

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6510500号  
(P6510500)

(45) 発行日 令和1年5月8日(2019.5.8)

(24) 登録日 平成31年4月12日(2019.4.12)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 5/117	(2006.01)
A61K 38/06	(2006.01)
A61P 7/02	(2006.01)
A61K 47/50	(2017.01)
A61K 9/14	(2006.01)
CO7K	5/117
A61K	38/06
A61P	7/02
A61K	47/50
A61K	9/14

請求項の数 7 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-517144 (P2016-517144)
(86) (22) 出願日	平成26年6月3日(2014.6.3)
(65) 公表番号	特表2016-521696 (P2016-521696A)
(43) 公表日	平成28年7月25日(2016.7.25)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2014/079098
(87) 國際公開番号	W02014/194809
(87) 國際公開日	平成26年12月11日(2014.12.11)
審査請求日	平成29年3月16日(2017.3.16)
(31) 優先権主張番号	201310225330.6
(32) 優先日	平成25年6月5日(2013.6.5)
(33) 優先権主張国	中国(CN)

(73) 特許権者	515060447 シャンハイ ルーモサ セラピューティク ス カンパニー リミテッド 中華人民共和国 200131 シャンハ イ シャンハイ・パイロット・フリー・ト レード・ゾーン ファースト・イースト・ フェート・ロード ナンバー・146 ビ ルディング・1 サード・フロア ルー ム・3026
(74) 代理人	100120891 弁理士 林 一好
(74) 代理人	100165157 弁理士 芝 哲央
(74) 代理人	100126000 弁理士 岩池 滉

最終頁に続く

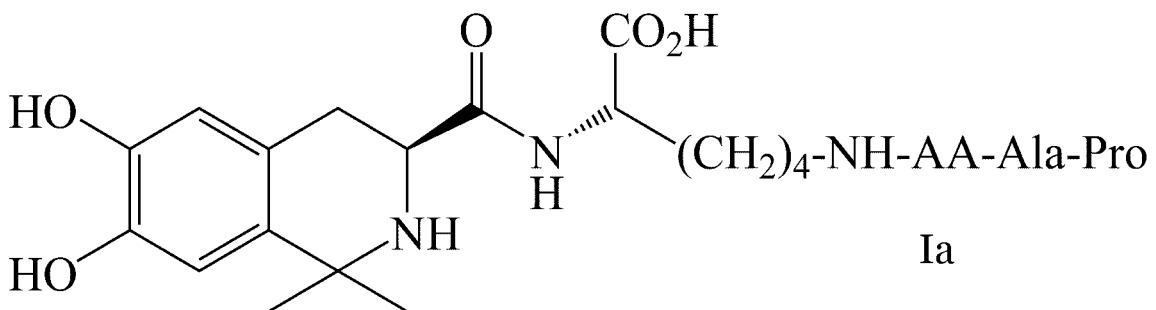
(54) 【発明の名称】 血栓溶解、抗血栓及びフリー・ラジカル消去の3つの活性を有する新規の化合物、その合成、ナノ構造と応用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記一般式 Ia を有する化合物。

## 【化 1】



10

(式中、AAは、L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp、及びL-Gluからなる群から選択される。)

## 【請求項 2】

AAがL-Lysである、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 3】

請求項1又は2に記載の化合物、及び薬学的に許容される担体を含む薬物組成物。

20

## 【請求項 4】

前記化合物は、ナノスフェア構造を形成できる請求項 3 に記載の薬物組成物。

## 【請求項 5】

血栓溶解薬物、NO フリーラジカル消去の薬物又は抗血栓薬物である請求項 3 に記載の薬物組成物。

## 【請求項 6】

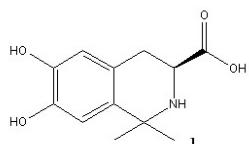
卒中又は脳梗塞を治療する薬物である請求項 3 に記載の薬物組成物。

## 【請求項 7】

一般式 1 の化合物を提供する工程 (1) と、

## 【化 2】

10



結合のためのリンカーアームである L-Lys 及び Pro-Ala-AA 配列を有するペプチド Q を提供し、前記 AA は請求項 1 に記載の定義と同義である工程 (2) と、  
前記式 1 の化合物のカルボキシル基と前記 L-Lys の - アミノ基とをペプチド結合を介してカップリングする工程 (3) と、

20

適当な反応条件において、前記 Pro-Ala-AA 配列を有するペプチド Q と、工程 (3) で得られる化合物をカップリングする工程 (4) であって、前記ペプチド Q は、L-Lys 部分の - アミノ基とペプチド結合でカップリングする、請求項 1 に記載の一般式 Ia の化合物の調製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血栓溶解、フリーラジカル消去及び血栓標的/抗血栓の 3 つの機能を兼ね備えた新規の化合物及びその調製方法や用途に関し、更に、C<sub>1-4</sub> アルキル基を 2 つ有するテトラヒドロイソキノリン類化合物と血栓溶解オリゴペプチドをリンカーアームで結合した新規の二元コンジュゲート (binary conjugate) に関し、また、前記化合物を含む薬物組成物、前記化合物の調製方法及びそのナノ構造に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

卒中・脳梗塞のような血栓性疾患は、発病率が各種の疾患の首位を占め、近年、ますます増える勢いであり、ヒトの健康を厳しく脅かしている。血栓性疾患の薬物治療は、血栓治療の重点とホットトピックスである。現在、臨床応用の血栓薬物に数多くの限界性があるので、安全で効果的な血栓新薬を捜すのは薬物研究のホットトピックスの 1 つになっている。

40

## 【0003】

従来の研究によると、3S-1,1-ジメチル-6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸は、抗血小板凝集及び抗血栓活性に加え、更にフリーラジカル消去活性を有することが判明されている。また、2008年1月30日付で提出された中国特許出願公開第CN101497651B号には、「3S-6,7-1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジヒドロキシイソキノリン-3-アシル-Pro-Ala-Lys、3S-6,7-1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジヒドロキシイソキノリン-3-アシル-Ala-Arg-Pro-Ala-Lys、3S-6,7-1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジヒドロキシイソキノリン-3-アシル-Ala-Arg-Pro-Ala-Lys、3S-6,7-1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジヒドロキシイソキノリン-3-アシル-Gly-Arg-Pro-Ala-Lys」が記載されている。

50

1 a - L y s 、 3 S - 6 , 7 - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン - 3 - アシル - G 1 n - A r g - P r o - A 1 a - L y s 、 3 S - 2 - [ P r o - A 1 a - L y s ] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン - 3 - カルボン酸、 3 S - 2 - [ A r g - P r o - A 1 a - L y s ] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン - 3 - カルボン酸、 3 S - 2 - [ A 1 a - A r g - P r o - A 1 a - L y s ] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン - 3 - カルボン酸、 3 S - 2 - [ G 1 y - A r g - P r o - A 1 a - L y s ] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン - 3 - カルボン酸、 3 S - 2 - [ G 1 n - A r g - P r o - A 1 a - L y s ] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン」を含む、 血栓溶解活性を有する 10 種類のテトラヒドロイソキノリン類化合物（以下、「血栓溶解活性を有する 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリン」と略称する）が開示されている。しかしながら、これらの 6 , 7 - ジヒドロキシイソキノリンの血栓溶解は、有効量が高く、その抗血栓とフリーラジカル消去の作用が開示又は検証されておらず、卒中に対する治療でもその発作中しか効果が見られず、発作から 30 分間以上の卒中に対する効果が開示又は検証されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、臨床的に血栓性疾患を効果的に安全に治療するために、血栓溶解、抗血栓及びフリーラジカル消去の活性を兼ね備え、また血液脳関門を効果的に通過し、そして低用量で前記効果を達成可能な新規の化合物が相変わらず望まれている。

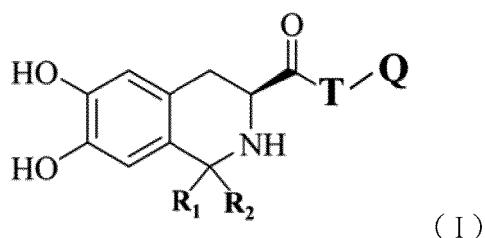
20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第 1 の目的は、一般式 I の化合物であって、

【化 1】



30

【0006】

ただし、T は結合用基を少なくとも 2 つ有するリンカーアームを示し、Q は血栓溶解活性を有するペプチドを示し、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は同一又は異なる C<sub>1 - 4</sub> アルキル基を示す化合物を提供することにある。

【0007】

本発明の具体的な実施例において、リンカーアーム T の少なくとも 1 つの結合用基はアミノ基であり、且つ残りの結合用基はカルボキシル基又はアミノ基である。

40

【0008】

本発明の好ましい具体的な実施例において、リンカーアームは、例えば、L - L y s 、 L - A s p 又は L - G l u のような天然アミノ酸であってもよい。

【0009】

本発明の更に好ましい具体的な実施例において、リンカーアームは、L - L y s であつてもよい。

【0010】

本発明の好ましい具体的な実施例において、本発明に用いられる血栓溶解活性を有するペプチドは、P A ( P r o - A 1 a ) 配列、 P A K ( P r o - A 1 a - L y s ) 配列、 A K

50

P (Ala-Lys-Pro)配列又はKAP (Lys-Ala-Pro)配列を含むオリゴペプチド或いはPAK配列、AKP配列又はKAP配列を構造単位とした反復配列を含むペプチドからなる群から選ばれたものであってもよい。

【0011】

本発明の具体的な実施例において、血栓溶解活性を有するオリゴペプチドは、PA (Pro-Ala)配列、PAK配列、AKP配列又はKAP配列を含むトリペプチド～オクタペプチドであってもよく、PA配列を含むトリペプチドであることが好ましい。更に好ましい実施例において、PA配列を含むトリペプチドは、下記一般式Q1又はQ2を有し、



10

ただし、AAは、L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Gluからなる群から選ばれたものである。

【0012】

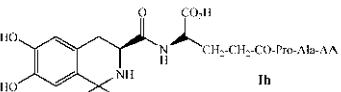
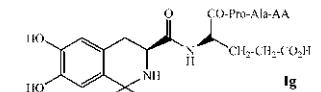
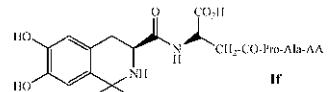
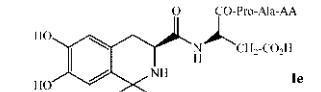
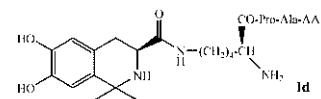
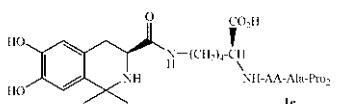
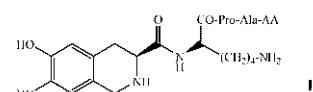
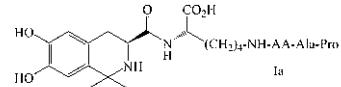
本発明の好ましい具体的な実施例において、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の何れもメチル基である。

【0013】

本発明の好ましい具体的な実施例において、一般式Iの化合物におけるR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の何れもメチル基であり、リンカーアームはL-Lys、L-Asp又はL-Gluであり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドはPA (Pro-Ala)配列を含むトリペプチドであり、例えば、下記一般式Ia (例えば、図1に示した5Aa-p化合物)、Ib (例えば、図2示した5Ba-p化合物)、Ic (例えば、図3に示した5Ca-p化合物)、Id (例えば、図4に示した5Da-p化合物)、Ie (例えば、図5に示した5Ea-p化合物)、If (例えば、図6に示した5Fa-p化合物)、Ig (例えば、図7に示した5Ga-p化合物)又はIh (例えば、図8に示した5Ha-p化合物)を有してもよい。

20

【化2】



30

ただし、AAは、L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe

40

50

e、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Gluからなる群から選ばれたものである。

## 【0014】

本発明の第2の目的は、前記本発明に係る化合物、及び薬学的に許容される担体を含む薬物組成物を提供することにある。

## 【0015】

本発明の薬物組成物の好ましい具体的な実施例において、前記化合物は、ナノスフェア構造を形成できる。

## 【0016】

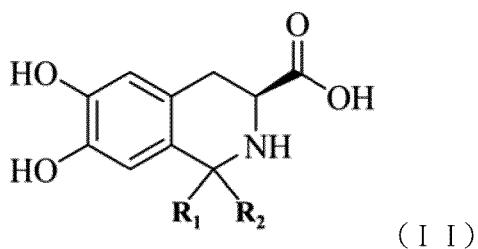
本発明の好ましい具体的な実施例において、本発明の薬物組成物は、血栓溶解薬物、NOフリーラジカル消去薬物又は血栓標的／抗血栓薬物とされてもよい。

## 【0017】

本発明の別の好ましい具体的な実施例において、本発明の薬物組成物は、卒中又は脳梗塞を治療する薬物とされてもよく、発病してから4時間、6時間及び24時間を超えた卒中又は脳梗塞の治療に用いられることが更に好ましく、且つ薬を連続的に投与するよう治療する。

## 【0018】

本発明の第三の目的は、  
一般式IIの化合物を提供し、  
【化3】

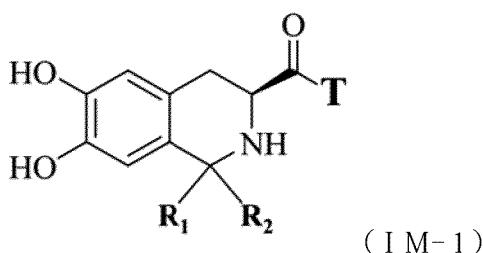


R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同一又は異なるC<sub>1-4</sub>アルキル基を示す工程(1)と、

結合用基を少なくとも2つ有するリンカーアームT、及び血栓溶解活性を有するペプチドQを提供し、前記リンカーアームは第1の結合用基と第2の結合用基を有する工程(2)と、

適当な反応条件において、一般式IIの化合物のカルボキシル基と前記リンカーアームTの第1の結合用基を結合し、一般式IM-1化合物を形成する工程(3)と、

## 【化4】



適当な反応条件において、前記血栓溶解活性を有するペプチドQの一端が前記リンカーアームTの第2の結合用基と結合するように、前記血栓溶解活性を有するペプチドQと一般式IM-1化合物を結合して、一般式Iの化合物を形成する工程(4)と、

10

20

30

40

50

を含む一般式 I の化合物の調製方法を提供することにある。

【0019】

本発明の具体的な実施例において、リンカーアーム T は、第 1 の結合用基が一般式 II の化合物のカルボキシル基と縮合反応するためのアミノ基であり、第 2 の結合用基が血栓溶解活性を有するペプチド Q の N 端又は C 端との結合するためのカルボキシル基又はアミノ基である。本発明の調製方法に用いられるリンカーアーム T 及び血栓溶解活性を有するペプチド Q は、前記本発明の式 I 化合物で定義されたものと同じである。

【0020】

好ましい具体的な実施例において、本発明の調製方法に係るリンカーアームは、L-Lys、L-Asp 又は L-Glu であってもよく、更に L-Lys であることが好ましく、血栓溶解活性を有するペプチドは、PA (Pro-Ala) 配列を含むトリペプチド、PAK (Pro-Ala-Lys) 配列、AKP (Ala-Lys-Pro) 配列又は KAP (Lys-Ala-Pro) 配列を含むオリゴペプチド、或いは PAK 配列、AKP 配列又は KAP 配列を構造単位とした反復配列を含むペプチドであってもよく、下記一般式 Q 1 又は Q 2 を有するトリペプチドであることが更に好ましい。

Pro-Ala-AA (Q1)

AA-Ala-Pro (Q2)

ただし、AA は、L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp 及び L-Glu からなる群から選ばれたものである。

【0021】

また他の好ましい具体的な実施例において、本発明の調製方法に係る一般式 II の化合物の R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> の何れもメチル基であり、リンカーアームは L-Lys、L-Asp 又は L-Glu であり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドが PA (Pro-Ala) 配列を含むトリペプチドである。更に好ましい具体的な実施例において、本発明の調製方法は、上記一般式 Ia-h 化合物の形成に用いられることができる。

【0022】

本発明に係る化合物又は薬物組成物によるラット体内活性試験により、低用量でも優れた血栓溶解及び抗血栓活性を有し、卒中ラットの神経機能を効果的に保護し、臨床的に血栓性疾患を効果的に安全に治療することができる事が判明された。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ia を合成する合成経路である。

