

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成28年4月14日(2016.4.14)

【公表番号】特表2015-529209(P2015-529209A)

【公表日】平成27年10月5日(2015.10.5)

【年通号数】公開・登録公報2015-062

【出願番号】特願2015-530267(P2015-530267)

【国際特許分類】

C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 0 7 K	1/02	(2006.01)
A 6 1 P	7/02	(2006.01)
A 6 1 P	39/06	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	47/48	(2006.01)
A 6 1 K	47/18	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	7/06	Z N A
C 0 7 K	1/02	
A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	39/06	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	47/18	

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月23日(2016.2.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】血栓溶解、フリーラジカル捕捉および血栓へのターゲティング機能を兼ねる新規化合物およびその製造方法と用途

【技術分野】

【0001】

本発明は血栓溶解、NOフリーラジカル捕捉および血栓へのターゲティング/抗血栓という三つの機能を兼ねる新規化合物およびその製造方法と用途に関する。さらに、本発明はカルボキシル基およびアミノ基を含むリンカーにより、PAK配列(配列番号1)を含む血栓溶解オリゴペプチド、1-(4-オキソアセチル-フェニル)-3,3,4,4-テトラメチル-イミダゾリン及びRGD配列(配列番号2)を含む血栓へのターゲティングペプチド/抗血栓オリゴペプチドを連結して形成する「PAK配列含有ペプチド/イミダゾリン/RGD配列含有ペプチド」という新規三元コンジュゲート(ternary conjugate)に関する。さらに、本発明は前記化合物を含む、NOフリーラジカル捕捉、血栓溶解、血栓へのターゲティング/抗血栓および脳卒中/脳梗塞の治療のための医薬組成物に関する。本発明は前記化合物の製造方法

も関する。

【背景技術】

【0002】

全世界範囲において、血栓性疾患は罹患率および死亡率がともに第一位にある。冠状動脈血栓は心筋梗塞を引き起こすものである。脳血管栓塞は脳梗塞を引き起し、すなわち臨床上の虚血性脳卒中である。心筋梗塞患者に対して、血栓溶解薬を静脈注射してよいし、バイパス手術を行ってもよい。指摘すべきこととして、心筋梗塞患者に血栓溶解薬を静脈注射することによって得られた肯定的な結果は虚血再灌流である。虚血再灌流過程において多量のNOフリーラジカルが生じるので、血栓溶解過程は心筋損傷及び患者死亡に関連する。これは現在血栓溶解により心筋梗塞を治療する場合の深刻な問題である。現在、脳梗塞治療においてはより複雑な問題に直面している。例えば、既存の血栓溶解薬はいずれも血液脳関門を有効的に通過することができないため、血栓溶解薬の静脈注射による脳梗塞患者の治療効果は非常に限りがある。別例として、現在、脳梗塞患者を救う適切な手術がない状況である。同様に、脳梗塞患者に血栓溶解薬を静脈注射することによって肯定的な結果が得られたとしても、虚血再灌流過程においても多量のNOフリーラジカルが生じるので、血栓溶解過程が脳組織損傷及び患者死亡に関与する。これは現在血栓溶解により脳梗塞を治療する場合の深刻な問題である。さらに、脳卒中患者の臨床治療は四つの難題に直面している。1) tPA (tissue-type plasminogen activator, 組織プラスミノーゲン活性化因子)以外、脳卒中患者に対して治療効果を示すほかの薬剤がないこと。2) tPA治療はただ患者の脳卒中の3時間以内に治療効果を示し、すなわち、tPAに3時間の治療黄金期しかないこと。3) tPA治療は、通常全身性出血を引き起こすこと。4) tPA治療は、虚血再灌流過程で生じた多量のNOフリーラジカルによる患者の脳組織損傷及び患者死亡を回避できること。このような四つの難題を解決してこそ、脳卒中患者の臨床治療は実質的な成果が得られる。

【0003】

中国特許出願公開番号CN102807604およびCN102807605において、N - (1,3 - ジオキソ - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン - 2 - フェニル - 4' - オキソアセチル) - n - 脂肪アシル - Lys - Arg - Gly - Asp - Val および N - (1,3 - ジオキソ - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン - 2 - フェニル - 4' - オキソアセチル) - n - 脂肪アシル - Lys - Arg - Gly - Asp - Phe の二つの化合物が開示されている。これらの二つの化合物はNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリンとRGD配列(Arg - Gly - Asp)を含む抗血栓オリゴペプチドをリジンにより組み合わせてなるものである。本発明の化合物と異なり、これら二つの化合物に血栓溶解ペプチドが連結されていない。これらの二つの化合物は血栓溶解作用を有せず、血栓溶解薬の製造に適用しなく、そして虚血性脳卒中の患者の治療にも適用しない。

【0004】

上述した問題を解決するために、血栓溶解、NOフリーラジカル捕捉および血栓へのターゲティング/抗血栓作用を兼ねる新規化合物が必要となる。また、このような新規化合物は、患者の脳卒中の3時間後に治療効果を示し、すなわち、tPAを使用する場合の3時間の治療黄金期のような制限がない必要がある。それに、虚血再灌流過程で生じた多量のNOフリーラジカルを捕捉できる必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

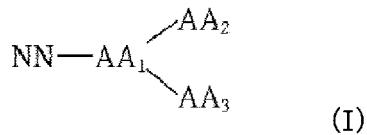
本発明は血液脳関門通過、血栓溶解、抗血栓およびNOフリーラジカル捕捉活性の作用を兼ねる三元コンジュゲートを提供し、前記三元とはNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類、血栓溶解活性を有するペプチド及び血栓へのターゲティングペプチドであり、それらは適切なリンカーによって一体に連結されている。

【0006】

具体的に、本発明の三元コンジュゲートは式I化合物で示される。

【0007】

【化1】



その中、NNはNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類を表し、AA₁は少なくとも3つの連結用基を有するリンカーを表し、AA₂は血栓溶解活性を有するペプチドを表し、AA₃は血栓へのターゲティングペプチドを表す。

【0008】

本発明に使用できるイミダゾリン類はニトロニル ニトロキシド(Nitronyl Nitroxide)s)(NN)類イミダゾール類ニトロキシドフリーラジカルを含み、それがNOを捕捉でき、酸素フリーラジカルを捕捉する機能もあり、酸素フリーラジカルに損傷される細胞にとって強い保護作用を奏する。本発明のNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類は、1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンが好ましく、それが優れた化学安定性および物理安定性を有し、血栓溶解活性ペプチド及び血栓へのターゲティングペプチドとコンジュゲートするいかなる化学反応にも使用できるし、貯蔵過程で分解しにくく、製剤要求に満足できる。

【0009】

本発明に使用できるリンカーは少なくとも3つの連結用基を有し、例えば、カルボキシル基およびアミノ基により、イミダゾリン類、血栓溶解活性を有するペプチド、血栓へのターゲティングペプチドの3つをつなぐものである。本発明のリンカーは天然アミノ酸、例えばL-Lys、L-AspおよびL-Gluであってよい。本発明に使用されるリンカー(AA₁)は3つ以上の連結用基を有する場合、1つ以上のNN、AA₂、またはAA₃をつなぐことができ、そのうち2つ以上のNN、AA₂、またはAA₃が同一でも相違してもよい。例えば、AA₁は4つの連結用基を有する場合、1つのNN、2つのAA₂、および1つのAA₃をつなぐことができる。この際、2つのAA₂は同一なまは異なる血栓溶解活性ペプチドでもよい。

【0010】

本発明に使用できる血栓溶解活性を有するペプチドはPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むオリゴペプチド、あるいはPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を構造単位として含む繰り返し配列ペプチドでもよい。オリゴペプチドとは分子量が1000ドルトン(D)以下の小分子ペプチドであり、一般的に3~8のアミノ酸からなる。本発明の血栓溶解活性を有するオリゴペプチドはPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むトリペプチド~オクタペプチドでもよく、好ましくはPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むトリペプチド~ペンタペプチドである。例えば、本発明に使用できるPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むオリゴペプチドはPAK(配列番号1)、RPAK(配列番号5)、ARPAK(配列番号6)、GRPAK(配列番号7)、QRPAK(配列番号8)、AKP(配列番号3)、KAP(配列番号4)、KPAK(配列番号9)、PAKP(配列番号10)、AKPAK(配列番号11)またはPAKPA(配列番号12)である。例えば、本発明に使用できるPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を構造単位とする繰り返し配列ペプチドは中国特許出願公開番号CN101190941に開示される一連の血栓溶解活性を有するペプチドであってよく、PAKを構造単位として合成した繰り返し配列ペプチド(PAK)₂、(PAK)₃、(PAK)₄、(PAK)₅および(PAK)₆(配列番号13-17)；AKPを構造単位として合成した繰り返し配列ペプチド(AKP)₂、(AKP)₃、(AKP)₄、(AKP)₅および(AKP)₆(配列番号18-22)；及びKPAを構造単位として合成した繰り返し配列ペプチド(KPA)₂、(KPA)₃、(KPA)₄、(KPA)₅および(KPA)₆(配列番号23-27)が挙げられる。

【0011】

本発明に使用できる血栓へのターゲティング/抗血栓ペプチドはRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドでもよい。RGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドはRGDS、RGDVおよびRGDF(配列番号28、29、30)などのRGDテトラペプチドでもよい。フィブリノゲン(Fibrinogen, Fg)および活性化血小板膜糖タンパク質(Glycoprotein, GP)IIb/IIIaレセプターの特異的結合は、各生理的誘導剤が血小板凝集を引き起こす最終的な共通経路であり、血栓形成において重要な役目を果たす。また、RGD配列(配列番号2)は配体Fgおよび活性化GP IIb/IIIaレセプターの結合の活性部位であり、血小板を活性化する標的性を有する。RGD配列(配列番号2)を含む構造物は競争的にFgおよびGPIIb/IIIaレセプターの結合を阻害および遮断できるので、血小板凝集および血栓の形成を遮断して、RGD(配列番号2)を含むオリゴペプチドを有効な血栓へのターゲティング分子および抗血栓剤とする。

【0012】

また、本発明に使用できる血栓へのターゲティングペプチドは中国特許出願公開番号CN 101190940に開示される一連の標的抗血栓活性を有するポリペプチドでもよく、RGDペプチド(配列番号2)とYIGSペプチド(配列番号31)をコンジュゲート式修飾して得られたポリペプチドが挙げられる。これらの修飾して得られたポリペプチドはYIGSRRGDS、YIGSRRGDV、YIGSRRGDF、YIGSRYIGSK、YIGSRYIGSR、YIGSKRGDS、YIGSKRGDF、YIGSKRGDV、YIGSKYIGSK、YIGSKYIGSR、RGDSRGDS、RGDVRGDV、RGDFRGDF、RGDSYIGSR、RGDSYIGSK、RGDVYIGSR、RGDVYIGSK、RGDFYIGSR、またはRGDFYIGSKでもよい(配列番号32-50)。

【0013】

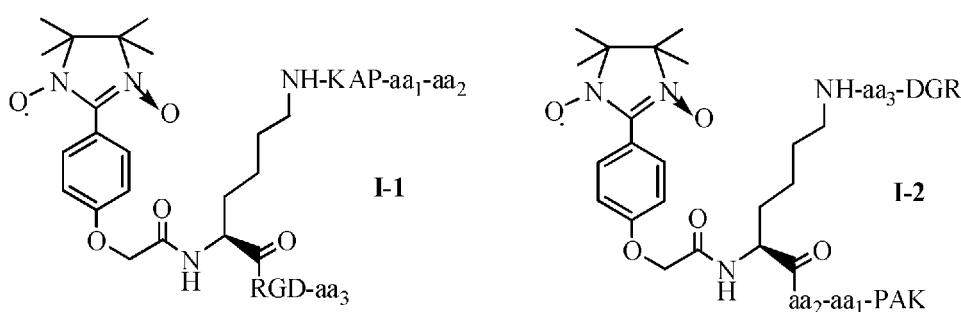
好適な実施態様においては、本発明化合物の中でNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである。これによって、本発明は血液脳関門通過、血栓溶解、抗血栓およびNOフリーラジカル捕捉活性の作用を兼ねる「PAK配列含有ペプチド/イミダゾリン/RGD配列含有ペプチド」という三元コンジュゲートを提供する。

【0014】

1つの実施態様においては、本発明化合物の中でNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、リンカーがL-Lysであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである。そのうち、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドはARPAKペントペプチド、GRPAKペントペプチド、RPAKテトラペプチドまたはPAKトリペプチド(配列番号6、7、5、1)でもよく、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドはRGDテトラペプチド、例えばRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)でもよい。L-Lysをリンカーとする時、本発明化合物は以下の一般式I-1またはI-2でもよい。

【0015】

【化2】



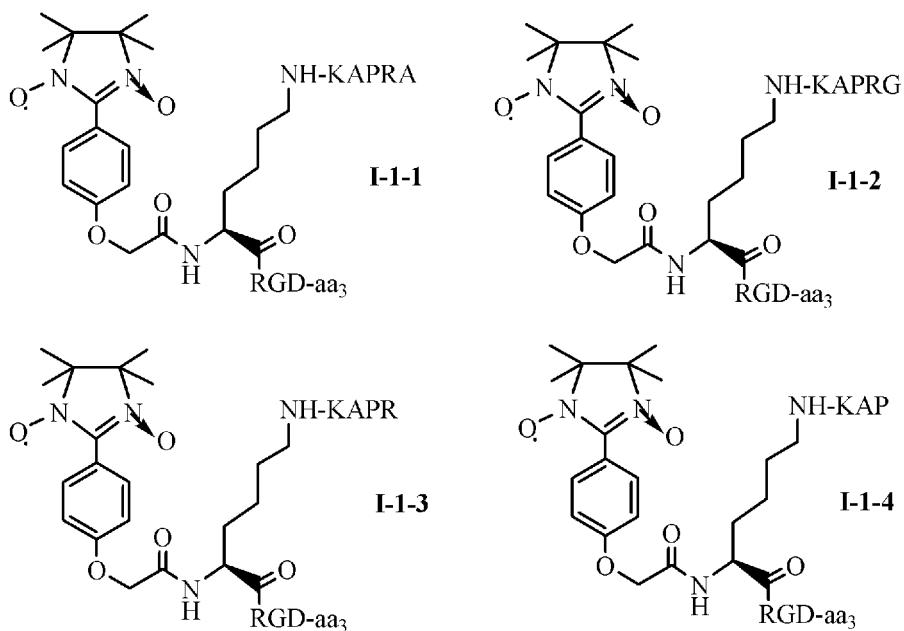
そのうち、 aa_1 および aa_2 が、同時に存在することでも、 aa_1 が存在するが aa_2 が存在しないことでも、または同時に存在しないことでもよい。同時に存在する時、 aa_1 がR (Arg)で、且つ aa_2 がG (Gly)、A (Ala)またはQ (Gln)であり、 aa_1 が存在するが aa_2 が存在しない時、 aa_1 がR (Arg)であり、 aa_3 がS (Ser)、V (Val)、またはF (Phe)でもよい。

【 0 0 1 6 】

一般式I-1化合物を例とすれば、好適な実施態様においては、本発明化合物は以下の一般式I-1-1で示されるARPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲートでもよい。他の好適な実施態様においては、本発明化合物は以下の一般式I-1-2で示されるGRPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲートでもよい。他の好適な実施態様においては、本発明化合物は以下の一般式I-1-3で示されるRPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲートでもよい。他の好適な実施態様においては、本発明化合物は以下の一般式I-1-4で示されるPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲートでもよい。

〔 0 0 1 7 〕

【化3】



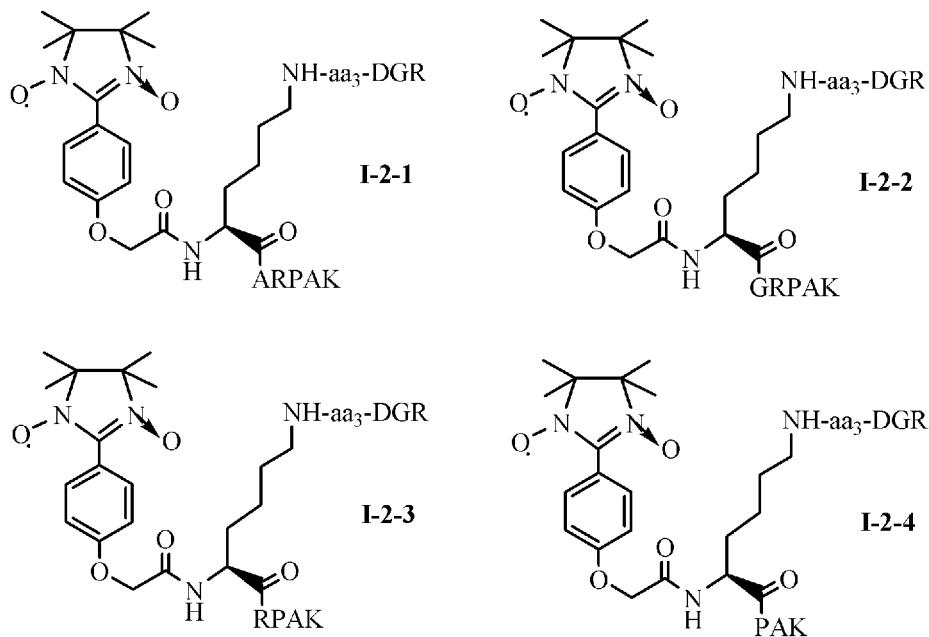
aa₃ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好みしくは V (Val) である。

【 0 0 1 8 】

一般式I-2化合物を例とすれば、本発明化合物は以下の一般式I-2-1、I-2-2、I-2-3またはI-2-4が好ましい。

【 0 0 1 9 】

【化 4】



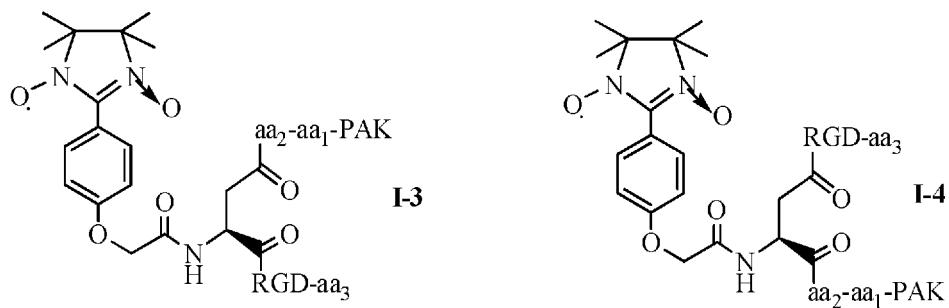
aa₃ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好ましくは V (Val) である。

【 0 0 2 0 】

他の実施態様においては、本発明化合物の中で、NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、リンカーがL-Aspであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ前記血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである。L-Aspをリンカーとする時、本発明化合物は以下の一般式I-3またはI-4でもよい。

