dap(Boc)-OH ; Fmoc-Gln(Trt)-OH ; Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Hyp(tBu)-OH ; Fmoc-Ile-OH ; Fmoc-Leu-OH ; Fmoc-Lys(Boc)-OH ; Fmoc-Nle-OH ; Fmoc-Met-OH ; Fmoc-[N-Me]Ala-OH ; Fmoc-[N-Me]Nle-OH ; Fmoc-Phe-OH ; Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Sar-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH.

【0256】

“Prelude 方法 A” の方法は、0.100 mmol スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールの場合、樹脂に結合した Sieber リンカーの量により決定される。このスケールは、約 140 mg の上記 Sieber - Merrifield 樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100 mmol のスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミン N 末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。Fmoc-N-メチルアミノ酸のカップリングおよび第二級アミン N 末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。クロロアセチル基とペプチドの N-末端とのカップリングは、下記“クロロアセチルクロリドカップリング方法”または“クロロ酢酸カップリング方法”に詳述する。

【0257】

樹脂膨潤方法：

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、Merrifield : Sieber 樹脂(140 mg, 0.100 mmol)を加えた。樹脂を下記の通りに 3 回洗った：反応容器に、DMF(5.0 mL)および DCM(5.0 mL)を加えた。この混合物に、反応容器の底部からの N₂ バブリングにより周期的に 10 分間混合して、次いで溶媒を排出した。

【0258】

シングルカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン : DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン : DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように 5 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に 60 秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出

した。反応容器に、アミノ酸溶液およびHOAt(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)、次いでDIC(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に60分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10：1：89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

10

【0259】

第二級アミンカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20：80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20：80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸溶液およびHOAt(DMF中で0.2M, 5.0mL, 5eq)、次いでDIC(DMF中で0.2M, 5.0mL, 5eq)を加えた。混合物を、周期的に300分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10：1：89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

20

【0260】

クロロアセチルクロリドカップリング方法：

30

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20：80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20：80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、DIPPEA溶液(4.0mmol, 0.699mL, 40eq)(3.0mL)、クロロ塩化アセチル(2.0mmol, 0.160mL, 20eq)/DMFを加えた。混合物を、12～18時間周期的に混合して、次いで溶液を排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液を排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DCM(4.0mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液を排出した。

40

【0261】

Prelude方法B：

全ての操作を、Preludeペプチド合成器(Protein Technologies)でオートメーションの下で行った。全ての方法を、底部フリットを取り付けた10または45mLポリプロピレンチューブ内で行った。DMFおよびDCMを、チューブ上部から加えて、チューブ側面を均等に洗い落とした。残りの試薬を、チューブ底部から加えて、フリットを通過させて、樹脂に接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌

50

”とは、底部フリットからのN₂ガスの短いパルスをいう；このパルスは、およそ5秒間継続させて、30秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。DMF = デメチルホルムアミド；HCTU = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；DIPPEA = ジイソプロピルエチルアミン；Sieber = Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、この“3-イルオキシ”の場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、Sieberリンカー(窒素でFmoc保護された)を有するMerrifieldポリマー(ポリスチレン)；100~200メッシュ、1%DVB、0.71mmol/gローディング。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

“Prelude方法B”の方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、約140mgの上記Sieber-Merrifield樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミンN末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミンN末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。クロロアセチル基とペプチドのN-末端とのカップリングは、下記“クロロアセチルクロリドカップリング方法”または“クロロ酢酸カップリング方法”に詳述する。

【0262】

樹脂膨潤方法：

40mLポリプロピレン固相反応容器に、Merrifield: Sieber樹脂(140mg, 0.100mmol)を加えた。樹脂を、下記の通りに3回洗った(膨潤させた)：反応容器に、DMF(5.0mL)およびDCM(5.0mL)を加えた。この混合物に、反応容器の底部からのN₂バーリングにより周期的に10分間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。

【0263】

シングルカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン: DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン: DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)を加えて、次いでHCTU(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)、最後にDIPPEA(DMF中で0.8M, 2.5mL, 20eq)を加えた。混合物を、周期的に30分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各

10

20

30

40

50

洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：D I E A : D M F (10 : 1 : 89 v / v / v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0264】

ダブルカップリング：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(D M F 中で0.2M, 5.0 mL, 10 eq)、次いでH C T U (D M F 中で0.2M, 5.0 mL, 10 eq)、最終的にD I P E A (D M F 中で0.8M, 2.5 mL, 20 eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器上部から、D M F (4.0 mL)で連続的に3回洗い、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(D M F 中で0.2M, 5.0 mL, 10 eq)、次いでH C T U (D M F 中で0.2M, 5.0 mL, 10 eq)、最後にD I P E A (D M F 中で0.8M, 2.5 mL, 20 eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0265】

第二級アミンカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(D M F 中で0.2M, 2.5 mL, 10 eq)、次いでH C T U (D M F 中で0.2M, 2.5 mL, 10 eq)、最後にN M M (D M F 中で0.8M, 1.5 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、周期的に12時間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0266】

クロロアセチルクロリドカップリング方法A：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連續的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排

10

20

30

40

50

出した。反応容器に、D M F 中の、D I P E A 溶液(4.0 mmol, 0.699 mL, 40 eq)、クロロ塩化アセチル(2.0 mmol, 0.160 mL, 20 eq)の3.0 mL 溶液を加えた。混合物を、12~18時間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、D M F(4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、C H₂C l₂(2.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

【0267】

クロロ酢酸カップリング方法B：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：D M F(20:80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：D M F(20:80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、D M F(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、D M F(2.0 mL)、クロロ酢酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(1.2 mmol, 0.187 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、12~18時間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、D M F(4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、C H₂C l₂(2.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

【0268】

P r e l u d e 方法C：

全ての操作を、P r e l u d eペプチド合成器(Protein Technologies)でオートメーション下において実施した。別段の記載が無ければ、全ての方法を、底部フリットを取り付けた10または45mLポリプロピレンチューブ中で行った。チューブは、チューブの底部と上部の双方を介してP r e l u d eペプチド合成器に連結している。D M FおよびD C Mを、チューブ上部から加えて、チューブ側面を均等に洗い落とした。残りの試薬を、チューブ底部から加えて、フリットを通過させて、樹脂に接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌”とは、底部フリットからのN₂ガスの短いパルスをいう；このパルスは、およそ5秒間継続させて、30秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。H A T U 溶液を、調製5日以内で使用した。D M F = ジメチルホルムアミド；H C T U = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；H A T U = 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩；D I P E A = ジイソプロピルエチルアミン；S i e b e r = F m o c - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、この“3-イルオキシ”的場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、S i e b e rリンカー(窒素でF m o c保護された)を有するM e r r i f i e l dポリマー(ポリスチレン)；100~200メッシュ、1%D V B、0.71 mmol/gローディング。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

F m o c - A l a - O H ; F m o c - A r g (P b f) - O H ; F m o c - A s n (T r t) - O H ; F m o c - A s p (O t B u) - O H ; F m o c - B z t - O H ; F m o c - C y s (T r t) - O H ; F m o c - D a b (B o c) - O H ; F m o c - D a p (B o c) - O H ; F m o c - G l n (T r t) - O H ; F m o c - G l y - O H ; F m o c - H i s (T r t) - O H ; F m o c - H y p (t B u) - O H ; F m o c - I l e - O H ; F m o c

10

20

30

40

50

- Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

【0269】

“Prelude方法C”の方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、約140mgの上記Sieber-Merrifield樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミンN末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミンN末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。樹脂の最終の洗いは、下記“最終洗浄方法”を使用した。

【0270】

樹脂膨潤方法：

40mLポリプロピレン固相反応容器に、Merrifield:Sieber樹脂(140mg, 0.100mmol)を加えた。樹脂を、下記の通りに3回洗った(膨潤させた)：反応容器に、DMF(5.0mL)およびDCM(5.0mL)を加えた。この混合物に、反応容器の底部からのN₂バーピングにより周期的に10分間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。

【0271】

シングルカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン:DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン:DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部から加えて、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)、次いでHATU(DMF中で0.2M, 5.0mL, 10eq)、最後にDIPAEA(DMF中で0.8M, 2.5mL, 20eq)を加えた。混合物を、周期的に60分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸:DIEA:DMF(10:1:89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部から加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0272】

第二級アミンカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン:DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン:DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排

10

20

30

40

50

出した。反応容器に、アミノ酸(DMF 中で 0.2 M, 2.5 mL, 5 eq)、次いで HATU(DMF 中で 0.2 M, 2.5 mL, 5 eq)、最終的に DIP EA(DMF 中で 0.8 M, 1.5 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、周期的に 300 分間混合して、次いで反応溶液を、フリットから通して濾過した。樹脂を下記の通りに 2 回洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF 中で 0.2 M, 2.5 mL, 5 eq)、最後に DIP EA(DMF 中で 0.8 M, 1.5 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、周期的に 300 分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに 2 回洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。10

【0273】

カスタムアミノ酸 - カップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように 5 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF 中で 0.2 M, 0.5 ~ 2.5 mL, 1 ~ 5 eq)、次いで HATU(DMF 中で 0.2 M, 0.5 ~ 2.5 mL, 1 ~ 5 eq)、最後の DIP EA(DMF 中で 0.8 M, 0.5 ~ 1.5 mL, 4 ~ 12 eq)を加えた。混合物を、周期的に 60 分 ~ 600 分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに 2 回洗った：各洗いについて、DMF(2.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。20

反応容器に、無水酢酸：DIEA : DMF(10 : 1 : 89 v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に 10 分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 4 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に 90 秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。30

【0274】

最終洗浄方法：

樹脂を、下記の通りに 2 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に 90 秒混合して、溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 4 回連続的に洗った：各洗いについて、DCM(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に 90 秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。40

【0275】

クロロ酢酸カップリング方法：

Note マニュアルステップ。先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、室温で 5 分間振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように 5 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を攪拌して、溶液をフリットから排出した。反応容器に、DMF(2.0 mL)、クロロ酢酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)および N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(1.2 50

mmol , 0.187 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、室温で12~18時間、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、 CH_2Cl_2 (4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

【0276】

Prelude方法D：

全ての操作を、Preludeペプチド合成器(Protein Technologies)でオートメーションの下で行った。別段の記載が無ければ、全ての方法を、底部フリットを取り付けた10または45 mLポリプロピレンチューブ内で実施した。チューブは、チューブの底部と上部の双方を介してPreludeペプチド合成器に連結している。DMFおよびDCMを、チューブ上部から加えて、チューブの側面を均等に洗い落とした。残りの試薬を、チューブ底部から加えて、フリットを通過させて、樹脂に接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌”とは、底部フリットからの N_2 ガスの短いパルスをいう；このパルスは、およそ5秒間継続し、30秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。HATU溶液を、調製の5日以内で使用する。DMF=ジメチルホルムアミド；HCTU=2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリニアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；HATU=1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩；DIPPEA=ジイソプロピルエチルアミン；Sieber=Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、この“3-イルオキシ”の場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、Sieberリンカー(窒素でFmoc保護された)を有するMerrifieldポリマー(ポリスチレン)；100~200メッシュ、1%DVB、0.71 mmol/gローディングである。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(tBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

【0277】

“Prelude方法D”の方法は、0.100 mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、約140 mgの上記Sieber-Merrifield樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100 mmolのスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミンN末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミンN末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。樹脂の最終の洗いは、下記“最終洗浄方法”を使用した。

【0278】

樹脂膨潤方法：

10

20

30

40

50

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、Merrifield : Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)を加えた。樹脂を、下記の通りに3回洗った(膨潤させた)：反応容器に、DMF(5.0 mL)およびDCM(5.0 mL)を加えた。この混合物に、反応容器の底部からのN₂バーピングにより周期的に10分間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。

【0279】

シングルカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に60秒間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、次いでHATU(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、最終的にDIEA(DMF中で0.8 M, 0.75 mL, 5 eq)を加えた。混合物を、周期的に30分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10 : 1 : 89 v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0280】

第二級アミンカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20 : 80 v/v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、次いでHATU(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、最終的にDIEA(DMF中で0.8 M, 0.75 mL, 5 eq)を加えた。混合物を、周期的に30分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに2回洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、次いでHATU(DMF中で0.2 M, 1.25 mL, 2.5 eq)、最後にDIEA(DMF中で0.8 M, 0.75 mL, 5 eq)を加えた。混合物を、周期的に30分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに2回洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10 : 1 : 89 v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに2回洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10 : 1 : 89 v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0281】

最終洗浄方法：

樹脂を、下記の通りに2回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、D C M (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、周期的に90秒混合して、溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

10

【0282】

クロロ酢酸カップリング方法：

Note マニュアルステップ。先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ペリジン：D M F (20 : 80 v / v, 5.0 mL)を加えた。混合物を、室温で5分間振盪した、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を攪拌して、溶液をフリットから排出した。反応容器に、D M F (2.0 mL)、クロロ酢酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(1.2 mmol, 0.187 mL, 12 eq)を加えた。混合物を、室温で12~18時間で振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間混合して、溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、C H₂ C l₂ (4.0 mL)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

20

【0283】

C E M 方法 A：

全ての操作を、C E Mライブラリーマイクロウェーブペプチド合成器(CEM Corporation)でオートメーションの下で行った。全ての方法を、別段の記載が無ければ、C E Mディスカバリーマイクロウェーブユニットに底部フリットを取り付けた30または125 mLポリプロピレンチューブ内で行った。このチューブは、チューブの底部と上部の双方を介してC E Mリバティー合成器と連結している。D M FおよびD C Mは、チューブの上部および底部から加えられることができ、チューブ側面を均等に洗い流すことができる。全ての溶液を、樹脂を上部から移すことを除いて、チューブの底部から除去した。“周期的バブリング”とは、底部フリットからのN₂ガスの短時間のバブリングをいう。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。H A T U溶液を、調製5日以内で使用した。D M F =ジメチルホルムアミド；H C T U = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；H A T U = 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1 H - 1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩；D I P E A =ジイソプロピルエチルアミン；S i e b e r =F m o c -アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、この“3-イルオキシ”的場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、S i e b e rリンカー(窒素でF m o c保護された)を有するM e r r i f i e l dポリマー(ポリスチレン)；100~200メッシュ、1%D V B、0.71 mmol/gローディングである。他の一般的な樹脂、例えばR i n k、クロロトリチルまたはその他の酸感受性リンカーは、合成中に使用され得るが、特定の実施例において別段の記載が無ければ、S e i b e rアミド樹脂を使用した。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

30

F m o c - A l a - O H ; F m o c - A r g (P b f) - O H ; F m o c - A s n (T r t) - O H ; F m o c - A s p (O t B u) - O H ; F m o c - B z t - O H ; F m o c - C y s (T r t) - O H ; F m o c - D a b (B o c) - O H ; F m o c - D a p (B o c) -

40

50

O H ; F m o c - G l n (T r t) - O H ; F m o c - G l y - O H ; F m o c - H i s (T r t) - O H ; F m o c - H y p (t B u) - O H ; F m o c - I l e - O H ; F m o c - L e u - O H ; F m o c - L y s (B o c) - O H ; F m o c - N l e - O H ; F m o c - M e t - O H ; F m o c - [N - M e] A l a - O H ; F m o c - [N - M e] N l e - O H ; F m o c - O r n (B o c) - O H ; F m o c - P h e - O H ; F m o c - P r o - O H ; F m o c - S a r - O H ; F m o c - S e r (t B u) - O H ; F m o c - T h r (t B u) - O H ; F m o c - T r p (B o c) - O H ; F m o c - T y r (t B u) - O H ; F m o c - V a l - O H .

【 0 2 8 4 】

“ C E M 方法 A ” の方法は、 0 . 1 0 0 m m o l のスケールで実施した実験を述べたもので、このスケールは、樹脂に結合した Sieber リンカーの量により決定される。このスケールは、約 1 4 0 m g の上記 Sieber - Merrifield 樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、 0 . 1 0 0 m m o l のスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミン N 末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミン N 末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。クロロアセチル基とペプチドの N - 末端とのカップリングは、上記した“クロロアセチルクロリドカップリング方法”または“クロロ酢酸カップリング方法”により詳述される。

【 0 2 8 5 】

樹脂膨潤方法 :

5 0 m L ポリプロピレンコニカルチューブに、 Merrifield : Sieber 樹脂(1 4 0 m g , 0 . 1 0 0 m m o l)を加えた。次いで、 D M F (7 m L)を、チューブに加えて、その後 D C M (7 m L)を加えた。樹脂を、反応容器に、容器上部から移し入れた。この方法を、更に 2 回繰り返した。 D M F (7 m L)を加えて、次いで D C M (7 m L)を加えた。樹脂を、反応容器の底部から 1 5 分間 N₂ バブリングを用いて膨潤させて、その後溶媒を、フリットを通して排出した。

【 0 2 8 6 】

標準カップリング方法 :

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン : D M F (2 0 : 8 0 v / v , 5 . 0 m L)の溶液を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン : D M F (2 0 : 8 0 v / v , 5 . 0 m L)溶液を加えた。混合物を、3 分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 3 回連続的に洗った : D M F (7 m L)は、上部から洗い、次いで D M F (7 m L)を底部から洗い、最後に D M F (7 m L)を用いて上部から洗った。反応容器に、アミノ酸溶液(D M F 中で 0 . 2 M , 2 . 5 m L , 5 e q)、 H A T U (D M F 中で 0 . 5 M , 1 . 0 m L , 5 e q)、 D I P E A (N M P 中で 2 M , 0 . 5 m L , 1 0 e q)を加えた。混合物を、5 0 でカップリングされる F m o c - C y s (T r t) - O H および F m o c - H i s (T r t) - O H を除く全てのアミノ酸については N₂ バブリングにより 5 分間 7 5

で攪拌して、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 3 回連続的に洗った : D M F (7 m L)は上部から、次いで D M F (7 m L)は底部から、最後に D M F (7 m L)は上部から洗った。反応容器に、無水酢酸 : D I E A : D M F (1 0 : 1 : 8 9 v / v / v , 5 . 0 m L)溶液を加えた。混合物を、6 5 で 2 分間周期的にバブリングして、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 3 回連続的に洗った : D M F (7 m L)は上部から、その後 D M F (7 m L)は底部から、最後に D M F (7 m L)は上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【 0 2 8 7 】

ダブルカップルカップリング方法 :

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン : D M F (2 0 : 8 0 v / v ,

10

20

30

40

50

5.0 mL)の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)は底部から、最後にDMF(7mL)は上部から洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HATU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)、およびDipea(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。混合物を、50でカップリングされるFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHを除く全てのアミノ酸について5分間75でN₂バブリングにより混合して、反応溶液を、フリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、その後DMF(7mL)は底部から、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HATU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)およびDipea(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。混合物を、50でカップリングされるFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHを除いた全てのアミノ酸について、75で5分間、N₂バブリングにより混合して、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、続いてDMF(7mL)は底部から洗い、最後にDMF(7mL)は上部から洗った。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10:1:89v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、2分間65で周期的にバブリングして、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)は底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
10
20

【0288】

第二級アミンカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、5%ピペラジンおよび0.1M HOBt/DMF(7mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間75で周期的に混合して、次いで溶液を排出した。この方法を1回以上繰り返した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から流して、次いでDMF(7mL)は底部から流して、最後にDMF(7mL)は上部から流して洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HCTU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)、Dipea(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。混合物を、全てのアミノ酸については75で5分間(Fmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHについては50で)、N₂バブリングにより混合して、その後加熱せずに6時間混合した。排出後に、この樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10:1:89v/v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、65で2分間周期的にバブリングして、次いで溶液を排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
30
40

【0289】

カスタムアミノ酸 - カップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0 mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、その後DMF(7mL)を底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて、上部から洗った。反応容器に、HATU(2.5eq～10eq)を含有するアミノ酸溶液(1.25mL～5mL, 2.5
50

$\text{eq} \sim 10 \text{ eq}$)を加えて、最終的に D I P E A (N M P 中で 2 M , 0.5 mL ~ 1 mL , 20 eq)を加えた。混合物を、 N_2 バーリングにより 25 ~ 75 度で 5 分間 ~ 2 時間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 3 回連續的に洗った：D M F (7 mL)は、上部から洗い、次いで D M F (7 mL)は底部から洗い、最後に D M F (7 mL)で上部から洗った。反応容器に、無水酢酸 : D I E A : D M F (10 : 1 : 8.9 v / v / v , 5.0 mL)溶液を加えた。混合物を、65 度で 2 分間周期的にバーリングを行い、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 3 回連續的に洗った：D M F (7 mL)は、上部から洗い、その後 D M F (7 mL)により、底部から洗い、最後に D M F (7 mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

10

【0290】

S y m p h o n y 方法 A :

全ての操作を、S y m p h o n y ペプチド合成器(Protein Technologies)でオートメーション下において実施した。別段の記載が無ければ、全ての方法を、底部フリットを取り付けた S y m p h o n y ポリプロピレンチューブ中で実施した。このチューブは、チューブの底部および上部の双方を介して S y m p h o n y ペプチド合成器に連結させた。全ての溶媒、D M F、D C M、アミノ酸および試薬を、チューブの底部から加えて、フリットを通して通過させて、樹脂と接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌”とは、底部フリットからの N_2 ガスの短いパルスをいう；このパルスは、おおよそ 5 秒間続いて、15 秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから 3 週間を過渡しては使用しない。H A T U 溶液を、調製 5 日以内で使用した。D M F = ジメチルホルムアミド；H C T U = 2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム；H A T U = 1 - [ビス(ジメチルアミノ)メチレン] - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾロ[4, 5 - b]ピリジニウム 3 - オキシドヘキサフルオロリン酸塩；N M M = n - メチルモルホリン；D I P E A = ジイソプロピルエチルアミン；S i e b e r = F m o c - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、この“3 - イルオキシ”的場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、S i e b e r リンカー(窒素で F m o c 保護された)を有するM e r r i f i e l d ポリマー(ポリスチレン)；100 ~ 200 メッシュ、1% D V B、0.71 mmol / g ローディング。その他の一般的な酸感受性樹脂も、合成において使用され得る(例えば、R i n k または官能化クロロトリチル樹脂)。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

20

F m o c - A l a - O H ; F m o c - A r g (P b f) - O H ; F m o c - A s n (T r t) - O H ; F m o c - A s p (O t B u) - O H ; F m o c - B z t - O H ; F m o c - C y s (T r t) - O H ; F m o c - D a b (B o c) - O H ; F m o c - D a p (B o c) - O H ; F m o c - G l n (T r t) - O H ; F m o c - G l y - O H ; F m o c - H i s (T r t) - O H ; F m o c - H y p (t B u) - O H ; F m o c - I l e - O H ; F m o c - L e u - O H ; F m o c - L y s (B o c) - O H ; F m o c - N l e - O H ; F m o c - M e t - O H ; F m o c - [N - M e] A l a - O H ; F m o c - [N - M e] N l e - O H ; F m o c - P h e - O H ; F m o c - P r o - O H ; F m o c - S a r - O H ; F m o c - S e r (t B u) - O H ; F m o c - T h r (t B u) - O H ; F m o c - T r p (B o c) - O H ; F m o c - T y r (t B u) - O H ; F m o c - V a l - O H .

