(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 7 月 4 日 (04.07.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/100132 A1

(51) 国際特許分類：
C07K 1/113 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)
C07K 1/08 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2012/084103

(22) 国際出願日： 2012 年 12 月 28 日 (28.12.2012)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2011-288865 2011 年 12 月 28 日 (28.12.2011)
特願 2012-156943 2012 年 7 月 12 日 (12.07.2012)

(71) 出願人：中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者：雁行 しおり (KARIYUKI, Shiori); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 飯田 健夫 (IIDA, Takeo); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 小嶋 美樹 (KOJIMA, Miki); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 武山 隆一 (TAKEYAMA, Ryuichi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 棚田 幹将 (TANADA, Mikimasa); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 飯倉 仁 (IIKURA, Hitoshi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 松尾 篤 (MATSUO, Atsushi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 白石 拓也 (SHIRAISHI, Takuya); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 江村 岳 (EMURA, Takashi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 中野 効彦 (NAKANO, Kazuhiko); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 鷹野 宏治 (TAKANO, Koji); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 木生 康輔 (KISOU, Kousuke); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 鳥澤 拓也 (TORIZAWA, Takuya); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 高野 隆介 (TAKANO, Ryusuke); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 久田 望 (HISADA, Nozomi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 村尾 尚昭 (MURAO, Naoaki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 太田 淳 (OHTA, Atsushi); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 木村 香緒梨 (KIMURA, Kaori); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 山岸 祐介 (YAMAGISHI, Yusuke); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 加藤 達也 (KATO, Tatsuya); 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人：清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1一1一1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PEPTIDE-COMPOUND CYCLIZATION METHOD

(54) 発明の名称：ペプチド化合物の環化方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an effective drug-discovery technique for tough targets for which drug discovery has heretofore been difficult. The present invention pertains to the following: a novel peptide-compound cyclization method for solving the aforementioned problem; a novel peptide compound; and a library containing said method and compound.

(57) 要約：本発明は、従来創薬困難であったtough targetに対する有効な創薬手法を提供することを課題とし、本目的を達するためのペプチド化合物の新規な環化方法、及び新規なペプチド化合物及びそれらを含むライブラリーに関するものである。

WO 2013/100132 A1

規則 4.17 に規定する申立て：

- 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類：

– 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

– 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称 :ペプチド化合物の環化方法

技術分野

[0001] 本発明はペプチド化合物の新規な環化方法、及び新規なペプチド化合物及びそれらを含むライブラリーに関する。

背景技術

[0002] 中分子化合物 (分子量500~2000) を用いて、タンパクータンパク相互作用阻害、アゴニスト、分子シャペロンに代表されるtough target への創薬を可能とする創薬技術開発が近年注目を集めている。 (非特許文献1)。これまで抗体以外での創薬が困難とされてきたtough target への有効な阻害が分子量500~2000 の化合物でも可能であるという考察がなされている (非特許文献2)。また、Lipinskiが提唱したruLe of 5の範囲外 (その多くは分子量500を超える分子量)であっても、経口剤や細胞内標的への阻害が可能である例も天然物を中心に報告されている (非特許文献3)。中分子化合物は、tough target にアクセスできる点で低分子には出来ないこと、細胞内に移行できる点 (細胞内標的創薬可、経口化可)で抗体にも出来ないことが実現できる可能性がある点で価値の高い分子種である。

[0003] 従来の低分子創薬のほとんどは分子量５００未満の範囲で実施されてきたため、人類が有するTough target (HTS (ハイスループットスクリーニング)を用いた従来の低分子化合物からではHit(ヒット)化合物の取得が困難な薬効標的の総称。低分子が結合し得る深い穴 (キャビティ)を持たないことを特徴とする。例えば、IL-6 とIL-6R の結合阻害に代表されるタンパクータンパク相互作用阻害が挙げられる。その他RNA_ タンパク相互作用阻害、核酸 - 核酸相互作用阻害などが挙げられる。)への創薬を可能にする中分子のほとんどが天然物に限定される。天然物を由来とした薬剤は現在でもFirst In CLass(FIC) 化合物の３０％を占めると分析されており、有効な手法である。しかしながら、既知化合物全てを併せても１０^{6}化合物程度の多様性であるので、

活性化合物が得られる標的が限定される。また、活性化合物の膜透過性や代謝安定性に難がある場合が多く、低分子にも抗体にも創薬出来ない領域への創薬を可能とする膜透過可能な分子種類は10^6を大きく下回ると考えられる。また、天然物Hitの膜透過性や代謝安定性を向上させたい場合でも、複雑な化学合成が必要なため化学修飾による改良が困難である場合が多い。このため、天然物医薬品の多くが化学修飾されないまま上市されている。

[0004] バイオ創薬にて実用化されているin vitro displayed技術を活用すれば、短期間で高い多様性を有する新規高分子化合物群を創出することができるが、この技術を中分子化合物でのtough target 創薬へ展開するためには、現状では様々な限界がある。この限界は、既に実用化されているバイオ創薬である抗体創薬と比較すると理解し易い。大規模なライブラリーからあらゆる標的に対する分子を作出できる抗体は、巨大なタンパク質スキャフォルドであり長い可変領域を有し、さらに二次構造、三次構造を形成するために立体的に多様な構造の結合面を形成できる。このため10^{11}種類程度のライブラリーにて多くの細胞外タンパクに対して強力に結合・阻害する化合物を創出することが出来る。一方、バイオ技術を活用して得られる中分子である環状ペプチドでは、抗体にはできない膜透過性が求められるため鎖長（分子量）にも制限があるうえに、現状バイオ技術では天然型アミノ酸に限定されるため立体的な多様性にも限界がある。

[0005] 簡便に合成、化学修飾でき、膜透過性や代謝安定性を有し、かつ構造的に多様で多数の中分子を短期間で作成でき、かつこれらを薬効評価できる技術創出は価値が高い。このような技術の候補の1つとして上記のDisplayed Library（ディスプレイ ライブラリー）技術が挙げられる（10^{12}種類の化合物を一度に合成して評価可能）。Display Library で獲得できる化合物は、現状ではペプチドに限定されるが、ペプチド医薬品は既に40種以上上市されている価値の高い化学種である（非特許文献4）。シクロスポリンAはその代表例で、11残基から成る微生物が産生するペプチドで、経口投与可能な細胞内標的（サイクロフィリン）を阻害するペプチドである。ペプチドは一般

に代謝安定性や膜透過性が低いとされてきたが、ペプチドの環化やN—メチル化などの非天然化により改良可能であることも明らかとなってきている（非特許文献5）。

[0006] 一方で、非天然ペプチド化、特にN_メチル化などの主鎖変換により天然ペプチドの構造が変化するため、天然ペプチドをリード化合物として、その薬効を維持しながらペプチドへの膜透過性と代謝安定性の両方を付与させて臨床候補化合物を得ることは極めて困難である。成功例としてインテグリン阻害ペプチドを環化し、さらに非天然化により経口剤として臨床試験入した例が報告されている（非特許文献6）が、このような薬剤開発は長い研究期間の末にもたらされた数少ない例である。例えば、インシュリン、GLP_1（グルカゴン様ペプチド—1）、PTH（副甲状腺ホルモン）、カルシトニンなど価値の高い医薬品注射剤の経口剤開発は未だに成功していない。

[0007] 近年、非天然型アミノ酸やヒドロキシカルボン酸誘導体（非特許文献22）を含むペプチドがリボゾームにて合成できることが報告されたことにより、非天然型アミノ酸を含むDisplay Library実現が現実味を帯びてきた。特にN_メチルアミノ酸を含むペプチドがPureSystem（登録商標）などの無細胞翻訳系と非天然アミノ酸を結合したtRNAの活用によりリボゾームにて合成できることが相次いで報告された（非特許文献7、8，9，10，11）。非天然型アミノ酸を1つ含むDisplay library への挑戦例も報告された（非特許文献12、13）。また、N—メチルアミノ酸を含むペプチドのDisplayが作製された例も報告されている（非特許文献23）。

[0008] 中分子ペプチドに膜透過性と代謝安定性の両立を達成させる条件の考察も進行している。Lokeyらは6つのアミノ酸からなる環状ペプチドのプロリンもしくはN_メチル化を実施し、PAMPA (Para LLeL Art ificial Membrane Permeation Assay) 測定法を用いた膜透過に影響を与える因子の特定（非特許文献14）、さらにはラットにてBA（バイオアベイラビリティ）28%のペプチドを創出している（非特許文献15）。Kess Lerらは5つもしくは6つのアミノ酸からなる環状ペプチドのN_メチル化を実施して、膜透過や代謝安定性に

好ましい条件を見出す総説を報告している (非特許文献１６、１７)。一方、一般論としてどのようなペプチドであれば膜透過性と代謝安定性が両立するのか、また、より多様性が高いためHit創出割合が高くなると想定されるより分子量の大きい (アミノ酸数７以上)中分子ペプチドの幅広いDrug likenesss条件への考察例は我々の知る限り報告されていない。

[0009] Display libraryにて中分子Hit化合物を獲得するためには、環化法にも改良の余地がある。例えば、従来Phage DispLay (ファージディスプレイ)で環化するには２つのＣｙｓがＳ_Ｓ結合する場合に限定されていた (非特許文献１８)。Ｓ—Ｓ結合を利用した環化方法で作製された環状ペプチドは代謝不安定であるため血中半減期が短いだけではなく、細胞内の弱酸性で還元・切断されて分解に至る、経口吸収が困難である、切断されて生成したＳＨ基が体内タンパクとランダムに共有結合を形成することによる毒性が発現する可能性があるなど、Drug likeness な中分子ペプチドという点からはさまざまな改良を必要とされるものであった。近年これを改良する技術として、メシチレンを介して２つのＣｙｓを環化させる手法が報告された (非特許文献１９)。この手法を用いればより安定なチオエーテルを介した環化になるが、その効果は部分的で改良の余地が残る。例えば、チオエーテルが酸化代謝を受けやすいことは広く一般に知られている。チトクロムＰ４５０によりＲＳＣＨ$_2$Ｒ'→ＲＳＨ＋Ｒ,ＣＨ０に分解されることや、フラビン含有モノオキシゲナーゼにより、スルホキシドへと代謝されることが報告されている (非特許文献２０)。前者は生成すると反応性代謝物 (Reactive metabolite) となるため、毒性発現にもつながる。

一方、ペプチドの環化方法としてドラックライクな環化法であるアミド環化が実現できた画期的な報告もなされている (非特許文献２１、非特許文献２５、非特許文献２６、非特許文献２７)が、それらはいずれも、主鎖アミド結合を切断させた結果得られる活性種とアミノ酸主鎖アミノ基を化学反応させた構造を生成させるため、本方法を、そのままDispLay libraryにおける環化方法としては適用することはできない。これらの手法は、シクロスポリ

ンＡなど多くの天然物の、主鎖のカルボン酸と主鎖のアミノ基で縮合環化させる手法として有用である。一方、DispLay ﾚbrary では、主鎖カルボン酸末端はｍRNAと結合させる必要があるため、このように主鎖アミド結合の分解により活性種を発生させる手法を用いることはできない。

[001 0] mRNA display では、これまで２つの新たな環化法が提案されてきたが、上記点が改良されたDispLay手法の確立にはいまだ至つていない。Ｎ末端のメチオニンのァミノ基と下流 (C末端側）に配置したリジンのアミノ基をジスクシンィミジル・ダルタレート (ＤＳＧ）でクロスリンクさせることによる環化方法 (非特許文献１２）やＮ末端の翻訳開始アミノ酸としてクロロアセチル基を有するアミノ酸誘導体を導入し、下流にＣｙｓを配置することによって分子内環化反応によりチオエーテルを形成させることによる環化方法 (非特許文献１１、特許文献１）を用いた場合でも上記点の改善は不十分であり、これらに代わる新たな環化方法の開発が求められていた。例えば、２つのシスティンを利用したＳ＿Ｓ環化法では２箇所のアミノ酸を特定のもの (システィン）にする必要があるが、ＤＳＧを用いたクロスリンクによる環化法ではリジンを含めて３箇所のアミノ酸を特定のものにしてしまうことになり、一定の残基数のペプチドライブラリーにおいて構造の多様性を減少させてしまうことになる。

また、環化部位の構造を変化させると、当該環化部位を有するペプチドが持つ活性 (薬効の強度）が大きく低下してしまうことが報告されている (非特許文献２４）。この例では、環化部位を有するペプチドを取得した後、膜透過性と代謝安定性に優れたペプチドとするために、その環化部位を改変することが困難であることが示されている。

医薬品の開発に利用できる膜透過性と代謝安定性に優れた環状部位を有するペプチドライブラリーが求められるが、そのようなペプチドライブラリーの確立には様々な点で改善の余地がある。

[001 1]

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開第２００８/１１７８３３号

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Satyanarayanajois, S. D., Hill, R. A. Medicinal chemistry for 2020, Future Med. Chem. 2011, 3, 1765

非特許文献2：WeLLs, J. に' McCLendon, C. L., Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at prote in-prote in interfaces. Nature, 2007, 450, 1001

非特許文献3：Ganesan, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. Curr. Opin. Chem. Bio. 2008, 12, 306.

非特許文献4：Gracia, S. R., Gaus, K., SewaLd, N. Synthesis of chemically modified bioactive peptides: recent advances, chaLLenges and deveLopments for medicinal chemistry. Future Med. Chem. 2009, 1, 1289

非特許文献5：Chatterjee, 上, GiLon, に, Hoffman, に, KessLer, H, N-Methy Lation of peptides: A new perspective in medicinal chemistry. 2008, 41, 1331.

非特許文献6：KessLer, H. et. aL., CiLengitide: The first anti-angiogenic smaLL moLecuLe drug candidate. Design, synthesis and cLinicaL evaLuation. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry 2010, 10, 753

非特許文献7：Roberts, R. W., et aL. Encodamers: Unnatural peptide oligomers encoded in RNA. Chem. Bio. 2003, 10, 1043.

非特許文献8：Forster, A. C. et. aL., Specificity of trans Lation for N-aLkyL amino acids. J. Am. Chem. Soに 2007, 129, 11316.

非特許文献9：Merryman, に, Green, R. Transformation of aminoacyL tRNAs for the in vitro seLection of "Drug-like" moLecuLes. Chem. Bio. 2004, 11, 575.

非特許文献10：Szostak, J. W. et aL. RibosomaL synthesis of N-methyL peptides. J. Am. Chem. Soに 2008, 130, 6131.

非特許文献11：Suga, H. et. al., Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. Chem. Biol. 2008, 15, 32.

非特許文献12：Roberts, R. et. al., In vitro selection of mRNA display libraries containing an unnatural amino acid. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 9972

非特許文献13：Roberts, R. et. al. Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity. ACS chem. Biol. 2007, 9, 625.

非特許文献14：Lokey, R. S. et. al., Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2510

非特許文献15：Lokey, R. S. et. al., On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds. Nature Chem. Biol. 2011, 7, 810

非特許文献16：Kessler, H. et. al., Improvement of drug-like properties of peptides: the somatostatin paradigm. Expert Opin. Drug Discov. 2010, 5, 655.

非特許文献17：Kessler, H. et. al., The impact of amino acid side chain mutations in conformational design of peptides and proteins. Chem. Eur. J. 2010, 16, 5385.

非特許文献18：Comb Chem High Throughput Screen. 2010;13:75-87Phage-displayed combinatorial peptide libraries in fusion to beta-Lactamase as reporter for an accelerated cLone screening: Potential uses of selected enzyme-linked affinity reagents in downstream applications. Shukla GS, Krag DN.

非特許文献19：Heinis, C., Rutherford, T. Freund, S. Winter, G., Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides.

Nature Chem. Bio. 2009, 5, 502.

非特許文献20 :薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版 加藤隆一 鎌滝哲也 編

非特許文献21 :Kawakami T, Diverse backbone-eyelized peptides via codon reprogramming. Nat Chem Biol 2009, 5, 888-90.

非特許文献22 :Ohta A, et al, Synthesis of polyester by means of genetic code reprogramming. Chem Biol, 2007, 14, 1315-22. Goto Y, et al, FLexizymes for genetic code reprogramming. Nat Protoc. 2011, 6, 779-90.

非特許文献23 : Yamagishi Y. et al., Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin Ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo Library. Chem BioL. 2011, 18, 1562-70.

非特許文献24 : Chen S, et al. Structurally diverse eyeLisation Linkers impose different backbone conformations in bieyelic peptides. Chembiochem. 2012, 13, 1032-8

非特許文献25 :Parthasarathy, R. Subramanian, S., Boder, E. T. Bioconjugate Chem., 2007, 18, 469-476.

非特許文献26 : Tsukiji S., Nagamune T., ChemBioChem, 2009, 10, 787-798.

非特許文献27 : Katoh, Takayuki ; Goto, Yuki ; Reza, Md. Shamim; Suga, Hiroaki. Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) (2011), 47 (36), 9946-9958)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 薬効、膜透過性、代謝安定性の全てを具備したペプチド臨床開発化合物を得るためには、膜透過性と代謝安定性を具備したペプチドをデザインしてそれらの化合物群をDisplayさせ、その中から薬効を有するペプチドを選択するDisplay Library 技術の実現が有効と考えられる。予め膜透過性と代謝安定性をある程度備えたHit化合物が獲得できると、天然物とは異なり容易に合成、

化学修飾可能なため、従来のruLe of 5内での低分子創薬と同様Hit化合物の構造変化を小さくしたまま構造最適化を実施することが可能となり、比較的容易に臨床開発化合物を創出できると期待できる。このような創薬技術、手法を確立するためには、ruLe of 5の範囲外である中分子ペプチドのDrug likeness（薬らしさ：本明細書では、好ましくは、膜透過性と代謝安定性の両立を示す。）を満たす条件の把握、およびその条件を満足させる分子群からなる非天然型アミノ酸を含むDispLay library の構築の2つが必須となると考えた。

一方、中分子ペプチドdispLayの限られた規模（ドラックライクネスを考慮するとペプチド鎖長に制限があることを指す）を有効に利用するためには、ライプラリーに全く異なる構造のペプチド（非天然型アミノ酸を含んだペプチド）を多く含ませることが肝要である。側鎖の性質の異なるアミノ酸を多種類導入することも然ることながら、制限された分子量の中で固定された部位を少なくして可変領域を拡大すること、主鎖構造の異なるペプチドを含ませることにより様々な標的に対して結合ペプチドが得られる可能性が高められることになり価値がある。この観点から有効な方法として例えば、様々な環化部位を有するペプチド、分枝ペプチドをディスプレイさせることなどが挙げられる。

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、本発明はペプチドディスプレイライブラリー構築のための、ペプチド化合物の新規な環化方法、分枝ペプチド合成法を提供し、また、これらを用いてドラッグライクなデイスプレイライブラリーおよびドラッグライクなペプチド化合物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決するために検討した結果、ドラックライクな環状ペプチドに必要とされる条件を初めて明らかにした。また、当該条件を満たした多様性の高い環化部を有するペプチド化合物からなるディスプレィライブラリー合成法を見出した。すなわち、新規な翻訳方法および翻訳後

修飾を用いて環化部を有するペプチド化合物ライブラリーを合成する方法、および目的の活性を有するドラッグライクなペプチドの取得の可能性がより高まるため、更に直鎖部を有するペプチド化合物のライブラリーを合成する法を見出し、標的分子に対する結合および阻害を示す化合物取得を可能とし、本発明を完成するに至った。

[0016] すなわち、本発明は、以下を含む。

〔1〕

環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

1) アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、C末端側に側鎖の1つに反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、N末端側にもう1つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含む、工程 ;

2) N末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、C末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させ、アミド結合又は炭素—炭素結合を形成させる工程

を含む、前記方法。

〔2〕

環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

1) アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残

基又はアミノ酸類縁体残基、及び、アミン近傍に反応補助基を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

２）前記反応補助基を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体と、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基をアミド結合させて環状化合物を得る工程

を含む、〔１〕に記載の方法。

〔３〕

活性エステルがチオエステルである、〔２〕に記載の方法。

〔４〕

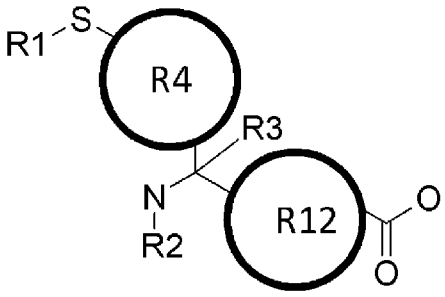
前記反応補助基が、ＳＨ基である、〔２〕又は〔３〕に記載の方法。

〔５〕

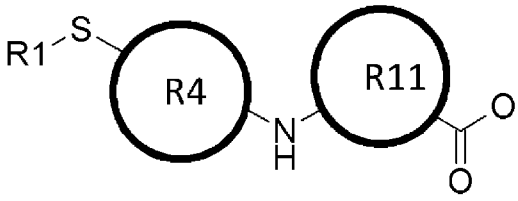
前記環状化合物を得る工程の後、反応補助基を除去する工程を含む、〔３〕または〔４〕に記載の方法。

〔６〕

前記アミン近傍に反応補助基を有するアミノ酸、アミノ酸類縁体又はＮ末端カルボン酸類縁体が、下記一般式で表される化合物Ｎ＿１または化合物Ｎ＿２である、〔２〕から〔５〕のいずれかに記載の方法；



化合物Ｎ—１



化合物Ｎ—２

（式中、Ｒ１は、水素原子、Ｓ—Ｒ２３（Ｒ２３は、置換基を有していてもよいアルキル基、アリール基もしくはアラルキル基を示す。）、またはＨＳ基の保護基を示し；

Ｒ２、Ｒ３は、それぞれ独立して、水素原子、または、置換基を有していてもよい、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロ

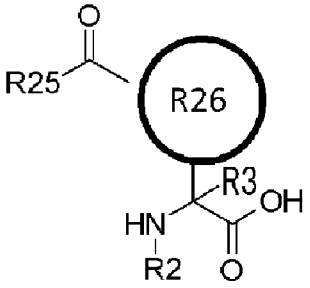
アリール基、アラルキル基もしくはシクロアルキル基を示し;またはＲ２とＲ３が環を形成した置換基、またはＲ２もしくはＲ３がＲ４と環を形成した置換基を示し;

Ｒ４は、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい２価のアラルキル基を示し;

Ｒ１１、Ｒ１２は、それぞれ独立して、単結合、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい２価のアラルキル基を示す。)。

〔７〕

前記活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体が、下記一般式で表される化合物Ｃ－１である、〔２〕～〔６〕のいずれかに記載の方法;



化合物Ｃ－１

(式中、Ｒ２５は、ＯＨ、ハロゲン原子、ＯＲ、またはＳＲ１を示し(Ｒは Ｂｔ、Ａｔ、ＮＳｕまたはＰｆｐを示し、Ｒ１は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアリール基または置換基を有していてもよいアラルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいヘテロアリール基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキレン基を示す。);

Ｒ２６は、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい２価のアラルキル基を

示し；

Ｒ２、Ｒ３は、それぞれ独立して、水素原子または置換基を有していてもよいアルキル基を示す。）。

〔８〕

前記環状部を有するペプチド化合物の環状部を構成する、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにＮ末端カルボン酸類縁体の総数が、５～１２である、〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の方法。

〔９〕

前記環状部を有するペプチド化合物を構成する、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにＮ末端カルボン酸類縁体の総数が、９～１３である、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔１０〕

環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

１）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにＮ末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、Ｎ末端の主鎖アミノ基を有するアミノ酸残基、あるいは、主鎖もしくは側鎖にアミノ基を有するアミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

２）Ｎ末端のアミノ酸残基、Ｎ末端のアミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体と活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体をアミド結合させて環状化合物を得る工程

を含む、〔１〕に記載の方法。

〔１１〕

活性エステル基がアルキルチオエステル基又はァラルキルチオエステル基であって、工程１）の翻訳合成後に活性化剤を添加させることにより、より活性な活性エステル基に変換させる工程を含む、〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕

活性剤が、アリールチオール又はＮ―ヒドロキシスクシンイミドである、〔１１〕に記載の方法。

〔１３〕

翻訳されたチオエステルとの反応性が高い活性化剤と、環化させるアミンとの反応性が高い活性化剤を添加させ、より活性の高い活性エステル基に変換させる工程である、〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕

アリールチオエステルで活性エステル基に変換させた後、オキシマおよびその誘導体で更に活性の高いエステル基に変換させる工程である、〔１３〕に記載の方法。

〔１５〕

工程１）のＮ末端部位の翻訳合成が、フォルミルメチオニン以外の翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体をアシル化した翻訳開始ｔＲＮＡを用いて導入する方法にて行われる、〔１〕から〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１６〕

工程１）のＮ末端部位の翻訳合成が、開始コドンを読み飛ばし、Ｎ末端にＭｅｔ以外の翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、〔１０〕から〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１７〕

工程１）のＮ末端部位の翻訳合成が、アミノペプチダーゼにてＮ末端のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はカルボン酸類縁体を切断する方法を用いて行われる、〔１０〕から〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１８〕

前記Ｎ末端部位の翻訳合成が、メチオニン アミノペプチダーゼにて処理することによりＮ末端のフォルミルＭｅｔを除去しＮ末端に他ののの翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕

前記Ｎ末端部位の翻訳合成が、Ｍｅｔの代わりにノルロイシンを含む翻訳系にて翻訳され、メチオニン アミノペプチダーゼにて処理することによりＮ末端のフォルミルノルロイシンを除去しＮ末端に他ののの翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、〔１０〕～〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔２０〕

前記Ｎ末端のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はカルボン酸類縁体の除去に、さらに、ペプチドデフォルミラーゼが用いられる、〔１７〕から〔１９〕のいずれかに記載の方法。

〔２１〕

前記環状部を有するペプチド化合物が、さらに直鎖部を有する、〔１〕から〔２〕０のいずれかに記載の製造方法。

〔２２〕

前記非環状ペプチド化合物がα—ヒドロキシカルボン酸、及び、側鎖に保護されていてもよいアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体を含み、工程２）の環状化合物を形成する工程の後で、工程３）α—ヒドロキシカルボン酸部位と側鎖に保護されていてもよいアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体部位を化学反応させて分枝部位を形成させる工程を含む、〔１〕から〔２１〕のいずれかに記載の方法。

〔２３〕

環状部と直鎖部とを有するペプチド化合物の製造方法であって、

1）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、N末端カルボン酸類縁体並びにα—ヒドロキシカルボン酸により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、該非環状のペプチド化合物が、

i）C末端側に側鎖の1つに反応点を有するアミノ酸残基（又はアミノ酸類縁体残基）、及び、N末端側にもう1つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含み、

ii）前記i)に記載の2つの反応点の間にα位にRf5を有するα—ヒドロキシカルボン酸（Rf5は水素原子、置換されてもよいアルキル基、アラルキル基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、アリケニル基、アルキニル基から選択される）、及び、非環状ペプチド化合物中に保護されていてもよいアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基を含む、

非環状のペプチド化合物である、工程；

2）N末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、C末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させる、環化反応工程；

3）工程1）のii）に記載のα—ヒドロキシカルボン酸のエステル結合を切断してチオエステル基を発生させる工程

4）工程3）において発生させたチオエステル基と工程1）のii）に記載のアミノ基を結合させる環化反応工程、

を含む、方法。

〔24〕

工程1）のii）に記載のα—ヒドロキシカルボン酸とアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の間に含まれるアミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基の数が7つ以下である、〔23〕に記載の方法。

〔25〕

工程１）のｉｉ）に記載のα―ヒドロキシカルボン酸が、Ｃｙｓ＿Ｐｒｏ＿α―ヒドロキシカルボン酸として非環状ペプチド化合物中に含まれる、〔２３〕又は〔２４〕に記載の方法。

〔２６〕

工程１）のｉ）に記載のＮ末端側にもう１つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体が反応補助基を有している、〔２３〕から〔２５〕のいずれかに記載の方法。

〔２７〕

工程１）のｉ）に記載のＮ末端側にもう１つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体が反応補助基を有さず、ｉｉ）に記載のアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基のアミノ基が保護基を有し、活性化剤を添加することによって、工程２）の環化反応が行われ、工程２）の環化反応後、工程３）の環化反応前に、前記ｉｉ）に記載のアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基のアミノ基の保護基を除去する工程を含む、〔２３〕から〔２６〕のいずれかに記載の方法。

〔２８〕

環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

１）アミノ酸残基及び/ 又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/ 又はアミノ酸類縁体残基並びにＮ末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、側鎖の１つに反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、Ｎ末端にもう１つの反応点を有するアミノ酸、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

２）Ｎ末端のアミノ酸残基、Ｎ末端のアミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体の反応点と、側鎖に１つの反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体の反応点とを炭素－炭素結合させる工程

を含む、〔1〕に記載の方法。

〔29〕

N末端のアミノ酸残基、N末端のアミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点として炭素-炭素2重結合を選択し、側鎖に1つの反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点としてアリールハライドを選択して、遷移金属を触媒とした炭素—炭素結合反応により環化反応を実施する工程を含む、〔28〕に記載の方法。

〔30〕

遷移金属を触媒とした炭素—炭素結合反応が、Pdを触媒としたHeck型の化学反応である、〔29〕に記載の方法。

〔31〕

前記環状部を有するペプチド化合物の環状部を形成するアミノ酸又はアミノ酸類縁体の合計が5~12となる位置に環化反応を実施するための反応点を有する、〔1から〔30〕のいずれかに記載の方法。

〔32〕

前記環状部を有するペプチド化合物のアミノ酸及びアミノ酸類縁体残基の総数が9~13である、〔31〕に記載の方法。

〔33〕

ペプチド化合物のC末端と翻訳合成に用いた錶型とがスペーサーを介して結合しているペプチド化合物ー核酸複合体を製造することを特徴とする、〔1〕ー〔32〕のいずれかに記載の方法。

〔34〕

ペプチド化合物—核酸複合体が、翻訳合成に用いられる非環状ペプチド化合物をコードする核酸の3'末端にリンカーを介してピューロマイシンが結合している核酸を用いて合成される、〔33〕に記載の方法。

〔35〕

スペ—サ—がペプチド、RNA、DNA、またはヘキサエチレングリコールのポリマー、又は、これらの組合せである、〔33〕又は〔34〕に記載

の方法。

〔３６〕

ペプチド化合物を、互いに異なる配列を有する複数の核酸から成る核酸ライブラリーを翻訳して製造することを特徴とする、〔１〕から〔３５〕のいずれかに記載の方法。

〔３７〕

〔１〕から〔３６〕のいずれかに記載の製造方法により作製されるペプチド化合物又はペプチド化合物－核酸複合体。

〔３８〕

異なる構造を有する複数の〔３７〕記載のペプチド化合物又はペプチド化合物－核酸複合体からなるライブラリー。

〔３９〕

以下の（ｉ）～（ｉＶ）を有することを特徴とする、環状部を有するペプチド化合物；

（ｉ）アミノ酸及びアミノ酸類縁体残基数の合計が５～１２からなる環状部を含み、アミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数が９～１３である、

（ｉｉ）Ｎ置換アミノ酸を少なくとも２つ含み、Ｎ置換されていないアミノ酸を少なくとも１つ含む、

（ｉｉｉ）ＣｌｏｇＰ値が６以上である、

（ｉｖ）環状部を形成しているアミノ酸又はアミノ酸類縁体の結合が、アミノ酸又はアミノ酸類縁体の側鎖にある活性エステル基と、他のアミノ酸又はアミノ酸類縁体のアミン基とからなる結合を少なくとも１つ有する。

〔４０〕

ペプチド化合物に含まれるアミノ酸及びアミノ酸類縁体が、翻訳合成可能なアミノ酸又はアミノ酸類縁体、若しくは、翻訳可能なアミノ酸又はアミノ酸類縁体の側鎖またはＮ置換部位を化学修飾することによって得られるアミノ酸又はアミノ酸誘導体から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体である、〔３９〕に記載のペプチド化合物。

c41〕

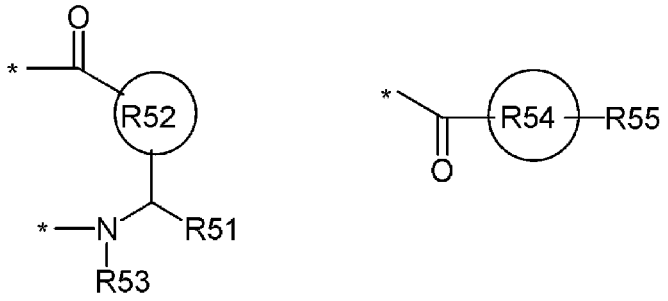
さらに、アミノ酸及びアミノ酸類縁体残基数の合計が1~8からなる直鎖部を少なくとも1つ含む、〔39〕又は〔40〕に記載のペプチド化合物。

〔42〕

環状部を形成しているアミノ酸又はアミノ酸類縁体の結合がアミド結合又は炭素—炭素結合である、〔39〕から〔41〕のいずれかに記載のペプチド化合物。

〔43〕

環状部が下記一般式（I）で示される交差ユニットを含む、〔39〕から〔42〕のいずれかに記載のペプチド化合物；



（I）

(式中の記号は以下の意味を示す；

R51は、置換基を有していても良いC1—C6アルキル基、C5—C10アリール基、アラルキル基、エステル基、又は式1で示されるアミドであり、

R52は、置換基を有していても良いC1—C6アルキル基、アリール基、またはアラルキル基であり、

R53は、置換基を有していても良いC1—C6アルキル基、もしくは水素原子であるか、または、R53とR51とが互いに結合してC3—C5のアルキレン基を形成し窒素原子を含む5員ー7員環を形成していてもよく、

R54は、0—8アミノ酸残基より構成されるペプチドであり、

R55は、置換基を有していても良いC1—C6アルキル基、C5—C10アリール基、アラルキル基、エステル基、置換基を有していても良いアミド基であり、

＊は、環状部における結合部位を示す。）。

〔４４〕

〔３９〕から〔４３〕のいずれかに記載のペプチド化合物を含む医薬組成物。

〔４５〕

前記医薬組成物が経口剤である、〔４４〕の医薬組成物。

〔４６〕

〔３９〕から〔４５〕のいずれかに記載のペプチド化合物の製造方法であつて、工程（ｉ）～（ｖ）を含む方法：

（ｉ）アミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数が９～１３である非環状ペプチド化合物を翻訳合成して、当該非環状ペプチド化合物とそれをコードする核酸配列を有する複合体がリンカーを介して結合している非環状ペプチド化合物－核酸複合体を形成する工程；

（ｉｉ）工程（ｉ）で翻訳合成された複合体の非環状ペプチド化合物をアミド結合又は炭素―炭素結合によって環化し、環状部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の残基数の合計が５～１２となる環状化合物を形成する工程；および、

（ｉｉｉ）工程（ｉｉ）で得られた環状部を有するペプチド化合物－核酸複合体ライブラリーと生体内分子とを接触させ、当該生体内分子に対して結合活性を有する複合体を選択する工程。

〔４７〕

さらに、以下の工程を含む、〔４６〕に記載の製造方法；

（ｉｖ）前記工程（ｉｉｉ）で選択された複合体の核酸配列からペプチド化合物の配列情報を得る工程、および、

（ｖ）前記工程（ｉｖ）で得られた配列情報に基づきペプチド化合物を化学合成する工程。

〔４８〕

前記非環状ペプチド化合物がα―ヒドロキシカルボン酸、及び、保護され

ていてもよい側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体を含み、工程（ｉｉ）の環状化合物を形成する工程の後で、α—ヒドロキシカルボン酸部位と側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体部位を化学反応させて分枝部位を形成させる工程を含む、〔４６〕又は〔４７〕に記載の方法。

〔４９〕

生体内分子が、分子量５００未満の化合物が結合し得る領域を有していない分子である、〔４６〕から〔４８〕いずれかに記載の製造方法。

〔５０〕

生体内分子に対して結合活性を有する複合体が、さらに該生体内分子が他の生体内分子との結合を阻害する活性を有する、〔４６〕から〔４９〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５１〕

環化反応するＮ末端側のァミノ酸又はアミノ酸類縁体が、前記化合物Ｎ-１または化合物Ｎ—２で表わされる化合物から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体であり、Ｃ末端側のアミノ酸又はアミノ酸類縁体が前記化合物Ｃ-１で表わされる化合物から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体であり、工程（ｉｉ）の環状化合物を得る工程の後、反応補助基を除去する工程を含む、〔４６〕から〔５０〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５２〕

核酸配列が３'末端にスペーサーを有し、翻訳合成されるペプチド化合物のＣ末端が、当該スペーサーを介して、当該核酸配列と複合体を形成する、〔４６〕から〔５１〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５３〕

ペプチド化合物—核酸複合体が、翻訳合成に用いられる非環状ペプチド化合物をコードする核酸の３'末端にリンカーを介してピューロマイシンが結合している核酸を用いて合成される、〔５２〕に記載の方法。

〔５４〕

スペ—サ—がペプチド、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはヘキサエチレングリコールのポリマーである、〔５２〕又は〔５３〕に記載の製造方法。

発明の効果

[001７] 本発明によれば、翻訳合成することができるドラックライクな(膜透過性と代謝安定性に優れた)環状部を有するペプチド化合物又は環状部と直鎖部を有するペプチド化合物、及び、当該化合物のディスプレイライブラリーが提供される。また、本発明のディスプレイライブラリーは、多様性に富んだライプラリーであることから、所望の標的分子に対するヒット化合物を取得できる確率が高い。さらに、本発明のディスプレイライプラリーから得られた該ヒット化合物は、既に優れた膜透過性と代謝安定性を有していることからことから、大きな構造変換をすることなく、従来の低分子化合物の考え方と同様医薬品としての最適化を効率的に実施することが可能である。このように本発明は、これまで医薬品として知られている低分子化合物や抗体とは異なる新しい医薬品のためのScaf f０Ldの提供と効率的に医薬品を創出するための新しい創薬システムを提供するものである。

図面の簡単な説明

[001８] [図1]側鎖カルボン酸が活性エステル化されたァミノァシル化pdCpA化合物群の一般的合成法を示した図である。

[図2]G Lu(SBn) を含むペプチド配列Ｐ＿１をコードするmRNAの翻訳産物のマススペクトル解析を示した図である。

[図3]Asp(SMe) を含むペプチド配列Ｐ—２をコードするmRNAの翻訳産物のマススペクトル解析したことを示した図である。Asp(SMe) の翻訳にて、翻訳された全長ペプチドから脱MeSHされた化合物が主生成物として検出された (翻訳ペプチドP-3) 。

[図4]翻訳ペプチドＰ＿６の加水分解反応によるペプチドP-4の生成を示した図である。

[図5]Tyr を含まず、チオエステルを含むペプチド配列の翻訳を示した図である。

[図6] N末端アミノ基を持たないチオエステル含有ペプチドの翻訳合成を示した図である。

[図7] 側鎖がチオエステル化されたアミノ酸に続くC末端側アミノ酸にN—アルキル化されたアミノ酸を導入させたモデルペプチドの翻訳合成を示した図である。

[図8-1] チオエステルとグリシン誘導体あるいはシスティン誘導体との化学反応性の比較を示した図である。

[図8-2] 図8—1の続きを示す図である。

[図9] イミダゾール添加条件でのチオエステル5b-1とグリシン誘導体との反応によるアミド5d—1の合成を示した図である。

[図10] システィン誘導体のアミノアシル化pdCpAの一般的合成法を示した図である。

[図11] システィン誘導体のアミノアシル化pdCpAの合成例を示した図である。

[図12]Cys (St Bu) をN末端としたペプチド翻訳合成を示した図である。

[図13] 化合物2n—A及び化合物2e—Aの翻訳模擬液中での安定性を示した図である。

[図14] Initiation read-th rough を積極活用したN末端 Cysの効率的翻訳導入を示した図である。

[図15-1] Cys直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である (P-15:Phe)。

[図15-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である (P-16 :Leu)。

[図16-1] Cys直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である (P-17:Tyr)。

[図16-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である (P-18 :Cys)。

[図17-1] Gys直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である (P-19:T印)。

[図17-2]Gys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-20 :Leu)。

[図18-1]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-21:Leu)。

[図18-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-22 :Pro)。

[図19-1]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-23 :His)。

[図19-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-24 :Gln)。

[図20-1]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P_25 :Arg)。

[図20-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-26 :Arg)。

[図21-1]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-27 :Ile)$_0$

[図21-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-29 :Asn)。

[図22]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-30 :Ser)。

[図23-1]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-32 :Val)。

[図23-2]Cys 直後の3番目のコドンに様々なアミノ酸をコードさせた翻訳産物のマススペクトルを示した図である(P-33 :Ala)。

[図24] システィン以外のSH基付き非天然型アミノ酸およびそのアミノアシル化pdCpAの一般的合成法を示した図である。

[図25] SH基を含有する安定化アミノアシル化tRNAを用いた翻訳ペプチドのマススペクトルを示した図である(P-34 :tBuSSEtGly, P-35 :tBuSSEt βAla,

P-36 :tBuSSEtGABA, [M+H] が標的化合物、S脱保護は、標的化合物のSH基に付与されていた保護基が脱離された化合物であり、標的化合物が翻訳されたことを示す、Read-through は2番目のThrから開始された翻訳生成物であり、副生成物である)

[図26] SH基を含有する安定化アミノアシル化tRNAを用いた翻訳ペプチドのマススペクトルを示した図である (P-41 :Cys(StBu), P-40 :PenCys(StBu), P-38 :NVOC-Cys(StBu)) 。

[図27] メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体をN末端に導入する方法を用いた翻訳合成及びアミド環化ペプチドのマススペクトルを示した図である。

[図28]In itiation read-through を用いた翻訳及びアミド環化ペプチドのマススペクトルを示した図である (NCL:標的化合物)。

[図29]In itiation read-through を用いた翻訳及びアミド環化ペプチドのマススペクトルを示した図である (NCL :標的化合物)。

[図30-1]In itiation read-through を用いた翻訳及びアミド環化ペプチドの構造決定のためのMSおよびMS/MS 解析を示した図である。

[図30-2] 図30—1の続きを示す図である。

[図31] モデル基質を用いたラジカル脱硫反応を示した図である。

[図32] モデル基質を用いたラジカル脱硫反応の条件検討を示した図である。

[図33] 翻訳ペプチドP—50の脱硫反応条件、および得られたペプチドP—51のマススペクトルを示した図である。

[図34] 脱硫反応の蛋白への影響評価を示した図である。

[図35- 1] 代謝物のマスクロマトグラムを示した図である。

[図35- 2]Peak 1のMS/MSスペクトルを示す図である。

[図35-3]Peak 2のMS/MSスペクトルを示す図である。

[図35-4]Peak 3のMS/MSスペクトルを示す図である。

[図35-5 サ631<4 のV13/V15 スペクトルを示す図である。

[図36] 環化反応による化合物P-136の生成反応液をLCMSで分析した結果を

示す図である。

[図37] 環化反応による化合物P-136の生成反応液をLCMSで分析した結果を示す図である。

[図38] 環化反応による化合物P-137の生成反応液をLCMSで分析した結果を示す図である。

[図39] ベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチドの翻訳合成により得られた翻訳反応物のマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図40] 翻訳ペプチドP141上のチオエステルとN末端α—アミノ基を用いたペプチドのアミド環化実験により得られた生成物のマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図41]化合物10の合成条件の対比を示す図である。

[図42] 化合物P-151の生成反応をLCMSで分析した結果を示す図である。

[図43] 環化反応後のmRNA-ペプチドフユージョン分子を錶型とした逆転写反応の結果を示す図である。

[図44] N末端Phe, ALaとベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチドのMALDI—MSによる分析結果を示す図である。

[図45] N末端Phe, ALaとベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチドのMALDI—MSによる分析結果を示す図である。

[図46] 環化反応条件におけるRNA安定性を電気泳動により評価した結果を示す図である。

[図47] ペプチド環化反応の反応生成物の電気泳動による解析結果を示す図である。

[図48] ノルロイシンで翻訳開始され、ベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を側鎖に含むペプチドを用いた、翻訳後開始アミノ酸除去と反応補助基を利用しないペプチド環化による環化ペプチドのMALDI—MSによる分析結果を示す図である。

[図49] 化合物SP-606の生成反応液をLCMSで分析した結果を示す図である

。

[図50] システニルプロリルエステル配列及び側鎖アミノ基を持つ環状ペプチド (化合物Ｐ—ＨＩ) のＭＡＬＤＩ—ＭＳによる分析結果を示す図である。

[図51] 翻訳ペプチドP-H1を用いた分子内分枝ペプチド (直鎖部２) 生成反応における生成物のＭＡＬＤＩ—ＭＳによる分析結果を示す図である。

[図52] 化合物SP-606の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図53] 化合物SP-606の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図54] 化合物SP-606の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図55] 化合物SP-607の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図56] 脱硫反応前 (化合物 SP606) のマスクロマトグラム (上段) と脱硫反応３時間後における保持時間０．３４分から０．３９分までを積算し平均化したマスクロマトグラム (下段) (分析条件ＳＱＤ ＦＡ０５) の図である。この範囲で積算すれば、目的化合物や反応原料のみならず、類似の構造を有する副生成物が存在すればその分子量が観測されるはずであるため、全体の反応選択性を正確に評価することが可能である。図５６に限らず、一定領域のマススペクトルで時間範囲を積算しているものは、全てこの意図に従っている。

[図57] 化合物SP-607の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図58] 脱硫反応前 (化合物 SP606) のマスクロマトグラム (上段) と脱硫反応３時間後における保持時間０．３４分から０．３９分までを積算し平均化したマスクロマトグラム (下段) (分析条件ＳＱＤ ＦＡＯ５) の図である。

[図59] 化合物SP618の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図60] 化合物SP619の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図61]図６１は、ＬＣＭＳ　０．３分から０．６分のマスクロマトグラフである。なお、ペプチド成分は本分析条件では０．３分から０．６分に全て溶出される。従って、反応の選択性を評価する目的で０．３分から０．６分までのマスクロマトグラフを積算して平均化させた結果、本反応が選択的に新区したことが明らかとなったことを示す図である。

[図62]図６２は、N末端フォルミルメチオニンを含み、側鎖チオール基とカルボン酸でチオエステル環化したペプチドＰ—Ｅ１（ピークＩ）と、N末端フォルミルメチオニンが除去され、その結果露出したＮ末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物Ｐ—Ｅ２（ピークＩＩ）のＭＡＬＤＩ_ＭＳによる分析結果を示す図である。

[図63]化合物SP618の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図64]化合物SP619の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図65]図６５は、ＬＣＭＳ　０．３分から０．６分のマスクロマトグラフである。なお、ペプチド成分は本分析条件では０．３分から０．６分に全て溶出される。従って、反応の選択性を評価する目的で０．３分から０．６分までのマスクロマトグラフを積算して平均化させた図である。

[図66]計算機によるシミュレーションを活用した仮想ライブラリによるCLOGP値、NMeアミノ酸数、分子量の平均値および分布の推測図である。

[図67]計算機によるシミュレーションを活用した仮想ライブラリによるCLOGP値、NMeアミノ酸数、分子量の平均値および分布の推測図である。

[図68]ＬＣＭＳ　全範囲を積算して平均化させたマスクロマトグラフである。

[図69]ＬＣＭＳ　全範囲を積算して平均化させたマスクロマトグラフである。

[図70]ＬＣＭＳ　全範囲を積算して平均化させたマスクロマトグラフである。

[図71]化合物SP664の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図72]化合物SP672の生成反応液をＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図73] 実施例26で得られた化合物 (SP854、SP855、SP857、SP859) のhIL-6及びshIL-6Rによる細胞増殖の阻害活性を示す図である。

[図74] 分子内分枝ペプチド(直鎖部2)を有するペプチド—RNA複合体を含む反応生成物の電気泳動による解析結果を示す図である。

[図75] 翻訳反応物のMALDI—MS分析による結果を示す図である。

[図76] 翻訳反応物のマスクロマトグラムおよびマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図77] 翻訳反応物のマスクロマトグラムおよびマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図78] 翻訳反応物のマスクロマトグラムおよびマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図79] 翻訳反応物のマスクロマトグラムおよびマススペクトルによる分析結果を示す図である。

[図80] 側鎖アミノ基脱保護条件でのRNA安定性を電気泳動により評価した結果を示す図である。

[図81] RNase処理済みサンプルを処理して得られたサンプルのLC／MS分析の結果を示す図である。

[図82-1]10のアミノ酸にて環状を形成し、3つのアミノ酸が分岐された13残基からなるペプチドとタンパク質の相互作用を示す図である。

[図82- 2]10のアミノ酸にて環状を形成し、3つのアミノ酸が分岐された13残基からなるペプチドとタンパク質の相互作用を示す図である (左側)。13アミノ酸のアミノ酸にて環状を形成するペプチドとタンパク質の相互作用を示す図である (右側)。

[図83] 側鎖アミノ基脱保護条件でのRNA安定性を電気泳動により評価した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] <ペプチド化合物>

●環状部を有するペプチド化合物

本発明の環状部を有するペプチド化合物とは、アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体がアミド結合あるいはエステル結合して形成される化合物であり、環状部がアミド結合あるいは炭素-炭素結合形成反応などの共有結合を介して環化された化合物である。当該化合物をさらに化学修飾して得られる化合物も本発明のペプチド化合物に含まれる。本発明のペプチド化合物は直鎖部を有していてもよく、例えば、スキームA（スキームA—1、A-2）のように記載することができる。環状部を有するペプチド化合物は、さらに、直鎖部を有していてもよい。アミド結合あるいはエステル結合の数（アミノ酸又はアミノ酸類縁体の数'長さ）を特に限定しないが、直鎖部を有する場合、環状部と直鎖部を併せて30残基以内が好ましい。高い膜透過性を獲得するためには、環化部位と直鎖部位を併せた総アミノ酸数は13残基以下であることがより好ましい。高い代謝安定性を獲得するためには、総アミノ酸数が9以上であることがより好ましい。膜透過性と代謝安定性の両立（ドラックライクネス）を考慮すると上記に加えて環状部を構成するアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数は5～12であることが好ましい。さらに、上の記載に加え

て環状部を構成するアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数はより好ましくは５～１１、さらに７～１１残基が好ましい。特に９～１１残基が好ましい。直鎖部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数（ユニットの数）は０～８であることが好ましい。さらに、０～３が好ましい。尚、本願では特に限定しない限り、アミノ酸にはアミノ酸類縁体も含まれる場合があるものとする。また、ここで、「ドラックライクネス」あるいは「ドラックライク」とは、ペプチド化合物が、少なくとも経口剤、あるいは、細胞内蛋白、核酸、膜蛋白の細胞内領域又は膜蛋白の膜貫通ドメインを標的とした場合に、医薬品として利用できる程度の膜透過性と代謝安定性を有することを意味する。

[0020] 本発明の環状部を有するペプチド化合物の環状部位は環状を形成しているペプチドであれば特に限定されないが、翻訳後環化部は膜透過性と代謝安定性を両立（Druglikeness）できる官能基を形成する環化ユニットであることが必要である。そのような環化法であれば特に限定されない。例えばカルボン酸とアミンから形成されるアミド結合や、鈴木反応、Heck反応（ヘック反応）、Sonogashira反応等の遷移金属を触媒とした炭素－炭素結合反応などが挙げられる。従って本発明のペプチド化合物は、これらの結合反応が可能な少なくとも1組の官能基を含む。特に代謝安定性の観点からは、結合反応によってアミド結合が形成される官能基が含まれることが好ましい。

[002 1] 本発明のペプチド化合物の環状部としては、例えば、スキームAに記載のような翻訳合成後の化学反応により環化されることにより形成される環状部が好ましい。さらに、翻訳後にRNAやDNAなどの核酸に影響を与えることのない反応条件でも形成することができる環状部が好ましい。

[0022] 環状部の形成はドラックライクな環化であることが好ましい。ドラックライクな環化とは、生成される結合がドラックライクである結合を意味する。例えば、容易に酸化される可能性を有するヘテロ原子を含むような結合であって、代謝安定性の妨げとなる結合が含まれないことが好ましい。環化によって生成される結合としては、例えば、活性エステルとアミンとの結合によるアミド結合、炭素－炭素2重結合とアリールハライドによるHeck反応生成

物などによって生成される結合が含まれる。これらはスキームＡにも記載の三角ユニット(環化Ｎ端側ユニット)や交差ユニットに反応性官能基を要求するため、三角ユニットや交差ユニットには必ずしもドラックライクに適したアミノ酸が選択されない。しかしながら、翻訳後修飾を実施した後にドラックライクな官能基を有する化合物へと変換される。本発明においては、このような結合もドラックライクな環化の結合に含まれる。

[0023] スキームＡの曲線部分が翻訳後に環化される部位(翻訳後環化部)であり、この部分はアミド結合あるいはHeck反応などの炭素-炭素結合形成反応に代表される様々な翻訳後修飾化学反応にて結合されて環状部が形成される。なお、本明細書において「翻訳合成」は、ペプチド化合物をコードする核酸(たとえば、ＤＮＡ、ＲＮＡ)から、該ペプチド化合物を翻訳して合成すること意味する。翻訳とは、リボゾームの作用によってｍＲＮＡを錶型にアミド結合やエステル結合反応を繰り返すことによって直鎖ペプチドを得る工程である。

翻訳後修飾とは、翻訳後にリボゾームの作用以外で自動的あるいは別試薬を添加させて生じさせる化学反応を指し、例えば環化反応や脱保護反応を挙げることができる。

翻訳後環化とは、翻訳後修飾の中で環形成反応を伴うものである。(スキームＡ:本発明のペプチド化合物を説明したスキームである。白丸ユニット、黒丸ユニット、三角ユニット、四角ユニットはそれぞれアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体を意味する。また、それぞれのユニットは同一あるいは別々のアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体を意味する。三角ユニットはＮ末端カルボン酸類縁体の場合もあり得る。例えば、8個の黒丸ユニットはそれぞれ別種類のアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体であってもよく、その中のいくつか、あるいは全てが同一のものであってもよい。また、翻訳後に実施可能な化学修飾により、アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体は、別骨格を有する化合物へ化学変換や骨格変換されていてもよい。ここで、1ユニットとは、翻訳後修飾が終了した時点でのアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体が、これに該当するが

、１つのｔ RNAによって翻訳されたアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体が、翻訳後修飾により、別骨格を有する化合物へ化学変換や骨格変換されたものも、これに含まれる。ユニットの数についても同様に計算される。尚、本願では特に限定しない限り、アミノ酸にはアミノ酸類縁体も含まれるものとする。また、本明細書中において、翻訳後環化は単に環化という場合がある。

[0024] 例えば、環状部とはスキームＡ—１においては、１つの三角（▲）ユニット（残基）（環化Ｎ端側ユニット）と８つの黒丸（●）ユニット（環状部主鎖ユニット）および１つの白丸（○）ユニット（交差ユニット）から成る部位であり、直鎖部とは６つの四角（■）ユニット（直鎖部主鎖ユニット）から成る部位である。またスキームＡ—２では環状部とは１つの三角ユニットと８個の黒丸ユニットおよび１つの交差ユニットから成る部位であり、直鎖部とは４つの四角および３つの四角ユニットから成る部位である。

[0025] 本発明において交差ユニットとは、翻訳後に形成される環化前のペプチド化合物（非環化ペプチド化合物）において、アミノ酸側鎖に当該ペプチド化合物中の三角ユニットのアミノ酸又はアミノ酸類縁体が持つ官能基あるいはＮ末端カルボン酸類縁体が持つ官能基と、化学反応によって環化される官能基を有するアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体であり、当該三角ユニットとの環化に必要な官能基を有していれば特に限定されない。スキームＡの白丸ユニットがこれに該当する。交差ユニットは、上記のアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体から選択され、核酸からの翻訳が可能であるものが好ましい。また、そのものが翻訳困難であっても、その誘導体が翻訳される場合には、そのものが翻訳されることが必須ではない。例えば、Asp(SBn)が翻訳される場合には、交差ユニットとしてはAspの側鎖メチレン鎖を自由に置換した化合物も許容される（例えば化合物Ｃ—３のＲ２８やＲ２９は、翻訳されないものであってもよい）。交差ユニットでは、主鎖のアミノ基、カルボキシル基が翻訳合成での共有結合形成に使用され、かつ第三の官能基が翻訳後環化に必要であるため、合計３つ以上の官能基を有する必要がある。この中で、翻訳後環化部位は交差ユニットの側鎖部位の官能基により環化される。

[0026] ここで、交差ユニットと環化する官能基を有するアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体、もしくはN末端カルボン酸類縁体は、交差ユニットと環化する官能基を有する限り特に限定されない。スキームAの三角ユニットがこれに該当する。三角ユニットは、例えば、スキームA中ではN末端に配置された例を示した。このような例では、三角ユニットとしてアミノ酸を選択した場合には主鎖アミノ基を環化官能基として使用することができる。例えば、交差ユニットに活性エステルを活用した場合、三角ユニットの主鎖アミノ基とアミド結合による翻訳後環化させることが可能である。このように、主鎖アミノ基を反応性官能基として活用する場合、三角ユニットの側鎖には反応性官能基を有していなくともよい。側鎖にSH基 (チオール基)などの反応補助基を導入することもできる。また、三角ユニットとしてアミノ酸類縁体を利用した場合、主鎖のヒドロキシル基を反応性官能基として使用してもよく、また側鎖に配置させた反応性官能基を利用してもよい。また、N末端カルボン酸類縁体を利用した場合には、上述と同様アミノ基やヒドロキシル基を反応性官能基として利用してもよいが、アミノ基やヒドロキシル基を持たない自由な反応性ユニットとして様々な官能基を導入させることができる。三角ユニットは、上記のアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体、もしくはN末端カルボン酸類縁体から選択され、翻訳されるものが好ましい。また、そのものが翻訳困難であっても、その誘導体が翻訳される場合には、そのものが翻訳されることが必須ではないことは、交差ユニットと同様である。

[0027] 交差ユニットと三角ユニットは、環化可能な位置であれば、環化前のペプチド化合物中の所望の位置に組み込むことが可能であるが、環化、もしくは環化後の翻訳後修飾が施された後の環状部位のアミノ酸またはアミノ酸類縁体あるいはN末端カルボン酸類縁体を併せた数が5~12となるような位置に組み込まれることが好ましい。さらに、環化、もしくは環化後の翻訳後修飾が施された後の環状部のアミノ酸またはアミノ酸類縁体あるいはN末端カルボン酸類縁体を併せた数が5~11となるような位置に組み込まれることが好ましい。

[0028] また、三角ユニット はスキームAではN末端に配置させているが、N末端以外の位置に配置させることもできる。その場合、その位置は、交差ユニットよりN末端側に配置させる必要がある。三角ユニット をN末端以外の位置に配置させる場合、三角ユニットには、アミノ酸およびアミノ酸類縁体から選択され、側鎖に交差ユニット と環化反応する官能基を有する。

[0029] 黒丸ユニット、四角ユニットは、アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体より選択される。また、アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体で翻訳された後、翻訳後修飾により生じさせることのできる化学構造も含まれる (例えば直鎖部2の構造)。アミノ酸を選択した場合、黒丸ユニットは特に限定されないが、好ましくは ドラックライクなアミノ酸、もしくは反応性官能基を有し翻訳後修飾にて化学反応させて ドラックライクな官能基に変換させるアミノ酸から選択される (例えば直鎖部2のアミノ酸残基としてリジンが挙げられる。)。アミノ酸類縁体から選択した場合、黒丸ユニットは特に限定されないが、好ましくは ドラックライクなァミノ酸類縁体もしくは側鎖に様々な反応性官能基を有するアミノ酸類縁体が翻訳後の修飾により反応性官能基が化学修飾され、 ドラックライクなァミノ酸類縁体に変換されるァミノ酸類縁体から選択される。

[0030] 直鎖部の数 (分枝の数) は特に限定されず、スキームA—1のように1つであってもよく、スキームA—2のように2つ以上であってもよい。また、スキームA—1の四角ユニット の数が0個になった化合物でもよく、またスキームA—2の四角ユニット のうち直鎖部1の数が0個になった化合物でもよい。直鎖部を有することで、本発明の環状部を有するペプチ ド化合物の機能を強化することが可能である。例えば、あるレセプターとリガン ドの結合を阻害するために本発明のペプチ ド化合物を利用する場合、当該ペプチ ド化合物が直鎖部を有することで、直鎖部がない場合と比較して、ペプチ ド化合物の、レセプターあるいはリガン ドに対する結合活性を高めることができる。当該結合活性の増強により、レセプターとリガン ドの結合阻害効果を高めることが可能である。特に本発明の直鎖部は、例えば後述の方法に従って、

環状部の所望の位置に直鎖部を付与することが可能であり、より高い機能を得るために最適の位置に直鎖部が付与されたペプチド化合物を得ることができる (以後、直鎖部２)。

[0031] またこれらの直鎖部は、環状部を有するペプチド化合物のライブラリーから、所望の活性を有するペプチド化合物をより効率よく得る上でも好ましい。所望の活性を有するペプチド化合物とは、標的物質に対してけ結合活性を有するもの、標的物質の機能を阻害する作用を有するもの、あるいは標的物質の機能を活性化させる作用を有するもの、標的物質の機能を変更させる作用を有するものなどが挙げられ、これらの中から目的に応じて機能を選択することができる。本発明の環状部を有するペプチド化合物が標的物質に対して結合活性を有する場合、これらのペプチド化合物は膜透過性と脂質安定性に優れていることから、例えば、該ペプチド化合物を標識することで、生体内だけでなく、細胞内の標的物質の分布をリアルタイムでモニタリングすることが可能となる。更に標的物質が疾患の原因因子である場合には、該疾患の診断に利用できる可能性もある。また、本発明の環状部を有するペプチド化合物が、標的物質の機能を阻害、活性化又は変更させる効果を有する場合、例えば、標的物質が疾患の原因因子である場合には該疾患の治療薬として利用できる。また、例えば、本発明の環状部を有するペプチド化合物が直鎖部２を有する場合、無い場合と比較して阻害化合物の取得割合を向上させることが可能となる。タンパクＡと結合して、タンパクＡとタンパクＢのタンパク-タンパク相互作用を阻害する13残基環状部を有するペプチド化合物の場合、当該ペプチド化合物が結合しているタンパクＡ内のペプチドの接触部位を図８２_２の右側に示した。環状化合物であるため、ペプチドとタンパクＡの接触領域を円で近似させると約３~５残基分の直径であると判断できる。この接触領域にタンパクＢが結合する場合には効果的にタンパクＡとタンパクＢのタンパク-タンパク相互作用を阻害することが可能であるが、この接触領域以外でタンパクＢがタンパクＡと結合する場合には、有効な阻害が得られない可能性が考えられる (いわゆるアロステリック阻害例はタンパ

クータンパク相互作用阻害例としては報告例が少ない)。

[0032] このように考えると、なるべく広い領域にてタンパクと結合するペプチド化合物を得ることが重要となる。一方で、膜透過可能な総アミノ酸数は限定されているので、直鎖部が有効となる。例えば、図８２_１には先と同じ13残基の環状ペプチドではあるが、10残基にて環状を構築し、残り3つが分枝されたペプチドを示した。特に直鎖部２は後述の手法に従って、ペプチド化合物の任意の場所に直鎖部を付与することが可能であるので、図８２_１の４つの分枝ボイントだけでなく、さらに多くの分枝ボイントを獲得できるが、仮に4つを重ねると、図８２—2の左に示す領域まで接触領域が拡大される。同一の場所(穴)に作用しているにも関わらず、タンパクAとタンパクBの結合領域と重なることにより阻害剤等の機能を有するペプチド化合物を取得できる割合が高まる。

[0033] なお、本明細書において、ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」を、それぞれ、「アミノ酸残基」、「アミノ酸類縁体残基」ということがある。

アミノ酸とはα、βおよびァアミノ酸であり、天然型アミノ酸(本願では天然型アミノ酸とはタンパク質に含まれる２０種類のアミノ酸を指す。具体的にはＧｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａし Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ｃｙｓ、Ｍｅｔ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｐｒｏを指す。)に限定されず、非天然型アミノ酸であってもよい。α—アミノ酸の場合、Ｌ型アミノ酸でもＤ型アミノ酸でもよく、α，α—ジアルキルアミノ酸でもよい。アミノ酸側鎖の選択は特に制限を設けないが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケ二ル基、アルキ二ル基、ァリール基、ヘテロァリール基、ァラルキル基、シクロアルキル基から自由に選択される。それぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も例えば、Ｎ原子、０原子、Ｓ原子、Ｂ原子、Ｓｉ原子、Ｐ原子を含む任意の官能基の中から自由に選択される(すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルケ二ル基、アルキ二ル基、ァリール基、ヘテロァリ

—ル基、ァラルキル基、シクロアルキル基など)。

ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」にはそれぞれに対応する全ての同位体を含む。「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」の同位体は、少なくとも1つの原子が、原子番号(陽子数)が同じで,質量数(陽子と中性子の数の和)が異なる原子で置換されたものである。本発明ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」に含まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、2H、3H、13C、14C、15N、170、180、31P、32P、35S、18F、36CI等が含まれる。

[0034] 置換基として、例えば、ハロゲン由来の置換基として、フルオロ(_F)、クロロ(_CI)、プロモ(_Br)、ヨウド(_I)などが挙げられる。これらで1つ以上置換された、ハロゲンを置換基に有していてもよいアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ァリール基、ヘテロアリール基、ァラルキル基などが挙げられる。

[0035] 0原子由来の置換基としてエーテルを形成させるための置換基として、アルコキシ基(_OR)が挙げられ、アルコキシ基はアルキルアルコキシ基、シクロアルキルアルコキシ基、アルケニルアルコキシ基、アルキニルアルコキシ基、ァリールアルコキシ基、ヘテロァリールアルコキシ基、ァラルキルアルコキシ基、などの中から選択される。アルコール部位を形成させる置換基として、ヒドロキシル基(_OH)が挙げられ、カルボニル基を形成させる置換基として、カルボニル基(_C=0_R)が挙げられ、カルボニル基は、ヒドロカルボニル基(_C=0_H,化合物としてはアルデヒドが得られる)、アルキルカルボニル基(化合物としてはケトンが得られる)、シクロアルキルカルボニル基、アルケニルカルボニル基、アルキニルカルボニル基、ァリールカルボニル基、ヘテロァリールカルボニル基、ァラルキルカルボニル基などの中から選択される。カルボン酸を形成させる置換基(_$C0_2H$)としてカルボキシル基が挙げられ、エステル基を形成させる置換基とし

て、オキシカルボニル基 (_ 0 _ C = 0 _ R) およびカルボニルアルコキシ基 (_ C = 0 _ O R) が挙げられ、カルボニルアルコキシ基は、アルキルオキシカルボニル基、シクロアルキルオキシカルボニル基、アルケニルオキシカルボニル基、アルキニルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、ヘテロアリールオキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基などの中から選択され、オキシカルボニル基は、アルキルカルボニルオキシ基、シクロアルキルカルボニルオキシ基、アルケニルカルボニルオキシ基、アルキニルカルポニルオキシ基、アリールカルポニルオキシ基、ヘテロアリールカルポニルオキシ基、アラルキルカルボニルオキシ基などの中から選択される。

[0036] チオエステルを形成させる置換基としてメルカプトカルボニル基 (_ S _ C = 0 - R) およびカルボニルアルキルメルカプト基 (_ C = 0 _ S R) などが挙げられ、メルカプトアルキルカルボニル基、メルカプトシクロアルキルカルポニル基、メルカプトアルケニルカルボニル基、メルカプトアルキニルカルポニル基、メルカプトアリールカルポニル基、メルカプトヘテロアリールカルポニル基、メルカプトアラルキルカルボニル基などの中から選択され、あるいは、カルボニルアルキルメルカプト基、カルボニルシクロアルキルメルカプト基、カルボニルアルケニルメルカプト基、カルボニルアルキニルメルカプト基、カルボニルアリールメルカプト基、カルボニルヘテロアリールメルカプト基、カルボニルアラルキルメルカプト基が挙げられる。

[0037] アミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルカルボニル基 (_ N H - C O - R)、アミノシクロアルキルカルボニル基、アミノアルケニルカルポニル基、アミノアルキニルカルポニル基、アミノシクロアルキルカルボニル基、アミノアリールカルポニル基、アミノヘテロアリールカルポニル基、アミノアラルキルカルボニル基などが挙げられ、もしくはカルボニルアルキルアミノ基 (—C O—N H R)、カルボニルシクロアルキルアミノ基、カルポニルアルケニルアミノ基、カルボニルアルキニルアミノ基、カルボニルアリールアミノ基、カルボニルヘテロアリールアミノ基、カルボニルアラル

キルアミノ基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0038] カルバメート基を形成する置換基としては、アミノアルキルカルバメート基（_ＮＨ_ＣＯ_ＯＲ）、アミノシクロアルキルカルバメート基、アミノアルケニルカルバメート基、アミノアルキニルカルバメート基、アミノシクロアルキルカルバメート基、アミノアリールカルバメート基、アミノヘテロアリールカルバメート基、アミノアラルキルカルバメート基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0039] スルホンアミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルスルホニル基（_ＮＨ_Ｓ０$_2$_Ｒ）、アミノシクロアルキルスルホニル基、アミノアルケニルスルホニル基、アミノアルキニルスルホニル基、アミノシクロアルキルスルホニル基、アミノアリールスルホニル基、アミノヘテロアリールスルホニル基、アミノアラルキルスルホニル基などが挙げられ、もしくはスルホニルアルキルアミノ基（_Ｓ０$_2$_ＮＨＲ）、スルホニルシクロアルキルアミノ基、スルホニルアルケニルアミノ基、スルホニルアルキニルアミノ基、スルホニルアリールアミノ基、スルホニルヘテロアリールアミノ基、スルホニルアラルキルアミノ基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0040] スルファミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルスルファモイル基（_ＮＨ_Ｓ０２_ＮＨＲ）、アミノシクロアルキルスルファモイル基、アミノアルケニルスルファモイル基、アミノアルキニルスルファモイル基、アミノシクロアルキルスルファモイル基、アミノアリールスルファモイル基、アミノヘテロアリールスルファモイル基、アミノアラルキルスルファモイル基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シ

クロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0041] チオカルボン酸を形成させる置換基としては、チオカルボン酸基 (_C(=0)-SH) が挙げられ、ケト酸を形成させる官能基としてケト酸基 (–C(=0)-C0$_2$H) が挙げられる。

[0042] さらに、S原子由来の置換基としてチオール基を形成する置換基としては、チオール基 (_SH) が挙げられ、アルキルチオール、シクロアルキルチオール、アルケニルチオール、アルキニルチオール、アリールチオール、ヘテロアリールチオール、アラルキルチオールが形成される。チオエーテル (-S-R) を形成する置換基としては、アルキルメルカプト基、シクロアルキルメルカプト基、アルケニルメルカプト基、アルキニルメルカプト基、アリールメルカプト基、ヘテロアリールメルカプト基、アラルキルメルカプト基などの中から選択され、スルホキシド基 (_S=0_R) を形成させる置換基としては、アルキルスルホキシド基、シクロアルキルスルホキシド基、アルケニルスルホキシド基、アルキニルスルホキシド基、アリールスルホキシド基、ヘテロアリールスルホキシド基、アラルキルスルホキシド基などの中から選択され、スルホン基 (_S(0)$_2$-R) を形成させる置換基としては、アルキルスルホン基、シクロアルキルスルホン基、アルケニルスルホン基、アルキニルスルホン基、アリールスルホン基、ヘテロアリールスルホン基、アラルキルスルホン基などの中から選択され、スルホン酸を形成させる置換基としてスルホン酸基 (_S0$_3$H) が挙げられる。

[0043] N原子由来の置換基として、例えばアジド基 (_N$_3$) が挙げられ、ニトリル基 (_CN) が挙げられ、1級アミンを形成させる置換基としてアミノ基 (_NH$_2$) が挙げられ、2級アミン (_NH_R) を形成させる置換基として、アルキルアミノ基、シクロアルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、アラルキ

ルァミノ基などが挙げられ、3級アミン（－ＮＲ（Ｒ，））を形成させる置換基として、アルキル（アラルキル）アミノ基など、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などの中から、任意の2つあるいは同一の置換基を2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられ、アミジノ基（－Ｃ（＝ＮＲ）－ＮＲ'Ｒ"）を形成させる置換基として、アミジノ基（－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$）、あるいはN原子上の置換基3点が、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の同一あるいは別々の任意の3つで置換された、例えばアルキル（アラルキル）（アリール）アミジノ基などが挙げられ、グアニジノ基（－ＮＲ－Ｃ（＝ＮＲ'"）－ＮＲ'Ｒ"）を形成させる置換基として、グアニジン基（－ＮＨ－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$）あるいは、Ｒ，Ｒ'，Ｒ"，Ｒ''，がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の4つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0044] ウレア基を形成する置換基としては、アミノカルバモイル基（－ＮＲ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ'Ｒ"）が挙げられる。Ｒ，Ｒ'，Ｒ"はそれぞれ水素原子、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の3つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0045] またB原子由来の官能基として、アルキルボラン（－ＢＲ（Ｒ'））やアルコキシボラン（－Ｂ（ＯＲ）（ＯＲ'））などが挙げられる。これらの2つの置換基はアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などの中から、任意の2つあるいは同一の置換基を2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0046] このように、ハロゲン基等通常低分子化合物にて利用される0原子、N原子、S原子、B原子、P原子、Si原子、ハロゲン原子が含まれる様々官能基が1つあるいは2つ以上付与されていてもよい。つまり、これら置換基の1つに示されるアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基にさらに別の置換基が1つ以上付与されていても良い。これら全てを満たす官能基の条件を、自由に置換基を選択することと定義する。βやγ—アミノ酸の場合にも任意の立体配置が、α_アミノ酸の場合と同様に許容され、その側鎖の選択も特に制限なくα_アミノ酸の場合と同様である。また、アミノ酸の主鎖アミノ基部位はフリー(NH_2基)でもよく、N—メチル化などのN—アルキル化(NHR基:Rは自由に置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基を示し、またプロリンのようにN原子から出た炭素原子とα位からの炭素原子が環を形成していてもよい。置換基としては、自由に選択することが可能であり、たとえばハロゲン基、エーテル基、ヒドロキシル基などが挙げられる。)されていてもよい。

[0047] 本明細書では、「翻訳アミノ酸」又は「翻訳可能なアミノ酸」とは、「アミノ酸」のうち、翻訳させることのできる側鎖を有するものを指す。以下明細書で述べるとおり、ハロゲン基、ヒドロキシル基(—OH)、アルコキシ基(—OR)、エステル基(—C(=O)-OR)、チオエステル基(—C(=O)-SR)、カルボキシル基(—CO_2H)、アミド基(—CO—NRR"または_NR—CO—R')、チオール基(—SH)、アルキルチオ基(—SR)、スルホキシド基(—S(=O)-R)、スルホン基(—SO_2_R)、アミノ基(—NH_2)、モノ置換アミノ基(—NHR)、ジ置換アミノ基(-NRR')、アジド基(—N_3)、ニトリル基(—CN)、アミジノ基(-N-C(=N)_NH_2)などによって1つ以上置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アラルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基を有するL型のαアミノ酸や、N—メチル化され

たＬ型のαアミノ酸、Ｎ＿エチル化やＮ—プロピル化などのＣ１～Ｃ４アルキル置換やＮ—ベンジル化などのＮ—アラルキル置換されたダリシン誘導体や、チオール基などの反応補助基を有する置換基ゃアミノ基などの三角ユニットや交差ユニットに活用できる反応性の高い様々な官能基を有するＬ型のαアミノ酸などが含まれる。また、Ｄ—チロシンなど一部のＤ型のαアミノ酸やβ—アラニンなどのβアミノ酸や、α＿メチル一アラニン (Ａｉｂ) などのα、α—ジアルキルアミノ酸なども含まれる。

[0048] 本明細書では、「ドラックライクなアミノ酸」とは『アミノ酸」と同一の骨格、すなわち、α、βおよびァアミノ酸であり、主鎖アミノ基 (NH_2基) の水素原子２つのうちの１つ、およびメチレン基 (＿CH_2＿基）の水素原子のうち１つあるいは２つはアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などで置換されてもよい。CH_2基の水素原子が上記の基によって置換された基を側鎖とする。これら置換基は、さらにドラックライクなペプチド化合物の構成要素として機能する置換基で置換されたものも含まれる。これらは、好ましくは別途上述で定義した置換基の中から選択され、例えば、ヒドロキシル基 (＿ＯＨ)、アルコキシ基 (＿ＯＲ)、アミド基 (—ＮＲ—ＣＯ—Ｒ'もしくは—Ｃ０—ＮＲＲ')、スルホン基 (—Ｓ０２—Ｒ)、スルホキシド基 (＿ＳＯ＿Ｒ)、ハロゲン基、ヒドロキシルアミノ基 (一ＮＲ—ＯＲ')、アミノヒドロキシ基 (—０—ＮＲＲ') などの中から選択される１つ以上の置換基によって置換されていてもよい。また、L型アミノ酸およびD型アミノ酸、α、α—ジアルキルアミノ酸に対応するものいずれでもよい。ドラックライクなアミノ酸は、翻訳可能な必要は必ずしも無い。 翻訳アミノ酸」から得られたペプチドの側鎖部分 (例えばD—チロシンにてヒット化合物が取得された場合には、そこから化学修飾させたD型のアミノ酸、β—アラニンにてヒット化合物が取得された場合には、そこから化学修飾させたβ—アミノ酸）、あるいはNメチルアミノ酸の化学変換によるN置換部分の構造最適化により化学的に合成し得る全てのアミノ酸を含む。これらのアミノ酸はドラックライクなペプチド化

合物の構成要素として機能するため、翻訳後に実施する化学修飾によって得られるペプチド化合物がドラックライクとなるような範囲から選択される。以下にて述べるとおり、例えばアミノアルキル基を有するリジンは、アミノ基が翻訳後修飾に関与しない場合にはドラックライクなアミノ酸には含まれない。しかしながら、リジンのアミノ基を翻訳後修飾の反応性官能基として活用する場合(例えば交差ユニット)にはリジンユニットをドラックライクなアミノ酸のユニットとして含む。このように、「ドラックライクなアミノ酸」に該当するかどうかは、翻訳後の修飾によって変換された後の官能基にて判断される。このような置換基になり得る例として、別途上で定義した置換基の中から、例えばエステル基(—CO—OR)、チオエステル基(_C0—SR)、チオール基(_SH)、あるいは保護されたチオール基、アミノ基(_NH2)、モノ置換アミノ基(_NH_R)あるいはジ置換アミノ基(_NRR')、あるいは保護されたアミノ基、置換スルホニルアミノ基(-NH-S02-R)、アルキルボラン基(_BRR')、アルコキシボラン基(_B(OR)(OR'))、アジド基(_N3)、ケト酸基(_CO_C02H)、チオカルボン酸基(—CO—SH)、ホスホリルエステル基(-CO-PO(R)(R,))、アシルヒドロキシルアミノ基(—NH—0—C0-R)などが挙げられる。

[0049] 本発明のアミノ酸類縁体とは、好ましくはα—ヒドロキシカルボン酸を意味する。α—ヒドロキシカルボン酸の側鎖は、アミノ酸と同様水素原子以外にも様々な置換基を有していてもよい(自由な置換基を有していてもよい)。α—ヒドロキシカルボン酸の立体構造はアミノ酸のL型でもD型に対応するものでもよく、側鎖の選択には特に制限を設けないが、例えば自由に置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基などの中から自由に選択される。置換基の数は1つに限定されず、2つ以上有していてもよい。例えば、S原子を有し、さらにアミノ基やハロゲン基などの官能基を有していてもよい。

[0050] 本明細書では、 翻訳アミノ酸類縁体」又は 翻訳可能なアミノ酸類縁体」とは、 『アミノ酸類縁体」のうち、翻訳させることのできるアミノ酸類縁体を意味する。具体的には、例えば、Ｌ型アミノ酸の主鎖アミノ基がヒドロキシル基に置き換わった化合物が挙げられる。Ｌ＿ Lact ic acid、α＿ ヒドロキシ酢酸、ＬもしくはＤ＿ pheny LLact ic acidなどが挙げられる。また、 「ドラックライクなアミノ酸類縁体」とは 『アミノ酸類縁体」のうち ドラックライクなペプチド化合物の構成要素として機能するものであれば特に限定されない。この範囲は上述の ドラックライクなアミノ酸の側鎖あるいはＮ置換部分の定義と同様である。具体的には、例えば、ＬもしくはＤ＿ Lact ic acid、もしくはその側鎖メチル基に様々な ドラックライクな置換基 (例えば、ハロゲン基、ヒドロキシル基、置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、ヘテロアリール基など)が付与された化合物、α—ヒドロキシ酢酸、ＬもしくはＤ＿ pheny LLact ic acid、もしくはその側鎖ベンジル基に様々な ドラックライクな置換基 (例えば、ハロゲン基、ヒドロキシル基、置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、ヘテロアリール基など)が付与された化合物などが挙げられる。また、 ドラックライクなアミノ酸類縁体は、翻訳可能な必要は必ずしも無い。 翻訳アミノ酸類縁体」を翻訳後に化学修飾によって、ペプチド化合物が ドラックライクとなるような場合には、当該アミノ酸類縁体も 「ドラックライクなアミノ酸類縁体」に含まれる。そのようなアミノ酸類縁体としては、例えば、側鎖にＳＨ基が付与されたα—ヒドロキシカルボン酸や側鎖にアミノ基、あるいは保護されたアミン部位が付与されたα—ヒドロキシカルボン酸が挙げられる。例えば、ＳＨ基は、翻訳後修飾後に、脱硫反応によって除去することが可能であり、アミノ基は翻訳後修飾によりアミド等に変換させることができる。個別例として、Ｒ＿ 2 —hydroxy— 3 —su Lfany Lpropano ic acidなどが挙げられる。

[0051] 本発明のN末端カルボン酸類縁体とはアミノ基とカルボキシル基とを同時に

持ち、両者の間の原子数が3つ以上の化合物、アミノ基を持たない様々なカルボン酸誘導体や、2残基ー4残基から形成されるペプチド、主鎖アミノ基がカルボン酸とのアミド結合などで化学修飾されたアミノ酸でもよい。また、曲線部での環化に使用できるホゥ酸やホゥ酸エステル部位を有していてもよい。また、二重結合部位や三重結合部位を有するカルボン酸でもよく、ケトンやハライドを有するカルボン酸でもよい。なお、これらの化合物も規定した官能基以外の部分は、置換されてもよいアルキル基、アラルキル基、アリール基、シクロアルキル基、ヘテロアリール基、アルケニル基、アルキニル基などの中から幅広く選択 (自由な置換基) される。

[0052] 本明細書では、 翻訳N末端カルボン酸類縁体」又は 翻訳可能なN末端カルボン酸類縁体」とは、 「N末端カルボン酸類縁体」のうち、翻訳させることのできるN末端カルボン酸類縁体を意味する。具体的には、例えば、2重結合とカルボン酸がアルキル基で接続された化合物 (プタ_3—エン酸、ペンタ_4—エン酸など)、N末端がアセチル化などでアミド化されたL型アミノ酸 (Ac—Phe, Ac_Ala, Ac—Leuなど)、OH基がアルキル化されたα—ヒドロキシカルボン酸誘導体やジペプチド、トリペプチドなどが挙げられる。また、 「ドラックライクなN末端カルボン酸類縁体」とは 「N末端カルボン酸類縁体」のうち ドラックライクなペプチド化合物の構成要素として機能するものであれば特に限定されない。これらの置換基は ドラックライクなアミノ酸の側鎖で定義した置換基と同一のものが含まれる。具体的には、例えば、2重結合とカルボン酸がアルキル基で接続された化合物 (プタ—3—エン酸、ペンター4—エン酸など)のうち、炭素原子から ドラックライクな範囲で置換基が付与された化合物、N末端がアセチル化などでアミド化されたL型アミノ酸 (Ac-Phe, Ac-Ala, Ac—Leuなど)のうち、アセチル基あるいは側鎖あるいはα位の水素原子が ドラックライクな範囲で置換された化合物、0H基がアルキル化されたα—ヒドロキシカルボン酸誘導体のうち、OH基のアルキル基やヒドロキシカルボン酸の側鎖やα位の水素原子などが ドラックライクな範囲で置換された化合物、 ドラックライク

な範囲で置換されたジペプチド、トリペプチドなどが挙げられる。また、ドラックライクなN末端カルボン酸類縁体は、翻訳可能な必要は必ずしも無い。翻訳N末端カルボン酸類縁体」を翻訳後に化学修飾によって、ペプチド化合物がドラックライクとなるような場合には、当該N末端カルボン酸類縁体も「ドラックライクなN末端カルボン酸類縁体」に含まれる。そのようなN末端カルボン酸類縁体としては、例えば、N末端にアミノ基が残存したままのジペプチド、アーアミノカルボン酸、δ—アミノカルボン酸など挙げられる。

[0053] ペプチド化合物の膜透過性

本発明のペプチド化合物が良好な膜透過性を有するためには、ペプチド化合物中に含まれる総アミノ酸数が13以下であることが好ましい。

それぞれのユニット(アミノ酸残基)の選択に特に制限はないが、翻訳後化学修飾が全て完了した形式の分子の形(主鎖構造)に考慮し直して、形成される分子のCLogP(コンピューターで計算した分配係数であって、Day U ght Chemical Informat ion Systems, Inc. 社のDay U ght Vers ion 4.9を用いて計算した)が6を超えるように選択することが好ましい。特に良好な膜透過性を確保するために、CLogPは8を超え、15を超えないように選択することが好ましい。

[0054] 膜透過性を確保するために、より好ましくはアミノ酸側鎖の選択としては、ドラックライクな置換基の中から選択される。例えば、置換されていてもよいアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アラルキル基、アリール基、ヘテロアリール基の中から、例えば置換基としてハロゲン基、水酸基(_OH)、アミド基(_CO-NRR'あるいは—NR-CO-R')、スルホン基(_SO_2_R)、エーテル基(_OR)などが付与されたものがよい(R、R'は同様にこれらで置換されてもよいアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から選択される)。アリール基、アラルキル基のアリール基部位としては、フエニル基の他、ピリジン基などの塩基性基、チアゾール基などの2つ以上のヘテロ原子含有基、イミダゾール基などの水素

原子 ドナー、インドール基などの縮合芳香環も許容される。

[0055] 一方、膜透過性を獲得するために好ましくない極性官能基としては生体中(pH= 7 付近)で極度にイオン化される官能基であるアルキルアミノ基やアルキルグアジニノ基などが挙げられ、これらの官能基が含まれないことが好ましい。

[0056] 膜透過性を獲得する目的で、ペプチド化合物を構成するアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体としてN—メチル化やプロリンのようなα位炭素原子との環化などのN—アルキル化されたものを用いてもよく、その数が1つのペプチド分子あたり2個以上存在することが好ましい。また、1つのペプチド分子あたり、N—アルキル化されていないアミド結合が、少なくとも1個は存在することが好ましい。望ましくは、1つのペプチド分子あたり、N—アルキル化されたものが3個以上存在し、N_アルキル化されていないものが3個以上存在することが好ましい。このN—アルキル化とは、NH以外の化学修飾を全て含み、従って、置換されてもよい(置換基の選択は、上の膜透過性を確保するためのアミノ酸側鎖の置換基と同様)アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から選択されるものとする。また、N—アルキル化とはプロリンのように、N原子とα炭素との間で環構造を形成するものも含まれる。

[0057] ペプチド化合物のC末端部位はカルボン酸のままではなく、化学修飾されることがより好ましい。例えば、カルボン酸部位をピペリジンなどと反応させたピペリジンアミドなどの置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基アミド化合物(—CO—NRR' :のRとR'の1つが水素原子で、他方が化学修飾されてもよく、RとR'の両方が化学修飾されていてもよく、RとR'が環を形成して、例えばピペリジンアミドのように化学修飾されていてもよい。また、RとR'がともに水素原子でもよい)への変換や、カルボン酸基をメチル基やトリフルオロメチル基などの置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基

などの様々な非イオン性官能基に変換させることが好ましい。置換基の選択は、上の膜透過性を確保するためのアミノ酸側鎖の置換基と同様である。また、ペプチド化合物を構成するアミノ酸は、翻訳合成された化合物を最適化することもできる。また、得られたペプチド化合物を構成するアミノ酸は、翻訳合成されるものに限定されるものではない。

[0058] ここで最適化とは、「翻訳アミノ酸」から翻訳合成された化合物中のそれぞれのアミノ酸の構造を変換させることにより、よりドラックライクなペプチド化合物となるように化学修飾する、より薬効標的に強い活性を有するペプチド化合物となるように化学修飾する、及び/又は、より毒性が回避されたペプチド化合物となるように化学修飾することを意味する。ここで、回避すべき、あるいは回避した方が好ましい毒性として、例えば、hERG阻害（心臓八の毒性）、AMES試験（癌原性試験）、CYP阻害（薬物間相互作用試験）、CYP誘導、GSH結合能測定試験（ダルタチオンによるペプチドあるいはペプチド代謝物の共有結合形成試験）、などが挙げられる。これらの試験では、薬効本体のペプチド化合物そのものと、その代謝産物の両方が関与する場合が考えられ、特にAMES試験、CYP誘導、GSH結合能測定試験で陰性結果を確保するためには、共有結合を生成する可能性がある代謝産物を避けることが好ましい。このため、ディスプレイライブラリー中の全てのペプチド化合物に含まれる環化部位がこのような可能性のある官能基を形成しない、特に酸化反応に対してある程度の安定性を有する環化反応で環化されることが好ましい。例えば多くの低分子化合物で実施されている通り、フエニルァラニンが翻訳アミノ酸として同定された場合、フエニル基にアルキル置換、ハロゲン置換など様々な化学修飾が可能である。このような変換は、翻訳合成された化合物の3次元構造を大きく損なうことなく実施できる点で従来の天然ペプチドのN-メチル化や環化による化学修飾とは大きく異なる。なおかつ、天然ペプチドでは多くの場合、極度にイオン化されたアルギニンやリジン残基が活性に寄与することが多いため、これらを容易にドラックライクな官能基に変換させるのが困難であるのに対し、本技術を駆使

すれば予めドラックライクな官能基のみで限定された官能基が薬効標的に対する活性を獲得し、ドラックライクな環化法で環化されているため、低分子化学で通常実施するような化学修飾が施され、低分子化学と同様な確度と成功率で臨床候補化合物を獲得することができる。一方、脂溶性の指標であるCLogP値は、最適化の過程で容易に調整することができる。また、通常低分子化合物の最適化でも実施するアルキル化やハロゲン化により、標的に対する結合活性を高めることができる。通常10倍～50倍の活性向上が期待できる。これらの通常の変換は、同時にCLogP値を高めることもできる。例えばクロロ化にて約0．7、メチル化にて約0．5程度を高めることができる。極度にイオン化された官能基を有する場合、最適化の過程でCLogP値を高めても、優れた膜透過性を得るには不十分であるが、極度にイオン化された官能基を有しない場合、最適化の過程で膜透過に十分なCLogP値を得ることができる。従って、例えば平均のCLogP値が6付近のディスプレイライブラリーから、CLogP値が5のヒット化合物が得られた場合、更にCLogP値を高めて、膜透過に最適な範囲の8～15の範囲へと最適化することは十分可能であると判断できる

[0059] 本発明のペプチド化合物の膜透過性の確認は、公知の方法、例えば、ラット腸管法、培養細胞 (Caco-2, MDCK, HT-29, LLC-PK1 など) 単層膜法、Immobi Lized Art if icial Membrane chromatography (固定化人工膜クロマトグラフィー) 法、分配係数を用いる方法、リボソーム膜法、PAMPA(Para LLeL Art if iciaL Membrane Permeat ion Assay) 法等を用いて確認することができる。具体的には、例えばPAMPA法を用いる場合、Ho Lger Fischer らの文献 (非特許文献：H．Fischer et. aL. Permeat ion of permanent Ly pos itive charged mo Lecu Les through art if icial membranes- inf Luence of phys ic- chem icaL propert ies. Eur J. Pharm. Sci. 2007, 31, 32-42) の記載に従って確認することができる。より具体的には、実施例19-2に記載の方法に従って確認することができる。

[0060] 経口医薬品として膜透過性を有するヒドロクロロジアジド、フロセミド及

びメトプロロールの膜透過性をPAMPA法で測定した時のiPAMPA Pe値はそれぞれ0.6X 10-6、1.5X 10-6及び2.9X 10-5である。本発明のペプチド化合物の膜透過性は、例えばPAMPA法で測定したときのiPAMPA Peの値が、通常1.0 x 10-6以上である場合に医薬品として使用可能な膜透過性を得ることができたと考えることが可能であり、1.0x 10-6以上であることが好ましく、1.0X 10-5以上であることがより好ましく、1.5X 10-5以上であることが特により好ましく、2.0X 10-5以上であることが更により好ましい。

[0061] ·ペプチド化合物の代謝安定性

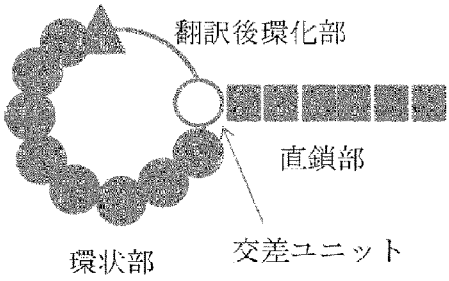
本発明のペプチド化合物が良好な代謝安定性を有するためには、ペプチド化合物中に含まれる総アミノ酸数が9以上であることが好ましく、11以上であることがより好ましい。総アミノ酸数が9以上のペプチド化合物であれば、上述の膜透過性を有するための条件は、当該ペプチド化合物の代謝安定性に影響しない。

[0062] 本発明のペプチド化合物の代謝安定性の確認は、公知の方法、例えば、肝細胞、小腸細胞、肝ミクロソーム、小腸ミクロソーム、肝S9等を用いて確認することができる。具体的には、例えば、肝ミクロソーム中のペプチド化合物の安定性をLL von Mo Ltke らの文南犬(Midazo lam hydroxy Lat ion by hum an Liver Microsomes in vitro: inhibit ion by f luoxet ine, norf Luoxet ine, and by azo Le ant if unga L agents. J CLin Pharmaco l, 1996, 36(9), 783-791)の記載に従って測定することで確認することができる。より具体的には、実施例18-2に記載の方法に従って確認することができる。

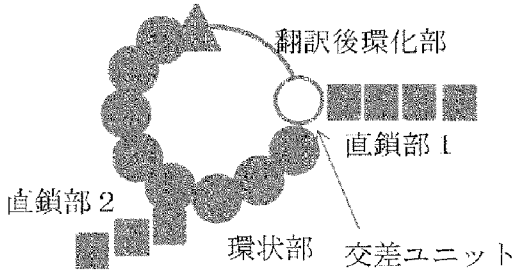
[0063] 代謝安定性は、例えば肝ミクロソーム中の安定性を上述の方法に従って測定した時の、肝固有クリアランス(CL h int(μL/min/mg prote in))の値が、150以下である場合に経口剤の医薬品として使用可能な代謝安定性を得ることができたと考えることが可能であり、好ましくは100以下である。CYP3A4により代謝される薬物の場合、ヒトにおける小腸代謝を回避するためには78以下(作特許文南犬:M. Kato et aし The intest inal f irst-pass metabo Lism of substances of CYP3A4 and P-g Lycoprote in-quant itat ive ana lys is

based on information from the literature. Drug Metab. Pharmacokinet. 2003, 18(6), 365-372. ）であることが好ましく、ヒトにおいて約３０％以上のバイオアベイラビリティを示すためには３５以下 (ＦａＦｇ＝１、タンパク結合率０％を仮定）であることが、より好ましい。

[0064] スキームＡ



スキームＡ—1



スキームＡ—2

[0065] 撮聽 は れ め 。チ ほ 合物の製造方法

本発明の環状部を有するペプチド化合物は、以下に記載の方法を利用して製造することが可能である。

例えば、以下の製造方法を含む製造方法を挙げることができる。

１）アミノ酸残基及び/ 又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、ァミノ酸残基及び/ 又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、C末端側に側鎖の１つに反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、N末端側にもう1つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含む、工程 ;

２）N末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、C末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させ、アミド結合又は炭素-炭素結合を形成させる工程

を含む、前記方法。

本発明の翻訳合成には、公知の方法を利用することができる。

[0066] 翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

本来は、一般的に翻訳開始アミノ酸としてメチオニンをN末端アミノ酸として翻訳されるが、他の所望のアミノ酸をアミノアシル化した翻訳開始tRNAを用いて翻訳させることによってN末端を所望のアミノ酸として翻訳させる方法を使用することもできる。非天然アミノ酸のN末端導入ではアミノ酸の許容度が伸長時よりも高く、天然型アミノ酸と大きく構造の異なるアミノ酸、アミノ酸類縁体を利用することが知られている（非特許文献：J Am Chem Soc. 2009 Apr 15;131(14):5040-1. Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides. Goto Y, Suga H.）。例えば、本発明において、メチオニン以外の翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なN末端カルボン酸誘導体をN末端に導入する方法としては、以下の方法がある。翻訳開始tRNAとして、三角ユニットをアシル化したtRNAをメチオニン、フオルミルドナーもしくはメチオニルトランスフエラーゼを抜いた翻訳系に添加し、翻訳開始コドン（例えばATG）に三角ユニットをコードさせ翻訳させることによって末端を三角ユニットとする環化前のペプチド化合物又はペプチド化合物ライブラリーを構築する。アンチコドンがCAUでない翻訳開始tRNAと当該アンチコドンに対応するコドンの様々な組み合わせを翻訳開始tRNA及び開始コドンの組み合わせとして利用するとN末端に多様性をもたせることが可能である。つまり、アンチコドンの異なる複数種類の翻訳開始tRNAに所望のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体をそれぞれアミノアシル化し、これに対応するコドンを開始コドンとしたmRNA又はmRNAライブラリーを翻訳させることによってN末端残基が一種類に限定されない環化前のペプチド化合物又はペプチド化合物のライブラリーを作製することができる。具体的には例えば、Mayer C, et al. Anticodon sequence mutants of Escherichia coli initiator tRNA: effects of overproduction of aminoacyl-tRNA synthetases, methionyl-tRNA formyltransferase, and initiation factor 2 on activit

y in initiation. Biochemistry. 2003, 42, 4787-99. (CAU以外のanticodonを持つ開始tRNAの変異大腸菌によるf-Met以外のアミノ酸からの翻訳開始と同codonを途中に含む蛋白の発現。)に記載の方法を用いて環化前のペプチド化合物又はペプチド化合物ライブラリーを作製することができる。

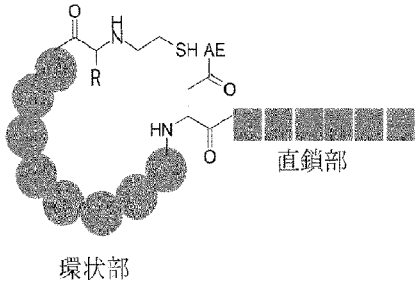
[0067] また、N末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、C末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させる方法としては、例えば、N末端側の側鎖にアミノ基と反応補助基を有する、アミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体と、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基をアミド結合させて環状化合物を得る方法、N末端アミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体にアミノ基を有し、これと活性エステル基を側鎖に有するァミノ酸残基又はアミノ酸残基をァミド結合させて環状化合物を得る方法、N末端のアミノ酸残基、N末端のアミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、側鎖に1つの反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体の反応点とを炭素-炭素結合させる方法などが挙げられる。また、上記の例に限定されず、例えば、N末端側のアミノ酸残基、N末端側のアミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸側に活性エステル基を有し、C末端側の側鎖にァミノ基(反応補助基を有してもよい)をアミド結合させるなど、上記と逆の官能基配置にしてもよい。

[0068] 以下にアミド環化を利用する場合を例にした反応設計を述べる。三角ユニットの反応させたいァミノ基と反応させたくない塩基性官能基との反応選択性を獲得するためには反応させたいアミンの反応性をその他の官能基に対して向上させる必要がある場合があり得る。通常ァミンより活性化させる手法として、例えば、ァミン近傍に反応補助基を導入することが可能である。反応補助基としてはRNAが反応しない程度にアミンを活性化できるものであれば特に限定されないが、例えば末端ァミンからメルカプトエチル基やメルカプトプロピル基を導入することも可能であり、また、システィンのように、ァミンのα位からチオール部位を位置させることも可能である(スキーム

Ｃ参照）。これらのチオール基は翻訳導入の過程では、保護されていても、保護されていなくてもよいが、反応時もしくは事前に必要に応じて脱保護反応によりチオール基を生成させる。このように活性化されたアミンとカルボン酸活性エステルとの反応により望みの位置でのアミド環化されたペプチドが得られる。得られた環状ペプチドのＳＨ基をＴＣＥＰ（トリス（2—カルボキシルエチル）ホスフィン）とＶＡ—０４４（２，２'—アゾビス—２—（２_イミダゾリン_２_イル）プロパン）などの試薬を加えるＲＮＡが反応しない温和な反応条件で脱硫させることができる。

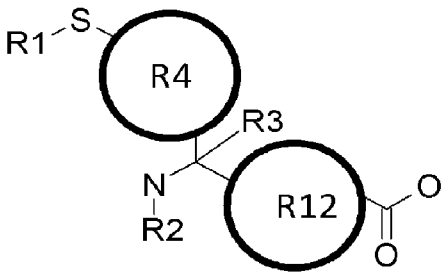
[0069] 翻訳によりディスプレイライブラリーを実施する場合、翻訳導入させる交差ユニットの活性エステルとしてはチオエステルが好ましい。反応補助基にＳＨ基を用いる場合、例えば次のような組合せで行われる。ＳＨ基を無保護の状態で翻訳合成させる場合には、交差ユニットであるチオエステルとしてアスパラギン酸誘導体を用いることが好ましい。この場合、全ての黒丸ユニットと四角ユニットは翻訳アミノ酸や翻訳アミノ酸類縁体の中から任意に選択され得る。一方、ＳＨ基に保護基を有する状態で翻訳合成させる場合には、アスパラギン酸チオエステルのＣ末端側となりの四角ユニットはＮ—アルキル化されたアミノ酸（例えばプロリンや、Ｎ—メチルアラニンなど）の中から選択されることが好ましい。

[0070] スキーム C

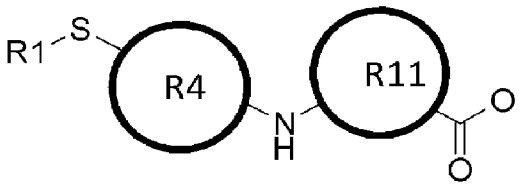


スキーム C. 三角ユニットに活性化アミン、交差ユニットにアスパラギン酸および活性エステルを導入した場合の環化前翻訳化合物例。A-1 の具体例の１つ。Rはアミノ酸側鎖、AEはOHあるいは活性エステル

[0071]



化合物N—1



化合物N—2

[0072] 一般式として、三角ユニットとしてのアミン近傍に反応補助基を有するアミノ酸、N末端カルボン酸類縁体、例えばN末端アミノ酸の例として、化合物N- 1あるいはN—2のように書くことができる。これら化合物N—1およびN—2の置換基は、好ましくは、これらのRで表わされる置換基のうち、保護基 (R 1、R 2 3あるいは トリチル基など)以外で使用される置換基は上述で定義した ドラックライクなアミノ酸の側鎖の定義と同様である。また、それらが導入された結果得られた化合物が翻訳合成され得るものがより好ましいが、その誘導体そのものが翻訳合成されなくても、その類縁体が翻訳合成されるものも含まれる (後述の段落 (たとえば3つ後ろの段落)を参照)。

[0073] R 1は水素原子、もしくはS—R 2 3基、あるいはC (Phe)$_3$基 (トリチル基)などで表わされるS H基の保護基の中から選択される。R 2 3はメチル基、エチル基、イソプロピル基、t e r t _ プチル基などのアルキル基、フエニル基、p _ トリフルオロメチルフエニル基、p—フルオロフェニル基のようなアリール基、ベンジル基、フエネチル基などのアラルキル基、ヘテロアリール基、アルケニル基、アルキニル基などから選択される。これらの基は、結果として得られる化合物N _ 1あるいはN _ 2が翻訳合成可能となる置換基の中から選択される。例えばジメチルアミノ基によってR 2 3のエチル基が置換された、N , N—ジメチルアミノエチルメルカプト基などでもよい。R 1が保護基を有している場合 (H原子以外の場合)、選択される保護基は、翻訳合成が可能な保護基の中から選択され、かつ翻訳合成液中で脱保護され、環化させる前に水素原子となるものであれば、特に限定されず

選択することができる。S_R23基のような保護基は翻訳合成液中でゆっくりと脱保護されるため、積極的に脱保護条件を別途定める必要なく脱保護させることができる。必要に応じて本明細書記載の様々な反応条件にて脱保護剤を添加させることができる。 (SH基の保護基記載。)

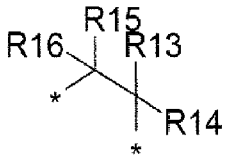
[0074] R2、R3はドラックライクなアミノ酸の側鎖の定義と同様に定義される。たとえば、R2、R3は、好ましくは、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、もしくはシクロアルキル基を示し、またはR2とR3が環を形成した置換基、またはR2もしくはR3がR4と環を形成した置換基を示す。さらに好ましくは水素原子、あるいはC1—C4アルキル基、アルコキシ基、ハロゲン基などで置換されてもよいC1—C4アルキル基などから選択される。なお、R3基の立体はL型アミノ酸、D型アミノ酸に対応するもの両方が許容される。好ましくはR3基の立体は、R3基が水素原子と仮定した場合のL型アミノ酸に対応するものがよい。

[0075] R4は、S(硫黄)原子とアミノ酸部位を連結するユニットである。以下その代表的構造を示す。両ユニットを置換されていてもよいメチレン基 (部分構造N_3、C1ユニット)、置換されてもよいエチレン基 (部分構造N_4、C2ユニット)、置換されてもよいプロピレン基 (部分構造N_5、C3ユニット)などのC1~C6ユニットで連結させることができる。置換されていてもよいメチレン基、エチレン基、プロピレン基における置換基の例としては、たとえば、R13がメチル化された (R14=H)化合物N_1や、R13=R14=Meのようにジメチル化された化合物N_1などが挙げられる。これらのうちで、その誘導体のどれかが翻訳合成される場合、その他の誘導体は、仮に翻訳合成されなくても全てこの定義に含まれる。例えば、R13=R14=Hが翻訳合成される場合には、R13=R14=Meのような誘導体が、仮に翻訳合成されない場合でも、これらの置換基はドラックライクアミノ酸側鎖の定義に含まれるため三角ユニットとして含まれる。R13、R14、R15、R16、R17、R18、R19、R20、

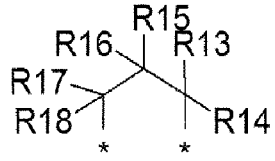
Ｒ２１、Ｒ２２らも、Ｒ４と同様の定義であるが、例えば、水素原子、Ｃ１～Ｃ４アルキル基、アルコキシ基、ハロゲン原子などで置換されてもよいＣ１～Ｃ４アルキル基から選択される。これらの間で環化構造となっていてもよい。特に好ましくは、水素原子、メチル基から選択される。また芳香族化合物のアリール炭素から直接連結させることもできる（部分構造Ｎ—６）。またアラルキル構造で連結させることもできる（部分構造Ｎ＿７、Ｎ-８）。部分構造N-7では、２価のうち、どちらが窒素原子側であっても、硫黄原子側であってもよい。下スキームでは、連結位置をオルトに限定したが、オルトに限定されずメタ、パラなども可能である。アリール基としてフエニル基で示したが、フエニル基はハロゲン基やアルコキシ基やトリフルオロメチル基などの置換基により置換されていてもよく、またフエニル基以外のアリール基（すなわち、ヘテロアリール基を含む様々な芳香環）を用いてもよい。

[0076]

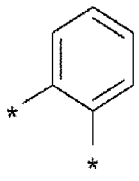
部分構造Ｎ－３



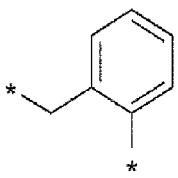
部分構造Ｎ－４



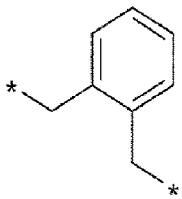
部分構造Ｎ－５



部分構造Ｎ—６



部分構造Ｎ—７

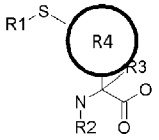


部分構造Ｎ—８

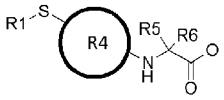
[0077] Ｒ１１、Ｒ１２もＲ４と同様な部分構造から選択される。例えば部分構造Ｎ—３、Ｎ—４、Ｎ—５、Ｎ—６、Ｎ—７、Ｎ—８の中から選択することができる。$_{R1}$2は$_{C0}$ユニット（連結部位は直接結合している場合）も含むことができる。

[0078] 化合物構造Ｎ—１および化合物構造Ｎ—２の好ましい構造式を、化合物構造Ｎ＿９、Ｎ＿１０、Ｎ＿１１、Ｎ-１２に示す。化合物Ｎ＿９では、化合物Ｎ＿１のＲ１２部位がＣＯユニットで連結部位が直接連結している。化合

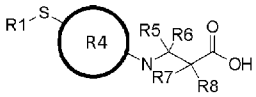
物Ｎ＿１０では、化合物Ｎ＿２のＲ１１部位がＣ１ユニット（部分構造Ｎ-３に対応）で連結している。化合物Ｎ—１１では、化合物Ｎ—２のＲ１１部位がＣ２ユニット（部分構造Ｎ—４に対応）で連結している。化合物Ｎ—１２では、化合物Ｎ＿２のＲ１１部位がＣ３ユニット（部分結合Ｎ＿５に対応）で連結している。



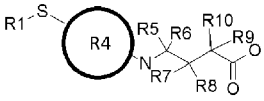
化合物Ｎ—９



化合物Ｎ—１０



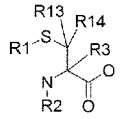
化合物Ｎ—１１



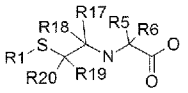
化合物Ｎ—１２

Ｒ５～Ｒ１０は、前記Ｒ１３～Ｒ１８の定義と同様である。

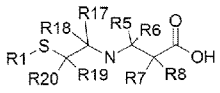
[0079] さらに、これらの望ましい構造式を以下化合物Ｎ—１３、Ｎ＿１４、Ｎ-１５、Ｎ＿１６、Ｎ＿１７、Ｎ＿１８、Ｎ＿１９、Ｎ＿２０に示す。化合物Ｎ＿１３では、化合物Ｎ＿９のＲ４部位がＣ１ユニット（部分構造Ｎ＿３に対応）で連結されている。化合物Ｎ—１４では、化合物Ｎ＿１０のＲ４部位がＣ２ユニット（部分構造Ｎ—４に対応）で連結されている。化合物Ｎ—１５では、化合物Ｎ＿１１のＲ４部位がＣ２ユニット（部分構造Ｎ＿４に対応）で連結されている。化合物Ｎ—１６では、化合物Ｎ—１２のＲ４部位がＣ２ユニット（部分構造Ｎ—４に対応）で連結されている。化合物Ｎ—１７では、化合物Ｎ—９のＲ４部位がＣ２ユニット（部分構造Ｎ—４）で連結されている。化合物Ｎ—１８では、化合物Ｎ—１０のＲ４部位がＣ３ユニット（部分構造Ｎ—５）で連結されている。化合物Ｎ—１９では、化合物Ｎ—１１のＲ４部位がＣ３ユニット（部分構造Ｎ—５）で連結されている。化合物Ｎ—２０では、化合物Ｎ—１２のＲ４部位が、Ｃ３ユニット（部分構造Ｎ—５）で連結されている。



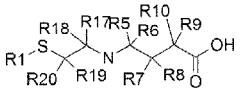
化合物N－ｉ３



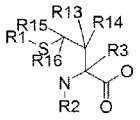
化合物Ｎ—１４



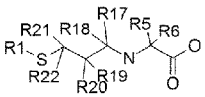
化台物Ｎ—１５



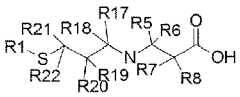
化合物N－１６



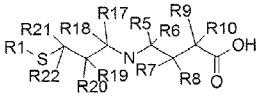
化合物Ｎ—１７



化合物Ｎ—ｉ８



化合物Ｎ—１９



化合物Ｎ—２０

[0080] ここまで一般式化合物Ｎ＿１および化合物Ｎ＿２で表わせる化学構造について述べたが、反応補助基ＳＨを含む三角ユニットの定義としては、これらに限定されない。すなわち、交差ユニットと反応させるユニットであるアミノ基と反応補助基を有しており、翻訳合成可能な構造の中から任意の構造から選択される。アミノ基は主鎖由来でも側鎖由来でもよい。三角ユニットはＮ末端に存在させる必要は必ずしもなく、三角ユニットよりＮ末端側に四角ユニット (直鎖部）が存在していてもよい。ＳＨ基とアミノ基の位置関係がβ（２つの官能基の間に連結原子２つ）、γ（連結原子３つ）など連結原子２～６までの範囲に存在する化学構造が好ましい。より好ましくは、ＳＨ基とァミノ基の位置関係がβあるいはァであることが好ましい。また、三角ユニットに活性エステル官能基を有するユニットが配置されても交差ユニット側にアミンを含むユニットが配置されていてもよい。

[0081] 活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基の一般式として化合物Ｃ＿１のように記すことができる。好ましくは、これらの活性エステル部位を除いた置換基は上述で定義したドラックライクなァミノ酸の側鎖の定義と同様である。その誘導体そのものが翻訳合成されなくても、その類縁体が翻訳合成されるものも含まれる。本願では活性エステルとはァミノ基部位と直接あるいは反応補助基を介して反応させることが可能なカルボン酸誘導体を意味し、そのような性質を有する活性エステルあるいは活性チオエステルであれば特に制限されないものとする。Ｒ２５は水素原子あるいは活性エステル基の中から選択されるものである。活性エステルは、例えば広く一般に使用されているように、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド (ＯＮＳｕ）基、ＯＡｔ基、

ＯＢｔ基などや、メチルチオエステルゃァリールチオエステル、ァラルキルチオエステルなどに代表される。これらの活性エステル部位には通常広く利用されている化合物置換基 (たとえば、置換基としては、反応性を高める目的で使用されることが多いハロゲン基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、ニトリル基などの電子吸引基や、反応をより低めて反応選択性を高める目的で使用されることが多いメトキシ基などのアルコキシ基、メチル基などのアルキル基のような電子供与基、ｔ—ブチル基やイソプロピル基に代表されるかさ高い置換基、水中での実施を受けて、水との親和性を考慮した、スルホン酸基や、ジメチルァミノ基のようなジ置換アミノ基などが挙げられ、逆に親脂性との親和性を考慮した長鎖アルキル基などの高脂溶性基などが挙げられる。) が付与された誘導体であっても、同様の反応性を示すものは全て含まれる。

[0082] Ｒ２およびＲ３は上記ァミン部位で定義したとおりである。

[0083] Ｒ２６はＲ４の定義と同様であり、以下その代表的構造を示す。両ユニットをメチレン基 (部分構造Ｎ＿３）、エチレン基 (部分構造Ｎ＿４）、プロピレン基 (部分構造Ｎ—５）などのＣ１～Ｃ６ユニットで連結させることができる。Ｒ１３、Ｒ１４、Ｒ１５、Ｒ１６、Ｒ１７、Ｒ１８、Ｒ１９、Ｒ２０、Ｒ２１、Ｒ２２では、好ましくは、これら置換基は上述で定義したドラックライクなアミノ酸の側鎖の定義と同様である。その誘導体そのものが翻訳合成されなくても、その類縁体が翻訳合成されるものも含まれる。例えば、水素原子、Ｃ１～Ｃ４アルキル基、ハロゲン原子などで置換されてもよいＣ１～Ｃ４アルキル基から選択される。これらの間で環化構造となっていてもよい。より好ましくは、メチレン基 (Ｃ１ユニット、部分構造Ｎ—３）の他、C4 ユニット、C5 ユニットＣ—６ユニットから選択される。さらに好ましくは、C1ユニット (部分構造N-3) が選択される。また芳香族化合物のァリール炭素から直接連結させることもできる (部分構造Ｎ—６）。またァラルキル構造で連結させることもできる (部分構造Ｎ＿７、Ｎ- ８）。下スキームでは、連結位置をオルトに限定したが、オルトに限定されずメタ、パラなども

可能である。アリール基としてフエニル基で示したが、フエニル基はハロゲン基やアルコキシ基などの置換基により置換されていてもよく、またフエニル基以外のアリール基を用いてもよい。

[0084] 化合物C—1の中で、好ましい構造を化合物C—2に示した。R27は水素原子、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、、置換されてもよいアリール基、置換されてもよいヘテロアリール基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいアルキル基が付与されていてもよいアラルキル基の中から選択される。これら置換基としては、その置換基が選択された結果得られる化合物C_2が翻訳合成され得るものであれば、特に限定されない。たとえば、置換基としては、反応性を高める目的で使用されることが多いハロゲン基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、ニトリル基などの電子吸引基や、反応をより低めて反応選択性を高める目的で使用されることが多いメトキシ基などのアルコキシ基、メチル基などのアルキル基のような電子供与基、t_ブチル基やイソプロピル基に代表される、かさ高い置換基、水中での実施を受けて、水との親和性を考慮した、スルホン酸基や、ジメチルアミノ基のようなジ置換アミノ基、逆に親脂性を考慮した長鎖アルキル基などの高脂溶性基などから選択される。好ましくは、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいアラルキル基から選択される。さらに好ましくは、アルキル基、アリール部位が置換されていてもよいアラルキル基から選択される。

R3はドラックライクなアミノ酸の側鎖の定義と同様に定義されるが、例えばC1—C4アルキル基、ハロゲンなどで置換されてもよいC1—C4アルキル基から選択されるが、特に水素原子が好ましい。なお、R3基の立体はR3基が水素原子と仮定した場合のL型、D型アミノ酸に対応するもの両方が許容されるが、L型アミノ酸に対応するものが好ましい。

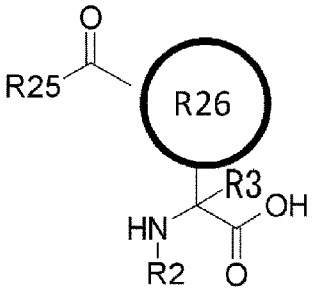
[0085] さらに好ましい構造を化合物C—3に示した。R28およびR29はそれぞれ、ドラックライクなアミノ酸の側鎖の定義と同様に定義されるが、例え

ば水素原子、置換されてもよいＣ１～Ｃ６アルキル基、置換されてもよいＣ２～Ｃ６アルケニル基、置換されてもよいＣ２～Ｃ６アルキニル基、、置換されてもよいアリール基、置換されてもよいヘテロアリール基、置換されてもよいＣ１～Ｃ６アルキル基が付与されていてもよいアラルキル基、置換されてもよいシクロアルキル基の中から選択される。これら置換基としては、たとえば、モノメチル化（Ｒ２８＝Ｍｅ、Ｒ２９＝Ｈ）やジメチル化（Ｒ２８＝Ｒ２９＝Ｍｅ）、モノトリフルオロメチル化（Ｒ２８＝ＣＦ３、Ｒ２９＝Ｈ）などが挙げられる。

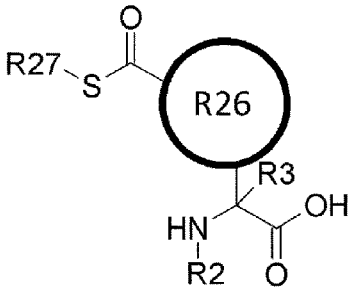
[0086] Ｒ３は水素原子、Ｃ１—Ｃ４アルキル基、ハロゲンなどで置換されてもよいＣ１＿Ｃ４アルキル基などから選択されるが、特に水素原子が好ましい。なお、Ｒ３基の立体はR3基が水素原子と仮定した場合のL型、Ｄ型アミノ酸に対応するもの両方が許容されるが、L型アミノ酸に対応するものが好ましい。

化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3と同様に、化合物C0H-1、化合物C0H—2、化合物C0H—3から選択することもできる。

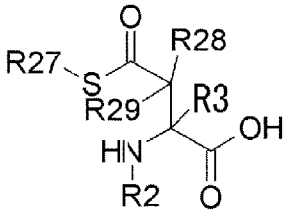
[0087]



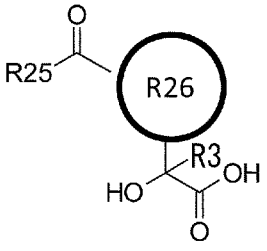
化合物Ｃ－１



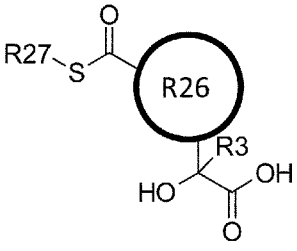
化合物Ｃ－２



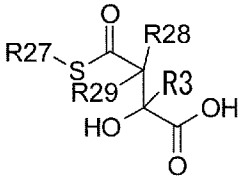
化合物Ｃ－３



化合物COH—１



化合物COH—２



化合物COH—３

[0088] 化合物Ｃ＿２あるいは化合物Ｃ＿３を用いた場合、化合物Ｎ＿１あるいは

化合物Ｎ＿２との反応は温和で選択的に進行させることができる。翻訳液中（例えば、３７℃、ｐＨは７．３付近）でもスムースに反応を進行させることができる。反応補助基の除去もＲＮＡが安定な反応条件で容易に進行させることができる。

[0089] N末端側（三角ユニット）に活性エステルが配置された場合、C末端側（交差ユニット）には反応補助基を有するアミンユニットが配置されてもよい。この場合には、交差ユニットの側鎖にアミノ基とチオール基が配置される。翻訳段階ではこれらは保護されていてもよいが、反応直前には脱保護されている。アミノ基とチオール基は近傍に存在すれば特に限定されないが、両者の関係がβ位あるいはγ位であることが好ましい。

[0090] すなわち、三角ユニットの側鎖にチオエステルなどの活性エステルを有し、もう一方（交差ユニット）に側鎖のアミノ基（近傍にチオールなどの反応補助基を有する）とのアミド縮合反応によりドラックライク環化させる手法も全て本願に含まれ、どちらの官能基が三角ユニットもしくは交差ユニットに配置されていてもよい。

[0091] 以下、反応補助基を有するアミン部位として、化合物Ｎ＿１および化合物Ｎ—２とは異なる構造の具体例を示した。いずれもアミノ基、チオール基は必要に応じて保護されていてもよい。保護基および脱保護反応条件の選択は、本明細書記載の方法を利用することができる。化合物Ｎａ＿１０では図に記載のとおり、アミノ基とチオール基の間に炭素原子が２つ配置させた構造を選択することができる。化合物Ｎａ＿１１では図に記載のとおり、アミノ基とチオール基の間に炭素原子が３つ配置させた構造を選択することができる。Ｒａ２０～Ｒａ２５のどれかにＮａ＿７基、Ｎａ＿８基あるいはＮａ＿９基が置換基として配置される。またＲａ７の定義は既に記載のとおりであるが、化合物Ｎａ＿１０あるいは化合物Ｎａ＿１１の場合に限り、Ｒａ７にもＮａ＿７基、Ｎａ＿８基、Ｎａ＿９基を選択することができる。Ｎａ＿７基、Ｎａ＿８基、Ｎａ＿９基は、Ra_７もしくはRa２０~Ra２５の中のどこか１か所のみに限定されて選択される。Na_７基あるいはNa-８基、Na-９基

が選択された置換基以外のＲａ２０～Ｒａ２５には、水素原子の他、ドラックライクな官能基で置換されてもよいアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などがから選択される。好ましくは水素原子、アルキル基から選択される。

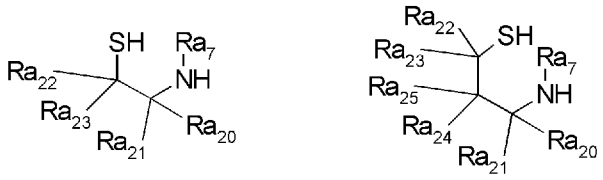
[0092] 三角ユニット（N末端側）にチオエステル基などの活性エステルを有するユニットが選択される場合、それらは例えば化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3の他、化合物Ca_1、化合物C0H_1、化合物C0H_2、化合物C0H-3から選択することができる。化合物C-1などは、環化した後に主鎖アミノ基が保持されてしまうのに対し、化合物Ca_1、化合物C0H_1、化合物C0H_2、化合物C0H-3にはアミノ基が存在しないため、よりドラックライクとなるためより好ましい。この場合には、交差ユニットとして化合物Na_10（Na_7基あるいはNa_8基）や化合物Na_11（Na_7基あるいはNa_8基）などから選択される。これらの化合物は保護された状態で翻訳されてもよい。翻訳されうる保護基、およびRNAに安定な反応条件での脱保護条件は本明細書に記載された方法を用いることができる。より好ましくは、より代謝安定性が高いことから化合物Na_7基を利用することが、Na_8基を利用することより好ましい。

[0093] また、交差ユニット（C末端側）に活性エステル基を有する化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3、あるいは化合物C0H_1、化合物C0H_2、化合物C0H-3などが選択された場合、三角ユニット（N末端側）には既に述べた化合物N_1や化合物N_2の他にも、化合物Na_10および化合物Na_11から選択することができる。三角ユニットをN末端とする場合には、化合物N_1、化合物N-2の他にも化合物Na_10（Na-8基、およびNa_9基）あるいはNa_11（Na-8基、およびNa_9基）を選択することが好ましい。Na_7基を利用すると、主鎖アミンが保持され、ドラックライクネスが低下するためである。一方で、三角ユニットをN末端としない場合には、化合物Na_10（Na-7基およびNa_8基）および化合物Na-11（Na_7基およびNa_8基）を用いることができる。この場合にはN末端にはアミノ酸誘導体もしくはN末端カルボ

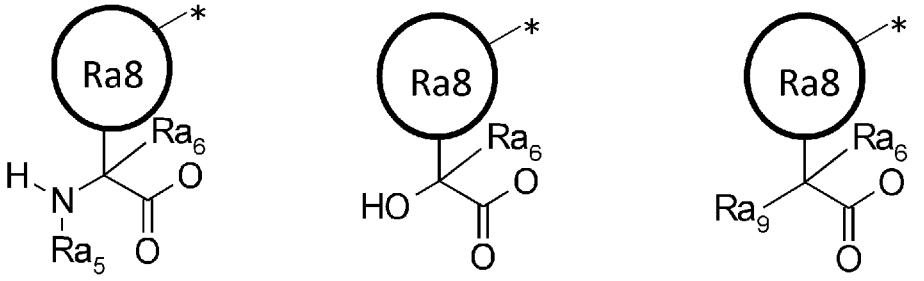
ン酸誘導体を用いることがより好ましい。N末端に主鎖アミノ基を保持させないためである。

[0094] また、化合物Na_ １０および化合物Na_ １１に付与されるものはNa_ ７基、Na_ ８基、Na_ ９基に限定されない。例えば、Na_ ７基はαアミノ酸骨格由来であるが、これがβアミノ酸骨格であってもよい。

[0095]



化合物Na—10 化合物Na—11



Na—7基 Na—8基 Na—9基

[0096] 通常アミンより活性化させる手法としては、前述の反応補助基としてSH基を含有するものに限定されない。通常アミンより活性化させる手法として、アミンに直接ヘテロ原子を導入してアミンの反応性を向上させることも可能である。例えばヒドロキシアミン（化合物F_ １、化合物F_ ４、化合物F_ ５、化合物F_ ７）やアルコキシアミン（化合物F_ ２、化合物F_ １４、化合物F- １５、化合物F-16）、アジド（化合物F_ ３、化合物F_ ９、化合物F_ １０、化合物F_ １１）などが挙げられる。このように、アミノ基に直接あるしはリンカーを伴って近傍に反応補助基となり得るヘテロ原子を導入させることにより、アミノ基を活性化させる手法は全て本願に含まれる。ヒドロキシアミンとの反応では、活性エステル部としては化合物F—７や化合物F-8など

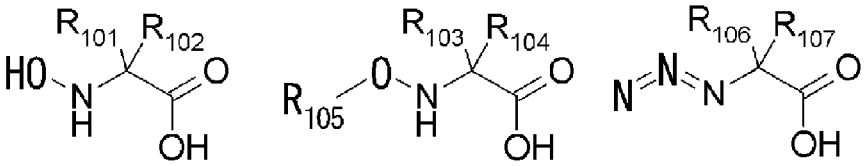
が選択される。アルコキシァミンとの反応では、化合物F—１７や化合物F—１８などが選択される。アジ ドとの反応では、化合物F—１２や化合物F-13などが選択される。

[0097] Ｒ１０１、Ｒ１０２、Ｒ１０３、Ｒ１０４、Ｒ１０５、Ｒ１０６、Ｒ１０７は通常使用されるァミノ酸側鎖であり、天然型アミノ酸に限定されない置換基である。すなわち、水素原子、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケ二ル基、置換されてもよいアルキ二ル基、置換されてもよいァリール基、置換されてもよいヘテ口ァリール基、置換されてもよいァラルキル基から選択される。

Ｒ１０１、Ｒ１０２のうち１つが水素原子、Ｒ１０３、Ｒ１０４のうち１つが水素原子、Ｒ１０６、Ｒ１０７のうち１つが水素原子であることがより好ましい。また水素原子の配置はこれらがＬ型アミノ酸と同じ立体配置になるように配置されることが好ましい。

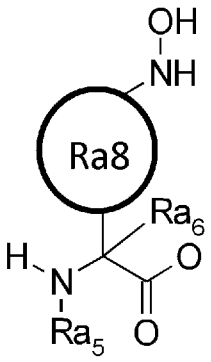
[0098] Ｒ１０５は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケ二ル基、置換されてもよいアルキ二ル基、置換されてもよいァリール基、置換されてもよいァラルキル基の中から選択される。

[0099]

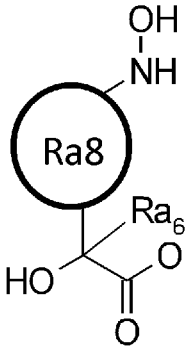


化合物 F— １ 化合物 F—２ 化合物 F— 3

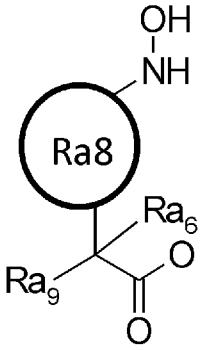
[01 00]



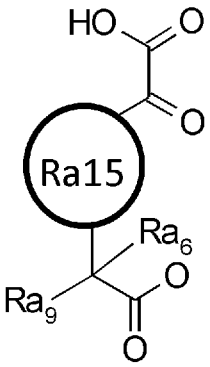
化合物F—4



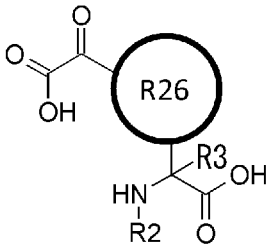
化合物F—5



化合物F—6

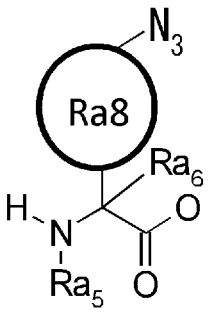


化合物F—7

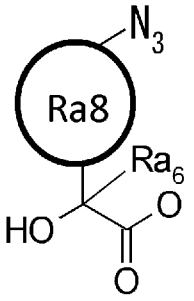


化合物F—8

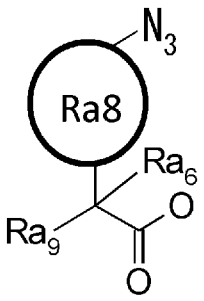
[0101]



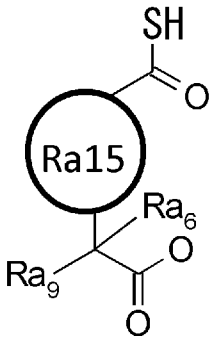
化合物F—9



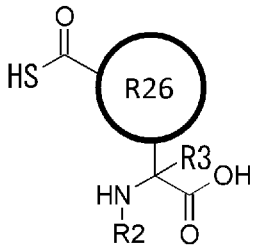
化合物F—10



化合物F—11

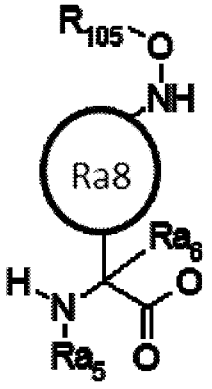


化合物F－12

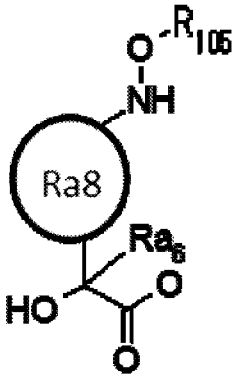


化合物F－13

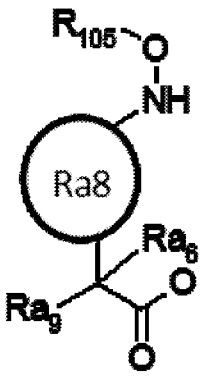
[0102]



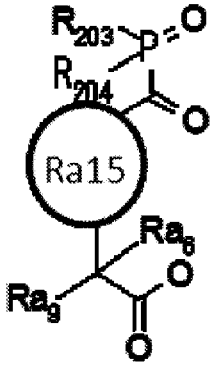
化合物F－14



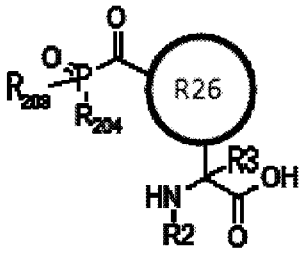
化合物F－15



化合物F－16

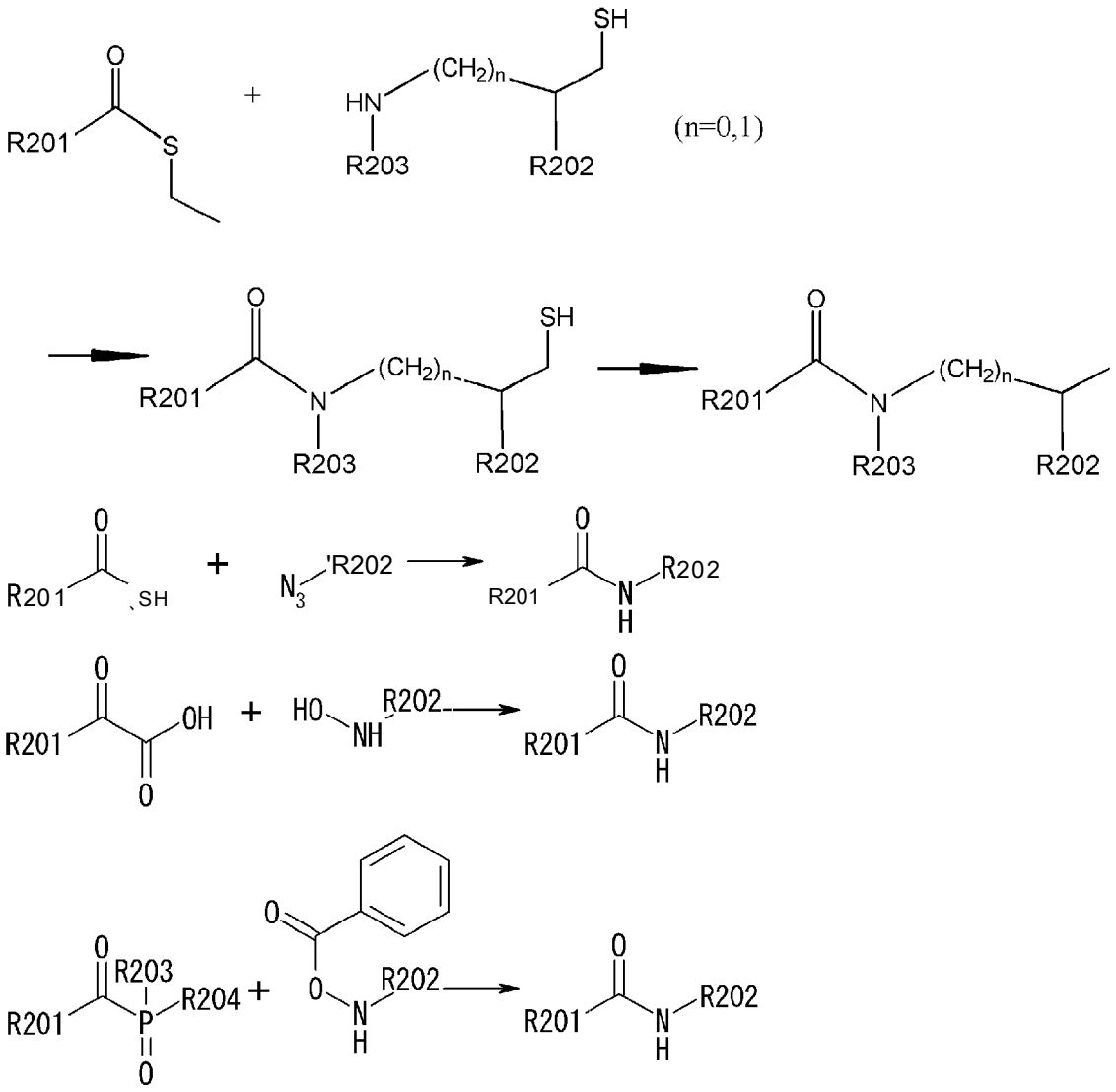


化合物F－17



化合物F－18

[0103] 上記のような活性化アミンを選択した場合に対応する交差ユニット候補となる活性エステルとの組み合わせとして、例えばチオエステルとチオールを近傍に有するアミン、αケトエステルとアジドなどの組み合わせが考えられる。



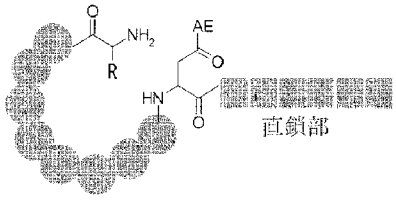
[0104] initiation read through (イニシエーション リード スルー :開始コドンの読み飛ばし)を利用することによって、上記のメチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入による末端が多様なペプチド化合物又はペプチド化合物ライブラリーの合成法での複数種類アミノアシル翻訳開始tRNAの用意の必要がない方法がある。initiation read through とは、一般的にはタンパクやペプチドはAUCコドンとしてコードされる翻訳開始アミノ酸であるメチオニンから翻訳されるが、無細胞翻訳系において翻訳開始メチオニルtRNAが含まれない場合や翻訳効率の低い非天然アミノ酸が翻訳開始tRNAに付加されたものからの翻訳を開始させようとした際に2番目以降のコドンにコードされるアミノ酸からの翻訳産物が生じる現象を意味する。

[0105] Initiation read through を利用する方法としては、ペプチドをコードするmRNAの開始コドンの次の2番目のコドンに三角ユニットをコードさせ、メチオニンもしくは翻訳開始メチオニンtRNAを含まない翻訳系にて翻訳させることによってN末端を三角ユニットとするペプチド又はペプチドライブラリーを作成する方法が使用できる。別報として、酵素、例えば、peptidedeformylase（ペプチドデフォルミラーゼ）とMethionine aminopeptidase（メチオニンアミノペプチダーゼ）を作用させることによってペプチドのN末端のメチオニンを削り取る方法が知られている（非特許文献：Meinnel, T., et al. Biochimie (1993) 75, 1061-1075, Methionine as translation start signal: A review of the enzymes of the pathway in Escherichia coli.）。翻訳開始メチオニンから始まるペプチドのライブラリーを用意し、これにMethionine aminopeptidaseを作用させることによってN末端のメチオニンを除去し、N末端がランダムなライブラリーを調製することも出来る。また、翻訳開始メチオニンなどに続く2番目のアミノ酸を利用して環化した後にアミノペプチダーゼ処理することでメチオニンなどのN末端アミノ酸を除去できることを示した。これらによりメチオニン残基はスキームAのユニットには含まれず（ユニット数は全ての翻訳後修飾が終了した化学構造で判断することは既に定義済である）、三角ユニットに対応するアミノ酸残基は2番目にコードされたアミノ酸となる結果、複数のコドンに三角ユニットをコードさせられるため自由度を2種類以上に拡大させ可変箇所が一つ増えることになる。三角ユニットとして2種類以上のアミノ酸又はアミノ酸類縁体を利用することが可能となるため、本発明のペプチド化合物またはペプチド化合物ライブラリーを作製する際に、より多様性の増大したペプチド化合物またはペプチド化合物ライブラリーを作製することが可能となる。最大ではランダム領域と同数のアミノ酸又はアミノ酸類縁体を使用することが可能となり、ランダム領域と同数の自由度にまで拡大させることも可能となった。ここでランダム領域とは、本発明のペプチド化合物において、自由にアミノ酸又はアミノ酸類縁体を選択することができる領域を意味し、本法以外ではスキームA

の交差ユニットおよび三角ユニット以外の領域 (すなわち黒丸ユニットと四角ユニット) を指すが、本法では三角ユニットもランダム領域となる。三角ユニットの持つ交差ユニットとの反応性を維持したまま、黒丸ユニットや四角ユニットのもつ構造多様性を確保できる。すなわち、本方法を用いれば、翻訳後環化のためにはディスプレイライブラリー中で、従来２つのアミノ酸（三角ユニットと交差ユニットに相当）を固定する必要があつたのに対し、固定を１つのアミノ酸 (交差ユニット) に減少させることができる。例えば、ランダム領域に選択されるアミノ酸およびアミノ酸類縁体のほとんどは主鎖アミノ基を有しているため、これを三角ユニットにも適用させるとＮ末端にはアミノ基を有するランダムアミノ酸配列が配置される。この中で共通に存在する主鎖ァミノ基との選択的アミド結合形成によりアミド環化を行うことが可能となる。例えば、リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸を導入しないディスプレイライブラリーを構築する場合に特に有用である。我々の検討結果から、ドラックライクネスを有する残基数は１３残基以下であることから、固定すべきユニットの数が２から１へ減少することは、ランダム領域のユニット数は１１から１２へ増加することを意味する。ランダム化できる残基数が１つ増加することの価値は、ドラックライクネスを維持するための限定された条件下での自由度を最大限活かすという意味で、非常に高い。

[0106] 具体的には交差ユニット (直鎖部と環状部と三角ユニットの交差するアミノ酸）側鎖にカルボン酸あるいはカルボン酸活性エステルを翻訳導入させることができるため、固定された交差ユニットとランダムなアミノ酸から選択された三角ユニットの間でアミド結合生成が可能となる (スキームＢ）。ライブラリー構築の際には、交差ユニットは１種類である必要はなく、２種類以上から選択させることも可能である。具体的にはそれぞれの交差ユニットをコードするコドン、 (アミノ）ァシル化ｔＲＮＡを用意し、所望の位置に交差ユニットコドンを配置したｍＲＮＡを錶型にライブラリーを構築することが出来る。

スキームＢ



環状部

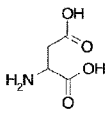
スキーム B. 三角ユニットにランダムアミノ酸、交差ユニットにアスパラギン酸および活性エステルを導入した場合の環化前翻訳化合物例。A-1 の具体例の1つ。Rはアミノ酸側鎖、AEはOHあるいは活性エステル

[0107] N末端(三角ユニット)を固定することなしに環化させたライブラリー構築の手法の例として、アミド環化の例が挙げられる(本手法は、N末端を固定した場合にも利用できる)。交差ユニットとしてアスパラギン酸誘導体を例として挙げるが、これ以外にも制限されず、例えば化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3にて表せる化合物群の中から選択される。N—メチルアスパラギン酸などのN-アルキル化体、グルタミン酸誘導体などの側鎖にカルボン酸を持つアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体であれば何でもよい。(i)側鎖にカルボン酸を有するアミノ酸を導入し、翻訳後に活性エステル化させることが可能である。例えば、化合物E—1に示すとおり、アスパラギン酸自体を翻訳導入させることができる。得られた翻訳ペプチドに対し、カルボン酸とN末端アミンとの縮合反応によりアミド環化させることができる。例えば、化合物E—2に示すようなN—ヒドロキシスクシンイミド活性エステルやHOBt、HOAtなどの活性エステルに変換させることができる。得られた活性エステルは容易にアミンと反応させることができるため、結果としてN末端をランダム化させたアミド環化反応が実現できる。本手法の実現には、カルボン酸部位のみが活性エステル化され、RNA(などの核酸部位)が反応されない手法の選択が鍵となる。(ii)側鎖にカルボン酸活性エステルを有するアミノ酸を翻訳導入し、その活性エステルとアミンとを反応させることができる。化合物E_2のような活性エステルを予め翻訳合成させる手法である。化合物E_2の他にも化合物E_3のようなベンジルチオエステル、化合物E—4のようなアリールチオエステル、アルキルチオエステルなどを翻訳導入させることも可能である。化合物E_4や化合物E_3の場合、フェニル基を例と

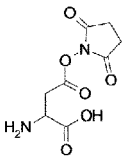
しているがァリール基やヘテロァリール基であれば制限がない。またァリール基やヘテロァリール基に、たとえば、置換基として、ハロゲン基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、ニトリル基などの電子吸引基や、メトキシ基などのアルコキシ基、メチル基などのアルキル基のような電子供与基などを有していてもよい。これらはチオエステル交換反応の速度と交換反応後のチオエステルのァミンとの反応性や水との副反応の選択性を考慮し、これらのバランスが良好な置換基が好ましい。また、置換基としては、t—ブチル基やイソプロピル基に代表されるかさ高い置換基、水中での実施を受けて、水との親和性を考慮した、スルホン酸基や、ジメチルァミノ基のようなジ置換ァミノ基、逆に親脂性を考慮した、長鎖アルキル基などの高脂溶性基などから選択される。ニトロ基、トリフルオロメチル基、ハロゲンなど、多種類の置換基が同時に導入されていてもよい。化合物E—4のように、化合物E—3よりも活性化されたチオァリール活性エステルを予め翻訳導入させてもよい。チオエステルとしては、このようなァラルキルやァリールチオエステルの他、アルキルチオエステルからも選択することができる。本手法の実現には、翻訳合成中には安定で、かつ反応補助基の無いァミンと十分な反応性を有する、2つの性質を併せ持つことが鍵となる。(iii)チオエステルなどの中から翻訳合成中に十分に安定性を確保できる活性エステルを翻訳導入させておき、翻訳後に添加剤を添加させて、より活性な活性エステルを系中で発生させて反応補助基の無いァミンと環化反応させることも可能である。例えば、翻訳導入されたチオエステルに対し、より電子不足なチオールを外部から添加してより活性なチオエステルを系中で発生させてァミンと環化反応させることが挙げられる。例えば、化合物E_3などのチオエステルの例の場合、翻訳後に直接アミノ基と反応させてもよいが、トリフルオロメチルフェニルチオールのような、より反応性の高いチオールを翻訳系中に添加して、より活性化された活性エステルE-4に置換させてから、アミノ基と反応させてもよい。その他、例えば、H0Bt、H0At、HONSuなどの活性エステルを形成することが知られている様々な原料を添加させることも可能である。添加剤はこれ

らの中から1種類選択してもよく、あるいは2種類以上選択してもよい。2種類以上の添加剤を添加する長所は反応性の向上が挙げられる。翻訳液中で十分安定で翻訳可能な活性エステルから、あらゆるアミノ基と十分反応性が高い活性エステルへ返還することはエネルギー的に不利で、このような反応は1段階では困難である場合もある。このような場合、翻訳可能な安定活性エステルから、一度、交換可能なより活性の高い活性エステルへ返還した後、さらにここからあらゆるアミノ基と十分反応性が高い活性エステルへ返還することも可能となる。このような多段階による活性エステルの活性化を用いることで、反応性の低いアミノ基とのアミド化反応も可能となりえる。これらの活性エステルなどの添加剤には置換基が導入されていてもよく、たとえば、置換基として、ハロゲン基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、ニトリル基などの電子吸引基や、メトキシ基などのアルコキシ基、メチル基などのアルキル基のような電子供与基などを有していてもよい。t—ブチル基やイソプロピル基に代表されるかさ高い置換基、水中での実施を受けて、水との親和性を考慮した、スルホン酸基や、カルボキシル基、ヒドロキシ基、ジメチルアミノ基のようなジ置換アミノ基、逆に親脂性を考慮した、長鎖アルキル基などの高脂溶性基などから選択される。(iv)安定な活性エステルを (iii) と同様翻訳導入させておき、翻訳後に化学反応 (例えば脱保護反応) を実施させ、分子内反応により活性化させた後に反応補助基を持たないアミンと環化反応させることも可能である。例えば化合物E_5のように、より安定なチオエステルを翻訳導入させておき、翻訳後にS_S結合の脱保護を伴い、分子内反応によって、より反応性の高いアリールチオフェノールなどに変化させてからアミンと反応させてもよい。また、 (i) ~ (iv) の概念の2つ以上を組み合わせることによって、本課題を達成してもよい。このように、Initiation read through 法を有効に活用させる1つの手法として、N末端に共通に存在するアミノ基と交差ユニットを反応させてDrug‐likeな環化部位を有する、より多様性に富んだDispLay library を構築することができる。

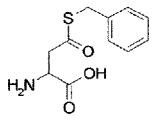
[0108]



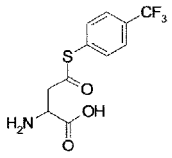
化合物E-1
アスパラギン酸



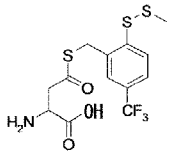
化合物E-2
アスパラギン酸
OSuエステル



化合物E-3
アスパラギン酸
ベンジルチオエステル



化合物E-4
アスパラギン酸
アリールチオエステル



化合物E-5
アスパラギン酸
翻訳後活性化エステル

[01 09] この中で、(iii)のアルキルチオエステルもしくはベンジルチオエステルなど翻訳合成中に十分に安定性を確保でき、翻訳導入可能な活性エステルを用し、、翻訳後に添加剤を添加させて、より活性な活性エステルを系中で発生させて反応補助基の無いアミンと環化反応させる場合、翻訳合成に用いる活性エステルとして、例えばアスパラギン酸の側鎖カルボン酸をメチルチオエステル（Asp(SMe)）などのアルキルチオエステルやベンジルチオエステル（Asp(SBn)）などのアラルキルチオエステルを用いることができる。

[01 10] これらを交差ユニットとして翻訳合成したのち、反応補助基を有しない三角ユニットと化学反応させる目的で加える添加剤として例えば4_（トリフルオロメチル）ベンゼンチオールなどのアリールチオールやヘテロアリールチオールが挙げられ、これらは電子吸引基や電子供与基、脂溶性基や水溶性基などで置換されていてもよいが、好ましくは電子吸引基である。電子吸引基としてトリフルオロメチル基やニトロ基やフルオロ基などが挙げられるが、好ましくはトリフルオロメチル基程度の電子吸引基が挙げられる。

[01 11] これらのチオールの添加量は特に限定されないが、反応性を十分高める目的では10mMより多い方が好ましく、添加剤を溶解させる目的では10Mより少ない方が好ましい。より好ましくは50 mM~ 5Mの範囲がよいが、さらに好ましくは200 mM~ 2Mがよい。添加剤をチオール(酸性)のまま加えることもできるが、酸性部をトリエチルアミンなどの塩基を当量数加えて中和させ、中性条件として添加させることが好ましい。

[01 12] より活性の高い活性エステルは翻訳反応系内に存在する様々な試薬と反応する場合がある。例えば、通常利用されるトリスバッファー中のアミン成分（トリスヒドロキシメチルアミノエタン）もその1つとなりえるため、反応性のアミン成分を含まないバッファー中で翻訳合成および、化学反応のため

のバッファーを追加することが好ましい。このようなバッファーとして例えばＨＥＰＥＳバッファー、リン酸バッファーなどが挙げられる。

[01 13] また、反応の進行とともに副反応である空気中での酸化反応（S-S形成反応）に伴い反応進行に必要なチオール量の減少を避け、かつ、塩基性が高くなり加水分解の生成が優位な条件になることを避ける目的で、反応翻訳液にバッファーを追加することも可能である。また、トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィンのような還元剤を添加することも可能である。また、環化反応をなるべく空気中酸素に触れさせないことも有効である。

[01 14] 化学反応中の溶媒のｐＨはRNAが安定に存在する目的では２～１０が好ましい。化学反応を円滑に進行させる目的では７．８以上が好ましく、加水分解の生成を抑制させる目的では９．２以下に維持することが好ましい。反応条件としてはPureSystem などの反応翻訳液中単独で実施してもよく、これにDMFやNMPなどの有機溶媒を添加してもよい。また、翻訳液をカラム精製などで精製した後に溶媒を変更して実施してもよい。反応温度は通常化学反応が実施できる範囲であれば特に限定されないが、このましくは１５℃~80 ℃であり、より好ましくは２５℃～５０℃である。

[01 15] 環化反応を円滑に進行させる三角ユニットとしては特に制限はなく、アミノ基は１級アミンでも２級アミン（例えばN-メチルなどのN—アルキル基）でも許容され、アミノ酸側鎖部位の置換基も限定されない。特にアミノ基のとなりの炭素原子が無置換（CH2）の場合では１級アミンでも2級アミンでも許容される。２級アミンの中ではメチル基がより好ましい。アミノ基のとなりの炭素原子に置換基が存在する場合、１級アミンがより好ましい。置換基部分としては、ALa やPhe のようにβ位がCH2であるほうが、Va LやThr などより好ましい。また、プロリンのように窒素原子とα位の炭素原子とが５員環を形成したアミノ酸や、同様に４員環や６員環などのように、環状の２級アミンも好ましい。

[01 16] 以上、N末端（三角ユニット）を固定することなしに環化させたライブラリ—構築の手法の例を述べたが、この反応補助基を用いないアミノ基と活性エ

ステル基との縮合反応によるアミド環化反応の利用は、N末端の主鎖アミノ基との反応に留まらない。アミノ酸、アミノ酸類縁体の側鎖のアミノ基や、N末端カルボン酸誘導体のアミノ基と、アミノ酸、アミノ酸類縁体の側鎖の活性エステルやN末端カルボン酸誘導体の活性エステルとの任意の組み合わせで実施することができる。

[0117] また、本手法はスキームCの場合と同様、三角ユニットに活性エステルを有するユニットが配置され、交差ユニット側にアミン側鎖が配置されてもよく、活性エステルとアミノ基が三角ユニットと交差ユニットのどちらに配置されてもよい。

[0118] そのような組み合わせの例を以下述べる。

交差ユニットに活性エステル基を有するユニットが選択される場合、交差ユニットは化合物C-1、あるいは化合物C-2、化合物C-3やあるいは化合物C0H_1、化合物C0H_2、化合物C0H—3から選択することもできる。これら6種類の化合物を選択する場合には常に、そのC末端側直後のアミノ酸はN-アルキル化されたユニットの中から選択することが好ましい。この制限は、アスパルチミド形成の副反応を避ける目的であり、これら6種類の化合物が選択された場合の共通の好ましい選択となる。代謝安定性の観点から、化合物C-1、あるいは化合物C-2、化合物C-3がより好ましい。このような場合、三角ユニットは化合物Na-1、化合物Na-2、化合物Na-3の中から選択することもできる。三角ユニットとして、N末端(三角ユニット)を固定させない場合には、これらの化合物から複数個を同時に選択することもできる。

化合物Na-1および化合物Na-2、化合物Na_3のどちらでも側鎖アミノ基は保護されていてもよい。保護されている場合には、環化反応と同時あるいは事前に脱保護させてから環化反応を行う。保護基あるいは脱保護の条件は本明細書に記載の方法を利用することができる。

[0119] 化合物Na-1のRa13は、水素原子あるいはC1-C6アルキル基もしくはアラルキル基などから選択することができる。これらはヒドロキシル基やフルオロ基、エーテル基などドラックライクで定義される官能基で置換されていても良

し。好ましくは、水素原子、あるいはメチル基、エチル基、 n プロピル基、ベンジル基が良い。

[0120] 化合物Na-2 のRa 1は、Ra 13 と同様に選択することができる。特に好ましくは、水素原子あるいはメチル基から選択される。Ra2 はRa 13 と同様に選択することができるが、好ましくは水素原子あるいはメチル基が良い。特に好ましくは水素原子が良い。水素原子が選択された場合、その立体配置はアミノ酸としてL型とD型のいずれも許容される。より好ましくはL型の立体配置が好ましし。Ra3 はR13 と同様に選択することができる。Ra3 とRa4 とで環を形成していても良い。特に好ましくは水素原子が良い。Ra4 は水素原子、アルキル基、シクロアルキル基、アラルキル基、ヘテロアリール基、アリール基から選択することができる。これらは ドラックライクで定義される官能基で置換されていても良い。また、Ra4 はRa 1 と共に環を形成していても良い。例えば、プロリンなどがこの環に相当する。

[0121] 化合物Na-3 のRa 11はRa 13 と同様に選択することができるが、特に好ましくは水素原子、あるいはメチル基、エチル基、 n プロピル基、ベンジル基が良し。特に好ましくは水素原子が良い。Ra9 はRa4 と同様に選択することができる。水素原子あるいはC1-C6 アルキル基もしくはアラルキル基から選択されることが好ましい。これらは ドラックライクで定義される官能基で置換されていても良い。また、Ra9 とRa 11 とで環を形成していても良い。環のサイズは3 ~ 8 員環が好ましい。環形成としては特に5員環と6 員環がより好ましい。Ra 9の置換基としては特に好ましくは水素原子が良い。Ra 10 およびRa 12 は、Ra4 と同様に選択することができる。好ましくはRa 1 3 と同様に選択することができる。より好ましくは、Ra 10 もしくはRa 12 のいずれかが水素原子である。特に好ましくはRa 10 およびRa 12 のいずれもが水素原子である。この場合には、N末端にはアミノ酸誘導体あるいはN末端カルボン酸誘導体から選択されることが好ましい。N末端の主鎖にアミノ基が存在すると反応選択性の点で不利となるうえ、翻訳修飾終了後にもアミノ基が保持されて ドラックライクネスが低下するためである。

[0122] 交差ユニットが化合物C-1、あるいは化合物C-2、化合物C-3から選択された場合、三角ユニットとして、三角ユニットをN末端以外に配置させ、三角ユニットを固定させる場合には、三角ユニットは化合物Na-4もしくは化合物Na-5から選択することができる。

[0123] 化合物Na-4のRa5は、Ra1と同様に選択することができる。Ra6は、Ra2と同様に選択することができる。Ra7はRa4と同様に選択することができる。より好ましくは水素原子あるいはメチル基が良い。特に好ましくは水素原子である。Ra8は、R4と同様で部分構造N-3、N-4, N-5などのC1~C6ユニットのアルキレン基、N-6、N-7、N-8（オルト置換のみならず、メタ置換、パラ置換も含む）から選択することができる。なお、ここではR13~R22の置換基はドラックライクで選択させる官能基のうち、活性エステルやアミノ基と反応しない官能基の中から選択することができる。好ましくは、置換基を有していてもよし、C4~C6アルキレンユニットやアリール基を有する部分構造N-6、N-7、N-8などから選択されることが好ましい。

[0124] 化合物Na-5のRa5は、Ra1と同様に選択することができる。Ra6は、Ra2と同様に選択することができる。Ra7はRa4と同様に選択することができる。より好ましくは水素原子あるいはメチル基が良い。特に好ましくは水素原子である。Ra8は、R4と同様で部分構造N-3、N-4, N-5などのC1~C6ユニットのアルキレン基、N-6、N-7、N-8（オルト置換のみならず、メタ置換、パラ置換も含む）から選択することができる。なお、ここではR13~R22の置換基はドラックライクで選択させる官能基のうち、活性エステルやアミノ基と反応しない官能基の中から選択することができる。好ましくは、置換基を有していてもよし、C4~C6アルキレンユニットやアリール基を有する部分構造N-6、N-7、N-8などから選択されることが好ましい。

[0125] 化合物Na-4および化合物Na-5のどちらでも側鎖アミノ基は保護されていてもよい。保護されている場合には、環化反応と同時あるいは事前に脱保護させてから環化反応を行う。保護基あるいは脱保護の条件は本明細書に記載の方法を利用することができる。

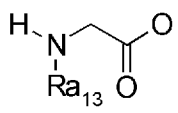
[0126] 交差ユニットが化合物C-1、あるいは化合物C-2、化合物C-3から選択された場合、三角ユニットとして、三角ユニットをN末端に配置させ、側鎖のアミノ基と環化させる場合には、三角ユニットは、化合物Na_4、化合物Na_5のほか、アミノ基とカルボキシル基を有する幅広い化合物群の中から選択することができる。翻訳合成ではN末端カルボン酸類縁体として、様々なユニットが翻訳合成させることができる。アミド環化されるアミノ基とペプチド翻訳されるカルボン酸を有していれば特に限定されない。好ましくは、アミノ基とカルボン酸基を接合させる2価のユニットの有する官能基はドラックライクな官能基の中から選択される。そのような化合物の一例として例えば化合物Na-6が挙げられる。化合物Na-6のRa9は、ドラックライクな官能基にて置換されてもよいアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基から選択されても良い。それ以外にも、—NRC0R'基（Rおよび R'はドラックライクな置換基）や-OR（Rはドラックライクな置換基）やNR基（R部分にアミノ酸やジペプチド、トリペプチドなどを含む）などが許容される。

[0127] 一方、交差ユニットにアミノ基側のユニットが存在する場合も可能である。例えば化合物Na_4や化合物Na_5が選択された場合、三角ユニットには化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3、化合物C0H—1、化合物C0H—2、化合物C0H—3などを選択することもできる。この場合、三角ユニットよりN末端側にも直鎖部が存在して、かつN末端にはN末端カルボン酸誘導体から選択されることが、ドラックライクの点から好ましい。

例えば化合物Na_4や化合物Na_5が選択された場合、三角ユニットには化合物C0H_1、化合物C0H_2、化合物C0H—3などを選択することもできる。この場合、三角ユニットがN末端に存在してもよく、あるいは三角ユニットよりN末端側にも直鎖部が存在して、かつN末端にはN末端カルボン酸誘導体から選択されることが、ドラックライクの点から好ましい。

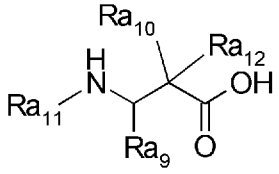
[0128] また、交差ユニットに、化合物Na-4、化合物Na-5などが選択された場合、三角ユニットに化合物Ca_1を選択することもできる。

[0129]

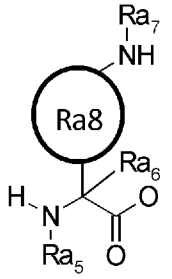


化合物Na—1

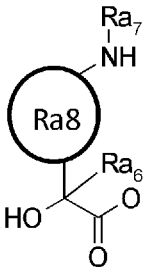
化合物Na—2



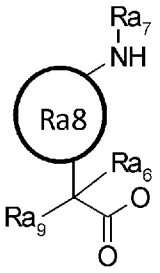
化合物Na—3



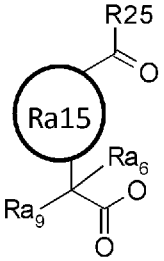
化合物Na—4



化合物Na—5



化合物Na—6



化合物Ca—1

[01 30] ·直聽 2 嶋 細 の付与

直鎖部2を発生させる手法として、α—ヒドロキシカルボン酸などの主鎖にアミノ基を持たずにエステル結合を翻訳合成により形成できるアミノ酸類縁体と保護されていてもよいアミノ基側鎖 (保護基はァミノ基の保護基として作用し、翻訳合成されるアミノ酸を与えるものであれば、特に限定されない)を有するァミノ酸の両方を翻訳導入して翻訳後修飾させる手法を用いることが可能である (スキームE)。ディスプレイライブラリーへの適用時には、翻訳されるユニットから選択される。しかし、その後の最適化により得られるペプチド化合物では、当該ペプチド化合物そのものが翻訳合成されなくても、翻訳合成後の翻訳後修飾により得られるものも含まれる。α—ヒドロキシカルボン酸部位の側鎖は特に限定はされないが、スキームEに記載の手法では、特に、翻訳合成の点ではRe1が水素原子 (グリコール酸 (H0Gly)そのもの)あるいは、側鎖にチオール基 (SH基)あるいは保護されたチオール基を有しているものが好ましい。側鎖の立体配置も特に限定されないが、α位に水素原子が存在する場合にはL型アミノ酸と同様な立体配置を取ることがより好ましい。チオール基あるいは保護されたチオール基の配置も特に限定されないが、OH基のβ位、もしくはァ位に配置されていること (す

なわち、Re 1が保護されていてもよいメルカプトメチル基あるいはメルカプトエチル基）が特に好ましい。これらのチオール基もしくは保護されたチオール基は、α—ヒドロキシカルボン酸側鎖の置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ァラルキル基、ァリール基、ヘテロァリール基、から配置（付加）される。これらα—ヒドロキシカルボン酸側鎖の置換基としては、付加されたチオール基あるいは保護されたチオール基を除けば、ドラックライクなァミノ酸の側鎖で定義された置換基であることがより好ましい。

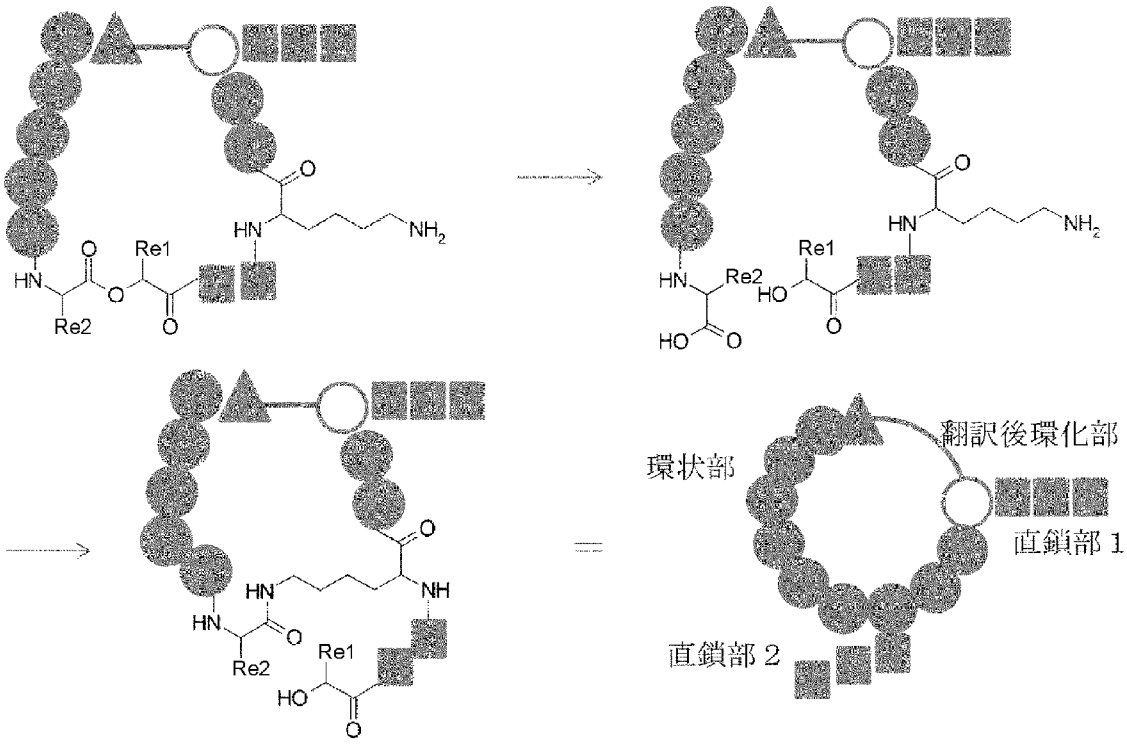
[0131] アミノ基側鎖を有するアミノ酸の種類も、アミノ基を有してれば、置換されてもよいアルキルアミノ基、アルケニルァミノ基、アルキニルァミノ基、ァラルキルアミノ基、ァリールァミノ基、ヘテロァリールァミノ基、シクロアルキルアミノ基、のどれも可能であり特に限定されないが、側鎖に同時にチオール基（SH基）あるいは保護されたチオール基を有していてもよい。これらの置換基は反応補助基（例えばＳＨ基）を除けば、ドラックライクなァミノ酸の側鎖で定義された置換基であることが好ましい。さらに、翻訳合成可能な置換基から選択されることがより好ましい。また、スキーム中NH2で表わされている部位の水素原子のうち１つは水素原子に特定されるが、もう１つの水素原子は置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ァラルキル基、ァリール基、ヘテロァリール基、シクロアルキル基、にて置換されていてもよく、これらに反応補助基が付与されていても良いが、このましくはNH2基がよい。これらの置換基も反応補助基（例えばＳＨ基）を除けば、ドラックライクなアミノ酸の側鎖で定義された置換基であることが好ましい。さらに、翻訳合成可能な置換基から選択されることがより好ましい。α—ヒドロキシカルボン酸などのアミノ基を持たずにエステル結合を形成できるアミノ酸類縁体をコードするコドン（A）、これをァシル化ｔＲＮＡ、アミノ基側鎖を有するアミノ酸をコードするコドン（B）、これをァミノァシル化したｔＲＮＡを用意し、コドン（A）とコドン（B）の間に所望の数（好ましくは０～７個、より好ましくは０～２個）のランダムなコドンを

配置したｍＲＮＡを錶型に翻訳させて得たペプチドを上記の方法あるいは別法にてまず環化させる。コドンAをコドンBよりN末端側に配置させる。得られた環化ペプチド (例えば、スキームBやスキームCの手法を用いることができる）を必要に応じて側鎖アミノ基に保護基が存在する場合には脱保護し、加水分解あるいは外部から添加剤を加えて工ステル部位を活性化させるとアミド結合は加水分解されずに工ステル結合を加水分解あるいは活性化 (活性エステル化、活性チオ工ステル化）させることができる。得られた主鎖カルボン酸あるいは活性 (チオ）工ステルと側鎖アミンを分子内環化反応させることにより望みの分枝ペプチドである直鎖部２を有するペプチドを得ることができる。例えば、外部から加える添加剤として、チオール化合物、H0NSu、HOBt、HOAtなど様々な活性工ステルを形成させる化合物群、あるいはこれらの２種類以上の混合物が挙げられる。スキームEでは、コドンAとしてRe1置換されたヒドロキシカルボン酸、コドンBとしてリジンを用いた例を挙げた。

[0132] Ｒｅ１が水素原子の場合、１回目の環化 (三角ユニットと交差ユニットの環化）反応では、三角ユニットにはアミン部位に反応補助基を有するものを選択してもよいが、反応補助基を持たないものを選択してもよい。反応補助基を有するユニットが三角ユニットとして選択された場合 (例えば化合物Ｎ_１や化合物N-２）、１回目の環化反応は容易に進行させることができる。翻訳合成可能な側鎖にチオ工ステルを有する交差ユニットとの反応は、ｐＨが７付近 (翻訳条件）にて、反応添加物を加えてもよいが加えなくてもよい。一方、反応補助基を有しないユニットが三角ユニットとして選択された場合 (例えば化合物Na_ ２に含まれるALaやPheが選択された場合）、１回目の反応を進行させるためにはトリフルオロメチルチオフエノールのような添加剤を加えることがより好ましい。ｐＨは７．８付近にまで上昇させ、３７℃～５０℃付近の反応温度にて６～10時間程度の反応時間をかけることがより好ましし。また、２回目の分枝化反応を行うにはアミン部位に反応補助基の無いものでもよいが、アミン部位に反応補助基を有することがより好ましくその場合にはNH基は保護されていることが好ましい。この場合の工ステルの活性化

剤としては、チオールを添加することが好ましい。チオールとしては、アルキルチオールが好ましく、特に添加剤の溶解性の点から水溶性置換基を有するアルキルチオールが好ましく、中でも2—ジメチルアミノエタンチオール、2_メルカプトエタンスルホン酸が好ましい。これらチオールの添加量は特に限定されないが、反応性を十分高める目的では10mMより多い方が好ましく、添加剤を溶解させる目的では10Mより少ない方が好ましい。より好ましくは100 mM~ 5Mの範囲で良いが、さらに好ましくは500 mM~ 4 Mが良い。アミン部位の選択は特に限定されないが、脱保護を有する場合の反応条件はスキームF2に記載と同様である。

[0133]



スキームE. 直鎖部2を形成させる手法例1

[0134] スキームEの方法の変法として様々な手法も可能である。例えば、Re1部位にSH基、あるいは保護されたSH基を有するヒドロキシカルボン酸を用い、アミン側鎖部位もしくは保護されたアミン側鎖部位のアミン近傍にSH基、あるいは保護されたSH基などの反応補助基を導入させたアミノ酸などを翻訳導入してもよい。この場合、翻訳により得られたペプチドのSH基に付与された保護基、および必要に応じて保護された場合のアミン部位が

脱保護されると、容易にスキームFに示すエステル→チオエステル交換が生じる。得られたチオエステルは反応補助基を有するアミンと容易に反応するため、望みの分枝ペプチド(直鎖部2)を有するペプチドを得ることができる。得られたSH基を含む分枝ペプチドのSH基はRNAが化学反応に関与しない程度の温和な反応条件で、容易に脱硫させることが可能である。この場合にも、より(チオ)エステルを活性化させる目的で、外部から添加剤を加えてもよい。スキームFの手法では翻訳後環化部の環化反応を本直鎖部2形成反応の前後どちらで行なつてもよい。

上記のようにヒドロキシカルボン酸とアミン側鎖部位の両方にSH基あるいは保護されたSH基などの反応補助基を有してもよく、もしくはいずれか片方のみに反応補助基を有していてもよく、もしくは両方ともに反応補助基を有していなくともよい。また、アミン側鎖部位に保護基を有していてもよく、保護基を有していなくてもよい。

またいずれの場合でも、反応を加速させる添加剤を加えてもよい。添加剤としては、例えば置換していてもよいアルキルチオール、置換されていてもよいアルケニルチオール基、置換されてもよいアルキニルチオール基、置換されていてもよいアラルキルチオール、置換されていてもよいアリールチオール、置換されてもよいヘテロアリールチオール基、置換されてもよいシクロアルキルチオール基でもよい。また、HOBt、HONSu、HOAt、パラニトロフエノールなど通常活性エステル化させる試薬、あるいはその誘導体でもよし。添加剤を加える場合には、翻訳後環化部の環化反応を実施後に本直鎖部2形成反応を実施することが好ましい。添加剤の置換基は、前記"アミノ酸"の側鎖で定義したのと同様、自由な置換基を選択することができる。

[0135] また、直鎖部2を発生させる手法として、α—ヒドロキシカルボン酸などのエステル官能基を足がかりにしてチオエステルを発生させる点では同様であるが、α—ヒドロキシカルボン酸のN末端側直前の2配列にCysとProを配置した、例えばCys-Pro-^{HQ}GLy配列からチオエステルを発生させる手法を用いることもできる(スキームF2参照)。スキームF2では、分枝させるための活性

チオエステル発生配列としてCys-Pro に続いて側鎖にRf5 を有するα—ヒドロキシカルボン酸を有し、これと反応させるアミノ酸として側鎖にアミノ基を有するリジンを用いた例を示した。α—ヒドロキシカルボン酸などのアミノ基を持たずにエステル結合を形成できるアミノ酸類縁体をコードするコドン（A）、これをアシル化ｔＲＮＡ、アミノ基側鎖を有するアミノ酸をコードするコドン (B）、これをアミノアシル化したｔＲＮＡを用意し、コドン（A）とコドン (B）の間に所望の数 (好ましくは0 ~ 7個、より好ましくは0 ~ 2個）のランダムなコドンを配置したｍＲＮＡを錶型に翻訳させて得たペプチドを上記の方法あるいは別法にてまず環化させる (例えばスキームBやスキームC) 。コドンAをコドンBよりN末端側に配置させる。Cys-Pro- HQGLyなどの分枝発生部位は、1回目の環化反応条件では安定に化学反応を生じさせずに存在し、その後、必要に応じて4 —トリフルオロメチルフエニルチオールなどのチオールを添加剤として加えると共に、ｐHを塩基性側 (例えば9）に調整して活性チオエステルを新たに発生させた後、より活性なトリフルオロメチルフエニルチオエステルを経由して、リジンの側鎖アミノ基などとアミド結合を形成させた分枝ペプチドが生成する (側鎖アミノ基に保護基が存在する場合には脱保護反応を先行させる）。その後、必要に応じて脱SH反応など反応補助基を除去する反応を実施してもよい。この反応では、分枝ペプチド生成前にあったCys-Pro- HQGLy構造のうち、CysとProは脱離されて分枝ペプチド生成時 (全ての翻訳後修飾終了時）には含まれない。従って、これらは黒丸ユニットにも四角ユニットにも含まれない。従って、分枝ペプチド生成時のユニット数によって、ドラックライクなユニット数も計算される。

[0136] α—ヒドロキシカルボン酸部位のα位 （Rf5) は、水素原子、置換されてもよいアルキル基、アラルキル基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、アリール基などの中から選択される。置換基はドラックライクな官能基が好ましい。特に、このチオエステル発生部位は、1回目の環化の反応条件では安定で前駆体 (例えばCys-Pro- HQGLy) 構造を維持することが好ましく、水素原子、メチル基などのアルキル基やベンジル基などのアラルキル基が好ましい

。

[0137] また、この部分のRf5の置換基は主鎖OH基をアミノ基に置き換えた場合の立体としてL型およびD型のアミノ酸に対応するもののいずれもが許容されるが、特に翻訳効率の点でL型の立体に対応するこものが好ましい。特にARSにより翻訳可能なユニットであれば、翻訳効率を高めることができるので好ましし。このような例として、Lacなどが挙げられる。このチオエステルと反応させて分枝を形成させるアミノ基側鎖を有するアミノ酸の側鎖としては、アミノ基および保護されていてもよいアミノ基を有していれば特に限定されないが、保護されていないアミノ基を利用する場合には1回目の環化に用いるアミノ基より十分反応性が低い必要がある。アミノ基は2級アミンでも1級アミンでもよいが、分枝化反応を効率よく進行させる目的で1級アミンがより好ましい。アミノ基あるいは保護されていても良いアミノ基の近傍にSH基などのような反応補助基が存在しても良いし、これらも保護されていてもよい。アミノ基側鎖を有するアミノ酸の種類は、アミノ基を有してれば、置換されてもよいアルキルアミノ基、アラルキルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、シクロアルキルアミノ基、のどれも可能であり特に限定されないが、側鎖に同時にチオール基（SH基）あるいは保護されたチオール基を有していてもよい。これらの置換基は反応補助基（例えばSH基）を除けば、ドラックライクなアミノ酸の側鎖で定義された置換基であることが好ましい。さらに、翻訳合成可能な置換基から選択されることがより好ましい。また、スキーム中NH2で表わされている部位の水素原子のうち1つは水素原子に特定されるが、もう1つの水素原子は置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アラルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、にて置換されていてもよく、これらに反応補助基が付与されていても良いが、このましくはNH2基がよい。これらの置換基も反応補助基（例えばSH基）を除けば、ドラックライクなアミノ酸の側鎖で定義された置換基であることが好ましい。さらに、翻訳合成可能な置換基から選択されることがより好ましい。

[01 38] 1回目の環化と分枝化がともにアミド結合反応である例をスキームF3に示した。本分枝ペプチドを得るためには、三角ユニットは化合物N-1や化合物N-2に代表される反応補助基を有するアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体あるいはN末端カルボン酸誘導体、もしくは反応補助基を有さない化合物Na-1、化合物Na-2、化合物Na-3、もしくは化合物Na-4、Na-5、Na-6などから選択される。交差ユニットは化合物C-1に代表される活性エステルの中から選択される。2回目の分枝化反応の際に活性エステル化される部位として化合物e1に代表されるα—ヒドロキシカルボン酸誘導体か、あるいは化合物F5として示されるCys_Pro-α—ヒドロキシカルボン酸の3つの構成要素からなる部位か、化合物C-1に代表される活性エステルなどから選択される（Cys、Pro, α_ヒドロキシカルボン酸はそれぞれ別途のユニットとしてt RNAにより翻訳されるが、翻訳修飾後にCysとProは脱離されるため、この2つは黒丸ユニットにも四角ユニットにも属さない。α—ヒドロキシカルボン酸は四角ユニットとなる）。また、この分枝化反応でのアミノ基を有する部位は、化合物Na-4や化合物Na_10、化合物Na-11（また、これらのNHで表わされるH原子は翻訳合成中には保護されてもよい）に代表される化合物から選択される。そのような例として、リジンなどの無保護アミンの他、化合物tk100、tk101、tk102、tk103、tk104、tk34、tk7、tk14、tk105、tk106、tk107、tk108などが挙げられる。

[01 39] 本コンセプトでは、分枝化によって従来より多彩な構造体をディスプレイライブラリーにて提示することが可能となった。このことにより、従来では困難であった薬効標的に対して結合する分子や阻害する分子などの様々な機能を有する化合物を取得できる可能性がより高まると期待される。このような分枝化を可能とするため、本手法の価値は1回目の環化反応がドラックライクな環化のケースには留まらず、2回目の環化反応によってドラックライクな環化が形成されれば、1回目の環化反応がどのような環化反応であってもよい。多彩な構造体を形成させる点で、1回目の環化反応がドラックライクな環化反応に留まらない本方法は有用である。そのような場合、活性エステ

ルを翻訳物から発生させる全ての手法は本手法の範疇に含まれる。例えば、化合物F5、化合物e1、化合物C-1、化合物C-2、化合物C-3などが挙げられる。また、2回目アミン基部位としては、保護されていてもよい化合物Na-4、化合物Na-5、化合物Na-10 (Na-7基とNa-8基の場合)、化合物Na-11 (Na-7基とNa-8基の場合)などが挙げられる。

[0140] 反応補助基を有するユニットが三角ユニットとして選択された場合(例えば化合物N_1や化合物N-2)、1回目の環化反応は容易に進行させることができる。翻訳合成可能な側鎖にチオエステルを有する交差ユニットとの反応は、pHが7付近(翻訳条件)にて、反応添加物を加えてもよいが加えなくてもよい。この場合、2回目の分枝化に用いる部位の選択は大きくなる。すなわち、化合物e1は安定に存在させることができ、化合物F5ではRf5は水素原子以外が好ましいが、水素原子でも安定に存在させることができ許容される。アミノ基側のユニットも、アミノ基が保護されていないユニットである、例えばLysのような反応補助基を有しないアミノ基も許容される。また、アミノ基が保護されていてもよく、反応補助基を有するアミンで保護されていても良い。これら全ての場合を利用することができる。必要に応じて保護基を除去した後、分枝反応を経、続いて反応補助基を除去する工程を経て、望みの分枝ペプチドを得ることができる。

[0141] 化合物e1のRf1基の選択は先に述べたとおりであるが、より好ましくは水素原子、保護されても良いメルカプトアルキル基(保護されるのはSH基)から選択される。特に好ましくは水素原子、あるいは保護されても良いメルカプトメチル基あるいは2_メルカプトエチル基から選択される。

化合物F5のRf2基は保護されても良いメルカプトアルキル基から選択される。Rf2を含むアミノ酸の立体配置はL型が好ましい。さらに好ましくは保護されてもよいメルカプトメチル基あるいは2_メルカプトエチル基から選択される。Rf3基はRa13と同様に選択させることができる。好ましくはRa1と同様に選択させることができる。特に好ましくはメチル基あるいは、Rf4とで環を形成することが好ましい。環のサイズは3~8員環が好ましく、より好ま

しくは4 ~ 6員環である。これら環を形成する炭素原子はドラックライクなアミノ酸の側鎖で定義される置換基にて置換されていてもよい。5員環の代表例としてプロリンなどが好ましい。Rf4はRa4と同様に選択させることができる。

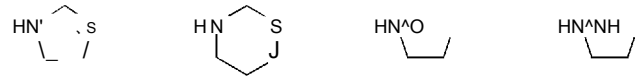
[0142] 一方、反応補助基を有しないユニットが三角ユニットとして選択された場合（例えば化合物Na_2に含まれるALaやPheが選択された場合）、1回目の反応を進行させるためにはトリフルオロメチルチオフェノールのような添加剤を加えることがより好ましい。pHは7．8付近にまで上昇させ、37℃~50℃付近の反応温度にて6 ~ 10時間程度の反応時間をかけることがより好ましい。そのため、分枝化部位にはこのような反応条件で化学反応せず、安定して存在することが好ましい。従って、分枝反応でアミド結合生成に関与するアミノ基部位にはLysのような保護されていないアミノ基を有するユニットは選択しないことが好ましい。すなわち、化合物Na-4や化合物Na-10や化合物Na-11のNH基（反応補助基も）は保護されることが好ましい。保護されたアミノ基を有していれば、保護されていてもよい反応補助基を有していても（例えば化合物tk100）有していなくとも（例えばtk104）よい。これらの保護基は翻訳中および1回目の環化反応中には安定に存在している必要がある。このような保護基として、例えばトリフロオロアセチル基、4_アジドベンジルオキシカルボニル基、3—ニトロー2_ピリジンスルフェニル基、チアゾリジン環による保護基が挙げられる。トリフロオロアセチル基はpHを8より大きくした場合に、初めて選択的に脱保護される。4_アジドベンジルオキシカルボニル基は還元剤トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを加えた場合に初めて選択的に脱保護される。3—ニトロー2_ピリジンスルフェニル基はpH4で添加剤2_メルカプトピリジンを加えた場合に初めて選択的に脱保護される。チアゾリジン環による保護基はpH4で添加剤ジチオジピリジンを加えチアゾリジン環を開環させたのち、トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィンの添加により初めて選択的に脱保護される。このように、翻訳合成されえるアミノ基の保護基であって、翻訳合成中および1

回目の環化反応中に安定であり、なおかつRNAが安定な反応条件で1回目の環化後に選択的に脱保護することが可能な保護基から選択することができる。また、2回目の分枝化時に発生させるチオエステルの前駆体部位としては化合物e1から選択される場合には、Rf1部位が水素原子または、Rf1部位には反応補助基（例えばSH基）が存在することが好ましいが、その反応補助基は保護されていることが好ましい。化合物F5から選択される場合、Rf5は水素原子以外が好ましい。例えばそのような例としてRf5がメチル基やベンジル基などが挙げられる。ヒドロキシル部位のα位（Rf5）が水素原子である場合には、チオエステル生成が避けられず、1回目の環化反応を選択的に行うことができなくなるのに対し、この位置に炭素原子を1つ以上配置した場合には1回目の環化反応条件ではチオエステルの生成を抑制することができる。このように分枝化部位を選択した場合には、アミン部位あるいはチオエステル部位の脱保護反応を必要に応じて実施した後、pHを8．2以上に上昇させて分枝化させる。このように1回目の環化反応中には安定に存在させ、脱保護工程を経て分枝化反応を実行させ、最後に必要に応じて反応補助基を除去させて、分枝ペプチドを得ることができる。

[0143] 分枝化反応でアミド結合を形成するアミノ基を有する化学構造および、その保護基に関する記載を以下示す。

[0144] 翻訳合¾は Ｕ得られため 。チほ 合物－核騰 き のほ 諭 こ宥附 るアリ ¾の纏 ¾ｔ， 瞧 護カ法

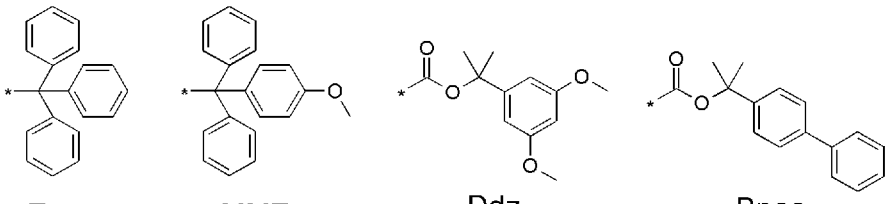
ここで記載されるアミノ基の保護基とは、単一の1級アミンもしくは2級アミンの反応性を不活性化もしくは低下させる官能基だけでなく、1つの官能基で複数のアミノ基もしくは他のヘテロ原子を同時に不活性する構造も保護基として定義する。例えば、チアゾリジン環、チアジナン環、オキサゾリジン環、イミダゾリジン環もアミノ基の保護基として含まれる。これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。



チアゾリジン環　チアジナン環　オキサゾリジン環　イミダゾリジン環

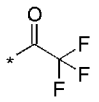
[0145] 上述した保護基とは、1）酸性条件で外れる保護基、2）塩基性条件で外れる保護基、3）酸化的条件で外れる保護基、4）還元的条件で外れる保護基、5）光照射により外れる保護基、6）求核剤の添加で外れる保護基のうち、1）から6）のいずれか、もしくは1）から6）までを複数組み合わせることで脱保護可能な保護基を指す。

[0146] 酸性条件で外れる保護基とはｐＨ１からｐＨ７の範囲で外れる保護基であり、好ましくはｐＨ２からｐＨ６の範囲で脱保護可能な保護基であり、例えば以下に示したトリチル基 (Ｔｒ)、Ｎ- (４―メトキシフエニル)ジフエニルメチル基 (ＭＭＴｒ)、３、５―ジメトキシフエニルイソプロポキシカルボニル基 (Ｄｄｚ)、２- (４―ビフエニル)イソプロポキシカルボニル基 (Ｂｐｏｃ)である。(非特許文献 ｉ) Ｇｒｅｅｎｅ's Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ, Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ, ｉｉ) Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ, ２００９, １０９(６), ２４５５―２５０４) これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。

[0147] 

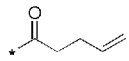
[0148] 塩基性条件で外れる保護基とはｐＨ７からｐＨ１４の範囲で外れる保護基であり、好ましくはｐＨ７からｐＨ１０の範囲で脱保護可能な保護基であり、例えば、極度に電子吸引基が付与された2-[フエニル(メチル)スルホニオ]エトキシカルボニル基などが挙げられる。例えばハロゲン基やニトロ基、トリフルオロ基などが１つあるいは複数個導入されたトリクロロアセチル基などが挙げられる。具体的には以下に示したトリフルオロアセチル基 (Ｔｆａ)である。(非特許文献 ｉ) Ｇｒｅｅｎｅ's Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ, Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ, ｉｉ) Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ, ２０

０９，１０９（６），２４５５-２５０４）



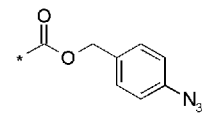
Tfa

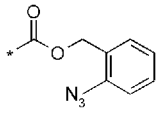
[0149] 酸化的条件で外れる保護基とは、例えばヨウ素存在下で脱保護可能な以下に示したペンテノィル基である。（非特許文献ｉ）Ｇｒｅｅｎｅ's Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ｉｉ）Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９７，６２，７７８-７７９，ｉｉｉ）Ｍｅｔｈｏｄ，２００５，３６，２４５-２５１）

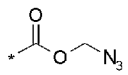


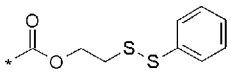
Pentenoyl

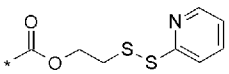
[01 50] 還元的条件で外れる保護基とは、例えばトリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ），やジチオトレイトール（ＤＴＴ）存在下で脱保護可能な保護基であり、例えばアジド基（非特許文献ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ，２００９，１０，１１８６_１１９２）、４_アジドベンジルオキシカルボニル基（ｐ_Ａｃｂｚ）（非特許文献Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ １，１９９６，１２０５—１２１１）、２_アジドベンジルオキシカルボニル基（ｏ_Ａｃｂｚ）、アジドメトキシカルボニル（Ａｚｏｃ）（非特許文献Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒｓ，２００７，９（１１），２２２３-２２２５）、フエニルジスルファニルエチルオキシカルボニル基（Ｐｈｄｅｃ）、２_ピリジルジスルファニルエチルオキシカルボニル基（Ｐｙｄｅｃ）（非特許文献Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２００９，１０９（６），２４５５-２５０４）である。これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。


p-Acbz

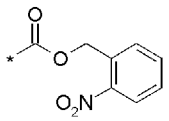

o-Acbz

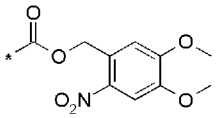

Azoc

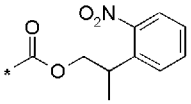

Phdec


Pydec

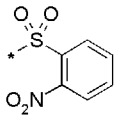
[01 51] 光照射により外れる保護基とは、例えばｏ—二トロベンジルオキシカルボニル基（ｏＮｚ）、４，５—ジメトキシ_２—二トロベンゾキシ）カルボニル基（Ｎｖｏｃ）、２-（２—二トロフエニル）プロピルオキシカルボニル基（Ｎｐｐｏｃ）である。（非特許文献ｉ）Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２００９，１０９（６），２４５５—２５０４、ｉｉ）Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９７，６２，７７８—７７９、ｉｉｉ）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１２，２０，２６７９-２６８９）これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。

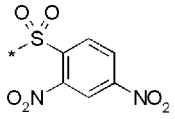

oNz

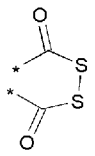

Nvoc


Nppoc

[01 52] 求核剤の添加で外れる保護基とは、例えばチオール存在下で脱保護される保護基であり、例えば、ｏ—二トロベンゼンスルホニル基（ｏ_ＮＢＳ）、２、４—ジ二トロベンゼンスルホニル基（ｄＮＢＳ）、ジチオスクシノィル基（Ｄｔｓ）である。（非特許文献Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２００９，１０９（６），２４５５-２５０４）これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。

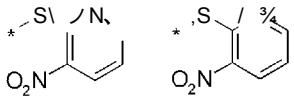

o-NBS


dNBS


Dts

[01 53] 先述したから１）から６）までを複数組み合わせることで脱保護可能な保護基とは、例えば１）と６）を組み合わせる脱保護方法として、ｐＨ２からｐＨ６の範囲でチオールを添加することで脱保護可能な保護基、例えば３-

ニトロ_2_ピリジンスルフエニル基 (Npys) (非特許文献 i) International Journal of Peptide and Protein Research, 1990, 35, 545-549、ii) International Journal of Peptide and Protein Research, 1980, 16, 392—401)、 2—ニトロフエニルスルフエニル基 (Nps) (非特許文献 Chemical Reviews, 2009, 109 (6), 2455-2504)である。これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。



Npys Nps

[01 54] また1)と3)を組み合わせる脱保護方法に適用する保護基とは、例えばpH2からpH6の範囲でジスルフィド化合物を添加することで脱保護可能な保護基、例えばチアゾリジン環、チアジナン環である。これらの保護基を形成する炭素原子は置換されていてもよい。

チアゾリン環 チアジナン環

[01 55] チアゾリジン環およびチアジナン環の開環によるアミノ基への脱保護方法

チオールの求核性を利用するNative Chemical Ligation (NCL)によるアミド化反応は、ペプチドおよびタンパク質の化学合成において有用な手法である。連続的なアミド化反応や任意のタイミングでNCLを行う場合、アミノ基およびチオール基にあらかじめ保護をしておくのは有用な手段であり、例えば非特許文献v 1に記載されているペプチド鎖の多段階アミド化によるタンパク質合成や、非特許文献v 2に記載されているタンパク質の化学修飾では、システィンのァミノ基およびチオール基を同時に保護する構造としてチアゾリジン環が報告されている。

[0156] ペプチド構造中のチアゾリジン環のアミノ基、チオール基への脱保護方法

は、ｐＨ４からｐＨ７の緩衝液中にメトキシァミンを添加する方法が公知（例えば非特許文南犬ｖ１（Angewandte Chemie, Internat ionaｌ Edition, 2006, 45(24), 3985-3988）および非特許文献ｖ２（Journａｌ of the Amer ican Che micaL Soc iety, 201 1, 133, 1141 8-1 1421））であるが、例えば本特許に記載しているペプチド化合物中にエステル、またはチオエステルが含まれている構造では、脱保護反応時もしくはワンポットで次の反応を行う際、副反応としてメトキシァミンとエステル部分が反応したアルコキシアミドの生成が危惧される。

[01 57] 本発明者らはメトキシァミンを使用しないチアゾリジン環およびチアジナン環の脱保護方法として、ジスルフィド化合物を添加する方法を開発した。

本手法は、酸性条件下でチアゾリジン環およびチアジナン環を開環し、ァミノジスルフィド構造へと導くことを特徴としており、続く還元剤の添加によりアミノチオールへと導くことが可能である。

本手法は、水中、緩衝液中、もしくは水と混和した有機溶媒中で行う。使用する有機溶媒は、水と混和が可能で、基質と反応もしくは析出しないものを選択する。例えばＮ，Ｎ＿ジメチルァセトアミド、Ｎ、Ｎ—ジメチルホルムアミド、ァセトニトリルを使用する。水と有機溶媒の比率は、基質およびジスルフィド化合物の溶解性によって決まるが、例えば１ＯｍＭのジチオジピリジンで反応を行う場合、ジチオジピリジンの溶解性の観点から、５％以上のＮ，Ｎ＿ジメチルァセトアミドを使用するのが好ましい。

[01 58] チアゾリジン環を開環するためのｐＨ範囲は、反応を１２時間以内に完結させることを目的とした場合、ｐＨ１～５が好ましい。更に酸性で不安定なチアゾリジン環を有する化合物を取り扱う場合、ｐＨ４～５が好ましい。

チアゾリジン環を開環するための反応温度は、反応を１２時間以内に完結させることを目的とした場合、１５℃以上が好ましい。更に熱に不安定なチァゾリジン環を有する化合物を取り扱う場合、１５～５０℃の範囲が好ましい。

[01 59] 添加するジスルフィド化合物は、例えばジアルキルジススフィドやジァリ

—ルジスルフィドを用いることができるが、ジアリールジスルフィドが好ましく、更にジチオジピリジンがより好ましい。

[01 60] ジチオジピリジンの使用量はチアゾリジン誘導体の使用量によって決まるが、例えば1．0ｍＭのチアゾリジン誘導体に対して30ｍＭのジチオジピリジンを使用し、ｐＨ4．2、36℃で反応を行うと、12時間以内にチアゾリジン環の開環は完了する。

[01 61] アミノジスルフィド構造からアミノチオールへ変換する還元剤としては、アルキルホスフィン、アリールホスフィン、還元力を有するチオール化合物を用いることができ、例えばＴＣＥＰ、ＤＴＴを用いる。アミノチオールへの変換を速やかに進める場合にはＴＣＥＰが好ましい。

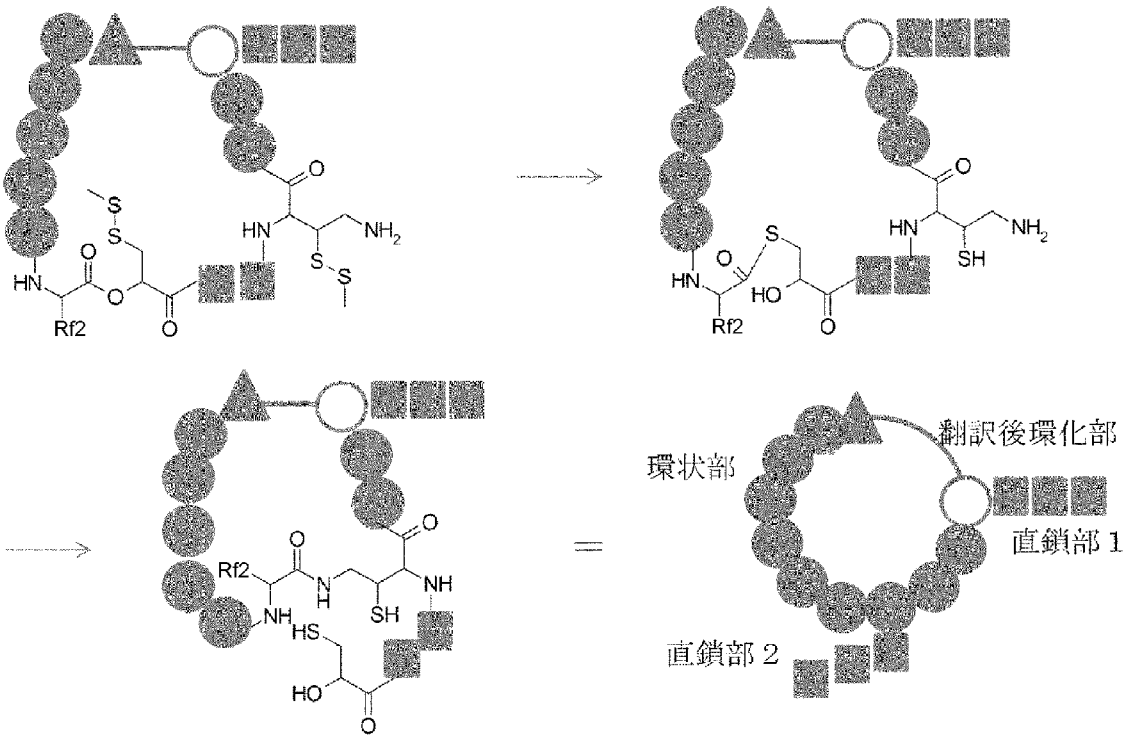
[01 62] ＴＣＥＰの使用量は使用するチアゾリジン誘導体とジチオジピリジンの使用量によって決まるが、例えば1ｍＭのチアゾリジン誘導体を30ｍＭのジチオジピリジンにより2＿（2—ピリジルジチオ）エチルアミン体へと導いた場合、40ｍＭのＴＣＥＰを使用し、ｐＨ4．5、24℃で反応を行うと、1時間以内にアミノエタンチオール体への誘導が完了する。

[01 63] このようにｍＲＮＡの一次配列情報から翻訳される直鎖ペプチド配列から分枝構造を形成させる技術は、従来の技術では到達できない分枝構造を有する構造多様性の高いペプチド群のｍＲＮＡディスプレイライブラリー構築を可能とする。

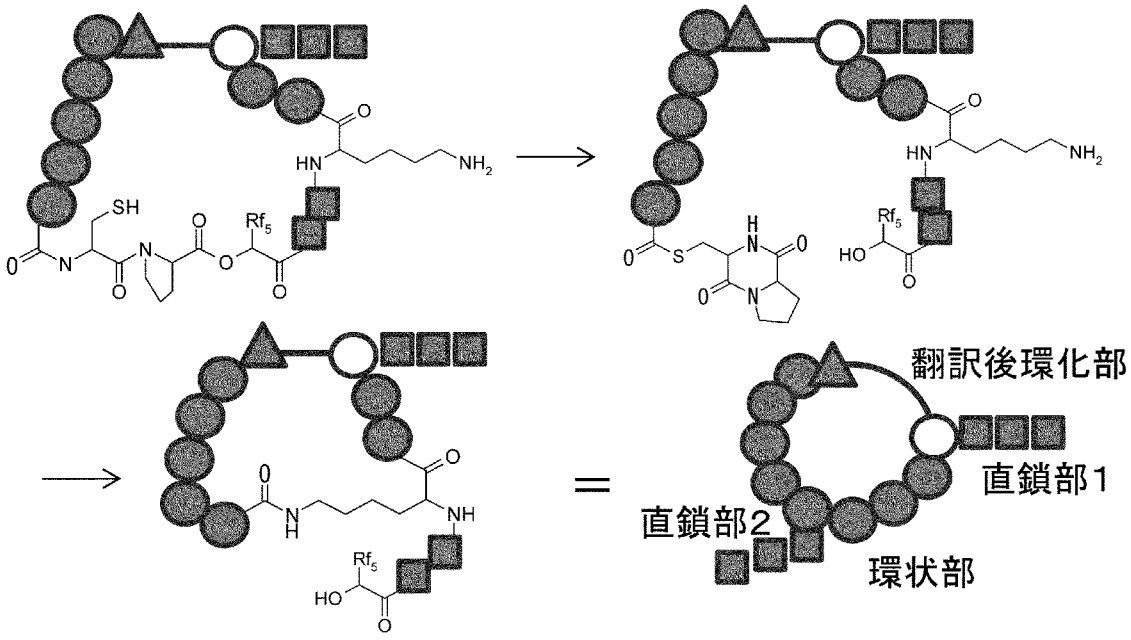
[01 64] このようにヒドロキシカルボン酸を足がかりにしたChemicaL Space 拡大ペプチド合成法を述べたが、本概念はスキームＥおよびスキームＦ、スキームF2、スキームF3の手法に限らない。1回目の環化反応は上述の環化反応に限らず、分枝化反応を可能にする（1回目の環化反応中に安定に存在し、RNAに安定な反応条件で分枝化のための活性化が可能であること）反応条件で適用できる全ての環化反応に適用できる。2回目の活性エステル発生部位として化合物F5もしくは化合物E1を用い、2回目アミノ基部位として化合物Na-4、化合物Na-5、化合物Na-10(Na-7基又はNa-8基)あるいは化合物Na-11(Na-7基又はNa-8基)を用いる任意の方法で活用できる。ヒドロキシカルボン酸とアミン

部位を有するアミノ酸を所望の位置に配置させ、適切な化学反応を実施させれば望みの分枝ペプチド(直鎖部２)が得られる。ヒドロキシカルボン酸とアミン、それぞれのアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体の選択は必要な官能基を有していれば自由であるが、ヒドロキシカルボン酸部位はＮ末端側に配置されることが好ましい。ヒドロキシカルボン酸は、α—ヒドロキシカルボン酸と制限されず、βやァーヒドロキシカルボン酸に代表される様々なヒドロキシカルボン酸を取り得る。またヒドロキシカルボン酸ではなく、チオカルボン酸を翻訳導入させ、エステルではなくチオエステルを足がかりにした分枝ペプチド形成反応も可能である。本手法は、アミノ酸数が限定された中分子でのヒット創出には欠かせないChemicaL space 拡大を実現するものである。

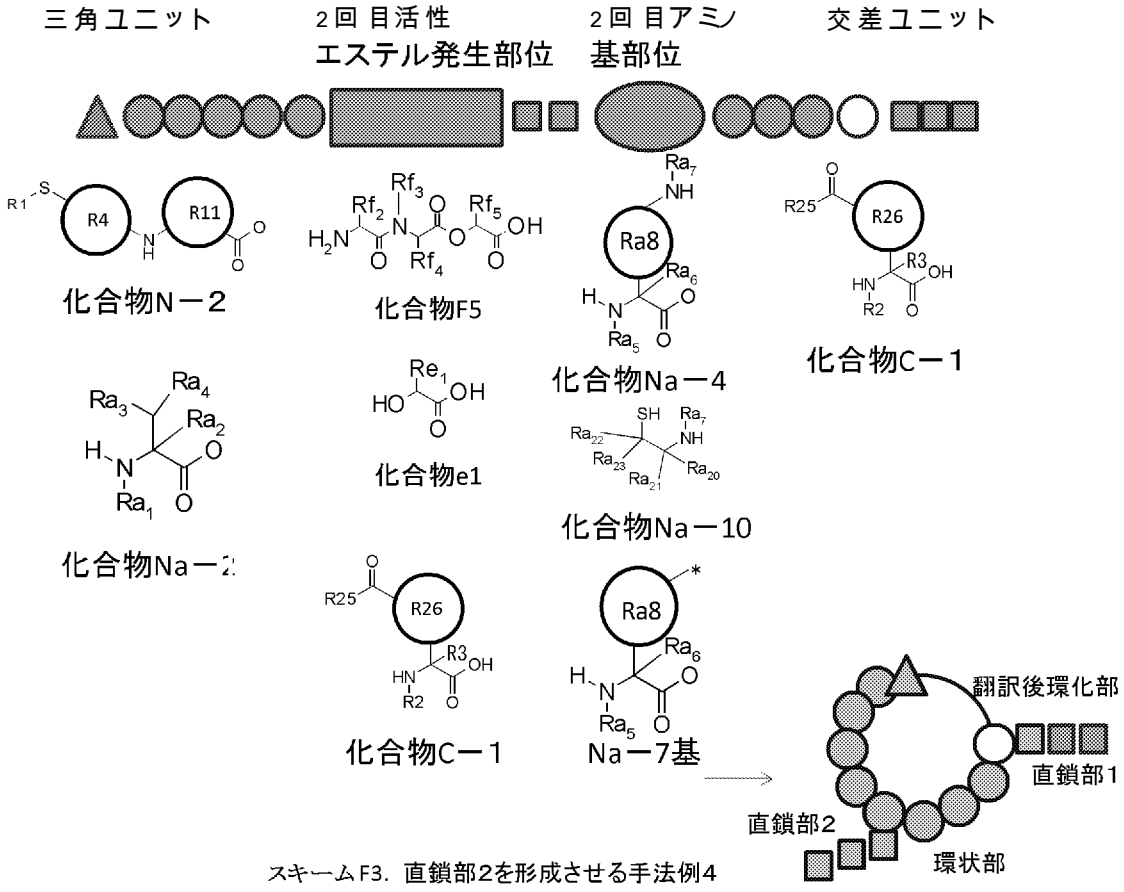
[0165]



スキーム 11 直鎖部２を形成させる手法例２



スキームF2. 直鎖部2を形成させる手法例3



スキームF3. 直鎖部2を形成させる手法例4

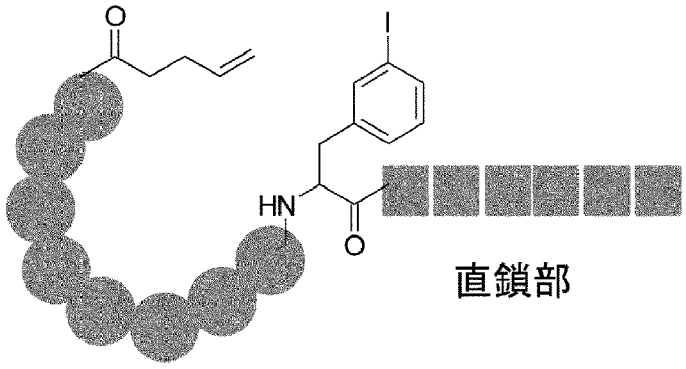
[0166] 次に、C-C結合環化を利用する場合を例にした反応設計を述べる。例えば、三角ユニットには、N末端カルボン酸類縁体である2重結合を有するカルボ

ン酸を翻訳導入させ、交差ユニット (○ユニット) には、側鎖にヨードフエニル基を有するアミノ酸を翻訳導入させることができる (スキームC-2) 。このように三角ユニットと交差ユニットにそれぞれ、Pdを用いたHeck反応により縮合反応させる官能基を導入させた場合、Pdを用いた反応によりC-C結合環化生成物が得られる。Pdの配位子として様々な選択肢が可能である。通常のPd触媒反応において使用されている配位子としてホスフィン配位子、ホスフィンオキシド配位子、窒素原子からなる配位子、ヒ素原子からなる配位子、カルベン型配位子などが使用可能である。これらは分子内に配位可能な官能基を1つ有する一座配位子でも、これらPdに配位可能な官能基のなかから2つを組み合わせた二座配位子でも良い。反応を水中で行う必要があることから水溶性官能基を有する配位子を使用してもよい。ここでは翻訳液中に含まれるRNA成分、GTP、ATPなどの核酸成分によりPdが錯体形成による不活性化を受けるためPdと強固な配位結合を形成する配位子が好ましく、例えば1, 1' - ビス (ジフエニルホスフイノ)フエロセン、2, 2' - ビス (ジフエニルホスフイノ) - 1, 1' - ビフエニル、2, 2' - ビス (ジフエニルホスフイノ) - 1, 1' - ビナフチル、4, 5- ビス (ジフエニルホスフイノ)-9, 9- ジメチルキサンテン、1, 3- ビス (ジフエニルホスフィノ)プロパンのような二座のホスフィン配位子が挙げられ、含水系溶媒への溶解性の点から2, 2' - ビス (ジフエニルホスフイノ) - 1, 1' - ビフエニルがより好ましい。通常有機合成化学反応では、Pdは触媒量 (多くの場合には1mo L%以下) の使用で十分であるが、翻訳合成後のDisp Lay Libraryへの適用では、Pdが翻訳合成に必要なRNA部分と錯形成してしまうため、Pdを過剰量利用しないと所望の化学反応が十分な速度で進行しない一方で、Pdを過剰に利用しすぎるとRNAとの錯体の溶解度が低下してしまって、所望の化学反応が十分な速度で進行しない。Pd使用量はm_RNAを1pmol含有する翻訳合成物に対し1nmol以上使用するのが好ましく、更に60nmol使用するのが好ましい。後述の実施例に記載のようにミセルを利用すると反応の加速が得られるため、好ましい。

[0167] 使用可能なミセルはァニオン性、カチオン性、双性、非イオン性のいずれ

も使用可能であるが、特に非イオン性ミセルであるセバシン酸ポリオキシエタニル-α-トコフェリル（ＰＴＳ）を使用するのが好ましい。セバシン酸ポリオキシエタニル-α-トコフェリルの使用濃度としては任意の濃度で使用可能であるが最終濃度１％以上であることが好ましく、最終濃度７．５％以上で使用することがより好ましい。反応進行には塩基を使用することが必要であり、Ｐｄに配位しない成分からなるバッファーを使用することが好ましく、リン酸バッファー、炭酸塩バッファーなどが使用可能である。反応溶媒のｐＨはｍ＿ＲＮＡが安定に存在可能でかつ環化反応が進行する範囲に調節することが好ましく、７以上、１０以下がより好ましく、７．５以上、８．５以下が更により好ましい。反応温度はｍ＿ＲＮＡが安定に存在可能で通常化学反応が実施できる範囲であれば特に限定されないが、好ましくは１５℃~80℃であり、より好ましくは４０℃~６０℃である。

[0168]



スキーム C-2. 三角ユニットに炭素 - 炭素2重結合基、交差ユニットにヨードフェニル基を導入した場合の環化前翻訳化合物例。スキーム A-1 の具体例の1つ。

[0169] C-C結合反応として、Pdを利用したHeck反応の例を述べたが、本出願ではC-C結合環化反応として、Pdを利用したHeck反応に限定されない。Suzuki反応やSonogashira反応など、Pdを用いた様々な反応も、同様に実施することができる。この場合、配位子や塩基の選択が重要となる場合がある。また、遷移金属としても、Pdに限定されず、Ni, Ru, Coなど様々な金属でC-C結合反応を実施することが可能である（非特許文献Matthew S. SigmanらAdvances in Transition MetaL (Pd, Ni, Fe) - Catalyzed Cross-Coup Ling Reactions Using ALk

y L-organometa LLics as React ion Partners. Chem. Rev., 201 1, 111, 1417-1492, Lutz Ackermann らRuthen ium-Cata Lyzed Direct Ary Lat ions Through C-H Bond Cleavages. Top Cur r Chem. 201 0, 292, 21. Pau L Knoche L らPd-, Ni-, Fe-, and Co-Cata Lyzed Cross-Coup Lings Us ing Funct iona Lized In-, Mg-, Fe-, and In-Organometa LLics. Isr. J. Chem. 201 0, 50, 547. GWi Lhe rm Evano らCopper-Mediated Coup Ling React ions and The ir App Licat ions i n Natura l

Products and Des igned Biomo Lecu Les Synthes is. Chem. Rev. 2008, 108, 3054) 。

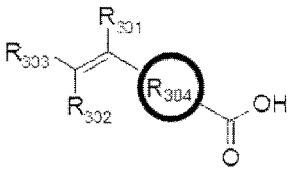
[01 70] スキームC-2 を構成する三角ユニットであるアミノ酸、アミノ酸類縁体、N末端カルボン酸類縁体には反応性官能基を有していれば特に限定されない。しかし、アミノ酸を選択すれば、N末端にァミンが残存するため、これが残存しない場合と比較して膜透過に不利である。このため、三角ユニットとしては、ヘテロ原子の数が少ないものがより好ましい。このようなN末端カルボン酸類縁体の例として、化合物ば-1~CC-4 に記載の化合物を挙げることができる。化合物CC-1では炭素-炭素2重結合が反応点となる。化合物CC-2では、炭素-炭素3重結合が反応点となる。化合物CC-3では、Xが反応点となる。Xとしてはハロゲンが好ましく、CL, Br, I, Fの中から選択される。反応性の点からはBrとIが好ましく、Iが最も好ましい。化合物CC-4では、ほう酸エステル部分が反応点となる。R301, R302, R303は水素原子の他、置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ァリール基、ヘテロァリール基、ァラルキル基の中から選択される。これら置換基としては、置換された結果得られる化合物ＣＣ_1~ ＣＣ_4 が翻訳合成可能なものであれば特に限定されない。そのような置換基としてたとえば、ハロゲン基、アルコキシ基などが挙げられる。

[01 71] R304は反応点と翻訳点 (カルボン酸部位) を連結するユニットである。以下その代表的構造を示す。両ユニットをメチレン基 (部分構造N-3) 、エチレン基 (部分構造N-4) 、プロピレン基 (部分構造N-5) などのC1~C6 ユニット

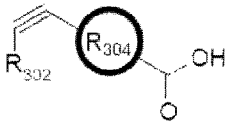
で連結させることができる。また、芳香族化合物のアリール炭素から直接連結させることもできる (部分構造N-6) 。またアラルキル構造で連結させることもできる (部分構造N-7、N-8) 。なお、連結位置はオルトに限定されずメタ、パラであってもよく、またフエニル基以外の置換アリール基や置換アラルキル基であってもよい。置換基としては、たとえば、ハロゲン基、アルコキシ基などが挙げられる。

[01 72] また、スキームC-2を構成する三角ユニットのアミノ酸の例としては、側鎖に2重結合、3重結合、ハロゲン、ほう酸エステルを有するアミノ酸であれば特に限定されない。L型アミノ酸やD型アミノ酸、α-α-ジアルキルアミノ酸でもよいが、特にL型アミノ酸が好ましい。ドラックライクなペプチドを取得する上では、N末端のアミノ基は置換されていることが好ましい。N-メチルなどのアルキル化も可能であるが、むしろ、アシル化などのアミド化など窒素原子の塩基性を失わせる置換基の導入が好ましい。

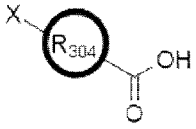
[01 73] また、スキームC-2を構成する三角ユニットのアミノ酸類縁体もしくはN末端カルボン酸類縁体としては、側鎖に2重結合、3重結合、ハロゲン、ほう酸エステルを有するヒドロキシカルボン酸であってもよい。アミノ酸の場合と同様、側鎖の選択には特に限定されない。α—ヒドロキシカルボン酸の他、βやァーヒドロキシカルボン酸であってもよい。また、側鎖に2重結合、3重結合、ハロゲン、ほう酸エステルを有するジペプチドやトリペプチドであってもよい。



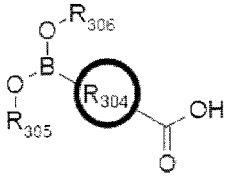
化合物CC-1



化合物CC-2



化合物CC-3



化合物CC-4

[01 74] スキームC-2を構成する交差ユニット (○ユニット) の例としては、側鎖に2重結合、3重結合、ハロゲン、ほう酸エステルを有するアミノ酸あるいはα—ヒドロキシカルボン酸が挙げられる。アミノ酸あるいはα—ヒドロキシカルボン酸の側鎖としては、これらの反応性官能基が存在していれば、その

他は特に限定されない。それぞれの反応性官能基にて置換された、置換されてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などの中から選択される。これら置換基としては、たとえば、ハロゲン基、アルコキシ基などが挙げられる。

L型、D型、α_ α—ジアルキル型のいずれも許容されるが、α位に水素原子が存在する場合にはL型アミノ酸もしくはアミノ酸類縁体が好ましい。

[01 75] 三角ユニットと交差ユニット (○) ユニットの組み合わせは、Pdなどの遷移金属により縮合反応させられる組み合わせであれば特に限定されない。

[01 76] ·《プチド化合物の化学合成

本発明のペプチド化合物は、化学合成することによって製造することも可能である。

例えば、Ｆｍｏｃ合成と呼ばれる方法とＢｏｃ合成と呼ばれる方法が挙げられる。Ｆｍｏc合成では、主鎖アミノ基をＦｍｏｃ基により保護され、側鎖官能基を必要に応じてピペリジンなどの塩基性で切断されない保護基で保護され、主鎖カルボン酸を保護しないアミノ酸を基本単位とする。その他、Ｆｍｏｃ保護されたアミノ基とカルボン酸基を有する組み合わせであれば、特に限定されない。例えばジペプチドを基本単位としてもよい。Ｎ末端に配置させる基本単位には、Ｆｍｏｃアミノ酸以外であってもよい。例えば、Ｂｏｃアミノ酸であってもよく、アミノ基を有しないカルボン酸類縁体であってもよい。主鎖カルボン酸基を固相担体の官能基との化学反応により固相に担持させる。続いてピペリジンやＤＢＵなどの塩基によりＦｍｏｃ基を脱保護し、新たに生じたアミノ基と続いて添加される基本単位のカルボン酸を有する保護アミノ酸とを縮合反応させることで、ペプチド結合を生成させる。縮合反応では、ＤＩＣとＨ０Ｂｔの組み合わせ、ＤＩＣとＨ０Ａｔの組み合わせ、ＨＡＴＵとＤＩＰＥＡとの組み合わせなど様々な組み合わせが可能である。脱Ｆｍｏc基とそれに続くペプチド結合生成反応の繰り返しにより、望みのペプチド配列を生成させることができる。望みの配列が得られた後、固相から

の切り出しと必要に応じて導入した側鎖官能基の保護基の脱保護が行われる。また、固相からの切り出しを行う前にペプチドの構造変換や環化を行うことも可能である。固相からの切り出しと、脱保護は同一の条件、例えば９０：１０のＴＦＡ/ H_2O で行っても良いし、必要に応じて別々の条件で脱保護しても良い。固相からの切り出しは、１％　ＴＦＡなどの弱酸での切り出しが可能なものもあれば、保護基としてＰｄなどを利用して、両者の化学反応の直行性を利用することが可能である。これらの工程の間もしくは最後に、環化などの工程を実施することもできる。例えば、側鎖カルボン酸とＮ末端主鎖のアミノ基とを縮合させることや、側鎖アミノ基とＣ末端主鎖のカルボン酸を縮合させることができる。この際、Ｃ末端側のカルボン酸と環化させる側鎖カルボン酸の間、もしくはＮ末端側の主鎖アミノ基またはヒドロキシル基と環化させる側鎖アミノ基の間で反応直行性が必要であり、前述のとおり保護基の直行性を考慮して保護基の選択が行われる。このようにして得られた反応物を逆相カラムや、分子ふるいカラムなどで精製することができる。これらの詳細は、例えばメルク株式会社が平成１４年5月1日に発行した固相合成ハンドブックなどに記載されている。

[01 77] ドラックライクな《プチド化さ物又は《プチド化合物-核酷複合体の作製

さらに本発明は、所望の活性を有するドラックライクなペプチド化合物又はペプチド化合物-核酸複合体を製造する方法を提供する。

[01 78] 所望の活性を有するドラックライクなペプチド化合物-核酸複合体を製造する方法としては、例えば以下の工程を含む製造方法を挙げることができる：

(i)アミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数が9~1 3残基である非環状ペプチド化合物を翻訳合成して、当該非環状ペプチド化合物とそれをコードする核酸配列がリンカーを介して結合している複合体からなる非環状ペプチド化合物-核酸複合体を形成する工程

(ii)工程 (i)で翻訳合成された複合体の非環状ペプチド化合物をアミド結合又は炭素-炭素結合によって環化し、環状部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の残基数の合計が５～ １２となる環状化合物を形成する工程

(iii)工程 (ii)で得られた環状部を有するペプチド化合物-核酸複合体ライブラリーと生体内分子とを接触させ、当該生体内分子に対して結合活性を有する複合体を選択する工程。

[0179] さらに、上記の工程で選択された複合体から、所望の活性を有するドラックライクなペプチド化合物を製造することができる。

例えば以下の工程を含む製造方法を挙げることができる：

(iv)前記工程 (iii)で選択された複合体の核酸配列からペプチド化合物の配列情報を得る工程、および、

(V)前記工程 (iv)で得られた配列情報に基づきペプチド化合物を化学合成する工程

さらに、上記の製造工程において、前記非環状ペプチド化合物がα-ヒドロキシカルボン酸、及び、保護されていてもよい側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体を含み、工程 (ii) の環状化合物を形成する工程の前又は後で、α—ヒドロキシカルボン酸部位と側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体部位を化学反応させて分枝部位を形成させる工程を含んでいてもよい。当該工程により、環状部の様々な位置に上述の直鎖部2を有するペプチド化合物を製造することが可能である。

[0180] ここで、上述の工程 (i)に記載のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数、及び、工程 (ii)に記載の環状部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の残基数の合計には、翻訳後修飾によって除かれるアミノ酸又はアミノ酸類縁体は含まれない。例えば、上述のスキームF3において、直鎖部2を有するペプチド化合物の製造中で翻訳後修飾中に当該ペプチドから脱離されるCys-Pro 配列は、工程 (i)及び (ii)のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数には含まれない、その他、例えば、ペプチド化合物とRNAのリンカー部位としてGLy-Ser の繰り返し構造部を含むものを利用する場合は当該GLy-Ser の繰り返し構造部や、固定されているアミノ酸領域、本発明の環状部を有するペプチド化合物、特にドラックライクなペプチド化合物部分と核酸とを結合させる目的の部分はリンカーに含まれ、工程 (i)及び (ii)のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数には含まれない。そ

の場合には、工程 (ii) の環化後の環部の残基数は５～１１ではなくそれより長い残基数であるが、直鎖部２を生成させる反応後に環部の残基数が５～１１になればよい。

[01 81] なお、本製造方法では、工程 (ii)や工程 (V)において、上述のドラックライクなペプチド化合物とするための化学修飾、最適化するための化学修飾を行ってもよい。また、本発明において、標的物質は生体内分子が好ましい。本発明における「生体内分子」とは、生体内の分子であれば特に限定されないが、疾患治療のターゲットとなる分子が好ましく、特に、従来の分子量500未満の低分子化合物が結合し得る穴 (キヤビティ)を有していない分子や、抗体等の高分子化合物がアクセスすることのできない細胞内蛋白、核酸、膜蛋白の細胞内領域又は膜蛋白の膜貫通 ドメイン等が好ましい。

具体的には例えば、STAT, AP1, CREB, SREBPなどの転写因子、ムスカリン性アセチルコリン受容体，カンナビノイド受容体、ＧＬＰ＿１受容体、PTH受容体などのGタンパク質共役型受容体（GPCR)、TNF、TNFR、IL-6 、IL-6R 等のサイトカインやそのレセプター、P2X受容体，ニコチン性アセチルコリン受容体などのイオンチャネル型受容体、イオンチャネル、トランスポーター、miR-21, MiR206 などのmicroRNA などが挙げられる。

また、環状部の形成には、例えば、上述の環化反応を利用して形成することが可能であり、当該環化反応によって、アミド結合や炭素-炭素結合を形成させることが可能である。

[01 82] また、ペプチド化合物-核酸複合体の合成工程において、無細胞翻訳系など公知の技術を用いることができる。具体的には、以下のような方法を用いて作製することができる。

[01 83] 転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）は、分子量２５０００から３００００で、３'末端のＣＣＡ配列を含む鎖長７３～９３塩基からなるＲＮＡで、３'末端を介してアミノ酸のカルボキシ末端とエステル結合したアミノアシル化ｔＲＮＡとしてポリペプチド伸長因子 (ＥＦ—Ｔｕ)、ＧＴＰと三重複合体を形成しribosomeに運ばれ、ribosome によるｍＲＮＡの塩基配列情報のアミノ酸配列への翻

訳において、ｔＲＮＡの配列中のアンチコドンとｍＲＮＡのコドンとの塩基対形成によってコドンの識別に関与するＲＮＡである。細胞内で生合成されるｔＲＮＡには共有結合的に修飾された塩基が含まれており、ｔＲＮＡのコンフオメーシヨンやアンチコドンの塩基対形成に影響し、ｔＲＮＡのコドン識別を助けていることがある。一般的な試験管内転写にて合成したｔＲＮＡは所謂核酸塩基であるアデニン、ゥラシル、グァニン、シトシンから成るが、細胞内から調製したものや化学的に合成したものにはその他のメチル化体、含硫誘導体、脱ァミノ誘導体、イソペンテニル基ゃトレオニンを含むアデノシン誘導体などの修飾塩基を含むものもあり、ｐｄＣｐＡ法などを利用した場合にデオキシ塩基を含む場合もある。

[01 84] 所望のｔＲＮＡ配列をコードし、上流にT7, T3もしくはSP6プロモーターを配置した鋳型ＤＮＡを用意し、T7 RNA polymerase やT3, SP6 RNA polymeraseなどプロモーターに適応したRNAポリメラーゼを利用して転写によってＲＮＡを合成することが出来る。細胞からｔＲＮＡを抽出精製し、ｔＲＮＡの配列の相補配列のプローブを用いて目的の生成ｔＲＮＡを抽出することも出来る。この際目的のｔＲＮＡの発現ベクターで形質転換した細胞をソースにすることも出来る。化学合成によって目的の配列のＲＮＡを合成することも出来る。例えば、このようにして得られた3'末端のＣＣＡ配列からＣＡを除いたｔＲＮＡと別途調製したァミノアシル化したｐｄＣｐＡとをＲＮＡリガーゼで結合させることでアミノアシルｔＲＮＡを得ることが出来る (ｐｄＣｐＡ法)。全長でＲＮＡを用意し、種々の非天然アミノ酸の活性エステルをｔＲＮＡに担持させるリボザィムであるフレキシザィムによるァミノアシル化も可能である。この他にも後述の方法を用いることによってアシル化ｔＲＮＡを得ることが出来る。

[01 85] 大腸菌の翻訳に必要な蛋白因子類 (メチオニルtRNA トランスフォルミラーゼ、 EF-G、 RF1、 RF2、 RF3、 RRF、 IF1、 IF2、 IF3、 EF-Tu、 EF-Ts、 ARS(ALaRS、 ArgRS, AsnRS、 AspRS, CysRS、 GLnRS, GLuRS, GLyRS, HisRS、 IleRS、 LeuRS、 LysRS、 MetRS、 PheRS、 ProRS、 SerRS、 ThrRS、 TrpRS、 TyrRS、 ValLRSから必

要なものを選ぶ））、リボソーム、アミノ酸、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、無機ピロフォスファターゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、E. coLi由来tRNA、クレアチンリン酸、グルタミン酸カリウム、HEPES-KOH pH7. 6、酢酸マグネシウム、スペルミジン、ジチオスレイトール、GTP、ATP、CTP、UTPなどを混合したPURExpress tem mRNAを加えることによってペプチドに翻訳することが出来る。また、T7 RNA polymerase を加えておけばT7プロモーターを含む鋳型DNAからの転写、翻訳を共役して行なうこともできる。このとき所望のアシル化tRNA群やARSが許容する非天然アミノ酸群 (例えばF-Tyr) を系に添加することによって非天然アミノ酸群を含むペプチドを翻訳合成することが出来る (Kawakami T, et al. Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids. J Am Chem Soc. 2008, 130, 16861-3. , Kawakami T, et al. Diverse backbone-engineered peptides via codon reprogramming. Nat Chem Biol. 2009, 5, 888-90. ）。あるいは、ribosome やEF-Tu などの変異体を利用することによって非天然アミノ酸の翻訳導入の効率を高めることも出来る (Dedkova LM, et al. Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins. Biochemistry. 2006, 45, 15541-51. , Doi Y, et al. Elongation factor Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. J Am Chem Soc. 2007, 129, 14458-62. , Park HS, et al. Expanding the genetic code of Escherichia coLi With phosphoserine. Science. 2011, 333, 1151-4. ）。

[0186] mRNAディスプレイライブラリーは、まずT7プロモーターなどのプロモーターの下流に所望の配列を配置したDNAのライブラリーを化学合成し、これを鋳型にプライマー伸長反応にて二本鎖DNAにする。これを鋳型にT7 RNApolymerase などのRNAポリメラーゼを用いてmRNAに転写する。このRNAの3'末端にアミノアシルtRNAのアナログである抗生物質ピューロマイシンなどがつながったリンカー (スペーザー) を結合する。これを上記のPURExpress など公知の無細胞翻訳系に加え、保温することによってmRNAが翻訳され、mRNAとこれにコードされるペプチドがピューロマイシンを介して

連結される。このようにしてｍＲＮＡとその産物が対応付けられたｍＲＮＡとその産物の複合体からなるディスプレイライブラリーを構築することが出来る。

[01 87] さらに、所望の固定した標的に当該ライブラリーを接触させ、標的に結合しない分子を洗い流すことで標的に結合する分子を濃縮することが出来る（バニング）。このように選択された分子についている遺伝子情報を含むタグであるｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲ増幅し、塩基配列を解析することで結合したペプチドの配列を明らかにすることが出来る。

[01 88] 本発明では、環化ペプチド化合物-核酸複合体ディスプレイライブラリーの構築、さらには構築されたディスプレイライブラリーから、標的に結合する環化ペプチド化合物（環状部を有するペプチド化合物）もしくは環化分枝ペプチド（環状部に更に直鎖部2を有するペプチド化合物）の取得は、具体的には、例えば以下の様態に示す方法〔門一〔ＸＶＩＩ〕によって行なうことができる。

[01 89] initiation read through

〔Ｉ〕 本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、以下の1又は複数の工程を含むことができる。

A) 化合物Ｃ＿１をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと前記の工程B)のtRNAを連結させ、化合物Ｃ＿１をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素（MetRS）、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフエラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、翻訳開始ATGに続いてシスティンコドンＵＧＵもしくはUGCを、その下流に工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを含むペプチド配列をコードした錶型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D) の無細胞翻訳系に工程G) のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また本発明においては、工程G) の後、mRNAライプラリーの3' 領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。

さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0190] 〔II〕 また、 本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、以下の1又は複数の工程を含むことができる。

A) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A) のpdCpAと前記の工程B) のtRNAを連結させ、化合物C_1をァミノァシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C) のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、翻訳開始ATGに続いてシスティンコドンUGUもしくはUGCを、その下流に工程C) のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを含むペプチド配列をコードした錶型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D) の無細胞翻訳系に工程G) のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 工程H) のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノ

ペプチダーゼを作用させる工程

H，Ｉの工程は翻訳時にペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

J) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また本発明においては、工程H)ないし工程I)の後、mRNAライブラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0191] 〔ＩＩＩ〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、以下の１又は複数の工程を含むことができる。

A) 化合物Ｃ＿３（Ｒ２＝Ｒ３＝Ｒ２８＝Ｒ２９＝Ｈ、L-ァスパラギン酸誘導体）をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物Ｃ＿３をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素(MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、翻訳開始コドンＡＴＧの次にシスティンコドンを有し、さらにその下流に、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを有する錶型DNAライブラリーであって、ペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D)の無細胞翻訳系に工程G)のスペーサーを結合したmRNAライブラリ

—を加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 環状構造を形成させた後、脱硫反応をさせる工程

本発明においては、工程G)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0192] 〔IV〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、以下の1又は複数の工程を含むことができる。

A) 化合物C_3 (R2=R3=R28=R29=H、L-ァスパラギン酸誘導体)をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物C_3をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C)のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、翻訳開始コドンATGの次にシスティンコドンを有し、さらにその下流に、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを有する錶型DNAライブラリーであって、ペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D)の無細胞翻訳系に工程G)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 工程H)のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

Ｈ，Ｉの工程は翻訳時にペプチドデフォルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

I) 環状構造を形成させた後、脱硫反応をさせる工程

本発明においては、工程G)の後、mRNAライブラリーの3'領域にアニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0193] 〔1〕 メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいtBSSEtGABA、tBSSEt βALaをN末端とすることで実施可能となるアミド環化ペプチド化合物ライブラリーを構築する方法であって、以下の１又は複数の工程を含む方法に関する。

A) tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程、

D) 化合物C-1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)の3'末端のtRNAを連結させ、化合物Ｃ_１をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)の開始tRNAと工程F)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素(MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、ATGを１番目のコドンとして有し、さらにその下

流にエ程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程い 環状部位および直鎖部位2を形成させるエ程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0194] [V- 2] メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいtBSSEtGABA、tBSSEt βALaをN末端とすることで実施可能となるアミド環化ベプチド化合物ライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをァミノァシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化した開始t RNAを提供する工程、

D) 化合物C-1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D) のpdCpAと工程E) の3' 末端のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供し、任意のN—メチルアミノ酸をアミノアシル化したpdCpAを提供した後、3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供し、これらpdCpAとtRNAを連結させ、N_メチルアミノ酸をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C) の開始tRNAと工程F) のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルt RNA トランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、ATGを1番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F) のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3 ' 側に工程F) のN—メチルアミノアシル化tRNAに対するコドンをを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G) の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程い 環状部位および直鎖部位2を形成させるエ程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3' 領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0195] 〔VI_1〕 メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいtBSSEtGABA、tBSSEt βALaをN末端とすることで実施可

能となるアミド環化ペプチド化合物ライブラリーを構築する方法であって、以下の１又は複数の工程を含む方法に関する。

A) tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3' 末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A) のpdCpAと工程B) の開始tRNAを連結させ、tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化した開始t RNAを提供する工程、

D) Asp(SBn) をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D) のpdCpAと工程E) の3' 末端のtRNAを連結させ、Asp(SBn) をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C) の開始tRNAと工程F) のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルt RNA トランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、ATGを１番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F) のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、その３' 側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G) の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物 - mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程い 環状部位および直鎖部位２を形成させるエ程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3' 領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0196] 〔ＶＩ－２〕 メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいtBSSEtGABA、tBSSEt βALaをN末端とすることで実施可能となるアミド環化ペプチド化合物ライブラリーを構築する方法であって、以下の１又は複数の工程を含む方法に関する。

A) tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3' 末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A) のpdCpAと工程B) の開始tRNAを連結させ、tBSSEtGABAもしくはtBSSEt βALaをアミノアシル化した開始t RNAを提供する工程、

D) Asp(SBn) をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D) のpdCpAと工程E) の3' 末端のtRNAを連結させ、Asp(SBn) をアミノアシル化したtRNAを提供し、任意のN－メチルアミノ酸をアミノアシル化したpdCpAを提供した後、3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供し、これらpdCpAとtRNAを連結させ、N－メチルアミノ酸をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C) の開始tRNAと工程F) のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルt RNA トランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、ATGを１番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F) のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その３' 側に工程F) のN－メチルアミノアシル化tRNAに対するコドンをを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

1) 工程H) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程い 環状部位および直鎖部位2を形成させるエ程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0197] 〔VI 1—1〕 メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいアミノ酸をN末端とすることで実施可能となるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)の pdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N—2の中をァミノァシル化した開始tRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程 D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)の開始tRNAと工程F)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルt RNA トランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)の翻訳開始tRNAのアンチコドンに対応するコドンを1番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環状部位を形成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0198] [VII-2] メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいアミノ酸をN末端とすることで実施可能となるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_2をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)の pdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N—2の中をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程 D) のpdCpAと工程E) のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C) の開始tRNAと工程F) のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C) の翻訳開始tRNAのアンチコドンに対応するコドンを1番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F) のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンをを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I) のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G) の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環状部位を形成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0199] 〔VI 1—3〕 メチオニン以外のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体のN末端導入

あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、翻訳伸長反応で許容されにくいアミノ酸をN末端とすることで実施可能となるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_2をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N—2の中をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、さらに、任意のN—メチルアミノ酸をアミノアシル化したPdCpAを提供する工程、さらに3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程、さらにこれらpdCpAとtRNAを連結させ、N—メチルアミノ酸をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)の開始tRNAと工程F)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合成酵素(MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フォルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)の翻訳開始tRNAのアンチコドンに対応するコドンを1番目のコドンとして有し、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側に工程F)のN—メチルアミノアシル化tRNAに対するコドンをを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程G)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環状部位を形成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にアニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

M) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

N) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

0) 塩基配列を解析する工程

[0200] 〔ＶＩＩ 1—1〕 メチオニン以外のアミノ酸をN末端に有するペプチドの環化あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、N末端アミノ酸の異なる複数種類のペプチドを同時に翻訳することで実施可能となる環化部位の構造の異なるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であつて、以下の１又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物Ｃ＿Ｘ（本明細書において「化合物Ｃ＿Ｘ」とは化合物Ｃ＿１、化合物Ｃ＿２および化合物Ｃ一３から選択されるいずれかの化合物を指す。本明細において以下同じ）をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A) のpdCpAと前記の工程B) のtRNAを連結させ、化合物Ｃ＿Ｘをアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C) のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、工程C) のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、その3 ' 側にプロリンもしくは他のARSの基質となるＮ—メチルアミノ酸のコドンを途中に含むペプチド配列をコードした錶型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E) の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D) の無細胞翻訳系に工程G) のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物 - mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

1) 工程H) のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

Ｈ, Ｉの工程は翻訳時にペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

J) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また本発明においては、工程H)ないし工程I)の後、mRNAライブラリーの3'領域にアニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0201] 〔IX〕 グリシン、アラニン、フエニルアラニンをN末端に有するペプチドの環化 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、N末端アミノ酸の異なる複数種類のペプチドを同時に翻訳することで実施可能となる環化部位の構造の異なるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物C_Xをアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと前記の工程B)のtRNAを連結させ、化合物C_Xをアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C)のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、翻訳開始ATGの直後にグリシン、アラニン、フエニルアラニンのいずれかのコドンを、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを途中に含むペプチド配列をコードした鋳型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D)の無細胞翻訳系に工程G)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 工程H) のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

H, Iの工程は翻訳時にペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

J) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また本発明においては、工程H) ないし工程I) の後、mRNAライプラリーの3' 領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0202] 〔K〕 メチオニン以外のアミノ酸をN末端に有するペプチドの環化 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、N末端アミノ酸の異なる複数種類のペプチドを同時に翻訳することで実施可能となる環化部位の構造の異なるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) Asp (SBn) をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A) のpdCpAと前記の工程B) のtRNAを連結させ、Asp (SBn) をアミノアシル化した開始tRNAを提供する工程

D) 工程C) のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

E) プロモーターの下流に、工程C) のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3' 側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを途中に含むペプチド配列をコードした鋳型DNAライブラリーを提供する工程

F) 工程E) の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

G) 工程F) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

H) 工程D)の無細胞翻訳系に工程G)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ディスプレイライブラリーを提供する工程

I) 工程H)のライブラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

H, Iの工程は翻訳時にペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

J) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また本発明においては、工程H)ないし工程I)の後、mRNAライブラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

J) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

K) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

L) 塩基配列を解析する工程

[0203] 〔XI〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_1又は化合物N_2をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損する開始tRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)の開始tRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N_2をァミノァシル化した開始tRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)の開始tRNAと工程F)のtRNAを含みメチオニン、メチオニルtRNA合

成酵素 (MetRS)、メチオニン用翻訳開始tRNA、フオルミルドナー、メチオニルtRNAトランスフェラーゼのいずれかを含まない無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)の翻訳開始tRNAのアンチコドンに対応するコドンを1番目のコドンとして有し、その下流にHOGIyのコドンとリジンのコドンとで挟んだ0個から2個の任意のコドンを (アラニンがよりN末端側)、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、化合物N-1もしくは化合物N-2のSH基が保護されている場合には、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコー ドする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環を形成させる工程

M) HOGIyと直前のN末端側のアミノ酸とで形成されるエステルを活性化させてチオエステルを生成させる工程

N) リジン側鎖アミノ基とアミド結合形成させて直鎖部位2を生成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

0) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

P) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

Q) 塩基配列を解析する工程

[0204] 〔ＩＩ〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_1又は化合物N_2をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N_2をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)のtRNAと工程F)のtRNAと乳酸を含む無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを2番目のコドンとして有し、その下流にシスティン、プロリン、乳酸と連なるコドンを、さらにその下流にリジンを、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、化合物N-1もしくは化合物N-2のSH基が保護されている場合には、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環を形成させる工程

M) システィン、プロリン、乳酸部位から活性チオエステルを発生させる工程

N) 生成した活性チオエステルを、リジン側鎖アミノ基とアミド結合形成させて直鎖部位2を生成させる工程、さらに続いて脱硫反応を実施させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールす

るプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

0) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

P) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

Q) 塩基配列を解析する工程

[0205] (XIII) あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物N_1又は化合物N_2をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物N_1又は化合物N_2をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)のtRNAと工程F)のtRNAと乳酸を含む無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを2番目のコドンとして有し、その下流にシスティン、プロリン、乳酸と連なるコドンを、その下流にリジンのコドンを、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

1) 工程H)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディ

スプレイライブラリーを提供する工程

い 工程K)のライプラリーにペプチ ドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

K, Lの工程は翻訳時にペプチ ドデフォルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

M) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。

N) システィン、プロリン、乳酸ユニットから活性チオエステルを発生させる工程

0) 生成したカルボン酸を活性エステル化し、リジン側鎖アミノ基とアミド結合形成させて直鎖部位2を生成させる工程、続いて必要に応じて脱硫反応させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

P) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

P) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

Q) 塩基配列を解析する工程

[0206] 〔ＸＩＶ〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチ ド化合物の製造方法は、環状分枝ペプチ ドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物Ｃ＿１をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物Ｃ＿１をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C)のtRNAと工程F)のtRNAと乳酸を含む無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、システィンコドンを2番目のコドンとして有し、その下流にシスティン、プロリン、乳酸と連なるコドンを、さらに保護さ

れたァミン化合物Na-4のコドンを、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンをを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

L) 環を形成させる工程

M) 化合物Na-4の側鎖アミノ基を脱保護させる工程、およびシスティン、プロリン、乳酸ユニットから、活性チオエステルを発生させる工程

N) 生成した活性チオエステルを化合物Na-4の側鎖アミノ基とアミド結合形成させて直鎖部位2を生成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

0) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

P) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

Q) 塩基配列を解析する工程

[0207] 〔ＸＶ〕 あるいは本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物Ｎ_１又は化合物Ｎ_２をアミノアシル化したpdCpAを提供するエ程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物Ｎ_１又は化合物Ｎ_２をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

D) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na_7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

H) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

I) 工程G)のpdCpAと工程H)のtRNAを連結させ、アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na-7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

J) 工程C)のtRNAと工程F)のtRNAと工程I)のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

K) プロモーターの下流に、工程C)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを2番目のコドンとして有し、その下流のCys、Pro, 乳酸のt RNAのアンチコドンに対応するコドン、その下流に工程G)のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、さらにその下流に工程D)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

L) 工程K)の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

M) 工程L)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

N) 工程M)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

0) 工程K)のライブラリーにペプチドデフォルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを作用させる工程

K, Lの工程は翻訳時にペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン アミノペプ

チダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

P） 環状構造を形成させる工程

Q） アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na_7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)を脱保護する工程

R） 直鎖部位2を生成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。

本発明においては、工程」)の後、mRNAライブラリーの3'領域にァニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

S） バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

T） 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

U） 塩基配列を解析する工程

[0208] 前記〔XIII〕、〔XV〕においてN—1，2をN末端とするペプチドは前記〔XI門と同様の方法にて調製することもできる。

[0209] 〔XVI〕 メチオニン以外のアミノ酸をN末端に有するペプチドの環化による環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、N末端アミノ酸の異なる複数種類のペプチドを同時に翻訳することで実施可能となる環化部位の構造の異なるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のtRNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

D) 化合物アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na_7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3' 末端のCAを欠損するtRNAを提供する工程

F) 工程D) のpdCpAと工程E) のtRNAを連結させ、アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_ 4 もしくは化合物Na_ １０ (Na_ ７基) もしくは化合物Na_ １１ (Na_ ７基) をアミノアシル化したtRNAを提供する工程、

G) 工程C) のtRNAと工程F) のtRNAと工程 Ｉ) のtRNAを含む無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程F) のtRNAのアンチコドンに対応するコドンを、その下流にCys、Pro, 乳酸のt RANのアンチコドンに対応するコドンを、さらにその下流に工程C) のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3 ' 側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN —メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする鋳型DNAライブラリーを提供する工程

Ｉ) 工程H) の鋳型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程Ｉ) のmRNAライブラリーの3' 末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物 - mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

い 工程K) のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン ァミノペプチダーゼを作用させる工程

K, Lの工程は翻訳時にペプチドデフォルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

L) 環状構造を形成させる工程

M) アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_ 4 もしくは化合物Na_ １０ (Na_ ７基) もしくは化合物Na_ １１ (Na_ ７基) を脱保護する工程

N) 直鎖部位２を生成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3' 領域にァニールす

るプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

0) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

P) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

Q) 塩基配列を解析する工程

工程G) にてメチオニンの代わりにノルマルロイシンを加えることもできる。

[0210] (xvii) メチオニン以外のアミノ酸をN末端に有するペプチドの環化による環状分枝ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。本発明の環状部を有するペプチド化合物の製造方法は、N末端アミノ酸の異なる複数種類のペプチドを同時に翻訳することで実施可能となる環化部位の構造の異なるアミド環化ペプチドライブラリーを構築する方法であって、以下の1又は複数の工程を含む方法に関する。

A) 化合物C_1をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

B) 3'末端のCAを欠損するt RNAを提供する工程

C) 工程A)のpdCpAと工程B)のt RNAを連結させ、化合物C_1をアミノアシル化したt RNAを提供する工程、

D) 化合物アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na_7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)をアミノアシル化したpdCpAを提供する工程

E) 3'末端のCAを欠損するt RNAを提供する工程

F) 工程D)のpdCpAと工程E)のt RNAを連結させ、化合物アミノ基および必要に応じてチオール基も保護された化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na-7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)をアミノアシル化したt RNAを提供する工程、

G) 工程C)のt RNAと工程F)のt RNAと乳酸を含む無細胞翻訳系を提供する工程

H) プロモーターの下流に、工程C)のt RNAのアンチコドンに対応するコドンを2番目のコドンとして有し、その下流にシスティン、プロリン、乳酸と連

なるコドンを、さらにその下流に工程F)のtRNAのアンチコドンに対応するコドン、その3'側にプロリンもしくは他のARSの基質となるN—メチルアミノ酸のコドンを含むペプチド配列をコードする錶型DNAライブラリーを提供する工程

I) 工程H)の錶型DNAライブラリーからmRNAライブラリーを提供する工程

J) 工程I)のmRNAライブラリーの3'末端にスペーサーを結合させる工程

K) 工程」)の無細胞翻訳系に工程」)のスペーサーを結合したmRNAライブラリーを加え、翻訳することで、環化前ペプチド化合物-mRNA複合体ペプチドディスプレイライブラリーを提供する工程

い 工程K)のライプラリーにペプチドデフオルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを作用させる工程

K, Lの工程は翻訳時にペプチドデフォルミラーゼ、メチオニン アミノペプチダーゼを系に加えることにより同時に実施することもできる。

M) 環状構造を形成させる工程

環状構造の形成においては、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。

N) 化合物Na_4もしくは化合物Na_10 (Na_7基)もしくは化合物Na_11 (Na_7基)の側鎖保護基を脱保護させる工程、およびCys、Pro, 乳酸ユニットから活性チオエステルを発生させる工程

0) 生成した活性チオエステル化と側鎖アミノ基とアミド結合形成させて直鎖部位2を生成させる工程

本発明においては、工程」)の後、mRNAライプラリーの3'領域にアニールするプライマーにてcDNAを合成する工程する工程を含むことができる。さらに本発明の方法は、以下の工程を含むことができる。

P) バニングにて、標的物質に結合したmRNAライブラリーを濃縮する工程

Q) 逆転写酵素にてcDNAを合成する工程

R) 塩基配列を解析する工程

工程G) にてメチオニンの代わりにノルマルロイシンを加えることもできる。

アミノアシルtRNAの調製は、pdCpAの利用に限らずアミノアシルtRNA合成酵

素、フレキシザィム、カチオンミセル中超音波混合法、PNAアミノ酸活性エステル法などの利用も含む。

[021 1] ァスパルチミド形成抑制法

ァスパラギン酸型のチオエステルを翻訳にて導入する場合、C末端側直後のアミド結合に水素原子と反応してァスパルチミドを形成してしまうため、ァスパラギン酸型のチオエステルを翻訳にて導入する際に直後のアミノ酸残基をN—アルキル基を有するアミノ酸 (例えばプロリン)にすることによつて望みのチオエステルを含む全長ペプチドを翻訳合成する方法

[021 2] 本明細書において、「アルキル基」とは脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される1価の基であり、骨格中にヘテロ原子または不飽和炭素—炭素結合を含有せず、水素および炭素原子を含有するヒドロカルビルまたは炭化水素基構造の部分集合を有する。炭素鎖の長さnは1~20個の範囲である。アルキル基としては、たとえば、「C1~C6アルキル基」が挙げられ具体的には、メチル基、ェチル基、プロピル基、プチル基、ペンチル基、ヘキシル基、イソプロピル基、t—プチル基、sec—プチル基、1_メチルプロピル基、1,1—ジメチルプロピル基、2,2—ジメチルプロピル基、1,2—ジメチルプロピル基、1,1,2_トリメチルプロピル基、1,2,2_トリメチルプロピル基、1,1,2,2—テトラメチルプロピル基、1_メチルプチル基、2_メチルプチル基、3_メチルプチル基、1,1—ジメチルプチル基、1,2—ジメチルプチル基、1,1_ジメチルプチル基、1,2—ジメチルプチル基、1,3—ジメチルプチル基、2,2—ジメチルプチル基、2,3—ジメチルプチル基、3,3—ジメチルプチル基、1_エチルプチル基、2_エチルプチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基等が挙げられる。

本明細書において前記「アルキル基」は、下記の「アルケニル基」、「アルキニル基」が含まれる場合がある。

[021 3] 本明細書において「アルケニル基」とは、少なくとも1個の二重結合 (2個の隣接SP2炭素原子)を有する1価の基である。二重結合および置換分

（存在する場合）の配置によって、二重結合の幾何学的形態は、エントゲーゲン（E）またはッザンメン（Z）、シスまたはトランス配置をとることができる。アルケニル基としては、直鎖状または分枝鎖状のものが挙げられ、内部オレフィンを含む直鎖などを含む。好ましくはＣ２—Ｃ１０アルケニル基、さらに好ましくはＣ２—Ｃ６アルケニル基が挙げられる。　このようなアルケニルは、具体的には、たとえば、ビニル基、ァリル基、１_プロペニル基、２_プロペニル基、１—プテニル基、２—プテニル基（シス、トランスを含む）、３—プテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基などが挙げられる。

[0214] 本明細書において「アルキニル」は、少なくとも１個の三重結合（２個の隣接ＳＰ炭素原子）を有する、１価の基である。直鎖状または分枝鎖状のアルキニル基が挙げられ、内部アルキレンを含む。好ましくはＣ２—Ｃ１０アルキニル基、さらに好ましくはＣ２—Ｃ６アルキニル基が挙げられる。　アルキニルとしては具体的には、たとえば、エチニル基、１_プロピニル基、プロパルギル基、３_プチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基、３_フエニル—２_プロピニル基、３_（２,_フルオロフェニル）_２_プロピニル基、２—ヒドロキシー２_プロピニル基、３_（３—フルオロフェニル）－２_プロピニル基、３—メチル—（５—フエニル）_４_ペンチニル基などが挙げられる。

[0215] 「シクロアルキル基」とは、飽和または部分的に飽和した環状の１価の脂肪族炭化水素基を意味し、単環、ビシクロ環、スピロ環を含む。好ましくはＣ３—Ｃ１０シクロアルキル基が挙げられる。シクロアルキル基としては具体的には、たとえば、シクロプロピル基、シクロプチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基、ビシクロ［２．２．１］ヘプチル基などが挙げられる。

[0216] 「ハロゲンを置換基に有していてもよいＣ１～Ｃ６アルキル基」とは、１つ以上のハロゲン原子で置換された「Ｃ１～Ｃ６アルキル基」を意味する。例えば、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、フルオロメチル基、

ペンタプルオロエチル基、テトラフルオロエチル基、トリフルオロエチル基、ジフルオロエチル基、フルオロエチル基、トリクロロメチル基、ジクロロメチル基、クロロメチル基、ペンタクロロエチル基、テトラクロロエチル基、トリクロロエチル基、ジクロロエチル基、クロロエチル基等が挙げられる。

[0217] 「ハロゲン」とは、フッ素（F）、塩素（Cl）、臭素（Br）またはヨウ素（I）を意味する。

[0218] 本明細書において「アリール基」とは1価の芳香族炭化水素環を意味し、好ましくはC5—C10アリールが挙げられる。アリールとしては具体的には、たとえば、フエニル基、ナフチル（たとえば、1_ナフチル基、2—ナフチル基）などが挙げられる。

本明細書において前記「アリール基」は、下記の「ヘテロアリール」が含まれる場合がある。

[0219] 本明細書において「ヘテロアリール」とは、環を構成する原子中に好ましくは1～5個のヘテロ原子を含有する芳香族性の環の1価の基を意味し、部分的に飽和されていてもよい。環は単環、または2個の縮合環（たとえば、ベンゼン環または単環ヘテロアリール環と縮合した2環式ヘテロアリール）であってもよい。環を構成する原子の数は好ましくは5～10である（C5-C10ヘテロアリール）。

ヘテロアリールとしては具体的には、たとえば、フリル基、チエニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、オキサゾリル基、イソオキサゾリル基、オキサジアゾリル基、チアジアゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、ピリジル基、ピリミジル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、トリアジニル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチエニル基、ベンゾチアジアゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾオキサジアゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、インドリル基、イソインドリル基、インダゾリル基、キノリル基、イソキノリル基、シンノリニル基、キナゾリニル基、キノキサリニル基、ベンゾジオキソリ

ル基、インドリジニル基、ィミダゾピリジル基などが挙げられる。

[0220] 「C5~C10アリールC1—C6アルキル基 (アラルキル基)」とは、前記、C1—C6アルキル基の水素原子のうちの1個が前記C5~C10アリ—ル基で置換されているアルキル基を指す。

[0221] アリールアルキル基 (アラルキル基)とは、アリール基とアルキル基を共に含む基であり、例えば、前記アルキル基の少なくとも一つの水素原子がアリール基で置換された基を意味し、好ましくは、 「C5~C10アリールC1—C6アルキル基」が挙げられる。たとえば、ベンジル基などが挙げられる。 置換基を有していてもよいC5~C10アリールC1—C6アルキル基」とは、前記 「C5~C10アリールC1_C6アルキル基」のアリール基および/ またはアルキル基の少なくとも一つの水素原子が、置換基により置換された基を示す。これら置換基としては、たとえば、"アミノ酸"の側鎖の置換基で定義した様々置換基などが挙げられる。

[0222] 「アルコキシ基」とは、水酸基の水素原子が前記アルキル基で置換された基を意味し、たとえば、好ましくは 「C1—C6アルコキシ基」が挙げられる。

[0223] 本明細書において、 「活性エステル基」とは、アミノ基と反応してアミド結合を生成するカルボニル基を含む基であって、該カルボニル基に、たとえばOBt、OAt、OSu、OPfp、SR1などが結合した基であり、アミノ基との反応を促進しうる基である。

[0224] 「反応補助基」とは、望みの位置で選択的に反応を起こさせるために、結合させる官能基の近傍に導入されて、該官能基を結合反応に対して活性化する基であり、たとえば、カルボニル基とアミノ基を反応させるため、カルボニル基とアミノ基側のいずれか、あるいは両方に反応補助基を導入させることができる。このような反応補助基としては、たとえば、SHなどが挙げられる。このような反応補助基は、結合反応とともに、あるいは結合反応後に脱離させることもできる。

「通常アミン」とは、反応補助基により活性化されていないアミンを意味

する。

[0225] mRNA display

本発明における 核酸」には、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA) あるいは、人工塩基を有するヌクレオチド誘導体を含むこともできる。また、ペプチド核酸 (PNA) を含むこともできる。本発明の核酸は、目的とする遺伝情報が保持される限り、これらの核酸のいずれか、あるいは混成とすることもできる。すなわち、DNA—RNAのハイブリッドヌクレオチドやDNAとRNAのような異なる核酸が1本鎖に連結されたキメラ核酸も本発明における核酸に含まれる。

本発明においては、これら核酸を錶型として含む、display ライプラリーなどの核酸ライブラリーを好適に用いることができる。

[0226] displayライブラリーは表現型であるペプチドとその遺伝子型であるペプチドをコードするRNAもしくはDNAが対応付けられているライブラリーである。所望の固定した標的にライブラリーを接触させ、標的に結合しない分子を洗い流すことで結合するペプチドの濃縮が可能である (パニング法)。このような過程を経て選択されたペプチドに対応付けられている遺伝子情報を解析することで標的に結合したタンパク質の配列を明らかにすることが出来る。例えば、アミノアシルtRNAのアナログである抗生物質ピューロマイシンがribosomeによるmRNA翻訳伸長中の蛋白質に非特異的に連結されることを利用する方法がmRNA display(Proc Nat L Acad Sci USA. 1997; 94: 12297-302. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Roberts RW, Szostak JW.)なしよin vitro virus(FEBS Lett. 1997;414:405-8. In vitro virus : bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H.)として報告されている。

[0227] T7プロモーターなどのプロモーターを含むDNAライプラリーから転写にて得たmRNAのライプラリーの3'端にピューロマイシンなどのスペーサ

—を結合しておき、無細胞翻訳系でｍＲＮＡをタンパク質に翻訳させるとピューロマイシンがribosomeによってアミノ酸と間違ってタンパク質に取り込まれ、ｍＲＮＡとこれにコードされる蛋白質が連結され、ｍＲＮＡとその産物が対応付けられたライブラリーになる。この過程では大腸菌などの形質転換を含まないため高い効率が実現され、大規模なdisplayライブラリー（10，^{2}_ 1O^{14}種類）を構築することが出来る。バニングで濃縮、選択された分子についている遺伝子情報を含むタグであるｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲ増幅し、塩基配列を解析することで結合した蛋白の配列を明らかにすることが出来る。ライブラリーの錶型となるDNAライブラリーのアミノ酸残基を固定しない箇所は塩基を混ぜて合成することによって得ることができる。A，T，G，Cの4塩基の混合（N）の3の倍数個の繰り返し、もしくはコドンの一文字目二文字目はN、三文字目はW，M，K，Sなどの2塩基の混合として合成する、さらに導入するアミノ酸の種類を16以下に抑えるのであれば、三文字目を1種類の塩基にする方法もある。また、実施例のようにコドンの3文字に相当するコドンユニットを用意し、これを任意の割合で混合して合成に用いることによってアミノ酸残基の出現頻度を自由に調整できる。

[0228] 無細胞翻訳系を利用したdisplayライプラリーには、mRNA display の他に、ペプチドとピューロマイシンの複合体が結合しているペプチドをコードするｃＤＮＡからなるライブラリーであるcDNA display(Nuc Leic Acids Res. 2009;37(16):e108. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions. Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, Nemoto N上 ｍＲＮＡ翻訳中にribosomeと翻訳産物が比較的安定な複合体であることを利用したribosome display(Proc Nat l Acad Sci U S A. 1994; 91:9022-6. An in vitro polysome display system for identifying Ligands from very Large peptide libraries. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower W上)、bacteriophage endonuclease P2AがDNAと共有結合を形成することを利用したcovalent display(Nuc Leic Acids

Res. 2005; 33: e10. Cova Lent ant ibody display--an in vitro ant ibody-DNA Library select ion system. Reiersen H, Lobers Li I, Loset GA, Hvattum E, Simonsen B, Stacy JE, McGregor D, Fitzgera ld K, We Lschof M, Brekke OH, Marv ik O工)、微生物のプラスミドの複製開始蛋白RepAが複製開始点oriに結合することを利用したCIS disp Lay(Proc Nat L Acad Sci U S A. 2004; 101:2806-10. CIS display: In vitro select ion of pept ides from Librar ies of prote in-DNA comp lexes. Odegr ip R, Coomber D, ELdr idge B, Hederer R, Kuh Lman PA, ULLman C, FitzGera Ld K, McGregor D.)が知られている。また、DNAライブラリーを構成するDNAの1分子毎に転写翻訳系をwater- in-o iLエマルジヨンゃリポソームに封入し、翻訳反応を行うin vitro compartmenta Li zat ion(Nat Biotechno L. 1998; 16:652-6. Man-made ceLL-Like compartments for mo Lecu Lar evo lut ion. Tawf ik DS, Griffiths AD.)も知られてしゝる。適宜、公知の方法を用いて上記方法を使用することができる。

[0229] 本発明では、以下に記載の無細胞翻訳系を用いてこれら核酸ライブラリーを翻訳することができる。無細胞翻訳系を使用する場合、目的の核酸の下流にスペーサーをコードする配列を含むことが好ましい。スペーサー配列としては、グリシンゃセリンを含む配列が挙げられるがこれに限定しない。またピューロマイシン、その誘導体などリボソームによる翻訳時にペプチドに取り込まれる化合物と核酸ライプラリーの間には、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ヘキサエチレングリコール（ｓｐｃ１８）のポリマー (例えば５つのポリマー）などで形成されるリンカーを含むことが好ましい。

[0230] 籠醜隠

本発明のペプチド化合物の製造方法では、無細胞翻訳系などのタンパク質製造システムを使用することが好ましい。無細胞翻訳系とは、細胞より抽出したribosomeの他、翻訳に関与する蛋白因子群、ｔＲＮＡ、アミノ酸、ＡＴＰなどのエネルギー源、その再生系を組み合わせたものでｍＲＮＡを蛋白に翻訳することが出来る。本発明の無細胞翻訳系には、これら以外にも、開始因子、伸長因子、解離因子、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素、メチオニルｔ

RNA トランスフオルミラーゼなどを含むことができる。これらの因子は、種々の細胞の抽出液から精製することによって得ることができる。因子を精製するための細胞は、例えば原核細胞、または真核細胞を挙げることができる。原核細胞としては、大腸菌細胞、高度好熱菌細胞、または枯草菌細胞を挙げることができる。真核細胞としては、酵母細胞、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、植物細胞、昆虫細胞、または動物細胞を材料にしたものが知られている。

[0231] 無細胞翻訳系は材料の細胞を破砕し、遠心分離、透析などによって調製した抽出液にtRNA、アミノ酸、ATPなどを加えたものである。例えば、大腸菌(Methods Enzymol. 1983; 101:674-90. Prokaryotic coupled transcription-translation. Chen HZ, Zubay G.)、酵母(J Biol Chem. 1979 254: 3965-3969. The preparation and characterization of a cell-free system from Saccharomyces cerevisiae that translates natural messenger ribonucleic acid. E Gasior, F Herrera, I Sadnik, C S McLaughlin, and K Moldave)、小麦胚芽(Methods Enzymol. 1983; 96: 38-50. Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. Erickson AH, Blobel G.)、ウサギ網状赤血球(Methods Enzymol. 1983; 96: 50-74. Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. Jackson RJ, Hunt T.)、HeLa細胞(Methods Enzymol. 1996; 275: 35-57. Assays for poliovirus polymerase, 3D(Pol), and authentic RNA replication in HeLa S10 extracts. Barton DJ, Morasco BJ, Flanegan JB.)、昆虫細胞(Comp Biochem Physiol B. 1989; 93: 803-6. Cell-free translation in lysates from Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) cells. Swerdel MR, Faller AM.)を材料にしたものを用いることができる。T7 RNA polymerase などのRNAポリメラーゼを加えることでDNAからの転写、翻訳を共役させることができる。一方、PURE system は大腸菌の翻訳に必要な蛋白因子類、エネルギー再生系酵素、ribosome それぞれを抽出、精製し、tRNA、アミノ酸、ATP、GTPなどと混合した再構成無細胞翻訳系である。不

純物の含有量が少ないだけでなく、再構成系であるため排除したい蛋白因子、アミノ酸を含まない系を容易に作製することができる。((i)Nat Biotechnol. 2001;19:751-5. Cell-free translation reconstituted with purified components. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. (ii)Methods Mol Biol 2010;607:11-21. PURE technology. Shimizu Y, Ueda T.)。適宜、公知の方法を用いて上記方法を使用することができる

[0232] ribosome, tRNA等、無細胞翻訳系に含まれる種々の因子は大腸菌細胞や酵母細胞から当業者に周知の方法によって精製することができる。またtRNAやアミノアシルtRNA合成酵素は天然に存在するものに加え、人工tRNAや非天然アミノ酸を認識する人工アミノアシルtRNA合成酵素を用いることもできる。人工tRNAや人工アミノアシルtRNA合成酵素を用いることにより部位特異的に非天然アミノ酸を導入したペプチドを合成することができる。

[0233] 非天然アミノ酸のペプチドへの翻訳導入には、直交性を有し効率よくribosomeに取り込まれるtRNA((i)Biochemistry. 2003;42:9598-608. Adaptation of an orthogonal archaeal Leucyl-tRNA and synthetase pair for four-base, amber, and opal suppression. Anderson JC, Schultz PG., (ii)Chem Biol 2003;10:1077-84. Using a solid-phase ribozyme aminoacylation system to reprogram the genetic code. Murakami H, Kourouklis D, Suga H.)のアミノアシル化が必要である。tRNAをアミノアシル化する方法として以下の5つの方法を用いることができる。

[0234] 細胞内ではtRNAのアミノアシル化をアミノ酸別にアミノアシルtRNA合成酵素が用意されている。ある種のアミノアシルtRNA合成酵素がN-Me Hisなど非天然アミノ酸を許容することを利用する方法、非天然アミノ酸を許容する変異アミノアシルtRNA合成酵素を用意し、これを利用する方法である((i)Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:9715-20. An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporati

on of an unnatura l amino acid into prote ins in eukaryot ic trans lat ion and its app Licat ion in a wheat germ ceLL-free system. Kiga D, Sakamot o K, Kodama K, KigaWa T, Matsuda T, Yabuk i T, Shirouzu M, Harada Y, N akayama H, Tak io K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S. (ii)Sc ien ce. 2003; 301 : 964-7. An expanded eukaryot ic genet ic code. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherj i M, Zhang Z, Schu Ltz PG. Chin, JW. (iii) Proc Nat L Acad Sci U S A. 2006; 103 :4356-61 . Enzymat ic aminoacy Lat ion of tR NA With unnatura l amino acids. Hartman MC, Josephson K, Szostak JW.) 。試験管内でtRNAをアミノアシル化しその後アミノ酸を化学修飾する方法も用いることができる (J Am Chem Soc. 2008; 130 : 6131-6. Ribosoma L synthes is of N-methy L pept ides. Subte Lny AO, Hartman MC, Szostak JW.) 。tRNAの3'末端のCCA配列からCAを除いたものと別途調製したアミノアシル化したpdCpAとをRNAリガーゼで結合させることでアミノアシルtRNAを得ることが出来る (Biochem ist ry. 1984; 23: 1468-73. T4 RNA Ligase med iated preparat ion of n ove L "chem icaLLy misacy Lated" tRNAPheS. Heck Ler TG, Chang LH, Zama Y, Naka T, Chorghade MS, Hecht SM.)。種々の非天然アミノ酸の活性エステルをtRNAに担持させるリボザィムであるフレキシザィムによるアミノアシル化もある (J Am Chem Soc. 2002; 124 :6834-5. Aminoacy L-tRNA synthes is by a res in-immobiLized ribozyme. Murakam i H, Bonzagn i NJ, Suga H.)。tRNAとアミノ酸活性エステルとをカチオン性ミセル中で超音波混合する方法も用いることができる (Chem Commun (Camb) . 2005; (34) :4321 -3. Simple and quick chem icaL aminoacy Lat ion of tRNA in cat ionic miceLLar solut ion under u Lt rason ic agitat ion. Hash imoto N, Ninomiya K, Endo T, Sisido M.)。tRNAの3'末端付近に相補的なPNAにアミノ酸活性エステルを結合したものをtRNAに加えることによつてもアミノアシル化が可能である (J Am Chem Soc. 2004 ; 126: 15984-9. In situ chem icaL aminoacy Lat ion With amino acid thioeste rs Linked to a pept ide nuc leic acid. Ninomiya K, Minohata T, Nishimura M, Sisido M.)。

[0235] 非天然アミノ酸を導入するコドンとして終止コドンを利用する方法が多く報告されているが、前述のPURExystem を用いることで天然アミノ酸、ARSを除いた合成系を構築できるため、アミノ酸をコードするコドンについて除外した天然アミノ酸の代わりに非天然アミノ酸を導入することが出来る(J Am Chem Soc. 2005; 127 :11727-35. Ribosoma L synthes is of unnatura l pept ides. Josephson K, Hartman MC, Szostak JW.)。さらにコドンの縮重を解くことにより天然アミノ酸を除外することなく非天然アミノ酸を加えることが出来る (Kwon I, et aL. Break ing the degeneracy of the genet ic code. J Am Chem Soc. 2003, 125, 751 2-3.) 。N-メチルアミノ酸を含むペプチドがPureSystemなどの無細胞翻訳系の活用によりリボゾームにて合成できる。

[0236] N-メチルアミノ酸の出現頻度の調整

ライブラリーを構成するペプチドに含まれるN-メチルアミノ酸の数は、DNAライブラリーを合成する際にN-メチルアミノ酸に当てたコドンの出現頻度にて調整することができる。例えば１０のアミノ酸残基可変箇所を含むペプチドのライブラリーではアミノ酸の種類が20種類から選択されると仮定された場合、N-Meアミノ酸を10種類選択すると、N-Meアミノ酸のコドンユニットが可変箇所１箇所当り10/20(５０％)を占めるように合成することによってライブラリーのペプチドに含まれるN-メチルアミノ酸の数は平均５個になる。

[0237] 本発明の環状部を有するペプチド化合物からなるライプラリーは、アミノ酸及び/又はアミノ酸類縁体の数が９~ １３残基からなる環状部を有するペプチド化合物から構成されるが、この９~ １３残基はディスプレイライブラリーのランダム領域が始まる直前のN末端側アミノ酸を１として、13残基目までのアミノ酸にてカウントされる (翻訳後修飾がすべて完了された後のユニットとしてカウントされる)。当該環状部を有するペプチド化合物を形成する９~ １３残基中、N-メチルアミノ酸の数の平均が３~ １０、好ましくは４~ ９、より好ましくは５~ ８含まれるように、ランダム領域に含まれるアミノ酸をN-アルキルアミノ酸とNH_2を有するアミノ酸の割合を考慮することが必要である。同様に、この１３残基のペプチドのCLogP値の平均が４以上、好ま

しくは５以上、より好ましくは６以上に設定されるように、ランダム領域に含まれるアミノ酸の種類を選定させる必要がある。

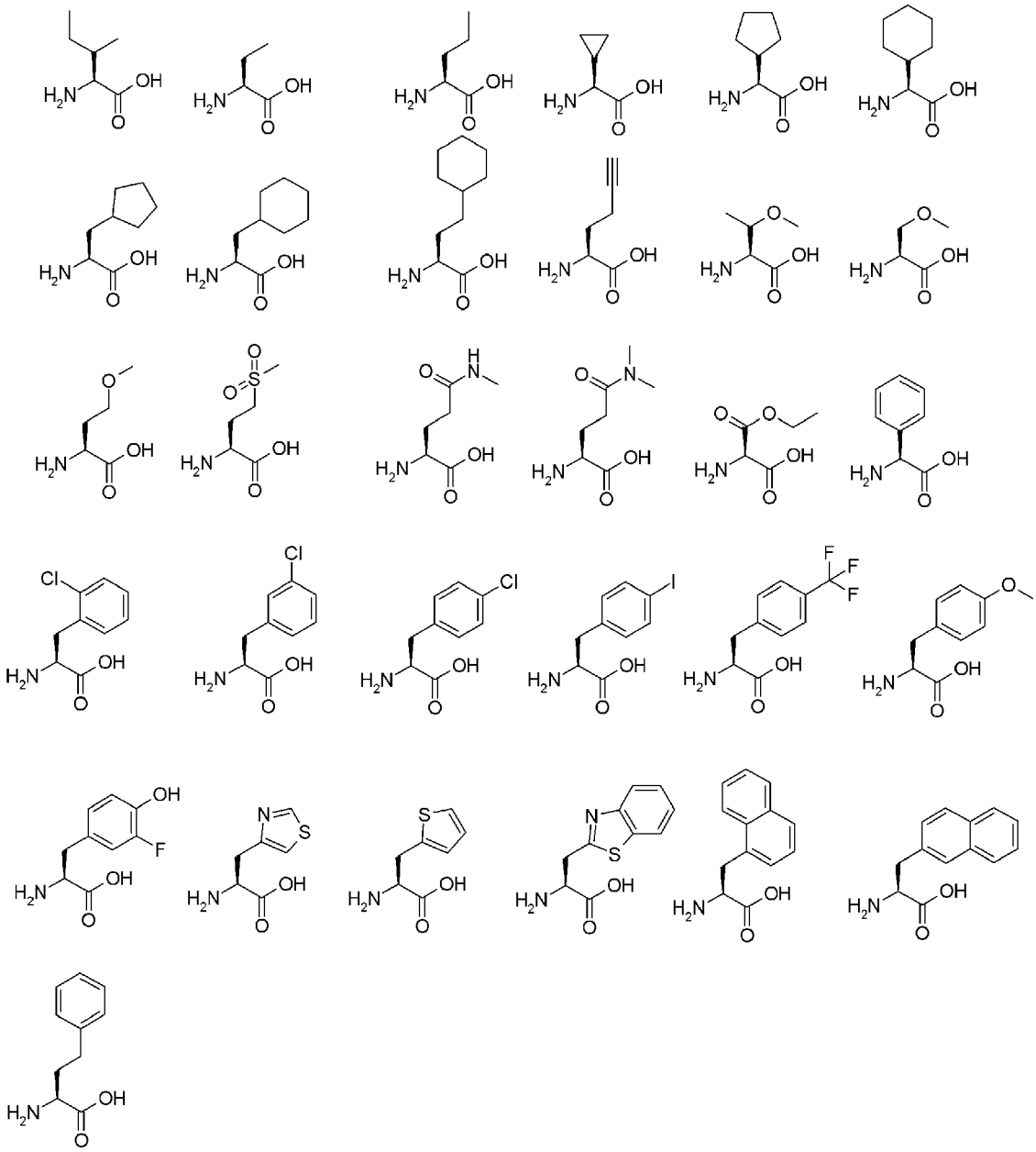
[0238] 選定されるアミノ酸としては、選択されるすべてのアミノ酸が中性（例えばｐＨ＝７．０）で極度にイオン化されない官能基の中であることが好ましい。例えば酸としてはｐＫａが３．５以上であることが好ましい。より好ましくは４．５以上であり、さらに好ましくは５以上である。例えばアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基のｐＫａ＝３．９であり、チロシンの側差フエノール性水酸基のｐＫａ＝１０である。またテトラゾールのｐＫａ＝５．６である。また、塩基としてはｐＫａが９以下であることが好ましく、より好ましくは７．５以下であり、更に好ましくは６．５以下である。例えば、アルギニンの側鎖グアニジノ基のｐＫａは１２．５であり、リジンの側鎖アミノ基のｐＫａは１０．５であり、ヒスチジンのイミダゾリル基のｐＫａは６．１である。また、ピリジンのｐＫａは５．２である。ペプチドのN末端αアミノ酸の主鎖のアミノ基のｐＫａは８付近である。

実際に我々の実施例24に記載の通り、このルールに則ると、可変領域のアミノ酸の種類は２１種類であり、そのうち１０種類がNメチルなどのNアルキルアミノ酸が選定された。Initiation read through 法では固定アミノ酸２つのうち、両方ともがNH_2であったため、平均のN-アルキル数は４．４と計算された。Inhitiation suppression法では２つの固定アミノ酸のうち１つがNアルキルであり、また交差ユニットのC末端側もN-アルキルアミノ酸の中から選定されたこともあり平均のN—アルキルアミノ酸数は６．０と計算された。

同様に両者の平均のCLogP値は、それぞれ５．９７と６．１２であった。

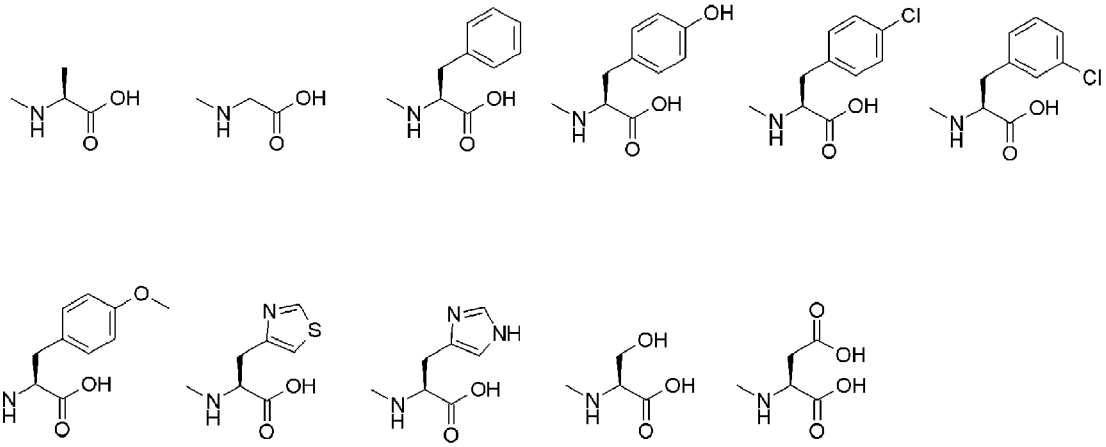
[0239] 翻訳合成に使用でさる非天然型アミノ酸

本発明に使用できる非天然型アミノ酸（翻訳アミノ酸）を以下に例示するが、それらに限定されない。これらの非天然型アミノ酸の多くは側鎖が保護あるいは無保護、アミン部位が保護あるいは無保護の状態で購入される。購入されないものは、既知の方法によって合成される。

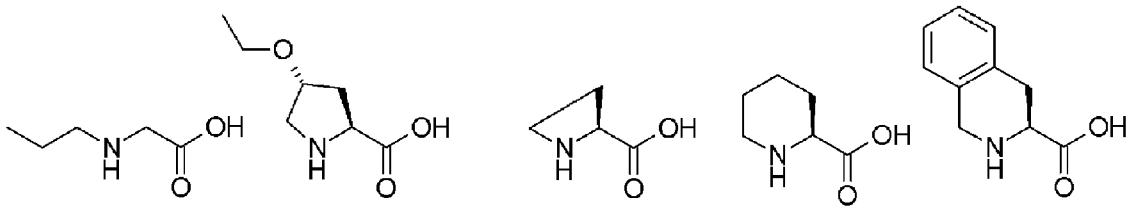


[0240] 非天然型アミノ酸として、以下のＮ＿Ｍｅアミノ酸を用いることができる。

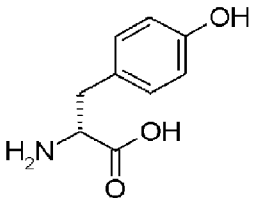
Ｎ―メチルアラニン、Ｎ―メチルグリシン、Ｎ＿メチルフエニルアラニン、Ｎ―メチルチロシン、Ｎ―メチル－３＿クロロフエニルアラニン、Ｎ―メチル－４―クロロフエニルアラニン、Ｎ―メチル－４―メトキシフエニルアラニン、Ｎ＿メチル－４＿チアゾールアラニン、Ｎ―メチルヒスチジン、Ｎ―メチルセリン、Ｎ―メチルアスパラギン酸、



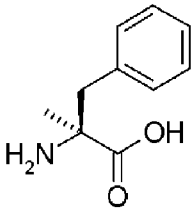
[0241] 非天然型アミノ酸として、以下のＮ―アルキルアミノ酸も用いることができる。



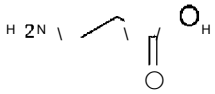
[0242] 非天然型アミノ酸として、以下のＤ型アミノ酸も用いることができる。



[0243] 非天然型アミノ酸として、以下のα，α―ジアルキルアミノ酸も用いることができる。



[0244] 非天然型アミノ酸として以下のアミノ酸も用いることができる。



[0245] アミノアシルｔＲＮＡの作製

アミノ酸及びアミノ酸類縁体は、ｐｄＣｐＡと反応させるために、例えば

活性エステルに変換することができる。これらの活性エステルは多くはシアノメチルエステルとして単離することができる。

[0246] 単離されたシアノメチルエステルをｐｄＣｐＡと反応させてコンジュゲート化させた後、例えばLigat ionによりｔＲＮＡとアミノ酸又はアミノ酸類縁体のコンジュゲートとすることができる。

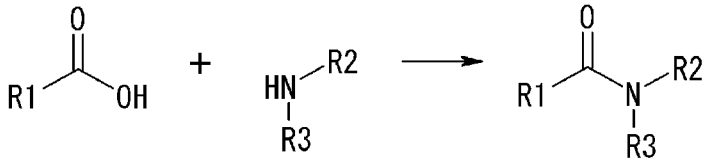
[0247] ｔＲＮＡとアミノ酸のコンジュゲートとする手法としては、このようなｐｄＣｐＡ法に拘らず、FLexizymeを使用する手法によっても、あるいはARSを使用する手法によっても合成できる。

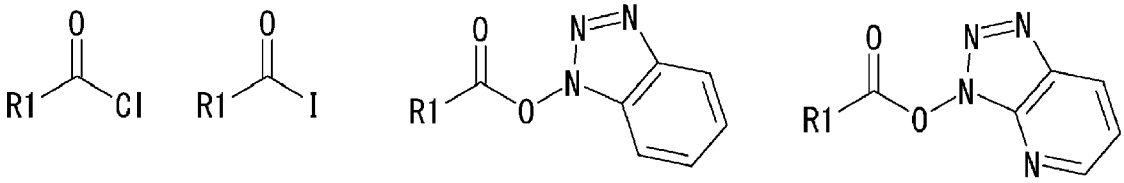
[0248] 翻訳合成後に環化するために活用可能な、アミド結合形成反応

カルボン酸と一級および二級アミンとの反応によるアミド結合形成反応は、広く有機合成化学一般に使用されている。例えば、カルボン酸を予め活性化された活性エステルなどとして単離してからアミンと混合させる方法、直接カルボン酸とアミンを混合させた後にカルボン酸を活性化させてアミド結合を形成させる方法などを用いることができる。カルボン酸の活性体として酸クロライドや酸アオイダイドなどの酸ハライド群や、ＨＯＢｔ、Ｈ０Ａｔ、ＨＯＳｕ、ＨＯＰｆｐ、チオエステルなどの活性エステル群が広く知られている。

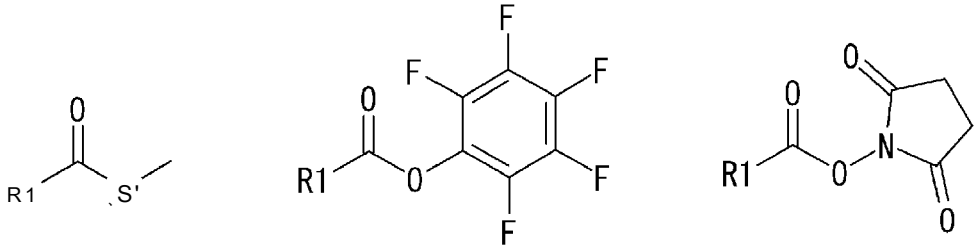
チオエステルとしては、好ましくは、－Ｃ（＝０）ＳＲ１で表されるものが挙げられる。

[0249]



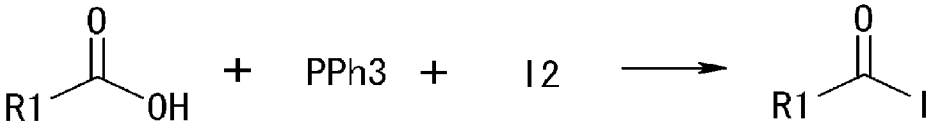


酸クロライド　酸アイオダイド　ＨＯＢｔ活性エステル　ＨＯＡｔ活性エステル



チオエステル　Ｐｆｐエステル　ＨＯＳｕエステル

[0250] 酸ハライドはカルボン酸とＳＯＣｌ$_2$などのハライド化剤を混合された後、精製操作によって単離することができる。得られた酸ハライドは高い反応性のため、ＰｕｒｅＳｙｓｔｅｍなどの翻訳系で使用する場合には、PureSystemにて翻訳した後にカルボン酸を酸/ハライド化させる可能性のある温和な反応条件としてＰＰｈ$_3$とＩ$_2$から酸アイオダイドへと活性化させる手法（Lakshmanら，Eur. J. Org. Chem. 2010, 2709) を用いることができる。

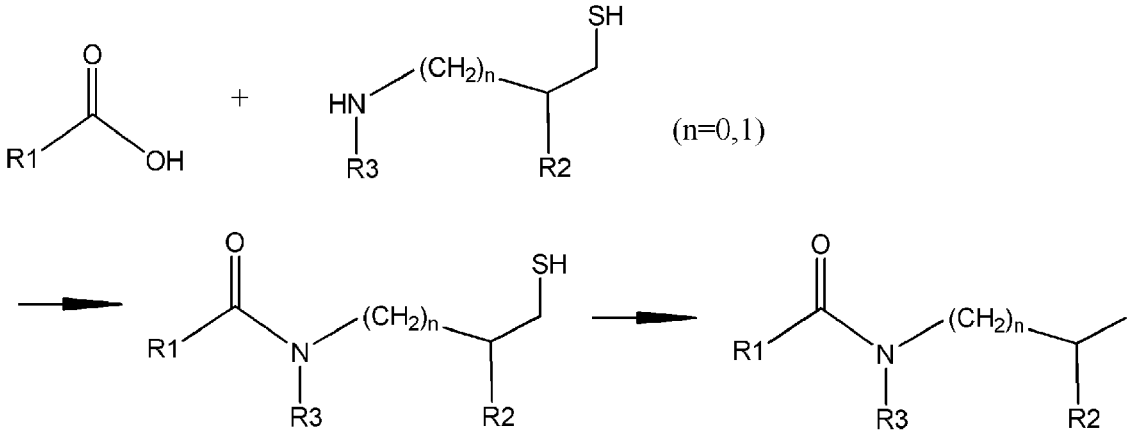


[0251] 活性エステル化法では、例えば、カルボン酸をPureSystemなどにて翻訳させた後に反応系中で活性エステル化反応により活性化エステルを発生させる手法、予め活性エステルとして単離した化合物をPureSystemにて翻訳させる手法などを用いることができる。一般的には、活性エステルの中でも反応性のより低いチオエステルなどは予め活性エステルとして単離後に翻訳させるのに適しているのに対し、より反応性の高いＨＯＡｔ活性エステルなどは翻訳後に活性化エステルを発生させるのが望ましい。

また、望みの位置で選択的にカルボン酸とアミノ基を反応させるため、カ

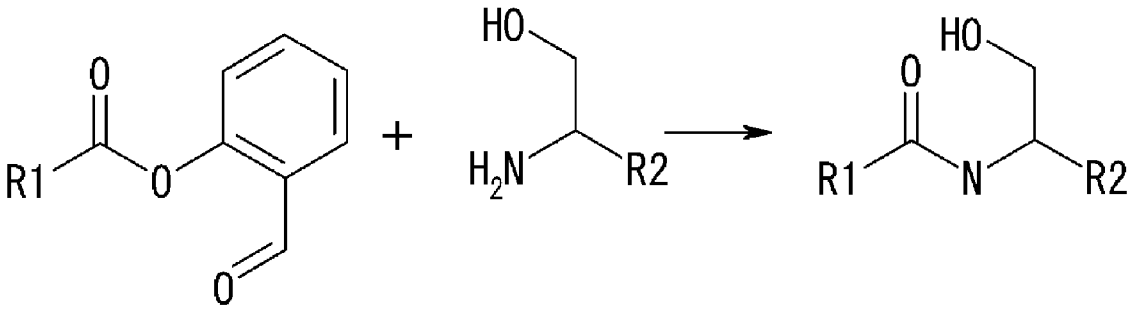
ルボン酸とアミノ基側のいずれか、あるいは両方に反応補助基を導入させることも可能である。

[0252] アミノ基近傍に反応補助基を導入する手法として、例えばアミノ基近傍にチオール基を導入させる手法が挙げられる。アミノ基とチオール基をつなぐ原子数 (炭素鎖数) は2もしくは3が特に好ましい。カルボン酸もしくは活性化されたカルボン酸と近傍にチオール基を導入したアミノ基を有するユニットをPureSystem にて導入させた後、この2つの部位を選択的に反応させてアミド結合化合物が得ることができる。SH基が高い求核性を有するためにまずSH基活性エステルと素早く反応し、分子内転移反応にてより熱力学的に安定なアミド結合に移行する結果、補助基を有するアミノ基に対する選択的なアミド化が可能となる。このような反応例は特にチオエステルとシステインの反応として (Chemical ligation法) 幅広く使用されている。



[0253] 得られたSH基含有アミド化合物を温和な反応条件で還元して脱硫反応することが望ましい。SH基が含まれている場合には、SH基が様々な標的と共有結合を形成してしまうため、効率的にHit創出が困難となるためである。

カルボン酸側とアミノ基側の両方に反応補助基を導入させる例として、以下スキームが挙げられる (Liら, Org. Lett. 2010, 12, 1724) 。

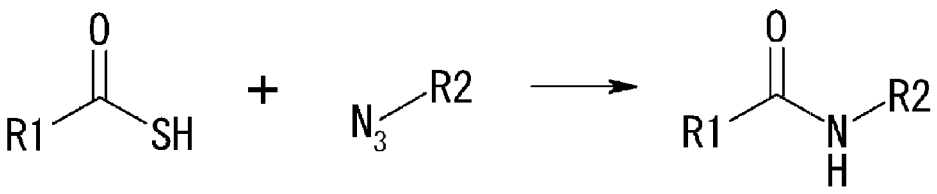


[0254] カルボン酸側の活性エステル基にアルデヒド部位があるため、アミノ基近傍にアルコール部位がある基質と選択的にN，0＿ベンジリデンアセタールを素早く形成させることができる。これを酸性条件下で転移反応させるとアミド結合が生成する。この活性エステルを、フエニルチオエステル共存下、選択的にセリンと反応させることができる。また、ＯＨ基を含むセリンはリジン存在下、選択的に本活性エステルと反応させることができる。

[0255] 活性エステルを経由せず、カルボン酸とアミンを直接反応させることもできる。活性エステルを経由しない場合には脱水反応のため、例えば縮合にて生成する水を除去（トルエンとの共沸やモレキュラーシーブスなどの脱水剤の併用）する。プロトン酸ではなく、より温和な反応条件が報告されている。また、遷移金属などの触媒を用いた反応として、例えば鉄触媒を用いることができる（Dasら，丄 Org. Chem. 2003, 68, 1165.）。

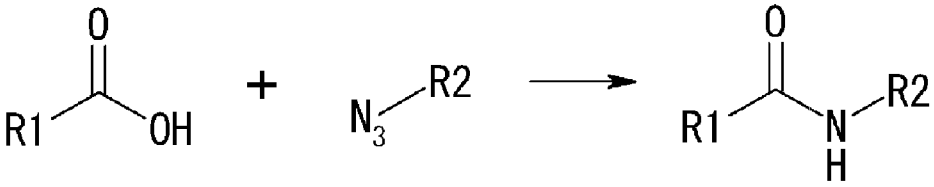
[0256] カルボン酸とアミンとの反応ではなく、いずれかもしくは両方を別官能基として反応させることもでき、例えばアミンではなくアジドを用いて活性エステルと反応させる手法である。

[0257] カルボン酸の活性化体としてチオカルボン酸を用い、アミン等価体としてアジドを用いることもできる（wはいamsら．丄 Am. Chem. Soに 2003, 125, 7754.）。

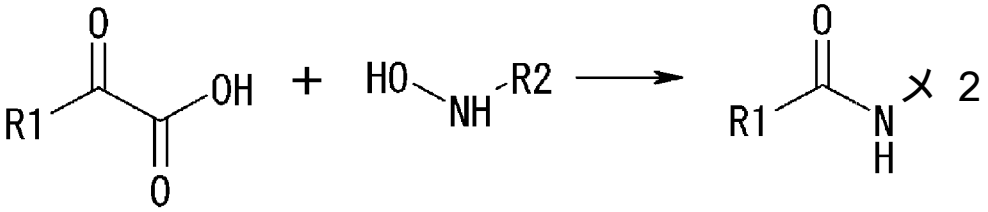


この反応は、比較的温和な反応条件（６０℃、３６時間）、水中で適用可能である。

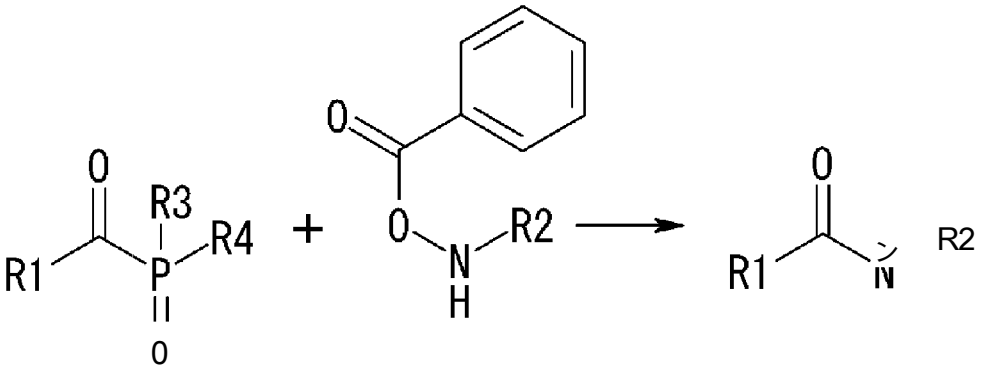
[0258] ァミン等価体としてアジ ドを用いることもできる (V はarrasa ら上 Org. Chem. 2009, 74, 2203) 。カルボン酸を反応系中で3級ホスフィン存在下ジチオ触媒あるいはジセレノ触媒にて活性化させてチオエステルあるいはセレノエステルに活性化させる。またアジ ド部位は3 級ホスフィンと反応させて活性化させ、活性エステルと反応させる。チオエステルとホスフィン部位の両方を分子内に有する活性エステルとすることにより、より効果的にアミ ド結合が生成するとの報告がなされ、Staud inger 反応として広く使用されている (R ainesら Org. Lett. 2001, 3, 9) 。ペプチ ド合成への適用も可能である (Ha ckenberger_ ら Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 5984) 。



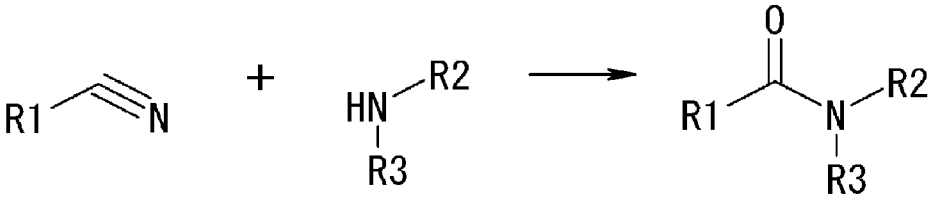
[0259] カルボン酸の代わりにケ ト酸を用い、ァミンの代わりにヒドロキシァミンを用いた縮合反応によってアミ ド化反応を行うことができる (Bodeら. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 1248) 。本反応は温厚な条件 H (4 0 ℃) にて含水溶媒系でカルボン酸やァミンなどの官能基共存下で選択的に反応させることができる。



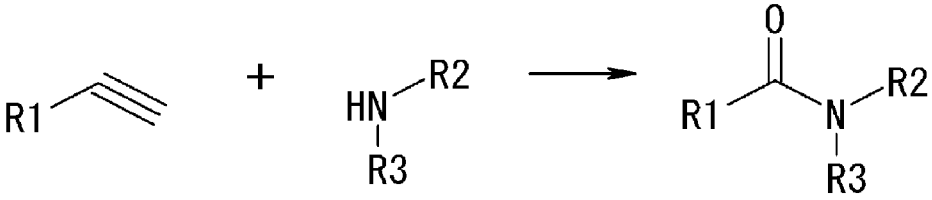
[0260] 上反応の変法として、以下のような方法も用いることができる (Bodeら. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 1248) 。



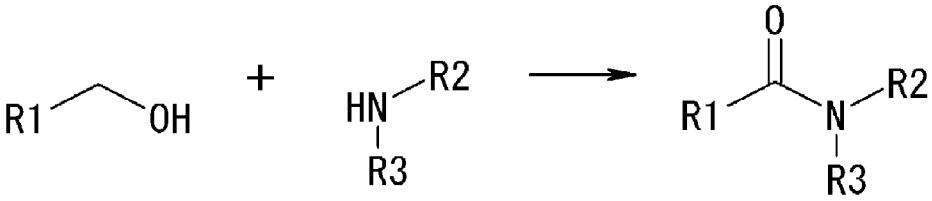
[026 1] その他、カルボン酸部位の他官能基への転換として、アルコール、ニトリル、アセチレン部位を出発原料とする手法も用いることができる。ニトリルとァミンとの縮合によるアミド化反応 (下記反応例)では、ルテニウム (Murahash iら 丄 Am. Chem. Soc. 1986, 108, 7846) 、白金 (Vriesら. Tet. Lett. 2000, 41, 2467) 、鉄 (wはいams ら. Tet. Lett. 2009, 50, 4262) などの遷移金属触媒の利用が可能である。



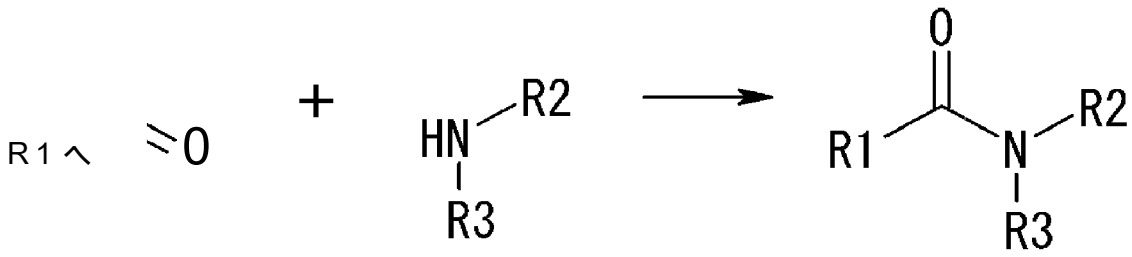
[0262] アルキンとァミンとをマンガンポルフィリン系触媒を用いた触媒反応で水中、室温、1時間で温和な酸化条件 (オキソン)でアミド化が行うことができる (Cheら. 丄 Am. Chem. Soc. 2006, 128, 14796) 。この方法は側鎖無保護のペプチド合成への適用も可能である。



[0263] アルコールとァミンのルテニウム錯体触媒を用いて縮合させることもできる (Milsteinら, Science 2007, 317, 790) 。



[0264] アルデヒドとァミンのパラジウム錯体触媒 (Yoshidaらs. Synthesis, 1983, 474) およびロジウム錯体触媒 (BeLLerら Eur. 丄 Org. Chem. 200 1, 423) による縮合反応も用いることができる。



[0265] < 医薬組成物>

本発明は、本発明の方法で製造されたペプチド化合物を含有する医薬組成物を提供する。

本発明の医薬組成物は、本発明の方法で製造されたペプチド化合物に加えて医薬的に許容し得る担体を導入し、公知の方法で製剤化することが可能である。製剤化には通常用いられる賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤や、および必要により安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、ｐＨ調製剤、防腐剤、抗酸化剤などを使用することができ、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して常法により製剤化される。

例えば、経口製剤を製造するには、本発明にかかる化合物またはその薬理学的に許容される塩と賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。

[0266] これらの成分としては例えば、大豆油、牛脂、合成グリセライド等の動植物油 ;流動パラフィン、スクワラン、固形パラフィン等の炭化水素 ;ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル等のエステル油 ;セトステアリルアルコール、ベヘニルアルコール等の高級アルコール ;シリコン樹脂 ;シリコン油 ;ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロックコポリマー等の界面活性剤 ;ヒドロキシエチルセルロース、ポリアクリル酸、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロースなどの水溶性高分子 ;エタノール、イソプロパノールなどの低級アルコール ;グリセリン、プロピレン

グリコール、ジプロピレングリコール、ソルビトールなどの多価アルコール;グルコース、シヨ糖などの糖 ;無水ケィ酸、ケィ酸アルミニウムマグネシゥム、ケィ酸アルミニウムなどの無機粉体、精製水などがあげられる。

[0267] 賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスターチ、白糖、プドウ糖、マンニトール、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素などが挙げられる。

[0268] 結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、ェチルセルロース、アラビアゴム、 トラガントゃゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシェチレン・プロックポリマー、メグルミンなどが挙げられる。

[0269] 崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クェン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が挙げられる。

[0270] 滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシゥム、タルク、ポリ工チレングリコール、シリカ、硬化植物油等が挙げられる。

[0271] 着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末、ハツカ脳、芳香散、ハツカ油、竜脳、桂皮末等が用いられる。

[0272] これらの錠剤・顆粒剤には糖衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。また、シロップ剤や注射用製剤等の液剤を製造する際には、本発明にかかる化合物またはその薬理学的に許容される塩にpH調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤などを加えて、常法により製剤化する。

[0273] 例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、《ヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用

量形態で混和することによつて製剤化することが考えられる。具体的には、軽質無水ケィ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルァセタールジェチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

[0274] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、プドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD—ソルビトール、D—マンノース、D—マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80（登録商標）、HCO—50と併用してもよい。

[0275] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フエノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

[0276] 投与は好ましくは経口投与であるが、投与方法は経口投与に拘らない。非経口投与としては、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

[0277] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本

発明の方法で製造されたペプチド化合物を含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

実施例

[0278] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

[0279] [実施例1]側鎖カルボン酸が活性エステル化された化合物 (1g)の合成

チオエステルを有する一連の活性エステル (化合物1g)の合成を実施し、Rex1=Me、Et、iPr、tBu、Bn、Ph、Phenetyl基の合成を図1の方法に従って行った。

なお、実施例中では以下の略号を使用した。

DCM ジクロロメタン

DIC N,N—ジイソプロピルカルポジィミド

DIPEA N,N_ジィソプロピルエチルァミン

DMAP 4—ジメチルァミノピリジン

DMF ジメチルホルムアミド

DMSO ジメチルスルホキシド

DTT ジチオスレイロール

FA ギ酸

TFA トリフルオロ酢酸

THF テトラヒドロフラン

HFIP 1,1,1,3,3,3_ヘキサフルオロー2_プロパノール

HOBT 1H—ベンゾ[d] [1,2,3]トリアゾール—1—オール

WSCI・HCI 1—エチルー3_(3—ジメチルァミノプロピル)カ

ルポジィ

ミド塩酸塩

TCEP トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン

NMP N-メチル-2-ピロリドン

DBU 1,8—ジアザビシクロ[5.4.0]—7—ウンデセン

なお、ペプチド合成及び、固相合成に用いる反応溶媒はペプチド合成用(関東化学、和光純薬あるいは渡辺化学から購入)を用いた。例えばDCM、DMF、DMS0、2% DBU in DMF, 20% piperidine in DMFなどである。また、水を溶媒として加えない反応では脱水溶媒や無水溶媒(関東化学、和光純薬などから購入)を用いた。

[0280] また、LCMSの分析条件は、下記のとおりである。

[表 1]

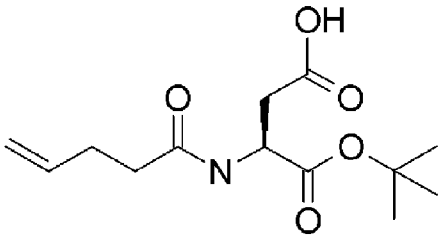
分析条件	装置	カラム(I.D.x 長さ)(mm)	移動相	勾配(A/B)	流速 (ml/分)	カラム温度 (℃)	波長
SQD AA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH4,H2O B)MeOH	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQD AA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH4,H2O B)MeOH	50/50=> 0/100(0.7分間) 0/100(0.7分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQD FA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H2O B)0.1% FA,MeCN	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQD FA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H2O B)0.1% FA,MeCN	50/50=> 0/100(0.7分間) 0/100(0.7分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
ZQ AA05	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)10mM AcONH4,H2O B)MeOH	95/5=> 0/100(3.0分間) 0/100(2.0分間)	2.0	室温	210-400nm PDA total
ZQ AA50	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)10mM AcONH4,H2O B)MeOH	50/50=> 0/100(3.0分間) 0/100(2.0分間)	2.0	室温	210-400nm PDA total
ZQ FA05	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)0.1% FA,H2O B)0.1% FA,MeCN	95/5=> 0/100(3.0分間) 0/100(3.0分間)	2.0	室温	210-400nm PDA total
SMD method1	Nexera/2020	Kinetex 1.7u C18 (2.1x50)	A)0.05% TFA,H2O B)0.05% TFA,MeCN	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.5分間)	1.0	35	210-400nm PDA total

SMD method4	Shimadzu LCMS権 ü LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3愈 50)	織 藝 TF¾ mo B)MeCN	窗 き> き麺 1.2ゞ賺 鎖 麺 膽 麺 => 95/5(a1 細 》 鶴 鍵 麺 》	1.0	40	動 ·籠 nm PDA total
S脚 method5	Shimadzu LCMS-2020 1€-20雇	Waters Atlantis T3 (4.6x脚	細 ,き誓 FA, H2O B)MeCN	き 5=》 醫 瞻 .2舊 』 m 00職 細 》 => 95/5(0.1 価 ! 95/5(0.2 誦	1.0	疆	跡 画 nm PDA total
ZQ HFIP-Et3N	2525BGM/2996 PDA/ZQ2000	XBridge TM OST C18 (4.6x50)	A)40mM HFIP-15mM Et3N,H 20 B)40mM HFIP-15mM Et3N,MeOH	95/5=> 5/95(8.0 分間) 5/95(2.0 分間)	1.0	室温	260n m PDA
ZQ HFIP-Me2NEt	2525BGM/2996 PDA/ZO2000	XBridge TM OST C18 (4.6x50)	A)400mM HFIP- l5mM Me2NEt,H 20 B:400mM HFIP-15mM Et3N,MeOH	95/5=> 5/95(8.0 分間) 5/95(2.0 分間)	1.0	室温	260n m PDA
Orbitrap HF[P-Et3N	Acquity UPLC/ LTQ Orbitrap XL	Acquity UPLC BEH C- 18 (2.1x50)	A)40OmM HFIP-15mM Et3N,H 20 B)40OmM HFIP-15mM Et3N,MeOH	95/5=> 2/ 98(12.0 分間)2/98(1.0 分間)	0.2	60	200-500nm PDA total
SMD Method6	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3.0x50)	A)0.1%FA,H2O B)0.1 %FA,MeCN	90/1 0=> 0/1 00(2.0 分間) 0/1 00(1 .0 分間) => 90/10(0.3 分間) 90/10(0.2 分間)	1.0	40	190-800nm PDA total
SMD Method 7	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3.0x50)	A)0.05%TFA,H2O B)0.05%TFA,MeCN	95/5=> 0/100(1.2 分間)0/1 00(1 .0 分間) => 95/5(0.13 分間) 95/5(0.1 7 分間)	1.0	40	190-800nm PDA total
SMD Method8	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3.0x50)	A)0.05%TFA,H2O B)0.05%TFA,MeCN	95/5=> 0/ 100(2.0 分間)0/1 00(1 .2 分間) => 95/5(0.13 分間) 95/5(0.27 分間)	1.0	40	190-800nm PDA total
SMD Method9	Shimadzu LCMS-2020 LG-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3.0x50)	A)0.05%TFA,H2O B)0.05%TFA,MeGN	95/5=> 0/100(1.2 分間)0/1 00(0.9 分間) => 95/5(0.1 分間) 95/5(0.5 分間)	1.0	40	190-800nm PDA total

SMD Method 10	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Waters Xselect (3.0x50)	A)0.1%FA,H2O B)0.05%FA,MeCN	95/5=〉45/55(5.0分間)45/55(2.0分間) => 95/5(0.2分間) 95/5(0.2分間)	0.9	35	190-800nm PDA total
SMD Method 11	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS (3.0x50) (3.0x50)	A)0.05%TFA,H2O B)0.05%TFA,MeCN	90/10=〉 0/100(1.7分間) 0/100(1.5分間) => 90/10(0.13分間) 90/10(0.27分間)	0.9	40	190-800nm PDA total
Orbitrap HFIP-Et3N-2	UltiMate3000/LTQ Orbitrap XL	Acclaim PepMap RSLG C18(0.075x150)	A)棚mM HFIP-15mM Et3N,H20 B)400mM HFIP-15mM Et3N,MeOH	96/4=> 30/70(45.0分間) 2/98(1.0分間) 2/98(2.0分間)	0.0003	40	-

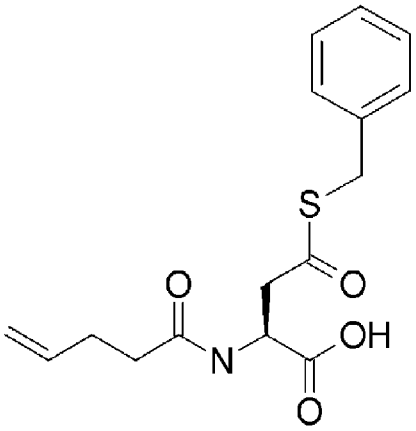
[0281] 1．1g-IDの合成

1—1．(S)-4-(tert—プトキシ)_4_オキソ_3__(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸___(化合物1b_I)_の合成



[0282] (S)—3—アミノー4—(tert—プトキシ)－4—オキソブタン酸(化合物1a_I)(21.1mmol 4.00g)とNa_2C0_3(63.3mmol，6.71g)のTHF(70mL)、水(140ml)溶液に塩化ペンター4—エノィル(42.2mmol，4.66ml)を0℃で加え、室温で20分間攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を0℃で滴下し、pH2とした。酢酸エチルで希釈した後に、適量のNaClを加え塩析抽出を行った。得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシゥムで乾燥した。そして、減圧濃縮により(S)-4-(tert—プトキシ)_4_オキソ_3_(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸(化合物1b_I)とペンタ_4_エン酸(1：0.8)の混合粗生成物A(7.69g、100%)を得た。

[0283] 1-2．(S)-4-(ベンジルチオ)_4_オキソ_2__(ペンタ_4_エンアミド)ブタン酸___(化合物1f_ID)_の合成

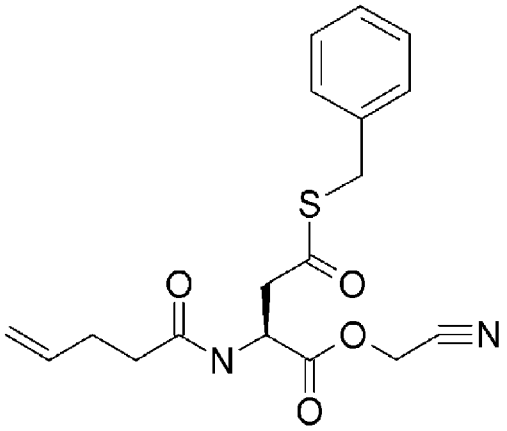


[0284] （Ｓ）－４－（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－４―オキソ－３―(ペンター４―エンアミド)ブタン酸 (化合物１ｂ＿Ｉ）とペンタ＿４＿エン酸 (1：0．8）の混合粗生成物Ａ（２．５１ｇ、１２．９ｍｍｏｌ）のCH_2Cl_2（３５ｍｌ）溶液にＤＩＣ（Ｎ、Ｎ'―ジイソプロピルカルボジイミド) (2．４１ｍし １５．５ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（Ｎ、Ｎ―ジメチルアミノピリジン）（３１５ｍｇ、２．５８ｍｍｏｌ）およびフエニルメタンチオール (1．８２ｍし １５．５ｍｍｏｌ）を加え、室温で４時間攪拌した。その後、反応混合物にＴＦＡ（２１ｍｌ）を加え、室温で９時間半攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール＝８０/ ２０→４０/ ６０）にて精製し、 (Ｓ）―４―(ベンジルチオ）－４―オキソ－２―(ペンタ＿４―エンアミド)ブタン酸 (化合物１ｆ＿ＩＤ）（１．６５ｇ、７４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ ｚ ＝ ３２２ (Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．７８分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0285] 1－３．４－ (ベンジルチオ)＿４＿オキソ＿２＿(ペンター４―エンアミド)ブタン酸 (Ｓ)―シアノメチル (化合物１ｑ＿ＩＤ)の合成



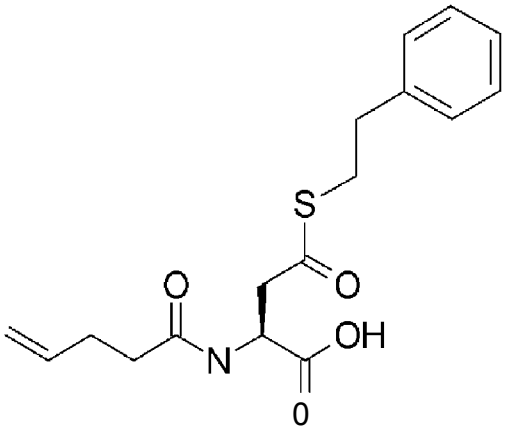
[0286] （Ｓ）―4 ―(ベンジルチオ）－４―オキソ－２―(ペンター4 ―エンアミド)ブタン酸 (化合物１ｆ＿ＩＤ）（１．００ｇ、３．１２ｍｍｏｌ）のＤＭＳＯ（４．３５ｍｌ）溶液に2 ―ブロモアセトニトリル (4．３５ｍｌ、６２．４ｍｍｏｌ）とＮ＿エチル＿Ｎ―イソプロピルプロパン＿２＿アミン (0．６５１ｍし ３．７４ｍｍｏｌ）を加え、室温で４０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (5ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→４０/ ６０）にて精製し、4 - (ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿ (ペンタ＿４―エンアミド)ブタン酸 (S）＿シアノメチル (化合物１ｇ＿ＩＤ）（８８５．２ｍｇ、７９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z ＝ ３６１ (M+H)+

保持時間 :0．９１分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0287] ２．１ｇ- ＩＥの合成

２―１．(Ｓ)＿―4 ―オキソ－２―＿(ペンター4 ―エンアミド)－４―＿(フエネチルチオ)＿ブタン酸 (化合物１ｆ＿ＩＥ）の合成

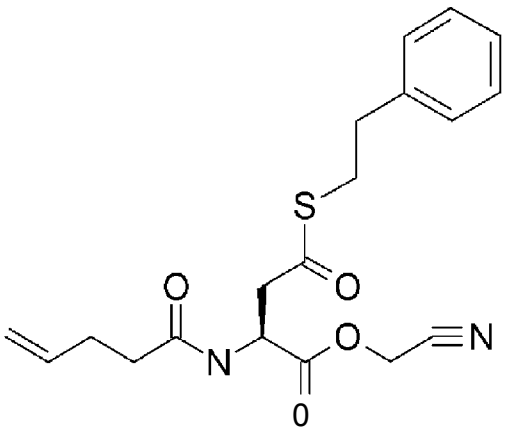


[0288] 化合物１ｆ＿ＩＤの製造例と同様の条件で（Ｓ）－４－（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－４―オキソ－３―（ペンター４―エンアミド）ブタン酸（化合物１ｂ＿Ｉ）とペンタ＿４＿エン酸（１：０．８）の混合粗生成物Ａ（１．３ｇ、６．６５ｍｍｏｌ）を用い、さらにフエニルメタンチオールの代わりに２―フエニルエタンチオール（０．８８９ｍし６．６３ｍｍｏｌ）を用いることで、（Ｓ）―４―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－４―（フエネチルチオ）ブタン酸（化合物１ｆ＿ＩＥ）（６０７ｍｇ、４９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝３３６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８３分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0289] ２－２．４―ォキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－４―（フエネチルチォ）ブタン酉奮（Ｓ）―シアノメチル（化さ物１ｑ＿ＩＥ）のさ成



[0290] （（Ｓ）―４―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－４―（フエネチルチオ）ブタン酸（化合物１ｆ―ＩＥ）（３００ｍｇ、０．８９４ｍｍ

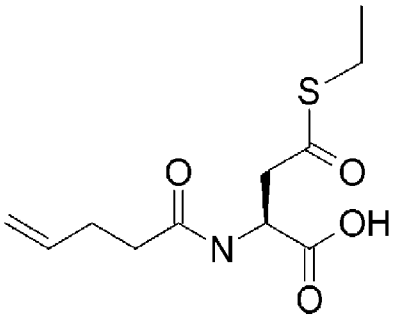
ｏｌ）の２－プロモアセトニトリル（1．８７ｍｌ）溶液にＮ－エチル―Ｎ―イソプロピルプロパン－２―アミン（0．１８７ｍし１．０７ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液（5ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→６０/ ４０）にて精製し、４＿オキソ＿２＿（ペンター４＿エンアミド）＿４＿（フエネチルチオ）ブタン酸　（Ｓ）―シァノメチル（化合物１ｇ－ＩＥ）（２９５ｍｇ、８８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ　＝　３７５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0291] ３．１ｇ－ＩＧの合成

３－１．　（Ｓ）－４－（エチルチオ）＿４＿ォキソ＿２＿（ペンタ＿４＿エンアミド）ブタン酷（化合物１ｆ－ＩＧ）の合成

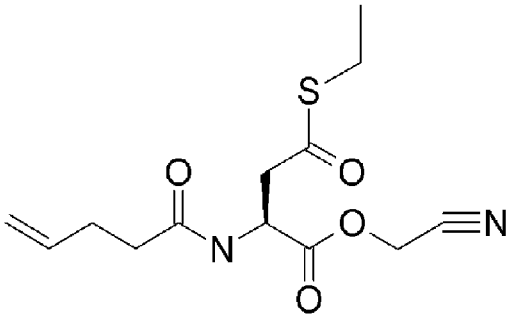


[0292] 化合物１ｆ＿ＩＤの製造例と同様の条件で（Ｓ）－４－（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－４―オキソ－３―（ペンター４－エンアミド）ブタン酸（化合物１ｂ－Ｉ）とペンタ＿４＿エン酸（１：０．８）の混合粗生成物Ａ（８８９ｍｇ、４．５５ｍｍｏｌ）を用い、さらにフエニルメタンチオールの代わりにエタンチオール（0．３３８ｍし４．５６ｍｍｏｌ）を用いることで、（Ｓ）－４－（エチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　（化合物１ｆ＿ＩＧ）（２３３ｍｇ、３６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ　＝　２６０　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．５８分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0293] 3－2．　4－（エチルチオ）＿4＿オキソ＿2＿（ペンター4―エンアミド）ブタン酸＿（S）―シアノメチル（化合物1q＿IG）の合成