【図 2】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ib を合成する合成経路である。

【図 3】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ic を合成する合成経路である。

【図 4】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Id を合成する合成経路である。

【図 5】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ie を合成する合成経路である。

【図 6】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 If を合成する合成経路である。

【図 7】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ig を合成する合成経路である。

【図 8】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 Ih を合成する合成経路である。

【図 9】本発明の一実施例により、本発明に係る化合物 5Aa-p のナノ構造を測定する透過型電子顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、図面及び実施例を併せて、本発明の技術案を詳しく説明する。しかし、本発明の保護範囲は、下記内容を含むが、それらに限定されない。

【0025】

本発明では、C<sub>1-4</sub> アルキル基を 2 つ有するテトラヒドロイソキノリン類化合物（即ち、一般式 II の化合物）と血栓溶解オリゴペプチドをリンカーアームで結合して、血栓溶解、フリーラジカル消去及び血栓標的 / 抗血栓の 3 つの機能を兼ね備えた新規の二元コ

10

20

30

40

50

ンジュゲートを形成し、以下、「本発明の新規の二元コンジュゲート」と略称する。

【0026】

一般式IIの化合物の1位に2つのC<sub>1-4</sub>アルキル基が導入され、3位にリンカーアームが導入されるため、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、従来既知の「血栓溶解活性を有する6,7-ジヒドロキシソキノリン」と比べ、以下の4つの優位を有する。1)一般式IIの化合物の1位に導入された2つのC<sub>1-4</sub>アルキル基の立体障害効果により、カルボキシペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼの何れも、「本発明の新規の二元コンジュゲート」における血栓溶解オリゴペプチドに容易に片寄らないので、加水分解しにくい。2)一般式IIの化合物の1位に導入された2つのC<sub>1-4</sub>アルキル基の疎水性のおかげで、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、血液脳関門をより好適に通過することができる。3)一般式IIの化合物の1位に導入された2つのC<sub>1-4</sub>アルキル基の電子供与のおかげで、「本発明の新規の二元コンジュゲート」の還元能力は、フリーラジカル消去の要求に応えることができる。4)一般式IIの化合物の3位に導入されたリンカーアームにより、「本発明の新規の二元コンジュゲート」の分子は、効果的に会合して、粒径が20~210nm、より好ましくは20~100nmのナノスフェアを形成することができ、このような安定的なナノ構造により、「本発明の新規の二元コンジュゲート」が血液循環でマクロファージに飲み込まれないようになり、血栓形成部位に安全に伝送され、最終的に血液脳関門を通過することができる。要するに、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、ナノ構造を形成し、血液脳関門の通過する効果を達成することができ、溶血栓と抗血栓に加え、OHや、NO、超酸化物陰イオン等のフリーラジカルを効果的に消去し、且つ低用量で血栓を効果的に溶解でき、臨床応用においてかなり将来性がある。

10

【0027】

本文に用いられる場合、「結合用基」とは、例えば、カルボキシル基やアミノ基のような縮合反応を行うことのできる官能基である。

【0028】

本文に用いられる場合、「リンカーアーム」とは、前記結合用基を有し、一般式IIの化合物と血栓溶解活性を有するペプチドQとを結合させるための分子である。リンカーアームは、少なくとも1つの結合用基がアミノ基であり、且つ残りの結合用基がカルボキシル基又はアミノ基である。本発明によると、リンカーアームは、例えば、L-Lys、L-Asp又はL-Gluのような天然アミノ酸であってもよい。

30

【0029】

導入されたリンカーアームにより、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、マクロファージに飲み込まれない安定的なナノスフェア構造となり、血栓形成部位に安全に伝送され、最終的に血液脳関門を通過することができる。特に、L-Lysをリンカーアームとする場合、「本発明の新規の二元コンジュゲート」の分子がより効果的に会合して、粒径が20~210nm、より好ましくは20~100nmのナノスフェアを形成する。このような安定的なナノ構造により、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、血液循環中でマクロファージに飲み込まれないようになり、血栓形成部位に安全に伝送され、最終的に血液脳関門を通過することができる。

40

【0030】

本文に用いられる場合、「オリゴペプチド」とは、一般的に3~8のアミノ酸からなる分子量が1000ダルトン(D)以下の小分子ペプチドである。

【0031】

本文に用いられる場合、「血栓溶解活性を有するペプチド」とは、P6A(ARP<sub>AK</sub>  
(配列番号1))、P6A代謝物、及び関連の誘導体を含む、血管透過性向上作用及び血栓溶解作用を有するオリゴペプチド血栓溶解剤である。従来の研究には、複数の血栓溶解オリゴペプチド(Ala-A<sub>Arg</sub>-Pro-Ala-Lys(配列番号1)、Gly-A<sub>Arg</sub>-Pro-Ala-Lys(配列番号2)、Gln-A<sub>Arg</sub>-Arg-Pro-Ala-Lys(配列番号3)とPro-Ala-Lysを含む)において、Pro-Ala

50

- L y s は、活性が優れた最短の配列ばかりでなく、一番安定的な配列である。一般式 I I の化合物の 3 位にリンカーアームによって P r o - A l a - A A 配列トリペプチドを導入することで、より優れた安定性及びより強い血栓溶解活性を「本発明の新規の二元コンジュゲート」に持たせることができる。

#### 【 0 0 3 2 】

例としては、本発明に用いられる P A K 配列、 A K P 配列又は K A P 配列を含むオリゴペプチドは、 P A K 、 R P A K ( A r g - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 4 ) 、 A R P A K ( A l a - A r g - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 1 ) 、 G R P A K ( G l y - A r g - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 2 ) 、 Q R P A K ( G l n - A r g - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 3 ) 、 A K P 、 K A P 、 K P A K ( L y s - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 5 ) 、 P A K P ( P r o - A l a - L y s - P r o ) ( 配列番号 6 ) 、 A K P A K ( A l a - L y s - P r o - A l a - L y s ) ( 配列番号 7 ) 又は P A K P A ( P r o - A l a - L y s - P r o - A l a ) ( 配列番号 8 ) であってもよい。

#### 【 0 0 3 3 】

例としては、本発明に用いられる P A K 配列、 A K P 配列又は K A P 配列を構造単位とした反復配列ペプチドは、中国特許出願公開番号第 C N 1 0 1 1 9 0 9 4 1 号出願に開示された、 P A K を構造単位として合成した反復配列ペプチド ( P A K ) <sub>2</sub> 、 ( P A K ) <sub>3</sub> 、 ( P A K ) <sub>4</sub> 、 ( P A K ) <sub>5</sub> 及び ( P A K ) <sub>6</sub> 、 A K P を構造単位として合成した反復配列ペプチド ( A K P ) <sub>2</sub> 、 ( A K P ) <sub>3</sub> 、 ( A K P ) <sub>4</sub> 、 ( A K P ) <sub>5</sub> 及び ( A K P ) <sub>6</sub> 、及び K P A を構造単位として合成した反復配列ペプチド ( K P A ) <sub>2</sub> 、 ( K P A ) <sub>3</sub> 、 ( K P A ) <sub>4</sub> 、 ( K P A ) <sub>5</sub> 及び ( K P A ) <sub>6</sub> を含む一連の血栓溶解活性を有するペプチドであってもよい。

#### 【 0 0 3 4 】

本文に用いられる場合、「 C <sub>1 - 4</sub> アルキル基」とは、例えば、メチル基、エチル基、 n - プロピル基、イソプロピル基、 n - プチル基、イソブチル基、 s e c - ブチル基、 t e r t - ブチル基のような炭素数 1 ~ 4 のアルキル基である。本発明の一般式 I の化合物における R <sub>1</sub> 及び R <sub>2</sub> の何れもメチル基である場合、出発物質である一般式 I I の化合物は、トリフルオロ酢酸 ( t r i f l u o r o a c e t i c a c i d ; T F A ) と無水硫酸マグネシウムの存在下で、 3 , 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニンとアセトンが P i c t e t - S p e n g l e r 縮合して得られたものであり、より調製しやすいメリットがある。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明の薬物組成物は、臨床的に許容されるいかなる適宜な製剤であってもよい。注射製剤 ( 粉末注射剤、凍結乾燥粉注射剤、水注射剤、点滴等 ) が好ましく、薬学的に許容される担体は、マンニトール ( m a n n i t o l ) 、水、リンガー注射液 ( R i n g e r ' s s o l u t i o n ) 、又は生理食塩水注射液 ( i s o t o n i c s o d i u m c h l o r i d e s o l u t i o n ) 等であってもよい。

#### 【 0 0 3 6 】

血液脳関門をより好適に通過できるには、本発明に係る化合物のナノスフェア粒径は、 2 0 ~ 2 1 0 n m にあり、より好ましくは 2 0 ~ 1 0 0 n m にある。

#### 【 0 0 3 7 】

安定的なナノ構造により、本発明に係る化合物は、血液循環でマクロファージに飲み込まれないようになり、血栓形成部位に安全に伝送され、最終的に血液脳関門を通過することができる。本発明の薬物組成物は、心筋梗塞 ( M m y o c a r d i a l i n f a r c t i o n ) 、卒中 ( I s c h e m i c s t r o k e ) 、静脈血栓症 ( D e e p v e i n t h r o m b o s i s ) 、肺塞栓症 ( P u l m o n a r y e m b o l i s m ) 、末梢動脈閉塞性疾患 ( P e r i p h e r a l a r t e r i a l o c c l u s i v e d i s e a s e ) 、静脈管閉塞 ( o c c l u d e d c e n t r a l v a s c u l a r 50 )

access devices)、動静脈瘻及びシャント閉塞 (Clotted arteriovenous fistula and shunts)、及び頸動脈狭窄症 (Carotid Stenosis) 等の疾患を治療するための血栓溶解薬物とされてもよい。本発明の薬物組成物は、神経変性疾患 (Neurodegenerative diseases)、心血管疾患 (Cardiovascular disease)、精神疾患、高山病 (Altitude sickness)、糖尿病、関節リウマチ、外傷性脳損傷 (Traumatic brain injury)、癌、脆弱X症候群 (Frangible X syndrome)、鐸状赤血球症 (Sickle Cell Disease)、扁平苔癬 (Lichen planus)、白斑 (Vitiligo)、又は慢性疲労症候群 (Chronic fatigue syndrome) 等の疾患を治療するためのNOフリーラジカル消去薬物とされてもよい。本発明の薬物組成物は、血小板増加症 (Thrombocytosis)、骨髄増殖性疾患 (myeloproliferative disease)、真性多血症 (Polycythemia vera)、又はバッドキアリ症候群 (Budd-Chiari syndrome) 等の疾患を治療するための血栓標的 / 抗血栓薬物とされてもよい。  
10

#### 【0038】

本発明の薬物組成物 / 化合物は、OH、NO及び超酸化物陰イオン等のフリーラジカルの消去、血栓溶解及び抗血栓 / 血栓標的の機能を兼ね備えるため、患者が卒中になって4時間の後でも効果を維持し、即ち、tPAの3時間の治療最適期に制限されず、tPAのような全身出血の反応にならなく、虚血再灌流の途中で生じた大量のOH、NO及び超酸化物陰イオン等のフリーラジカルを消去することができ、患者が治療時に脳神経組織が損傷されないようにする。一般式IIの化合物の1位に2つのC<sub>1-4</sub>アルキル基が導入され、3位にリンカーアームが導入されるため、「本発明の新規の二元コンジュゲート」は、従来既知の「血栓溶解活性を有する6,7-ジヒドロキシイソキノリン」と比べ、低用量でもより優れた血栓溶解活性、独特的のフリーラジカル消去と抗血栓活性が現われ、やや高い用量で4時間以上の卒中に対して優れた効果がある。  
20

#### 【0039】

中国特許公開番号第CN101497651B号には、「血栓溶解活性を有する6,7-ジヒドロキシイソキノリン」は、10nmol/kgの用量で血栓溶解の効果が現われる。しかしながら、本発明に係る化合物は、0.1nmol/kgで、優れた血栓溶解及び抗血栓の効果が現われ、且つ1μmol/kg、2.5μmol/kg、5μmol/kgの用量で、それぞれ卒中になって4、6、24時間の後で著しい優れた治療作用がある。  
30

#### 【0040】

本発明に係る化合物調製方法で、まず血栓溶解活性を有するペプチドQを合成して、そしてリンカーアームTの第2の結合用基と結合し、或いは血栓溶解活性を有するペプチドQにおけるアミノ酸を予定配列に従い順次に1つずつ又は複数でリンカーアームTと結合し、例えば、まず血栓溶解活性を有するペプチドQにおける一端の第1のアミノ酸をリンカーアームTの第2の結合用基と結合し、そして、残りのアミノ酸を順次に1つずつ又は複数で接合する。  
40

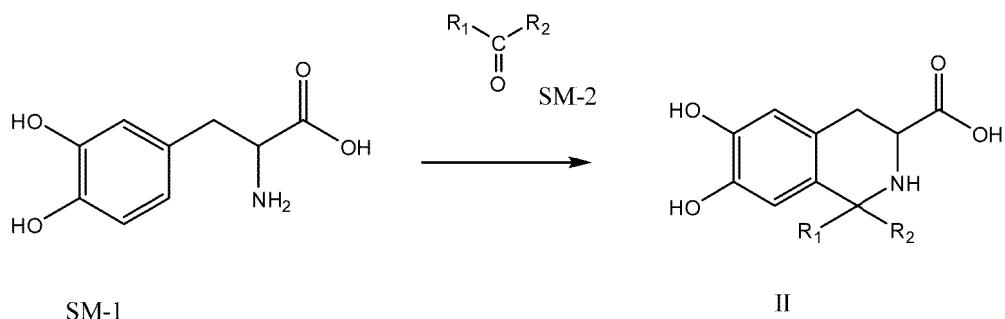
#### 【0041】

本発明の調製方法は、以下の更に詳しい説明で更に了解することができる。

#### 【0042】

一般式IIの化合物は、以下の合成経路で得られる。

【化 5】



10

$R_1$  及び  $R_2$  は同一又は異なる  $C_{1-4}$  アルキル基を示す。例としては、まず 3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン (SM-1) と一般式 SM-2 化合物をトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解させ、無水硫酸マグネシウムがある条件で、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンと SM-2 に対して Pictet-Spengler 縮合を発生して一般式 I の化合物が得られる。

【 0 0 4 3 】

好ましい実施例において、本発明の調製方法に係るリンカーアームがL-Lysであり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドがPA(Pro-Ala)配列を含むトリペプチドであり、例えば、まず一般式IIの化合物のカルボキシル基とL-Lysの1つのN端を接続し、そしてPA配列を含むトリペプチドとL-Lysリンカーアームにおける残りのN端又はC端を接合する。一部の実施例において、一般式IIの化合物におけるR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の何れもメチル基(即ち、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸)であり、リンカーアームがL-Lysであり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドがPA(Pro-Ala)配列を含むトリペプチドである場合、本発明の調製方法は、上記の化合物Ia、Ib、Ic、又はIdを形成してもよい。

20

[ 0 0 4 4 ]

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 Ia を形成する時に、図 1 に記載された合成経路を参照してもよい。

30

〔 0 0 4 5 〕

図1に示すような実施例において、まずPA配列を含むトリペプチドを合成して、またL-Lysリンカーアームと結合し、AAは、L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Glu残基（それぞれが5AA-化合物である）から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl・Lys(Boc)-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) 4M HCl/EA氷浴、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、4M HCl/EA、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 2M NaOH。別の実施例において、まずPA配列を含むトリペプチドにおける1つのアミノ酸（例えばAA）をL-Lysリンカーアームと結合し、そしてPA配列を含むトリペプチドにおける残りの2つのアミノ酸（例えばPro-Ala）をAAと結合する。

10

〔 0 0 4 6 〕

例としては、本発明に係る化合物 Ia の形成に用いられる実施例において、本発明の調製方法は、以下の工程を含んでもよい。

1) トリフルオロ酢酸 (TFA) と無水硫酸マグネシウムがある条件で、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンとアセトンがPicte-Spengler縮合を発生し、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-1イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸を生成する。

50

2) ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) がある条件で、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸が無水N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) でHCl·Lys(Boc)-OBz1と縮合して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc)-OBz1を形成し、縮合反応中に同時にN-メチルモルホリン (NMM) によってpH=9を調節する。

3) 塩化水素の酢酸エチル溶液で3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc)-OBz1に対してBocを除去して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1が得られる。 10

4) DCCとHOBtがある条件でBoc-Proが無水テトラヒドロフランでTos·Ala-OBz1と縮合してBoc-Pro-Ala-OBz1を形成する。

5) エタノールでBoc-Pro-Ala-OBz1をBoc-Pro-Alaに水素化分解させる。

6) DCCとHOBtがある条件でBoc-Pro-Alaが無水テトラヒドロフランでAA-OBz1と縮合してBoc-Pro-Ala-AA-OBz1 (AAがL-Ala、Gly、L-Phe、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Trp、L-Ser、L-Thr、L-Tyr、L-Lys(Z)、L-Pro、L-Asn及びL-Gln残基から選ばれる)を形成する。 20