30

【0291】

“S y m p h o n y 方法 A” の方法は、0.050 mmol スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合した S i e b e r リンカーの量により決定される。このスケールは、おおよそ 70 mg の上記 S i e b e r - M e r r i f i e l d 樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.050 mmol のスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミン N 末端のカップリングには、下記に記載した“標準カップリン

40

50

グ方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミンN末端とのカップリングには“ダブルカップリング”を用いて、カスタムアミノ酸は、下記したアミノ酸“ブランクカップリング”的マニュアルブランク添加によりカップリングされる。

【0292】

膨潤方法：

S y m p h o n y ポリプロピレン固相反応容器に、Merrifield : Sieber樹脂(70mg, 0.050mmol)を加えた。樹脂を、下記の通りに3回洗った(膨潤させた)：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に10分間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF(6.25mL)で洗い、容器の底部から加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最終的にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0293】

標準カップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF(6.25mL)で洗い、容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0294】

第二級アミンカップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v,

2.5 mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、NMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に300分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂をDMF(6.25mL)で洗い、容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最終的にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に300分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
10

【0295】

カスタムアミノ酸 - カップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バーリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。この合成をSymphony softwareにより停止させて、カスタムアミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を手作業により反応容器に加えて、オートメーションを再スタートさせた：HATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に300分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに、6回DMF(2.5mL)で洗い、これを容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v, 1:1:3, 2.5mL)を加えて、混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
20
30

【0296】

Symphony方法B：

全ての操作を、Symphonyペプチド合成器(Protein Technologies)上でオートメーション下において実施した。別段の記載が無ければ、全ての方法を、底部フリットを備えたSymphonyポリプロピレンチューブ中で行った。このチューブは、チューブの底部および上部の双方を介してSymphonyペプチド合成器に連結させた。全ての溶媒、DMF、DCM、アミノ酸および試薬を、チューブの底部から加えて、フリットを通して通過して、樹脂と接触させた。全ての溶液を、チューブの底部から除去した。“周期的攪拌”とは、底部フリットからのN₂ガスの短いパルスをいう；このパルスは、およそ5秒間続いて、15秒毎におこる。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。HATU溶液を、調製5日以内で使用した。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；HATU = 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩；NMM = n-メチルモルホリン；DIPEA = デイソプロピルエチルアミン；S
40
50

i e b e r = F m o c - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、 “ 3 - イルオキシ ” の場所は、ポリスチレン樹脂への結合の位置およびタイプを記述する。使用した樹脂は、 S i e b e r リンカー(窒素で F m o c 保護された)を有する M e r r i f i e l d ポリマー(ポリスチレン)； 1 0 0 ~ 2 0 0 メッシュ、 1 % D V B 、 0 . 7 1 m m o l / g ローディング。その他の一般的な酸感受性樹脂も、合成において使用され得る(例えば、 R i n k または官能化クロロトリチル樹脂)。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は括弧内に示した)。

F m o c - A l a - O H ; F m o c - A r g (P b f) - O H ; F m o c - A s n (T r t) - O H ; F m o c - A s p (O t B u) - O H ; F m o c - B z t - O H ; F m o c - C y s (T r t) - O H ; F m o c - D a b (B o c) - O H ; F m o c - D a p (B o c) - O H ; F m o c - G l n (T r t) - O H ; F m o c - G l y - O H ; F m o c - H i s (T r t) - O H ; F m o c - H y p (t B u) - O H ; F m o c - I l e - O H ; F m o c - L e u - O H ; F m o c - L y s (B o c) - O H ; F m o c - N l e - O H ; F m o c - M e t - O H ; F m o c - [N - M e] A l a - O H ; F m o c - [N - M e] N l e - O H ; F m o c - P h e - O H ; F m o c - P r o - O H ; F m o c - S a r - O H ; F m o c - S e r (t B u) - O H ; F m o c - T h r (t B u) - O H ; F m o c - T r p (B o c) - O H ; F m o c - T y r (t B u) - O H ; F m o c - V a l - O H .

【 0 2 9 7 】

“ S y m p h o n y 方法 B ” の方法は、 0 . 0 5 0 m m o l スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合した S i e b e r リンカーの量により決定される。このスケールは、上記した S i e b e r - M e r r i f i e l d 樹脂(おおよそ 7 0 m g)に対応している。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、 0 . 0 5 0 m m o l のスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“ 膨潤方法 ” として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミン N 末端のカップリングには、下記に記載した “ 標準カップリング方法 ” を用いた。アミノ酸と第二級アミン N 末端とのカップリングには、“ 第二級アミンカップリング方法 B ” を用いて、カスタムアミノ酸は、下記のアミノ酸 “ カスタムアミノ酸 - カップリング方法 ” のマニュアルプランク付加によりカップリングされ、クロロアセチル無水物は、下記 “ 最終キャッピング方法 ” を用いて配列の最終位置に加えた。

【 0 2 9 8 】

膨潤方法 :

S y m p h o n y ポリプロピレン固相反応容器に、 M e r r i f i e l d : S i e b e r 樹脂(7 0 m g , 0 . 0 5 0 m m o l)を加えた。樹脂を、下記の通りに 3 回洗った(膨潤させた)：反応容器に、 D M F (2 . 5 m L)を加えて、この混合物に反応容器の底部からの N₂ バブリングにより周期的に 1 0 分間混合して、次いで溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン： D M F (2 0 : 8 0 v / v , 2 . 5 m L)を加えた。混合物を、周期的に 2 . 5 分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに 6 回連続的に洗った：各洗いについて、 D M F (2 . 5 m L)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、 3 0 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(D M F 中で 0 . 2 M , 1 . 2 5 m L , 5 e q)を加えて、次いで H A T U (D M F 中で 0 . 2 M , 1 . 2 5 m L , 5 e q)、最後に N M M (D M F 中で 0 . 8 M , 1 . 2 5 m L , 1 0 e q)を加えた。混合物を、周期的に 1 0 分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、 D M F (6 . 2 5 m L)で洗い、容器の底部から加えて、得られる混合物を、 3 0 秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(D M F 中で 0 . 2 M , 1 . 2 5 m L , 5 e q)を加えて、次いで H A T U (D M F 中で 0 . 2 M , 1 . 2 5 m L , 5 e q)、 N M M (D M F 中で 0 . 8 M , 1 . 2 5 m L , 1 0 e q)を加えた。混合物を、周期的に 1 0 分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を下記の通りに 3 回洗った：反応容器に、 D M F (2 . 5 m L)を加えて、混合物を反応容器の底部からの N₂ バブリングを用いて、周期的に 3

10

20

30

40

50

0秒間混合して、溶媒を、フリットを通して排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。

【0299】

標準カップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに6回洗った：DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac2O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。10

【0300】

第二級アミンカップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)を加えて、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF(6.25mL)で洗い、容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、次いでHATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最終的にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac2O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。3040

【0301】

カスタムアミノ酸 - カップリング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バブリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 50

, 2.5 mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。このシステムを、反応容器(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)にカスタムアミノ酸をマニュアル付加するためにシステムを停止させて、次いでオートメーションを再スタートさせて、反応小胞に、HATU(DMF中で0.2M, 1.25mL, 5eq)、最後にNMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに6回洗った：DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac2O/DIPEA/DMF(v/v/v, 1:1:3, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
10

【0302】

最終キャッピング方法：

樹脂を下記の通りに3回洗った：反応容器に、DMF(2.5mL)を加えて、この混合物に、反応容器の底部からのN₂バーリングにより周期的に30秒間混合して、その後溶媒を、フリットを通して排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に2.5分間混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに6回洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、NMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)、次いでクロロ無水酢酸(DMF中の0.4M、1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF(6.25mL)で洗い、容器の底部をから加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、NMM(DMF中で0.8M, 1.25mL, 10eq)、次いでクロロ無水酢酸(DMF中の0.4M、1.25mL, 10eq)を加えた。混合物を、周期的に15分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下の通りに6回洗った：DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac2O/DIPEA/DMF(v/v/v, 1:1:3, 2.5mL)を加えた。混合物を、周期的に10分間混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下の通りに6回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、DCM(2.5mL)を容器の底部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。次いで、得られる樹脂を、10分間窒素ストリームで乾燥させた。
20
30
40

【0303】

グローバル脱保護方法A：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法A”の方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”は、トリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(92.5:2.5:2.5:2.5, v:v:v:w)を用いて調製された。樹脂を、反応容器から除去して、フリットを備えた25mLシリンジに移した。シリンジに、“脱保護溶液”(5.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で85分間混合した
50

。溶液を、濾過して、濃縮して、ジエチルエーテル(30mL)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキサンテーションして、固体をジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体を、ジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体を高真空中で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

【0304】

グローバル脱保護方法B：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法B”の方法は、0.04mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.04mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン(96:4; v:v)を用いて製造した。樹脂を、反応容器から除去して、フリットを備えた10mLシリングに移した。このシリングに、“脱保護溶液”(2.0～3.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で1時間または1.5時間混合した。溶液を濾過して、脱保護溶液(0.5mL)で洗い、濃縮して、ジエチルエーテル(30mL)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキサンテーションして、固体を、ジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体をジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体を高真空中で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

10

【0305】

グローバル脱保護方法C：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法C”の方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(95:2.5:2.5, v:v:w)を用いて調製した。樹脂を、反応容器から除去して、Bio-Radチューブに移した。Bio-Radチューブに、“脱保護溶液”(4.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で60分間混合した。溶液を濾過して、ジエチルエーテル(30mL)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキサンテーションして、固体をジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体を、ジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体を高真空中で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

20

【0306】

グローバル脱保護方法D：

30

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法B”の方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(94:3:3, v:v:w)を用いて調製した。樹脂を、反応容器から除去して、フリットを備えた25mLシリングに移した。このシリングに、“脱保護溶液”(5.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で5分間混合した。溶液を濾過して、ジエチルエーテル(30mL)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキサンテーションして、固体を、ジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、

40

50

3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションして、残存固体を、ジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションして、残存固体を高真空下で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

【0307】

グローバル脱保護方法E：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法E”的方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールの場合、樹脂に結合したFmoc Gly-C1Trtリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(95:2.5:2.5, v:v:w)を用いて調製した。樹脂を、反応容器から除去して、Bio-Radチューブに移した。Bio-Radチューブに、“脱保護溶液”(2.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で3分間混合した。溶液を濾過して、Centrifugeチューブ中に集めた。Bio-Radチューブに、“脱保護溶液”(2.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で3分間混合した。溶液を濾過して、Bio-Radチューブ内に集めた。遠心用チューブ中の溶液を、60分間静置させた。集めた溶液を、次いでジエチルエーテル(30mL)で希釈して、沈殿物が形成した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキャンテーションして、固体を、ジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションして、残存固体を、ジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションして、残存固体を高真空下で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

【0308】

グローバル脱保護方法F：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法F”的方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールの場合、樹脂に結合したRinkリンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(95:2.5:2.5, v:v:w)を用いて調製した。樹脂を、反応容器から除去して、6mLのBio-Radチューブに移した。Bio-Radに、“脱保護溶液”(4.0mL)を加えた。混合物を、シェーカー内で90分間混合した。溶液を濾過して、ジエチルエーテル(30mL)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキャンテーションして、固体を、ジエチルエーテル(25mL)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションし、残存固体を、ジエチルエーテル(25mL)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキャンテーションして、残存固体を高真空下で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

【0309】

環化方法A

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“環化方法A”的方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを作成するために使用された樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定には基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。粗製ペプチド固体を、アセトニトリル：8Mグアニジン／50mM TRIS(1:3)水溶液(pH8.6)(7mL:18mLまたは同

様の割合)の溶液に溶解し、その後必要であれば、この溶液をNaOH(1.0M)水溶液を用いて、pH = 8.5 ~ 9.0に調整した。次いで、溶液を、12 ~ 18時間シェーカーを用いて混合した。反応溶液を濃縮して、次いで残留物を、アセトニトリル：水に溶解した。この溶液を、逆相HPLC精製に付して、目的とする環状ペプチドを得た。

【0310】

環化方法C：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“環化方法C”を、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを生成するために使用した樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定には基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。粗製ペプチド固体を、アセトニトリル：0.1Mアンモニウム重炭酸塩緩衝水溶液(11mL : 24mLまたは同様の割合)の溶液に溶解させて、次いでこの溶液を、NaOH(1.0M)水溶液を用いて、pH = 8.5 ~ 9.0に注意深く調整した。次いで、溶液を12 ~ 18時間シェーカーを用いて混合した。反応溶液を濃縮して、次いで残留物を、アセトニトリル：水に溶解した。この溶液を、逆相HPLC精製に付して、目的とする環状ペプチドを得た。

【0311】

環化方法D：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“環化方法D”的方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを生成するために使用した樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定には基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。粗製ペプチド固体を、アセトニトリル：0.1Mアンモニウム重炭酸塩緩衝水溶液(11mL : 24mL)の溶液に溶解して、次いでこの溶液を、NaOH(1.0M)水溶液を用いて、pH = 8.5 ~ 9.0に注意深く調整した。次いで溶液を、12 ~ 18時間攪拌しながら混合した。反応溶液を濃縮して、次いで残留物を、アセトニトリル：水に溶解した。この溶液を、逆相HPLC精製に付して、目的とする環状ペプチドを得た。

【0312】

環化方法E：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“環化方法E”的方法は、0.100mmolスケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを生成するために使用した樹脂に結合したSieberリンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定には基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。粗製ペプチド固体を、6MグアニジンHC1緩衝水溶液(15mL)に溶解して、次いで溶液を12 ~ 18時間攪拌しながら混合した。反応溶液を濃縮して、DMSO(15mL)を残渣に加えて、スラリーを得て、これを濾過した。この濾過した溶液を、逆相HPLC精製に付して、目的とする環状ペプチドを得た。

【0313】

マニュアルカップリング方法A：

先の工程から得た樹脂を含むBio-Rad反応容器に、ピペリジン：DMF(2.0 : 8.0v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、5分間周期的に攪拌して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、DMF(4.0mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を60秒間振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(1.2 ~ 10当量)の典型(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、次いでHATU(1.210当量)の典型(DMF中50

で 0.2 M , 2.5 mL , 5 eq)、最終的に D I P E A (2.4 ~ 20 当量)の典型(DMF 中で 0.8 M , 1.25 mL , 10 eq)を加えた。混合物を、60 分間 ~ 18 時間振盪した、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに 4 回連続的に洗った：各洗いについて、DMF (4.0 mL)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、60 秒間振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。

【0314】

樹脂方法 A (Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. Org. Lett. 2013, 15(19), 5012-5015) で N - メチル化：

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“樹脂方法 A での N - メチル化”の方法は、0.100 mmol スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを生成するために使用された樹脂に結合した Sieber リンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定に基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100 mmol のスケールを超えて拡大できる。10

【0315】

樹脂を、焼結シリング (25 mL) 中に移した。樹脂に、ピペリジン : DMF (20 : 80 v/v, 5.0 mL) を加えた。混合物を、3 分間振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF (4.0 mL) で 3 回洗った。反応容器に、ピペリジン : DMF (20 : 80 v/v, 4.0 mL) を加えた。混合物を、3 分間振盪して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、DMF (4.0 mL) で 3 回連続的に洗い、DCM (4.0 mL) で 3 回洗った。樹脂に、DMF (2.0 mL)、エチルトリフルオロ酢酸 (0.119 mL, 1.00 mmol)、1,8 - ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデカ - 7 - エン (0.181 mL, 1.20 mmol) を加えた。混合物を、60 分間シェーカーに静置した。溶液を、フリットから排出した。樹脂を、DMF (4.0 mL) で 3 回連続的に洗い、DCM (4.0 mL) で 3 回洗った。20

【0316】

樹脂を、乾燥 THF (2.0 mL) で 3 回洗い、いずれの残留水も除去する。オープン内で、乾燥させた 4.0 mL バイアルを、乾燥 4 モレキュラ・シーブス (20 mg) 上で THF (1.0 mL) およびトリフェニルホスフィン (131 mg, 0.500 mmol) を加えた。溶液を、この樹脂に移して、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (0.097 mL, 0.5 mmol) をゆっくりと加えた。樹脂を、15 分間攪拌した。溶液を、フリットから排出して、樹脂を、乾燥 THF (2.0 mL) を用いて 3 回洗い、いずれの残留水をも除去する。オープン内で、乾燥した 4.0 mL バイアルを、乾燥 4 モレキュラ・シーブス (20 mg) 上で、THF (1.0 mL)、トリフェニルホスフィン (131 mg, 0.500 mmol) を加えた。溶液を、樹脂に移して、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (0.097 mL, 0.5 mmol) をゆっくりと加えた。樹脂を 15 分間攪拌した。溶液を、フリットから排出した。樹脂を、DMF (4.0 mL) で 3 回連続的に洗い、DCM (4.0 mL) で 3 回洗った。樹脂を、エタノール (1.0 mL) および THF (1.0 mL) に懸濁して、水素化ホウ素ナトリウム (37.8 mg, 1.000 mmol) を加えた。混合物を、30 分間攪拌して、排出した。樹脂を、DMF (4.0 mL) で 3 回連続的に洗い、DCM (4.0 mL) で 3 回洗った。30

【0317】

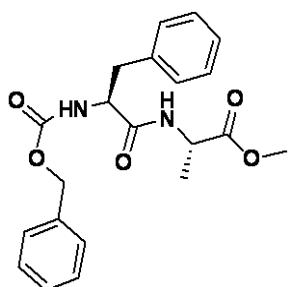
マイクロ開裂 A :

少量の < 10 mg 樹脂試料に、TIS (2 滴) およびトリフルオロ酢酸 (1 mL) を滴加して、室温で攪拌した。1 時間後に、少量のアリコートを取り出し、0.5 mL アセトニトリルで希釈して、濾過して、LC - MS 分析により得た。

【0318】

(S) - メチル 2 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - フェニルブロパンアミド) プロパノエート

【化17】



(S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-フェニルプロパン酸(500 mg, 1.670 mmol)およびHATU(699 mg, 1.837 mmol)を、CH₂Cl₂(10 mL)およびDMF(4 mL)に溶解した。混合物を、室温で10分間攪拌して、DMF(1 mL)に(S)-メチル2-アミノプロパノエート、HCl(245 mg, 1.754 mmol)およびヒューニッヒ塩基(1.167 mL, 6.68 mmol)を加えた。混合物を、RTで2時間攪拌した時点で、LC-MSは、完全な変換を示した。1N HCl(3 mL)を用いてクエンチした。EA(150 mL)中に注ぎ入れて、10% LiClで2回洗った。次いで、有機層を濃縮した。粗製物質を、50 g GOLD C18カラムで精製した。10%~100%溶液Bのグラジエント/22分。溶液A：水/TFA；溶液B：ACN/TFA。

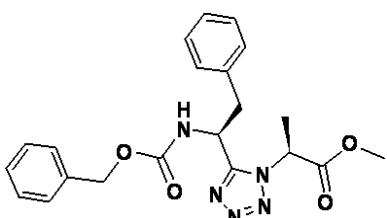
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させて、表題化合物(600 mg, 86%)を提供する。

分析LCMS条件A：保持時間 = 0.88 min；ESI-MS (+) m/z 385.1 (M + H).

【0319】

(S)-メチル2-(5-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパノエート

【化18】



圧力バイアルに、N₂下において、THF(20 mL)中の(S)-メチル2-((S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-フェニルプロパンアミド)プロパノエート(600 mg, 1.561 mmol)およびジフェニル-2-ピリジルホスフィン(1644 mg, 6.24 mmol)を入れた。溶液をN₂でバージして、その後DIA(1.214 mL, 6.24 mmol)を滴加した。次いで、ジフェニルホスホリルアジド(1.682 mL, 7.80 mmol)をゆっくりと加えた。混合物を、50℃に加熱し、50℃で14時間攪拌すると、その時点でLC-MSは目的の生成物のピークを示した。RTに冷却して、混合物を80 mL EtOAc中に注ぎ入れて、冷1N HCl、飽和NaHCO₃および塩水で洗った。次いで、有機層を濃縮して、得られる物質をRediSepカラム：シリカ 80 g Gold；流量：60 mL/min；15分内でグラジエント0%~45%溶液B；溶媒：A1ヘキサン；溶媒：B1酢酸エチル。

【0320】

目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させて、表題化合物(290 mg)を得た。

分析LCMS条件A：保持時間 = 1.0 min；ESI-MS (+) m/z 410.1 (M + H).

【0321】

10

20

30

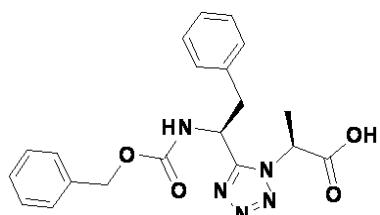
40

50

50

(S)-2-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパン酸

【化19】



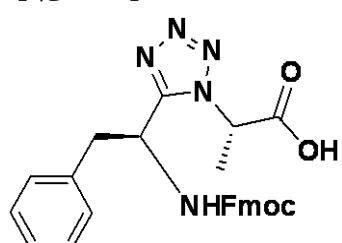
(S)-メチル 2-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパノエート(290mg, 0.425mmol)を、THF(4mL)およびMeOH(1mL)の共溶媒に溶解した。この溶液に、LiOH(1.275mL, 2.55mmol)を二回に分けて加えた。LC-MSは、RTで2時間攪拌した後に、完全な変換を示す。1N HClを用いて反応をクエンチして、pHを1~2に調整した。EtOAcで2回抽出した。次いで、有機層を、Na₂SO₄上で乾燥させて、濃縮して、285mgの粗製物質を得た。精製は行わなかった。

分析LCMS条件A：保持時間 = 0.83分；ESI-MS(+)m/z 396.3(M+H).

【0322】

(S)-2-((S)-1-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパン酸

【化20】



(S)-2-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパン酸(285mg, 0.721mmol)を、N₂下において、MeOH(4mL)中に溶解した。このシステムをN₂でバージして、その後Pd/C(77mg, 0.072mmol)を加えた。混合物を、H₂バルーン下において終夜RTで攪拌した。珪藻土(Celite(登録商標))プラグを用いて触媒を濾去して、メタノールで洗い、溶媒を除去した。

【0323】

上記残留物を、アセトニトリル(4mL)および水(2mL)に溶解した。0℃に冷却して、この溶液に、Na₂CO₃(1.802mL, 3.60mmol)、続いて(9H-フルオレン-9-イル)メチル(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート(267mg, 0.793mmol)/CH₃CN(1mL)を加えた。反応混合物を、2時間RTまで昇温させた。1N HClを用いてpH2まで酸性とし、EtOAcで抽出した。次いで、有機層をNa₂SO₄上で乾燥させて、濃縮した。得られる粗製物質を、逆相HPLCで精製した。カラム：Axia Luna C18 30 × 100mm；溶液A：95%H₂O/5%ACN/0.05%TFA；溶液B：95%ACN/5%H₂O/0.05%TFA；グラジエント10%~100%溶液B/12分。

目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させて、表題化合物(90mg)を得た。

【0324】

分析LCMS条件A：保持時間 = 0.97min；ESI-MS(+)m/z 484.0(M+H).