【 0 0 2 1 】

【化 5 】



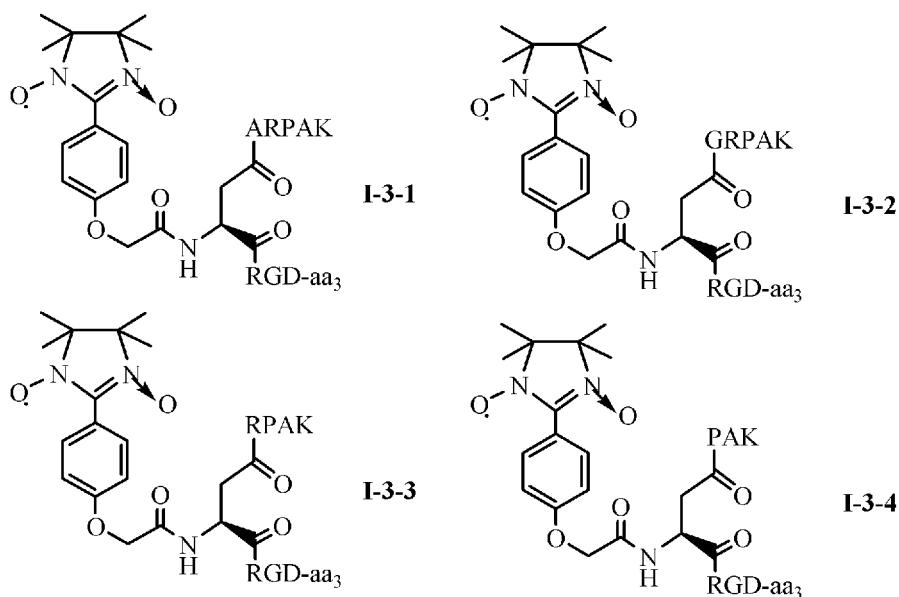
そのうち、aa₁およびaa₂が、同時に存在することでも、aa₁が存在するがaa₂が存在しないことでも、または同時に存在しないことでもよい。それらが同時に存在する時、aa₁がR (Arg)で、且つaa₂がG (Gly)、A (Ala)またはQ (Gln)であり、aa₁が存在するがaa₂が存在しない時、aa₁がR (Arg)であり、aa₃がS (Ser)、V (Val)、またはF (Phe)でもよい。aa₁はR (Arg)が好ましく、aa₂はG (Gly)が好ましく、且つaa₃はV (Val)が好ましい。

【 0 0 2 2 】

一般式I-3化合物を例とすれば、本発明化合物は以下の一般式I-3-1、I-3-2、I-3-3またはI-3-4が好ましい。

【 0 0 2 3 】

【化 6】



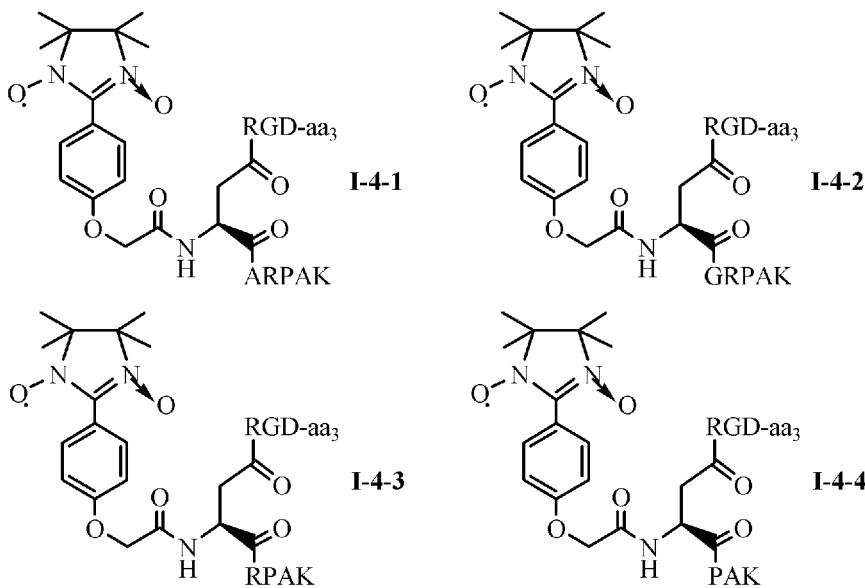
aa₃ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好ましくは V (Val) である。

【 0 0 2 4 】

一般式I-4化合物を例とすれば、本発明化合物は以下の一般式I-4-1、I-4-2、I-4-3またはI-4-4が好ましい。

【 0 0 2 5 】

【化 7】



aa₃ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好ましくは V (Val) である。

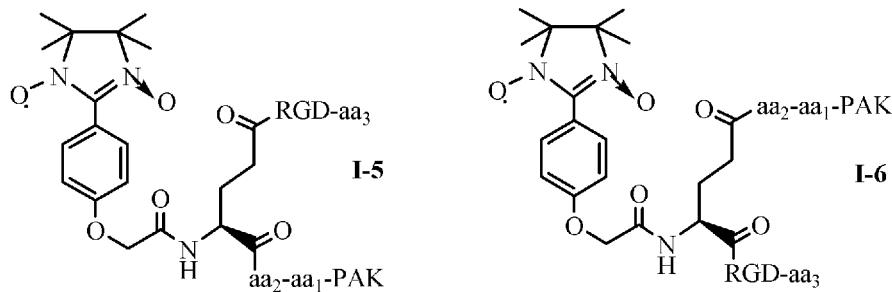
〔 0 0 2 6 〕

他の実施態様においては、本発明化合物の中でNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[$(4$ -オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイ

ミダゾリンであり、リンカーがL-Gluであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである。L-Gluをリンカーとする時、本発明化合物は以下の一般式I-5またはI-6でもよい。

〔 0 0 2 7 〕

【化 8】



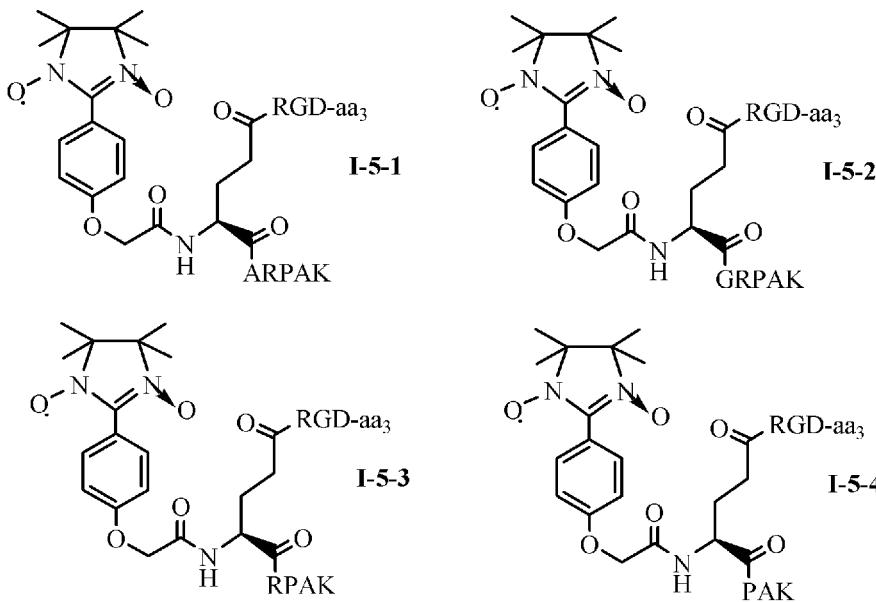
そのうち、aa₁およびaa₂が、同時に存在することでも、aa₁が存在するがaa₂が存在しないことでも、または同時に存在しないことでもよい。それらが同時に存在する時、aa₁がR (Arg)で、且つaa₂がG (Gly)、A (Ala)またはQ (Gln)であり、aa₁が存在するがaa₂が存在しない時、aa₁がR (Arg)であり、aa₃がS (Ser)、V (Val)、またはF (Phe)でもよい。aa₁はR (Arg)が好ましく、aa₂はG (Gly)が好ましく、且つaa₃はV (Val)が好ましい。

【 0 0 2 8 】

一般式I-5化合物を例とすれば、本発明化合物は以下の一般式I-5-1、I-5-2、I-5-3またはI-5-4が好ましい。

〔 0 0 2 9 〕

【化 9 】



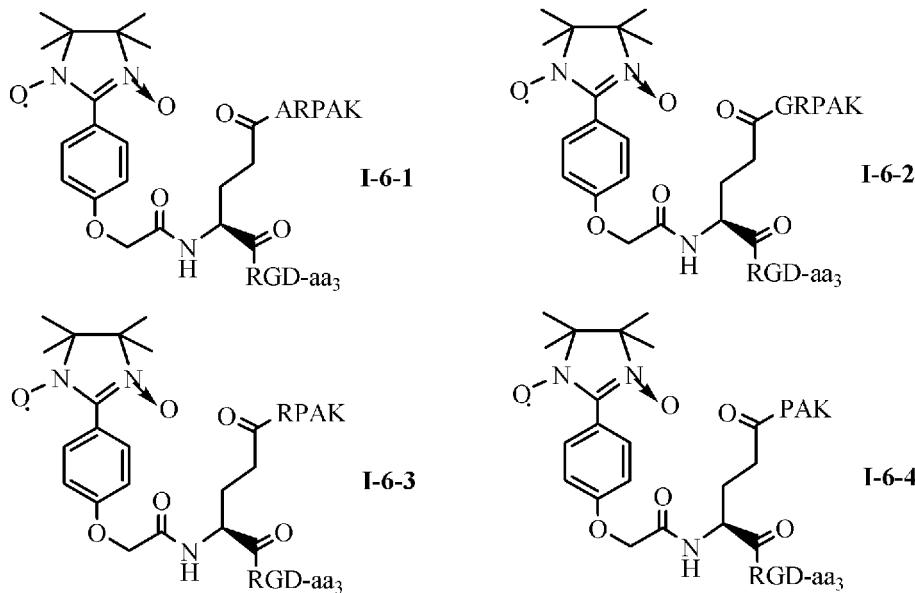
aa₂ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好ましくは V (Val) である。

[0 0 3 0]

一般式I-6化合物を例とすれば、本発明化合物は以下の一般式I-6-1、I-6-2、I-6-3またはI-6-4が好ましい。

〔 0 0 3 1 〕

【化 1 0 】



aa₃ は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよく、好みしくは V (Val) である。

【 0 0 3 2 】

一方、本発明は前記本発明化合物および医薬上許容される担体を含む医薬組成物にも関する。本発明医薬組成物は前記一般式I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、またはI-6の化合物を含むことが好ましい。本発明医薬組成物は一般式I-1-1、I-1-2、I-1-3またはI-1-4の化合物を含むことがより好ましい。本発明医薬組成物は一般式I-1-1、I-1-2、I-1-3またはI-1-4の化合物を含む時、これらの化合物が医薬組成物の中で2量体、3量体または4量体構造を形成してよく、且つ直径2 nm～300 nmのナノスフィアも形成してよい。本発明医薬組成物の中で、前記ナノスフィア構造は2 nm～100 nmの直径を有することがより好ましい。ナノ薬学における公知事実の一つとして、直径が100 nm未満のナノスフィアが血液輸送においてマクロファージに取り込まれにくく、毛細血管壁を通過しやすい。これらの性能により、本発明の化合物は血液脳関門を通過することが可能である。本発明医薬組成物は血栓溶解薬として、心筋梗塞(Myocardial infarction)、脳卒中(Ischemic stroke)、静脈血栓症(Deep vein thrombosis)、肺塞栓(Pulmonary embolism)、末梢動脈閉塞症(Peripheral arterial occlusive disease)、静脈カテーテル閉塞(occluded central vascular access devices)、動静脈瘻及びシャント閉塞(Clotted arteriovenous fistula and shunts)、および頸動脈狭窄症(Carotid Stenosis)などの疾患の治療のために使用することができる。また、本発明医薬組成物はNOフリーラジカル捕捉薬として、例えばアルツハイマー病(Alzheimer's disease)、パーキンソン病(Parkinson's disease)、運動ニューロン疾患(motor neuron diseases)、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis)、騒音性難聴(Noise - induced hearing loss)、ルー・ゲーリック病(Lou Gehrig's disease)、またはハンチントン病(Huntington's disease)のような神経変性疾患(Neurodegenerative diseases)の治療のために；例えばアテローム性動脈硬化症(Atherosclerosis)、冠状動脈性心臓病(Coronary heart disease)、または心筋梗塞(Myocardial infarction)のような心血管疾患(Cardiovascular disease)の治療のために；例えば双極性障害(Bipolar disorder)、統合失調症(Schizophrenia)、または自閉症(Autism)のような精神疾患の治療のために；並びに、高山

病(Altitude sickness)、糖尿病、関節リウマチ、外傷性脳損傷(Traumatic brain injury)、癌、脆弱性X症候群(Fragile X syndrome)、鐸状赤血球症(Sickle Cell Disease)、扁平苔癬(Lichen planus)、白斑(Vitiligo)、または慢性疲労症候群(Chronic fatigue syndrome)などの疾患の治療のために使用できる。また、本発明医薬組成物は血栓へのターゲティング/抗血栓薬として、血小板増加(Thrombocytosis)、骨髄増殖性疾患(myeloproliferative disease)、真性多血症(Polycythemia vera)、またはブルカ症候群(Budd - Chiari syndrome)などの疾患の治療のために使用できる。また、本発明医薬組成物は脳卒中または脳梗塞を治療するための薬として、好ましくは、発症してから3時間、4時間、6時間および24時間を超える脳卒中または脳梗塞の治療に使用し、且つ連続投与の形で治療する。本発明医薬組成物/化合物はNOフリーラジカル捕捉、血栓溶解、および抗血栓/血栓へのターゲティングの機能を同時に有するので、患者が脳卒中にかかってから3時間後でも治療効果をもち、即ちtPAを使用するときの3時間の治療黄金期に制限されない。tPAのような全身性出血反応を引き起こさず、虚血再灌流過程で生じた多量のNOフリーラジカルを捕捉できるため、治療の際、患者の脳神経組織が損傷を受けることが回避できる。本発明医薬組成物において、前記化合物のナノ構造によって、血液脳関門通過、血栓溶解、血栓へのターゲティング/抗血栓および虚血再灌流過程で生じたNOフリーラジカルの捕捉の作用を最大化にすることができる。

【0033】

本発明医薬組成物は臨床的に許容されるいずれかの好適な製剤でもよい。例えば、注射用製剤(粉末注射剤、凍結乾燥粉末注射剤、液体注射剤、輸液など)、錠剤、経口液剤、顆粒剤、カプセル剤、軟カプセル剤またはドロッピングピルなどでもよい。そのうち、医薬上許容される担体は、キシリトール、マンニトール、ラクトース、フルクトース、グルカン、グルコース、ポリビニルピロリドン、低分子量デキストラン、塩化ナトリウム、グルコン酸カルシウムまたはリン酸カルシウムのうち一つまたは複数でもよい。また、本発明医薬組成物にはさらに添加剤が含まれ、前記添加剤が酸化防止錯化剤、充填剤、骨格材料などでもよい。

【0034】

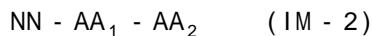
一方、本発明は前記式I化合物の製造方法も関し、前記製造方法が

(1) NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類(NN)、少なくとも3つの連結用基を有するリンカー(AA₁)、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)及び血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)を提供する工程(そのうち、リンカーが第一連結用基、第二連結用基及び第三連結用基をもつ)

(2) 適当な反応条件下において、NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類(NN)とリンカー(AA₁)の第一連結用基をつなぎ、一般式IM-1の化合物を形成する工程



(3) 適当な反応条件下において、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)と一般式IM-1の化合物をつなぎ、一般式IM-2の化合物を形成する工程(そのうち、血栓溶解活性を有するペプチドの一端がリンカーの第二連結用基とつながる)



(4) 適当な反応条件下において、血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)と一般式IM-2の化合物をつなぎ、一般式Iの化合物を形成する工程(そのうち、血栓へのターゲティングペプチドの一端がリンカーの第三連結用基とつながる)を含み、そのうち、工程(3)と工程(4)の順序を交換してよい。

【0035】

本発明の製造方法において、工程(1)が、さらに、リンカー(AA₁)の第二および第三連結用基を保護基で保護し、且つ血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)および血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)上の、連結用末端を除く活性基を保護基で保護することを含み、工程(3)が、さらに、まず保護された第二連結用基を脱保護して、次に血栓溶解活性を有するペプチドと脱保護した第二連結用基をつなぐことを含み、工程(4)が、さらに、まず保護された第三連結用基を脱保護して、次に血栓へのターゲティングペプチドと脱保護し

た第三連結用基をつなぐことを含み、そして、工程(4)の後に、さらに、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)および血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)上の保護された活性基を脱保護することを含む。保護基を付加・除去する技術を利用することで、NN、AA₂およびAA₃とリンカーとつながる順序および位置を制御できる。組合せが完了した後、ほかの活性基上の保護基を脱保護させる。適当な反応条件とは、ポリペプチド合成における通常の条件である。本発明の製造方法に使用できるNOフリー・ラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類(NN)、少なくとも3つの連結用基を有するリンカー(AA₁)、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)及び血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)は、前記本発明式I化合物に使用される定義と同じである。

【0036】

本発明の製造方法は以下のより詳細な説明から理解できる。

一つの実施態様として、本発明の製造方法におけるリンカーの第一連結用基がアミノ基であり、且つ前記第二および第三連結用基がカルボキシル基およびアミノ基から選ばれる。

【0037】

本発明の製造方法の好適な実施態様において、NOフリー・ラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、リンカーがL-Lysであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである。L-Lysをリンカーとする時、以下の二つのつながり方がある。

【0038】

(1) 1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンとL-Lysリンカーの一つのアミノ基がつながり、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチド上のカルボキシル基とL-Lysリンカーのもう一つのアミノ基がつながり、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Lysリンカーのカルボキシル基がつながる(前記一般式I-1の化合物が示す通り)。または、

(2) 1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンとL-Lysリンカーの一つのアミノ基がつながり、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Lysリンカーのカルボキシル基がつながり、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチド上のカルボキシル基とL-Lysリンナーのもう一つのアミノ基がつながる(前記一般式I-2の化合物が示す通り)。

【0039】

一般式I-1の化合物を例として、一般式I-1-1、I-1-2、I-1-3またはI-1-4の化合物を製造する時、本発明の製造方法は図1-図4に示す合成経路でもよい。図1は一般式I-1-1の化合物を製造する合成経路図であり、図2は一般式I-1-2の化合物を製造する合成経路図であり、図3は一般式I-1-3の化合物を製造する合成経路図であり、図4は一般式I-1-4の化合物を製造する合成経路図である。図1~図4において、上記のように、aa₃はS(Ser)、V(Val)、またはF(Phe)でもよい。一般式I-1-2の化合物を例として、本発明の製造方法を以下のように説明する。

(1) 1,3-ジオキソ-2-(4-オキシ酢酸基-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンを製造する。