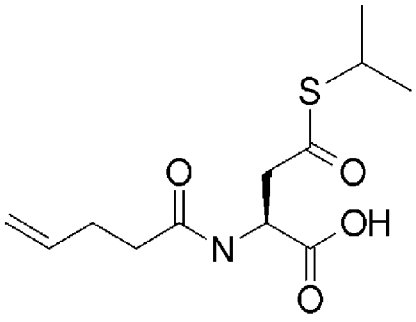
[0294] 化合物1g＿IDの製造例と同様の条件で（S）－4－（ベンジルチオ）―4―オキソ－2―（ペンター4―エンアミド）ブタン酸（化合物1f―ID）の代わりに（S）－4－（エチルチオ）＿4＿オキソ＿2＿（ペンター4―エンアミド）ブタン酸（化合物1f＿IG）（100mg、0.386mmol）を用いることで4＿（エチルチオ）＿4＿オキソ＿2＿（ペンタ＿4―エンアミド）ブタン酸（S）―シアノメチル（化合物1g＿IG）（59.8mg、52%）を得た。

LCMS（ESI）　m/z　=299（M+H）+

保持時間：0.69分（分析条件30D「六05）

[0295] 4．1g－IBの合成

4－1．（S）－4－（イソプロピルチオ）＿4＿ォキソ＿2＿（ペンタ＿4―エンアミド）ブタン酸（化合物1f＿IB）の合成



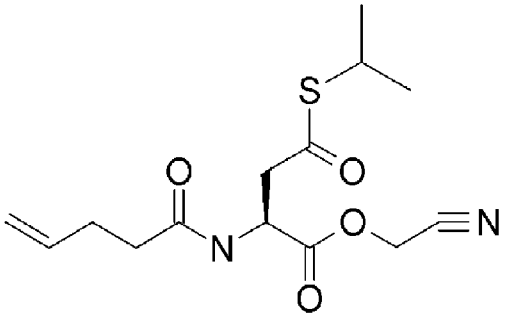
[0296] 化合物1f－IDの製造例と同様の条件で（S）－4－（tert―プトキシ）－4―オキソ－3―（ペンター4―エンアミド）ブタン酸（化合物1b－I）とペンタ＿4＿エン酸（1：0.8）の混合粗生成物A（788m

g、４．２３ｍｍｏｌ）を用い、さらにフエニルメタンチオールの代わりにプロパン－２―チオール（0．３９３ｍし ４．２３ｍｍｏｌ）を用いることで、（S）－４－（イソプロピルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸（化合物１ｆ＿ＩＢ）（４８５ｍｇ、７６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２７４ （M＋Ｈ）＋

保持時間：0．７０分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0297] ４－２．４―（イソプロピルチオ）－４―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）ブタン酸＿（S）＿―シァノメチル（化合物１ｑ＿ＩＢ）＿の合成



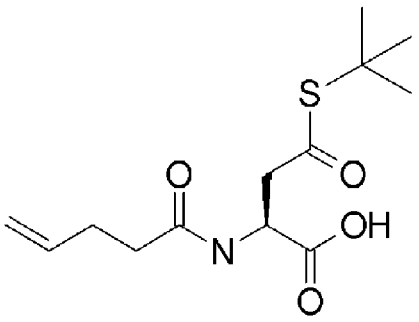
[0298] （Ｓ）－４－（イソプロピルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）プタン酸（化合物１ｆ＿ＩＢ）（２００ｍｇ、０．７３２ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１ｍｌ）溶液に２―プロモアセトニトリル（0．５１０ｍｌ、７．３２ｍｍｏｌ）とＮ＿エチル＿Ｎ―イソプロピルプロパン＿２＿アミン（0．１５３ｍし ０．８７８ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニゥム水溶液（1ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシゥムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→６０/ ４０）にて精製し、４―（イソプロピルチオ）－４―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）プタン酸 （S）＿シァノメチル（化合物１ｇ＿ＩＢ）（１６１ｍｇ、７０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ３１３ （M＋Ｈ）＋

保持時間：0．７５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0299] 5．1g_ICの合成

5-1．(S)-4-(tert—プチルチオ)_4_オキソ_2__(ペンタ—4—エンアミド)_ブタン酸 (化合物1f_IC)_の合成

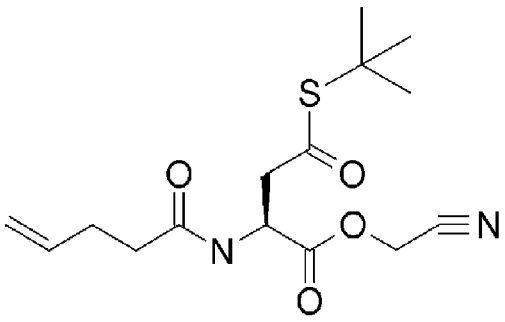


[0300] 化合物1f_IDの製造例と同様の条件で (S)-4-(tert—プトキシ)－4—オキソ－3—(ペンター4—エンアミド)ブタン酸 (化合物1b_I)とペンタ_4_エン酸 (1:0．8)の混合粗生成物A (1．23g、6．64mmol)を用い、さらにフエニルメタンチオールの代わりに2_メチルプロパン_2_チオール (0．748mし 6．63mmol)を用いることで、 (S)-4-(tert—プチルチオ)_4_オキソ_2-(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸 (化合物1f_IC) (653mg、62%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 288 (M+H)+

保持時間 :0．79分 (分析条件SQDAAO5)

[0301] 5-2． 4-(tert—プチルチオ)_4_ォキソ_2__(ペンター4—エンアミ゛)_ブタン酷 (S)—シァノメチル (化さ物1g_IC)_のさ成



[0302] 化合物1g_IEの製造例と同様の条件で ((S)_4_オキソ_2_(

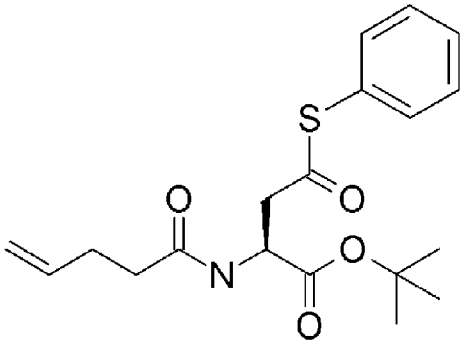
ペンター4—エンアミド)_4_(フエネチルチオ)ブタン酸 (化合物1f-IE)の代わりに(S)-4-(tert—プチルチオ)_4_オキソ-2-(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸 (化合物1f_IC)(300mg、1.04mmol)を用いることで4-(tert—プチルチオ)—4—オキソ—2—(ペンター4—エンアミド)ブタン酸 (S)—シァノメチル (化合物1g_IC)(293mg、86%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 327 (M+H)+

保持時間:0.90分 (分析条件SQDAA05)

[0303] 6.1e-IFの合成

6—1._4—オキソ—2—_(ペンター4—エンアミド)—4—_(フエニルチオ)ブタン酷 (S)-tert—プチル (化合物1e_IF)の合成



[0304] (S)-4-(tert—プトキシ)—4—オキソ—3—(ペンター4—エンアミド)ブタン酸 (化合物1b_I)とペンタ_4_エン酸 (1:0.8)の混合粗生成物A(2.53g、13.Ommol)のCH_2Cl_2(35ml)溶液にDIC(2.43mし 15.6mmol)、DMAP(318mg、2.60mmol)およびベンゼンチオール (1.59mし 15.6mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。反応混合物をろ過し、得られたろ液を濃縮後、酢酸エチルで希釈した後に、飽和塩化アンモニゥム水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシゥムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10mM酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール=70/30→0/100)にて精製し、さらに得られた粗生成物をシリカゲルカラ

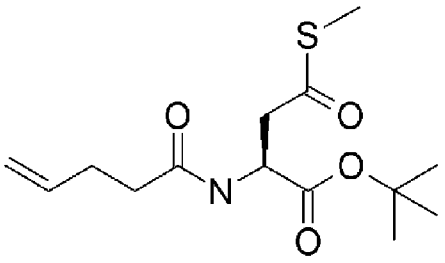
ムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル= １００/ ０→６５/ ３５) にて精製し、４―オキソ－２― (ペンター4 ―エンアミド) －４― (フエニルチオ) ブタン酸 (S) _ t e r t _ プチル (化合物１e_ ＩF) (1．９９g、７９%) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = ３６４ (M+ H) +

保持時間 :1．０１分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0305] ７．１g- ＩAの合成

７- １． ４- (メチルチオ) _ ４ _ オキソ_ ２ _ (ペンター4 ―エンアミド) ブタン酸 (S) - t e r t ―プチル (化合物１e_ ＩA) の合成

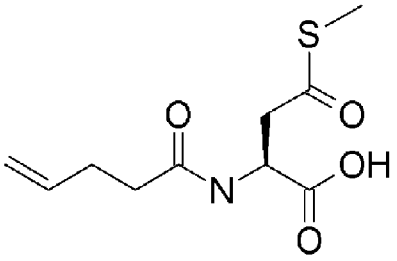


[0306] (S) - ４- (t e r t ―プトキシ) －４―オキソ－３― (ペンター4 ―エンアミド) ブタン酸 (化合物１b_ Ｉ) とペンタ_４_エン酸 (1：0．8) の混合粗生成物Ａ (1．９６g、９．６８mmｏｌ) のＴＨＦ (４４mｌ) 溶液にＥｔ$_3$Ｎ (1．５４mし １１．Ｏmmｏｌ) とカルボノクロリド酸エチル (1．０５mし １１．０mmｏｌ) を加え、室温で２５分攪拌した。その後、反応混合物にナトリウム メタンチオラート (1．０６g、１５．１mmｏｌ) のＤＭＦ (１８mｌ) 溶液を加え、室温で１時間攪拌した。その後、反応混合物に水を加え、ジクロロメタンで希釈し、有機層を水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (１０mM酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール= ７０/ ３０→４０/ ６０) にて精製し、４_ (メチルチオ) _ ４―オキソ－２― (ペンター4 ―エンアミド) ブタン酸 (S) - t e r t - プチル (化合物１e_ ＩA) (1．３８g、８５%) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = ３０２ (M+ H) +

保持時間 :0．９０分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0307] 7-2.(S)-4-(メチルチオ)_4_オキソ_2_(ペンター4—エンアミド)ブタン酸(化合物1f_IA)の合成

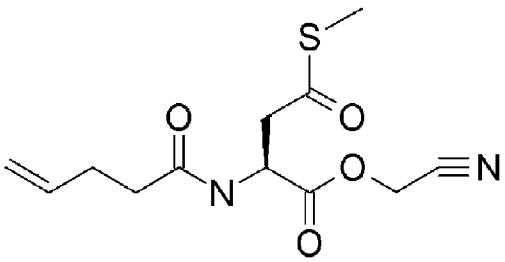


[0308] 4-(メチルチオ)_4_オキソ_2_(ペンタ_4—エンアミド)プタン酸 (S)_tert—プチル(化合物1e_IA、69.3mg、0.23mmol)のジクロロメタン(1.2ml)溶液にトリフルオロ酢酸(0.684mし9.20mmol)を加え、室温で6時間半攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー(10mM酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール=100/0→60/40)にて精製し、(S)—4—(メチルチオ)−4—オキソ−2—(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸(化合物1f_IA)(46.9mg、83%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 246 (M+H)+

保持時間:0.51分(分析条件SQDAA05)

[0309] 7-3.4-(メチルチオ)_4_ォキソ_2_(ペンター4—エンアミド)ブタン酸___(S)_—シァノメチル(化合物1q_IA)の合成



[0310] (S)-4-(メチルチオ)_4_オキソ_2_(ペンタ_4—エンアミド)プタン酸(化合物1f_IA)(1.17g、3.78mmol)のDMF(5ml)溶液に2—プロモアセトニトリル(2.64mし37.8mmol)とN_エチル_N—イソプロピルプロパン−2—アミン(3.2

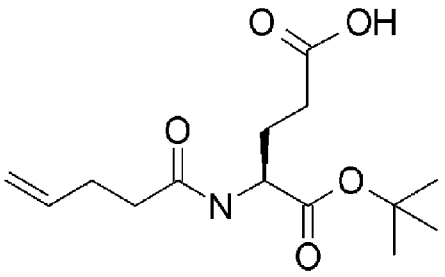
９ｍｌ １８．９ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (3ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→３０/ ７０）にて精製し、４_（メチルチオ）－４―オキソ－２―(ペンター４―エンアミド）ブタン酸 (S）-シアノメチル (化合物１ｇ_ＩＡ）（３６８ｍｇ、３４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ２８５ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．６９分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

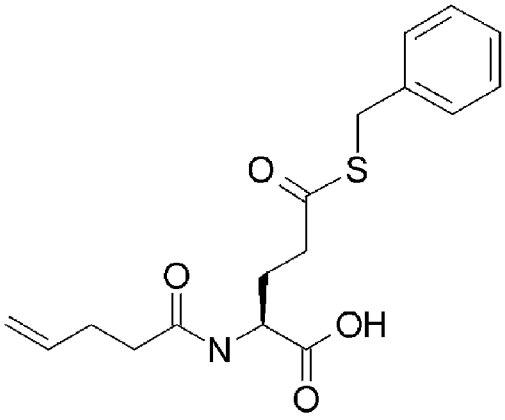
[031 1] ８．１ｇ-ＩＩＤの合成

８-１．（Ｓ）-５-（ｔｅｒｔ―ブトキシ）_５_ォキソ_４__(ペンタ_４―エンアミド)ペンタン酴 (化合物１ｂ_ＩＩ)_の合成



[031 2] 化合物１ｂ_Ｉの製造例と同様の条件で (Ｓ）_３―アミノ_４_（ｔｅｒｔ―プトキシ）_４_オキソブタン酸 (化合物１ａ_Ｉ）の代わりに (Ｓ）―４―アミノ－５―（ｔｅｒｔ―プトキシ）－５―オキソペンタン酸 (化合物１ａ―Ｉし ５．ＯＯｇ、２４．２ｍｍｏｌ）用いることで、 (Ｓ）―５-（ｔｅｒｔ―プトキシ）－５―オキソ－４―(ペンター４―エンアミド）ペンタン酸 (化合物１ｂ_ＩＩ）とペンタ_４_エン酸 (１：０．８）の混合粗生成物Ｂ（９．２８ｇ、１００％）を得た。

[031 3] ８-２．（Ｓ）-５-(ベンジルチオ)_５_オキソ_２__(ペンタ_４_エンアミド)ペンタン酸 (化合物１ｆ_ＩＩＤ)_の合成

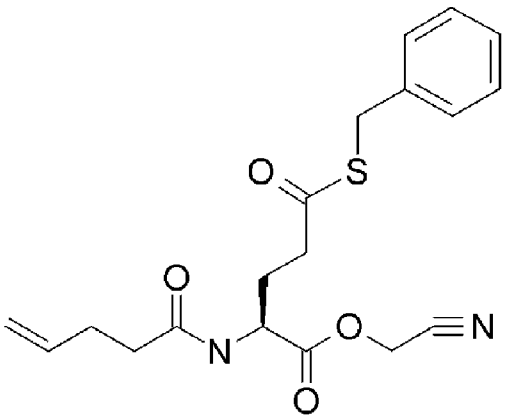


[0314] 化合物１ｆ＿ＩＤの製造例と同様の条件で混合粗生成物Ａの代わりに混合粗生成物Ｂ（２．３０ｇ、１０．８０ｍｍｏｌ）を用いることで、（Ｓ）＿５－（ベンジルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ペンタン酸（化合物１ｆ＿ＩＩＤ）（１．４５ｇ、７２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３３６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８２分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[031 5] ８－３．５－（ベンジルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４＿エンアミド）ペンタン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＩＤ）の合成



[031 6] 化合物１ｇ＿ＩＤの製造例と同様の条件で（Ｓ）－４－（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸（化合物１ｆ＿ＩＤ）の代わりに（Ｓ）－５－（ベンジルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンター４＿エンアミド）ペンタン酸（化合物１ｆ―ＩＩＤ）（９６４ｍｇ、２．８７ｍｍｏｌ）を用いることで、５＿（ベンジルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ペンタン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ

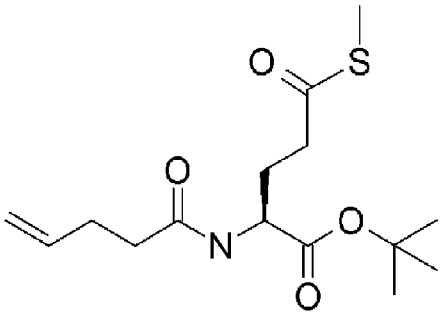
-ＩＩＤ）（９５１ｍｇ、８９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　３７５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９３分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0317] ９．１ｇ-ＩＩＡの合成

９-１．　５-（メチルチオ）_５_オキソ_２__(ペンター４―エンアミド）ペンタン酸___(Ｓ)-ｔｅｒｔ―ブチル（化合物１ｅ_ＩＩＡ）の合成

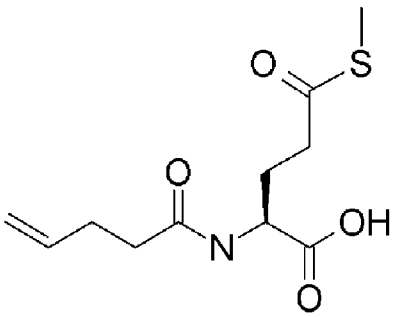


[0318] 化合物１ｅ_ＩＡの製造例と同様の条件で、混合粗生成物Ａの代わりに混合粗生成物Ｂ（１．９４ｇ、９．１１ｍｍｏｌ）を用いることで、５―（メチルチオ）_５_オキソ_２_（ペンタ_４―エンアミド）ペンタン酸　（Ｓ）-ｔｅｒｔ―ブチル（化合物１ｅ_ＩＩＡ）（１．２２ｇ、７６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　３１６　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９２分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0319] ９-２．　（Ｓ）-５-（メチルチオ）_５_ォキソ_２__(ペンタ_４_エンアミド）ペンタン酸（化合物１ｆ_ＩＩＡ）の合成



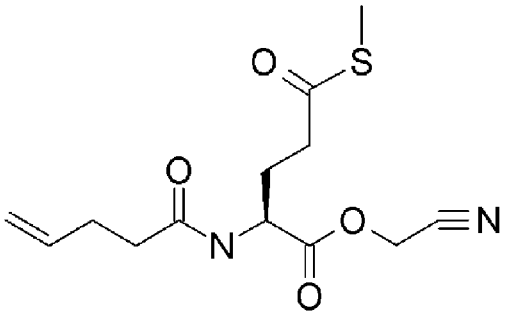
[0320] 化合物１ｆ_ＩＡの製造例と同様の条件で４_（メチルチオ）_４―オキソー２―（ペンター４_エンアミド）ブタン酸　（Ｓ）_ｔｅｒｔ―ブチル（化合物１ｅ_ＩＡ）の代わりに５_（メチルチオ）_５_オキソ_２_（

ペンター4―エンアミド)ペンタン酸　(S)-tert―ブチル (化合物1e-IIA)（1.02g、3.24mmol）を用いることで、(S)-5-(メチルチオ)_5_オキソ_2_(ペンタ_4―エンアミド)ペンタン酸 (化合物1f_IIA)（790mg、94%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 260 (M+H)+

保持時間 :0.54分 (分析条件SQDAA05)

[0321] 9-3. 5-(メチルチオ)_5_オキソ_2_(ペンター4―エンアミド）ペンタン酸 (S)_―シアノメチル (化合物1g_IIA)_の合成



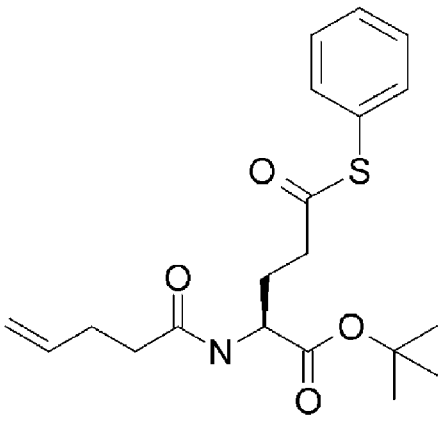
[0322] （S）-5-（メチルチオ）－5―オキソ－2―(ペンター4―エンアミド)ペンタン酸 (化合物1f_IIA)（673mg、2.60mmol）のDMSO（5、5ml）溶液に2―プロモアセトニトリル (3.60ml、52.0mmol）とN_エチル_N―イソプロピルプロパン_2_アミン (0.297mし 2.86mmol）を加え、室温で30分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (3ml）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=100/0→30/70）にて精製し、5-(メチルチオ)_5_オキソ_2_(ペンタ_4―エンアミド)ペンタン酸 (S)_シアノメチル (化合物1g_IIA)（772mg、100%）を得た。

LCMS（ESI） m/z =299 (M+H)+

保持時間 :0.75分 (分析条件SQDAAO5)

[0323] 10. 1g-IIFの合成

１０―１．　５―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－５―（フエニルチオ）ペンタン酸　（Ｓ）－ｔｅｒｔ―ブチル（化合物１ｅ＿ＩＩＦ）の合成

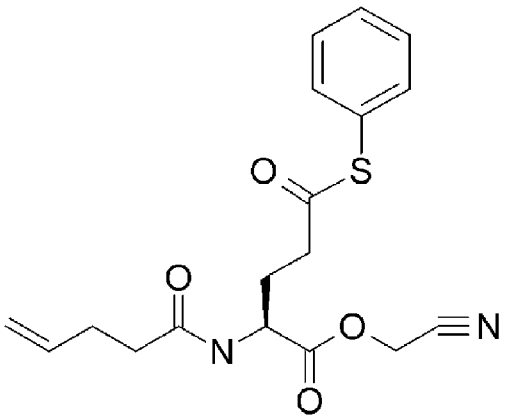


[0324] 化合物１ｅ＿ＩＦの製造例と同様の条件で、混合粗生成物Ａの代わりに混合生成物Ｂ（２．１１ｇ、９．９０ｍｍｏｌ）を用いることで５―オキソ－２－（ペンター４―エンアミド）－５―（フエニルチオ）ペンタン酸　（Ｓ）－ｔｅｒｔ－ブチル（化合物１ｅ＿ＩＩＦ）（１．５２ｇ、７３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝３７８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０３分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0325] １０－２．　５―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－５―（フエニルチオ）ペンタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＩＦ）の合成



[0326] ５―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－５―（フエニルチオ）ペンタン酸　（Ｓ）＿ｔｅｒｔ＿ブチル（化合物１ｅ＿ＩＩＦ）（９７８ｍｇ

、２．５９ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（６．７４ｍｌ）溶液にトリフルオロ酢酸（３．８５ｍｌ　５１．８ｍｍｏｌ）を加え、室温で３時間攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣の２＿プロモアセトニトリル（８ｍｌ）溶液にＮ＿エチル＿Ｎ―イソプロピルプロパン＿２＿アミン（１．３０ｍｌ　７，４７ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に水を加えた後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝６０/ ４０→２０/ ８０）にて精製し、５―オキソ－２―（ペンター４―エンアミド）－５―（フエニルチオ）ペンタン酸　（Ｓ）＿シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＩＦ）（７２２ｍｇ、６４％）を得た。

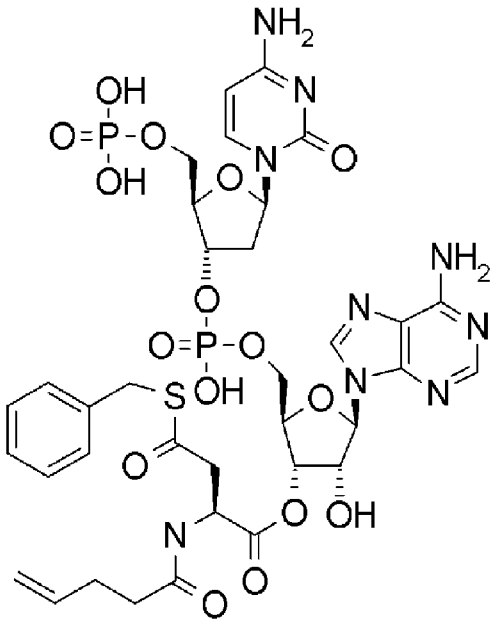
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ　＝　３６１　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0327] ［実施例２］側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化ｐｄＣｐＡの合成

実施例１で合成した側鎖カルボン酸が活性エステル化された化合物（化合物１ｇ）を用いてアミノアシル化ｐｄＣｐＡ（化合物１ｉ）の合成を行った。

[0328] １．４－（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ブタン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　（化合物１ｉ＿ＩＤ）の合成



[0329] ｐｄＣｐＡ(リン酸二水素 ((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4—アミノ—2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)—イル)_3_((((2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-(6—アミノー9Ｈ—プリンー9—イル)－3，4—ジヒドロキシテ トラヒドロフラン_2_イル)メトキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_2_イル)メチル 化合物1ｈ)の合成を文献、Nucleos ides, Nucleot ides & Nucleic Acids, 20(3), 197-21 1; 2001、Xue-Feng Zhu and A. Lan Scott, に従って合成した。

緩衝液Ａ(１１３ｍｌ)にリン酸二水素 ((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)—イル)_3_((((2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-(6—アミノー9Ｈ—プリンー9—イル)—3，4—ジヒドロキシテ トラヒドロフランー2—イル)メトキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_2_イル)メチル (化合物1ｈ)(２００ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ)の水溶液 (6．２５ｍｌ)と4_(ベンジルチオ)_4_オキソ_2_(ペンタ_4—エンアミド)ブタン酸 (S)_シアノメチル (化合物1ｇ_ＩＤ)(４５４ｍｇ、1．２６ｍｍｏｌ)のテトラヒドロフラン (3．１５ｍｌ)溶液を加え、室温で1時間攪拌した。その後、トリフルオロ酢酸 (2．５２ｍし ３３．９ｍｍｏｌ)を加えた後に、凍結乾燥させた。得られた残渣を逆相シリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー (0．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液= １００/ ０→６０/ ４０）にて精製し、４-（ベンジルチオ）_４_オキソ_２_（ペンタ_４―エンアミド）プタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）-２-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (化合物１ｉ_ＩＤ）（７０．９ｍｇ、２４％）を得た。

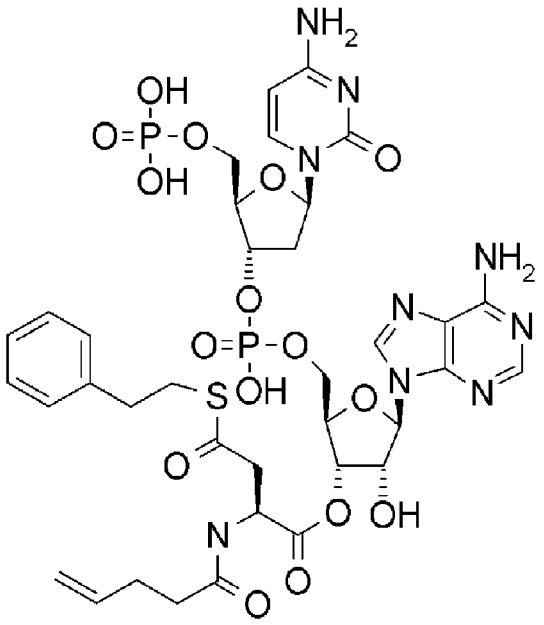
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ９４０ （Ｍ+Ｈ）+

保持時間 :０．５３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0330] なお、緩衝液Ａは以下のように調整した。

Ｎ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン_１_アミニウム 塩化物 (６，４Ｏｇ、２０ｍｍｏｌ）とイミダゾール (６．８１ｇ、１００ｍｍｏｌ）の水溶液に酢酸を添加し、ｐＨ８、２０ｍＭ Ｎ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン―１―アミニウム、１００ｍＭイミダゾールの緩衝液Ａ（１Ｌ）を得た。

[0331] ２．４_ォキソ_２_（ペンター４―エンアミド）_４_（フエネチルチオ）ブタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン―３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (化合物１ｉ_ＩＥ）の合成

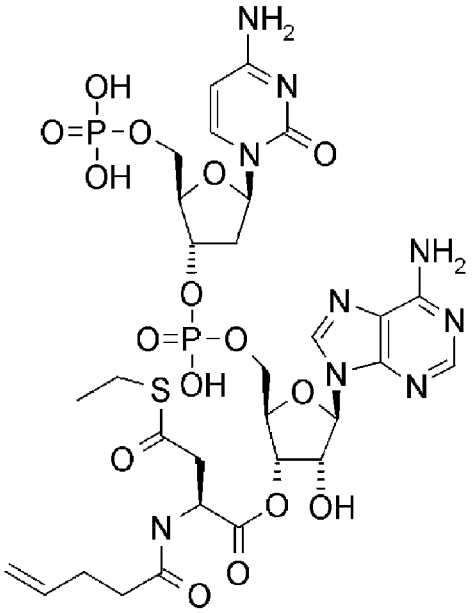


[0332] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（５０ｍｇ、０．０７９ｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　(Ｓ)―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに４―オキソ－２―(ペンター４―エンアミド)－４―(フエネチルチオ)ブタン酸　(Ｓ)―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＥ）（１１８ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）用いることで、４―オキソ－２―(ペンター４―エンアミド)－４―(フエネチルチオ)ブタン酸　(2Ｓ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　（化合物１ｉ＿ＩＥ）（２２．８ｍｇ、３０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝９５４（M＋Ｈ）＋

保持時間：0．８０分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0333] ３．　４－（エチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ブタン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）－イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノー９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物１ｉ＿ＩＧ）の合成



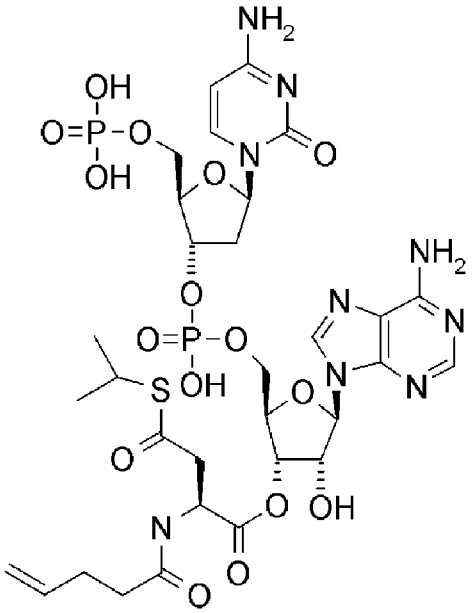
[0334] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（５０ｍｇ、０．０７９ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに４＿（エチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸（

Ｓ）―シアノメチル (化合物１ｇ_ＩＧ）（９４ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）用いることで、４_（エチルチオ）_４_オキソ_２_（ペンタ_４―エンアミド）ブタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_３―イル (化合物１ｉ_ＩＧ）（２３．９ｍｇ、３５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝８７８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６６分 (分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0335] ４．４-(イソプロピルチオ)_４_オキソ_２_(ペンタ_４_エンアミド)ブタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)_２_(（ホスホノオキシ)メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_３―イル (化合物１ｉ_ＩＢ)_の合成



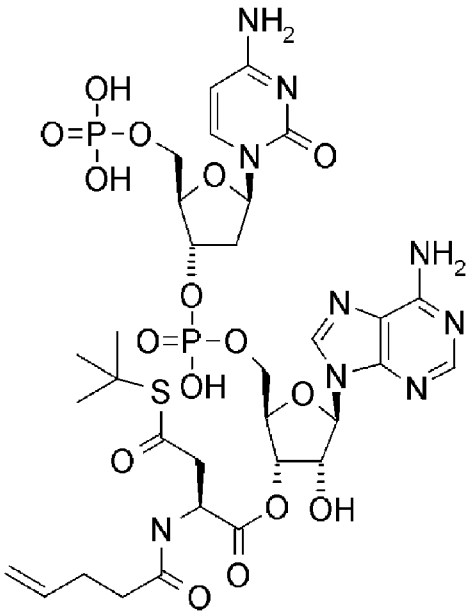
[0336] 化合物１ｉ_ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((２Ｒ，３

Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（５０ｍｇ、０．０７９ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに４＿（イソプロピルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＢ）（９８ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）用いることで、４＿（イソプロピルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ブタン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ＿２―オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物１ｉ＿ＩＢ）（２７．３ｍｇ、３９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝８９２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７０分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0337] ５．　４－（ｔｅｒｔ―ブチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ブタン酸　（２Ｓ）＿（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物１ｉ＿ＩＣ）の合成

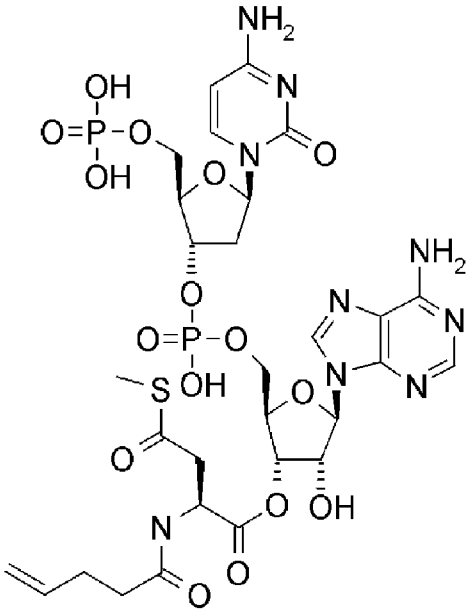


[0338] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（５０ｍｇ、０．０７９ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　(Ｓ)―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに４＿（ｔｅｒｔ―ブチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド)ブタン酸　(Ｓ)＿シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＣ）（１０３ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）用いることで、４＿（ｔｅｒｔ―ブチルチオ）＿４＿オキソ―２―(ペンター４―エンアミド)ブタン酸　(２Ｓ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ＿２―オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物１ｉ＿ＩＣ）（２６．２ｍｇ、３７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝９０６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７４分　(分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１)

[0339] ６．　４－（メチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ブタン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）－イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ＿プリン－９＿イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３＿イル　(化合物１ｉ＿ＩＡ)の合成



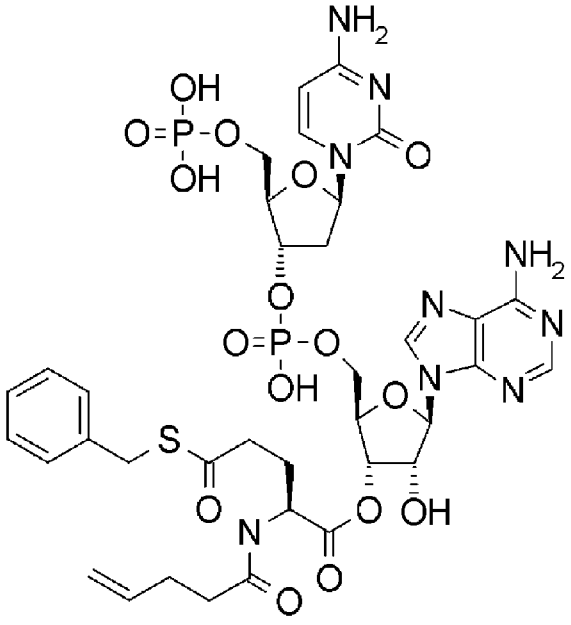
[0340] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル　(化合物１ｈ）（１５０ｍｇ、０．２３６ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル　(化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに４＿（メチルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸

（Ｓ）―シアノメチル (化合物１ｇ_ＩＡ）（２６８ｍｇ、０．９４３ｍｍｏｌ）用いることで、４_（メチルチオ）_４_オキソ_２_（ペンタ_４―エンアミド)ブタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）―２―（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン-１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン―３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）―５-（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (化合物１ｉ_ＩＡ）（８３．６ｍｇ、４１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝８６４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４０分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0341] ７． ５-（ベンジルチオ）_５_オキソ_２_(ペンター４―エンアミド)ペンタン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６-アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (化合物１ｉ－ＩＩＤ）の合成

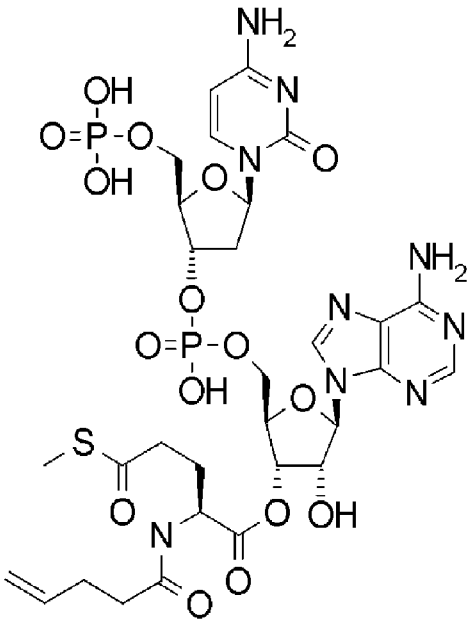


[0342] 化合物1ｉ_ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4―アミノ―2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)―イル)-3-(((((2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-(6―アミノ_9Ｈ_プリン―9―イル)－3，4―ジヒドロキシテトラヒドロフラン―2―イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン―2―イル)メチル (化合物1ｈ)(２００ｍｇ、０．３１４ｍｏｌ)を用い、さらに4_(ベンジルチオ)_4_オキソ_2_(ペンタ_4―エンアミド)ブタン酸 (Ｓ)―シアノメチル (化合物1ｇ_ＩＤ)の代わりに5_(ベンジルチオ)－5―オキソ－2―(ペンター4―エンアミド)ペンタン酸 (Ｓ)―シアノメチル (化合物1ｇ_ＩＩＤ)(４７２ｍｇ、１．２６ｍｍｏｌ)用いることで、5_(ベンジルチオ)_5_オキソ_2_(ペンタ―4―エンアミド)ペンタン酸 (2Ｓ)-(2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-2-(((((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4―アミノ―2_オキソピリミジン―1(2Ｈ)―イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6―アミノ―9Ｈ―プリン―9―イル)－4―ヒドロキシテトラヒドロフラン―3―イル (化合物1ｉ_ＩＩＤ)(３１．３ｍｇ、１０％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/z = 954 (M+H)+

保持時間:0．５５分 (分析条件３０Ｄ「六05)

[0343] 8．5-(メチルチオ)_5_オキソ_2_(ペンター4―エンアミド)ペンタン酸 (2Ｓ)-(2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-2-(((((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4―アミノ―2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)_―イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン―3―イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6―アミノ―9Ｈ―プリン―9―イル)－4―ヒドロキシテトラヒドロフラン―3―イル (化合物1ｉ_ＩＩＡ)の合成

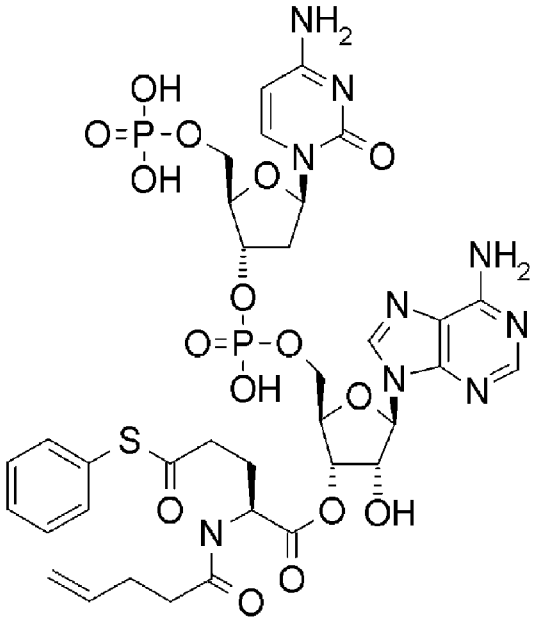


[0344] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（２００ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸　(Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに５＿（メチルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ペンタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物１ｇ＿ＩＩＡ）（３７６ｍｇ、１．２６ｍｍｏｌ）用いることで、５＿（メチルチオ）＿５＿オキソ＿２＿（ペンター４―エンアミド）ペンタン酸　(２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物１ｉ＿ＩＩＡ）（６８．０ｍｇ、２５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝８７８（M＋Ｈ）＋

保持時間：０．４３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0345] ９．５＿オキソ＿２＿(ペンター４―エンアミド)＿５＿(フエニルチオ)《ンタン酸 （２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―ィル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿ィル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６－アミノー９Ｈニプリンー９―ィル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフランー３―ィル（化合物１ｉ－ＩＩＦ）の合流



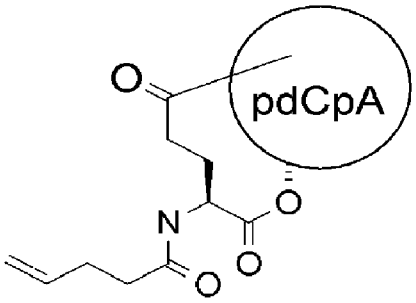
[0346] 化合物１ｉ＿ＩＤの製造例と同様の条件で、リン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―ィル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリンー９―ィル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフランー２－ィル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフランー２―ィル）メチル (化合物１ｈ）（１５０ｍｇ、０．２３６ｍｍｏｌ）を用い、さらに４＿（ベンジルチオ）＿４＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）ブタン酸 (Ｓ）―シアノメチル (化合物１ｇ＿ＩＤ）の代わりに５＿オキソ＿２＿（ペンタ＿４―エンアミド）＿５＿（フエニルチオ）ペンタン

酸　(S)—シアノメチル (化合物1g_IIF)（534mg、0.944mmol）を用いることで、5—オキソ−2—(ペンター4—エンアミド)-5-（フエニルチオ）ペンタン酸　(2S)-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノ_2—オキソピリミジン−1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）−5—（6—アミノ−9H—プリン−9—イル）−4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物1i_IIF) と化合物1i_IIFのチオエステル部位とpdCpA部位のアルコール部位あるいはアミノ基部位と分子内縮合した推定化合物2種類 (化合物1i_IIF_B1)、(化合物1i_IIF—B2）をLCMS分析により観測した。その割合は、LCMSのUVエリア%比より、化合物1i_IIF：(化合物1i−IIF-B1）+（化合物1i_IIF−B2）=20：9であった。

(化合物1i-IIF)

LCMS（ESI）　m/z　=940（M+H）+

保持時間：0.70分 (分析条件SQDFA05)



(1i-IIF-B1)

LCMS（ESI）　m/z　=828（M-H）-

保持時間：0.65分 (分析条件SQDFA05)

(1i-IIF-B2)

LCMS（ESI）　m/z　=828（M-H）-

保持時間：0.66分 (分析条件SQDFA05)

これまで示してきたように、Rex1＝Me、Et，iPr，Ph，Bz、P

henetyl基を有する側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化pdCpA（化合物1i）を合成した。

[0347] [実施例3] 側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシルtRNAの合成

以下の方法に従って、側鎖カルボン酸がチオエステル化されたアミノアシル化tRNAの合成を行なった。

[0348] 1. 転写によるtRNA_(CA欠損)の合成

鋳型DNA（配列番号D_1）から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega社, P1300）を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNAEnAsnGAG (-CA) （配列番号R_1）を合成し、RNeasy Mini kit (Qiagen社）により精製した。

[0349] 配列番号D_1（配列番号：1）

tRNAEnAsnGAG (-CA) DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTgagAATCCGTATGTCACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0350] 配列番号R_1（配列番号：30）

tRNAEnAsnGAG (-CA) RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[0351] 2. 側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化pdCpA_(化合物1i)_とtRNA_(CA欠損)_(配列番号：R_1)_のligationによるアミノアシル化tRNA_(化合物AT—1)_の合成

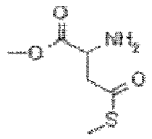
50μM 転写tRNAEnAsnGAG (-CA) （配列番号R—1） 10从Lに、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP) 2μL、Nuclease free water 4从1を加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールデイングを行った。20u门；t／从しの丁4 RNAリガーゼ（New England Biolab. 社）2从Lおよび、5mMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化pd

ＣｐＡ（化合物１ｉ）のＤＭＳＯ溶液　２μＬを加え、１５℃で４５分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液　２０从1に、３Ｍ酢酸ナトリウム　４从1と１２５ｍＭ　ヨウ素（水：ＴＨＦ＝１：１溶液）２４μＬを加え、室温で１時間、脱保護を行った。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ―１）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ＿１）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウムに溶解した。

[0352] 化合物ＡＴ―１－ＩＡ

Asp（SMe）－ t RNAEnAsnGAG

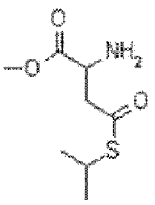
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgag
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA



[0353] 化合物ＡＴ―１－ＩＢ

Asp（SiPr）－ t RNAEnAsnGAG

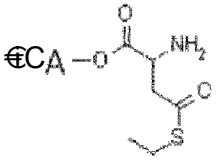
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgag
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA



[0354] 化合物ＡＴ―１－ＩＧ

Asp（SEt）－ t RNAEnAsnGAG

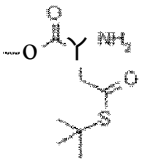
G6CUCUGUAGUUCAGUCG6UAGAAC €CiC6GACUgag
AAUCC6UAUGUCACUG6UUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC- €CA



[0355] 化合物ＡＴ―１－ＩＣ

Asp（St Bu）－ t RNAEnAsnGAG

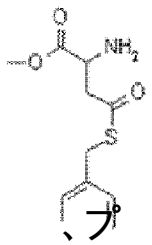
GGCUCUGUAGUUCAGUCGCJUAGAACGGCGGACUgag
AAUCCGUAUGUCACUG3UJCGAGUCCAGUCAGAGCC6 C-dCA



[0356] 化合物ＡＴ―１－ＩＤ

Asp(SBn) - tRNAEnAsnGAG

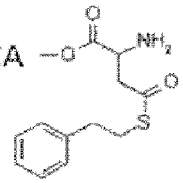
GGC画 G嗎 UUCAGUCG驅 GAACGGCGG腳 gag
AAUCCC3UAUGUCACUGSUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-clCA



[0357] 化合物AT_1-IE (配列番号:31)

Asp(SPhenety L) - tRNAEnAsnGAG

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgag
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA



[0358] 化合物AT—1-IIA

GLu(SMe) - tRNAEnAsnGAG

[0359] 化合物AT—1-IID

GLu(SBn) - tRNAEnAsnGAG

[0360] [実施例4] 側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノ酸を用いた翻訳合成

様々なアミノ酸によりアミノアシル化されたtRNAを、無細胞翻訳系に加えて翻訳を開始することにより、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、鋳型DNAからの転写系を含む原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。具体的には、転写翻訳液(5%(v/v) T7 RNA polymerase RiboMAX Enzyme Mix (Promega 社, P1300), 2mM GTP, 2mM ATP, 1mM CTP, 1mM UTP, 20mMクレアチンリン酸, 50mM HEPES—KOH pH7.6, 100mM グルタミン酸カリウム, 12mM 酢酸マグネシウム, 2mMスペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, 1.5mg/ml E.coli MRE600 (RNaseネガティブ)由来tRNA (ロシュ社), 4从9/m1 クレアチンキナーゼ, 3μg/ml ミオキナーゼ, 2unitZml 無機ピロフォスファターゼ,

1．1μg/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，0．6μM メチオニルtRNAトランスフオルミラーゼ，0．26μM EF-G，0．25μM RF1，0．24μM RF2，0．17μM RF3，0．5μM RRF，2．7μM IF1，0．4μM IF2，1．5μM IF3，40μM EF-Tu，84μM EF-Ts，1．2μM リボソーム，0．73μM AlaRS，0．03μM ArgRS，o．38μM AsnRS，o．13μM AspRS，0．02μM CysRS，0．06μM GlnRS，0．23μM GluRS，0．09μM GlyRS，0．02μM HisRS，0．4μM IleRs，0．04μM leuRs，0．11μM LysRS，0．03μM MetRS，0．68μM PheRS，0．16μM ProRS，0．04μM SerRS，0．09μM ThrRS，0．03μM TrpRS，0．02μM TyrRS，0．02μM ValRS（自家調製タンパクは基本的はHisタグ付加タンパクとして調製した））に、0．02μM 鋳型DNA、それぞれの鋳型DNAにコードされているタンパク質性アミノ酸群をそれぞれ300μMずつ、ならびに50μMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化tRNA（化合物AT-1）を翻訳反応混合物に添加し、37℃で30分から1時間静置することで行つた。

[0361] 翻訳産物はマトリックスとしてα_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸を用いてMALDI—MSスペクトルを測定して同定した。

[0362] 1．チオエステル化されたグルタミン酸誘導体を含むペプチド_(化合物P_1）の翻訳合成

20nM 鋳型DNA Mtyg_R（配列番号D_2）に、0．3mM GLy，0．3mM Met，0．3mM Arg，0．3mM Thr，0．3mM Tyr および、50μM GLu(SBn)-tRNAEnAsnGAG （化合物AT—1-IID）を含む前述の転写翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳反応物を、SPE C-TIP（日京テクノス社）で精製し、MALDI—MSで分析した。しかしながら、図2に示すように分子量799から2000の範囲に翻訳ペプチドに由来

するマススペクトルのピークをMALDI—MSにて確認することが出来なかった。例えば、分子量882、918、1256付近に検出されたピークは、陰性対照として鋳型DNAを加えないPURESystem を分析したときにも観測されるピークであることから、翻訳ペプチド由来のピークではない。

[0363] 配列番号 D_2 (配列番号 :2)

Mtyg—R DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgACTACAACGCGActttacta

ccgtcgtggcggcTAATAAATAGATAG

[0364] ペプチド配列P_1

MetThrThrThrArg[G Lu(SBn)]TyrTyrArgArgG LyG Ly

[0365] MALDI-MS :

Not detected (ca Lc. 1595. 7)

[0366] 2. チオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチドの翻訳合成

2_1. As_D(SMe) を含むモデルペプチドの翻訳合成

20nM 鋳型DNA Mtryg3 (配列番号D_3)、Leuを除く各0.3mMの19種類のタンパク質性アミノ酸、50μM Asp(SMe)-tRNAEnAsnGAG (化合物AT—1-IA)を加えた転写翻訳液を、37℃で60分間保温した。SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、MALDI—MSで分析した。その結果、チオエステルを含む全長ペプチドから、脱MeSHされた分子量を示すマススペクトル (MS)が主生成物として観測された (図3)。

[0367] 配列番号D_3 (配列番号 :3)

Mt ryg3 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgACTACAACGCGActttacta

ccgtggcggcTAGTAGATAGATAG

[0368] ペプチド配列P_2

MetThrThrThrArg[Asp(SMe)]TyrTyrArgG LyG Ly

[0369] MALDI-MS :

m/z : [H+M]+ = 1302. 5 (チオエステル含む全長ペプチドCa Lに 1349. 6, 脱M

ｅＳＨペプチドCa Lに 1301．6) (観測された分子量１３０２の化合物をペプチドP—3とする)

[0370] 2-2．最も反応性の高いＴｖｒを含まず、チオエステルを含むペプチド(化合物Ｐ—５)の翻訳

２０ｎＭ 錶型ＤＮＡ Ft02A _dR (配列番号Ｄ_４) に、前述の転写翻訳液に、Ｌｅｕを除く各０．３ｍＭの１９種類のタンパク質性アミノ酸，および前記の方法で調製した５０μＭ 化合物AT-1 -ID(Asp(SBn)-tRNAEnAsnGAG)を加え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、チオエステルアミノ酸を含む全長ペプチドP—5が生成した後に、脱ＢｎＳＨ化されたＭＳスペクトルが同様に主生成物として確認された (ペプチドP—６)。このことから脱ＢｎＳＨ化される反応点としてはフエノール性水酸基では無いことが確認された (図５)。

[0371] Ｆｔ０２Ａ__ｄＲ ＤＮＡ配列 (配列番号Ｄ_４) (配列番号 :4)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAgaaggagatatacatATGACTACAACGgcgggcggcCT

Ttttt ttggcggcAAATAATAA

[0372] ペプチド配列 Ｐ_５

MetThrThrThrALaG LyG Ly[Asp(SBn)]PhePheG LyG LyLys

[0373] MALDI-MS： m/z： [H+M] + = 1271．8 (ペプチドP- 5が脱BnSH化されたペプチドP- 6 Ca Lc. 1270. 6)

[0374] 2-3．翻訳ペプチドＰ_６の構造推定のための加水分解実験

前述の翻訳反応物Ｐ—６を、３３３ｍＭ Bicine KOH pH9. 0中で、９５℃で１５分間加水分解を行い、SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析した。その結果、脱BnＳＨペプチドP—6が加水分解され18分子量の増加が確認された (ペプチド化合物Ｐ_４)。想定されるチオエステル部位の縮合反応はアミノ基とのアミド形成反応ではなく、比較的加水分解され易い０Ｈ基やＳＨ基とのエステル化反応ゃチオエステル化反応などであると示唆された (図４)。

ペプチド化合物P_4

MALDI-MS：

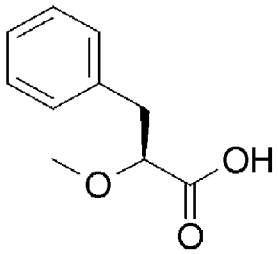
m/z：[H+M]+=1289.6（P-6の加水分解体Ca Lc. 1288.7）

[0375] 2-4．N末端アミノ基を持たないMeOF Lac（化合物7a）_で翻訳開始させたチオエステル含有《プチドの翻訳合成

N末端にアミノ基を持たないペプチドの翻訳合成を行い、以下のように解析した。

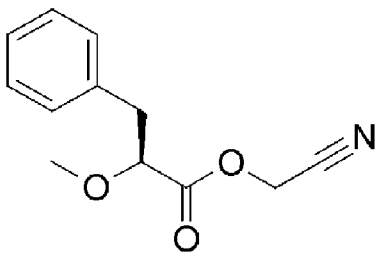
[0376] 2-4-1．MeOF Lac-pdCpAの合成

2-4-1-1．（S）_2—メトキシ—3_フエニルプロパン酸の合成（化合物7a、MeOF Lac）



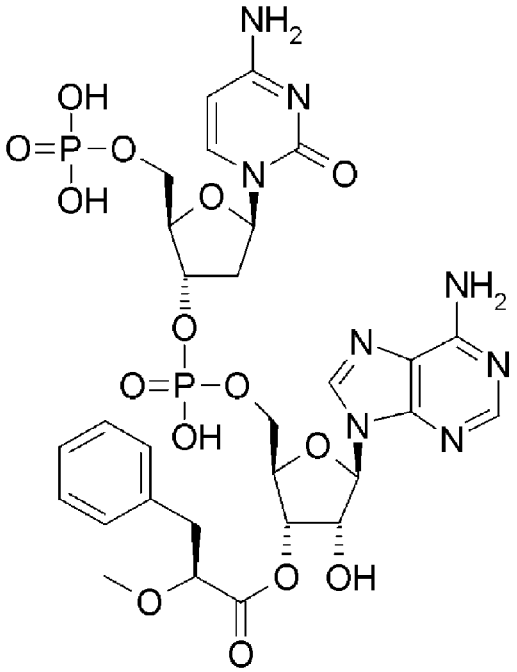
[0377] （S）—2—ヒドロキシー3—フエニルプロパン酸（1.0g、6.02mmol）をTHF（100ml）に溶解し、水素化ナトリウム（0.48g、12.00mmol）およびヨウ化メチル（1.71g、12.04mmol）を加えて65度で一時間攪拌した。放冷後、反応液を減圧濃縮し、6Mの塩酸水溶液を加えてpH4とした。この水層を酢酸エチルで抽出し、この有機層を濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ジクロロメタン：メタノール=10：1）で精製し、標題化合物（0.71g、59%）を得た。

[0378] 2-4-1-2．2—メトキシー3—フエニルプロパン酸（S）_—シアノメチル（化合物7b）の合成



[0379] （Ｓ）＿２―メトキシ―3＿フエニルプロパン酸 (化合物７ａ、０．５０ｇ、２．５０ｍｍｏｌ）および２―プロモアセトニトリル (1．２０ｇ、１０．ＯＯｍｍｏｌ）をアセトニトリル (６０ｍｌ）に溶解させ、氷冷下、トリエチルアミン (0．５０ｇ、４．９９ｍｍｏｌ）を滴下して加えた。室温で４０分攪拌した後、反応液を減圧濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ（石油エーテル :酢酸エチル= ２０ :1）で精製し、標題化合物 (0．３９ｇ、６５％）を得た。

[0380] ２―メトキシー3―フエニルプロパン酸＿(2Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ＿２―オキソピリミジンー1＿(２Ｈ）＿イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノー9Ｈ―プリンー9―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフランー3―イル (化さ物７ｃ）のさ成



[0381] イミダゾール (3．４０ｇ、５０．ＯＯｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン＿１＿アミニゥム 塩化物 (3．２０ｇ、１０．００ｍｍｏｌ）を溶かした水溶液 (３０ｍｌ）にリン酸二水素 （(2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-５-（４―アミノー2＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）

- 3 - (((((2 R , 3 S , 4 R , 5 R) - 5 - (6 — アミノ _ 9 H — プリン ー 9 — イル) − 3 , 4 — ジヒドロキシテトラヒドロフラン ー 2 — イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) テトラヒドロフラン _ 2 _ イル) メチル (化合物 1 h 、 0 . 3 2 g 、 0 . 5 0 m m o l) および 2 — メトキシ — 3 _ フエニルプロパン酸 (S) _ シアノメチル (化合物 7 b 、 0 . 4 4 g 、 2 . 0 1 m m o l) を加えて室温で 3 0 分攪拌した。反応液に TFA (1 . O m l) を加えて濃縮し、得られた残渣を preparat ive— HPLC (0 . 0 5 % TAF 水溶液 : アセトニトリル = 8 4 : 1 6 ~ 6 0 : 4 0) で精製し、標題化合物 (6 6 m g 、 1 6 %) を得た。

[0382] LCMS : m / z 7 9 9 (M + H) +

保持時間 : 0 . 6 0 9 分 (分析条件 SMDmethod 1)

[0383] 2 - 4 - 2 . 転写による tRNA _ (CA 欠損) _ の合成

錯型 DNA (配列番号 D — 5) から、RiboMAX Large Scale RNA product ion System T7 (Promega 社 , P 1 3 0 0) を用いた in vitro の転写により 3' 端の CA を欠く tRNAfMetCAU(-CA) (配列番号 R _ 5) を合成し、RNeasy Mini kit (Qiagen 社) により精製した。

[0384] 配列番号 D _ 5 (配列番号 : 5) :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGCTCATAACCCGAAGAT CGTCGGTTCAAATCCGGCCCCCGCAAC

[0385] 配列番号 R — 5 (配列番号 : 3 2) :

GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAUAACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCC CGCAAC

[0386] 2 - 4 - 3 . N 末端アミノ基を含まないアシル化 pdCpA _ (化合物 7 c) _ と tRNA _ (CA 欠損) _ (配列番号 : R — 5) _ の ligation によるアシル化 tRNA (化合物 AT — 2) _ の合成

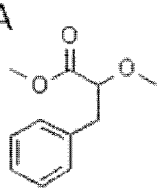
5 0 μM 転写 tRNAfMetCAU(-CA) (配列番号 R — 5) 1 0 从 L に、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP) 2 トし、Nuclease free water 4 从 L を加え、9 5 ℃で 2 分間加熱した後、室

温で5分間放置し、ｔＲＮＡのリフォールディングを行った。１０ｕηｉｔ／μＬのT4 RNAリガーゼ（New England Bio Lab. 社）2从1および、５ｍＭのＮ末端アミノ基を含まないアシル化ｐｄＣｐＡ（化合物７ｃ）のＤＭＳＯ溶液　2从1を加え、１５℃で４５分間ライゲーション反応を行った。アシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—２）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—２）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリゥムに溶解した。

化合物ＡＴ—２

MeOF Lac- tRNAfMetCAU （配列番号：３３）

GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAUAA
CCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA



[0387] ２０ηＭ 錶型ＤＮＡ Mtyg_R （配列番号Ｄ＿２）に、前述の転写翻訳液、アミノ酸０．３ｍＭ GLy, ０．３ｍＭ Arg, ０．３ｍＭ Thr, ０．３ｍＭ Tyr, および前記の方法で調製した５０μＭ Asp(SBn)-tRNAEnAsnGAG （化合物ＡＴ—１-ＩＤ），５０μＭ MeOF Lac-tRNAfMetCAU （化合物ＡＴ—２）を加え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP （日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、チオエステルを含む全長ペプチドP—７から、脱ＢｎＳＨ化されたペプチドに相当するＭＳが主生成物として観測された（翻訳ペプチド　Ｐ＿８）。MeOF Lacを翻訳開始に用いてＮ末端にアミンを持たないペプチドを翻訳したにも関わらず、分子量の減少が見られたため、Ｎ末端アミンとの反応も否定された（図６）。

[0388] ペプチド配列　Ｐ＿７

[MeOF Lac]ThrThrThrArg[Asp(SBn)]TyrTyrArgArgG LyG Ly

MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1489. 6（ペプチド配列P-7から脱BnSH化されたペプチドP＿８ Ca Lc. 1488. 6）

[0389] ２-５．側鎖がチオエステル化されたアミノ酸に続くＣ末端側アミノ酸にＮ

—アルキル化されたアミノ酸を導入させたモデルペプチドの翻訳合成

２０ｎＭ 鋳型ＤＮＡ KA03（配列番号 Ｄ＿６）に、前述の転写翻訳液、０．１ｍＭ 10-HCO-H4fo Late（10-formy L-5, 6, 7, 8, -tet rahydroph i Lic acid、特開２００３-１０２４９５参照）、Leuを除く各０．３ｍＭの１９種類のタンパク質性アミノ酸，および前記の方法で調製した５０μM Asp(SMe)-tRNAEnAsnGAG（化合物ＡＴ—１-ＩＡ）を加え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP（日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ＿ＭＳで分析したところ、チオエステルを含む全長ペプチドのＭＳが主生成物として観測され、脱ＭｅＳＨ化されたピークは認められなくなった。

以上の結果により、アスパラギン酸型のチオエステル残基は、直後のアミド結合に水素原子が存在する場合、これと反応してアスパルチミドを形成したことが明らかとなった（翻訳ペプチドＰ—３、Ｐ＿６、Ｐ＿８ではいずれもチオエステルのＣ末端側となりのアミド結合の水素原子と反応してアスパルチミドを形成していた）。一方で、直後のアミノ酸残基をＮ—アルキルのアミノ酸にすることによって望みのチオエステルを含む全長ペプチドの翻訳に成功した（図７）。

[0390] 配列番号 Ｄ＿６（配列番号：６）

KA03 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgACTAGAACTaaggcgTACTG

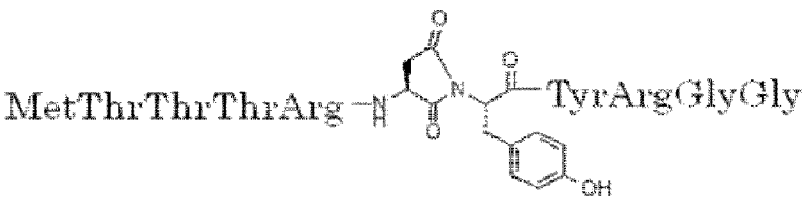
GAGCcttCCGggcggctaa

[0391] ペプチド配列 Ｐ＿９

MetThrArgThrLysALaTyrTrpSer[Asp(SMe)]ProG LyG Ly

MALDI-MS： m/z：[H+M]+ = 1527. 7（翻訳ペプチドＰ＿９ Ca Lc. 1526. 7,）

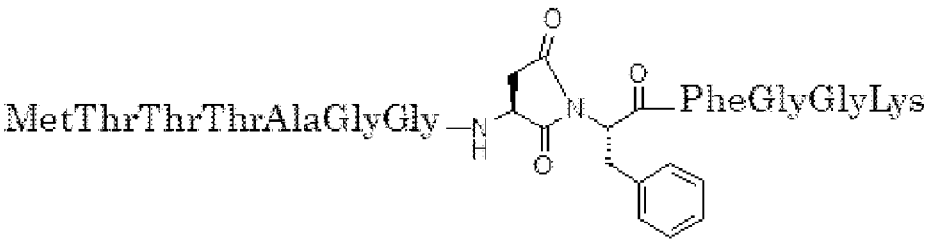
[0392] 翻訳ペプチドＰ＿３の化学構造（配列番号：３４）



MALDI-MS：

m/z： [H+M] + = 1302. 5 (チオエステル含む全長ペプチドCa Lc. 1348. 6, 脱MeSHペプチドCa Lに 1301 . 6) (観測された分子量1302の化合物をペプチドP _ 3 とする)

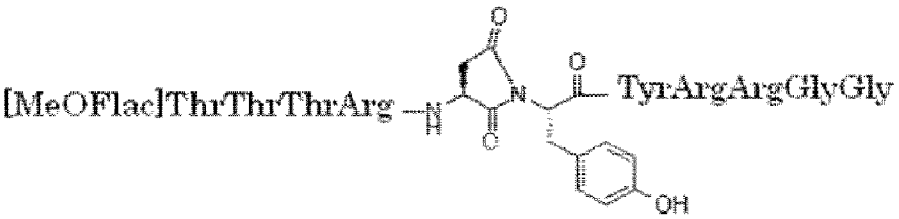
[0393] 翻訳ペプチドP _ 6 の化学構造 (配列番号 :3 5)



チオエステルアミノ酸を含む全長ペプチドP — 5 が生成した後に、脱 B n S H 化されたペプチド

MALDI-MS： m/z： [H+M] + = 1271 . 8 (ペプチドP _ 5 が脱 B n S H 化されたペプチド Ca Lc. 1270. 6)

[0394] 翻訳ペプチドP_ 8 の化学構造



MALDI-MS :m/z： [H+M] + = 1489. 6 (ペプチド配列P _ 7 から脱 B n S H 化されたペプチドCa Lに 1488. 6)

[0395] また、錶型 D N A としてK A O 1 チオエステルアミノ酸のC 末端側をN M e —フエニルァラニンとしても、同様にチオエステルアミノ酸を含む全長ペプチド (Met-Thr-Arg-Thr-Lys-ALa-Tyr-Trp-Ser-Asp(SBn)-MePhe-G Ly-G Ly) がM S スペクトルで確認された。

MALDI-MS :m/z： [H+M] + = 1 6 3 9 . 7 (Ca Lc. 1 6 3 8 . 7)

[0396] [実施例 5] チオエステルと反応させるアミノ基側ユニットを選択するための実験

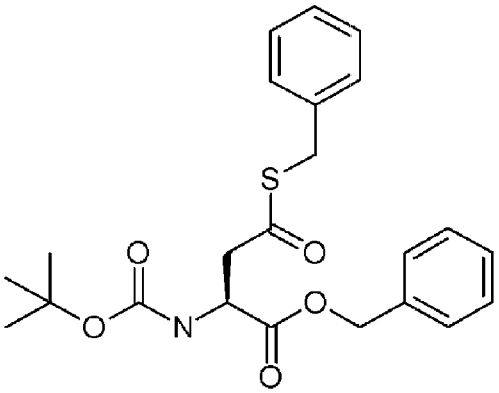
チオエステルの翻訳合成が可能となったため、これとアミド結合縮合させるァミノ基側のユニットとして良好な要件を特定するための実験を以下のよ

うな手順で行った。

[0397] 1．チオエステル部位を有するモデル化合物の合成

図8に記載の方法に従って、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸のチオエステルを有するペプチドモデルとして化合物5b-1および5b_2を合成した。

1—1．4-(ベンジルチオ)_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_4_オキソブタン酸(S)—ベンジル(化合物5b_1)の合成

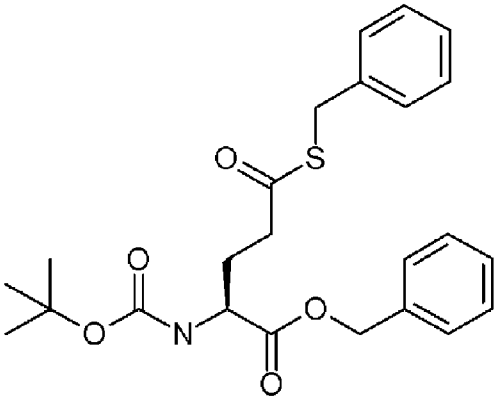


[0398] (S)-4-(ベンジルオキシ)_3_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_4_オキソブタン酸(化合物5a—1)(1．OOg、3．09mmol)のジクロロメタン(15ml)溶液にN，N'—ジイソプロピルカルボジイミド(1．06mし 6．80mmol)、N，N_ジメチルアミノピリジン(94．4mg、0．773mmol)、ベンジルメルカブタン(0．380mし 3．24mmol)を加え、室温で終夜攪拌した。その後、反応液に水を加え、酢酸エチルで希釈後、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=100/0→65/35)にて精製し、4—(ベンジルチオ)—2—((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_4_オキソブタン酸(S)—ベンジル(化合物5b_1)(478mg、36%)を得た。尚、化合物5a_1は一般に入手可能である。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４３０ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 ：１．１０分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0399] １－２．５－（ベンジルチオ）＿２＿（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）ァミノ）＿５—オキソペンタン酸 （Ｓ）—ベンジル (化合物５ｂ－２）の合成



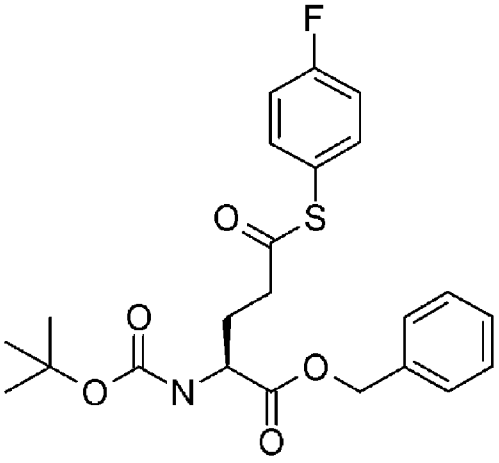
[0400] （Ｓ）－５－（ベンジルオキシ）＿４＿（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）ァミノ）＿５＿オキソペンタン酸 (化合物５ａ—２）（１．００ｇ、２．９６ｍｍｏｌ）のジクロロメタン （１４．８ｍｌ）溶液にＮ，Ｎ'—ジィソプロピルカルボジィミド (１．０２ｍし ６．５１ｍｍｏｌ）とＮ，Ｎ—ジメチルァミノピリジン (９０．４ｍｇ、０．７４０ｍｍｏｌ）、ベンジルメルカブタン (０．３６５ｍし ３．１１ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜攪拌した。その後、反応液に水を加え、酢酸エチルで希釈後、有機層を飽和塩化アンモニゥム水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００／０→６５／３５）にて精製し、５—（ベンジルチオ）－２—（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）ァミノ）＿５＿オキソペンタン酸 （Ｓ）—ベンジル (化合物５ｂ－２）（１．１８ｇ、９０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４４４ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 ：１．１１分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0401] １－３．２—丄ｕｅｒｔ－プトキシカルボニル）ァミノ）－５—（（４

—フルオロフェニル）チオ）_５_オキソペンタン酸___(S)_—ベンジル（化合物５ｅ—２）_の合成

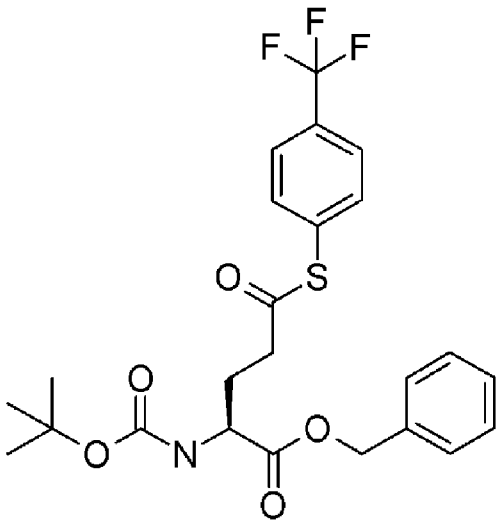


[0402] （Ｓ）-５-（ベンジルオキシ）_４_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_オキソペンタン酸（化合物５ａ_２）（５００ｍｇ、１．４８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（5ｍｌ）溶液にＮ，N'—ジイソプロピルカルボジイミド（0．５１０ｍし３．２６ｍｍｏｌ）とＮ，Ｎ_ジメチルアミノピリジン（４５．２ｍｇ、０．３７０ｍｍｏｌ）、４_フルオロベンゼンチオール（0．１６４ｍし１．５５ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜攪拌した。その後、反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→２０/ ８０）にて精製し、２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（（４—フルオロフェニル）チオ）_５_オキソペンタン酸　(S)—ベンジル（化合物５ｅ_２）（５４０ｍｇ、８２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　４４８　(Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：１．０９分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0403] １-４．２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５—オキソ—５-（（４—（トリフルオロメチル）フエニル）チオ）ペンタン酸___(S)_—ベンジル（化合物５ｆ_２）の合成



[0404] （Ｓ）－５－（ベンジルオキシ）＿４＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸（化合物５ａ＿２）（５００ｍｇ、１．４８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（５ｍｌ）溶液にＮ，Ｎ'＿ジィソプロピルカルポジィミド（０．５１０ｍし３．２６ｍｍｏｌ）とＮ，Ｎ＿ジメチルァミノピリジン（４５．２ｍｇ、０．３７０ｍｍｏｌ）、４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（０．２１１ｍし１．５５ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜攪拌した。その後、反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール＝７０/３０→２０/８０）にて精製し、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿オキソ＿５＿（（４－（トリフルオロメチル）フエニル）チオ）ペンタン酸（Ｓ）―ベンジル（化合物５ｆ＿２）（３７３ｍｇ、５１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝４９８ （Ｍ＋Ｈ）＋

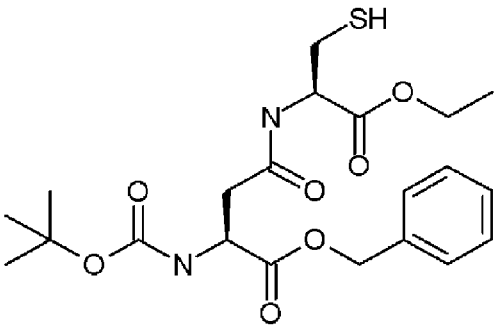
保持時間：１．１２分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0405] ２．チオエステルを含むモデル化合物とアミノ基側ユニットとの反応検討による良好な反応性を有するアミノ基側ユニットの選択

図８に示すように、チオエステルモデル化合物５ｂまたは５ｅ、５ｆと、システィンあるいはグリシン誘導体モデル化合物とを反応させることで、チオエステルと容易にアミド結合を生成する基質を選択した。

２－１．２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿４＿（（（

R）＿１―エトキシ－３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿４＿オキソブタン酸＿＿（Ｓ）―ベンジル（化合物５ｃ＿１）の合成

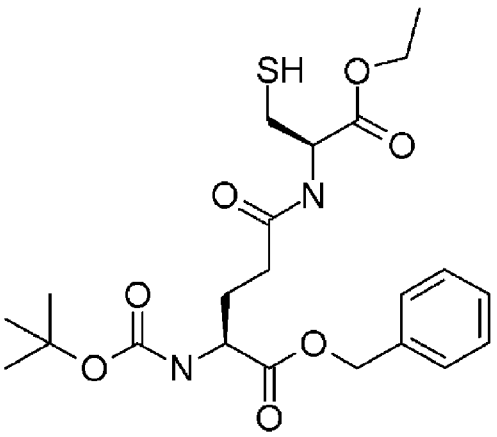


[0406] ４－（ベンジルチオ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿４＿オキソブタン酸（Ｓ）―ベンジル（化合物５ｂ＿１）（２０１．５ｍｇ、０．４６９ｍｍｏｌ）と２＿アミノ－３―メルカプトプロパン酸（Ｒ）―エチル塩酸塩（１０４．５ｍｇ、０．５６３ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１．２ｍｌ）と水（０．３ｍｌ）溶液に、ＤＩＰＥＡ（０．０９８ｍし０．５６３ｍｍｏｌ）を加え５０度で３時間攪拌した。その後、反応液に水を加えた後に、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール＝８０/２０→０/１００）にて精製し、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－４＿（（（Ｒ）＿１―エトキシ－３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿４―オキソプタン酸（Ｓ）―ベンジル（化合物５ｃ＿１）（１３３ｍｇ、６７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝４５５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９８分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0407] ２－２．２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿（（（Ｒ）＿１―エトキシ－３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸＿＿（Ｓ）―ベンジル（化合物５ｃ―２）の合成



[0408] 5-（ベンジルチオ）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5b—2)（208.2mg、0.469mmol）と2—アミノー3—メルカプトプロパン酸 (R)—エチル塩酸塩 (104.5mg、0.563mmol）のDMF（1.2ml）と水 (0.3ml）溶液に、DIPEA（0.098mし 0.563mmol）を加え50度で3時間攪拌した。その後、後処理として反応液に0.4M トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (TCEP）水溶液 (3.27ml）、DMF（3.27ml）を加えた後に、室温で1時間攪拌した。その後、反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10mM酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール=70/ 30→20/ 80）にて精製し、2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_4_（（（R）_1—エトキシー3_メルカプトー1—オキソプロパンー2—イル）アミノ）_4_オキソブタン酸 (S)—ベンジル (化合物5c—2）（192.4mg、88%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 469 (M+H)+

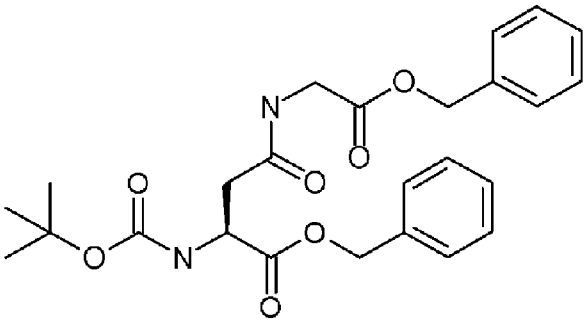
保持時間 :0.99分 (分析条件SQDAAO5)

[0409] 尚、0.4M トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (TCEP）水溶液の調整は以下のように行った。

トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (TCEP）塩酸塩 (1.0g、3.49mmol)の水 (6.8ml）溶液に トリエチルアミン (1.64ml）加え、pH7とし、0.4M トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン（

ＴＣＥＰ）水溶液を得た。

[0410] 2-3. 4-((2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエチル)アミノ)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-4-オキソブタン酸(S)-ベンジル(化合物5d-1)の合成



[0411] 4-(ベンジルチオ)_2_((ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)_4_オキソブタン酸(S)―ベンジル(化合物5b_1)(30.0mg、0.0698mmol)と2-アミノ酢酸ベンジル塩酸塩(16.8mg、0.0834mmol)のＤＭＦ(0.18ml)と水(0.045ml)溶液に、ＤＩＰＥＡ(0.0145mし0.0834mmol)を加え５０度で攪拌した。反応の経時変化はＬＣＭＳを用いて観測した。3日間攪拌後、目的の化合物５d-１が観測されたが、化合物５d-１のベンジルエステルが１つ加水分解した化合物５d-１bもまた観測され、原料である化合物５b_１の多く残る結果となった。その割合は、化合物５b_１:化合物５d_１:化合物５d_１のベンジルエステルが１つ加水分解した化合物５d_１b=２２:１:８(ＬＣＭＳのUVエリア比より)であつた。

化合物５d_１

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/z = ４７２ (M+H)+

保持時間:0.９９分(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

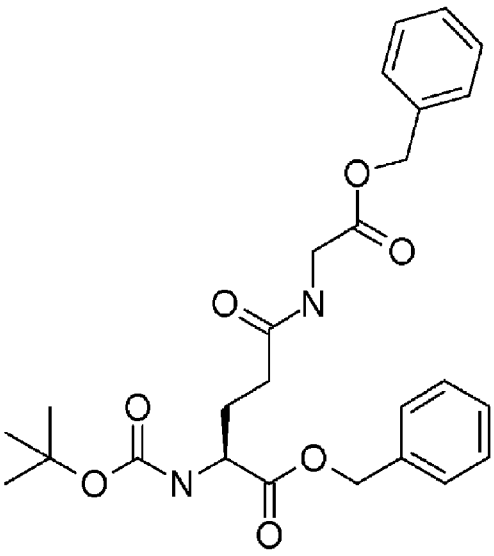
化合物５d_１b

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/z = ３８０ (M+H)+

保持時間:0.９０分(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0412] 2-4. 5-((2-(ベンジルオキシ)_２―オキソエチル)アミノ)―2-((tert―ブトキシカルボニル)アミノ)_５_オキソペンタン量

（Ｓ）－ベンジル（化合物５ｄ－２）の合成



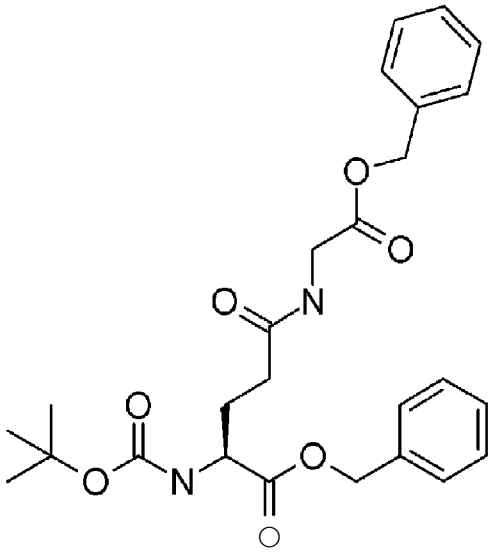
[0413] ５－（ベンジルチオ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－５－オキソペンタン酸（Ｓ）－ベンジル（化合物５ｂ－２）（３１．８ｍｇ、０．０７１７ｍｍｏｌ）と２－アミノ酢酸ベンジル塩酸塩（１７．３ｍｇ、０．０８６０ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（０．１９ｍｌ）と水（０．０４８ｍｌ）溶液に、ＤＩＰＥＡ（０．０１５０ｍｌ、０．０８６０ｍｍｏｌ）を加え５０度で攪拌した。反応の経時変化はＬＣＭＳを用いて観測した。３日間攪拌後、目的の化合物５ｄ－２が観測されたが、原料である化合物５ｂ－２が多く残る結果となった。その割合は、化合物５ｂ－２：化合物５ｄ－２＝２２：１０（ＬＣＭＳのＵＶエリア比より）であった。

化合物５ｄ－２

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝４８５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０１分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0414] ２－５．５－（（２－（ベンジルオキシ）－２－オキソエチル）アミノ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－５－オキソペンタン酸－（Ｓ）－ベンジル（化合物５ｄ－２）の合成

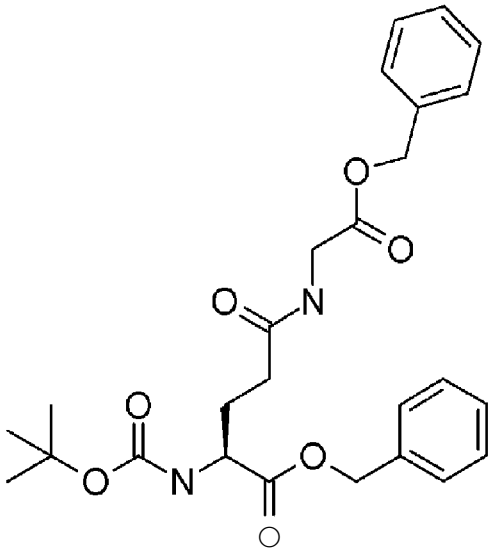


[041 5] 2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((4_フルオロフェニル)チオ)_5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5e-2)(30.Omg、0.0670mmol)のDMF(0.463ml)と水 (0.220ml)溶液に、2—アミノ酢酸ベンジル塩酸塩 (17.6mg、0.0871mmol)とDIPEA(0.0152mし 0.0871mmol)のDMF溶液 (0.0871ml)を加え50度で6時間攪拌した。その後、反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(10mM酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール= 70/ 30→20/ 80)にて精製し、5_((2—(ベンジルオキシ)_2—オキソエチル)アミノ)_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5—オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5d_2)(29.4mg、91%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 485 (M+H)+

保持時間:2.80分 (分析条件ZQAA05)

[041 6] 2-6.5-((2-(ベンジルオキシ)_2—オキソエチル)アミノ)—2-((tert_ブトキシカルボニル)アミノ)_5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5d_2)の合成



[0417] 2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((4—トリフルオロフエニル)チオ)_5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5f—2) (30.Omg、0.0603mmol)のDMF (0.541ml)と水 (0.200ml)溶液に、2—アミノ酢酸ベンジル塩酸塩 (15.8mg、0.0784mmol)とDIPEA (0.0136ml、0.0784mmol)のDMF溶液 (0.0784ml)を加え50度で45分間攪拌した。その後、反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール=70/30→20/80)にて精製し、5—((2—(ベンジルオキシ)—2—オキソエチル)アミノ)_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5—オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物5d_2) (26.4mg、90%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 485 (M+H)+

保持時間:2.80分 (分析条件ZQAA05)

[0418] 以上のように、チオエステルとの反応性は反応補助基のあるアミンのモデル化合物であるCys誘導体と反応補助基のないアミンのモデルであるGI$_y$誘導体の間では大きな差があった。反応補助基のあるCys誘導体はRNAが安定な条件で十分高い環化反応性を有することが明らかとなった。また、反応補助基のあるアミンは反応補助基のないアミンに対して十分な選択性

を持つため、翻訳後の環化にて複数の反応点の中から反応補助基のあるアミンとの選択的な反応が可能であると判断できる。また、チオエステルの反応性はチオアリールの場合とチオアルキルもしくはチオアラルキルの場合を比較すると、チオアリールエステルの場合で高く、この場合には反応補助基のないアミノ基とも良好な反応性を有することが明らかとなつた。

[041 9] 3．チオエステルと反応補助基のないァミンとの反応で高い反応性を示す条件として知られるイミダゾール添加条件での化学反応

Yangmeiらの文南犬 (Journa l of combinator ial chem ist ry2009, 11, 1066-1072) に従い、ァセトニトリル＿1．5Mイミダゾール水溶液 (7 ：1）の条件下で反応を行った (図9）。

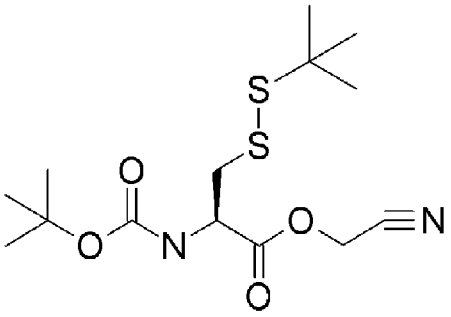
液性はpH6．4、pH7．4の2条件で、反応温度を37度、70度、100度と3条件行った。最も反応転化率が良好な反応条件 (pH7．4、100度）では、望みのアミド化反応の進行が46LC area%程度確認された。

[0420] [実施例6] SH基にて活性化されたアミノ酸及び、そのアミノアシル化pdCpAの合成

チオエステル部位と翻訳後環化させるN末端に使用するアミノ酸として、CysおよびMeCysなどのSH基にて活性化されたアミノ酸の合成及びそれらを用いたアミノアシル化pdCpAの合成を、図10に示す手法に従つて以下のように行った。

[0421] 1．2n＿Aの合成

1—1．2-（（tert—プトキシカルボニル）ァミノ）＿3＿（tert—プチルジスルファニル）プロパン酸 (R)—シァノメチル (化合物2l-A）の合成

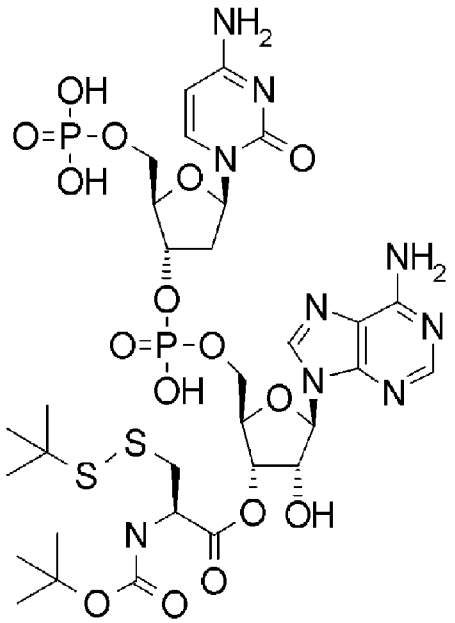


[0422] （R）－2－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）―3―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｋ―A）（７００ｍｇ、２．２６ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（５ｍｌ）溶液に2―ブロモアセトニトリル（０．４７３ｍし ６．７８ｍｍｏｌ）とN―エチル－N―イソプロピルプロパン―2―アミン（0．４４４ｍし ２．４９ｍｍｏｌ）を加え、室温で１０分撹拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液（1ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→７０/ ３０）にて精製し、２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（R）―シアノメチル（化合物２Ｉ―A）（７４８ｍｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ３４７ （M－H）－

保持時間：1．００分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0423] 1－２． ２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（2R）－（２R．３S．４R．５R）－２－（（（（（２R．３S．５R）－５－（４―アミノ_２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―《ル（２ｍ_A）の合成



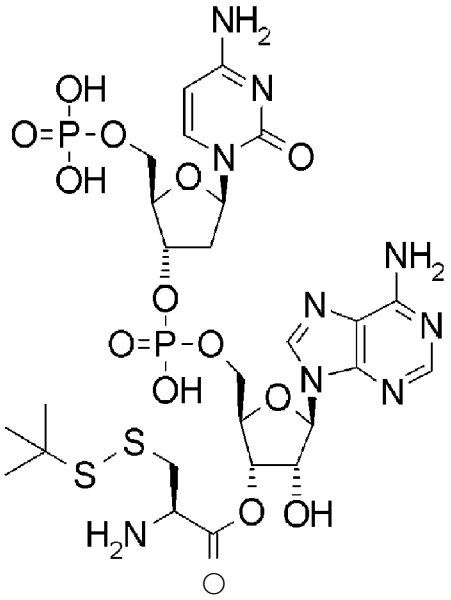
[0424] 緩衝液Ａ（１１３ｍｌ）にリン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿３＿（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン＿２＿イル）メチル（化合物１ｈ）（２００ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）の水溶液（６．２５ｍｌ）と２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパン酸　(Ｒ)―シアノメチル（化合物２１－Ａ）（４５４ｍｇ、１．２６ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３．１５ｍｌ）溶液を加え、室温で１時間攪拌した。その後、反応混合物を凍結乾燥させた。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液＝１００／０→６０/４０）にて精製し、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）―３―（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパン酸　(２Ｒ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ－プリン－９

ーィル）_４ーヒドロキシテトラヒドロフランー３ーィル (化合物２ｍ_Ａ)（１２９ｍｇ、４６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝９２８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５８分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0425] 1-3. 2ーアミノー3_(tert_ブチルジスルファニル)プロパン酸 (2R)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4ーアミノー2_オキソピリミジン_1(2H)ーィル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_ィル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6ーアミノ_9H―プリンー9ーイリル)ー4ーヒドロキシテトラヒドロフランー3ーイリル (2n-A)の合成



[0426] 2-((tertーブトキシカルボニル)アミノ)_3_(tertーブチルジスルファニル)プロパン酸 (2R)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4ーアミノ_2ーオキソピリミジン_1(2H)ーィル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_ィル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)ー5ー(6ーアミノー9H―プリンー9ーィル)ー4ーヒドロキシテトラヒドロフランー3ーィル (化合物２ｍ_Ａ)（４０ｍｇ、０．０４５ｍ

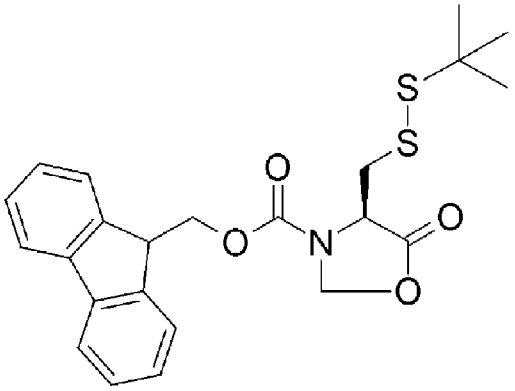
ｍｏｌ）にトリフルオロ酢酸（0．５ｍｌ）を加え、室温で１０分攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、２―アミノ_３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパン酸　(2Ｒ)-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）-５-（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物２ｎ―Ａ）（４５．１ｍｇ、１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝８２８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．３５分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0427] ２．　２ｎ_Ｂの合成

２-１．　４-（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）－５―オキソオキサゾリジン－３_カルボン酸　(R)-（９Ｈ―フルオレン－９―イル）メチル（化さ物２ｂ_Ｂ）のさ成



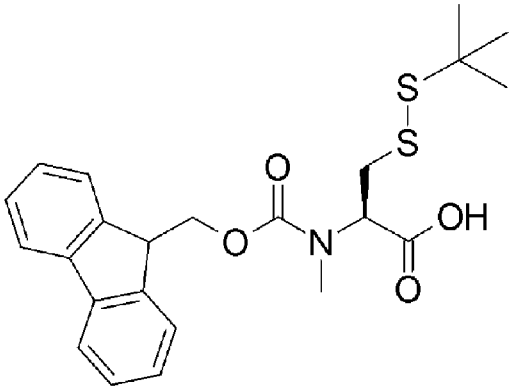
[0428] （Ｒ）-２-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ａ―Ｂ）（２．ＯＯｇ、４．６３ｍｍｏｌ）のトルエン（１０ｍｌ）溶液に、パラーフオルムアルデヒド（８４３ｍｇ、９．２６ｍｍｏｌ）と１０―ショウノウスルホン酸（７５ｍｇ、０．３２４ｍｍｏｌ）を加え、１００度で4時間攪拌した。反応混合物を室温に戻した後に、減圧濃縮させた。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル

＝１００／０→７０／３０）にて精製し、４＿（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）＿５＿オキソオキサゾリジン－３＿カルボン酸　(R)＿（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メチル（化合物２ｂ＿Ｂ）（１．９３６ｇ、９４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　４４４　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１６分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0429] ２－２．　(R)－２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）(メチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｃ＿Ｂ）の合成

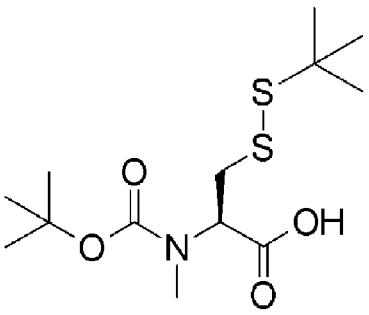


[0430] ４－（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）＿５＿オキソオキサゾリジン－３＿カルボン酸　(R)－（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メチル（化合物２ｂ－Ｂ）（１．６８ｇ、３．７８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（１８ｍｌ）溶液に、トリエチルシラン（６．０４ｍｌ、３７．８ｍｍｏｌ）とトリフルオロ酢酸（９ｍｌ）を加え室温で１日攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／メタノール＝７０／３０→２０／８０→０／１００）にて精製し、(R)－２－（（（（９Ｈ―フルオレン－９―イル）メトキシ）カルボニル）(メチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｃ＿Ｂ）（１．２２ｇ、７２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　４４６　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０２分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0431] ２－３．　（Ｒ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）＿(メチル）ァミノ）＿３＿＿（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸　(化合物２ｋ－Ｂ）の合成

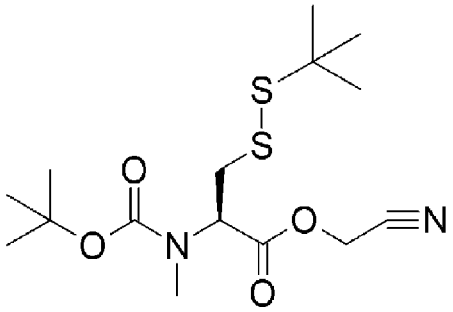


[0432] （Ｒ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）(メチル）ァミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸　(化合物２ｃ－Ｂ）（１．０６ｇ、２．３７ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（１１ｍｌ）溶液にピペリジン（0．５８６ｍし５．９３ｍｍｏｌ）を加え、室温で７０分攪拌した。その後、反応混合物に二炭酸ジ＿ｔｅｒｔ―プチル（4．１５ｇ、１９．Ｏｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（3．３Ｏｍし２３．７ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。その後反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→２０/ ８０→０/ １００）にて精製し、(Ｒ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）(メチル）ァミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸　(化合物２ｋ＿Ｂ）（５８６ｍｇ、７６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝３２２　（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８８分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0433] ２－４．　２－（（ｔｅｒｔ＿ブトキシカルボニル）＿(メチル）ァミノ）－３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸＿＿(Ｒ）＿―シァノメチル　(化合物２１－Ｂ）の合成

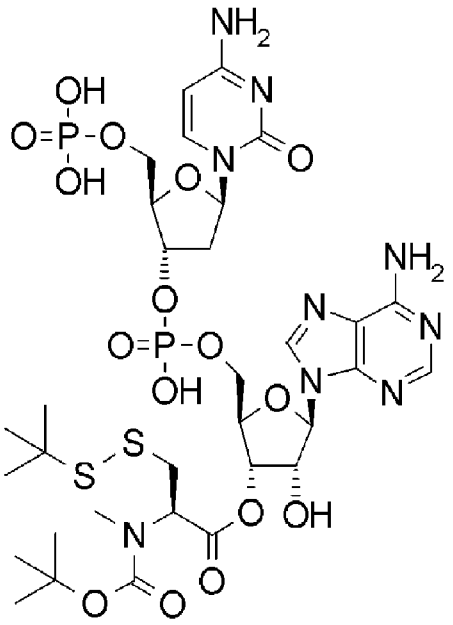


[0434] （Ｒ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２Ｋ―Ｂ）（３０９ｍｇ、０．９５５ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（２．５ｍｌ）溶液に２―ブロモアセトニトリル（０．２００ｍｌ、２．８７ｍｍｏｌ）とＮ―エチル－Ｎ―イソプロピルプロパン－２―アミン（０．１８３ｍｌ、１．０５ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液（３ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル＝１００/０→７０/３０）にて精製し、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ｒ）―シアノメチル（化合物２Ｉ－Ｂ）（２７２ｍｇ、７８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝３６３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0435] ２－５．　２－（（ｔｅｒｔ＿ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）プロパン酸（２Ｒ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１＿（２Ｈ）＿イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ―プリン＿９＿イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物２ｍ＿Ｂ）の合成



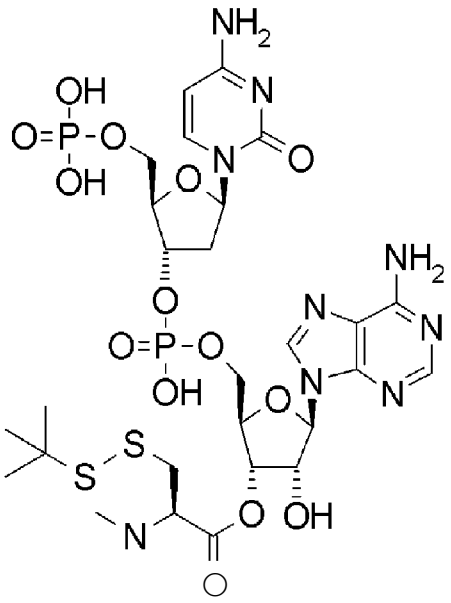
[0436] 化合物２ｍ＿Ａの製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-５-（６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン＿２＿イル）メチル (化合物１ｈ）（１１２ｍｇ、０．１７６ｍｍｏｌ）を用い、さらに２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸 (Ｒ）―シアノメチル (化合物２Ｉ-Ａ）の代わりに２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）(メチル）アミノ）－３―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸 (Ｒ）―シアノメチル (化合物２Ｉ-Ｂ）（２５５ｍｇ、０．７０４ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）(メチル）アミノ）＿３-（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸 (２Ｒ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノ＿２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ―プリン＿９＿イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物２ｍ＿Ｂ）（３８．

６ｍｇ、２３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝９４２（M+Ｈ）+

保持時間：0．６２分 (分析条件３０Ｄ「六0５)

[0437] ２－６．３－（ｔｅｒｔ＿プチルジスルファニル）＿２＿（メチルアミノ）＿プロパン酸 （２Ｒ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テ トラヒ ドロフラン＿３＿イル）オキシ）＿（ヒ ドロキシ）ホスホ リル）オキシ）メチル）＿５＿（６－アミノー９Ｈニプ リンー９―イル）＿―４―ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフランー３＿イル (化合物２ｎ＿Ｂ）の合成



[0438] 化合物２ｎ＿Ａの製造例と同様の条件で、２＿（（ｔｅｒｔ―プ トキシカルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン醗 （２Ｒ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テ トラヒ ドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒ ドロキシ）ホスホ リル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プ リン－９―イル）－４―ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフラン－３―イル (2ｍ＿Ａ）の代わりに２＿（（ｔｅｒｔ―プ トキシカルボニル） (メチル）ア

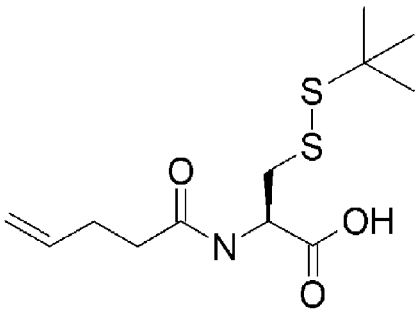
ミノ）―3―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸　(2Ｒ)-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン―９―イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物２ｍ_Ｂ）（２３．２ｍｇ、０．０２５ｍｍｏｌ）を用いることで、３―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）_２_（メチルアミノ）プロパン酸　(2Ｒ)-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン―９―イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物２ｎ_Ｂ）（２６．３ｍｇ、１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝８４２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．３６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0439] ３．２ｍ_ｃの合成

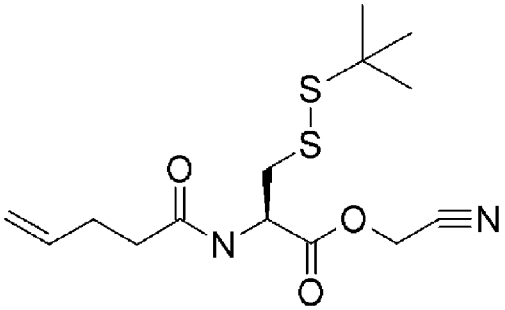
３-１．（Ｒ）-３-（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）_２_（ペンタ_４―エンアミド）プロパン酸（化合物２ｋ-Ｃ）の合成



[0440] （Ｒ）_２_アミノ_３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパン酸（１ｇ、４．５８ｍｍｏｌ）と炭酸ナトリウム（１．４６ｇ、１３．７ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（７ｍｌ）、水（１４ｍｌ）溶液に塩化ペンター４_エノイル（１．０１５ｍｌ，９．１６ｍｍｏｌ）を０℃で加え、室

温で２０分間攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を0℃で滴下し、ｐＨ２とした。酢酸エチルで希釈した後に、適量のＮａＣｌを加え塩析抽出を行った。得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。そして、減圧濃縮により (R) - 3 - (ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル) －２—(ペンター4 —エンアミド)プロパン酸 (2ｋ—C) とペンタ_４_エン酸 (1 :0．９) の混合粗生成物Ｃ (1．７１g、１００%) を得た。

[0441] ３-２．３-(ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル)_２_(ペンタ_４_エンアミド)プロパン酸 (R)_シァノメチル (化合物２Ｉ_Ｃ) の合成

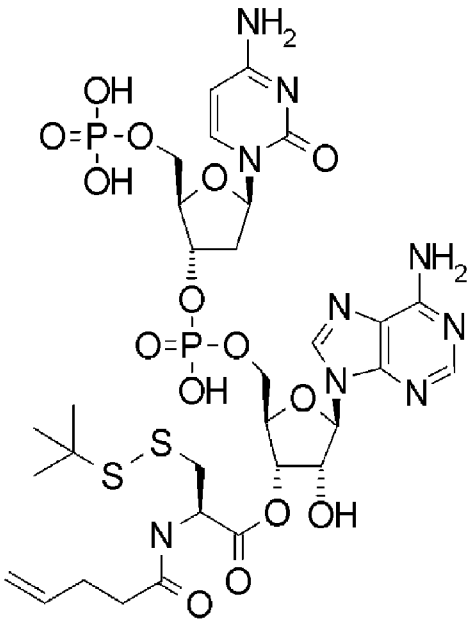


[0442] (R) - 3 - (ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル)_２_(ペンター4 _エンアミド)プロパン酸 (化合物２ｋ—C) とペンタ_４_エン酸 (1 :0．９) の混合粗生成物Ｃ (1．７５g、８．７０mmｏｌ) のＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド (１１mｌ) 溶液に2—プロモアセトニトリル (0．９５７mし １３．７４mmｏｌ) とＮ_エチル_Ｎ—イソプロピルプロパン－２—ァミン (1．７６mし １０．１mmｏｌ) を加え、室温で５０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニゥム水溶液 (6ｍｌ) を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシゥムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル= １００/ ０→５０/ ５０) にて精製し、３—(ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル) －２—(ペンター4 —エンアミド)プロパン酸 (R)_シァノメチル (化合物２Ｉ_Ｃ) (９４０mg、６２%) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = ３３１ (M+ H) +

保持時間 :0．９４分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0443] ３．３．　３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）＿２＿(ペンタ＿４＿エンアミド)＿プロパン酸　(2Ｒ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（＿（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）＿２＿(（ホスホノオキシ)メチル）テトラヒドロフラン－３＿イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ)メチル）－５―丄6―アミノー9Ｈ＿プリン－９＿イル）―4：ヒドロキシテトラヒドロフラン―3―イル (化合物２ｍ＿Ｃ)＿の合成



[0444] 化合物２ｍ＿Ａの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン＿２＿イル)メチル (化合物１ｈ)（２００ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）を用い、さらに２＿（(ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)＿３＿（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル)プロパン酸　(Ｒ)―シアノメチル (化合物２Ｉ－Ａ）の代わりに３＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル)＿２＿(ペンタ＿４―エンアミド)プロパン酸　(Ｒ)＿シアノメチル (２Ｉ―Ｃ)（４１

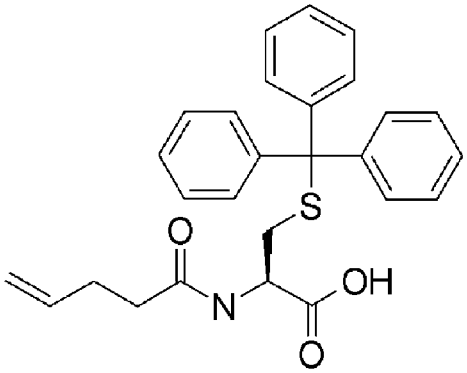
５ｍｇ、１．２３ｍｍｏｌ）を用いることで、３―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）－２―（ペンター4―エンアミド）プロパン酸　（2Ｒ）―（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノー2_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン_９_イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフランー3―イル（化合物２ｍ―Ｃ）（４２．０ｍｇ、１５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝９１０（M＋Ｈ）＋

保持時間：0．５３分（分析条件３０Ｄ「六05）

[0445] 4．_2ｍ_Ｄの合成

4－１．（Ｒ）－２－（ペンター4―エンアミド）―3―（トリチルチオ）プロパン酸（化合物２ｈ）_の合成



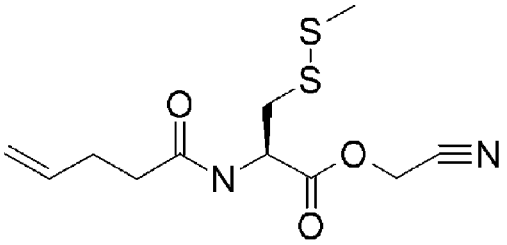
[0446] （Ｒ）―2―アミノー3―（トリチルチオ）プロパン酸（1．５０ｇ、４．１３ｍｍｏｌ）と炭酸ナトリウム（1．３１ｇ、１２．４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（3．５ｍｌ）、水（7ｍｌ）溶液に塩化ペンタ_４―エノイル（0．９１５ｍｌ，8．２５ｍｍｏｌ）を加え、室温で1時間攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を0℃で滴下し、ｐＨ２とした。酢酸エチルで希釈した後に、適量のＮａＣｌを加え塩析抽出を行った。得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール＝７０/３０→0/１００）にて精製し

、 (R) - 2 - (ペンタ_4 —エンアミド) _3_ (トリチルチオ) プロパン酸 (化合物2h) (1.14g、62%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 444 (M-H) -

保持時間 :0.95分 (分析条件SQDAAO5)

[0447] 4-2. 3- (メチルジスルファニル) _2_ (ペンター4 —エンアミド) プロパン酸 (R) _ シアノメチル (化合物2I-D) の合成



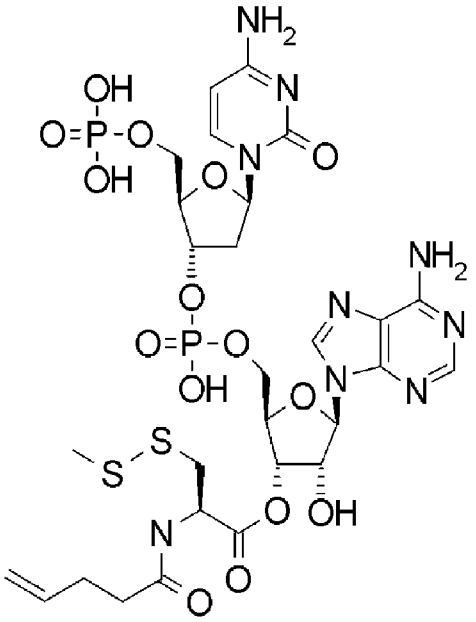
[0448] (R) - 2 - (ペンタ_4 —エンアミド) _3_ (トリチルチオ) プロパン酸 (化合物2h) (1.01g、2.28mmol) のジクロロメタン (10ml) 溶液に トリフルオロ酢酸 (1.76ml、22.8mmol) と トリイソプロピルシラン (0.934ml、4.56mmol) を加え、室温で10分攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣と炭酸ナトリウム (1.21g、11.4mmol) の水 (5ml) 溶液に、メタンスルホノチオ酸 S—メチル (1.44g、11.4mmol) のエタノール (5ml) 溶液を0℃で滴下し、その後室温で30分攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を0℃で滴下し、pH2とした。酢酸エチルで希釈し抽出を行った。得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣のDMF (1ml) 溶液に2—プロモアセトニトリル (0.438ml、6.29mmol) とN—エチル—N—イソプロピルプロパン—2—アミン (0.440ml、2.52mmol) を加え、室温で10分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (3ml) を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10mM酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール= 70/ 30→0/ 100) にて精製し、3_

（メチルジスルファニル）_２_（ペンタ_４―エンアミド）プロパン酸（Ｒ）_シアノメチル（化合物２Ｉ_Ｄ）（２９１ｍｇ、４８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝２８９（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0449] ４－３．３－（メチルジスルファニル）_２_（ペンター４―エンアミド）_プロパン酸（２Ｒ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６－アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）_―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３_イル（化合物２ｍ_Ｄ）_の合成



[0450] 化合物２ｍ_Ａの製造例と同様の条件で、リン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ）（１５０ｍｇ、０．２３６ｍｍｏｌ）を用い、さらに２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ

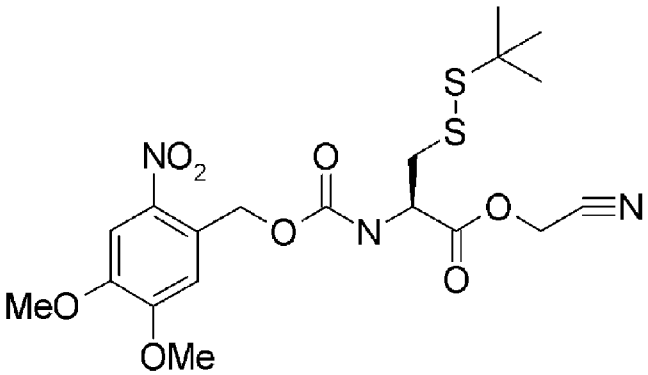
—プチルジスルファニル）プロパン酸　(R)—シァノメチル (化合物２Ｉ-Ａ）の代わりに3_（メチルジスルファニル）_２_（ペンタ_４—エンアミド)プロパン酸　(R)_シァノメチル (化合物２Ｉ_Ｄ）（２７２ｍｇ、０．９４３ｍｍｏｌ）用いることで、３_（メチルジスルファニル）－２-（ペンター４—エンアミド)プロパン酸　(２Ｒ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４—アミノ_２—オキソピリミジンー１（２Ｈ）—ィル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５—（６—アミノー９Ｈ—プリンー９—ィル）－４—ヒドロキシテトラヒドロフランー３—ィル (化合物２ｍ_Ｄ）（２１．２ｍｇ、１０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝８６８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４５分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0451] ５．２ｍ_Ｅの合成

５-１．　３-（ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル）_２_（（（（４，５—ジメトキシ_２—ニトロベンジル）ォキシ）カルボニル）アミノ）プロパン酸　（Ｒ）—シァノメチル (化さ物２１-Ｅ）のさ成



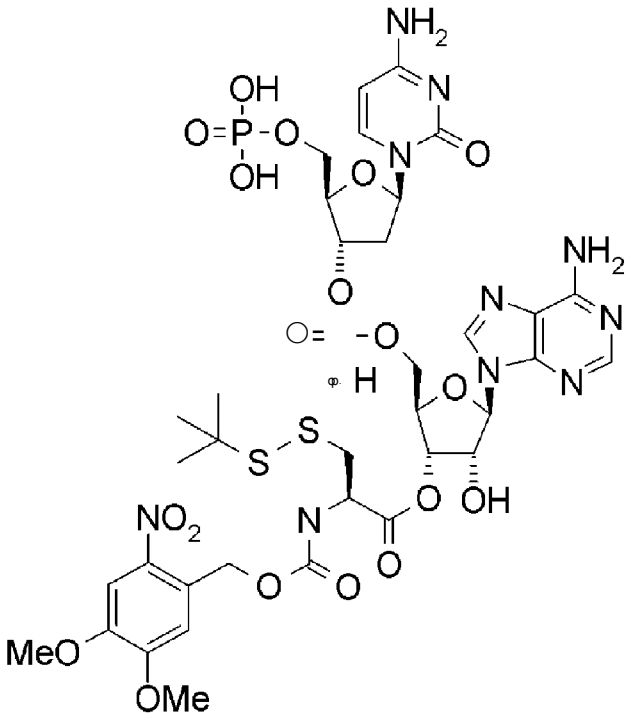
[0452] （Ｒ）_２_アミノ_３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）プロパン酸 (化合物２ｆ_Ｅ、５００ｍｇ、２．２９ｍｍｏｌ）と炭酸ナトリウム (534ｍｇ、５．０４ｍｍｏｌ）のジオキサン (５ｍｌ）、水 (５ｍｌ）溶液にカルボノクロリド酸　４，５—ジメトキシ_２—ニトロベンジル (６９４ｍｇ、２．５２ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。その後、反応液

に１Ｎ塩酸を加えｐＨ２とし、酢酸エチルを加え抽出した。有機抽出物を硫酸マグネシゥムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣のＤＭＦ（６ｍｌ）溶液に２―プロモアセトニトリル(０．２８４ｍし４．０８ｍｍｏｌ）とＮ_エチル_Ｎ―イソプロピルプロパン－２―アミン（0．２８５ｍし１．６３ｍｍｏｌ）を加え、室温で２０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニゥム水溶液（3ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル＝１００/０→６０/４０）にて精製し、３_（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）_２_（（（（４，５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）プロパン酸　(R)―シァノメチル（化合物２Ｉ―Ｅ）（６５３ｍｇ、９８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４８６　(M-H)-

保持時間：０．９９分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0453] ５-２．　３-（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）_２_（（（（４，５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル）ォキシ）カルボニル）アミノ）プロパン酸　(２Ｒ)-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_ォキソピリミジン_１_（２Ｈ）_―イル）-２-（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル_（化合物２ｍ―Ｅ）の合成



[0454] 化合物２ｍ_Ａの製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-５-（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル (化合物１ｈ）（１５０ｍｇ、０．２３６ｍｍｏｌ）を用い、さらに２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸 (Ｒ)―シアノメチル (化合物２Ｉ-Ａ）の代わりに３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）_２_（（（（４，５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）プロパン酸 (Ｒ)_シアノメチル (化合物２Ｉ_Ｅ）（４６０ｍｇ、０．９４３ｍｍｏｌ）用いることで、３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）-２-（（（（４，５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）プロパン酸 (２Ｒ)-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）

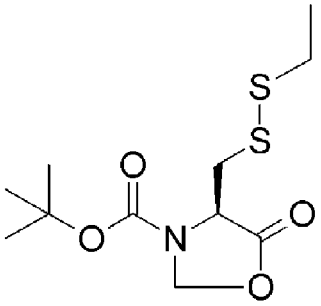
- 5- （6—アミノ－9Ｈ—プリン－9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物２ｍ—Ｅ）（１０．６ｍｇ、４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝１０６７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．６２分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0455] ６．２ｍ_Ｆの合成

６－１．４－（_（エチルジスルファニル）メチル）_５—オキソオキサゾリジン_３_カルボン酸___(Ｒ)－ｔｅｒｔ—ブチル (２ｅ_Ｆ)_の合成

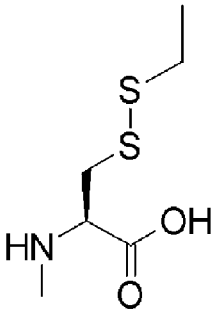


[0456] ジシクロヘキシルアミン (Ｒ)－２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（エチルジスルファニル）プロパン酸塩 (化合物２ｄ—ｆ）（２．００ｇ、４．３２ｍｍｏｌ）のトルエン (８ｍｌ）溶液に（（１Ｓ，４Ｒ）－７，７—ジメチル_２—オキソビシクロ[２．２．１]ヘプタン—１—イル）メタンスルホン酸 (１．０７ｇ、４．６２ｍｍｏｌ）、パラホルムアルデヒド (８４７ｍｇ、２．８９ｍｍｏｌ）を加え１００℃で終夜攪拌した。その後、反応液を室温に戻し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→８７/ １３）にて精製し、４_（（エチルジスルファニル）メチル）_５_オキソオキサゾリジン—３_カルボン酸 (Ｒ)－ｔｅｒｔ—ブチル (２ｅ－Ｆ）（８４７ｍｇ、６７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２９４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９８分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0457] ６－２．（Ｒ）－３－（エチルジスルファニル）_２__(メチルアミノ)プロパン酸 (２ｆ_Ｆ）の合成

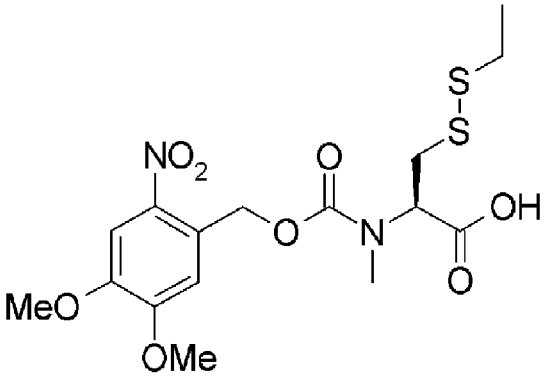


4-((エチルジスルファニル)メチル)_5_オキソオキサゾリジン-3_カルボン酸 (R)_tert_ブチル (化合物2e_F) (819mg、2.79mmol)のジクロロメタン (14ml)溶液にトリエチルシラン (4.46mし27.9mmol)、トリフルオロ酢酸 (6.88mし89.Ommol)を0℃で加え、室温で1時間攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー (10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール=100/0→60/40)にて精製し、(R)-3-(エチルジスルファニル)_2_(メチルアミノ)プロパン酸 (化合物2f_F) (232mg、43%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 196 (M+H)+

保持時間:0.39分 (分析条件SQDAA05)

[0458] 6-3. (R)-2-(((((4,5—ジメトキシ_2—ニトロベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)_3_(エチルジスルファニル)プロパン酸 (2k-F)の合成



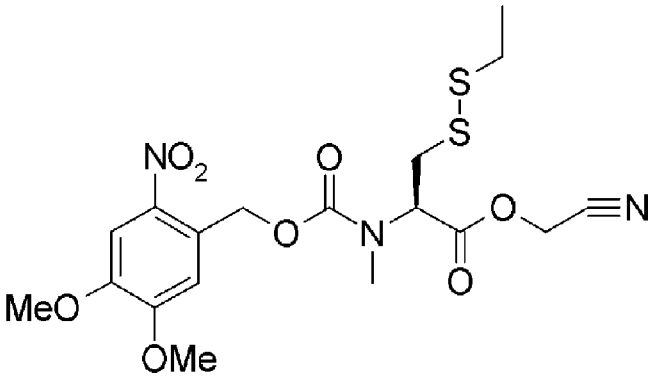
(R)-3-(エチルジスルファニル)_2_(メチルアミノ)プロパン酸 (化合物2f_F) (232mg, 1.19mmol)と炭酸ナトリウム (252mg、2.38mmol)のジオキサン (3ml)、水 (3ml)

溶液に、カルボノクロリド酸　４，５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル（３９４ｍｇ、１．４３ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液（３ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→０/ １００）にて精製し、（Ｒ）－２－（（（（４，５―ジメトキシ－２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）_３_（エチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｋ_Ｆ）（４８３ｍｇ、９３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ ＝ ４３５ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８２分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0459] 6－４．２－（（（（４．５―ジメトキシ_２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）_３_（エチルジスルファニル）プロパン酸　（Ｒ）_―シアノメチル（２Ｉ―Ｆ）_のさ成



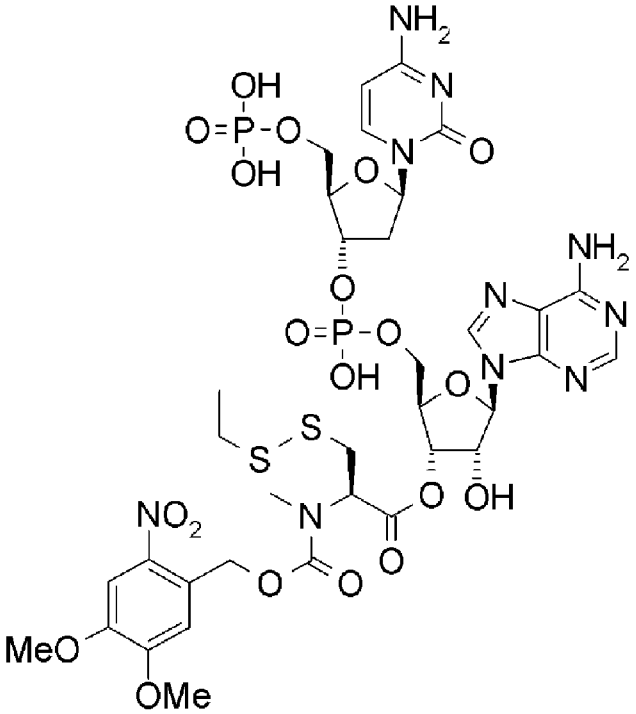
[0460] （Ｒ）―２―（（（（４，５―ジメトキシ－２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）_３_（エチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｋ_Ｆ）（２３８ｍｇ、０．５４９ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（２．５ｍｌ）溶液に、２―ブロモアセトニトリル（０．１１５ｍｌ　１．６５ｍｍｏｌ）とＮ_エチル_Ｎ―イソプロピルプロパン－２―アミン（０．１０５ｍｌ　０．６０４ｍｍｏｌ）を加え、室温で１０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液（３ｍｌ）を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾

燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール=70/30→0/100）にて精製し、2—（（（（4，5—ジメトキシー2—ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）_3_（エチルジスルファニル）プロパン酸　（R）_シアノメチル（化合物2I_F）（221mg、85%）を得た。

LCMS（ESI）　m/z　=　474　（M+H）+

保持時間：0.97分（分析条件SQDAA05）

[0461] 6-5.　2-（（（（4，5—ジメトキシ_2—ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）_3_（エチルジスルファニル）プロパン酸　（2R）-（2R.3S.4R.5R）-2-（（（（（2R.3S.5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン_1_（2H）_イル）-2-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノー9H_プリン_9_イル）_4_ヒドロキシテトラヒドロフラン_3_イル_（2m_F）_の合成



[0462] 化合物2m_Aの製造例と同様の条件で、リン酸二水素　（（2R，3S

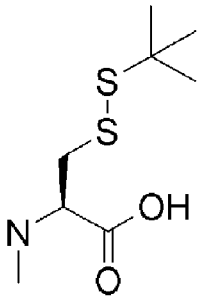
，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン＿２＿イル）メチル（化合物１ｈ）（６６．Ｏｍｇ、０．１０４ｍｍｏｌ）を用い、さらに２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ｒ）―シアノメチル（化合物２Ｉ－Ａ）の代わりに２＿（（（（４，５―ジメトキシ＿２―ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（エチルジスルファニル）プロパン酸（Ｒ）＿シアノメチル（化合物２Ｉ＿Ｆ）（１９６ｍｇ、０．４１５ｍｍｏｌ）用いることで、２＿（（（（４，５―ジメトキシ－２＿ニトロベンジル）オキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（エチルジスルファニル）プロパン酸（２Ｒ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物２ｍ＿Ｆ）（１８．６ｍｇ、１７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１０５３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５９分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0463] ７．２ｍ＿Ｇの合成

７－１．（Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）＿２＿（メチルアミノ）プロパン酸（化合物２ｆ＿Ｇ）の合成

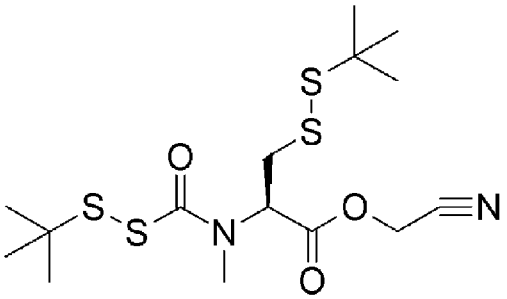


[0464] （Ｒ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）（メチル）ァミノ）_３_（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸（化合物２ｃ―Ｂ）（２．７０ｇ、６．０６ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（２０ｍｌ）溶液にピペリジン（１．８ｍし１８．２ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液／メタノール＝１００／０→６０／４０）にて精製し、（Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）_２_（メチルァミノ）プロパン酸（化合物２ｆ－Ｇ）（６１０ｍｇ、４５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　２２４　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６３分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0465] ７－２．　２_（（ｔｅｒｔ_プチルジスルファンンカルポニル）（メチル）_ァミノ）_３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）プロパン酸　（Ｒ）_―シァノメチル（化さ物２Ｉ－Ｇ）のさ成



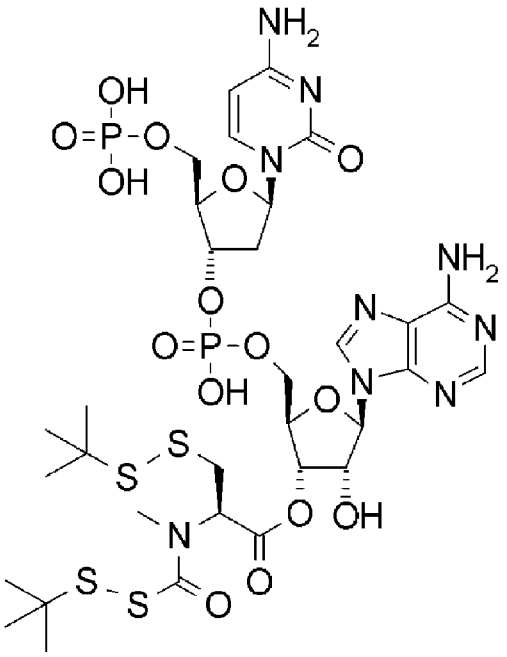
[0466] 塩化クロロカルボニルスルフエニル（０．４９７ｍし６．ＯＯｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（６ｍｌ）溶液に２_メチルプロパン－２―チオール（０．６６３ｍし５．８８ｍｍｏｌ）を０℃で滴下し、０℃で３０分攪拌し、０．８Ｍカルボノクロリド（ジチオペルオキソ酸）ＳＳ_ｔｅｒｔ―プチルーテトラヒドロフラン溶液を調整した。（Ｒ）_３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）_２_（メチルァミノ）プロパン酸（化合物２ｆ_Ｇ、５００ｍｇ、２．２４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（３．４ｍｌ）、水（１４．４ｍｌ）溶液に炭酸水素ナトリウム（７５２ｍｇ、８．９５ｍｍｏｌ）、０．８Ｍカルボノクロリド（ジチオペルオキソ酸）ＳＳ_ｔｅ

ｒｔ－ブチルーテトラヒドロフラン溶液 (4．２ｍｌ 3．３６ｍｍｏｌ) を加え、室温で5分攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を0℃で滴下し、ｐＨ2とした。酢酸エチルで希釈した後に、適量のＮａＣｌを加え塩析抽出を行った。得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣の2_ブロモアセトニトリル (1．０２ｍｌ) 溶液にＮ－エチル—Ｎ－イソプロピルプロパン—2—アミン (0．２８２ｍｌ 1．６２ｍｍｏｌ) を加え、室温で３０分攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (3ｍｌ) を加えた後に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル= １００/ ０→８０/ ２０) にて精製し、2_ ((ｔｅｒｔ_ブチルジスルファンンカルボニル) (メチル)アミノ)_3_ (ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル)プロパン酸 (R)—シアノメチル (化合物２Ｉ_Ｇ) (２０５ｍｇ、６８％) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ｚ = ４１１ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：1．１１分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

[0467] 7-3．2_((ｔｅｒｔ_ブチルジスルファンンカルボニル)(メチル)アミノ)_3_(ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル)プロパン酸 (2Ｒ)-(2Ｒ．3Ｓ．4Ｒ．5Ｒ)-2-((((((2Ｒ．3Ｓ．5Ｒ)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ－９Ｈ—プリン_9_イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル (化合物２ｍ_Ｇ) の合成



[0468] 緩衝液A（４６ｍｌ）にリン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿３＿（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン＿２＿イル）メチル (化合物１ｈ）（７７ｍｇ、０．１２１ｍｍｏｌ）の水溶液 (２．４０ｍｌ）と２－（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファンニルカルボニル）（メチル）アミノ）―３―（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸 （R）―シアノメチル (化合物２Ｉ－Ｇ）（１９８ｍｇ、０．４８３ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン (１．２１ｍｌ）溶液を加え、室温で２時間攪拌した。その後、トリフルオロ酢酸 (０．９６７ｍｌ）を加えた後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液＝１００/ ０→６０/ ４０）にて精製し、２＿（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファンニルカルボニル）（メチル）アミノ）＿３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパン酸 （２Ｒ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ＿２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホ

リル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ_9H—プリン_9_イル）—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物2m_G）（3．8mg、3％）を得た。

LCMS（ESI） m/z =990（M+H）+

保持時間：0．65分 (分析条件30D「六05）

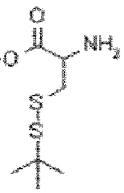
[0469] [実施例7] Cys誘導体を有するアミノアシル化tRNAの合成

50μM 転写tRNAfMetCAU(-CA) (配列番号R—5） 10从Iに、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM MgCL2, 10 mM ATP) 2μl Nuclease free water 4μ,lを加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールディングを行った。 10unit／μl T4 RNAリガーゼ（New eng Land bio Lab.社） 2从Lおよび、5mMの○又5（StBu）のアミノアシル化pdCpA (化合物2n—A）のDMSO溶液 2从1を加え、15℃で45分間ライゲーション反応を行った。アミノアシル化tRNA（化合物AT—2—A）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化tRNA（化合物AT_2_A）は、翻訳混合物に添加する直前に1mM酢酸ナトリゥムに溶解した。

[0470] 化合物AT—2—A（配列番号：33）

Cys(StBu)-tRNAfMetCAU

eGC6GGGUGGA6CAGCCU6GUAGCUCC5UC6GGCUCAU
AACCCGAAGAUC6UCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA



[0471] [実施例8] pdCpA法を用いたCys（StBu）の翻訳合成

1._ペプチド配列P_10の翻訳合成

20nM 鋳型DNA Mtryg3 (配列番号 D_3）に、前述の転写翻訳液、0．1mM 10-HCO-H4fo Late、0．3mM GLy, 0．3mM Arg, 0．3mM Thr, 0．3mM Tyr, 0．3mM Leu, および前記の方法で調製した50μM Cys(StBu)-tRNAfMetCAU (化合物AT—2_A）を加

え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP （日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、標的分子であるペプチド配列Ｐ—１０を観測することはできなかった (図１２）。すなわち、開始ＡＵＧからの翻訳ペプチドは検出されなかった。Cys誘導体をN末端に配置させて翻訳導入させるには工夫が必要である。一方で、２番目コドンにコードされるアミノ酸であるThr から全長にわたって翻訳されたペプチド (ペプチドP-１１）のＭＳが特異的に観測される興味深い現象が確認された。

[0472] ペプチド配列 Ｐ＿１０

[Cys(StBu)]ThrThrThrArgLeuTyrTyrArgG LyG Ly

MALDI-MS : m/z : Not detected (Ca Lc. 1345. 7)

[0473] ペプチド配列 (Ｐ＿１１) (配列番号 :３６）

ThrThr ThrArgLeuTyrTyrArgG LyG Ly

MALDI-MS : m/z : [M+H] + = 1300. 7 (Ca Lc. 1299. 7)

[0474] ２．ペプチド配列Ｐ- １２の翻訳合成

２０ｎＭ 錶型ＤＮＡ (配列番号 Ｄ—７）に、前述の転写翻訳液、０．１ｍＭ 10-HCO-H4fo Late 、Met とLys を除く各０．３ｍＭの１８種類のタンパク質性アミノ酸，および前記の方法で調製した５０μＭ Cys(StBu)-tRNAfMe tCAU (化合物ＡＴ—２＿Ａ）を加え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP （日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、標的分子であるペプチド配列Ｐ—１２を観測することが出来た。一方で、２番目コドンにコードされるアミノ酸であるThr から全長にわたって翻訳されたペプチドＰ—１３のＭＳが主生成物として観測された。Cys(StBu) をN末端に配置させたペプチド翻訳合成が可能であることが示されたが、その効率は低く改良検討を以下行った。

[0475] ＤＮＡ配列 （Ｄ- ７）

AKC17 DNA配列 (配列番号Ｄ—３１と同一） (配列番号 :７）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTAGAACTGCCTACTGGAG

CcttTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGC

[0476] ペプチド配列 (P_１２)

[Cys (St Bu)] ThrArgTh rA LaTy rTrpSe r LeuCysG LySe r GLySe r GLySe r

MALDI-MS :m/z : [M+H] + = 1723. 7 (Ca Lc. 1722. 7)

[0477] ペプチド配列 (P_１３) (配列番号 :３７)

ThrArgTh rA LaTy rTrpSe r LeuCysG LySe r GLySe r GLySe r

MALDI-MS :m/z : [M+H] + = 1532. 7 (Ca Lc. 1531. 7)

[0478] [実施例９] ｐｄＣｐＡ法によるＮ末端Ｃｙｓ導入効率低い原因の特定

ｐｄＣｐＡ法によるＮ末端Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）導入効率が低い原因を特定するために以下の実験を行った。

[0479] 1. 化合物２ｎ- Ａ側鎖ＳｔＢｕの脱保護

前駆体である化合物２ｎ_Ａを用いてｐｄＣｐＡ_Ｃｙｓの側鎖ＳｔＢｕの脱保護および脱保護された化合物２ｅ_Ａの安定性を調べる以下の実験を行った。２５０μＭ の化合物２ｎ_Ａ、ｐＨ７の５０ｍＭ Tris・HCL buffer、ＤＴＴ １０ｍＭの条件下、室温で側鎖の脱保護を行い、その経時変化をＬＣ—ＭＳ（ＳＱＤ）を用いて観測した。目的の化合物２ｅ_Ａは観測されず、アミノ酸が加水分解し脱離したｐｄＣｐＡが観測された。５分後、化合物２ｎ_Ａ ５１%、化合物２ｅ—Ａ ０%, ｐｄＣｐＡ４９%であり、２時間後に脱保護は完了し化合物２ｎ_Ａが ０%になったが、化合物２ｅ_八は0%で、全てｐｄＣｐＡＩ００%に加水分解された (図１３)。

以上のことから、ｐｄＣｐＡ_Ｃｙｓ (化合物２ｅ_Ａ) は通常翻訳条件下で不安定であり、ほぼ生成と同時に加水分解されるため、翻訳に不利であることが判明した。

[0480] 2. 化合物２ｎ_Ａの安定性評価

ＣｙｓのＳＨ基を保護した化合物２ｎ_Ａの安定性を評価した。以下の表２の通りに5条件の保存サンプルをそれぞれ調整し、ＬＣ—ＭＳを用いて分析した。

[048 1]

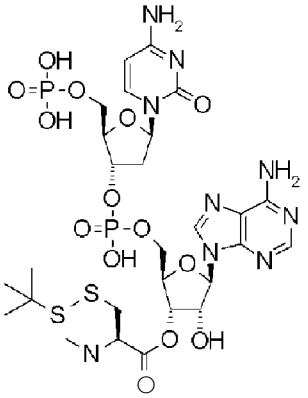
[表2]

保存状態	pdC pA- Cys(StB u)濃度	pH	温度	時間	pdCpA- Cys(StBu) 残存%	by LC-MS pdCpA%
HEPES buffer 中	1mM	7	室温	1時間	30	70
AcONa buffer 中	1mM	5	室温	1時間	70	30
AcONa buffer 中	2.5mM	5	0度	2.5日間	35	65
DMSO 中	5mM	4	0度	2.5日間	58	42
固体保存	-	-	室温	16日間	64	36

[0482] HEPES buffer 中、ｐＨ７で１時間後の化合物２ｎ＿Ａの残存％は３０％であった。先に記載したとおり、側鎖を脱保護した化合物２ｅ＿Ａは脱保護されると速やかに加水分解してしまった結果と比較すると、側鎖を保護することで安定性が増す結果となつた。

[0483] ３．　化合物２ｎ＿Ｂの安定性評価

ＭｅＣｙｓのＳＨ基を保護した化合物２ｎ＿Ｂの安定性もあわせて評価した。以下の表３の通りに4条件の保存サンプルを調整し、ＬＣ—ＭＳを用いて分析した。



化合物２ｎ一Ｂ

[0484] [表3]

保存状態	pdCpA- MeCys(StBu) 濃度	pH	温度	時間	pdCpA-MeCys(StBu) 残存%	by LC-MS pdCpA%
HEPES buffer 中	1mM	7	室温	1時間	49	51
Tris buffer 中	1mM	7	室温	1時間	35	65
AcONa buffer 中	1mM	5	室温	5時間	100	0
DMSO 中	5mM	4	0度	1日間	100	0

[0485] ｐＨ７のbuffer 中においては、化合物２ｎ＿Ａと同等の安定性であった。ｐＨ５ buffer 中、あるいはＤＭＳＯ溶液中の安定性は化合物２ｎ＿Ａと比較して安定化した。化合物２ｎ—ＢはＮ—メチル化されているため、メチル

原子の電子効果によってｐｄＣｐＡ―アミノ酸の安定度が上がったと考えられる。

以上のことからｐｄＣｐＡ法によるＮ末端Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）導入効率が低い原因の一つとして、側鎖ＳＨ基の存在によるアミノアシル化ｔＲＮＡの不安定化を特定した。

[0486] [実施例１０] Initiation read through 法を用いたＮ末端Ｃｙｓの効率的翻訳導入

実施例9で観測された2番目のコドンからの翻訳開始が効率的に得られた現象（Int iation read through) を積極的に活用することで、ペプチドのＮ末端にＣｙｓの導入を以下のように試みた。

[0487] 1. Initiation read through 法

以下の方法により翻訳を行った。２０ｎＭ 鋳型ＤＮＡ Mct ryg3 (配列番号Ｄ―８）に、前述の転写翻訳液、０．３ｍＭ GLy, ０．３ｍＭ Arg, ０．３ｍＭ Thr, ０．３ｍＭ Tyr, ０．３ｍＭ Leu、０．３ｍＭ Cys を加え、３７℃で６０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP （日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ―ＭＳで分析したところ、開始コドンであるAUGからではなく、AUGの次にコードされるコドン（TGC、Cys に相当）から翻訳された標的ペプチドＰ_１４のＭＳが期待どおり主生成物として観測された (図１４参照）。

[0488] 配列番号Ｄ―８ (配列番号：８）

Mct ryg3 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATat g tgcACTACAACGCGTc ttta ctaccgtggcggcTAGTAGATAGATAG

[0489] 翻訳ペプチド Ｐ_１４ (配列番号：３８）

CysThr ThrThrArgLeuTyrTyrArgGLyGLy

MALDI-MS : m/z : [M+H] + = 1290. 6 (Ca Lc. 1289. 6)

[0490] 2. Ｃｖｓ直後の３番目のコドンの違いによるinitiation read through 赫 の藉 織 寸

三文字目のコドンがinitiation read through にどのように影響するか評価した。２０ｎＭ 鋳型ＤＮＡ IniRt—XXX—am（配列番号Ｄ—９からＤ—２８まで）に、前述の大腸菌由来の再構成無細胞転写翻訳液、Ｍｅｔを除く各０．３ｍＭの１９種類のタンパク質性アミノ酸を加え、３７℃で６０分間翻訳した。対照実験としてＭｅｔを含む翻訳も別途行った。翻訳反応物を、SPE C-TIP（日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、開始のＡＵＧの次にコードされるＣｙｓから翻訳されたペプチドのＭＳが観測された。

[0491] 本来の翻訳開始アミノ酸であるメチオニンを翻訳系から除き、翻訳開始コドンＡＴＧの直後にＣｙｓをコードするｍＲＮＡを翻訳させるとＣｙｓをＮ末端残基とするペプチドが、実施した１９翻訳ペプチドすべて（翻訳ペプチドＰ—１５からＰ—３３）で再現性よく主生成物として翻訳合成されることを見出した。これにより不安定なCysacy L tRNAを系外で調製して翻訳系に添加することなく、Ｎ末端にＣｙｓを導入することが可能となった（図１５～２３参照）。また、対照実験として上記翻訳系にメチオニンも添加して、initiation read through させずに全長ペプチドを翻訳させる試験も同時におこなった。

[0492] IniRt_XXX_am 鋳型DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG tgcXXXACTACAACGc ttta ctaccgtggcggcTAGTAGATAGATAG

(XXX: TTT（配列番号Ｄ_９（配列番号：９）），TTG（配列番号Ｄ—１０（配列番号：１０）），TAC（配列番号Ｄ_１１（配列番号：１１）），TGC（配列番号Ｄ_１２（配列番号：１２）），TGG（配列番号Ｄ_１３（配列番号：１３）），CTT（配列番号Ｄ_１４（配列番号：１４）），CTA（配列番号Ｄ-１５（配列番号：１５）），CCG（配列番号Ｄ—１６（配列番号：１６）），CAT（配列番号Ｄ_１７（配列番号：１７）），CAG（配列番号Ｄ—１８（配列番号：１８） CGT（配列番号Ｄ_１９（配列番号：１９）），CGG（配列番号Ｄ—２０（配列番号：２０）），ATT（配列番号Ｄ_２１（配列番号：

２１））, ACT（配列番号Ｄ＿２３（配列番号：２２））, AAC（配列番号Ｄ－２４（配列番号：２３））, AGT（配列番号Ｄ—２５（配列番号：２４））, AGG（配列番号Ｄ＿２６（配列番号：２５））, GTT（配列番号Ｄ＿２７（配列番号：２６））, GCT（配列番号Ｄ—２８（配列番号：２７））

[0493] IniRt_XXX_am ペプチド配列（翻訳ペプチド番号 Ｐ—１５からＰ—３３まで）

CysXaaThrThrThrLeuTyrTyrArgG LyG Ly（配列番号：３９～５７）

[0494] ＭＡＬＤＩ－ＭＳの計算値および実測値の表

[表4]

翻訳ペプチド番号	3rd codon XXX	アミノ酸 Xaa	計算値	実測値 [M+H]+
P-15 (配列番号:39)	TTT	Phe	1280.6	1281.4
P-16 (配列番号:40)	TTG	Leu	1246.6	1247.4
P-17 (配列番号:41)	TAC	Tyr	1296.6	1297.3
P-18 (配列番号:42)	TGC	Cys	1236.5	1237.2
P-19 (配列番号:43)	TGG	Trp	1319.6	1320.3
P-20 (配列番号:44)	CTT	Leu	1246.6	1247.3
P-21 (配列番号:45)	CTA	Leu	1246.6	1247.3
P-22 (配列番号:46)	CCG	Pro	1230.6	1231.3
P-23 (配列番号:47)	CAT	His	1270.6	1271.3
P—24 (配列番号:48)	CAG	Gin	1261.6	1262.3
P-25 (配列番号:49)	CGT	Arg	1289.6	1290.3
P-26 (配列番号:50)	CGG	Arg	1289.6	1290.3
P-27 (配列番号:51)	ATT	Ile	1246.6	1247.3
P-28 (配列番号:52)	ACT	Thr	1234.6	1235.2
P-29 (配列番号:53)	AAC	Asn	1247.6	1248.2
P-30 (配列番号:54)	AGT	Ser	1220.5	1221.3
P-31 (配列番号:55)	AGG	Arg	1289.6	1290.3
P-32 (配列番号:56)	GTT	Val	1232.6	1233.3
P-33 (配列番号:57)	GCT	Ala	1204.6	1205.3

[0495] [実施例11] Cys以外のSH基付非天然型アミノ酸および、そのアミノアシル化pdCpAの合成

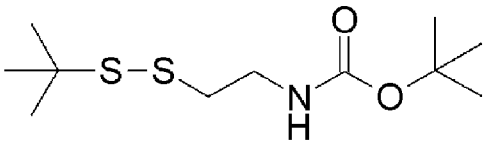
天然型アミノ酸であるCysは、ARSを活用したInt iation read throughh法により効率的に翻訳導入されたが、非天然型アミノ酸をARS導入するには限界があるため、アミノアシル化pdCpAのうち、活性エステル部分の加水分解速度を遅くする工夫をした化合物を合成・評価した。すなわち、SH基をカルボン酸活性エステル部位からより離した一連の化合物群を合成・

評価した。

[0496] まず、Ｃｙｓ以外のＳＨ基を有し、活性エステル部位が加水分解に対し安定なＮ末端非天然型アミノ酸を有するアミノアシル化ｐｄＣｐＡの合成を行った（図２４）

１．化合物６ｉ－Ａの合成

１―１．（２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エチル）カルバミン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物６ｂ－Ａ）の合成

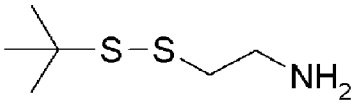


[0497] 窒素雰囲気下、１－クロロ－１Ｈ―ベンゾ［ｄ］［１，２，３］トリアゾール（１．７３ｇ、１１．２８ｍｍｏｌ）および１Ｈ―ベンゾ［ｄ］［１，２，３］トリアゾール（０．６７ｇ、５．６４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２４．０ｍｌ）に溶解させ、―７８度に冷却した後、（２―メルカプトエチル）カルバミン酸ｔ６「ｔ－ブチル（化合物６３）（１．００ｇ、５．６４ｍｍｏｌ）のＤＣＭ溶液（３．０ｍｌ）を滴下した。－７８度で１０分間攪拌した後、チオ尿素（１．２９ｇ、１６．９２ｍｍｏｌ）のＴＨＦ懸濁液（６．０ｍｌ）を加え、さらに１０分間攪拌した。その後、２－メチルプロパン－２―チオール（０．７６ｇ、８．４６ｍｍｏｌ）のＤＣＭ溶液（３．０ｍｌ）を滴下し、室温まで昇温させながら２０時間攪拌した。反応液中の固体をろ過して除き、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝４：１）で精製して、標題化合物（１．１５ｇ、７７％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ ２６６ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分（分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0498] １－２．２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エタンアミン（化合物６ｃ－Ａ）の合成

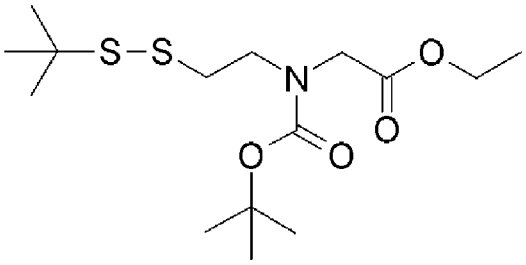


[0499] （2-（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）エチル）カルバミン酸 ｔｅｒｔ-ブチル (化合物６ｂ_Ａ、１００ｍｇ、０．３７７ｍｍｏｌ）にＴＦＡ（１．０ｍｌ）のＤＣＭ溶液 (1．Ｏｍｌ）を加え、室温で１５分攪拌した。反応液を減圧濃縮して標題化合物 (２０９ｍｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ :m/ｚ １６６ (Ｍ+Ｈ）+

保持時間 :０．６３分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0500] 1-3．2_-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）(2_-（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）エチル〕_アミノ）酢酸エチル (化合物６ｅ-Ａ）の合成

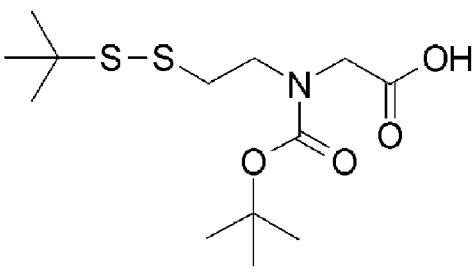


[0501] 2-（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）エタンアミン (化合物６ｃ_Ａ、０．２１ｇ、１．２６ｍｍｏｌ）、2_ブロモ酢酸エチル (０．２３ｇ、１．３９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（６．Ｏｍｌ）に溶解し、ＤＩＰＥＡ（１．１Ｏｍし ６．３１ｍｍｏｌ）を加えて室温で１７時間攪拌した。反応液にｔｅｒｔ_ブチルジカーボネート (３５８ｍｇ、１．６４ｍｍｏｌ）を加えて室温で１５分攪拌した後、反応液をそのままカラムクロマトグラフィ (ヘキサン :酢酸エチル=４：１）で精製し、標題化合物 (３３４．８ｍｇ、７５％）を得た。

ＬＣＭＳ :m/ｚ ３５２ (Ｍ+Ｈ）+

保持時間 :１．１１分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0502] 1-4．2_-（（ｔｅｒｔ_ブトキシカルボニル）(2_-（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）エチル）_アミノ）酢酸 (化合物６ｆ-Ａ）の合成

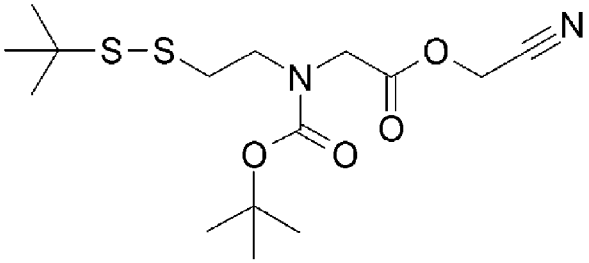


[0503] 2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2—（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸エチル（化合物６ｅ＿Ａ、３２０ｍｇ、０．９１ｍｍｏｌ）をメタノール（８０ｍｌ）に溶解し、水酸化カリウム水溶液（０．１８ｍｏｌ／ｌ、３０．３ｍｌ）を加えて室温で２時間攪拌した。反応液中のメタノールを減圧濃縮で除去し、水層をジエチルエーテルで洗浄した後、１ｍｏｌ／ｌ塩酸水溶液でｐＨ３とした。この水層を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮することで標題化合物（２６８．１ｍｇ、９１％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ ３２２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８９分（分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0504] １－５．２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（２＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物６ｑ＿Ａ）の合成

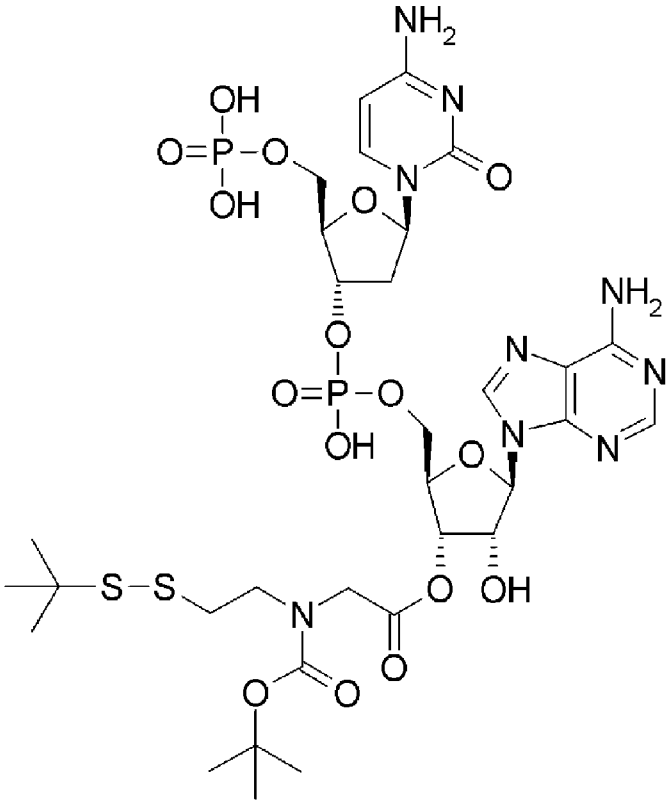


[0505] 2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2—（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸（化合物６ｆ＿Ａ、２６８．１ｍｇ、０．８３ｍｍｏｌ）および２＿ブロモアセトニトリル（１９９ｍｇ、１．６６ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１．０ｍｌ）に溶解し、ＤＩＰＥＡ（０．４３ｍｌ、２．４９ｍｍｏｌ）を加えて室温で１５分攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、ジエチルエーテルで抽出した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝３：１）で精製し、標題化合物（２８７．７ｍｇ、９６％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ ３６３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０４分（分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0506] 1-6．2__((tert—ブトキシカルボニル)__(2__(tert—プチルジスルファニル)エチル)アミノ)酢酸___(2R，3S，4R，5R)-2-((((((2R，3S，5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジンー1_(2H)_—イル)_2__((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)__(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)__5___(6__アミノ_9H—プリニ9__イリ)__4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物6h_A)の合成



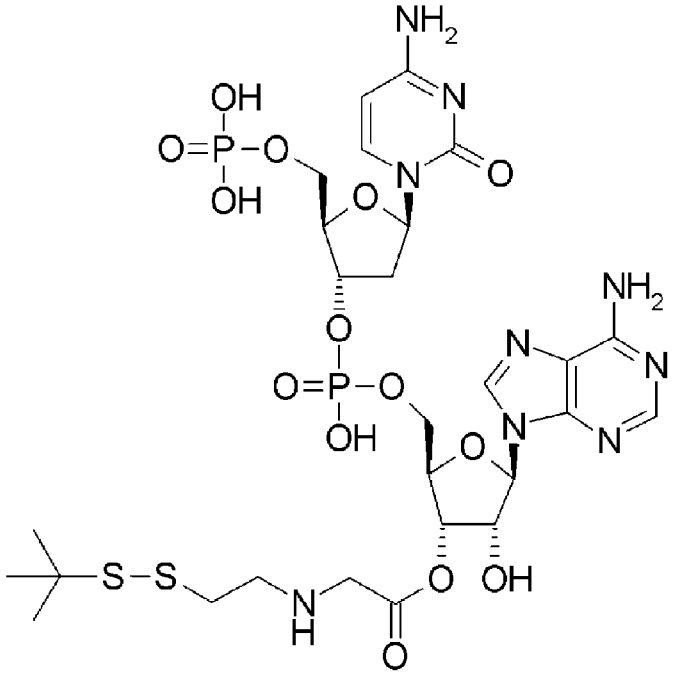
[0507] イミダゾール (272．3mg、4．OOmmol)およびN，N，N-トリメチルヘキサデカン_1_アミニゥム 塩化物 (256．Omg、0．8Ommol)を溶かし、酢酸でpH8に調節した緩衝液 (40ml)にリン酸二水素 ((2R，3S，5R)-5-(4—アミノー2—オキソピリミジン—1(2H)—イル)_3_(((((2R，3S，4R，5R)-5-(6—アミノー9H—プリンー9—イル)-3，4—ジヒドロキシテトラヒドロフラン_2_イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_2_イル)メチル (化合物1h、100mg、0．

１５７ｍｍｏｌ）の水溶液（１．Ｏｍｌ）を加えた後、２＿（（ｔｅｒｔ＿プトキシカルボニル）（２―（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物６ｇ＿Ａ、１９８ｍｇ、０．５４６ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（１．２ｍｌ）溶液を加えて室温で４時間攪拌した。反応液をそのまま凍結乾燥し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（０．０５％ＴＦＡ水溶液：０．０５％ＴＦＡアセトニトリル溶液＝８５：１５）で精製し、標題の化合物（５７．７ｍｇ、３９％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ　９４２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８９分　（分析条件　ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0508] １－７．２－（（２－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸　（２Ｒ，３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿ォキソピリミジン＿１（２Ｈ）＿イル）＿２＿（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン＿９―イル）＿４＿ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物６ｉ－Ａ）の合成



[0509] ２－（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）（２―（ｔｅｒｔ―プチルジス

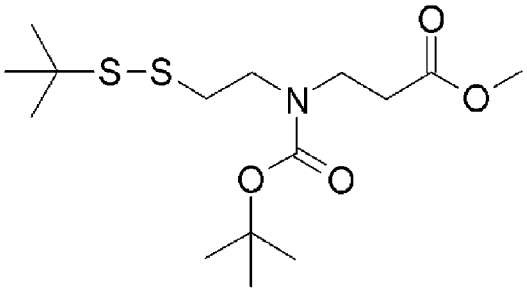
ルファニル）エチル）アミノ）酢酸　(2R，3S，4R，5R)-2-（（（（（（2R，3S，5R)-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン-1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－5-（6—アミノー9H—プリン－9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル　(化合物6h_A、56.2mg、0.060mmol）をTFA（1.0ml）に溶解し、室温で5分撹拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をカラムクロマトグラフィ（0.05%TFA水溶液：0.05%TFAアセトニトリル溶液=85：15=85：15）で精製して標題化合物　(40.6mg、81%）を得た。

LCMS：m/z　842（M+H）+

保持時間：0.39分　(分析条件　SQDAA05）

[0510] 2._化合物6_i_Bの合成

2-1.3-（（tert—ブトキシカルボニル）_(2_（tert_プチルジスルファニル）_エチル）_アミノ）_プロパン酸メチル　(化合物6e_B）_の合成



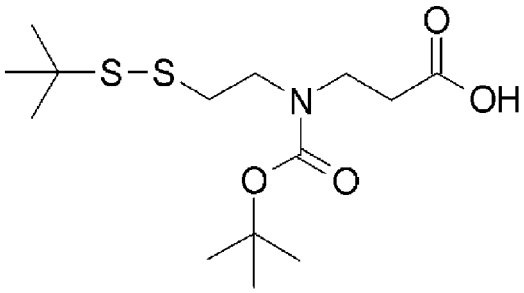
[0511] 2-（tert_プチルジスルファニル）エタンアミン　(化合物6c—A、0.80g、0.84mmol）およびアクリル酸メチル（1.74ml、19.36mmol）をジクロロエタン（14.0ml）に溶解し、DIPEA（4.23mし24.20mmol）を加えて85℃で2時間撹拌した。放冷し、tert—プチルジカーボネート（1.37g、6.29mmol）を加えて室温で45分撹拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで抽出した。得られた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗

浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製し、標題化合物(1.14g、67%)を得た。

LCMS:m/z 352(M+H)+

保持時間:1.11分 (分析条件 SQDAA05)

[0512] 2-2.3__((tert—ブトキシカルボニル)__(2__(tert_ブチルジスルファニル)エチル〕_アミノ)プロパン酸(化合物6f_B)の合成

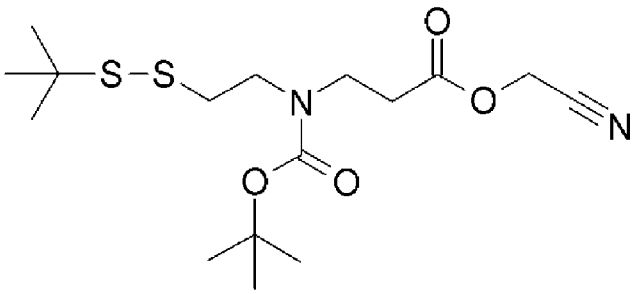


[0513] 3-((tert—ブトキシカルボニル)(2—(tert—ブチルジスルファニル)エチル)アミノ)プロパン酸メチル(化合物6e_B、1.14g、3.24mmol)を原料とし、化合物6f_Aの合成と同様の方法で標題化合物(1.04g、95%)を得た。

LCMS:m/z 336(M-H)-

保持時間:0.96分 (分析条件 SQDAA05)

[0514] 2-3.3__((tert—ブトキシカルボニル)__(2__(tert_ブチルジスルファニル)エチル)_アミノ)プロパン酸シアノメチル(化合物6g-B)の合成



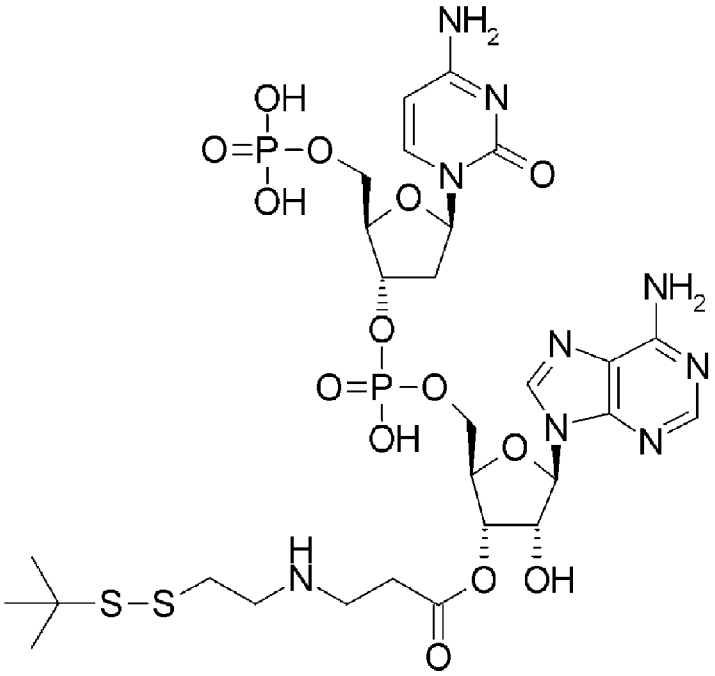
[0515] 3_((tert—ブトキシカルボニル)(2_(tert_ブチルジスルファニル)エチル)アミノ)プロパン酸(化合物6f_B、1.03g、

３．０５ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物６ｇ＿Ａの合成と同様の方法で標題化合物（１．０５ｇ、９１％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ ３７７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０９分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ０５)

[0516] ２－４．３－（（２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）プロパン酸 (２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル (化合物６ｉ－Ｂ）の合成



[0517] 氷冷下、リン酸二水素 （（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチル テトラブチルアンモニウム塩 (化合物１ｈ、４４．６ｍｇ、０．３１４ｍｍｏｌ）と３－（（

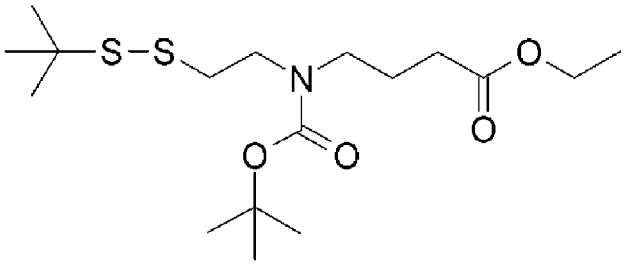
ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2—（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）プロパン酸シアノメチル（化合物６ｇ＿Ｂ、２３６ｍｇ、０．６２８ｍｍｏｌ）をＤＭＦに溶解させ、トリエチルアミン（０．０８８ｍｌ、０．６２８ｍｍｏｌ）を加えた。室温で１時間攪拌した後、反応液をカラムクロマトグラフィ（０．０５％丁「八水溶液：０．０５％ＴＦＡアセトニトリル溶液＝７０：３０）で精製した。得られた残渣にＴＦＡ（１．５ｍｌ）を加えて室温で５分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（０．０５％丁「八水溶液：０．０５％ＴＦＡアセトニトリル溶液＝８０：２０）で精製し、標題化合物（６６．９ｍｇ、２５％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　８５６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６２９分　（分析条件　ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[051 8] ３．化合物６ｉ＿Ｃの合成

３－１．４－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（２＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸エチル（化合物６ｅ＿Ｃ）の合成

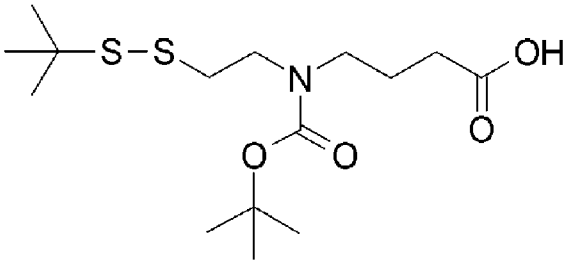


[051 9] ２＿プロモ酢酸エチルの代わりに４＿プロモブタン酸エチル（２．６８ｍｌ、１８．１５ｍｍｏｌ）を用い、化合物６ｅ＿Ａの合成と同様の方法で標題化合物（５５６．２ｍｇ、２４．２％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　３８０（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１５分　（分析条件　ＳＱＤＡＡ０５）

[0520] ３－２．４－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（２＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）エチル）アミノ》ブタンJ酸（化合物６ｆ－Ｃ）の合成

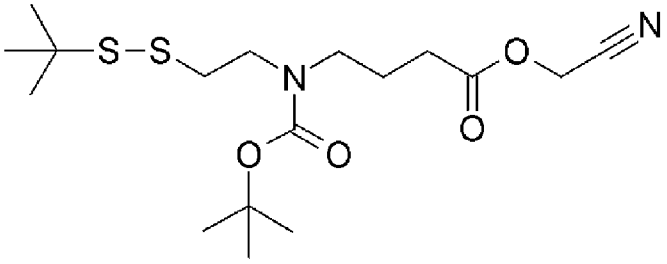


[0521] 2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2—（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸エチル（化合物６ｅ＿Ａ）の代わりに4-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2—（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸エチル（化合物６ｅ＿Ｃ、０．９６ｇ、２．５３ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物６ｆ＿Ａの合成と同様の方法により標題化合物（０．８６ｇ、９７％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ ３５２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９９分（分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0522] 3-3．4-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸シアノメチル（化合物６ｑ＿Ｃ）のさ成

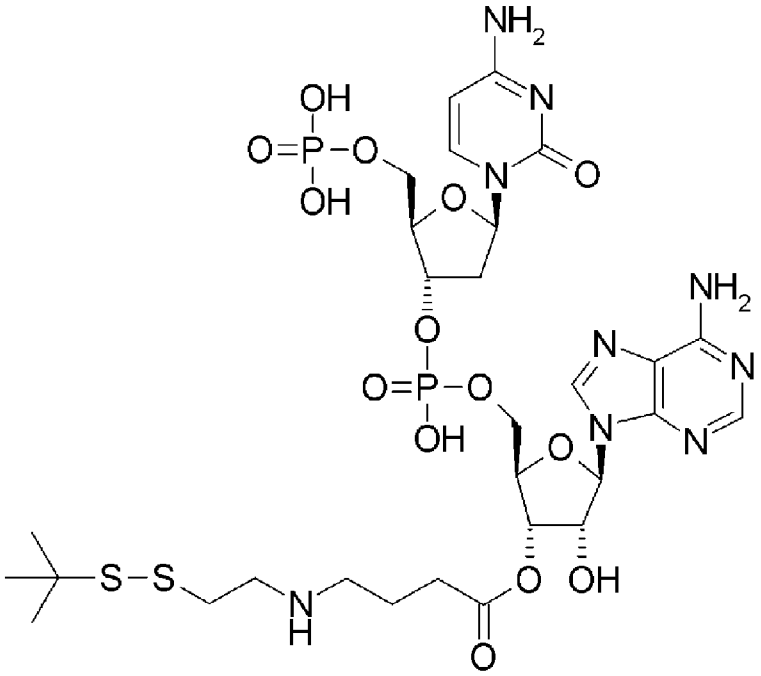


[0523] 2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）酢酸（化合物６ｆ＿Ａ）の代わりに4＿（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）（2＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸（化合物６ｆ＿Ｃ、０．８６ｇ、２．４５ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物６ｇ＿Ａの合成と同様の方法により標題化合物（０．７１ｇ、７４％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ ３９１（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分（分析条件 ＳＱＤＡＡ０５）

[0524] ３－４．－（（２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸　(２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（化合物６ｉ－Ｃ）の合成



[0525] ３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）（２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）プロパン酸シアノメチル（化合物６ｇ－Ｂ）の代わりに４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）（２－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）エチル）アミノ）ブタン酸シアノメチル（化合物６ｇ－Ｃ、２４５ｍｇ、０．６２８ｍｍｏｌ）原料とし、化合物６ｉ－Ｂの合成と同様の方法により、標題化合物（１０３ｍｇ、３７．６％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　８７０（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６４１分　（分析条件　ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

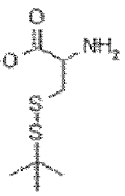
[0526] ［実施例１２］ＳＨ基を有する安定アミノアシル化ｐｄＣｐＡを用いたアミノアシル化ｔＲＮＡ合成

５０μＭ転写tRNAfMetCAU(-CA)（配列番号Ｒ＿５）１０从Ｉに、10X Ligat ion buffer (500 ㎜ HEPES-KOH pH 7.5, 200 ㎜ MgC L2, 10 ㎜ ATP) ２μし Nuc lease free water ４μ,Ｉを加え、９５℃で２分間加熱した後、室温で5分間放置し、ｔＲＮＡのリフォールデイングを行った。１０ｕηｉｔ/μ,Ｉ Ｔ４ ＲＮＡリガーゼ（New eng Land bio Lab.社）２从1および、５ｍＭのアミノアシル化ｐｄＣｐＡ（化合物６ｉ＿Ａ、Ｂ、Ｃ、２ｎ-Ａ、２ｍ—ｃ、２ｍ—Ｅ）のＤＭＳＯ溶液 ２从1を加え、１５℃で４５分間ライゲーシヨン反応を行った。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—２＿Ａ、Ｃ、Ｅ、ＡＴ＿６＿Ａ、Ｂ、Ｃ）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ＿２＿Ａ、Ｃ、Ｅ、ＡＴ＿６＿Ａ、Ｂ、Ｃ）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウムに溶解した。

[0527] 化合物ＡＴ—２—Ａ

Cys(StBu)-tRNAfMetCAU

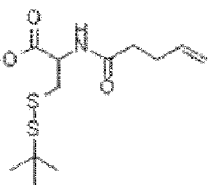
GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAU
AACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA



[0528] 化合物ＡＴ—２＿Ｃ

PenCys(StBu)-tRNAfMetCAU

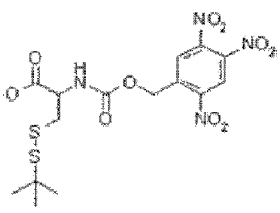
GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAU
AACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA



[0529] 化合物ＡＴ—２—Ｅ

NVOCCys(StBu)-tRNAfMetCAU

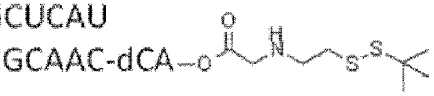
GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCG.GGCUCAU
AACCCGAAGAUCGUC6 GUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA-



[0530] 化合物ＡＴ—６—Ａ

tBuSSEtG Ly- t RNAf Me t CAU

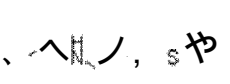
GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAU
AACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA—o



[0531] 化合物ＡＴ—６—Ｂ

tBuSSEt βS ALa-tRNAfMetCAU

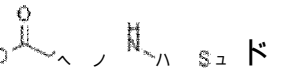
GGCGGGGUGGAGCA6CCU6S UA GcUc5UcGG36 CUCA U
A ACCCGA A G AUCGUC6 G1UUC AAAUCCG GCCCCCG 議 C-dCA—o



[0532] 化合物ＡＴ＿６＿Ｃ （配列番号 :３３）

tBuSSEtGABA-tRNAfMetCAU

GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAU
AACCCGAA6 AUCGUC3GUUCA AA UCC6 GCCCCCGCAA C-dCA—o



[0533] [実施例１３] ＳＨ基含有安定化アミノアシル化ｔＲＮＡを用いた翻訳合成

以下の実験で示すとおり、ＣｙｓのＳＨ基や主鎖アミノ基を保護すると、Ｃｙｓ自身と比較してアミノアシル化ｐｄＣｐＡの翻訳液モデル系中（HEPES buffer）の安定性が向上し、翻訳合成効率も向上することが示された。また、ＳＨ基の位置をα＿カルボン酸部位から遠くに配置させた、各種新規ＳＨ基含有各種非天然型アミノ酸の翻訳導入効率も向上された。

[0534] ２０ｎＭ 鋳型DNA AKC17（配列番号Ｄ—３１）もしくはKA03（配列番号Ｄ-６）に、前述の転写翻訳液、０．１ｍＭ 10-HCO-H4fo Late 、Met を除く各０．３ｍＭの１９種類のタンパク質性アミノ酸，および前記の方法で調製した２５~５０μＭ Xaa-tRNAfMetCAU (Xaa :Cys(StBu) , PenCys(StBu) , NVOC-Cys(StBu) , tBuSSEtG Ly, tBuSSEt βALa, tBuSSEtGABA) を加え、３７℃で３０分間翻訳した。翻訳反応物を、SPE C-TIP（日京テクノス社）で精製し、ＭＡＬＤＩ—ＭＳで分析したところ、Ｎ末端にＸａａが導入されたペプチドのＭＳが観測された（ＭＡＬＤＩ-ＭＳ）。

結果、Ｃｙｓと比較して、ＳＨ基やＮを保護すると、ｐｄＣｐＡ—アミノ

酸体の安定性が向上し、かつ翻訳合成効率も向上することが示された。また、Cysをより安定化させたSH含有各種非天然型アミノ酸の翻訳導入効率も向上された (図25、26参照)。

[0535] [表5]

ペプチド配列番号	icafiold	Xaa	計算値	実測値
P—34	KA03	tBuSSEtGly	1541.1	1541.8
P-35	KA03	tBuSSEtβAla	1555.1	1555.8
P—36	KA03	tBuSSEtGABA	1569.1	1569.7
P-38	AKC17	NVOC-Cys (StBu)	1961.8	1962.8
P-40	AKC17	PenCys (StBu)	1804.8	1805.8
P-41	AKC17	Cys (StBu)	1722.7	1723.7

[0536] 配列番号 D_31 (配列番号:7)

AKC17 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTAGAACTGCCTACTGGAG

CctTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGC

[0537] ペプチド配列番号 P_34~P_41のScaffold配列

KA03 ペプチド配列

[Xaa] ThrArgThrLysA LaTyrTrpSerLeuProGlyGLy

AKC17 ペプチド配列

[Xaa] ThrArgThrA LaTyrTrpSerLeuCysG LySerGLySerGLySer

[0538] [実施例14] Intiation suppression法を用いた翻訳および環化反応

1. 側鎖カルボン酸が活仲工ステル化されたアミノアシルtRNAの合成

以下の方法に従って、側鎖カルボン酸がチオエステル化されたアミノアシル化tRNAの合成を行なった。

[0539] 1—1. 転写によるtRNA (CA欠損)の合成

鋳型DNA (配列番号D—33)から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega社, P1300)を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNAEnAsnGAG (-CA) (配列番号R—33)を合成し、RNeasy Mi

ni kit (Qiagen 社) により精製した。

[0540] 配列番号D_33 (配列番号D_1と同一) (配列番号:1)

tRNAEnAsnGAG(-CA) DNA配列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTgagAATCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0541] 配列番号R_33 (配列番号R_1と同一) (配列番号:30)

tRNAEnAsnGAG(-CA) RNA配列:

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA

GCCGC

[0542] 1-2. 側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化DdCDA (化合物1_i) とtRNA_(CA欠損) (配列番号:R_33) のLigation によるアミノアシル化tRNA_(化合物AT—1) の合成

50 μM 転写tRNAEnAsnGAG(-CA) (配列番号R—33) 10 从Lに、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP) 2 μL、Nuclease free water 4 μLを加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールディングを行った。10 unit/μLのT4 RNAリガーゼ (New England Biolabs. 社) 2 μLおよび、5 mMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化pdCpA (化合物1i) のDMSO溶液 2 从1を加え、15℃で45分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液20 μLに、125 mM ヨウ素 (水:THF=1:1溶液) 4 从Lを加え、室温で1時間、脱保護を行った。アミノアシル化tRNA (化合物AT—1) は、フェノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化tRNA (化合物AT_1) は、翻訳混合物に添加する直前に1 mM酢酸ナトリウムに溶解した。

[0543] 化合物AT—1-IA2 (化合物AT—1_IAと同一)

Asp(SMe)-tRNAEnAsnGAG

[0544] 化合物番号 AT—1_IB2 (化合物AT—1—IBと同一)

Asp(S iPr)-tRNAEnAsnGAG

[0545] 化合物番号 AT—1_IC2 (化合物AT—1_ICと同一)

Asp(StBu)-tRNAEnAsnGAG

[0546] 化合物番号 AT—1_ID2 (化合物AT—1—IDと同一)

Asp(SBn)-tRNAEnAsnGAG

[0547] 化合物番号 AT—1_IE2 (化合物AT—1—IEと同一)

Asp(SPhenety L)-tRNAEnAsnGAG

[0548] 化合物番号 AT—1_IG2 (化合物AT—1_IGと同一)

Asp(SEt)-tRNAEnAsnGAG

[0549] 2._メチオニン以外のアミノ酸、_アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体をN末端に導入する方法を用いた翻訳合成およびアミド環化反応

鋳型DNAとしてKA03 DNA配列 (配列番号 D—6)を用いて翻訳反応を行った。

鋳型DNAに、前述の転写翻訳液、MetおよびLeuを除く各0.3mMの18種類のタンパク質性アミノ酸,および前記の方法で調製した25μM tBuSSEtGABA-tRNAfMetCAU (化合物番号 AT—6—C)と50μM Asp(SMe)-tRNAEnAsnGAG (化合物番号 AT—1_IA2)を加え37℃で3時間翻訳した。翻訳産物に、1/20(v/v)量の200mM TCEP(pH6.6)を添加し、37℃で15分反応させ、Asp(SMe)部位と分子内環化反応を行った。その結果、目的の環状ペプチド (ペプチド配列P—43)がMSスペクトルで確認された (図27)。チオエステルに続くアミノ酸をN—アルキルアミノ酸とすることで効率的に翻訳・環化が実現された。

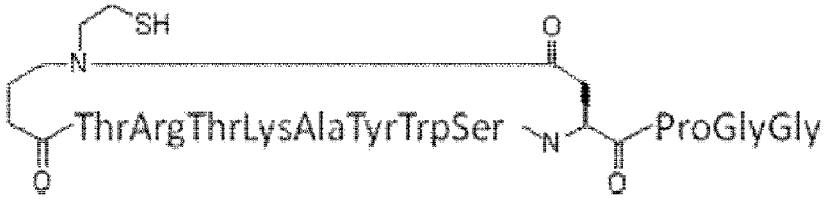
[0550] ペプチド配列P—42

[tBuSSEtGABA]ThrArgThrLysALaTyrTrpSer[Asp(SMe)]ProG LyG Ly

MALDI-MS :m/z : [M+H] + = 1601.7 (Ca Lc. 1601.0)

[0551] ペプチド配列P_43

[HSEtGABA]ThrArgThrLysALaTyrTrpSer[Asp(SMe)]ProG LyG LyのGABAの主鎖窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物



MALDI-MS :m/z： [M+H] + = 1465. 6 (Ca Lc. 1465. 0)

[0552] [実施例１５] Intioat ion read through 法を用いた翻訳および環化

1. NCL (Nat ive Chemical Ligat ion) を介したアミド型環化ペプチドの合成

鋳型ＤＮＡとしてKA02. 5U DNA配列 (配列番号 Ｄ—３２) を用いて翻訳反応を行った。

鋳型ＤＮＡに、前述の転写翻訳液、Ｍｅｔ およびＡｌａ、Leu を除く各０．３ｍＭの１７種類のタンパク質性アミノ酸，３ ｍＭ乳酸、および前記の方法で調製した５０μ, M Asp (SRex2) - t RNAEnAsnGAG (R ex2 :ベンジル，メチル，エチル，イソプロピル、ターシャリーブチル、フエネチル) (化合物番号 ＡＴ—１—ＩＡ２、ＩＢ２、ＩＣ２、ＩＤ２、ＩＥ２，ＩＧ２) を加え３７℃で3 時間翻訳した。その結果、環化した全長ペプチドがＭＳスペクトルで確認された (図２８〜図２９)。

[0553] 配列番号 Ｄ_３２ (配列番号 :２８)

KA02. 5U DNA配列:

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG

tgcACTAGAACTaaggcgTACTGGAGCc t tCCGggc t aa

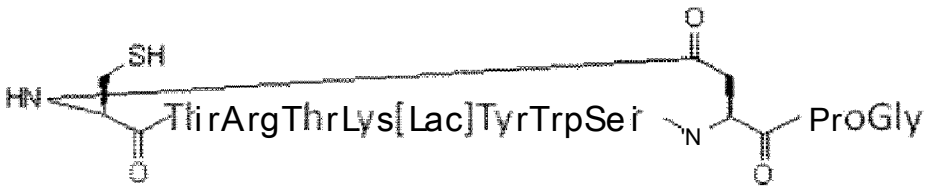
[0554] 翻訳ペプチド

CysTh rArgTh rLys [Lac] TyrTrpSe r[Asp (SRex2)] ProGLy

(R ex2 ：ベンジル、メチル、エチル、イソプロピル、ターシャリーブチル、フエネチル、Ｌａｃ：乳酸)

翻訳後、環化したペプチドの化学構造 (ペプチド配列番号P_４４ からP_４９)

CysTh rArgTh rLys [Lac] TyrTrpSe r[Asp (SRex2)] ProGLy のCys の主鎖アミノ基とAspの側鎖カルボン酸との分子内アミド化された化合物



[0555] [表6]

ペプチド配列番号	チオエステル Rex2	計算値(環化)	[M+H]+
P-44	Bn	1366.6	1367.7
P-45	Me	1366.6	1367.7
P-46	Et	1366.6	1367.7
P-47	iPr	1366.6	1367.7
P-48	tBu	1366.6	1367.7
P—49	phenethyl	1366.6	1367.7

[0556] 以上の結果からIninitiation read through 法によりCysが翻訳導入され、翻訳および環化がスムースに進行し、様々なチオエステル体から主生成物としてアミド環化体が得られることが明らかとなった。さらに、乳酸を含む本配列が有効に翻訳されたことから、乳酸がAlaRSにより選択的かつ効率的に導入できることが初めて明らかとなつた。

[0557] Initiation read through 法にて述べたように、アミンを活性化させる役割のSH基が保護されていない場合には、チオエステルに続く非天然型アミノ酸 (タンパク性アミノ酸も含む)はN—アルキル基を有するアミノ酸に拘らなくとも良い。翻訳後すぐにSH基との反応を経由してアミドが生成するためである。SH基が保護されたアミノ酸を翻訳させる場合には、翻訳工程終了後から脱保護工程に至る時間内にアスパルチミド形成される。

[0558] 2. 翻訳によるアミド環化ペプチドの構造決定

2_1._LC-MS分析用翻訳ペプチド調製

20nM 錶型DNA Mct ryg3 (配列番号D_8)に、前述の転写翻訳液、0.1mM 10-HCO-H4fo Late (10-formy L-5, 6, 7, 8, -tet rahydroph iLie acid)、MetおよびLeuを除く各0.3mMの18種類のタンパク質性アミノ酸,および前記の方法で調製した50μM Asp(SMe)-tRNAEnAsnGAG (化合物AT—1_IA)を加え、37℃で3時間翻訳した。翻訳反応物に1m

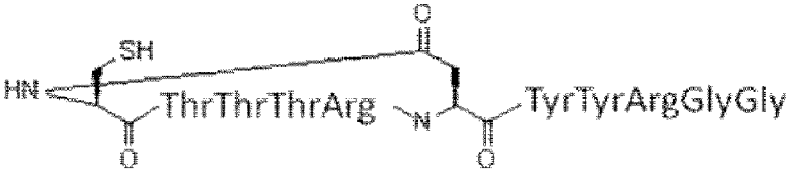
M ジチオスレイトールを添加し、３７℃で３０分間還元を行った後、１０mM ヨードアセトアミドを添加し、遮光'室温で４０分間、チオールのカルボキシアミドメチル化を行った。

[0559] ペプチド配列 P_52

CysThrThrThrArg[Asp(SMe)]TyrTyrArgG LyG Ly

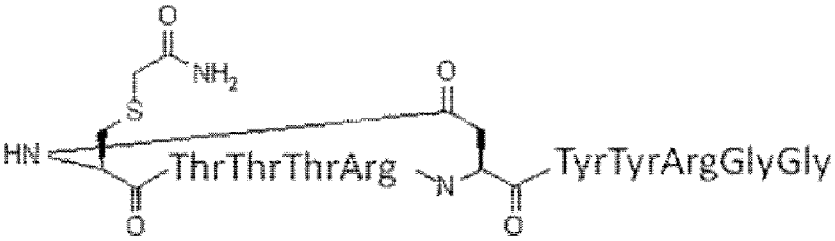
[0560] ペプチド配列 P_53 (配列番号 :59)

CysThrThrThrArg[Asp(SMe)]TyrTyrArgG LyG Ly のCysの主鎖アミノ基とAspの側鎖カルボン酸が分子内アミド環化された化合物 mass スペクトル calに 1273.6



[0561] ペプチド配列P_54 アセトアミド化後 Exact Mass Calc. 1330.6

CysThrThrThrArg[Asp(SMe)]TyrTyrArgG LyG Ly (ペプチド配列P_52) のCysの主鎖アミノ基とAspの側鎖カルボン酸が分子内アミド環化されたペプチド配列P—53のCysのSH基がアセトアミド化された化合物



[0562] 2-2. 翻訳合成品と同一の配列を有する《プチドの化学合成

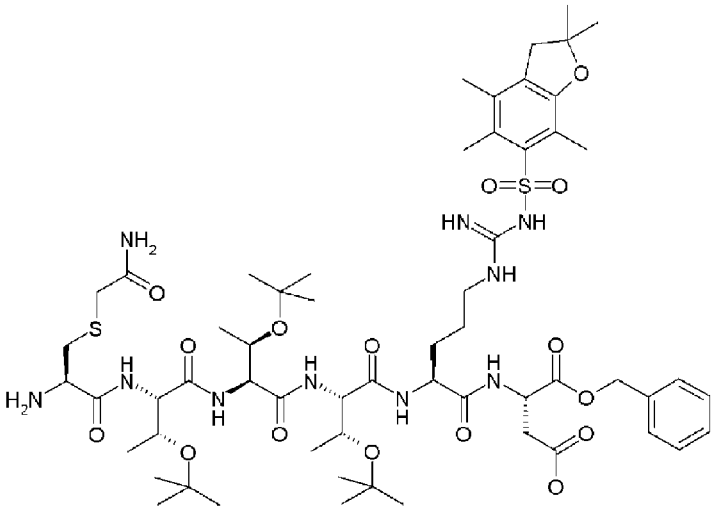
2-2-1. 自動合成機による《プチド固相合成の一般法

ペプチド合成機 (Multipep RS; Intavis社製) を用いて、Fmoc法によりペプチド合成を行った。Fmoc-Cys(Mmt)-OH をノバビオケム社から購入し、Fmoc-Cys(Mmt)-OH を除く他のFmocアミノ酸を渡辺化学工業から購入した。なお、操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

合成機にC末端のFmocアミノが結合した2_クロロトリチルレジン (1カラムあたり250—300mg) と、各種Fmocアミノ酸 (0.6m

ｏｌ/ Ｌ）と1－ヒドロキシー7－アザベンゾトリアゾール (ＨＯＡｔ）（0．375ｍｏｌ/ Ｌ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液と、ジイソプロピルカルポジイミド (ＤＩＣ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド (ＤＭＦ）溶液 (10％ｖ/ ｖ）をセットし、Ｆｍｏｃ脱保護溶液として、5％（ｗｔ/ ｖ）の尿素を含むピペリジンのＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (20％ｖ/ ｖ）、またはジアザビシクロウンデセン (ＤＢＵ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (2％ｖＺｖ）を用いて合成を行った。レジンはＤＭＦ溶液で洗浄した後、Ｆｍｏｃ脱保護に次いでＦｍｏｃアミノ酸の縮合反応を1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでレジン表面上にペプチドを伸長させた。このような実験例としてRamon Sub i ros-funosas らの非特許文献 (Org. Biomo L. Chem. 201 0, 8, 3665-3673) などを参考にして合成した。

[0563] 2－2－2．H-Cys(CH,CONH,)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp-OBn（ペプチドP―55）の合成



[0564] Ｆｍｏｃアミノ酸としてFmoc-Cys(Mmt)-OH，Fmoc-Thr (tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-0H （いずれも渡辺化学工業から購入）を用いた。合成機にFmoc-Asp-OBnが結合した2―クロロトリチルレジン (250 ｍｇ、13カラム、1．36ｍｍｏｌ）をセットし、ペプチドを固相合成した。

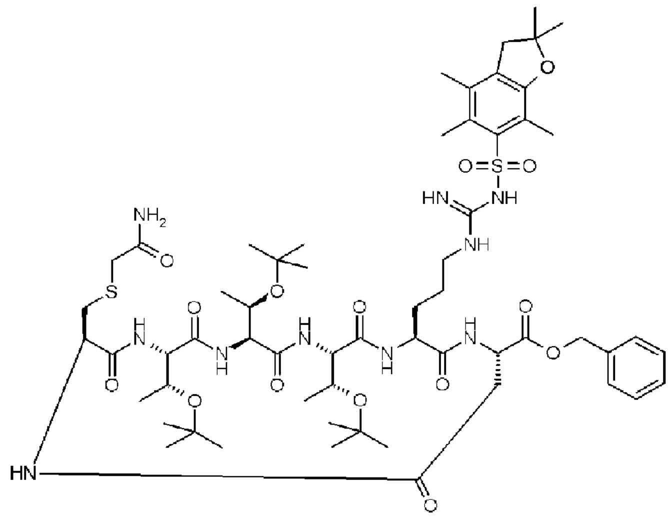
伸長終了後、レジンをジクロロメタンで洗浄し、トリフルオロ酢酸/ トリイソプロピルシラン/ ジクロロメタン (＝2／5／93，100ｍＬ）を加え、レジンからペプチドの切り出しとＳ―メトキシトリチル基の脱保護を行

た。1-6時間後、チューブを合成用カラムで濾過することにより樹脂を除き、反応液に2-ヨードアセトアミド（ISI mg、1.36 mmol）、DIPEA（ISI μL）、DMF（16 mL）を加え、Sのアルキル化を行った。1-5時間後、減圧濃縮し得られた残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液／0.1%ギ酸アセトニトリル溶液＝96/6→0/100）にて精製し、直鎖ペプチドH-Cys(CH_2CONH_2)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Asp-Arg(pbf)-Asp-OBn（ペプチドp-66）を得た。（180 mg、10%）

LCMS（ESI）m/z＝1262（M-H）-

保持時間：0.71分（分析条件SQDFA05）

[0666] 2-2-3. c(Cys(CH_2CONH_2)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Arg(pbf)-Asp)-OBn（ペプチドp-56）の合成



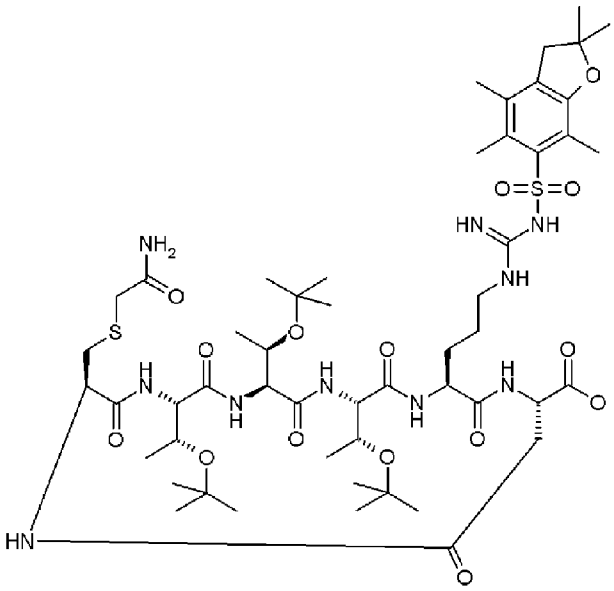
[0666] H-Cys(CH_2CONH_2)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Arg(pbf)-Asp-OBn（ペプチドp-55、180 mg）をジクロロメタン／ジメチルスルホキシド（9/1）（141 mL）に溶かし、O-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）（81 mg、0.214 mmol）と、ジイソプロピルエチルアミン（0.149 mL、0.856 mmol）を加え、攪拌した。1-6時間後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液／0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

= 5 0 / 5 0 → 0 / 1 0 0 ）にて精製し、環状ペプチドc(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr （tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-OBn （ペプチドP — 5 6 ）を得た。（9 2 m g 、 5 2 % ）

L C M S （E S I ） m / z = 1 2 4 6 （M + H ）+

保持時間 ：1 . 0 2 分 (分析条件S Q D F A 0 5 ）

[0567] 2 - 2 - 4 . c(Cys (CH$_2$CONH$_2$)- Thr(tBu) -Thr(tBu) -Thr(tBu) -ArgfPbf)-ASD)-0H（ペプチドP 5 7 ）の合成

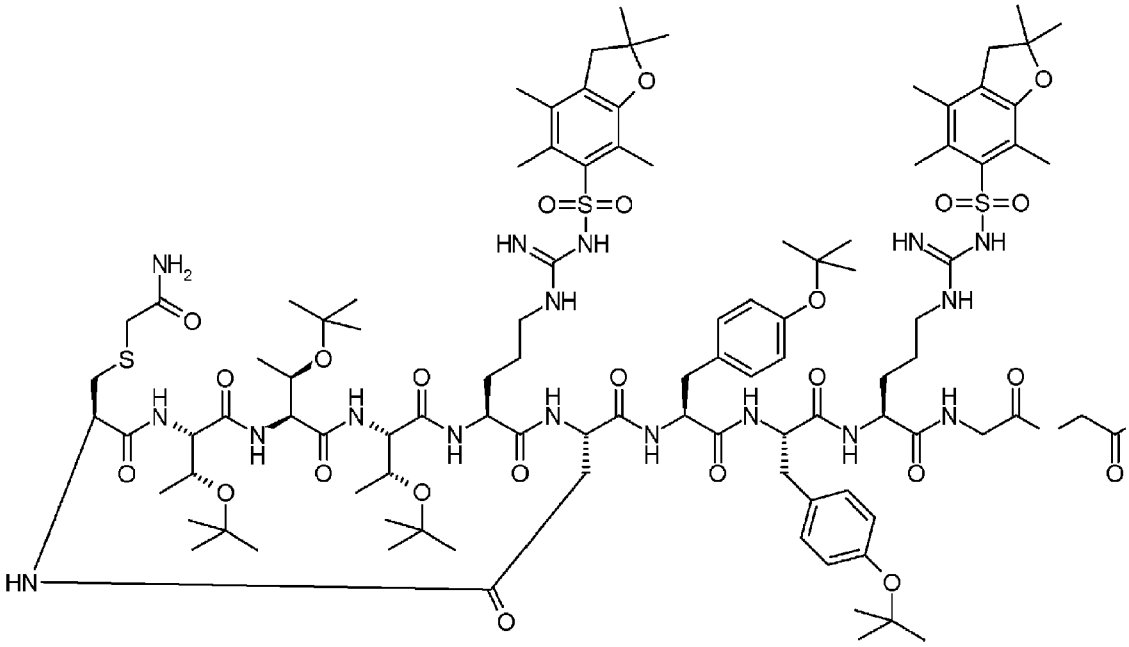


[0568] c(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-0Bn （ペプチドP — 5 6 、 9 0 m g ）をエタノール (2 m L ）に溶解させ、 1 0 % パラジウム炭素 (1 O O m g ）を加え、水素雰囲気下攪拌した。 1 8 時間後、反応液を減圧濃縮し、環状ペプチKc(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-OH （ペプチドP _ 5 7 ）を得た。 (7 2 m g 、 8 6 % ）

L C M S （E S I ） m / z = 1 1 5 6 （M + H ）+

保持時間 ：0 . 9 3 分 (分析条件3 0 D 「六0 5 ）

[0569] 2 - 2 - 5 . C(Cvs(CHXONH,)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arq(Pbf)-Asp)-Tyr (tBu)-Tvr (tBu)-Arq(Pbf)-G Ly-G Lv-OH （ペプチドP -5 8 ）の合成



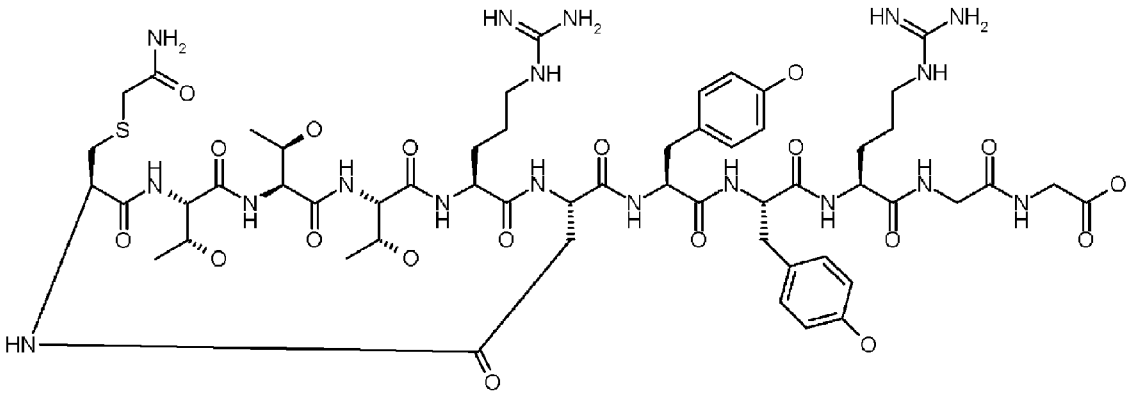
[0570] Ｆｍｏｃアミノ酸としてFmoc-G Ly-0H ，Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH（いずれも渡辺化学工業から購入）を用い、合成機にFmoc-G Ly-OHが結合した２＿クロロトリチルレジン (２５０ｍｇ）をセットし、H-Tyr (tBu)-Tyr (tBu)-Arg(Pbf)-G Ly-G Ly-OH配列を有するペプチド (ペプチドＰ—５９）を固相合成した。

上記レジンに、c(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-0H （ペプチドＰ—５７、４６ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）、１—ヒドロキシ—７—アザベンゾトリアゾール (Ｈ０Ａｔ）（５．４ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）ジイソプロピルカルポジイミド (ＤＩＣ）（０．０７５ｍＬ０．０４８ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド (ＤＭＦ）溶液を加えた。１７時間後、レジンをジクロロメタンで洗浄し、トリフルオロ酢酸/ ジクロロメタン (= 1/ ９９，４ｍＬ）を加え、レジンからペプチドの切り出しを行った。１．５時間後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、減圧濃縮し得られた残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝５０/ ５０→０/ １００）にて精製し、C(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-Tyr (tBu)-Tyr (tBu)-Arg(Pbf)-G Ly-G Ly-OH（ペプチドＰ—５８）を得た。（６．２ｍｇ、７．３％）

ＬＣＭＳ：１０５９ ｍ/ｚ （Ｍ＋２Ｈ）２＋

保持時間：０．８３分 (分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0571] ２－２－６．C(Cvs(CH $_2$CONH$_2$)-Thr-Thr-Thr-Arg-Asp)-Tvr-Tyr-Arg-G Lv-G Lv-0 H（ペプチドＰ＿５４）の合成



[0572] C(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Thr (tBu)-Arg(Pbf)-Asp)-Tyr (tBu)-Ty r (tBu)-Arg(Pbf)-G Ly-G Ly-OH（ペプチドＰ＿５８、6.2 mg）に、トリフルオロ酢酸/ トリイソプロピルシラン/ 水 (= 9/ 1/ 1, v/ v/ v、１ｍＬ）を加え、攪拌した。４時間後、減圧濃縮し得られた残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝９５/５→０/ １００）にて精製し、C(Cys(CH $_2$C0NH$_2$)-Thr-Thr-Thr-Arg-Asp)-Tyr-T yr-Arg-G Ly-G Ly-OH（ペプチドＰ—５４）を得た。（0．８ｍｇ、２０％）

ＬＣＭＳ：６６４ ｍ/ｚ （Ｍ－２Ｈ）２－、１３２９．４（Ｍ－Ｈ）－

ＬＣＭＳ：１３３１．４ ｍ/ｚ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４９分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0573] ２－３．翻訳ペプチドのＬＣ/ＭＳ分析による環化部位特定と構造決定

翻訳合成品（ペプチドＰ＿５４）と同一の配列を有する有機合成品を作製したので、高分解能ＬＣ/ＭＳ装置（Orbitrap Ve Los、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、ＵＳＡ）を用いて比較分析した。翻訳品については、翻訳溶液約３０ｕＬに０．５％トリフルオロ酢酸６０ｕＬを加え攪拌後、遠心分離上清をOasis HLBカートリッジ（３０ｍｇ、１ｃｃ、Waters Corporat ion、ＵＳＡ）にアプライした。０．５％トリフルオロ酢酸含有５％アセトニトリル溶液１ｍＬで洗浄後、０．５％トリフルオロ酢酸含有６０％ア

セトニトリル溶液１ｍＬで溶出した。溶出液を窒素乾固し、０．５％トリフルオロ酢酸含有２０％アセトニトリル溶液６０ｕＬに再溶解しＬＣ/ＭＳ分析に付した。翻訳産物の精密質量をポジティブイオンモードで測定した結果、ｍ/ｚ　６６６．２９３７に２価のプロトン化分子［Ｍ＋２Ｈ］$_2$+を与え、理論値ｍ/ｚ　６６６．２９３５と良く一致していた。高速液体クロマトダラフにおける保持時間ならびにＭＳ/ＭＳスペクトルパターンを有機合成品と比較した結果、いずれも良く一致していた。以上の結果、翻訳合成産物は有機合成による環化ペプチドと同一のものであることが確認された（図３０）。

[0574] ［実施例１６］翻訳合成、環化後の脱硫反応

翻訳合成にてアミド環化反応が進行した一方、我々の目的のためには反応補助基のＳＨ基の除去が必要となる。ＳＨ基は様々なタンパクと共有結合を形成することが知られているため、ＳＨ基依存的な結合化合物が得られる可能性が高い一方で、そのような化合物は高い反応性のため薬剤になりにくい。

ＳＨ基の除去には分子間反応が必要である。既に述べたように分子間反応を１ｕＭ濃度にて、かつ様々な反応性官能基が共存する条件下での実現の難易度は高い。このような反応を実現させる手法として、以下の２つが考えられる。(i)過剰に用いる試薬は、望みの反応点以外では可逆的な反応（例えば配位結合）のみが生じ、反応完結後の後処理により除去される。(ii)過剰に用いる試薬はＲＮＡには全く影響を与えない。

このような各種条件をクリアできる反応基質と反応条件を様々検討した結果を以下に示す。

[0575] １．モデル基質を用いたラジカル脱硫反応

モデル基質２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）―５＿（（（Ｒ）-１―エトキシ―３＿メルカプト―１―オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸　（Ｓ）―ベンジル（化合物３ａ）を用いてWanら（Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 9248）と同様の方法でラジカル

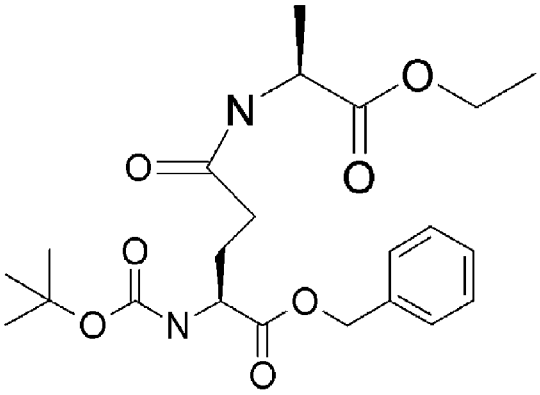
脱硫反応が進行することを確認した（図３１および図３２）。ラジカル脱硫反応としてＭｅｔｈｏｄＡ及びＭｅｔｈｏｄＢを行った。

[0576] １－１．ＭｅｔｈｏｄＡの実験例

以下、図３２に記載の実験を行った。

１－１－１．図３２　Ｅｎｔｒｙ　１の実験

２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－５－（（（Ｓ）－１－エトキシ－１－オキソプロパン－２－イル）アミノ）－５－オキソペンタン酸　（Ｓ）－ベンジル（化合物３ｂ）の合成



[0577] ２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－５－（（（Ｒ）－１－エトキシ－３－メルカプト－１－オキソプロパン－２－イル）アミノ）－５－オキソペンタン酸　（Ｓ）－ベンジル（化合物３ａ）（２０．０ｍｇ、０．０４２７ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（０．８ｍｌ）溶液に０．４Ｍ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（０．４２８ｍｌ、０．１７１ｍｍｏｌ）を加え室温で１５分間攪拌後、ｔＢｕＳＨ（０．０１４４ｍｌ、０．１２８ｍｍｏｌ）　１Ｍ　２，２'－アゾビス－２－（２－イミダゾリン－２－イル）プロパン（ＶＡ－０４４）水溶液（０．０４２７ｍｌ、０．０４２７ｍｍｏｌ）を加え、５０度で２時間半攪拌した。その後反応溶液に水を加え希釈後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／メタノール＝７０／３０→２０／８０）にて精製し、２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－５－（（（Ｓ）－１－エトキシ－１－オキソプロパン－２－イル）アミノ）－５－オキソペンタン酸　（Ｓ）－ベンジル（化合物３ｂ）（１８．１ｍｇ、９７％）を得

た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４３７ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９６分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0578] 反応に使用する試薬等は以下のように調製した。

０．４Ｍトリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）水溶液の調整

トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）塩酸塩 (1．０ｇ、３．４９ｍｍｏｌ）の水 (6．８ｍｌ）溶液にトリエチルアミン (1．６４ｍｌ）加え、ｐＨ７とし、０．４Ｍトリス (2＿カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）水溶液を得た。

[0579] １Ｍ ２，２'—アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿ィル）プロパン（ＶＡ-０４４）水溶液の調整

２，２'—アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿ィル）プロパン (ＶＡ-０４４）塩酸塩 (１００ｍｇ、０．３０９ｍｍｏｌ）に水 (0．３０９ｍｌ）加え１Ｍ ２，２'—アゾビス—２＿（２＿イミダゾリン—２＿ィル）プロパン (ＶＡ—０４４）水溶液を調整した。

[0580] ０．１Ｍ ２，２'—アゾビス—２＿（２＿イミダゾリン—２＿ィル）プロパン (ＶＡ—０４４）水溶液の調整

２，２'—アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿ィル）プロパン (ＶＡ-０４４）塩酸塩 (１００ｍｇ、０．３０９ｍｍｏｌ）に水 (3，０９ｍｌ）加え０．１Ｍ ２，２'—アゾビス—２＿（２＿イミダゾリン—２＿ィル）プロパン (ＶＡ—０４４）水溶液を調整した。

[0581] １-１-２．図３２ Ｅｎｔｒｙ２、Ｅｎｔｒｙ３の実験

２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－５＿（（（Ｓ）＿１＿エトキシ－１＿オキソプロパン＿２＿ィル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸＿＿(Ｓ)＿—ベンジル (化合物３ｂ)＿

２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿（（（Ｒ）＿１—エトキシ－３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）アミノ）－

5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3a) (10.Omg、0.0213mmol)のDMF (0.5ml)あるいはメタノール (0.5ml)溶液に、グルタチオン (19.7mg、0.064mmol)と0.4Mトリス (2—カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)水溶液 (0.214mし0.0852mmol)を加え室温で10分間攪拌後、1M 2,2'—アゾビス—2_(2_イミダゾリン—2_イル)プロパン (VA-044)水溶液 (0.0213mし0.0213mmol) を室温で加え、50度で2時間攪拌した。反応の変化をLCMSを用いて観測したところ、entry2は2時間で原料化合物3aがすべて消失し、目的の化合物3bが観測された。

LCMS (ESI) m/z = 437 (M+H)+

保持時間 :0.96分 (分析条件SQDAA05)

[0582] 1-1-3. 図32 Entry4の実験

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((S)-1-エトキシ—1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3b)

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((R)_1—エトキシ—3_メルカプト_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)—5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3a) (10.Omg、0.0213mmol)のメタノール (4.66ml)、水 (2.06ml)溶液に0.4Mトリス (2—カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)水溶液 (0.268mし0.107mmol)を加え室温で10分間攪拌後、1M 2,2'—アゾビス—2_(2_イミダゾリン—2_イル)プロパン (VA_044)水溶液 (0.0213mし0.0213mmol) を室温で加え、50度で1時間攪拌した。反応の変化をLCMSを用いて観測したところ、原料3aが完全には消失されなかったが、目的化合物3bが観測された。さらに、副生成物として、推定化合物3c、3dもまた観測された。その割合は、LCMS UVエリア強度比より、原料化合物3a:目

的化合物3ｂ：3ｃ：3ｄ＝７：２０：１６：１１であった。

化合物3ｂ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９６分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

構造推定化合物3ｃ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４５３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９１分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

構造推定化合物3ｄ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝３３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．８７分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0583] 1-1-4．図32　Ｅｎｔｒｙ5の実験

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_5_（（（Ｓ）-1-エトキシー1_ォキソプロパン_2_イル）アミノ）_5_ォキソペンタン酸（Ｓ）—ベンジル（化合物3ｂ）

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_5_（（（Ｒ）_1—エトキシー3_メルカプト_1_オキソプロパン_2_イル）アミノ）ー5_オキソペンタン酸（Ｓ）—ベンジル（化合物3ａ）（10．Ｏｍｇ、0．０２１３ｍｍｏｌ）のメタノール（4．６６ｍｌ）、水（0．２０ｍｌ）溶液にグルタチオン（１９６ｍｇ、0．６３９ｍｍｏｌ）と0．４Ｍトリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（0．２６８ｍし0．１０７ｍｍｏｌ）を加え室温で１０分間攪拌後、１Ｍ　２，2'—アゾビス_2_（2_イミダゾリン—2_イル）プロパン（ＶＡ—０４４）水溶液（0．０２１３ｍし0．０２１３ｍｍｏｌ）　を室温で加え、５０度で1時間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測したところ、原料3ａが完全には消失され、目的化合物3ｂが観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９６分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0584] 1-1-5．図32　Ｅｎｔｒｙ6の実験

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)ー5_((((S)_1_エトキシー1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_5_オキソペンタン酸___(S)_—ベンジル (化合物3b)_

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_(((R)_1—エトキシー3_メルカプト_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)ー5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3a) (10.Omg、0.0213mmol)のメタノール (4.66ml)、水 (2.06ml)溶液にグルタチオン (19。6mg、0.0639mmol)と0.4Mトリス (2_カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)水溶液 (0.268mし0.107mmol)を加え室温で10分間攪拌後、1M 2,2'—アゾビスー2_(2_イミダゾリンー2_イル)プロパン (VA—044)水溶液 (0.0213mし0.0213mmol) を室温で加え、50度で1時間攪拌した。反応の変化をLCMSを用いて観測したところ、原料3aが完全には消失され、目的化合物3bが観測された。さらに、副生成物として、推定化合物3c、3dもまた観測された。その割合は、LCMS UVエリア強度比より、原料化合物3a :目的化合物3b :3c :3d=0 :79 :14 :6であった。

化合物3b

LCMS (ESI) m/z =437 (M+H)+

保持時間 :0.96分 (分析条件SQDAAO5)

構造推定化合物3c

LCMS (ESI) m/z =453 (M+H)+

保持時間 :0.91分 (分析条件SQDAAO5)

構造推定化合物3d

LCMS (ESI) m/z =337 (M+H)+

保持時間 :0.87分 (分析条件SQDAAO5)

[0585] 1-1-6. 図32 Entry7の実験

2-(上tert—ブトキシカルボニル)アミノ)-5-((((S)-1-

エトキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_５_オキソペンタン酸___(S)_—ベンジル　(化合物３ｂ)_

２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（（（R）_１—エトキシー３_メルカプト_１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）ー５_オキソペンタン酸　(S)—ベンジル　(化合物３ａ)（１０．Ｏｍｇ、０．０２１３ｍｍｏｌ）のメタノール　(０．５ｍｌ）溶液に０．４Ｍトリス（２—カルボキシエチル）ホスフィン　(ＴＣＥＰ）水溶液　(０．２６８ｍｌ、０．１０７ｍｍｏｌ）を加え室温で１０分間攪拌後、１Ｍ　２，２'—アゾビス—２_（２_イミダゾリン—２_イル）プロパン　(ＶＡ—０４４）水溶液　(０．０２１３ｍし　０．０２１３ｍｍｏｌ）を室温で加え、５０度で１時間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測したところ、原料３ａが完全に消失され、目的化合物３ｂが観測された。さらに、副生成物として、推定化合物３ｃ、３ｄもまた観測された。その割合は、ＬＣＭＳ　ＵＶエリア強度比より、原料化合物３ａ：目的化合物３ｂ：３ｃ：３ｄ＝０：２４：３２：１９であった。

化合物３ｂ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９６分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

構造推定化合物３ｃ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝４５３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９１分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

構造推定化合物３ｄ

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝３３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８７分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0586] １-２．Ｍｅｔｈｏｄ　Ｂの実験例

Ｍｅｔｈｏｄ　Ａとほぼ同様の製造方法であるが、２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（（（R）_１—エトキシー３_メルカプトー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_５_オキソペンタン酸

（Ｓ）―ベンジル （化合物３ａ）のＭｅＯＨ＿Ｈ２Ｏ溶液に０．４Ｍ トリス（２＿カルボキシエチル）ホスフィン （ＴＣＥＰ）水溶液、ダルタチオンを加え、目的の反応温度３０度、４０度あるいは５０度に加熱後 １Ｍ ２，２'―アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿イル）プロパン （ＶＡ―０４４）水溶液を加え、そのまま３０度、４０度あるいは５０度の反応温度で攪拌した。反応の経時変化をＬＣ＿ＭＳを用いて観測した。

[0587] 尚、０．４Ｍ トリス （２―カルボキシエチル）ホスフィン （ＴＣＥＰ）水溶液の調整は以下のように行った。

トリス （２―カルボキシエチル）ホスフィン （ＴＣＥＰ）塩酸塩 （１．０ｇ、３．４９ｍｍｏｌ）の水 （６．８ｍｌ）溶液にトリエチルアミン （１．６４ｍｌ）加え、ｐＨ７とし、０．４Ｍ トリス （２＿カルボキシエチル）ホスフィン （ＴＣＥＰ）水溶液を得た。

[0588] また、１Ｍ ２，２'―アゾビス―２＿（２＿イミダゾリン―２＿イル）プロパン （ＶＡ―０４４）水溶液の調整は以下のように行った。

２，２'―アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿イル）プロパン （ＶＡ－０４４）塩酸塩 （１００ｍｇ、０．３０９ｍｍｏｌ）に水 （０．３０９ｍｌ）加え１Ｍ ２，２'―アゾビス―２＿（２＿イミダゾリン―２＿イル）プロパン （ＶＡ―０４４）水溶液を調整した。

[0589] １―２―１．図３２ Ｅｎｔｒｖ８の実験

２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－５＿（（（Ｓ）＿１＿エトキシ－１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸 （Ｓ）＿―ベンジル （化合物３ｂ）＿

２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿（（（Ｒ）＿１―エトキシ－３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）－５＿オキソペンタン酸 （Ｓ）―ベンジル （化合物３ａ）（１．１ｍｇ、０．００２３ｍｍｏｌ）のメタノール （０．５ｍｌ），水 （０．０６ｍｌ）溶液に０．４Ｍ トリス （２―カルボキシエチル）ホスフィン （ＴＣＥＰ）水溶液 （０．１９２ｍｌ ０．０９２ｍｍｏｌ）を加え５０度で１０分間攪拌後

、０．１Ｍ　２，２'―アゾビス―２＿（２＿イミダゾリン―２＿イル）プロ
め　（ＶＡ―０４４）水溶液（０．０２３ｍし０．００２３ｍｍｏｌ）
を５０度で加え、その後、５０度で３０分間攪拌した。反応の変化をＬＣＭ
Ｓを用いて観測したところ、原料３ａが完全に消失され、目的化合物３ｂが
観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0590] １―２―２．　図３２　Ｅｎｔｒｙ９の実験

２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ー５＿（（（Ｓ）＿１＿
エトキシー１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン
酸　（Ｓ）ーベンジル（化合物３ｂ）

２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿（（（Ｒ）＿１
―エトキシー３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）ー
５＿オキソペンタン酸　（Ｓ）―ベンジル（化合物３ａ）（１．１ｍｇ、０
．００２３ｍｍｏｌ）のメタノール（０．５ｍｌ），水（０．０６ｍｌ）溶
液にグルタチオン（２１．２ｍｇ、０．０６９ｍｍｏｌ）と０．４Ｍトリス
（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（０．１９２ｍｌ
、０．０９２ｍｍｏｌ）を加え５０度で１０分間攪拌後、０．１Ｍ　２，２'
―アゾビスー２＿（２＿イミダゾリンー２＿イル）プロパン（ＶＡ―０４４
）水溶液（０．０２３ｍし０．００２３ｍｍｏｌ）　を５０度で加え、そ
の後、５０度で３０分間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測した
ところ、原料３ａが完全に消失され、目的化合物３ｂが観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[059 1] １―２―３．　図３２　Ｅｎｔｒｙ１０の実験

２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ー５＿（（（Ｓ）＿１＿
エトキシー１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン
酸．（Ｓ）－ベンジル（化合物３ｂ）

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((((R)_1—エトキシー3_メルカプト_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)ー5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3a) (1.1mg、0.0023mmol)のメタノール (0.5ml),水 (0.06ml)溶液に0.4Mトリス (2—カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)水溶液 (0.192mし0.092mmol)を加え40度で15分間攪拌後、0.1M 2,2'—アゾビス—2_(2_イミダゾリン—2_イル)プロパン (VA—044)水溶液 (0.023mし0.0023mmol)を40度で加え、40度で30分間攪拌した。反応の変化をLCMSを用いて観測したところ、原料3aが完全に消失され、目的化合物3bが観測された。

LCMS (ESI) m/z = 437 (M+H)+

保持時間 :0.96分 (分析条件SQDAAO5)

[0592] 1-2-4. 図32 Entry11の実験

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((((S)-1-エトキシー1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_5_オキソペンタンi発 (S)—〃ンジル (化合物3b)

2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_5_((((R)_1—エトキシー3_メルカプト_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)ー5_オキソペンタン酸 (S)—ベンジル (化合物3a) (1.1mg、0.0023mmol)のメタノール (0.5ml),水 (0.06ml)溶液にグルタチオン (21.2mg、0.069mmol)と0.4Mトリス(2—カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)水溶液 (0.192ml、0.092mmol)を加え40度で15分間攪拌後、0.1M 2,2'—アゾビスー2_(2_イミダゾリンー2_イル)プロパン (VA—044)水溶液 (0.023mし0.0023mmol)を40度で加え、その後40度で30分間攪拌した。反応の変化をLCMSを用いて観測したところ、原料3aが完全に消失され、目的化合物3bが観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝４３７（M+H）+

保持時間：0．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0593] 1—2—5．図３２ Ｅｎｔｒｙ１２の実験

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ー５_（（（Ｓ）_１_エトキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_５_オキソペンタン酸_（Ｓ）_—ベンジル（化合物３ｂ）

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（（（Ｒ）_１—エトキシー３_メルカプト_１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）ー５_オキソペンタン酸 （Ｓ）—ベンジル（化合物３ａ）（１．１ｍｇ、０．００２３ｍｍｏｌ）のメタノール（０．５ｍｌ），水（０．０６ｍｌ）溶液に0．４Ｍ トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（０．１９２ｍし ０．０９２ｍｍｏｌ）を加え３０度で１５分間攪拌後、０．１Ｍ ２，２'—アゾビス—２_（２_イミダゾリン—２_イル）プロめ （ＶＡ—０４４）水溶液（０．０２３ｍし ０．０００２３ｍｍｏｌ）を３０度で加え、その後３０度で１時間３０分間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測したところ、原料３ａが完全に消失され、目的化合物３ｂが観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝４３７（M+H）+

保持時間：0．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0594] 1—2—6．図３２ Ｅｎｔｒｙ１３の実験

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ー５_（（（Ｓ）_１_エトキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_５_オキソペンタン酸_（Ｓ）_—ベンジル（化合物３ｂ）

2-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（（（Ｒ）_１—エトキシー３_メルカプト_１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）ー５_オキソペンタン酸 （Ｓ）—ベンジル（化合物３ａ）（１．１ｍｇ、０．００２３ｍｍｏｌ）のメタノール（０．５ｍｌ），水（０．０６ｍｌ）溶液にグルタチオン（２１．２ｍｇ、０．０６９ｍｍｏｌ）と0．４Ｍ トリス

（２＿カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（0．１９２ｍｌ、０．０９２ｍｍｏｌ）を加え３０度で１５分間攪拌後、０．１Ｍ　２，２'―アゾビス－２＿（２＿イミダゾリン－２＿イル）プロパン（ＶＡ―０４４）水溶液（0．０２３ｍし　０．０００２３ｍｍｏｌ）を３０度で加え、その後３０度で1時間３０分間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測したところ、原料３ａが完全に消失され、目的化合物３ｂが観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝４３７（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0595] 図３２に示す通り、様々な条件でラジカル脱硫反応を検討した。Ｅｎｔｒｙ４，６，７において、チオールの総量が低濃度である場合、ｍｅｔｈｏｄＡでは３ｃ、３ｄが副生成物として観測された。DispLay Library（ペプチド低濃度）に適応させる為、チオールが低濃度でも副生成物３ｃ，３ｄが生成しない条件を検討したところ、ラジカル開始剤（ＶＡ―０４４）を反応溶液加熱下加える（ＭｅｔｈｏｄＢ）ことで副生成物３ｃ，３ｄの生成を抑えることができた。（ｅｎｔｒｙ８，１０，１２）

[0596] 結果、チオエステルを側鎖に持つアスパラギン酸誘導体をカルボン酸誘導体として翻訳導入させ、アミノ基としてＣｙｓあるいはその誘導体をＮ末端に翻訳導入させた後、これらを環化させる手法を見出した。initiata ion read-through 法によってＮ末端にＣｙｓを導入した場合、Ａｓｐ（ＳＢｎ）をペプチドに翻訳導入することによって目的の環状ペプチドが得られた。

[0597] ２．脱硫反応におけるＲＮＡ安定性評価

ＲＮＡ化合物を脱硫反応の条件に付し、安定性の確認を行った。

[0598] ２－１．5'-AGCUUAGUCA-ピューロマイシン-3´（化合物RP-1、（配列番号：１７８））の合成

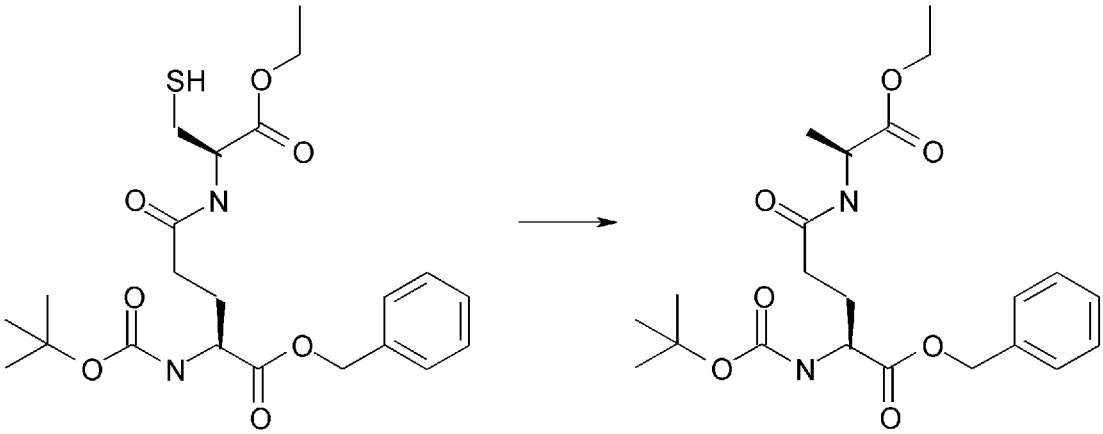
ダレンリサーチ社製ピューロマイシンCPG（２２．７ｍｇ、０．９９９μｍｏｌ）を用い、DNA合成機によりRNA結合伸長を行った。A、G、C、Uの伸長反応に用いるアミダイド試薬はグレンリサーチ社製Ａ―Ｔ０Ｍ―ＣＥホスホアミダイド、Ｇ＿Ｔ０Ｍ＿ＣＥホスホアミダイド、Ｃ＿Ｔ０Ｍ＿ＣＥホスホア

ミダイド、U_T0M_CEホスホアミダイドを使用し、縮合活性化剤として5_ベンジルチオ—1H—テトラゾールを使用し実施した。縮合後の固相担体を乾燥後、エタノール (0.25mい、40%メチルアミン水溶液 (0.25mL) を加え65℃にて1時間攪拌した。固相担体を濾別し、メタノール (0.5mいで洗浄した。得られた溶液を濃縮しメタノール (1.OmL) に溶解し、そのうち0.8mLを濃縮しテトラメチルアンモニゥムフルオライド水和物 (50从ぃに溶かし65℃にて15分間攪拌した。反応液に0.1M酢酸アンモニゥム水溶液を加え逆相カラムで精製した。濃縮後、得られた化合物を再度逆相カラムで精製した。得られた溶液に水を加え逆相カラムに添着後、水 (30mいで洗浄したのちメタノール (50mいで目的物を溶出した。得られた溶液を濃縮し水 (1.0mL) に溶解し5'-AGCUUAGUCA-ピユ—ロマイシン-3' (化合物RP-1) 水溶液を得た。

LCMS (ESI) m/z = 1224.6 (M-3H)3-

保持時間 :0.38分 (分析条件SQDAAO5)

[0599] 2-2_脱硫反応による2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-5-((S)-1-エトキシ-1-ォキソプロパン-2-イル)アミノ)-5-ォキソペンタン酸 (S)-ベンジル (化合物5e_2)_の合成とその反応条件における5'-AGCUUAGUCA-ピユ—ロマイシン-3'_(化合物RP-1)_の安定忡評価



5'-AGCUUAGUCA-ピユ—ロマイシン-3' (化合物RP-1) 水溶液 (10^L)、標準物質として5mM 3—フヱニル安息香酸メタノール溶液 (10バい、5mM 2-((tert—プトキシカルボニル)アミノ)_4_((R

）＿１―エトキシー３＿メルカプト＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿４＿オキソブタン酸　(S)―ベンジル (化合物５ｃ―２）メタノール溶液 (5μい、１００ｍＭ ダルタチオン水溶液 (１５μい、トリエチルアミンを使用しｐＨを７．１に事前調整した０．４Ｍ トリス (2―カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）水溶液 (5μい、１０ｍＭ ２，２'―アゾビス＿２＿（２＿イミダゾリン―２＿イル）プロパン水溶液 (5れい を混合し５０℃にて２時間反応した。反応液をＬＣ/ ＭＳで分析し5'-AGCUUAGUCA-ピューロマイシン-3' (化合物RP-1）の残存量に変化がないことが確認された。この条件において２＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）-５-（（（Ｒ）―１―エトキシー３―メルカプトー１―オキソプロパンー２＿イル）アミノ）＿５＿オキソペンタン酸　(S)―ベンジル (化合物５ｃ-２）は消失し脱硫反応の生成物である2-((tert-プトキシカルボニル)アミノ)-5-((S)-1-エトキシ-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-5-オキソペンタン酸 (S)-ベンジル (化合物５ｅ＿２）が確認された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ = ４３７．３ (Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．９６分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0600] このように脱硫反応が進行する反応条件においてＲＮＡが反応することなく安定に存在することが確認された。

[0601] ２．翻訳反応

以下の方法により翻訳を行った。

鋳型ＤＮＡ配列番号Ｄ―３４として以下の配列を用いて翻訳反応を行った。

[0602] 配列番号 Ｄ＿３４ (配列番号 :２９）

Met ryg3― 08U05U :GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGtgcACTACAACGCGTc tttactaccg tggcggcTAGTAGATAGATA

[0603] 反応系中において、アミノ酸はメチオニンを除く１９種類のタンパク質性アミノ酸を加えた。その結果、開始コドンにコードされるメチオニンが欠如し、二番目のコドンにコードされるシスティンから翻訳が開始したペプチド

を合成した。この反応液に、ＶＡ—０４４　（２５０ｍＭ）、ＴＣＥＰ（２ＯＯｍＭ）、Ｌ—システィン（２０ｍＭ）を加えて、４０℃で１時間反応させた。その結果、ペプチド鎖中のシスティン側鎖のＳＨ基が脱硫され分子量が３２減少したＭＳスペクトルが確認された（図３３）。

[0604] ペプチド番号Ｐ＿５０　脱硫前　（配列番号：３８）

CysThr ThrThrArgLeuTyrTyrArgGLyGLy

(Ca Lc. 1289. 6)

[0605] ペプチド番号Ｐ＿５１　脱硫後　（配列番号：５８）

ALaThr ThrThrArgLeuTyrTyrArgGLyGLy

m/z： [M+H] + = 1258. 7 (Ca Lc. 1257. 7)

[0606] ［実施例１７］環化脱硫反応下での蛋白変性の評価

脱硫反応液によるタンパク質変性の評価を行った（図３４）。モデル系として、電気化学発光免疫測定法によるＩＬ＿６およびＩＬ—６Ｒの相互作用検出系において、脱硫反応条件が、ＩＬ—６Ｒに対して、どのような影響を及ぼすか評価した。まず、MSD Mu Lt i-ar ray 384 we LL（ＭＳＤ社）に７５０ｎｇの抗ＩＬ＿６Ｒ抗体クローン番号１７５０６（R&D biosystems 社）を4度で一晩保存し、抗体の固相化を行った。８０从1のＰＢＳＴでプレートを三回洗浄し、未反応の抗体を除いた後、２％スキムミルクで１時間プロツキングを行った。プロッキング剤を８０μｌのＰＢＳＴでプレートを三回洗浄後、１０μｌのsolub le human ＩＬ-６Ｒ（ＩＬ-６Ｒ）を２５ｎＭ加え、室温で５０分間振とうした。８０从ＩのＰＢＳＴでプレートを三回洗浄し、脱硫反応液（２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ-Ｋ（ｐＨ７．６），２００ｍＭ　ＴＣＥＰ，２５ＯｍＭ　ＶＡ-０４４，１０ｍＭ　Ｃｙｓ）を添加し、室温で５０分間振とうした。８０从ＩのＰＢＳＴでプレートを三回洗浄し、１０从1のｕｍａｎ　ＩＬ-６-ＢＡＰ（５００ｎＭ）を添加し、室温で５０分間振とうした。８Ｏμｌの ＰＢＳＴでプレートを三回洗浄し、１０μＬ SULFO-TAG StAv（ＭＳＤ社，ｃａｔ＃Ｒ３２ＡＤ＿５，１从g/ ｍＬ）を添加後、室温で５０分間振とうした。８０从ＩのＰＢＳＴでプレートを三回洗浄し、３５从

Ｉの2X read buffer （ＭＳＤ社，Ｒ９２ＳＣ—３）を添加後、SECTOR Imager 2400 （ＭＳＤ社）で測定した (図３４）。

その結果、脱硫反応液を添加することで、ＩＬ６—Ｒが影響を受け、ＩＬ_６との相互作用が弱まることが示された。また、脱硫反応液に、酸化型のＤＴＴ（ＤＴＴｏｘ）を添加することで、IL— ６Rへの影響が弱まり、IL— 6との相互作用が回復することが示された。

[0607] [実施例１８] チオエーテル化法との比較

チオエーテル環化法と本発明の環化法の比較を行った。脂質膜透過速度が速いと考えられる脂溶性が高いチオエーテル環化ペプチドを合成した。

1．チォエーテル環化《プチドのさ成

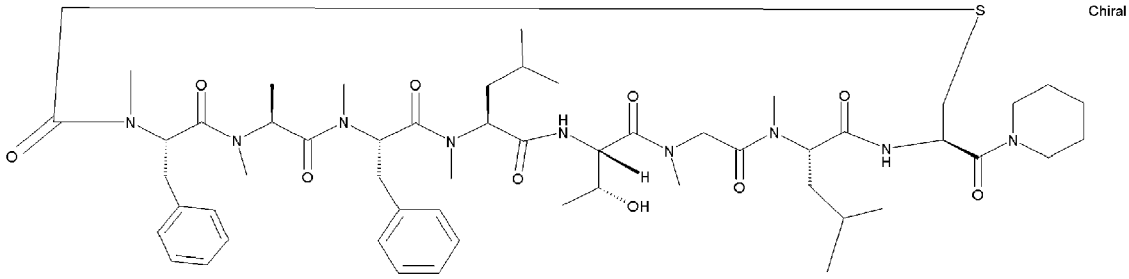
Ｆｍｏｃアミノ酸として、Fmoc-MePhe-OH 、Fmoc-MeALa-OH 、Fmoc-MeLeu-OH 、Fmoc-MeG Ly-OH、Fmoc-Mel Le-0H 、Fmoc-Ser (tBu)-0H 、Fmoc-Thr (Trt)-0H 、Fmoc-Ser (Trt) —0H、Fmoc—Phe—0H、Fmoc—Bip—0H、Fmoc—Leu—0H、Fmoc_Cha_0H 、Fmoc-ALa-0H 、Fmoc-Cys (Mmt) OHなどを用いてペプチドの伸長を行った (略語は渡辺化学カタログによる）。ペプチドの伸長後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を脱保護し、ＨＯＡｔ，ＤＩＣを縮合剤としてクロロ酢酸を縮合させた後、レジンをジクロロメタンにて洗浄した。レジンにトリフルオロ酢酸/ ジクロロメタン/ ２，２，２—トリフルオロエタノール/ トリイソプロピルシラン (= 1/ 62/ 31/ 6，v/ v/ v/ v、４ｍＬ）を加えて２時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しと同時に0_トリチル基、Ｓ—ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、反応液をジイソプロピルエチルアミン（1ｍＬ）溶液を入れたチューブに反応液を加え、クロロアセチル基とシスティンとの環化反応を行った。反応終了後、溶媒を留去した。得られた租生成物を、ＤＭＦ中、ピペリジン (1．９ｅｑ．）0-（７—アザー１Ｈベンゾトリアゾール_１_イル）_Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルゥロニゥム ヘキサフルオロホスフエート (ＨＡＴＵ）（１．７ｅｑ．）にてＣ末端カルボン酸のピペリジンアミド化を行った。反応終了後、Ｇｅｎ

ｅｖａｃにて溶媒留去した。得られた粗生成物はジメチルスルホキシドに溶解し、得られたペプチド溶液は高速逆相クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で精製した。

[0608] 化合物Ｐ＿１０１

Ac*-MePhe-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Cys*-piperidine

（２つの*部位にて環化）



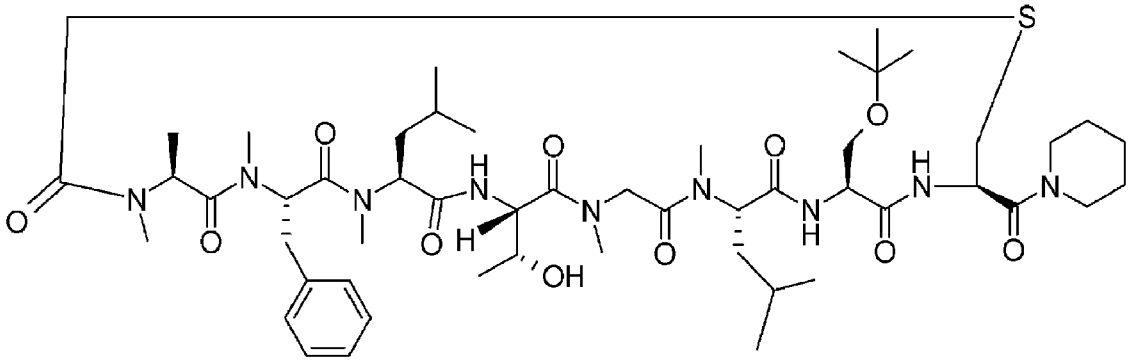
ＬＣＭＳ：1063 m/z （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0.77分 (分析条件 SQDAA50)

[0609] 化合物Ｐ＿１０２

Ac*-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Ser(tBu)-Cys*-piperidine

（２つの*部位にて環化）



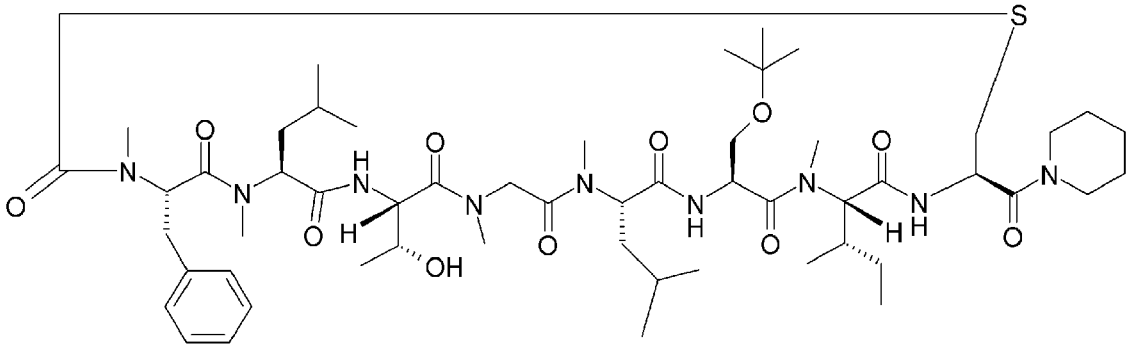
ＬＣＭＳ：1045 m/z （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0.76分 (分析条件 SQDAA50)

[0610] 化合物Ｐ＿１０３

Ac*-MePhe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Ser(tBu)-MeIle-Cys*-piperidine

（２つの*部位にて環化）



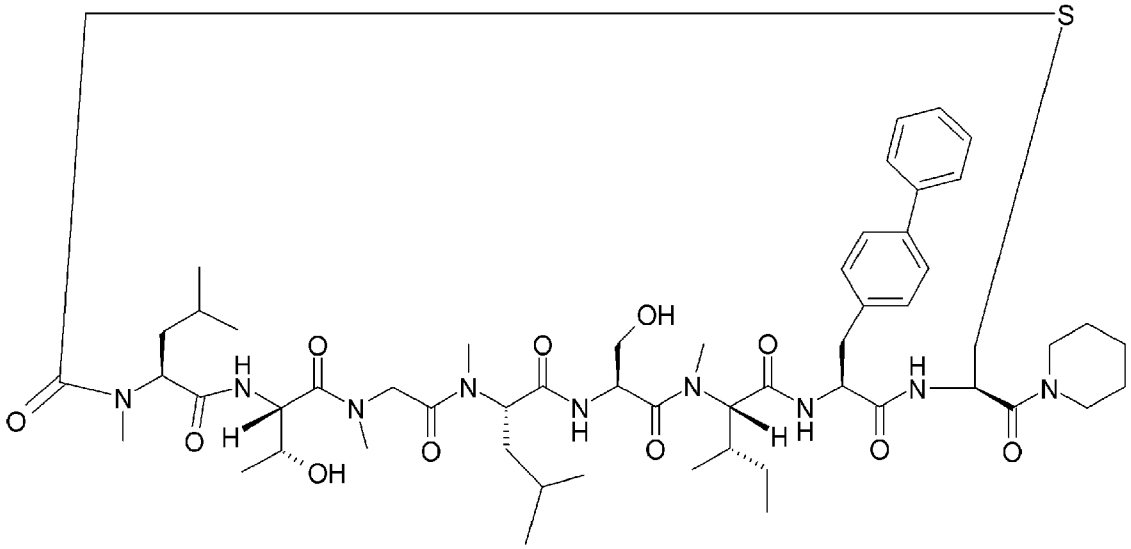
LCMS :1087 m/z (M+H)+

保持時間 :2.72分 (分析条件 ZQAA50)

[0611] 化合物P_104

Ac*-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Ser-MeLeu-Bip-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



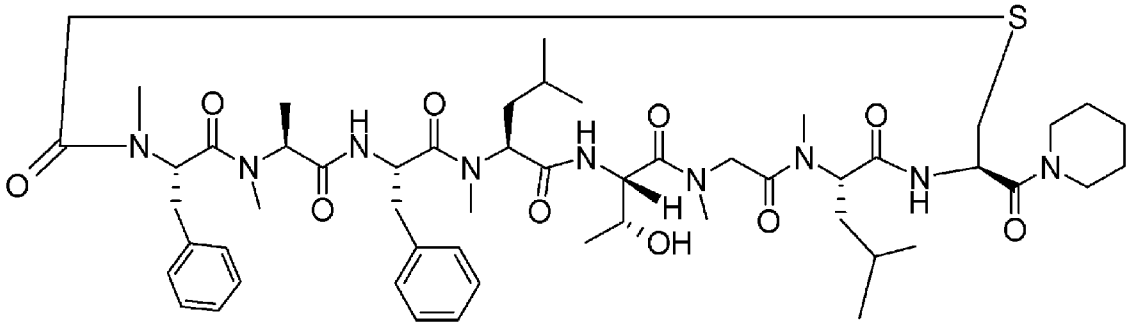
LCMS :1093 m/z (M+H)+

保持時間 :2.52分 (分析条件 ZQAA50)

[0612] 化合物P_105

Ac*-MePhe-MeALa-Phe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



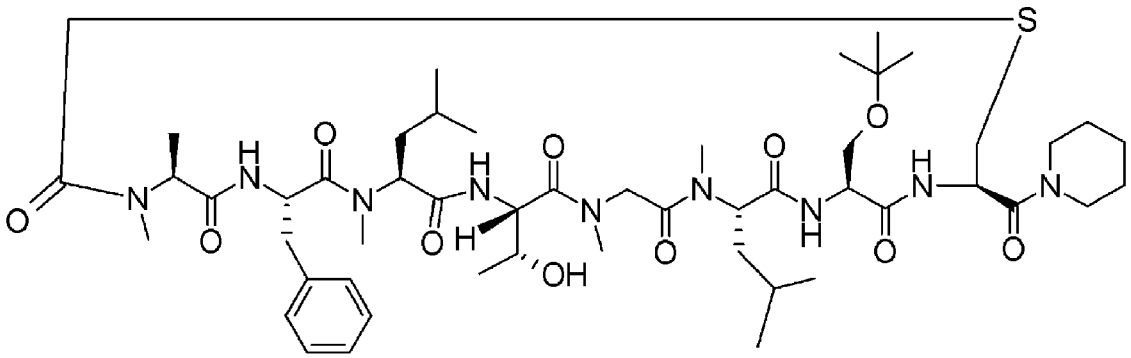
LCMS :1049 m/z (M+H)+

保持時間 :0.77分 (分析条件 SQDAA50)

[0613] 化合物P_106

Ac*-MeALa-Phe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



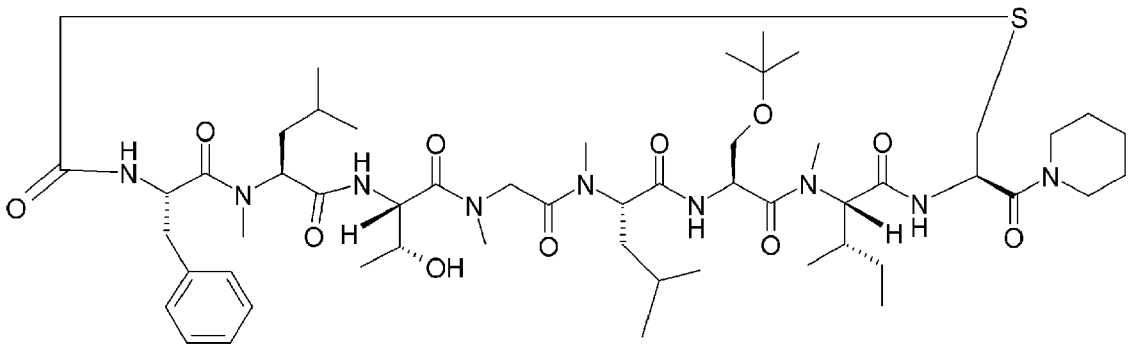
LCMS :1031 m/z (M+H)+

保持時間 :0.74分 (分析条件 SQDAA50)

[0614] 化合物P_107

Ac*-Phe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-MeLeu-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



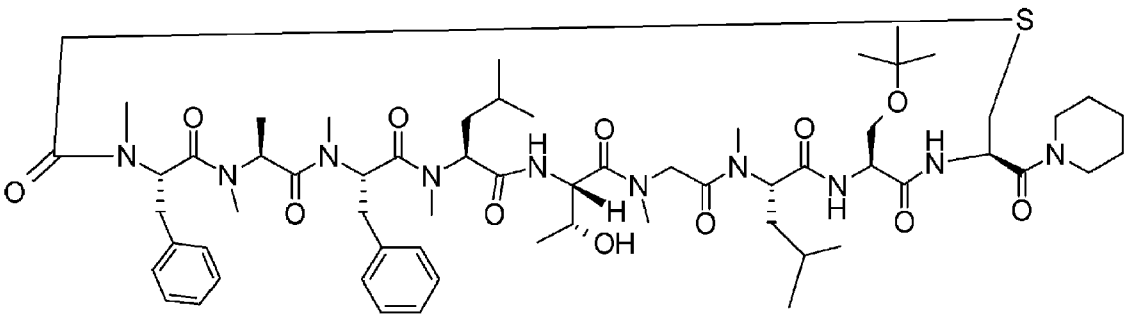
LCMS :1073 m/z (M+H)+

保持時間 :0.82分 (分析条件 SQDAA50)

[0615] 化合物P_108

Ac*-MePhe-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



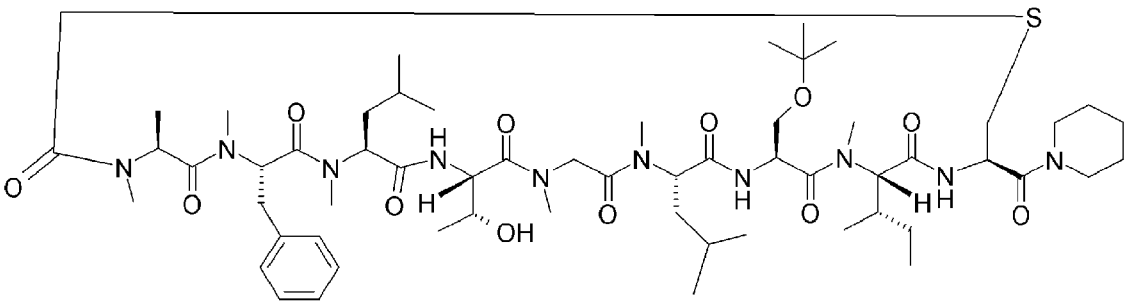
LCMS :1206 m/z (M+H)+

保持時間 :2.60分 (分析条件 ZQAA50)

[0616] 化合物P_109

Ac*-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-MeLeu-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



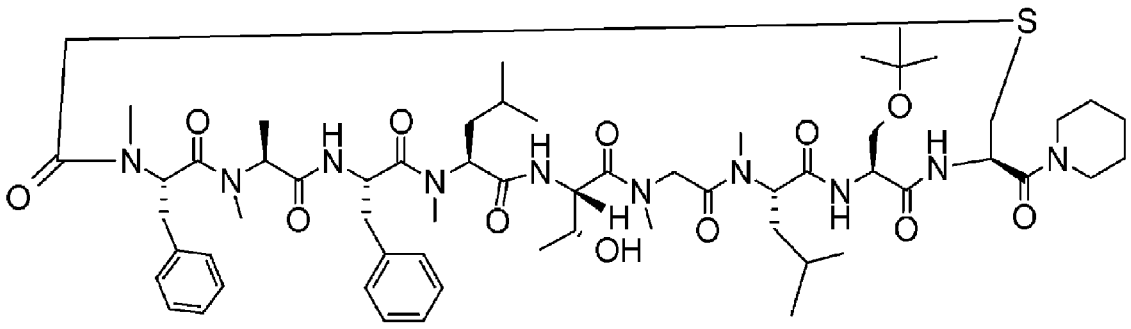
LCMS :1172 m/z (M+H)+

保持時間 :2.75分 (分析条件 ZQAA50)

[0617] 化合物P_110

Ac*-MePhe-MeALa-Phe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-Cys*-piperidine

(2つの*部位にて環化)



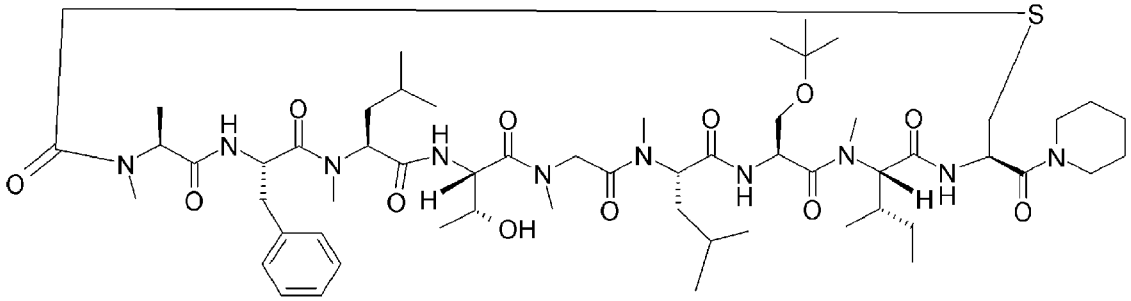
ＬＣＭＳ：1192 ｍ/ｚ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0.81分 (分析条件 SQDAA50)

[0618] 化合物Ｐ＿１１１

Ac*-MeALa-Phe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-MeIle-Cys*-piperidine

（２つの*部位にて環化）



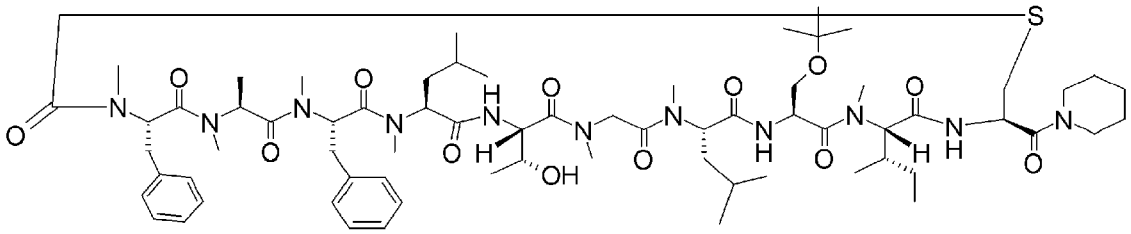
ＬＣＭＳ：1158 ｍ/ｚ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：2.75分 (分析条件 ZQAA50)

[0619] 化合物Ｐ＿１１２

Ac*-MePhe-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-MeIle-Cys*-piperidine

（２つの*部位にて環化）



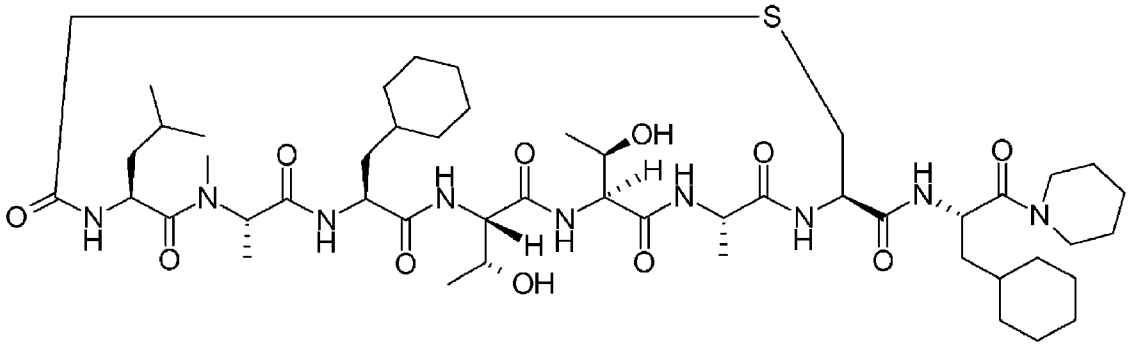
ＬＣＭＳ：1333 ｍ/ｚ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：2.87分 (分析条件 ZQAA05)

[0620] 化合物Ｐ＿１１３

Ac*-Leu-MeAla-Cha-Thr-Thr-Ala-Cys*-Cha-piperidine

（2つの*部位にて環化）



LCMS：1007 m/z (M+H)+

保持時間：2.46分 (分析条件 ZQAA50)

[0621] 2．き き 痛

2-1．チオエーテル環化ペプチドのSerum安定仲、肝ミクロソーム中き 隨 験

得られた化合物を2uMの濃度にてマウス血清 (雄雌混合、VaLLey BiomedicaL社、USA）（33．5mM HEPES緩衝液によりpH7．4に調製）と2時間代謝反応させた。経時的にアセトニトリルによる除タンパク処理を施し、LC/MSを用いて残存する未変化体量を分析し、代謝半減期（t1/2）を算出した。NADPH存在下および非存在下、マウス肝ミクロソームならびに小腸ミクロソーム (雄、XEN0TECH社、USA）を100mMリン酸緩衝液（pH7．4）を用いて0．5mg proteinZmLになるよう調製したミクロソーム溶液と化合物を1uMの濃度にて30分間代謝反応させた。経時的にアセトニトリルによる除タンパク処理を施し、LC/MSを用いて残存する未変化体量を分析し，肝固有クリアランス (CLh，int）ならびに小腸固有クリアランス (CLg，int）を算出した。 (表7）。これらのペプチドはマウス血清中並びにミクロソーム中においてペプチダーゼなどの加水分解による代謝を受ける速度は十分遅く、脂溶性の低い天然アミノ酸からなるペプチドと比較して対照的な結果となった。これらの結果と比較し、ミクロソーム中NADPH存在下における代謝速度は高く、代

謝の主な経路は酸化代謝であることが明らかとなった。

[0622] [表7]

													Serum stability t1/2 (Mouse) (h)	Hepatic Microsome CLh,int (Mouse) (ul/min/mg Protein)	
														NADPH 存在下	NADPH 非存在下
P-101			Ac	MeF	MeA	MeF	MeL	T	MeG	MeL	C	piperidine	>60	358	1.1
P-102			Ac	MeA	MeF	MeL	T	MeG	MeL	StBu	C	piperidine	>60	55.1	0
P-103			Ac	MeF	MeL	T	MeG	MeL	StBu	MeI	C	piperidine	>60	63	11.1
P-104			Ac	MeL	T	MeG	MeL	S	MeI	Bip	C	piperidine	>60	105.7	6.9
P-105			Ac	MeF	MeA	F	MeL	T	MeG	MeL	C	piperidine	>60	278.1	5.1
P-106			Ac	MeA	F	MeL	T	MeG	MeL	StBu	C	piperidine	>60	150.9	1.9
P-107			Ac	F	MeL	T	MeG	MeL	StBu	MeI	C	piperidine	>60	111.1	10.1
P-108		Ac	MeF	MeA	MeF	MeL	T	MeG	MeL	StBu	C	piperidine	>60	72.3	5.2
P-109		Ac	MeA	MeF	MeL	T	MeG	MeL	StBu	MeI	C	piperidine	>60	57.4	10.3
P-110		Ac	MeF	MeA	F	MeL	T	MeG	MeL	StBu	C	piperidine	>60	162.6	6.1
P-111		Ac	MeA	F	MeL	T	MeG	MeL	StBu	MeI	C	piperidine	>60	76.4	0
P-112	Ac	MeF	MeA	MeF	MeL	T	MeG	MeL	StBu	MeI	C	piperidine	>60	30.4	17.9

表７のそれぞれのペプチドはＡｃ部位とC部位で環化されている。

[0623] ２－２．比較的代謝安定性の高かったチオエーテル環化ペプチドおよびチオエーテル部位の酸化化合物（スルホキシド体およびスルホン体）のヒト肝ミクロソーム中代謝安定仲試験、マウス小腸ミクロソーム中代謝安定仲試験

２－１．にて示したのと同様の実験にて、代謝安定性試験を行った。

マウスにて比較的代謝安定性の高かったチオエーテル化合物の小腸での代謝安定性試験と、ヒトでの肝ミクソーム中での代謝安定性試験を実施した（化合物Ｐ―１１２、１０３、１０２、１０９）。ヒトでの肝ミクロソームでの代謝安定性は、マウスの場合と比較しておよそ3倍程度悪化した。

続いて化合物Ｐ―１１２（配列 Ac*-MeA-MeF-MeL-Thr-MeG-MeL-SertBu-MeI-Cys*- piperidine)のＳ原子を酸化させたスルホキシド体（化合物Ｐ_１１４）の肝および小腸酸化代謝速度を測定した結果、化合物Ｐ_１１２と比較してそれぞれマウス肝０．６倍、ヒト肝およそ０．３倍、小腸０．２倍とな

り、ヒト肝および小腸代謝に改善が観測された（表８）。スルホン体Ｐ—１１５の小腸酸化代謝速度は０．５倍となった。

チオエーテルからスルホキシドへの変換での代謝安定化はマウスの肝ミクロソームでいくつか他の合成検体でも観測された（表９）。

[0624] [表8]

													Hepatic Microsome CLhint (ul/min/mg Protein)		Intestinal Microsome CLg,int (ul/min/mg Protein)
													Mouse	Human	Mouse
P-112	Ac	^{Me}F	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	T	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	30.4	117.6	25.9
P-103			Ac	^{Me}F	^{Me}L	T	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	63.0	220.9	66.3
P-102			Ac	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	C	thioether	55.1	124.3	79.0
P-109		Ac	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	T	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	57.4	157.5	45.8
P-114		Ac	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	T	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	sulfoxide	33.7	35.3	9.1
P-115		Ac	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	T	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	sulfone	42.1	61.6	21.8

表８のペプチドはＡｃ部位とＣ部位で環化されている。

[0625]

[表9]

													Mouse Hepatic Microsome CLh, int (ul/min/mg Protein)
P-112	Ac	^{Me}F	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	30.4
P-115	Ac	^{Me}F	^{Me}A	^{Me}F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	sulfoxide	12.1
P-111		Ac	^{Me}A	F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	76.4
P-116		Ac	^{Me}A	F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	sulfoxide	56.5
P-103			Ac	^{Me}F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	thioether	63
P-117			Ac	^{Me}F	^{Me}L	Thr	^{Me}G	^{Me}L	Ser^{tBu}	^{Me}I	C	sulfoxide	36

表９のペプチドはＡｃ部位とＣ部位とで環化されている。

[0626] ３．代謝部位の特定

化合物Ｐ―１１３環化ペプチドを１０ｕＭの濃度にてＮＡＤＰＨ存在下、マウス肝臓 (雄、XENOTECH社製、ＵＳＡ）を１００ｍＭリン酸緩衝液 （ｐＨ７．４）を用いて０．５ｍｇ prote in／ｍＬになるよう調製したミクロゾーム溶液と１時間代謝反応させた (図３５）。反応後アセトニトリルによる除タンパク処理を施し、得られた代謝産物を高分解能ＬＣ／ＭＳ装置 （Q-TOF Ultima API, Waters Corporat ion社製、ＵＳＡ）にて分析した。代謝産物のマスクロマトグラムを以下に示した。比較的強度の強い代謝産物として、水酸化体に相当するピークが４本検出された。各ピークのＭＳ／ＭＳスペクトルを下記に示した。Ｐｅａｋ１およびＰｅａｋ２の代謝物については高い脂溶性側鎖のシクロヘキシル基を含む部分構造に水酸化を受けていることが推察された。Ｐｅａｋ３の代謝物についてはピペリジン環に水酸化を受けた際の特徴的なイオンをｍ／ｚ １０２に与えたが、Ｐｅａｋ１およびＰｅａｋ２と類似のフラグメントイオンも与えており、Ｐｅａｋ３中にはＰｅａｋ１と

Ｐｅａｋ２の類縁体が存在するか、もしくは分離不十分によりＰｅａｋ１およびＰｅａｋ２が混入している可能性が示唆された。Ｐｅａｋ４の代謝物はチオールを含む部位が酸化されていることが推察されたが、この部位での酸化容易度を考慮すると硫黄原子が代謝部位である可能性が高いと考えられた。

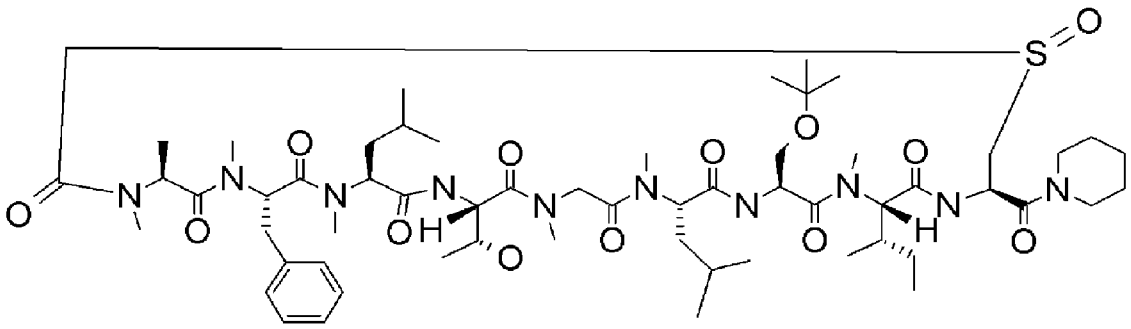
[0627] ４．チオエーテル環化ペプチドの直接酸化反応

代謝部位をより特定させるために、得られたチオエーテル環化ペプチドを直接酸化反応した。チオエーテル体誘導体に対し、オキソンを用いて直接酸化させるとメチオニン誘導体（ペプチドＰ—１３０）が選択的に酸化され、一方トリプトファン誘導体（ペプチドＰ＿１３２）は同一条件下で酸化反応が進行しないことを確認した。本条件を用いていくつかのチオエーテル体（ペプチドＰ＿１０９、Ｐ—１１２、Ｐ＿１１１、Ｐ-１０３）のチオエーテル部分を選択的に酸化させたペプチドＰ＿１１４、Ｐ—１１５、Ｐ—１１６、Ｐ＿１１７、Ｐ-１１８が得られた。

[0628] １８－４－１．（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）-８—ベンジル—２３-（ｔｅｒｔ—ブトキシメチル）＿２６＿（（Ｓ）-ｓｅｃ-プチル）-１４-（（Ｒ）＿１—ヒドロキシエチル）＿１１，２０-ジィソプチル—４，５，７，１０，１６，１９，２５—ヘプタメチル—２９-（ピペリジン-１—カルボニル）＿１＿チア—４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８—ノナァザシクロトリアコンタン＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７—ノナオン　１—オキシド（化合物　Ｐ＿１１４）の合成

Ac*-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Ser(tBu)-MeILe-Cys*-piperidine

化合物（2つの*にて環化、化合物Ｐ＿１０９）のスルホキシド体



[0629] （５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）－８―ベンジル－２３―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）－２６―（（Ｓ）－ｓｅｃ―ブチル）―１４―（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）―１１，２０―ジイソプチル－４，５，７，１０，１６，１９，２５＿ヘプタメチル－２９＿（ピペリジン―１＿カルボニル）＿１＿チア＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザシクロトリアコンタン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン (化合物Ｐ―１０９）（９．５ｍｇ、８．１１ｘ１０-3ｍｍｏｌ）をメタノール（０．５ｍｌ）に溶解し、水（０．２５ｍｌ）を加えた。溶液を撹拌しながら氷浴にて冷却し、０Ｘ０ＮＥ（５．５ｍｇ、８．９２ｘ１０-3ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を氷冷下２５分間撹拌後、ＤＭＳＯ（８０μｌ）を添加した。混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール＝６０/ ４０→０/ １００）にて精製し、（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）―８―ベンジル―２３―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）―２６―（（Ｓ）－ｓｅｃ―ブチル）＿１４＿（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）－１１，２０―ジイソプチル－４，５，７，１０，１６，１９，２５＿ヘプタメチル＿２９―（ピペリジン－１＿カルボニル）―１―チア―４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８-ノナァザシクロトリアコンタン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン　１―オキシド (化合物Ｐ―１１４）（８．６ｍｇ、９０％）を得た。

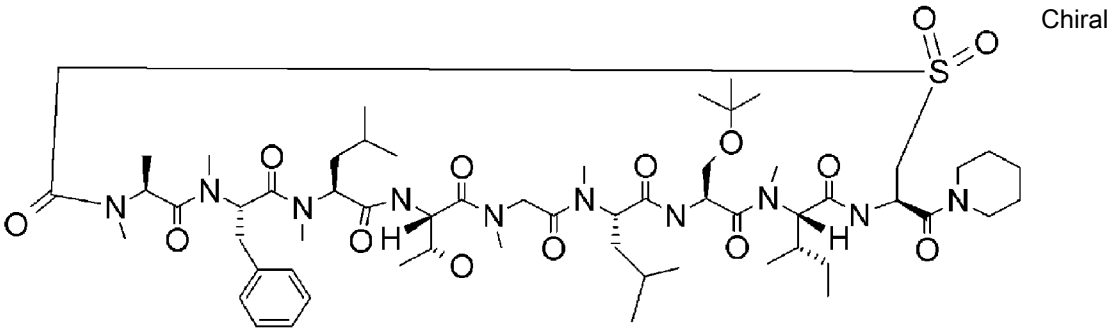
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ　＝　１１８７　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：２．４８分、２．６２分 (分析条件Ｚ０六六５０）

[0630] １８－４－２．（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）－８―ベンジル―２３ー（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）＿２６＿（（Ｓ）－ｓｅｃ－プチル）－１４－（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）－１１，２０－ジィソプチル―４，５，７，１０，１６，１９，２５―ヘプタメチル―２９－（ピペリジン－１ーカルボニル）＿１＿チア＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザシクロトリアコンタン＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン　１，１―ジオキシド（化合物Ｐ＿１１５）の合成

Ac*-MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeGLy-MeLeu-Ser(tBu) - MeILe-Cys*-piperidine

化合物（2つの*にて環化、化合物Ｐ＿１０９）のスルホン体



[0631] （５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）－８―ベンジル－２３―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）－２６―（（Ｓ）－ｓｅｃ―プチル）―１４―（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）―１１，２０―ジイソプチル－４，５，７，１０，１６，１９，２５＿ヘプタメチル－２９＿（ピペリジン―１＿カルボニル）＿１＿チア＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザシクロトリアコンタン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン（9．６ｍｇ、８．１９ｘ１０-3ｍｍｏｌ）をメタノール（０．６ｍｌ）に溶解し、水（０．３ｍｌ）を加えた。溶液を撹拌しながら、ＯＸＯＮＥ（１５．１ｍｇ、２．４６ｘ１０-2ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温にて１４時間撹拌後、ＤＭＳＯ（８０μ1）を添加した。混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール＝６０/ ４０→０/ １００）にて精製し、５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２

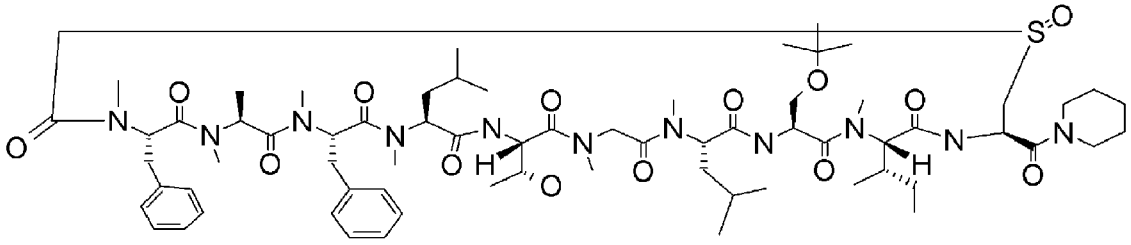
9R）_8_ベンジル_23-（tert—ブトキシメチル）－26—（（S）-sec—ブチル）—14—（（R）_1—ヒドロキシエチル）-11，20—ジイソプチル－4，5，7，10，16，19，25—ヘプタメチル—29—（ピペリジン—1_カルボニル）_1_チア_4，7，10，13，16，19，22，25，28—ノナアザシクロトリアコンタン－3，6，9，12，15，18，21，24，27—ノナオン 1，1_ジオキシド（8．3mg、84％）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 1203 （M+H）+

保持時間：0．82分 (分析条件30D六六50）

[0632] 18-4-3．（5S．8S．11S．14S．17S．23S．26S．29S．32R）-5．11—ジベンジル－26—（tert—ブトキシメチル）—29—（（S）-sec-ブチル）_11—（（R）_1—ヒドロキシエチル）—14，23—ジイソプチル—4，7．8．10，13，19．22，28—オクタメチル－32_（ピペリジン－1_カルボニル）_1—チア－4，7．10，13，16，19，22，25，28，31—デカアザシクロトリトリアコンタン_3，6．9．12，15，18，21，24，27，30—デカオン__1—オキシド_(化合物P—1_16）_の合成

Ac—MePhe—MeALa—MePhe—MeLeu—Thr-MeGLy-MeLeu-Ser (tBu)-MeILe-Cys—piperidine（化合物P_112）の直接酸化によるスルホキシド体



[0633] 18—4—1．と同様の方法で（5S，8S，11S，14S，17S，23S，26S，29S，32R）-5，11—ジベンジル—26—（tert—ブトキシメチル）—29—（（S）-sec—ブチル）_17_（（R）_1—ヒドロキシエチル）－14，23—ジイソプチル－4，7，8，10，13，19，22，28—オクタメチル－32—（ピペリジン－1—

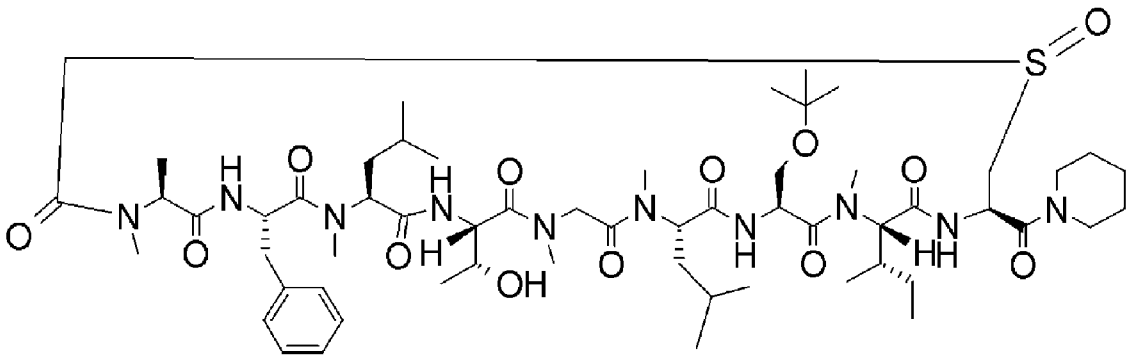
カルボニル）_１_チア_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１—デカァザシクロトリトリアコンタン—３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０—デカオン（16．9mg、1．27x10—2mmol）から5S，8S，11S，14S，17S，23S，26S，29S，32R）-５，１１—ジベンジル—２６—（ｔｅｒｔ—ブトキシメチル）—２９—（（S）-ｓｅｃ-プチル）_１１—（（R）_１—ヒドロキシエチル）—１４，２３—ジイソプチル—４，７，８，１０，１３，１９，２２，２８—オクタメチル—３２_（ピペリジン—１_カルボニル）—１—チア—４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１—デカァザシクロトリトリアコンタン—３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０—デカオン　１—オキシド（11．6mg、68％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１３４８　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．８４分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0634] １８－４－４．（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）-８—ベンジル—２３-（ｔｅｒｔ—ブトキシメチル）－２６—（（Ｓ）-ｓｅｃ-プチル）-１４-（（Ｒ）_１—ヒドロキシエチル）－１１，２０—ジイソプチル—４，５，１０，１６，１９，２５—ヘキサメチル-２９-（ピペリジン　１—カルボニル）_１_チア—４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８—ノナァザシクロトリアコンタン_３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７—ノナオン　１—オキシド（化合物Ｐ_１１７）_の合成

Ac*-MeAla-Phe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-^er(tBu)-MeIle-Cys水piperidine（化合物P-111）の直接酸化によるスルホキシド体（化合物Ｐ—１１７）



[0635] １８＿４＿１．と同様の方法で（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）―８―ベンジル－２３―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）―２６―（（Ｓ）－ｓｅｃ－ブチル）―１４―（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）＿１１，２０―ジイソプチル―４，５，１０，１６，１９，２５＿ヘキサメチル－２９―（ピペリジン－１＿カルボニル）＿１＿チア＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザシクロトリアコンタン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン（１２．５ｍｇ、１．０８ｘ１０―２ｍｍｏｌ）から（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｒ）―８―ベンジル―２３―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）―２６―（（Ｓ）－ｓｅｃ―ブチル）＿１４＿（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）－１１，２０―ジイソプチル－４，５，１０，１６，１９，２５＿ヘキサメチル＿２９―（ピペリジン－１＿カルボニル）＿１＿チア＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザシクロトリアコンタン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７―ノナオン　１―オキシド（１０．５ｍｇ、８３％）を得た。

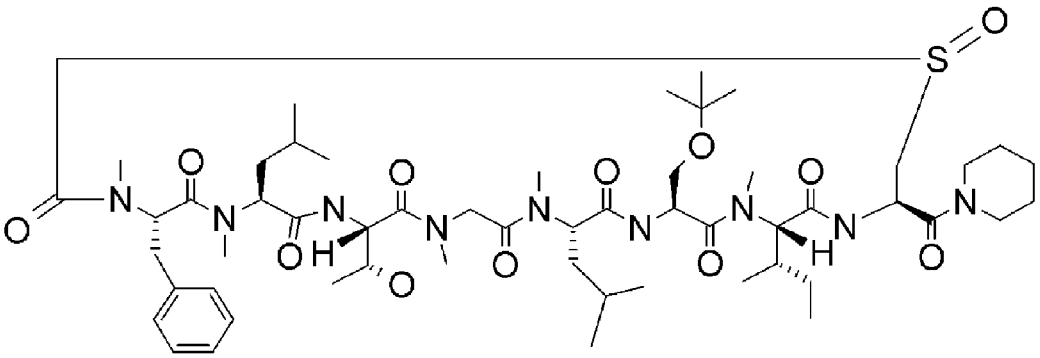
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　１１７３　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：２．５７分（分析条件Ｚ０六六５０）

[0636] １８－４－５．（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｒ）＿５＿ベンジル－２０―（ｔｅｒｔ―ブトキシメチル）－２３―（（Ｓ）－ｓｅｃ―ブチル）＿１１＿（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）＿８，１７－ジイソプチル－４，７，１３，１６，２２＿ペンタメチル＿２６―（ピペリジン－１―カルボニル）＿１＿チア―４，７，１０，１３，１６，１９，２

２，２５－オクタアザシクロヘプタコサン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４－オクタオン－１－オキシド（化合物Ｐ－１１８）の合成

化合物Ｐ－１０３の直接酸化反応による合成

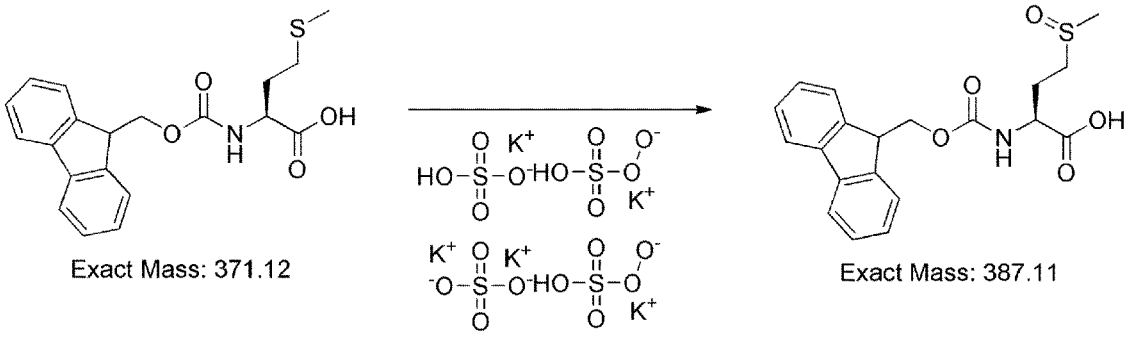


[0637] １８－４－１．と同様の方法で（(5Ｓ，8Ｓ，１１Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｒ）－５－ベンジル－２０－（ｔｅｒｔ－ブトキシメチル）－２３－（（Ｓ）－ｓｅｃ－ブチル）－１１－（（Ｒ）－１－ヒドロキシエチル）－８，１７－ジイソプチル－４，７，１３，１６，２２－ペンタメチル－２６－（ピペリジン－１－カルボニル）－１－チア－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オクタアザシクロヘプタコサン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４－オクタオン（21.4mg、1.97x10^{-2}mmol）から１８－４－５．（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｒ）－５－ベンジル－２０－（ｔｅｒｔ－ブトキシメチル）－２３－（（Ｓ）－ｓｅｃ－ブチル）－１１－（（Ｒ）－１－ヒドロキシエチル）－８，１７－ジイソプチル－４，７，１３，１６，２２－ペンタメチル－２６－（ピペリジン－１－カルボニル）－１－チア－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オクタアザシクロヘプタコサン－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４－オクタオン　１－オキシド（16.8mg、７７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１０２　(M+H)+

保持時間：0.80分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0638] １８－４－６．（Ｓ）－２－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ）－４－メチルスルファニル－酪酸の酸化



[0639] （Ｓ）－２－（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ）—4 —メチルスルファニル—酪酸 (ペプチドＰ—１３０、３８ｍｇ、０．１０２ｍｍｏｌ）をメタノール (2ｍＬ）に室温で溶解して、水 (0．２ｍＬ）を添加後、氷浴にて冷却した。混合物に０Ｘ０ＮＥ（６９ｍｇ、０．１１３ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を２０分間撹拌後、ＤＭＳ０（１００μＬ）を添加した。ＬＣＭＳにて反応進行を確認したところ、原料とは異なる保持時間に単一ピークを与えた (ペプチドＰ—１３１）。

（Ｓ）－２－（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ）－４—メチルスルファニル—酪酸 (ペプチドＰ—１３０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ３７２ (Ｍ＋Ｈ）＋

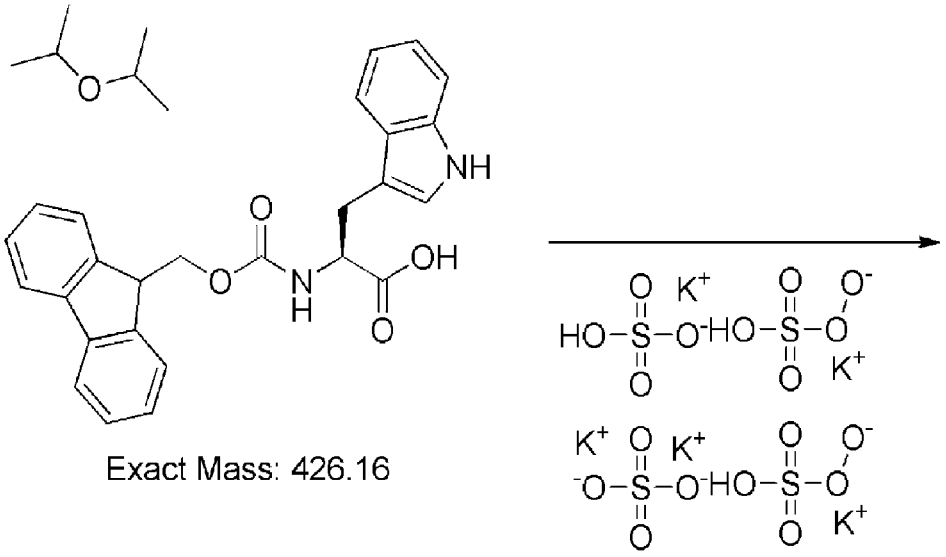
保持時間 :０．９４分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

生成物Ｐ-１３１

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ３８８ (Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．８６分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0640] １８－４－７．（Ｓ）－２－（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ）＿３＿＿（１Ｈ—インドール＿３＿ィル）—プロピオン酸＿・＿２—ゴソプロポキシ—プロパン （１：２/ ３）の酸化



[0641] （S）-2-（9H—フルオレン_9_ィルメトキシカルボニルァミノ）—3—（1H—インドール—3—ィル）—プロピオン酸 ・ 2—イソプロポキシ—プロパン (ペプチドP—132、1:2/3)（50mg、0.101mmol）をメタノール (2mL）に室温で溶解して、水 (0.2mL）を添加後、氷浴にて冷却した。混合物に0X0NE（68mg、0.113mmol）を添加し、反応混合物を20分間撹拌後、DMSO（100μL）を添加した。LCMSにて反応進行を確認したところ、原料と同一のピークを与えた。

（S）-2-（9H—フルオレン_9_ィルメトキシカルボニルァミノ）—3-（1H—インドール—3—ィル）—プロピオン酸 (ペプチドP—132)

LCMS（ESI） m/z = 427 (M+H)+

保持時間:0.95分 (分析条件SQDAA05)

[0642] このように、ペプチドの酸化反応により容易にチオールが酸化反応を受けたことから、チオエーテルは広く一般に認知されているように酸化代謝され易いことと関連させる。

[0643] これらの実験より以下のことが明らかとなつた。我々が膜透過可能と定義するペプチドでは、チオエーテル環化ペプチドの代謝速度は速い。ペプチドであるにも関わらず主な代謝はアミド結合の加水分解にはなく、酸化代謝で

あることが示された。チオエーテル部位を予め酸化させて酸化代謝部位をプロックされた化合物では代謝安定化が得られることを、対応するスルホキシドとの比較より明らかにした。チオエーテル部位が代謝部位の1つであると推定された。化学反応による酸化反応でも、チオエーテル部位が選択的に酸化されたことから、チオエーテル部位が他の部位よりも容易に酸化されることが示された。チオエーテルが酸化代謝を受けやすいことは広く一般に知られていることである。チトクロムP450によりRSCH2R'→RSH+R'CH0に分解されることや、フラビン含有モノオキシゲナーゼにより、スルホキシドへと代謝されることが報告されている(非特許文献、薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として第2版 加藤隆_ '鎌滝哲也 編)。前者は生成するとReact ive metabo liteとなるため、毒性発現にもつながる可能性がある。

[0644] 以上の知見から、アミド結合が代謝に対して安定である一方、酸化され易いチオエーテルを有する環化法には改良の余地があると結論された。各ユニットが全てアミド結合である本発明の方法による環状ペプチドは、従来の環化法による環状ペプチドよりも優れていると考察できる。

[0645] 5. ぉ エーテル環化とアミド環化は合物の代謝き き 隠

脂溶性が高いチオエーテル環化ペプチド群の中で、比較的代謝安定性の高かったチオエーテル3種類を選択し、環化部位以外は同じ配列(MeALa-MePhe-MeLeu— ̄i.hr - MeG Ly- MeLeu - Ser (tBu)八 MePhe-MeLeu-Thr-MeG Ly-MeLeu-Ser (tBu)-MeI Le、MeALa-MePhe-MeLeu-Thr-MeG Ly-MeLeu-Ser (tBu)-MeI Le)のアミド環化ペプチドを合成し、それらの代謝安定性を比較した。下表のようにマウス、ヒトともにミクロゾーム代謝安定性はマウスで2倍程度、ヒトで3倍程度向上した。一連の化合物で安定して代謝安定化が得られたことから、DispLayされる全ての化合物に含まれていたチオエーテル部分構造が除去されたアミド環化法では、DispLayされる化合物の多くがより代謝安定化された、よりDrug ̄keなDispLay手法であると考えられた。

[0646]

[表10]

											Hepatic microsome CLhint (Human) (ul/min/mg Protein)	
											NADPH 存在下	NADPH 非存在下
P-102		Ac	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Cys	thioether	124	3
P-119		Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	amide	56	5
P-120		MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	amide	67	5
P-121		Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Glu	amide	29	8
P-122		MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Glu	amide	46	1
P-103		Ac	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Cys	thioether	221	3
P-123		Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	amide	156	0
P-124		MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Glu	amide	69	8
P-109	Ac	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Cys	thioethr	158	11
P-125	Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	amide	35	1

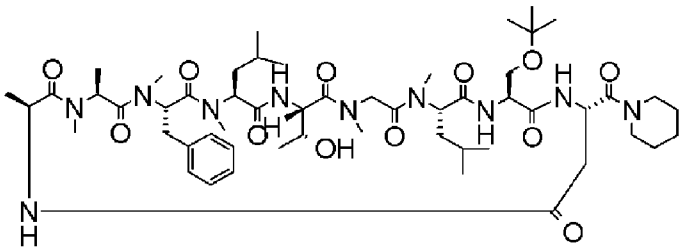
表10のペプチドはN末端アミノ酸とAspもしくはGluとでアミド環化しているか、Ac部位とCysとでチオエーテル環化しているかのどちらかである。

[0647] 化合物P-119

A La-MeA La-MePhe-MeLeu-Th r-MeG Ly-MeLeu-Se r(t Bu) -Asp-p iperidine

N末端アミンとAsp側鎖がアミド環化

Chiral



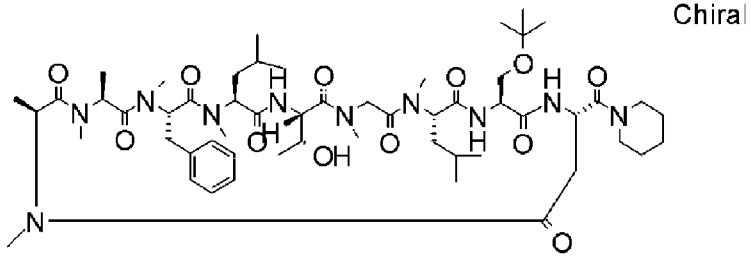
LCMS : 1067. 8 m/z (M-H) -

保持時間 :0.72分 (分析条件 SQDAA50)

[0648] 化合物P-120

MeA La-MeA La-MePhe-MeLeu-Th r- MeG Ly-MeLeu-Se r(t Bu) -Asp-p iperidine

N末端アミンとAsp側鎖がアミド環化



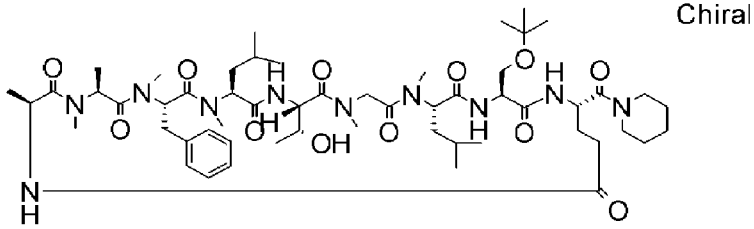
LCMS: 1081.9 m/z (M-H)-

保持時間：0.73分　（分析条件　SQDAA50）

[0649] 化合物Ｐ－１２１

Ala-MeAla-MePhe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-Glu-piperidine

Ｎ末端アミンとＧｌｕ側鎖がアミド環化



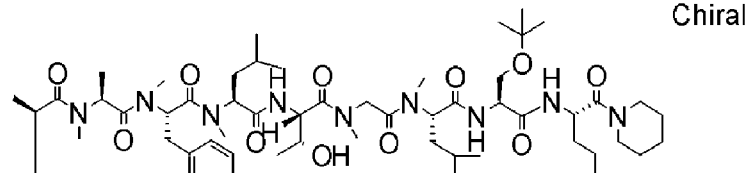
LCMS: 1082.0 m/z (M-H)-

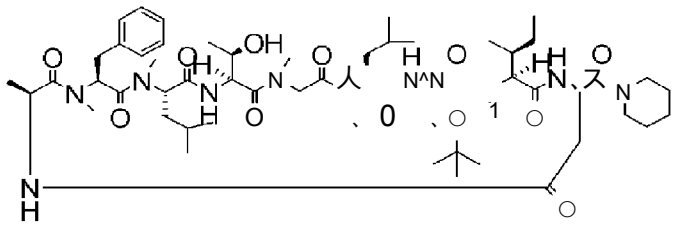
保持時間：0.73分　（分析条件　SQDAA50）

[0650] 化合物Ｐ－１２２

MeAla-MeAla-MePhe-MeLeu-Thr-MeGly-MeLeu-Ser(tBu)-Glu-piperidine

Ｎ末端アミンとＧｌｕ側鎖がアミド環化





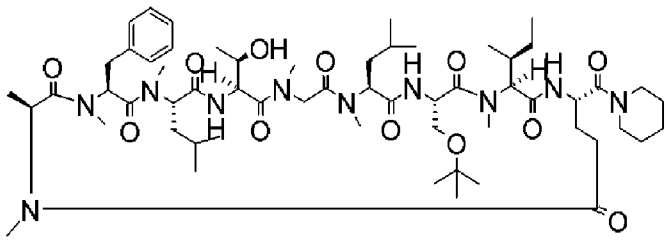
LCMS: 1110.0 m/z (M-H) -

保持時間 :0.82分 (分析条件 SQDAA50)

[0652] 化合物P-124

MeA La-MePhe-MeLeu-Th r-MeG Ly-MeLeu-i>e r(tBu)- MeI Le-G Lu-piperidine

N末端アミンとGlu側鎖がアミド環化



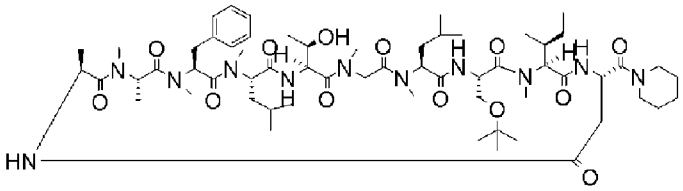
LCMS: 1137.8 m/z (M-H) -

保持時間 :0.81分 (分析条件 SQDAA50)

[0653] 化合物P-125

A La-MeA La-MePhe-MeLeu-Th r-MeG Ly-MeLeu-Se r(tBu)-MeI Le-Asp- piperidine

N末端アミンとAsp側鎖がアミド環化



LCMS: 1194.7 m/z (M-H) -

保持時間 :0.81分 (分析条件 SQDAA50)

[0654] [実施例18—2] チオエステル環化ペプチドを用いた酵素によるN末端アミノ酸除去とアミド環化への応用

N末端でない位置のシスティンと側鎖カルボン酸が活性化されたアミノ酸を含むペプチドを翻訳し、両官能基が反応したチオエステル環化ペプチドを調製した。続いて、同システィンよりもN末端部に位置するアミノ酸を酵素的に

除去することで、システィン残基のα-アミノ基を露出させ、それを用いたペプチドのアミド環化が進行するかを以下のように試みた。

1.転写によるtRNA(CA欠損)の合成

錯型DNA(配列番号DT—E1)から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega社, P1300)を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNAG LuAAG (-CA) (配列番号RT—E1)を合成し、RNeasy Mini kit (Qiagen社)により精製した。

[0655] 配列番号DT—E1(配列番号:179)

tRNAG LuAAG (-CA) DNA配列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTAAGACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0656] 配列番号RT—E1(配列番号:180)

tRNAG LuAAG (-CA) RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0657] 2.側鎖カルボン酸が活忡エステル化されたアミノアシル化DdCDA(化合物1_i_IA)とtRNA(CA欠損)(配列番号:RT_E1)のLigationによるアミノアシル化tRNA(化合物AT—E1)の合成

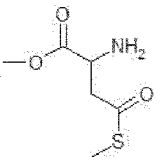
50 μM 転写tRNAG LuAAG (-CA) (配列番号RT—E1) 10从Lに、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$) 2μL、10 mM ATP 2μL、Nuclease free water 2.8从しを加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールディングを行った。20unit/μLのT4 RNAリガーゼ(New England Bio Lab.社)1.2μLおよび、5mMのアミノアシル化pdCpA(化合物1i—IA)のDMSO溶液 2从1を加え、15℃で45分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液 20从1に、3M酢酸ナトリウム 4从1と125mM ヨウ素(水:THF=1:1溶液)24从Lを加え、室温で1時間、脱保護を行った。アミノアシル化tRNA(化合物AT—E1)は

、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化tRNA（化合物AT_E1）は、翻訳混合物に添加する直前に1mM酢酸ナトリゥムに溶解した。

[0658] 化合物AT-E1（配列番号：1811）

Asp(SM e)-tRNAGLuAAG

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaag
ACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA



[0659] 3. N末端に位置しないシスティン残基と側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノ酸を含む《プチドの翻訳合成

側鎖カルボン酸をチオエステルにより活性化したァスパラギン酸誘導体でアミノアシル化されたtRNAを、無細胞翻訳系に加えて翻訳を開始することにより、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。具体的には、翻訳液，1/0（v/v）RNasein Ribonuclease inhibitor（Promega社，N2111），1mM GTP，1mM ATP，20mMクレアチンリン酸，50mM HEPES-KOH pH7.6，100mM酢酸カリウム，6mM酢酸マグネシウム，2mMスペルミジン，2mMジチオスレイトール，0.1mM 10-HCO-H4folate，1.5mg/ml E.coli MRE600（RNaseネガティプ）由来tRNA（Roche社），4μg/ml クレアチンキナーゼ，3μg／ml ミオキナーゼ，2unit/ml 無機ピロフォスファターゼ，1.Iμg／ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，0.6μM メチオニルtRNAトランスフオルミラーゼ，0.26μM EF_G，0.24μM RF2，0.17μM RF3，0.5μ,M RRF，2.7μM IF1，0.4μM IF2，1.5μ,M IF3，40μ,M EF-Tu，93μM EF_Ts，1.2μ,M リボソーム，0.73/μM AlaRS，0.03μM ArgRS

，0．38μM AsnRS，0．13μM AspRS，0．02μM CysRS，0．06μM GlnRS，0．23μM GluRS，0．09μM GlyRS，0．4μM IleRS，0．04μM LeuRS，0．11μM LysRS，0．03μM MetRS，0．68μM PheRS，0．16μM ProRS，0．04μM SerRS，0．09μM ThrRS，0．03μM TrpRS，0．02μM TyrRS，0．02μM ValRS（自家調製タンパクは基本的にはHisタグ付加タンパクとして調製した））に、1μM 鋳型RNA、それぞれの鋳型DNAにコードされているタンパク質性アミノ酸群をそれぞれ250μMずつ、ならびに50μMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化tRNA（化合物AT-E1）を翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0660] 翻訳産物はマトリックスとしてα_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸を用いてMALDI—MSスペクトルを測定して同定した。

[0661] 4．チオエステル環化《プチドの翻訳さ成と酵素を用いたN末端アミノ酸除去を秬觀ったアミド嘗;への魏

1μM 鋳型RNA 0T43 RNA（配列番号RM_E1）に、0．25mM Met，0．25mM Cys，0．25mM Thr，0．25mM Arg，0．25mM Tyr，0．25mM Pro，0．25mM GLyおよび、50μM Asp（SMe）_tRNAGLuAAG（化合物AT_E1）を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳溶液1μLに9μLの0．2％トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1μLのCHCA溶液（10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸、50%アセトニトリル、0．1％トリフルオロ酢酸溶液）と混和し、プレート上乾固し、MALDI—MSで分析した。その結果、N末端フォルミルメチオニンを含み、側鎖チオール基とカルボン酸でチオエステル環化したペプチドP—E1に相当するピークが観測された（図62、ピーク1）。続いて、上記翻訳反応物に終濃度がそれぞれ2μM、14μMとなるように酵素ペプチドデフ

オルミラーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼを加え、37℃で5分間保温した。得られた反応物を上述したようにMALDI—MSで分析したところ、原料のチオエステル環化ペプチドのピークは小さくなり、その代わりに、N末端フォルミルメチオニンが除去され、その結果露出したN末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物P—E2に相当するピークが観測された(図62、ピーク11)。このことから、チオエステル環化が進行した後でも、CysよりN末端部を除去することで、目的のアミド環化ペプチドが得られる事が示された。

[0662] 配列番号 RM—E1(配列番号:1822)

0T43 RNA

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugUGCACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUGGCGGCuaagcuucg

[0663] ペプチド配列P_E1(配列番号:1833)

f MetCysTh rTh rTh rArgAspP roTy rArgG LyGLyの側鎖硫黄原子とAspの側鎖カルボン酸でチオエステル環化した化合物

MALDI-MS:m/z: [M+H]+ = 1367.5 (Calc. 1367.6)

[0664] ペプチド配列P_E2(配列番号:1844)

CysTh rTh rTh rArgAspP roTy rArgG LyGLyのN末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物

MALDI-MS:m/z: [M+H]+ = 1208.3 (Calc. 1208.6)

[0665] [実施例19]ペプチド化合物

1._アミド環化ペプチドの合成

以下に示す環化ペプチドを合成した(表11_1:合成したペプチド化合物例(計9655化合物))。特に明示しない限り表中の1に位置するアミノ酸が前記スキームAなどで示した白丸○に対応する交差ユニットに対応し、アミノ酸配列中左端に表記したアミノ酸が同じく▲ユニットに対応する。これら2つの部位が結合を形成し環化ペプチドを構成する。また、表中H-1からH-6で示したアミノ酸は前記スキームAなどで示した直鎖部に相当する。ここ

で、表中右端に存在する部位がC末端を形成する。ここで表記したpipとはC末端カルボン酸がピペリジンとアミド結合を形成してピペリジンアミドを形成したことを意味している。また、H-1に何も記載されていない環化ペプチドはC末端カルボン酸が削除された化合物を意図する。この場合、1に位置するアミノ酸の持つ1つのカルボン酸とN末端のアミンとがアミド化反応して環化され、C末端カルボン酸部位が削除された誘導体、例えばメチル基やトリフルオロメチル基に置換された化合物がC末端に位置される。表11_1に示した略号は表11_2（アミノ酸略号が意図する構造との関連表）に表記したアミノ酸を意味する。

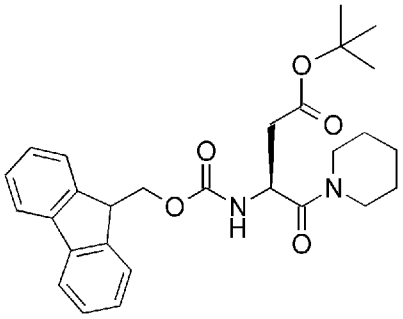
既に記載の方法と同様の手法を用いて表11－1に表記した環化ペプチドを合成し、それぞれの化合物の同定を行った（表11—3—1、表11—3－2：合成したペプチド化合物の同定（計965化合物））。

[0666] 1－1．レジンに結合させるC末端部位アミノ酸もしくはペプチドの合成例およびそのレジンへの担持方法

C末端部位の主鎖部位がアミドにて化学修飾（多くの実施例ではピペリジンアミド）され、かつアスパラギン酸の側鎖カルボン酸部位（交差ユニット）がN末端側のアミノ基（三角ユニット）とアミド結合させた様々な化合物を合成する目的で、以下のアミノ酸もしくはペプチドの担持レジンを合成した。以下に合成例のより詳細な内容を述べる。なお、以下の方法に限定されず、本明細書の他に記載の部分や、一般的なペプチドの合成法によっても合成できる。

[0667] 1－1－1．Fmoc-Asp-pip（化合物SP4_01）の側鎖カルボン酸にてレジンと結合させた化合物（化合物SP４０２）合成

[0668] (S)-3-(（((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸 tert-ブチル（化合物SP4_03、Fmoc-Asp(OtBu)-pip）の合成

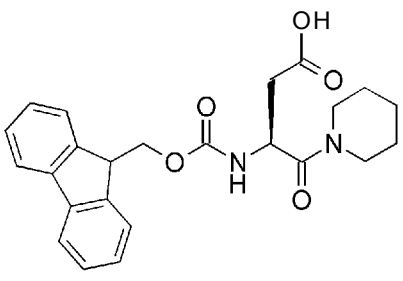


(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(tert-ブトキシ)-4-オキソブタン酸 (化合物SP4 0 4 、Fmoc-Asp(OtBu)-OH) (30g、72.9mmol)をDMF(243mL)に溶解させ、0℃にて4-メチルモルホリン (9.6mL、87mmol)、ついで0-(7-アザ-1Hベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,Nテトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフエート (HATU) (33.3g、87mmol)を加え、10分間攪拌した。さらにピペリジン (7.1mL、71.5mmol)を滴下し、30分間攪拌した。反応混合物をヘキサン/酢酸エチル=1/1(1500ml)で希釈し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄した。有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮をし、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=2/1)にて精製し、(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸 tert-ブチル (化合物SP4 0 3) (35.2g、99%)を得た。

LCMS(ESI) m/z =479.5(M+H)+

保持時間:1.10分 (分析条件SQDAA05)

[0669] (S)-3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸 (Fmoc-Asp-pip、化合物SP4 0 1)の合成



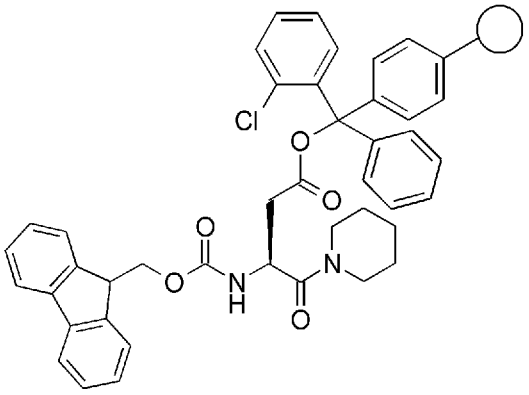
(S)-3-(((9H- フルオレン-9- ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4- オキソ -4- (ピペリジン-1- ィル)ブタン酸 tert- ブチル (化合物SP4 03) (9.3g、19.4mmol) をトルエン (300mL) に溶解させ、これを減圧下に濃縮した。この操作をさらに2回繰り返し行い、減圧下に終夜乾燥させた。反応容器に脱水ジクロロメタン (8.6ml) を入れ、窒素雰囲気下、0℃にて5分間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (8.6ml 116mmol) を滴下した。室温にて4時間攪拌した後、0℃にてトリエチルアミン (16.2ml 116mmol) を滴下した。反応混合物をジクロロメタン (100ml) で希釈し、有機層を5% リン酸2水素ナトリウム水溶液で6回洗浄した。有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮をし、得られた残渣を再度ジクロロメタン (100ml) で希釈し、有機層を5% リン酸二水素ナトリゥム水溶液で2回洗浄した。有機抽出物を硫酸ナトリゥムで乾燥した後、減圧下に濃縮をし、(S)-3-(((9H- フルオレン-9- ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4- オキソ-4- (ピペリジン-1- ィル)ブタン酸 (Fmoc-Asp-pip、化合物SP4 01) (7.8g、96%) を得た。この化合物はこれ以上の精製操作をせずに次の工程に使用した。

LCMS (ESI) m/z = 423 (M+H)+

保持時間 :0.88分 (分析条件SQDAA05)

[0670] (S)-3-(((9H- フルォレン-9- ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4- ォキソ-4-(ピペリジン-1- ィル)ブタン酸-2_クロロトリチルレジン (化合物SP4_02、Fmoc-Asp(0-Trt(2-Cl)-Resin)-pip) の合成

なお、本明細書では、ポリマーやレジンと化合物が結合した場合、ポリマーやレジン部位を○にて表記する場合がある。また、レジン部位の反応点を明確にさせる目的で、○に接続させて反応部位の化学構造を表記させる場合がある。下の構造では、レジンの2_クロロトリチル基がAspの側鎖カルボン酸とエステル結合を介して結合している様子を示している。



[0671] フィルター付きの反応容器に2_クロロトリチルクロライドレジン（100_200mesh、1%DVB、Chem_Impexから購入、29.6g、33.4mmol）と脱水ジクロロメタン（300ml）を入れ、室温にて10分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸（化合物SP401）（7.8g）の脱水ジクロロメタン（334ml）溶液に脱水メタノール（5.4ml）およびジイソプロピルエチルアミン（14ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、10分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（334ml）に脱水メタノール（41.6ml）およびジイソプロピルエチルアミン（14ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、90分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（300ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン（300ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸-2_クロロトリチルレジン（化合物SP402）（34.8g）を得た。

[0672] 得られた(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)ブタン酸-2_クロロトリチルレジン（化合物SP402）（13.42mg）を反応容器に入れ、DMF（0.2ml）およびピペリジン（0.2ml）を加え、室温にて1時間振盪した。反応容器にDMF（1.6ml）を加えた後、反応混合液（0.4ml）をDMF

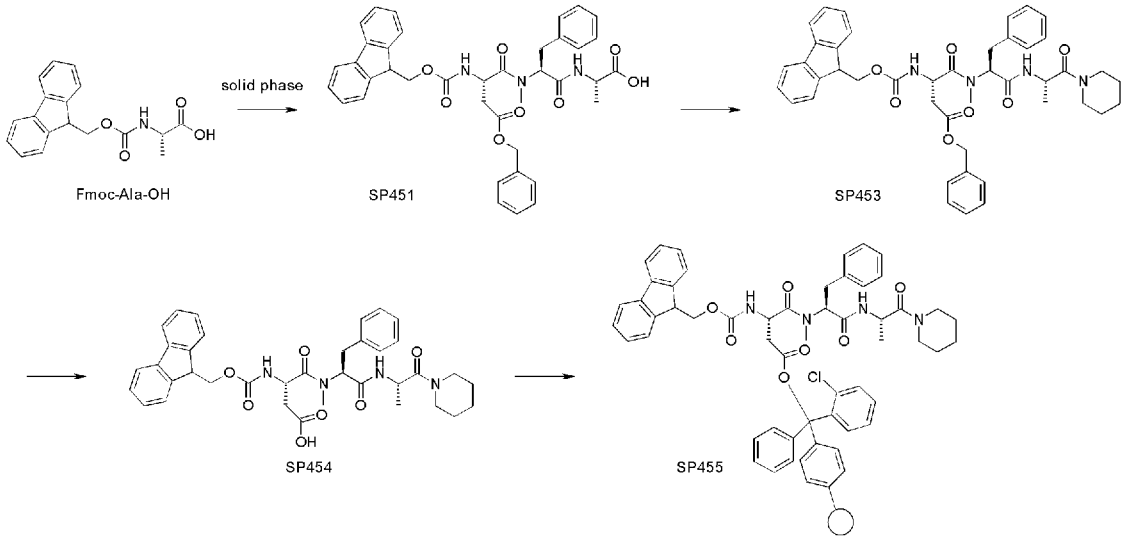
（９．６ｍｌ）で希釈し、その吸光度（３０１．２ｎｍ）を測定した。次の計算式により、（S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-オキソ-4-(ピペリジン-1-イル)プタン酸-２＿クロロトリチルレジン（化合物SP４０２）のローデイング率を２７．８％、０．２６７ｍｍｏｌ／ｇと算出した。

（吸光度（３０１．２ｎｍ）ｘ１０００ｘ５０）／（１３．４２ｘ７８００）＝０．２６７ｍｍｏｌ／ｇ

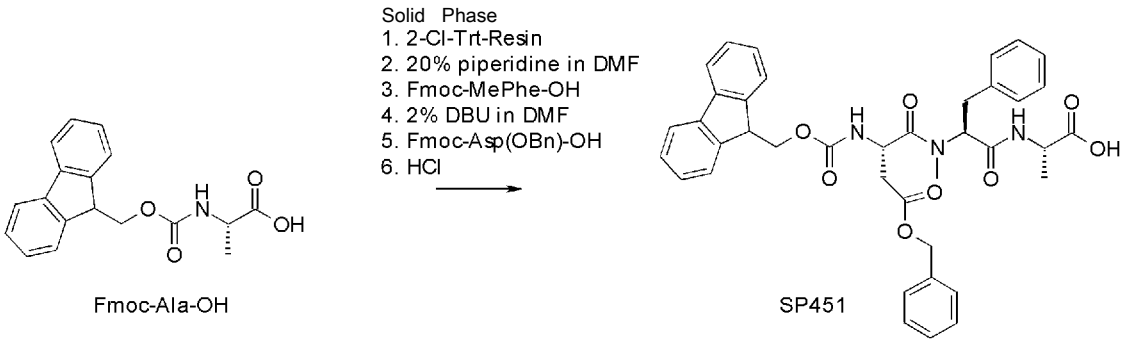
０．２６７ｍｍｏｌ／ｇｘ１００／（３３．４／３４．８）＝２７．８％

[0673] １-１-２．Ｆｍｏｃ-Ａｓｐ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５４）＿のAspの側鎖カルボン酸にてレジンと結合させた化合物（化合物ＳＰ４５５）の合成及び、Ｆｍｏｃ-Ａｓｐ-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５８）＿のAspの側鎖カルボン酸にてレジンと結合させた化合物（化合物ＳＰ４５９）＿の合成

以下のスキームに従い、（３Ｓ）-３-（９Ｈ—フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニルアミノ）＿４＿［メチル—［（２Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿［［（２Ｓ）＿１＿オキソ＿１—ピペリジン＿１—イルプロパン—２—イル］アミノ］＿３＿フエニルプロパン＿２＿イル］アミノ］＿４—オキソプタン酸—２＿クロロトリチルレジン（化合物ＳＰ４５５，Ｆｍｏｃ-Ａｓｐ（０-Ｔｒｔ（２-Ｃｌ）-Ｒｅｓｉｎ）-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ）の合成を行った。



[0674] （２Ｓ）－２－「「(２Ｓ)－２－「「(２Ｓ)－２－（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ)＿４＿オキソ＿４＿フエニルメトキシプタノィル'Ｉ＿—メチルァミノ'Ｉ＿＿３＿フエニルプロパノィル'Ｉ＿ァミノ'Ｉ＿プロパン酸（化合物ＳＰ４５１，Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯＢｎ）—ＭｅＰｈｅ—ＡＩａ－０Ｈ）の合成



[0675] （２Ｓ）－２－（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ）プロパン酸（Ｆｍｏｃ—ＡＩａ—ＯＨ）（４．８６ｇ、１５．８ｍｍｏＩ）およびジイソプロピルエチルァミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（１４．５ｍＬ、８３ｍｍｏＩ）を脱水ジクロロメタン（６０ｍＩ）に溶解し、２＿クロロトリチルクロライドレジン（１００＿２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、渡辺化学から購入、６．５ｇ、１０．５ｍｍｏＩ）を加え、室温で９０分振とうすることで、アミノ酸をレジンに担持させた。反応溶液を除去し、レジンを脱水ジクロロメタン（１００ｍＩ）で4回洗浄した。レジンに２０％ピペリジンＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド溶液（５２ｍＩ）を加え６０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド（４５ｍＩ）で3回洗浄した。続いて（２Ｓ）－２－［９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニル（メチル）ァミノ］＿３—フェニルプロパン酸（Ｆｍｏｃ—ＭｅＰｈｅ—０Ｈ）（３．７４ｇ、９．３ｍｍｏＩ）、３Ｈ－（１，２，３）トリアゾロ（４，５－ｂ）ピリジン－３—オール（ＨＯＡｔ）（１．２７ｇ、９．３ｍｍｏＩ）およびＮ，Ｎ'—メタンジイリデンビス（プロパン－２＿ァミン）（ＤＩＣ）（１．４４ｍし９．３ｍｍｏＩ）をＮ，Ｎ＿ジメチルホルムアミド（１３．５ｍＩ）に溶解し

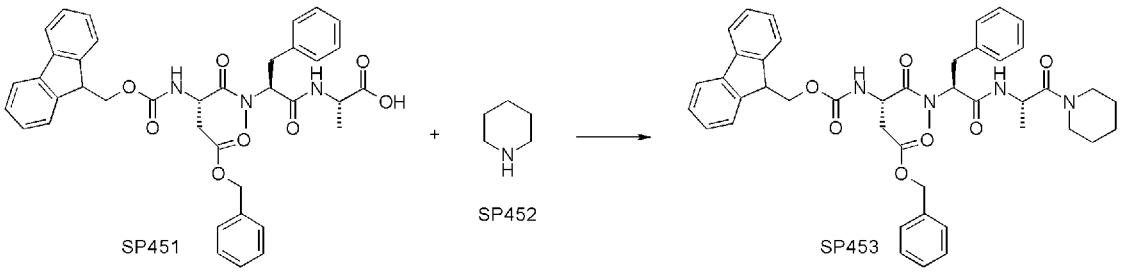
、レジンに加えて室温で９０分間振とうし、ペプチド化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（２３ｍｌ）で３回洗浄後、ジクロロメタン（２３ｍｌ）でさらに３回洗浄した。続いて前述のレジンに２％２，３，４，６，７，８，９，１０―オクタヒドロピリミド［１，２―ａ］アゼピン　Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（２％ＤＢＵ　ｉｎ　ＤＭＦ）（４０ｍｌ）を加え１８０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で３回洗浄した。続いて（２Ｓ）－２－（９Ｈ―フルオレン－９―イルメトキシカルボニルアミノ）＿４＿オキソ＿４＿フエニルメトキシブタン酸（Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯＢｎ）－ＯＨ）（５．１４ｇ、１１．５ｍｍｏｌ）、３Ｈ―（１，２，３）トリアゾロ（４，５－ｂ）ピリジン－３―オール（Ｈ０Ａｔ）（１．５８ｇ、１１．６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ'―メタンジイリデンビス（プロパン－２－アミン）（ＤＩＣ）（１．７８ｍｌ　２１１．６ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（３０ｍｌ）に溶解し、レジンに加えて室温で１６時間振とうし、ペプチド化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で３回洗浄後、ジクロロメタン（４５ｍｌ）でさらに３回洗浄した。続いて４Ｎ塩酸酢酸エチル溶液（１．９２ｍｌ　７．６９ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１００ｍｌ）と混ぜた溶液を前述のレジンに加え、１時間振とうを２回行い、アミノ酸のレジンからの切り出しをおこなった。レジンをジクロロメタン/２，２，２―トリフルオロエタノール（＝１/１，ｖ/ｖ、２５ｍＬ）にて２回洗浄した後、全ての抽出液を混合し減圧下濃縮し、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ（ＯＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ＯＨ（化合物ＳＰ４５１）（７．１１ｇ）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　６７８．６　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６５分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0676] （３Ｓ）－３－（９Ｈ―フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニルアミノ）－４－｜メチル－｜「（２Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿｜「「（２Ｓ）＿１＿オキソ－１－ピペリジン－１―イル］プロパン＿２＿イル］アミノ｝－３＿フエニル

プロパン—2—イル)_アミノ)_4_オキソブタン酸ベンジル (化合物ＳＰ４５３，Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ）の合成

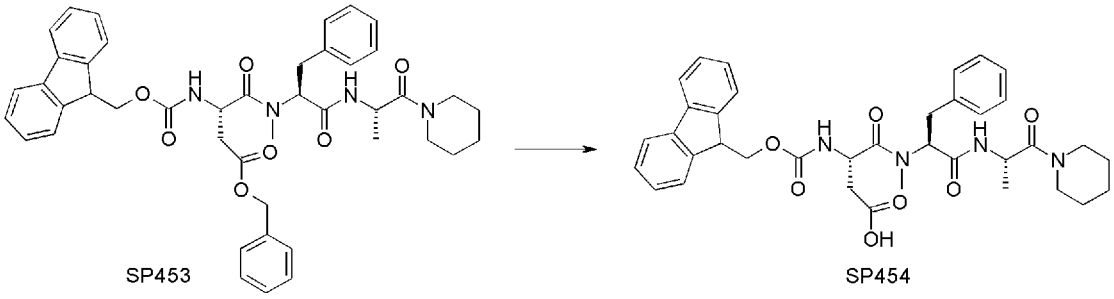


[0677] 窒素雰囲気下、Ｆｍｏｃ—Ａｓｐ（０Ｂｎ）—ＭｅＰｈｅ—Ａｌａ—ＯＨ (化合物ＳＰ４５１）（７．１１ｇ、１０．５ｍｍｏｌ）、ジイソプロピルエチルアミン (ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（３．２９ｍし １８．９ｍｍｏｌ）および０_（７—アザ_１Ｈ—ベンゾトリアゾール_１_イル）_Ｎ，Ｎ，Ｎ，，Ｎ' —テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩 (ＨＡＴＵ)（５．１９ｇ、１３．６ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド (４０ｍｌ）に溶解し、ピペリジン (化合物ＳＰ４５２）（０．９９ｍし １０．０ｍｍｏｌ）を加えて室温で１０分攪拌した。反応液に１５０ｍｌの酢酸エチルを加え、有機層を１５０ｍｌのアンモニウムクロリド飽和水溶液、１５０ｍｌの純水および１５０ｍｌの飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、減圧濃縮し、Ｆｍｏｃ—Ａｓｐ（ＯＢｎ）- ＭｅＰｈｅ- Ａｌａ- ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５３）（７．４４ｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ ｚ ＝ ７４５．７ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．８２分 (分析条件３０Ｄ六六５０)

[0678] （３Ｓ）- ３- （９Ｈ—フルオレン_９_イルメトキシカルボニルアミノ）- ４- 「メチル—「(２Ｓ)_１_オキソ_１_「「(２Ｓ)_１_オキソ- １- ピペリジン_１—イルプロパン—２—イル)_アミノ)_３_フエニルプロパン—２—イル)_アミノ)_４_オキソブタン酸 (化合物ＳＰ４５４，Ｆｍｏｃ- Ａｓｐ- ＭｅＰｈｅ- Ａｌａ- ｐｉｐ）のき成

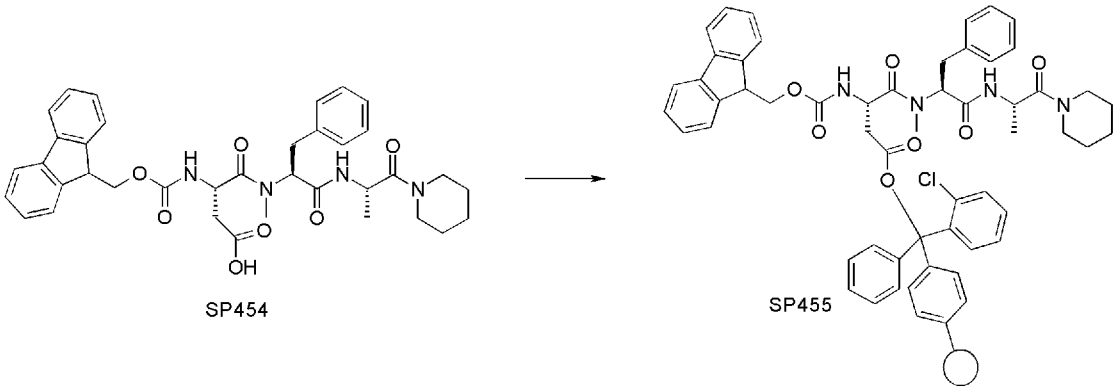


[0679] 窒素雰囲気下、Ｆｍｏｃ—Ａｓｐ（０Ｂｎ）-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５３）（７．４４ｇ、１０．０ｍｍｏｌ）、および２０％パラジウム－活性炭素（１．４９ｇ、２．８ｍｍｏｌ）をメタノール（５０ｍｌ）に加え、反応容器中を水素ガスで置換し、室温で５時間攪拌した。反応液をセライトで濾過後、有機層を減圧濃縮し、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ＿ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５４）（５．６９ｇ、８６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ６５５．６ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．６１分 (分析条件ＳＱＤＡＡ５０)

[0680] （３Ｓ）-３-（９Ｈ—フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニルアミノ）-４-「メチル－「（２Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿「「（２Ｓ）＿１＿オキソ-１-ピペリジン－１—イルプロパン－２—イル'１'アミノ'１'—３—フエニルプロパン－２—イル'１'アミノ'１'＿４＿オキソブタン酸－２＿クロロトリチルレジン（化合物ＳＰ４５５，ＦｍｏｃーＡｓｐ（Ｏ－Ｔｒｔ（２－Ｃｌ）－Ｒｅｓｉｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ）の合成

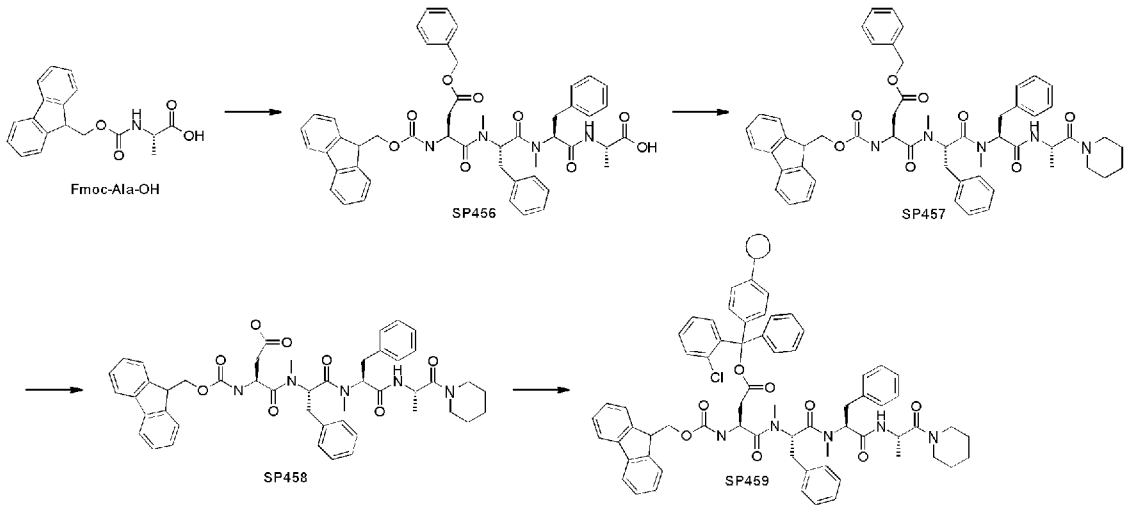


[0681] フィルター付きの反応容器に２＿クロロトリチルクロライドレジン（１００＿２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、渡辺化学から購入、１０．８ｇ、１７．