10

20

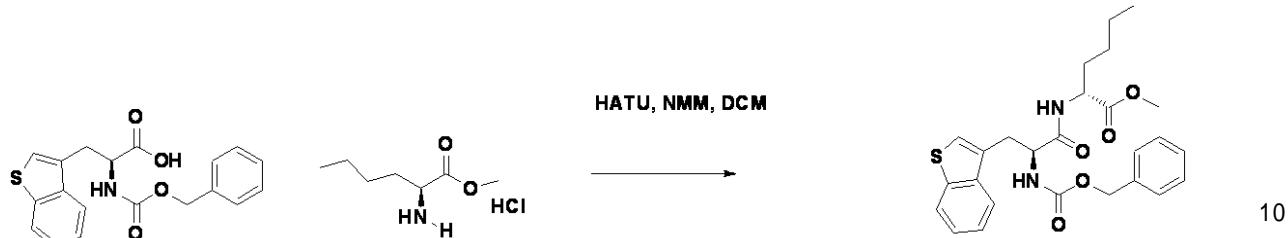
40

50

【0325】

(R) - メチル 2 - ((S) - 3 - (ベンゾ[*b*]チオフェン - 3 - イル) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)プロパンアミド)ヘキサノエート

【化21】



D C M(30.2 mL)中の(S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (4 - (tert - ブトキシ)フェニル)プロパン酸(2.24 g, 6.03 mmol)および(S) - メチル 2 - アミノプロパノエート塩酸塩(0.850 g, 6.09 mmol)溶液に、0 度で、固体HATU(2.408 g, 6.33 mmol)を加えて、15分後に、N - メチルモルホリン(1.326 mL, 12.06 mmol)を加えて、終夜RTに昇温させた。1N HCl(20 mL)を加えて、10分間攪拌した。分離漏斗に注ぎ入れて、層を分離して、水相をD C M(30 mL)で更に2x抽出した。有機層を合わせて、Na₂SO₄上で乾燥させて、濾過して、油状物を得た(stripped)。

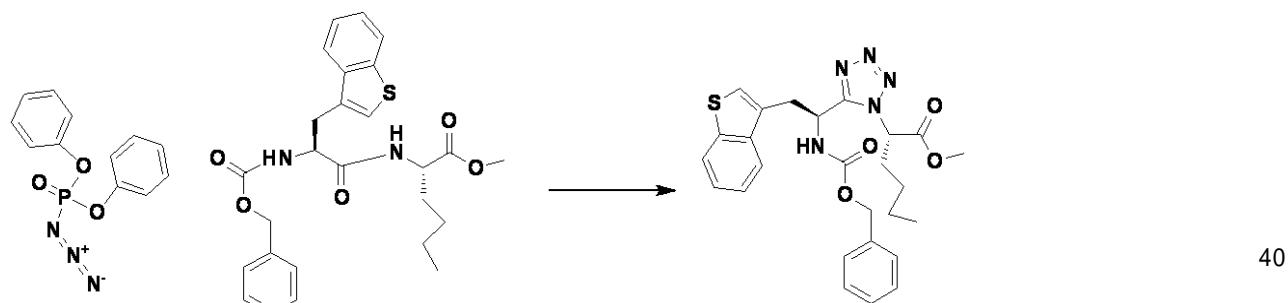
ヘキサン：酢酸エチルの0~100%を用いるIsco 80 Gカラム：シリカゲル上で物質を精製して、1.91 gを得た。

分析LCMS条件E：保持時間1.05 min 483.4(M+1); ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) ppm 8.46(1H, d, J = 7.46 Hz), 7.96(2H, t, J = 8.62 Hz), 7.57(1H, d, J = 8.68 Hz), 7.19 - 7.49(6H, m), 4.95(2H, t, J = 8.01, 5.50 Hz), 3.53 - 3.76(3H, s), 3.32(2H, s), 3.12 - 3.24(1H, m), 3.06(1H, dd, J = 14.67, 10.15 Hz), 1.50 - 1.80(2H, m), 1.29(3H, br. s.), 0.75 - 0.98(3H, m).

【0326】

(2R) - メチル 2 - (5 - ((S) - 2 - (ベンゾ[*b*]チオフェン - 3 - イル) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)エチル) - 4H - 1,2,3 - トリアゾール - 4 - イル)ヘキサノエート

【化22】



窒素の通気ラインおよびマグネチックスターーラーを備えた一首丸底フラスコに、(S) - メチル 2 - ((S) - 3 - (ベンゾ[*b*]チオフェン - 3 - イル) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)プロパンアミド)ヘキサノエート(1.91 g, 3.96 mmol)およびジフェニル - 2 - ピリジルホスフィン(3.13 g, 11.87 mmol)、次いでTHF(25 mL)をN₂下にて入れた。溶液を、N₂で5分間バージして、その後DIAD(2.309 mL, 11.87 mmol)を滴加した。ジフェニルホスホリルアジド(3.41 mL, 15.83 mmol)を、次いで滴下漏斗に加えた。反応を、窒素雰囲気下にて18時間RTで攪拌した。THFから粘性油状物を取り出して、酢酸エチル(100 mL)に粘性油状物を溶解して、1N HCl(100 mL)を加えた。水相を、50 mL 酢酸エチルで更

に2回抽出した。有機層を合わせて、 Na_2SO_4 上で乾燥させて、濾過して、油状物を得た。

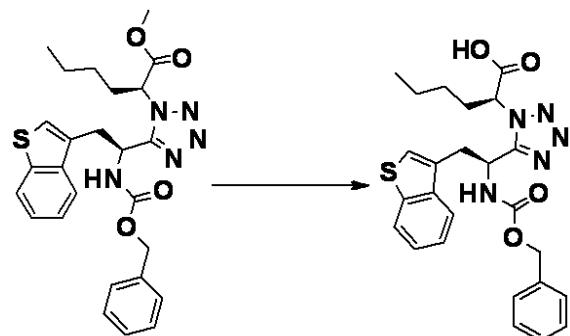
ISCO 220 g r a m シリカ；ヘキサン：酢酸エチルのグラジエント；0.556 gにて目的の物質を単離した。物質を、混合物として粗生成物を得た。

分析LCMS条件E：保持時間1.1分間，508.4 ($M + 1$)。

【0327】

(S)-2-(5-((S)-2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸

【化23】



10

(S)-メチル 2-(5-((S)-2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノエート(0.566 g, 1.115 mmol)に、MeOH(2.79 mL)およびTHF(2.79 mL)を加えた。混合物を、溶液となるまで攪拌して、次いで水酸化リチウム(1.673 mL, 3.35 mmol)を加えて、15分間RTで攪拌した。1N HClを加えて、pH 6までわずかに酸性として、得られたものを、酢酸エチル(25 mL)で3×抽出した。合わせた有機相を、 Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過して、溶媒を無色油状物まで除去して、これを精製せずに用いた。LCMS条件E：保持時間 = 0.99分間、494.4 ($M + 1$)。

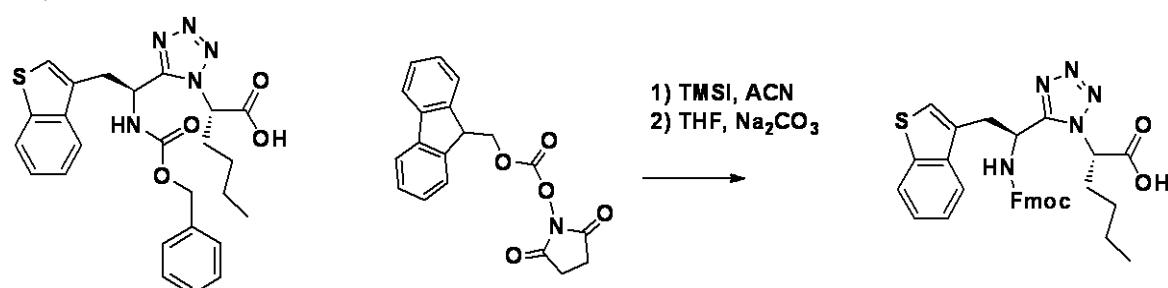
20

【0328】

(S)-2-(5-((S)-1-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸

30

【化24】



40

(S)-2-(5-((S)-2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸(0.55 g, 1.114 mmol)に、氷水浴中で冷却したアセトニトリル(12 mL)に溶解して、0℃で、ヨードトリメチルシラン(0.465 mL, 3.34 mmol)を加えた。0℃で1/2時間攪拌して、次いで、RTで1/2時間昇温させた。1N HClを加えて、20 mL 酢酸エチルを用いて4×抽出した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させて、濾過して、黄褐色油状物に精製した。

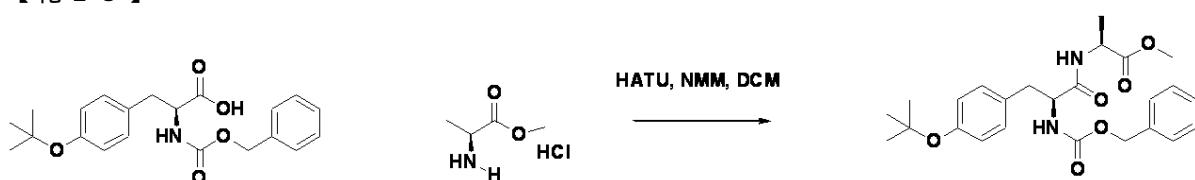
80 gram Gold Sillica カラムを用いるISCO上で精製により、0.126 g の白色固体を得た。

LCMS条件E：保持時間 = 0.99 mins, 582.5 ($M + 1$)

50

【0329】

(S) - メチル 2 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (4 - (tert - ブトキシ)フェニル)プロパンアミド)プロパノエート
【化25】

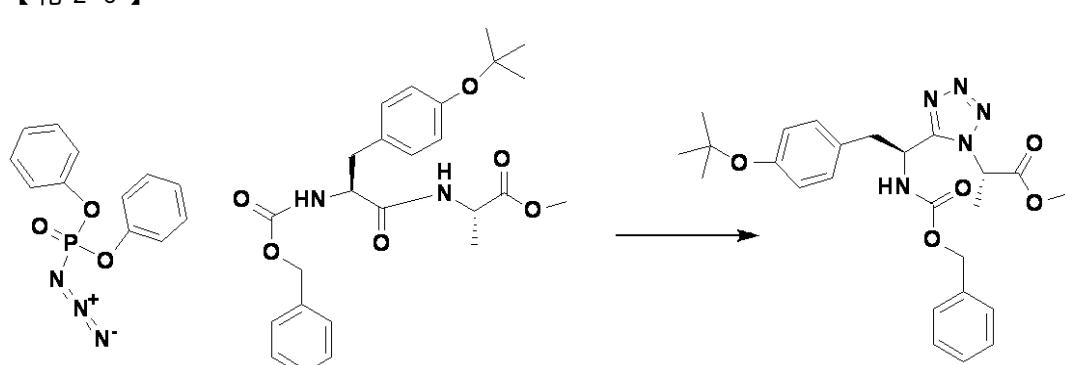


D C M (30.2 mL) 中の (S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (4 - (tert - ブトキシ)フェニル)プロパン酸 (2.24 g, 6.03 mmol) および (S) - メチル 2 - アミノプロパノエート塩酸塩 (0.850 g, 6.09 mmol) 溶液に、0 10
で、固体 H A T U (2.408 g, 6.33 mmol) を加えた。15 分後に、N - メチルモルホリン (1.326 mL, 12.06 mmol) を加えて、混合物を、終夜 R T まで昇温させた。1 N H C l (30 mL) を加えて、ジクロロメタン (30 mL) で 3 × 抽出して、有機層を合わせて、N a₂ S O₄ 上で乾燥させて、濾過して、ワックスを得た。残留物を、順相クロマトグラフィーの I S C O 80 grams Silica のヘキサン : 酢酸エチルのグラジエントにより精製して、1.3 g を得た。

L C M S 条件 E : 保持時間 = 0.97 分間、457.5 (M + 1); ¹ H N M R (400 MHz, クロロホルム - d) δ 7.40 - 7.31 (M, 5 H), 7.14 - 7.05 (M, J = 8.1 Hz, 2 H), 6.97 - 6.84 (M, 2 H), 5.31 (s, 1 H), 5.11 (s, 2 H), 4.49 (s, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 1.57 (br. s., 2 H), 1.38 - 1.29 (M, 12 H). 20

【0330】

(S) - メチル 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (4 - (tert - ブトキシ)フェニル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)プロパノエート
【化26】



(S) - メチル 2 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (4 - (tert - ブトキシ)フェニル)プロパンアミド)プロパノエート (1.77 g, 3.88 mmol) を入れた窒素の通気ラインおよびマグネチックスターラーを備えた一首丸底フラスコにおいて、N₂ 下においてジフェニル - 2 - ピリジルホスフィン (3.05 g, 11.64 mmol) / T H F (2.5 mL) を加えた。N₂ を用いて溶液をバージした後に、D I A D (2.261 mL, 11.63 mmol) を滴加した。次いで、ジフェニルホスホリルアジド (3.34 mL, 15.51 mmol) をゆっくりと加えた。反応を、R T で 2.5 時間攪拌した。混合物を、55 40 に加熱して、50 で 20 時間攪拌した。R T まで冷却して、40 mL 酢酸エチルに注ぎ入れて、冷 1 N H C l 、飽和 N a H C O₃ および塩水で洗った。有機層から粘性油状物まで除去した。残留物を I S C O 80 gram カラム : 0 ~ 100 % 酢酸エチル / ヘキサンで精製して、2.24 g の混合物を得て、これを更なる精製をせず用いた。

10

20

30

40

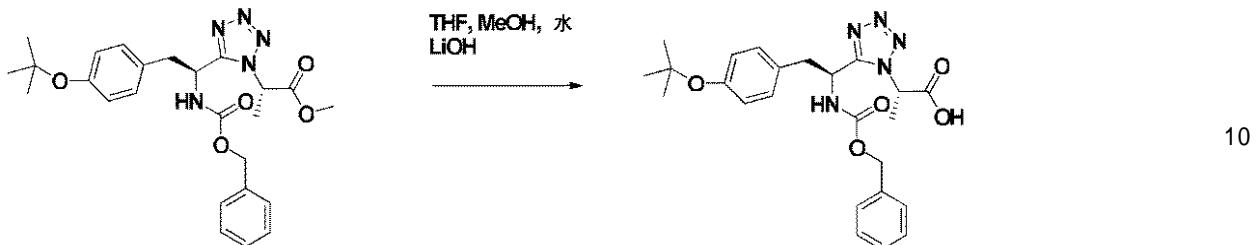
50

L C M S 条件 D : 保持時間 = 1 . 0 1 分間、 4 8 2 . 5 .

【 0 3 3 1 】

(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (4 - (tert - プトキシ)フェニル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)プロパン酸

【 化 2 7 】



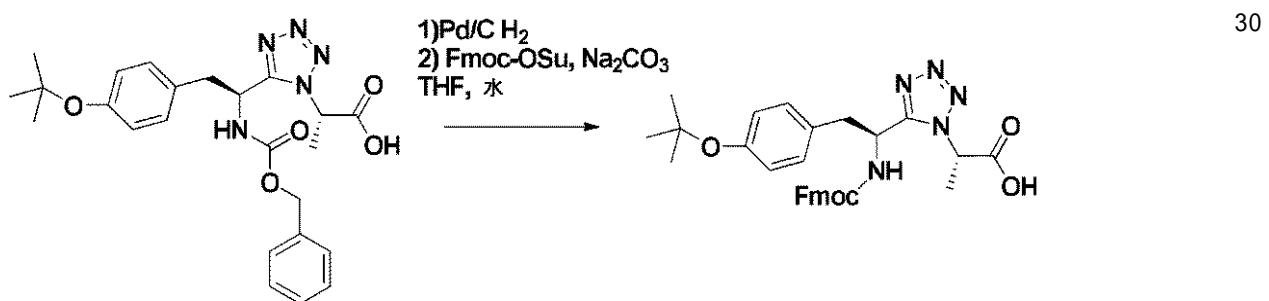
(S) - メチル 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (4 - (tert - プトキシ)フェニル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)プロパン酸エート(2.24 g, 4.65 mmol)に、MeOH(11.63 mL)およびTHF(11.63 mL)を加えた。混合物を、溶液になるまで攪拌して、水酸化リチウム(6.98 mL, 13.96 mmol)を加えた。混合物を、RTで15分間攪拌した。1N HClを加えて、弱酸性のpH 6とし、これを25 mL酢酸エチルで3×抽出した。Na₂SO₄にて有機層を併せて乾燥させて、濾過して、溶媒を除いて、油状物を得て、これ精製せずに次工程に用いた。

L C M S 条件 D : 保持時間 = 0 . 9 3 分間、 4 6 8 . 4 .

【 0 3 3 2 】

(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((((9 H - フルオレン - 9 - イル)メトキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (4 - (tert - プトキシ)フェニル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)プロパン酸

【 化 2 8 】



(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (4 - (tert - プトキシ)フェニル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)プロパン酸(3.4 g, 7.27 mmol)を、N₂下において、20 mL MeOHに溶解した。この溶液に、Pd/C(500 mg, 0.470 mmol)を加えた。溶液を脱気して、その後H₂バルーンに切り換えた。混合物を、H₂下において4時間攪拌した。LC-MSは、>95%の変換を示した。触媒を濾去して、溶媒を除いて、粗製物質を得る。

上記物質を、THF(8 mL)に溶解して、アセトニトリル(6 mL)および水(3 mL)を加えた。氷水浴中で0℃に冷却して、Na₂CO₃(2.312 g, 21.82 mmol)、次いで(9 H - フルオレン - 9 - イル)メチル(2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル)カーボネート(2.70 g, 8.00 mmol)を分割して加えた。RTで終夜攪拌した。1N HClを加えて、弱酸性pH 5とした。得られる物質を、25 mL酢酸エチルで4×抽出した。抽出物を併せて、Na₂SO₄上で乾燥させて、濾過して、溶媒を除去して、黄

40

50

色油状物を得た。ヘキサン：酢酸エチルのグラジエントを用いて ISCO 220gram カラムにより、0.403 gを得た。

L C M S 条件 D : 保持時間 = 1.2 分間、556.5

分析 H P L C 条件 H : 保持時間 11.34 min 94%

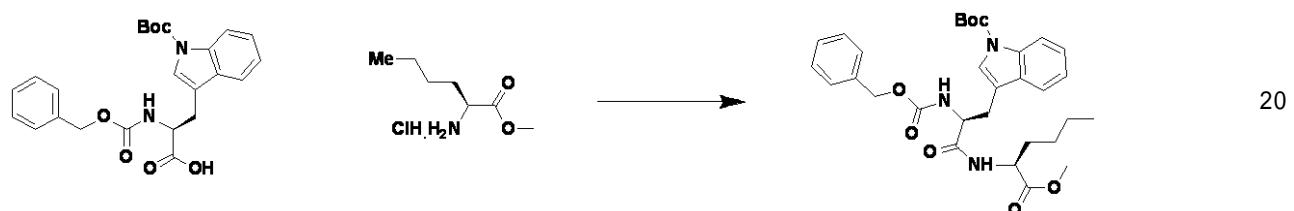
分析 H P L C 条件 G : 保持時間 12.39 min 93.9%

¹H N M R (400 MHz, D M S O - d₆) 13.9 - 13.4 (s, 1 H)、8.33 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.86 (d, J = 7.5 Hz, 2 H), 7.71 - 7.59 (M, 1 H), 7.57 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.47 - 7.34 (M, 2 H), 7.34 - 7.16 (M, 3 H), 6.92 - 6.75 (M, 2 H), 5.72 - 5.47 (M, 1 H), 5.3 - 5.05 (M, 1 H), 4.27 - 4.02 (M, 3 H), 3.25 (d d, J = 13.8、10.3 Hz, 1 H), 3.10 (d d, J = 14.1, 4.5 Hz, 1 H), 1.99 - 1.71 (M, 2 H), 1.65 (d, J = 7.0 Hz, 1 H), 1.29 - 1.11 (M, 9 H). 10

【0333】

t e r t - ブチル 3 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - ((S) - 1 - メトキシ - 1 - オキソヘキサン - 2 - イル)アミノ) - 3 - オキソプロピル) - 1 H - インドール - 1 - カルボキシレート

【化29】



H A T U (30.0 g, 79 mmol)を、R Tで、C H₂ C l₂ (274 mL)およびD M F (132 mL)中の(S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (1 - (t e r t - ブトキシカルボニル) - 1 H - インドール - 3 - イル)プロパン酸 (28.8 g, 65.7 mmol)の攪拌溶液に加えた。反応混合物を、R Tで10分間攪拌した。次いで、R Tで(S) - メチル 2 - アミノヘキサノエート塩酸塩 (14.32 g, 79 mmol)およびD I P E A (40.2 mL, 230 mmol) / D M F (2 mL)に加えた。反応溶液を、R Tで1時間半混合した。反応混合物を、1.5 N H C l および 10% L i C l 溶液で洗い、ジクロロメタンで抽出した。有機層をN a₂ S O₄ 上で乾燥させて、濃縮した。粗製物質を、I S C O 順相クロマトグラフィーにより精製した。化合物を20% 酢酸エチル / 石油エーテルで抽出した。 30

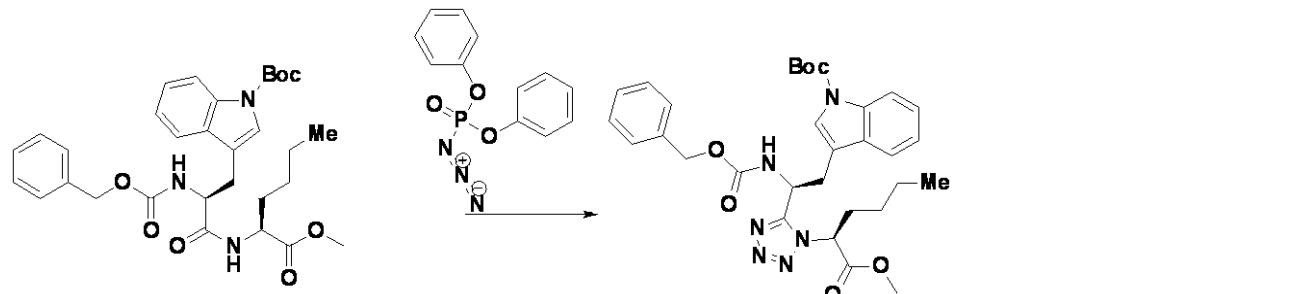
L C M S 条件 D : 保持時間 2.23 min, 566.4 (M + 1)

分析 H P L C 条件 G : 保持時間 23.97 min 97.9%.

【0334】

t e r t - ブチル 3 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - ((S) - 1 - メトキシ - 1 - オキソヘキサン - 2 - イル) - 1 H - テトラゾール - 5 - イル)エチル) - 1 H - インドール - 1 - カルボキシレート

【化30】



N₂ 下において、T H F (80 mL)中のt e r t - ブチル 3 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - ((S) - 1 - メトキシ - 1 - オキソヘキサン - 2 - 50

イル)アミノ) - 3 - オキソプロピル) - 1 H - インドール - 1 - カルボキシレート(10 g, 17.68 mmol)およびトリフェニルホスフィン(13.91 g, 53.0 mmol)溶液を攪拌する。この溶液を N₂ でパージして、D I A D(10.31 mL, 53.0 mmol)を滴加した。次いで、ジフェニルリン酸アジド(13.33 mL, 61.9 mmol)をゆっくりと添加した。反応混合物を、75 °C で加熱して、75 °C で24時間攪拌した。反応混合物を、RT に冷却して、500 mL 酢酸エチルに注ぎ入れて、2N HCl、飽和 NaHCO₃ および塩水で洗った。次いで有機層を濃縮して、粗製物質を得た。粗製物質を、順相クロマトグラフィーにより精製して、tert - プチル 3 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - ((S) - 1 - メトキシ - 1 - オキソヘキサン - 2 - イル) - 1 H - テトラゾール - 5 - イル)エチル) - 1 H - インドール - 1 - カルボキシレート(6 g, 9.65 mmol, 54.6% 収量)を得た。

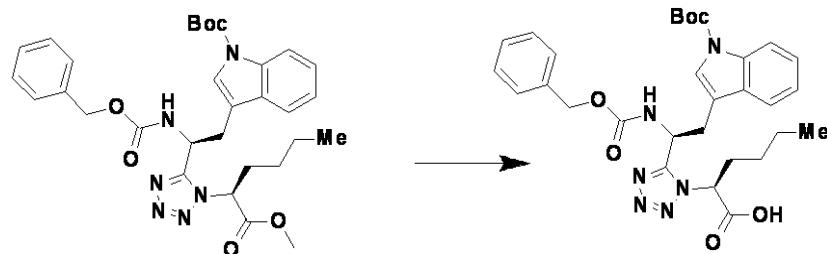
L C M S 条件 D : 保持時間 2.54 min 591.3 (M + 1).

分析 H P L C 条件 K : 保持時間 2.58 min 95.7%.