7) エタノールで工程6のBoc-Pro-Ala-AA-OBz1をBoc-Pro-Ala-AAに水素化分解させる。

8) DCCとHOBtがある条件で、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1が無水DMFで工程6のBoc-Pro-Ala-AAと縮合して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-AA)-OBz1 (AAの定義が工程6と同じである)を形成する。

9) DCCとHOBtがある条件で、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1が無水DMFでBoc-AA(OBz1)と縮合して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-AA(OBz1)]-OBz1 (AAはL-Asp、L-Glu残基から選ばれる)を形成する。 30

10) 塩化水素の酢酸エチル溶液で3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-AA(OBz1)]-OBz1に対してBocを除去して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[AA(OBz1)]-OBz1 (AAの定義が工程9と同じである)が得られる。

11) DCCとHOBtがある条件で、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[AA(OBz1)]-OBz1が無水DMFでBoc-Pro-Alaと縮合して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-Pro-Ala-AA(OBz1)]-OBz1 (AAの定義が工程9と同じである)を形成する。 40

12) 水素化分解とBoc除去により3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-AA)-OBz1 (AAの定義が工程6と同じである)と3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-Pro-Ala-AA(OBz1)]-OBz1 (AAの定義が工程9と同じである)を脱保護して3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ホルミル-Lys(Pro-Ala-AA)が得られる。

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 I b を形成する場合、図 2 に記載された合成経路を参照してもよく、AA は L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp 及び L-Glu 残基（それぞれが 5Ba-p 化合物）から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl・Lys(Boc)-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) エタノール、Pd/C、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、4M HCl/EA、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 4M HCl/EA、氷浴。

## 【0048】

10

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 I c を形成する場合、図 3 に記載された合成経路を参照してもよく、AA は L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp 及び L-Glu 残基（それぞれが 5Ca-p 化合物）から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl・Boc-Lys-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) 4M HCl/EA 氷浴、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、4M HCl/EA、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) エタノール、Pd/C。

## 【0049】

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 I d を形成する場合、図 4 に記載された合成経路を参照してもよく、AA は L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp 及び L-Glu 残基（それぞれが 5Da-p 化合物）から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl・Boc-Lys-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) エタノール、Pd/C、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、4M HCl/EA、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) エタノール、Pd/C。

## 【0050】

別の好ましい実施例において、本発明の調製方法に係るリンカーアームが L-Asp であり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドが PA (Pro-Ala) 配列を含むトリペプチドであり、例えば、まず一般式 I I の化合物のカルボキシル基と L-Asp の N 端を接続させ、そして PA 配列を含むトリペプチドと L-Asp リンカーアームにおける残りの 1 つの C 端を接合する。一部の実施例において、一般式 I I の化合物における R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> の何れもメチル基（即ち、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸）であり、リンカーアームが L-Asp であり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドが PA (Pro-Ala) 配列を含むトリペプチドである場合、本発明の調製方法は、上記の化合物 I e 又は I f を形成してもよい。

## 【0051】

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 I e を形成する場合、図 5 に記載された合成経路を参照してもよく、AA は L-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp 及び L-Glu 残基（それぞれが 5Ea-p 化合物）から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl・Asp(OCH<sub>3</sub>)-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) エタノール、Pd/C、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、2M NaOH、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 4M HCl/EA、氷浴。

## 【0052】

本発明の調製方法により本発明に係る化合物 I f を形成する場合、図 6 に記載された合

20

30

40

50

成経路を参照してもよく、AAはL-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Glu残基(それぞれが5Aa-p化合物)から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl·Asp(OBzl)-OCH<sub>3</sub>、DCC、HOBT、NMM、iii) 2M NaOH、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、2M NaOH、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 4M HCl/EA、氷浴。

#### 【0053】

また他の好ましい実施例において、本発明の調製方法に係るリンカーアームがL-Gluであり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドがPA(Pro-Ala)配列を含むトリペプチドであり、例えば、まず一般式IIの化合物とL-GluのN端を接続させ、そしてPA配列を含むトリペプチドとL-Gluリンカーアームにおける残りの1つのC端を接合する。一部の実施例において、一般式IIの化合物におけるR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の何れもメチル基(即ち、3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸)であり、リンカーアームがL-Gluであり、且つ血栓溶解活性を有するペプチドがPA(Pro-Ala)配列を含むトリペプチドである場合、本発明の調製方法は、上記の化合物Ig又はIhを形成してもよい。

#### 【0054】

本発明の調製方法により本発明に係る化合物Igを形成する場合、図7に記載された合成経路を参照してもよく、AAはL-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Glu残基(それぞれが5Ga-p化合物)から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl·Glu(OCH<sub>3</sub>)-OBzl、DCC、HOBT、NMM、iii) エタノール、Pd/C、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、2M NaOH、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 4M HCl/EA、氷浴。

#### 【0055】

本発明の調製方法により本発明に係る化合物Ihを形成する場合、図8に記載された合成経路を参照してもよく、AAはL-Ala、L-Val、L-Trp、L-Tyr、L-Pro、L-Phe、Gly、L-Ser、L-Ile、L-Thr、L-Lys、L-Leu、L-Gln、L-Asn、L-Asp及びL-Glu残基(それぞれが5Ha-p化合物)から選ばれ、且つ反応条件が以下の通りであり、i) Acetone、TFA、MgSO<sub>4</sub>、ii) HCl·Glu(OBzl)-OCH<sub>3</sub>、DCC、HOBT、NMM、iii) エタノール、Pd/C、iv) DCC、HOBT、NMM、v) エタノール、Pd/C、2M NaOH、氷浴、vi) エタノール、Pd/C、vii) 4M HCl/EA、氷浴。

#### 【0056】

本発明に係る化合物又は薬物組成物によるラット体内活性試験により、低用量でも優れた血栓溶解及び抗血栓活性を有し、卒中ラットの神経機能を効果的に保護し、臨床的に血栓性疾患を効果的に安全に治療することができる事が判明された。

#### 【0057】

以下、具体的な実施例を併せて更に本発明を説明し、本発明のメリットと特徴は説明に従い更に明らかになる。しかしながら、これらの実施例は、ただ示範であり、本発明の範囲にいかなる制限を与えない。当業者では、本発明の精神と範囲から逸脱せずに、本発明の技術案の細部と形式に対して変更や交換をすることができるが、これらの変更や交換の何れも本発明の保護範囲内にある。

#### 【0058】

実施例1～68は、図1の調製方法により、本発明の5Aa-p化合物を製造することを例示する。

10

20

30

40

50

## 実施例 1 液相トランスペプチダーゼ反応通法

## 【0059】

N 端に保護されたアミノ酸を無水テトラヒドロフラン (T H F) に溶解させ、得られた溶液に 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B t) を入れ、氷浴を行い、ゆっくり無水 T H F に溶解した N , N - ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) を入れ、0 °C で 15 分間攪拌し、反応液 (I) を得た。カルボキシル末端に保護されたアミノ酸も無水 T H F に溶解させ、N - メチルモルホリン (N M M) で pH 9 に調節し、そして反応液 (I) と混合し、N - メチルモルホリンで pH 9 を維持し、室温で 10 時間攪拌し、T L C で反応プロセスを測定した。原料点が消えてから、反応混合物を濾過し、濾液を減圧下濃縮し、得られた粘稠状物質を酢酸エチル又はジクロロメタンに溶解させ、得られた溶液を順次に 5 % Na H C O<sub>3</sub> 水溶液、5 % K H S O<sub>4</sub> 水溶液、飽和 N a C L の水溶液により洗浄し、酢酸エチル又はジクロロメタン相に無水硫酸ナトリウムを入れ、乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮して、目的化合物を得た。

## 実施例 2 B o c 除去通法

## 【0060】

B o c に保護されたペプチドを少量の無水酢酸エチルに溶解させ、氷浴で攪拌しながら塩化水素の酢酸エチル溶液 (4 M) を入れた。T L C の表示により原料点が消えてから、反応溶液をポンプによって繰り返して抜き取り、塩化水素気体を除去し、残留物を石油エーテル又は無水エーテルにより繰り返して研和し、目的化合物を得た。

## 実施例 3 ベンジルエステル除去通法

## 【0061】

ポリペプチドベンジルエステルを C H<sub>3</sub> O H に溶解させ、氷浴で攪拌しながらゆっくり N a O H の水溶液 (2 M) を滴下し、氷浴で反応液温度を 0 °C に維持し、T L C の表示により原料が消えた。反応液を 1 M の塩酸により中性に調節し、減圧してメタノールを除去し、続いて 1 M の塩酸を pH 2 に酸化し、溶液を酢酸エチルにより抽出し、合併された酢酸エチル相を飽和 N a C L の水溶液により中性に洗浄し、無水 N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮して、目的化合物を得た。

## 実施例 4 カルボベンゾキシ又はベンジルエステル基除去通法

## 【0062】

カルボベンゾキシ又はベンジルエステルによる保護を有するペプチドを適量のエタノールに溶解させ、パラジウム炭素 (反応物量の 10 %) を入れ、水素を導入し室温で水素化分解させた。反応終了後に濾過し、減圧下濃縮して、目的化合物を得た。

## 実施例 5 B o c - P r o の調製

## 【0063】

5 . 7 5 g (5 0 m m o l) の L - P r o を 1 m L の水に溶解させ、氷浴で攪拌しながらゆっくり 2 5 m L の N a O H 水溶液 (2 M) を滴下し、溶液 (I) を得た。1 3 . 0 8 g (6 0 m m o l) の (B o c)<sub>2</sub> O を 2 5 m L のジオキサンに溶解させ、溶液 (I I) を得た。氷浴で攪拌されている溶液 (I) の中に溶液 (I I) を滴下し、氷浴でゆっくり N a O H 水溶液 (2 M) を滴下し pH 9 に調節し、混合物を氷浴で攪拌した。3 0 分間後、反応混合物の pH 値を検出し、N a O H 水溶液 (2 M) によって pH 値を 9 に保持させ、反応による気体をポンプによって抽出した。4 8 時間攪拌し、T L C (ジクロロメタン : メタノール、2 0 : 1) により反応完全を検出した。反応混合物を減圧下濃縮してジオキサンを除去し、残留物を 5 m L の水に溶解させ、飽和硫酸水素カリウム水溶液で pH 2 に調節し、水溶液を酢酸エチルにより 3 回抽出し、合併された酢酸エチル相を 5 % の K H S O<sub>4</sub> により 3 回洗浄し、飽和 N a C L の水溶液により中性に洗浄し、分離された酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを入れ、乾燥させた。濾液を濾過し、減圧下濃縮し、残留物を酢酸エチル-石油エーテルにより再結晶化し、1 0 . 2 g (9 5 %) の無色結晶である目的化合物を得た。E S I - M S (m / e) : 2 1 4 [M - H]<sup>-</sup> .

## 実施例 6 B o c - P r o - A l a - O B z 1 の調製

## 【0064】

10

20

30

40

50

実施例 1 の方法により、4.3 g (20.0 mmol) の Boc-Pro と 8.45 g (24.0 mmol) の Tos·Ala-OBz 1 から 5.19 g (68%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 377 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 7 Boc-Pro-Ala の調製

【0065】

実施例 4 の方法により、5.19 g (13.8 mmol) の Boc-Pro-Ala-OBz 1 から 3.59 g (91%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 285 [M-H]<sup>-</sup>。

実施例 8 Boc-Pro-Ala-Ala-OBz 1 の調製

【0066】

実施例 1 の方法により、3.00 g (10.49 mmol) の Boc-Pro-Ala と 3.26 g (12.03 mmol) の Tos·Ala-OBz 1 から 3.04 g (68%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 448 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 9 Boc-Pro-Ala-Ala の調製

【0067】

実施例 3 の方法により、4.47 g (10 mmol) の Boc-Pro-Ala-Ala-OBz 1 から 3.21 g (90%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 356 [M-H]<sup>-</sup>。

実施例 10 Boc-Pro-Ala-Val-OBz 1 の調製

【0068】

実施例 1 の方法により、3.00 g (10.49 mmol) の Boc-Pro-Ala と 3.58 g (12.01 mmol) の Tos·Val-OBz 1 から 3.28 g (69%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 476 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 11 Boc-Pro-Ala-Val の調製

【0069】

実施例 3 の方法により、4.75 g (10 mmol) の Boc-Pro-Ala-Val-OBz 1 から 3.54 g (92%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 384 [M-H]<sup>-</sup>。

実施例 12 Boc-Pro-Ala-Trp-OBz 1 の調製

【0070】

実施例 1 の方法により、3.00 g (10.49 mmol) の Boc-Pro-Ala と 3.97 g (12.01 mmol) の HCl·Trp-OBz 1 から 3.65 g (65%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 563 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 13 Boc-Pro-Ala-Trp の調製

【0071】

実施例 3 の方法により、5.62 g (10 mmol) の Boc-Pro-Ala-Trp-OBz 1 から 4.21 g (89%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 471 [M-H]<sup>-</sup>。

実施例 14 Boc-Pro-Ala-Tyr-OBz 1 の調製

【0072】

実施例 1 の方法により、3.15 g (11 mmol) の Boc-Pro-Ala と 4.43 g (10 mmol) の Tos·Tyr-OBz 1 から 3.73 g (69%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 540 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 15 Boc-Pro-Ala-Tyr の調製

【0073】

実施例 3 の方法により、5.39 g (10 mmol) の Boc-Pro-Ala-Tyr-OBz 1 から 4.13 g (92%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) :

10

20

30

40

50

448 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例16 Boc-Pro-Ala-Phe-OBz1の調製

【0074】

実施例1の方法により、3.00g (10.0mmol) のBoc-Pro-Alaと2.92g (11.0mmol) のTos·Phe-OBz1から3.82g (66%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 524 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例17 Boc-Pro-Ala-Pheの調製

【0075】

実施例3の方法により、5.23g (10mmol) のBoc-Pro-Ala-Phe-OBz1から3.94g (91%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 10432 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例18 Boc-Pro-Ala-Gly-OBz1の調製

【0076】

実施例1の方法により、3.15g (11mmol) のBoc-Pro-Alaと3.37g (10mmol) Tos·Gly-OBz1から2.90g (67%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 434 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例19 Boc-Pro-Ala-Glyの調製

【0077】

実施例3の方法により、4.33g (10mmol) のBoc-Pro-Ala-Gly-OBz1から2.98g (87%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 20342 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例20 Boc-Pro-Ala-Ser-OBz1の調製

【0078】

実施例1の方法により、3.15g (11mmol) のBoc-Pro-Alaと3.67g (10mmol) Tos·Ser-OBz1から2.92g (63%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 464 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例21 Boc-Pro-Ala-Serの調製

【0079】

実施例3の方法により、4.63g (10mmol) のBoc-Pro-Ala-Ser-OBz1から3.28g (88%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 30372 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例22 Boc-Pro-Ala-Ile-OBz1の調製

【0080】

実施例1の方法により、3.15g (11mmol) のBoc-Pro-Alaと3.93g (10mmol) Tos·Ile-OBz1から3.33g (65%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 490 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例23 Boc-Pro-Ala-Ileの調製

【0081】

実施例3の方法により、4.89g (10mmol) のBoc-Pro-Ala-Ile-OBz1から3.67g (91%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 40398 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例24 Boc-Pro-Ala-Thr-OBz1の調製

【0082】

実施例1の方法により、3.15g (11mmol) のBoc-Pro-Alaと3.81g (10mmol) Tos·Thr-OBz1から3.39g (71%) の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 478 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例25 Boc-Pro-Ala-Thrの調製

【0083】

実施例3の方法により、4.77g (10mmol) のBoc-Pro-Ala-Thr-OBz1から3.56g (91%) の目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 50

386 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例26 Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzlの調製

【0084】

実施例1の方法により、3.15g(11mmol)のBoc-Pro-Alaと4.06g(10mmol)HCl-Lys(Z)-OBzlから4.15g(65%)の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 639 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例27 Boc-Pro-Ala-Lys(Z)の調製

【0085】

実施例3の方法により、6.39g(10mmol)のBoc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzlから4.71g(86%)の目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 547 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例28 Boc-Pro-Ala-Leu-OBzlの調製

【0086】

実施例1の方法により、3.15g(11mmol)のBoc-Pro-Alaと3.93g(10mmol)Tos-Leu-OBzlから3.37g(69%)の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 490 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例29 Boc-Pro-Ala-Leuの調製

【0087】

実施例3の方法により、4.89g(10mmol)のBoc-Pro-Ala-Leu-OBzlから3.67g(91%)の目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 398 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例30 Boc-Pro-Ala-Gln-OBzlの調製

【0088】

実施例1の方法により、3.15g(11mmol)のBoc-Pro-Alaと2.73g(10mmol)HCl-Gln-OBzlから3.23g(63%)の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 505 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例31 Boc-Pro-Ala-Glnの調製

【0089】

実施例3の方法により、5.04g(10mmol)のBoc-Pro-Ala-Gln-OBzlから3.73g(90%)の目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 413 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例32 Boc-Pro-Ala-Asn-OBzlの調製

【0090】

実施例1の方法により、3.15g(11mmol)のBoc-Pro-Alaと2.59g(10mmol)HCl-Asn-OBzlから3.04g(61%)の無色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 491 [M+H]<sup>+</sup>.