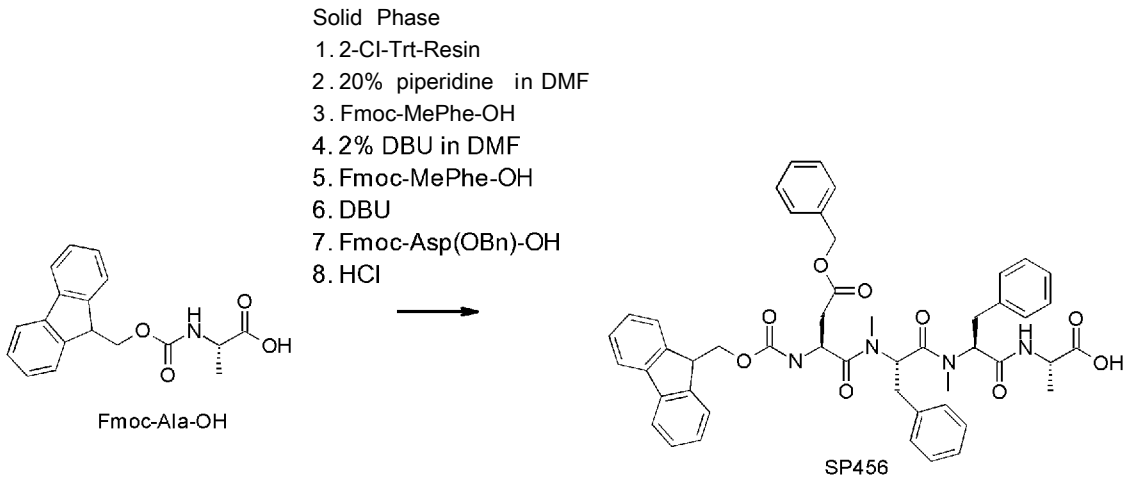
２ｍｍｏｌ）と脱水ジクロロメタン（１００ｍｌ）を入れ、室温にて１０分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ＿ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５４）（５．６４ｇ、８．６１ｍｍｏｌ）の脱水ジクロロメタン（１００ｍｌ）溶液に脱水メタノール（１．４ｍｌ）およびジィソプロピルエチルァミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（７．２ｍｌ，４１．３ｍｍｏｌ）を加えた混合液を反応容器に添加し、４０分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（１００ｍｌ）に脱水メタノール（２２．４ｍｌ）およびジイソプロピルエチルァミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（７．２ｍｌ，４１．３ｍｍｏｌ）を加えた混合液を反応容器に添加し、２時間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（１００ｍｌ）を入れ、５分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン（１００ｍｌ）を入れ、５分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ（０-Ｔｒｔ（２-Ｃｌ）-Ｒｅｓｉｎ）-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５５）（１４．Ｏｇ）を得た。

ローディング率：０．３１７ｍｍｏｌ/ｇ、２５．７％

[0682] 以下のスキームに従い、（３Ｓ）＿３＿（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィルメトキシカルボニルァミノ）＿４＿［メチルー［（２Ｓ）＿１＿［メチルー［（２Ｓ）—１—オキソー１—［［（２Ｓ）—１—オキソー１—ピペリジンー１—ィルプロパン＿２＿ィル］ァミノ］＿３＿フエニルプロパンー２—ィル］ァミノ］—１—オキソー３—フエニルプロパンー２—ィル］ァミノ］—４—オキソプタン酸ー２＿クロロトリチルレジン（化合物ＳＰ４５９，Ｆｍｏｃ-Ａｓｐ（０-Ｔｒｔ（２-Ｃｌ）-Ｒｅｓｉｎ）-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐ）の合成を行った。



[0683] （２Ｓ）－２－｛｛(２Ｓ)－２－｛｛(２Ｓ)－２－｛｛(２Ｓ)－２－(９Ｈ—フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ)－４—オキソ－４－フエニルメトキシブタノイル｝—メチルアミノ｝－３－フエニルプロパノイル｝—メチルアミノ｝－３－フエニルプロパノイル｝アミノ｝プロパン酸（化合物ＳＰ４５６，Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－０Ｈ）の合成



[0684] （２Ｓ）—２—（９Ｈ－フルオレン－９—イルメトキシカルボニルアミノ）プロパン酸（Ｆｍｏｃ—Ａｌａ－ＯＨ）（４．８６ｇ、１５．８ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（１４．５ｍＬ、８３ｍｍｏｌ）を脱水ジクロロメタン（６０ｍｌ）に溶解し、２－クロロトリチルクロライドレジン（１００－２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、渡辺化学から購入、６．５ｇ、１０．５ｍｍｏｌ）を加え、室温で９０分振とうす

ることで、アミノ酸をレジンに担持させた。反応溶液を除去し、レジンをジクロロメタン（１００ｍｌ）で4回洗浄した。レジンに２０％ピペリジンＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（５２ｍｌ）を加え６０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で3回洗浄した。続いて（２Ｓ）－２－［９Ｈ－フルオレン_９_ィルメトキシカルボニル（メチル）ァミノ］_３_フエニルプロパン酸（Ｆｍｏｃ―ＭｅＰｈｅ―０Ｈ）（３．７４ｇ、９．３ｍｍｏｌ）、３Ｈ－（１，２，３）トリァゾロ（４，５－ｂ）ピリジン－３―オール（ＨＯＡｔ）（１．２７ｇ、９．３ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ'―メタンジイリデンビス（プロパン－２―ァミン）（ＤＩＣ）（１．４４ｍし ９．３ｍｍ$_0$ 1）を叱 Ｎ―ジメチルホルムアミド（１３．５ｍｌ）に溶解し、レジンに加えて室温で９０分間振とうし、ペプチド化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（２３ｍｌ）で3回洗浄後、ジクロロメタン（２３ｍｌ）でさらに3回洗浄した。続いてレジンに２％２，３，４，６，７，８，９，１０―オクタヒドロピリミド［１，２―ａ］ァゼピン Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（２％ ＤＢＵ ｉｎ ＤＭＦ）（４０ｍｌ）を加え６０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で3回洗浄した。続いて（２Ｓ）－２－［９Ｈ―フルオレン_９_ィルメトキシカルボニル（メチル）ァミノ］_３_フエニルプロパン酸（Ｆｍｏｃ_ＭｅＰｈｅ_ＯＨ）（４．６１ｇ、１１．５ｍｍｏｌ）、３Ｈ－（１，２，３）トリアゾロ（４，５－ｂ）ピリジン－３―オール（ＨＯＡｔ）（１．５８ｇ、１１．６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ'―メタンジイリデンビス（プロパン－２―ァミン）（ＤＩＣ）（１．７８ｍし １１．６ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（３０ｍｌ）に溶解し、レジンに加えて室温で１６時間振とうし、ペプチド化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で3回洗浄後、ジクロロメタン（４５ｍｌ）でさらに3回洗浄した。続いてレジンに２％２，３，４，６，７，８，９，

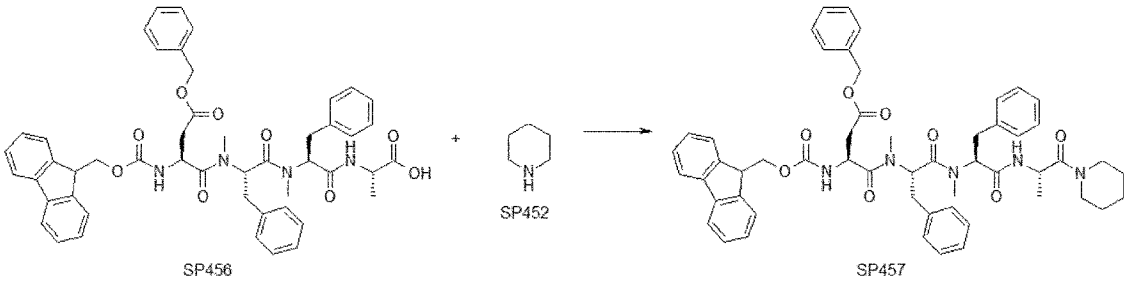
１０―オクタヒドロピリミド[１，２_ａ]アゼピン　Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（2％　ＤＢＵ　ｉｎ　ＤＭＦ）（４０ｍｌ）を加え６０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で3回洗浄した。続いて（２Ｓ）-２-（９Ｈ―フルオレン_９_イルメトキシカルボニルアミノ）_４―オキソ―4_フエニルメトキシプタン酸（Ｆｍｏｃ―Ａｓｐ（０Ｂｎ）―ＯＨ）（５．１４ｇ、１１．５ｍｍｏｌ）、３Ｈ―（１，２，３）トリアゾロ（4，５-ｂ）ピリジン―3―オール（ＨＯＡｔ）（１．５８ｇ、１１．６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ'―メタンジイリデンビス（プロパン―２―アミン）（ＤＩＣ）（１．７８ｍし　１１．６ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（３０ｍｌ）に溶解し、レジンに加えて室温で１６時間振とうし、ペプチド化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（４５ｍｌ）で3回洗浄後、ジクロロメタン（４５ｍｌ）でさらに3回洗浄した。続いて4Ｎ塩酸酢酸エチル溶液（１．９２ｍし　７．６９ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１００ｍｌ）と混ぜた溶液を前述のレジンに加え、１時間振とうを2回行い、アミノ酸のレジンからの切り出しをおこなった。レジンをジクロロメタン/２，２，２―トリフルオロエタノール（= 1/１，ｖ/ｖ、２５ｍＬ）にて2回洗浄した後、全ての抽出液を混合し減圧下濃縮し、Ｆｍｏｃ_Ａｓｐ（０Ｂｎ）-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ＯＨ（化合物ＳＰ４５６）（７．８１ｇ）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　８３９．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７１分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0685] （３Ｓ）-３-（９Ｈ―フルオレン_９_イルメトキシカルボニルアミノ）-４-「メチル―「（２Ｓ）-１-「メチル―「（２Ｓ）_１_オキソ_１-「「（２Ｓ）―１―オキソ―１―ピペリジン―１―イルプロパン―２―イル'_アミノ'_―３―フエニルプロパン―２―イル'_アミノ'_―１―オキソ―３―フエニルプロパン―２―イル'_アミノ'_―４―オキソプタン酸ベンジル（化合物ＳＰ４５７，　Ｆｍｏｃ-Ａｓｐ（ＯＢｎ）_ＭｅＰｈｅ_ＭｅＰ

ｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ）の合成

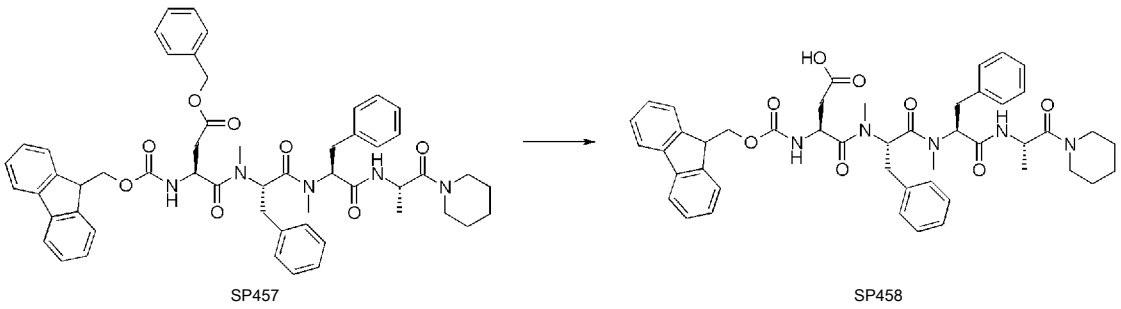


[0686] 窒素雰囲気下、Ｆｍｏｃ—Ａｓｐ（０Ｂｎ）—ＭｅＰｈｅ—ＭｅＰｈｅ—Ａｌａ－０Ｈ（化合物ＳＰ４５６）（７．８１ｇ、９．７０ｍｍｏｌ）、ジィソプロピルエチルァミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（３．０４ｍし　１７．５ｍｍｏｌ）および０＿（７—アザ—１Ｈ—ベンゾトリアゾール—１—イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'—テトラメチルゥロニゥム　ヘキサフルオロリン酸塩（ＨＡＴＵ）（４．８０ｇ、１２．６ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド（４０ｍｌ）に溶解し、ピペリジン（化合物ＳＰ４５２）（０．９４ｍし　９．５１ｍｍｏｌ）を加えて室温で１５分攪拌した。反応液に１５０ｍｌの酢酸エチルを加え、有機層を１５０ｍｌのアンモニゥムクロリド飽和水溶液、１５０ｍｌの純水および１５０ｍｌの飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、減圧濃縮し、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ（ＯＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５７）（８．０６ｇ、９２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　９０６．７　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８７分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0687] （３Ｓ）－３－（９Ｈ—フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニルァミノ）－４－｛メチル—｛（２Ｓ）－１－｛メチル—｛（２Ｓ）＿１＿オキソ＿１－｛｛（２Ｓ）—１—オキソ—１—ピペリジン—１—イルプロパン—２—イル｝ァミノ｝—３—フエニルプロパン—２—イル｝ァミノ｝—１—オキソ—３＿フエニルプロパン—２—イル｝ァミノ｝＿４＿オキソブタン酸（化合物ＳＰ４５８，　Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ）の合成

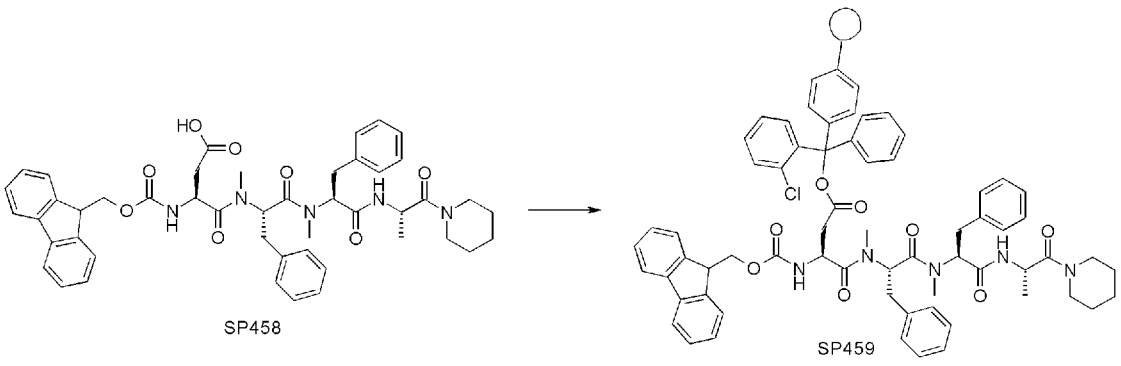


[0688] 窒素雰囲気下、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ（０Ｂｎ）－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５７）（８．０６ｇ、８．９０ｍｍｏｌ）、および２０％パラジウム—活性炭素（１．６１ｇ、３．０ｍｍｏｌ）をメタノール（５０ｍｌ）に加え、反応容器中を水素ガスで置換し、室温で５時間攪拌した。反応液をセライトで濾過後、有機層を減圧濃縮し、Ｆｍｏｃ＿Ａｓｐ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ（化合物ＳＰ４５８）（４．７９ｇ、６６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　８１６．７　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６９分（分析条件３０Ｄ六六５０）

[0689] （３Ｓ）－３－（９Ｈ—フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニルアミノ）－４－「メチル—「（２Ｓ）－１－「メチル—「（２Ｓ）＿＿１＿オキソ＿１－「「（２Ｓ）＿—１—オキソ—１—ピペリジン—１—イルプロパン—２—イル’１＿アミノ’１＿—３—フエニルプロパン—２—イル’１＿アミノ’１＿—１—オキソ—３—フエニルプロパン—２—イル’１＿アミノ’１＿—４—オキソプタン酸—２—クロロトリチルレジン＿（化合物ＳＰ４５９，　Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（Ｏ－Ｔｒｔ（２－Ｃｌ）－Ｒｅｓｉｎ）－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐ）の合成

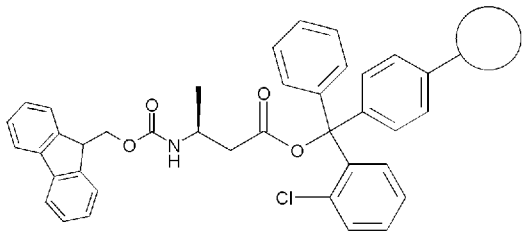


[0690] フィルター付きの反応容器に2_クロロトリチルクロライドレジン（100_200mesh、1%DVB、渡辺化学から購入、6.69g、11.7mmol）と脱水ジクロロメタン（50ml）を入れ、室温にて10分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、Fmoc_Asp_MePhe-MePhe-Ala-pip（化合物SP458）（4.79g、5.87mmol）の脱水ジクロロメタン（100ml）溶液に脱水メタノール（0.95ml）およびジィソプロピルエチルァミン（EtN（iPr）$_2$）（4.91mし28.2mmol）を加えた混合液を反応容器に添加し、40分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（100ml）に脱水メタノール（15.2ml）およびジィソプロピルエチルァミン（EtN（iPr）$_2$）（4.9ml，28.2mmol）を加えた混合液を反応容器に添加し、2時間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（100ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン（100ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、Fmoc_Asp（0-Trt（2-Cl）-Resin）-MePhe-MePhe-Ala-pip（化合物SP459）（8.66g）を得た。

ローデイング率：0.285mmol/g、21.0%

[0691] 1-1-3. Fmoc-Aspの側鎖カルボン酸にてレジンと結合させた化合物誘導体として主鎖カルボン酸部位を除去した化合物（化合物SP405、L-3-ABUのカルボン酸部位とレジンとが結合した化合物）の合成

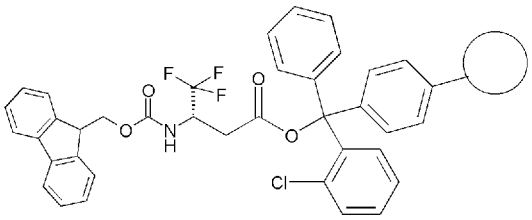
[0692] (S)-3-(((（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）プタン酸ー2—クロロトリチルレジン（Fmoc—L—3—ABU-（0-Trt-（2-Cl）-Resin、化合物SP405）の合成



[0693] フィルター付きの反応容器に2_クロロトリチルクロライドレジン（100_200mesh、1%DVB、渡辺化学から購入、3.84g、6.15mmol）と脱水ジクロロメタン（61ml）を入れ、室温にて10分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、（S）-3-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ブタン酸（化合物SP406、Fmoc-L-3-ABU-OH）（1.00g）の脱水ジクロロメタン（61ml）溶液に脱水メタノール（980μl）およびジイソプロピルエチルアミン（2.52ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（64ml）に脱水メタノール（8.0ml）およびジイソプロピルエチルアミン（2.5ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、2時間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（61ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン（61ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、（S）-3-（（（（9H—フルオレン－9—イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ブタン酸－2_クロロトリチルレジン（化合物SP405）（4.16g）を得た。ローディング率：0.470mmol／g、31.8%

[0694] 1-1-4．Fmoc-Aspの側鎖カルボン酸にてレジンと結合させた化合物誘導体として主鎖カルボン酸部位を除去した化合物（3_CF3_bAlaのカルボン酸部位とレジンとが結合した化合物、化合物SP407）の合成

[0695] （S）-3-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－4，4，4—トリフルオロブタン酸－2_クロロトリチルレジン（Fmoc_3_CF3_bAla-（0-Trt-（2-Cl）-Resin、化合物SP407）の合成



[0696] フィルター付きの反応容器に2_クロロトリチルクロライドレジン（100_200mesh、1%DVB、渡辺化学から購入、1.65g、2.64mmol）と脱水ジクロロメタン（26ml）を入れ、室温にて10分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、（S）-3-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_4,4,4—トリフルオロプタン酸（化合物SP408、Fmoc-CF3-bAla-0H）（500mg）の脱水ジクロロメタン（26ml）溶液に脱水メタノール（428μl）およびジイソプロピルエチルアミン（1.03ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（25ml）に脱水メタノール（3.Oml）およびジイソプロピルエチルアミン（1.Oml）を加えた混合液を反応容器に添加し、2時間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン（25ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン（25ml）を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、（S）_3_（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_4,4,4—トリフルオロプタン酸—2_クロロトリチルレジン（化合物SP407）（1.76g）を得た。

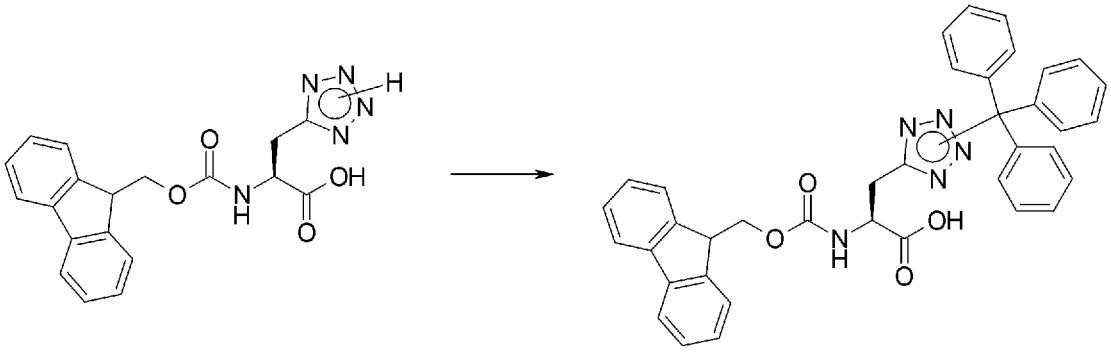
ローディング率：0.234mmol/g、15.6%

[0697] 1-2._アミノ酸誘導体の合成

ドラックライクネスを評価するための多くのアミノ酸誘導体は購入可能もしくは文献既知であり、定法により合成することができる。以下には文献未知のアミノ酸誘導体の合成法を記載した。

[0698] (2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(1-トリチル_トラゾール-5-イル)プロパン酸と(2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(2-トリチルテトラゾール-5-イル)プロパン酸（化合物SP409、Fmoc-ALa(5-Tet_(Trt)_)-0H)_の合成

以下のスキームに従い、合成を行った



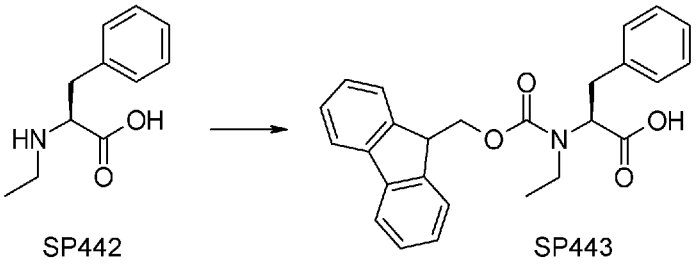
[0699] 上のスキームで、トリチル基はテトラゾール環上の4つの窒素原子のいずれかと結合していることを意味する。

[0700] (2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(1H-テトラゾール-5-イル)プロパン酸と(2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(2H-テトラゾール-5-イル)プロパン酸(化合物SP410、Fmoc-ALa(5-Tet)-0H)(900mg、2.37mmol)をテトラヒドロフラン(2.7ml)に溶解し、N,N—ジイソプロピルエチルアミン(0.36mL、2.61mmol)を加え5分攪拌した。上述の反応溶液にトリチルクロリド(628mg、2.25mmol)をテトラヒドロフラン(0.6ml)に溶解した溶液を加え90分攪拌した。反応液を濾過し、回収した反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール)で精製し、(2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(1-トリチルテトラゾール-5-イル)プロパン酸と(2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-(2-トリチルテトラゾール-5-イル)プロパン酸(化合物SP409、Fmoc-ALa(5-Tet(Trt)-0H)(644mg、44%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 620.3 (M-H)-

保持時間:1.06分(分析条件SQDAA05)

[0701] (S)-2-((((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)_3_フエニルプロパン酸(化合物SP443、Fmoc-Et-Phe-OH)の合成



SP442 SP443

[0702] （Ｓ）－２－（エチルアミノ）＿３＿フエニルプロパン酸（化合物ＳＰ４４２）の合成を、文南犬Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ａｓｙｍｍｅｔｒｙ、１９（８）、９７０—９７５；２００８、Stodu Lski, Maciej and MLynarski, Jaceに に従って合成した。

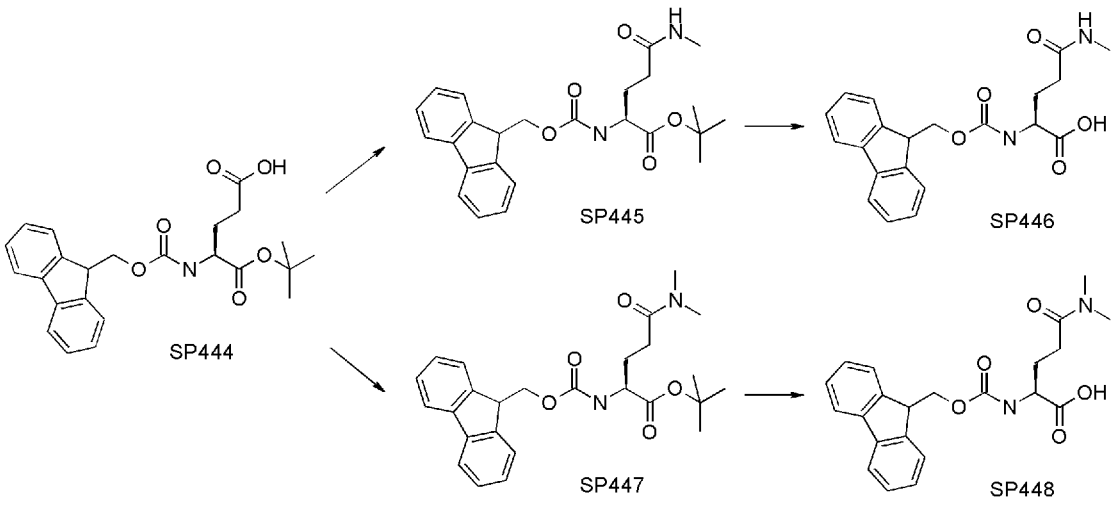
（Ｓ）－２－（エチルアミノ）＿３＿フエニルプロパン酸（化合物ＳＰ４４２）（４．００ｇ、２０．７ｍｍｏｌ）を１，４＿ジオキサン（１００ｍｌ）と水（１００ｍｌ）の混合液に溶解させ、炭酸カリウム（８．６９ｇ、６２．９ｍｍｏｌ）および炭酸 （２，５＿ジオキソピロリジン—１＿イル） （９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メチル（６．９８ｇ、２０．７ｍｏｌ）を加え、室温で８時間攪拌した。水層を硫酸水素カリウム水溶液でｐＨ４に調整し、減圧下で１，４＿ジオキサンを留去した。得られた水溶液を酢酸エチルにて抽出し、得られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後に減圧濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（酢酸エチル：石油エーテル＝１：１）で精製し、（２Ｓ，４Ｒ）－１－（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）＿４—エトキシピロリジン—２＿カルボン酸（化合物ＳＰ４４３）（３．２ｇ、３７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ ＝ ４１６ （Ｍ＋Ｈ）＋

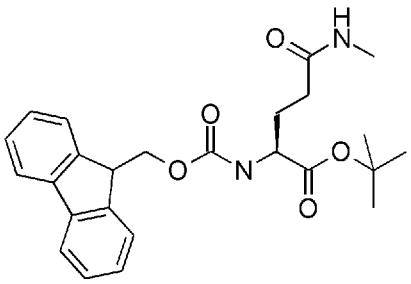
保持時間：１．９７分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１１）

[0703] (S)-2-(（((9H-フルォレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-（メチルアミノ)-5-ォキソペンタン酸（Ｆｍｏｃ＿Ｇｌｎ（Ｍｅ）－ＯＨ、化合物ＳＰ４４６）及び（S)-2-(（((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-（ジメチルアミノ)-5-ォキソペンタン酸（Ｆｍｏｃ＿Ｇｌｎ（Ｍｅ２）－ＯＨ、化合物ＳＰ４４８）の合成

以下のスキームに従って合成した。



[0704] (S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(メチルアミノ)-5-オキソペンタン酸 tert-ブチル（化合物ＳＰ４４５）の合成

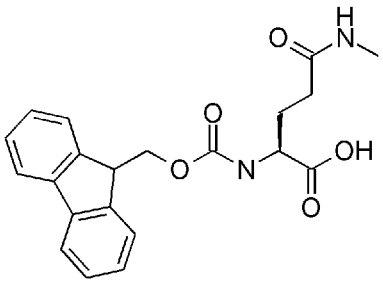


[0705] （Ｓ）－３－（（（（９Ｈ—フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_４_（ｔｅｒｔ—ブトキシ）_４_オキソブタン酸（化合物ＳＰ４４４）（７．００ｇ、１７．０ｍｍｏｌ）をジメチルホルムアミド（５０ｍｌ）に溶解し、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール—１—イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（ＰｙＢＯＰ）（１０．３ｇ、１９．８ｍｍｏｌ）と、メチルアミン（４２ｍｍｏｌ）を２ｍｏｌ／ｌのテトラヒドロフラン溶液として加え、室温で１時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機抽出液を重曹水、水で順に洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下溶媒留去することで、（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ—フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルアミノ）－５—オキソペンタン酸　ｔｅｒｔ—ブチル（化合物ＳＰ４４５）（１３．３ｇ）を粗生成物として得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　４３９　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 ：1．０５分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0706] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(メチルアミノ)-5-オキソペンタン酸 (化合物ＳＰ４４６)_の合成

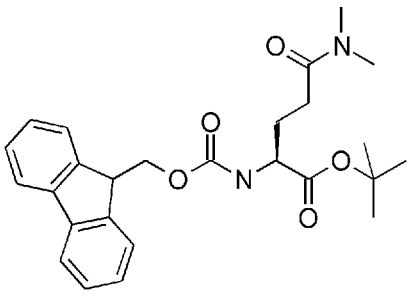


[0707] （Ｓ）－２－（（（（９Ｈ—フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－５—（メチルアミノ）－５—オキソペンタン酸 ｔｅｒｔ—ブチル (化合物ＳＰ４４５）（１３．３ｇ、粗生成物）をジクロロメタン（１４０ｍｌ）とトリフルオロ酢酸 (１４０ｍｌ）の混合液に溶解し、室温にて２時間攪拌した。減圧下溶媒留去し、得られた固体をヘキサンで洗浄後、真空乾燥して (Ｓ）_２_（（（（９Ｈ—フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルアミノ）_５_オキソペンタン酸（化合物ＳＰ４４６）（５．８４ｇ、９３％、２工程）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ３８３ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 ：２．０７分 (分析条件ＺＱＡＡＯ５)

[0708] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(ジメチルアミノ)-5-オキソペンタン酸tert-ブチル (化合物ＳＰ４４７)_の合成



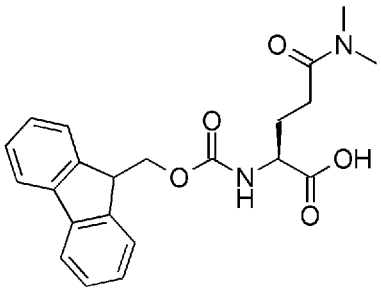
[0709] （Ｓ）－３－（（（（９Ｈ—フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_４_（ｔｅｒｔ—ブトキシ）_４_オキソブタン酸 (化合物ＳＰ４４４）（１０．０ｇ、２３．５ｍｍｏｌ）をジメチルホルムアミド（

７０ｍｌ）に溶解し、（(ベンゾトリアゾール―１―ィルオキシ）―トリス（ジメチルァミノ）ホスホニゥム　ヘキサフルオロリン酸塩　(ＢＯＰ）（１２．５ｇ、２８．３ｍｍｏｌ）と、ジメチルァミン（５８ｍｍｏｌ）を２ｍｏｌ/ｌのテトラヒドロフラン溶液として加え、室温で３０分攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機抽出液を硫酸マグネシゥムで乾燥し、減圧下溶媒留去することで、(Ｓ）-２-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）_５_（ジメチルアミノ）_５_オキソペンタン酸　ｔｅｒｔ_ブチル　(化合物ＳＰ４４７）（１５．２ｇ）を粗生成物として得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　４５３　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：３．００分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0710] (S)-2-(　((9H-フルォレン-9-ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(ジメチルァミノ)-5-ォキソペンタン酸　(化合物ＳＰ４４８）の合成

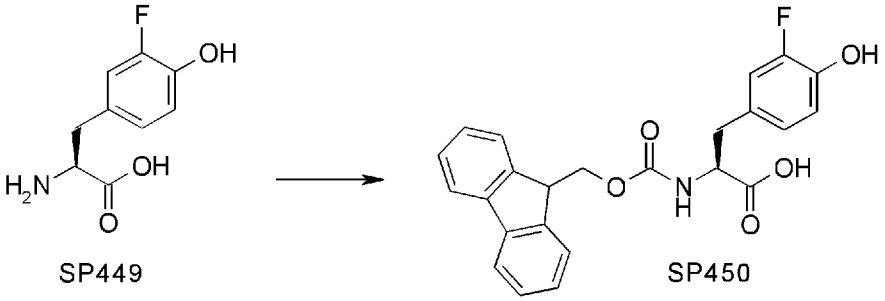


[0711] （Ｓ）-２-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）－５―（ジメチルァミノ）－５―オキソペンタン酸　ｔｅｒｔ―ブチル　(化合物ＳＰ４４７（１５．２ｇ、粗生成物）をジクロロメタン（２００ｍｌ）とトリフルオロ酢酸（２００ｍｌ）の混合液に溶解し、室温にて２．５時間攪拌した。減圧下溶媒留去し、得られた固体をヘキサンとｔｅｒｔ_ブチルメチルエーテルの混合溶液で洗浄後、真空乾燥して（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）-５-（ジメチルァミノ）_５_オキソペンタン酸　(化合物ＳＰ４４８）（９．１２ｇ、８５％、２工程）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　３９７　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：2．18分 (分析条件ZQAAO5)

[071 2] _(S)-2-((((9H—フルオレン_9_イル)_メトキシ)_カルボニル)_アミノ)_—3—_(3—フルオロ—4—ヒドロキシフエニル)_プロパン酸 (Fmoc-Tyr(3-F)-0H、化合物SP450)の合成



[071 3] (S)_2—アミノ—3_(3_フルオロ_4—ヒドロキシフエニル)プロパン酸 (H-Tyr (3-F)-0H 、SP449) (7．2g、36．2mmol)を10%炭酸ナトリウム水溶液 (250ml)に溶解し、N_(9_フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)—スクシンイミド(12．2g、36．2mmol)を加えて室温で1時間半攪拌した。反応液に水 (120ml)を加えた後、200mlのジエチルエーテルで2回洗浄し、100mlのジエチルエーテルで1回洗浄した。水層に6NのHCl水溶液を加えて酸性 (pH=2)とした後、250ml酢酸エチルで2回、200ml酢酸エチルで1回抽出した。得られた酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮して、標題化合物 (SP450、15．3g、100%)を得た。

LCMS (ESI) m/z =420．3 (M-H)-

保持時間：0．39分 (分析条件 SQDAA50)

[0714] 1-3．アミド環化ドラックライクペプチドの合成

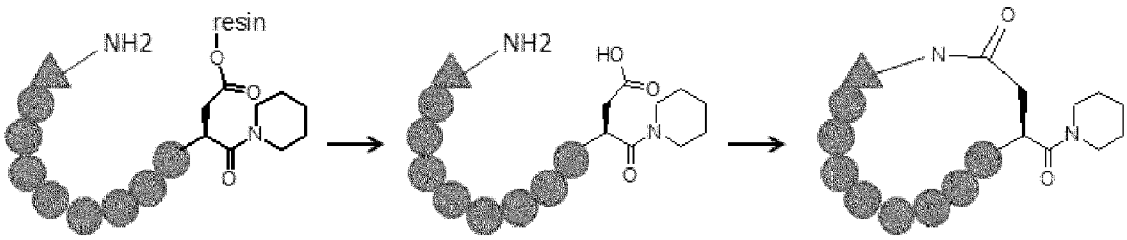
1-3-1． C末端のAspが交差ユニットとして機能し、すなわち主鎖カルボン酸がピペリジンなどによりアミド化され、側鎖カルボン酸でN末端の主鎖アミン_(三角ユニット)_とアミド環化したアスパラギン酸を有するペプチド群き 細

[071 5] C末端がアミド化 (本例ではピペリジン化)されたアスパラギン酸側鎖カル

ボン酸とN末端の主鎖アミノ基がアミド結合により環化されたペプチド群の合成例を述べる。本例を1つの代表例として述べるが、ペプチド化学合成については、本明細書の異なる場所に記載されているどの手法を用いてもよい。以下のスキームG1にその合成の一例を示した。

[0716] 化合物SP402（化合物SP401 (Fmoc-Asp-pip) を担持させた2_クロロトリチルレジン）(200mg）を用い、Fmocアミノ酸としては、Fmoc_MePhe_OH、Fmoc-EtPhe-OH（化合物SP443）、Fmoc_MeAla_0H、Fmoc_MeLeu_0H、Fmoc-D_MeAla_OH、Fmoc-MeGly-OH、Fmoc-MeVal_OH、Fmoc-MeIle_OH、Fmoc_g_MeAbu_0H、Fmoc-b-MeAla—OH、Fmoc—nPrGly—OH（化合物SP815）、Fmoc-MeAla（4-Thz）-OH（化合物SP811）、Fmoc－Pro-0H、Fmoc—Aze（2）-0H、Fmoc-Pic（2）－0H、Fmoc-Phe_0H、Fmoc–Phg－0H、Fmoc－al_0H、Fmoc-D-Val－0H、Fmoc－Ser（tBu）-0H、Fmoc－Thr（Trt）－0H、Fmoc－leu—OH、Fmoc-D-Leu-0H、Fmoc－Ile–0H、Fmoc—Ala-0H、Fmoc—D-Ala_0H、Fmoc–Gly－0H、Fmoc－_ys（Me2）－0H、Fmoc－Arg（Me2）－0H、Fmoc—Gln（Me2）－0H（化合物SP448）、Fmoc－Gln（Me）-0H（化合物SP446）、Fmoc—Gln-0H、Fmoc-Alg1y-0H、Fmoc－Ala（4-Thz）-0H、Fmoc-Ala（CN）－0H、Fmoc-Hph_0H、Fmoc–Phe3－0H、Fmoc—Ala（3Pyr）-0H、Fmoc-Tyr（3－F）-OH（化合物SP450）などを用いてペプチドの伸長を行った (アミノ酸の略語は表11—2に記載）。既に実施例に記載のFmoc法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った。ペプチドの伸長後、N末端のFmoc基の除去をペプチド合成機上にて行った後、レジンをDMFにて洗浄した。

レジンに4 N 1-1 ○ 1の1，4 —ジオキサン溶液／ジクロロメタン／2，2，2 — トリフルオロエタノール/ トリイソプロピルシラン (= 1/ 60/ 30/ 5．7，v/ v、4mL）を加えて2時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/ 2，2，2-トリフルオロエタノール (= 1/ 1，v/ v、1mL）にて2回洗浄した。全ての抽出液を混合し、DIPEA（43．2μL、0．248mmol）にて中和した後、減圧下濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン (8mL）に溶解した。0 —（7 — アザー1Hベンゾトリアゾール— 1 — イル）— N，N，N，Nテトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフエート (HATU）（0．24mmol）のDMS0溶液 (0．24mL），DIPEA （50．2μL、0．29mmol）を加え、室温にて2時間振とうした。減圧下、溶媒を留去した後、DMSOに溶解し、preparative_HPLCで精製し、表題のアミド環化ドラックライクペプチドの合成を行った。なお、DP_1~39、DP_47~122、DP-125~176、DP_215~277、DP_317~343、DP-408〜442、DP_465~482、DP_485~489、DP_494、DP—511~564、DP-587〜588、DP-590〜591、DP-593~594、DP_597~630、DP_632~638、DP-673〜675、DP-677〜751が本合成法に準拠した方法で合成可能である。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表11_3_2に記載した。



スキームG1. アミド環化ドラッグライクペプチドの合成法の一例

17] [表1

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-1	1481.9	12.5	Ala	Val	MeGly	Leu	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Asp	pip					
DP-2	1524.0	14.4	Ala	Val	MeLeu	MeGly	MeLeu	MeIle	Ala	MePhe	MePhe	Thr	MeLeu	Pro	Asp	pip					
DP-3	1326.6	9.0		Ala	Ala	Leu	MeVal	Leu	Phe	Phe	Pro	Ile	Thr	Gly	Asp	pip					
DP-4	1348.7	11.0		Ala	Val	MeAla	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Pro	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-5	1306.7	9.6		Ala	Ile	Pro	MeLeu	Thr	Gly	Phe	MeAla	Val	Leu	Leu	Asp	pip					
DP-6	1354.7	10.3		Ala	Thr	MeLeu	Leu	Phe	Pro	Phe	Val	MeGly	MeIle	Ala	Asp	pip					
DP-7	1382.8	11.4		Ala	Leu	MeGly	Leu	MeIle	MeAla	Phe	Thr	Phe	MeLeu	Pro	Asp	pip					
DP-8	1398.8	12.6		Ala	Leu	MeIle	MeLeu	Gly	MeAla	Phe	Thr	MeLeu	Phe	MeVal	Asp	pip					
DP-9	1382.8	11.6		Ala	Ile	Pro	MeLeu	MeGly	Thr	MePhe	MeAla	Leu	MeVal	Phe	Asp	pip					
DP-10	1438.9	13.6		Ala	Ile	Pro	MeLeu	Thr	MePhe	MePhe	Ala	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-11	1396.8	12.3		Ala	Thr	MePhe	MeLeu	Val	Pro	MePhe	Leu	MeGly	MeIle	MeAla	Asp	pip					
DP-12	1452.9	14.3		Ala	Thr	MeAla	MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	MePhe	Ile	Pro	MeVal	Asp	pip					
DP-13	1299.7	11.1			Ala	Ile	MeLeu	Leu	Thr	MePhe	Ala	Leu	Val	Phe	Asp	pip					
DP-14	1283.6	10.2			Ala	Leu	MeLeu	MeVal	Phe	MePhe	Ile	Pro	Gly	Thr	Asp	pip					
DP-15	1311.7	11.5			Ala	Val	MeLeu	MeLeu	MePhe	Phe	MeIle	Pro	MeGly	Thr	Asp	pip					
DP-16	1297.6	11.3			Ala	Gly	MeLeu	MeIle	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Pro	Asp	pip					
DP-17	1226.6	10.5				Ala	Leu	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	Pro	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-18	1214.6	10.8				Ala	Leu	MeIle	MeAla	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-19	1439.8	10.5	Ala	Phe	Ile	Pro	Leu	Thr	Gly	Phe	MeAla	Val	Leu	Leu	Asp	pip					
DP-20	1453.8	11.2	Ala	Gly	Thr	MePhe	Leu	Pro	Val	Phe	Leu	MeLeu	Ala	Ile	Asp	pip					
DP-21	1467.9	11.8	Ala	Val	MeAla	Thr	Leu	Phe	MeLeu	Pro	Phe	Ile	MeGly	Leu	Asp	pip					
DP-22	1481.9	12.5	Ala	Gly	MeVal	Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ile	Phe	Pro	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-23	1340.7	9.6		Ala	Phe	Pro	Leu	Thr	Gly	Phe	Val	MeAla	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-24	1354.7	10.3		Ala	Thr	MePhe	Leu	Pro	Val	Phe	MeGly	Leu	Ala	MeIle	Asp	pip					
DP-25	1424.8	13.0		Ala	Val	MeAla	MeLeu	Leu	Phe	MePhe	Ile	Pro	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-26	1368.7	11.0		Ala	Gly	MeVal	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Asp	pip					
DP-27	1382.8	11.6		Ala	Thr	MePhe	Leu	Pro	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ala	MeIle	Asp	pip					
DP-28	1243.6	9.1			Ala	Ile	Leu	MeGly	Ala	Phe	Thr	Leu	MePhe	Val	Asp	pip					
DP-29	1311.7	11.3			Ala	Ala	MeLeu	Leu	MeIle	Phe	Phe	Pro	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-30	1255.6	9.3			Ala	Gly	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	Phe	Leu	Pro	Asp	pip					
DP-31	1285.6	11.1			Ala	Gly	MeLeu	MeIle	Ala	MePhe	Thr	MeLeu	Phe	MeVal	Asp	pip					
DP-32	1221.5	9.5			Ala	Leu	Pro	Thr	MeGly	Phe	MeVal	MeAla	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-33	1113.4	9.0					Ala	Leu	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	Pro	Thr	Asp	pip					
DP-34	1085.4	8.3					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	pip					
DP-35	1370.7	11.2		Ala	Leu	MeIle	Leu	MeGly	Thr	Phe	Ala	MeLeu	Phe	Val	Asp	pip					
DP-36	1196.5	10.2				Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-37	1111.4	9.5					Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-38	1069.4	8.0					Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-39	1083.4	8.5					MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-40	1453.8	10.7		Ala	Leu	Pro	Ala	Leu	MeGly	Thr	Phe	Leu	MePhe	Val	Asp	Ile	pip				

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-41	1453.8	10.5			Ala	Leu	Phe	Leu	Thr	Pro	MeGly	Phe	Val	MeAla	Asp	Leu	Ile				
DP-42	1453.8	10.3				Ala	Leu	Thr	MeLeu	Phe	Pro	Val	Phe	MeLeu	Asp	Gly	Ala	pip			
DP-43	1396.8	10.8				Ala	Phe	Pro	Leu	Thr	Leu	Phe	MeVal	Ala	Asp	MeLeu	Ile	Ile	pip		
DP-44	1297.6	10.3				Ala	Thr	Leu	Pro	Phe	MePhe	MeVal	Ala	MeLeu	Asp	Ile	pip				
DP-45	1297.6	10.0						Ala	Leu	MeLeu	Ala	Leu	MePhe	Phe	Asp	Thr	Pro	Ile	pip		
DP-46	1200.5	9.1							Ala	Leu	Thr	MePhe	Phe	MeAla	Asp	Val	MeLeu	Ile	pip		
DP-47	1385.8	13.2			MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	Melle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-48	1327.7	11.9			b-MeAla	Leu	MeLeu	Melle	Ala	MePhe	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-49	1413.8	14.2			D-MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	Thr	MeAla	Melle	MeLeu	Asp	pip					
DP-50	1244.6	9.4				b-MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeVal	Phe	Asp	pip					
DP-51	1228.6	11.8				D-MeAla	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-52	1089.3	7.4					D-Ala	Thr	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-53	1384.8	12.0		D-Ala	Thr	MePhe	Leu	MeAla	Val	Phe	MeLeu	Leu	Gly	Melle	Asp	pip					
DP-54	1382.8	11.4		D-Ala	Leu	MeAla	Leu	Melle	MePhe	Gly	Thr	Phe	MeLeu	Pro	Asp	pip					
DP-55	1426.8	11.2		D-Val	Phe	MeGly	Leu	Phe	Pro	Thr	Ser(tBu)	MeLeu	Melle	Ala	Asp	pip					
DP-56	1410.8	12.6		D-Val	Thr	MeGly	Leu	Pro	MeVal	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	Melle	Asp	pip					
DP-57	1412.8	10.8		MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Gly	Melle	Leu	Pro	Thr	MeAla	Phe	Asp	pip					
DP-58	1396.8	12.2		MeAla	Thr	MePhe	Leu	Pro	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Melle	Ala	Asp	pip					
DP-59	1370.7	10.7		b-MeAla	MeAla	Phe	Val	MeLeu	Melle	Gly	MePhe	Thr	MeAla	Leu	Asp	pip					
DP-60	1111.4	9.6					MeGly	MeGly	Thr	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Melle	Asp	pip					
DP-61	1398.8	12.1		b-MeAla	Leu	MePhe	MeLeu	MeVal	Ala	MeAla	Thr	MeGly	Melle	MePhe	Asp	pip					
DP-62	1412.8	10.7		D-MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Phe	Pro	Thr	Leu	MeAla	Melle	Gly	Asp	pip					
DP-63	1484.9	14.2		D-MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	Thr	Phe	Melle	MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-64	1384.8	12.5		MeGly	Leu	MePhe	MeLeu	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	Melle	MePhe	Asp	pip					
DP-65	1283.6	10.6			D-Ala	Thr	MeAla	MePhe	Pro	Ala	MeVal	Phe	Melle	MeLeu	Asp	pip					
DP-66	1311.7	11.7			D-Val	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Ala	Pro	MeLeu	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-67	1297.6	11.3			MeAla	Thr	MeGly	MePhe	MePhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	pip					
DP-68	1313.7	11.2			b-MeAla	MeVal	MeLeu	Leu	Thr	MeAla	Phe	Melle	MeGly	MePhe	Asp	pip					
DP-69	1399.8	13.7			MeGly	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	Melle	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-70	1341.7	13.5			MeGly	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	Melle	Asp	pip					
DP-71	1096.4	8.1				D-Ala	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ala	Melle	Asp	pip					
DP-72	1228.6	11.7				D-Val	Thr	MeAla	Melle	MePhe	Gly	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-73	1110.4	8.7				MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Melle	Ala	Asp	pip					
DP-74	1214.6	11.3				D-MeAla	Thr	MeAla	Melle	Gly	MePhe	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-75	1096.4	8.2				MeGly	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	Ala	Melle	MeLeu	Asp	pip					
DP-76	1196.5	10.3				MeGly	Ser(tBu)	MeGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Melle	MeAla	Asp	pip					
DP-77	1111.4	9.5					D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Melle	Asp	pip					
DP-78	1101.4	9.4					D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-79	1103.4	7.9					MeAla	Thr	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-80	1103.4	7.0					b-MeAla	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	MePhe	Gly	Asp	pip					

	mw	cLogP	I3	I2	I1	I0	I9	I8	I7	I6	I5	I4	I3	I2	I	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-81	1125.5	10.1				D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Melle	Asp	pip						
DP-82	1427.8	10.6	Ala	Leu	Phe	Thr	Leu	MeAla	Phe	Gly	Val	Leu	Ala	MeLeu	Asp	pip					
DP-83	1455.8	11.9	Ala	Gly	MeAla	Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Asp	pip					
DP-84	1314.6	9.1		Ala	Ala	Leu	MeVal	Leu	Phe	Phe	MeAla	Ile	Thr	Gly	Asp	pip					
DP-85	1271.6	10.4			Ala	Leu	MeLeu	MeVal	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Gly	Thr	Asp	pip					
DP-86	1101.4	9.2					Ala	Leu	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-87	1441.8	11.4	Ala	Gly	Thr	MePhe	Leu	MeAla	Val	Phe	Leu	MeLeu	Ala	Ile	Asp	pip					
DP-88	1398.7	10.2		D-Ala	Phe	MeLeu	Leu	Phe	Pro	Thr	Ser(tBu)	MeGly	MeIle	Ala	Asp	pip					
DP-89	1398.8	12.5		MeAla	Phe	MeVal	Leu	MeIle	Leu	Gly	MeLeu	Phe	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-90	1484.9	14.2		MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	Thr	Phe	MeIle	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-91	1396.8	11.0		b-MeAla	MeAla	Leu	Thr	Pro	Phe	MePhe	MeIle	Gly	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-92	1484.9	13.4		b-MeAla	Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeIle	Ala	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-93	1370.7	11.7		D-MeAla	MeAla	Phe	MeLeu	Val	MeIle	Gly	MePhe	Thr	MeAla	Leu	Asp	pip					
DP-94	1398.8	13.0		D-MeAla	Leu	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	Melle	Asp	pip					
DP-95	1209.5	9.7			D-Ala	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Phe	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-96	1399.8	13.7			D-Ala	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	Thr	MeAla	Melle	MeLeu	Asp	pip					
DP-97	1313.7	12.3			D-Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	Melle	Thr	MeGly	Asp	pip					
DP-98	1299.7	11.7			D-Ala	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeIle	MeVal	MeGly	Thr	Asp	pip					
DP-99	1341.7	13.4			D-Ala	Ala	MeLeu	MeIle	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-100	1413.8	14.2			MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	Thr	MeAla	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-101	1327.7	12.8			MeAla	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-102	1223.6	9.2			b-MeAla	Phe	MeLeu	MeAla	MeLeu	Thr	Ala	MeVal	MeGly	Leu	Asp	pip					
DP-103	1413.8	13.2			b-MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	MePhe	MeIle	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-104	1383.8	13.8			b-MeAla	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Ala	MeLeu	MeIle	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-105	1327.7	12.8			D-MeAla	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-106	1297.6	10.8			MeGly	MeLeu	Phe	Leu	Gly	MeIle	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-107	1426.8	9.6		g-MeAbu	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Pro	Gly	Thr	Leu	MeAla	Ile	MePhe	Asp	pip					
DP-108	1384.8	10.3		g-MeAbu	MeAla	Phe	MeLeu	Val	MeLeu	Gly	MePhe	Thr	MeAla	Ile	Asp	pip					
DP-109	1410.8	10.6		g-MeAbu	MeAla	Leu	Thr	Pro	MePhe	Ile	MePhe	Gly	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-110	1371.8	12.6			D-Ala	MePhe	Ile	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-111	1223.6	9.7			MeAla	Leu	Leu	Ala	Leu	MeGly	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					
DP-112	1279.7	12.1			MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	MeAla	Ala	MeVal	MeLeu	Ile	Asp	pip					
DP-113	1325.7	9.9			g-MeAbu	MeLeu	MeLeu	Leu	MePhe	Gly	Phe	Thr	Pro	Ile	Asp	pip					
DP-114	1427.9	12.8			g-MeAbu	MeLeu	Ile	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-115	1262.6	10.8				D-Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	MePhe	Ile	Thr	Phe	Asp	pip					
DP-116	1234.5	10.0				MeAla	Phe	Phe	MeLeu	Leu	Thr	Leu	Gly	MePhe	Asp	pip					
DP-117	1234.5	9.1				b-MeAla	Leu	Phe	Leu	MeLeu	Phe	Thr	Gly	MePhe	Asp	pip					
DP-118	1152.5	9.1				b-MeAla	MeLeu	Ile	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	Leu	MePhe	Asp	pip					
DP-119	1276.6	11.4				D-MeAla	Phe	Ile	Leu	Thr	Leu	Phe	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-120	1244.6	10.1				D-MeAla	Phe	MeLeu	Thr	Gly	MePhe	MeLeu	Leu	Ser(tBu)	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-121	1242.6	10.1				g-MeAbu	Ala	MeLeu	Ile	MePhe	MeLeu	MeVal	Phe	Thr	Asp	pip					
DP-122	1224.6	9.5				g-MeAbu	Ser(tBu)	MeGly	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-123	1412.8	12.6				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-124	1356.7	10.7				D-MeAla	Ile	MeAla	MeVal	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-125	1129.5	10.5					MeAla	Thr	MeAla	Leu	MePhe	MePhe	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-126	1219.6	11.5					b-MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-127	1129.5	10.5					D-MeAla	Leu	Thr	MeAla	MePhe	Leu	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-128	1101.4	7.8					g-MeAbu	Ala	MePhe	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-129	1117.4	6.7					g-MeAbu	Thr	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	MePhe	Gly	Asp	pip					
DP-130	1111.4	7.6					g-MeAbu	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-131	1384.8	12.4		D-Ala	Leu	MePhe	MeLeu	Ile	MeVal	MePhe	Thr	MeGly	MeAla	MeAla	Asp	pip					
DP-132	1412.8	13.4		D-Val	Ile	MePhe	MeVal	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-133	1398.8	13.0		MeAla	Leu	MePhe	MeLeu	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-134	1396.8	11.1		b-MeAla	MePhe	Phe	Ile	Pro	MeVal	Thr	MeGly	MeLeu	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-135	1096.4	8.1				D-Ala	Phe	MeAla	MeVal	Thr	MeGly	MeLeu	Ala	MeIle	Asp	pip					
DP-136	1214.6	11.3				D-Ala	MeAla	MeLeu	Ile	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-137	1384.8	11.9		MeGly	MeVal	Phe	Ile	MeAla	Leu	Gly	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-138	1210.6	10.7				MeAla	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-139	1327.7	12.8			D-Ala	Leu	Thr	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-140	1228.6	10.8				b-MeAla	MeAla	Ile	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-141	1283.6	10.8			D-Ala	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Ala	Pro	MeLeu	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-142	1110.4	8.7				D-MeAla	Phe	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MeVal	Ala	MeIle	Asp	pip					
DP-143	1237.6	10.6			D-Val	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Phe	MeVal	Leu	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-144	1210.6	10.8				D-MeAla	MeAla	MeGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-145	1214.6	10.9				MeGly	Ala	MeIle	Leu	MePhe	MeLeu	Thr	Phe	MeVal	Asp	pip					
DP-146	1311.7	11.6			D-Val	Thr	MeAla	MePhe	Pro	Leu	MeVal	Phe	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-147	1256.6	12.8				MeGly	MeIle	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-148	1083.4	8.5					D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-149	1399.8	13.6			D-Val	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-150	1087.4	9.0					MeAla	Ala	MePhe	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-151	1313.7	12.3			D-Val	MeAla	MeLeu	MeLeu	MeGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-152	1125.5	10.1					MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-153	1087.4	8.1					b-MeAla	Ala	MeLeu	MePhe	MeLeu	Phe	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-154	1383.8	14.8			MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-155	1125.5	9.0					b-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-156	1341.7	13.3			MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	Ala	MePhe	Leu	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-157	1087.4	9.0					D-MeAla	Ala	MeLeu	MePhe	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-158	1355.8	14.0			MeAla	MeLeu	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-159	1355.8	13.1			b-MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	MeLeu	Thr	MePhe	MeAla	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-160	1097.4	9.1					D-MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-161	1073.3	8.5					MeGly	Ala	MePhe	MeLeu	MeLeu	Phe	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-162	1311.7	11.3			D-MeAla	Phe	MeLeu	Ile	MeLeu	Gly	MeLeu	Pro	Thr	Phe	Asp	pip					
DP-163	1083.4	8.5					MeGly	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-164	1297.6	11.2			D-MeAla	Thr	MeAla	MePhe	Ile	Pro	MeVal	Phe	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-165	1313.7	12.2			D-MeAla	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	MeVal	MeLeu	Phe	MeGly	Thr	Asp	pip					
DP-166	1355.8	14.0			D-MeAla	MeLeu	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-167	1209.5	9.7			MeGly	Phe	MeLeu	MeVal	MeGly	Thr	MeAla	Ala	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-168	1371.8	12.7			MeGly	MePhe	Ile	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeVal	Asp	pip					
DP-169	1214.6	11.2				D-Ala	MeLeu	MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	MePhe	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-170	1196.5	10.2				D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-171	1258.6	10.7				D-Val	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	pip					
DP-172	1242.6	12.1				D-Val	MeLeu	MeAla	MePhe	MePhe	MeLeu	MeAla	Thr	Ile	Asp	pip					
DP-173	1228.6	11.4				MeAla	Ala	MeLeu	Ile	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-174	1214.6	10.4				b-MeAla	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	Gly	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-175	1200.5	10.8				MeGly	Thr	MeAla	MePhe	Gly	MePhe	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-176	1117.4	8.3					D-Val	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-177	1441.8	11.1			Ala	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	MeVal	Ala	Phe	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-178	1574.0	14.9			Ala	Ile	McLeu	McAla	McLeu	MePhe	Thr	McAla	McLeu	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-179	1441.8	11.1			D-Ala	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Phe	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-180	1546.0	13.7			D-Ala	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeAla	MeAla	Ile	MePhe	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-181	1455.8	11.6			MeAla	MeLeu	MeAla	Thr	Gly	MeVal	Phe	MeAla	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-182	1544.0	11.8			b-MeAla	Phe	MeLeu	Gly	Phe	MeLeu	Pro	MeLeu	Leu	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-183	1546.0	13.7			D-MeAla	Ile	MeLeu	MeLeu	Phe	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-184	1588.1	15.4			D-MeAla	MeLeu	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-185	1529.9	12.2			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-186	1546.0	13.7			MeGly	MePhe	Thr	MeAla	MeAla	Leu	MePhe	MeVal	MeLeu	Ile	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-187	1418.8	11.3				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-188	1384.8	11.7				Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-189	1488.9	14.1				D-Ala	Thr	MePhe	Ile	MeAla	MeLeu	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-190	1517.0	15.0				D-Val	MeLeu	MeAla	Ile	MePhe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-191	1432.8	11.8				MeAla	Val	MeLeu	Thr	Gly	MeLeu	MePhe	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-192	1502.9	14.7				MeAla	Thr	MePhe	MeLeu	MeLeu	Ala	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-193	1432.8	10.9				b-MeAla	Val	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-194	1388.8	11.2				b-MeAla	MeAla	MeLeu	Thr	MePhe	Val	MeGly	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-195	1342.7	10.1				MeGly	Phe	MeVal	MeAla	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-196	1257.6	9.5					Ala	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-197	1313.7	11.5					D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-198	1285.6	10.4					D-Val	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-199	1327.7	12.1					MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-200	1291.6	8.4					b-MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Val	MePhe	MeAla	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-201	1327.7	11.0					b-MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-202	1313.7	11.5					MeGly	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-203	1560.0	13.9				Ala	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-204	1560.0	13.9				D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-205	1608.0	13.9				D-Val	Val	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-206	1574.0	14.5				MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-207	1664.1	16.5				D-MeAla	MePhe	MeLeu	Ala	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-208	1474.9	13.2					Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-209	1438.8	10.6					D-Ala	Thr	MeAla	MePhe	MeLeu	Val	MePhe	Gly	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-210	1502.9	14.2					D-Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-211	1488.9	13.8					MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-212	1432.8	10.8					b-MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-213	1452.8	11.1					D-MeAla	Val	MeLeu	MePhe	Gly	MePhe	MeAla	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-214	1432.8	11.8					D-MeAla	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-215	1382.8	11.6		D-Ala	Thr	MePhe	Leu	Pro	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ala	MeIle	Asp	pip					
DP-216	1412.8	12.9		D-Val	Leu	MePhe	Thr	MeAla	Val	Phe	MeLeu	Leu	Gly	MeIle	Asp	pip					
DP-217	1384.8	12.1		D-Val	MeVal	Gly	MeLeu	MeIle	Ala	Phe	MePhe	Thr	MeAla	Leu	Asp	pip					
DP-218	1410.8	12.4		D-Val	Leu	MeIle	Leu	MeAla	MePhe	Gly	Thr	Phe	MeLeu	Pro	Asp	pip					
DP-219	1499.0	14.6		D-Val	MeIle	Ala	MeLeu	Thr	Phe	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-220	1396.8	12.1		MeAla	Leu	MeAla	Thr	Pro	MePhe	Phe	MeIle	Gly	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-221	1398.8	11.4		b-MeAla	MeVal	Phe	Leu	MeAla	Thr	Leu	MeLeu	Gly	MeIle	Phe	Asp	pip					
DP-222	1412.8	9.8		b-MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Gly	Pro	Thr	Leu	MeAla	Phe	MeIle	Asp	pip					
DP-223	1398.8	12.4		D-MeAla	MeVal	Phe	Leu	MeAla	Thr	Phe	MeLeu	Leu	Gly	MeIle	Asp	pip					
DP-224	1396.8	12.1		D-MeAla	Leu	MeAla	Pro	Thr	MePhe	Gly	MeIle	Phe	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-225	1410.8	10.8		g-MeAbu	MePhe	Phe	Pro	Leu	MeVal	Thr	MeGly	Ala	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-226	1285.6	10.9			D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Ala	Thr	Asp	pip					
DP-227	1297.6	10.7			D-Ala	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Thr	Phe	Pro	Gly	MeLeu	Asp	pip					
DP-228	1369.8	14.2			D-Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	MeLeu	MePhe	Ala	MeIle	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-229	1313.7	12.2			D-Ala	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeVal	MeIle	Phe	Asp	pip					
DP-230	1313.7	11.8			D-Val	Leu	MeLeu	Phe	MeVal	MePhe	Ile	MeAla	Ala	Thr	Asp	pip					
DP-231	1325.7	11.7			D-Val	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	Thr	Pro	Phe	MeLeu	Asp	pip					
DP-232	1341.7	13.2			D-Val	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	Thr	MeGly	Asp	pip					
DP-233	1327.7	12.6			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeIle	MeGly	MeVal	Thr	Asp	pip					
DP-234	1369.8	14.3			D-Val	MeAla	MeLeu	MePhe	Ala	MeLeu	MePhe	MeIle	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-235	1369.8	14.4			D-Val	MeIle	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-236	1311.7	11.4			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-237	1223.6	10.2			MeAla	MeLeu	Phe	Thr	MeGly	MeAla	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-238	1299.7	10.5			b-MeAla	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	MePhe	Ile	Phe	MeAla	Ala	Asp	pip					
DP-239	1311.7	10.3			b-MeAla	MeLeu	MeLeu	Leu	Gly	MeIle	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-240	1341.7	12.3			b-MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	Ala	MePhe	Leu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-241	1327.7	11.9			b-MeAla	Phe	MeLeu	MeIle	MePhe	Thr	MeAla	MeVal	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-242	1299.7	11.5			D-MeAla	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	MeAla	Ile	MePhe	Ala	Phe	Asp	pip					
DP-243	1223.6	10.2			D-MeAla	MeLeu	Phe	Thr	MeGly	MeAla	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-244	1341.7	13.3			D-MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	Ala	MePhe	Leu	MeIle	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-245	1285.6	11.0			MeGly	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	MeAla	Ile	MePhe	Phe	Ala	Asp	pip					
DP-246	1313.7	12.3			MeGly	Leu	Thr	MeGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-247	1327.7	12.8			MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	Ala	MePhe	MePhe	MeIle	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-248	1397.8	13.4			g-MeAbu	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	MeLeu	Ala	MeIle	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-249	1355.8	11.9			g-MeAbu	MeLeu	Thr	MeAla	Ala	MePhe	MePhe	MeIle	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-250	1341.7	11.5			g-MeAbu	Phe	MeLeu	MeAla	MePhe	Ala	MeIle	MeVal	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-251	1369.8	12.5			g-MeAbu	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	MeIle	Asp	pip					
DP-252	1214.6	10.8				D-Ala	Ala	MeIle	MeLeu	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeVal	Asp	pip					
DP-253	1124.4	9.1				D-Val	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeLeu	Ala	MeGly	MeIle	Asp	pip					
DP-254	1124.4	9.1				D-Val	Phe	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	MeIle	Ala	Asp	pip					
DP-255	1242.6	12.2				D-Val	MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-256	1284.7	13.6				D-Val	Ala	MeIle	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-257	1224.6	11.1				D-Val	MeLeu	MePhe	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-258	1228.6	11.8				MeAla	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-259	1228.6	10.4				b-MeAla	Ala	MeIle	MeLeu	MePhe	Leu	MeVal	Phe	Thr	Asp	pip					
DP-260	1244.6	10.4				D-MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	pip					
DP-261	1242.6	10.4				g-MeAbu	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-262	1228.6	10.1				g-MeAbu	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	MeLeu	Gly	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-263	1073.3	8.4					D-Ala	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-264	1157.5	11.5					D-Val	MeLeu	Leu	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-265	1139.5	10.4					D-Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip					
DP-266	1111.4	9.4					D-Val	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-267	1097.4	9.1					MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-268	1143.5	10.1					b-MeAla	MePhe	Leu	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-269	1097.4	8.0					b-MeAla	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-270	1103.4	7.9					D-MeAla	Thr	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	Gly	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-271	1089.3	7.4					MeGly	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	MePhe	Gly	Asp	pip					
DP-272	1139.5	8.6					g-MeAbu	MePhe	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	MeIle	Asp	pip					
DP-273	1412.8	11.1		g-MeAbu	MeVal	Phe	Ile	Leu	Thr	MeAla	MeLeu	Gly	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-274	1313.7	10.0			g-MeAbu	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Ala	Asp	pip					
DP-275	1341.7	11.6			g-MeAbu	Ala	MeLeu	MeLeu	Ile	MePhe	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-276	1311.7	10.1			g-MeAbu	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Ala	MePhe	Pro	MeLeu	MeVal	Asp	pip					
DP-277	1258.6	9.1				g-MeAbu	Ser(tBu)	MeLeu	MePhe	Thr	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	pip					
DP-278	1558.0	13.1			D-Val	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Thr	Phe	Pro	Gly	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-279	1546.0	13.7			MeAla	Ile	MeLeu	Phe	MeLeu	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-280	1544.0	12.7			MeAla	Ile	Thr	Phe	MePhe	MeLeu	Gly	Pro	Leu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-281	1588.1	14.4			b-MeAla	MeLeu	MeAla	Ile	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-282	1501.9	12.7			b-MeAla	MeAla	Phe	MeVal	Phe	Gly	MeLeu	Leu	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-283	1544.0	12.7			D-MeAla	Ile	Leu	MeLeu	MePhe	MeLeu	Gly	Pro	Thr	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-284	1574.0	14.9			MeGly	MeLeu	MeIle	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-285	1441.8	11.1			MeGly	MeLeu	Thr	Phe	MeVal	Gly	MeAla	Leu	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-286	1650.1	15.9				Ala	Thr	MePhe	Ile	MeAla	MeLeu	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-287	1580.0	13.0				Ala	Val	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-288	1342.7	10.1				Ala	Phe	MeAla	MeVal	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-289	1650.1	15.9				D-Ala	Thr	MePhe	Ile	MeAla	MeLeu	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-290	1384.8	11.7				D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-291	1418.8	11.3				D-Ala	Val	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-292	1678.2	16.8				D-Val	Thr	MePhe	Ile	MeAla	MeLeu	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-293	1517.9	12.2				D-Val	MeGly	MeAla	MeVal	Thr	Phe	MeLeu	MeAla	Ile	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-294	1370.7	11.0				D-Val	Ile	MeVal	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-295	1664.1	16.5				MeAla	MePhe	Ile	MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-296	1356.7	10.7				MeAla	Phe	MeVal	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-297	1574.0	13.5				b-MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeVal	Ile	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-298	1504.0	12.6				b-MeAla	Val	MeLeu	MePhe	Gly	MeLeu	Phe	MeVal	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-299	1502.9	13.8				b-MeAla	Thr	MePhe	MeLeu	MePhe	Ile	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-300	1574.0	14.5				D-MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Ile	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-301	1432.8	11.8				D-MeAla	Val	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-302	1560.0	14.0				MeGly	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Val	MeLeu	Melle	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-303	1580.0	13.0				MeGly	Val	MeLeu	Phe	MeLeu	Gly	MePhe	MeVal	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-304	1418.8	11.3				MeGly	Val	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-305	1313.7	11.5					Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Val	MeLeu	Melle	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-306	1446.8	12.2					D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-307	1277.6	8.8					D-Ala	Thr	MeAla	MePhe	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-308	1341.7	12.4					D-Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ile	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-309	1452.8	11.1					MeAla	Val	MeLeu	MePhe	MePhe	Gly	MeAla	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-310	1271.6	10.1					MeAla	Val	MePhe	MeGly	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-311	1291.6	9.4					MeAla	Thr	MeAla	Val	MeGly	MePhe	MeLeu	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-312	1452.8	10.1					b-MeAla	Val	MeLeu	MePhe	Gly	MePhe	MeAla	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-313	1327.7	12.1					D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-314	1438.8	10.5					MeGly	Val	MeLeu	MePhe	Gly	MePhe	MeAla	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-315	1418.8	11.3					D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-316	1277.6	8.9					MeGly	Thr	MeGly	Val	MeLeu	MePhe	MeAla	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-317	1386.7	10.9		MeAla	MePhe	Ala	MeAla	Phe	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Ser(tBu)	MeVal	Asp	pip					
DP-318	1384.8	11.4		b-MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	MeVal	Ala	MeVal	MeGly	Thr	MeAla	MePhe	Asp	pip					
DP-319	1266.6	9.6		D-MeAla	MeAla	Ala	MePhe	MeLeu	MeVal	Thr	MeGly	MeAla	MeAla	Val	Asp	pip					
DP-320	1333.7	10.9			Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	MeLeu	Phe	Thr	Ala	Phe	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-321	1285.6	10.4			D-Ala	Leu	Phe	Thr	Ile	Phe	Gly	Leu	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-322	1243.6	9.9			MeAla	Thr	MeAla	Ala	MePhe	MeLeu	MeVal	MeAla	Phe	MeAla	Asp	pip					
DP-323	1355.8	12.0			b-MeAla	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	MeLeu	Leu	Ile	Asp	pip					
DP-324	1237.6	9.3			b-MeAla	Leu	Leu	MeGly	Leu	Thr	Ala	Phe	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-325	1341.7	11.8			b-MeAla	Leu	MeAla	Thr	Phe	Leu	MeLeu	Phe	MeLeu	Ile	Asp	pip					
DP-326	1243.6	8.9			b-MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	Phe	MeVal	MeLeu	MeAla	Ala	Asp	pip					
DP-327	1223.6	9.5			D-MeAla	Ile	Leu	Ala	Leu	MeGly	Leu	Leu	Thr	Phe	Asp	pip					
DP-328	1237.6	10.3			D-MeAla	Thr	Ala	MeGly	Leu	Phe	Leu	MeVal	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-329	1262.6	10.8				Ala	Leu	Phe	Leu	Thr	Ile	MePhe	Leu	Phe	Asp	pip					
DP-330	1206.5	8.8				Ala	Phe	MeGly	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr	Phe	Asp	pip					
DP-331	1276.6	11.4				MeAla	Leu	Ile	Phe	Thr	Leu	MePhe	Phe	Leu	Asp	pip					
DP-332	1290.7	12.0				MeAla	Phe	Ile	MeLeu	Thr	Leu	MePhe	Phe	Leu	Asp	pip					
DP-333	1242.6	12.1				MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Phe	MePhe	MeVal	Ile	MeLeu	Asp	pip					
DP-334	1290.7	11.1				b-MeAla	Phe	MeLeu	Ile	Thr	Leu	MePhe	Phe	Leu	Asp	pip					
DP-335	1244.6	9.1				b-MeAla	MeLeu	Thr	Phe	Gly	MePhe	Leu	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-336	1284.7	12.4				b-MeAla	Leu	MeLeu	Thr	Phe	MeLeu	MePhe	Ile	MeLeu	Asp	pip					
DP-337	1172.5	8.8				b-MeAla	MeVal	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	Asp	pip					
DP-338	1290.7	12.0				D-MeAla	Phe	Ile	MeLeu	Leu	Thr	Leu	Phe	MePhe	Asp	pip					
DP-339	1256.6	12.2				D-MeAla	MeVal	Ile	Leu	Thr	Phe	MeLeu	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-340	1202.5	8.8				D-MeAla	Thr	Gly	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeAla	Phe	MeVal	Asp	pip					
DP-341	1144.4	8.9				D-MeAla	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-342	1095.4	10.6					MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	Asp	pip					
DP-343	1171.5	11.8					D-MeAla	Leu	MePhe	MeLeu	Phe	MeLeu	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-344	1503.9	12.5			MeAla	MeAla	MeLeu	Ala	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-345	1433.8	9.9			MeAla	MeAla	Ala	Phe	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MePhe	MeGly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-346	1461.8	10.0			b-MeAla	MeAla	Ala	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-347	1503.9	12.5			D-MeAla	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	MeAla	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-348	1475.8	11.3			D-MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	Ala	MePhe	Ala	MeVal	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-349	1314.6	9.3				MeAla	MeAla	Val	MeAla	MePhe	Thr	MeGly	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-350	1474.9	13.3				MeAla	MeLeu	Leu	MeLeu	Thr	Ala	MePhe	Phe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-351	1488.9	12.9				b-MeAla	MeLeu	Phe	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	Leu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-352	1390.7	9.4				b-MeAla	Val	MeLeu	Phe	MeVal	Thr	MeAla	Gly	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-353	1376.7	10.3				D-MeAla	MePhe	MeAla	Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-354	1314.6	9.2				D-MeAla	MeVal	MeAla	Phe	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-355	1362.7	9.5				D-MeAla	Ala	MeLeu	Phe	Thr	MeAla	MePhe	MeVal	Gly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-356	1390.7	10.3				D-MeAla	MeVal	Phe	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	Gly	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-357	1243.6	9.1					MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	Val	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-358	1313.7	10.5					b-MeAla	MePhe	MeVal	Val	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-359	1403.8	13.3					D-MeAla	Leu	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	MeLeu	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-360	1475.8	10.2			b-MeAla	MePhe	MeVal	MeAla	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	Ala	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-361	1433.8	8.8			b-MeAla	MeAla	Ala	MeGly	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MePhe	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-362	1503.9	11.5			b-MeAla	MeAla	MeAla	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-363	1433.8	9.9			D-MeAla	MeAla	Ala	MeLeu	Phe	MeAla	MeAla	Thr	MeGly	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-364	1558.0	11.5			g-MeAbu	Phe	MeLeu	Pro	Ile	MeLeu	Gly	MePhe	Leu	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-365	1469.9	10.2			g-MeAbu	MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Gly	MeLeu	Leu	MeLeu	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-366	1602.1	14.0			g-MeAbu	MeLeu	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-367	1475.8	11.3			MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	MeVal	Ala	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-368	1385.7	9.6			MeAla	MeLeu	MeAla	Ala	MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-369	1474.9	12.3				b-MeAla	MeLeu	Leu	MeLeu	Thr	Ala	MePhe	Phe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-370	1404.8	10.2				b-MeAla	MeVal	MePhe	MePhe	Ala	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-371	1398.8	12.2				D-MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	MeGly	Ile	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-372	1446.8	10.6				g-MeAbu	Val	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-373	1517.0	13.3				g-MeAbu	MeAla	Thr	MePhe	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-374	1412.8	10.8				g-MeAbu	MeAla	MeLeu	Thr	MePhe	MeGly	Ile	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-375	1362.7	9.4				MeAla	Ala	MeLeu	Phe	MeVal	MeAla	MePhe	Thr	Gly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-376	1440.9	13.6				MeAla	MeLeu	MeVal	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-377	1376.7	10.3				MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-378	1277.6	8.8					Ala	Thr	MeAla	MePhe	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-379	1347.7	10.4					b-MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MePhe	Phe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-380	1257.6	9.5					D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-381	1347.7	11.3					D-MeAla	MeLeu	MeAla	Thr	Phe	MePhe	Val	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-382	1305.6	9.7					D-Val	Thr	MeAla	MePhe	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-383	1305.6	8.1					g-MeAbu	Thr	MeGly	MeAla	Val	MePhe	MeLeu	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-384	1341.7	10.6					g-MeAbu	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-385	1285.6	8.8					g-MeAbu	Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeGly	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-386	1347.7	11.4					MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MePhe	Phe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-387	1403.8	13.3					MeAla	MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	Phe	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-388	1257.6	9.6					MeGly	Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-389	1489.9	11.3				Ala	Ile	MePhe	MeVal	Thr	MeGly	MeLeu	MeAla	Ala	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-390	1580.0	11.9				b-MeAla	MeVal	Val	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Thr	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-391	1475.8	9.8				b-MeAla	Ala	MePhe	MeVal	Gly	Thr	MeAla	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-392	1517.9	10.6				g-MeAbu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeGly	Ala	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-393	1509.9	10.7				MeAla	Phe	MeAla	Gly	Thr	MeAla	MePhe	Val	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-394	1503.9	11.9				MeAla	Phe	MeLeu	Ile	MeGly	Thr	MeAla	MeAla	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-395	1503.9	12.1				MeAla	MePhe	MeAla	Ile	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-396	1438.8	10.6					Ala	Thr	MeAla	MePhe	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-397	1488.9	12.9					b-MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-398	1404.8	9.8					b-MeAla	MeGly	MePhe	Ala	MeLeu	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-399	1488.9	13.8					D-MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Ile	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-400	1404.8	10.9					D-MeAla	MePhe	MeLeu	Val	MeAla	MeAla	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-401	1466.8	11.5					D-Val	Thr	MeAla	MePhe	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-402	1466.8	9.9					g-MeAbu	Val	MeLeu	Gly	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-403	1502.9	12.6					g-MeAbu	Thr	MePhe	MeLeu	Val	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-404	1446.8	10.3					g-MeAbu	MeAla	MePhe	Val	MeLeu	MeGly	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-405	1432.8	11.8					MeAla	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-406	1362.7	9.4					MeAla	MeGly	MePhe	MeAla	Ala	MeAla	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-407	1418.8	11.3					MeGly	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-408	1328.7	9.4		b-MeAla	Ala	MePhe	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	MeVal	MeAla	Leu	Asp	pip					
DP-409	1386.7	10.8		D-MeAla	MePhe	Ala	MeAla	Phe	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-410	1266.6	9.6		MeAla	MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	MeVal	Val	MeGly	MeAla	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-411	1251.6	9.5			b-MeAla	Leu	Ile	MeGly	Leu	Val	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	pip					
DP-412	1307.7	11.5			b-MeAla	MeVal	Leu	Phe	Thr	Leu	Leu	Val	MeLeu	Ile	Asp	pip					
DP-413	1279.7	11.1			b-MeAla	MeLeu	Thr	Phe	MeGly	Ala	MeLeu	Ile	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-414	1223.6	9.5			b-MeAla	MeAla	Ala	MeVal	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-415	1333.7	10.9			D-Ala	Ile	Leu	Phe	MeLeu	Leu	Phe	Ala	Thr	Phe	Asp	pip					
DP-416	1341.7	12.4			D-MeAla	Phe	Leu	Thr	Phe	Leu	MeLeu	Val	Leu	Ile	Asp	pip					
DP-417	1279.7	12.2			D-MeAla	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	MeVal	Ile	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-418	1265.6	11.6			D-MeAla	MeLeu	Thr	Phe	MeGly	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-419	1257.6	10.6			D-MeAla	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	MeGly	Ala	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-420	1223.6	9.5			MeAla	Leu	Leu	Ala	Leu	MeGly	Leu	Leu	Phe	Thr	Asp	pip					
DP-421	1237.6	10.3			MeAla	Thr	Ala	Leu	MeGly	Phe	Leu	MeVal	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-422	1215.5	9.0			MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	Phe	MeAla	Ala	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-423	1220.5	8.5				b-MeAla	Thr	Phe	Ile	Leu	MeLeu	Gly	Phe	Phe	Asp	pip					
DP-424	1276.6	10.4				b-MeAla	Leu	Thr	Phe	Ile	Leu	Phe	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-425	1256.6	11.2				b-MeAla	Ile	MeVal	Phe	Thr	Leu	MeLeu	Leu	MePhe	Asp	pip					
DP-426	1258.6	9.8				b-MeAla	MePhe	Gly	MeLeu	Phe	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-427	1242.6	11.2				b-MeAla	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	Ile	MeVal	MeLeu	Asp	pip					
DP-428	1180.5	10.3				b-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Gly	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-429	1312.7	13.7				b-MeAla	MeLeu	MeLeu	Ile	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-430	1206.5	8.8				D-Ala	Phe	Leu	MeGly	Phe	Leu	Ile	Phe	Thr	Asp	pip					
DP-431	1220.5	9.4				D-MeAla	Phe	Thr	Phe	Leu	MeLeu	Ile	Phe	Gly	Asp	pip					
DP-432	1270.7	12.8				D-MeAla	MeVal	MeLeu	Thr	Phe	MeLeu	Ile	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-433	1152.5	10.2				D-MeAla	MeVal	Thr	MeGly	Ile	MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-434	1242.6	12.1				D-MeAla	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	Ile	MeVal	MeLeu	Asp	pip					
DP-435	1138.5	9.9				D-MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Gly	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-436	1220.5	9.4				MeAla	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-437	1244.6	10.2				MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	Gly	MePhe	Leu	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-438	1202.5	8.8				MeAla	Ser(tBu)	Gly	MeLeu	MePhe	Phe	MeAla	MeVal	Thr	Asp	pip					
DP-439	1152.5	10.2				MeAla	MeGly	Phe	MeVal	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Ile	Asp	pip					
DP-440	1095.4	9.6					b-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ile	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-441	1219.6	12.5					D-MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-442	1219.6	12.5					MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Thr	MePhe	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-443	1461.8	11.1			D-MeAla	MeAla	Ala	MePhe	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-444	1385.7	9.6			D-MeAla	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	Ala	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-445	1461.8	11.1			MeAla	Ala	MeAla	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-446	1418.8	10.4				b-MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Gly	MeLeu	Phe	Thr	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-447	1426.8	11.9				b-MeAla	MeVal	MeLeu	Ile	MeVal	Leu	MeAla	MePhe	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-448	1342.7	9.1				b-MeAla	MeVal	MeAla	Phe	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-449	1342.7	9.2				b-MeAla	MeAla	Val	MeVal	MePhe	MeGly	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-450	1475.8	10.0				b-MeAla	MeVal	MeAla	Val	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-451	1474.9	13.3				D-MeAla	MeLeu	MeLeu	Leu	Thr	Ala	MePhe	Phe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-452	1551.9	12.1				D-MeAla	MeAla	Val	MePhe	MeLeu	Gly	Thr	MeVal	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-453	1398.8	12.1				D-MeAla	MeVal	Phe	MeLeu	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-454	1546.0	13.3				D-MeAla	Phe	MeLeu	MeVal	Ile	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-455	1503.9	12.1				D-MeAla	MePhe	MeAla	Ile	MeAla	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-456	1551.9	12.1				MeAla	MeAla	Val	MePhe	Gly	MeLeu	Phe	MeVal	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-457	1433.8	9.2				MeAla	Ala	MeVal	Thr	Gly	MePhe	MeAla	MeAla	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-458	1314.6	9.2				MeAla	MeVal	MeAla	Thr	MeAla	Phe	McLeu	Ala	McAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-459	1546.0	13.3				MeAla	MeLeu	Phe	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-460	1447.8	10.1				MeAla	MeAla	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	Val	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-461	1403.8	12.2					b-MeAla	MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	Phe	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-462	1243.6	9.1					D-MeAla	MePhe	MeAla	Val	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-463	1362.7	9.4					D-MeAla	MePhe	MeGly	Thr	Ala	MeAla	MeLeu	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-464	1404.8	10.9					MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Val	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-465	1386.7	9.8		b-MeAla	MePhe	Ala	MeAla	Phe	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-466	1356.7	11.6		D-MeAla	MePhe	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	MeAla	MeGly	Ala	MeAla	MePhe	Asp	pip					
DP-467	1300.6	9.4		D-MeAla	Phe	MePhe	MeAla	MeVal	Leu	MeGly	Ala	MeAla	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-468	1412.8	11.8		g-MeAbu	Ile	MePhe	MeLeu	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-469	1356.7	11.6		MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	MeVal	Ala	MeAla	MeGly	Thr	MeAla	MePhe	Asp	pip					
DP-470	1300.6	9.4		MeAla	Ala	MePhe	Leu	MeAla	MeVal	MeGly	Phe	MeAla	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-471	1299.7	11.0			b-MeAla	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-472	1265.6	10.3			b-MeAla	Phe	Val	Leu	MeGly	Thr	Leu	MeVal	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-473	1265.6	10.3			b-MeAla	Thr	Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Phe	MeLeu	MeVal	MeAla	Asp	pip					
DP-474	1243.6	9.9			D-MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	MeVal	Phe	MeAla	MeAla	Asp	pip					
DP-475	1223.6	9.7			D-MeAla	Leu	Ile	Ala	MeGly	Leu	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					
DP-476	1195.5	9.7			D-MeAla	MeAla	Ala	MeAla	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-477	1327.7	10.9			g-MeAbu	MeAla	MeLeu	Leu	Thr	MeGly	MePhe	Ile	MeVal	MePhe	Asp	pip					
DP-478	1279.7	11.6			MeAla	Leu	MeAla	Thr	Phe	Leu	MeLeu	Val	Leu	Ile	Asp	pip					
DP-479	1265.6	11.6			MeAla	MeLeu	Thr	Phe	MeGly	Ala	MeVal	MeLeu	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-480	1195.5	9.7			MeAla	MeAla	Ala	MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeAla	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-481	1327.7	12.8			MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeVal	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-482	1257.6	10.6			MeAla	MeAla	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-483	1531.9	13.2			Ala	Ile	MeLeu	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeVal	MeAla	Phe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-484	1560.0	14.1			D-Val	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeVal	MePhe	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-485	1110.4	8.7				D-MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Ile	MeLeu	MeGly	MePhe	Ala	Asp	pip					
DP-486	1234.5	10.0				D-MeAla	Phe	MeLeu	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	MePhe	Asp	pip					
DP-487	1242.6	10.4				g-MeAbu	MeLeu	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeAla	Asp	pip					
DP-488	1256.6	12.2				MeAla	MeVal	Ile	Phe	Thr	Leu	MeLeu	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-489	1138.5	9.9				MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Gly	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-490	1356.7	9.7				b-MeAla	Phe	MeVal	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Ile	MeAla	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-491	1342.7	10.1				D-Ala	Ile	MeAla	MeVal	Thr	MeAla	MeLeu	Ala	MePhe	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-492	1398.8	12.2				MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MePhe	Ile	MeGly	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-493	1488.9	14.2				MeGly	Thr	MePhe	MeLeu	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-494	1171.5	11.8					MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-495	1503.9	10.9				b-MeAla	Ile	MePhe	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-496	1574.0	13.2				b-MeAla	MeLeu	Ile	MeVal	Phe	Thr	MeGly	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-497	1489.9	10.2				b-MeAla	MeGly	Thr	Phe	MeVal	Ala	MeLeu	MeVal	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-498	1461.8	9.5				b-MeAla	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeAla	MePhe	Ile	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-499	1664.1	15.3				b-MeAla	MePhe	MeLeu	MeAla	MePhe	Ile	MeLeu	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-500	1531.9	12.0				b-MeAla	MePhe	MeLeu	MeAla	Val	MeLeu	MeAla	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-501	1580.0	13.0				D-Ala	Val	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeVal	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-502	1489.9	11.3				D-Ala	Phe	MeAla	MeVal	Thr	MeGly	MeLeu	MeAla	Ile	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-503	1594.0	13.6				D-MeAla	Val	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Gly	MeVal	Phe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-504	1509.9	10.7				D-MeAla	Phe	Gly	MeAla	Thr	MeAla	MePhe	Val	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-505	1433.8	9.2				D-MeAla	Ala	MeVal	Thr	Gly	MeAla	Val	MeAla	MePhe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-506	1503.9	11.9				D-MeAla	Phe	MeLeu	MeVal	MeGly	Thr	MeAla	MeAla	Ile	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-507	1461.8	10.4				D-MeAla	MeGly	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MeAla	MeVal	Ala	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-508	1433.8	9.5				D-MeAla	MeAla	Ala	MeAla	MeGly	Thr	MeAla	Ile	MePhe	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-509	1447.8	10.1				D-MeAla	MeAla	Val	MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-510	1588.1	14.9				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeVal	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-511	1280.6	9.1		b-MeAla	MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	MeGly	MeLeu	Val	MeAla	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-512	1095.4	10.6					D-MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-513	1285.6	10.4			Ala	Leu	Leu	Phe	Ile	Thr	Gly	Leu	Phe	MeLeu	Asp	pip					
DP-514	1251.6	9.4			b-MeAla	Val	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	pip					
DP-515	1248.6	10.2				D-Ala	Leu	Phe	Ile	Leu	Phe	Thr	Leu	Phe	Asp	pip					
DP-516	1285.6	10.4			b-MeAla	MeVal	Thr	MeAla	MePhe	MeAla	MeGly	MePhe	MeLeu	Ile	Asp	pip					
DP-517	1398.7	10.2		MeGly	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Gly	Pro	Ile	MeAla	Thr	Phe	MeLeu	Asp	pip					
DP-518	1369.8	14.3			MeGly	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	Ile	Asp	pip					
DP-519	1214.6	11.3				MeGly	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-520	1143.5	11.1					MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Thr	MeAla	MePhe	MeLeu	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-521	1032.3	7.9						MeGly	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-522	942.2	4.9						b-MeAla	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-523	998.3	7.8						MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-524	968.2	6.7						g-MeAbu	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-525	1012.3	6.5						g-MeAbu	MePhe	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-526	974.2	7.2						D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-527	998.3	7.9						D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-528	984.2	7.3						D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-529	998.3	7.8						D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-530	972.2	6.7						Ala	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	pip					
DP-531	871.1	5.7							MeGly	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-532	885.1	5.3							b-MeAla	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-533	855.1	6.9							MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-534	885.1	4.4							g-MeAbu	Thr	MeLeu	MeGly	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-535	885.1	4.3							g-MeAbu	MePhe	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-536	837.1	5.8							D-MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-537	841.1	6.4							D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-538	813.0	5.4							D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	pip					
DP-539	875.1	6.2							Ala	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-540	1238.6	11.9				MeAla	MePhe	nPrGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-541	1325.7	12.5			MeAla	Thr	nPrGly	MePhe	MePhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	pip					
DP-542	1311.7	12.0			MeAla	Thr	MeGly	EtPhe	MePhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	pip					
DP-543	1224.6	11.4				MeGly	Ser(tBu)	nPrGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	MeIle	MeAla	Asp	pip					
DP-544	1341.7	13.5			nPrGly	Leu	Thr	MeGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-545	1341.7	13.4			MeGly	Leu	Thr	nPrGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-546	1327.7	12.8			MeGly	Leu	Thr	MeGly	EtPhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-547	1224.6	11.4				D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	nPrGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-548	1235.6	9.5			MeAla	Leu	Leu	Ala	Leu	Aze(2)	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					
DP-549	1263.6	10.6			MeAla	Leu	Leu	Ala	Leu	Pic(2)	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					
DP-550	1309.7	10.6			Aze(2)	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-551	1337.7	11.8			Pic(2)	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-552	1267.6	9.2			MeAla	Phe	Aze(2)	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-553	1295.6	10.3			MeAla	Phe	Pic(2)	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-554	1267.6	9.2			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	Aze(2)	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-555	1295.6	10.3			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	Pic(2)	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-556	1267.6	9.2			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	Aze(2)	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-557	1295.6	10.3			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	Pic(2)	Thr	Pro	Phe	Asp	pip					
DP-558	1297.6	10.8			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Aze(2)	Phe	Asp	pip					
DP-559	1325.7	11.9			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pic(2)	Phe	Asp	pip					
DP-560	1237.6	10.2			MeAla	Leu	Leu	Aib	Leu	MeGly	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-561	1285.6	10.7			MeAla	Leu	Leu	Phg	Leu	MeGly	Thr	Phe	Leu	MeVal	Asp	pip					
DP-562	1103.4	7.9					Aib	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-563	1151.4	8.4					Phg	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Gly	Asp	pip					
DP-564	1249.6	10.5			MeAla	Phe	MeLeu	Leu	MeIle	Gly	MeLeu	Thr	Pro	Aib	Asp	pip					
DP-565	1402.7	9.6							Ala	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	Leu	Asp	MePhe	MeAla	Pro	MePhe	Ala	pip
DP-566	1209.5	8.2							Ala	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	Leu	Asp	MeLeu	Val	MeAla	Ala	pip	
DP-567	1101.4	8.6							Ala	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	Leu	Asp	MePhe	Ile	pip			
DP-568	1181.5	7.2							D-Ala	MePhe	Ile	Thr	MeGly	Val	Asp	MeLeu	Gly	MeLeu	Ala	pip	
DP-569	1192.5	7.7							D-Ala	MePhe	Ile	Thr	MeGly	Val	Asp	MePhe	MePhe	Ala	pip		
DP-570	1560.0	12.8						D-Ala	Val	MePhe	MeLeu	MeAla	Thr	Phe	Asp	MeLeu	MePhe	Val	MeAla	Ile	pip
DP-571	1158.4	8.3						D-Ala	Val	MePhe	MeLeu	MeAla	Thr	Phe	Asp	MeGly	Leu	pip			
DP-572	1508.9	12.5						Ala	Leu	MeIle	Val	MePhe	Leu	MePhe	Asp	MePhe	Ala	Thr	Phe	pip	
DP-573	1302.7	13.6						Ala	Leu	MeIle	Val	MePhe	Leu	MePhe	Asp	MePhe	Ile	pip			
DP-574	1560.0	13.3						Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MeLeu	MePhe	Asp	MeAla	Thr	MePhe	MeLeu	Ala	pip
DP-575	1315.7	9.8					D-Val	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Gly	Asp	MeLeu	Ala	pip			
DP-576	1412.8	12.3					D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MeGly	MeLeu	Ile	pip		
DP-577	1409.8	12.2					D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	Phe	pip			
DP-578	1506.9	9.5					D-McAla	McAla	MePhe	MeLeu	Thr	McAla	McLeu	Ser	Asp	McAla	Ile	Pro	Val	Ala	pip
DP-579	1505.9	12.5				D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	Pro	Val	Leu	pip		
DP-580	1645.1	13.2				D-Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	MePhe	Ile	Thr	Phe	Asp	MeAla	Leu	Ala	Ile	pip	
DP-581	1522.9	10.6				MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ile	Ala	Asp	MeLeu	Thr	MeLeu	Ala	pip	
DP-582	1597.1	14.1			D-Val	MeAla	MeLeu	MeLeu	MeGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	Thr	Asp	MeAla	MeLeu	Ala	pip		
DP-583	1497.9	13.1			D-MeAla	MeLeu	Phe	Thr	MeGly	MeAla	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	Asp	MeIle	Phe	pip			
DP-584	1512.0	13.8			D-Val	MeAla	MeLeu	MeLeu	MeGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	Thr	Asp	MeAla	Ile	pip			
DP-585	1448.9	12.3				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	His	MeGly	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-586	1547.0	15.7				D-Val	MeLeu	MePhe	MeLeu	His	MeLeu	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-587	1482.0	14.2				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Lys(Me2)	MeGly	Leu	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-588	1580.2	17.6				D-Val	MeLeu	MePhe	MeLeu	Lys(Me2)	MeLeu	Leu	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-589	1454.9	12.9				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Glu	MeGly	Leu	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-590	1496.0	12.8				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Arg(Me2)	MeGly	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-591	1431.8	12.2				D-Val	MeAla	MePhe	MeLeu	Ala(3Pyr)	MeGly	Ala	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-592	1666.2	15.5			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Leu	MePhe	His	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-593	1599.1	13.8			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Ala	Pro	Lys(Me2)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-594	1705.2	16.9			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Leu	MePhe	Lys(Me2)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-595	1572.0	12.5			MeGly	Phe	MeLeu	MeAla	Phe	MeLeu	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-596	1678.1	15.6			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Leu	MePhe	Glu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-597	1613.1	12.5			MeGly	Phe	MeLeu	MeGly	Phe	MeLeu	Leu	Pro	Arg(Me2)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-598	1733.3	16.0			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Leu	MePhe	Arg(Me2)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-599	1563.0	12.4			MeAla	Phe	MeLeu	MeAla	Phe	MeLeu	Ala	Pro	Ala(3Pyr)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-600	1697.2	16.4			MeGly	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Leu	MePhe	Ala(3Pyr)	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-601	1564.0	13.1				Ala	Phe	MeLeu	Gln	MePhe	Phe	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-602	1517.9	11.0				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Gln	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-603	1515.9	12.0				Ala	Phe	MeLeu	Gln(Me2)	MePhe	Ala	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-604	1546.0	11.4				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Leu	MeLeu	MeLeu	Gln(Me2)	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-605	1480.8	11.9				Ala	Tyr(3-F)	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-606	1528.9	12.4				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Tyr(3-F)	MeAla	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-607	1565.0	12.8				Ala	Phe	MeLeu	Met(O2)	MePhe	Leu	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-608	1519.9	12.3				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeLeu	Trp	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-609	1499.9	12.7				Ala	Phe	MeLeu	Ala(4-Thz	MePhe	Gly	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-610	1501.9	11.7				Ala	Phe	MeLeu	Gln(Me)	MePhe	Ala	MeLeu	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-611	1430.8	11.4				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeLeu	MeLeu	Algly	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-612	1444.8	12.0				Ala	Phe	MeLeu	Thr	MePhe	Algly	MeAla	MeLeu	Leu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-613	1413.8	11.4				Ala	Phe	MeLeu	Ala(CN)	MePhe	Ala	MeLeu	MeLeu	Ala	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-614	1327.7	12.5			MeGly	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeLeu	D-Val	MeVal	Thr	Asp	pip					
DP-615	1327.7	12.6			Leu	MeAla	MeLeu	D-Val	MePhe	Phe	MeLeu	MeGly	MeVal	Thr	Asp	pip					
DP-616	1327.7	12.6			Phe	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	D-Val	MeLeu	MeGly	MeVal	Thr	Asp	pip					
DP-617	1368.8	12.0			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeLeu	MeGly	MeLeu	Gln	Asp	pip					
DP-618	1410.8	12.8			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeLeu	MeAla	MeLeu	Gln(Me2)	Asp	pip					
DP-619	1347.7	11.7			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Tyr(3-F)	MeLeu	MeAla	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-620	1417.9	12.1			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeLeu	MeAla	MeLeu	Met(O2)	Asp	pip					
DP-621	1481.9	11.4			D-Val	MeAla	MeLeu	Met(O2)	MePhe	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-622	1338.7	11.6			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Trp	MeLeu	MeGly	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-623	1372.7	11.6			D-Val	MeAla	MeLeu	Trp	MePhe	Phe	MeLeu	MeGly	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-624	1324.7	11.2			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeAla	MeAla	MeAla	Ala(4-Thz	Asp	pip					
DP-625	1396.8	11.9			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Ala(4-Thz	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	Asp	pip					
DP-626	1396.8	12.6			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Phe	MeLeu	MeAla	MeLeu	Gln(Me)	Asp	pip					
DP-627	1328.7	8.4			D-Val	MeAla	MeLeu	Gln(Me)	MePhe	Phe	MeLeu	MeGly	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-628	1339.7	12.7			D-Val	MeAla	MeLeu	Algly	MePhe	Phe	MeLeu	MeAla	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-629	1282.6	9.5			D-Val	MeAla	MeLeu	Ala(CN)	MePhe	Phe	MeLeu	MeGly	MeAla	Thr	Asp	pip					
DP-630	1338.7	11.5			D-Val	MeAla	MeLeu	Leu	MePhe	Ala(CN)	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	Asp	pip					
DP-631	1425.9	12.2				D-Val	MeAla	MePhe	MeAla	Lys(Me2)	MeGly	Val	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ala	pip			
DP-632	1311.7	12.0			MeAla	Thr	MeGly	MePhe	EtPhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	pip					
DP-633	1341.7	13.4			D-MeAla	Leu	MeLeu	EtPhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-634	1224.6	11.5				nPrGly	Ser(tBu)	MeGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	MeIle	MeAla	Asp	pip					
DP-635	1355.8	14.0			D-MeAla	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	nPrGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-636	1341.7	13.5			D-MeAla	Leu	MeLeu	EtPhe	Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-637	1341.7	13.5			D-MeAla	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	EtPhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip					
DP-638	1313.7	12.2			MeGly	Leu	Thr	MeGly	MePhe	Ala	EtPhe	Leu	MeIle	MeLeu	Asp	pip					
DP-639	1190.6	13.7			D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Leu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-640	1204.6	14.0			Val	MeLeu	Leu	D-Leu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	L-3-ABU						

	mw	cLogP	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-641	1204.6	14.1			MeGly	MeLeu	Leu	MeLeu	Abu	D-Leu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	L-3-ABU						
DP-642	1204.6	13.9			MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Leu	D-Leu	L-3-ABU						
DP-643	1204.6	14.0			Leu	D-Leu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Val	L-3-ABU						
DP-644	1190.6	13.6			MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Leu	MeLeu	Ala	L-3-ABU						
DP-645	1190.6	13.8			MeLeu	Abu	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	AOC(2)	MeGly	MeLeu	L-3-ABU						
DP-646	1190.6	13.7			MeLeu	AOC(2)	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Abu	L-3-ABU						
DP-647	1204.6	14.2			Leu	MeGly	MeLeu	AOC(2)	MeLeu	Ser	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-648	1204.6	14.1			MeSer	AOC(2)	MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Abu	D-Leu	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-649	1148.5	12.1			MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	L-3-ABU						
DP-650	1162.6	12.5			MeLeu	Ala	MeLeu	Ala	D-Leu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Abu	L-3-ABU						
DP-651	1148.5	12.0			Abu	MeGly	MeLeu	Leu	MeLeu	Ser	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-652	1148.5	11.9			MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Val	D-Ala	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-653	1148.5	11.9			MeLeu	MeSer	Val	MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Leu	D-Ala	MeLeu	L-3-ABU						
DP-654	1188.5	12.1			MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	-CF3-bAla						
DP-655	1188.5	12.1			MeLeu	Abu	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Abu	-CF3-bAla						
DP-656	1188.5	12.1			Leu	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeSer	Abu	MeGly	MeLeu	Val	-CF3-bAla						
DP-657	1188.5	12.0			MeSer	Leu	MeGly	MeLeu	Leu	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	-CF3-bAla						
DP-658	1319.7	9.7						D-Ala	Val	MePhe	MeLeu	MeAla	Thr	Phe	Asp	MePhe	Leu	Ala	pip		
DP-659	1549.0	12.8					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MeAla	Leu	Val	MeAla	Ala	pip
DP-660	1512.0	13.1					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MePhe	MeAla	Val	Ala	pip	
DP-661	1348.7	11.0					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MeAla	Pro	Ala	pip		
DP-662	1334.7	10.4					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	Ala	Pro	Ala	pip		
DP-663	1293.7	12.1					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	MeLeu	Ala	pip			
DP-664	1166.5	10.3					MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	Ala	pip				
DP-665	1550.9	10.6					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	MeAla	Ile	Pro	Val	Ala	pip
DP-666	1529.9	11.5					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	Phe	Leu	Ile	Ala	pip	
DP-667	1529.9	11.8					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	MeLeu	MeAla	MePhe	Ala	pip	
DP-668	1283.6	9.7					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	MeAla	Ile	pip			
DP-669	1198.5	9.4					Ala	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	Ile	pip				
DP-670	1569.0	12.6				D-Ala	Ala	MeIle	MeLeu	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeVal	Asp	MeGly	MeAla	MeLeu	Ala	pip	
DP-671	1481.9	11.6				D-Ala	Ala	MeIle	MeLeu	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeVal	Asp	Pro	Val	Ala	pip		
DP-672	1356.7	10.5				D-Ala	Ala	MeIle	MeLeu	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeVal	Asp	MeGly	Ala	pip			
DP-673	1014.3	10.5						Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-674	799.0	4.5							D-Ala	MePhe	Ile	Thr	MeGly	Val	Asp	pip					
DP-675	1096.4	8.1				MeAla	Thr	MeAla	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ile	Ala	Asp	pip					
DP-676	1551.9	11.3			Ala(5-Tet	MeLeu	Val	MePhe	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	Asp	MePhe	Ala	pip			

	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-677	899.1	4.9								g-MeAbu	Thr	MeLeu	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-678	869.1	7.5								MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-679	911.2	8.9								MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-680	899.1	4.9								g-MeAbu	MePhe	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-681	941.2	6.3								g-MeAbu	MePhe	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-682	1012.3	8.4							D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-683	1054.4	9.8							D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-684	1040.4	9.2							D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-685	1026.3	7.0							g-MeAbu	MePhe	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-686	1068.4	8.5							g-MeAbu	MePhe	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-687	986.2	7.3							MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	pip					
DP-688	1028.3	8.8							MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	pip					
DP-689	1040.4	9.3							MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-690	982.3	8.7							Val	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-691	982.3	8.7							Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	MeGly	Leu	Asp	pip					
DP-692	1026.3	8.6							Leu	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-693	1012.3	8.1							Val	MePhe	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-694	1012.3	8.1							Val	MePhe	MeGly	Thr	MeLeu	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-695	1012.3	6.5							g-MeAbu	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-696	1040.4	9.2							MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	Leu	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-697	998.3	7.8							MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-698	1040.4	9.2							MeAla	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Leu	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-699	1002.3	8.3							MeAla	Ala	Thr	MeLeu	Phe	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-700	1002.3	8.3							MeAla	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	Ala	MePhe	Asp	pip					
DP-701	1016.3	8.6							D-Val	Leu	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-702	1016.3	8.6							D-Val	Leu	Thr	MeAla	MePhe	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-703	1058.4	10.0							D-Val	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeLeu	Phe	Asp	pip					
DP-704	1012.3	7.4							b-MeAla	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-705	1054.4	8.8							b-MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-706	1070.4	10.2							MeLeu	MeLeu	Leu	MePhe	Thr	Pro	MePhe	Asp	pip					
DP-707	1012.3	8.4							MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-708	998.3	7.7							D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					
DP-709	1032.3	7.8							MeGly	Thr	MeAla	MePhe	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-710	1032.3	7.8							MeAla	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-711	1018.3	7.1							Ala	MePhe	MeGly	MePhe	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-712	954.2	6.3							g-MeAbu	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-713	982.3	7.1							g-MeAbu	MeGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-714	982.3	8.7							D-Val	MeLeu	MeGly	MePhe	Thr	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-715	927.2	5.7								g-MeAbu	Thr	MeLeu	Leu	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-716	927.2	5.7								g-MeAbu	Leu	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	MePhe	Asp	pip					
DP-717	913.2	7.1								MeLeu	Thr	MeLeu	MeGly	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-718	899.1	6.5								Leu	MeGly	MeLeu	MePhe	Thr	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-719	869.1	7.2								Val	MeGly	Thr	MeLeu	MeLeu	MePhe	Asp	pip					
DP-720	855.1	6.6								Val	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-721	897.2	8.3								D-Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-722	939.2	9.7								MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-723	869.1	7.1								Leu	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-724	885.1	5.9								Val	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeGly	Thr	Asp	pip					
DP-725	893.2	7.7								D-MeAla	MeLeu	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip					

	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-726	835.1	7.1								Leu	MeGly	Thr	MeLeu	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-727	821.1	6.6								Val	Leu	MeLeu	MeLeu	MeGly	Thr	Asp	pip					
DP-728	1293.7	12.2				MeAla	Leu	MeAla	Thr	Hph	Leu	MeLeu	Val	Leu	Ile	Asp	pip					
DP-729	1307.7	12.7				MeAla	Leu	MeAla	Thr	Phe3	Leu	MeLeu	Val	Leu	Ile	Asp	pip					
DP-730	1299.7	11.4				D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal	Hph	MePhe	Ile	MeAla	Ala	Thr	Asp	pip					
DP-731	1313.7	11.9				D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal	Phe3	MePhe	Ile	MeAla	Ala	Thr	Asp	pip					
DP-732	1325.7	12.1				D-Val	Thr	MeAla	MePhe	Pro	Leu	MeVal	Hph	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-733	1339.7	12.6				D-Val	Thr	MeAla	MePhe	Pro	Leu	MeVal	Phe3	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-734	1257.6	10.4				MeAla	Thr	MeAla	Ala	MePhe	MeLeu	MeVal	MeAla	Hph	MeAla	Asp	pip					
DP-735	1271.6	11.0				MeAla	Thr	MeAla	Ala	MePhe	MeLeu	MeVal	MeAla	Phe3	MeAla	Asp	pip					
DP-736	1251.6	11.1				D-Val	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Hph	MeVal	Leu	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-737	1265.6	11.6				D-Val	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Phe3	MeVal	Leu	MeLeu	Ala	Asp	pip					
DP-738	897.2	8.3								MeLeu	Leu	MePhe	Thr	MeLeu	MeAla	Asp	pip					
DP-739	855.1	6.8								D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-740	897.2	8.3								D-Ala	MeLeu	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-741	841.1	6.2								D-Ala	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Leu	Asp	pip					
DP-742	827.0	5.6								D-Ala	MeGly	MePhe	MeLeu	Thr	Leu	Asp	pip					
DP-743	913.2	7.1								MeGly	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-744	841.1	6.3								MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	Leu	MePhe	Asp	pip					
DP-745	841.1	6.3								Leu	MeAla	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	Asp	pip					
DP-746	927.2	6.6								b-MeAla	Thr	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-747	927.2	6.6								b-MeAla	MePhe	MeLeu	MeLeu	Thr	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-748	941.2	7.9								Val	MeLeu	Ser(tBu)	Thr	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-749	885.1	5.9								Val	MeGly	MeLeu	Thr	MePhe	Ser(tBu)	Asp	pip					
DP-750	871.1	4.7								b-MeAla	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Asp	pip					
DP-751	861.0	5.6								Ala	MeGly	Thr	MePhe	MePhe	Leu	Asp	pip					
DP-752	1273.6	9.4			D-MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Phe	Pro	Thr	Leu	MeAla	MeAla	Gly	L-3-ABU						
DP-753	1217.5	9.7			D-MeAla	MeAla	Phe	MeAla	Val	MeVal	Gly	MePhe	Thr	MeAla	Leu	L-3-ABU						
DP-754	1315.7	10.8			D-MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Phe	Pro	Thr	Leu	MeAla	MeIle	Gly	L-3-ABU						
DP-755	1273.6	11.7			D-MeAla	MeAla	Phe	MeLeu	Val	MeIle	Gly	MePhe	Thr	MeAla	Leu	L-3-ABU						
DP-756	1387.8	13.3			b-MeAla	Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeIle	Ala	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-757	1357.8	14.6			D-MeAla	MeLeu	Phe	MeLeu	Val	MeIle	Gly	MePhe	Thr	MeLeu	Leu	L-3-ABU						
DP-758	1429.9	14.7			b-MeAla	Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeIle	Leu	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-759	1387.8	14.3			MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	Thr	Phe	MeIle	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-760	1401.8	14.5			D-Val	MeIle	Ala	MeLeu	Thr	Phe	MePhe	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	MeAla	L-3-ABU						
DP-761	1429.9	15.7			MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	Phe	MeIle	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-762	1392.2	15.3			D-MeAla	MeLeu	Phe	MeLeu	Val	MeIle	Gly	MePhe(3-C	Thr	MeLeu	Leu	L-3-ABU						
DP-763	1146.4	8.9				b-MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	Phe	MeVal	MeLeu	MeAla	Ala	L-3-ABU						
DP-764	1112.4	9.6				D-Ala	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	Phe	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	L-3-ABU						
DP-765	1130.4	8.9				MeAla	Thr	MeGly	MePhe	MePhe	MeAla	Pro	MeLeu	Ala	MeAla	L-3-ABU						
DP-766	1158.4	9.8				Ala	Gly	MeLeu	MeAla	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Pro	L-3-ABU						
DP-767	1200.5	11.2				Ala	Gly	MeLeu	MeIle	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Pro	L-3-ABU						
DP-768	1200.5	11.3				MeAla	Thr	MeGly	MePhe	MePhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	L-3-ABU						
DP-769	1202.5	11.5				D-MeAla	MeLeu	Leu	MeVal	Thr	MeAla	Ile	MePhe	Ala	Phe	L-3-ABU						
DP-770	1182.6	12.2				MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	MeAla	Ala	MeVal	MeLeu	Ile	L-3-ABU						
DP-771	1288.7	13.1				MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	L-3-ABU						
DP-772	1238.7	14.2				MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	MeLeu	Ala	MeLeu	MeLeu	Ile	L-3-ABU						
DP-773	1272.7	14.3				D-Val	MeIle	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	MeAla	L-3-ABU						
DP-774	1228.6	12.5				MeAla	Thr	MeGly	MePhe	MePhe	MeAla	Pro	MeLeu	AOC(2)	MeVal	L-3-ABU						

	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-775	1274.7	12.9				MeAla	MePhe	AOC(2)	MeLeu	Thr	MeGly	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	L-3-ABU						
DP-776	1306.7	15.1				MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe(4-CF3	MeLeu	Ala	MeLeu	MeLeu	Ile	L-3-ABU						
DP-777	1147.5	9.3					b-MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe	Gly	MeVal	Phe	L-3-ABU						
DP-778	1103.4	8.7					g-MeAbu	Ala	MeLeu	Ile	MePhe	MeAla	MeVal	Phe	Thr	L-3-ABU						
DP-779	1113.4	10.7					MeAla	MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-780	1145.5	12.1					D-Val	MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-781	1187.6	13.6					D-Val	MePhe	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-782	1222.0	14.3					D-Val	MePhe	MeLeu	Ile	MeLeu	MePhe(3-C	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-783	1131.5	11.8					D-MeAla	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-784	1137.4	10.1					D-MeAla	Phe	MeLeu	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	MePhe	L-3-ABU						
DP-785	1020.3	6.5						g-MeAbu	Thr	MeAla	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	MePhe	Gly	L-3-ABU						
DP-786	944.2	7.0						D-Ala	MeAla	MePhe	MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-787	986.3	8.4						D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-788	1004.3	9.3						D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	L-3-ABU						
DP-789	1028.3	10.0						D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeIle	L-3-ABU						
DP-790	1114.4	11.6						D-Val	Leu	Thr	MeAla	Phe(4-CF3	MeLeu	MePhe	MeLeu	L-3-ABU						
DP-791	1074.4	11.9						MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Thr	L-3-ABU						
DP-792	1148.8	12.3						D-Val	Leu	Thr	MeAla	Phe(4-CF3	MeLeu	MePhe(3-C	MeLeu	L-3-ABU						
DP-793	1122.5	12.5						D-MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	L-3-ABU						
DP-794	845.0	4.7							b-MeAla	Thr	MeAla	Ser(tBu)	MePhe	MeLeu	Gly	L-3-ABU						
DP-795	915.2	6.5							g-MeAbu	MePhe	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-796	877.1	7.1							D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	L-3-ABU						
DP-797	901.2	7.8							D-MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-798	917.2	10.5							Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MeLeu	MePhe	L-3-ABU						
DP-799	1062.8	10.7						D-MeAla	MePhe(3-C	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeIle	L-3-ABU						
DP-800	994.3	10.0						D-MeAla	MeLeu	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeIle	L-3-ABU						
DP-801	1048.8	10.0						D-Val	MePhe(3-C	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-802	980.3	9.4						D-Val	MeLeu	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-803	1147.9	11.4					MeAla	MePhe(3-C	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-804	1079.4	10.8					MeAla	MeLeu	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	L-3-ABU						
DP-805	1250.6	12.1				b-MeAla	MeLeu	Thr	Phe(4-CF3	MeGly	Ala	MeLeu	Ile	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-806	1148.5	11.3				b-MeAla	MeLeu	Thr	Leu	MeGly	Ala	MeLeu	Ile	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-807	1277.5	10.5			Ala	Ile	Pro	MeLeu	Thr	Gly	Phe(4-CF3	MeAla	Val	Leu	Leu	L-3-ABU						
DP-808	1175.5	9.7			Ala	Ile	Pro	MeLeu	Thr	Gly	Leu	MeAla	Val	Leu	Leu	L-3-ABU						
DP-809	1249.9	11.0					b-MeAla	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Thr	MePhe(3-C	Gly	MeVal	Phe(4-CF3	L-3-ABU						
DP-810	1360.0	12.1			MeAla	Leu	MeAla	Thr	Pro	MePhe(3-C	Phe(4-CF3	MeIle	Gly	MeAla	Leu	L-3-ABU						
DP-811	1200.4	13.1					D-MeAla	MeAla	Ile	MeLeu	MePhe(3-C	Thr	MePhe(3-C	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-812	1214.4	13.5					D-Val	MePhe(3-C	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe(3-C	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-813	1077.5	12.2					D-Val	MeLeu	MeLeu	Ile	MeAla	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-814	1395.6	12.9			Ala	Leu	MeAla	MeLeu	Gly	MeAla	Phe(4-CF3	Thr	MeLeu	Phe(4-CF3	MeVal	L-3-ABU						
DP-815	1230.6	10.1				D-MeAla	Phe	MeLeu	Ser(tBu)	Phe	Pro	Thr	Leu	MeIle	Gly	L-3-ABU						
DP-816	1240.6	12.8				MeAla	MePhe	Ala	MeLeu	Thr	MeIle	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-817	1282.7	14.2				MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeIle	MeAla	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	L-3-ABU						
DP-818	965.2	8.1					D-Ala	MeLeu	MeAla	Thr	MeGly	MeVal	Ala	MeLeu	Leu	L-3-ABU						
DP-819	962.2	7.8						D-MeAla	MeVal	Thr	MeAla	Ile	MePhe	Ala	Phe	L-3-ABU						
DP-820	1127.5	11.0					MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MeVal	L-3-ABU						
DP-821	1169.6	12.5					MeLeu	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MeVal	L-3-ABU						
DP-822	1113.4	10.7					MeAla	MePhe	AOC(2)	MeLeu	Thr	MeGly	MeAla	Ser(tBu)	MeVal	L-3-ABU						
DP-823	984.3	8.0						g-MeAbu	Ala	MeLeu	Ile	MeLeu	MeVal	Phe	Thr	L-3-ABU						

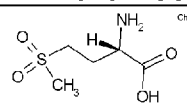
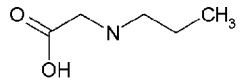
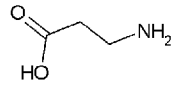
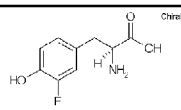
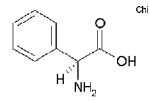
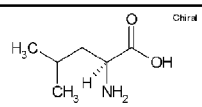
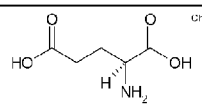
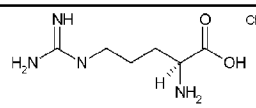
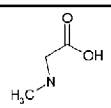
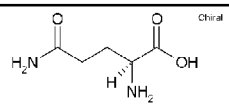
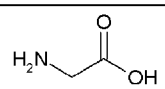
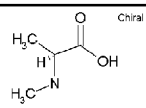
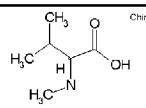
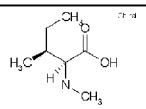
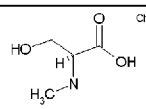
	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-824	1018.3	8.0						g-MeAbu	Ala	MeLeu	Ile	MePhe	MeVal	Phe	Thr	L-3-ABU						
DP-825	953.2	9.5							D-Val	Leu	Thr	MeAla	Phe(4-CF3	MeLeu	MeLeu	L-3-ABU						
DP-826	867.1	7.9							D-MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	Ser(tBu)	MeLeu	MeIle	L-3-ABU						
DP-827	949.2	7.0					MeAla	Leu	MeAla	Thr	Pro	MeIle	Gly	MeAla	Leu	L-3-ABU						
DP-828	1018.7	10.7						D-Val	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe(3-C	Thr	MeAla	MeLeu	L-3-ABU						
DP-829	1180.4	10.5				Ala	Leu	MeAla	MeLeu	Gly	MeAla	Phe(4-CF3	Thr	MeLeu	MeVal	L-3-ABU						
DP-830	1255.6	12.2						MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Phe(4A)	pip					
DP-831	1255.6	12.2						MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Phe(3A)	pip					
DP-832	1271.7	13.1						MePhe	MeGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Phe(4B)	pip					
DP-833	1273.7	13.3						MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(4A)	pip					
DP-834	1273.7	13.3						MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(3A)	pip					
DP-835	1289.7	14.2						MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-836	1275.7	13.6						MePhe	MeLeu	Ile	MeAla	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-837	1271.7	13.1						MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-838	1257.7	12.6						MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-839	1283.7	13.6						Ser(tBu)	nPrGly	MeLeu	Thr	MePhe	MeLeu	MeIle	MeAla	Phe(4A)	pip					
DP-840	1261.7	13.3						Thr	MeAla	MePhe	MePhe	MeLeu	Gly	MeIle	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-841	1289.7	14.2						MeAla	Ile	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-842	1295.7	12.6						Phe	MeLeu	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	MePhe	Phe(4B)	pip					
DP-843	1261.7	13.3						Thr	MeAla	MePhe	Gly	MePhe	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-844	1075.4	12.9								MePhe	Gly	MePhe	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-845	1225.6	12.8						MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	Gly	MeLeu	MeLeu	MeLeu	Phe(4A)	pip					
DP-846	1273.7	13.0						Ala	MeLeu	Ile	MePhe	MeLeu	MeVal	Phe	Thr	Phe(3A)	pip					
DP-847	1289.7	13.9						Ala	MeIle	MeLeu	MePhe	Leu	MeVal	Phe	Thr	Phe(4B)	pip					
DP-848	1263.6	11.4						Thr	Gly	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeAla	Phe	MeVal	Phe(4B)	pip					
DP-849	1275.7	13.6						MeAla	Ile	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-850	1430.9	14.6					MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Phe(4A)	pip					
DP-851	1430.9	14.6					MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Phe(3A)	pip					
DP-852	1446.9	15.5					MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Phe(4B)	pip					
DP-853	1432.9	15.0					MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Phe(3C)	pip					
DP-854	1372.8	14.5					Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Phe(4A)	pip					
DP-855	1372.8	14.5					Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Phe(3A)	pip					
DP-856	1388.8	15.4					Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-857	1374.8	14.8					Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-858	1416.9	16.3					MeLeu	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-859	1402.9	15.8					MeLeu	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-860	1358.8	13.8					Gly	MeLeu	MeIle	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	MeLeu	Pro	Phe(3C)	pip					
DP-861	1446.9	15.5					MePhe	Ile	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Phe(4B)	pip					
DP-862	1460.9	16.0					MeLeu	Ile	MePhe	MePhe	Ser(tBu)	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-863	1148.5	11.7							EtPhe	Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-864	1372.8	14.5					Leu	MeLeu	MeIle	Ala	MePhe	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	Phe(4A)	pip					
DP-865	1360.8	14.2					Gly	MeLeu	MeIle	Ala	MePhe	Thr	MeLeu	Phe	MeVal	Phe(4B)	pip					
DP-866	1280.7	11.7					Leu	Pro	Thr	MeGly	Phe	MeVal	MeAla	Leu	MeLeu	Phe(3A)	pip					
DP-867	1402.9	15.9					Leu	Thr	nPrGly	MePhe	Ala	MePhe	MeLeu	MeIle	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-868	1416.9	16.5					Ile	MeLeu	MeAla	MeLeu	Thr	MePhe	MeAla	MeLeu	MePhe	Phe(4B)	pip					
DP-869	1269.7	14.2						Leu	Pro	MeVal	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	MeIle	Phe(4A)	pip					
DP-870	1269.7	14.2						Leu	Pro	MeVal	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	MeIle	Phe(3A)	pip					
DP-871	1285.7	15.1						Leu	Pro	MeVal	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	MeIle	Phe(4B)	pip					
DP-872	1271.7	14.6						Leu	Pro	MeVal	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	MeIle	Phe(3C)	pip					

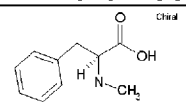
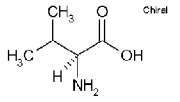
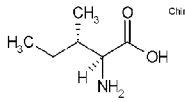
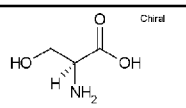
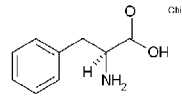
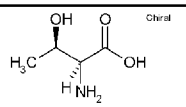
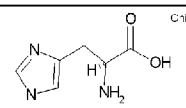
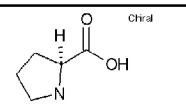
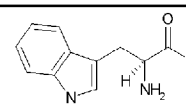
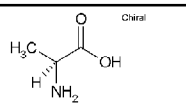
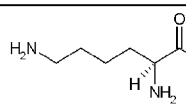
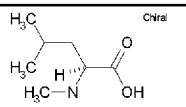
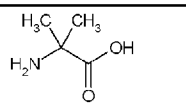
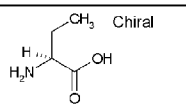
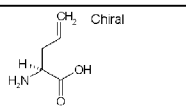
	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-873	1546.1	16.9				Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeIle	Ala	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-874	1532.0	16.3				Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeIle	Ala	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Phe(3C)	pip					
DP-875	1459.9	15.6				Leu	MePhe	MeLeu	Ile	MeVal	MePhe	Thr	MeGly	MeAla	MeAla	Phe(4B)	pip					
DP-876	1445.9	15.0				Ile	MePhe	MeVal	Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MeGly	MeLeu	MeAla	Phe(3C)	pip					
DP-877	1443.9	14.0				Leu	MeIle	Leu	MeAla	MePhe	Gly	Thr	Phe	MeLeu	Pro	Phe(3C)	pip					
DP-878	1429.9	13.4				Thr	MePhe	Leu	Pro	Val	Phe	MeGly	Leu	Ala	MeIle	Phe(4B)	pip					
DP-879	1167.5	11.9						Leu	Pro	Val	Phe	MeGly	Leu	Ala	MeIle	Phe(4A)	pip					
DP-880	1179.6	12.3						Leu	Pro	MeVal	Phe	MeGly	MeLeu	Ala	MeIle	Phe(4A)	pip					
DP-881	1459.9	15.6				Leu	MePhe	MeLeu	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Phe(4B)	pip					
DP-882	1457.9	14.8				Leu	MeIle	MeLeu	Gly	MeAla	Phe	Thr	MeLeu	Phe	MeVal	Phe(3A)	pip					
DP-883	1471.9	15.4				Thr	MePhe	MeLeu	Val	Pro	MePhe	Leu	MeGly	MeIle	MeAla	Phe(4B)	pip					
DP-884	1483.9	15.2				Val	MeAla	MeLeu	Leu	Phe	MePhe	Ile	Pro	Thr	MeLeu	Phe(3A)	pip					
DP-885	1429.9	13.5				Gly	MeVal	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-886	1445.9	15.0				Ile	MePhe	MeLeu	Ala	MeVal	MeAla	Thr	MeGly	MeLeu	MePhe	Phe(3C)	pip					
DP-887	1515.0	14.2			Gly	MeAla	Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(4A)	pip					
DP-888	1372.8	13.9					Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(4A)	pip					
DP-889	1515.0	14.2			Gly	MeAla	Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(3A)	pip					
DP-890	1372.8	13.9					Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(3A)	pip					
DP-891	1531.0	15.1			Gly	MeAla	Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(4B)	pip					
DP-892	1388.8	14.8					Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(4B)	pip					
DP-893	1517.0	14.5			Gly	MeAla	Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(3C)	pip					
DP-894	1374.8	14.2					Leu	Val	MeLeu	Phe	MePhe	Ile	MeAla	Leu	Thr	Phe(3C)	pip					
DP-895	1557.0	15.6			Val	MeGly	Leu	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Phe(4B)	pip					
DP-896	1543.0	15.1			Val	MeGly	Leu	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-897	1372.8	13.9					Leu	MeLeu	Ala	MeIle	Phe	MePhe	Thr	Pro	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-898	1486.9	12.9			Leu	Phe	Thr	Leu	MeAla	Phe	Gly	Val	Leu	Ala	MeLeu	Phe(4A)	pip					
DP-899	1583.1	16.7			Val	MeLeu	MeGly	MeLeu	MeIle	Ala	MePhe	MePhe	Thr	MeLeu	Pro	Phe(3A)	pip					
DP-900	1529.0	14.3			Val	MeAla	Thr	Leu	Phe	MeLeu	Pro	Phe	Ile	MeGly	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-901	1344.7	12.6					Thr	Leu	Phe	MeLeu	Pro	Phe	Ile	MeGly	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-902	1557.0	15.6			Gly	MeVal	Ala	Leu	MeLeu	MePhe	Ile	Phe	Pro	Thr	MeLeu	Phe(4B)	pip					
DP-903	1500.9	13.0			Phe	Ile	Pro	Leu	Thr	Gly	Phe	MeAla	Val	Leu	Leu	Phe(3C)	pip					
DP-904	1207.6	11.6						D-Leu	MePhe	MeLeu	His	MeAla	MeLeu	Phe	MeLeu	Asp	pip					
DP-905	1271.6	10.9						MePhe	Thr	MeLeu	Leu	MePhe	MePhe	His	MeLeu	Asp	pip					
DP-906	1449.9	13.8				MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	His	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	pip					
DP-907	1237.6	12.2						MeLeu	Ala(5-Tet)	MeLeu	Val	MePhe	MePhe	Leu	MeLeu	Asp	pip					
DP-908	1506.0	17.0				MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	Leu	MePhe	MeLeu	Ala(5-Tet)	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-909	1336.7	13.4					Ala(5-Tet)	MePhe	MeLeu	Ala	MeLeu	MePhe	D-Leu	MeLeu	MeLeu	Asp	pip					
DP-910	1515.0	13.4								Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	Leu	Pro	Phe	Leu	Ile	pip
DP-911	1483.4	14.8								D-Val	MeAla	/MePhe(3-C	MeLeu	Thr	MeLeu	Asp	MeLeu	Ile	MeAla	MeLeu	Ile	pip
DP-912	1461.3	12.7								MeAla	Leu	MeLeu	MeAla	/MePhe(3-C	Thr	Asp	Val	MeLeu	MePhe	MeGly	Ile	pip
DP-913	1483.0	13.8								Ala	MeLeu	Val	MePhe	Val	Ile	Asp	MePhe	MeLeu	Thr	MeLeu	Ile	pip
DP-914	1545.5	15.3								Phe	Thr	Leu	MeLeu	MeAla	MeLeu	Asp	Ile	/MePhe(3-C	MeLeu	Leu	Ile	pip
DP-915	1569.4	13.8								Ala	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Asp	Pro	MeAla	/MePhe(3-C	MePhe	Ile	pip
DP-916	1446.3	15.0								D-Val	/MePhe(3-C	MeAla	MeLeu	Thr	MeLeu	Asp	MePhe	MeLeu	MeLeu	Ile	pip	
DP-917	1369.8	12.5								D-Ala	MeLeu	Thr	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	Val	Phe	Ile	Ile	pip	
DP-918	1361.7	11.3								Ala	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	Asp	MeLeu	MePhe	MeAla	Ile	pip	
DP-919	1259.7	11.2								D-Ala	Thr	MeLeu	Ile	MeLeu	Leu	Asp	MeGly	MeLeu	Leu	Ile	pip	
DP-920	1418.3	13.5								MeAla	Ile	MeLeu	Thr	Leu	/MePhe(3-C	Asp	Val	MeLeu	MePhe	Ile	pip	
DP-921	1403.8	12.2								MeAla	Val	Leu	MePhe	Leu	Thr	Asp	MePhe	Phe	MeLeu	Ile	pip	

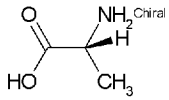
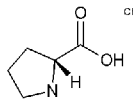
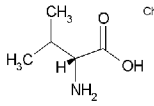
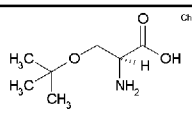
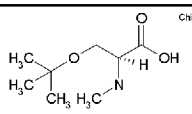
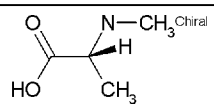
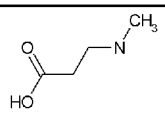
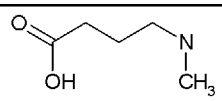
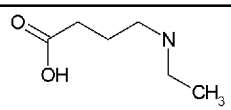
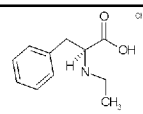
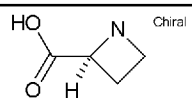
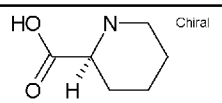
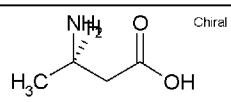
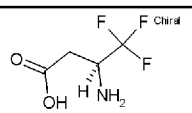
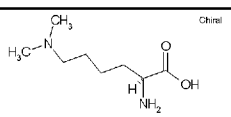
	mw	cLogP	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
DP-922	1572.0	12.7							Ala	MeAla	MePhe	Thr	MePhe	Leu	Pro	Asp	Ile	MeLeu	Phe	Val	Ile	pip
DP-923	1745.0	16.5							Phe	MePhe	Pro	Leu	MePhe(3-C	Thr	Leu	Asp	MeLeu	MeAla	Leu	MePhe(3-C	Ile	pip
DP-924	1622.5	14.6							D-Val	Val	Thr	Leu	Phe	MeLeu	MePhe(3-C	Asp	MePhe	MeAla	MeGly	MeLeu	Ile	pip
DP-925	1642.6	16.3							Phe	Leu	MeLeu	Thr	MePhe(3-C	MeAla	MeLeu	Asp	MeLeu	Leu	Pro	Leu	Ile	pip
DP-926	1662.6	14.7							b-MeAla	MePhe	Val	MeLeu	Thr	MeLeu	Ile	Asp	Pro	Val	MePhe(3-C	MePhe	Ile	pip
DP-927	1563.4	14.8							MeAla	Val	MePhe	Thr	Pro	MePhe	Leu	Asp	MePhe(3-C	MeLeu	MeLeu	Ile	pip	
DP-928	1523.4	13.7							Ala	Thr	MeLeu	Val	MePhe(3-C	MeLeu	Phe	Asp	Ile	MeAla	MePhe	Ile	pip	
DP-929	1472.9	12.2							D-Val	Ala	MePhe	MeAla	Phe	MeLeu	Thr	Asp	MePhe	Pro	MeLeu	Ile	pip	
DP-930	1502.9	12.7							b-MeAla	MeAla	Leu	Thr	MePhe	MeLeu	MePhe	Asp	MeLeu	Phe	Val	Ile	pip	
DP-931	1579.5	15.7							Phe	Ile	MeLeu	MeLeu	Phe	Thr	MePhe(3-C	Asp	Leu	MeLeu	MeAla	Ile	pip	
DP-932	1327.7	11.1							MeAla	Val	Ala	Leu	MePhe	Leu	Thr	Asp	MePhe	MeLeu	Ile	pip		
DP-933	1363.8	13.7							D-Val	Leu	MeLeu	Thr	Val	MeLeu	MePhe	Asp	MeLeu	Leu	Ile	pip		
DP-934	1369.8	12.6							Ala	MePhe	MeLeu	MeLeu	Phe	Thr	Val	Asp	Leu	MeLeu	Ile	pip		
DP-935	1701.2	15.3						D-Val	Val	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	Ile	Asp	MePhe	Val	MeAla	MeLeu	Ile	pip
DP-936	1699.6	15.8						Ala	MeLeu	MePhe(3-C	Val	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	Asp	MeAla	Val	Pro	MeLeu	Ile	pip
DP-937	1625.2	15.4						b-MeAla	Leu	MeLeu	Thr	MeAla	Ile	MeLeu	MeLeu	Asp	Pro	Ile	MeLeu	Leu	Ile	pip
DP-938	1723.3	17.7						MeAla	MeLeu	MePhe	Thr	MeLeu	MeLeu	Ile	MeLeu	Asp	MeLeu	Ala	Val	MePhe	Ile	pip
DP-939	1512.0	12.9						D-Val	Ala	Thr	MeAla	Phe	MeLeu	MePhe	MeLeu	Asp	Val	MeGly	MeLeu	Ile	pip	
DP-940	1534.0	14.9						MeAla	Leu	MePhe	Leu	MeGly	MeLeu	Ile	MeLeu	Asp	Thr	MeLeu	Val	Ile	pip	
DP-941	1672.6	16.8						b-MeAla	MePhe(3-C	Leu	Thr	Leu	Ile	MeLeu	MeLeu	Asp	MePhe	Ile	MeLeu	Ile	pip	
DP-942	1648.5	15.6						D-MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	MePhe(3-C	Thr	MePhe	Leu	Asp	Ile	Pro	MeAla	Ile	pip	
DP-943	1586.0	13.6						MeAla	Thr	MePhe	Val	Pro	MePhe	Leu	MePhe	Asp	Val	MeLeu	MeAla	Ile	pip	
DP-944	1695.2	16.7					D-Val	MeLeu	MeLeu	Ala	Phe	Thr	Leu	MePhe	MeLeu	Asp	MeAla	Leu	MeLeu	Ile	pip	
DP-945	1667.2	16.0					Ala	MeLeu	Val	Ala	MeLeu	MeLeu	MePhe	Thr	MePhe	Asp	MeAla	Leu	MeLeu	Ile	pip	
DP-946	1777.7	18.0					MeAla	Thr	MeAla	MeLeu	Phe	MePhe(3-C	MeLeu	Ile	Val	Asp	Ile	MeLeu	MePhe	Ile	pip	
DP-947	1681.2	16.2					D-Val	MeLeu	MeAla	Phe	MePhe	MeLeu	Ile	Thr	Leu	Asp	MeLeu	Val	MeAla	Ile	pip	
DP-948	1665.2	14.4					b-MeAla	Phe	MeLeu	Thr	Val	Gly	MeLeu	Leu	MeLeu	Asp	MePhe	Pro	MeLeu	Ile	pip	
DP-949	1707.6	16.0				D-Val	MeAla	MeLeu	Thr	MeGly	MePhe	MeLeu	MePhe(3-C	MeLeu	Ala	Asp	Phe	Val	Ile	pip		
DP-950	1701.6	16.9				MeAla	Val	MeAla	Thr	MePhe(3-C	Leu	MeLeu	MeAla	Leu	Ile	Asp	MePhe	MeLeu	Ile	pip		
DP-951	1695.2	17.6				MeAla	MeLeu	MeLeu	Leu	MeLeu	MePhe	MePhe	Thr	MeAla	MeLeu	Asp	MeAla	Val	Ile	pip		
DP-952	1657.1	14.4			Ala	Thr	MeGly	Leu	Pro	MeLeu	Phe	MePhe	MeLeu	Ala	MeLeu	Asp	Phe	Ile	pip			
DP-953	1773.3	17.4			Phe	MeLeu	Ala	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	MeLeu	Thr	Phe	MePhe	MeAla	Asp	Ile	Ile	pip			
DP-954	1725.3	16.1			b-MeAla	Phe	MePhe	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	Val	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	Val	Ile	pip			
DP-955	1595.0	14.0		Ala	Thr	MeGly	Leu	Pro	MeLeu	Phe	MePhe	MeAla	MeLeu	Ala	MeLeu	Asp	Ile	pip				
DP-956	1669.2	15.7		D-MeAla	MePhe	MeAla	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	MeAla	Ile	Ser	Thr	MeLeu	Asp	Ile	pip				
DP-957	1554.0	14.9		b-MeAla	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	MeLeu	Ile	MeLeu	Phe	MePhe	Ala	Asp	pip					
DP-958	1596.1	16.7		b-MeAla	Ile	MeLeu	MeAla	MePhe	Thr	MeLeu	MeAla	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Asp	pip					
DP-959	1669.2	16.1	D-MeAla	MePhe	MeAla	MeLeu	Ile	MeLeu	Phe	MeLeu	MeAla	Leu	Ser	Thr	MeLeu	Asp	pip					
DP-960	1545.0	14.7						b-MeAla	MeLeu	MePhe	Leu	MeLeu	MeLeu	Thr	MeAla	Asp	MePhe	MePhe	Ile	pip		
DP-961	1630.1	15.3					b-MeAla	Ile	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Val	MeLeu	Asp	MePhe	MePhe	Ile	pip		
DP-962	1642.1	16.2				MeAla	Phe	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	Ile	Pro	Thr	Leu	Asp	MePhe	Ile	pip			
DP-963	1725.3	17.5		D-MeAla	MePhe	MeAla	MeLeu	MeLeu	Phe	MeLeu	MeAla	Ile	Ser(tBu)	Thr	MeLeu	Asp	Ile	pip				
DP-964	1481.4	14.8						^{HO}Gly	Pro	MeLeu	Lys	MeAla	Leu	MeLeu	MeLeu	Asp-pip	MeLeu	MePhe(3-C	Ile			
DP-965	1238.6	12.3							Ala	Leu	MeIle	Val	MePhe	Leu	MePhe	Asp	Pro	Ile	pip			

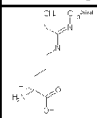
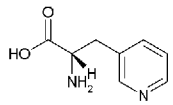
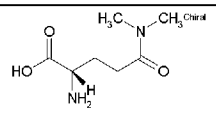
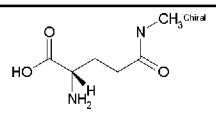
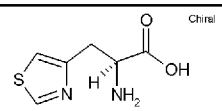
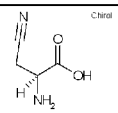
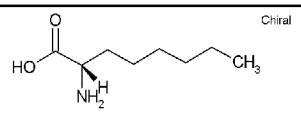
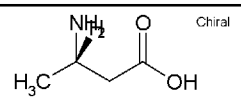
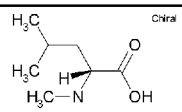
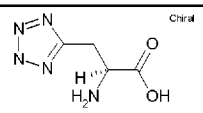
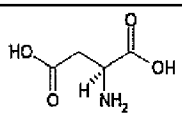
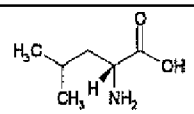
*DP-910 – DP-964のcLogPはDaylight Chemical Information Systems, Inc. 社のDaylight Version ver4.95を用いて計算した
**DP-964の場合はH－１のＭｅＬｅｕが▲ユニットに対応する。

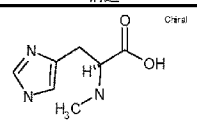
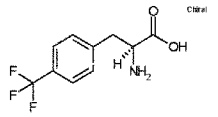
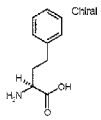
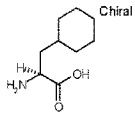
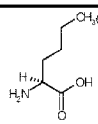
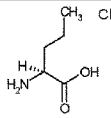
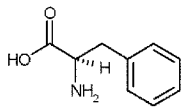
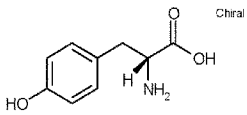
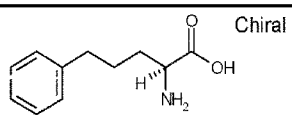
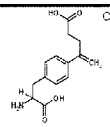
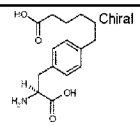
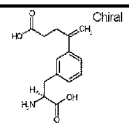
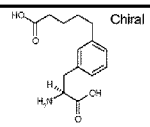
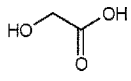
[0718] [表 11-2]

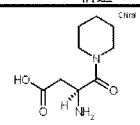
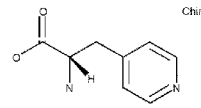
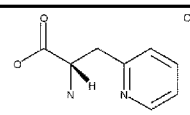
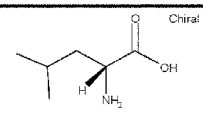
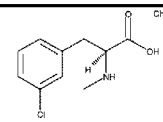
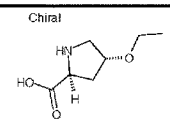
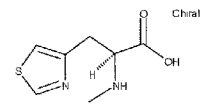
Chem CODE	MOLSTRUCTURE
Met(O2)	
nPrGly	
bAla	
Tyr(3-F)	
Phg	
Leu	
Glu	
Arg	
MeGly	
Gln	
Gly	
MeAla	
MeVal	
MeIle	
MeSer	

Chem CODE	MOLSTRUCTURE
MePhe	
Val	
Ile	
Ser	
Phe	
Thr	
His	
Pro	
Trp	
Ala	
Lys	
MeLeu	
Aib	
Abu	
Algly	

Chem CODE	MOLSTRUCTURE
D-Ala	
D-Pro	
D-Val	
Ser(tBu)	
MeSer(tBu)	
D-MeAla	
b-MeAla	
g-MeAbu	
g-EtAbu	
EtPhe	
Aze(2)	
Pic(2)	
D-3-ABU	
3-CF3-bAla	
Lys(Me2)	

Chem CODE	MOLSTRUCTURE
Arg(Me2)	
Ala(3Pyr)	
Gln(Me2)	
Gln(Me)	
Ala(4-Thz)	
Ala(CN)	
AOC(2)	
L-3-ABU	
D-MeLeu	
Ala(5-Tet)	
Asp	
D-Leu	

略号	構造
MeHis	
Phe(4-CF3)	
Hph	
Cha	
Nle	
Nva	
D-Phe	
D-Tyr	
Phe3	
Phe(4A)	
Phe(4B)	
Phe(3A)	
Phe(3C)	
HOGly	

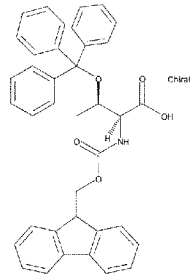
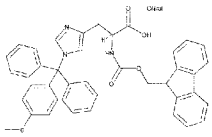
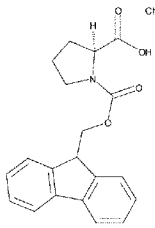
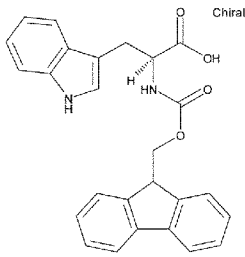
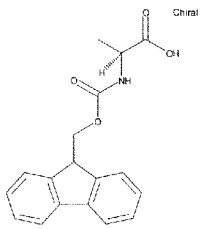
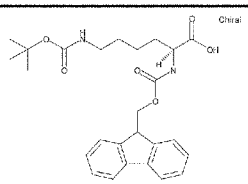
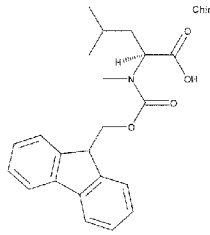
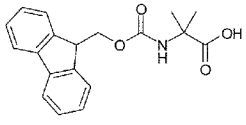
略号	構造
Asp-pip	
Ala(4Pyr)	
Ala(2Pyr)	
D-Leu	
MePhe(3-Cl)	
Hyp(Et)	
MeAla(4-Thz)	

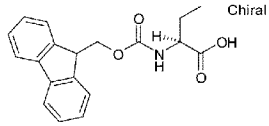
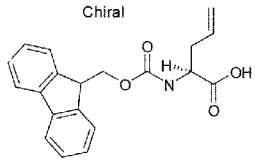
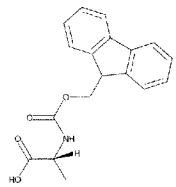
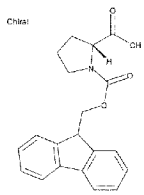
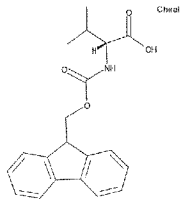
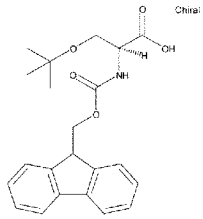
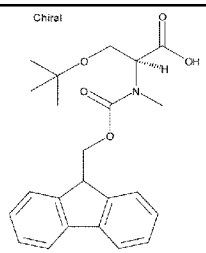
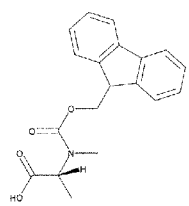
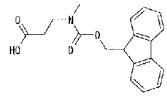
略号	構造
Fmoc-MeHis(Trt)-OH	
Fmoc-Phe(4-CF3)-OH	
Fmoc-Hph-OH	
Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH	
Fmoc-Phe3-OH	
Fmoc-Phe(4A)-pip	
Fmoc-Phe(4B)-pip	
Fmoc-Phe(3A)-pip	
Fmoc-Phe(3C)-pip	
Fmoc-Asp-pip	

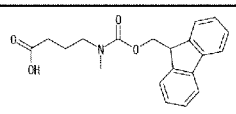
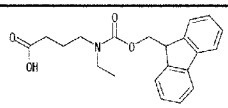
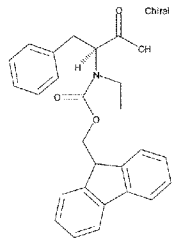
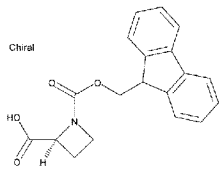
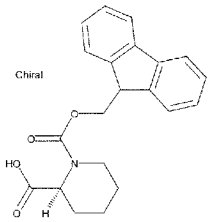
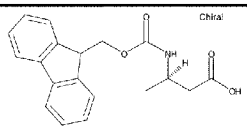
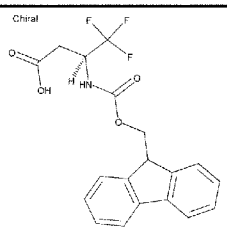
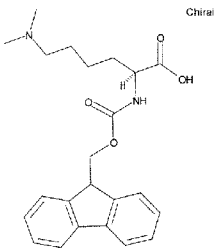
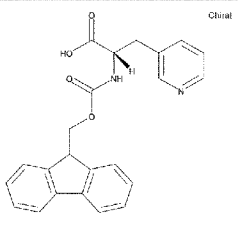
略号	構造
Fmoc-D-Leu-OH	
Fmoc-MePhe(3-Cl)-OH	
Fmoc-Met(O2)-OH	
Fmoc-nPrGly-OH	
Fmoc-bAla-OH	
Fmoc-Tyr(3-F)-OH	
Fmoc-Phg-OH	
Fmoc-Leu-OH	

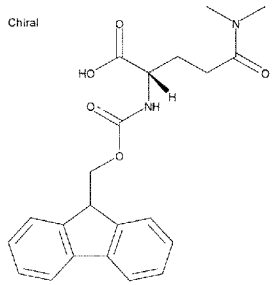
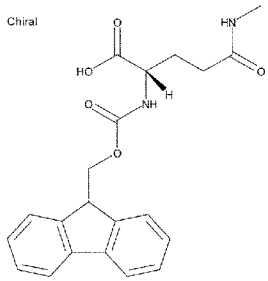
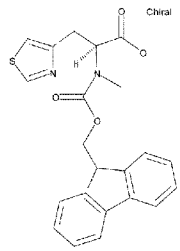
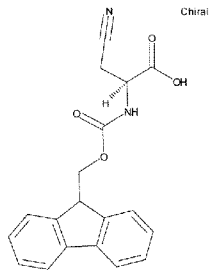
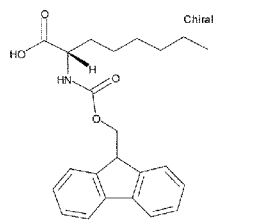
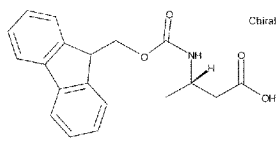
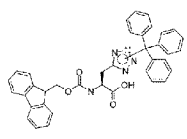
略号	構造
Fmoc-Glu(OAl)-OH	
Fmoc-Arg(Me2)-OH	
Fmoc-MeGly-OH	
Fmoc-Gln-OH	
Fmoc-Gly-OH	
Fmoc-MeAla-OH	
Fmoc-MeVal-OH	

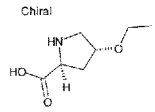
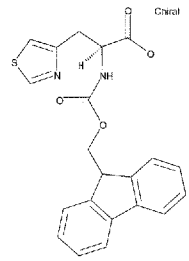
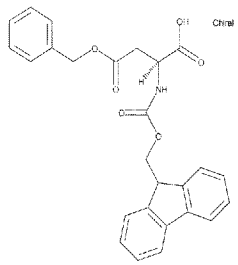
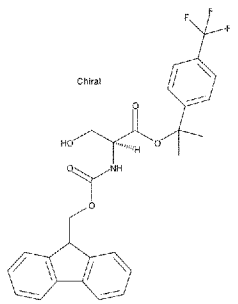
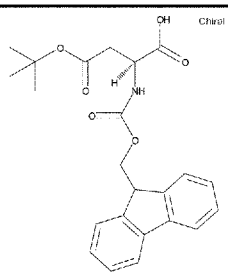
略号	構造
Fmoc-MeIle-OH	
Fmoc-MeSer(DMT)-OH	
Fmoc-MePhe-OH	
Fmoc-Val-OH	
Fmoc-Ile-OH	
Fmoc-Ser(Trt)-OH	
Fmoc-Phe-OH	

略号	構造
Fmoc-Thr(Trt)-OH	
Fmoc-His(MMT)-OH	
Fmoc-Pro-OH	
Fmoc-Trp-OH	
Fmoc-Ala-OH	
Fmoc-Lys(Boc)-OH	
Fmoc-MeLeu-OH	
Fmoc-Aib-OH	

略号	構造
Fmoc-Abu-OH	
Fmoc-Algly-OH	
Fmoc-D-Ala-OH	
Fmoc-D-Pro-OH	
Fmoc-D-Val-OH	
Fmoc-Ser(tBu)-OH	
Fmoc-MeSer(tBu)-OH	
Fmoc-D-MeAla-OH	
Fmoc-b-MeAla-OH	

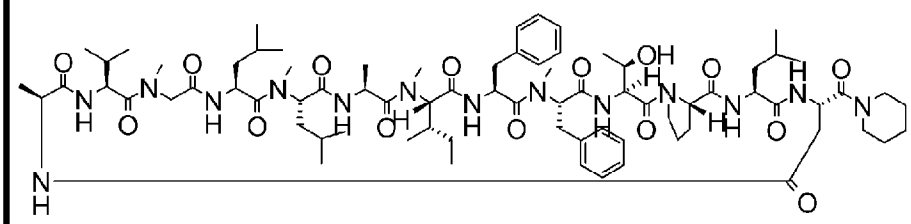
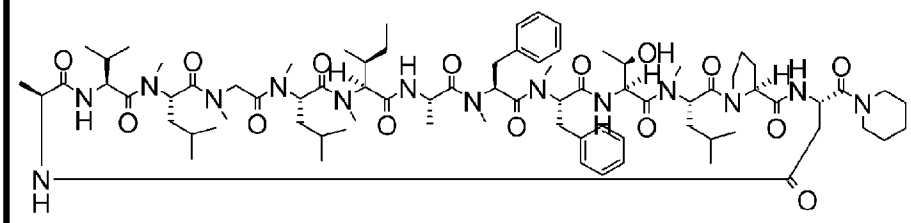
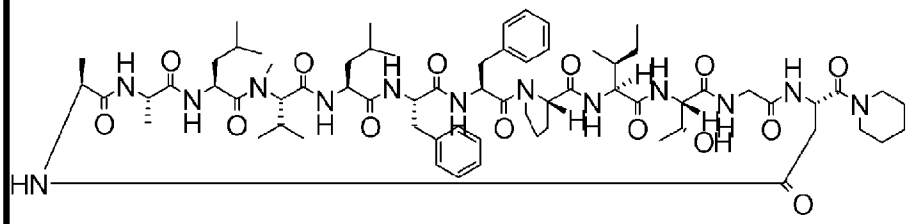
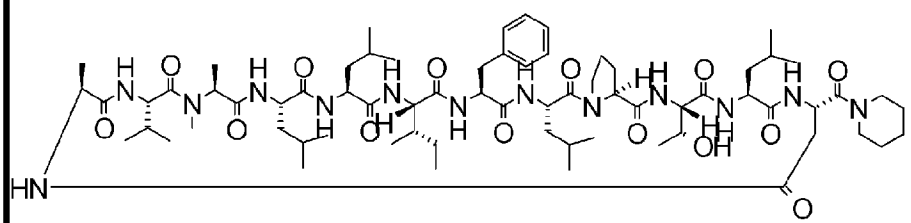
略号	構造
Fmoc-g-MeAbu-OH	
Fmoc-g-EtAbu-OH	
Fmoc-EtPhe-OH	
Fmoc-Aze(2)-OH	
Fmoc-Pic(2)-OH	
Fmoc-D-3-ABU-OH	
Fmoc-CF3-bAla-OH	
Fmoc-Lys(Me2)-OH	
Fmoc-Ala(3Pyr)-OH	

略号	構造
Fmoc-Gln(Me2)-OH	
Fmoc-Gln(Me)-OH	
Fmoc-MeAla(4-Thz)-OH	
Fmoc-Ala(CN)-OH	
Fmoc-AOC(2)-OH	
Fmoc-L-3-ABU-OH	
Fmoc-Ala(5-Tet(Trt))-OH	

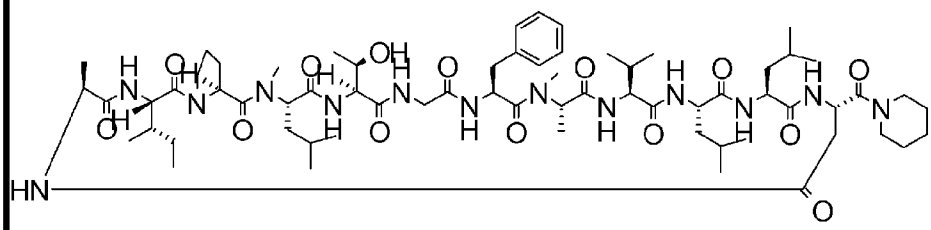
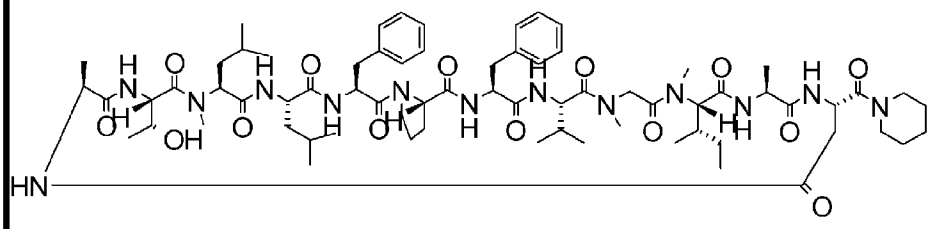
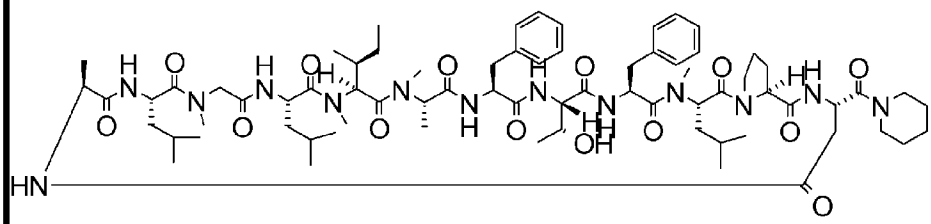
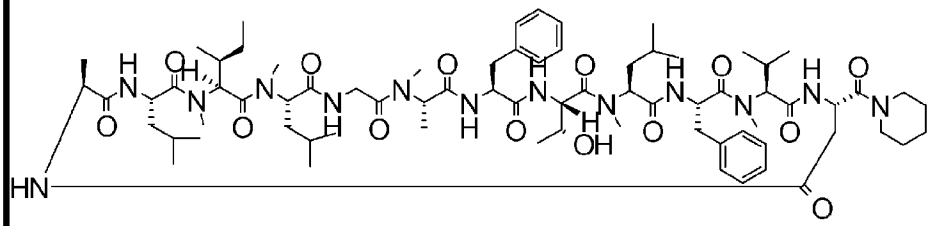
略号	構造
Fmoc-Hyp(Et)-OH	
Fmoc-Ala(4-Thz)-OH	
Fmoc-Asp(OBn)-OH	
Fmoc-Ser-OCF3Pis	
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	

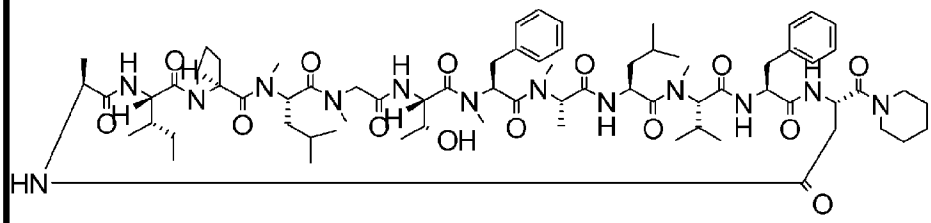
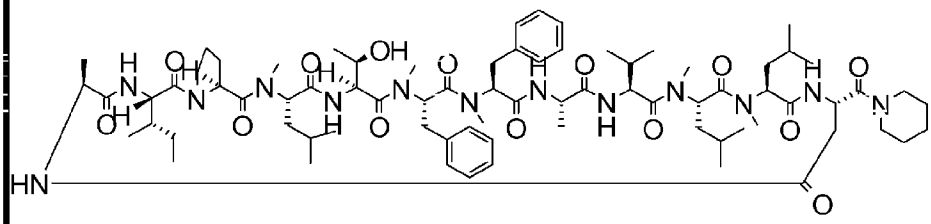
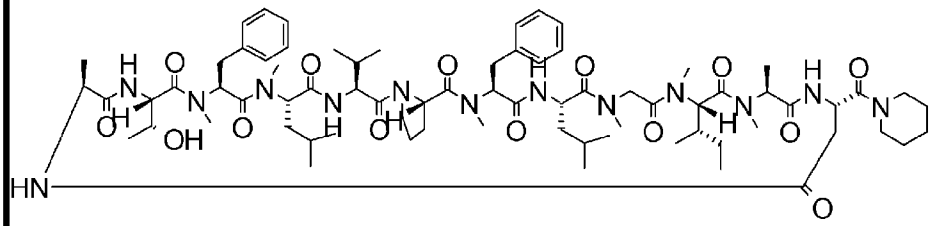
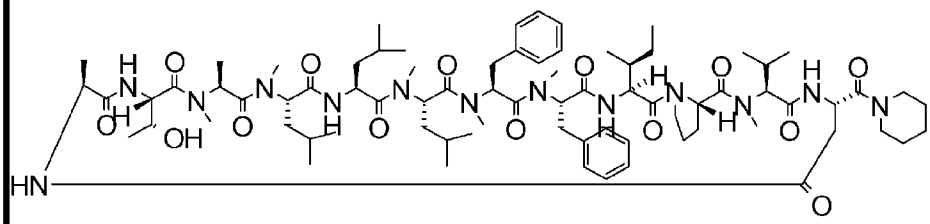
[0719

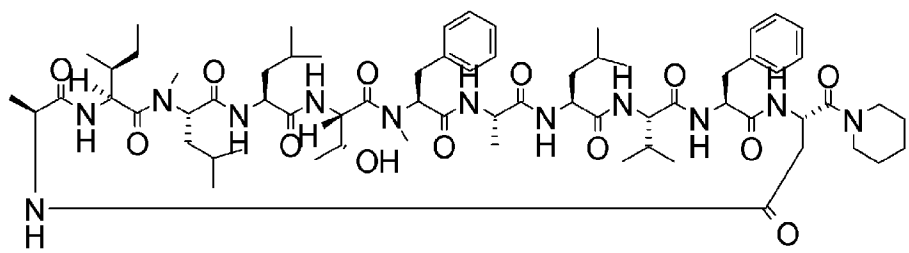
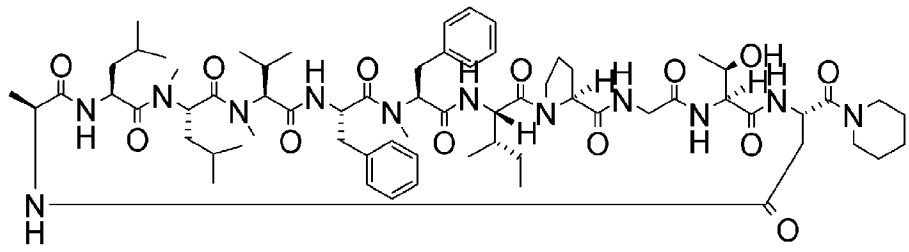
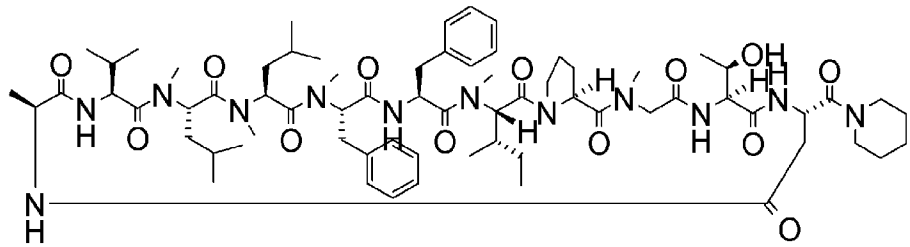
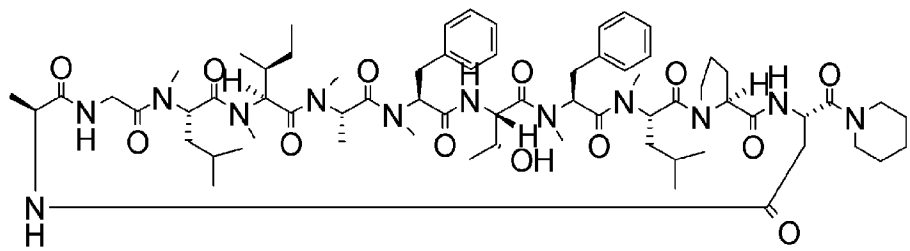
[表11-3-1]

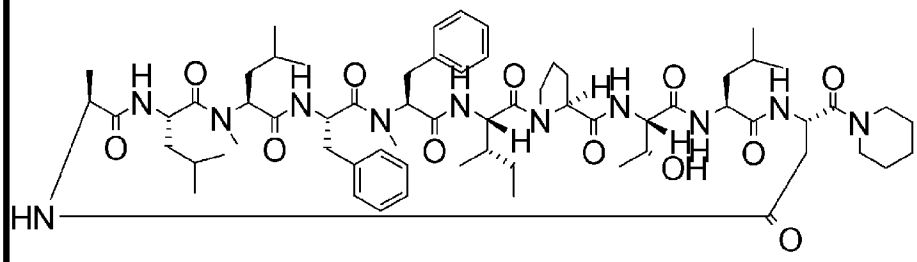
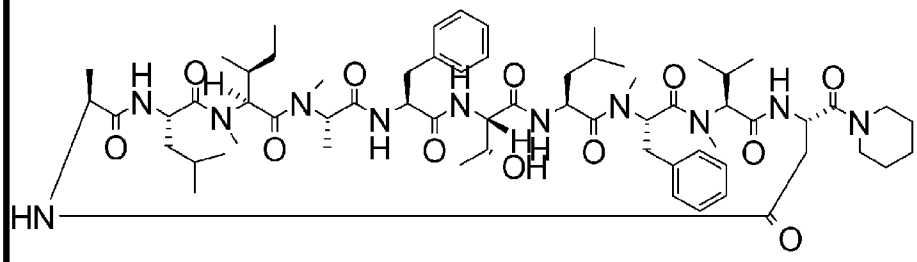
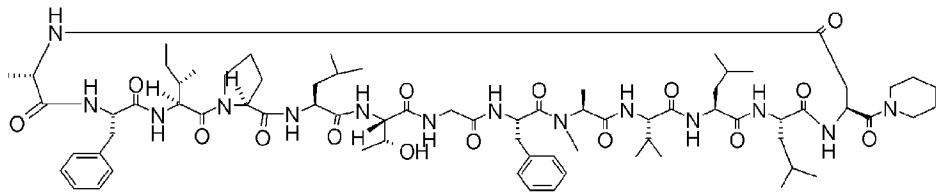
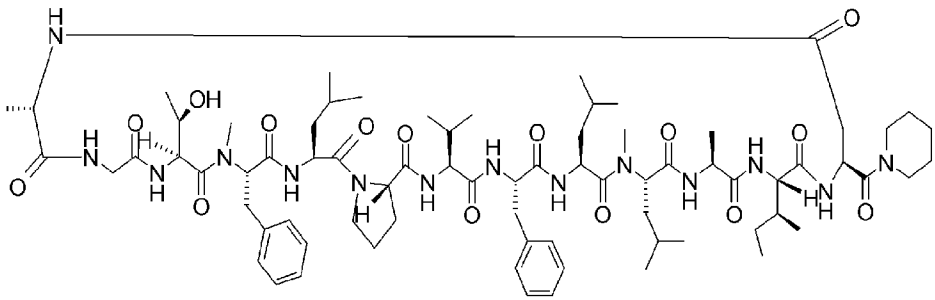
DP-1	 Chiral
DP-2	 Chiral
DP-3	 Chiral
DP-4	 Chiral

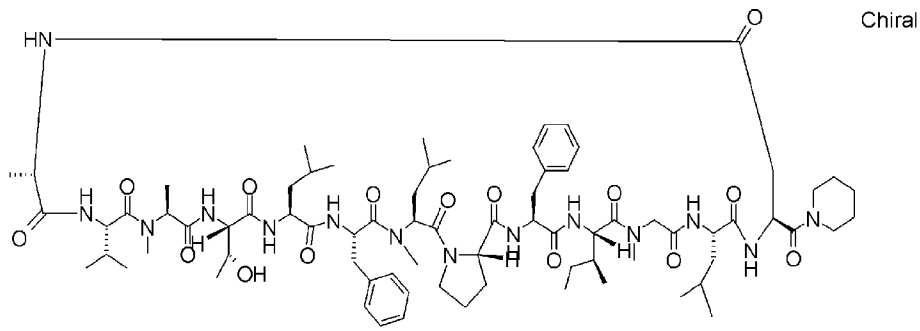
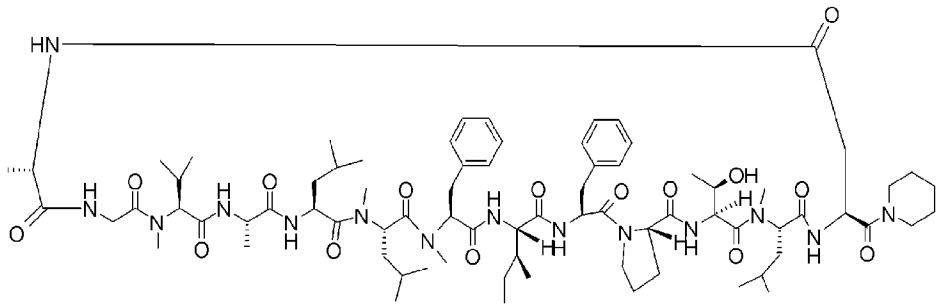
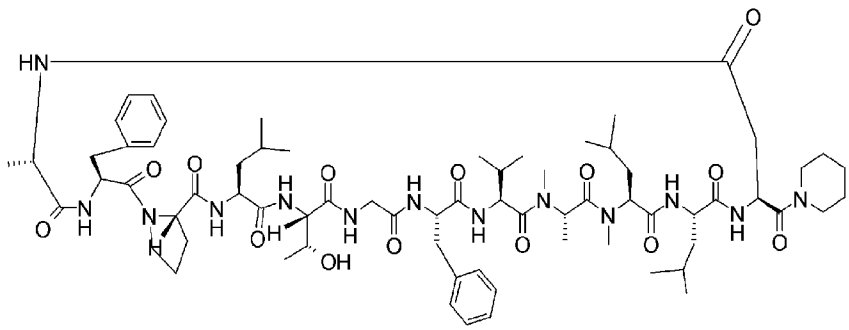
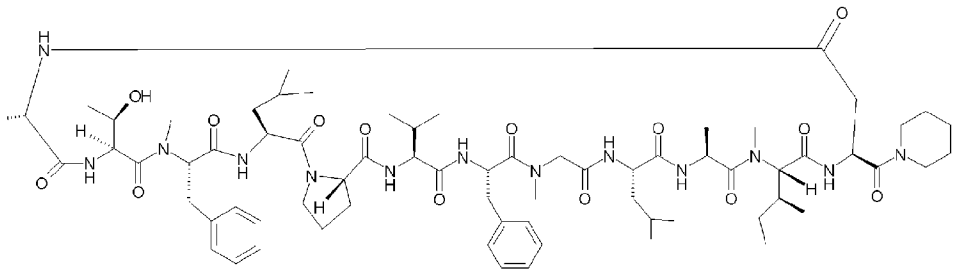
11-3-1]

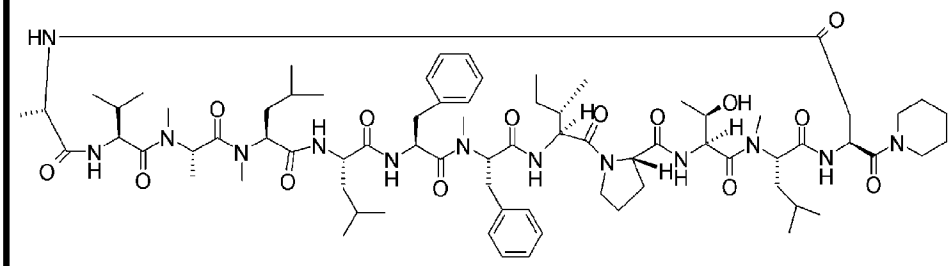
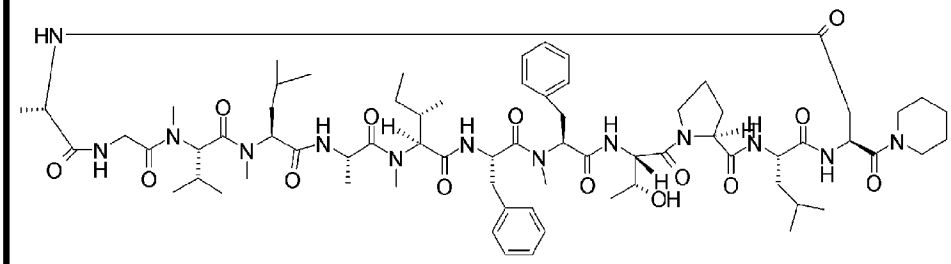
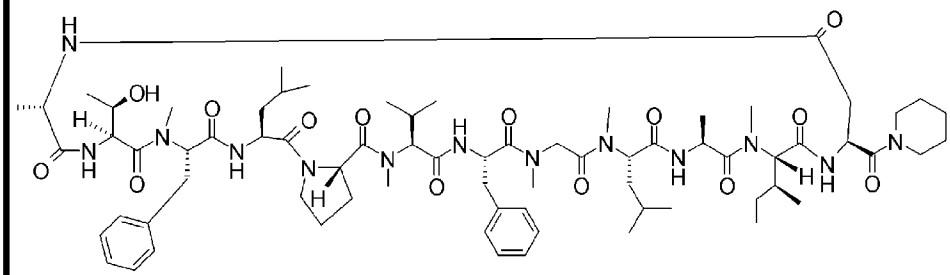
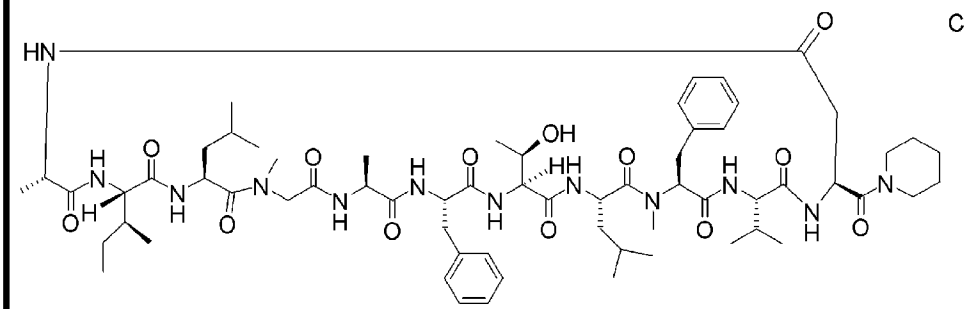
DP-5	 Chiral
DP-6	 Chiral
DP-7	 Chiral
DP-8	 Chiral

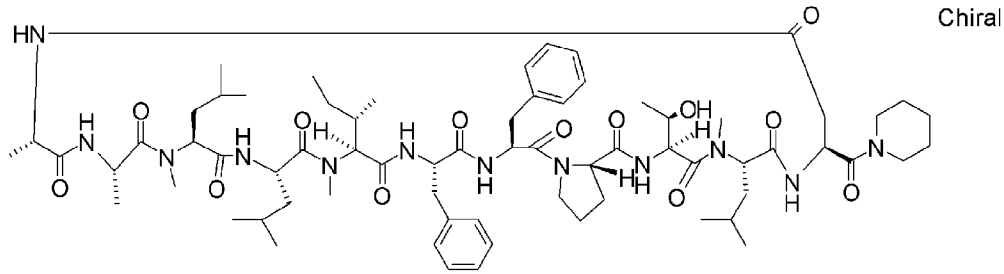
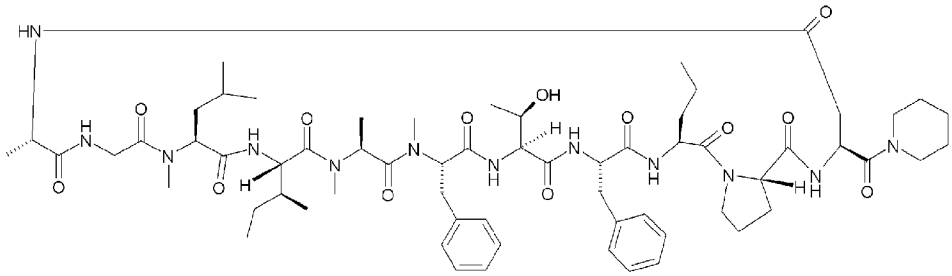
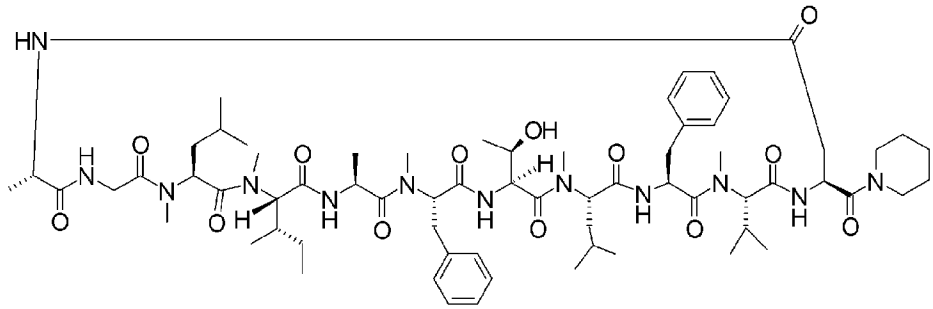
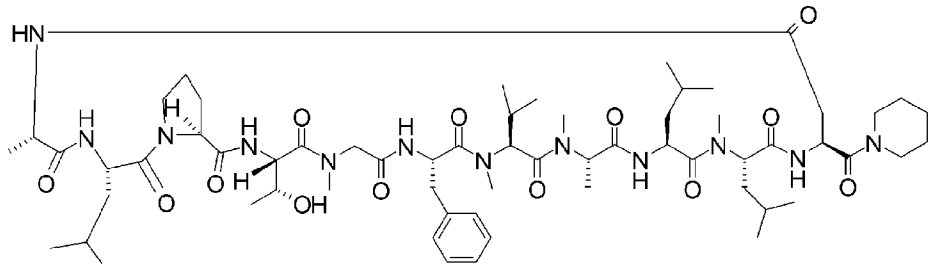
DP-9	 Chiral
DP-10	 Chiral
DP-11	 Chiral
DP-12	 Chiral

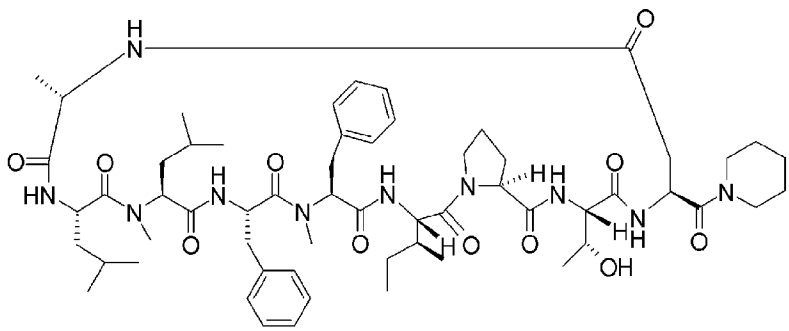
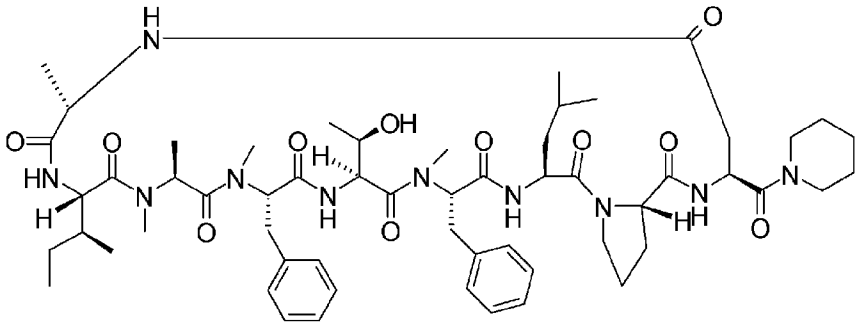
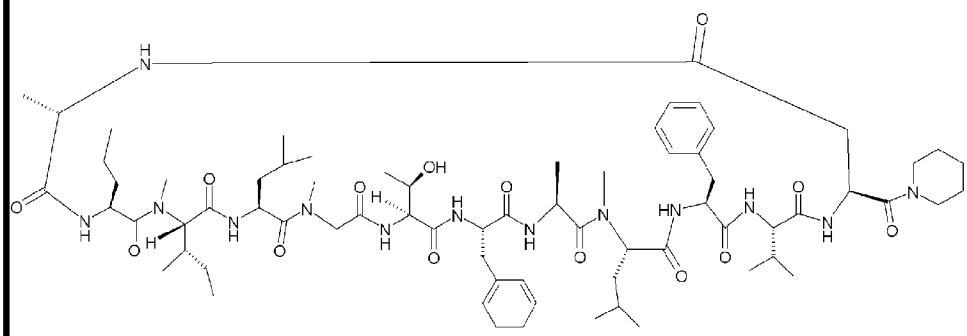
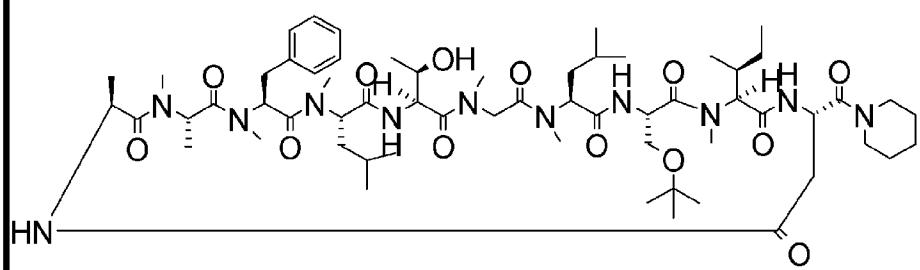
DP-13	 Chiral
DP-14	 Chiral
DP-15	 Chiral
DP-16	 Chiral

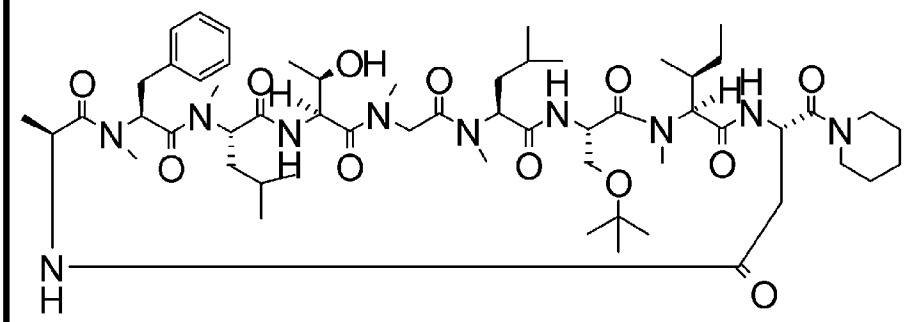
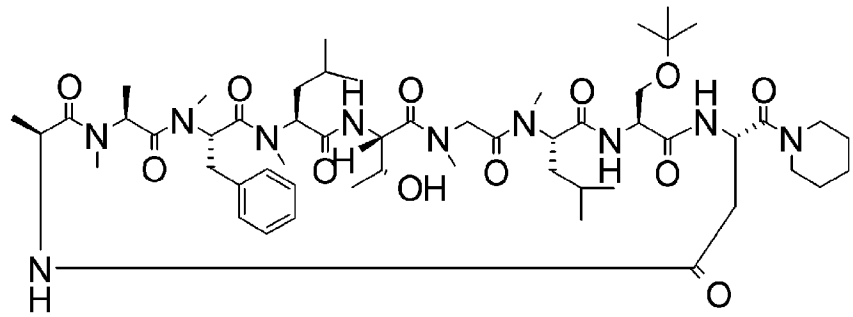
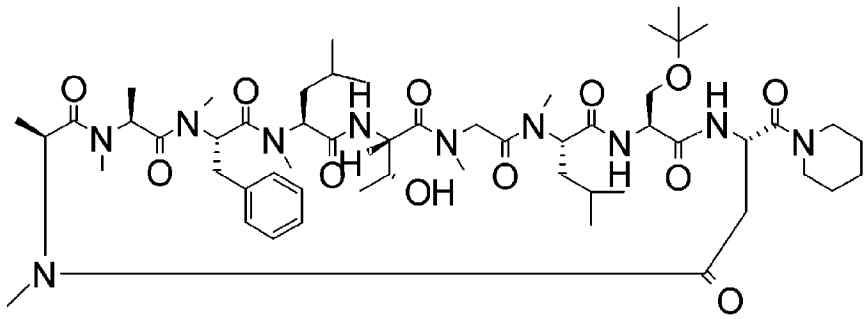
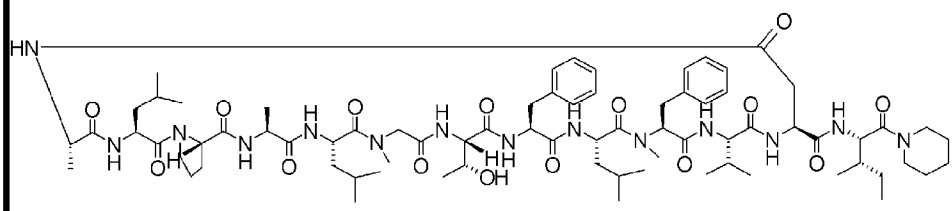
DP-17	 Chiral
DP-18	 Chiral
DP-19	 Chiral
DP-20	 Chiral

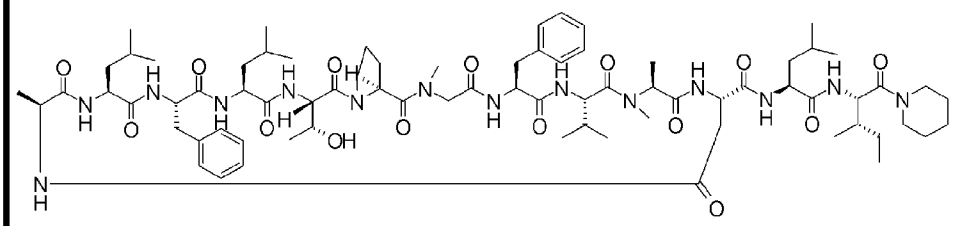
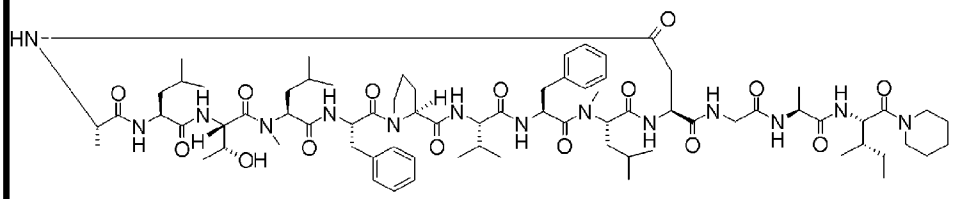
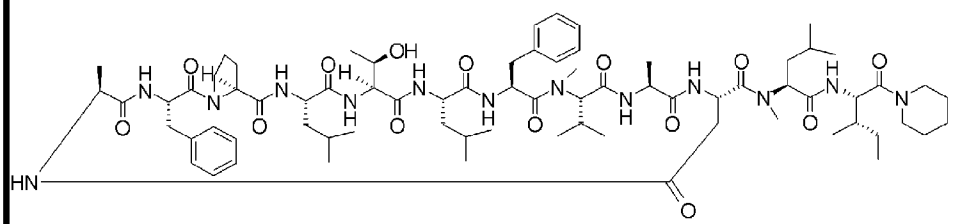
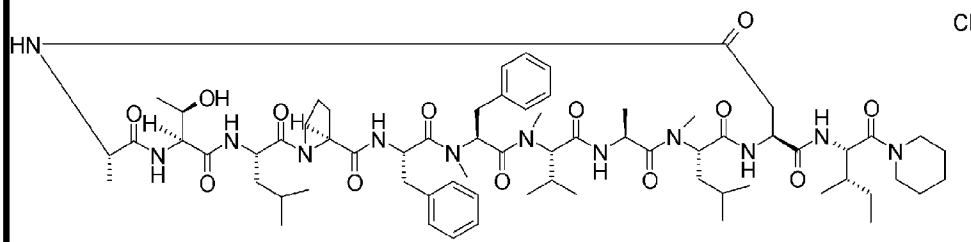
DP-21	 Chiral
DP-22	 Chiral
DP-23	 Chiral
DP-24	 Chiral

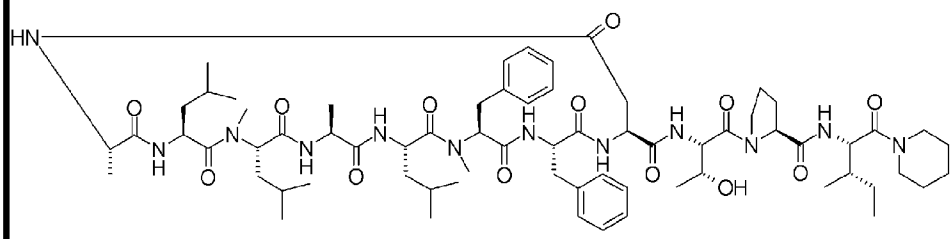
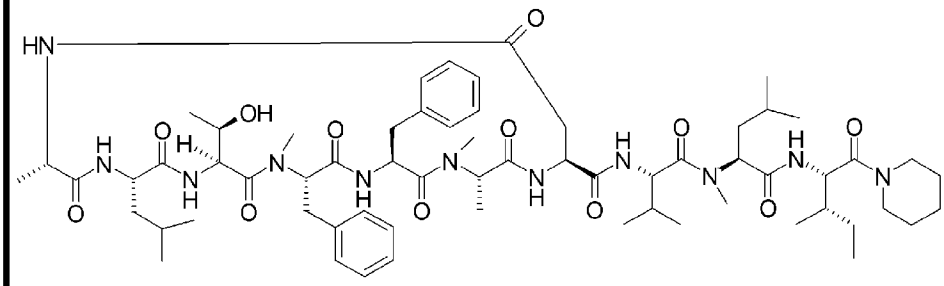
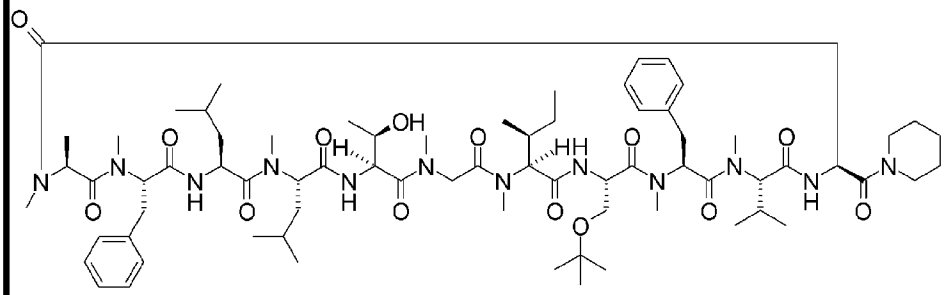
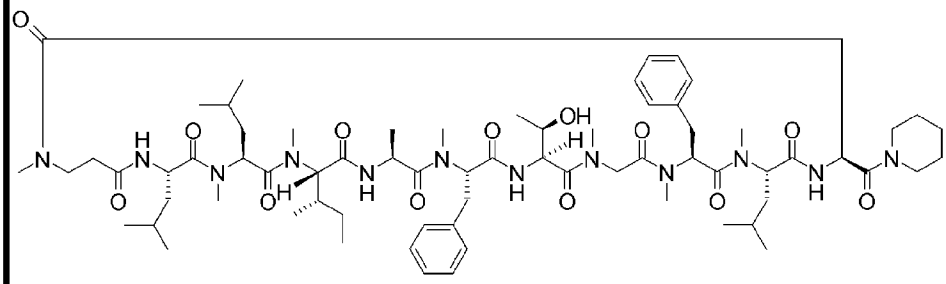
DP-25		Chiral
DP-26		Chiral
DP-27		Chiral
DP-28		Chiral

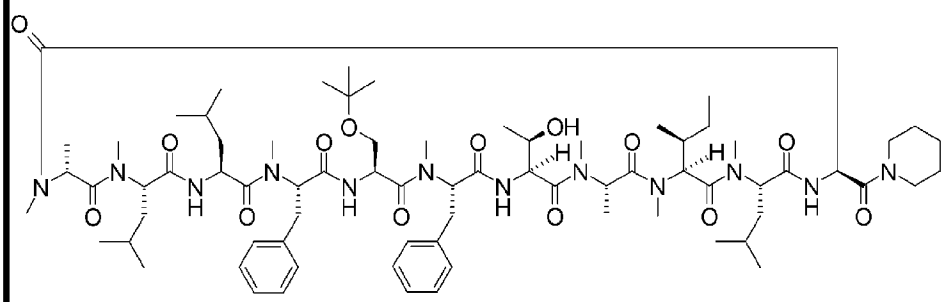
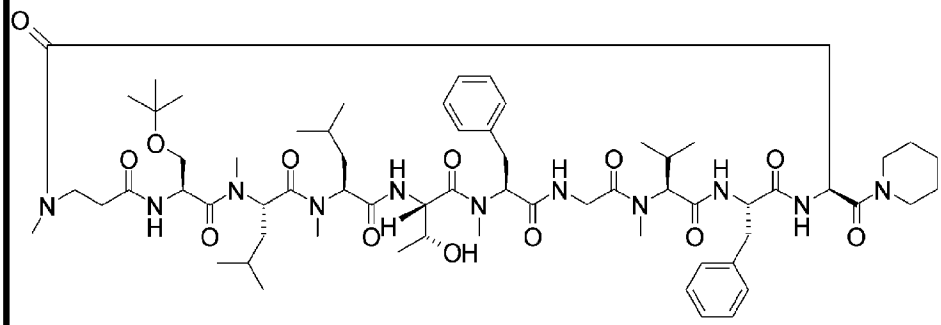
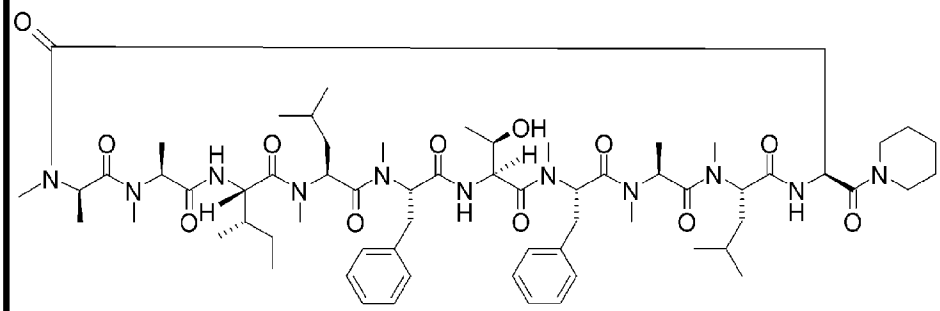
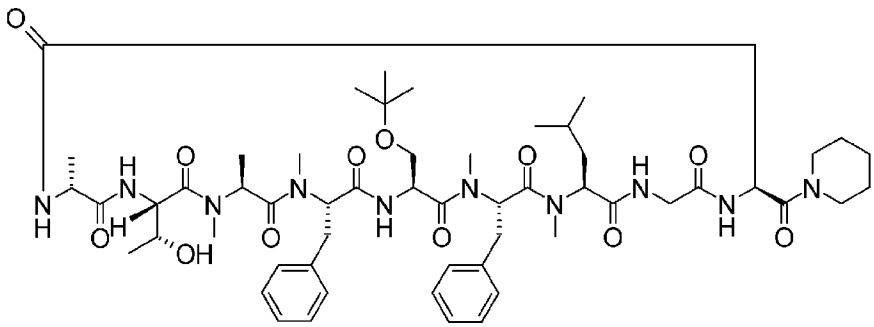
DP-29	 Chiral
DP-30	 Chiral
DP-31	 Chiral
DP-32	 Chiral

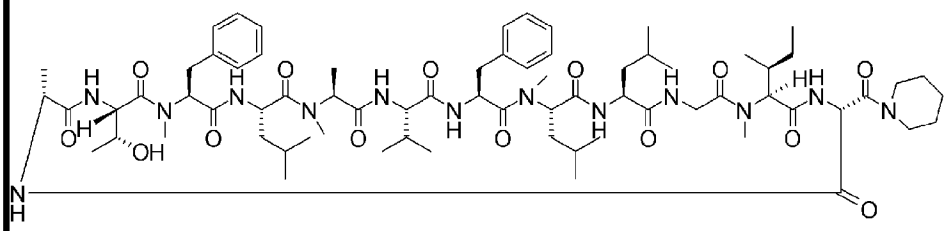
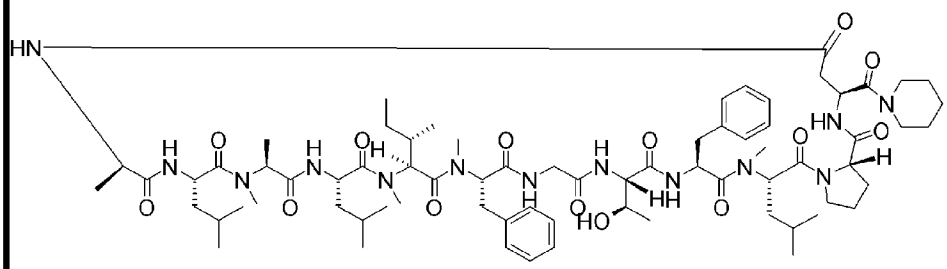
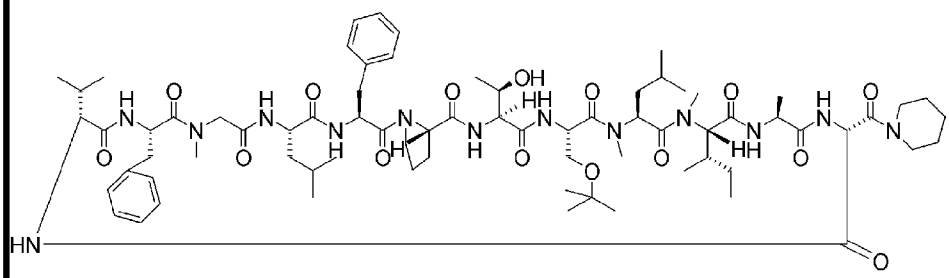
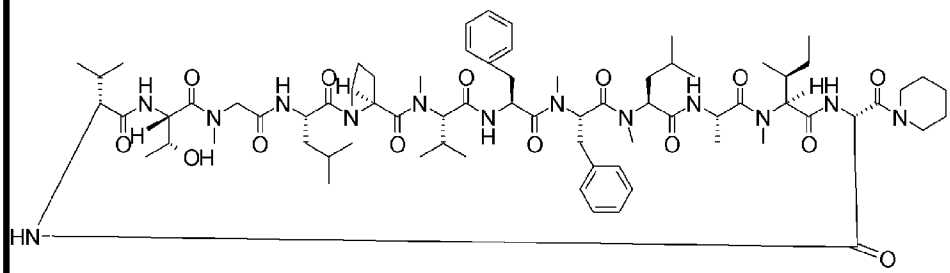
DP-33	 Chiral
DP-34	 Chiral
DP-35	 Chiral
DP-36	 Chiral

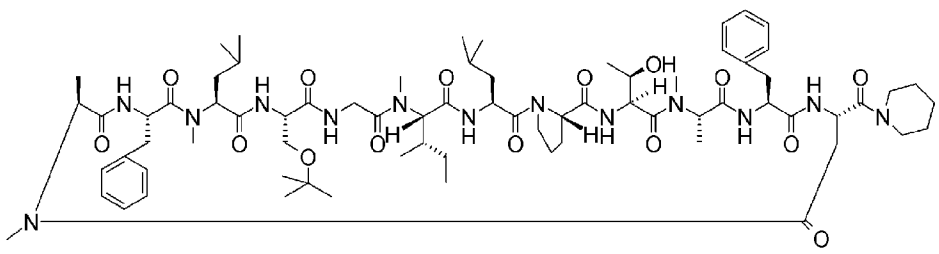
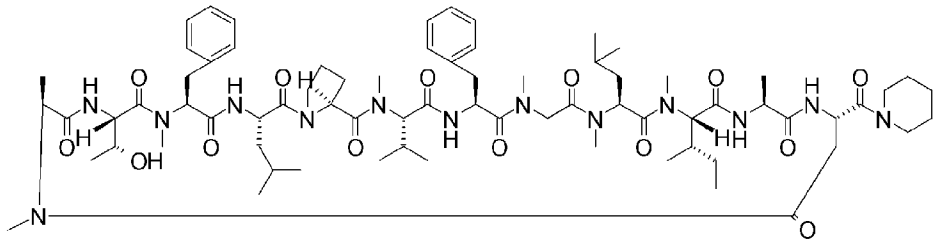
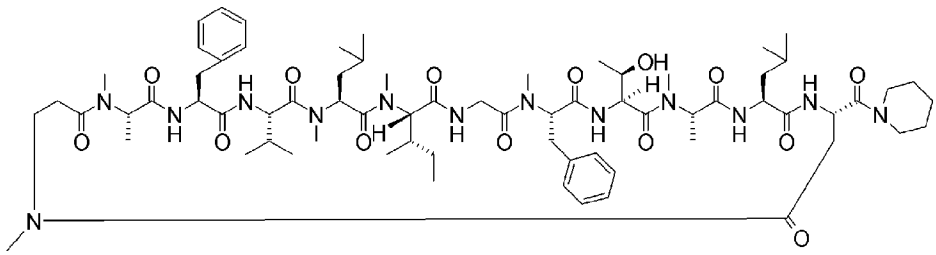
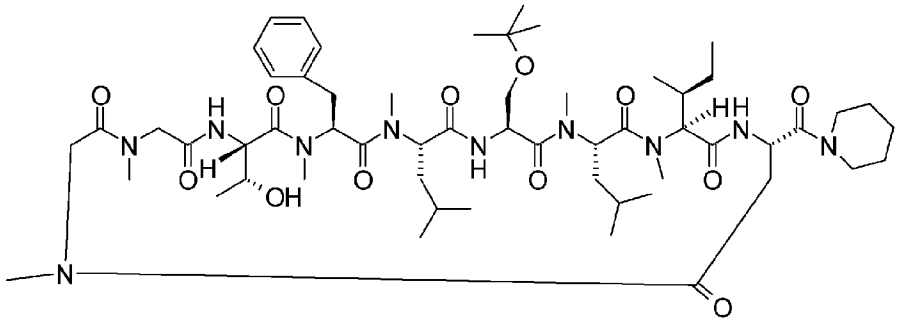
DP-37	 Chiral
DP-38	 Chiral
DP-39	 Chiral
DP-40	 Chiral

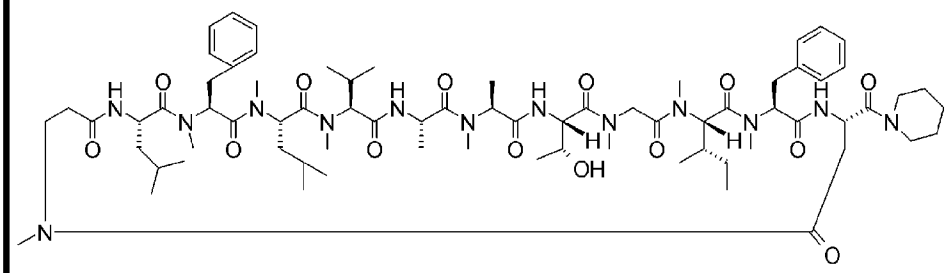
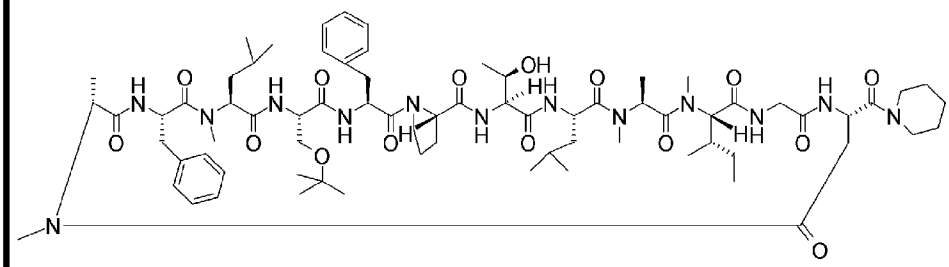
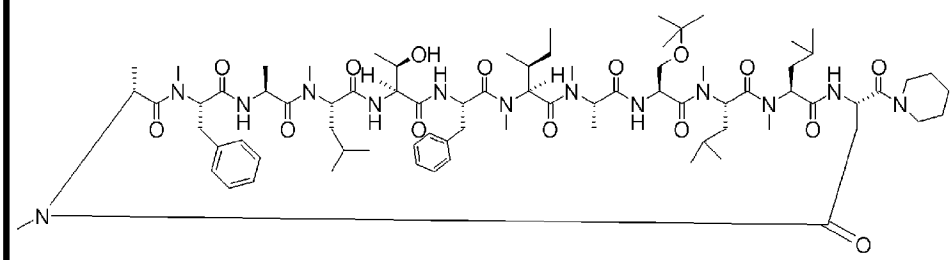
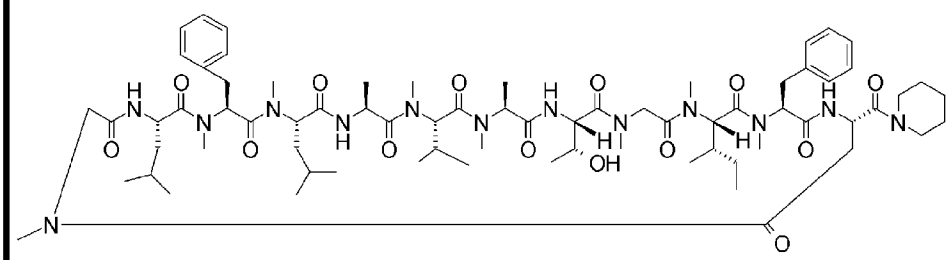
DP-41	 Chiral
DP-42	 Chiral
DP-43	 Chiral
DP-44	 Chiral

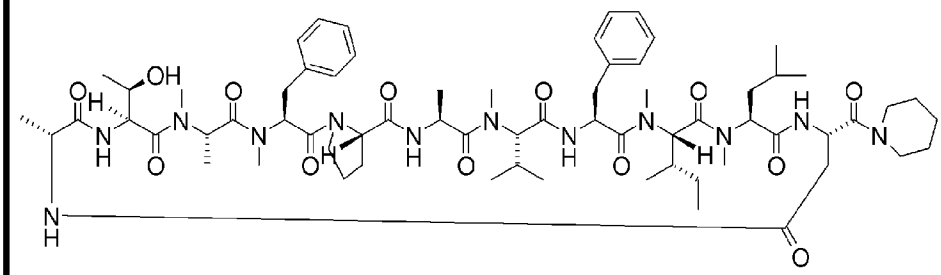
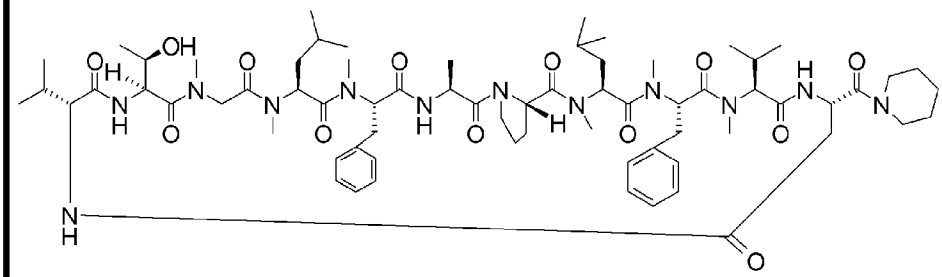
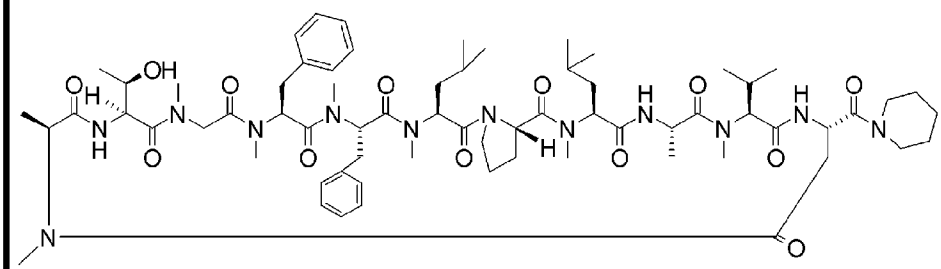
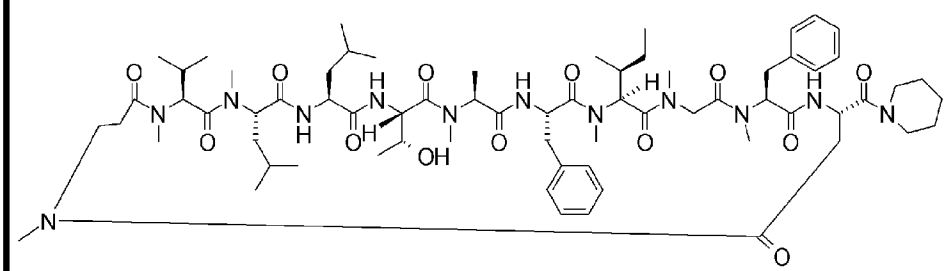
DP-45		Chiral
DP-46		Chiral
DP-47		Chiral
DP-48		Chiral

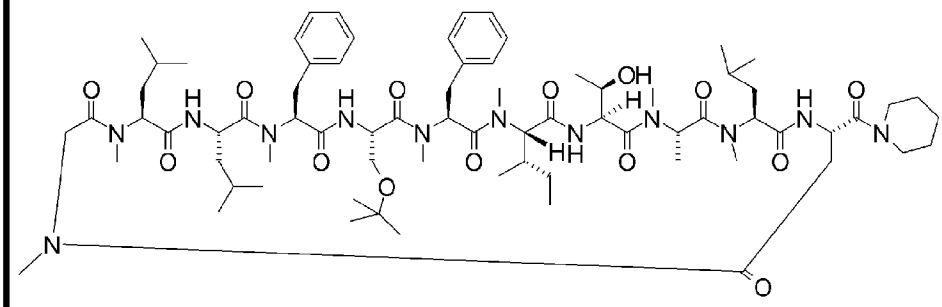
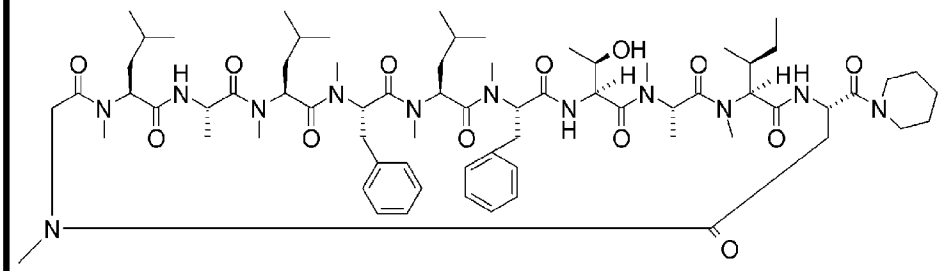
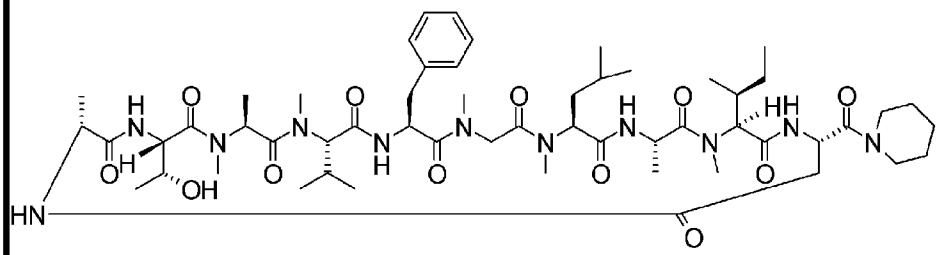
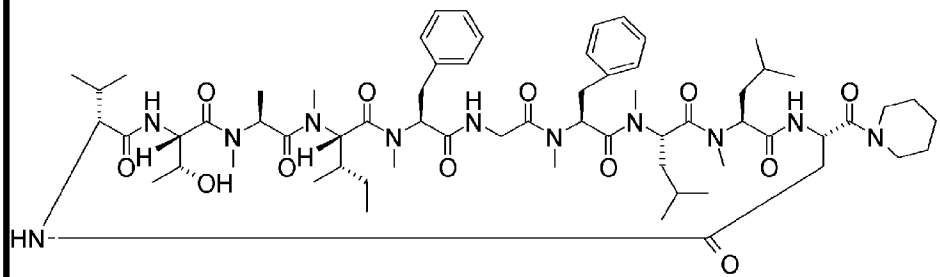
DP-49	 Chiral
DP-50	 Chiral
DP-51	 Chiral
DP-52	 Chiral

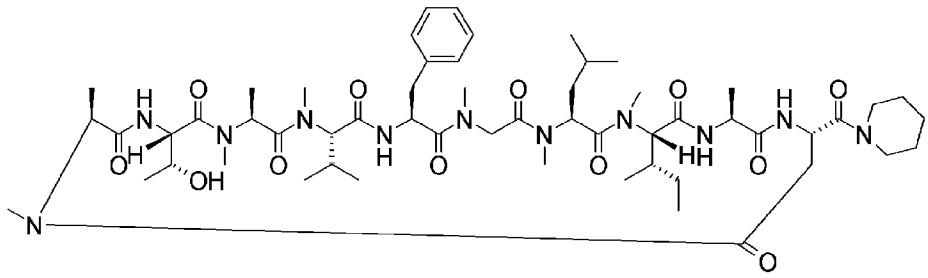
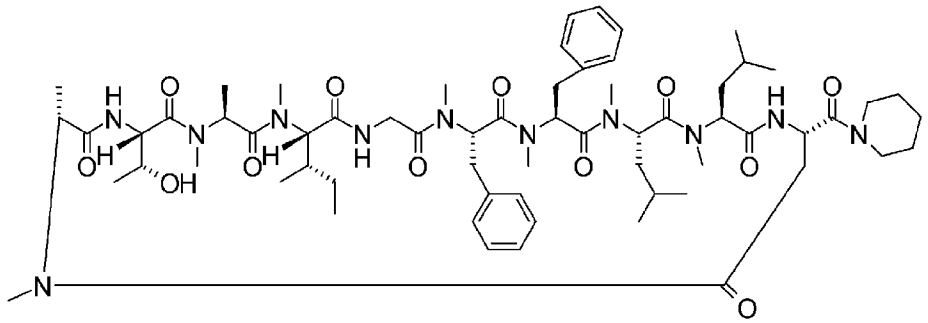
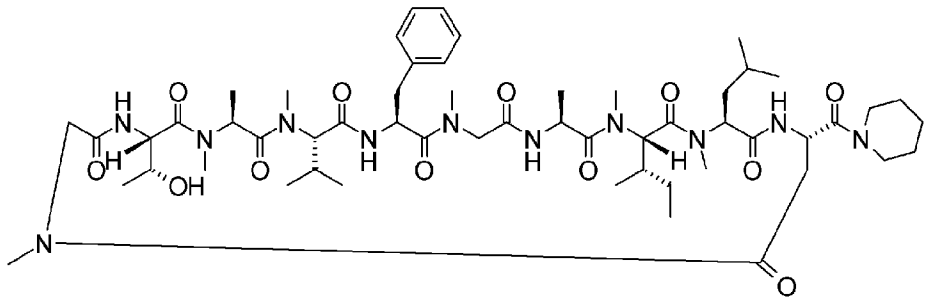
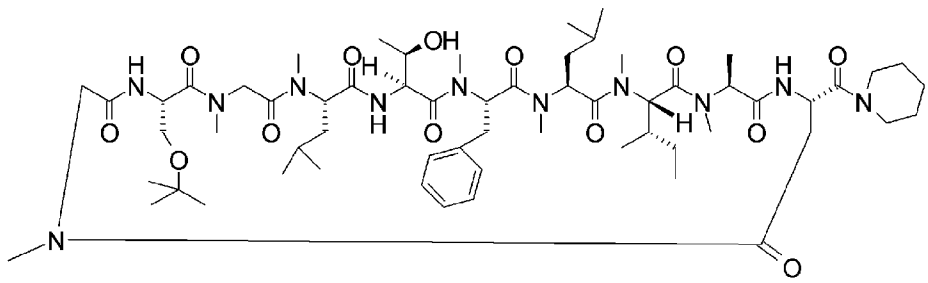
DP-53	 Chiral
DP-54	 Chiral
DP-55	 Chiral
DP-56	 Chiral

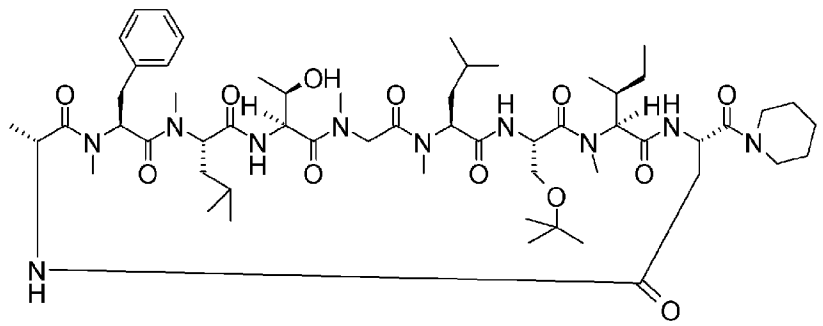
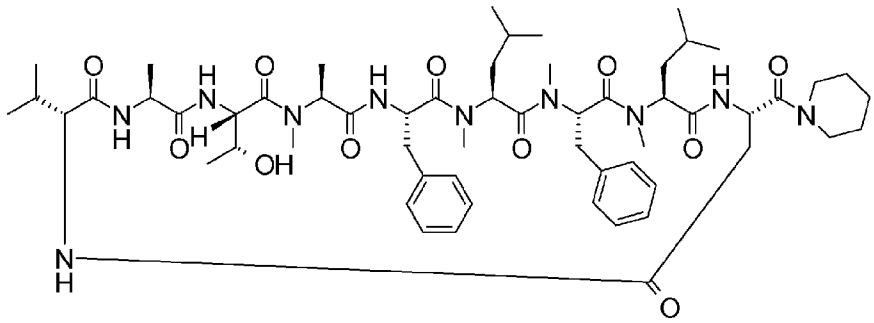
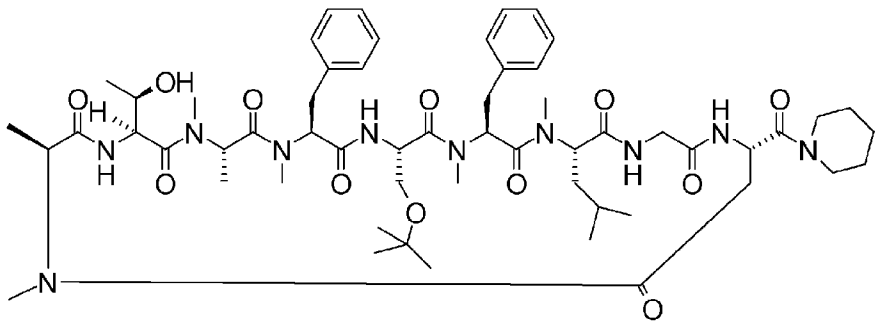
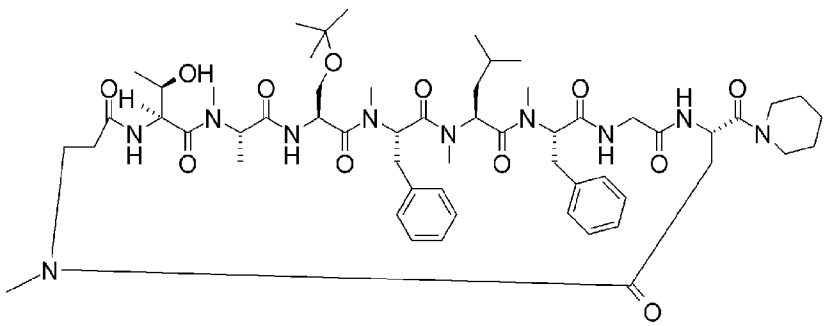
DP-57	 Chiral
DP-58	 Chiral
DP-59	 Chiral
DP-60	 Chiral

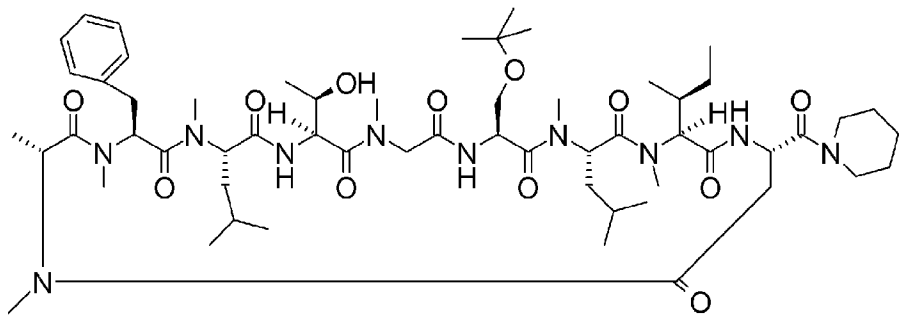
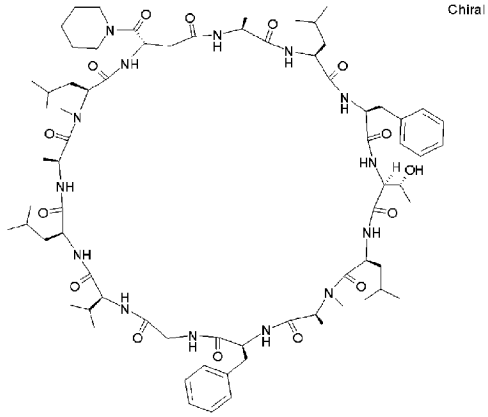
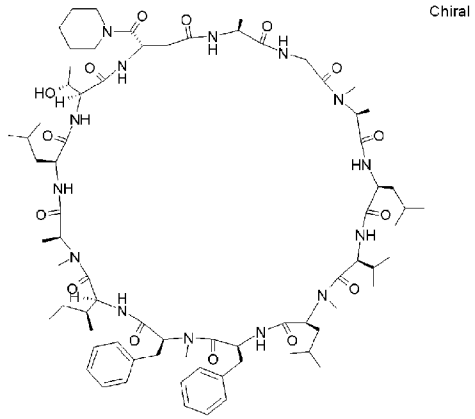
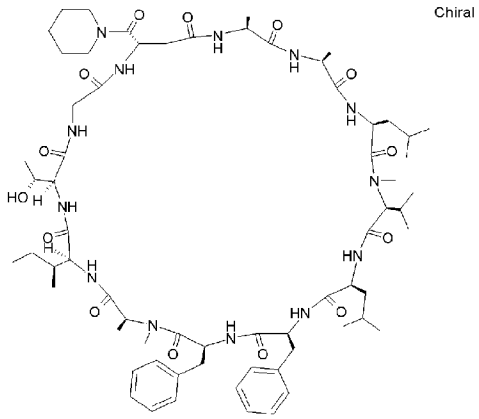
DP-61	 Chiral
DP-62	 Chiral
DP-63	 Chiral
DP-64	 Chiral

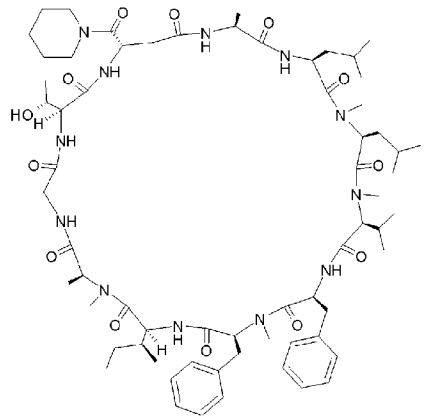
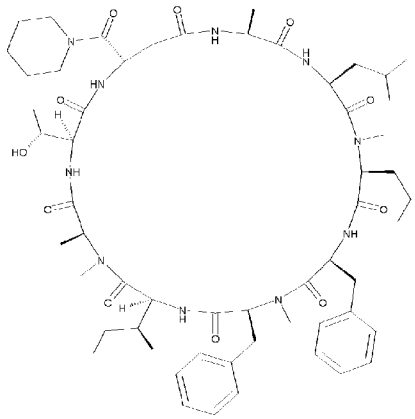
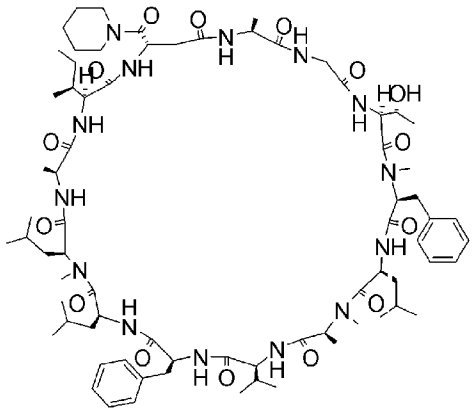
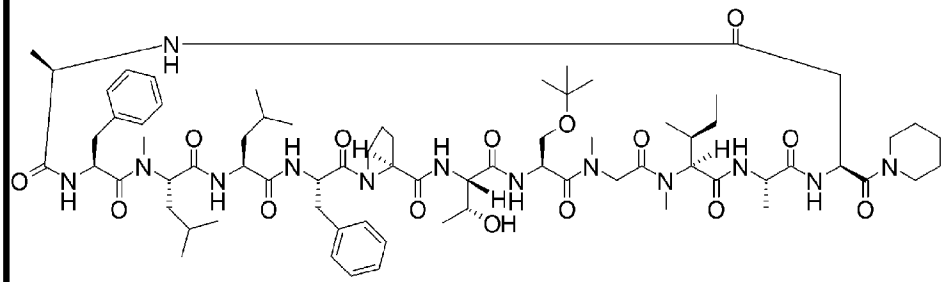
DP-65		Chiral
DP-66		Chiral
DP-67		Chiral
DP-68		Chiral

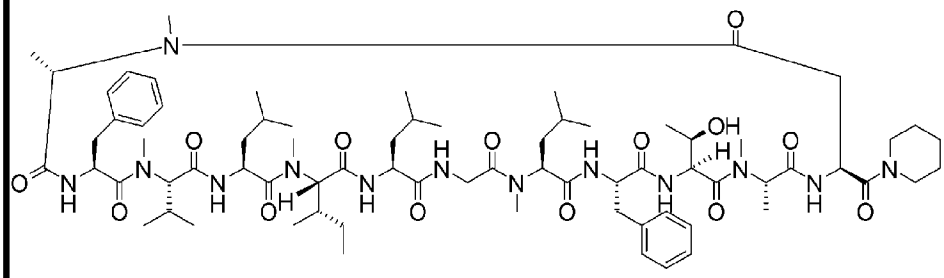
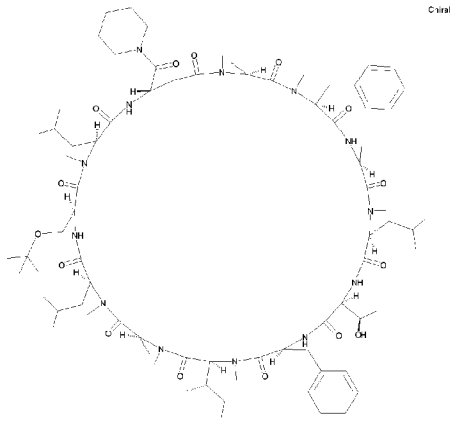
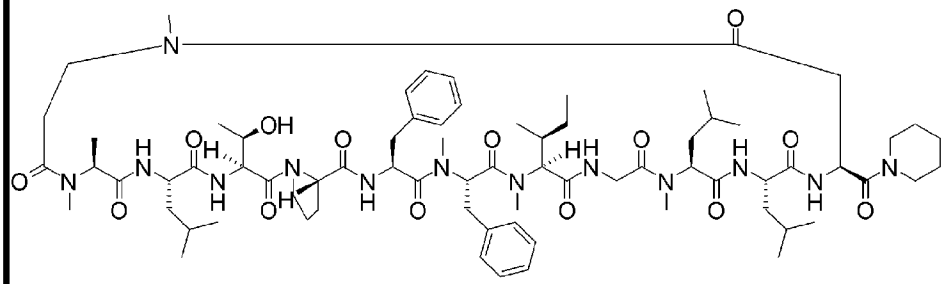
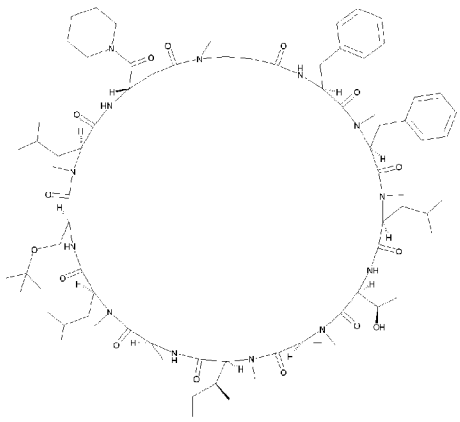
DP-69	 Chiral
DP-70	 Chiral
DP-71	 Chiral
DP-72	 Chiral

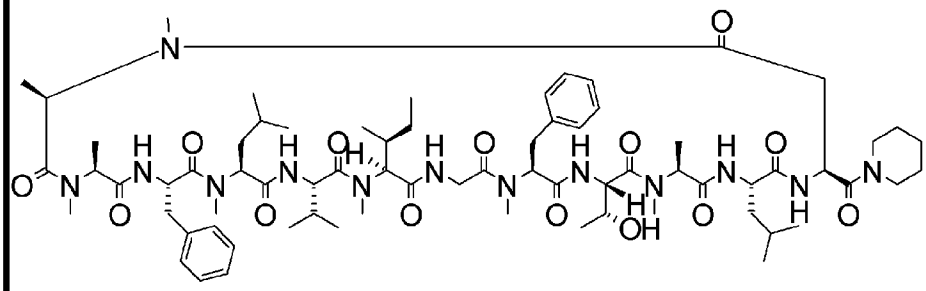
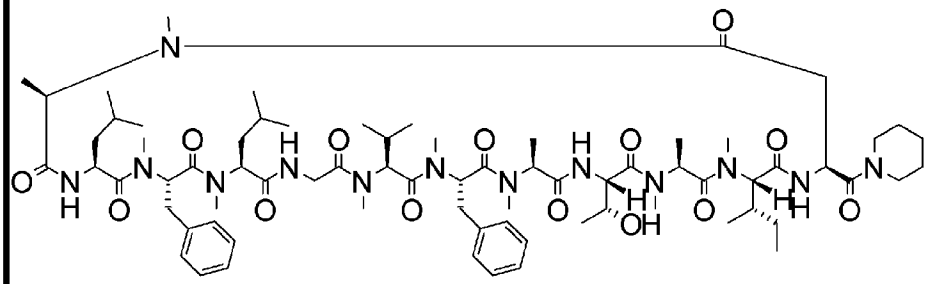
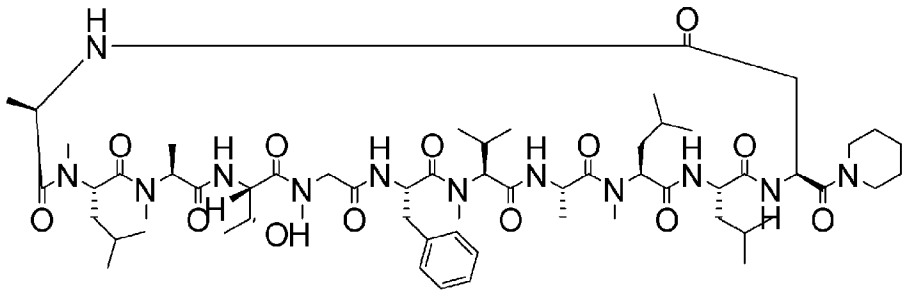
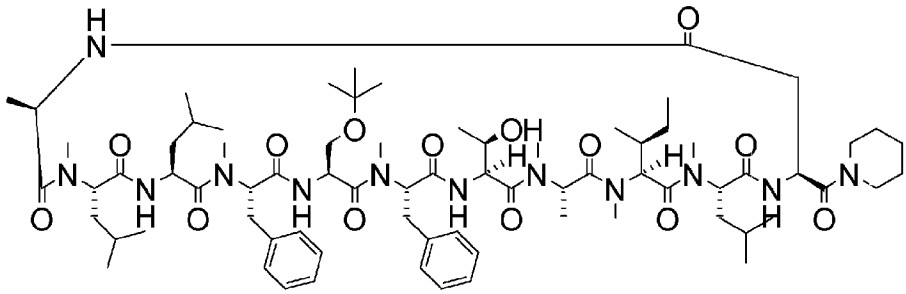
DP-73	 Chiral
DP-74	 Chiral
DP-75	 Chiral
DP-76	 Chiral

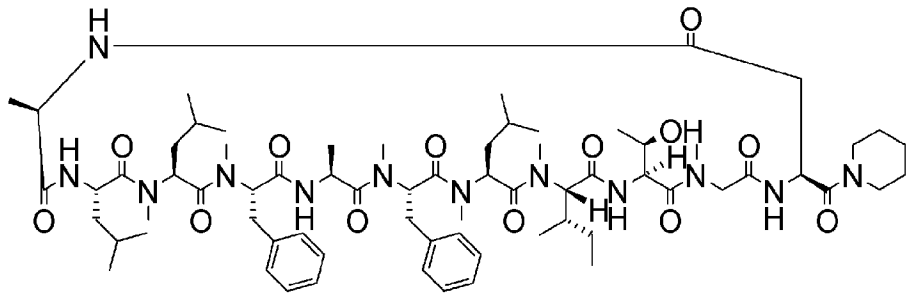
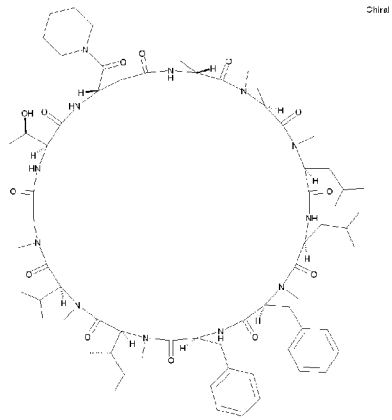
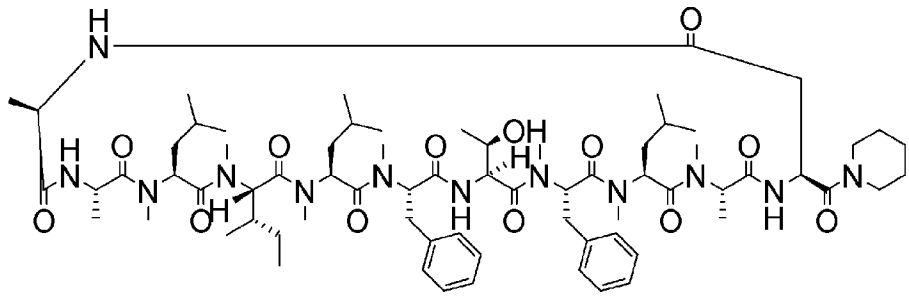
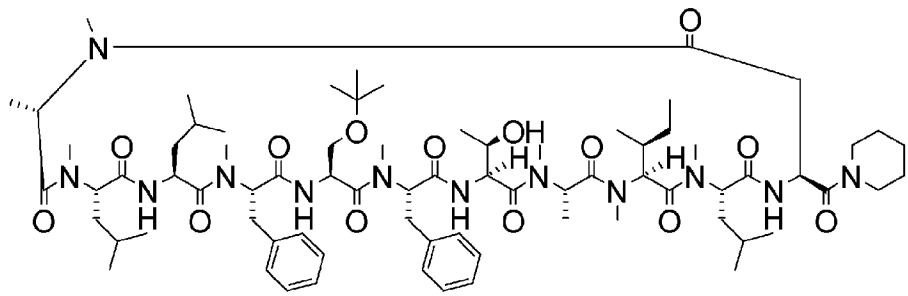
DP-77	 Chiral
DP-78	 Chiral
DP-79	 Chiral
DP-80	 Chiral

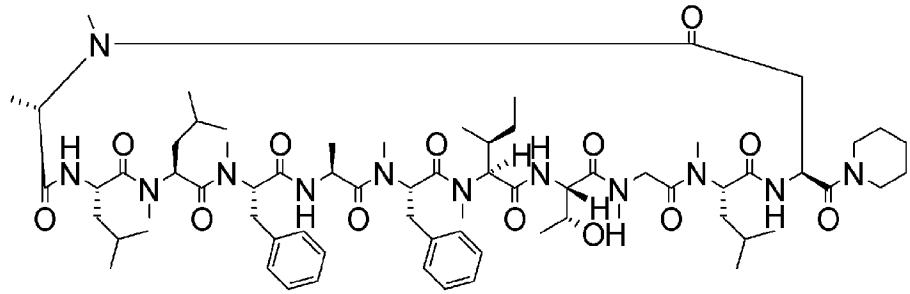
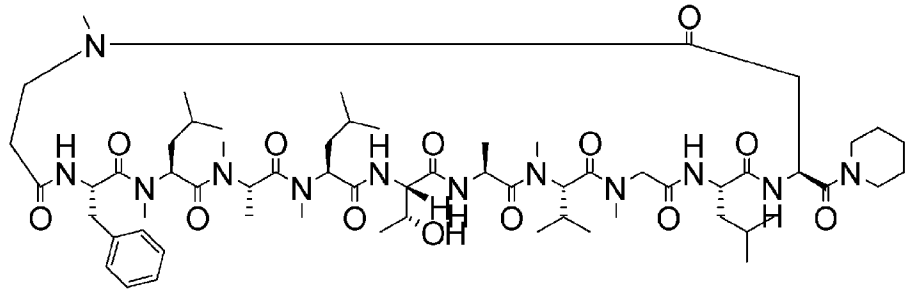
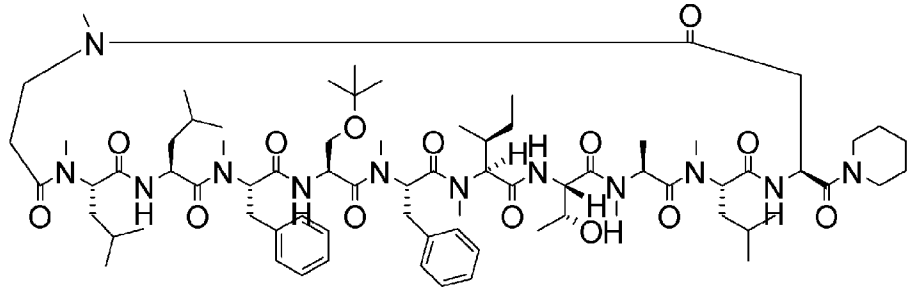
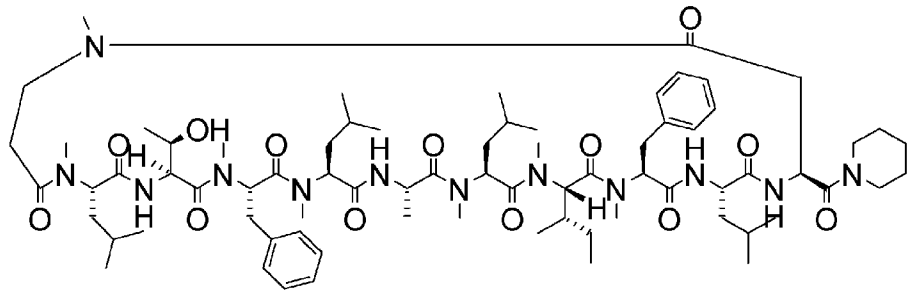
DP-81	 Chiral
DP-82	 Chiral
DP-83	 Chiral
DP-84	 Chiral

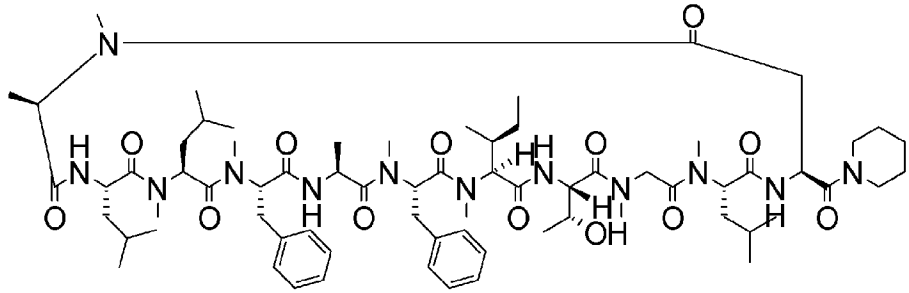
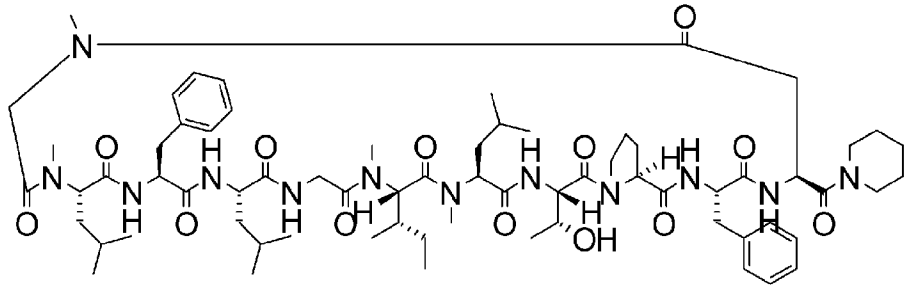
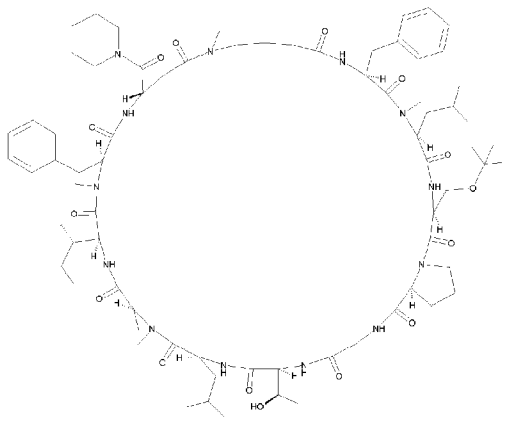
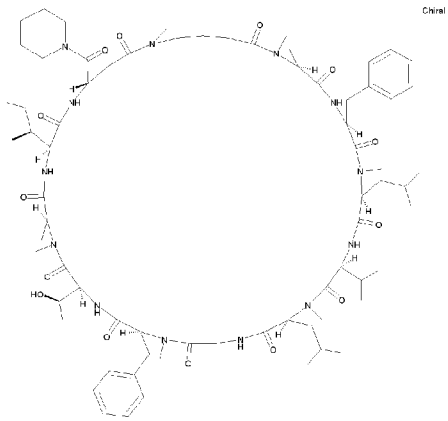
DP-85	 Chiral
DP-86	 Chiral
DP-87	 Chiral
DP-88	 Chiral

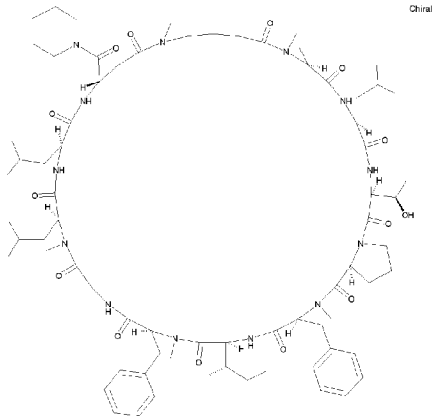
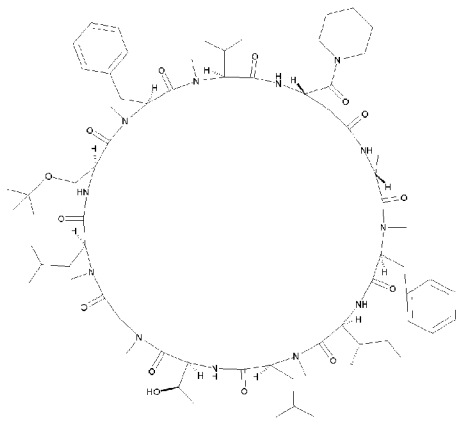
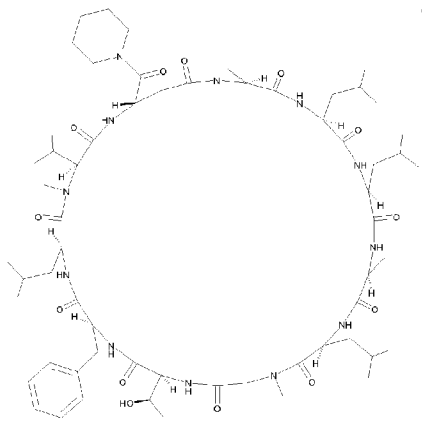
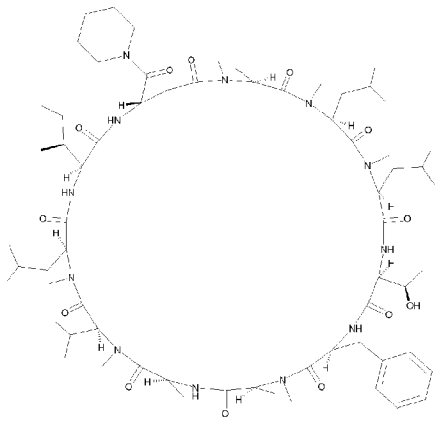
DP-89	 Chiral
DP-90	
DP-91	 Chiral
DP-92	

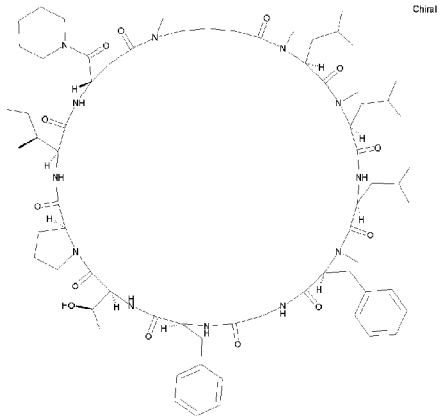
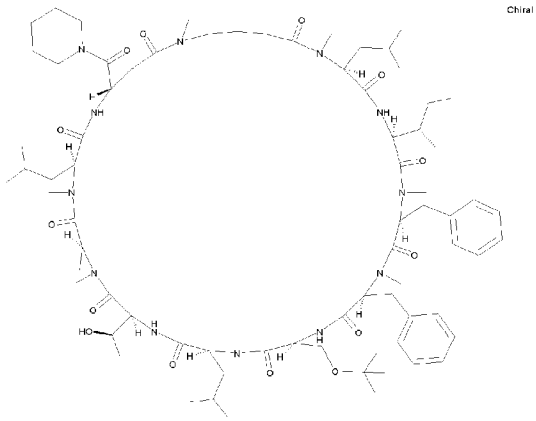
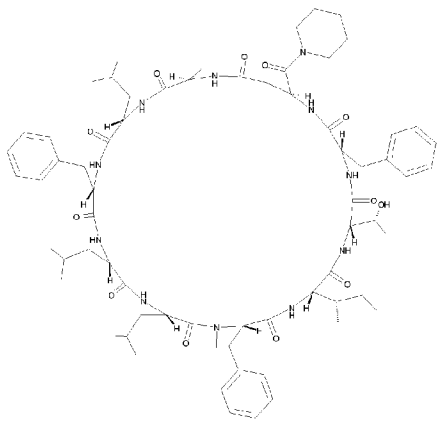
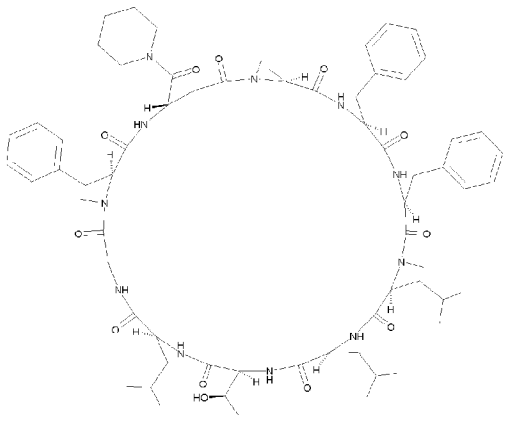
DP-93	 Chiral
DP-94	 Chiral
DP-95	 Chiral
DP-96	 Chiral

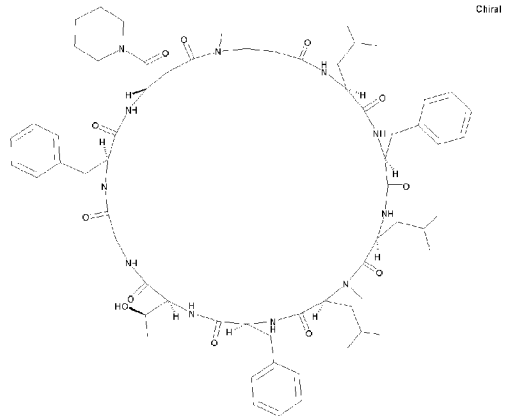
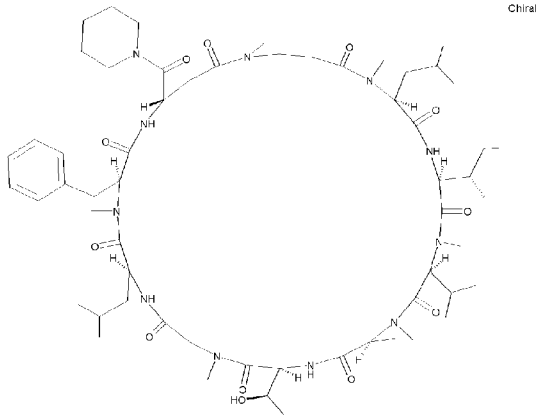
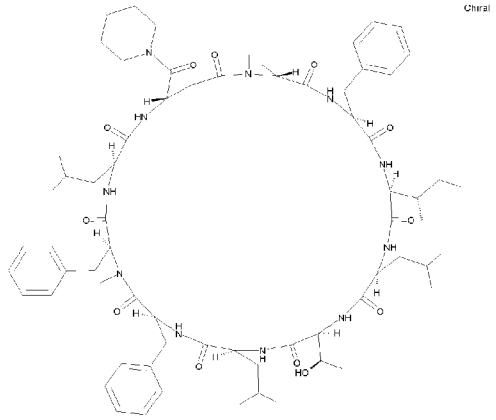
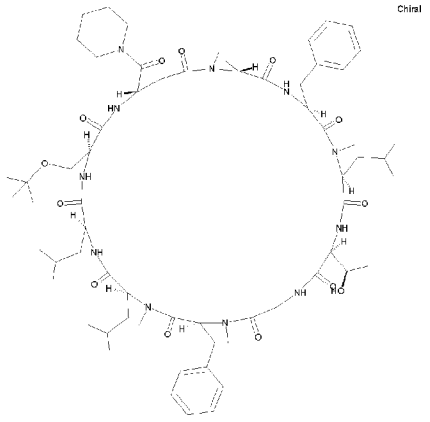
DP-97	 Chiral
DP-98	
DP-99	 Chiral
DP-100	 Chiral

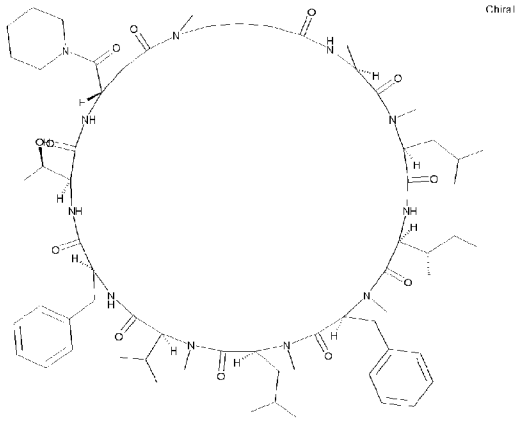
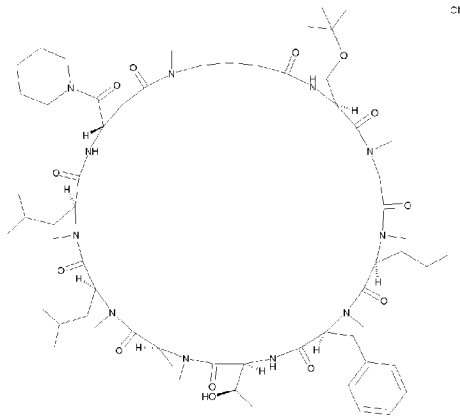
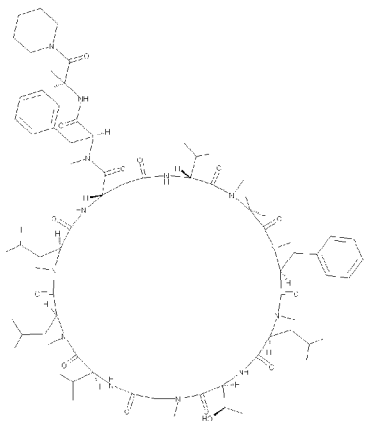
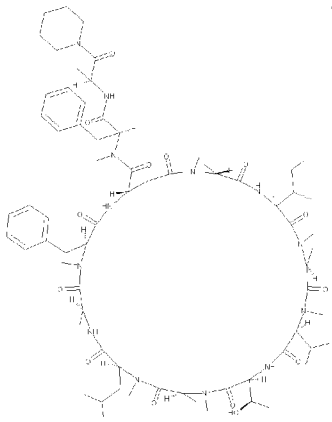
DP-101		Chiral
DP-102		Chiral
DP-103		Chiral
DP-104		Chiral

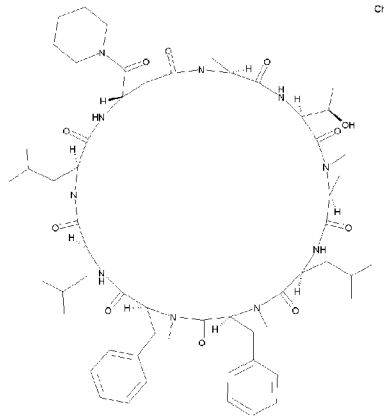
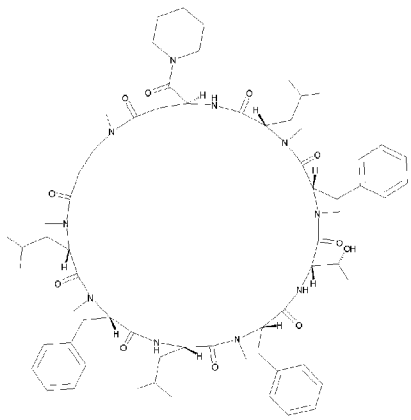
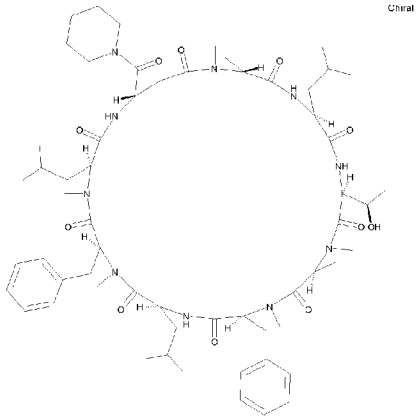
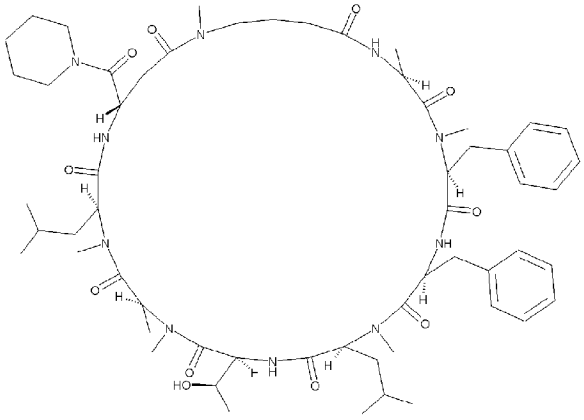
DP-105	 Chiral
DP-106	 Chiral
DP-107	 Chiral
DP-108	 Chiral

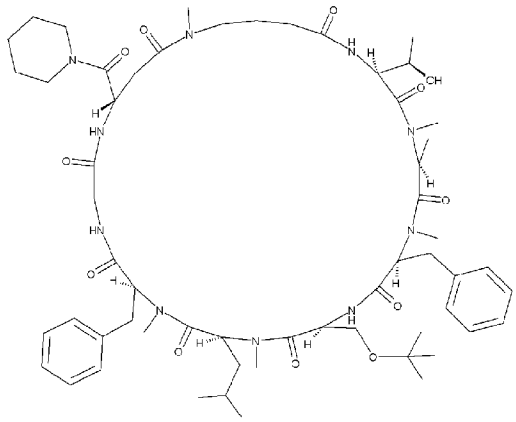
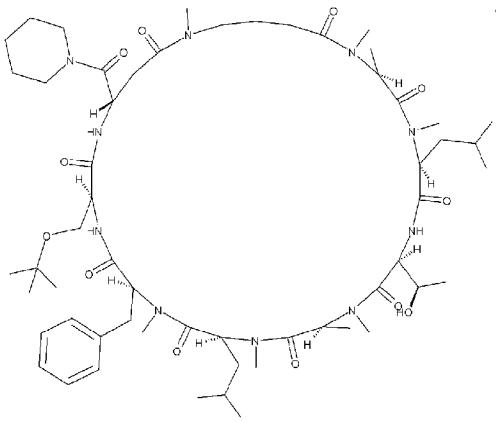
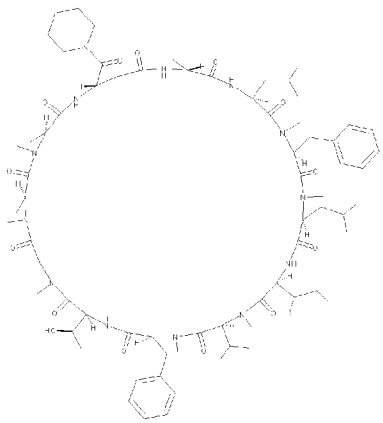
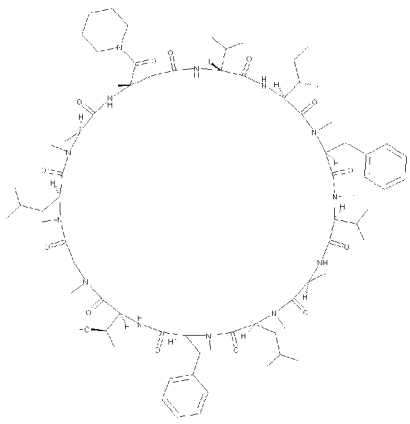
DP-109	
DP-110	
DP-111	
DP-112	

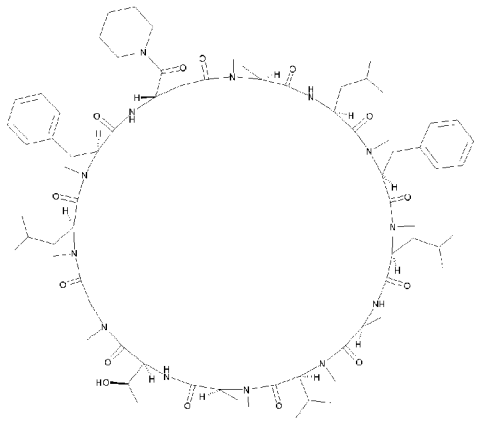
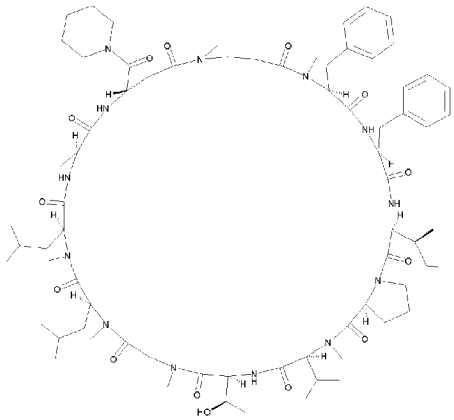
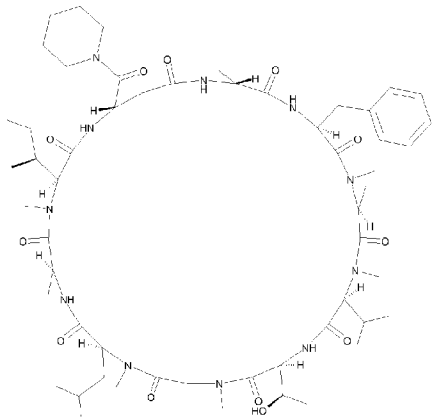
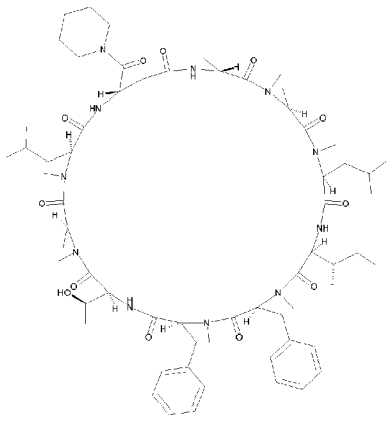
DP-113	
DP-114	
DP-115	
DP-116	

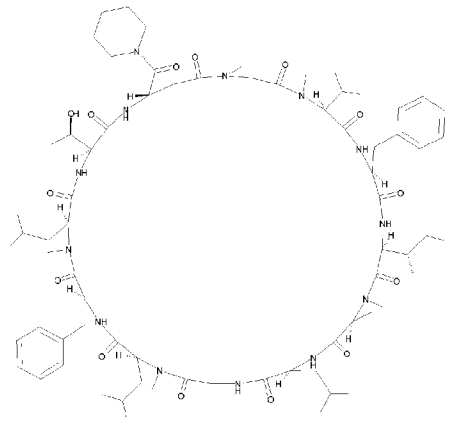
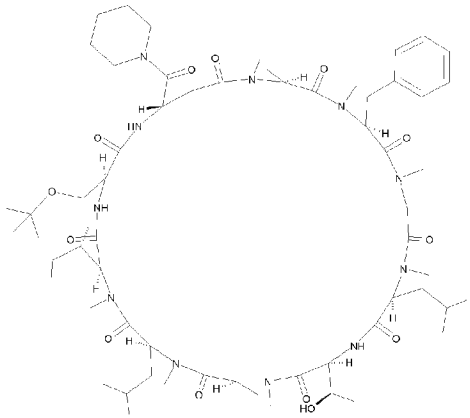
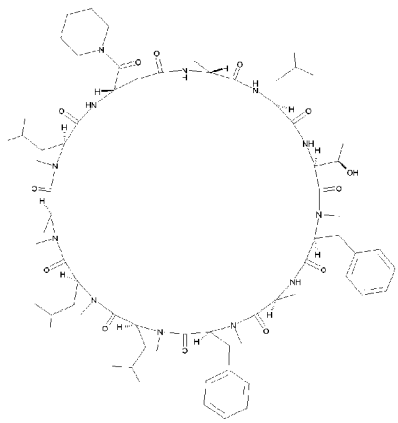
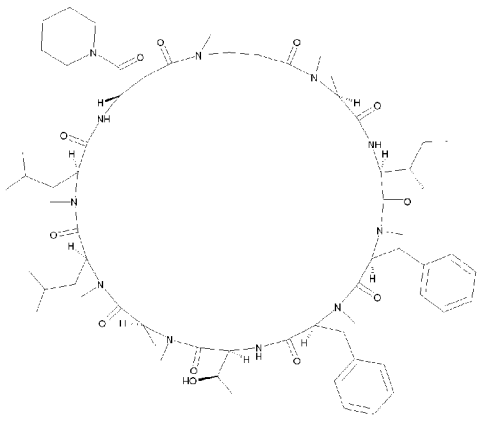
DP-117	
DP-118	
DP-119	
DP-120	

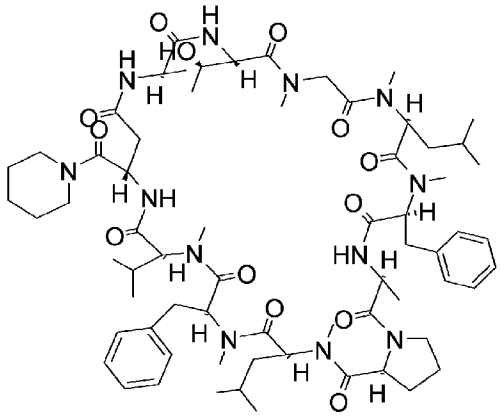
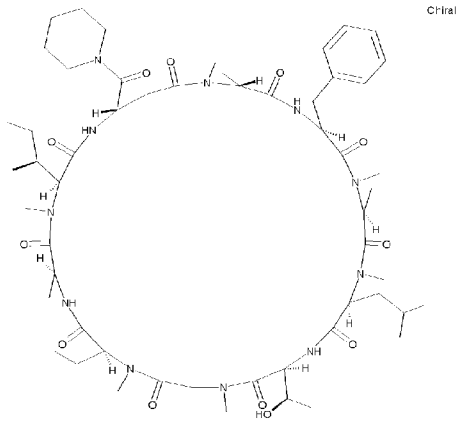
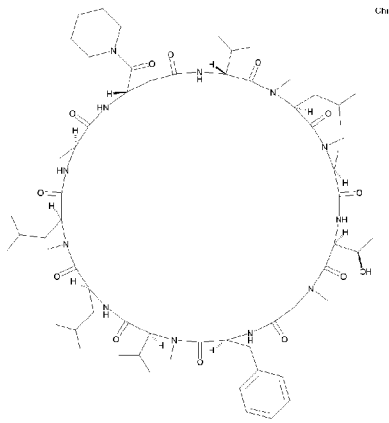
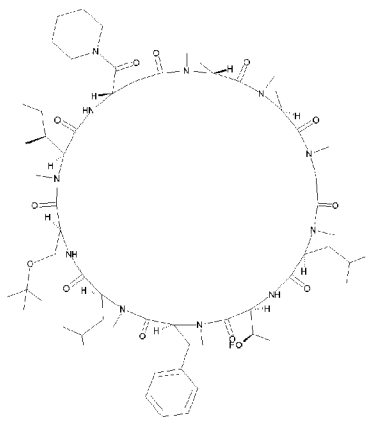
DP-121	
DP-122	
DP-123	
DP-124	

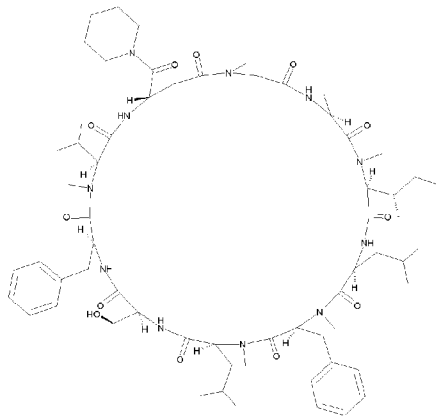
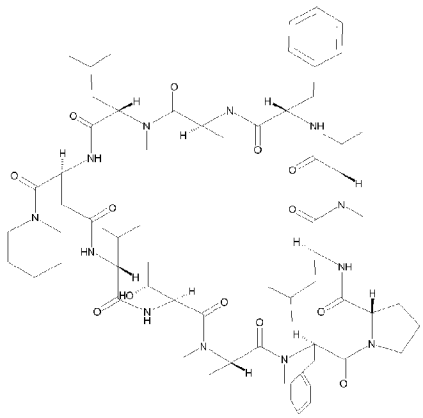
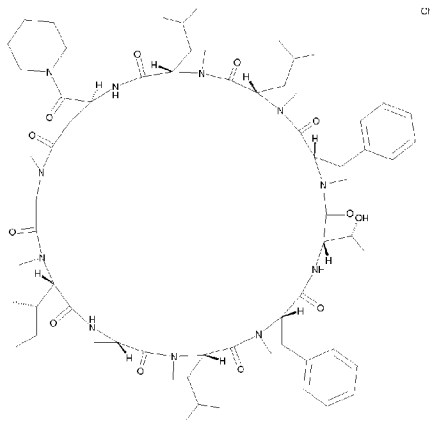
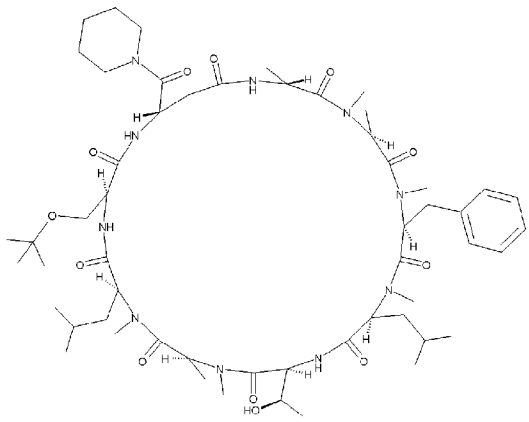
DP-125	
DP-126	
DP-127	
DP-128	

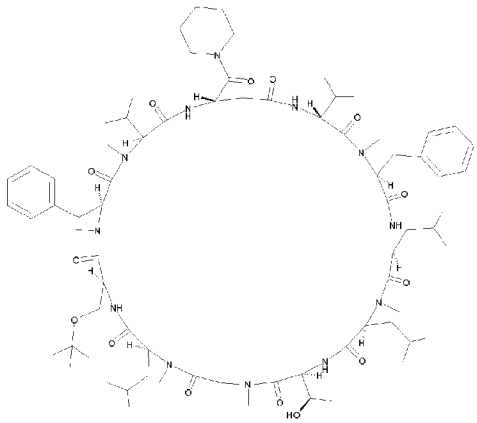
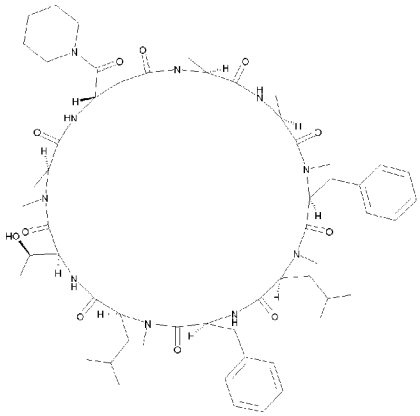
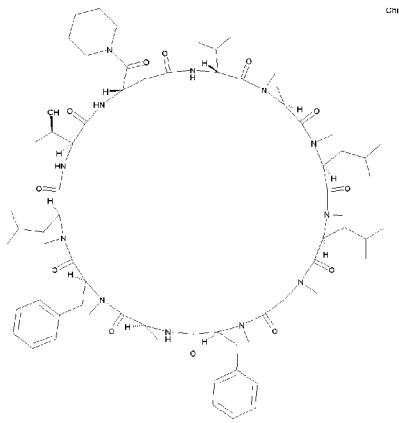
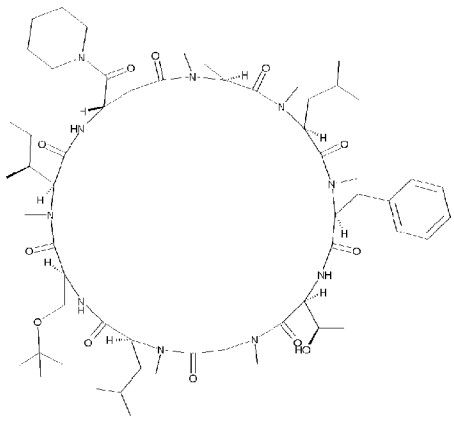
DP-129	
DP-130	
DP-131	
DP-132	

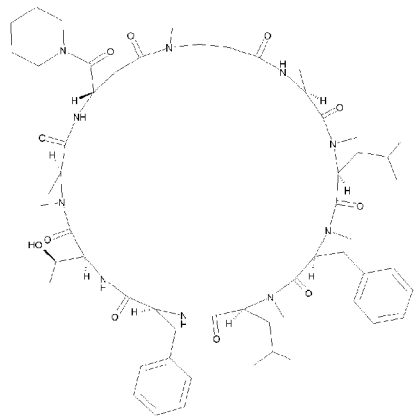
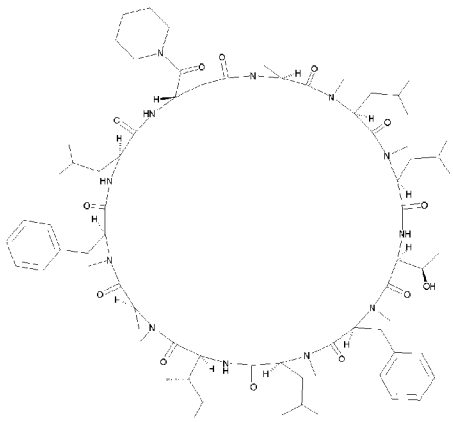
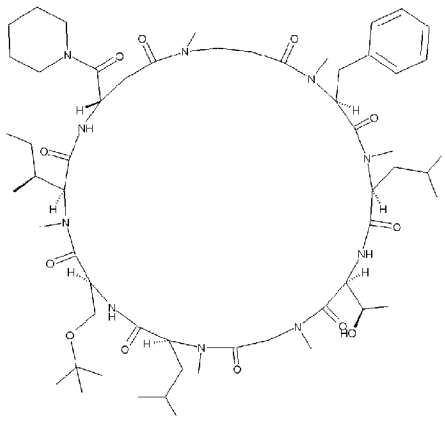
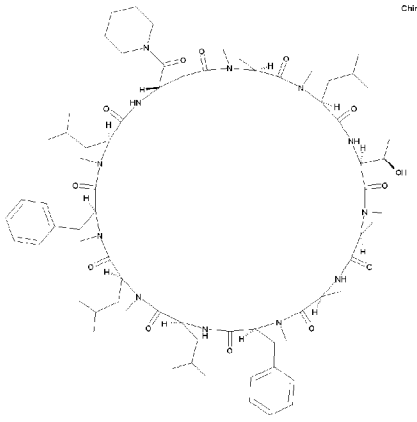
DP-133	
DP-134	
DP-135	
DP-136	

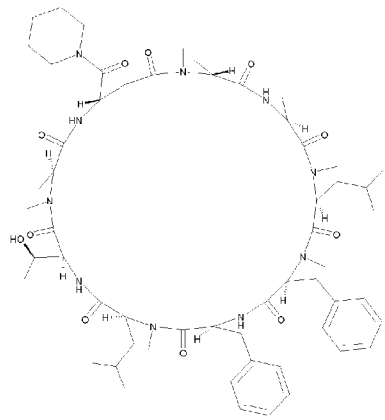
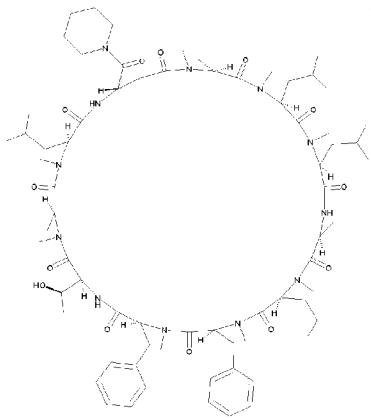
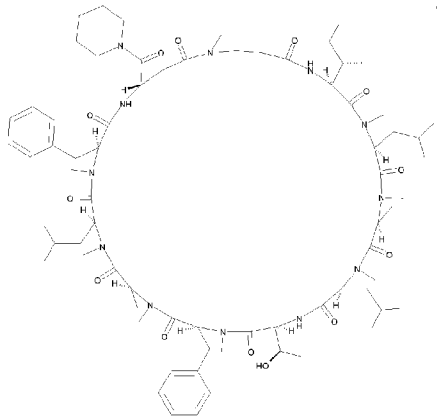
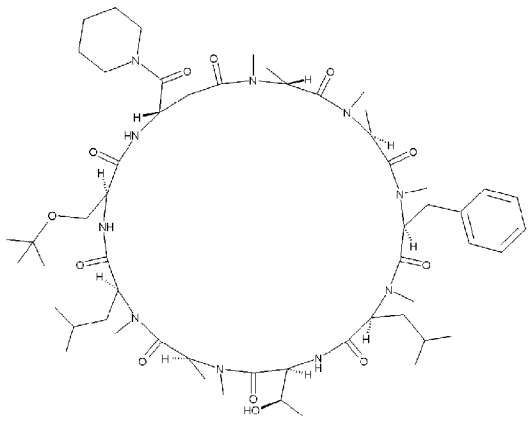
DP-137	
DP-138	
DP-139	
DP-140	

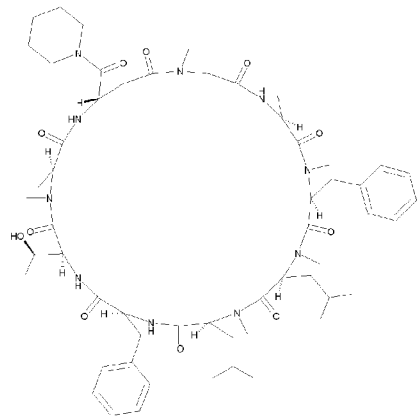
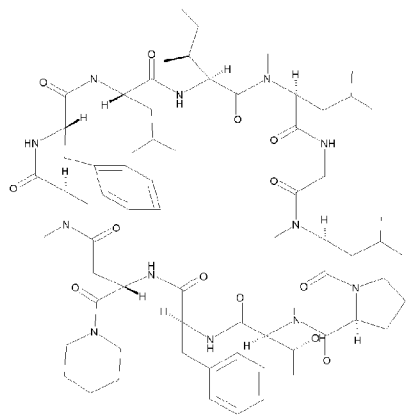
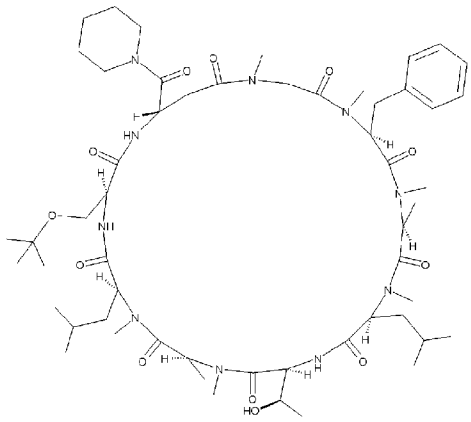
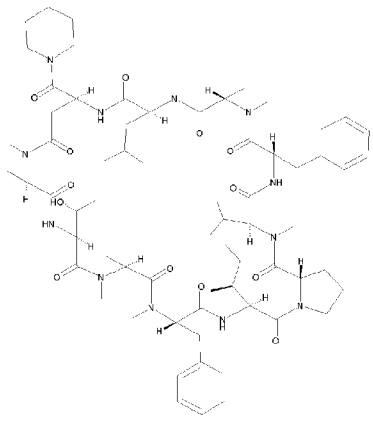
DP-141	 Chiral
DP-142	 Chiral
DP-143	 Chiral
DP-144	 Chiral

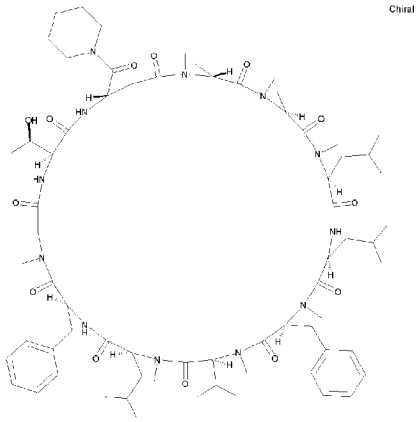
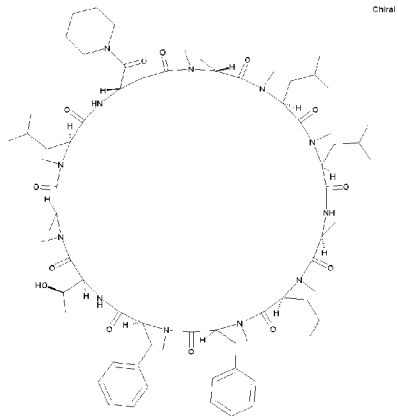
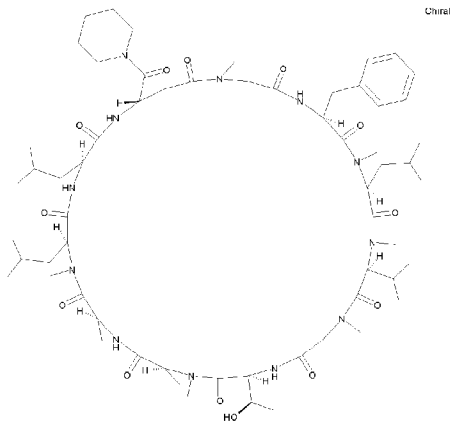
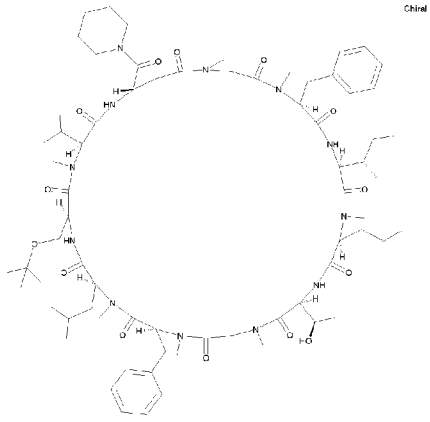
DP-145	
DP-146	
DP-147	
DP-148	

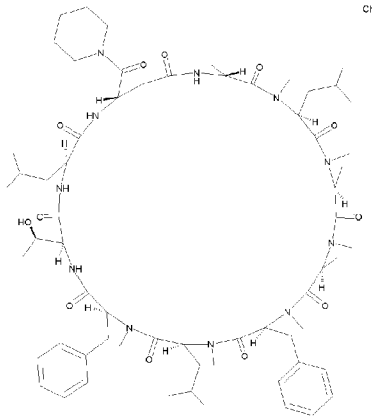
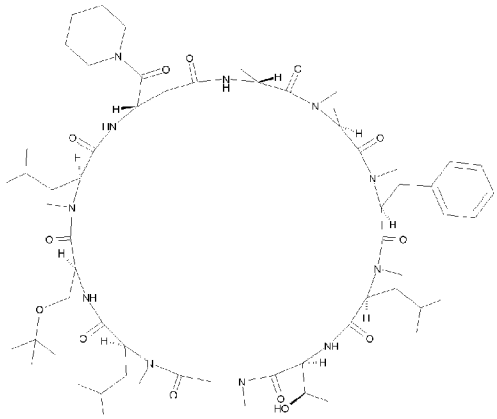
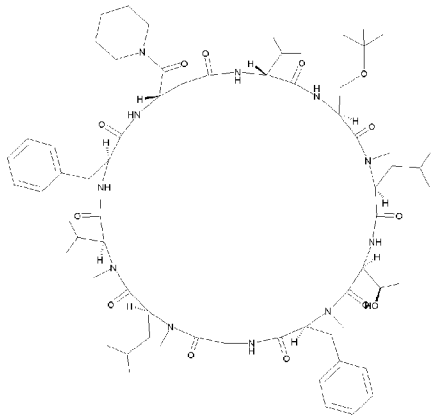
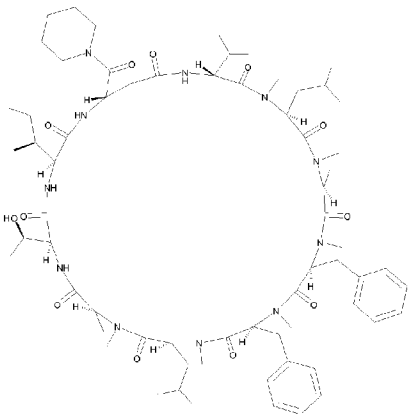
DP-149	
DP-150	
DP-151	
DP-152	

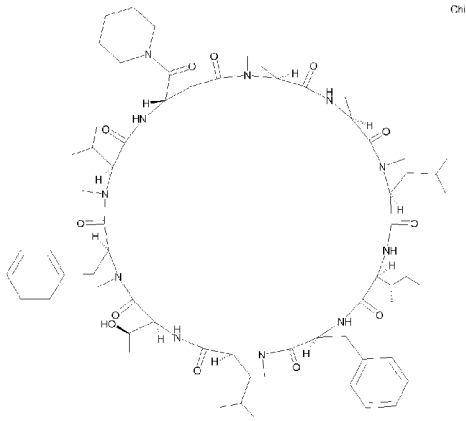
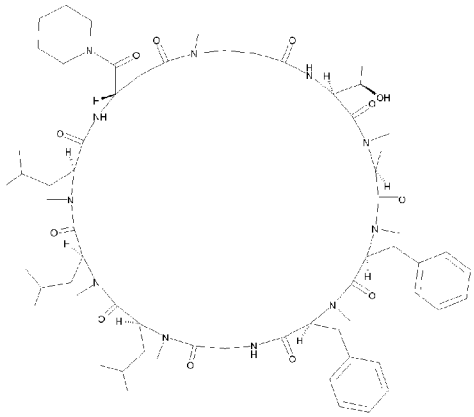
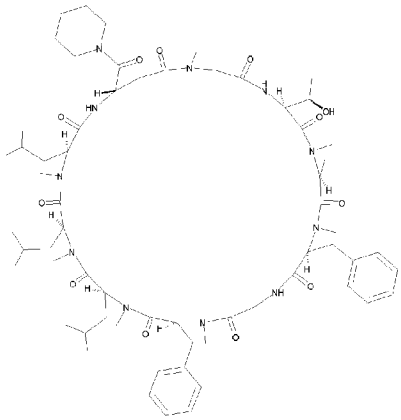
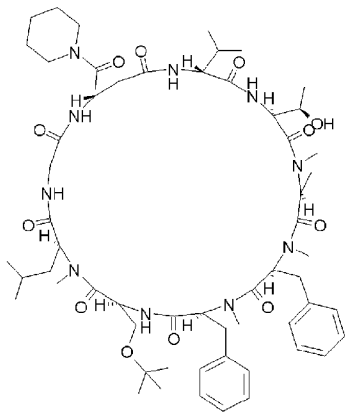
DP-153	
DP-154	
DP-155	
DP-156	

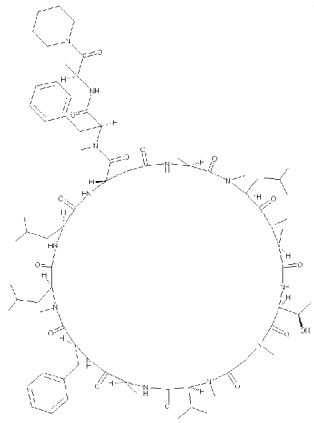
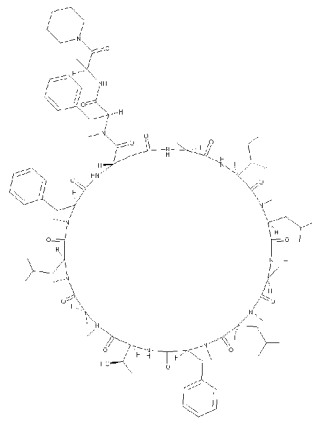
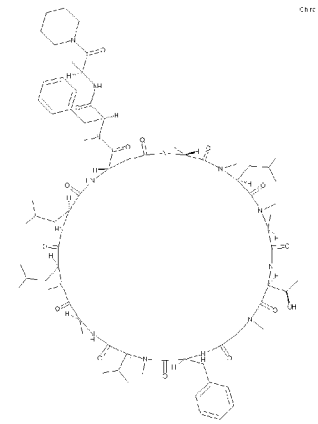
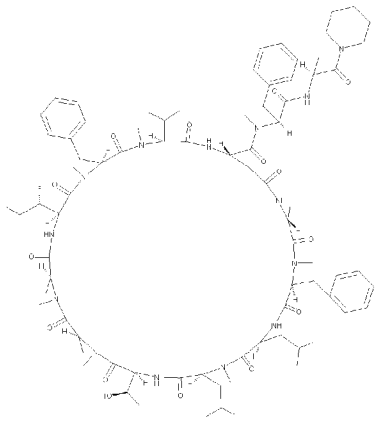
DP-157	
DP-158	
DP-159	
DP-160	

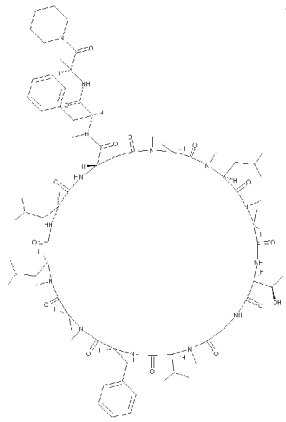
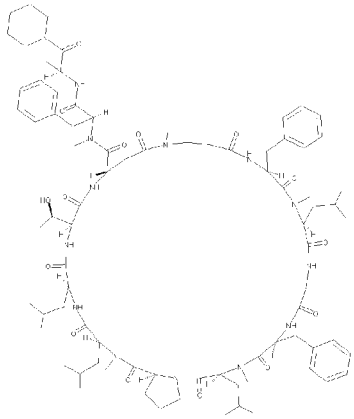
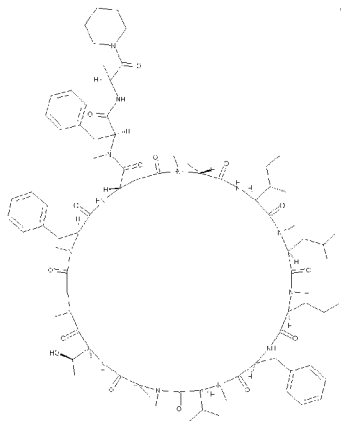
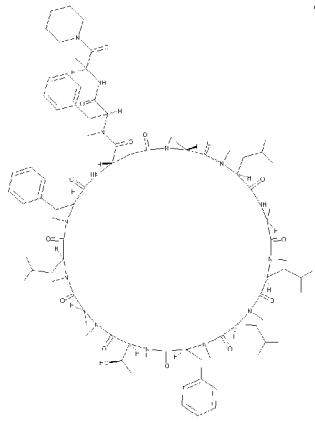
DP-161	
DP-162	
DP-163	
DP-164	

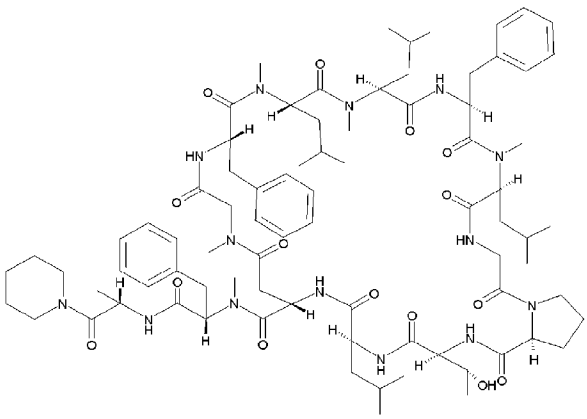
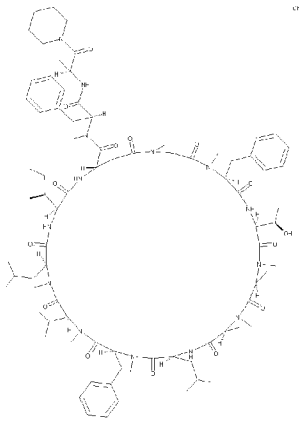
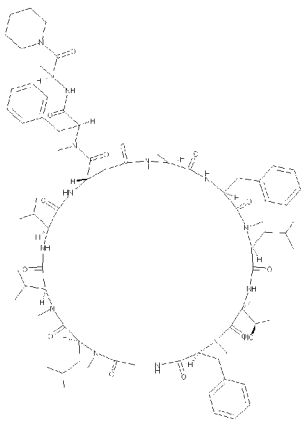
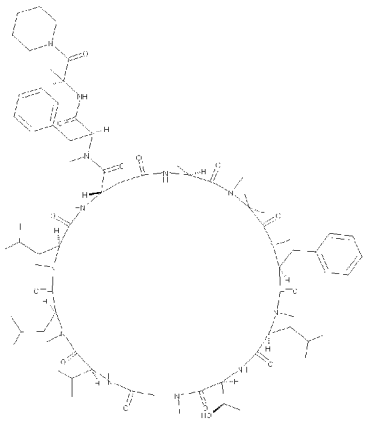
DP-165	
DP-166	
DP-167	
DP-168	

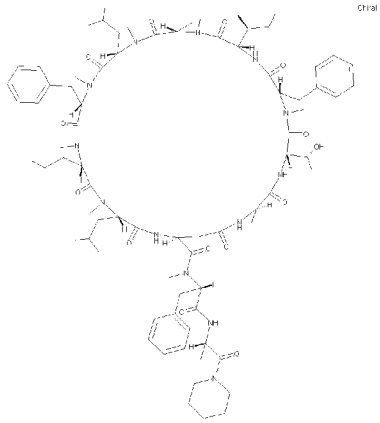
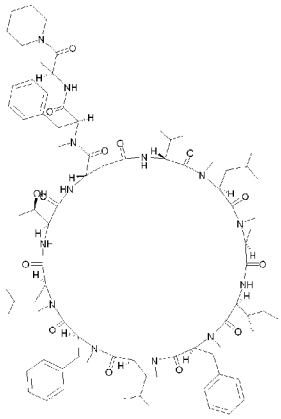
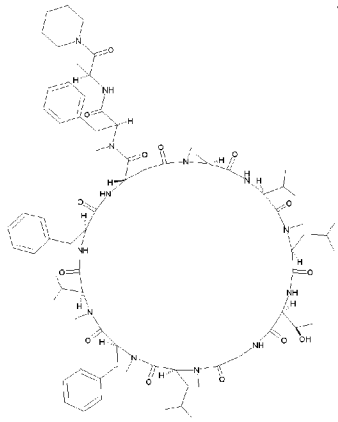
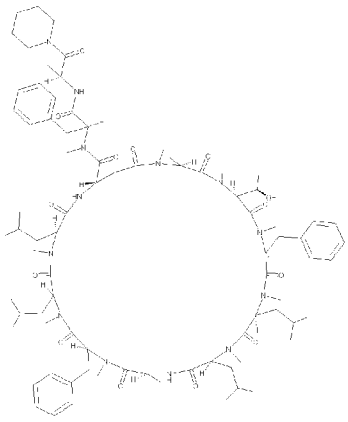
DP-169	
DP-170	
DP-171	
DP-172	

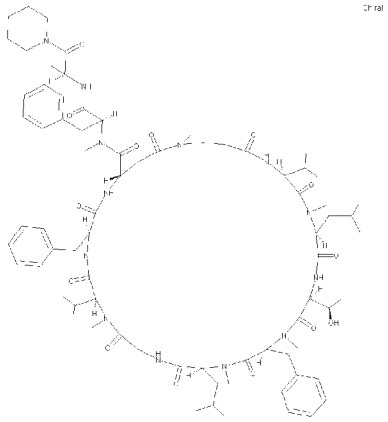
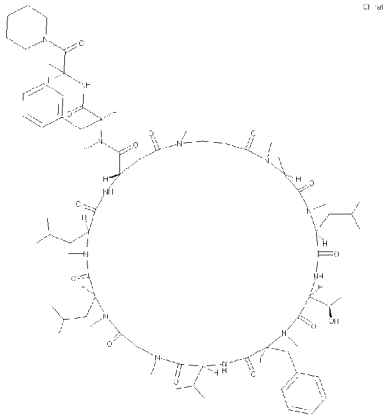
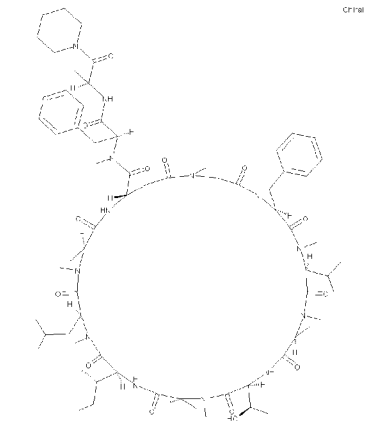
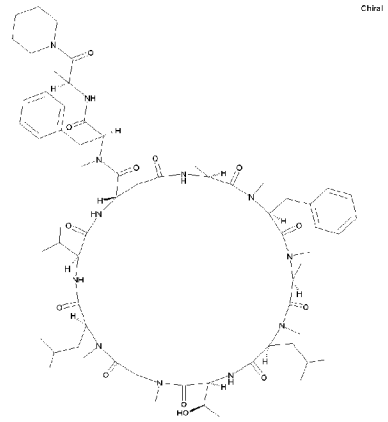
DP-173	
DP-174	
DP-175	
DP-176	

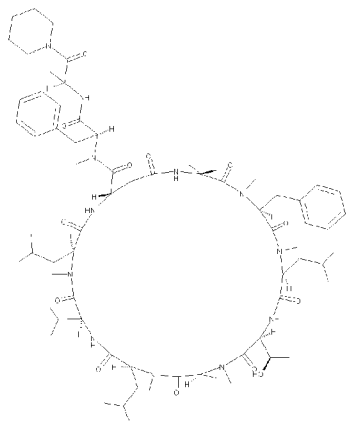
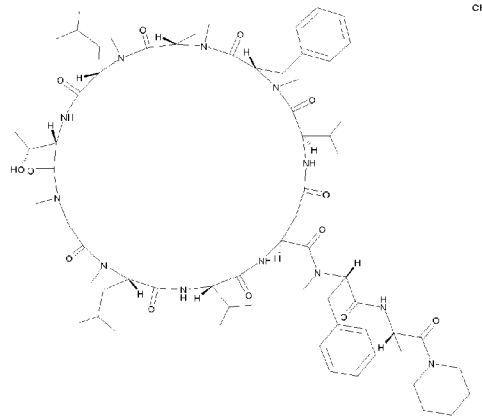
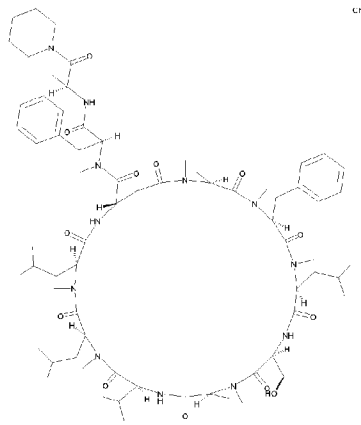
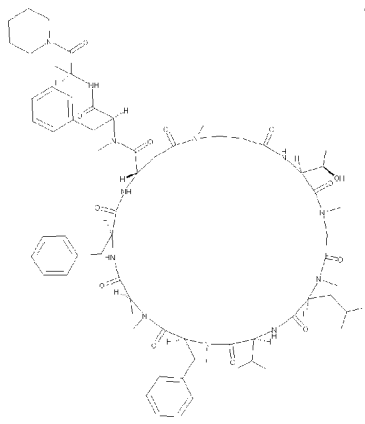
DP-177	
DP-178	
DP-179	
DP-180	

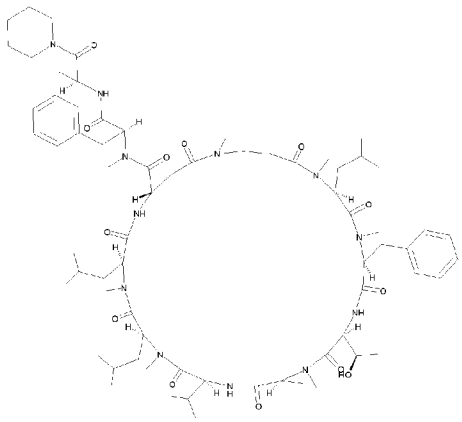
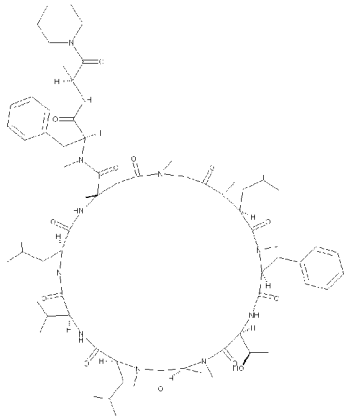
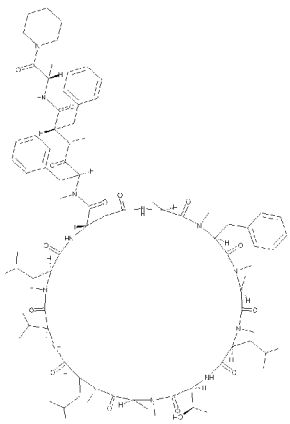
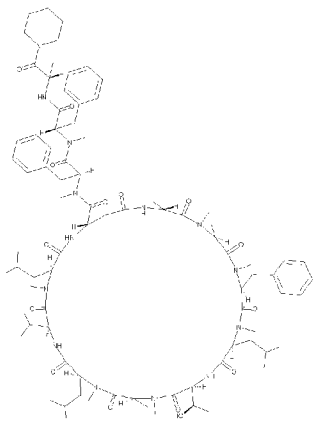
DP-181	
DP-182	
DP-183	
DP-184	

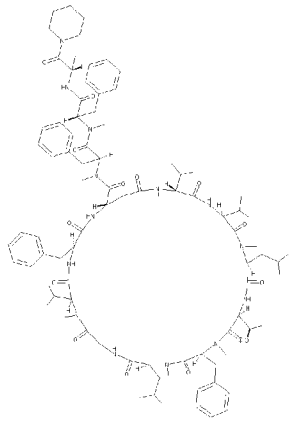
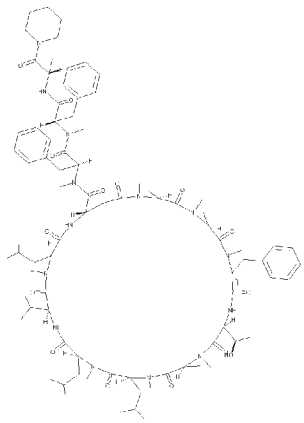
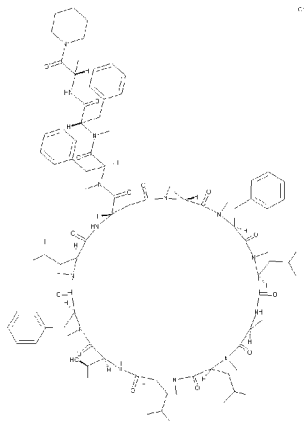
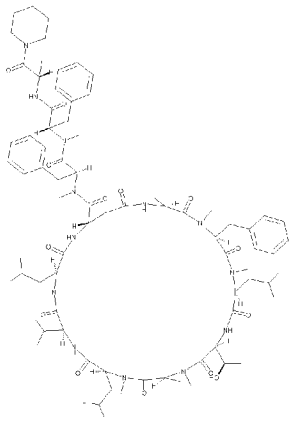
DP-185	
DP-186	
DP-187	
DP-188	

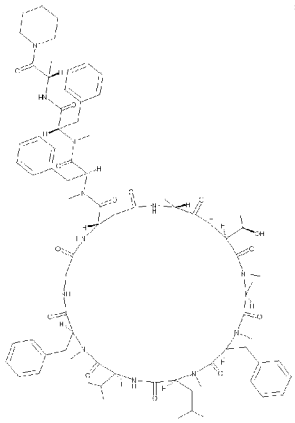
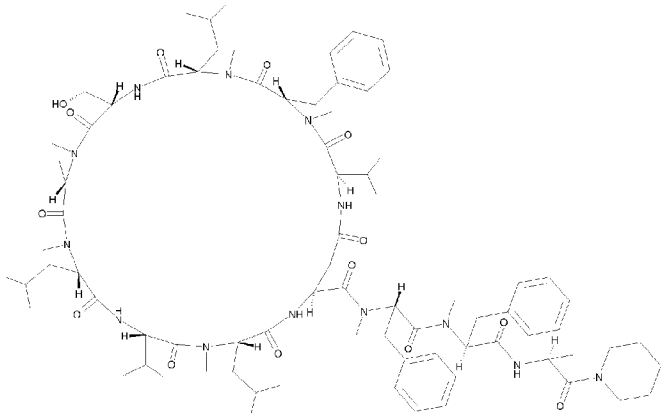
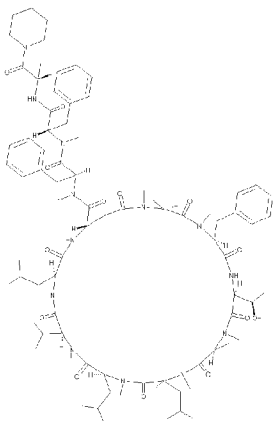
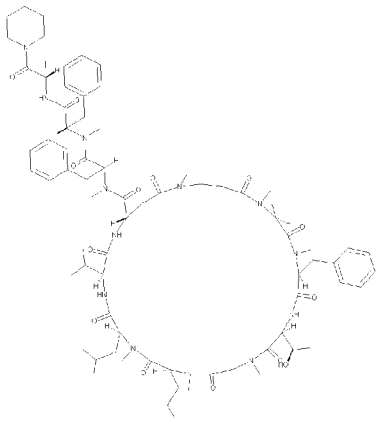
DP-189	
DP-190	
DP-191	
DP-192	

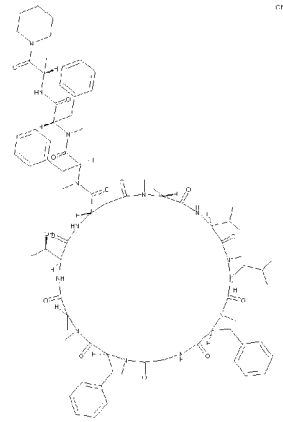
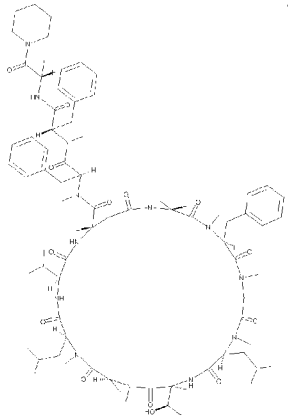
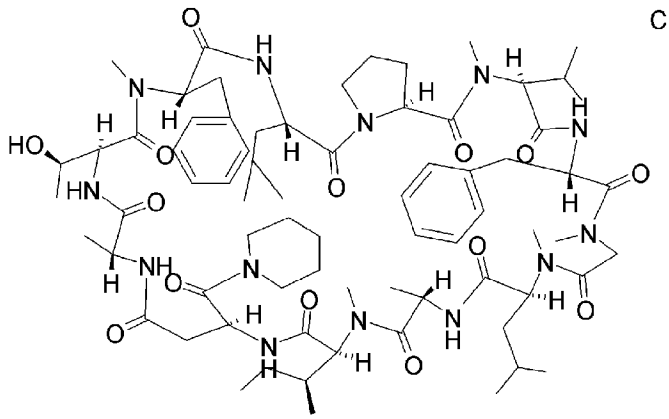
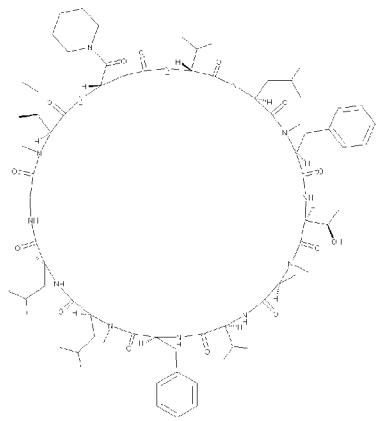
DP-193	
DP-194	
DP-195	
DP-196	

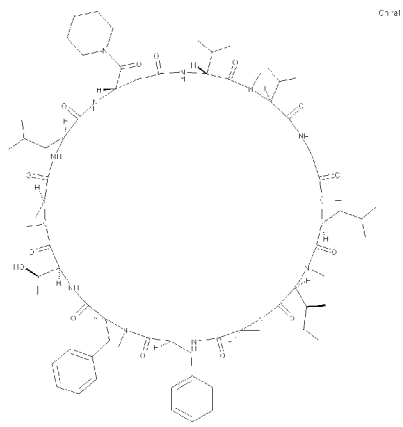
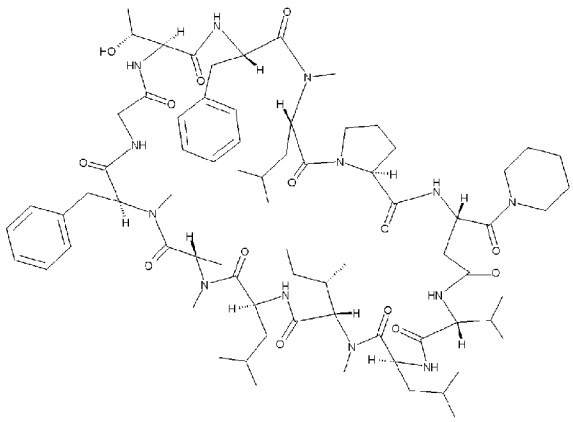
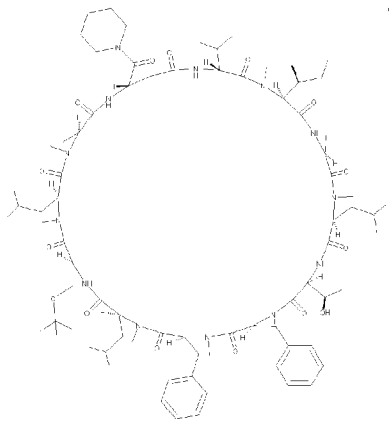
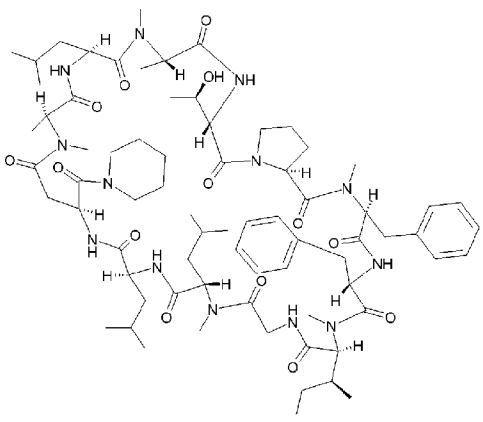
DP-197	
DP-198	
DP-199	
DP-200	

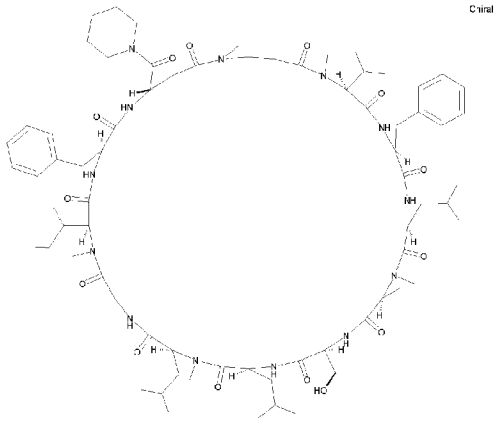
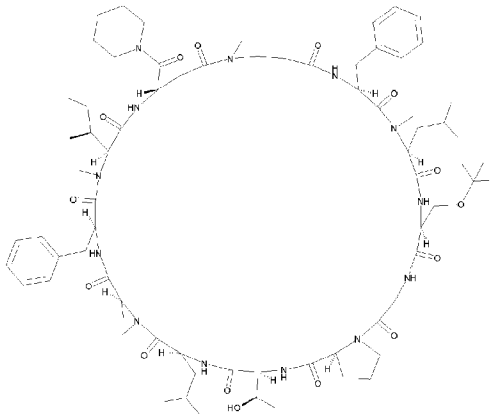
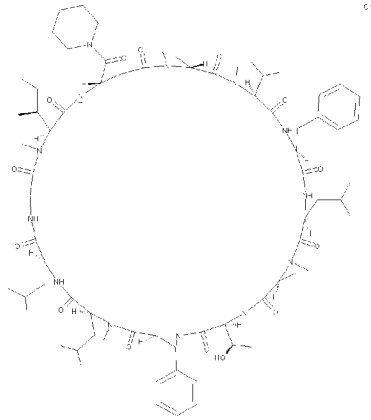
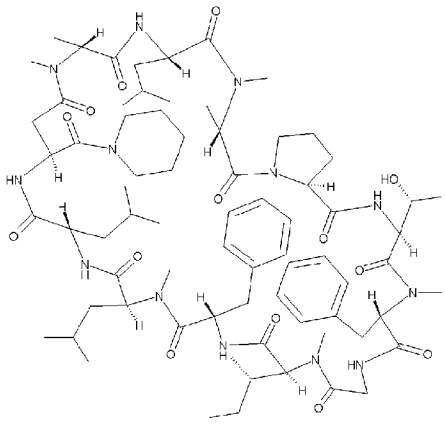
DP-201	
DP-202	
DP-203	
DP-204	

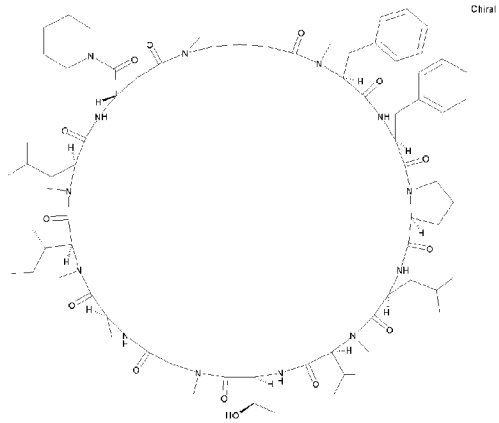
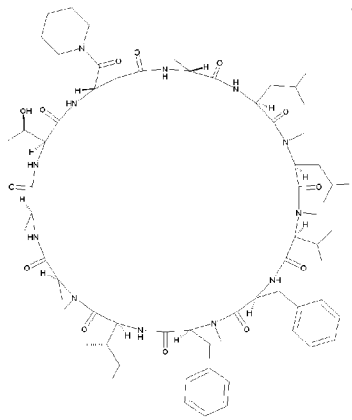
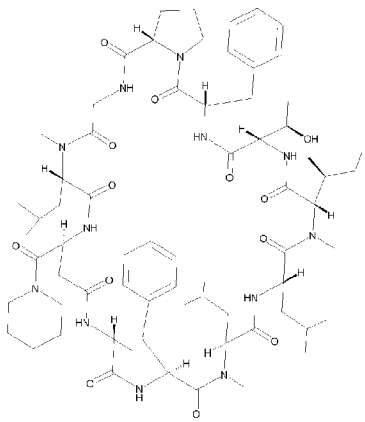
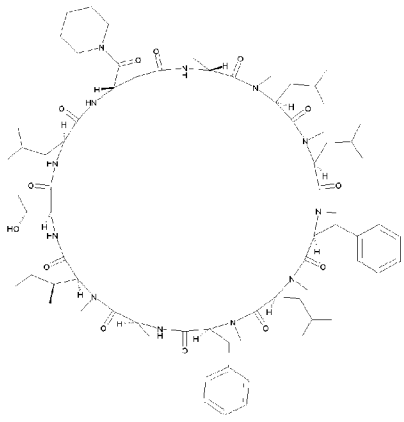
DP-205	
DP-206	
DP-207	
DP-208	

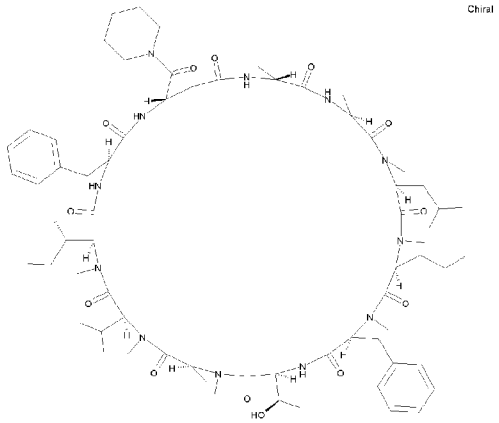
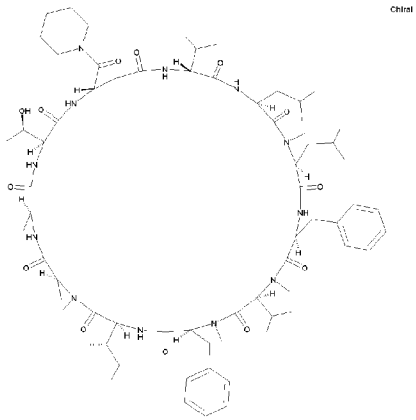
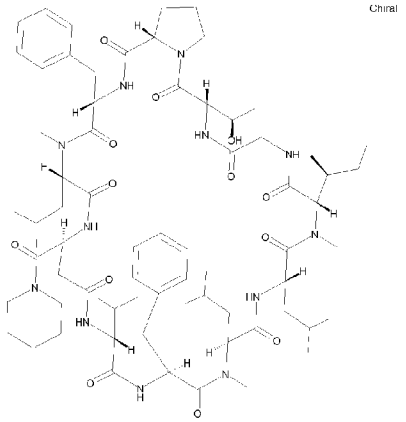
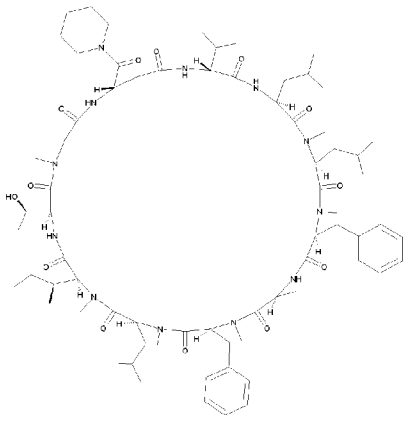
DP-209	
DP-210	
DP-211	
DP-212	

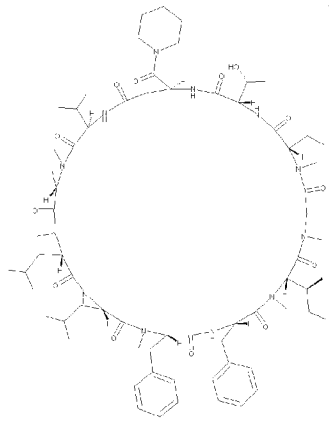
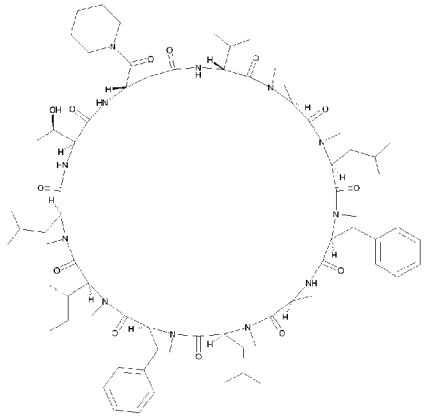
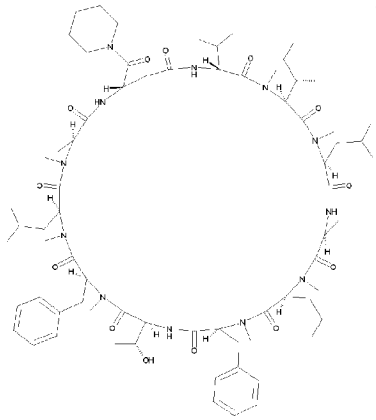
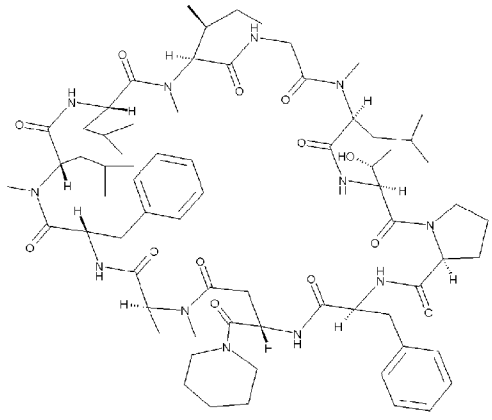
DP-213	
DP-214	
DP-215	
DP-216	