【0335】

(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - (tert - プトキシカルボニル) - 1 H - インドール - 3 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)ヘキサノイン酸

【化31】



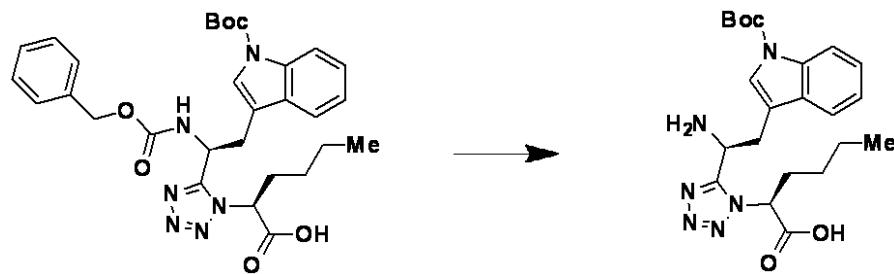
T H F (33.6 mL)およびMeOH (8.40 mL)中のtert - プチル 3 - ((S) - 2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - ((S) - 1 - メトキシ - 1 - オキソヘキサン - 2 - イル) - 1 H - テトラゾール - 5 - イル)エチル) - 1 H - インドール - 1 - カルボキシレート(6 g, 10.16 mmol)の攪拌溶液を、LiOH (15.24 mL, 30.5 mmol)で処理して、室温で3時間攪拌した。反応混合物を、1N HCl で酸性化して、酢酸エチルで抽出した。有機層を乾燥させて、濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物を、combi flashにより精製して、(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - (tert - プトキシカルボニル) - 1 H - インドール - 3 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)ヘキサノイン酸(3.5 g, 5.89 mmol, 58.0% 収量)を得た。

L C M S 条件 D : 保持時間 2.41 min 477.2 (M + 1).

【0336】

(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - アミノ - 2 - (1 - (tert - プトキシカルボニル) - 1 H - インドール - 3 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)ヘキサノイン酸

【化32】



(S) - 2 - (5 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (1 - (tert - プトキシカルボニル) - 1 H - インドール - 3 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾー

10

20

30

30

40

40

50

ル - 1 - イル)ヘキサノイン酸(3.5 g, 6.07 mmol) / MeOH(56.7 mL)の攪拌溶液に、N₂下において、Pd/C(1.292 g, 1.214 mmol)を加えた。溶液を脱気して、その後H₂に切り換えた。

【0337】

混合物に、H₂下において、RTで7時間攪拌した。反応混合物を、珪藻土(Celite(登録商標))を通して濾過して、ベッドをメタノールで洗い、濃縮して、(S)-2-(5-((S)-1-アミノ-2-(1-(tert-ブトキシカルボニル)-1H-インドール-3-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸(1.8 g, 3.69 mmol, 42.6%収量)を得た。

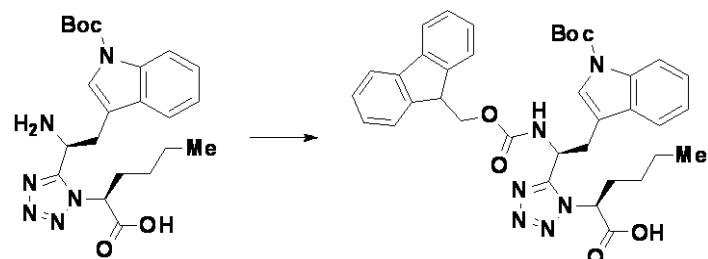
LCMS条件D：保持時間2.13 min 441.2(M+1).

10

【0338】

(S)-2-(5-((S)-1-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-(1-(tert-ブトキシカルボニル)-1H-インドール-3-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸

【化33】



20

Oに冷却したアセトニトリル(24.88 mL)および水(12.44 mL)中の(S)-2-(5-((S)-1-アミノ-2-(1-(tert-ブトキシカルボニル)-1H-インドール-3-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸(1.8 g, 4.07 mmol)の攪拌溶液に、Na₂CO₃(6.51 mL, 13.02 mmol)、次いでFmoc-Osu(1.647 g, 4.88 mmol)を加えて、RTで4時間攪拌した。反応混合物を、1N HClでクエンチして、pHを1~2に調整した。酢酸エチルで抽出して、濃縮して、粗油状物を得た。粗製化合物を、逆相combi flashにより精製して、(S)-2-(5-((S)-1-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-(1-(tert-ブトキシカルボニル)-1H-インドール-3-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノイン酸(0.88 g)を得た。

30

LCMS条件D：保持時間2.25 min 666.6(M+1).

分析HPLC条件H：保持時間16.2分間, 92%.

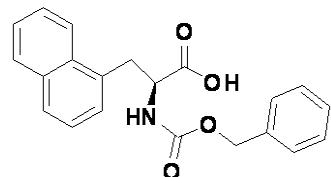
¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) 8.45(d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.02(d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.84(d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.76(d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.66(s, 1H), 7.60-7.49(M, 2H), 7.40-7.26(M, 3H), 7.26-7.14(M, 2H), 5.16(d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.18-4.04(M, 2H), 3.51-3.36(M, 2H), 3.17(s, 2H), 2.28(br.s., 1H), 1.63-1.46(M, 9H), 1.19(d, J = 7.0 Hz, 2H), 1.07(d, J = 8.0 Hz, 1H), 0.75-0.63(M, 2H).

40

【0339】

(S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-(ナフタレン-1-イル)プロパン酸

【化34】



50

クロロギ酸ベンジル(1.081mL, 7.67mmol)およびNaOH(8.36mL, 8.36mmol)を、0℃で同時に、(S)-2-アミノ-3-(ナフタレン-1-イル)プロパン酸(1.5g, 6.97mmol)/THF(7mL)および1N NaOH(7mL)の攪拌溶液に滴加した。混合物を、RTで2時間攪拌して、この時点では、LC-MSは、目的とする生成物のピークを示した。1N HClを用いて酸性化して、EtOAcで抽出した。EtOAcを除いて、得られた粗製物質を、RediSepカラム：シリカ80g；流量：60mL/min；溶媒A：ジクロロメタン；溶媒B：20%MeOH/80%DCM；グラジエント0%～50%溶液B/20分間、により精製した。

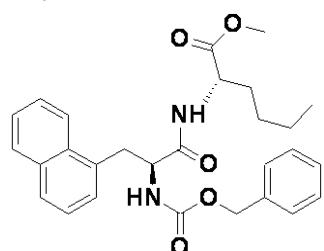
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(2.21g, 89%)を得た。

分析LCMS条件A：保持時間=0.98min；ESI-MS(+)/z 350.08(M+H).

【0340】

(S)-メチル 2-(((S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-(ナフタレン-1-イル)プロパンアミド)ヘキサノエート

【化35】



(S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-(ナフタレン-1-イル)プロパン酸(2.1g, 6.01mmol)およびHATU(2.74g, 7.21mmol)を、CH₂C₁₂(25mL)およびDMF(12mL)に溶解した。混合物を、RTで10分間攪拌して、DMF(2mL)中の(S)-メチル 2-アミノヘキサノエート, HCl(1.310g, 7.21mmol)およびヒューニッヒ塩基(3.67mL, 21.04mmol)を加えた。混合物を、RTで2時間攪拌して、その時点でLC-MSは完全な変換を示した。1N HCl(10mL)を用いてクエンチした。混合物を、EtOAc(250mL)に注入し、10%LiClで2回、塩水で1回洗った。次いで有機層を、Na₂SO₄上で乾燥させて、濃縮した。粗製物質を、RediSepカラム：シリカ220g

流量：150mL/min

平衡化容量：1.0 CV

溶媒A 1：ヘキサン；溶媒B 1：酢酸エチル

グラジエント0%～40%溶液B, 15分

で精製した。

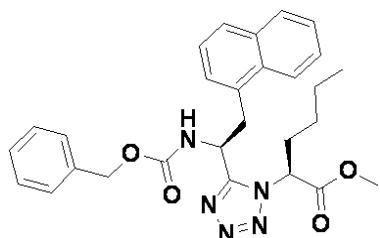
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(1.86g, 65%)を得た。

分析LCMS条件A：保持時間=1.14min；ESI-MS(+)/z 477.1(M+H).

【0341】

(S)-メチル 2-(5-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-(ナフタレン-1-イル)エチル)-1H-テトラゾール-1-イル)ヘキサノエート

【化36】



T H F (3.5 mL) 中の (S)-メチル 2 - ((S)-2 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 3 - (ナフタレン - 1 - イル)プロパンアミド)ヘキサノエート (1.8 g, 3.7 mmol) およびジフェニル - 2 - ピリジルホスフィン (2.98 g, 11.33 mmol) を入れた圧力バイアルを、N₂ 下において、N₂ でバージして、その後 D I A D (2.203 mL, 11.33 mmol) を滴加した。次いで、ジフェニルホスホリルアジド (2.85 mL, 13.22 mmol) をゆっくりと添加した。混合物を、55 °C に加熱して、55 °C で 18 時間攪拌して、その時点で L C - M S は目的の生成物のピークを示した。

R T に冷却して、E t O A c (200 mL) に注ぎ入れて、2 N H C l、飽和 N a H C O₃ および塩水で洗った。次いで、有機層を濃縮して、得られる物質を、R e d i S e p カラム：シリカ 330 g G o l d, 流量：200 mL/min; 平衡化容量：3.0 °C V; 溶媒：A 1 ヘキサン；溶媒：B 1 酢酸エチル；15 分内でグラジエント 0% ~ 40% 溶液 B、により精製した。

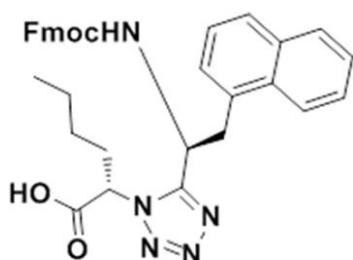
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させて、表題化合物 (533 mg, 28%) を得た。

分析 L C M S 条件 A：保持時間 = 1.18 min; E S I - M S (+) m/z 502.2 (M + H).

【0342】

(S)-2 - (5 - ((S)-1 - (((9H - フルオレン - 9 - イル)メトキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (ナフタレン - 1 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)ヘキサノイン酸

【化37】



(S)-メチル 2 - ((S)-1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - (ナフタレン - 1 - イル)エチル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)ヘキサノエート (533 mg, 1.063 mmol) を、T H F (8 mL) および M e O H (2 mL) の共溶媒に溶解した。この溶液に、2 分割して L i O H (1.594 mL, 3.19 mmol) を加えた。R T で 2 時間攪拌した後に、L C - M S により、完全な変換が示された。生成物のピークは、0.99 / 2.0 分で出現する。反応を 1 N H C l でクエンチして、p H を 1 ~ 2 に調整した。E t O A c で抽出した。次いで、有機層を N a₂ S O₄ 上で乾燥させて、濃縮して、粗製物質を得た。

【0343】

上記物質を、N₂ 下において、M e O H (10 mL) 中に溶解した。この溶液に、P d / C (170 mg, 0.159 mmol) を加えた。溶液を脱気して、その後 H₂ バルーンに切り換えた。混合物を、H₂ 下において、7 時間攪拌して、この時点で、L C - M S は > 95% の変換を示した。触媒を濾取して、溶媒を除去した。得られる残留物を、アセトニ

10

20

20

30

40

50

トリル(6 mL)および水(3 mL)に溶解した。0℃に冷却して、Na₂CO₃(1.594 mL, 3.19 mmol)、次いで(9H-フルオレン-9-イル)メチル(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート(394 mg, 1.169 mmol)を加えた。混合物を、RTで3時間攪拌して、その時点でLC-MSは、完全な変換を示した。1N HClでクエンチして、pHを1~2に調整して、EtOAcで抽出した。次いで有機層を、真空下で濃縮して、得られる粗製物質を、RediSepカラム：シリカ40 g；流量：40 mL/min；平衡化容量：5.0 CV；溶媒：Aジクロロメタン；溶媒：B 20% MeOH/DCM；15分間でグラジエント0%~50%溶液Bにより精製した。

【0344】

目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(429 mg, 63%, 3工程)を得た。10

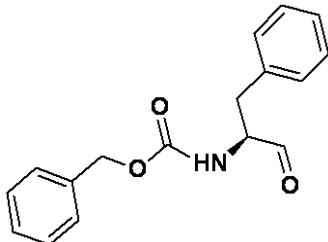
分析LCMS条件A：保持時間 = 1.18 min；ESI-MS(+)m/z 576.2 (M+H)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) 14.15 - 13.65 (s, 1H), 8.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.95 - 7.89 (M, 1H), 7.89 - 7.76 (M, 3H), 7.63 - 7.49 (M, 5H), 7.43 - 7.32 (M, 3H), 7.26 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.51 - 5.31 (M, 1H), 5.31 - 5.18 (M, 1H), 4.17 - 4.04 (M, 3H), 3.81 - 3.71 (M, 2H), 2.24 (br. s., 2H), 2.85 - 2.1 (M, 2H), 1.23 - 1.08 (M, 2H), 0.75 - 0.62 (M, 3H). 20

【0345】

(S)-ベンジル(1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)カルバメート

【化38】



30

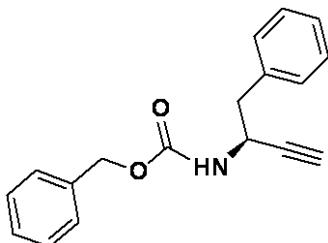
(S)-ベンジル(1-ヒドロキシ-3-フェニルプロパン-2-イル)カルバメート(0.457 g, 1.6 mmol)/DCM(6 mL)の混合物に、デス-マーチン・ペルヨージナン(0.814 g, 1.920 mmol)を加えた。2時間後に、RTで6時間攪拌した後に、LCMSは、完全な変換を示した。反応混合物を、ジクロロメタンで希釈して、冷1N NaOHで洗った。有機層をMgSO₄で乾燥させて、濾過し、濃縮した。さらなる精製をせずに次工程に使用した。

分析LCMS条件A：保持時間 = 0.85 min；ESI-MS(+)m/z 284.0 (M+H).

【0346】

(S)-ベンジル(1-フェニルブタ-3-イン-2-イル)カルバメート

【化39】



40

出発物質である(S)-ベンジル(1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)カルバメート(400 mg, 1.412 mmol)を、乾燥MeOH(8 mL)に溶解した。0℃に

50

冷却して、次いで K_2CO_3 (390 mg, 2.82 mmol)、次いでジメチル(1-ジアゾ-2-オキソプロピル)ホスホネート(0.318 mL, 2.118 mmol)を加えた。混合物を、RTにゆっくりと温めて、3時間攪拌した。LC-MSは、部分的な変換を示した。目的とする生成物のピークは、0.97 / 2.0分であった。反応を、RTで終夜攪拌して、この時点でLC-MSは、完全な変換を示した。混合物を、0.5N HClに注ぎ入れて、酢酸エチルで抽出した。有機層を、次いで Na_2SO_4 上で乾燥させて、濃縮した。次いで、粗製物質を、24 g ICSOカラム；溶液A : CH_2Cl_2 ；溶液B : 20% MeOH / CH_2Cl_2 ；15分間内でグラジエント0 ~ 50% 溶液B；50% 溶液Bを10分間保持、で精製した。

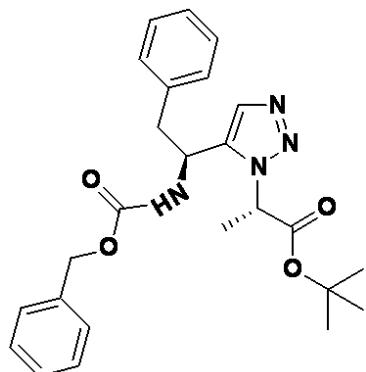
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(240 mg, 61%)を得た。 10

分析 LCMS 条件 A : 保持時間 = 0.96 min ; ESI-MS (+) m/z 280.1 (M + H).

【0347】

(S)-tert-ブチル 2-(5-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)プロパンエート

【化40】



20

出発物質(S)-ベンジル(1-フェニルブタ-3-イン-2-イル)カルバメート(85 mg, 0.304 mmol)および(S)-tert-ブチル 2-アジドプロパンエート(208 mg, 1.217 mmol)を、トルエン(4 mL)中に溶解した。 N_2 でバージして、その後 Ru触媒[113860-07-4](16.54 mg, 0.015 mmol)を加えた。混合物を、100 °C で16時間攪拌し、この時点で、LC-MSは、完全な変換を示した。溶媒を除去した。得られる残留物を、逆相HPLCカラム : 30 × 100 mm Luna；溶液A : 95% H_2O / 5% CH_3CN / 0.1% TFA；溶液B : 5% H_2O / 95% CH_3CN / 0.1% TFA、により精製した。 30

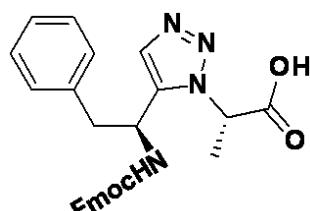
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(56 mg, 41%)を得た。

分析 LCMS 条件 A : 保持時間 = 1.01 min ; ESI-MS (+) m/z 451.1 (M + H)

【0348】

(S)-2-(5-((S)-1-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)プロパン酸

【化41】



40

出発物質(S)-tert-ブチル 2-(5-((S)-1-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)プロパン酸

50

ル)アミノ) - 2 - フェニルエチル) - 1 H - 1 , 2 , 3 - トリアゾール - 1 - イル)プロパノエート(142 mg, 0.315 mmol)を、N₂下において、MeOH(4 mL)に溶解した。システムをN₂でバージして、Pd/C(33.5 mg, 0.032 mmol)を添加した。混合物を、RTで7時間、H₂バルーン下において攪拌して、この時点では、中間体(S)-tert-ブチル 2 - (5 - ((S) - 1 - アミノ - 2 - フェニルエチル) - 1 H - 1 , 2 , 3 - トリアゾール - 1 - イル)プロパノエートへの完全な変換を示した。触媒を濾去して、溶媒を除去した。得られる残留物を、アセトニトリル(4 mL)および水(2 mL)に溶解した。0℃に冷却して、溶液に、1 mL CH₃CN中のN₂CO₃(0.788 mL, 1.576 mmol)、次いで(9 H - フルオレン - 9 - イル)メチル(2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル)カーボネート(117 mg, 0.347 mmol)を加えた。反応混合物を、RTに2時間温めた。LC-MSは、出発物質が消費されたことを示した。1 N HClを用いてpH2に酸性化して、酢酸エチルで抽出した。有機層を、次いでNa₂SO₄上で乾燥させて、濃縮した。得られる物質を、RTで7時間、20%TFA/C₂H₅Cl(5 mL)を用いて処理した。LC-MSは、完全な変換を示した。得られる粗製物質を、逆相HPLC；カラム：30×100 mm Luna；溶液A：95%H₂O/5%CH₃CN/0.1%TFA；溶液B：5%H₂O/95%CH₃CN/0.1%TFA、で精製した。

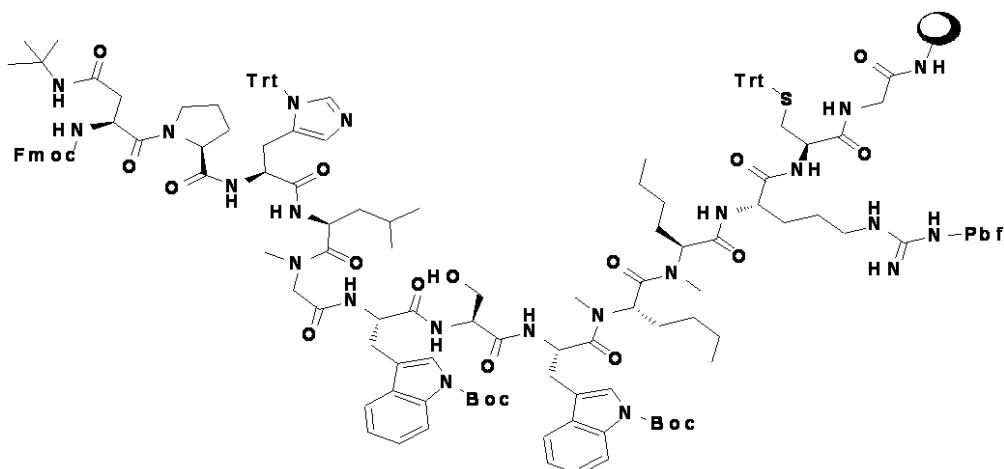
目的の生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させて、表題化合物(6.8 mg, 44% 3工程)を提供する。

分析LCMS条件A：保持時間 = 0.95 min；ESI-MS(+)/m/z 483.1(M+H)。

【0349】

中間体樹脂A：(9 H - フルオレン - 9 - イル)メチル((S) - 1 - (((S) - 4 - アミノ - 1 - ((S) - 2 - (((5 R, 8 S, 11 S, 14 S, 17 S, 20 S, 23 S, 29 S, 32 S) - 17, 23 - ビス((1 H - インドール - 3 - イル)メチル) - 1 - アミノ - 11, 14 - ジブチル - 8 - (3 - グアニジノプロピル) - 20 - (ヒドロキシメチル) - 33 - (1 H - イミダゾール - 5 - イル) - 29 - イソブチル - 5 - (メルカプトメチル) - 12, 15, 27 - トリメチル - 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 - ウンデカオキソ - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 - デカアザトリトリアコンタン - 32 - イル)カルバモイル)ピロリジン - 1 - イル) - 1, 4 - ジオキソブタン - 2 - イル)アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル)(メチル)カルバメート Sieberアミド樹脂

【化42】



125 mLの反応器に、Sieber樹脂(1410 mg, 1 mmol)を加えて、容器を、CEMリバティーマイクロウェーブペプチド合成器に静置した。次いで、以下の方法を、順に行なった：

“CEM方法A：樹脂膨潤方法”を用いて行なった；

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Gly-OHを用いて行なった

10

20

30

40

50

;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - C y s (T r t) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - A r g (P b f) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : ダブルカップルカップリング方法 ” を、 F m o c - [N - M e] N l e - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : ダブルカップルカップリング方法 ” を、 F m o c - [N - M e] N l e - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : ダブルカップルカップリング方法 ” を、 F m o c - T r p (B o c) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - S e r (t B u) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - T r p - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - S a r - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : ダブルカップルカップリング方法 ” を、 F m o c - L e u - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - H i s (T r t) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - P r o - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : ダブルカップルカップリング方法 ” を、 F m o c - A s n (t B u) - O H を用いて行なった ;

【 0 3 5 0 】

得られる樹脂を、フリットを備えた 1 0 0 m L ポリプロピレンチューブに移して、 D C M (4 0 m L × 3) で洗った。最終的に、樹脂を、真空下にて乾燥させて、合成のための中間体として使用した。

【 0 3 5 1 】

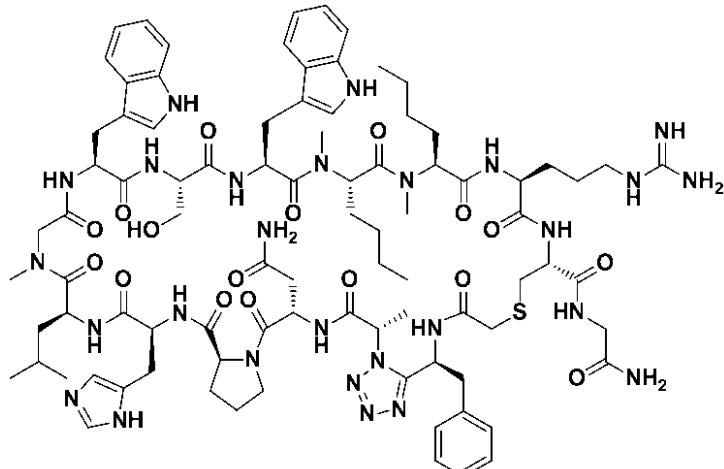
マイクロ開裂 A を行なった。

分析 L C M S 条件 A : 保持時間 = 1 . 0 m i n 、 E S I - M S (+) m / z 9 6 6 . 6 (M + 2 H + 1 C O 2).