実施例33 Boc-Pro-Ala-Asnの調製

【0091】

実施例3の方法により、4.90g(10mmol)のBoc-Pro-Ala-Asn-OBzlから3.67g(92%)の目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e): 399 [M-H]<sup>-</sup>.

実施例34 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸(1)の調製

【0092】

5.0g(25mmol)の3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンを250mLのアセトンに溶解させた。得られた溶液に6.0g(30mmol)の無水硫酸マグネシウムを入れた。30分間後、氷浴で25mLのトリフルオロ酢酸(TFA)を入れ、後で、室温で96h攪拌し、TLC(ジクロロメタン/メタノール、1:1)の表示により原料点が消えた。反応液を濾過し、濾液を減圧下濃縮し、残留物をアセトンに溶解させ、続いて減圧下濃縮することを繰り返して3回行った。残留物に200mLの無水エーテルを入

れ、大量の無色固体が析出され、吸引ろ過して 5.8 g (95%) の無色固体である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 238 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 6.61 (s, 1H)、6.45 (s, 1H)、3.70 (dd, J = 3.9, 11.4 Hz, 1H)、2.76 (dd, J = 11.7, 15.3 Hz, 1H)、2.62 (m, 1H)、1.41 (s, 3H)、1.32 (s, 3H)。

実施例 35 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc)-OBz1 (2) の調製

【0093】

実施例 1 の方法により、1.19 g (5.01 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸を 10 mL の無水 DMF に溶解させた。得られた溶液に 675 mg (5.00 mmol) の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) を入れた。10 分後、氷浴で 1.20 g (5.83 mmol) のジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) と 5 mL の無水 DMF の溶液を入れ、反応液 (I) を得た。2.83 g (5.53 mmol) の HCl-Lys (Boc)-OBz1 を 15 mL の無水 DMF に溶解させ 30 分間攪拌し、反応液 (II) を得た。氷浴で攪拌しながら、反応液 (II) を反応液 (I) に入れ、そして室温で 12 h 攪拌し、同時に N-メチルモルホリン (NMM) によって pH = 9 に調節し、TLC (ジクロロメタン / メタノール、10 : 1) の表示により 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-カルボン酸が消えた。

反応混合物を濾過しジシクロヘキシル尿素 (DCU) を除去した。濾液を減圧下濃縮して、DMF を除去した。残留物を 150 mL の酢酸エチルに溶解させた。得られた溶液を順次に飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液により 3 回洗浄し飽和 NaCl の水溶液により 3 回洗浄した。酢酸エチル溶液を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により乾燥させ、濾過し、乾燥まで濾液を減圧下濃縮して、残留物をカラムクロマトグラフィにより精製 (ジクロロメタン / メタノール、50 : 1) し、327 mg (59%) のライトピンク粉末である目的化合物を得た。ESI-MS (m/e) : 556 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 8.64 (s, 1H)、8.52 (s, 1H)、8.14 (d, J = 7.5 Hz, 1H)、7.36 (m, 5H)、6.74 (m, 1H)、6.57 (s, 1H)、6.37 (s, 1H)、5.14 (m, 2H)、4.30 (m, 1H)、3.55 (m, 2H)、3.32 (m, 2H)、2.88 (m, 2H)、2.57 (d, J = 3.9 Hz, 1H)、2.27 (m, 1H)、2.15 (s, 1H)、1.69 (m, 4H)、1.36 (s, 9H)、1.33 (s, 3H)、1.25 (s, 3H)。

実施例 36 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 (3A) の調製

【0094】

実施例 2 の通法により、1.50 g (2.73 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc)-OBz1 から 1.01 g (82%) のライトピンク固体である目的化合物が得られ、直接次の反応に用いられた。ESI-MS (m/e) : 456 [M+H]<sup>+</sup>。

実施例 37 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ala)-OBz1 (4Aa) の調製

【0095】

実施例 1 の方法により、482 mg (1.01 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 と 424 mg (1.20 mmol) の Boc-Pro-Ala-Ala から 302 mg (38%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 795 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.15 (s, 1H)、8.89 (s, 2H)、8.11 (m, 1H)、7.94 (m, 1H)、7.85

10

20

30

40

50

(m、1H)、7.76(m,1H)、7.44-7.31(m,5H)、6.66(s,1H)、6.47(s,1H)、5.14(m,2H)、4.25(m,1H)、4.23(m,3H)、4.12(m,1H)、3.66(m,1H)、3.12(m,2H)、2.96(m,2H)、2.89-2.91(m,2H)、2.11-2.08(m,1H)、1.77(m,5H)、1.59(s,3H)、1.47-1.27(m,17H)、1.27-1.08(m,7H)。

実施例38 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Val)-OBzl(4Ab)の調製

【0096】

実施例1の方法により、964mg(2.01mmol)の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBzlと924mg(2.40mmol)のBoc-Pro-Ala-Valから604mg(37%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e) : 823 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.18(s, 1H)、8.93(m, 2H)、8.05(m, 2H)、7.42(m, 5H)、6.66(s, 1H)、6.47(s, 1H)、5.16(s, 1H)、4.37-4.28(m, 3H)、4.11(m, 3H)、3.06-2.89(m, 5H)、2.75(m, 6H)、2.04(s, 1H)、1.91(m, 1H)、1.79(m, 5H)、1.62(s, 3H)、1.49(s, 3H)、1.39(m, 7H)、1.32(m, 3H)、1.21(m, 4H)、0.82(m, 6H)。

実施例39 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Trp)-OBzl(4Ac)の調製

【0097】

実施例1の方法により、482mg(1.01mmol)の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBzlと567mg(1.20mmol)のBoc-Pro-Ala-Trpから318mg(35%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e) : 910 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.51(s, 1H)、9.26(m, 2H)、8.98(m, 2H)、8.05(d, 1H, J = 7.2Hz)、7.94(m, 1H)、7.78(d, 1H, J = 7.2Hz)、7.54(m, 1H)、7.38(m, 5H)、7.31(d, 1H, J = 4.5Hz)、7.24(m, 1H)、7.11(t, 1H, J = 4.5Hz)、7.05(t, 1H, J = 4.5Hz)、6.67(s, 1H)、6.52(s, 1H)、5.15(s, 2H)、4.44(m, 1H)、4.35(m, 2H)、4.07(m, 2H)、3.23(m, 1H)、3.17(m, 5H)、2.86(m, 1H)、1.97(m, 2H)、1.76-1.70(m, 8H)、1.31(s, 3H)、1.24(s, 3H)、1.93-1.79(m, 9H)、1.16(m, 4H)。

実施例40 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Tyr)-OBzl(4Ad)の調製

【0098】

実施例1の方法により、964mg(2.01mmol)の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBzlと1077mg(2.40mmol)のBoc-Pro-Ala-Tyrから549mg(31%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e) : 887 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.17(m, 1H)、9.02(m, 1H)、8.73(m, 1H)、8.51(m, 1H)、8.09(m, 1H)、7.97(m, 1H)、7.73(m, 1H)、7.40(m, 5H)、

10

30

40

50

6.96 (m, 2H)、6.61 (m, 3H)、6.48 (s, 1H)、5.16 (s, 2H)、4.23 (m, 2H)、4.07 (m, 2H)、3.88 (m, 1H)、3.01 (m, 3H)、2.74 (m, 3H)、2.02 (m, 2H)、1.74 (m, 5H)、1.46 (s, 3H)、1.36-1.24 (m, 16H)、1.16 (m, 3H)、0.87 (m, 1H) .

実施例41 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Pro)-OBz1 (4Ae) の調製

【0099】

実施例1の方法により、964mg (2.01mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 10 と957mg (2.40mmol) のBoc-Pro-Ala-Proから607mg (37%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 821 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.54 (m, 1H)、9.23 (s, 1H)、9.11 (m, 1H)、8.96 (s, 1H)、8.05 (m, 1H)、7.85 (m, 1H)、7.40 (m, 5H)、6.67 (s, 1H)、6.48 (s, 1H)、5.16 (m, 2H)、4.54 (m, 1H)、4.38 (m, 2H)、4.24 (m, 1H)、4.10 (m, 2H)、3.55 (m, 1H)、3.17 (m, 3H)、3.05 (m, 3H)、2.94 (m, 1H)、1.96 (m, 2H)、1.79 (m, 7H)、1.64 (s, 3H)、1.51 (s, 3H)、1.38-1.32 (m, 13H)、1.20 (m, 4H) . 20

実施例42 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Phe)-OBz1 (4Af) の調製

【0100】

実施例1の方法により、964mg (2.01mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 30 と1039mg (2.40mmol) のBoc-Pro-Ala-Pheから626mg (36%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 871 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.24 (s, 1H)、9.09 (m, 2H)、8.96 (s, 1H)、8.01-7.93 (m, 3H)、7.38 (m, 5H)、7.21 (m, 5H)、6.67 (s, 1H)、6.49 (s, 1H)、5.17 (s, 2H)、4.38 (m, 3H)、4.09 (m, 2H)、3.28 (m, 4H)、2.88 (m, 2H)、2.79 (m, 5H)、1.99 (m, 2H)、1.74 (m, 8H)、1.50 (m, 3H)、1.32 (m, 14H)、1.16 (m, 4H) .

実施例43 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Gly)-OBz1 (4Ag) の調製

【0101】

実施例1の方法により、482mg (1.01mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 40 と412mg (1.20mmol) のBoc-Pro-Ala-Glyから304mg (39%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 781 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.39 (s, 1H)、8.97 (m, 2H)、8.24-8.14 (m, 2H)、7.79 (m, 1H)、7.41 (m, 5H)、6.66 (s, 1H)、6.47 (s, 1H)、5.16 (s, 2H)、4.35 (m, 2H)、4.21 (m, 2H)、3.71-3.66 (m, 2H)、3.03 (m, 3H)、2.89-2.76 (m, 1H)、2.07 (m, 1H)、1.81-1.77 (m, 6H)、1.62 (s, 3H)、1.50 (s, 3H)、1.350

8 (m, 7 H)、1.32 (m, 8 H)、1.23 (m, 4 H) .

実施例 4 4 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ser)-OBz1 (4 Ah) の調製

【0102】

実施例 1 の方法により、965 mg (2.01 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 と 896 mg (2.40 mmol) の Boc-Pro-Ala-Ser から 454 mg (29%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 811 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.48 (m, 1 H) 10)、9.23 (s, 2 H)、8.96 (m, 1 H)、8.19 (m, 1 H)、7.40 (m, 5 H)、6.67 (s, 1 H)、6.48 (s, 1 H)、5.16 (m, 2 H)、4.92 (m, 1 H)、4.31 (m, 3 H)、4.13 (m, 3 H)、3.53 (m, 2 H)、3.16 (m, 3 H)、3.04-2.81 (m, 4 H)、2.08 (m, 1 H)、1.78 (m, 5 H)、1.63 (s, 3 H)、1.51 (s, 3 H)、1.39-1.32 (m, 14 H)、1.22 (m, 3 H) .

実施例 4 5 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ile)-OBz1 (4 Ai) の調製

【0103】

実施例 1 の方法により、482 mg (1.01 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 と 479 mg (1.20 mmol) の Boc-Pro-Ala-Ile から 310 mg (37%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 837 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 8.84-8.68 (m, 2 H)、8.37 (s, 1 H)、7.99-7.87 (m, 3 H)、7.39 (m, 4 H)、6.60 (s, 1 H)、6.39 (s, 1 H)、5.14 (m, 2 H)、4.32 (m, 2 H)、4.17 (m, 2 H)、3.65 (m, 1 H)、3.54 (m, 1 H)、3.17 (m, 1 H)、2.96 (m, 2 H)、2.68 (m, 3 H)、2.11 (m, 1 H)、1.74-1.68 (m, 7 H)、1.31-1.21 (m, 11 H)、1.17 (m, 5 H)、1.08 (m, 1 H)、0.82 (m, 8 H) .

実施例 4 6 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Thr)-OBz1 (4 Aj) の調製

【0104】

実施例 1 の方法により、964 mg (2.01 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 と 929 mg (2.40 mmol) の Boc-Pro-Ala-Thr から 495 mg (30%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 825 [M + H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.18 (s, 1 H) 40)、8.91 (s, 2 H)、8.27 (m, 1 H)、7.64 (m, 1 H)、7.41 (m, 6 H)、6.65 (s, 1 H)、6.48 (s, 1 H)、5.16 (s, 2 H)、4.35 (m, 3 H)、4.23 (m, 3 H)、3.07 (m, 3 H)、2.72 (m, 1 H)、1.83-1.76 (m, 5 H)、1.61 (s, 3 H)、1.48 (s, 3 H)、1.38-1.32 (m, 14 H)、1.23 (m, 3 H)、1.11 (m, 3 H) .

実施例 4 7 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys [Boc-Pro-Ala-Lys (Z)]-OBz1 (4 Ak) の調製

【0105】

実施例 1 の方法により、964 mg (2.01 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-

20

30

40

50

1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1と1209mg(2.40mmol)のBoc-Pro-Ala-Lys(Z)から750mg(30%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e):987 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 8.68 (s, 1H)、8.56 (s, 1H)、8.16 (m, 1H)、8.04 (m, 1H)、7.78 (m, 1H)、7.68 (m, 1H)、7.34 (m, 10H)、6.58 (s, 1H)、6.37 (s, 1H)、5.14 (s, 2H)、4.98 (s, 2H)、4.29 (m, 2H)、4.09 (m, 3H)、3.56 (m, 3H)、3.01 (m, 4H)、2.62 (m, 1H)、2.40 (m, 1H)、2.27 (m, 1H)、2.15 (s, 1H)、2.06 (m, 1H)、2.01 (s, 1H)、1.78 (m, 6H)、1.38-1.31 (m, 18H)、1.17 (m, 10H)。

実施例48 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Leu)-OBz1(4A1)の調製

#### 【0106】

実施例1の方法により、482mg(1.01mmol)の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1と479mg(1.20mmol)のBoc-Pro-Ala-Leuから301mg(36%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e):837 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 8.69-8.57 (m, 2H)、8.18-8.06 (m, 2H)、7.85 (m, 1H)、7.69 (m, 5H)、6.58 (s, 1H)、6.37 (s, 1H)、5.14 (m, 2H)、4.25-4.11 (m, 5H)、3.63-3.55 (m, 1H)、3.17 (s, 2H)、3.04-2.98 (m, 2H)、2.64-2.59 (m, 1H)、2.15-2.07 (m, 1H)、1.78-1.67 (m, 5H)、1.36 (m, 14H)、1.28 (m, 4H)、1.19 (m, 6H)。

実施例49 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Gln)-OBz1(4Am)の調製

#### 【0107】

実施例1の方法により、965mg(2.01mmol)3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1と994mg(2.40mmol)のBoc-Pro-Ala-Glnから665mg(39%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e):852 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.3-9.1 (m, 4H)、8.16 (m, 1H)、7.96 (m, 2H)、7.83 (m, 1H)、7.44-7.38 (m, 7H)、6.89 (s, 1H)、6.86 (s, 1H)、6.56 (s, 1H)、5.17 (s, 2H)、4.4-4.1 (m, 6H)、3.17 (m, 4H)、2.98-2.83 (m, 2H)、2.08 (m, 4H)、1.91 (m, 1H)、1.64 (s, 3H)、1.51 (s, 3H)、1.38-1.31 (m, 17H)、1.22-1.20 (m, 4H)。

実施例50 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Boc-Pro-Ala-Asn)-OBz1(4An)の調製

#### 【0108】

実施例1の方法により、965mg(2.01mmol)の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1と960mg(2.40mmol)のBoc-Pro-Ala-Asnから636mg(38%)の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS(m/e):838 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>HNMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.26 (s, 1H)