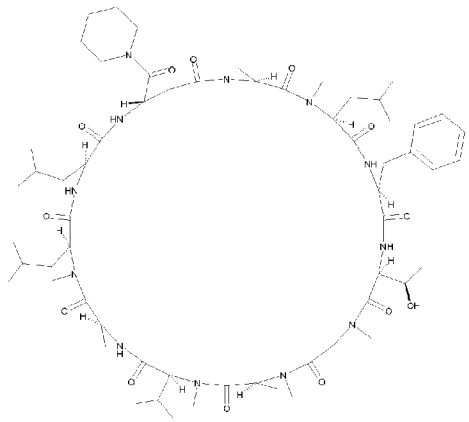
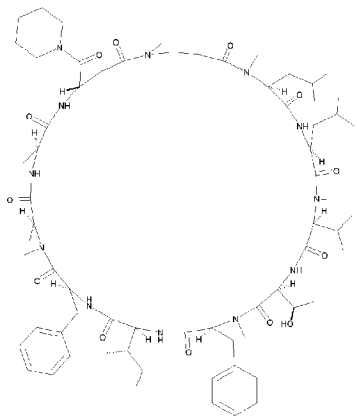
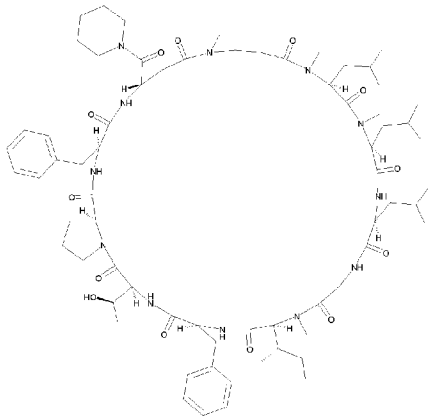
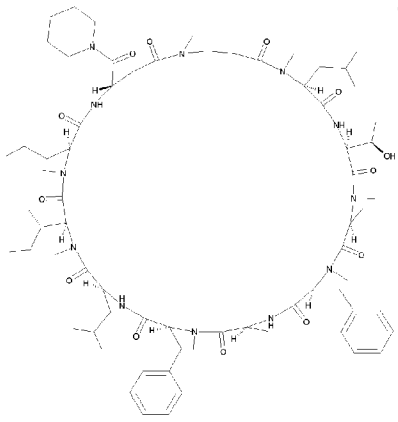
DP-217	
DP-218	
DP-219	
DP-220	

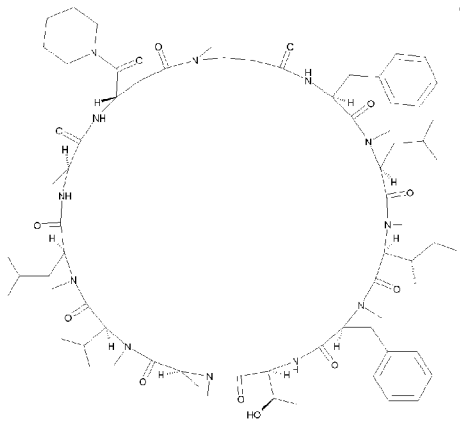
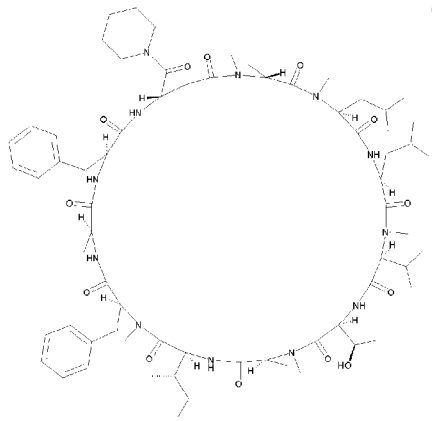
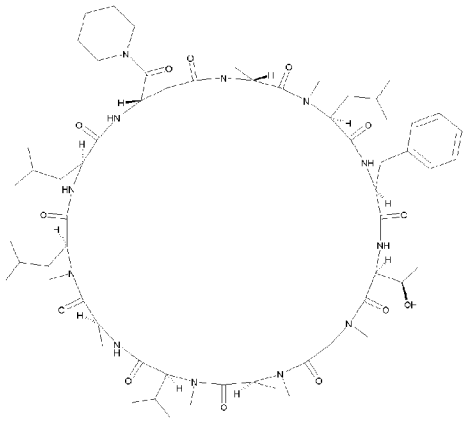
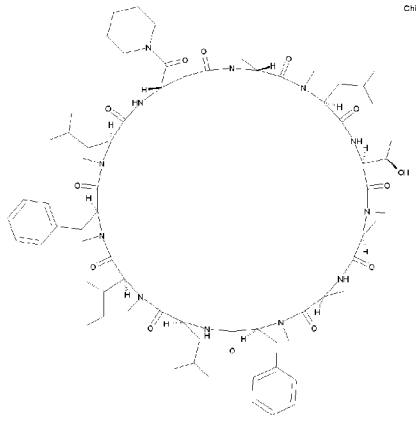
DP-221	
DP-222	
DP-223	
DP-224	

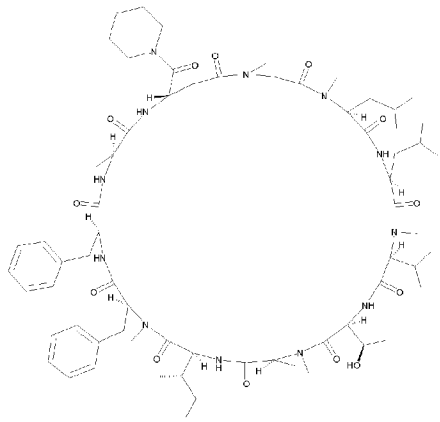
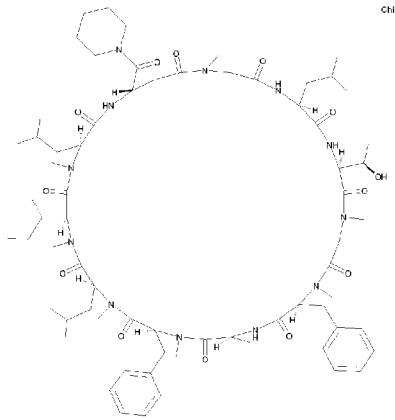
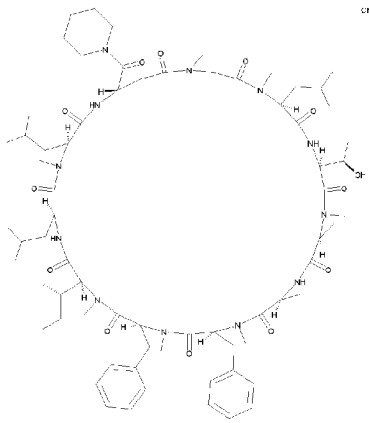
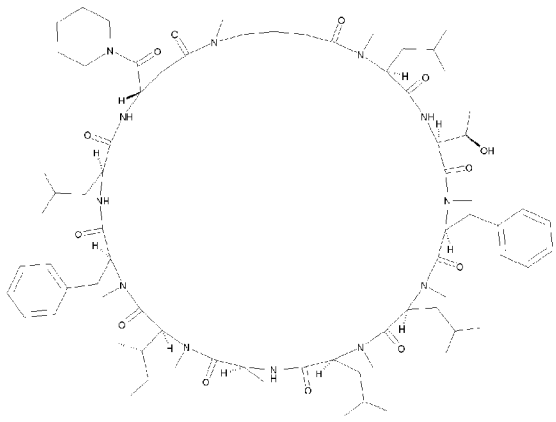
DP-225	
DP-226	
DP-227	
DP-228	

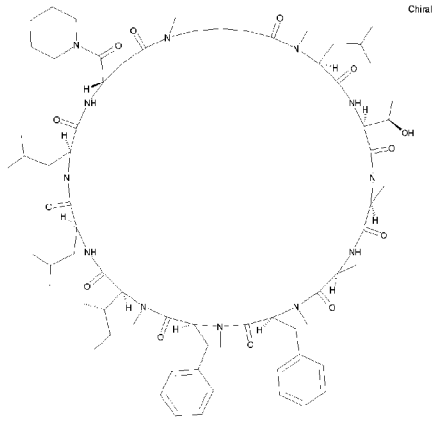
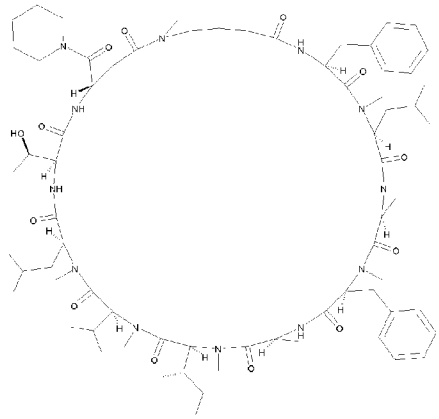
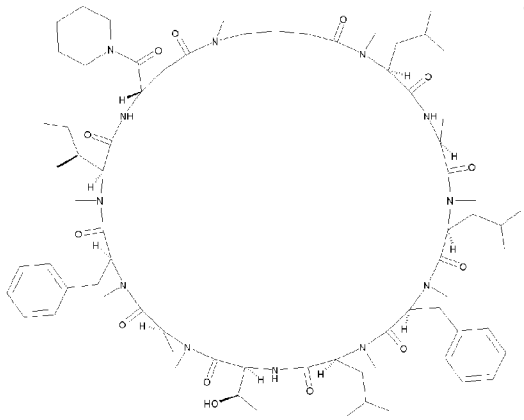
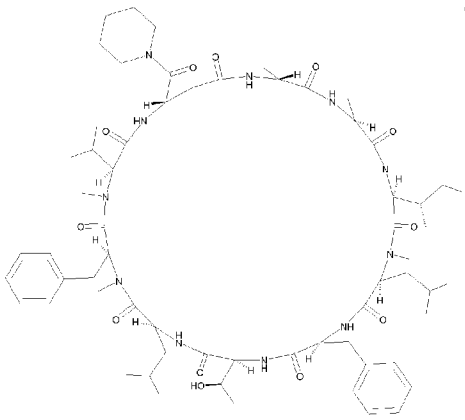
DP-229	
DP-230	
DP-231	
DP-232	

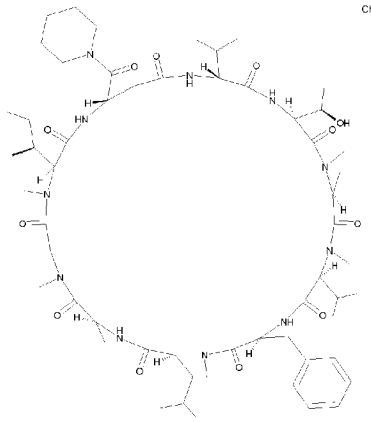
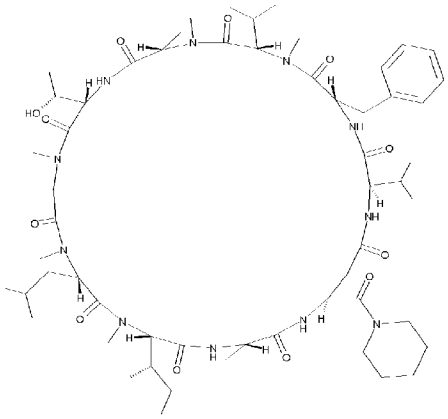
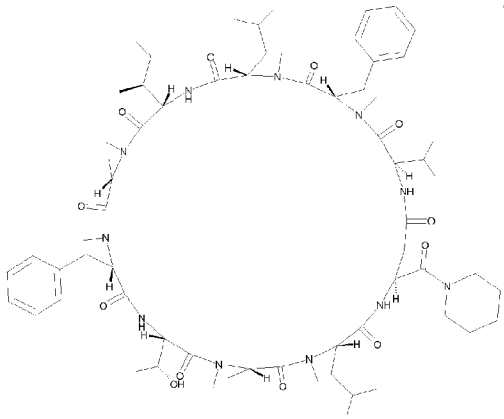
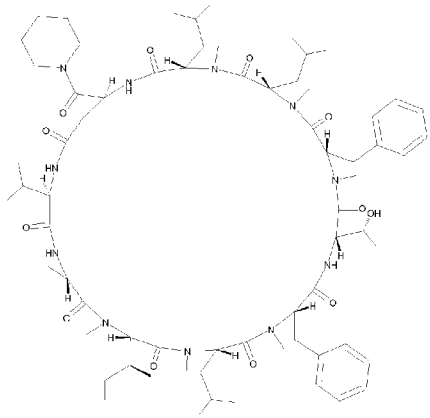
DP-233	
DP-234	
DP-235	
DP-236	

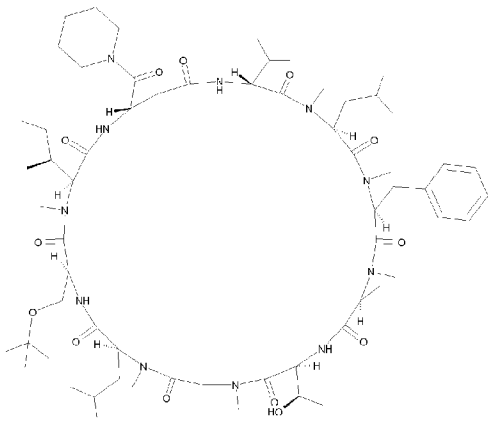
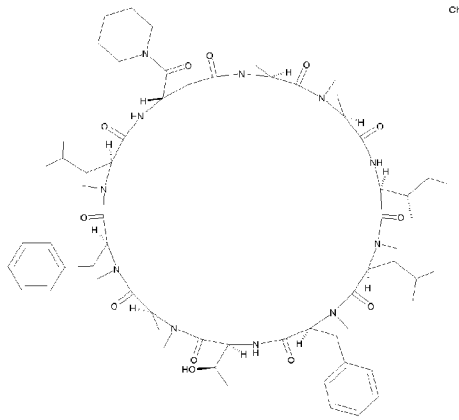
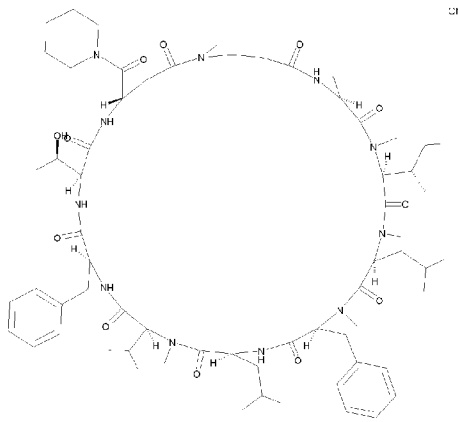
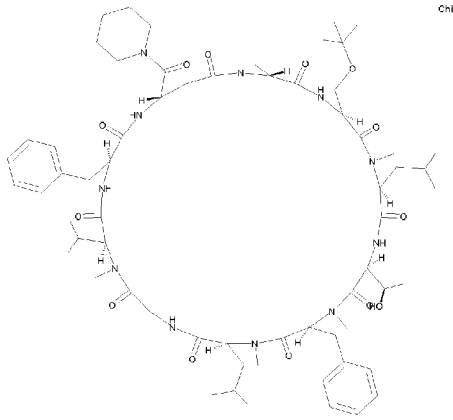
DP-237	
DP-238	
DP-239	
DP-240	

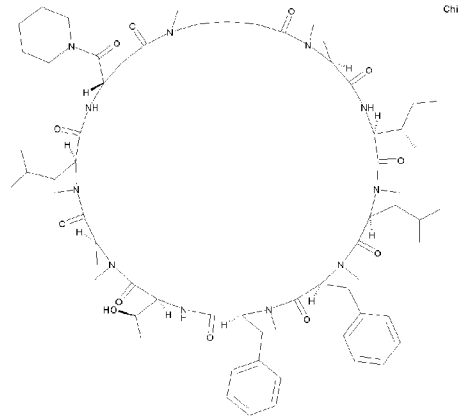
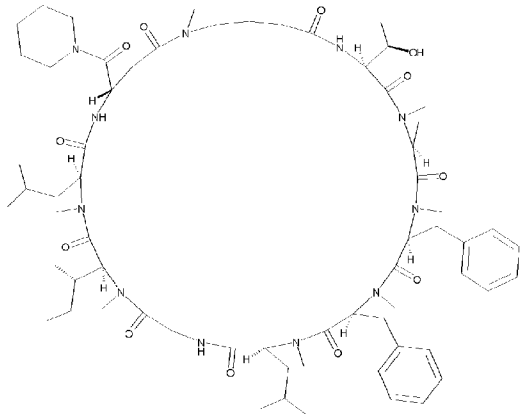
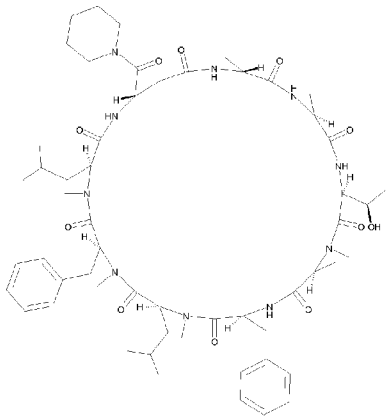
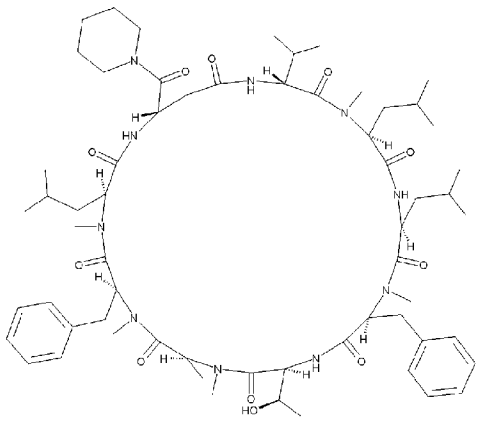
DP-241	
DP-242	
DP-243	
DP-244	

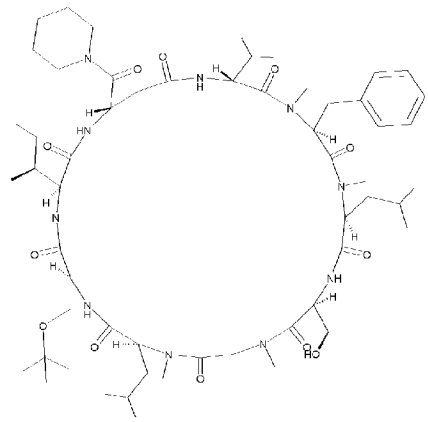
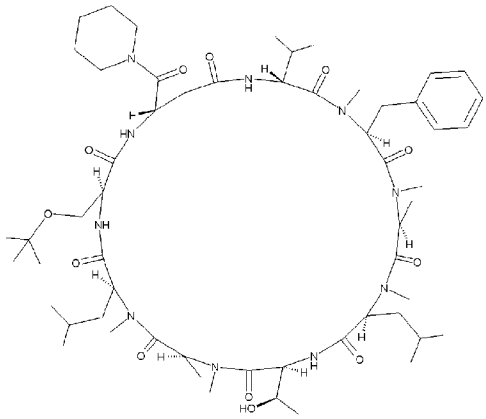
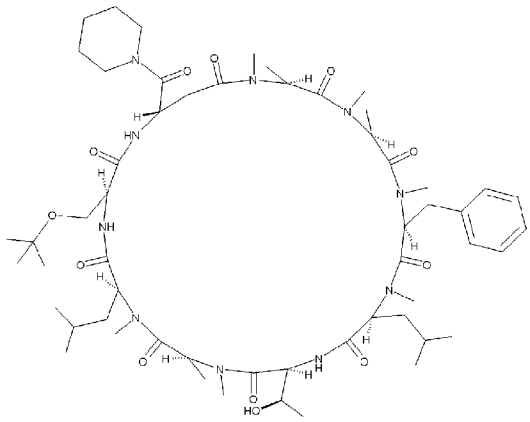
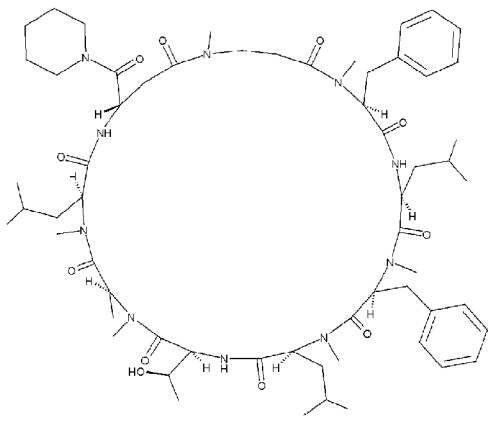
DP-245	
DP-246	
DP-247	
DP-248	

DP-249	
DP-250	
DP-251	
DP-252	

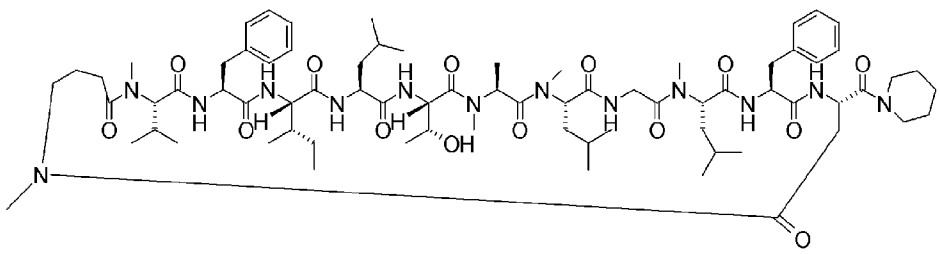
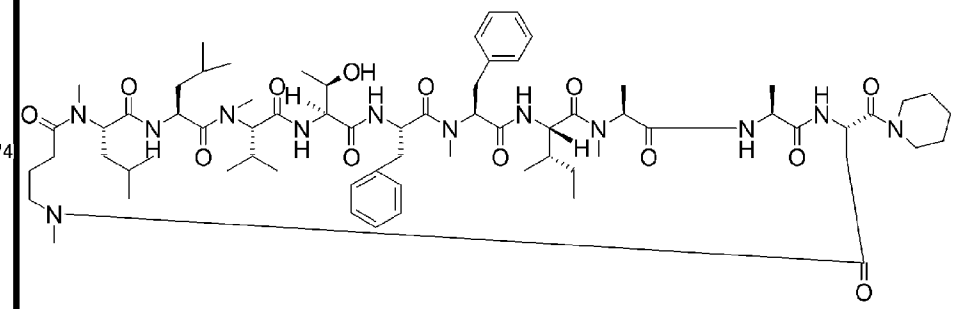
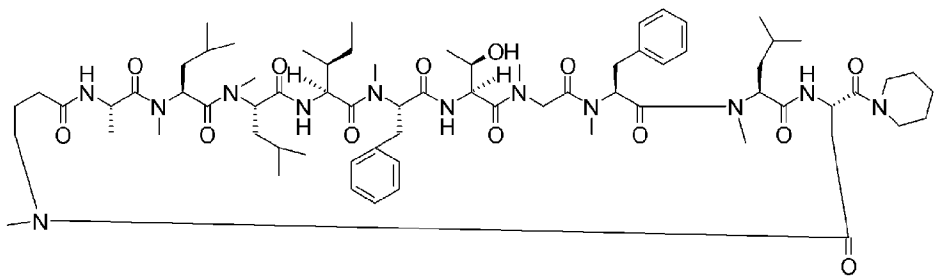
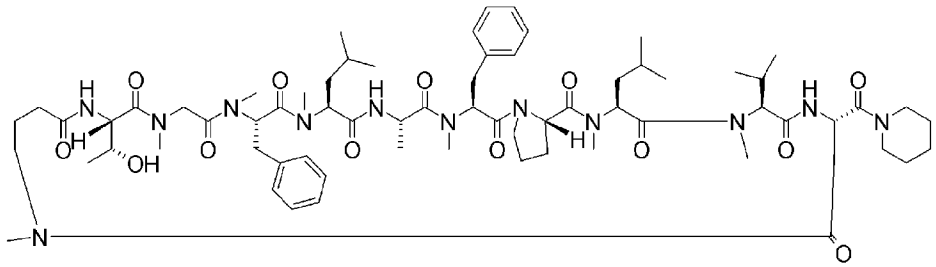
DP-253	
DP-254	
DP-255	
DP-256	

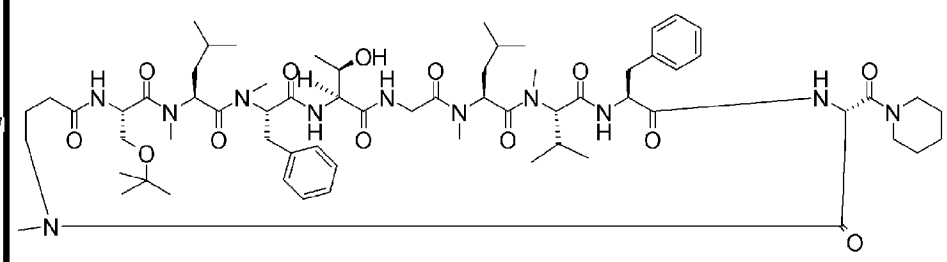
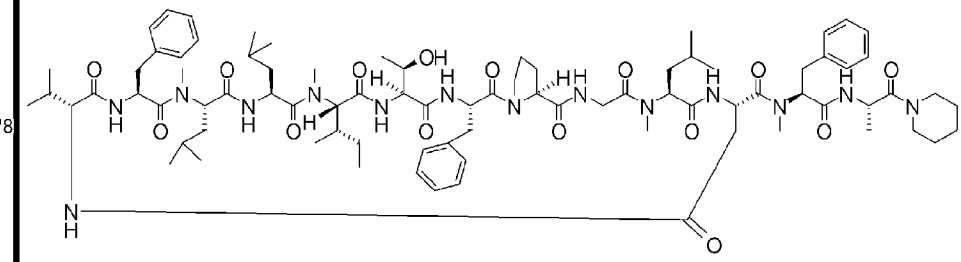
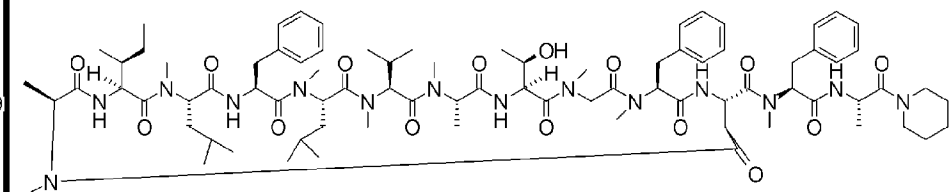
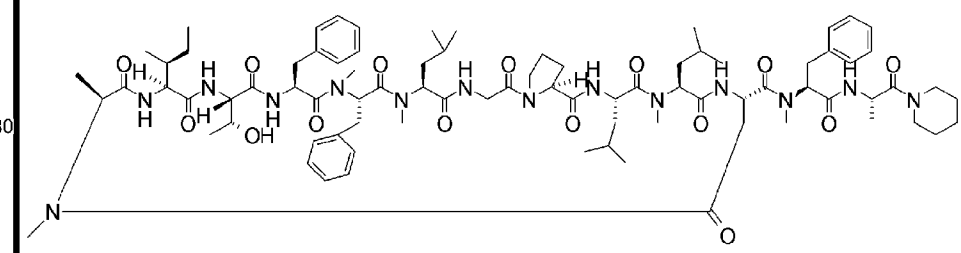
DP-257	
DP-258	
DP-259	
DP-260	

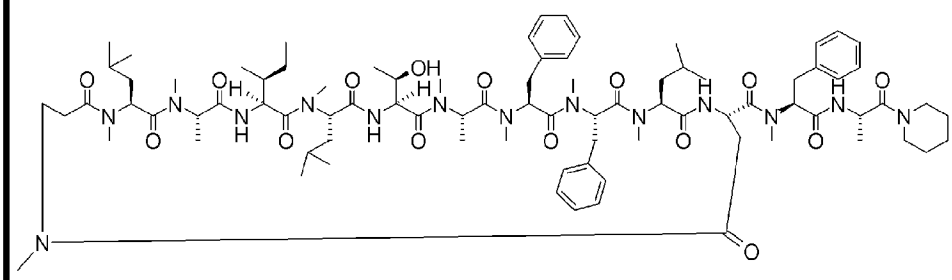
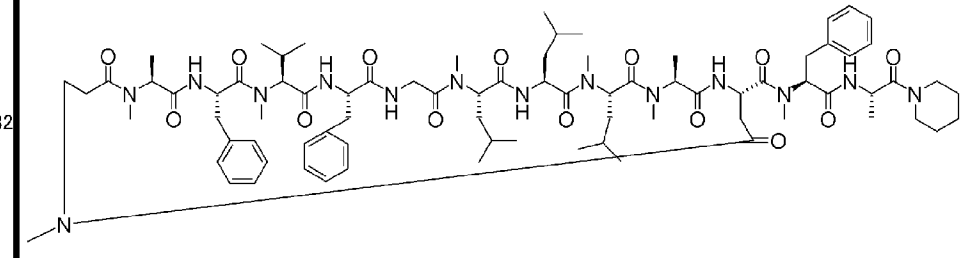
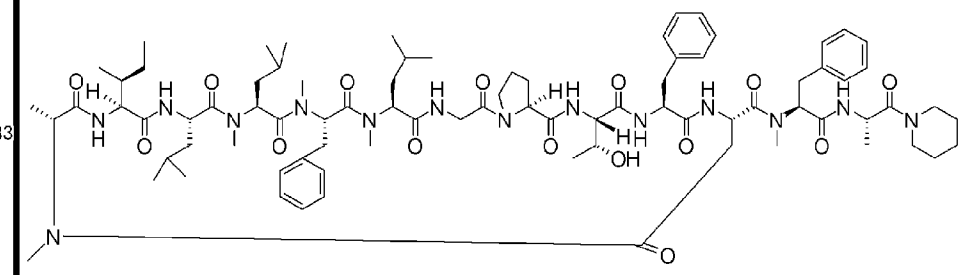
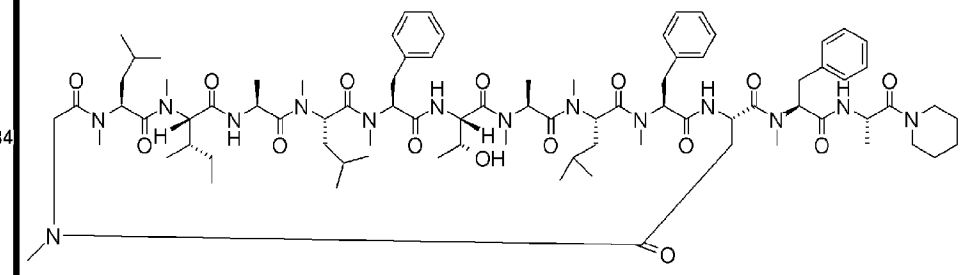
DP-261	
DP-262	
DP-263	
DP-264	

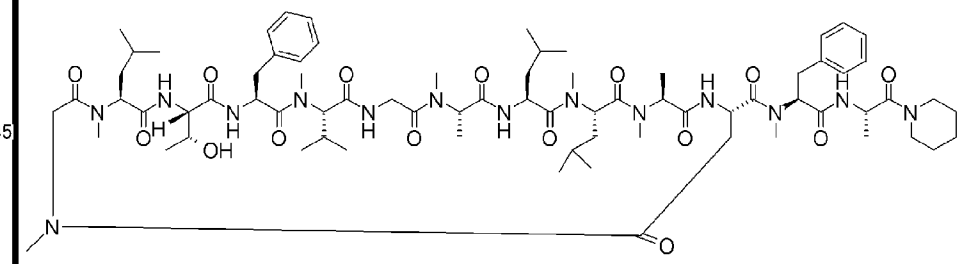
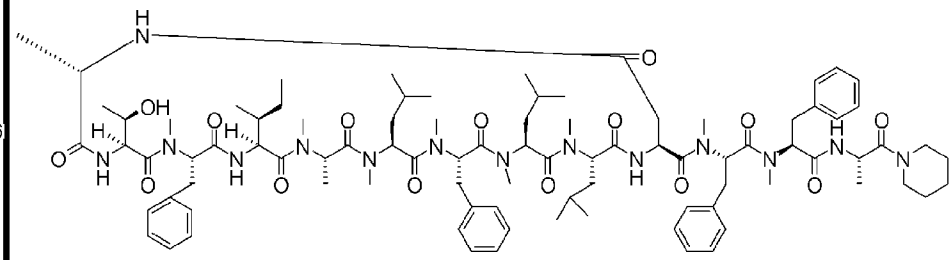
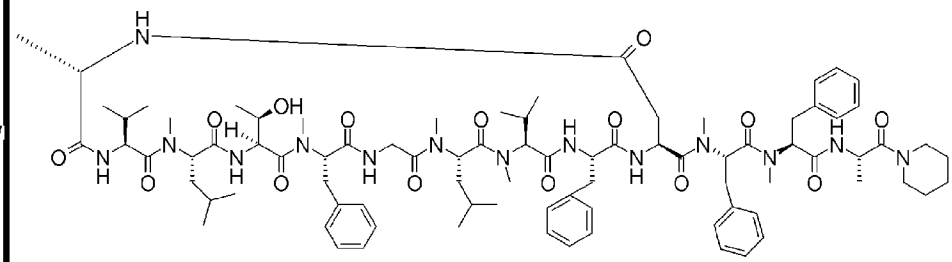
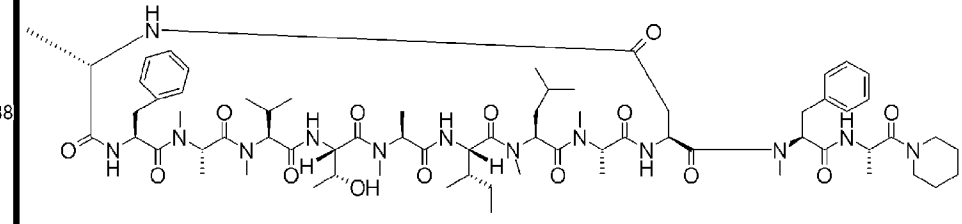
DP-265	 Chiral
DP-266	 Chiral
DP-267	 Chiral
DP-268	 Chiral

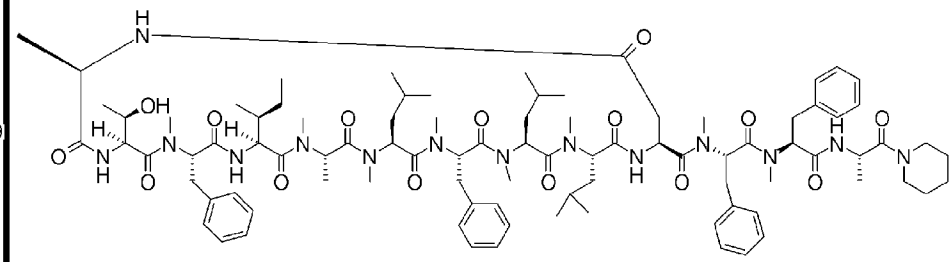
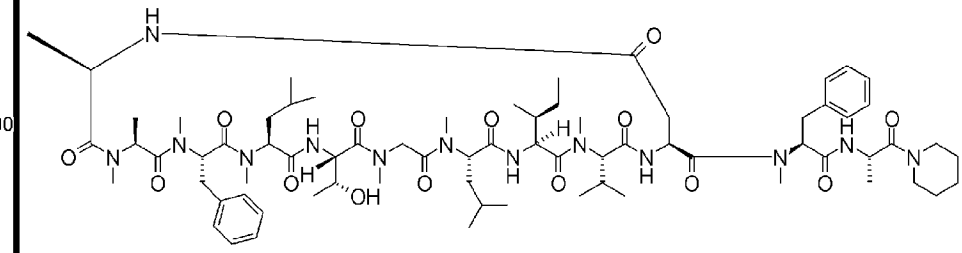
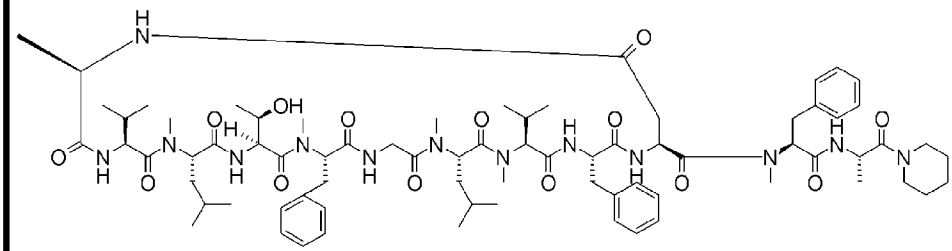
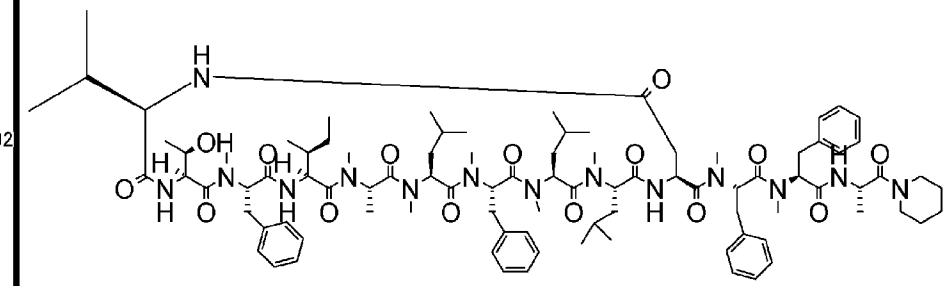
DP-272	
DP-271	
DP-270	
DP-269	

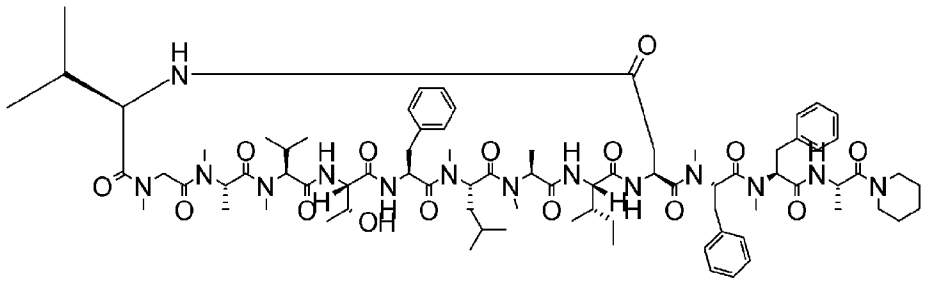
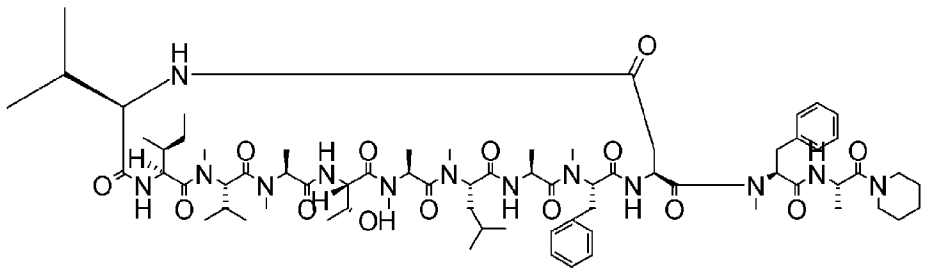
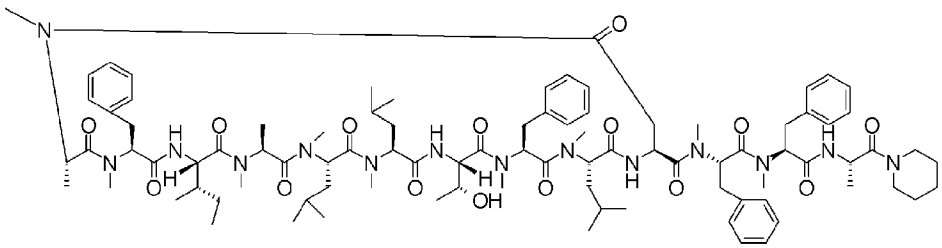
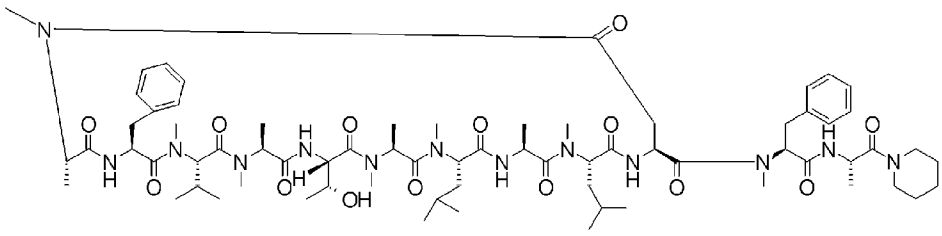
DP-273	 Chiral
DP-274	 Chiral
DP-275	 Chiral
DP-276	 Chiral

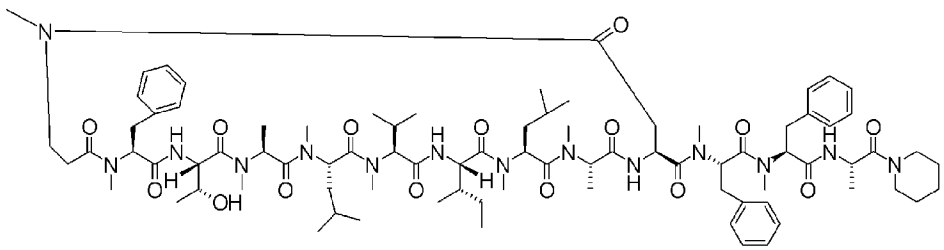
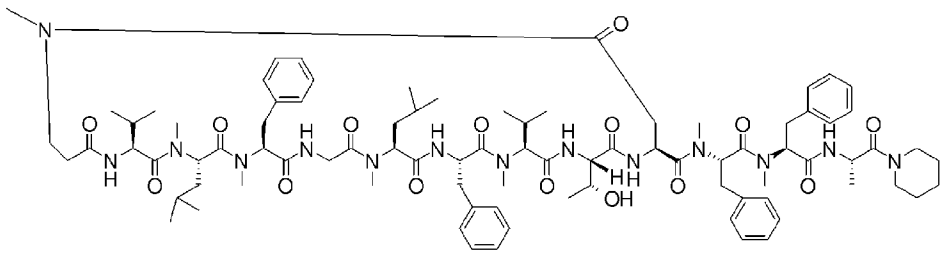
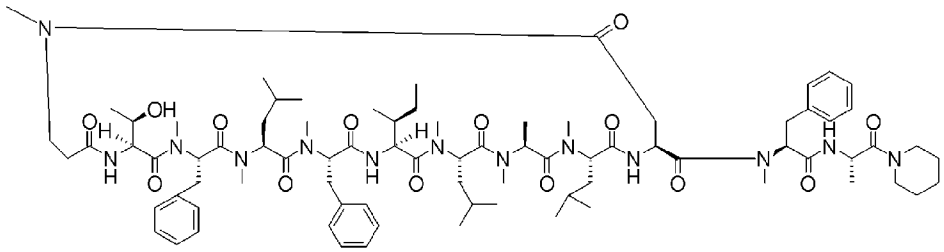
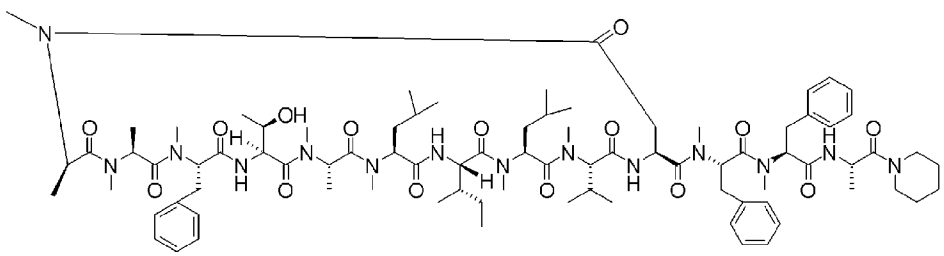
DP-277	 Chiral
DP-278	 Chiral
DP-279	 Chiral
DP-280	 Chiral

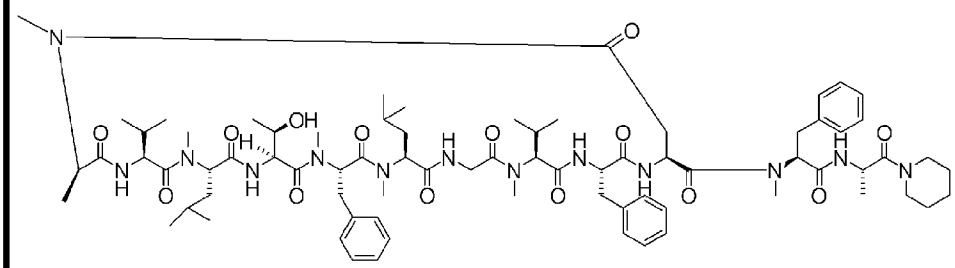
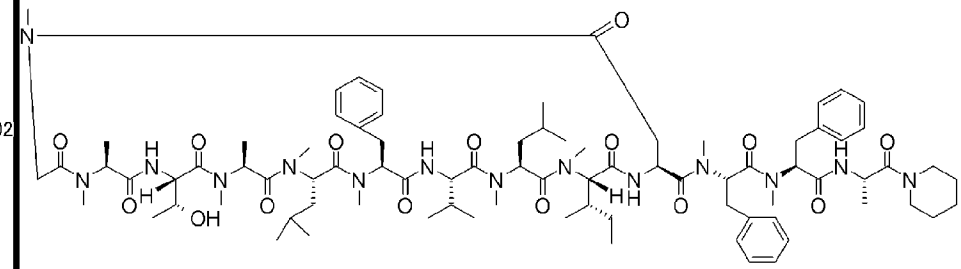
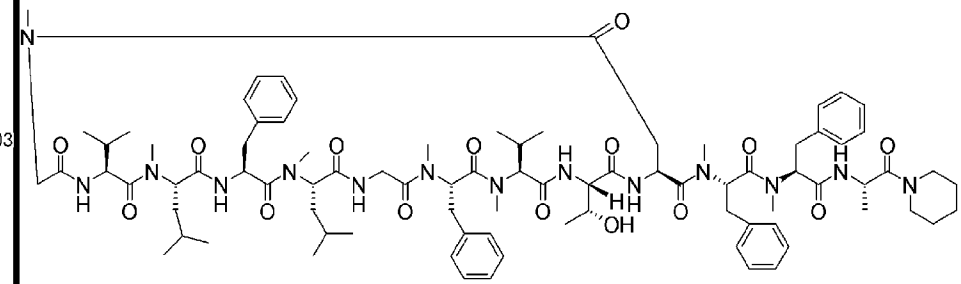
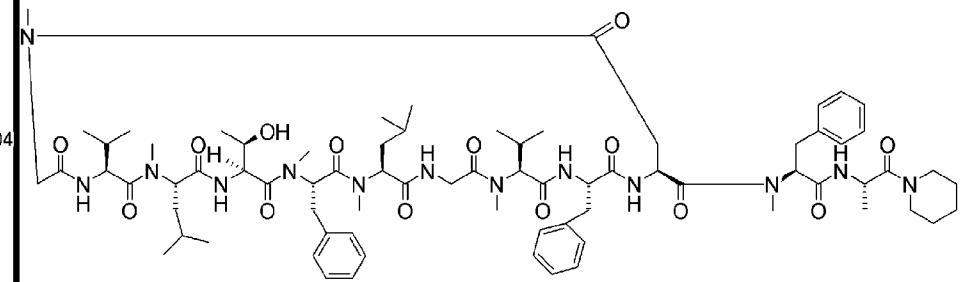
DP-281		Chiral
DP-282		Chiral
DP-283		Chiral
DP-284		Chiral

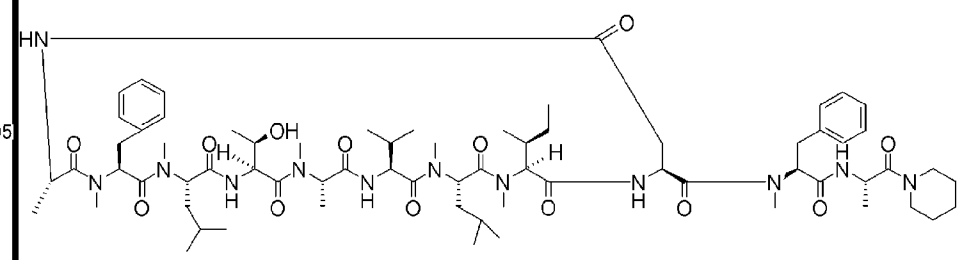
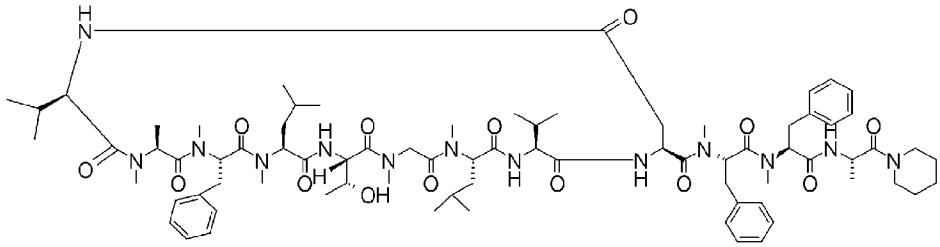
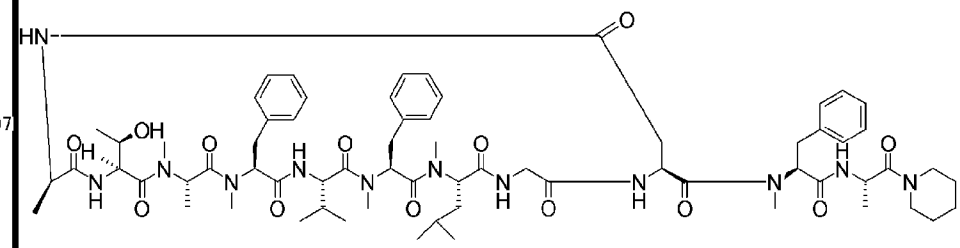
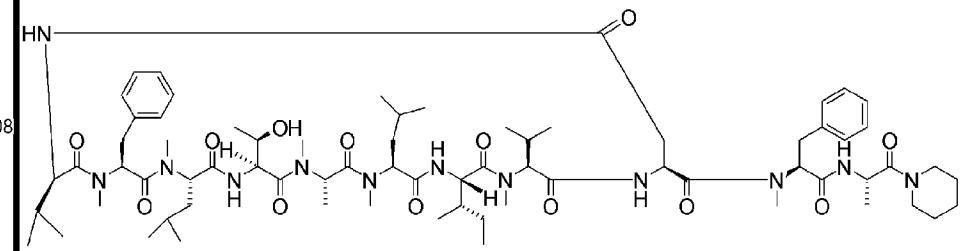
DP-285	 Chiral
DP-286	 Chiral
DP-287	 Chiral
DP-288	 Chiral

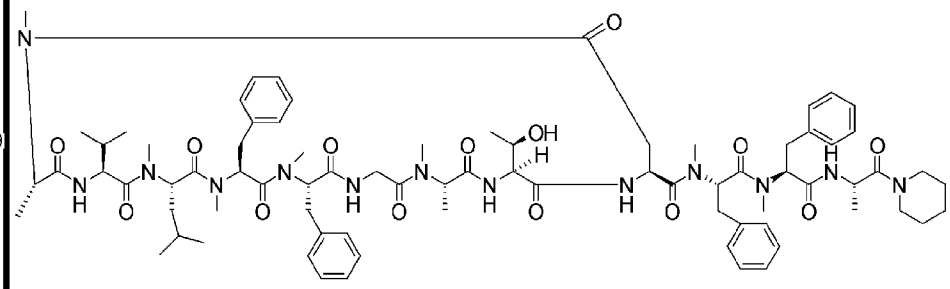
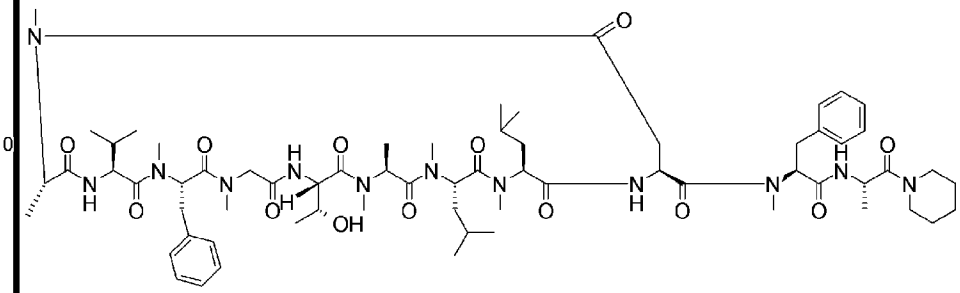
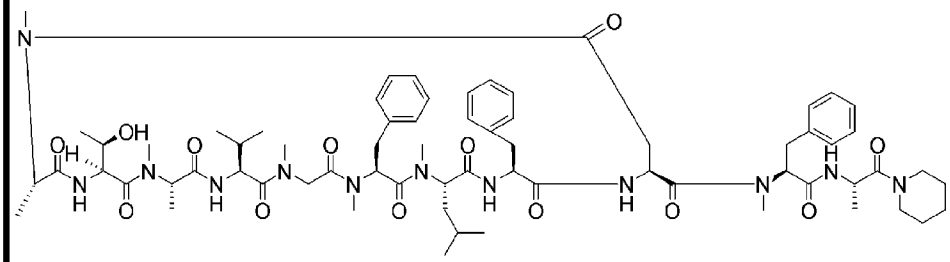
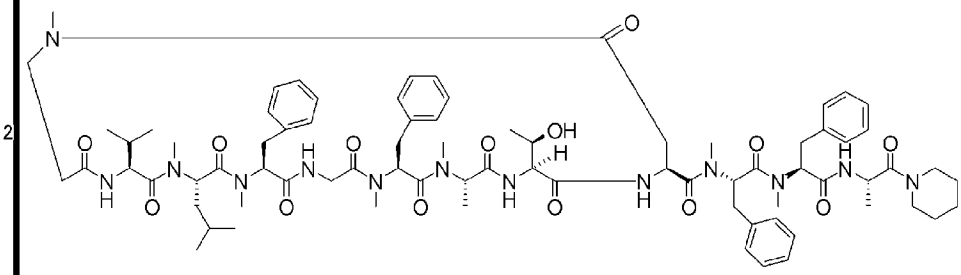
DP-289	 Chiral
DP-290	 Chiral
DP-291	 Chiral
DP-292	 Chiral

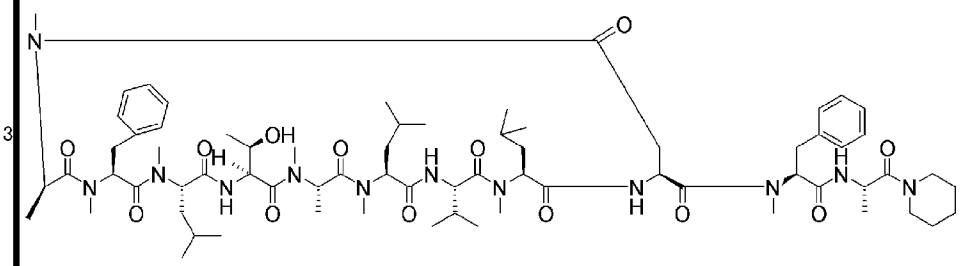
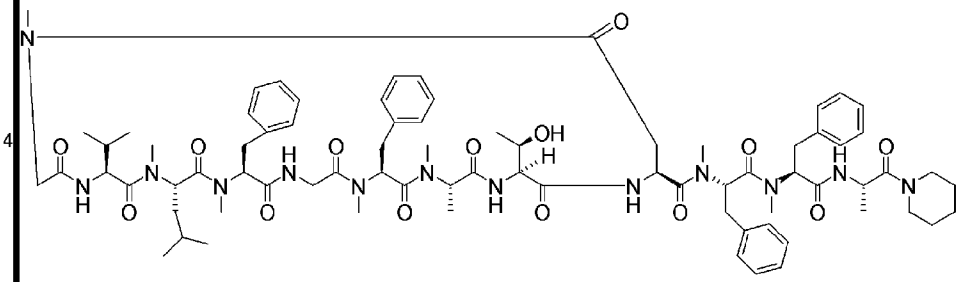
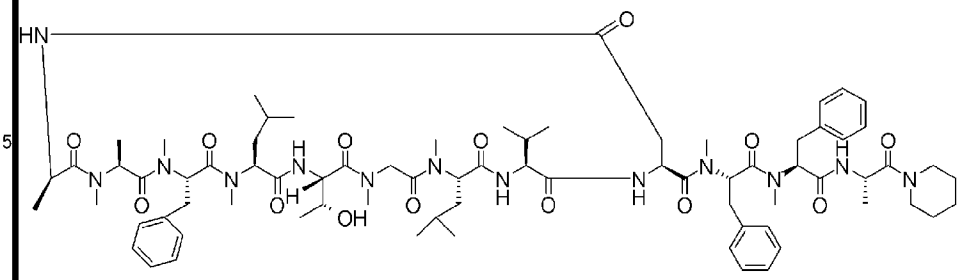
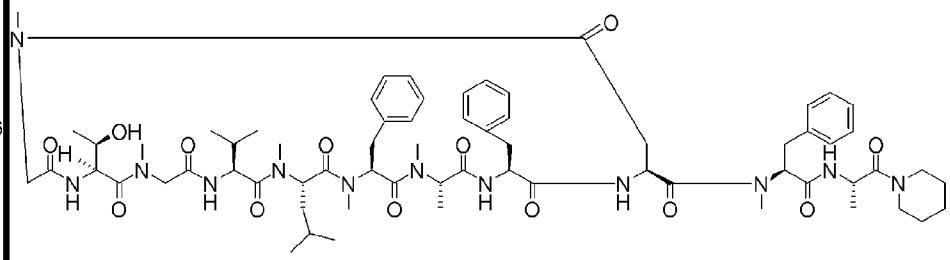
DP-293	 Chiral
DP-294	 Chiral
DP-295	 Chiral
DP-296	 Chiral

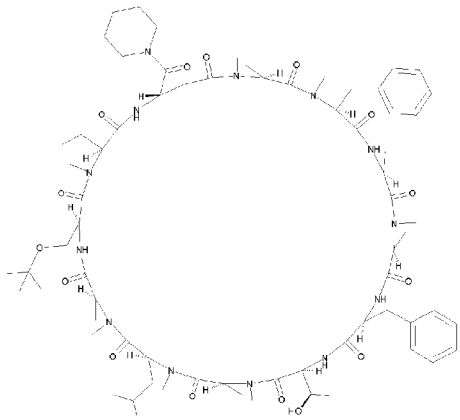
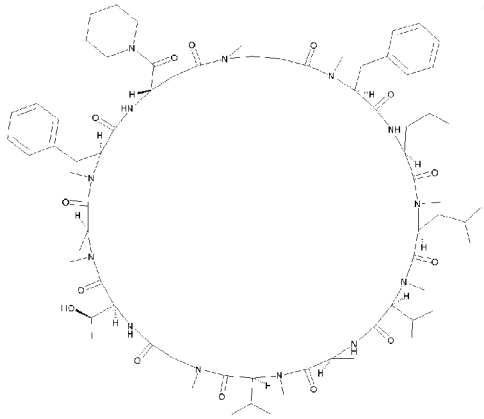
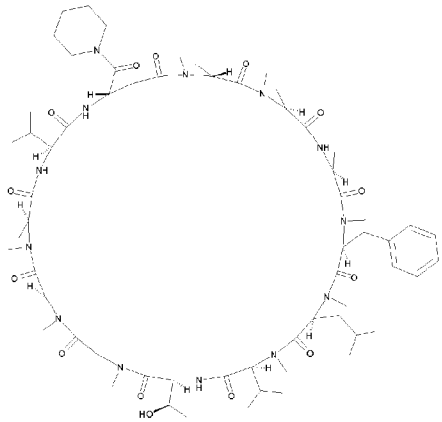
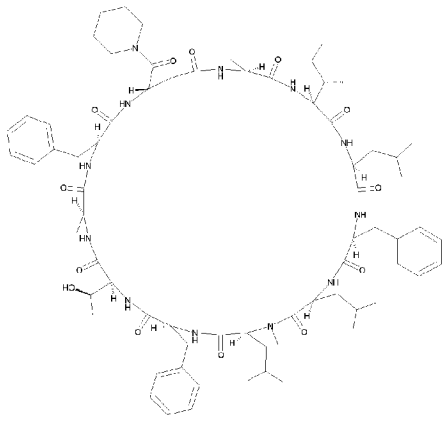
DP-297		Chiral
DP-298		Chiral
DP-299		Chiral
DP-300		Chiral

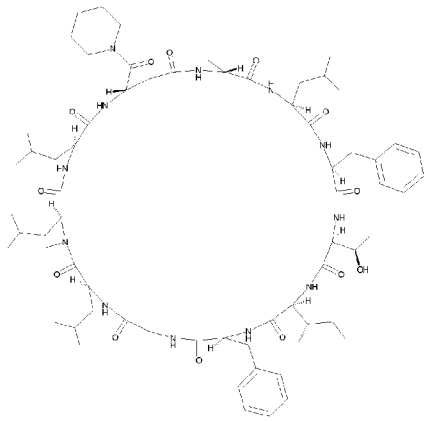
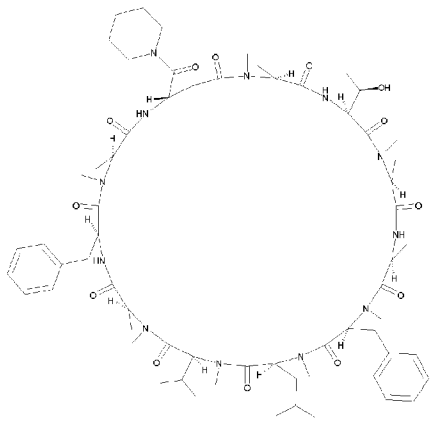
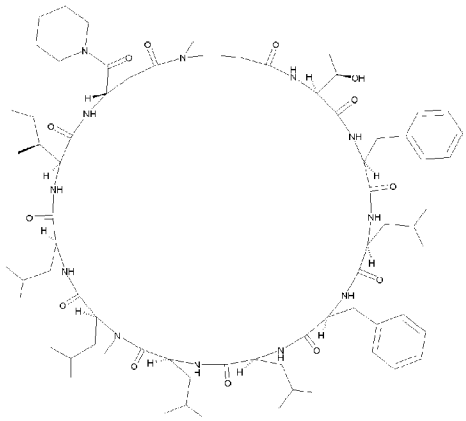
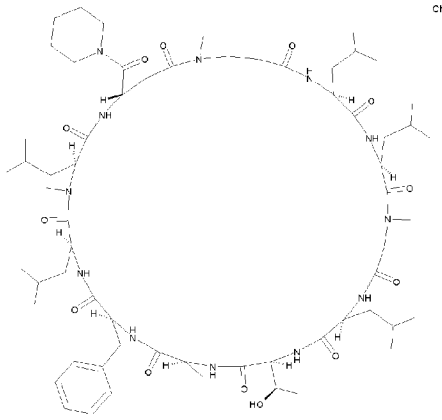
DP-301	 Chiral
DP-302	 Chiral
DP-303	 Chiral
DP-304	 Chiral

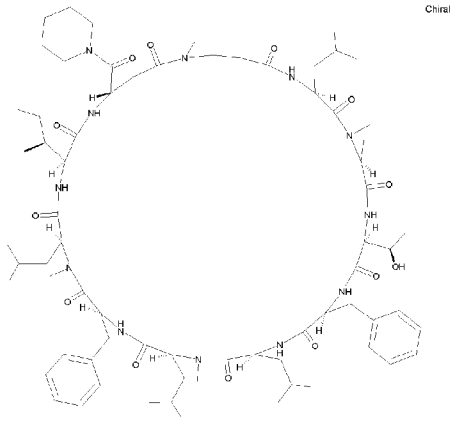
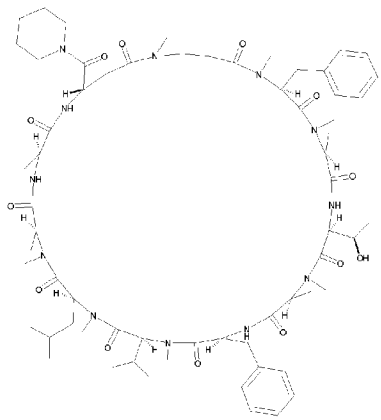
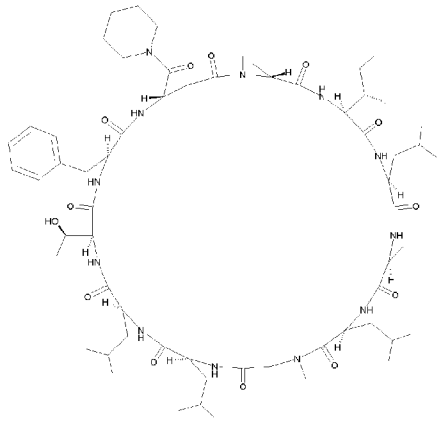
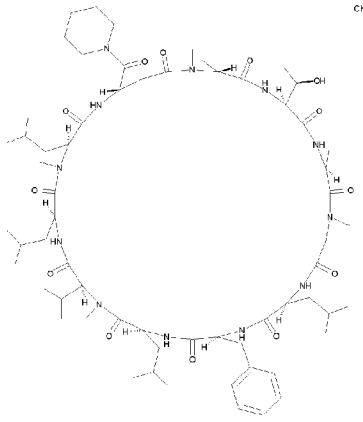
DP-305		Chiral
DP-306		Chiral
DP-307		Chiral
DP-308		Chiral

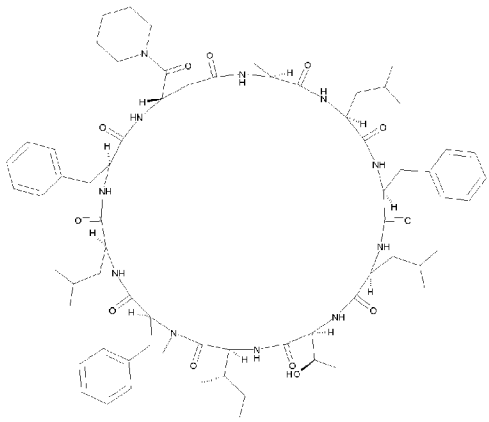
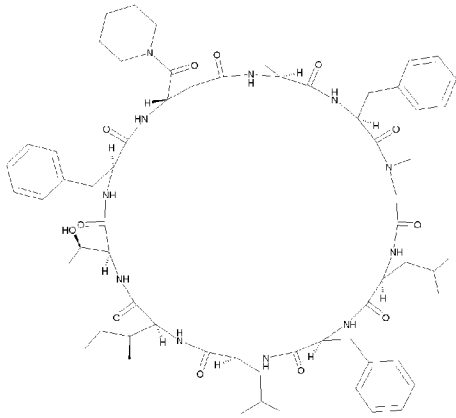
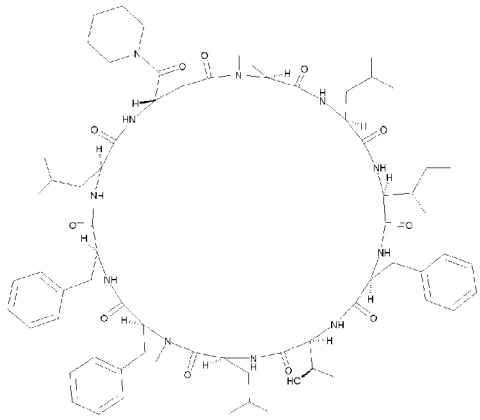
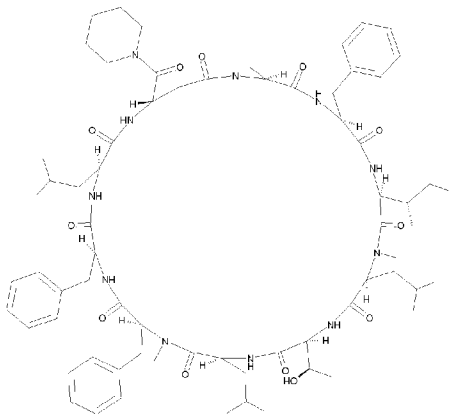
DP-309		Chiral
DP-310		Chiral
DP-311		Chiral
DP-312		Chiral

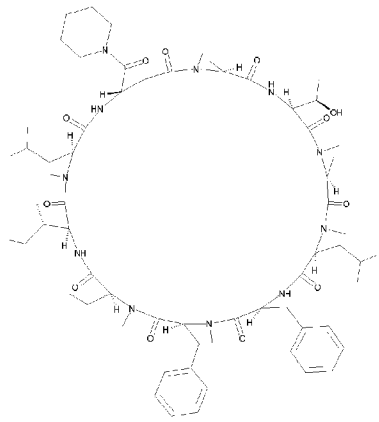
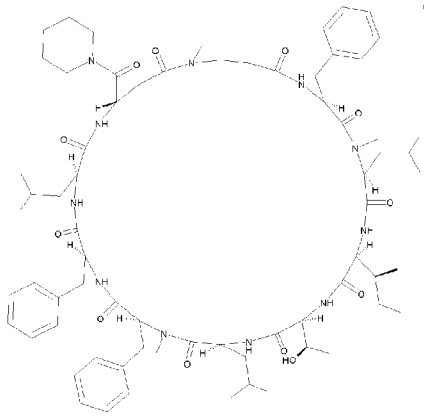
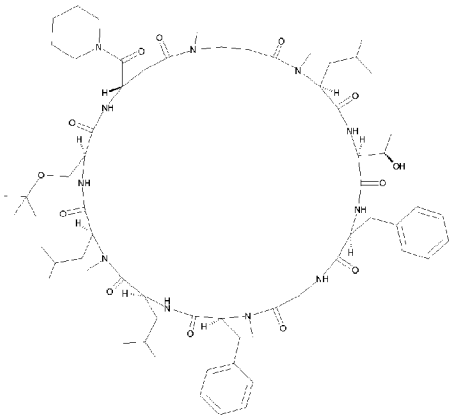
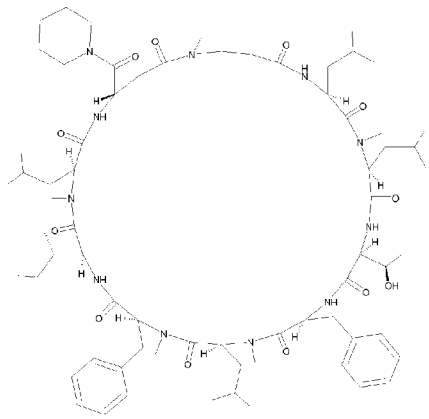
DP-313	 Chiral
DP-314	 Chiral
DP-315	 Chiral
DP-316	 Chiral

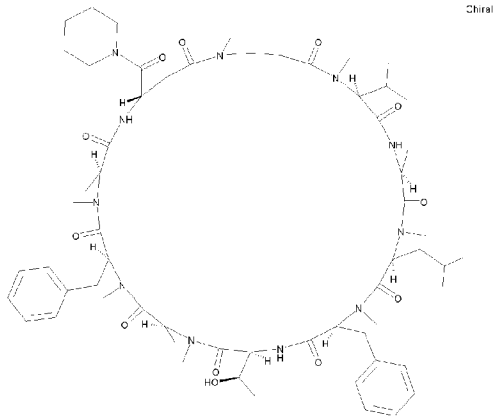
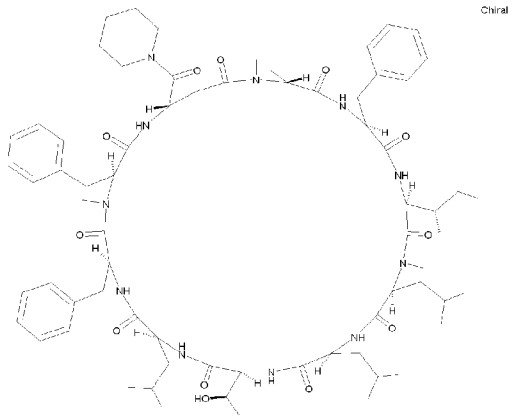
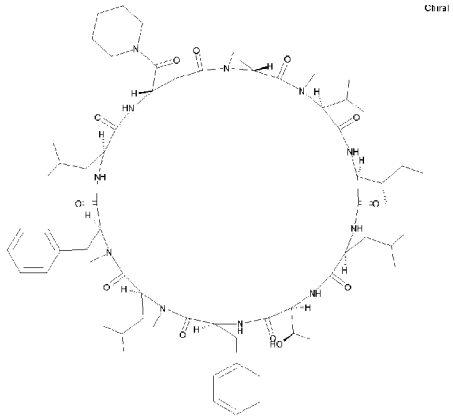
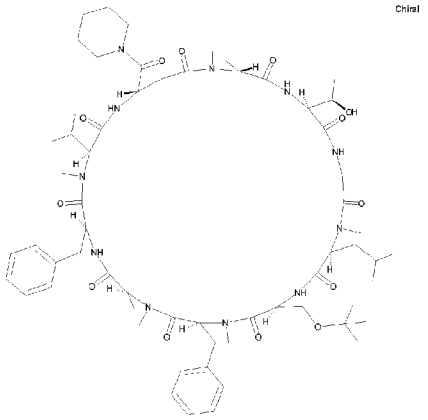
DP-317	
DP-318	
DP-319	
DP-320	

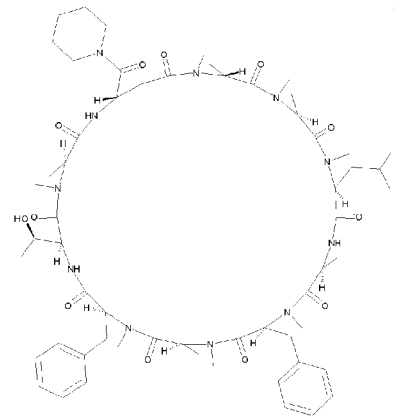
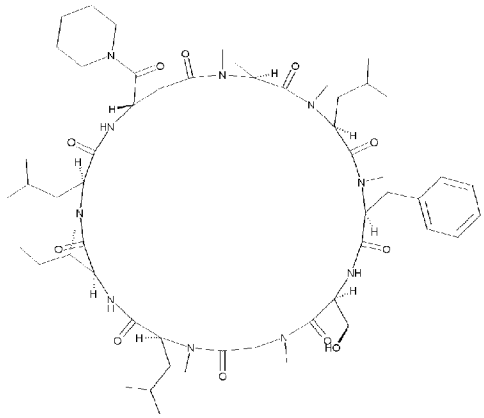
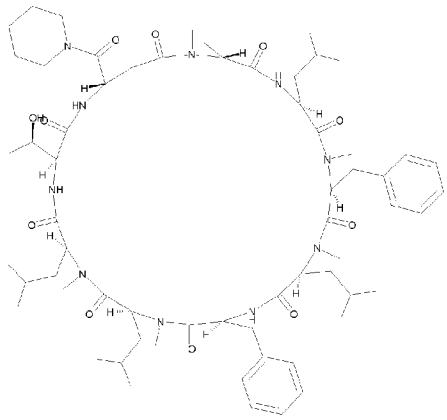
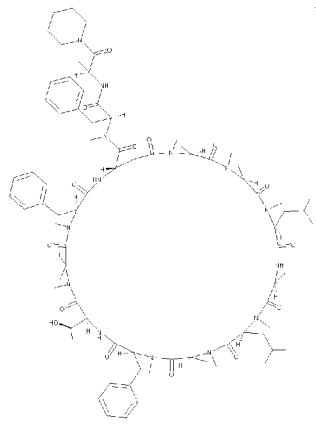
DP-321	
DP-322	
DP-323	
DP-324	

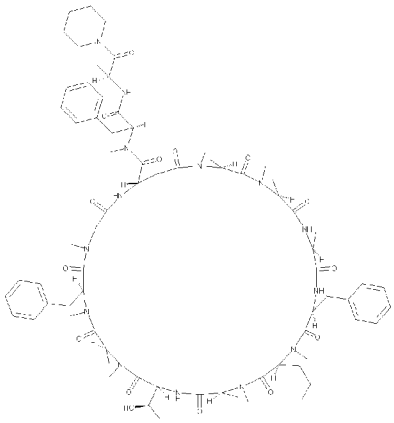
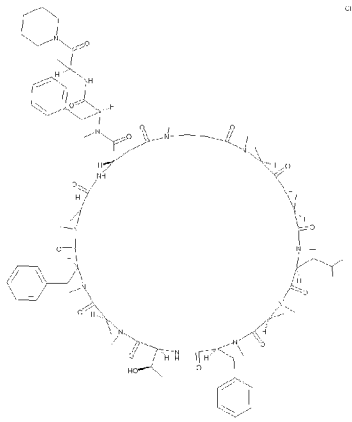
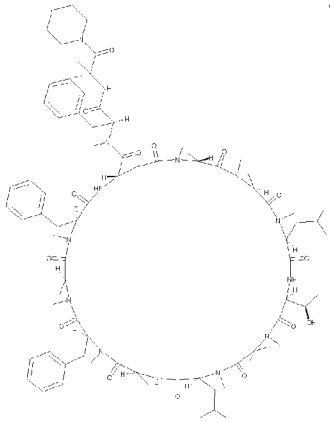
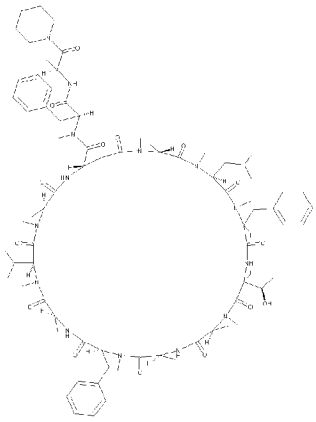
DP-325	
DP-326	
DP-327	
DP-328	

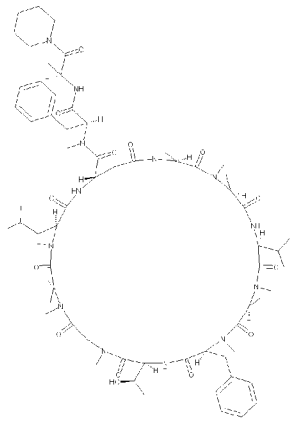
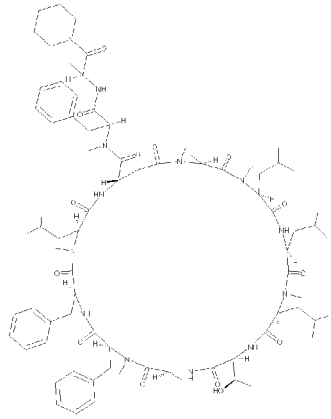
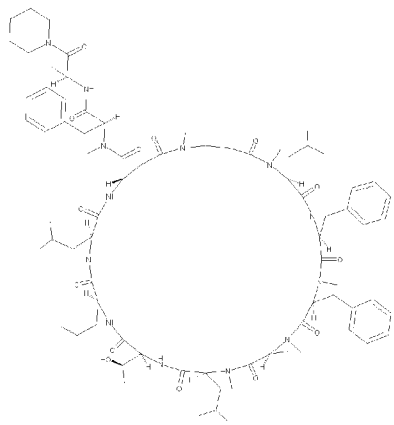
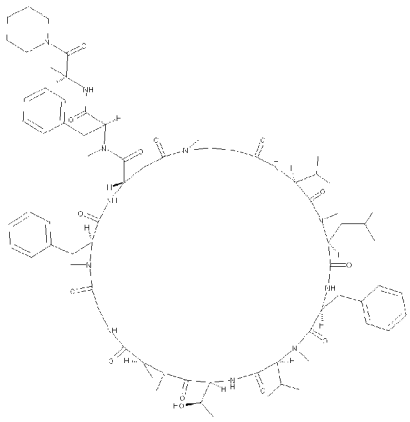
DP-329	
DP-330	
DP-331	
DP-332	

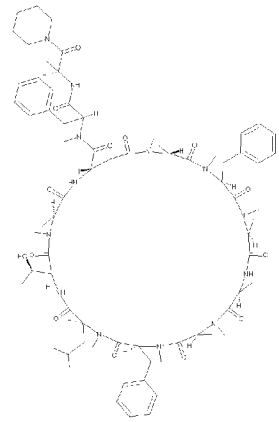
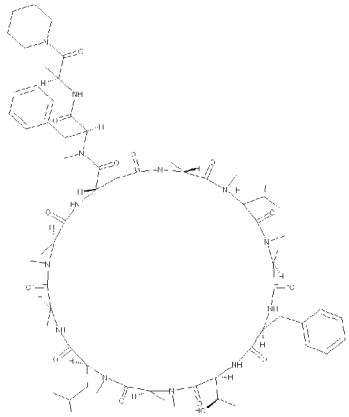
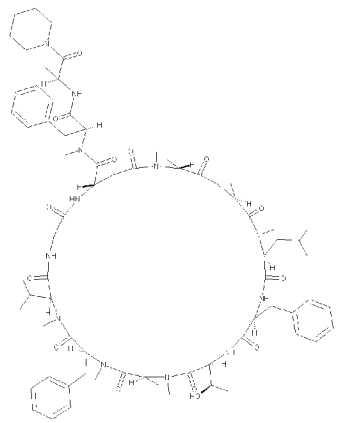
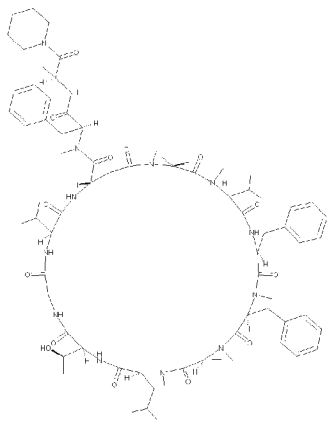
DP-333	
DP-334	
DP-335	
DP-336	

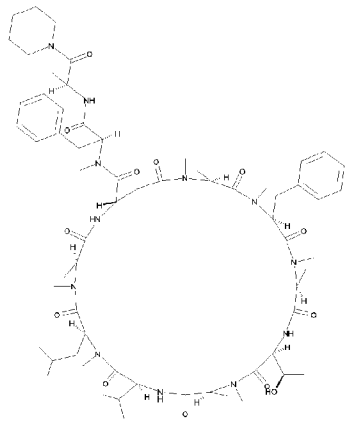
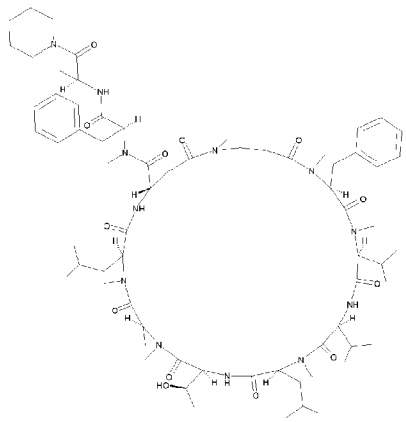
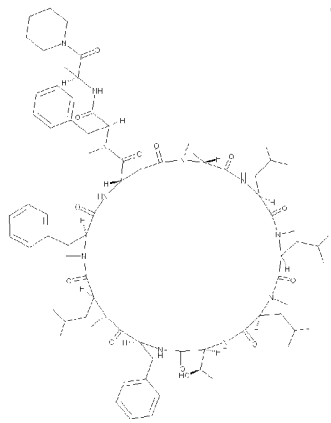
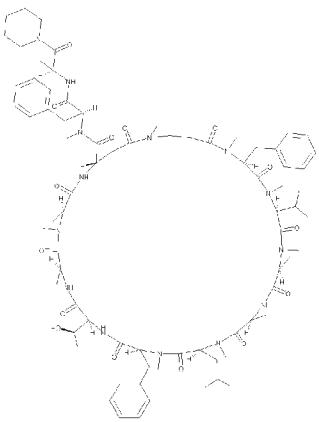
DP-337	
DP-338	
DP-339	
DP-340	

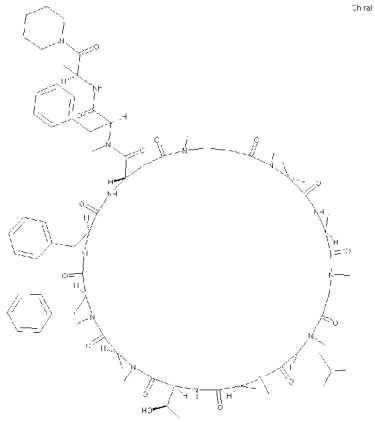
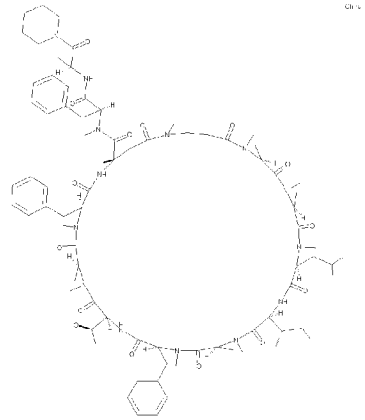
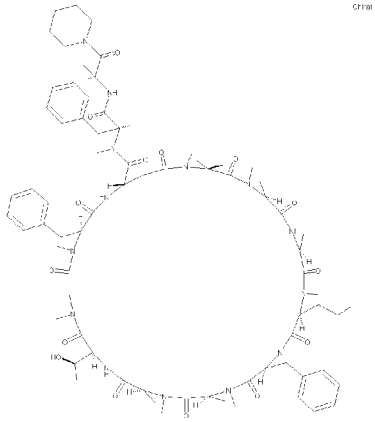
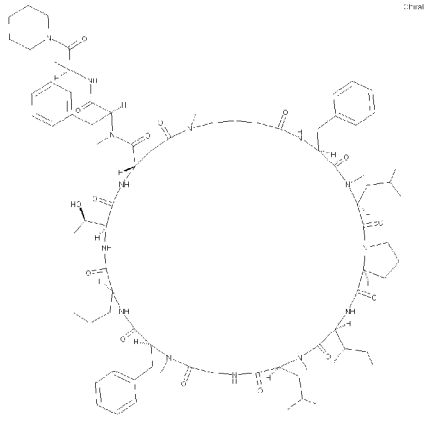
DP-341	
DP-342	
DP-343	
DP-344	

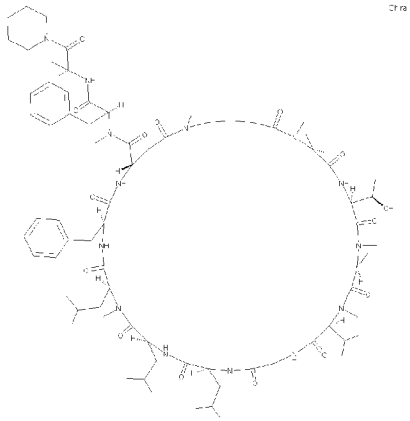
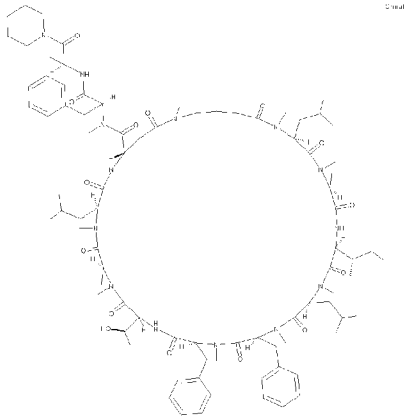
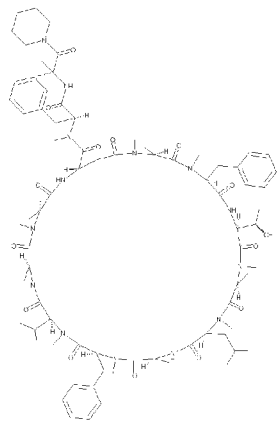
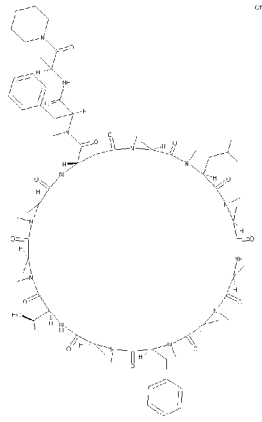
DP-345	
DP-346	
DP-347	
DP-348	

DP-349	
DP-350	
DP-351	
DP-352	

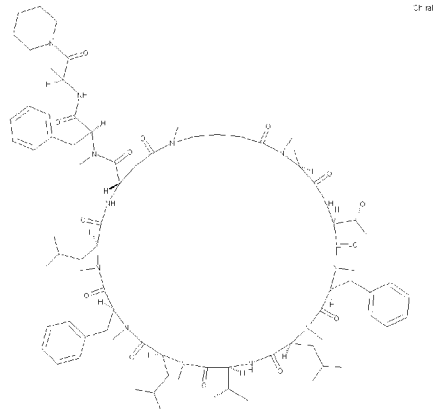
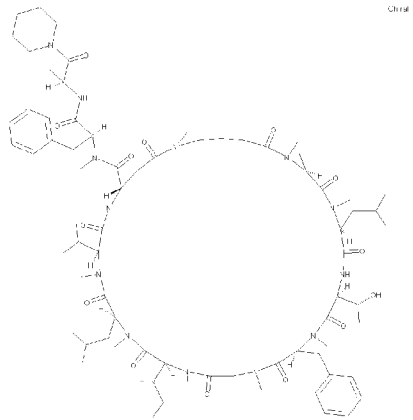
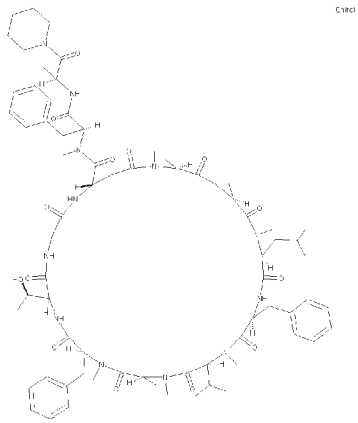
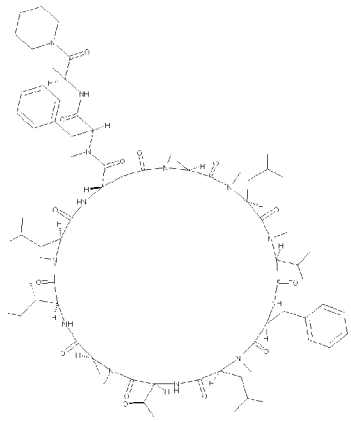
DP-353	
DP-354	
DP-355	
DP-356	

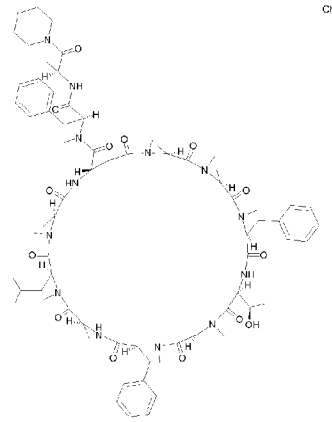
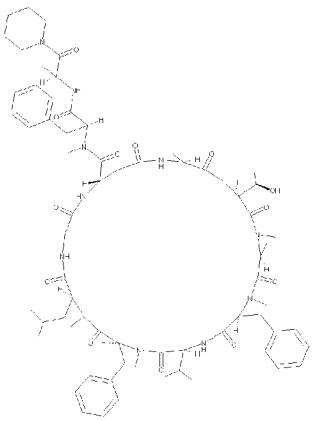
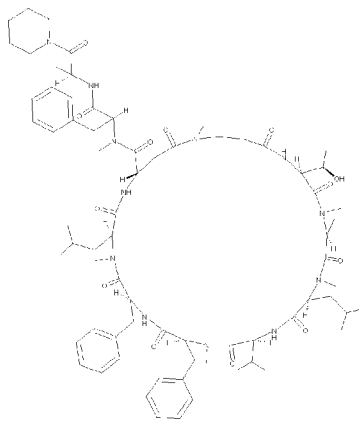
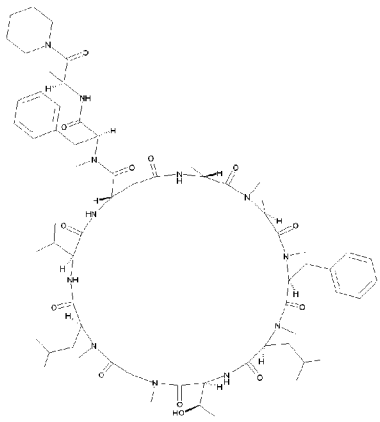
DP-357	
DP-358	
DP-359	
DP-360	

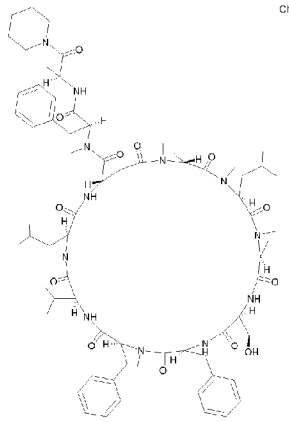
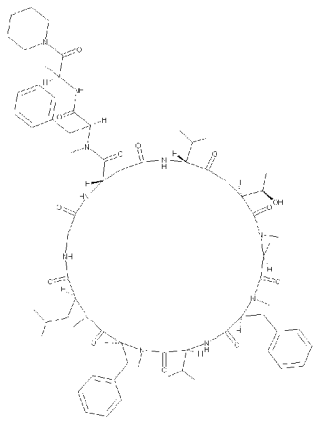
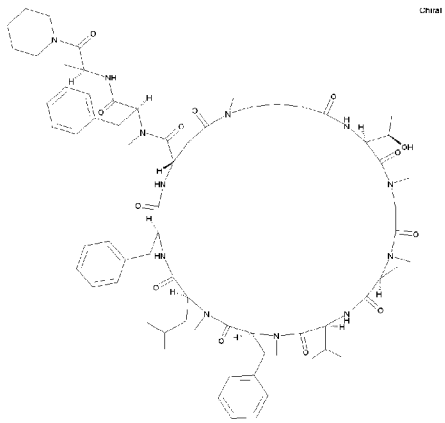
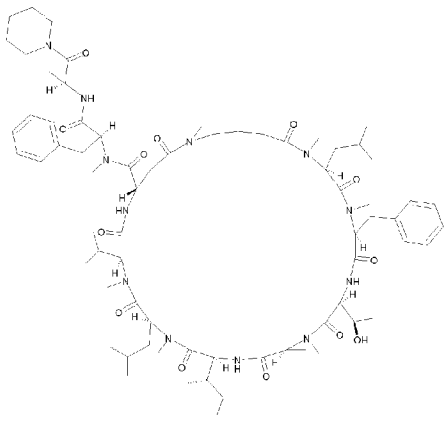
DP-361	
DP-362	
DP-363	
DP-364	

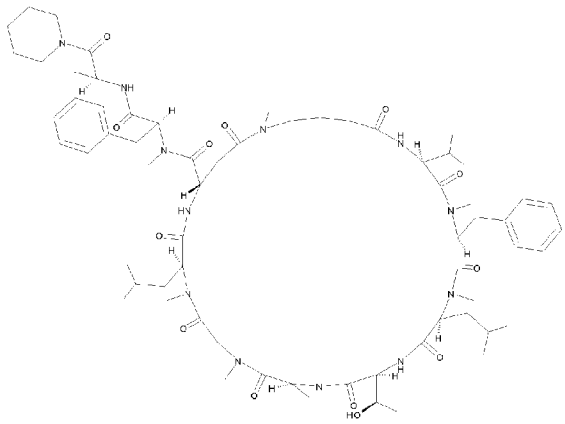
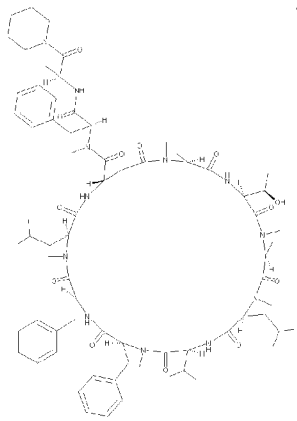
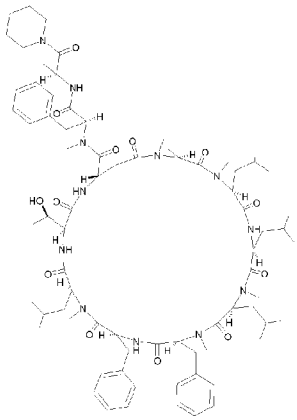
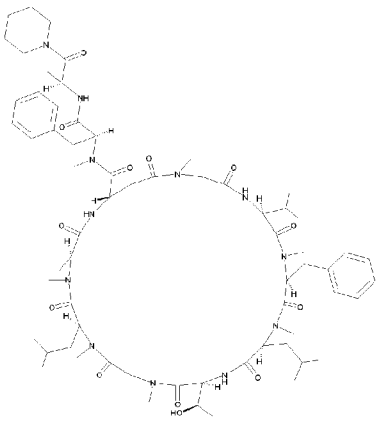
DP-365	
DP-366	
DP-367	
DP-368	

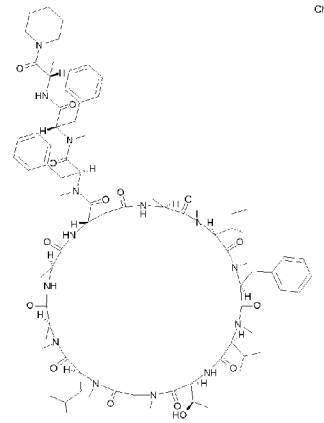
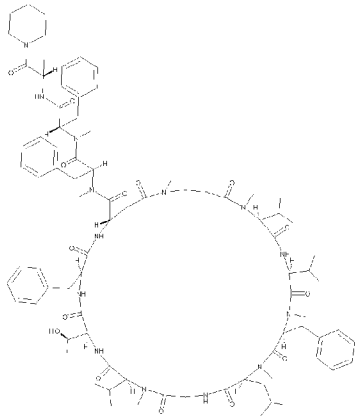
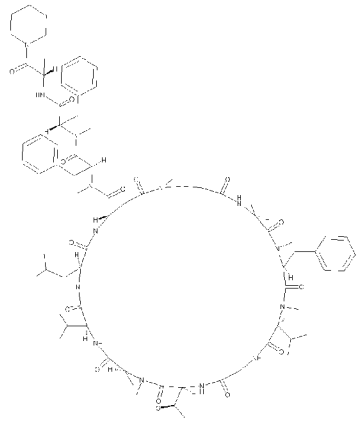
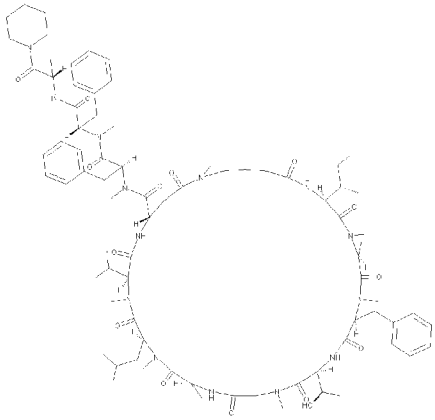
DP-372	
DP-371	
DP-370	
DP-369	

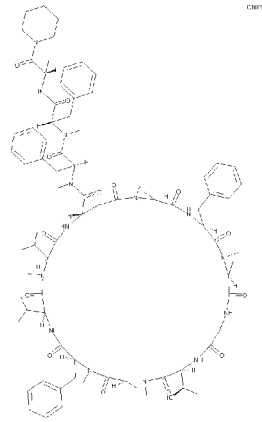
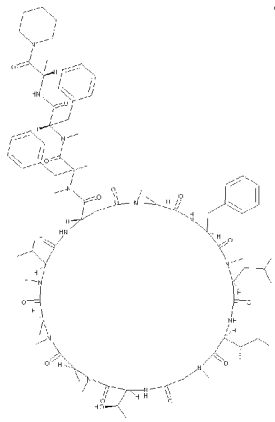
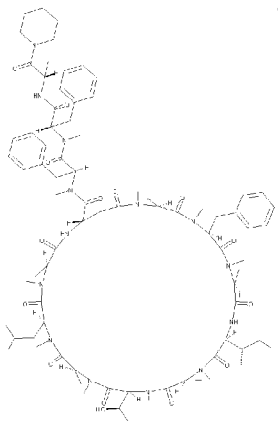
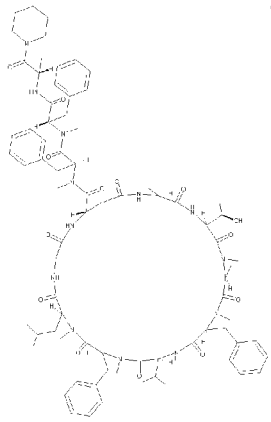
DP-373	
DP-374	
DP-375	
DP-376	

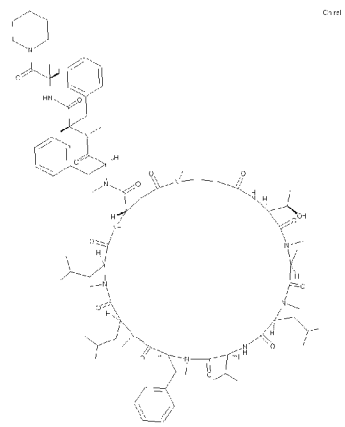
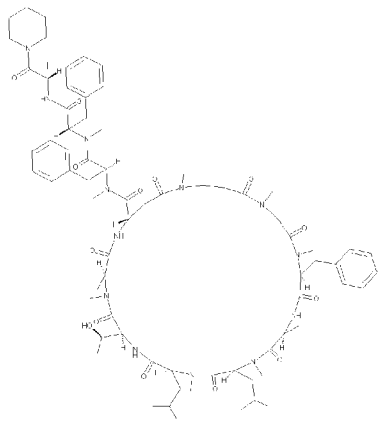
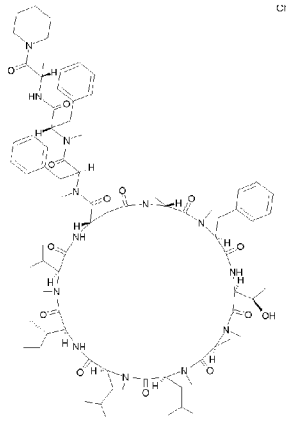
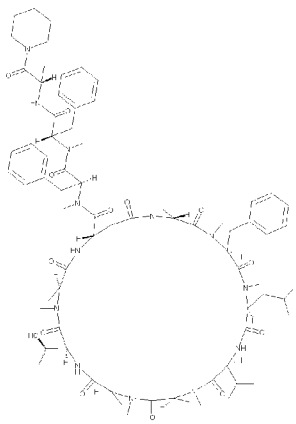
DP-377	
DP-378	
DP-379	
DP-380	

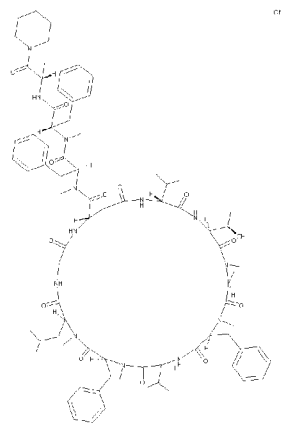
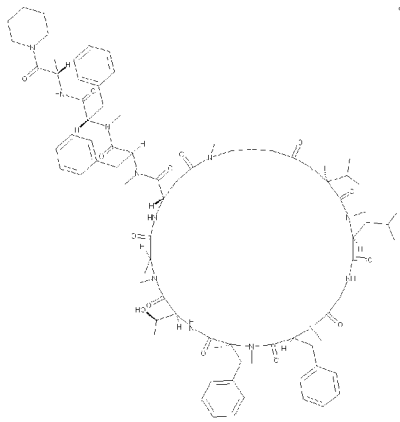
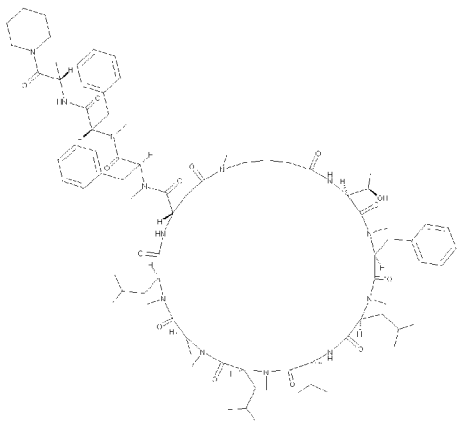
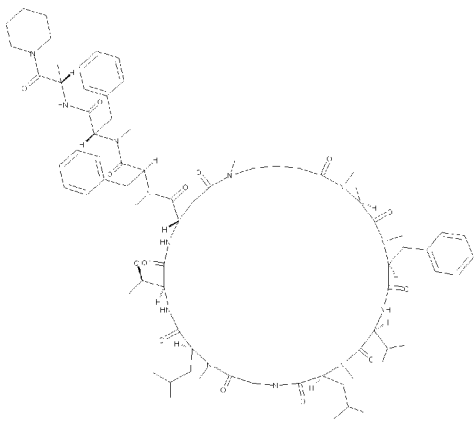
DP-381	
DP-382	
DP-383	
DP-384	

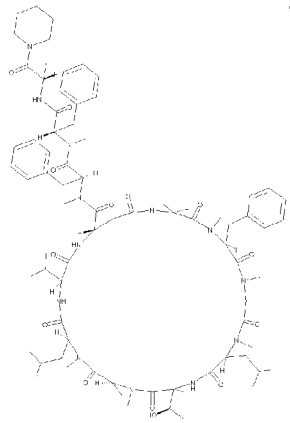
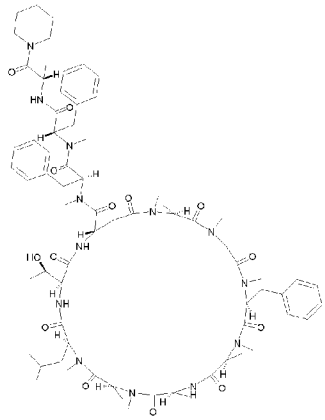
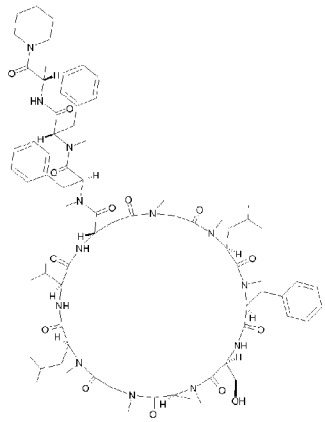
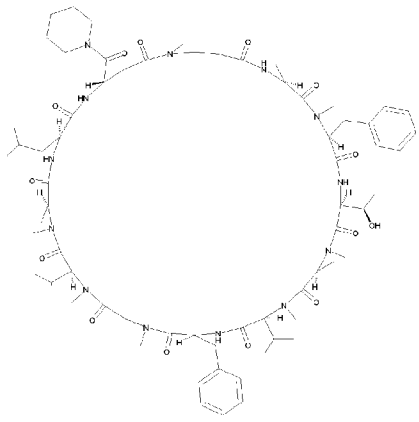
DP-385	
DP-386	
DP-387	
DP-388	

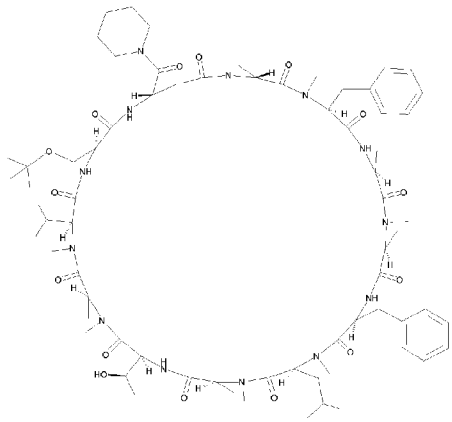
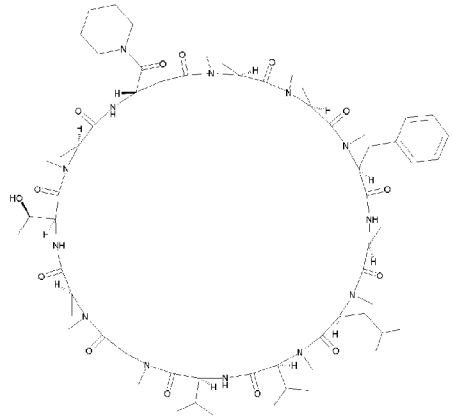
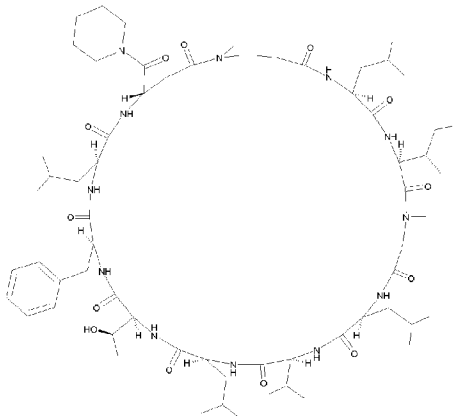
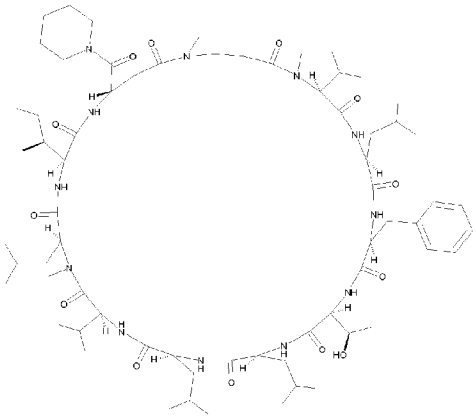
DP-389	
DP-390	
DP-391	
DP-392	

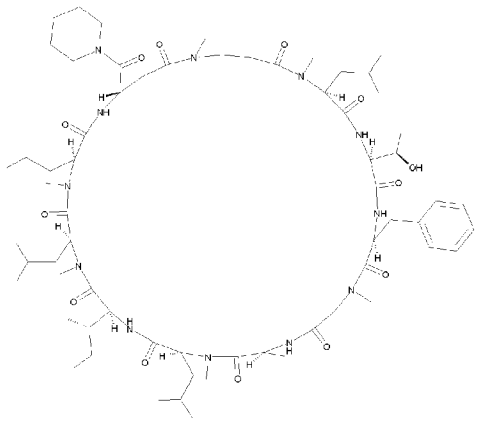
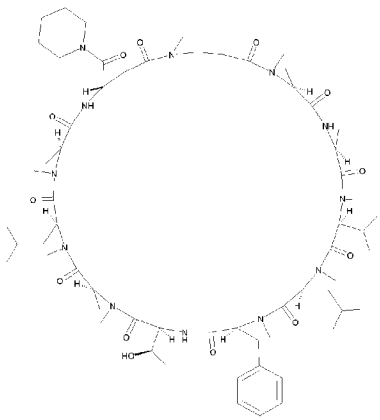
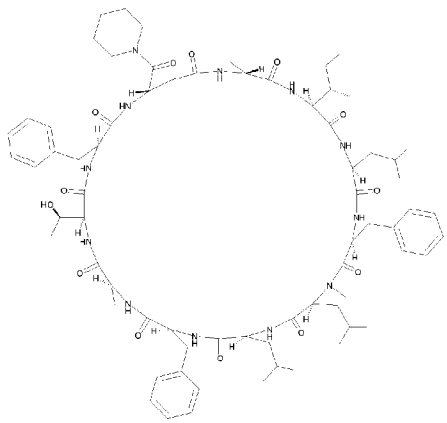
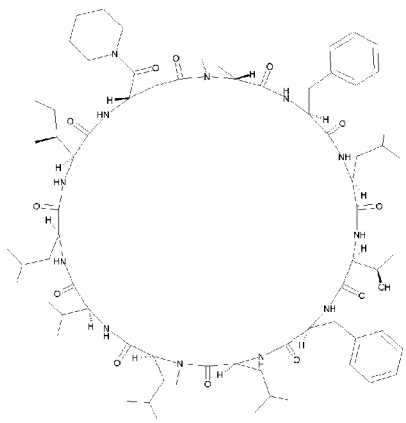
DP-393	
DP-394	
DP-395	
DP-396	

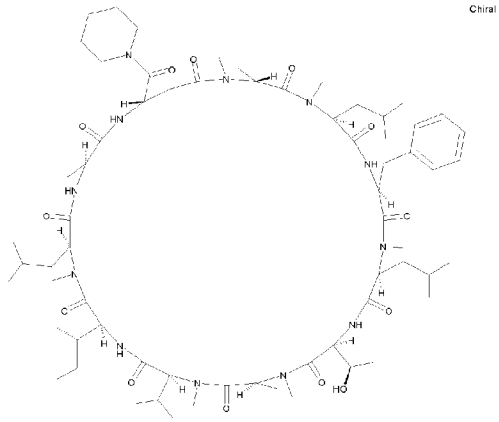
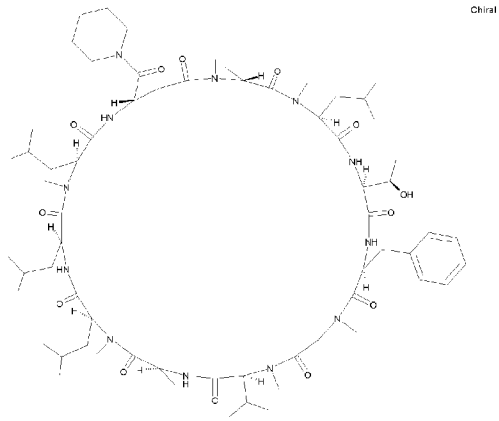
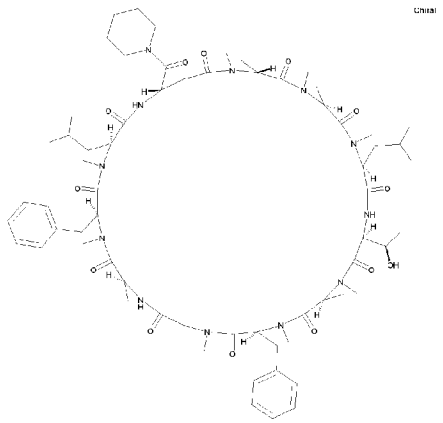
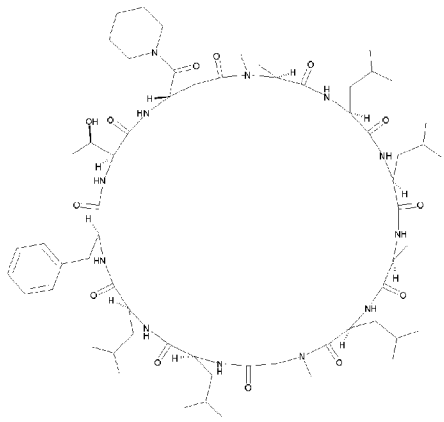
DP-397	
DP-398	
DP-399	
DP-400	

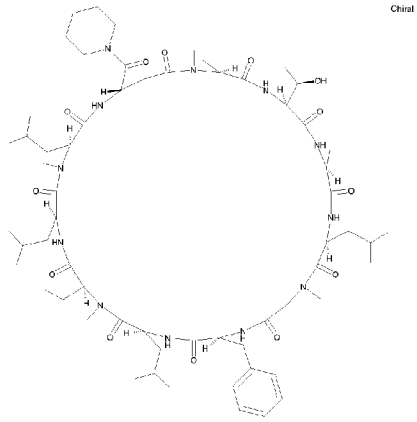
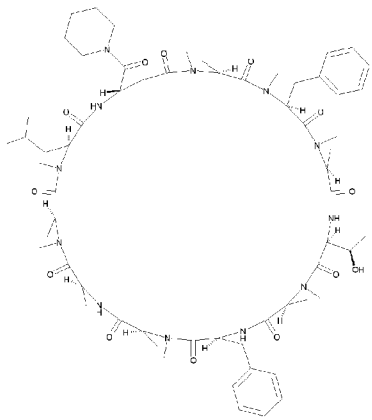
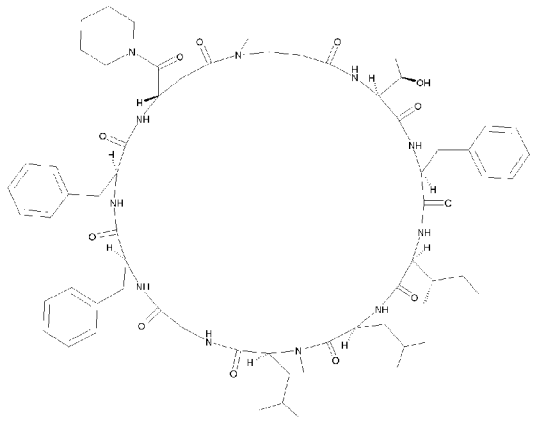
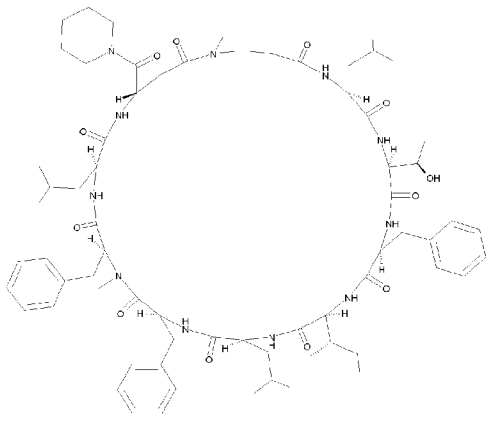
DP-401	
DP-402	
DP-403	
DP-404	

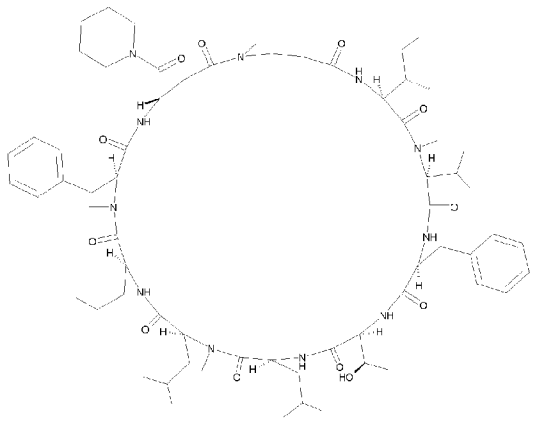
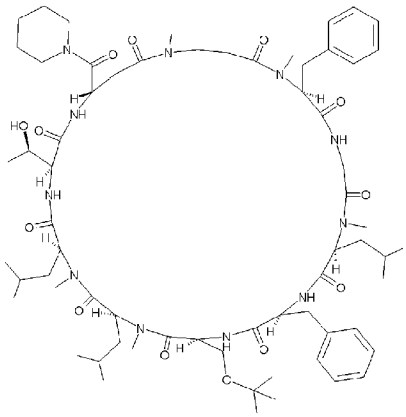
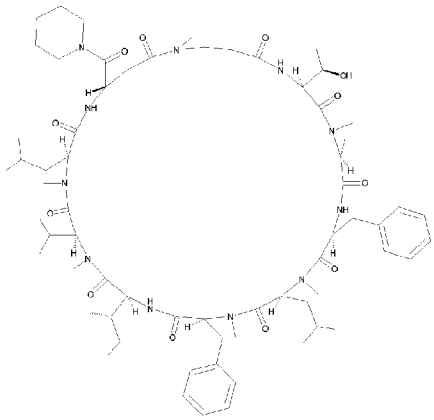
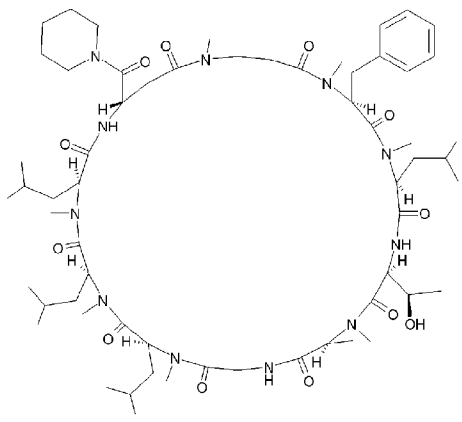
DP-405	
DP-406	
DP-407	
DP-408	

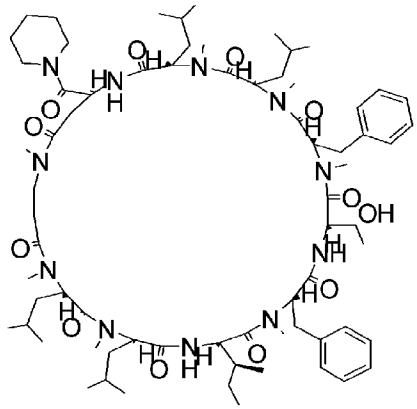
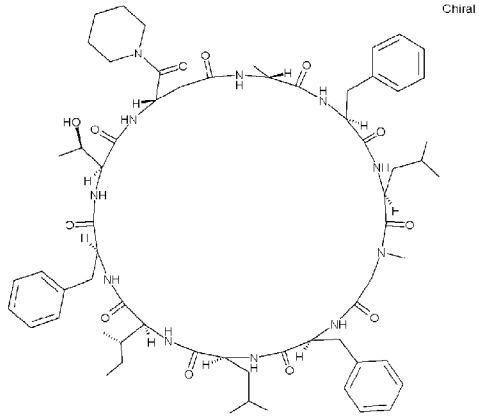
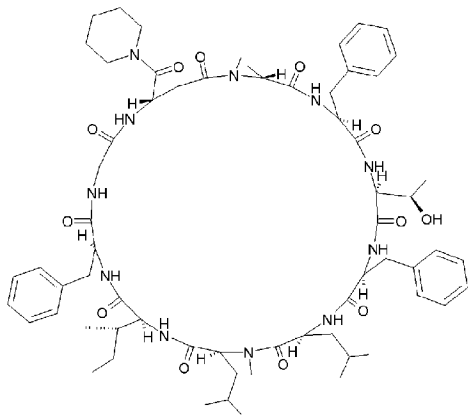
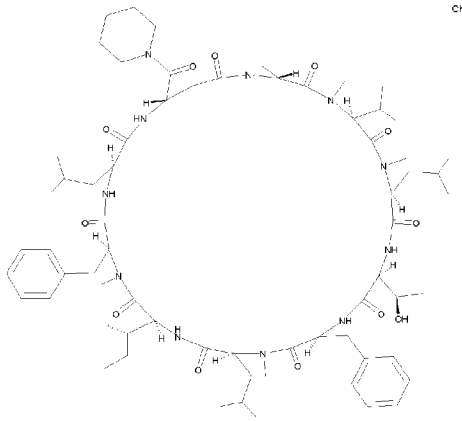
DP-409	
DP-410	
DP-411	
DP-412	

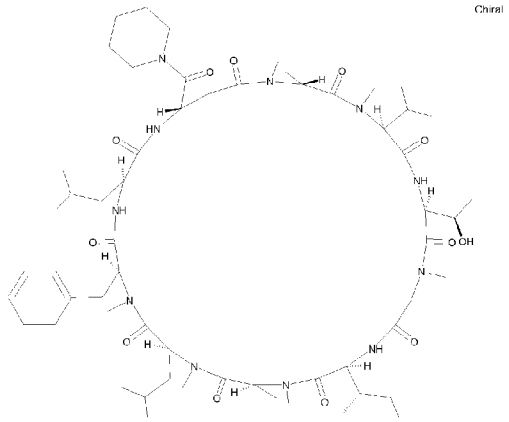
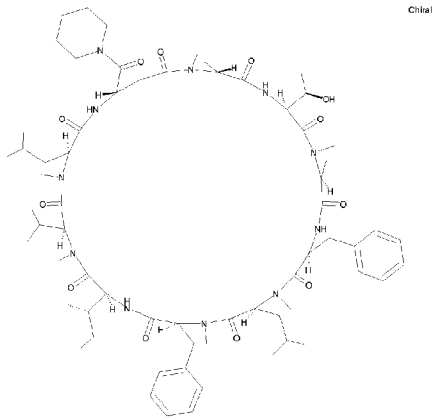
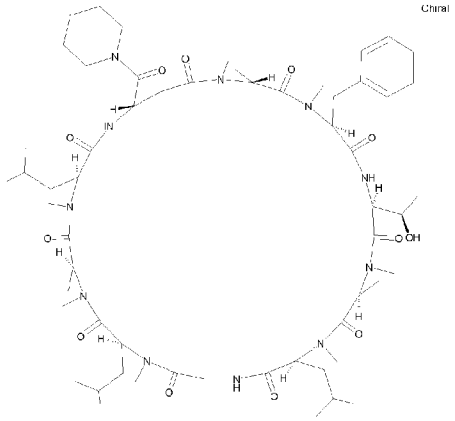
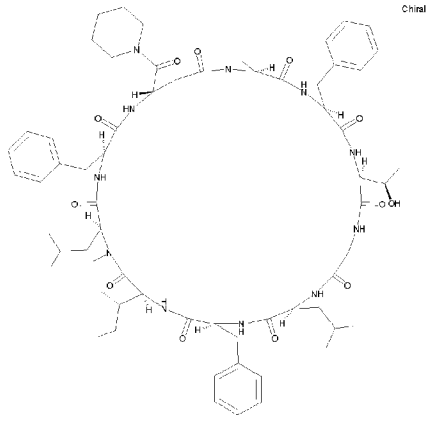
DP-413	
DP-414	
DP-415	
DP-416	

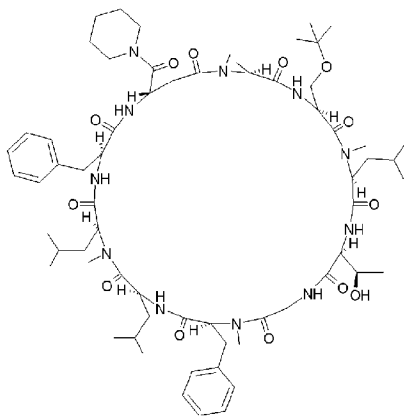
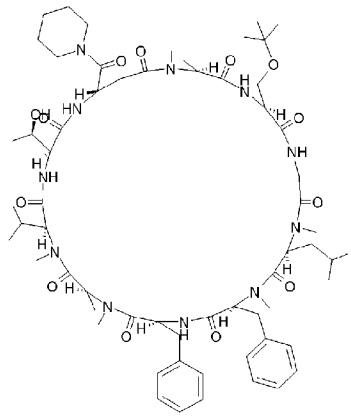
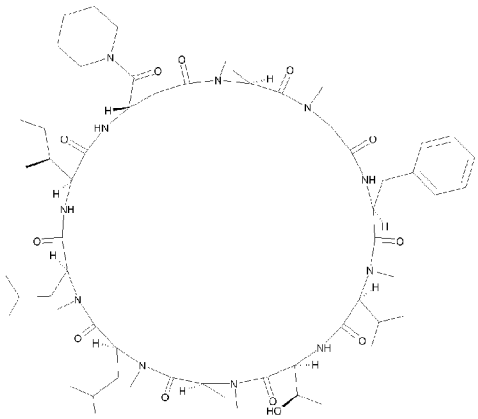
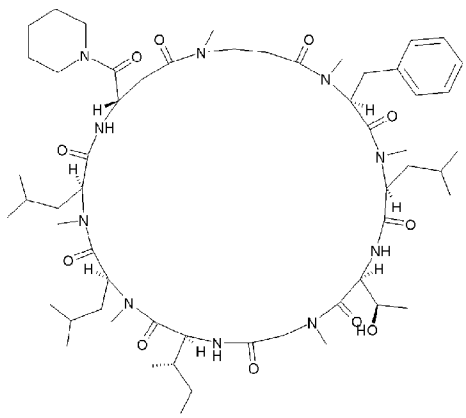
DP-417	
DP-418	
DP-419	
DP-420	

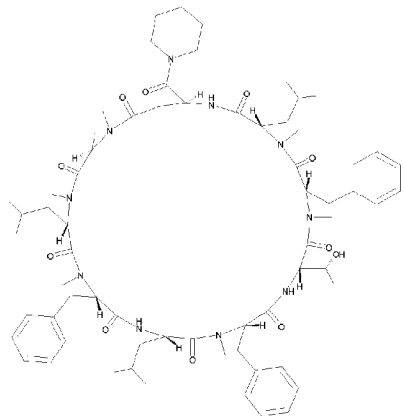
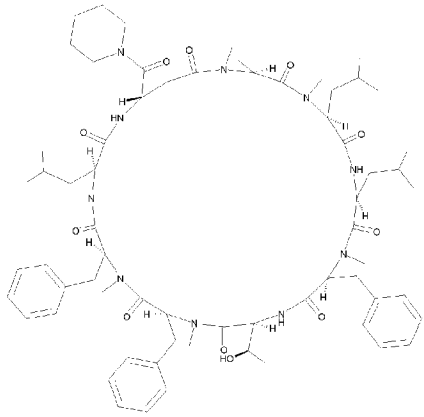
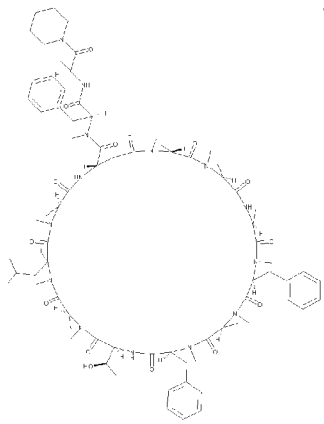
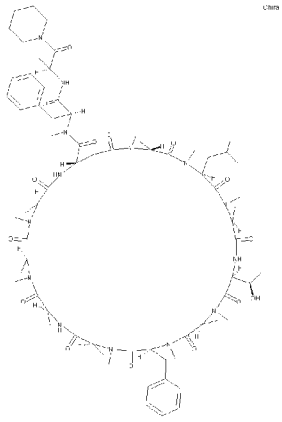
DP-421	
DP-422	
DP-423	
DP-424	

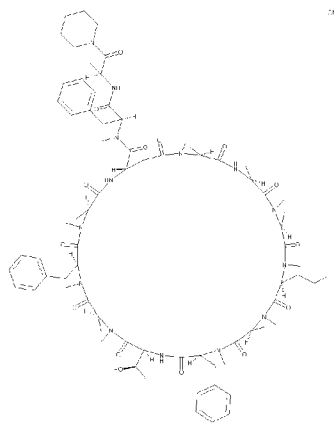
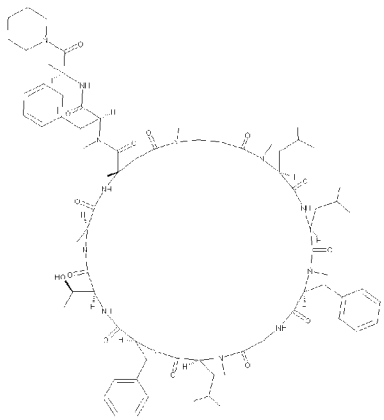
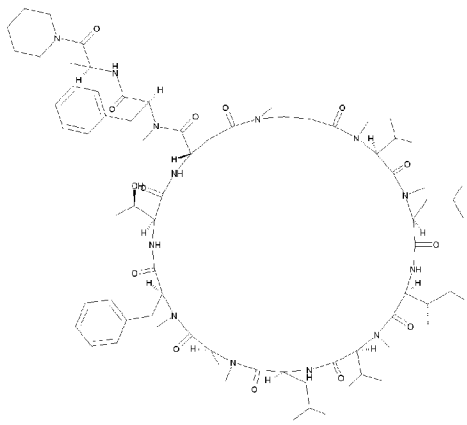
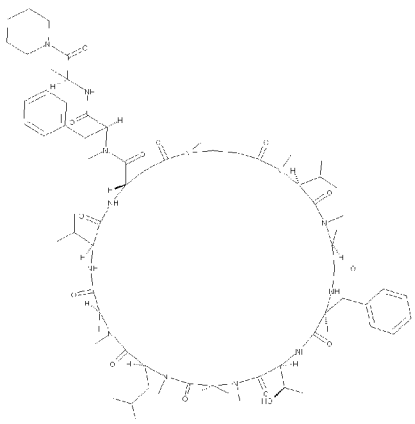
DP-425	 Chiral
DP-426	 Chiral
DP-427	 Chiral
DP-428	 Chiral

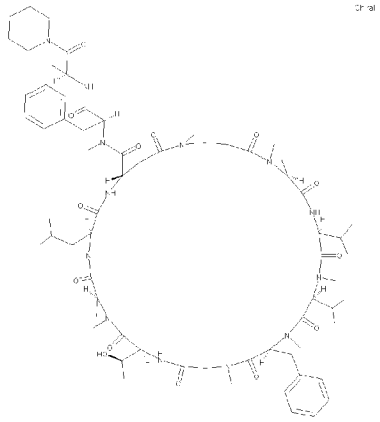
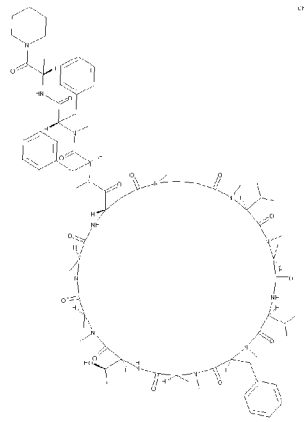
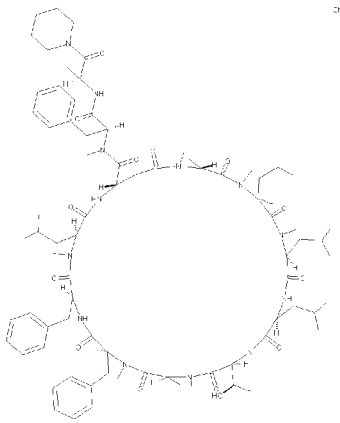
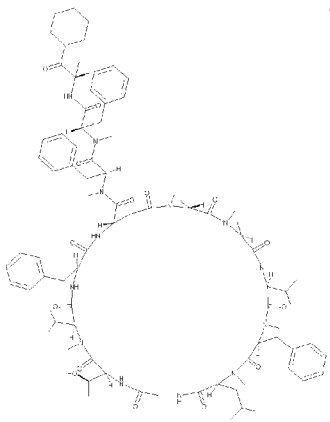
DP-429	
DP-430	
DP-431	
DP-432	

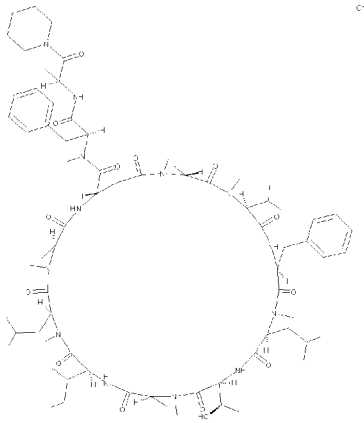
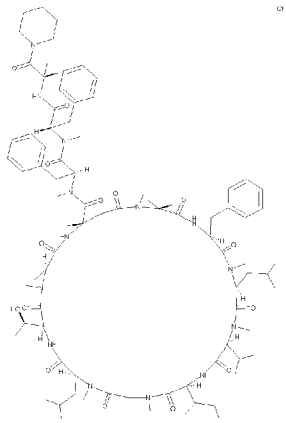
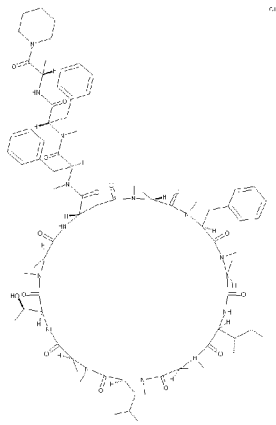
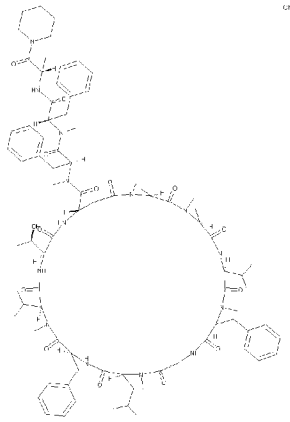
DP-433	
DP-434	
DP-435	
DP-436	

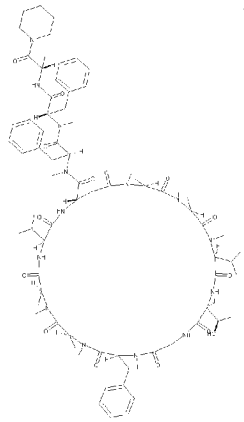
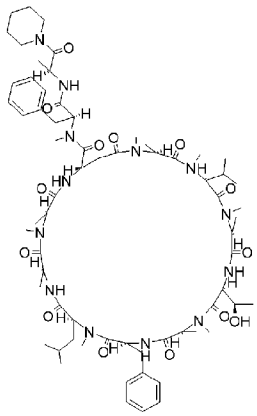
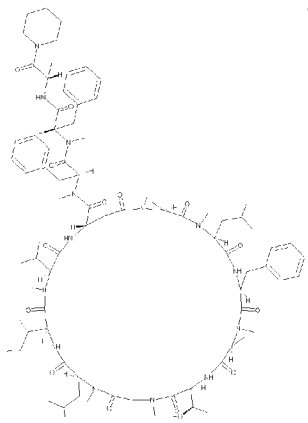
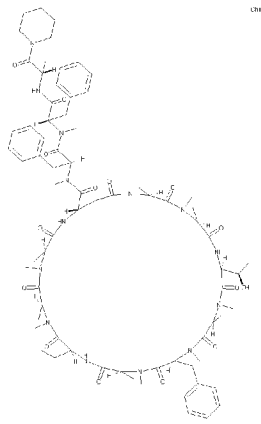
DP-437	 Chiral
DP-438	 Chiral
DP-439	 Chiral
DP-440	 Chiral

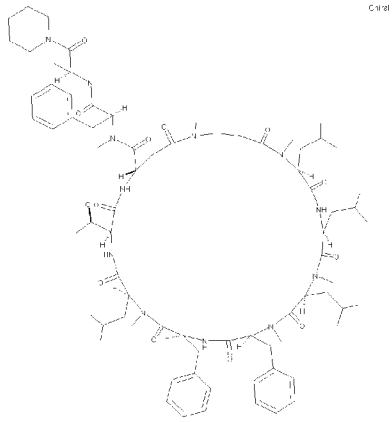
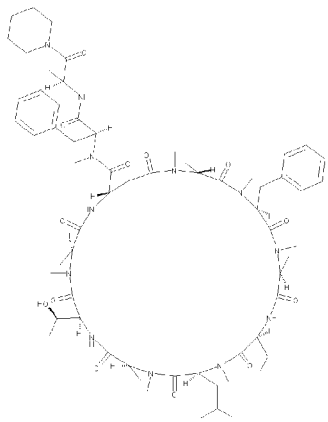
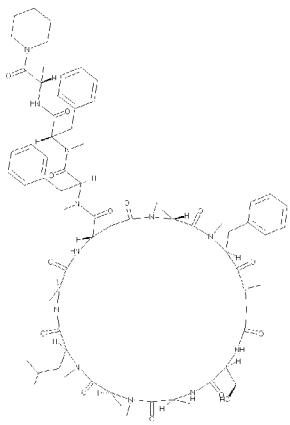
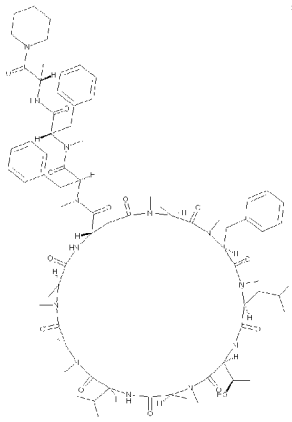
DP-441	
DP-442	
DP-443	
DP-444	

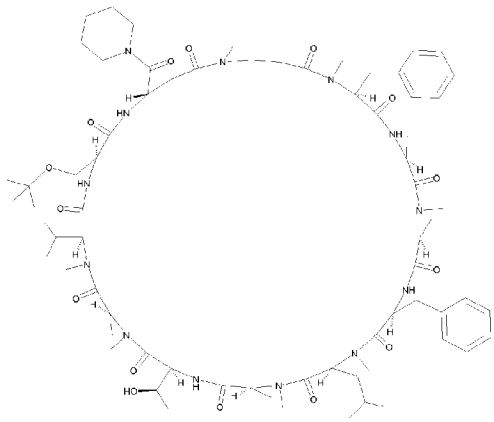
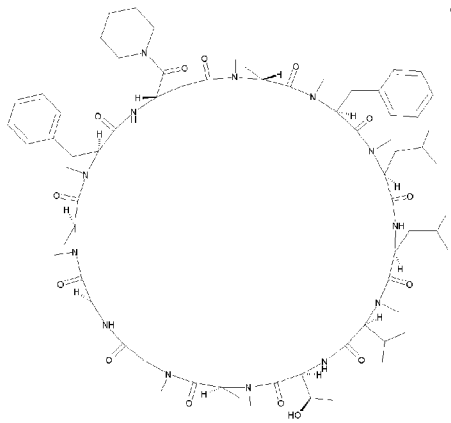
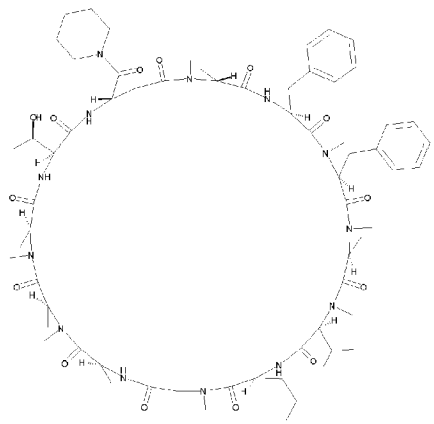
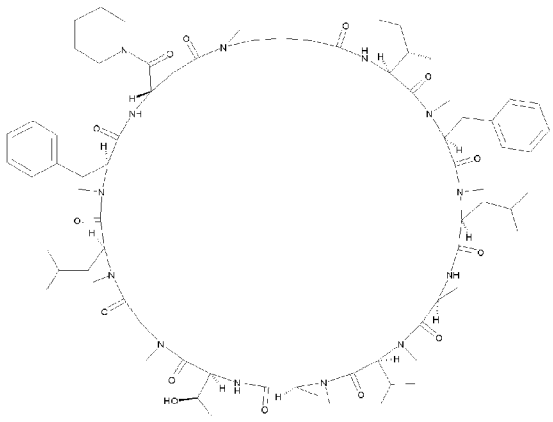
DP-445	
DP-446	
DP-447	
DP-448	

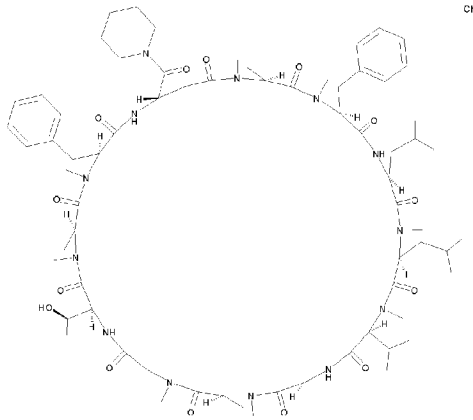
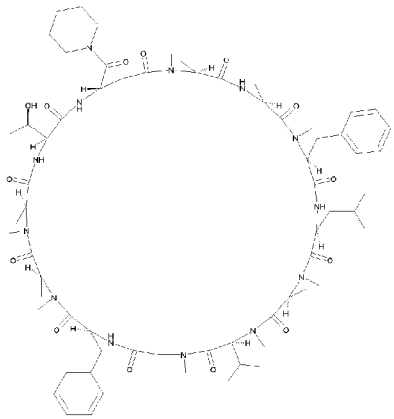
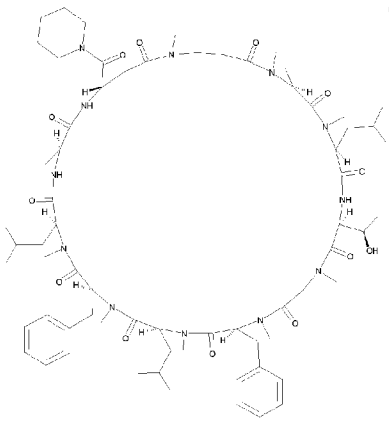
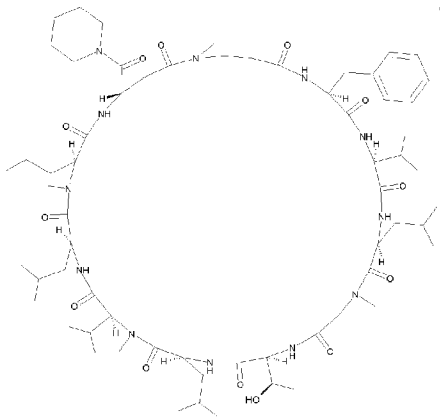
DP-449	
DP-450	
DP-451	
DP-452	

DP-453	
DP-454	
DP-455	
DP-456	

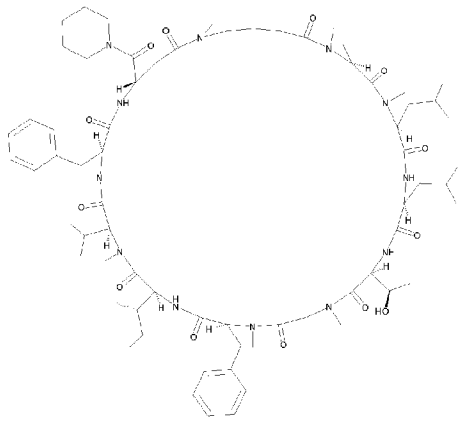
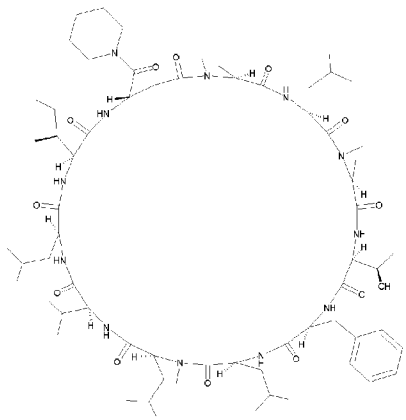
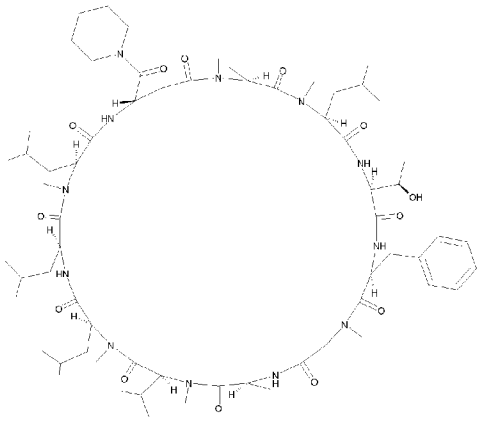
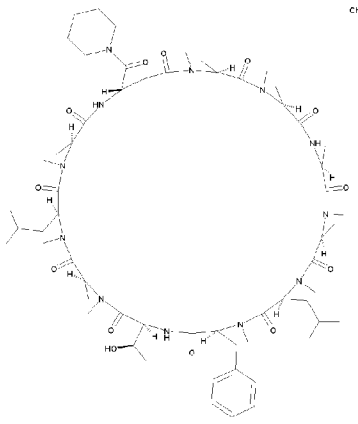
DP-457	
DP-458	Chiral 
DP-459	
DP-460	

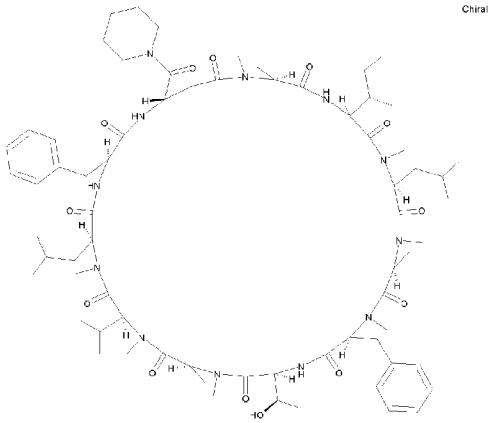
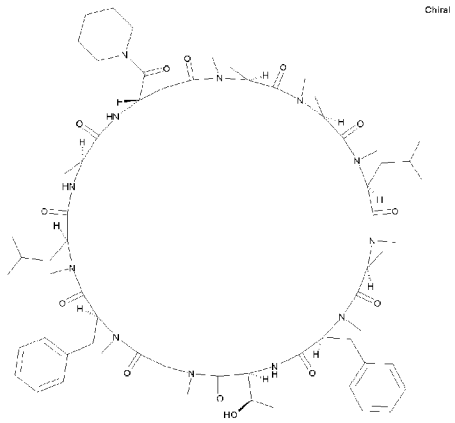
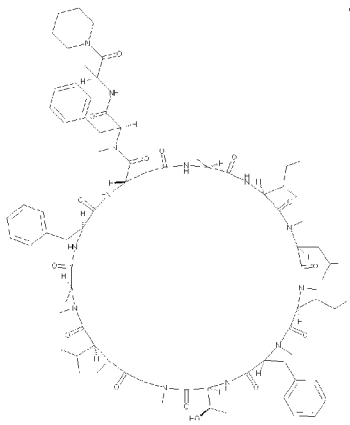
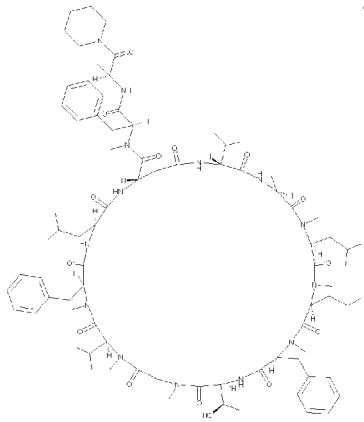
DP-461	
DP-462	
DP-463	
DP-464	

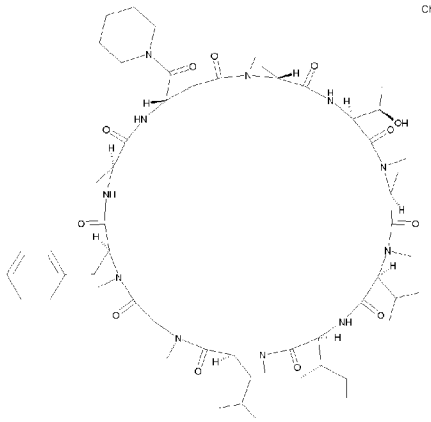
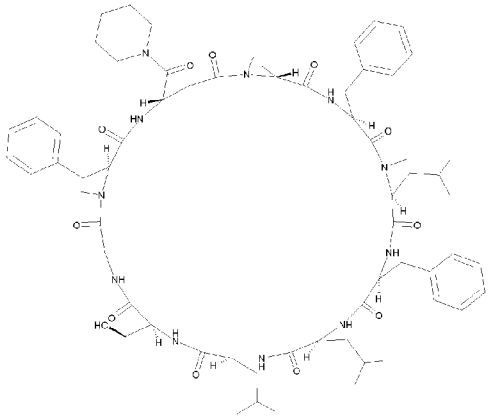
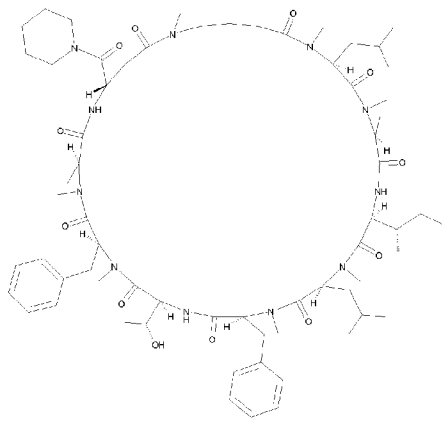
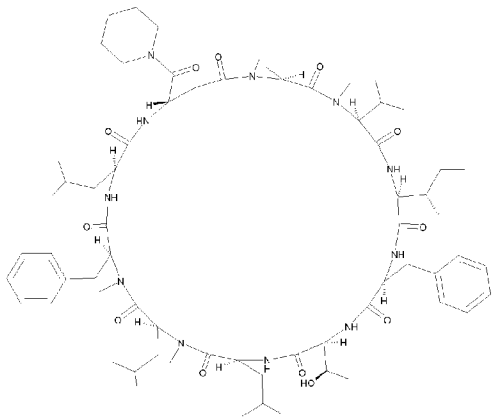
DP-465	
DP-466	
DP-467	
DP-468	

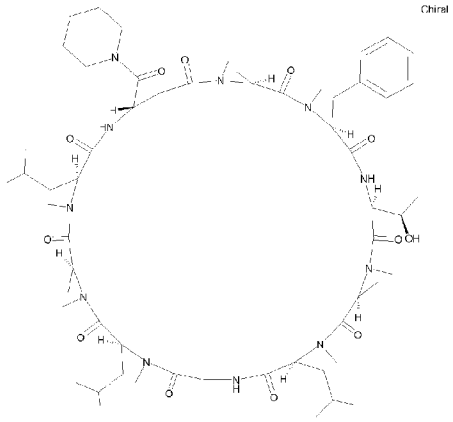
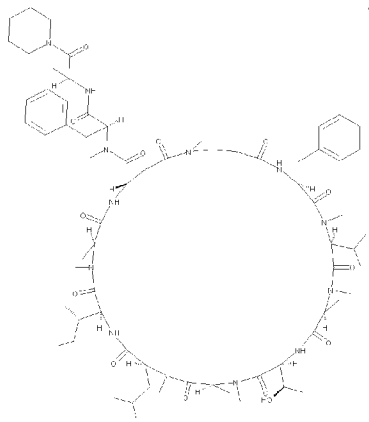
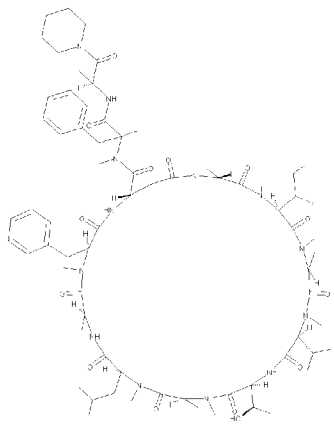
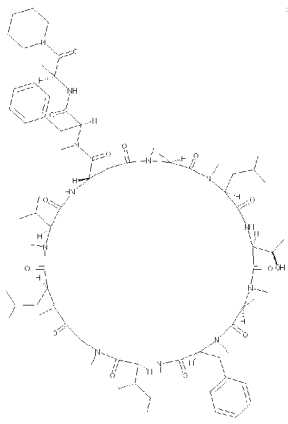
DP-469	
DP-470	
DP-471	
DP-472	

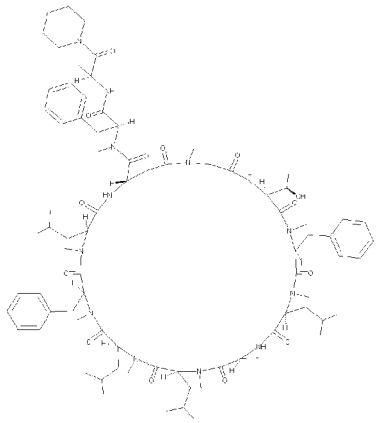
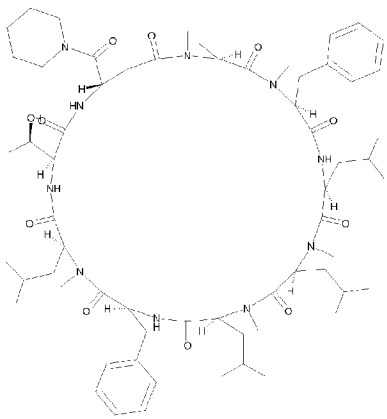
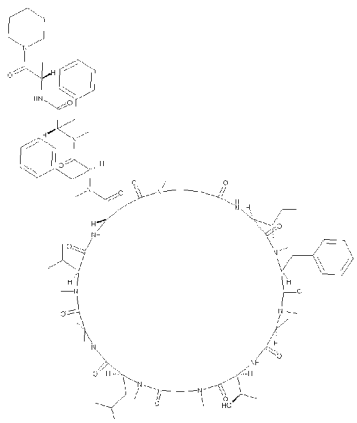
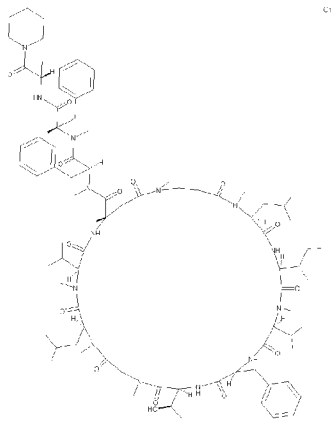
DP-473	
DP-474	
DP-475	
DP-476	

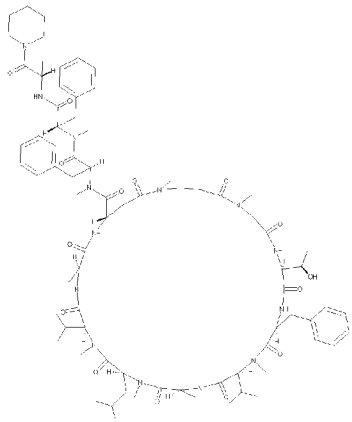
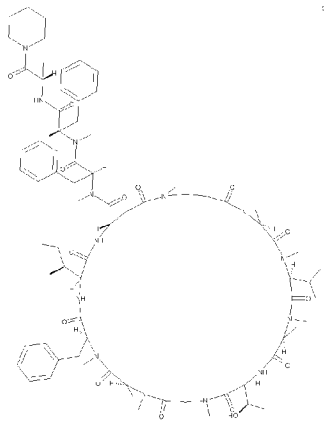
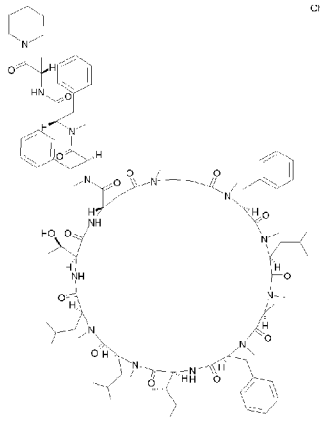
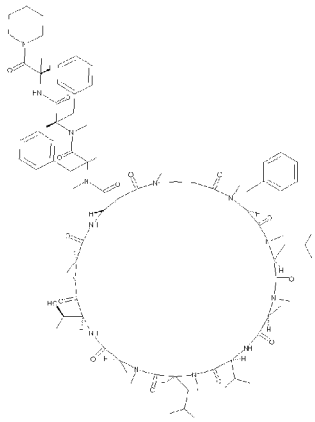
DP-477	
DP-478	
DP-479	
DP-480	

DP-481	
DP-482	
DP-483	
DP-484	

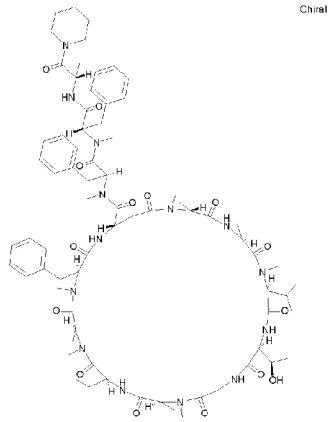
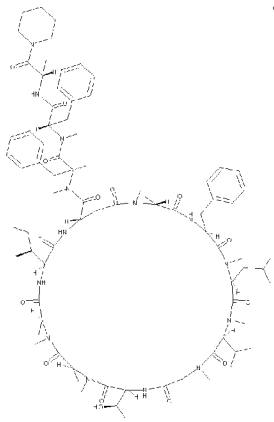
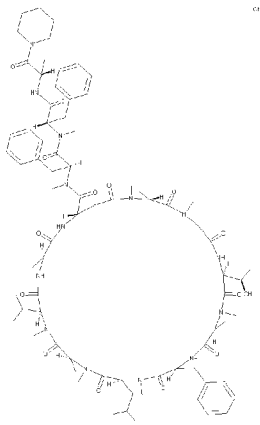
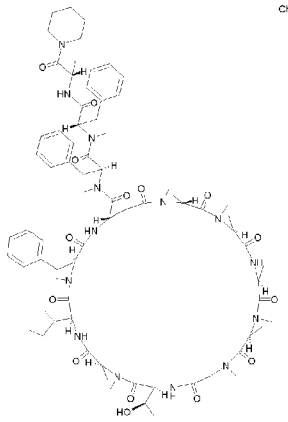
DP-485	 Chiral
DP-486	 Chiral
DP-487	 Chiral
DP-488	 Chiral

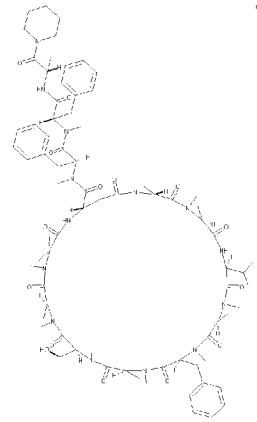
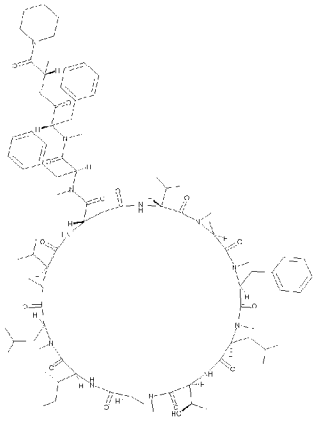
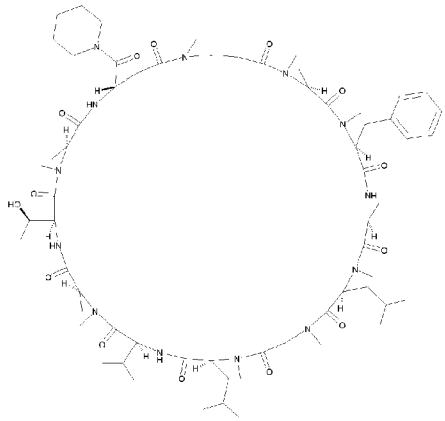
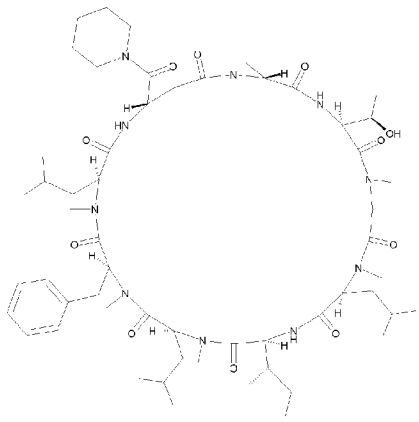
DP-489	
DP-490	
DP-491	
DP-492	

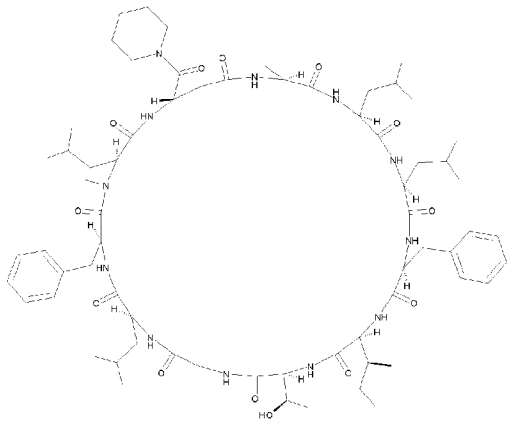
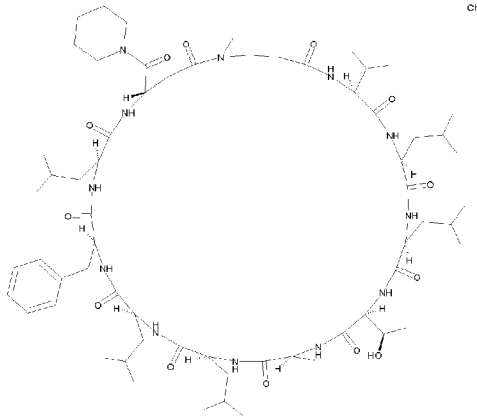
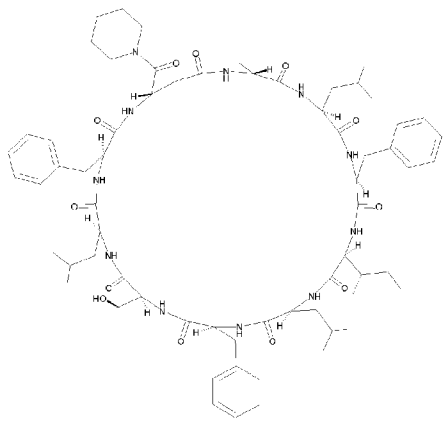
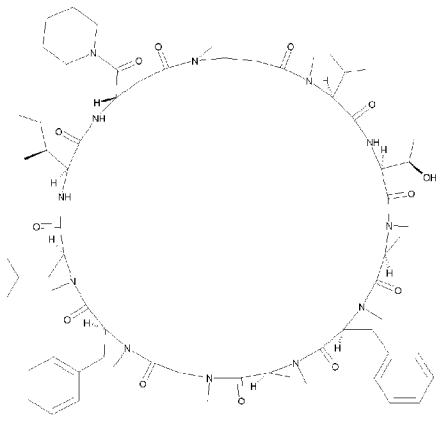
DP-493	
DP-494	
DP-495	
DP-496	

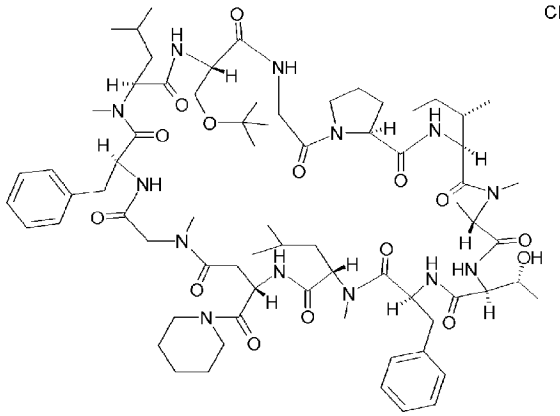
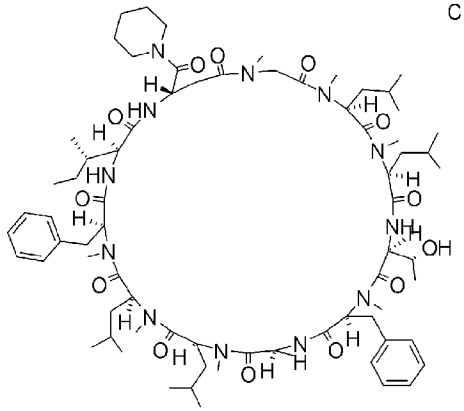
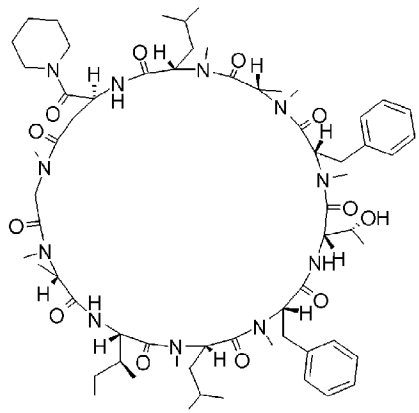
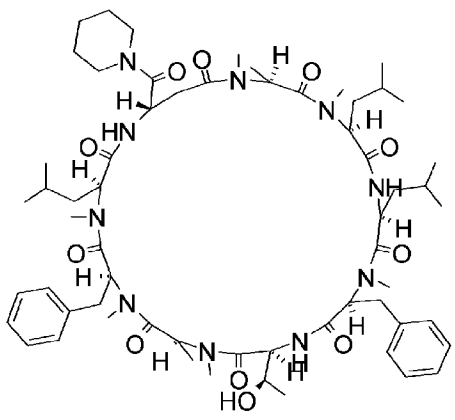
DP-497	
DP-498	
DP-499	
DP-500	

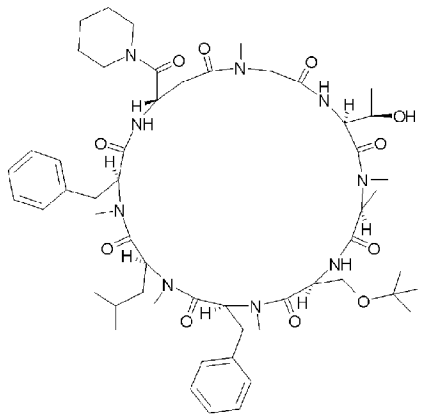
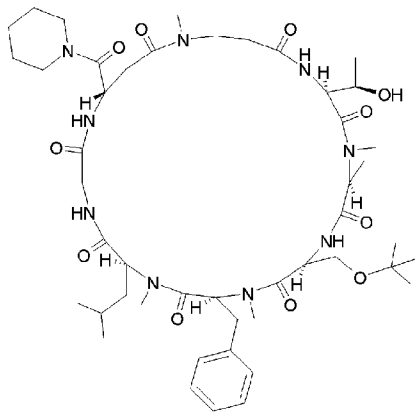
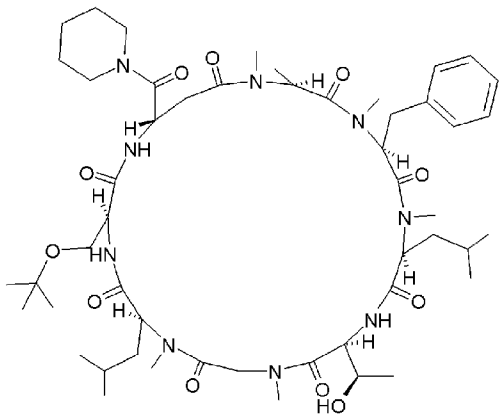
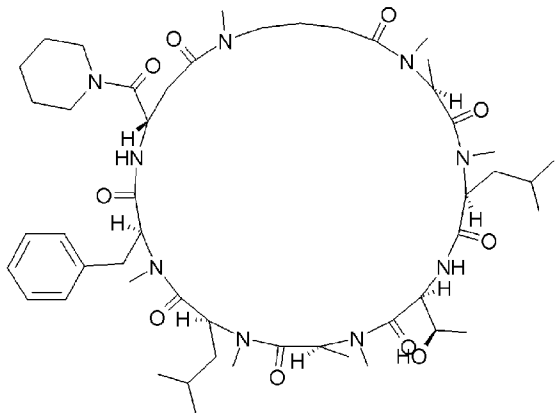
DP-504	
DP-503	
DP-502	
DP-501	

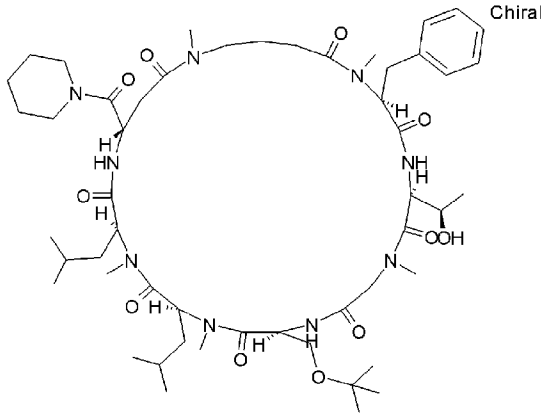
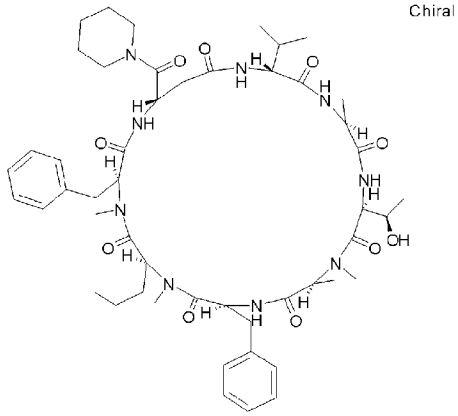
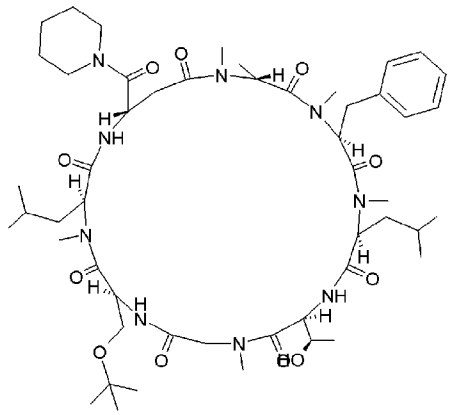
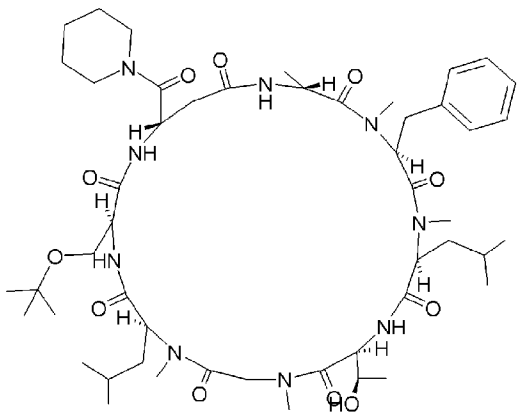
DP-505	
DP-506	
DP-507	
DP-508	

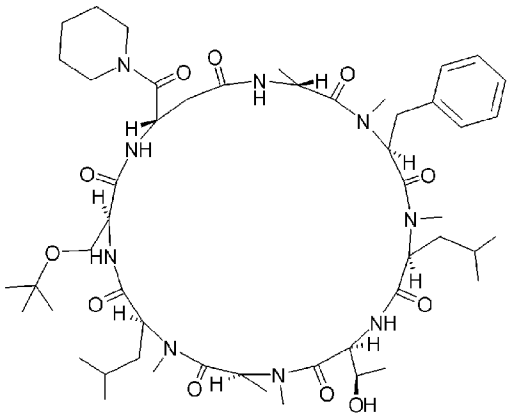
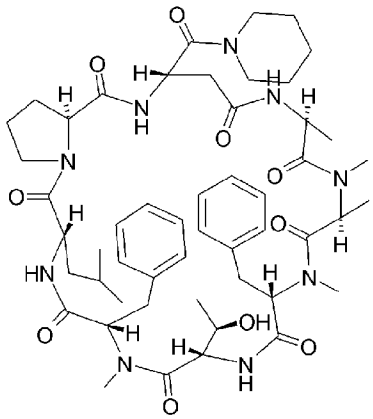
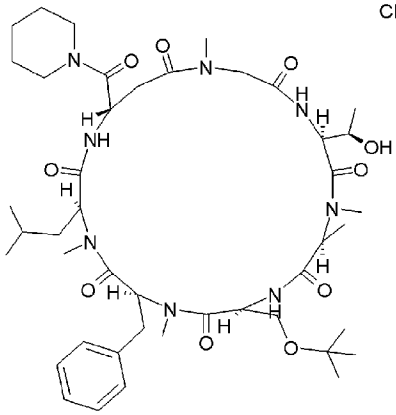
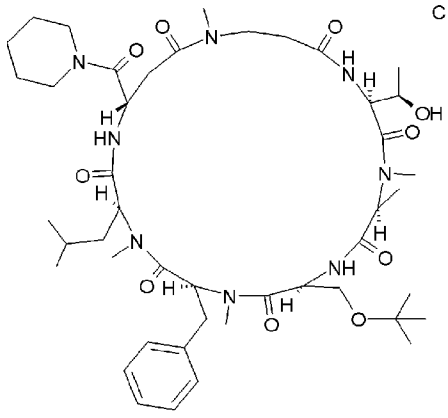
DP-509	
DP-510	
DP-511	
DP-512	

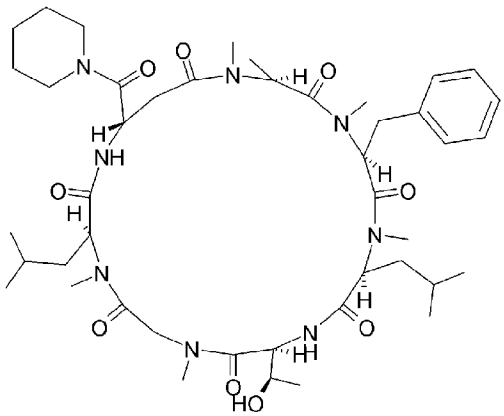
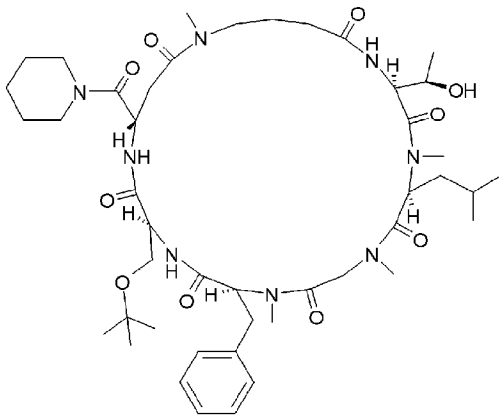
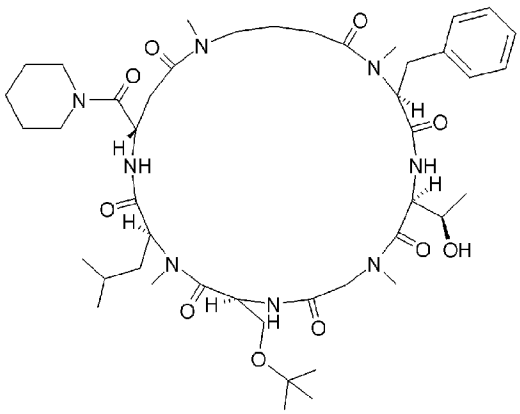
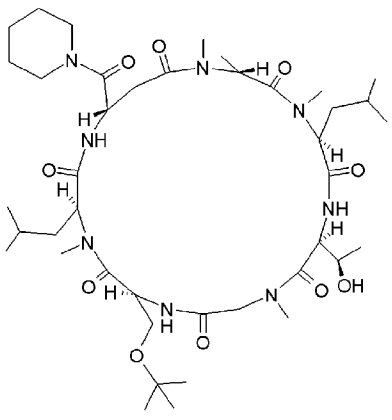
DP-513	
DP-514	
DP-515	
DP-516	

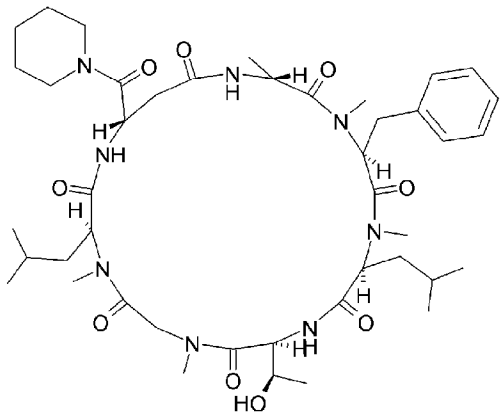
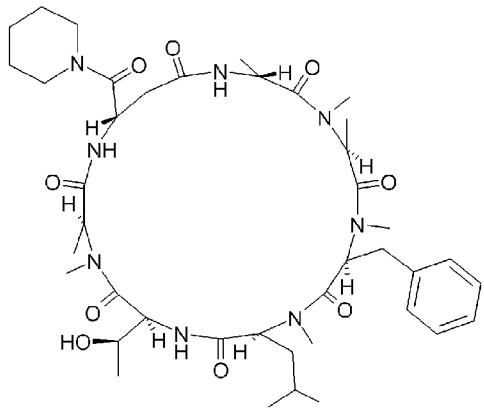
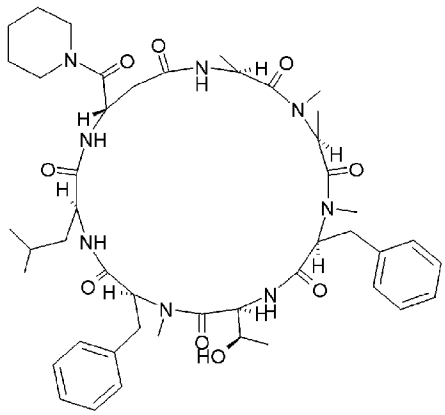
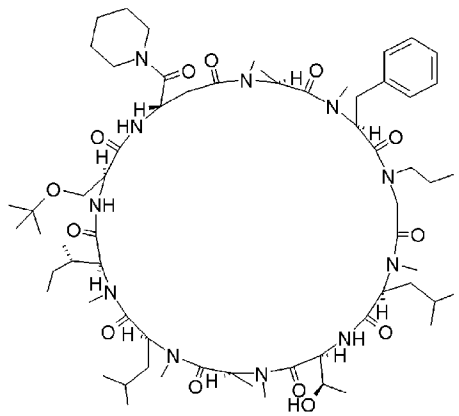
DP-517	Chiral 
DP-518	Chiral 
DP-519	Chiral 
DP-520	Chiral 

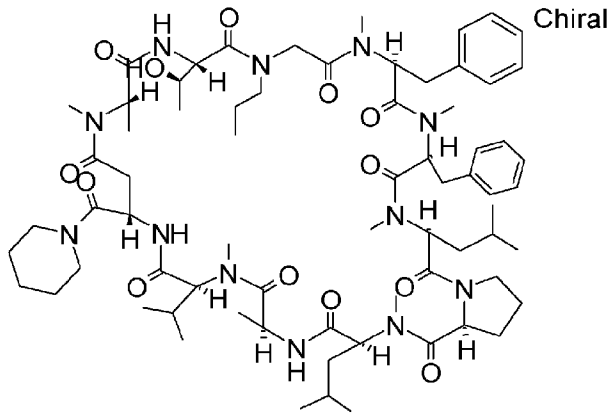
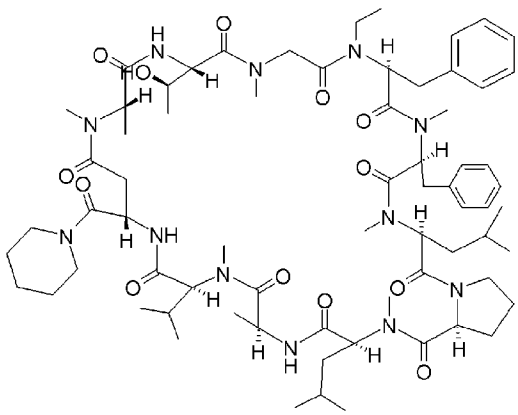
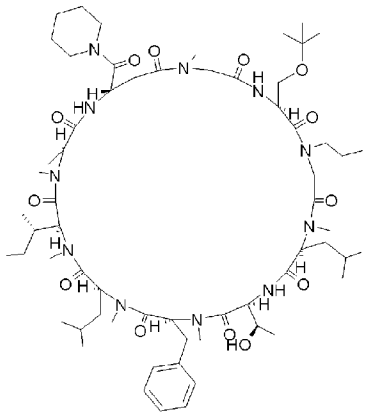
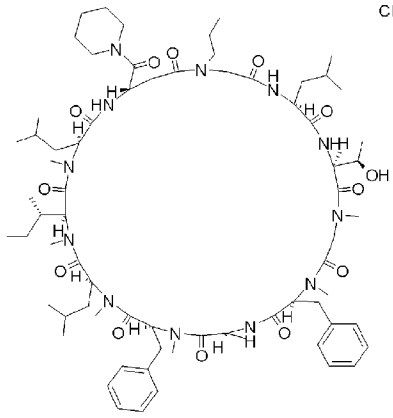
DP-521	Chiral 
DP-522	Chiral 
DP-523	Chiral 
DP-524	Chiral 

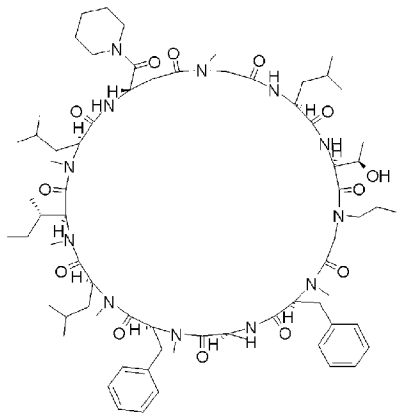
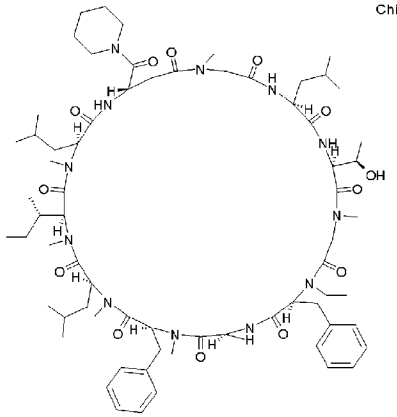
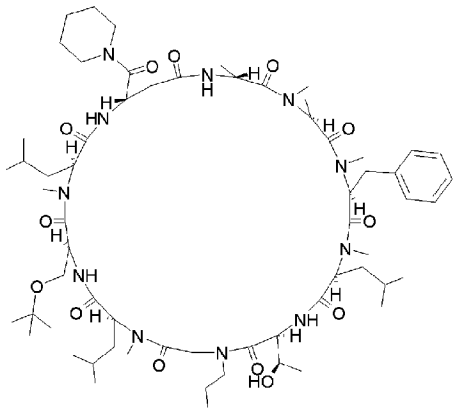
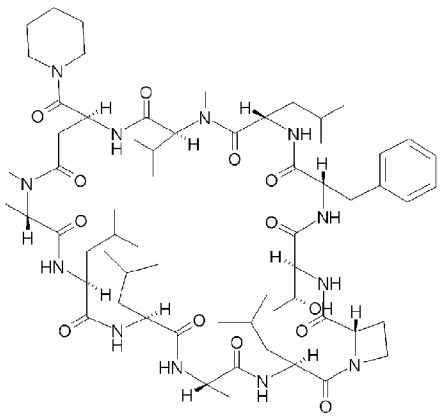
DP-525	 Chiral
DP-526	 Chiral
DP-527	 Chiral
DP-528	 Chiral

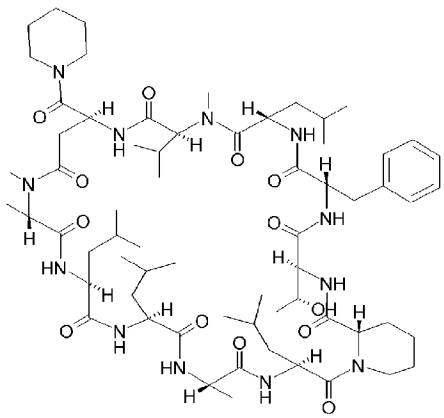
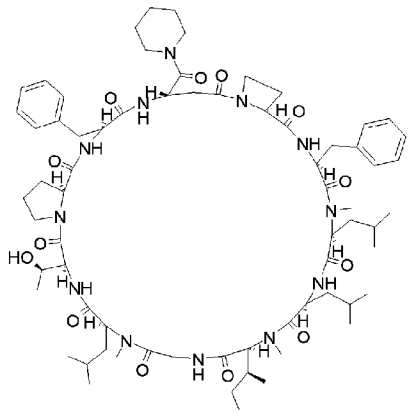
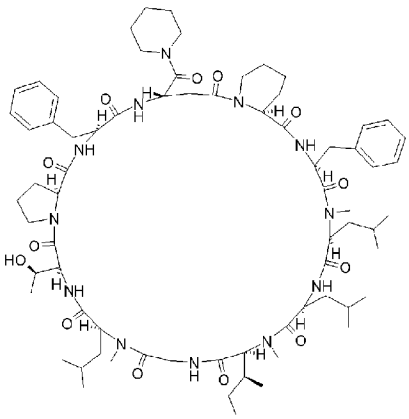
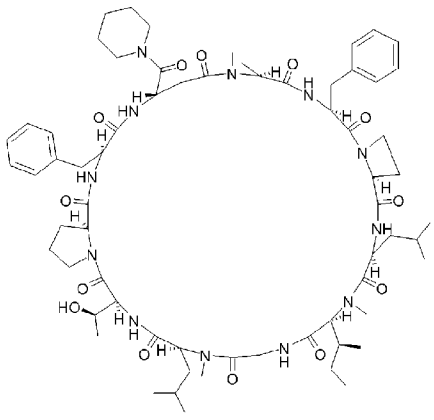
DP-529	Chiral 
DP-530	Chiral 
DP-531	Chiral 
DP-532	Chiral 

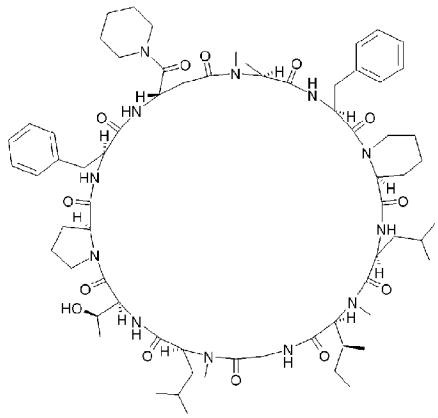
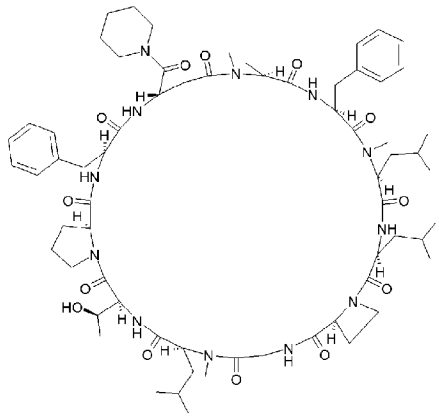
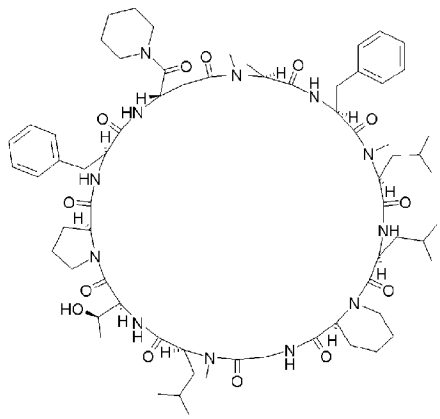
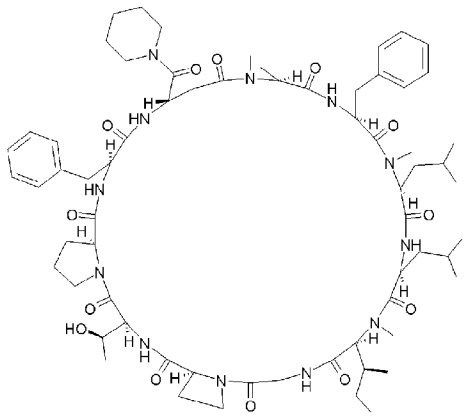
DP-533	 Chiral
DP-534	 Chiral
DP-535	 Chiral
DP-536	 Chiral

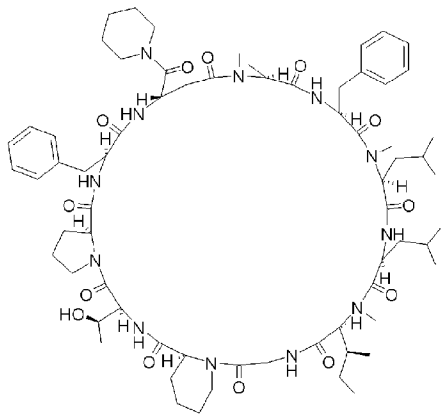
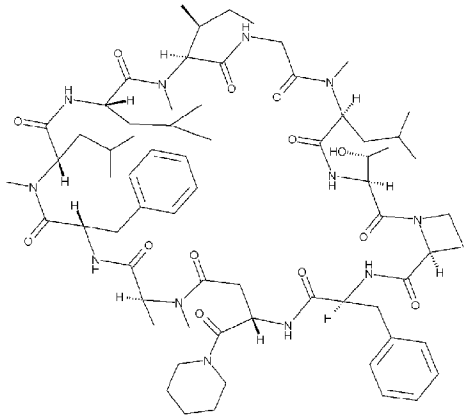
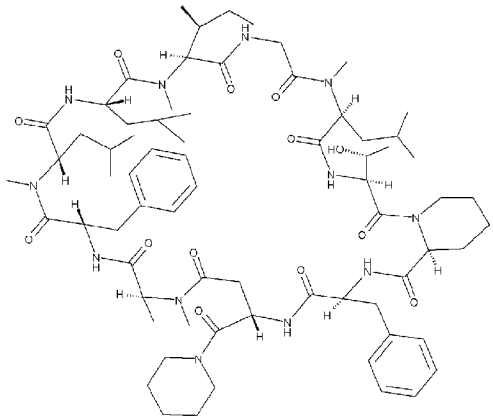
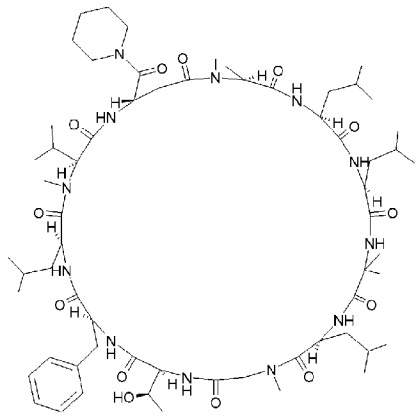
DP-537	Chiral 
DP-538	Chiral 
DP-539	Chiral 
DP-540	Chiral 

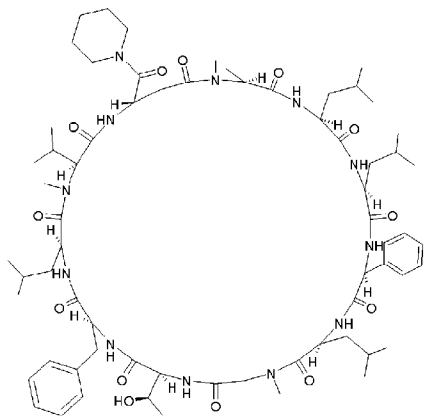
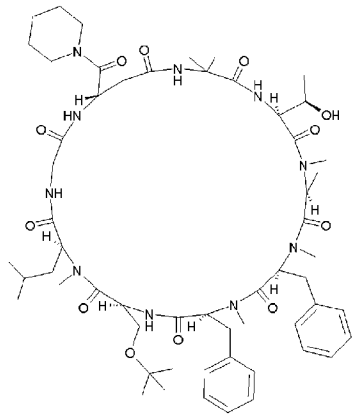
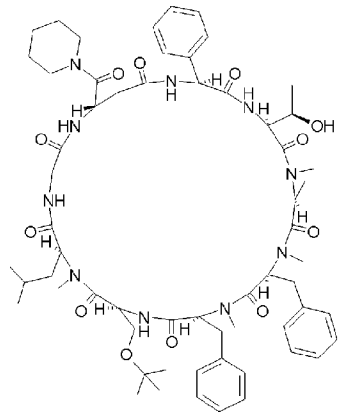
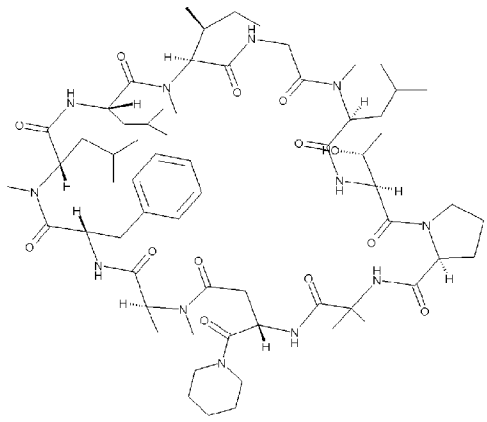
DP-541	 Chiral
DP-542	 Chiral
DP-543	 Chiral
DP-544	 Chiral

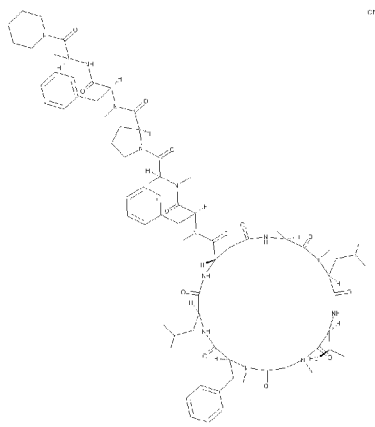
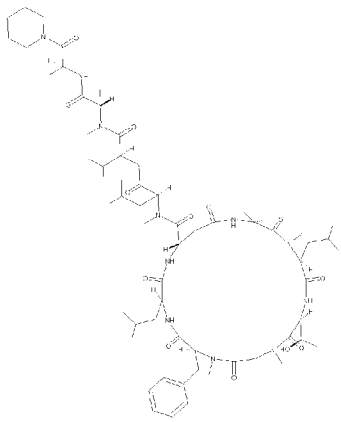
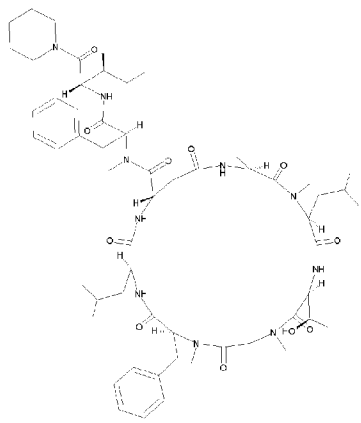
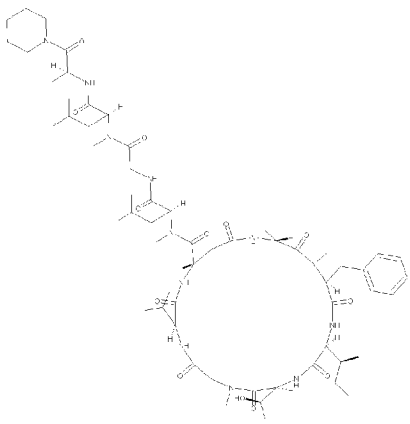
DP-545	 Chiral
DP-546	 Chiral
DP-547	 Chiral
DP-548	 Chiral

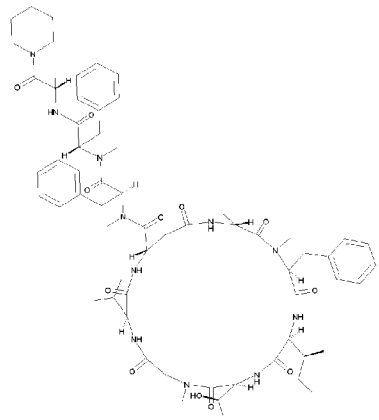
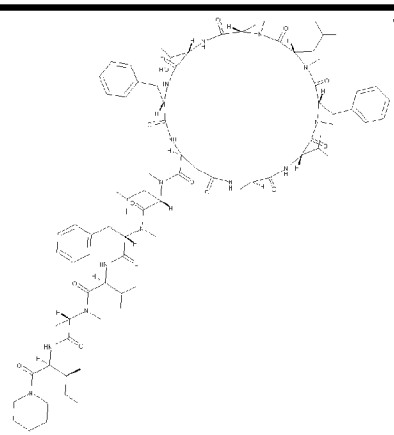
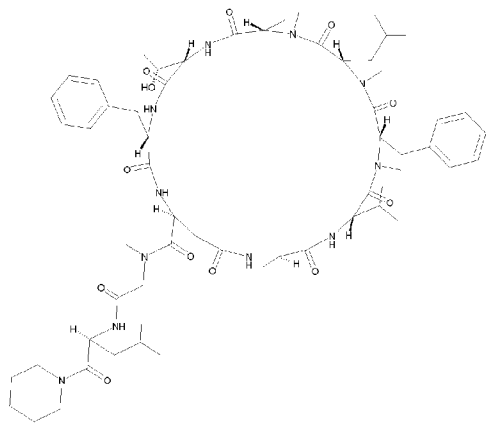
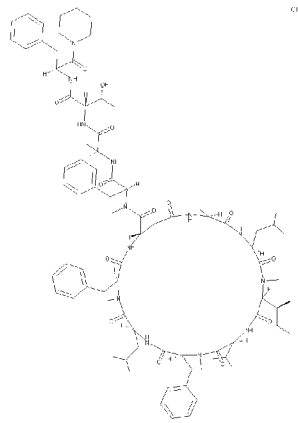
DP-549	 Chiral
DP-550	 Chiral
DP-551	 Chiral
DP-552	 Chiral

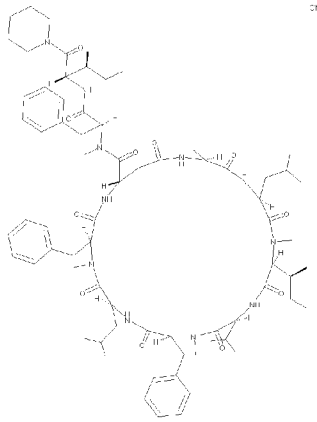
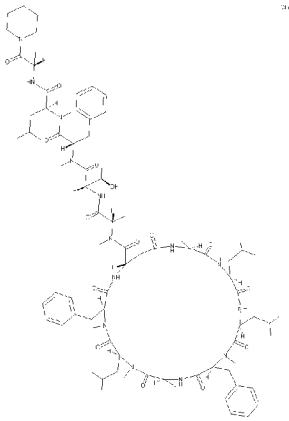
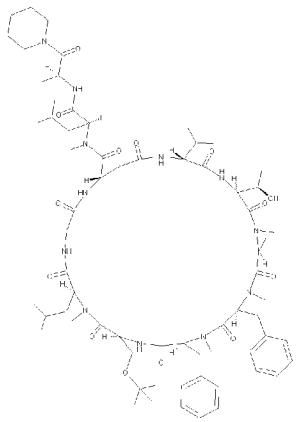
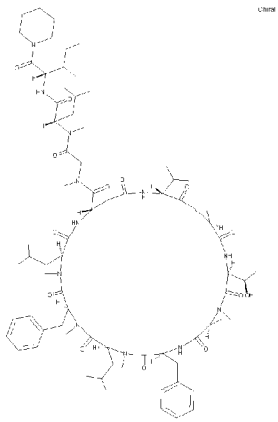
DP-553	 Chiral
DP-554	 Chiral
DP-555	 Chiral
DP-556	 Chiral

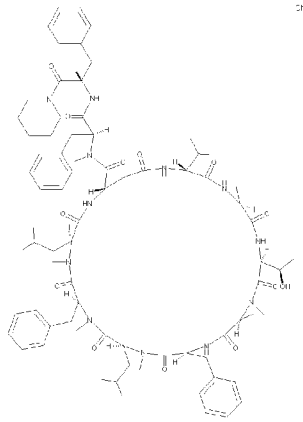
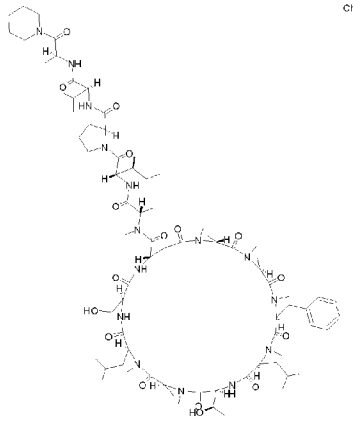
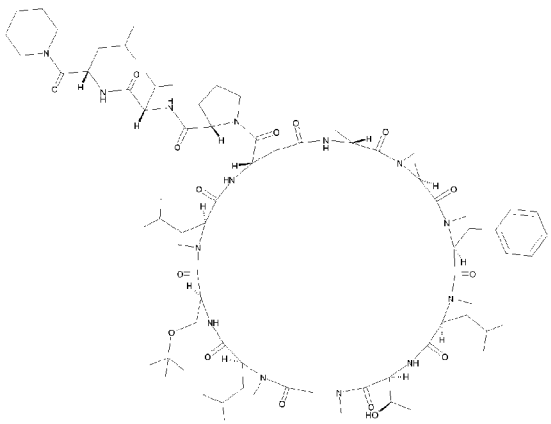
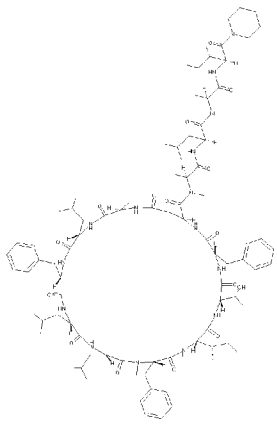
DP-557	 Chiral
DP-558	 Chiral
DP-559	 Chiral
DP-560	 Chiral

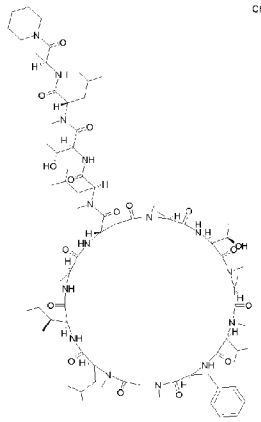
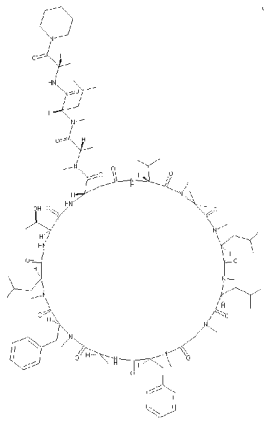
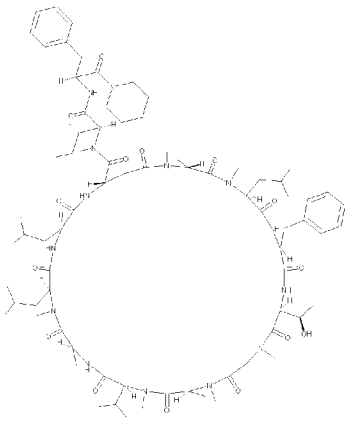
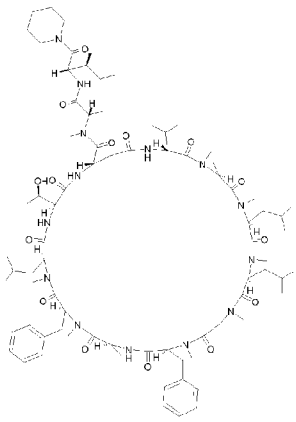
DP-561	 Chiral
DP-562	 Chiral
DP-563	 Chiral
DP-564	 Chiral

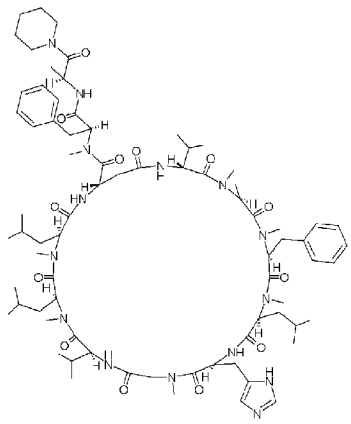
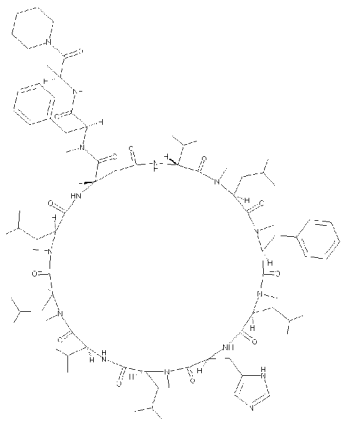
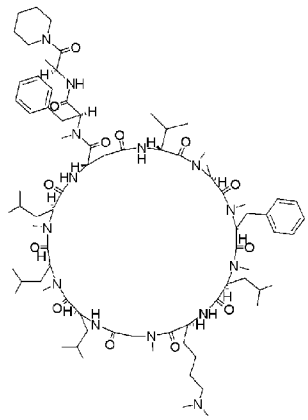
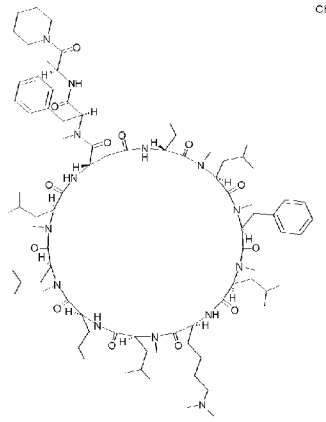
DP-565	
DP-566	
DP-567	
DP-568	

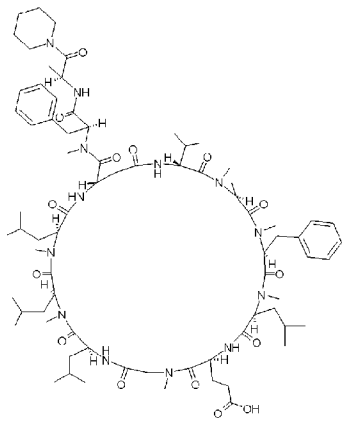
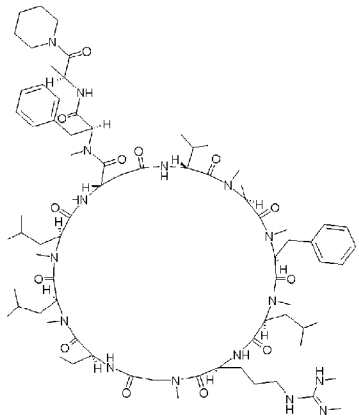
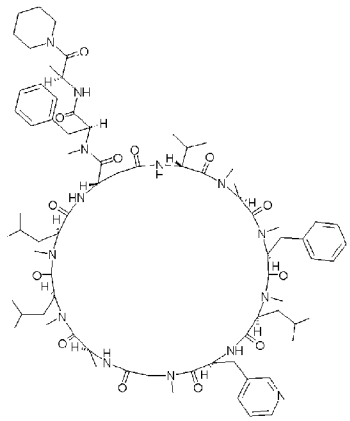
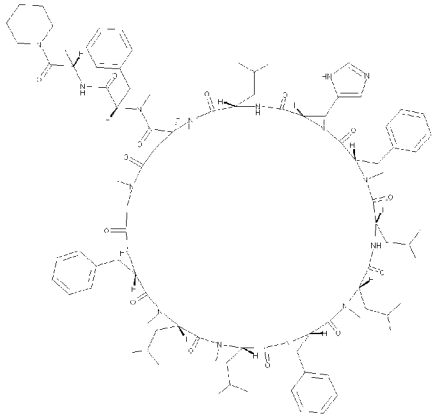
DP-569	
DP-570	
DP-571	
DP-572	

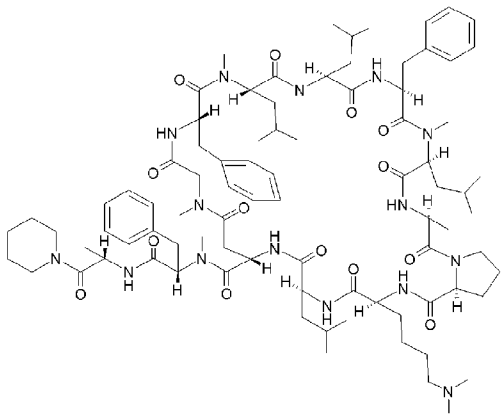
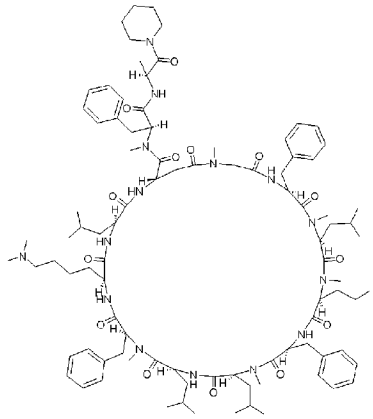
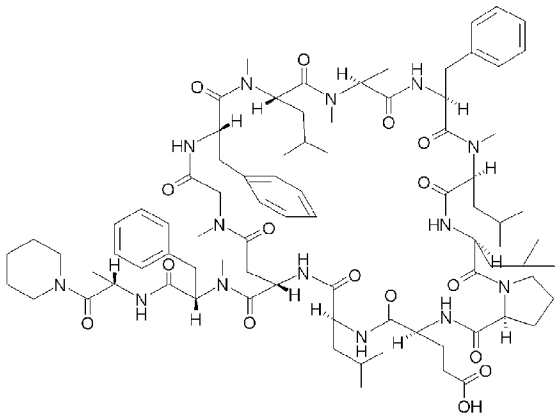
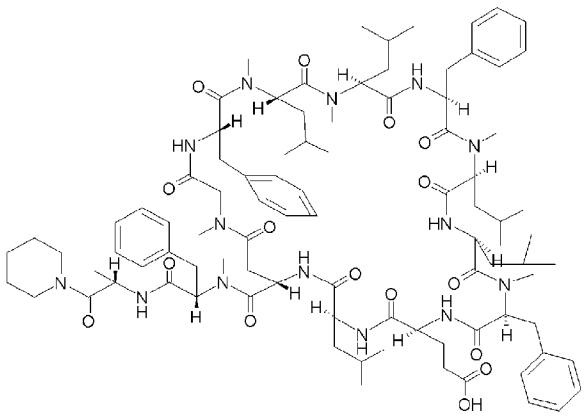
DP-573	
DP-574	
DP-575	
DP-576	

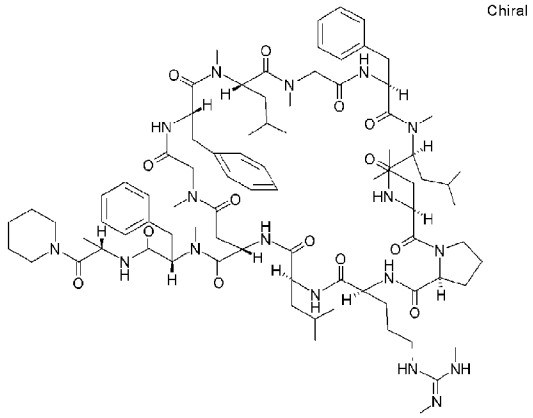
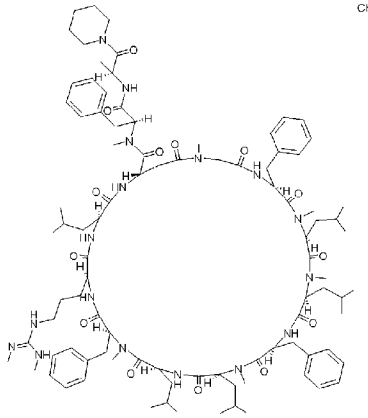
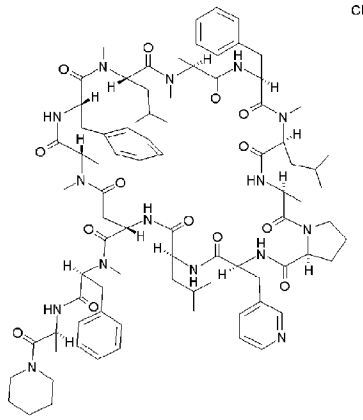
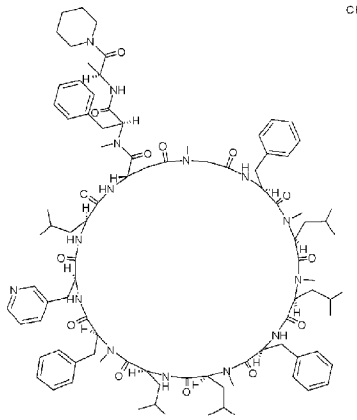
DP-577	
DP-578	
DP-579	
DP-580	

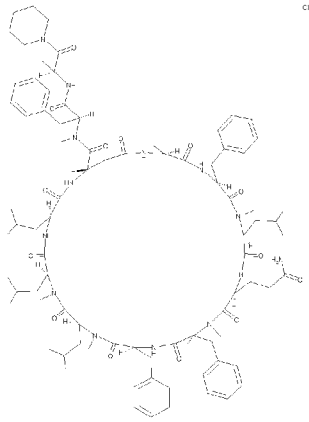
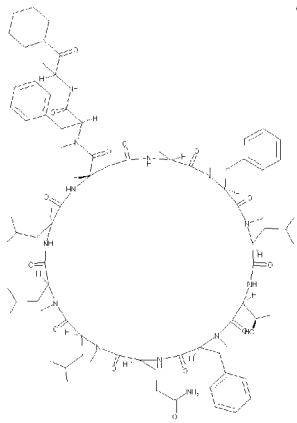
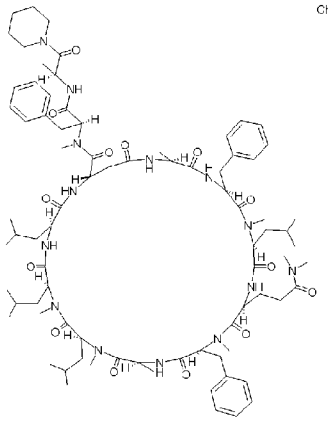
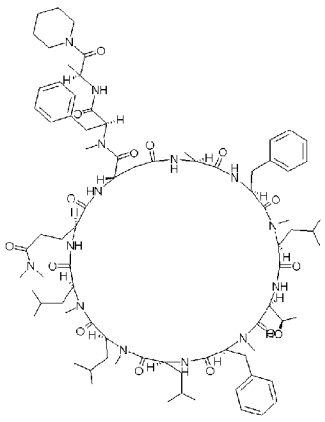
DP-581	
DP-582	
DP-583	
DP-584	

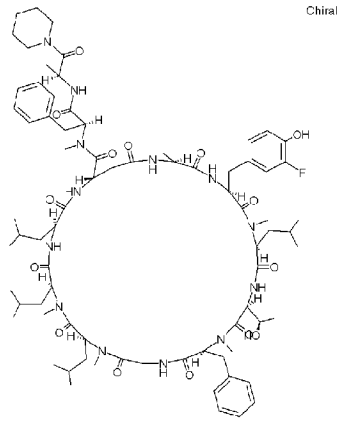
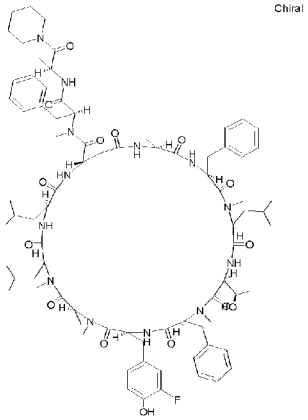
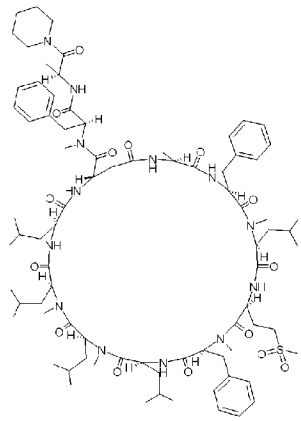
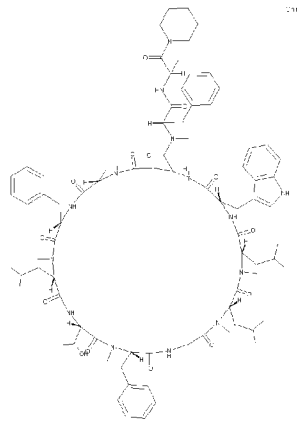
DP-585	
DP-586	
DP-587	
DP-588	

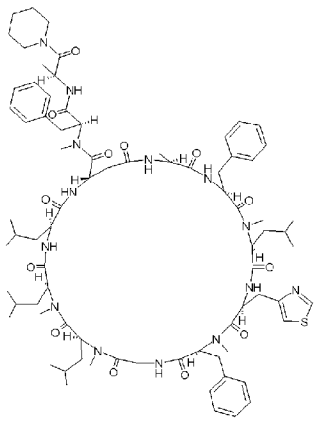
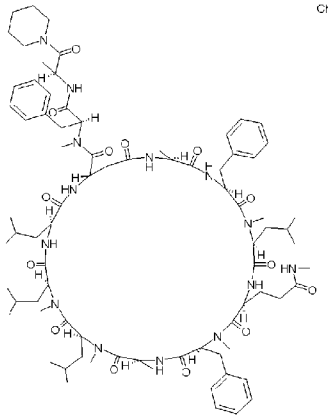
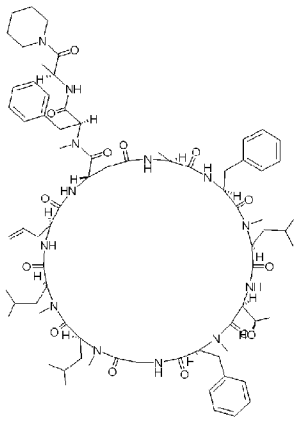
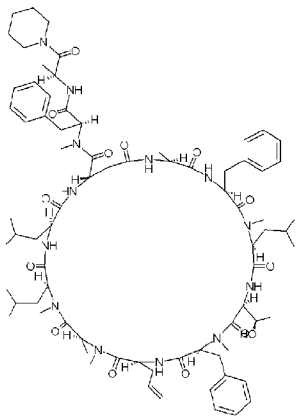
DP-589	
DP-590	
DP-591	
DP-592	

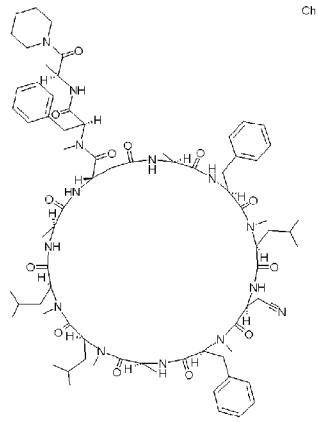
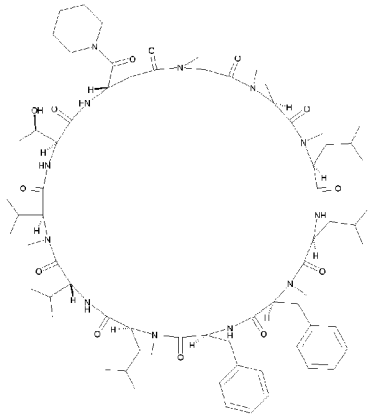
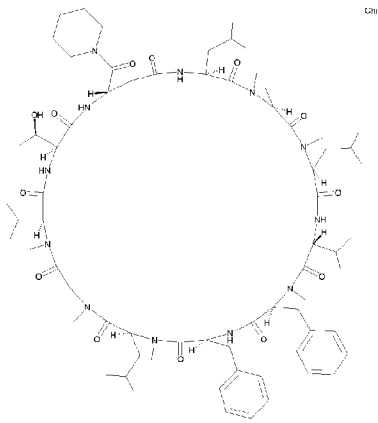
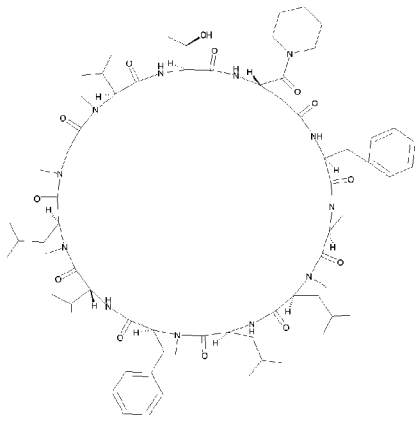
DP-593	 Chiral
DP-594	 Chiral
DP-595	 Chiral
DP-596	 Chiral

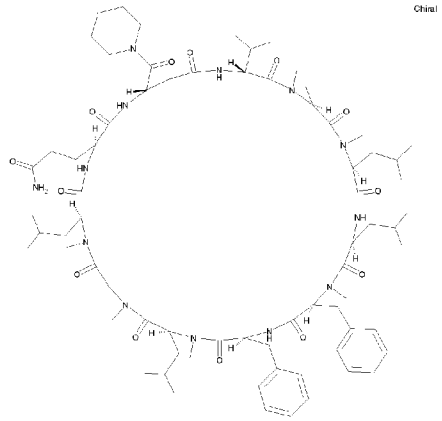
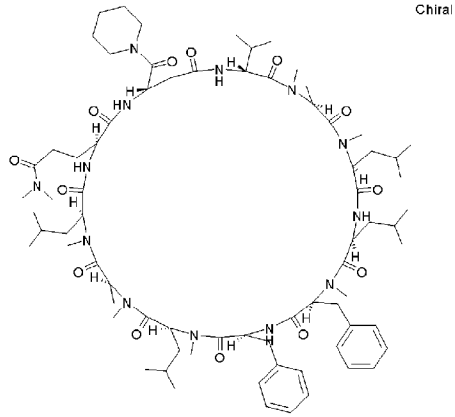
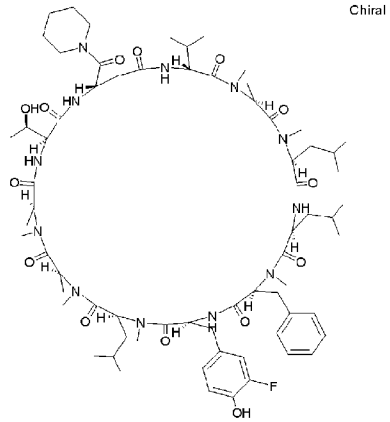
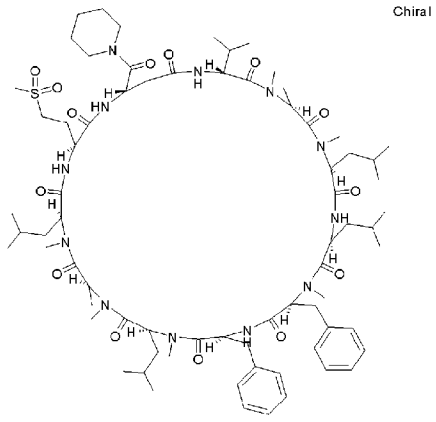
DP-597	
DP-598	
DP-599	
DP-600	

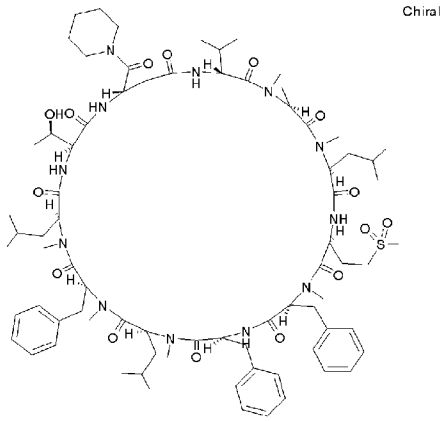
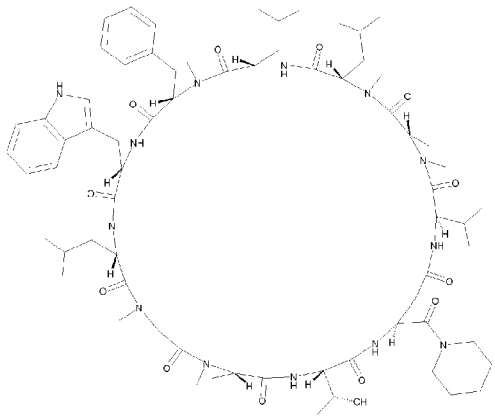
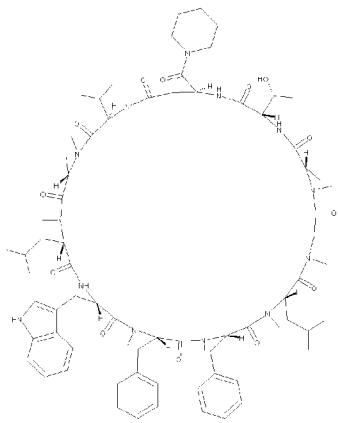
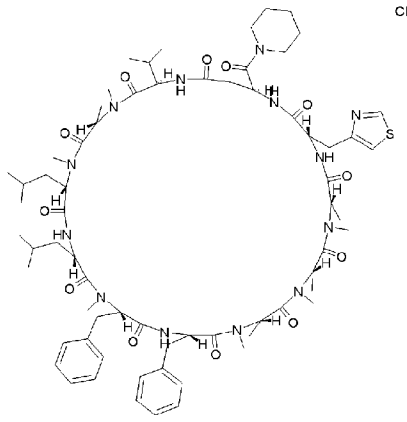
DP-601	
DP-602	
DP-603	
DP-604	

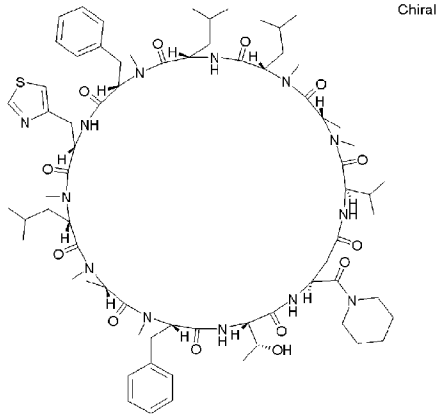
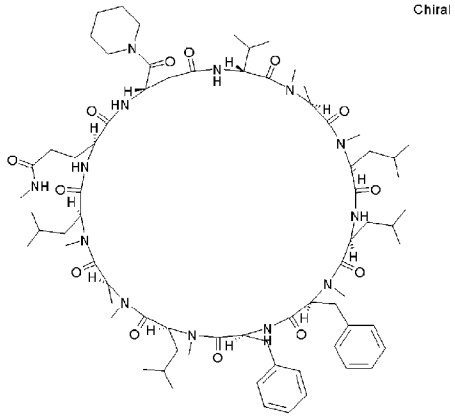
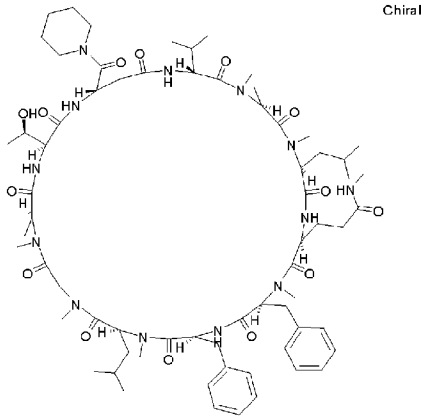
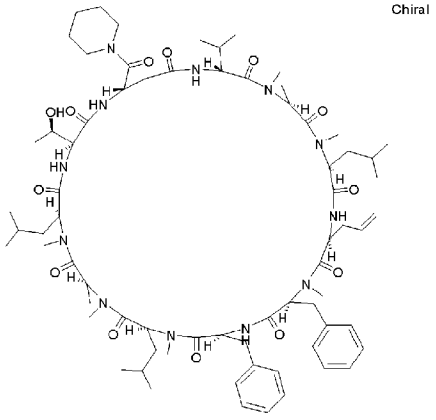
DP-605	
DP-606	
DP-607	
DP-608	

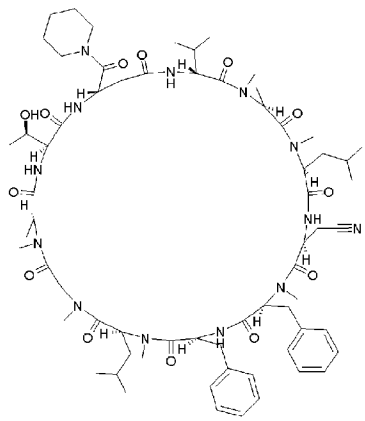
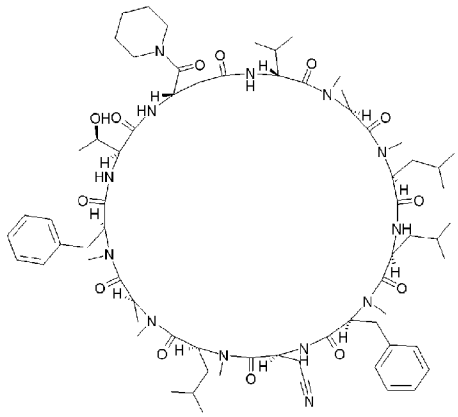
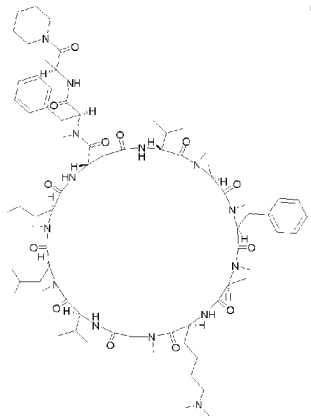
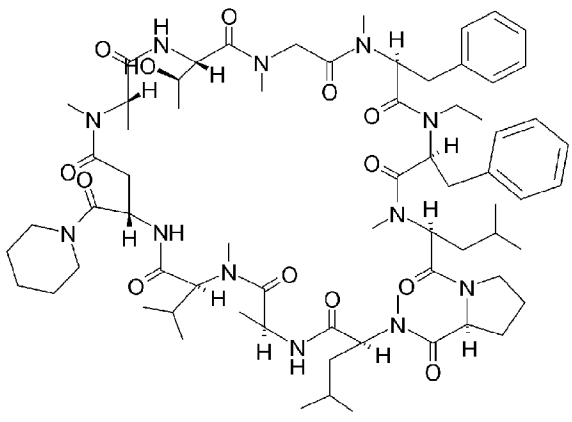
DP-609	 Chiral
DP-610	 Chiral
DP-611	 Chiral
DP-612	 Chiral

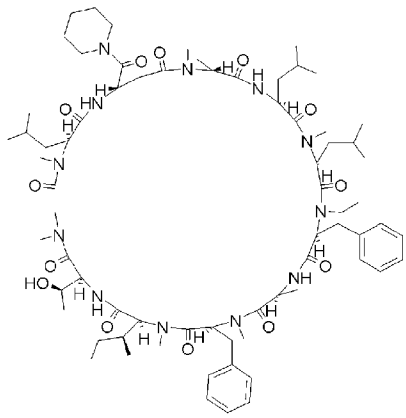
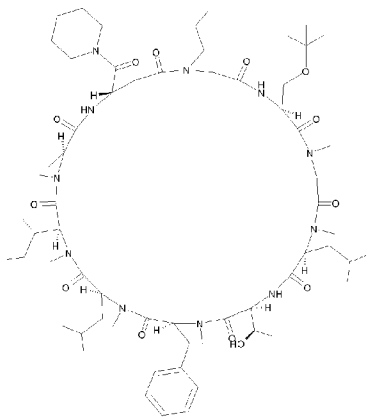
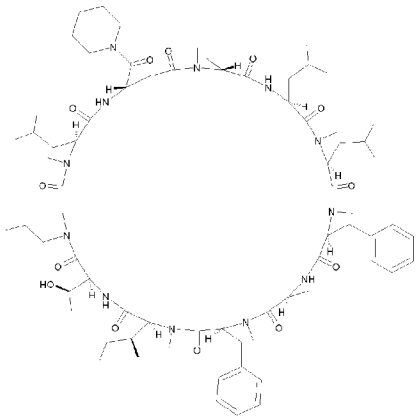
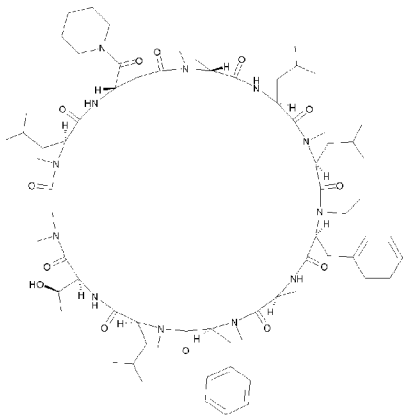
DP-613	
DP-614	
DP-615	
DP-616	

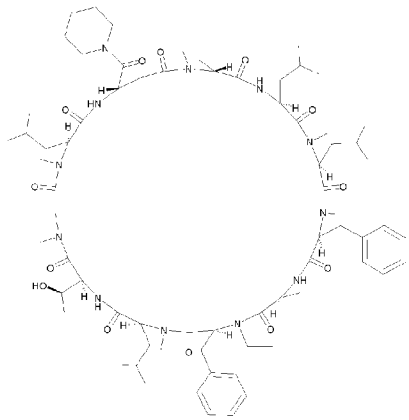
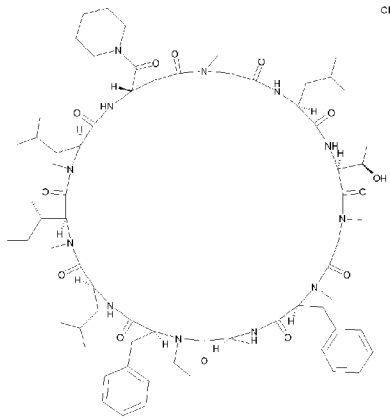
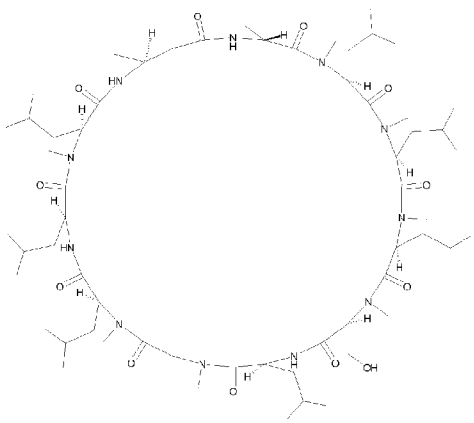
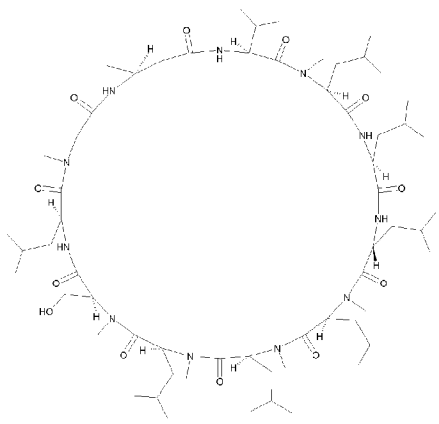
DP-617	 Chiral
DP-618	 Chiral
DP-619	 Chiral
DP-620	 Chiral

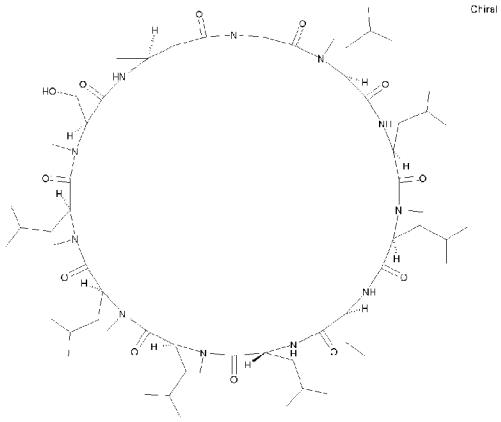
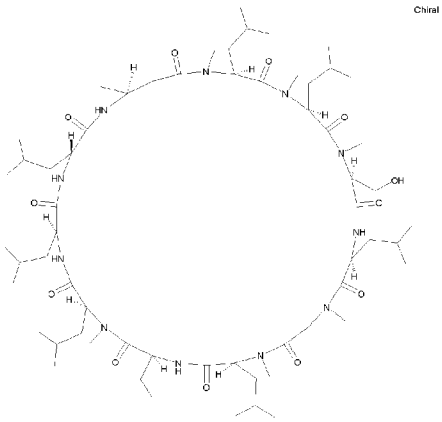
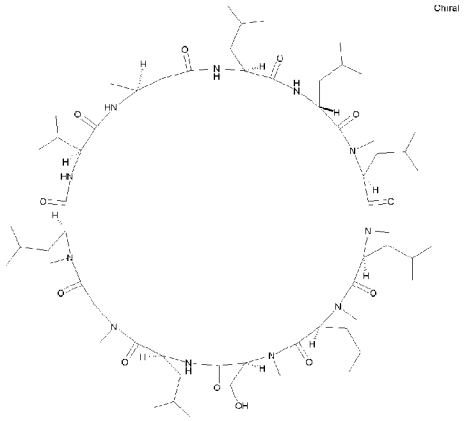
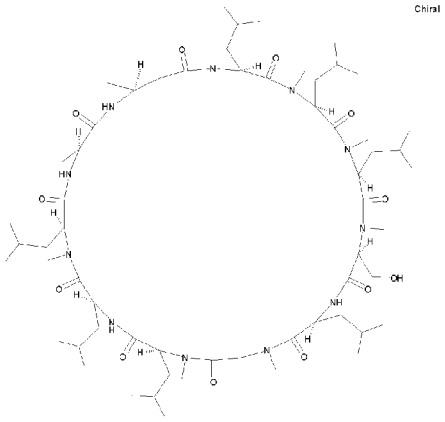
DP-621	
DP-622	
DP-623	
DP-624	

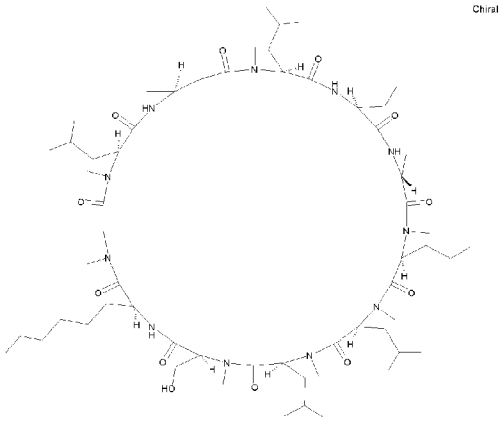
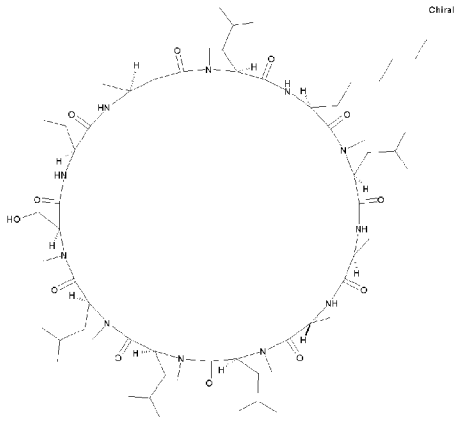
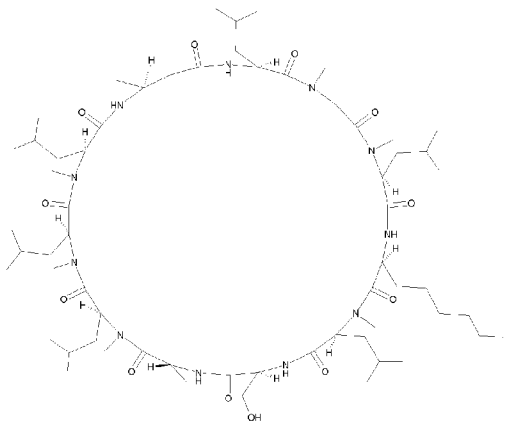
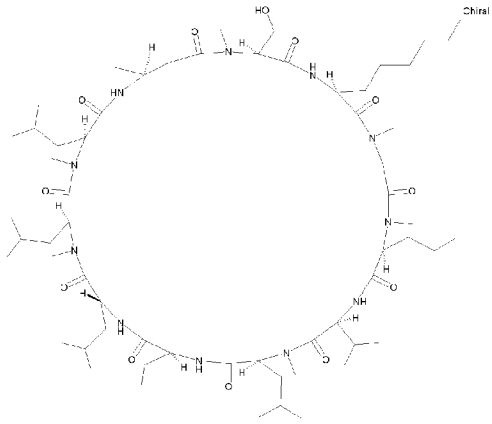
DP-625	 Chiral
DP-626	 Chiral
DP-627	 Chiral
DP-628	 Chiral

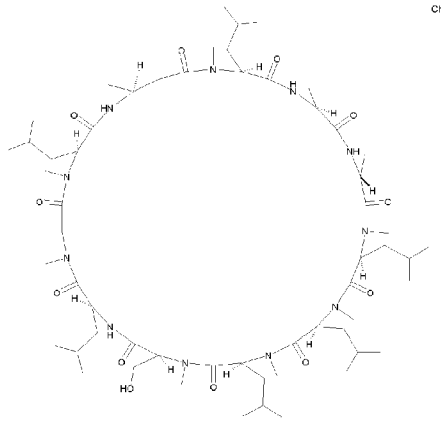
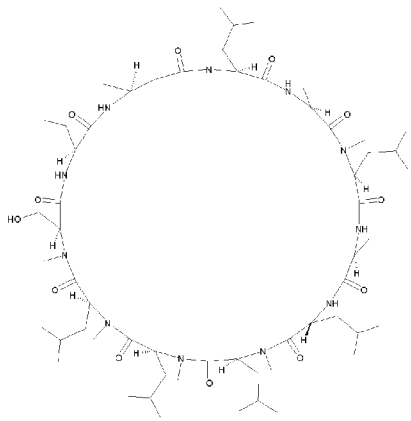
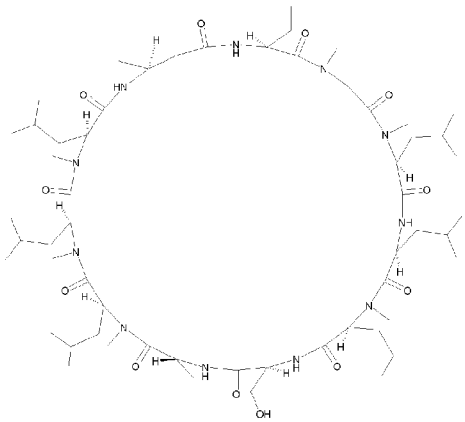
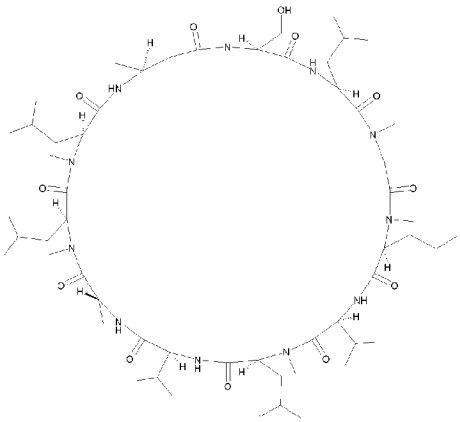
DP-629	 Chiral
DP-630	 Chiral
DP-631	 Chiral
DP-632	 Chiral

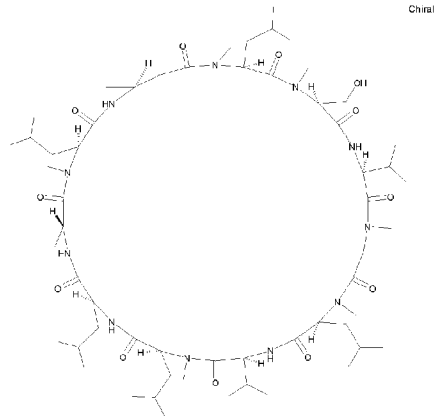
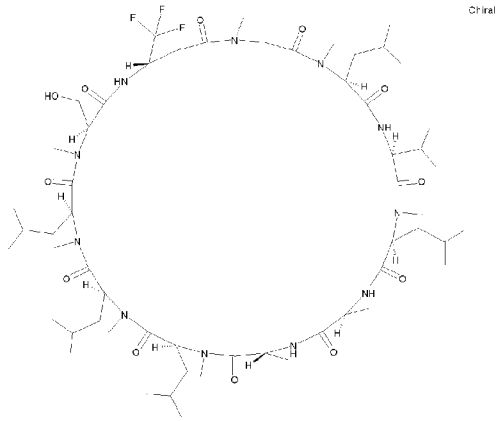
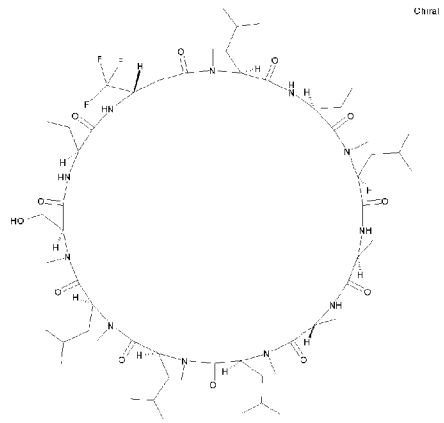
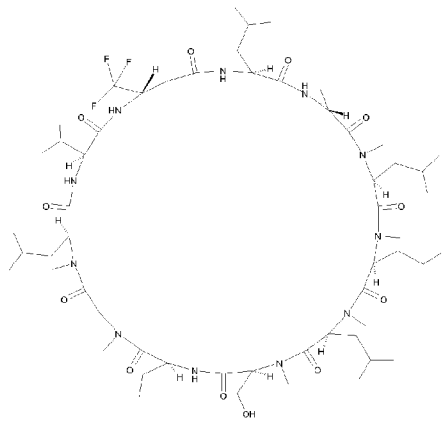
DP-633	 Chiral
DP-634	 Chiral
DP-635	 Chiral
DP-636	 Chiral

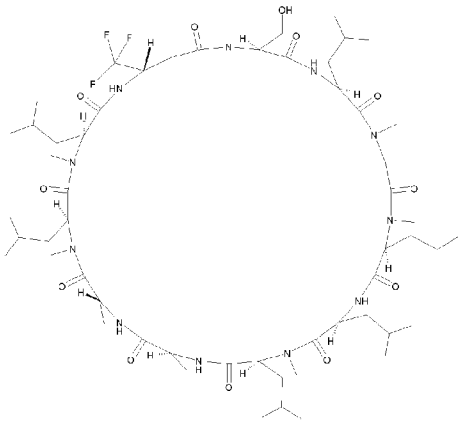
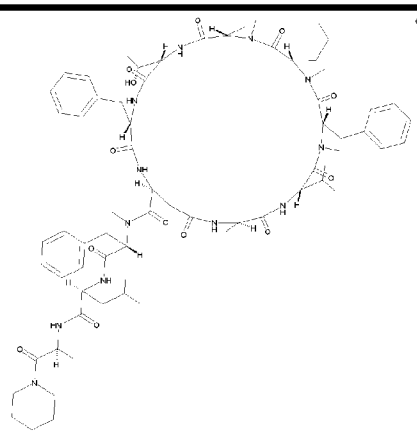
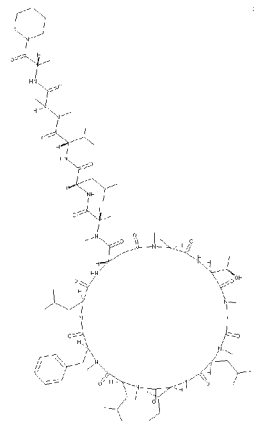
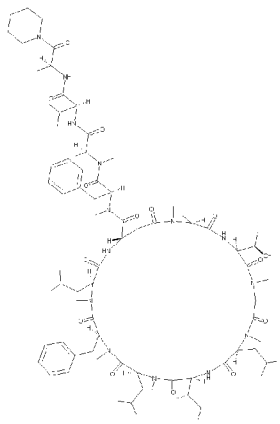
DP—637	
DP-638	
DP-639	
DP-640	

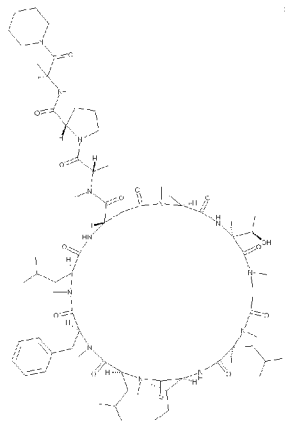
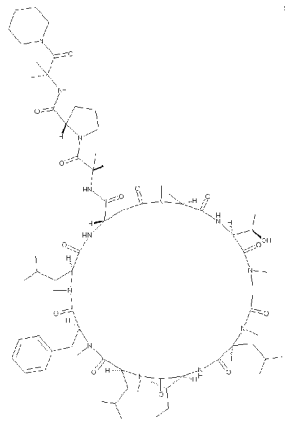
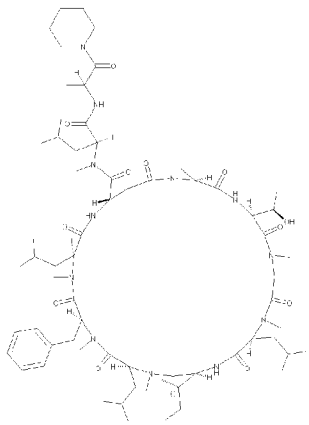
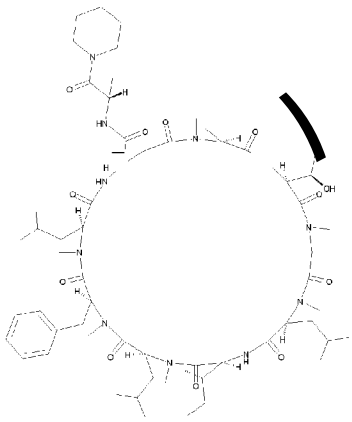
DP-641	
DP-642	
DP-643	
DP-644	

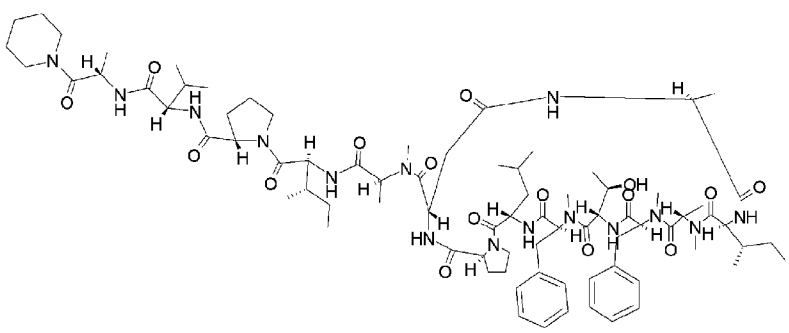
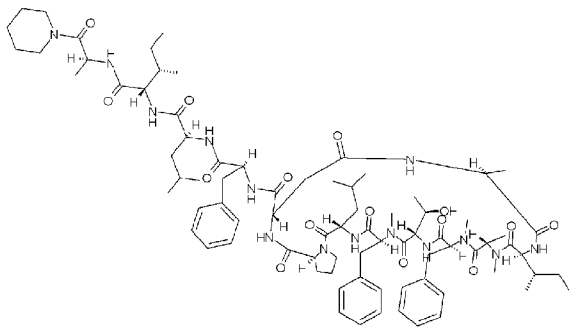
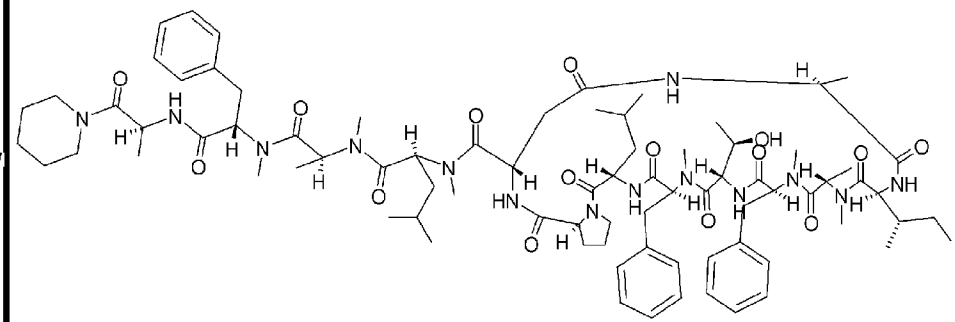
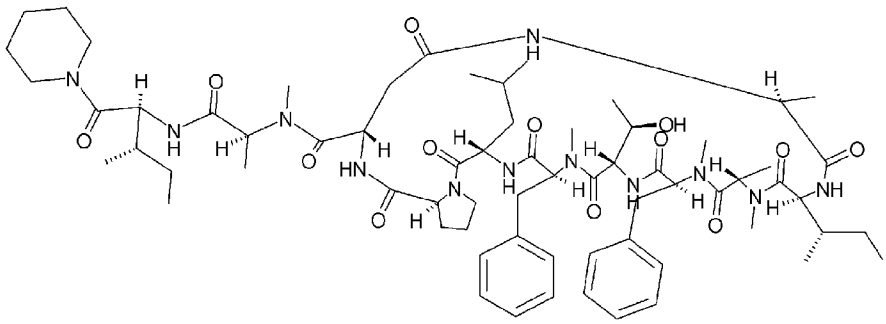
DP-645	
DP-646	
DP-647	
DP-648	

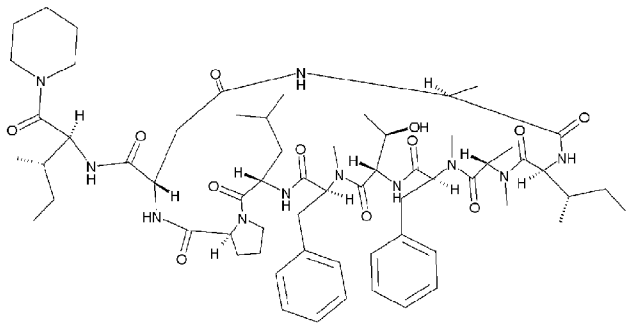
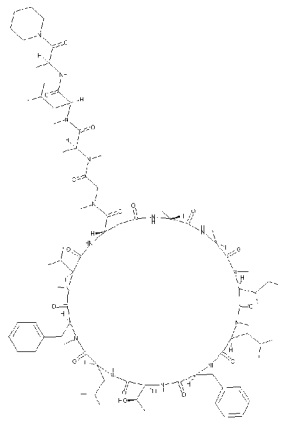
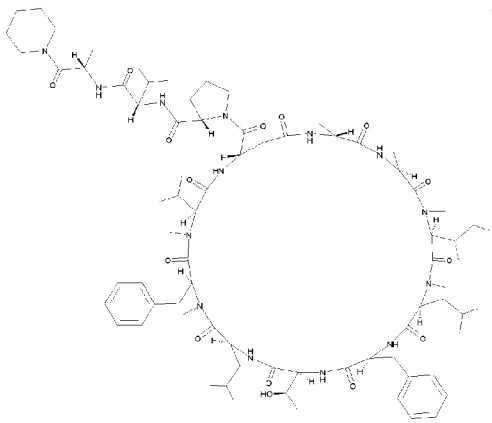
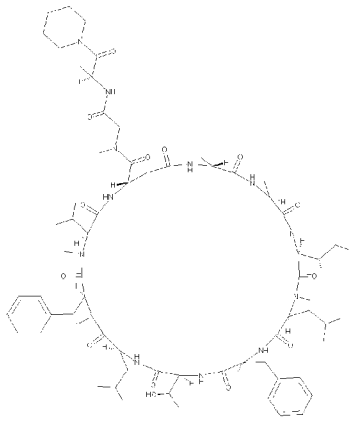
DP-649	
DP-650	
DP-651	
DP-652	

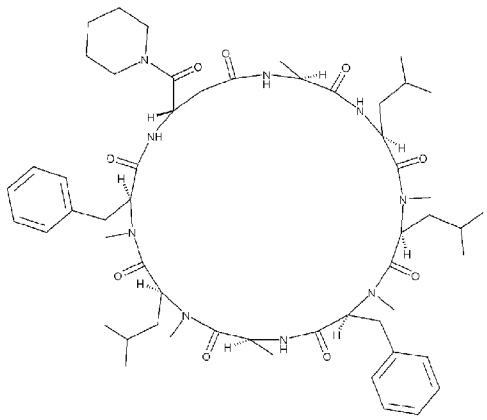
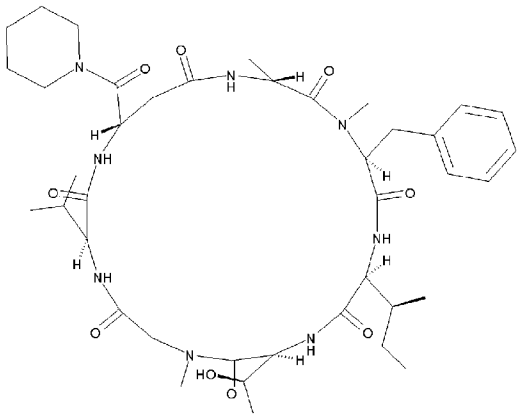
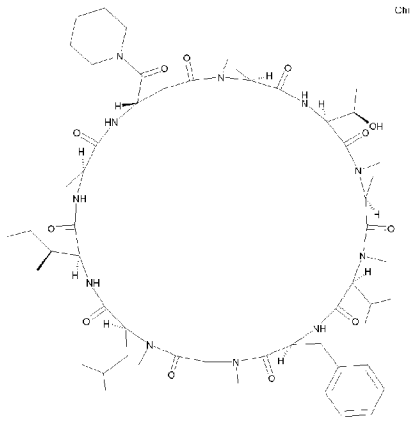
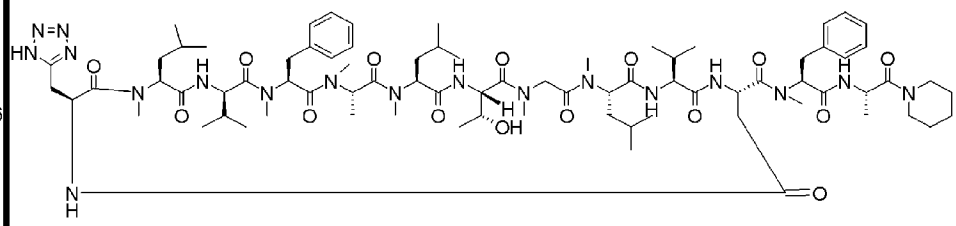
DP-653	
DP-654	
DP-655	
DP-656	

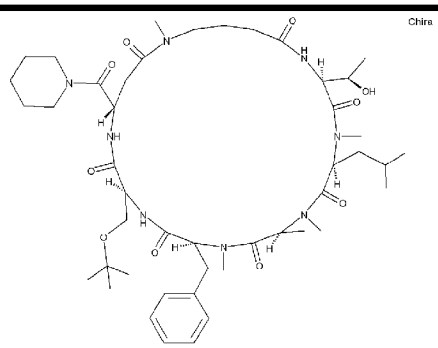
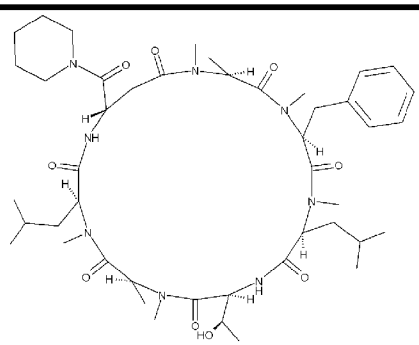
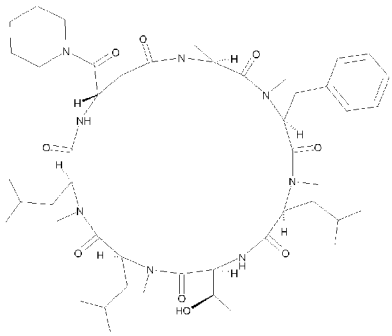
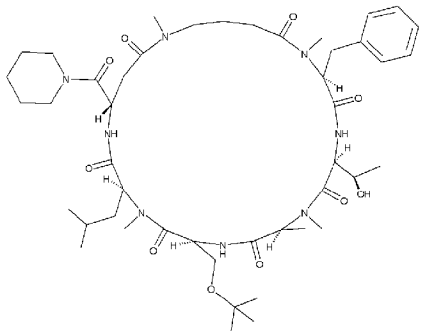
DP-657	
DP-658	
DP-659	
DP-660	

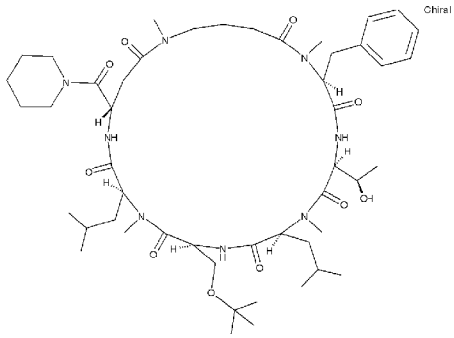
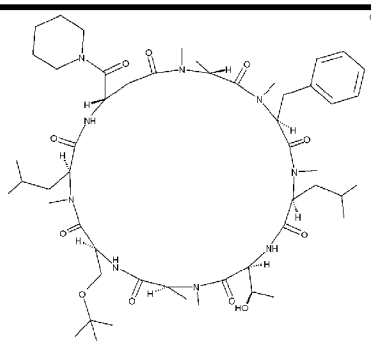
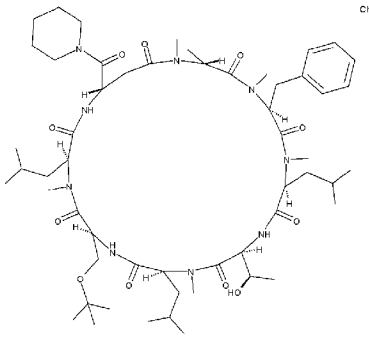
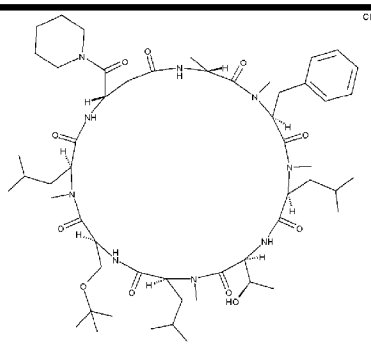
DP-661	
DP-662	
DP-663	
DP-664	

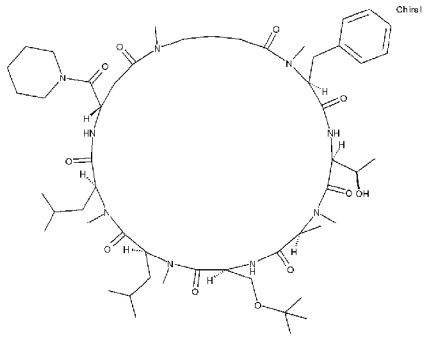
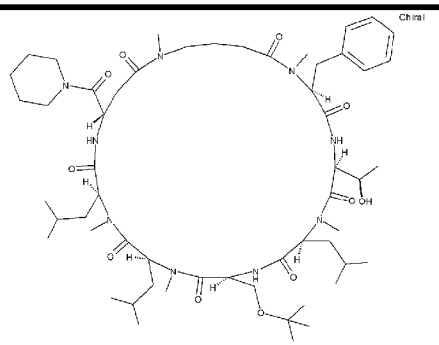
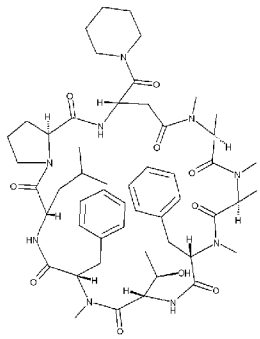
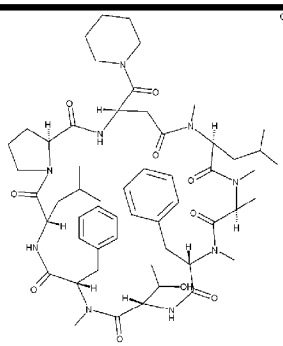
DP-665	 Chiral
DP-666	 Chiral
DP-667	 Chiral
DP-668	 Chiral

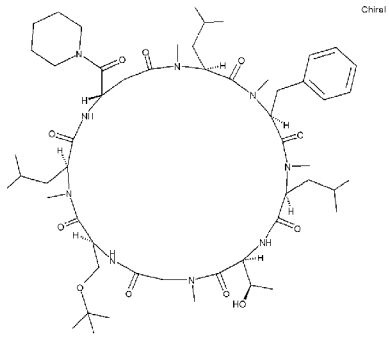
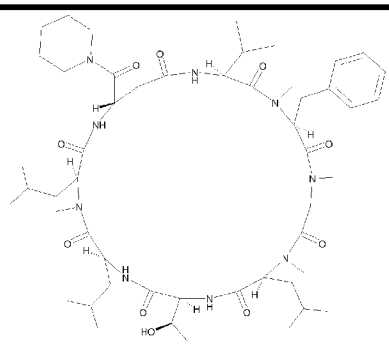
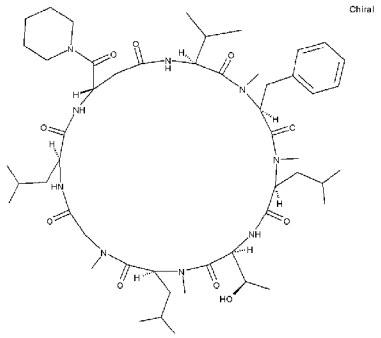
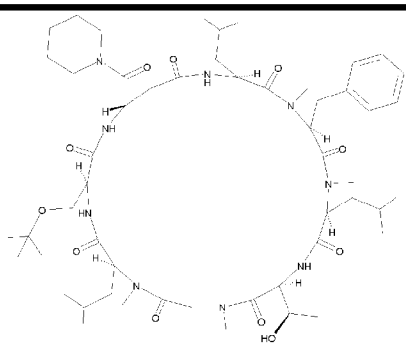
DP-669	
DP-670	
DP-671	
DP-672	

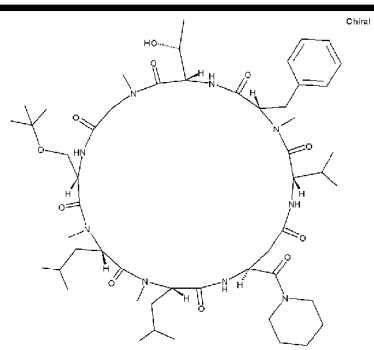
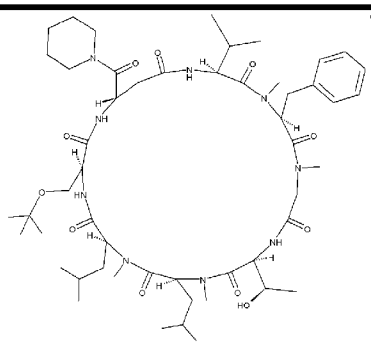
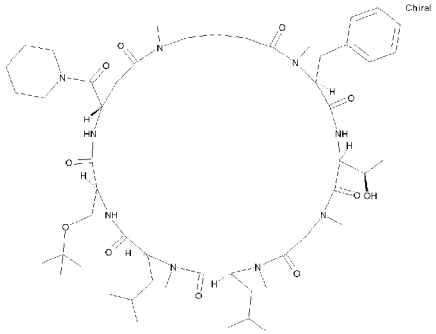
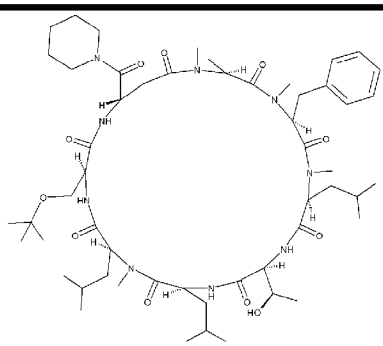
DP-673	 Chiral
DP-674	 Chiral
DP-675	 Chiral
DP-676	 Chiral

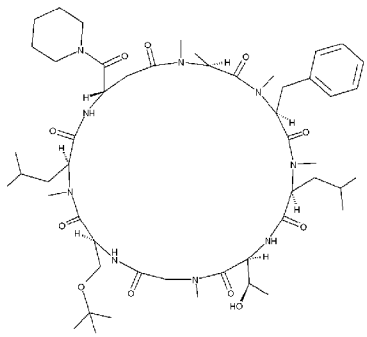
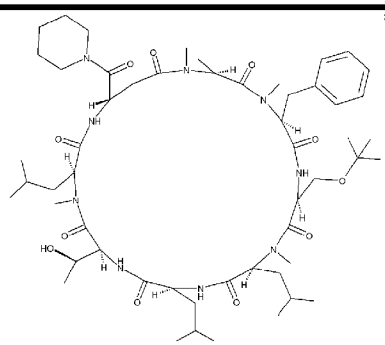
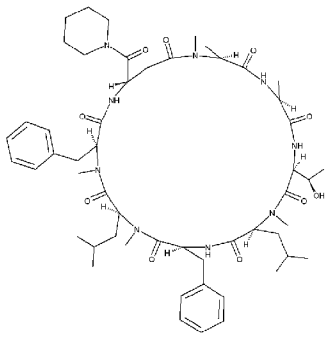
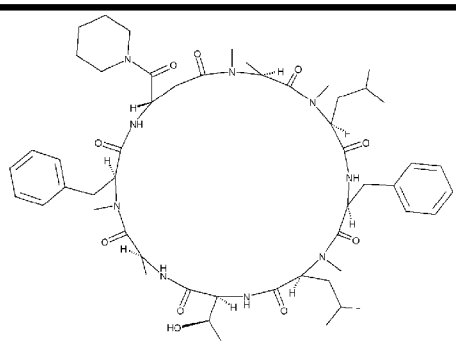
DP-677	
DP-678	
DP-679	
DP-680	

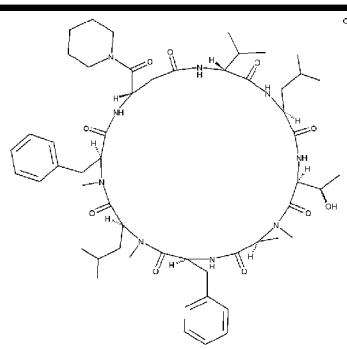
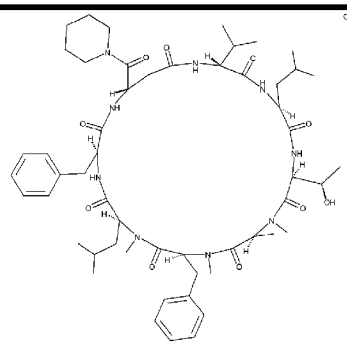
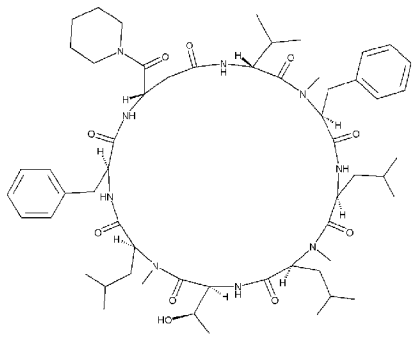
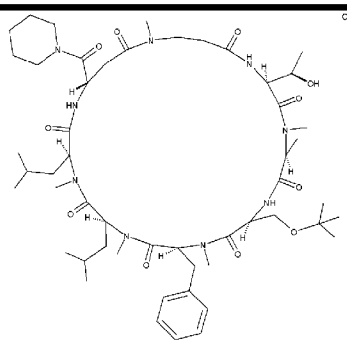
DP-681	
DP-682	
DP-683	
DP-684	

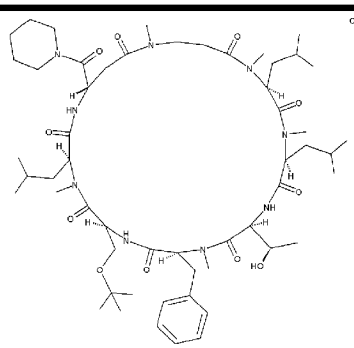
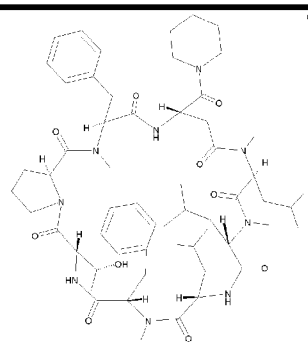
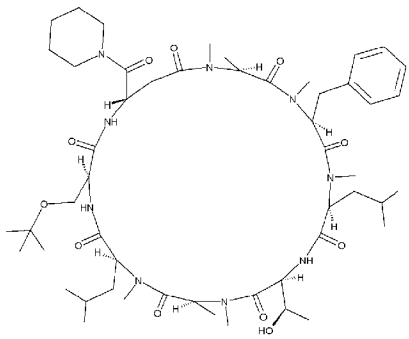
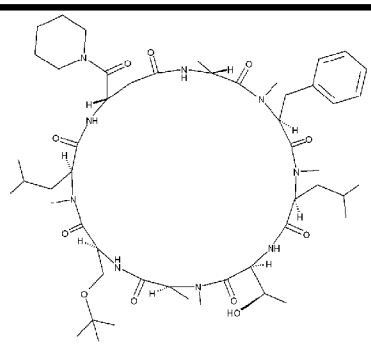
DP-685	
DP-686	
DP-687	
DP-688	

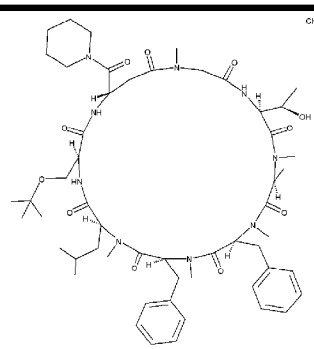
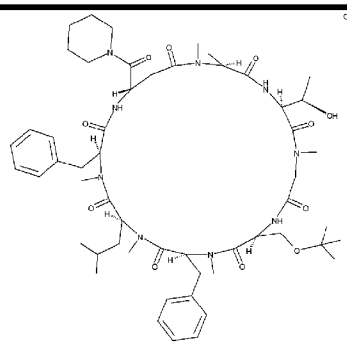
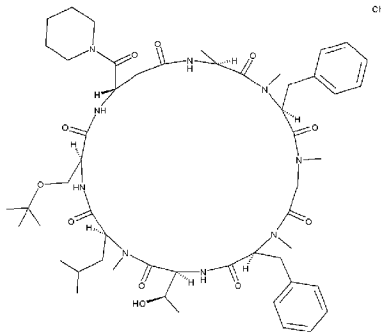
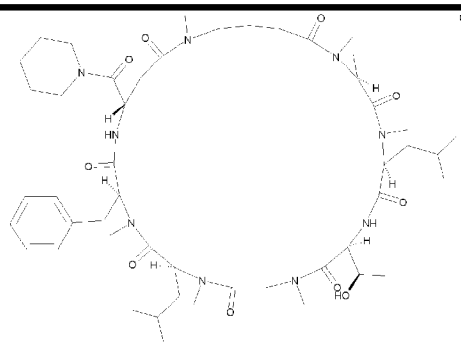
DP-689	
DP-690	
DP-691	
DP-692	

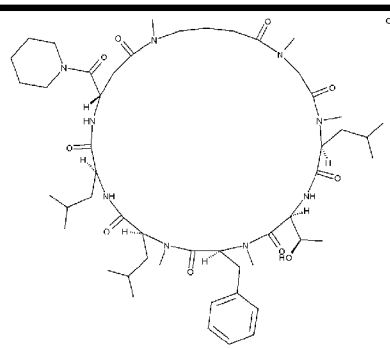
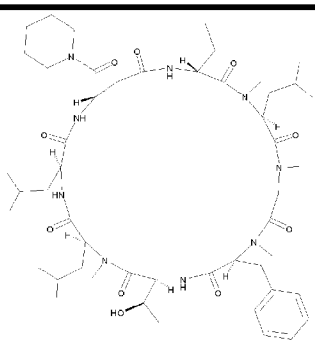
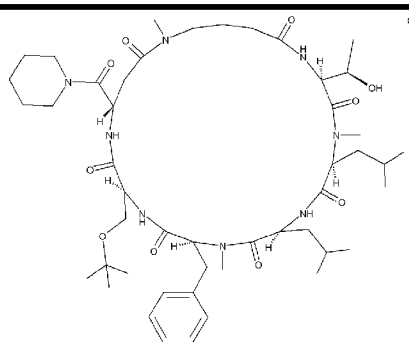
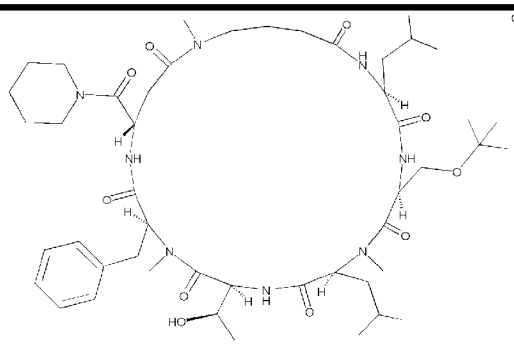
DP-693	
DP-694	
DP-695	
DP-696	

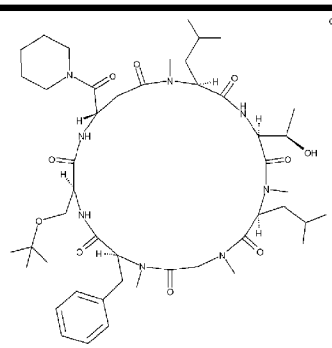
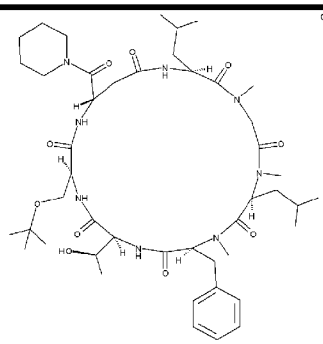
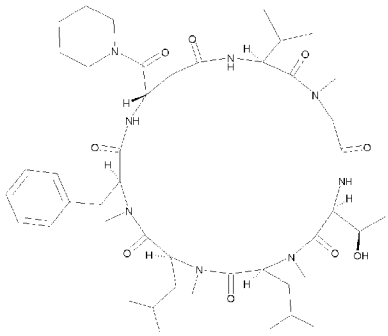
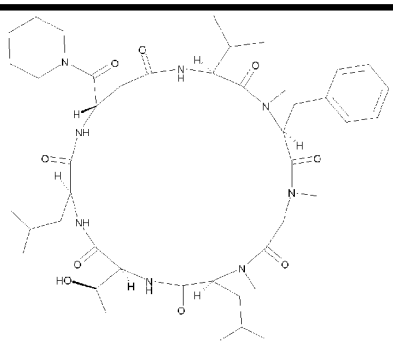
DP-697	
DP-698	
DP-699	
DP-700	

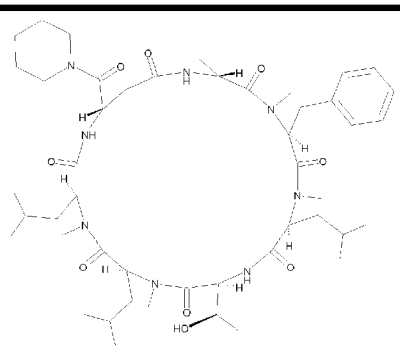
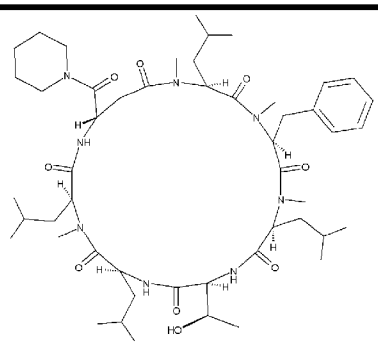
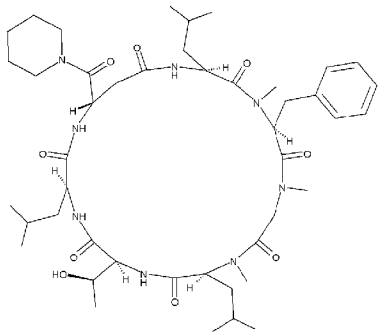
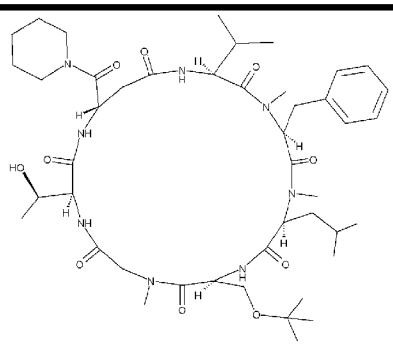
DP-701	
DP-702	
DP-703	
DP-704	

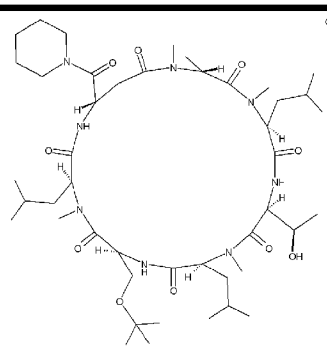
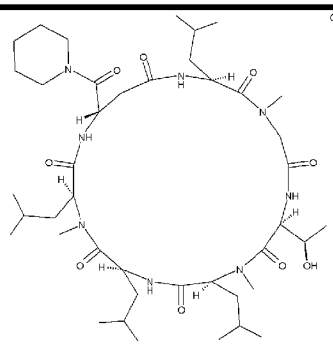
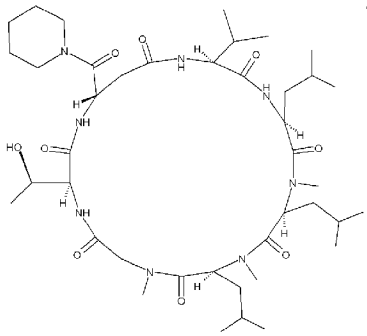
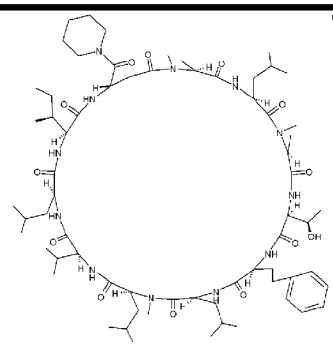
DP-705	
DP-706	
DP-707	
DP-708	

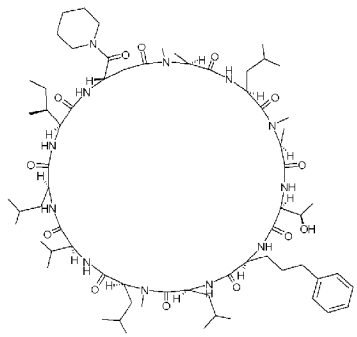
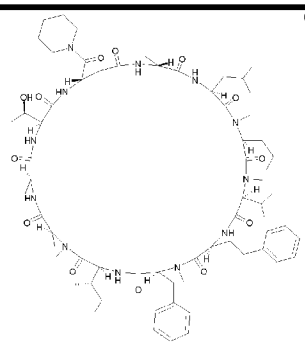
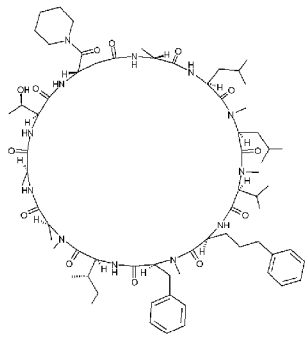
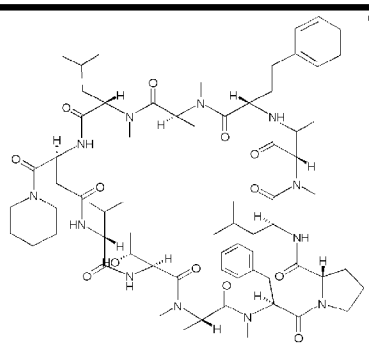
DP-709	
DP-710	
DP-711	
DP-712	

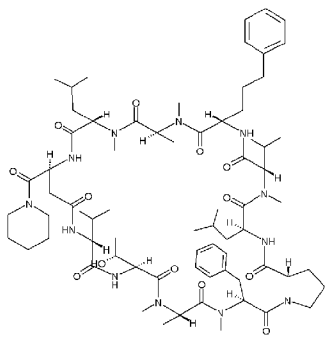
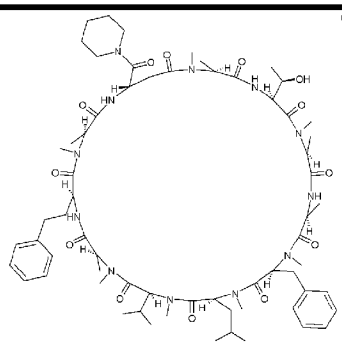
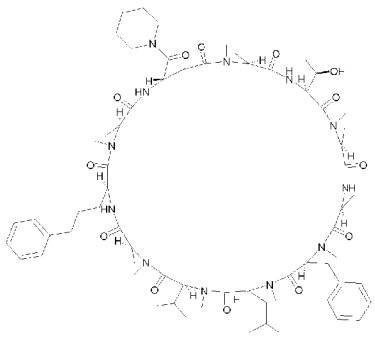
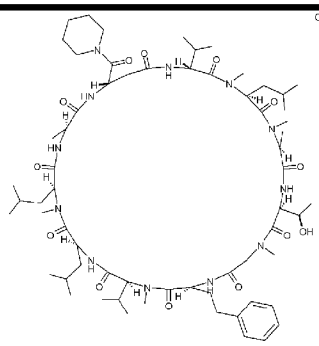
DP-713	
DP-714	
DP-715	
DP-716	

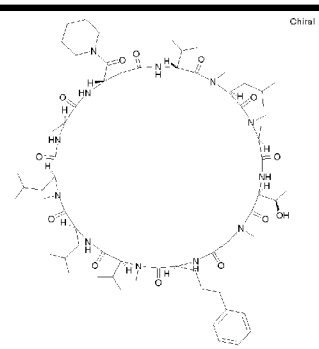
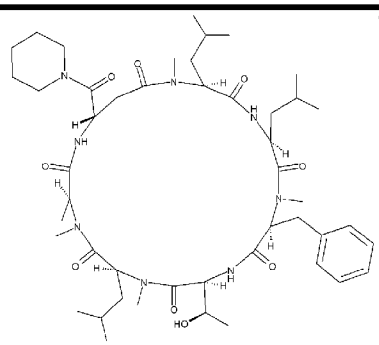
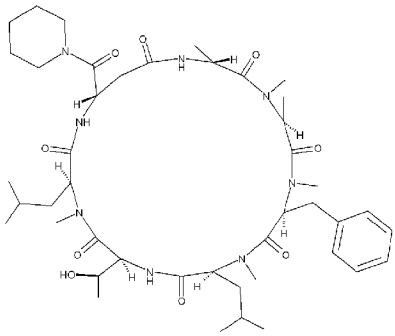
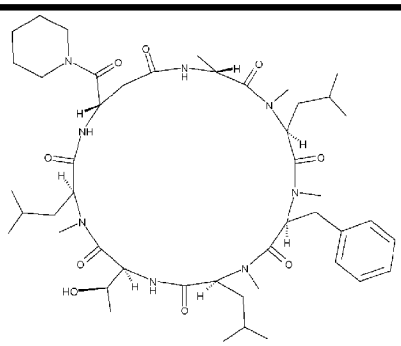
DP-717	
DP-718	
DP-719	
DP-720	

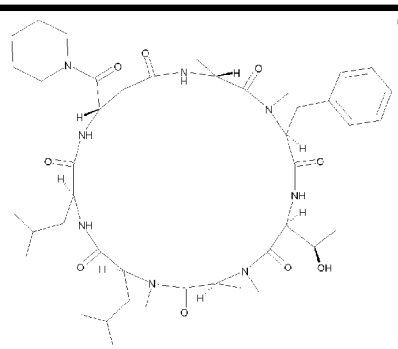
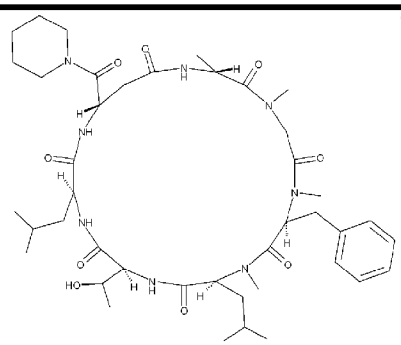
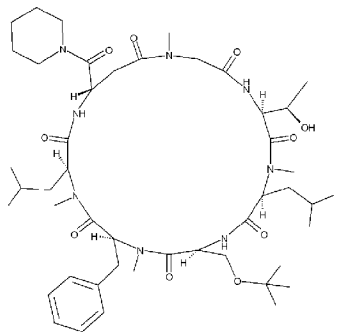
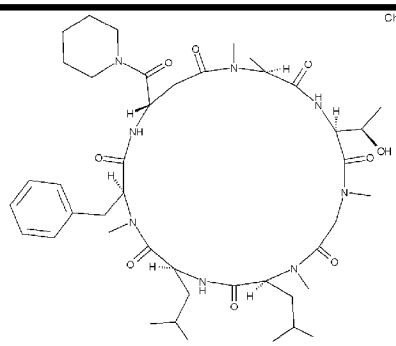
DP-721	
DP-722	
DP-723	
DP-724	

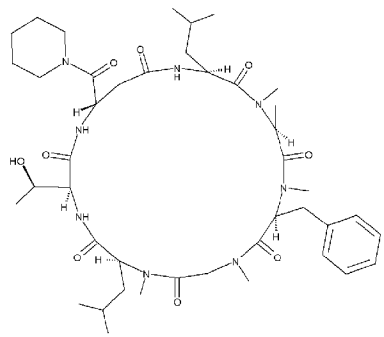
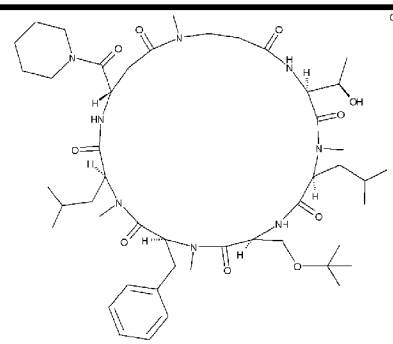
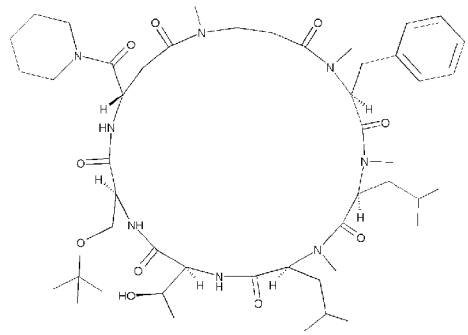
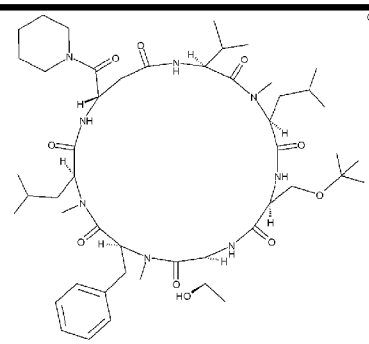
DP-725	 Chiral
DP-726	 Chiral
DP-727	 Chiral
DP-728	 Chiral

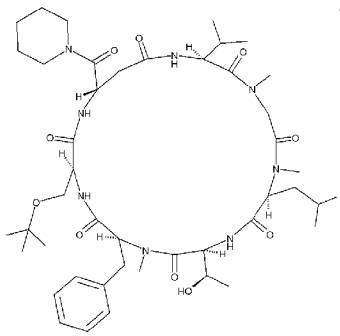
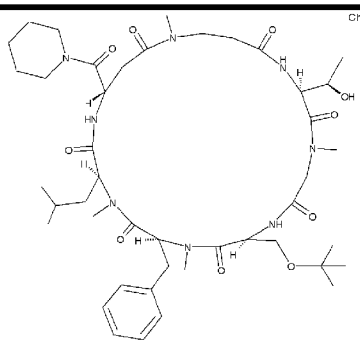
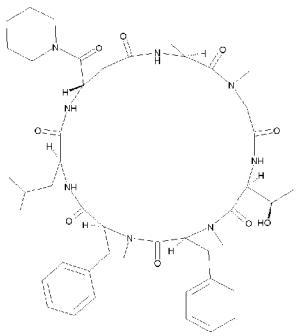
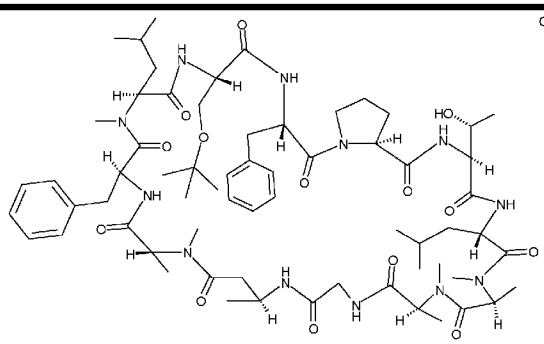
DP-729	
DP-730	
DP-731	
DP-732	

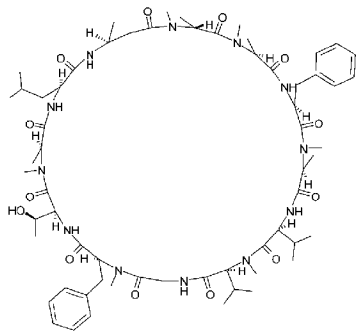
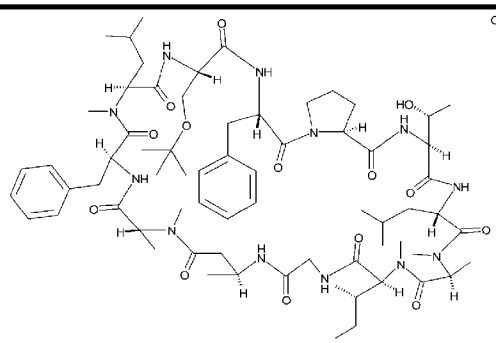
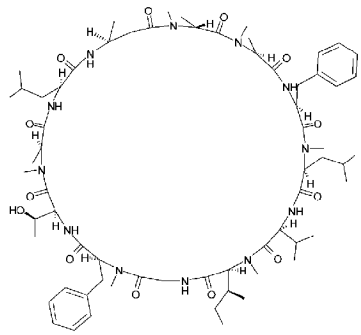
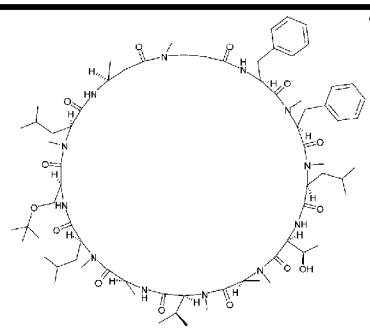
DP-733	
DP-734	
DP-735	
DP-736	

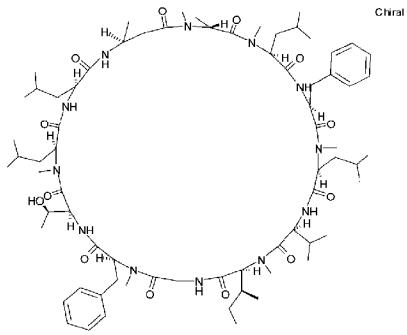
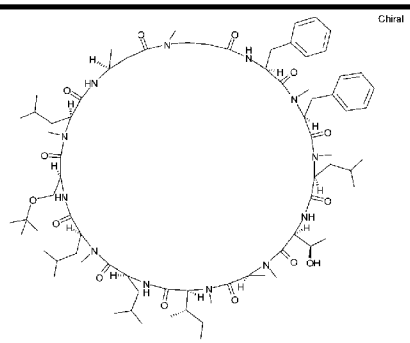
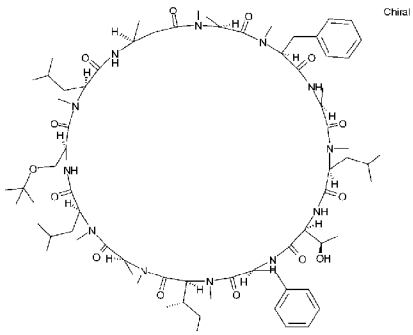
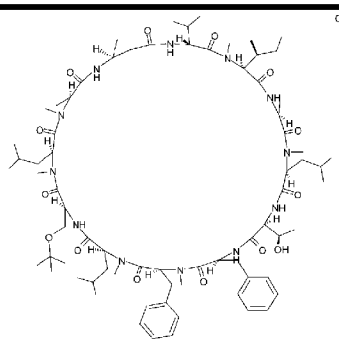
DP-737	
DP-738	
DP-739	
DP-740	

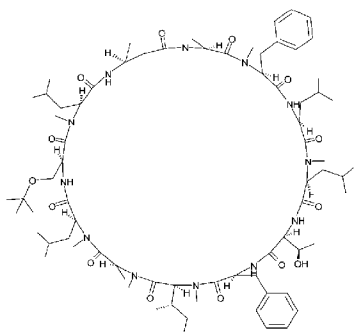
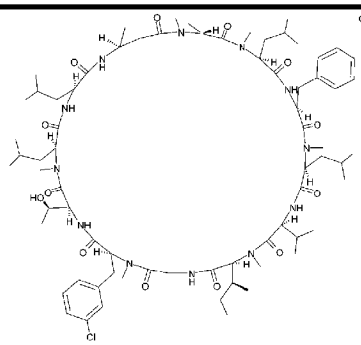
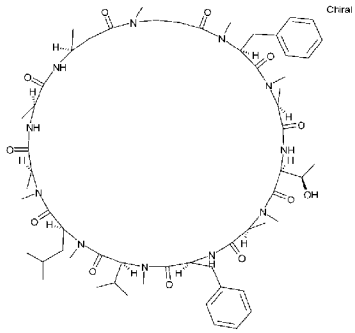
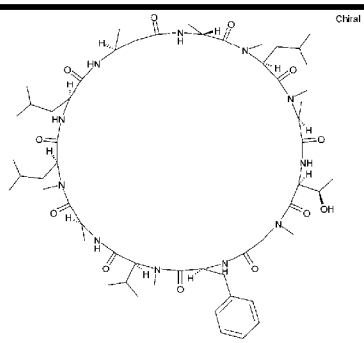
DP-741	 Chiral
DP-742	 Chiral
DP-743	 Chiral
DP-744	 Chiral

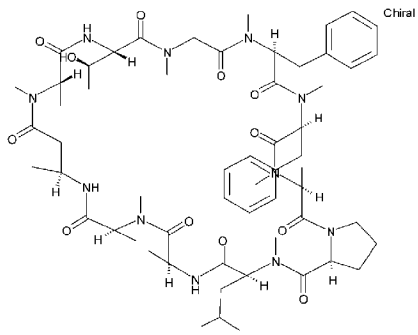
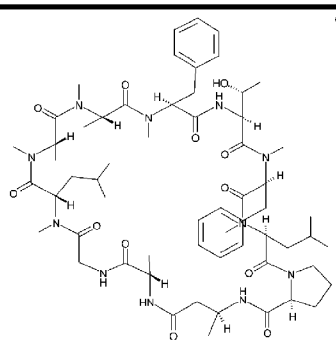
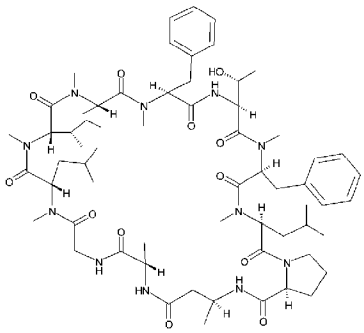
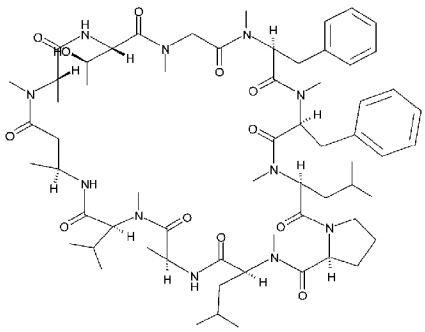
DP-745	 Chiral
DP-746	 Chiral
DP-747	 Chiral
DP-748	 Chiral

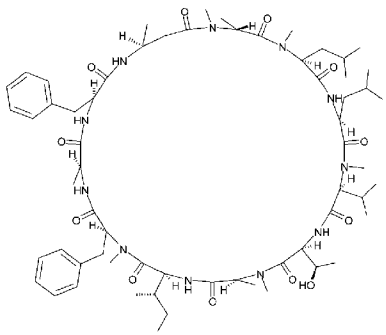
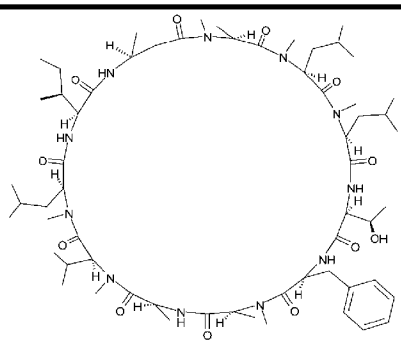
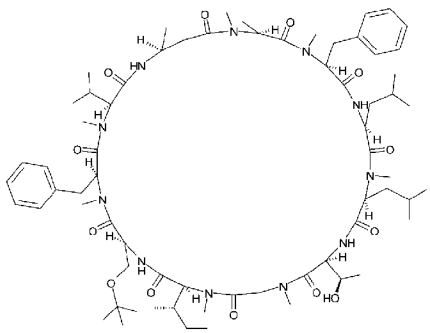
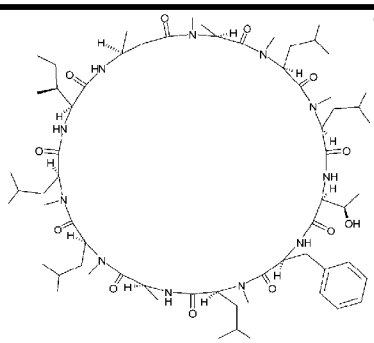
DP-749	
DP-750	
DP-751	
DP-752	

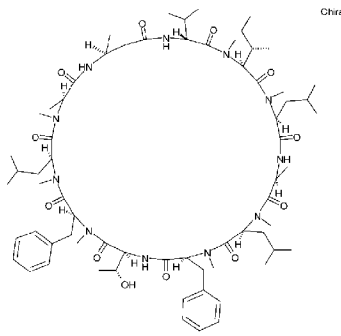
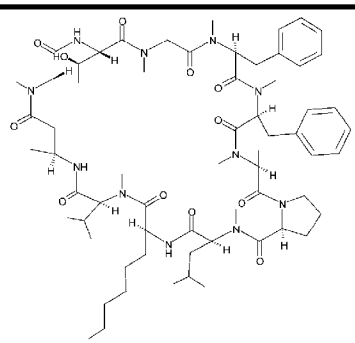
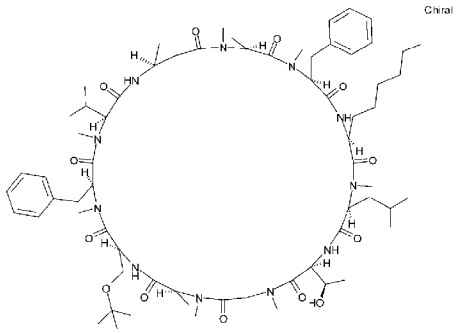
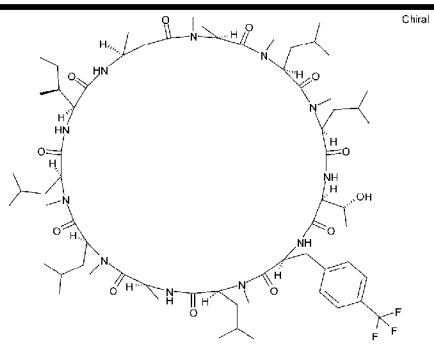
DP-753	 Chiral
DP-754	 Chiral
DP-755	 Chiral
DP-756	 Chiral

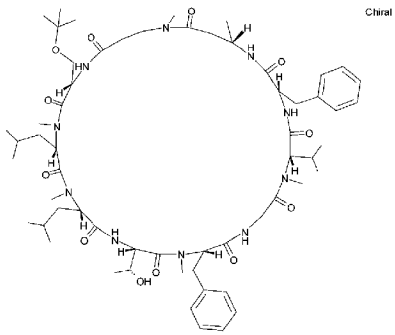
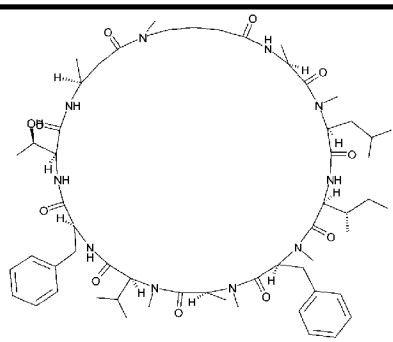
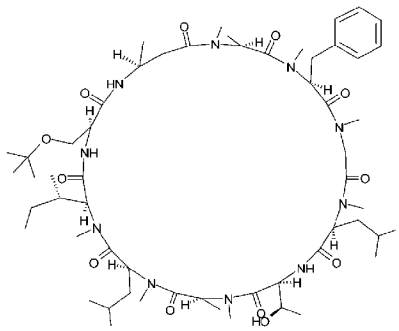
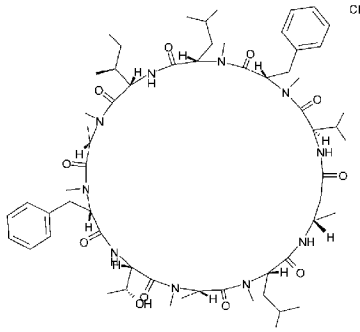
DP-757	
DP-758	
DP-759	
DP-760	

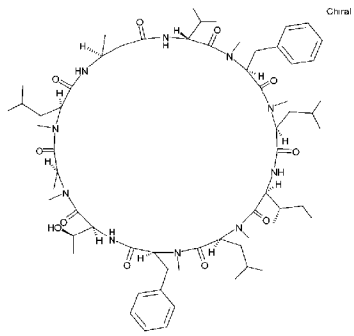
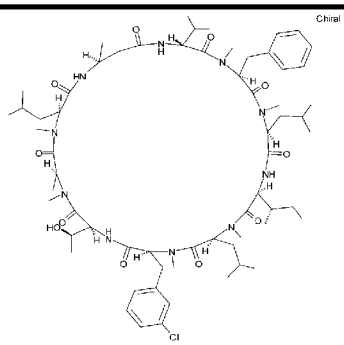
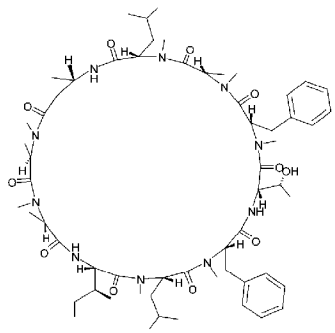
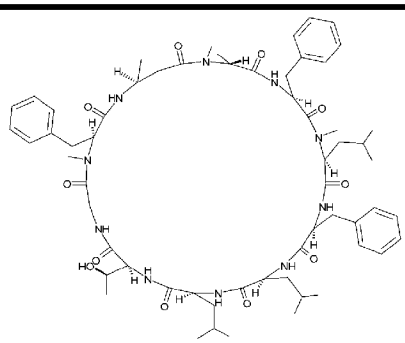
DP-761	
DP-762	
DP-763	
DP-764	

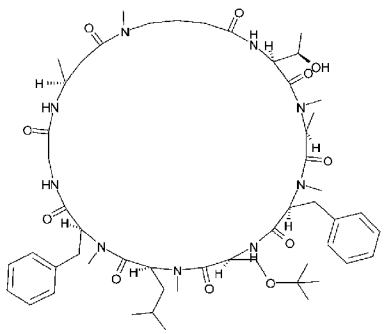
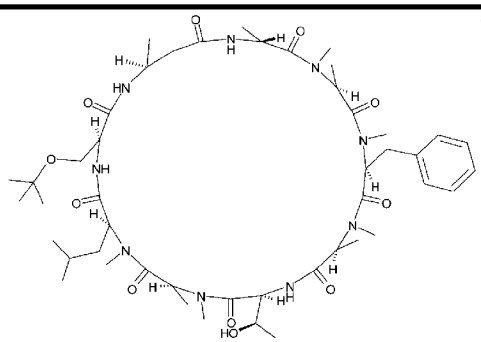
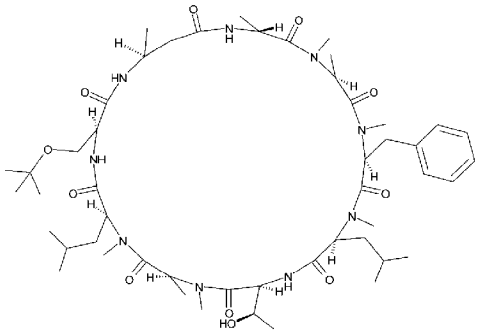
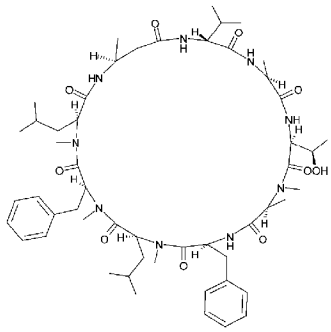
DP-765	 Chiral
DP-766	 Chiral
DP-767	 Chiral
DP-768	 Chiral

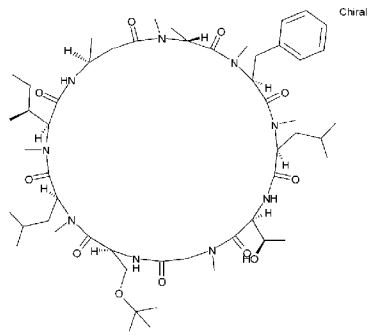
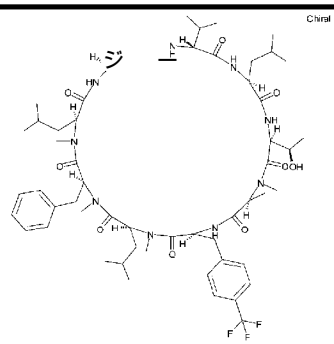
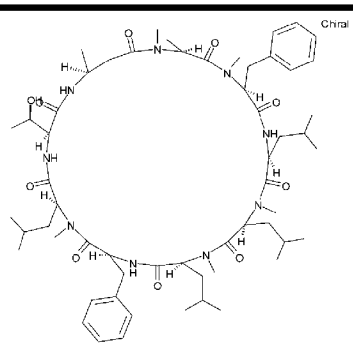
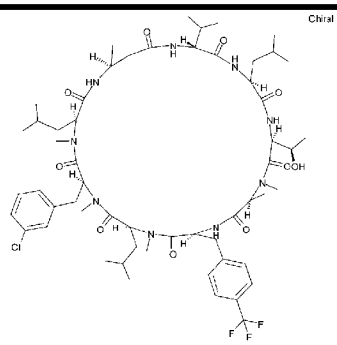
DP-769	 Chiral
DP-770	 Chiral
DP-771	 Chiral
DP-772	 Chiral

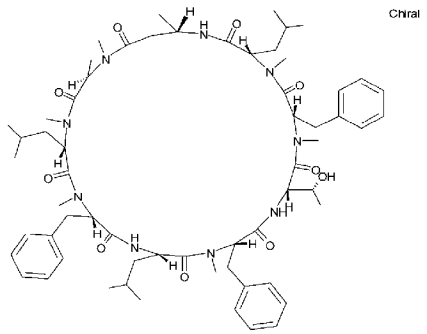
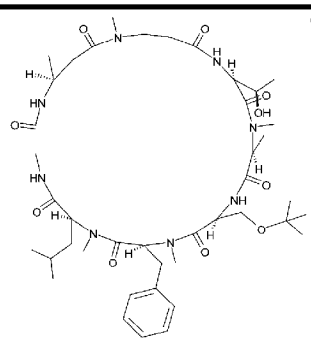
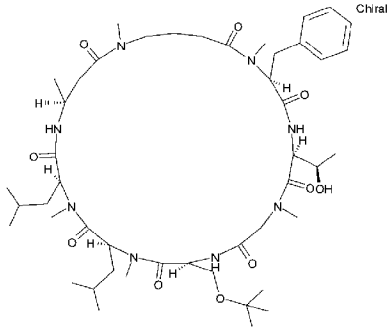
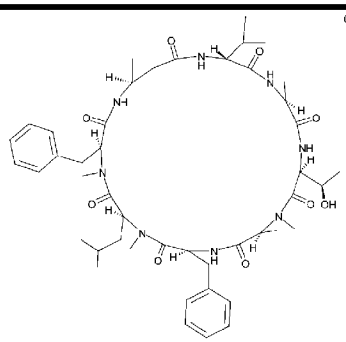
DP-773	
DP-774	
DP-775	
DP-776	

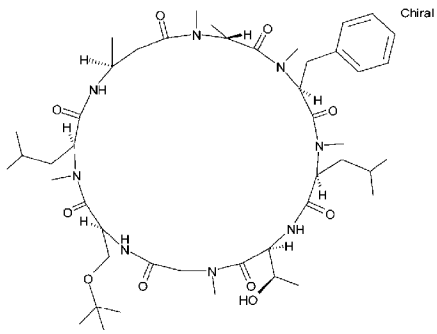
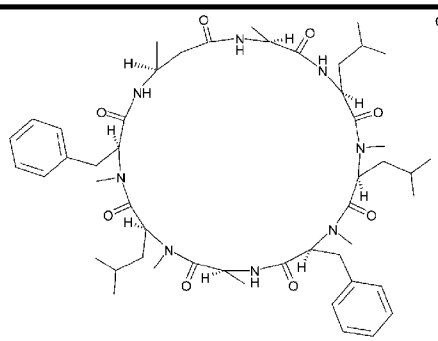
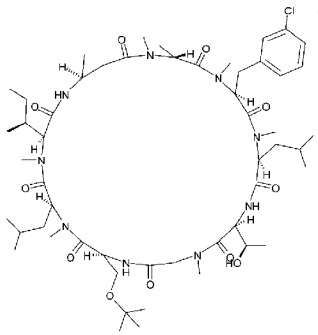
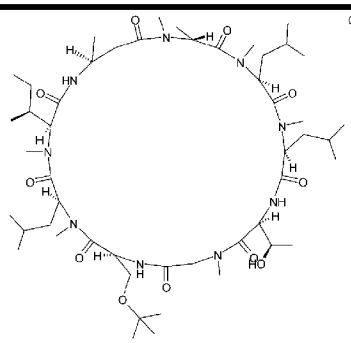
DP-777	 Chiral
DP-778	 Chiral
DP-779	 Chiral
DP-780	 Chiral

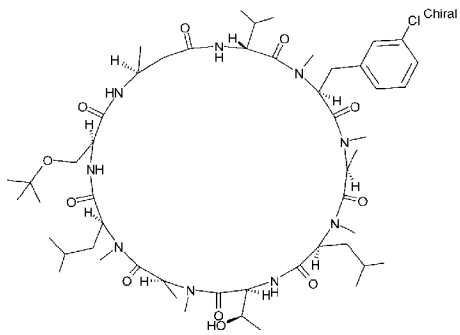
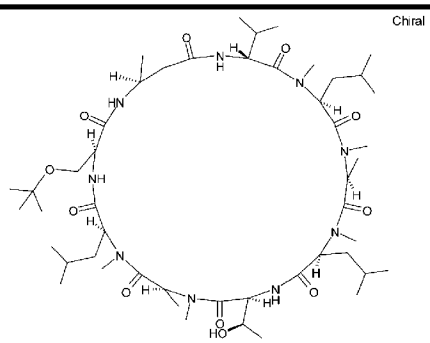
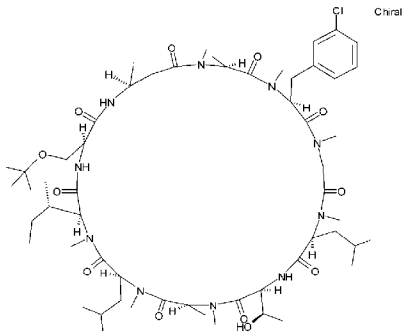
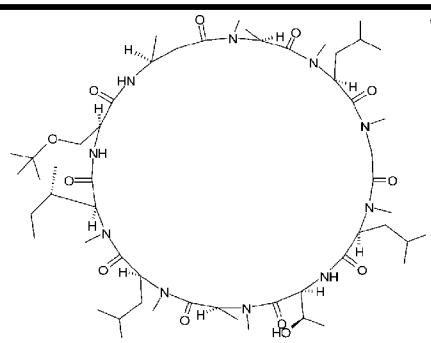
DP-781	
DP-782	
DP-783	
DP-784	

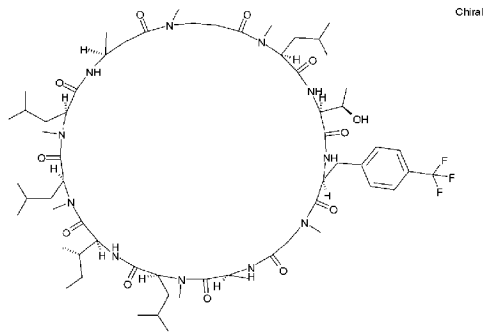
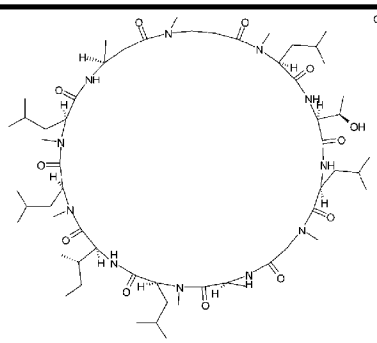
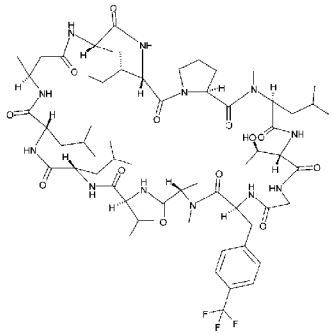
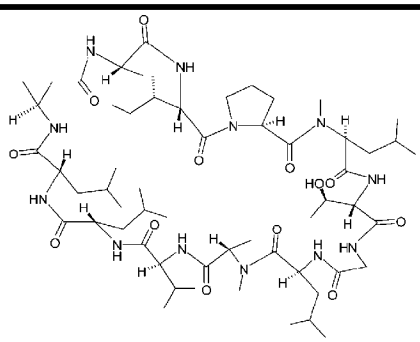
DP-785	 Chiral
DP-786	 Chiral
DP-787	 Chiral
DP-788	 Chiral

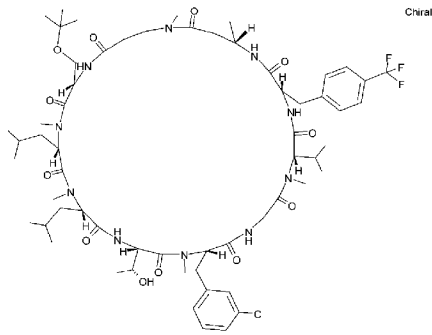
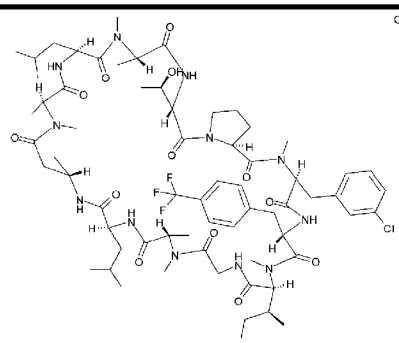
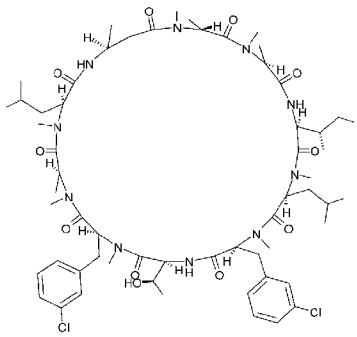
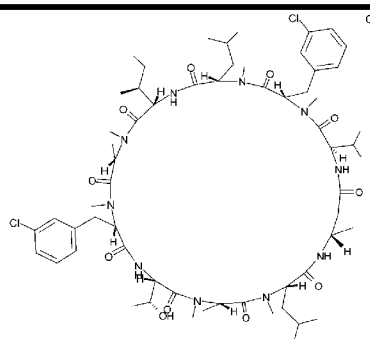
DP-789	
DP-790	
DP-791	
DP-792	

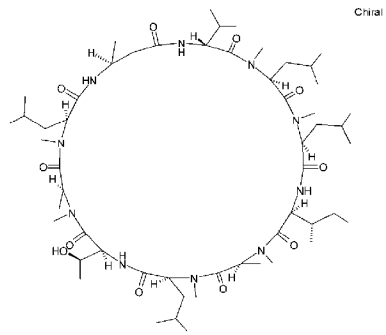
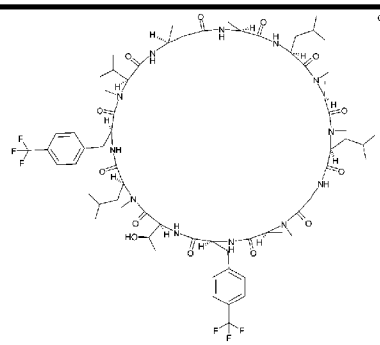
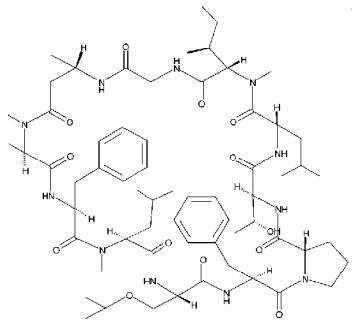
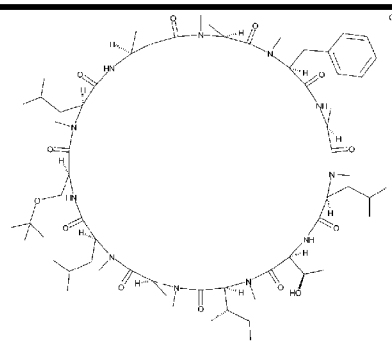
DP-793	 Chiral
DP-794	 Chiral
DP-795	 Chiral
DP-796	 Chiral