【 0 3 5 2 】

実施例 1 0 0 1 および実施例 1 0 0 2 の製造

【 化 4 3 】



中間体樹脂 A を用いて開始して、得られる樹脂を以下の方法を順に行なって処理した :

10

20

30

40

50

“マニュアルカップリング方法A”を、(S)-2-(5-((S)-1-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-テトラゾール-1-イル)プロパン酸のために行なった。

“クロロ酢酸カップリング方法B”

“グローバル脱保護方法C”

“環化方法D”

【0353】

実施例1001、アイソマー1

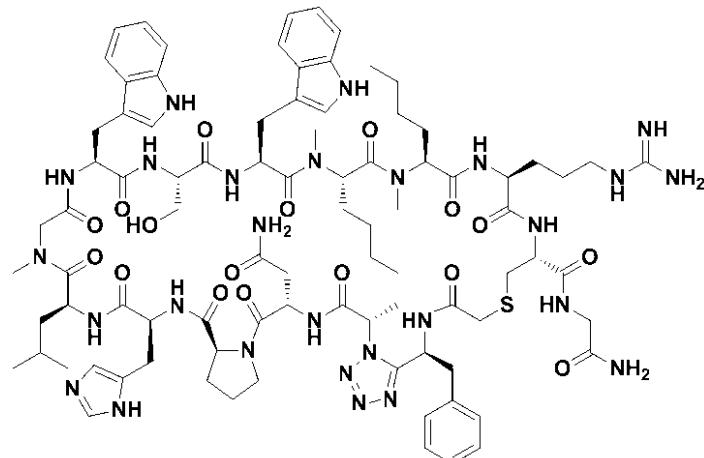
粗製物質を、以下の条件を用いて分取LC/MSにより精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm粒子；移動相A：5：95 アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；移動相B：95：5 アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25分かけて20～60%B、次いで5分間100%B保持する；流量：20 mL/min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、2.1 mgであり、LCMS分析によるその算出純度は、95%であった。

分析LCMS条件D：保持時間 = 1.57 min; ESI-MS (+) m/z 932.15 (M + 2 H)

分析LCMS条件E：保持時間 = 1.44 min; ESI-MS (+) m/z 932.35 (M + 2 H).

【0354】

【化44】



実施例1002、アイソマー2

粗製物質を、以下の条件を用いて分取LC/MSにより精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm粒子；移動相A：5：95 アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；移動相B：95：5 アセトニトリル：水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25分かけて20～60%B、次いで60%Bで5分間保持；流量：20 mL/min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は1.5 mgであり、LCMS分析によるその算出純度は99%であった。

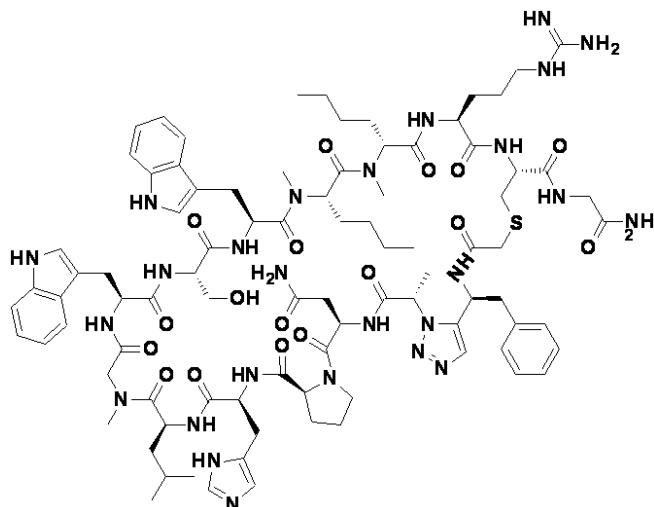
分析LCMS条件D：保持時間 = 1.79 min; ESI-MS (+) m/z 932.15 (M + 2 H).

分析LCMS条件E：保持時間 = 1.66 min; ESI-MS (+) m/z 931.85 (M + 2 H).

【0355】

実施例1003および実施例1004の製造

【化45】



10

中間体樹脂Aを用いて開始した。得られる樹脂を、以下の方法を順に行い処理した：

“マニュアルカップリング方法A”を、(S)-2-(5-((S)-1-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)プロパン酸のために行なった。

“クロロ酢酸カップリング方法B”

20

“グローバル脱保護方法C”

“環化方法D”

【0356】

一般的な合成方法“クロロ酢酸カップリング方法B”、“グローバル脱保護方法C”、および“環化方法D”を、次いで行なった。

実施例1003、アイソマー1

粗製物質を、以下の条件を用いて分取LC/MSにより精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm粒子；移動相A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25分かけて20 ~ 65% B、次いで65% Bで5分間保持；流量：20 mL/min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、0.9 mgであり、LCMS分析によるその算出純度は100%であった。

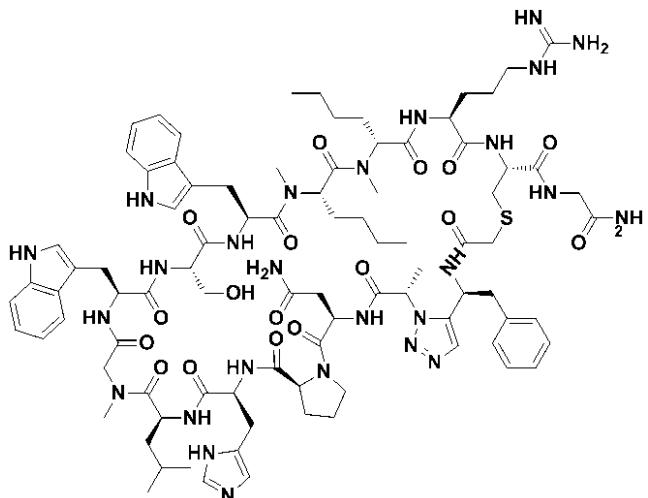
30

分析LCMS条件D：保持時間 = 1.54 min; ESI-MS (+) m/z 931.85 (M + 2 H)

分析LCMS条件E：保持時間 = 1.41 min; ESI-MS (+) m/z 931.90 (M + 2 H).

【0357】

【化46】



10

実施例1004、アイソマー2

粗製物質を、以下の条件を用いて分取LC/MSにより精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm粒子；移動相A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25分かけて20~60% B、次いで60% Bで5分間保持；流量：2.0 mL/min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、1.9 mgであり、LCMS分析によるその算出純度は、96%であった。

20

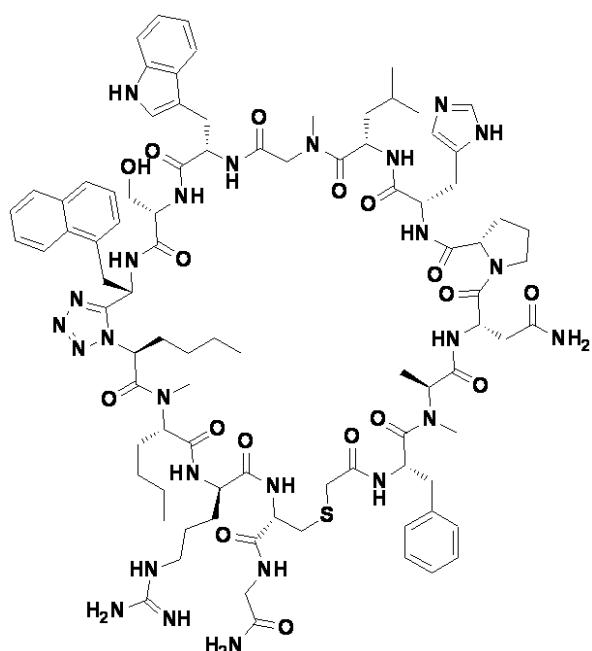
分析LCMS条件D：保持時間 = 1.55 min; ESI-MS (+) m/z 931.90 (M + 2H)

分析LCMS条件E：保持時間 = 1.42 min; ESI-MS (+) m/z 931.60 (M + 2H).

【0358】

実施例1005の製造

【化47】



30

40

実施例テトラゾール1005を、以下の一般的方法からなる実施例1001の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony方法A：樹脂膨潤方法”、“Symphony方法A：標準カップリング方法”、“Symphony方法A：第二級アミンカップリング方法B”、“クロロ酢酸カップリング方法B”、“グロー

50

バル脱保護方法 C ”および“ 環化方法 D ”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25分かけて 25 ~ 65% B、次いで10分間 65% B で保持；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.6 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 98 % であった。

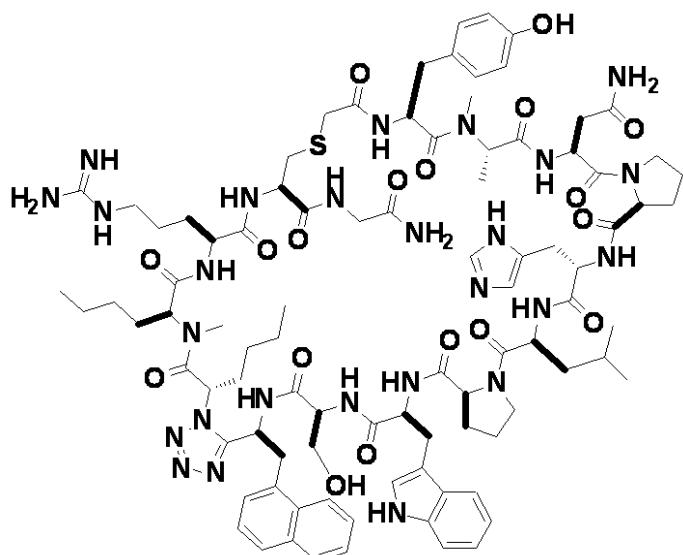
分析 LCMS 条件 D : 保持時間 = 1.83 min ; ESI - MS (+) m/z 937.9 (M + 2 H)

分析 LCMS 条件 E : 保持時間 = 1.76 min ; ESI - MS (+) m/z 938.0 (M + 2 H). 10

【0359】

実施例 1006 の製造

【化48】



20

実施例テトラゾール 1006 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 A : 樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 A : 標準カップリング方法”、“Symphony 方法 A : 第二級アミンカップリング方法 B”、“クロロ酢酸カップリング方法 B”、“グローバル脱保護方法 C ”および“環化方法 D ”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mm, 5 μm粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25分かけて 15 ~ 65% B、次いで5分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.1 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は、96 % であった。

30

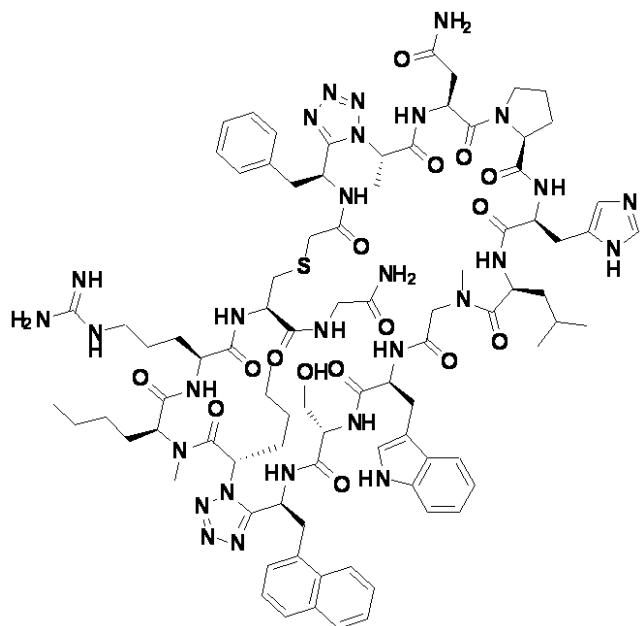
分析 LCMS 条件 D : 保持時間 = 1.69 min ; ESI - MS (+) m/z 959.3 (M + 2 H).

40

【0360】

実施例 1007 の製造

【化49】



10

実施例テラゾール1007を、以下の一般的方法からなる実施例1001の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony方法A：樹脂膨潤方法”、“Symphony方法A：標準カップリング方法”、“Symphony方法A：第二級アミンカップリング方法B”、“クロロ酢酸カップリング方法B”、“グローバル脱保護方法C”および“環化方法D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取LC/MSにより精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm粒子；移動相A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；移動相B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25分かけて15 ~ 65 % B、次いで10分間100 % Bで保持；流量：20 mL/min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は1.4 mgであり、LCMS分析によるその算出純度は100 %であった。

20

分析LCMS条件D：保持時間 = 1.71 min; ESI-MS (+) m/z 943.4 (M + 2 H)

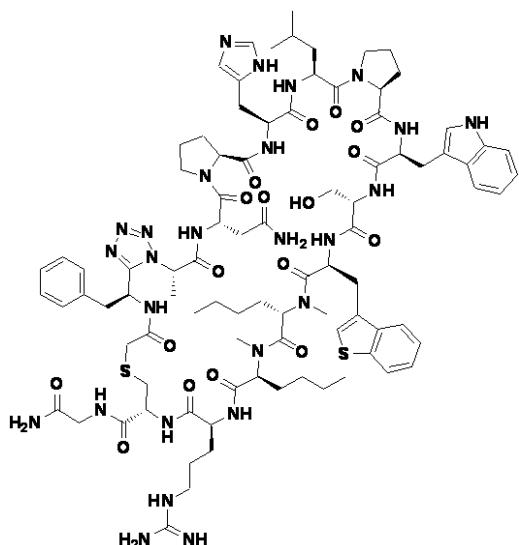
30

分析LCMS条件E：保持時間 = 1.69 min; ESI-MS (+) m/z 943.8 (M + 2 H).

【0361】

実施例1010の製造

【化 5 0】



10

実施例 1010 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成手順に従って Rink 樹脂で製造した：“Symphony 方法 A：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 A：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 A：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 A：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XB ridge C18 300, 19 × 250 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 25 ~ 70% B、次いで 5 分間 100% B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 × 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 25 ~ 70% B、次いで 5 分間 100% B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.9 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 98% であった。

分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.73 min；ESI - MS (+) m/z 954.0 (M + 2 H).

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.67 min；ESI - MS (+) m/z 954.2 (M + 2 H).

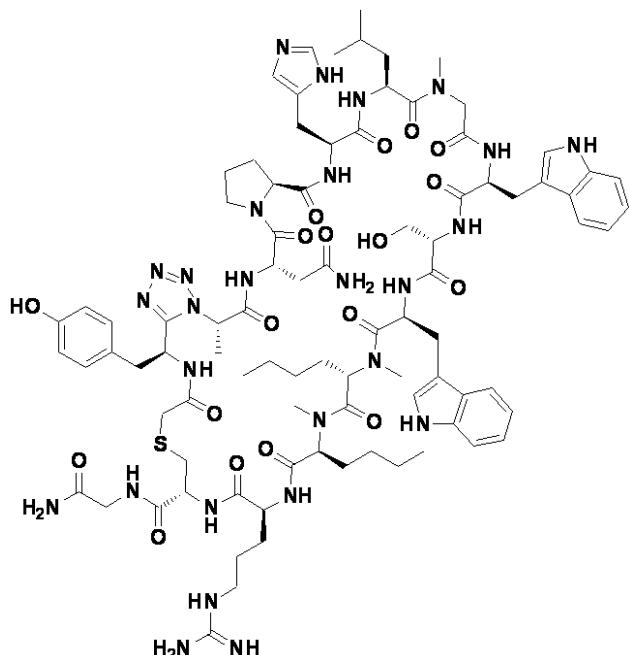
【0362】

実施例 1012 の製造

20

30

【化 5 1】



10

実施例 1012 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成手順に従って Rink 樹脂で製造した：“S y m p h o n y 方法 A：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 A：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 A：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 A：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 200 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 15 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.2 mg であり、LC 30

20

MS 分析によるその算出純度は 100 % であった。

30

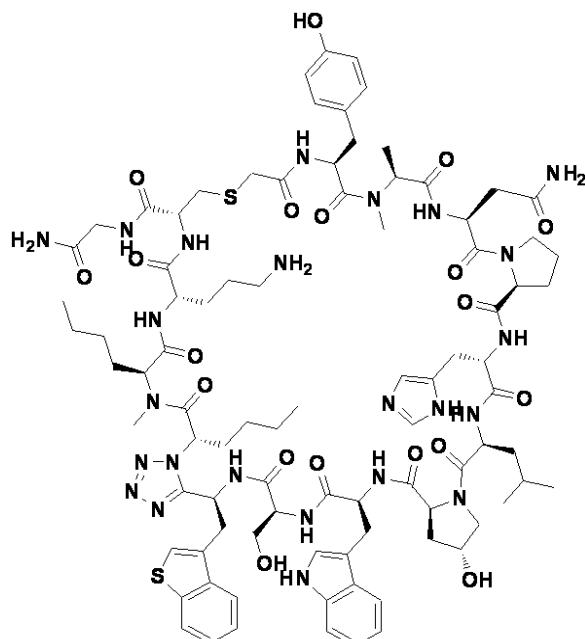
分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.51 min；ESI - MS (+) m/z 940.5 (M + 2 H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.44 min；ESI - MS (+) m/z 940.3 (M + 2 H)。

【0363】

実施例 1013 の製造

【化 5 2】



10

実施例 1013 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Prelude 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Prelude 方法 B：標準カップリング方法”、“Prelude 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Prelude 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Prelude 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 20 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.2 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100 % であった。

分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.54 min；ESI - MS (+) m/z 949.0 (M + 2 H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.50 min；ESI - MS (+) m/z 949.3 (M + 2 H)。

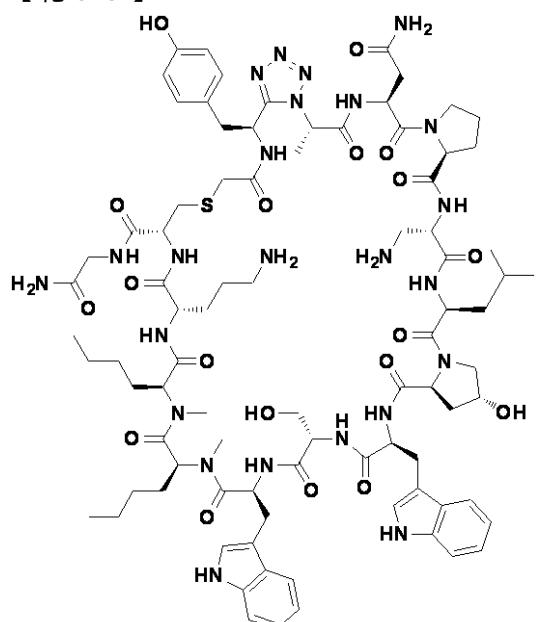
【0364】

実施例 1014 の製造

30

40

【化53】



10

実施例 1014 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“P r e l u d e 方法 B：樹脂膨潤方法”、“P r e l u d e 方法 B：標準カップリング方法”、“P r e l u d e 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“P r e l u d e 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“P r e l u d e 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 15 ~ 60 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 4.8 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は、100 % であった。

分析 L C M S 条件 D：保持時間 = 1.43 min；E S I - M S (+) m/z 914.9 (M + 2 H)。

分析 L C M S 条件 E：保持時間 = 1.43 min；E S I - M S (+) m/z 914.9 (M + 2 H)。

【0365】

実施例 1050 の製造

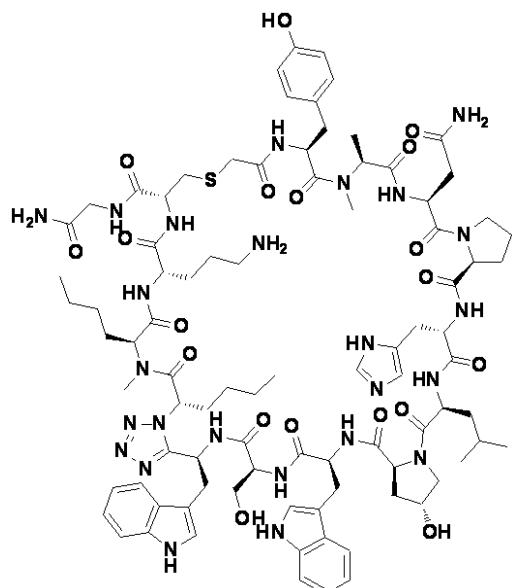
20

30

30

40

【化 5 4】



10

実施例 1050 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成手順に従って Rink 樹脂で製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65% B、次いで 5 分間 100% B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 2.0 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 98% であった。

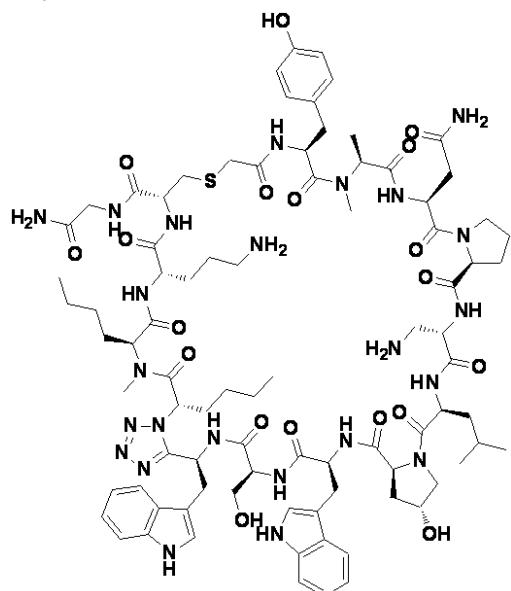
分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.47 min ; ESI - MS (+) m/z 940.3 (M + 2H). 30

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.42 min ; ESI - MS (+) m/z 940.6 (M + 2H).

【0366】

実施例 1051 の製造

【化 5 5】



10

実施例 1051 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成手順に従って Rink 樹脂で製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。
20

粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、1.9 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は、95 % であった。
30

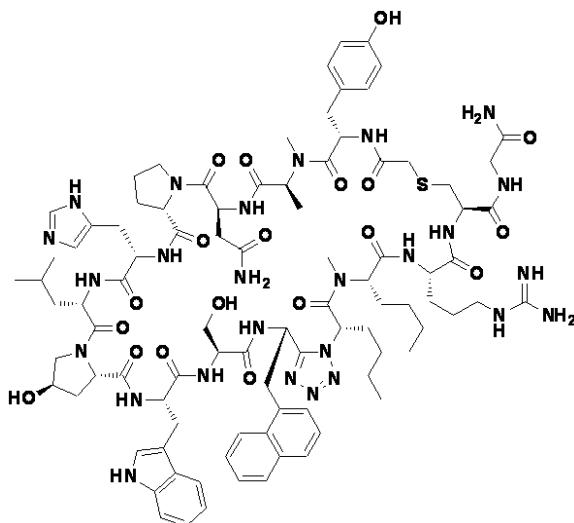
分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.43 min；ESI - MS (+) m/z 914.8 (M + 2 H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.44 min；ESI - MS (+) m/z 915.2 (M + 2 H)。

【0367】

実施例 1052 の製造

【化 5 6】



10

実施例 1052 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C 18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65% B、次いで 5 分間 100% B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 2.4 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 93% であった。

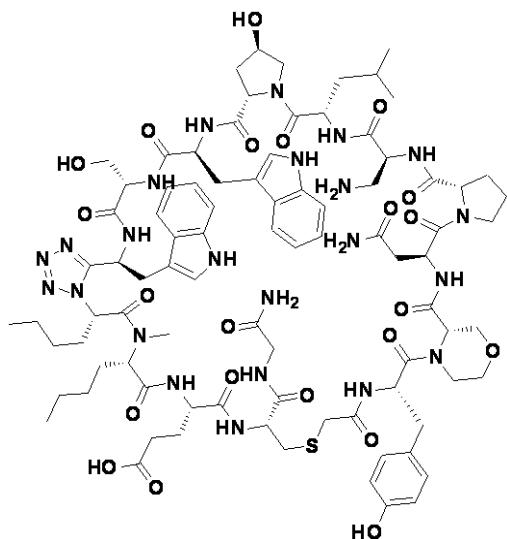
分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.58 min；ESI - MS (+) m/z 967.0 (M + 2 H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.52 min；ESI - MS (+) m/z 966.8 (M + 2 H)。

【0368】

実施例 1053 の製造

【化 5 7】



40

実施例 1053 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S

50

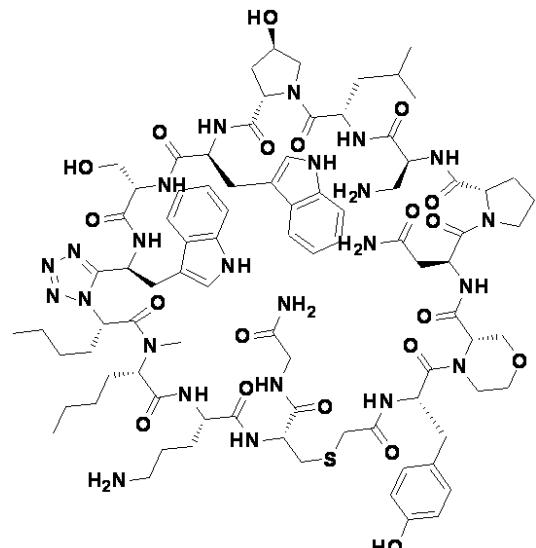
y m p h o n y 方法 B : 標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B : 第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A ”、“S y m p h o n y 方法 B : 最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F ”および“環化方法 D ”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C 18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 4.3 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 91 % であった。分析 LCMS 条件 D : 保持時間 = 1.38 min ; ESI - MS (+) m/z 936.5 (M + 2 H).
10

分析 LCMS 条件 E : 保持時間 = 1.48 min ; ESI - MS (+) m/z 936.1 (M + 2 H).