)、9.04 (m, 2H)、8.31 (m, 1H)、8.03 (m, 1H)、7.57 (m, 1H)、7.44 (m, 6H)、6.90 (m, 1H)、6.68 (s, 1H)、6.49 (s, 1H)、5.16 (s, 2H)、4.45-4.40 (m, 3H)、4.14 (m, 2H)、3.42 (m, 5H)、3.17 (m, 3H)、2.89-2.82 (m, 1H)、2.09 (m, 1H)、1.90 (m, 1H)、1.79-1.74 (m, 6H)、1.64 (s, 3H)、1.52 (s, 3H)、1.39-1.32 (m, 15H)、1.22 (m, 3H)。

実施例 51 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-Pro-Ala-Asp(OBzl)]-OBzl (4Ao) の調製

10

【0109】

実施例 1 の方法により、870mg (1.24mmol) の化合物 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys[Asp(OBzl)]-OBzl と 429mg (2.48mmol) の Boc-Pro-Ala から 403mg (35%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 929 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 8.32 (m, 1H)、8.10 (m, 1H)、7.96 (m, 1H)、7.36 (m, 10H)、6.60 (s, 1H)、6.39 (s, 1H)、5.14 (s, 2H)、5.06 (s, 2H)、4.57 (m, 1H)、4.32 (m, 1H)、4.23 (m, 1H)、4.11 (m, 2H)、3.74 (m, 1H)、3.55 (m, 1H)、3.34-3.28 (m, 2H)、3.00 (m, 2H)、2.89 (s, 1H)、2.81 (m, 1H)、2.73 (m, 2H)、2.58 (m, 1H)、2.16-2.06 (m, 1H)、1.91 (s, 2H)、1.75 (m, 5H)、1.40-1.32 (m, 22H)、1.17 (m, 3H)。

20

実施例 52 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys[Boc-Pro-Ala-Glu(OBzl)]-OBzl (4Ap) の調製

【0110】

実施例 1 の方法により、530mg (0.75mmol) の化合物 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys[Glu(OBzl)]-OBzl と 256mg (0.90mmol) の Boc-Pro-Ala から 269mg (38%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 943 [M+H]<sup>+</sup>、<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) / ppm = 9.26 (s, 1H)、9.10 (m, 1H)、8.97 (s, 1H)、8.79-7.88 (m, 3H)、7.36 (m, 10H)、6.67 (s, 1H)、6.48 (s, 1H)、5.14 (s, 2H)、5.06 (s, 2H)、4.35 (m, 1H)、4.23 (m, 2H)、4.10 (m, 1H)、3.83 (s, 1H)、3.34 (m, 5H)、2.83 (m, 1H)、2.72 (m, 1H)、2.34 (m, 2H)、1.78 (m, 10H)、1.51 (s, 3H)、1.36-1.31 (m, 14H)、1.21 (m, 3H)。

30

実施例 53 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Ala) (5Aa) の調製

40

【0111】

まず実施例 4 の方法により、300mg (0.38mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ala)-OBzl に対してベンジルエステル除去をした。更に、実施例 2 の方法により、Boc 除去をし、266mg (78%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 207.2-209.4°C。

## 【数1】

$[\alpha]_D^{25} = -4.5$  (c = 0.25, CH<sub>3</sub>OH)

ESI-MS (m/e) : 630 [M-H]<sup>-</sup>, IR (KBr) : 3221.1, 3057.2, 2983.8, 2943.3, 2362.8, 1660.7, 1546.9, 1533.4, 1448.5, 1379.1, 1240.2, 1049.3, 867.9, 659.7, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.79 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.36-4.29 (m, 5H), 3.32-3.12 (m, 6H), 1.89 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (m, 2H), 1.33 (m, 9H).

実施例54 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Val) (5Ab) の調製

## 【0112】

実施例53の方法により、300mg (0.36mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Val)-OBz1から187mg (81%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 195.8-197.9°C.

## 【数2】

$[\alpha]_D^{25} = -3.5$  (c = 0.25, CH<sub>3</sub>OH)

ESI-MS (m/e) : 630 [M-H]<sup>-</sup>, IR (KBr) : 3221.1, 3062.9, 2970.4, 1658.8, 1546.9, 1533.4, 1450.5, 1384.9, 1240.2, 1047.4, 991.41, 866.04, 671.2, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 8.13 (m, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.36-4.29 (m, 4H), 3.89 (m, 1H), 3.36 (m, 2H), 3.23 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 1.89 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (m, 1H), 1.37 (m, 6H), 1.32 (m, 2H), 0.89 (m, 6H).

実施例55 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Trp) (5Ac) の調製

## 【0113】

実施例53の方法により、300mg (0.33mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Trp)-OBz1から180mg (76%) のライトピンク粉末である目的化合物が得られた。Mp 205.1-207.9°C.

## 【数3】

$[\alpha]_D^{25} = -1.3$  (c = 0.25, CH<sub>3</sub>OH)

ESI-MS (m/e) : 718 [M-H]<sup>-</sup>, IR (KBr) : 3221.2, 3059.1, 2981.9, 2941.4, 1660.7, 1533.4, 1448.5, 1388.7, 1240.2, 867.9, 748.4, 630.7, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.16 (m, 3H), 3.06 (m, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.68 (m, 4H), 1.47 (m, 3H), 1.37 (m, 2H), 1.25 (m,

3 H)、1.21(m, 3 H).

実施例 5 6 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Pro-Ala-Tyr)(5Ad)の調製

【0114】

実施例 5 3 の方法により、303 mg (0.34 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Bo-c-Pro-Ala-Tyr)-OBz1 から 174 mg (74%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 200.5-202.8 °C.

【数 4】

$$[\alpha]_D^{25} = -2.3 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

ESI-MS (m/e) : 695 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3215.3, 3055.2, 2983.8, 2947.2, 1658.8, 1548.8, 1523.8, 1448.5, 1384.9, 1238.3, 1163.1, 657.7, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.98 (m, 2H)、6.92 (m, 3H)、6.65 (s, 1H)、4.34-4.26 (m, 6H)、3.27 (m, 2H)、3.15 (m, 1H)、3.08 (m, 1H)、2.96 (m, 2H)、2.85 (m, 12H)、1.89 (m, 5H)、1.70 (s, 3H)、1.51 (m, 3H)、1.33 (m, 3H)、1.25 (m, 4H).

実施例 5 7 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Pro-Ala-Pro)(5Ae)の調製

【0115】

実施例 5 3 の方法により、301 mg (0.36 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Bo-c-Pro-Ala-Pro)-OBz1 から 179 mg (78%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 204.8-205.4 °C.

【数 5】

$$[\alpha]_D^{25} = -5.0 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

ESI-MS (m/e) : 629 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3244.3, 3070.7, 2980.1, 2947.2, 1662.6, 1639.5, 1554.6, 1450.5, 1379.1, 1246.1, 1201.6, 1047.3, 995.3, 871.8, 657.7, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.78 (s, 1H)、6.68 (s, 1H)、4.57 (m, 1H)、4.39-4.33 (m, 5H)、3.74 (m, 1H)、3.60 (m, 1H)、3.26 (m, 2H)、3.17 (m, 1H)、3.04 (m, 2H)、2.19 (m, 3H)、1.85 (m, 5H)、1.69 (m, 4H)、1.54 (m, 6H)、1.36 (m, 6H).

実施例 5 8 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Pro-Ala-Phe)(5Af)の調製

【0116】

実施例 5 3 の方法により、300 mg (0.34 mmol) の 3 S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys(Bo-c-Pro-Ala-Phe)-OBz1 から 183 mg (78%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 175.8-178.2 °C.

【数 6】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.3 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

ESI-MS (m/e) : 679 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3215.3, 3049.5, 2949.2, 1662.6, 1539.2, 1454.3, 1394.5, <sup>1</sup>

10

20

30

40

50

HNMR (300MHz、D<sub>2</sub>O) / ppm = 7.26 (m, 3H)、7.14 (m, 2H)、6.77 (s, 1H)、6.65 (s, 1H)、4.39-4.33 (m, 3H)、4.03 (m, 3H)、3.42 (m, 1H)、3.37 (m, 1H)、3.29 (m, 2H)、3.17 (m, 1H)、3.09 (m, 4H)、2.95 (m, 3H)、1.91 (m, 5H)、1.74 (s, 3H)、1.53 (s, 3H)、1.33 (m, 6H) .

実施例59 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Gly) (5Ag) の調製

【0117】

実施例53の方法により、300mg (0.38mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Gly)-OBz1から193mg (85%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 196.4-199.5°C.

【数7】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.0 \text{ (c=0.25, CH}_3\text{OH)}$$

ESI-MS (m/e) : 588 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3223, 1,306  
2,983, 8, 1630, 2, 1552, 7, 1537, 3, 1448, 5, 1  
382, 9, 1244, 1, 1049, 3, 1006, 8, 869, 9, 661, 6, 1  
HNMR (300MHz、D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.77 (s, 1H)、6.67 (s, 1H)、4.34-4.28 (m, 4H)、3.78 (s, 2H)、3.30 (m, 2H)、3.15 (m, 3H)、1.92 (m, 3H)、1.70 (s, 3H)、1.55 (s, 3H)、1.33 (m, 6H) .

実施例60 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Ser) (5Ah) の調製

【0118】

実施例53の方法により、300mg (0.37mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ser)-OBz1から181mg (79%) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 195.6-197.4°C.

【数8】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.8 \text{ (c=0.25, CH}_3\text{OH})$$

ESI-MS (m/e) : 619 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3228, 8, 306  
1,0, 2981, 9, 2943, 4, 1732, 1, 1662, 6, 1550, 7, 1  
533, 3, 1448, 5, 1384, 9, 1244, 1, 1159, 2, 1049, 3  
869, 9, 657, 7, 518, 8, <sup>1</sup>HNMR (300MHz、D<sub>2</sub>O) / ppm  
m = 6.78 (s, 1H)、6.67 (s, 1H)、4.41-4.26 (m, 5H)、  
3.74 (m, 2H)、3.25-3.13 (m, 6H)、1.91 (m, 3H)、1.  
69 (s, 3H)、1.55 (m, 3H)、1.46 (m, 2H)、1.37 (m, 6H) .

実施例61 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Ile) (5Ai) の調製

【0119】

実施例53の方法により、302mg (0.36mmol) の3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Boc-Pro-Ala-Ile)-OBz1から181mg (78%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 175.6-178.4°C.

## 【数9】

$[\alpha]_D^{25} = -3.3$  (c=0.25, CH<sub>3</sub>OH)

E S I - M S ( m / e ) : 645 [M-H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3224.9, 305  
 7.2, 2970.4, 2758.2, 2497.8, 2360.87, 1656.9, 1535.3, 1454.3, 1388.7, 1244.1, 1159.1, 1037.7, 871.8, 659.6, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.79 ( s, 1 H ), 6.68 ( s, 1 H ), 4.42 ( m, 1 H ), 4.35 ( m, 1 H ), 4.29 ( m, 1 H ), 4.18 ( m, 1 H ), 3.92 ( d, J = 1.2 H z, 1 H ), 3.31 ( m, 2 H ), 3.19 ( m, 2 H ), 3.10 ( m, 3 H ), 2.34 ( m, 1 H ), 2.12 ( m, 1 H ), 1.74 ( m, 4 H ), 1.57 ( m, 3 H ), 1.36 ( m, 6 H ), 1.21 ( m, 2 H ), 0.84 ( m, 9 H ).

実施例 62 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys ( Pro-Ala-Thr ) ( 5 A j ) の調製

## 【0120】

実施例 53 の方法により、300 mg ( 0.36 mmol ) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys ( Boc-Pro-Ala-Thr )-OBz1 から 175 mg ( 76 % ) の淡黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 194.8-197.5 °C.

## 【数10】

$[\alpha]_D^{25} = -2.8$  (c=0.25, CH<sub>3</sub>OH)

E S I - M S ( m / e ) : 633 [M-H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3236.5, 3066.8, 2933.7, 1660.7, 1548.8, 1533.4, 1450.8, 1381.0, 1240.2, 1157.3, 1049.3, 869.9, 669.3, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.81 ( s, 1 H ), 6.71 ( s, 1 H ), 4.43-4.31 ( m, 4 H ), 4.11 ( m, 2 H ), 3.33 ( m, 2 H ), 3.24 ( m, 1 H ), 3.24 ( m, 2 H ), 3.21 ( m, 1 H ), 3.18 ( m, 1 H ), 3.09 ( m, 1 H ), 1.94 ( m, 3 H ), 1.74 ( s, 3 H ), 1.58 ( s, 3 H ), 1.51 ( m, 2 H ), 1.23 ( m, 1 H ), 1.19 ( m, 1 H ), 1.14 ( m, 3 H ).

実施例 63 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys ( Pro-Ala-Lys ) ( 5 A k ) の調製

## 【0121】

実施例 53 の方法により、305 mg ( 0.31 mmol ) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys [ Boc-Pro-Ala-Lys I ( Z ) ]-OBz1 が得られる 152 mg ( 75 % ) の濃い黄色粉末である目的化合物が得られた。Mp 185.6-188.1 °C.

## 【数11】

$[\alpha]_D^{25} = -1.8$  (c=0.25, CH<sub>3</sub>OH)

E S I - M S ( m / e ) : 660 [M-H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3853.7, 3738.1, 2956.8, 2349.3, 2017.5, 1668.4, 1537.3, 1400.3, 1257.6, 1043.5, 871.8, 671.2, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.80 ( s, 1 H ), 6.69 ( s, 1 H ), 4.45 ( m, 1 H ), 4.35 ( m, 1 H ), 4.29 ( m, 1 H ), 4.18 ( m, 2 H ), 3.73 ( m, 2 H ), 3.22-3.13 ( m, 8 H ), 3.09 ( m, 4 H ), 2.95 ( m, 1 H ), 1.93 ( m, 6 H ), 1.74 ( m, 9 H ), 1.58 ( m, 6 H ), 1.47 ( m, 2 H ), 1.32-1.27 ( m, 16 H ), 1.18 ( m, 2 H ).

H) .

実施例 6 4 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( P r o - A l a - L e u ) ( 5 A l ) の調製

【 0 1 2 2 】

実施例 5 3 の方法により、300 mg ( 0.36 mmol ) の 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( B o c - P r o - A l a - L e u ) - O B z 1 から 178 mg ( 77 % ) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 189.7 - 192.7 °C.

【 数 1 2 】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.5 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

10

E S I - M S ( m / e ) : 645 [M - H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3224.9, 3064.9, 2956.8, 1660.7, 1548.8, 1535.3, 1448.5, 1381.0, 1242.2, 1049.3, 997.2, 869.9, 669.3, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.78 ( s, 1 H ), 6.68 ( s, 1 H ), 4.38 - 4.29 ( m, 3 H ), 4.13 ( m, 2 H ), 3.31 ( m, 3 H ), 3.21 ( m, 1 H ), 3.08 ( m, 2 H ), 1.89 ( m, 4 H ), 1.70 ( s, 3 H ), 1.57 ( m, 4 H ), 1.46 ( m, 5 H ), 1.32 ( m, 6 H ), 1.32 ( m, 1 H ), 1.16 ( m, 6 H ).

実施例 6 5 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( P r o - A l a - G l n ) ( 5 A m ) の調製

20

【 0 1 2 3 】

実施例 5 3 の方法により、300 mg ( 0.35 mmol ) の 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( B o c - P r o - A l a - G l n ) - O B z 1 から 184 mg ( 79 % ) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 181.3 - 183.3 °C.

【 数 1 3 】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.0 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

E S I - M S ( m / e ) : 660 [M - H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3213.4, 3059.1, 2981.9, 2943.4, 2362.8, 1739.8, 1662.6, 1548.8, 1537.3, 1450.5, 1375.3, 1244.1, 1047.2, 871.8, 659.7, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.80 ( s, 1 H ), 6.69 ( s, 1 H ), 4.40 - 4.29 ( m, 5 H ), 3.33 ( m, 3 H ), 3.17 ( m, 3 H ), 1.90 ( m, 2 H ), 1.69 ( s, 3 H ), 1.55 ( s, 3 H ), 1.43 ( m, 2 H ), 1.31 ( m, 8 H ).

30

実施例 6 6 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( P r o - A l a - A s n ) ( 5 A n ) の調製

【 0 1 2 4 】

実施例 5 3 の方法により、302 mg ( 0.36 mmol ) の 3 S - 6, 7 -ジヒドロキシ- 1, 1 -ジメチル- 1, 2, 3, 4 -テトラヒドロ- イソキノリン- 3 -ホルミル- L y s ( B o c - P r o - A l a - A s n ) - O B z 1 から 174 mg ( 78 % ) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 202.5 - 204.7 °C.