(2) 1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン(Lysリンナーのカルボキシル基を保護基で保護する)を製造する。

(3) HCl・Arg(NO₂)・Gly・Asp(OBzl)・Ser(Bzl)・OBzl、HCl・Arg(NO₂)・Gly・Asp(OBzl)・Val・OBzlまたはHCl・Arg(NO₂)・Gly・Asp(OBzl)・Phe・OBzlを製造する。

(4) Boc-Gly-Arg(NO₂)・Pro-Ala-Lys(Z)を製造する。

(5) Boc-Gly-Arg(NO₂)・Pro-Ala-Lys(Z)を1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンのリジンにつなぐことで1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-Boc-Gly-Arg(NO₂)・Pro-Ala-Lys(Z)]}を製造する。

a - Lys(Z)] - Lys} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンが得られる。

(6) HCl・Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl、HCl・Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Val - OBzl または HCl・Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzl をそれぞれ 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンとコンジュゲートすることで、1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン、1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp - (OBzl) - Val - OBzl} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンまたは 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzl} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンがそれぞれ得られる。

(7) 工程(6)で製造された化合物の保護基を除去することで、1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Gly - Arg - Pro - Ala - Lys] - Lys - Arg - Gly - Asp - Ser} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン、1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Gly - Arg - Pro - Ala - Lys] - Lys - Arg - Gly - Asp - Val} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンまたは 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Gly - Arg - Pro - Ala - Lys] - Lys - Arg - Gly - Asp - Phe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンが得られる。

【0040】

一般式 I - 1 - 1、I - 1 - 3、および I - 1 - 4 の化合物を製造する時、工程(4)における「Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)」を「Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)」、「Boc - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)」、および「Boc - Pro - Ala - Lys(Z)」に変更して、前記製造工程を行う。

【0041】

PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドとRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドは、組合せ設計の要求に応じて、適当な位置にある活性基において保護基で保護することによって、配列の一端(リンカーと接合できる活性基を含む)を選択してリンカーの活性基と結合する。PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドとRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドを組み合わせる工程は順序を交換し、例えば、まずRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドと組み合わせて、次にPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドと組み合わせてよい。

【0042】

活性基には、アミノ基またはカルボキシル基などの縮合反応を行える基が含まれる。アミノ基の保護基は、カルボベンゾキシ基(CBz)、tert-ブトキシカルボニル基(Boc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)、ベンジル基(Bn)またはp-メトキシフェニル基(PMP)でもよい。カルボキシル基の保護基は、メチルエステル(OMe)、ベンジルエステル(OBn)、ベンジルメチルエステル(OBzl)、tert-ブチルエステル(OBUT)、またはシリルエステル(OSi(CH₃)₃)でもよい。

【0043】

一般式 I - 2 の化合物を例として、一般式 I - 2 - 1、I - 2 - 2、I - 2 - 3 または I - 2 - 4 の化合物を製造する時、本発明の製造方法は図5 - 図8に示す合成経路でもよい。図5は一般式 I - 2 - 1 の化合物を製造する合成経路図であり、図6は一般式 I - 2 - 2 の化合物を製造する合成経路図であり、図7は一般式 I - 2 - 3 の化合物を製造する合成経路図であり、図8は一般式 I - 2 - 4 の化合物を製造する合成経路図である。図5 ~ 図8において、上記のように、aa₃は S (Ser)、V (Val)、または F (Phe) でもよい。一般式 I - 2 - 1、I - 2 - 2、I - 2 - 3 または I - 2 - 4 の化合物を合成する時、まず 1,3 - ジオキソ - 2 - [(4' - オキソアセチル - Lys - OMe) フェニル] - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンを製造して、その後 RGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドのC端とLysリンカーのアミノ基を組み合わせて、最後に PA

K配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドのN端と脱保護されたリンカーのカルボキシル基を組み合わせる。

【0044】

もう一つの実施態様において、本発明の製造方法のNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、リンカーがL-Aspであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドであり、そして、そのうち1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンとL-Aspリンカーのアミノ基がつながり、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Aspリンカーのカルボキシル基がつながり、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Aspリンカーのもう一つのカルボキシル基がつながる(前記一般式I-3またはI-4の化合物が示す通り)。

【0045】

一般式I-3の化合物を例として、一般式I-3-1、I-3-2、I-3-3またはI-3-4の化合物を製造する時、本発明の製造方法は図9-図12に示す合成経路でもよい。図9は一般式I-3-1の化合物を製造する合成経路図であり、図10は一般式I-3-2の化合物を製造する合成経路図であり、図11は一般式I-3-3の化合物を製造する合成経路図であり、図12は一般式I-3-4の化合物を製造する合成経路図である。図9~図12において、上記のように、aa₃はS(Ser)、V(Val)、またはF(Phe)でもよい。一般式I-3-1、I-3-2、I-3-3またはI-3-4の化合物を合成する時、まず1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Asp-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンを製造して、その後PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドのN端とAspリンカーの一つのカルボキシル基を組み合わせて、最後にRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドのN端と脱保護されたAspリンカーのもう一つのカルボキシル基を組み合わせる。

【0046】

一般式I-4の化合物を例として、一般式I-4-1、I-4-2、I-4-3またはI-4-4の化合物を製造する時、本発明の製造方法は図13-図16に示す合成経路でもよい。図13は一般式I-4-1の化合物を製造する合成経路図であり、図14は一般式I-4-2の化合物を製造する合成経路図であり、図15は一般式I-4-3の化合物を製造する合成経路図であり、図16は一般式I-4-4の化合物を製造する合成経路図である。図13~図16において、上記のように、aa₃はS(Ser)、V(Val)、またはF(Phe)でもよい。一般式I-4-1、I-4-2、I-4-3またはI-4-4の化合物を合成する時、まず1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Asp-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンを製造して、その後RGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドのN端とAspリンカーの一つのカルボキシル基を組み合わせて、最後にPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドのN端と脱保護されたAspリンカーのもう一つのカルボキシル基を組み合わせる。

【0047】

もう一つの実施態様において、本発明の製造方法のNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、リンカーがL-Gluであり、血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドであり、そして、そのうち1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンとL-Gluのアミノ基がつながり、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Gluリンカーの一つのカルボキシル基とつながり、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチド上のアミノ基とL-Gluリンマーのもう一つのカルボキシル基とつながる(前記一般式I-5またはI-6の化合物が示す通り)。

【0048】

一般式I-5の化合物を例として、一般式I-5-1、I-5-2、I-5-3またはI-5-4の化

合物を製造する時、本発明の製造方法は図17 - 図20に示す合成経路でもよい。図17は一般式I - 5 - 1の化合物を製造する合成経路図であり、図18は一般式I - 5 - 2の化合物を製造する合成経路図であり、図19は一般式I - 5 - 3の化合物を製造する合成経路図であり、図20は一般式I - 5 - 4の化合物を製造する合成経路図である。図17～図20において、上記のように、aa₃はS (Ser)、V (Val)、またはF (Phe)でもよい。一般式I - 5 - 1、I - 5 - 2、I - 5 - 3またはI - 5 - 4の化合物を合成する時、まず1,3 - ジオキソ - 2 - [(4' - オキソアセチル - Glu - OMe)フェニル] - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンを製造して、その後RGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドのN端とGluリンカーの一つのカルボキシル基を組み合わせて、最後にPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドのN端と脱保護されたGluリンカーのもう一つのカルボキシル基を組み合わせる。

【0049】

一般式I - 6の化合物を例として、一般式I - 6 - 1、I - 6 - 2、I - 6 - 3またはI - 6 - 4の化合物を製造する時、本発明の製造方法は図21 - 図24に示す合成経路でもよい。図21は一般式I - 6 - 1の化合物を製造する合成経路図であり、図22は一般式I - 6 - 2の化合物を製造する合成経路図であり、図23は一般式I - 6 - 3の化合物を製造する合成経路図であり、図24は一般式I - 6 - 4の化合物を製造する合成経路図である。図21～図24において、上記のように、aa₃はS (Ser)、V (Val)、またはF (Phe)でもよい。一般式I - 6 - 1、I - 6 - 2、I - 6 - 3またはI - 6 - 4の化合物を合成する時、まず1,3 - ジオキソ - 2 - [(4' - オキソアセチル - Glu - OMe)フェニル] - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンを製造して、その後PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドのN端とGluリンカーの一つのカルボキシル基を組み合わせて、最後にRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドのN端と脱保護されたGluリンカーのもう一つのカルボキシル基を組み合わせる。

【0050】

前記製造方法において、PAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドはARPAK、GRPAK、QRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、8、5、1)でもよく、且つRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドがRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)でもよい。

【0051】

本発明の化合物または医薬組成物はラット体内におけるNO捕捉活性試験において、比較的高いNOフリーラジカル捕捉活性を有することが示されている。体内外における血栓溶解および抗血栓活性試験において、優れた血栓溶解および抗血栓活性を有することが示されている。ラット体内における抗脳卒中活性試験において、有効に脳卒中ラットの神経機能を保護し、優れた抗脳卒中活性を有することが示されている。脳卒中ラット大脳梗塞体積試験において、有効に脳卒中ラット大脳梗塞体積を低減できることが示されている。

【図面の簡単な説明】

【0052】

- 【図1】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 1 - 1の化合物)の合成経路図である。
- 【図2】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 1 - 2の化合物)の合成経路図である。
- 【図3】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 1 - 3の化合物)の合成経路図である。
- 【図4】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 1 - 4の化合物)の合成経路図である。
- 【図5】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 2 - 1の化合物)の合成経路図である。
- 【図6】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 2 - 2の化合物)の合成経路図である。
- 【図7】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 2 - 3の化合物)の合成経路図である。
- 【図8】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 2 - 4の化合物)の合成経路図である。
- 【図9】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 3 - 1の化合物)の合成経路図である。
- 【図10】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 3 - 2の化合物)の合成経路図である。
- 。
- 【図11】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 3 - 3の化合物)の合成経路図である
- 。
- 【図12】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I - 3 - 4の化合物)の合成経路図である
- 。

【図13】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-4-1の化合物)の合成経路図である。

【図14】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-4-2の化合物)の合成経路図である。

【図15】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-4-3の化合物)の合成経路図である。

【図16】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-4-4の化合物)の合成経路図である。

【図17】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-5-1の化合物)の合成経路図である。

【図18】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-5-2の化合物)の合成経路図である。

【図19】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-5-3の化合物)の合成経路図である。

【図20】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-5-4の化合物)の合成経路図である。

【図21】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-6-1の化合物)の合成経路図である。

【図22】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-6-2の化合物)の合成経路図である。

【図23】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-6-3の化合物)の合成経路図である。

【図24】本発明化合物の一つの実施態様(一般式I-6-4の化合物)の合成経路図である。

【図25】本発明化合物Iaの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図26】本発明化合物Ibの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図27】本発明化合物Icの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図28】本発明化合物Idの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図29】本発明化合物Ieの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図30】本発明化合物Ifの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図31】本発明化合物Igの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図32】本発明化合物Ihの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図33】本発明化合物Iiの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図34】本発明化合物Ijの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図35】本発明化合物Ikの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図36】本発明化合物IIの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造である。

【図37】本発明化合物Ieの濃度0.01 μ Mにおける高分解能FT-MS質量スペクトルである。

【図38】本発明化合物Ieの濃度0.1 μM における高分解能FT-MS質量スペクトルである。

【図39】本発明化合物Ieの濃度1 μM における高分解能FT-MS質量スペクトルである。

【図40】本発明化合物Ieの濃度10 μM における高分解能FT-MS質量スペクトルである。

【発明を実施するための形態】

【0053】

以下、具体的な実施例を参考しながら本発明をさらに説明する。本発明のメリットおよび特徴は説明によってより明瞭になる。しかしながら、これらの実施例はただ例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者が理解すべきこととして、本発明の精神と範囲に反しない条件下で本発明の技術内容の細部および形式を修正または変更してよく、これらの修正および変更はいずれも本発明の保護範囲に入っている。

【0054】

NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類：1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

【0055】

実施例1 2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタン

2-ニトロプロパン69 g (0.78 mol)をNaOH (6N)水溶液130 mLに入れ、氷塩浴で攪拌しながら1 h 以内でBr₂ 20 mL (0.38 mol)を滴下し、その後エタノール240 mLを加え、90 °Cで3 h還流させ、反応液を熱いうちに氷水800 mLに入れて、表記化合物55 g (81%)を濾過した。その化合物は無色のシート状結晶であり、Mpが110-112 °Cである。

【0056】

実施例2 2,3-ジメチル-2,3-ジヒドロキシアミノブタンの製造

2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタン7 g (40 mmol)およびNH₄Cl 4 gをエタノール水溶液80 mL (50%)に懸濁して、氷浴で攪拌しながら3 h以内で亜鉛粉16 gを加えた。亜鉛粉の添加が完了した後、氷浴を外し、引き続き室温で3 h攪拌反応した後、反応液を吸引ろ過した。エタノール水溶液(50%)でケーキを繰り返し洗浄して、ろ液と洗浄液を合わせて、濃塩酸でpH=2になるように調整して、スラリ状になるまで減圧蒸発した。適量な炭酸カリウムを加え、均一に攪拌した後、クロロホルムを抽出剤として、ソックスレー抽出器により6 h抽出した。抽出液を少量になるまで減圧濃縮し、石油エーテルを加えた後、表記化合物2.60 g (44%)が析出した。その化合物は無色の結晶であり、Mpが157-159 °Cである。

【0057】

実施例3 1,3-ジヒドロキシ-2-(4'-ヒドロキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリジンの製造

p-ヒドロキシベンズアルデヒド1.22 g (10 mmol)と2,3-ジメチル-2,3-ジヒドロキシアミノブタン1.48g (10 mmol)をメタノール10 mLに溶かし、室温で8 h攪拌した後、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。吸引ろ過により表記化合物である無色の結晶1.29 g (51%)が得られた。EI-MS (m/z) 252 [M]⁺. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (ppm) = 1.03 (s, 6H), 1.05 (s, 6H), 4.39 (s, 1H), 6.70 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.85 (s, 2H)。

【0058】

実施例4 1,3-ジヒドロキシ-2-(4'-ヒドロキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリジンの製造

1,3-ジヒドロキシ-2-(4'-ヒドロキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリジン504 mg (2 mmol)をメタノール30 mLに溶かし、PbO₂ 3 gを加え、室温で40 min攪拌し、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。吸引ろ過により固体を除去し、室温でろ液を減圧蒸発乾燥して、カラムクロマトグラフィーにより残存物を精製する

(クロロホルム溶出)ことで、表記化合物である青色の固体260 mg (52%)が得られた。Mp 134 - 135, EI - MS (m/z) 249 [M]⁺. IR (KBr) 3250, 1610, 1500, 1490, 840.

【0059】

実施例5 1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸エチル-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

1,3-ジヒドロキシ-2-(4'-ヒドロキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン250 mg (1 mmol)、プロモ酢酸エチル0.32 mL及び水素化ナトリウム32 mgを無水THF 5 mLに溶かし、混合物を60 度5時間攪拌し、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。室温で減圧ろ過し、ろ液を乾燥になるまで減圧濃縮して、カラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:石油エーテル=1:5)により残存物を精製することで、目的化合物300 mg (90%)が得られた。Mp 107 - 109.

【0060】

実施例6 1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン(TMMZ) の製造

1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸エチル-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン33 mg (0.1 mmol)とメタノール3 mLの溶液にNaOH(2N)水溶液7滴を加え、室温で30 min攪拌し、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。反応液を減圧濃縮し、残存物をまず飽和食塩水2 mLで希釈して、さらに2N HClでpH 6になるまで調整し、その後酢酸エチルで3回(3 mL × 3)抽出した。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥しろ過して、室温でろ液を乾燥になるまで減圧濃縮することで、表記化合物である青色の結晶30 mg (99%)が得られた。Mp 155 - 157. EI - MS (m/z) 307 [M]⁺.

NOフリー・ラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類とリンカーとの組合せ: 1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン

【0061】

実施例7 1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-N-Boc-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン307 mg (1 mmol)と無水THF 30 mLの溶液を氷浴で攪拌した。溶液にDCC 250 mg (1.2 mmol)とHOBt 135 mg (1 mmol)を加え、氷浴で10 min攪拌した。当該溶液にHCl · Lys(Boc) - Ome 300 mg (1 mmol)、N-メチルモルホリン122 mg (1 mmol)及び無水THF 6 mLで調製した溶液を加えた。得られた反応混合物を室温で24時間反応させた。TLC(酢酸エチル:石油エーテル = 2:1)でHCl · Lys(Boc) - Omeがなくなったことを確認した。反応混合物を乾燥になるまで減圧濃縮し、酢酸エチルにより残存物を溶解して、不溶物をろ過して取り除く。飽和重炭酸ナトリウム水溶液および飽和塩化ナトリウム水溶液で順次にろ液を洗浄した。分離した酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を37 度減圧濃縮(以下、これらの操作を通常の処理と総称する)した。カラムクロマトグラフィーにより残存物を精製する(酢酸エチル:石油エーテル = 2:1)ことで、表記化合物である青色の固体433 mg (65%)が得られた。ESI - MS(m/z) 550 [M + H]⁺.

【0062】

実施例8 1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

1,3-ジオキソ-2-[(4'-オキソアセチル-N-Boc-Lys-OMe)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン625 mg (1 mmol)を無水塩化水素-酢酸エチル液15mL (4 N)に溶かし、室温で3時間攪拌し、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法により反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られた。

【0063】

血栓溶解活性を有するペプチド: 適切に保護されたARPAKの製造

【0064】

実施例9 Boc - Ala - Lys(Z) - OBzlの製造

Boc - Ala 473 mg (2.5 mmol)を無水THF 10 mLに溶かす。氷浴において、HOBr 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)及び無水THF 10 mLで調製した溶液を加えた。氷浴で反応混合物を20分間攪拌した。当該溶液にHCl・Lys(Z) - OBzl 936 mg (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)及び無水THF 6 mLで調製した溶液を加えた。得られた反応混合物を室温で24時間反応し、TLC (CHCl₃:MeOH = 30:1)でHCl・Lys(Z) - OBzlがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理で表記化合物である無色の固体1.204 g (97%)が得られた。Mp 88 - 90.

(外1)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -29.2 (c = 0.1, MeOH). ESI - MS(m/z) 565 [M + Na]⁺.

【0065】

実施例10 HCl・Ala - Lys(Z) - OBzlの製造

Boc - Ala - Lys(Z) - OBzl 1.354 g (2.5 mmol)を無水塩化水素 - 酢酸エチル溶液約10 mL (4N)に溶かし、室温で3時間攪拌し、TLC(CHCl₃:MeOH, 30:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合液を室温で減圧濃縮し、残存物をさらに酢酸エチルで溶かし、室温で濃縮する。遊離した塩化水素(以下、これらの操作を通常の処理と総称する)が完全に除去されるまで、このように複数回繰り返した。残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0066】

実施例11 Boc - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzlの製造

Boc - Pro 538 mg (2.5 mmol)を適量の無水THFに溶かし、氷浴でHOBr 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)の無水THF溶液を加え、20分間反応させた。当該溶液にHCl・Ala - Lys(Z) - OBzl 1.099 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)及び無水THF 10 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで、表記化合物2.847 g (98%)が得られた。Mp 82 - 83.