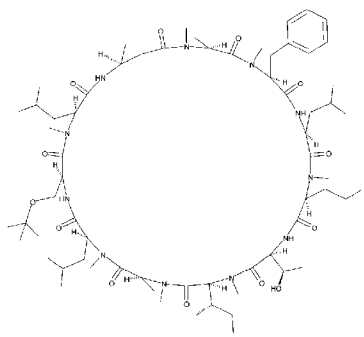
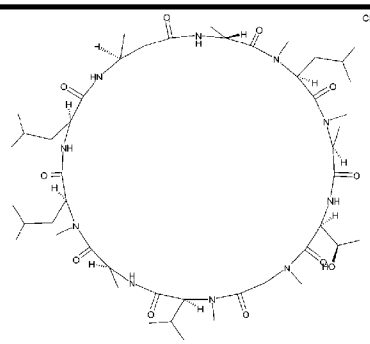
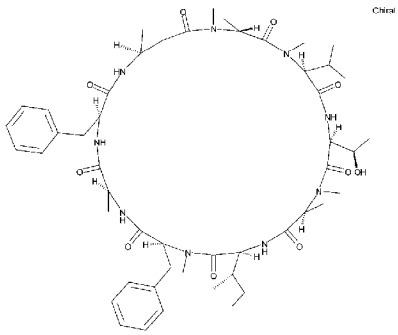
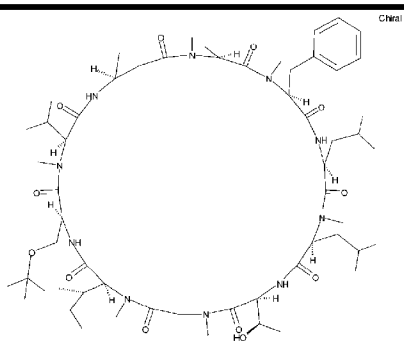
DP-797	
DP-798	
DP-799	
DP-800	

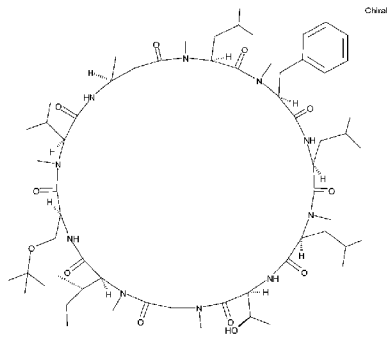
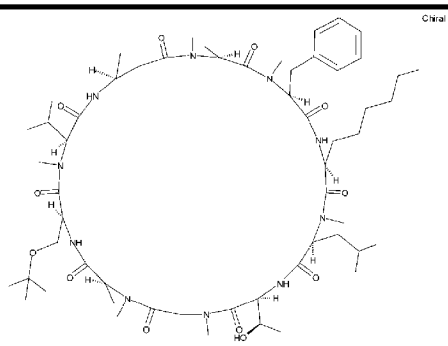
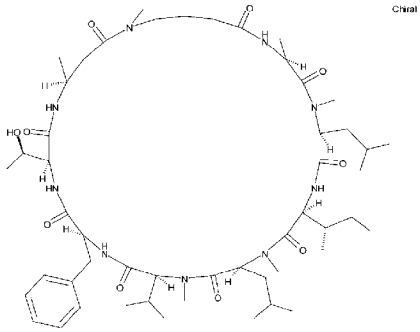
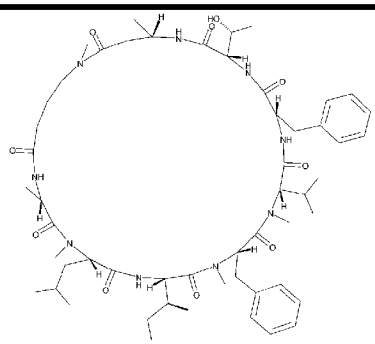
DP-801	
DP-802	
DP-803	
DP-804	

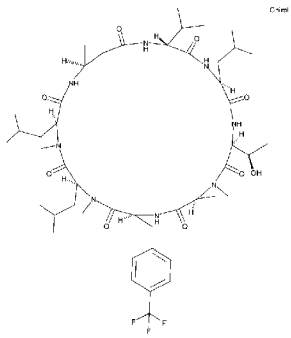
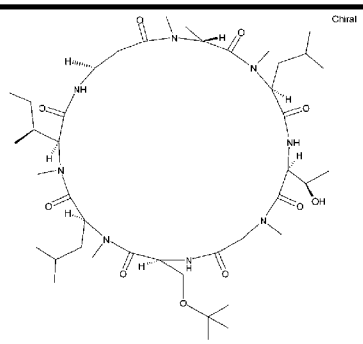
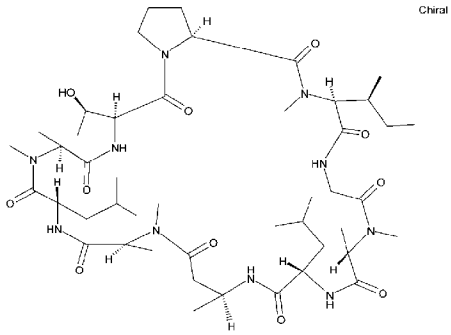
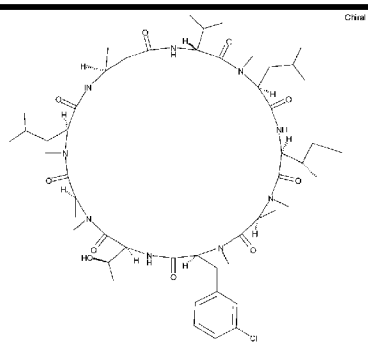
DP-805	
DP-806	
DP-807	
DP-808	

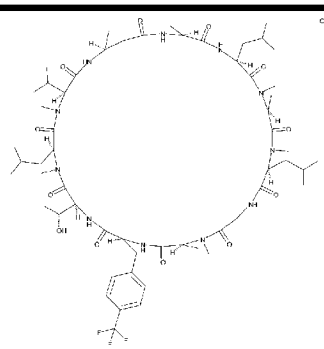
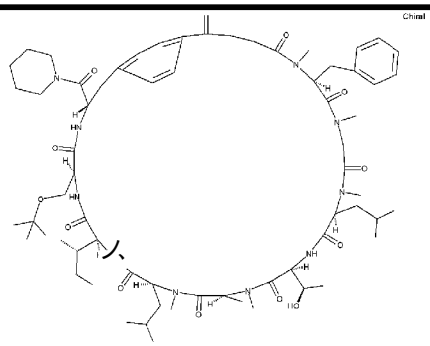
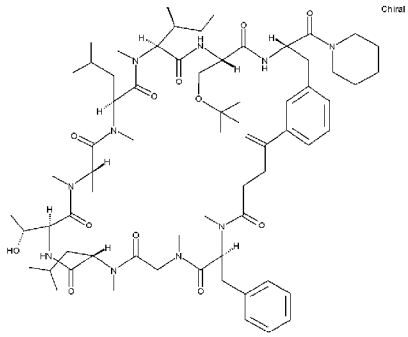
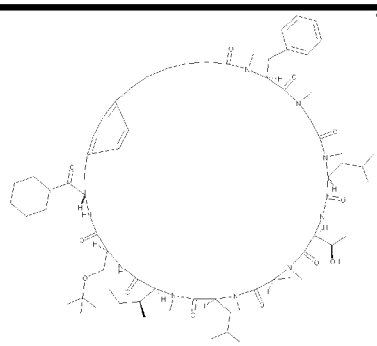
DP-809	 Chiral
DP-810	 Chiral
DP-811	 Chiral
DP-812	 Chiral

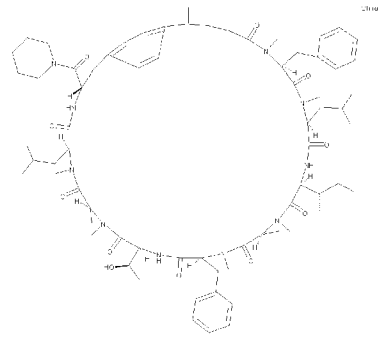
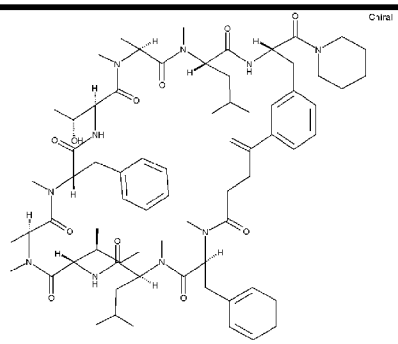
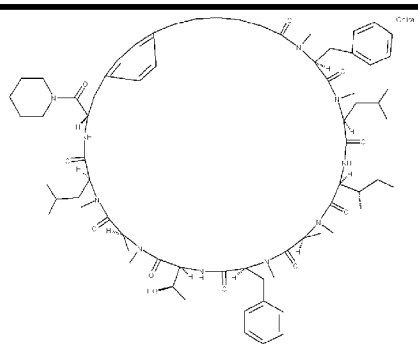
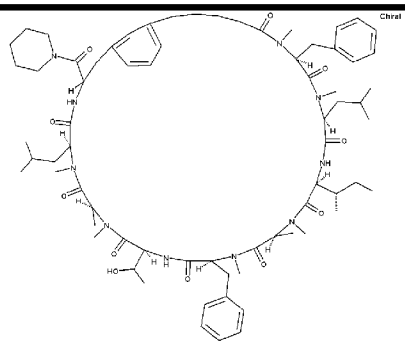
DP-813	
DP-814	
DP-815	
DP-816	

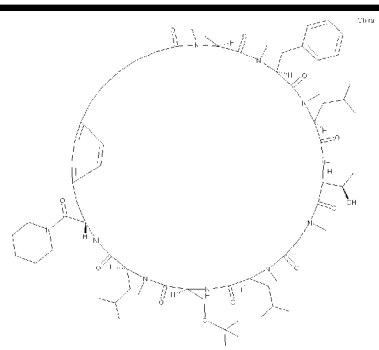
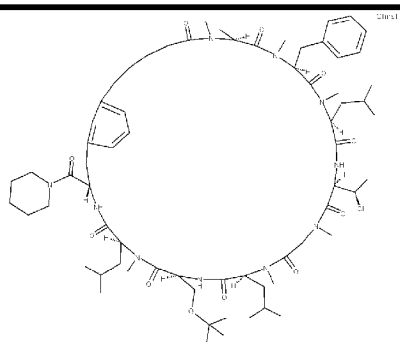
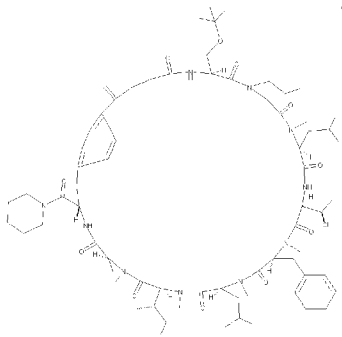
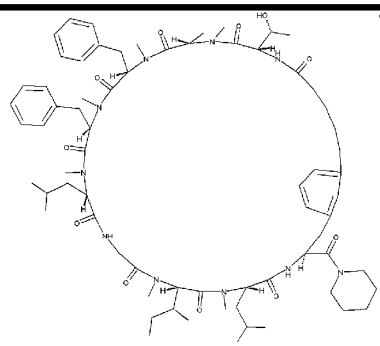
DP-817	
DP-818	
DP-819	
DP-820	

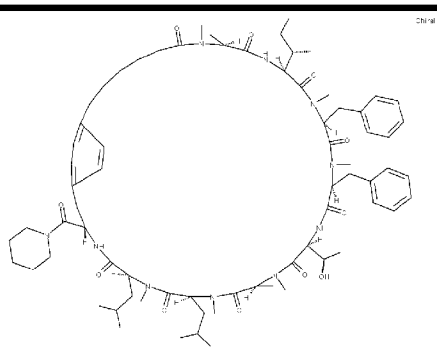
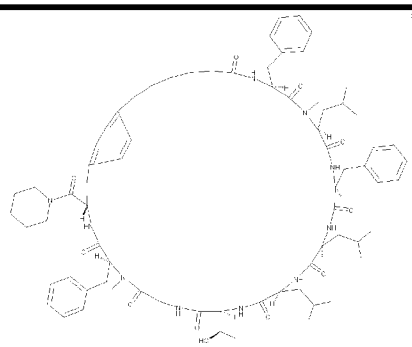
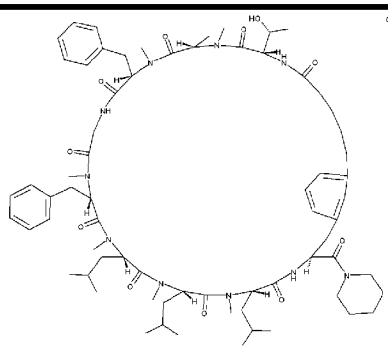
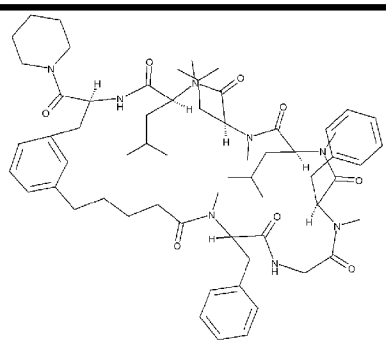
DP-821	
DP-822	
DP-823	
DP-824	

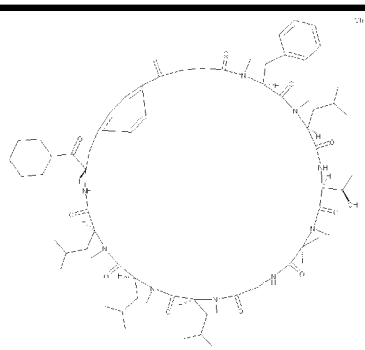
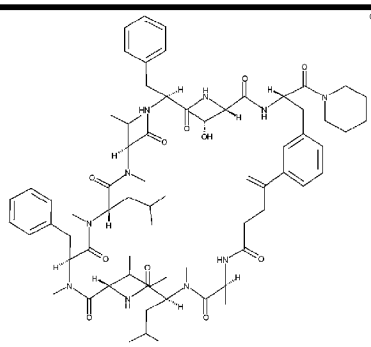
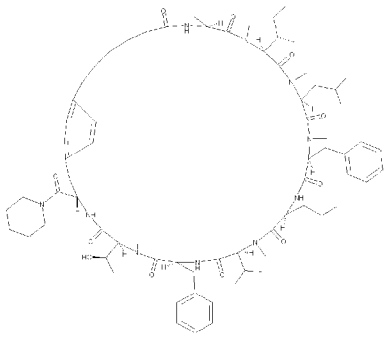
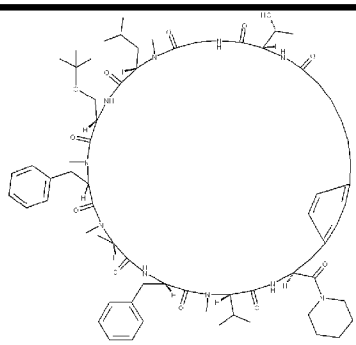
DP-825	
DP-826	
DP-827	
DP-828	

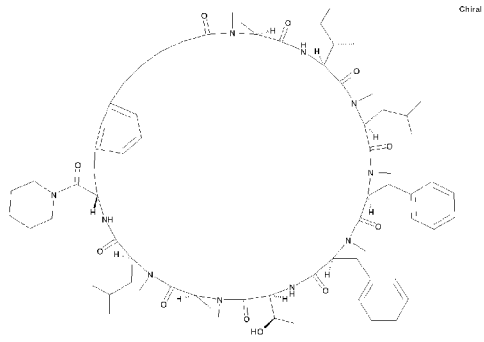
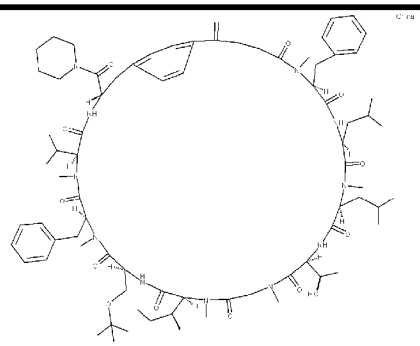
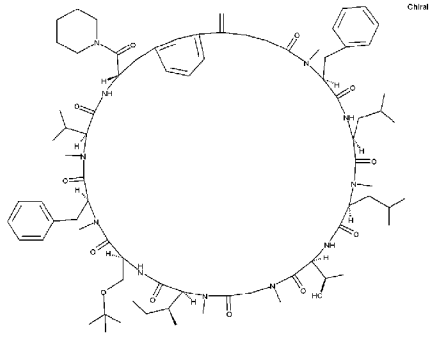
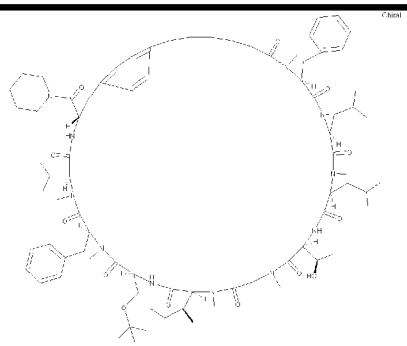
DP-829	
DP-830	
DP-831	
DP-832	

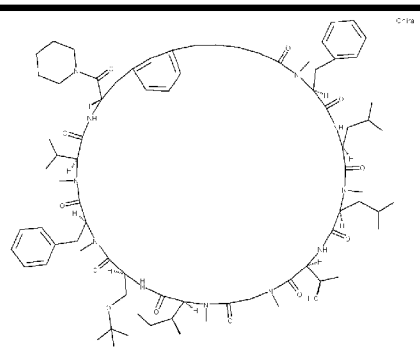
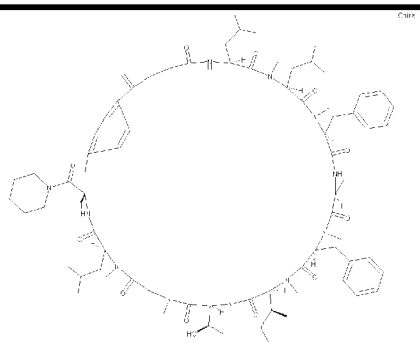
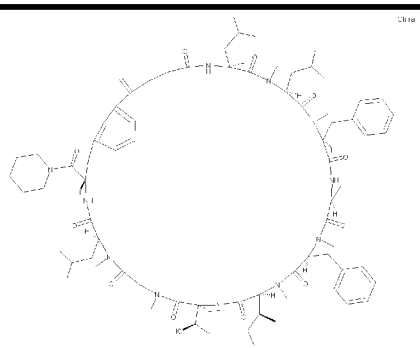
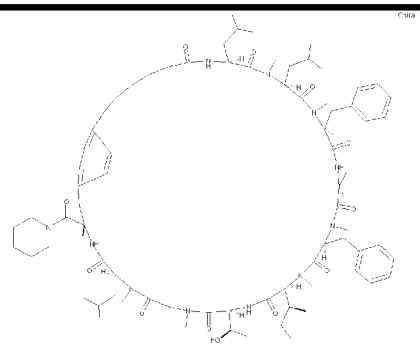
DP-833	
DP-834	
DP-835	
DP-836	

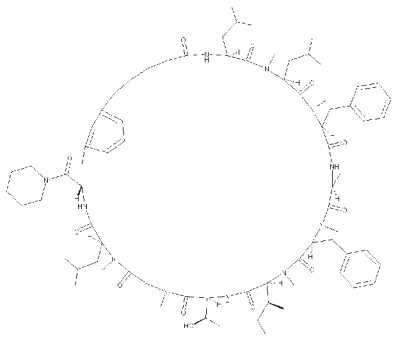
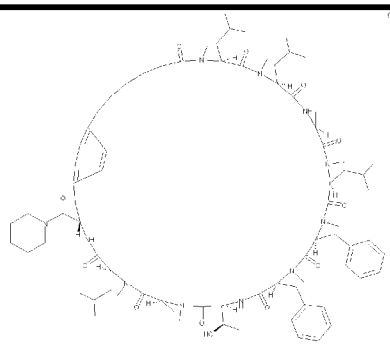
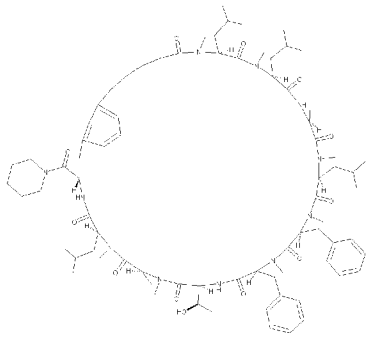
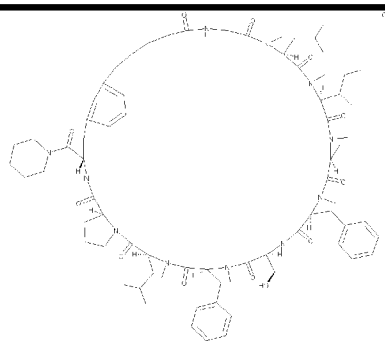
DP-837	
DP-838	
DP-839	
DP-840	

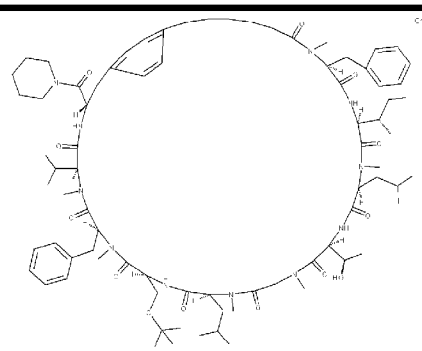
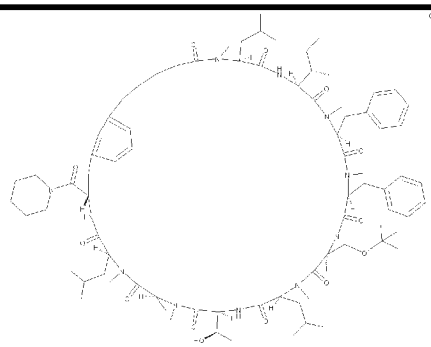
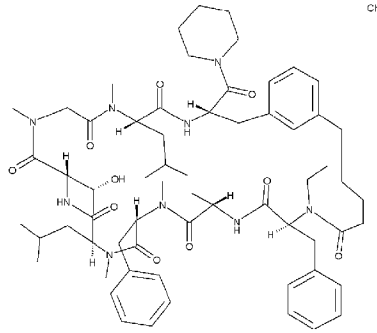
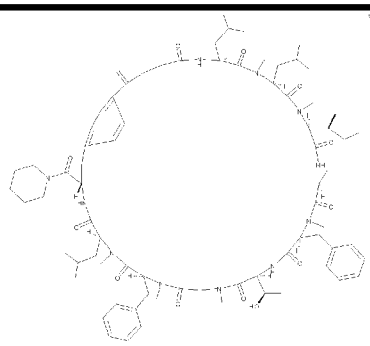
DP-841	
DP-842	
DP-843	
DP-844	

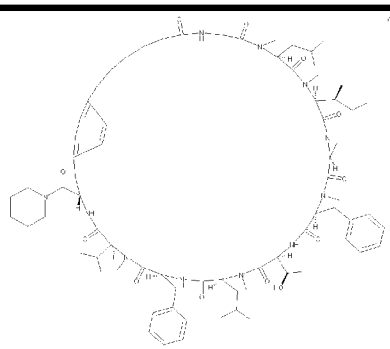
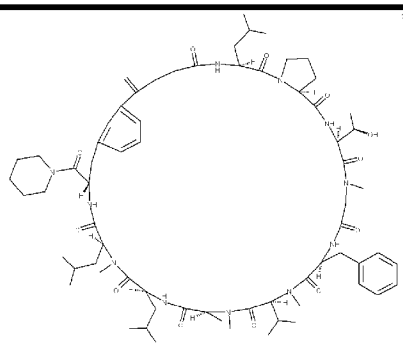
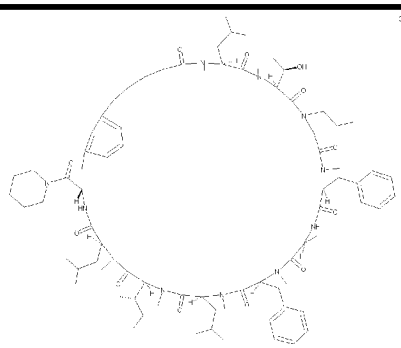
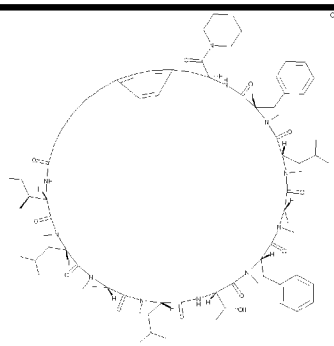
DP-845	
DP-846	
DP-847	
DP-848	

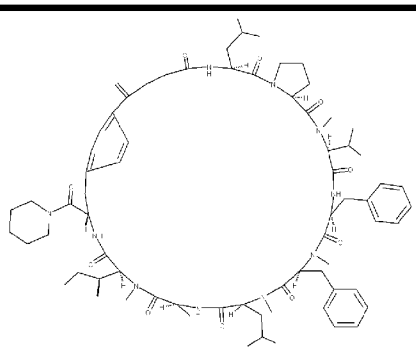
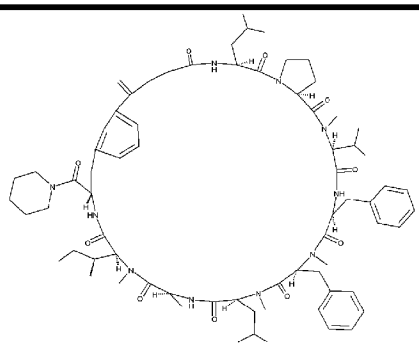
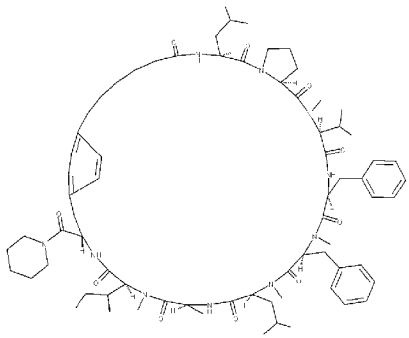
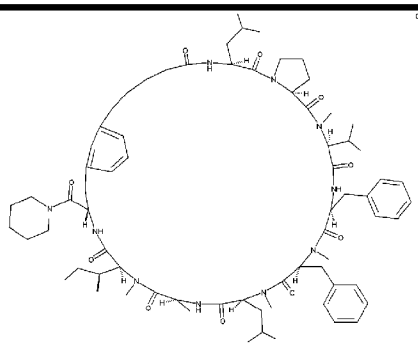
DP-849	
DP-850	
DP-851	
DP-852	

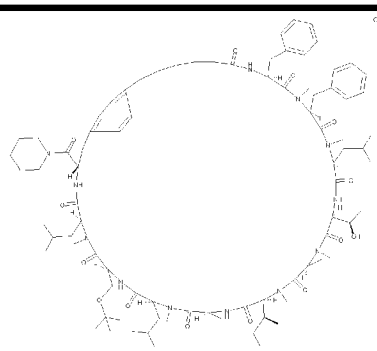
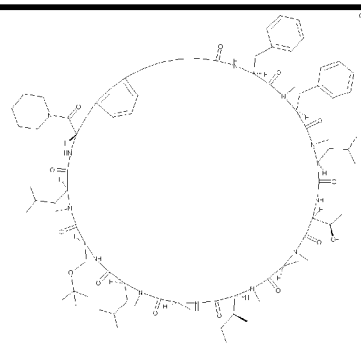
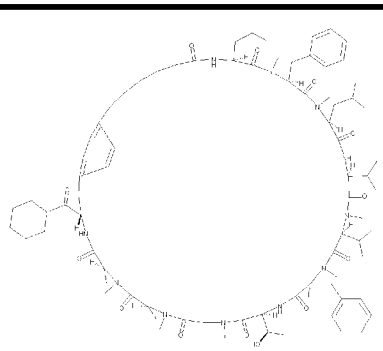
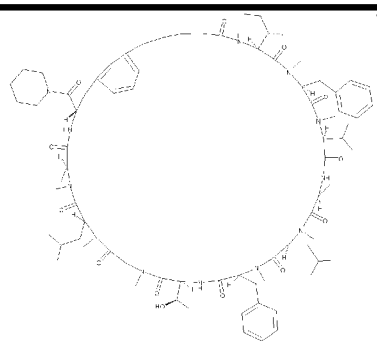
DP-853	
DP-854	
DP-855	
DP-856	

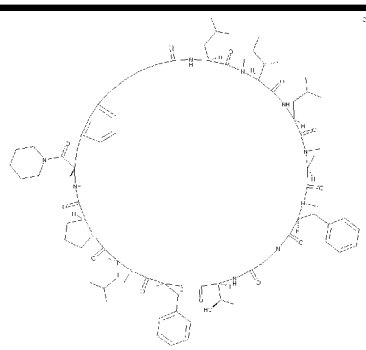
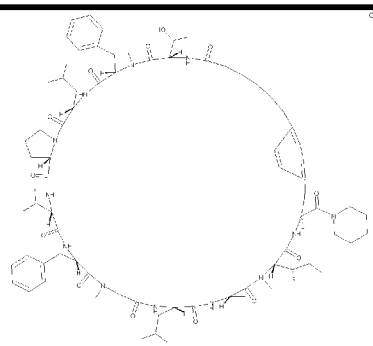
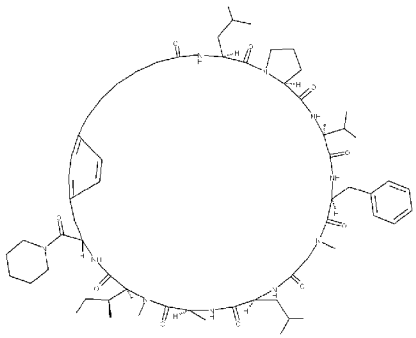
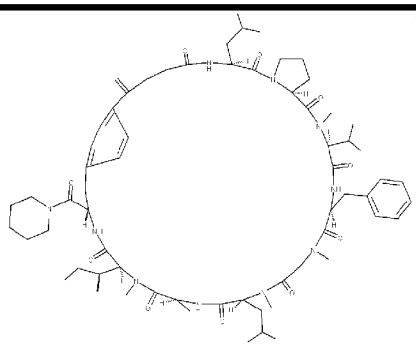
DP-857	
DP-858	
DP-859	
DP-860	

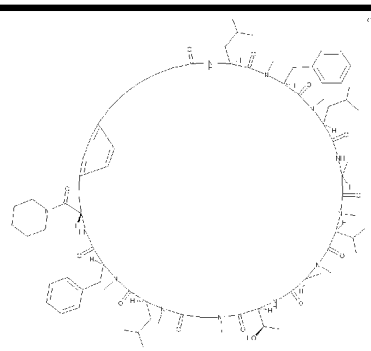
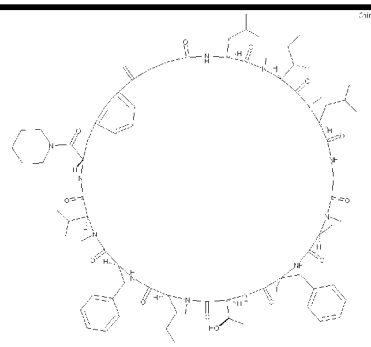
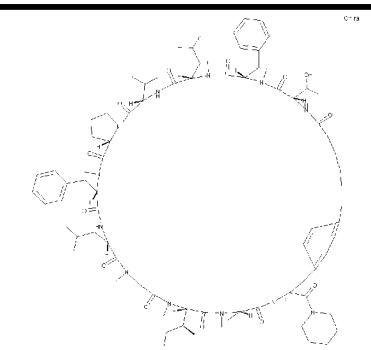
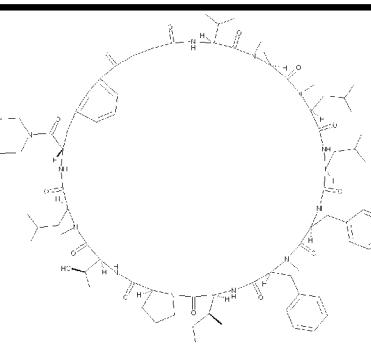
DP-861	
DP-862	
DP-863	
DP-864	

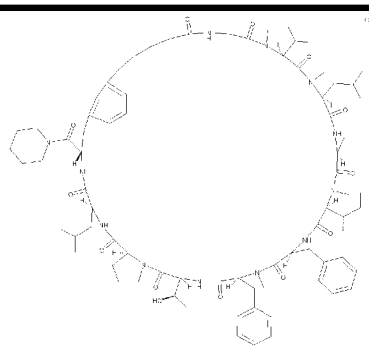
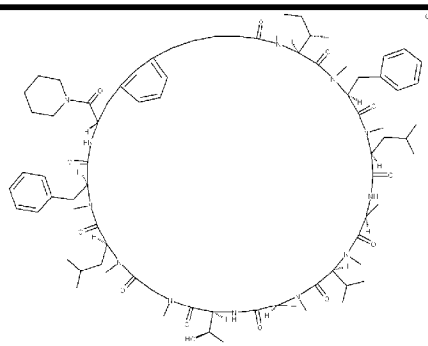
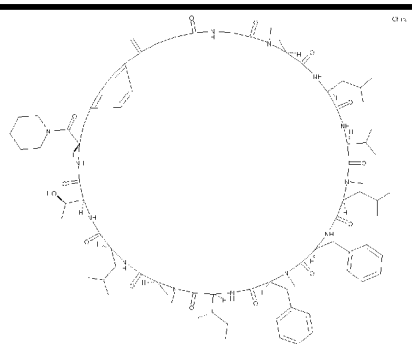
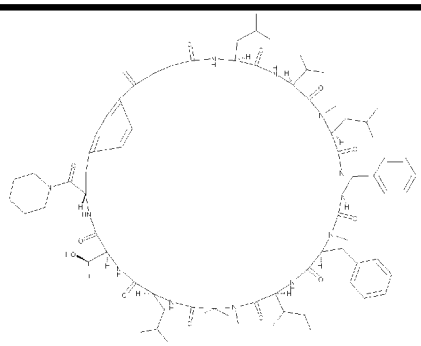
DP-865	
DP-866	
DP-867	
DP-868	

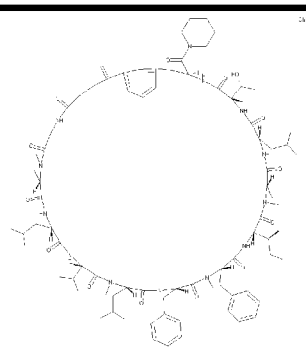
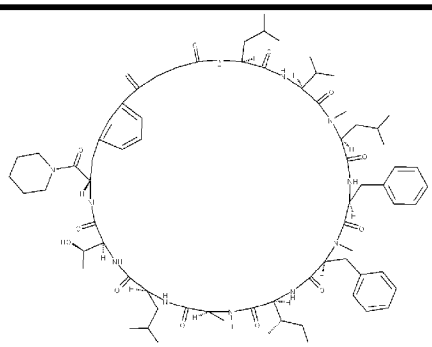
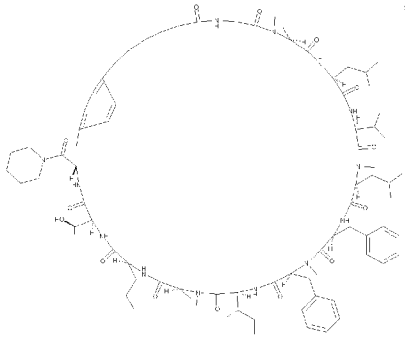
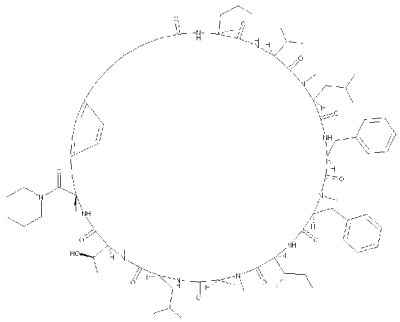
DP-869	
DP-870	
DP-871	
DP-872	

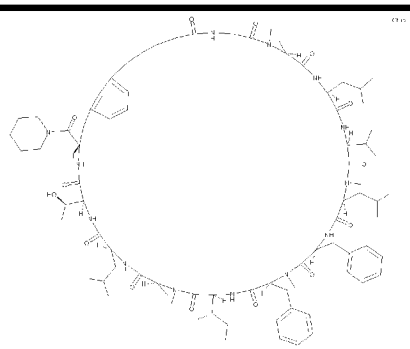
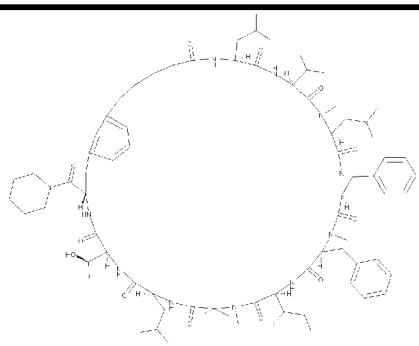
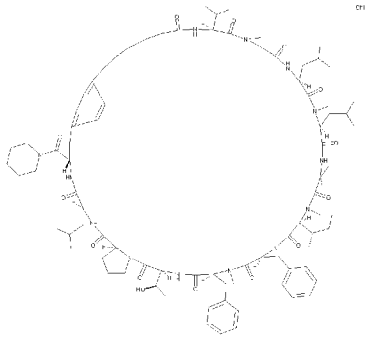
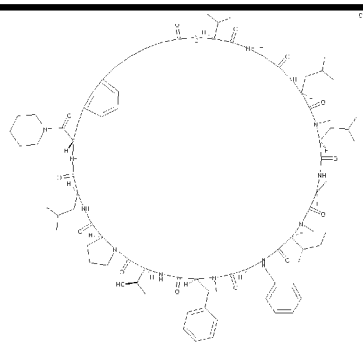
DP-873	
DP-874	
DP-875	
DP-876	

DP-877	
DP-878	
DP-879	
DP-880	

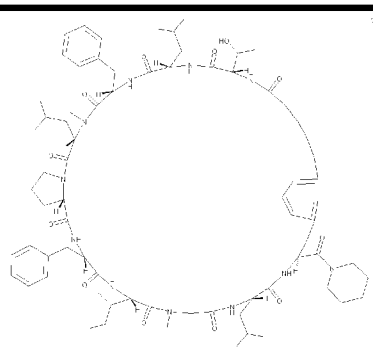
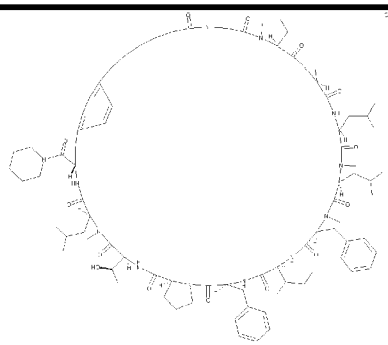
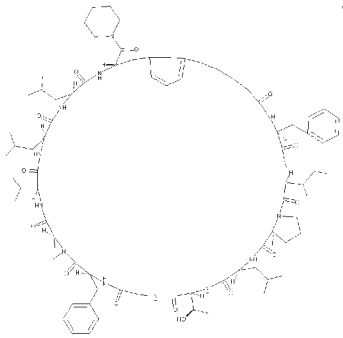
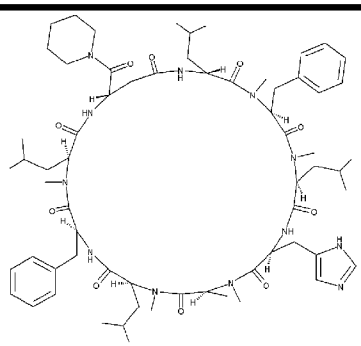
DP-881	
DP-882	
DP-883	
DP-884	

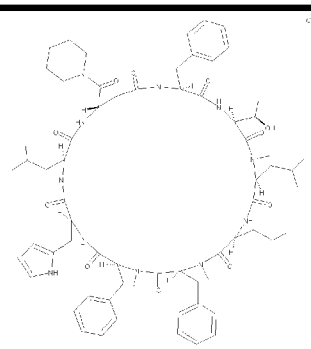
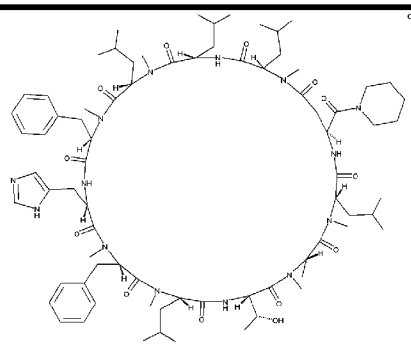
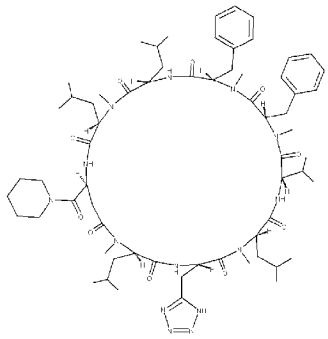
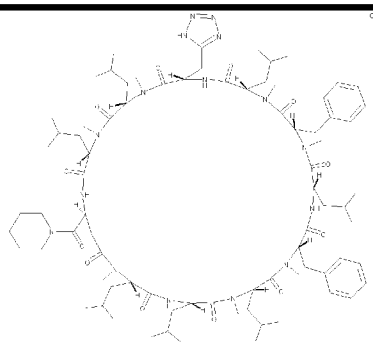
DP-885	
DP-886	
DP-887	
DP-888	

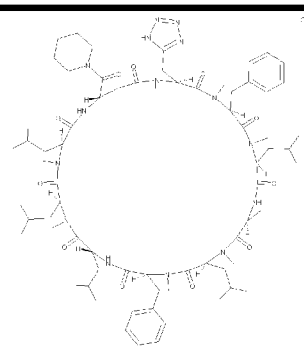
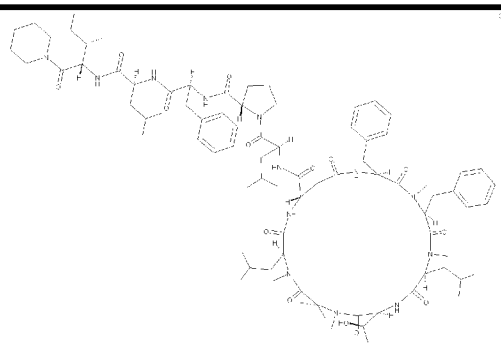
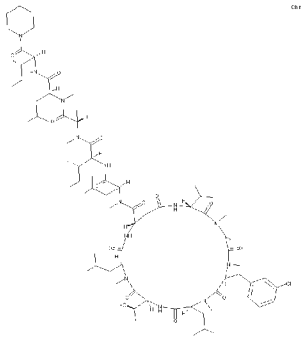
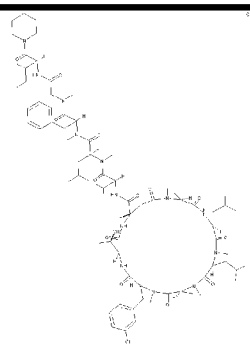
DP-889	
DP-890	
DP-891	
DP-892	

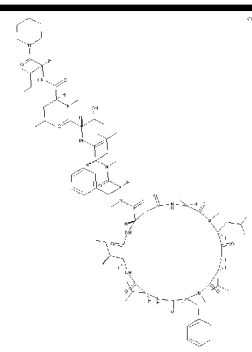
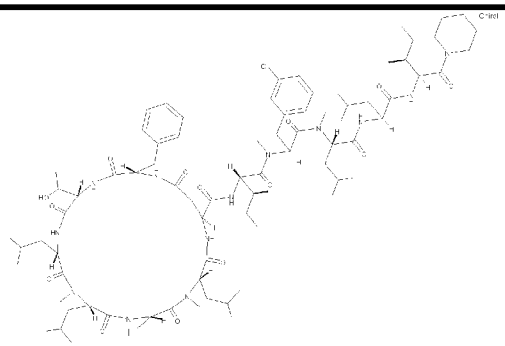
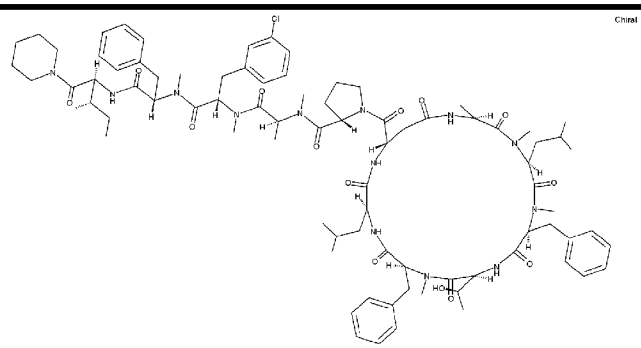
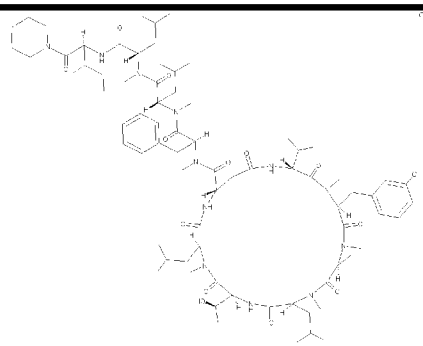
DP-893	
DP-894	
DP-895	
DP-896	

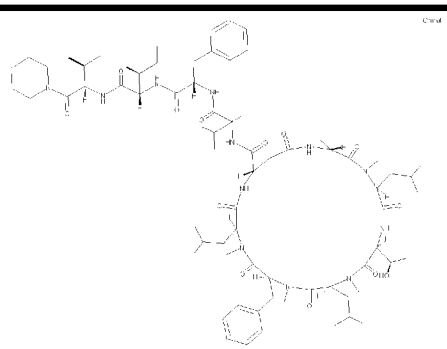
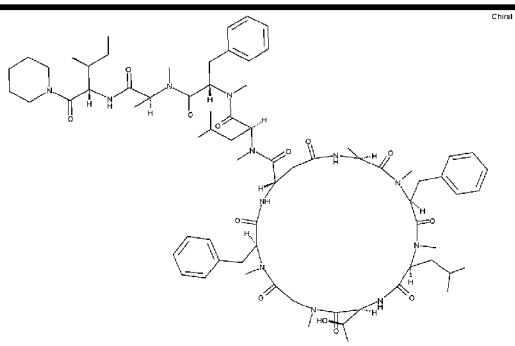
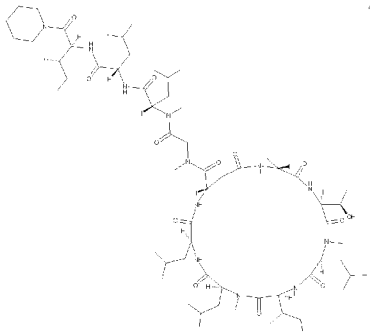
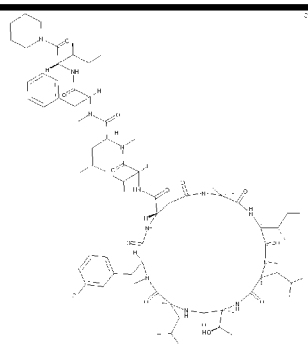
DP-900	
DP-899	
DP-898	
DP-897	

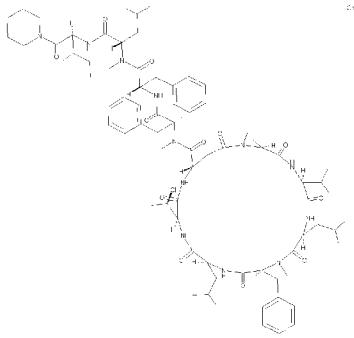
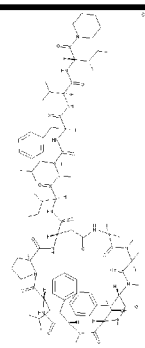
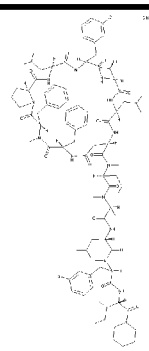
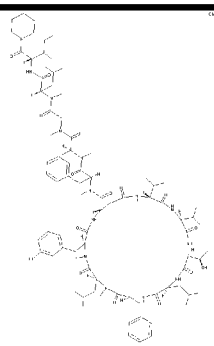
DP-901	
DP-902	
DP-903	
DP-904	

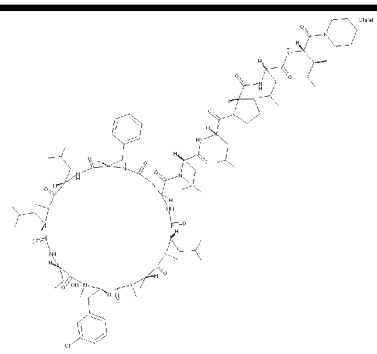
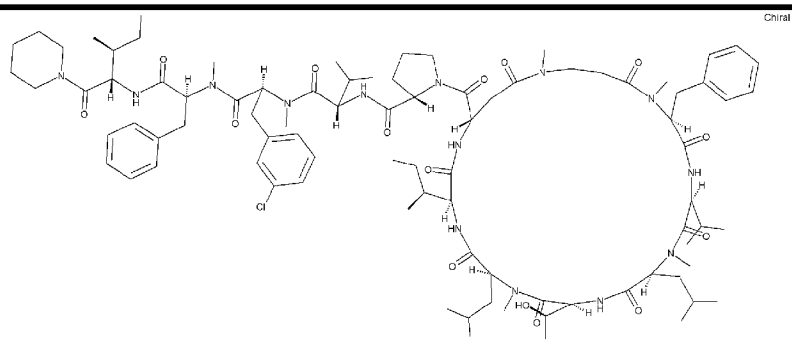
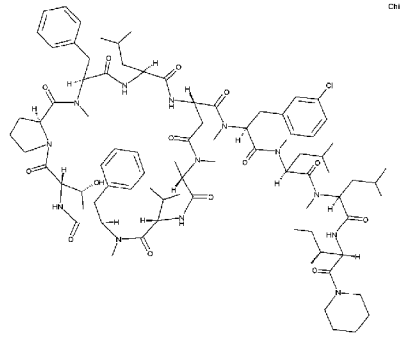
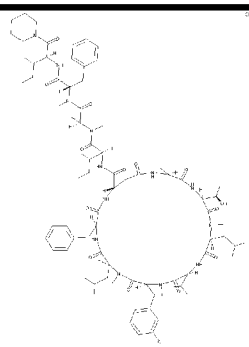
DP-905	
DP-906	
DP-907	
DP-908	

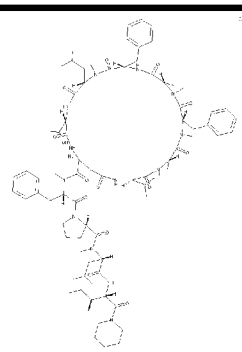
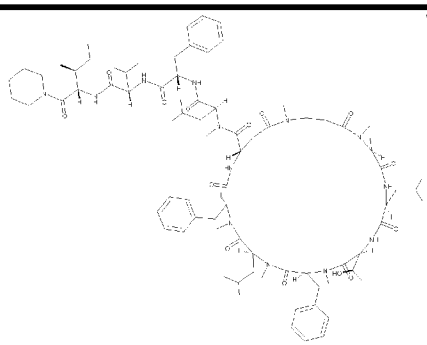
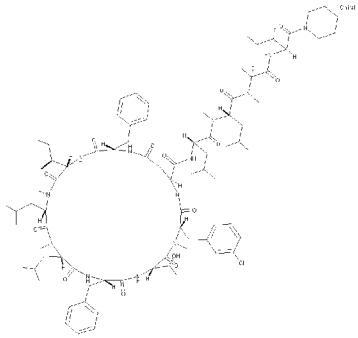
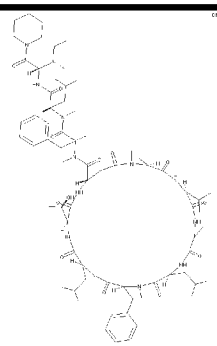
DP-909	
DP-910	
DP-911	
DP-912	

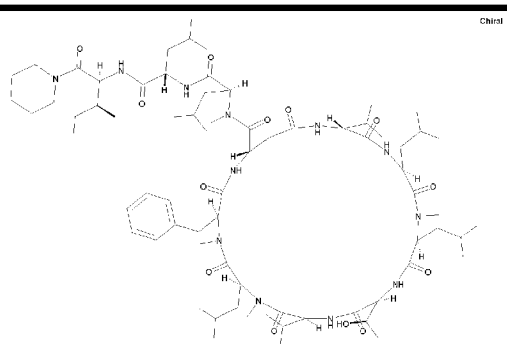
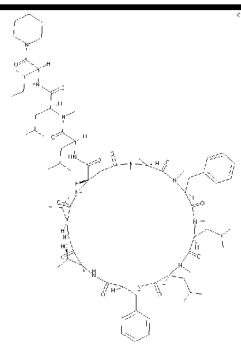
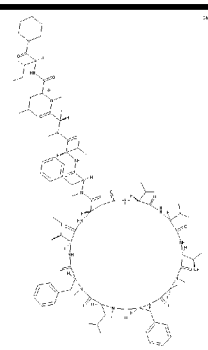
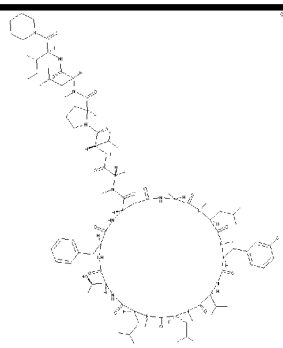
DP-913	
DP-914	
DP-915	
DP-916	

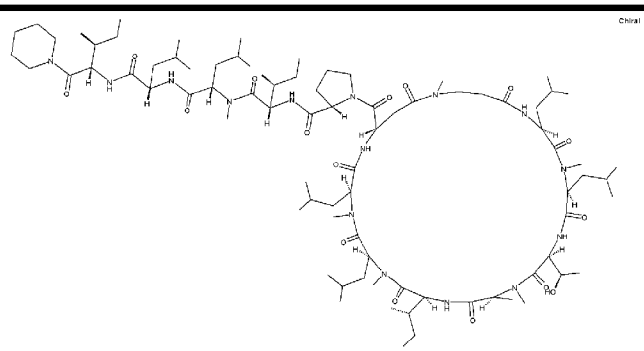
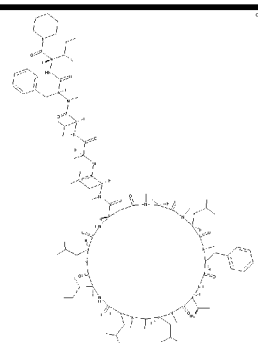
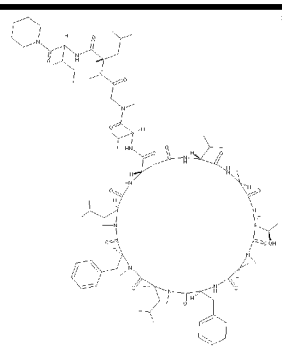
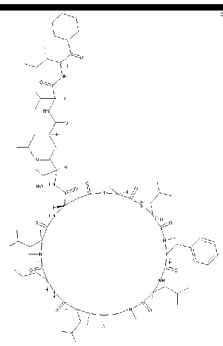
DP-917	
DP-918	
DP-919	
DP-920	

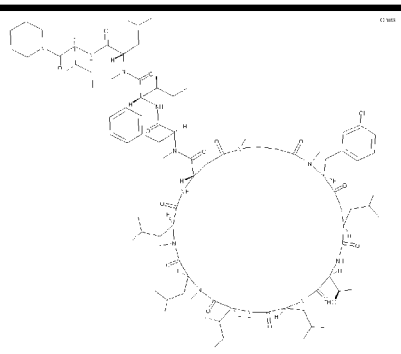
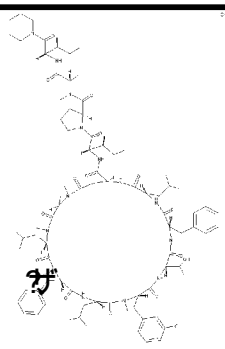
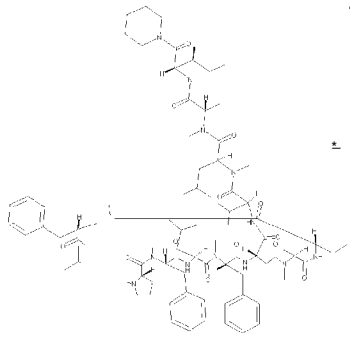
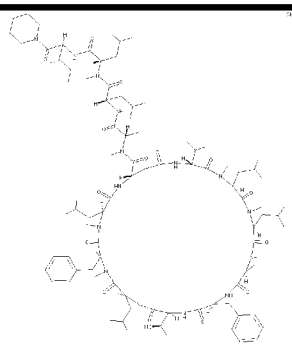
DP-921	
DP-922	
DP-923	
DP-924	

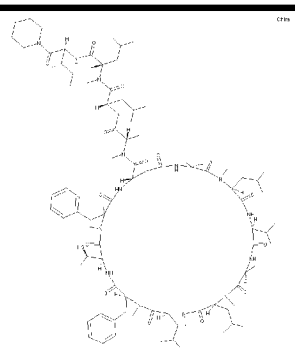
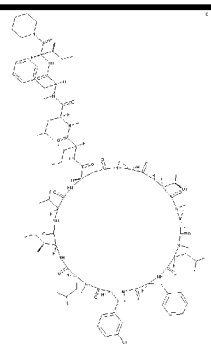
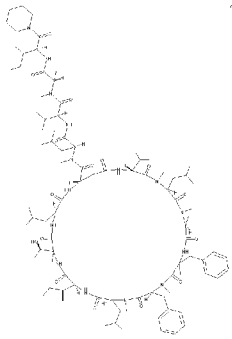
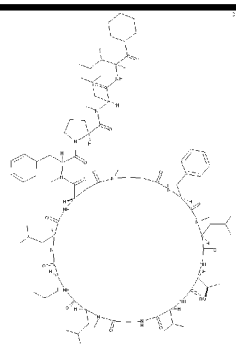
DP-925	
DP-926	
DP-927	
DP-928	

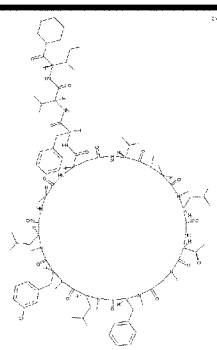
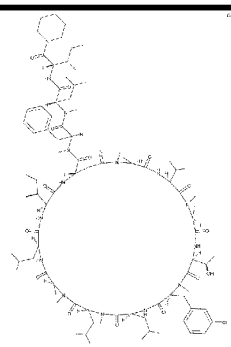
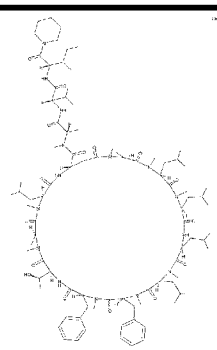
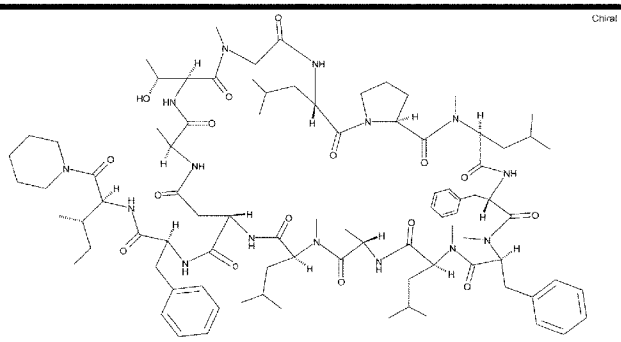
DP-929	
DP-930	
DP-931	
DP-932	

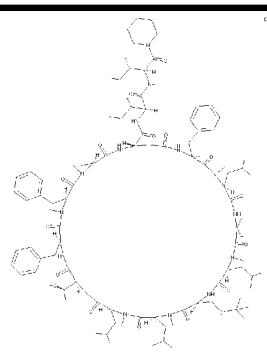
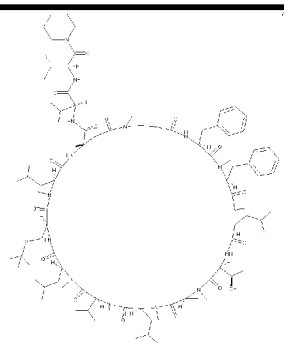
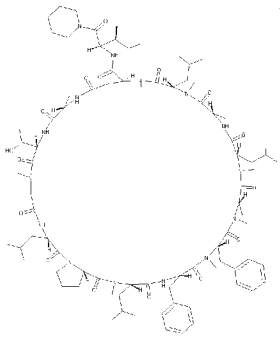
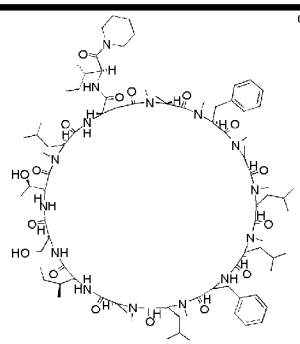
DP-933	
DP-934	
DP-935	
DP-936	

DP-937	
DP-938	
DP-939	
DP-940	

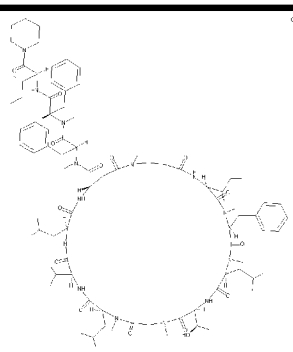
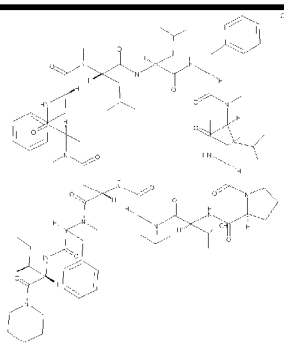
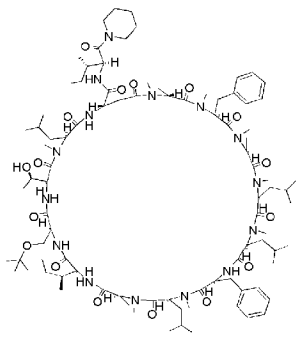
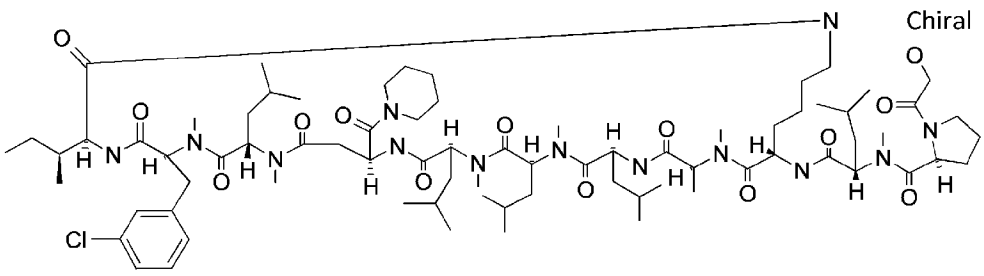
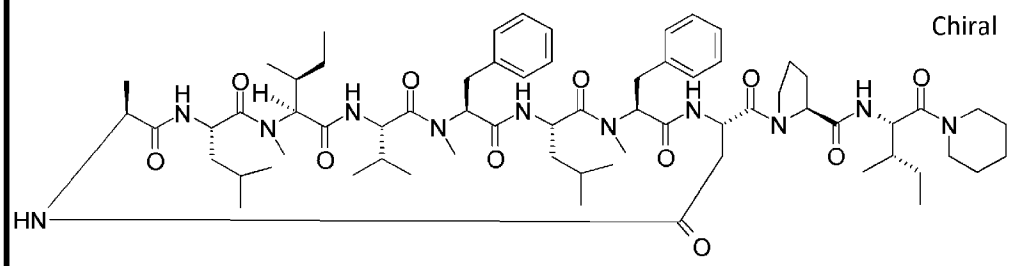
DP-941	
DP-942	
DP-943	
DP-944	

DP-945	
DP-946	
DP-947	
DP-948	

DP-949	
DP-950	
DP-951	
DP-952	

DP-953	
DP-954	
DP-955	
DP-956	Chiral 

DP-960	
DP-959	
DP-958	
DP-957	

DP-961	
DP-962	
DP-963	
DP-964	
DP-965	

[0720] [表11-3-2]

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-1	SQDAA50	0.82	1480	（M－H）－
DP-2	SQDAA50	0.83	1522	（M－H）－
DP-3	SQDAA50	0.75	1325	（M－H）－
DP-4	SQDAA50	0.78	1349	（M＋H）＋
DP-5	SQDAA50	0.76	1307	（M＋H）＋
DP-6	SQDAA50	0.74	1355	（M＋H）＋
DP-7	SQDAA50	0.77	1381	（M－H）－
DP-8	SQDAA50	0.80	1397	（M－H）－
DP-9	SQDAA50	0.78	1381	（M－H）－
DP-10	SQDAA50	0.81	1437	（M－H）－
DP-11	SQDAA50	0.79	1395	（M－H）－
DP-12	SQDAA50	0.88	1451.5	（M－H）－
DP-13	SQDAA50	0.77	1298	（M－H）－
DP-14	SQDAA50	0.77	1282	（M－H）－
DP-15	SQDAA50	0.78	1310	（M－H）－
DP-16	SQDAA50	0.81	1296	（M－H）－
DP-17	SQDAA50	0.80	1225	（M－H）－
DP-18	SQDAA50	0.77	1215	（M＋H）＋
DP-19	SQDFA05	0.87	1438	（M－H）－
DP-20	SQDAA50	0.85	1452.5	（M－H）－
DP-21	SQDAA50	0.84	1466.6	（M－H）－
DP-22	SQDAA50	0.85	1480.6	（M－H）－
DP-23	SQDAA50	0.79	1339	（M－H）－
DP-24	SQDAA50	0.81	1353	（M－H）－
DP-25	SQDFA05	1.04	1423.5	（M－H）－
DP-26	SQDAA50	0.83	1367	（M－H）－
DP-27	SQDAA50	0.83	1381.5	（M－H）－
DP-28	SQDAA50	0.79	1242	（M－H）－
DP-29	SQDAA50	0.85	1310	（M－H）－
DP-30	SQDAA50	0.78	1254	（M－H）－
DP-31	SQDAA50	0.83	1284	（M－H）－
DP-32	SQDAA50	0.76	1220	（M－H）－
DP-33	SQDAA50	0.82	1112	（M－H）－
DP-34	SQDAA50	0.74	1084	（M－H）－
DP-35	SQDAA50	0.82	1369	（M－H）－
DP-36	SQDAA50	0.79	1195	（M－H）－
DP-37	SQDAA50	0.80	1110	（M－H）－
DP-38	SQDAA50	0.70	1068	（M－H）－
DP-39	SQDAA50	0.71	1082	（M－H）－
DP-40	SQDAA50	0.77	1452	（M－H）－
DP-41	SQDAA50	0.76	1452	（M－H）－
DP-42	SQDAA50	0.79	1452	（M－H）－
DP-43	SQDAA50	0.84	1395	（M－H）－
DP-44	SQDAA50	0.79	1296	（M－H）－
DP-45	SQDAA50	0.81	1296	（M－H）－
DP-46	SQDAA50	0.78	1199	（M－H）－
DP-47	SQDAA50	0.86	1386	（M＋H）＋
DP-48	SQDAA50	0.77	1328	（M＋H）＋
DP-49	SQDAA50	0.88	1414	（M＋H）＋
DP-50	SQDAA50	0.76	1245	（M＋H）＋

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-51	SQDAA50	0.79	1229	(M+H)+
DP-52	SQDAA50	0.73	1090	(M+H)+
DP-53	SQDAA50	0.83	1383	(M−H)−
DP-54	SQDAA50	0.79	1381	(M−H)−
DP-55	SQDAA50	0.82	1425	(M−H)−
DP-56	SQDAA50	0.84	1409	(M−H)−
DP-57	SQDAA50	0.81	1411	(M−H)−
DP-58	SQDAA50	0.80	1395	(M−H)−
DP-59	SQDAA50	0.77	1369	(M−H)−
DP-60	SQDAA50	0.82	1110	(M−H)−
DP-61	SQDAA50	0.82	1397	(M−H)−
DP-62	SQDAA50	0.81	1411	(M−H)−
DP-63	SQDAA50	0.86	1483	(M−H)−
DP-64	SQDAA50	0.77	1383	(M−H)−
DP-65	SQDAA50	0.77	1282	(M−H)−
DP-66	SQDAA50	0.78	1310	(M−H)−
DP-67	SQDAA50	0.80	1296	(M−H)−
DP-68	SQDAA50	0.78	1312	(M−H)−
DP-69	SQDAA50	0.87	1398	(M−H)−
DP-70	SQDAA50	0.85	1340	(M−H)−
DP-71	SQDAA50	0.70	1095	(M−H)−
DP-72	SQDAA50	0.80	1227	(M−H)−
DP-73	SQDAA50	0.70	1109	(M−H)−
DP-74	SQDAA50	0.81	1213	(M−H)−
DP-75	SQDAA50	0.65	1095	(M−H)−
DP-76	SQDAA50	0.77	1195	(M−H)−
DP-77	SQDAA50	0.80	1110	(M−H)−
DP-78	SQDAA50	0.81	1100	(M−H)−
DP-79	SQDAA50	0.77	1102	(M−H)−
DP-80	SQDAA50	0.74	1102	(M−H)−
DP-81	SQDAA50	0.79	1124	(M−H)−
DP-82	SQDAA50	0.78	1426	(M−H)−
DP-83	SQDAA50	0.83	1454	(M−H)−
DP-84	SQDAA50	0.74	1313	(M−H)−
DP-85	SQDAA50	0.77	1270	(M−H)−
DP-86	SQDAA50	0.79	1100	(M−H)−
DP-87	SQDAA50	0.83	1440	(M−H)−
DP-88	SQDAA50	0.79	1397	(M−H)−
DP-89	SQDAA05	1.18	1397	(M−H)−
DP-90	SQDAA05	1.22	1483	(M−H)−
DP-91	SQDAA50	0.79	1395	(M−H)−
DP-92	SQDAA05	1.20	1483	(M−H)−
DP-93	SQDAA05	1.15	1369	(M−H)−
DP-94	SQDAA05	1.15	1397	(M−H)−
DP-95	SQDAA05	1.10	1208	(M−H)−
DP-96	SQDAA05	1.22	1398	(M−H)−
DP-97	SQDAA05	1.18	1312	(M−H)−
DP-98	SQDAA05	1.15	1298	(M−H)−
DP-99	SQDAA05	1.18	1340	(M−H)−
DP-100	SQDAA05	1.22	1412	(M−H)−

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-101	SQDAA05	1．17	1326	（M－H）－
DP-102	SQDAA05	1．09	1222	（M－H）－
DP-103	SQDAA05	1．22	1412	（M－H）－
DP-104	SQDAA05	1．23	1382	（M－H）－
DP-105	SQDAA05	1．18	1326	（M－H）－
DP-106	SQDAA05	1．17	1296	（M－H）－
DP-107	SQDAA50	0．82	1427	（M＋H）＋
DP-108	SQDAA50	0．79	1383	（M－H）－
DP-109	SQDAA50	0．81	1411	（M＋H）＋
DP-110	SQDAA50	0．84	1372	（M＋H）＋
DP-111	SQDFA05	0．88	1222	（M－H）－
DP-112	SQDAA50	0．80	1280	（M＋H）＋
DP-113	SQDAA50	0．81	1326	（M＋H）＋
DP-114	SQDAA50	0．88	1428	（M＋H）＋
DP-115	SQDAA50	0．84	1263	（M＋H）＋
DP-116	SQDAA50	0．80	1235	（M＋H）＋
DP-117	SQDAA50	0．80	1235	（M＋H）＋
DP-118	SQDAA50	0．76	1153	（M＋H）＋
DP-119	SQDAA50	0．83	1277	（M＋H）＋
DP-120	SQDAA50	0．82	1245	（M＋H）＋
DP-121	SQDAA50	0．84	1243	（M＋H）＋
DP-122	SQDAA50	0．80	1225	（M＋H）＋
DP-123	SQDAA50	0．81	1413	（M＋H）＋
DP-124	SQDAA50	0．80	1355	（M－H）－
DP-125	SQDAA50	0．82	1130	（M＋H）＋
DP-126	SQDAA50	0．86	1220	（M＋H）＋
DP-127	SQDAA50	0．81	1130	（M＋H）＋
DP-128	SQDAA50	0．76	1102	（M＋H）＋
DP-129	SQDAA50	0．75	1118	（M＋H）＋
DP-130	SQDAA50	0．77	1112	（M＋H）＋
DP-131	SQDAA50	0．81	1383	（M－H）－
DP-132	SQDAA50	0．84	1411	（M－H）－
DP-133	SQDAA50	0．82	1397	（M－H）－
DP-134	SQDAA50	0．79	1395	（M－H）－
DP-135	SQDAA50	0．71	1095	（M－H）－
DP-136	SQDAA50	0．80	1213	（M－H）－
DP-137	SQDAA50	0，80	1383	（M－H）－
DP-138	SQDAA50	0．81	1209	（M－H）－
DP-139	SQDAA50	0．88	1326	（M－H）－
DP-140	SQDAA50	0．82	1227	（M－H）－
DP-141	SQDFA05	0．88	1284	（M＋H）＋
DP-142	SQDAA50	0．72	1109	（M－H）－
DP-143	SQDAA50	0．80	1236	（M－H）－
DP-144	SQDAA50	0．84	1209	（M－H）－
DP-145	SQDAA50	0．81	1213	（M－H）－
DP-146	SQDAA50	0．81	1310	（M－H）－
DP-147	SQDAA50	0．88	1255	（M－H）－
DP-148	SQDAA50	0．79	1082	（M－H）－
DP-149	SQDAA50	0．88	1398	（M－H）－
DP-150	SQDAA50	0．78	1086	（M－H）－

- (H- IVI)	063 L	7	osvvaos	oo2-dp
- (H- IVI)	1 3 6 9		osvvaos	991-da
- (H- IVI)	1 7 8 3 1	1	osvvaos	891-da
- (H- IVI)	Z 1 3 1		ogvvaos	791-da
- (H- IVI)	9 3 5 L	1 L O.	ogvvaos	691-da
- (H- IVI)	1 4 3 1	2	ogvvaos	S91-da
- (H- IVI)	1 3 9 7	3	osvvaos	491-da
- (H- IVI)	1 4 3 1	O.	ogvvaos	391-da
- (H- IVI)	1 60L	1	osvvaos	291-da
- (H- IVI)	1 4 3 1	2	ogvvaos	191-Dp
- (H- IVI)	1 6 1 6	S6 O.	osvvaos	091-da
- (H- IVI)	1 4 8 7		osvvaos	681-da
- (H- IVI)	I 3 S 3	1	osvvaos	881-da
- (H- IVI)	L V4V	8 6 O.	osvvaos	781-da
- (H- IVI)	17179 L		ogvvaos	981-da
- (H- IVI)	8 2 9 L		ogvvaos	58 L-da
- (H- IVI)	1 989	0 6 O.	osvvaos	481-Dp
- (H- IVI)	1 5 4 4	8 6 O.	ogvvaos	38 I-da
- (H- IVI)	1 5 4 2 L	S O.	ogvvaos	281-Dp
- (H- IVI)	1 4 5 4		osvvaos	181-Dp
- (H- IVI)	1 5 P 4	6	ogvvaos	081-da
- (H- IVI)	01717 L	8 1 O.	osvvaos	971-da
- (H- IVI)	1 5 7 Z		osvvaos	8L I-dQ
- (H- IVI)	1 4 O P	1	osvvaos	LL1-Dp
- (H- IVI)	1 1 1 6	7 6 0.	ogvvaos	971-da
- (H- IVI)	9 9 L L	7 9 O.	ogvvaos	9Z L-da
- (H- IVI)	Ε L 3 L	7 6 O.	ogvvaos	971-da
- (H- IVI)	1 2 2 7	3	osvvaos	D p-1 L3
- (H- IVI)	IVZ V	2	ogvvaos	271-da
- (H- IVI)	1 2 5 7		ogvvaos	171-da
- (H- IVI)	1 9 5 L L	8 T O.	osvvaos	0 p-1 70
- (H- IVI)	1 Z 1 3	8 1 O.	osvvaos	691-da
- (H- IVI)	I 3 7 O	8 4 0.	osvvaos	891-da
- (H- IVI)	1 2 0 8	VL 0.	osvvaos	791-da
- (H- IVI)	1 3 5 4		ogvvaos	991-da
- (H- IVI)	I 3 I Z	3	ogvvaos	991-Dp
- (H- IVI)	L 2 9 6		ogvvaos	491-dp
- (H- IVI)	380 L	7 8 O.	ogvvaos	391-da
- (H- IVI)	O ι ε ι	3	osvvaos	291-DP
- (H- IVI)	Z L O V	7 6 O.	ogvvaos	191-dp
- (H- IVI)	960 L	7 9 O.	ogvvaos	091-da
- (H- IVI)	17SS L	O.	osvvaos	951-Dp
- (H- IVI)	I 3 5 4	6	osvvaos	851-Dp
- (H- IVI)	980 1		osvvaos	751-dp
- (H- IVI)	017S L	S 7 0.	osvvaos	9S1-da
- (H- IVI)	1 I 2 4	3	ogvvaos	S51-da
- (H- IVI)	1 3 8 3		osvvaos	451-DP
- (H- IVI)	980 1	7 6 O.	ogvvaos	53 i-da
- (H- IVI)	1 1 2 4		ogvvaos	251-Dp
- (H- IVI)	ι ε ι 2	3	osvvaos	151-dp
	m, / z (Ξsi) siAicn	(分) 保持時間	siAicn 釣竿	

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-201	SQDAA50	0.81	1326	(M−H)−
DP-202	SQDAA50	0.81	1312	(M−H)−
DP-203	SQDAA50	0.88	1558	(M−H)−
DP-204	SQDAA50	0.86	1558	(M−H)−
DP-205	SQDAA50	0.89	1606	(M−H)−
DP-206	SQDAA50	0.88	1572	(M−H)−
DP-207	SQDAA50	0.94	1662	(M−H)−
DP-208	SQDAA50	0.87	1473	(M−H)−
DP-209	SQDAA50	0.82	1437	(M−H)−
DP-210	SQDAA50	0.89	1501	(M−H)−
DP-211	SQDAA50	0.88	1487	(M−H)−
DP-212	SQDAA50	0.83	1431	(M−H)−
DP-213	SQDAA50	0.82	1451	(M−H)−
DP-214	SQDAA50	0.81	1431	(M−H)−
DP-215	SQDAA50	0.88	1380.4	(M−H)−
DP-216	SQDAA50	0.89	1413	(M+H)+
DP-217	SQDAA50	0.86	1385	(M+H)+
DP-218	SQDAA50	0.81	1409	(M−H)−
DP-219	SQDAA50	0.93	1497	(M−H)−
DP-220	SQDAA50	0.82	1395	(M−H)−
DP-221	SQDAA50	0.83	1397	(M−H)−
DP-222	SQDAA50	0.82	1411	(M−H)−
DP-223	SQDAA50	0.84	1397	(M−H)−
DP-224	SQDAA50	0.83	1395	(M−H)−
DP-225	SQDAA50	0.78	1409	(M−H)−
DP-226	SQDAA50	0.80	1284	(M−H)−
DP-227	SQDAA50	0.86	1295.4	(M−H)−
DP-228	SQDAA50	0.92	1368	(M−H)−
DP-229	SQDAA50	0.84	1311.5	(M−H)−
DP-230	SQDAA50	0.86	1311.4	(M−H)−
DP-231	SQDAA50	0.84	1323.4	(M−H)−
DP-232	SQDAA50	0.87	1339.4	(M−H)−
DP-233	SQDAA50	0.84	1326	(M−H)−
DP-234	SQDAA50	0.91	1368	(M−H)−
DP-235	SQDAA50	0.89	1368	(M−H)−
DP-236	SQDAA50	0.85	1309.4	(M−H)−
DP-237	SQDAA50	0.76	1224	(M+H)+
DP-238	SQDAA50	0.80	1297.4	(M−H)−
DP-239	SQDAA50	0.81	1312	(M+H)+
DP-240	SQDAA50	0.84	1339.4	(M−H)−
DP-241	SQDAA50	0.83	1326	(M−H)−
DP-242	SQDAA50	0.82	1297.4	(M−H)−
DP-243	SQDAA50	0.75	1221.4	(M−H)−
DP-244	SQDAA50	0.87	1339.4	(M−H)−
DP-245	SQDAA50	0.82	1283.4	(M−H)−
DP-246	SQDAA50	0.83	1314	(M+H)+
DP-247	SQDAA50	0.87	1326	(M−H)−
DP-248	SQDAA50	0.90	1396	(M−H)−
DP-249	SQDAA50	0.87	1354	(M−H)−
DP-250	SQDAA50	0.83	1340	(M−H)−

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-251	SQDAA50	0.86	1368	(M−H)−
DP-252	SQDAA50	0.80	1215	(M+H)+
DP-253	SQDAA50	0.76	1123	(M−H)−
DP-254	SQDAA50	0.76	1123	(M−H)−
DP-255	SQDAA50	0.85	1241	(M−H)−
DP-256	SQDAA50	0.88	1283	(M−H)−
DP-257	SQDAA50	0.85	1223	(M−H)−
DP-258	SQDAA50	0.84	1227	(M−H)−
DP-259	SQDAA50	0.82	1227	(M−H)−
DP-260	SQDAA50	0.86	1242.4	(M−H)−
DP-261	SQDAA50	0.81	1243	(M−H)+
DP-262	SQDAA50	0.79	1227	(M−H)−
DP-263	SQDAA50	0.80	1071.4	(M−H)−
DP-264	SQDAA50	0.85	1158	(M+H)+
DP-265	SQDAA50	0.86	1138	(M−H)−
DP-266	SQDAA50	0.85	1110	(M−H)−
DP-267	SQDAA50	0.80	1096	(M−H)−
DP-268	SQDAA50	0.82	1141.4	(M−H)−
DP-269	SQDAA50	0.81	1098	(M+H)+
DP-270	SQDAA50	0.79	1101.4	(M−H)−
DP-271	SQDAA50	0.78	1087.4	(M−H)−
DP-272	SQDAA50	0.83	1138	(M−H)−
DP-273	SQDAA50	0.80	1411	(M−H)−
DP-274	SQDAA50	0.80	1312	(M−H)−
DP-275	SQDAA50	0.83	1340	(M−H)−
DP-276	SQDAA50	0.80	1310	(M−H)−
DP-277	SQDAA50	0.82	1257	(M−H)−
DP-278	SQDAA50	0.91	1556	(M−H)−
DP-279	SQDAA50	0.91	1544	(M−H)−
DP-280	SQDAA50	0.87	1542	(M−H)−
DP-281	SQDAA50	0.88	1586	(M−H)−
DP-282	SQDAA50	0.84	1500	(M−H)−
DP-283	SQDAA50	0.91	1542	(M−H)−
DP-284	SQDAA50	0.89	1572	(M−H)−
DP-285	SQDAA50	0.81	1440	(M−H)−
DP-286	SQDAA50	0.95	1648	(M−H)−
DP-287	SQDAA50	0.89	1578	(M−H)−
DP-288	SQDAA50	0.77	1341	(M−H)−
DP-289	SQDAA50	0.93	1648	(M−H)−
DP-290	SQDAA50	0.81	1383	(M−H)−
DP-291	SQDAA50	0.88	1417	(M−H)−
DP-292	SQDAA50	0.95	1676	(M−H)−
DP-293	SQDAA50	0.86	1516	(M−H)−
DP-294	SQDAA50	0.80	1369	(M−H)−
DP-295	SQDAA50	0.95	1662	(M−H)−
DP-296	SQDAA50	0.78	1355	(M−H)−
DP-297	SQDAA50	0.88	1572	(M−H)−
DP-298	SQDAA50	0.85	1592	(M−H)−
DP-299	SQDAA50	0.90	1501	(M−H)−
DP-300	SQDAA50	0.89	1572	(M−H)−

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-301	SQDAA50	0.86	1431	(M−H)−
DP-302	SQDAA50	0.87	1558	(M−H)−
DP-303	SQDAA50	0.89	1578	(M−H)−
DP-304	SQDAA50	0.84	1417	(M−H)−
DP-305	SQDAA50	0.86	1312	(M−H)−
DP-306	SQDAA50	0.85	1445	(M−H)−
DP-307	SQDAA50	0.79	1276	(M−H)−
DP-308	SQDAA50	0.86	1340	(M−H)−
DP-309	SQDAA50	0.82	1451	(M−H)−
DP-310	SQDAA50	0.80	1270	(M−H)−
DP-311	SQDAA50	0.81	1290	(M−H)−
DP-312	SQDAA50	0.80	1451	(M−H)−
DP-313	SQDAA50	0.81	1326	(M−H)−
DP-314	SQDAA50	0.80	1437	(M−H)−
DP-315	SQDAA50	0.81	1417	(M−H)−
DP-316	SQDAA50	0.77	1276	(M−H)−
DP-317	SQDAA50	0.79	1385	(M−H)−
DP-318	SQDAA50	0.80	1383	(M−H)−
DP-319	SQDAA50	0.65	1265	(M−H)−
DP-320	SQDAA50	0.84	1332	(M−H)−
DP-321	SQDAA50	0.83	1284	(M−H)−
DP-322	SQDAA50	0.73	1242	(M−H)−
DP-323	SQDAA50	0.85	1354	(M−H)−
DP-324	SQDAA50	0.76	1236	(M−H)−
DP-325	SQDAA50	0.86	1340	(M−H)−
DP-326	SQDAA50	0.69	1242	(M−H)−
DP-327	SQDAA50	0.82	1222	(M−H)−
DP-328	SQDAA50	0.79	1236	(M−H)−
DP-329	SQDAA50	0.85	1261	(M−H)−
DP-330	SQDAA50	0.77	1205	(M−H)−
DP-331	SQDAA50	0.83	1275	(M−H)−
DP-332	SQDAA50	0.84	1289	(M−H)−
DP-333	SQDAA50	0.87	1241	(M−H)−
DP-334	SQDAA50	0.84	1289	(M−H)−
DP-335	SQDAA50	0.80	1243	(M−H)−
DP-336	SQDAA50	0.88	1283	(M−H)−
DP-337	SQDAA50	0.73	1171	(M−H)−
DP-338	SQDAA50	0.87	1289	(M−H)−
DP-339	SQDAA50	0.82	1255	(M−H)−
DP-340	SQDAA50	0.77	1201	(M−H)−
DP-341	SQDAA50	0.68	1143	(M−H)−
DP-342	SQDAA50	0.85	1094	(M−H)−
DP-343	SQDAA50	0.86	1170	(M−H)−
DP-344	SQDAA50	0.81	1502	(M−H)−
DP-345	SQDAA50	0.71	1432	(M−H)−
DP-346	SQDAA50	0.73	1460	(M−H)−
DP-347	SQDAA50	0.85	1502	(M−H)−
DP-348	SQDAA50	0.79	1474	(M−H)−
DP-349	SQDAA50	0.70	1313	(M−H)−
DP-350	SQDAA50	0.94	1473	(M−H)−

DP-351	soavvaso	0. 86	1 ASV	- (H- ıvı)
DP-352	ogvvaos	0. 8ı	1 68S	- (H- ıvı)
DP-353	ogvvaos	0. ı ı	1 37.6	- (H- ıvı)
DP-354	ogvvaos	0. ı z	1 313	- (H- ıvı)
DP-355	ogvvaos	0. ı ı	1 S6ı	- (H- ıvı)
ap-356	ogvvaos	0. ı 9	1 68S	- (H- ıvı)
d。-357	ogvvaos	0. ı z	v zvz	- (H- ıvı)
89G-da	ogvvaos	ε	2 ı ε ı	- (H- ıvı)
ap-359	ogvvaos	0 . 8 9	1 3017	- (H- ıvı)
d。-360	sQeFaoƃ	0. 8 8	1 474	- (H- ıvı)
l9G-da	ogvvaos		V 4Z2	- (H- ıvı)
DP-362	ogvvaos	0. ζ 8	1 309	- (H- ıvı)
ap-363	ogvvaos	0 . ı z	1 432	- (H- ıvı)
ぼ - d。	ogvvaos	0. 8 S	999 L	- (H- ıvı)
99G-da	ogvvaos	0. 8 ı	1 8ı7	- (H- ıvı)
a9ε-da	ogvvaos	0 . 8 9	009 L	- (H- ıvı)
d。-36ζ	ogvvaos	0. 7 9	1 474	- (H- ıvı)
d。-369	ogvvaos	0. 6 9	1 789ı	- (H- ıvı)
d。-369	ogvvaos	0. 8 9	ı V73	- (H- ıvı)
DP-370	ogvvaos	0. 7 9	1 4 03	- (H- ıvı)
Lz.e-da	ogvvaos	0. 8 S	ı 397	- (H- ıvı)
Dp-372	ogvvaos	0. 8 9	1445	- (H- ıvı)
d。-ε2ε	ogvvaos	9	1 6ı 6	- (H- ıvı)
DP-374	ogvvaos	0 . 7 9	1 V1 1	- (H- ıvı)
d。-375	ogvvaos	0. ı ı	L S6ı	- (H- ıvı)
d。-ε2 6	ogvvaos	0. S 7	1 6817	- (H- ıvı)
Dp-377	ogvvaos	0. 75	ı 375	- (H- ıvı)
DP-378	ogvvaos	0. ı ı	L 3.7 6	- (H- ıvı)
d。-ε2 9	ogvvaos	0. 8ı	L S17	- (H- ıvı)
a0ε-d。	ogvvaos	0 . 7 6	1 992	- (H- ıvı)
a1ε-da	ogvvaos	0. 8ı	L 9 P3 1	- (H- ıvı)
DP-382	ogvvaos	0. 8 8	ı 3OV	- (H- ıvı)
εδε -da	ogvvaos	0. 7 6	1 1709	- (H- ıvı)
。d - 靴	ogvvaos	0. 8ε	1 3OP	- (H- ıvı)
ap-385	ogvvaos	0. 75	1 1783	- (H- ıvı)
a8ε-d。	ogvvaos	0. S 8	L 917S	- (H- ıvı)
ζ8ε-d。	ogvvaos		1 3017	- (H- ıvı)
d。-388	ogvvaos	0. ı ı	1 993	- (H- ıvı)
a8ε-da	ogvvaos	0. 78	O 8817 L	- (H- ıvı)
d。-39ε	ogvvaos	0. 8 6	L 6.7 8	- (H- ıvı)
l6G-da	ogvvaos	0. 7 9	1474	- (H- ıvı)
DP-392	ogvvaos	0. ζ 8	1 6ı 6	- (H- ıvı)
ε6ε-da	ogvvaos	0. 8ゖ	L 609	- (H- ıvı)
ぼ - d。	ogvvaos	0. 7 9	L 0 92	- (H- ıvı)
96G-da	ogvvaos	0. ζ 8	1 309	- (H- ıvı)
a6ε-da	ogvvaos	0. 8ı	L 437	- (H- ıvı)
ζ6ε-d。	ogvvaos	0. 9 0	L SV7	- (H- ıvı)
98ε-d。	ogvvaos		ε o 41	- (H- ıvı)
99ε-d。	ogvvaos	7 .0 S	L SV7	- (H- ıvı)
oo卜da		7 .	1 4O3	- (H- ıvı)

	LCMS条件	保持時間 (分)	ncIaiS(≡ si) m/z	

	ɯ, /z (is ≡)siAicn	(分) 保持時間	LCMS条件	
(H+ ıvı) +	1466	0. SV	osvvaos	d。ト01
(H- ıvı) -	9917 L	0. 80	ogvvaos	d。-20Ɛ
(H- ıvı) -	1 609	0. 88	ogvvaos	sot?-d。
(H- ıvı) -	1 AD5	0. 11	osvvaos	d。-ヶ0ヶ
(H- ıvı) -	1431	0. 7 9	ogvvaos	da-405
(H- ıvı) -	L S6 L	0. 1 Q	osvvaos	d。-406
(H- ıvı) -	1 AV 4	0. 7S	osvvaos	d。ト0Z
(H+ ıvı) +	1Z9 9	0. 18	osvvaos	dP-4o8
(H+ M) +	1387	0. 88	osvvaos	6017-da
(H+ ıvı) +	1 Z 67	0. 74	ogvvaos	da-4lO
(H+ ıvı) +	1 393	0. 86	ogvvaos	ap— ほ
(H+ M) +	1308	0. 96	osvvaos	DP-412
(H+ M) +	L 080	0. 36	ogvvaos	da-413
(H+ M) +	ı 224	0. 78	ogvvaos	da-414
(H- ıvı) -	1332	0. 76	ogvvaos	5 LI7-da
(H+ ıvı) +	1 ζ42	0. 66	osvvaos	9 LI7-da
(H+ ıvı) +	L 280	0. 86	osvvaos	ヹけ—da
(H+ ıvı) +	1 993	0. 96	osvvaos	8 LI7-da
(H+ ıv1) +	1258	0. 78	ogvvaos	DP-419
(H+ M) +	L 224	0. 8ヰ	osvvaos	DP-420
(H+ ıvı) +	1238	0. ZQ	ogvvaos	d。ト に
(H+ ıvı) +	1 ζ16	0. 75	ogvvaos	DP-422
(H+ M) +	ν ζζι	0. 68	osvvaos	d。-ひ3
(H+ M) +	L L Z Y	0. 36	ogvvaos	da-424
(H+ M) +	1 Z57	0. 66	ogvvaos	dP-425
(H+ ıvı) +	1 693	0. 96	ogvvaos	d。-ひ9
(H+ ıvı) +	1 2P3	1. 30	osvvaos	d。ト27
(H+ ıvı) +	L 8 L L	0. 9L	osvvaos	da-ひ8
(H+ ıvı) +	1 3V 3	1. 13	osvvaos	dP-4Z9
(H+ ıvı) +	LQZ 1	0. 8	ogvvaos	d。ト3O
(H+ M) +	L Z3 L	0. 3	osvvaos	DP-431
(H+ ıvı) +	VL Z Y	0. 3	ogvvaos	DP-432
(H+ ıvı) +	1 163	0. 06	ogvvaos	d。-4ɜɜ
(H+ M) +	1243	1. P0	osvvaos	DP-4ヲ4
(H+ M) +	L 3 9	0. 88	ogvvaos	da-435
(H+ M) +	ιζζ ι	0. 06	ogvvaos	da-436
(H+ ıvı) +	19173	0. 96	osvvaos	d。ト37
(H+ ıvı) +	1203	0. 06	Qovvaos	8GI7-da
(H+ ıvı) +	SS L L	0. ZQ	osvvaos	da-4ɜ6
(H+ M) +	960 L	0. 83	osvvaos	da-44o
(H+ ıvı) +	1620	0. 0ヒ	ogvvaos	da-4ヶ1
(H+ M) +	1 030	0. 05	osvvaos	DP-442
(H+ M) +	3917 L	0. 86	osvvaos	da-443
(H- ıvı) -	178S L	0. 80	osvvaos	da-444
(H+ M) +	1 ∀62	0. 86	osvvaos	DP-445
(H+ M) +	6 L17 L	0. 96	ogvvaos	da-446
(H+ M) +	1 ∀Z7	L L. L	ogvvaos	dQ-44L
(H- ıvı) -	1 3ヰ1	0. 81	osvvaos	da-448
(H- ıvı) -	1341	0. 81	osvvaos	d。-617ト
(H+ ıvı) +	1 ∀76	・ ・	osvvaos	da-450

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-451	SQDAA05	1.01	1475	(M+H)+
DP-452	SQDAA50	0.93	1550	(M−H)−
DP-453	SQDAA50	0.98	1399	(M+H)+
DP-454	SQDAA50	1.04	1544	(M−H)−
DP-455	SQDAA50	0.91	1504	(M+H)+
DP-456	SQDAA50	0.99	1550	(M−H)−
DP-457	SQDAA50	0.82	1434	(M+H)+
DP-458	SQDAA50	0.81	1315	(M+H)+
DP-459	SQDAA50	1.05	1546	(M+H)+
DP-460	SQDAA50	0.81	1448	(M+H)+
DP-461	SQDAA50	1.11	1404	(M+H)+
DP-462	SQDAA50	0.83	1244	(M+H)+
DP-463	SQDAA50	0.80	1363	(M+H)+
DP-464	SQDAA50	0.91	1405	(M+H)+
DP-465	SQDAA50	0.75	1387	(M+H)+
DP-466	SQDAA50	0.76	1357	(M+H)+
DP-467	SQDFA05	0.74	1301	(M+H)+
DP-468	SQDAA50	0.81	1413	(M+H)+
DP-469	SQDAA50	0.75	1357	(M+H)+
DP-470	SQDFA05	0.74	1301	(M+H)+
DP-471	SQDAA50	0.78	1300	(M+H)+
DP-472	SQDAA50	0.79	1266	(M+H)+
DP-473	SQDAA50	0.78	1286	(M+H)+
DP-474	SQDAA50	0.74	1244	(M+H)+
DP-475	SQDAA50	0.78	1224	(M+H)+
DP-476	SQDAA50	0.68	1196	(M+H)+
DP-477	SQDAA50	0.80	1328	(M+H)+
DP-478	SQDAA50	0.80	1280	(M+H)+
DP-479	SQDAA50	0.81	1266	(M+H)+
DP-480	SQDFA05	0.78	1196	(M+H)+
DP-481	SQDAA50	0.81	1328	(M+H)+
DP-482	SQDFA05	0.78	1256	(M−H)−
DP-483	SQDAA50	0.85	1532	(M+H)+
DP-484	SQDAA50	0.85	1560	(M+H)+
DP-485	SQDFA05	0.75	1109	(M−H)−
DP-486	SQDAA50	0.81	1235	(M+H)+
DP-487	SQDAA50	0.81	1243	(M+H)+
DP-488	SQDAA50	0.83	1257	(M+H)+
DP-489	SQDAA50	0.75	1139	(M+H)+
DP-490	SQDAA50	0.76	1357	(M+H)+
DP-491	SQDAA50	0.81	1343	(M+H)+
DP-492	SQDAA50	0.81	1399	(M+H)+
DP-493	SQDAA50	0.89	1489	(M+H)+
DP-494	SQDAA50	0.85	1172	(M+H)+
DP-495	SQDAA50	0.80	1502	(M−H)−
DP-496	SQDAA50	0.85	1572	(M−H)−
DP-497	SQDAA50	0.80	1488	(M−H)−
DP-498	SQDAA50	0.74	1460	(M−H)−
DP-499	SQDAA50	0.88	1662	(M−H)−
DP-500	SQDAA50	0.81	1530	(M−H)−

oss- d a	Sovdaos	0. 9 6	OLSL	+ (H + IVI)
6179-dO	SQaFvo5	0. LQ	12 6V	+ (H + IVI)
8179-dO	SQaFvo5	0. 3 6	1 3 6	+ (H + IVI)
LV5- d Q	SQeFao5	L. 9 0	1 Z Z 5	+ (H + IVI)
dp-546	SQeFao5	L. 30	1328	+ (H + IVI)
9l79-da	SQaFvo5	1. OV	13 P2	+ (H + IVI)
d。-544	SQaFvo5	L. 170	1342	+ (H + IVI)
ε5 4- d a	Sovdaos	L. 3 0	1 Z 3 9	+ (H + IVI)
ひ S- d。	SQaFvo5	0. 97	1312	+ (H + IVI)
け S- d。	SQaFvo5	1. O3	13 3 9	+ (H + IVI)
dp-5400	SQeFao5	1. 07	1239	+ (H + IVI)
dp-539	Sovdaos	.	8'7 9. 8	+ (H + IVI)
D p -638	SQaFvo5	0. YL	813. 8	+ (H + IVI)
37 S- d。	SQaFvo5	.	842	+ (H + IVI)
9C9-da	SQeFao5	.	838	+ (H + IVI)
535- d a	Sovdaos	.	888	+ (H + IVI)
DP -534	SQaFvo5	0. 7 6	888	+ (H + IVI)
SSS- d。	SQaFvo5	.	998	+ (H + IVI)
DP–532	SQeFao5	.	888	+ (H + IVI)
dp -531	Sovdaos	O. V8	8 7 Z	+ (H + IVI)
0G9-dO	SQeFao5	0. 2	9 7 3	+ (H + IVI)
D p -529	SQeFao5	0. S6	666	+ (H + IVI)
D p -528	Sovdaos	O. △8	9 8 5	+ (H + IVI)
27 S- d。	SQaFvo5	0. 98	666	+ (H + IVI)
D p -626	SQaFvo5	0. 81	2 7 9	+ (H + IVI)
DP–525	SQeFao5	.	S LO L	+ (H + IVI)
dp -524	Sovdaos	.	696	+ (H + IVI)
dp -623	SQaFvo5	0. 91	666	+ (H + IVI)
DP–522	SQeFao5	. 2	943	+ (H + IVI)
に S- d。	SQeFao5	. 2	1 0 ε ε	+ (H + IVI)
D p -520	Sovdaos	O. 96	1144	+ (H + IVI)
dO-619	SQaFvo5	0. ら し	1 3 1 6	+ (H + IVI)
dO-618	SQaFvo5	V. 1 3	V 3 1O	+ (H + IVI)
dp–ST乙	SQeFao5	. ~7	6 6 S L	+ (H + IVI)
D p -516	ogvvaos	.	983 L	+ (H + IVI)
da-615	ogvvaos	.	LVZ Y	- (H - IVI)
da-S14	ogvvaos	. 7	1 260	- (H - IVI)
DP–513	ogvvaos	.	1783 L	- (H - IVI)
ひ s-da	ogvvaos	.	1 09Z	- (H - IVI)
ほ - d a	ogvvaos	0. 69	1 3 7 9	- (H - IVI)
610-da	ogvvaos	. ~	989 L	- (H - IVI)
60S - d a	ogvvaos	. 2	1 9PV	- (H - IVI)
dO-608	ogvvaos	0. 74	1432	- (H - IVI)
7 09-da	ogvvaos	0. 7 6	1 ㄐ 6 0	- (H - IVI)
dO-909	ogvvaos	.	1 602	- (H - IVI)
sos - d a	ogvvaos	.	1432	- (H - IVI)
DP -50Z	ogvvaos	0. 81	1 809	- (H - IVI)
SOS- d。	ogvvaos	0. 8 9	1 6 9 3	- (H - IVI)
209-dO	ogvvaos	.	L 8 8 ㄐ	- (H - IVI)
10-s d。	osvvaos	0. 91	1578	- (H - IVI)
	LCMS条件	保持時間 (分)	nicisis(≡ si) m/z	

	LCMS条件	保持時間 (分)	ncisiA(ε si) mz/z	
L99-dQ	sQaFov5	1- 06	1338	+(H+IVI)
SSS-dₚ	sQaFov5	0. 96	1 963	+(H+IVI)
1799-da	sQaFov5	· ⌒	1 893	+(H+IVI)
999-da	sQaFov5	0. 97	1 963	+(H+IVI)
ap-6S6	sQaFov5	0. 94	1 Z68	+(H+IVI)
dₚ-S57	sQaFov5	0. ら1	1 963	+(H+IVI)
899-dO	sQaFov5	1- oo	1 968	+(H+IVI)
699-dO	sQaFov5	1. 0ヵ	1 Z96	+(H+IVI)
099-dO	sQaFov5	0. 9S	1 Z08	+(H+IVI)
Dp-66I	sQaFov5	0. 97	1 983	+(H+IVI)
299-dO	sQaFov5	· ⌒	11 0ヵ	+(H+IVI)
S9S-da	sQaFov5	0. 9ヵ	1 L5 3	+(H+IVI)
1?99-da	sQaFov5	0. 9S	1 Z60	+(H+IVI)
999-da	sQaFov5	·	1 017L	-(H-IVI)
Dp-566	sQaFov5	0. 97	803 L	-(H-IVI)
/.99-da	sQaFov5	· 2	1 00 L	-(H-IVI)
899-dO	sQaFov5	· 5	1 80 1	-(H-IVI)
699-dO	sQaFov5		1 91 1	-(H-IVI)
o7a-d ₚ	sQaFov5	0. 89	1 658	-(H-IVI)
LZ.9-da	sQaFov5	0. 8L	1 L5 7	-(H-IVI)
ZLQ-dQ	sQaFov5	0. 9ヵ	1 50 7	-(H-IVI)
ε Z-s ₚ	sQaFov5		1 301	-(H-IVI)
DP-574	sQaFov5	0. 89	1 658	-(H-IVI)
9Z.9-da	sQaFov5	· 3	1 314	-(H-IVI)
9 Z-S ₚ	sQaFov5	0. 90	1 411	-(H-IVI)
77-S ₚ	sQaFov5		1 0ヵ 8 L	-(H-IVI)
a8-57 ₚ	sQaFov5	0. 7 9	1 909	-(H-IVI)
6 Z-S ₚ	sQaFov5	5	1 1709	-(H-IVI)
089-dO	sQaFov5	0. 89	1 9179	-(H-IVI)
L89-da	sQaFov5	·	1 6Z1	-(H-IVI)
089-dO	sQaFov5	0. S7	1 969	-(H-IVI)
G89-da	sQaFov5	0. 86	1 9617	-(H-IVI)
1789-da	sQaFov5	0. 90	1 610	-(H-IVI)
/.89-da	sQaFov5	· 5	1 0180. 2	-(H-IVI)
889-dO	sQaFov5	1- 00	1 678. 6	-(H-IVI)
Dp-589	sQaFov5	· ⌒	1 453. 6	-(H-IVI)
069-dO	sQaFov5	· 2	1 ム9ム. 1	-(H-IVI)
Dp-69I	sQaFov5	· 2	1 430. 2	-(H-IVI)
669-dO	sQaFov5	·	1 68ム	-(H-IVI)
ap-593	sQaFov5	0. 78	1 59 7	-(H-IVI)
ₚ-594	sQaFov5	·	1 703	-(H-IVI)
969-dO	sQaFov5	1- oo	1570	-(H-IVI)
Dp-596	sQaFov5	1- 09	1 6.7 9	-(H-IVI)
/.69-da	sQaFov5	0. 1Z	1 6T 1	-(H-IVI)
869-dO	sQaFov5	·	1731	-(H-IVI)
669-dO	sQaFov5	0. 79	1 66I	-(H-IVI)
009-da	sQaFov5	1- 01	969 L	-(H-IVI)

099-dO	ogvvaos	O. 8 S	L L 9	- (H - ıvı)
6179—d。	ogvvaos	O. 乙 8	1 L P	- (H - ıvı)
8179-dO	ogvvaos	0. 9 1	ı ζo3	- (H - ıvı)
LV9-dQ	ogvvaos	O. S 7	1 Z O 3	- (H - ıvı)
9ヒ9 - d a	ogvvaos	O. 8 9	L L 8 9	- (H - ıvı)
9179-dO	ogvvaos	O. S V	9 8 1 1	- (H - ıvı)
449 - d a	ogvvaos	O. 2 8	L L 8 9	- (H - ıvı)
ε1?9 - d a	ogvvaos	O. 8 9	L 2 0 3	- (H - ıvı)
ひ 9 - d 。	ogvvaos	O. 8 8	1 2 0 3	- (H - ıvı)
け 9—d 。	ogvvaos	O. S 7	ı ζo3	- (H - ıvı)
0179-d。	ogvvaos	O. 8 8	1 Z O 3 . 6	- (H - ıvı)
6S9- d a	ogvvaos	0. 8ヤ	L L 8 9	- (H - ıvı)
Dp-639	sQaFvo5	-1 o ε	ı ε ı v	+ (H + ıvı)
sQaFvo5-d。	1. 06	1 3 P 2 . 2		+ (H + ıvı)
9S9- d 。	sQaFvo5	1. 0 9	1 3 4 2	+ (H + ıvı)
pa-635	sQavJaQs	-1 0 9	1 3 5 6 . 5	+ (H + ıvı)
Dp-63ヒ	sQavJaQs	O. 6 8	1 9 3 3	+ (H + ıvı)
εε9-da	sQavJaQs	1. 0 9	1 3 4 2	+ (H + ıvı)
2C9-da	sQaFvo5	1. LO	1 3 1 2	+ (H + ıvı)
631- d a	sQavJaQs	O. 9 8	1 4 2 4	- (H - ıvı)
0G9-da	sQavJaQs	O. 9 1	1 3 3 7	- (H - ıvı)
629–d。	sQaFvo5	O. S 1	I SZI	- (H - ıvı)
Dp-628	sQavJaQs	O. 6 6	L SS8	- (H - ıvı)
627- d 。	sQavJaQs	O. 8 3	I 2 7 3	- (H - ıvı)
Dp-626	sQavJaQs	O. 8 6	1 3 6 9	- (H - ıvı)
Dp-625	sQaFvo5	O. 176	L 3 6 9	- (H - ıvı)
624- d a	sQavJaQs	O. 8 8	1 3 2 3	- (H - ıvı)
da-623	sQaFvo5	O. 36	1 3 7 1	- (H - ıvı)
Dp–622	sQavJaQs	0. 9 1	I 3 3 7	- (H - ıvı)
に 9 - d 。	sQaFvo5	L. SO	L 0817	- (H - ıvı)
Dp-620	sQavJaQs	L. LO -	9 L17 L	- (H - ıvı)
6 L9-dO	sQavJaQs	O. VS	I 3 P 9	- (H - ıvı)
8 L9-dO	sQavJaQs	1. LO	1 6017	- (H - ıvı)
da-乙L9—	sQaFvo5	O. S 6	I 3 6 7	- (H - ıvı)
9 L9-dO	sQavJaQs	L. 3 L	I 3 Z 9	- (H - ıvı)
5 L9-dO	sQavJaQs	1. O 1 -	1 3 3 9	- (H - ıvı)
da-614	sQaFvo5	L. 0 6	I 3 Z 9	- (H - ıvı)
3 L9- d a	sQavJaQs	L に L	I V I 2	- (H - ıvı)
ひ 9- d a	sQavJaQs	1. 8 0 -	1 4 P 3	- (H - ıvı)
u9-da	sQavJaQs	1. L O	1 6317	- (H - ıvı)
0 L9-dO	sQaFvo5	L. 1 4	L 600	- (H - ıvı)
609 - d a	sQavJaQs	L. O L -	L 8617	- (H - ıvı)
809-dO	sQavJaQs	1. 6 0 -	1 6 1 8	- (H - ıvı)
Z09-d。	sQaFvo5	1. 1 9 -	1 6 6 3	- (H - ıvı)
909-dO	sQaFvo5	L. S O	1 5 Z 7	- (H - ıvı)
eo9-da	sQavJaQs	O. 8 6	1 6LV	- (H - ıvı)
1709-d。	sQaFvo5	L. 1 L	1 5 P V	- (H - ıvı)
ε。9 - d 。	sQavJaQs	1. 9 1 -	1 6 1 ıı	- (H - ıvı)
209-dO	sQaFvo5	L. 0 9	L 9 L 6	- (H - ıvı)
601- d 。	sQaFvo5	1. 9 1 -	1 399	- (H - ıvı)
	LCMS条件	保持時間 (分)	ncIAisi(≡ si) mz / z	

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-651	SQDAA50	0.80	1147	（M－H）－
DP-652	SQDAA50	0.82	1147	（M－H）－
DP-653	SQDAA50	0.83	1147	（M－H）－
DP-654	SQDAA50	0.78	1187	（M－H）－
DP-655	SQDAA50	0.88	1187	（M－H）－
DP-656	SQDAA50	0.87	1187	（M－H）－
DP-657	SQDAA50	0.83	1187	（M－H）－
DP-658	SQDAA50	0.80	1318	（M－H）－
DP-659	SQDAA50	0.88	1547.5	（M－H）－
DP-660	SQDAA50	0.89	1510.5	（M－H）－
DP-661	SQDAA50	0.83	1347	（M－H）－
DP-662	SQDAA50	0.83	1333	（M－H）－
DP-663	SQDAA50	0.88	1292	（M－H）－
DP-664	SQDAA50	0.84	1165	（M－H）－
DP-665	SQDAA50	0.79	1549.5	（M－H）－
DP-666	SQDAA50	0.84	1528.5	（M－H）－
DP-667	SQDAA50	0.83	1528.5	（M－H）－
DP-668	SQDAA50	0.80	1282	（M－H）－
DP-669	SQDAA50	0.80	1197	（M－H）－
DP-670	SQDAA50	0.82	1567.5	（M－H）－
DP-671	SQDAA50	0.81	1480	（M－H）－
DP-672	SQDAA50	0.78	1355	（M－H）－
DP-673	SQDAA50	0.83	1013	（M－H）－
DP-674	SQDAA50	0.53	797.5	（M－H）－
DP-675	SQDAA50	0.67	1095	（M－H）－
DP-676	SQDFA05	1.02	1550.4	（M－H）－

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-677	SQDFA05	0.74	900	(M+H)+
DP-678	SQDFA05	0.84	870	(M+H)+
DP-679	SQDFA05	0.97	912	(M+H)+
DP-680	SQDFA05	0.82	900	(M+H)+
DP-681	SQDFA05	0.95	942	(M+H)+
DP-682	SQDFA05	0.87	1013	(M+H)+
DP-683	SQDFA05	1.04	1055	(M+H)+
DP-684	SQDFA05	1.08	1041	(M+H)+
DP-685	SQDFA05	0.86	1027	(M+H)+
DP-686	SQDFA05	1.01	1069	(M+H)+
DP-687	SQDFA05	0.77	987	(M+H)+
DP-688	SQDFA05	0.89	1029	(M+H)+
DP-689	SQDFA05	1.05	1041	(M+H)+
DP-690	SQDFA05	0.91	983	(M+H)+
DP-691	SQDFA05	0.90	983	(M+H)+
DP-692	SQDFA05	0.97	1027	(M+H)+
DP-693	SQDFA05	0.93	1013	(M+H)+
DP-694	SQDFA05	0.93	1013	(M+H)+
DP-695	SQDFA05	0.86	1013	(M+H)+
DP-696	SQDFA05	0.98	1041	(M+H)+
DP-697	SQDFA05	0.94	999	(M+H)+
DP-698	SQDFA05	1.01	1041	(M+H)+
DP-699	SQDFA05	0.85	1003	(M+H)+
DP-700	SQDFA05	0.96	1003	(M+H)+
DP-701	SQDFA05	0.87	1017	(M+H)+
DP-702	SQDFA05	0.86	1017	(M+H)+
DP-703	SQDFA05	1.02	1059	(M+H)+
DP-704	SQDFA05	0.88	1013	(M+H)+
DP-705	SQDFA05	1.03	1055	(M+H)+
DP-706	SQDFA05	1.10	1071	(M+H)+
DP-707	SQDFA05	0.94	1013	(M+H)+
DP-708	SQDFA05	0.95	999	(M+H)+
DP-709	SQDFA05	0.89	1033	(M+H)+
DP-710	SQDFA05	0.89	1033	(M+H)+
DP-711	SQDFA05	0.88	1019	(M+H)+
DP-712	SQDFA05	0.76	955	(M+H)+
DP-713	SQDFA05	0.86	983	(M+H)+
DP-714	SQDFA05	0.92	983	(M+H)+
DP-715	SQDFA05	0.82	928	(M+H)+
DP-716	SQDFA05	0.88	928	(M+H)+
DP-717	SQDFA05	0.86	914	(M+H)+
DP-718	SQDFA05	0.80	900	(M+H)+
DP-719	SQDFA05	0.86	870	(M+H)+
DP-720	SQDFA05	0.78	856	(M+H)+
DP-721	SQDFA05	0.95	898	(M+H)+
DP-722	SQDFA05	0.97	940	(M+H)+
DP-723	SQDFA05	0.81	870	(M+H)+
DP-724	SQDFA05	0.78	886	(M+H)+
DP-725	SQDFA05	0.94	894	(M+H)+
DP-726	SQDFA05	0.76	836	(M+H)+

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-727	SQDFA05	0.79	822	(M+H)+
DP-728	SQDFA05	0.94	1294	(M+H)+
DP-729	SQDFA05	0.95	1308	(M+H)+
DP-730	SQDFA05	0.84	1300	(M+H)+
DP-731	SQDFA05	0.87	1314	(M+H)+
DP-732	SQDFA05	0.93	1326	(M+H)+
DP-733	SQDFA05	0.95	1340	(M+H)+
DP-734	SQDFA05	0.82	1258	(M+H)+
DP-735	SQDFA05	0.86	1272	(M+H)+
DP-736	SQDFA05	0.89	1252	(M+H)+
DP-737	SQDFA05	0.93	1266	(M+H)+
DP-738	SQDFA05	0.85	898	(M+H)+
DP-739	SQDFA05	0.80	856	(M+H)+
DP-740	SQDFA05	0.91	898	(M+H)+
DP-741	SQDFA05	0.74	842	(M+H)+
DP-742	SQDFA05	0.73	828	(M+H)+
DP-743	SQDFA05	0.78	914	(M+H)+
DP-744	SQDFA05	0.76	842	(M+H)+
DP-745	SQDFA05	0.79	842	(M+H)+
DP-746	SQDFA05	0.91	928	(M+H)+
DP-747	SQDFA05	0.90	928	(M+H)+
DP-748	SQDFA05	0.96	942	(M+H)+
DP-749	SQDFA05	0.81	886	(M+H)+
DP-750	SQDFA05	0.73	872	(M+H)+
DP-751	SQDFA05	0.75	862	(M+H)+
DP-752	SQDFA05	0.79	1274	(M+H)+
DP-753	SQDFA05	0.76	1218	(M+H)+
DP-754	SQDFA05	0.92	1316	(M+H)+
DP-755	SQDFA05	0.89	1274	(M+H)+
DP-756	SQDFA05	1.01	1388	(M+H)+
DP-757	SQDFA05	1.05	1358	(M+H)+
DP-758	SQDFA05	1.10	1430	(M+H)+
DP-759	SQDFA05	1.04	1388	(M+H)+
DP-760	SQDFA05	1.08	1402	(M+H)+
DP-761	SQDFA05	1.11	1430	(M+H)+
DP-762	SQDFA05	1.09	1392	(M+H)+
DP-763	SQDFA05	0.73	1147	(M+H)+
DP-764	SQDFA05	0.75	1113	(M+H)+
DP-765	SQDFA05	0.72	1131	(M+H)+
DP-766	SQDFA05	0.78	1159	(M+H)+
DP-767	SQDFA05	0.85	1201	(M+H)+
DP-768	SQDFA05	0.90	1201	(M+H)+
DP-769	SQDFA05	0.96	1203	(M+H)+
DP-770	SQDFA05	0.87	1183	(M+H)+
DP-771	SQDFA05	1.07	1289	(M+H)+
DP-772	SQDFA05	1.04	1239	(M+H)+
DP-773	SQDFA05	1.05	1273	(M+H)+
DP-774	SQDFA05	0.99	1229	(M+H)+
DP-775	SQDFA05	1.02	1275	(M+H)+
DP-776	SQDFA05	1.09	1307	(M+H)+

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-777	SQDFA05	0.90	1148	(M+H)+
DP-778	SQDFA05	0.83	1104	(M+H)+
DP-779	SQDFA05	0.95	1114	(M+H)+
DP-780	SQDFA05	0.93	1146	(M+H)+
DP-781	SQDFA05	1.07	1188	(M+H)+
DP-782	SQDFA05	1.11	1222	(M+H)+
DP-783	SQDFA05	0.97	1132	(M+H)+
DP-784	SQDFA05	0.90	1138	(M+H)+
DP-785	SQDFA05	0.80	1021	(M+H)+
DP-786	SQDFA05	0.74	945	(M+H)+
DP-787	SQDFA05	0.87	987	(M+H)+
DP-788	SQDFA05	0.90	1005	(M+H)+
DP-789	SQDFA05	0.89	1029	(M+H)+
DP-790	SQDFA05	1.04	1115	(M+H)+
DP-791	SQDFA05	1.02	1075	(M+H)+
DP-792	SQDFA05	1.09	1149	(M+H)+
DP-793	SQDFA05	1.02	1123	(M+H)+
DP-794	SQDFA05	0.65	846	(M+H)+
DP-795	SQDFA05	0.77	916	(M+H)+
DP-796	SQDFA05	0.78	878	(M+H)+
DP-797	SQDFA05	0.81	902	(M+H)+
DP-798	SQDFA05	1.01	918	(M+H)+
DP-799	SQDFA05	0.94	1063	(M+H)+
DP-800	SQDFA05	0.89	995	(M+H)+
DP-801	SQDFA05	1.02	1049	(M+H)+
DP-802	SQDFA05	0.96	981	(M+H)+
DP-803	SQDFA05	1.00	1148	(M+H)+
DP-804	SQDFA05	0.96	1080	(M+H)+
DP-805	SQDFA05	0.94	1251	(M+H)+
DP-806	SQDFA05	0.89	1149	(M+H)+
DP-807	SQDFA05	0.85	1278	(M+H)+
DP-808	SQDFA05	0.79	1176	(M+H)+
DP-809	SQDFA05	1.00	1250	(M+H)+
DP-810	SQDFA05	0.98	1360	(M+H)+
DP-811	SQDFA05	1.06	1200	(M+H)+
DP-812	SQDFA05	1.01	1214	(M+H)+
DP-813	SQDFA05	0.93	1078	(M+H)+
DP-814	SQDFA05	0.95	1396	(M+H)+
DP-815	SQDFA05	0.87	1231	(M+H)+
DP-816	SQDFA05	1.05	1241	(M+H)+
DP-817	SQDFA05	1.14	1283	(M+H)+
DP-818	SQDFA05	0.70	966	(M+H)+
DP-819	SQDFA05	0.78	963	(M+H)+
DP-820	SQDFA05	1.03	1128	(M+H)+
DP-821	SQDFA05	1.12	1170	(M+H)+
DP-822	SQDFA05	0.97	1114	(M+H)+
DP-823	SQDFA05	0.82	985	(M+H)+
DP-824	SQDFA05	0.82	1019	(M+H)+
DP-825	SQDFA05	0.93	954	(M+H)+
DP-826	SQDFA05	0.91	868	(M+H)+

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-827	SQDFA05	0.74	950	(M+H)+
DP-828	SQDFA05	0.92	1019	(M+H)+
DP-829	SQDFA05	0.83	1181	(M+H)+
DP-830	SQDFA05	1.08	1254	(M−H)−
DP-831	SQDFA05	1.10	1254	(M−H)−
DP-832	SQDFA05	1.11	1270	(M−H)−
DP-833	SQDFA05	1.08	1272	(M−H)−
DP-834	SQDFA05	1.09	1272	(M−H)−
DP-835	SQDFA05	1.12	1288	(M−H)−
DP-836	SQDFA05	1.10	1274	(M−H)−
DP-837	SQDFA05	1.14	1270	(M−H)−
DP-838	SQDFA05	1.14	1256	(M−H)−
DP-839	SQDFA05	1.07	1282	(M−H)−
DP-840	SQDFA05	1.03	1260	(M−H)−
DP-841	SQDFA05	1.11	1288	(M−H)−
DP-842	SQDFA05	1.05	1294	(M−H)−
DP-843	SQDFA05	1.03	1260	(M−H)−
DP-844	SQDFA05	1.14	1074	(M−H)−
DP-845	SQDFA05	1.04	1224	(M−H)−
DP-846	SQDFA05	1.12	1272	(M−H)−
DP-847	SQDFA05	1.09	1288	(M−H)−
DP-848	SQDFA05	0.92	1262	(M−H)−
DP-849	SQDFA05	1.09	1274	(M−H)−
DP-850	SQDFA05	1.15	1429	(M−H)−
DP-851	SQDFA05	1.16	1429	(M−H)−
DP-852	SQDFA05	1.21	1445	(M−H)−
DP-853	SQDFA05	1.18	1431	(M−H)−
DP-854	SQDFA05	1.10	1371	(M−H)−
DP-855	SQDFA05	1.12	1371	(M−H)−
DP-856	SQDFA05	1.12	1387	(M−H)−
DP-857	SQDFA05	1.12	1373	(M−H)−
DP-858	SQDFA05	1.24	1415	(M−H)−
DP-859	SQDFA05	1.19	1401	(M−H)−
DP-860	SQDFA05	1.00	1357	(M−H)−
DP-861	SQDFA05	1.20	1445	(M−H)−
DP-862	SQDFA05	1.25	1459	(M−H)−
DP-863	SQDFA05	1.05	1147	(M−H)−
DP-864	SQDFA05	1.12	1371	(M−H)−
DP-865	SQDFA05	1.02	1359	(M−H)−
DP-866	SQDFA05	0.97	1279	(M−H)−
DP-867	SQDFA05	1.14	1401	(M−H)−
DP-868	SQDFA05	1.14	1415	(M−H)−
DP-869	SQDFA05	1.12	1270	(M+H)+
DP-870	SQDFA05	1.13	1268	(M−H)−
DP-871	SQDFA05	1.14	1284	(M−H)−
DP-872	SQDFA05	1.20	1270	(M−H)−
DP-873	SQDFA05	1.21	1544	(M−H)−
DP-874	SQDFA05	1.20	1530	(M−H)−
DP-875	SQDFA05	1.10	1458	(M−H)−
DP-876	SQDFA05	1.08	1444	(M−H)−

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS（ESI）m／z	
DP-877	SQDFA05	1.07	1444	(M+H)+
DP-878	SQDFA05	0.96	1428	(M−H)−
DP-879	SQDFA05	0.95	1166	(M−H)−
DP-880	SQDFA05	1.01	1178	(M−H)−
DP-881	SQDFA05	1.09	1458	(M−H)−
DP-882	SQDFA05	1.13	1456	(M−H)−
DP-883	SQDFA05	1.05	1470	(M−H)−
DP-884	SQDFA05	1.14	1482	(M−H)−
DP-885	SQDFA05	1.03	1428	(M−H)−
DP-886	SQDFA05	1.08	1444	(M−H)−
DP-887	SQDFA05	0.98	1513	(M−H)−
DP-888	SQDFA05	1.04	1371	(M−H)−
DP-889	SQDFA05	1.01	1513	(M−H)−
DP-890	SQDFA05	1.09	1371	(M−H)−
DP-891	SQDFA05	1.00	1529	(M−H)−
DP-892	SQDFA05	1.06	1387	(M−H)−
DP-893	SQDFA05	1.01	1517	(M+H)+
DP-894	SQDFA05	1.09	1373	(M−H)−
DP-895	SQDFA05	1.01	1555	(M−H)−
DP-896	SQDFA05	1.02	1541	(M−H)−
DP-897	SQDFA05	1.07	1371	(M−H)−
DP-898	SQDFA05	0.96	1485	(M−H)−
DP-899	SQDFA05	1.13	1581	(M−H)−
DP-900	SQDFA05	0.73	1527	(M−H)−
DP-901	SQDFA05	0.91	1343	(M−H)−
DP-902	SQDFA05	1.04	1555	(M−H)−
DP-903	SQDFA05	0.97	1499	(M−H)−
DP-904	SQDFA05	0.77	1206	(M−H)−
DP-905	SQDFA05	0.80	1269.9	(M−H)−
DP-906	SQDFA05	0.83	1448.2	(M−H)−
DP-907	SQDFA05	1.08	1236	(M−H)−
DP-908	SQDFA05	1.34	1504.3	(M−H)−
DP-909	SQDFA05	1.21	1335.1	(M−H)−
DP-910	SQDAA50	0.87	1513	(M−H)−
DP-911	SQDAA50	0.89	1481	(M−H)−
DP-912	SQDAA50	0.88	1459	(M−H)−
DP-913	SQDAA50	0.93	1481	(M−H)−
DP-914	SQDAA50	0.91	1543	(M−H)−
DP-915	SQDAA50	0.86	1567	(M−H)−
DP-916	SQDAA50	0.91	1444	(M−H)−
DP-917	SQDAA50	0.87	1368	(M−H)−
DP-918	SQDAA50	0.85	1360	(M−H)−
DP-919	SQDAA50	0.83	1258	(M−H)−
DP-920	SQDAA50	0.90	1416	(M−H)−
DP-921	SQDAA50	0.86	1402	(M−H)−
DP-922	SQDAA50	0.85	1570	(M−H)−
DP-923	SQDAA50	0.96	1742	(M−H)−
DP-924	SQDAA50	0.90	1620	(M−H)−
DP-925	SQDAA50	0.94	1640	(M−H)−
DP-926	SQDAA50	0.90	1660	(M−H)−

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS (ESI) m／z	
DP-927	SQDAA50	0.93	1561	(M-H)-
DP-928	SQDAA50	0.88	1521	(M-H)-
DP-929	SQDAA50	0.85	1471	(M-H)-
DP-930	SQDAA50	0.87	1501	(M-H)-
DP-931	SQDAA50	0.95	1577	(M-H)-
DP-932	SQDAA50	0.80	1326	(M-H)-
DP-933	SQDAA50	0.89	1362	(M-H)-
DP-934	SQDAA50	0.87	1368	(M-H)-
DP-935	SQDAA50	0.93	1699	(M-H)-
DP-936	SQDAA50	0.90	1697	(M-H)-
DP-937	SQDAA50	0.89	1623	(M-H)-
DP-938	SQDAA50	0.98	1721	(M-H)-
DP-939	SQDAA50	0.89	1510	(M-H)-
DP-940	SQDAA50	0.91	1532	(M-H)-
DP-941	SQDAA50	0.93	1670	(M-H)-
DP-942	SQDAA50	0.92	1646	(M-H)-
DP-943	SQDAA50	0.91	1584	(M-H)-
DP-944	SQDAA50	0.92	1693	(M-H)-
DP-945	SQDAA50	0.92	1665	(M-H)-
DP-946	SQDAA50	0.94	1775	(M-H)-
DP-947	SQDAA50	0.92	1679	(M-H)-
DP-948	SQDAA50	0.91	1663	(M-H)-
DP-949	SQDAA50	0.88	1705	(M-H)-
DP-950	SQDAA50	0.92	1699	(M-H)-
DP-951	SQDAA50	0.92	1693	(M-H)-
DP-952	SQDAA50	0.88	1655	(M-H)-
DP-953	SQDAA50	0.94	1771	(M-H)-
DP-954	SQDAA50	0.91	1723	(M-H)-
DP-955	SQDAA50	0.87	1593	(M-H)-
DP-956	SQDAA50	0.89	1667	(M-H)-
DP-957	SQDAA50	0.87	1552	(M-H)-
DP-958	SQDAA50	0.90	1594	(M-H)-
DP-959	SQDAA50	0.87	1667	(M-H)-
DP-960	SQDAA50	0.90	1543	(M-H)-
DP-961	SQDAA50	0.89	1628	(M-H)-
DP-962	SQDAA50	0.93	1640	(M-H)-
DP-963	SQDAA50	0.94	1723	(M-H)-
DP-964	SQDAA50	0.85	1479	(M-H)-
DP—965	SQDAA50	0.90	1237	(M-H)-

[0721] なお、記載のLC-Mass 条件の詳細を表１１_４に記載した

[表11-4]

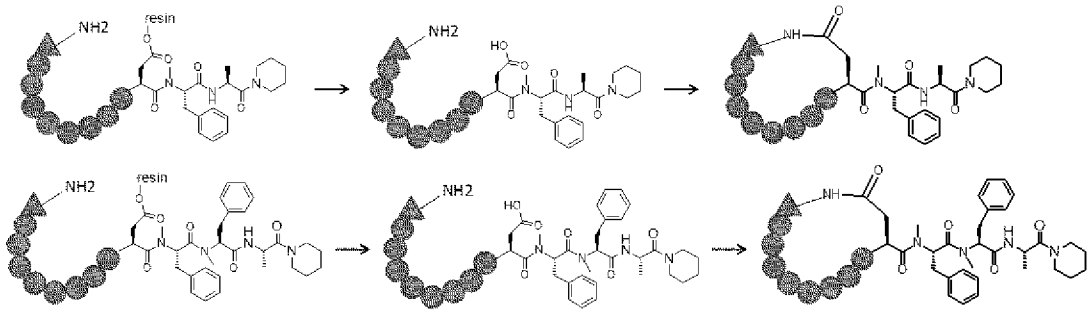
分析条件	装置	カラム(I.D.x長さ)(mm)	移動相	勾配(A/B)	流速(mL/分)	カラム温度(℃)	波長
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH$_4$H$_2$O B)MeOH	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH$_4$H$_2$O B)MeOH	50/50=> 0/100(0.7分間) 0/100(0.7分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H$_2$O B)0.1% FA,MeCN	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H$_2$O B)0.1% FA,MeCN	50/50=> 0/100(0.7分間) 0/100(0.7分間)	1	35	210-400nm PDA total
ZQAA05	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)10mM AcONH$_4$H$_2$O B)MeOH	95/5=> 0/100(3.0分間) 0/100(2.0分間)	2	室温	210-400nm PDA total
ZQAA50	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)10mM AcONH$_4$H$_2$O B)MeOH	50/50=> 0/100(3.0分間) 0/100(2.0分間)	2	室温	210-400nm PDA total
ZQFA05	2525BGM/2996PDA/ZQ2000	Chromolith Flash RP-18e (4.6x25)	A)0.1% FA,H$_2$O B)0.1% FA,MeCN	95/5=> 0/100(3.0分間) 0/100(2.0分間)	2	室温	210-400nm PDA total
SMDmethod1	Nexera/2020	Kinetex 1.7u C18 (2.1x50)	A)0.05% TFA,H$_2$O B)0.05% TFA,MeCN	95/5=> 0/100(1.5分間) 0/100(0.5分間)	1	35	210-400nm PDA total

[0722] 1-3-2. 直鎖部1を有するペプチドの合成例その1

固定された直鎖部 (MePhe_Ala-pip及び、MePhe_MePhe-Ala-pip) を有するペプチドの合成

C末端がアミド化 (本例ではピペリジン化) され、C末端以外に配置されたアスパラギン酸側鎖カルボン酸とN末端アミノ基がアミド結合により環化された合成例を述べる。本例を1つの代表例として述べるが、ペプチド化学合成については、本明細書の異なる場所 (例えば142、512 (実施例15の2—2)、553 (実施例18) など) の各所に記載されているどの手法を用いてもよい。以下のスキームXにその合成の一例を示した。

[0723]



スキームx. 固定直鎖部 (MePhe-Ala-Pip及び、MePhe-MePhe-Ala-Pip)を有するアミド環化ドラッグライクペプチドの合成法の一例

[0724] 化合物SP455と同様の手法にて合成したFmoc—Asp (0-Trt (2-Cl)-Resin)-MePhe-Ala-pip (200mg) を用い、Fmocアミノ酸としてFmoc_MePhe_0H、Fmoc-EtPhe-OH (化合物SP443)、Fmoc_MeAla_OH、Fmoc_MeLeu_0H、Fmoc_D_MeAla_OH、Fmoc

－ＭｅＧ１ｙ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ＭｅＶａ１－０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ＭｅＩｌｅ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ｇ－ＭｅＡｂｕ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ｂ-ＭｅＡＩａ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ｎＰｒＧ１ｙ-ＯＨ（化合物ＳＰ８１５）、Ｆｍｏｃ-ＭｅＡ１ａ（４-Ｔｈｚ）－０Ｈ（化合物ＳＰ８１１）、Ｆｍｏｃ—Ｐｒｏ—０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ａｚｅ（２）＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｐｉｃ（２）＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ｐｈｇ—０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＶａＩ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｄ-Ｖａ１－ＯＨ、Ｆｍｏｃ—Ｓｅｒ（ｔＢｕ）＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ-Ｌｅｕ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ｄ—Ｌｅｕ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ－１１ｅ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ－ＡＩａ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａ１ａ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ｇ１ｙ—０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｌｙｓ（Ｍｅ２）－０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ａｒｇ（Ｍｅ２）-０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＧＩｎ（Ｍｅ２）－０Ｈ（化合物ＳＰ４４８）、Ｆｍｏｃ-ＧＩｎ（Ｍｅ）-ＯＨ（化合物ｓＰ４４６）、Ｆｍｏｃ＿Ｇ１ｎ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＡＩＧＩｙ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ＡＩａ（４-Ｔｈｚ）＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ－ＡＩａ（ＣＮ）＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ-Ｈｐｈ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ—Ｐｈｅ３-０Ｈ、Ｆｍｏｃ—ＡＩａ（３Ｐｙｒ）＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ—Ｔｙｒ（３—Ｆ）-０Ｈ（化合物SP4５０）、Ｆｍｏｃ-Ｇ１ｕ（０Ａ１）-ＯＨ，　Ｆｍｏｃ-Ｈｉｓ（Ｍｍｔ）-０Ｈ，　Ｆｍｏｃ—Ａ１ａ（５-Ｔｅｔ（Ｔｒｔ））-０Ｈ（化合物ＳＰ４０９）などを用いてペプチドの伸長を行った（アミノ酸の略語は表１１—２に記載）。既に実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った。例えば、化合物ＤＰ＿１７７の合成の場合、ペプチドの伸長後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基の除去をペプチド合成機上にて行った後、レジンをＤＭＦにて洗浄した。レジンに４Ｎ $^{1-1}$○１の１，４—ジオキサン溶液/ ジクロロメタン/ ２，２，２—トリフルオロエタノール/ トリイソプロピルシラン（＝１/ ６０/ ３０/ ５．７，ｖ/ ｖ、４ｍＬ）を加えて２時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/ ２，２，２—トリフルオロエタノール（＝１/ １，ｖ/ ｖ、

１ｍＬ）にて２回洗浄した。全ての抽出液を混合し、ＤＩＰＥＡ（５０．０トし、０．２８６ｍｍｏｌ）にて中和した後、減圧下濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン (8ｍＬ）に溶解した。０―（７―アザー１Ｈベンゾトリアゾール_１_ィル）_Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルゥロ二ゥム　ヘキサフルオロホスフエート (ＨＡＴＵ）（６８ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）のＤＭＳ０溶液 (０．２０ｍＬ），ＤＩＰＥＡ（３７μＬ、０．２１ｍｍｏｌ）を加え、室温にて２時間振とうした。減圧下、溶媒を留去した後、ＤＭＳＯに溶解し、ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ―ＨＰＬＣで精製し、ＤＰ_１７７（４．２７ｍｇ、５％）を得た。上述と同様の方法、もしくはＦｍｏｃ_Ａｓｐ（０-Ｔｒｔ（２―ＣＩ）―Ｒｅｓｉｎ）-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐの代わりに化合物ＳＰ４５９と同様に調製したＦｍｏｃ_Ａｓｐ（Ｏ-Ｔｒｔ（２-ＣＩ）-Ｒｅｓｉｎ）-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐを用し、表題のアミド環化ドラックライクペプチドの合成を行った。なお、ＤＰ_１２３~１２４、ＤＰ_１７７~２１４、ＤＰ_２７８~３１６、ＤＰ―３４４~４０７、ＤＰ_４４３~４６４、ＤＰ_４８３~４８４、ＤＰ-４９０～４９３、ＤＰ-４９５～５１０、ＤＰ-５８７～５８８、ＤＰ-５９０~５９１、ＤＰ_５９３~５９４、ＤＰ_５９７~６１３、ＤＰ―６３１が本合成法に準拠した方法で合成可能である。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表１１―３＿２に記載した。

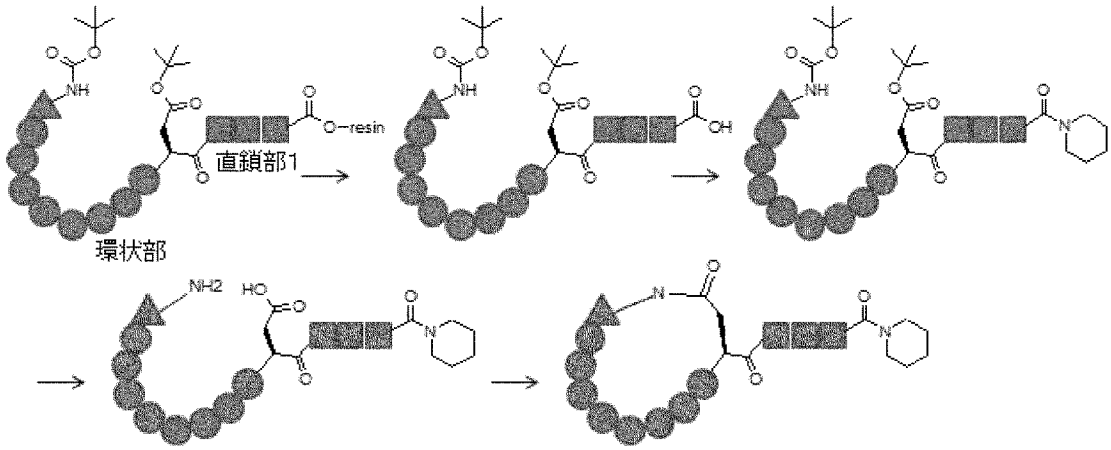
[0725] １-３-３．　直鎖部１を有するペプチドの合成例その２

C末端がアミド化 (本例ではピペリジン化）され、C末端以外に配置されたァスパラギン酸側鎖カルボン酸とN末端アミノ基がアミド結合により環化された合成例を述べる。本例を１つの代表例として述べるが、ペプチド化学合成については、本明細書の異なる場所の各所に記載されているどの手法を用いてもよい。以下のスキームＧ２にその合成の一例を示した。

[0726] Ｎ末端にＦｍｏｃアミノ酸の代わりにＢｏｃアミノ酸を用い、Ｆｍｏｃ―１ｌｅ_ＯＨもしくはＦｍｏｃ_Ｐｈｅ_ＯＨ、Ｆｍｏｃ-ＶａＩ-ＯＨ、Ｆｍｏｃ-Ａｌａ-ＯＨを坦持させた２_クロロトリチルレジン（１００ｍ

ｇ）（アミノ酸のレジンへの担持方法は前述の方法に従った）を用い、ァスパラギン酸のソースとしてＦｍｏｃ―Ａｓｐ（０ｔＢｕ）―ＯＨを用い、既に実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った。ペプチドの伸長後、レジンにジクロロメタン/２，２，２―トリフルオロエタノール/トリイソプロピルシラン（＝１/１/０．２，ｖ/ｖ、２ｍＬ）を加えて２時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/２，２，２―トリフルオロエタノール（＝１/１，ｖ/ｖ、１ｍＬ）にて２回洗浄した後、全ての抽出液を混合し減圧下濃縮した。得られた残渣を０＿（７―アザ－１Ｈベンゾトリアゾール＿１＿イル）＿Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスフエート（ＨＡＴＵ）（０．１２ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１４５ｍｍｏｌ）、ピペリジン（０．１４５ｍｍｏｌ）にてＣ末端のカルボン酸をピペリジンアミド化した後、減圧下、溶媒を留去した。得られた残渣をＴＦＡ/トリイソプロピルシラン/ジクロロメタン（３/１/６、ｖ/ｖ、０．５ｍＬ）で処理し、Ｎ末端のＢｏｃ基、ｏ―トリチル基およびァスパラギン酸側鎖カルボン酸のｔｅｒｔ―ブチル基の除去を同時に行った。反応完結後、氷冷したＤＭＦ（３ｍＬ）を加えた後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をジクロロメタン（３ｍＬ）に溶かした。さらに、水（０．５ｍＬ）を加えた後、水（０．５ｍＬ）で湿らせた珪藻土カラム（１ｍＬ、ＣｈｅｍＥｌｕｔ、アジレントテクノロジー社製）に溶液を通し、ジクロロメタン（３ｍＬ）で２回抽出した。全ての抽出液を混合し、溶液を０＿（７―アザ―１Ｈベンゾトリアゾール＿１＿イル）＿Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスフエート（ＨＡＴＵ）（０．１２ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１４５ｍｍｏｌ）にて処理することによりペプチドの環化を行った。減圧下、溶媒を留去した後、ＤＭＳＯに溶解し、ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ＿ＨＰＬＣで精製し、直鎖部１を有するアミド環化ドラックライクペプチドの合成を行った。なお、ＤＰ＿４０～４６、ＤＰ-５６５～５８４

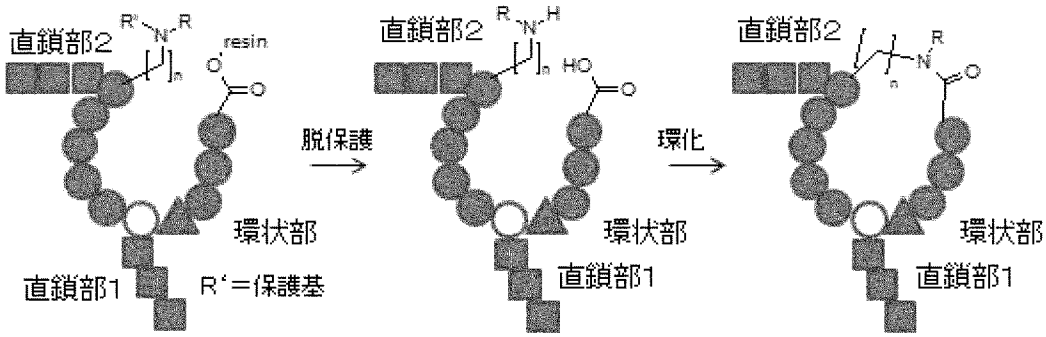
、ＤＰ＿６５８～６７２、ＤＰ＿９１０～９５６、ＤＰ-９６０～９６３、ＤＰ-９６５が本合成法に準拠した方法で合成可能である。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表１１—３＿２に記載した。



スキームG2 直鎖部1を有するアミド環iヒドラックライクペプチドの合成法の一例

[0727] 1-3-4. 直鎖部1および2を有する《プチドの合成

Ｃ末端以外に配置されたアスパラギン酸側鎖カルボン酸がアミド化され（本例ではピペリジンであるが直鎖部１を構成するペプチドが結合していてもよい）、Ｎ末端以外に配置されたアミノ基側鎖を有するアミノ酸の側鎖アミノ基とＣ末端に配置されたアミノ酸のカルボン酸とで環化したペプチドの化学合成例を述べる。ここでは直鎖部１および２を有するペプチドの例として、交差ユニット（○ユニット）としてＡｓｐ＿ｐｉｐ、アミノ基ソースとして保護基のついたアミノ基側鎖を有するアミノ酸、Ｎ末端にカルボン酸類縁体を用いたケースを代表例として示した。本例でＮ末端に用いた$_{H}$。Ｇｌｙはヒドロキシル基を保護した化合物を用いても良い。ペプチド化学合成については、本明細書の異なる場所の各所に記載されているどの手法を用いてもよい。以下のスキームＧ３にその合成の一例を示した。



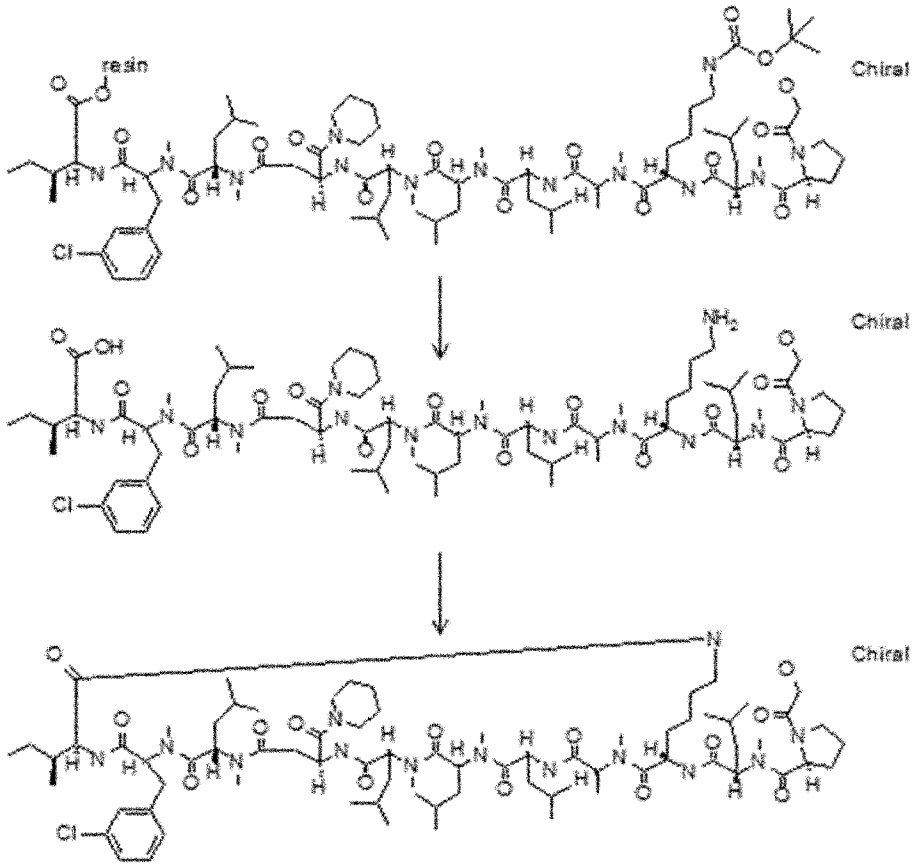
スキームG3. 直鎖都1および2を有するアミド環化 ドラックライクペプチドの合f⑫去の一例

[0728] 本例を１つの代表例として述べるが、合成法は本法に拘らず、この応用として様々な方法も可能である。例えば、非特許文献 (Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９９３，３４，４７０９—４７１２）などのように、側鎖カルボン酸の保護基としてアリルエステル、環化部位アミノ基の保護基として１_（４，４—ジメチル_２，６—ジオキソシクロヘキシリデン）エチル基 (Ｄｄｅ）を用いてペプチドの伸長を行った後、Ｄｄｅ基を脱保護したアミノ基にオリゴペプチドを縮合し、アリルエステルの脱保護を行ったカルボン酸とレジン上で環化を行うことでも合成可能である。

[0729] ＤＰ-９６４

^{H0}Ｇｌｙ-Ｐｒｏ_Ｍｅ_Ｌｅｕ—氷Ｌｙｓ_ＭｅＡｌａ-Ｌｅｕ-ＭｅＬｅｕ—ＭｅＬｅｕ—Ａｓｐ—ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ—ＭｅＬｅｕ—ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｉｌｅ氷

（２つの* 部位にて環化）



スキームx2. 盧譲鶴2を有するアミド環化ドラックライクペプチド(DP-964 》Φ含應麺 ーき|

[0730] N末端にＦｍｏｃアミノ酸の代わりにH0ＧｌｙをＨＯＧｌｙを用い、ァスパラギン酸のソースとしてFmoc-Asp-Piperidineを用い、Ｆｍｏｃ＿Ｉｌｅ＿ＯＨを担持させた２―クロロトリチルレジン（１００ｍｇ）を用い、Ｆｍｏｃアミノ酸としてＦｍｏｃ―ＭｅＰｈｅ（３-CL）-ＯＨ（化合物SP８１２）、Ｆｍｏｃ＿ＭｅＡｌａ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ＿ＭｅＬｅｕ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ_Pro_ ＯＨ、Ｆｍｏｃ＿Ｌｅｕ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ―Lys(Boc) ＿０Ｈ、などを用いてペプチドの伸長を行った（アミノ酸の略語は表１１＿２に記載）。既に実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った。４Ｎ 1-1 ○ 1の１，４＿ジオキサン溶液/ ジクロロメタン/ トリフルオロエタノール/ トリイソプロピルシラン （1／４０Ｚ２０Ｚ４、ｖ/ ｖ、２ｍＬ）をレジンに加えて２時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、ＤＭＦ（１ｍＬ）を入れたチューブに反応液を加えた。レジンをジクロロメタン/ ２，２，２―トリフルオロエタノール（= 1/ １，v

/ｖ、１ｍＬ）にて２回洗浄した後、逆相カラムクロマトグラフィー精製を行った。得られた生成物をジクロロメタン（８ｍＬ）に溶解した後、０＿（７―アザー１Ｈベンゾトリアゾール＿１＿イル）＿Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスフエート（ＨＡＴＵ）（０．１２９ｍｍｏｌ）のＤＭＳＯ溶液　（０．１２９ｍＬ）、ＤＩＰＥＡ　（３０．０μＬ、０．１５５ｍｍｏｌ）を加え、室温にて１時間振とうした。減圧下、溶媒を留去した後、ＤＭＳＯに溶解し、逆相カラムクロマトグラフィー（Ｗａｋｏｓｉｌ　２５Ｃ１８、０．１％ギ酸水溶液/０，１％ギ酸アセトニトリル）で精製し、標題化合物ＤＰ―９６４（１．６ｍｇ、１．６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　１４７９（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８５分　（分析条件　ＳＱＤＡＡ５０）

[0731] １－３－５．《プチド環化後、弱酷を用いた脱保護を必要とするアミノ酸（本件ではＦｍｏｃ＿Ａｌａ（５－Ｔｅｔ（Ｔｒｔ））－ＯＨ及び、Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨ）を有するペプチドの合成

化合物ＳＰ４０２と同様の手法にて合成したＦｍｏｃ－Ａｓｐ（Ｏ－Ｔｒｔ（２－Ｃｌ）＿Ｒｅｓｉｎ）ーｐｉｐ（１００ｍｇ）を用し、Ｆｍｏｃアミノ酸としてＦｍｏｃーＭｅＰｈｅ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ＿ＭｅＡｌａ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ―ＭｅＬｅｕーＯＨ、Ｆｍｏｃ＿Ｄ＿ＭｅＡｌａ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＧｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃーｍｅｖａｌ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅーｏｈ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｖａｌ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃーｓｅｒ（ｔＢｕ）＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）＿ＯＨ、Ｆｍｏｃーｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ＿Ｄ＿ｌｅｕ＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃーａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ―Ｇｌｙーｏｈ、Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨ，　Ｆｍｏｃ－Ａｌａ（５－Ｔｅｔ（Ｔｒｔ））－ＯＨ（化合物４０９）などを用いてペプチドの伸長を行った（アミノ酸の略語は表１１＿２に記載）。既に実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行つた。例えば、化合物ＤＰ―９０８の合成の場合、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を脱

保護し、レジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (= 2/ 1、v/ v、2ml) を加えて2時間振盪させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除いた。さらにレジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (= 2/ 1、v/ v、1ml) を加えて15分間振盪させ、上記の溶液とあわせて溶媒留去した。得られた残渣をDCM (8ml) に溶解し、DIPEA (17μL、0.096mmol) を加えた。これに1M—0—(7-ァザー1Hベンゾトリアゾール_1_イル)_N,N,N,Nテトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフエート (HATU) (30mg,0.08mmol) in DMSO (250μL) を加えてN末アミンとAsp側鎖カルボン酸との環化反応を行った。反応終了後、溶媒留去した。得られた残渣をトリフルオロエタノール (1.0ml) に溶解した。これにTFA/ トリイソプロピルシラン/ DCM (1/ 5/ 94、v／v／v、1.0ml) を加えて10分間攪拌し、保護基の脱保護を行った。反応終了後、DIPEA (5OμL, 0.286mmol) を加えてTFAを中和し、溶媒留去した。得られた粗生成物はジメチルスルホキシドに溶解し、得られたペプチド溶液は高速逆相クロマトグラフィー (HPLC) で精製し、溶媒留去した。得られた残渣をトリフルオロエタノール (1.5ml) に溶解し、水 (0.5ml) とヘキサン (2ml) を加えて攪拌し、ヘキサン層を除去した。もう一度ヘキサン (2ml) を加えて攪拌し、ヘキサン層を除去した後に溶媒留去し,化合物DP—908 (1.92mg, 4.8%) を得た。上述と同様の方法、もしくはFmoc—Asp (O-Trt (2—Cl) —Resin)-pipの代わりに化合物SP455と同様に調製したFmoc-Asp (O-Trt (2-Cl) —Resin)-MePhe-Ala-pipを用い、表題のアミド環化ドラックライクペプチドの合成を行った。DP-585～586、DP_592、DP_676、DP_904~909が本合成法に準拠した方法で合成可能である。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表11—3_2に記載した。

[0732] 1-3-6. ペプチド環化後、還元反応を用いた脱保護を必要とするアミノ酸 (本件ではFmoc_Glu(OAl)-OH) を有するペプチドの合成

化合物SP455と同様の手法にて合成したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-Resin)-MePhe-Ala-pip(100mg)を用い、Fmocアミノ酸としてFmoc_MePhe_OH、Fmoc_MeAla_OH、Fmoc-MeLeu-OH、Fmoc-MeGly_OH、Fmoc_MeVal_OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc_Phe_OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc_D_Val_OH、Fmoc-Ser(tBu)_OH、Fmoc-Thr(Trt)_OH、Fmoc—Leu—OH、Fmoc—Ala—OH、Fmoc—D—Ala—OH、Fmoc—Gly—OH、Fmoc—Glu(OAl)—OHなどを用いてペプチドの伸長を行った (アミノ酸の略語は表11_2に記載)。既に実施例に記載のFmoc法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った。例えば、化合物DP-595の合成の場合、N末端のFmoc基を脱保護し、レジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (=2/1、v/v、2ml) を加えて2時間振盪させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除いた。さらにレジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (=2/1、v/v、1ml) を加えて15分間振盪させ、上記の溶液とあわせて溶媒留去した。得られた残渣をDCM (8ml) に溶解し、DIPEA (20μL、0.1155mmol) を加えた。これに1M 0—(7—アザー1Hベンゾトリアゾール_1_イル)_N,N,N,Nテトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフエート (HATU) (37mg, 0.0966mmol) in DMSO (200μL) を加えてN末端アミンとAsp側鎖カルボン酸との環化反応を行った。反応終了後、溶媒留去した。得られた粗生成物をDMFに溶解し、テトラキス (トリフエニルホスフィン)パラジウム (0) (Pd(PPh3)4) (7mg、0.006mmol) のジクロロメタン (1ml) 溶液を加えた。続いてフエニルシラン (7

．４ｕｌ，　０．０６ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。反応液を濾過後、有機層を減圧濃縮し、得られた粗生成物をＤＭＳＯに溶解し、得られたペプチド溶液は高速逆相クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で精製後、溶媒を留去し、化合物ＤＰ―５９５（１４．７ｍｇ，２２％）を得た。上述と同様の方法でアミド環化ドラックライクペプチドＤＰ＿５８９、ＤＰ-５９６の合成を行った。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表１１―３―２に記載した。

[0733] １-３-７．Ｃ末端アミノ酸が有する主鎖カルボン酸部位を除去し、アルキル基などに置き換えたペプチド誘導体の合成

Ｃ末端にベータアミノ酸誘導体を用い、Ｃ末端のベータアミノ酸誘導体とＮ末端アミノ基がアミド結合により環化された、直鎖部を有さない化合物の合成例を述べる。ペプチド化学合成については、本明細書の異なる場所の各所に記載されているどの手法を用いてもよい。

[0734] ２＿クロロトリチルレジンと結合させた化合物（化合物SP４０５、１００ｍｇ）を用い、Ｆｍｏｃアミノ酸としてＦｍｏｃ-ＭｅＰｈｅ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＭｅＰｈｅ（３-ＣＩ）＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＭｅＡｌａ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ｂ-ＭｅＡｌａ―ＯＨ、Ｆｍｏｃ―９－ＭｅＡｂｕ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＬｅｕ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＭｅＩｌｅ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＭｅＶａｌ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｄ-ＭｅＡｌａ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＧｌｙ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ―ＭｅＳｅｒ（ＤＭＴ）＿ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ-ＯＨ、Ｆｍｏｃ-Ｐｈｅ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ―Ｐｈｅ（４－ＣＦ３）－０Ｈ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｄ-Ｖａｌ-ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｔｒｔ）－０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｓｅｒ（ｔＢｕ）-ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）－０Ｈ、Ｆｍｏｃ-Ｌｅｕ―ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－ｌｅｕ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ―Ｉｌｅ＿０Ｈ、Ｆｍｏｃ-ＡＯＣ（２）-０Ｈ、Ｆｍｏｃ－Ａｂｕ－０Ｈ、Ｆｍｏｃ―Ａｌａ-ＯＨ、Ｆｍｏｃ―Ｄ―Ａｌａ-０Ｈ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨなどを用いて、既に実施例に記載のFmoc法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った（アミノ酸の略語は表１１＿２に記載）。ペプチ

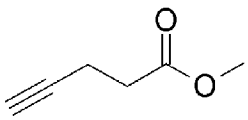
ドの伸長後、例えば化合物DP―６３９の場合、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を脱保護し、レジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (= 2/ 1、v/ v、２ｍｌ）を加えて2時間振盪させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除いた。さらにレジンにジクロロメタン/ トリフルオロエタノール (= 2/ 1、v/ v、1ｍｌ）を加えて１５分間振盪させ、上記の溶液とあわせて溶媒留去した。得られた残渣をＤＣＭ（４ｍｌ）に溶解し、ＤＩＰＥＡ（３１．６μ,\、３．６ｅｑ．）を加えた。これに1Ｍ　０―（７―アザー１Ｈベンゾトリアゾール_１_イル）_Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスフエート(ＨＡＴＵ)　ｉｎ　ＤＭＳＯ（１５５μし　３．０ｅｑ．）を加えてＮ末端の主鎖アミンとC末端のカルボン酸との環化反応を行った。反応終了後、溶媒留去した。得られた残渣をトリフルオロエタノール (1．１ｍｌ）に溶解し、トリイソプロピルシラン (5．０ｅｑ．）を加えた。これにＴＦＡ/ ＤＣＭ（1/ ９９、v/ v、1．1ｍｌ）を加えて１０分間攪拌し、保護基の脱保護を行った。反応終了後、ＤＩＰＥＡ（４３．９μｌ、５．０ｅｑ．）を加えてＴＦＡを中和し、溶媒留去した。得られた粗生成物はジメチルスルホキシドに溶解し、得られたペプチド溶液は高速逆相クロマトグラフィー (ＨＰＬＣ）で精製し、溶媒留去した。得られた残渣をトリフルオロエタノール (1．５ｍｌ）に溶解し、水 (0．５ｍｌ）とヘキサン (2ｍｌ）を加えて攪拌し、ヘキサン層を除去した。もう一度ヘキサン (2ｍｌ）を加えて攪拌し、ヘキサン層を除去した後に溶媒留去することでＤＰ―６３９を得た。ＤＰ―６３９と同様の手法、もしくはＦｍｏｃ-Ｌ-３-ＡＢＵ-（０-Ｔｒｔ-（２-Ｃｌ）-Ｒｅｓｉｎ（（Ｓ）-３-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ブタン酸ー２―クロロトリチルレジン）の代わりにＦｍｏｃ―３―ＣＦ３-ｂＡｌａ-（０-Ｔｒｔ-（２-Ｃｌ）-Ｒｅｓｉｎ（（Ｓ）-３-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ー４，４，４―トリフルオロプタン酸ー２_クロロトリチルレジン、化合物Ｓ

Ｐ４０７）を用いて、ＤＰ＿６４０～ＤＰ＿６５７、ＤＰ-７５２～ＤＰ８２９を得た。各化合物のマススペクトルの値と液体クロマトグラフィーの保持時間は表１１—３—２に記載した。

[0735] ２．Ｃ—Ｃ環化ペプチドの合成

２-１．Ｃ—Ｃ環化ペプチドを合成するためのＮ末端カルボン酸誘導体の合成

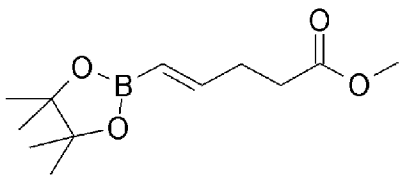
２—１—１．　ペンタ＿４＿イン酸メチル



[0736] ペンター4—イン酸（5．０ｇ、５１．Ｏｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（２０ｍｌ）に溶解し、氷冷下でトリメチルシリルジアゾメタンのジエチルエーテル溶液（2．０Ｍ、５０ｍし１００ｍｍｏｌ）を加えた。室温で３０分攪拌した後、反応液を減圧濃縮して標題化合物（5．７ｇ、１００％）を得た。

^{1}Ｈ-ＮＭＲ（Ｖａｒｉａｎ　４００-ＭＲ，４００　ＭＨｚ，　ＣＤＣｌ$_{3}$）　８　ｐｐｍ　３．７２　（３Ｈ，　ｓ），２．５０-２．６０　（４Ｈ，　ｍ），　１．９９　（１Ｈ，　ｍ）

[0737] ２-１-２．　（Ｅ）-５-（４，４，５．５—テトラメチル—１，３，２-ジオキサボロラン＿２＿ゴル）ペンター4—エン酸＿メチル

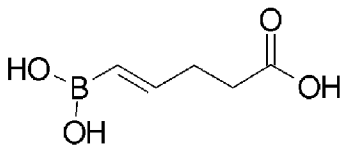


[0738] ペンター4—イン酸メチル（5．０ｇ、４４．６ｍｍｏｌ）と4，4，5，5—テトラメチル＿１，３，２＿ジオキサボロラン（7．４２ｇ、５８．０ｍｍｏｌ）を混合し、ジルコノセン　クロリド　ヒドリド（1．１８ｇ、４．４６ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（0．６２２ｍし４．４６ｍｍｏｌ）を加えて６５度で終夜攪拌した。放冷後、反応液をジエチルエーテルで希釈し、析出した白色固体をセライトろ過で除去した。ろ液を減圧濃縮

して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン :酢酸エチル）で精製し、標題化合物 (5．３６ｇ、５０．１%）を得た。

^{1}H-ＮＭＲ（Ｖａｒｉａｎ ４００-ＭＲ，４００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）Ｓ ｐｐｍ ６．０２ （１Ｈ，ｄｔ，１８，５．６Ｈｚ），５．４８ （１Ｈ，ｄ，１８Ｈｚ），３．６８ （３Ｈ，ｓ），２．４０-２．５３ （４Ｈ，ｍ），１．２８ （１２Ｈ，ｓ）

[0739] ２―１―３，（Ｅ）―５―ボロノペンター４―エン酸

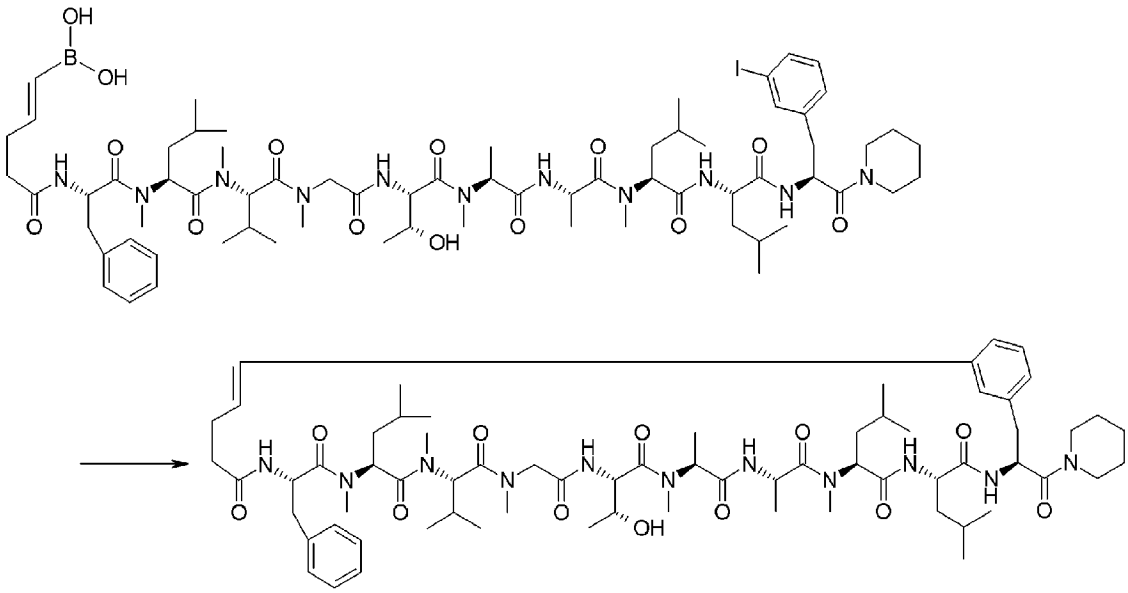


[0740] （Ｅ）-５-（４，４，５，５―テトラメチル―１，３，２―ジオキサボロラン―２―イル）ペンター４―エン酸 メチル (２．０ｇ、８．３３ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（ＩＯＯｍｌ）に溶解し、０．８Ｍ水酸化カリウム水溶液（５２．１ｍｌ ４１．６ｍｍｏｌ）を加えて室温で終夜攪拌した。減圧濃縮によりＭｅＯＨを除去した後、ｐＨが３になるまで３Ｍの塩酸を加えた。この水溶液を、ｔｅｒｔ―ブチル―メチルエーテルで洗浄した後に減圧濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液 :メタノール）で精製し、減圧濃縮して得られた固体を再度ｔｅｒｔ―ブチル―メチルエーテルで洗浄して、標題化合物 (６７４．６ｍｇ、５６．３%）を得た。

^{1}H-ＮＭＲ（Ｖａｒｉａｎ ４００-ＭＲ，４００ ＭＨｚ，Ｄ$_2$０）８ ｐｐｍ ６．５９ （１Ｈ，ｍ），５．５１ （１Ｈ，ｄ，１８Ｈｚ），２．４４-２．５１ （４Ｈ，ｍ）

[0741] ２-２．Ｃ_Ｃ環化したドラックライクペプチドの合成

２―２―１．氷Ｐｈｅ_ＭｅＬｅｕ_ＭｅＶａｌ-ＭｅＧｌｙ-Ｔｈｒ-ＭｅＡｌａ―Ａｌａ―ＭｅＬｅｕ―Ｌｅｕ―Ｐｈｅ*ーｐｉＤｅｒｉｄｉｎｅ（２つの氷の間でＣ_Ｃ結合されている）(化合物ＤＣＣ―1) の合成

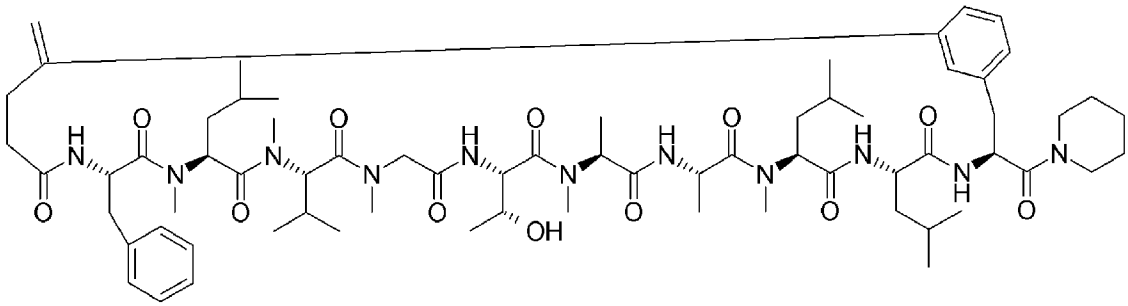


[0742] 既に実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従い、Ｎ末端にはＦｍｏｃアミノ酸の代わりに、(Ｅ)＿５―ボロノペンタ＿４＿エン酸を用いて合成した（(2Ｓ，5Ｓ，8Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，Ｅ)-２９―ベンジル－１７―（(Ｒ)―１＿ヒドロキシエチル)＿２＿（３―ヨードベンジル)＿５，８，２６―トリイソプチル―２３＿イソプロピル＿９，１１，１４，１５，２１，２４，２７＿ヘプタメチル―１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―ウンデカオキソ＿１―(ピペリジン＿１―イル)＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０―デカアザペンタトリアコンタ－３４―エン－３５―イル)ボロン酸 (Ｐｈｅ―ＭｅＬｅｕ―ＭｅＶａｌ-ＭｅＧｌｙ-Ｔｈｒ-ＭｅＡｌａ-Ａｌａ-ＭｅＬｅｕ-Ｌｅｕ-Ｐｈｅ(3-Ｉ)-ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ、上記反応式の原料化合物、０．０２ｇ、０．０４０５ｍｍｏｌ)をＤＭＦ（７．０ｍｌ）に溶解し、Ｐｄ(ｄｐｐｆ)$Ｃｌ_2$・$ＣＨ_2Ｃｌ_2$（１０．０ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ)、トリエチルアミン (０．２８２ｍし ２．０２５ｍｍｏｌ)を加えて、８０度で２時間半攪拌した。反応液を放冷、減圧濃縮した後、ＤＭＳ０に溶解し、ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ-ＨＰＬＣで精製し、標題化合物ＤＣＣ―１（３．３２ｍｇ、６．５％）を得た。

ＬＣＭＳ :m/ｚ １２６８．８ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :0．７５分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ５０)

[0743] ２—２—１．氷Ｐｈｅ—き｜ｅｕ-^{Me}Ｖａｌ-^{Me}Ｇ｜ｙ-Ｔｈｒ—きＡｌａ—Ａｌａ—^{Me}Ｌｅｕ－Ｌｅｕ—Ｐｈｅ＊－ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ（２つの＊の間で○－Ｃ縮合されている）（化合物ＤＣＣ-2） の合成



[0744] 上記ＤＣＣ—１を合成する反応の反応副生成物として、標題化合物ＤＣＣ-２（２．４３ｍｇ、４．８％）を得た。

ＬＣＭＳ :m/ｚ １２６８．８（Ｍ＋Ｈ）＋

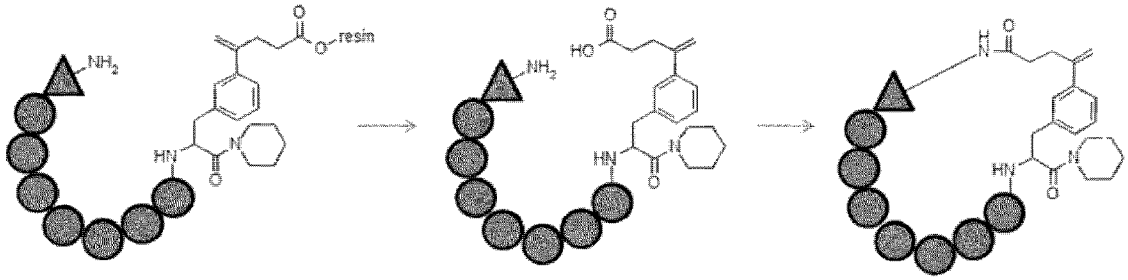
保持時間 :0．７８分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ５０)

[0745] ２-３．Ｃ—Ｃ結合化合物 ドラックライクネス評価

Ｃ-Ｃ結合環化ペプチド合成の別法も述べる。Ｃ＿Ｃ結合環化を利用したＤｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙでは、例えばＮ末端側の三角ユニットの部位に炭素—炭素二重結合、Ｃ末端側の交差ユニットのアミノ酸の側鎖にヨードフエニル基を有するペプチドを翻訳合成した後 (スキームＣ—２)、Ｐｄを使用したＨｅｃｋ反応によりＣ＿Ｃ結合環化生成物を得ることができる。

上記手法で得られるＣ＿Ｃ結合環化生成物のドラックライクネスを評価するために、Ｃ—Ｃ結合環化ペプチドの合成を行った。以下のスキームHにその合成の一例を示した。環化ペプチドの合成に際して、Ｐｄによる環化反応ではなく、アミド化反応で環化ペプチドを合成した。すなわち、交差ユニットであるＣ末端フエニルアラニンの主鎖カルボン酸がアミドにて化学修飾 (ピペリジンアミド化）され、かつ側鎖上のカルボン酸部位でレジンに結合させたフエニルアラニン誘導体を合成し、このレジンを用いて、Ｆｍｏｃ合成法に従いペプチドの伸張反応を行った。伸張後、ペプチドをレジンから切り出し、N末端側のアミノ基 (三角ユニット) とC末端フエニルアラニン誘導体側

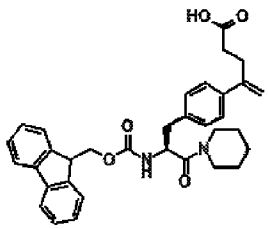
鎖上のカルボン酸部位 (交差ユニット) をアミド結合で縮合させて環化体とすることで、Ｄｉｓｐｌａｙ　ｌｉｂｒａｒｙの生成物に相当するＣ—Ｃ結合環化ペプチドの合成を行った。スキームＨではC-C結合によりC-Cの2重結合が得られる場合のみを記載したが、C-Cの１重結合や３重結合も可能であり、その場合に応じて化合物群を合成した。



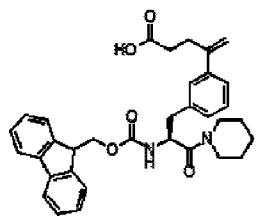
スきームＨ．　ドラックライクネス軽価爾Ｃ一(ご¾ｉ¡環化化合物の合威法の一例

[0746] ２—３—１．アミノ酸ユニットおよびユ レジンに能　させたアミノ酸ユニットの合成

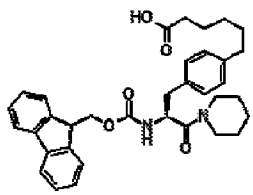
ドラックライクネス評価に使用した交差ユニット部位のフエニルァラニン誘導体として、以下に示すアミノ酸およびそのレジン結合化合物を合成した。



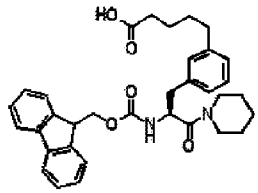
化合物ＳＰ４１６



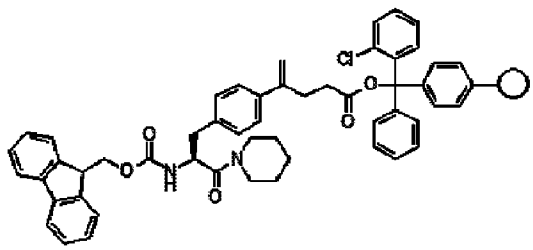
化合物ＳＰ４２１



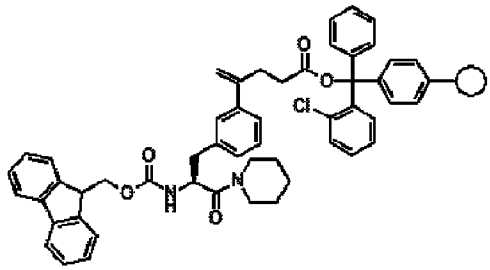
化合物ＳＰ４２７



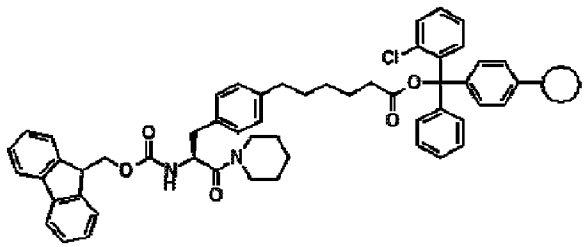
化合物ＳＰ４３２



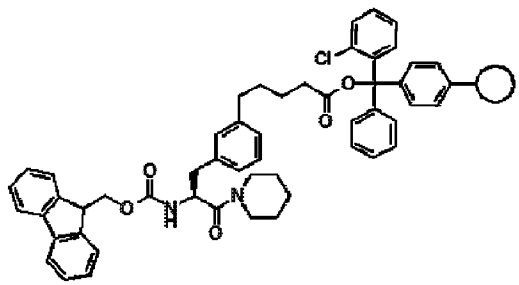
化合物ＳＰ４１７



化合物ＳＰ４２２



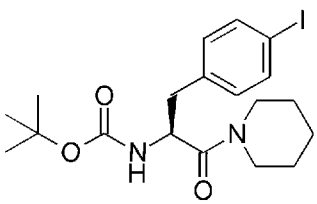
化合物ＳＰ４２８



化合物ＳＰ４３３

[0747] 化合物SP4 １６および化合物SP4 １７の合成

（Ｓ）-（３―（４―ヨー ドフエニル）－１―ォキソ－１―（ピペ リジン－１―イル）プロパン－２－イル）カルバミン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物SP4 １３、Boc-Phe(4-Ihp ip）の合成



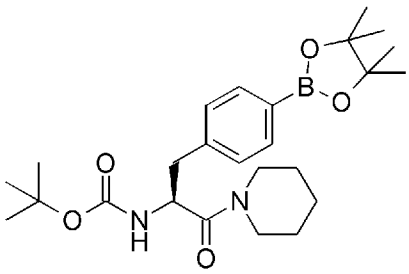
[0748] （Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－３―（４―ヨー ドフエニル）プロパン酸 （Boc-Phe(4-I)-0H) （１５．０ｇ、３８．３ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１８０．Ｏｍｌ）に溶解させ、氷冷下、ピペ リジン (7．９５ｍし ８０．６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（１７．５ｇ、４６．０ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（８．０１ｍし ４６．０ｍｍｏｌ）を加えた。室温

で３０分攪拌した後、反応液をヘキサン/ 酢酸エチル (1/ 1、４００ｍｌ) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮して標題化合物SP4 １３ (１６．９ｇ、９６%) を淡黄色固体として得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z =４５９．５ (M+ H) +

保持時間 :１．０５分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ０５)

[0749] (Ｓ)- (１_オキソ_１_ (ピペリジン－１_イル)_３_ (４- (４,_４,_５,_５—テトラメチル－１,_３,_２_ジオキサボロラン_２_イル)フェニル)プロパン_２_イル)カルバミン酸 tert—ブチル (化合物SP４１４)の合成

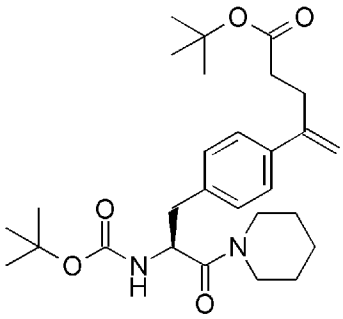


[0750] (Ｓ)—(３—(４—ヨードフェニル)－１—オキソ－１—(ピペリジン_１_イル)プロパン_２_イル)カルバミン酸 tert—ブチル (化合物SP4 １３) (６．０ｇ、１３．０９ｍｍｏｌ) をＤＭＳＯ (６０．Ｏｍｌ) に溶解し、ビス (ピナコラート)ジボロン (４．９９ｇ、１９．６４ｍｍｏｌ)、Ｐｄ (ｄｐｐｆ) Cl_2-CH_2Cl_2 (０．５３８ｇ、０．６５５ｍｍｏｌ) および酢酸カリウム (５．４０ｇ、５５．０２ｍｍｏｌ) を加えて、室温で５時間攪拌した。反応液をヘキサン/ 酢酸エチル (1/ 1) で希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン :酢酸エチル= １００ : ０～６０ :４０) で精製し、標題化合物SP4 １４ (５．５５ｇ、９２%) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z =４５９．４ (M+ H) +

保持時間 :０．９９分 (分析条件 ＳＱＤＦＡ０５)

[0751] （Ｓ）－４－（４－（２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンター４—エン酸　ｔｅｒｔ—ブチル（化合物SP4 １５）の合成

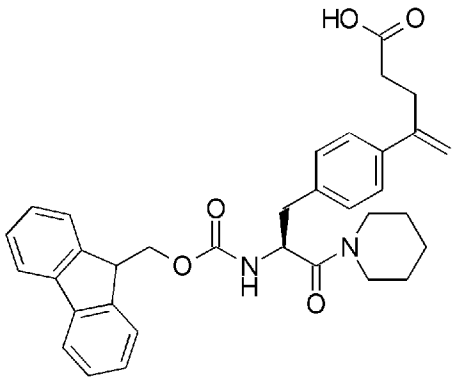
[0752] 

[0753] （Ｓ）－（１—オキソ－１—（ピペリジン－１—イル）－３—（４—（４，４，５，５—テトラメチル＿１，３，２＿ジオキサボロラン＿２＿イル）フエニル）プロパン＿２＿イル）カルバミン酸　ｔｅｒｔ—ブチル（化合物SP4 １４）（３．００ｇ、６．５４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２４．０ｍｌ）および水（６．０ｍｌ）に溶解し、文献（Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、２０１１、１３、５８３０＿５８３３）記載の方法で合成した４＿ブロモペンター４—エン酸　ｔｅｒｔ—ブチル（２．３１ｇ、９．８２ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$（１．１３ｇ、０．９７８ｍｍｏｌ）および炭酸カリウム（１．８１ｇ、１３．１０ｍｍｏｌ）を加えて、８０℃で２時間攪拌した。放冷後、反応液をヘキサン/酢酸エチル（１/１）で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～７５：２５）で精製し、標題化合物SP4 １５（２．７２ｇ、８５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４８７．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0754] （Ｓ）－４－（４－（２－（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタ—４—エン酸（化合物SP4 １６）の合成

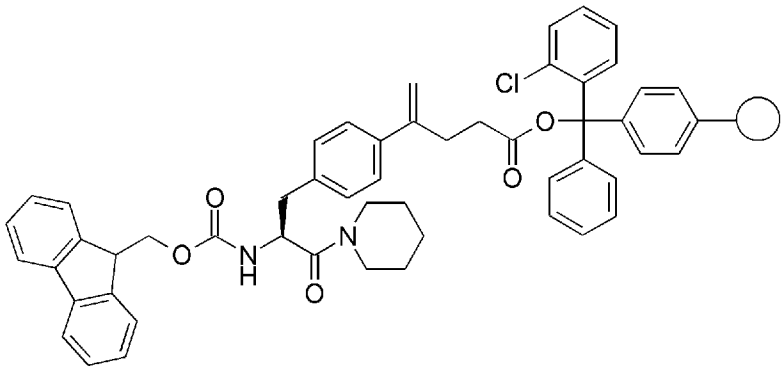


[0755] （Ｓ）－４－（４－（２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタ＿４＿エン酸　ｔｅｒｔ＿ブチル（化合物SP4１５）（０．５０ｇ、１．０３ｍｍｏｌ）を酢酸（７．０ｍｌ　１２２．２８ｍｍｏｌ）および水（７．０ｍｌ）に懸濁させ、加熱還流条件で８時間攪拌した。同様の反応を追加で４回実施し、反応液をまとめて減圧濃縮して得られた残渣を１０％炭酸ナトリウム水溶液（３８ｍｌ）に懸濁させ、Ｎ―（９―フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）－スクシンイミド（１．６５ｇ、４．８９ｍｍｏｌ）の１，４＿ジオキサン溶液（１９．０ｍｌ）を加えて室温で１時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルで洗浄し、酢酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～４０：６０）で精製して、標題化合物SP4１６（１．６０ｇ、５６．３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５５３．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８９分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0756] （Ｓ）－４－（４－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタ＿４＿エン酸＿２＿クロロトリチルレジン＿（化合物SP4１７）の合成



[0757] ２―クロロトリチルクロライドレジン（1．０７ｍｍｏｌＺｇ、１００―２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、Ｃｈｅｍ－Ｉｍｐｅｘ社製、２．５０ｇ、２．６８ｍｍｏｌ）とジクロロメタン（１８ｍｌ）を混合し、室温で５分間振とうした。ジクロロメタンを除いた後、（Ｓ）－４－（４－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン_９_ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）_３―オキソ_３_（ピペリジン－１_ィル）プロピル）フエニル）ペンター４―エン酸（化合物ＳＰ４１６）（０．７４ｇ、１．３４ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（１６．５ｍｌ）にメタノール（0．４３ｍし１０．７ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルァミン（1．１ｍし６．３２ｍｍｏｌ）を加えた混合液を添加して、室温で１０分間振とうさせた。反応液を除いた後、ジクロロメタン（１６．５ｍｌ）にメタノール（５ｍｌ）およびジィソプロピルエチルァミン（1．７ｍｌ）を加えた混合液を添加して、室温で２時間振とうさせた。この反応液を除いた後、ジクロロメタン（１８ｍｌ）を入れて振とうし、ジクロロメタンを除いた後、再度ジクロロメタン（１８ｍｌ）を入れ振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、減圧下でレジンを乾燥させ標題化合物ＳＰ４１７（２．５３ｇ）を得た。

[0758] 得られた（Ｓ）－４－（４－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン－９―ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）_３_オキソ_３_（ピペリジン－１_ィル）プロピル）フエニル）ペンター４―エン酸－２―クロロトリチルレジン（化合物ＳＰ４１７）（７．９４ｍｇ）にＤＭＦ（０．２ｍｌ）およびピペリジン（0．２ｍｌ）を加え、室温にて３０分振とうさせた。反応液にＤＭＦ（１．６ｍｌ）を加えた後、反応混合液（0．４ｍｌ）をＤＭＦ（９．６

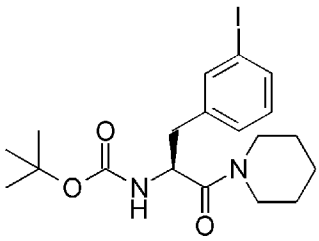
ｍｌ）で希釈し、その吸光度（３０１ｎｍ）を測定したところ０．３２８であった。次の計算式により、（Ｓ）－４－（４－（２－（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン＿１＿ィル）プロピル）フエニル）ペンタ＿４＿エン酸（化合物ＳＰ４１６）のローディング率を２５．０％、０．２６５ｍｍｏｌ／ｇと算出した。

（吸光度（３０１ｎｍ）ｘ１０００ｘ５０）／（用いたレジン量ｘ７８００）

＝０．２６５ｍｍｏｌ／ｇ

０．２６５ｍｍｏｌ／ｇｘ１００／（２．６８／２．５３）＝２５．０％

[0759] （Ｓ）－（３－（３＿ヨードフエニル）＿１＿ォキソ＿１＿（ピペリジン—１—ィル）プロパン＿２＿ィル）カルバミン酸ｔｅｒｔ—ブチル（化合物ＳＰ４１８、Boc-Phe(3-I)-pip）の合成



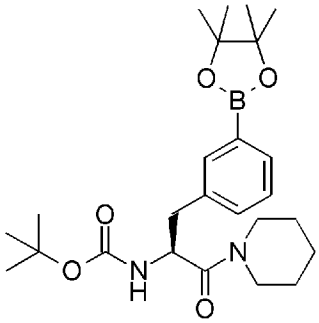
[0760] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）ァミノ）＿３＿（３－ヨードフエニル）プロパン酸（Boc-Phe(3-I)-OH）（１０．０ｇ、２５．６ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１００．Ｏｍｌ）に溶解させ、氷冷下、ピペリジン（５．３０ｍし５３．７ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（１１．７ｇ、３０．８ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（５．３４ｍし３０．７ｍｍｏｌ）を加えた。室温で３０分攪拌した後、反応液をヘキサン／酢酸エチル（１／１）で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和塩化アンモニゥム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮して標題化合物ＳＰ４１８（１１．６ｇ、９９％）を淡黄色アモルファスとして得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４５９．２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0761] （Ｓ）—〔１—オキソ－１—（ピペリジン－１－ィル）—３—（３—ヨード—４，—

４，５，５―テトラメチル_１，３，２_ジオキサボロラン_２_イル）フェニル）プロパン_２_イル）カルバミン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物SP４１９）の合成

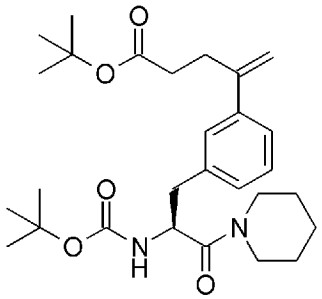


[0762] （Ｓ）―（３―（３―ヨードフェニル）－１―オキソ－１―（ピペリジン_１_イル）プロパン_２_イル）カルバミン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物SP４１８）（６．７６ｇ、１４．７５ｍｍｏｌ）をＤＭＳＯ（６０．０ｍｌ）に溶解し、ビス（ピナコラート）ジボロン（５．６２ｇ、２２．１２ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2-CH_2Cl_2（６０７．Ｏｍｇ、０．７３７ｍｍｏｌ）および酢酸カリウム（６．０８ｇ、６１．９ｍｍｏｌ）を加えて、室温で６時間攪拌後、さらにビス（ピナコラート）ジボロン（５．６２ｇ、２２．１２ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2-CH_2Cl_2（６０７．０ｍｇ、０．７３７ｍｍｏｌ）および酢酸カリウム（６．０８ｇ、６１．９ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液をヘキサン/酢酸エチル（１/１）で希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～６０：４０）で精製し、標題化合物SP４１９（６．５０ｇ、９６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４５９．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９９分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0763] （Ｓ）－４－（３－（２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－３_オキソ_３_（ピペリジン－１_イル）プロピル）フェニル）ペンター４―エン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物SP４２０）の合成

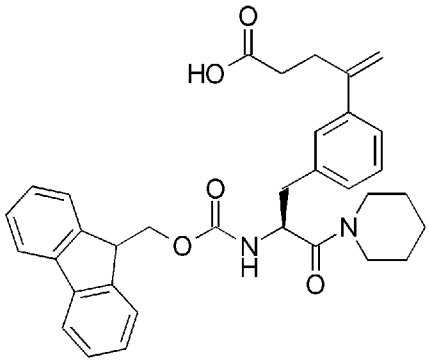


[0764] （Ｓ）－（１―オキソ－１―（ピペリジン－１―イル）－３―（３―（４，４，５，５―テトラメチル_１，３，２_ジオキサボロラン_２_イル）フエニル）プロパン_２_イル）カルバミン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物ＳＰ４１９）（３．００ｇ、６．５４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２４．０ｍｌ）および水（６．０ｍｌ）に溶解し、文献（Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒｓ、２０１１、１３、５８３０_５８３３）記載の方法で合成した４_ブロモペンター４―エン酸ｔｅｒｔ―ブチル（２．３１ｇ、９．８２ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$（１．１３４ｇ、０．９８２ｍｍｏｌ）および炭酸カリウム（１．８１ｇ、１３．１ｍｍｏｌ）を加えて、８０℃で２時間攪拌した。放冷後、反応液をヘキサン/酢酸エチル（１/１）で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～７５：２５）で精製し、標題化合物ＳＰ４２０（２．９４ｇ、９２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４８７．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0765] （Ｓ）－４－（３－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_３_オキソ_３_（ピペリジン－１_イル）プロピル）フエニル）ペンタ―４―エン酸（化合物ＳＰ４２１）の合成

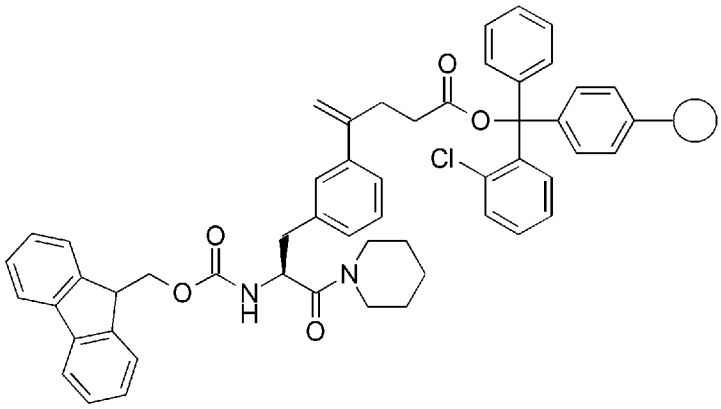


[0766] （Ｓ）－４－（３－（２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタ＿４＿エン酸　ｔｅｒｔ＿ブチル（化合物SP４２０）（０．５０ｇ、１．０３ｍｍｏｌ）を酢酸（７．０ｍし　１２２．２８ｍｍｏｌ）および水（７．０ｍｌ）に懸濁させ、加熱還流条件で８時間攪拌した。同様の反応を追加で４回実施し、反応液をまとめて減圧濃縮して得られた残渣を１０％炭酸ナトリウム水溶液（３８ｍｌ）に懸濁させ、Ｎ―（９―フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）－スクシンイミド（１．６５ｇ、４．８９ｍｍｏｌ）の１，４＿ジオキサン溶液（１９．Ｏｍｌ）を加えて室温で１時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルで洗浄し、酢酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～５０：５０）で精製し、標題化合物SP４２１（０．７８ｇ、２７．５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５５３．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９０分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

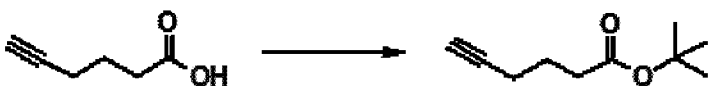
[0767] （Ｓ）－４－（３－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタ＿４＿エン酸＿２＿クロロトリチルレジン＿（化合物SP４２２）の合成



[0768] ２―クロロトリチルクロライドレジン（1．０７ｍｍｏｌＺｇ、１００-２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、Ｃｈｅｍ―Ｉｍｐｅｘ社製、２．５０ｇ、２．６８ｍｍｏｌ）とジクロロメタン（１８ｍｌ）を混合し、室温で５分間振とうした。ジクロロメタンを除いた後、（Ｓ）-４-（３-（２-（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_３―オキソ_３_（ピペリジン－１_イル）プロピル）フエニル）ペンター４―エン酸（化合物SP４２１）（０．７４ｇ、１．３４ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（１６．５ｍｌ）にメタノール（0．４３ｍし１０．７ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルアミン（1．１ｍし６．３２ｍｍｏｌ）を加えた混合液を添加して、室温で１０分間振とうさせた。反応液を除いた後、ジクロロメタン（１６．５ｍｌ）にメタノール（５ｍｌ）およびジイソプロピルエチルアミン（1．７ｍｌ）を加えた混合液を添加して、室温で２時間振とうさせた。この反応液を除いた後、ジクロロメタン（１８ｍｌ）を入れて振とうし、ジクロロメタンを除いた後、再度ジクロロメタン（１８ｍｌ）を入れ振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、減圧下でレジンを乾燥させ標題化合物SP４２２（２．５２ｇ）を得た。

ローディング率：0．２７８ｍｍｏｌ/ｇ、２６．１％

[0769] ヘキサ―５―イン酸ｔｅｒｔ―ブチル（化合物SP４２３）の合成

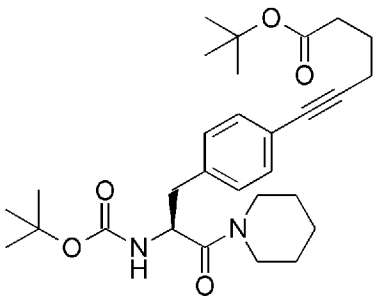


化合物ＳＰ４２４　　化合物ＳＰ４２３

[0770] ヘキサ―5_イン酸 (化合物SP4 2 4) (8. Og、7 1. 3 mmo l)、2_メチルプロパン―2―オール (1 0. 6 g、1 4 3. Ommo l) および4- (ジメチルァミノ) ピリジン (0. 4 4 g、3. 6 0 mmo l) をDCM (1 7. 5 ml) に溶解させ、ジシクロヘキシルカルポジイミド (1 6. 2 g、7 8. 5 mmo l) のDCM溶液 (1 7. 5 ml) を加えて、室温で終夜攪拌した。反応液中の白色固体をろ過して除いた後、0. 5M塩酸水溶液および飽和炭酸水素ナトリゥム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシゥムで乾燥した。ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン :酢酸エチル= 1 0 0 :0～9 0 :1 0) で精製し、標題化合物SP4 2 3 (6. 7 3 g、5 6. 1%) を得た。

^{1}H_NMR (Variαn 4 0 0-MR, 4 0 0 MHz, CDCl$_3$) δ ppm 2. 3 9 (2 H, t, 7. 2 Hz), 2. 2 8 (2 H, m), 2. 0 8 (1 H, s), 1. 8 5 (2 H, m), 1. 4 9 (9 H, s)

[0771] (S) - 6- (4- (2- ((tert―ブトキシカルポニル)ァミノ)―3_ォキソ_3_(ピペリジン―1_イル)プロピル)フエニル)ヘキサ―5_イン酸 tert―ブチル (化合物SP4 2 5) の合成



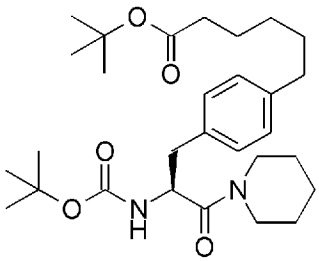
[0772] (S) - (3- (4―ヨードフエニル)_1_オキソ_1_ (ピペリジン_1_イル)プロパン_2_イル)カルバミン酸 tert―ブチル (化合物SP4 1 3、Boc-Phe(4-I)-p ip) (6. 0 0 g、1 3. 0 9 mmo l)、ヘキサ―5_イン酸 tert_ブチル (化合物SP4 2 3) (4. 4 0 g、2 6. 2 mmo l)、トリエチルァミン (5. 4 7 mし 3 9. 3 mmo l) をDMF (6 0. Oml) に溶解し、Cul (0. 1 2 5 g、0. 6 5 5 m

ｍｏｌ）およびＰｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2-CH_2Cl_2（０．５３８ｇ、０．６５５ｍｍｏｌ）を加えて室温で4時間攪拌した。反応液をヘキサン/ 酢酸エチル（1/ 1）で希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～６０：４０）で精製し、標題化合物SP4２５（６．１９ｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝４９９．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０７分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0773] （Ｓ）－６－（４－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フエニル）ヘキサン酸ｔｅｒｔ－ブチル（化合物SP4２６）の合成

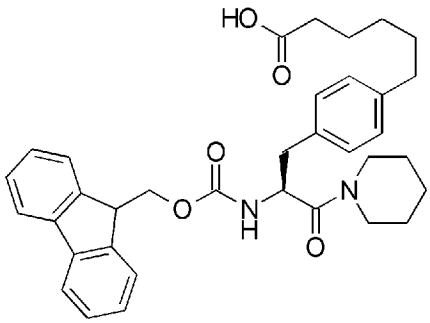


[0774] （Ｓ）－６－（４－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フエニル）ヘキサ－５－イン酸ｔｅｒｔ－ブチル（化合物SP４２５）（５．７４ｇ、１１．５１ｍｍｏｌ）を酢酸エチル（４０ｍｌ）に溶解し、窒素雰囲気下、１０％パラジウム（ＩＩ）炭素（１．７２ｇ）を加えた。その後、水素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。セライトろ過後、ろ液を減圧濃縮し、標題化合物SP４２６（５．６５ｇ、９８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝５０３．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１４分（分析条件　ＳＱＤＡＡ０５）

[0775] （Ｓ）－６－（４－（２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フエニル）ヘキサン酸（化合物SP４２７）の合成

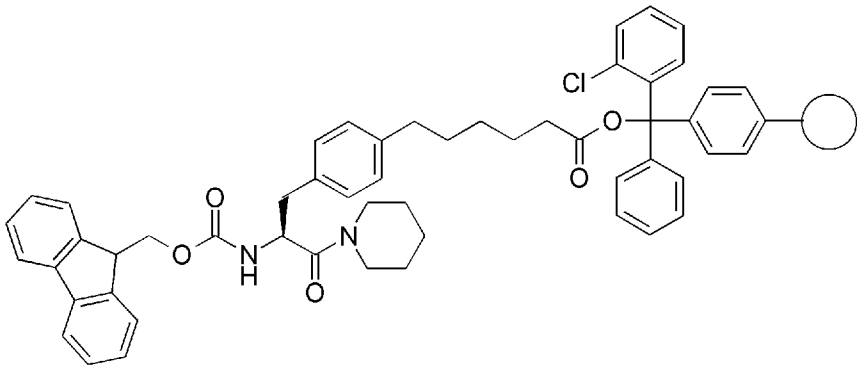


[0776] （Ｓ）－６－（４－（２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ヘキサン酸　ｔｅｒｔ＿ブチル　(化合物SP４２６）（５．６５ｇ、１１．２４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３０．０ｍｌ）に溶解し、トリフルオロ酢酸（１５．０ｍし　１９５ｍｍｏｌ）を加えて、室温で３０分間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣をジオキサン（４０ｍｌ）、１０％炭酸ナトリウム水溶液（８０ｍｌ）に溶解し、Ｎ―（９―フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）－スクシンイミド（３．６８ｇ、１０．９０ｍｍｏｌ）を加えて室温で１時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルで洗浄し、５Ｎ　ＨＣｌ水溶液を加えて酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水Na_2SO_4で乾燥し、ろ過、減圧濃縮し、標題化合物SP４２７（６．３９ｇ、１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　＝５６９．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０２分　（分析条件　ＳＱＤＡＡ０５）

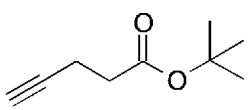
[0777] （Ｓ）－６－（４―（２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ヘキサン酸―２＿クロロトリチルレジン＿（化合物SP４２８）の合成



[0778] 2_クロロトリチルクロライドレジン（1．07mmol/g、100-200mesh、1%DVB、Chem—Impex社製、3．00g、3．21mmol）とジクロロメタン（20ml）を混合し、室温で振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、（S）_6_（4—（2—（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3—オキソ—3-（ピペリジン_1—イル）プロピル）フエニル）ヘキサン酸（化合物SP427）（0．91g、1．60mmol）のジクロロメタン溶液（14ml）にメタノール（0．52mし12．85mmol）およびジイソプロピルエチルアミン（1．35mし7．75mmol）を加えた混合液を添加して、室温で5分間振とうさせた。反応液を除いた後、ジクロロメタン（14ml）にメタノール（4．2ml）およびジイソプロピルエチルアミン（1．4ml）を加えた混合液を添加して、室温で2．5時間振とうさせた。この反応液を除いた後、ジクロロメタン（20ml）を入れて振とうし、ジクロロメタンを除いた後、再度ジクロロメタン（20ml）を入れ振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、減圧下でレジンを乾燥させ標題化合物（化合物SP428）（3．15g）を得た。

ローディング率：0．217mmol/g、21．3%

[0779] ペンタ—4—イン酸tert—ブチル（化合物SP429）の合成

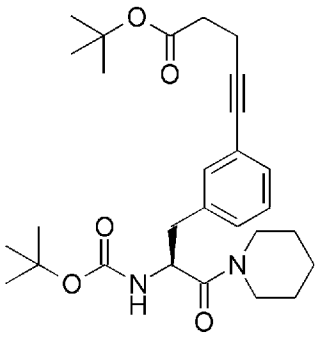


[0780] ペンター4—イン酸（5．0g、51．0mmol）、2—メチルプロパン—2—オール（7．56g、102．Ommol）および4-（ジメチル

ァミノ）ピリジン (0．３１ｇ、２．５４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１７．５ｍｌ）に溶解させ、ジシクロヘキシルカルポジイミド (１１．６ｇ、５６．２ｍｍｏｌ）のＤＣＭ溶液 (１７．５ｍｌ）を加えて、室温で終夜攪拌した。反応液中の白色固体をろ過して除いた後、０．５Ｍ塩酸水溶液および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシゥムで乾燥した。ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (ＤＣＭ）で精製し、標題化合物 (化合物SP4２９）（７．１５ｇ、９１．０％）を得た。

^{1}Ｈ＿ＮＭＲ（Ｖａｒｉａｎ ４００-ＭＲ, ４００ ＭＨｚ, ＣＤＣｌ$_3$） Ｓ ｐｐｍ ２．４８-２．５０ (４Ｈ, ｍ）, ２．００ (１Ｈ, ｓ）, １．４９（９Ｈ, ｓ）

[0781] （Ｓ）-５-（３-（２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルポニル）ァミノ）ー３＿ォキソ＿３＿（ピペリジンー１＿イル）プロピル）フエニル）ペンターー４＿イン酸＿ｔｅｒｔ—プチル (化合物SP4３０）の合成



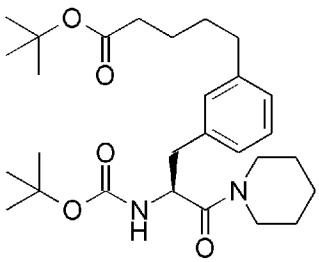
[0782] （Ｓ）—（３—（３—ヨードフエニル）－１—オキソー１—（ピペリジン＿１＿イル）プロパン＿２＿イル）カルバミン酸 ｔｅｒｔ—プチル (化合物SP4１８、Boc-Phe(3-I)-p ip) （５．００ｇ、１０．９１ｍｍｏｌ）、ペンター4—イン酸 ｔｅｒｔ—プチル (3．３６ｇ、２１．８２ｍｍｏｌ）、トリエチルァミン (4．５６ｍし ３２．７ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（５０．Ｏｍｌ）に溶解し、ＣｕＩ（０．１０４ｇ、０．５４５ｍｍｏｌ）およびＰｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ$_2$-ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（０．４４９ｇ、０．５４５ｍｍｏｌ）を加えて室温で5時間攪拌した。反応液をヘキサン/ 酢酸エチル (1/ 1）で希釈し、飽和塩化アンモニゥム水溶液および飽和食塩水で洗浄した。有機層

を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～６０：４０）で精製し、標題化合物（化合物SP4３０）（４．８４ｇ、９２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝４８５．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０３分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0783] （Ｓ）－５－（３－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フェニル）ペンタン酸ｔｅｒｔ－ブチル（化合物SP4３１）の合成

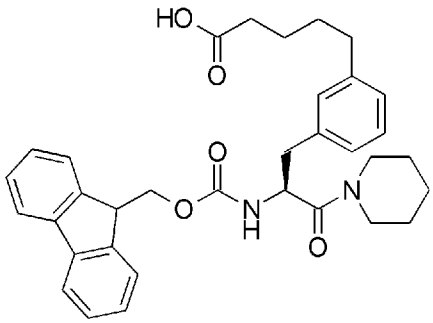


[0784] （Ｓ）－５－（３－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フェニル）ペンタ－４－イン酸ｔｅｒｔ－ブチル（化合物SP4３０）（４．８４ｇ、９．９９ｍｍｏｌ）を酢酸エチル（４０ｍｌ）に溶解し、窒素雰囲気下、１０％パラジウム（ＩＩ）炭素（９６８ｍｇ）を加えた。その後、水素雰囲気下、室温で３．５時間攪拌した。セライトろ過後、ろ液を減圧濃縮し、標題化合物（化合物SP4３１）（４．７４ｇ、９７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝４８９．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０８分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0785] （Ｓ）－５－（３－（２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－オキソ－３－（ピペリジン－１－イル）プロピル）フェニル）ペンタン酸（化合物SP4３２）の合成

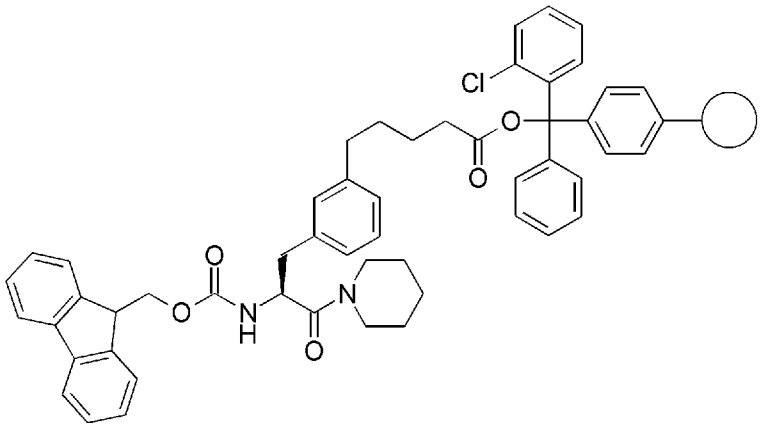


[0786] （Ｓ）－５－（３－（２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタン酸　ｔｅｒｔ＿ブチル（化合物SP4３１）（４．７０ｇ、９．６２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３０．Ｏｍｌ）に溶解し、トリフルオロ酢酸（１５．０ｍｌ、１９５ｍｍｏｌ）を加えて、室温で５０分間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣をジオキサン（３４ｍｌ）、１０％炭酸ナトリウム水溶液（６８ｍｌ）に溶解し、Ｎ―（９―フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）－スクシンイミド（３．１５ｇ、９．３３ｍｍｏｌ）を加えて室温で３時間攪拌した。５Ｎ　ＨＣｌ水溶液を加えて酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水Ｎａ２Ｓ０４で乾燥し、ろ過、減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ（ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０～３０：７０）で精製し、標題化合物（化合物SP4３２）（４．６５ｇ、８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５５５．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９２分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0787] （Ｓ）－５－（３－（２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿オキソ＿３＿（ピペリジン－１＿イル）プロピル）フエニル）ペンタン酸－２＿クロロトリチルレジン（化合物SP4３３）の合成



[0788] ２―クロロトリチルクロライドレジン（１．０７ｍｍｏｌＺｇ、１００-２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、Ｃｈｅｍ－Ｉｍｐｅｘ社製、５．００ｇ、５．３５ｍｍｏｌ）とジクロロメタン（３５ｍｌ）を入れ、室温で振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、（Ｓ）＿５＿（３―（２―（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）＿３＿オキソ＿３-（ピペリジン＿１―ィル）プロピル）フエニル）ペンタン酸（化合物ＳＰ４３２）（１．４８ｇ、２．６７ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（３３ｍｌ）にメタノール（０．８７ｍし２１．５０ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルァミン（２．２４ｍし１２．８６ｍｍｏｌ）を加えた混合液を添加して、室温で１０分間振とうさせた。反応液を除いた後、ジクロロメタン（３３ｍｌ）にメタノール（１０ｍｌ）およびジィソプロピルエチルァミン（３．３ｍｌ）を加えた混合液を添加して、室温で２時間振とうさせた。この反応液を除いた後、ジクロロメタン（３３ｍｌ）を入れて振とうし、ジクロロメタンを除いた後、再度ジクロロメタン（３３ｍｌ）を入れ振とうさせた。ジクロロメタンを除いた後、減圧下でレジンを乾燥させ標題化合物（化合物ＳＰ４３３）（５．８０ｇ）を得た。

ローディング率：０．３２６ｍｍｏｌ/ｇ、３５．３％

[0789] ２．合成した環化ペプチドのPAMPA法による膜透過性評価

合成した環化ペプチドの膜透過性を比較検討する目的でＰＡＭＰＡ（Para Le L Art ificial Membrane Permeab iLity Assay）による試験を実施した。

ミリポア９６穴メンプレンフィルター（疎水性ＰＶＤＦ（ポリビニリデンジ

フルオリド)、ｐｏｒｅ　ｓｉｚｅ　０．４５μｍ）（日本ミリポア社より購入）に、Ｅｇｇ　ｌｅｃｉｔｈｉｎ１０％ (w/　ｖ）、コレステロール０．５％ (w/　ｖ）、ドデカン (以上Ｆｌｕｋａ社より購入）からなるリン脂質有機溶媒溶液を４μＬ添加することで、人工リン脂質膜を作製した。

[0790] グリココール酸５．０％ (w/　ｖ）を含むｐＨ６．５　５０ｍＭ　ＭＯＰＳ０緩衝液に、化合物を１０ｍＭの濃度で含むＤＭＳ０溶液を０．５％（ｖ/ｖ）の割合で添加し、それを９６穴テフロン製プレートに３３０μＬ添加した（ドナープレート）。ドナープレート上に上記の人工リン脂質膜プレートを装着し、グリココール酸５．０％ (w/w)　を含むｐＨ６．５　５０ｍＭ　ＭＯＰＳ０緩衝液にＤＭＳ０を０．５％（ｖ/ｖ）の割合で添加した溶液２８０从１を、人工リン脂質膜上に添加した (アクセプタープレート)。これらを１８時間、３７℃にて静置後、ドナープレートおよびアクセプタープレートにおける溶液中化合物濃度をＬＣ/ＭＳ又はLC/UV により測定し、下記（１）、（２）式より化合物の膜透過速度 (P_e) を算出した。但しｔを試験時間、Ａをメンプレンフィルター面積、V_Dをドナー液量、V_Aをアクセプター液量、$C_{D、t}$を時間ｔにおけるドナー液中化合物濃度、○ん$_1$を時間ｔにおけるアクセプター液中化合物濃度とする。本手法により得られた結果を表１１_５ (PAMPA法による環状ペプチドの膜透過評価結果）に記載した。

[0791] （式１）

$$P_e = \frac{2.303V_D}{A \cdot t} \cdot \left(\frac{1}{1 + V_D/V_A}\right) \log_{10}\left[1 - \left(\frac{1 + V_A/V_D}{1 - R}\right)\left(\frac{C_{A,t}}{C_{D,t=0}}\right)\right] \qquad (1)$$

$$R = 1 - \frac{\left(C_{D,t} + \left(C_{A,t}V_A/V_D\right)\right)}{C_{D,t=0}} \qquad (2)$$

[0792]

[表11-5]

	iPAMPA Pe
DP-3	5.6E-07
DP-4	1.1E-05
DP-5	1.3E-05
DP-7	1.0E-05
DP-9	1.3E-05
DP-16	3.0E-05
DP-17	3.8E-05
DP-18	3.0E-05
DP-29	3.1E-05
DP-35	1.2E-05
DP-36	2.7E-05
DP-37	3.1E-05
DP-38	1.6E-05
DP-39	1.6E-05
DP-40	5.8E-06
DP-41	1.1E-05
DP-44	2.0E-05
DP-47	5.0E-05
DP-48	3.3E-05
DP-49	1.8E-05
DP-50	3.5E-05
DP-51	3.4E-05
DP-52	2.3E-05
DP-53	3.0E-05
DP-54	1.5E-05
DP-55	2.1E-05
DP-56	3.0E-05
DP-57	2.6E-05
DP-58	2.0E-05
DP-59	2.1E-05
DP-60	4.2E-05
DP-61	1.9E-05
DP-62	3.3E-05
DP-63	1.7E-05
DP-64	2.4E-05
DP-65	1.4E-05
DP-66	1.9E-05
DP-67	2.3E-05
DP-68	2.6E-05
DP-69	2.1E-05
DP-70	4.0E-05
DP-71	5.4E-06
DP-72	2.7E-05
DP-73	5.4E-06
DP-74	2.9E-05
DP-75	3.3E-06
DP-76	1.6E-05
DP-77	2.1E-05
DP-78	3.8E-05
DP-79	2.8E-05
DP-80	1.2E-05
DP-81	2.5E-05
DP-88	1.3E-05
DP-89	2.3E-05
DP-90	9.1E-06

	iPAMPA Pe
DP-91	2.0E-05
DP-92	2.6E-05
DP-93	2.2E-05
DP-94	2.8E-05
DP-95	7.3E-06
DP-96	1.3E-05
DP-97	2.7E-05
DP-98	2.6E-05
DP-99	5.6E-05
DP-100	1.7E-06
DP-101	5.6E-05
DP-102	1.8E-06
DP-103	1.9E-05
DP-104	6.7E-06
DP-105	4.5E-05
DP-106	3.4E-05
DP-107	2.3E-05
DP-108	2.2E-05
DP-109	3.0E-05
DP-110	3.0E-05
DP-111	1.2E-05
DP-112	3.5E-05
DP-113	2.8E-05
DP-114	4.4E-05
DP-115	4.5E-07
DP-116	2.3E-05
DP-117	2.5E-05
DP-118	1.4E-05
DP-119	1.6E-05
DP-120	5.0E-05
DP-121	4.1E-05
DP-122	3.2E-05
DP-123	5.8E-05
DP-124	2.0E-05
DP-125	5.5E-05
DP-126	5.4E-05
DP-127	4.7E-05
DP-128	2.3E-05
DP-129	1.7E-05
DP-130	2.1E-05
DP-131	6.1E-05
DP-132	3.9E-05
DP-133	3.0E-05
DP-134	1.3E-05
DP-135	5.2E-06
DP-136	3.5E-05
DP-137	3.2E-05
DP-138	3.1E-05
DP-139	2.3E-05
DP-140	6.1E-05
DP-142	4.0E-06
DP-143	2.0E-05
DP-144	6.5E-05
DP-145	2.9E-05
DP-146	2.6E-05

	iPAMPA Pe
DP-147	2.9E-05
DP-148	3.1E-05
DP-149	1.7E-05
DP-150	3.3E-05
DP-151	2.7E-05
DP-152	6.1E-05
DP-153	2.6E-05
DP-154	9.3E-06
DP-155	5.5E-05
DP-156	2.4E-05
DP-157	2.7E-05
DP-158	4.9E-05
DP-159	3.9E-05
DP-160	3.7E-05
DP-161	2.6E-05
DP-162	3.5E-05
DP-163	2.3E-05
DP-164	3.0E-05
DP-165	5.6E-05
DP-166	5.5E-05
DP-167	9.5E-06
DP-168	2.3E-05
DP-169	3.6E-05
DP-170	4.3E-05
DP-171	5.0E-05
DP-172	7.0E-05
DP-173	5.8E-05
DP-174	2.2E-05
DP-175	4.8E-05
DP-176	2.5E-05
DP-177	2.3E-05
DP-178	1.0E-06
DP-179	1.7E-05
DP-180	2.3E-05
DP-181	1.8E-05
DP-182	2.6E-05
DP-183	2.9E-05
DP-184	1.3E-06
DP-185	4.6E-05
DP-186	3.7E-05
DP-187	4.3E-05
DP-188	2.8E-05
DP-189	1.4E-06
DP-190	6.0E-07
DP-191	3.4E-05
DP-192	6.4E-07
DP-193	5.3E-05
DP-194	2.2E-05
DP-195	8.0E-06
DP-196	2.9E-05
DP-197	2.7E-05
DP-198	3.6E-05
DP-199	5.9E-05
DP-200	2.2E-05
DP-201	2.7E-05

	iPAMPA Pe
DP-202	5.5E-05
DP-203	1.1E-05
DP-204	2.2E-05
DP-205	1.2E-07
DP-206	9.0E-06
DP-207	1.6E-07
DP-208	2.7E-05
DP-209	4.2E-05
DP-210	1.8E-06
DP-211	3.2E-06
DP-212	2.9E-05
DP-213	5.5E-05
DP-214	3.4E-05
DP-215	2.4E-05
DP-216	4.5E-06
DP-217	3.8E-05
DP-218	3.3E-05
DP-219	1.3E-06
DP-220	3.3E-05
DP-221	3.1E-05
DP-222	1.6E-05
DP-223	2.3E-05
DP-224	1.8E-05
DP-225	1.6E-05
DP-226	3.2E-05
DP-227	3.8E-05
DP-228	5.2E-06
DP-229	3.3E-05
DP-230	4.4E-05
DP-231	1.8E-05
DP-232	1.8E-05
DP-233	3.2E-05
DP-234	2.0E-06
DP-235	9.0E-06
DP-236	7.0E-05
DP-237	1.2E-05
DP-238	1.9E-05
DP-239	2.5E-05
DP-240	3.8E-05
DP-241	2.6E-05
DP-242	2.9E-05
DP-243	8.4E-06
DP-244	3.1E-05
DP-245	3.1E-05
DP-246	4.1E-05
DP-247	2.8E-05
DP-248	2.6E-06
DP-249	3.4E-05
DP-250	2.9E-05
DP-251	2.4E-05
DP-252	4.7E-05
DP-253	7.5E-06
DP-254	3.5E-06
DP-255	4.8E-05
DP-256	1.9E-05

	iPAMPA Pe
DP- 257	3.3E-05
DP- 258	5.2E-05
DP- 259	2.8E-05
DP-26C	4.4E-05
DP- 261	2.7E-05
DP- 262	3.8E-05
DP- 263	3.4E-05
DP- 264	3.7E-05
DP- 265	4.2E-05
DP- 266	4.3E-05
DP- 267	2.5E-05
DP- 268	5.0E-05
DP- 269	1.1E-05
DP-27C	2.2E-05
DP- 271	1.0E-05
DP- 272	4.9E-05
DP- 273	2.1E-05
DP- 274	2.5E-05
DP- 275	3.6E-05
DP- 276	1.9E-05
DP- 277	3.8E-05
DP- 278	1.5E-06
DP- 279	1.5E-05
DP-28C	2.1E-05
DP- 281	1.7E-05
DP- 282	2.8E-05
DP- 283	1.5E-06
DP- 284	2.1E-07
DP- 285	1.6E-05
DP- 286	2.4E-07
DP- 287	1.4E-06
DP- 288	1.8E-05
DP- 289	1.4E-07
DP-29C	1.9E-05
DP- 291	1.4E-05
DP- 292	1.0E-07
DP- 293	4.5E-05
DP- 294	1.7E-05
DP- 295	1.0E-07
DP- 296	1.5E-05
DP- 297	1.9E-05
DP- 298	7.0E-06
DP- 299	5.3E-06
DP-30C	8.2E-06
DP- 301	1.5E-05
DP- 302	1.8E-05
DP- 303	1.2E-06
DP- 304	3.5E-05
DP- 305	3.5E-05
DP- 306	5.6E-05
DP- 307	2.2E-05
DP- 308	2.7E-05
DP- 309	2.6E-05
DP- 310	3.5E-05
DP- 311	4.8E-05

	iPAMPA Pe
DP- 312	4.7E-05
DP- 313	2.1E-05
DP- 314	4.9E-05
DP- 315	3.0E-05
DP- 316	1.2E-05
DP- 317	2.0E-05
DP- 318	2.6E-05
DP- 319	1.0E-06
DP-32C	1.5E-06
DP- 321	6.2E-06
DP- 322	1.0E-05
DP- 323	7.8E-06
DP- 324	7.7E-06
DP- 325	4.4E-05
DP- 326	2.5E-06
DP- 327	3.5E-06
DP- 328	1.6E-05
DP- 329	2.4E-06
DP-33C	9.9E-06
DP- 331	2.4E-07
DP- 332	1.4E-05
DP- 333	4.7E-05
DP- 334	2.0E-05
DP- 335	2.2E-05
DP- 336	3.5E-05
DP- 337	1.7E-05
DP- 338	4.9E-06
DP- 339	1.8E-05
DP-34C	3.1E-05
DP- 341	9.5E-06
DP- 342	3.3E-05
DP- 343	3.6E-05
DP- 344	2.2E-05
DP- 345	2.8E-06
DP- 346	4.0E-06
DP- 347	2.5E-05
DP- 348	1.9E-05
DP- 349	3.9E-06
DP-35C	2.0E-06
DP- 351	6.3E-05
DP- 352	2.5E-05
DP- 353	1.6E-05
DP- 354	3.3E-06
DP- 355	1.7E-05
DP- 356	3.4E-05
DP- 357	1.4E-05
DP- 358	3.2E-05
DP- 359	4.3E-05
DP-36C	7.3E-06
DP- 361	1.5E-06
DP- 362	2.7E-05
DP- 363	5.0E-06
DP- 364	2.8E-05
DP- 365	2.0E-05
DP—366	1.4E-05

	iPAMPA Pe
DP- 367	1.2E-05
DP- 368	1.6E-06
DP- 369	2.6E-05
DP- 370	2.5E-05
DP- 371	3.4E-05
DP- 372	4.2E-05
DP- 373	9.2E-06
DP- 374	2.4E-05
DP- 375	1.9E-05
DP- 376	2.9E-05
DP- 377	2.3E-05
DP- 378	3.1E-05
DP- 379	4.1E-05
DP- 380	1.7E-05
DP- 381	4.5E-05
DP- 382	4.9E-05
DP- 383	1.4E-05
DP- 384	2.6E-05
DP- 385	1.8E-05
DP- 386	5.4E-05
DP- 387	2.8E-06
DP- 388	1.1E-05
DP- 389	1.5E-05
DP- 390	3.5E-06
DP- 391	4.5E-06
DP- 392	2.0E-05
DP- 393	1.8E-05
DP- 394	2.2E-05
DP- 395	1.9E-05
DP- 396	5.5E-05
DP- 397	1.1E-05
DP- 398	2.4E-05
DP- 399	8.9E-07
DP- 400	1.5E-05
DP- 401	8.6E-06
DP- 402	2.4E-05
DP- 403	1.8E-05
DP- 404	2.0E-05
DP- 405	2.6E-05
DP- 406	4.4E-06
DP- 407	3.8E-05
DP- 408	1.9E-06
DP- 409	1.3E-05
DP- 410	1.4E-06
DP- 411	8.4E-06
DP- 412	2.6E-05
DP- 413	2.9E-05
DP- 414	4.4E-06
DP- 415	2.9E-06
DP- 416	2.3E-07
DP- 417	4.3E-05
DP- 418	2.8E-05
DP- 419	6.7E-06
DP- 420	1.0E-05
DP- 421	2.9E-05

	iPAMPA Pe
DP- 422	3.8E-06
DP- 423	1.5E-05
DP- 424	4.6E-05
DP- 425	2.7E-05
DP- 426	3.6E-05
DP- 427	3.7E-05
DP- 428	2.6E-05
DP- 429	1.5E-05
DP- 430	3.2E-05
DP- 431	3.4E-05
DP- 432	2.6E-05
DP- 433	4.5E-05
DP- 434	3.8E-05
DP- 435	1.6E-05
DP- 436	4.5E-05
DP- 437	3.7E-05
DP- 438	3.8E-05
DP- 439	3.4E-05
DP- 440	2.9E-05
DP- 441	3.7E-05
DP- 442	3.8E-05
DP- 443	9.1E-06
DP- 444	7.2E-07
DP- 445	1.1E-05
DP- 446	4.0E-05
DP- 447	3.3E-05
DP- 448	6.2E-06
DP- 449	6.0E-06
DP- 450	2.3E-06
DP- 451	3.5E-05
DP- 452	2.2E-05
DP- 453	2.5E-05
DP- 454	1.4E-05
DP- 455	1.5E-05
DP- 456	4.1E-05
DP- 457	1.0E-05
DP- 458	7.7E-06
DP- 459	1.9E-05
DP- 460	5.1E-06
DP- 461	3.3E-05
DP- 462	9.5E-06
DP- 463	3.1E-06
DP- 464	2.5E-05
DP- 465	5.1E-06
DP- 466	1.5E-05
DP- 467	1.5E-06
DP- 468	2.7E-05
DP- 469	1.4E-05
DP- 470	1.2E-06
DP- 471	2.1E-05
DP- 472	2.4E-05
DP- 473	1.4E-05
DP- 474	1.3E-05
DP- 475	1.6E-05
DP—476	2.8E-06

	iPAMPA Pe
DP-477	2.9E-05
DP-478	1.8E-05
DP-479	4.6E-05
DP-48C	6.6E-06
DP-481	3.1E-05
DP-482	3.7E-06
DP-483	1.8E-05
DP-484	1.3E-05
DP-485	5.9E-06
DP-486	3.8E-05
DP-487	2.4E-05
DP-488	6.2E-06
DP-489	2.4E-05
DP-49C	1.1E-05
DP-491	1.8E-05
DP-492	2.0E-05
DP-493	2.4E-06
DP-494	5.5E-05
DP-495	2.1E-05
DP-496	2.3E-05
DP-497	9.3E-06
DP-498	2.7E-06
DP-499	3.1E-07
DP-50C	2.7E-05
DP-501	2.3E-07
DP-502	1.7E-05
DP-503	2.0E-07
DP-504	3.1E-05
DP-505	6.8E-06
DP-506	2.0E-05
DP-507	1.1E-05
DP-508	2.5E-06
DP-509	5.1E-06
DP-510	2.2E-06
DP-511	1.1E-06
DP-512	1.8E-05
DP-513	3.0E-05
DP-514	6.8E-06
DP-515	1.0E-07
DP-516	9.1E-06
DP-52C	2.9E-05
DP-521	4.4E-05
DP-522	5.3E-06
DP-523	2.0E-05
DP-524	1.6E-05
DP-525	2.2E-05
DP-526	1.4E-05
DP-527	1.1E-05
DP-528	1.3E-05
DP-529	2.3E-05
DP-53C	1.1E-05
DP-531	5.8E-06
DP-532	2.0E-05
DP-533	1.0E-05
DP-534	6.3E-06

	iPAMPA Pe
DP-535	2.1E-05
DP-536	9.9E-06
DP-537	1.0E-05
DP-538	5.5E-06
DP-539	2.0E-05
DP-54C	3.6E-05
DP-541	2.3E-05
DP-542	2.2E-05
DP-543	2.8E-05
DP-544	4.2E-05
DP-545	4.0E-05
DP-546	4.1E-05
DP-547	3.4E-05
DP-56C	2.6E-05
DP-561	2.4E-05
DP-563	3.5E-05
DP-564	2.7E-05
DP-565	1.8E-05
DP-566	1.1E-05
DP-567	3.0E-05
DP-568	4.4E-06
DP-569	2.1E-05
DP-57C	2.1E-06
DP-571	2.3E-05
DP-572	1.0E-07
DP-573	1.0E-07
DP-574	1.2E-06
DP-575	2.8E-05
DP-576	1.5E-05
DP-577	9.4E-07
DP-578	3.4E-06
DP-579	2.4E-05
DP-580	1.3E-07
DP-581	2.7E-06
DP-582	2.1E-05
DP-583	2.5E-05
DP-584	1.8E-05
DP-585	1.5E-05
DP-586	4.4E-07
DP-587	3.3E-06
DP-588	6.0E-07
DP-589	1.1E-05
DP-59C	1.4E-06
DP-591	2.6E-05
DP-592	1.8E-07
DP-593	1.1E-06
DP-594	1.3E-06
DP-595	4.9E-06
DP-596	3.2E-06
DP-597	1J E-06
DP-598	1.0E-07
DP-599	2.8E-05
DP-60C	1.0E-07
DP-607	1.2E-06
DP-617	2.9E-05

	iPAMPA Pe
DP-618	2.8E-05
DP-619	1.2E-05
DP-620	2.4E-05
DP-621	2.1E-05
DP-624	2.4E-05
DP-625	2.6E-05
DP-626	3.6E-05
DP-627	2.4E-06
DP-631	1.6E-06
DP-639	3.3E-05
DP-640	5.0E-05
DP-641	4.6E-05
DP-642	3.2E-05
DP-643	2.9E-05
DP-644	3.3E-05
DP-645	4.9E-05
DP-646	2.9E-05
DP-647	2.9E-05
DP-648	5.3E-05
DP-649	2.2E-05
DP-650	2.6E-05
DP-651	2.4E-05
DP-652	3.0E-05
DP-653	3.3E-05
DP-654	2.3E-05
DP-655	3.4E-05
DP-656	3.0E-05
DP-657	2.4E-05
DP-658	3.2E-05
DP-659	2.2E-05
DP-660	2J E-05
DP-661	2.5E-05
DP-662	1.8E-05
DP-663	4.3E-05
DP-664	7.0E-05
DP-665	4.0E-06
DP-666	3.0E-06
DP-667	1.9E-05
DP-668	2.6E-05
DP-669	2.9E-05
DP-670	1.2E-05
DP-671	1.6E-05
DP-672	1.3E-05
DP-673	3.0E-05

	iPAMPA Pe
DP- 677	7.2E-06
DP- 678	2.6E-05
DP- 679	2.5E-05
DP- 680	1.5E-05
DP- 681	2.8E-05
DP- 682	1.3E-05
DP-683	3.2E-05
DP- 684	2.3E-05
DP- 685	2.8E-05
DP- 686	3.6E-05
DP- 687	1.0E-05
DP- 688	1.7E-05
DP- 689	4.4E-05
DP-690	3.3E-05
DP- 691	3.3E-05
DP- 692	2.9E-05
DP- 693	3.5E-05
DP- 694	3.3E-05
DP- 695	1.5E-05
DP- 696	3.7E-05
DP- 697	3.5E-05
DP- 698	3.1 E-05
DP- 699	2.9E-05
DP- 700	4.9E-05
DP-701	3.1 E- 05
DP- 702	2.5E-05
DP- 703	3.4E-05
DP-704	2.9E-05
DP- 705	4.9E-05
DP- 706	4.8E-05
DP- 707	2.9E-05
DP- 708	1.6E-05
DP- 709	3.5E-05
DP-710	4.4E-05
DP-71 1	2.9E-05
DP-71 2	1.2E-05
DP-71 3	2.7E-05
DP-71 4	3.1 E-05
DP-71 5	2.4E-05
DP-71 6	2.1 E- 05
DP-71 7	2.1 E-05
DP-71 8	1.7E-05
DP-71 9	2.6E-05
DP- 720	1.6E-05
DP- 721	4.9E-05
DP-722	4.5E-05
DP- 723	2.6E-05
DP-724	2.0E-05
DP- 725	3.5E-05
DP- 726	1.7E-05
DP- 727	1.6E-05
DP- 728	6.5E-06
DP- 729	4.7E-06
DP- 730	3.7E-05
DP-731	4.8E-05
DP- 732	2.6E-05

	iPAMPA Pe
DP-733	2.6E-05
DP- 734	1.6E-05
DP- 735	2.1 E- 05
DP-736	2.7E-05
DP-737	3.0E-05
DP- 738	2.2E-05
DP-739	1.8E-05
DP- 740	3.1 E- 05
DP-741	1.0E-05
DP- 742	1.5E-05
DP-743	1.6E-05
DP- 744	1.2E-05
DP-745	1.7E-05
DP- 746	4.7E-05
DP- 747	2.0E-05
DP-748	4.5E-05
DP-749	1.7E-05
DP- 750	1.3E-05
DP- 751	1.8E-05
DP- 752	6.2E-06
DP- 753	1.0E-05
DP-754	3.2E-05
DP- 755	3.6E-05
DP-756	3.0E-05
DP- 757	3.3E-05
DP- 758	2.4E-05
DP- 759	2.7E-05
DP- 760	2.8E-05
DP- 761	9.2E-06
DP- 762	1.3E-05
DP- 763	2.5E-06
DP-764	5.0E-06
DP- 765	3.0E-06
DP- 766	1.3E-05
DP-767	3.0E-05
DP- 768	2.5E-05
DP- 769	5.3E-05
DP- 770	3.3E-05
DP- 771	4.7E-05
DP- 772	7.0E-05
DP- 773	4.6E-05
DP- 774	2.6E-05
DP-775	3.7E-05
DP- 776	1.8E-05
DP- 777	3.9E-05
DP-778	2.6E-05
DP- 779	3.7E-05
DP-780	4.1 E-05
DP- 781	2.9E-05
DP- 782	1.0E-05
DP- 783	3.1 E- 05
DP- 784	4.6E-05
DP- 785	2.9E-05
DP-786	5.9E-06
DP- 787	2.9E-05
DP- 788	4.9E-05

	iPAMPA Pe
DP- 789	3.5E-05
DP- 790	5.6E- 05
DP- 791	4.1 E- 05
DP- 792	3.3E-05
DP- 793	5.3E-05
DP- 794	3.7E-06
DP- 795	1.9E-05
DP- 796	2.0E-05
DP- 797	2.6E-05
DP- 798	6.9E-05
DP- 799	3.2E- 05
DP- 800	2.5E-05
DP- 801	6.0E-05
DP- 802	2.9E-05
DP- 803	2.8E-05
DP- 804	2.9E-05
DP- 805	4.1 E- 05
DP- 806	2.7E-05
DP- 807	1.5E-05
DP- 808	3.3E-06
DP-809	7.0E-05
DP- 810	1.4E-05
DP-811	7.0E-05
DP- 812	3.4E-05
DP- 813	3.0E-05
DP- 814	5.7E-05
DP- 815	4.2E-05
DP-81 6	3.2E-05
DP-817	2.5E-05
DP- 818	2.0E-06
DP- 819	3.0E-05
DP-820	4.8E-05
DP- 821	6.2E- 05
DP- 822	3.7E-05
DP- 823	3.1 E-05
DP- 824	2.9E-05
DP- 825	3.9E-05
DP- 826	3.0E-05
DP- 827	5.8E-06
DP-828	4.2E–05
DP- 829	2.1 E- 05
DP- 830	4.0E-05
DP- 831	5.5E-05
DP-832	2.1 E-05
DP- 833	1.2E-05
DP- 834	1.4E-05
DP- 835	8.0E-06
DP-836	1.8E-05
DP- 837	5.8E-05
DP- 838	5.4E-05
DP- 839	2.4E-05
DP-840	6.4E-05
DP- 841	2.0E-05
DP- 842	2.5E-07
DP- 843	3.1 E-05
DP- 844	1.1E–05

	iPAMPA Pe
DP- 845	2.8E-05
DP- 846	3.4E-06
DP- 847	3.3E-06
DP-848	3.0E-05
DP- 849	4.1 E-05
DP- 850	4.3E-06
DP- 851	2.5E-06
DP- 852	7.0E-07
DP- 853	6.3E-06
DP- 854	7.4E-06
DP- 855	4.3E-06
DP- 856	4.4E-07
DP- 857	3.7E-06
DP- 858	1.0E-06
DP- 859	3.7E-06
DP- 860	5.5E-05
DP- 861	2.9E-06
DP- 862	1.0E-07
DP- 863	3.5E-05
DP- 864	2.3E-06
DP- 865	1.5E-05
DP- 866	5.1 E- 05
DP- 867	1.4E-07
DP- 868	2.4E-07
DP- 869	8.6E-07
DP- 870	8.3E-06
DP- 871	1.2E-06
DP- 872	3.1 E- 06
DP- 873	1.OE-07
DP-874	1.5E- 07
DP- 875	1.9E-05
DP- 876	5.5E-05
DP- 877	4.6E-06
DP- 878	2.3E-05
DP- 879	3.5E-05
DP- 880	3.4E-05
DP- 881	6.8E-06
DP- 882	1.8E-06
DP- 883	1.4E-05
DP- 884	2.0E-07
DP- 885	3.0E-05
DP- 886	2.2E-05
DP- 887	3.9E-06
DP- 888	8.1 E-07
DP- 889	3.6E-06
DP- 890	1.5E-07
DP- 891	2.9E-06
DP-892	3.2E-07
DP-893	5.3E-06
DP- 894	4.6E-07
DP- 895	5.5E-06
DP- 896	1.3E-05
DP-897	2.4E-06
DP- 898	1.5E-07
DP- 899	3.8E-06
DP- 900	1.3E-06

	iPAMPA Pe
DP−901	2.3E-05
DP- 902	9.3E-07
DP- 903	3.4E-07
DP- 904	7.8E-06
DP- 905	6.0E-07
DP- 906	6.5E-07
DP- 907	2.1 E- 05
DP- 908	1.6E-06
DP-909	1.2E-05
DP- 910	1.6E-07
DP- 9"	1.0E-07
DP- 912	1.3E-06
DP- 913	1.0E-07
DP- 914	1.0E-07
DP- 915	1.0E-07
DP- 916	1.0E-07
DP—917	1.0E-07

	iPAMPA Pe
DP−918	5.3E-06
DP- 919	2.7E-05
DP-920	2.2E-07
DP- 921	3.4E-07
DP- 922	1.2E-07
DP−923	1.0E-07
DP- 924	1.0E-07
DP-925	1.0E-07
DP-926	1.0E-07
DP- 927	1.0E-07
DP- 928	1.0E-07
DP−929	1.2E-05
DP-930	4.6E-07
DP- 931	1.0E-07
DP- 932	
DP−933	
DP—934	

	iPAMPA Pe
DP- 935	1.0E-07
DP-936	1.1E-07
DP-937	4.7E-07
DP-938	1.0E-07
DP- 939	3.6E-06
DP- 940	1.4E-07
DP-941	1.0E-07
DP-942	1.0E-07
DP-943	1.0E-07
DP- 944	1.0E-07
DP- 945	1.0E-07
DP- 946	1.0E-07
DP-947	1.0E-07
DP-948	7.8E-07
DP- 949	1.1 E-07
DP- 950	1.0E-07
DP−951	1.0E-07

	iPAMPA Pe
DP- 952	4.4E-06
DP-953	1.0E-07
DP-954	1.0E-07
DP-955	6.3E-06
DP- 956	5.8E-07
DP- 957	4.0E-06
DP- 958	5.4E-07
DP-959	2.9E-06
DP-960	
DP- 961	5.7E-07
DP- 962	
DP- 963	1.0E-07
DP-964	8.9E-06
DP-965	1.6E-05

[0793] 3．環化ペプチド化合物のヒト肝ミクロソーム中代謝安定性試験

合成した環化ペプチドの代謝安定性を比較検討する目的で、ヒト肝ミクロソーム中代謝安定性試験を実施した。(方法は既に記載済み、結果は表１１_６：ヒト肝ミクロソーム中代謝安定性試験結果)。

[0794]

[表 11-6]

	CL NADPH (+)
DP- 1	27
DP- 2	7
DP- 3	45
DP- 4	42
DP- 5	68
DP- 6	35
DP- 7	48
DP- 8	36
DP- 9	18
DP- 10	14
DP- 11	67
DP- 12	32
DP- 13	66
DP- 14	57
DP- 15	34
DP- 16	74
DP- 17	94
DP- 18	202
DP- 19	80
DP- 20	97
DP- 21	25
DP- 22	71
DP- 23	105
DP- 24	52
DP- 25	24
DP- 26	62
DP- 27	31
DP- 28	113
DP- 29	158
DP- 30	63
DP- 31	57
DP- 32	26
DP- 33	202
DP- 34	102
DP- 35	32
DP- 36	35
DP- 37	156
DP- 38	55
DP- 39	67
DP- 40	38
DP- 41	72
DP- 42	17
DP- 43	44
DP- 44	59
DP- 45	129
DP- 46	249
DP- 47	37
DP- 48	32
DP- 49	51
DP- 50	80
DP- 51	96
DP- 52	136
DP- 53	60
DP- 54	13
DP- 55	79
DP- 56	43

	CL NADPH (+)
DP- 57	23
DP- 58	27
DP- 59	65
DP- 60	145
DP- 61	47
DP- 62	22
DP-63	58
DP- 64	25
DP- 65	97
DP- 66	69
DP- 67	15
DP- 68	35
DP- 69	68
DP- 72	58
DP- 73	30
DP- 74	118
DP- 75	27
DP- 76	27
DP- 77	33
DP-78	57
DP- 79	145
DP- 80	43
DP- 81	38
DP- 82	16
DP- 83	39
DP- 84	21
DP- 85	58
DP-86	237
DP- 87	120
DP- 88	32
DP- 89	58
DP- 90	30
DP- 91	58
DP-92	29
DP- 93	17
DP- 94	17
DP- 95	19
DP- 96	51
DP- 97	72
DP- 98	27
DP- 99	52
DP- 100	80
DP- 101	101
DP- 102	5
DP- 103	73
DP- 104	29
DP- 105	60
DP- 106	155
DP- 107	14
DP- 108	48
DP- 109	36
DP-1 10	36
DP- 111	17
DP- 112	49
DP- 113	84
DP—114	56

	CL NADPH (+)
DP- 115	28
DP- 116	333
DP- 117	194
DP- 118	79
DP- 119	67
DP- 120	84
DP- 121	46
DP- 122	169
DP- 123	21
DP-1 24	27
DP- 125	189
DP- 126	239
DP- 127	194
DP- 128	276
DP- 129	120
DP- 130	76
DP- 131	48
DP- 132	37
DP- 133	51
DP-1 34	18
DP- 135	15
DP- 136	147
DP- 137	86
DP- 138	48
DP- 139	22
DP- 140	96
DP- 141	77
DP- 142	22
DP- 143	25
DP- 144	125
DP- 145	232
DP- 146	52
DP- 147	147
DP- 148	69
DP- 150	701
DP- 151	30
DP- 152	93
DP- 153	179
DP- 155	101
DP- 157	368
DP- 158	41
DP- 159	54
DP- 160	68
DP- 161	194
DP- 162	90
DP- 163	68
DP-1 64	253
DP- 165	42
DP- 167	75
DP- 168	85
DP- 169	43
DP- 170	22
DP- 171	191
DP- 172	25
DP-1 73	251
DP- 174	66

	CL NADPH (+)
DP- 175	94
DP- 176	47
DP- 177	27
DP- 179	13
DP-1 80	35
DP- 181	13
DP- 182	9
DP- 183	25
DP- 185	19
DP- 187	22
DP- 188	84
DP- 189	3
DP- 190	3
DP- 191	46
DP- 193	124
DP- 194	72
DP- 195	52
DP- 196	65
DP- 197	48
DP- 198	34
DP- 199	170
DP- 200	57
DP- 201	209
DP- 202	134
DP- 203	18
DP-204	48
DP- 205	29
DP- 207	12
DP- 208	34
DP- 209	98
DP-21 1	178
DP- 212	27
DP-21 3	71
DP-21 4	33
DP- 215	35
DP-21 6	43
DP- 217	37
DP- 218	18
DP-21 9	49
DP- 220	26
DP- 221	75
DP- 222	30
DP- 223	42
DP-224	18
DP- 225	32
DP- 226	46
DP-227	141
DP- 228	28
DP-229	100
DP- 230	31
DP- 231	56
DP- 232	77
DP- 233	39
DP- 234	91
DP-235	58
DP—236	79

	CL NADPH (+)
DP- 237	37
DP- 238	129
DP- 239	109
DP- 240	125
DP- 241	30
DP- 242	43
DP- 243	32
DP- 244	16
DP- 245	71
DP- 246	42
DP- 247	48
DP- 248	36
DP- 249	151
DP- 250	42
DP- 251	45
DP- 252	119
DP- 253	42
DP-254	13
DP- 255	79
DP- 256	44
DP- 257	46
DP- 258	188
DP- 259	91
DP- 260	259
DP- 261	84
DP- 262	94
DP- 263	136
DP- 264	94
DP- 265	58
DP- 266	134
DP- 267	75
DP- 268	508
DP- 269	58
DP- 270	79
DP- 271	38
DP- 272	82
DP- 273	102
DP- 274	183
DP-275	440
DP- 276	68
DP- 277	389
DP- 280	28
DP- 281	28
DP- 282	138
DP- 284	11
DP- 285	69
DP- 288	80
DP- 290	23
DP-291	97
DP- 293	29
DP- 294	35
DP- 296	64
DP- 297	78
DP- 298	39
DP- 299	56
DP- 300	166

	CL NADPH (+)
DP- 301	184
DP- 302	102
DP- 303	27
DP- 304	212
DP- 305	700
DP- 306	63
DP- 307	125
DP- 309	212
DP- 310	143
DP- 311	74
DP- 313	61
DP- 314	133
DP- 315	63
DP- 316	35
DP- 319	12
DP- 320	36
DP- 321	19
DP-322	74
DP- 323	182
DP-324	59
DP- 325	99
DP- 326	15
DP- 327	70
DP- 328	32
DP- 329	66
DP-330	61
DP- 331	198
DP-332	284
DP- 333	157
DP- 334	80
DP- 335	109
DP- 337	74
DP- 338	146
DP- 339	213
DP- 340	86
DP- 341	69
DP- 342	121
DP- 343	427
DP-344	30
DP- 345	7
DP- 346	7
DP- 347	40
DP- 348	17
DP-349	13
DP- 350	29
DP- 351	51
DP-352	66
DP- 353	13
DP-354	8
DP- 355	66
DP- 356	66
DP- 357	56
DP- 358	82
DP- 361	9
DP-363	15
DP- 364	75

	CL NADPH (+)
DP- 365	35
DP- 367	17
DP- 368	6
DP- 370	36
DP- 371	31
DP- 372	78
DP-374	53
DP- 375	39
DP- 377	70
DP-378	219
DP- 379	236
DP- 380	58
DP- 381	84
DP- 382	188
DP-383	138
DP- 384	214
DP- 385	102
DP- 386	222
DP- 388	41
DP- 389	14
DP- 390	52
DP- 391	14
DP-392	18
DP- 394	10
DP- 395	23
DP-396	141
DP- 397	92
DP- 398	123
DP- 400	24
DP- 401	145
DP- 402	185
DP- 403	57
DP- 404	107
DP- 405	83
DP- 406	11
DP- 407	29
DP- 408	14
DP- 409	28
DP- 410	19
DP- 411	114
DP- 412	122
DP- 413	68
DP- 414	20
DP- 415	118
DP- 416	20
DP- 417	113
DP- 418	71
DP- 419	17
DP- 420	69
DP- 421	171
DP- 422	26
DP-423	110
DP- 424	135
DP- 425	150
DP- 426	546
DP- 427	141

	CL NADPH (+)
DP- 428	77
DP- 429	115
DP- 430	96
DP- 431	239
DP- 432	396
DP- 433	35
DP-434	166
DP- 435	41
DP- 436	142
DP-437	265
DP- 438	155
DP- 439	139
DP- 440	124
DP- 441	123
DP- 442	159
DP- 443	17
DP- 444	3
DP- 445	14
DP- 446	104
DP- 447	159
DP- 448	27
DP- 449	6
DP-450	17
DP- 451	14
DP- 452	21
DP- 453	64
DP- 454	50
DP- 455	17
DP- 456	29
DP- 457	14
DP-458	10
DP- 459	143
DP- 460	17
DP- 461	78
DP- 462	17
DP- 463	10
DP- 464	30
DP- 465	23
DP-466	17
DP- 467	12
DP- 468	53
DP- 469	23
DP- 470	11
DP- 471	30
DP- 472	52
DP- 473	82
DP- 474	129
DP- 475	35
DP- 476	10
DP- 477	30
DP- 478	50
DP- 479	183
DP- 480	15
DP- 481	82
DP-482	11
DP- 483	23

	CL NADPH (+)
DP-484	29
DP-485	45
DP-486	87
DP-487	386
DP-488	261
DP-489	59
DP-490	27
DP-491	39
DP-492	61
DP-493	52
DP-494	330
DP-495	7
DP-496	13
DP-497	58
DP-498	9
DP-500	28
DP-501	7
DP-502	19
DP-503	43
DP-504	216
DP-505	18
DP-506	14
DP-507	17
DP-508	11
DP-509	30
DP-511	15
DP-512	62
DP-513	184
DP-514	103
DP-515	23
DP-516	19
DP-517	31
DP-519	157
DP-520	130
DP-521	125
DP-522	87
DP-523	99
DP-524	162
DP-525	86
DP-526	49
DP-527	30
DP-528	55
DP-529	100
DP-530	37
DP-531	42
DP-532	105
DP-533	86
DP-534	55
DP-535	129
DP-536	113
DP-537	78
DP-538	37
DP-539	260
DP-540	67
DP-541	22
DP-542	21

	CL NADPH (+)
DP-543	23
DP-544	45
DP-545	36
DP-546	34
DP-547	33
DP-548	16
DP-550	108
DP-552	157
DP-553	106
DP-554	80
DP-555	95
DP-556	65
DP-557	96
DP-558	133
DP-559	145
DP-560	28
DP-561	48
DP-562	91
DP-563	111
DP-564	80
DP-565	56
DP-566	38
DP-567	224
DP-568	30
DP-569	203
DP-571	62
DP-573	72
DP-574	113
DP-575	70
DP-576	17
DP-579	19
DP-580	54
DP-581	7
DP-582	12
DP-583	27
DP-584	20
DP-586	15
DP-591	15
DP-592	5
DP-595	9
DP-597	12
DP-599	84
DP-600	12
DP-601	21
DP-602	26
DP-603	17
DP-605	30
DP-606	70
DP-607	2
DP-608	13
DP-609	16
DP-611	20
DP-612	155
DP-613	37
DP-615	42
DP-616	69

	CL NADPH (+)
DP-617	30
DP-618	39
DP-619	29
DP-620	26
DP-621	11
DP-622	36
DP-623	16
DP-624	30
DP-625	27
DP-626	28
DP-627	9
DP-628	36
DP-629	16
DP-630	34
DP-631	5
DP-632	41
DP-633	98
DP-634	32
DP-635	112
DP-636	73
DP-637	56
DP-638	47
DP-639	134
DP-641	91
DP-642	65
DP-643	24
DP-644	80
DP-645	74
DP-646	139
DP-647	132
DP-648	109
DP-649	27
DP-650	33
DP-651	68
DP-652	51
DP-653	235
DP-655	62
DP-657	157
DP-658	86
DP-659	13
DP-660	222
DP-661	17
DP-662	101
DP-664	304
DP-665	77
DP-666	74
DP-667	39
DP-668	142
DP-669	54
DP-670	22
DP-671	39
DP-672	72
DP-673	631
DP-674	10
DP-675	22

	CL NADPH (+)
DP-677	45
DP-678	284
DP-679	342
DP-680	96
DP-681	275
DP-682	20
DP-683	53
DP-684	126
DP-685	90
DP-686	227
DP-687	10
DP-688	23
DP-689	103
DP-690	217
DP-691	326
DP-692	212
DP-693	246
DP-694	170
DP-695	47
DP-696	194
DP-697	87
DP-698	142
DP-699	81
DP-700	398
DP-701	69
DP-702	123
DP-703	222
DP-704	83
DP-705	265
DP-706	264
DP-707	84
DP-708	35
DP-709	90
DP-710	121
DP-711	217
DP-712	57
DP-713	169
DP-714	145
DP-715	134
DP-716	133
DP-717	101
DP-718	99
DP-719	218
DP-720	62
DP-721	915
DP-722	311
DP-723	154
DP-724	160
DP-725	138
DP-726	75
DP-727	59
DP-728	42
DP-729	54
DP-730	50
DP-731	53
DP—732	57

	CL NADPH (+)
DP-733	97
DP-734	84
DP-735	88
DP-736	47
DP-737	45
DP-738	221
DP-739	164
DP-740	483
DP-741	169
DP-742	175
DP-743	126
DP-744	61
DP-745	232
DP-746	318
DP-747	248
DP-748	341
DP-749	56
DP-750	49
DP-751	156
DP-752	33
DP-753	35
DP-754	41
DP-755	144
DP-756	65
DP-757	124
DP-758	59
DP-759	144
DP-760	194
DP-761	118
DP-762	81
DP-763	15
DP-764	27
DP-765	13
DP-766	54
DP-767	34
DP-768	34
DP-769	78
DP-770	95
DP-771	228
DP-772	153
DP-773	17
DP-774	71
DP-775	119
DP-776	44
DP-777	428
DP-778	139
DP-779	78
DP-780	249
DP-781	142
DP-782	127
DP-783	269
DP-784	97
DP-785	193
DP-786	14
DP-787	33
DP-788	158

	CL NADPH (+)
DP-789	113
DP-790	40
DP-791	794
DP-792	16
DP-793	218
DP-794	43
DP-795	143
DP-796	66
DP-797	91
DP-798	1539
DP-799	222
DP-800	58
DP-801	133
DP-802	77
DP-803	85
DP-804	40
DP-805	169
DP-806	88
DP-807	81
DP-808	33
DP-809	201
DP-810	46
DP-811	241
DP-812	222
DP-813	195
DP-814	22
DP-815	104
DP-816	192
DP-817	165
DP-818	1
DP-819	134
DP-820	511
DP-821	547
DP-822	518
DP-823	254
DP-824	501
DP-825	168
DP-826	213
DP-827	49
DP-828	154
DP-829	65
DP-830	321
DP-831	683
DP-832	850
DP-833	427
DP-834	501
DP-835	497
DP-836	552
DP-837	284
DP-838	224
DP-839	91
DP-840	357
DP-841	386
DP-842	135
DP-843	505
DP—844	356

	CL NADPH (+)
DP-845	248
DP-846	310
DP-847	329
DP-848	148
DP-849	202
DP-850	119
DP-851	99
DP-852	484
DP-853	120
DP-854	252
DP-855	210
DP-856	183
DP-857	284
DP-858	77
DP-859	87
DP-860	322
DP-861	320
DP-862	118
DP-863	927
DP-864	171
DP-865	87
DP-866	211
DP-867	211
DP-868	61
DP-869	331
DP-870	474
DP-871	389
DP-872	397
DP-873	39
DP-874	48
DP-875	34
DP-876	103
DP-877	43
DP-878	152
DP-879	239
DP-880	490
DP-881	83
DP-882	32
DP-883	294
DP-884	64
DP-885	75
DP-886	162
DP-887	103
DP-888	69
DP-889	89
DP-890	47
DP-891	100
DP-892	57
DP-893	86
DP-894	71
DP-895	54
DP-896	57
DP-897	56
DP-898	21
DP-899	32
DP—900	244

	CL NADPH (+)
DP-901	131
DP-902	121
DP-903	26
DP-904	89
DP-905	73
DP-906	49
DP-907	
DP-908	3
DP-909	15
DP-910	
DP-911	152
DP-912	8
DP-913	30
DP-914	29
DP-915	89
DP-916	55
DP-917	177

	CL NADPH (+)
DP-918	55
DP-919	128
DP-920	27
DP-921	88
DP-922	70
DP-923	8
DP-924	19
DP-925	2
DP-926	53
DP-927	5
DP-928	60
DP-929	49
DP-930	168
DP-931	12
DP-932	108
DP-933	43
DP-934	143

	CL NADPH (+)
DP-935	29
DP-936	29
DP-937	164
DP-938	8
DP-939	8
DP-940	37
DP-941	49
DP-942	23
DP-943	7
DP-944	20
DP-945	28
DP-946	15
DP-947	14
DP-948	20
DP-949	37
DP-950	12
DP-951	11

	CL NADPH (+)
DP-952	91
DP-953	8
DP-954	26
DP-955	30
DP-956	40
DP-957	54
DP-958	31
DP-959	
DP-960	36
DP-961	33
DP-962	22
DP-963	18
DP-964	38
DP-965	56

[0795] ペプチドのマウスPK試験

我々が明らかにしたドラッグライクを兼ね備えるためのペプチドの条件（鎖長、N—メチルアミノ酸数、CLogP）を満たす8種のペプチドのマウスにおける静脈内ならびに経口投与後の血漿中濃度推移を評価した。雄性マウス（C57BL/6J, 6週齢、日本クレア社製：1群3匹）に化合物を20 mg/kgの用量で静脈内ならびに経口投与し、投与後24時間までの血液を抗凝固剤としてヘパリン処理済みのヘマトクリット管を用い、背中足静脈より経時的に採取した。血液は遠心分離により血漿を分離し、アセトニトリルによる除タンパク処理後、LC/MS/MS装置（API3200, AB SCIEX社製、USA）を用いて血漿中濃度を測定した。得られた血漿中濃度推移より、解析ソフトPhoenix WinNonLin 6.1（Pharsight Corporation社製、USA）を用いて、ノンコンパートメント解析により薬物動態パラメータを算出した。

[0796] 以下に各パラメータの定義を示した。静脈内投与後の時間0における濃度（C0；外挿値、ng/mlい、経口投与後の最高血漿中濃度（Cmax；ng/mL）、最高血漿中濃度到達時間（Tmax；時間）、血漿中濃度一時間曲線下面積（AUC；n9-時間かL）、全身クリアランス（CL；mL/分/kg）、定常状態分布容積（Vss；mL/kg）、消失半減期（t1/2；時間）、及びバイオアバイラビリティー（F；%）を算出した。静脈内投与後の全身クリアランスはいずれも小さく（1.7-9

.5 mL/分/kg)、代謝的安定性が高いことが示唆された。化合物のバイオアベイラビリティーは最大で35%であり、評価した8種類のペプチドは期待通り経口投与剤として開発可能な経口吸収性を有していた。

[0797] [表11-7]

化合物												
DP-125			MeAla	Thr	MeAla	Leu	MePhe	MePhe	Leu	MeLeu	Asp	pip
DP-265			D-Val	MePhe	MeLeu	Thr	MeGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeIle	Asp	pip
DP-540		MeAla	MePhe	nPrGly	MeLeu	Thr	MeAla	MeLeu	MeIle	Ser(tBu)	Asp	pip
DP-547		D-Ala	MeAla	MePhe	MeLeu	Thr	nPrGly	MeLeu	Ser(tBu)	MeLeu	Asp	pip
DP-965		Ala	Leu	MeI	Val	MePhe	Leu	MePhe	Asp	Pro	Ile	pip
DP-47	MeAla	MePhe	Leu	MeLeu	Thr	MeGly	MeIle	Ser(tBu)	MePhe	MeVal	Asp	pip
DP-67	MeAla	Thr	MeGly	MePhe	MePhe	MeLeu	Pro	MeLeu	Ala	MeVal	Asp	pip
DP-101	MeAla	Leu	MeLeu	MePhe	Ala	MePhe	MeIle	Thr	MeGly	MeLeu	Asp	pip

[0798] [表11-8]

静脈内投与時の薬物動態パラメータ

化合物	アミノ酸残基数	C0 (ng/mL)	AUC (ng/時間*mL)	CL (mL/分/kg)	Vss (L/kg)	T1/2 (時間)
DP-125	9	46400	35400	9.49	0.545	1.44
DP-265	9	58300	35300	9.48	0.713	1.82
DP-540	10	48100	41400	8.16	0.803	1.63
DP-547	10	44500	37200	8.98	0.541	1.10
DP-965	10	171000	193000	1.73	0.403	2.99
DP-47	11	107000	202000	1.66	0.381	2.68
DP-67	11	102000	70700	4.74	0.431	3.25
DP-101	11	112000	83300	4.01	0.455	1.91

[0799] [表11-9]

経口投与時の薬物動態パラメータ

化合物	アミノ酸残基数	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC (ng/時間*mL)	CL/F (mL/分/kg)	T1/2 (時間)	F (%)
DP-125	9	3090	3.50	12100	27.5	算出不能	34.6
DP-265	9	2850	0.67	5120	85.1	1.96	14.5
DP-540	10	1810	議	9800	35.8	3.11	23.7
DP-547	10	1470	1.00	4510	74.6	1.84	12.1
DP-965	10	1920	2.67	13700	28.9	2.99	7.12
DP-47	11	4490	2.67	38000	8.86	3.88	18.8
DP-67	11	2310	3.50	10900	37.9	4.36	15.5
DP-101	11	2320	1.83	12700	26.2	2.27	15.2

[0800] [実施例20] 反応補助基を持たないN末端アミノ酸とC末端側活性エステルとのアミド化縮合反応

1. 反応補助基を持たないN末端アミノ酸活性エステルとの溶液中でのアミド化反応

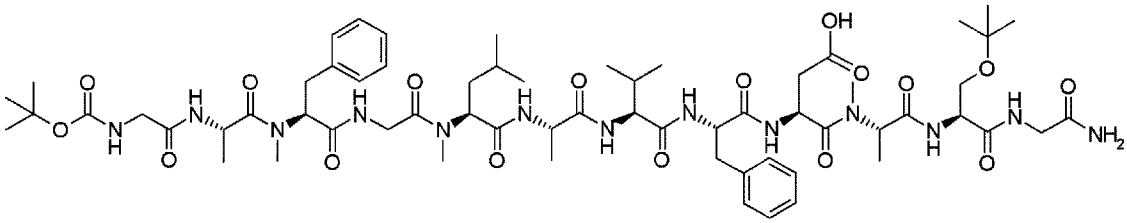
1-1. 比較的安定な活性エステルを溶解しておき、溶解後に活性エステル部分を加水分解させ、遊離のカルボン酸を活性化させて、反応補助

を有さないアミンと反応させる手法例

1-1-1．モデル反応原料化合物の合成

[0801] (化合物P_145)

(9S,12S,18S,21S,24S,27S,30S)-30-((S)-1-((S)-1-((2—アミノ_2—オキソエチル)アミノ)-3-(tert—ブトキシ)_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_1_オキソプロパン_2_イル)(メチル)カルバモイル)—12,27—ジベンジル—18_イソプチル_24_イソプロピル_2,2,9,11,17,21—ヘキサメチル—4,7,10,13,16,19,22,25,28—ノナオキソ—3_オキサ_5,8,11,14,17,20,23,26,29—ノナアザドトリアコンター32—酸 (Boc-GLv-ALa-MsPhe_Gly-MeLeu-ALa-Val-Phe-AspD-MeALa-Ser[tBu)_-Gly-NH2}の合成



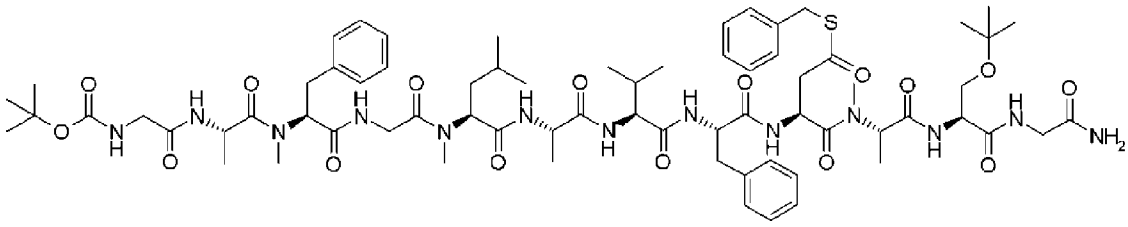
[0802] N末端にFmocアミノ酸の代わりにBocアミノ酸を用い、既に記載のFmoc法によるペプチド合成により合成した(9S,12S,18S,21S,24S,27S,30S)-30-((S)-1-((S)-1-((2—アミノ_2—オキソエチル)アミノ)_3_(tert—ブトキシ)_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_1_オキソプロパン—2—イル)(メチル)カルバモイル)_12,27—ジベンジル_18_イソプチル_24_イソプロピル_2,2,9,11,17,21—ヘキサメチル—4,7,10,13,16,19,22,25,28—ノナオキソ_3—オキサ—5,8,11,14,17,20,23,26,29—ノナアザドトリアコンター32—酸 ベンジル (Boc-Gly-ALa-『ePhe-Gly-MeLeu-ALa-Val-Phe-Asp(OBn)』eALa-Ser(tBu)-Gly—NH2、919mg, 0.657mmol)のメタノール(6ml)溶液に窒素雰囲気下、ジヒドロキシパラジウ

ム/炭素 (312mg、50%wet w/w) を加え、水素置換した後に室温で2時間攪拌した。その後、反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (10mM酢酸アンモニウム水溶液 :メタノール=70/30—0/100) で精製して、標題化合物P—145 (Boc-Gly-ALa-MePhe-Gly-MeLeu-ALa-Val L-Phe-Asp-MeALa-Ser (tBu)-Gly-NH2) (374mg、44%) を得た。LCMS : m/z 1307 (M-H) ー

保持時間 :1.09分 (分析条件 SQD AA05)

[0803] (化合物P—146)

(9S,12S,18S,21S,24S,27S,30S)-30-((S)-1-((S)-1-((2—アミノ_2—オキソエチル)アミノ)-3-(tert—ブトキシ)_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_1_オキソプロパン_2_イル)(メチル)カルバモイル)—12,27—ジベンジル—18_イソプチル_24_イソプロピル_2,2.9.11,17,21_ヘキサメチル—4,7.10,13,16,19,22,25,28—ノナオキソ—3_オキサ_5,8.11,14,17,20,23,26,29—ノナアザドトリアコンタン_32_チオ酸_S—ベンジル (Boc-GLv-ALa-fePhe-GLv-feLeu-ALa-Val L-Phe-Asp(SBn)-^ALa-Ser (tBu)-GLv-NH2) の合成



[0804] (9S,12S,18S,21S,24S,27S,30S)-30-((S)-1-((S)-1-((2—アミノ_2—オキソエチル)アミノ)_3_(tert—ブトキシ)_1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_1_オキソプロパン_2_イル)(メチル)カルバモイル)—12,27—ジベンジル—18_イソプチル_24_イソプロピル_2,2,9,

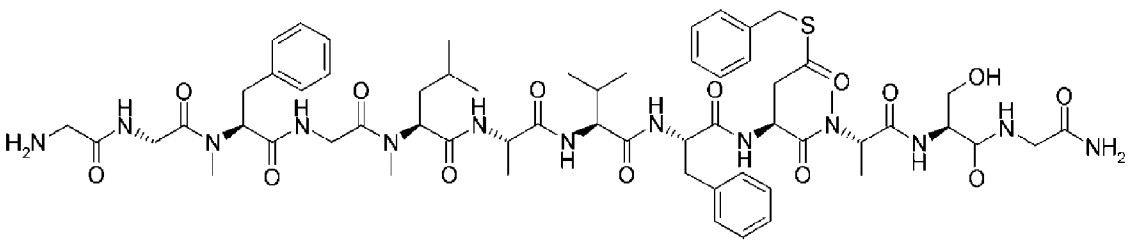
１１，１７，２１_ヘキサメチル_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナオキソ－３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナアザドトリアコンタン_３２_酸（化合物Ｐ―１４５，(Boc-G Ly-ALa-^{Me}Phe-G Ly-^{Me}Leu-ALa-Va L-Phe-Asp-^{Me}ALa-Ser (tBu)-G Ly- NH2））（５０．Ｏｍｇ、０．０３８ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（３２０μＬ）およびＤＭＦ（８０μＬ）に溶解させ、フエニルメタンチオール（９．４９ｍｇ、０．０７６ｍｍｏｌ）、ＤＩＣ（９．６４ｍｇ、０．０７６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ_ジメチルビリジン_４―アミン（３．５４ｍｇ、０．０２９ｍｍｏｌ）を加えて室温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液：メタノール）で精製して、標題化合物（１１．８ｍｇ、２１．８％）を得た。

[0805] ＬＣＭＳ：m/ｚ　１４１４．８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０８分　(分析条件　ＳＱＤ　ＡＡ０５)

[0806] （化合物Ｐ―１４７）

（４Ｓ．７Ｓ．１３Ｓ．１６Ｓ．１９Ｓ．２２Ｓ．２５Ｓ）_１―アミノ―２５-（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）(メチル）カルバモイル）－７，２２-ジベンジル_１３_イソプチル―１９_イソプロピル―４，６，１２，１６―テトラメチル－２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３―オクタオキソ－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４－オクタアザヘプタコサン-２７―チオ酸　Ｓ―ベンジル（G Lv-ALa-MaPhe-G Lv-feLeu-ALa-Va L-Phe-Asp（ＳＢｎ）-MsALa-Ser-G Ly- ＮＨ２）の合成



[0807] （９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブトキシ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）－１２，２７―ジベンジル―１８＿イソプチル＿２４＿イソプロピル＿２，２，９，１１，１７，２１＿ヘキサメチル＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナアザドトリアコンタン－３２―チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物Ｐ―１４６）（１１．８ｍｇ、０．００８３ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１５０μＬ）に溶解し、ＴＦＡ（７５．０μＬ，０．９７３ｍｍｏｌ）を加えて室温で１時間半攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（０．１％「八水溶液：０．１％ＦＡアセトニトリル溶液）で精製し、標題化合物（７．３ｍｇ、６９．５％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　１２５８．６（Ｍ＋Ｈ）＋

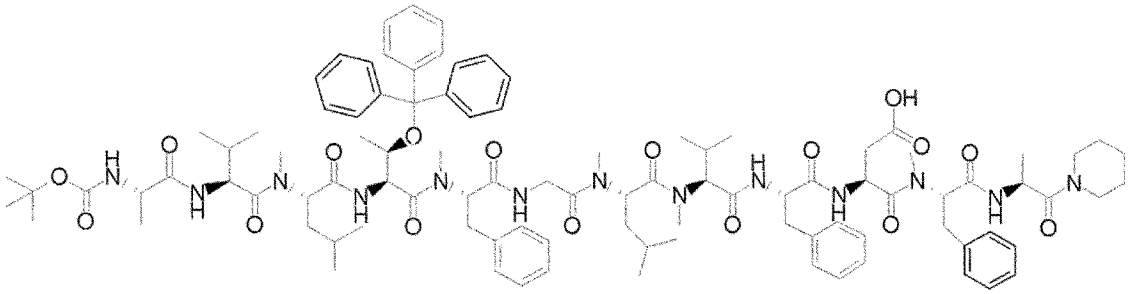
保持時間：０．５８分　（分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５）

[0808] （化合物Ｐ－１３３）

（６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１５Ｓ．１８Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ．３３Ｓ）－１８．３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル－２，２．６．１１，１７，２３，２６＿ヘプタメチル－３３＿＿（メチル（（Ｓ）＿＿１―オキソ－１＿＿（（（Ｓ）＿＿１―オキソ－１－（ピペリジン＿１＿イル）プロパン＿２＿イル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿イル）カルバモイル）―４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）＿３＿オキサ―５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２＿デカアザペンタトリアコンタン―３５＿酸（Boc-ALa-Val-MeLeu-Thr(Trt)-MePhe-Gly-MeLeu-MeVal-Phe-Asp-MePhe-ALa-piperidine）の合成

なお、本明細書ではALa-piperidineもしくはALa-pipとは、ピペリジンの窒素原子とALaの主鎖カルボン酸部位とでアミド結合を形成した化合物とする。

この部分構造をペプチド部位に有する場合にも、同様の表記を用いる。



[0809] 常法に従って合成した (6S, 9S, 12S, 15S, 18S, 24S, 27S, 30S, 33S)-18, 30—ジベンジル－12, 24—ジイソプチル—9, 27—ジイソプロピル_2, 2, 6, 11, 17, 23, 26—ヘプタメチル_33-(メチル ((S)_1_オキソ_1_((S)-1_オキソ_1_(ピペリジン－1_イル)プロパン_2_イル)アミノ)_3_フエニルプロパン_2_イル)カルバモイル)_4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31—デカオキソ－15—((R)—1—(トリチルオキシ)エチル)_3_オキサ_5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32—デカアザペンタトリアコンタン－35—酸ベンジル (Boc-ALa-Va L-MeLeu-Thr (Trt)-MePhe-G Ly-MeLeu-MeVa L-Phe-Asp(OBn)-MePhe-A La-piperidine) (770mg, 0.412mmol) のメタノール (4ml) 溶液に窒素雰囲気下、ヒドロキシパラジウム/炭素 (256mg、50%wet. w/w) を加え、水素置換した後に室温で2.5時間攪拌した。その後、反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮し標題化合物 (726mg、99%) を得た。

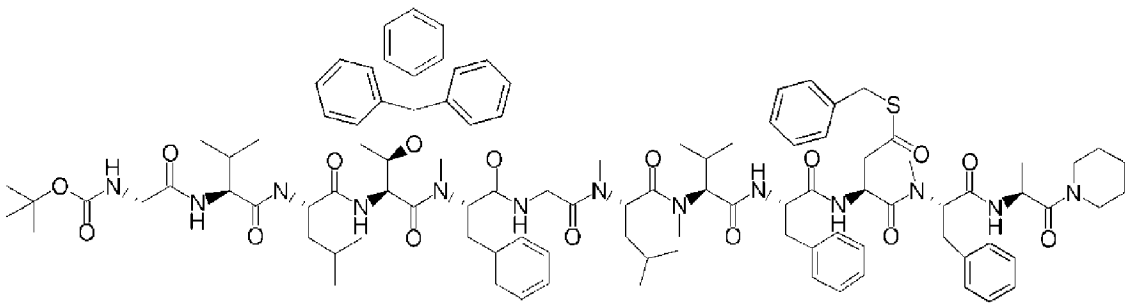
LCMS:m/z 1777.6 (M—H)-

保持時間:0.86分 (分析条件 SQD AA50)

[0810] (化合物P—134)

(6S. 9S. 12S. 15S. 18S. 24S. 27S. 30S. 33S)-18. 30—ジベンジル—12, 24—ジイソプチル—9, 27—ジイソプロピル－2, 2. 6. 11, 17, 23, 26_ヘプタメチル－33_(メチル((S)－1—オキソ—1-((S)-1—オキソ—1－(ピペ

リジン_１_ィル)_プロパン_２_ィル)_アミノ)_３_フエニルプロパン_２_ィル)_カルバモイル)―４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ―１５―((Ｒ)-１-(トリチルオキシ)_エチル)_３_オキサ―５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカアザペンタトリアコンタン―３５_チオ酸__Ｓ―ベンジル (Boc-ALa-Va L-MeLeu-Thr (Trt)-MePhe-G Ly-MeLeu-MeVa L-Phe-Asp(S Bn)-MePhe-A La-D iperidine) の合成



[0811] (６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ)-１８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_２，２，６，１１，１７，２３，２６―ヘプタメチル－３３-(メチル ((Ｓ)_１―オキソ－１_((((Ｓ)_１―オキソ－１－(ピペリジン－１_ィル)プロパン_２_ィル)アミノ)_３_フエニルプロパン_２_ィル)カルバモイル)_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ―１５―((Ｒ)-１-(トリチルオキシ)エチル)_３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカアザペンタトリアコンタン－３５_酸 (化合物Ｐ―１３３) (５０．０ｍｇ、０．０２８ｍｍｏｌ)を原料とし、化合物Ｐ_１４６の合成と同様にして標題化合物 (３３．０ｍｇ、６２．３％)を得た。

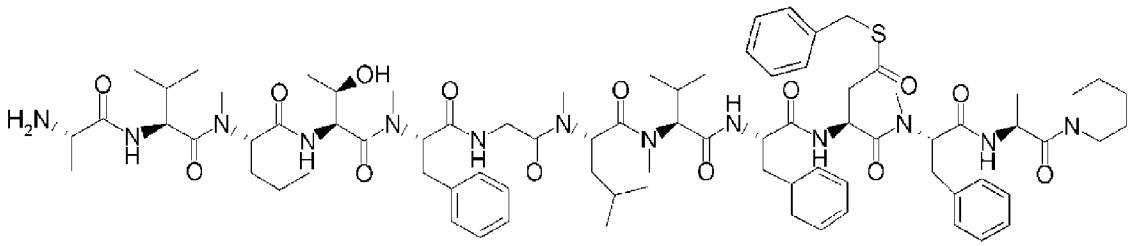
ＬＣＭＳ :m/z １８８３．３ (Ｍ―Ｈ)-

保持時間 :０．９３分 (分析条件 ＳＱＤ ＡＡ５０)

[0812] (化合物Ｐ―１３５)

(３Ｓ．６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１８Ｓ．２１Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ)-３０―アミノ－６」１８―ジベンジル－２１-((Ｒ)_-１―ヒドロキシ

エチル）—１２，２４—ジイソプチル—９，２７—ジイソプロピル＿１０，＿１３，１９，２５—テトラメチル－３＿（メチル（(S)＿１＿オキソ＿１—（（（Ｓ）＿—１—オキソ－１－＿（ピペリジン－１—ィル）プロパン－２－ィル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿ィル）カルバモイル）－５，＿８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９—ノナオキソ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８—ノナァザヘントリアコンタン－１＿チオ酸＿Ｓ—ベンジル（ALa-Va L-MeLeu-Thr-MePhe-G Lv-MeLeu-MeVa L-Phe-ASD)(ＳＢｎ)-MePhe-A La-piperidine)＿のき¡¼



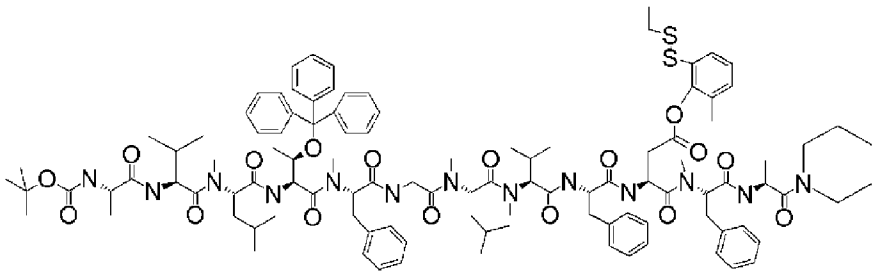
[081 3] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０—ジベンジル—１２，２４—ジイソプチル—９，２７—ジイソプロピル＿２，２，６，１１，１７，２３，２６—ヘプタメチル－３３－（メチル（(S)＿１—オキソ－１＿（（（Ｓ）＿１—オキソ－１－（ピペリジン－１＿ィル）プロパン＿２＿ィル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿ィル）カルバモイル）＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１—デカオキソ－１５—（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）＿３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２＿デカァザペンタトリアコンタン－３５＿チオ酸 Ｓ—ベンジル（化合物Ｐ—１３４）（３３．Ｏｍｇ、０．０１８ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物Ｐ＿１４７の合成と同様にして標題化合物（6．Ｏｍｇ、２２．９％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ １５４１．０（Ｍ—Ｈ）－

保持時間：０．７７分 (分析条件 ＳＱＤ FA05)

[0814] （６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１５Ｓ．１８Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ．３３Ｓ）－１８，３０—ジベンジル＿１２，２４＿ジイソプチル＿９，２７＿ジィ

ソプロピル_２，２，６，１１，１７，２３，２６_ヘプタメチル－３３_（メチル（（Ｓ）_１―オキソ－１_（（（Ｓ）_１―オキソ－１－（ピペリジン_１_イル）プロパン_２_イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）カルバモイル）―４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）_３_オキサ―５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２―デカアザペンタトリアコンタン_３５―酸　２－（エチルジスルファニル）_６―メチルフエニル（化合物Ｐ-１３８）の合成



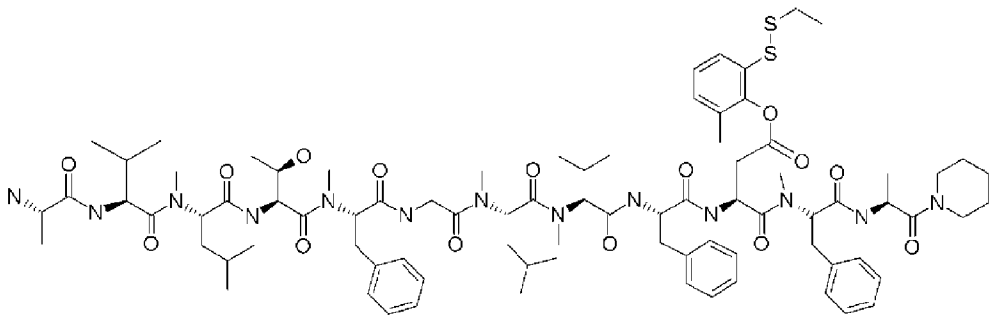
[0815] Ｎ末端にＦｍｏｃアミノ酸の代わりにＢｏｃアミノ酸を用い、既に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成により合成した（６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０―ジベンジル－１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_２，２，６，１１，１７，２３，２６_ヘプタメチル_３３－（メチル（（Ｓ）_１―オキソ－１―（（（Ｓ）―１―オキソ－１－（ピペリジン－１―イル）プロパン_２_イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）カルバモイル）_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ_１５_（（Ｒ）_１_（トリチルオキシ）エチル）_３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２―デカアザペンタトリアコンタン―３５-ll（Ｂｏｃ－ALa-Va L-^{Me}Leu-Th r(Trt)-^{Me}Phe-G Ly-^{Me}Leu-^{Me}Va L-Phe-Asp-^{Me}Phe-ALa-ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ、６０．９ｍｇ、０．０３４ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（３００ｕｌ）溶液に、常法に従い（丄 AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 5432-5437）別途合成した２_（エチルジスルファニル）_６_メチルフエノール（１０．３ｍｇ、０．０５１ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ'_

メタンジイリデンビス (プロパン－２―アミン) (8．Ｏｕし０．０５１ｍｍｏｌ)、Ｎ，Ｎ_ジメチルビリジン_４―アミン (4．２ｍｇ、０．０３４ｍｍｏｌ) を加え室温で終夜攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→０/ １００) にて精製し、 (６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ) - １８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_２，２，６，１１，１７，２３，２６_ヘプタメチル－３３_ (メチル ((Ｓ) - １―オキソ－１_ (((Ｓ) _１―オキソ－１－ (ピペリジン－１―イル) プロパン_２_イル) アミノ)_３_フエニルプロパン_２_イル) カルバモイル)_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―((Ｒ) - １- (トリチルオキシ) エチル)_３―オキサ―５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２―デカアザペンタトリアコンタン－３５_酸 ２_ (エチルジスルファニル)_６_メチルフエニル (化合物Ｐ―１３８) (５３．８ｍｇ， ８０％) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ ｚ ＝１９５９．２ (Ｍ― Ｈ) －

保持時間 ：１．０５分 (分析条件ＳＱＤＡＡ５０)

[0816] (３Ｓ．６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１８Ｓ．２１Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ) - ３０―アミノ－６，１８―ジベンジル－２１―(_(Ｒ)_―１―ヒドロキシエチル)―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_１０，１３，１９，２５―テトラメチル－３_ _(メチル ((Ｓ)_ １_オキソ_１―_(((Ｓ)_―１―オキソ－１－_(ピペリジン－１―イル)_プロパン－２-イル)_アミノ)_３_フエニルプロパン_２_イル)_カルバモイル)－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナオキソ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナアザヘントリアコンタン－１_酸 ２_ _(エチルジスルファニル)_６_メチルフエニル (化合物Ｐ―１３９) の合成



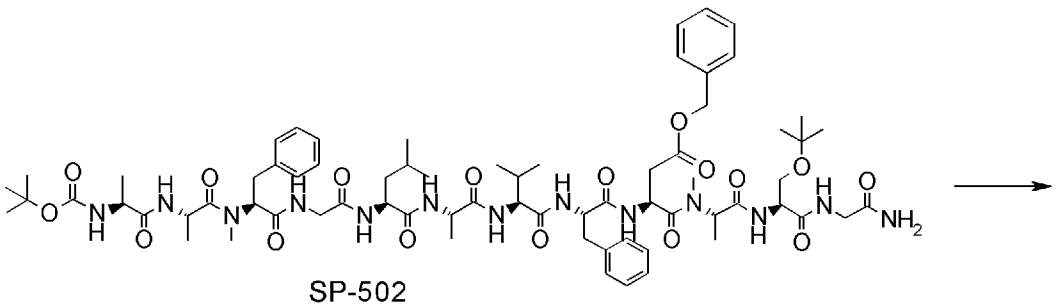
[0817] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル＿２，２，６，１１，１７，２３，２６―ヘプタメチル－３３－（メチル（(Ｓ）＿１―オキソー１＿（（（Ｓ）＿１―オキソー１－（ピペリジンー１＿ィル）プロパン＿２＿ィル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿ィル）カルバモイル）＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソー１５―（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）＿３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２＿デカァザペンタトリアコンターー３５＿酸　２―（エチルジスルファニル）＿６＿メチルフエニル　(化合物Ｐ―１３８）（５３．Ｏｍｇ、２７ｕｍｏｌ）のジクロロメタン（２００ｕｌ）溶液にトリフルオロ酢酸（３００ｕｌ）とトリイソプロビルシラン（２７．７ｕし０．１３５ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液＝７０/３０→０/１００）にて精製し、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）＿３０―アミノ＿６，１８―ジベンジル＿２１＿（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）＿１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル＿１０，１３，１９，２５－テトラメチルー３＿（メチル（(Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿（（（Ｓ）－１－オキソ＿１＿（ピペリジンー１＿ィル）プロパン＿２＿ィル）アミノ）＿３―フエニルプロパン＿２＿ィル）カルバモイル）＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナオキソ＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナァザヘントリアコンターー１―酸　２―（エチ

ルジスルファニル）_６_メチルフエニル (化合物P_１３９）（２２．４ｍｇ、５１％）を得た。

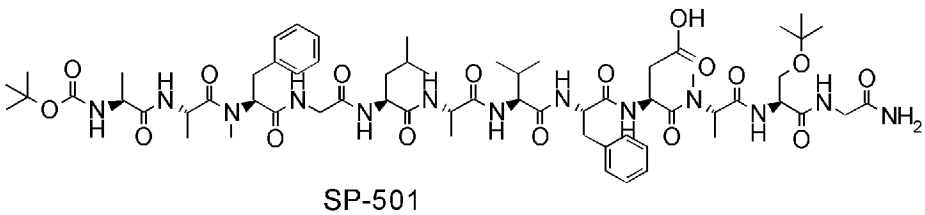
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝１６２０（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８８分 (分析条件３０Ｄ六六５０）

[0818] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０_（（（Ｓ）_１_（（（Ｓ）_１_（（２―アミノ_２―オキソエチル）_アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブトキシ）_１―オキソプロパン_２_イル）_アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）(メチル）カルバモイル）_１２，２７―ジベンジル―１８_イソプチル―２４_イソプロピル_２，２，６．９．１１，２１_ヘキサメチル－４，７．１０．１３．１６．１９．２２．２５，２８―ノナオキソ－３_ォキサ_５，８．１１，１４，１７，２０．２３，２６，２９―ノナァザドトリアコンタン－３２―酸 (Ｂｏｃ―Ａｌａ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ－ＭｅＡｌａ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＧＩｖ－ＮＨ２）(化合物SP_５０１）の合成



SP-502



SP-501

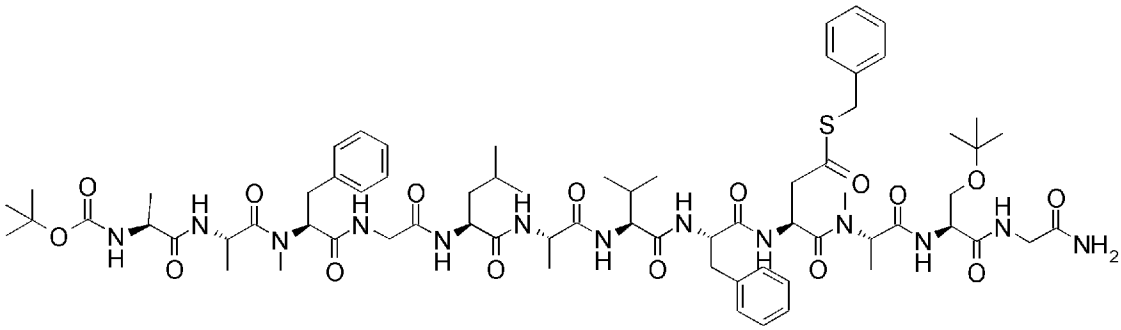
[0819] 常法に従って合成した (６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２_アミノ－２―オキソエチル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－１―オキ

ソプロパン_２_ィル）ァミノ）_１_オキソプロパン_２_ィル）（メチル）カルバモイル）_１２，２７―ジベンジル_１８_イソプチル―２４―イソプロピル_２，２，６，９，１１，２１_ヘキサメチル_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ―３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナァザドトリアコンタン―３２―酸　ベンジル（化合物SP―５０２、Ｂｏｃ-Ａｌａ-Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｙ-Ｌｅｕ-Ａｌａ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ（０Ｂｎ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ（ｔＢｕ）-Ｇｌｙ-ＮＨ２）（７４９ｍｇ，０．５３６ｍｍｏｌ）のメタノール（５ｍｌ）―酢酸エチル（５ｍｌ）溶液に窒素雰囲気下、ヒドロキシパラジウム/炭素（２５０ｍｇ、５０％ｗｅｔ．ｗ/ｗ）を加え、水素置換した後に室温で３．５時間攪拌した。その後、反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮し標題化合物（SP―５０１）（６２０ｍｇ、８８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１３０６．４（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．７４分　（分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５）

[0820] （６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１８Ｓ．２１Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ）-３０-（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ_２―ォキソエチル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブトキシ）_１―ォキソプロパン_２_ィル）アミノ）_１_ォキソプロパン_２_ィル）（メチル）カルバモイル）_１２，２７―ジベンジル―１８_イソプチル―２４_イソプロピル_２，２，６，９，１１，２１―ヘキサメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナオキソ－３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナァザドトリアコンタン_３２_チオ酸　Ｓ―ベンジル（Ｂｏｃ_Ａｌａ-Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｙ-Ｌｅｕ-Ａｌａ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ（ＳＢｎ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ（ｔＢｕ）-Ｇｌｙ-ＮＨ２）（化合物SP―５０３）の合成

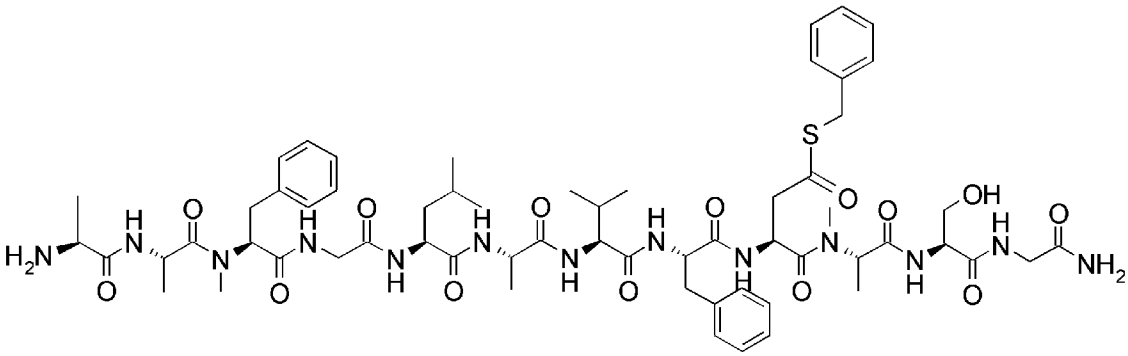


[0821] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２＿オキソエチル）アミノ）－３―（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）－１２，２７―ジベンジル―１８＿イソプチル＿２４＿イソプロピル＿２，２，６，９，１１，２１＿ヘキサメチル＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナアザドトリアコンタン＿３２＿酸（化合物ＳＰ－５０１）（３２５．５ｍｇ、０．２４９ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物Ｐ＿１４６の合成と同様にして標題化合物（ＳＰ＿５０３）（１７８．２ｍｇ、５１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４１２．６（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８７分（分析条件ＳＱＤ　ＦＡＯ５）

[0822] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－アミノ－３＿（（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）＿３―ヒドロキシ－１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）－６，２１―ジベンジル―１５＿イソプチル―９＿イソプロピル＿１２，２２，２４＿トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン―１―チオ酸　Ｓ―ベンジル（Ａｌａ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－ＭｅＡｌａ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－ＮＨ２）（化合物ＳＰ―５０４）の合成



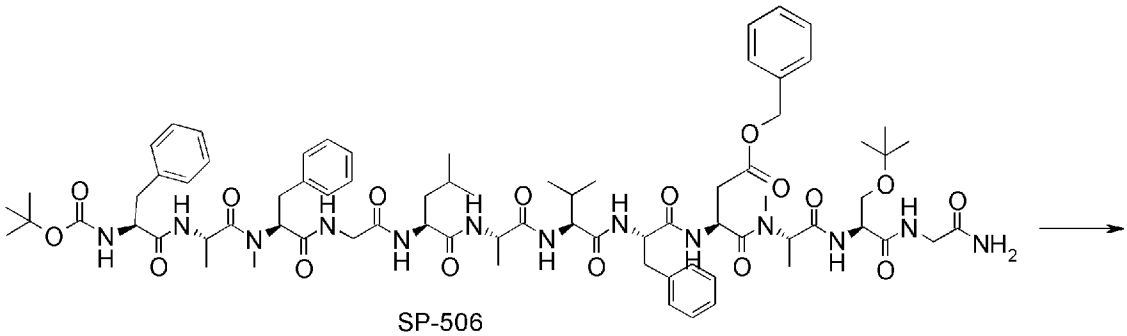
[0823] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２＿オキソエチル）アミノ）－３―（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）－１２，２７―ジベンジル―１８＿イソプチル＿２４＿イソプロピル＿２，２，６，９，１１，２１＿ヘキサメチル＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナアザドトリアコンタン－３２―チオ酸　Ｓ―ベンジル　(化合物SP―５０３）（７２．９ｍｇ、０．０５２ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物Ｐ＿１４７の合成と同様にして標題化合物（SP―５０４）（４７．３．ｍｇ、７３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ　＝１２５６．８（Ｍ－Ｈ）－

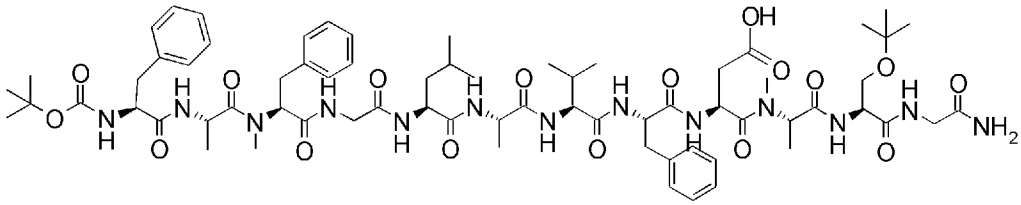
保持時間：０．５８分　(分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５)

[0824] （６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１８Ｓ．２１Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブトキシ）＿１―オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）＿６，１２，２７＿トリベンジル＿１８＿イソプチル＿２４＿イソプロピル＿２．２．９．１１，２１＿ペンタメチル－４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８．１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナアザドトリアコンタン－３２―酸　(Ｂｏｃ―Ｐｈｅ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－

Ａｓｐ-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ（ｔＢｕ）-Ｇｌｙ-ＮＨ２））（化合物SP—５０５）の合成



SP-506



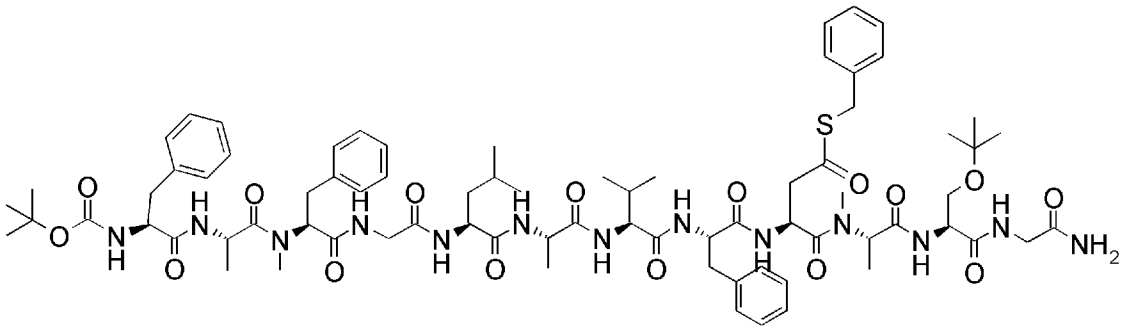
SP-505

[0825] 常法に従って合成した（６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-３０-（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２＿アミノ－２—オキソエチル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ—ブトキシ）－１—オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）—６，１２，２７＿トリベンジル＿１８＿イソプチル—２４—イソプロピル＿２，２，９，１１，２１—ペンタメチル＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８—ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９—ノナアザドトリアコンタン—３２—酸　ベンジル（Ｂｏｃ—Ｐｈｅ—Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｙ-Ｌｅｕ-Ａｌａ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ（０Ｂｎ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ（０ｔＢｕ）-Ｇｌｙ-ＮＨ２）（化合物SP＿５０６）（８３１ｍｇ，０．５６３ｍｍｏｌ）のメタノール（５ｍｌ）—酢酸エチル（５ｍｌ）溶液に窒素雰囲気下、ヒドロキシパラジウム/炭素（２７７ｍｇ、５０％ｗｅｔ．ｗ/ｗ）を加え、水素置換した後に室温で３．５時間攪拌した。その後、反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮し標題化合物（SP＿５０５）（６４８ｍｇ、８３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１３８２．６（M-Ｈ）-

保持時間：0．８０分　(分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５)

[0826] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-３０_(（（Ｓ）_１_(（（Ｓ）_１_(（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３_(ｔｅｒｔ―ブトキシ）_１―オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）(メチル）カルバモイル）_６，１２，２７_トリベンジル_１８_イソプチル－２４_イソプロピル_２，２，９，１１，２１―ペンタメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナオキソ－３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナアザドトリアコンタン_３２_チオ酸_Ｓ―ベンジル（Ｂｏｃ―Ｐｈｅ―Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｖ―Ｌｅｕ―Ａｌａ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ（ＳＢｎ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ（ｔＢｕ）-Ｇｌｖ-ＮＨ２）（化合物SP―５０７）の合成



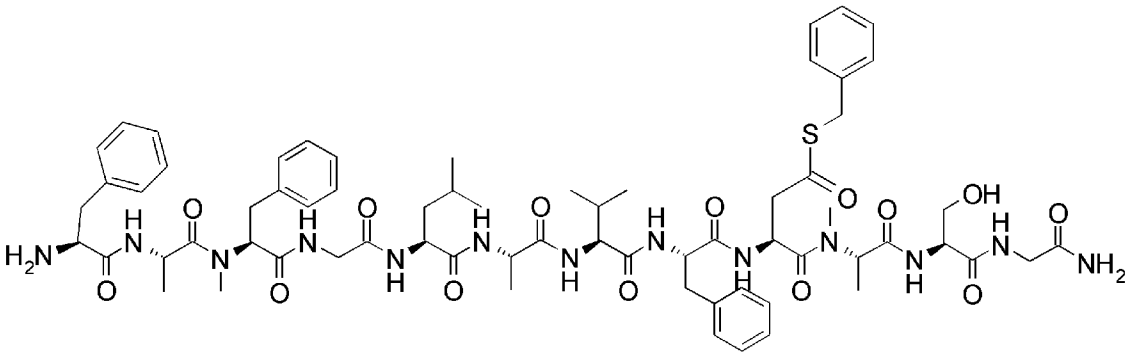
[0827] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-３０-（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ－２_オキソエチル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブトキシ）_１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）(メチル）カルバモイル）-６，１２，２７_トリベンジル_１８_イソプチル_２４_イソプロピル－２，２，９，１１，２１―ペンタメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナオキソ－３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナアザドトリアコンタン_３２_酸（化合物SP-５０５）（３４４．５ｍｇ、０．２４９ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物Ｐ_１４６の合成と同様にして標題化合物（SP_５０７）（１４３．８ｍｇ、

３９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１４９０．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９３分　(分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５)

[0828] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－ァミノ－３＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）ァミノ）＿３―ヒドロキシ－１＿オキソプロパン＿２＿ィル）ァミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）（メチル）カルバモイル）－６，２１―ジベンジル―１５＿イソプチル―９＿イソプロピル＿１２，２２，２４＿トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８＿フエニル－４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタァザォクタコサン－１―チォ酸＿Ｓ―ベンジル（Ｐｈｅ＿Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－ＭｅＡｌａ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－ＮＨ２）（化合物SP－５０８）の合成



[0829] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２＿オキソエチル）ァミノ）－３―（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－１―オキソプロパン－２―ィル）ァミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）（メチル）カルバモイル）－６，１２，２７＿トリベンジル＿１８＿イソプチル＿２４＿イソプロピル－２，２，９，１１，２１―ペンタメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナァザドトリアコンタン－３２―チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０７）（７２．１ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）を

原料とし、化合物Ｐ＿１４７の合成と同様にして標題化合物（SP―５０８）（５６．１ｍｇ、８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１３３２．７（Ｍ－Ｈ）－

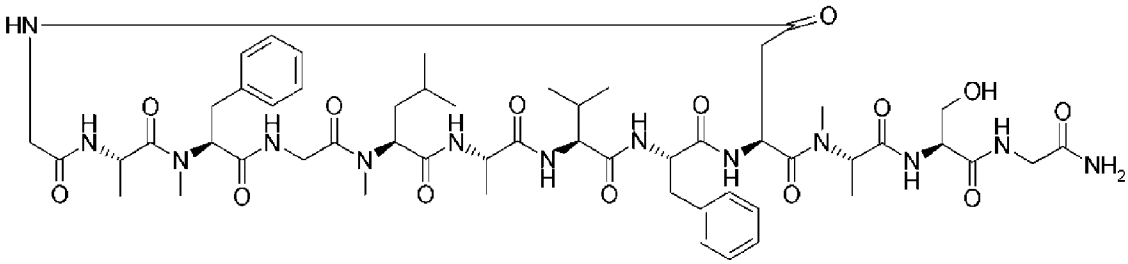
保持時間：０．６０分　(分析条件　ＳＱＤ　ＦＡＯ５)

[0830] １－１－２．環化モデル反応例

N末端がGLyである場合の反応例を示す。

(化合物P＿１３６)

（５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（＿(２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）－３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２＿ィル）アミノ）＿１＿ォキソプロパン―２＿ィル）―８，２３－ジベンジル－１４＿イソプチル－２０＿イソプロピル―Ｎ，５．７．１３，１７―ペンタメチル＿３，６．９．１２，１５．１８．２１．２４．２８－ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６．＿１９，＿２２，＿２５―ノナアザシクロォクタコサン＿２６＿カルポキサミドの合成



[0831] その１

４＿（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（0．０１８ｇ、０．１０ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（１０．１ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）を１００ｍＭのリン酸水素２ナトリウム水溶液（８０μＬ）およびＮＭＰ（１０μＬ）に溶解させた。この溶液に（４Ｓ，７Ｓ，１３Ｓ，１６Ｓ，１９Ｓ，２２Ｓ，２５Ｓ）＿１―アミノ―２５―（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿３―ヒドロキシ＿１―オキソプロパン＿２＿ィル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）（メチル）カルバモイル）＿７，２２―ジベンジル＿１３＿イソプチル―１９＿

イソプロピル_４，６，１２，１６—テトラメチル_２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３—オクタオキソ_３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４—オクタアザヘプタコサン—２７_チオ酸　Ｓ—ベンジル（化合物Ｐ-１４７）のＮＭＰ溶液（１０ｍＭ、１０μＬ、０．１０μｍｏｌ）を加えて、室温で５時間攪拌した。反応液をＬＣＭＳで分析し、標題化合物の生成を確認した。なお、標題化合物と原料（保持時間０．５８分、分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）およびＡｓｐのチオエステルが加水分解されたカルボン酸体（保持時間：０．５１分、分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ７４：１１：１５であった。結果を図３６に示す。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ　１１３４．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６４分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0832] その２

ベンゼンチオール（０．１１０ｍｇ、０．００１ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（０．２０２ｍｇ、０．００２ｍｍｏｌ）を１００ｍＭリン酸水素２ナトリウム水溶液（８０μＬ）およびＮＭＰ（１０μＬ）に溶解させた。この溶液に（４Ｓ，７Ｓ，１３Ｓ，１６Ｓ，１９Ｓ，２２Ｓ，２５Ｓ）-１—アミノ_２５_（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２—アミノ—２—オキソエチル）アミノ）_３—ヒドロキシ—１_オキソプロパン—２—イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）-７，２２—ジベンジル—１３_イソプチル_１９_イソプロピル_４，６，１２，１６—テトラメチル_２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３—オクタオキソ_３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４—オクタアザヘプタコサン—２７_チオ酸　Ｓ—ベンジル（化合物Ｐ—１４７）のＮＭＰ溶液（１ＯｍＭ、１０μＬ、０．１０μｍｏｌ）を加えて、室温で８時間攪拌した。反応液をＬＣＭＳで分析し、標題化合物の生成を確認した。なお、標題化合物と原料（保持時間０．５８分、分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）およびＡｓｐのチオエステルが加水分解されたカルボン酸体（保持時間：０．５０

分、分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）の生成比はＬＣＭＳのＵＶ工リァ比でおおよそ８９　:８　:３であった。結果を図３７に示す。

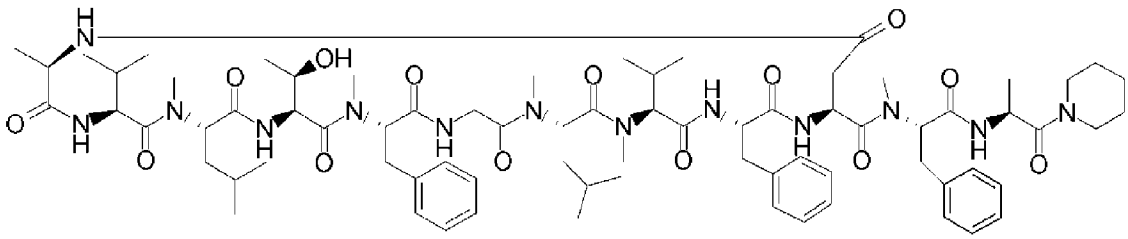
ＬＣＭＳ　:m/ ｚ　１１３４．６（M+ H）+

保持時間　:０．６３分　　(分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0833]　N末端がALaである場合の反応例を示す。

(化合物P_１３７）

（２Ｒ，５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ）-１４，２６―ジベンジル－１１_（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）－８，２０―ジイソプチル―５，２３―ジイソプロピル―Ｎ，２，７，１３，１９．２２―ヘキサメチル－３，６．９．１２，１５，１８，２１，２４．２７，３１―デカオキソーＮ_（（Ｓ）_１_ォキソ_１_（（（Ｓ）-１-ォキソ_１_（ピペリジン－１_ィル）プロパン_２_ィル）アミノ）_３―フエニルプロパン_２_ィル）－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８_デカァザシクロヘントリアコンタン－２９_カルボキサミドの合成



[0834]　その１

４_（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール　(8．９１ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）および トリエチルァミン　(5．０６ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）の水溶液　(２５从１）と　(３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-３０―アミノ_６，１８―ジベンジル－２１_（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）－１２，２４―ジイソプチル－９，２７―ジイソプロピル－１０，１３，１９，２５―テ トラメチル－３_（メチル（（Ｓ）-１―オキソ－１_（（（Ｓ）_１―オキソ－１－（ピペリジン－１－ィル）プロパン_２_ィル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_ィル）

カルバモイル）_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナオキソ_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナアザヘントリアコンタン－１－チオ酸　Ｓ－ベンジル（化合物Ｐ－１３５）のＮＭＰ溶液（５ｍＭ、２０μＬ、０．１μｍｏｌ）を混合し、さらに水（２５从Ｌ）とＮＭＰ（３ＯμＬ）を加え、５０度で終夜攪拌した。ＬＣＭＳ測定により、原料の消失とともに標題化合物の生成を確認した。なお、標題化合物とＡｓｐのチオエステルが加水分解されたカルボン酸体（保持時間：０．６８分、分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比で、おおよそ７２：２８であった。結果を図３８に示す。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　１４１７（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：１．０４分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0835] その２

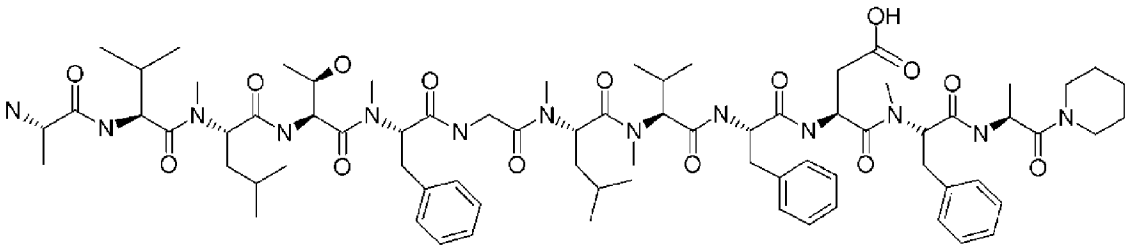
（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０－アミノ－６，１８－ジベンジル－２１－（（Ｒ）－１－ヒドロキシエチル）－１２，２４－ジイソプチル－９，２７－ジイソプロピル_１０，１３，１９，２５－テトラメチル－３_（メチル（（Ｓ）_１－オキソ－１－（（（Ｓ）－１－オキソ－１－（ピペリジン－１－イル）プロパン－２－イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）カルバモイル）_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナオキソ_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナアザヘントリアコンタン－１－ＩＩ　２－（エチルジスルファニル）_６_メチルフエニル（０．１６２ｍｇ，０．１ｕｍｏｌ）（化合物Ｐ_１３９）と１－ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（０．５７５ｍｇ、５ｕｍｏｌ）のＤＭＦ_４００ｍＭリン酸緩衝溶液（ｐＨ８．５）１：１混合溶液（９５ｕｌ）に１Ｍトリス（２_カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（５ｕｌ）を加え、室温で３０分攪拌した後、ＬＣＭＳを用いて反応を観測したところ、環化前駆体は完全に消失し、標題化合物Ｐ_１３７と加水分解体Ｐ_１４０が３：１（ＬＣＭＳ：ＵＶエリア比）で観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝１４１７．２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間 :1．０４分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

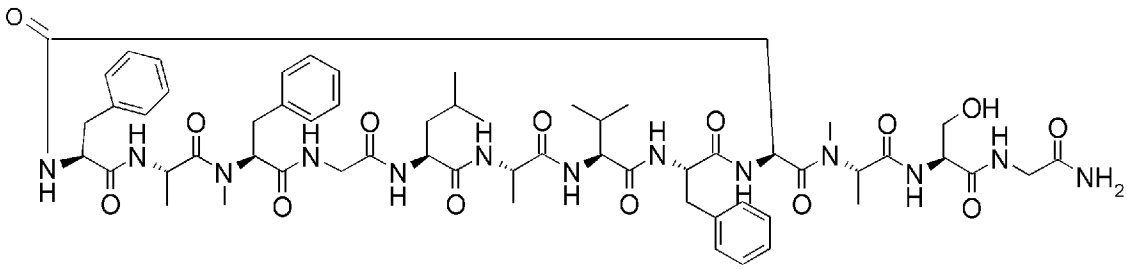
[0836] 加水分解体P_１４０

（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－３０―アミノ－６，１８―ジベンジル－２１―（（Ｒ）―１―ヒドロキシエチル）―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル－１０，１３，１９，２５―テトラメチル－３－（メチル（(S)－１－オキソ－１―（（（Ｓ）―１―オキソ－１－（ピペリジン－１―イル）プロパン－２－イル）アミノ）－３－フエニルプロパン－２－イル）カルバモイル）－５，８．１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―ノナオキソ－４，７．１０，１３，１６，１９，２２．２５．２８―ノナアザヘントリアコンタン－１―酸



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝１４３５．３（Ｍ－Ｈ）－

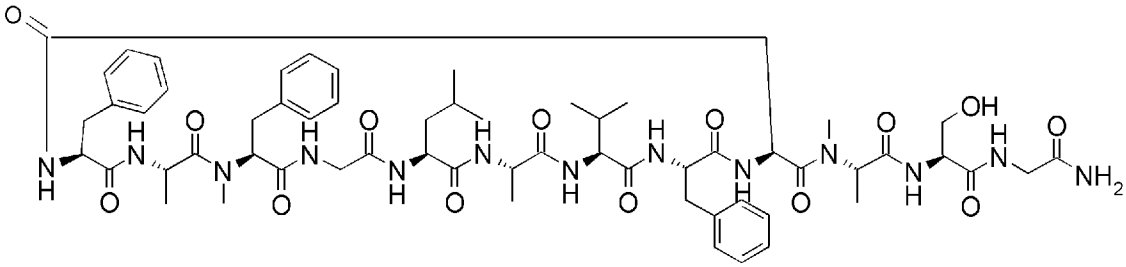
保持時間 :0．６７分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[0837] 

[0838] N末端がPheである場合の反応例を示す。

（２Ｓ，５S^8 Ｓ，１４ＳＪ ７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）－３―ヒドロキシ－１－オキソプロパン－２－イル）アミノ）－１―オキソプロパン－２－イル）－２．８．２３－トリベンジル－１４－イソプチル

＿２０＿イソプロピル＿Ｎ，５，７，１７―テトラメチル＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８－ノナオキソ＿１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―ノナアザシクロオクタコサン－２６―カルボキサミド（化合物SP＿５０９）の合成



[0839] ４－（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（１３．６ｕｌ　０．１Ｏｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（１３．９ｕｌ　０．１０ｍｍｏｌ）を１００ｍＭのリン酸水素２ナトリウム水溶液（８０μＬ）およびＮＭＰ（１０μＬ）に溶解させた。この溶液に（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）―２７―アミノ―３＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿３―ヒドロキシ＿１―オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）＿６，２１―ジベンジル＿１５＿イソプチル―９―イソプロピル－１２，２２，２４―トリメチル＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６－オクタオキソ－２８－フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オクタアザオクタコサン－１－チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０８）のＮＭＰ溶液（１０ｍＭ、１０从１、０．１０μｍｏｌ）と内部標準としてフタル酸のアセトニトリル溶液（５０ｍＭ、１．０μｌ）を加えて、３０度で３時間攪拌した。反応開始時のｐＨは９．７であった。反応液をＬＣＭＳで分析し、標題化合物の生成を確認した。３時間攪拌後で内部標準と原料のエリア面積比より転化率は９０％であり、標題化合物（SP―５０９）と加水分解体（化合物SP―５１０）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ３：２であった。

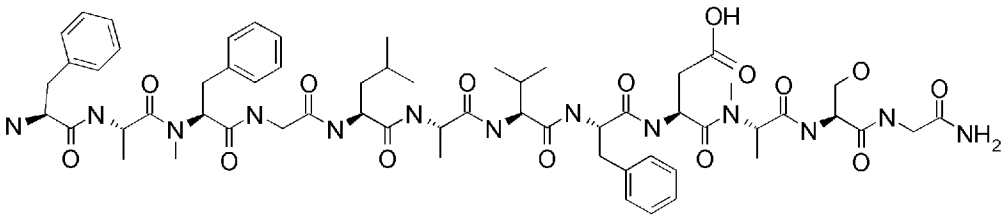
●標題化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１２１０．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：1．０４分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0840] ・加水分解体（化合物SP_５１０）

（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－ァミノ－３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―ァミノ－２―オキソエチル）ァミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン_２_ィル）ァミノ）_１_オキソプロパン_２_ィル）（メチル）カルバモイル）_６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタァザオクタコサン－１―酸

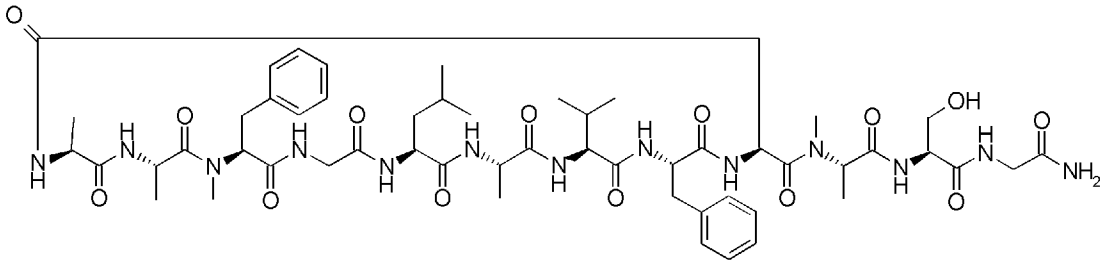


ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝１２２８．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[0841] モデルペプチドを用いたＰｕｒｅＳｙｓｔｅｍ（翻訳液）中での環化反応例その１

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―ァミノ_２―オキソエチル）ァミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―ィル）ァミノ）－１―オキソプロパン_２_ィル）－８，２３―ジベンジル－１４_イソプチル_２０―イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７―ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５_ノナァザシクロオクタコサン_２６_カルボキサミド（化合物SP_５１１）の合成



[0842] 4-（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（6.8μL、0.050mmol）およびトリエチルアミン（7.0μl、0.050mmol）を水（8.2μl）に溶解させ、チオール溶液を調整した。

（3S,6S,9S,12S,15S,21S,24S,27S）-27-アミノ_3_（（（S）-1-（（（S）-1-（（2-アミノ-2-オキソエチル）アミノ）_3-ヒドロキシ-1_オキソプロパン_2_イル）アミノ）_1_オキソプロパン_2_イル）（メチル）カルバモイル）_6,21-ジベンジル-15_イソプチル_9_イソプロピル_12,22,24-トリメチル-5,8,11,14,17,20,23,26-オクタオキソ_4,7,10,13,16,19,22,25-オクタアザオクタコサン_1_チオ酸 S-ベンジル（化合物SP-504）のNMP溶液（10mM、5.0μl 0.050μmol）に内部標準として4_プロピル安息香酸のNMP溶液（11mM、2.25μl）を加えた。次に翻訳用緩衝液（6.25μl）、PURESYSTEM(r) classic II Soに B（バイオコゥマー社、製品番号PURE2048C）（10μl）、20種の天然アミノ酸溶液（それぞれ5mM，2.5从l）を加えた。