40

【 数 1 4 】

$$[\alpha]_D^{25} = -2.3 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

E S I - M S ( m / e ) : 646 [M - H]<sup>-</sup>、I R ( K B r ) : 3207.6, 3059.1, 2943.3, 1674.2, 1537.3, 1448.5, 1381.0, 1247.9, 642.3, <sup>1</sup>H N M R ( 300 M H z, D<sub>2</sub>O ) / p p m = 6.78 ( s, 1 H ), 6.67 ( s, 1 H ), 4.48 ( m, 1 H ), 4.42 - 4.29 ( m, 1 H ).

50

4 H)、3.29 (m, 2 H)、3.16 (m, 4 H)、2.65 (m, 2 H)、1.90 (m, 2 H)、1.69 (s, 3 H)、1.55 (s, 3 H)、1.31 (m, 6 H)

実施例 67 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Asp) (5Aa) の調製

【0125】

実施例 53 の方法により、300 mg (0.32 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-[Boc-Pro-Ala-Asp (OBz1)]-OBz1 から 174 mg (83%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 207.1-209.7 °C.

【数15】

$$[\alpha]_D^{25} = -3.5 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH)}$$

ESI-MS (m/e) : 647 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3383.3, 3061.0, 2360.9, 1670.3, 1550.8, 1448.5, 1400.3, 1246.3, 873.8, 611.4, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.76 (s, 1 H)、6.66 (s, 1 H)、4.52 (m, 1 H)、4.37-4.281 (m, 4 H)、3.27 (m, 4 H)、3.13 (m, 1 H)、3.05 (m, 1 H)、2.76 (m, 2 H)、1.97 (m, 1 H)、1.90 (m, 1 H)、1.71 (s, 3 H)、1.55 (s, 3 H)、1.43 (m, 2 H)、1.31 (m, 6 H)

実施例 68 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (Pro-Ala-Glu) (5Ap) の調製

【0126】

実施例 53 の方法により、301 mg (0.32 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys [Boc-Pro-Ala-Glu (OBz1)]-OBz1 から 173 mg (82%) の無色粉末である目的化合物が得られた。Mp 194.7-196.1 °C.

【数16】

$$[\alpha]_D^{25} = -2.3 \text{ (c = 0.25, CH}_3\text{OH})$$

ESI-MS (m/e) : 661 [M-H]<sup>-</sup>、IR (KBr) : 3053.3, 2945.3, 2370.5, 2320.4, 1651.1, 1546.9, 1533.4, 1448.5, 1388.8, 1240.2, 1165.0, 1045.4, 644.2, <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) / ppm = 6.78 (s, 1 H)、6.67 (s, 1 H)、4.42-4.28 (m, 5 H)、3.29 (m, 2 H)、3.13 (m, 3 H)、2.99 (m, 1 H)、2.38 (m, 2 H)、2.29 (m, 1 H)、1.90 (m, 5 H)、1.69 (s, 3 H)、1.55 (s, 3 H)、1.31 (m, 6 H)。

対照例 1 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys (6) の調製

【0127】

実施例 4 の方法により、1.00 g (2.03 mmol) の 3S-6,7-ジヒドロキシ-1,1-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-ホルミル-Lys-OBz1 から 620 mg (85%) のライトピンク固体である目的化合物が得られた。ESI-MS (m/e) : 363 [M-H]<sup>-</sup>。

実験例 1 本発明に係る化合物 5Aa-p の静脈薬投与の血栓溶解活性に対する評価

1) 評価方法

【0128】

200~220 g オスSDラットに対して 20% ウレタン溶液 (6 mL / kg, i.p)

10

20

30

40

50

. )により麻酔をかけた。麻酔ラットを仰臥位に固定し、右総頸動脈を分離させ、近位端で動脈鉗子によりクリッピングし、近位端及び遠位端に対してそれぞれ縫合糸を縫い、遠位端の縫合糸を毛皮用止血鉗子でクリッピングし、遠位端で挿管し、動脈鉗子を緩め、約 1 m L の動脈血を放出し 1 m L の E P 管に入れた。垂直に固定されたガラス管（長さが 15 mm、内径が 2.5 mm、外径が 5.0 mm であり、管の底部がゴムプラグにより密封された）に 0.1 m L のラットの動脈血液を注入し、管内に速やかにステンレス材料の血栓固定ボルトを 1 本挿入した。当該血栓固定螺旋は、直径が 0.2 mm のステンレス線により巻き付けられ、螺旋部分の長さが 1.2 mm であり、1.5 の螺旋リングを含み、螺旋リングの直径が 1.0 mm であり、支持ハンドルと螺旋とが接続され、長さが 7.0 mm であり、疑問符の形を呈した。血液が凝固し 40 min の後で、ガラス管の底部のゴムプラグを開け、ピンセットにより血栓固定螺旋の支持ハンドルを固定し、ガラス管から血栓に包まれた血栓固定螺旋を取り出し、精確に重量を量った。 10

#### 【 0 1 2 9 】

バイパス挿管は 3 段からなる。中段は、ポリエチレンホースであり、長さが 60 mm、内径が 3.5 mm であり、両端は、同じポリエチレン管であり、長さが 100 mm、内径が 1 mm、外径が 2 mm である。当該管の一端は、尖った管（ラットの頸動脈又は静脈への挿入用）に引かれ、外径が 1 mm であり、他端の外部には、長さが 7 mm、外径が 3.5 mm であるポリエチレン管（太くされ、中段のポリエチレンホース内への挿入用）が覆われた。3 段管の何れの内壁もシリル化された。血栓に包まれた血栓固定螺旋を中段のポリエチレンホース内に入れて、ホースの両端がそれぞれ 2 本のポリエチレンの太端と互いに覆った。注射器により尖った管端を通して管にヘパリン生理食塩水溶液（50 IU / kg）を満たして使用に備えた。 20

#### 【 0 1 3 0 】

ラットの左外頸静脈を分離させ、近位端及び遠位端に対してそれぞれ縫合糸を縫い、遠位端を結紮し、露出された左外頸静脈で慎重に斜切口を切り、上記の調製しておいたバイパスパイプの尖った管を斜切口から左外頸静脈開口の近位端に挿入し、同時にバイパス管中段（精確に重量を量ったの血栓固定螺旋を含む）内の血栓固定螺旋の支持ハンドルから離れた。注射器により他端の尖った管を通して精確量のヘパリン生理食塩水（50 IU / kg）を押入れ、この時に注射器からポリエチレン管を取り去らず、止血鉗子により注射器とポリエチレン管にあるソフトチューブをクリッピングした。右総頸動脈の近位端で動脈鉗子により止血し、動脈鉗子に近いところで右総頸動脈に対して慎重に斜切口を切った。ポリエチレン管の尖った部から注射器を抜き取り、ポリエチレン管の尖った部を動脈の斜切口の近位端に挿入した。バイパスパイプの両端の何れも 4 号縫合糸により動静脈と固定した。 30

#### 【 0 1 3 1 】

頭皮鍼により生理食塩水、ウロキナーゼの生理食塩水溶液又は濃度が異なった化合物の生理食塩水溶液をバイパス管の中段（精確に重量を量ったの血栓固定螺旋を含む）を通して、血栓固定螺旋から離れた静脈に近いところに挿入し、動脈鉗子を開けて、血がバイパスパイプを通して動脈から静脈に流れ、これは即ちラット動静脈バイパスの血栓溶解モデルである。ゆっくり注射器における液体を血液に（約 6 min）注入して、生理食塩水、ウロキナーゼ又は本発明に係る化合物が血液循環により、静脈-心臓-動脈の順に従い血栓に作用した。注射開始時から時間測定をし、1 h 後でバイパスパイプから血栓固定螺旋を取り出し、精確に重量を量った。各ラットのバイパスパイプにおける血栓固定螺旋の薬投与前後の質量差を計算し、化合物の体内血栓溶解活性を統計し評価した。血栓重量減少は、平均値及び基準差（-X ± SD）で表示される。 40

#### 2 ) 薬投与方法と用量

#### 【 0 1 3 2 】

静脈に注射により薬投与した。空白対照が生理食塩水であり、薬投与の用量が 3 m L / kg であった。陽性対照がウロキナーゼであり、用量が 20000 U / kg であり、1.68 mg / kg に相当した。本発明に係る化合物 5 A a - p の用量が 0.1 nmol / kg 50

g であった。

### 3 ) 評価結果

#### 【 0 1 3 3 】

血栓溶解活性は、血栓重量減少  
(外)

$$(\bar{X} \pm S D \text{ mg})$$

で表示され、結果が表 1 に示された。データにより、 $0.1 \text{ nmol} / \text{kg}$  の用量で静脈に薬投与して化合物 5 A a - p が血栓 (生理食塩水との比較で  $p < 0.01$ ) を効果的に溶解させることができ、化合物 5 A a、5 A f、5 A g、5 A k、5 A o の血栓溶解活性が用量が  $20000 \text{ U} / \text{kg}$  であるウロキナーゼに相当することが判明された。血栓溶解活性が優れた 5 A a、5 A d、5 A f、5 A g、5 A k における 5 A k の血栓溶解活性が一番強いため、更に用量依頼関係を評価した。

#### 【表 1 】

表 1 本発明に係る化合物 5 A a - p の静脈薬投与の血栓溶解活性

化合物	血栓重量減少	化合物	血栓重量減少
生理食塩水	$9.25 \pm 1.59$	ウロキナーゼ	$18.95 \pm 2.73 \text{ a}$
5 A a	$19.35 \pm 2.76 \text{ b}$	5 A i	$16.00 \pm 2.03 \text{ a}$
5 A b	$17.12 \pm 1.64 \text{ a}$	5 A j	$15.23 \pm 2.45 \text{ a}$
5 A c	$16.23 \pm 2.81 \text{ a}$	5 A k	$19.38 \pm 2.81 \text{ b}$
5 A d	$18.11 \pm 2.48 \text{ b}$	5 A l	$14.65 \pm 2.86 \text{ a}$
5 A e	$13.63 \pm 1.92 \text{ a}$	5 A m	$16.65 \pm 2.52 \text{ a}$
5 A f	$17.92 \pm 1.69 \text{ b}$	5 A n	$16.44 \pm 2.32 \text{ a}$
5 A g	$18.98 \pm 2.14 \text{ b}$	5 A o	$15.86 \pm 2.21 \text{ a}$
5 A h	$17.10 \pm 1.79 \text{ a}$	5 A p	$16.03 \pm 2.14 \text{ a}$
6	$13.87 \pm 3.07 \text{ a}$	PAK	$14.17 \pm 1.84 \text{ a}$
6 + PAK	$15.37 \pm 3.00 \text{ a}$		

10

20

30

$n = 10$ 、a ) 生理食塩水との比較で  $p < 0.01$ 、b ) 生理食塩水との比較で  $p < 0.01$ 、化合物 6、PAK 及び 6 + PAK との比較で  $p < 0.05$ 、ウロキナーゼとの比較で  $p > 0.05$ 。

実験例 2 本発明に係る化合物 5 A k の静脈薬投与の血栓溶解活性の用量効果関係に対する評価

#### 【 0 1 3 4 】

実験例 1 の方法により静脈注射による薬投与をした。空白対照が生理食塩水であり、薬投与の用量が  $3 \text{ mL} / \text{kg}$  であった。陽性対照がウロキナーゼであり、薬投与の用量が  $20000 \text{ U} / \text{kg}$  であり、 $1.68 \text{ mg} / \text{kg}$  に相当した。5 A k に対して  $0.1 \text{ nmol} / \text{kg}$  (高)、 $0.01 \text{ nmol} / \text{kg}$  (中) と  $0.001 \text{ nmol} / \text{kg}$  (低) の 3 つの用量を選び取った。結果が表 2 に示された。データにより、5 A k は著しい用量効果関係が表示されることが判明された。

40

## 【表2】

表2 本発明に係る化合物5Akの血栓溶解の用量効果関係

化合物	血栓重量減少 ( $\bar{X} \pm S D$ mg)
生理食塩水、3mL/kg	10.55 ± 2.52
ウロキナーゼ、20000U/kg	25.61 ± 3.87
5Ak、0.1nmol/kg	21.61 ± 4.62 a
5Ak、0.01nmol/kg	14.62 ± 2.46 b
5Ak、0.001nmol/kg	11.73 ± 2.15 c

n = 10、a) 生理食塩水及び0.01nmol/kgの5Akとの比較でp < 0.01、b) 生理食塩水及び0.001nmol/kgの5Akとの比較でp < 0.01、c) 生理食塩水との比較でp > 0.05。

## 実験例3 本発明に係る化合物5Aa-pの静脈薬投与の抗血栓活性に対する評価

## 1) 評価方法

## 【0135】

挿管は3段からなり、中段の長さが80mm、内径が3.5mmであり、両端が同じポリエチレン管であり、長さが100mm、内径が1mm、外径が2mmであり、当該管の一端が尖った管(ラットの頸動脈又は静脈への挿入用)に引かれ、3段管の何れの内壁もシリル化された。前もって重量を量た長さ60mmの糸を中段のポリエチレン太管に入れ、太管の両端がそれぞれ2本のポリエチレン細管の細くされない端と互いに覆われた(一段が0.5mmの糸を押さえて固定した)。注射器により尖った管端を通して管にヘパリン生理食塩水溶液(50IU/kg)を満たして使用に備えた。

## 【0136】

200~220gのオスSDラットに対して、20%ウレタン溶液(6mL/kg、i.p.)によって麻酔をかけた。麻酔ラットを仰臥位に固定し、ラットの左外頸静脈を分離させ、近位端及び遠位端に対してそれぞれ縫合糸を縫い、遠位端を結紮し、露出された左外頸静脈で慎重に斜切口を切り、上記の調製しておいたバイパスパイプの糸が押さえられない端の尖った管を斜切口から左外頸静脈開口の近位端に挿入し、注射器により他端の尖った管を通して精確量のヘパリン生理食塩水(50IU/kg)を押入れて、注射器を交換し、同じ方法により精確量の薬物を押入れ、この時に注射器からポリエチレン管を取り去らず、右総頸動脈を分離させ、近位端で動脈鉗子をクリッピングし、近位端及び遠位端に対してそれぞれ縫合糸を縫い、遠位端を結紮し、動脈鉗子に近いところで右総頸動脈に対して慎重に斜切口を切った。ポリエチレン管の尖った部から注射器を抜き取り、ポリエチレン管の尖った部を動脈の斜切口の近位端に挿入した。バイパスパイプの両端の何れも4号縫合糸により動静脈と固定した。動脈鉗子を開けて、血がバイパスパイプを通して動脈から静脈に流れ、これは即ちラット動静脈バイパスの血栓溶解モデルである。注射開始時から時間測定をし、15min後でバイパスパイプから血栓がかけられた糸を取り出し、精確に重量を量り、糸の前後の質量差が血栓の湿重量であり、化合物の体内抗血栓活性を統計し評価した。血栓の湿重量は、平均値及び基準差(-X ± SD)で表示される。

## 2) 薬投与方法と用量

## 【0137】

静脈に薬投与した。空白对照が生理食塩水であり、薬投与の用量が1mL/kgであった。陽性対照がアスピリンであり、薬投与の用量が9mg/kgであった。本発明に係る化合物5Aa-pの用量が0.1nmol/kgであった。

## 3) 結果

10

20

30

40

50

## 【0138】

抗血栓活性は、血栓湿重量  
(外)

$(\bar{X} \pm S D m g)$

で表示され、結果が表3に示された。データにより、 $0.1 \text{ nmol/kg}$ の用量で化合物5Akを静脈投与すれば、血栓形成(生理食塩水との比較で $p < 0.001$ )を効果的に抑制できことが判明され、活性の優れた5Akについて、更に、用量依存関係を評価した。

## 【表3】

10

表3 本発明に係る化合物5Aa-pの静脈薬投与による体内抗血栓実験

化合物	血栓湿重量 ( $\bar{X} \pm S D m g$ )	化合物	血栓湿重量 ( $\bar{X} \pm S D m g$ )
NS	65.40 ± 2.73	Aspirin	46.95 ± 5.21 a
5Aa	54.04 ± 6.43 a	5Ai	56.12 ± 5.55 a
5Ab	54.17 ± 6.61 a	5Aj	50.56 ± 3.96 a
5Ac	52.93 ± 3.96 a	5Ak	51.93 ± 2.74 a
5Ad	51.91 ± 4.97 a	5Al	54.20 ± 3.93 a
5Ae	57.20 ± 6.43 a	5Am	58.14 ± 2.30 a
5Af	54.01 ± 4.25 a	5An	55.11 ± 4.76 a
5Ag	54.28 ± 3.57 a	5Ao	48.34 ± 3.29 a
5Ah	50.67 ± 3.71 a	5Ap	49.97 ± 6.32 a