【0369】

実施例 1054 の製造

【化 58】



20

30

実施例 1054 を、以下の一般的な方法から構成される実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B : 樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B : 標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B : 第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A ”、“S y m p h o n y 方法 B : 最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 D ”および“環化方法 D ”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 250 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 10 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 15 ~ 60 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 2.2 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100 % であった。
40

分析 LCMS 条件 D : 保持時間 = 1.44 min ; ESI - MS (+) m/z 929.0 (M + 2 H).

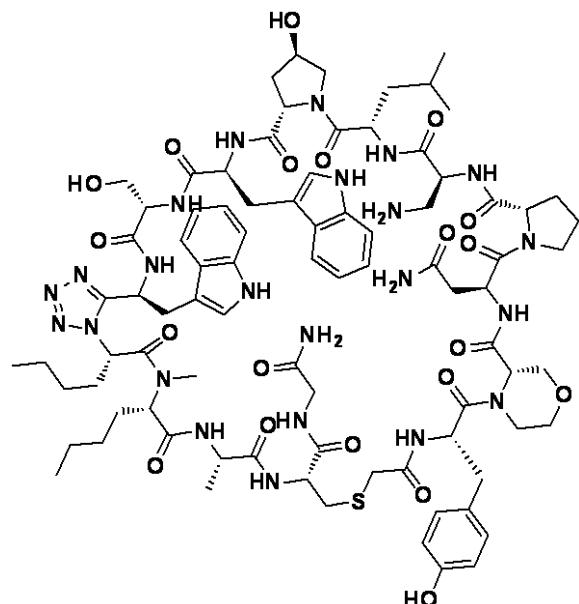
50

分析 L C M S 条件 E : 保持時間 = 1.39 m i n ; E S I - M S (+)m / z 929.0 (M + 2 H).

【 0 3 7 0 】

実施例 1055 の製造

【 化 5 9 】



10

20

実施例 1055 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B : 樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B : 標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B : 第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B : 最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 D ”および“環化方法 D ”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム : Waters XBridge C 18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント : 25 分かけて 15 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量 : 20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により更に精製した：カラム : XBridge C18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント : 25 分かけて 20 ~ 60 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量 : 20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.1 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は 93 % であった。

分析 L C M S 条件 D : 保持時間 = 1.50 m i n ; E S I - M S (+)m / z 907.4 (M + 2 H).

30

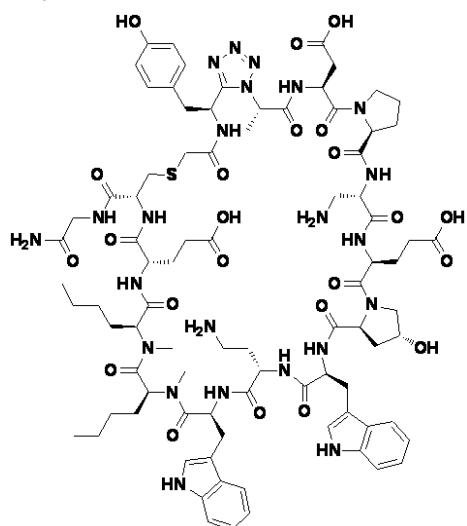
分析 L C M S 条件 E : 保持時間 = 1.49 m i n ; E S I - M S (+)m / z 907.9 (M + 2 H).

40

【 0 3 7 1 】

実施例 1056 の製造

【化 6 0】



10

実施例 1056 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 10.8 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100 % であった。

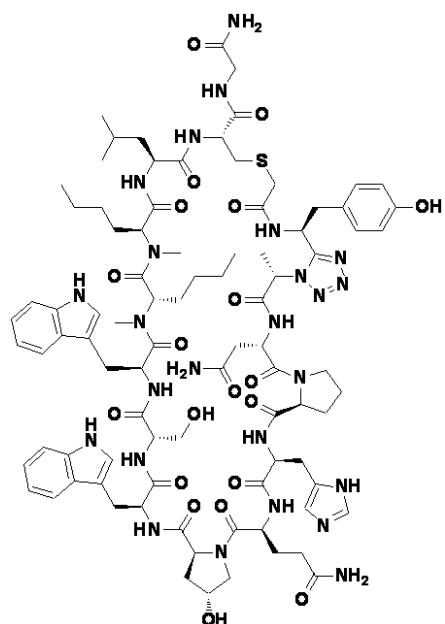
分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.41 min. ; ESI - MS (+) m/z 937.4 (M + 2H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.03 min. ; ESI - MS (+) m/z 936.6 (M + 2H). 30

【0372】

実施例 1057 の製造

【化 6 1】



40

50

実施例 1057 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 45 ~ 85 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 5 ~ 45 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.3 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 97 % であった。

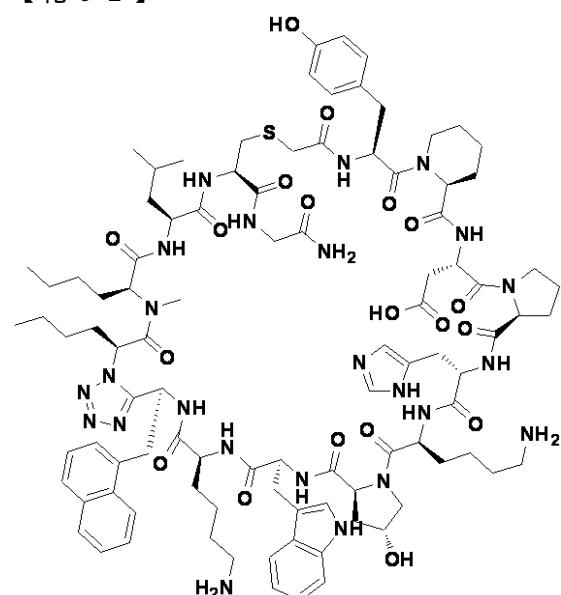
分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.68 min. ; ESI - MS (+) m/z 634.4 (M + 3H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.35 min. ; ESI - MS (+) m/z 947.0 (M + 2H). 20

【0373】

実施例 1058 の製造

【化 62】



実施例 1058 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 50 ~ 90 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わ 40

10

20

30

40

50

せて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 5.7 mg であり、LC MS 分析によるその算出純度は 97 % であった。

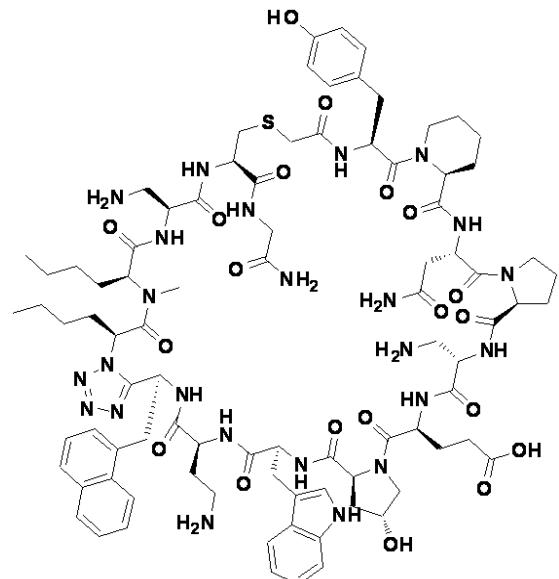
分析 LCMS 条件 H : 保持時間 = 1.81 min. ; ESI - MS (+) m/z 986.9 (M + 2H).

分析 LCMS 条件 I : 保持時間 = 2.50 min. ; ESI - MS (+) m/z 986.8 (M + 2H).

【0374】

実施例 1059 の製造

【化63】



10

20

実施例 1059 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム : XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル : 水 (10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル : 水 (10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント : 30 分かけて 15 ~ 55 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量 : 2.0 mL / min. 目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.6 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 94 % であった。

分析 LCMS 条件 H : 保持時間 = 1.61 min. ; ESI - MS (+) m/z 934.4 (M + 2H).

分析 LCMS 条件 I : 保持時間 = 3.01 min. ; ESI - MS (+) m/z 934.3 (M + 2H).

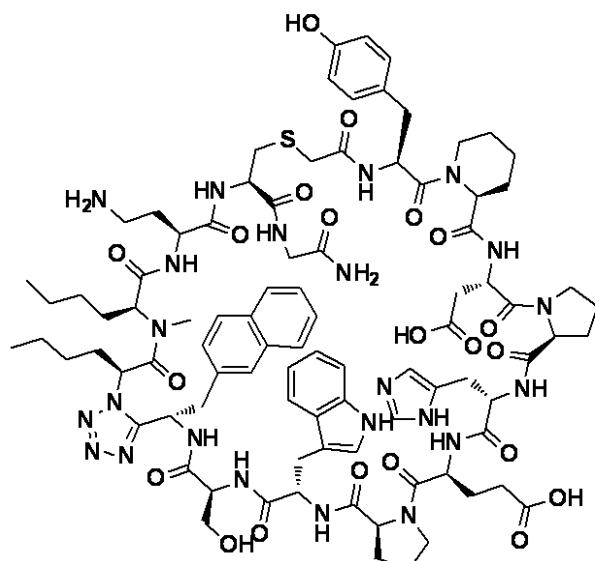
【0375】

実施例 1060 の製造

30

40

【化 6 4】



実施例 1060 を、以下の一般的な方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 10 ~ 50 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.1 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 97 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.52 min. ; ESI - MS (+) m/z 960.9 (M + 2H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.81 min. ; ESI - MS (+) m/z 960.7 (M + 2H).

【0376】

実施例 1061 の製造

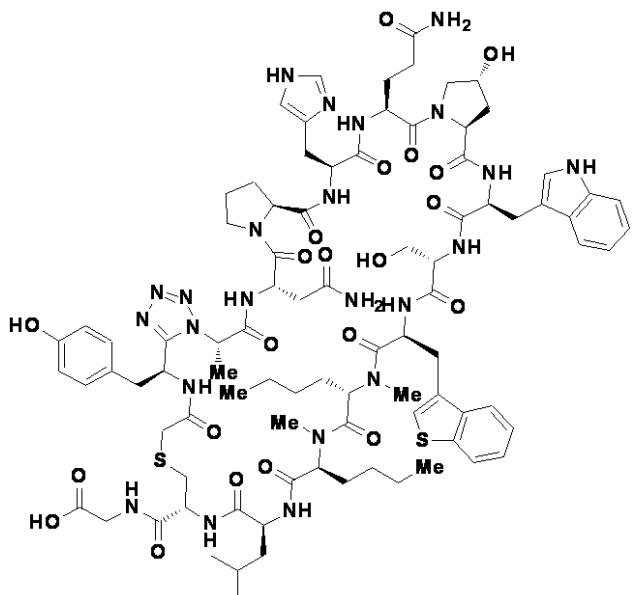
20

30

30

40

【化 6 5】



10

実施例 1061 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“Symphony 方法 B：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 メタノール：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 メタノール：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 50 ~ 100 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル：水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 20 ~ 60 % B、次いで 5 分間 100 % B 保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 14.4 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 96 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H : 保持時間 = 1.54 min. ; ESI - MS (+) m/z 956.3 (M + 2H).

30

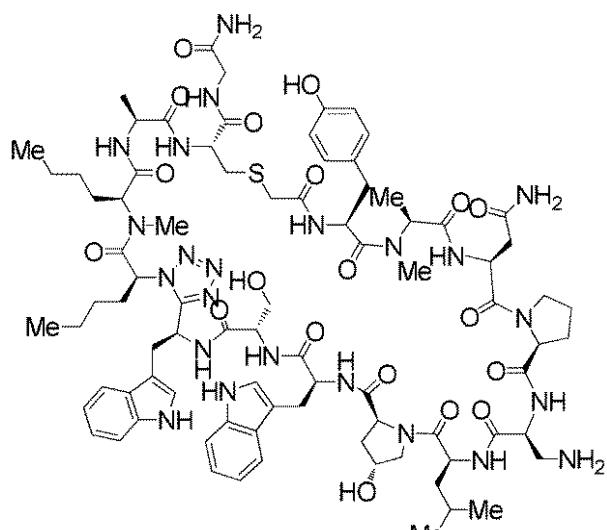
分析 LCMS 条件 I : 保持時間 = 2.84 min. ; ESI - MS (+) m/z 956.8 (M + 2H).

【0377】

実施例 1100 の製造

40

【化 6 6】



分子量 : 1785.04

実施例 1100 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：Waters XBridge C 18, 19 x 250 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：25 分かけて 15 ~ 65 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 5.9 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は 99 % であった。

分析 L C M S 条件 D：保持時間 = 1.53 min ; E S I - M S (+) m/z 893.2 (M + 2 H).

分析 L C M S 条件 E：保持時間 = 1.51 min ; E S I - M S (+) m/z 893.3 (M + 2 H).

【0378】

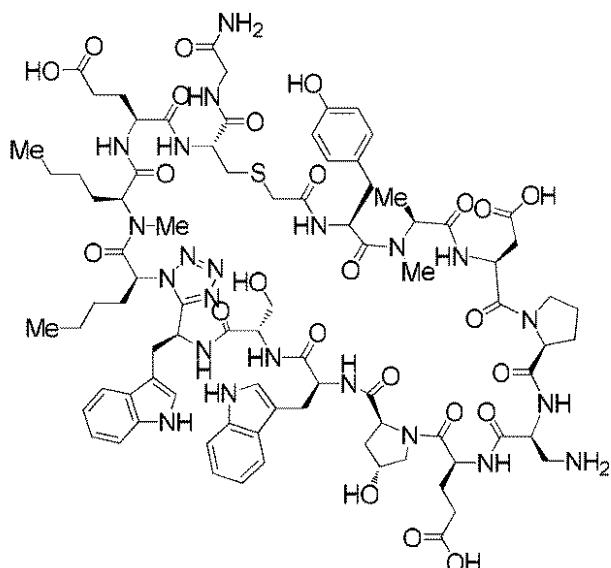
実施例 1101 の製造

10

20

30

【化 6 7】



10

分子量 : 1860.01

実施例 1101 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 35 ~ 75 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.2 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 98 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.404 min；ESI - MS (+) m/z 930.85 (M + 2 H).

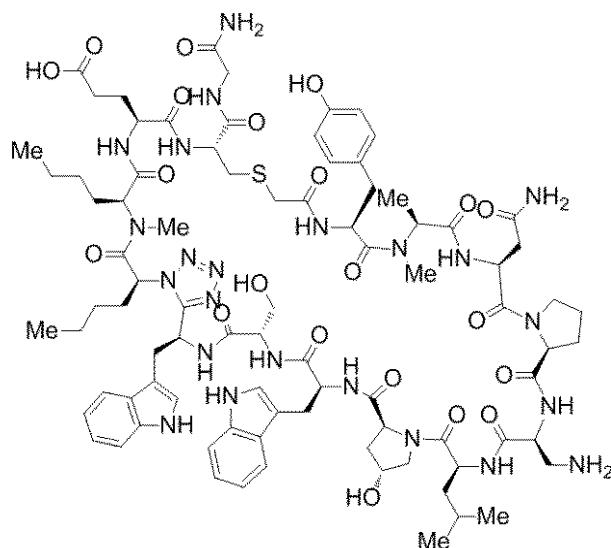
30

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.715 min；ESI - MS (+) m/z 930.90 (M + 2 H).

【0379】

実施例 1102 の製造

【化 6 8】



10

分子量 : 1843.07

実施例 1102 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μ m粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 35 ~ 75 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 19.0 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は 98 % であった。

20

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.796 min；E S I - M S (+) m/z 941.20 ($M + 2H$)。

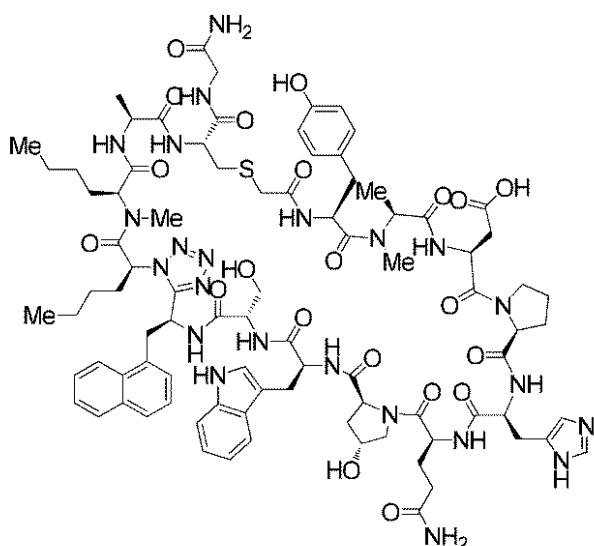
30

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.389 min；E S I - M S (+) m/z 940.95 ($M + 2H$)。

【0380】

実施例 1103 の製造

【化 6 9】



10

分子量 : 1863.06

実施例 1103 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(1.0 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.3 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は 98 % であった。

20

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.60 min；E S I - M S (+) m/z 932.1 (M + 2 H)。

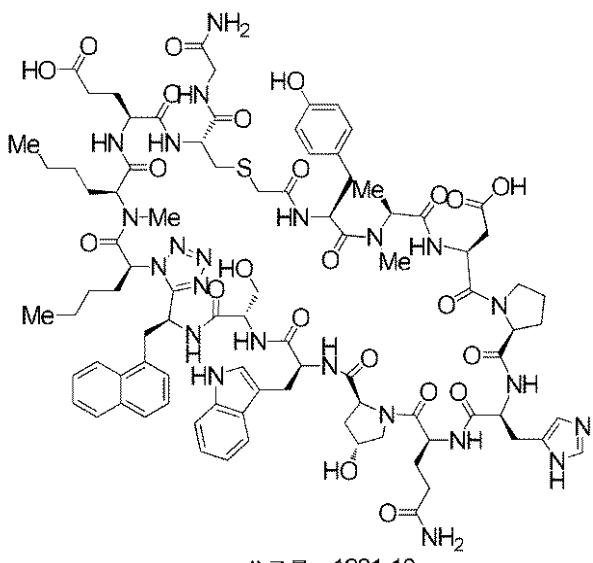
30

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.70 min；E S I - M S (+) m/z 932.8 (M + 2 H)。

【0381】

実施例 1104 の製造

【化 7 0】



分子量 : 1921.10

実施例 1104 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 35 ~ 75 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.8 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は、95 % であった。

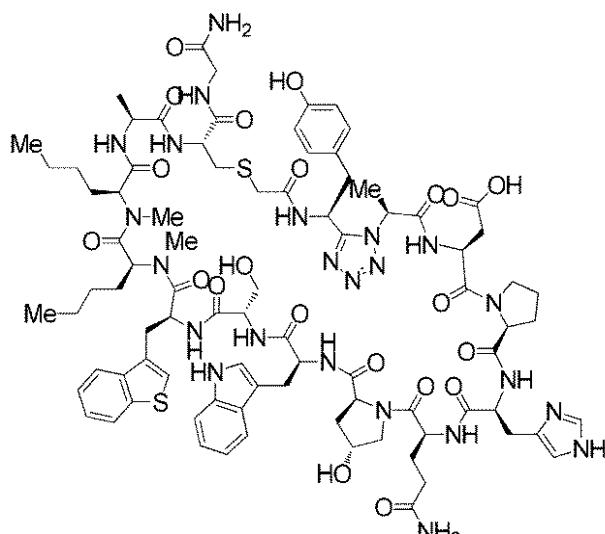
分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.537 min ; ESI - MS (+) m/z 961.6 30
5 (M + 2 H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.988 min ; ESI - MS (+) m/z 961.1
0 (M + 2 H).

【0382】

実施例 1105 の製造

【化71】



分子量 : 1869.09

10

実施例 1105 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：Waters XBridge C18, 19 x 200 mM, 5 μm 粒子；移動相 A：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 10 ~ 55% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 3.9 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 92% であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.622 min；ESI - MS (+) m/z 935.80 (M + 2H)。

30

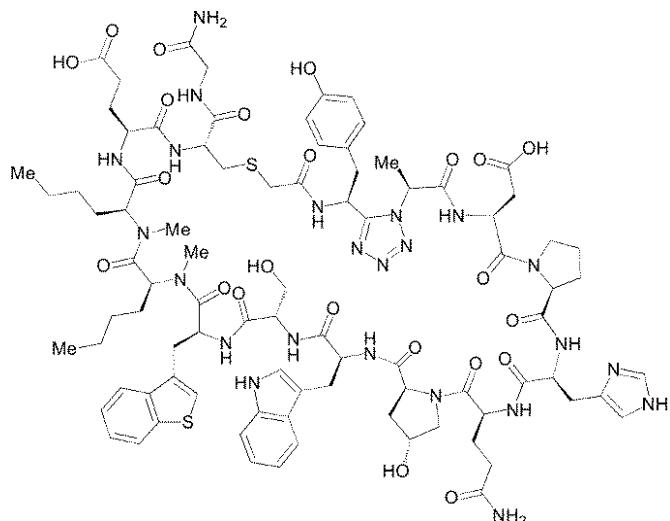
分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 3.125 min；ESI - MS (+) m/z 935.25 (M + 2H)。

【0383】

40

実施例 1106 の製造

【化72】



分子量 : 1927.13

実施例 1106 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 6.5 mg であり、LCM S 分析によるその算出純度は 97 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.419 min；ESI - MS (+) m/z 964.80 (M + 2 H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.875 min；ESI - MS (+) m/z 946.95 (M + 2 H).

【0384】

実施例 1107 の製造

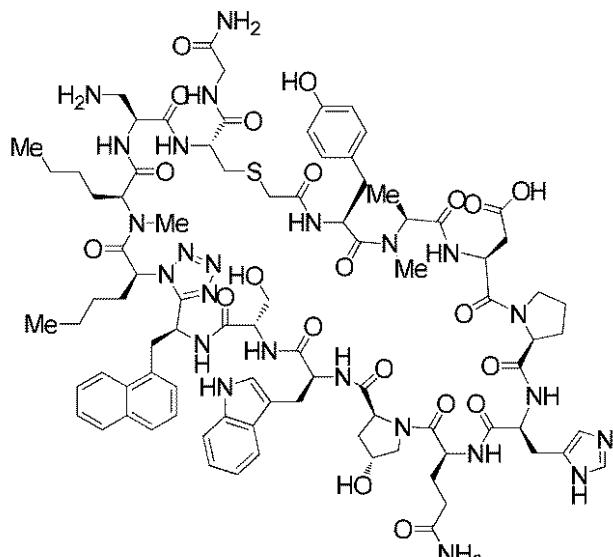
20

30

30

40

【化73】



分子量 : 1878.08

実施例 1107 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 0.8 mg であり、L C M S 分析によるその算出純度は 100% であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.624 min；E S I - M S (+) m/z 939.80 (M + 2 H).