(外2)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -46.4 (c = 0.11, MeOH). ESI - MS(m/z) 661 [M + Na]⁺.

【0067】

実施例12 HCl・Pro - Ala - Lys(Z) - OBzlの製造

Boc - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzl 1.596 g (2.5 mmol)を無水塩化水素 - 酢酸エチル液15 mL (4N)に溶かし、室温で3時間攪拌し、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理することで、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0068】

実施例13 Boc - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzlの製造

氷浴でBoc - Arg(NO₂) 798 mg (2.5 mmol)、HOBr 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl・Pro - Ala - Lys(Z) - OBzl 1.322 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 2

0:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の処理で、表記化合物1.642 g (85%) が得られた。Mp 84 - 85 .

(外 3)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 65.0 (c = 0.13, MeOH). ESI - MS (m/z) 864 [M + Na]⁺。

【0069】

実施例 14 HCl · Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI の製造
Boc - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI 2.099 g (2.5 mmol) を無水塩化水素 - 酢酸エチル液20 mL (4N) に溶かし、室温で3時間攪拌し、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理することで、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0070】

実施例 15 Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI の製造
氷浴でBoc - Ala 473 mg(2.5 mmol)、HOEt 338 mg(2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol) および無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI 1.785 g(2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg(2.3 mmol) と無水THF 5 mL で調製した溶液を加え、24時間反応させることで、表記化合物1.802 g (86%) が得られた。Mp 87 - 89 .

(外 4)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 63.9 (c = 0.12, MeOH). ESI - MS(m/e) 934 [M + Na]⁺。

【0071】

実施例 16 Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) の製造
Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI 921 mg(1 mmol) をメタノール3 mL に溶かし、氷浴でNaOH水溶液(2N)を加え、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、氷浴で10 min攪拌し、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。2N HClでpH 7に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水2 mLで希釈して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出して(5 mL × 3)、合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、室温で減圧濃縮することで表記化合物である無色の固体767 mg (80%) が得られた。EI - MS (m/z) 830 [M - H]⁻。

【0072】

血栓へのターゲティング/抗血栓ペプチド：適切に保護されたRGDS、RGDV、RGDFの製造
【0073】

実施例 17 Boc - Asp(OBzI) - Ser(BzI) - OBzI の製造
氷浴でBoc - Asp(OBzI) 808 mg(2.5 mmol)、HOEt 338 mg(2.5 mmol)、DCC 619 mg(3 mmol) および無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌反応した。当該溶液にHCl · Ser(BzI) - OBzI 740 mg (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol) と無水THF 5 mL で調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで表記化合物である無色の油状物1.29 g (95%) が得られた。ESI - MS(m/z) 591 [M + H]⁺。

【0074】

実施例 18 HCl · Asp(OBzI) - Ser(BzI) - OBzI の製造
Boc - Asp(OBzI) - Ser(BzI) - OBzI 1.477 g (2.5 mmol) を無水塩化水素 - 酢酸エチ

ル液(4N) 15 mL に溶かし、且つ室温で3時間攪拌して、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0075】

実施例 19 Boc - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl の製造
 氷浴で Boc - Gly 438 mg (2.5 mmol)、HOBt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol) および無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌した。当該溶液に HCl · Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl 1.212 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン 232 mg (2.3 mmol) と無水THF 5 mL で調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である無色の固体 1.461 g (98%) が得られた。Mp 53 - 55.

(外 5)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -23.7 (c = 0.13, MeOH). ESI - MS (m/z) 649 [M + H]⁺.

【0076】

実施例 20 HCl · Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl の製造
 Boc - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl 1.619 g (2.5 mmol) を無水塩化水素 - 酢酸エチル液(4N) 15 mL に溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理することで、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0077】

実施例 21 Boc - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl の製造
 氷浴で Boc - Arg(NO₂) 798 mg (2.5 mmol)、HOBt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol) 及び無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌した。当該溶液に HCl · Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl 1.343 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン 232 mg (2.3 mmol) と無水THF 5 mL で調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の処理で、表記化合物である無色の固体 1.66 g (85%) が得られた。Mp 74 - 75.

(外 6)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -26.2 (c = 0.12, MeOH). ESI - MS (m/z) 872 [M + Na]⁺.

【0078】

実施例 22 HCl · Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl の製造
 Boc - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Ser(Bzl) - OBzl 2.122 g (2.5 mmol) と塩化水素 - 酢酸エチル液(4N) 20 mL の混合物を室温で3時間攪拌し、TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化することで、表記化合物が得られた。

【0079】

実施例 23 Boc - Asp(OBzl) - Val - OBzl の製造
 氷浴で Boc - Asp(OBzl) 808 mg (2.5 mmol)、HOBt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol) 及び無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌した。当該溶液に HCl · Val - OBzl 558 mg (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン 232 mg (2.3 mmol) と無水THF

5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで表記化合物である無色の油状液体1.129 g (96%)が得られた。ESI-MS(m/z) 512 [M + H]⁺。

【0080】

実施例24 HCl・Asp(OBzl)-Val-OBzlの製造

Boc-Asp(OBzl)-Val-OBzl 1.278 g (2.5 mmol)を無水塩化水素・酢酸エチル液(4N) 15 mLに溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させることで、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0081】

実施例25 Boc-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzlの製造

氷浴でBoc-Gly 438 mg (2.5 mmol)、HOBr 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl・Asp(OBzl)-Val-OBzl 1.03 g (2.3 mmol)、N-メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで表記化合物である無色の固体1.242 g (95%)が得られた。Mp 66 - 68 .

(外7)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -43.8 (c= 0.11, MeOH). ESI-MS(m/z) 592 [M + Na]⁺.

【0082】

実施例26 HCl・Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzlの製造

Boc-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl 1.421 g (2.5 mmol)を無水塩化水素・酢酸エチル液(4N)15 mLに溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理することで、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させ、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0083】

実施例27 Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzlの製造

氷浴でBoc-Arg(NO₂) 798 mg (2.5 mmol)、HOBr 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl・Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl 1.162 g (2.3 mmol)、N-メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで表記化合物である無色の固体1.523 g (86%)が得られた。Mp 107 - 109 .

(外8)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -38.0 (c= 0.12, MeOH). ESI-MS(m/z) 793 [M + Na]⁺.

【0084】

実施例28 HCl・Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzlの製造

Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl 1.925 g (2.5 mmol)を無水塩化水素・酢酸エチル液(4N) 20 mLに溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物

を無水エチルエーテルで結晶化させることで、表記化合物が得られた。

【0085】

実施例29 Boc - Asp(OBzl) - Phe - OBzlの製造

氷浴でBoc - Asp(OBzl) 808 mg (2.5 mmol)、HOt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Phe - Obzl 668 mg (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の処理で、表記化合物である無色の固体1.222 g (95%)が得られた。Mp 79 - 80 .

(外9)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -24.2 (c = 0.13, MeOH), ESI - MS(m/z) 561 [M + H]⁺。

【0086】

実施例30 HCl · Asp(OBzl) - Phe - OBzlの製造

Boc - Asp(OBzl) - Phe - OBzl 1.398 g (2.5 mmol)を無水塩化水素 - 酢酸エチル溶液(4N)15 mLに溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させることで、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0087】

実施例31 Boc - Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzlの製造

氷浴でBoc - Gly 438 mg (2.5 mmol)、HOt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)の無水THF溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Asp(OBzl) - Phe - Obzl 1.141 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である無色の固体1.29 g (91%)が得られた。Mp 70 - 71 .

(外10)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -22.5 (c = 0.14, MeOH), ESI - MS(m/z) 640 [M + Na]⁺。

【0088】

実施例32 HCl · Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzlの製造

Boc - Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzl 1.541 g (2.5 mmol)を無水塩化水素 - 酢酸エチル液(4N)15 mLに溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化させることで、表記化合物が得られ、そのまま次の反応に用いられる。

【0089】

実施例33 Boc - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzl) - Phe - OBzlの製造

氷浴でBoc - Arg(NO₂) 798 mg (2.5 mmol)、HOt 338 mg (2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Gly - Asp(OBzl) - Phe - Obzl 1.272 g (2.3 mmol)、N - メチルモルホリン232 mg (2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である無色の固体1.637g (87%)が得られた。Mp 77 - 79 .

(外 1 1)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 22.6 (c = 0.09, MeOH). ESI - MS(m/z) 841 [M + Na]⁺。

【0090】

実施例 3 4 HCl - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Phe - OBzI の製造
Boc - Arg(NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Phe - OBzI 2.045 g (2.5 mmol) を無水塩化水素 - 酢酸エチル液(4N)15 mL に溶かし、室温で3時間攪拌して、TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。通常の方法で反応混合物を処理し、残存物を無水エチルエーテルで結晶化することで、表記化合物が得られた。

【0091】

ARPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲート(一般式 I - 1 - 1 の化合物) : Ia、Ib、Ic の製造

【0092】

実施例 3 5 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造
冰浴で Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) 821 mg (1 mmol)、HOBt 135 mg (1 mmol)、DCC 250 mg (1 mmol) および無水THF 10 mL の溶液を20分間攪拌した。当該溶液に 1,3 - ジオキソ - 2 - [(4' - オキソアセチル - Lys - OMe) フェニル] - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 480 mg (1 mmol) および N - メチルモルホリン 100 mg (1 mmol) と無水THF 5 mL で調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 40:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで表記化合物である青色の固体 925 mg (83%) が得られた。Mp 179 - 182.

(外 1 2)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 34.3 (c = 0.14, MeOH), ESI - MS(m/z) 1275 [M + Na]⁺。IR (KBr) 3319, 2935, 1658, 1531, 1448, 1363, 1254, 1168, 1053, 835, 749, 540 cm⁻¹。

【0093】

実施例 3 6 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造
冰浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 1260 mg (1 mmol) をメタノール 3 mL に溶かし、NaOH水溶液(2N)を加えて、室温で 30 min 攪拌した。pH 12 を保持し、冰浴で 10 min 攪拌して、TLC で原料スポットがなくなったことを確認した。2N HCl で pH 7 に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水 2 mL で希釈して、2N HCl で pH 2 に調整し、酢酸エチルで 3 回抽出した (5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である青色の固体 945 mg (82%) が得られた。EI - MS (m/z) 1238 [M - H]⁻。

【0094】

実施例 3 7 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Ser(BzI) - OBzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造
冰浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro -

Ala - Lys(Z)] - Lys}フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン618 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Arg(NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Ser(BzI) - ObzI 42 mg (0.5 mmol)、N - メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体300 mg (31%)が得られた。Mp 138 - 140 .

(外13)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 39.4 (c = 0.13, MeOH). ESI - MS(m/z) 1991 [M + H]⁺. IR(KBr) 3309, 2936, 1656, 1531, 1449, 1363, 1256, 836, 743, 697, 601 cm⁻¹.

【0095】

実施例38 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Val - ObzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン618 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Arg(NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Val - ObzI 421 mg (0.5 mmol)、N - メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体389 mg (36%)が得られた。Mp 117 - 120 .

(外14)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 14.8 (c = 0.01, MeOH). ESI - MS(m/z) 1913 [M + H]⁺. IR(KBr) 3312, 2937, 1655, 1530, 1448, 1362, 1257, 835, 744, 697, 592 cm⁻¹.

【0096】

実施例39 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Phe - ObzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Ala - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン618 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl · Arg(NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Phe - ObzI 445 mg (0.5 mmol)、N - メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体320 mg (36%)が得られた。Mp 115 - 118 .

(外15)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 21.5 (c = 0.16, MeOH). ESI - MS(m/z) 1961 [M + H]⁺. IR(KBr) 3316,

2936, 1654, 1529, 1448, 1362, 1256, 1169, 742, 698, 593 cm⁻¹。

【0097】

実施例40 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン (Ia) の製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Ser(BzI)-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン199 mg (0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体109 mg (85%)が得られた。Mp 134 - 135 .

(外16)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -39.7 (c = 0.12, MeOH). FT-MS(m/z) 1374.7290 [M + H]⁺, 2748.4580 [2M + H]⁺, 4122.1870 [3M + H]⁺, 5495.9160 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3346, 3180, 2920, 1665, 1537, 1449, 1252, 1179, 1030, 837, 801, 720, 639, 518 cm⁻¹。

【0098】

実施例41 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Val]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン (Ib) の製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Val-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン190 mg (0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10 で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体96 mg (82%)が得られた。Mp 143 - 144 .

(外17)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -31.8 (c = 0.01, MeOH). FT-MS(m/z) 1386.7654 [M + H]⁺, 2772.5308, [2M + H]⁺, 4158.2962 [3M + H]⁺, 5544.0616 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3349, 2942, 1659, 1539, 1394, 1250, 1030, 639 cm⁻¹。

【0099】

実施例42 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン (Ic) の製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Phe-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン194 mg (0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフ

ルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体106 mg (81%)が得られた。Mp 96 - 97 .

(外18)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -44.4 (c = 0.15, MeOH). FT-MS (m/z) ESI-MS (m/z) 1444.7654 [M + H]⁺, ESI-MS (m/z) 2888.5308 [2M + H]⁺, 4332.2962 [3M + H]⁺, 5776.0616 [4M + H]⁺. g = 2.00789. IR(KBr) 3363, 1665, 1538, 1448, 1256, 1173, 1031, 640, 577, 518 cm⁻¹.

【0100】

血栓溶解活性を有するペプチド：適切に保護されたGRPAKの製造

【0101】

実施例43 Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzlの製造
氷浴でBoc-Gly 438 mg(2.5 mmol)、HOBt 338 mg(2.5 mmol)、DCC 619 mg (3 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl 1.785 g(2.3 mmol)、N-メチルモルホリン232 mg(2.3 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、24時間反応させることで、表記化合物1.857 g (90%)が得られた。Mp 85 - 87 .

(外19)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -38.5 (c = 0.11, MeOH). ESI-MS (m/e) 920 [M + Na]⁺.

【0102】

実施例44 Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z) の製造
Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl 907 mg(1 mmol)をメタノール3 mLに溶かし、氷浴でNaOH水溶液(2N)を加えて、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、氷浴で10 min攪拌して、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。2N HClでpH 7に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水2 mLで希釈して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、室温で減圧濃縮することで、表記化合物である無色の固体785 mg (82%)が得られた。EI-MS (m/z) 816 [M - H]⁻.

【0103】

GRPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲート(一般式I-1-2の化合物)：Id、Ie、Ifの製造

【0104】

実施例45 1,3-ジオキソ-2-[4'-オキソアセチル-{N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造
氷浴でBoc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z) 817 mg (1 mmol)、HOBt 135 mg (1 mmol)、DCC 250 mg (1 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液に1,3-ジオキソ-2-[4'-オキソアセチル-Lys-OMe]フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン480 mg(1 mmol)およびN-メチルモルホリン100 mg (1 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeO

H, 40:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体680mg (52%)が得られた。Mp 79 - 82 .
(外20)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -12.3 (c = 0.14, MeOH), ESI-MS(m/z) 1261 [M + Na]⁺。IR (KBr) 3319, 2935, 1658, 1531, 1448, 1363, 1254, 1168, 1053, 835, 749, 540 cm⁻¹。

【0105】

実施例46 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造
氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン1260 mg (1 mmol)をメタノール3 mLに溶かし、NaOH水溶液(2N)を加えて、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、氷浴で10 min攪拌して、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。2N HClでpH 7に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水2 mLで希釈して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である青色の固体945 mg (82%)が得られた。EI-MS (m/z) 1223 [M - H]⁻。

【0106】

実施例47 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造
氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン611 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)·Gly·Asp(OBzl)·Ser(Bzl)·OBzl 442 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体500 mg (48%)が得られた。Mp 127 - 129 .
(外21)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -49.4 (c = 0.13, MeOH). ESI-MS(m/z) 1956 [M + H]⁺。IR(KBr) 3306, 2936, 1652, 1531, 1449, 1362, 1255, 1166, 742, 697, 592 cm⁻¹。

【0107】

実施例48 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}フェニル}-4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造
氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン611 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)·Gly·Asp(OBzl)·Val·OBzl 421 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固

体392 mg (35%) が得られた。Mp 147 - 150 .
(外22)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -34.6 (c = 0.16, MeOH). ESI-MS(m/z) 1899 [M + Na]⁺。IR(KBr) 3311, 3068, 2937, 1661, 1531, 1451, 1395, 1254, 1163, 839, 743, 697, 596 cm⁻¹。

【0108】

実施例49 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl}フェニル}-4,4',5,5'-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4',5,5'-テトラメチルイミダゾリン611 mg(0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl 445 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体336 mg (31%) が得られた。Mp 125 - 128 .

(外23)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -31.3 (c = 0.18, MeOH). ESI-MS(m/z) 1925 [M + H]⁺。IR(KBr) 3315, 2935, 1657, 1529, 1448, 1361, 1257, 1173, 834, 742, 698, 541 cm⁻¹。

【0109】

実施例50 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Gly-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]フェニル}-4,4',5,5'-テトラメチルイミダゾリン(Id) の製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}フェニル}-4,4',5,5'-テトラメチルイミダゾリン195 mg (0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸 6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラクションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体102 mg (82%) が得られた。Mp 142 - 145 .

(外24)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -29.7 (c = 0.14, MeOH). FT-MS(m/z) 1360.7133 [M + H]⁺, 2720.4266 [2M + H]⁺, 4080.1399 [3M + H]⁺, 5439.8532 [4M + H]⁺。g = 2.00779. IR(KBr) 3348, 3180, 2940, 1670, 1539, 1447, 1199, 1134, 1034, 836, 801, 721, 638 cm⁻¹。

【0110】

実施例51 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Gly-Arg-Pro-Ala-

- Lys) - Lys - Arg - Gly - Asp - Val] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン (Ie) の製造

氷浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Val - OBzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 190 mg (0.1 mmol) とトリフルオロ酢酸 6 mL およびトリフルオロメタンスルホン酸 1.5 mL を混合し、1 時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25% アンモニア水で pH 8 に調整し、Sephadex G10 で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体 99 mg (84%) が得られた。Mp 147 - 149.

(外 25)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -31.1 (c = 0.17, MeOH). FT-MS (m/z) 1372.7497 [M + H]⁺, 2744.4994 [2M + H]⁺, 4116.2491 [3M + H]⁺, 5487.9988 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3338, 2960, 1662, 1539, 1451, 1392, 1251, 1170, 1030, 639, 519 cm⁻¹.