20

$n = 10$ 、5Aa-p(i.v.) :  $0.1 \text{ nmol/kg}$ 、Aspirin :  $9 \text{ mg/kg}$

a) NSとの比較で、 $p < 0.001$ 。

実験例4 本発明に係る化合物5Akの静脈薬投与の抗血栓活性の用量効果関係に対する評価

## 1) 評価方法

30

## 【0139】

実験例3の方法と同じであった。

## 2) 薬投与方法と用量

## 【0140】

静脈に薬投与した。空白対照が生理食塩水であり、薬投与の用量が $3 \text{ mL/kg}$ であった。陽性対照がアスピリンであり、薬投与の用量が $9 \text{ mg/kg}$ であった。5Akに対して $0.1 \text{ nmol/kg}$ (高)、 $0.01 \text{ nmol/kg}$ (中)と $0.001 \text{ nmol/kg}$ (低)の3つの用量を選び取った。

## 3) 結果

## 【0141】

40

結果が表4に示され、5Akが著しい用量効果関係が表示された。

## 【表4】

表4 本発明に係る化合物5Akの体内抗血栓の実験用量効果関係

化合物	血栓湿重量 ( $\bar{X} \pm S D m g$ )
NS	63.46 ± 3.67
Aspirin	45.62 ± 2.60
5Ak、 $0.1 \text{ nmol/kg}$	52.16 ± 2.02 a
5Ak、 $0.01 \text{ nmol/kg}$	57.34 ± 3.73 b
5Ak、 $0.001 \text{ nmol/kg}$	61.91 ± 3.27 c

50

$n = 10$ 、a) 生理食塩水及び $0.01 \text{ nmol} / \text{kg}$ の5Akとの比較で $p < 0.01$ 、b) 生理食塩水及び $0.001 \text{ nmol} / \text{kg}$ の5Akとの比較で $p < 0.01$ 、c) 生理食塩水との比較で $p > 0.05$ 。

#### 実験例5 本発明に係る化合物5Akが卒中ラットへの治療作用に対する評価

##### 【0142】

化合物5Aa-pが卒中ラットへの治療作用を考察するために、化合物5Akを代表として選び取り、以下の方法により卒中ラットへの治療作用を考察した。

##### 1) 評価方法

##### 【0143】

SDオスマット(280-300g)をランダムにUK陽性対照組に分けられ、用量が20000IU/kgであった。生理食塩水の空白対照組において、化合物対照組PAKの用量が $5 \mu\text{mol} / \text{kg}$ であり、化合物5Ak組の用量が $1 \mu\text{mol} / \text{kg}$ (高)、 $0.1 \mu\text{mol} / \text{kg}$ (中)と $0.01 \mu\text{mol} / \text{kg}$ (低)であった。ラットに対して10%抱水クロラール(400mg/kg)で腹腔注射により麻酔をかけ、頸部の真ん中のやや右に寄せた部分で垂直に約2cmの長さの切口を切り、胸鎖乳突筋の内側縁を沿って右総頸動脈(CC A)、頸外動脈(ECA)と頸内動脈(ICA)を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈に対して小さい開口を切り、頸外動脈の遠位端を結紮し、頸総動脈の近位端の動脈鉗子を緩め、 $10 \mu\text{L}$ の血を取り、血を取った後で非侵襲的動脈鉗子により頸総動脈の近位端をクリッピングした。取られた $10 \mu\text{L}$ の血を $1 \text{mL}$ のEP管に入れ、常温で30分間置いて血液を凝固させ、そして-20°C冷藏庫の中に移動し1時間置いて、血液を固結させた。1時間終了後、血塊を取り出し、 $1 \text{mL}$ の生理食塩水を入れスチールショベルにより血塊をサイズが均一で小さな血栓につき砕き、そして小さな血栓の懸濁液を $1 \text{mL}$ の注射器内に移動して使用に備えた。ラット頸内の動脈鉗子を緩める同時に、上記 $1 \text{mL}$ の注射器内の血栓懸濁液をゆっくりラットの頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通してラットの大脳に注入し、そして頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開けて、血の流れを回復させた。そしてラット総頸静脈を分離させ、注入されたUK用量が20000IU/kgであり、生理食塩水又は化合物5Ak組の用量が $1 \mu\text{mol} / \text{kg}$ であった。静脈を結紮し、傷口に3滴のペニシリンを滴下し、傷口を縫合し、動物の蘇生まで待った。

##### 【0144】

ラットが蘇生してから24時間の後、Zea longa方法により神経機能の欠損程度を評定した。0点は、いかなる神経機能が消失した兆候がないことを示し、1点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4点は、意識障害で自主歩行が無しを示し、5点は、死亡したことを示した。以上、各組の採点結果に対して統計学で比較し、t検証をした。

##### 【0145】

ラットが蘇生してから24時間の後Zea longa方法により神経機能の欠損程度を評定した後、ウレタンにより麻酔をかけた後で速やかに首を切り大脳を取り、脳組織を-20°Cの冷藏庫に2時間置いた後で、前頭極から約2mmの冠状連続的なスライスし、共に5枚であり、そして2%TTC溶液に入れ37°Cで光避け30min孵化させ、脳スライスの色変化を観察し、正常組織がTTCにより赤色に染められ、虚血組織が白色を呈した。そしてデジタルカメラにより写真を撮り、画像計ソフトウェアで処理し、冠状スライスにおける梗塞の体積と正常組織の面積を計算し、各組の梗塞体積百分比の値を統計し、並做t検証をした。

##### 2) 評価結果

##### 【0146】

ラット蘇生後のZea longa方法による採点データが表5に示され、ラットの大脳梗塞体積の百分比データが表6に示された。

10

20

30

40

50

## 【表5】

表5 ラット蘇生後24hのZealonga方法による採点

化合物	神経機能採点 ( $\bar{x} \pm S.D.$ )
生理食塩水	2. 90 ± 0. 99
ウロキナーゼ、20000IU/kg	1. 30 ± 0. 95 a
5AK、1μmol/kg	1. 10 ± 0. 74 a
5AK、0.1μmol/kg	1. 40 ± 1. 07 b
5AK、0.01μmol/kg	2. 30 ± 0. 95 c
PAK、5μmol/kg	2. 20 ± 1. 60

10

n = 9、a) 生理食塩水及び0.1μmol/kgの5AKとの比較でp < 0.05、  
 b) 生理食塩水及び0.01μmol/kgの5AKとの比較でp < 0.05、c) 生理食塩水及び5μmol/kgのPAKとの比較でp > 0.05。

## 【表6】

表6 ラットの大脳梗塞体積の百分比 (%)

化合物	梗塞体積比 ( $\bar{x} \pm S.D.$ %)
生理食塩水	22. 99 ± 5. 08
ウロキナーゼ、20000IU/kg	4. 60 ± 2. 09
5AK、1μmol/kg	3. 44 ± 1. 99 a
5AK、0.1μmol/kg	9. 88 ± 2. 52 b
5AK、0.01μmol/kg	18. 05 ± 5. 77 c
PAK、5μmol/kg	18. 36 ± 7. 38

20

n = 7、a) 生理食塩水との比較でp < 0.01、0.1μmol/kgの5AKとの比較でp < 0.05、ウロキナーゼとの比較でp > 0.05、b) 生理食塩水及び0.1μmol/kgの5AKとの比較でp < 0.05、c) 生理食塩水との比較でp > 0.05。

## 【0147】

30

表5と表6のデータにより、化合物5AKは、脳虚血のラットの運動障害と大脳組織の梗塞を効果的に防止することが判明された。5AKのこのような機能は、用量依存関係を有した。

## 実験例6 本発明に係る化合物5Aa-pフリーラジカル消去の活性に対する評価

## 1) ヒドロキシフリーラジカル活性の消去

## 【0148】

11.316mgのDMPO(ジメチルピリジンN-酸化物、5igm)を1mLの純水に溶解させて、濃度が0.1MのDMPO溶液を得て、2.78gのFeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oを1mLの純水に溶解させて濃度が10mMの溶液を得た。30%医用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を0.2%に希釈した。

40

## 【0149】

まず2.5μLのFeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O溶液+2.5μLのDMPO溶液+5μLのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液+5μLの水のOH信号ピークの第1のピークの高さを測定し、6回を重複して、当該ピークの高さが既知のOH信号ピークの高さであった。更に2.5μLのFeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O溶液+2.5μLのDMPO溶液+5μLのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液+5μLの化合物5Aa-pの1つの溶液のOH信号ピークの第1のピークの高さを測定し、6回を重複した。当該ピークの高さは、即ち5Aa-pが既知のOH信号ピークの高さを消去した残りのことであった。

## 【0150】

消去率 = (既知のOH信号ピークの高さ - 5Aa-pを入れたOH信号ピークの高さ)

50

/ 既知のO H信号ピークの高さ。

2) NOフリーラジカル活性の消去

【0151】

7.325 mgのM G D (N-メチル-グルコサミンジチオカルバミン、S i g m a)を1 mLの純水に溶解させ濃度が25 mMのM G D溶液を得て、3.475 gのFe S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>Oを1 mLの純水に溶解させ濃度が12.5 mMの溶液を得て、25 mgのS N A P (S-ニトロソ-N-アセチル-D L-ペニシラミン; S-n i t r o s o -N-a c e t y l p e n i c i l l a m i n e)を1 mLの純水に溶解させ濃度が110 μMの緑色母液を得て、100倍に希釈して1 μMのS N A P溶液を得た。

【0152】

まず5 μL M G D溶液 + 5 μLのFe S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O溶液 + 5 μLのS N A P + 5 μLの水のNO信号の第1のピークの高さを測定し、6回を重複した。当該ピークの高さが既知のNO信号ピークの高さであった。更に5 μLのM G D溶液 + 5 μLのFe S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O溶液 + 5 μLのS N A P + 5 μLの化合物5 A a - p溶液の1つのNO信号ピークの第1のピークの高さを測定し、6回を重複した。当該ピークの高さは、即ち5 A a - pが既知のNO信号ピークの高さを消去した残りのことであった。

【0153】

消去率 = (既知のNO信号ピークの高さ - 5 A a - pを入れたNO信号ピークの高さ) / 既知のNO信号ピークの高さ。

3) 超酸化物陰イオンフリーラジカル活性の消去

【0154】

0.3 gのヒポキサンチンを1 mLの純水に溶解させ濃度が0.5 Mのヒポキサンチン溶液(乳白色、大量が不溶性である)を得て、市販のヒポキサンチンオキシダーゼ原液を10倍に希釈してヒポキサンチンオキシダーゼ溶液を得て、飽和D E T A P A C溶液を20倍に希釈して濃度が0.9 mMの溶液を得て、11.316 mgのD M P Oを1 mLの純水に溶解させ濃度が0.1 MのD M P O溶液を得た。

【0155】

5 μLのD M P O溶液 + 5 μLのD E T A P A C溶液 + 5 μLのヒポキサンチン溶液 + 5 μLのヒポキサンチンオキシダーゼ溶液 + 5 μLの化合物5 A a - p溶液。

【0156】

まず5 μLのD M P O溶液 + 5 μLのD E T A P A C溶液 + 5 μLのヒポキサンチン溶液 + 5 μLのヒポキサンチンオキシダーゼ溶液 + 5 μLの水の超酸化物陰イオン信号の第1のピークの高さを測定し、6回を重複した。当該ピークの高さは、即ち既知の超酸化物陰イオンの信号ピークの高さであった。更に5 μLのD M P O溶液 + 5 μLのD E T A P A C溶液 + 5 μLのヒポキサンチン溶液 + 5 μLのヒポキサンチンオキシダーゼ溶液 + 5 μL化合物5 A a - p溶液の1つの超酸化物陰イオンの信号ピークの第1のピークの高さを測定し、6回を重複した。当該ピークの高さは、即ち5 A a - pが既知の超酸化物陰イオンの信号ピークの高さを消去した残りのことであった。

【0157】

消去率 = (既知の超酸化物陰イオン信号ピークの高さ - 5 A a - pを入れた超酸化物信号ピークの高さ / 既知の超酸化物陰イオンの信号ピークの高さ)。

【0158】

結果は表7に示された。データにより、5 A a - pは、三種のフリーラジカル活性を消去したE C<sub>50</sub>が0.4 ~ 0.7 mMであり、明確なフリーラジカル消去活性を有することが判明された。

10

20

30

40

【表7】

表7 本発明に係る化合物5Aa-pによるフリーラジカル消去のEC<sub>50</sub>

化合物	以下のフリーラジカルを消去したEC <sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm SD \times 10^{-4} M$ )		
	·NO	·OH	超酸化物陰イオンフリーラジカル
5Aa	5. 99±0. 38	4. 59±0. 66	4. 77±0. 56
5Ab	5. 32±0. 73	4. 71±0. 71	4. 71±0. 34
5Ac	4. 63±0. 92	3. 78±0. 85	3. 66±0. 71
5Ad	4. 53±0. 41	3. 69±0. 32	3. 54±0. 71
5Ae	6. 17±0. 88	4. 66±0. 47	4. 81±0. 45
5Af	5. 68±0. 95	5. 44±0. 43	4. 85±0. 31
5Ag	6. 09±0. 95	4. 22±0. 61	4. 67±0. 94
5Ah	5. 23±0. 85	4. 13±0. 73	4. 01±0. 72
5Ai	5. 27±0. 90	4. 95±0. 61	4. 52±0. 64
5Aj	5. 10±0. 75	4. 16±0. 28	4. 17±0. 95
5Ak	4. 99±0. 89	4. 22±0. 82	3. 63±0. 94
5Al	5. 03±0. 41	4. 89±0. 32	4. 14±0. 97
5Am	6. 47±0. 88	4. 66±0. 77	3. 71±0. 45
5An	6. 59±0. 89	5. 72±0. 72	3. 83±0. 94
5Ao	4. 73±0. 99	3. 96±0. 48	4. 35±0. 65
5Ap	4. 77±0. 91	4. 0±0. 51	4. 20±0. 73

$n = 6$ 、EC<sub>50</sub> =  $X \pm SD$  化合物濃度が  $X \times 10^{-4} M$ 。

実験例7 本発明に係る化合物5Aa-pの透過型電子顕微鏡による測定

【0159】

サンプルを3回蒸留の水によりそれぞれ $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-1} M$ の溶液に調製し、微量(約 $10 \mu L$ )を吸い取って銅網の表面に滴下し、銅網の下に濾過紙を敷き、自然乾燥させ、透過型電子顕微鏡(JEOL、JEM-1230)によってその形状及び粒径を観察し、写真に記録した。

【0160】

水溶液で本発明に係る化合物5Aa-pは、直徑が $20 \sim 210 nm$ のナノスフェアに自己組織化することができ、殆どの粒径が $20 \sim 100 nm$ にあり、これらのナノスフェアがつながた形の異なったナノ網、ナノ鎖等を形成し、現在、 $1 \times 10^{-9} M$ の体内濃度(理論的な血中濃度)を例として、各化合物の電子顕微鏡図(図9)を挙げた。図9において、本発明に係る化合物5Aa-pが対応した図番は、それぞれ5a、5b、5c、5d、5e、5f、5g、5h、5i、5j、5k、5l、5m、5n、5oと5pであった。

実験例8 ラットが卒中になって4時間の後で $1 \mu mol/kg$ の5Akによる6回の連続的治療を受ける試験

【0161】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オスSDラットに対して、腹腔に用量が $400 mg/kg$ の体重である10%抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹(長さ:約3cm)を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で $0.5 mL$ の血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の $0.5 mL$ の血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注

10

20

30

40

50

射により2万IUのペニシリンを注射した。4時間後、化合物5AK(用量: 1 μmol/kg, n = 10)の生理食塩水溶液を連続的に6日間点滴注射をし、7日間観察し、毎日自身を対照し、Zeal ong a方法により神経機能の欠損程度を評定した。0点は、いかなる神経機能が欠失した兆候がないことを示し、1点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5点は、死亡したことを示した。試験結果は、表8に示された。結果により、ラットが卒中になって4時間の後で、毎日1回の用量が1 μmol/kgの5AKによる治療を受け、連続的に6回の治療を受け、死亡せず、10匹のラットの中に8匹が持ち直し、いかなる神経機能が欠失した兆候がなく、2匹が軽い神経機能が欠失した兆候があった。これにより、1 μmol/kgの用量で、5AKは卒中になって4時間の場合に対して確実な治療の効果があることが判明された。