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 3.090 min；E S I - M S (+) m/z 939.85 (M + 2 H).

【0385】

実施例 1108 の製造

10

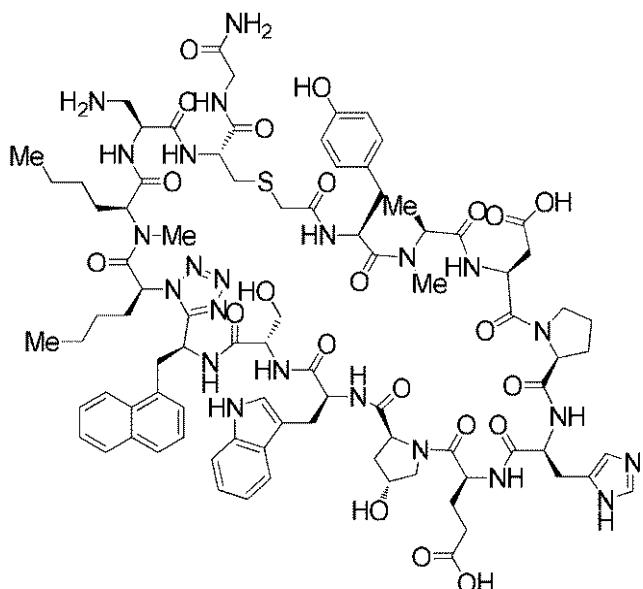
20

30

30

40

【化74】



分子量 : 1879.06

10

実施例 1108 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.0 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100% であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.702 min；ESI - MS (+) m/z 942.90 (M + 2 H).

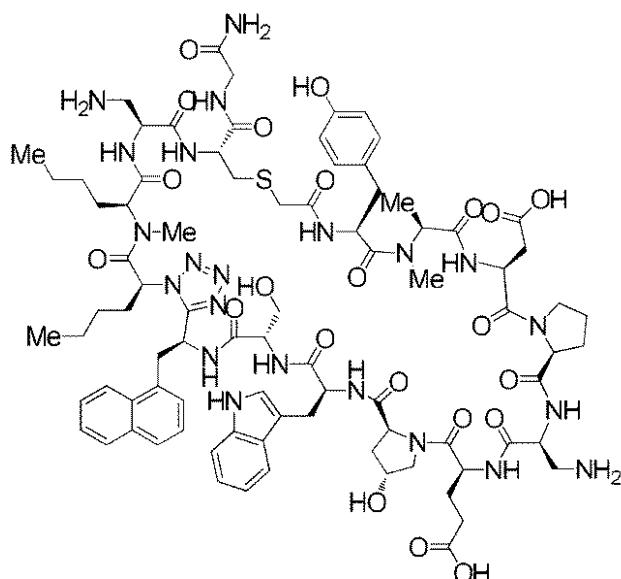
30

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 3.245 min；ESI - MS (+) m/z 942.95 (M + 2 H).

【0386】

実施例 1109 の製造

【化 7 5】



分子量 : 1828.01

実施例 1 1 0 9 を、以下の一般的方法からなる実施例 1 0 0 1 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μ m粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 2.5 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100 % であった。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.73 min；ESI - MS (-) m/z 913.6 (M - 2H).

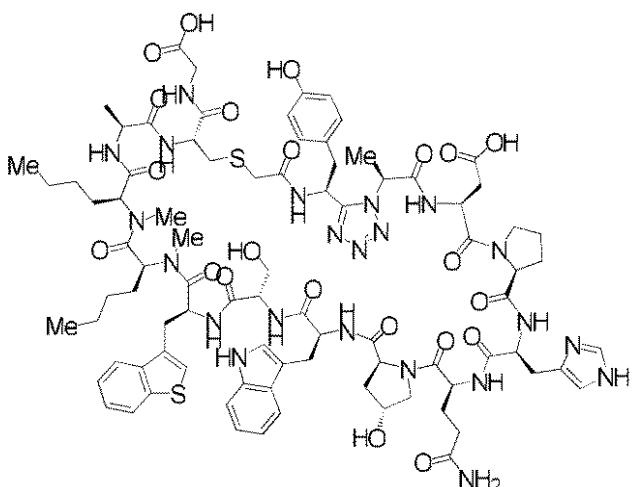
【0387】

実施例 1 1 1 0 の製造

20

30

【化76】



10

分子量 : 1870.07

実施例 1110 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 40 ~ 80 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、4.4 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は、94 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.494 min ; ESI - MS (+) m/z 936.1 30
5 (M + 2 H).

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.966 min ; ESI - MS (+) m/z 935.8
0 (M + 2 H).

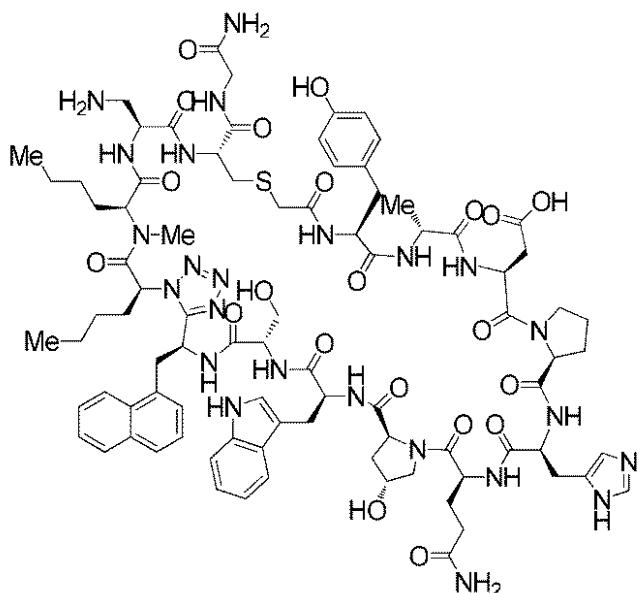
【0388】

実施例 1111 の製造

20

30

【化77】



分子量 : 1864.05

実施例 1111 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 × 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 45 ~ 85 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 19.8 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 99 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.56 min；ESI - MS (+) m/z 933.4 (M + 2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.71 min；ESI - MS (+) m/z 933.4 (M + 2H)。

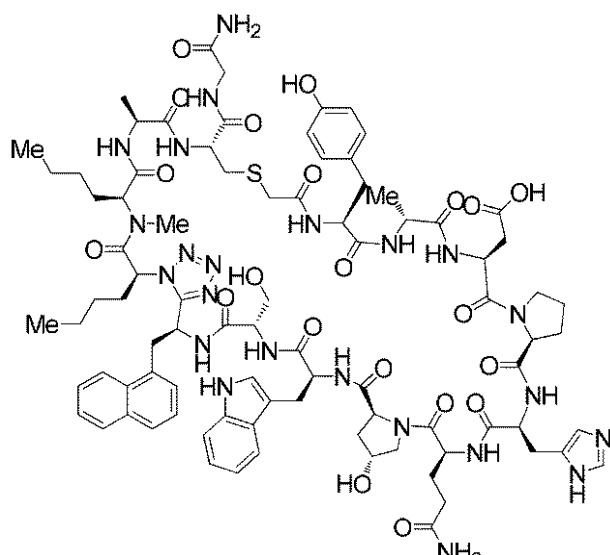
【0389】

実施例 1113 の製造

20

30

【化78】



分子量 : 1849.03

実施例 1113 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“S y m p h o n y 方法 B：樹脂膨潤方法”、“S y m p h o n y 方法 B：標準カップリング方法”、“S y m p h o n y 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“S y m p h o n y 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 45 ~ 85 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 10 ~ 50 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 4.2 mg であり、LCM S 分析によるその算出純度は 98 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.53 min；ESI - MS (+) m/z 926.1 (M + 2 H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.61 min；ESI - MS (+) m/z 925.8 (M + 2 H)。

【0390】

実施例 1114 の製造

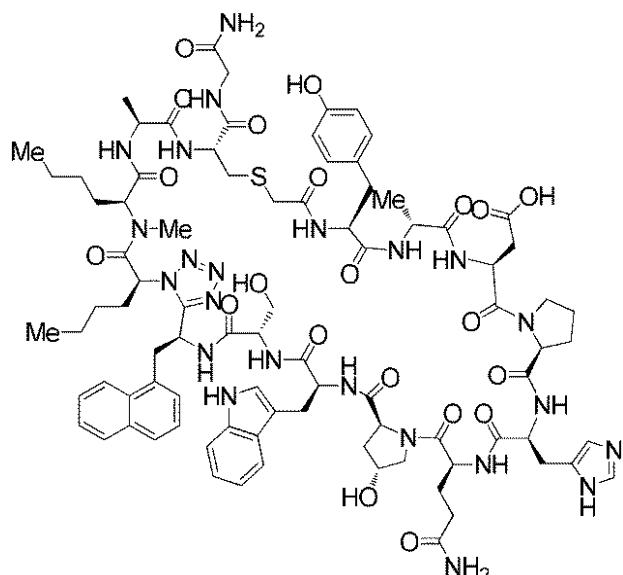
10

20

30

40

【化 7 9】



10

実施例 1114 を、一般的な方法の実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成手順に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 メタノール：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 45 ~ 85 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 15 ~ 55 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 11.0 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 98 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.57 min；ESI - MS (+) m/z 925.9 (M + 2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.65 min；ESI - MS (+) m/z 925.8 (M + 2H)。

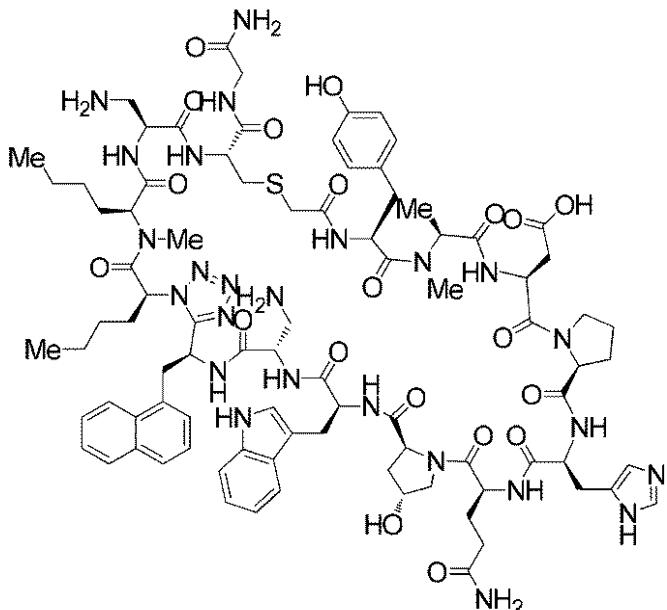
30

【0391】

40

実施例 1115 の製造

【化 8 0】



分子量 1877.09

10

30

実施例 1115 を、以下の一般的方法からなる実施例 1001 の製造のために記述した一般的な合成方法に従って製造した：“Symphony 方法 B：樹脂膨潤方法”、“Symphony 方法 B：標準カップリング方法”、“Symphony 方法 B：第二級アミンカップリング方法”、“マニュアルカップリング方法 A”、“Symphony 方法 B：最終キャッピング方法”、“グローバル脱保護方法 F”および“環化方法 D”。粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 メタノール : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；移動相 B : 95 : 5 メタノール : 水(10 mM 酢酸アンモニウムを含む)；グラジエント：30 分かけて 45 ~ 90 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により更に精製した：カラム：XBridge C18, 19 x 200 mm, 5 μm 粒子；移動相 A : 5 : 95 アセトニトリル : 水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B : 95 : 5 アセトニトリル : 水(0.1 % トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：30 分かけて 10 ~ 50 % B、次いで 5 分間 100 % B で保持する；流量：20 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は 1.2 mg であり、LCMS 分析によるその算出純度は 100 % であった。

分析 L C M S 条件 H : 保持時間 = 1.60 min ; E S I - M S (+) m / z 938.3 (M - 2H).

分析 LCMS 条件 I : 保持時間 = 2.80 min ; ESI - MS (+) m/z 940.3 (M + 2H).

[0 3 9 2]

分析データ：

質量スペクトル分析法：“ESI-MS(+)”とは、ポジティブイオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-MS(-)”とは、ネガティブイオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-HRMS(+)”とは、ポジティブイオンモードで実施した高分解エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す；“ESI-HRMS(-)”とは、ネガティブイオンモードで実施した高分解エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は、“ m/z ”単位表記に従って報告された。1000より

大きい精密質量を有する化合物は、二重電荷イオンまたは三重電荷イオンとして高頻度で検出された。

【0393】

高分解質量スペクトル分析法(H R M S)分析を、25,000(最大高の半分で全幅, F W H M)にて操作するポジティブまたはネガティブエレクトロスプレーイオン化を用いてフーリエ変換オービトラップ型質量分析(Exactive, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)上で行なった。機器を、製造者仕様書に従って常に校正を行い、質量精度の誤差<5 ppmを得た。オペレーティングソフトウェアであるXcaliburを使用して、理論的質量対電荷値を計算して、得られたデータを処理した。

【0394】

10

分析L C M S条件A:

カラム: BEH C18, 2.1 x 50 mM, 1.7 μm粒子; 移動相A: 水(0.05% TFAを含む); 移動相B: アセトニトリル(0.05% TFAを含む); 温度: 50; グラジェント: 1分かけて2% B ~ 98% B、次いで0.5分間98% Bで保持; 流量: 0.8 mL/min; 検出: 220 nmのUV.

【0395】

20

分析L C M S条件D:

カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mM, 1.7 μm粒子; 移動相A: 5:95アセトニトリル:水(10 mM酢酸アンモニウムを含む); 移動相B: 95:5アセトニトリル:水(10 mM酢酸アンモニウムを含む); 温度: 50; グラジェント: 3分かけて0~100% B、次いで100% Bで0.75分間保持; 流量: 1.11 mL/min; 検出: 220 nmのUV.

【0396】

20

分析L C M S条件E:

カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mM, 1.7 μm粒子; 移動相A: 5:95アセトニトリル:水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む); 移動相B: 95:5アセトニトリル:水(0.1%トリフルオロ酢酸を含む); 温度: 50; グラジェント: 3分かけて0~100% B、次いで100% Bで0.75分間保持; 流量: 1.11 mL/min; 検出: 220 nmのUV.

【0397】

30

一般的な方法:

C E M方法A:

全ての操作を、CEMリバティーマイクロウェーブ合成器(CEM Corporation)上のオートメーション下において実施した。別段の記載が無ければ、全ての方法を、CEMディスクバリーマイクロウェーブ装置に底部フリットを取り付けた30または125 mLのポリプロピレンチューブ内で実施した。このチューブは、チューブの底部と上部の双方を介してCEMリバティー合成器と連結している。DMFおよびDCMは、チューブの上部および底部から加えられることができ、チューブ側面を均等に洗い流すことができる。全ての溶液を、上部から樹脂を移すことを除いて、チューブの底部から除去した。“周期的バブリング”とは、底部フリットからのN₂ガスの短時間のバブリングをいう。アミノ酸溶液を、一般的には、調整してから3週間を過渡しては使用しない。HATU溶液を、調製5日以内で使用した。DMF=ジメチルホルムアミド; HCTU=2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム; HATU=1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩; DIPEA=ジイソプロピルエチルアミン; Sieber=Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、この“3-イルオキシ”的場所は、ポリスチレン樹脂への結合性に関する位置およびタイプを示す。使用した樹脂は、Sieberリンカー(窒素でFmoc保護された)を有するMerrifieldポリマー(ポリスチレン); 100~200 メッシュ、1%DVB、0.71 mmol/g ローディングである。使用した一般的なアミノ酸を、下記に挙げた(側鎖保護基は

40

50

括弧内に示した)。

Fmoc - Ala - OH ; Fmoc - Arg(Pbf) - OH ; Fmoc - Asn(Trt) - OH ; Fmoc - Asp(OtBu) - OH ; Fmoc - Bzt - OH ; Fmoc - Cys(Trt) - OH ; Fmoc - Dab(Boc) - OH ; Fmoc - Dap(Boc) - OH ; Fmoc - Gln(Trt) - OH ; Fmoc - Gly - OH ; Fmoc - His(Trt) - OH ; Fmoc - Hyp(tBu) - OH ; Fmoc - Ile - OH ; Fmoc - Leu - OH ; Fmoc - Lys(Boc) - OH ; Fmoc - Nle - OH ; Fmoc - Met - OH ; Fmoc - [N-Me]Ala - OH ; Fmoc - [N-Me]Nle - OH ; Fmoc - Phe - OH ; Fmoc - Pro - OH ; Fmoc - Sar - OH ; Fmoc - Ser(tBu) - OH ; Fmoc - Thr(tBu) - OH ; Fmoc - Trp(Boc) - OH ; Fmoc - Tyr(tBu) - OH ; Fmoc - Val - OH.

【0398】

“CEM方法A”の方法は、0.100mmolスケールで実施した実験を記述しており、このスケールは、樹脂に結合したSieberリンクマーの量により決定される。このスケールは、約140mgの上記Sieber-Merrifield樹脂に対応する。全ての方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100mmolのスケールを超えて拡大できる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、“樹脂膨潤方法”として下記に述べた樹脂膨潤方法を用いて開始する。アミノ酸と第一級アミンN末端のカップリングには、下記に記載した“単カップリング方法”を用いた。アミノ酸と第二級アミンN末端とのカップリングは、下記に述べた“第二級アミンカップリング方法”を用いた。クロロアセチル基とペプチドのN-末端とのカップリングは、上記“クロロアセチルクロリドカップリング方法”または“クロロ酢酸カップリング方法”により詳述される。

【0399】

樹脂膨潤方法：

50mLポリプロピレンコニカルチューブに、Merrifield : Sieber樹脂(140mg, 0.100mmol)を加えた。次いで、DMF(7mL)をチューブに加えて、その後DCM(7mL)を加えた。次いで、樹脂を反応容器に容器の上部から移した。方法を、更に2回繰り返した。DMF(7mL)を加えて、その後DCM(7mL)を加えた。樹脂を、15分間反応容器の底部からN₂バーリングにより膨潤させて、その後溶媒を、フリットを通して排出した。

【0400】

標準カップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HATU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)およびDIPPEA(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。混合物を、50℃でカップリングされるFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHを除いた全てのアミノ酸について、75℃で5分間、N₂バーリングにより混合した。反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10:1:89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、65℃で2分間周期的にバーリングした。次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工

程において直接使用した。

【0401】

ダブルカップルカップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HATU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)およびDIPPEA(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。
10
混合物を、50℃でカップリングされるFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHを除いた全てのアミノ酸について、75℃で5分間、N₂バブリングにより混合した。反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は上部から、次いでDMF(7mL)により底部から、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、アミノ酸(DMF中で0.2M, 2.5mL, 5eq)、HATU(DMF中で0.5M, 1.0mL, 5eq)およびDIPPEA(NMP中で2M, 0.5mL, 10eq)を加えた。混合物を、50℃でカップリングされるFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHを除いた全てのアミノ酸について、75℃で5分間、N₂バブリングにより混合して、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10:1:89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、65℃で2分間周期的にバブリングした。次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
20

【0402】

カスタムアミノ酸 - カップリング方法：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)の溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、HATU(2.5eq～10eq)を含有するアミノ酸溶液(1.25mL～5mL, 2.5eq～10eq)を加えて、最後にDIPPEA(NMP中で2M, 0.5mL～1mL, 20eq)を加えた。混合物を、25℃～75℃で5分間～2時間N₂バブリングにより混合して、次いで該反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。反応容器に、無水酢酸：DIEA：DMF(10:1:89v/v/v, 5.0mL)溶液を加えた。混合物を、65℃で2分間周期的にバブリングして、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：DMF(7mL)は、上部から洗い、次いでDMF(7mL)により底部から洗い、最後にDMF(7mL)を用いて上部から洗った。得られる樹脂を、次工程において直接使用した。
40

【0403】

クロロアセチルクロリドカップリング方法A：

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：DMF(20:80v/v, 5.0mL)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排
50

出した。反応容器に、ピペリジン：D M F (2 0 : 8 0 v / v , 5 . 0 m L)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4 . 0 m L)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、D I P E A 溶液(4 . 0 m m o l , 0 . 6 9 9 m L , 4 0 e q)(3 . 0 m L)およびクロロ塩化アセチル(2 . 0 m m o l , 0 . 1 6 0 m L , 2 0 e q)/ D M F を加えた。混合物を、12～18時間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4 . 0 m L)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、C H₂C l₂ (2 . 0 m L)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

【 0 4 0 4 】

クロロ酢酸カップリング方法 A :

先の工程からの樹脂を含有する反応容器に、ピペリジン：D M F (2 0 : 8 0 v / v , 5 . 0 m L)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：D M F (2 0 : 8 0 v / v , 5 . 0 m L)を加えた。混合物を、3分間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記のように5回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4 . 0 m L)を、容器の上部を通して加えて、得られる混合物を、30秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、D M F (2 . 0 m L)、クロロ酢酸(1 . 2 m m o l , 1 1 3 m g , 1 2 e q)およびN, N' - ジイソプロピルカルボジイミド(1 . 2 m m o l , 0 . 1 8 7 m L , 1 2 e q)を加えた。混合物を、12～18時間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに3回連続的に洗った：各洗いについて、D M F (4 . 0 m L)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、下記の通りに4回連続的に洗った：各洗いについて、C H₂C l₂ (2 . 0 m L)を、容器の上部に加えて、得られる混合物を、90秒間周期的に混合して、次いで溶液をフリットから排出した。

【 0 4 0 5 】

グローバル脱保護方法 B :

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“グローバル脱保護方法 B ”の方法は、0.100 m m o l スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、樹脂に結合したS i e b e r リンカーの量により決定される。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.100 m m o l のスケールを超えて拡大できる。“脱保護溶液”を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール(9 4 : 3 : 3 , v : v : w)を用いて調整した。樹脂を、反応容器から除去して、フリットを備えた25mLシリングに移した。このシリングに、“脱保護溶液”(5 . 0 m L)を加えた。混合物を、シェーカー内で5分間混合した。溶液を濾過して、ジエチルエーテル(3 0 m L)で希釈した。沈殿した固体を、3分間遠心分離した。上清溶液をデキサンテーションして、固体をジエチルエーテル(2 5 m L)に再懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションし、残存固体をジエチルエーテル(2 5 m L)に懸濁した。懸濁液を、3分間遠心分離した。上清をデキサンテーションして、残存固体を高真空下で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色～オフホワイトの固体として得た。

【 0 4 0 6 】

環化方法 C :

全ての操作を、別段の記載が無ければ手動により実施した。“環化方法 C ”の方法は、0.100 m m o l スケールで行った実験を述べたものであり、このスケールは、ペプチドを生成するために使用した樹脂に結合したS i e b e r リンカーの量により決定される。このスケールは、本方法において使用したペプチドの量の直接的な決定には基づくものではない。この方法は、記載した体積をスケールの倍数で調整することにより、0.10

0 mmol のスケールを超えて拡大できる。粗製ペプチド固体を、アセトニトリル：溶液 : 0.1 M アンモニウム重炭酸塩緩衝水溶液(11 mL : 24 mL)に溶解し、次いでこの溶液を、NaOH(1.0 M)水溶液を用いて、pH = 8.5 ~ 9.0 に注意深く調整した。次いで、溶液を、12 ~ 18 時間シェーカーを用いて混合した。反応溶液を濃縮して、次いで残留物を、アセトニトリル：水に溶解した。この溶液を、逆相 HPLC 精製に付して、目的とする環状ペプチドを得た。