【0111】

実施例 5 2 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - (Gly - Arg - Pro - Ala - Lys) - Lys - Arg - Gly - Asp - Phe] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン (If) の製造

氷浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Gly - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Phe - OBzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 192 mg (0.1 mmol) とトリフルオロ酢酸 6 mL およびトリフルオロメタンスルホン酸 1.5 mL を混合し、1 時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25% アンモニア水で pH 8 に調整し、Sephadex G10 で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体 106 mg (81%) が得られた。Mp 84 - 85.

(外 26)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -54.1 (c = 0.15, MeOH). FT-MS (m/z) 1420.7497 [M + H]⁺, 2840.4994 [2M + H]⁺, ESI-MS FT-MS (m/z) 1420.7497 [M + H]⁺, 2840.4994 [2M + H]⁺, 4260.2491 [3M + H]⁺, 5679.9976 [4M + H]⁺. g = 2.00789. IR(KBr) 3344, 3080, 2930, 1666, 1535, 1392, 1250, 1181, 1030, 835, 800, 719, 638 cm⁻¹.

【0112】

血栓溶解活性を有するペプチド：適切に保護されたRPAKの製造

【0113】

実施例 5 3 Boc - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) の製造

Boc - Arg(NO₂) - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI 850 mg (1 mmol) をメタノール 3 mL に溶かし、氷浴で NaOH 水溶液 (2N) を加えて、室温で 30 min 攪拌した。pH 12 を保持し、氷浴で 10 min 攪拌して、TLC で原料スポットがなくなったことを確認した。2N HCl で pH 7 に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水 2 mL で希釈して、2N HCl で pH 2 に

調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である無色の固体742 mg (92%)が得られた。EI-MS (m/z) 849 [M - H]⁻。

【0114】

RPAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲート(一般式I-1-3化合物) : Ig、Ih、Iiの製造

【0115】

実施例54 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴でBoc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z) 760 mg (1 mmol)、HOBr 135 mg (1 mmol)、DCC 250 mg (1 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液に1,3-ジオキソ-2-{(4'-オキソアセチル-Lys-OMe)フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン480 mg (1 mmol)およびN-メチルモルホリン100 mg (1 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 4:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体920 mg (83%)が得られた。Mp 72 - 76.

(外27)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -32.7 (c = 0.13, MeOH), ESI-MS (m/z) 1204 [M + Na]⁺。IR (KBr) 3317, 2937, 1658, 1531, 1447, 1362, 1254, 1168, 1055, 835, 746, 697, 541, 460 cm⁻¹。

【0116】

実施例55 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン1200 mg (1 mmol)をメタノール3 mLに溶かし、NaOH水溶液(2N)を加えて、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、冰浴で10 min攪拌して、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。2N HClでpH 7に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水2 mLで希釈して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である青色の固体899 mg (80%)が得られた。EI-MS (m/z) 1116 [M - H]⁻。

【0117】

実施例56 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン583 mg (0.5 mmol)、HOBr 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl 442 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体421 mg (40%)が得られた。Mp 77 - 79.

(外28)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 45.4 (c = 0.15, MeOH). ESI-MS(m/z) 1897 [M + H]⁺. IR(KBr) 3319, 2934, 1658, 1530, 1449, 1361, 1256, 834, 741, 698, 542 cm⁻¹.

【0118】

実施例57 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(ObzI)-Val-OBzI}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン583 mg (0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(ObzI)-Val-ObzI 421 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体472 mg (42%)が得られた。Mp 107 - 109.

(外29)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 28.8 (c = 0.11, MeOH). ESI-MS(m/z) 1820 [M + H]⁺. IR(KBr) 3314, 2938, 1658, 1531, 1448, 1362, 1258, 742, 698, 594 cm⁻¹.

【0119】

実施例58 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(ObzI)-Phe-OBzI}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン583 mg (0.5 mmol)、HOBt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(ObzI)-Phe-ObzI 445 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体420 mg (47%)が得られた。Mp 141 - 144.

(外30)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 35.7 (c = 0.12, MeOH). ESI-MS(m/z) 1867 [M + H]⁺. IR(KBr) 3319, 2936, 1656, 1529, 1448, 1362, 1257, 1169, 834, 743, 698, 541 cm⁻¹.

【0120】

実施例59 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン(Ig)の製造

冰浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(ObzI)-Ser(BzI)-OBzI}フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン170 mg (0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TLC(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックショ

ンを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体102 mg (82%)が得られた。Mp 148 - 150 .
(外31)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -22.4 (c = 0.14, MeOH). FT-MS(m/z) 1303.6919 [M + H]⁺, 2606.3838, [2M + H]⁺, 3909.0757 [3M + H]⁺, 5211.7676 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3344, 3080, 2930, 1666, 1535, 1392, 1250, 1181, 1030, 835, 800, 719, 638.

【0121】

実施例60 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Val]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン (Ih) の製造

氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Val-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン182 mg(0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体99 mg (84%)が得られた。Mp 137 - 139 .

(外32)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -34.3 (c = 0.18, MeOH). ESI-MS(m/z) 1315.7282 [M + H]⁺, 2630.4564 [2M + H]⁺, 3945.1846 [3M + H]⁺, 5259.9128 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3329, 2953, 1665, 1533, 1391, 1198, 1134, 834, 801, 720, 599 cm⁻¹.

【0122】

実施例61 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン (Ii) の製造

氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Phe-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン187 mg(0.1 mmol)とトリフルオロ酢酸6 mLおよびトリフルオロメタンスルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体96 mg (81%)が得られた。Mp 99 - 100 .

(外33)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 24.7 (c = 0.14, MeOH). FT-MS (m/z) 1363.7282 [M + H]⁺, 2726.4564 [2M + H]⁺, 4089.1846 [3M + H]⁺, 5451.9128 [4M + H]⁺. g = 2.00789. IR(KBr) 3322, 3060, 2928, 1661, 1530, 1391, 1303, 1247, 641 cm⁻¹.

【0123】

血栓溶解活性を有するペプチド：適切に保護されたPAKの製造

【0124】

実施例 6 2 Boc - Pro - Ala - Lys(Z) の製造

Boc - Pro - Ala - Lys(Z) - OBzI 638 mg (1 mmol)をメタノール3 mLに溶かし、氷浴でNaOH水溶液(2N)を加えて、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、氷浴で10 min攪拌した。TLCで原料スポットがなくなったことを確認し、2N HClでpH 7に調整した。反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水溶液2 mLで希釀して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である無色の固体509 mg (91.6%)が得られた。EI-MS (m/z) 547 [M - H]⁻.

【0125】

PAK/イミダゾリン/RGD三元コンジュゲート(一般式I-1-4の化合物)：Ij、Ik、IIの製造

【0126】

実施例 6 3 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造

氷浴でBoc - Pro - Ala - Lys(Z) 548 mg (1 mmol)、HOEt 135 mg (1 mmol)、DCC 250 mg (1 mmol)および無水THF 10 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液に1,3 - ジオキソ - 2 - [(4' - オキソアセチル - Lys - OMe) フェニル] - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン480 mg(1 mmol)およびN - メチルモルホリン100 mg (1 mmol)と無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 40:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体876 mg (87%)が得られた。Mp 77 - 80.

(外34)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= - 12.6 (c = 0.16, MeOH). ESI-MS(m/z) 1003 [M + Na]⁺. IR (KBr): 3315, 3069, 2937, 1671, 1531, 1449, 1394, 1364, 1302, 1167, 1132, 1054, 836, 743, 698, 596, 541, 458 cm⁻¹.

【0127】

実施例 6 4 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造

氷浴で1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - OMe} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン980 mg (1 mmol)をメタノール3 mLに溶かし、NaOH水溶液(2N)を加えて、室温で30 min攪拌した。pH 12を保持し、氷浴で10 min攪拌して、TLCで原料スポットがなくなったことを確認した。2N HClでpH 7に調整して、反応液を減圧濃縮し、残存物を飽和食塩水2 mLで希釀して、2N HClでpH 2に調整し、酢酸エチルで3回抽出した(5 mL × 3)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過して、ろ液を室温で減圧濃縮することで、表記化合物である青色の固体867 mg (80%)が得られた。EI-MS (m/z) 965 [M - H]⁻.

【0128】

実施例 6 5 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - {N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(OBzI) - Ser(BzI) - OBzI} フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリンの製造

氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン483 mg(0.5 mmol)、HOt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)·Gly·Asp(OBzI)·Ser(BzI)·ObzI 442 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体421 mg (42%)が得られた。Mp 97 - 100 .

(外35)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -42.5 (c = 0.14, MeOH). ESI-MS(m/z) 1697 [M + H]⁺. IR(KBr) 3298, 3070, 2935, 2869, 1642, 1534, 1450, 1369, 1253, 741, 697, 596 cm⁻¹ .

【0129】

実施例66 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Val-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン483 mg(0.5 mmol)、HOt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)·Gly·Asp(OBzI)·Val·ObzI 432 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体357 mg (37%)が得られた。Mp 117 - 120 .

(外36)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -22.3 (c = 0.17, MeOH). ESI-MS(m/z) 1620 [M + H]⁺. IR(KBr) 3303, 3072, 2935, 1644, 1533, 1451, 1394, 1364, 1255, 1167, 745, 697, 597 cm⁻¹ .

【0130】

実施例67 1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzI)-Phe-OBzI]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンの製造

氷浴で1,3-ジオキソ-2-{4'-オキソアセチル-[N-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys]フェニル}-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン483 mg(0.5 mmol)、HOt 69 mg (0.5 mmol)、DCC 126 mg (0.6 mmol)および無水THF 20 mLの溶液を20分間攪拌した。当該溶液にHCl·Arg(NO₂)·Gly·Asp(OBzI)·Phe·ObzI 439 mg (0.5 mmol)、N-メチルモルホリン50 mg (0.5 mmol)及び無水THF 5 mLで調製した溶液を加え、室温で24時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応混合物を通常の処理することで、表記化合物である青色の固体472 mg (48%)が得られた。Mp 111 - 114 .

(外37)

$[\alpha]_D^{20}$

= - 15.3 (c = 0.13, MeOH). ESI - MS(m/z) 1667 [M + H]⁺. IR(KBr) 3296, 3071, 2935, 1641, 1534, 1394, 1253, 1170, 834, 745, 697, 594 cm⁻¹.

【0131】

実施例 6 8 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - (Pro - Ala - Lys) - Lys - Arg - Gly - Asp - Ser] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン (Ij) の製造
冰浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Ser(BzI) - ObzI] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 169 mg (0.1 mmol) とトリフルオロ酢酸 6 mL およびトリフルオロメタンスルホン酸 1.5 mL を混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25% アンモニア水で pH 8 に調整し、Sephadex G10 で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体 98 mg (80%) が得られた。Mp 127 - 128.

(外 3 8)

 $[\alpha]_D^{20}$

= - 22.4 (c = 0.13, MeOH). FT - MS(m/z) 1147.5907 [M + H]⁺, 2294.1814 [2M + H]⁺, 3440.7721 [3M + H]⁺, 4587.3628 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3204, 1672, 1543, 1436, 1199, 1133, 837, 801, 722, 598 cm⁻¹.

【0132】

実施例 6 9 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - (Pro - Ala - Lys) - Lys - Arg - Gly - Asp - Val] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン (Ik) の製造
冰浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Val - ObzI] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 162 mg (0.1 mmol) とトリフルオロ酢酸 6 mL およびトリフルオロメタンスルホン酸 1.5 mL を混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1) で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25% アンモニア水で pH 8 に調整し、Sephadex G10 で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体 96 mg (81%) が得られた。Mp 123 - 124.

(外 3 9)

 $[\alpha]_D^{20}$

= - 24.6 (c = 0.13, MeOH). FT - MS(m/z) 1159.6271 [M + H]⁺, 2318.2542 [2M + H]⁺, 3476.8813 [3M + H]⁺, 4635.5084 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3388, 2959, 1666, 1540, 1494, 1198, 1134, 835, 801, 720, 598 cm⁻¹.

【0133】

実施例 7 0 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - (Pro - Ala - Lys) - Lys - Arg - Gly - Asp - Phe] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン (II) の製造
冰浴で 1,3 - ジオキソ - 2 - {4' - オキソアセチル - [N - [Boc - Pro - Ala - Lys(Z)] - Lys - Arg - (NO₂) - Gly - Asp(ObzI) - Phe - ObzI] フェニル} - 4,4,5,5 - テトラメチルイミダゾリン 169 mg (0.1 mmol) とトリフルオロ酢酸 6 mL およびトリフルオロメタンス

ルホン酸1.5 mLを混合し、1時間攪拌した後、TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)で原料スポットがなくなったことを確認した。反応化合物を減圧濃縮し、残存物を無水エチルエーテルで繰り返し洗浄した。減圧濃縮し、残存物を水で溶かした。25%アンモニア水でpH 8に調整し、Sephadex G10で脱塩し、C18カラムで精製し、回収したフラックションを凍結乾燥することで、表記化合物である青色の固体96 mg (81%)が得られた。Mp 153 - 154

(外40)

$$[\alpha]_D^{20}$$

= -12.6 (c = 0.16, MeOH). FT-MS (m/z) 1207.6271 [M + H]⁺, 2414.2542 [2M + H]⁺, 3620.8813 [3M + H]⁺, 4827.5084 [4M + H]⁺. g = 2.00789. IR(KBr) 3385, 2938, 1659, 1541, 1450, 1391, 1251, 1126, 963, 841, 599, 456 cm⁻¹.

【0134】

試験例1 本発明化合物Ia~IIのNOフリーラジカル捕捉試験

体重が250 - 300gである雄Wistarラットを術前12時間断食させ、自由に水を飲ませ、頸椎脱臼によって死亡させた。迅速的に開胸して胸部大動脈を取り、付着した結合組織を剥離して、血管を長さ3 - 5 mmの動脈輪に切断してかん流バスに置いた。バス内にKrebs - Henseleit液15 mlを満たし、37°で定温して、95% O₂ - 5% CO₂ガスを導入した。動脈輪を固定するためのフックにテンショントランスデューサをつなぎ、2チャンネルレコーダーで血管運動曲線を描く。紙の速度が1 mm/minである。静止張力を1.0gに調整し、30 minバランスさせた後、終濃度が10⁻⁸ Mになるようにノルエピネフリンを投与することで、早期興奮作用を奏するように動脈収縮させた。ノルエピネフリンを洗い落として、30 minバランスさせ、終濃度が10⁻⁸ Mになるようにバスにノルエピネフリンを添加した。収縮張力がプラットフォームレベルで安定した後、バス内に生理食塩水(プランク) 20 μlまたは化合物Ia - IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(終濃度が5 × 10⁻⁶ Mである) 20 μl、あるいはNOフリーラジカル捕捉剤(1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン、TMMZ)の生理食塩水溶液(終濃度が5 × 10⁻⁶ Mである) 20 μlを入れた。安定した後、アセチルコリンの生理食塩水溶液(終濃度が10⁻⁶ Mである) 20 μlを加えた。薬剤のNO捕捉能力は、アセチルコリンによる血管条の拡張が阻害される百分率で表す。試験結果を表1に示す。

【0135】

試験結果から、NOを捕捉することによって、Ia - IIはアセチルコリンの血管ストリップ拡張作用を阻害できることが分かる。ここから分かるように、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤(1,3-ジオキソ-2-(4'-オキシ酢酸-フェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン、TMMZ)につなぐことで、アセチルコリンの血管ストリップ拡張を阻害する活性がTMMZより明らかに強い化合物が9つあり、アセチルコリンの血管ストリップ拡張を阻害する活性がTMMZとほぼ同一である化合物が2つあり、アセチルコリンの血管ストリップ拡張を阻害する活性がTMMZより明らかに弱い化合物が1つある。評価された12の化合物のうち、阻害率が30%を超える化合物は4つある。これら4つの化合物はアセチルコリンの血管ストリップ拡張を阻害する活性の順番がIe > Ih > Ib > Ifである。これは、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、全体的にTMMZ基がNOフリーラジカルを捕捉する活性を改良したことを意味している。

【0136】

【表1】

表1 アセチルコリンの血管ストリップ拡張に対する
Ia-IIの阻害百分率

化合物	阻害率(Mean ± SD %)
TMMZ	15.47 ± 2.20
Ia	22.82 ± 3.27 ^a
Ib	35.32 ± 4.74 ^a
Ic	21.78 ± 3.11 ^a
Id	17.60 ± 2.75 ^b
Ie	41.28 ± 3.27 ^a
If	32.55 ± 2.55 ^a
Ig	24.40 ± 3.60 ^a
Ih	37.54 ± 1.84 ^a
Ii	13.75 ± 2.07 ^b
Ij	27.22 ± 2.68 ^a
Ik	11.13 ± 2.92 ^c
Il	22.62 ± 3.60 ^a

n=6、a) TMMZ と比べると p<0.01 である。

b) TMMZ と比べると p>0.05 である。c) TMMZ と
比べると p<0.05 である。

試験例2 本発明化合物Ia~IIのオイグロブリン溶解試験

豚の血と3.8% クエン酸ナトリウム溶液を体積比9:1で混合し、直ちに3000 r/minの速度で10 min遠心分離することで、乏血小板血漿を分離した。50 mLの遠心管に豚の乏血小板血漿2 mLおよび超純水36 mLを入れた。遠心管1本につき酢酸(1%)0.4 mLを加え、十分に混合した。4 の冷蔵庫に入れ、10 min冷凍して、3000 r/minの速度で10 min遠心分離した。遠心管を反転させて、液体が流れなくなった後、ろ紙で管内壁の液体を吸収した。遠心分離で得られたオイグロブリンを沈殿させ、約40 min凍結乾燥し、こすり落とした。オイグロブリン約35 mgを硼砂バッファー液(pH 9.28)7 mLに溶かした。1時間後オイグロブリンがほとんど溶解して、CaCl₂溶液(25 mM) 0.7 mLを添加し、直ちに10 cm × 10 cmのガラスプレート上に厚さ約1 mmで敷いた。凝固した後、ピペットで生理食塩水10 μLまたは化合物Ia~IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(1 mM)10 μL、あるいはウロキナーゼの生理食塩水溶液(0.8 mg/mL)10 μLを凝固プレート上に滴下した。両点の間の間隔が1.5 cmより大きく、1サンプル当たり3回滴下した。4時間後溶解円の直径を量り、示度を表2に示した。

【0137】

試験結果から、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、全ての化合物が明らかなオイグロブリン溶解活性を