なお翻訳用緩衝液の成分は8mM GTP，8mM ATP，160mMクレアチンリン酸，400mM HEPES-KOH pH7.6，800mM 酢酸カリウム，48mM 酢酸マグネシウム，16mMスペルミジン，8mM ジチオスレイトール，0.8mM 10-HCO-H4folate，12mg／ml E.coli MRE600（RNaseネガテイブ）由来tRNA（Roche社）である。これにトリス（2_カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（pH=7.5、1.25M、2.0从1）お

よび先に調整したチオール溶液を加えた。この時点での反応液のＰＨは７．８であった。

反応液を３０℃で２０時間攪拌した後、ＬＣ/ＭＳで分析し、標題化合物の生成を確認した。２０時間攪拌後の反応液のｐＨは９．４であった。また、標題化合物（SP_５１１）と加水分解体（化合物SP_５１２）との生成比はＵＶエリア比で１：１．６であった。

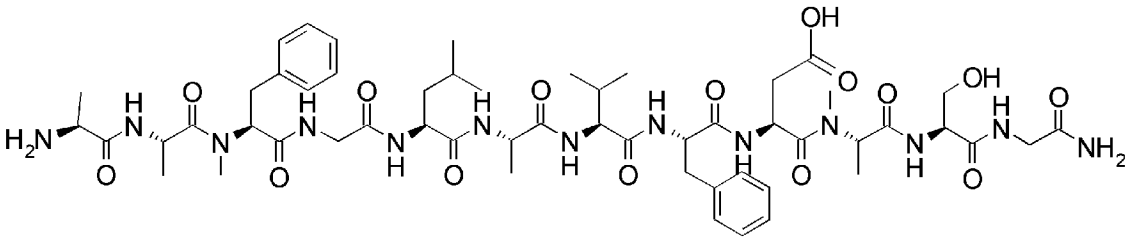
翻訳剤勿

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１１３４．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６４分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体（化合物SP—５１２）

（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－アミノー３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２—アミノー２—オキソエチル）アミノ）_３—ヒドロキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）_６，２１—ジベンジル—１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４—トリメチルー５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６—オクタオキソー４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５—オクタァザオクタコサン—１—酸

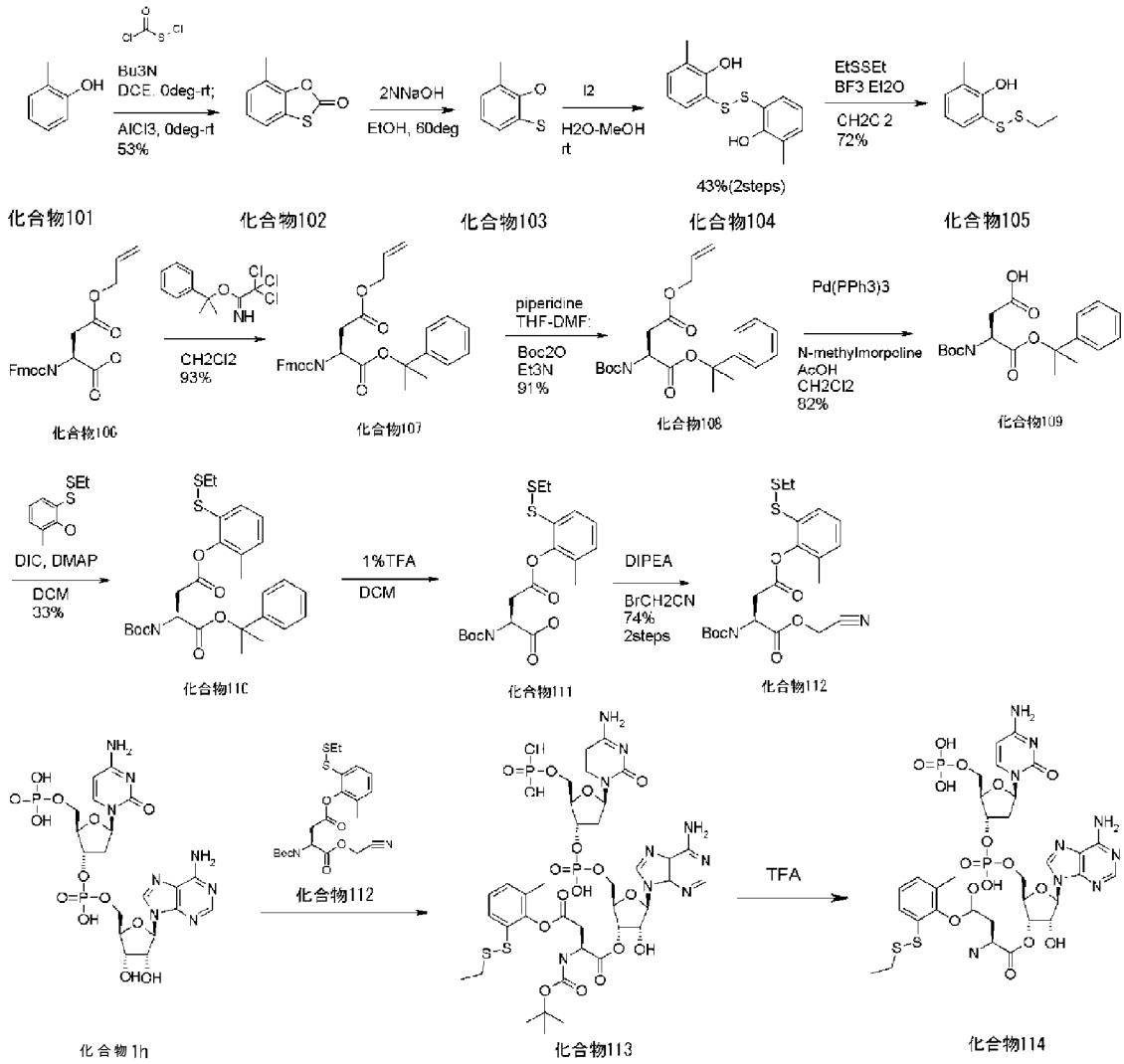


ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１１５２．５（Ｍ＋Ｈ）＋

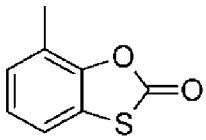
保持時間：０．４８分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0843] 以上示したとおり、Cys（反応補助基を有する）やGLy（α位に置換基が存在せず最も反応性が高い）に続き、ALaやPheでも水中で、翻訳可能なチオエステルをさらに活性化させる手法を用いて環化反応が進行することが明らかとなつた。翻訳液中でも反応進行を確認できた。

[0844] 1-1-3．環化用活性エステルを有したpdCpA-AAの合成



[0845] 7_メチルベンゾ「d］__「1,_3ｌォキサチオール_2_オン_(化合物10.2）の合成



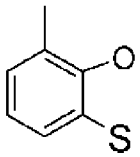
[0846] o—クレゾール（化合物101）（27.7mmol、3.00g）とトリプチルァミン（30.5mmol、7.35ml）のジクロロエタン（48mL）溶液に塩化クロロカルボニルスルフエニル（30.5mmol、2.58ml）を0℃で加え、室温で2時間攪拌した。その後、反応混合物に塩化アルミニウム（66.6mmol、8.88g）を0℃で加え、室温で終夜攪拌した。その後、反応混合物に水（10ml）を0度で加えた後

に、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液＝１００/ ０→３０/ ７０）にて精製し、７_メチルベンゾ［ｄ］［１，３］オキサチオール_２―オン（化合物１０２）（２．４６ｇ、５３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １６７ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0847] ２―メルカプト―６―メチルフェノール（化合物１０３）の合成

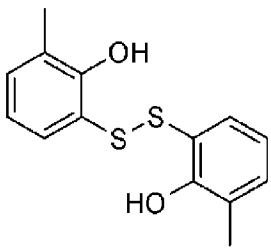


[0848] ７_メチルベンゾ［ｄ］［１，３］オキサチオール_２―オン（化合物１０２）（２．３４ｇ、１４．４４ｍｍｏｌ）のエタノール（１５ｍｌ）溶液に２Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１５ｍｌ）を加え、６０度で１時間攪拌した。その後、反応混合物に濃塩酸を０度で加えクエンチ後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、２_メルカプト_６_メチルフェノール（化合物１０３）（１．９０ｇ）を得た。この化合物はこれ以上の精製操作をせずに次の工程に使用した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １３９ （Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．７０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0849] 6,6'-ジスルファンジイルビス（2-メチルフェノール）（化合物１０４」_の合成



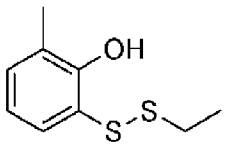
[0850] 上記で得られた２_メルカプト_６_メチルフェノール（化合物１０３）（１．９０ｇ）の水（１０ｍｌ）２層溶液に１２（１．７１７ｇ、６．７６

ｍｍｏｌ）のメタノール（7ｍｌ）溶液を加え、室温で１０分攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、有機層を飽和Ｎａ２Ｓ２０３水溶液、及び水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル＝１００/０→９２/８）にて精製し、６，６'―ジスルファンジィルビス（２―メチルフエノール）（化合物１０４）（１．６１ｇ、４３％（２工程））を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝２７７（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．９５分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0851] 2-(エチルジスルファニル)-6-メチルフエノール（化合物１０５）の合成

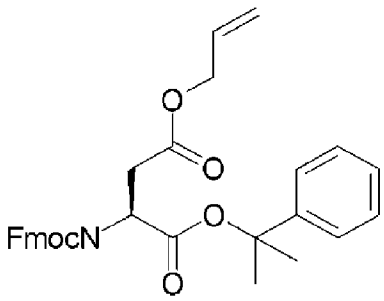


[0852] ６，６'―ジスルファンジィルビス（２―メチルフエノール）（化合物１０４）（１．６１ｇ、５．７８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（３０ｍｌ）溶液に二硫化ジエチル（１４．２４ｍし　１１６ｍｍｏｌ）とＢＦ３．０Ｅｔ２（１４．６６ｍｍｌ，　１６．４２ｍｍｏｌ）を加え、室温で5時間攪拌した。その後、反応混合物に飽和ＮａＨＣ０３溶液を0度でゆっくり滴下しクエンチ後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その後、有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル＝１００/０→９０/１０）にて精製し、２_（エチルジスルファニル）_６_メチルフエノール（化合物１０５）（１．６７ｇ、７２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝１９９（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．９２分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0853] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)コハク酸 1-は-フエニルプロパン-2-ゴル）4-アリル（化合物１０７）の合成

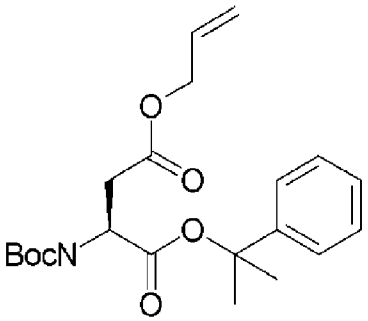


[0854] （Ｓ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_４_（アリルオキシ）_４_オキソブタン酸（化合物１０６）（１．８０ｇ、４．５５ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（４０ｍｌ）溶液に常法により別途合成した２，２，２―トリクロロアセトイミド酸２_フエニルプロパン―2―イル（２．１７ｇ、７．７４ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル＝１００/０→６５/３５）にて精製し、（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン－９―イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）コハク酸１－（２―フエニルプロパン_２_イル）４―アリル（化合物１０７）（２．１７ｇ、９３％）を得た。

ＬＣ保持時間：１．１２分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

^{1}Ｈ_ＮＭＲ（Ｖａｒｉａｎ４００-ＭＲ，４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）Ｓｐｐｍ７．７６（２Ｈ，ｄ，７．６Ｈｚ），７．４９（２Ｈ，ｄ，７．２Ｈｚ），７．４１-７．２４．（９Ｈ，ｍ），５．９０（１Ｈ，ｍ）５．７７（１Ｈ，ｄ，８．４Ｈｚ），５．２９（２Ｈ，ｍ），４．６２（３Ｈ，ｍ），４．３７（２Ｈ，ｍ），４．２１（１Ｈ，ｔ，６．８Ｈｚ），３．０８（１Ｈ，ｄｄ，１７．２，４．４Ｈｚ），２．９０（１Ｈ，ｄｄ，１７．２，４．８Ｈｚ），１．８０（３Ｈ，ｓ），１．７８（３Ｈ，ｓ）

[0855] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）コハク酸１－」２_フエニルプロパン_２_イル）４―アリル（化合物１０８）の合成

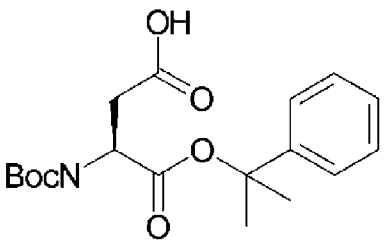


[0856] （Ｓ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）コハク酸 １－（２_フエニルプロパン_２_イル） ４―アリル （化合物１０７）（１．０３ｇ、２．ＯＯｍｍｏｌ）のＴＨＦ（６ｍｌ）－ＤＭＦ（１．５ｍｌ）溶液にピペリジン （０．２９７ｍし ３．００ｍｍｏｌ）を加え、室温で3時間半攪拌した。その後、反応混合物に二炭酸ジ―ｔｅｒｔ―ブチル （１．３１ｇ、 ６．ＯＯｍｍｏｌ）とトリエチルアミン （０．８３７ｍし ６ｍｍｏｌ）を加え室温で１５分攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー （１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→０/ １００）にて精製し、 （Ｓ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）コハク酸 １－（２_フエニルプロパン_２_イル） ４_アリル （化合物１０８）（７１０ｍｇ、９１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ ｚ ＝ ３９０（Ｍ－Ｈ）－

保持時間 ：０．６３分 （分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0857] （Ｓ）－３－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_４―オキソ―４－（（２_フエニルプロパン_２_イル）オキシ）ブタン酸 （化合物１０９） の合成



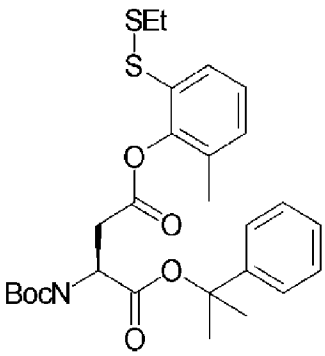
[0858] （Ｓ）―２―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）コハク酸 １_（２―フエニルプロパン_２_イル） ４―アリル （化合物１０８）（７

１０ｍｇ、１．８１ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（２０ｍｌ）―酢酸（1．０８ｍｌ）＿Ｎ―メチルモルホリン（0．５４１ｍｌ）溶液にＰｄ（Ｐｈ３Ｐ）４（２１０ｍｇ、０．１８１ｍｍｏｌ）を加え、室温で３時間半攪拌した。その後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール＝１００/０→３０/７０）にて精製し、（Ｓ）＿３＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）＿４＿オキソ＿４＿（（２―フエニルプロパン－２＿ィル）オキシ）ブタン酸（化合物１０９）（５２５ｍｇ、８２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝３５０（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：0．８０分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[0859] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）コハク酸＿１－＿（２＿フエニルプロパン＿２＿ィル）＿４＿（２－（エチルジスルファニル））＿６＿メチルフエニル）＿（化さ物１＿１０）＿のさ成



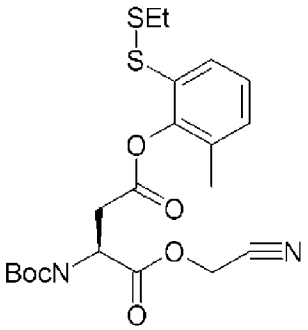
[0860] （Ｓ）－３－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）＿４＿オキソ－４－（（２＿フエニルプロパン＿２＿ィル）オキシ）ブタン酸（化合物１０９）（４９５ｍｇ、１．４１ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（７ｍｌ）溶液に２＿（エチルジスルファニル）＿６＿メチルフエノール（化合物１０５）（４２３ｍｇ、２．１１ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ'―ジイソプロピルカルボジイミド（0．３２９ｍｌ，２．１１ｍｍｏｌ），Ｎ，Ｎ―ジメチルピリジン―4―アミン（３４．４ｍｇ，０．２８２ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。その後、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィ

-（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール＝７０/ ３０→０/ １００）にて精製し、(S)-2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)コハク酸 1-(2_フエニルプロパン_2_イル) 4_(2-(エチルジスルファニル)_6_メチルフエニル) (化合物１１０)（２４９ｍｇ、３３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z = ５３２（M-H）-

保持時間：１．１５分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0861] (S)-2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)コハク酸 4-(2-(エチルジスルファニル)_6_メチルフエニル) 1_(シアノメチル) (化合物112)の合成

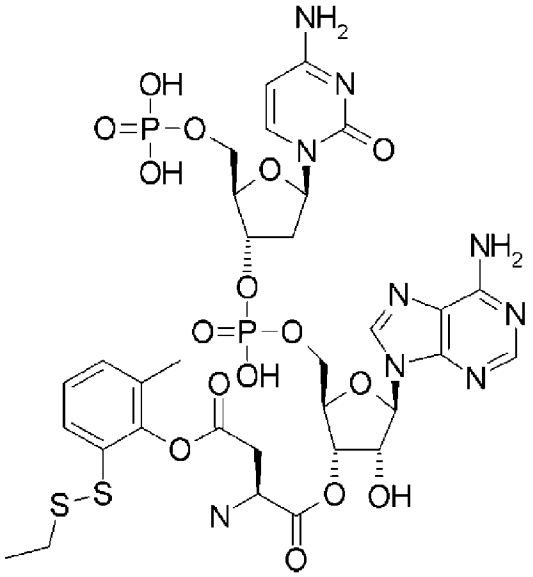


[0862] (S)—2—((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)コハク酸 1-(2_フエニルプロパン_2_イル) 4_(2-(エチルジスルファニル)_6_メチルフエニル) (化合物１１０)（２４０ｍｇ、０．４５０ｍｍｏｌ）のジクロロメタン (4ｍｌ)溶液にトリフルオロ酢酸 (０．０４０ｍｌ，０．５１９ｍｍｏｌ)を加え、室温で1時間半攪拌し、さらにトリフルオロ酢酸 (０．０４０ｍｌ，０．５１９ｍｍｏｌ)を加え、室温で1時間半攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣のプロモアセトニトリル (４．７０ｍｌ)溶液にＤＩＰＥＡ（０．２５９ｍｌ，１．４９ｍｍｏｌ）を加え、室温で１０分攪拌し、反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル＝１００/ ０→５０/ ５０)にて精製し、(S)-2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)コハク酸 4-(2-(エチルジスルファニル)_6_メチルフエニル) 1-(シアノメチル) (化合物１１２)（１５１ｍｇ、７４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４５３（M- H）-

保持時間 :1．０４分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0863] （２Ｓ）—2—アミノコハク酸 4—（2- （エチルジスルファニル）－６—メチルフェニル） 1_ _（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- 2- （（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- 5- （4—アミノー2_オキソピリミジン_ 1_（2H）_—ィル）_ 2_ _（（ホスホノオキシ）メチル）テ トラヒ ドロフランー3—ィル）オキシ） (ヒ ドロキシ）ホスホ リル）オキシ）メチル）_ 5_ _（6_ _ァミノー９Ｈ—プ」ン 9 －ィル） 4_ _ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフラン_ 3_ィル） (化合物 1_１４）_の合成



[0864] 緩衝液Ａ（２９．２ｍｌ）にリン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- 5- （4—アミノー2_オキソピリミジン_ 1（2H）—ィル）_ 3_ （（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- 5- （6—アミノ_ ９Ｈ_プリンー９—ィル）－３，４—ジヒ ドロキシテ トラヒ ドロフランー２—ィル）メトキシ）（ヒ ドロキシ）ホスホ リル）オキシ）テ トラヒ ドロフラン_ ２_ィル）メチル（ｐｄＣｐＡ，化合物１ｈ）（４９．Ｏｍｇ、０．０７７ｍｍｏｌ）の水溶液 (1．５２ｍｌ）と (S）_２_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）アミノ）コハク醫 4- （2- （エチルジスルファニル）_６_メチルフエニル） 1－（シァノメチル）（１４０ｍｇ、０．３０８ｍｍｏｌ）のテ トラヒ ドロフラン (0．７６４ｍｌ）溶液を加え、室温で１時間半攪拌した。そ

の後、トリフルオロ酢酸 (0．３９６ｍｌ 5．３７ｍｍｏｌ) を加えた後に、凍結乾燥させた。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液＝１００/ ０→５０/ ５０) にて精製し、 (２Ｓ) _２_ ((ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)コハク酸 ４- (２- (エチルジスルファニル)_６―メチルフェニル) １_ ((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)- ２- (((((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)- ５- (４―アミノ―２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)-イル)_２_ ((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン―３―イル)オキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_５_ (６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル)―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル)とＮ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン_１_アミニウム の混合物を得た。得られた混合物をトリフルオロ酢酸 (0．１０ｍｌ) に溶解させ、１０分間室温攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液＝１００/ ０→６０/ ４０) にて精製し、 (２Ｓ) _２―アミノコハク酸 ４_ (２―(エチルジスルファニル)_６_メチルフェニル) １- ((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)- ２- (((((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)- ５- (４―アミノ―２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)_２- ((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_３_イル)オキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_５_ (６―アミノ_９Ｈ_プリン_９_イル)_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_３_イル) (化合物１１４) (２．９ｍｇ， ４０％) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) ｍ/ｚ ＝ ９３２ (Ｍ- Ｈ)-

保持時間 :０．７０分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[0865] ２．翻訳されたペプチドでのアミド化反応

翻訳合成後の反応補助基を利用しないアミド化反応をTOF-MSにて生成を確認した。

２- １． 転写によるｔＲＮＡ(ＣＡ欠損)の合成

鋳型ＤＮＡ（配列番号Ｄ＿４０）から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega 社，Ｐ１３００）を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNAG LuAAG (-CA)（配列番号Ｒ—４０）を合成し、RNeasy Mini kit（Qiagen 社）により精製した。

[0866] 配列番号Ｄ—４０（配列番号：６４）

tRNAG LuAAG (-CA) DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTAAGACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0867] 配列番号Ｒ＿４０（配列番号：６５）

tRNAG LuAAG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

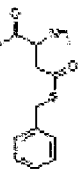
[0868] 2-2.側鎖カルボン酸が活忡エステル化されたアミノアシル化DdCDA（化合物1i＿ＩＤ）とｔＲＮＡ（ＣＡ欠損）（配列番号：R-40）のLigationによるアミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—７—A)の合成

５０μM転写tRNAG LuAAG (-CA)（配列番号Ｒ—４０）１０从Ｌに、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP) 2トし、Nuclease free water 4从1を加え、９５℃で２分間加熱した後、室温で5分間放置し、ｔＲＮＡのリフォールデイングを行った。２０ｕｎｉｔ／μＬのＴ４ＲＮＡリガーゼ（New England Bio Lab. 社）2从1および、５ｍＭの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化ｐｄＣｐＡ（化合物１ｉ—ID）のＤＭＳＯ溶液２从1を加え、１５℃で４５分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液２０从1に、３Ｍ酢酸ナトリウム４从1と１２５ｍＭヨウ素（水：ＴＨＦ＝１：１溶液）２４μＬを加え、室温で１時間、脱保護を行った。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—７—A)は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—７—A)は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウムに溶解した。

[0869] 化合物ＡＴ—７＿Ａ（配列番号：６６）

Asp(SBn) - tRNAG LuAAG

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaag
ACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGCC-dCA



[0870] 2-3. 側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノ酸を用いた翻訳合成

側鎖カルボン酸をチオエステルにより活性化したァスパラギン酸誘導体でアミノアシル化されたｔＲＮＡを、無細胞翻訳系に加えて翻訳を開始することにより、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。具体的には、翻訳液，1ｏ（ｖ/ｖ）ＲＮａｓｅｉｎ Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ (Promega 社，Ｎ２１１１)，１ｍＭ ＧＴＰ，１ｍＭ ＡＴＰ，２０ｍＭクレアチンリン酸，５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ-ＫＯＨ ｐＨ７．６，１００ｍＭ 酢酸カリウム，６ｍＭ 酢酸マグネシウム，２ｍＭスペルミジン，１ｍＭ ジチオスレイトール，０．１ｍＭ １０-ＨＣＯ-Ｈ４ｆｏｌａｔｅ，１．５ｍｇ/ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社），４μｇ/ｍｌ クレアチンキナーゼ，３μｇ／ｍｌ ミオキナーゼ，２ｕｎｉｔ/ｍｌ 無機ピロフォスファターゼ，１．Ｉμｇ／ｍｌ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，０．６μＭ メチオニルｔＲＮＡ トランスフオルミラーゼ，０．２６μＭ ＥＦ＿Ｇ，０．２４μＭ ＲＦ２，０．１７μＭ ＲＦ３，０．５μ,Ｍ ＲＲＦ，２．７μＭ ＩＦ１，０．４μＭ ＩＦ２，１．５μ,Ｍ ＩＦ３，４０μ,Ｍ ＥＦ-Ｔｕ，９３μＭ ＥＦ＿Ｔｓ，１．２μ,Ｍ リボソーム，０．７３μＭ ＡｌａＲＳ，０．０３μＭ ＡｒｇＲＳ，０．３８μ,Ｍ ＡｓｎＲＳ，０．１３μＭ ＡｓｐＲＳ，０．０２μＭ ＣｙｓＲＳ，０．０６μ,Ｍ ＧｌｎＲＳ，０．２３μＭ ＧｌｕＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＧｌｙＲＳ，０．０２μＭ ＨｉｓＲＳ，０．４μＭ ＩｌｅＲＳ，０．０４μ,Ｍ ＬｅｕＲＳ，０．１１μＭ ＬｙｓＲＳ，０．０３μＭ

MetRS, 0.68μM PheRS, 0.16μM ProRS, 0.04μ,M SerRS, 0.09μM ThrRS, 0.03μM TrpRS, 0.02μ,M TyrRS, 0.02μM ValRS (自家調製タンパクは基本的にはHisタグ付加タンパクとして調製した))に、1μM鋳型RNA、それぞれの鋳型DNAにコードされているタンパク質性アミノ酸群をそれぞれ250μMずつ、ならびに50μMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化tRNA (化合物AT—7—A) を翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0871] 翻訳産物はマトリックスとしてα_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸を用いてMALDI—MSスペクトルを測定して同定した。

[0872] 2-4._ベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチド_(化合物P—141)の翻訳合成

1μ,M 鋳型RNAMgtp_R (配列番号R_41 (配列番号:67)) に、0.25mM GLy, 0.25mM Pro, 0.25mM Arg, 0.25mM Thr, 0.25mM Tyr および、50μM Asp(SBn) —tRNAGLuAAG (化合物AT_7_A) を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳反応物を、SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、MALDI—MSで分析した。その結果、開始メチオニン直後のGLyから翻訳開始された、N末端α—アミノ基とチオエステルを含むペプチドP-141 (図39、ピーク1)、及びそのGLy直後に位置するThrから翻訳開始されたペプチドP-142 (図39、ピークΠ) が主生成物として観測された (図39)

[0873] 配列番号 R_41 (配列番号:67)

Mgtp_R RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugGGUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUGGCGGCuaagcuucg

[0874] ペプチド配列P_141

GLyThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Ly

[0875] ペプチド配列P_142

ThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Ly

[0876] MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1286. 6 (配列P- 1 4 1 に対応するペプチド。Ca Lc. 1286. 6)

m/z : [H+M] + = 1229. 6 (配列P- 1 4 2 に対応するペプチド。Ca Lc. 1229. 6)

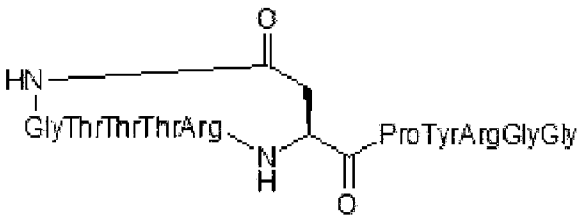
[0877] 2 - 5 . 翻訳ペプチドP- 1 4 1上のチオエステルとN末端α—アミノ基を用いたペプチドのアミド環化実験

前述の翻訳反応物P—141を含む翻訳溶液3. 5 μL、1从1チオフエノール溶液 (5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール、5M トリエチルアミンを等量混合したもの)、0. 5从1 500mM トリカルボキシエチルホスフィン溶液 (pH7. 5)を混合し、50℃で2時間保温した。その結果、出発物質であるP—141のピークは消失し、代わりにN末端α—アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物P- 1 4 3 に相当するピークを観測した (図40、ピークI)。

[0878] ペプチド配列P_143 (配列番号 :68)

GLyThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG LyのN末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物

MALDI-MS :m/z : [M+H] + = 1162. 4 (Ca Lc. 1162. 6)



[0879] 2 - 6 . Initiation read through 法を用いた複数種の非Cys残基N末端アミノ酸含有ペプチド合成と、それを用いた反応補助基を利用しないペプチド環化

側鎖カルボン酸をチオエステルにより活性化したアスパラギン酸誘導体でアミノアシル化されたtRNAと、開始メチオニンを除いたタンパク質性アミノ酸混合物を無細胞翻訳系に加えて翻訳することで、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。具体的には、翻

訳液，1％（v／v）RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社，N2111），1mM GTP，1mM ATP，20mMクレアチンリン酸，50mM HEPES-KOH pH7.6，100mM 酢酸カリウム，6mM 酢酸マグネシウム，2mMスペルミジン，0.1mM 10-HCO-H4folate，1.5mg/ml E.coli MRE600（RNaseネガティブ）由来tRNA（Roche社），4μg/ml クレアチンキナーゼ，3μg／ml ミオキナーゼ，2unit/ml 無機ピロフォスファターゼ，1.1μg/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，0.6μM メチオニルtRNA トランスフォルミラーゼ，0.26μM EF_G，0.24μM RF2，0.17μM RF3，0.5μM RRF，2.7μM IF1，0.4μM IF2，1.5μM IF3，40μM EF-Tu，93μM EF-Ts，1.2μM リボソーム，0.73μM AlaRS，0.03μM ArgRS，0.38μM AsnRS，0.13μM AspRS，0.02μM CysRS，0.06μM GlnRS，0.23μM GluRS，0.09μM GlyRS，0.4μM IleRS，0.04μM LeuRS，0.11μM LysRS，0.03μM MetRS，0.68μM PheRS，0.16μM ProRS，0.04μM SerRS，0.09μM ThrRS，0.03μM TrpRS，0.02μM TyrRS，0.02μM ValRS（自家調製タンパクは基本的にはHisタグ付加タンパクとして調製した））に、1μM 錠型RNA、タンパク質性アミノ酸群をそれぞれ250μMずつ、ならびに50μMの側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化tRNA（化合物AT—7-A）を翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0880] 翻訳産物はマトリックスとしてα_シアノ_4—ヒドロキシケイ皮酸を用いてMALDI—MSスペクトルを測定して同定した。

[0881] 2-7．N末端Phe，_ALaとベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を含むペプチド_(P_D1._P-D2）の翻訳合成

1μM 鋳型RNA 0T89 (配列番号RM_D1) に、O.25mM Phe, 0.25mM GLy, 0.25mM Pro, 0.25mM Arg, 0.25mM Thr, 0.25mM Tyr および、50μM Asp(SBn) - tRNAG LuAAG (化合物AT—7—A) を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。同様に別容器にて1μM 鋳型RNA OT90 (配列番号RM—D2) に、0.25mM Ala, 0.25mM GLy, 0.25mM Pro, 0.25mM Arg, 0.25mM Thr, 0.25mM Tyr および、50μM Asp(SBn) - tRNAG LuAAG (化合物AT-7-A) を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた2つの翻訳反応物1从1にそれぞれ9从1の0.2%トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLずつをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1μLのCHCA溶液 (10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケイ皮酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸溶液) と混和し、プレート上乾固した。MALDI—MS分析の結果、RM_D1、RM—D2それぞれの鋳型から、開始メチオニン直後のPheもしくはAlaから翻訳開始された望みのペプチドP—D1 (図44、ピークI) 及びペプチドP—D2 (図45、ピークI) が主生成物として観測された。

[0882] 配列番号RM—D1 (配列番号 :78)

0T89 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugUUUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUGGCGGCuaagcuucg

[0883] ペプチド配列P—D1

PheThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Ly

[0884] 配列番号RM—D2 (配列番号 :79)

0T90 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugGCUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUGGCGGCuaagcuucg

[0885] ペプチド配列P_D2

ALaThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Ly

[0886] MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1376. 4 (配列P_D1に対応するペプチド。Ca Lc. 1376. 6)

m/z : [H+M] + = 1300. 4 (配列P_D2に対応するペプチド。Ca Lc. 1300. 6)

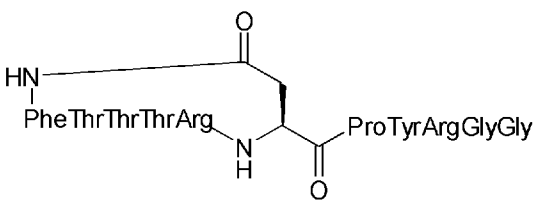
[0887] 2-8. 翻訳ペプチドP-D1、P_D2上のチオエステルとN末端α—アミノ基を用いたペプチドのアミド環化実験

前述の翻訳反応物P_D1を含む翻訳溶液3. 5μLそれぞれに、1μLチオフエノール溶液 (5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール、5Mトリエチルァミンを等量混合したもの)、0. 5从1 500mM トリカルポキシエチルホスフィン溶液 (pH7. 5)を混合し、50℃で2時間保温した。得られた反応液2μLに12μLの2% トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDI ターゲットプレート上に載せた後、1从LのCHCA溶液 (10mg/mL α—シアノ—4—ヒドロキシケィ皮酸、50% アセトニトリル、0. 1% トリフルオロ酢酸溶液)と混和し、プレート乾固した後、MALD1—MSにて解析を行った。その結果、出発物質であるP—D1のピークは消失し、代わりにN末端α—アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物P-D3に相当するピークを観測した (図44、ピークII)。前述の翻訳反応物P_D2を含む翻訳溶液についても、上記と同様な操作を行いMALDI—MSにて解析したところ、N末端α—アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物P-D4に相当するピークを観測した (図45、ピークΠ)

[0888] ペプチド配列P_D3 (配列番号 :80)

PheThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Lyの N末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物

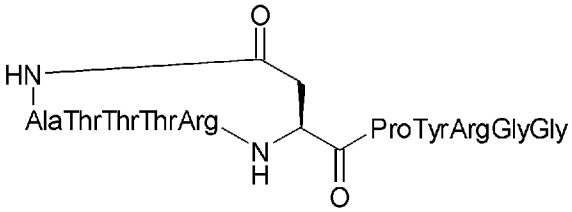
MALDI-MS :m/z : [M+H] + = 1252. 3 (Ca Lc. 1252. 6)



[0889] ペプチド配列P_D4 (配列番号 :81)

ALaThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Lyの N 末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物

MALDI-MS m/z : [M+H] + = 1176. 3 (Ca Lc. 1176. 6)



[0890] 2 - 9 . 環化反応条件におけるRNA安定性評価

反応補助基を利用しないアミド化環化反応条件においてRNAが分解しないことを評価するため、反応条件に伏したRNAをゲル電気泳動により解析した。

1uM Mgtp_R RNA (配列番号R_41) を含む溶液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mMクレアチンリン酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 酢酸カリウム, 6mM 酢酸マグネシウム, 2mMスペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, 0. 1mM 10-HCO-H4folate,) 3. 5μL、1从1チオフエノール溶液 (5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール、5M トリエチルァミンを等量混合したもの)、0. 5从1 500mM トリカルボキシエチルホスフィン溶液 (pH7. 6)を混合し、50℃で0. 5~2時間保温した。その後反応液をRNeasy mine Lute(q iagen社)により精製した。環化条件に付していない対照実験として、保温時間をなくしたもの、チオフエノール溶液の代わりに水を加えたもの、それらに加えて精製操作を行わなかったものも同様の操作を施した。得られたRNA溶液は、6M尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った後、SYBR goLd nuc leic acid sta in (Inv itrogen社)により染色を行った。

その結果、対象実験として環化条件に付していないRNA (Lane 1—3)と比べても、反応条件に付したRNA(Lane 6)はバンドパターンやバンド濃さに変化がなく、環化反応条件においてもRNAが安定であることが明らかとなった (図46)。

[089 1] 本実験より以下の事柄が明らかとなった。 (1) Intiation read through法はCysやGLyと同様にALaやPheであっても有効に機能し、選択的に望みのペプチド配列が翻訳できることが明らかとなつた。 (2) ALa、 Pheともに望みの環化反応を進行させることができた。翻訳液中でCys (反応補助基有) やGLy (α位置換基無のため最も反応性高い) 以外のアミノ酸でもチオエステルを経由したアミド化反応が進行することを初めて示すことができた。本反応を進行させる目的には翻訳液中で安定な活性エステルを翻訳合成させ、その活性エステルを含む交差ユニットのC末端側となりのユニットのアミノ酸にはN—メチル化などのN-アルキル化されたユニット (プロリンも含む) が選択されることが必要である (アスパルチミド形成を避ける目的)。 (3) 主な副生成物はチオエステル部位の加水分解であった。 (4) 本反応条件ではRNAは安定に存在させることができ、ペプチドーRNA複合体でも、同様の反応が進行させることができる。

[0892] 3-1. 環化ほ応条件の最 商化

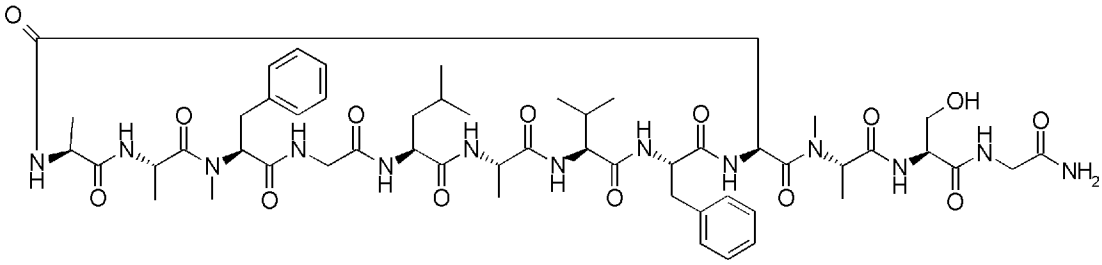
翻訳ペプチドでの環化反応例と合成ペプチドでの翻訳合成液中での反応例では類似の結果を得たことから、合成ペプチドでの翻訳合成液中での反応収率向上が確認されれば、翻訳ペプチドの環化反応収率向上が得られたと解釈できる。以下、合成ペプチドでの翻訳液中での反応最適化検討を行った。

[0893] 3-1-1. pHの効果

pHを9から10付近で反応を実施していたが、pH7.8, 8.1, 9.2の3点で環化反応を行った結果、pHが小さい方が環化:加水分解の比が目的の方向に向上することが明らかとなつた。

[0894] (2S, 5S, 8S, 14S, 17S, 20S, 23S, 26S)-N-((S)-1-((S)-1-((2—アミノ_2—オキソエチル)アミノ)—3—ヒドロキシー1—オキソプロパンー2—イル)アミノ)ー1—オキソプロパン_2_イル)ー8,_23—ジベンジルー14_イソプチル_20—イソプロピルーN, 2, 5, 7, 17—ペンタメチルー3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 28_ノナオキソ_1,_4ュ7, 10, 13」

16，19，22，25_ノナアザシクロオクタコサン_26_カルボキサミド（化合物SP—511）の合成



[0895] 4-（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（13.6uし0.10mmol）およびトリエチルアミン（13.9uし0.10mmol）を100mMのリン酸水素2ナトリゥム水溶液（80μ門およびNMP（10μ，l）に溶解させた。この溶液に（3S，6S，9S，12S，15S，21S，24S，27S）—27—アミノ—3_（（（S）-1-（（（S）-1-（（2—アミノ_2—オキソエチル）アミノ）_3—ヒドロキシ_1—オキソプロパン_2_イル）アミノ）_1_オキソプロパン_2_イル）（メチル）カルバモイル）_6，21—ジベンジル_15_イソプチル—9—イソプロピル-12，22，24—トリメチル_5，8，11，14，17，20，23，26_オクタオキソ-28_フエニル—4，7，10，13，16，19，22，25_オクタアザオクタコサン—1_チオ酸 S—ベンジル（化合物SP—504）のNMP溶液（10mM、10μ1、0.1Oμmol）と内部標準として4_プロピル安息香酸のアセトニトリル溶液（50mM、1.0μl）を加え、30度で終夜撹拌した。反応開始時のpHは9.0であった。反応液をLCMSで分析し、標題化合物の生成を確認した。2時間撹拌後の転化率は内部標準とのLCMS—UVエリア比より72%で、標題化合物（SP_511）と加水分解体（化合物SP_512）の生成比（LCMSのUVエリア比による）は12：1であった。さらに、4時間後は転化率は81%、標題化合物（SP—511）と加水分解体（化合物SP—512）の生成比（LCMSのUVエリア比による）は8：1であった。そして、終夜撹拌後、原料化合物（SP—504）は消失したが、標題化合物（SP_511）と加水分解体（化合物SP—512）の生成比（LCMSのUVエリ

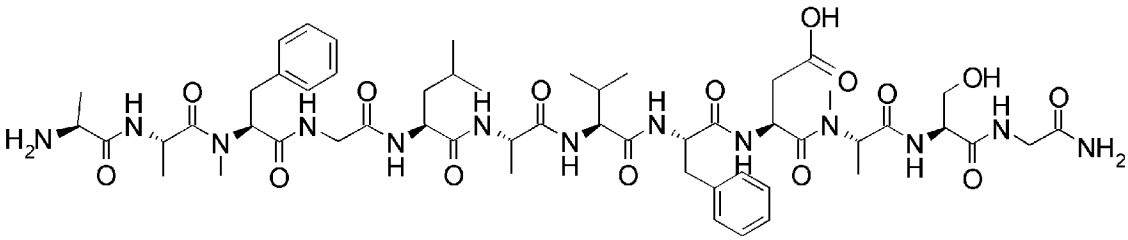
ァ比及びマス強度比の変化 (6時間後データと終夜攪拌後データの比較）による）は3 :1であった。つまり、反応時間の延長と供に、標題化合物の加水分解に対する選択性は低下する結果となった (表１２）。終夜攪拌後の反応液のpHを測定するとｐH１０．０となっていた。

•標題化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ z =１１３２．３（M- H）-

保持時間 :0．６４分 (分析条件３０Ｄ「六0５)

・加水分解体 (化合物SP—５１２)



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z =１１５０．４（M- H）-

保持時間 :0．４９分 (分析条件３０Ｄ「六0５)

[0896] [表12]

時間	0時間	1時間	2時間	4時間	6時間	終夜
転化率(%)	0	43	72	81	99	100
標題化合物/加水分解体	—	13/1	12/1	8/1	3/1	3/1
pH	9.0	—	—	—	—	10.3

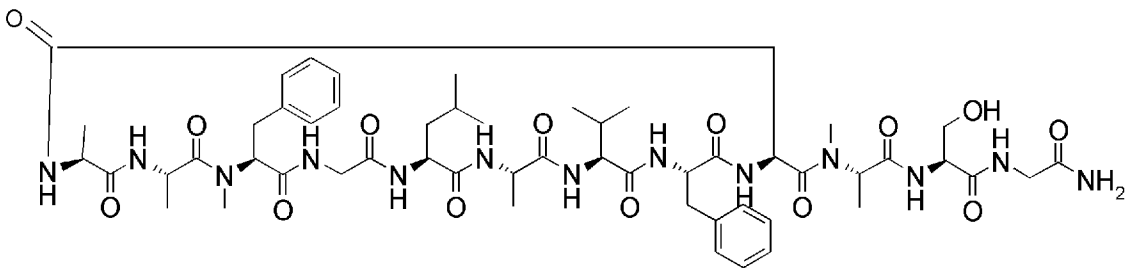
[0897] 以上の結果より、反応時間の経過とともに、ｐHが上昇しており、これに従つて環化体 (標題化合物）/ 加水分解体の選択性が低下していくことがわかつた。時間経過と共にｐＨが上昇するのは、系内でフリーの トリ工チルアミンが発生することが原因である。本反応では水溶性を高める目的で、添加剤として用いる4＿（トリフルオロメチル）ベンゼンチオールを トリエチルァミンとの塩として添加している。この、４＿（トリフルオロメチル）ベンゼンチオールが酸化されてジスルフィドとなると、これまでSH基にて中和されていたァミンが過剰となり、系内にフリーの トリ工チルァミンが生成し、結果としてｐＨが上昇する。

[0898] 環化体 (標題化合物）/ 加水分解体の選択性を向上させるには、反応中、

塩基性を維持して、塩基性が高くならない反応条件設定が鍵であると結論される。そのための方法として、使用する緩衝液の濃度を上げ、フリーのトリエチルアミンが発生しても緩衝作用によってｐＨの上昇を抑えることが挙げられる。また、系内でフリーのトリエチルアミンが発生しないようにチオールの酸化を抑制する方法も考えられる。つまり、反応を窒素雰囲気下で行う、または還元剤であるトリス (2—カルボキシエチル）ホスフィンなどを共存させて行うことが望ましい。

従って、このような観点から、反応のpH上昇を抑えるため、反応液中の緩衝剤の濃度を６２ｍMから５００ｍMに上げ、還元剤としてトリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン５０ｍＭを添加した条件で実験した。以下、環化体 (標題化合物）/ 加水分解体の選択性に対するpHの影響を確認する為に、反応のpHは、pH7.8，8.1，9.2の３点で実施した。

[0899] （２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１４Ｓ．１７Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２—アミノ＿２—オキソエチル）アミノ）—３—ヒドロキシ－１—オキソプロパン－２—イル）アミノ）－１—オキソプロパン＿２＿イル）－８，２３—ジベンジル－１４＿イソプチル－２０—イソプロピル－Ｎ，２．５．７．１７—ペンタメチル－３，６．９．１２．１５，１８，２１，２４．２８—ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５—ソナアザシクロオクタコサン－２６—カルボキサミド (化合物SP＿５１１）の合成



[0900] ｐＨ７．８における化合物SP—５１１の合成

水 (１０．９ｕｌ）、４—（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール (６．８０ｕし ０．０５０ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン (６．９７ｕし ０．０５０ｍｍｏｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に１．９Ｍ ＨＥ

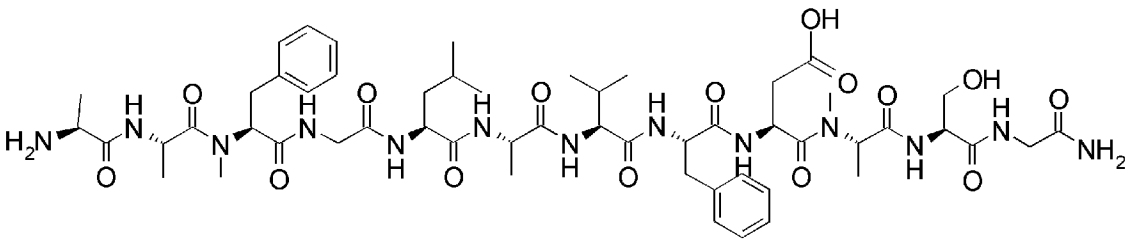
ＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝７．５，　１３．１ｕｌ）、０．５Ｍトリス（2＿カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、５．０ｕｌ）を加えた。さらに、（3Ｓ，6Ｓ，9Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）＿２７―アミノ＿３＿（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２＿アミノ－２―オキソエチル）アミノ）＿３―ヒドロキシ－１＿オキソプロパン－２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）＿６，２１―ジベンジル―１５＿イソプチル＿９＿イソプロピル＿１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン＿１＿チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０４）の１０ｍＭ　Ｎ―メチルピロリドン溶液５ｕｌと１１ｍＭの内部標準（4―プロピル安息香酸）Ｎ＿メチルピロリドン溶液（２．２５ｕｌ）を加え３０℃で６時間攪拌した。反応開始時のｐＨは７．８であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、標題化合物の生成を確認した。６時間で内部標準との工リア面積比より転化率は９６％であり、標題化合物（SP-５１１）と加水分解体（化合物SP―５１２）の生成比はＬＣＭＳのＵＶ工リア比でおおよそ３８：1であった。

●標題化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１１３２．３（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．６３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

・加水分解体（化合物SP―５１２）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１５０．５（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．４８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0901] ｐＨ８．１における化合物SP＿５１１の合成

上記のｐＨ７．８における化合物SP_５１１の合成と同様の方法で、１．９Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝７．５，　１３．１ｕｌ）の代わりに１．９Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，　１３．１ｕｌ）を用い反応を行った。３０℃で６時間攪拌した。反応開始時のｐＨは８．１であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、標題化合物の生成を確認した。６時間で内部標準とのエリア面積比より転化率は９３％であり、標題化合物（SP―５１１）と加水分解体（化合物SP―５１２）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ４０：１であった。

・標題化合物（SP_５１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１３２．３（M-H）-

保持時間：０．６３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

・加水分解体（化合物SP―５１２）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１５０．４（M-H）-

保持時間：０．４８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0902] pH９．２における化合物SP―５１１の合成

上記のｐＨ７．８における化合物SP_５１１の合成と同様の方法で、１．９Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝７．５，　１３．１ｕｌ）の代わりに１．９Ｍ　Ｂｉｃｉｎｅ緩衝溶液（ｐＨ＝９．５，　１３．１ｕｌ）を用い反応を行った。３０℃で６時間攪拌した。反応開始時のｐＨは９．２であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、標題化合物の生成を確認した。６時間で内部標準とのエリア面積比より転化率は８７％であり、標題化合物（SP―５１１）と加水分解体（化合物SP―５１２）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ２２：１であった。

・標題化合物（SP_５１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１３２．４（M-H）-

保持時間：０．６３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

・加水分解体（化合物SP―５１２）

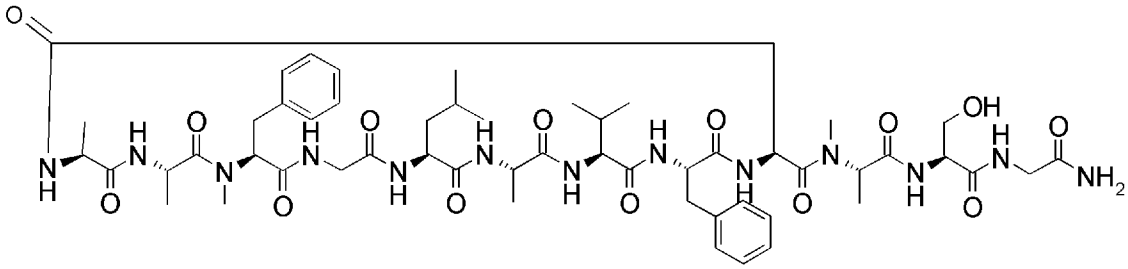
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１５０．３（M-H）-

保持時間 :0．４８分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[0903] ３－１－２．添加剤_(4-(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール)の濃度効星

濃度１Mではなく１００ｍMとした場合には、加水分解比率が増加することが明らかとなった。

(２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ)－Ｎ－((Ｓ)－１－((Ｓ)－１－((２―アミノ_２―オキソエチル)アミノ)―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル)アミノ)－１―オキソプロパン_２_イル)－８，２３―ジベンジル－１４_イソプチル_２０―イソプロピル－Ｎ，２．５．７．１７―ペンタメチル－３，６．９．１２．１５，１８，２１，２４．２８―ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５―ソナアザシクロオクタコサン－２６―カルボ%サミド_(化合物SP_５１１)の合成



[0904] 水 (４１．６ｕｌ)、４―(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール (１．３６ｕし０．ＯＩｍｍｏｌ)とトリエチルアミン (1．３９ｕし０．０１ｍｍｏｌ)の混合溶液を調整した。その混合溶液に、１．９ＭＨＥＰＥＳ緩衝溶液 (ｐＨ＝８．１， ２６．２ｕｌ)、０．５Ｍトリス (2―カルボキシエチル)ホスフィン水溶液 (ｐＨ＝７．６、１０ｕｌ)を加えた。さらに、 (3Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ)－２７―アミノ_３_((Ｓ)－１－((Ｓ)－１－((２―アミノ－２―オキソエチル)アミノ)_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン－２―イル)アミノ)_１_オキソプロパン_２_イル) (メチル)カルバモイル)－６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オ

クタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタァザオクタコサン＿１＿チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０４）の１０ｍＭ　Ｎ＿メチルピロリドン溶液１０ｕし　１１ｍＭの内部標準（４＿プロピル安息香酸）Ｎ＿メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）とＮ―メチルビロリドン（４．８９uL）を加え３０℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは７．９であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、標題化合物の生成を確認した。終夜攪拌後で内部標準とのエリア面積比より転化率は９８％であり、標題化合物（SP_５１１）と加水分解体（化合物SP-５１２）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ６：１であった。

・標題化合物（SP_５１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１３２．３（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．６３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

・加水分解体（化合物SP―５１２）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１１５０．２（Ｍ-Ｈ）-

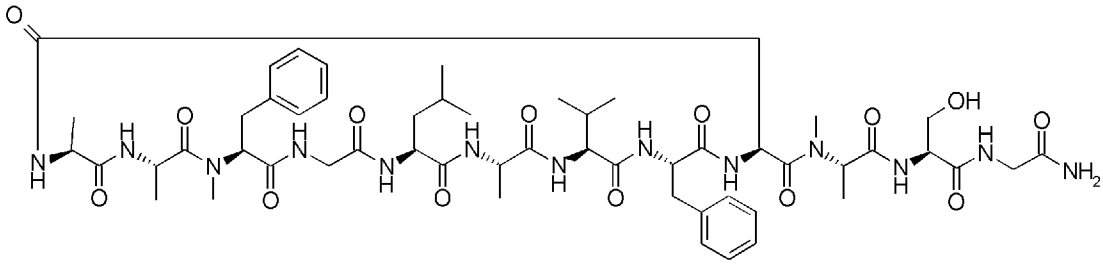
保持時間：０．４８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[0905] ３-１-３．有機溶媒と水の比率変化による転化と加水分解体生成比変化

有機溶媒比率は向上させる方が有利である結果を得た。

添加剤（4-（トリフルォロメチル）ベンゼンチオール）濃度１Ｍ、有機溶媒（ＮＭＰ）：水＝５０：５０での反応例

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）-Ｎ-（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン＿２＿イル）－８，２３―ジベンジル－１４＿イソプチル＿２０―イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７―ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５＿ノナァザシクロオクタコサン＿２６＿カルボキサミド（化合物SP_５１１）の合成



[0906] ＨＥＰＥＳ緩衝溶液 (5Ｍ、ｐＨ＝７．５、１０．０μ 1)、４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール (１３．６μｌ、０．１０ｍｍｏｌ) および トリエチルァミン (１３．９μ し ０．１０ｍｍｏｌ) の混合溶液を調整した。その混合溶液に水 (２１．７５μ 1)、ＮＭＰ (２１．７５μ 1)、トリス (2＿カルボキシエチル）ホスフィン水溶液 (1．１Ｍ、ｐＨ＝７．５、４．５μ 1) を加えた。さらに、 (３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ) ―２７―ァミノ―３＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―ァミノ＿２―オキソエチル）ァミノ）＿３―ヒドロキシ＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）ァミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル） (メチル）カルバモイル）―６，２１―ジベンジル―１５＿イソプチル＿９＿イソプロピル＿１２，２２，２４―トリメチル＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５＿オクタァザオクタコサン－１＿チオ酸 Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０４）のＮＭＰ溶液 (１０ｍＭ、１０μ 1、０．１０μｍｏｌ) および内部標準として４＿プロピル安息香酸のＮＭＰ溶液 (１１ｍＭ、４．５μｌ) を加えて３０℃で攪拌した。反応開始時のｐＨは７．５であった。６時間後、ＬＣＺＭＳで反応を分析したところ、標題化合物の生成を確認した。内部標準とのエリア面積比から、反応の転換率は９１％であり、標題化合物 （SP―５１１）と加水分解体 (化合物SP―５１２）の生成比はＬＣ/ＭＳのＵＶエリア比でおよそ３５ :1であった。

・標題化合物 （SP＿５１１）

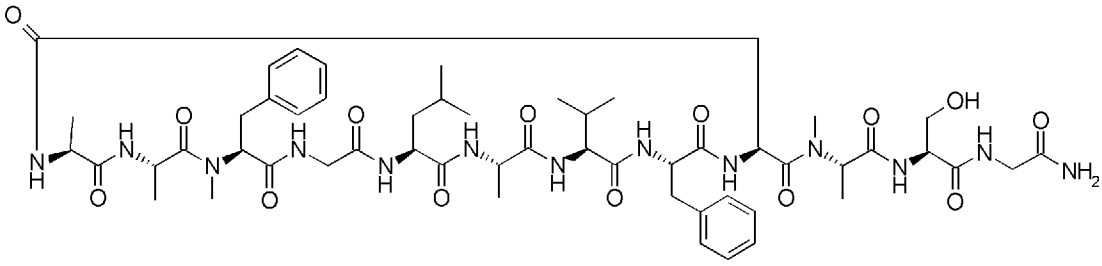
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ z ＝１１３４．５ (M+ H) +

保持時間 :０．６４分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[0907] 添加吝＿(4-（トリフルォロメチル)《ンゼンチオール）濃度１Ｍ、有機溶媒（

ＮＭＰ）：水＝１０：９０での反応例

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン－２－イル）－８，２３―ジベンジル－１４－イソプチル－２０―イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７―ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－ノナアザシクロオクタコサン－２６－カルボキサミド（化合物ＳＰ－５１１）の合成



[0908] ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（５Ｍ、ｐＨ＝７．５、１０．０μｌ）、４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（１３．６μｌ、０．１０ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（１３．９μし０．１０ｍｍｏｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に水（５０．７５从ｌ）、トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（１．１Ｍ、ｐＨ＝７．５、４．５μｌ）を加えた。さらに、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７―アミノ－３－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）－３―ヒドロキシ－１－オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１－オキソプロパン－２－イル）（メチル）カルバモイル）－６，２１―ジベンジル―１５－イソプチル－９－イソプロピル－１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン－１－チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物ＳＰ―５０４）のＮＭＰ溶液（１８．２ｍＭ、５．５μｌ、０．１０从ｍｏｌ）および内部標準として４－プロピル安息香酸のＮＭＰ溶液（２８．５ｍＭ、１．７５从门　を

加えて３０℃で攪拌した。反応開始時のｐＨは７．４であった。６時間後、ＬＣ/ ＭＳで反応を分析したところ、標題化合物の生成を確認した。内部標準とのエリア面積比から、反応の転換率は９３％であり、標題化合物 （SP_５１１）と加水分解体 (化合物SP―５１２）の生成比はＬＣ/ ＭＳのＵＶＩリア比でおよそ１２：１であった。

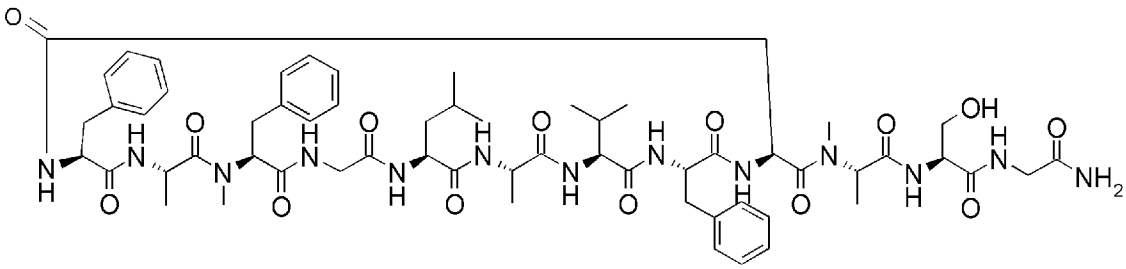
●標題化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ z = １１３４．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．６４分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0909] ３―１―４．__添加剤の最適化

（２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１４Ｓ．１７Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ_２―ォキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシー１_ォキソプロパン_２_ィル）アミノ）_１―ォキソプロパン－２―ィル）－２，８．２３_トリベンジル_１４_イソプチル_２０_イソプロピル_Ｎ，５．７．１７―テトラメチル－３，６．９．１２．１５，１８，２１，２４．２８―ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６ニ １９ニ ２２」２５―ノナァザシクロオクタコサン ニ２６―カルボキサミド_(化さ物SP―５０９）_のさ成



[091 0] 水 (２１．８ｕｌ）、４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール （１３．６ｕし ０．ＩＯＯｍｍｏｌ）とトリエチルァミン (１３．９ｕし ０．１００ｍｍｏｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に１．９Ｍ ＨＥＰＥＳ緩衝溶液 (ｐＨ＝８．１， ２６．２ｕｌ）、０．５Ｍトリス (２―カルボキシエチル）ホスフィン水溶液 (ｐＨ＝７．０、１０．０ｕｌ）を加えた。さらに、 (３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）_２７―アミノ_３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―ア

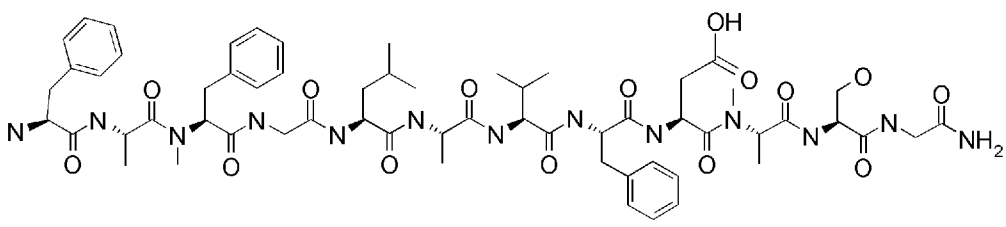
ミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）_６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル―１２，２２，２４―トリメチルー５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ―２８―フエニルー４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン_１_チオ酸　Ｓ―ベンジル（Ｐｈｅ-Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｙ-Ｌｅｕ-Ａｌａ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ（ＳＢｎ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ-Ｇｌｙ-ＮＨ２）（化合物SP_５０８）の１０ｍＭ　Ｎ_メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４―プロピル安息香酸）Ｎ―メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは８．１であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、原料化合物SP_５０８は消失し、標題化合物（SP―５０９）と加水分解体（化合物SP―５１０）のＭＡＳＳを観測し、ＬＣＭＳのＭＡＳＳ強度比（+）はおおよそ８：１であった。

・標題化合物（SP―５０９）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２１０．４（Ｍ＋Ｈ）＋

・加水分解体（化合物SP―５１０）

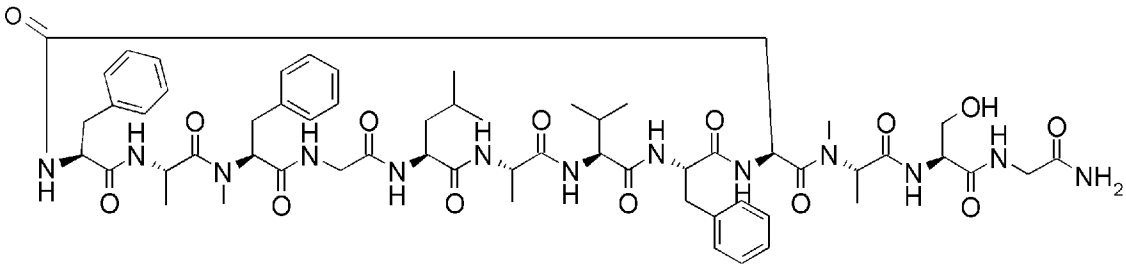
[0911] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）-２７-アミノー３_（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノー２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシー１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）_６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチルー５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソー２８_フエニルー４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５_オクタアザオクタコサンー１―酸



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１２２８．４（Ｍ＋Ｈ）＋

[0912] ３－１－４－１．添加剤として_(4_＿(トリフルオロメチル）ベンゼンチオ―ル）＿(１Ｍ)_ではなく、４―ニトロベンゼンチオール（１Ｍ)_を用いた場合

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（_(Ｓ)－１－（（（Ｓ)－１－（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン－２―イル）－２，８，２３＿トリベンジル＿１４＿イソプチル＿２０＿イソプロピル－Ｎ，５，７，１７―テトラメチル－３，６，９，１２．１５，１８，２１，２４．２８―ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５―ノナアザシクロオクタコサン－２６―カルボキサミド＿(化さ物SP―５０９)_のさ成



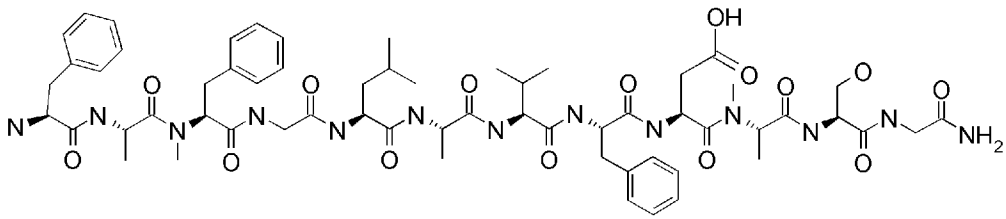
[0913] 水（３２．６８ｕｌ）、４－ニトロベンゼンチオール（１６．０ｍｇ、０．１００ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１３．９４ｕし０．１００ｍｍｏｌ）、１．９Ｍ ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，２６．２ｕｌ）、０．５Ｍトリス（２＿カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０．０ｕｌ）とＮ＿メチルピロリドン（２．６６ｕｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）―２７―アミノ―３＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿３―ヒドロキシ＿１―オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）＿６，２１―ジベンジル＿１５＿イソプチル―９―イソプロピル－１２，２２，２４―トリメチル＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，

１６，１９，２２，２５－オクタァザオクタコサン－１－チオ酸　Ｓ－ベンジル（化合物SP－５０８）の１０ｍＭ　Ｎ_メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４－プロピル安息香酸）Ｎ_メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは８．３であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、終夜攪拌すると原料化合物は消失し、標題化合物（SP－５０９）と加水分解体（化合物SP－５１０）とチオエステル交換体（化合物SP－５１３）のＭＡＳＳを観測し、ＬＣＭＳのＭＡＳＳ強度比（+）はおおよそ７：７：２であった。

●標題化合物（SP－５０９）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２１０．４（Ｍ＋Ｈ）＋

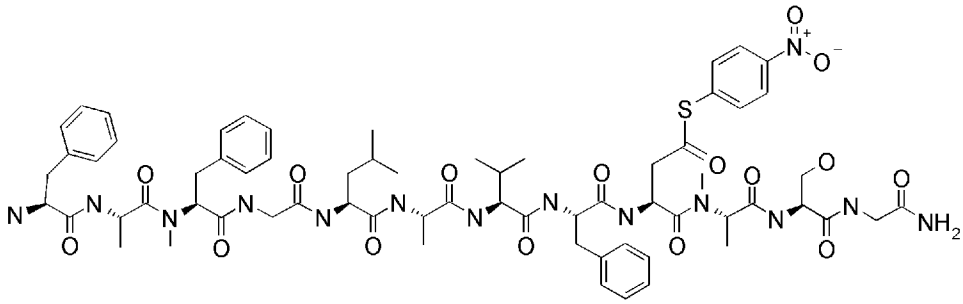
・加水分解体（化合物SP－５１０）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２２８．４（Ｍ＋Ｈ）＋

[0914] ・チオエステル交換体（化合物SP－５１３）

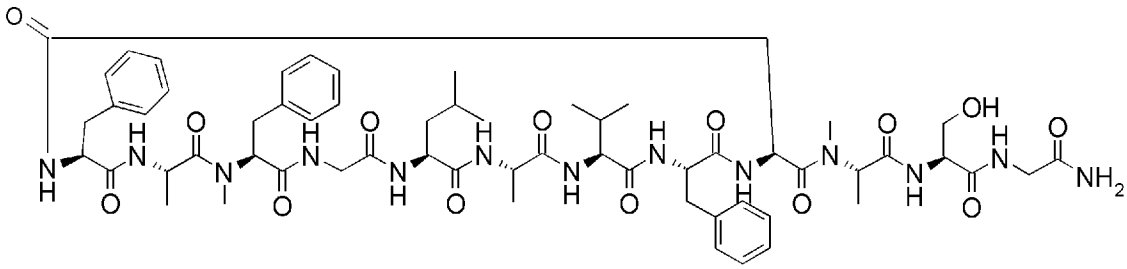
（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－ァミノ－３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２－ァミノ－２－オキソエチル）ァミノ）_３－ヒドロキシ－１_オキソプロパン_２_ィル）ァミノ）_１_オキソプロパン_２_ィル）（メチル）カルバモイル）_６，２１－ジベンジル－１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４－トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６－オクタオキソ－２８_フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オクタァザオクタコサン_１_チオ酸　Ｓ－（４－ニトロフエニル）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１３６５．３（Ｍ＋Ｈ）＋

[091 5] ３－１－４－２．添加剤として_(4＿_(トリフルォロメチル）ベンゼンチォ—ル）_(１Ｍ)_ではなく、２，３．４．５．６＿ペンタフルォロベンゼンチオール_(１Ｍ)_を用いた場合

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（_(Ｓ)－１－（（(Ｓ)－１－（(２—アミノ_２—オキソエチル）アミノ）—３—ヒドロキシ－１—オキソプロパン－２—ィル）アミノ）－１—オキソプロパン－２—ィル）－２，８，２３＿トリベンジル＿１４＿イソプチル＿２０＿イソプロピル－Ｎ，５，７，１７—テトラメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８—ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５—ノナァザシクロオクタコサン－２６—カルボキサミド_(化合物SP_５０９）の合成



[091 6] 水（２２．０４ｕｌ）、２，３，４，５，６＿ペンタフルオロベンゼンチオール（１３．３ｕし０．１００ｍｍｏｌ）、トリエチルァミン（１３．９４ｕし０．１００ｍｍｏｌ）、１．９ＭＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，２６．２ｕｌ）、０．５Ｍトリス（２—カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０．０ｕｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ

）_２７―アミノ_３_（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン－２―イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）-６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８－フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン_１_チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物SP―５０８）の１０ｍＭ　Ｎ―メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４―プロピル安息香酸）Ｎ_メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは８．０であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、終夜攪拌後も原料化合物（化合物SP-５０８）は消失せず、標題化合物（SP―５０９）とチオエステル交換体（化合物SP―５１４）のＭＡＳＳは観測されなかった。一方、加水分解体（化合物SP_５１０）のＭＡＳＳは観測された。原料化合物（化合物SP_５０８）と加水分解体（化合物SP―５１０）のＬＣＭＳのＭＡＳＳ強度比（+）はおおよそ１８：１であった。

・原料化合物（化合物SP―５０８）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１３３４．４（Ｍ＋Ｈ）＋

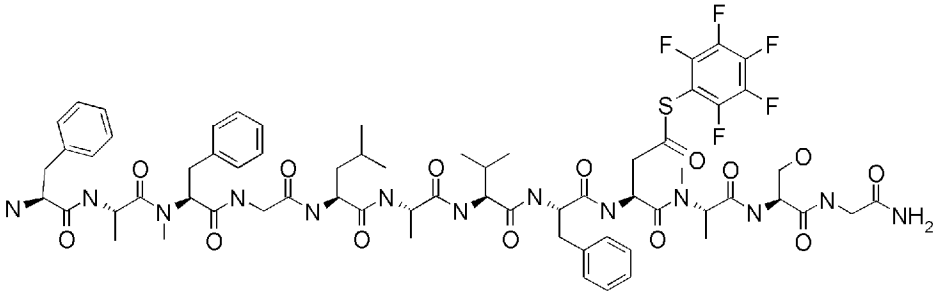
・加水分解体（化合物SP―５１０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１２２８．４（Ｍ＋Ｈ）＋

・チオエステル交換体（化合物SP―５１４）

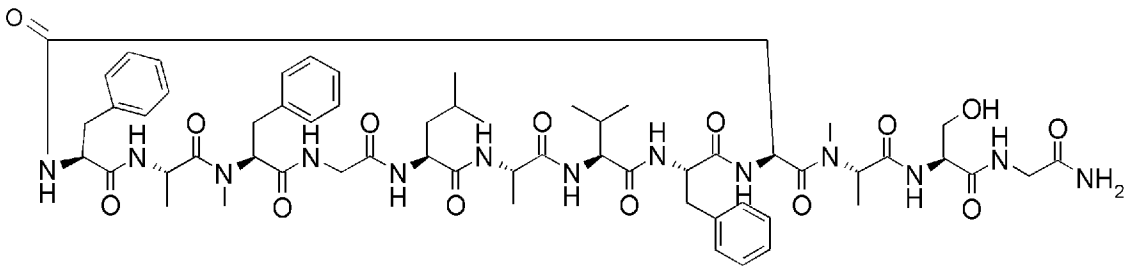
[0917] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）-２７-アミノ－３_（（（Ｓ）-１-（（（Ｓ）-１-（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）_６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８－フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オ

クタァザオクタコサン_１_チオ酸　Ｓ―（ペルフルオロフェニル）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　は観測されなかった。

[0918] ３－１－４－３．添加剤として（４－（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール）（１Ｍ）ではなく、２－メルカプト安息香酸（１Ｍ）を用いた場合（２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１４Ｓ．１７Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１―オキソプロパン_２_イル）－２，８．２３_トリベンジル_１４_イソプチル_２０_イソプロピル－Ｎ，５，７，１７―テトラメチル_３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ_１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５_ノナァザシクロオクタコサン_２６_カルボキサミド（化合物ＳＰ―５０９）の合成



[0919] 水（３２．６８ｕｌ）、２_メルカプト安息香酸（１５．Ｏｍｇ、０．１００ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１３．９４ｕし０．１００ｍｍｏｌ）、１．９Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，　２６．２ｕｌ）、０．５Ｍ　トリス（２_カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０．０ｕｌ）とＮ_メチルピロリドン（２．６６ｕｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）―２７―アミノ_３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－

（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ_１―オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）_６，２１―ジベンジル_１５_イソプチル_９_イソプロピル―１２，２２，２４―トリメチル_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン－１―チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物ＳＰ―５０８）の１０ｍＭ　Ｎ_メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４―プロピル安息香酸）Ｎ_メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは８．０であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、終夜攪拌すると原料化合物は消失し、標題化合物（ＳＰ―５０９）と加水分解体（化合物ＳＰ―５１０）とチオエステル交換体（化合物ＳＰ―５１５）のＭＡＳＳを観測し、ＬＣＭＳのＭＡＳＳ強度比（–）はおおよそ１：１０：７であった。

・標題化合物（ＳＰ―５０９）

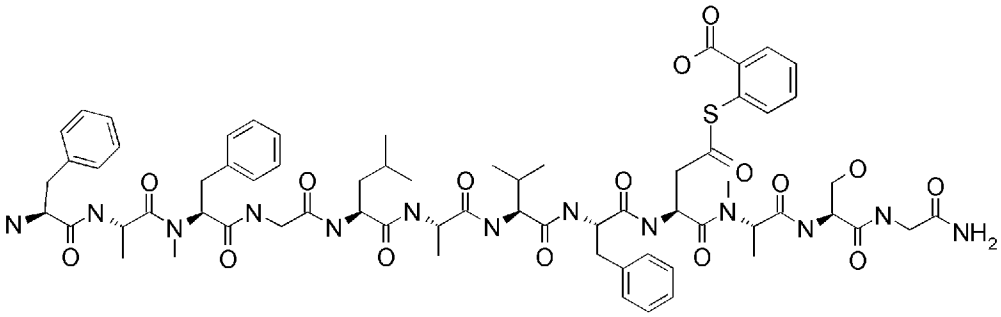
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２０８．９（Ｍ－Ｈ）－

・加水分解体（化合物ＳＰ―５１０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２２６．３（Ｍ－Ｈ）－

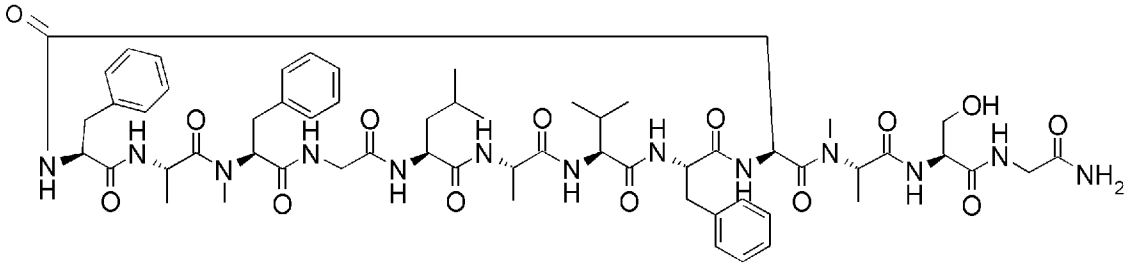
・チオエステル交換体（化合物ＳＰ―５１５）

[0920] ２－（（（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）_２７―アミノ_３_（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ－２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン_２_イル）アミノ）_１_オキソプロパン_２_イル）（メチル）カルバモイル）－６，２１―ジベンジル―１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４―トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６－オクタオキソ－２８―フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン―１―オイル）チオ）安息香酸



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　＝１３６２．１（Ｍ－Ｈ）－

[0921] ３－１－４－４．添加剤として（４－（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール）（１Ｍ）ではなく、２－メルカプトフエノール（１Ｍ）を用いた場合（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２－アミノ－２－オキソエチル）アミノ）－３－ヒドロキシ－１－オキソプロパン－２－イル）アミノ）－１－オキソプロパン－２－イル）－２，８，２３－トリベンジル－１４－イソプチル－２０－イソプロピル－Ｎ，５，７，１７－テトラメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８－ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－ノナアザシクロオクタコサン－２６－カルボキサミド（化合物ＳＰ－５０９）の合成



[0922] 水（２４．６４ｕｌ）、２－メルカプトフエノール（１０．０５ｕｌ　０．１００ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１３．９４ｕｌ　０．１００ｍｍｏｌ）、１．９Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，　２６．２ｕｌ）、０．５Ｍ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０．０ｕｌ）とＮ－メチルピロリドン（０．６５ｕｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）－２７－アミノ－３－（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－

1-（（2―アミノ_2―オキソエチル）アミノ）_3―ヒドロキシー1_オキソプロパン_2_イル）アミノ）_1_オキソプロパン_2_イル）（メチル）カルバモイル）_6，21―ジベンジル_15_イソプチル_9_イソプロピル－12，22，24―トリメチル_5，8，11，14，17，20，23，26―オクタオキソ－28―フエニルー4，7，10，13，16，19，22，25―オクタァザオクタコサンー1―チオ酸　S―ベンジル（化合物SP―508）の10mM　N_メチルピロリドン溶液10uIと11mMの内部標準（4―プロピル安息香酸）N―メチルピロリドン溶液（4．56uI）を加え30℃で1時間攪拌した。反応開始時のpHは8．0であった。LCMSを用いて反応の変化を観測したところ、1時間攪拌すると原料化合物は消失し、標題化合物（SP―509）と加水分解体（化合物SP―510）のMASSを観測し、LCMSのMASS強度比（+）はおおよそ1．1：1であった。

・標題化合物（SP―509）

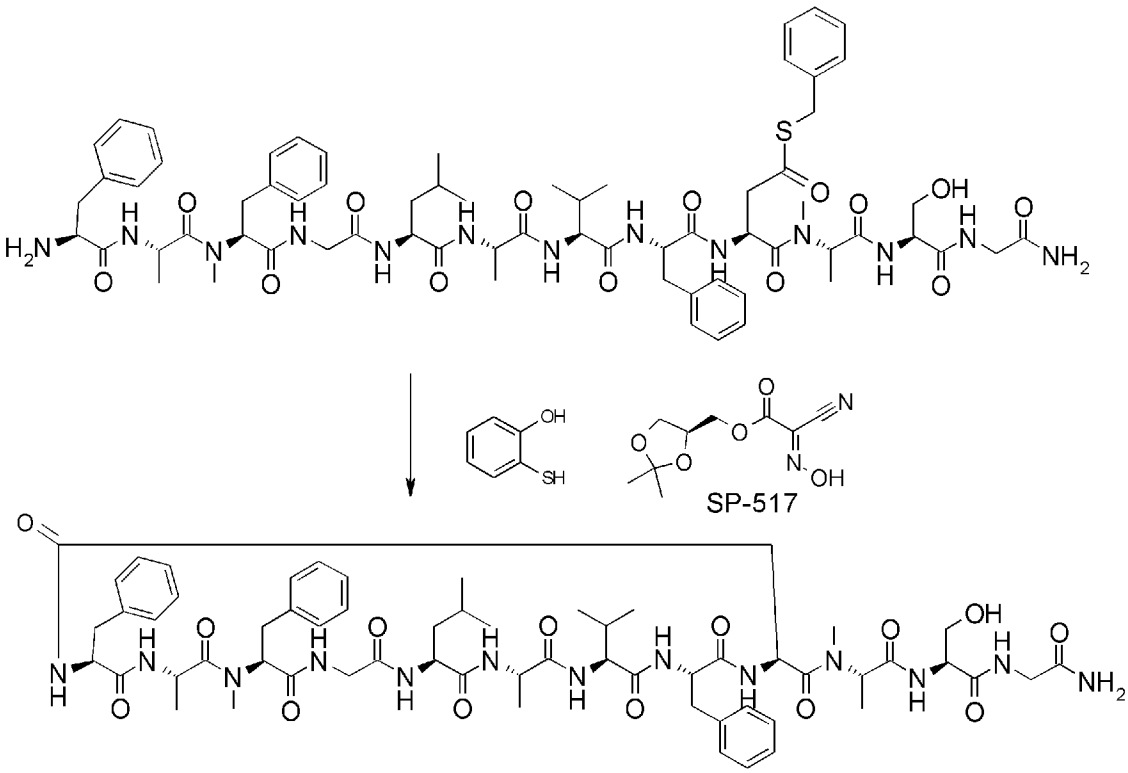
LCMS（ESI）m/z　=1210．4（M+H）+

・加水分解体（化合物SP―510）

LCMS（ESI）m/z　=1228．4（M+H）+

[0923] 3-1-4-5．添加剤として_(4_(トリフルォロメチル）ベンゼンチォール）（1M）_ではなく、_2_メルカプトフエノール（0．_5M）_と2―シァノー2_(ヒドロキシィミノ）酢酸（S，_Z）_(2，_2―ジメチル－1，_3―ジオキソラン－4_イル）メチル（0．_5M）_を用いた場合（2S，5S，8S，14S，17S，20S，23S，26S）-N-（（S）-1-（（（S）-1-（（2―アミノ_2―オキソエチル）アミノ）_―3―ヒドロキシー1―オキソプロパンー2―イル）アミノ）－1―オキソプロパンー2―イル）－2，8，23_トリベンジル_14_イソプチル_20_イソプロピル－N，5，7，17―テトラメチル－3，6，9，12，15，18，21，24，28―ノナオキソ－1，4，7，10，13ニ16，19，22，25_ノナァザシクロオクタコサンー26_カルボキ

サミド(化合物SP—５０９)の合成



[0924] 水(2．４６ｕｌ)、２_メルカプトフエノール(5．０３ｕし０．０５０ｍｍｏｌ)、常法(Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒ，２０１２，１４，３３７２-３３７５)に従い別途合成した２_シァノ_２_(ヒドロキシィミノ)酢酸 (Ｓ，Ｚ)-(２，２—ジメチル—１，３—ジオキソラン_４_ィル)メチル (化合物SP５１７)(１１．０ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ)、トリエチルァミン(１３．９４ｕし０．１００ｍｍｏｌ)、１Ｍリン酸緩衝溶液(ｐＨ＝７．７，５２．４ｕｌ)、０．５Ｍトリス(2—カルポキシエチル)ホスフィン水溶液(ｐＨ＝７．６、１０．Ｏｕｌ)とＮ_メチルピロリドン(１．６５ｕｌ)の混合溶液を調整した。その混合溶液に、(３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ)-２７—ァミノ_３_(((Ｓ)-１-((Ｓ)-１-((２—ァミノ—２—オキソエチル)ァミノ)_３—ヒドロキシ—１_オキソプロパン_２_ィル)ァミノ)_１_オキソプロパン_２_ィル)(メチル)カルバモイル)_６，２１—ジベンジル—１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４—トリメチル—５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６—オクタ

オキソ－２８－フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５－オクタアザオクタコサン＿１＿チオ酸　Ｓ－ベンジル（化合物SP－５０８）の１０ｍＭ　Ｎ＿メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４－プロピル安息香酸）Ｎ－メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で１時間攪拌した。反応開始時のｐＨは７．０であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、１時間攪拌後、標題化合物（SP＿５０９）、加水分解体（化合物SP＿５１０）とエステル交換体（化合物SP＿５１６）のＭＡＳＳを観測し、ＬＣＭＳのＭＡＳＳ強度比（－）はおおよそ４：５：２であった。

・標題化合物（SP－５０９）

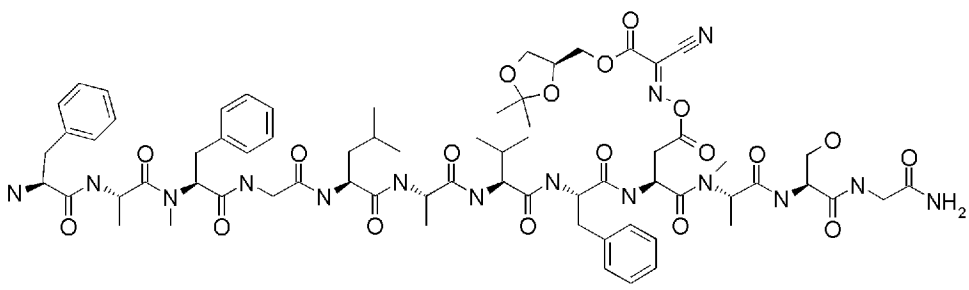
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１２０８．１（Ｍ－Ｈ）－

・加水分解体（化合物SP－５１０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１２２６．２（Ｍ－Ｈ）－

・エステル交換体（化合物SP＿５１６）

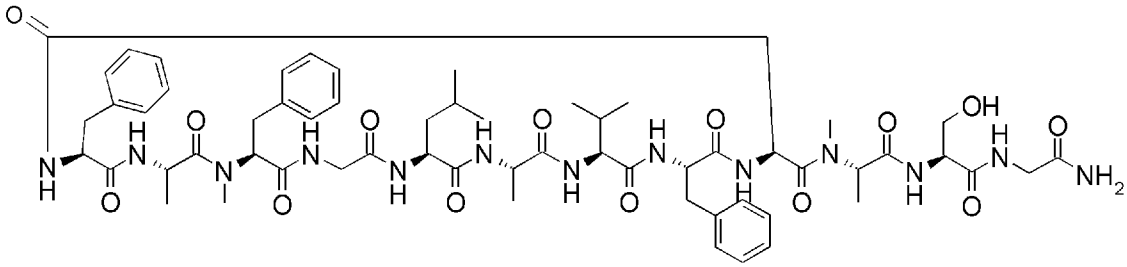
[0925] （７Ｓ，１０Ｓ，１３Ｓ，１６Ｓ，１９Ｓ，２５Ｓ，２８Ｓ，３１Ｓ，Ｅ）＿３１－アミノ＿７＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２－アミノ－２－オキソエチル）アミノ）＿３－ヒドロキシ－１＿オキソプロパン＿２＿イル）アミノ）＿１＿オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）－１０，２５－ジベンジル－２＿シアノ＿１９＿イソプチル＿１３＿イソプロピル－１６，２６，２８－トリメチル＿５，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０－ノナオキソ－３２－フエニル－４－オキサ－３，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９－ノナアザドトリアコンター２－エン－１－酸　（Ｓ）－２，２－ジメチル－１，３－ジオキソラン－４＿イル）メチル



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１４３６．４（M-Ｈ）-

[0926] ３-１-４-６．添加剤として_(4__(トリフルオロメチル）ベンゼンチオ―ル）__(１Ｍ)_ではなく、２_シァノ_２―_(ヒドロキシィミノ）酢酸___(Ｓ，Ｚ）-（２，２―ジメチル－１，３―ジオキソラン－４_ィル）メチル_(０．５Ｍ)_を用いた場合

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）-Ｎ-（_(Ｓ)-１-（（(Ｓ)-１-（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―ィル）アミノ）－１―オキソプロパン－２―ィル）－２，８，２３_トリベンジル_１４_イソプチル_２０_イソプロピル_Ｎ，５．７．１７―テトラメチル－３，６．９．１２．１５，１８，２１，２４．２８―ノナオキソ－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５―ノナァザシクロオクタコサン―２６―カルボキサミド_(化さ物SP―５０９)_のさ成



[0927] 水（6．４８ｕｌ）、常法（Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒ，２０１２，１４，３３７２―３３７５）に従い別途合成した２_シァノ_２―（ヒドロキシィミノ）酢酸（Ｓ，Ｚ）-（２，２―ジメチル－１，３―ジオキソラン_４_ィル）メチル（化合物ＳＰ―５１７）（１１．０ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１３．９４ｕし０．１００ｍｍｏｌ）、１Ｍリン酸緩衝溶液（ｐＨ＝７．７，５２．４ｕｌ）、０．５Ｍトリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０．０ｕ冂とＮ_メチルピロリドン（２．７ｕｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）_２７―アミノ_３_（（(Ｓ)-１-（（(Ｓ)-１-（（２―アミノ_２―オキソエチル）アミノ）_３―ヒドロキシ－１_オキソプロパン－２

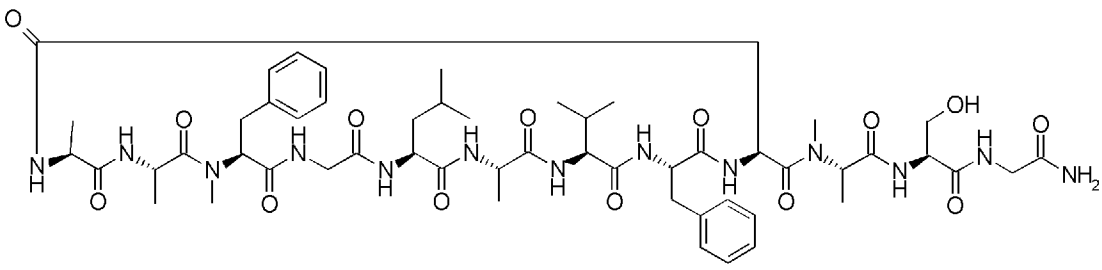
—ィル）ァミノ）_１_オキソプロパン_２_ィル）（メチル）カルバモイル）_６，２１—ジベンジル—１５_イソプチル_９_イソプロピル_１２，２２，２４—トリメチル－５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６—オクタオキソ－２８—フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５—オクタァザオクタコサン_１_チオ酸　Ｓ—ベンジル（化合物SP—５０８）の１０ｍＭ　Ｎ—メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（４—プロピル安息香酸）Ｎ_メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で１時間攪拌した。反応開始時のｐＨは９．８であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、１時間攪拌後、加水分解体（化合物SP—５１０）のＭＡＳＳを観測した。標題化合物（SP—５０９）及びエステル交換体（化合物SP—５１６）のＭＡＳＳは観測されなかった。

・加水分解体（化合物SP—５１０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１２２６．７（Ｍ－Ｈ）－

[0928] ３－１－４－７．添加剤として_(４_（トリフルォロメチル）ベンゼンチォ—ル）（１００ｍＭ）_ではなく、_ベンゼンチオール（１００ｍＭ）_を用いた場合

（２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１４Ｓ．１７Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２—アミノ_２—ォキソエチル）アミノ）—３—ヒドロキシ－１—ォキソプロパン－２—ィル）ァミノ）－１—ォキソプロパン_２_ィル）－８，２３—ジベンジル－１４_イソプチル_２０—イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７—ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８—ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５_ノナァザシクロオクタコサン_２６_カルボキサミド_(化合物SP_５１１）の合成



[0929] 水 (41．86ｕｌ)、ベンゼンチオール (1．03ｕし 0．01ｍｍｏｌ)とトリエチルアミン (1．39ｕし 0．01ｍｍｏｌ)の混合溶液を調整した。その混合溶液に、1．9ＭＨＥＰＥＳ緩衝溶液 (ｐＨ＝8．1，26．2ｕｌ)、0．5Ｍ トリス (2－カルボキシエチル)ホスフィン水溶液 (ｐＨ＝7．6、10ｕｌ)を加えた。さらに、 (3Ｓ，6Ｓ，9Ｓ，12Ｓ，15Ｓ，21Ｓ，24Ｓ，27Ｓ)－27－アミノ－3－(((Ｓ)－1－((Ｓ)－1－((2－アミノ－2－オキソエチル)アミノ)－3－ヒドロキシ－1－オキソプロパン－2－イル)アミノ)－1－オキソプロパン－2－イル) (メチル)カルバモイル)－6，21－ジベンジル－15－イソプチル－9－イソプロピル－12，22，24－トリメチル－5，8，11，14，17，20，23，26－オクタオキソ－28－フエニル－4，7，10，13，16，19，22，25－オクタアザオクタコサン－1－チオ酸 Ｓ－ベンジル (化合物SP－504)の10ｍＭ Ｎ－メチルピロリドン溶液10ｕし 11ｍＭの内部標準 (4－プロピル安息香酸)Ｎ－メチルピロリドン溶液 (4．56ｕｌ)とＮ－メチルピロリドン (4．96ｕｌ)を加え30℃で終夜攪拌した。反応開始時のｐＨは7．9であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、標題化合物の生成を確認した。終夜攪拌後で内部標準とのエリア面積比より転化率は94％であり、標題化合物 (SP－511)と加水分解体 (化合物SP－512)の生成比はＬＣＭＳのＵＶ工リア比でおおよそ3：1であった。

・標題化合物 (SP－511)

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ｚ ＝1132．3 (Ｍ－Ｈ)－

保持時間：0．63分 (分析条件30Ｄ「六05)

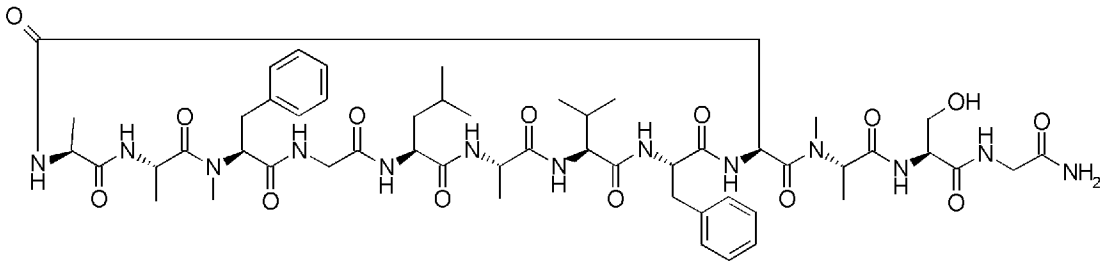
・加水分解体 (化合物SP－512)

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ｚ ＝1150．2 (Ｍ－Ｈ)－

保持時間：0．48分 (分析条件30Ｄ「六05)

[0930] 3－1－4－8．添加剤として(4－(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール)(1Ｍ)ではなくベンゼンチオール (1Ｍ)を用いた¾合

（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン＿２＿イル）－８，２３―ジベンジル－１４＿イソプチル＿２０―イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７―ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ＿１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５＿ノナアザシクロオクタコサン＿２６＿カルボキサミド（化合物ＳＰ＿５１１）の合成



[0931] 水（２４．４４ｕｌ）、ベンゼンチオール（１０．３ｕｌ　０．１０ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（１３．９ｕｌ　０．１０ｍｍｏｌ）の混合溶液を調整した。その混合溶液に、１．９ＭＨＥＰＥＳ緩衝溶液（ｐＨ＝８．１，２６．２ｕｌ）、０．５Ｍトリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．６、１０ｕｌ）を加えた。さらに、（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ）＿２７―アミノ―３＿（（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン＿２＿イル）（メチル）カルバモイル）＿６，２１―ジベンジル―１５＿イソプチル＿９＿イソプロピル＿１２，２２，２４―トリメチル＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６―オクタオキソ＿２８＿フエニル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５―オクタアザオクタコサン＿１＿チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物ＳＰ―５０４）の１０ｍＭ　Ｎ―メチルピロリドン溶液１０ｕｌと１１ｍＭの内部標準（フタル酸）Ｎ―メチルピロリドン溶液（４．５６ｕｌ）を加え３０℃で40時間攪拌した。反応開始時のｐＨは８．１であった。ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、

標題化合物の生成を確認した。40時間攪拌後、原料(化合物SP-504)は消失し、標題化合物（SP_５１１）と加水分解体(化合物SP_５１２）の生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比でおおよそ７：１であった。

・標題化合物（SP_５１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z =１１３２．３（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．６３分(分析条件３０Ｄ「六０５）

・加水分解体(化合物SP—５１２）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z =１１５０．４（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．４８分(分析条件３０Ｄ「六０５）

[0932] 以上の結果、添加剤として様々なアリールチオエステルが使用可能なことが明らかとなつた。翻訳可能なチオエステルを早い反応速度で活性化する目的ではチオール基の電子供与性が高い方が有利であり、活性化されたチオエステルがアミンと十分な速度で環化反応するには電子吸引性が高い方が有利であり、両者のバランスが重要であることが明らかとなつた。

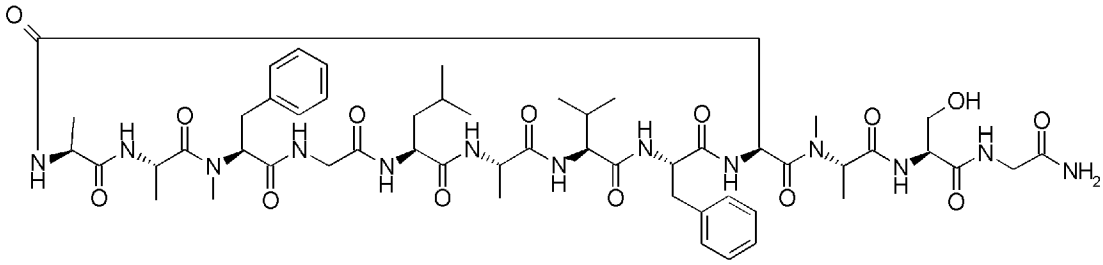
[0933] グリシンなどの反応性が高いアミンの場合、添加剤としてベンゼンチオールを用いた場合、その濃度は10mMで充分な環化反応の選択性(環化反応：加水分解＝30：１）を得ることができる。一方、アラニンなどより反応性が低いアミンの場合、ベンゼンチオール濃度を10mMから100mMへ上げた条件で、環化反応と加水分解の比率は3：1と低下してしまう。さらに、ベンゼンチオール濃度を1Mへ上げた条件でもその比率は７：１であり、反応性が高いアミンほどの選択性（３０：１）は得られない。その場合、添加剤としてベンゼンチオールではなく、電子吸引性基を導入した４_（トリフルオロメチル）ベンゼンチオールを1M用いると、環化反応と加水分解の比率は30：１となり、選択性を向上させることができる。ところが、４_（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール濃度を１００ｍＭへ下げると、その選択性は低下（6：１）してしまう。したがって、反応性が低いアミンの場合、添加剤として用いる４-（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール濃度は高濃度であることが望ましい。

また、活性エステルへの交換反応を単一の添加剤を加えて実施するのではなく、複数の添加剤を加えて実現させることも可能である。２＿シアノ＿２－（ヒドロキシイミノ）酢酸　(Ｓ，Ｚ）―（２，２―ジメチル－１，３―ジオキソラン＿４＿イル）メチル（化合物SP―５１７）での活性化は、翻訳可能なチオエステルからの直接変換は達成できなかったが、まず、２＿メルカプトフエノールにて翻訳可能なチオエステルを活性化した後、ここからのさらなる活性化が可能であることが明らかとなった。２＿シアノ＿２＿（ヒドロキシイミノ）酢酸　(Ｓ，Ｚ）－（２，２―ジメチル－１，３―ジオキソラン―４＿イル）メチル（化合物SP―５１７）では、水中で高効率でN-メチル化されたアミノ酸やペプチドへの高効率なアミド化反応が報告されており（Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｌｅｔｔｅｒ，２０１２，１４，３３７２-３３７５）、２段階の活性化を経て本活性種への活性化が達成された事実は、注目に値する。

[0934] ３－２－１．反き議　神　で-の反応最適化き　で-のi環き　応

上に述べた反応条件最適化に伴い、反応翻訳液中で環化反応を実施した結果、翻訳ペプチドの環化実験実施条件と比較して加水分解比率を低下させ、目的化合物割合を向上させることができた。

[0935] （２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１４Ｓ．１７Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（（Ｓ）－１－（（２―アミノ＿２―オキソエチル）アミノ）＿―３―ヒドロキシ－１―オキソプロパン－２―イル）アミノ）－１―オキソプロパン＿２＿イル）－８，２３―ジベンジル－１４＿イソプチル＿２０―イソプロピル－Ｎ，２，５，７，１７―ペンタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２８―ノナオキソ－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５＿ノナアザシクロオクタコサン＿２６＿カルボキサミド（化合物SP＿５１１）の合成



[[00993366]] 4-(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール(6.8从し0.050mmo()およびトリエチルアミン(7.0μ、0.050mmo()をHEPES緩衝液(pH=7.6(1.9M8.2μ,)に溶解させ、チオール溶液を調整した。

(3S,6S,9S,12S,15S,21S,24S,27S)-27ーアミノ_3_(((S)-1-(((S)-1-(2ーアミノー2ーオキソエチル)アミノ)_3ーヒドロキシー1_オキソプロパン_2_イル)アミノ)_1_オキソプロパン_2_イル)(メチル)カルバモイル)_6,2(ージベンジルル——(5_イソプチル_9_イソプロピル_(2,22,24ートリメチルー5,8(1(14(17,20,23,26ーオクタオキソ_4,7(10(13(16(19,22,25ーオクタアザオクタコサン_(_チオ酸S-ベンジル(化合物SSPP-504)のNMP溶液(10mM5.0μし0.050μmol)に内部標準として4_プロピル安息香酸のNMP溶液(1(1mM2.25μl)を加えた。次に翻訳用緩衝液(6.25μ()、PURESYSTEM(r)classic(1SoにB(バイオコゥマー社製品番号PURE2048C)(10μ()、20種の天然アミノ酸溶液(それぞれ5mM2.5从()を加えた。

[[00993377]] なお翻訳用緩衝液の成分は8mM GTP、8mM ATP、160mMクレアチンリン酸、400mM HEPES-KOH pH7.6、800mM酢酸カリウム、48mM酢酸マグネシウム、16mMスペルミジン、8mMジチオスレイトール、0.8mM(10-HCO-H4folate, 12mg/ml E.coli MRE600(RNaseネガティブ)由来tRNA(Roche社)である。これにトリス(2_カルボキ

シェチル）ホスフィン水溶液（ｐＨ＝７．５、１．２５Ｍ、２．０从1）および先に調整したチオール溶液を加えた。この時点での反応液のｐＨは７．７であった。

反応液を３０℃で２２時間攪拌した後、ＬＣ/ＭＳで分析し、標題化合物の生成を確認した。２２時間攪拌後の反応液のｐＨは９．４であった。また、標題化合物（化合物SP—５１１）と加水分解体（化合物SP—５１２）との生成比はＵＶエリア比で２．６：1であった。

標題化合物（SP—５１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１１３４．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６４分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体（化合物SP—５１２）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１１５２．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４８分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

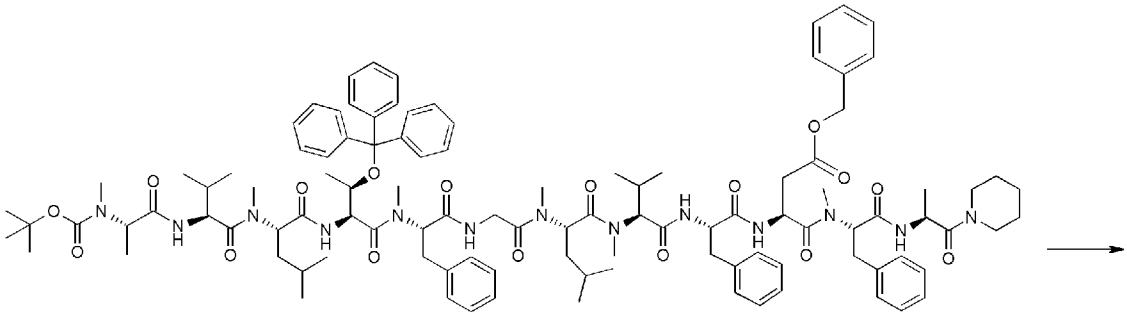
[0938] ３－３．N末MeALaモデルペプチドを用いた環化反応

N末端をALaやPheに続き、N—アルキルアミノ酸であるMeALaのモデル反応も実施し、環化体の生成を確認した。

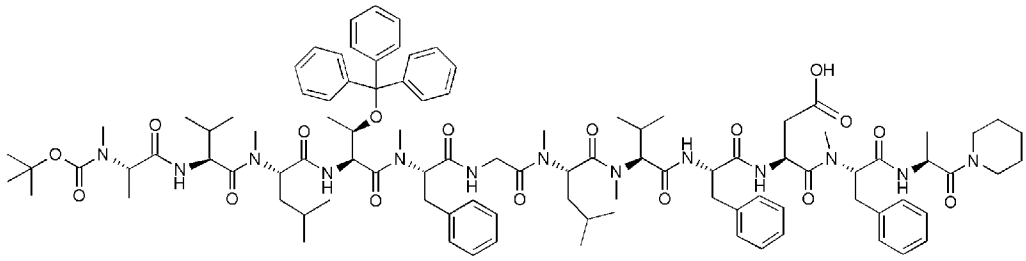
[0939] ３—３—１．N末端ＭｅＡＩａモデルペプチドの合成

（６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１５Ｓ．１８Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ．３３Ｓ）－１８．３０—ジベンジル—１２，２４—ジイソプチル—９，２７—ジィソプロピル－２，２，５，６，１１，１７，２３，２６—オクタメチル_３３－（メチル（（Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）_１_オキソ_１_（ピペリジン_１_ィル）プロパン_２_ィル）ァミノ）_３_フエニルプロパン—２_ィル）カルバモイル）—４，７，１０，１３，１６，１９，２２'_２５，２８，３１—デカオキソ－１５—（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）_３_オキサ—５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカァザペンタトリアコンタン－３５_酸（Ｂｏｃ_ＭｅＡＩａ-Ｖａｌ-ＭｅＬｅｕ-Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）-ＭｅＰｈｅ-Ｇｌｙ-ＭｅＬｅｕ-ＭｅＶａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ_ｐｉＤｅｒｉ

ｄｉｎｅ）（化合物SP—５１８）の合成



SP-519



SP-51 8

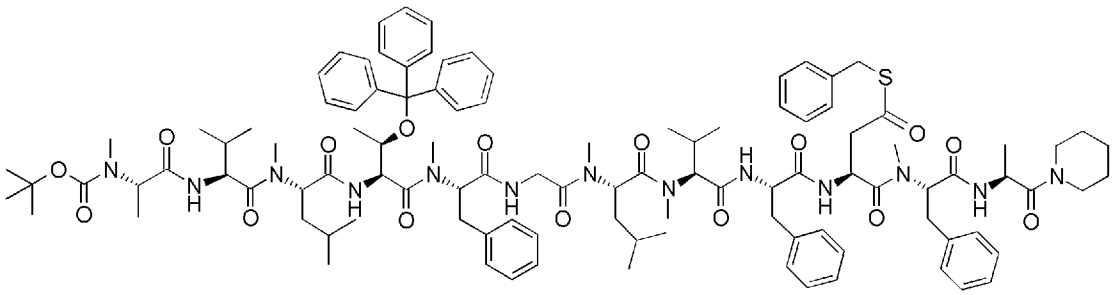
[0940] 常法に従って合成した（６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０—ジベンジル－１２，２４—ジイソプチル—９，２７—ジイソプロピル＿２，２，５，６，１１，１７，２３，２６—オクタメチル－３３＿（メチル（（Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿（（（Ｓ）—１—オキソ－１—（ピペリジン－１—ィル）プロパン－２—ィル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿ィル）カルバモイル）＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１—デカオキソ－１５—（（Ｒ）＿１—（トリチルオキシ）エチル）＿３＿オキサ＿５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２—デカァザペンタトリアコンタン－３５—酸　ベンジル（化合物SP—５１９、Ｂｏｃ－ＭｅＡｌａ－Ｖａｌ－ＭｅＬｅｕ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）－ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－ＭｅＬｅｕ－ＭｅＶａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ（０Ｂｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ）（５１６ｍｇ、０．２７４ｍｍｏｌ）のメタノール（３．５ｍｌ）溶液にヒドロキシパラジウム/炭素（１７２ｍｇ、５０％ｗｅｔ．ｗ/ｗ）を加えて、水素置換した後に室温で２．５時間攪拌した。その後、反応液をセライ

トろ過し、ろ液を減圧濃縮して標題化合物（SP_５１８）（４６８ｍｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１７９０．９（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８７分（分析条件　ＳＱＤＡＡ５０）

[0941] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル－２，２，５，６，１１，１７，２３，２６―オクタメチル_３３－（メチル（（Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）_１_オキソ_１_（ピペリジン_１_イル）プロパン_２_イル）アミノ）_３_フエニルプロパン―２_イル）カルバモイル）―４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―（（Ｒ）－１－（トリチルオキシ）エチル）_３_オキサ_５，８．１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカアザペンタトリアコンタン－３５_チオ酸_Ｓ―ベンジル（Ｂｏｃ－ＭｅＡｌａ－Ｖａｌ－ＭｅＬｅｕ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）―ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－ＭｅＬｅｕ－ＭｅＶａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ）（化合物SP－５２０）の合成



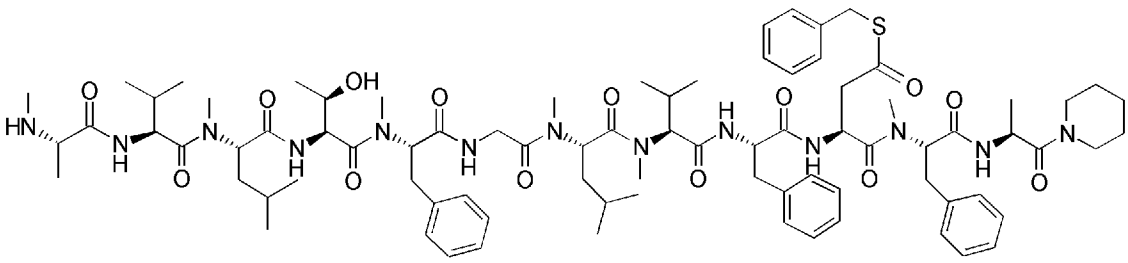
[0942] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_２，２，５，６，１１，１７，２３，２６―オクタメチル－３３－（メチル（（Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）_１_オキソ_１_（ピペリジン－１_イル）プロパン_２_イル）アミノ）_３_フエニルプロパン―２_イル）カルバモイル）_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―（（Ｒ）―１―（トリチルオキ

シ）エチル）_３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカアザペンタトリアコンタン―３５_酸（化合物SP―５１８）（５０．Ｏｍｇ、０．０２８ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（３２０μｌ）およびＤＭＦ（８０μｌ）に溶解させ、フエニルメタンチオール（６．９３ｍｇ、０．Ｏ５６ｍｍｏｌ）、ＤＩＣ（７．０４ｍｇ、０．０５６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ_ジメチルピリジン_４―アミン（２．５８ｍｇ、０．０２１ｍｍｏｌ）を加えて室温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液：メタノール）で精製して、標題化合物（SP―５２０）（３７．６ｍｇ、７１．０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１８９７．３（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．９９分（分析条件　ＳＱＤＡＡ５０）

[0943] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－１５，２７―ジベンジル－１２―（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）_９，２１―ジイソプチル―６，２４―ジイソプロピル_３，８，１４，２０，２３―ペンタメチル－３０_（メチル（（Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）―１―オキソ－１―（ピペリジン－１―イル）プロパン－２―イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）カルバモイル）－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ－２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―デカアザドトリアコンタン－３２―チオ酸　Ｓ―ベンジル（ＭｅＡｌａ－Ｖａｌ－ＭｅＬｅｕ－Ｔｈｒ―ＭｅＰｈｅ－Ｇｌｙ－ＭｅＬｅｕ－ＭｅＶａｌ－Ｐｈｅ－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－ＭｅＰｈｅ－Ａｌａ－ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ）（化合物SP―５２１）の合成



[0944] （６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ

)-18,30—ジベンジル—12,24—ジイソプチル—9,27—ジイソプロピル_2,2,5,6,11,17,23,26—オクタメチル_33-(メチル((S)_1_オキソ_1_(((S)_1_オキソ_1_(ピペリジン_1_イル)プロパン_2_イル)アミノ)_3_フエニルプロパン—2_イル)カルバモイル)—4,7,10,13,16,19,22,25,28,31—デカオキソー15—((R)-1-(トリチルオキシ)エチル)_3_オキサ_5,8,11,14,17,20,23,26,29,32_デカアザペンタトリアコンターン—35_チオ酸 S—ベンジル(化合物SP—520)(37.6mg、0.020mmol)をジクロロメタン(300μl)に溶解し、TFA(150.0μ,\、1.95mmol)を加えて室温で1時間半攪拌した。反応液にトリイソプロピルシラン(15.7mg、0.099mmol)を加えた後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ(0.1%FA水溶液:0.1%FAアセトニトリル溶液)で精製して標題化合物(SP_521)(18.5mg、60.0%)を得た。

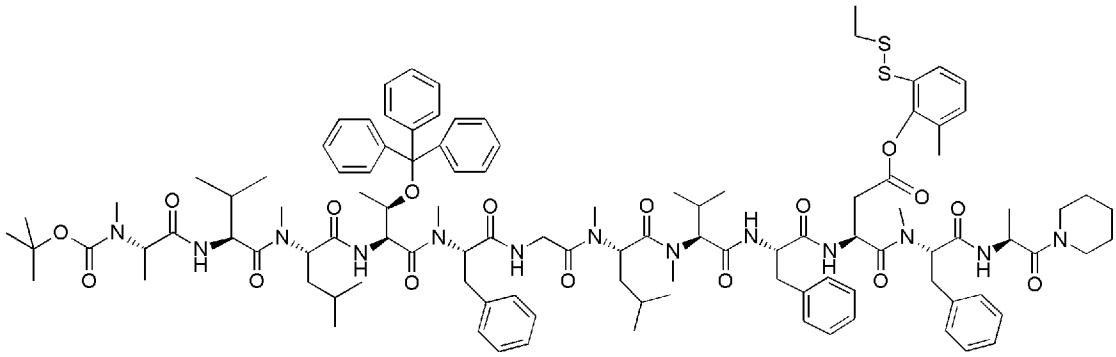
LCMS(ESI)m/z=1555.1(M-H)-

保持時間:0.79分(分析条件 SQDFA05)

[0945] (6S,9S,12S,15S,18S,24S,27S,30S,33S)-18,30—ジベンジル—12,24—ジイソプチル—9,27—ジイソプロピル—2,2,5,6,11,17,23,26—オクタメチル_33-(メチル((S)_1_オキソ_1_(((S)_1_オキソ_1_(ピペリジン_1_イル)プロパン_2_イル)アミノ)_3_フエニルプロパン—2_イル)カルバモイル)—4,7,10,13,16,19,22,25,28,31—デカオキソー15—((R)-1-(トリチルオキシ)エチル)_3_オキサ—5,8,11,14,17,20,23,26,29,32_デカアザペンタトリアコンターン—35_酸 2—(エチルジスルファニル)-6—メチルフエニル(Boc—MeAla-Val—MeLeu-Thr(Trt)-MePhe-Gly-MeLeu-MeVal-

Ｐｈｅ-Ａｓｐ(０(２-ＥｔＳＳ-６-Ｍｅ-Ｐｈ))-ＭｅＰｈｅ-Ａｌａ-ｐｉｐｅｒｉｄｉｎｅ)(化合物SP_５２２)の合成

なお、本明細書では、Aspの側鎖カルボン酸が2-(エチルジスルファニル)-6-メチルフエニルエステル基にて置換された化合物をAsp(0(2-EtSS-6-Me-Ph))と記載する。この部位がペプチドに含まれる場合にも同様に記載することとする。



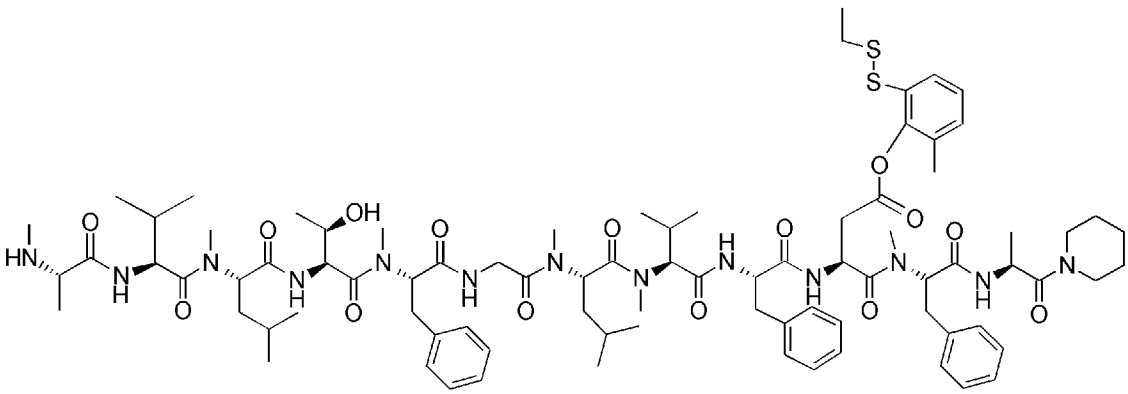
[0946] (６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ)-１８，３０―ジベンジル―１２，２４―ジイソプチル―９，２７―ジイソプロピル_２，２，５，６，１１，１７，２３，２６―オクタメチル―３３-(メチル((Ｓ)_１_オキソ_１_((Ｓ)_１_オキソ_１_(ピペリジン―１_イル)プロパン_２_イル)アミノ)_３_フエニルプロパン―２_イル)カルバモイル)_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ―１５_((Ｒ)_１_(トリチルオキシ)エチル)_３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２_デカアザペンタトリアコンタン―３５_酸(化合物ＳＰ―５１８)(５０．Ｏｍｇ、０．０２８ｍｍｏｌ)のジクロロメタン(３００ｕｌ)溶液に、常法に従い(j．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．２００９，１３１，５４３２―５４３７)別途合成した２―(エチルジスルファニル)_６_メチルフエノール(８．３８ｍｇ、０．０４２ｍｍｏｌ)、Ｎ，Ｎ'―メタンジイリデンビス(プロパン―２―アミン)(６．５２ｕｌ、０．０４２ｍｍｏｌ)、Ｎ，Ｎ_ジメチルピリジン_４―アミン(３．４１ｍｇ、０．０２８ｍｍｏｌ)を加え室温で終夜攪拌した。その後、反応液

を減圧濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール=70/30→0/100）にて精製し、標題化合物（化合物SP—522）（43.8mg，80%）を得た。

LCMS（ESI） m/z =1973.5（M—H）-

保持時間：1.01分（分析条件SQDAA50）

[0947] （3S，6S，9S，12S，15S，21S，24S，27S，30S）-15，27—ジベンジル—12_（（R）_1—ヒドロキシエチル）—9，21—ジイソプチル—6，24—ジイソプロピル—3，8，14，20，23—ペンタメチル—30_（メチル（（S）_1_オキソ_1_（（（S）—1—オキソ—1—（ピペリジン—1—イル）プロパン—2—イル）アミノ）_3_フエニルプロパン_2_イル）カルバモイル）—4，7．10，13，16，19，22，25，28—ノナオキソ—2，5．8．11，14．17，20，23，26，29—デカアザドトリアコンタン—32—酸（2-（エチルジスルファニル）_6_メチルフエニル（MeAla-Val-MeLeu-Thr-MePhe-Gly-MeLeu-MeVal-Phe—Asp（0（2-EtSS-6-Me-Ph））-MePhe-Ala-piperidine）（化合物SP—523）の合成



[0948] （6S，9S，12S，15S，18S，24S，27S，30S，33S）-18，30—ジベンジル—12，24—ジイソプチル—9，27—ジイソプロピル_2，2，5，6，11，17，23，26—オクタメチル—33-（メチル（（S）_1_オキソ_1_（（（S）_1_オキソ_1_（ピペリジン—1_イル）プロパン_2_イル）アミノ）_3_フエニルプ

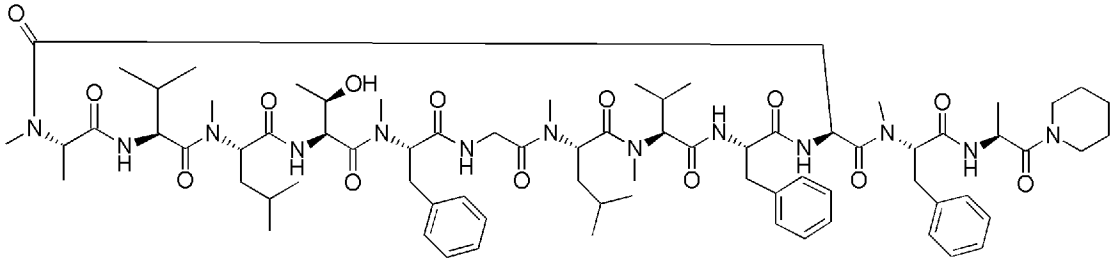
ロパン―2_ィル）カルバモイル）_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカオキソ－１５―（（Ｒ）―１―（トリチルオキシ）エチル）_３_オキサ_５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２―デカァザペンタトリアコンタン－３５―酸　２―（エチルジスルファニル）_６_メチルフエニル　(化合物SP―５２２）（４２．９ｍｇ、２２ｕｍｏｌ）のジクロロメタン（２００ｕｌ）溶液にトリフルオロ酢酸（１００ｕｌ）とトリイソプロピルシラン（２２．３ｕし　０．１０９ｍｍｏｌ）を加え、室温で１０分間攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸ァセトニトリル溶液＝７０/ ３０→０/ １００）にて精製し、標題化合物（化合物SP―５２３）（１１．７ｍｇ、３３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ ｚ　＝１６３２．９（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８３分　(分析条件３０Ｄ「六０５）

[0949] ３－３－２．Ｎ末端ＭｅＡＩａモデルベプチドでの環化反応例

（２Ｒ．５Ｓ．８Ｓ．１１Ｓ．１４Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ．２９Ｓ）－１４．２６―ジベンジル－１１_（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）_８．２０―ジイソプチル―５，２３―ジイソプロピル_Ｎ，１，２．７．１３．１９，２２―ヘプタメチル－３，６．９．１２，１５，１８，２１，２４，２７，３１―デカオキソ－Ｎ_（（Ｓ）_１_ォキソ_１_（（（Ｓ）－１_オキソ_１_（ピペリジン－１_ィル）プロパン_２_ィル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_ィル）－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―デカァザシクロヘントリアコンタン－２９_カルボキサミドの_(化合物SP_５２４）合成



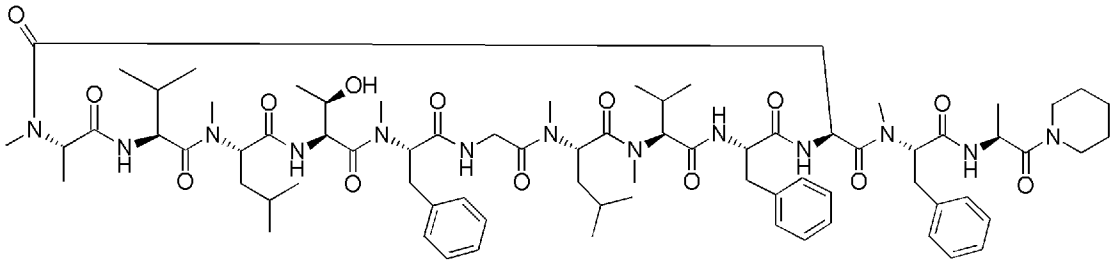
[0950] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ

）-１５，２７―ジベンジル－１２_（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）－９，２１―ジイソプチル―６，２４―ジイソプロピル_３，８，１４，２０，２３―ペンタメチル－３０_（メチル（(Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）―１―オキソ－１―（ピペリジン－１―イル）プロパン－２―イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）カルバモイル）_４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ_２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―デカアザドトリアコンタン－３２―チオ酸　Ｓ―ベンジル（化合物ＳＰ―５２１）のＮＭＰ溶液（１０ｍＭ、１０μｌ、０．ＩＯμｍｏｌ）に４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオールの４００ｍＭリン酸水素二ナトリウム緩衝液（0．２Ｍ、５０．０μ１、１０．０μｍｏｌ）、トリエチルアミンのＮＭＰ溶液（１Ｍ、１０μ１、１０．０μｍｏｌ）およびＮＭＰ（３０．０μｌ）を加えて、室温で４時間攪拌した。ＬＣ/ＭＳでの分析により、標題化合物（SP―５２４）の生成を確認しし。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１４３２．８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０６分（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

[0951] （２Ｓ．５Ｓ．８Ｓ．１１Ｓ．１４Ｓ．２０Ｓ．２３Ｓ．２６Ｓ．２９Ｓ）－１４．２６―ジベンジル－１１_（（Ｒ）_１―ヒドロキシエチル）_８．２０―ジイソプチル―５，２３―ジイソプロピル_Ｎ，１，２．７．１３，１９，２２―ヘプタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３１―デカオキソ－Ｎ_（（Ｓ）_１_オキソ_１_（（（Ｓ）-１_オキソ_１_（ピペリジン－１_イル）プロパン_２_イル）アミノ）_３_フエニルプロパン_２_イル）－１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―デカアザシクロヘントリアコンタン－２９_カルボキサミド_（化合物SP_５２４）の合成



[0952] （３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）－１５，２７―ジベンジル－１２＿（（Ｒ）＿１―ヒドロキシエチル）－９，２１―ジイソプチル―６，２４―ジイソプロピル＿３，８，１４，２０，２３―ペンタメチル－３０＿（メチル（（Ｓ）＿１＿オキソ＿１＿（（（Ｓ）―１―オキソ－１―（ピペリジン－１―イル）プロパン－２―イル）アミノ）＿３＿フエニルプロパン＿２＿イル）カルバモイル）＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナオキソ＿２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９―デカアザドトリアコンタン－３２―酸　２＿（エチルジスルファニル）＿６＿メチルフエニル（化合物Ｐ―５２３）（０．１６３ｍｇ，０．１００ｕｍｏｌ）と１―ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（０．５７５ｍｇ、５．Ｏｕｍｏｌ）のＤＭＦ（５０ｕｌ）溶液に１Ｍリン酸緩衝溶液（ｐＨ８．５、２０ｕｌ）、水（２５ｕｌ）を加えた。さらに１Ｍトリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）水溶液（５ｕｌ）を加え、室温で２時間攪拌した。ＬＣＭＳを用いて反応を観測したところ、標題化合物（化合物ＳＰ―５２４）が観測された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１４３２．９（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0953] ５．ＲＮＡ―ペプチド複合体を用いた反応補助基を利用しないペプチド環化

ＲＮＡ―ペプチド複合体において反応補助基を利用しないペプチド環化反応を施し、生成物を電気泳動にて解析した。

[0954] ５－１．ピューロマイシンを含む鋳型ｍＲＮＡの調製とそれを用いたＲＮＡ―ペプチド複き　の麺　合成

ＰＣＲにより調製した３つのＤＮＡ（配列番号　ＤＭ＿Ｄ１、ＤＭ＿Ｄ２、ＤＭ―Ｄ３）を鋳型に、それぞれＩｎ ｖｉｔｒｏ転写によりｍＲＮＡ（配列番号　ＲＭ＿Ｄ３、

R_D4、R—D5)を調整し、RNeasy mini kit (Qiagen社)を用いて精製した。各々に対し、10μMのmRNAに、50μMのピューロマイシンリンカー(Sigma社)(配列番号C—D1) 1X T4 RNAライゲースリアクションバッファー(NEB社)、1mM D汀、1mM ATP、0.02%BSA (Takara社)、510μM (PEG2000) (Wako社)、10% DMS0、1% (v/v) RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111) 0.85 unit/μL T4 RNAライゲース(NEB社)を加え、15℃で一晩ライゲーション反応させた後、RNeasy MinELutekit(Qiagen社)により精製した。次に、上記で調製した3つのmRNA-ピューロマイシンリンカー連結体1 μMそれぞれを錶型に、前述の無細胞翻訳液と0.25mM Ser、0.25mM GLy, 0.25mM Pro, 0.25mM Arg, 0.25mM Thr, 0.25mM Tyrおよび、50 μ,M Asp (SBn) —t RNAG LuAAG (化合物AT—7—A)を加え、37℃で60分間保温した後、続けて室温で12分間保温した。また、OT98RNA (配列番号 RM—D4)、OT99RNA (配列番号 RM—D5)由来のmRNA-ピューロマイシンを錶型にする場合、それぞれ0.25mMのHh6, 0.25mMのALaを加えて翻訳を行った。その後、反応液をRNeasy mineLute(qiagen社)により精製し、■ -ペプチド複合体を得た。

[0955] 配列番号 DM—D1 0T-97 (配列番号:82)

OT-97 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGTACTACAACGCGTCTTCC

GTACCGTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAAA

[0956] 配列番号 DM—D2 0T-98 (配列番号:83)

OT-98 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTTACTACAACGCGTCTTCC

GTACCGTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAAA

[0957] 配列番号 DM—D3 0T-99 (配列番号:84)

OT-99 DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTACTACAACGCGTCTTCC

GTACCGTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAAA

[0958] 配列番号 RM—D3 OT-97 (配列番号:85)

0T-97 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGGGUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUAGCGGCUCUGG

CUCUGGCUCUAAAAAAA

[0959] 配列番号 RM—D4 OT-98 (配列番号:86)

0T-98 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGUUUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUAGCGGCUCUGG

CUCUGGCUCUAAAAAAA

[0960] 配列番号 RM—D5 OT-99 (配列番号:87)

0T-99 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGGCUACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUAGCGGCUCUGG

CUCUGGCUCUAAAAAAA

[0961] 配列番号 C—D1 HY_C18_dCdC Linker

[P] dCdC [Fluorescein-dT] [Space r18] [Space r18] [Space r18] [Space r18] dCdC [puromycin] ([P]:5,リン酸化)

[0962] 5-2.ペプチドーRNA複合体を用いた反応補助基を利用しないペプチド環化反応

窒素雰囲気下、上記で調整したOT-97 RNA配列(配列番号RM—D3)に由来する70μLのRNA-ペプチド複合体に、20.1从Lのチオフエノール溶液(5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール水溶液、5Mトリエチルァミン水溶液を等量混合したもの)、10从1 500mM トリカルポキシエチルホスフィン溶液 (pH7.5)を混合し、50℃で2時間反応させた。また、HEPES緩衝液 (pH7.6)を用いて5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール溶液および5M トリエチルァミン溶液を調整し、これらを等量混合してチオフエノール溶液を調整した後、OT-98 RNA配列(配列番号RM-D4)、OT-99 RNA配列(配列番号RM—D5)に由来するRNA-ペプチド複合体70μLそれぞれに対し、20.1μLのNMP、上述のチオフエ

ノール溶液２０．１μＬ、５００ｍＭ　トリカルボキシエチルホスフィン溶液　（ｐＨ７．５）１ＯμＬ　を窒素雰囲気下で混合し、３０℃で２２時間攪拌した。

得られた3つの反応液それぞれから、RNeasy mine Lute(q iagen社)を用いてペプチドーRNA複合体を精製し、純水７０μ1にてカラムから溶出した。続けて、８．４μLの１０ｘRNase ONE ribonuc Lease反応ノくッファー（promega社）、２．８μLのRNase ONE ribonuc Lease（promega社）、２．８μLのRNase H（Life techno log ies社）を加え、37度にて一晩保温した。続いて、得られた反応溶液と何も反応させていないピューロマイシンリンカー（配列番号C-D1）をpept ide-PAGE mini（TEFC0社）にて電気泳動し、ピューロマイシンリンカーに由来するFLuorece inにてバンドを可視化した。その結果、いずれの反応溶液に関してもピューロマイシンリンカーにペプチドが結合したことに由来するバンド移動度の差が観測された（（図４７）。このことから、目的の環化ペプチド—ＲＮＡ複合体の存在が示された。

[0963] ６．ノルロイシンを使ったメチォニン代替とアミノペプチダーゼを利用した《プチド環化一の応用

翻訳後に、N末端のフオルミル化された翻訳開始アミノ酸をメチオニンアミノペプチダーゼ、及びペプチドデフオルミラーゼにて切断し、それにより露出したα-アミノ基を用いてペプチド環化反応を施し、MALDI-MS にて分析した。なお、翻訳開始アミノ酸としては、メチオニンの代わりに、酸化されやすい硫黄原子を含まないアミノ酸であるノルロイシン（CAS番号３２７－５７－１）を使用した。

[0964] ６－１．ノルロイシンで翻訳開始され、ベンジルチオエステル化されたアスパラギン酸誘導体を側鎖に含む《プチドを用いた、翻訳後開始アミノ酸除去と反応補助基を利用しないペプチド環化

１μM 錶型ＲＮＡ Mgtp—Ｒ（配列番号Ｒ＿４１）に、０．２５ｍＭ Pro，０．２５ｍＭ GLy，０．２５ｍＭ Thr，０．２５ｍＭ Arg，０．２５ｍＭ Tyr，２．５ｍＭ ノルロイシン（N Le）および、５０μM Asp(SBn) - t

RNAGLuAAG (化合物AT-7-A) を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳溶液1μLに9μLの0.2%トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1从LのCHCA溶液 (10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケイ皮酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸溶液) と混和し、プレート上乾固した。MALDI-MSの結果、フォルミルノルロイシンより翻訳開始された目的のペプチドP_D5に由来するピークが観測された (図48、ピークI)。続いて上記で得られた翻訳溶液4从1に、Hisタグ付加タンパクとして調製した150μM メチオニンアミノペプチダーゼ、20μM ペプチドデフォルミラーゼをそれぞれ0.5从1ずつ加え、37℃で30分間保温した。得られた反応液1μLを前述したように前処理し、MALDI-MSにて分析したところ、開始フォルミルノルロイシンが外れ、N末端にGLyが露出したペプチドP—141に相当するピークが観測された (図48、ピークΠ)。最後に、このP—141を含む翻訳溶液3.5μL、1れLチオフエノール溶液 (5M 4—トリフルオロメチルチオフエノール、5Mトリエチルアミンを等量混合したもの)、0.5从1 500mM トリカルボキシエチルホスフィン溶液 (pH7.6)を混合し、50℃で2時間保温した。得られた反応溶液2从1を使って、12从1の2%トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1μLのCHCA溶液 (10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケイ皮酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸溶液) と混和し、プレート乾固した後、MALDI—MSにて解析を行った。その結果N末端α—アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した目的の化合物P-143に相当するピークを観測した (図48、ピークΠI)。

[0965] ペプチド配列P—D5

f NLeG LyThrThrThrArg[Asp(SBn)]ProTyrArgG LyG Ly

[0966] MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1427.4 (配列P-D5に対応するペプチド。Ca Lc. 1427.7)

m/z : [H+M] + = 1286.4 (配列P-141に対応するペプチド。Ca Lc. 1286.6)

m/z: [H+M]+ = 1162.3 (配列P-143に対応するペプチド。Ca Lc1 162.6)

[0967] [実施例21] 分枝ペプチドの翻訳産物からの生成 (直鎖部2の生成)

1. 分枝ペプチドの翻訳産物からの生成を可能とするユニットの選択および、反細 綱 寸

1-1. 分子間モデル反応によるアミド化反応

以下に示す1-(2- メルカプトエチルアミノ)-1-オキソ-3- フエニルプロパン-2-イルカルバミン酸 (S)-tert- ブチル (化合物10) の合成検討の結果、エステル官能基を水中でチオールの添加によりチオエステルに活性化させることが出来、かつ活性化させたチオエステルからアミンとの縮合反応によりアミド結合を選択的に生成させることができることが明らかとなつた。

以下の反応の結果を図41に示す。

[0968] Entry 1

2- メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (33mg、 0.200mmol) と2- アミノエタンチオール 塩酸塩 (22.7mg、 0.200mmol) にpH7.7の0.2M HEPES緩衝液 (1.60ml)、DMF (0.400ml) を加えpH7.4に調整し、室温で5分間攪拌した。その後、2-(tert- ブトキシカルボニルアミノ)-3- フエニルプロパン酸 (S)-2- アミノ-2-オキソエチル (化合物11) (6.4mg、 0.02mmol) を加え、50度で24時間攪拌した。

LCMSを用いて反応の変化を観測したところ、24時間で1-(2- メルカプトエチルアミノ)-1-オキソ-3- フエニルプロパン-2-イルカルバミン酸 (S)-tert-ブチル (化合物10) が生成していることを確認した。加水分解物と目的化合物10との生成比は、LCMSのUVエリア比で46:43であった。

[0969] Entry 2

2- メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (164mg、 1.000mmol) と2- アミノエタンチオール 塩酸塩 (11.4mg、 0.100mmol) にpH7.0の0.2M HEPES緩衝液 (0.250ml)、DMF (0.200ml)、水 (0.500ml) を加え室温で5分間攪拌

した。さらに１Ｍ　水酸化ナトリウム水溶液　(0．０５０ｍｌ）を加えてｐＨ７．６に調整した後に、2-(tert-　プトキシカルボニルアミノ)-3- フエニルプロパン酸　(S)-2-アミノ-2-オキソエチル　(化合物１１）（３．２ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）を加え、４０度で２４時間攪拌した。

ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、２４時間で1-(2-メルカプトエチルアミノ)-1-オキソ-3- フエニルプロパン-2-イルカルバミン酸　(S)-tert-プチル　(化合物１０）が生成していることを確認した。加水分解物と目的化合物１０との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で２４　:６０であった。

[0970] Entry 3

2-ジメチルアミノエタンチオール塩酸塩　(１４２ｍｇ、　１．０００ｍｍｏｌ）と2-アミノエタンチオール 塩酸塩　(１１．４ｍｇ、　０．１００ｍｍｏｌ）にｐＨ７．０の０．２Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝液　(0．７５０ｍｌ）、ＤＭＦ（０．２００ｍｌ）、水　(0．１００ｍｌ）を加え室温で５分間攪拌した。さらに１Ｍ　水酸化ナトリウム水溶液　(0．１５０ｍｌ）を加えてｐＨ７．３に調整した後に、2-(tert-　プトキシカルボニルアミノ)-3- フエニルプロパン酸　(S)-2-アミノ-2-オキソエチル　(化合物１１）（３．２ｍｇ、　０．０１ｍｍｏｌ）を加え、４０度で２４時間攪拌した。

ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、２４時間で1-(2-メルカプトエチルアミノ)-1-オキソ-3- フエニルプロパン-2-イルカルバミン酸　(S)-tert-プチル　(化合物１０）が生成していることを確認した。加水分解物と目的化合物１０との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で２３　:７１であった。

[0971] Entry 4

2-ジメチルアミノエタンチオール塩酸塩　(４２５ｍｇ、　３．０００ｍｍｏｌ）と2-アミノエタンチオール 塩酸塩　(１１．４ｍｇ、　０．１００ｍｍｏｌ）にｐＨ７．０の０．５Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝液　(0．３００ｍｌ）、ＤＭＦ（０．２００ｍｌ）、水　(0．２００ｍｌ）を加え室温で５分間攪拌した。さらに１Ｍ　水酸化ナトリウム水溶液　(0．３００ｍｌ）を加えてｐＨ６．９に調整した後に、2-(tert-　プトキシカルボニルアミノ)-3- フエニルプ

ロパン酸 （S)-2-アミノ-2-オキソエチル (化合物１１）（３．２ｍｇ、 ０．０１ｍｍｏｌ）を加え、４０度で２４時間攪拌した。

ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測したところ、２４時間で1-(2-メルカプトエチルアミノ)-1-オキソ-3-フエニルプロパン-2-イルカルバミン酸 （S)-tert-ブチル (化合物１０）が生成していることを確認した。加水分解物と目的化合物１０との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で１５ :８４であった。

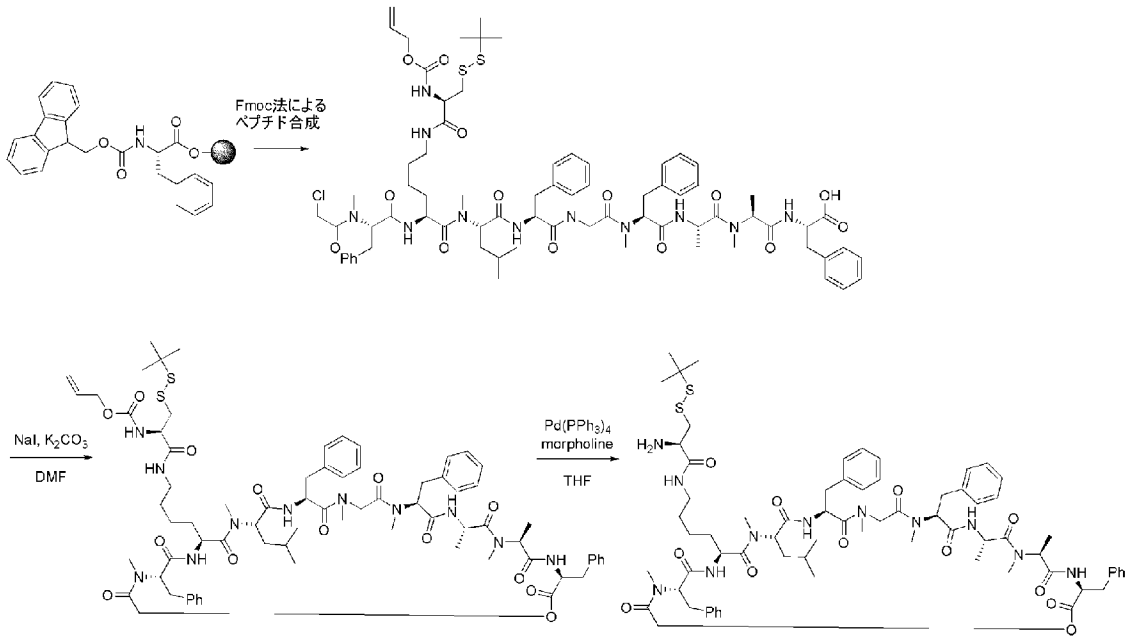
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ３２５ (Ｍ+Ｈ）+

保持時間 :０．７１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

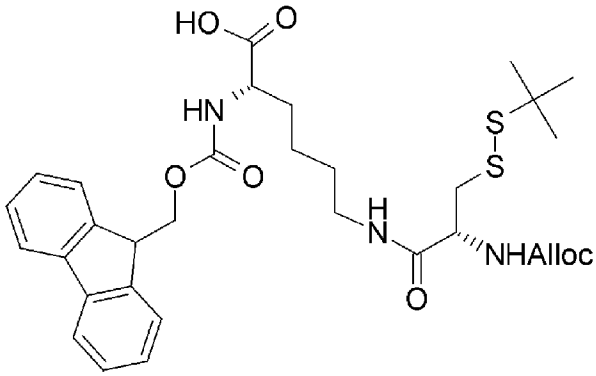
[0972] １-２．翻訳ペプチドモデル化合物による分子内分枝ペプチド_(直鎖部２）_鍾 反歳

既に環化されたペプチド (1回目のアミド環化）が生成後のペプチドを想定したモデルからの反応にて分枝化 (直鎖部２の生成）を確認した。以下のスキームに従い、アミド環化 (アミド環化部も主鎖環化を用いた）され、かつ主鎖にエステル官能基を有し、アミノ酸側鎖に反応補助基を有するアミノ基を有するモデル化合物の合成を行った。続いて分枝化実験を行い、環状ペプチドからRNAが安定に存在できる温和な反応条件にて水中にて分枝化が観測された。

[0973] １-２-１．翻訳ペプチドモデル化合物P-150の合成



(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニルアミノ)-6-((R)-2-(アリルオキシカルボニルアミノ)-3-(tert-ブチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸 (Fmoc_Lys_(AL Loc-Cvs(StBu)_)_-OH)_(化合物150a)_の合成

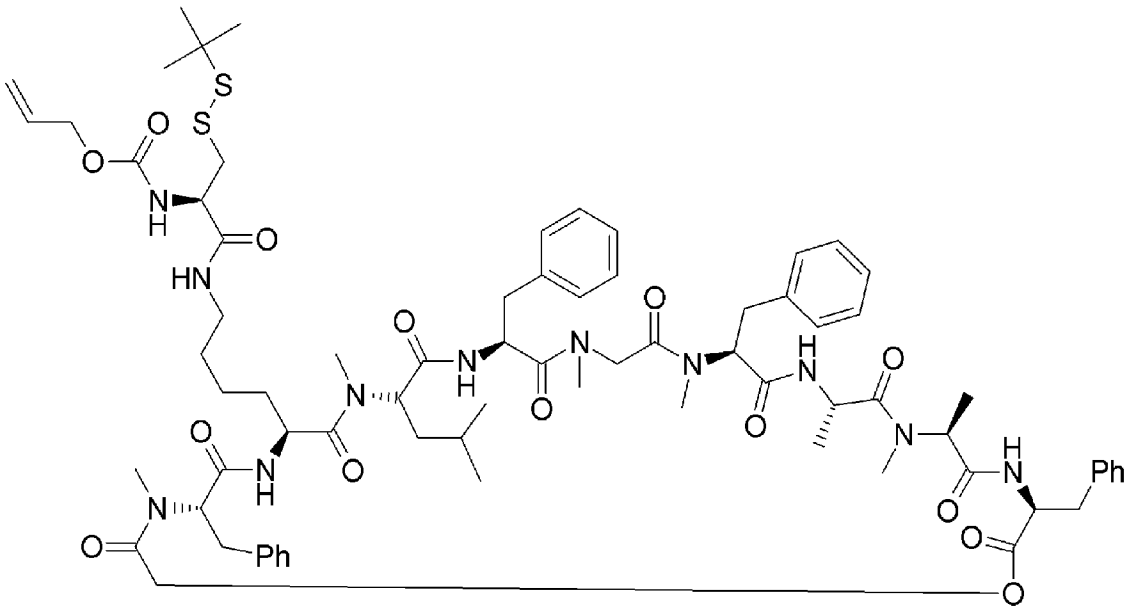


[0974] (R)-2-(アリルオキシカルボニルアミノ)-3-(tert-ブチルジスルファニル)プロパン酸(AL Loc-Cys(StBu)-OH) (1.9g、6.48mmol)とN_ヒドロキシスクシンイミド(0.745g、6.48mmol)のジクロロメタン(10ml)溶液を0度に冷却した後に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC・HCl 1.24g、6.48mmol)を加え、反応液を室温で20時間攪拌した。20時間後、反応液を0度に冷却した後にN,N—ジイソプロピルエチルアミン(2.49ml 14.25mmol)とFmoc_L_ys_OH(2.39g、6.48mmol)を加え、反応液を室温で2時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタンと1M塩酸を加えて、ジクロロメタンにて抽出を行った。有機層を25wt%食塩水で洗浄し、得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニルアミノ)-6-((R)-2-(アリルオキシカルボニルアミノ)-3-(tert-ブチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸(化合物150a、Fmoc-Lys(AL Loc-Cys(StBu))-OH) (2.66g、64%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 644.6 (M+H)+

保持時間:0.91分(分析条件30D FAO5)

[0975] （Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）－１－オキソ－１－（４－（（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ）－５，１４，２０，２９－テトラベンジル－１１－イソプチル－４，１０，１６，１９，２３，２５，２６－ヘプタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０－デカオキソ－１－オキサ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナアザシクロトリアコンタン－８－イル）プチルアミノ）プロパン－２－イルカルバミン酸アリル（化合物１５０ｂ）の合成



[0976] Ｆｍｏｃアミノ酸として、Fmoc-MePhe-OH 、Fmoc-MeALa-OH 、Fmoc-MeLeu-OH 、Fmoc-MeG Ly-OH、Fmoc-Phe-0H 、Fmoc-ALa-0H 、Fmoc-Lys (AL Loc-Cys(StBu))-OH（化合物１５０ａ）を用いてペプチドの伸長を行った。ペプチドの伸長後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を脱保護し、ＨＯＡｔ，ＤＩＣを縮合剤としてクロロ酢酸を縮合させた後、レジンをＤＭＦにて洗浄した。レジンにジクロロメタン/２，２，２－トリフルオロエタノール（＝１/１，ｖ/ｖ、４ｍＬ）を加えて１時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/２，２，２－トリフルオロエタノール（＝１/１，ｖ/ｖ、１ｍＬ）にて洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、粗生成物

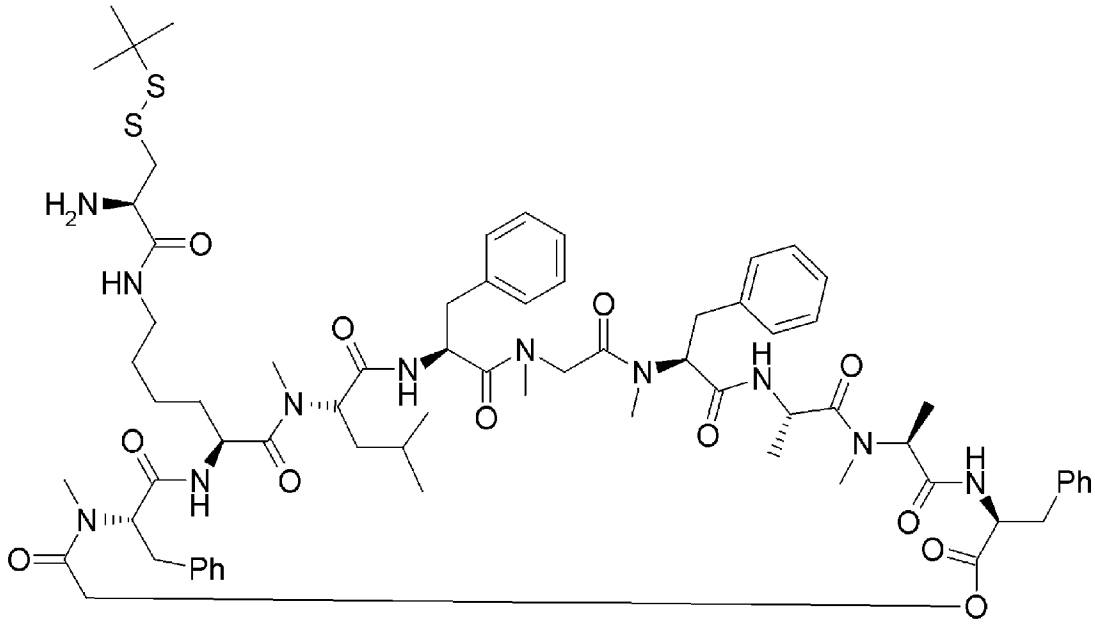
（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，３０Ｒ）－２，１１，１７＿トリベンジル―３０＿（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）－２３―（（Ｓ）―２―（２―クロロ－Ｎ―メチルアセトアミド）－３＿フエニルプロパンアミド）－２０＿イソプチル－５，６，８，１２，１５，２１＿ヘキサメチル＿４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２９，３２―ノナオキソ－３３＿オキサ＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２８，３１―ノナアザヘキサトリアコンタ＿３５―エン－１―酸（cLAc-MePhe-Lys(ALLoc-Cys(StBu))-MeLeu-Phe-MeGLy-MePhe-ALa-MeALa-Phe)（８７．２ｍｇ）を得た。得られた粗生成物（cLAc-MePhe-Lys(ALLoc-Cys(StBu))-MeLeu-Phe-MeGLy-MePhe-ALa-MeALa-Phe)（８７．２ｍｇ，０．０５９ｍｍｏｌ）とヨウ化ナトリウム（２２．２ｍｇ，０．１４８ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（７．５ｍｌ）溶液に窒素雰囲気下、炭酸カリウム（１２．３ｍｇ、０．０８９ｍｍｏｌ）を加え、反応液を３５度で２．５時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、標題化合物１５０ｂ（７４．２ｍｇ、８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４３３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６６分（分析条件３０Ｄ ＦＡ５０）

[0977] 化合物Ｐ＿１５０

＿（Ｒ）＿２＿アミノ＿３＿＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）＿Ｎ＿＿（４－（（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ）－５，１４，２０，２９―テトラベンジル－１１＿イソプチル－４，１０，１６，１９，２３，２５，２６―ヘプタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０―デカオキソ－１＿オキサ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８―ノナアザシクロトリアコンタン＿８―イル）ブチル）プロパンアミドの合成



[0978] （R）－3－（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）＿１＿オキソ＿１＿（４－（（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ）－５，１４，２０，２９―テトラベンジル－１１＿イソプチル－４，１０，１６，１９，２３，２５，２６―ヘプタメチル＿３，６，９，12，１５，１８，２１，２４，２７，３０－デカオキソ－１－オキサ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８－ノナアザシクロトリアコンタン－８－イル）ブチルアミノ）プロパン―２―イルカルバミン酸アリル（化合物１５０ｂ）（２３．１ｍｇ，０．０１６ｍｍｏｌ））のＴＨＦ（０．１６ｍｌ）溶液に窒素雰囲気下、テトラキス（トリフエニルホスフィン）パラジウム（０）（２．Ｏｍｇ、０．００２ｍｍｏｌ）とモルホリン（５．６２ｍし０．０６４ｍｍｏｌ）を加え、反応液を３０度で４時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、標題化合物Ｐ＿１５０（１０．２ｍｇ、４７％）を得た。

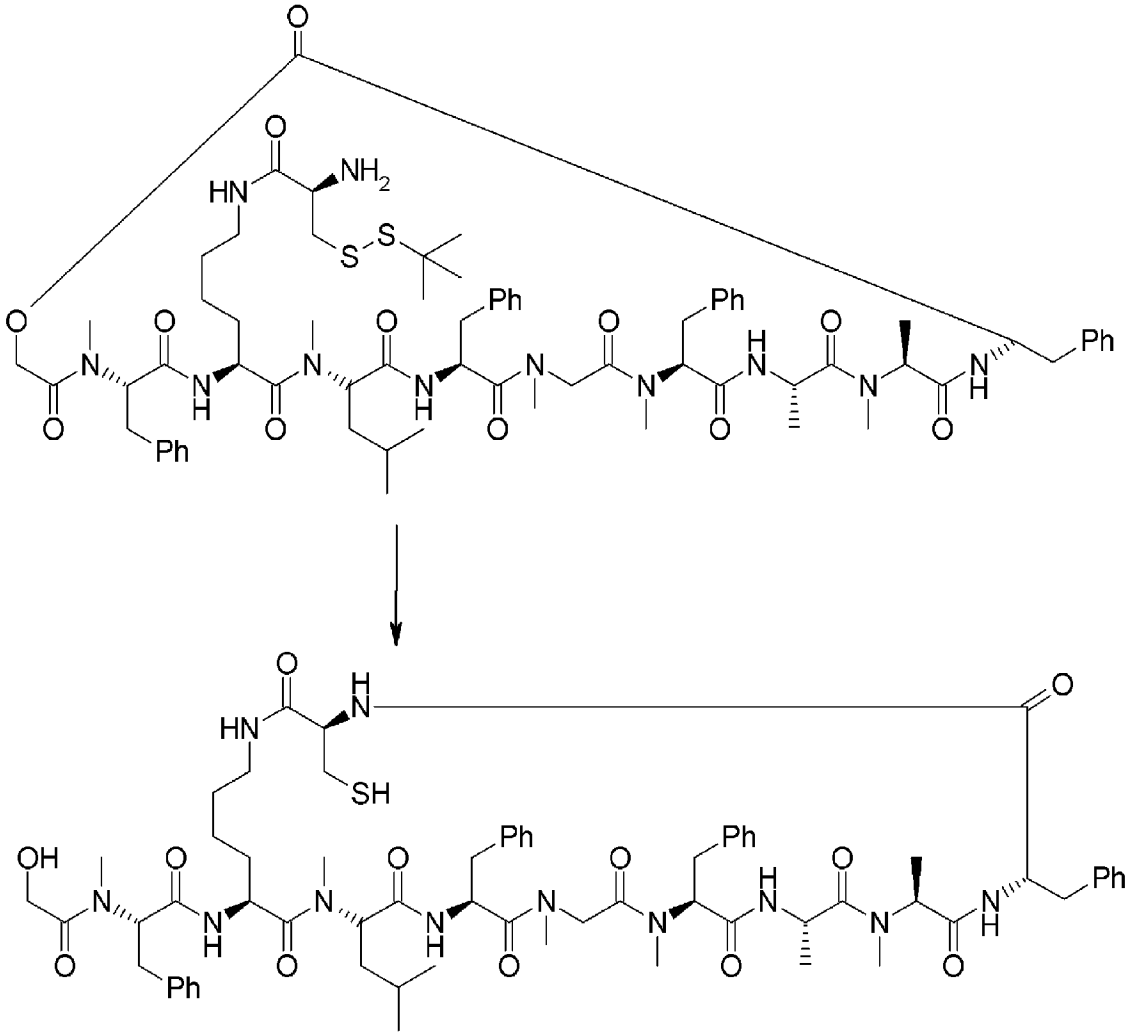
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１３４９　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７４分（分析条件３０Ｄ　ＦＡＯ５）

[0979] <u>１－２－２．翻訳モデルペプチドからの分子内分枝ペプチド生成反応</u>

化合物Ｐ＿１５１

(S)-2-(2- ヒドロキシ-N- メチルアセトアミド)-3- フエニル-N-((3R, 6S, 9S, 12S, 15S, 21S, 24S, 27S)-6, 15, 21- トリベンジル-24- イソプチル-3- (メルカプトメチル)-9, 10, 12, 16, 19, 25- ヘキサメチル-2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26- ノナオキソ- 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25- ノナアザシクロヘントリアコンタン- 27- イル) プロパンアミドの合成



[0980] 2- メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (99mg、 0.600mmol) とトリス (2_ カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (2.9mg、 0.OlOmmol) にpH7.0の0.5M HEPES緩衝液 (0.060ml)、1, 3- ジメチル-2- イミダゾリジノン (DMI) (0.010m1)、水 (0.010ml) を加え室温で5分間攪拌した。さらに2M 水酸化ナトリウム水溶液 (0.060ml) を加えてpH8.5に調整した後に、R)-2- アミノ- 3-(tert- プチルジスルファニル)-N-(4-((5S, 8S, 11S, 14S, 20

S, 23S, 26S, 29S)-5, 14, 20, 29- テトラベンジル-11-ィソプチル-4, 10, 16, 19, 23, 25, 26- ヘプタメチル-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30- デカオキソ-1-オキサ-4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28- ノナァザシクロトリアコンタン-8-ィル)プチル)プロパンアミド (化合物P—１５０）の０．０１Ｍ 1, 3-ジメチル-2- イミダゾリジノン（ＤＭＩ）溶液 (0．０５０ｍし ０．５μmＯＩ）を加え、３０度で６時間３０分間攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳを用いて観測したところ、６時間３０分後、目的化合物が生成していることを確認し、目的化合物P-１５１と加水分解化合物との生成比はＬＣＭＳのＵＶエリア比で５５：９であった。(図４２、加水分解化合物 保持時間：０．６４分）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = １２６１ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８７分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[0981] ２．１回目のi景化でほ応補旦ガ¼を有するN末端に位置する≡角ニニ〆トとC¾端個Iのほ忤チォエステル (な差ニニット）のアミド化ほ応を用い、２回目の分枝化にてCys-Pro-MG Lvから活件エステルを発生させ、無保護の個I銷ァミノ¾と反応させて分枝させる例の輸

２-１．自動合成機によるキ銷にエステル¾を含む《プチドの因相合成一般法

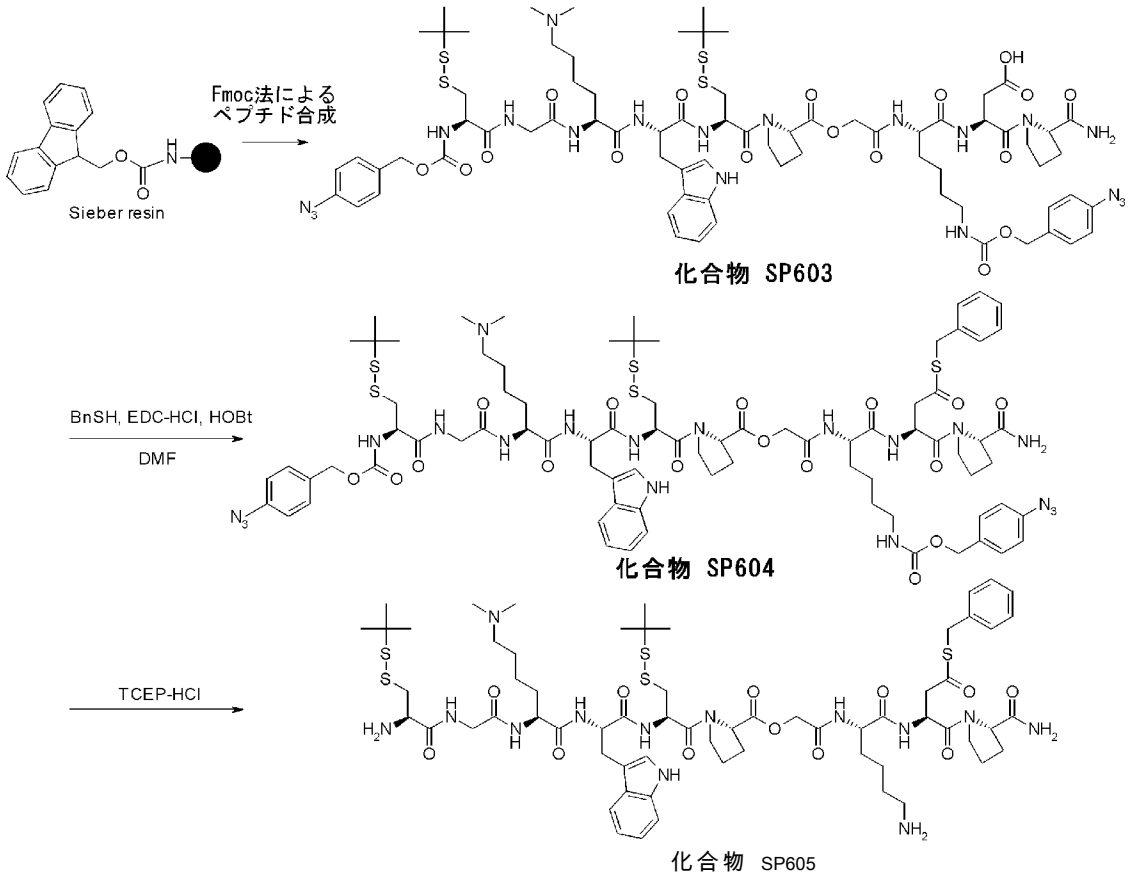
合成機にＳｉｅｂｅｒ Ａｍｉｄｅ ｒｅｓｉｎ（１カラムあたり１６０—２００ｍｇ、Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍより購入）と、各種Ｆｍｏｃアミノ酸 (0．６ｍｏｌ/ Ｌ）と１—ヒドロキシ－７－ァザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）（０．３７５ｍｏｌ/ Ｌ）のＮ_メチル_２_ピロリドン (ＮＭＰ）溶液と、ジイソプロピルカルポジイミド (ＤＩＣ）のＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド (ＤＭＦ）溶液 (１０％ｖ/ ｖ）をセットし、Ｆｍｏｃ脱保護溶液として、ピペリジンのＮ，Ｎ—ジメチルホルムァミド溶液 (２０％Ｖ/ Ｖ）を用い、Ｆｍｏｃ脱保護反応時間を５分として合成を行った。ＤＭＦ溶液で洗浄した後、Ｆｍｏｃ脱保護に次いでＦｍｏｃアミノ酸の縮合反応を１サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでレジン表面上にペプチドを伸長させた。このような実験例として相本らの非特許文献 (Ｔｅｔｒａｈｅｄ

ｒｏｎ ２００９， ６５， ３８７１_３８７７）を参考にして合成することもできる。なお、本法は、他ペプチドの合成法としても、本明細書一般に渡って適切なケースに使用できる。

[0982] ２－２．１回目の環化で反応補助基を有するN末端に位置する三角ユニットとC末端側の活性チオエステル（交差ユニット）のアミド化反応を用い、２回目の分枝化にてCys-Pro-皿GLyから活性エステルを発生させ、無保護の側鎖アミノ基と反応させて碰させる蘭ほ反細幅せ

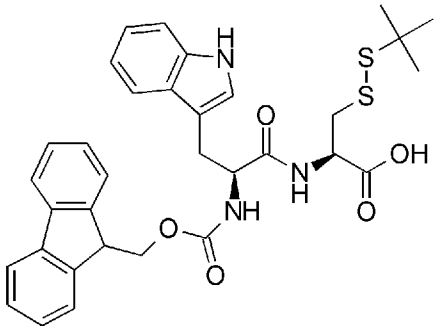
２－２－１．翻訳ペプチドモデル化合物SP６０５の合成

以下のスキームに従い、N末端にCysを有し、C末端側の１回目の環化ユニットとしてAsp(SBn)を有し、２回目の分枝化ユニットとして、活性チオエステル発生パートとして$Cys-Pro$-HQGLyを有し、側鎖アミン反応部位としてLysを有するモデルペプチド合成を行った。



[0983] (5S，8R)-5-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-1-(9H-フルオレン-9-イル）-12，12-ジメチル-3，6-ジオキソ-2-オキサ-10，11-ジチア-4，7-ジアザトリデカン-8

-カルボン酸 (化合物SP６０２、Fmoc-Ｔｒｐ-Cys(StBu)-OH) の合成



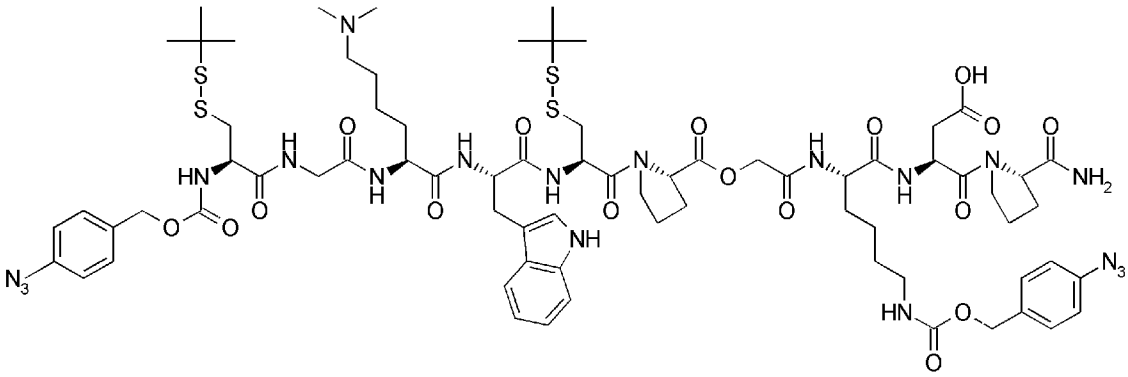
[0984] Fmoc-Ｔｒｐ-OH（５ｇ、 １１．７２ｍｍｏｌ）とＮ—ヒドロキシスクシンイミド（1．３５ｇ、１１．７２ｍｍｏｌ）のジクロロメタン (２３ ｍｌ）溶液を0度に冷却した後に、1-(3- ジメチルァミノプロピル)-3- エチルカルポジィミド塩酸塩 (ＥＤＣ'ＨＣし ２．２５ｇ、１１．７２ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で５．５時間攪拌した。反応液を0度に冷却した後にＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルァミン (2．０５ｍし １１．７２ｍｍｏｌ）とH_ Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）- ＯＨ（２．４５ｇ、１１．７２ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で１４時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタンと１Ｍ塩酸を加えて、ジクロロメタンにて抽出を行った。有機層を２５ｗｔ％食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸ァセトニトリル溶液）にて精製し、(5S, 8R)-5-(（1H-インドール-3- ィル)メチル)-1-(9H- フルオレン-9- ィル)-12, 12- ジメチル-3, 6- ジオキソ-2- オキサ-10, 11- ジチア-4, 7- ジァザトリデカン-8- カルボン酸 (化合物SP６０２、Fmoc-Ｔｒｐ-Cys(StBu)-OH) （４．１５ｇ、５７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ６１８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．９３分 (分析条件３０Ｄ ＦＡＯ５）

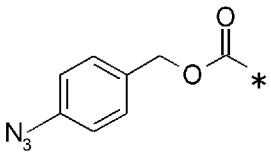
[0985] (S)-3-((S)-2-(2-((S)-1 -((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(（1H-インドール-3- ィル)メチル)-6-((4- アジドベンジルオキシ)カルボニルァミノ)- 18-((tert- プチルジスルファニル)メチル)-1 2-(4- (ジメチルァミノ)プチル)-2, 2- ジメチル-7, 10, 13, 16- テトラオキソ-3, 4- ジチア-8, 11, 14, 17- テトラァザノナデカン)ピロリジン-2- カルボニルオキシ)ァセトアミド)-6-(_(4- アジドベンジルオキシ)カル

ボニルァミノ)ヘキサンアミド)-4-((S)-2- カルバモイルピロリジン-1-イル)-4-オキソプタン酸 (化合物SP603、Acbz-Cvs(StBu)-G Lv-Lys(Me,)-Trp-Cvs(^ tBu)-Pro- 皿GLv-Lvs(Acbz)-Asi3 -Pro-NH2) の合成



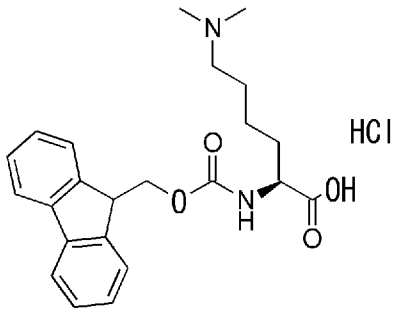
[0986] 用語の定義

Acbz : 4 _ アジドベンジルオキシカルボニル基

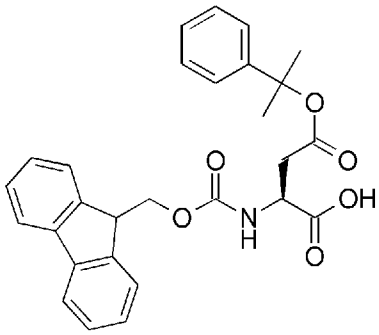


HOGLy : クリコール酸

Fmoc-Lys(Me 2)-0H ・HC L: N-α-(9- フルオレニルメトキシカルボニル)-N-ε,N-ε-ジメチル-L- リシン 塩酸塩



Fmoc-Asp(0P is)-0H : N-α-(9- フルオレニルメトキシカルボニル)-L- アスパラギン酸 β-(2- フエニル)イソプロピル エステル



[0987] N末端のアミノ酸としてAcbz-Cys(StBu)-OH 、Fmocアミノ酸として、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Me$_2$)-OH・HCl、Fmoc-Trp-Cys(StBu)-OH 、Fmoc-Pro-^{HO}GLy-OH(化合物SP632)、Fmoc-Lys(Acbz)-OH(化合物SP661)、Fmoc-Asp(OPis)-OH、Fmoc—Pro—OH、Fmoc-Trp-Cys(StBu)-OH(化合物SP602)を用いて、実施例2_1記載の方法に基づいてペプチドの伸長を行った。

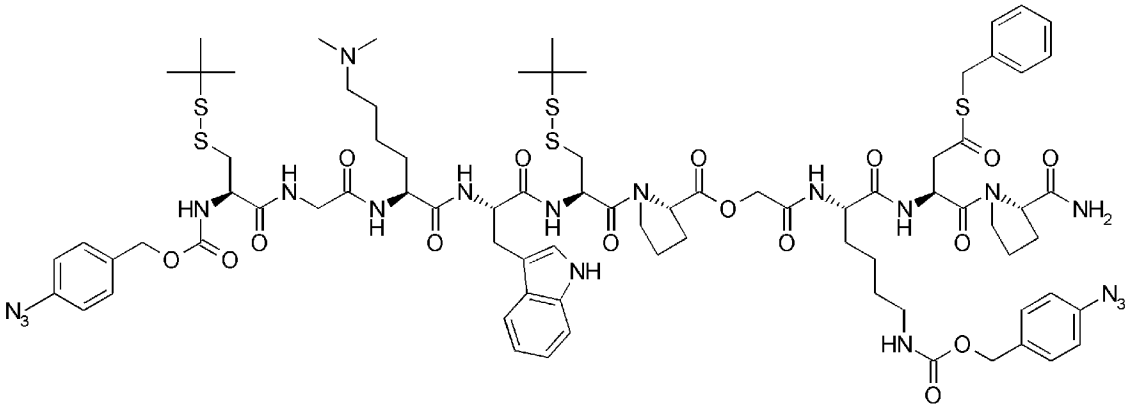
[0988] ペプチドの伸長後、レジンをDMF,ジクロロメタンにて洗浄した。レジンに2%TFA(v/v)を含むジクロロメタン/2,2,2—トリフルオロエタノール(=1/1,v/v、4mL)を加えて室温で3時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/2,2,2—トリフルオロエタノール(=1/1,v/v、2mL)にて4回洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、標題化合物(Acb$_Z$-Cys(StB$_U$)-Gly-Lys(Me$_2$)-Tr$_P$-Cys(StBu)-Pro-^{HO}GLy-Lys(Acbz)-Asp-Pro-NH2)(化合物SP603)(360mg、39%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1645 (M+H)+

保持時間:0.75分(分析条件30DFAO5)

[0989] 1-((6R,12S,15S,18R)-15-(1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-アジドベンジルオキシ)カルボニルアミノ)-18-(tert-ブチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-2,2-ジメチル-7,10,13,16-テトラオキソ-3-パ-ジチア吒-!!,1も口-テ_トラアザノナデカン)ピロリジン-2-カルボン酉_(S

)-2-((9S, 12S)-1 -(4- アジドフェニル)-12-((S)-2- カルバモイルピロリジン-1 -カルボニル)-3, 10, 14- トリオキソ-16- フェニル-2- オキサ-15- チア-4, 11- ジアザヘキサデカン-9- イルアミノ)-2- オキソエチル (化合物SP604、Acbz-Cys(StBu)-G Lv-Lys(Me,)-Trp-Cvs(StBu)-Pro-mG Lv-Lys(Acbz)-Asp (SBn) -Pro-NH2)の合成



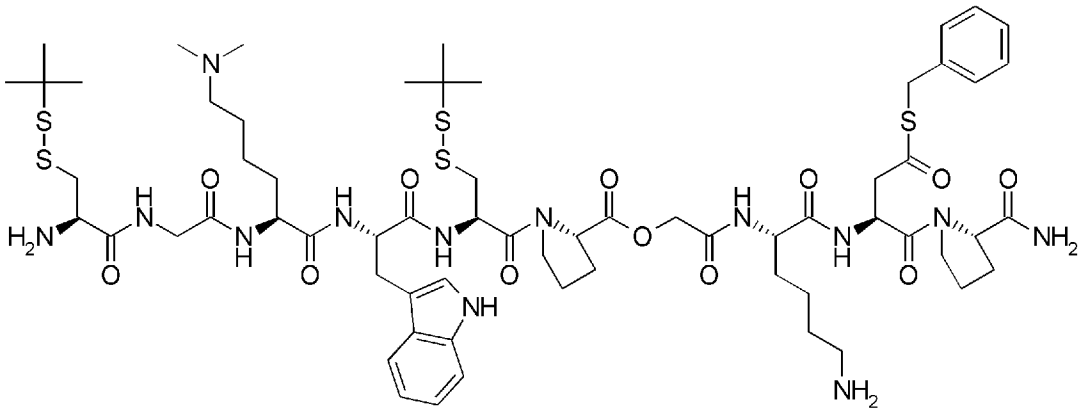
[0990] (S)-3-((S)-2-(2-((S)-1 -((6R, 12S, 15S, 18R)-15-((1H- インドール-3- イル)メチル)-6-((4- アジドベンジルオキシ)カルボニルアミノ)-18-((tert- ブチルジスルファニル)メチル)-12-(4- (ジメチルアミノ)ブチル)-2, 2- ジメチル-7, 10, 13, 16- テトラオキソ-3, 4- ジチア-8, 11, 14, 17- テトラアザノナデカン)ピロリジン-2- カルボニルオキシ)アセトアミド)-6-((4- アジドベンジルオキシ)カルボニルアミノ)ヘキサンアミド)-4-((S)-2- カルバモイルピロリジン-1- イル)-4- オキソブタン酸 (化合物SP603、Acbz-Cys(StBu)-GLy-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{H0}GLy-Lys(Acbz)-Asp-Pro-NH2) (180mg, 0.110mmol) とHOBt (44.4mg, 0.329mmol) のDMF (1.096ml) 溶液を0度に冷却した後に、1-(3- ジメチルアミノプロピル)-3- エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC・HCl 63mg、0.329mmol) を加え、3分間攪拌後にベンジルメルカプタン (64.3μL, 0.548mmol) を加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、標題化合物 (化合物SP604、Acbz-Cys(StBu)-GLy-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{H0}GLy-Lys(Acbz)-Asp (SBn) -Pro-NH2) (136.3

ｍｇ、７１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　１７５１　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．７８分（分析条件３０Ｄ　ＦＡＯ５）

[0991] 1-((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-アミノ-18-(（t6け-プチルジスルファニル）メチル）-1 2-(4-(ジメチルアミノ）プチル）-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン）ピロリジン-2-カルボン酸（S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-（ベンジルチオ）-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル）-1, 4-ジオキソプタン-2-イルアミノ）-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ）-2-オキソエチル（化合物SP６０５、H-Cvs(StBu)-G Lv-Lvs(Me,)-Trp-Cvs(StBu)-Pro-MG Lv-Lvs-Asp (SBn) -Pro-NH2）の合成



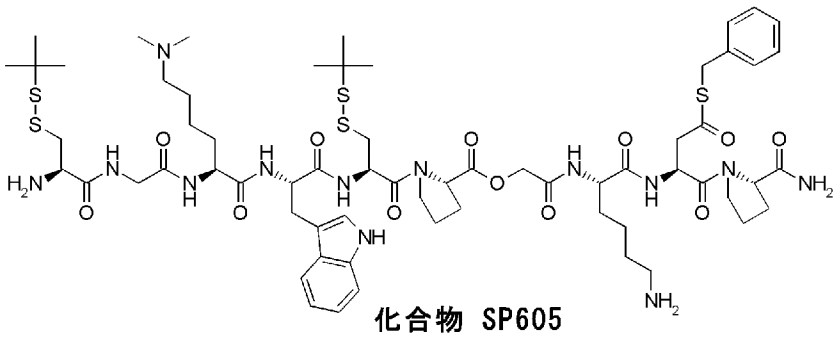
[0992] 1-((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-((4-アジドベンジルオキシ）カルボニルアミノ）-18-(（tert-プチルジスルファニル）メチル）-12-(4-（ジメチルアミノ）プチル）-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン）ピロリジン-2-カルボン酸(S)-2-((9S, 12S)-1-(4-アジドフエニル）-12-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-カルボニル）-3, 10, 14-トリオキソ-16-フエニル-2-オキサ-15-チア-4, 11-ジアザヘキサデカン-9-イルアミノ）-2-オキソエチル（化合物SP６０４、Acbz-Cys(StBu)-G Ly-Lys(Me $_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{Ho}GLy-Lys(Acbz)-Asp (SBn) -Pro-NH2）（１３６．３ｍｇ，０．０７８ｍｍｏｌ）の1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（ＤＭＩ）（１．６ｍｌ）溶液を0度に冷却した後に、ＴＣＥＰ

（トリス（2_カルボキシルエチル）ホスフィン）塩酸塩（66．9mg，0．234mmol）の水溶液（1．6ml）溶液を加えた。反応液を室温で90分間攪拌し、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．1%ギ酸水溶液/0．1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、標題化合物（化合物SP605、H-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{HO}Gly-Lys-Asp(SBn)-Pro-NH2）（63mg、58%）を得た。

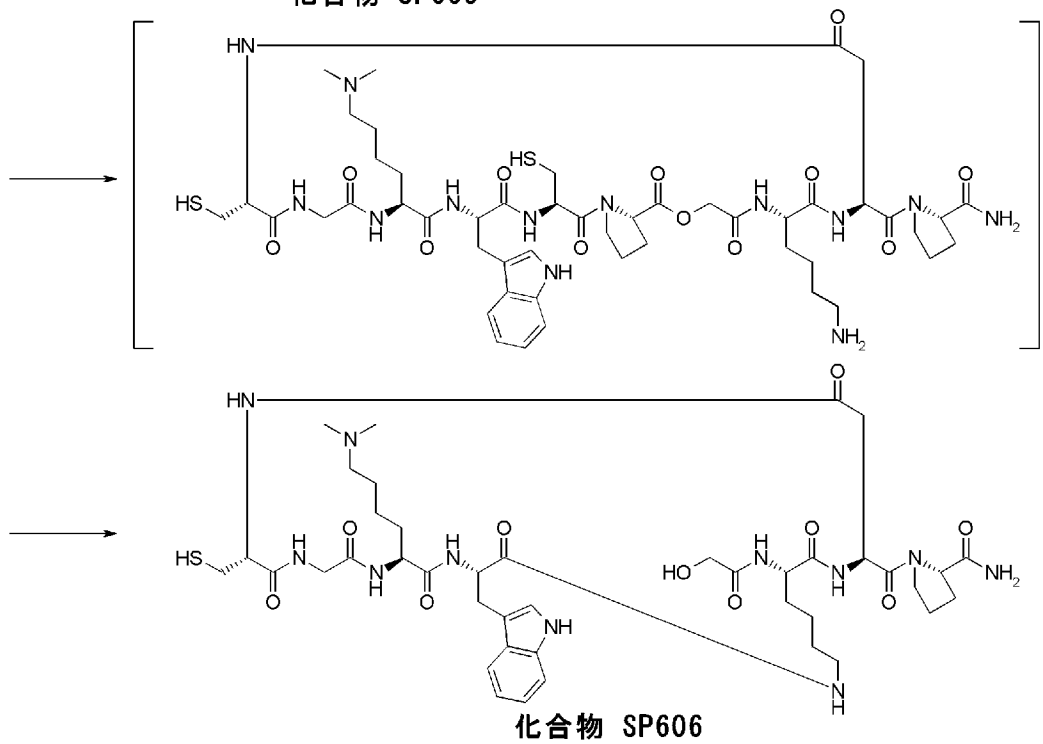
LCMS（ESI）m/z=1401（M+H）+

保持時間：0．46分（分析条件30DFAO5）

[0993] 2-2-2．直鎖ペプチドを基質としたnative chemical ligationによる環化反応とN-S転移反応を利用したアミノ酸のアミド基の連続反応による分子内分枝状ペプチド化合物SP606生成反応例（緩衝溶液中）



化合物 SP605



化合物 SP606

[0994] 0．5M HEPES緩衝液 (pH7．0、 10从门 、水 (78从门 、1M水酸化ナトリウム水溶液 (5μl) 、0．5M TCEP塩酸塩水溶液 (2μl) をそれぞれ加えて溶液を調製した。この溶液に、1-((6R, 12S, 15S, 18R)-15-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-アミノ-18-((tert-プチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(ジメチルアミノ)プチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-(ベンジルチオ)-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-1, 4-ジオキソプタン-2-イルアミノ)-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ)-2-オキソエチル (化合物SP605、H-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{H_0}GLy-Lys-Asp(SBn)-Pro-NH2) (20mM, 0．10μmol) と内部標準として4-ペンチル安息香酸 (20mM, 0．10μmol) のDMA溶液 (5从l) を室温下で添加し、反応液を37℃で60分間静置した。その後、2-(4-メルカプトフエニル)酢酸溶液 (100mM 2-(4-メルカプトフエニル)酢酸、250mM HEPES、100mM TCEP) (50μ1) に反応液 (50μ1) を室温下で添加し (反応液を加えた後の混合溶液のpH 8．2) 、反応液を30℃で7時間静置し、LCMSを用いて反応の変化を観測した。7時間で(S)-1-((3S, 6S, 12R, 16S, 19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)プチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-(メルカプトメチル)-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド (化合物SP606) が生成していることを確認した。化合物SP606と加水分解物 (副生成物) との生成比は、LCMSのUVエリア比で19:81であった。 (図49、加水分解化合物 保持時間:0．30分)

[0995] LCMS (ESI) m/z = 900 (M+H)+
保持時間:0．36分 (分析条件30D FAO5)

[0996] 2-3．翻訳されたペプチドでの分子内分枝ペプチド (直鎖部2) 生成反応逝

2—2にて合成されたペプチドが緩衝液中 (水中) にてRNAが安定である温

和な反応条件にて分枝させる反応条件が得られたため、翻訳合成後でも同様に分子内分枝ペプチドが生成することをＭＡＬＤＩ－ＭＳにて確認した。

[0997] ２－３－１．　転写によるｔＲＮＡ（ＣＡ欠損）の合成

２つの鋳型ＤＮＡ(配列番号ＤＴ―Ｈ１、配列番号ＤＴ_Ｈ２)から、それぞれRiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega社，Ｐ１３００）を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNAGLuAAG (-CA)（配列番号ＲＴ―Ｈ１）、tRNAGLuCＵＧ (-CA)（配列番号ＲＴ―Ｈ２）を合成し、RNeasy Mini kit（Qiagen社）により精製した。

[0998] 配列番号ＤＴ―Ｈ１（配列番号Ｄ_４０と同じ）（配列番号：６４）

tRNAGLuAAG (-CA) DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTAAGACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0999] 配列番号ＤＴ―Ｈ２（配列番号：８８）

tRNAGLuCTG (-CA) DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTCTGACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1000] 配列番号ＲＴ―Ｈ１（配列番号：６５）

tRNAGLuAAG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1001] 配列番号ＲＴ―Ｈ２（配列番号：８９）

tRNAGLuCＵＧ (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUCUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

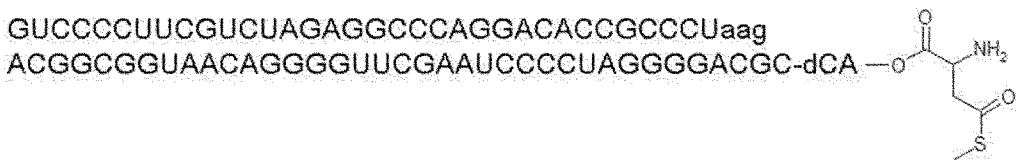
[1002] ２－３－２．　側鎖カルボン酸が活性エステル化されたアミノアシル化ｐｄＣｐＡ（化合物１ｉ_IA）とｔＲＮＡ（ＣＡ欠損）（配列番号：ＲＴ_Ｈ１）のｗｇａｔｉｏｎによるアミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ―Ｈ１）の合成

５０μＭ　転写tRNAGLuAAG (-CA)（配列番号ＲＴ―Ｈ１）　１０从Ｌに、１

0X Ligat ion buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$) 2 μL、10 mM ATP 2 μL、Nuc lease free water 2.8 从しを加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールデイングを行った。20unit／μLのT4 RNAリガーゼ（New England Bio Lab. 社）1.2 μLおよび、5mMのアミノアシル化pdCpA（化合物1i—IA）のDMSO溶液 2从1を加え、15℃で45分間ライゲーシヨン反応を行った。ライゲーシヨン反応液 20从1に、3M酢酸ナトリウム 4从1と125mM ヨウ素（水：THF=1：1溶液）24从Lを加え、室温で1時間、脱保護を行った。アミノアシル化tRNA（化合物AT—H1）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化tRNA（化合物AT-H1）は、翻訳混合物に添加する直前に1mM酢酸ナトリゥムに溶解した。

[1003] 化合物AT—H1

Asp(SMe)-tRNAGLuAAG（配列番号：66）



[1004] 2-3-3. グリコール酸でァシル化されたpdCpA（化合物20）とtRNA（CA欠損）（配列番号：RT—H2）のi'qat ionによるアミノアシル化tRNA（化合物AT—H2）の合成

50 μM 転写tRNAGLuCTG (-CA)（配列番号RT—H2） 10从Lに、10X Ligat ion buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$) 2 μL、10 mM ATP 2 μL、Nuc lease free water 2.8 从しを加え、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールデイングを行った。20unit／μLのT4 RNAリガーゼ（New England Bio Lab. 社）1.2 μLおよび、5mMのグリコール酸でァシル化されたpdCpA（化合物20）のDMSO溶液 2从1を加え、15℃で45分間ライゲーシヨン反応を行った。アミノアシル化tRNA（化合物AT—H2）は、フエ

ノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—Ｈ2）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウムに溶解した。

[1005] 化合物ＡＴ—Ｈ2（配列番号：９０）^{H}oGLy- tRNAG LuC U G

[1006] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCGCAGGACACCGeceUcug
ACGGGGGUAACAGGGG議 GAAUCCCCUAGGGGACGCH -o, OH

[1007] ２－３－４．システニルプロリルエステル配列及び側鎖アミノ基を持つ環状《プチド_(化合物Ｐ—Ｈ１)の翻訳合成

前述したアシル化されたｔＲＮＡ（化合物ＡＴ_Ｈ1、化合物ＡＴ—Ｈ2）を、無細胞翻訳系に加えて翻訳を開始することにより、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。

[1008] 具体的には、翻訳液，１％（ｖＺｖ）ＲＮａｓｅｉｎ Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ (Promega 社，Ｎ２１１１)，１ｍＭ ＧＴＰ，１ｍＭ ＡＴＰ，２０ｍＭクレアチンリン酸，５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ—ＫＯＨ ｐＨ７．６，１００ｍＭ 酢酸カリウム，６ｍＭ 酢酸マグネシウム，２ｍＭスペルミジン，１ｍＭ ジチオスレイトール，１．５ｍｇ/ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社），４μｇ／ｍｌ クレアチンキナーゼ，３μｇ／ｍｌ ミオキナーゼ，２ｕｎｉｔ/ｍｌ 無機ピロフォスファターゼ，１．Ｉμｇ／ｍｌ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，０．６μＭ メチオニルｔＲＮＡ トランスフオルミラーゼ，０．２６μＭ ＥＦ_Ｇ，０．２４μ,Ｍ ＲＦ２，０．１７μ,Ｍ ＲＦ３，０．５μＭ ＲＲＦ，２．７μＭ ＩＦ１，０．４μＭ ＩＦ２，１．５μ,Ｍ ＩＦ３，４０μＭ ＥＦ-Ｔｕ，９３μＭ ＥＦ-Ｔｓ，１．２μＭ リボソーム，０．７３μＭ ＡｌａＲＳ，０．０３μＭ ＡｒｇＲＳ，０．３８μＭ ＡｓｎＲＳ，０．１３μＭ ＡｓｐＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＣｙｓＲＳ，０．０６μＭ ＧｌｎＲＳ，０．２３μＭ ＧｌｕＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＧｌｙＲＳ，０．４μＭ ＩｌｅＲＳ，０．０４μ.

MLeuRS, 0.11μM LysRS, 0.03μM MetRS, 0.68μM PheRS, 0.16μM ProRS, 0.04μM SerRS, 0.09μM ThrRS, 0.03μM TrpRS, 0.02μM TyrRS, 0.02μM ValRS (自家調製タンパクは基本的にはHisタグ付加タンパクとして調製した))に、1μM 鋳型RNAOT86b (配列番号RM_H1)、0.25mM Cys, 0.25mM Thr, 0.25mM Trp, 0.25mM Phe, 0.25mM Arg, 0.25mM Pro, 0.25mM Lys, 0.25mM Ser、20mM トリス(2_カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、および、50μM Asp(SMe) - tRNAGLuAAG (化合物AT—H1)、50μM HQGLy_ tRNAGLuCUG (化合物AT_H2)を含む前述の翻訳液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳反応物を、SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、マトリックスとしてα_シアノ—4—ヒドロキシケィ皮酸を用いてMALDI—MSにて分析した。その結果、開始メチオニン直後のCysから翻訳開始され、そのα—アミノ基上の窒素原子とアスパラギン酸の側鎖カルボン酸でアミド環化したペプチドP-H1 (図50、ピークI)が観測された(図50)。また、対照実験として、上記の翻訳反応組成から鋳型RNA0T86b (配列番号RM—H1)のみを除いた翻訳溶液に関しても37℃で60分間の保温を行った。

[1009] 配列番号 RM—H1 (配列番号:91)

0T86b RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugUGCACUACAUGGUUCCGUUGGUGCCCACAGUUCAAGUGGCUUCCUCGUAGUUAAGG

[1010] ペプチド配列P—H1

CysThrThrTrpPheArgTrpCysPro HQGLyPheLysTrp[Asp(SMe)]ProArgSer のN末端アミノ基の窒素原子とAspの側鎖カルボン酸でアミド環化した化合物 (HQGLyはグリコール酸を指す)

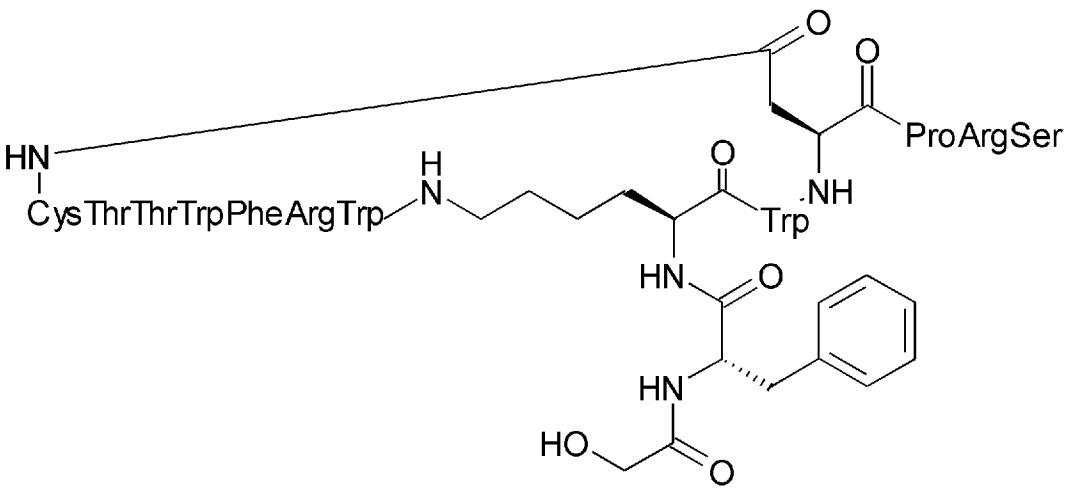
[1011] MALDI-MS:

m/z: [H+M]+ = 2155.6 (配列P—H1に対応するペプチド。Calc. 2156.0)

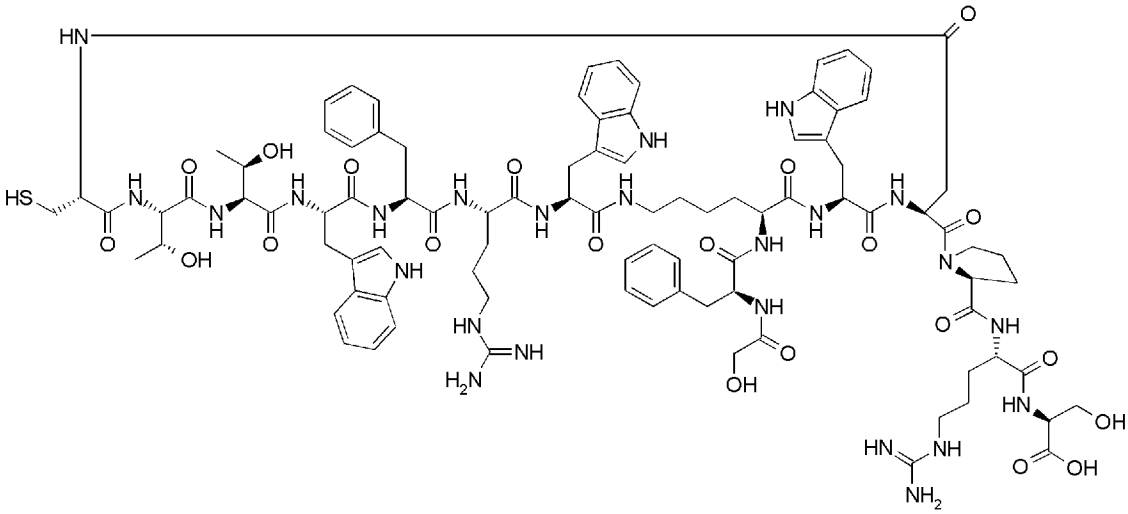
[1012] 2-3-5. 翻訳ペプチドP-H1を用いた分子内分枝ペプチド(直鎖部2)生成反応

前述の翻訳反応物P_H1を含む翻訳溶液5μLと、pH8.5に調整した5μLの環化反応試薬溶液(0.3M HEPES-K0H, 0.1M TCEP、0.1M p—メルカプトフエニル酢酸)を混合し、30℃で17時間保温した。その後、得られた反応溶液を、SPE C-TIP (日京テクノス社)で精製し、マトリックスとしてα_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸を用いてMALDI—MSで分析した。対象実験として、前述した錶型RNAOT86b(配列番号RM_H1)を含まない翻訳溶液に対しても同様の操作を施し、両者を比較することで、錶型RNA依存的に合成される翻訳産物由来のピークを判別し、解析を行った。その結果、錶型RNAO T86b(配列番号RM—H1)を含む翻訳反応液には、目的の分子内分枝骨格をもつ化合物H1に相当するピークが観測され、翻訳ペプチドを用いた分子内分枝ペプチド(直鎖部2)の生成が確認された(図51、ピーク1)。

化合物H1



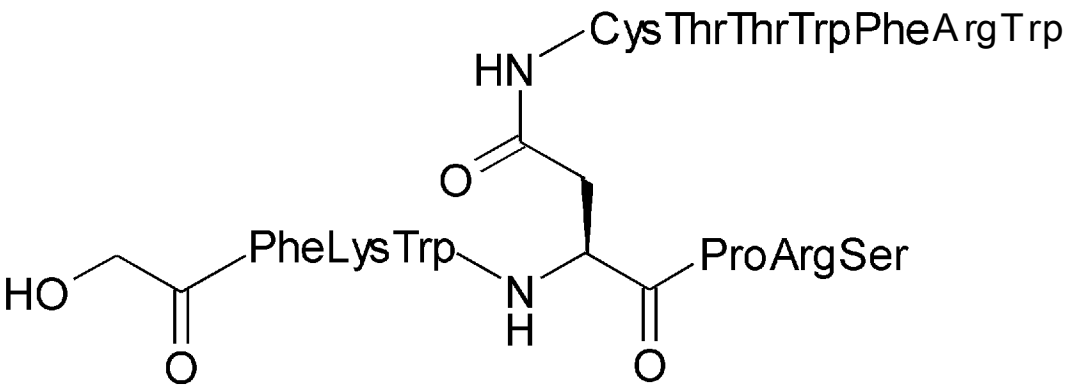
[1013] さらに詳細な構造(アミノ酸の3文字表記を全て化学構造に変換)を以下に示す。



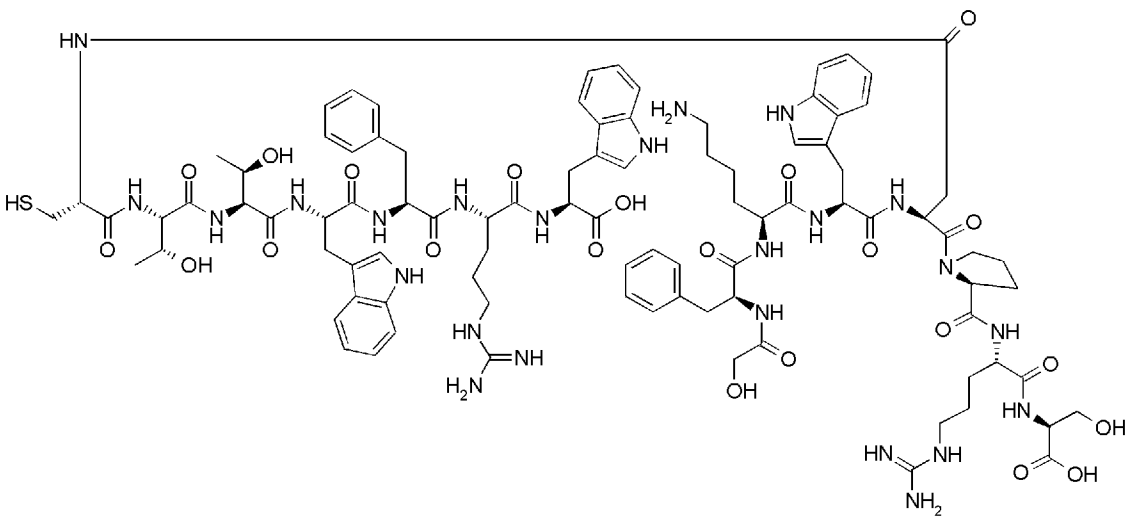
[1014] MALDI-MS :

m/z : [H+M]+ = 1955.4 (化合物H1に対応するペプチド。Ca Lc. 1955.9)

化合物H2



[1015] さらに詳細な構造 (アミノ酸の3文字表記を全て化学構造に変換)を以下に示す。



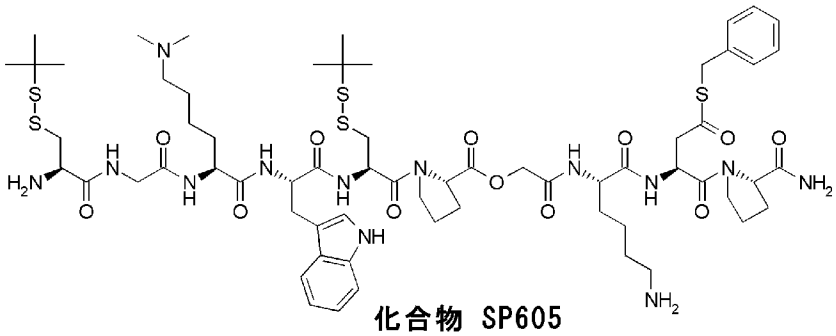
MALDI-MS :

m/z : [H+M]+ = 1973. 4 (化合物H2に対応するペプチド。Ca Lc. 1973. 9)

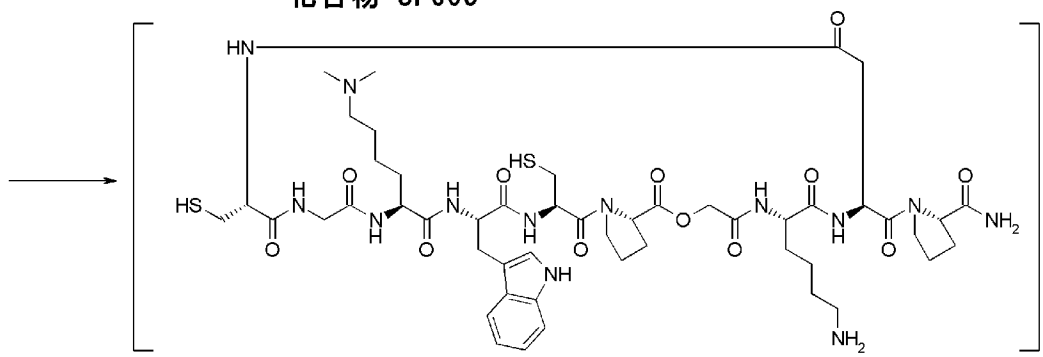
[1016] 3．1回目の環化で反応補助基を有するN末端に位置する三角ユニットとC末端側の活性チオエステル(交差ユニット)のアミド環化反応を行い、2回目の分枝化にてCvs_Pro_mG Ｉｖから活性エステルを発生させ、無保護のアミノ¾と:反ま､させて碰 させる讀 ほ 反ま､排 の改き 改ぉ れ,こ排 下生成した直鎖部2を有する分枝ペプチドの持つチオール基を除去するための脱硫反肺 ||

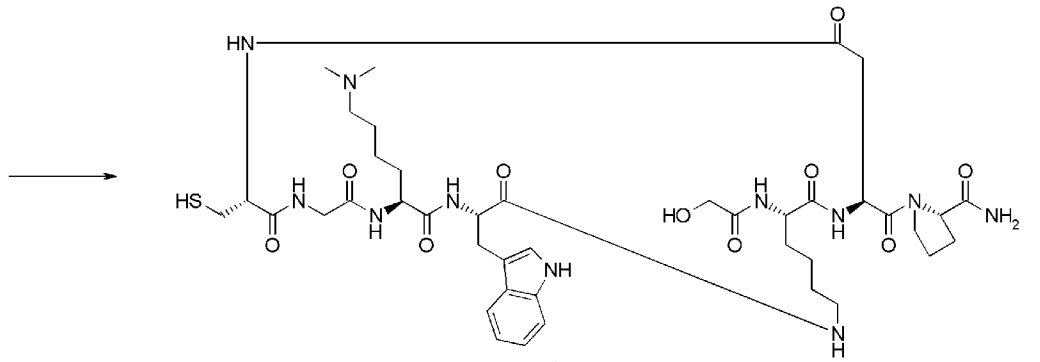
上に示したとおり、合成ペプチド化合物SP６０５から化合物SP６０６への変換にて設定した分枝化反応条件を翻訳ペプチドに適用した結果、翻訳ペプチドでも分枝化反応の進行が確認された。以下の実験では、化合物SP６０５から化合物SP６０６への合成ペプチドをモデルとした反応最適化である。水中での反応、および翻訳液中での反応を実施し、翻訳ペプチドによる分枝化反応の最適化を行った結果、反応選択性に優れた反応条件の設定に至った。

[1017]



化合物 SP605





化合物 SP606

[1018] 3-1. 緩衝溶液中における分子内分枝《プチド生成反応雄容咖璧の膽雄

変更点として、1回目の環化反応では有機溶媒(DMA)含有率を5%から50%へと増大させ、2回目の分枝化反応では2.5%から50%へと増大させた結果を示す。

[1019] 0.5M HEPES緩衝液(pH7.0,10从门、水(33从门、1M水酸化ナトリウム水溶液(5从1)、DMA(45μ1),0.5M TCEP塩酸塩水溶液(2μ1)をそれぞれ加えて溶液を調製した。この溶液に、1-((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-アミノ-18-((tert-プチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(ジメチルアミノ)プチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデ

カン)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-(ベンジルチオ)-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-1,4-ジオキソブタン-2-イルアミノ)-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ)-2-オキソエチル (化合物SP605、H-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{HO}GLy-Lys-Asp(SBn)-Pro-NH2) (20 mM, 0.10从mol) と内部標準として4-ペンチル安息香酸 (20 mM, 0.10 μmol) のDMA溶液 (5从门 を室温下で添加し、反応液を37℃で60分間静置した。60分後、125 mM 2-(4-メルカプトフェニル)酢酸のDMA溶液 (40 μl)、0.5M HEPES緩衝液 (pH7.0, 18 μ门、水 (6 μ门、5M水酸化ナトリゥム水溶液 (6 μl)、0.5M TCEP塩酸塩水溶液 (10 μl) をそれぞれ加えた溶液に、反応液 (20 μl) を室温下で添加し (反応液を加えた後の混合溶液のpH 8.2)、反応液を30℃で24時間静置し、LCMSを用いて反応の変化を観測した。24時間後、(S)-1-((3S, 6S, 12R, 16S, 19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)プチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-(メルカプトメチル)-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド (化合物SP606) が生成していることを確認した。化合物SP606と加水分解物 (副生成物) と反応中間体の生成比は、LCMSのUVエリア比で40:4:56であった。

以上の結果から、1回目の環化反応には有機溶媒含有率の向上が有利であることがわかり、加水分解が抑制されて目的化合物を得る選択性が高まった。一方、2回目の分枝化反応では、目的化合物を得るための化学反応速度が低下するため、さらに改良検討を継続した。

[1020] 2-(4-メルカプトフェニル)酢酸の代わりにチオフエノールを用いた場合の効則 比較無

[1021] 0.5M HEPES緩衝液 (pH7.0, 10从门、水 (33从门、1M水酸化ナトリウム水溶液 (5从1)、DMA (45 μ1), 0.5M TCEP塩酸塩水溶液 (2 μ1) をそれぞれ加えて溶液を調製した。この溶液に、1

-((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-アミノ-18-(tert-ブチルジスルファニル)メチル)-12-(4-（ジメチルアミノ）ブチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-(ベンジルチオ)-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-1, 4-ジオキソブタン-2-イルアミノ)-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ)-2-オキソエチル (化合物SP605、H-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{Ho}GLy-Lys-Asp(SBn)-Pro-NH2) (20 mM, 0.10 μmol) と内部標準として4-ブチル安息香酸 (20 mM, 0.10 μmol) のDMA溶液 (5 μl) を室温下で添加し、反応液を37℃で30分間静置した。その後、チオフェノール (0.52 μl, 5 μmol) にDMA (40 μl), 2M Bicine (N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)グリシン) 緩衝液 (pH8.7, 18 μl)、0.5M TCEP塩酸塩水溶液 (10 μl) をそれぞれ加え1M 水酸化ナトリウム水溶液 (12 μl) により溶液を調整した後に、反応液 (20 μl) を室温下で添加し (反応液を加えた後の混合溶液のpH 8.1)、反応液を30℃で24時間静置し、LCMSを用いて反応の変化を観測した。24時間で(S)-1-((3S, 6S, 12R, 16S, 19S)-3-(（1H-インドール-3-イル）メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-(メルカプトメチル)-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド (化合物SP606) が生成していることを確認した。化合物SP606と加水分解物 (副生成物) との生成比は、LCMSのUVエリア比で84:16であった。

[1022] 細 ヒ反ま､が-良好に進行れ 反ま､排 で-き 脳 ll

検討の結果、以下に示す反応条件が上の条件 (2_2_2) よりも優れていることを見出した。変更点として、1回目の環化反応では有機溶媒含有率増大 (50%) し、2回目の分枝化反応でも有機溶媒含有率増大 (50%) と共に、添加剤のチオールを変更 (4—(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール) と共に添加剤濃度の増大 (500 mM) とした。さらに緩衝溶液としてHE

PES １５０ｍＭから、Bicine (N,N-ビスー (2—ヒドロキシルェチル）ダリシン）３６０ｍＭに変更した。０．５Ｍ HEPES緩衝液 (ｐＨ7．０， １０μ, 1）、水 (３３μｌ）、１M水酸化ナトリゥム水溶液 (5μｌ）、N-メチル-2-ピロリドン (ＮＭＰ） (４５μ 1），０．５Ｍ ＴＣＥＰ塩酸塩水溶液 (2μｌ）をそれぞれ加えて溶液を調製した。この溶液に、1-((6R, 12S, 15S, 18R)-15-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-アミノ-18-(（tert-プチルジスルファニル）メチル）-12-(4-（ジメチルアミノ）プチル）-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン）ピロリジン-2-カルボン酸 （S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-（ベンジルチオ）-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル）-1, 4-ジオキソプタン-2-イルアミノ）-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ）-2-オキソエチル (化合物SP６０５、 H-Cys(StBu)-GLy-Lys(Me $_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{Ho}GLy-Lys-Asp (SBn) -Pro-NH2) （２０ｍＭ, ０．１０μｍｏｌ）と内部標準として4-プチル安息香酸 (２０ｍＭ, ０．１０μｍｏｌ）のNMP溶液 (5从Ｉ）を室温下で添加し、反応液を３７℃で30分間静置した。その後、4-(トリフルオロメチル）ベンゼンチオール (6．８μ, Ｉ, ５０μｍｏｌ）にNMP（４０μＩ），２Ｍ Bicine (N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル）グリシン）緩衝液 (ρＨ8．７， １８μ 1）、０．５Ｍ ＴＣＥＰ塩酸塩水溶液 (１０バＩ）をそれぞれ加え５Ｍ 水酸化ナトリウム水溶液 (１２バＩ）により溶液を調整した後に、反応液 (２０バＩ）を室温下で添加し (反応液を加えた後の混合溶液のｐＨ ８．２）、反応液を３０℃で２４時間静置し、ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測した。２４時間で^)-1-((3S, 6S, 12R, 16S, 19S)-3-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-(4-（ジメチルアミノ）プチル）-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-(メルカプトメチル）-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル）ピロリジン-2-カルボキサミド (化合物SP６０６）が生成していることを確認した。化合物SP６０６と加水分解物 (副生成物）との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で９８ :２であった。 (図５２、加水分解化合物 保持時間 :０．３１分）

[1023] 3-2．改良された緩衝液中での化学反応条件を適用させた、化合物SP605からSP606への変換反応をPURE system (翻訳合成液)中で実施した分子内分枝《プチド生成反応

翻訳用緩衝液 (6．25从1)、水 (1．25从1)、PURESYSTEM(r) cLassic II SoL. B (バイオコゥマー社、製品番号PURE2048C) (10μ1)、20種類の天然型アミノ酸溶液 (それぞれ5mM，2．5从1) を混合しジメチルァセトアミド (DMA) (22．5μ1)，TCEP水溶液 (100mM、5μl)、をそれぞれ加えて溶液を調製した。翻訳用緩衝液の成分は8mM GTP，8mM ATP，160mMクレアチンリン酸，400mM HEPES—KOH pH7．6，800mM 酢酸カリウム，48mM 酢酸マグネシウム，16mMスペルミジン，8mM ジチオスレイトール，0．8mM 10-HCO-H4folate，12mg/ml E．coli MRE600 (RNaseネガティプ) 由来tRNA (Roche社) である。この溶液に、1-((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(1H-インドール-3-イル)メチル)-6-アミノ-18-(tert-プチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(ジメチルアミノ)プチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラァザノナデカン)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-((S)-6-アミノ-1-((S)-4-(ベンジルチオ)-1-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-1, 4-ジオキソプタン-2-イルアミノ)-1-オキソヘキサン-2-イルアミノ)-2-オキソエチル (化合物SP605、H-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{HO}GLy-Lys-Asp(SBn)-Pro-NH$_2$) (20 mM, 0．05μmol) と内部標準として4-プチル安息香酸 (20mM, 0．05μmol) のDMA溶液 (2．5μl) を室温下で添加し、反応液を37℃で30分間静置した。4-(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール (6．8μ1, 50μmol) にDMA (40μ1)、2M Bicine (N,N-ビス-(2-ヒドロキシェチル)グリシン) 緩衝液 (pH8．7, 18μ1)、0．5M TCEP塩酸塩水溶液 (10μ門 をそれぞれ加え5M 水酸化ナトリゥム水溶液 (12μl) により溶液を調整した後に、反応液 (20μl) を室温下で添加し (反応液を加えた後の混合溶

液のｐＨ ８．２）、反応液を３０℃で２４時間静置し、ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測した。２４時間で（S)-1-((3S, 6S, 12R, 16S, 19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-(メルカプトメチル)-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド（化合物SP６０６）が生成していることを確認した。化合物SP６０６と加水分解物（副生成物）との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で９１：９であった。（図５３、加水分解化合物 保持時間：０．３０分）

[1024] ３-３．ＰＵＲＥ ＳＹＳＴＥＭの翻訳溶媒をＲＮｅａｓｙ(r) ＭｉｎＥｌｕｔｅ™ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液Φでの分枝《プチド生成ほ応（化さ物SP６０５から化さ物SP６０６八の変換）

翻訳ベプチドでディスプレイライブラリーを実施する際には、翻訳液に直接試薬を追加した翻訳後修飾を実施することもできる一方、ペプチドーRNA複合体を一度精製した後に、一部あるいは全ての翻訳後修飾を実施することもできる。そのような精製過程の１つとして、ＲＮｅａｓｙ(r) ＭｉｎＥｌｕｔｅ™ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（キアゲン社）を用いた精製が挙げられる。そのような精製を実施した後の翻訳後修飾の例として以下の実験を実施した。

[1025] ＰＵＲＥ ＳＹＳＴＥＭの翻訳溶媒をＲＮｅａｓｙ(r) ＭｉｎＥｌｕｔｅ™ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液（３５从门とジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）（４５μｌ）、１００ｍＭ トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（１０从し１．０μｍｏｌ）を混ぜ、１_（（６Ｒ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｒ）-１５-（（１Ｈ―インドール_３_イル）メチル）_６―アミノ_１８_（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）_１２_（４-（ジメチルアミノ）ブチル）ー２，２―ジメチル_７，１０，１３，１６―テトラオキソ_３，４―ジチアー８，１１，１４，１７_テトラアザノナデカン）ピロリジン_２_カルボン酸 （Ｓ）-２-（（Ｓ）_６―アミノー１_（（Ｓ）-４

-（ベンジルチオ）_１_（（Ｓ）_２_カルバモイルピロリジン－１―イル）_１，４―ジオキソブタン－２_イルアミノ）_１―オキソヘキサン－２―イルアミノ）－２―オキソエチル（H-Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）-Ｇｌｙ-Ｌｙｓ（Me_2）-Ｔｒｐ-Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）-Ｐｒｏ-^{HO}Ｇｌｙ-Ｌｙｓ-Ａｓｐ（ＳＢｎ）-Ｐｒｏ-NH_2）（化合物SP６０５）（２０ｍＭ、０．１０μｍｏｌ）と内部標準として用いた４_プチル安息香酸（２０ｍＭ、０．１０μｍｏｌ）のＤＭＡ溶液（５．０从ｌ）を室温下で添加した。２ＭＨＥＰＥＳ緩衝液（５μｌ、ｐＨ＝７．５）と１Ｎ　水酸化ナトリウム水溶液（１．５从１）を加え、ｐＨ＝７．５にてサーマルサイクラー中、３７℃で３０分間静置した。

[1026] ４―（トリフルオロメチル）ベンゼンチオール（６．８μ１，５０μｍｏｌ）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）（４０μ１）、２Ｍ　Ｂｉｃｉｎｅ（N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)グリシン）緩衝液（ｐＨ８．７、１６μｌ）、０．５Ｍ　トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩水溶液（１０μ１）、５Ｎ　水酸化ナトリウム水溶液（１４μ１）で調整した溶液に、得られた反応液（２０μ１）を室温下で添加し、ｐＨ　８．２にてサーマルサイクラー中、３７℃で２０時間静置し、ＬＣＭＳを用いて反応の変化を観測した。２０時間後（Ｓ）_１_（（３Ｓ，６Ｓ，１２Ｒ，１６Ｓ，１９Ｓ）-３-（（１Ｈ_インドール_３_イル）メチル）_６-（４-（ジメチルアミノ）プチル）－１９―（２―ヒドロキシアセトアミド）－１２―（メルカプトメチル）_２，５，８，１１，１４，１８―ヘキサオキソ－１，４，７，１０，１３，１７―ヘキサアザシクロトリコサン－１６_カルボニル）ピロリジン_２_カルボキサミド（化合物SP６０６）が生成していることを確認した。目的化合物と加水分解物（ＬＣＭＳ保持時間０．２９分）との生成比は、ＬＣＭＳのＵＶエリア比で９５：５であった。（図５４）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝９００　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．３６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1027] ＰＵＲＥ ＳＹＳＴＥＭの翻訳溶媒をＲＮｅａｓｙ(r) ＭｉｎＥｌｕｔｅ™ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液は以下のように調整した。既に実施例に記載済みの翻訳用緩衝液（１２．５μｌ）、ＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭ(r) ｃｌａｓｓｉｃ ＩＩ Ｓｏに Ｂ（バイオコゥマー社、製品番号ＰＵＲＥ２０４８Ｃ）（２０μｌ）、２０種の天然アミノ酸溶液（それぞれ５ｍＭ，５．０μｌ）、水（６２．５从ｌ）を混合し翻訳液を調整した。翻訳液（２０μｌ）にＢｕｆｆｅｒ ＲＬＴ（７０μｌ）、ＥｔＯＨ（１３５μｌ）を加えピペッティングを行い、ＲＮｅａｓｙ ＭｉｎＥｌｕｔｅ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎにアプライした。１００００ｒｐｍで１５秒遠/しし、ろ液を除いた。ＲＮｅａｓｙ ＭｉｎＥｌｕｔｅ Ｓｐｉｎ ＣｏｌｕｍｎにＢｕｆｆｅｒ ＲＰＥ（５００μｌ）を添加し、１００００ｒｐｍで１５秒遠心し、ろ液を除いた。ＲＮｅａｓｙ ＭｉｎＥｌｕｔｅ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎに８０％ＥｔＯＨ水溶液（５００μｌ）を添加し、１００００ｒｐｍで２分遠心し、ろ液を除いた。ＲＮｅａｓｙ ＭｉｎＥｌｕｔｅ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎの蓋を開け、１５０００ｒｐｍで５分遠心し、カラムを乾燥させた後、水（２２μｌ）を加え、溶出した液を用いた。なお、この際使用した水はＲＮａｓｅフリー水を用いている。

[1028] １００ｍＭ トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。５００ｍＭ トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩水溶液（２０从し １０μｍｏｌ）に２Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１８μｌ）、水（６２μｌ）を加え調整した。

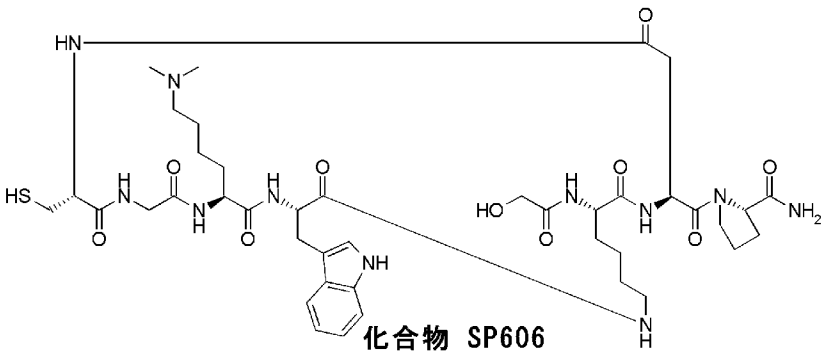
[1029] 以上、水中（緩衝液中）およびPureSystem（反応翻訳液中）で同様に、両者の差は大きくなく、目的の反応が進行することが確認された。これらの反応条件は、RNAが十分安定な範囲であり、このことから、反応翻訳後に直鎖ペプチド化合物から効率的に分枝反応が進行すること、およびペプチドーRNA複合体においても、RNAを分解させることなく効率的に分枝反応を進行させることができることが明らかとなつた。

[1030] これらの結果より以下の事柄が明らかとなった。

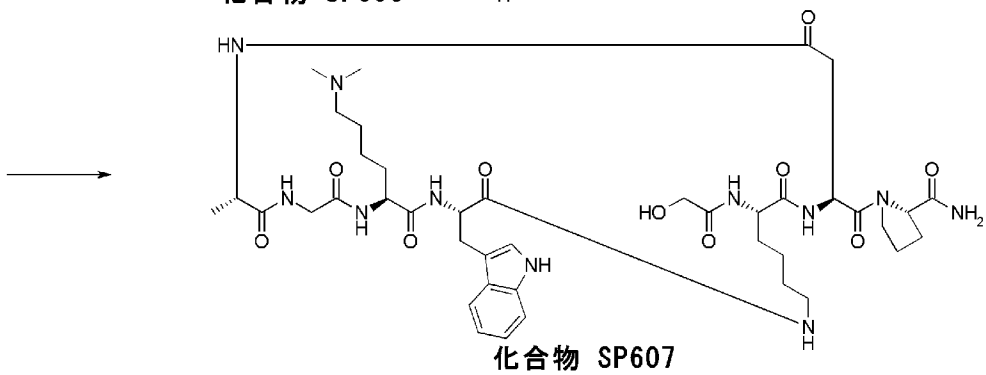
三角ユニットに反応補助基を有するアミノ基が配置された場合、1回目の環化反応は高選択に進行して、2回目の分枝化のためのCys-Pro-HOG Lyの活性化との選択性が獲得できた。特に水と混じり合う有機溶媒含有率が高いと反応選択性に優れる。2回目の分枝化では、添加剤としてチオール存在下(好ましくはアリールチオール)にて、水と混じるあう有機溶媒存在下が好ましく、反応溶液のpHが7.0から9.0の間が好ましく、反応温度は0℃から100℃(より好ましくは15℃から50℃)が好ましい。これまで示した結果から、本条件は緩衝液(水中)のみならず、翻訳液中(PureSystem)でも同様の結果を与える。

[1031] 3-4.直鎖部2を有する分子内分枝《プチドからの脱硫ほ応

(S)-1-((3S,6S,12S,16S,19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-メチル-2,5,8,11,14,18-ヘキサオキソ-1,4,7,10,13,17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド(化合物SP607)の合成



化合物 SP606



化合物 SP607

[1032] PURE system中における分子内分枝ペプチドからの脱硫反応

上述の3_2.に記載の翻訳ベプチドモデル化合物(化合物SP605)か

らの分子内分枝ペプチド生成反応に用いた反応溶液（10μl）に0．5M トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩水溶液（10μl）を加えた。混合溶液をヘキサン（200μl）にて洗浄した後に（ヘキサンによる洗浄を7回実施）、得られた水層に、500mM グルタチオン水溶液（4μl）、1M 2、2—アゾビス[2—（2—イミダゾリン—2—イル）プロパン]二塩酸塩（VA—044）水溶液（2μl）、5M 水酸化ナトリウム水溶液（2μl）を室温にて加え、40℃で3時間静置した。反応の変化をLCMSで追跡し、3時間後に原料である化合物SP606が完全に消費され、目的物である(S)-1-((3S, 6S, 12S, 16S, 19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-メチル-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド（化合物SP607）に変換されていることを確認した。（図55、56）

LCMS（ESI） m/z = 868（M+H）+

保持時間：0．35分（分析条件30D FAO5）

[1033] PURE SYSTEMの翻訳溶媒をRNeasy(r) MinElute™ Cleanup Kit（キアゲン社）を用い精製した溶出液中で行ったほ応により生成した分枝《プチドからの脱硫ほ応

[1034] 上述の3_3．PURE SYSTEMの翻訳溶媒をRNeasy(r) MinElute™ Cleanup Kit（キアゲン社）を用い精製した溶出液中での分枝ペプチド生成反応（化合物SP605から化合物SP606への変換）に用いた反応溶液（50μl）に0．5M トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩水溶液（50μl）を加えた。混合溶液をヘキサン（1．0ml）にて洗浄した後に（ヘキサンによる洗浄を7回実施）、得られた水層に、500mM ダルタチオン水溶液（20μl）、1M 2、2—アゾビス[2—（2_イミダゾリン—2_イル）プロパン]二塩酸塩（VA_044）水溶液（10μl）、5N 水酸化ナトリウム水溶液（8μl）を室温にて加え、45℃で30分静置した。反応の変化

をＬＣＭＳで追跡し、１時間後目的物である(S)-1-((3S, 6S, 12S, 16S, 19S)-3-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-19-(2-ヒドロキシアセトアミド)-12-メチル-2, 5, 8, 11, 14, 18-ヘキサオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 17-ヘキサアザシクロトリコサン-16-カルボニル)ピロリジン-2-カルボキサミド(化合物SP６０７)が生成していることを確認した。(図５７、５８)

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/z = ８６８(M+H)+

保持時間:０．３５分(分析条件３０Ｄ ＦＡＯ５)

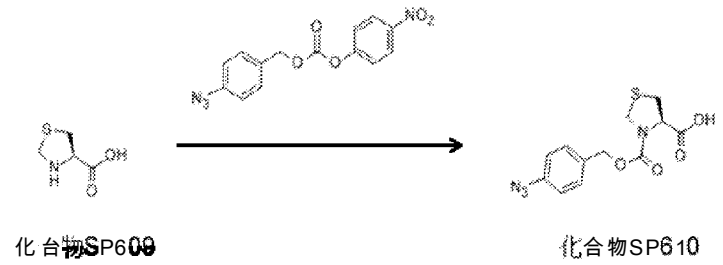
[1035] ４．１回目の環化で反応補助基を有するN末端とC末端側の活性チオエステルのアミド化ほ応を用い、２回目の分枝化にてエステルから直接活性エステルを射き き應アミノ¾調應させた反応嫌媒はれアミンとの反応によJ分枝さ-る例の輸。

３にて記載と同様の考え方で、有効性を確認した。

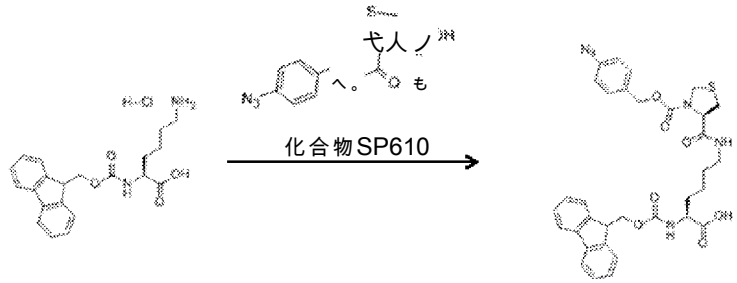
４_１.翻訳ペプチドモデル化さ物(化さ物SP６１６)のさ成

以下のスキームに従い、１回目の環化としてN末端にCysを用い、C末端側にAsp(SBn)を用いてアミド化環化反応を行い、２回目の分枝化として、活性エステルをグリコール酸のエステルの活性化にて実施し、Lysの側鎖アミノ基にN原子とS原子を保護させたCysを配置させた化合物のS原子とN原子を脱保護してアミド化反応を行う例を実施する目的で、以下のモデル化合物SP６１６の合成を行った。

[1036]

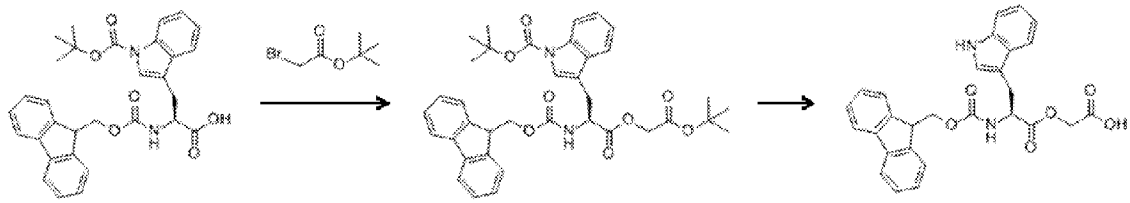


化合物SP609 化合物SP610



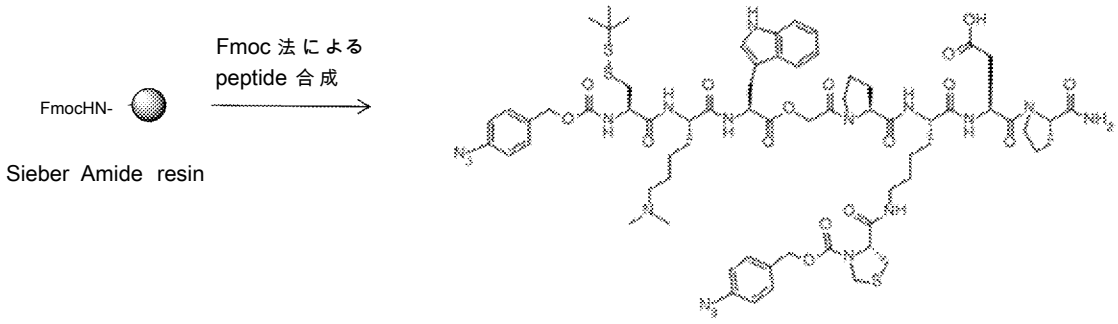
化合物SP610

化合物SPβ11

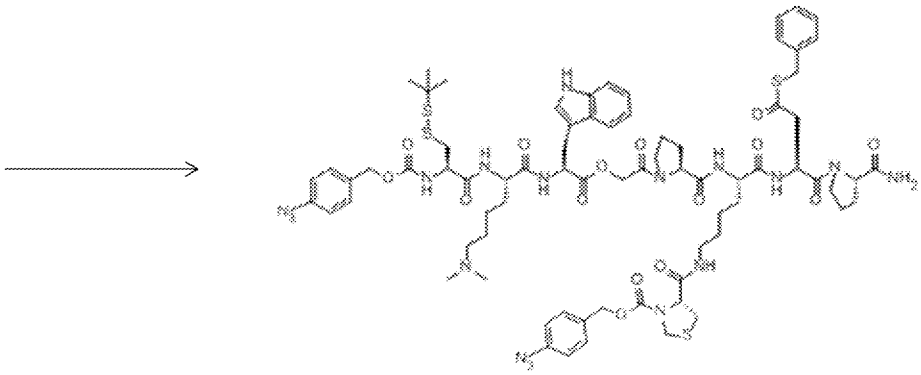


化合物srei3 化合物srei4 化合物srei2

[1037]

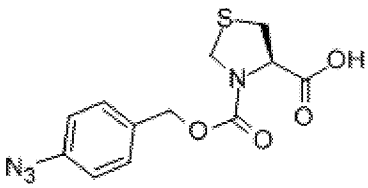


化合物SP615



化合物SP616

[1038] (R)-3-((4-アジドベンジル)オキシ)カルボニル)チアゾリジン－４－カルボン酸（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ－ＯＨ）（化合物SP６１０）の合成



[1039] 窒素雰囲気下、(R)—チアゾリジン—4_カルボン酸(H_Thz—OH)(化合物SP609)(1.48g、11.1mmol)とトリエチルアミン(Et_3N)(4.66mL、33.4mmol)のジメチルホルムアミド(DMF)溶液(11.0mL)に0度にて、文献既知法(Bioconjugate Chem. 2008, 19, 714)により調整した炭酸(4—ニトロフエニル)4_アジドベンジル(3.50g、11.1mmol)を加え、室温にて19時間攪拌した。反応液にギ酸(2.1mL)を加え、逆相シリカゲルクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(R)-3-((4—アジドベン

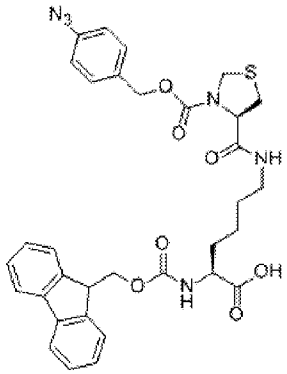
ジル）オキシ）カルボニル）チアゾリジン―4＿カルボン酸 (Ａｃｂｚ＿Ｔｈｚ-ＯＨ) (化合物SP６１０) (３．１７ｇ、９２％) を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ３０７ (M― Ｈ）－

保持時間 :０．６８分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[1040] ＿(Ｓ)＿-２-＿(（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）＿ァミノ)＿６＿＿(（Ｒ)＿＿３＿＿(（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）チアゾリジン―4＿カルボキサミド) ヘキサン酸 (Ｆｍｏｃ＿Ｌｖｓ（Ａｃｂｚ-Ｔｈｚ）-ＯＨ) ＿(化合物SP６１１）の合成

なお、本明細書中では、他の例と同様Fmoc-Lys-OH の側鎖アミノ基とAcbz-Thz＿0Hのカルボキシル基がアミド結合した化合物をFmoc-Lys (Acbz-Thz) ＿OHと定義する。



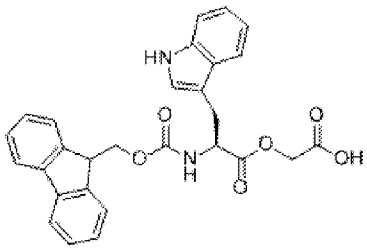
[1041] 窒素雰囲気下、 (R) ＿３＿（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）チアゾリジン―4＿カルボン酸 (Ａｃｂｚ＿Ｔｈｚ＿ＯＨ) (化合物SP６１０) (３．１７ｇ、１０．３ｍｍｏｌ) のジメチルホルムアミド (ＤＭＦ) 溶液 (１７．０ｍｌ) に4―(４，６―ジメトキシ[１．３．５] トリアジン＿２＿ィル）＿４＿メチルモルホリニウム塩化物 (ＤＭＴ―ＭＭ) (２．８５ｇ、１０．３ｍｍｏｌ) を室温にて加え、同温度にて１時間３０分攪拌した。反応液に (S) -２-（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）－６―アミノヘキサン酸 (Ｆｍｏｃ―Ｌｙｓ―ＯＨ) 塩酸塩 (４．１６ｇ、１０．３ｍｍｏｌ) とジイソプロピルエチルアミン (ＤＩＰＥＡ) (２．６９ｍし １５．４ｍｍｏｌ) のジメチルホルムアミド (ＤＭＦ) 溶液 (１７ｍｌ) を室温にて加え、同温度にて４時間攪

拌した。反応液にギ酸 (1．９ｍｌ) を加え、逆相シリカゲルクロマトダラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、 (S) _２_ ((((９Ｈ—フルオレン_９_ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_６_ ((R)_３_ (((４—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)チアゾリジン—４_カルボキサミド)ヘキサン酸 (Ｆｍｏｃ—Ｌｙｓ (Ａｃｂｚ-Ｔｈｚ)-ＯＨ) (化合物SP６１１) (３．４８ｇ、５１％) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ｚ = ６５９ (Ｍ+Ｈ)+

保持時間 :０．８７分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[1042] (Ｓ)-２-((２-((((９Ｈ—フルオレン_９_ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_３_(１Ｈ_インドール_３_ィル)プロパノィル)オキシ)酢酸 (Ｆｍｏｃ_Ｔｒｐ_Ｇｌｖ-ＯＨ) (化合物SP６１２)の合成



[1043] 窒素雰囲気下、 (S)-２-(((９Ｈ—フルオレン_９_ィル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_３_ (１-(ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル)—１Ｈ—インドール—３—ィル)プロパン酸 (Ｆｍｏｃ—Ｔｒｐ(Ｂｏｃ)-ＯＨ) (化合物SP６１３) (５．０ｇ、９．５０ｍｍｏｌ) とジイソプロピルエチルアミン (ＤＩＰＥＡ) (４．９８ｍし ２８．５ｍｍｏｌ) のジクロロメタン (ＤＣＭ) 溶液 (９．５ｍｌ) に２_プロモ酢酸 ｔｅｒｔ—プチル (２．０９ｍし １４．２ｍｍｏｌ) を室温にて加え、同温度にて４８時間攪拌した。反応液に塩化アンモニウム水溶液を加え、ジクロロメタン (ＤＣＭ) で２回抽出し、有機層を飽和食塩水で２回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過を行い、減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル) にて精製し

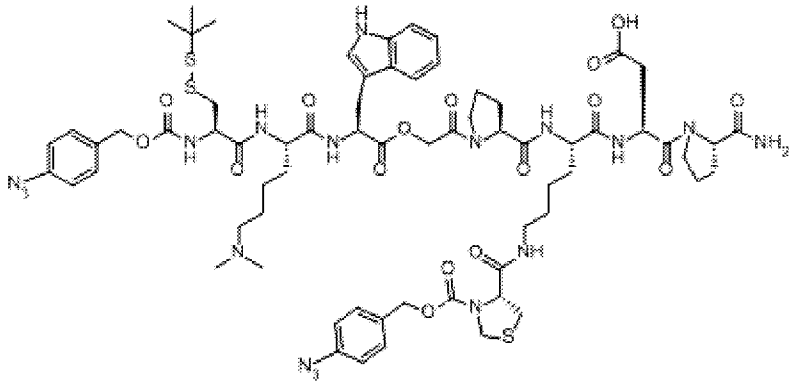
、３＿（２＿（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（２＿（ｔｅｒｔ—プトキシ）＿２—オキソエトキシ）－３—オキソプロピル）—１Ｈ—インドール—１—カルボン酸　(Ｓ)－ｔｅｒｔ－プチル　(Ｆｍｏｃ＿Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－^{H0}ＧＩｙ－０ｔＢｕ）（化合物SP６１４）を混合物　(5．２５ｇ）として得た。

[1044]　得られた混合物　(5．２５ｇ）のジクロロメタン　(ＤＣＭ）溶液　(8．１９ｍＩ）にトリイソプロピルシラン　(ＴＩＰＳ）（４．２０ｍし２０．５ｍｍｏＩ）とトリフルオロ酢酸　(ＴＦＡ）（８．２１ｍし　１０７ｍｍｏＩ）を室温にて加え、反応液を同温度にて５時間３０分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー　(0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、　(Ｓ）＿２＿（（２－（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（１Ｈ—インドール＿３＿イル）プロパノイル）オキシ）酢酸　（Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－^{H0}ＧＩｙ－０Ｈ）（化合物SP６１２）（３．４０ｇ、２段階収率７４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　４８５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間　:０．８３分　(分析条件３０Ｄ「六０５）

[1045] （Ｓ）－３－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－１－（（６Ｒ．９Ｓ．１２Ｓ）－１２－（（１Ｈ＿インドール＿３＿イル）メチル）＿６＿（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿９＿（４－（ジメチルアミノ）プチル）－２，２—ジメチル－７，１０，１３＿トリオキソ－１４＿オキサ－３，４—ジチア—８，１１—ジアザヘキサデカン—１６—オイル）ピロリジン－２＿カルボキサミド）＿６＿（（Ｒ）＿３＿（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）チアゾリジン＿４＿カルボキサミド）ヘキサンアミド）＿４＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿１＿イル）＿４—オキソプタン酸　(Ａｃｂｚ＿Ｃｖｓ＿（ＳｔＢｕ）－Ｌｖｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{HO}ＧＩｙ－Ｐｒｏ－Ｌｖｓ（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ）－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－ＮＨ^）＿＿（化合物SP６１５）の合成



[1046] 既に、実施例に記載の自動合成機による主鎖にエステル基を含むペプチドの固相合成一般法 (2—1) に従いペプチド鎖の伸長を行った。レジンはSieber Amide Resin（1カラムあたり160mg、8カラム使用、Novabiochemより購入）を用いた。N末端のアミノ酸として (R)_2_((((4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）—3—（tert—ブチルジスルファニル）プロパン酸 (Acbz—Cys（StBu）-OH) (化合物tk20) を用い、Fmocアミノ酸として、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Asp（OPis）_OH、（S）-2-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）—6_（（R）_3_（（（4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）チアゾリジン—4_カルボキサミド）ヘキサン酸 (Fmoc_Lys（Acbz-Thz）-OH) (化合物SP611)、（S）-2-（（2-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3_（1H—インドール_3_イル）プロパノイル）オキシ）酢酸 (Fmoc—Trp-^{H0}Gly-0H) (化合物SP612)、Fmoc-Lys（Me_2）-OH-HClを用いた。

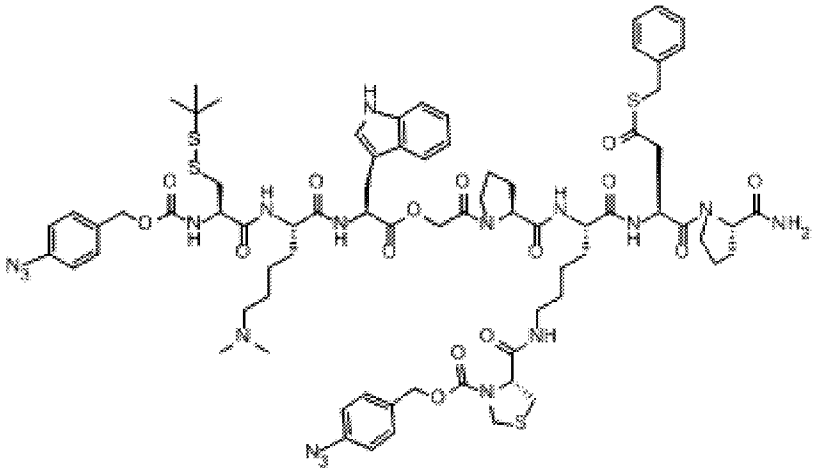
[1047] ペプチドの伸長後、レジンをジメチルホルムアミド (DMF)、ジクロロメタン (DCM) で洗浄した。レジンに2%トリフルオロ酢酸 (TFA) のジクロロメタン (DCM) / 2，2，2—トリフルオロエタノール (TFE) (= 1/1、v/v、4.0ml) 溶液を加えて室温にて3時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタ

ン (ＤＣＭ) / ２，２，２―トリフルオロエタノール (ＴＦＥ) (= 1/ 1，v/ v、４．ＯｍＬ) にて４回洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、 (Ｓ) - ３- ((Ｓ) - ２- ((Ｓ)―１―((６Ｒ，９Ｓ，１２Ｓ) - １２- ((１Ｈ―インドール―３―イル)メチル)_６_(((４―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_９_(４- (ジメチルアミノ)プチル)_２，２―ジメチル_７，１０，１３_トリオキソ―１４_オキサ_３，４―ジチア_８，１１_ジアザヘキサデカン―１６―オイル)ピロリジン_２_カルボキサミド)_６_((Ｒ) - ３- (((４―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)チアゾリジン_４_カルボキサミド)ヘキサンアミド)_４_((Ｓ)_２_カルバモイルピロリジン―１―イル)－４―オキソプタン酸 (Ａｃｂｚ―Ｃｙｓ(ＳｔＢｕ) - Ｌｙｓ(Ｍｅ$_2$) - Ｔｒｐ- ^{H0}Ｇｌｙ- Ｐｒｏ- Ｌｙｓ(Ａｃｂｚ - Ｔｈｚ) - Ａｓｐ- Ｐｒｏ- ＮＨ$_2$) (化合物SP６１５) (１７９ｍｇ、１３％) で得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = １５１１．４ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :０．６９分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[1048] ４- ((Ｓ) - ５- ((Ｓ) - １- ((６Ｒ．９Ｓ．１２Ｓ) - １２- ((１Ｈ―インドール_３_イル)メチル)_６_(((４―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_９_(４- (ジメチルアミノ)プチル) - ２，２―ジメチル－７，１０，１３_トリオキソ－１４_オキサ－３，４―ジチア―８，１１―ジアザヘキサデカン―１６―オイル)ピロリジン―２_カルボキサミド)_６_((Ｓ) - ４- (ベンジルチオ)_１_((Ｓ)_２_カルバモイルピロリジン_１_イル)－１，４―ジオキソプタン_２_イル)アミノ)_６―オキソヘキシル)カルバモイル)チアゾリジン_３_カルボン酸 (Ｒ)_４_アジドベンジル (Ａｃｂｚ_Ｃｖｓ(ＳｔＢｕ) - Ｌｖｓ(Ｍｅ$_2$) - Ｔｒｐ―Ｇｌｙ- Ｐｒｏ- Ｌｙｓ(Ａｃｂｚ- Ｔｈｚ) - ＡｓＤ(ＳＢｎ)―Ｐｒｏ―ＮＨ$_2$) (化合物SP６１６)の合成



[1049] 窒素雰囲気下、(S)_3_((S)_2_((S)_1_((6R,9S,12S)-12-((1H_インドール_3_イル)メチル)_6_(((((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_9_(4-(ジメチルアミノ)ブチル)ー2,2—ジメチル_7,10,13—トリオキソー14—オキサ_3,4—ジチア_8,11—ジアザヘキサデカンー16—オイル)ピロリジン_2_カルボキサミド)_6_((R)_3_(((4_アジドベンジル)オキシ)カルボニル)チアゾリジン_4_カルボキサミド)ヘキサンアミド)_4_((S)_2_カルバモイルピロリジンー1—イル)ー4—オキソブタン酸 (Acbz—Cys(StBu)-Lys(Me_2)-Trp-^{HO}Gly-Pro-Lys(Acbz-Thz)-Asp—Pro-NH_2) (化合物SP615) (50mg、0.033mmol)のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (331μl) に1—ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (13.4mg、0.099mmol)、1-エチル_3_(3—ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDCI・HCl) (19.2mg、0.099mmol)、ベンジルメルカプタン (BnSH) (19.4μl、0.165mmol)を室温にて加え、同温度にて1時間攪拌した。反応液に1N 塩酸水溶液 (43μl) を加え、逆相シリカゲルクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、4_((S)_5_((S)_1_((6R,9S,12S)-12-((1H_インドール_3_イル)メチル

）－６－（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿９－（４－（ジメチルアミノ）プチル）＿２，２—ジメチル＿７，１０，１３—トリオキソ—１４＿オキサ＿３，４—ジチア＿８，１１—ジアザヘキサデカン＿１６—オイル）ピロリジン－２＿カルボキサミド）＿６＿（（（Ｓ）－４－（ベンジルチオ）＿１＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン－１—イル）＿１，４—ジオキソブタン－２＿イル）アミノ）＿６—オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン—３＿カルボン酸　(R)＿４＿アジドベンジル　(Ａｃｂｚ—Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）—Ｌｙｓ（$Ｍｅ_2$）－Ｔｒｐ－^{HO}Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ）－Ａｓｐ（ＳＢｎ）—Ｐｒｏ—$ＮＨ_2$）（化合物SP６１６）（４５．７ｍｇ、８５％）を得た。

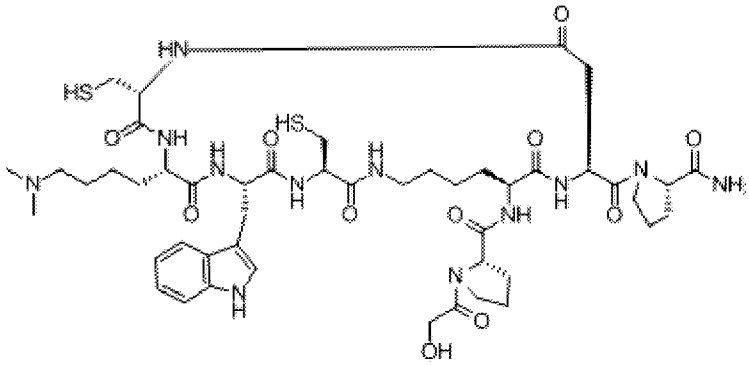
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　１６１７．４　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７４分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1050] ４－２．翻訳ペプチドモデル化合物（化合物SP６１６）からの水中あるいは翻訳反応液中での分枝（直鎖部２）ペプチド生成反応

[1051] （Ｓ）－Ｎ－（（３Ｒ．６Ｓ．９Ｓ．１２Ｒ．１６Ｓ．１９Ｓ）－６－（（１Ｈ—インドール＿３＿イル）メチル）＿１６＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿１＿カルボニル）＿９＿（４－（ジメチルアミノ）プチル）－３．１２＿ビス（メルカプトメチル）－２，５．８．１１，１４，１８—ヘキサオキソ－１，４，７．１０，１３，１７＿ヘキサアザシクロトリコサン－１９—イル）－１—（２—ヒドロキシアセチル）ピロリジン－２—カルボキサミド（皿Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｖｓ（＊Ｃｖｓ＿Ｌｖｓ（Ｍｅつ）－Ｔｒｐ－Ｃｖｓ）－Ａｓｐ＊－Ｐｒｏ－$ＮＨ_2$、２つの氷部位にて環化）（化合物SP６１７）の合成

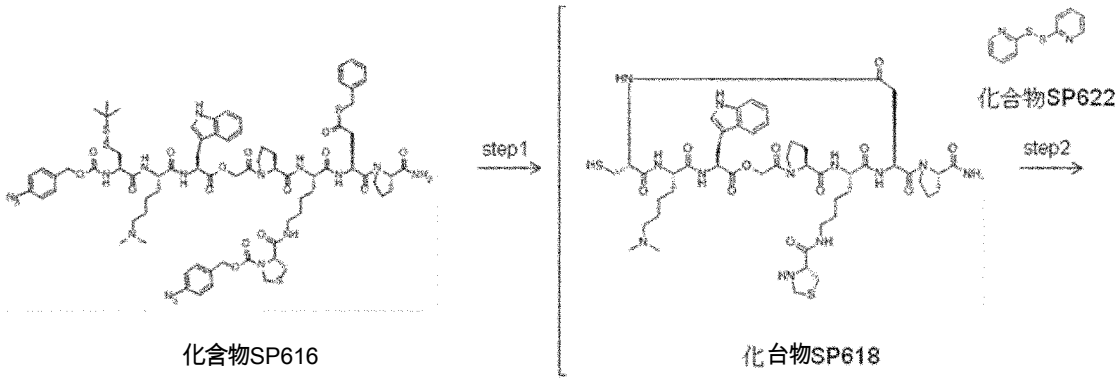
なお、本明細書中では他の例と同様、Ｌｙｓの側鎖アミノ基とＨ＿Ｃｙｓ－Ｌｙｓ（$Ｍｅ_2$）＿Ｔｒｐ＿Ｃｙｓ＿０ＨのＣ末端のカルボキシル基がアミド結合した化合物を、Ｈ＿Ｌｙｓ（Ｈ－Ｃｙｓ－Ｌｙｓ（$Ｍｅ_2$）－Ｔｒｐ－Ｃｙｓ）＿０Ｈと記載する。



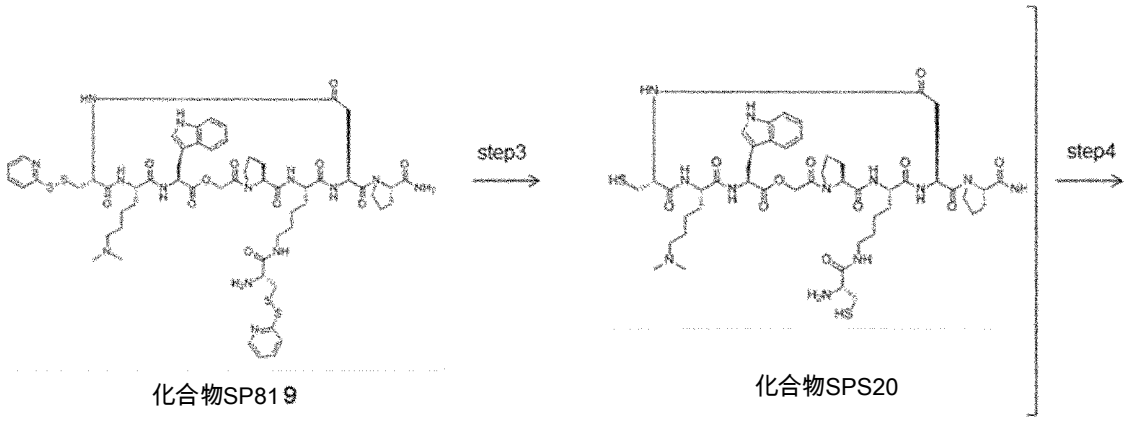
[1052] 4-2-1. HEPES緩衝液中での分枝ペプチド生成反応

以下のスキームに従い反応を行った。すなわち、化合物SP616からステップ1では2つのアミノ基の保護基を脱保護した後（この時点で反応を構成するための各ユニットは翻訳ペプチドと同様の構造となる。C末端がカルボン酸ではなく、カルボン酸アミドとなっている他は翻訳ペプチドと同様）、そのまま1回目の環化反応を実施したところ、選択的に目的化合物SP618を得ることができた。続いて、化合物618から分枝化反応で用いるためのアミン側のユニットの脱保護をステップ2およびステップ3にて実施し、反応補助基を有するアミノ基の脱保護が達成された化合物SP620が得られた。RNAに安定な化学反応条件にて、アミンの保護基を脱保護することができた。エステル官能基から直接チオエステルを発生させる手法にて分枝化ペプチド化合物SP617が得られた。

[1053]

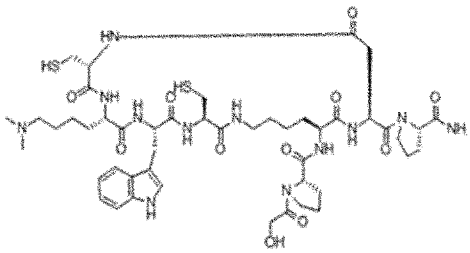


[1054]



化合物SP819 化合物SPS20

[1055]



化合物SP617

[1056] ｓｔｅｐ１（化合物SP６＿１６から化合物SP６＿１８への変換反応）

窒素雰囲気下、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液（７０μｌ、ｐＨ＝７．５）に４ｍＭ ４－（（（Ｓ）－５－（（Ｓ）－１－（（６Ｒ，９Ｓ，１２Ｓ）－１２－（（１Ｈ―インドール＿３＿イル）メチル）＿６＿（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿９＿（４－（ジメチルアミノ）プチル）－２，２―ジメチル＿７，１０，１３＿トリオキソ＿１４―オキサ＿３，４―ジチア＿８，１１―ジアザヘキサデカン―１６―オイル）ピロリジン＿２＿カルボキサミド）＿６＿（（（Ｓ）－４－（ベンジルチオ）－１－（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿１＿イル）＿１，４―ジオキソブタン－２＿イル）アミノ）＿６―オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン＿３＿カルボン酸（Ｒ）＿４＿アジドベンジル（化合物SP６１６、Ａｃｂｚ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）－Ｌｙｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{H0}Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ）－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－Ｐｒｏ－NH_2）のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（２５μｌ 0．１μｍｏｌ）、内部標準として用いた２０ｍＭ ２、４―ジメチル安息香酸のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（５．０μｌ、０．１μｍｏｌ）、別途調整した２００

ｍＭ　トリス（2＿カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（１０μｌ、２．０μｍｏｌ、ｐＨ＝７．４）を室温にて加え、ｐＨ＝７．４にて、同温度で１時間３０分静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１時間３０分後目的物SP６１８が主要生成物であり、副反応は観測されなかつた（目的化合物SP６１８（ＬＣＭＳ保持時間０．３８分）と内部標準（ＬＣＭＳ保持時間０．６４分）はＬＣＭＳのＵＶ工リア比で５４：４６であつた）。（図５９）

[1057] ２００ｍＭ　トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（2＿カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩（５．Ｏｍｇ、１７μｍｏｌ）を５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（５７．０从し　ｐＨ＝７．５）、２Ｎ　水酸化ナトリウム水溶液（３０μｌ）で溶解させ、ｐＨ＝７．４に調整した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１０５３（Ｍ—Ｈ）－

保持時間：０．３８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1058] ｓｔｅｐ２（化合物SP６＿１８から化合物SP６＿１９への変換）

窒素雰囲気下、ｓｔｅｐ１で調整した反応液（９０μ１）に８０ｍＭ　２，２'—ジチオジピリジン（化合物SP６２２、２，２'＿ＰｙＳＳＰｙ）溶液（９０μ１）を室温にて加え、ｐＨ＝３．０にてサーマルサイクラー中、３７度で１２時間静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１２時間後目的物が生成していることを確認した。目的化合物（化合物SP６１９、ＬＣＭＳ保持時間０．４３分）と加水分解体（副生成物、ＬＣＭＳ保持時間０．４１分）はＬＣＭＳのＵＶ工リア比で９７：３であった。（図６０）

[1059] ８０ｍＭ　２，２'－ジチオジピリジン（２，２'—ＰｙＳＳＰｙ）溶液の調整法は以下の通りである。４００ｍＭ　２，２'—ジチオジピリジン（２，２'－ＰｙＳＳＰｙ）のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（２０从し８．０μｍｏｌ）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）（１０μ１）、１００ｍＭ　塩酸水溶液（７０μ１）を加えた。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１２６１．３（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :0．４３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1060] ｓｔｅｐ３ (化合物SP６１９から化合物SP６２０への変換）

窒素雰囲気下、ｓｔｅｐ２で調整した反応液 (９０μｌ）に別途調整した６００ｍＭ トリス (２—カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液 (１０从し ６．０μ,mｏ\、ｐＨ＝７．２）を室温にて加え、ｐＨ＝４．６にて同温度で１時間間静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１時間後目的物 (化合物SP６２０）が生成していることを確認した。

６００ｍＭ トリス (２—カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス (２＿カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）塩酸塩 (１３．８ｍｇ、４８μｍｏｌ）に２Ｎ 水酸化ナトリウム水溶液 (８０μｌ）を加え、ｐＨ＝７．２に調整した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ １０４１ （Ｍ＿Ｈ）— (図６１）

保持時間 :0．３６分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1061] ｓｔｅｐ４ (化合物SP６２０から化合物SP６１７への変換）

窒素雰囲気下、ｓｔｅｐ３で調整した反応液 (３０μｌ）に別途調整した５．０Ｍ ２—メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム溶液 (３０μｌ ｐＨ＝８．５）を室温にて加え、ｐＨ＝８．５にてサーマルサイクラー中、３０度で１５時間間静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１５時間後目的物である (Ｓ）＿Ｎ＿ ((３Ｒ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｒ，１６Ｓ，１９Ｓ）-６-（(１Ｈ＿インドール＿３＿イル）メチル）＿１６＿ ((Ｓ）-２-カルバモイルピロリジン＿１＿カルボニル）＿９＿ (４-（ジメチルアミノ）プチル）＿３，１２＿ビス (メルカプトメチル）＿２，５，８，１１，１４，１８—ヘキサオキソ—１，４，７，１０，１３，１７—ヘキサアザシクロトリコサン—１９—イル）＿１＿ (２—ヒドロキシアセチル）ピロリジン-２＿カルボキサミド (HOＧｌｙ-Ｐｒｏ-Ｌｙｓ (*Ｃｙｓ＿Ｌｙｓ（Ｍｅ$_2$）-Ｔｒｐ-Ｃｙｓ）＿Ａｓｐ*＿Ｐｒｏ＿ＮＨ$_2$、２つの* 部位にて環化） (化合物SP６１７）が生成していることを確認した。

[1062] ５．０Ｍ ２＿メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム溶液の調整法は以

下の通りである。２_メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム（７４．０ｍｇ、０．４５ｍｍｏｌ）に１Ｎ　水酸化ナトリウム水溶液（４５μ門、水（４５从１）を加え、ｐＨ＝８．５に調整した。

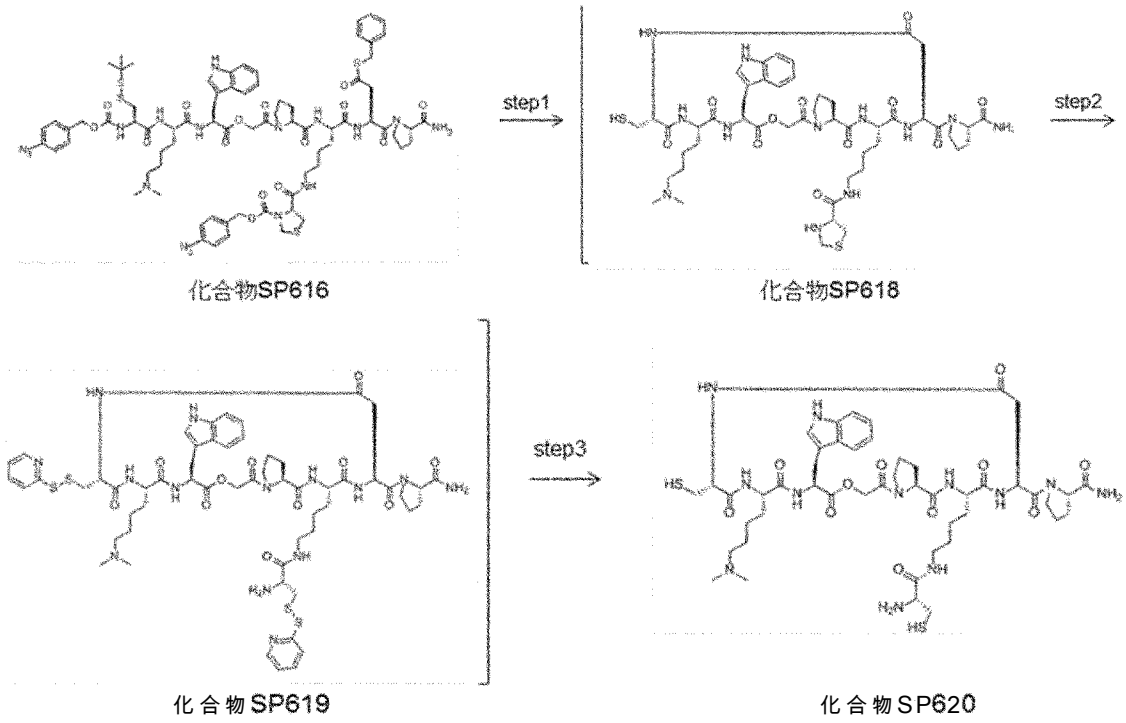
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝１０４３　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1063] ４-２-２．翻訳条件溶液中での分枝ペプチド生成反応

実際に行われる翻訳条件を模擬して、以下の条件で反応を行った。脱保護（化合物SP620）までＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの翻訳系において反応を実施した。その後の分枝ペプチド生成反応において、ディスプレイライブラリー実験ではＲＮｅａｓｙ(r)　ＭｉｎＥｌｕｔｅ™　Ｃｌｅａｎｕｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）での精製を行うこともできる。この精製過程で、RNAとペプチドの複合体の精製が可能で、特にたんぱく成分や低分子成分が除去される。本実験では、化合物SP６２０が得られた時点で、精製を実施することを仮定して化合物SP６２０を単離し、分枝化反応を実施した。そのために、使用する反応溶媒としてディスプレイライブラリーでの精製を考慮してＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの翻訳系溶媒をＲＮｅａｓｙ(r)　ＭｉｎＥｌｕｔｅ™　Ｃｌｅａｎｕｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液を用いた。なお、化合物SP６２０の精製中にペプチドに存在する２つのSH基が分子内にてS-S結合を形成した化合物SP６２３に変換された。よって化合物SP６２３から、再びディスプレイライブラリー模擬中で化合物SP６２０を再発生させてから分枝化反応を行い、化合物SP６１７を得た。

[1064] ＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの¾訳系において下記のスキームに従い反応を行った。



[1065] ｓｔｅｐ１（化合物SP６＿１６から化合物SP６＿１８への変換）

窒素雰囲気下、翻訳用緩衝液（１２．５从１）、ＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭ(r) ｃｌａｓｓｉｃ ＩＩ Ｓｏに Ｂ（バイオコゥマー社、製品番号ＰＵＲＥ２０４８Ｃ）（２０μｌ）、２０種の天然アミノ酸溶液（それぞれ５ｍＭ，５．０从１）、水（３２．５μｌ）を混合し、ジメチルァセトアミド（ＤＭＡ）（２６．２５μｌ）を加えて溶液を調製した。４ｍＭ ４－（（（Ｓ）－５－（（Ｓ）－１－（（６Ｒ，９Ｓ，１２Ｓ）－１２－（（１Ｈ＿インドール＿３＿ィル）メチル）＿６＿（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）ァミノ）＿９＿（４－（ジメチルァミノ）プチル）＿２，２－ジメチル＿７，１０，１３＿トリオキソー１４＿オキサ＿３，４－ジチア＿８，１１－ジァザヘキサデカン－１６－オイル）ピロリジン＿２＿カルボキサミド）＿６＿（（（Ｓ）＿４＿（ベンジルチオ）＿１＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿１＿ィル）＿１，４－ジオキソプタンー２＿ィル）ァミノ）＿６－オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジンー３＿カルボン酸（Ｒ）－４－アジドベンジル（Ａｃｂｚ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）－Ｌｙｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{H0}Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ）－Ａｓｐ

（ＳＢｎ）- Ｐｒｏ- NH_2）（化合物SP６１６）のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（２．５μｌ、０．０１μｍｏｌ）、内部標準として用いた８ｍＭ　２、４―ジメチル安息香酸のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（１．２５μ,\、０．０１μｍｌｏｌ）、別途調整した１００ｍＭ　トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（１０μし１．Ｏμｍｏし　ｐＨ＝７．６）を室温にて加え、ｐＨ＝７．５にて、同温度で１時間静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１時間後目的物（化合物SP６１８）が生成していることを確認した。目的化合物（ＬＣＭＳ保持時間０．３７分）と内部標準（ＬＣＭＳ保持時間０．６４分）はＬＣＭＳのＵＶエリア比で４５：５５であったことから、翻訳液中でも緩衝液と同等の反応の選択性と速度が得られていることがわかる。（図６３）

[1066] 翻訳用緩衝液の成分は以下の通りである。８ｍＭ　ＧＴＰ，８ｍＭ　ＡＴＰ，１６０ｍＭ　クレアチンリン酸，４００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ- ＫＯＨ　ｐＨ７．６，８００ｍＭ　酢酸カリウム，４８ｍＭ　酢酸マグネシウム，１６ｍＭ　スペルミジン，８ｍＭ　ジチオスレイトール，０．８ｍＭ　１０- ＨＣＯ- Ｈ４ｆｏｌａｔｅ，　１２ｍｇ/ ｍｌ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社）。

[1067] １００ｍＭ　トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（２＿カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩（５．０ｍｇ、１７μｍｌｏｌ）を５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（１２２从し　ｐＨ＝７．５）、１Ｎ　水酸化ナトリウム水溶液（５２μｌ）で溶解させ、ｐＨ＝７．６に調整した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ ｚ　＝　１０５３　（Ｍ―Ｈ）－

保持時間：０．３７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1068] ｓｔｅｐ２（化合物SP６＿１８から化合物SP６＿１９への変換）

窒素雰囲気下、ｓｔｅｐ１で調整した反応液（８０μ１）に８０ｍＭ　２，２'―ジチオジピリジン（化合物SP６２２、２，２'＿ＰｙＳＳＰｙ）溶液（８０μ１）を室温にて加え、５００ｍＭ　水酸化ナトリウム水溶液（２．

0μl）を室温にて加え、pH=4．0にてサーマルサイクラー中、37度で13時間静置した。反応の変化をLCMSで追跡し、13時間後目的物（化合物SP619）が生成していることを確認した。目的化合物（LCMS保持時間0．44分）と加水分解体（LCMS保持時間0．40分）はLCMSのUVエリア比で90：10であった。（図64）

80mM 2，2'_ジチオジピリジン（化合物SP622、2，2'-Py5SPy）溶液の調整法は以下の通りである。400mM 2，2'_ジチオジピリジン（化合物SP622、2，2'—PySSPy）のジメチルアセトアミド（DMA）溶液（20μl 8．0μmol）にジメチルアセトアミド（DMA）（10μ1）230mMの塩酸水溶液（70从l）を加えた。

LCMS（ESI） m/z = 1261．3 （M+H）+

保持時間：0．44分（分析条件30D「六05）

[1069] step3（化合物SP619から化合物SP620への変換）

窒素雰囲気下、step2で調整した反応液（81μ1）に別途調整した600mM トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩溶液（9．0μl、pH=7．2）を室温にて加え、pH=5．1にて同温度で1時間間静置した。反応の変化をLCMSで追跡し、1時間後目的物（化合物SP620）が生成していることを確認した。HEPES 緩衝液中での反応と比較し、PURE SYSTEMの使用による新たな副生成物は観測されなかった。（図65）

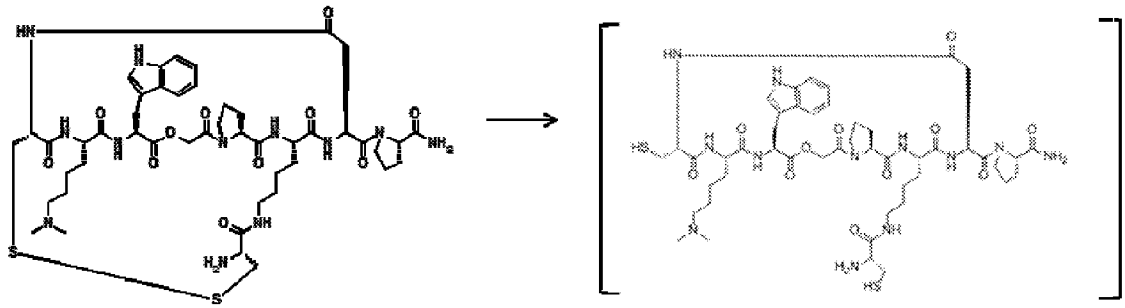
600mM トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（2_カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩（17．6mg、61μmol）に2N 水酸化ナトリウム水溶液（102μ1）を加え、pH=7．2に調整した。

LCMS（ESI） m/z = 1041 （M_H）—保持時間：0．36分（分析条件SQDFA05）

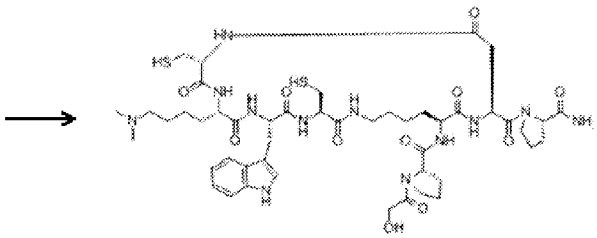
[1070] 精製した結果S-S結合を新たに形成した分枝ペプチド前駆体（化合物SP623）（調整法は下記（4—2—4）に記載）（S）_1_（（3S，10R

，１５Ｒ，１８Ｓ，２１Ｓ，２９ａＳ，３３Ｓ）＿２１＿（（１Ｈ—インド—ル＿３＿ィル）メチル）＿１０—アミノ＿１８＿（４－（ジメチルァミノ）プチル）－１，９，１６，１９，２２，２５，３１，３５—オクタオキソヘキサコサヒドロ＿１５，３－（エピミノプロパノイミノメタノ）ピロロ［２，１＿ｘ］［１，１１，１２，４，７，１６，２２，２５］オキサジチアペンタァザシクロヘプタコシン＿３３＿カルボニル）ピロリジン＿２＿カルボキサミド（＊Ｃｙｓ＃—Ｌｙｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{H0}Ｇｌｙ—Ｐｒｏ—Ｌｙｓ（Ｈ＿Ｃｙｓ＃）＿Ａｓｐ＊＿Ｐｒｏ＿NH_2、２つの＊部位、＃部位にて環化、＃部位で２つのSH基がジスルフイド結合を形成している）を使用し、ＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの翻訳溶媒をＲＮｅａｓｙ(r)　ＭｉｎＥｌｕｔｅ™　Ｃｌｅａｎｕｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液中で、化合物SP６２０を再生成させた後に分枝ペプチド（化合物SP６１７）生成反応を下記スキームに従い行った。

[1071]



化合物SP623　　化合物SP620



化合¾|SPei7

[1072]　窒素雰囲気下、ＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの翻訳系溶媒をＲＮｅａｓｙ(r)　ＭｉｎＥｌｕｔｅ™　Ｃｌｅａｎｕｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液（２５μｌ）に５００ｍＭ　トリス（２—カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（５．０μｌ　２．５μｍｏｌ）、２Ｎ　水

酸化ナトリウム (8μl)、2_メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (24.8mg、0.15mmol)を混ぜた溶液に10mM (S)-1-((3S,10R,15R,18S,21S,29aS,33S)-21-((1H_インドール_3_イル)メチル)_10—アミノ_18_(4-(ジメチルアミノ)プチル)ー1,9,16,19,22,25,31,35—オクタオキソヘキサコサヒドロ_15,3-(エピミノプロパノイミノメタノ)ピロロ[2,1_x][1,11,12,4,7,16,22,25]オキサジチアペンタアザシクロヘプタコシンー33_カルボニル)ピロリジン_2_カルボキサミド(*Cys#_Lys(Me_2)-Trp-^{H0}Gly-Pro-Lys(H—Cys#)—Asp*—Pro—NH_2、2つの*部位、#部位にて環化、#部位で2つのSH基がジスルフィド結合を形成している) (化合物SP623)のジメチルイミダゾリジノン (DMI)溶液 (12.5μ,\、0.125μmol)、内部標準として用いた50mM 2、4—ジメチル安息香酸のジメチルイミダゾリジノン (DMI)溶液 (2.5μl、0.125μmol)を加え、pH=8.4にてサーマルサイクラー中、30度で30時間間静置した。反応の変化をLCMSで追跡し、30時間後目的物である (S)_N_((3R,6S,9S,12R,16S,19S)-6-((1H_インドール_3_イル)メチル)_16_((S)_2_カルバモイルピロリジン_1_カルボニル)_9_(4-(ジメチルアミノ)プチル)_3,12_ビス (メルカプトメチル)_2,5,8,11,14,18—ヘキサオキソー1,4,7,10,13,17—ヘキサアザシクロトリコサンー19_イル)_1_(2—ヒドロキシアセチル)ピロリジン—2—カルボキサミド(HOGly-Pro-Lys(*Cys—Lys(Me_2)-Trp-Cys)_Asp*_Pro_NH_2、2つの*部位にて環化) (化合物SP617)が生成していることを確認した。HEPES緩衝液中での反応と比較し、PURE SYSTEMの翻訳溶媒を精製した溶出液の使用による新たな副生成物は観測されなかつた。

[1073] PURE SYSTEMの翻訳溶媒をRNeasy(r) MinElute

™ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液は以下のように調整した。既に実施例に記載の翻訳用緩衝液（１２．５μｌ）、ＰＵＲＥ ＳＹＳＴＥＭ(r) ｃｌａｓｓｉｃ ＩＩ Ｓｏに Ｂ（バイオコゥマー社、製品番号ＰＵＲＥ２０４８Ｃ）（２０μ１）、２０種の天然アミノ酸溶液（それぞれ５ｍＭ，５．０从１）、水（６２．５μ１）を混合し翻訳液を調整した。翻訳液（２０μ１）にＢｕｆｆｅｒ ＲＬＴ（７０μ，＼）、Ｅｔ０Ｈ（１３５μ１）を加えピペッティングを行い、ＲＮｅａｓｙ ＭｉｎＥｌｕｔｅ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎにアプライした。ＩＯＯＯＯｒｐｍで１５秒遠心し、ろ液を除いた。カラムにＢｕｆｆｅｒ ＲＰＥ（５００μｌ）を添加し、１００００「Ｐｍで１５秒遠心し、ろ液を除いた。カラムに８０％Ｅｔ０Ｈ水溶液（５００μｌ）を添加し、１００００ｒｐｍで２分遠心し、ろ液を除いた。カラムの蓋を開け、１５０００ｒｐｍで５分遠心し、乾燥させた後、水（２２从１）を加え、溶出した。なお、この際使用した水はＲＮａｓｅフリー水を用いている。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ １０４３ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1074] 以上、水中およびPureSys tem（反応翻訳液中）で同様に、両者の差は大きくなく、目的の反応が進行することが確認された。これらの反応条件は、RNAが十分安定な範囲であり、このことから、反応翻訳後に直鎖ペプチド化合物から効率的に分枝反応が進行すること、およびペプチドーRNA複合体においても、RNAを分解させることなく効率的に分枝反応を進行させることができることが明らかとなった。

[1075] これらのことから、翻訳反応液中の反応進行の見積もりには、これらと類似の反応の場合には水中（緩衝液中）での反応性を測定すれば評価できることも明らかとなった。

[1076] ４－２－３．翻訳条件を模擬した条件下で分枝（直鎖部２）《プチドからの脱硫反応

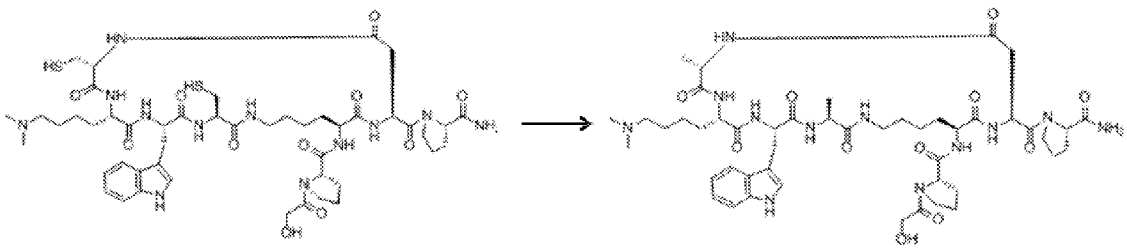
４－２－２で用いた、化合物６１７を含むPure SYSTEMの翻訳系溶媒をＲＮ

ｅａｓｙ（登録商標）ＭｉｎＥｌｕｔｅ（登録商標）CLeanup Kit（キアゲン社）を用い精製した溶出液中での分枝ペプチド精製反応で用いた反応溶液に対し脱硫反応を行った。

（Ｓ）－Ｎ－（（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１６Ｓ，１９Ｓ）－６－（（１Ｈ－インドール－３－イル）メチル）－１６－（（Ｓ）－２－カルバモイルピロリジン－１－カルボニル）－９－（４－（ジメチルアミノ）ブチル）－３，１２－ジメチル－２，５，８，１１，１４，１８－ヘキサオキソ－１，４，７，１０，１３，１７－ヘキサアザシクロトリコサン－１９－イル）－１－（２－ヒドロキシアセチル）ピロリジン－２－カルボキサミド（化合物ＳＰ６２４、Ｈ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（＊Ａｌａ－Ｌｙｓ（Ｍｅ２）－Ｔｒｐ－Ａｌａ）－ＡＳＤ氷－Ｐｒｏ－ＮＨ２、２つの＊部位にて環化）の合成

なお、本明細書中では他の例と同様、Ｌｙｓの側鎖アミノ基とＨ－Ａｌａ－Ｌｙｓ（Ｍｅ２）－Ｔｒｐ－Ａｌａ－ＯＨのＣ末端のカルボキシル基がアミド結合した化合物を、Ｈ－Ｌｙｓ（Ｈ－Ａｌａ－Ｌｙｓ（Ｍｅ２）－Ｔｒｐ－Ａｌａ）－ＯＨと記載する。

[1077]



化合物SP817　　化合物SP624

[1078] 窒素雰囲気下、４－２－２で用いた化合物ＳＰ６１７を含むＰＵＲＥ　ＳＹＳＴＥＭの翻訳系溶媒をＲＮｅａｓｙ（登録商標）ＭｉｎＥｌｕｔｅ（登録商標）　Ｃｌｅａｎｕｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）を用い精製した溶出液中での分枝ペプチド生成反応に用いた反応溶液（９．０从１）に１．５Ｍ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（２０μｌ、ｐＨ＝７．４）を加え５０℃で５分攪拌した。２５０ｍＭ　２，２－アゾビス［２－（２－イミダゾリン－２－イル）プロパン］二塩酸塩（ＶＡ－０４４）水溶液（１．２μｌ）を室温にて加え、５０℃で１時間攪拌した。反

応の変化をＬＣＭＳで追跡し、１時間後目的物である (S) - N- ((３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１６Ｓ，１９Ｓ)―６―((１Ｈ―インドール―３―イル)メチル)－１６―((Ｓ) - ２_カルバモイルピロリジン－１―カルボニル)_９_(４- (ジメチルアミノ)プチル)_３，１２―ジメチル- ２，５，８，１１，１４，１８―ヘキサオキソー１，４，７，１０，１３，１７―ヘキサアザシクロトリコサン－１９―イル)_１_(２―ヒドロキシアセチル)ピロリジン_２_カルボキサミド (化合物SP６２４、^{HO}Ｇｌｙ- Ｐｒｏ- Ｌｙｓ(＊Ａｌａ- Ｌｙｓ(Ｍｅ$_2$) - Ｔｒｐ- Ａｌａ) - Ａｓｐ＊_Ｐｒｏ_ＮＨ$_2$、２つの＊部位にて環化)が生成していることを確認した。

１．５Ｍ　トリス (2―カルボキシエチル)ホスフィン (ＴＣＥＰ)塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス (2_カルボキシエチル)ホスフィン (ＴＣＥＰ)塩酸塩 (２４．５ｍｇ、８５．５μｍｏｌ) ５Ｎ 水酸化ナトリウム水溶液 (５７μｌ)を加え、ｐＨ＝７．４に調整した。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ)　m/ｚ ＝ ９７９ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :０．３６分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

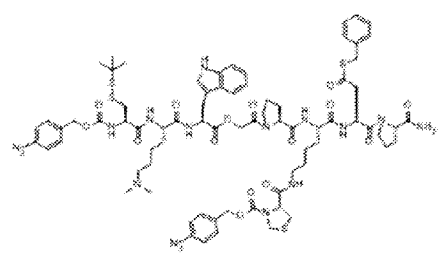
[1079] ４－２－４．1回目のi環化を実施し_その後アミノ基部ねの脱保護を実施した編　青製エ程

分枝ペプチド牛成反応に使用した_(S)_１_((３Ｓ．１ＯＲ．１５Ｒ．１８Ｓ，２１Ｓ，２９ａＳ，３３Ｓ)―２１―((１Ｈ―インドール―３-イル)メチル)_１０―アミノ_１８_(４―(ジメチルアミノ)プチル)―１，９，１６，１９，２２，２５，３１，３５―オクタオキソヘキサコサヒドロー１５，３-(エピミノプロパノイミノメタノ)ピロロ「2，1-ｘ1「1，11，12，４，７，16，22，２５]オキサジチアペンタアザシクロヘプタコシン_３３_カルボニル)ピロリジン_２_カルボキサミド_(氷Ｃｖｓ#_Ｌｖｓ_(Ｍｅ$_2$) - Ｔｒｐ―皿Ｇｌｙ- Ｐｒｏ- Ｌｙｓ(Ｈ-Ｃｖｓ#)―Ａｓｐ氷―Ｐｒｏ―ＮＨ$_2$、２つの氷部位、#部位にて環化、#部位で２つのSH基がジスルフィド結合を形成している)(化合物SP６２３)

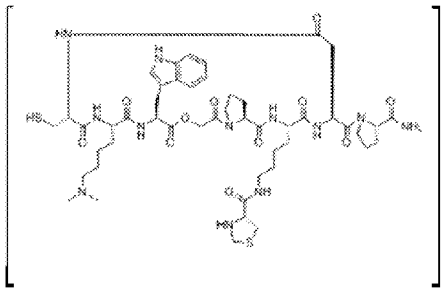
の合成

精製した結果、SP620のままでは精製できず、化合物SP623となった。化合物SP623は容易にSP620へと還元条件にて再び変換可能なため、化合物SP623を精製し、単離した。なお、精製には化合物重量が多く必要なため、上記実験とは別に再合成を行った。

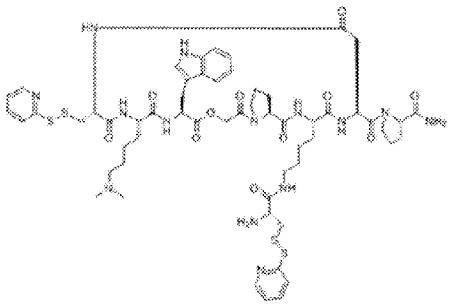
[1080] 下記のスキームに従い反応を行った。



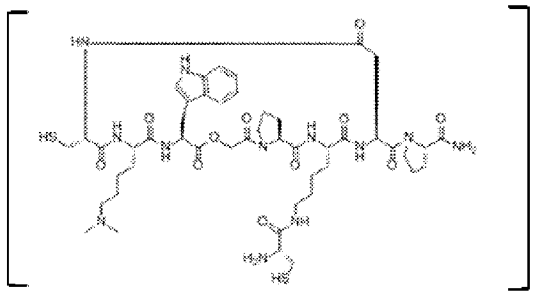
化合物sraie



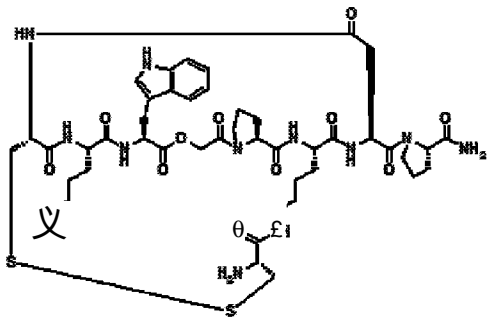
化合物SP618



化合物SP619



化^l¾SP620

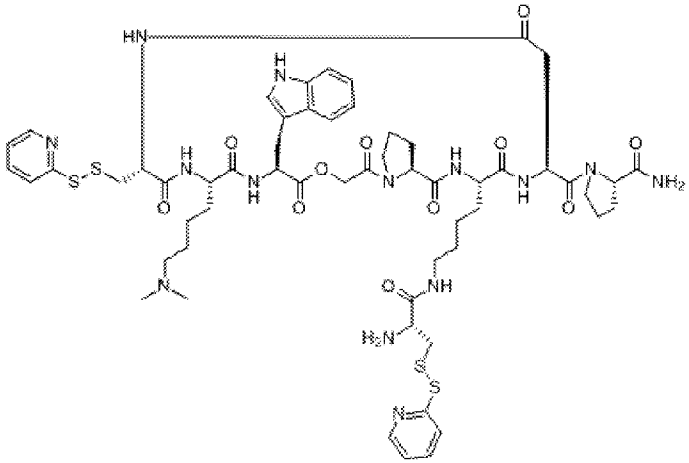


化合物SP623

[1081] （S）-1-（（3S，6S，10R，13S，16S，24aS）-16-（（1H_インドール_3_イル）メチル）_3_（4-（（R）-2-アミノ_3_（ピリジン_2—イルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）ー13—（4-（ジメチルアミノ）プチル）ー1，4，8．11，14，17，20_ヘプタオキソー10_（（ピリジン_2—イルジスルファニ

ル）メチル）ドコサヒドロ－１Ｈ－ピロロ「1，２－ｄ］「1，４，７，１０，１４，１７，２０］オキサヘキサアザシクロドコシン－６－カルボニル）ピロリジン－２－カルボキサミド（水Ｃｖｓ（ＳＰｙ）－Ｌｖｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{H}ＱＧｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ｈ－Ｃｖｓ（ＳＰｖ））－Ａｓｐ水－Ｐｒｏ－NH_2、２つの水部位にて環化）（化合物SP６１９）の合成

[1082]



[1083] 窒素雰囲気下、２００ｍＭ リン酸緩衝液（６９１μｌ、ｐＨ＝７．６）にジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）（７９７μｌ）を混ぜた溶液に4－（（（Ｓ）－５－（（Ｓ）－１－（（６Ｒ，９Ｓ，１２Ｓ）－１２－（（１Ｈ－インドール－３－イル）メチル）－６－（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－９－（４－（ジメチルアミノ）ブチル）－２，２－ジメチル－７，１０，１３－トリオキソ－１４－オキサ－３，４－ジチア－８，１１－ジアザヘキサデカン－１６－オイル）ピロリジン－２－カルボキサミド）－６－（（（Ｓ）－４－（ベンジルチオ）－１－（（Ｓ）－２－カルバモイルピロリジン－１－イル）－１，４－ジオキソブタン－２－イル）アミノ）－６－オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン－３－カルボン酸 (R)－4－アジドベンジル（Ａｃｂｚ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）－Ｌｙｓ（Me_2）－Ｔｒｐ－^{HO}Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ａｃｂｚ－Ｔｈｚ）－Ａｓｐ（ＳＢｎ）－Ｐｒｏ－NH_2）（化合物SP６１６）（８．０ｍｇ し 4．９４μｍｏｌ）を室温にて加えた。別途調整した１Ｍ トリス（2－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（１００μｌ 100μ

ｍｏｌ ｐＨ＝７．４）を室温にて加え、反応液をｐＨ＝７．４にて、同温度で２時間静置した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、２時間後環化反応が進行し化合物SP６１８が生成していることを確認した。

１Ｍ トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）塩酸塩（３９ｍｇ、０．１３６ｍｍｏｌ）を５Ｎ 水酸化ナトリウム水溶液（９１μｌ）、水（４５μｌ）で溶解させ、ｐＨ＝７．４に調整した。

[1084] 窒素雰囲気下、得られた化合物SP６１８を含む反応液（１．５ｍｌ）に３３０ｍＭ ２，２'―ジチオジピリジン（化合物SP６２２、２，２'-ＰｙＳＳＰｙ）溶液（１．５ｍｌ）を室温にて加え、ｐＨ＝２．１にて３７度で１３時間静置した。得られた反応液を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）-１-（（３Ｓ，６Ｓ，１０Ｒ，１３Ｓ，１６Ｓ，２４ａＳ）-１６-（（１Ｈ_インドール_３_イル）メチル）_３_（４-（（Ｒ）_２―アミノ-３-（ピリジン_２―イルジスルファニル）プロパンアミド）ブチル）-１３―（４_（ジメチルアミノ）ブチル）_１，４，８，１１，１４，１７，２０_ヘプタオキソ－１０_（（ピリジン_２―イルジスルファニル）メチル）ドコサヒドロ－１Ｈ－ピロロ［１，２―ｄ］［１，４，７，１０，１４，１７，２０］オキサヘキサアザシクロドコシン―６_カルボニル）ピロリジン_２_カルボキサミド（*Ｃｙｓ（ＳＰｙ）-Ｌｙｓ（Me_2）-Ｔｒｐ_^{HO}Ｇｌｙ-Ｐｒｏ-Ｌｙｓ（Ｈ_Ｃｙｓ（ＳＰｙ））―Ａｓｐ水―Ｐｒｏ_NH_2、２つの*部位にて環化）（化合物SP６１９）（３．７ｍｇ、６０％）を得た。

３３０ｍＭ ２，２'－ジチオジピリジン（化合物SP６２２、２，２'-ＰｙＳＳＰｙ）溶液の調整法は以下の通りである。４００ｍＭ ２，２―ジチジオピリジン（化合物SP６２２、２，２'―ＰｙＳＳＰｙ）のジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）溶液（１．５ｍｌ ０．６ｍｍｏｌ）に２Ｎ 塩酸水溶液

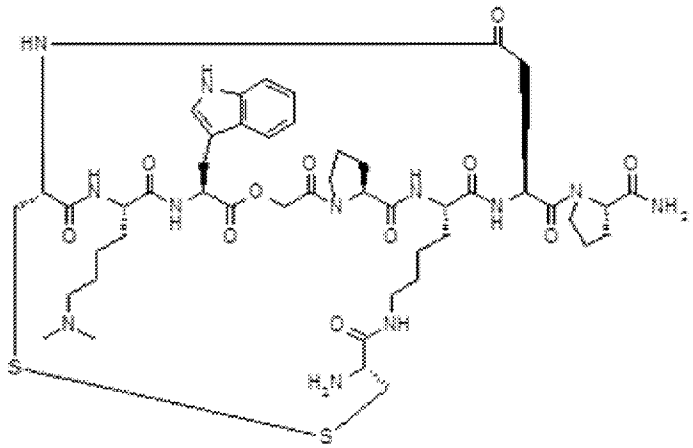
（２３８μｌ）、水（８０μ１）を加えた。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝１２６１．４　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1085] 分枝ペプチド前駆体、（Ｓ）－１－（（３Ｓ，１０Ｒ，１５Ｒ，１８Ｓ，２１Ｓ，２９ａＳ，３３Ｓ）－２１－（（１Ｈ－インドール－３－ィル）メチル）－１０－アミノ－１８－（４－（ジメチルアミノ）プチル）－１，９，１６，１９，２２，２５，３１，３５－オクタオキソヘキサコサヒドロ－１５，３－（エピミノプロパノイミノメタノ）ピロロ［２，１－ｘ］［１，１１，１２，４，７，１６，２２，２５］オキサジチアペンタアザシクロヘプタコシン－３３－カルボニル）ピロリジン－２－カルボキサミド（＊Ｃｖｓ＃－Ｌｖｓ（Ｍｅ，つ）－Ｔｒｐ－ｍ　Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ（Ｈ－Ｃｖｓ＃）－ＡｓＤ＊－Ｐｒｏ－ＮＨユ、２つの＊部位、＃部位にて環化、＃部位で２つのSH¾がジスルフィド結合を形成している）（化合物SP６２３）の合成

[1086]



[1087] 窒素雰囲気下、２００ｍＭ　リン酸緩衝液（７２０μｌ、ｐＨ＝７．６）とジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）（７２０μｌ）の溶液に、（Ｓ）－１－（（３Ｓ，６Ｓ，１０Ｒ，１３Ｓ，１６Ｓ，２４ａＳ）－１６－（（１Ｈ－インドール－３－ィル）メチル）－３－（４－（（Ｒ）－２－アミノ－３－（ピリジン－２－ィルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）－１３－（４－（ジメチルアミノ）プチル）－１，４，８，１１，１４，１７，２０－ヘプタオキソ－１０－（（ピリジン－２－ィルジスルファニル）メチル）ドコサヒドロ－１Ｈ－ピロロ［１，２－ｄ］［１，４，７，１０，１４，１

7，20]オキサヘキサァザシクロドコシン－6_カルボニル）ピロリジン—2—カルボキサミド（*Cys（SPy）—Lys（Me_2）-Trp-^{HO}Gly-Pro-Lys（H_Cys（SPy））-Asp*-Pro-NH_2、2つの*部位にて環化）（化合物SP619）（9．1mg、7．2μmol）を室温にて加えた。別途調整した600mM トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩溶液（100从し 60μmol、pH=3．7）を室温にて加え、pH=5．6にて同温度で30分間静置した。得られた反応液を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（0．1%ギ酸水溶液/ 0．1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製した。得られたフラクションを凍結乾燥することで、ジスルフィド形成が起こり、分枝ペプチド前駆体として、（S）—1—（（3S，10R，15R，18S，21S，29aS，33S）_21_（（1H—インドール—3_イル）メチル）-10—アミノ_18_（4—（ジメチルアミノ）プチル）－1，9，16，19，22，25，31，35—オクタオキソヘキサコサヒドロ_15，3-（エピミノプロパノイミノメタノ）ピロロ[2，1_x][1，11，12，4，7，16，22，25]オキサジチアペンタァザシクロヘプタコシン—33—カルボニル）ピロリジン_2_カルボキサミド（*Cys#_Lys（Me_2）-Trp-^{H0}Gly-Pro-Lys（H_Cys#）—Asp*_Pro_NH_2、2つの*部位、#部位にて環化、#部位で2つのSH基がジスルフイド結合を形成している）（化合物SP623）（3．7mg、49%）を得た。

600mM トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（2_カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩（22．5mg、78．5mmol）を1N水酸化ナトリゥム水溶液（131μ 1）で溶解させ、pH=3．7に調整した。

LCMS（ESI） m/z = 1039 (M— H)–

保持時間 :0．34分（分析条件30D「六05）

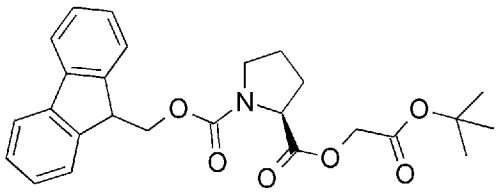
[1088] 5．2回目の分枝化反応で発生させる活性チオエステル創出ユニットの最適検討

Cys-Pro-HQGlyからチオエステルが発生させる反応条件は温和でpH=7.3でもゆっくりと進行することが明らかとなった（後述）。1回目の環化反応との選択性を最大化する目的、さらには1回目の環化反応でより温和でない反応条件を使用できるようにすることを目的として、Cys-Pro-HQGlyよりも安定で、反応進行のスィッチオン－オフが可能なユニットを探索した結果、より好ましいユニットの条件が明らかとなった。望ましいCys-Pro-Lacユニットを用いて、翻訳液中での環化反応および分枝化反応が進行することを確認した。

[1089] 5-1．モデル化さ物原料のさ成

Cys-Pro』0Glyおよびその代替ユニットを含む5残基ペプチドの合成を、そのチオエステル発生の条件を得るためのモデルペプチドとした。そのモデル化合物を合成した。

[1090] ピロリジン－1，2—ジカルポン酸＿2＿（2＿（tert—ブトキシ）－2—ォキソエチル）＿（S）-1-（（9H—フルオレン_9_ィル）メチル）（Fmoc-Pro-MGly-OtBu）（化合物SP631）の合成



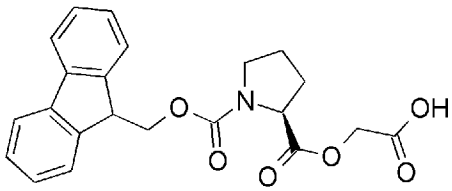
[1091] （S）-1-（（（9H—フルオレン_9_ィル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_2_カルボン酸（Fmoc-Pro-OH）（5.00g、14.8mmol）の塩化メチレン溶液（59mL）にN—エチルジイソプロピルアミン（DIPEA）（7.77mL、44.5mmol）と2—プロモ酢酸tert_ブチル（4.34g、22.2mmol）を室温にて攪拌しながら混合し、反応混合物を室温で48時間撹拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニゥム水溶液を加え洗浄し、有機層は塩化メチレンにて抽出をおこなった。得られた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄し、硫酸ナトリウムを加えて乾燥させた。有機層を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、ピロリジン－1，2―ジカルボン酸 2―（2―（tert―ブトキシ）－2―オキソエチル） (S) - 1- （（9H―フルオレン_9_イル）メチル）（Fmoc-Pro-^{HO}GLy-OtBu) （化合物SP631）（6．40g、14．2mmol、96%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 396 （M-tBu+H）+

保持時間：1．02分 (分析条件SQDFA05)

[1092] （S）-2-（（1―（（（9H―フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）酢酸 （Fmoc-Pro-MG Lv-OH) （化さ物SP632）のさ成



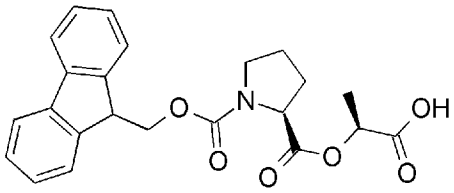
[1093] ピロリジン―1，2―ジカルボン酸 2_（2_（tert―ブトキシ）_2―オキソエチル） (S) - 1- （（9H―フルオレン_9_イル）メチル）（Fmoc-Pro 』^{0}GLy-0tBu) （化合物SP631）（6．40g、14．2mmol）の塩化メチレン溶液（29mL）にトリイソプロピルシラン（7．29mL、35．4mmol）とトリフルオロ酢酸（14．2mL、184mmol）を室温にて攪拌しながら混合し、反応混合物を室温で16時間撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．1%ギ酸水溶液/ 0．1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（S）-2-（（1-（（（9H―フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）酢酸 （Fmoc-Pro-^{HO}GLy-0H) （化合物SP632）（5．6g、14．2mmol、100%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 396 （M+H）+

保持時間：0．77分 (分析条件SQDFA05)

[1094] （S）-2-（（（S）-1-（（（9H―フルオレン_9_イル）メトキ

シ）_カルボニル）_ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）_プロパン酸　（Fmoc-Pro-Lac-OH）　（化合物SP６３３）の合成

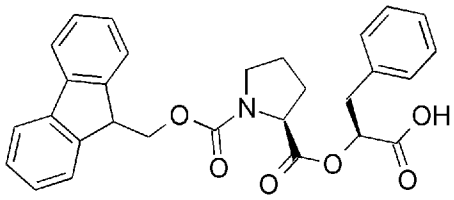


[1095] 窒素雰囲気下、（S）_１_（（（９Ｈ―フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_２_カルボン酸　（Fmoc-Pro-OH）　（６．００ｇ、１７．８ｍｍｏｌ）とＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（６９μし、０．８８９ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液　（７１ｍＬ）に0度にて攪拌しながら塩化オキサリル　（２．３４ｍＬ、２６．７ｍｍｏｌ）を滴下した後、反応混合物を室温にて1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣に塩化メチレン　（７１ｍＬ）、Ｎ―エチルジイソプロピルアミン　（ＤＩＰＥＡ）　（４６．６ｍＬ、２６７ｍｍｏｌ）、Ｌ―（＋）―乳酸　（２４．０ｇ、２６７ｍｍｏｌ）を0度にて混合し、反応混合物を室温にて2時間攪拌した。反応溶液を１Ｎ塩酸で2回、飽和塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧濃縮をおこなった。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー　（0．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（S）_２_（（（S）_１_（（（９Ｈ―フルオレン－９_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）プロパン酸　（Fmoc-Pro-Lac-OH）　（化合物SP６３３）（５．２ｇ、１２．７ｍｍｏｌ、７１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　４１０　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間　：0．８１分　(分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1096] （S）-２-（（（S）-１-（（_（９Ｈ―フルオレン_９_イル）_メトキシ）_カルボニル）_ピロリジン_２_カルボニル）ォキシ）_３_フエニルプロパン酸Fmoc-Pro-PhLac-OH）_　（化合物SP６３４）の合成



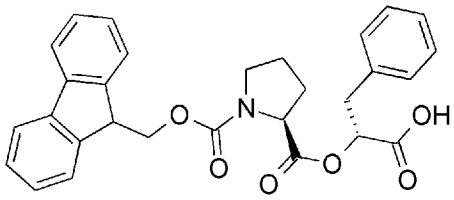
[1097] 窒素雰囲気下、(S)_1_((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボン酸(Fmoc-Pro-OH) (3.00g、8.89mmol)とN,N—ジメチルホルムアミド(34从L、0.445mmol)の塩化メチレン溶液(40mL)に0度にて攪拌しながら塩化オキサリル(1.17mL、13.3mmol)を滴下した後、反応混合物を室温にて1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣に塩化メチレン(36mL)、N—エチルジイソプロピルアミン(DIPEA)(2.33mL、13.3mmol)、(S)—2—ヒドロキシー3—フエニルプロパン酸(H0-Ph Lac-0H、2.22g、13.3mmol)を0度にて混合し、反応混合物を室温にて2時間攪拌した。反応溶液を1N塩酸で2回、飽和塩化ナトリゥム水溶液で2回洗浄し、硫酸ナトリゥムにて乾燥した後、減圧濃縮をおこなった。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-((S)-1-((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_3_フエニルプロパン酸(Fmoc-Pro-PhLac-OH) (化合物SP634)(3.00g、6.18mmol 70%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 486 (M+H)+

保持時間:0.92分 (分析条件30D「六05)

なお、PhLacとは、本明細書では(S)—ヒドロキシ-3_フエニルプロパン酸のヒドロキシル基とカルボン酸官能基を形成するヒドロキシル基を取り除いた部分構造とする。

[1098] _(R)-2-((S)-1-((9H—フルオレン_9_イル)_メトキシ)_カルボニル)_ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_3_フエニルプロパン酸(Fmoc-Pro-D-PhLac-OH) (化合物SP635)の合¾

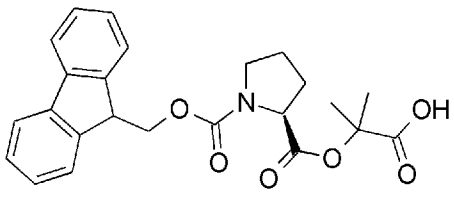


[1099] 窒素雰囲気下、(S)_1_((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボン酸(Fmoc-Pro-OH) (3.00g、8.89mmol)とN,N—ジメチルホルムアミド(34从L、0.445mmol)の塩化メチレン溶液(36mL)に0度にて攪拌しながら塩化オキサリル(1.17mL、13.3mmol)を滴下した後、反応混合物を室温にて1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣に塩化メチレン(36mL)、N—エチルジイソプロピルアミン(DIPEA)(2.33mL、13.3mmol)、(R)—2—ヒドロキシ—3—フエニルプロパン酸(2.22g、13.3mmol)を0度にて混合し、反応混合物を室温にて2時間攪拌した。反応溶液を1N塩酸で2回、飽和塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧濃縮をおこなった。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(R)_2-(((S)-1-(((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン—2—カルボニル)オキシ)—3—フエニルプロパン酸(Fmoc-Pro-D-PhLac-OH) (化合物SP635)(3.20g、6.59mmo\、74%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 486 (M+H)+

保持時間:0.91分 (分析条件SQDFA05)

[1100] (S)-2-((1-(((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_2_メチルプロパン酸(Fmoc-Pro-Aib-OH) (化合物SP636)の合成



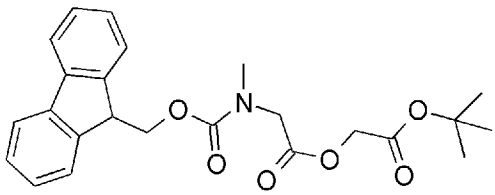
[1101] 窒素雰囲気下、(S)_1_((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボン酸 (Fmoc-Pro-OH) (3.00g、8.89mmol)とN,N—ジメチルホルムアミド(34从L、0.445mmol)の塩化メチレン溶液 (36mL)に0度にて攪拌しながら塩化オキサリル (1.17mL、13.3mmol)を滴下した後、反応混合物を室温にて1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣に塩化メチレン (36mL)、N—エチルジイソプロピルアミン (DIPEA) (4.66mL、26.7mmol)、2—ヒドロキシー2—メチルプロパン酸 (2.78g、26.7mmol)を0度にて混合し、反応混合物を室温にて2時間攪拌した。反応溶液を1N塩酸で2回、飽和塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧濃縮をおこなった。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)_2_((1-((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_2_メチルプロパン酸 (Fmoc-Pro-^{HO}GLy(Me)$_2$-OH) (化合物SP636)(3.70g、8.74mmol 98%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 424 (M+H)+

保持時間:0.85分 (分析条件30D「六05)

なお、^{HO}GLy(Me)$_2$とは、本明細書では2—ヒドロキシ-2_メチルプロパン酸のヒドロキシル基とカルボン酸官能基を形成するヒドロキシル基を取り除いた部分構造とする。

[1102] 2-((((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)酢酸 2_(tert—ブトキシ)—2—オキソエチル (Fmoc-MeGLy-^{HO}GLy-OtBu) (化合物SP637)の合成



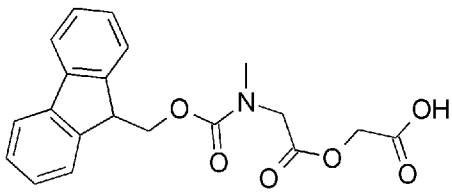
[1103] 2-(((((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)(メ

チル）アミノ）酢酸（Fmoc-MeG Ly-OH)（1．94g、6．23mmol）の塩化メチレン溶液（25mL）にN—エチルジイソプロピルアミン（DIPEA）（3．26mL、18．7mmol）と2—プロモ酢酸 tert—ブチル（1．82g、9．34mmol）を室温にて攪拌しながら混合し、反応混合物を室温で48時間撹拌した。反応混合物に1N塩酸を加え洗浄し、有機層は塩化メチレンにて抽出をおこなった。得られた有機層を飽和塩化ナトリゥム水溶液にて洗浄し、続いて硫酸ナトリゥムを加えて乾燥させた。有機層を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、2_（（（（9H—フルオレン—9—ィル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）酢酸 2_（tert—ブトキシ）_2_オキソエチル（Fmoc-MeG Ly』^{0}G Ly-0tBu)（化合物SP637）（2．30g、5．41mmol、87%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 370（M-tBu+H）+

保持時間：0．99分 (分析条件30D「六05）

[1104] 2-（2-（（（（9H—フルオレン_9_ィル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）アセトキシ）酢酸（Fmoc-MeG Lv-皿G Lv-OH)（化合物SP638）のさ成



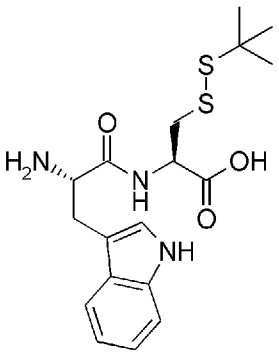
[1105] 2-（（（（9H—フルオレン_9_ィル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）酢酸 2_（tert—ブトキシ）_2_オキソエチル（Fmoc-MeG Ly-^{HO}G Ly-OtBu)（化合物SP637）（2．30g、5．41mmol）の塩化メチレン溶液（18mL）にトリイソプロビルシラン（2．78mL、13．5mmol）とトリフルオロ酢酸（5．41mL、70．3mmol）を室温にて攪拌しながら混合し、反応混合物を室温で2時間撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．1%ギ酸水溶液/0．1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し

、２＿（２＿（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）アセトキシ）酢酸（Fmoc-MeGLy-^{D}GLy-OH）（化合物SP６３８）（２．ＯＯｇ、５．４１ｍｍｏｌ　１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝３７０　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1106] ＿（Ｒ）＿２—＿（（Ｓ）＿２—アミノ－３—＿（１Ｈ—インドール－３—イル）＿プロパンアミド）-３-（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパン酸＿（H-TrD-Cys(StBu)-OH）＿（化合物SP６３９）の合成

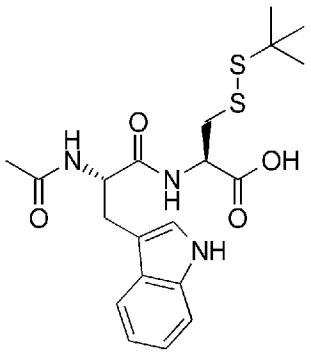


[1107] 調製した（Ｒ）-２-（（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ—フルオレン－９—イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（１Ｈ—インドール－３—イル）プロパンアミド）＿３＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパン酸（Fmoc-Trp-Cys(StBu)-OH）（化合物SP６０２）（５００ｍｇ、０．８０９ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド溶液（１．６ｍＬ）に１，８—ジアザビシクロ［５．４．０］＿７＿ウンデセン（ＤＢＵ）（１３４μＬ、０．８９０ｍｍｏｌ）を室温で攪拌しながら混合し、反応溶液を室温で３０分攪拌した。反応溶液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｒ）＿２＿（（Ｓ）—２—アミノ－３—（１Ｈ—インドール－３—イル）プロパンアミド）-３-（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパン酸（H-Trp-Cys(StBu)-OH）（化合物SP６３９）（２９０ｍｇ、０．７３３ｍｍｏｌ　９１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝３９６　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４９分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1108] （Ｒ）－２－（（Ｓ）＿２＿アセトアミド＿３＿（１Ｈ—インドール－３－イル）プロパンアミド）－３－（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパン酸＿（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH）（化合物SP６４０）の合成

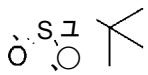


[1109] （Ｒ）—２—（（Ｓ）—２—アミノ－３—（１Ｈ—インドール－３—イル）プロパンアミド）＿３＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロノ《ン酸 (H-Trp-Cys(StBu)-OH) （化合物SP６３９）（２８０ｍｇ、０．７０８ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１．４ｍＬ）に、室温にて攪拌しながらＮ—エチルジイソプロピルアミン (ＤＩＰＥＡ)（３７１μＬ、２．１２ｍｍｏｌ）と無水酢酸 (６６．８μＬ、０．７０８ｍｍｏｌ）を混合し、反応溶液を室温にて１時間攪拌した。反応溶液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｒ）—２—（（Ｓ）—２—アセトアミド－３＿（１Ｈ—インドール－３—イル）プロパンアミド）＿３＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH) （化合物SP６４０）（２７０ｍｇ、０．６１７ｍｍｏｌ ８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４３８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．６６分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

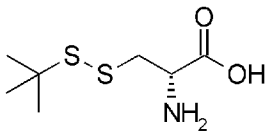
[1110] メタンスルホノ天才酸_S-tert- プチル（化合物SP６８４）の合成



[1111] ナトリウム 2-メチル-2- プロパンチオラート (７．８３ｇ、６９．８ｍｍｏｌ）にテトラヒドロフラン（１００ｍｌ）を加え、＿６０度以下に冷却した。この懸濁液にメタンスルホニルクロリド (６．７７ｍｌ ８７．Ｏｍｍ

ｏｌ）のテトラヒドロフラン（５０ｍｌ）溶液を２５分かけて滴下した。反応液を２時間かけて室温まで昇温し、更に室温で１時間攪拌させた。反応液をジクロロメタン（３００ｍｌ）で希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮しメタンスルホノチオ酸 S-tert- プチル（化合物SP６８４）（１１．１７ｇ、７６％）を得た。得られた化合物は非特許文献（Ｉｎｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｌｙ、２０１０、４９、８６３７-８６４４）に掲載されている化合物データにて確認した。

[1112] （Ｓ）―２―アミノ―３―（ｔｅｒｔ－プチルジスルファニル）プロパン酸（H-D-Cys(StBu)-OH）（化合物SP６４１）の合成

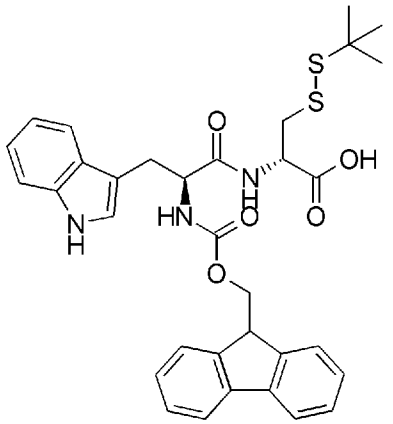


[1113] （Ｓ）－２―アミノ－３－メルカプトプロパン酸 塩酸塩 水和物（１．００ｇ、５．６９ｍｍｏｌ）のメタノール溶液（５．１ｍＬ）に、０度にて攪拌しながら調製したメタンスルホノチオ酸 Ｓ－ｔｅｒｔ―プチル（化合物SP６８４、１．０５ｇ、６．２６ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（２．０ｍＬ）とトリエチルアミン（２．３８ｍＬ、１７．１ｍｍｏｌ）を混合し、反応混合物を室温にて３時間攪拌した。反応混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）－２―アミノ－３－（ｔｅｒｔ－プチルジスルファニル）プロパン酸（H-D-Cys(StBu)-OH）（化合物SP６４１）（６２０ｍｇ、２．９６ｍｍｏし ５２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２１０ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５６分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1114] （Ｓ）-２-（（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ―フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロパンアミド）－３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸（Fmoc-Trip-D-CvsiStBu)-OH）（化合物SP６４２）の合成



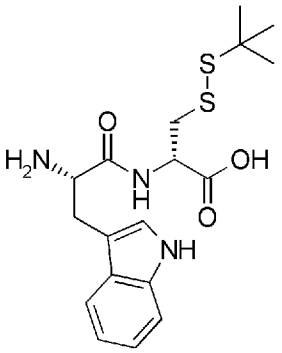
[1115] （S）-2-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3_（1H_インドール_3_イル）プロパン酸（Fmoc-Trp-OH）（1.26g、2.96mmol）とN—ヒドロキシスクシンイミド（341mg、2.96mmol）の塩化メチレン（5.9mL）に、0度にて1_エチル_3_（3—ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（WSCI・HCl）（568mg、2.96mmol）を混合し、反応溶液を室温にて16時間攪拌した。続いてN—エチル—N—イソプロピルプロパン—2—アミン（DIPEA、517μL、2.96mmol）と（S）—2—アミノ-3-（tert—ブチルジスルファニル）プロパン酸（H-D-Cys（StBu）-OH）（化合物SP641）（620mg、2.96mmol）を0度にて混合し、反応溶液を室温にて5時間攪拌した。1N塩酸を加えて洗浄し、有機層を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて粗精製し、（S）-2-（（S）-2-（（（（9H—フルオレン—9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3_（1H—インドール_3_イル）プロパンアミド）_3_（tert_ブチルジスルファニル）プロパン酸（Fmoc-Trp-D-Cys（StBu）-OH）（化合物SP642）を得た。

LCMS（ESI）m/z=618（M+H）+

保持時間：0.94分（分析条件30D「六05）

[1116] _{（S）-2-（（S）—2—アミノ—3—（1H—インドール—3—イル）

プロパンアミド)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパン酸 (H-Trp-D-Cys(StBu)-OH) (化合物SP643)の合成

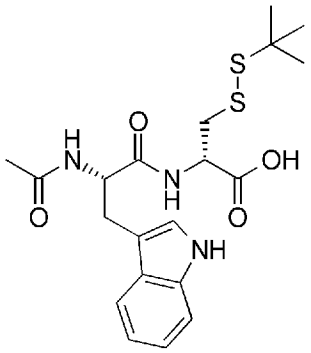


[1117] ((S)-2-((S)-2-(((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_3_(1H_インドール_3_イル)プロパンアミド)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパン酸 (Fmoc-Trp- D-Cys(StBu)-OH) (化合物SP642)(1.93g、3.12mmol)のN,N—ジメチルホルムアミド溶液 (6.3mL)に1,8—ジアザビシクロ[5.4.0]_7_ウンデセン (DBU) (706μL、4.69mmol)を室温で攪拌しながら混合し、反応溶液を室温で1時間攪拌した。反応溶液に1N塩酸を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-((S)_2—アミノ_3-(1H—インドール_3_イル)プロパンアミド)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパン酸 (H-Trp-D-Cys(StBu)-OH) (化合物SP643)(870mg、2.20mmol 70%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 396 (M+H)+

保持時間:0.83分 (分析条件SQDAA05)

[1118] (S)-2-((S)_2_アセトアミド_3_(1H—インドール—3-イル)プロパンアミド)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパン酸 (Ac-Trp-D-Cys(StBu)-OH) (化合物SP644)の合成

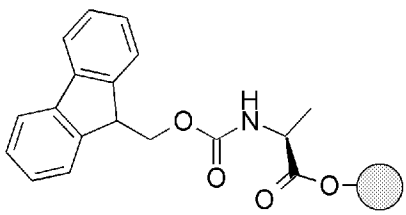


[1119] （Ｓ）―２―（（Ｓ）―２―アミノ－３―（１Ｈ―インドール－３―イル）プロパンアミド）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸(H-Trp-D-Cys(StBu)-OH)（化合物SP６４３）（８７０ｍｇ、２．２０ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（４．４ｍＬ）に、室温にて撹拌しながらＮ_エチルジイソプロピルアミン（ＤＩＰＥＡ）（１．１５ｍＬ、６．６０ｍｍｏｌ）と無水酢酸（２０８从1、２．２Ｏｍｍｏｌ）を混合し、反応溶液を室温にて１時間撹拌した。反応溶液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）―２―（（Ｓ）―２―アセトアミド―３_（１Ｈ―インドール―３―イル）プロパンアミド）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸(Ac-Trp-D-Cys(StBu)-OH)（化合物SP６４４）（９６０ｍｇ、２．２０ｍｍｏｌ　１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝４３８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

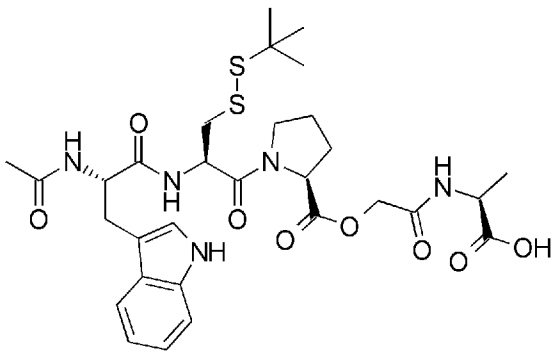
[1120] Ｆｍｏｃ-Ａｌａ-Ｏ-Ｔｒｔ（２-Ｃｌ）ｒｅｓｉｎ（化合物SP６４５）の調製



[1121] クロロートリチル（２―クロロ）レジン（cL-Trt-(2-C L)-Resin（１００～２００Mesh、１％ DVB)、渡辺化学から購入、１４．４ｇ、２２．９６ｍｍｏｌ）に塩化メチレン（１ＯＯｍＬ）を加え、混合物を室温にて４５分間静

置した。液相を取り除き、固相を塩化メチレン（１００ｍＬ）で洗浄した。固相に対して、塩化メチレン（１００ｍＬ）、メタノール（3．５ｍＬ）、Ｎ―エチルジイソプロピルアミン（ＤＩＰＥＡ）（１０ｍい、（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）メトキシ）カルボニル）ァミノ）プロパン酸（3．５７ｇ、１１．５ｍｍｏｌ）を混合し、反応混合物を室温にて５分間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂に塩化メチレン（１００ｍＬ）、メタノール（３０ｍＬ）、Ｎ―エチルジイソプロピルアミン（ＤＩＰＥＡ）（１０ｍＬ）を混合し、反応混合物を室温にて２時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂を塩化メチレン（１００ｍＬ）にて３回洗浄し、減圧乾燥をし、標題化合物（化合物SP６４５）１５．９６ｇを得た。本明細書に記載の方法に従い、ローディング値を計算したところ、２５．４％であった。