## 【表8】

表8 ラットが卒中になって4時間の後で1 μmol/kgの5AKによる治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean ± SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	3匹	5匹	1匹	1匹	0匹	0匹
2日目	5匹	4匹	1匹	0匹	0匹	0匹
3日目	3匹	6匹	1匹	0匹	0匹	0匹
4日目	8匹	1匹	1匹	0匹	0匹	0匹
5日目	6匹	4匹	0匹	0匹	0匹	0匹
6日目	8匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹

実験例9 ラットが卒中になって6時間の後で1 μmol/kgの5AKによる6回の連続的治療を受ける試験

## 【0162】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オスSDラットに対して、腹腔に用量が400mg/kgの体重である10%抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹(長さ: 約3cm)を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で0.5mLの血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の0.5mLの血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注射により2万IUのペニシリンを注射した。6時間後、化合物5AK(用量: 1 μmol/kg, n = 10)の生理食塩水溶液を連続的に6日間点滴注射をし、7日間観察し、毎日自身を対照し、Zeal ong a方法により神経機能の欠損程度を評定した。0点は、いかなる神経機能が欠失した兆候がないことを示し、1点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5点は、死亡したことを示した。試験結果は、表9に示された。結果により、ラットが卒中になって6時間の後で、毎日1回の用量が1 μmol/kgの5AKによる治療を受け、連続的に6回の治療を受け、1匹が意外に死亡した以外、9匹のラットの中に6匹が持ち直し、いかなる神経機能が欠失した兆候がなく、3匹が軽い神経機能が欠失した兆候があった。これにより、1 μmol/kgの用量で、5AKは卒中になって6時間の場合に対して確実な治療の効果があることが判明された。

【表9】

表9 ラットが卒中になって6時間の後で $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の5AKによる治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean $\pm$ SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	0匹	4匹	4匹	2匹	0匹	0匹
2日目	0匹	7匹	2匹	1匹	0匹	0匹
3日目	1匹	6匹	2匹	1匹	0匹	0匹
4日目	4匹	4匹	1匹	0匹	0匹	1匹
5日目	7匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹
6日目	6匹	3匹	0匹	0匹	0匹	0匹

10

実験例10 ラットが卒中になって24時間の後で $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の5AKによる6回の連続的治療を受ける試験

【0163】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オスSDラットに対して、腹腔に用量が $400 \text{mg}/\text{kg}$ の体重である10%抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹（長さ：約3cm）を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で $0.5 \text{mL}$ の血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の $0.5 \text{mL}$ の血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注射により2万IUのペニシリンを注射した。24時間後、化合物5AK（用量： $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、n=10）の生理食塩水溶液を連続的に6日間点滴注射をし、7日間観察し、毎日自身を対照し、Zea longa方法により神経機能の欠損程度を評定した。0点は、いかなる神経機能が欠失した兆候がないことを示し、1点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5点は、死亡したことを示した。試験結果は、表10に示された。結果により、ラットが卒中になって24時間の後で、2匹が死亡し、残りの8匹が毎日1回の用量が $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の5AKによる治療を受け、連続的に6回の治療を受け、8匹のラットの中に3匹が持ち直し、いかなる神経機能が欠失した兆候がなく、4匹が軽い神経機能が欠失した兆候があり、1匹が著しい神経機能が欠失した兆候があった。これにより、 $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で、5AKは卒中になって24時間の場合に対して依然として確実な治療の効果があることが判明された。

20

【表10】

表10 ラットが卒中になって24時間の後で $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の5AKによる治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean $\pm$ SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	1匹	4匹	0匹	2匹	1匹	0匹
2日目	2匹	3匹	3匹	1匹	0匹	0匹
3日目	3匹	2匹	3匹	0匹	0匹	0匹
4日目	2匹	3匹	3匹	0匹	0匹	0匹
5日目	4匹	3匹	1匹	0匹	0匹	0匹
6日目	3匹	4匹	1匹	0匹	0匹	0匹

30

40

50

実験例 1 1 ラットが卒中になって 6 時間の後で  $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の 5 A k による 6 回の連続的治療を受ける試験

【 0 1 6 4 】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オス SD ラットに対して、腹腔に用量が  $400 \text{mg}/\text{kg}$  の体重である 10 % 抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹（長さ：約 3 cm）を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で  $0.5 \text{mL}$  の血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の  $0.5 \text{mL}$  の血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注射により 2 万 IU のペニシリンを注射した。6 時間後、化合物 5 A K（用量： $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、n = 10）の生理食塩水溶液を連続的に 6 日間点滴注射をし、7 日間観察し、毎日自身を対照し、Zea longa 方法により神経機能の欠損程度を評定した。0 点は、いかなる神経機能が消失した兆候がないことを示し、1 点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2 点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3 点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4 点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5 点は、死亡したことを示した。試験結果は、表 1 1 に示された。結果により、9 匹のラットが卒中になって 6 時間の後で、毎日 1 回の用量が  $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の 5 A k による治療を受け、連続的に 6 回の治療を受け、死亡せず、9 匹のラットの中に 7 匹が持ち直し、いかなる神経機能が消失した兆候がなく、1 匹が軽い神経機能が消失した兆候があった。これにより、 $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の用量で、5 A k が卒中になって 6 時間の場合に対する治療の効果は、 $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の用量での治療よりも著しく優れたことが判明された。

【表 1 1】

表 1 1 ラットが卒中になって 6 時間の後で  $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の 5 A k による治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean $\pm$ SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	1匹	7匹	0匹	1匹	0匹	0匹
2日目	3匹	4匹	2匹	0匹	0匹	0匹
3日目	6匹	2匹	1匹	0匹	0匹	0匹
4日目	6匹	3匹	0匹	0匹	0匹	0匹
5日目	5匹	4匹	0匹	0匹	0匹	0匹
6日目	7匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹

実験例 1 2 ラットが卒中になって 24 時間の後で  $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$  の 5 A k による 6 回の連続的治療を受ける試験

【 0 1 6 5 】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オス SD ラットに対して、腹腔に用量が  $400 \text{mg}/\text{kg}$  の体重である 10 % 抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹（長さ：約 3 cm）を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で  $0.5 \text{mL}$  の血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の  $0.5 \text{mL}$  の血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の

10

20

30

40

50

動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注射により2万IUのペニシリンを注射した。24時間後、化合物5AK(用量: 2.5 μmol/kg, n = 10)の生理食塩水溶液を連続的に6日間点滴注射をし、7日間観察し、毎日自身を対照し、Zea longa方法により神経機能の欠損程度を評定した。0点は、いかなる神経機能が欠失した兆候がないことを示し、1点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5点は、死亡したことを示した。試験結果は、表12に示された。結果により、ラットが卒中になって24時間の後で、3匹が死亡し、残りの6匹が毎日1回の用量が2.5 μmol/kgの5AKによる治療を受け、連続的に6回の治療を受け、2匹が死亡し、3匹が持ち直し、いかなる神経機能が欠失した兆候がなく、1匹が軽い神経機能が欠失した兆候があり、1匹が著しい神経機能が欠失した兆候があった。これにより、2.5 μmol/kgの用量で、5AKが卒中になって24時間の場合に対して依然としてある程度の治療の効果があることが判明された。

【表12】

表12 ラットが卒中になって24時間の後で2.5 μmol/kgの5Akによる治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean $\pm$ SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	1匹	4匹	1匹	0匹	1匹	0匹
2日目	3匹	2匹	1匹	1匹	0匹	0匹
3日目	3匹	2匹	1匹	0匹	0匹	1匹
4日目	2匹	2匹	1匹	1匹	0匹	0匹
5日目	4匹	0匹	1匹	0匹	0匹	1匹
6日目	3匹	1匹	1匹	0匹	0匹	0匹

### 実験例 13 ラットが卒中になって 24 時間の後で $5 \mu\text{mol/kg}$ の 5Ak による 6 回の連続的治療を受ける試験

【 0 1 6 6 】

効果は、神経機能の採点で表示され、採点が低ければ低いほど効果が優れた。オスSDラットに対して、腹腔に用量が 400 mg / kg の体重である 10% 抱水クロラール溶液を注射し、麻酔をかけた。頸部の正中で縦に切口を切り、右側の頸総動脈幹（長さ：約 3 cm）を分離させた。舌骨で水平に頸外動脈の各分岐を分離させて結紮し、頸膨大の箇所で頸内動脈を分離させた。非侵襲的動脈鉗子によりそれぞれ頸内動脈の開口と頸総動脈の近位端をクリッピングし、頸外動脈の遠位端を結紮した。頸外動脈幹で 0.5 mL の血餅の生理食塩水の懸濁液が入れられた導管を挿入し、頸内動脈鉗子を緩める同時に、導管内の 0.5 mL の血餅の生理食塩水の懸濁液をゆっくり頸外動脈から近位端へ頸内動脈を通して大脳中央動脈に注入した。後で、頸外動脈の近位端を結紮し、頸内動脈と頸総動脈の動脈鉗子を開け、血の流れを回復させ、傷口を縫合した。感染を防止するように、筋肉注射により 2 万 IU のペニシリンを注射した。24 時間後、化合物 5AK（用量：5 μmol / kg, n = 10）の生理食塩水溶液を連続的に 6 日間点滴注射をし、7 日間観察し、毎日自身を対照し、Zea longa 方法により神経機能の欠損程度を評定した。0 点は、いかなる神経機能が欠失した兆候がないことを示し、1 点は、損傷がない側の前肢が伸びることができないことを示し、2 点は、損傷がない側へ歩行したことを示し、3 点は、損傷がない側へ回って尾を追うように歩行したことを示し、4 点は、意識障害で自主歩行無しを示し、5 点は、死亡したことを示した。試験結果は、表 13 に示された。結果により、ラットが卒中になって 24 時間の後で、1 匹が死亡し、残りの 10 匹が毎日 1 回の用量が 5 μmol / kg の 5AK による治療を受け、連続的に 6 回の治療を受け、死亡せず、7 匹が持ち直し、いかなる神経機能が欠失した兆候がなく、3 匹が軽い神経機能が欠失した兆候があった。これにより、5 μmol / kg の用量で、5AK が卒中になって 24

時間の場合に対する治療の効果は、 $2.5 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量での治療よりも著しく優れたことが判明された。

【表13】

表13 ラットが卒中になって24時間の後で $5 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の5Akによる治療を受けた効果

採点時間	毎日神経機能の採点 (Mean $\pm$ SD) 及び得点したラット数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	0匹	5匹	4匹	0匹	1匹	0匹
2日目	2匹	6匹	2匹	0匹	0匹	0匹
3日目	2匹	6匹	2匹	0匹	0匹	0匹
4日目	5匹	5匹	0匹	0匹	0匹	0匹
5日目	6匹	4匹	0匹	0匹	0匹	0匹
6日目	7匹	3匹	0匹	0匹	0匹	0匹

10

【0167】

実験結果により、本発明に係る化合物は、ナノ構造を形成し、血液脳関門を越える効果を達成することができ、溶血栓と抗血栓に加え、OH、NO及び超酸化物陰イオン等のフリーラジカルを効果的に消去し、且つ低用量で血栓を効果的に溶解でき、やや高い用量で4時間以上の卒中に対して優れた効果が現われ、良好な臨床応用前景を有することが判明された。

20

【図1】

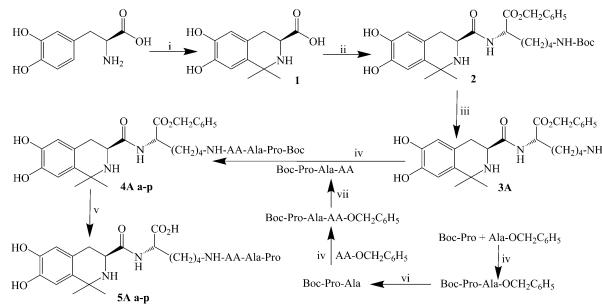


図1

【図2】

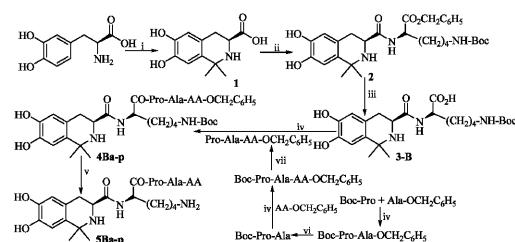


図2

【図3】

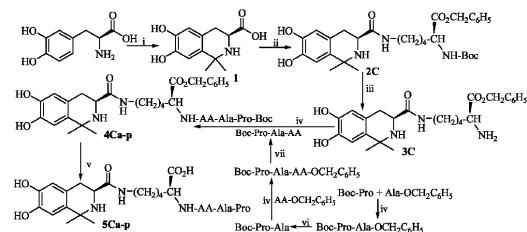


図3

【図4】

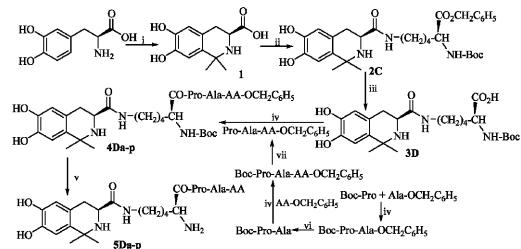


図4

〔 図 5 〕

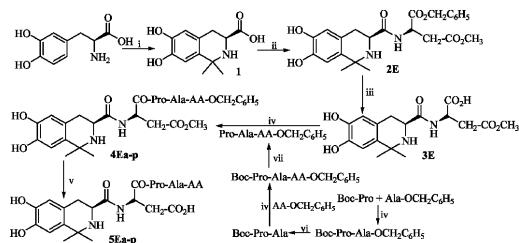


图5

【 図 6 】

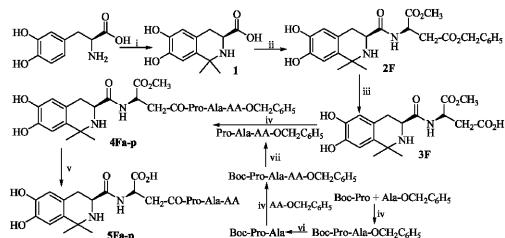


图6

( 义 7 )

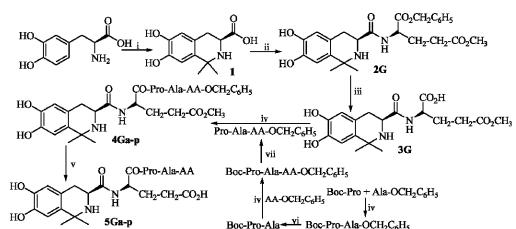


图7

〔 义 8 〕

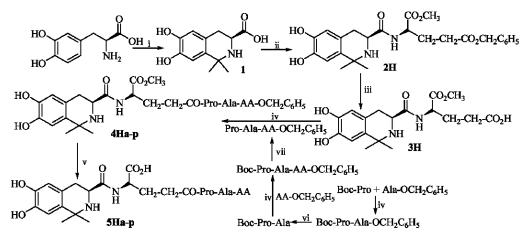


图8

〔 9 〕

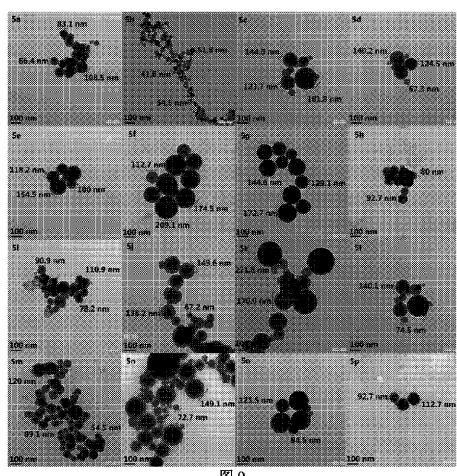


图 9

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 39/06 (2006.01) A 6 1 P 39/06  
A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00  
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10

(72)発明者 彭 師 奇  
中国北京市 海 淀区学院路38号26号楼9 層 5号

(72)発明者 趙 明  
中国北京市 豊 台区玉林小区シ一樓401室

(72)発明者 吳 建 輝  
中国北京市 豊 台区右安 門 外西 頭 条10号

(72)発明者 王 玉 記  
中国北京市 豊 台区右安 門 外西 頭 条10号

(72)発明者 馮 き き  
中国北京市 豊 台区右安 門 外西 頭 条10号

審査官 田中 耕一郎

(56)参考文献 中国特許出願公開第101190941(CN, A)  
中国特許第101497651(CN, B)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K 1/00 - C 07 K 19/00  
C a p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
P u b M e d