示すことが分かる。

【0138】

【表2】

表2 Ia-II が 4 h 作用した時のオイグロブリン溶解直径

化合物	直径 (Mean \pm SD mm)
生理食塩水	2.9 \pm 0.6 ^a
ウロキナーゼ	10.7 \pm 0.4 ^a
Ia	4.0 \pm 0.0
Ib	5.2 \pm 0.3
Ic	3.8 \pm 0.3
Id	5.2 \pm 0.3
Ie	5.5 \pm 0.3
If	4.5 \pm 0.5
Ig	5.2 \pm 0.3
Ih	4.2 \pm 0.3
Ii	4.0 \pm 0.0
Ij	4.0 \pm 0.0
Ik	4.5 \pm 0.5
Il	4.2 \pm 0.3

n=3 a) Ia-1 と比べると p<0.01 である。

試験例3 本発明化合物Ia~IIのin vitro血栓溶解試験

SDラット(オス、350 - 400 g)に1200 mg/kgの用量でウレタン溶液を腹腔内注射することで麻酔をかけた。麻酔されたラットを仰臥位で固定させ、右総頸動脈を分離した。近位端で動脈鉗子を挟み、近位端および遠位端でそれぞれ縫合糸を通した。遠位端の縫合糸を毛皮用止血鉗子によって締め、遠位端で挿管した。動脈鉗子を緩めて、全ての動脈血を排出し、あらかじめシリコンオイル化された50 mlの容器に入れた。垂直に固定されたカラスチューブ(長さ20 mm、内径4 mm、外径5 mm、チューブの底がゴム栓で密封されている)にラット動脈血0.8 mlを注入し、速やかにチューブ内にステンレス製の血栓固定ボルトを一つ挿した。当該血栓固定スクリューは直径が0.2 mmのステンレス糸で巻きついてなるものであり、スクリュー部の長さが18 mmであり、15周の螺旋を含む。螺旋の直径が1.8 mmであり、螺旋とつながる柄は、長さが7.0 mmであり、疑問符状を呈する。血液が凝固した40 min後、ガラスチューブの底部のゴム栓を開栓して、ピンセットによって血栓固定スクリューの柄を保持し、ガラスチューブから血栓に包まれた血栓固定スクリューを入念に取り出した。それを三回蒸留した水に懸濁することで、表面に浮いている血を取り除いた。1 h後取り出して、精確に重量を量った。血栓を8 mLの生理食塩水、あるいは化合物Ia - IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(濃度が100 nMである)、あるいはARPAK、またはGRPAK、またはRPAK、またはPAK(配列番号6、7、5、1)の生理食塩水溶液(濃度は100 nM)、あるいはウロキナーゼの生理食塩水溶液(100 IU/mL)に懸濁浸漬して、37 °Cで恒温したシェーカーの中で振動させた(63 r/min)。2 h後取り出して、正確に重量を量った。投与前後の血栓の質量差を求め、結果を表3に示す。

【0139】

試験結果から、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、全ての化合物が明らかなin vitro血栓溶解活性を示すことが分かった。Ia - Icの活性とARPAK(配列番号6)の活性がほぼ同じであり、Id - Ifの活性とGRPAK(配列番号7)の活性がほぼ同じであり、Ig - Iiの活性とRPAK(配列番号5)の活性がほぼ同じであり、Ij - IIの活性とPAK(配列番号1)の活性がほぼ同じであるので、Ia - IIのin vitro血栓溶解活性は、一方では血栓溶解ペプチドの活性によるが、他方では、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、対応する血栓溶解ペプチドの活性を低減させることはないことが分かった。

【0140】

【表3】

表3 Ia-IIが2h作用した時のin vitro血栓溶解活性

化合物	血栓重量減少 (Mean \pm SD mg)		
生理食塩水	16.67	\pm	1.86 ^a
ウロキナーゼ	58.33	\pm	4.08 ^a
ARPAK	26.35	\pm	3.10
Ia	28.50	\pm	2.59
Ib	28.17	\pm	2.31
Ic	27.33	\pm	2.07
GRPAK	15.47	\pm	2.61
Id	14.17	\pm	3.55
Ie	14.00	\pm	1.41
If	15.29	\pm	3.36
RPAK	26.01	\pm	3.11
Ig	27.83	\pm	2.56
Ih	29.33	\pm	3.01
Ii	24.83	\pm	1.17
PAK	26.67	\pm	3.20
Ij	26.16	\pm	3.15
Ik	25.00	\pm	1.54
II	25.83	\pm	2.31

n=6 a) Ia-IIと比べるとp<0.01である。

試験例4 本発明化合物Ia~IIのin vivo血栓溶解試験

SDラット(オス、220 - 230 g)に1200 mg/kgの用量でウレタン溶液を腹腔内注射することで麻酔をかけた。麻酔されたラットを仰臥位で固定させ、右総頸動脈を分離した。近位端で動脈鉗子を挟み、近位端および遠位端でそれぞれ縫合糸を通した。遠位端の縫合糸を毛皮用止血鉗子によって締め、遠位端で挿管した。動脈鉗子を緩めて、約1mlの動脈血を排出し、1mlの弾丸の中に入れた。垂直に固定されたカラスチューブ(長さ15 mm、内径2.

5 mm、外径5.0 mm、チューブの底がゴム栓で密封されている) にラット動脈血0.1 mlを注入し、速やかにチューブ内にステンレス製の血栓固定ボルトを一つ挿した。当該血栓固定スクリューは直径が0.2 mmのステンレス糸で巻きついてなるものであり、スクリュー部の長さが12 mmであり、15周の螺旋を含む。螺旋の直径が1.0 mmであり、螺旋とつながる柄は、長さが7.0 mmであり、疑問符状を呈する。血液が凝固した15 min後、ガラスチューブの底部のゴム栓を開栓して、ピンセットによって血栓固定スクリューの柄を保持し、ガラスチューブから血栓に包まれた血栓固定スクリューを入念に取り出して、精確に重量を量った。

【0141】

バイパス挿管は3つの部分からなる。中部はポリエチレンチューブであり、長さが60.0 mmであり、内径が3.5 mmである。両端は同様なポリエチレンチューブであり、チューブの長さが100.0 mmであり、内径が1.0 mmであり、外径が2.0 mmである。ラットの頸動脈または静脈に挿入されるために、この管の一端が尖るように延伸されて、外径が1.0 mmである。他端の外部に長さ7.0 mm、外径3.5 mmのポリエチレンチューブ(中部のポリエチレンチューブ内に挿入するために、太くした)が嵌められた。3つの部分の内壁はいずれもシリル化された(1%のシリコンオイルエチルエーテル溶液)。血栓に包まれた血栓固定スクリューを中部のポリエチレンチューブの中に入れて、管の両端がそれぞれ二つの太くしたポリエチレン製末端を嵌めている。注射器を使って、尖った端から管にヘパリン生理食塩水溶液(50 IU/kg)をいっぱい入れて、必要に備えた。引き続き麻酔ラットの気管を分離し、気管の挿管を行った。ラットの左外頸静脈を分離し、近位端および遠位端でそれぞれ縫合糸を通し、露出した左外頸静脈に入念に切り目を斜めにつけ、斜めになつた切り目から、前記製造されたバイパス管の尖った管を、バイパス管中部(精確に重量を量った血栓固定スクリューを含む)内の血栓固定スクリューの柄から遠ざけて、左外頸静脈開口の近位端に挿入した。注射器を使って、他端の尖った管から精確な量のヘパリン生理食塩水(50 IU/kg)を入れた。この時、注射器がポリエチレンチューブから離れない。止血鉗子により注射器とポリエチレンチューブの間のホースを挟んだ。右総頸動脈の近位端で動脈鉗子で止血し、動脈鉗子の付近で右総頸動脈に入念に切り目を斜めにつけた。ポリエチレンチューブの尖った部分から注射器を抜き出し、ポリエチレンチューブの尖った部分を、動脈の斜めになつた切り目の近位端に挿入した。バイパス管の両端も#4の縫合糸により動脈と固定されている。

【0142】

頭皮静脈針を使って、バイパス管の中部(精確に重量を量った血栓固定スクリューを含む)から、生理食塩水(3 mL/kg)、あるいはウロキナーゼの生理食塩水溶液(用量20000 IU/kg)、あるいは化合物Ia - IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(用量0.1 μ mol/kg)、あるいはARPAK、またはGRPAK、またはRPAK、またはPAK(配列番号6、7、5、1)の生理食塩水溶液(用量1 μ mol/kg)を、血栓固定スクリューから遠ざかる静脈付近に刺した。動脈鉗子を緩めて、血流をバイパス管により動脈から静脈に流せ、ラット動静脈バイパス血栓溶解モデルとなった。注射器中の液体を徐々に血液に注入し、血液循環を利用して静脈 - 心臓 - 動脈の順に生理食塩水(プランク)、ウロキナーゼ(陽性対照)、あるいはARPAK、またはGRPAK、またはRPAK、またはPAK(配列番号6、7、5、1) (成分対照)、あるいはIa - IIを血栓に作用させた。注射開始の時点から計時し、1 h後バイパス管から血栓固定スクリューを取り出し、精確に重量を量った。各ラットに対して、バイパス管における投与前後の血栓固定スクリューの質量差を求め、試験結果を表4に示す。

【0143】

試験結果から、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF (配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことで得られた化合物Ia - Icは、用量0.1 μ mol/kgでは、いずれも明らかな血栓溶解活性を有するとともに、活性強度が対応する血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)の用量1 μ mol/kgでの血栓溶解活性強度とほぼ同じであることが分かった。ここから分かるように、Lysによって血栓溶解ペプチドA

RPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、有効用量を10倍低減することができる。

【0144】

【表4】

表4 Ia-IIのin vivo血栓溶解活性

化合物	血栓重量減少 (Mean \pm SD mg)
生理食塩水	11.05 \pm 1.51 ^a
ウロキナーゼ	18.02 \pm 2.32 ^a
ARPAK	15.20 \pm 2.55
Ia	15.39 \pm 3.19
Ib	14.35 \pm 2.95
Ic	15.79 \pm 3.07
GRPAK	15.47 \pm 2.61
Id	14.17 \pm 3.55
Ie	14.00 \pm 1.41
If	15.29 \pm 3.36
RPAK	15.67 \pm 2.61
Ig	16.35 \pm 2.42
Ih	15.37 \pm 1.82
Ii	15.73 \pm 2.95
PAK	15.00 \pm 2.61
Ij	14.89 \pm 1.84
Ik	15.47 \pm 2.61
Il	16.21 \pm 2.84

n=10 a) Ia-IIと比べるとp<0.01である。

試験例5 本発明化合物Ia~IIのin vivo抗血栓試験

SDラット(オス、220-230g)をランダムにグループ分けして、1グループにつき11匹である。一日安静飼育し、飼育を中止して一晩過ごした。ラットに生理食塩水(用量3mL/kg)、あるいは化合物Ia~IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(用量0.1μmol/kg)、あるいは標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)の生理食塩水溶液(用量10μmol/kg)、あるいはアスピリン(用量33mg/kg)を胃内投与した。30分後、20%ウレタン溶液を利用してラットに麻酔をかけた後、右頸動脈と左頸静脈を分離した。挿管内にヘパリンナトリウムの生理食塩水溶液を満たした後、一端を左側の静脈に挿入し、他端では抗凝固のために注射器で規定量のヘパリンナトリウムを添加した後、右側の動脈に挿入した。血流は右側の動脈からポリエチレンチューブを通じて左側の静脈に流れ、15分後血栓がついた糸を取り出して重量を記録し、総重量から糸の重量を引いて血栓湿重量となる。試験結果を表5に示す。

【0145】

試験結果から、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6

、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより得られた化合物Ia - Icは、経口用量0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ では、いずれも明らかな抗血栓活性を有するとともに、活性強度が対応する標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)の用量10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ での抗血栓活性強度とほぼ同じであることが分かった。ここから分かるように、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことにより、有効用量を100倍低減することができる。

【0146】

【表5】

表5 Ia-IIl の in vivo 抗血栓活性

化合物	血栓湿重量 (Mean \pm SD mg)
生理食塩水	27.38 \pm 2.62 ^a
アスピリン	12.85 \pm 2.49 ^a
RGDS	20.02 \pm 2.35
RGDV	21.26 \pm 2.07
RGDF	19.55 \pm 2.21
Ia	24.32 \pm 2.10
Ib	20.14 \pm 2.45
Ic	20.50 \pm 2.26
Id	19.46 \pm 1.84
Ie	16.92 \pm 1.53
If	17.99 \pm 2.47
Ig	17.89 \pm 2.05
Ih	18.24 \pm 1.89
Ii	17.79 \pm 2.02
Ij	19.45 \pm 1.79
Ik	22.25 \pm 2.25
Il	19.32 \pm 2.56

n=11 a) Ia-IIl と比べると p<0.01 である。

脳卒中患者に対する本発明化合物の確実な治療効果を評価するための動物モデルの構築

(1) ここで記載されたラット実験プロトコールはジュネーブ動物実験ガイドに合致し、学校倫理委員会に認められている。体重280 - 305 gのクリーニングレードの健康なオスSDラットはVital River実験動物センターから購入した。これらのラットは血栓の製造または脳卒中モデルの製造にランダムに用いられた。

(2) SDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸動脈を分離し、新鮮な動脈血15 mLを取り、10 μL ごとに1.5 mLのEP管に入れて、形成された血栓をまず室温で2時間静置し、さらに - 20 の冷蔵庫内で22時間静置した。使用の際、生理食塩水0.5 mLを添加し、ガラス棒ですりつぶして、大きさが均一である血栓塊の生理食塩水懸濁液を調製し、血栓塊一つあたりの体積が約0.1 m

m^3 である。

(3) SDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸動脈を分離し、新鮮な動脈血15 mLを取り、10 μL ごとに1.5 mLのEP管に入れて、形成された血栓をまず室温で24時間静置した。使用の際、生理食塩水0.5 mLを添加し、ガラス棒ですりつぶして、大きさが均一である血栓塊の生理食塩水懸濁液を調製し、血栓塊一つあたりの体積が約0.1 mm^3 である。

(4) オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させた。外頸静脈を分離し、外頸静脈から生理食塩水(プランク)または本発明化合物の生理食塩水溶液を注入した。傷口を縫合し、感染を予防するために2万IUのペニシリンを筋肉注射した。これは脳卒中直後の治療モデルである。

(5) オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために、2万IUのペニシリンを筋肉注射した。4時間、6時間または24時間後、尾静脈から生理食塩水(プランク)または本発明化合物の生理食塩水溶液を注入した。これは脳卒中にかかった4時間、6時間および24時間後のラットの治療モデルである。

【0147】

脳卒中にかかった4時間、6時間および24時間後の本発明化合物の確実な治療効果を評価するための動物モデルの構築

(1) ラットが脳卒中にかかった直後に本発明化合物の治療を受けること、ラットが脳卒中にかかった4時間後本発明化合物の治療を受けること、ラットが脳卒中にかかった6時間後本発明化合物の治療を受けることによって得られた治療効果とは、ラットが蘇った24時間後観察された行行為である。前記行為には、歩き方、右瞼の垂下程度、尾の硬直程度、筋肉張力、頭部が偏る程度、手足の支持力および死亡状況が含まれる。

(2) ラットが脳卒中にかかった24時間後本発明化合物の治療を受けることによって得られた治療効果とは、24時間治療した後観察された行行為である。前記行為には、歩き方、右瞼の垂下程度、尾の硬直程度、筋肉張力、頭部が偏る程度、手足の支持力および死亡状況が含まれる。

(3) 一度で本発明化合物の治療を受けた脳卒中ラットの治療効果と一度で生理食塩水の治療を受けた脳卒中ラットを比較した。

(4) 連続的な治療を受けた脳卒中ラットに対して、24時間につき尾静脈から本発明化合物の生理食塩水を注入し、翌日録画して比較した。

本発明化合物Ia~IIの前記動物モデルにおける試験結果は以下のとおりである。

【0148】

試験例6 ラットが脳卒中にかかった直後に本発明化合物Ia～IIの治療を受けた試験
本発明化合物のin vivo抗脳卒中活性は神経機能点数で表される。点数が低ければ、活性が強い。SDオスラット(250 - 300 g)に10%抱水クロラール(400 mg/kg)を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から少し右方へ離れた所で、縦に長さ約2 cmの切り目をつけて、胸鎖乳突筋の内側縁に沿って右総頸動脈、外頸動脈および内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、外頸動脈に小さな切り目をつけて、外頸動脈の遠位端を結紮した。総頸動脈の近位端の動脈鉗子を緩め、血10 µlを取り、その後、さらに非侵襲的動脈鉗子によって総頸動脈の近位端を締めた。得られた血10 µlを1 mLのEP管内に入れて、まず常温で30分間静置することで、血液を凝固させた。その後、-20 の冷蔵庫に移して1時間静置し、血液凝塊をしっかりとさせた。1時間後血液凝塊を取り出し、生理食塩水1 mLを添加した。シャベルを使って、血液凝塊を比較的均一で細かい血栓につぶした後、細かい血栓の懸濁液を1 mLの注射器に移し、必要に備えた。ラットの内頸動脈鉗子を緩めて、同時に1 mLの注射器内の血栓懸濁液をゆっくりとラット外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端のラット大脳に注入した。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈と総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させた。ラットの総頸静脈を分離し、または直ちに静脈を結紮して、傷口のところに3滴のペニシリンを滴下し、傷口を縫合した。動物が蘇った後、偽手術群として、ウロキナーゼの生理食塩水溶液(陽性対照群、用量20000 IU/kg)を注入するか、生理食塩水(プランク群、用量3 mL/kg)を注入するか、TMMZの生理食塩水溶液(成分対照群、用量1 µmol/kg)を注入するか、あるいは血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)の生理食塩水溶液(成分対照群、用量1 µmol/kg)を注入し、あるいは化合物Ia - IIのうちいずれか一つの生理食塩水溶液(用量0.1 µmol/kg)を注入した。ラットが蘇った24時間後、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するように歩くことを表し、4点は意識障害のため自動的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表6に示す。

【0149】

試験結果から分かるように、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことで得られた化合物Ia - Icは用量0.1 µmol/kgでは、いずれも明らかな抗脳卒中活性を有する。一方、用量20000 IU/kgでは、ウロキナーゼは明らかな抗脳卒中活性を示していない。同様に、用量1 µmol/kgでは、血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)も明らかな抗脳卒中活性を示していない。これにより、Lysで血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことで、化合物に抗脳卒中作用を持たせることができた。そのうち、用量1 µmol/kgでは、抗脳卒中活性が用量20000 IU/kgでのウロキナーゼの抗脳卒中活性とほぼ同一である化合物は4つあり、抗脳卒中活性が用量20000 IU/kgでのウロキナーゼの抗脳卒中活性より明らかに強い化合物は8つあった。

【0150】

【表6】

表6 Ia-Icのin vivo抗脳卒中活性

化合物	神経機能点数 (Mean ± SD)
生理食塩水	3.07 ± 1.04
ウロキナーゼ	1.90 ± 1.37 ^a
TMMZ	2.83 ± 0.75 ^a
ARPAK	2.21 ± 0.94 ^a
Ia	1.00 ± 1.01 ^b
Ib	0.56 ± 1.01 ^c
Ic	0.89 ± 1.36 ^c
GRPAK	2.38 ± 0.92 ^a
Id	1.22 ± 1.32 ^b
Ie	0.44 ± 1.01 ^c
If	0.60 ± 0.84 ^c
RPAK	2.38 ± 0.97 ^a
Ig	1.00 ± 1.19 ^b
Ih	1.33 ± 1.22 ^b
Ii	0.87 ± 1.05 ^c
PAK	2.42 ± 0.95 ^a
Ij	0.90 ± 1.10 ^c
Ik	0.56 ± 0.53 ^c
Il	0.50 ± 0.53 ^c

n=10 a) 生理食塩水と比べると、p>0.05である。

b) ウロキナーゼと比べると、p>0.05であり、
生理食塩水と比べると、
p<0.01である。c) 生理食塩水およびウロキナーゼと比べると、
p<0.01である。