[1122] （Ｓ）－２－（２－（（（Ｓ）－１－（（Ｒ）－２－（（Ｓ）＿２＿アセトアミド―３―＿（１Ｈ―インドール―３―ィル）プロパンアミド）―３―（ｔｅｒｔ＿プチルジスルファニル）プロパノィル）ピロリジン＿２＿カルボニル）ォキシ）ァセトアミド）プロパン酸（Ac-Tnp-Cvs(StBu)-Pro-通GLv-ALa-0H)（化さ物SP６４６）のさ成



[1123] 調製したFmoc-ALa-0-res in（化合物SP６４５）（２００ｍｇ、０．４０５ｍｍｏｌ/ｇ、８０．９μｍｏｌ）にＤＭＦ（０．８ｍＬ）を加え、室温にて１５分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に２％ＤＢＵ/Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（０．８ｍＬ）を加え、室温にて３０分間振とうし、液相を取り除くという作業を２度繰り返した。得られた樹脂をＮ

，Ｎ―ジメチルホルムアミド（0．８ｍＬ）にて４度洗浄し、続いて（Ｓ）－２－（（１＿（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン＿２＿カルボニル）オキシ）酢酸（Fmoc-Pro-^{HQ}GLy-OH）（化合物ＳＰ６３２）（１５４ｍｇ、０．３８８ｍｍｏｌ）と１―ヒドロキシ－７―アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）（３３．０ｍｇ、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液（０．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（０．５２ｍＬ）を混合し、室温にて３時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（０．８ｍＬ）にて４度洗浄した後、５％ピペリジン/Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（０．８ｍＬ）を混合し、室温にて１時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（０．８ｍＬ）にて４度洗浄した後、（Ｒ）－２－（（Ｓ）＿２＿アセトアミド＿３＿（１Ｈ―インドール＿３＿イル）プロパンアミド）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH）（化合物ＳＰ６４０）（１７０ｍｇ、０．３８８ｍｍｏｌ）と３，４―ジヒドロ－３―ヒドロキシ－４＿オキソ－１，２，３＿ベンゾトリアジン（ＨＯＯｂｔ（３９．６ｍｇ、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液（０．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ＿ジメチルホルムアミド溶液（０．５２ｍＬ）を混合し、室温にて１５時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（０．８ｍＬ）にて４度、続いて塩化メチレン（０．８ｍＬ）にて４度洗浄した後、５０％２，２，２―トリフルオロエタノール/塩化メチレン溶液（１．ＯｍＬ）を混合し、室温にて２時間振とうした。

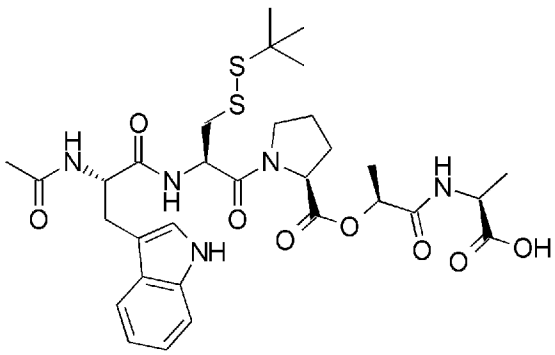
固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン（１．ＯｍＬ）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精

製し、 (S)-2-(2-(((S)-1-((R)-2-((S)-2-アセトアミド_3_(1H—インドール_3_イル)プロパンアミド)_3-(tert_ブチルジスルファニル)プロパノイル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)アセトアミド)プロパン酸(Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{D}GLy-ALa-OH) (化合物SP646)(37.8mg、57μmol、70%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 664 (M+H)+

保持時間:0.80分 (分析条件SQDAAO5)

[1124] (S)-2-((S)-2-((S)-1-((R)-2-((S)-2—アセトアミド—3—(1H—インドール—3—イル)プロパンアミド)-3-(tert_ブチルジスルファニル)プロパノイル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)プロパンアミド)プロパン酸(Ac-Tnp-Cys(StBu)-Pro-Lac-ALa-0H) (化合物SP647)の合成



[1125] 調製したFmoc-ALa-0-resin(化合物SP645)(200mg、0.405mmol/g、80.9μmol)にDMF(0.8mL)を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液 (0.8mL)を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド(0.8mL)にて4度洗浄し、続いて (S)-2-(((S)-1-(((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)プロパン酸(Fmoc-Pro-Lac-OH) (化合物SP633)(159mg、0.388mmol)と1—ヒドロ

キシ―7―ァザベンゾトリアゾール (H０Ａｔ）（３３．Ｏｍｇ、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液 (0．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルポジイミド (ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．５２ｍＬ）を混合し、室温にて3時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド (0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、５％ピペリジン/ ーＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．８ｍＬ）を混合し、室温にて1時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、 (R）-２-（（Ｓ）_２―ァセトアミド―3_（1Ｈ―インドール_３_ィル）プロパンアミド）_３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH) (化合物SP６４０）（１７０ｍｇ、０．３８８ｍｍｏｌ）と3，4―ジヒドロ_３―ヒドロキシ－４_オキソ－１，２，３_ベンゾトリアジン (ＨＯＯｂｔ）（３９．６ｍｇ、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液 (0．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルポジィミド (ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．５２ｍＬ）を混合し、室温にて１５時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド (0．８ｍＬ）にて4度、続いて塩化メチレン (0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、５０％２，２，２―トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液 (1．ＯｍＬ）を混合し、室温にて2時間振とうした。

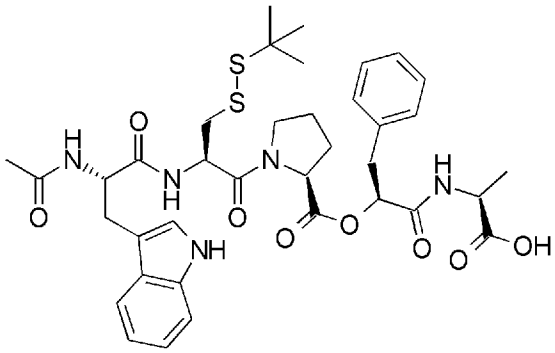
固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン (1．ＯｍＬ）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、 (S）-２-（（Ｓ）-２-（（（Ｓ）-１-（（Ｒ）-２-（（Ｓ）―2―アセトアミド―3―（1Ｈ―インドール―3―ィル）プロパンアミド）_３_（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパノィル）ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）プロパンアミド）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)

-Pro-Lac-ALa-OH) (化合物SP647)(51.4mg、76μmol、94%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 678 (M+H)+

保持時間:0.82分 (分析条件SQDAAO5)

[1126] (S)-2-((S)-2-((S)-1-((R)-2-((S)-2—アセトアミド—3—(1H—インドール—3—イル)プロパンアミド)-3-(tert-ブチルジスルファニル)プロパノイル)ピロリジン-2-カルボニル)オキシ)-3-フェニルプロパンアミド)プロパン酸(Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-PhLac-ALa-OH) (化合物SP648)の合成



[1127] 調製したFmoc-ALa-0-resin(化合物SP645)(200mg、0.405mmol/g、80.9μmol)にDMF(0.8mL)を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液(0.8mL)を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド(0.8mL)にて4度洗浄し、続いて(S)-2-((S)-1-((9H—フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン-2-カルボニル)オキシ)-3-フェニルプロパン酸(Fmoc-Pro-PhLac-OH) (化合物SP634)(189mg、0.388mmol)と1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)(33.0mg、0.243mmol)のNMP溶液(0.64mL)とジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(65μL、0.417mmol)のN,N—ジメチルホルムアミド溶液(0.52mL)を混合し、室温にて3時間振

とうした。

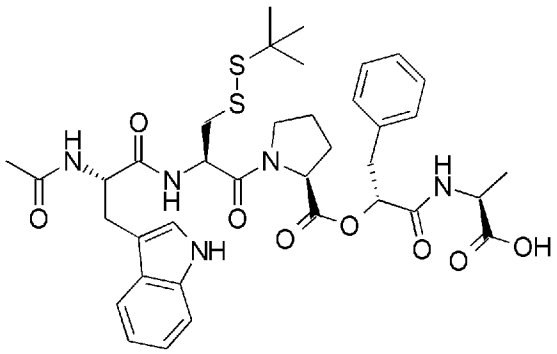
固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド(0．8mL)にて4度洗浄した後、5％ピペリジン/ ー，N—ジメチルホルムアミド溶液 (0．8mL)を混合し、室温にて1時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド溶液 (0．8mL)にて4度洗浄した後、 (R)-2-((S)_2_アセトアミド_3_(1H—インドール_3_イル)プロパンアミド)_3_(tert—ブチルジスルファニル)プロパン酸(Ac-Trp-Cys (StBu)-OH) (化合物SP640)(170mg、0．388mmol)と3，4—ジヒドロー3—ヒドロキシー4_オキソー1，2，3_ベンゾトリアジン (HOOBt (39．6mg、0．243mmol)のNMP溶液 (0．64mL)とジイソプロピルカルボジイミド (DIC) (65μL、0．417mmol)のN，N_ジメチルホルムアミド溶液 (0．52mL)を混合し、室温にて15時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド(0．8mL)にて4度、続いて塩化メチレン (0．8mL)にて4度洗浄した後、50％2，2，2—トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液 (1．OmL)を混合し、室温にて2時間振とうした。

固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン (1．OmL)で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．1％ギ酸水溶液/ 0．1％ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、 (S)-2-((S)-2-(((S)-1-((R)-2-((S)—2—アセトアミド—3—(1H—インドール—3—イル)プロパンアミド)_3_(tert—ブチルジスルファニル)プロパノイル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_3_フエニルプロパンアミド)プロパン酸(Ac-Trp-Cys (StBu)-Pro-PhLac-ALa-OH) (化合物SP648)(51．2mg、68μmol 84％)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 754 (M+H)+

保持時間 :0．92分 (分析条件SQDAA05)

[1128] （Ｓ）－２－（（Ｒ）－２－（（（Ｓ）－１－（（Ｒ）－２－（（Ｓ）－２－アセトアミド－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロパンアミド）－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパノイル）ピロリジン－２－カルボニル）オキシ）－３－フェニルプロパンアミド）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-D-PhLac-ALa-OH）の合成



[1129] 調製したFmoc-ALa-0-resin（化合物SP645）（200mg、0.405mmol/g、80.9μmol）にDMF（0.8mL）を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2％DBU/N，N－ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN，N－ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄し、続いて（R）－2－（（（S）－1－（（（9H－フルオレン－9－イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン－2－カルボニル）オキシ）－3－フェニルプロパン酸（Fmoc-Pro-D-PhLac-OH）（化合物SP635）（189mg、0.388mmol）と1－ヒドロキシ－7－アザベンゾトリアゾール（HOAt）（33.0mg、0.243mmol）のNMP溶液（0.64mL）とジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（65μL、0.417mmol）のN，N－ジメチルホルムアミド溶液（0.52mL）を混合し、室温にて3時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N－ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄した後、5％ピペリジン/N，N－ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を混合し、室温にて1時間振とうした。固相と液

相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、 (R) - 2- （（Ｓ）_２_アセトアミド_３_（１Ｈ―インドール_３_イル）プロパンアミド)_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH) （化合物SP６４０）（１７０ｍｇ、０．３８８ｍｍｏｌ）と３，４―ジヒドロ－３―ヒドロキシ－４_オキソ－１，２，３_ベンゾトリアジン (ＨＯＯｂｔ）（３９．６ｍｇ、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液 (0．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルボジィミド (ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．５２ｍＬ）を混合し、室温にて１５時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（０．８ｍＬ）にて4度、続いて塩化メチレン (0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、５０％２，２，２―トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液 （１．ＯｍＬ）を混合し、室温にて2時間振とうした。

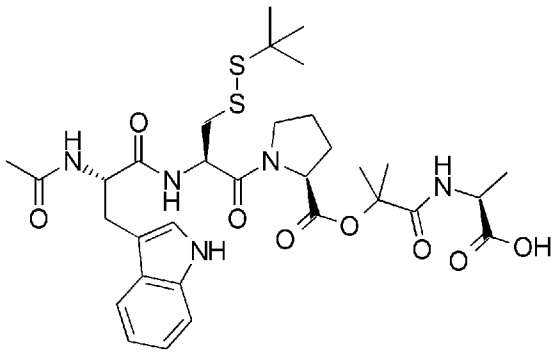
固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン (1．ＯｍＬ）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、 (S) - 2- （（R) - 2- （（（S) - 1- （（R) - 2- （（S）―2―アセトアミド―3―（１Ｈ―インドール―3―イル）プロパンアミド)_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパノイル）ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）_３_フエニルプロパンアミド)プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-D-PhLac-ALa-OH) （化合物SP６４９）（５０．０ｍｇ、６６．Ｏμｍｏし ８２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ７５４ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :0．９３分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1130] _(S)_- 2- (2- (((S) - 1- ((R) - 2- ((S)_ 2 _アセトアミド―3―_(１Ｈ―インドール―3―イル)_プロパンアミド)_―3―_(ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル)_プロパノイル)_ピロリジン_２_カルボニル）_オキシ）―2―メチルプロパンアミド)_プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-P

ro-mG_Lv(Me),-ALa-OH) __(化合物SP650)の合成



調製したFmoc-ALa-0-res in(化合物SP645)(200mg、0.405mmol/g、80.9μmol)にDMF(0.8mL)を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液(0.8mL)を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド(0.8mL)にて4度洗浄し、続いて(S)-2-((1_((((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)_2_メチルプロパン酸(Fmoc-Pro-^{HO}GLy(Me)$_2$-0H)(化合物SP636)(164mg、0.388mmol)と1—ヒドロキシー7_アザベンゾトリアゾール(HOAt)(33.0mg、0.243mmol)のNMP溶液(0.64mL)とジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(65μL、0.417mmol)のN,N_ジメチルホルムアミド溶液(0.52mL)を混合し、室温にて3時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド(0.8mL)にて4度洗浄した後、5%ピペリジン/ー,N—ジメチルホルムアミド溶液(0.8mL)を混合し、室温にて1時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド溶液(0.8mL)にて4度洗浄した後、(R)-2-((S)_2—アセトアミド—3_(1H—インドール_3_イル)プロパンアミド)_3_(tert_ブチルジスルファニル)プロパン酸(Ac-Trp-Cys(StBu)-OH)(化合物SP640)(170mg、0.388mmol)と3,4—ジヒドロ_3—ヒ

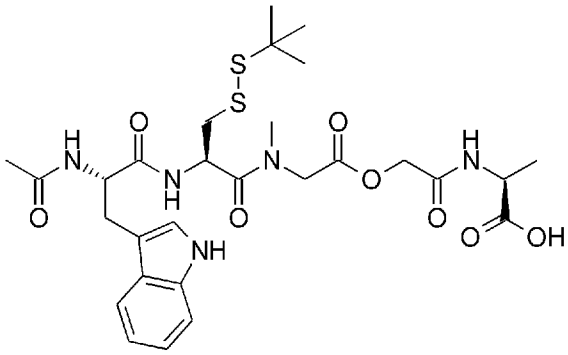
ドロキシー4_オキソー1，2，3_ベンゾトリアジン（HOOBt）（39．6mg、0．243mmol）のNMP溶液（0．64mL）とジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（65μL、0．417mmol）のN，N—ジメチルホルムアミド溶液（0．52mL）を混合し、室温にて15時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド（0．8mL）にて4度、続いて塩化メチレン（0．8mL）にて4度洗浄した後、50％2，2，2—トリフルオロエタノール/塩化メチレン溶液（1．OmL）を混合し、室温にて2時間振とうした。固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン（1．OmL）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．1％ギ酸水溶液/0．1％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（S）-2-（2-（（（S）-1-（（R）-2-（（S）_2_アセトアミド—3_（1H-インドール_3_イル）プロパンアミド）_3_（tert—プチルジスルファニル）プロパノイル）ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）_2—メチルプロパンアミド）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-^{Hp}GLy(Me)$_2$-ALa-0H）（化合物SP650）（46．4mg、67μmol、83％）を得た。

LCMS（ESI）m/z＝692（M＋H）＋

保持時間：0．84分（分析条件SQDAAO5）

[1131] （4S，7R，16S）_4_（（1H—インドール—3_イル）メチル）-7-（（tert—プチルジスルファニル）メチル）—9，16_ジメチル—2，5，8，11，14_ペンタオキソー12_オキサー3，6，9，15—テトラアザヘプタデカン—17_酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-MeGLv-皿GLv-ALa-0H）_（化合物SP651）の合成



[1132] 調製したFmoc-ALa-O-res in（化合物SP645）（200mg、0.405mmol/g、80.9μmol）にDMF（0.8mL）を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄し、続いて2_（2-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）アセトキシ）酢酸（Fmoc-MeGLy-HOGLy-OH）（化合物SP638）（143mg、0.388mmol）と1—ヒドロキシー7—アザベンゾトリアゾール（HOAt）（33.0mg、0.243mmol）のNMP溶液（0.64mL）とジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（65μL、0.417mmol）のN,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.52mL）を混合し、室温にて3時間振とうした。

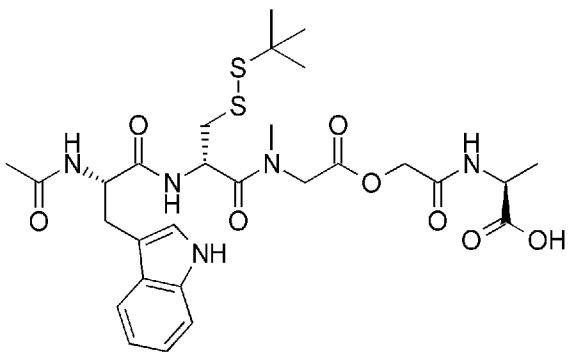
固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄した後、5%ピペリジン/N,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を混合し、室温にて1時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）にて4度洗浄した後、（R）-2-（（S）_2_アセトアミド_3_（1H—インドール_3_イル）プロパンアミド）_3_（tert—ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-OH）（化合物SP640）（170mg、0.388mmol）と3,4—ジヒドロー3—ヒドロキシー4_オキソー1,2,3_ベンゾトリアジン（HOOBt）（39.6mg

、０．２４３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液（0．６４ｍＬ）とジイソプロピルカルボジィミド（ＤＩＣ）（６５μＬ、０．４１７ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（0．５２ｍＬ）を混合し、室温にて１５時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（０．８ｍＬ）にて4度、続いて塩化メチレン（0．８ｍＬ）にて4度洗浄した後、５０％２，２，２―トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液（１．ＯｍＬ）を混合し、室温にて2時間振とうした。固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン（1．ＯｍＬ）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（４Ｓ，７Ｒ，１６Ｓ）-４-（（１Ｈ―インドール_３_イル）メチル）_７_（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）_９，１６―ジメチル_２，５，８，１１，１４―ペンタオキソ―１２―オキサ－３，６，９，１５―テトラアザヘプタデカン－１７_酸（Ac-Trp-Cys(StBu)-MeG Ly-^{HQ}GLy-ALa-OH）（化合物SP６５１）（２６．７ｍｇ、４２μｍｏｌ、５２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ６３８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1133] （４Ｓ．７Ｓ．１６Ｓ）-４-（（１Ｈ_インドール_３_イル）メチル）-７-（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）－９，１６_ジメチル－２，５，８，１１，１４_ペンタオキソ－１２_オキサ－３，６，９，１５―テトラアザヘプタデカン―１７_酸（Ac-Trp-D-Cys(StBu)-MeG Lv-ⅢGLv-ALa-OH）（化合物SP６５２）の合成



[1134] 調製したFmoc-ALa-O-res in（化合物SP645）（200mg、0.405mmol/g、80.9μmol）にDMF（0.8mL）を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄し、続いて2_（2-（（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）アセトキシ）酢酸（Fmoc-MeGLy-HOGLy-OH）（化合物SP638）（143mg、0.388mmol）と1—ヒドロキシー7—アザベンゾトリアゾール（HOAt）（33.0mg、0.243mmol）のNMP溶液（0.64mL）とジイソプロピルカルポジイミド（DIC）（65μL、0.417mmol）のN,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.52mL）を混合し、室温にて3時間振とうした。

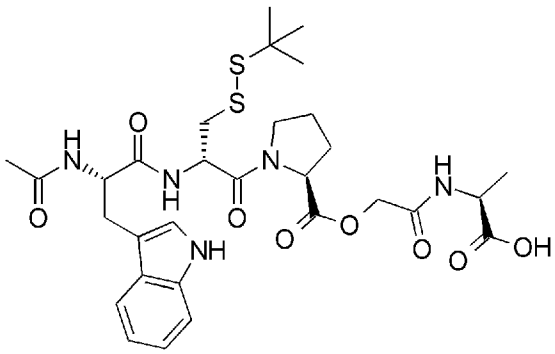
固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度洗浄した後、5%ピペリジン/N,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）を混合し、室温にて1時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.8mL）にて4度洗浄した後、（S）-2-（（S）_2_アセトアミド_3_（1H—インドール_3_イル）プロパンアミド）_3_（tert—ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys(StBu)-OH）（化合物SP644）（170mg、0.388mmol）と3,4—ジヒドロー3—ヒドロキシ—4_オキソー1,2,3_ベンゾトリアジン（HOOBt）（39.6mg、0.243mmol）のNMP溶液（0.64mL）とジイソプロピルカルポジィミド（DIC）（65μL、0.417mmol）のN,N—ジメチルホルムアミド溶液（0.52mL）を混合し、室温にて15時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド（0.8mL）にて4度、続いて塩化メチレン（0.8mL）にて4度洗浄した後、50%2,2,2—トリフルオロエタノール/塩化メチレン溶液

（１．ＯｍＬ）を混合し、室温にて２時間振とうした。固相と液相を分離し、固相を塩化メチレン（1．ＯｍＬ）で洗浄し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（4Ｓ，7Ｓ，１６Ｓ）-４-（（１Ｈ―インドール_３_イル）メチル）_７_（（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）メチル）_９，１６―ジメチル_２，５，８，１１，１４_ペンタオキソ―１２_オキサ_３，６，９，１５―テトラアザヘプタデカン―１７_酸（Ac-Trp-D-Cys(StBu)-MeGLy-HOGLy-ALa-OH）（化合物SP６５２）（３６．５ｍｇ、５７μｍｏｌ、７１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ６３８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８１分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1135] （Ｓ）-２-（２-（（（Ｓ）-１-（（Ｓ）-２-（（Ｓ）_２_アセトアミド―３―_（１Ｈ―インドール―３―イル）プロパンアミド）―３―（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパノイル）ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）アセトアミド）プロパン酸（Ac-Tnp-D-Cvs(StBu)-Pro-ΠGLv-ALa-0H）（化合物SP６５３）の合成



[1136] 調製したFmoc-ALa-0-resin（化合物SP６４５）（５０ｍｇ、０．４０５ｍｍｏｌ/ｇ、２０．２μｍｏｌ）にＤＭＦ（０．２ｍＬ）を加え、室温にて１５分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に２％ＤＢＵ/ Ｎ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液（0．２ｍＬ）を加え、室温にて３０分間振とうし、液相を取り除くという作業を２度繰り返した。得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（0．２ｍＬ）にて４度洗浄し、続いて（Ｓ）-

2-((1-(((9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）酢酸（Fmoc-Pro-HOGLy-OH)（化合物SP632）（38.4mg、0.097mmol）と1—ヒドロキシ—7—アザベンゾトリアゾール（HOAt）（8.26mg、60.7μmol）のNMP溶液（0.16mL）とジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（16从し、0.104mmol）のN，N—ジメチルホルムアミド溶液（0.13mL）を混合し、室温にて6時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド（0.2mL）にて4度洗浄した後、5％ピペリジン/ 一，N—ジメチルホルムアミド溶液（0.2mL）を混合し、室温にて1時間振とうした。

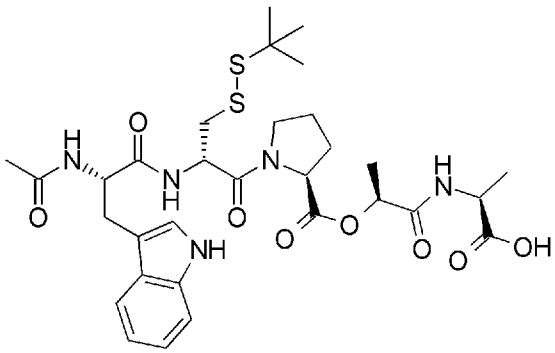
固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド溶液（0.2mL）にて4度洗浄した後、（S）-2-（（S）_2—アセトアミド—3_（1H—インドール_3_イル）プロパンアミド）_3_（tert—ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys(StBu)-OH)（化合物SP644）（42.5mg、0.097mmol）と3，4—ジヒドロ—3—ヒドロキシ—4_オキソ—1，2，3_ベンゾトリアジン（HOOBt）（9.9mg、60.8mol）のNMP溶液（0.160mL）とジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（16μL、0.104mmol）のN，N—ジメチルホルムアミド溶液（0.13mL）を混合し、室温にて15時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をN，N—ジメチルホルムアミド（0.2mL）にて4度、続いて塩化メチレン（0.2mL）にて4度洗浄した後、50％2，2，2—トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液（0.25mL）を混合し、室温にて2時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製し、（S）-2-（2-（（（S）—1—（（S）-2-（（S）—2_アセトアミド_3_（1H—インドール_3_イル）プロパンアミド）-3-（tert_ブチルジスルファニル）プロパノイル）ピロリジン—2

—カルボニル）オキシ）アセトアミド）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys (St Bu) - Pro - HOGLy-A La-0H) (化合物SP653)（3.0mg、4.5μmol、22%）を得た。

LCMS (ESI) m/z = 664 (M+H)+

保持時間：0.85分 (分析条件SQDAAO5)

[1137] (S)-2-((S)-2-((S)-1-((S)-2-((S)-2—アセトアミド—3—(1H—インドール—3—イル)プロパンアミド)-3-(tert_ブチルジスルファニル)プロパノイル)ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）プロパンアミド）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys (St Bu) - Pro -Lac-A La- OH) (化合物SP654)の合成



[1138] 調製したFmoc-A La-0- resin (化合物SP645)（50mg、0.405mmolZg、20.2μmol）にDMF（0.2mL）を加え、室温にて15分間振とうし、固相と液相を分離した。得られた樹脂に2%DBU/N,N—ジメチルホルムアミド溶液 (0.2mL) を加え、室温にて30分間振とうし、液相を取り除くという作業を2度繰り返した。得られた樹脂をN,N—ジメチルホルムアミド (0.2mL) にて4度洗浄し、続いて (S)-2-((S)-1-((9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）ピロリジン_2_カルボニル）オキシ）プロパン酸（Fmoc-Pro-Lac-0H) (化合物SP633)（39.8mg、0.097mmol）と1—ヒドロキシ—7—アザベンゾトリアゾール (HOAt)（8.2633.0mg、60.7μ,O.243mmol）のNMP溶液 (0.16mL) とジイソプロピルカルボジイミド (DIC)（16μL、0.104mmol）のN,

Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．１３ｍＬ）を混合し、室温にて６３時間振とうした。

固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド (0．２ｍＬ）にて4度洗浄した後、５％ピペリジン/ ヘ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．２ｍＬ）を混合し、室温にて１時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．２ｍＬ）にて4度洗浄した後、 (Ｓ）- 2 - （（Ｓ）_２_ァセトアミド_３_（１Ｈ―インドール_３_ィル）プロパンアミド）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys(StBu)-OH) (化合物SP６４４）（４２．５ｍｇ、０．０９７ｍｍｏｌ）と３，４―ジヒドロ－３―ヒドロキシ－４―オキソ－１，２，３_ベンゾトリアジン (Ｈ００ｂｔ）（９．９ｍｇ、６０．８ｍｏｌ）のＮＭＰ溶液 (0．１６０ｍＬ）とジイソプロピルカルボジィミド (ＤＩＣ）（１６μＬ、０．１０４ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド溶液 (0．１３ｍＬ）を混合し、室温にて１５時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた樹脂をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（０．２ｍＬ）にて4度、続いて塩化メチレン (0．２ｍＬ）にて4度洗浄した後、５０％２，２，２―トリフルオロエタノール/ 塩化メチレン溶液 (０．５ｍＬ）を混合し、室温にて2時間振とうした。固相と液相を分離し、得られた液相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (１０ｍＭ酢酸アンモニゥム/ メタノール）にて精製し、 (Ｓ）- 2 - （（Ｓ）- 2 - （（（Ｓ）- 1 - （（Ｓ）- 2 - （（Ｓ）_２―アセトアミド―３―（１Ｈ―インドール―３―ィル）プロパンアミド）―３―（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパノィル）ピロリジン_２_カルボニル）オキシ）プロパンアミド）プロパン酸（Ac-Trp-D-Cys (StBu)-Pro-Lac-ALa-OH) (化合物SP６５４）（３．０ｍｇ、４．４μｍｏ＼、２２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ ｚ ＝ ６７８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間 :０．８６分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1139] 5-2．翻訳用PURESYSTEM中での5残基モデル化合物の反応性評価

各pH中での安定性（1回目の環化反応中では反応せず安定に存在することが望まれる）および、pHを向上させた場合の反応選択性（メルカプトエチルアミンとの反応にて確認した）を評価した。

[1140] 翻訳用PURESYSTEM中、pH 7.3での5残基モデル化合物の2—アミノエタンチオールとの反応性確認

各pH中での安定性（1回目の環化反応中では反応せず安定に存在することが望まれる。）および、pHを向上させた場合の反応選択性（2—アミノエタンチオールとの反応にて確認した）を評価した。

[1141] 10mM Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-RRR-ALa-OH/ 25%DMA水溶液（2.0μL）、10mM 2，4—ジメチル安息香酸/ 25%DMA水溶液（2.0μL、内部標準として使用）、100mM TCEP/ 50mM HEPES緩衝液溶液（pH7.6、2.0μL）を混合し、窒素雰囲気下、室温にて1時間静置した。続いて、翻訳用緩衝液（3.8μL）、PURESYSTEM(r) cLassic II Solし B（バイオコゥマ－社、製品番号PURE2048C)（4.0从し）、50mM 1，2—ジチアン—4，5—ジオール水溶液（4.2从L）、500mM 2—アミノエタンチオール/ 50mM HEPES緩衝液溶液（pH7.6、2.0μL）を混合し、窒素雰囲気下、37度にて静置した。なお翻訳用緩衝液の成分の反応溶液中での濃度はそれぞれ次のとおりである。2mM GTP，2mM ATP，1mM CTP，1mM UTP，20mM クレアチンリン酸，50mM HEPES-KOH pH7.6，100mM 酢酸カリウム，14mM 酢酸マグネシウム，2mMスペルミジン，1mM ジチオスレイトール，0.5mg/ml E.coli MRE600（RNaseネガティブ）由来tRNA（Roche社）,アミノ酸（ALa, Cys, Phe, GLy, His, I Le, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Va L, Trp がそれぞれ0.3mM）。反応の進行状況はLCMS測定によって確認した。なおRRRはH°Gly、Lac、PhLac、D-PhLac、H。G Ly(Me)$_2$のいずれかを表わす。

[1142] [表13]

Entry	基質		基質回収	相本反応	直接アミド化	加水分解
1	Cys-Pro-^{HO}Gly	SP646	45%/32%	55%/68%	0%/0%	0%/0%
2	Cys-Pro-Lac	SP647	>99%/95%	<1%/5%	0%/0%	0%/0%
3	Cys-Pro-PhLac	SP648	96%/90%	4%/10%	0%/0%	0%/0%
4	Cys-Pro-D-PhLac	SP649	92%/87%	8%/13%	0%/0%	0%/0%
5	Cys-Pro-^{HO}Gly(Me)$_2$	SP650	100%/100%	0%/0%	0%/0%	0%/0%
6	Cys-MeGly-^{HO}Gly	SP651	別途記載	別途記載	別途記載	別途記載
7	D-Cys-MeGly-^{HO}Gly	SP652	別途記載	別途記載	別途記載	別途記載
8	D-Cys-Pro-^{HO}Gly	SP653	0%/0%	0%/0%	100%/100%	0%/0%
9	D-Cys-Pro-Lac	SP654	89%/81%	0%/0%	11%/19%	0%/0%

(8h の収率/24h の収率), 収率はLCのUVエリア比

[1143] 上記表中、基質とは5残モデルAc-Trp-Cys-Pro-RRR-ALa-OHのうち、中核を示すCys-Pro-RRR部位を示した(一部Cysの代わりにD-Cysを、またProの代わりにMeGlyを用いた例も記載した)。基質回収とは、Ac-Trp-Cys-Pro-RRR-ALa-OHと、Cys部位が反応剤である2-メルカプトエチルアミンとジスルフィド結合したAc-Trp-Cys(SCH$_2$CH$_2$NH$_2$)-Pro-RRR-ALa-0H、およびCys部位が反応系中に含まれているジチオスレイトール(DTT)の脱水体と推定される1,4-ジメルカプトプタン-2-オンとジスルフィド結合したAc-Trp-Cys(SCH$_2$C0CH$_2$CH$_2$SH)-Pro-RRR-ALa-OHもしくはAc-Trp-Cys(SCH$_2$CH$_2$C0CH$_2$SH)-Pro-RRR-ALa-0Hの割合の合計を示した。すなわち、主鎖の基本骨格が維持されたままの化合物群の合計となる。相本反応とは5残基モデルからチオエステルが生じた結果、2-メルカプトエチルアミンと反応したAc-Trp-NHCH$_2$CH$_2$SHと、それが反応剤である2-メルカプトエチルアミンとジスルフィド結合したAc-Trp-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$NH$_2$の割合の合計を示した。直接アミド化とは副反応によって得られたAc-Trp-Cys-Pro-RRR-ANHCH$_2$CH$_2$SHと、Ac-Trp-Cys*-Pro-RRR-ANHCH$_2$CH$_2$S*において*でジスルフィド結合し環を巻いた生成物、およびAc-Trp-Cys(SCH$_2$CH$_2$NH$_2$)-Pro-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$NH$_2$の合計の割合を示した。加水分解とは5残基モデルから発生したチオエステルが2-メルカプトエチルアミンと反応せず、代わりに水と反応して得られたAc-Trp-OHの割合を示した。

従って、指定されたｐＨにて１回目の環化反応が実施されることが想定される場合、基質回収割合が高いほど望ましい。また、指定されたｐＨにて２回目の環化反応が想定される場合には相本反応の割合が高いほど望ましい。

[1144] なお表１３のent ry 6および7については、ピークどうしの保持時間の重なりのため、ＵＶエリア比は算出していないが、各化合物群のマス強度比（ネガティプモード）は次のとおりである。

Ent ry 6

（8時間）基質回収 ：２７％ 相本反応 ：３９％ 直接アミド化 ：３３％ 加水分解 ：０％

（２４時間）基質回収 ：１３％ 相本反応 ：３１％ 直接アミド化 ：５６％ 加水分解 ：０％

Ent ry 7

（8時間）基質回収 ：１２％ 相本反応 ：５０％ 直接アミド化 ：３８％ 加水分解 ：０％

（２４時間）基質回収 ：０％ 相本反応 ：５０％ 直接アミド化 ：５０％ 加水分解 ：０％

[1145] 翻訳用ＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭ中、ＤＨ７．８での５残基モデル化合物の２—アミノエタンチオールとのほ応性確認

１０ｍＭ Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-RRR-ALa-0H/ ２５％ＤＭＡ水溶液（５．０μＬ）、１０ｍＭ４＿ペンチル安息香酸/ ２５％ＤＭＡ水溶液（５．０μ,し、内部標準として使用）、１００ｍＭＴＣＥＰ/ ５０ｍＭＨＥＰＥＳ緩衝液溶液（ＰＨ７．６、５．０μＬ）を混合させ、システィン残基側鎖保護基を素早く脱保護し、窒素雰囲気下、室温にて１時間静置した。続いて、翻訳用緩衝液（９．５μＬ）、PURESYSTEM（登録商標）ｃlass ｉｃ ＩＩ Soし Ｂ（バィオコゥマー社、製品番号PURE2048C)（１０从し）、５０ｍＭ１，２—ジチアン—４，５-ジオール水溶液（１０．５从し）、５００ｍＭ２＿アミノエタンチオール/ ５０ｍＭＨＥＰＥＳ緩衝液溶液（ｐＨ７．６、５．０μＬ）を混合し、さらに１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１．０バＬ）を混合して反

応液をｐＨ７．８に調整して、窒素雰囲気下、３７度にて静置した。なお翻訳用緩衝液の成分の反応溶液中での濃度はそれぞれ次のとおりである。２ｍＭ ＧＴＰ，２ｍＭ ＡＴＰ，１ｍＭ ＣＴＰ，１ｍＭ ＵＴＰ，２０ｍＭ クレアチンリン酸，５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ-ＫＯＨ ｐＨ７．６，１００ｍＭ 酢酸カリウム，１４ｍＭ 酢酸マグネシウム，２ｍＭスペルミジン，１ｍＭ ジチオスレイトール，０．５ｍｇ/ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社）,アミノ酸（ALa, Cys, Phe, GLy, His, ILe, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, VaL, Trp がそれぞれ０．３ｍＭ）。反応の進行状況はＬＣＭＳ測定によって確認した。

[1146] [表 14]

Entry	基質		基質回収	相本反応	直接アミド化	加水分解
1	Cys-Pro-^{HO}Gly	SP646	10%/2%	85%/92%	5%/7%	0%/0%
2	Cys-Pro-Lac	SP647	93%/84%	7%/16%	0%/0%	0%/0%

(8h の収率/27h の収率)，収率はLCのUVエリア比

[1147] 実施例にて示したとおり、Cys-Pro 』ᵠGLyを用いた場合には、１回目の環化としてCys とAsp(SBn) を用いた場合には高選択的であった。しかし、本結果から、１回目の環化として用いるｐH= 7.8付近では、Cys-Pro- ^{HQ}GLyは反応性を有し、この条件でも安定に存在せず、チオエステルが生じることが明らかとなった (反応補助基を有するアミノ基を用いた場合には、１回目の環化反応が十分速いため、結果として反応選択性を有していたと解釈できる。)。１回目の反応中では反応せず、2回目の反応時にチオエステルが始めて発生する状態を得るには、Cys-Pro-Lac など、よりエステル付近の立体障害を高めることが、選択性を高める目的ではより好ましいことが明らかとなった。

[1148] Ｂｕｆｆｅｒ中、ｐＨ ８．５での５残基モデル化合物の２＿アミノエタンチオールとの反応性確認

１０ｍＭ Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-RRR-ALa-0H/ ２５％ＤＭＡ水溶液 (5．０μＬ)、１０ｍＭ４＿ペンチル安息香酸/ ２５％ＤＭＡ水溶液 (5．０μ, し、内部標準として使用)、１００ｍＭＴＣＥＰ/ ５０ｍＭＨＥＰＥＳ緩衝

液溶液（ｐＨ７．８、５．Ｏμｌ）を混合させ、システィン残基側鎖保護基を素早く脱保護し、窒素雰囲気下、室温にて１時間静置した。続いて、１００ｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液（ｐＨ８．９、１９．５μＬ）、５０ｍＭ１，２—ジチアン—４，５＿ジオール/ １ＯＯｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液溶液（ｐＨ８．９、１０．５μＬ）、５００ｍＭ２＿アミノエタンチオール／１００ｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液溶液（ｐＨ８．５、５．Ｏμｌ）を混合し、さらに０．５Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１．Ｏμｌ）を混合して反応液をｐＨ８．５に調整して、窒素雰囲気下、３７度もしくは５７度にて静置した。反応の進行状況はLCMS測定によつて確認した。

[1149] [表 15]

３７度にて２４ｈ

Entry	基質		基質回収	相本反応	加水分解	その他
1	Cys-Pro-Lac	SP647	31%	55%	6%	8%
2	Cys-Pro-PhLac	SP648	17%	75%	2%	5%
3	Cys-Pro-D-PhLac	SP649	6%	89%	0%	5%

収率はLCのUVエリア比

[1150] [表 16]

５７度にて２４ｈ

Entry	基質		基質回収	相本反応	加水分解	その他
1	Cys-Pro-Lac	SP647	0%	84%	7%	8%
2	Cys-Pro-PhLac	SP648	0%	90%	5%	5%
3	Cys-Pro-D-PhLac	SP649	0%	94%	0%	5%

収率はLCのUVエリア比

[1151] Cys-Pro-Lac やCys-Pro-PhLac などは、ｐＨを8.5にまで上昇させた場合、初めてチオエステルが選択的に生じて、望みの反応が翻訳液中で加水分解に対して選択的に進行することが明らかとなった。ｐＨが７．８付近では反応を進行させずに、８．５で望みの反応を進行させることができた。

[1152] Ｂｕｆｆｅｒ中、ｐＨ　９．０での５残基モデル化合物の２＿アミノエタンチオールとの反応性確認

１０ｍＭ Ac-Trp-Cys(StBu)-Pro-RRR-ALa-0H/ ２５％ＤＭＡ水溶液（５．

Ｏμｌ）、１０ｍＭ４＿ペンチル安息香酸/ ２５％ＤＭＡ水溶液 (5．０μし、内部標準として使用）、１００ｍＭＴＣＥＰ/ ５０ｍＭＨＥＰＥＳ緩衝液溶液 (ＰＨ７．８、５．ＯμＬ）を混合させ、システィン残基側鎖保護基を素早く脱保護し、窒素雰囲気下、室温にて１時間静置した。続いて、１００ｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液 (ｐＨ８．９、１９．５μＬ）、５０ｍＭ１，２—ジチアン—４，５＿ジオール/ １ＯＯｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液溶液 (ｐＨ８．９、１０．５μＬ）、５００ｍＭ２＿アミノエタンチオール／１００ｍＭＢｉｃｉｎｅ緩衝液溶液 (ｐＨ８．５、５．ＯμＬ）を混合し、さらに0．５Ｎ水酸化ナトリウム水溶液 (2．ＯμＬ）を混合して反応液をｐＨ９．０に調整して、窒素雰囲気下、３７度もしくは５７度にて静置した。反応の進行状況はＬＣＭＳ測定によつて確認した。

[1153] [表17]

３７度にて２４ｈ

Entry	基質		基質回収	相本反応	加水分解	その他
1	Cys-Pro-Lac	SP647	5%	82%	8%	5%
2	Cys-Pro-PhLac	SP648	5%	87%	3%	5%
3	Cys-Pro-D-PhLac	SP649	0%	95%	0%	5%

収率はLCのUVエリア比

[1154] [表18]

５７度にて２４ｈ

Entry	基質		基質回収	相本反応	加水分解	その他
1	Cys-Pro-Lac	SP647	0%	91%	6%	3%
2	Cys-Pro-PhLac	SP648	0%	90%	5%	5%
3	Cys-Pro-D-PhLac	SP649	0%	95%	0%	5%

収率はLCのUVエリア比

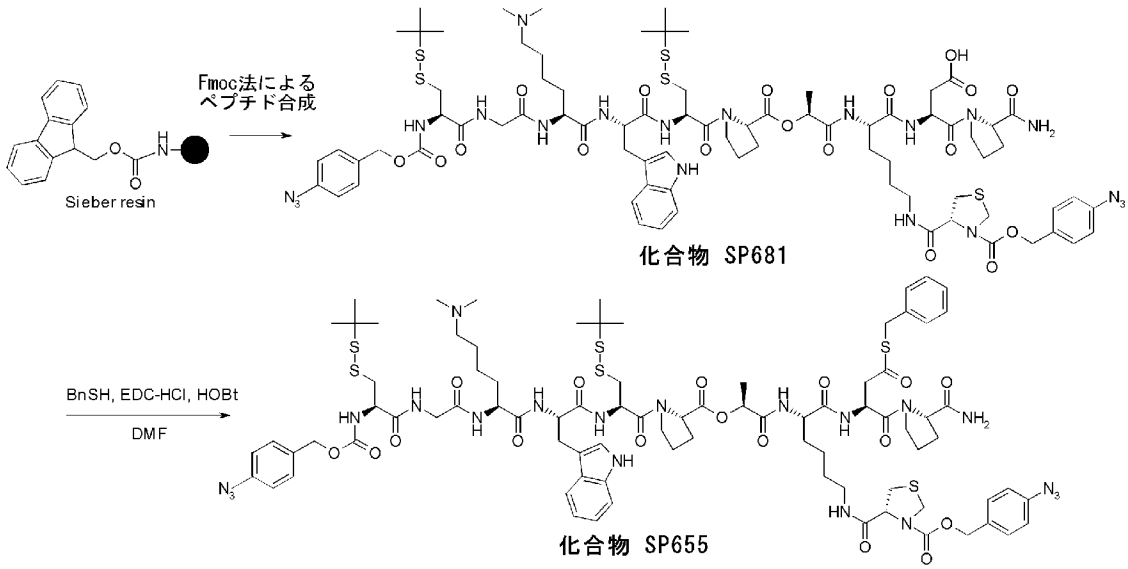
[1155] ｐＨが9.0でもRNAが安定に存在して分解しないことも実施例記載済みであるため、本条件を用いればペプチドーRNA複合体でも望みの分枝化が可能であることが示された。

[1156] ５－３．１回目の環化で反応補助基を有するN末端に位置する三角ユニットとC末端個のほ忤チォエステル（交差ユニット）のアミド化ほ応を用い、２回目の分枝化にてほ応補助¾を有する保護アミノ¾を脱保護ほ応後にCys-Pro-Lac

から活性エステルを発生させ、側鎖アミノ基と反応させて分枝させる例の化学反細　幅　せ

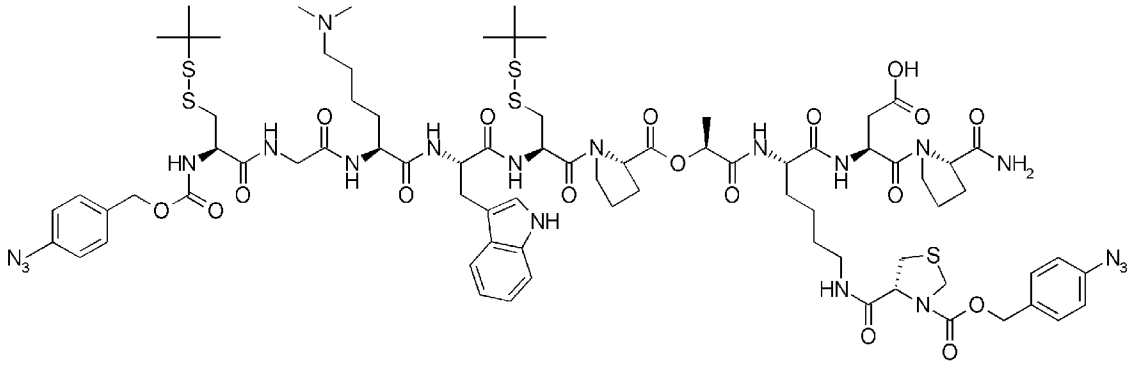
5-3-1．翻訳ペプチドモデル化合物ＳＰ655の合成

以下のスキームに従い、1回目の環化としてN末端にCysを用い、C末端側にAsp(SBn)を用いてアミド化環化反応を行い、2回目の分枝化として、活性チオエステル発生パートとしてCys-Pro-Lacを有し、Lysの側鎖アミノ基にN原子とS原子を保護させたCysを配置させた化合物のS原子とN原子を脱保護してアミド化反応を行う例を実施する目的で、以下のモデル化合物SP655の合成を行った。



[1157] (S)-3-(　(S)-2-(　(S)-2-(　(S)-1-((6R, 12S, 15S, 18R)-15-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-((4-アジドベンジルオキシ)カルボニルアミノ)-18-(（tert-ブチルジスルファニル）メチル）-12-(4-（ジメチルアミノ)ブチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン)ピロリジン-2-カルボニルオキシ)プロパンアミド)-6-(　(R)-3-(　(4-アジドベンジルオキシ)カルボニル)チアゾリジン-4-カルボキサミド)ヘキサンアミド)-4-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸　(化合物SP681、Ａｃｂｚ-Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）-Ｇｌｙ-Ｌｙｓ（Ｍｅ2）-Ｔｒｐ-Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）―Ｐｒｏ―Ｌａｃ-Ｌｙｓ（Ａｃｂｚ―Ｔｈｚ）―Ａｓｐ―Ｐｒｏ-ＮＨ２）の合成

本明細書では、Lysの側鎖のアミノ基とAcbz-Thz の有するカルボキシル基とでアミド結合した化合物をLys(Acbz-Thz) と表記する。



[1158] 既に、実施例に記載の自動合成機による主鎖にエステル基を含むペプチドの固相合成一般法に従いペプチド鎖の伸長を行った。レジンはSieber Amide Resin（1カラムあたり160mg、Novabiochemより購入）を用いた。N末端のアミノ酸としてAcbz-Cys(StBu)-OH 、Fmocアミノ酸として、Fmoc-GLy-0H、Fmoc-Lys(Me$_2$)-0H・HClし Fmoc_Trp-Cys（StBu）-OH（化合物 SP602）、Fmoc-Pro-Lac-0H（化合物 SP633）、Fmoc-Lys(Acbz-Thz)-0H（化合物 SP611）、Fmoc-Asp（OPis）_OH、Fmoc_Pro_OH、を用いて、ペプチドの伸長を行った。

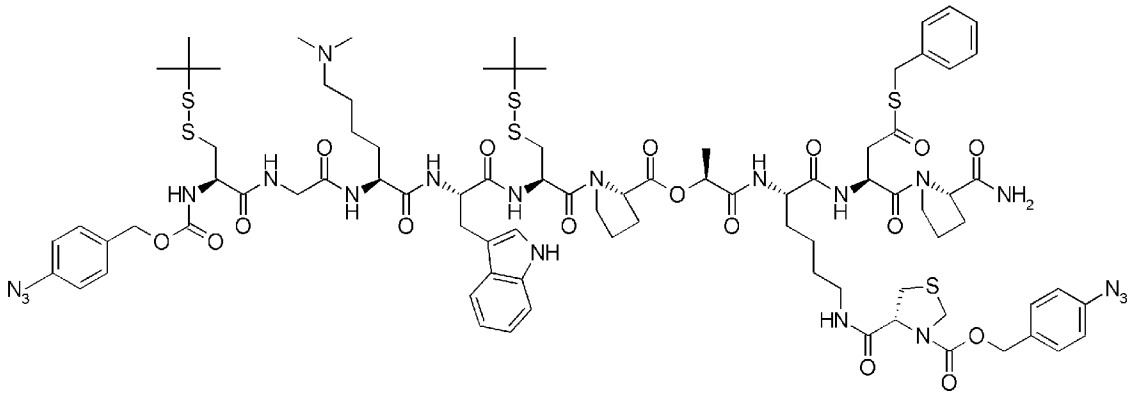
ペプチドの伸長後、レジンをジメチルホルムアミド（DMF）、ジクロロメタン（DCM）で洗浄した。レジンに2％トリフルオロ酢酸（TFA）のジクロロメタン（DCM）/ 2，2，2—トリフルオロエタノール（TFE）（= 1/ 1、v/ v、4．0ml）溶液を加えて室温にて3時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン（DCM）/ 2，2，2—トリフルオロエタノール（TFE）（= 1/ 1，v/ v、4．OmL）にて4回洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（0．1％ギ酸水溶液/ 0．1％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、(S)-3-((S)-2-((S)-2-((S)-1 -((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-(（1H-インドール-3-イル）メチル）-6-(（4-アジドベンジルオキ

シ)カルボニルアミノ}18-({(tert-ブチルジスルファニル)メチル}-12-(4-{ジメチルアミノ}ブチル)-2,2-ジメチル-7,10,13,16-テトラオキソ-3,4-ジチア-8,11,14,17-テトラアザノナデカン-19-イル)ピロリジン-2-カルボニルオキシ}プロパンアミド)-6-({(R)-3-({4-アジドベンジルオキシ}カルボニル)チアゾリジン-4-カルボキサミド}ヘキサンアミド)-4-({(S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル}-4-オキソブタン酸 (Acbz—Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-Lac-Lys(Acbz-Thz)-Asp-Pro-NH2) (化合物SP681) (184.6mg、24%) を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1773.9 (M+H)+

保持時間:0.76分 (分析条件30D「六05)

[1159] 4-(((S)-5-((S)-2-(((S)-1-((6R,12S,15S,18R)-15-((1H_インドール_3_イル)メチル)_6-(((((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)—18—((tert—ブチルジスルファニル)メチル)_12_(4-(ジメチルアミノ)ブチル)—2,_2—ジメチル—7,_10,_13,_16—テトラオキソ—3,_4—ジチア—8,_11,_14,_17—テトラアザノナデカン_19_オイル)ピロリジン_2_カルボニル)オキシ)プロパンアミド)_6_((S)-4-(ベンジルチオ)_1_((S)_2_カルバモイルピロリジン—1_イル)—1,_4—ジオキソブタン—2_イル)アミノ)_6—オキソヘキシル)カルバモイル)チアゾリジン-3-カルボン酸_(R)_4—アジドベンジル (化合物SP655、Acbz-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me_2)-Trp-Cys(StBu)-Pro-Lac-Lys(Acbz-Thz)-Asp(SBn)-Pro-NH2)の合成



[1160] (S)-3-((S)-2-((S)-2-((S)-1 -((6R, 12S, 15S, 18R)-1 5-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-((4-アジドベンジルオキシ)カルボニルアミノ)-18-((tert-ブチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-2, 2-ジメチル-7, 10, 13, 16-テトラオキソ-3, 4-ジチア-8, 11, 14, 17-テトラアザノナデカン)ピロリジン-2-カルボニルオキシ)プロパンアミド)-6-((R)-3-((4-アジドベンジルオキシ)カルボニル)チアゾリジン-4-カルボキサミド)ヘキサンアミド)-4-((S)-2-カルバモイルピロリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸 (化合物SP681、Acbz-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-Lac-Lys(Acbz-Thz)-Asp-Pro-NH2) (102mg, 0.057mmol)とHOBt (23.2mg, 0.172mmol)のDMF (0.6ml)溶液を0度に冷却した後に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC'HCl 32.9mg、0.172mmol)を加え、5分間攪拌後にベンジルメルカプタン (34μl 0.286mmol)を加えた。反応液を室温で70分間攪拌し、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、標題化合物 (化合物SP655、Acbz-Cys(StBu)-Gly-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys(StBu)-Pro-Lac-Lys(Acbz-Thz)-Asp(SBn)-Pro-NH2) (75.7mg、70%)を得た。

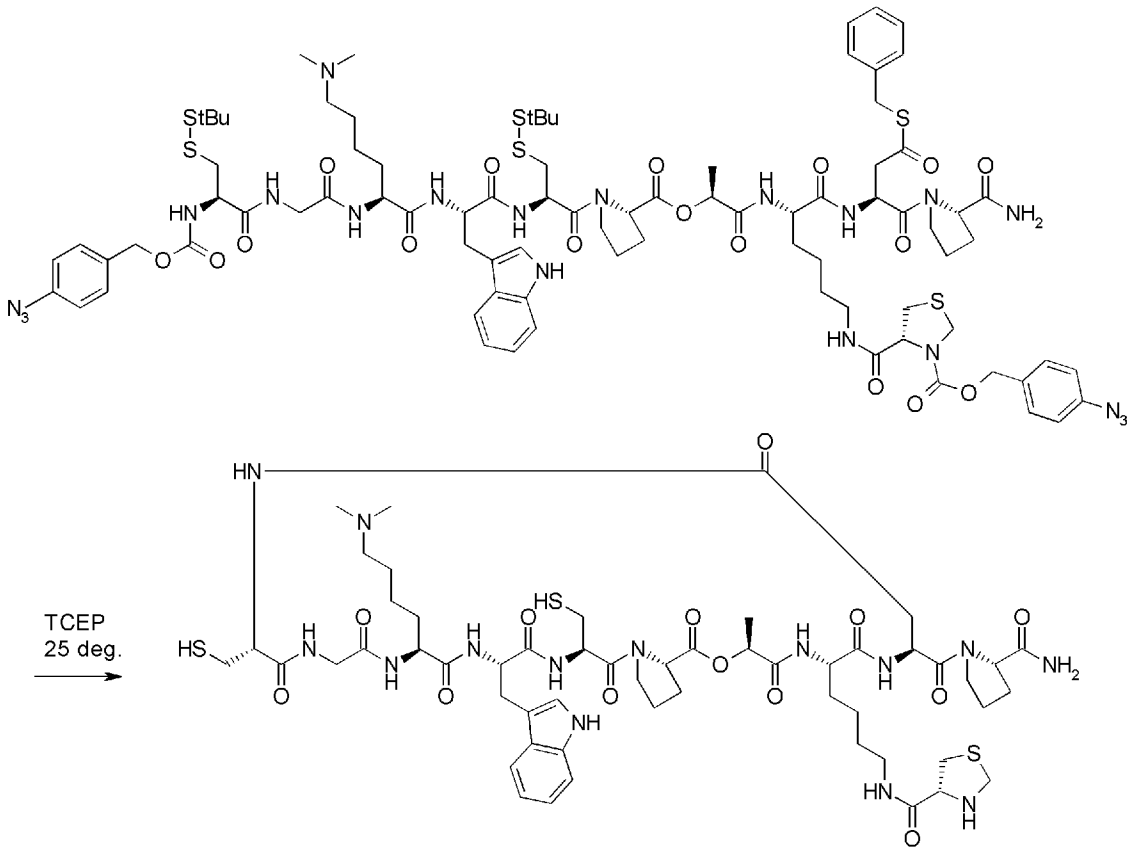
LCMS (ESI) m/z = 1880.0 (M+H)+

保持時間 :0.80分 (分析条件SQDFA05)

[1161] 5-4.翻訳用PURESYSTEM中、配列にCys-Pro_Lacを有する直鎖モデルペプチドを用いた、NCL反応による環化とそれに続く分枝形成反応

Cys-Pro-Lac ユニットでは、1回目の環化反応中、反応補助基の有無にかかわらず安定に存在することが可能であり、また2回目の分枝化反応では高い選択性で望みの分枝化反応が実現できることが明らかとなつたため、モデルペプチドにて分枝化反応を翻訳液中にて確認した。

[1162] 1段階目:NCL反応による直鎖モデルペプチド(化合物SP655、Acbz-Cys(StBu)-Glv-Lys(Me,)-Trp-Cys(StBu)-Pro-Lac-Lys(Acbz-Thz)-Asp(SBn)-Pro-NH,)の環化による化合物SP656の生成反応



[1163] 54mM4-((S)-5-((S)-2-((S)-1-((6R,12S,15S,18R)-15-((1H-インドール-3-イル)メチル)-6-(((4-アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)-18-(tert-ブチルジスルファニル)メチル)-12-(4-(

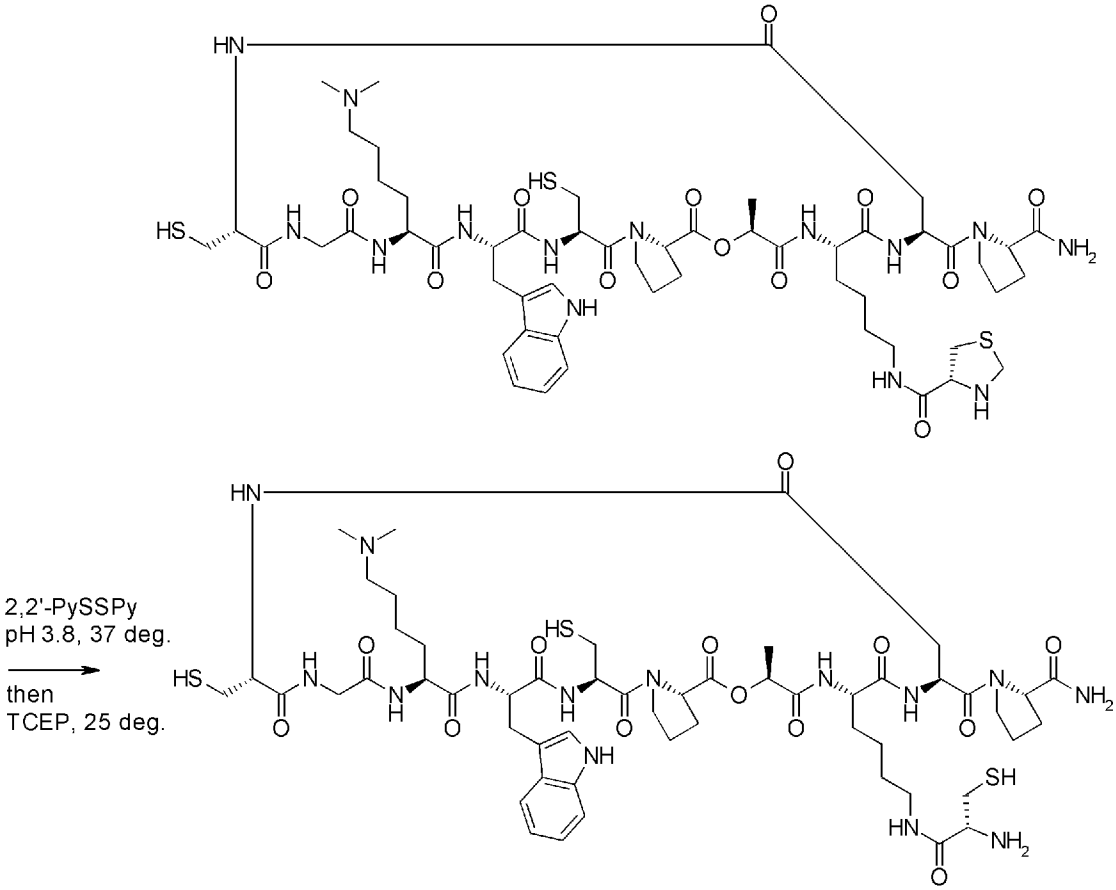
ジメチルアミノ，プチル，－２，２－ジメチル＿７，１０，１３，１６－テトラオキソ－３，４－ジチア－８，１１，１４，１７－テトラアザノナデカン－１９－オイル，ピロリジン＿２＿カルボニル，オキシ，プロパンアミド）－６－（（（Ｓ）－４－（ベンジルチオ，＿，＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿，＿イル，＿，４－ジオキソブタン－２＿イル，アミノ）＿６－オキソヘキシル，カルバモイル，チアゾリジン－３＿カルボン酸（Ｒ）＿４＿アジドベンジル，化合物 SSPP６５５．AAccbbzz--CCyyss((SSttBBuu))--GG LLyy--LLyyss((MMee$_2$))--TTrrpp--CCyyss((SSttBBuu))--PPrroo--LLaacc--LLyyss((AAccbbzz--TThhzz))--AAsspp((ＳＢｎ))--PPrroo--NNHH$_2$))// ＤＭＡ溶液（９．４μＬ）、５４ｍＭ ２，４－ジメチル安息香酸酸// ＤＭＡ溶液，９．４μＬ，内部標準として使用，，翻訳用緩衝液，６．３从11＿），PPUURREESSYYSSTTEEMM（登録商標，ｃ llaassss ｉｃ IIII SSoo LL.. ｂ（バイオコゥマー社，製品番号 PPUURREE22004488CC））（，０从11＿），２０種天然アミノ酸溶液，２．５μＬ）、，．ＯＭ ＴＣＥＰ（，２．５μＬ、ｐＨ７．５）を混合し，２５度にて２時間静置した．なお，翻訳用緩衝液の成分は８ｍＭ ＧＴＰ，８ｍＭ ＡＴＰ，，６０ｍＭクレアチンリン酸，４００ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ ｐＨ７．６，８００ｍＭ 酢酸カリウム，４８ｍＭ 酢酸マグネシウム，，６ｍＭスペルミジン，８ｍＭ ジチオスレイトール，０．８ｍＭ 10-HCO-H4folate，１２ｍｇ／ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ，由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社）である。反応溶液をＬＣＭＳ測定したところ、目的の環化体である（Ｒ）－Ｎ－（４－（（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１３Ｒ，１９Ｓ，２２Ｓ，２５Ｒ，３０ａＳ）－２２－（（１Ｈ－インドール－３－イル）メチル）＿９＿（（Ｓ）＿２＿カルバモイルピロリジン＿１＿カルボニル）－１９－（４－（ジメチルアミノ）プチル）－１３，２５－ビス（メルカプトメチル）＿３＿メチル＿１，４，７，１１，１４，１７，２０，２３，２６－ノナオキソオクタコサヒドロ＿１Ｈ－ピロロ［２，１－ｃ］［１，４，７，１０，１３，１６，１９，２３，２６］オキサオクタアザシクロオクタコシン＿６＿イル）プチル）チアゾリジン－４＿カルボキサミド（化合物ＳＰ６５６、*Cys-GLy-Lys(Me$_2$)-Trp-Cys-Pro-Lac-Lys(Thz)-Asp*-Pro-NH$_2$に

おいて、*で環を巻いた化合物)の生成が確認された。(図６８)

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = １２２７ (M-H)-

保持時間：０．７６分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[1164] ２段階目：化合物SP６５６のＴｈｚの脱保護反応による化合物SP６５７の生成反応



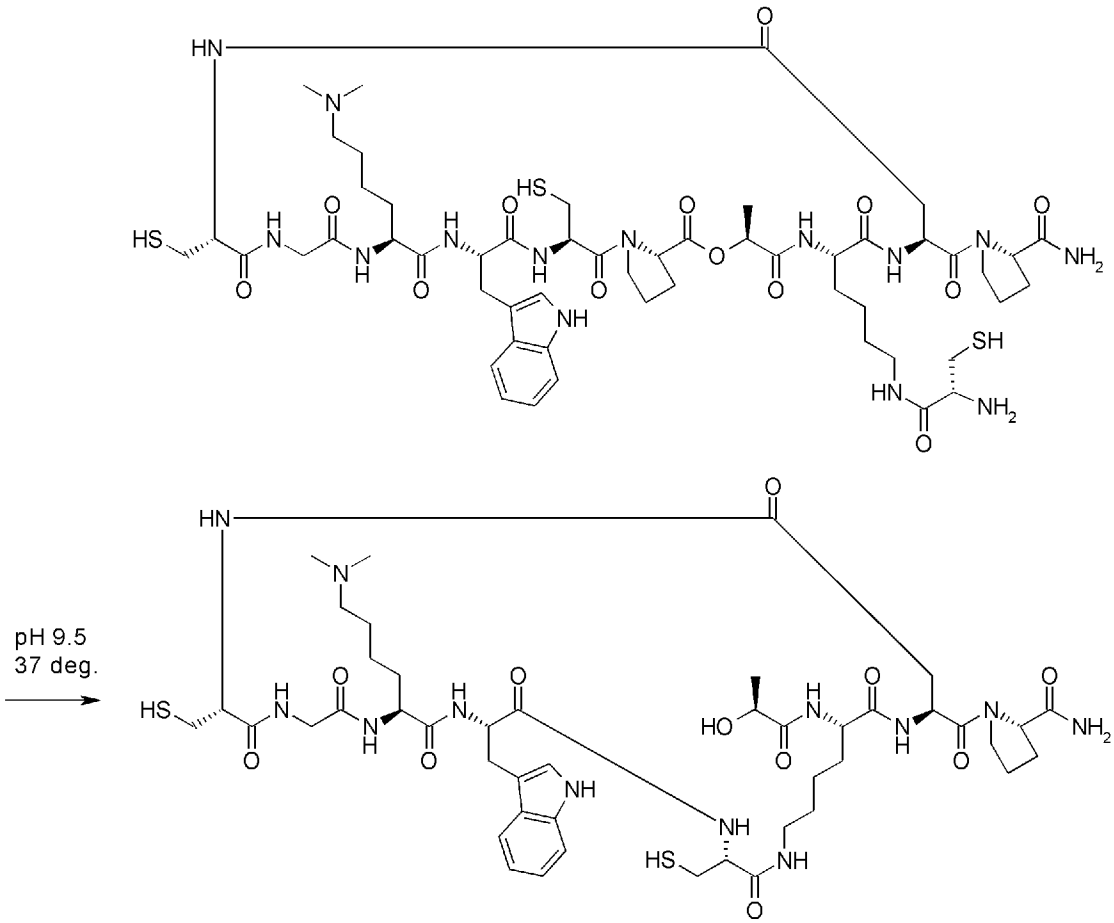
[1165] ＮＣＬによって環化した化合物SP６５６の反応混合物(上の反応混合物、２５μＬ)、ＤＭＡ（２５μＬ）、６．７Ｍ １，２―ジ(ピリジン－２_ィル)ジスルファン/ ＤＭＡ溶液（１５从1）を混合し、５Ｎ塩酸にてｐＨ３．８に調整した混合物を、３７度にて１５時間静置した。つづいて、反応混合物のうち２５μＬを取り出し、１．２５Ｍ 丁○巳?水溶液(５０从1、ｐＨ７．５)を混合し、２５度にて3時間静置した。反応溶液をＬＣＭＳ測定したところ、Ｔｈｚ部位が脱保護された化合物、(S)_１_((３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１３Ｒ，１９Ｓ，２２Ｓ，２５Ｒ，３０ａＳ)-２２-((１Ｈ_インドール_３_ィル)メチル)_６_(４-((Ｒ)_２―アミノ

＿３＿メルカプトプロパンアミド)プチル）－１９—（４－（ジメチルアミノ）プチル）－１３，２５＿ビス（メルカプトメチル）＿３—メチル－１，４，７，１１，１４，１７，２０，２３，２６—ノナオキソオクタコサヒドロ—１Ｈ—ピロロ［２，１－ｃ］［１，４，７，１０，１３，１６，１９，２３，２６］オキサオクタアザシクロオクタコシン＿９＿カルボニル）ピロリジン＿２＿カルボキサミド（化合物SP６５７、*Cys-G Ly-Lys(Me $_2$) -Trp-Cys-Pro-Lac-Lys(H-Cys)-Asp*-Pro-NH $_2$で、*で環を巻いた化合物）の生成が確認された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１２１５（Ｍ—Ｈ）—（図６９）

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1166] ３段階目：化さ物SP６５７環状《プチ ド の分枝彬成反応による化さ物SP６５８の牛成ほ応



[1167] Thzの脱保護をし、ジスルフイドを還元した化合物SP６５７の反応混合物（

上の反応混合物、２５从$_1$）と2．ＯＭ　Ｂｉｃｉｎｅ緩衝液（ｐＨ８．７、３０μＬ）を混合し、５Ｎ水酸化ナトリウム水溶液でｐＨ９．５に調整し、反応溶液を３７度にて4時間静置した。反応溶液をＬＣＭＳ測定したところ、環状ペプチドに分枝形成した、（S）_１_（（３Ｒ，６Ｓ，９Ｓ，１５Ｒ，１９Ｓ，２２Ｓ）-６-（（１Ｈ_インドール_３_イル）メチル）-９-（４-（ジメチルアミノ）ブチル）－２２―（（Ｓ）_２―ヒドロキシプロパンアミド）_３，１５_ビス（メルカプトメチル）_２，５，８，１１，１４，１７，２１―ヘプタオキソ_１，４，７，１０，１３，１６，２０_ヘプタアザシクロヘキサコサン_１９_カルボニル）ピロリジン－2－カルボキサミド（化合物SP６５８、H-Lac-Lys(*Cys-G　Ly-Lys(Me $_2$)-Trp-Cys)-Asp*-Pro-NH $_2$で、＊で環を巻いた化合物）の生成が確認された。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１０１７　（Ｍ＋Ｈ）＋

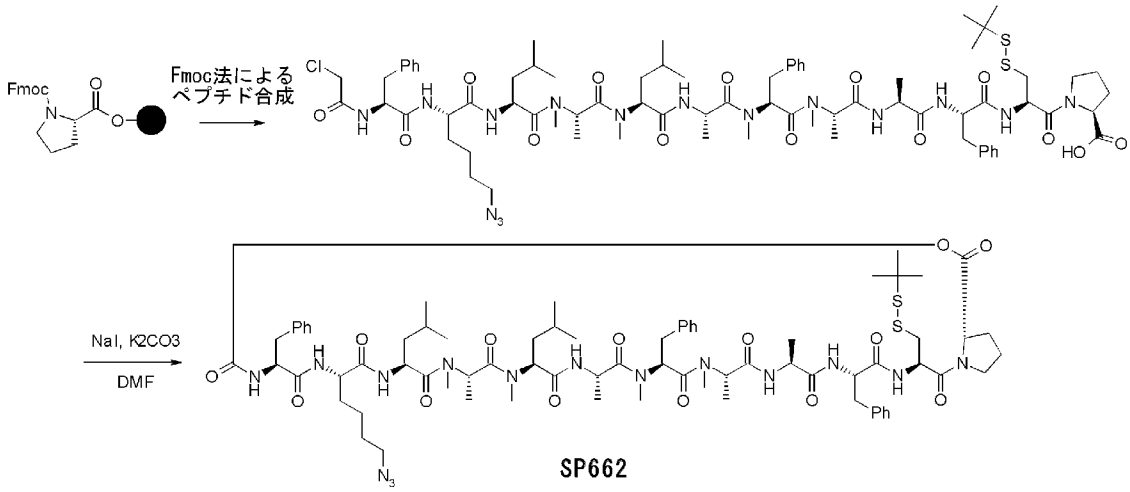
保持時間：0．６５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）（図７０）

[1168] ６．１回目の環化が終了済であることを想定し、２回目の分枝化にてCys-Pro-皿GLv力ら活ゃエステリは射　き　_き　應　アミノ¾調　應　させて分枝させる例の実施。

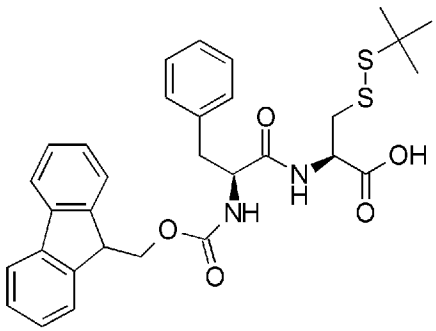
２回目の分枝化のコンセプト証明のための別実験である。１回目の環化が終了済であることを想定している。従って、Aspの側鎖のカルボン酸とN末端のアミノ基によるアミド環化を実施せず、主鎖環化したモデル化合物とした。２回目の分枝化にてCys-Pro-^{HQ}GLyから活性エステルを発生させ、その前後にて保護されたアミンを脱保護させて分枝化させるモデル反応性を以下のように実施した。

[1169] ６-１．翻訳ペプチドモデル化合物SP６６２の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。



[1170] (5S, 8R)-5- ベンジル-1-(9H- フルオレン-9- イル)-12, 12-ジメチル-3, 6-ジオキソ-2- オキサ-10, 11-ジチア-4, 7-ジアザ トリデカン-8- カルボン酸 (化合物SP663、Fmoc-Phe-Cys(StBu)-OH) の合成



[1171] Fmoc-Phe-OH (4g、10.32mmol) とN—ヒドロキシスクシンイミド (1.19g、10.32mmol) のジクロロメタン (20ml) 溶液を0度に冷却した後に、1-(3- ジメチルアミノプロピル)-3- エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC'HCl 1.98g、10.32mmol) を加え、反応液を室温で6時間攪拌した。反応液を0度に冷却した後にN, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.80ml、10.23mmol) とS-(t-ブチルチオ)-L- システイン (H_Cys(StBu)-OH) (2.16g、10.32mmol) を加え、反応液を室温で12時間攪拌した。反応混合物に酢酸エチルと2M塩酸を加えて、酢酸エチルにて抽出を行った。有機層を25wt%食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、(5S, 8R)-5

-ベンジル-1-(9H-フルオレン-9-イル)-12,12-ジメチル-3,6-ジオキソ-2-オキサ-10,11-ジチア-4,7-ジアザトリデカン-8-カルボン酸(化合物SP663、Fmoc-Phe-Cys(StBu)-OH)(4.22g、71%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 579 (M+H)+

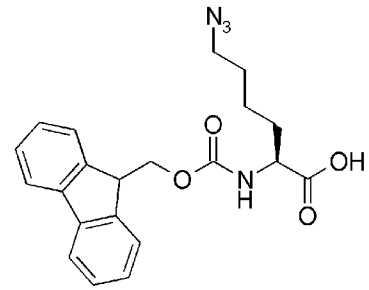
保持時間:0.97分(分析条件30DFAO5)

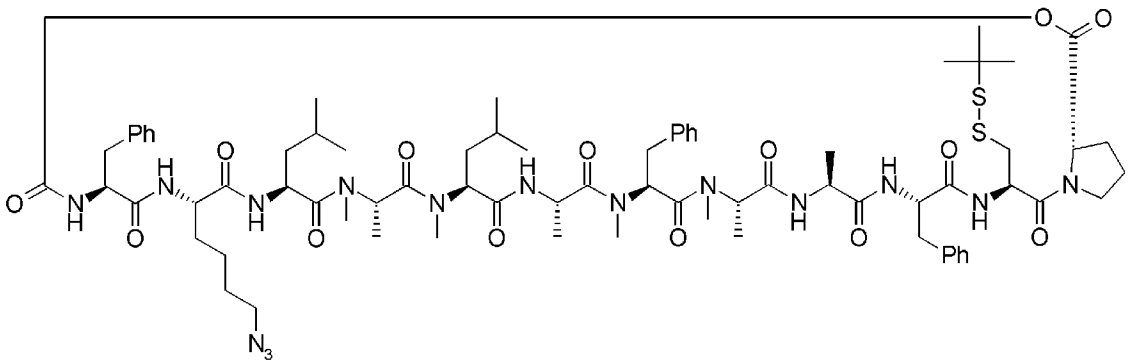
[1172] (6S,9S,12S,15S,18S,21S,24S,27S,30S,33S,36R,41aS)-9-(4-アジドブチル)-6,24,33-トリベンジル-36-((tert-ブチルジスルファニル)メチル)-12,18-ジイソプロピル-14,15,17,21,23,26,27,30-オクタメチルヘキサコサヒドロピロロ[2,1-c][1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37]オキサトリデカアザシクロノナトリアコンチン-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37(3H)-トリデカオン(化合物SP662、c(HOGly-Phe-Lys(N3)-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-ALa-Phe-Cys(StBu)-Pro))の合成

(HOGlyはグリコール酸を示す)

用語の定義

Fmoc-Lys(N3)-0H : (S)-2-((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニルアミノ)-6-アジドヘキサン酸





[1173] Fmocアミノ酸として、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-MeALa-OH、Fmoc-MeLeu-OH

、Fmoc-Lys(N3)-0H 、Fmoc—Phe—0H、Fmoc—ALa—0H、Fmoc-Leu-0H 、Fmoc-Phe-Cys(StBu)-OH (化合物SP663) を用いてペプチドの伸長を行った。ペプチドの伸長後、N末端のFmoc基を脱保護し、H0At，DICを縮合剤としてクロロ酢酸を縮合させた後、レジンをDMF，ジクロロメタンにて洗浄した。レジンにジクロロメタン/ 2，2，2—トリフルオロエタノール (= 1/ 1，v/ v、4mL) を加えて1時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン/ 2，2，2—トリフルオロエタノール (= 1/ 1，v/ v、1mL) にて洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、粗生成物 ((S)-1-((2R, 5S, 8S, 11S, 14S, 17S, 20S, 23S, 26S, 29S, 32S)-29-(4- アジドプチル)-5, 14, 32- トリベンジル-2-((tert- プチルジスルファニル)メチル)-35- クロロ-20, 26- ジィソプチル-8, 11, 12, 15, 17, 21, 23, 24- オクタメチル-4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34- ウンデカオキソ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33- ウンデカアザペンタトリアコンタン)ピロリジン-2- カルボン酸 (CLAc-Phe-Lys (N3) -Leu-MeA La-MeLeu-A La-MePhe-MeA La-A La-Phe-Cys(StBu)-Pro) (419mg) を得た。得られた粗生成物 (CLAc-Phe-Lys(N3) -Leu-MeA La-MeLeu-A La-MePhe-MeA La-A La-Phe-Cys(StBu)-Pro) (419mg，0.271mmol) とヨウ化ナトリウム (102mg，0.678mmol) のDMF (20ml)、THF (20mL) 溶液に窒素雰囲気下、炭酸カリウム (56.2mg、0.407mmol) を加え、反応液を40度で5.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/ 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、標題化合物 (化合物SP662、158mg、39%) を得た。

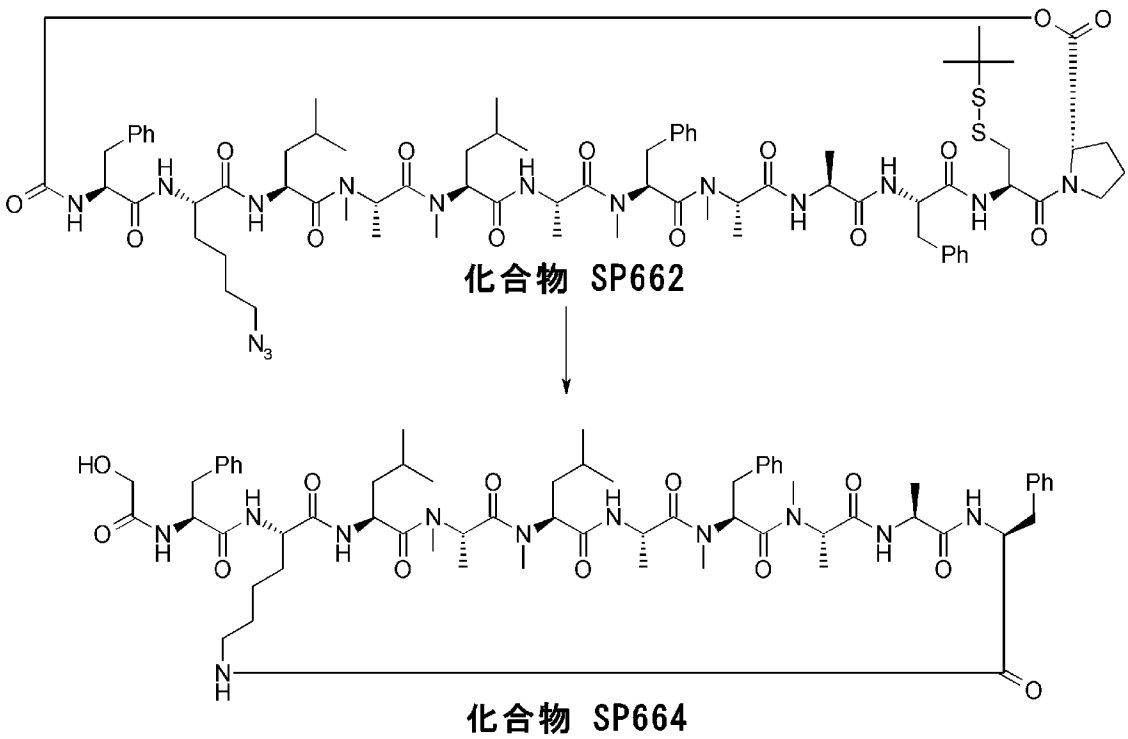
LCMS (ESI) m/z = 1509 (M+H)+

保持時間：0.63分 (分析条件30D FA50)

[1174] 6-2. 翻訳モデルペプチドからの分子内分枝ペプチド生成反応

(S)-N-((3S, 6S, 9S, 12S, 15S, 18S, 21S, 24S, 27S)-3, 12- ジベンジル-18, 24- ジィ

ソブチル-6, 9, 10, 13, 15, 19, 21, 22- オクタメチル-2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26-ノナオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25- ノナアザシクロヘントリアコンタン-27-イル)-2-(2- ヒドロキシアセトアミド)-3- フェニルプロパンアミド (化合物SP664) の合成



[1175] 緩衝溶液Φにおける分子内分枝《プチド牛成ほ応

0. 5M HEPES緩衝液 (pH7. 0、 60μ1) と1, 3-ジメチル-2- イミダゾリジノン (DMI) (40μ1) の混合溶液に、TCEP塩酸塩 (トリス (2_カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩) (2. 9mg、 0. 010mmol)、2-(4- メルカプトフェニル)酢酸 (1. 7mg、 0. 010mmol) を加えた。さらにこの溶液に2N水酸化ナトリウム水溶液 (35从1) と水 (45μ1) を加えてpH8. 5に調整し、室温で5分攪拌した。その後、(6S, 9S, 12S, 15S, 18S, 21S, 24S, 27S, 30S, 33S, 36R, 41aS)-9-(4- アジドプチル)-6, 24, 33- トリベンジル-36-((tert- プチルジスルファニル)メチル)-12, 18-ジィソプチル-14, 15, 17, 21, 23, 26, 27, 30- オクタメチルヘキサコサヒドロピロロ[2, 1-c] [1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37] オキサドデカアザシクロノナトリアコンチン-1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37(3H)- トリ

デカオン(c ([H0]GLy-Phe-Lys (N3) -Leu-MeA La-MeLeu-A La-MePhe-MeA La-A La-Phe-Cys(StBu)-Pro)) (化合物SP662)の0.01M 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (DMI)溶液 (20从し 0.2μmol)を加え、反応液を30℃で24時間攪拌した。LCMSを用いて反応の変化を観測したところ、24時間で(S)-N-((3S, 6S, 9S, 12S, 15S, 18S, 21S, 24S, 27S)-3, 12-ジベンジル-18, 24-ジィソプチル-6, 9, 10, 13, 15, 19, 21, 22-オクタメチル-2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26-ノナオキソ-1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-ノナァザシクロヘントリアコンタン-27-イル)-2-(2-ヒドロキシァセトアミド)-3-フエニルプロパンアミド (化合物SP664) が生成していることを確認した。加水分解物と化合物SP664との生成比は、LCMSのUVエリア比で12:88であった。(図71、加水分解化合物 保持時間:0.62分)

LCMS (ESI) m/z = 1195 (M+H)+

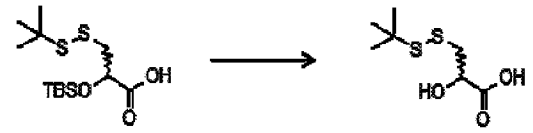
保持時間:0.77分 (分析条件30D FAO5)

[1176] 7.1回目のi環き 赫 終了經 想れ 、2回目の分教 び 応嫌 媒 を針 るエステルから直き 牛エステルは 射 き き (保m)アノ基をアミド化ほ応により分枝させる例の幸施。

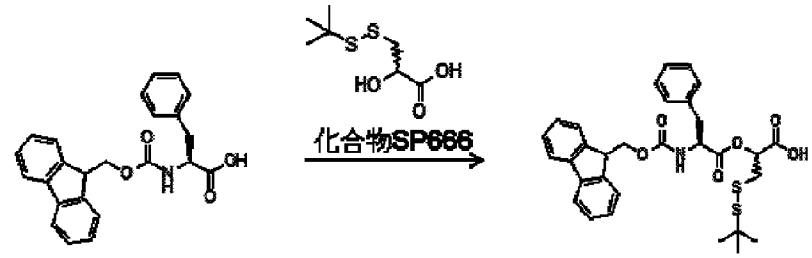
コンセプト証明のための別実験である。1回目の環化反応終了後を想定した。従ってAspの側鎖カルボン酸とN末端アミンとの環化ではなく、C末端ALaのカルボン酸とN末端アミンとをアミド環化させた。2回目の分枝化のためのアミノ基の保護基もデイスプレーライプラリーでの使用を想定したものではない。反応補助基を有するエステルからの分枝化反応が進行することを確認することを目的としたコンセプト証明のためのモデル実験である。

[1177] 7-1.翻訳ベプチドモデル化合物 (化合物665)の合成

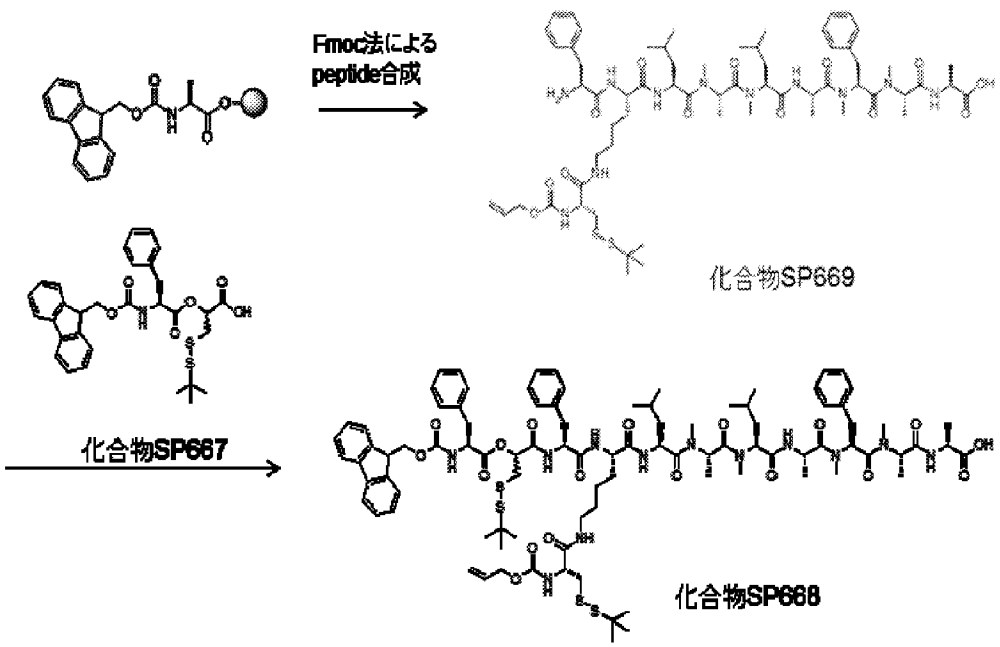
以下のスキームに従い、合成を行った。

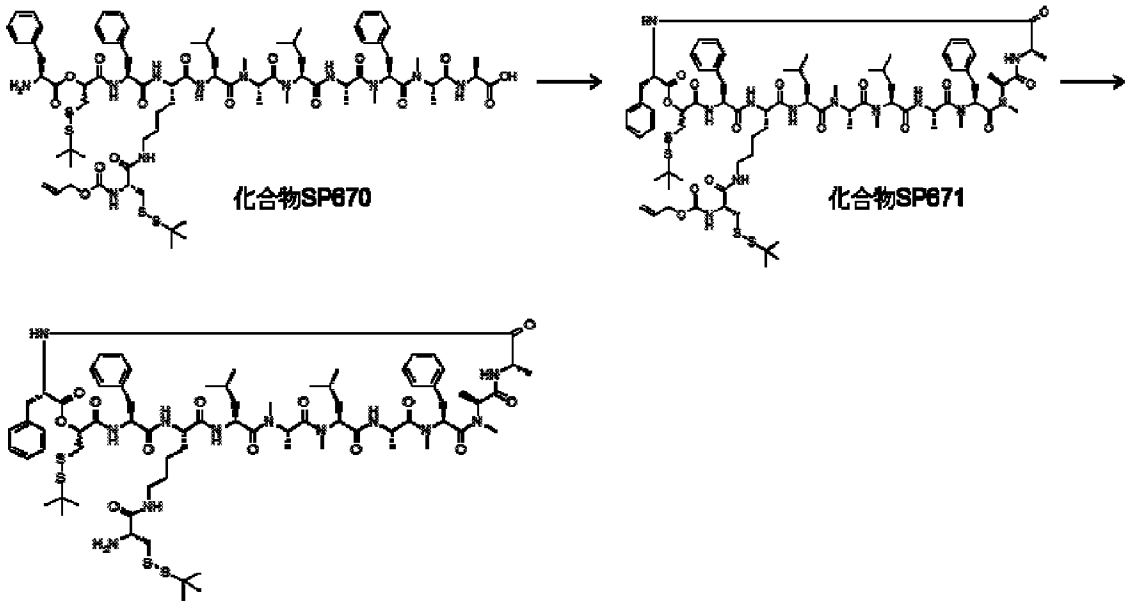


化合物24 化合物SP666



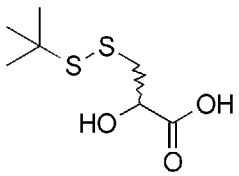
化合物SP667





化合物SP672

[1178] 3-(tert—ブチルジスルファニル)_2—ヒドロキシプロパン酸 (化合物SP666、H-tBuSSlac-OH)の合成



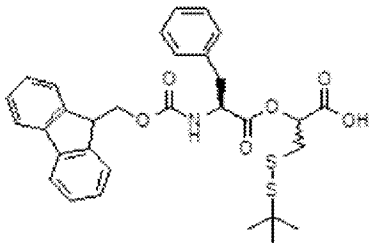
[1179] 文献既知法 (J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 4919.) により調整した2_(tert_ブチルジメチルシリルオキシ)_3-(tert—ブチルジスルファニル)プロピオン酸 (化合物24) (30.0mg、0.092mmol)のテトラヒドロフラン (THF)溶液 (300μl)に室温にて1N 塩酸水溶液 (300μl)を加え、60度で16時間攪拌した。反応液を逆相シリカゲルクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、3_(tert—ブチルジスルファニル)—2—ヒドロキシプロパン酸 (H—tBuSSlac-0H) (化合物SP666) (7.4mg、54%)を得た。

なお、本明細書中では、化合物SP666のヒドロキシル基上の水素原子とカルボン酸上のヒドロキシル基を除いた2価の構造をtBuSS Lacとする。

LCMS (ESI) m/z = 209 (M— H) –

保持時間：0．６０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1180] ２－（（（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－フエニルプロパノイル）オキシ）－３－（ｔｅｔｒ－ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ｔＢｕＳＳＩａｃ－０Ｈ）（化合物SP６６７）の合成



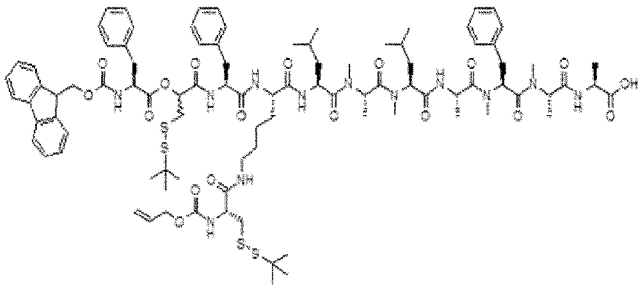
[1181] 窒素雰囲気下、（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－フエニルプロパン酸（Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ）（５００ｍｇ、１．２９ｍｍｏｌ）とＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＨＯＳｕ）（１４９ｍｇ、１．２９ｍｍｏｌ）のジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液（４．５ｍｌ）に室温にて１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣＩ．ＨＣＩ）（２４７ｍｇ、１．２９ｍｍｏｌ）を加え、同温度にて１８時間攪拌した。反応液（１．７ｍｌ）に３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）－２－ヒドロキシプロパン酸（化合物SP６６６）（１００ｍｇ、０．４７５ｍｍｏｌ）と４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）（５８．１ｍｇ、０．４７５ｍｍｏｌ）を室温にて加え、同温度で５時間攪拌した。反応液にギ酸（１８μｌ）を加え、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２－（（（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３－フエニルプロパノイル）オキシ）－３－（ｔｅｔｒ－ブチルジスルファニル）プロパン酸（Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ｔＢｕＳＳＩａｃ－ＯＨ）（化合物SP６６７）（１１０ｍｇ、４０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝５８０．５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．０５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1182] （５Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，３２Ｓ，３５Ｓ）－１４－（４－（（Ｒ）－２－（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ブチル）－５，１１，２９－トリベンジル－８－（（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）メチル）－１－（９Ｈ－フルオレン－９－イル）－１７，２３－ジイソプチル－１９，２０，２２，２６，２８，３１，３２，３５－オクタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０，３３－ウンデカオキソ－２，７－ジオキサ－４，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１，３４－デカアザヘキサトリアコンタン－３６－酸（Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ｔＢｕＳＳＩａｃ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（Ａｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－ＯＨ）（化合物SP６６８）のさ成

なお、本明細書中では、他の例と同様Ｈ－Ｌｙｓ－ＯＨの側鎖アミノ基とＡｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）－ＯＨのカルボキシル基とがアミド結合した化合物をＨ－Ｌｙｓ（Ａｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－ＯＨと記載する。

[1183] 

[1184] 既に、実施例に記載のＦｍｏｃ法によるペプチド合成法に従いペプチド鎖の伸長を行って、Ｈ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（Ａｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－ＯＨ（化合物SP６６９）を合成した。レジンはＣｌ－Ｔｒｔ（２－Ｃｌ）－Ｒｅｓｉｎ（１００～２００Ｍｅｓｈ，１％ ＤＶＢ，渡辺化学より購入）を用いた。Ｆｍｏｃアミノ酸として、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＡｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＰｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＭｅＬ

ｅｕ—ＯＨ、Ｆｍｏｃ—Ｌｅｕ—ＯＨ、Ｆｍｏｃ—Ｌｙｓ（ＡＩｌｏｃ—Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））-ＯＨ（化合物１５０ａ）、Ｆｍｏｃ＿Ｐｈｅ＿ＯＨを用いた。ペプチドの伸長後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を２０％ピペリジンのジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液（４．ＯｍＩ）で脱保護し、レジンをジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）で洗浄した。レジンにジクロロメタン（ＤＣＭ）／２，２，２—トリフルオロエタノール（ＴＦＥ）（＝１／１、ｖ／ｖ、４．０ｍＩ）を加えて１時間反応させ、レジンからのペプチドの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをジクロロメタン（ＤＣＭ）／２，２，２—トリフルオロエタノール（ＴＦＥ）（＝１／１，ｖ／ｖ、１ｍＬ）にて４回洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、粗生成物として（２Ｓ，５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，３０Ｒ）＿２３＿（（Ｓ）＿２＿アミノ－３＿フエニルプロパンアミド）－８—ベンジル－３０＿（（ｔｅｒｔ＿プチルジスルファニル）メチル）—１４，２０—ジイソプチル—２，５，６，９，１１，１５，１７，１８—オクタメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２９，３２—ノナオキソ－３３＿オキサ＿３，６，９，１２，１５，１８，２１，２８，３１—ノナアザヘキサトリアコンター３５—エン＿１＿酸（Ｈ＿Ｐｈｅ＿Ｌｙｓ（ＡＩｌｏｃ-Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））-Ｌｅｕ-ＭｅＡｌａ-ＭｅＬｅｕ-Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＡｌａ-Ａｌａ-ＯＨ）（化合物SP６６９）（７１．０ｍｇ）を得た。

[1185] 窒素雰囲気下、２＿（（（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ—フルオレン—９—イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿フエニルプロパノイル）オキシ）-３-（ｔｅｔｒ—プチルジスルファニル）プロパン酸（Ｆｍｏｃ—Ｐｈｅ-ｔＢｕＳＳＩａｃ-ＯＨ）（化合物SP６６７）（１０．０ｍｇ、１７μｍｏＩ）とＮ—ヒドロキシスクシンイミド（ＨＯＳｕ）（１．９９ｍｇ、１７μｍｏＩ）のジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液（１００μ１）に室温にて１＿エチル＿３＿（３—ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣＩ・ＨＣＩ）（３．３１ｍｇ、１７μｍｏＩ）を加え、同温度にて

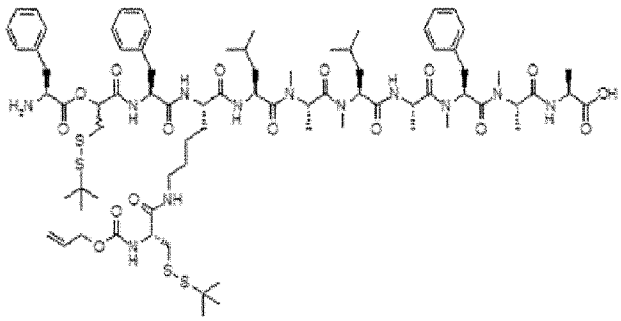
１５時間攪拌した。反応液に (2Ｓ，5Ｓ，8Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，３０Ｒ)－２３－（（Ｓ）―２－アミノ－３－フエニルプロパンアミド)－８－ベンジル―３０―（（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）メチル）―１４，２０―ジイソプチル―２，５，６，９，１１，１５，１７，１８―オクタメチル－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２９，３２－ノナオキソ－３３－オキサ－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２８，３１－ノナアザヘキサトリアコンター３５－エン－１－酸 (H―Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（Ａｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ―Ａｌａ―ＭｅＰｈｅ―ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－ＯＨ) (化合物SP669) （２２．１ｍｇ）のジメチルホルムアミド (ＤＭＦ) 溶液 (２２０μｌ) とジイソプロピルエチルアミン (ＤＩＰＥＡ) （３．０１μｌ、１７μｍｏｌ）を室温にて加え、３０度で3時間３０分攪拌した。

[1186] 反応液を逆相シリカゲルクロマトグラフィー (１０ｍＭ 酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール）にて精製し、 (5Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，３２Ｓ，３５Ｓ)－１４－（４－（（Ｒ）－２－（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ)－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパンアミド)プチル）－５，１１，２９―トリベンジル―８－（（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）メチル）－１－（９Ｈ－フルオレン－９－イル）－１７，２３―ジイソプチル－１９，２０，２２，２６，２８，３１，３２，３５―オクタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０，３３―ウンデカオキソ－２，７－ジオキサ－４，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１，３４―デカアザヘキサトリアコンタン－３６―酸 (Ｆｍｏｃ―Ｐｈｅ―ｔＢｕＳＳＩａｃ―Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（Ａｌｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ―ＭｅＬｅｕ―Ａｌａ―ＭｅＰｈｅ―ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－ＯＨ) (化合物SP668) （１７．０ｍｇ、５４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ １８４４．６ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :０．８４分 (分析条件ＳＱＤＡＡ５０)

[1187] （９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ，３３Ｓ）－１２－（４－（（Ｒ）－２－（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ—ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ブチル）－６－（（（Ｓ）－２—アミノ－３＿フエニルプロパノィル）オキシ）＿９，２７—ジベンジル－１５，２１—ジイソプチル—２，２，１７，１８，２０，２４，２６，２９，３０，３３—デカメチル＿７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１—ノナオキソ＿３，４—ジチア＿８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９，３２＿ノナァザテトラトリアコンタン＿３４＿酸（Ｈ—Ｐｈｅ－ｔＢｕＳＳＩａｃ－Ｐｈｅ－Ｌｖｓ（ＡＩｌｏｃ－Ｃｖｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－０Ｈ）（化合物SP６７０）の合成



[1188] （５Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，３２Ｓ，３５Ｓ）－１４－（４＿（（Ｒ）－２－（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ブチル）＿５，１１，２９＿トリベンジル—８＿（（ｔｅｒｔ＿ブチルジスルファニル）メチル）＿１＿（９Ｈ—フルオレン－９—イル）＿１７，２３—ジイソプチル—１９，２０，２２，２６，２８，３１，３２，３５—オクタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０，３３—ゥンデカオキソ－２，７—ジオキサー４，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１，３４－デカァザヘキサトリアコンター３６－酸（Ｆｍｏｃ—Ｐｈｅ—ｔＢｕＳＳＩａｃ—Ｐｈｅ—Ｌｙｓ（ＡＩｌｏｃ—Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ－ＯＨ）（化合物SP６６８）（２３．Ｏｍｇ、０．０

12mmol）に5％ピペリジンのジメチルホルムアミド（DMF）溶液（250μl）を室温にて加え、同温度で10分攪拌した。反応液にギ酸（5.0μL）を加え、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（0.1％ギ酸水溶液/0.1％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（9S，12S，15S，18S，21S，24S，27S，30S，33S）-12-（4-（（R）-2-（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ）_3_（tert—プチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）_6_（（（S）-2—アミノー3_フエニルプロパノィル）オキシ）_9，27—ジベンジルー15，21—ジイソプチル—2，2，17，18，20，24，26，29，30，33—デカメチルー7，10，13，16，19，22，25，28，31—ノナオキソ_3，4—ジチア_8，11，14，17，20，23，26，29，32—ノナアザテトラトリアコンターン34—酸（H—Phe—tBuSSlac—Phe—Lys（Alloc—Cys（StBu））-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala-OH）（化合物SP670）（21.Omg）を定量的に得た。

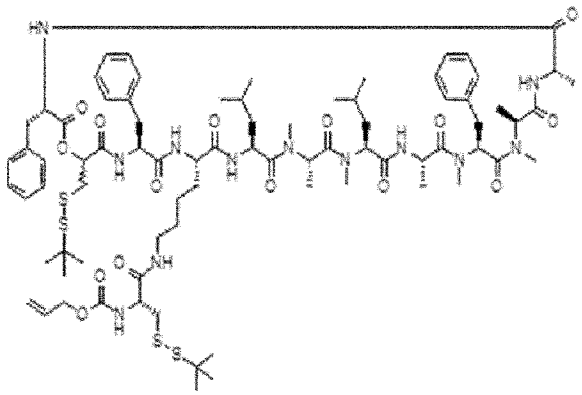
LCMS（ESI）m/z=1622（M+H）+

保持時間：0.30分、0.34分（分析条件SQDFA50）

tBuSS Lac部位が光学異性体混合物であるため、化合物としてジアステレオマーが存在し、2本のピークを観測した。

[1189] （（2R）-3-（tert—プチルジスルファニル）—1—オキソ—1—（（4-（（5S，8S，11S，14S，17S，20S，23S，26S，29S，32S）-5，23，32—トリベンジル—2—（（tert—プチルジスルファニル）メチル）—11，17—ジイソプチル—13，14，16，20，22，25，26，29—オクタメチル—3，6，9，12，15，18，21，24，27，30，33_ウンデカオキソ_1—オキサ—4，7，10，13，16，19，22，25，28，31—デカアザシクロトリトリアコンターン8_イル）プチル）アミノ）プロパン_2_イル）カルバミン酸アリル（*Phe_tBuSSlac-Phe-Lys

（Alloc-Cys（StBu））-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala*、2つの水部位にて環化）（化合物SP671）の合成



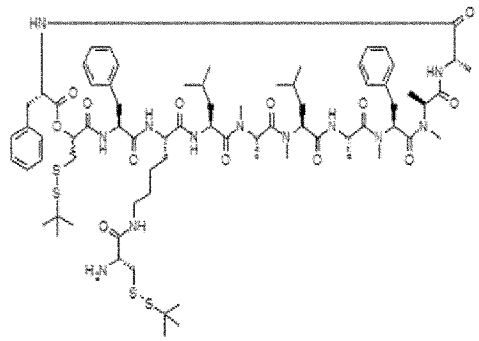
[1190] （9S，12S，15S，18S，21S，24S，27S，30S，33S）-12-（4-（（R）-2-（（（アリルオキシ）カルボニル）アミノ）_3_（tert—プチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）-6-（（（S）_2—アミノー3_フエニルプロパノィル）オキシ）—9，27—ジベンジル—15，21—ジイソプチル—2，2，17，18，20，24，26，29，30，33—デカメチルー7，10，13，16，19，22，25，28，31—ノナオキソ_3，4—ジチア_8，11，14，17，20，23，26，29，32—ノナアザテトラトリアコンタンー34—酸（H_Phe_tBuSSIac_Phe_Lys（Alloc-Cys（StBu））-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala-OH）（化合物SP670）（1.2mg、0.74μmmol）のジメチルホルムアミド（DMF）/ジクロロメタン（DCM）（=4/1、v/v、800μ門溶液に0_（7—アザ_1H—ベンゾトリアゾール_1_イル）_N，N，N' N' —テトラメチルウロニゥム ヘキサフルオロリン酸塩（HATU）（0.42mg、1.11μmol）のジメチルホルムアミド（DMF）溶液（4.2μ1）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）（0.194μl、1.11μmol）のジメチルホルムアミド（DMF）溶液（2.0μ，\）を室温にて加え、同温度で3時間攪拌した。反応液にギ酸（0.28μL）を加え、逆相シリ

カゲルクロマトグラフィー (0．1％ギ酸水溶液/ 0．1％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（(2R)-3-（tert—プチルジスルファニル）_1_オキソ_1_（(4_（(53，8S，11S，14S，17S，20S，23S，26S，29S，32S)-5，23，32—トリベンジル—2_（（tert—プチルジスルファニル）メチル）—11，17—ジイソプチル—13，14，16，20，22，25，26，29—オクタメチル—3，6，9，12，15，18，21，24，27，30，33-ウンデカオキソ—1—オキサ—4，7，10，13，16，19，22，25，28，31—デカアザシクロトリトリアコンタン_8_イル）プチル）アミノ）プロパン_2_イル）カルバミン酸アリル (* Phe_tBuSS 1ac-Phe-Lys（Alloc-Cys（StBu））-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala水、2つの*部位にて環化）(化合物SP671）（0．90mg、76％）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 1604．5 (M+H)+

保持時間：0．79分 (分析条件30D「六50）

[1191] _(2R)_2—アミノ_3_(tert—プチルジスルファニル)_N_(4-((5S．8S．11S．14S．17S．20S．23S．26S．29S．32S)-5．23，32—トリベンジル—2_((tert—プチルジスルファニル)メチル)—11，17—ジイソプチル—13，14，16，20，22，25，26，29—オクタメチル—3，6，9，12，15，18，21，24，27，30，33_ウンデカオキソ—1_オキサ—4，7，10，13，16，19，22，25，28，31—デカアザシクロトリトリアコンタン—8_イル)プチル)プロパンアミド_(* Phe_tBuSSlac-Phe-Lys（H-Cys（StBu））-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala水、2つの*部位にて環化）(化合物SP665）の合成



[1192] （（２Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）－１―オキソ―１－（（４－（（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，３２Ｓ）－５，２３，３２－トリベンジル―２―（（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）メチル）―１１，１７―ジイソプチル―１３，１４，１６，２０，２２，２５，２６，２９―オクタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０，３３－ウンデカオキソ－１―オキサ―４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１－デカアザシクロトリトリアコンタン－８－イル）プチル）アミノ）プロパン－２―イル）カルバミン酸アリル（＊Ｐｈｅ－ｔＢｕＳＳＩａｃ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（ＡＩｌｏｃ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ＊、２つの＊部位にて環化）（化合物ＳＰ６７１）（２．５ｍｇ、１．５６从ｍｏｌ）にフエニルシラン（ＰｈＳｉＨ$_3$）（０．３８５μし３．１２μｍＯＩ）の１，３―ジメチル－２―イミダゾリジノン（ＤＭＩ）溶液（１４０μ１）、テトラキス（トリフエニルホスフィン）パラジウム（０）（Ｐｄ（Ｐｈ$_3$Ｐ）$_4$）（１．８０ｍｇ、１．５６μｍｏｌ）を室温にて加え、反応液を３０度で１時間３０分攪拌した。反応液を逆相シリカゲルクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（２Ｒ）－２―アミノ―３－（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）－Ｎ－（４－（（５Ｓ，８Ｓ，１１Ｓ，１４Ｓ，１７Ｓ，２０Ｓ，２３Ｓ，２６Ｓ，２９Ｓ，３２Ｓ）－５，２３，３２―トリベンジル－２－（（ｔｅｒｔ－プチルジスルファニル）メチル）―１１，１７－ジイソプチル―１３，１４，１６，２０，２２，２５，２

６，２９―オクタメチル－３，６，９，１２，１５，１８，２１，２４，２７，３０，３３―ウンデカオキソ－１―オキサ－４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８，３１―デカアザシクロトリトリアコンタン－８―イル）プチル）プロパンアミド（＊Ｐｈｅ＿ｔＢｕＳＳＩａｃ＿Ｐｈｅ＿Ｌｙｓ（Ｈ－Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ））－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ＿ＭｅＰｈｅ＿ＭｅＡｌａ＿Ａｌａ＊、２つの＊部位にて環化）（化合物ＳＰ６６５）（２．６０ｍｇ、８８％）を得た。

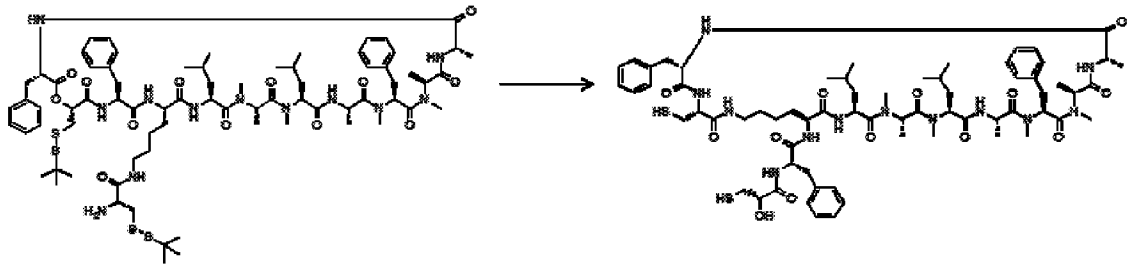
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１５２０　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1193] ７－２．翻訳《プチ｛モデル化さ物（化さ物ＳＰ６６５）＿からの分枝《プチ｛生成反応

（２Ｓ）－Ｎ－（（３Ｒ．６Ｓ．９Ｓ．１２Ｓ．１５Ｓ．１８Ｓ．２１Ｓ．２４Ｓ．２７Ｓ．３０Ｓ）－６．１５―ジベンジル－２１，２７―ジイソプチル－３＿（メルカプトメチル）－９，１２，１３，１６，１８，２２，２４，２５―オクタメチル－２，５．８．１１，１４，１７，２０，２３，２６．２９―デカオキソ－１，４，７．１０，１３，１６，１９，２２，２５．２８―デカアザシクロテトラトリアコンタン－３０＿イル）＿２＿（２－ヒドロキシ－３＿メルカプトプロパンアミド）－３＿フエニルプロパンアミド（Ｈ―ＨＳＬａｃ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ（＊Ｃｙｓ）－Ｌｅｕ－ＭｅＡｌａ－ＭｅＬｅｕ－Ａｌａ－ＭｅＰｈｅ－ＭｅＡｌａ－Ａｌａ＿Ｐｈｅ氷、２つの＊部位にて環化）（化合物ＳＰ６７２）の合成

なお、本明細書では、ＨＳＬａｃとは化合物ＳＰ６６６の側鎖ｔＢｕＳ基が脱保護されたもので、ヒドロキシル基上の水素原子とカルボン酸上のヒドロキシル基を除いた２価の構造を意味する。



化合物©Pββ5 化合物SP672

[1194] 窒素雰囲気下、1M トリス (2—カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)塩酸塩水溶液 (1μl)、2M HEPES緩衝液 (1.5μl、pH=7.6)、1N 水酸化ナトリウム水溶液 (1.8μl)、水 (38.2μl)を混ぜた溶液に (2R)_2—アミノ_3_(tert_ブチルジスルファニル)_N—(4—((5S,8S,11S,14S,17S,2OS,23S,26S,29S,32S)-5,23,32—トリベンジル-2-((tert—ブチルジスルファニル)メチル)—11,17—ジイソプチルー13,14,16,20,22,25,26,29—オクタメチルー3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33—ウンデカオキソー1_オキサ-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31—デカアザシクロトリトリアコンタン_8_イル)プチル)プロパンアミド (*Phe_tBuSSIac_Phe_Lys(H_Cys(5tBu))-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla_Ala*、2つの*部位にて環化) (化合物SP665) (76μg、0.05μmol)の1,3—ジメチルー2_イミダゾリジノン (DMI)溶液 (7.5μl)を室温にて加え、pH=6.6にて、30度で13時間攪拌した。反応の変化をLCMSで追跡し、13時間後目的物である化合物SP672が生成していることを確認した。目的化合物の他に、加水分解体 (m/z=1359.8 (M—H)−)、m/z=1309.6 (M—H)-(ともにLCMS保持時間0.64分)、m/z=1377.8 (M—H)-(LCMS保持時間0.82分)、m/z=1559.9 (M-H)-(LCMS保持時間0.56分)が副生成物として観測された。目的化合物はLCMSのUVエリア比で43%であった。 (図7

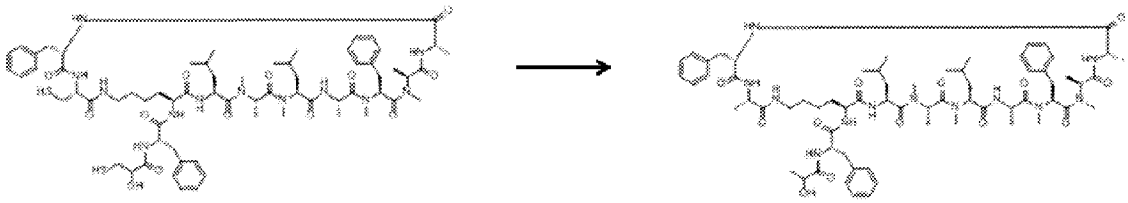
2）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = １３４２ (M— Ｈ）－

保持時間 :0．８１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1195] ７-３．分枝《プチドからの脱硫反応

（２Ｓ）-Ｎ-（（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-６，１５—ジベンジル—２１，２７—ジィソプチル_３，９，１２，１３，１６，１８，２２，２４，２５—ノナメチル—２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３，２６，２９ーデカオキソー１，４，７，１０，１３，１６，１９，２２，２５，２８-ﾃﾞカァザシクロテトラトリアコンタンー３０—ィル）_２_（２—ヒドロキシプロパンアミド）-３_フエニルプロパンアミド (Ｈ_ｌａｃ_Ｐｈｅ_しＶｓ（氷Ａｌａ）-Ｌｅｕ-ＭｅＡｌａ-ＭｅＬｅｕ-Ａｌａ-ＭｅＰｈｅ-ＭｅＡｌａ-Ａｌａ_Ｐｈｅ*，２つの*部位にて環化）（化合物SP６７３）のさ成



化合物SP672 化合物SP673

[1196] 窒素雰囲気下、上述の７_２．に記載の化合物SP673を含む翻訳ペプチドモデル化合物 (化合物SP６６５）からの分枝ペプチド生成反応に用いた反応溶液 (２０从门に３３０ｍＭ ダルタチオン水溶液（１０．８μ门、６７０ｍＭ トリス (2—カルボキシエチル）ホスフィン (ＴＣＥＰ）塩酸塩溶液（７．２从し ｐＨ＝７．１）を加え５０℃で５分攪拌した。２５０ｍＭ ２，２—アゾビス [２—（２_イミダゾリンー２_ィル）プロパン] 二塩酸塩 (ＶＡ—０４４）水溶液 (1．６从1）を室温にて加え、５０℃で２０分攪拌した。反応の変化をＬＣＭＳで追跡し、２０分後目的物である (２Ｓ）-Ｎ-（（３Ｓ，６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，１５Ｓ，１８Ｓ，２１Ｓ，２４Ｓ，２７Ｓ，３０Ｓ）-６，１５—ジベンジル—２１，２７—ジイソプチル—３，９，１２，１３，１６，１８，２２，２４，２５—ノナメチル—２，５，

8，11，14，17，20，23，26，29—デカオキソ_1，4，7，10，13，16，19，22，25，28—デカァザシクロテトラトリアコンタン—30—イル）—2—（2—ヒドロキシプロパンアミド）—3—フエニルプロパンアミド（H_Iac-Phe-Lys（*Ala）-Leu-MeAla-MeLeu-Ala-MePhe-MeAla-Ala-Phe*、2つの*部位にて環化）（化合物SP673）が生成していることを確認した。

670mM トリス（2—カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩溶液の調整法は以下の通りである。トリス（2_カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）塩酸塩（29mg、101μmOI）に水（100从1）、トリエチルアミン（Et_3N）（50从1）を加え、pH=7.1に調整した。

LCMS（ESI） m/z = 1280（M+H）+

保持時間：0.77分（分析条件SQDFA05）

8．ペプチドーRNA複合体を用いた分子内分枝ペプチド（直鎖部2）生成反応

RNA—ペプチド複合体において分子内分枝ペプチド反応を施し、生成物を電気泳動により分析した。

[1197] 8-1．ピューロマイシンを含む鋳型mRNAの調製とそれを用いたRNA—ペプチド複き の龍 尺合成

PCRにより調製したDNA（配列番号 DM-H 1）を錶型に、In vitro転写によりmRNA（配列番号RM—H2）を調整し、RNeasy mini kit（Qiagen社）を用いて精製した。10μMのmRNAに、15μMのピューロマイシンリンカー（Sigma社）（配列番号C-H 1）1X T4 RNAライゲースリアクションバッファー（NEB社）、1mM ATP、10% DMS0、0.63 unit/μL T4 RNAライゲース（NEB社）を加え、室温で30分間ライゲーション反応させた後、RNeasy MiniELutekit（Qiagen社）により精製した。次に、前述した翻訳系の錶型RNAOT86b（配列番号RM—H1）の代わりに上記で調製した1μMのmRNA-ピューロマイシンリンカー連結体を錶型として用い、さらに0.25mM GLyを追加した翻訳反応液を調製し

、３７℃で６０分間保温した後、続けて室温で12分間保温した。その後、反応液をRNeasy mineLute(qiagen社)により精製し、ペプチド—RNA複合体分子を得た。

[1198] 配列番号DM-H1 0T-104 (配列番号:92)

0T-104 DNA配列

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgTGCACTACATGGTTCCG

TTGGTGCCCACAGTTCAAGTGGCTTCCTCGTAGTGGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAA

A

[1199] 配列番号RM—H2 0T-104 (配列番号:93)

0T-104 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaugUGCACUACAUGGUUCCGUUGGUGCCCACAGUUCAAGUG

GCUUCCUCGUAGUGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1200] 配列番号C_H1 S2PuF Lin配列 (配列番号:76)

[P] CCCGTCCCCGCCGCCC [FLuorece in-dT] [Space r18] [Space r18] [Space r18] [Space r18] [Space r18] CC[Pu romyc in] ([P]:5,リン酸化)

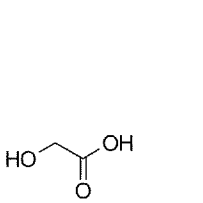
[1201] 8-2.分子内分枝ペプチド_(直鎖部2)_を有するペプチド—RNA複合体の生成

上記で調製したペプチド—RNA複合体溶液100从1に対して100从1のN,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、5.5μLの2M HEPES—K0H(pH7.6)、2.1从1の1Mトリス(2—カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)(pH7.6)を加え、３７℃で2時間保温した。続けて848μLの試薬溶液(59mMトリス(2—カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩、425mM N,N_ビス—(2—ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)(pH8.7)、590mM水酸化ナトリウム、47%(v/v)N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、593mM 4—(トリフルオロメチル)ベンゼンチオール)を反応溶液に加え、３７℃でさらに20時間保温した。得られた反応液から、RNeasy mineLute (qiagen社)を用いてペプチド—RNA複合体を精製し、純水100μLにてカラムから溶出した。続けて、12从1の1

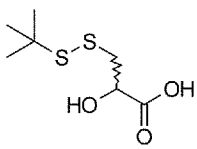
0 x RNase ONE ribonuc Lease 反応バッファー (promega 社)、6 μL のRNase ONEribonuc Lease (promega 社)、6 μL のRNase H (Life Techno Logies社) を加え、室温にて3 日間保温した。得られた反応溶液と何も反応させていないピューロマイシンリンカー (配列番号C-H1) をpept ide-PAGE mini (TEFC0 社) にて電気泳動し、ピューロマイシンリンカーに由来するFLuorece inにてバンドを可視化した (図７４)。その結果、分枝ペプチド (直鎖部２) 生成反応を行ったサンプルに関して、ピューロマイシンリンカーにペプチドが結合したことに由来するバンド移動度の差が観測された (図７４、レーン２、バンドI)。このことから、目的の分子内分枝ペプチド—ＲＮＡ複合体の存在が示された。

[1202] ９．分枝ペプチドの翻訳産物からの生成を可能とするユニットのアミノアシル化DdCpA の合成

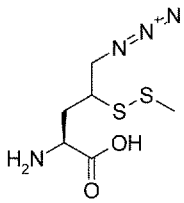
なお、本明細書では、アミノ酸あるいはアミノ酸誘導体、アミノ酸類縁体の主鎖カルボン酸とｐｄＣｐＡのヒドロキシル基 (2 位あるいは3 位) とエステル結合を形成した化合物をアミノ酸—ｐｄＣｐＡと記載する。アミノ酸、アミノ酸誘導体、アミノ酸類縁体部位は略称で示しており、各略称は以下のように定義する。



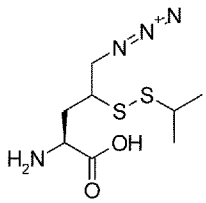
HOGly



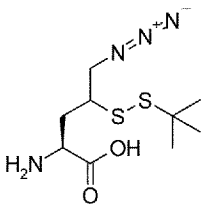
tBuSSlac



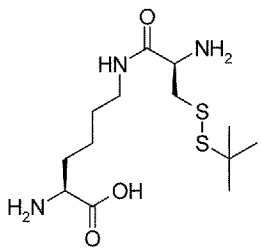
Orn(N3)(4-SSMe)



Orn(N3)(4-SSiPr)



Orn(N3)(4-SStBu)

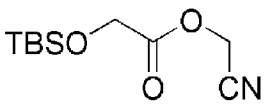


Lys(Cys(StBu))

[1203] ９－１．アミノアシル化ｐｄCpA化合物２０の合成

化合物２１

2-（tert—プチルジメチルシリルオキシ）酢酸シアノメチルの合成



[1204] グリコール酸（1.0g、13.15mmol）とイミダゾール（4.48g、65.7mmol）のDMF（13.15ml）溶液を0度に冷却した後に、tert_プチルジメチルクロロシラン（4.76g、31.6mmol）を加え、反応液を室温で12時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテル/水で抽出操作を行い、有機層を25wt%食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣にTHF（30mL）を加えて0度に冷却した後に、メタノール（90mL）と9.1wt%炭酸カリウム水溶液（30mL）を加え、反応液を室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、粗生成物（4.25g）得た。

粗生成物（1.53g）にアセトニトリル（6.7ml）とDMF（6.7ml）を加えて、混合物を0度に冷却した後に、ジイソプロピルエチルアミン（3.51mL、20.1mmol）と2_プロモアセトニトリル（0.93ml、13.4mmol）を加え、反応液を室温で6時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテル/水で抽出操作を行い、有機層を25wt%食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、2_（tert—プチルジメチルシリルオキシ）酢酸シアノメチル（化合物21）（556mg、52%）を得た。

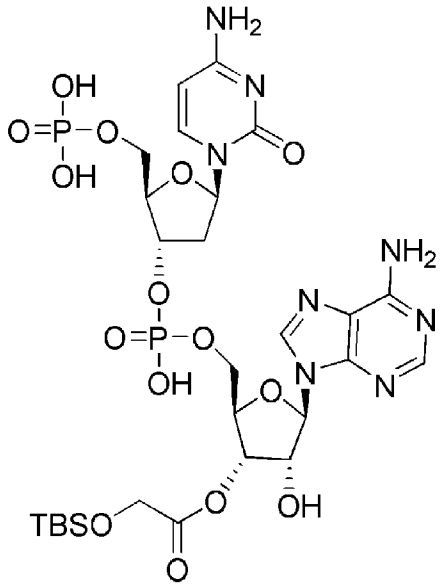
LCMS（ESI） m/z = 230 (M+H)+

保持時間：0.54分（分析条件30D六六50）

[1205] 化合物22

2-（tert_プチルジメチルシリルオキシ）酢酸（2R,3S,4R,5R)-2-（（（（2R,3S,5R）-5-（4—アミノ_2—オキソピリミジン_1(2H)_イル)_2_ホスホノオキシメチル）テトラヒド

ロフラン_３_ィルオキシ）__(ヒドロキシ)_ホスホリルオキシ）メチル）－5-（6―アミノ_９Ｈ―プリン－９－ィル）-４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イルの合成



[1206] 緩衝液Ａ（３０ｍＬ）にリン酸二水素 （(2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-（4―アミノ－2_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―ィル）_３_（（（（（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-（6―アミノ－9Ｈ―プリン－9―ィル）―3，4―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－2―ィル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_ィル）メチル (化合物ｉｈ）（１４４ｍｇ、０．２２７ｍｍｏｌ）の水溶液（1ｍｌ）と2_（ｔｅｒｔ―プチルジメチルシリルオキシ）酢酸シアノメチル (化合物２１）（１０４ｍｇ、０．４５３ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（1ｍｌ）溶液を加え、室温で2時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２_（ｔｅｒｔ-プチルジメチルシリルオキシ）酢酸 (2Ｒ，3Ｓ，４Ｒ，5Ｒ)-２-（（（（2Ｒ，３Ｓ，5Ｒ）-5-（4―アミノ－2_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―ィル）_２_（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン_３_ィルオキシ）(ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）－５―（6―アミノ－9Ｈ―プリン－9―ィル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－3―ィル (化合物２２）（１０４．

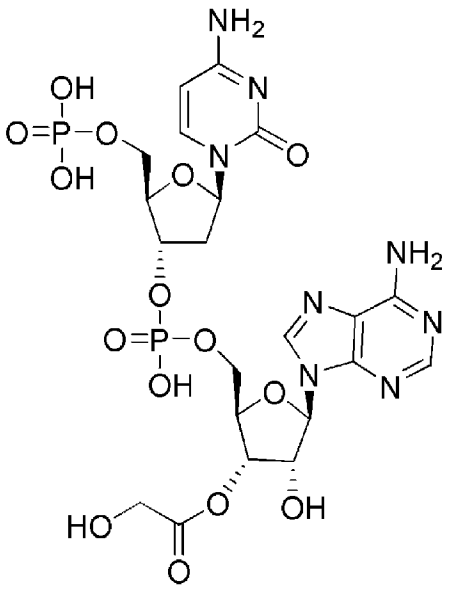
５ｍｇ、５７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ８０９．５ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５２分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1207] 化合物２０

２―ヒドロキシ酢酸 (２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－２－（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン＿３＿イルオキシ）（ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９＿イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン＿３＿イル (皿Ｇｌｙ－ｐｄＣｐＡ）の合成



[1208] ２－（ｔｅｒｔ―ブチルジメチルシリルオキシ）酢酸 (２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－２－（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン＿３＿イルオキシ）（ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (化合物２２）（７０．Ｏｍｇ、８７μｍｏｌ）のジクロロメタン (２ｍｌ）溶液に室温にてトリフルオロ酢酸 (２ｍｌ）を添加し、同温度で３０分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニ

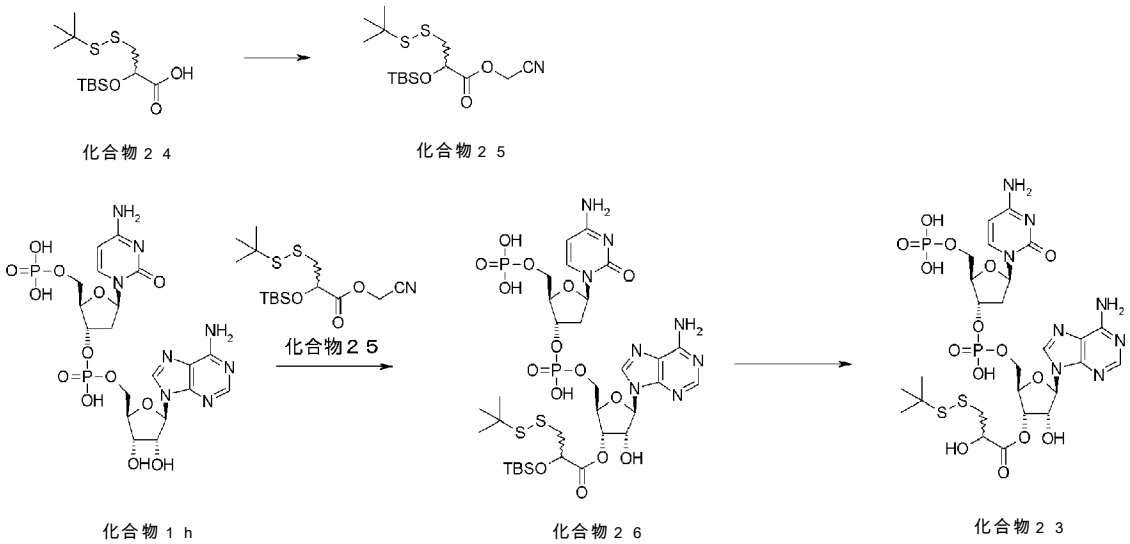
トリル溶液）にて精製し、２―ヒドロキシ酢酸　(２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－２－（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）_２_（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン_３_イルオキシ）(ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）_５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル)－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル　(H0Ｇｌｙ―ｐｄＣｐＡ）（化合物２０）（１４．Ｏｍｇ、２３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　６９５　（Ｍ＋Ｈ）＋

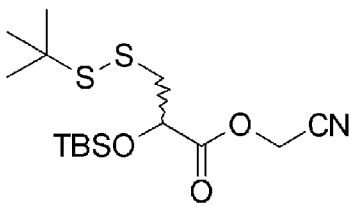
保持時間：０．２８分　(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1209] ２－２．アミノアシル化ＤｄCoA化合物２３の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。



[1210] ２－（ｔｅｒｔ_ブチルジメチルシリルオキシ）_３―（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロピオン酸シアノメチル（化合物２５）の合成



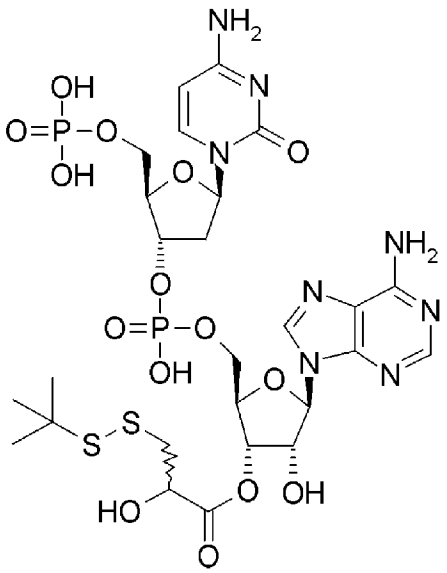
[1211] 文献既知法（Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００８，１３０，４９１９．）により調整した２―（ｔｅｒｔ_ブチルジメチルシリルオキシ）_３－（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロピオン酸（化合物２４、６０．

Ｏｍｇ、０．１８５ｍｍｏｌ）と２―ブロモアセトニトリル（２６．０μＬ、０．３７３ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１．８ｍＬ）溶液に室温にて、ジイソプロピルエチルアミン（９８．０μＬ、０．５６ｍｍｏｌ）を加え、反応液を同温度で１．５時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテルで希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、２－（ｔｅｒｔ―ブチルジメチルシリルオキシ）－３－（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロピオン酸シアノメチル（化合物２５）（４８ｍｇ、７１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３６４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８４分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[1212] ３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）－２―ヒドロキシプロピオン酸（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－２－（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン－３－イルオキシ）（ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物２３）（ｔBuSS Lac-pdCpA）の合成



[1213] 2-（ｔｅｒｔ_ブチルジメチルシリルオキシ）_３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロピオン酸シアノメチル（化合物２５）（２３．４ｍｇ、０．０６４ｍｍｏｌ）にリン酸二水素（（2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン―２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ）のテトラブチルアンモニウム塩（４８ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（６４０μｌ）溶液、トリエチルアミン（４４．８μｌ　０．３２１ｍｍｏｌ）を室温で加え、反応液を３５度で１時間攪拌した。反応混合物にギ酸（３０从１）を加え、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２_（ｔｅｒｔ―ブチルジメチルシリルオキシ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジメチルスルファニル）プロピオン酸（2Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）-イル）_２_（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン―３―イルオキシ）（ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン―９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物２６）を混合物（２９．４ｍｇ）として得た。

[1214] 得られた混合物（２９．４ｍｇ）に対し、トリフルオロ酢酸（１ｍｌ　１３．０ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で５時間攪拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液/０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）－２―ヒドロキシプロピオン酸（2Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（ホスホノオキシメチル）テトラヒドロフラン_３_イルオキシ）（ヒドロキシ）ホスホリルオキシ）メチル）-５-（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル)―４―ヒドロキシテトラヒド

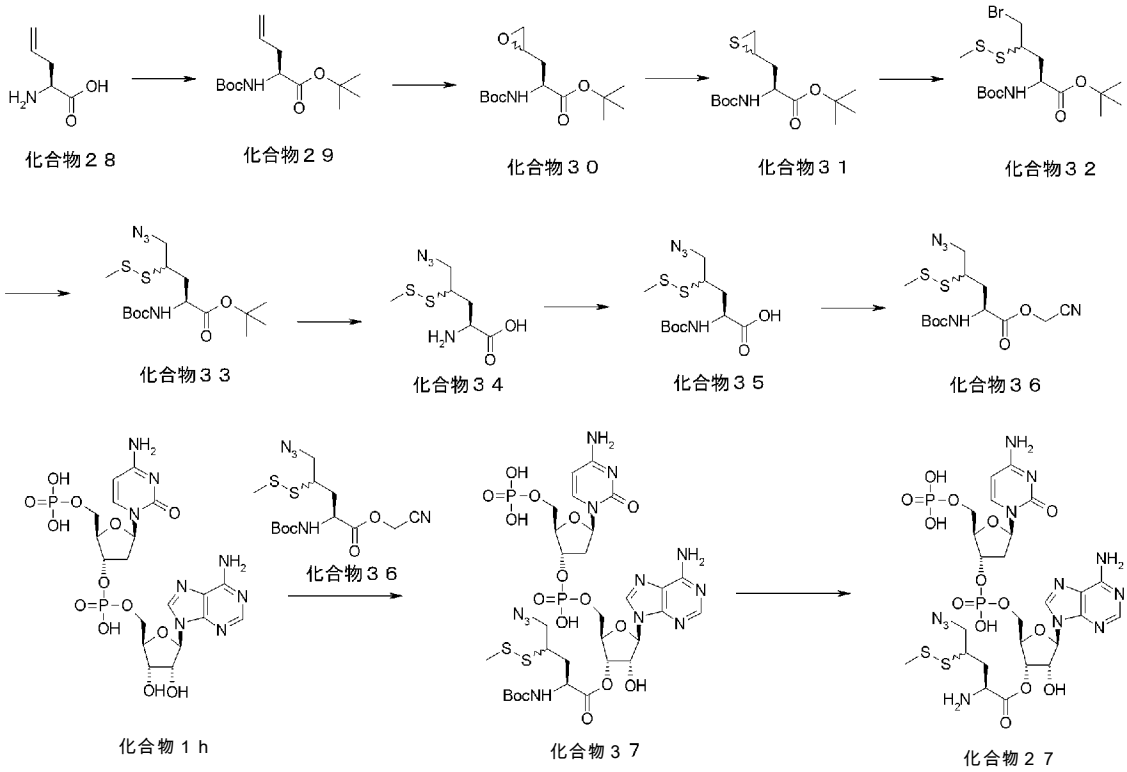
ロフラン—3 —イル (１８．Ｏｍｇ、２段階収率６８％) (化合物２３) (t BuSS Lac -pdCpA) を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ８２９ (M+ H) +

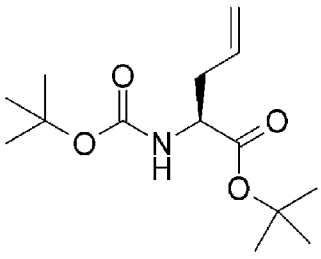
保持時間 :0．４１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1215] ２－４．アミノアシル化ｐｄCpA化合物２７の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。



[1216] (S)-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-ペンタ-4- エン酸 tert- ブチルエステル (化合物２９)_の合成



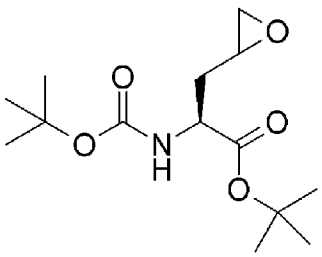
L-アリルグリシン (化合物２８) (２５．Ｏｇ、 ２１７ｍｍｏｌ) の1„４_ジオキサン (２５０ ｍｌ) / 水 (１２５ｍｌ) 懸濁液を0℃に冷却した後、二炭酸ジ-tert- ブチル (５２．１ｇ、 ２３９ｍｏｌ) および炭酸

水素ナトリウム（３６．５ｇ、４３４ｍｏｌ）を加え、反応液を室温で１２時間攪拌した。反応が完結した後、反応液を0℃に冷却し、液性がｐＨ４になるまで１Ｍ塩酸を加えた。この混合物を酢酸エチルで抽出操作を行い、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮し(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-ペンタ-4-エン酸を得た。得られた(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-ペンタ-4-エン酸をトルエン（２００ｍｌ）に溶解させ、N,N-ジメチルホルムアミドジ-tert-ブチルアセタール（１３０ｍｌ）を加え、９０℃で4時間攪拌した。更にN,N-ジメチルホルムアミドジ-tert-ブチルアセタール（２５ｍｌ）を加え９０℃で２時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-ペンタ-4-エン酸 tert-ブチルエステル（化合物２９）（３３．１６ｇ、５６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z = ２９４ (M+Na)+

保持時間：１．０５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1217] (S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-オキシラニル-プロピオン酸 tert-ブチルエステル（化さ物３０）のさ成



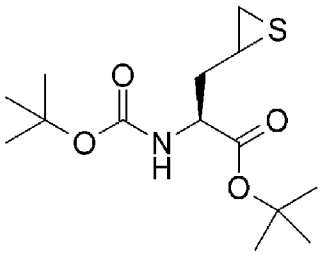
(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-ペンタ-4-エン酸 tert-ブチルエステル（化合物２９）（３２．０ｇ、１１８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（３８４ｍｌ）溶液にメタクロロ過安息香酸（４０．７ｇ、２３６ｍｍｏｌ）を加え、室温で１５時間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、炭酸水素ナトリウム（２０ｇ）水溶液（３００ｍｌ）および飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液（１００ｍｌ）を加え、反応を終了させた。混合物を酢酸エチルで抽出操作を行い、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウ

ムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10mM酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール) にて精製し、(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-オキシラニル-プロピオン酸 tert- ブチルエステル (化合物30) (18.53g、55%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 310 (M+Na)+

保持時間 :1.03分 (分析条件SQDAAO5)

[1218] (S)-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-3-チイラニル-プロピオン酸 tert- ブチルエステル (化合物31) の合成

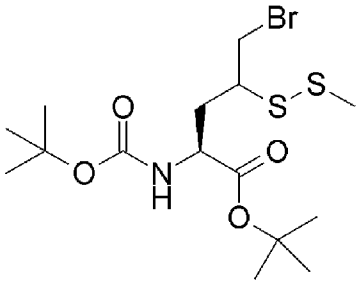


(S)-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-3-オキシラニル-プロピオン酸 tert-ブチルエステル (化合物30) (315mg、 1.096mmol) にメタノール (4ml) およびチオ尿素 (83mg、 1.096mmol) を加え、反応液を1.5時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル) にて精製し、(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-チイラニル-プロピオン酸 tert- ブチルエステル (化合物31) (278mg、84%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 326 (M+Na)+

保持時間 :0.59分 (分析条件30D六六50)

[1219] (S)-5-ブロモ-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 tert- ブチルエステル (化合物32) の合成

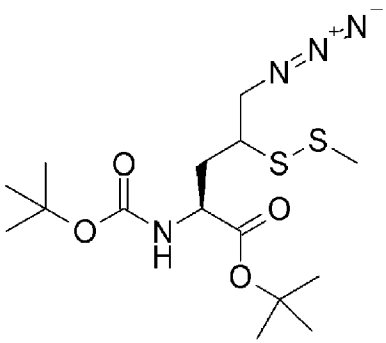


(S)-2-tert- プトキシカルボニルアミノ-3- チイラニル- プロピオン酸 tert- プチルエステル (化合物３１) (２．２８ｇ、 ７．５１ｍｍｏｌ) のジクロロメタン (３５ｍｌ) 溶液にテトラメチル尿素 (1．０６ｍし ９．０２ｍｍｏｌ) を加え、＿７８℃に冷却した。非特許文献 (Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２００１、６６、９１０- ９１４) に掲載されている手法に従い、另途調製した１．６０Ｍメタンスルフエニルプロミド １，２—ジクロロエタン溶液 (5．１７ｍｌ) を加えた。反応液を2 時間かけて攪拌しながら—78℃から0℃まで昇温させた。反応液を減圧下濃縮し、 (S)-5- プロモ-2-tert- プトキシカルボニルアミノ-4- メチルジスルファニル- ペンタン酸 tert- プチルエステル (化合物３２) を粗生成物として得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = ４３０ (M+ H) +

保持時間 :0．７４分 (分析条件３０Ｄ六六５０)

[1220] (S)-5- アジド2-tert- プトキシカルボニルアミノ-4- メチルジスルファニル- ペンタン酸 tert- プチルエステル (化合物３３) の合成



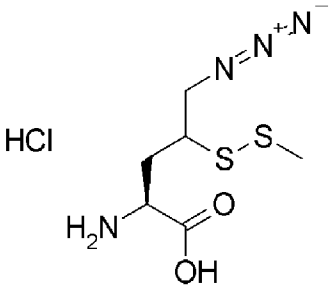
前述で得られた未精製の (S)-5- プロモ-2-tert- プトキシカルボニルアミノ-4- メチルジスルファニル- ペンタン酸 tert- プチルエステル (化合物３２) のＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド (１００ｍｌ) 溶液にアジ化ナトリウム (2．４４ｇ、 ３７．６ｍｍｏｌ) を加え、反応混合物を室温で6 時間攪拌し

た。反応終了後、不溶物をろ別し、ろ液を減圧下濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 tert-ブチルエステル（化合物３３）（１．８７ｇ、６４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４１５ （M+Ｎａ）+

保持時間 :0．８０分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[1221] (S)-2-アミノ-5-アジド4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩（化合物３４）の合成

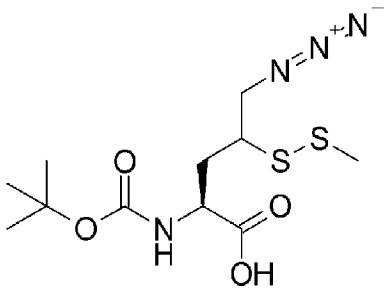


(S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 tert-ブチルエステル（化合物３３）（９２ｍｇ、 ０．２３４ｍｍｏｌ）の２，２，２―トリフルオロエタノール （0．９ｍｌ）溶液にクロロトリメチルシラン （２９７从し ２．３４４ｍｍｏｌ）を加え、室温で2時間攪拌した。更にクロロトリメチルシラン （１５０从し １．１８４ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で１２時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をヘキサン/酢酸エチル/ジクロロメタン（３：１：０．１）の混合溶媒で洗浄し、（S)-2-アミノ-5-アジド4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩（化合物３４）（５８ｍｇ、９１%）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２３７ （M+H）+

保持時間 :0．３６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1222] (S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-《ンタン酴（化合物３５）の合成

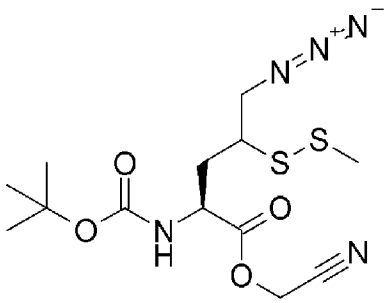


(S)-2-アミノ-5-アジド4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩 (化合物34) (70mg、 0.257mmol)の1,4—ジオキサン (0.7 ml) / 水 (0.35ml) 懸濁液に二炭酸ジ-tert-ブチル (112mg、 0.513mmol) および炭酸水素ナトリウム (54mg、0.642mmol) を加え、反応液を室温で3時間攪拌した。反応が完結した後、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10mM酢酸アンモニウム水溶液/ メタノール) にて精製し、 (S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 (化合物35) (79mg、92%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 335 (M-H)-

保持時間 :0.78分 (分析条件30D「六05)

[1223] (S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 シアノメチルエステル (化合物36) の合成



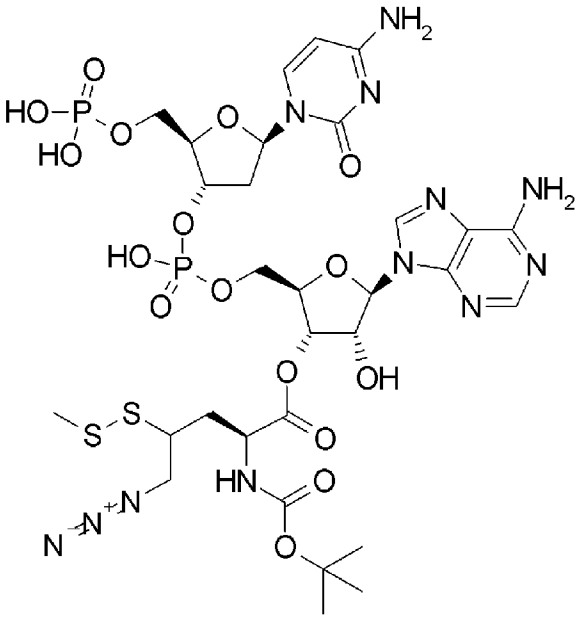
(S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 (化合物35) (75mg、 0.223mmol) のアセトニトリル (2 ml) 溶液にブロモアセトニトリル (45μl、 0.669mmol) および,N-ジイソプロピルエチルアミン (58μl、 0.334mmol) を加え、反応液を室温で5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチ

ル/ 飽和塩化アンモニゥムで抽出操作を行い、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、（S)-5-アジド2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-4- メチルジスルファニル-ペンタン酸 シアノメチルエステル (化合物３６）（８１ｍ９、９７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ３７４ (M- H) -

保持時間 :0．８７分 (分析条件３０Ｄ「六0５)

[1224] (2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(((((2R, 3S, 5R)-5-(4- アミノ-2- オキソピリミジン- 1 (2H)- イル)-2- ((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3- イル)オキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル) -5-(6- アミノ- 9H- プリン-9- イル)- 4- ヒドロキシテトラヒドロフラン- 3- イル _5- アジド2-((tert- ブトキシカルボニル)アミノ)-4- (メチルジスルファニル)ペンタノエート_ (化合物３７)_ の合成



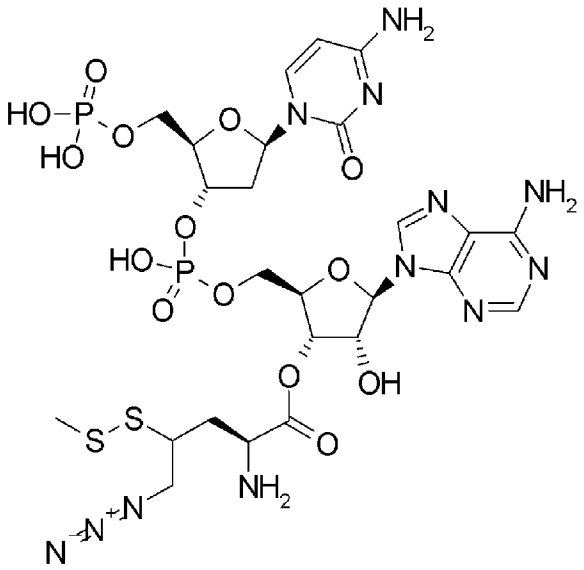
緩衝液Ａ（２９ｍＬ）にリン酸二水素 （ (2Ｒ，3Ｓ，５Ｒ) - ５- （４—アミノー２_ オキソピリミジン_ １（２Ｈ）—イル）_ ３_ （（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ) - ５- （６—アミノー９Ｈ—プリンー９—イル）ー３，４—ジヒドロキシテトラヒドロフランー２—イル）メトキシ） (ヒドロ

キシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ）（４５ｍｇ、０．０７１ｍｍｏｌ）の水溶液（１ｍｌ）と(S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸 シアノメチルエステル（化合物３６）（８０ｍｇ、０．２１３ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（１ｍｌ）溶液を加え、室温で3時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、(2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(((((2R, 3S, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル 5-アジド2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-4-(メチルジスルファニル)ペンタノエート（化合物３７）（１５ｍｇ、２２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ９５５ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５５分（分析条件３０Ｄ「六05）

[1225] 2-アミノ-5-アジド4-（メチルジスルファニル）ペンタン酸 (2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(((((2R, 3S, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル (0rn(N3)(4-SSMe)-pdCpA)（化合物２１）の合成



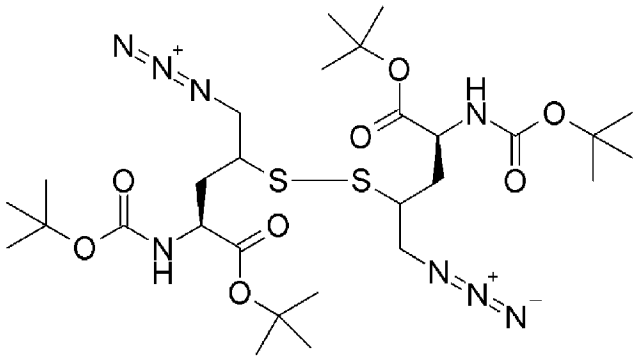
(2S) - (2R, 3S, 4R, 5R) -2- (((((2R, 3S, 5R) -5- (4- アミノ-2- オキソピリミジン - 1(2H) - イル)2- ((ホスホノオキシ)メチル)テ トラヒ ドロフラン-3- イル)オキシ) (ヒ ドロキシ)ホスホ リル)オキシ)メチル) -5- (6- アミノ- 9H- プリン-9- イル) -4- ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフラン- 3- イル 5- アジ ド2- ((tert - プ トキシカルポニル)アミノ)4- (メチルジスルファニル)ペンタノエー ト (化合物 3 7) (1 0 m g 、 1 0 . 4 7 μ m o l) に室温にて トリフルオ ロ酢酸 (0 . 2 m L) を添加 し、同温度で 2 0 分間撹拌 した。減圧濃縮後、得 られた残渣を逆相シ リカゲルカラムクロマ トグラフィー (0 . 1 % ギ酸水溶液/ 0 . 1 % ギ酸ァセ ト二 トリル溶液) にて精製 し、2- アミノ- 5- アジ ド4- (メチルジスルフ ァニル)ペンタン酸 (2S) - (2R, 3S, 4R, 5R) -2- (((((2R, 3S, 5R) -5- (4- アミノ-2- オキソピリミジン- 1(2H) - イル)2- ((ホスホノオキシ)メチル)テ トラヒ ドロフラン- 3- イル)オキシ) (ヒ ドロキシ)ホスホ リル)オキシ)メチル)5- (6- アミノ- 9H- プリン-9- イル)4- ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフラン- 3- イル (0 r n (N3) (4-SSMe) -pdCpA) (化合物 2 7) (2 m g 、 2 6 %) を得た。

L C M S (E S I) m/ z = 8 5 5 (M + H) +

保持時間 :0 . 3 2 分 (分析条件 3 0 D 「六0 5)

[1226] 2 - 5 . アミノアシル化 D d CoA化合物 4 3 の合成

(2S , 2' S) - ジ- tert - プチル 4, 4' - ジスルファンジィルビス (5- アジ ド2- ((tert - ブ トキシカルポニル)アミノ)ペンタノエー ト) (化合物 3 8) の合成

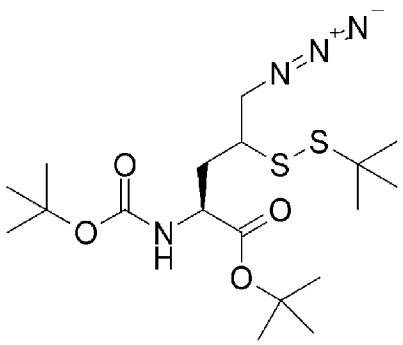


前述した(S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチルジスルファニル-ペンタン酸tert-ブチルエステル(化合物33)の合成において、副生成物として、(2S,2'S)-ジ-tert-ブチル4,4'-ジスルファンジイルビス(5-アジド2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタノエート)(化合物38)(414mg)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 691.7 (M+H)+

保持時間:0.80分(分析条件SQDAA50)

[1227] (S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸tert-ブチルエステル(化合物39)の合成



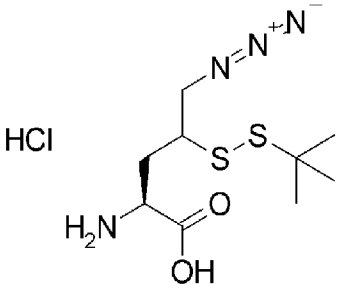
(2S,2'S)-ジ-tert-ブチル4,4'-ジスルファンジイルビス(5-アジド2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタノエート)(化合物38)(312mg、0.452mmol)にジ-tert-ブチルジスルフィド(5.67mL、29.4mmol)およびヨウ素(57mg、0.226mmol)を加え、60度で18時間攪拌した。反応液を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、(S)-5-アジド2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸tert-ブチル

エステル（化合物３９）（１６１ｍｇ、８１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝４３５．５　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７７分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[1228] (S)-2-アミノ-5-アジド-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩（化合物４０）の合成

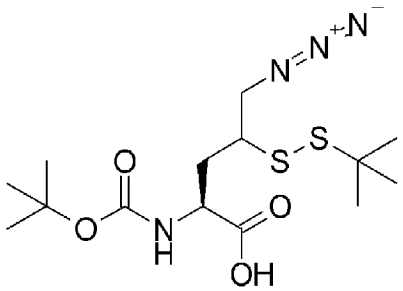


(S)-5-アジド-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 tert-ブチルエステル（化合物３９）（１６０ｍｇ、０．３６８ｍｍｏｌ）の２，２，２―トリフルオロエタノール（３．２ｍｌ）溶液にクロロトリメチルシラン（４６７μＬ、２．３４４ｍｍｏｌ）を加え、室温で２時間攪拌した。更にクロロトリメチルシラン（４６７μＬ、２．３４４ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で３時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をヘキサン/酢酸エチル/ジクロロメタン（３：１：０．１）の混合溶媒で洗浄し、(S)-2-アミノ-5-アジド-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩（化合物４０）（１１３ｍｇ、９７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝２７９　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1229] (S)-5-アジド-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸（化合物４０ａ）の合成

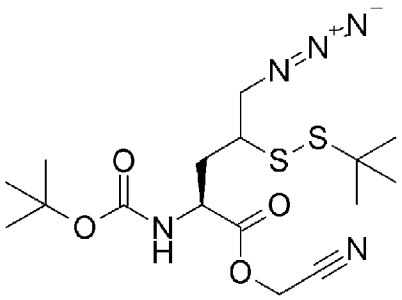


(S)-2-アミノ-5-アジド-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 塩酸塩（化合物40）（110mg、 0.349mmol）の1,4-ジオキサン (1 ml) / 水 (0.5ml) 溶液に二炭酸ジ-tert-ブチル (152mg、 0.699mmol) および炭酸水素ナトリウム (73mg、0.873mmol) を加え、反応液を室温で1.5時間攪拌した。更に二炭酸ジ-tert-ブチル (152mg、 0.699mmol) および炭酸水素ナトリウム (73mg、0.873mmol) を加え、反応液を室温で2時間攪拌した。反応が完結した後、反応液を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン/ メタノール）にて精製し、(S)-5-アジド-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 (化合物40a) （120mg、91%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 377 (M-H)-

保持時間 :0.89分 (分析条件30D「六05)

[1230] (S)-5-アジド-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 シアノメチルエステル (化合物41) の合成



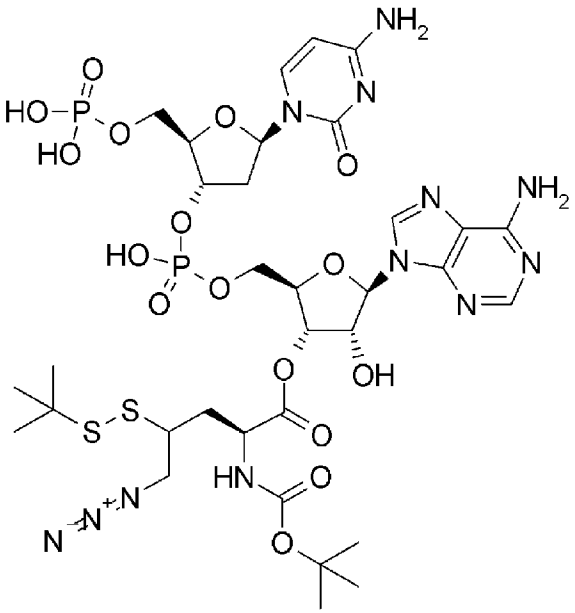
(S)-5-アジド-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-tert-ブチルジスルファニル-ペンタン酸 (化合物40a) （115mg、 0.304mmol）のアセトニトリル (1 ml) 溶液にブロモアセトニトリル (62μl、 0.911mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (79μl、 0.456mmol) を加え、反応液を室温で2時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル/ 飽和塩化アンモニウムで抽出操作を行い、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン

/ 酢酸エチル）にて精製し、（S)-5-アジド-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-4-tert- ブチルジスルファニル-ペンタン酸 シアノメチルエステル (化合物４１）（１２０ｍｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４１６ （Ｍ- Ｈ）-

保持時間 :0．９７分 (分析条件３０Ｄ「六05)

[1231] (2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(((((2R, 3S, 5R)-5-(4- アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-2- ((ホスホノオキシ)メチル)テ トラヒ ドロフラン-3- イル)オキシ)(ヒ ドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6- アミノ-9H-プリン-9- イル)-4- ヒ ドロキシテ トラヒ ドロフラン-3- イル 5- アジ ド-2-((tert- ブトキシカルボニル)アミノ)-4-(tert- ブチルジスルファニル)ペンタノエート (化合物４２）の合成



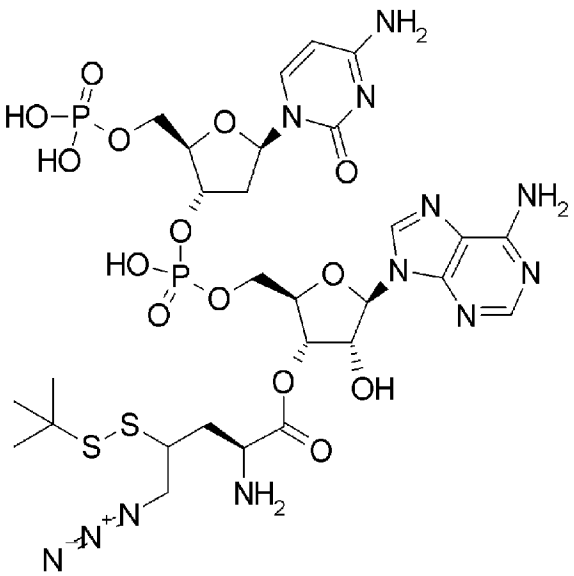
緩衝液Ａ（２９ｍＬ）にリン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- ５- （４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿３＿（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- ５- （６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）―3 ，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ） (ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン＿２＿イル）メチル (化合物１ｈ）（５６ｍｇ、０．０８８ｍｍｏｌ）の水溶液 (１ｍｌ）と（S)-5-アジド-2-tert- ブトキシカルボニルアミノ-4-tert- ブチルジスルファニル-ペ

ンタン酸 シァノメチルエステル (化合物４１) (１１０ｍｇ、０．２６３ｍｍｏｌ) のテトラヒドロフラン (1ｍｌ) 溶液を加え、室温で3時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％ トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％ トリフルオロ酢酸ァセトニトリル溶液) にて精製し、(2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 5R)-5-(4-ァミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-ィル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-ィル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-ァミノ-9H-プリン-9-ィル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-ィル 5-アジド-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-4-(tert-ブチルジスルファニル)ペンタノエートの粗精製物 (化合物４２) (５５ｍｇ) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ｚ = ９９７ (M+H)+

保持時間 :0．６４分 (分析条件３０Ｄ「六05)

[1232] 2-ァミノ-5-アジド-4-(tert-ブチルジスルファニル)ペンタン酸 (2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-ィル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-ィル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-ァミノ-9H-プリン-9-ィル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-ィル (0rn(N3)(4-SStBu)-DdCDA) (化合物４３) の合成



前述した(2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 5R)-5-(4-ァミノ-2-オキソピ

リミジン-1(2H)-イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル 5-アジド-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-4-(tert-ブチルジスルファニル)ペンタノエート(化合物４２）の粗精製物 (５３ｍｇ）にジクロロメタン (２ｍｌ）を加えて懸濁させ、室温にてトリフルオロ酢酸 (０．５ｍＬ）を添加し、同温度で３０分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2-アミノ-5-アジド-4-(tert-ブチルジスルファニル)ペンタン酸 (2S)-(2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル (0rn(N3) (4-SStBu)-pdCpA) (化合物４３）（２４ｍｇ、２ステップ ３１％）を得た。

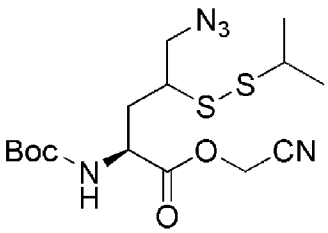
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ８９７ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :０．４１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1233] ２－６．アミノアシル化ＤｄCoA化合物４７の合成

以下に述べる手法により、化合物３６のSHの保護基を１工程にて変更でき、容易にｐｄCpA誘導体を合成する手法を確立した。

[1234] ５＿アジド＿２＿(ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニルアミノ)＿４＿(イソプロピルジスルファニル)ペンタン酸＿(２Ｓ)＿シアノメチル (化合物４５）の合成



５＿アジド＿２＿(ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニルアミノ)＿４＿(メチ

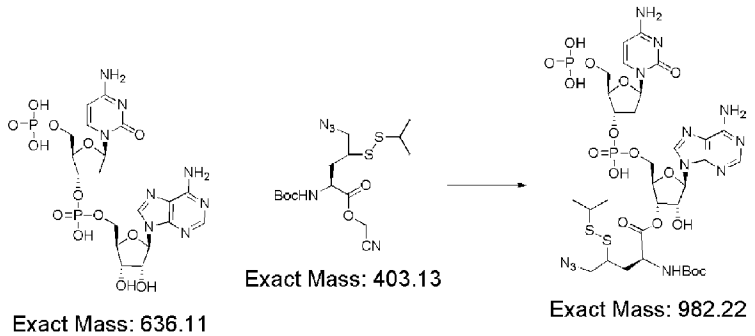
ルジスルファニル）ペンタン酸　(2S)_シアノメチル (化合物36)（110mg、0.293mmol）にジイソプロピルジスルフイド (4.67mし 29.3mmol）および ヨウ素 (30mg、0.117mmol）を加え、60度で24時間攪拌した。反応液を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、5_アジド_2_（tert—ブトキシカルボニルアミノ）_4_（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸　(2S)_シアノメチル (化合物45)（89mg、75%）を得た。

LCMS（ESI）　m/z = 402　(M-H)-

保持時間 :0.61分 (分析条件SQDAA50)

[1235] 化合物46

5_アジド_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_4_(イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ_2—オキソピリミジン-1_(2H)_—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ)メチル)_5—(6—アミノー9H—プリン—9—イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イルの合成



緩衝液A（12mL）にリン酸二水素　((2R，3S，5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_3_（（（（（2R，3S，4R，5R)-5-（6—アミノー9H—プリンー9—イル）—3，4—ジヒドロキシテトラヒドロフランー2—イル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_2_イル）メチル (化

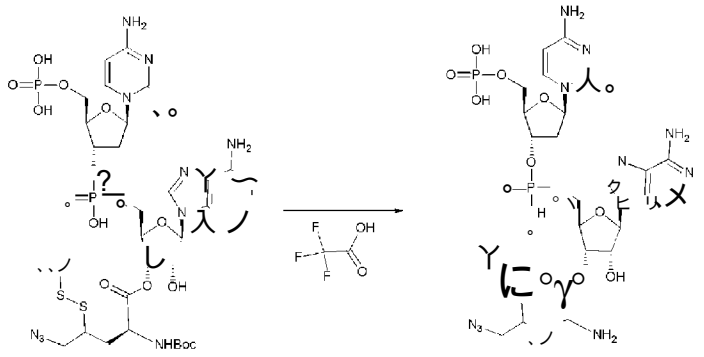
合物１ｈ、４３．６ｍｇ、０．０６９ｍｍｏｌ）の水溶液（０．３ｍＬ）と５＿ァジド＿２＿（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）ァミノ）＿４＿（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸（２Ｓ）—シァノメチル（化合物４５）（８３ｍｇ、０．２０６ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（０．２ｍＬ）溶液を加え、室温で５５分間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液／０．０５％トリフルオロ酢酸ァセトニトリル溶液）にて精製し、５＿アジド＿２＿（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）ァミノ）＿４＿（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸（２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４—ァミノ－２＿オキソピリミジン-１（２Ｈ）—ィル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿ィル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）-５-（６—ァミノ－９Ｈ—プリン－９—ィル）－４—ヒドロキシテトラヒドロフラン—３—ィル（化合物４６）（２７．７ｍｇ、４１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝９８１．６（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．５８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1236] 化合物４７

２—ァミノ－５＿アジド＿４＿＿（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸＿＿（２Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４—ァミノ－２＿オキソピリミジン＿１＿（２Ｈ）＿—ィル）＿２-（（ホスホノオキシ）＿メチル）テトラヒドロフラン＿３＿ィル）オキシ）＿（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）＿メチル）＿５＿＿（６—ァミノ＿９Ｈ＿プリン＿９＿ィル）＿＿４—ヒドロキシテトラヒドロフラン－３—ィル（Orn(N3) (4-SS_iPr)-pdCpA）の合成



Exact Mass: 982.22 Exact Mass: 882.1 7

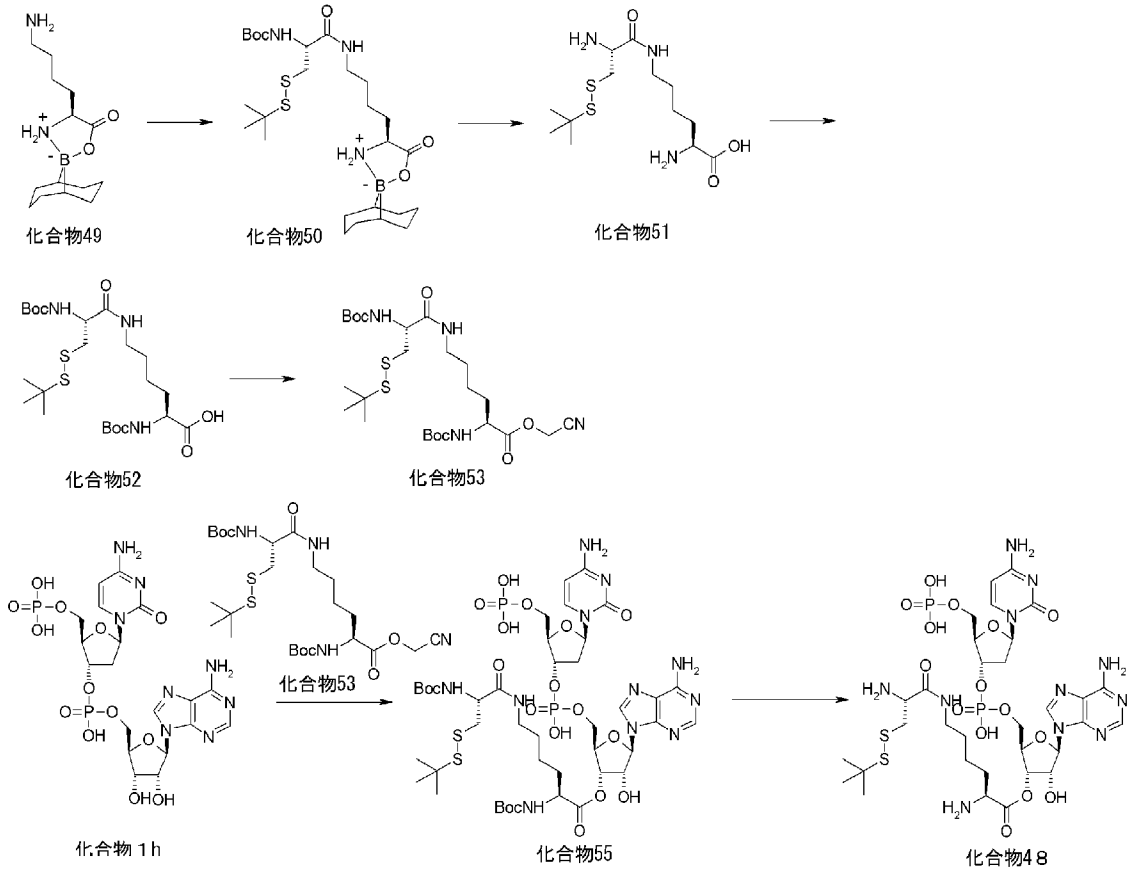
5_アジド－2_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_４_（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸 (2Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ_２―オキソピリミジン-１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物４６）（２７．７ｍｇ、２８μｍｏｌ）のジクロロメタン（0．４ｍＬ）溶液にトリフルオロ酢酸 (0．１ｍＬ）を添加し、室温で３５分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２_アミノ－５―アジド－４―（イソプロピルジスルファニル）ペンタン酸 (2Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（0rn(N3) (4-SS iPr)-pdCpA) (化合物４７）（２１．５ｍｇ、８６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝８８１．４ (M-H)-

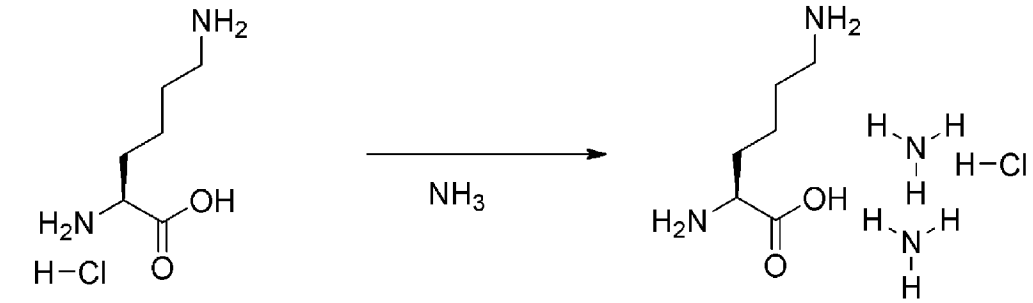
保持時間：0．３９分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1237] ２-５．アミノアシル化_Ｄ ｄ CoA化合物４８ (Us(Cvs(StBu))-DdCDA) の合成

以下のスキームに従い合成を行った。



[1238] （Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサン酸，ジアンモニア塩　塩酸塩（化合物５６）の合成

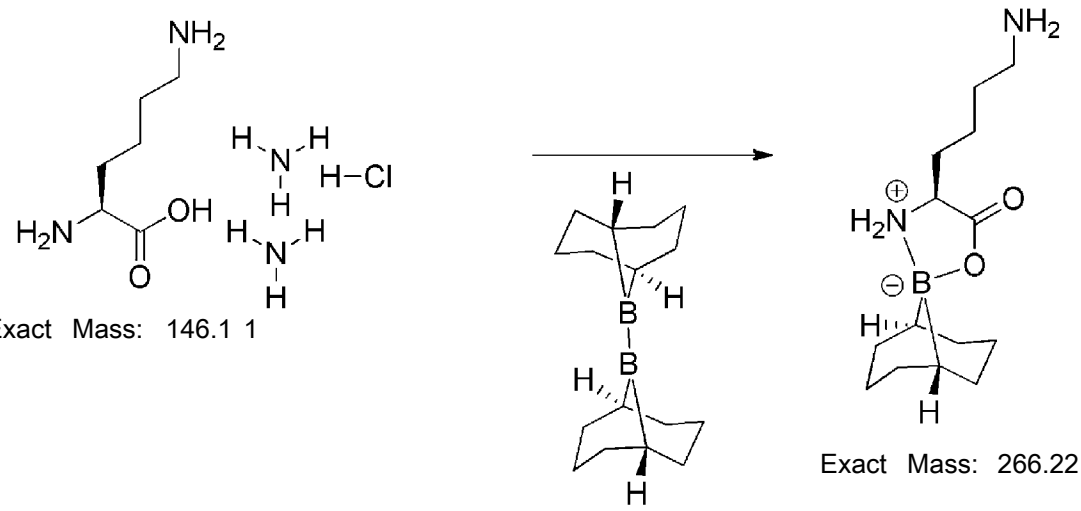


Exact Mass: 146.11 Exact Mass: 146.11

Ｌ（＋）－リジン一塩酸塩（３．０８ｇ、１６．８６ｍｍｏｌ）を氷浴で冷却後、アンモニア水（１５ｍＬ）を添加した。反応液を同温度で２５分間撹拌後、減圧濃縮して得た粗生成物（３．２０ｇ）をそのまま次工程に用いた。

[1239] （１Ｒ，４'Ｓ．５Ｓ）－４'－（４－アミノブチル）－５'－オキソスピロ－「ビシクロ［３．－３．－１１ノナン－９，２'－［１，３，２］オキサザボロリジ

ン'l _ 3 ' —ィゥム— 1_1 —ウイ ド_(化合物４９)_の合成



Exact Mass: 146.1 1

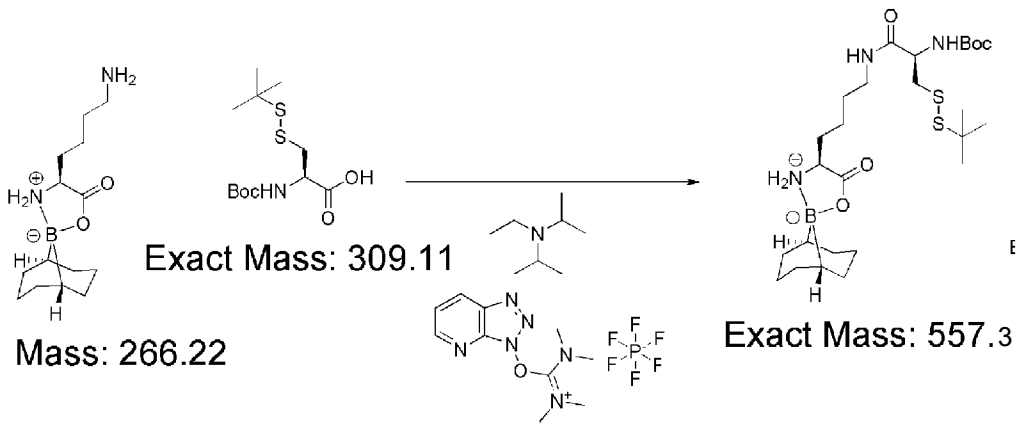
Exact Mass: 266.22

窒素雰囲気下、 (S) - 2, 6—ジァミノヘキサン酸, ジアンモニア塩塩酸塩 (化合物５６) (3. 20g、14. 77mmol) 及び9_BBNダイマー (4. 11g、16. 98mmol) のメタノール (40mL) 懸濁液を1時間加熱還流した。室温に冷却後、溶媒を減圧留去して得た粗生成物をそのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI) m/z = 265 (M- H) -

保持時間 :0. 43分 (分析条件30D「六05)

[1240] (1R. 4'S, 5S) _4'_ (4- ((R) - 2- ((tert—プトキシカルボニル)アミノ)_3_ (tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)プチル)_5'—ォキソスピロ_「ビシクロ_「3. 3. 1'l ノナン— 9. 2'_ _「1, 3, 2'l ォキサザポロリジン'l _3'_ィゥム_1_1_ウイド_(化さ物５０)_のさ成



Exact Mass: 309.11

Exact Mass: 266.22

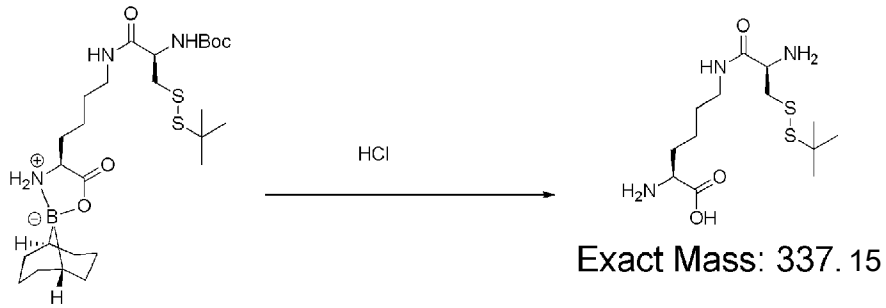
Exact Mass: 557.3

窒素雰囲気下、（1Ｒ，4'Ｓ，5Ｓ）―4'―（4―アミノブチル）―5'―オキソスピロ［ビシクロ［3．3．1］ノナン－9，2'-［1，3，2］オキサザボロリジン］―3'_ィゥム_11―ゥイド（化合物49）（3．73g、14mmol）及びBoc_Cys（StBu）-OH（4．33g、14mmol）のDMF（10mL）懸濁液に室温で撹拌しながら、N，N_ジィソプロピルェチルァミン（3．66mL、21mmol）を添加した。得られた混合物にHATU（5．86g、15．4mmol）を添加後、室温にて1日間撹拌した。反応混合物に飽和食塩水を添加し、酢酸エチルにて抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン/酢酸エチル）にて精製し、（1Ｒ，4'Ｓ，5Ｓ）_4'_（4-（（Ｒ）-2-（（tert―プトキシカルボニル）ァミノ）_3_（tert_プチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）_5'―オキソスピロ［ビシクロ［3．3．1］ノナン－9，2'―［1，3，2］オキサザボロリジン］－3'_ィゥム_11―ゥイド（化合物50）（7．34g、94％）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 558．5 （M+H）+

保持時間：0．98分（分析条件30D「六05）

[1241] （Ｓ）―2－アミノ－6―（（Ｒ）―2－アミノ－3―（tert-プチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸（Lys(Cys(StBu)）（化合物51）の合成



Exact Mass: 557.3

Exact Mass: 337.15

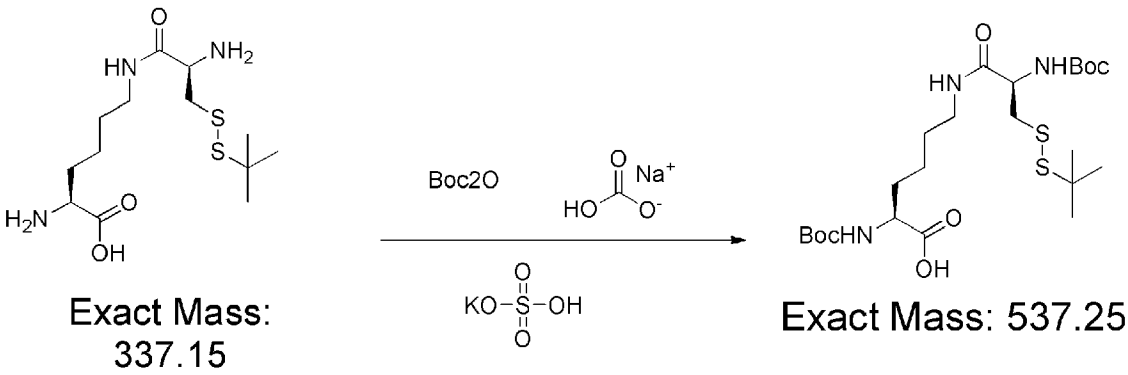
（1Ｒ，4'Ｓ，5Ｓ）_4,―（4_（（Ｒ）_2_（（tert―プトキシカルボニル）ァミノ）_3―（tert―プチルジスルファニル）プロ

パンアミド)プチル)_5'—オキソスピロ[ビシクロ[3．3．1]ノナン—9，2'-[1，3，2]オキサザボロリジン]—3'—イウム—11—ウィド(化合物50)(715．8mg、1．28mmol)の1，4—ジオキサン(3mL)溶液に室温にて濃塩酸(1．1mL)を添加し、得られた反応混合物を40℃で13時間15分間撹拌した。室温に冷却後、減圧濃縮して得られた粗生成物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(10mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール)にて精製し、(S)_2—アミノ-6-((R)_2—アミノー3_(tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸(Lys(Cys(StBu)))(化合物51)(394．1mg、91%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 336 (M-H)-

保持時間:0．67分(分析条件SQDAAO5)

[1242] (S)-2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_6_((R)_2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸(化合物52)の合成



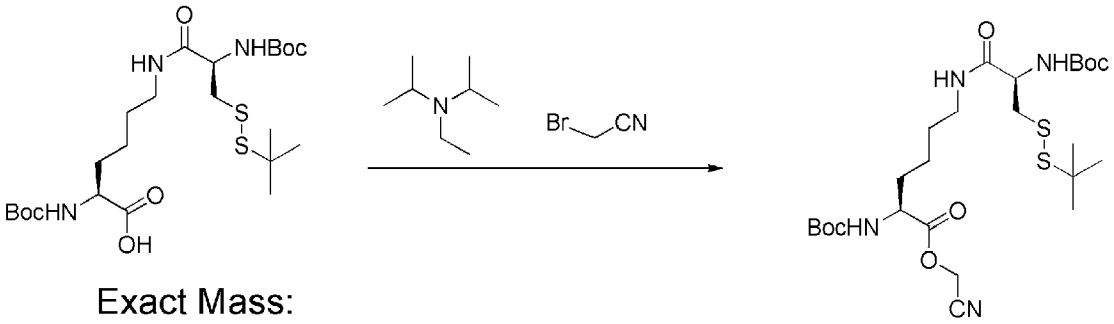
(S)_2—アミノー6_((R)_2—アミノー3_(tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸(Lys(Cys(StBu)))(化合物51)(390mg、1．16mmol)の1，4_ジオキサン(5ml)及び水(6mL)混合物を氷浴にて冷却し、炭酸水素ナトリウム(388mg、4．62mmol)、続いてBoc_2O(807mg、3．70mmol)を添加した。反応混合物を室温で3時間撹拌した。氷浴にて冷却後、硫酸水素カリウム(157mg、1．16mmol)及び飽和硫酸水素カリウ

ム水溶液（1mL）を添加して、pH2に調整した。得られた混合物を酢酸エチルにて抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）にて精製し、（S）-2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）-6-（（R）-2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）—3—（tert—ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸（化合物52）（579.5mg、93%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 536 （M-H）-

保持時間：0.86分（分析条件30D「六05）

[1243] 2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_6_（（R）-2-（（tert_ブトキシカルボニル）アミノ）_3_（tert—ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸_（S）—シアノメチル（化合物53）の合成



Exact Mass: 537.25

Exact Mass: 576.27

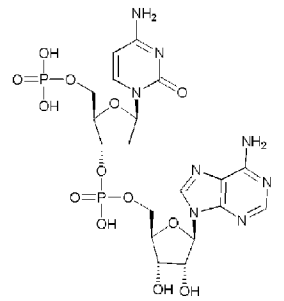
窒素雰囲気下室温にて、（S）-2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_6_（（R）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_3_（tert_ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸（化合物52）（206mg、0.383mmol）のアセトニトリル（0.3mL）溶液にN，N—ジイソプロピルエチルアミン（0.073mL、0.421mmol）、続いてブロモアセトニトリル（0.080mL、1.15mmol）を添加した。反応混合物を同温度にて5時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、2_（（tert—ブトキシカルボニ

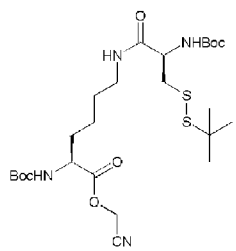
ル）アミノ）_６_（（Ｒ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸　(Ｓ）―シアノメチル　(化合物５３）（１７２．２ｍｇ、７８％）を得た。

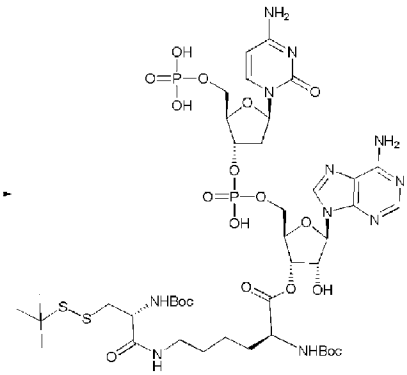
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　５７７．６　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９２分　(分析条件３０Ｄ「六０５）

[1244] 2－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（Ｒ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸＿(２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ_２―オキソピリミジン－１_（２Ｈ）_―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）_テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）_(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）_－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　(化さ物５５）のさ成







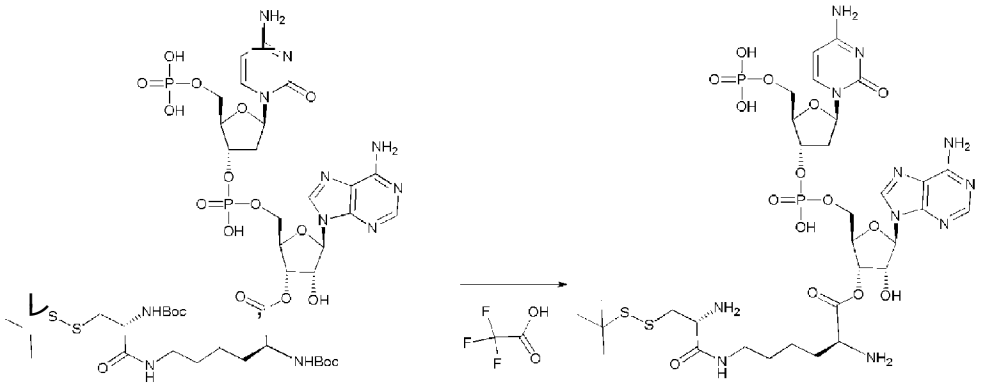
緩衝液Ａ（１１ｍＬ）にリン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６_アミノ－９Ｈ_プリン－９_イル）―３，４_ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２_イル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル　(化合物１ｈ）（３７．９ｍｇ、０．０６０ｍｍｏｌ）の水溶液　(０．３ｍＬ）と２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（Ｒ）－２－

（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド)ヘキサン酸　(Ｓ)―シアノメチル　(化合物５３)（１０３ｍｇ、０．１７９ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン　(０．３ｍＬ）溶液を加え、室温で２時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー　(０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（Ｒ）-２-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパンアミド)ヘキサン酸　(２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ_２―オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（(ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　(化合物５５）（１２ｍｇ、１７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ　＝　１１５６．７　(Ｍ+Ｈ）+

保持時間　:０．６３分　(分析条件３０Ｄ「六０５）

[1245] ２―アミノ－６―_(_(Ｒ)_―２―アミノ－３―_(ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド)ヘキサン酸__(２Ｓ)-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_(２Ｈ)_―イル）_２_(（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）オキシ）_(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）_メチル）－５―_(６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）_－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　(Lys(Cys(StBu)_)-pdCpA)　(化合物４８)_の合成



Exact Mass: 1155.35

Exact Mass: 955.25

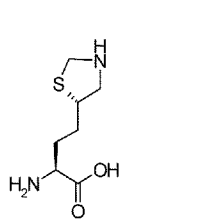
2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_6_((R)-2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_3_(tert—ブチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ—2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)—5—(6—アミノ—9H—プリン—9—イル)—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物55) (12mg、10.38μmol)のジクロロメタン (0.4mL)溶液に室温にてトリフルオロ酢酸 (0.1mL)を添加し、同温度で15分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、2_アミノ—6—((R)—2_アミノ—3—(tert-ブチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ_2—オキソピリミジン—1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)—5—(6—アミノ—9H_プリン—9—イル)—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Lys(Cys(StBu))-pdCpA) (化合物48) (9.3mg、94%)を得た。

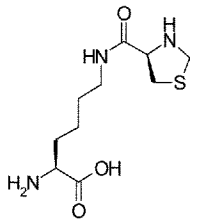
LCMS (ESI) m/z = 956 (M+H)+

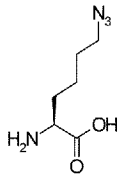
保持時間 :0．２９分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

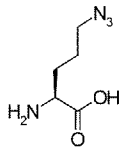
[1246] １０．保護基を有するアミン部位の合成 (その２)

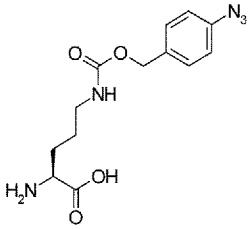
翻訳合成可能であり、かつRNAに安定な反応条件にて脱保護できる保護基の探索、およびアミノ酸ユニットとの組み合わせ例を以下に示す。また、以下に示すように、本明細書中に使用する各アミノ酸の略称も化合物番号と共に示した。これらの略称はペプチド内に含有されても、あるいはpdCpAなどのRNAやDNAに含有されても同じユニットが含まれるものとする。また、例えばH-Gly-OHなどの場合、N末端もしくはC末端が化学修飾されてない場合には、HやOH基の記載を省略して単にGlyなどとすることもある。

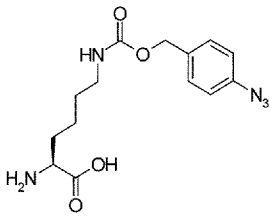

Ala(Tzm)
化合物tk100

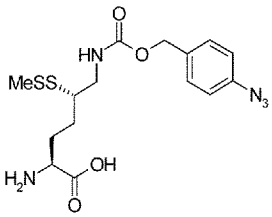

Lys(Thz)
化合物tk101

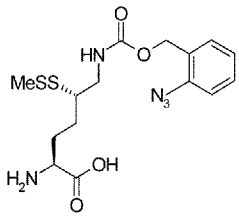

Lys(N3)
化合物tk102

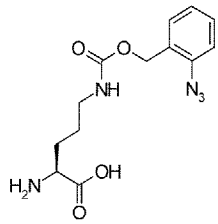

Orn(N3)
化合物tk103

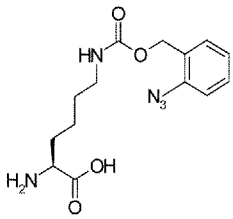

Orn (Acbz)
化合物tk104

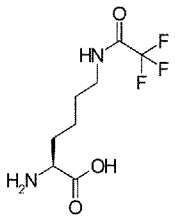

Lys (Acbz)
化合物tk34

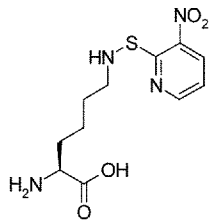

Lys (5S —SSMe) (Acbz)
化合物tk7


Lys (5S-SSMe) (oAcbz)
化合物tk14

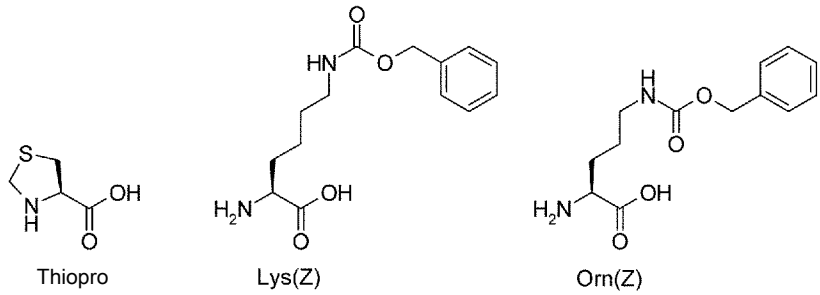

Orn (oAbcz)
化合物tk1 05


Lys (oAcbz)
化合物tk1 06


Lys (Tfa)
化合物tk1 07


Lys (Npys)
化合物tk1 08

また、翻訳合成可能なアミノ酸として、本明細書中に使用する各アミノ酸の略称を以下の様に定義する。

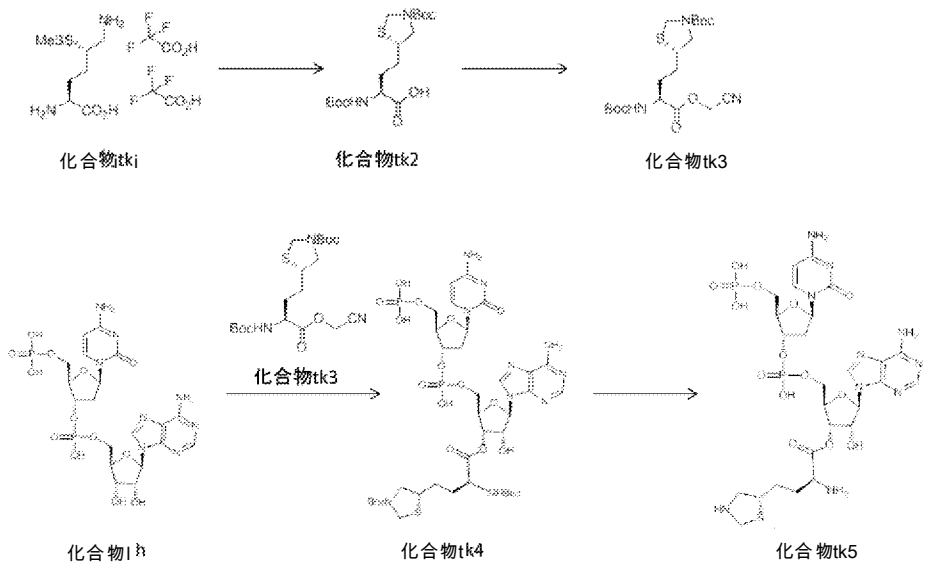


[1247] １０－１．DdCDA—側鎖アミノ基が保護されたアミノ酸の合成

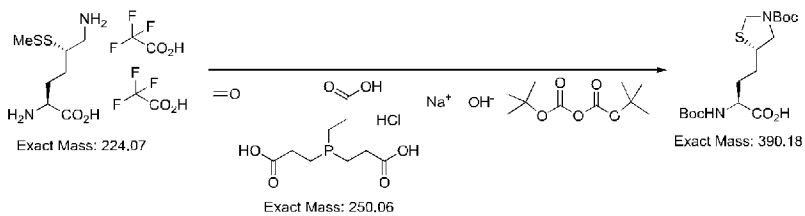
１０－１－１．保護基を有するアミン部位の探索：アミノアシル化ＤｄＣｐＡ化合物ｔｋ５の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム1



[1248] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－４－（（Ｓ）－３－（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）チアゾリジン—５_ィル）ブタン酸（化合物ｔｋ２）の合成



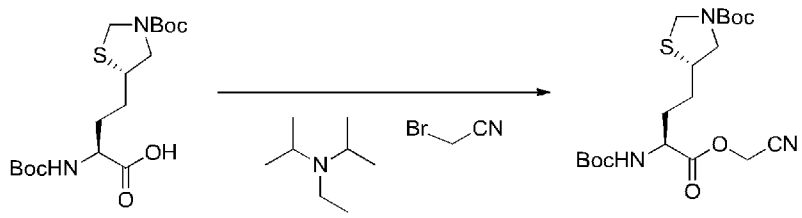
[1249] 文献記載（J．Ａm．Ｃｈｅm．Ｓｏｃ．２０１１，１３３，１０７０８．）の方法で合成した（１Ｓ，４Ｓ）－１—カルボキシ—４_（メチルスル

フイノチオイル）ペンタン_１，５―ジアミニゥム　２，２，２―トリフルオロ酢酸塩（化合物ｔｋ１）（２７３．４ｍｇ、０．６０４ｍｍｏｌ）を室温で２Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（２．１ｍＬ）に溶解後、トリス（２_カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（１８２ｍｇ、０．６３５ｍｍｏｌ）を添加した。同温度で１５分間撹拌後、３７％ホルマリン水溶液（０．９ｍＬ）を添加した。同温度で１．５時間撹拌後、２Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（０．１５ｍＬ）及びBoc_2O（５２８ｍｇ、２．４１７ｍｍｏｌ）の１，４―ジオキサン（２ｍＬ）溶液を添加した。反応混合物を同温度で１７．５時間撹拌後、Boc_2O（２５０ｍｇ）を添加した。６．５時間撹拌後、酢酸エチルで希釈した混合物を氷浴で冷却し、飽和硫酸水素カリウム水溶液（０．８ｍＬ）を添加した。酢酸エチルで抽出し（２回）、有機相を飽和食塩水（４ｍＬ）で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）―４-（（Ｓ）-３-（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）チアゾリジン―５_イル）ブタン酸（化合物ｔｋ２）（１３１．７ｍｇ、５６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝３８９（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．８３分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1250] ５-（（Ｓ）-３-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_４_（シアノメトキシ）_４_オキソブチル）チアゾリジン―３_カルボン酸___（Ｓ）-ｔｅｒｔ―ブチル（化合物ｔｋ３）の合成



Exact Mass: 390.18　　Exact Mass: 429.19

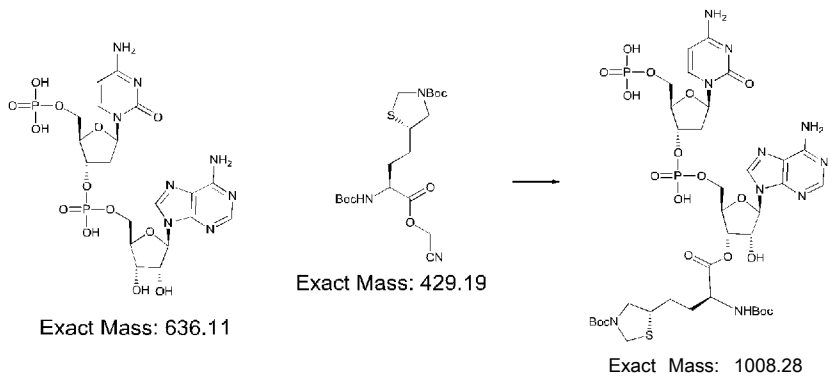
[1251] 窒素雰囲気下、（Ｓ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）-４-（（Ｓ）-３-（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）チアゾリジン―５_イル）ブタン酸（化合物ｔｋ２）（９８ｍｇ、０．２５１ｍｍｏｌ）の

ァセトニトリル (0．５ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルァミン (４８从1、０．２７６ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル（８８μＬ、１．２５５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて３時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、５_（（Ｓ）-３-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）ァミノ）－４—（シァノメトキシ）－４—オキソプチル）チアゾリジン—３_カルボン酸 (S)-ｔｅｒｔ—プチル (化合物ｔｋ３）（９４．Ｏｍｇ、８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ４２８．１ (M-H)-

保持時間 :０．８５分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1252] ５-（（３Ｓ）-４-（（（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４—アミノー２_ォキソピリミジン_１（２Ｈ）—ィル）_２_（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）_５_（６-アミノー９Ｈ—プリン－９—ィル）－４—ヒドロキシテトラヒドロフラン－３_ィル）ォキシ）_３_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－４_ォキソプチル）チアゾリジン—３_カルボン酸 (５Ｓ)-ｔｅｒｔ-プチル (化合物ｔｋ４）の合成



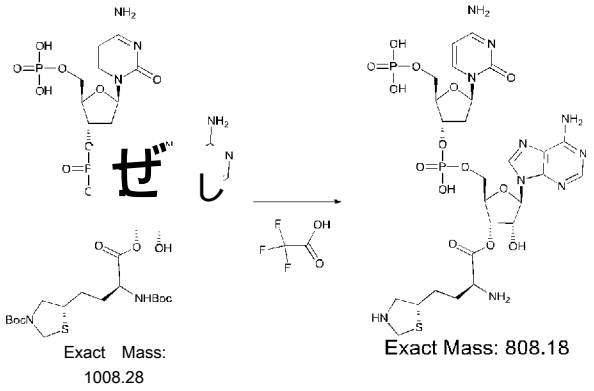
[1253] 緩衝液Ａ（１２．５ｍＬ）にリン酸二水素 ((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４—アミノー２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）—ィル）_３_（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６—アミノ_９Ｈ_プリンー９—ィル）－３，４—ジヒドロキシテトラヒドロフランー２—ィル）メトキシ）（

ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_2_イル）メチル（化合物1h）（44.Omg、0.069mmol）と5_（（S）-3-（（tert—プトキシカルボニル）アミノ）_4_（シアノメトキシ）_4_オキソプチル）チアゾリジン—3_カルボン酸 (S)-tert-プチル (化合物tk3）（89mg、0.207mmol）のアセトニトリル（0.3mL）溶液を加え、室温で1.25時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、5_（（3S）-4-（（（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン-1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン—3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）—5-（6—アミノー9H—プリン—9—イル）—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）_3_（（tert—プトキシカルボニル）アミノ）_4_オキソプチル）チアゾリジン—3_カルボン酸 (5S)-tert-プチル (化合物tk4）（17.4mg、25%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 1007.7 (M-H)-

保持時間：0.54分 (分析条件30D「六05）

[1254] 2—アミノー4_（（S）—チアゾリジン—5_イル）ブタン酸 (2S)-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ_9H—プリン—9_イル）_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル （ALa(Tzm)-pdCpA) (化合物tk5）の合成



5-（（3S）-4-（（（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン—3—イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノー9H—プリン—9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）_3_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）_4_オキソブチル）チアゾリジン—3_カルボン酸 (5S)-tert—ブチル (化合物tk4)（8.5mg、8.43从mol）のジクロロメタン (0.2mL）溶液に、10%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（0.16mL）を添加し、室温で1.25時間撹拌した。減圧濃縮後、2—アミノー4—（（S）—チアゾリジン—5—イル）ブタン酸 (2S)-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ_9H—プリン—9—イル）_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル （ALa(Tzm)-pdCpA）(化合物tk5)（10.6mg、quant.）を得た。

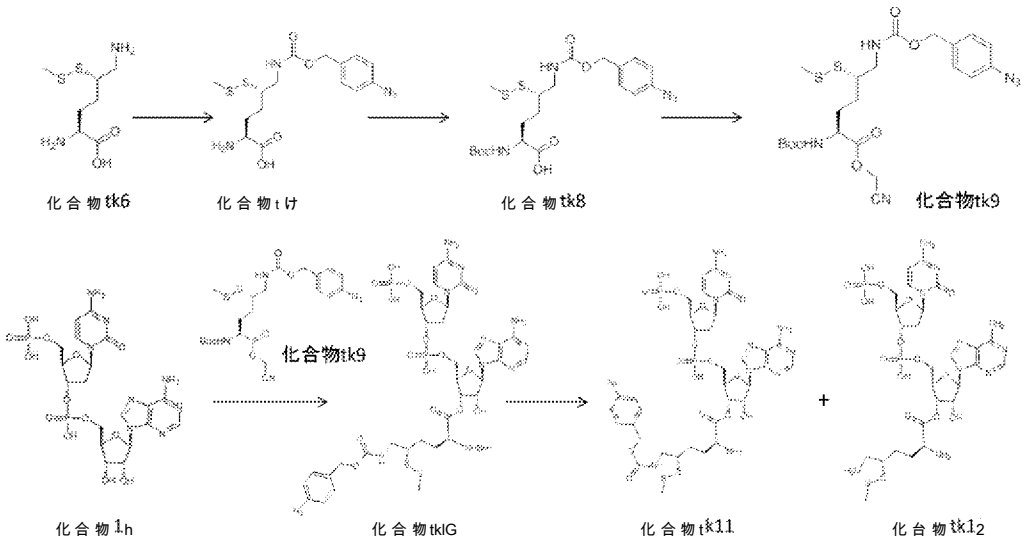
LCMS（ESI） m/z = 807.5 (M-H)-

保持時間 :0.14分 (分析条件SQDFA05)

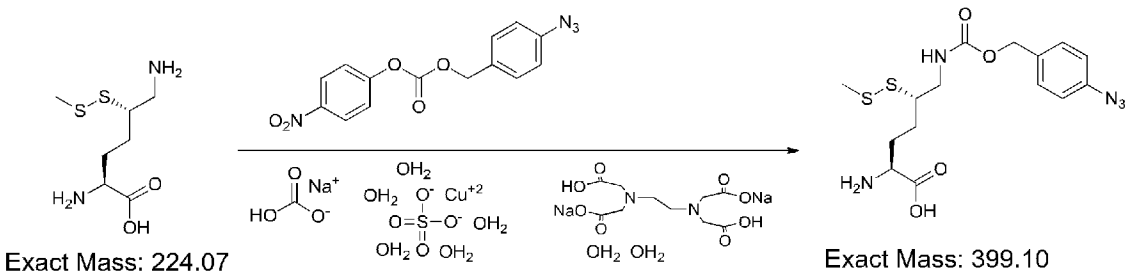
[1255] 10-1-2. アミノアシル化pdCpA化合物tk12の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム2



[1256] (2S,5S)_2—アミノー6_((((4_アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)-5-(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (Lys(5S-SSMe)(Acbz)) (化合物tk7)の合成



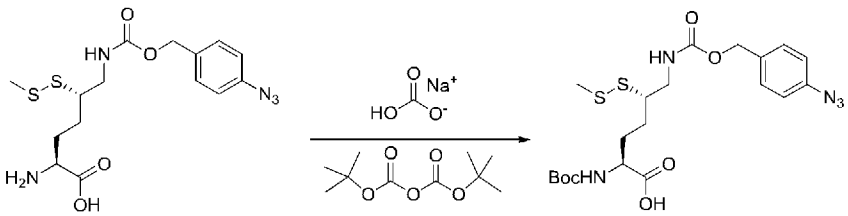
[1257] (2S,5S)-2,6—ジアミノー5_(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (化合物tk6) (176mg、0.785mol)と炭酸水素ナトリウム (659mg、7.85mmol)の水 (1.2mL)溶液に、室温で硫酸銅五水和物 (100mg、0.4mmol)の水 (0.3mL)溶液を添加し、続いて文献記載 (Bioconjugate Chem.2008,19,714.)の方法で合成した炭酸 (4—ニトロフエニル)4—アジドベンジル (296mg、0.941mmol)のアセトン (2.7mL)溶液を添加した。同温度で25.75時間撹拌後、反応混合物をろ過し、水でろ紙上の固体を洗浄した。ろ取した固体を水 (10mL)—メタノール (1mL)に懸濁し、室温でエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム (

３５０ｍｇ、０．９４１ｍｍｏｌ）を添加した。同温度で７．７５時間撹拌後、反応混合物をろ過し、ろ紙上の白色固体を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製し、（２Ｓ，５Ｓ）_２―アミノ－６_（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（Lys(5 S-SSMe) (Acbz)）（化合物ｔｋ７）（５０．２ｍｇ、１６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝３９８　（M－Ｈ）－

保持時間：０．８５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1258] （２Ｓ，５Ｓ）－６－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（化さ物ｔｋ８）のさ成



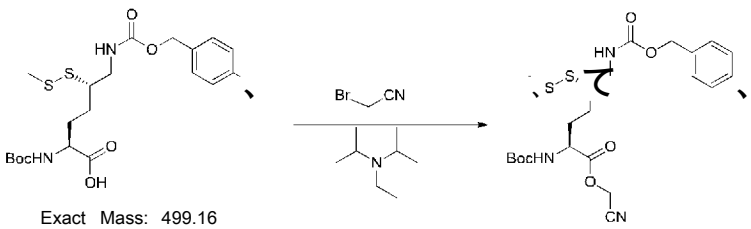
Exact Mass: 399.10　　Exact Mass: 499.16

[1259] （２Ｓ，５Ｓ）_２―アミノ－６_（（（（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（Lys(5 S-SSMe) (Acbz)）（化合物ｔｋ７）（７０ｍｇ、０．１７５ｍｍ$_0$ 1）の１，４_ジオキサン（２ｍＬ）―アセトニトリル（１ｍＬ）溶液に、室温で炭酸水素ナトリウム（４４．２ｍｇ、０．５２６ｍｍｏｌ）、水（１ｍＬ）及び$Boc_2$0（１１５ｍｇ、０．５２６ｍｍｏｌ）を添加した。同温度で２２．５時間撹拌後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた粗生成物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製し、（２Ｓ，５Ｓ）－６－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（化合物ｔｋ８）（７１．６ｍｇ、８２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４９８．４　（M－Ｈ）－

保持時間 :0．９１分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[1260] 6- ((((4 —アジ ドベンジル) オキシ) カルボニル) アミノ)_ 2 _ _(_(t e r t —プ トキシカルボニル) アミノ)_ 5 _ _(メチルジスルファニル) ヘキサン酸 ___ (2 S , _5 S) _ _ シアノメチル (化合物ｔｋ９)_の合成



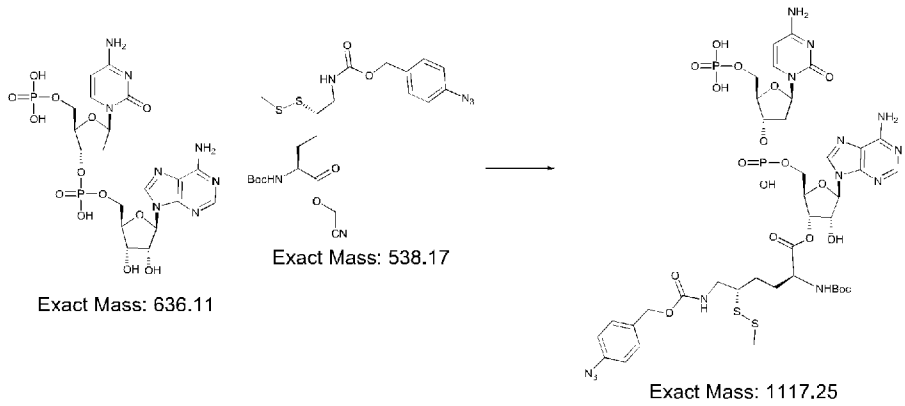
[1261] 窒素雰囲気下、 (2 S ，5 S) - 6- ((((4 _ アジ ドベンジル) オキシ) カルボニル) アミノ)_ 2 _ ((t e r t —プ トキシカルボニル) アミノ)_ 5 _ (メチルジスルファニル) ヘキサン酸 (化合物ｔｋ８) (１３２ｍｇ、０．２６４ｍｍｏｌ) のアセ トニ トリル (0．４ｍＬ) 溶液に、室温でＮ ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン (5 1μし、０．２９１ｍｍｏｌ) 、続いてプロモアセ トニ トリル (9 2 从1 、１．３２１ｍｍｏｌ) を添加した。反応混合物を同温度にて４．５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマ トグラフィー (ヘキサン/ 酢酸ェチル) にて精製し、６_ ((((４ —アジ ドベンジル) オキシ) カルボニル) アミノ)_ ２_ ((t e r t —プ トキシカルボニル) アミノ)_ ５_ (メチルジスルファニル) ヘキサン酸 (2 S ，5 S) _ シアノメチル (化合物ｔｋ９) (１２７．３ｍｇ、８９％) を得た。

ＬＣＭＳ (ＥＳＩ) m/ z = ５３７．６ (M- H) -

保持時間 :0．９１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1262] 6- ((((4 —アジ ドベンジル) オキシ) カルボニル) アミノ)_ 2 _ _(_(t e r t —プ トキシカルボニル) アミノ)_ 5 _ _(メチルジスルファニル) _ヘキサン酸 ___ (2 S , 5 S) - (2 R , 3 S , 4 R , 5 R) - 2- (((_((_(2 R , 3 S , 5 R) - 5- (4 —アミノー2 _ オキソピリミジン_ 1 _(2 H) _—イル) _ 2 _ _((ホスホノォキシ) メチル) テ トラヒ ドロフラン - 3 - イル) _オキシ) _ 1ヒ ドロキシ) _ホスホ 1ル) オキシ) メチル) - 5 -

(６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル)－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物ｔｋ１０)_の合成



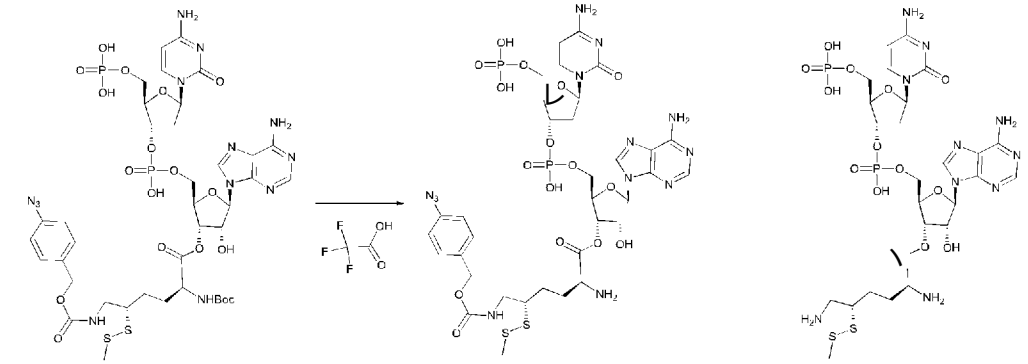
[1263] 緩衝液Ａ（１３ｍＬ）にリン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)_３_(((((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-５-(６_アミノ－９Ｈ_プリン－９_イル)―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル)メトキシ) (ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_２_イル)メチル (化合物１ｈ)（４９．２ｍｇ、０．０７７ｍｍｏｌ）と６―(((((４―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_２_((ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)_５_(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (２Ｓ，５Ｓ)―シアノメチル (化合物ｔｋ９)（１２５ｍｇ、０．２３２ｍｍｏｌ）のアセトニトリル (０．５ｍＬ)溶液を加え、室温で２時間撹拌した。アセトニトリル (０．５ｍＬ)を添加して１．２５時間撹拌後、アセトニトリル (０．５ｍＬ)を添加した。更に１．２５時間撹拌後、アセトニトリル (０．５ｍＬ)を添加して、１．５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、６-(((((４―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_２_((ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)_５_(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (２Ｓ，５Ｓ)-(２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)―２―(((((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１

（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_３―イル（化合物ｔｋ１０）（１４．Ｏｍｇ、１６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１１１６．７（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．６２分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1264] ２―アミノ―６_（_（_（_（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（２Ｓ，５Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ_２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）_―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ_プリン―９―イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（Lys(5S-SSMe)(Acbz)-pdCPA）（化合物ｔｋ１１）及び２，６―ジアミノ―５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（２Ｓ，５Ｓ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ―２_オキソピリミジン―１_（２Ｈ）_―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５－（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３_イル（Lys(5S-SSMe)-pdCpA．化合物ｔｋ１２）の合成



Exact Mass: 1117.25　　Exact Mass: 1017.20　　Exact Mass: 842.16

[1265] ６―（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－２―

（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　(2Ｓ，5Ｓ)-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ）-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-5-（4—アミノ－2_オキソピリミジン－1（2Ｈ）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5-（6—アミノ－9Ｈ—プリン－9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル（化合物ｔｋ10）（14．Ｏｍｇ、0．013ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（0．2ｍＬ）溶液に、10％トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（0．24ｍＬ）を添加し、室温で30分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．05％トリフルオロ酢酸水溶液/0．05％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2—アミノ—6_（（（（4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_5_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　(2Ｓ，5Ｓ)-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ）-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-5-（4—アミノ－2_オキソピリミジン_1（2Ｈ）—イル）－2-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ－9Ｈ—プリン－9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル（Lys(5S-SSMe)(Acbz)-pdCpA)（化合物ｔｋ11）（3．2ｍｇ、25％）及び2，6—ジアミノ－5—（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　(2Ｓ，5Ｓ)-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ）-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-5-（4—アミノ－2_オキソピリミジン_1（2Ｈ）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ－9Ｈ—プリン_9_イル）_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル（Lys(5S-SSMe)-pdCpA)（化合物ｔｋ12）（1．5ｍｇ、14％）を得た。

[1266] 2—アミノ－6_（（（（4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_5_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　(2Ｓ，5Ｓ)-（2Ｒ

，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ＿２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Lys(5S-SSMe) (Acbz)-pdCpA)（化合物ｔｋ１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１０１６．５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．４５分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1267] ２，６―ジアミノ－５＿（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（２Ｓ，５Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ―プリン＿９＿イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Lys(5S-SSMe)-pdCpA)（化合物ｔｋ１２）

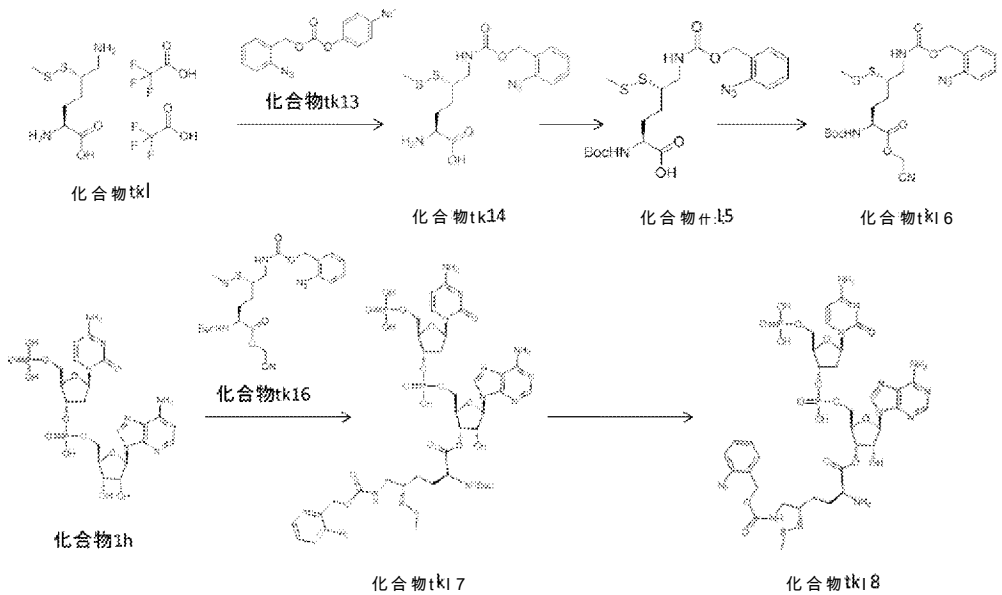
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝８４１．４（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．２０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

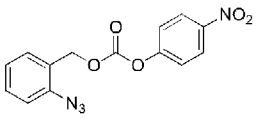
[1268] １０－１―３．ー＿アミノアシル化ＤｄＣＤＡ化合物ｔｋ１８の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム3



[1269] 炭酸___(4—ニトロフエニル)___2_アジドベンジル (化合物tk13)_の合成



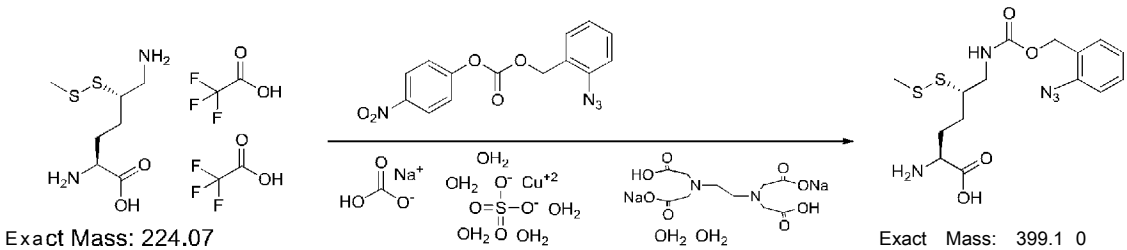
Exact Mass: 314.07

[1270] 文献記載 (Bioconjugate Chem. 2008, 19, 714.)の方法と同様に (2_アジドフエニル)メタノール及びクロロギ酸 4—ニトロフエニルから合成した。

LCMS (ESI) m/z = 138 ($H0C_6H_4N0_2$- H)-

保持時間 :1.03分 (分析条件SQDAA05)

[1271] (2S, 5S)_2—アミノー6_ _((((2—アジドベンジル)オキシ)_カルボニル)_アミノ)_5_ _(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (Lys(5S--SSMeKoAcbzH (化合物tk14)の合成



Exact Mass: 224.07

Exact Mass: 399.1 0

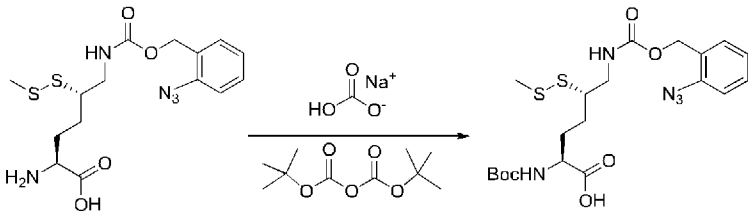
[1272] 文献記載 (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10708.)の方法で合成した (1S, 4S)-1—カルボキシ—4_ (メチルスルフイノチオイル)ペンタン_1, 5—ジアミニウム 2, 2, 2—トリフルオロ酢酸塩 (化合物tk1) (226mg、0.50mmol)と炭酸水素ナトリウム (420mg、5.OOmmol)の水 (1.2mL)溶液に、室温で硫酸銅五水和物 (63.6mg、0.255mmol)の水 (0.3mL)溶液を添加し、続いて炭酸 (4—ニトロフエニル) 2_アジドベンジル (化合物tk13) (188mg、0.599mmol)のアセトニトリル (6mL)溶液を添加した。同温度で49時間撹拌後、反応混合物をろ過し、水でろ紙上の固体を洗浄した。ろ取した固体を水 (10mL)—メタノール (1mL)に懸濁し、室温でエチレンジアミン四酢酸二水素二ナト

リウム（２２３ｍｇ、０．５９９ｍｍｏｌ）を添加した。同温度で１７．２５時間撹拌後、反応混合物をろ過し、ろ紙上の白色固体を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製し、（(２Ｓ，５Ｓ）―２―アミノ－６―（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（Lys(5S-SSMe) (oAcbz)）（化合物ｔｋ１４）（３０．２ｍｇ、１５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝３９８（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８５分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1273] （２Ｓ．５Ｓ）－６－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（化合物ｔｋ１５）の合成



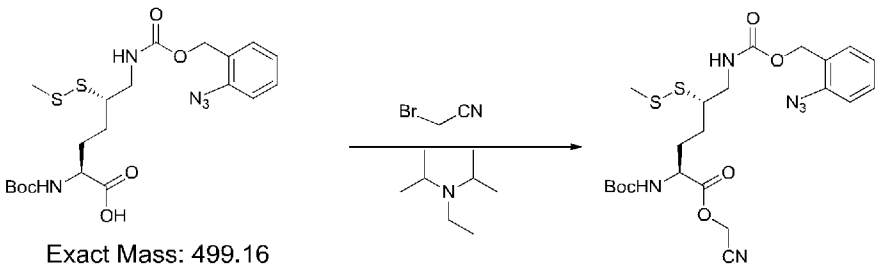
[1274] （（２Ｓ，５Ｓ）_２―アミノ－６_（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（Lys(5S-SSMe) (oAcbz)）（化合物ｔｋ１４）（７８ｍｇ、０．１９５ｍｍｏｌ）及び炭酸水素ナトリウム（６５．６ｍｇ、０．７８１ｍｍｏｌ）の混合物に、室温で水（１ｍＬ）及びBoc_2O（１７０ｍｇ、０．７８１ｍｍｏｌ）の１，４_ジオキサン（１ｍＬ）溶液を添加した。同温度で１２．５時間撹拌後、氷浴で冷却し、酢酸エチル及び水で希釈した混合物に硫酸水素カリウム（１１５ｍｇ）水溶液を添加した。酢酸エチルにて抽出し（２回）、有機相を食塩水（１ｍＬで２回）にて洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮後、得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（２Ｓ，５Ｓ）－６－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシ

カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（化合物ｔｋ１５）（９０．３ｍｇ、９３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝４９８（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．９０分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1275] 6－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　（２Ｓ，５Ｓ）_シアノメチル（化合物ｔｋ１６）の合成



Exact Mass: 499.16

Exact Mass: 538.17

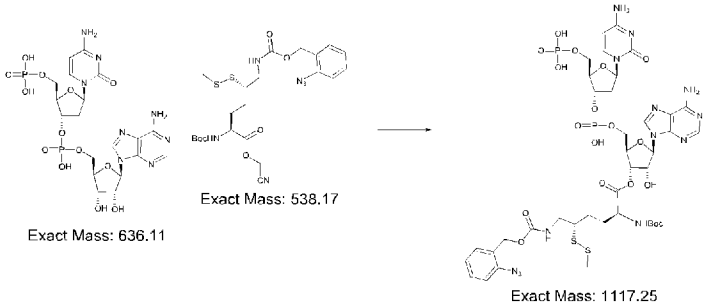
[1276] 窒素雰囲気下、（２Ｓ，５Ｓ）－６－（（（（２_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（化合物ｔｋ１５）（８９．５ｍｇ、０．１７９ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．３ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ―ジイソプロピルエチルアミン（３４μＬ、０．１９７ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル（６２从Ｌ、０．８９６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて１．２５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、６_（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸　（２Ｓ，５Ｓ）―シアノメチル（化合物ｔｋ１６）（７７．５ｍｇ、８０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝５３９．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．９２分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1277] 6－（（（（２_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－５－（メチルジスルファニル

)_ヘキサン酸___(2S,_5S)-_(2R,_3S,_4R,_5R)-_2-_((_(_((_(2R,_3S,_5R)-_5-_(4―アミノー2_オキソピリミジン_1_(2H)―イル)_2_(ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)_(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6―アミノー9H―プリンー9―イル)ー4―ヒドロキシテトラヒドロフラン_3―イル (化合物tk17)の合成



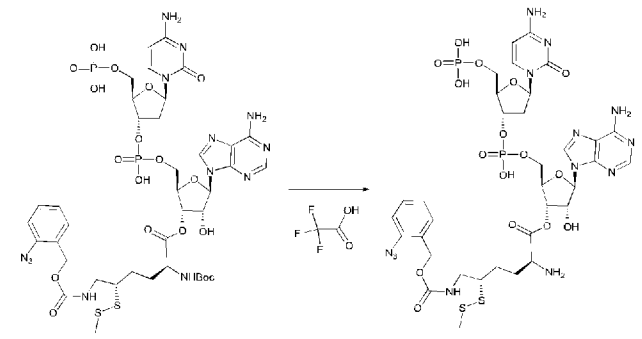
[1278] 緩衝液A(8mL)にリン酸二水素 ((2R,3S,5R)-5-(4―アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)―イル)_3_(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6―アミノー9H―プリンー9―イル)ー3,4―ジヒドロキシテトラヒドロフランー2―イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_2_イル)メチル (化合物1h)(30.3mg、0.048mmol)と6―(((((2―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_2_((tert―ブトキシカルボニル)アミノ)_5_(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (2S,5S)―シアノメチル (化合物tk16)(77mg、0.143mmol)のアセトニトリル (0.7mL)溶液を加え、室温で40分間撹拌した。アセトニトリル (3mL)を添加して55分間撹拌した。更にアセトニトリル (2mL)を添加して、5時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、6_(((((2―アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_2_((tert―ブトキシカルボニル)アミノ)_5_(メチルジスルファニル)ヘキサン酸 (2S,5S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((((

２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６－アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ１７）（２．８ｍｇ、５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１１１６．２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．６５分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1279] ２―アミノ－６＿＿（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿５＿＿（メチルジスルファニル）ヘキサン酸＿＿（２Ｓ，５Ｓ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４－アミノ＿２＿オキソピリミジン＿１＿（２Ｈ）＿イル）＿２＿＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）＿（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿＿（６―アミノ＿９Ｈ＿プリン－９―イル）＿＿４＿＿ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル＿（Ｌｖｓ．Ｌ５Ｓ-ＳＳＭｅＫ_ｏＡｃｂｚ）－ｐｄＣｐＡ）（化さ物ｔｋ１８）のさ成



Exact Mass: 1117.25 Exact Mass: 1017.20

[1280] ６－（（（（２＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿５＿（メチルジスルファニル）ヘキサン酸（２Ｓ，５Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロ

フラン―3―イル (化合物ｔｋ１７）（２．８ｍｇ、２．５０４μｍｏｌ）のジクロロメタン（０．１ｍＬ）溶液に、１０％トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（０．１ｍＬ）を添加し、室温で６０分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２―アミノ―６_（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_５_（メチルジスルファニル）ヘキサン酸 (2Ｓ，5Ｓ)-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-（4―アミノ―2_オキソピリミジン_1（2Ｈ）―イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９_イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（Lys(5S-SSMe) (oAcbz)-pdCpA) （化合物ｔｋ１８）（１．４ｍｇ、５５％）を得た。

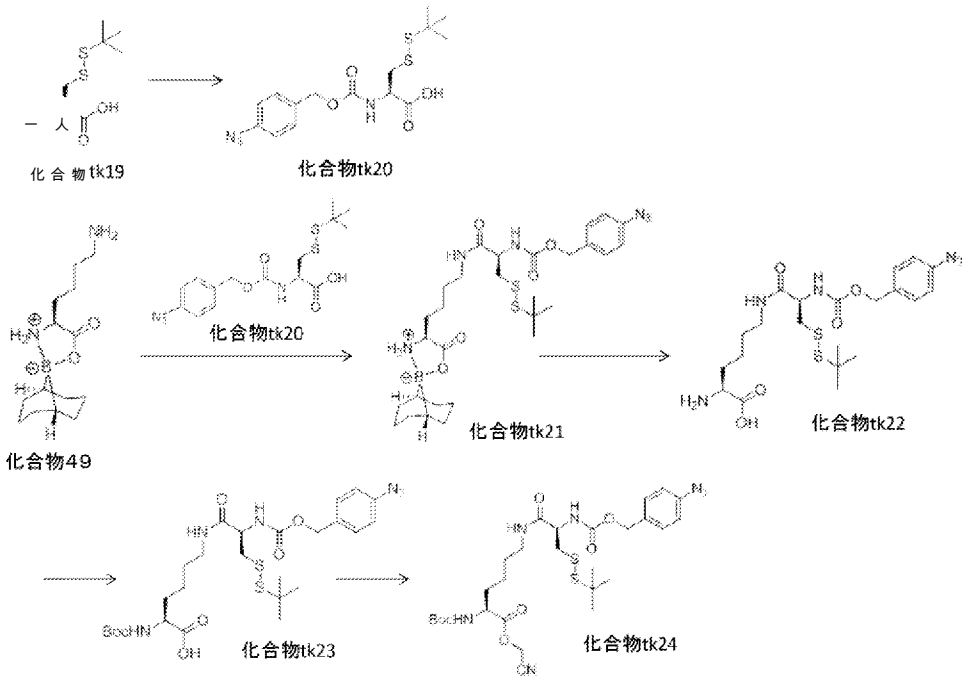
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１０１６．０ (Ｍ-Ｈ)-

保持時間：０．４４分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

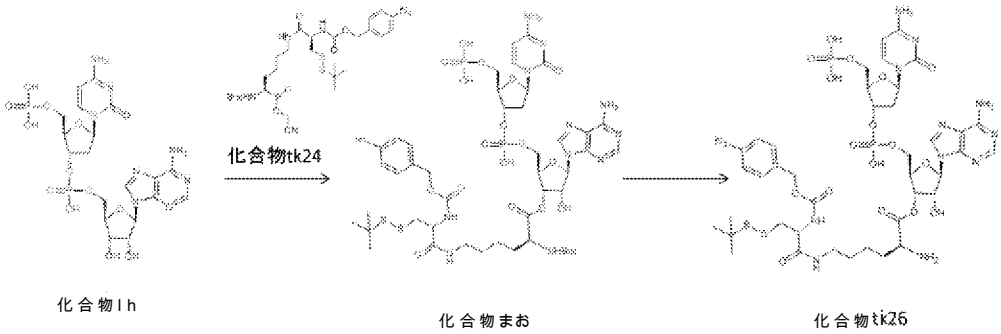
[1281] １０―１-４．アミノアシル化ＤｄＣＤＡ化合物ｔｋ２６の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

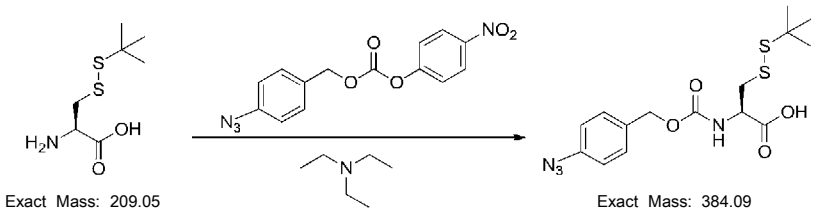
TKスキーム4-1



TKスキーム4-2



[1282] _(R)-2-(((4_アジドベンジル)オキシ)カルボニル)_アミノ)-3-(tert—プチルジスルファニル)プロパン酸 (化合物tk20)の合成



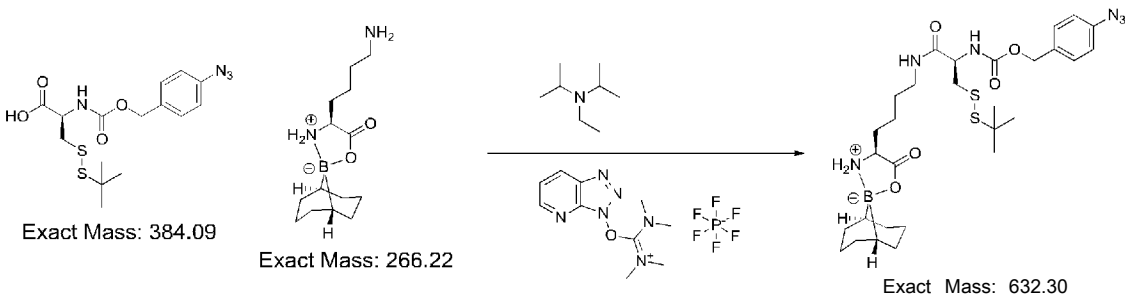
[1283] 窒素雰囲気下、S_tert_プチルメルカプト_L—システィン (化合物tk19) (116mg、0.554mmol)と文献記載 (Bioconjugate Chem. 2008, 19, 714.)の方法で合成した炭酸 (4—ニトロフエニル)4—アジドベンジル (209mg、0.665mmol)の混合物に室温にてDMF (0.5mL)を添加した。混合物を氷浴で冷却後、トリエチルアミン (232μL、1.663mmol)を添加した。反応混合物を氷冷下から25℃で15.5時間撹拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(R)_2-(((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_3_(tert_プチルジスルファニル)プロパン酸 (化合物tk20) (211.4mg、99%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 383 (M-H)-

保持時間:0.84分 (分析条件30D「六05)

[1284] 」1R,_4'S, 5S)-4'ー⊥4—((R)ー2-(((4—アジドベ

ンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）＿５'―オキソスピロ）－５'―ビシクロ［３．３．１］ノナン―９，２'＿［１，３，２］オキサザボロリジン―９，２'－［１，３，２］イウム－１１―ウイド（化合物ｔｋ２１）の合成

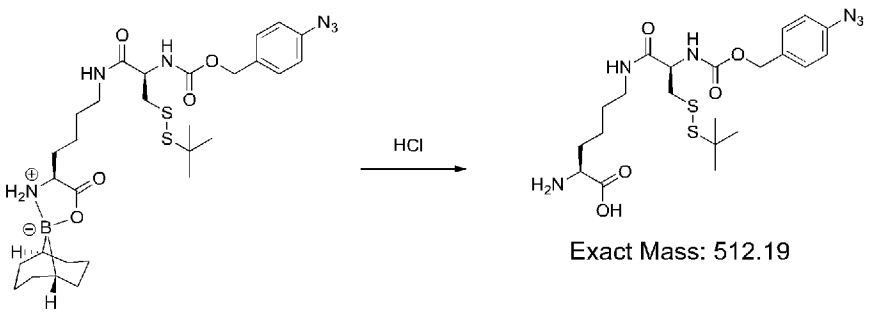


[1285] 窒素雰囲気下、（１Ｒ，４'Ｓ，５Ｓ）＿４'＿（４―アミノブチル）―５'―オキソスピロ［ビシクロ［３．３．１］ノナン－９，２'－［１，３，２］オキサザボロリジン］＿３'―イウム―１１―ウイド（化合物４９）（１６６ｍｇ、０．６２５ｍｍｏｌ）及び（Ｒ）－２－（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパン酸（化合物ｔｋ２０）（２００．３ｍｇ、０．５２１ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（０．６ｍＬ）懸濁液に室温で撹拌しながら、Ｎ，Ｎ―ジイソプロピルエチルアミン（１３６从１、０．７８１ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合物を氷浴で冷却後、ＨＡＴＵ（２３８ｍｇ、０．６２５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温にて４５分間撹拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（１Ｒ，４'Ｓ，５Ｓ）＿４'－（４－（（Ｒ）－２－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）＿５'―オキソスピロ）－５'―ビシクロ［３．３．１］ノナン－９，２'－［１，３，２］オキサザボロリジン―９，２'－［１，３，２］イウム－１１―ウイド（化合物ｔｋ２１）（３１３．１ｍｇ、９５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝６３１．５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：１．０１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1286] _（Ｓ）_ ２―アミノ－６_ _（_（Ｒ）_ ２_ _（_（_（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_ ３_ _（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸 _（Lys(Acbz-Cys(StBu) ））（化合物ｔｋ２２）の合成



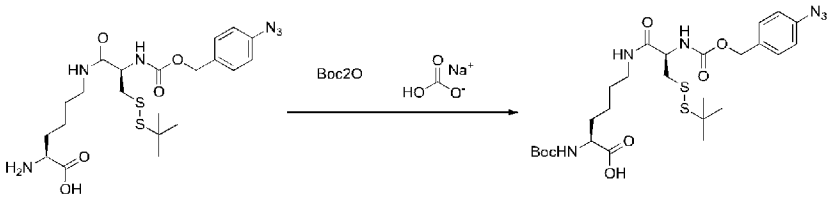
[1287] 窒素雰囲気下、（１Ｒ，４'Ｓ，５Ｓ）_４'_（４-（（Ｒ）-２-（（（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）プチル）_５'―オキソスピロ）―５'―ビシクロ［３．３．１］ノナン－９，２'-［１，３，２］オキサザボロリジン―９，２'-［１，３，２］イウム_１１―ウイド（化合物ｔｋ２１）（３００ｍｇ、０．４７４ｍｍｏｌ）の１，４_ジオキサン（２．４ｍＬ）の懸濁液に濃塩酸（３９５μＬ）を添加した。反応混合物を４０～４５℃で３．５時間撹拌した。室温に冷却後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）_２―アミノ－６_（（Ｒ）-２-（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_３_（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸（Lys(Acbz-Cys(StBu) ））（化合物でｋ２２）（１２１．９ｍｇ、５０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ５１３ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1288] （Ｓ）-６-（（Ｒ）-２-し（（⊥４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）-３-（ｔｅｒｔニプチルジスルファニル）プロパンアミド

)－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ２３）の合成



Exact Mass: 512.19

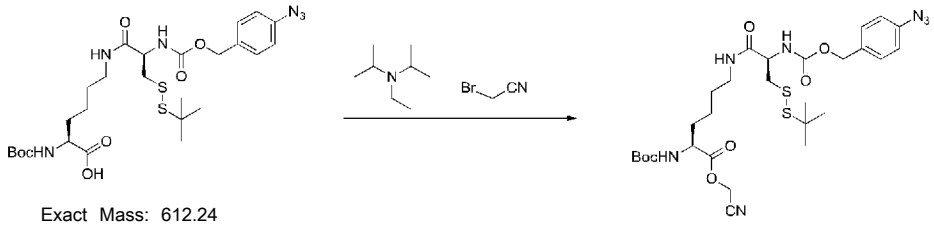
Exact Mass: 612.24

[1289] （Ｓ）－２―アミノ－６－（（Ｒ）－２－（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸（Lys(Acbz-Cys(StBu))）（化合物でｋ２２）（１２１．９ｍｇ、０．２３８ｍｍｏｌ）に室温で１，４－ジオキサン（１ｍＬ）及び水（１ｍＬ）を添加した。得られた混合物を氷浴で冷却後、炭酸水素ナトリウム（５９．９ｍｇ、０．７１３ｍｍｏｌ）を添加し、次にBoc_2O（１０４ｍｇ、０．４７６ｍｍｏｌ）を加えた。得られた反応混合物を室温で２１時間撹拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）－６－（（Ｒ）－２－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ２３）（１１１．０ｍｇ、７６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝６１１（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８８分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1290] ６－（（Ｒ）－２－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）プロパンアミド）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸－（Ｓ）－シアノメチル（化さ物ｔｋ２４）のさ成



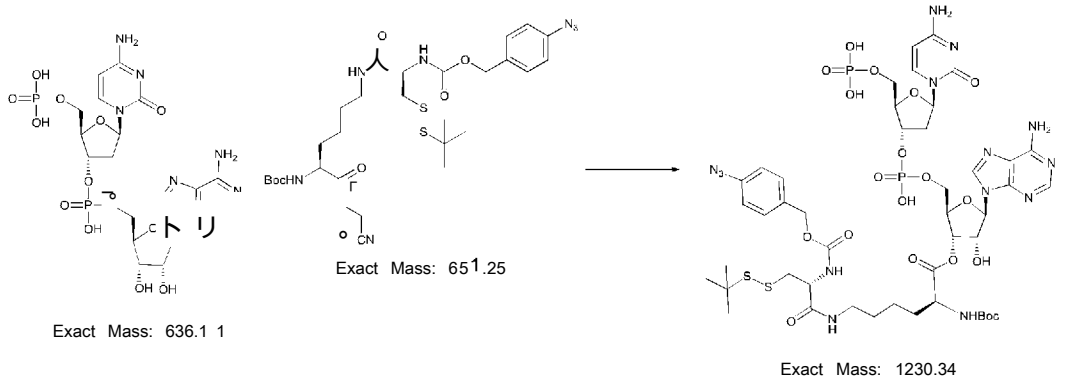
Exact Mass: 612.24 Exact Mass: 651.25

[1291] 窒素雰囲気下、(S)_6_((R)_2_(((((4_アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)ー2_((tert—プトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(化合物tk23)(110mg、0.180mmol)のアセトニトリル(0.3mL)溶液に、室温でN,N—ジイソプロピルエチルアミン(34从1、0.197mmol)、続いてプロモアセトニトリル(38トし、0.539mmol)を添加した。反応混合物を同温度にて15.5時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、6_((R)-2-(((((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_3_(tert—プチルジスルファニル)プロパンアミド)_2_((tert—プトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(S)—シアノメチル(化合物tk24)(97.3mg、83%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 650.6 (M-H)-

保持時間:0.95分(分析条件30D「六05)

[1292] 6-((R)-2-(((((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_3_(tert_プチルジスルファニル)プロパンアミド)_2_((tert—プトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリンー9—イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル(化合物tk25)の合成

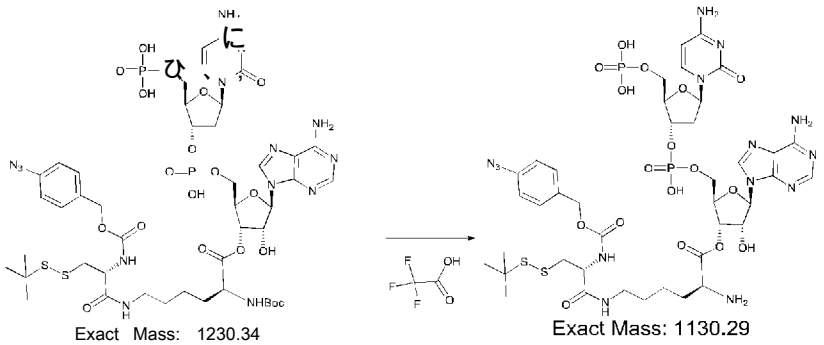


[1293] 緩衝液Ａ（９ｍＬ）にリン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- ５- （４—ァミノー２_オキソピリミジン_ １（２Ｈ）—ィル）_３_（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- ５- （６—アミノー９Ｈ—プリンー９—ィル）－３，４—ジヒドロキシテ トラヒドロフランー２—ィル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テ トラヒドロフラン_２_ィル）メチル （化合物１ｈ）（３０．３ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）の水溶液 (０．３ｍＬ）と６- （（Ｒ）- ２- （（（（４_アジ ドベンジル）オキシ）カルボニル）ァミノ）_３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）プロパンアミド）_２_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）ァミノ）ヘキサン酸 （Ｓ）—シァノメチル （化合物ｔｋ２４）（９３ｍｇ、０．１４３ｍｍｏｌ）のテ トラヒドロフラン （０．３ｍＬ）溶液を加え、室温で４．５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマ トグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％ トリフルオロ酢酸ァセ トニ トリル溶液）にて精製し、６_（（Ｒ）- ２- （（（（４—アジ ドベンジル）オキシ）カルボニル）ァミノ）_３_（ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル）プロパンアミド）—２_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）ァミノ）ヘキサン酸 （２Ｓ）- （２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- ２- （（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- ５- （４—アミノー２_オキソピリミジン_ １（２Ｈ）—ィル）_２- （（ホスホノオキシ）メチル）テ トラヒドロフラン_３_ィル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６—アミノ_９Ｈ_プリン_９_ィル）_４—ヒドロキシテ トラヒドロフランー３—ィル （化合物ｔｋ２５）（６．７ｍｇ、１１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １２３１．７ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間 :０．９０分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[1294] ２―アミノ－６_ _(（Ｒ)_ ２- _(（（（４―アジドベンジル）オキシ)_カルボニル)_アミノ)_ ３_ _(ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル)プロパンアミド)ヘキサン酸___(２Ｓ)_ _(２Ｒ,_３Ｓ,_４Ｒ,_５Ｒ)_ ２_ _(（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)- ５- _(４―アミノ－２_オキソピリミジン_ １_(２Ｈ)―イル)_ ２_ _(（ホスホノオキシ)メチル）テトラヒドロフラン－３_ィル）オキシ)__(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ)_メチル)_ ５_ _(６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル)－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―ビル_(Lys(Acbz-Cys(StBu))-pdCpA) ___(化合物ｔｋ２６）の合成



[1295] ６- （（Ｒ)- ２- （（（（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ)_ ３_ （ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパンアミド)_ ２- （（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (２Ｓ)_ （２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)- ２- （（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)- ５- （４―アミノ－２_オキソピリミジン_ １（２Ｈ）―イル）_ ２_ （（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_ ３_ィル）オキシ） (ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）_ ５_ （６―アミノ_ ９Ｈ―プリン_ ９_ィル）_ ４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物ｔｋ２５）（６．７ｍｇ、５．４４μｍｏｌ）のジクロロメタン (０．４ｍＬ）溶液を氷浴で冷却後、トリフルオロ酢酸 (０．１ｍＬ）を添加し、室温で２５分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸

ァセトニトリル溶液）にて精製し、2—アミノ—6_（（R）_2_（（（4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_3_（tert-ブチルジスルファニル）プロパンアミド）ヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ—2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリン_9_イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Lys(Acbz-Cys(StBu))-pdCpA) (化合物tk26)（1.7mg、28%）を得た。

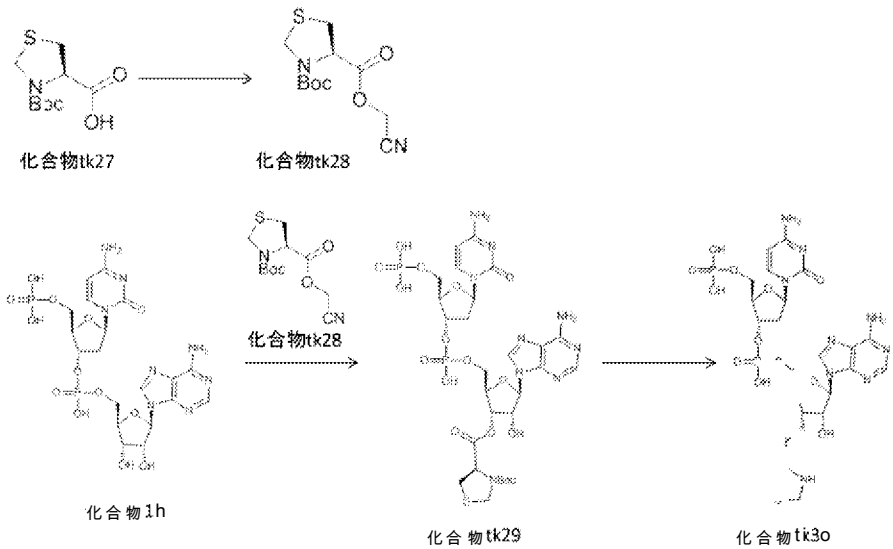
LCMS(ESI) m/z = 1130.1 (M-H)-

保持時間：0.54分 (分析条件30D「六05）

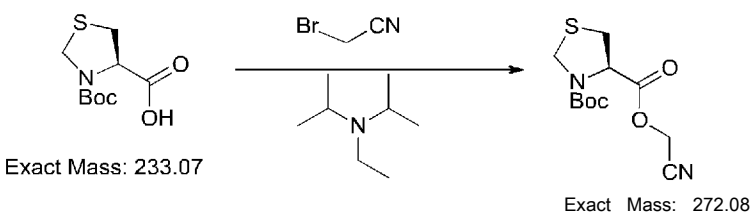
[1296] 10-1-5. アミノアシル化DdCDA化合物tk30の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキームS



[1297] チアゾリジン—3,4—ジカルボン酸 4—(シアノメチル) (R)—3-tert-ブチル (化合物tk28)の合成

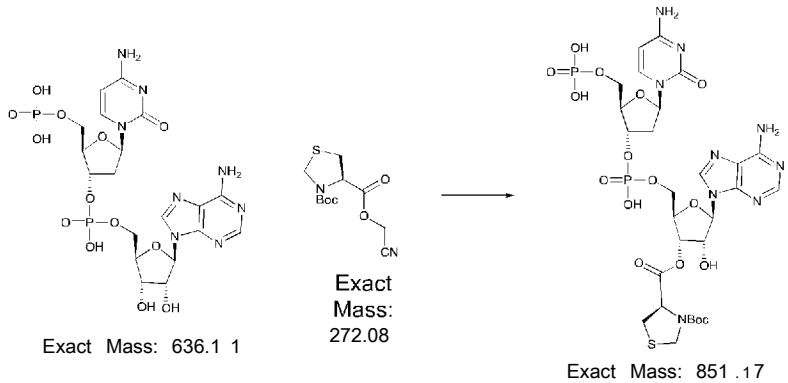


[1298] 窒素雰囲気下、Ｂｏｃ＿Ｔｈｉｏｐｒｏ＿ＯＨ（化合物ｔｋ２７）（３７７ｍｇ、１．６１６ｍｍ０１）のアセトニトリル（１ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ＿ジイソプロピルエチルアミン（３１０μＬ、１．７７８ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル（５６３从Ｌ、８．０８ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて２．２５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、チアゾリジン－３，４―ジカルボン酸　４―（シアノメチル）　（Ｒ）－３－ｔｅｒｔ－ブチル（化合物ｔｋ２８）（２７２．９ｍｇ、６２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝２７３．３　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1299] チアゾリジン―３，４―ジカルボン酸＿３＿ｔｅｒｔ＿ブチル＿（４Ｒ）＿４－（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン＿９＿イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン＿３＿イル）（化合物ｔｋ２９）の合成



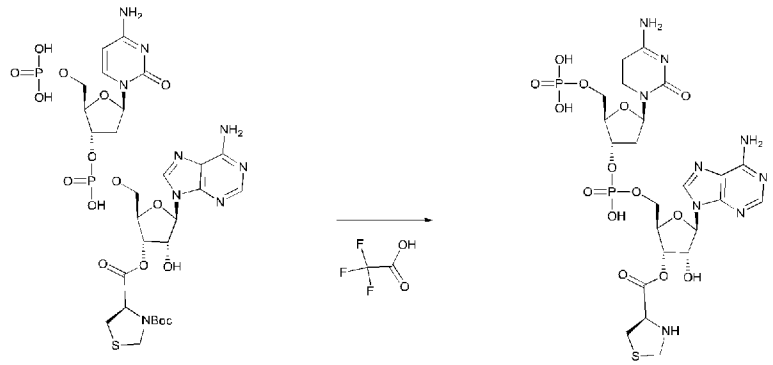
[1300] 緩衝液Ａ（３０ｍＬ）にリン酸二水素　（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿３＿（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６＿アミノ－９Ｈ＿プリン－９＿イル）―３，４＿ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２＿イル）メトキシ）（ヒド

ロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物ｉｈ）（１４８ｍｇ、０．２３３ｍｍｏｌ）とチアゾリジン—３，４—ジカルボン酸　４—（シアノメチル）　（Ｒ）－３－ｔｅｒｔ—ブチル（化合物ｔｋ２８）（２５４ｍｇ、０．９３３ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．７ｍＬ）溶液を加え、室温で１．５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、チアゾリジン_３，４—ジカルボン酸　３_ｔｅｒｔ_ブチル　（４Ｒ）－４－（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４—アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）—イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６—アミノ－９Ｈ—プリン－９—イル）－４—ヒドロキシテトラヒドロフラン－３—イル）（化合物ｔｋ２９）（６４．７ｍｇ、３３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　８５０．３　（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．４１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1301] チアゾリジン—４_カルボン酸___（４Ｒ）_＿（２Ｒ，３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４—アミノ－２_ォキソピリミジン－１_（２Ｈ）_—イル）_２_＿（（ホスホノォキシ）_メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）＿（ヒドロキシ）_ホスホリル）オキシ）_メチル）－５－（６—アミノ－９Ｈ—プリン－９—イル）_－４—ヒドロキシテトラヒドロフラン－３—イル（Thiopro-edCpA）_ぶ_化合物_ｔｋ３０）の合成



Exact Mass: 851.17　　Exact Mass: 751.12

[1302] チアゾリジン_３，４―ジカルボン酸 ３_ｔｅｒｔ_ブチル (４Ｒ)-４-((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-(((((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)_２_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_３_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_５_(６―アミノ－９Ｈ―プリン－９_イル)_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物ｔｋ２９) (１９ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ)のジクロロメタン (０．４ｍＬ)溶液に１０％トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液 (０．４ｍＬ)を添加し、室温で６０分間撹拌後、減圧濃縮してチアゾリジン_４_カルボン酸 (４Ｒ)-(２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-(((((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)-２-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_３_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_５_(６―アミノ_９Ｈ―プリン－９―イル)－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (Thiopro-pdCpA) (化合物ｔｋ３０) (２５ｍｇ、ｑｕａｎｔ．)を得た。

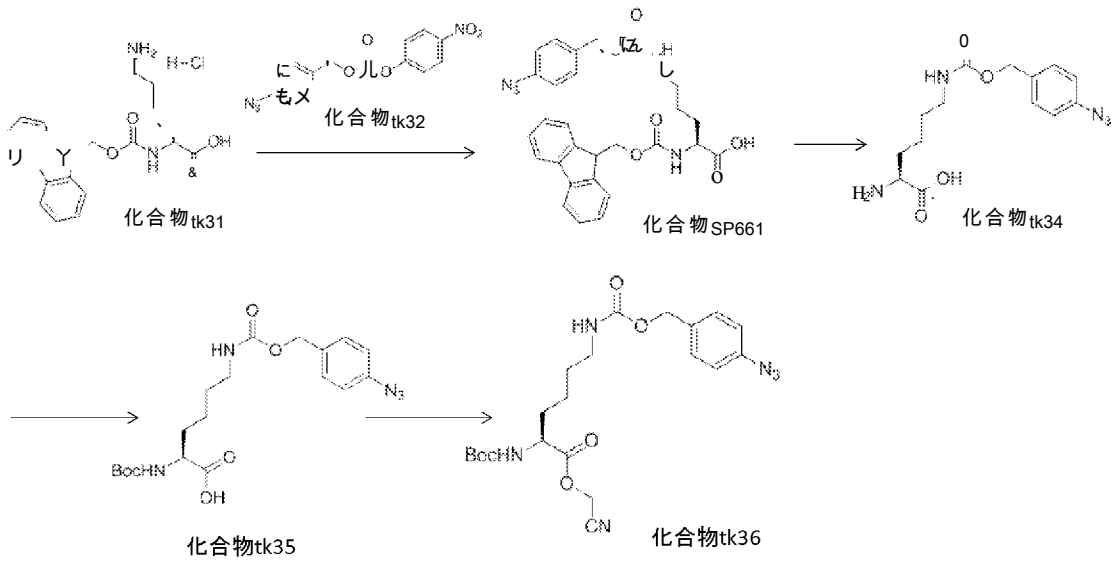
ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) ｍ/ｚ＝７５０．４ (Ｍ-Ｈ)-

保持時間：０．３４分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

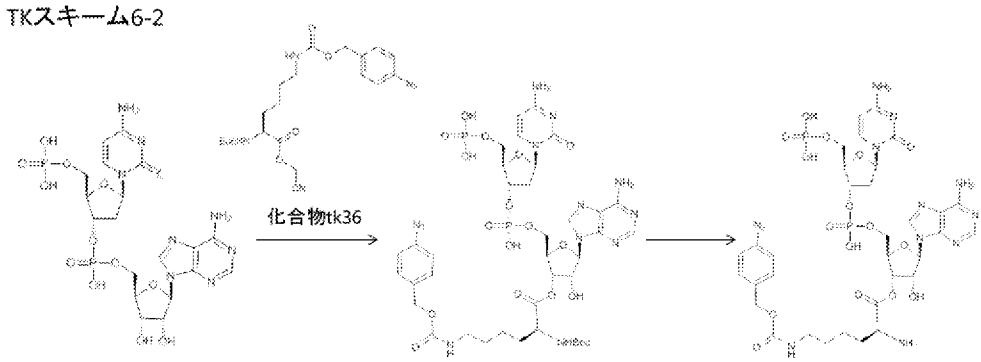
[1303] １０-１-６．アミノアシル化ＤｄＣＤＡ化合物ｔｋ３８の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

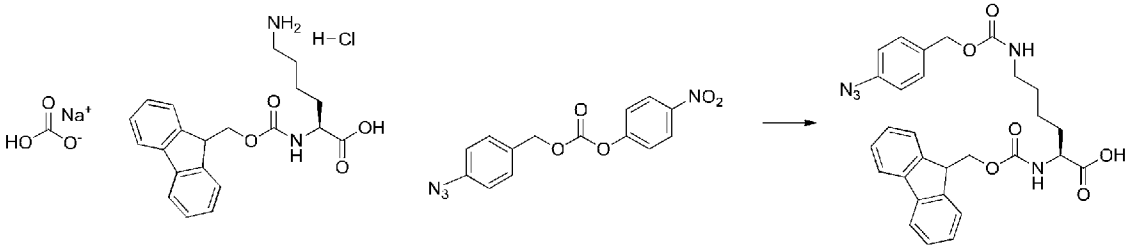
TKスキーム6-1



TKスキーム6-2



[1304] （Ｓ）－２－（（（（１９Ｈ—フルオレン－９—イル」_メトキシ）カルボニル）アミノ）－６_（（（（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸　(化合物ＳＰ６６１)_の合成



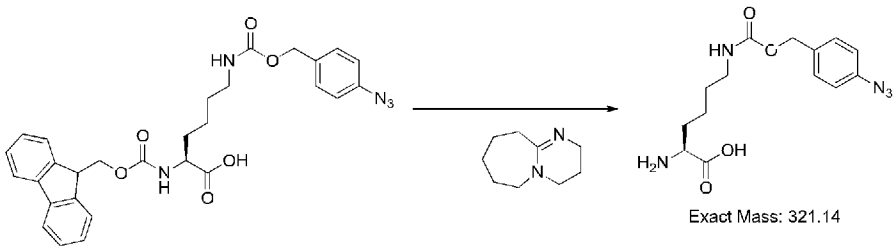
[1305] 氷冷下、Ｆｍｏｃ_リシン塩酸塩　(化合物ｔｋ３１)（４．９ｇ、１２．１０ｍｍｏｌ）と炭酸水素ナトリウム（２．７７ｇ、３３．Ｏｍｍｏｌ）のＤＭＦ（２２ｍＬ）懸濁液に文献記載（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅ

m. ２００８, １９, ７１４.）の方法で合成した炭酸 (4—ニトロフエニル）４_アジドベンジル (化合物ｔｋ３２）（３．４６ｇ、１１．０ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を２５℃で８時間撹拌後、１Ｎ塩酸を添加し、酢酸エチルにて抽出した。有機相を食塩水にて３回洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．１％ギ酸水溶液/ ０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、 (Ｓ）- ２- （（（（９Ｈ—フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_６_（（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (化合物ＳＰ６６１）（５．５ｇ、９２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ z = ５４２ （M- H）-

保持時間 :０．８９分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1306] （Ｓ）_２—アミノー６_（（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (Lys(Acbz)) (化合物ｔｋ３４）の合成



Exact Mass: 543.21

Exact Mass: 321.14

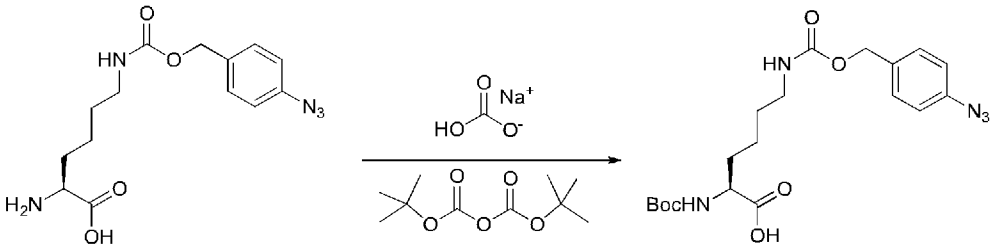
[1307] 窒素雰囲気下、 (Ｓ）- ２- （（（（９Ｈ—フルオレン_９_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_６_（（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (化合物ＳＰ６６１）（２１０ｍｇ、０．３８６ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（０．７ｍＬ）溶液に室温でＤＢＵ（０．０６４ｍＬ、０．４２５ｍｍｏｌ）を添加した。得られた反応混合物を同温度で２０分間撹拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、 (Ｓ）_２—アミノー６_（（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 （Lys(Acbz)） (化合物ｔｋ３４）（１０

０ｍｇ、８１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ３２０ （Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．４７分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1308] (Ｓ)－６－（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (化合物ｔｋ３５）の合成



Exact Mass: 321 .14 Exact Mass: 421.20

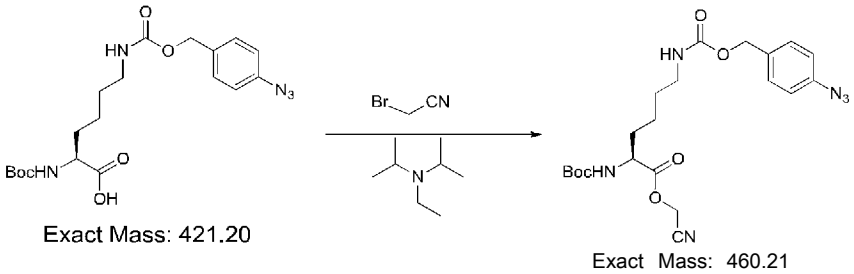
[1309] ２―アミノ―６＿（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 （Lys(Acbz)）(化合物ｔｋ３４）（１００ｍｇ、０．３１１ｍｍｏｌ）に室温で１，４＿ジオキサン (５ｍＬ）及び水 (２ｍＬ）を添加した。得られた混合物を氷浴で冷却後、炭酸水素ナトリウム (７８ｍｇ、０．９３４ｍｍｏｌ）を添加し、次にBoc_2O（１３６ｍｇ、０．６２２ｍｍｏｌ）を加えた。得られた反応混合物を室温で２時間２０分間撹拌後、Boc_2O（７０ｍｇ）を添加した。同温度で４０分間撹拌後、氷冷下で酢酸エチル及び水を添加した。得られた混合物に飽和硫酸水素カリウム水溶液 (０．３ｍＬ）を添加後、酢酸エチルにて２回抽出した。有機相を水及び食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、 (Ｓ)－６－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 （化合物ｔｋ３５）（１０３．９ｍｇ、７９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ４２０ （Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．７６分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[13 10] ６－(J.（し4＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ」－２－（

（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (S)—シアノメチル (化合物ｔｋ３６）の合成

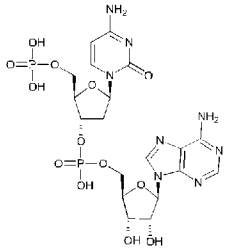


[1311] 窒素雰囲気下、 (S)-6-（（（(4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (化合物ｔｋ３５）（１００．９ｍｇ、０．２３９ｍｍｏｌ）のアセトニトリル (0．４ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン (46从1、０．２６３ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル (83μＬ、１．１９７ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて2．５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、６_（（（(4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (S)—シアノメチル (化合物ｔｋ３６）（１０８．５ｍｇ、９８％）を得た。

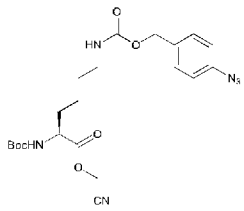
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ４５９ (M-H)-

保持時間 :0．８４分 (分析条件３０Ｄ「六05）

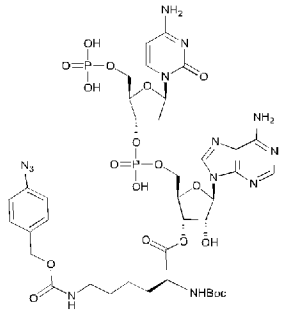
[1312] 6-（（（(4_アジドベンジル）ォキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸_（2Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４-アミノ_２_ォキソピリミジン_１_(２Ｈ)—イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６—アミノ_９Ｈ_プリン—９—イル）—４—ヒドロキシテトラヒドロフラン—３—イル (化合物ｔｋ３７）の合成



Exact Mass: 636.1 1



Exact Mass: 460.21



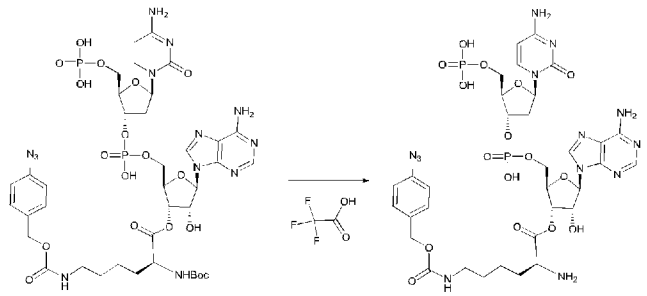
Exact Mass: 1039.30

[1313] 緩衝液Ａ（１４ｍＬ）にリン酸二水素（(2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノー２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―ィル）_３_（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-５-（６_アミノー９Ｈ_プリンー９_ィル）―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフランー２―ィル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_ィル）メチル（化合物ｉｈ）（４７．９ｍｇ、０．０７５ｍｍｏｌ）の水溶液（0．３ｍＬ）と６_（（（（４_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ｔｋ３６）（１０４ｍｇ、０２２６ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（0．３ｍＬ）溶液を加え、室温で１．７５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、６_（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（(2Ｓ)-（(2Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-２-（（（（（(2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノー２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―ィル）_２_（(ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリンー９_ィル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフランー３―ィル（化合物ｔｋ３７）（１４．６ｍｇ、１９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１０４０．８　(Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：0．５６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1314] 2—アミノー6_ _(((（4_アジドベンジル）オキシ)_カルボニル)_アミノ）ヘキサン酎 （2S）- （2R，3S，4R，5R）- 2- （（（（（2R，3S，5R）- 5- （4—アミノー2_オキソピリミジン_1_（2H）_—イル）_2_ _（（ホスホノオキシ）_メチル）テトラヒドロフランー3—イル）オキシ）_（ヒドロキシ）_ホスホリル）オキシ）_メチル）_5_ _（6_ _アミノー9H—プ」ン_9_イル）_ _4_ _ヒドロキシテトラヒドロフラン_3—イル （Lys(Acbz)-pdCpA） _（化合物tk38）_の合成



Exact Mass: 1039.30

Exact Mass: 939.24

[1315] 6- （（（（4_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert—プトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (2S)- （2R，3S，4R，5R）- 2- （（（（（（2R，3S，5R）- 5- （4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ_9H—プリンー9—イル）_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル (化合物tk37）（14.6mg、0.014mmol）のジクロロメタン (0.4mL）溶液を氷浴で冷却後、トリフルオロ酢酸 (0.05mL）を添加し、室温で35分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/ 0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2—アミノ—6_（（（（4—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (2S)- （2R，3S，4R，5R）- 2- （（（（（（2R，3S，5R）- 5- （4- アミノ_2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオ

キシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）ー５―（６―アミノー９Ｈ―プリン－９―イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフランー３―イル（Lys(Acbz)-pdCpA）（化合物ｔｋ３８）（１．１ｍｇ、８％）を得た。

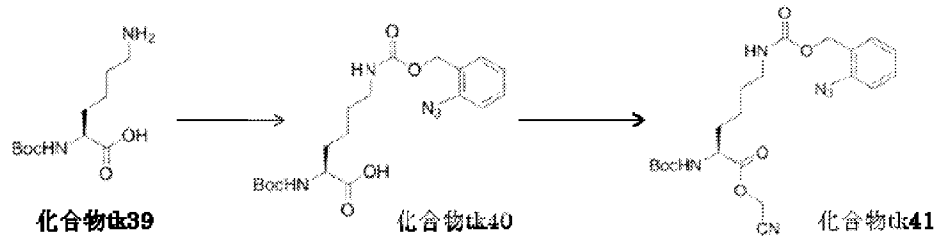
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝９３８．５（Ｍ－Ｈ）－

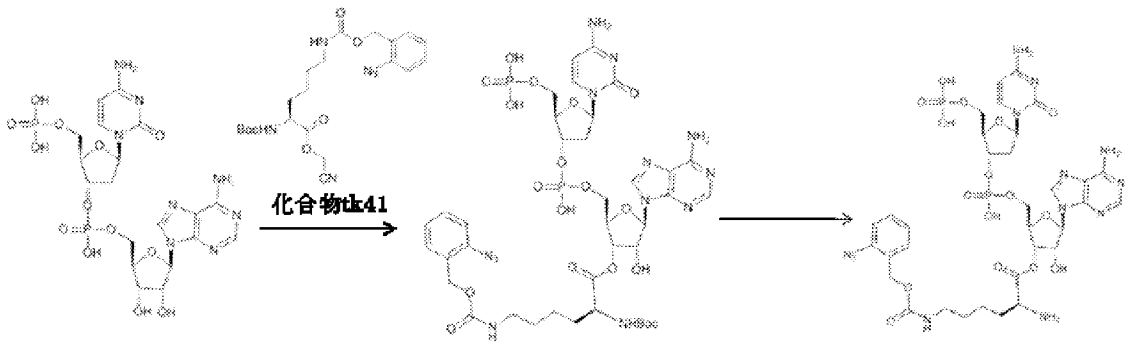
保持時間：０．３９分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1316] １０－１－７．アミノアシル化ｐｄＣｐＡ化合物ｔｋ４３の合成

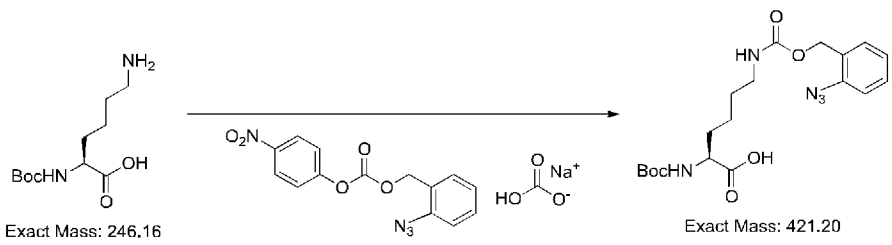
以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム７





[1317] （Ｓ）－６－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ４０）の合成



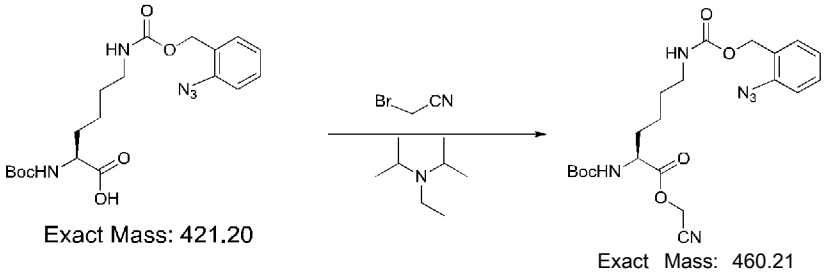
[1318] Ｂｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨ（化合物ｔｋ３９）（２９５ｍｇ、１．１９８ｍｍ

ｏｌ）と炭酸水素ナトリウム（２５２ｍｇ、２．９９ｍｍｏｌ）の１，４＿ジオキサン（３ｍＬ）―水（２ｍＬ）の懸濁液に炭酸（４―ニトロフエニル）２＿アジドベンジル（４１４ｍｇ、１．３１７ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で２２時間撹拌後、氷浴で冷却し、酢酸エチル及び水で希釈した混合物に飽和硫酸水素カリウム水溶液（０．７ｍＬ）を添加した。酢酸エチルにて抽出し（２回）、有機相を水（１ＯｍＬで２回）及び食塩水（１ＯｍＬ）にて洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮後、得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（Ｓ）－６－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ４０）（４３１．５ｍｇ、８５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝４２０（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．７６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1319] ６－（（（（２＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ＿ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸＿（Ｓ）―シアノメチル（化合物ｔｋ４１）の合成



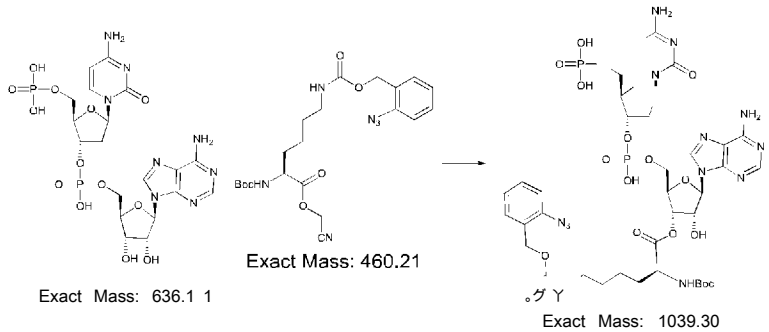
[1320] 窒素雰囲気下、（Ｓ）－６－（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ４０）（１１４ｍｇ、０．２７０ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．４ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ―ジイソプロピルエチルアミン（５２μＬ、０．２９８ｍｍｏｌ）、続いてブロモアセトニトリル（９４μＬ、１．３５２ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて１．５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグ

ラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、6_（（（（2—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (S）—シアノメチル (化合物tk41）（140.2mg、quant.）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 459.5 (M-H)-

保持時間 :0.84分 (分析条件30D「六05）

[1321] 6-（（（（2_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (2S）-（2R_3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4-アミノ_2_オキソピリミジン_1_（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ_9H_プリン—9—イル）_4—ヒドロキクテトラヒドロフラン—3—ゴル（化合物tk42）の合成



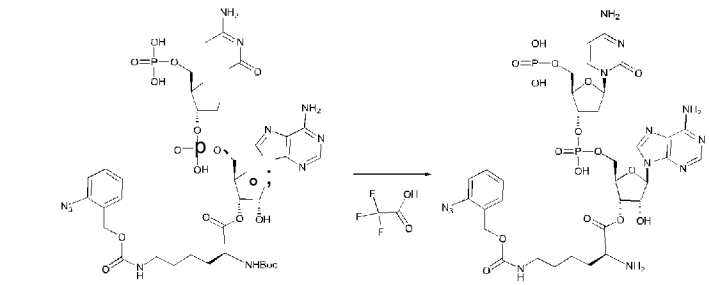
[1322] 緩衝液A（14mL）にリン酸二水素 ((2R，3S，5R）-5-（4—アミノ—2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_3_（（（（（2R，3S，4R，5R）-5-（6—アミノ—9H—プリン—9—イル）—3，4—ジヒドロキシテトラヒドロフラン—2—イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_2_イル）メチル (化合物ih）（46.3mg、0.073mmol）の水溶液 (0.3mL）と6_（（（（2_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (S）—シアノメチル (化合物tk41）（134mg、0.291mmol）のテトラヒ

ドロフラン (0．3mL) 溶液を加え、室温で1．75時間撹拌した。アセトニトリル (0．6mL) を添加し、同温度で1．25時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．05％トリフルオロ酢酸水溶液/0．05％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、6_((((2—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸 (2S)-(2R，3S，4R，5R)-2-(((((((2R，3S，5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)－2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ－9H—プリン－9—イル)－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル (化合物tk42) (11．1mg、15％) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 1038．6 (M-H)-

保持時間：0．58分 (分析条件30D「六05)

[1323] 2—アミノー6_((((((2—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ヘキサン酸 (2S)-(2R．3S．4R．5R)-2-(((((((2R．3S．5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン－3—イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6_アミノー9H—プリン_9－イル)_4_ヒドロキシテトラヒドロフラン_3—イル (Lys(oAcbz)-pdCpA) (化合物tk43) の合成



Exact Mass: 1039.30

Exact Mass: 939.24

[1324] (2S)－(2R，3S，4R，5R)-2-(((((((2R，3S，5R)－5—(4－アミノー2—オキソピリミジン－1(2H)—イル)－

2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ—9H—プリン_9_イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物tk42) (10mg、9.62μmol)のジクロロメタン (0.4mL)溶液にトリフルオロ酢酸 (0.075mL)を添加し、室温で20分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、2—アミノ—6_(((((2—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ—2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリン_9_イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Lys(oAcbz)-pdCpA) (化合物tk43) (8.0mg、89%)を得た。

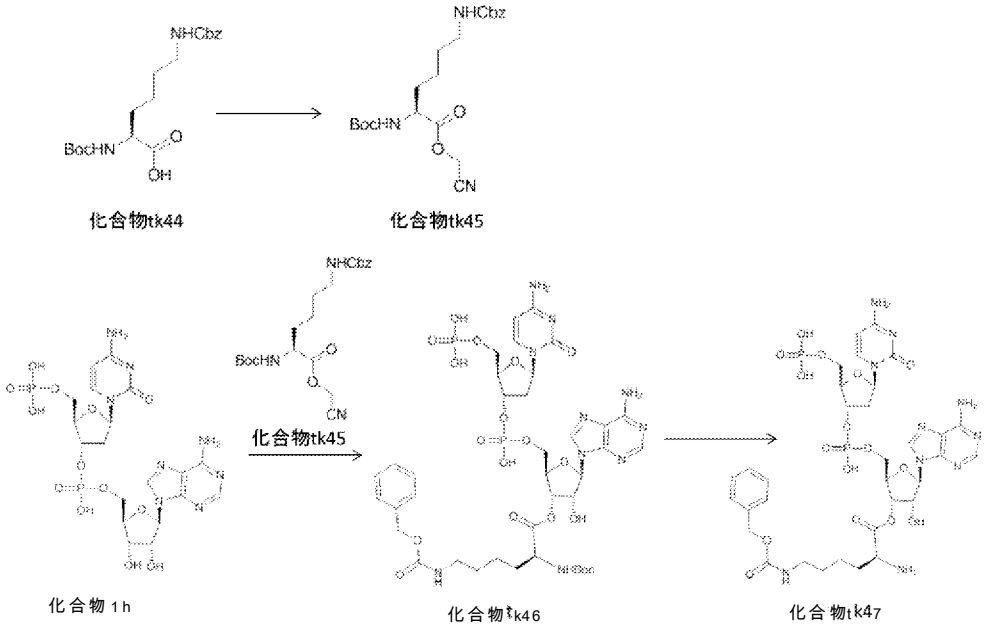
LCMS(ESI) m/z = 938.5 (M-H)-

保持時間:0.39分 (分析条件30D「六05」)

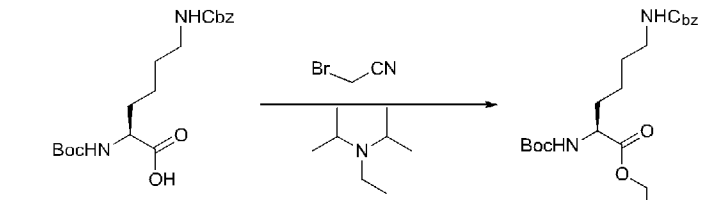
[1325] 10-1-8. アミノアシル化DdCpA化合物tk47の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム8



[1326] 6-((((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸-(S)-シアノメチル(化合物tk45)の合成



Exact Mass: 380.19

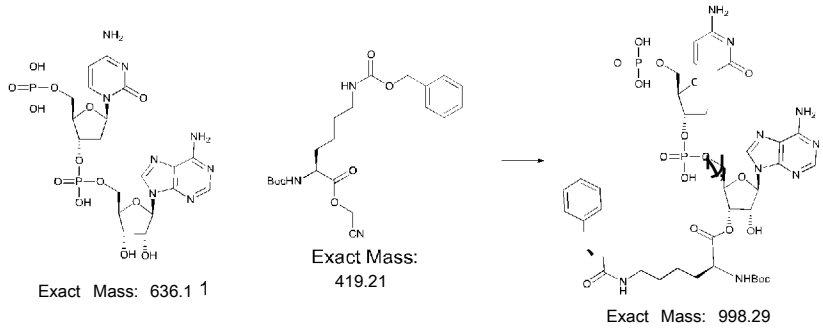
Exact Mass: 419.21

[1327] 窒素雰囲気下、Boc-Lys(Z)-OH(化合物tk44)(160mg、0.421mmol)のアセトニトリル(0.6mL)溶液に、室温でN,N-ジイソプロピルエチルアミン(81μL、0.463mmol)、続いてプロモアセトニトリル(147μL、2.103mmol)を添加した。反応混合物を同温度にて13時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、6-((((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(S)-シアノメチル(化合物tk45)(180mg、quant.)を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝４１８（M-Ｈ）-

保持時間：0．７９分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1328] 6-（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）-２-（（ｔｅｒｔ-7"トキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（2Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ-２―オキソピリミジン―１（２Ｈ）―イル）-２-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン-３-イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）-５―（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）-４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物ｔｋ４６）の合成



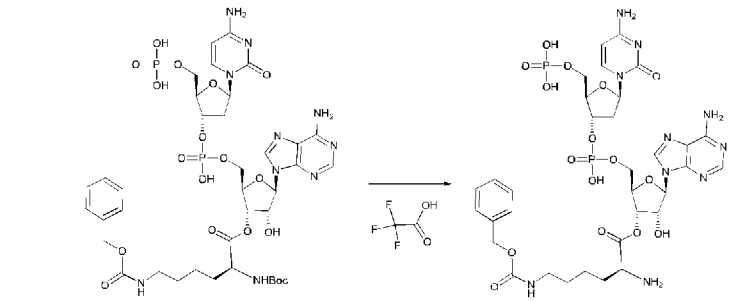
[1329] 緩衝液Ａ（１８ｍＬ）にリン酸二水素（（2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２-オキソピリミジン-１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６-アミノ―９Ｈ-プリン―９-イル）―３，４-ジヒドロキシテトラヒドロフラン―２-イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン-２-イル）メチル（化合物１ｈ）（６５．６ｍｇ、０．１０３ｍｍｏｌ）の水溶液（０．３ｍＬ）と6-（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）-２-（（ｔｅｒｔ-ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ｔｋ４５）（１７３ｍｇ、０．４１２ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（０．３ｍＬ）溶液を加え、室温で０．７５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、6-（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）-２-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（2Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４

Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ_２―オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ－プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物ｔｋ４６）（１８．６ｍｇ、１８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ９９９．７ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1330] ２―アミノ－６_(（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸 （２Ｓ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン_９_イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル （Lvs(Z)-pdCpA) (化合物ｔｋ４７）の合成



Exact Mass: 998.29

Exact Mass: 898.24

[1331] ６－（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ_ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 （２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (化合物ｔｋ４６）（１８．６ｍｇ、

０．０１９ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（１ｍＬ）溶液にトリフルオロ酢酸（０．０７５ｍＬ）を添加し、室温で４０分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２―アミノ－６＿（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）ヘキサン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Lys(Z)-pdCpA）（化合物ｔｋ４７）（１３．４ｍｇ、８０％）を得た。

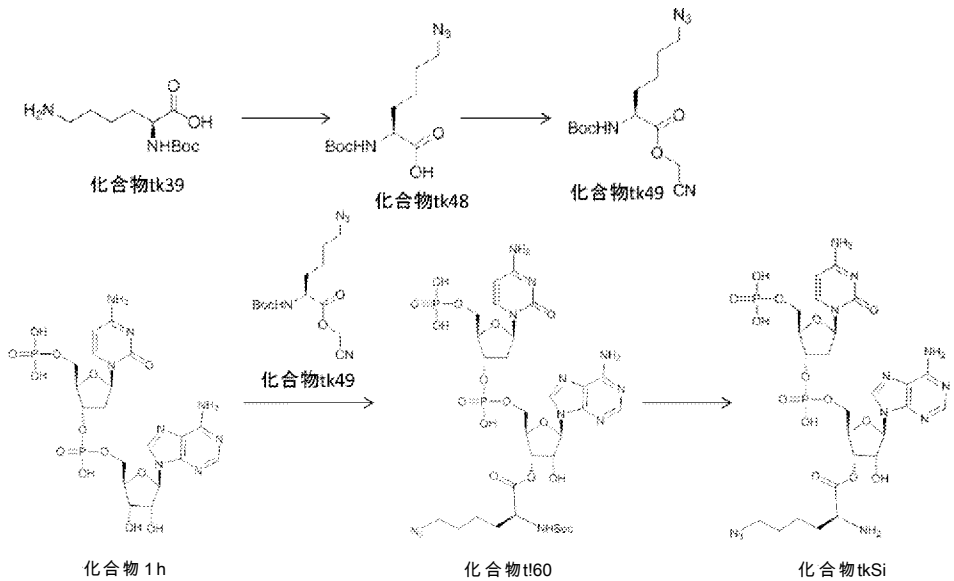
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝８９７．４（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．３５分（分析条件３０Ｄ「六０５）

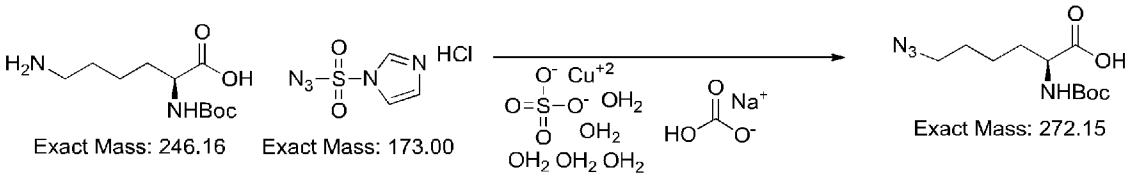
[1332] １０－１－９．アミノアシル化ＤｄＣＤＡ化合物ｔｋ５１の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム9



[1333] （Ｓ）－６＿アジド＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化さ物ｔｋ４８）のさ成

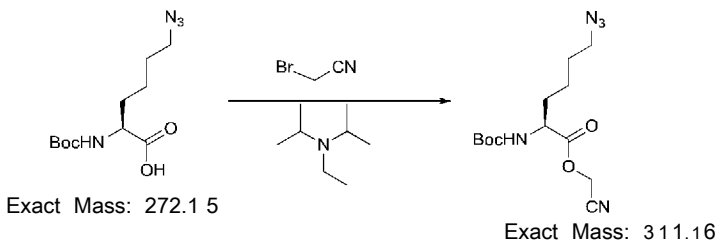


[1334] Ｂｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨ（化合物ｔｋ３９）（１．０ｇ、４．０６ｍｍｏｌ）と硫酸銅五水和物（２０ｍｇ、０．０８１ｍｍｏｌ）のメタノール（１５ｍＬ）―水（３ｍＬ）混合物に室温で炭酸水素ナトリウム（０．６５ｇ、７．７４ｍｍｏｌ）を添加し、続いて文献記載（Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，２００７，９，３７９７．）の方法で合成したアジ化－１Ｈ－イミダゾール－１－スルホニル塩酸塩（１．０２ｇ、４．８７ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物に炭酸水素ナトリウム（０．６５ｇ、７．７４ｍｍｏｌ）を添加後、室温で２３時間撹拌した。反応混合物を氷浴で冷却後、飽和硫酸水素カリウム水溶液（１０ｍＬ）を添加した。得られた混合物をセライトろ過し、酢酸エチルにて洗浄後、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液／０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｓ）－６－アジド－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ４８）（９４８．７ｍｇ、８６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝２７１（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．６６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1335] ６－アジド－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（Ｓ）－シアノメチル（化合物ｔｋ４９）の合成



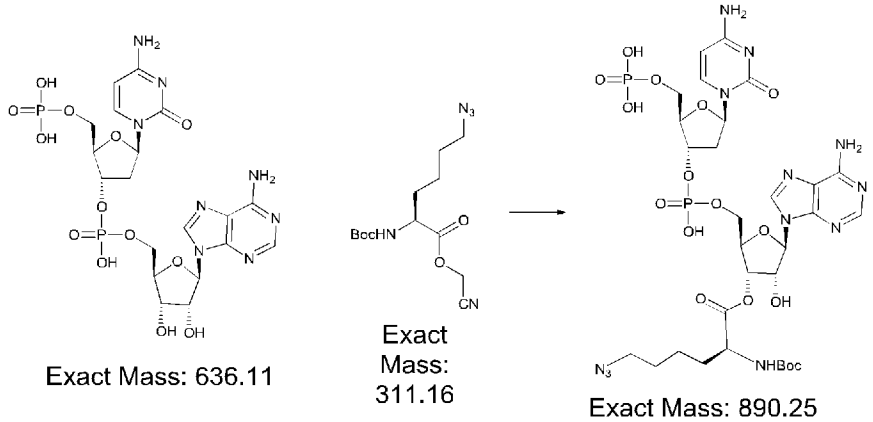
[1336] 窒素雰囲気下、（Ｓ）－６－アジド－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ４８）（１４０ｍｇ、０．５１４ｍｍｏｌ））のアセトニトリル（０．６ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ－ジイソ

プロピルエチルアミン (99μL、0.566mmol)、続いてブロモアセトニトリル (179从1、2.57mmol)を添加した。反応混合物を同温度にて3.75時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、6—アジド_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(S)—シアノメチル (化合物tk49) (175mg、quant.)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 310 (M-H)-

保持時間 :0.77分 (分析条件SQDFA05)

[1337] 6_アジド_2_((tert_ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(2S)-(2R.3S.4R.5R)-2-((((((2R.3S.5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)—2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ—9H—プリン_9_イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル (化合物tk50)の合成



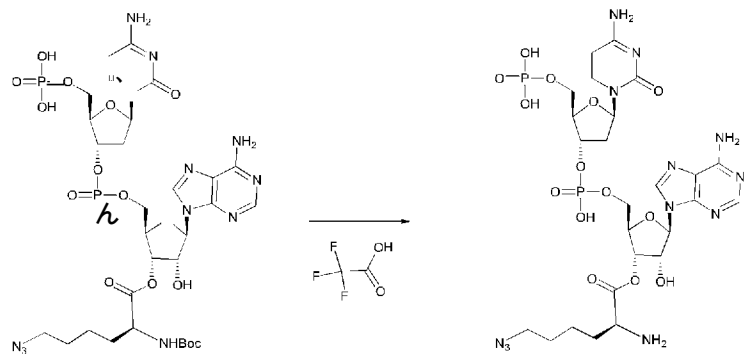
[1338] 緩衝液A (18mL)にリン酸二水素 ((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_3_(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6_アミノー9H_プリンー9_イル)—3,4_ジヒドロキシテトラヒドロフランー2_イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_2_イル)メチル (化

合物１ｈ）（７８ｍｇ、０．１２２ｍｍｏｌ）の水溶液（０．３ｍＬ）と６―アジド_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ｔｋ４９）（１５２ｍｇ、０．４８８ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（０．３ｍＬ）溶液を加え、室温で０．７５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、６_アジド_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸　（２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物ｔｋ５０）（３０．２ｍｇ、２８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ　＝　８８９．４　（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．４７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1339] ２―アミノ―６_アジドヘキサン酸___(２Ｓ)-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_ォキソピリミジン_１_(２Ｈ)_―イル）_２_(（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）－５―(６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル)－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（Lys(N3)-pdGpA）i化合物ｔｋ５１）の合成



Exact Mass: 890.25　　Exact Mass: 790.19

[1340] 6—アジド－2—（（tert－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ－2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリン－9—イル)－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル (化合物tk50)（30.2mg、0.034mmol）のジクロロメタン（1.5mL）溶液にトリフルオロ酢酸 (0.1mL) を添加し、室温で30分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05% トリフルオロ酢酸水溶液/ 0.05% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2—アミノ—6_アジドヘキサン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ－2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリン－9—イル)－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル (Lys(N3)-pdCpA) (化合物tk51)（19.4mg、72%）を得た。

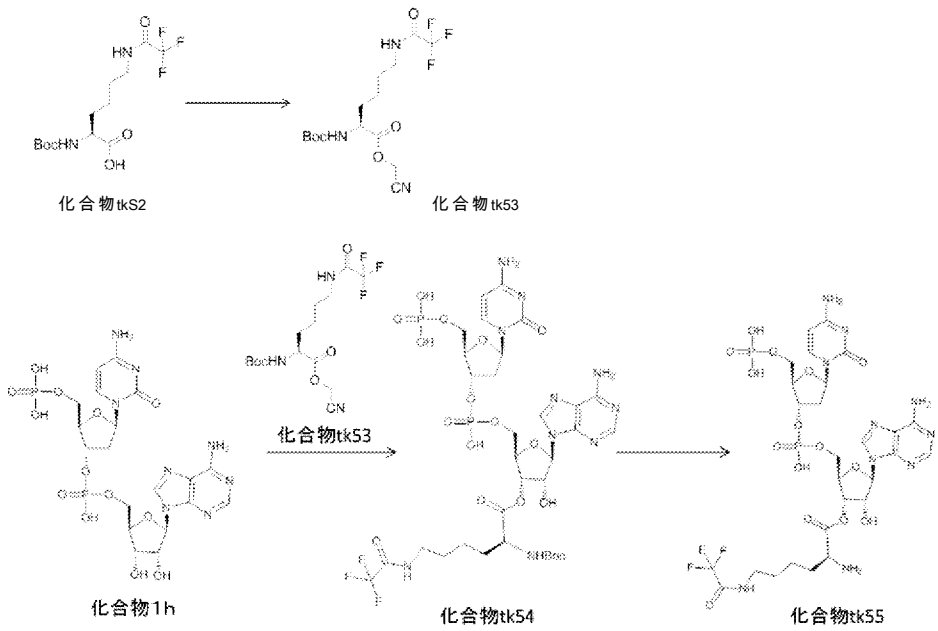
LCMS（ESI） m/z = 789.4 (M-H)-

保持時間 :0.27分 (分析条件30D「六05)

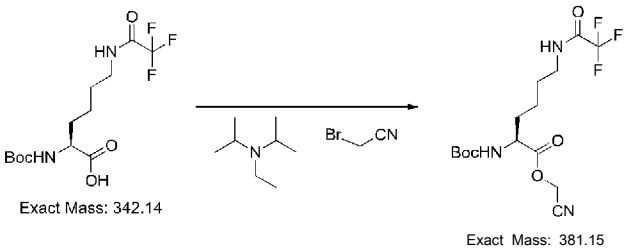
[1341] 10-1-10. アミノアシル化pdCpA化合物tk55の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム 10



[1342] 2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_6_(2,2,2_トリフルオロアセトアミド)ヘキサン酸 (S)—シアノメチル (化合物tk53)の合成

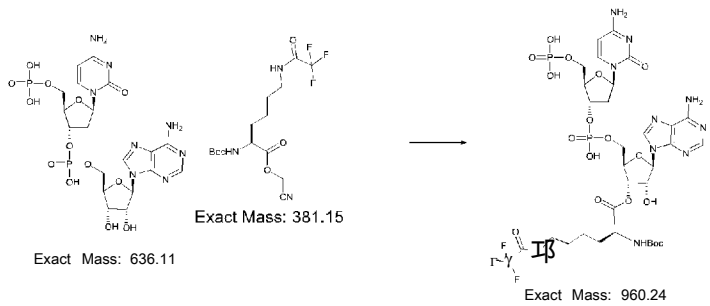


[1343] 窒素雰囲気下、Boc_Lys(Tfa)—OH(化合物tk52)(182mg、0.532mmol)のアセトニトリル(0.5mL)溶液に、室温でN,N—ジイソプロピルエチルアミン(102μL、0.585mmol)、続いてブロモアセトニトリル(185从1、2.66mmol)を添加した。反応混合物を同温度にて5.25時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、2—((tertーブトキシカルボニル)アミノ)-6-(2,2,2—トリフルオロアセトアミド)ヘキサン酸(S)ーシアノメチル(化合物tk53)(200.8mg、99%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 379.9 (M-H)-

保持時間：0．７０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1344] ２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（２，２，２－トリフルオロアセトアミド）ヘキサン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（化合物ｔｋ５４）の合成



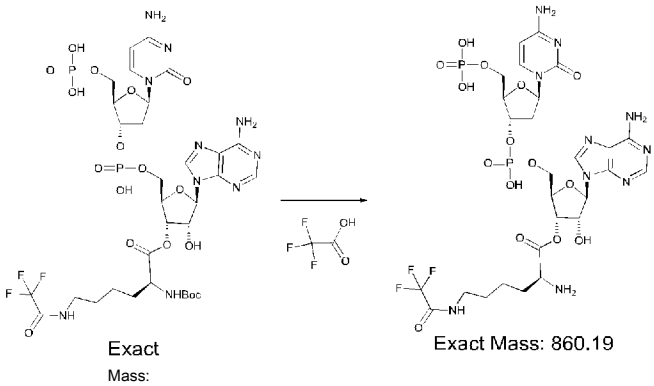
[1345] 緩衝液Ａ（２０ｍＬ）にリン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチル（化合物１ｈ）（８１ｍｇ、０．１２７ｍｍｏｌ）と２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（２，２，２－トリフルオロアセトアミド）ヘキサン酸（Ｓ）－シアノメチル（化合物ｔｋ５３）（１９４ｍｇ、０．５０９ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．７ｍＬ）溶液を加え、室温で１．７５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液／０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（２，２，２－トリフルオロアセトアミド）ヘキサン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル

）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ５４）（５．３ｍｇ、４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝９５９．５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．４４分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1346] ２―アミノ－６―（２，２，２―トリフルオロアセトアミド）ヘキサン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ_プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Lys(Tfa)-DdCpA)（化合物ｔｋ５５）の合成



[1347] ２―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－６―（２，２，２－トリフルオロアセトアミド）ヘキサン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ_２―オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ５４）（５．３ｍｇ、５．５２μｍｏｌ）のジクロロメタン（０．１ｍＬ）溶液に１０％トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（０．２１ｍＬ）を添加し、室温で５５分間撹拌

した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2—アミノー6_（2，2，2—トリフルオロアセトアミド)ヘキサン酸 (2S)-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノー2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）-5-（6—アミノー9H—プリンー9—イル）－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Lys(Tfa)-pdCpA) (化合物tk55)（4.2mg、88%）を得た。

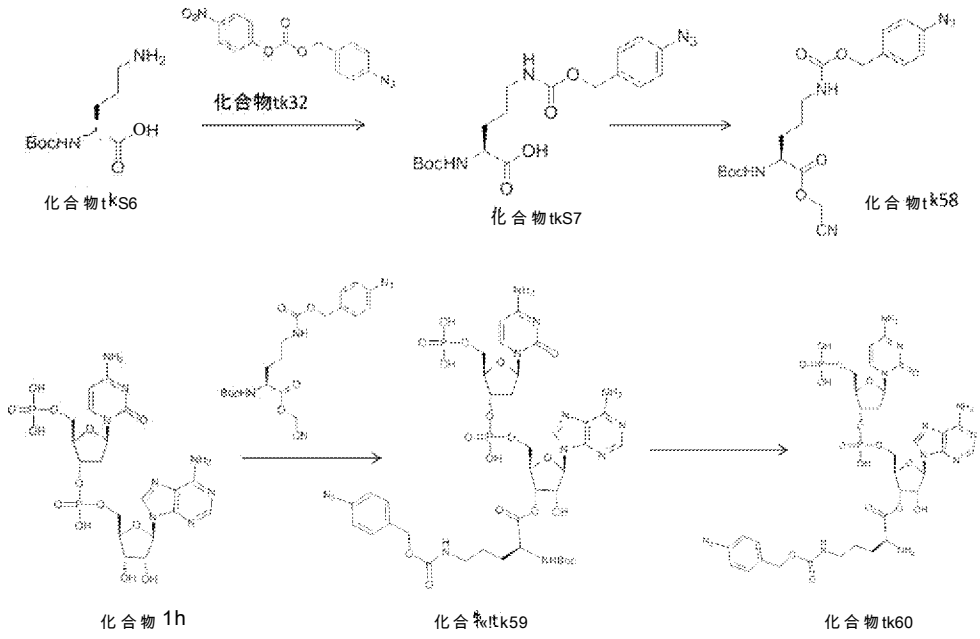
LCMS（ESI） m/z = 859.4 （M-H）-

保持時間：0.26分 (分析条件30D「六05）

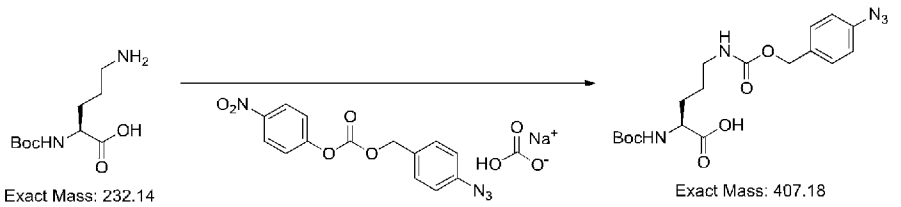
[1348] 10-1-11. アミノアシル化DdC_DA化合物t_k60の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

τKスキーム11



[1349] （S）-5-（（（（4_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）-2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸 (化合物tk57）の合成



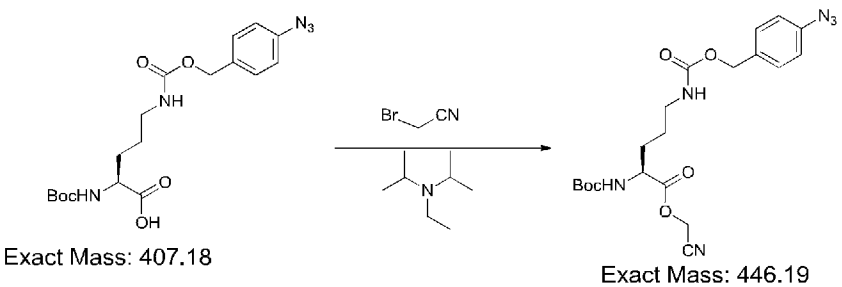
Exact Mass: 232.14 Exact Mass: 407.18

[1350] Ｂｏｃ-Ｏｒｎ-ＯＨ（化合物ｔｋ５６）（３２１ｍｇ、１．３８２ｍｍｏｌ）と炭酸水素ナトリウム（２９０ｍｇ、３．４５ｍｍｏｌ）の１，４＿ジオキサン（３ｍＬ）―水（２ｍＬ）の懸濁液に文献記載（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２００８，１９，７１４．）の方法で合成した炭酸（４―ニトロフエニル）４＿アジドベンジル（化合物ｔｋ３２）（５２１ｍｇ、１．６５８ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で２３時間撹拌後、氷浴で冷却し、酢酸エチル及び水で希釈した混合物に飽和硫酸水素カリウム水溶液（２ｍＬ）を添加した。酢酸エチルにて抽出し（２回）、有機相を水（１０ｍＬで２回）及び食塩水（１０ｍＬ）にて洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮後、得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（（Ｓ）－５－（（（（４―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（化合物ｔｋ５７）（５０１．３ｍｇ、８９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４０６（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．７３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1351] ５－（（（（４＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ＿ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸＿（Ｓ）―シアノメチル（化さ物ｔｋ５８）のさ成



Exact Mass: 407.18 Exact Mass: 446.19

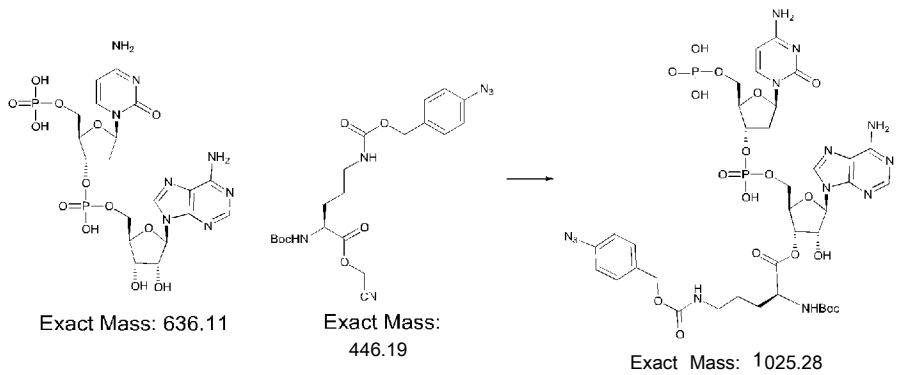
[1352] 窒素雰囲気下、（Ｓ）―５―（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カル

ボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（化合物ｔｋ５７）（３６７ｍｇ、０．９０１ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（１ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン（１７３μＬ、０．９９１ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル（３１４μＬ、４．５０ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて１時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、５_（（（（４—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（Ｓ）_シアノメチル（化合物ｔｋ５８）（４１７．２ｍｇ、ｑｕａｎｔ．）な得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４４５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８２分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1353] χ．５－（（（（４＿アジドベンジル）ォキシ）カルボニル）アミノ）＿２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸＿（２Ｓ）＿＿（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４—アミノー２＿ォキソピリミジン＿１（２Ｈ）—イル）＿２＿（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）＿５＿（６—アミノ＿９Ｈ—プリン＿９＿イル）＿４—ヒドロキシテトラヒドロフラン—３—イル（化合物ｔｋ５９）の合成



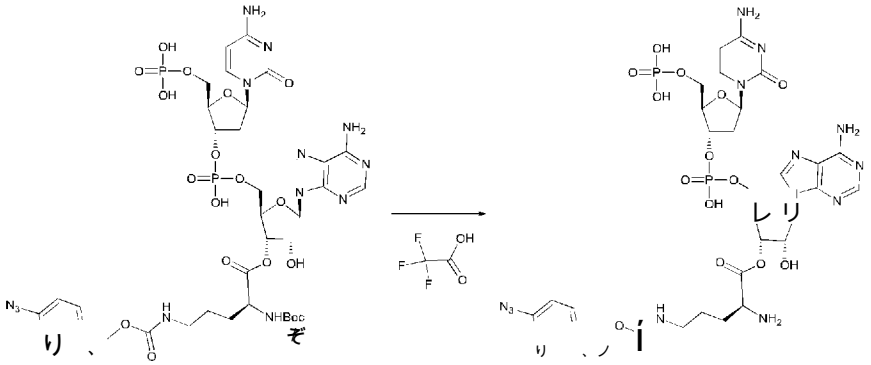
[1354] 緩衝液Ａ（３３ｍＬ）にリン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４—アミノー２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）—イル）＿３＿（（（（（

２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチル（化合物１ｈ）（１４３ｍｇ、０．２２４ｍｍｏｌ）と５－（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（Ｓ）－シアノメチル（化合物ｔｋ５８）（４００ｍｇ、０．８９６ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（１ｍＬ）溶液を加え、室温で１．５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液／０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、５－（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（化合物ｔｋ５９）（５４．７ｍｇ、２４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝１０２４．５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．５４分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1355] ２－アミノ－５－（（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ペンタン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル　Orn(Acbz)-pdCpA（化合物ｔｋ６０）の合成



Exact Mass: 1025.28 Exact Mass: 925.23

[1356] 5-(((((4_アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)_2_((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ_9H—プリン—9—イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (化合物tk59) (22.7mg、0.022mmol)のジクロロメタン (0.4mL)溶液に、10%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液 (0.4mL)を添加し、室温で20分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、2—アミノ—5_(((((4—アジドベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ペンタン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ−9H—プリン−9—イル)−4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Orn(Acbz)-pdCpA) (化合物tk60) (4.3mg、21%)を得た。

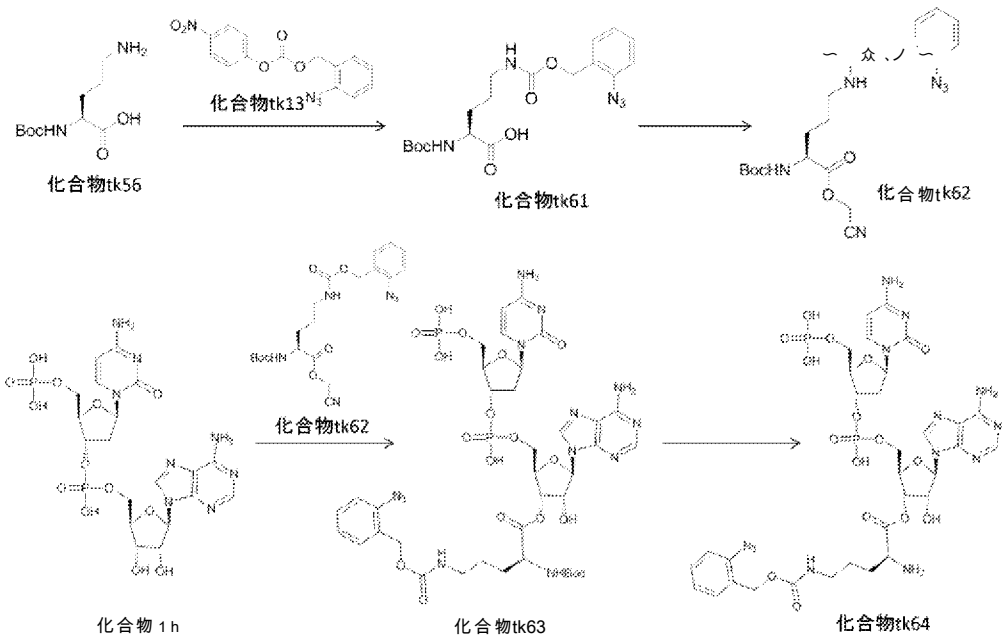
LCMS(ESI) m/z = 924.3 (M-H)-

保持時間:0.37分 (分析条件30D「六05)

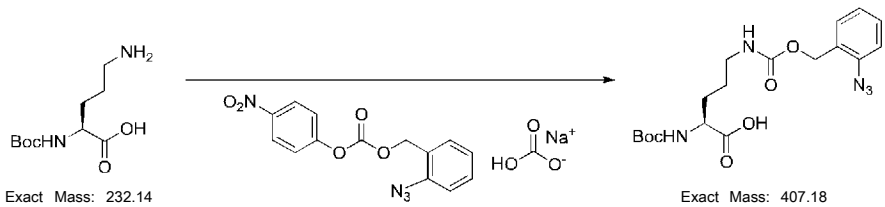
[1357] 10-1-12. アミノアシル化DdCDA化合物tk64の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム 12



[1358] （S）-5-（（（（2_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）-2-（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（化合物tk61）の合成



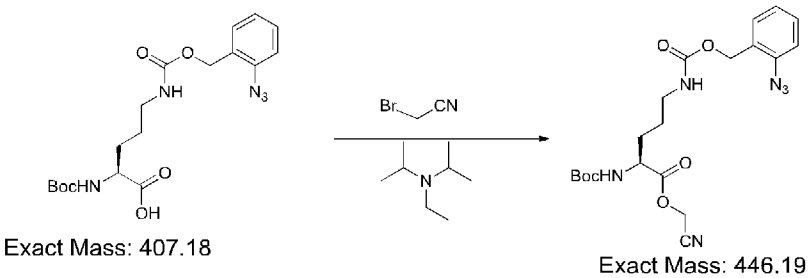
[1359] Boc-Orn-OH（化合物tk56）（308mg、1.326mmol）と炭酸水素ナトリウム（278mg、3.32mmol）の1，4－ジオキサン（3mL）—水（2mL）の懸濁液に炭酸（4－ニトロフェニル）2—アジドベンジル（化合物tk13）（458mg、1.459mmol）を添加した。反応混合物を室温で20.25時間撹拌後、水浴で冷却し、酢酸エチル及び水で希釈した混合物に飽和硫酸水素カリウム水溶液（1.5mL）を添加した。酢酸エチルにて抽出し（2回）、有機相を水（10mLで2回）及び食塩水（10mL）にて洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧濃縮後、得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、 (S）_５_ （（（（２—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_ （（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸 (化合物ｔｋ６１）（５５６．Ｏｍｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ４０６ (M- H）-

保持時間 :0．７３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1360] 5- （（（（２_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸___(S）_—シアノメチル (化合物ｔｋ６２）の合成



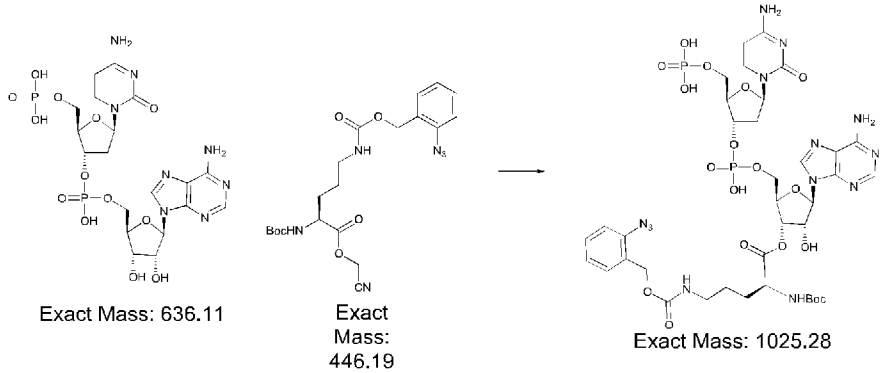
[1361] 窒素雰囲気下、 (S）- 5- （（（（２—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_ （（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸 (化合物ｔｋ６１）（４３５．５ｍｇ、１．０６９ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（１ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン（２０５μＬ、１．１７６ｍｍｏｌ）、続いてブロモアセトニトリル (３７３μＬ、５．３４ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて３．５時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、５_ （（（（２—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）_２_ （（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸 (S）—シアノメチル (化合物ｔｋ６２）（４７７．２ｍｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ４４５．４ (M- H）-

保持時間 :0．８１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1362] 5- (J.（（２—アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ」- ２- （

（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸　(2Ｓ)-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ）-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-5-（4-ァミノ_2_オキソピリミジン_1_（2Ｈ）_ィル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_ィル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6―アミノ_9Ｈ_プリン－9―ィル）―4―ヒドロキシテトラヒドロフラン－3―ィル（化合物ｔｋ63）の合成



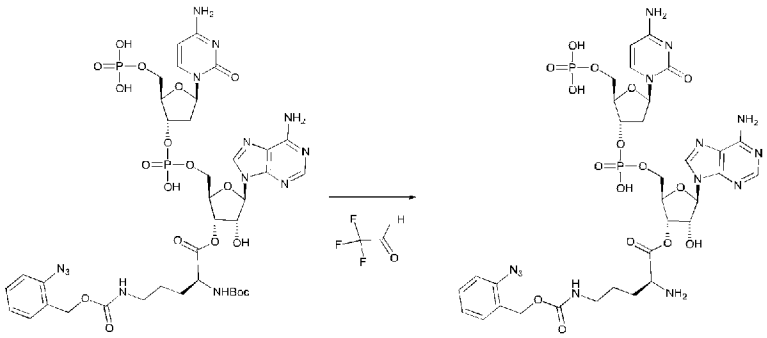
[1363] 緩衝液Ａ（３３ｍＬ）にリン酸二水素（(2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-（4―アミノ－2_オキソピリミジン_1（2Ｈ）―ィル）_3_（（（（（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-（6―アミノ－9Ｈ―プリン－9―ィル）―3，4―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－2―ィル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_2_ィル）メチル（化合物１ｈ）（１６０ｍｇ、０．２５２ｍｍｏｌ）と5_（（（（2_アジドベンジル）オキシ）カルボニル）ァミノ）_2_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸（S）―シアノメチル（化合物ｔｋ６２）（４５０ｍｇ、１．００８ｍｍｏｌ）のァセトニトリル（１．５ｍＬ）溶液を加え、室温で2時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸ァセトニトリル溶液）にて精製し、5_（（（（2―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）ァミノ）_2_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸（2Ｓ）-（2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ）-2-（（（（（（2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ）-5-（4―アミノ_2―オキ

ソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ６３）（５１．３ｍｇ、２０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１０２４．５（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．５４分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1364] ２―アミノ－５＿（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ペンタン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン＿３―イル（Orn(pAcbz)-pdCpA）（化合物ｔｋ６４）の合成



Exact Mass: 1025.28 Exact Mass: 925.23

[1365] ５－（（（（２＿アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ―プリン－９―イル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ６３）（５１ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（０．４５ｍＬ）溶液に

、１０％トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（０．４５ｍＬ）を添加し、室温で４５分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液／０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２―アミノ―５_（（（（２―アジドベンジル）オキシ）カルボニル）アミノ）ペンタン酸　（２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（Orn(oAcbz)-pdCpA）（化合物ｔｋ６４）（４２．６ｍｇ、９３％）を得た。

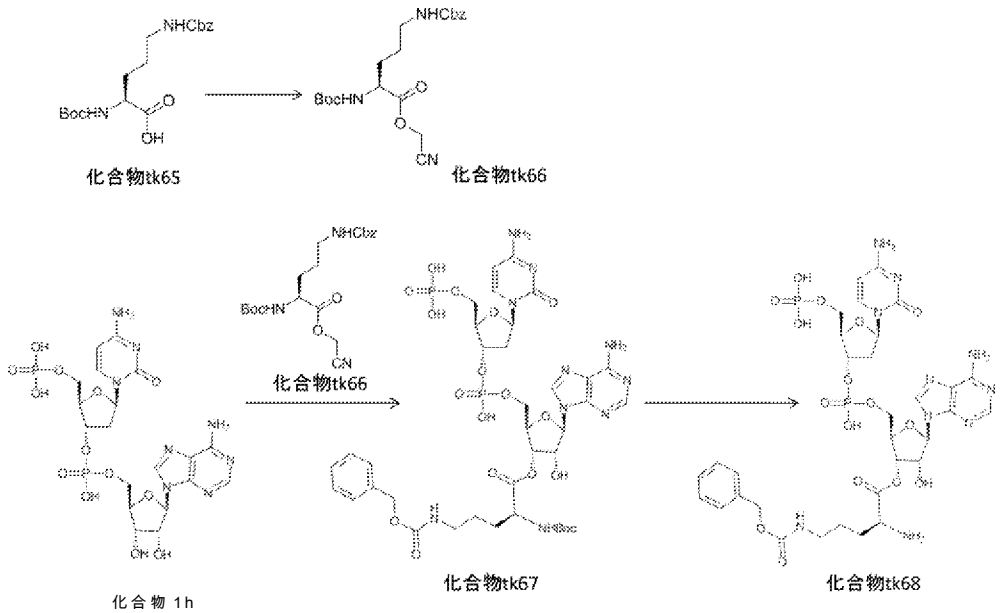
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝９２４．４（Ｍ-Ｈ）-

保持時間：０．３７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1366] １０-１-１３．　アミノアシル化ＤｄＣＤＡ化合物ｔｋ６８の合成

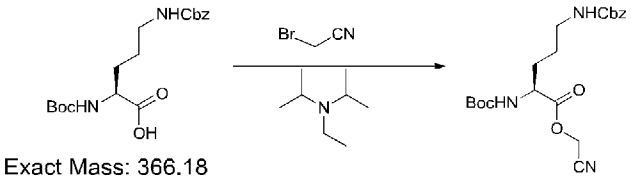
以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム13



[1367] ５-（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタンJ発　ＬＳ）_シアノメチル（化合物ｔ