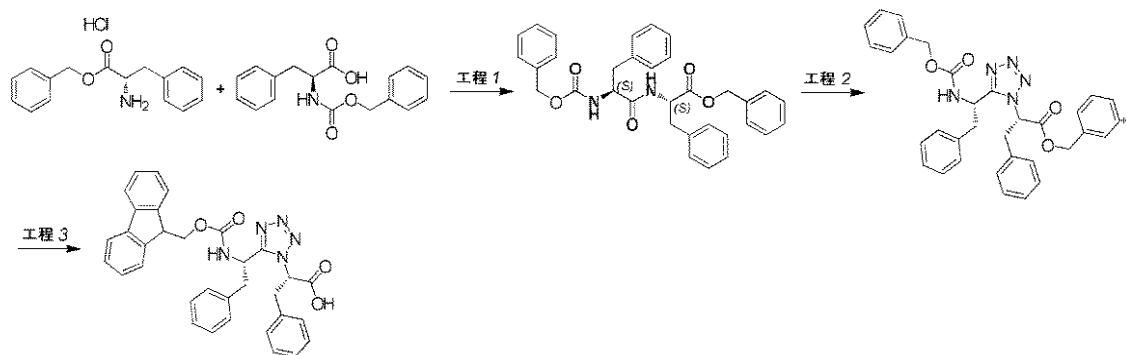
【0407】

(S)-2-((S)-1-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2-フェニルエチル-1H-テトラゾール-1-イル)-3-フェニルプロパン酸[Fmoc-Phe-CN₄-L-Phe-OH]の製造

10

スキーム：

【化81】



20

ステップ1：

L-フェニルアラニンベンジルエステル塩酸塩(2 g, 6.85 mmol)、Z-Phe-OH(2.257 g, 7.54 mmol)、DIPEA(2.99 mL, 17.14 mmol)およびDCM(100 mL)の溶液を、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(1.120 g, 8.23 mmol)およびEDC(1.577 g, 8.23 mmol)で処理して、室温で15時間攪拌した。混合物を、飽和NaHCO₃(2 × 100 mL)、1 M HCl(2 × 50 mL)および塩水(50 mL)で洗い、乾燥させて(Na₂SO₄)、減圧濃縮して、(S)-ベンジル-2-((S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-フェニルプロパンアミド)-3-フェニルプロパノエート(3.2 g, 5.96 mmol, 87% 収量)を白色固体として得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.42 - 7.11(M, 21H)、4.96(d, J = 2.0 Hz, 4H)、4.63 - 4.45(M, 1H)、4.06 - 3.91(M, 2H)、3.34 - 2.96(M, 3H)、2.85(br.s., 4H)。

30

【0408】

ステップ2(Schroeder, G. M.; Marshall, S.; Wan, H.; Purandare, A. V. Tetrahedron Lett. 2010, 51, 1404-1406.)：

圧力バイアルに、N₂下において、THF(9.32 mL)中の(S)-ベンジル-2-((S)-2-(((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-3-フェニルプロパンアミド)-3-フェニルプロパノエート(1.0 g, 1.864 mmol)およびジフェニル-2-ピリジルホスフィン(3.17 g, 7.45 mmol)を入れた。溶液を、N₂でバージして、その後DIA(D(1.449 mL, 7.45 mmol))を滴加した。反応溶液を5分間攪拌した。次いで、ジフェニルホスホリルアジド(1.606 mL, 7.45 mmol)を、30分かけて滴加した。添加が完了した後に、もはや窒素形成がなく、密封チューブを閉めて、反応溶液を55℃で4時間攪拌した。

40

反応溶液をRTに冷却して、酢酸エチル(200 mL)に注ぎ入れて、冷1N HCl(100 mL)、飽和NaHCO₃(100 mL)および塩水(100 mL)で洗った。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させて、濾過して、濃縮して、橙色の油状物を得た。溶離液

50

として 100% ヘキサンから 60% 酢酸エチル / ヘキサンを用いるシリカゲルクロマトグラフィーによる精製により、低い純度にて (S) - ベンジル - 2 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - フェニルエチル - 1 H - テトラゾール - 1 - イル - 3 - フェニルプロパノエート (660 mg) を得た。以下の条件を用いる分取 HPLC による第二の精製：カラム：Phenomenex Luna 5u C18(2)100A 250 x 21.2mm AXIA packed (10 - 100 mg) # 520551 - 2。移動相 A : 0.1 TFA / 水；移動相 B : 0.1% TFA / アセトニトリル；グラジエント：20 分かけて 50 ~ 80% B、次いで 10 分間のグラジエント 95% B；流量：1.5 mL / min；検出：220 nm の UV。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。(S) - ベンジル - 2 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - フェニルエチル - 1 H - テトラゾール - 1 - イル - 3 - フェニルプロパノエートを、肌色の吸湿性固体として、LC / MS 分析により 60.0 mg の収量 (70% 純度) にて得た。分析条件 A : 保持時間 = 1.82 分；ESI - MS (+) m/z 562.5 (M + H). 10

ステップ 3 :

(S) - ベンジル - 2 - ((S) - 1 - (((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - フェニルエチル - 1 H - テトラゾール - 1 - イル - 3 - フェニルプロパノエート (60 mg, 0.107 mmol) / MeOH (534 μL) の溶液を、ラテックスバルーンからの水素を 2 時間用いて、10% パラジウム炭素 (22.74 mg, 0.021 mmol) 上で水素化した。触媒を濾去して、濾液を減圧濃縮して、白色ゴム状固体を得た。生成物を、MeCN (2 mL) および水 (2 mL) および Et₃N (100 μL) に溶解して、Fmoc - OSu (36.0 mg, 0.107 mmol) で処理した。混合物を、rt で 15 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (50 mL) で希釈して、1 M HCl (2 x 20 mL) および塩水 (20 mL) で洗い、乾燥させて (Na₂SO₄)、減圧濃縮して、Fmoc - Phe [CN₄] - L - Phe - OH [(S) - 2 - ((S) - 1 - (((9H - フルオレン - 9 - イル)メトキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - フェニルエチル] - 1 H - テトラゾール - 1 - イル - 3 - フェニルプロパン酸] (42 mg, 0.075 mmol, 70% 収量) を黄色固体として得た。生成物の純度を、LC / MS 分析により算出すると 64% であった。 20

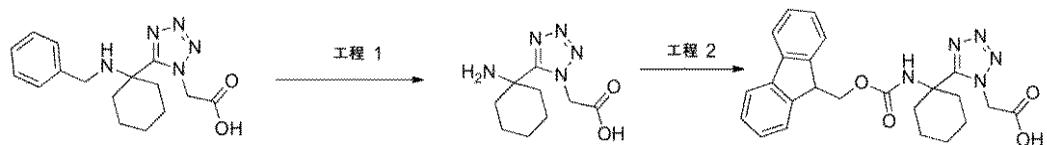
分析 LCMS 条件 A : 保持時間 = 1.70 min；ESI - MS (+) m/z 560.5 (M + H). 30

【0409】

2 - ((5 - (1 - (((9H - フルオレン - 9 - イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)シクロヘキシリル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル) 酢酸 [Fmoc - Ac_cc₆[CN₄] - Gly - OH の製造

スキーム：

【化 82】



ステップ 1.

2 - ((5 - (1 - (ベンジルアミノ)シクロヘキシリル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル) 酢酸 (Cambridge; CAS No. 915920-47-7) (0.500 g, 1.585 mmol) / MeOH (7.48 mL) の溶液を、ラテックスバルーンからの水素を 16 時間用いて 10% パラジウム炭素 (0.675 g, 0.634 mmol) 上で水素化した。触媒を、DCM で洗いながら、珪藻土 (Celite^{登録商標}) 上で濾去して、得られる溶液を減圧能濃縮した。 40

【0410】

ステップ 2

0 に冷却したステップ 1 からの粗製アミノ酸 / アセトニトリル : (3.74 mL)、水 (50

3.74 mL)およびトリエチルアミン(0.221 mL, 1.585 mmol)の溶液に、(9H-フルオレン-9-イル)メチル(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート(0.535 g, 1.585 mmol)を加えて、反応混合物を0℃で4時間攪拌した。この溶液をEtOAcに希釈して、1N HClおよび塩水で洗い、無水Na₂SO₄上で乾燥させて、減圧下において黄色の油状物に濃縮した。これを0~100% EtOAc/ヘキサンのグラジエントを用いるフラッショクロマトグラフィーにより精製した。カラムを、30% MeOH/DCMを用いて洗い、生成物を完全に溶出した。目的とする生成物を含有する画分をプールして、減圧濃縮して、生成物を褐色固体として116 mg(16%全収量)を得た。生成物の純度は、LC/MS分析によりほぼ100%であると算出された。

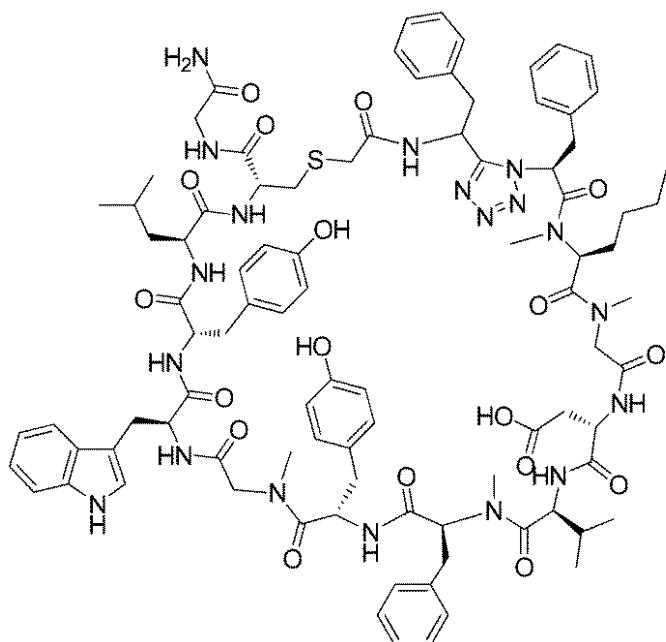
10

分析LCMS条件A：保持時間=1.45 min; ESI-MS(+)m/z 448.0 (M+H).

【0411】

実施例3001および3002の製造

【化83】



20

30

実施例 3001 および 3002

実施例3001および3002を、下記の一般的な合成手順に従って製造した。

50 mLポリプロピレンチューブに、Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)を加えて、このチューブを、CEMリバティーマイクロウェーブペプチド合成器上に静置した。次いで、以下の方法を順に行なった：

“CEM方法A：樹脂膨潤方法”を行なった；

40

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Gly-OHを用いて行なった；

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Cys(Trt)-OHを用いて行なった；

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Leu-OHを用いて行なった；

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Tyr(tBu)-OHを用いて行なった；

“CEM方法A：標準カップリング方法”を、Fmoc-Tyr(tBu)-OHを用いて行なった；

50

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - S a r - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - T y r (t B u) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - [N - M e] P h e - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : カスタムアミノ酸 - カップリング方法 ” を、 75 °で 2 時間、 10 eq で F m o c - V a l - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - A s p (O t B u) - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : 標準カップリング方法 ” を、 F m o c - S a r - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : カスタムアミノ酸 - カップリング方法 ” を、 5 eq を用いて 10 分間、 F m o c - [N - M e] N l e - O H を用いて行なった ;

“ C E M 方法 A : カスタムアミノ酸 - カップリング方法 ” を、 5 eq で 10 分間 F m o c - P h e [C N ₄] - L - P h e - O H を用いて行なった ; “ クロロアセチルクロリドカップリング方法 A ” を行ない、“ グローバル脱保護方法 B ” を行ない、“ 環化方法 C ” を行なった。

【 0 4 1 2 】

実施例 3 0 0 1 , アイソマー 1

粗製物質を、以下の条件を用いて分取 L C / M S により精製した：カラム : Phenomenex Luna 5u C18(2)250 x 21.2 AXIA, 100A Ser. #520221-1 ; 移動相 A : 0.1 % T F A / 水 ; 移動相 B : 0.1 % T F A / アセトニトリル ; グラジエント : 50 分かけて 35 ~ 75 % B 、次いで 5 分間、 95 % B までのグラジエント ; 流量 : 1.5 mL / min 。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバポレーションにより乾燥させて、凍結乾燥した。実施例 3 0 0 1 , アイソマー 1 の収量は、 1.5 mg であり、以下の条件を用いる H P L C 分析によるその算出する純度は 82.0 % であった：カラム : Phenom Kinetex 2.6u C18(2)2.1x50mm Ser. #515561-57 ; 移動相 A : 0.025 % 酢酸アンモニウム / 5 % メタノール / 水 ; 移動相 B : アセトニトリル : / 水 (4 : 1) ; グラジエント : 60 °で、 20 分かけて 30 ~ 95 % B ; 流量 1 mL / min 。検出 UV : 217 nm 。

分析 L C M S 条件 A : 保持時間 = 1.50 min ; E S I - M S (+) m / z 904.5 (M + 2 H) .

【 0 4 1 3 】

第二のアイソマー、アイソマー 2 を、上記分取 L C / M S 条件により単離した。実施例 3 0 0 2 , アイソマー 2 の収量は 1.6 mg であり、以下の条件を用いる H P L C 分析によるその算出される純度は 89.6 % であった：カラム : Phenom Kinetex 2.6u C18(2)2.1 x 50mm Ser. #515561-57 ; 移動相 A : 0.025 % 酢酸アンモニウム / 5 % メタノール / 水 ; 移動相 B : アセトニトリル : / 水 (4 : 1) ; グラジエント : 60 °で 20 分かけて 30 ~ 95 % B ; 流量 1 mL / min 。検出 UV : 217 nm 。

分析 L C M S 条件 A : 保持時間 = 1.52 min ; E S I - M S (+) m / z 904.5 (M + 2 H) .

【 0 4 1 4 】

実施例 3 0 0 3 の製造

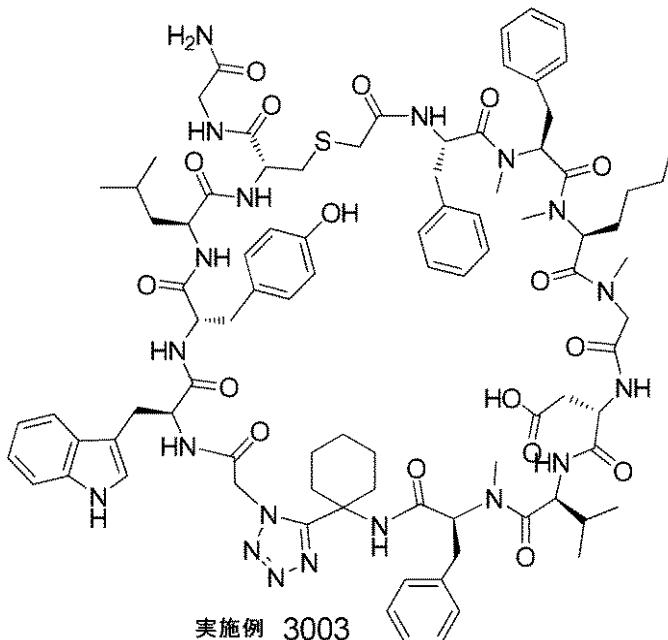
10

20

30

40

【化 8 4】



10

実施例 3003 を、以下の一般的な方法から構成される実施例 3001 の製造について記述した一般的な合成方法に従って製造した：“ CEM 方法 A：樹脂膨潤方法”、“ CEM 方法 A：標準カップリング方法”、“ CEM 方法 A：カスタムアミノ酸 - カップリング方法”、“ クロロ酢酸カップリング方法 A ”、“ グローバル脱保護方法 B ” および “ 環化方法 C ”。Fmoc - [2 - (5 - (1 - アミノシクロヘキシル) - 1 H - テトラゾール - 1 - イル)] - OH [Fmoc - Acc₆ [CN₄] - Gly - OH] を、“ CEM 方法 A：カスタムアミノ酸 - カップリング方法” を用いて Trp 残基の後ろにカップリングした。

20

粗製物質を、以下の条件を用いて分取 LC / MS により精製した：カラム：XBridge C18 300, 19 x 250 mm, 5 μm 粒子；移動相 A：5 : 95 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；移動相 B：95 : 5 アセトニトリル：水(0.1% トリフルオロ酢酸を含む)；グラジエント：25 分かけて 30 ~ 70% B、次いで 5 分間 100% B で保持する；流量：2.0 mL / min。目的とする生成物を含有する画分を合わせて、遠心エバボレーションにより乾燥させた。生成物の収量は、0.37 mg であり、“ 分析 LCMS 条件 D および E ” を用いる LCMS 分析によるその算出純度は 82% であった。

30

分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.66 min；ESI - MS (+) m/z 885.5 (M + 2H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.87 min；ESI - MS (+) m/z 885.4 (M + 2H)。

ESI - HRMS (+) m/z :

計算値：884.9371 (M + 2H)

実測値：884.9343 (M + 2H)

40

【0415】

均一時間分解蛍光 (HTRF) 結合アッセイを使用する大環状ペプチドが PD - 1 の PD - L1 への結合を競合する能力を試験する方法

本発明の大環状ペプチドが PD - L1 に結合する能力を PD - 1 / PD - L1 均一時間分解蛍光 (HTRF) 結合アッセイを使用して試験した。

【0416】

方法

可溶性 PD - 1 の可溶性 PD - L1 への結合の均一時間分解蛍光 (HTRF) アッセイ。可溶性 PD - 1 および可溶性 PD - L1 は、膜貫通領域が排除されたカルボキシル末端切除型のタンパク質であって、かつ異種性配列、特にヒト免疫グロブリン G 配列 (IgG) の F

50

c部分またはヘキサヒスチジンエピトープタグ(His)と融合されているものを指す。全ての結合研究を、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミンおよび0.05%(v/v)Tween-20を添加したdPBSからなるHTRFアッセイ緩衝液で行った。PD-1-Ig/PD-L1-His結合アッセイについて、阻害剤をPD-L1-His(10nM最終)と、4μlのアッセイ緩衝液と共に15分プレインキュベートし、続いて1μlのアッセイ緩衝液中のPD-1-Ig(20nM最終)を添加し、さらに15分インキュベートした。ヒト、カニクイザル、マウスまたはその他の種のいずれかからのPD-L1融合タンパク質を使用した。HTRF検出を、ユウロピウムクリプテート標識抗Igモノクローナル抗体(1nM最終)およびアロフィコシアニン(APC)標識抗Hisモノクローナル抗体(20nM最終)を使用して達成した。抗体をHTRF検出緩衝液で希釈し、5μlを結合反応の上部に分配した。反応を30分平衡化させ、EnVision蛍光光度計を使用してシグナル(665nm/620nm比)を得た。さらなる結合アッセイをPD-1-Ig/PD-L2-His(それぞれ20nMおよび5nM)、CD80-His/PD-L1-Ig(それぞれ100nMおよび10nM)およびCD80-His/CTLA4-Ig(それぞれ10nMおよび5nM)で確立した。ビオチニル化化合物番号71とヒトPD-L1-Hisの間の結合/競合研究を次のとおり行った。大環状ペプチド阻害剤をPD-L1-His(10nM最終)と60分、4μlのアッセイ緩衝液中でプレインキュベートし、1μlのアッセイ緩衝液中のビオチニル化化合物番号71(0.5nM最終)を添加した。結合を30分平衡化させ、5μlのHTRF緩衝液中のユウロピウムクリプテート標識ストレプトアビシン(2.5pM最終)およびAPC標識抗His(20nM最終)を添加した。反応を30分平衡化させ、シグナル(665nm/620nm比)をEnVision蛍光光度計を使用して得た。
10
20

【0417】

組み換えタンパク質。C末端ヒトIgエピトープタグを有するカルボキシル切断型ヒトPD-1(アミノ酸25~167)[hPD-1(25~167)-3S-IG]およびC末端Hisエピトープタグを有するヒトPD-L1(アミノ酸18~239)[hPD-L1(19~239)-タバコ葉脈斑紋ウイルスプロテアーゼ開裂部位(TVMV)-His]をHEK293T細胞で発現させ、組み換えタンパク質A親和性クロマトグラフィーおよび分子ふるいクロマトグラフィーで連続的に精製した。ヒトPD-L2-His(Sino Biologicals)、CD80-His(Sino Biologicals)、CTLA4-Ig(RnD Systems)を全て商業的供給源から得た。
30

【0418】

組換えヒトPD-1-Igの配列

【化85】

hPD1(25-167)-3S-IG

1	LDSPDRPWNP PTFSPALLVV TEGDNATPTC SFSNTSESFV LNWYRMSPSN
51	QTDKLAAFPE DRSPQPGQDCR FRVTQLPNGR DFHMSVVRAR RNDSGTYLCG
101	AISLAPKAQI KESLRAELRV TERRAEVPTA HPSPSPRPAG QFQGSPGGGG
151	GREPKSSDKT HTSPPSPAPE LLGGSSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
201	VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
251	LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
301	SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
351	KSRWQQGNVF SCSVMEALH NHYTQKSLSL SPGK

40

(配列番号: 1)

組換えヒトPD-L1-TVMV-His(PD-L1-His)の配列

【化 8 6】

hPDL1(19-239)-TVMV-His

1 FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
51 HGEEDLKVQH SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101 GGADYKRITV KVNA PYNKIN QRILVVDPVT SEHE LTCQAE GYPKAEVIWT
151 SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSLR INTTTNEIFY CTFRRLDPEE
201 NHTAELVIPE LPLAHPPNER TGSSETVRFQ GHCCCCC

(配列番号 : 2)

【 0 4 1 9 】

10

この結果を表 1 に示した。示した通り、本発明の大環状ペプチドは、 P D - L 1 - T V
M V - H i s (P D - L 1 - H i s)への P D - 1 - I g 結合活性の強力な阻害を示した。
範囲は以下のとおりである : A = 0 . 1 0 ~ 1 0 μ M ; B = 0 . 0 1 ~ 0 . 0 9 9 μ M ; C
= 0 . 0 0 5 ~ 0 . 0 0 9 9 μ M 。

【表 1 - 1】

表 1

実施例番号	HTRF IC50 (μM)
実施例 1001	A
実施例 1002	0.20
実施例 1003	A
実施例 1004	A
実施例 1005	A
実施例 1006	A
実施例 1007	A
実施例 1010	A
実施例 1012	0.03
実施例 1013	B
実施例 1014	C
実施例 1050	A
実施例 1051	A
実施例 1052	B
実施例 1053	B
実施例 1054	A
実施例 1055	0.008
実施例 1056	A
実施例 1057	A

10

20

30

【表1-2】

実施例 1058	B
実施例 1059	B
実施例 1060	0.02
実施例 1061	A
実施例 1100	A
実施例 1101	A
実施例 1102	A
実施例 1103	A
実施例 1104	B
実施例 1105	A
実施例 1106	A
実施例 1107	A
実施例 1108	A
実施例 1109	B
実施例 1110	A
実施例 1111	2.16
実施例 1113	A
実施例 1114	A
実施例 3001	A
実施例 3002	A
実施例 3003	0.59

10

20

30

40

【0420】

当業者には、本願発明が前述に例示した実施例に限定されず、その本質的特性から逸脱することなく他の特定の形に具現化できることは明らかである。それゆえに、実施例は、あらゆる点で制限的ではなく説明的と見なすことが望まれ、前記実施例ではなく添付する特許請求の範囲を参照すべきであり、請求の範囲と等価の意味および範囲に入る全ての変化は包含されると意図される。

【配列表】

0006726195000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 マイケル・マシュー・ミラー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 マーティン・パトリック・アレン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 リン・リー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 クラウディオ・マペッリ

アメリカ合衆国 0 9 0 4 7 ペンシルベニア州ラングホーン、ブリッグス・ロード 4 6 5 番

(72)発明者 モード・ア・ポワリエ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 リ・チアン・スン

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ 5 番、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ジャオ・チエン

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネチカット州ウォリングフォード、ヒンツ・ドライブ 9 3 番

(72)発明者 エリック・マル

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ 5 番、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 エリック・ピー・ギリス

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ 5 番、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ポール・マイケル・スコラ

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ 5 番、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第2014 / 151634 (WO , A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 07K 7 / 08

C A p l u s / R E G I S T R Y / W P I D S (S T N)