試験例7 ラットが脳卒中にかかった直後に本発明化合物Ia～IIでの治療を受けた場合の脳梗塞体積試験

試験例6のラットが蘇った24時間後、神経機能欠損程度を評価した。その後、ウレタンで麻酔をかけた後、速やかに断頭し脳を取った。脳組織を-20°の冷蔵庫で2時間置いて後、前頭極から合計6枚の約2mmの冠状連続的な切片を行った。その後、2%TTC溶液の中に置いて、37°で30min遮光してインキュベートした。そして、脳切片の色変化を観察したところ、正常脳組織がTTCにより赤色に染められたが、虚血脳組織、即ち梗塞脳組織が白色を呈する。その後、デジタルカメラで撮影し、SPSS統計ソフトで処理することで、冠状切片における梗塞脳組織の体積および正常脳組織の体積を計算した。試験結果を表7に示す。

【0151】

試験結果から、Lysによって血栓溶解ペプチドARPAK、GRPAK、RPAKまたはPAK(配列番号6、7、5、1)および標的ペプチドRGDS、RGDVまたはRGDF(配列番号28、29、30)をフリーラジカル捕捉剤TMMZにつなぐことで得られた化合物Ia - Icは、用量0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ では、いずれも脳卒中ラットの脳梗塞体積を有効に低減でき、そしてこのような作用が用量20000 IU/kgでのウロキナーゼの作用より明らかに強いことが分かった。

【0152】

【表7】

表7 Ia-Icで治療した脳卒中ラットの脳梗塞体積

化合物	梗塞体積比 (Mean \pm SD%)	
生理食塩水	22.92	\pm 2.74
ウロキナーゼ	11.00	\pm 2.42 ^b
TMMZ	22.96	\pm 2.43 ^a
ARPAK	22.00	\pm 2.20 ^a
Ia	7.21	\pm 0.82
Ib	7.13	\pm 0.83
Ic	7.40	\pm 1.65
GRPAK	21.77	\pm 2.46 ^a
Id	8.21	\pm 1.91
Ie	6.44	\pm 1.51
If	7.47	\pm 1.31
RPAK	22.11	\pm 2.25 ^a
Ig	6.40	\pm 0.28
Ih	7.35	\pm 1.14
Ii	7.06	\pm 1.08
PAK	22.07	\pm 2.40 ^a
Ij	6.84	\pm 0.82
Ik	7.86	\pm 1.02
I1	6.56	\pm 0.41

n = 10 a) 生理食塩水と比べるとp>0.05である。

b) 生理食塩水およびIa-I1と比べるとp<0.01である。

試験例8 ラットが脳卒中にかかった直後に異なる用量で本発明化合物Ieの治療を受けた試験

化合物Ia ~ IIが前記試験で示した治療作用は用量依存関係を有することを説明するために、本発明はあらゆる試験結果を分析、比較および総合したうえで、化合物Ieを代表として選び、用量 - 効果関係試験が行われた。強調すべきこととして、試験例1 - 7においてIa ~ IIのほかの化合物とIeが類似したNOフリーラジカル捕捉、オイグロプリン溶解、血栓溶解、抗血栓、並びに脳卒中ラット治療などの効果を奏したので、Ia ~ IIのほかの化合物はIeと同様に用量依存的治療作用が得られるはずである。

【0153】

SDオスマラット(250 - 300 g)に10%抱水クロラール(400 mg/kg)を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から少し右方へ離れた所で、縦に長さ約2 cmの切り目をつけて、胸鎖乳突筋の内側縁に沿って右総頸動脈、外頸動脈および内頸動脈を分離した

。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、外頸動脈に小さな切り目をつけて、外頸動脈の遠位端を結紮した。総頸動脈の近位端の動脈鉗子を緩め、血10 μ lを取り、その後、さらに非侵襲的動脈鉗子によって総頸動脈の近位端を締めた。得られた血10 μ lを1 mLのEP管内に入れて、まず常温で30分間静置することで、血液を凝固させた。その後、-20 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫に移して1時間静置し、血液凝塊をしっかりとさせた。1時間後血液凝塊を取り出し、生理食塩水1 mLを添加した。シャベルを使って、血液凝塊を比較的均一で細かい血栓につぶした後、細かい血栓の懸濁液を1 mLの注射器に移し、必要に備えた。ラットの内頸動脈鉗子を緩めて、同時に1 mLの注射器内の血栓懸濁液をゆっくりとラット外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端のラット大脳に注入した。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈と総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させた。ウロキナーゼの生理食塩水溶液(陽性対照群、用量20000 IU/kg)を注入するか、tPAの生理食塩水溶液(陽性対照群、用量3 mg/kg)を注入するか、生理食塩水(プランク群、用量3 mL/kg)を注入するか、あるいは化合物Ieの生理食塩水溶液(用量1 μ mol/kg、0.1 μ mol/kg、0.01 μ mol/kg)を注入した。ラットが蘇った24時間後、Zealanga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するように歩くことを表し、4点は意識障害のため自動的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表8に示す。結果から分かるように、ラットが脳卒中にかかった直後に1 μ nmol/kg、0.1 μ nmol/kgおよび0.01 μ nmol/kgの化合物Ieでの治療を受けた場合、神経機能点数が0であるラットの百分率はそれぞれ60%、30%および0%であり、神経機能点数が1であるラットの百分率はそれぞれ20%、30%および10%であった。ここから、化合物Ieの抗脳卒中活性は用量依存性を示していることが分かった。さらに、20000 IU/kgウロキナーゼおよび3 mg/kg tPAで治療した脳卒中ラットの神経機能点数が0であるラットの百分率はそれぞれ10%および40%であり、神経機能点数が1であるラットの百分率はそれぞれ50%および10%である。上述した結果と比べると、1 μ nmol/kgおよび0.1 μ nmol/kgの化合物Ieの治療効果は明らかに優れる。

【0154】

【表8】

表8 異なる用量での本発明化合物Ieのin vivo抗脳卒中活性

化合物	毎日の神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得点ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
生理食塩水	0匹	2匹	3匹	5匹	1匹	0匹
ウロキナーゼ	1匹	5匹	0匹	3匹	1匹	0匹
tPA	4匹	1匹	1匹	3匹	1匹	0匹
Ie	1 μ nmol/kg	6匹	2匹	0匹	2匹	0匹
	100 nmol/kg	3匹	3匹	0匹	3匹	1匹
	10 nmol/kg	0匹	1匹	6匹	1匹	0匹

n = 10 a)生理食塩水と比べると、p<0.01である。

試験例9 ラットが脳卒中にかかった4時間後1 μ mol/kgの本発明化合物Ieでの連続的な治療を6回受けた試験

治療効果は神経機能点数で表される。点数が低ければ、活性が強い。オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈

および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために2万IUのペニシリンを筋肉注射した。4時間後尾静脈から化合物Ie(用量1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, n = 11)の生理食塩水溶液、またはウロキナーゼ(用量20000 IU/kg, n = 6)の生理食塩水溶液、またはtPA(用量3 mg/kg, n = 6)の生理食塩水溶液を注入した。一日あたりラットの尾静脈から化合物Ieの生理食塩水溶液を一回注入して、6日連続して注入し、7日観察した。毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。あるいは、一日あたりラットの尾静脈からウロキナーゼの生理食塩水溶液を一回注入して、2日連続して注入し、毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。あるいは、一日あたりラットの尾静脈からtPAの生理食塩水溶液を一回注入して、2日連続して注入し、毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するよう歩くことを表し、4点は意識障害のため自動的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表9-1、9-2および9-3に示す。

【0155】

表9-1のデータから、ラットが脳卒中にかかった4時間後、一日あたり用量1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の化合物Ieでの治療を一回受け、6回治療し続いた場合、1匹が翌日突然死亡した以外、ほかの10匹のうち8匹が好転し、神経機能欠損兆候が全くなくなり、2匹がやや神経機能欠損兆候をもつ。ここから、用量1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ では、化合物Ieは黄金期を超えた脳卒中に確実な治療作用を有することが分かった。

【0156】

【表9】

表 9-1 ラットが脳卒中にかかった4時間後1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得点ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	1匹	4匹	4匹	1匹	1匹	0匹
2日目	3匹	5匹	1匹	1匹	0匹	1匹
3日目	5匹	5匹	0匹	0匹	0匹	0匹
4日目	7匹	3匹	0匹	0匹	0匹	0匹
5日目	8匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹
6日目	8匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹
7日目	8匹	2匹	0匹	0匹	0匹	0匹

表9-2のデータから分かるように、ラットが脳卒中にかかった4時間後、一日あたり用量20000 IU/kgのウロキナーゼでの治療を一回受けた場合、6匹のラットのうち2匹が48時間以内に死亡した。死亡したラットの死体を解剖したところ、いずれも臓器に出血現象が発見した。とりわけ、肺出血が酷かった。そこで、2回投与した後投与を終止させた。2回投与した後、神経機能欠損兆候が全くなくなるまたはやや神経機能欠損兆候が残るように好転したラットがいなかった。

【0157】

【表10】

表 9-2 ラットが脳卒中にかかった4時間後20000 IU/kgのウロキナーゼでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得点ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目			2匹	3匹		1匹
2日目			3匹	1匹		1匹

表9-3のデータから分かるように、ラット脳卒中にかかった4時間後、一日あたり用量3mg/kgのtPAでの治療を一回受けた場合、6匹のラットのうち1匹が24時間以内に死亡した。死亡したラットの死体を解剖したところ、臓器に出血現象が発見した。とりわけ、肺出血が酷かった。そこで、2回投与した後投与を終止させた。2回投与した後、神経機能欠損兆候が全くなくなるように好転したラットがいなかった。やや神経機能欠損兆候が残るようないい転じたラットがいた。

【0158】

【表11】

表 9-3 ラットが脳卒中にかかった4時間後3 mg/kgのtPAでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得点ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目			2匹	3匹		1匹
2日目		2匹	2匹	1匹		

表9-1、9-2および9-3のデータをまとめて分かるように、脳卒中にかかった4時間後のラットに対して、二日連続して治療したとしても、用量1 μ mol/kgの化合物Ieが用量20000 IU/kgのウロキナーゼおよび用量3mg/kgのtPAより優れる。

【0159】

試験例10 ラットが脳卒中にかかった6時間後1 μ mol/kgの本発明化合物Ieでの連続的な治療を6回受けた試験

治療効果は神経機能点数で表される。点数が低ければ、治療効果が良い。オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために2万IUのペニシリンを筋肉注射した。6時間後尾静脈から化合物Ie(用量1 μ mol/kg, n=11)の生理食塩水溶液、またはウロキナーゼ(用量20000 IU/kg, n = 6)の生理食

塩水溶液、またはtPA(用量3 mg/kg, n = 6)の生理食塩水溶液を注入した。一日あたりラットの尾静脈から化合物Ieの生理食塩水溶液を一回注入して、6日連続して注入し、7日観察した。毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。あるいは、一日あたりラットの尾静脈からウロキナーゼの生理食塩水溶液を一回注入して、2日連続して注入し、毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。あるいは、一日あたりラットの尾静脈からtPAの生理食塩水溶液を一回注入して、2日連続して注入し、毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するように歩くことを表し、4点は意識障害のため自動的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表10-1、10-2および10-3に示す。

【0160】

表10-1のデータから分かるように、ラットが脳卒中にかかった6時間後、一日あたり用量1 μmol/kgの化合物Ieでの治療を一回受け、6回治療し続いた場合、2匹が翌日突然死した以外、ほかの9匹のうち2匹が好転し、神経機能欠損兆候が全くなくなり、1匹がやや神経機能欠損兆候が残り、6匹が未損傷側へ回って尾行するように歩く兆候が残っている。ここから、用量1 μmol/kgでは、化合物Ieは黄金期を超えた脳卒中に確実な治療作用を有することが分かった。

【0161】

【表12】

表 10-1 ラットが脳卒中にかかった6時間後1 μmol/kgの本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean ± SD) 及び得点ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目	0匹	3匹	5匹	2匹	1匹	0匹
2日目	0匹	2匹	2匹	4匹	1匹	2匹
3日目	0匹	2匹	4匹	2匹	1匹	0匹
4日目	1匹	1匹	2匹	4匹	0匹	0匹
5日目	1匹	1匹	2匹	4匹	0匹	0匹
6日目	2匹	1匹	1匹	4匹	1匹	0匹
7日目	2匹	1匹	0匹	6匹	0匹	0匹

表10-2のデータから分かるように、ラットが脳卒中にかかった6時間後、一日あたり用量20000 IU/kgのウロキナーゼでの治療を一回受けた場合、6匹のラットのうち4匹が24時間以内に死亡した。死亡したラットの死体を解剖したところ、いずれも臓器に出血現象が発見した。とりわけ、肺出血が酷かった。そこで、2回投与した後投与を終止させた。2回投与した後、1匹のラットが好転し神経機能欠損兆候が全くなくなって、1匹のラットが意識障害が残り、自動的に歩く兆候がない。

【0162】

【表13】

表10-2 ラットが脳卒中にかかった6時間後20000 IU/kgのウロキナーゼでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得分ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目		1匹			1匹	4匹
2日目	1匹				1匹	

表10-3のデータから分かるように、ラット脳卒中にかかった6時間後、一日あたり用量3mg/kgのtPAでの治療を一回受けた場合、6匹のラットのうち2匹が24時間以内に死亡した。死亡したラットの死体を解剖したところ、いずれも臓器に出血現象が発見した。とりわけ、肺出血が酷かった。そこで、2回投与した後投与を終止させた。2回投与した後、神経機能欠損兆候が全くなくなるように好転したラットがいなかった。2匹が神経機能欠損兆候がやや残り、1匹が未損傷側へ回って尾行するように歩く兆候が残り、1匹が意識障害が残り、自動的に歩く兆候がない。

【0163】

【表14】

表10-3 ラットが脳卒中にかかった6時間後3mg/kgのtPAでの治療を受けた場合の治療効果

評価時間	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD) 及び得分ラットの数					
	0点	1点	2点	3点	4点	5点
1日目		1匹	1匹	1匹	1匹	2匹
2日目		2匹		1匹	1匹	

表10-1、10-2および10-3のデータをまとめて分かるように、脳卒中にかかった6時間後のラットに対して、二日連続して治療したとしても、用量1 μ mol/kgの化合物Ieが用量20000 IU/kgのウロキナーゼおよび用量3mg/kgのtPAより優れる。

【0164】

試験例11 ラットが脳卒中にかかった6時間後一回目5 μ mol/kg、その後2 μ mol/kg 5回の本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の試験

治療効果は神経機能点数で表される。点数が低ければ、治療効果が良い。オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために2万IUのペニシリンを筋肉注射した。6時間後尾静脈から化合物Ie (一回目の用量5 μ mol/kg、n=12)の生理食塩水溶液を注入した。その後、一日あたりラットの尾静

脈から化合物Ieの生理食塩水溶液(用量2 $\mu\text{mol/kg}$ 、n=12)を一回注入して、6日連続して注入し、7日観察した。毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するように歩くことを表し、4点は意識障害のため自主的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表11に示す。

【0165】

表11のデータから分かるように、ラットが脳卒中にかかった6時間後、1日目用量5 $\mu\text{mol/kg}$ の化合物Ieでの治療を一回受けて、その後一日につき一回用量2 $\mu\text{mol/kg}$ の化合物Ieでの治療を5日受けることで、確実な治療効果が得られた。2匹が死亡した以外、治療を受けた12匹のラットのうち、残った10匹のラットの中6匹が好転し、神経機能欠損兆候が全くなくなり、2匹がやや神経機能欠損兆候が残り、1匹が未損傷側へ歩く兆候が残り、1匹が未損傷側へ回って尾行するように歩く兆候が残っていた。ここから、化合物Ieの連続的な治療は黄金期を超えた脳卒中に確実な効果を有することが分かった。

【0166】

【表15】

表11 ラットが脳卒中にかかった6時間後本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の治療効果

ラット番号	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD)						
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
1	1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
3	3	1	5				
4	2	1	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	2	2	1	0	0	0	0
7	5						
8	2	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	4	3	3	2	2	2	2
11	3	3	3	2	1	1	1
12	1	1	4	3	3	3	3

試験例12 ラットが脳卒中にかかった24時間後一回目5 $\mu\text{mol/kg}$ で、次に2 $\mu\text{mol/kg}$ で5回本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の試験

治療効果は神経機能点数で表される。点数が低ければ、治療効果が良い。オスSDラットに用量400 mg/kg体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために2万IUのペニシリンを筋肉注射した。24時間後尾静脈から化合物Ie (一回目の用量5 $\mu\text{mol/kg}$ 、n=12)の生理食塩水溶液を注入した。その後、一日あたりラットの尾静脈から化合物Ieの生理食塩水溶液(用量2 $\mu\text{mol/kg}$ 、n=12)を一回注入して、6日連続して注入し、7日観察した。毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行する

ように歩くことを表し、4点は意識障害のため自主的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表12に示す。

【0167】

表12のデータから分かるように、ラットが脳卒中にかかった24時間後、1日目用量5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の化合物Ieでの治療を一回受けて、その後一日につき一回用量2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の化合物Ieでの治療を5日受けることで、確実な治療効果が得られた。3匹が死亡した以外、治療を受けた12匹のラットのうち、残った9匹のラットの中8匹が好転し、神経機能欠損兆候が全くなくなり、1匹がやや神経機能欠損兆候が残っていた。ここから、化合物Ieの連続的な治療は黄金期を超えた脳卒中に確実な効果を有することが分かった。

【0168】

【表16】

表12 ラットが脳卒中にかかった24時間後本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の

治療効果

ラット番号	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD)						
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
1	3	2	2	1	0	0	0
2	3	2	1	1	1	0	0
3	2	1	1	0	0	0	0
4	3	2	2	1	1	0	0
5	5						
6	2	1	1	1	1	0	0
7	3	3	3	2	1	1	1
8	3	4	2	1	1	0	0
9	5						
10	3	3	1	1	1	1	1
11	5	0	0	0	0	0	0
12	2	1	1	1	0	0	0

試験例13 ラットが脳卒中にかかった6時間後2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の本発明化合物Ieでの治療を6回受けた場合の試験

治療効果は神経機能点数で表される。点数が低ければ、治療効果が良い。オスSDラットに用量400 mg/kg 体重で10%抱水クロラール溶液を腹腔内注射することで、麻酔をかけた。頸部の真ん中から縦に切り目をつけ、右側の総頸動脈主幹(長さ約3 cm)を分離した。舌骨において結紮された外頸動脈の各ブランチを水平に分離して、頸部の膨れ上がる部位で内頸動脈を分離した。非侵襲的動脈鉗子によって内頸動脈の開口部位と総頸動脈の近位端をそれぞれ締めて、それに外頸動脈の遠位端を結紮した。外頸動脈の主幹において、血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLを入れたカテーテルを挿した。内頸動脈鉗子を緩めて、同時にカテーテル内の血栓塊の生理食塩水懸濁液0.5 mLをゆっくりと外頸動脈から内頸動脈を通じて近位端の大脳動脈に注入させた。上述した試験例と異なり、本試験例で使用される血栓塊は-24で保存した血栓により製造された血栓塊の生理食塩水懸濁液ではなく、室温で24時間静置したもっと陳旧性血栓により製造された、明らかに硬い血栓塊の生理食塩水懸濁液である。その後、外頸動脈の近位端を結紮し、内頸動脈および総頸動脈の動脈鉗子を緩め、血流を回復させて、傷口を縫合した。感染を予防するために2万IUのベニシリソウ筋肉注射した。6時間後尾静脈から化合物Ie(一回目の用量5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、n=12)の生理食塩水溶液を注入した。その後、一日あたりラットの尾静脈から化合物Ieの生理食塩水溶液(用量2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)を一回注入して、6日連続して注入し、7日観察した。毎日自分で対照して、Zealonga法に基づき神経機能欠損程度を評価した。0点は神経機能欠損兆候がまったくないことを表し、1点は未損傷側の前肢が伸びられないことを表し、2点は未損傷側へ歩くことを表し、3点は未損傷側へ回って尾行するように歩くことを表し、4点は意識障害のため自主的に歩けないことを表し、5点は死亡したことを表す。試験結果を表1

3に示す。

【0169】

【表17】

表13 ラットが脳卒中にかかった6時間後 $2\mu\text{mol}/\text{kg}$ の本発明化合物Ieでの治療を受けた場合の治療効果

ラット番号	毎日神経機能点数 (Mean \pm SD)						
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
1	4	3	2	1	1	1	1
2	3	2	1	1	0	0	0
3	3	3	3	3	1	1	1
4	3	3	1	1	1	1	1
5	5						
6	3	3	1	1	1	1	1
7	5						
8	3	3	1	1	1	1	1
9	5						
10	5						
11	5						
12	3	5					

表13のデータから分かるように、陳旧性血栓により誘導されたラット脳卒中6時間後のモデルにおいて、一日につき一回用量 $2\mu\text{mol}/\text{kg}$ の化合物Ieでの治療を6回連続して受けることで、確実な治療効果が得られた。6匹が死亡した以外、治療を受けた12匹のラットのうち、残った6匹のラットの中1匹が好転し、神経機能欠損兆候が全くなくなり、5匹がやや神経機能欠損兆候が残っていた。ここから、化合物Ieの連続的な治療は陳旧性脳卒中に確実な効果を有することが分かった。

強調すべきこととして、試験例1-7においてIa~IIのほかの化合物とIeが類似したNOフリーラジカル捕捉、オイグロプリン溶解、血栓溶解、抗血栓、並びに脳卒中ラット治療などの効果を奏したので、Ia~IIのほかの化合物はIeと同様に用量依存的治療作用が得られるはずである。

試験例14 本発明化合物Ia~IIの濃度 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} Mにおけるナノ構造試験

三回蒸留した水を利用して、本発明化合物Ia~IIをそれぞれ 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} Mの溶液に調製した。10 μL の溶液を吸い取って、銅メッシュの表面に滴下した。銅メッシュの下にろ紙を当てて、自然乾燥させた。透過電子顕微鏡(JEOL、JEM-1230)により観察し、形態と粒子径を写真の形で記録した。

1. 被験化合物：本発明化合物Ia~II。

2. 試験方法：三回蒸留した水を利用して、被験化合物(Ia~II)を 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} Mの溶液に調製した。微量の溶液(10 μL)を吸い取って、銅メッシュの表面に滴下した。銅メッシュの下にろ紙を当てて、自然乾燥させた。透過電子顕微鏡(JEOL、JEM-1230)により形態と粒子径を観察し写真の形で記録した。

3. 試験結果を図25-図36に示す。図25は本発明化合物Iaの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIaのナノ構造が直径3.1 nm~86.1 nmのナノスフィアである。図26は本発明化合物Ibの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIbのナノ構造が直径4.3 nm~297.9 nmのナノスフィアである。図27は本発明化合物Icの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIcのナノ構造がそれぞれ直径2.2 nm~165.7 nmのナノスフィアである。図28は本発明化合物Idの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり

、水溶液においてIdのナノ構造が直径16.2 nm～201.2 nmのナノスフィアである。図29は本発明化合物Ieの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIeのナノ構造が直径3.3 nm～138.9 nmのナノスフィアである。図30は本発明化合物Ifの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIfのナノ構造が直径3.6 nm～82.4 nmのナノスフィアである。図31は本発明化合物Igの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIgのナノ構造が直径6.3 nm～264.5 nmのナノスフィアである。図32は本発明化合物Ihの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIhのナノ構造が直径5.1 nm～149.8 nmのナノスフィアである。図33は本発明化合物Iiの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIiのナノ構造が直径4.7 nm～107.7 nmのナノスフィアである。図34は本発明化合物Ijの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIjのナノ構造が直径9.1 nm～73.7 nmのナノスフィアである。図35は本発明化合物Ikの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIkのナノ構造が直径10.1 nm～66.7 nmのナノスフィアである。図36は本発明化合物Iiの 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} M水溶液におけるナノ構造であり、水溶液においてIiのナノ構造が直径6.1 nm～153.3 nmのナノスフィアである。

【0170】

試験例15 本発明化合物Ia～IIの濃度 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} Mおよび 1×10^{-12} Mにおける高分解能FT-MS試験

三回蒸留した水を利用して、化合物Ia～IIを2.5 μ Mの溶液に調製した。10 μ Lの溶液を吸い取ってアプライし、solariX FT-ICR質量スペクトル(Bruker Daltonik)により分子間会合状態を観察し、データを記録した。結果を表14～表16に示す。

【0171】

【表18】

表14 本発明化合物Ia～IIが三つの濃度で形成された2量体の

高分解能FT-MSのデータ

化合物	濃度		
	1×10^{-6} M/2量体	1×10^{-9} M/2量体	1×10^{-12} M/2量体
Ia	2748.4580	2748.4580	2748.4580
Ib	2772.5308	2772.5308	2772.5308
Ic	2888.5308	2888.5308	2888.5308
Id	2720.4266	2720.4266	2720.4266
Ie	2744.4994	2744.4994	2744.4994
If	2840.4994	2840.4994	2840.4994
Ig	2606.3838	2606.3838	2606.3838
Ih	2630.4564	2630.4564	2630.4564
Ii	2726.4564	2726.4564	2726.4564
Ij	2294.1814	2294.1814	2294.1814
Ik	2318.2542	2318.2542	2318.2542
Ii	2414.2542	2414.2542	2414.2542

【0172】

【表19】

表15 本発明化合物Ia-IIが三つの濃度で形成した3量体の高分解能

FT-MSのデータ

化合物	濃度		
	1×10^{-6} M/3 量体	1×10^{-9} M/3 量体	1×10^{-12} M/3 量体
Ia	4122.1870	4122.1870	4122.1870
Ib	4158.2962	4158.2962	4158.2962
Ic	4332.2962	4332.2962	4332.2962
Id	4080.1399	4080.1399	4080.1399
Ie	4116.2491	4116.2491	4116.2491
If	4260.2491	4260.2491	4260.2491
Ig	3909.0757	3909.0757	3909.0757
Ih	3945.1846	3945.1846	3945.1846
Ii	4089.1846	4089.1846	4089.1846
Ij	3440.7721	3440.7721	3440.7721
Ik	3476.8813	3476.8813	3476.8813
Il	3620.8813	3620.8813	3620.8813

【0173】

【表20】

表16 本発明化合物Ia-IIが三つの濃度で形成した4量体の高分解能

FT-MSのデータ

化合物	濃度		
	1×10^{-6} M/4 量体	1×10^{-9} M/4 量体	1×10^{-12} M/4 量体
Ia	5495.9160	5495.9160	5495.9160
Ib	5544.0616	5544.0616	5544.0616
Ic	5776.0616	5776.0616	5776.0616
Id	5439.8532	5439.8532	5439.8532
Ie	5487.9988	5487.9988	5487.9988
If	5679.9976	5679.9976	5679.9976
Ig	5211.7676	5211.7676	5211.7676
Ih	5259.9128	5259.9128	5259.9128
Ii	5451.9128	5451.9128	5451.9128
Ij	4587.3628	4587.3628	4587.3628
Ik	4635.5084	4635.5084	4635.5084
Il	4827.5084	4827.5084	4827.5084

表14 - 表16はFT高分解能質量スペクトルにより測定した精確な質量データである。これらの質量データによれば、本発明化合物Ia - IIは 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} および 1×10^{-12} Mという三つの濃度で同時に2量体、3量体および4量体を検出したことが分かった。これから分かるように、本発明化合物は水溶液において同時に2量体、3量体および4量体を形成できる。

【0174】

試験例16 本発明化合物Ieの濃度10.0 μ M、1.0 μ M、0.1 μ M、0.01 μ Mにおける高分解能FT - MS試験

質量スペクトルを視認化するために、三回蒸留した水を利用して、化合物Ieをそれぞれ10.0 μ M、1.0 μ M、0.1 μ M、0.01 μ Mの溶液に調製した。10 μ Lの溶液を吸い取ってアプライし、solariX FT - ICR質量スペクトル(Bruker Daltonik)により分子間会合状態を観察し、スペクトルを記録した。結果を図37 - 図40に示す。図37は本発明化合物Ieの濃度0.01 μ Mにおける高分解能FT - MS質量スペクトルであり、915.84146が2量体の三価イオンであり、1030.32114が3量体の四価イオンであり、1099.00914が4量体の五価イオンである。図38は本発明化合物Ieの濃度0.1 μ Mにおける高分解能FT - MS質量スペクトルであり、915.84124が2量体の三価イオンであり、1030.32208が3量体の四価イオンであり、1099.00829が4量体の五価イオンである。図39は本発明化合物Ieの濃度1 μ Mにおける高分解能FT - MS質量スペクトルであり、915.84095が2量体の三価イオンであり、1030.32067が3量体の四価イオンであり、1099.00914が4量体の五価イオンである。図40は本発明化合物Ieの濃度10 μ Mにおける高分解能FT - MS質量スペクトルであり、915.84163が2量体の三価イオンであり、1030.32067が3量体の四価イオンであり、1099.00914が4量体の五価イオンである。

【0175】

本発明化合物が水溶液において形成した2量体、3量体および4量体をさらに組み立て、直径2 nm ~ 300 nmのナノスフィアが形成された。これらのサイズのナノスフィアのうち、直径が100 nm未満のナノスフィアの数は99%を超えており、ナノ薬学における公知事実の一つとして、直径が100 nm未満のナノスフィアが血液輸送においてマクロファージに取り込まれにくく、毛細血管壁を通過しやすい。これらの性能により、本発明の化合物は血液脳関門を通過することが可能である。本発明化合物は、血液脳関門通過可能な性能があることから、治療を受けた脳卒中ラットの脳組織に本発明化合物の代謝物が検出された。

【0176】

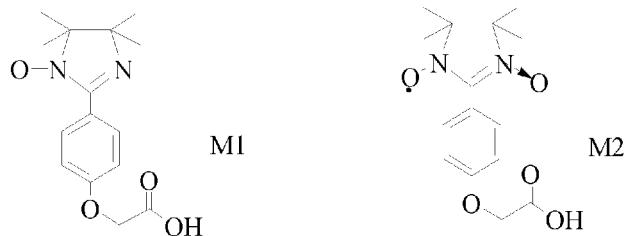
試験例17 高分解能FT - MSにより本発明化合物Ieで治療したラットの脳組織における代謝物を監視する試験

ラット大脳全体を取り、50 mLの遠心管に置き、0.9% NaCl溶液10 mL添加し、ホモジネートして均一な懸濁物が得られた。その後、3000 rpmの条件で10 min遠心分離し、上澄み液5 mLを取り、さらにメタノール10 mLを添加して、均一に振盪した後、3000 rpmの条件で10 min遠心分離した。上澄み液を取り、減圧濃縮し蒸発乾燥させた。さらにメタノール1 mLを添加して、また12000 rpmの条件で10 min遠心分離することで上澄み液が得られた。当該上澄み液は化合物Ieで治療したラットの脳組織における代謝物の含有量の監視に用いられた。

高分解能FT - MSの測定結果によれば、脳に二つの代謝物M1およびM2があることが示された。そのうち、M1の $[M+1]^+$ が291.06971であり、分子式が $C_{15}H_{19}O_5N_2$ である。M2の $[M+1]^+$ が307.04350であり、分子式が $C_{15}H_{19}O_4N_2$ である(質量スペクトルの条件:アプライ量10 μ L、電離モデルES+、コーン電圧30 V、移動相流速0.2 mL/min)。これらのデータから、代謝物M1およびM2が以下の化合物であると推定できる。

【0177】

【化11】



【0178】

【表21】

	M1	M2
理論分子量：	291.1345	307.1249
測定分子量：	291.0697	307.0435

これにより、本発明化合物1eは確実に血液脳関門を通過し、脳内におけるNOフリーラジカル捕捉、血栓溶解および抗血栓の治療効果を達成できることが分かった。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

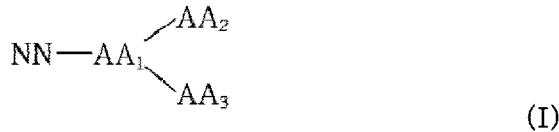
【請求項1】

NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類と、血栓溶解活性を有するペプチドと血栓へのターゲティングペプチドとが適当なリンカーで連接されてなる三元コンジュゲート。

【請求項2】

式1に示すものである請求項1に記載の三元コンジュゲート。

【化12】



(式中、NNはNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類を表し、AA₁は少なくとも3つの連結用基を有するリンカーを表し、AA₂は血栓溶解活性を有するペプチドを表し、AA₃は血栓へのターゲティングペプチドを表す。)

【請求項3】

前記NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンである請求項1又は2に記載の

三元コンジュゲート。

【請求項 4】

前記連結用基がカルボキシル基およびアミノ基からなる群より選ばれる請求項1又は2に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 5】

前記リンカーが天然アミノ酸、とりわけL-Lys、L-AspまたはL-Gluである請求項4に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 6】

前記血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むオリゴペプチド、あるいはPAK配列、AKP配列またはKAP配列を構造単位として含む繰り返し配列ペプチドである請求項1又は2に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 7】

前記血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである請求項1又は2に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 8】

前記血栓へのターゲティングペプチドがRGDペプチド(配列番号2)とYIGSペプチド(配列番号31)をコンジュゲートように修飾してなるポリペプチドである請求項1又は2に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 9】

前記NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、前記リンカーがL-Lys、L-AspまたはL-Gluであり、前記血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ前記血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである請求項1又は2に記載の三元コンジュゲート。

【請求項 10】

請求項1~9のいずれか一項に記載の三元コンジュゲート及び医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 11】

前記化合物がナノスフィア構造を形成してよい請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

血栓溶解薬、NOフリーラジカル捕捉薬または抗血栓薬である請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

脳卒中または脳梗塞を治療する医薬である請求項10に記載の医薬組成物。

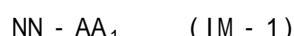
【請求項 14】

発症時間が3時間を超える脳卒中または脳梗塞の治療に用いられる請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

(1) NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類(NN)、少なくとも3つの連結用基を有するリンカー(AA₁)、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)及び血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)を提供する工程(前記リンカーが第一連結用基、第二連結用基及び第三連結用基をもつ)、

(2) 適当な反応条件下において、前記NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類(NN)と前記リンカー(AA₁)の第一連結用基をつなぎ、一般式IM-1の化合物を形成する工程、



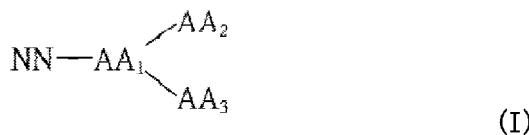
(3) 適当な反応条件下において、前記血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)と一般式IM-1の化合物をつなぎ、一般式IM-2の化合物を形成する工程(前記血栓溶解活性を有するペプチドの一端が前記リンカーの第二連結用基とつながる)、

NN - AA₁ - AA₂ (IM - 2)

(4) 適当な反応条件下において、前記血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)と一般式IM - 2の化合物をつなぎ、一般式Iの化合物を形成する工程(前記血栓へのターゲティングペプチドの一端が前記リンカーの第三連結用基とつながる)を含む製造方法であって、

但し工程(3)と工程(4)の順序を交換してよい式Iに示す請求項1に記載の三元コンジュゲートの製造方法。

【化13】



(式中、NNはNOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類を表し、AA₁は少なくとも3つの連結用基を有するリンカーを表し、AA₂は血栓溶解活性を有するペプチドを表し、AA₃は血栓へのターゲティングペプチドを表す。)

【請求項16】

工程(1)が、さらに、前記リンカー(AA₁)の第二および第三連結用基を保護基で保護し、且つ血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)および血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)における、連結用末端を除く活性基を保護基で保護することを含み、

工程(3)が、さらに、まず保護された第二連結用基を脱保護して、次に前記血栓溶解活性を有するペプチドと前記脱保護した第二連結用基をつなぐことを含み、

工程(4)が、さらに、まず保護された第三連結用基を脱保護して、次に前記血栓へのターゲティングペプチドと前記脱保護した第三連結用基をつなぐことを含み、

そして、工程(4)の後に、さらに、血栓溶解活性を有するペプチド(AA₂)および血栓へのターゲティングペプチド(AA₃)上の保護された活性基を脱保護することを含む請求項15に記載の製造方法。

【請求項17】

前記第一連結用基がアミノ基であり、且つ前記第二および第三連結用基がカルボキシル基およびアミノ基からなる群より選ばれる請求項15または16に記載の製造方法。

【請求項18】

前記リンカーが天然アミノ酸、とりわけL-Lys、L-AspまたはL-Gluである請求項17に記載の製造方法。

【請求項19】

前記血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)、AKP配列(配列番号3)またはKAP配列(配列番号4)を含むオリゴペプチド、あるいはPAK配列、AKP配列またはKAP配列を構造単位として含む繰り返し配列ペプチドである請求項17に記載の製造方法。

【請求項20】

前記血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである請求項17に記載の製造方法。

【請求項21】

前記NOフリーラジカル捕捉活性を有するイミダゾリン類が1,3-ジオキソ-2-[(4-オキシ酢酸)フェニル]-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリンであり、前記リンカーがL-Lys、L-AspまたはL-Gluであり、前記血栓溶解活性を有するペプチドがPAK配列(配列番号1)を含むオリゴペプチドであり、且つ前記血栓へのターゲティングペプチドがRGD配列(配列番号2)を含むオリゴペプチドである請求項15または16に記載の製造方法。