ｋ６６）の合成



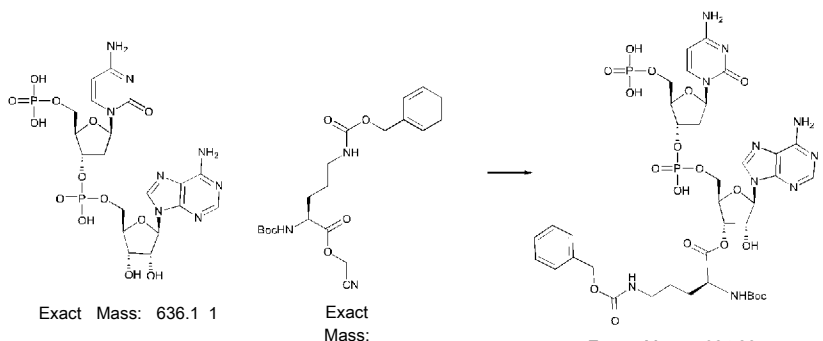
Exact Mass: 366.18 Exact Mass: 405.1 9

[1368] 窒素雰囲気下、Ｂｏｃ＿０ｒｎ（Ｚ）—ＯＨ（化合物ｔｋ６５）（１６０ｍｇ、０．４３７ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（0．５ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン（８４μＬ、０．４８０ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル（１５２从１、２．１８３ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて１時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、５＿（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（S）—シアノメチル（化合物ｔｋ６６）（１８６．７ｍｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝４０４（M- H）-

保持時間：０．７７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1369] ５- （（（ベンジルォキシ）カルボニル）アミノ）＿２＿（（ｔｅｒｔ- 7" トキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸＿（２Ｓ）- （２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）- ２- （（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）- ５- （４—アミノ＿２—オキソピリミジン－１（２Ｈ）—イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５—（６—アミノ－９Ｈ—プリン－９—イル）＿４—ヒドロキシテトラヒドロフラン－３—イル（化合物ｔｋ６７）の合成



Exact Mass: 636.1 1 Exact Mass: 405.19 Exact Mass: 984.28

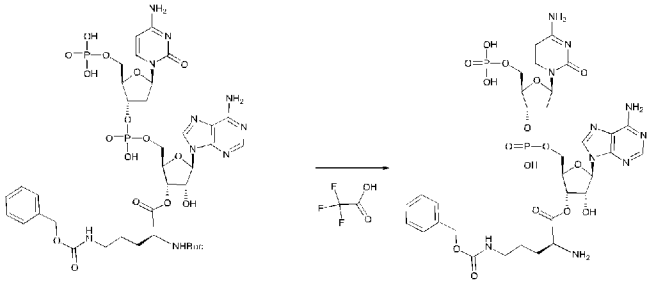
[1370] 緩衝液A（18mL）にリン酸二水素（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノ—2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）_3_（（（（（2R，3S，4R，5R）-5-（6—アミノ—9H—プリン—9—イル）—3，4—ジヒドロキシテトラヒドロフラン—2—イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_2_イル）メチル（化合物1h）（67.9mg、0.107mmol）の水溶液（0.3mL）と5_（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert_ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（S）—シアノメチル（化合物tk66）（173mg、0.427mmol）のアセトニトリル（0.3mL）溶液を加え、室温で1.25時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、5-（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）_2_（（tert—ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（2S）-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノ_2—オキソピリミジン—1（2H）—イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）—5—（6—アミノ—9H—プリン—9—イル）—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル（化合物tk67）（30.1mg、29%）を得た。

LCMS（ESI）m/z=983.4（M-H）-

保持時間：0.54分（分析条件30D「六05）

[1371] 2—アミノ—5_（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）ペンタン酸（2S）-（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4—アミノ—2_オキソピリミジン_1（2H）—イル）—2-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6—アミノ—9H—プリン—9—イル》—4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル（_0rn_

(Z)-pdCpA) (化合物tk68)の合成



[1372] 5-((((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)_2_((tert_ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ_2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5—(6—アミノー9H—プリンー9—イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル (化合物tk67)(30mg、0.030mmol)のジクロロメタン(1.1mL)溶液にトリフルオロ酢酸(0.117mL)を添加し、室温で35分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、2—アミノー5_((((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ)ペンタン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ—9H—プリンー9—イル)_4—ヒドロキシテトラヒドロフランー3—イル (Orn(Z)-pdCpA) (化合物tk68)(24.4mg、91%)を得た。

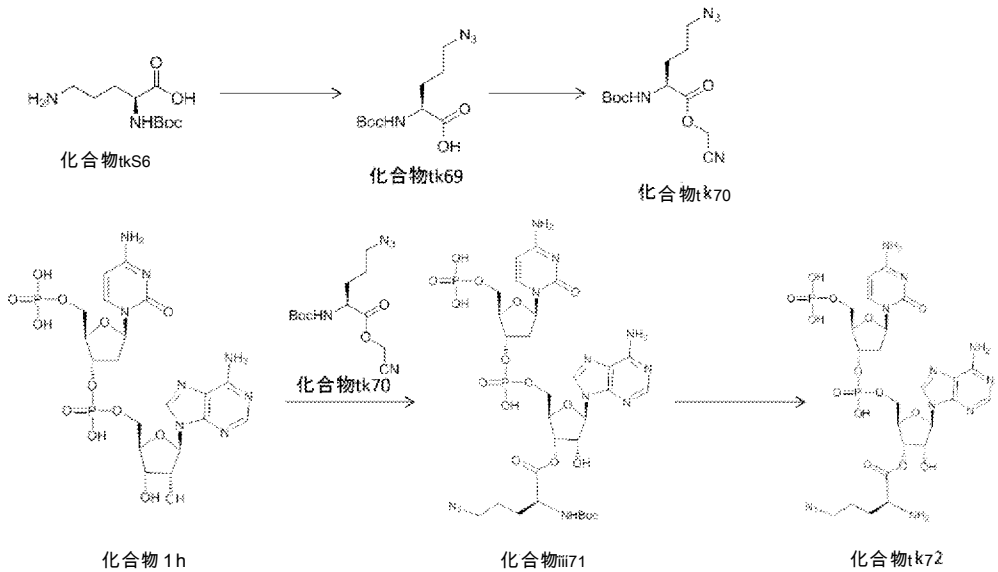
LCMS(ESI) m/z = 883.3 (M-H)-

保持時間:0.33分 (分析条件30D「六05)

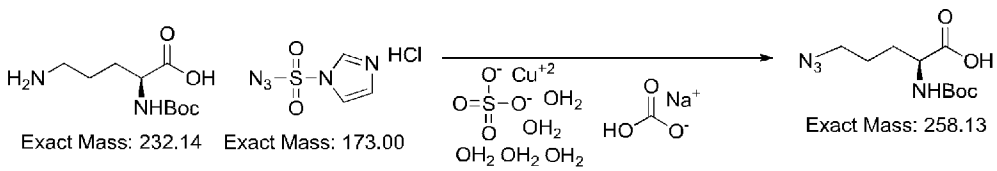
[1373] 10-1-14. アミノアシル化DdCDA化合物tk72の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム 14



[1374] (S)-5-アジド-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタン酸 (化合物tk69)の合成



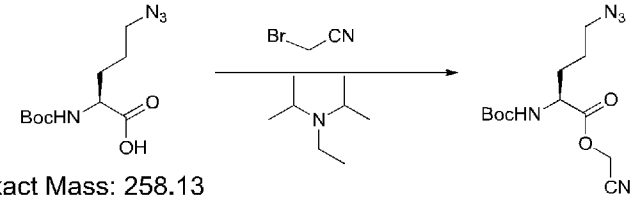
[1375] Boc-Orn-OH (化合物tk56) (1.0g、4.31mmol)と硫酸銅五水和物 (21mg、0.086mmol)のメタノール (20mL)—水 (6mL)混合物に室温で炭酸水素ナトリウム (1.99g、23.68mmol)を添加し、続いて文献記載 (Org. Lett., 2007, 9, 3797.)の方法で合成したアジ化 1H—イミダゾール—1—スルホニル塩酸塩 (1.08g、5.17mmol)を加えた。反応混合物を室温で24時間撹拌した。反応混合物を氷浴で冷却後、飽和硫酸水素カリウム水溶液 (8mL)を添加した。得られた混合物を酢酸エチルにて抽出し (3回)、有機相を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-5-アジド-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ペンタン酸 (化合物t

ｋ６９）（１．１９ｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２５７ （M- H）-

保持時間 :0．６１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1376] ５＿アジドー２＿＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸＿＿（Ｓ）＿―シァノメチル (化合物ｔｋ７０）の合成



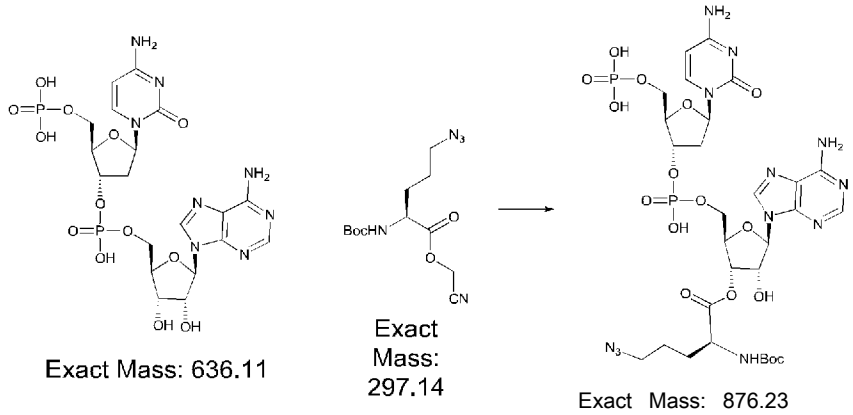
Exact Mass: 258.13 Exact Mass: 297. 14

[1377] 窒素雰囲気下、 (S）＿５＿アジド＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸 (化合物ｔｋ６９）（１５０ｍｇ、０．５８１ｍｍｏｌ）のァセトニトリル (0．８ｍＬ）溶液に、室温でＮ，Ｎ―ジイソプロピルエチルァミン (１１１从1、０．６３９ｍｍｏｌ）、続いてプロモアセトニトリル (２０３从し ２．９Ｏｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度にて4時間撹拌後、減圧濃縮して得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸ェチル）にて精製し、５＿アジドー２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸 (S）―シァノメチル (化合物ｔｋ７０）（１８５ｍｇ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２９６ （M- H）-

保持時間 :0．７３分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[1378] ５＿アジドー２＿＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）ァミノ）ペンタン酸＿＿（２Ｓ）- （２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）- ２- （（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）- ５- （４―アミノー２＿ォキソピリミジン＿１＿（２Ｈ）＿―イル）ー２- （（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿ィル）ォキシ）＿（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）＿５＿＿（６―アミノー９Ｈ―プリン＿９＿ィル）＿４―ヒドロキシテトラヒドロフランー３―ィル (化合物ｔｋ７１）の合成

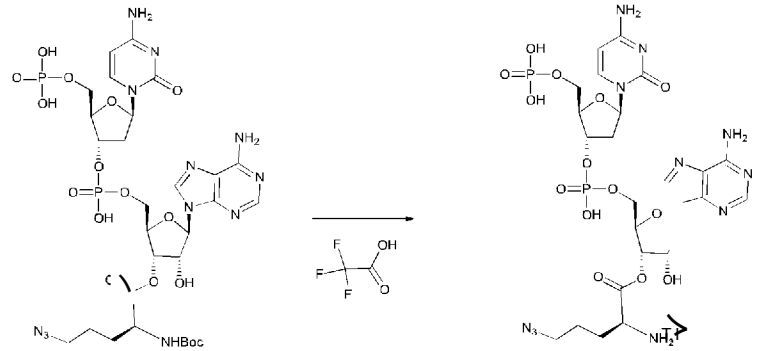


[1379] 緩衝液A（１８ｍＬ）にリン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- ５- （４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- ５- （６_アミノ－９Ｈ_プリン－９_イル）―３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル （化合物１ｈ）（７７ｍｇ、０．１２１ｍｍｏｌ）の水溶液 (０．３ｍＬ）と５―アジド－２―（（ｔｅｒｔ_ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸（Ｓ）―シアノメチル （化合物ｔｋ７０）（１４４ｍｇ、０．４８４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン (０．３ｍＬ）溶液を加え、室温で０．５時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/ ０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、５_アジド_２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸 (２Ｓ）- （２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）- ２- （（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）- ５- （４―アミノ_２―オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル （化合物ｔｋ７１）（２４．５ｍｇ、２３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ８７５．４ （Ｍ- Ｈ）-

保持時間 :０．４４分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1380] ２―アミノ－５―アジドペンタン酸　(２Ｓ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）_―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル　Ω0rn_(N3l^pdQpA)―　(化合物ｔｋ７２）の合成



Exact Mass: 876.23　　Exact Mass: 776. 18

[1381] ５_アジド－２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）ペンタン酸　(２Ｓ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ｔｋ７１）（２４．５ｍｇ、０．０２８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（１ｍＬ）溶液にトリフルオロ酢酸（０．０９ｍＬ）を添加し、室温で２５分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２―アミノ―５_アジドペンタン酸　(２Ｓ)－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）(ヒドロキシ)ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ

—プリン_９_ィル）_４—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル（orn (N3)-pdCpA）（化合物ｔｋ７２）（１８．８ｍｇ、８７％）を得た。

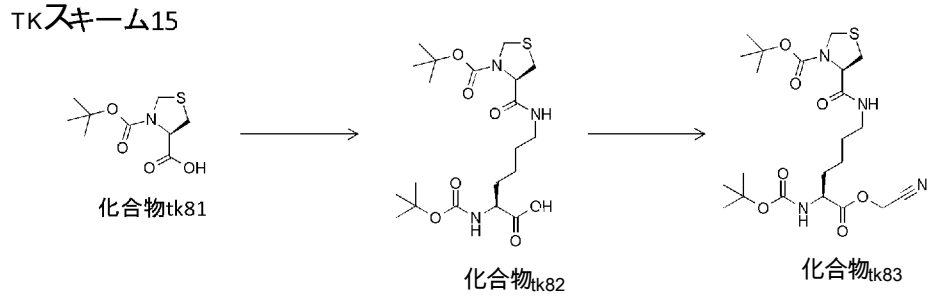
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝７７５．４（Ｍ－Ｈ）－

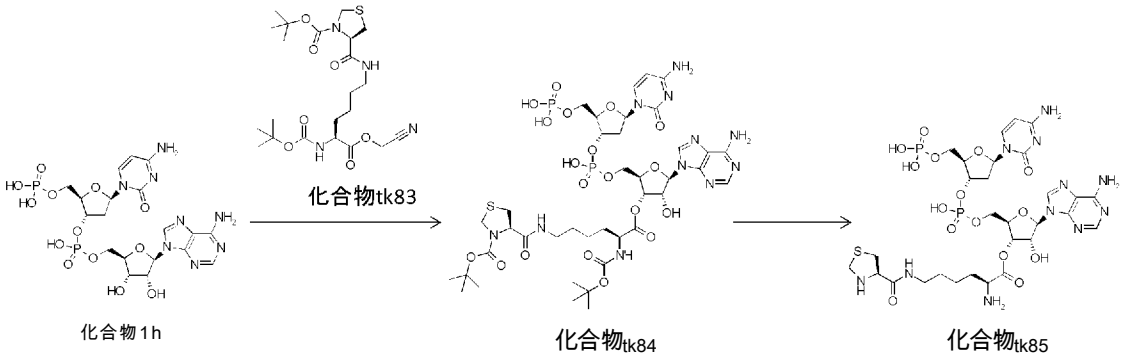
保持時間：0．２５分（分析条件３０Ｄ「六0５）

[1382] １０－１－１５．アミノアシル化ＰｄＣｐＡ化合物ｔｋ８５の合成

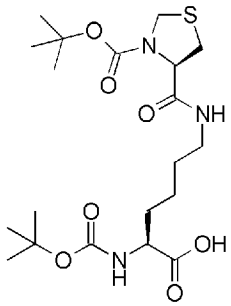
以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム15





[1383] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）チアゾリジン—4_カルボキサミド）ヘキサン酸（化さ物ｔｋ８２）のさ成



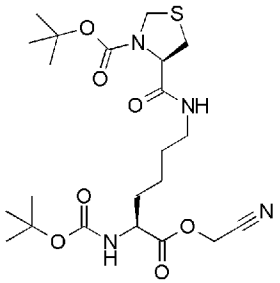
[1384] （Ｒ）－３－（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）チアゾリジン—4_カルボン酸（化合物ｔｋ８１）（２０８ｍｇ、０．８９２ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１ｍｌ）溶液に4—（4，６—ジメトキシ—1，３，５—トリアジン—2

—ィル）_４_メチルモルホリニゥムクロリド（２４７ｍｇ、０．８９２ｍｍｏｌ）を加え、室温で３０分間攪拌した。（Ｓ）_６—アミノ—２_（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキサン酸（２２０ｍｇ、０．８９２ｍｍｏｌ）の水（１ｍｌ）溶液を室温で３分間かけて滴下し、滴下終了後、室温で３０分間攪拌した。反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール）にて精製し、（Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（Ｒ）_３-（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）チアゾリジン—４_カルボキサミド）ヘキサン酸（化合物ｔｋ８２）（１５６ｍｇ、３８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４６２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1385] （Ｒ）-ｔｅｒｔ-ブチル_４_（（（Ｓ）-５-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（シアノメトキシ）_６—オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン—３_カルボキシレート（化合物ｔｋ８３）の合成



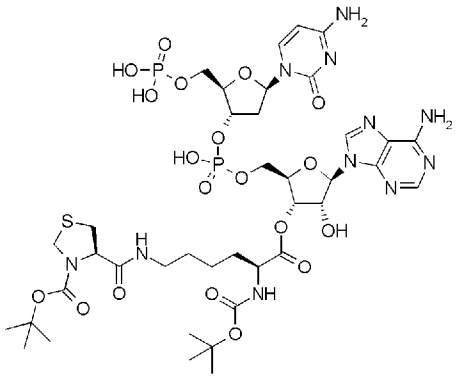
[1386] （Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（Ｒ）-３-（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）チアゾリジン—４_カルボキサミド）ヘキサン酸（化合物ｔｋ８２）（１３０ｍｇ、０．２８２ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（５ｍｌ）溶液にプロモアセトニトリル（５７μｌ、０．８４５ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ—ジィソプロピルエチルアミン（１４７μｌ、０．８４５ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で３時間攪拌した。反応混合物をエバポレーターで減圧濃縮し、残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（Ｒ）-ｔｅｒｔ—ブチル

４－（（（Ｓ）－５－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６－（シアノメトキシ）_６―オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン_３_カルボキシレート（化合物ｔｋ８３）（１４０ｍｇ、９９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝５０１．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７６分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1387] （４Ｒ）－ｔｅｒｔ－ブチル_４_（（（５Ｓ）－６－（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ―２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ－プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）_５_（（ｔｅｒｔ_ブトキシカルボニル）アミノ）_６―オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン―３_カルボキシレート_（化合物ｔｋ８４）_の合成



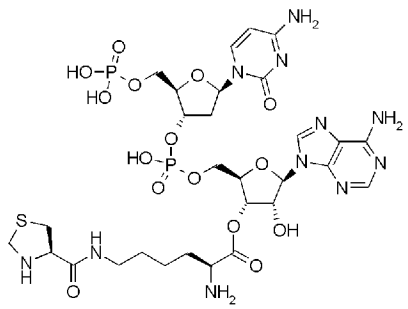
[1388] 緩衝液Ａ（４０ｍＬ）にリン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）―３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ）（５０ｍｇ、０．０７９ｍｍｏｌ）の水溶液（０．５ｍｌ）と（Ｒ）－ｔｅｒｔ―ブチル　４―（（（Ｓ）―５―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（シアノメトキシ）_６―オキソヘキシル）カル

バモイル）チアゾリジン―3_カルボキシレート（化合物tk83）（118mg、0.236mmol）のテトラヒドロフラン（0.5ml）溶液を加え、室温で2時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（水/アセトニトリル溶液）にて精製し、（4R）-tert-ブチル 4_（（（5S）-6-（（（2R，3S，4R，5R）-2-（（（（（（2R，3S，5R）-5-（4―アミノ_2―オキソピリミジン―1（2H）―イル）_2_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－5―（6―アミノ―9H―プリン―9―イル）－4―ヒドロキシテトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）_5_（（tert―ブトキシカルボニル）アミノ）_6―オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン_3_カルボキシレート（化合物tk84）の粗精製物（80mg）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 1078（M-H）-

保持時間：0.55分（分析条件30D「六05）

[1389] 2―アミノ―6_（（R）―チアゾリジン―4_カルボキサミド）ヘキサン酸_（2S）-（2R.3S.4R.5R）-2-（（（（（（2R.3S.5R）-5-（4―アミノ―2_オキソピリミジン_1_（2H）―イル）-2-（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6―アミノ_9H―プリン―9―イル）－4―ヒドロキシテトラヒドロフラン―3―イル（Lys(Thz)-pdCDA）（化合物tk85）の合成



[1390] 前述した（4R）-tert―ブチル 4_（（（5S）_6_（（（2

Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ＿９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）－５―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿６―オキソヘキシル）カルバモイル）チアゾリジン―３＿カルボキシレート（化合物ｔｋ８４）の粗精製物（２０ｍｇ）をジクロロメタン（０．３ｍｌ）に懸濁させ、室温にてトリフルオロ酢酸（０．１ｍＬ）を添加し、同温度で３０分間撹拌した。減圧濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（水／アセトニトリル溶液）にて精製し、２―アミノ―６＿（（Ｒ）―チアゾリジン＿４―カルボキサミド）ヘキサン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２＿オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（Lys(Thz)-pdCpA）（化合物ｔｋ８５）（１．６ｍｇ、２ステップ　７％）を得た。

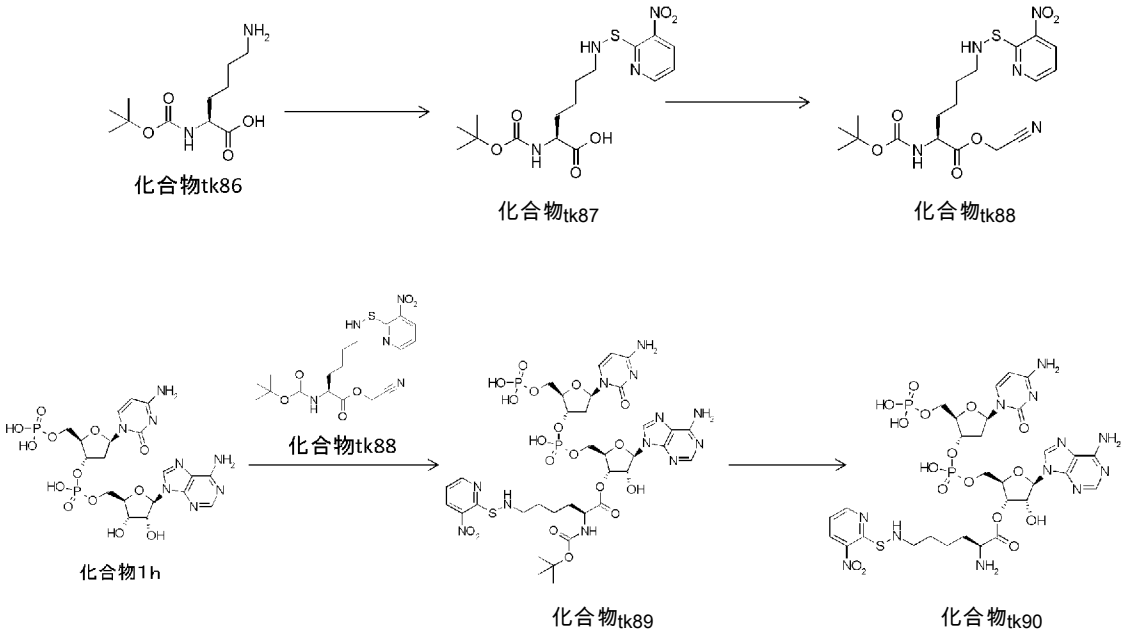
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝８７８（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．１７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

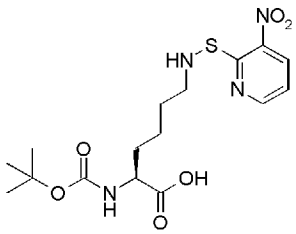
[1391] １０－１－１６．　アミノアシル化ｐｄＣｐＡ化合物ｔｋ９０の合成

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム16



[1392] (S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-6-((3-ニトロピリジン-2-イル)チオ)アミノ)ヘキサン酸(化合物tk87)の合成

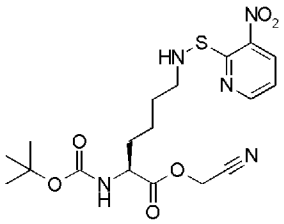


[1393] 2-ニトロ-2-ピリジンスルフェニルクロリド(313mg、1.644mmol)のジクロロメタン(30ml)溶液に(S)-6-アミノ-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(化合物tk86)(270mg、1.096mmol)を加え、この懸濁液にトリエチルアミン(1.53mL、10.96mmol)を3分間かけて滴下した。反応液を室温で3時間攪拌した後、エバポレーターで減圧濃縮し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-6-((3-ニトロピリジン-2-イル)チオ)アミノ)ヘキサン酸(化合物tk87)(62mg、14%)を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４０１（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７４分（分析条件３０Ｄ「六０５」）

[1394] （Ｓ）—シアノメチル ２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３—ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８８）の合成



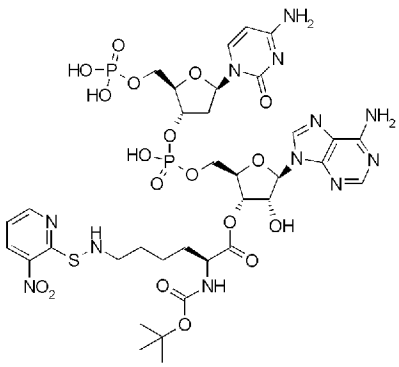
[1395] （（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３—ニトロピリジン—２－イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸（化合物ｔｋ８７）（１５０ｍｇ、０．３７５ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（６ｍｌ）溶液にプロモアセトニトリル（７６μｌ、１．１２４ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ—ジイソプロピルエチルアミン（１９６μｌ、１．１２４ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で５時間攪拌した。反応を完結させるため更にプロモアセトニトリル（４９μｌ、０．４１３ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。反応混合物をエバポレーターで減圧濃縮し、残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、（Ｓ）—シアノメチル ２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３—ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８８）（１５２ｍｇ、９２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４４０（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８３分（分析条件３０Ｄ「六０５」）

[1396] ２－（（ｔｅｒｔ—ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３—ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸 （２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４—アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）—イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３—イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホ

ル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル　２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３－ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８９）の合成



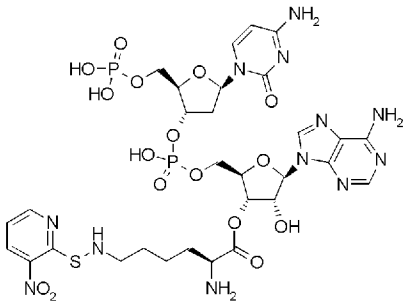
[1397] 緩衝液Ａ（３０ｍＬ）にリン酸二水素　（(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチル（化合物１ｈ）（２０ｍｇ、０．０３１ｍｍｏｌ）の水溶液（０．５ｍｌ）と（Ｓ）－シアノメチル　２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３－ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８８）（３０ｍｇ、０．０６９ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．５ｍｌ）溶液を加え、室温で２時間撹拌した。凍結乾燥後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．１％ギ酸水溶液／０．１％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－６－（（（３－ニトロピリジン－２－イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸　(２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラ

ン－３―イル　２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（（３―ニトロピリジン－２_イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８９）の粗精製物（１６ｍｇ）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝１０１７（M-Ｈ）-

保持時間：０．５４分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1398] ２―アミノ－６_[（（（３―ニトロピリジン－２_イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸]-(2Ｓ)-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-[（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）-イル）_２_[（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ]（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（$L_{VS}(N_{DVS})$-$_{D}{}^{d}C_{D}A$）（化さ物ｔｋ９０）のさ成



[1399] 前述した２_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－６_（（（３―ニトロピリジン－２_イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸（２Ｓ）_（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６―アミノ_９Ｈ―プリン_９_イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　２―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）_６_（（（３―ニトロピリジン_２―イル）チオ）アミノ）ヘキサノエート（化合物ｔｋ８９）の粗精製物（１６ｍｇ）をジクロロメタン（１ｍｌ）に懸濁させ、室温にてトリフルオロ酢酸（０．２５ｍＬ）を添加し、同温度で１５分間撹拌した。減圧濃縮後、得られ

た残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0．1％ギ酸水溶液/0．1％ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、2―アミノ―6_（（（3―ニトロピリジン―2_イル）チオ）アミノ）ヘキサン酸 (2S)-(2R，3S，4R，5R)-2-（（（（（（2R，3S，5R)-5-(4―アミノ―2_オキソピリミジン_1（2H）―イル）_2_（(ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_3_イル）オキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_5_（6―アミノ_9H―プリン―9―イル）_4―ヒドロキシテトラヒドロフラン―3―イル （Lys(Npys)-pdCpA （化合物tk90）（12mg、2ステップ 42％）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 917（M-H）-

保持時間 :0．34分 (分析条件30D「六05）

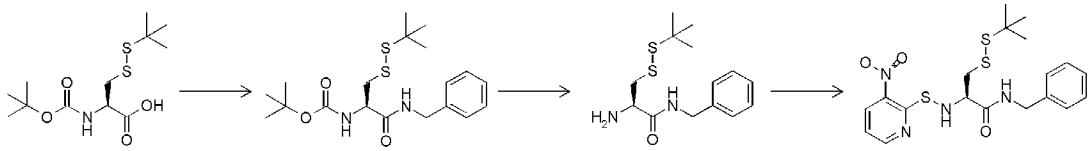
[1400] 10-2．脱保護条件の確認

RNAが安定な反応条件にてアミノ基保護基が脱保護されることを確認、もしくは新条件を探索する目的で以下の実験を行い、RNAが安定に存在する反応条件でのアミノ基脱保護反応を得た。

[1401] 10-2-1． 脱保護方法の評価化さ物tk94のさ成および脱保護反応

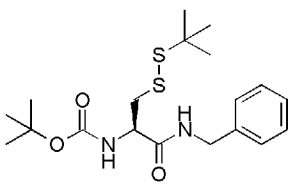
以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム17



化合物tk91 化合物tk92 化合物tk93 化合物tk94

[1402] （R)-tert―プチル (1－(ベンジルアミノ)_3_(tert-プチルジスルファニル)_1_オキソプロパン_2_イル)カルバメート(化合物tk92）の合成



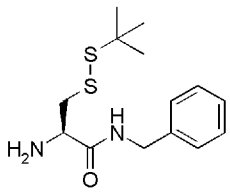
[1403] （R)-2-（（tert―プトキシカルボニル）アミノ）_3_（te

ｒｔ―プチルジスルファニル）プロパン酸 (化合物ｔｋ９１）（１．９５ｇ、６．３０ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン (２０ｍｌ）溶液に0―（７―ァザベンゾトリアゾール_１_ィル）_Ｎ、Ｎ、Ｎ'、Ｎ'―テトラメチルゥロニゥムヘキサフルオロリン酸塩 (ＨＡＴＵ）（２．５２ｇ、６．６２ｍｍｏｌ）、ベンジルアミン (０．７２３ｍし ６．６２ｍｍｏｌ）、Ｎ、Ｎ―ジィソプロピルエチルァミン (１．１５３ｍし ６．６２ｍｍｏｌ）を加え、反応液を室温で2時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、 (Ｒ）-ｔｅｒｔ―プチル (1－（ベンジルァミノ）_３_（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）_１_オキソプロパン_２_ィル）カルバメート (化合物ｔｋ９２）（２．３５７ｇ， ５．９１ｍｍｏし ９４％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ３９９ (Ｍ+Ｈ）+

保持時間 :０．９３分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1404] _(Ｒ)__２―ァミノ_Ｎ―ベンジル－３__(ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル)_プロパンアミド_(化合物ｔｋ９３)_の合成

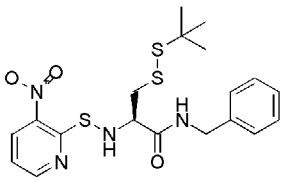


[1405] （Ｒ）-ｔｅｒｔ―プチル (1－（ベンジルァミノ）－３―（ｔｅｒｔ-プチルジスルファニル）_１_オキソプロパン_２_ィル）カルバメート（化合物ｔｋ９２）（１．０４９ｇ、２．６３ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（９ｍｌ）溶液にトリフルオロ酢酸 (３ｍｌ）を加え、反応液を室温で1時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮後、酢酸エチル/ 飽和炭酸水素ナトリウムで抽出操作を行い、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリゥムで乾燥させ、ろ過後、減圧濃縮することで、 (Ｒ）_２―ァミノ―Ｎ―ベンジル―3_（ｔｅｒｔ―プチルジスルファニル）プロパンアミド (化合物ｔｋ９３）（８１０ｍｇ、１００％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ２９７ （M- H）-

保持時間 :0．９３分 (分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1406] _(Ｒ)_ Ｎ—ベンジル—３_ _(ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル)_２_ _(_(（３—ニトロピリジン－２_ィル)チオ)_アミノ)プロパンアミド_(化合物)ｔｋ９４）の合成

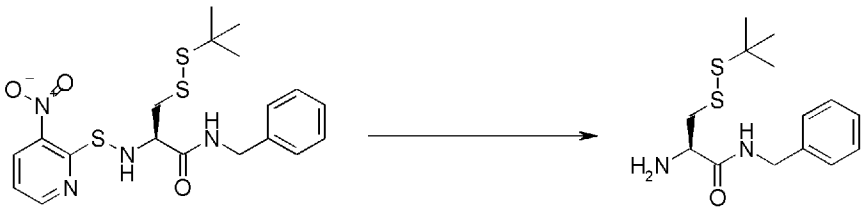


[1407] （Ｒ）_２—アミノ_Ｎ—ベンジル－３_（ｔｅｒｔ_ブチルジスルファニル）プロパンアミド (化合物ｔｋ９３）（６０ ｍｇ，０．２０１ ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン (0．０３４ ｍし 0．２４１ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１ｍｌ）に溶解し、この溶液を０℃に冷却した。３—ニトロ_２_ピリジンスルフエニルクロリド (４６．０ ｍｇ，０．２４１ ｍｍｏｌ）を加え、０℃で２時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル）にて精製し、 (Ｒ）—Ｎ—ベンジル—３—（ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル）_２_（（（３—ニトロピリジン－２_ィル）チオ）アミノ）プロパンアミド (化合物ｔｋ９４）（８７ｍｇ、９６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ４５３ （M+ H）+

保持時間 :1．０３分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[1408] ３—ニトロ_２_ピリジンスルフエニル基 _(Npvs) の脱保護実験



化合物tk94 化合物tk93

[1409] （Ｒ）_Ｎ—ベンジル—３_（ｔｅｒｔ_プチルジスルファニル）_２_（（（３—ニトロピリジン－２_ィル）チオ）アミノ）プロパンアミド (化

合物ｔｋ９４）をＮ，Ｎ＿ジメチルァセトアミド（ＤＭＡ）に溶解し、５０ｍＭのＤＭＡ溶液を調製した。このＤＭＡ溶液５０μｌに対して、ＤＭＡ（５０μｌ）、ｐＨ７．４に調製した１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（２５０μｌ）、２００ｍＭ　２＿メルカプトピリジンＤＭＡ溶液（５０μｌ）を順に加えた後、最後に１Ｍ塩酸（１３μｌ）を加えることでｐＨ４．１の反応液を調製した。この反応液を室温で静置することで脱保護反応を行った。反応の進行はＬＣＭＳによる（Ｒ）—Ｎ—ベンジル—３＿（ｔｅｒｔ—プチルジスルファニル）＿２＿（（（３—ニトロピリジン－２＿ィル）チオ）アミノ）プロパンアミド（化合物ｔｋ９４）の減少、および脱保護体である（Ｒ）＿２—ァミノ＿Ｎ—ベンジル－３＿（ｔｅｒｔ＿プチルジスルファニル）プロパンアミド（化合物でｋ９３）の増加を追跡した。反応後1時間で、化合物ｔｋ９３と化合物ｔｋ９４のＵＶ工リア比は１００：0であり、脱保護反応が完結したことを確認した。

[141 0] 化合物でｋ９３のＬＣＭＳの保持時間と質量電荷比は以下のとおりである。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝２９９　（Ｍ＋Ｈ）＋

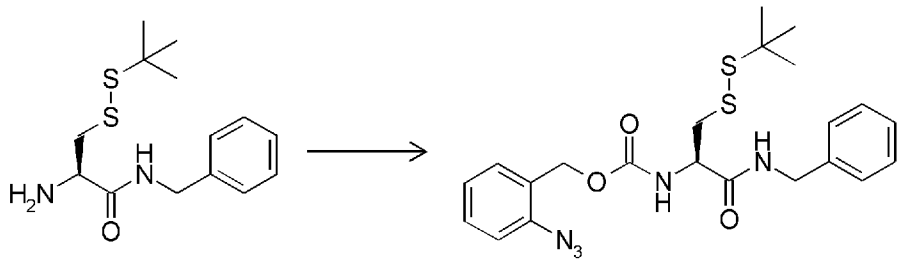
保持時間：0．９０分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

既知のＮｐｙｓ基の脱保護手法として、有機溶媒中、求核剤２＿メルカプトピリジンを用い、更に反応液中に酢酸を添加することで脱保護反応を加速させる条件が報告されている（非特許文献 Internat ional journa l of pept ide and prote in research, 1990, 35, 545-549）。本発明者らは、従来法の改良を行った結果、ＲＮＡが安定して存在する条件で、かつＮｐｙｓ基の脱保護反応が容易に進行する手法を見出した。実際にＲＮＡを本反応条件に伏した結果、ＲＮＡは安定性して存在することが確認され（表１９　反応条件Ｅ、および図８０　レーン５）、本反応条件の有用性が証明された。

[141 1] １０－２－２．　脱保悲　去の詈籠　剖勿ｔｋ９５き　き　なびそ編　呆讐Ａ

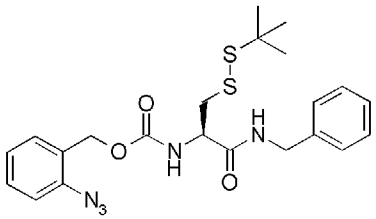
以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム18



化合物tk93 化合物tk95

[1412] （Ｒ）＿4＿アジドベンジル＿し1-（ベンジルアミノ）-３-（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）＿１＿ォキソプロパン＿２＿ィル）カルバメート＿（化合物ｔｋ９５）＿の合成

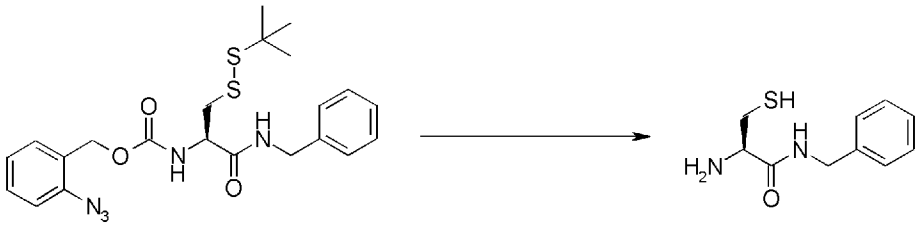


[1413] （Ｒ）-２―アミノ＿Ｎ―ベンジル－３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）プロパンアミド（化合物ｔｋ９３）（１４５ｍｇ、０．４８６ｍｍｏｌ）と炭酸水素ナトリウム（１０２ｍｇ、１．２１５ｍｍ$_0$ 1）の１，４＿ジオキサン（２ｍＬ）懸濁液に、室温で炭酸（４―ニトロフエニル）２―アジドベンジル（１６８ｍｇ、０．５３４ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を同温度で１５．５時間撹拌後、酢酸エチル及び水を添加した。得られた混合物を酢酸エチルで抽出し、有機相を水（５ｍＬで２回）及び食塩水（５ｍＬ）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）にて精製後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、（Ｒ）＿４＿アジドベンジル（１＿（ベンジルアミノ）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブチルジスルファニル）＿１＿オキソプロパン＿２＿ィル）カルバメート（化合物ｔｋ９５）（１４８．９ｍｇ、６５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝４７４．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：0．９７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1414] ２－アジドベンジルオキシカルボニル基（oAcbz）の脱保護実験



化合物tk95　　化合物tk9 9

[141 5] （Ｒ）－４－アジドベンジル（１－（ベンジルアミノ）－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジスルファニル）－１－オキソプロパン－２－イル）カルバメート（化合物ｔｋ９５）をアセトニトリルに溶解し、１０ｍＭのアセトニトリル溶液を調製した。このアセトニトリル溶液１０μｌに対して、アセトニトリル（５μｌ）、ｐＨ７．４に調製した１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（５０μｌ）、蒸留水（２５μｌ）、ｐＨ７．０に調製した１００ｍＭ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン水溶液（１０μｌ）を順に加え、ｐＨ７．４の反応液を調製した。この反応液を３７℃で静置して脱保護反応を行った。反応の進行はＬＣＭＳによる化合物ｔｋ９５の減少、および脱保護体であるＲ）－２－アミノ－Ｎ－ベンジル－３－メルカプトプロパンアミド（化合物ｔｋ９９）の増加を追跡した。反応後1．５時間で、化合物でｋ９９と化合物ｔｋ９５のＵＶエリア比は１００：０であり、脱保護反応が完結したことを確認した。

化合物でｋ９９のＬＣＭＳの保持時間と質量電荷比は以下のとおりである。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ＝２１１（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

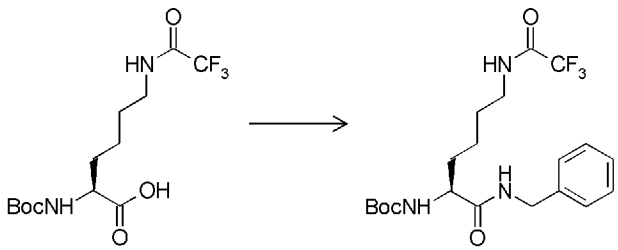
[141 6] このように、２－アジドベンジルオキシカルボニル基は、還元剤トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンを添加することで容易に脱保護できることが明らかとなった。本脱保護手法はＲＮＡが安定な条件として見出されており、実際にＲＮＡを本反応条件に伏した結果、ＲＮＡは安定性して存在することが確認され（表１９　反応条件Ｃ、および図８０　レーン３）、本反

応条件の有用性が証明された。

[1417] 2-3. 脱眉 力き 言籠 合物tk97き き な びそ 編 呆蓄电験

以下のスキームに従い、合成を行った。

TKスキーム19



化合物tk96 化合物tk97

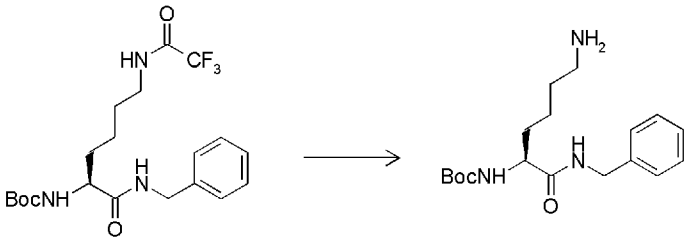
[1418] (1-(ベンジルアミノ)_1_オキソ_6_(2,2,2—トリフルオロアセトアミド)ヘキサン—2_イル)カルバミン酸(S)-tert—ブチル (化合物tk97)の合成

窒素雰囲気下、Boc_Lys(Tfa)-OH(化合物tk96)(104mg、0.304mmol)及び1H—ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール_1_オール (HOBT)(61.6mg、0.456mmol)のDMF(0.5mL)溶液を氷浴で冷却後、1_エチル_3_(3—ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (WSCI.HCl)(87mg、0.456mmol)を添加した。反応混合物を同温度で5分間撹拌後、ベンジルアミン (40从し 0.365mmol)を添加した。反応混合物を室温にて17.5時間撹拌後、酢酸エチル、ヘキサン及び食塩水を添加した。得られた混合物を酢酸エチルにて抽出し、有機相を食塩水 (1mLで2回)にて洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/ 酢酸エチル)にて精製し、 (1—(ベンジルアミノ)—1—オキソ—6—(2,2,2—トリフルオロアセトアミド)ヘキサン—2_イル)カルバミン酸 (S)-tert—ブチル (化合物tk97)(134.4mg、quant.)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 430.4 (M-H)-

保持時間：0．７３分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[141 9] トリフルオロアセチル基（Ｔｆａ）の脱保護実験



化合物tk97　　化合物tk98

[1420] （１―（ベンジルアミノ）－１―オキソ－６―（２，２，２―トリフルオロアセトアミド）ヘキサン―２―イル）カルバミン酸（Ｓ）－ｔｅｒｔ―ブチル（化合物ｔｋ９７）をジメトキシエタンに溶解し、２０ｍＭのジメトキシエタン溶液を調製した。このジメトキシエタン溶液１５μＬに対して、ジメトキシエタン（３０μＬ）、ＰＨ９．１に調製した１００ｍＭ Ｂｉｃｉｎｅ緩衝液（２１０μＬ）を順に加えた。この溶液８５μＬに１００ｍＭ Ｂｉｃｉｎｅ緩衝液（１５μＬ）を添加してｐＨ９．１の反応液とし、この反応液を３７℃で静置することで脱保護反応を行った。反応の進行は、ＬＣＭＳによるトリフルオロアセチル保護体（化合物ｔｋ９７）の減少、および脱保護体である（６―アミノ－１－（ベンジルアミノ）－１―オキソヘキサン－２－イル）カルバミン酸（Ｓ）－ｔｅｒｔ―ブチル（化合物ｔｋ９８）の増加を追跡した。

[1421] 17時間後および９３．５時間後の化合物ｔｋ９８と化合物ｔｋ９７のＵＶエリア比は以下のとおりであった。

１７時間後：化合物ｔｋ９８：化合物ｔｋ９７＝１９：８１

９３．５時間後：化合物ｔｋ９８：化合物ｔｋ９７＝７０：３０

[1422] 化合物ｔｋ９８のＬＣＭＳの保持時間と質量電荷比は以下のとおりである。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ＝３３６．４ （Ｍ＋Ｈ）＋

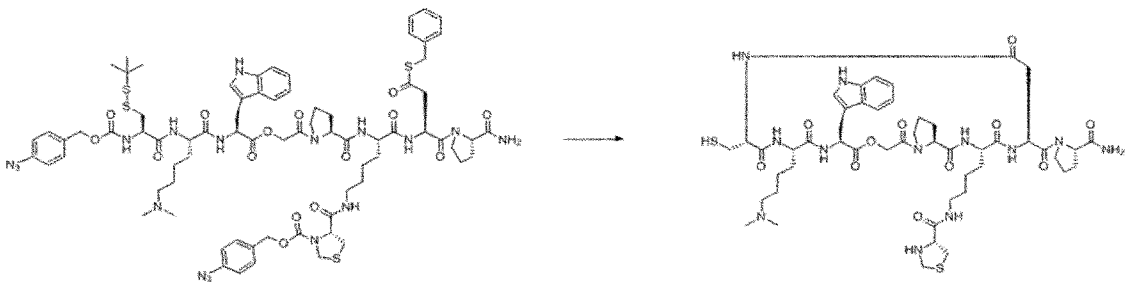
保持時間：０．７４分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1423] このようにトリフルオロアセチル基はｐＨ９の反応液中３７℃で脱保護が

可能であることが明らかとなつた。本脱保護手法はＲＮＡが安定な条件として見出されており、実際にＲＮＡを本条件のｐＨ、温度に伏した結果、ＲＮＡは安定して存在していることが確認され (図８３　レーン７）、本反応条件の有意性が証明された。

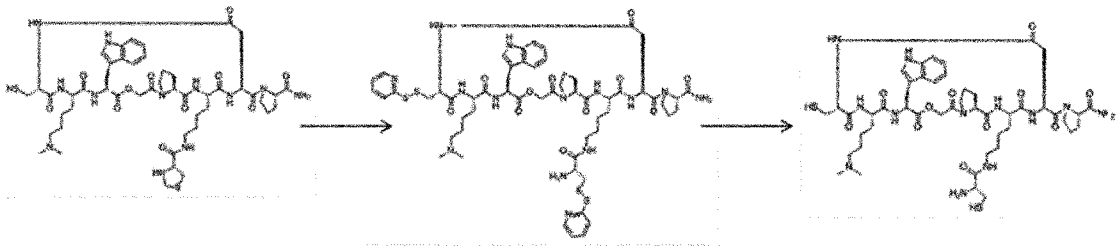
[1424] １０－３－４．４＿アジドベンジルオキシカルボニル基 （Acbz) ＿の脱保護反応

以下に示す化合物ＳＰ６１６から化合物６１８への変換反応の実験にて、別途証明済である



[1425] １０－３－５．チアゾリジン環の脱保護反応

以下に示す化合物ＳＰ６１８から化合物６２０への変換反応の実験にて、別途証明済である



[1426] 明細書中の実施例等における用語において下記略語または用語の意義は、特段の説明がある場合を除き以下のとおりである。

ｓｏｌＡ：次の成分を含んだ混合物　８ｍＭ　ＧＴＰ，８ｍＭ　ＡＴＰ，１６０ｍＭクレアチンリン酸，４００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ　ｐＨ７．６，８００ｍＭ　酢酸カリウム，４８ｍＭ　酢酸マグネシウム，１６ｍＭスペルミジン，８ｍＭ　ジチオスレイトール，０．８ｍＭ　１０－ＨＣＯ－Ｈ４ｆｏｌａｔｅ，　１２ｍｇ／ｍｌ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社）

ｓｏｌＢ：ＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭ(r) ｃｌａｓｓｉｃ ＩＩ Ｓｏｌ Ｂ（バイオコゥマー社、製品番号ＰＵＲＥ２０４８Ｃ）

２０種天然アミノ酸溶液：２０種の天然アミノ酸溶液（それぞれ５ｍＭ）

皿ＧＩＶ：グリコール酸

Ｌａｃ：Ｌ－（＋）―乳酸

ＰｈＬａｃ：（Ｓ）―２―ヒドロキシ－３―フエニルプロパン酸

^{D}ＰｈＬａｃ：（Ｒ）―２―ヒドロキシ－３―フエニルプロパン酸

皿ＧＩＶ（Ｍｅ）$_{2}$：２―ヒドロキシ－２―メチルプロパン酸

[1427] ３．分子内分枝《プチ^{ド}（直鎖部２）生成反応を拡張するアミノ酸ニニットの探索

環状化反応と続く分枝骨格生成反応の二つの反応を厳密に制御することを可能にする、温和な条件下で脱保護可能な側鎖アミノ基を含むアミノ酸の翻訳導入、及びＭＡＬＤＩ―ＭＳによる解析を行った。

３－１．転写によるｔＲＮＡ（ＣＡ欠損）の合成

錶型ＤＮＡ（配列番号ＤＴ―Ｈ３）から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega 社，Ｐ１３００）を用いたin vitroの転写により３'端のCAを欠くtRNAAsn-E2GUU(-CA)（配列番号ＲＴ―Ｈ３）を合成し、RNeasy Mini kit（Qiagen 社）により精製した。

[1428] 配列番号ＤＴ―Ｈ３（配列番号：９４）

tRNAAsn-E2GUU (-CA) DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACT g t t AATCCGTAT GTCACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[1429] 配列番号ＲＴ―Ｈ３（配列番号：９５）

tRNAAsn-E2GUU (-CA) RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguuAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA GCCGC

[1430] ３－２．側鎖アミノ基が保護されたアミノアシルｐｄＣｐＡ（化合物ｔｋ５、ｔｋ６０、ｔｋ６４，ｔｋ９０、ｔｋ３８、ｔｋ１１）とｔＲＮＡ（Ｃ

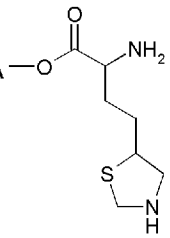
A欠損）(配列番号：RT—H3）のligationによるアミノアシル化tRNA（化合物AT—H3）の合成

50μM転写tRNAAsn-E2GUU (-CA)（配列番号RT—H3）20从1に、10X Ligation buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM $MgCl_2$) 4μL、10 mM ATP 4μL、Nuclease free water 5.6μlをカえ、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、tRNAのリフォールディングを行った。T4 RNAリガーゼ（New England Biolabs社）2.4μLおよび、5mMの側鎖アミノ基が保護されたアミノアシル化pdCpA（化合物tk5、tk60、tk64、tk90、tk38、tk11のいずれか一種類）のDMSO溶液 4μLを加え、16℃で45分間ライゲーション反応を行った。アミノアシル化tRNA（化合物AT—H3）は、フェノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化tRNA（化合物AT-H3）は、翻訳混合物に添加する直前に1mM酢酸ナトリウムに溶解した。

[1431] 化合物AT—H3A

ALa(Tzm) - tRNAAsn-E2GUU（配列番号：96）

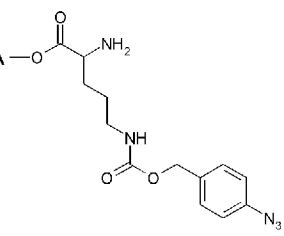
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA—O



[1432] 化合物AT—H3B

0rn(Acbz) - tRNAAsn-E2GUU（配列番号：96）

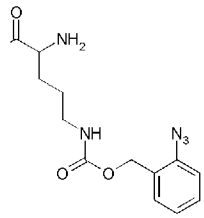
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA—O



[1433] 化合物AT_H3C

0rn(oAcbz) - tRNAAsn-E2GUU（配列番号：96）

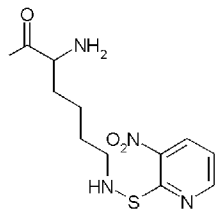
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA-o'



[1434] 化合物ＡＴ—Ｈ３Ｄ

Lys (Npys) - tRNAAsn-E2GUU (配列番号：９６)

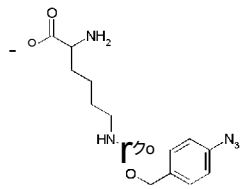
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA-o



[1435] 化合物ＡＴ—Ｈ３Ｅ

Lys(Acbz) - tRNAAsn-E2GUU (配列番号：９６)

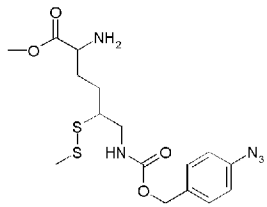
GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA



[1436] 化合物ＡＴ—Ｈ３Ｆ

Lys (5S-SSMe) (Acbz) - tRNAAsn-E2GUU (配列番号：９６)

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguu
AAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA



[1437] ３－３．保護された側鎖アミノ基ペプチドを含むペプチドの翻訳合成

様々なアミノ酸によりアミノアシル化されたｔＲＮＡ(化合物ＡＴ—Ｈ３)を、無細胞翻訳系に加えて翻訳を開始することにより、所望の非天然アミノ酸を含有するポリペプチドの翻訳合成を行った。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system を用いた。具体的には、翻訳液，１％（ｖ／ｖ）ＲＮａｓｅｉｎ Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ (Promega 社，Ｎ２１１１)，１ｍＭ ＧＴＰ，１ｍＭ ＡＴＰ，２０ｍＭクレアチンリン酸，５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ-ＫＯＨ ｐＨ７

．６，１００ｍＭ 酢酸カリウム，６ｍＭ 酢酸マグネシウム，２ｍＭスペルミジン，０．１ｍＭ １０－ＨＣＯ－Ｈ４ｆｏｌａｔｅ，１．５ｍｇ／ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社），４μｇ／ｍｌ クレアチンキナーゼ，３μｇ／ｍｌ ミオキナーゼ，２ｕｎｉｔ／ｍｌ 無機ピロフォスファターゼ，１．１μｇ／ｍｌ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，０．６μＭ メチオニルｔＲＮＡトランスフォルミラーゼ，０．２６μＭ ＥＦ＿Ｇ，０．２４μ,Ｍ ＲＦ２，０．１７μ,Ｍ ＲＦ３，０．５μＭ ＲＲＦ，２．７μＭ ＩＦ１，０．４μ,Ｍ ＩＦ２，１．５μ,Ｍ ＩＦ３，４０μＭ ＥＦ－Ｔｕ，９３μＭ ＥＦ＿Ｔｓ，１．２μＭ リボソーム，０．７３μＭ ＡｌａＲＳ，０．０３μＭ ＡｒｇＲＳ，０．３８μＭ ＡｓｎＲＳ，０．１３μＭ ＡｓｐＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＣｙｓＲＳ，０．０６μＭ ＧｌｎＲＳ，０．２３μＭ ＧｌｕＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＧｌｙＲＳ，０．４μＭ ＩｌｅＲＳ，０．０４μ,Ｍ ＬｅｕＲＳ，０．１１μ,Ｍ ＬｙｓＲＳ，０．０３μ,Ｍ ＭｅｔＲＳ，０．６８μＭ ＰｈｅＲＳ，０．１６μＭ ＰｒｏＲＳ，０．０４μＭ ＳｅｒＲＳ，０．０９μＭ ＴｈｒＲＳ，０．０３μＭ ＴｒｐＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＴｙｒＲＳ，０．０２μＭ ＶａｌＲＳ（自家調製タンパクは基本的にHisタグ付加タンパクとして調製した））に、１μＭ 鋳型ＲＮＡ、タンパク質性アミノ酸群をそれぞれ２５０μＭずつ、ならびに５０μＭずつアシル化ｔＲＮＡを翻訳反応混合物に添加し、３７℃で１時間静置することで行った。

[1438] ３－３－１．ALa(Tzm)を含むモデルペプチドの翻訳合成

１μ,Ｍ 鋳型RNA CT３２（配列番号ＲＭ＿Ｈ３）、０．２５ｍＭ Met、０．２５ｍＭ Arg, ０．２５ｍＭ Asp、０．２５ｍＭ Ｔｙｒ、０．２５ｍＭ Lys、１ｍＭ ジチオスレイトール、５０μＭ ALa(Tzm)-tRNAAsn-E2GUU（化合物ＡＴ＿Ｈ３Ａ）を含む前述の翻訳液を３７℃で６０分間保温した。得られた翻訳反応物１μＬに９μＬの０．２％ トリフルオロ酢酸を加え、そのうち１μＬをMALDI ターゲットプレート上に載せた後、１从ＬのCHCA溶液（

10mg/mL α—シアノ—4—ヒドロキシケィ皮酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸溶液）と混和し、プレート上乾固した。MALDI—MS分析の結果、ALa(Tzm)を含む全長ペプチド(ペプチド配列P—H2)が主生成物として観測された(図75、ピークI)。

[1439] 配列番号RM—H3（配列番号：97）

CT32 RNA配列

GGGUUAACUUUAACAAGGAGAAAAACAUGCGUaacCGUGACUACAAGGACGACGACGACAAGUAAGCUUCG

[1440] ペプチド配列P—H2

†MetArg[ALa(Tzm)] ArgAspTyrLysAspAspAspAspLys

[1441] MALDI-MS：

m/z：[H+M]+=1656.4（Ca Lc. 1656.7）

[1442] 3-3-2. Orn(Acbz)、Orn(oAcbz)、Lys(Npys)を含むモデルペプチドの翻訳合成

1μM鋳型RNA CT32（配列番号RM_H3）、0.25mM Met, 0.25mM Arg, 0.25mM Asp、0.25mM Tyr、0.25mM Lys、及び前記の方法で調製した50μMのOrn(Acbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT—H3B）、Orn(oAcbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT—H3C）、Lys(Npys)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT—H3D）をそれぞれ1種類含む前述の翻訳液、計3反応溶液を37℃で60分間保温した。Orn(Acbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT—H3B）を含む翻訳サンプルに関して、得られた翻訳溶液1μLに9μLの0.2%トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1μLのCHCA溶液（10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケィ皮酸、50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸溶液）と混和し、プレート乾固した後、MALDI—MSにて解析を行った。その結果、目的の全長ペプチドに由来するピークでなく、側鎖Acbz基が外れたペプチドP_H3Aに対応するピークが主生成物として観測された(図75ピークΠ)。これは上述の測定前処理操作あるいは測定中のレーザー照射

により側鎖脱保護反応が進行したことに由来すると考え、測定をLC-ESI-MS に変更して続けて同翻訳産物の解析をおこなった。上述のOrn(Acbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物ＡＴ—H3 B) を含む翻訳溶液5从Ｌと水5从Ｌを混合したものを用いLC-MS分析した結果、Acbz 基を有する全長の目的ペプチド（Orn(Acbz)：ペプチド配列Ｐ—H3）に由来するピークを確認することができた (図７６ピークI）。その一方で、側鎖脱保護されたＰ＿Ｈ３Aに由来するピークは観測されなかったことから、上述したように側鎖Acbz 基の脱保護反応はMALDI 測定あるいは分析前処理過程で起こっていることが明らかとなった (図７７)。同様に、0rn(oAcbz)-tRNAAsn-E2GUU （化合物ＡＴ—H3 C) 、Lys (Npys) -tRNAAsn-E2GUU （化合物ＡＴ＿H3 D) を含む翻訳溶液に関しても、LC-MSによる分析を行った結果、目的どおりOrn(oAcbz) :ペプチド配列Ｐ＿H4 、Lys (Npys) :ペプチド配列Ｐ＿H5）に相当するピークが観測された (図７８ピークＩ及び図７９ピークＩ)。

[1443] ペプチド配列Ｐ—H3

†MetArg[Orn(Acbz)] ArgAspTyrLysAspAspAspAspLys

[1444] ＬＣ-ＥＳＩ-ＭＳ：m/ｚ ８８５．３７３３（M-２Ｈ）２-，（Ｃａｌｅｄ ｆｏｒ $C_{72}H_{106}O_{27}N_{24}S$：８８５．３６９５）

保持時間：４．９９分 (分析条件 ＯｒｂｉｔｒａｐＨＦＩＰ＿Ｅｔ３Ｎ＿３）

[1445] ペプチド配列Ｐ—H3 A

fMetArgOrn ArgAspTyrLysAspAspAspAspLys

[1446] MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1598. 5 (Ca Lc. 1598. 7)

[1447] ペプチド配列Ｐ—H4

†MetArg[Orn(oAcbz)] ArgAspTyrLysAspAspAspAspLys

[1448] ＬＣ-ＥＳＩ-ＭＳ：m/ｚ ８８５．３７３５（M-２Ｈ）２-，（Ｃａｌｅｄ ｆｏｒ $C_{72}H_{106}O_{27}N_{24}S$：８８５．３６９５）

保持時間：5．２３分 (分析条件 ＯｒｂｉｔｒａｐＨＦＩＰ＿Ｅｔ３Ｎ＿

3）

[1449] ペプチド配列P—H5

†MetArg[Lys(Npys)] ArgAspTyrLysAspAspAspAspLys

[1450] LC-ESI-MS：m/z 881.8500（M-2H）2-，（Calcd for $C_{70}H_{105}O_{27}N_{23}S_2$：881.8501）

保持時間：4．34分（分析条件 OrbitrapHFIP_Et3N_3）

[1451] 3-3-3．Lys(Acbz), Lys(5S-SSMe) (Acbz)を含むモデルペプチドの翻訳合成

1μM鋳型RNA CT32（配列番号RM_H3）、0．25mM Met, 0．25mM Arg, 0．25mM Asp、0．25mM Tyr、0．25mM Lys、及び前記の方法で調整した50μMのLys(Acbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT—H3E）、Lys(5S-SSMe) (Acbz)-tRNAAsn-E2GUU（化合物AT_H3F）、をそれぞれ1種類含む前述の翻訳液、計3反応溶液を37℃で60分間保温した。得られた翻訳反応物1μLに9从1の0．2％トリフルオロ酢酸を加え、そのうち1μLをMALDIターゲットプレート上に載せた後、1μLのCHCA溶液（10mg/mL α_シアノ_4—ヒドロキシケイ皮酸、50％アセトニトリル、0．1％トリフルオロ酢酸溶液）と混和し、プレート上乾固した。MALDI—MS分析の結果、いずれにおいても側鎖Acbz基がMALDI測定中及び前処理中に外れたことに由来するペプチド配列P_H6，P-H7が観測された（それぞれ図75ピークIIしIV）。

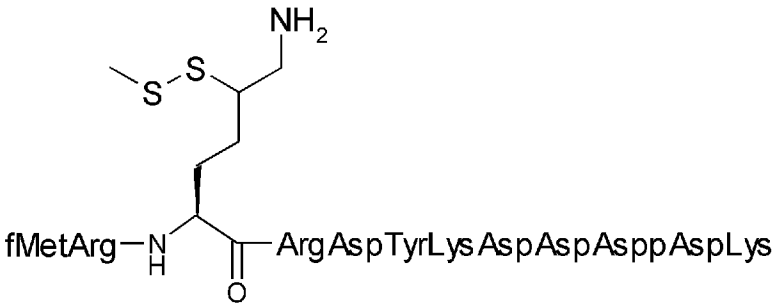
[1452] ペプチド配列P—H6

†MetArgLysArgAspTyrLysAspAspAspAspLys （配列番号：98）

[1453] MALDI-MS：

m/z：[H+M]+= 1612.4(Ca Lc. 1612.7)

[1454] ペプチド配列P—H7



[1455] MALDI-MS :

m/z : [H+M] + = 1690. 1 (Ca Lc. 1690. 7)

[1456] 3 - 4 . 垂 アミノ¾ 瞧 瞧 仆で側 Aき 牛痛

前述した側鎖アミノ基の保護基各々の脱保護条件下においてRNAが安定に存在するかを確認するため、RNAをそれぞれの脱保護条件に伏した後、ゲル電気泳動による解析を行った。

表19に示す反応条件にあるように各反応溶液を調製し、各々の反応温度、反応時間に従ってRNAを保温した。反応条件B—Eに伏した反応溶液それぞれに対しては、その後RNeasy mine Lute(q iagen社)を用いてRNAを精製し、10μLの水にて溶出した。これらと、反応溶液Aの各々10μLの溶液に対して10μLのTBE—Urea サンプルバッファー (2x) (Inv itrogen社)を加え、そのうち1μLを使って10%TBE—ウレアゲルにて電気泳動を行い、SYBR gold nucleic acid stain (Inv itrogen社)により染色を行つた (図80)。

その結果、対照実験として電気泳動した反応条件AのRNAと比べ反応条件B-Eに伏したRNAはバンドパターンやバンド濃さに大きな変化は観測されず、 (図80、レーン1vsレーン2—5)、RNAがこれらの反応条件にて安定に存在することが示された。なおB—Eの条件とは、それぞれ、B:4—アジドベンジルオキシカルボニル基 (Acbz)、C:2_アジドベンジルオキシカルポニル基 (oAcbz)、D:チアゾリジン環、E:3—ニトロー2—ピリジンスルフヱニル基 (Npys)の脱保護条件を模している。

[1457]

[表19]

反応条件	反応条件
A	２μM OT86ｂ RNA（配列番号RM-H1） （室温、０分、１０μＬスケール）
B	５０mM HEPES－KOH、１μM OT86ｂ RNA（配列番号RM-H1）、３０％（V/V)DMA、９．１mM TCEP （pH７．６、２５℃、１時間、２０μＬスケール）
C	５０mM HEPES－KOH、１μM OT86ｂ RNA（配列番号RM-H1）、１５％（V/V)アセトニトリル、５０mM TCEP （pH７．４、３７℃、１．５時間、２０μＬスケール）
D	５０mM 酢酸ナトリウム、１μM OT86ｂ RNA（配列番号RM-H1）、３０％（V/V)DMA、４０mM 2,2'－ジチオジピリジン （pH４．０、３７℃、１７時間、２０μＬスケール） 上記反応後２０μＬの反応液に６００mM TCEP （pH7.2)を２μＬ加えてさらに２５℃ １時間
E	５０mM 酢酸ナトリウム、１μM OT86ｂ RNA（配列番号RM-H1）、５０％（V/V)DMA、１９．５mM ２－メルカプトピリジン、 （pH４．１、２５℃、１時間、２０μＬスケール）

[1458] 続いて、酸性、あるいは塩基性条件下におけるＲＮＡ安定性を電気泳動を用いて評価した。２μＬのRNA溶液（２０μM ０Ｔ９５ ＲＮＡ（配列番号ＲＭ—Ｈ４）、１００ mM 塩化カリウム、 １０ mM 酢酸マグネシウム）に対して、２０μＬの１００mM 塩酸-塩化カリウム緩衝液（ｐＨ ２．０）、１００mMクエン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ ３．０）、１００mM酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ ４．０）、１０ＯmM酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ ５．０）、１０ＯmM HEPES-K緩衝液（ｐＨ ７．０）、１００mMトリス塩酸緩衝液（ｐＨ ８．０）、Bicine-K緩衝液（ｐＨ ９．０）をそれぞれ加え、各反応溶液を３７℃にて２２時間保温した。対象実験として、上述のRNA溶液に対して緩衝液の代わりに水２０μＬを加え、３７℃での保温を行わなかったものをマーカーＲＮＡとして調製し、上記反応サンプルとの泳動比較に用いることとした。得られた反応溶液とマーカーRNA２２μＬに対し、その後等量のTBE—Ureaサンプルバッファー（２ｘ）（Invitrogen社）を加え、そのうち４从

Lを使って10%TBE—ウレアゲルにて電気泳動を行い、SYBR gold nucleic acid stain (Invitrogen社)により染色を行った。その結果、いずれの反応サンプルにおいても、マーカーRNAと比較して顕著なRNA分解はみられなかった(図83)。この事から、上記反応条件においてRNAは安定に存在する事が示された。

[1459] 配列番号RM—H4 (配列番号:1855)

0T95 RNA配列

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGUGCACUACAACGCGUCUUCCGUACCGUAGCGGCUCUGG

CUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1460] [実施例22] RNA-ペプチド複合体モデル化合物を用いたHeck反応

実際にディスプレイライブラリー構築で合成される化合物はmRNAの長さが約100のmRNA—ペプチドフユージョンであり、そのような高分子化合物の反応の詳細な解析は困難である。そこで分子内に分子量分析可能な長さのRNA構造を有し、かつ分子内に金属触媒による環化反応が可能なペプチド構造を有するモデル化合物を用いmRNA—ペプチドフユージョンでの環化反応条件特定を実施した。

Pdを用いた翻訳後修飾でディスプレイライブラリーに適用させるためにはRNAに影響を与えることなく、望みの化学修飾反応を進行させる必要がある。その目的を達するため、以下のような実験を行った。 (1) tRNAなどが混在した系 (PureSystem) 中でのHeck反応を実施し、tRNAに影響を与えることなく、Heck反応が進行する反応条件を見出した。 (2) ペプチドとRNAのコンジユゲートを作成の上、Heck反応を実施し、ペプチドとRNAが結合していてもRNAに影響を与えることなくHeck反応が進行する反応条件を見出した。

モデル化合物として使用したのは以下の3種類の化合物である。

4-mer RNA-ペプチドコンジュゲート

10-mer RNA-ペプチドコンジュゲート

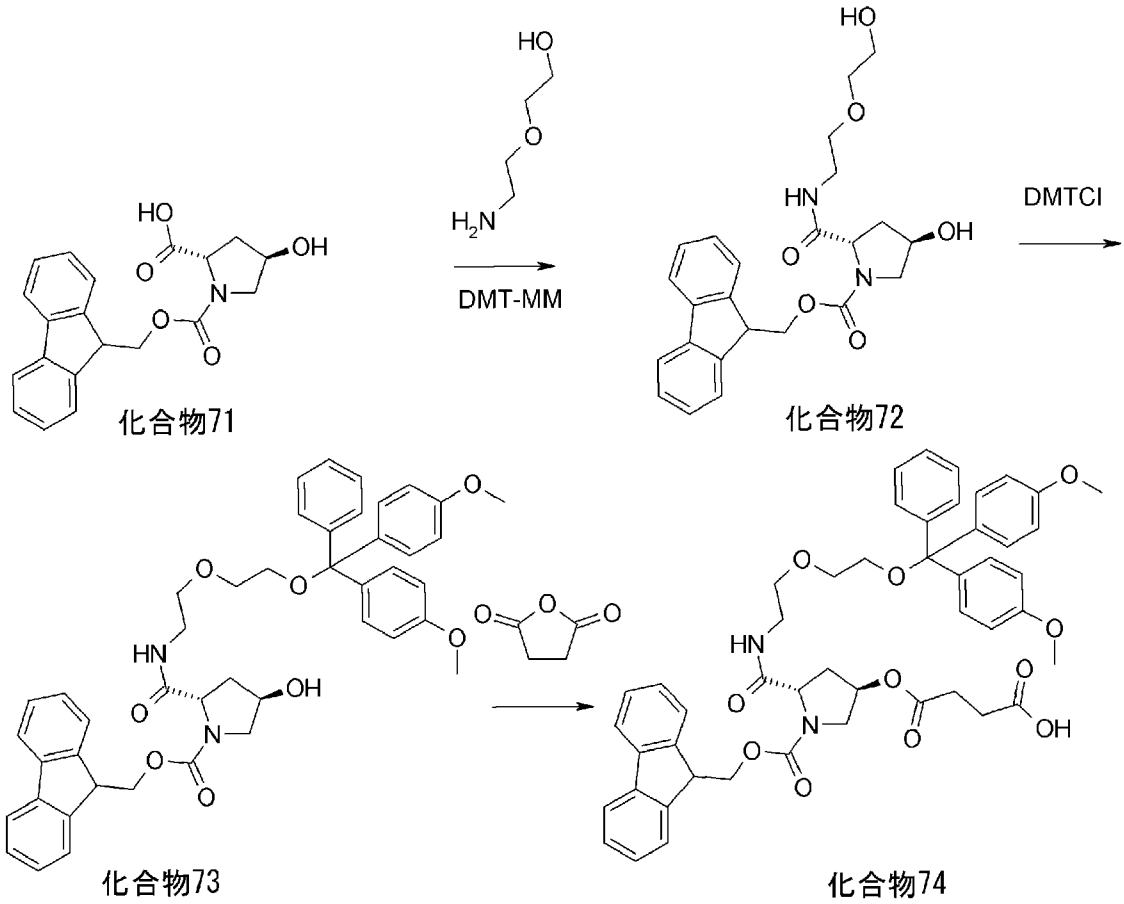
20-mer RNA-ペプチドコンジュゲート

[1461] 1-1. RNA-ペプチドコンジユゲートモデル反応原料の合成

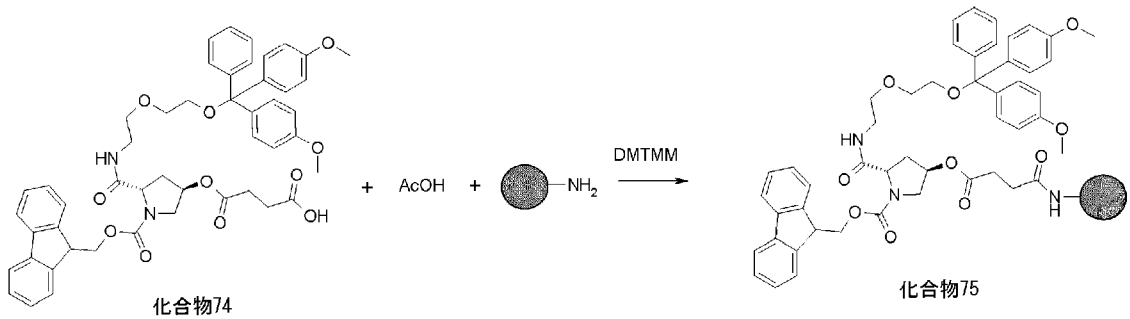
以下の一般製法 - 1に従って、モデル反応実施のための原料合成を行った。

(一般製法一1) ＲＮＡ－ペプチドコンジュゲートの合成

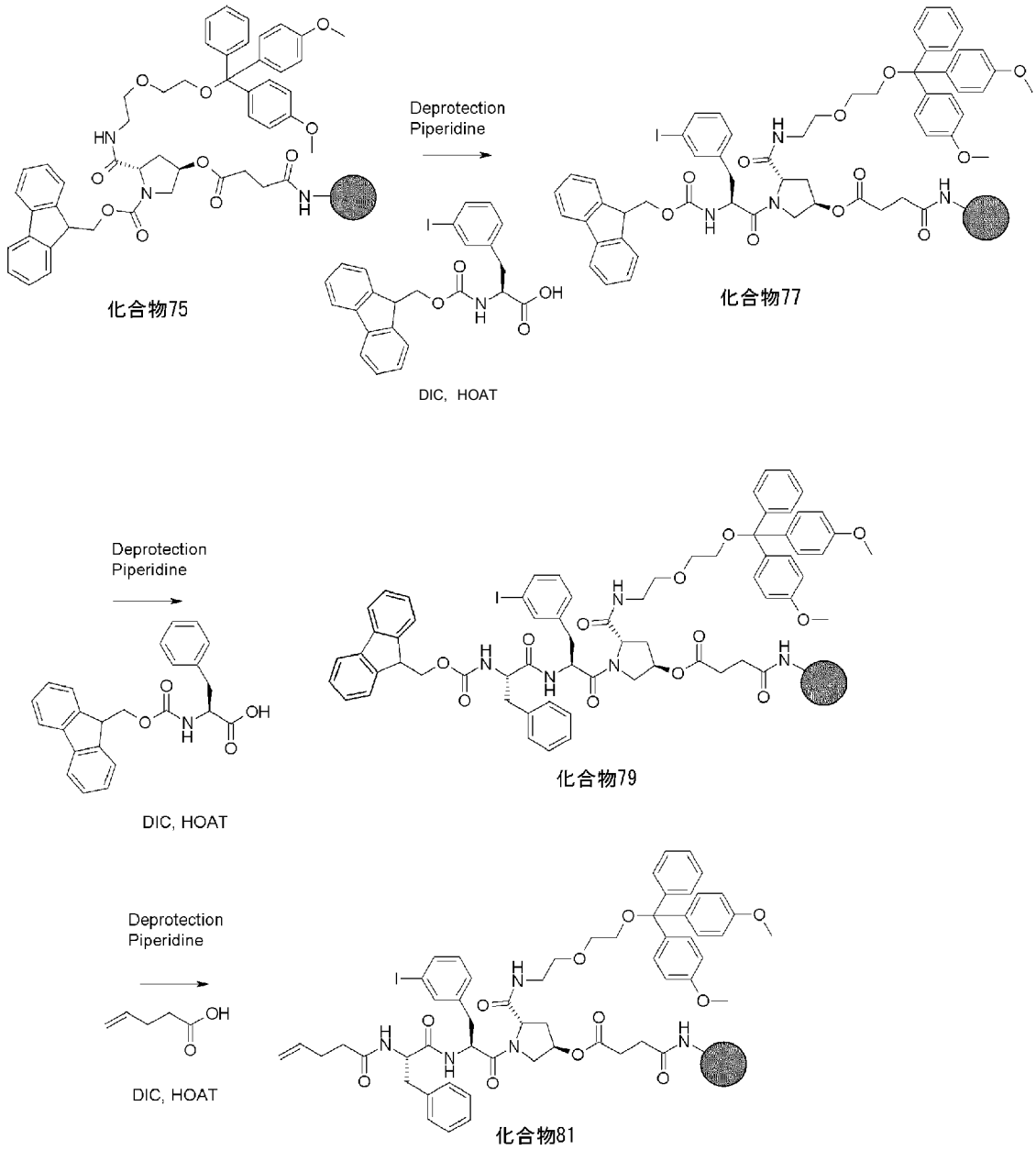
[1462] テンプレート合成



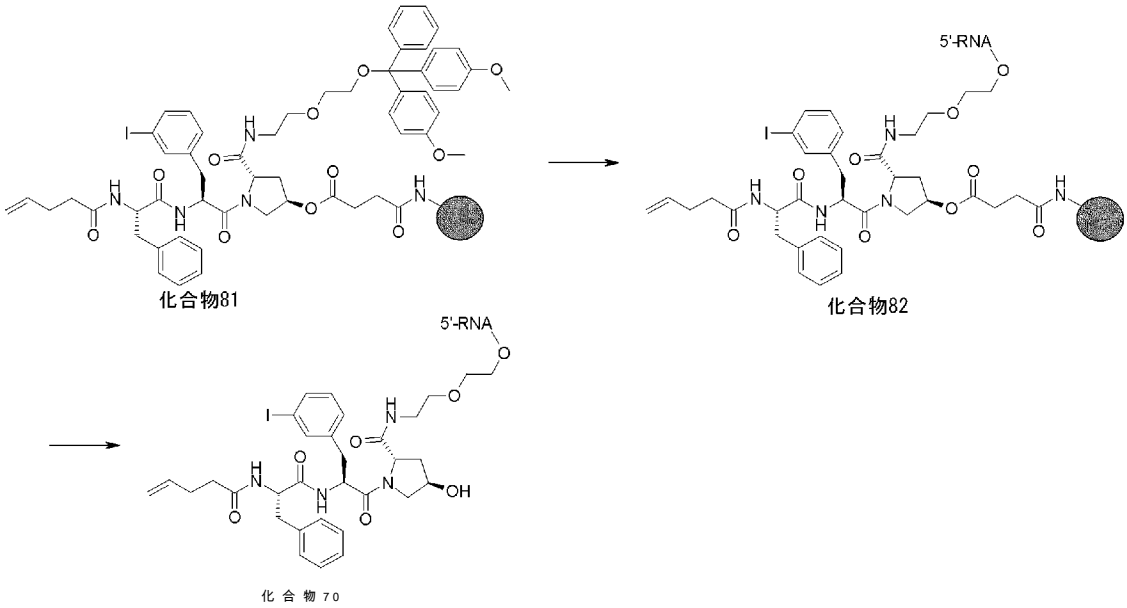
[1463] 固相担持



[1464] ペプチド伸長

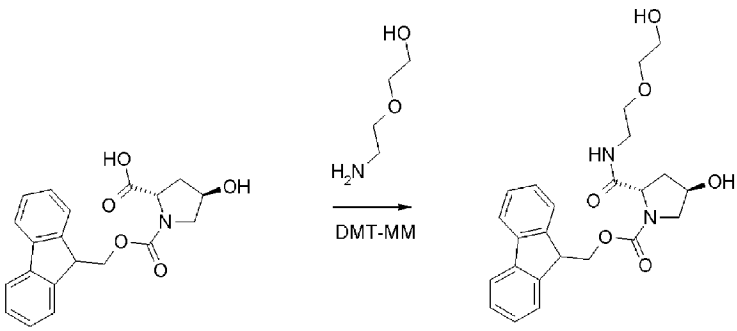


[1465] RNA合成、切り出し



[1466] 1-1-1. 4-mer RNA-ペプチドコンジュゲート (5'-AGCU-3'-Peiside) (化合物70a)の合成

(2S、4R)-4-ヒドロキシ-2-「2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルカルバモイル]-ピロリジン-1-カルボン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (化さ物72)のさ成

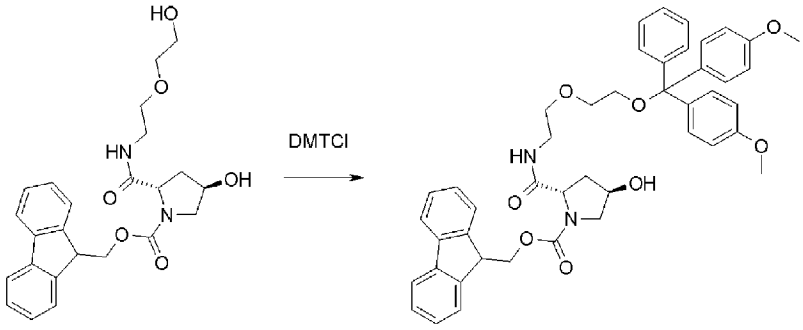


FM0C-L-ヒドロキシプロリン (化合物71) (2.12g、6.OOmmol)、2-(2-アミノエトキシ)エタノール (0.661mg、6.60mmol)をDMSO (4.0mL)に溶解し室温にて4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリドn水和物 (1.98g、6.6Ommol)を加え5時間攪拌した。反応液を逆相シリカ (ギ酸0.1%、H20、CH3CN、グラジェント)で精製し、標題化合物 (化合物72) (1.69g、64%)を淡黄色アモルファスとして得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ４４１．２（Ｍ+H） +

保持時間：１．５７分 (分析条件ZQAA０５）

[1467] （２Ｓ、４Ｒ）-２-（２-｛２-「ビス-（４―メトキシ-フエニル）-フエニル-メトキシ」―エトキシ｝―エチルカルバモイル）-４―ヒドロキシ-ピロリジン-１―カルボン酸 ９Ｈ―フルオレン-９―イルメチルエステル（化合物７３）の合成



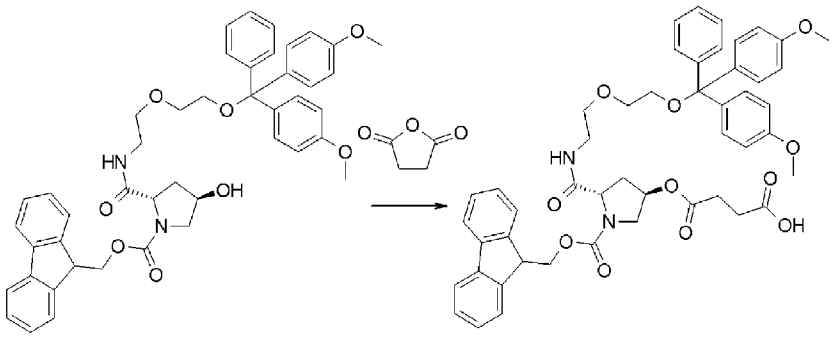
化合物72 化合物73

（２Ｓ、４Ｒ）-４―ヒドロキシ-２-[２-（２―ヒドロキシ-エトキシ）―エチルカルバモイル]―ピロリジン-１-カルボン酸 ９Ｈ―フルオレン-９―イルメチルエステル (化合物７２）（１．６９ｇ、３．８３ｍｍｏｌ）、４、４'―ジメトキシトリチルクロライド（２．４７ｇ、７．６６ｍｍｏｌ）をピリジン（５．０ｍL）に溶解し室温にて３時間攪拌した。反応液を逆相シリカ (酢酸アンモニウム０．１％、H20、CH30H、グラジェント）で精製し、標題化合物 (化合物７３）（２．２４ｇ、７９％）を淡黄色アモルファスとして得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ７６０．８（Ｍ+NH4) 十、７６５．７（Ｍ+Na) +

保持時間：１．１５分 (分析条件SQDAA０５）

[1468] コハク酸 モノ-「（３Ｒ，５Ｓ）-５-（２-｛２-「ビス-（４―メトキシ-フエニル）-フエニル-メトキシ」―エトキシ｝―エチルカルバモイル）-１-（９Ｈ―フルオレン-９-イルメトキシカルボニル）-ピロリジン―３―イル」エステル (化合物７４）の合成



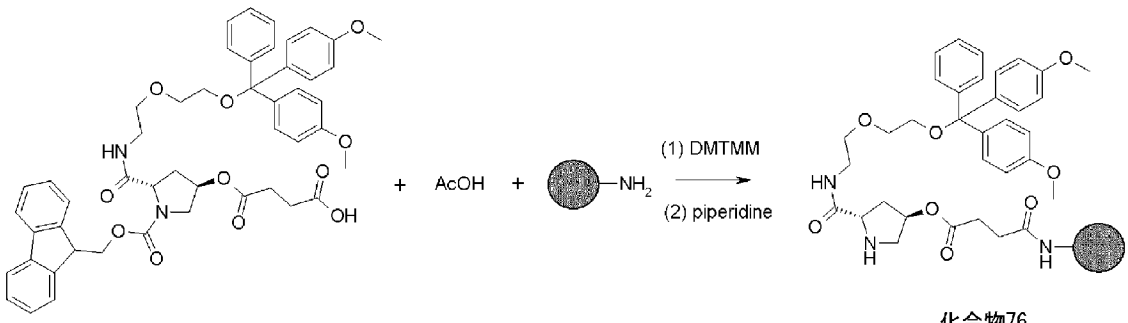
化合物73 化合物74

（２Ｓ、４Ｒ）－２－（２－｛２－［ビス－（４－メトキシ－フエニル）－フエニル－メトキシ］－エトキシ｝－エチルカルバモイル）－４－ヒドロキシ－ピロリジン－１－カルボン酸　９Ｈ－フルオレン－９－イルメチルエステル（化合物73）（１．００ｇ、１．３５ｍｍｏｌ）、無水コハク酸（１９２ｍｇ、２．０２ｍｍｏｌ）、Ｎ、Ｎ－ジメチルアミノピリジン（２４６ｍｇ、２．０２ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（３．０ｍＬ）に溶解し室温にて２．５時間撹拌した。反応液を逆相シリカ（酢酸アンモニウム０．１％、H20、CH30H、グラジエント）で精製し、標題化合物（化合物７４）（３４９ｍｇ、３１％）を無色アモルファスとして得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　８６０．５（Ｍ＋NH4）＋、８６５．５（Ｍ＋Na）＋

保持時間：１．１１分（分析条件SQDAA０５）

[1469] 固相担持FM0C脱保護ピロリジン誘導体（化合物７６）の合成

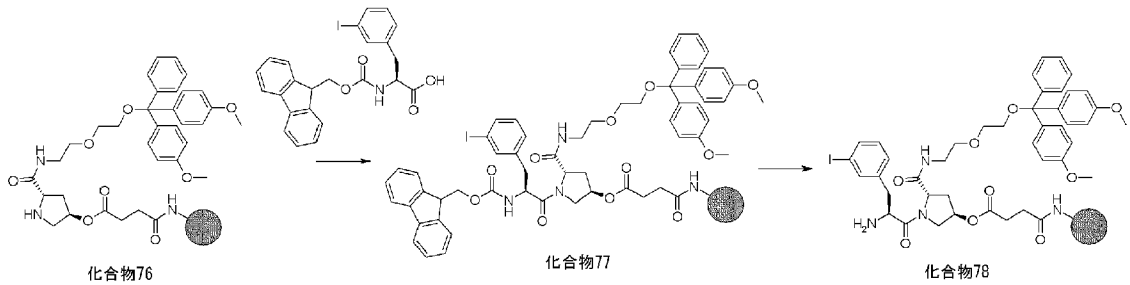


化合物74 化合物76

コハク酸モノ－［（３Ｒ，５Ｓ）－５－（２－｛２－［ビス－（４－メトキシ－フエニル）－フエニル－メトキシ］－エトキシ｝－エチルカルバモイル）－１－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニル）－ピロリジン－３－イル］エステル（化合物７４）（８５．１ｍｇ、０．１０１ｍｍ

ｏｌ）、Ｃｕｓｔｏｍ Ｐｒｉｍｅｒ Ｓｕｐｐｏｒｔ ２００ Ａｍｉｎｏ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１．０１ｇ）にアセトニトリル（５．ＯｍＬ）を加えた。これに酢酸（５．８μＬ、０．１０１ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．１ｍい溶液を加えたのち、室温にて4-(4, 6-ジメトキシ―１，３，５＿トリアジン＿２―ィル）＿４―メチルモルホリニゥムクロリドｎ水和物（６０．６ｍｇ、０．２０２ｍｍｏｌ）を加え室温にて１．５時間攪拌した。その後、反応液に4-(4, 6-ジメトキシ―１，３，５－トリアジン―２－ィル）＿４＿メチルモルホリニゥムクロリドｎ水和物（３００ｍｇ、１．０１ｍｍｏｌ）を加え１５分攪拌の後、酢酸（５８从し１．０１ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（０．５ｍい溶液を加え１時間攪拌した。反応物をろ取し得られた固体（化合物７５）を乾燥した。固体取得物に２０％ピペリジンDMF溶液（１０ｍＬ）を加え１時間反応させた。反応物をろ取し、DMF、アセトニトリルで洗浄し、減圧乾燥し固相担持FM0C脱保護ピロリジン誘導体（化合物７６）（１．０５ｇ）を得た。

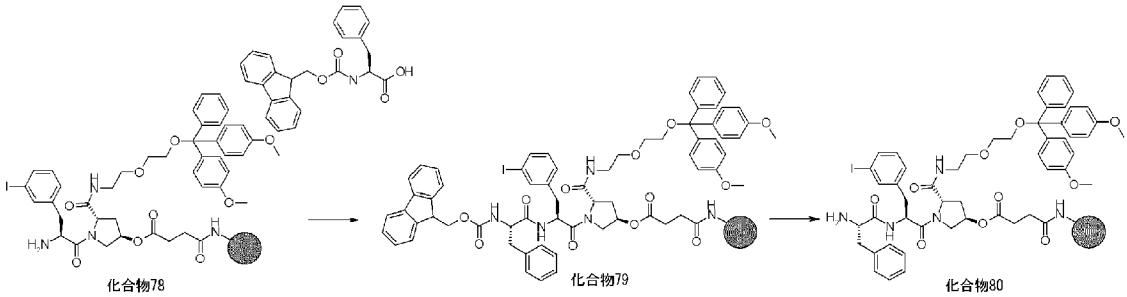
[1470] 因相キ旧持ヨードフエニルァラニン誘導休（化合物７８）＿の合成



Ｆｍｏｃ＿３―ヨードーL-フエニルァラニン（６２２ｍｇ、１．２１）、HOAt（１３６ｍｇ、０．９０９）、Ｎ，Ｎ'―ジイソプロピルカルポジイミド（０．２０６ｍし１．３３）をDMF（５．０ｍいに溶解し、固相担持FM0C脱保護ピロリジン誘導体化合物７６（１．０５ｇ）を加えた。室温にて3時間攪拌した。得られた固相担体をろ取、DMF（１０ｍいで3回洗浄し、続いて２０％ピペリジンDMF溶液（１０ｍいを加え室温にて1時間攪拌した。得られた固相担体をDMF（１０ｍい、アセトニトリル（１０ｍいでそれぞれ3回ずつ洗浄し減圧下乾燥し、３―ヨードーL-フエニルァラニンが結合された固相担持ヨ

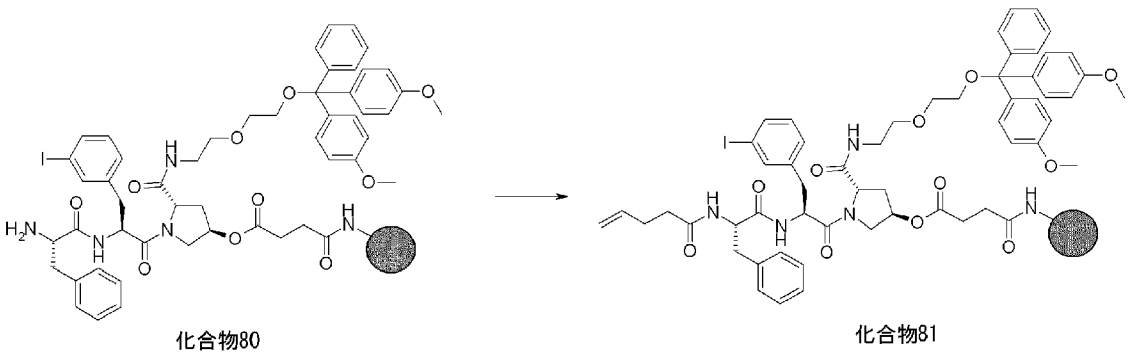
—ドフエニルァラニン誘導体化合物７８（１．００ｇ）を得た。

[1471] 固相柏持フエニルァラニン誘導体 (化合物８０)_の合成



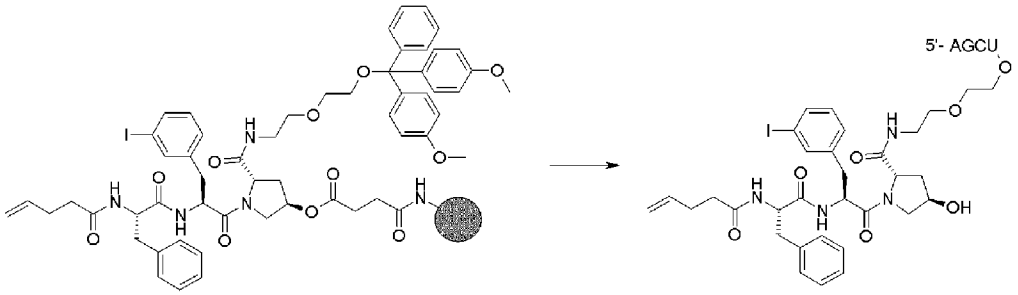
化合物７８を得る手法と同様の方法により、固相担持ヨー ドフエニルァラニン誘導体 (化合物７８）（１．００ｇ）、Ｆｍｏｃ＿L-フエニルァラニン（２３４ｍｇ、０．６０６）との縮合、それに続くFmocの脱保護によりL-フェニルァラニンが結合された固相担持フエニルァラニン誘導体 (化合物８０）（１．００ｇ）を得た。

[1472] 因相柏持４－《ンテン酴誘導休 (化合物８１)_の合成



化合物７８を得る手法と同様の方法により、L-フエニルァラニンが結合された固相担持フエニルァラニン誘導体 (化合物８０）（２５０ｍｇ）、4—ペンテン酸 (３０．６μL、０．３００ｍｍ）の縮合により4＿ペンテン酸が結合された固相担持４＿ペンテン酸誘導体 (化合物８１）（２４９ｍｇ）を得た。

[1473] 化合物７０aの合成

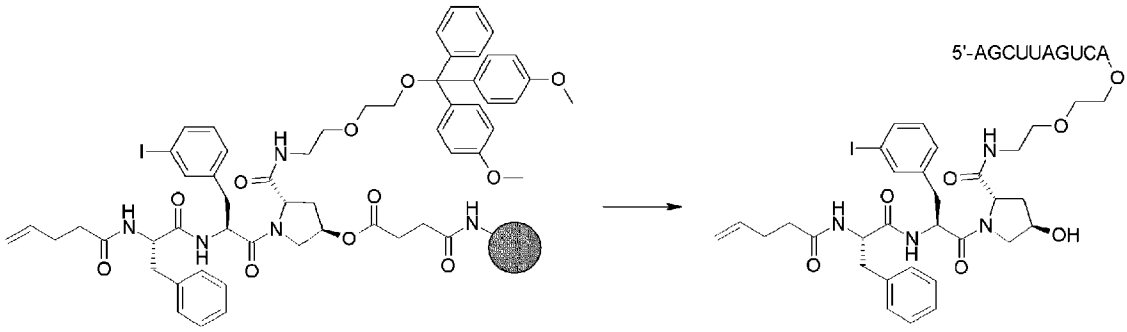


固相担持4_ペンテン酸誘導体 (化合物81) (8.Omg、0.8μmol)を用い、DNA合成機によりRNA結合伸長を行った。A、G、C、Uの伸長反応に用いるアミダイド試薬はグレンリサーチ社製A—T0M—CEホスホアミダイド、G_T0M_CEホスホアミダイド、C_T0M_CEホスホアミダイド、U_T0M_CEホスホアミダイドを使用し、縮合活性化剤として5_ベンジルチオ—1H—テトラゾールを使用し実施した。縮合後の固相担体を乾燥後、エタノール (0.10mい、40%メチルアミン水溶液 (0.10mL)を加え65℃にて15分間攪拌した。溶媒を減圧留去しテトラメチルアンモニウムフルオライド水和物 (10mg)、DMS0 (0.10mL)を加え65℃にて15分間攪拌した。反応液に0.1M酢酸アンモニウム水溶液を加え逆相カラムで精製した。濃縮後、得られた化合物を精製水 (0.50mい に溶かし4-mer RNA-ペプチドコンジュゲート (化合物70a) (5'-AGCU-3'-Peptide) 水溶液を得た。紫外分光計により得られた溶液の濃度は0.736mM、収率は46%であった。

LCMS (ESI) 668.0 (M-3H)3_、1002.4 (M-2H)2-

保持時間 :5.15分 (分析条件ZQHFIP_Et3N)

[1474] 1-1-2. 10-mer RNA-ペプチドコンジュゲート_(5'-AGCUUAGUCA-3'_(配列番号 :69)_-Peptide)_(化さ物70b)のさ成



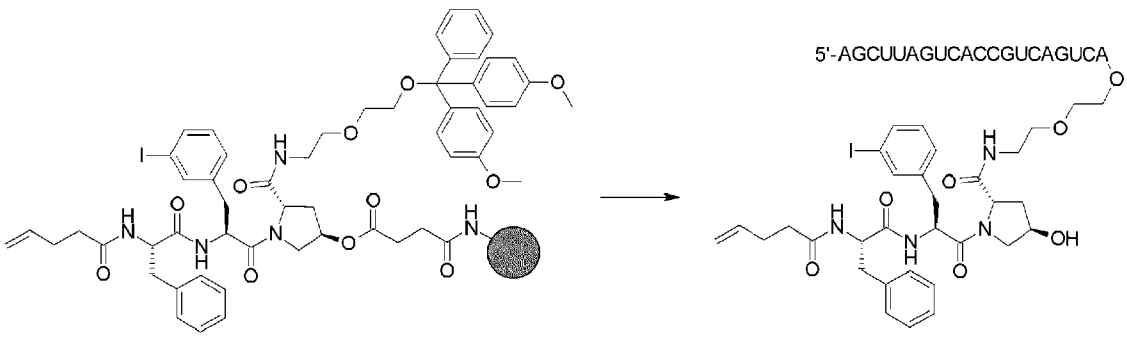
化合物81 化合物70b

化合物７０ａを得る手法と同等の方法により表記化合物水溶液（化合物７０ｂ）を得た。濃度０．３３ｍＭの水溶液０．５０ｍＬが得られた。収率は２１％であった。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）７８４．８（Ｍ－５Ｈ）５－、９８１．２（Ｍ－４Ｈ）４－、１３０８．５（Ｍ－３Ｈ）３－

保持時間：４．８７分（分析条件ＺＱＨＦＩＰ—Ｅｔ３Ｎ）

[1475] 1-1-3. 20-mer RNA-ペプチドコンジュゲート（5'-AGCUUAGUCACCGUCAGUCA-3'（配列番号：７０）-Peptide）（化合物７０ｃ）の合成



化合物81 化合物70ｃ

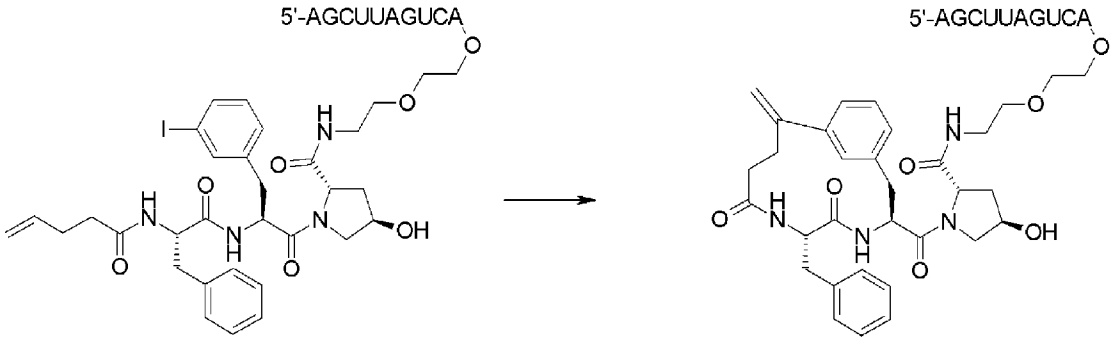
化合物７０ａを得る手法と同等の方法により表記化合物水溶液（化合物７０ｃ）を得た。濃度０．１４７ｍＭの水溶液０．３０ｍＬが得られた。収率は１５％であった。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）８８７．９（Ｍ－８Ｈ）８—、１０１５．０（Ｍ—７Ｈ）７－、１１８４．３（Ｍ－６Ｈ）６－、１４２１．０（Ｍ－５Ｈ）５—、１７７６．６（Ｍ－４Ｈ）４－

保持時間：４．６０分（分析条件ＺＱＨＦＩＰ—Ｅｔ３Ｎ）

[1476] 2-1．ＲＮＡ—ペプチドコンジュゲートの環化反応

2-1-1. 10-mer_RNA_ペプチドコンジュゲート_(化合物70b)_のHeck環化反応 (化合物83b)_の合成

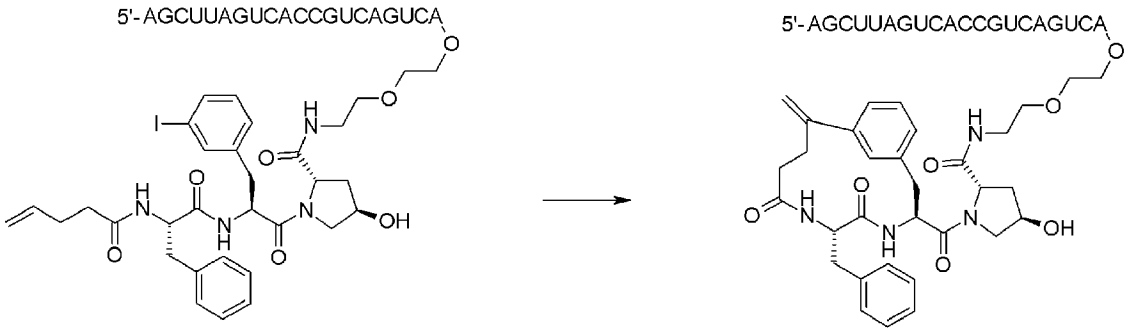


10-mer RNA_ペプチドコンジュゲート (化合物70b) (0.33mM水溶液 3.7ゆし、1.2nmol)、内部標準 (10mM p-n—プロピル安息香酸DMF溶液 3从し 30nmol)、リン酸バッファー (K2HP04 1.OmmolとK3P04 0.10mmolの水10mLの水溶液 10μL)、5%PTS (Polyoxyethanyl—α—tocopheryl sebacate)水溶液 (30μL)な混合し、逆相LCにより分析の後、PdCl2(MeCN)2 (1.Omg、3.9μmol)、2,2'_ビス (ジフエニルフォスフィノ)ー1,1'_ビフエニル (6.2mg、12.0μmol)をN_メチルピロリジノン (0.2mL)に窒素雰囲気下溶解したPd溶液 (8.OμL)を加え50℃にて窒素雰囲気下3時間攪拌した。反応液 (5.OμL)に1Mジチオスレイトール水溶液 (10.0从1)を加えLC分析サンプルとし分析した。反応前のLC分析結果との比較から生成物 (化合物83b)の収率は57%であった。

LCMS (ESI) 759.4 (M-5H)5_、949.5 (M-4H)4_、1265.9 (M-3H)3-

保持時間 :3.40分 (分析条件ZQHFIP-Me2NEt)

[1477] 2-1-2. 20-mer_RNA_ペプチドコンジュゲート_(化合物70c)_のHeck環化反応 (化合物83c)_の合成



20-mer RNA_ペプチドコンジュゲート (化合物70c) (0.15mM水溶液 2.0μL、0.29nmol)、内部標準 (10mM p-n-プチル安息香酸DMF溶液 2μL、20nmol)、100mM トリエチルァミン水溶液 (5从し、500 mmo L) 、5%PTS (Polyoxyethanyl—α—tocopheryl sebacate) 水溶液 (30μL) を混合し、逆相LCにより分析の後、PdCI2 (MeCN) 2 (0.5mg、1.9μmol)、2,2'—ビス (ジフエニルフォスフィノ) ー1,1'—ビフエニル (3.1mg、6.0μmol) をN—メチルピロリジノン (0.4mL) に窒素雰囲気下溶解したPd溶液 (8.0μL) を加え50℃にて窒素雰囲気下2時間攪拌した。反応液 (5.0μL) に0.1Mジチオスレィトール水溶液 (10.0从1) を加えLC分析サンプルとし分析した。反応前のLC分析結果との比較から生成物 (化合物83c) の収率は61%であった。

LCMS (ESI) 997.0 (M-7H)1-、1163.0 (M-6H)6_、1395.5 (M-5H)5_、1745.0 (M-4H)4-

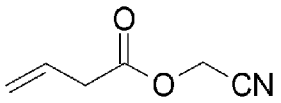
保持時間 :4.08分 (分析条件ZQHFIP_Et3N)

[1478] 実施例23〕 翻訳ペプチドのHeck反応

1_翻訳合成に活用させるためのC-C結合ニニットの合成

1-1. pdCpAアミノアシル化化合物85の合成

1-1-1. プター3_エン酸シァノメチル (化合物86)_の合成

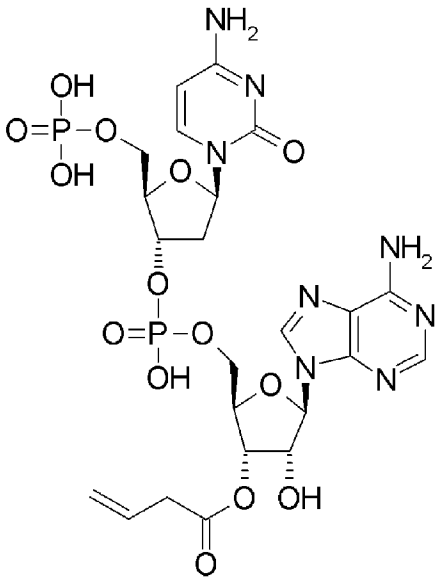


プター3—エン酸 (0.500g、5.81mmol) をァセトニトリル

（２０ｍｌ）に溶解し、２―ブロモアセトニトリル（３．３３ｇ、２７．７６ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（１．４０ｇ、１３．８６ｍｍｏｌ）を室温でゆっくり加えた。室温で３０分撹拌した後、反応液を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（石油エーテル：酢酸エチル＝２０：１）で精製し、標題化合物８６（０．５５０ｇ、７５％）を得た。

^{1}H-NMR（Ｂｒｕｋｅｒ，ａｖａｎｃｅＩＩＩ，４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δｐｐｍ５．９２（１Ｈ，ｍ），５．２２-５．２６（２Ｈ，ｍ），４．７５（２Ｈ，ｓ），３．２１（２Ｈ，ｍ）

[1479] １-１-２．ブタ―３―エン酸（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）―２―（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－｣６－アミノ―９Ｈ―プリン―９－イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル（化合物８５）のさ成



リン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２―オキソピリミジン―１（２Ｈ）―イル）－３―（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オ

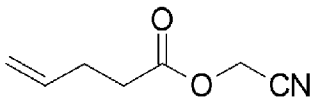
キシ）テトラヒドロフラン_２_ィル）メチル　テトラブチルアンモニゥム塩（化合物１ｈ）（０．２０ｇ、０．１５０ｍｍｏｌ）のＤＭＦ溶液（１．Ｏｍｌ）にプター３_エン酸シァノメチル（化合物８６）（０．０５０ｇ、０．４００ｍｍｏｌ）を加えて室温で１時間攪拌した。反応液に０．０５％ＴＦＡ水溶液を加え、凍結乾燥して得られた残渣をｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ—ＨＰＬＣ（０．０５％ＴＦＡ水溶液：アセトニトリル）で精製し、標題化合物８５（０．０１０ｇ、１０％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ　７０５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４６１、０．４８８分　（分析条件　ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[1480] １－２．DdCipAアミノアシル化化合物８７の合成

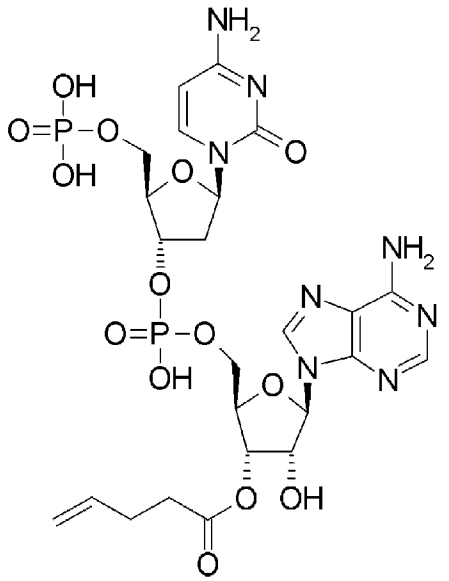
1-2-　1．ペンター４—エン酸シァノメチル（化合物８８）の合成



プター３—エン酸の代わりにペンター４—エン酸（０．５００ｇ、４．９９ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物８６の合成と同様の手法で、標題化合物８８（０．５２ｇ、７５％）を得た。

^{1}Ｈ-ＮＭＲ（Ｂｒｕｋｅｒ，ａｖａｎｃｅⅡ，３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）Ｓｐｐｍ５．８２（１Ｈ，ｍ），５．０４-５．３２（２Ｈ，ｍ），４．７４（２Ｈ，ｓ），２．３９-２．５７（４Ｈ，ｍ）

[1481] １—２—２．ペンター４—エン酸（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）—２—（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４—アミノ—２_ォキソピリミジン—１（２Ｈ）—ィル）_２_（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）_５-（６—アミノ—９Ｈ—プリン—９—ィル）—４—ヒドロキシテトラヒドロフラン—３—ィル（化合物８７、ｐｄＣｐＡ—ＰｅｎｔｅＡ）の合成



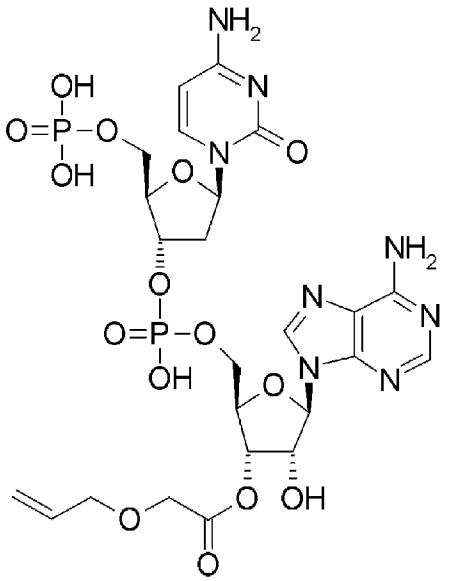
プター３―エン酸シアノメチルの代わりにペンター４―エン酸シアノメチル（化合物８８）（０．０６６ｇ、０．４８０ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物８５を得る手法と同様の方法により、標題化合物８７（０．０１０ｇ、１２％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　７１９（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．５０６、０．５２３分　（分析条件　ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ１）

[1482] １－３．pdCpAアミノアシル化化合物８９の合成

１－３－１．２－（アリルオキシ）酢酸　（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（化さ物８９）のさ成



2-（アリルオキシ）酢酸（0．５００ｇ、４．３１ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（２０ｍｌ）に溶解し、２―プロモアセトニトリル（2．０６ｇ、１７．１８ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（0．８７ｇ、８．６１ｍｍｏｌ）を室温でゆっくり加えた。室温で3時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（石油エーテル：酢酸エチル＝２０：1）で精製し、２_（アリルオキシ）酢酸シアノメチル（0．４０ｇ、６０％）を得た。

イミダゾール（1．０ｇ、１５．７ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン_１_アミニウム塩化物（1．０ｇ、３．１４ｍｍｏｌ）を溶かし、酢酸でＰＨ８に調節した緩衝液（１００ｍｌ）にリン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノー２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６-アミノー９Ｈ―プリンー９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフランー２_イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ）（１００ｍｇ、０．１５７ｍｍｏｌ）を加えた後、上記方法で得られた２_（アリルオキシ）酢酸シアノメチル（９３ｍｇ、０．６２８ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３．Ｏｍｌ）溶液を加えて室温で３０分攪拌した。反応液に酢酸を加えて凍結乾燥し、得られた残渣をｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ-ＨＰＬＣ（０．０５％ＴＦＡ水溶液：アセト

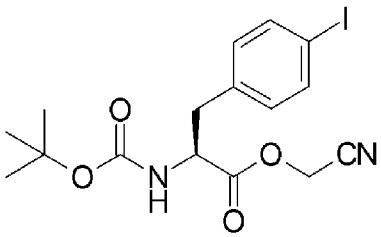
ニトリル）で精製し、標題化合物89（24.7mg、22%）を得た。

LCMS：m/z 735（M+H）+

保持時間：0.473、0.491分（分析条件 SMDmethod1）

[1483] 1-4．pdCpAアミノアシル化化合物90の合成

1-4-1．2-（（tert—プトキシカルボニル）アミノ）_3_（4—ヨードフエニル）プロパン酸（S）—シアノメチル（化合物91）の合成

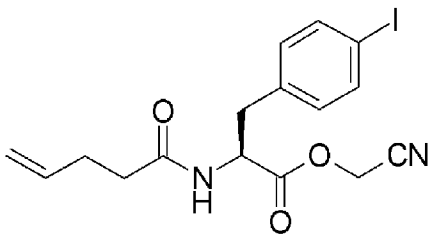


プタ_3—エン酸の代わりに（S）_2_（（tert—プトキシカルボニル）アミノ）—3—（4—ヨードフエニル）プロパン酸（1.0g、2.56mmol）を原料とし、化合物86を得る手法と同様の手法で標題化合物91（0.40g、36%）を得た。

保持時間：1.59分（分析条件 SMDmethod4）

^{1}H-NMR（Bruker, avancell, 300MHz, $CDCl_3$）Sppm 7.67（2H, d, 8.1Hz）, 6.93（2H, d, 8.1Hz）, 4.62-4.94（4H, m）, 2.98-3.14（2H, m）, 1.44（9H, s）

[1484] 1-4-2．3-（4—ヨードフエニル）—2—（ペンター4—エンアミド）プロパン醸（S）—シアノメチル（化さ物92）のさ成



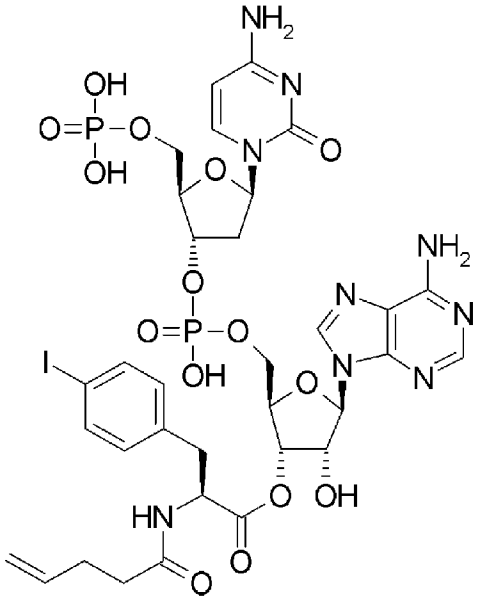
2-((tert—ブトキシカルボニル)アミノ)_3_(4—ヨードフェニル)プロパン酸 (S)_シアノメチル (化合物91) (0.89g、2.07mmol)をジエチルエーテル (20.Oml)に溶解させた。この溶液に塩酸ガスを吹き込んだ後、室温で2時間攪拌した。反応液中の固体をろ過し、減圧乾燥させることで2—アミノー3_(4—ヨードフエニル)プロパン酸 (S)—シアノメチル (0.65g、86%)を得た。

窒素雰囲気下、2—アミノ—3_(4—ヨードフエニル)プロパン酸 (S)—シアノメチル (0.65g、1.78mmol)をジクロロメタン (25.Oml)に溶解し、氷冷下でトリエチルアミン (0.45g、4.45mmol)を滴下した。その後、氷冷下で塩化ペンタ_4_エノィル (0.25g, 2.14mmol)のジクロロメタン溶液 (25.Oml)を滴下し、室温で2時間半攪拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ (石油エーテル:酢酸エチル=50:50〜33:67)で精製し、3—(4—ヨードフエニル)−2—(ペンター4—エンアミド)プロパン酸 (S)—シアノメチル (化合物92) (0.57g、78%)を得た。

LCMS:m/z 413.2 (M+H)+

保持時間:1.51分 (分析条件 SMDmethod5)

[1485] 1—4—3._3-(4—ヨードフエニル)−2—(ペンター4—エンアミド)_プロパン酸 (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノー2_オキソピリミジン_1_(2H)—イル)_2_((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6-アミノー9H—プリン−9—イル)−4—ヒドロキシテトラヒドロフラン−3_イル (化合物90)の合成



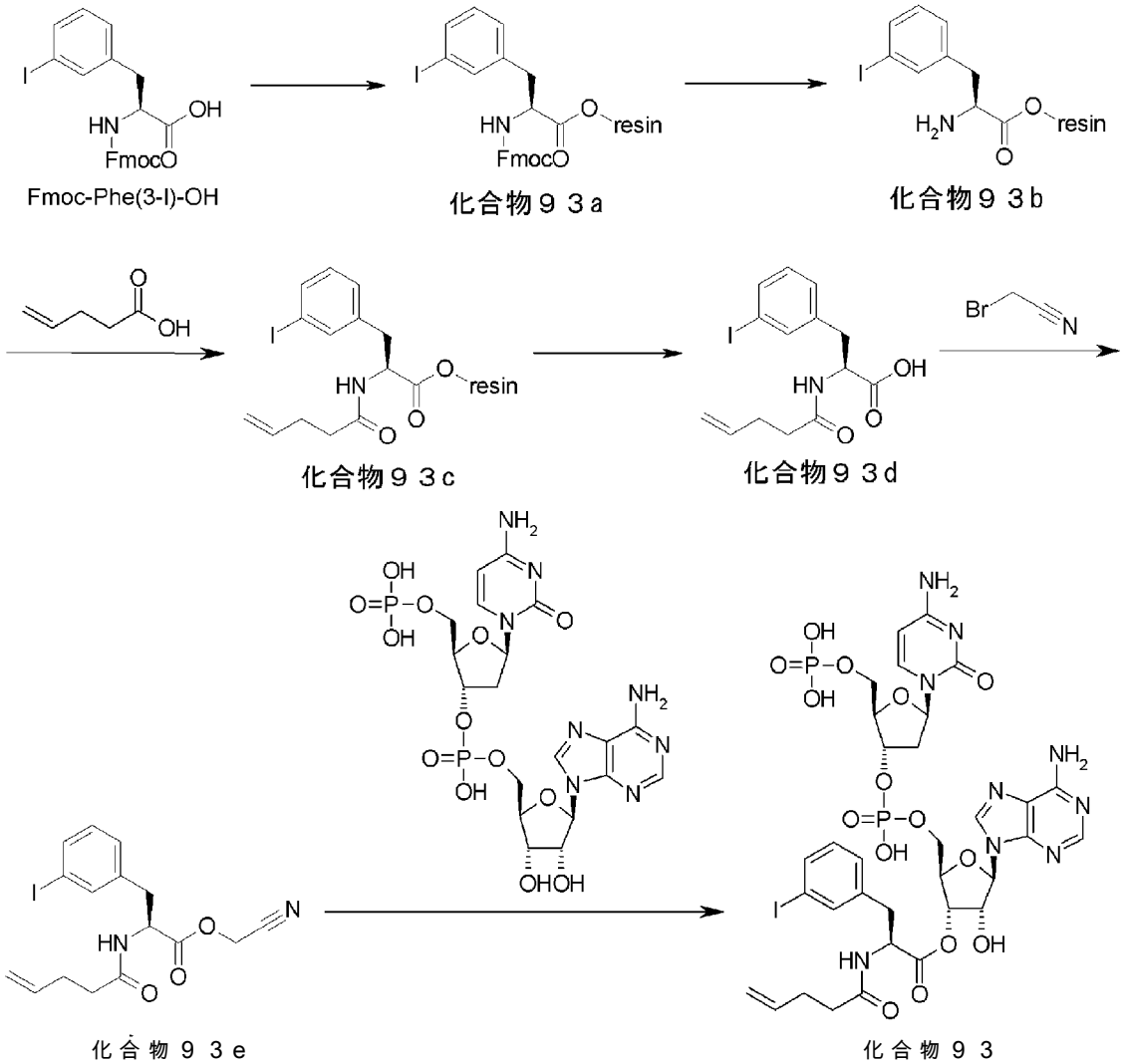
イミダゾール (６８０．８ｍｇ、１０．ＯＯｍｍｏｌ)およびＮ，Ｎ，Ｎ—トリメチルヘキサデカン_１_アミニウム 塩化物 (６４０．Ｏｍｇ、２．ＯＯｍｍｏｌ)を溶かし、酢酸でｐＨ８に調節した緩衝液 (１００ｍｌ)にリン酸二水素 ((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４—アミノ－２—オキソピリミジン－１(２Ｈ)—イル)－３—(((((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－５－(６—アミノ－９Ｈ—プリン－９—イル)－３，４—ジヒドロキシテトラヒドロフラン_２_イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_２_イル)メチル (化合物１ｈ) (９６ｍｇ、０．１５０ｍｍｏｌ)を加えた後、３_(４—ヨードフエニル)_２—(ペンタ_４—エンアミド)プロパン酸 (Ｓ)—シアノメチル (化合物９２) (２４９ｍｇ、０．６０ｍｍｏｌ)のＴＨＦ溶液 (１．Ｏｍｌ)を加えて室温で２時間攪拌した。反応液にＴＦＡ (１．Ｏｍｌ)を加えて凍結乾燥した後、得られた残渣をｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ_ＨＰＬＣ (０．０５％ＴＦＡ水溶液 :アセトニトリル＝８０ :２０～６０ :４０)で精製し、標題化合物９０ (３５ｍｇ、２３％)を得た。

ＬＣＭＳ :ｍ/ｚ ９９０ (Ｍ－Ｈ)－

保持時間 :１．４５分 (分析条件 ＺＱＦＡ０５)

[1486] １－５．DdCDAアミノアシル化化合物９３の合成

１―５―１．　３－（３―ヨードフェニル）－２―（ペンター４―エンアミド）プロパン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３―イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（化合物９３、ｐｄＣｐＡ－Ｐｈｅ（３－Ｉ））の合成



窒素雰囲気下、２－クロロトリチルクロライドレジン（１００―２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、渡辺化学から購入、２．７８ｇ）をジクロロメタン（３０ｍｌ）に浸し、室温で２０分撹拌して膨潤させた。ジクロロメタンを除いた後、（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ―フルオレン－９－イル）メトキシ）カ

ルボニル）アミノ）_３_（３―ヨードフエニル）プロパン酸（Ｆｍｏｃ―Ｐｈｅ（３―Ｉ）―ＯＨ、１．５０ｇ、２．９２ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（１．５０ｇ、１１．７ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（３０ｍｌ）を加えて室温で５時間攪した。その後、メタノール（３ｍｌ）を加えて室温でさらに１時間攪拌した。反応液を除去して得られたレジンをジクロロメタン（３０ｍＩＸ３回）およびＤＭＦ（３０ｍＩＸ２回）で洗浄し、化合物９３ａを得た。

Ｆｍｏｃ基の脱保護のために、化合物９３ａに２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液（２０ｍｌ）を加えて室温で２時間攪拌した後、反応液を除去した。このレジンをＤＭＦ（３０ｍＩＸ４回）で洗浄し、化合物９３ｂを得た。

化合物９３ｂにペンター４―エン酸（０．３９ｇ、３．９０ｍｍｏｌ）、ＤＩＣ（０．５５０ｇ、４．２９ｍｍｏｌ）、Ｈ０Ａｔ（０．８７０ｇ、４．２９ｍｍｏｌ）のＤＭＦ溶液（２０ｍｌ）を加えて室温で５時間攪拌した。反応液を除去し、レジンをＤＭＦ（３０ｍＩＸ４回）およびジクロロメタン（５０ｍＩＸ４回）で洗浄して化合物９３ｃを得た。

化合物９３ｃに２％ＴＦＡのジクロロメタン溶液（２０ｍｌ）を加えて、室温で１時間攪拌し、レジンをろ過して除いた。同様の操作をさらに３回繰り返し、得られた反応液をまとめて減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ（ジクロロメタン：メタノール＝３０：１）で精製し、（Ｓ）－３－（３―ヨードフエニル）－２―（ペンター４―エンアミド）プロパン酸（化合物９３ｄ）（０．４９４ｇ、６８％）を得た。

化合物９３ｄ（０．４９４ｇ、１．３２４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１０ｍｌ）に溶解し、２―ブロモアセトニトリル（０．６３ｇ、５．３０ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（０．３４１ｇ、２．６５ｍｍｏｌ）を室温でゆっくり加えた。室温で３０分攪拌した後、反応液を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ（石油エーテル：酢酸エチル＝５：１）で精製し、（Ｓ）－３－（３―ヨードーフエニル）_２_ペンタ_４_エノィルァミノープロピオン酸　シァノメチル　エステル（化合物９３ｅ）（０．３９２ｇ、７

２％）を得た。

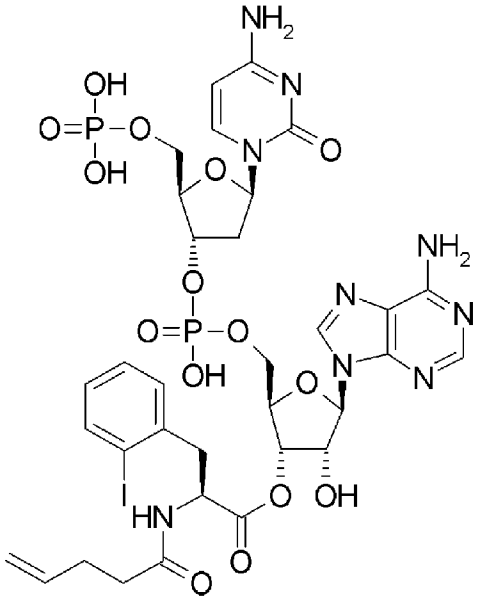
イミダゾール（４７６．６ｍｇ、７．０ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ，Ｎ―トリメチルヘキサデカン_１_アミニウム　塩化物（４４８．０ｍｇ、１．４ｍｍｏｌ）を溶かし、酢酸でｐＨ８に調節した緩衝液（７０ｍｌ）にリン酸二水素　（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン―１（２Ｈ）―イル）_３_（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン_２_イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル（化合物１ｈ、ｐｄＣｐＡ）（７０ｍｇ、０．１１ｍｍｏｌ）を加えた後、（Ｓ）_３_（３―ヨード―フエニル）―２―ペンター４―エノイルアミノープロピオン酸　シアノメチル　エステル（化合物９３ｅ）（１８１．３ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）のＴＨＦ溶液（３．０ｍｌ）を加えて室温で２時間攪拌した。反応液にＴＦＡ（１．０ｍｌ）を加えて凍結乾燥した後、得られた残渣をｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ―ＨＰＬＣ（０．０５％ＴＦＡ水溶液：アセトニトリル＝８０：２０～６０：４０）で精製し、標題化合物９３（１７．９ｍｇ、１６％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ/ｚ　９９２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７５分　（分析条件　ＳＱＤＡＡ０５）

[1487] １－６．pdCpAアミノアシル化化合物９４の合成

１―６―１．３－（２―ヨードフエニル）－２―（ペンター４―エンアミド）プロパン酸　（２Ｓ）－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５_（６－アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３_イルの合成



（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－３—（３—ヨードフエニル）プロパン酸の代わりに（２Ｓ）－２－［［（９Ｈ—フルオレン＿９＿イルメトキシ）カルボニル］アミノ］—３—（２—ヨードフエニル）プロパン酸（１．５０ｇ、２．９２ｍｍｏｌ）を原料とし、化合物９３を得る手法と同様の手法で標題化合物９４（１４．２ｍｇ、１３％）を得た。

ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　９９２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７１、０．７３分　(分析条件　ＳＱＤＡＡ０５)

[1488] ２－１．アミノアシル化ｔRNAの合成

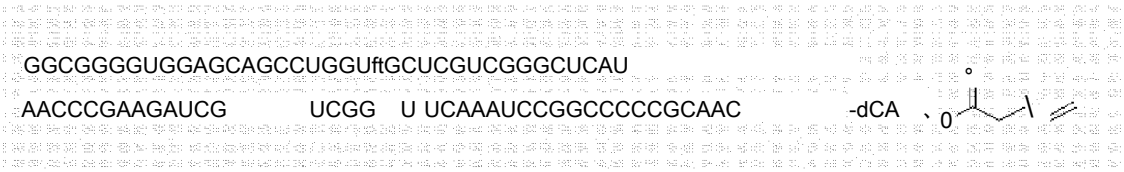
ｐｄＣｐＡ－ＰｅｎｔｅＡ（化合物８７）とｔＲＮＡ（ＣＡ欠損）(配列番号：Ｒ—５）のいgat ionによるアシル化ｔＲＮＡ（化合物AT—２＿ΠIA）の合成

５０μＭ転写tRNAfMetCAU(-CA)（配列番号Ｒ＿５）１０从Ｌに、10X Ligat ion buffer (500 ㎜ HEPES-KOH pH 7.5, 200 ㎜ $MgCl_2$, 10 ㎜ ATP) ２从Ｌ、Nuc lease free water ４从Ｌを加え、９５℃で２分間加熱した後、室温で５分間放置し、ｔＲＮＡのリフォールディングを行った。１０ｕηｉｔ／μＬのT4 RNAリガーゼ（New Eng land Bio Lab. 社）２从Ｌおよび、５ｍＭのｐｄＣｐＡ—ＰｅｎｔｅＡ（化合物８７）のＤＭＳＯ溶液　２从Ｌを加え

、１５℃で４５分間ライゲーションヨン反応を行った。アシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—２—ΠＩＡ）は、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—２—ΠＩＡ）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリゥムに溶解した。

[1489] 化合物ＡＴ—２—ΠＩＡ

ＰｅｎｔｅＡ- tRNAfMetCAU

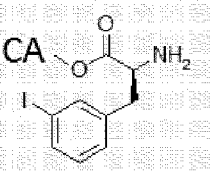


[1490] アミノアシル化ｐｄＣｐＡ_（化合物９３）_ｔＲＮＡ_（ＣＡ欠損）__（配列番号：Ｒ—１）_のいgat ionによるアミノアシル化ｔ_ＲＮＡ（化合物ＡＴ—_１-ＩＩＩＡ）の合成

５０μＭ転写tRNAEnAsnGAG (-CA)（配列番号Ｒ_１）１０从Ｌに、10X Ligat ion buffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM MgCL_2, 10 mM ATP) ２μＬ、Nuc lease free water ４从1を加え、９５℃で２分間加熱した後、室温で５分間放置し、ｔＲＮＡのリフォールデイングを行った。２０ｕ门；ｔ／从しの丁４ＲＮＡリガーゼ（New Eng land Bio Lab. 社）２从Ｌおよび、５ｍＭのｐｄＣｐＡ_Ｐｈｅ（３-Ｉ）（化合物９３）のＤＭＳ０溶液２从1を加え、１５℃で４５分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液２０μＬに、３Ｍ酢酸ナトリウム４从1と１２５ｍＭヨウ素(水：ＴＨＦ＝１：１溶液）２４μＬを加え、室温で１時間、脱保護を行った。アミノアシル化ｔＲＮＡは、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。アミノアシル化ｔＲＮＡ（化合物ＡＴ—１—ΠＩＡ）は、翻訳混合物に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリゥムに溶解した。

[1491] 化合物ＡＴ—_１-ＩＩＩＡ

Ｐｈｅ（３-Ｉ）- tRNAEnAsnGAG（配列番号：３３）

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUgagA
AUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA 

[1492] 2 - 2 . 翻 訳 合 成

[1493] H c 1 m R N A 配 列 (配 列 番 号R_ 4 1 ') (配 列 番 号 :7 1)

GGGUUAACUUUAAgaaggagauauacauAUGUUUCUUCCGagcggcucuggcucuggcucuUAGGGCGG
CGGGGACAAA

[1494] H e 2 m R N A 配 列 (配 列 番 号R_ 4 2) (配 列 番 号 :7 2)

GGGUUAACUUUAAgaaggagauauacauAUGACUACAACGagcggcucuggcucuUUUCUUCCGggcuc
uUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1495] H c 3 m R N A 配 列 (配 列 番 号R— 4 3) (配 列 番 号 :7 3)

GGGUUAACUUUAAgaaggagauauacauAUGAACAACAACAACAACACUACAACGggcCUUCCGggcuc
uUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1496] H c 1 ペ プ チ ド配 列 P — 1 6 0

[PenteA]Phe[Phe(3-I)]ProSerG LySerG LySerG LySer

[1497] H c 2 ペ プ チ ド配 列 P _ 1 6 1

[PenteA] ThrThrThrSerG LySerG LySerPhe[Phe(3-I)]ProG LySer

[1498] H c 3 ペ プ チ ド配 列 P _ 1 6 2

[PenteA]AsnAsnAsnAsnAsnThrThrThrG Ly[Phe(3-I)]ProG LySer

[1499] ペ プ チ ドP _ 1 6 0 、 P _ 1 6 1 、 P - 1 6 2 の翻 訳 合 成

Met, Leu を除 く各0 . 3 m M の 1 8 種 類 のタンパク質性アミノ酸、2 0 ト M Phe(3-I)-tRNAEnAsnGAG (化 合 物AT— 1 — IIIA) 、 2 0 μM PenteA-tRN AfMetCAU (化 合 物AT— 2 — ΠA) を加えた翻訳液に、1 μM 鋳型m R N A H c 1 、 H c 2 、 もしくはH c 3 (配 列 番 号R— 4 1 ' 、 R— 4 2 、 R— 4 3) を添加し、3 7 ℃ で 6 0 分 間 保 温 した。続いて、以下に示す方法でHeck 型の環化反応を行った。

[1500] Hc1（ペプチド配列P_160）の環化反応

リン酸バッファー（K2HP04 1.OmmolとK3P04 0.2mmolの水10mLの水溶液 80μL）、5%PTS（Polyoxyethanyl—α—tocopheryl sebacate）水溶液（200μL）を混合し配列番号R_41'により得られた翻訳生成物（Hc1，20μL）を加え窒素置換した。得られた混合物にPdCl2（MeCN）2（1.Omg、3.9从mol）、2，2'—ジフエニルフオスフイノー1，1'—ビフエニル（6.2mg、12μ,mol）をN_メチルピロリジノン（0.2mL）に窒素雰囲気下溶解したPd溶液（60.0μL）を加え50℃にて窒素雰囲気下12時間攪拌した。反応液に0.2Mチオシアヌル酸1.5カリウム塩水溶液（73.5μL）を加えた。

得られた反応溶液に水を加え2mLとし、遠心を行った（10000rpm、6分間、室温）。上清について凍結乾燥を行い、得られた残渣を水：アセトニトリル=9：1溶液 100μLに再溶解させLC/MS分析を行い、環化体の生成をを確認した。

LC—HRMS：m/z 1007.4149（M-H）-，（Calcd for $C_{46}H_{59}N_{10}O_{16}$：1007.4116）

保持時間：6.43分 (分析条件 OrbitrapHFIP_Et3N)

[1501] He2（ペプチド配列P—161）の環化反応

He1の場合と同様の方法により環化反応を実施した。得られた生成物をHe1の場合と同様の方法によりLC/MS分析を行い、環化体を示す二種類の化合物の生成を確認した。

LC—HRMS：m/z 1310.5579（M-H）-，（Calcd for $C_{58}H_{80}N_{!3}O_{22}$：1310.5546）

保持時間：4.91分

LC—HRMS：m/z 1310.5570（M-H）-，（Calcd for $C_{58}H_{80}N_{!3}O_{22}$：1310.5546）

保持時間：5．17分

(分析条件　OrbitrapHFIP_Et3N)

[1502] He3 (ペプチド配列P_162)_の環化反応

He1の場合と同様の方法により環化反応を実施した。得られた生成物をHe1の場合と同様の方法によりLC/MS分析を行い、環化体の生成を確認した。

LC—HRMS：m/z 1415.5860 (M-H)-, Calcd for $C_{58}H_{83}N_{18}O_{24}$：1415.5833)

保持時間：3．35分　(分析条件　OrbitrapHFIP_Et3N)

[1503] 逆転写実施，

mRNA—ペプチドフュージョンをHeck環化反応条件に付し回収したmRNA—ペプチドフュージョンを逆転写し逆転写が問題なく進行することを確認しmRNAがHeck環化反応条件において安定であることを確認した。

[1504] mRNA_ペプチドフュージョン溶液調整

PCRにより調製したDNA(配列番号　D-50)を錶型に、In vitro転写によりmRNAを調整し、RNeasy　mini kit (Qiagen社)を用いて精製した。1μMのmRNAに、1.5 μMのピューロマイシンリンカー(Sigma社)(配列番号C-1) 1X T4 RNAライゲースリアクションバッファー(NEB社)、20% DMS0、2 unit/μL T4 RNAライゲース(NEB社)を加え、37℃で30分間ライゲーシヨン反応させた後、RNeasy MiniE Lutek it(Qiagen社)により精製した。次に、1 μMのmRNA-ピューロマイシンリンカー連結体(以下、mRNA-Pu)を錶型に、前述の無細胞翻訳液からRF1を除いたものを加え、37℃で30分間翻訳し、mRNA-ペプチドフュージョン分子(化合物Fusion-1)を得た。

[1505] 配列番号　D-50(配列番号：74)

KA03S2　DNA配列：

gtaatacgactcactat　aGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATa　t gACTAGAACTaaggcgTACTG

GAGCcttCCGggcggcAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1506] KA03S2 mRNA 配列 :(配列番号 :75)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUaUgACUAGAACUaaggcgUACUGGAGCcUUCCGggcggcAG

CGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1507] 配列番号C-1 (配列番号 :76)

S2PuFL in配列 :

[P]CCCGTCCCCGCCGCCC[F Luorece in-dT] [Space r18] [Space r18] [Space r18] [Spac

er18] [Spacer 18]CC[Puromyc in] ([P] :5,リン酸化)

[1508] 環化反応

得られたmRNA-ペプチドフユージョン分子 (化合物Fusion-1, 11.0μL)に10-mer RNA_ペプチドコンジユゲート (化合物70b) (0.33mM水溶液 5.0μL、1.65nmol)、リン酸バッファー (K2HP04 1.Ommolと K3P04 0.20mmolの水10mLの水溶液 40μL)、5%PTS (Polyoxyethanyl-a—tocopheryl sebacate)水溶液 (100μL)を混合し、PdCl2(MeCN)2 (1.Omg、3.9μmol)、2,2'—ジフエニルフオスフイノ_1,1'—ビフエニル (6.2mg、12μmol)をN_メチルピロリジノン (0.2mL)に窒素雰囲気下溶解したPd溶液 (30.OμL)を加え50℃にて窒素雰囲気下12時間攪拌した。得られた反応液に0.2Mチオシアヌル酸 1.5カリウム塩水溶液 (37.Oμl)を加え室温にて30分間放置し、環化反応液を得た。反応液 (5.0μL)を水 (10.0μL)で希釈しLC分析サンプルとし分析し10-mer RNA_ペプチドコンジユゲート (化合物70b)の消失および10-mer RNA_ペプチドコンジユゲートの環化体 (化合物83b)の生成を確認した。

LCMS (ESI) 1265.9 (M-3H)3-

保持時間 :3.48分 (分析条件ZQHFIP-Me2NEt)

[1509] 逆転写確認

環化反応後のmRNA-ペプチドフユージョン分子をRNeasy MiniELute Kit(Qia

gen 社)で精製した。0.5 μM mRNA-ペプチドフユージョン分子を鋳型に、逆転写反応液 (1X M-MLV 逆転写反応バッファー (Promega 社), 各0.5 mMの dNTP mix, 4 unit/μL M-MLV 逆転写酵素 RNaseH マイナス点変異, 3 μM 逆転写プライマー (配列番号C-2))を添加し、42° Cで20分間逆転写反応を行った。反応産物を、TGX geL anykD(B iorad 社)を用いて電気泳動を行い、ピューロマイシンリンカーに付加されたフルオレセインの蛍光を検出した。その結果、環化反応の有無にかかわらず、効率良く逆転写反応が進行していることが確認された。結果を図43に示す。

[1510] 配列番号C-2(配列番号 :77)

逆転写プライマー

TTTGTCCCCGCCGCCCTAAGAGCCAGAGCCAGAGCCGCT

[1511] [実施例24]

RNA-複合体の Heck 反応

mRNA_ペプチド複合体溶液調製

6 μMの mRNA (Hc1 mRNA配列 (配列番号R—41)) に、9 μMのピューロマイシンリンカー (Sigma 社) (配列番号C-1) 1X T4 RNA ライゲースリアクションシヨンバッファー (New Eng land Bio Lab 社、カタログ番号M0204L) 、10% DMS0、0.63 unit/μL T4 RNA ライゲース (New Eng land Bio Lab 社、カタログ番号M0204L) を加え、37℃で30分間ライゲーションション反応させた後、RNeasy MiniE Lute kit (Qiagen 社)によりmRNA-ピューロマイシンリンカー連結体 (以下、mRNA-Pu) を精製した。精製した1 μMの mRNA-Pu を鋳型に、無細胞翻訳液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mMクレアチンリン酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 酢酸カリウム, 9mM 酢酸マグネシウム, 2mMスペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, 0.5mg/ml E.coli MRE600 (RNaseネガティブ)由来 tRNA (Roche社), 4μg/ml クレアチンキナーゼ, 3从g/ml ミオキナーゼ, 2unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1μg/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 0.6μM メチオニルt

ＲＮＡトランスフオルミラーゼ，０．２６μＭ ＥＦ-Ｇ，０．２４μＭ ＲＦ２，０．１７μ,Ｍ ＲＦ３，０．５μＭ ＲＲＦ，２．７μＭ ＩＦ１，０．４μ,Ｍ ＩＦ２，１．５μＭ ＩＦ３，４０μＭ ＥＦ-Ｔｕ，８４μ,Ｍ ＥＦ_Ｔｓ，１．２μＭ リボソーム，０．７３μＭ ＡＩａＲＳ，０．０３μ,Ｍ ＡｒｇＲＳ，０．３８μＭ ＡｓｎＲＳ，０．１３μＭ ＡｓｐＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＣｙｓＲＳ，０．０６μＭ ＧｌｎＲＳ，０．２３μ,Ｍ ＧｌｕＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＧｌｙＲＳ，０．０２μＭ ＨｉｓＲＳ，０．４μ,Ｍ ＩｌｅＲＳ，０．０４μ,Ｍ ＬｅｕＲＳ，０．１１μ,Ｍ ＬｙｓＲＳ，０．０３μ,Ｍ ＭｅｔＲＳ，０．６８μＭ ＰｈｅＲＳ，０．１６μ,Ｍ ＰｒｏＲＳ，０．０４μＭ ＳｅｒＲＳ，０．０９μＭ ＴｈｒＲＳ，０．０３μ,Ｍ ＴｒｐＲＳ，０．０２μＭ ＴｙｒＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＶａｌＲＳ（自家調製タンパクは基本的はHisタグ付加タンパクとして調製した），各３００μMのメチオニンとロイシンを除く１８種類のタンパク質性アミノ酸），２０μMの化合物AT— １_ ΠΙA 、２０μＭ ４-PenteA-tRNAfMetCAU （化合物AT— ２—ΠΙA ）を加え、37℃で30分間翻訳し、１８ｍＭ EDTA ＰＨ8.０を加え、mRNA-ペプチド複合体を得た。

[1512] 環化反応

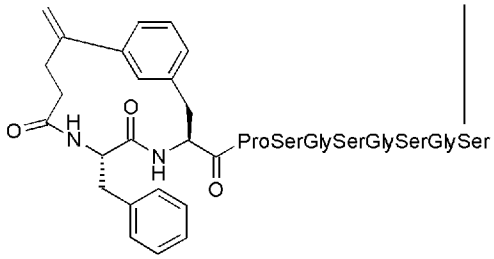
得られたmRNA-ペプチド複合体 (２０．０μＬ）に、リン酸バッファー (Ｋ２ＨＰ０４ １．ＯｍｍｏｌとＫ３Ｐ０４ ０．４０ｍｍｏｌの水１０ｍＬの水溶液 １２０μＬ）、１５％ＰＴＳ（Ｐｏｌｙｏｘｙｅｔｈａｎｙｌ—ａ—ｔｏｃｏｐｈｅｒｙｌ ｓｅｂａｃａｔｅ）水溶液（２００μ,Ｌ）な混合し、ＰｄＣｌ２（ＭｅＣＮ）２（４．Ｏｍｇ、１５．４从ｍｏｌ）、２，２'—ジフエニルフオスフイノ_１，１'—ビフエニル (２４．８ｍｇ、４７．５μｍｏｌ）をＮ_メチルピロリジノン (０．８ｍＬ）に窒素雰囲気下溶解したＰｄ溶液 (６０．ＯμＬ）を加え５０℃にて窒素雰囲気下２４時間攪拌した。得られた反応液に０．２Ｍチオシアヌル酸 １．５カリウム塩水溶液 (７３．５μＬ）を加え室温にて３０分間放置し、環化反応液を得た。

[1513] ＲＮａｓｅＭ

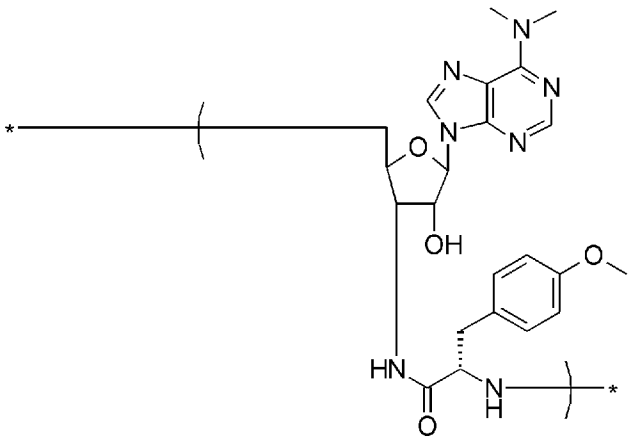
上記の環化反応液を卓上遠心機で遠心分離し、上澄みをRNeasy miniElute CLeanup kit（Qiagen社、Catalog No. 74204）で精製し、RNase フリー水で溶出した。溶出液を、1X React ion buffer (Promega 社、Catalog No. M217A、10mM TrisHCL pH7.5, 5mM EDTA, 0.2M AcONa)、0.5unit/μL RNaseONE ribonuc Lease(Promega 社、Catalog No. M425A)、0.1Unit/μL RNaseH(LifeTechno Logies社 Catalog No. 18021-014) を用いて37℃で3時間反応させ、以下の化合物 (化合物Fusion-2）を得た。

[1514] 化合物Fusion-2

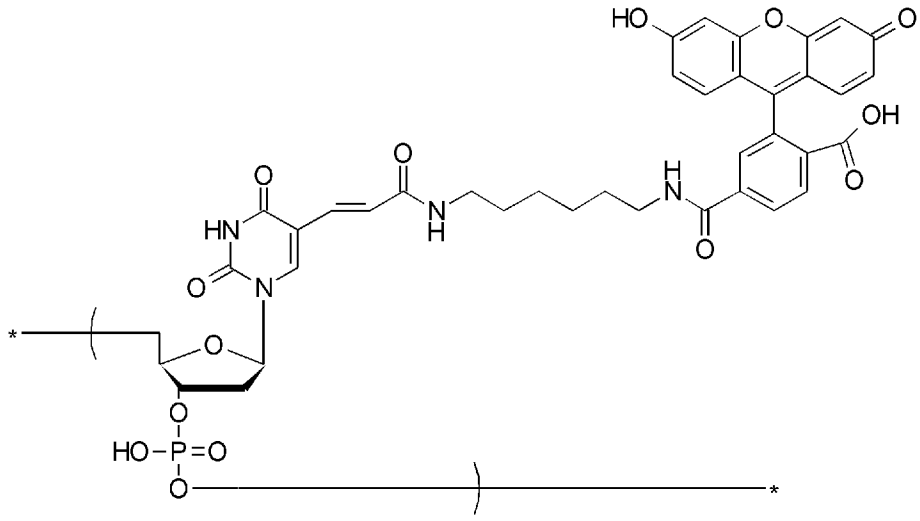
HO- CCCGTCCCCGCCGCCC[Fluorescein-dT][Spacer18][Spacer18][Spacer18][Spacer18]CC[Puromycin]



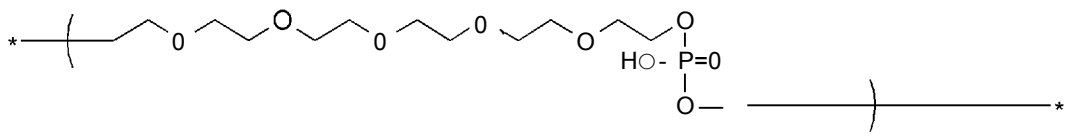
[1515] 詳細な部分構造は以下の通りである。



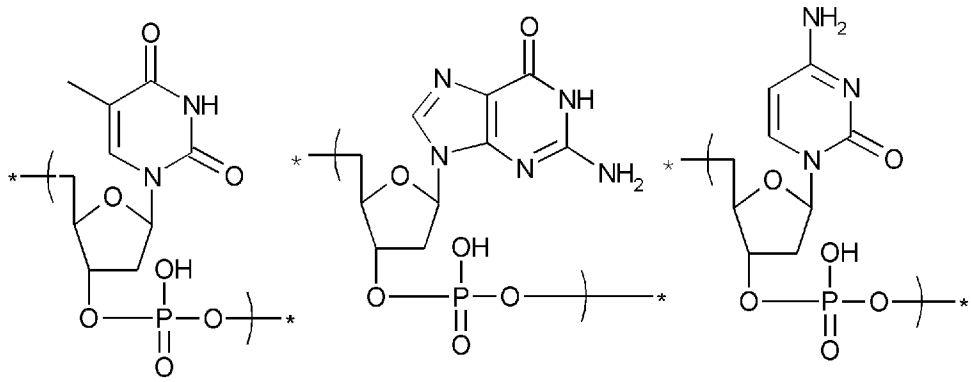
[Puromycin]



[Fl uoresce! ˙n-dT]



[Spacer18]



T G C

[1516] ＬＣ分析

ＲＮａｓｅ処理済みサンプル（１０μＬ）に４００ｍＭ ＨＦＩＰ、１５ｍＭ トリエチルアミン水溶液を９０μＬ加えた後、Ｏａｓｉｓ ＨＬＢ μＥｌｕｔｉｏｎ（Ｗａｔｅｒｓ社）を用いて固相抽出を行った。５０％アセトニトリル溶出画分について凍結乾燥を行い、水に再溶解したサンプルについてＬＣ/ＭＳ分析を行い、ペプチドフユージョン環化生成物の生成を確認した。（図８１）

ＬＣ—ＨＲＭＳ：m/ｚ ６６６．２１２４（M-１４Ｈ）１４—，６２１

．７２９３（M-１５H）１５-，５８２．８１００（M—１６H）１６—（Ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $C_{333}H_{466}N_{8}o0_{188}P_{24}$:Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｗｅｉｇｈｔ ９３４１）

保持時間：２９．７４分 (分析条件 ＯｒｂｉｔｒａｐＨＦＩＰ_Ｅｔ３Ｎ-２）

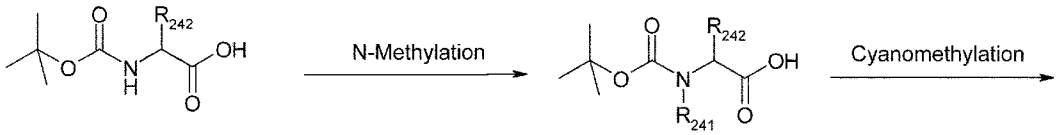
[1517] 「実施例２５］__アミド環化にて環化されたディスプレイライブラリーの実施

ＰｄCpA-アミノ酸群の合成、続いてｔRNA—アミノ酸複合体の合成により、導入される非天然型アミノ酸のうち、ARSによらずに導入されるものの準備を行った。続いて、多様性が高いランダムDNAの準備を行った。転写、翻訳、化学修飾によるRNAと環化ペプチドとの複合体作製に続き、バニングを実施してTNFα、TNFR1、IL-6R に対する結合ペプチドを取得するための実験を行った

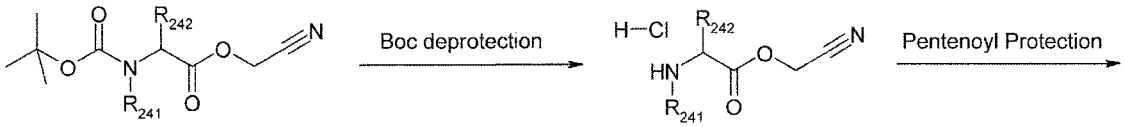
[1518] １．_ディスプレイライブラリ構築のためのＤｄＣ_ＤＡ_アミノ酸の合成

ｐｄＣｐＡとの複合体として、以下の非天然型アミノ酸 (ＭｅＧｌｙ、Ｐｈｇ、Ｐｈｅ（４_ＣＦ３）、Ｍｅｔ（０２）、βＡ\ａ、ＭｅＡｌａ（４_Ｔｈｚ）、ＭｅＰｈｅ（３_Ｃｌ）、ｎＰｒＧｌｙ、ＭｅＳｅｒ、Ｈｙｐ（Ｅｔ））を翻訳導入するための合成を行った。すなわち、以下のスキームに従い、化合物SP７０５（Ｐｅｎ-ＭｅＧｌｙ-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７１０（Ｐｅｎ-Ｐｈｇ-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７１５（Ｐｅｎ-Ｐｈｅ（４—ＣＦ３）-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７２０（Ｐｅｎ—Ｍｅｔ（０２）-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７２５（Ｐｅｎ-βＡｌａ-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７３１（Ｐｅｎ-ＭｅＡｌａ（４-Ｔｈｚ）-ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７３７（Ｐｅｎ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）_ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７４２（Ｐｅｎ_ｎＰｒＧｌｙ_ｐｄＣｐＡ）、化合物SP７５４（Ｐｅｎ—Ｈｙｐ（Ｅｔ）-ｐｄＣｐＡ）を合成した。化合物６ｉ_Ｃ（ｔBuSSEｔGABA）、化合物１ｉ-ＩＡの合成は既に記載済である。

[1519]

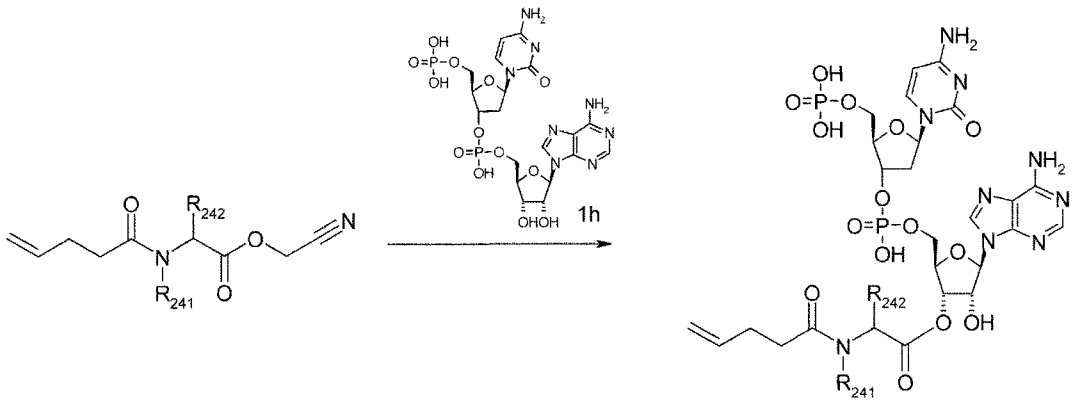


SP701(R241=Me, R242=H, for MeGly)
SP706(R241=H, R242=Phe, for Phg)
SP711(R241=H, R242=CH2 Phe(4-CF3), for Phe(4-CF3))
SP716(R241=H, R242=CH2 CH2 S(O)2 CH3, for Met(O2))
SP721 for βAla
SP726 (R242=CH2 4-thiazolyl, for MeA a(4-Thz))
SP727 (R241=Me, R242=CH2 4-thiazolyl, for MeAla(4-Thz))
SP732 (R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP733 (R241=Me, R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP738 (R241=nPr, R242=H, for nPrGly)
SP750 for Hyp(Et)



SP702(R241=Me, R242=H, for MeGly)
SP707(R241=H, R242=Phe, for Phg)
SP712(R241=H, R242=CH2 Phe(4-CF3), for Phe(4-CF3))
SP717(R241=H, R242=CH2 CH2 S(O)2 CH3, for Met(O2))
SP722 for βAla
SP728 (R241=Me, R242=CH2 4-thiazolyl, for MeAla(4-Thz)
SP734 (R241=Me, R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP739 (R241=nPr, R242=H, for nPrGly)
SP751 for Hyp(Et)

SP703(R241=Me, R242=H, for MeGly)
SP708(R241=H, R242=Phe, for Phg)
SP713(R241=H, R242=CH2 Phe(4-CF3), for Phe(4-CF3))
SP718(R241=H, R242=CH2 CH2 S(O)2 CH3, for Met(O2))
SP723 for βAla
SP729 (R241=Me, R242=CH2 4-thiazolyl, for MeAla(4-Thz))
SP735 (R241=Me, R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP740 (R241=nPr, R242=H, for nPrGly)
SP752 for Hyp(Et)

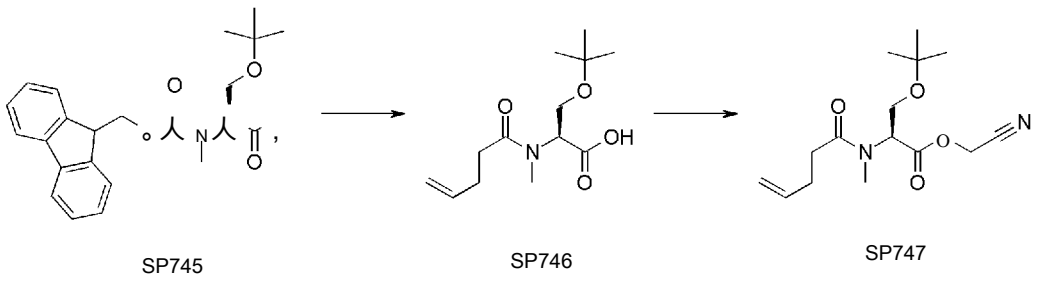


SP704(R241=Me, R242=H, for MeGly)
SP709(R241=H, R242=Phe, for Phg)
SP714(R241=H, R242=CH2 Phe(4-CF3), for Phe(4-CF3))
SP719(R241=H, R242=CH2 CH2 S(O)2 CH3, for Met(O2))
SP724 for βAla
SP730 (R241=Me, R242=CH2 4-thiazolyl,for MeAla(4-Thz)
SP736 (R241=Me, R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP741 (R241=nPr, R242=H, for nPrGly)
SP753 for Hyp(Et)

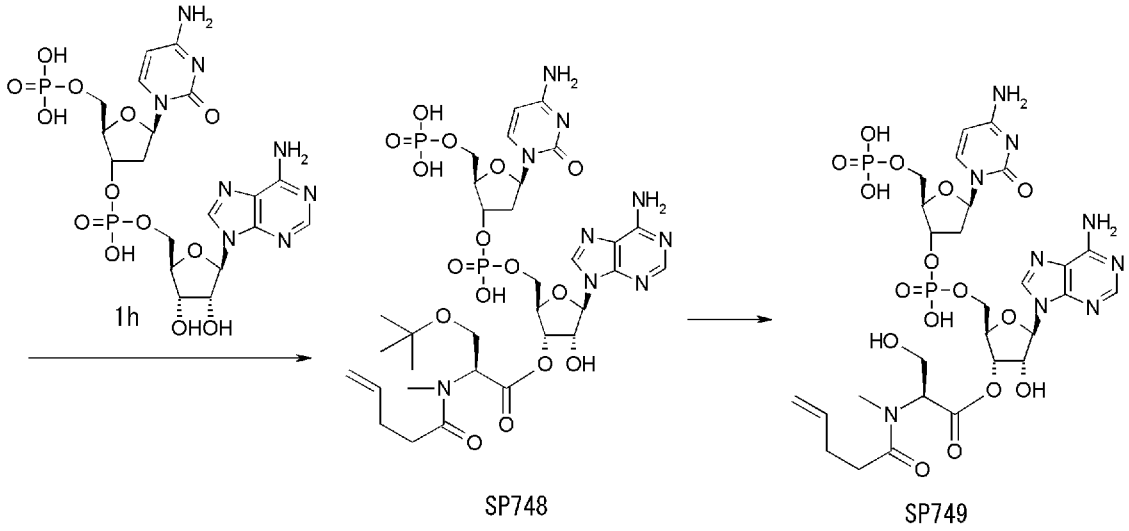
SP705(R241=Me, R242=H, for MeGly)
SP710(R241=H, R242=Phe, for Phg)
SP715(R241=H, R242=CH2 Phe(4-CF3), for Phe(4-CF3))
SP720(R241=H, R242=CH2 CH2 S(O)2 CH3, for Met(O2))
SP725 for βAla
SP731 (R241=Me, R242=CH2 4-thiazolyl, for MeAla(4-Thz))
SP737 (R241=Me, R242=CH2 Phe(3-Cl), for MePhe(3-Cl))
SP742 (R241=nPr, R242=H, for nPrGly)
SP754 for Hyp(Et)

1520] 合物 については のス

キームに従い合成を行った。

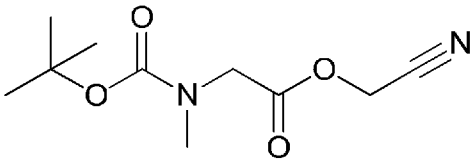


SP745 SP746 SP747



1h SP748 SP749

[1521] 2 (- ((tert_ブトキシカルボニル)__(メチル)_アミノ)酢酸シアノメチル (化合物SP702)_の合成



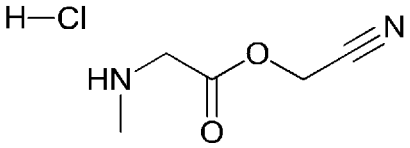
[1522] 窒素雰囲気下、2 (_ ((tert—ブトキシカルボニル) (メチル)アミノ)酢酸 (化合物SP701) (10.0g、52.9mmol)およびN_エチル—イソプロピルプロパン—2—アミン (DIPEA) (18.9mL、108mmol)をジクロロメタン (100ml)に溶解し、2—ブロモアセトニトリル (26.0g、217mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (酢酸エチル :石油エーテル= 1 :10→1 :4)で精製し、2 (– ((tert—ブ

トキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物SP７０２）（４．８０ｇ、８０％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２５１ （Ｍ＋Ｎａ）＋

保持時間：１．８２分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ６）

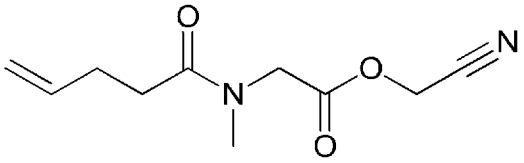
[1523] ２－（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の合成



[1524] ２（－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）（４．８０ｇ、２１．Ｏｍｍｏｌ）をジエチルエーテル（５０ｍｌ）に溶解し、塩酸ガスをバブリングさせ、室温で２時間攪拌した。析出した固体をろ過にて集め、減圧下乾燥させて２－（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）（３．００ｇ、８７％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1525] ２－（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド）酢酸シアノメチル（Ｐｅｎ―ＭｅＧｌｖ－ＯＣＨ^Ｃ Ｎ）（化合物ＳＰ７０４）の合成

なお、本明細書では、４－ペンテノィル基をＰｅｎ基と略称し、シアノメチル基をCH_2CNと記載する。



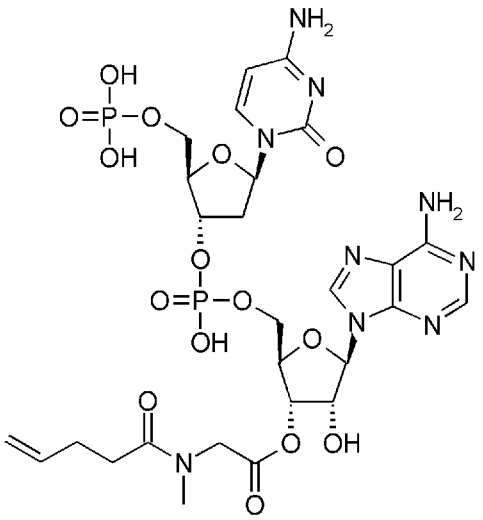
[1526] 窒素雰囲気下、２－（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物SP７０３）（３．００ｇ、１８．３ｍｍｏｌ）および トリエチルアミン（６．３４ｍし ４５．５ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（３０ｍｌ）に溶解させ、塩化ペンタ―４―エノィル（２．６０ｇ、２２．０ｍｍｏｌ）を０℃で滴下した。室温で２時間３０分攪拌後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルに溶解させ、固体をろ過にて取り除いた。溶液を減圧濃縮し、カラムクロマトグラフィ（酢酸エチル：石油エーテル＝１：１０→２：７）で精製し、２－（Ｎ―メチルペンタ－４―エンアミド）酢酸シアノメチル（化合

物SP７０４）（３．４０ｇ、８８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ２１１ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．５０分 (分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ６)

[1527] ２―（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド)酢酸 (２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２―オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル (Ｐｅｎ―ＭｅＧｌｖ－ｐｄＣｐＡ）（化合物ＳＰ７０５）の合成



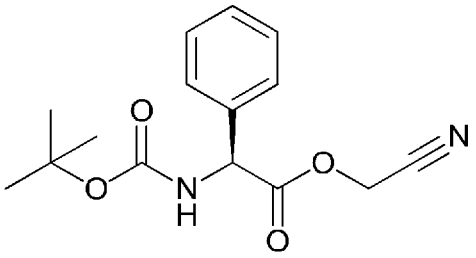
[1528] 緩衝液Ａ（１Ｌ）に、リン酸二水素 （(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチル (化合物１ｈ）（１．００ｇ、１．５７ｍｍｏｌ）を溶解させ、２―（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４）（２．００ｇ、９．５１ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン (５ｍＬ）溶液を加え、室温で３０分撹拌した。反応液を凍結乾燥し、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (０．５％トリフルオロ酢酸水溶液/ アセトニト

リル）にて精製し、表題化合物（化合物SP７０５）（１３９ｍｇ、１１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ７９０．５ （Ｍ＋Ｈ）＋

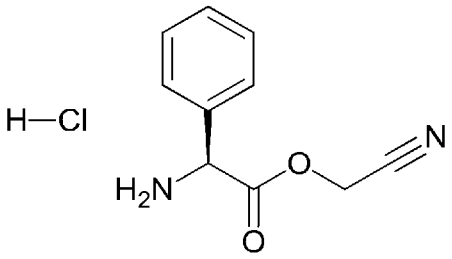
保持時間：０．４６分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1529] ２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿２＿フエニル酢酸＿（Ｓ）―シァノメチル（化合物ＳＰ７０７）の合成



[1530] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－２＿フエニル酢酸（化合物ＳＰ７０６）（１．ＯＯｇ、３．９８ｍｍｏｌ）を用いることで、２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿２＿フエニル酢酸（Ｓ）―シァノメチル（化合物SP７０７）（１．０２ｇ、８８％）を得た。

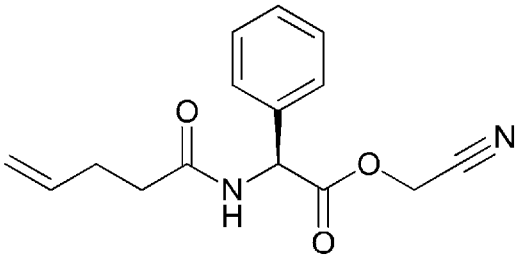
[1531] ２―アミノ－２＿フエニル酢醸＿（Ｓ）―シァノメチル塩酸塩＿（化さ物SP７０８）のさ成



[1532] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シァノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿２＿フエニル酢酸（Ｓ）＿シァノメチル（化合物ＳＰ７０７）（４．５０ｇ、１５．５ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿アミノ－２＿フエニル酢酸（Ｓ）―シ

ァノメチル塩酸塩 (化合物ＳＰ７０８）（２．８０ｇ、８０％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1533] ２－（ペンター４－エンアミド）－２－フエニル酢酸－（Ｓ）－シァノメチル（Ｐｅｎ－Ｐｈｑ－ＰＣＨ$_2$ＣＮ）（化合物ＳＰ７０９）の合成

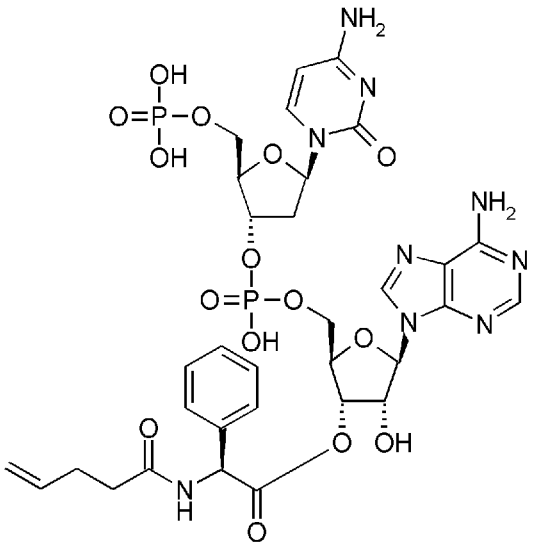


[1534] 化合物SP７０４の製造例と同様の条件で、２－（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、２－アミノ－２－フエニル酢酸－（Ｓ）－シァノメチル塩酸塩（化合物SP７０８）（２．８０ｇ、１２．４ｍｍｏｌ）を用いることで、２－（ペンター４－エンアミド）－２－フエニル酢酸－（Ｓ）－シァノメチル（化合物ＳＰ７０９）（１．９０ｇ、５６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ２７３ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．８８分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ７）

[1535] ２－（ペンター４－エンアミド）－２－フエニル酢酸－（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－２－オキソピリミジン－１－（２Ｈ）－イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル（Ｐｅｎ－Ｐｈｑ－ｐｄＣｐＡ）（化合物ＳＰ７１０）の合成

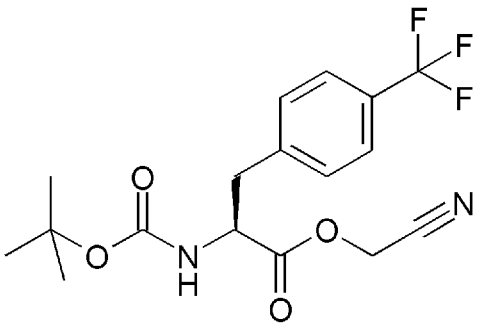


[1536] 化合物SP７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)－３－(((((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－５－(６―アミノ_９Ｈ―プリン－９―イル)－３，４_ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２_イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_２_イル)メチル (化合物１ｈ)(７００ｍｇ、１．１０ｍｍｏｌ)を用い、２－(Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４)の代わりに、２―(ペンター４_エンアミド)－２―フエニル酢酸(Ｓ)―シアノメチル (化合物ＳＰ７０９)を用いることで、表題化合物 (化合物ＳＰ７１０)(７９．７ｍｇ、８．５％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/ｚ = ８５２．５ (Ｍ＋Ｈ)＋

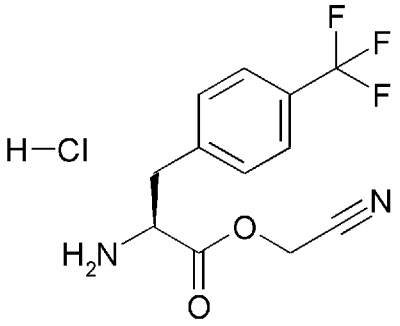
保持時間:０．４２分 (分析条件３０Ｄ「六０５)

[1537] ２－(ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル)アミノ)－３－(４－(トリフルオロメチル)フエニル)プロパン酸(Ｓ)―シアノメチル (化合物ＳＰ７１２)の合成



[1538] 化合物SP７０２の製造例と同様の条件で、２（_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）アミノ）_３_（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸（化合物ＳＰ７１１）（１．００ｇ、３．００ｍｍｏｌ）を用いることで、２_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）アミノ）_３_（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸（Ｓ）—シアノメチル（化合物ＳＰ７１２）（１．０１ｇ、９０％）を得た。

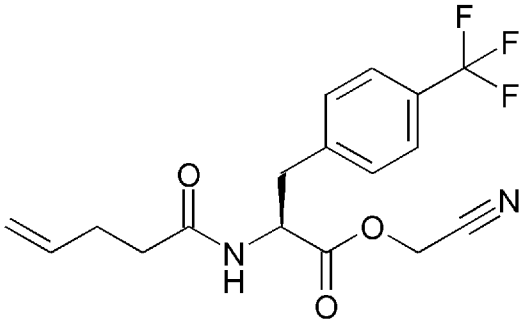
[1539] ２—アミノ—３_（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸（Ｓ）—シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７１３）の合成



[1540] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、２_（（ｔｅｒｔ—プトキシカルボニル）アミノ）_３_（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸（Ｓ）—シアノメチル（化合物SP７１２）（９．３０ｇ、２５．Ｏｍｍｏｌ）を用いることで、２_アミノ_３_（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸（Ｓ）—シアノメチル塩酸塩（化合物SP７１３）（７．ＯＯｇ、９１％）を粗生成

物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1541] 2-(ペンター4—エンアミド)－3—(4—(トリフルオロメチル)フエニル)プロパン酸(S)—シァノメチル (Pen_Phe(4-CF3)-OCH2CN) (化合物SP714)の合成

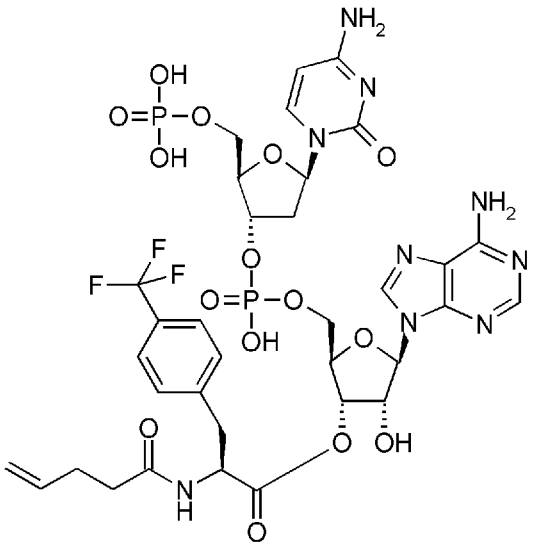


[1542] 化合物SP704の製造例と同様の条件で、2—(メチルァミノ)酢酸シァノメチル塩酸塩 (化合物SP703)の代わりに、、2—アミノ—3_(4-(トリフルオロメチル)フエニル)プロパン酸 (S)—シァノメチル塩酸塩 (化合物SP713) (7.00g、22.7mmol)を用いることで、表題化合物 (化合物SP714) (3.50g、44%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 355 (M+H)+

保持時間 :1.47分 (分析条件SMDmethod7)

[1543] 2-(ペンター4—エンアミド)－3—(4—(トリフルオロメチル)フエニル)プロパン酸(2S)-(2R.3S.4R.5R)-2-((((((2R.3S.5R)-5-(4—アミノー2_ォキソピリミジン_1(2H)—イル)_2_((ホスホノォキシ)メチル)テトラヒドロフラン－3_イル)ォキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)ォキシ)メチル)_5_(6—アミノー9H—プリン－9—イル)－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン—3—イル (Pen_Phe(4-CF3)-pdCpA) (化合物SP715)のさ成

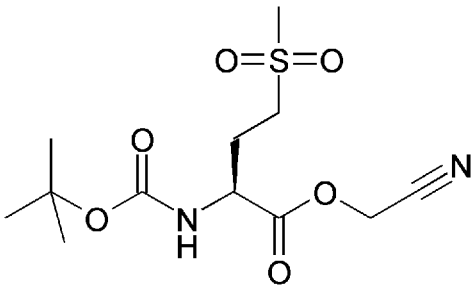


[1544] 化合物SP７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)－３－(((((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－５－(６―アミノ_９Ｈ―プリン－９―イル)－３，４_ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２_イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_２_イル)メチル (化合物１ｈ)(１．００ｇ、１．５７ｍｍｏｌ)を用い、２－(Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４)の代わりに、２―(ペンター４_エンアミド)－３―(４―(トリフルオロメチル)フェニル)プロパン酸 (Ｓ)―シアノメチル (化合物SP７１４)を用いることで、表題化合物 (化合物SP７１５)(２５８ｍｇ、１８％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/ｚ＝９３４．６ (Ｍ＋Ｈ)＋

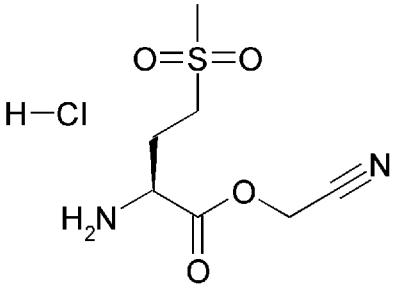
保持時間：０．７３分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

[1545] 2－((tert―ブトキシカルボニル)アミノ)―4―iメチルスルホニル)ブタン酸 (Ｓ)―シアノメチル (化さ物ＳＰ７１７)のさ成



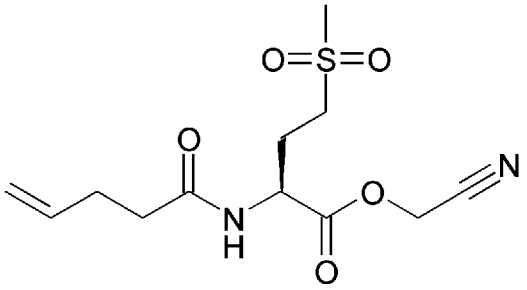
[1546] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）＿４＿（メチルスルホニル）ブタン酸（化合物ＳＰ７１６）（５．ＯＯｇ、１７．８ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）＿４－（メチルスルホニル）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７１７）（４．５０ｇ、７９％）を得た。

[1547] ２―アミノ－４＿＿（メチルスルホニル）ブタン酸＿＿（Ｓ）＿―シアノメチル塩酸塩＿（化合物ＳＰ７１８）の合成



[1548] 化合物SP７０３の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、２＿（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）＿４＿（メチルスルホニル）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７１７）（４．５０ｇ、１４．Ｏｍｍｏｌ）を用いることで、２―アミノ－４―（メチルスルホニル）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７１８）（３．５０ｇ、９８％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1549] ４―（メチルスルホニル）―２―（ペンタ－４―エンアミド）ブタン酸　（Ｓ）―シアノメチル（Ｐｅｎ―Ｍｅｔ（Ｏ２）―ＯＣＨ２ＣＮ（化合物ＳＰ７１９）の合成

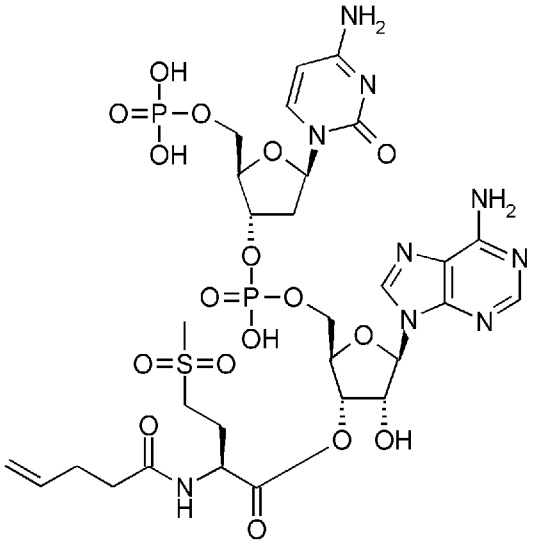


[1550] 化合物SP７０４の製造例と同様の条件で、２―（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、２―アミノ―４_（メチルスルホニル）ブタン酸　(S)―シアノメチル塩酸塩（化合物SP７１８）（３．５０ｇ、１３．７ｍｍｏｌ）を用いることで、４_（メチルスルホニル）-２-（ペンタ_４―エンアミド）ブタン酸　(S)―シアノメチル（化合物SP７１９）（２．００ｇ、４８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝３０３　(M+H)+

保持時間：１．２８分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ７）

[1551] ４-（メチルスルホニル）_２_(ペンター４―エンアミド)ブタン酸（２Ｓ）-（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_ォキソピリミジン_１_(２Ｈ)_―イル）_２_（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_ィル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）_５_(６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―ィル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル　(Ｐｅｎ-Ｍｅｔ（０，）-ｐｄＣｐＡ）（化合物ＳＰ７２０）の合成

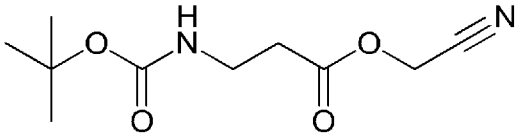


[1552] 化合物SP７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)-５-（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）(ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メチル (化合物１ｈ）（１．ＯＯｇ、１．５７ｍｍｏｌ）を用い、２-（Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４）の代わりに、４_（メチルスルホニル）_２_（ペンター４_エンアミド)ブタン酸 (Ｓ）―シアノメチル (化合物ＳＰ７１９）を用いることで、表題化合物 (化合物ＳＰ７２０）（１５３ｍｇ、１１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ８８２．３ (Ｍ+Ｈ)+

保持時間：０．４０分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

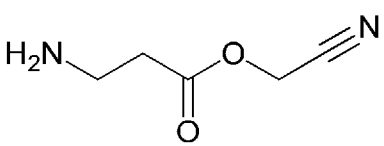
[1553] 3-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ)プロパン酸シアノメチル_(化合物ＳＰ７２２)_の合成



[1554] 化合物SP７０２の製造例と同様の条件で、２（_（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）(メチル）アミノ)酢酸 (化合物ＳＰ７０１）の代わりに３_（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸 (化合物SP７２１）（５．００ｇ、２６．４ｍｍｏｌ）を用いることで、３―（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸シアノメチル (化合物ＳＰ７２２）（４．７０ｇ、７８％）を得た。

[1555] 3―アミノプロパン酸シアノメチル塩酸塩_(化合物ＳＰ７２３)_の合成

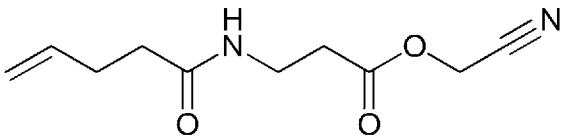
H―Cl



[1556] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（－（（ｔｅｒｔ－ブトキ

シカルボニル）(メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに3_（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸シアノメチル（化合物ＳＰ７２２）（４．７０ｇ、２０．６ｍｍｏｌ）を用いることで、３―アミノプロパン酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７２３）（３．ＯＯｇ、８８％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1557] 3-（ペンター4―エンアミド）プロパン酸シアノメチル（化合物SP７２４）の合成

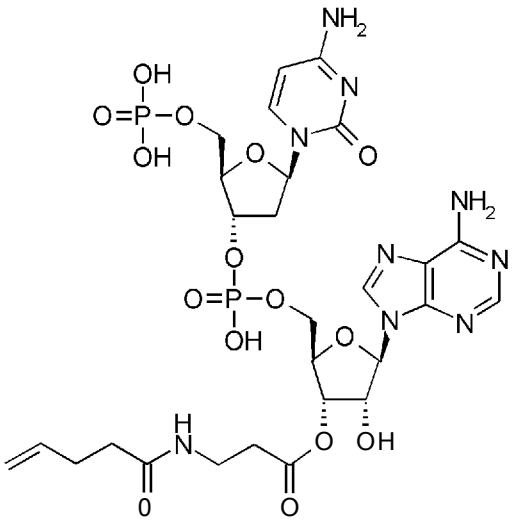


[1558] 化合物SP７０４の製造例と同様の条件で、２―（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、３―アミノプロパン酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７２３）（３．ＯＯｇ、１８．２ｍｍｏｌ）を用いることで、３―（ペンター4―エンアミド）プロパン酸シアノメチル（化合物SP７２４）（２．８０ｇ、７３％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝２１１（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．３７分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ８）

[1559] 3-（ペンター4―エンアミド）プロパン酸（2Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（（2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ_２―オキソピリミジン_１_（２Ｈ）_―イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５―（６―アミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Ｐｅｎ_βＡｌａ-ｐｄＣｐＡ）（化合物ＳＰ７２５）の合成

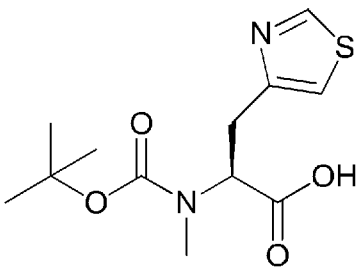


[1560] 化合物SP７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４―アミノ－２_オキソピリミジン_１(２Ｈ)―イル)－３－(((((２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ)－５－(６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル)－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン_２_イル)メチル (化合物１ｈ)(７００ｍｇ、１．１０ｍｍｏｌ)を用い、２－(Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４)の代わりに、３―(ペンター４―エンアミド)プロパン酸シアノメチル (化合物SP７２４)を用いることで、表題化合物 (化合物ＳＰ７２５)(１３４ｍｇ、１５％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/ｚ＝７９０．６ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間:０．４１分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

[1561] (Ｓ)－２－((tert_ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)_３－(チアゾール_４_イル)プロパン酸 (化合物ＳＰ７２７)の合成



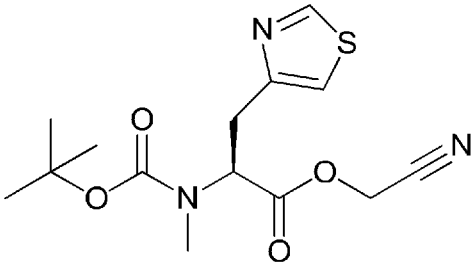
[1562] 窒素雰囲気下、水素化ナトリウム (４７０ｍｇ、１１．８ｍｍｏに６０

%）のテトラヒドロフラン（３０ｍｌ）懸濁液に、（Ｓ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）＿３＿（チアゾール＿４＿イル）プロパン酸（化合物SP７２６）（８００ｍｇ、２．９４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（２０ｍｌ）に溶液を滴下した。続いてヨードメタン（１．６７ｇ、１１．８ｍｍｏｌ）を加えて室温で１８時間攪拌した。反応液を６ｍｏｌ／ｌの塩酸水でｐＨを4に調整し、酢酸エチルで抽出した。得られた有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥後に減圧濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ（酢酸エチル）で精製し、（Ｓ）＿２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（チアゾール＿４＿イル）プロパン酸（化合物ＳＰ７２７）（５６０ｍｇ、６７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ　＝　２８７　（Ｍ＋Ｈ）＋

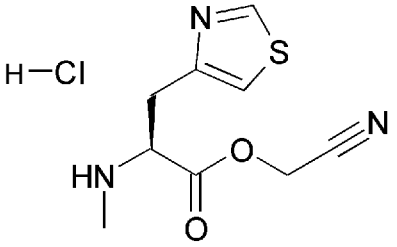
保持時間：１．２４分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ７）

[1563] 2-（（tert-ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）-3-（チアゾール-4-イル）プロパン酸（S）-シアノメチル（化合物SP728）の合成



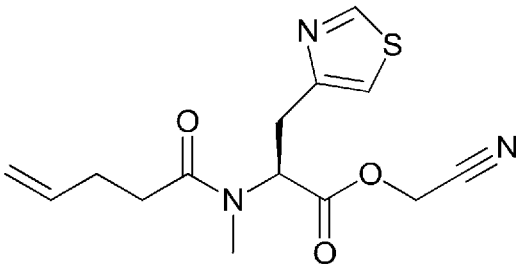
[1564] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（Ｓ）-２-（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（チアゾール＿４＿イル）プロパン酸（化合物ＳＰ７２７）（３．９４ｇ、１３．８ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（チアゾール＿４＿イル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７２８）（３．０４ｇ、６８％）を得た。

[1565] 2-（メチルアミノ）-3-（チアゾール-4-イル）プロパン酸（S）―シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７２９）の合成



[1566] 化合物SP７０３の製造例と同様の条件で、２（_（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、２_（（ｔｅｒｔ―プトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３-（チアゾール_４_イル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物SP728）（３．０４ｇ、９．３４ｍｍｏｌ）を用いることで、２―（メチルアミノ）_３_（チアゾール_４_イル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７２９）（１．８５ｇ、７６％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1567] ２-（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド）_３_（チアゾール－４―イル）プロパン酸（Ｓ）_シアノメチル（化合物ＳＰ７３０）の合成



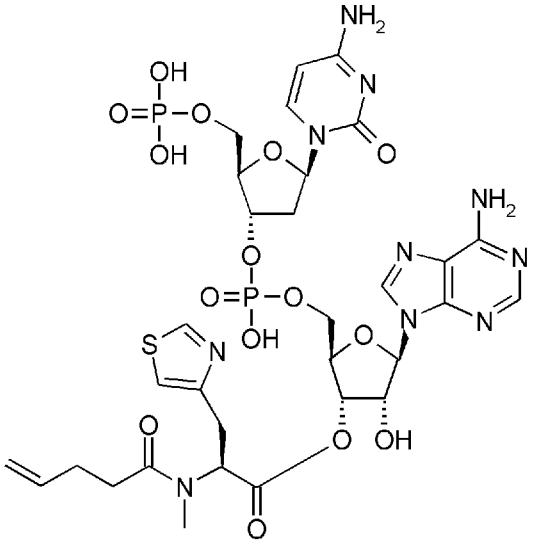
[1568] 化合物ＳＰ７０４の製造例と同様の条件で、２_（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、２_（メチルアミノ）-３-（チアゾール_４_イル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７２９）（１．８５ｇ、７．０７ｍｍｏｌ）を用いることで、表題化合物（化合物ＳＰ７３０）（１．４８ｇ、６８％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝３０８　（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．２８分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ７）

[1569] ２-（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド）_３_（チアゾール－４―イル）プロパン酸（２Ｓ）―（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－－２―（（（（（（

２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）―イル）_２__（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）_（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）_５__（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（Ｐｅｎ―ＭｅＡｌａ（４－Ｔｈｚ）―ｐｄＣｐＡ）（化合物ＳＰ７３１）の合成

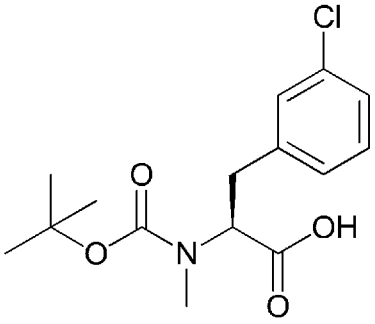


[1570] 化合物ＳＰ７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）－３－（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（６―アミノ_９Ｈ_プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（７００ｍｇ、１．１０ｍｍｏｌ）を用い、２－（Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０４）の代わりに、２_（Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド）_３_（チアゾール_４_イル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７３０）を用いることで、表題化合物（化合物ＳＰ７３１）（６０．９ｍｇ、６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ８８７．４ （Ｍ＋Ｈ）＋

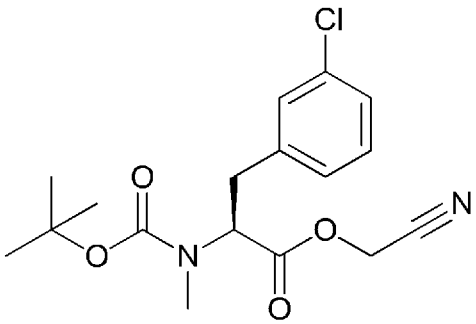
保持時間：０．４０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1571] （Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（３―クロロフェニル）プロパン酸（化合物ＳＰ７３３）の合成



[1572] 化合物ＳＰ７２７の製造例と同様の条件で、（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－３－（チアゾール－４－イル）プロパン酸（化合物ＳＰ７２６）の代わりに、（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）アミノ）－３－（３―クロロフェニル）プロパン酸（化合物ＳＰ７３２）（５．００ｇ、１６．７ｍｍｏｌ）を用いることで、（Ｓ）―２―（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（３―クロロフェニル）プロパン酸（化合物ＳＰ７３３）（５．１０ｇ、９７％）を得た。

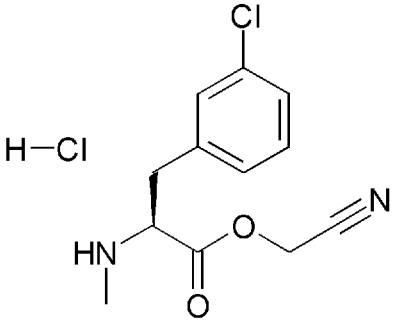
[1573] ２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（３－クロロフェニル）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７３４）の合成



[1574] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（Ｓ）－２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）－３－（３－クロロフェニル）プロパン酸（化合物ＳＰ７３３）（５．１０ｇ、１

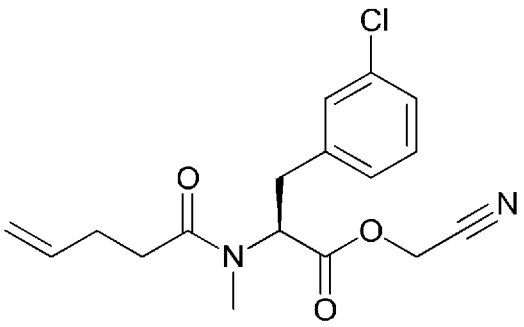
６．３ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（３―クロロフエニル）プロパン酸　(S)-シアノメチル（化合物ＳＰ７３４）（４．７５ｇ、８３％）を得た。

[1575] 3-(3―クロロフエニル)_2_(メチルアミノ)プロパン酸(S)-シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７３５）の合成



[1576] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）-３-（３―クロロフエニル）プロパン酸　(S)―シアノメチル（化合物ＳＰ７３４）（４．７５ｇ、１３．５ｍｍｏｌ）を用いることで、３＿（３―クロロフエニル）＿２＿（メチルアミノ）プロパン酸　(S)―シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７３５）（３．３１ｇ、８４％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1577] 3-(3―クロロフエニル)_2_(Ｎ―メチルペンター４―エンアミド)プロパン酸(S)_シアノメチル（化合物ＳＰ７３６、Ｐｅｎ＿ＭｅＰｈｅ（3-ＣＩ）-０ＣＨ2ＣＮ）の合成



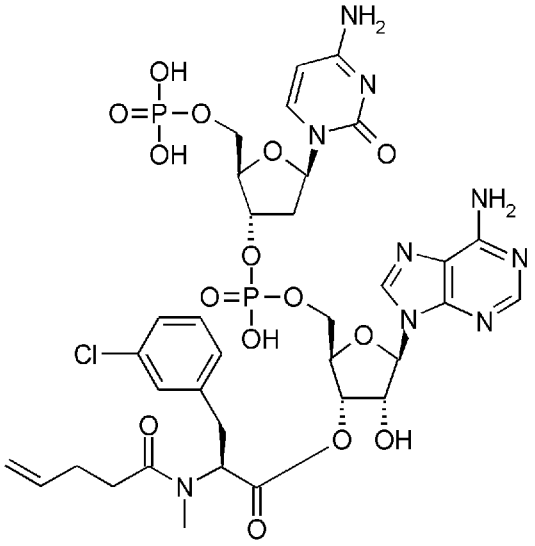
[1578] 化合物ＳＰ７０４の製造例と同様の条件で、２―（メチルアミノ）酢酸シ

ァノメチル塩酸塩 (化合物ＳＰ７０３）の代わりに、３＿（３―クロロフエニル）＿２＿（メチルァミノ）プロパン酸 (Ｓ）―シァノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７３５）（３．３１ｇ、１１．４ｍｍｏｌ）を用いることで、３-（３―クロロフエニル）＿２＿（Ｎ―メチルペンタ＿４―エンアミド）プロパン酸 (Ｓ）＿シァノメチル (化合物ＳＰ７３６）（２．７２ｇ、７１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝３３５ (Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．６７分 (分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ４）

[1579] ３-（３＿クロロフエニル）＿２＿（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド）プロパン酸 (２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２＿ォキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）＿２＿（（ホスホノォキシ）メチル）テトラヒドロフラン―３―イル）ォキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）ォキシ）メチル）＿５＿（６―アミノ―９Ｈ―プリン―９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン―３―イル (Ｐｅｎ＿ＭｅＰｈｅ（３-ＣＩ）-ｐｄＣｐＡ）(化合物ＳＰ７３７）の合成



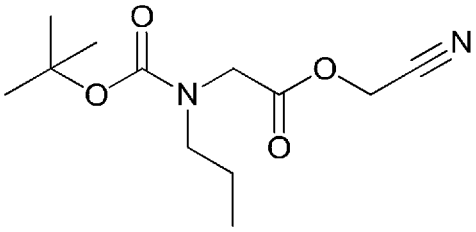
[1580] 化合物ＳＰ７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ―２＿オキソピリミジン＿１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６―アミノ＿９Ｈ＿

プリン－９―イル）－３，４－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（１．００ｇ、１．５７ｍｍｏｌ）を用い、２－（Ｎ―メチルペンタ－４―エンアミド）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０４）の代わりに、３－（３―クロロフェニル）－２－（Ｎ―メチルペンタ－４―エンアミド）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７３６）を用いることで、表題化合物（化合物ＳＰ７３７）（３８９ｍｇ、２７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝９１４．６（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７５分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

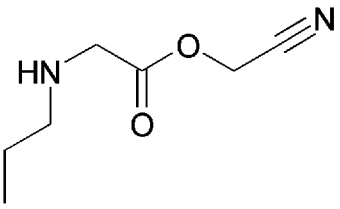
[1581] ２－（（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（プロピル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７３９）の合成



[1582] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２－（（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（プロピル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７３８）（５．００ｇ、２３．０ｍｍｏｌ）を用いることで、２－（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（プロピル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７３９）（４．２０ｇ、７１％）を得た。

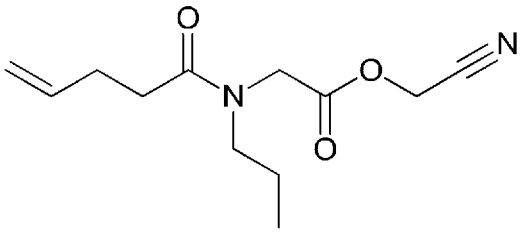
[1583] ２－（プロピルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７４０）の合成

H-Cl



[1584] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、２＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（プロピル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７３９）（４．２０ｇ、１６．４ｍｍｏｌ）を用いることで、２＿（プロピルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７４０）（２．５０ｇ、７９％）を粗生成物として得て、そのまま次の反応に用いた。

[1585] ２－＿（Ｎ―プロピルペンター4 ―エンアミド）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７４１、Ｐｅｎ－ｎＰｒＧｌｙ－ＯＣＨ$_2$ＣＮ）の合成

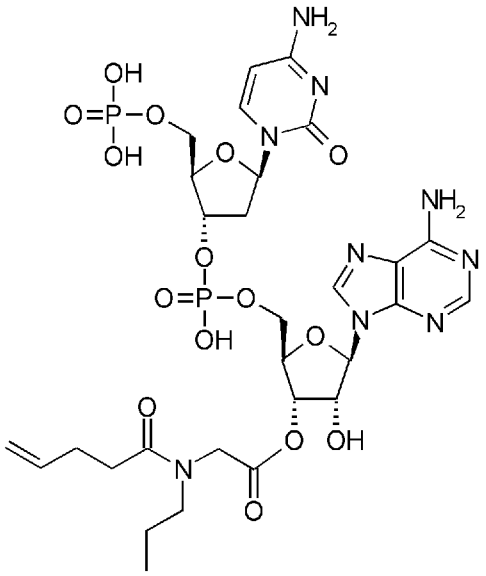


[1586] 化合物ＳＰ７０４の製造例と同様の条件で、２＿（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、２＿（プロピルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７４０）（２．５５ｇ、１３．２ｍｍｏｌ）を用いることで、２―（Ｎ―プロピルペンター4 ―エンアミド）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７４１）（２．１０ｇ、６７％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（Ｂｒｕｋｅｒ ＡＶＡＮＣＥ Ｍ、３００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）δ ｐｐｍ ６．１９－６．３２（１Ｈ、ｍ）、５．３８－５．４９（２Ｈ、ｍ）、５．１７＿５．２２（２Ｈ、ｍ）、４．４９－４．５５（２Ｈ、ｍ）、３．７０－３．７８（２Ｈ、ｍ）、２．７８－２．９０（４Ｈ、ｍ）、１．８４－２．０７（２Ｈ、ｍ）、１．３４（３Ｈ、ｔ、Ｊ＝８．１Ｈｚ）

[1587] ２＿＿（Ｎ―プロピルペンター4 ―エンアミド）酢酸＿＿（２Ｒ，３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）－５－（４―アミノ＿２―オキソピリミジン－１＿（２Ｈ）＿―イル）＿２＿＿（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン＿３＿ィル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキ

シ）メチル）－５－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－４－ヒドロキシテトラヒドロフラン－３－イル　(Ｐｅｎ－ｎＰｒＧｌｖ－ｐｄＣｐＡ)　(化合物ＳＰ７４２)の合成

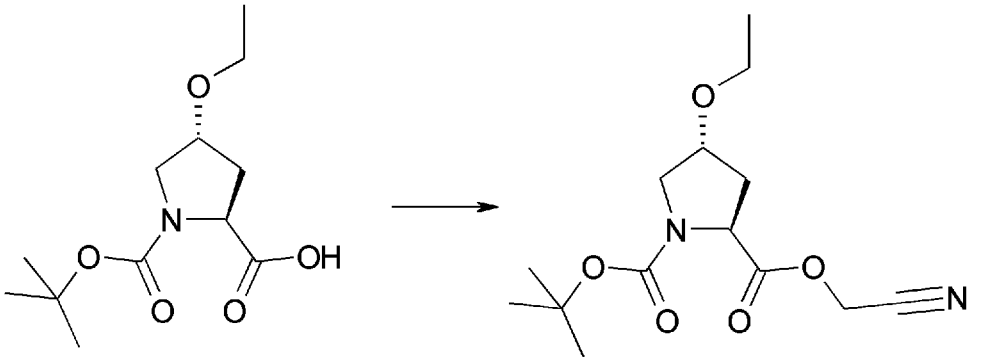


[1588] 化合物ＳＰ７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素　((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)－5－(4－アミノ－2－オキソピリミジン－1(2Ｈ)－イル)－3－(((((2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)－5－(6－アミノ－9Ｈ－プリン－9－イル)－3，4－ジヒドロキシテトラヒドロフラン－2－イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン－2－イル)メチル　(化合物１ｈ)　(1.00ｇ、1.57ｍｍｏｌ)を用い、2－(Ｎ－メチルペンタ－4－エンアミド)酢酸シアノメチル　(化合物ＳＰ７０４)の代わりに、2－(Ｎ－プロピルペンタ－4－エンアミド)酢酸シアノメチル　(化合物ＳＰ７４１)を用いることで、表題化合物　(化合物ＳＰ７４２)　(３１４ｍｇ、２４％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ)　m/ｚ＝８１８.４　(Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：0.57分　(分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

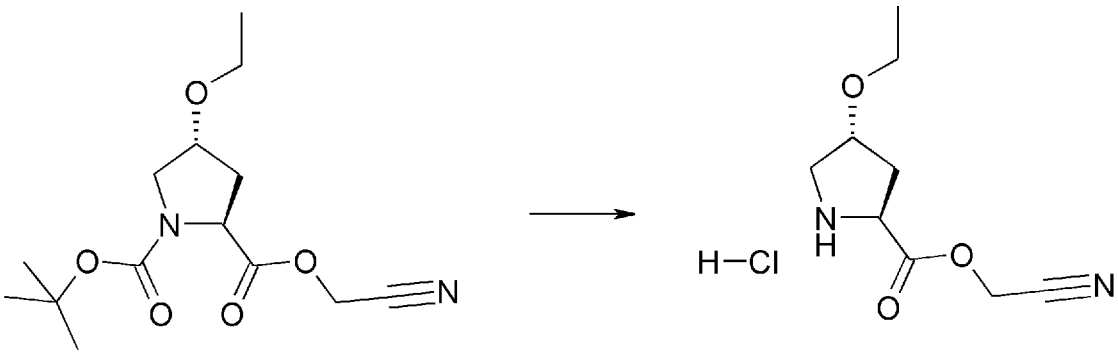
[1589] 4－エトキシピロリジン－1，2－ジカルボン酸－2－(シアノメチル)－(2Ｓ，4Ｒ)－1－ｔｅｒｔ－ブチル　(化合物ＳＰ７５１)の合成



SP750 SP751

[1590] 化合物ＳＰ７０２の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸（化合物ＳＰ７０１）の代わりに（２Ｓ，４Ｒ）－１－（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）＿４―エトキシピロリジン＿２＿カルボン酸（化合物ＳＰ７５０）（４．７５ｇ、１８．３ｍｍｏｌ）を用いることで、４―エトキシピロリジン－１，２―ジカルボン酸２－（シアノメチル）（２Ｓ，４Ｒ）－１－ｔｅｒｔ―ブチル（化合物ＳＰ７５１）（５．００ｇ、９１％）を得た。

[1591] ４―エトキシピロリジン＿２＿カルボン酸＿（２Ｓ，４Ｒ）＿シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７５２）の合成

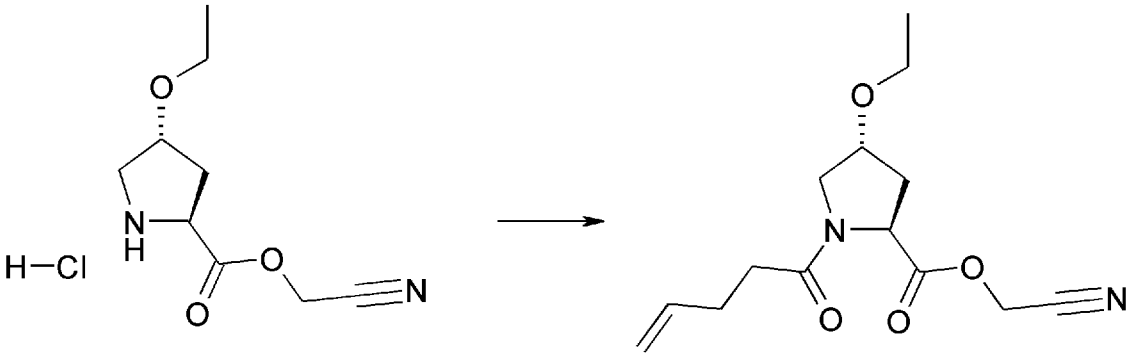


SP751 SP752

[1592] 化合物ＳＰ７０３の製造例と同様の条件で、２（＿（（ｔｅｒｔ―ブトキシカルボニル）（メチル）アミノ）酢酸シアノメチル（化合物ＳＰ７０２）の代わりに、４―エトキシピロリジン－１，２―ジカルボン酸２＿（シアノメチル）（２Ｓ，４Ｒ）－１－ｔｅｒｔ－ブチル（化合物ＳＰ７５１）（５．００ｇ、１６．８ｍｍｏｌ）を用いることで、４―エトキシピロリジン＿２＿カルボン酸（２Ｓ，４Ｒ）＿シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７

５２）（３．２５ｇ、８３％）を得た。

[1593] ４―エトキシ－１－（ペンタ－４－エノイル）ピロリジン－２－カルボン酸（２Ｓ，４Ｒ）―シアノメチル（Ｐｅｎ―ＨＶＰ（Ｅｔ）－ＯＣＨ$_2$ＣＮ）（化合物ＳＰ７５３）の合成



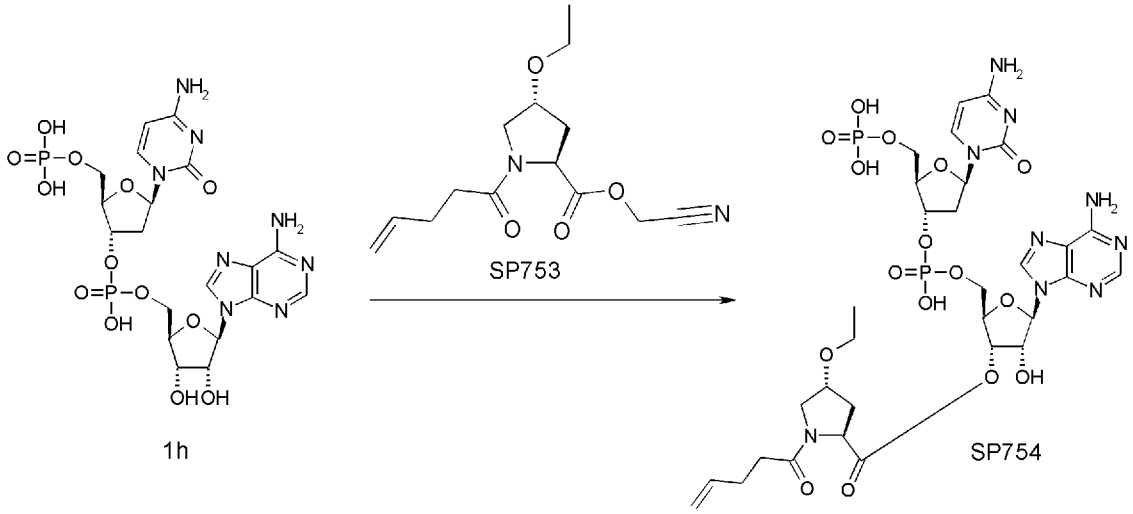
SP752 SP753

[1594] 化合物ＳＰ７０４の製造例と同様の条件で、２―（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０３）の代わりに、４―エトキシピロリジン－２－カルボン酸（２Ｓ，４Ｒ）－シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７５２）（３．００ｇ、１２．８ｍｍｏｌ）を用いることで、４―エトキシ－１－（ペンター４―エノイル）ピロリジン－２―カルボン酸（２Ｓ，４Ｒ）－シアノメチル（化合物ＳＰ７５３）（２．７５ｇ、７７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝２８１（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．４５分（分析条件ＳＭＤｍｅｔｈｏｄ４）

[1595] ４―エトキシ－１－（ペンタ－４－エノイル）ピロリジン－２－カルボン酸－（２Ｓ．４Ｒ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ．３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―アミノ－２－オキソピリミジン－１（２Ｈ）―イル）－２－（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３－イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－（６―アミノ―９Ｈ―プリン－９―イル）―４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（ＵＰｅｎ―Ｈｙｄ―（Ｅｔ）―ｄＣｄＡ）（化合物ＳＰ７５４）の合成

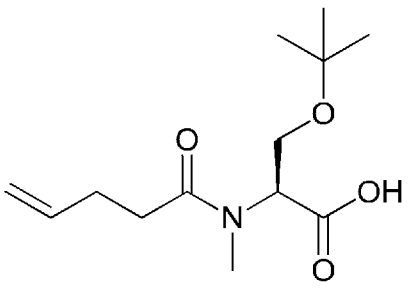


[1596] 化合物ＳＰ７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素 ((2Ｒ，3Ｓ，5Ｒ)-5-(4—アミノ—2_オキソピリミジン_1(2Ｈ)—イル)-3-(((((2Ｒ，3Ｓ，4Ｒ，5Ｒ)-5-(6—アミノ_9Ｈ_プリン—9—イル)－3，4－ジヒドロキシテトラヒドロフラン—2－イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)テトラヒドロフラン—2—イル)メチル (化合物１ｈ)（１．００ｇ、１．５７ｍｍｏｌ）を用い、2-(Ｎ—メチルペンタ_4—エンアミド)酢酸シアノメチル (化合物ＳＰ７０４）の代わりに、4—エトキシ—1_(ペンター4_エノイル)ピロリジン—2_カルボン酸 (2Ｓ，4Ｒ)_シアノメチル (化合物ＳＰ７５３）を用いることで、表題化合物 (化合物ＳＰ７５４）（１５４ｍｇ、１１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z = ８６０．４ (M+H)+

保持時間：０．５５分 (分析条件ＳＱＤＡＡ０５)

[1597] (Ｓ)-3-(tert—ブトキシ)—2—(Ｎ—メチルペンター4—エンアミド)プロパン酸 (化合物ＳＰ７４６）の合成

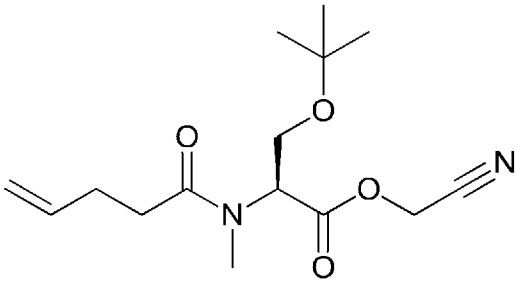


[1598] （Ｓ）－２－（３－（９Ｈ―フルオレン＿９＿ィル）＿Ｎ＿メチルプロパンアミド）＿３＿（ｔｅｒｔ―ブトキシ）プロパン酸（化合物ＳＰ７４５）（４，３５ｇ、１１．Ｏｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルァミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$）（１０．４ｍＬ、６０．Ｏｍｍｏｌ）を脱水ジクロロメタン（４６ｍｌ）に溶解し、２－クロロトリチルクロライドレジン（１００―２００ｍｅｓｈ、１％ＤＶＢ、渡辺化学から購入、４．６５ｇ、７．３０ｍｍｏｌ）を加え、室温で６０分振とうすることで、アミノ酸をレジンに担持させた。反応溶液を除去し、レジンを脱水ジクロロメタン（４６ｍｌ）で４回洗浄した。レジンに２０％ピペリジンＮ，Ｎ＿ジメチルホルムアミド溶液（１５ｍｌ）を加え９０分振とうし、Ｆｍｏｃ基の脱保護を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（１５ｍｌ）で３回洗浄した。続いてペンター４―エン酸（２．３ｍｌ２１．９ｍｍｏｌ）、３Ｈ―（１，２，３）トリアゾロ（４，５－ｂ）ピリジン－３―オール（ＨＯＡｔ）（１．９９ｇ、１４．６ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ'―メタンジィリデンビス（プロパン－２―ァミン）（ＤＩＣ、３．７１ｍｌ２４．１ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（１５ｍｌ）に溶解し、レジンに加えて室温で６０分振とうし、ペンテノィル化を行った。反応溶液を除去し、レジンをＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミド（１５ｍｌ）で３回洗浄後、ジクロロメタン（１５ｍｌ）でさらに３回洗浄した。続いて１％トリフルオロ酢酸ジクロロメタン溶液（１％ＴＦＡｉｎCH_2Cl_2）（４０ｍｌ）を前述のレジンに加え３０分振とうし、アミノ酸のレジンからの切り出しを行った。反応溶液を回収し、レジンをジクロロメタン（４０ｍｌ）で３回洗浄した。回収した反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール溶液）で精製し、（Ｓ）―３―（ｔｅｒｔ―ブトキシ）－２―（Ｎ＿メチルペンター４＿エンアミド）プロパン酸（化合物ＳＰ７４６）（１．０２ｇ、５４％）を得た。なお、この合成に使用されたジクロロメタンとＮ，Ｎ―ジメチルホルムアミドはペプチド合成用特製溶媒（渡辺化学から購入）を使用した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ２５８ （Ｍ+Ｈ）+

保持時間：0．７１分（分析条件ＳＱＤＡＡＯ５）

[1599] ３－（ｔｅｒｔ—ブトキシ）－２—（Ｎ—メチルペンター４—エンアミド）プロパン酸 （Ｓ）—シアノメチル（化合物ＳＰ７４７）の合成



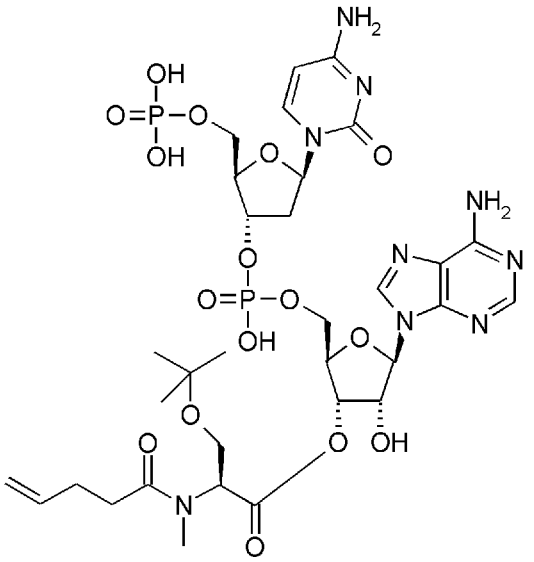
[1600] 窒素雰囲気下、（Ｓ）_３_（ｔｅｒｔ—ブトキシ）_２_（Ｎ—メチルペンター４—エンアミド）プロパン酸（化合物ＳＰ７４６）（１．０１ｇ、３．９２ｍｍｏｌ）およびＮ_エチル—イソプロピルプロパン—２—アミン（ＥｔＮ（ｉＰｒ）$_2$、１．３７ｍＬ、７．８５ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ—ジメチルホルムアミド（３．９２ｍｌ）に溶解し、２—ブロモアセトニトリル（０．８２ｍＬ、１１．８ｍｍｏｌ）を加えて室温で４５分攪拌した。反応液に５０ｍｌの酢酸エチルを加え、有機層を５０ｍｌのアンモニウムクロリド飽和水溶液と５０ｍｌの飽和食塩水で分液した。有機層を回収し、減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液/メタノール溶液）で精製し、３_（ｔｅｒｔ—ブトキシ）_２-（Ｎ—メチルペンター４—エンアミド）プロパン酸（Ｓ）—シアノメチル（化合物ＳＰ７４７）（１．ＯＯｇ、８６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = ２９７．６ （Ｍ+Ｈ）+

保持時間：0．７７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1601] ３－（ｔｅｒｔ—ブトキシ）_２_（Ｎ—メチルペンター４—エンアミド）プロパン酸（２Ｓ）－（２Ｒ．３Ｓ．４Ｒ．５Ｒ）－２－（（（（（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－５－（４—アミノ－２_オキソピリミジン_１_（２Ｈ）_—イル）_２_（（ホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン－３—イル）オキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）－５－ｕ６ァ.

ミノ－９Ｈ―プリン－９―イル）－４―ヒドロキシテトラヒドロフラン－３―イル（化合物ＳＰ７４８、Ｐｅｎ-ＭｅＳｅｒ（ｔＢｕ）-ｐｄＣｐＡ）の合成



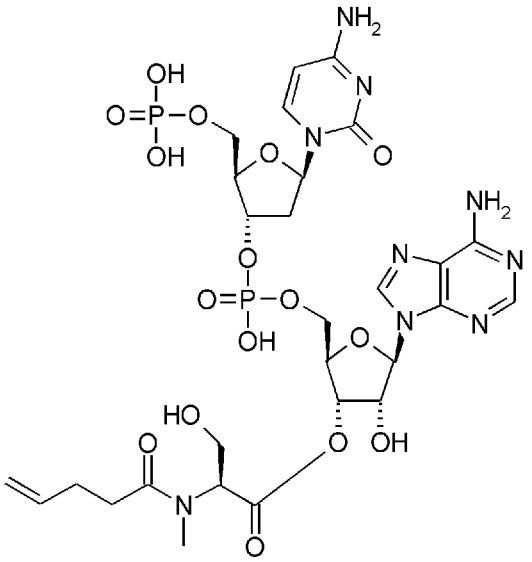
[1602] 化合物ＳＰ７０５の製造例と同様の条件で、リン酸二水素（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）-３-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-５-（６―アミノ_９Ｈ_プリン－９―イル）－３，４―ジヒドロキシテトラヒドロフラン－２―イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン－２―イル）メチル（化合物１ｈ）（５１９ｍｇ、０．８１６ｍｍｏｌ）を用い、２-（メチルアミノ）酢酸シアノメチル塩酸塩（化合物ＳＰ７０４）の代わりに、３_（ｔｅｒｔ―ブトキシ）_２_（Ｎ―メチルペンタ_４―エンアミド）プロパン酸（Ｓ）―シアノメチル（化合物ＳＰ７４７）を用いることで、表題化合物（化合物ＳＰ７４８）（３００ｍｇ、４２％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ/ｚ ＝ ８７６．７ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．４７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1603] ３―ヒドロキシ－２―（Ｎ―メチルペンター４―エンアミド）プロパン酸（２Ｓ）-（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）-２-（（（（（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）-５-（４―アミノ－２_オキソピリミジン_１（２Ｈ）―イル）_２-（（トホスホノオキシ）メチル）テトラヒドロフラン_３_イル）オキシ）―

_(ヒドロキシ)_ホスホリル)オキシ)メチル)_ 5 _ _(6—アミノ_ 9 H _プリン－9—イル)_－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル (Pen-MeSer-pdCpA) (化合物SP749)_の合成



[1604] (2S)-(2R,3S,4R,5R)-2-(((((((2R,3S,5R)-5-(4—アミノ－2_オキソピリミジン_1(2H)—イル)－2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン_3_イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)_5_(6—アミノ－9H—プリン－9—イル)－4—ヒドロキシテトラヒドロフラン－3—イル (化合物SP748) (299mg、0.341mmol)をトリフルオロ酢酸(3.38mし43.9mmol)で溶解し、30分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%蟻酸水溶液/アセトニトリル溶液)にて精製し、表題化合物 (化合物SP749) (144mg、52%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 820.5 (M+H)+

保持時間:0.31分 (分析条件SQDFA05)

[1605] 2._ディスプレイライブラリ構築のための転写tRNAおよび転写tRNA(CA欠損)き 成

バニングに使用する転写t[illegible]一六ぉよび転写tRNA(CA欠損)を以下の通り調製した。

[1606] 鋳型ＤＮＡ（配列番号ＤＴＬ＿１～１４）から、RiboMAX Large Scale RNA product ion System T7 (Promega社，Ｐ１３００）を用いたin vitroの転写により3'端のCAを欠くtRNA (-CA)（配列番号ＭＴＬ＿１～１２）および転写ｔＲＮＡ（配列番号ＭＴＬ＿１３～１４）を合成し、RNeasy Maxi kit（Qiagen社）により精製した。ただし、Ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写はＰｒｏｍｅｇａ社の標準プロトコールから、ＧＴＰ濃度を３．７５ｍＭに減らし、新たにＧＭＰを７．５ｍＭ加えた条件下で行った。ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＵＴＰは標準プロトコール通り、７．５ｍＭずつ加えた。

[1607] 配列番号ＤＴＬ—１（配列番号：９９）

tRNAGLuCUG (-CA) CAG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTctgACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1608] 配列番号ＤＴＬ—２（配列番号：１００）

tRNAGLuACG (-CA) CGU DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTacgACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1609] 配列番号ＤＴＬ-３（配列番号：１０１）

tRNAGLuUUC (-CA) GAA DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTttcACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[16 10] 配列番号ＤＴＬ—４（配列番号：１０２）

tRNAGLuCCU (-CA) AGG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcctACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[16 11] 配列番号ＤＴＬ—５（配列番号：１０３）

tRNAGLuCAA (-CA) UUG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcaaACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1612] 配列番号DTL—6（配列番号：1045）

tRNAG LuUAG (-CA) CUA DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTtagACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1613] 配列番号DTL—7（配列番号：1055）

tRNAG LuCUA (-CA) UAG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTctaACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1614] 配列番号DTL—8（配列番号：1066）

tRNAG LuCCG (-CA) CGG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTccgACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1615] 配列番号DTL—9（配列番号：1077）

tRNAG LuAAG (-CA) CUU DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaagACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1616] 配列番号DTL—10（配列番号：1088）

tRNAG LuGCA (-CA) UGC DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTgcaACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1617] 配列番号DTL—11（配列番号：1099）

tRNAG LuCAU (-CA) AUG DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcatACGGCGGTAAC

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[1618] 配列番号DTL—12（配列番号：1110）

tRNAAsn-E2GUU (-CA) AAC DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTgttAATCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[1619] 配列番号DTL—13（配列番号：111）

tRNAALal B DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTAGCACGCAGGAGGTC

TGCGGTTCGATCCCGCATAGCTCCACCA

[1620] 配列番号DTL—14（配列番号：112）

tRNATyrI DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGTGGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACTGTAAATCTGCCGTC

ATCGACTTCGAAGGTTCGAATCCTTCCCCCACCACCA

[1621] 配列番号MTL—1（配列番号：113）

tRNAG LuCUG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcugACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1622] 配列番号MTL—2（配列番号：114）

tRNAG LuACG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUacgACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1623] 配列番号MTL—3（配列番号：115）

tRNAG LuUUC (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuucACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1624] 配列番号MTL-4

tRNAG LuCCU (-CA) RNA配列：（配列番号：116）

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUccuACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1625] 配列番号MTL—5（配列番号：117）

tRNAG LuCAA (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcaaACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1626] 配列番号MTL-6（配列番号：118）

tRNAG LuUAG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1627] 配列番号MTL-7（配列番号：119）

tRNAG LuCUA (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcuaACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1628] 配列番号MTL-8（配列番号：120）

tRNAG LuCCG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUccgACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1629] 配列番号MTL-9（配列番号：121）

tRNAG LuAAG (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1630] 配列番号MTL—10（配列番号：122）

tRNAG LuGCA (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUgcaACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1631] 配列番号MTL—11（配列番号：123）

tRNAG LuCAU (-CA) RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcauACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG

GACGC

[1632] 配列番号MTL—12（配列番号：124）

tRNAAsn-E2GUU (-CA) RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguuAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA

GCCGC

[1633] 配列番号MTL—13 (配列番号 :125)

tRNAALal B RNA配列 :

GGGGCUAUAGCUCAGCUGGGAGAGCGCCUGCUUAGCACGCAGGAGGUCUGCGGUUCGAUCCCGCAUAGC

UCCACCA

[1634] 配列番号MTL—14 (配列番号 :126)

tRNATyrl RNA配列 :

GGUGGGGUUCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACUGUAAAUCUGCCGUCAUCGACUUCGAAGGUUCGAAU

CCUUCCCCCACCACCA

[1635] 3. tRNA(CA欠損)とpdCpA—アミノ酸との反応による、tRNA-アミノ酸調 本の合成

[1636] アミノアシル化DdCDAと転写tRNA(CA欠損)のligationによるパニング用アミノアシル化tRNA(化合物ATL_1~13)の合成、およびアミノアシル化tRNA混合物の調製

まず、個別にアミノアシル化tRNA (化合物ATL-1~13)を調製した。ライゲーションは、ligation buffer (50mM HEPES-KOH pH7.5, 20mM MgCL2, 1mM ATP)、25μM転写tRNA (-CA) (配列番号MTL—1~12、R—5)、0.6U/μl T4 RNAリガーゼ (New eng Land bio Lab.社)、0.5mM アミノアシル化pdCpAの条件で行った。25μM転写tRNA (-CA) と0.5mM アミノアシル化pdCpAの組み合わせは、以下の表20~22の通りに行った。

ライゲーションを行う前に、ligation buffer, 転写tRNA (-CA) (配列番号MTL_1~12、R-5)およびNuc lease free waterを混合したものを、95℃で2分間加熱した後、室温で5分間放置し、予めtRNAのリフォールディングを行った。その後、T4 RNAリガーゼ、アミノアシル化pdCpAのDMS0溶液を上述の通り加え、15℃で45分間ライゲーション反応を行った。

ライゲーション反応液に、0.3M 酢酸ナトリウムと、62.5mMヨウ素 (水 :THF=1 :1溶液)を加え、室温で1時間 (ただし、化合物SP

７４９を用いる際は室温で５分間）、ペンテノィル基の脱保護を行い、化合物ＡＴＬ-１~ １２を得た。ペンテノィル基を持たない化合物６ｉ_ Ｃを用いる際は、脱保護は行わず、ライゲーションヨン反応まで行い、化合物ＡＴＬ-１３を得た。

次に、翻訳液Ｓ用アミノアシル化tRNA 混合物 (In itiation suppress ion翻訳に使用）、翻訳液Ｓ用Initiator アミノアシル化tRNA (In itiation suppression翻訳に使用）、および翻訳液Ｔ用アミノアシル化tRNA混合物 （Read through翻訳に使用）を調製した。得られた化合物 ＡＴＬ-１~ １３を、表２０~２２に示す混合比で混合し、翻訳液Ｓ用アミノアシル化tRNA混合物、翻訳液Ｓ用Initiator アミノァシル化tRNA、翻訳液Ｔ用アミノァシル化tRNA混合物として、フエノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した。調製したアミノァシル化ｔＲＮＡは、翻訳液に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウムに溶解した。以降、翻訳で使用する際には、表２０~２２に示す最終濃度となるよう翻訳液を調製した。

[1637]

[表20]

アミノアシル化ｔＲＮＡ合成対応表（翻訳液Ｓ用アミノアシルtRNA混合物）

転写ｔＲＮＡ（－ＣＡ）配列番号	アミノアシル化ｐｄＣｐＡ	アミノアシル化ｔＲＮＡ	混合比	翻訳液における最終濃度（μＭ）
ＭＴＬ－１	化合物ＳＰ７２５	化合物ＡＴＬ－１	２	２０
ＭＴＬ－２	化合物１ｉ－ＩＡ	化合物ＡＴＬ－２	２	２０
ＭＴＬ－３	化合物ＳＰ７３１	化合物ＡＴＬ－３	１	１０
ＭＴＬ－４	化合物ＳＰ７３７	化合物ＡＴＬ－４	１	１０
ＭＴＬ－５	化合物ＳＰ７０５	化合物ＡＴＬ－５	１	１０
ＭＴＬ－６	化合物ＳＰ７１５	化合物ＡＴＬ－６	１	１０
ＭＴＬ－７	化合物ＳＰ７５４	化合物ＡＴＬ－７	１	１０
ＭＴＬ－８	化合物ＳＰ７４９	化合物ＡＴＬ－８	１	１０
ＭＴＬ－９	化合物ＳＰ７１０	化合物ＡＴＬ－９	２	２０
ＭＴＬ－１０	化合物ＳＰ７２０	化合物ＡＴＬ－１０	１	１０
ＭＴＬ－１２	化合物ＳＰ７４２	化合物ＡＴＬ－１２	１	１０

[1638] [表21]

アミノアシル化ｔＲＮＡ合成対応表（翻訳液Ｓ用 initiator アミノアシル化tRNA）

転写ｔＲＮＡ（－ＣＡ）配列番号	アミノアシル化ｐｄＣｐＡ	アミノアシル化ｔＲＮＡ	翻訳液における最終濃度（μＭ）
Ｒ－５	化合物６ｉ－Ｃ	化合物ＡＴＬ－１３	２５

[1639]

[表 22]

アミノアシル化ｔＲＮＡ合成対応表(翻訳液Ｔ用アミノアシル化 tRNA 混合物)

転写ｔＲＮＡ（－ＣＡ）配列番号	アミノアシル化ｐｄＣｐＡ	アミノアシル化ｔＲＮＡ	混合比	翻訳液における最終濃度（μＭ）
ＭＴＬ－１	化合物ＳＰ７２５	化合物ＡＴＬ－１	２	２０
ＭＴＬ－２	化合物１ｉ－ＩＡ	化合物ＡＴＬ－２	２	２０
ＭＴＬ－３	化合物ＳＰ７３１	化合物ＡＴＬ－３	１	１０
ＭＴＬ－４	化合物ＳＰ７３７	化合物ＡＴＬ－４	１	１０
ＭＴＬ－５	化合物ＳＰ７０５	化合物ＡＴＬ－５	１	１０
ＭＴＬ－６	化合物ＳＰ７１５	化合物ＡＴＬ－６	１	１０
ＭＴＬ－７	化合物ＳＰ７５４	化合物ＡＴＬ－７	１	１０
ＭＴＬ－８	化合物ＳＰ７４９	化合物ＡＴＬ－８	１	１０
ＭＴＬ－９	化合物ＳＰ７１０	化合物ＡＴＬ－９	２	２０
ＭＴＬ－１１	化合物ＳＰ７２０	化合物ＡＴＬ－１１	１	１０
ＭＴＬ－１２	化合物ＳＰ７４２	化合物ＡＴＬ－１２	１	１０

[1640] 化合物ＡＴＬ_１（配列番号：１２７）

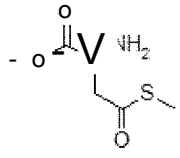
fS ALa- tRNAG LuCUG (-CA)

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcugACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA

[1641] 化合物ＡＴＬ_２（配列番号：１２８）

Asp(SMe) - tRNAG LuACG (-CA)

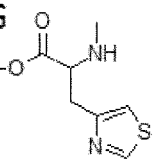
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUacgACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA



[1642] 化合物ＡＴＬ—３ （配列番号 ：１２９）

MeA La (4-Thz) - t RNAG LuUUC (-CA)

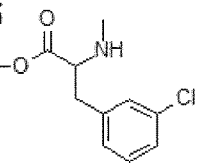
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuucACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA —O



[1643] 化合物ＡＴＬ—４ （配列番号 ：１３０）

MePhe (3-C L) - t RNAG LuCCU (-CA)

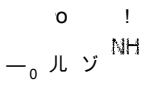
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUccuACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC -dCA —O



[1644] 化合物ＡＴＬ- ５ （配列番号 ：１３１）

MeG Ly - t RNAG LuCAA (-CA)

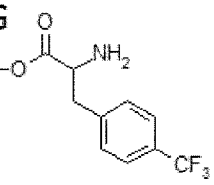
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcaaACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA



[1645] 化合物ＡＴＬ＿６ （配列番号 ：１３２）

Phe (4-CF3) - t RNAG LuUAG (-CA)

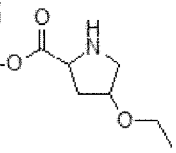
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuagACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA —O



[1646] 化合物ＡＴＬ＿７ （配列番号 ：１３３）

Hyp (Et) - t RNAG LuCUA (-CA)

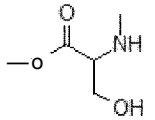
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcuaACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA —O



[1647] 化合物ＡＴＬ＿８ （配列番号 ：１３４）

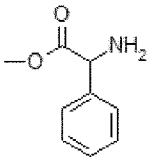
MeSe r - t RNAG LuCCG (-CA)

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUccgACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA



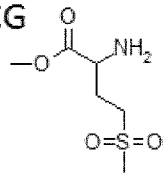
[1648] 化合物ＡＴＬ＿９（配列番号：１３５）

Phg- tRNAG LuAAG (-CA)

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA 

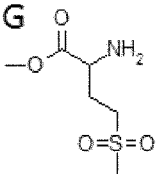
[1649] 化合物ＡＴＬ—１０（配列番号：１３６）

Met (02) - tRNAG LuGCA (-CA)

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUgcaACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA 

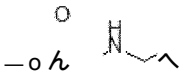
[1650] 化合物ＡＴＬ＿１１（配列番号：１３７）

Met (02) - tRNAG LuCAU (-CA)

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcauACG
GCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-dCA 

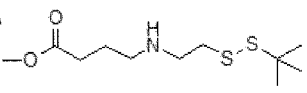
[1651] 化合物ＡＴＬ＿１２（配列番号：１３８）

n PrG Ly- tRNAAsn-E2GUU (-CA)

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUguuAAU
CCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-dCA 

[1652] 化合物ＡＴＬ—１３（配列番号：１３９）

tBuSSEtGABA- tRNAf MetCAU (-CA)

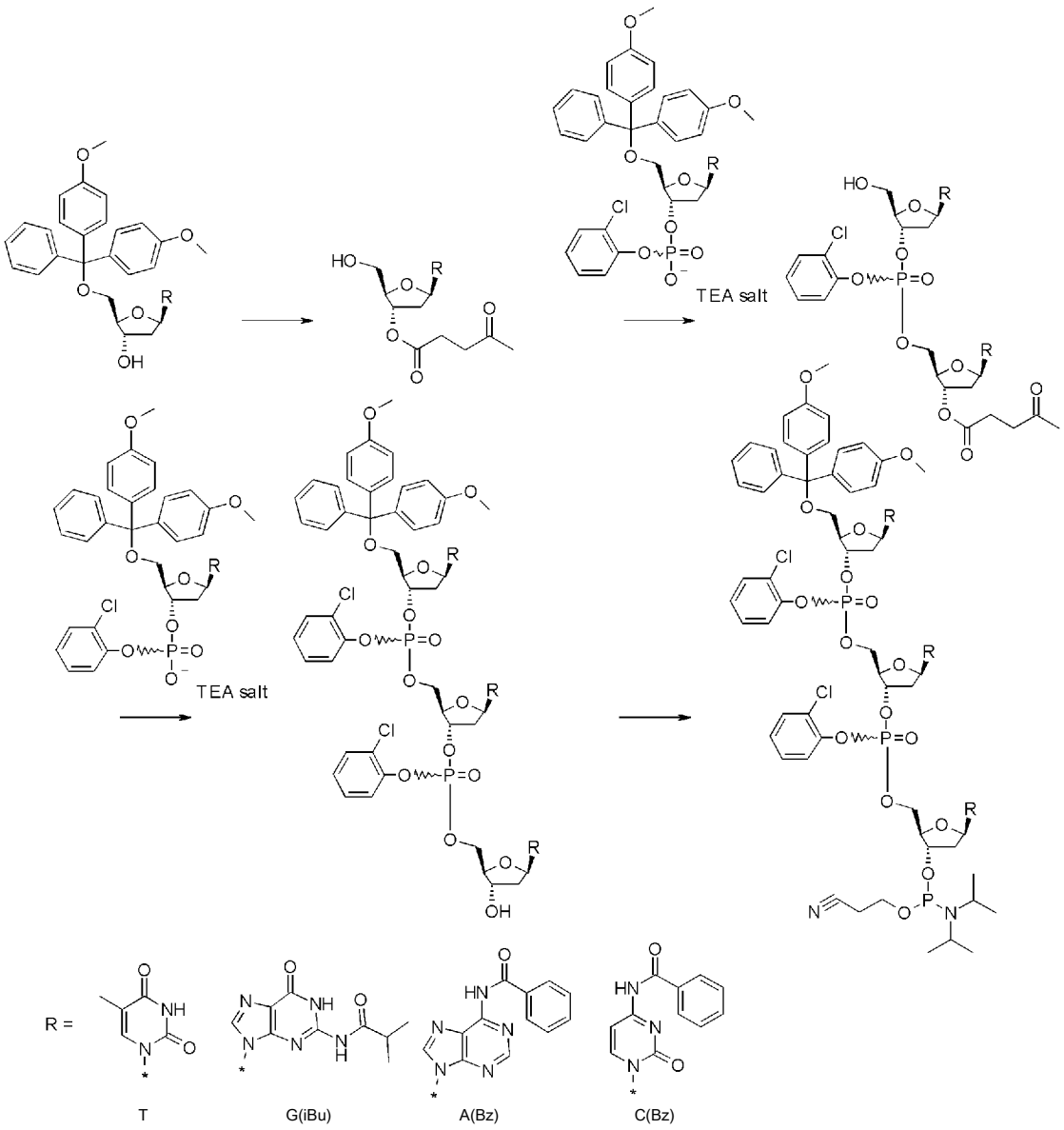
GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUcauAA
CCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-dCA 

[1653] ４．ディスプレイライブラリ構築のためのランダムDNA構築のためのコドンユニットの合成

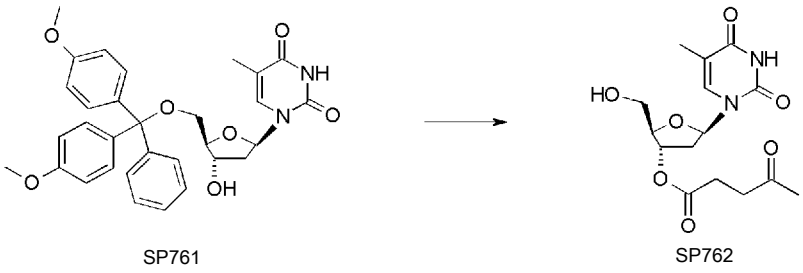
[1654] ＡＴＧ，ＧＴＴ，ＣＣＧ，ＡＣＴ，ＧＣＴ，ＣＡＴ，ＴＧＧ，ＧＧＴ，ＴＡＣ，ＣＡＧ，ＡＡＣ，ＴＧＣ，及びＧＡＡの各ユニットはＧｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈから購入した。TTT（化合物SP７７９

）、ATT（化合物SP７８０）、AGT（化合物SP７６８）、CGG（化合物SP７８１）、AGG（化合物SP７８２）、TTG（化合物SP７７５）、CTT（化合物SP７７６）、CTA（化合物SP７７７）、TAG（化合物SP７７８） Trimer Phosphoram iditeの各ユニットは以下のスキームに従い、合成を行った。なお上記の化合物は文献Yagodkin, A.；Azhayev, A.；Roivainen, J.：Antopo Lsky, M.；Kayushin, A.；Koroste Leva, M.；Miroshnikov, A.；Randolph, J.；and Mackie, H. Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 2007, 26, 473-497 の合成法でも合成可能である。コドンユニットとは本明細書において、ホスホジエステル結合で連結したＤＮＡ様のトリヌクレオチドで構成される化合物で、ＤＮＡの化学合成に応用できる化合物と定義する。例えばCAGユニットとは、5'位の水酸基が4，4'—ジメトキシトリチル基（ＤＭＴ）で保護されており、リン酸塩が2_クロロフエニル基で保護されているのに加え、下スキームによって定義される、アミノ基が保護された核酸塩基（C（Ｂｚ）、A(Bz),Ｇ（ｉＢｕ））を5'側から連続して有しており、3'末端にシアノエチル基で保護されたＮ，N' —ジイソプロピルアミノフォスフォールアミダイト基を有する化合物である。

[1655]



[1656] 4＿ォキソペンタン酸＿「(2R，3S．5R)－2－（ヒドロキシメチル）－5－（5—メチル－2，4—ジォキソピリミジン＿1＿ィル）ォキソラン—3—ィル'l＿（化さ物SP762）のさ成



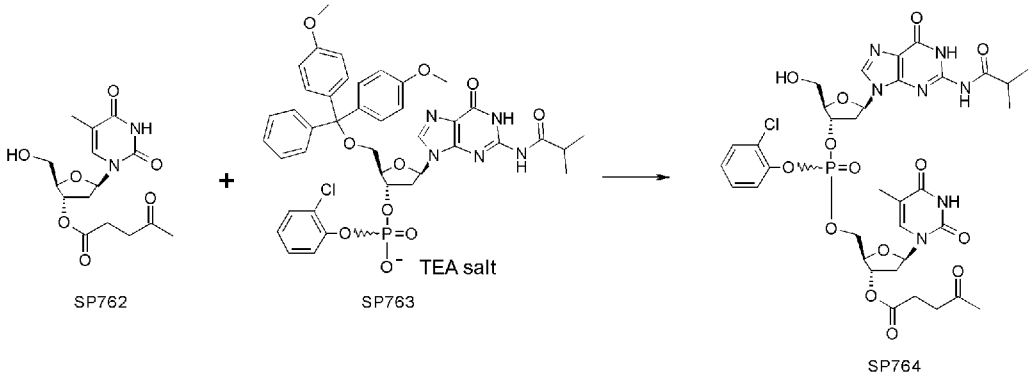
[1657] 窒素雰囲気下、1—[（2R，4S，5R）—5—[[ビス（4ーメトキシフエニル）－フエニルメトキシ]メチル]－4ーヒドロキシオキソラン－

2_イル]_5_メチルピリミジン—2,4—ジオン (化合物SP761) (1.09g、2mmol)、レプリン酉愛 (0.29mし 2.8mmol)、N,N_ジメチル—4_アミノピリジン (DMAP) (73mg、0.6mmol)、及び1_エチル_3_(3—ジメチルアミノプロピル)カルポジイミド塩酸塩 (EDC▪HCl、538mg、2.8mmol)をジクロロメタン (2ml)に溶解し室温で15分撹拌した。反応液に0.6mlのメタノールを加え、p—トルエンスルホン酸 (532mg、2.8mmol)を加えて1分間室温で撹拌した。上述の反応溶液に3mlのリン酸緩衝液 (pH=6, 1M)を加え、2分間撹拌した。反応溶液に10mlのジクロロメタン/エタノール溶液 (5:1)を加え、7mlのリン酸緩衝液 (pH=6, 1M)で分液操作した。有機層を回収し、水層を15mlのジクロロメタン/エタノール溶液 (5:1)で分液操作を2度行ない有機層を回収した。 回収した有機層を合わせて硫酸ナトリウムを加え、乾燥後、濾過により硫酸ナトリウムを取り除き、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=65:35→100:0)で精製し、表題化合物 (化合物SP762) (632.5mg、93%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 341.3 (M+H)+

保持時間:0.52分 (分析条件 SQDAA05)

[1658] 4—ォキソペンタン酸 「(2R,3S,5R)—2—「「(2—クロロフエノキシ)—「(2R,3S,5R)-2-(ヒドロキシメチル)_5_「2-(2—メチルプロパノィルァミノ)_6_オキソ_1H—プリン_9_ィル1オキソラン_3—ィル1オキシホスホリル1オキシメチル1-5-(5_メチル—2,4—ジオキソピリミジン—1—ィル)オキソラン_3—ィル1 (化合物SP764)の合成



SP762 SP763 SP764

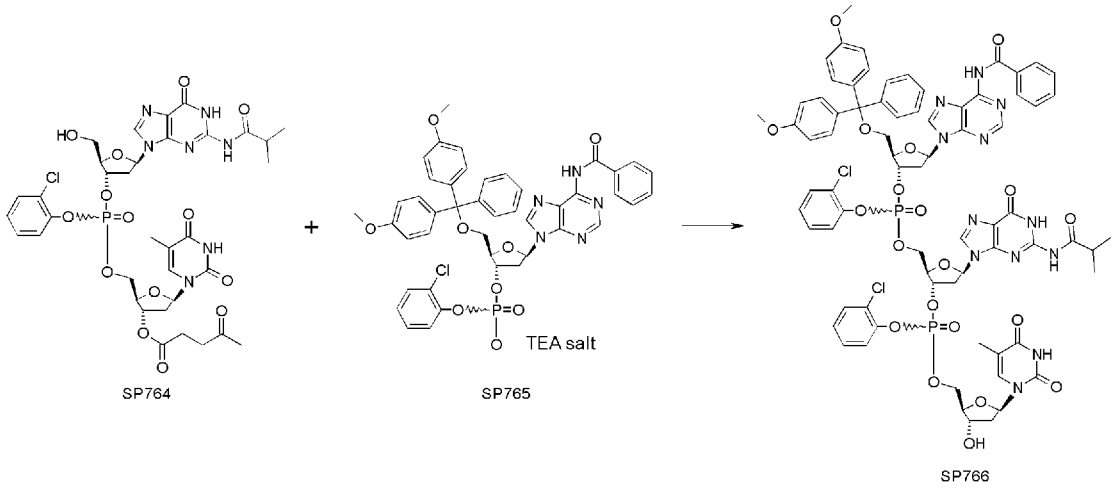
[1659] 窒素雰囲気下、化合物SP763（328mg、0.97mmol）及び、化合物SP762（862mg、0.92mmol）を脱水ピリジン（2.5ml）に溶解した。1―（2―メシチレンスルホニル）－3―ニトロ－1H―1，2，4―トリアゾール（MSNT）（681mg、2.3mmol）の脱水ピリジン（2.5ml）溶液を上述の反応液に10分間で滴下し、室温で2時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、残渣を6mlのジクロロメタン/メタノール（5：1）に溶解し、p_トルエンスルホン酸（350mg、1.84mmol）を加えて1分間室温で攪拌した。上述の反応溶液に8mlのリン酸緩衝液（pH=6，1M）を加え、2分間攪拌した。反応溶液に10mlのジクロロメタン/エタノール溶液（5：1）を加え、分液操作をした。有機層を回収し、水層を更に10mlのジクロロメタン/エタノール溶液（5：1）で分液操作を2度行ない、有機層を回収した。回収した有機層を合わせて硫酸ナトリウムを加え、乾燥後、濾過により硫酸ナトリウムを取り除き、有機層を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン=50：50→100：0）で精製し、表題化合物（化合物SP764）（725.4mg、93%）を得た。

LCMS（ESI） m/z = 850.4 （M+H）+

保持時間：0.62分（分析条件 SQDFA05）

[1660] リン酸（2―クロロフェニル）「（2R，3S，5R）-3-「（2―クロロフェノキシ）―「「（2R，3S，5R）_3―ヒドロキシ－5_（5_メチル－2，4―ジオキソピリミジン－1―イル）オキソラン_2―イル1メトキシ］ホスホリル］オキシ_5_\z-（2_メチルプロパノイル_

ァミノ）－６―オキソ－１Ｈ―プリン－９―ィル｝オキソラン－２―ィル｝メチル　「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（６－ベンズアミドプリン－９―ィル）－２－「「ビス－（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ｝メチル｝オキソラン―３―ィル｝（化合物ＳＰ７６６）の合成

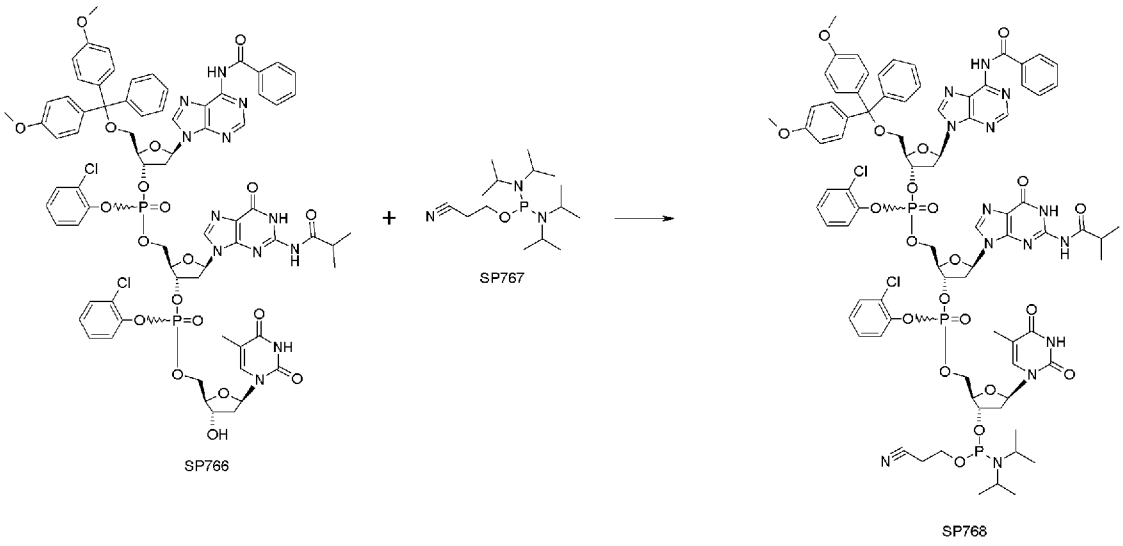


[1661] 窒素雰囲気下、化合物ＳＰ７６５（１．０ｇ、１．０５ｍｍｏｌ）及び、化合物ＳＰ７６４（８５０ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）を脱水ピリジン（２．５ｍｌ）に溶解した。１―（２―メシチレンスルホニル）－３―ニトロ－１Ｈ―１，２，４―トリアゾール（MSNT）（７４０ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）の脱水ピリジン（２．５ｍｌ）溶液を上述の反応液に１０分間で滴下し、室温で２時間撹拌した。反応溶液をＯｏＣに冷却し、酢酸（１．０ｍｌ）を滴下した。反応溶液にヒドラジン－水和物（０．２４ｍし５．０ｍｍｏｌ）を加え、５分間撹拌した。上述の反応溶液に１０ｍｌのリン酸緩衝液（ｐＨ＝６，１Ｍ）及び、ジクロロメタン（５ｍｌ）を加え、１分間撹拌した。反応溶液を１０ｍｌのジクロロメタン/エタノール溶液（１０：１）で３回分液操作をし、有機層を回収した。回収した有機層に硫酸ナトリウムを加え、乾燥した。濾過により硫酸ナトリウムを取り除き、有機層を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０ｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール）で精製し、表題化合物（化合物ＳＰ７６６）（１．２２ｇ、７７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ/ｚ＝１５８１．８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：1．11分（分析条件　SQDA A 05）

[1662] リン酸（2—クロロフェニル）「（2R，3S，5R）-3-「（2—クロロフェノキシ）—「「（2R，3S，5R）-3-「2—シアノエトキシ—「ジ（プロパン_2_イル）アミノ'ホスファニル'オキシ_5_（5—メチル—2，4—ジオキソピリミジン_1_イル）オキソラン_2—イル'メトキシ'ホスホリル'オキシ_5_「2_（2_メチルプロパノイルアミノ）—6—オキソ—1H—プリン—9—イル'オキソラン—2—イル'メチル「（2R，3S，5R）-5-（6_ベンズアミド—1，6—ジヒドロプリン—9—イル）—2—「「ビス（4—メトキシフェニル）—フェニルメトキシ'メチル，ォキソラン_3—イル'（化合物SP768、AGTユニット）の合成



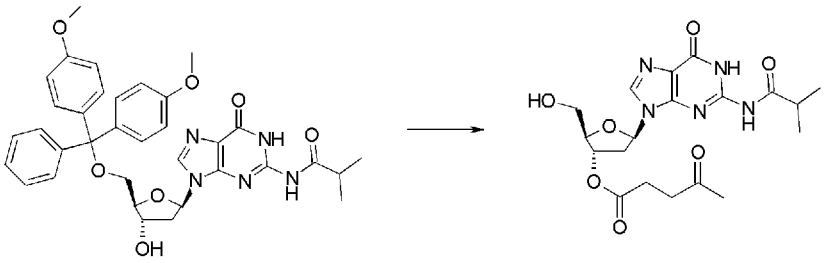
[1663] 窒素雰囲気下、化合物766（2．5g、1．71mmol）と5—エチルチオ—1H—テトラゾール（667mg、5．13mmol）をジクロロメタン（17ml）に溶解し、2—シアノエチル—N，N，N'，N'—テトライソプロピルホスホロジアミダイト（化合物767）（5．43ml、17．1mmol）を加え、室温で15分攪拌した。反応液にトリエチルアミン（0．71ml、5．13mmol）を加え、反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリル水溶液）で精製し、表題化合物（化合物768、AGTユニット）（1．84g、60

％）を得た。

[1664] なお、AGTユニットは本明細書では、AGT部位を有し、上化合物（SP768）のように5'位の水酸基が4，4'—ジメトキシトリチル基（DMT）で保護されており、リン酸塩が2_クロロフエニル基で保護されているのに加え、アミノ基が保護された核酸塩基（A（Bz）、G（iBu）、丁）を5'側から連続して有しており、3'末端にシアノエチル基で保護されたN，N'—ジィソプロピルアミノフォスフォールアミダイト基を有する化合物であると定義する。以下、例えばTTTユニットなど別名称でも、TTT部位を有し、同様に核酸部が保護され、N，N'—ジイソプロピルアミノフォスフォールアミダイト基を有する化合物であると定義する。LCMS（ESI） m/z = 1781.8 （M+H）+

保持時間：1．17分（分析条件 SQDA05）

[1665] 4_オキソペンタン酸___「(2R，3S．5R）-2-（ヒドロキシメチル）-5-「2__(2—メチルプロパノィルアミノ)_6_オキソ_1H—プリン—9—ィル1 オキソラン—3—ィル1__(化さ物SP770)_のさ成



SP769 SP770

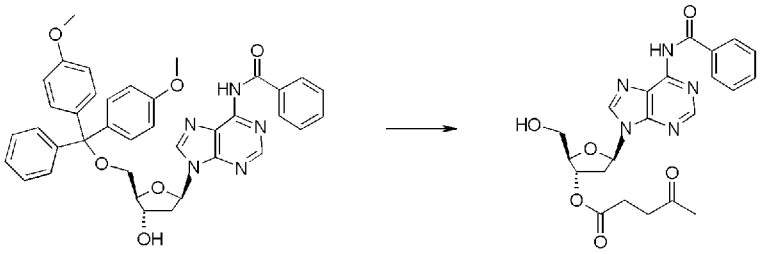
[1666] 化合物SP762の製造例と同様の条件で、1_[（2R，4S，5R）-5-[[ビス（4—メトキシフエニル）ーフエニルメトキシ]メチル]_4—ヒドロキシオキソランー2—イル]_5_メチルピリミジンー2，4—ジオン（化合物761）の代わりにN—[9-[（2R，4S，5R）-5-[[ビス（4—メトキシフエニル）ーフエニルメトキシ]メチル]_4—ヒドロキシオキソランー2_ィル]_6—オキソ-1H_プリンー2—イル]_2_メチルプロパンアミド（化合物769）を用いる事で、4—オキソペンタン酸 [（2R，3S，5R）—2—（ヒドロキシメチル）-5—[2

- （２＿メチルプロパノィルァミノ）＿６＿オキソ＿１Ｈ－プリン－９－ィル］オキソラン－３＿ィル］（化合物SP７７０）（２．９ｇ、８５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝４３５．９ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．２０５分（分析条件 ＳＭＤＭｅｔｈｏｄ９）

[1667] ４＿オキソペンタン酸＿「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）＿５＿（６＿ベンズアミドプリン＿９＿ィル）＿２＿（ヒドロキシメチル）オキソラン＿３－ィル］（化合物SP７７２）の合成

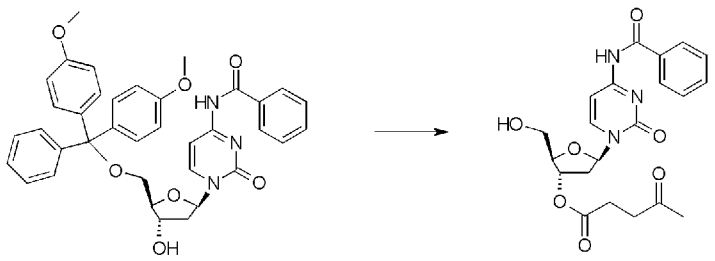


[1668] （化合物SP７６２）の製造例と同様の条件で、１＿［（２Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－［［ビス（４－メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］－４＿ヒドロキシオキソラン－２－ィル］＿５－メチルピリミジン－２，４－ジオン（化合物SP７６１）の代わりにＮ－［９－［（２Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－［［ビス（４－メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］－４－ヒドロキシオキソラン－２＿ィル］プリン＿６＿ィル］ベンズアミド（化合物SP７７１）を用いる事で、４＿オキソペンタン酸［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（６－ベンズアミドプリン－９＿ィル）－２－（ヒドロキシメチル）オキソラン－３＿ィル］（化合物SP７７２）（５０．０ｇ、５６％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝４５４．２ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１７７分（分析条件 ＳＭＤＭｅｔｈｏｄ４）

[1669] ４＿オキソペンタン酸＿「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）＿５＿（４＿ベンズアミド＿２＿オキソピリミジン－１＿ィル）＿２＿（ヒドロキシメチル）オキソラン－３－ィル］（化合物SP７７４）の合成



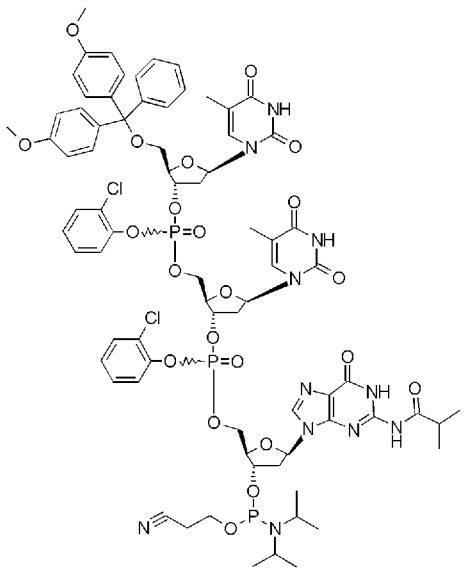
SP773 SP774

[1670] (化合物SP７６２）の製造例と同様の条件で、１_［（２Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－［［ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］―４―ヒドロキシオキソラン－２―イル］―５―メチルピリミジン－２，４－ジオン（化合物SP７６１）の代わりにＮ―［１－［（２Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－［［ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］－４―ヒドロキシオキソラン－２_イル］_２_オキソピリミジン_４―イル］ベンズアミド（化合物SP７７３）を用いる事で、４_オキソペンタン酸［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）―５―（４―ベンズアミド－２―オキソピリミジン_１_イル）_２_（ヒドロキシメチル）オキソラン－３_イル］（化合物SP７７４）（２．４ｇ、８９％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　m/ｚ＝４３０．２（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：３．１９３分（分析条件　ＳＭＤＭｅｔｈｏｄ１０）

[1671] リン酸＿（２―クロロフエニル）＿「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－「（２―クロロフエノキシ）－「「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－「２―シァノエトキシ－「ジ（プロパン_２_イル）アミノ'ホスファニル'オキシ_５_「２－（２_メチルプロパノイルアミノ）_６_オキソ_１Ｈ_プリン－９―イル'オキソラン_２―イル'メトキシ'ホスホリル'オキシ_５_（５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン_１_イル）オキソラン_２―イル'メチル＿「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－２－「「ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ'メチル，－５－（５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン―１_イル）オキソラン_３―イル'（化合物SP７７５、ＴＴＧユニット）の合成



SP775

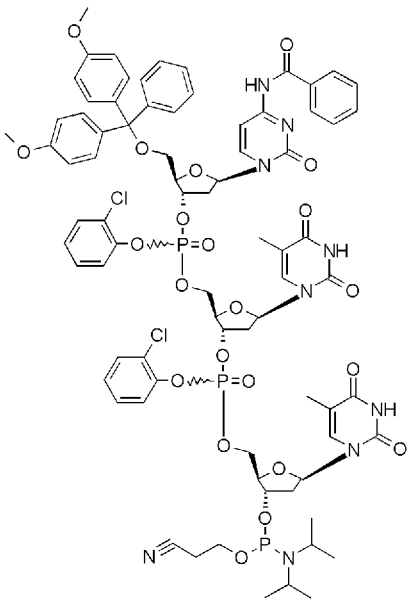
[1672] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸 （２—クロロフエニル） [（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－[（２—クロロフエノキシ）_ [[（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－[２—シァノエトキシー[ジ (プロパンー２—ィル）ァミノ] ホスファニル] オキシ－５—[２－（２—メチルプロパノィルァミノ）_６_オキソ_１Ｈ—プリン_９_ィル] オキソラン_２_ィル] メトキシ] ホスホリル] オキシ_５_（５_メチル_２，４—ジオキソピリミジン_１_ィル）オキソランー２_ィル] メチル [（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－２－[[ビス (４—メトキシフエニル）ーフエニルメトキシ] メチル] _５_（５_メチル_２，４—ジオキソピリミジンー１—ィル）オキソラン—３_ィル] (化合物SP７７５，ＴＴＧユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１６６８．８ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１５分 (分析条件 SQDA０５）

[1673] リン酸 (２—クロロフエニル）「(２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－「(２—クロロフエノキシ）ー「「(２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－「２—シァノエトキシー「ジ (プロパン_２_ィル）ァミノ'ホスファニル'ォキシ_５_（５—メチル－２，４—ジォキソピリミジン_１_ィル）ォキソラン_２—ィル'メトキシ'ホスホリル'ォキシ_５_（５—メチル－２，４—ジォキソピリミジンー１—《ルユオキソランー２—ゴル'メチル「(２Ｒ，３Ｓ，５

R）－５－（４―ベンズアミド－２―オキソピリミジン－１―イル）－２―「「ビス（４―メトキシフェニル）－フェニルメトキシ］メチル］オキソラン―３―イル］（化合物SP７７６、ＣＴＴユニット）の合成



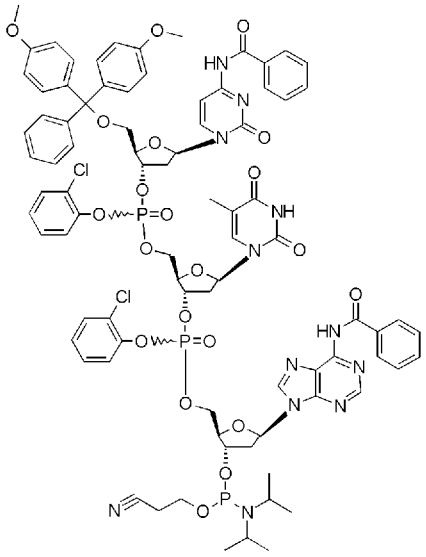
[1674] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸（２―クロロフェニル）［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－［（２―クロロフェノキシ）［［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－［２―シアノエトキシ－［ジ（プロパン－２－イル）アミノ］ホスファニル］オキシ－５－（５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン－１－イル）オキソラン－２－イル］メトキシ］ホスホリル］オキシ－５－（５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン－１―イル）オキソラン－２－イル］メチル［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（４―ベンズアミド－２―オキソピリミジン－１―イル）－２―［［ビス（４―メトキシフェニル）－フェニルメトキシ］メチル］オキソラン－３―イル］（化合物SP７７６，ＣＴＴユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１６６２．４（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１８分（分析条件 SQDA０５）

[1675] リン酸（２―クロロフェニル）「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－「「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－５－（６－ベンズアミドプリン－９－イル）－３－「２―シアノエトキシ－\ジ（プロパン－２－ゴル）アミノ］ホスファニルユオ

キシオキソラン_２―イル'l_メトキシー_(2―クロロフエノキシ)_ホスホリル'l オキシ_５_(５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン_１_イル)_オキソラン_２―イル'l_メチル___「(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４―ベンズアミド_２_オキソピリミジン－１―イル)_２_「「ビス_(4―メトキシフエニル)_ーフエニルメトキシ'l_メチル'l オキソラン_３―イル'l__(化合物SP777、_ＣＴＡユニット」の合成



SP777

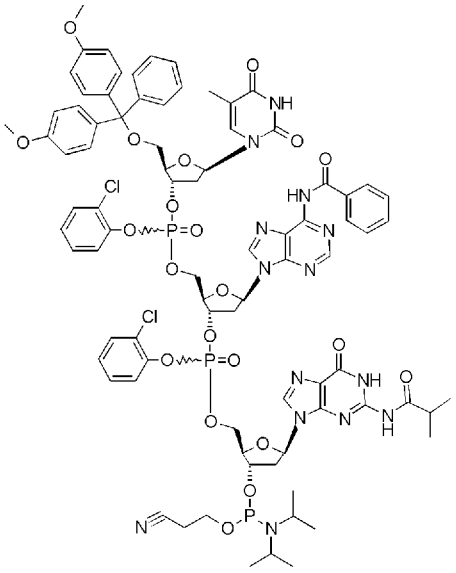
[1676] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸 (２―クロロフエニル) [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－３－[[(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(６―ベンズアミドプリン－９―イル)－３―[２―シアノエトキシー[ジ (プロパン_２_イル)アミノ]ホスファニル]オキシオキソラン_２_イル]メトキシー (２―クロロフエノキシ)ホスホリル]オキシー５－(５―メチル_２，４―ジオキソピリミジン_１_イル)オキソラン－２_イル]メチル [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－５－(４―ベンズアミド－２―オキソピリミジン－１―イル)－２―[[ビス (４―メトキシフエニル)―フエニルメトキシ]メチル]オキソラン－３_イル] (化合物SP７７７，ＣＴＡユニット)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ) m/ｚ＝１７７５．９ (Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：１．２０分(分析条件 SQDAＡＯ５)

[1677] リン酸 [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)－３－ヌ―シアノエトキシー[ジ(プロ

パン－２＿ィル）ァミノ′Ｉ ホスファニル′Ｉ オキシ＿５＿＿「２＿＿（２―メチルプロパノィルァミノ）＿６＿オキソ＿１Ｈ―プリン－９―ィル′Ｉ オキソラン＿２―ィル′Ｉ＿メチル＿＿（２―クロロフエニル）＿＿「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（６＿ベンズアミドプリン＿９＿ィル）＿２＿＿「「「（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－２－「「ビス＿（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ′Ｉ＿メチル′Ｉ－５－（５―メチル－２，４―ジオキソピリミジン＿１＿ィル）オキソラン－３―ィル′Ｉ オキシ－＿（２―クロロフエノキシ）ホスホリル′Ｉ オキシメチル′Ｉ オキソラン＿３―ィル′Ｉ＿（化合物SP７７８、ＴＡＧユニット）の合成



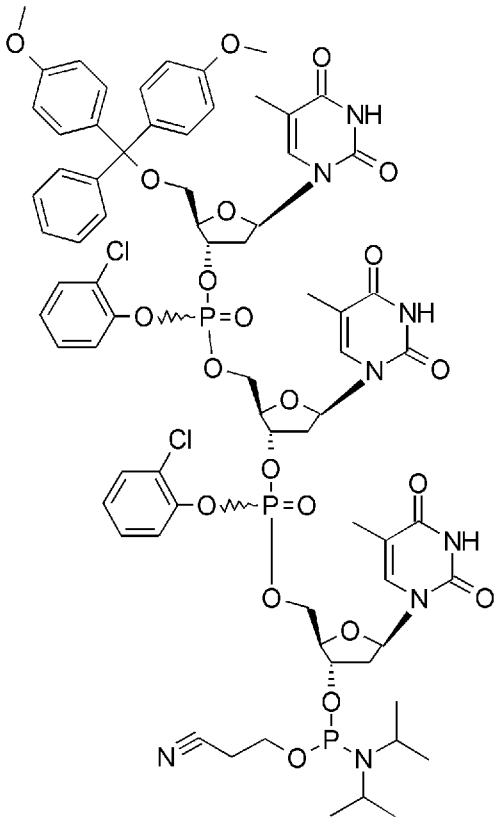
SP778

[1678] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－［２―シァノエトキシ－［ジ（プロパン－２―ィル）ァミノ］ホスファニル］オキシ＿５＿［２－（２―メチルプロパノィルァミノ）－６―オキソ－１Ｈ―プリン－９―ィル］オキソラン－２―ィル］メチル（２―クロロフエニル）［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（６―ベンズアミドプリン－９―ィル）－２―［［［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－２－［［ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］＿５＿（５―メチル＿２，４―ジオキソピリミジン＿１＿ィル）オキソラン＿３―ィル］オキシ－（２―クロロフエノキシ）ホスホリル］オキシメチル］オキソラン＿３＿ィル］（化合物SP７７８，ＴＡＧユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １７８１．９ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１７分 (分析条件SQDＡＡＯ５)

[1679] リン酸 (2—クロロフエニル) 「(2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ) - 3 - 「(2—クロロフエノキシ) — 「「(2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ) - 3 - 「2—シァノエトキシ— 「ジ (プロパン_２_ィル)ァミノ1 ホスファニル1 オキシ_５_(５—メチル—２，４—ジオキソピリミジン_１_ィル)オキソラン_２—ィル1_メトキシ1 ホスホリル1 オキシ_５_(５—メチル—２，４—ジオキソピリミジン—１_ィル)オキソラン_２—ィル] メチル 「(2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ) - 2 - 「「ビス_(4—メトキシフエニル)—フエニルメトキシ1_メチル1 - ５ - (５—メチル—２，４—ジォキソピリミジン_１_ィル)ォキソラン—３—イル] （化合物SP７７９，ＴＴＴユニット）の合成



SP779

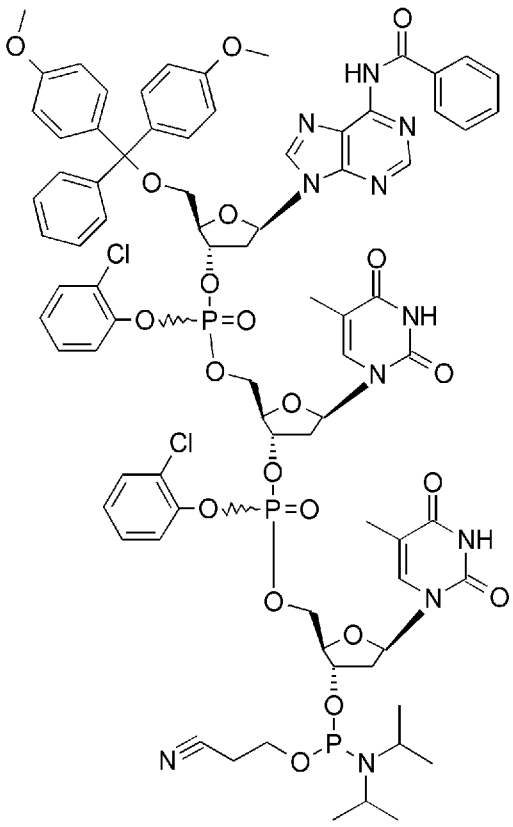
[1680] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸 (2—クロロフエニル) [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ) - 3 - [(２—クロロフエノキシ)_ [[(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ) - 3 - [２—シァノエトキシ— [ジ (プ

ロパン－２＿ィル）アミノ］ホスファニル］オキシ＿５＿（５―メチル＿２，４―ジオキソピリミジン＿１＿ィル）オキソラン－２＿ィル］メトキシ］ホスホリル］オキシ＿５＿（５―メチル＿２，４―ジオキソピリミジン－１―ィル）オキソラン－２＿ィル］メチル［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－２－［［ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］＿５＿（５―メチル＿２，４―ジオキソピリミジン＿１＿ィル）オキソラン＿３―ィル］（化合物ＳＰ７７９，ＴＴＴユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５７３．８（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１５分（分析条件ＳＱＤＡ０５）

[1681] リン酸＿＿（２―クロロフエニル）＿＿「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－＿「（２―クロロフエノキシ）－＿「「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－３－＿「２―シァノエトキシ－＿「ジ（プロパン＿２＿ィル）ァミノ'１ホスファニル］ォキシ＿５＿＿（５―メチル－２，＿４―ジォキソピリミジン＿１＿ィル）ォキソラン＿２―ィル'１＿メトキシ'１ホスホリル'１ォキシ＿５＿＿（５―メチル－２，＿４―ジォキソピリミジン－１＿ィル）ォキソラン＿２―ィル'１＿メチル＿＿「（２Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－５－＿（６―ベンズアミドプリン＿９＿ィル）＿２＿＿「「ビス＿（４―メトキシフエニル）＿－フエニルメトキシ'１＿メチル，ォキソラン＿３―ィル'１＿＿（化合物ＳＰ７８０、―ＡＴＴユニット）の合成



SP780

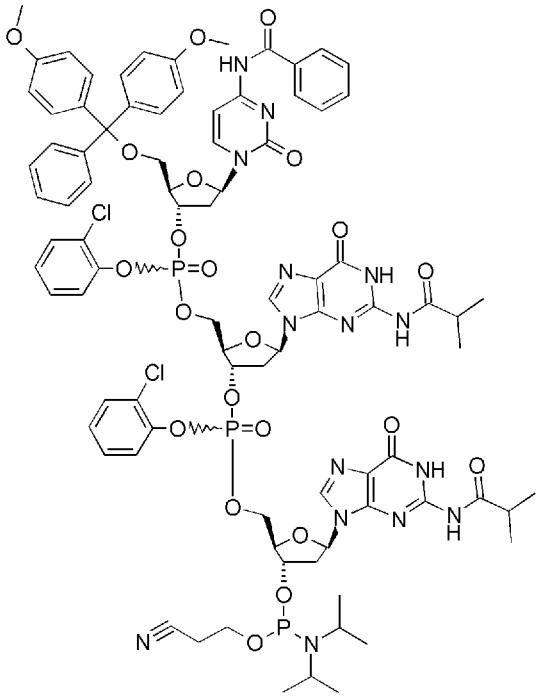
[1682] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸 （２—クロロフエニル） [（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－[（２—クロロフエノキシ）_[[（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－[２—シァノエトキシー[ジ (プロパンー２_ィル）ァミノ] ホスファニル] オキシ_５_（５—メチル_２，４—ジオキソピリミジン_１_ィル）オキソランー２_ィル] メトキシ] ホスホリル] オキシ_５_（５—メチル_２，４—ジオキソピリミジンー１—ィル）オキソランー２_ィル] メチル [（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－５－（６—ベンズアミドプリンー９_ィル）－２_[[ビス (４_メトキシフエニル）ーフエニルメトキシ] メチル] オキソランー３_ィル] (化合物SP７８０、ＡＴＴユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ = １６８６．４ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：１．１６分 (分析条件 SQDA０５）

[1683] リン酸 (２—クロロフエニル） 「(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－「(２—クロロフエノキシ)_ ΓΓ（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）_３—⊥２—シァノエトキ

シー｢ジ (プロパン_２_ィル)ァミノ'l ホスファニル'l オキシ_５_｢2-(２_メチルプロパノィルァミノ)_６_オキソ_１Ｈ_プリン－９―ィル'l オキソラン_２―ィル'l_メトキシ'l ホスホリル'l オキシ_５_｢２_(２_メチルプロパノィルァミノ)_６_オキソ_１Ｈ―プリン－９―ィル'l_オキソラン_２―ィル'l_メチル｢(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―ベンズアミド_２_オキソピリミジン－１―ィル)_２_｢｢ビス_(4―メトキシフエニル)_－フエニルメトキシ'l_メチル'l オキソラン_３―ィル'l_(化合物SP７８１、ＣＧＧユニット)の合成



SP781

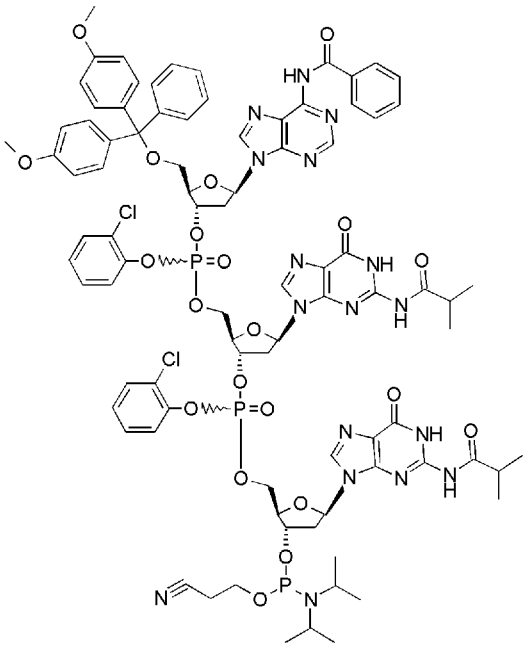
[1684] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸 (２―クロロフエニル) [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-３-[(２―クロロフエノキシ)_[[(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-３-[２―シァノエトキシ－[ジ (プロパン－２―ィル)ァミノ]ホスファニル]オキシ－５―[２-(２―メチルプロパノィルァミノ)_６_オキソ_１Ｈ―プリン_９_ィル]オキソラン_２_ィル]メトキシ]ホスホリル]オキシ_５_[２-(２―メチルプロパノィルァミノ)－６―オキソ－１Ｈ―プリン－９―ィル]オキソラン－２_ィル]メチル [(２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ)-５-(４―ベンズアミド－２

—オキソピリミジン－１—ィル）－２—［［ビス（4—メトキシフエニル）—フエニルメトキシ］メチル］オキソラン－３_ィル］（化合物SP７８１、ＣＧＧユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１８５２．５ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８７分（分析条件 SQDA５０）

[1685] リン酸（2—クロロフエニル）「（2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－「（2—クロロフエノキシ）－「「（2Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－「2—シァノエトキシ－「ジ（プロパン_２_ィル）ァミノ'ホスファニル'オキシ_５_「2-（２_メチルプロパノィルァミノ）_６_オキソ_１Ｈ_プリン－９—ィル'ォキソラン_２—ィル'_メトキシ'ホスホリル'ォキシ_５_「2_（２_メチルプロパノィルァミノ）_６_ォキソ_１Ｈ—プリン－９—ィル'_ォキソラン_２—ィル'_メチル「（2Ｒ，３Ｓ．５Ｒ）－５－（６—ベンズアミドプリン_９_ィル）_２_「「ビス_(4—メトキシフエニル）－フェニルメトキシ]_メチル'ォキソラン_３—ィル'（化合物SP７８２、ＡＧＧユニット）のさ成



SP782

[1686] 化合物ＳＰ７６１からＳＰ７６８の製造例と同様の条件で、リン酸（2—クロロフエニル）［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－［（２—クロロフエノ

キシ）_［［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）－３－［２―シアノエトキシー［ジ（プロパン－２―イル）アミノ］ホスファニル］オキシ－５―［２－（２―メチルプロパノイルアミノ）_６_オキソ_１Ｈ―プリン_９_イル］オキソラン_２_イル］メトキシ］ホスホリル］オキシ_５_［２－（２―メチルプロパノイルアミノ）－６―オキソ－１Ｈ―プリン－９―イル］オキソラン－２_イル］メチル［（２Ｒ，３Ｓ，５Ｒ）_５_（６_ベンズアミドプリン－９―イル）－２―［［ビス（４―メトキシフエニル）－フエニルメトキシ］メチル］オキソラン―３_イル］（化合物ＳＰ７８２、ＡＧＧユニット）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１８７６．５（Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．８４分（分析条件ＳＱＤＡ５０）

[1687] ５．ディスプレイライブラリーに用いるDNAのランダム化されたパーツの化学合成

上記載の方法もしくは購入して得たコドンユニットを用いて、以下のような手法でランダム化された多様性の高いDNAを合成した。

化合物ＳＰ７９１

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG (PPP)7 CGT (XXX) (PPP) AGC GGC TCT GGC TCT GGC TCT-3' （配列番号：１４０）

DNA/RNA合成機（NTS H-6、日本テクノサービス株式会社製）を用いて、ホスホロアミダイト法によりランダムDNA合成を行った。脱水アセトニトリルおよびデプロッキング溶液-１（３ｗ／ｖ％トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液）は和光純薬から購入し、ホスホロアミダイト試薬（dA, dC, dG, dT-CE phosphoramidite）、Cap Mix A (THF/Pyridine/Acetic anhydride)、Cap Mix B（16% 1-Me-Imidazole/THF）、Oxidizing Solution (0.02M I2 in THF/Pyridine/H2O)、Activator (5-Benzylthio-1H-tetrazole in MeCN)、トリマーホスホロアミダイト試薬（GTT、CCG、ACT, ATG, GCT、CAT, TGG、GGT、TAC、CAG、AAC、TGC、GAA Trimer Phosphoramidite）についてはGlen Research社から購入した。また、トリマーホスホロアミダイト試薬（TTT（化合物ＳＰ７７９

）、ATT（化合物SP７８０）、AGT（化合物SP７６８）、CGG（化合物SP７８１）、AGG（化合物SP７８２）、TTG（化合物SP７７５）、CTT（化合物SP７７６）、CTA（化合物SP７７７）、TAG（化合物SP７７８）Trimer Phosphoramidite）については、上記載のとおり合成したものを用いた。

[1688] 配列中に（PPP）と示した箇所には、トリマーホスホロアミダイト試薬（丌丁、A丌、G丌、AGT、CCG、ACT, GCT、CAT, TGG、GGT、TAC、CAG、AAC、CGG、AGG、TTG、CTT、CTA、TAG, TGC、GAA Trimer Phosphoramidite）を混合したものを適用し、（XXX）と示した箇所には、トリマーホスホロアミダイト試薬（TTT、CCG、GCT、CAT, AAC、CGG、AGG、TTG、TAG, GAA Trimer Phosphoramidite）を混合したものを適用した。従って、PPPはTTTのみを意味するのではなく、ATTやTACなどを意味する。また、（PPP）7は任意のPPPが7回結合していることを意味しており（ATT）7のみを意味するのでなく、、例えば21種類から選択すると217の多様性が生じることを模式的に示したものである。

なお、操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

[1689] フィルター付きの反応容器にGLenUnySupport CPG（10000A、44μmoL/g、5.2mg、0.2299μmol）を詰め、合成機にセットし、DNAを固相合成した。ここで5'末端水酸基の保護基（DMT：4，4'—ジメトキシトリチル基）は脱保護することなく合成機による伸長反応を終了とした。

伸長反応終了後、固相担体をスクリューキャップ付きガラスチューブに移し、30%アンモニア水溶液（0.4ml）を加え、60℃にて6時間攪拌することによりCPGからDNAの切り出しと脱保護を行い、反応混合液を分取HPLCにて精製した（分析条件LC05）。HPLCフラクションを凍結乾燥して得られた残渣を水（0.8ml）に溶かし、これに酢酸（3ml）を加え、室温にて10分間攪拌することにより、5'末端水酸基のDMT基を脱保護した。反応液を水（10ml）で希釈し、酢酸エチル（10ml）で5回抽出操作を行った後、得られた水層を凍結乾燥することにより、目的とするランダム化DNA（化合物SP791）（6.7%）を得た。なお収率については260nmにおける吸光度から算出した。

保持時間 :8．５５分 (分析条件LC０４)

[1690] 化合物SP７９２

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG (PPP)8 CGT (XXX) (PPP) AGC GGC TCT GGC TCT GGC TCT-3' (配列番号 :１４１)

[1691] 化合物SP７９１と同様の方法により、目的とするランダム化DNA (化合物ＳＰ７９２) (７．６％) を得た。

保持時間 :8．７１分 (分析条件LC０４)

[1692] 化合物SP７９３

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG (PPP)9 CGT (XXX) (PPP) AGC GGC TCT GGC TCT GGC TCT-3' (配列番号 :１４２)

[1693] 化合物SP７９１と同様の方法により、目的とするランダム化DNA (化合物ＳＰ７９３) (５．８％) を得た。

保持時間 :8．６７分 (分析条件LC０４)

[1694] 化合物SP７９４

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG TGC (QQQ)7 CGT (QQQ)2 AGC GGC TCT GGC TCT GGC TCT-3' (配列番号 :１４３)

[1695] 化合物SP７９１と同様の方法により、目的とするランダム化DNA (化合物ＳＰ７９４) (６．５％) を得た。配列中に (QQQ) と示した箇所には、トリマーホスホロアミダイト試薬 (TTT、ATT、ATG, GTT、AGT、CCG、ACT, GCT、CAT、TGG、GGT、TAC、CAG、AAC、CGG、AGG、TTG、CTT、CTA、TAG, GAA Trimer Phosphoramidite) を混合したものを適用した。従って、QQQはTTTのみを意味するのではなく、ATTやTACなどを意味する。また、 (QQQ) 7は任意のQQQ が７回結合していることを意味しており (ATT) 7のみを意味するのでなく、、例えば２１種類から選択すると21^7の多様性が生じることを模式的に示したものである。

保持時間 :8．５６分 (分析条件LC０４)

[1696] 化合物SP７９５

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG TGC (QQQ)8 CGT (QQQ)2 AGC GGC TCT GGC TCT

GGC TCT-3' (配列番号 ：１４４）

[1697] 化合物SP７９１と同様の方法により、目的とするランダム化DNA（化合物ＳＰ７９５）（６．０％）を得た。

保持時間 ：８．５４分 (分析条件LC04）

[1698] 化合物SP７９６

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG TGC (QQQ)9 CGT (QQQ)2 AGC GGC TCT GGC TCT GGC TCT-3' (配列番号 ：１４５）

[1699] 化合物SP７９１と同様の方法により、目的とするランダム化DNA（化合物ＳＰ７９６）（４．５％）を得た。

保持時間 ：８．８０分 (分析条件LC０４）

[1700] [表23]

分析条件	装置	カラム（I.D.x長さ）（mm）	移動相	勾配（A/B）	流速（mL/分）	カラム温度（℃）	波長
LC04	SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH LC-10AD*VP*	YMC-Pack ODS-A (4.6x150)	A）１００mM AcOH-TEA, H2O B）MeCN	９５/５=>５０/５０（２０分間）	１．０	４０	２６０nm
LC05	Preparative HPLC system with injection/fractionation function (Gilson, Inc. Middleton, WI, USA)	YMC-Actus ODS-A (20x100)	A）１００mM AcOH-TEA, H2O B）MeCN	８５/１５=>６５/３５（２０分間）	２０	５０	２６０nm

[1701] ６．ディスプレイライブラリーに用いるDNAライブラリーの調製

合成オリゴDNA（化合物SP７９１、ＳＰ７９２、ＳＰ７９３、ＳＰ７９４、ＳＰ７９５、ＳＰ７９６）と合成オリゴDNA（配列番号 ＤＯＬ＿１）を用いて、ExTaq (Takara 社)により伸長反応を行った。９５℃で二分間変性した後

、５０℃で一分、７２℃で一分のサイクルを５ないし１０回繰り返した。続いて、この伸長反応産物を鋳型に合成オリゴDNA（配列番号ＤＯＬ―１）と合成オリゴDNA（配列番号ＤＯＬ―２）を用いて、ExTaq (Takara 社)によりPCRを行った。９５℃で二分間変性した後、９５℃で一分、５０℃で一分、７２℃で一分のサイクルを５から１０回繰り返し、DNAライブラリー (配列番号ＤＭＬ-１〜ＤＭＬ-６）を構築した。

配列中に（PPP）と示した箇所は、TTT、ATT、GTT、AGT、CCG、ACT, GCT、CAT、TGG、GGT、TAC、CAG、AAC、CGG、AGG、TTG、CTT、CTA、TAG, TGC、GAAがランダムに出現することを、（XXX）と示した箇所には、TTT、CCG、GCT、CAT、AAC、CGG、AGG、TTG、TAG, GAAがランダムに出現することを、（QQQ）と示した箇所には、TTT、ATT、ATG、GTT、AGT、CCG、ACT, GCT、CAT, TGG、GGT、TAC、CAG、AAC、CGG、AGG、TTG、CTT、CTA、TAG, GAAがランダムに出現することを意味する。

[1702] 配列番号 ＤＯＬ―１（配列番号：１４６）

TTTGTCCCCGCCGCCCTAAGAGCCAGAGCCAGAGCCGCT

[1703] 配列番号ＤＯＬ_２（配列番号：１４７）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG

[1704] 配列番号ＤＭＬ―１（配列番号：１４８）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG (PPP)$_7$CGT(ＸＸＸ)(PPP)AGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1705] 配列番号ＤＭＬ―２（配列番号：１４９）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG(PPP)$_8$CGT(ＸＸＸ)(PPP)AGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1706] 配列番号ＤＭＬ―３（配列番号：１５０）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG(PPP)$_9$CGT(ＸＸＸ)(PPP)AGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1707] 配列番号ＤＭＬ―４（配列番号：１５１）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGC (QQQ)$_7$CGT (QQQ)$_2$AGC

GGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1708] 配列番号DML—5 (配列番号 :152)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGC (QQQ)$_8$CGT (QQQ)$_2$AGC

GGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1709] 配列番号DML—6 (配列番号 :153)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGC (QQQ)$_9$CGT (QQQ)$_2$AGC

GGCTCTGGCTCTGGCTCTTAGGGCGGCGGGGACAAA

[1710] 7. mRNA—ピューロマイシンリンカーライゲーション産物調製

PCRにより調製したDNAライブラリー(配列番号 DML_1~DML_3 (Initiation suppression翻訳用)、DML-4~DML-6 (Read throuth翻訳用))を錆型に、in vitro転写により以下のmRNA (配列番号MML_1~MML-3 (Initiation suppression翻訳用)、配列番号MML_4~MML-6 (Read throuth 翻訳用))を調製し、RNeasy mini kit (Qiagen社)を用いて精製した。10μMのmRNAに、15从Mのピューロマイシンリンカー (Sigma社)(配列番号C_1)、 1X T4 RNAライゲースリアクションバッファー (New eng Land bio Lab. 社)、1mM ATP、10% DMSO、0.625unit/μl T4 RNAライゲース (New eng Land bio Lab. 社)を加え、37℃で30分間ライゲーション反応させた後、RNeasy Mini kit(Qiagen社)により精製した。配列番号MML—1とMML—4は30μlスケール、配列番号MML—2とMML—5は60μlスケール、配列番号MML—3とMML—6は240μlスケールで、ライゲーションを行い、精製した。ピューロマイシンリンカー (配列番号C—1)と連結したMML_1,MML-2,MML—3をそれぞれモル比1:2 1:4 4 1となるように、ピューロマイシンリンカー(配列番号C—1)と連結したMML_4,MML-5,MML—6をそれぞれモル比1:2 1:4 4 1となるように混合し、前者をinitiation suppression翻訳用mRNA—ピューロマイシンリンカーライゲーション産物混合物と、後者をRead throuth 翻訳用mRNA—ピューロマイシンリンカーライゲーション産物混合物とした。

[1711] 配列中に（RRR）と示した箇所は、UUU、AUU、GUU、AGU、CCG、ACU、GCU、CAU、UGG、GGU、UAC、CAG、AAC、CGG、AGG、UUG、CUU、CUA、UAG、UGC、GAAがランダムに出現することを、（YYY）と示した箇所には、UUU、CCG、GCU、CAU、AAC、CGG、AGG、UUG、UAG、GAAがランダムに出現することを、（SSS）と示した箇所には、UUU、AUU、AUG、GUU、AGU、CCG、ACU、GCU、CAU、UGG、GGU、UAC、CAG、AAC、CGG、AGG、UUG、CUU、CUA、UAG、GAAがランダムに出現することを意味する。

[1712] 配列番号MML—1（配列番号：1544）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUG(RRR)$_7$CGU(YYY)(RRR)AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1713] 配列番号MML—2（配列番号：1545）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUG(RRR)$_8$CGU(YYY)(RRR)AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1714] 配列番号MML—3（配列番号：1546）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUG(RRR)$_9$CGU(YYY)(RRR)AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1715] 配列番号MML—4（配列番号：1547）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGUGC(SSS)$_7$CGU(SSS)$_2$AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1716] 配列番号MML—5（配列番号：1548）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGUGC(SSS)$_8$CGU(SSS)$_2$AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1717] 配列番号MML—6（配列番号：1549）

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGUGC(SSS)$_9$CGU(SSS)$_2$AGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUUAGGGCGGCGGGGACAAA

[1718] ビオチン化標的タンパク質の調製

バニングに使用する標的タンパク質として、インターロイキン6受容体（IL—6R）、Tumor Necrosis Factor-α（TNFα）、Tumor Necrosis Fa

ctor Receptorl （ＴＮＦＲ１）を用いた。ＩＬ＿６Ｒのビオチン化は非特許文献BMC biotechno logy, 2008, 8,41、および非特許文献Prote in Science, 1999,8,921-929の方法を用いた。ＩＬ＿６Ｒの調製は非特許文献J Biochem. 1990;108(4) :673-6. に従って行った。ＴＮＦαはProspec社のRcomb inant Human Tumor Necros is Factor-a Lpha (Cata Log Number #CYT-223)を、ＴＮＦＲ１はSinoB io Log ica l社のRecomb inant Human TNFR1/Fc Chimera (Cata Log Numbe r 10872-H03H) を購入した。それぞれThermo scient ific社のEZ-L ink NHS-PEG4-B iotin (Cata Log Number 21329)を用いてビオチン化を行った。

[1719] ・パニングに使用する翻訳液の定義

バニングに使用した翻訳液Ｓは以下の組成で構成される。１ｍＭ ＧＴＰ，１ｍＭ ＡＴＰ，２０ｍＭクレアチンリン酸，５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ-ＫＯＨ ｐＨ７．６，１００ｍＭ 酢酸カリウム，１０ｍＭ 酢酸マグネシウム，２ｍＭスペルミジン，１ｍＭ ジチオスレイトール，０．５ｍｇ/ｍｌ Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＲＥ６００（ＲＮａｓｅネガティブ）由来ｔＲＮＡ（Ｒｏｃｈｅ社），４μｇ／ｍｌ クレアチンキナーゼ，３μｇ／ｍｌ ミオキナーゼ，２ｕｎｉｔ/ｍｌ 無機ピロフォスファターゼ，１．Ｉμｇ／ｍｌ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，０．２６μＭ ＥＦ-Ｇ，２．７μＭ ＩＦ１，０．４μ,Ｍ ＩＦ２，１．５μＭ ＩＦ３，４０μＭ ＥＦ-Ｔｕ，８４μＭ ＥＦ＿ＴＳ，１．２μＭ リボソーム，２．７３μＭ ＡｌａＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＧｌｙＲＳ，０．４μＭ ＩｌｅＲＳ，０．６８μＭ ＰｈｅＲＳ，０．１６μＭ ＰｒｏＲＳ，０．０４μＭ ＳｅｒＲＳ，０．０９μ,Ｍ ＴｈｒＲＳ，０．０３μＭ ＴｒｐＲＳ，０．２２μ,Ｍ ＴｙｒＲＳ，０．０２μ,Ｍ ＶａｌＲＳ、３μＭ 転写ｔＲＮＡ ＡｌａＩＢ（配列番号ＭＴＬ＿１３）、３μ,Ｍ 転写ｔＲＮＡ Ｔｙｒ１（配列番号ＭＴＬ—１４）、２５０μＭグリシン、２５０μＭイソロイシン、２５０μＭプロリン、２５０μＭスレオニン、２５０μＭトリプトファン、２５０μＭバリン、１００μＭセリン、５ｍＭ Ｎ—メチルアラニン、５ｍＭ Ｎ—メチルフエニルアラニン、２ｍＭ Ｄ—チロシン。さらに翻訳液Ｓ用アミノアシル

化ｔＲＮＡ混合物および翻訳液Ｓ用Initiatorアミノアシル化tRNAを加えて調製した。また翻訳液Ｔは上記の翻訳液Ｓ用アミノアシル化ｔＲＮＡ混合物および翻訳液Ｓ用Initiator アミノアシル化tRNAを含まない翻訳液Ｓに０．０２μＭ ＣｙｓＲＳ、２５０μＭシスティン、および翻訳液Ｔ用アミノアシル化ｔＲＮＡ混合物を加えて調製した。

[1720] ・ラウンド1のバニングを行うための翻訳、環化、脱硫、逆転写反応、バニング、PCR

１μＭ initiation suppress ion翻訳用もしくはRead throuth 翻訳用ｍＲＮＡ_ピューロマイシンリンカーライゲーションヨン産物混合物を含む前述のＳ用、Ｔ用それぞれ２ｍｌ翻訳液を調製し、３７℃で１２０分間保温後、室温で１２分間放置した。この翻訳混合物に対して、２００μｌの２００ｍＭ ＥＤＴＡ溶液 (ｐＨ８．０、Naca Lai社、14362-24) および１００从１の２０ＯｍＭ ＴＣＥＰ溶液 (ｐＨ７．０) を加え、３７℃で１２０分間保温し、環化反応を行った。その後、翻訳混合物に対して、２６０μｌの２５０ｍＭ ＣｙｓＣｙｓ溶液および４０００从１の４００ｍＭ ＴＣＥＰ溶液 (ｐＨ７．０) を加え、４０℃で５分間保温した。続けて、１６００μｌの１Ｍ ＶＡ-０４４ (Wako社、CAS No. 27776-21 -2) を加えて、４０℃で１時間脱硫反応後、RNeasy mini kit (Qiagen社) により精製し、１ｍｌのペプチド—mRNA複合体溶液を調製した。この溶液に、３μＭ プライマー (配列番号ＤＯＬ—３)、M-MLV reverse transcr iptase react ion buffer (Promega 社、M368B)、０．５ｍＭ ｄＧＴＰ，０．５ｍＭ ｄＡＴＰ，０．５ｍＭ ｄＣＴＰ，０．５ｍＭ ｄＴＴＰ、８Ｕ/μｌ M-MLV Reverse transcr iptase (H-) (Promega社、M368B) を加えNuc lease free water で２ｍｌにメスアップし、４２℃、１時間保温し、逆転写反応を行つた。逆転写溶液に対してプロツキング剤Super BLock T20 (Pierce 社、3751 6) を等量加え、４ｍｌのペプチド—mRNA複合体溶液とした。

[1721] 上記の溶液に対して、ビオチン化標的タンパク質を２００ｎＭとなるように加え、４℃、３０分間回転混和を行った。その後、Dynabeads M-270 st rep

taVidin (invitrogen 社、653-05) を加え、4℃、5分間回転混和を行った。上清を取り除き、IxTBST (Naca Lai社)で2度洗浄した。DNAポリメラーゼを含まず、0.5μM プライマー (配列番号DOL—4)および0.5μ,M プライマー (配列番号DOL—5)を含むPCR溶液をDynabeadsに加え、95℃で10分間加熱溶出し、上清を回収した。上清に対してDNAポリメラーゼ Ex taq (Takara 社、RR001A-24) を加え、PCRによってcDNAを増幅後、QIAqu ick PCR pur ificat ion kit (Qiagen 社)によりDNAを精製した。

[1722] 配列番号DOL—3 (配列番号:160)

TTTGTCCCCGCCGCCCTAAGAGCCAGAGCCAGAGCCGCT

[1723] 配列番号DOL—4 (配列番号:161)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGA

[1724] 配列番号DOL_5 (配列番号:162)

TTTGTCCCCGCCGCCcta

[1725] 'ラウンド2のパニングを行うための転写、ライゲーション、翻訳、環化、脱硫、逆転写反応→バニング操作→PCR

ラウンド1で増幅したcDNAから、RiboMAX Express Large Scale RNA Product ion System (Promega 社, P1320)を用いてmRNAを合成し、RNeasy MinELute kit (Qiagen 社)により精製した。次にT4 RNA Ligase(NEB, M0204 いを利用してmRNAとピューロマイシンリンカーを連結し、RNeasy MinELute kit (Qiagen 社)により精製した。1μM mRNA—ピューロマイシンリンカーライゲーション産物を含む前述の100μl翻訳液を調製し、37℃で60分間保温後、室温で12分間放置した。この翻訳混合物に対して環化反応のために、10从1の200mM EDTA溶液 (pH8.0、Naca Lai社、14362-24) および5μlの200mM TCEP溶液 (pH7.0)を加え、37℃で120分間保温した。翻訳液Sに0.5M KOHを加えて、pH10に調整後、42℃で30分間保温した。その後、0.5M HClを加えて、pH7に調整した。その後、それぞれの翻訳混合物に対

して、１３从１の２５０ｍＭ　Ｃｙｓ溶液および２００从Ｉの４００ｍＭＴＣＥＰ溶液（ｐＨ７．０）を加え、４０℃で１分間保温した。続けて、８Ｏμｌの１Ｍ　ＶＡ－０４４ (Wako社、CAS No. 27776-21 -2) を加えて、４０℃で１時間脱硫反応後、RNeasy MinELute kit（Qiagen社）により精製し、１００μｌのペプチド—mRNA複合体溶液を調製した。この溶液に、３μＭ　プライマー（配列番号ＤＯＬ＿３）、M-MLV reverse transcr iptase react ion buffer (Promega社、M368B)、０．５ｍＭ　ｄＧＴＰ，０．５ｍＭ　ｄＡＴＰ，０．５ｍＭ　ｄＣＴＰ，０．５ｍＭ　ｄＴＴＰ、８Ｕ／μｌ　M-MLV Reverse transcr iptase（H-）(Promega社、M368B)を加え Nuc Lease free water でメスアップし、２００μｌ溶液で４２℃、１５分間保温し、逆転写反応を行った。逆転写溶液に対してプロッキング剤SuperB Lock T20（Pierce社、3751 6）を等量加え、４００μｌのペプチド—mRNA複合体溶液とした。

[1726] 上記の溶液に対して、Dynabeads M-270 st reptav idinを加え、４℃、５分間回転混和を行い、上清を回収した。上清に対してビオチン化標的タンパク質を２００ｎＭとなるように加え、４℃、３０分間回転混和を行った。その後、Dynabeads M-270 st reptav idinを加え、４℃、５分間回転混和し、上清を取り除き、ＩｘＴＢＳＴ (Naca Lai社）で３度洗浄した。ＤＮＡポリメラーゼを含まず、０．５μＭ　プライマー (配列番号ＤＯＬ—４）および０．５μＭ　プライマー (配列番号ＤＯＬ—５）を含むＰＣＲ溶液をDynabeads に加え、９５℃で１０分間加熱溶出し、上清を回収した。上清に対してＤＮＡポリメラーゼ Extaq (Takara社、RR001A-24) を加え、ＰＣＲによってｃＤＮＡを増幅後、QIAqu ick PCR pur if icat ion kit（Qiagen社）によりＤＮＡを精製した。

[1727] ・ラウンド3のバニングを行うための転写、_ライゲーションヨン、_翻訳、_環化、_脱硫、_逆転写反応→バニング操作→PCR

ラウンド2で増幅したｃＤＮＡから、RiboMAX Express Large Sca le RNA Product ion System (Promega社，Ｐ１３２０）を用いてｍＲＮＡを合成し、RNeasy MinELute kit（Qiagen社）により精製した。次にT4 RNA Ligase(NEB, M

0204 いを利用してｍＲＮＡとピューロマイシンリンカーを連結し、RNeasy MinELute kit (Qiagen 社）により精製した。１μＭ ｍＲＮＡ―ピューロマイシンリンカーライゲーションヨン産物を含む前述の１０fμｌ翻訳液を調製し、３７℃で６０分間保温後、室温で１２分間放置した。この翻訳混合物に対して環化反応のために、１从１の２００ｍＭ ＥＤＴＡ溶液 (ｐＨ８．Ｏ、Naca Lai社、14362-24) および０．５从１の２００ｍＭ ＴＣＥＰ溶液 (ｐＨ７．０）を加え、３７℃で１２０分間保温した。翻訳液Ｓに０．５Ｍ ＫＯＨを加えて、ｐＨ１０に調整後、４２℃で３０分間保温した。その後、０．５Ｍ ＨＣｌを加えて、ｐＨ７に調整した。その後、それぞれの翻訳混合物に対して、１．３从１の２５０ｍＭ Ｃｙｓ溶液および２０μｌの４００ｍＭ ＴＣＥＰ溶液 (ｐＨ７．０）を加え、４０℃で１分間保温した。続けて、８μｌの１Ｍ ＶＡ－０４４ (Wako 社、CAS No. 27776-21 -2) を加えて、４０℃で１時間脱硫反応後、RNeasy MinELute kit (Qiagen 社）により精製し、１０μｌのペプチド―mRNA複合体溶液を調製した。この溶液に、３μＭ プライマー（配列番号ＤＯＬ＿３）、M-MLV reverse transcriptase reaction buffer (Promega 社、M368B) 、０．５ｍＭ ｄＧＴＰ，０．５ｍＭ ｄＡＴＰ，０．５ｍＭ ｄＣＴＰ，０．５ｍＭ ｄＴＴＰ、８Ｕ／μｌ M-MLV Reverse transcriptase (H-) (Promega 社、M368B) をカエNuc Lease free water で２００μｌにメスアップし、４２℃、１５分間保温し、逆転写反応を行つた。逆転写溶液に対してブロッキング剤SuperB Lock T20 (Pierce 社、3751 6) を等量加え、４０μｌのペプチド―mRNA複合体溶液とした。

[1728] 上記の溶液１０μｌに対して、Dynabeads M-270 streptavidinを加え、4℃、5分間回転混和を行い、上清を回収した。この操作を計3回繰り返した上清に対してビオチン化標的タンパク質を２００ｎＭとなるように加え、4℃、３０分間回転混和を行った。その後、Dynabeads M-270 streptavidinを加え、4℃、5分間回転混和を行った。上清を取り除き、ｌｘＴＢＳＴ (NacaLai社）で3度洗浄した。ＤＮＡポリメラーゼを含まず、０．５μＭ プライマー (配列番号ＤＯＬ―４）および０．５μＭ プライマー (配列番号D

０Ｌ－５）を含むＰＣＲ溶液をDynabeads に加え、９５℃で１０分間加熱溶出し、上清を回収した。上清に対してＤＮＡポリメラーゼ Ex taq (Takara 社、RR001A-24）を加え、ＰＣＲによってｃＤＮＡを増幅後、QIAquick PCR purification kit (Qiagen社）によりＤＮＡを精製した。

ラウンド4 －6においても、ラウンド3 と同じ操作を繰り返すことで標的タンパク質特異的な結合を示すｃＤＮＡの濃縮を行った。濃縮されたＤＮＡプールの塩基配列解析を行い、濃縮されたペプチド配列を同定した。

[1729] 計算機によるシミュレーションを活用した仮想ライブラリによるCL0GP値、刚eアミノ酸数、分子量の平均値および分布の推測（図６６、６７）

今回設計されたディスプレイライブラリーのドラックライクネスの程度を評価した。すなわち、選択されたアミノ酸が均等にランダムにディスプレイされた場合のCLogP値、NMeアミノ酸が１つのペプチドに含まれる数の分布を計算によりシミュレーションした。

[1730] 現実のディスプレイライブラリのサイズは１０12種類以上であり、コンピュータ上の仮想ライブラリとしても網羅的に発生することは困難である。したがってディスプレイライブラリで翻訳合成されるペプチドをランダムに5万ペプチド発生させ、そのCL0GP、NMe数、アミノ酸数、分子量の分布および平均値を近似的に推測した。

[1731] ランダムなペプチドの構造はプログラムを作成して、SMILES形式で出力させた。その際、C末端の構造はピペリジンとした。出力されたペプチドの構造ファイルをCLOGP(daylight 社)およびPipelinePilot (accelrys 社)を用い、各パラメータの分布と平均値を求めた。なおCL0GP値の計算においては分子サイズの制限により、約6.5%のペプチドが計算不能となりそれらを除外した値（全体の93.5% が有効）となっている。

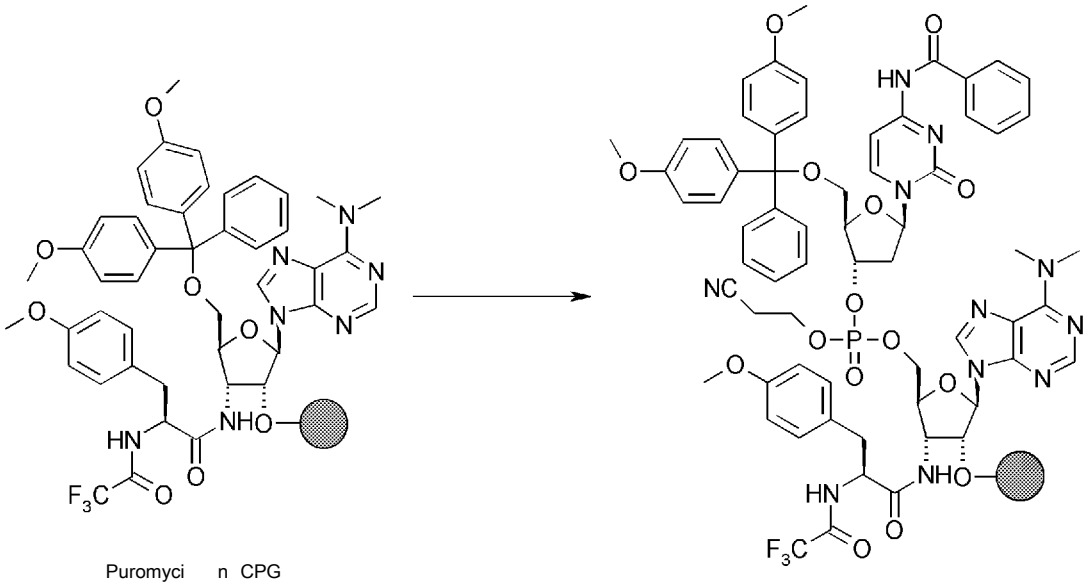
[1732] [実施例２６] ELectrochemiluminescence (ECL) を利用した翻訳産物のスクリーニング

バニングにて濃縮されたクローンの一部について、各クローンの翻訳産物ペプチドを用いたイムノアツセイを実施した。その際、低濃度のペプチド産

物を高感度に検出するため、電気化学発光法（ECIJ 測定装置（SECTOR Image r 2400）を利用した。その結果、IL-6R 、TNFα、TNFR1に対する結合ペプチドが同定された。

[1733] 1. Fl(urea)-dC-Puromycin(化合物SP806)の合成

dC-Puromycin CPG (化合物SP802)の合成



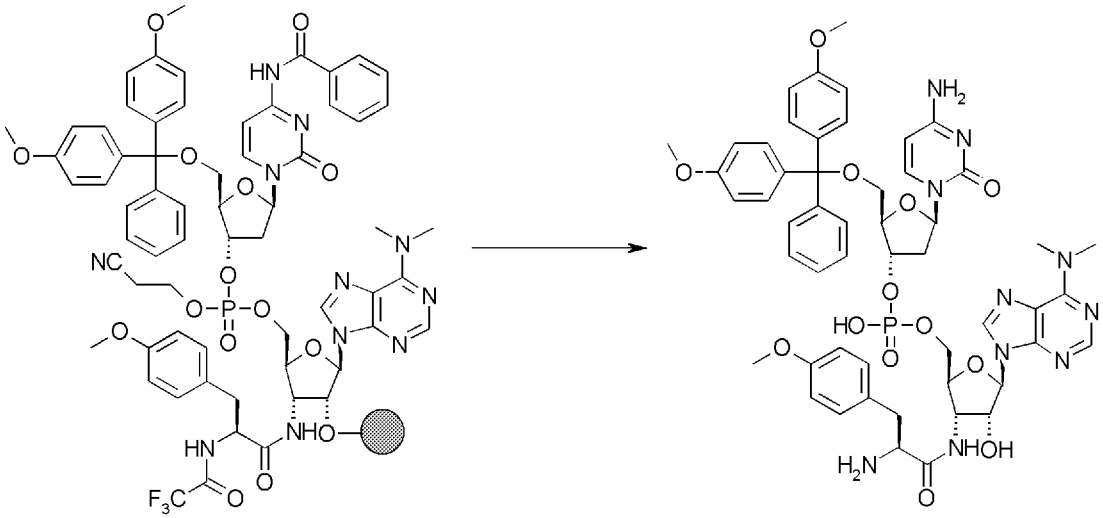
[1734] Puromycin CPG（化合物SP801）（Glen Research社製、44μmol/g、450mg）をDeblocking Mix（Glen Research社製、3%トリクロロ酢酸/DCM）で処理（3ml×4）し、アセトニトリルで洗浄（3ml×4）した。

得られたCPG担体にdC—CE Phosphoramidite（Glen Research社製、250mg、0.300mmol）のアセトニトリル溶液（3.0ml）とActivator（Glen Research社製、5—Benzylthio—1H—tetrazole in Acetonitrile、3ml）を加えて室温で10分間振とうさせた後、反応液を除去し、CPG担体をアセトニトリルで洗浄（3ml×4）し、乾燥させた。

次いでOxidizing Solution（Glen Resear

ｃｈ社製、０．０２Ｍ Ｉｏｄｉｎｅ ｉｎ ＴＨＦ/ Ｐｙｒｉｄｉｎｅ/ Ｗａｔｅｒ、３ｍｌ）を加えて室温で振とうさせた後、反応液を除去した。担体をアセトニトリルで洗浄 (3ｍＩＸ４）後、乾燥させて標題のｄＣ＿Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ ＣＰＧ（化合物SP８０２）（４５０ｍｇ）を得た。

少量のｄＣ- Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ ＣＰＧに２５％アンモニア水溶液を加えて６０℃で１時間半攪拌して担体から切り出し、反応液をＬＣ/ ＭＳで分析することで、反応の進行、およびｄＣ＿Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ（化合物ＳＰ８０３）の生成を確認した。



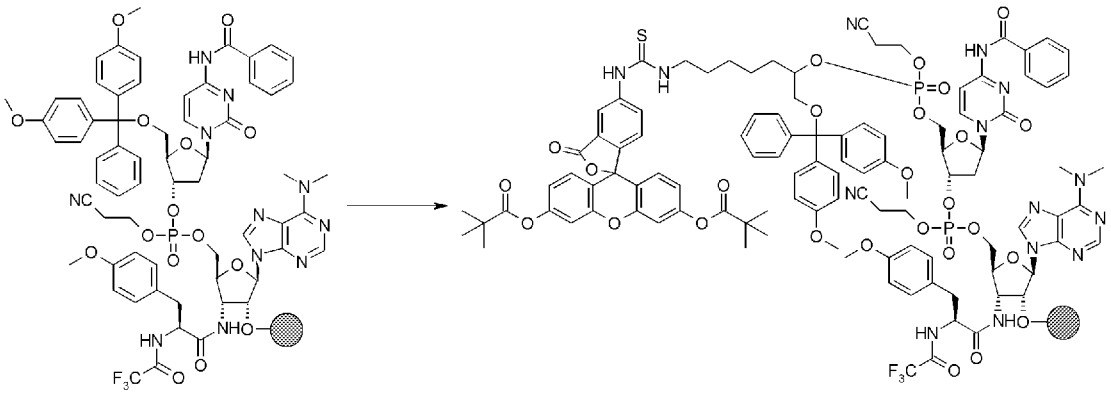
dC-Puromyci n CPG
SP802

dC-Puromyci n
SP803

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ ｚ ＝１０６１．４（Ｍ- Ｈ）-

保持時間 :０．５３分 (分析条件 ＳＱＤＡＡ５０）

[1735] Ｆ」＿ｄＣ—Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ＿ＣＰＧ（化合物ＳＰ８０４）の合成



dC-Puromycin CPG
SP802

F dC-Puromycin CPG
SP804

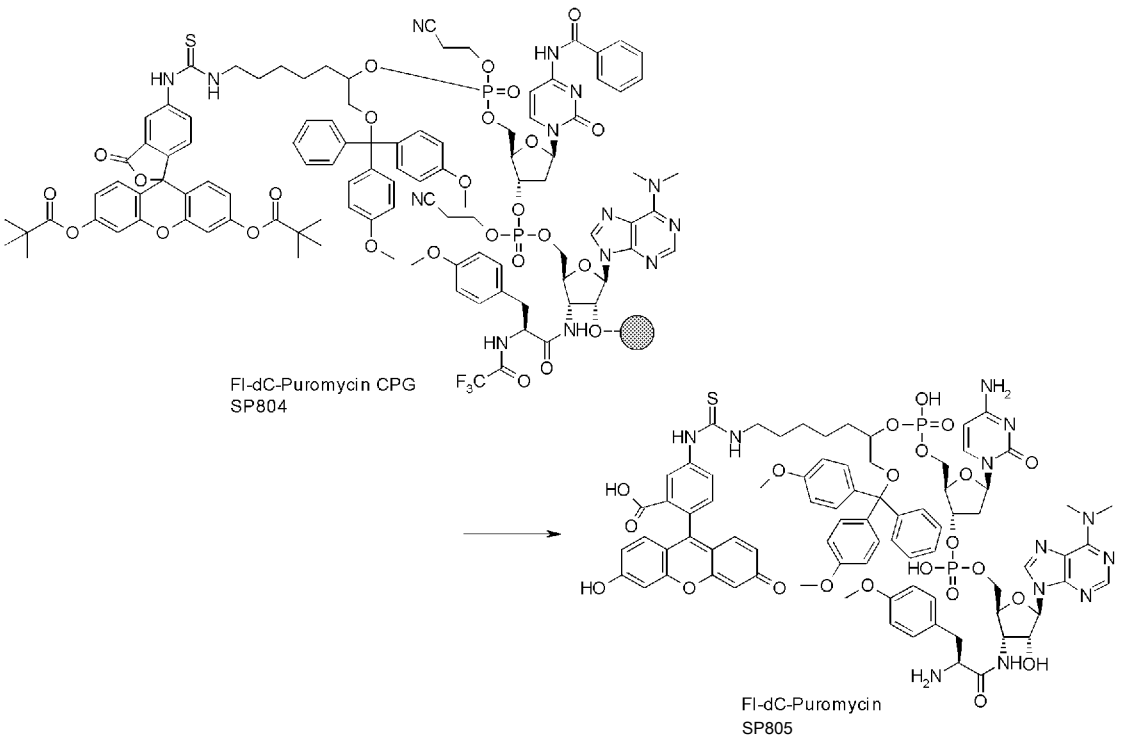
[1736] ｄＣ- Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ ＣＰＧ (化合物SP８０２) (４４μｍｏｌ/ｇ、４５０ｍｇ) をＤｅｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｍｉｘ (Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、３％ トリクロロ酢酸/ ＤＣＭ) で処理した後、アセトニトリルで洗浄した。

得られたＣＰＧ担体にＦｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ Ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅ (Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、１２５ｍｇ、０．１０４ｍｍｏｌ) のアセトニトリル溶液 (1．０ｍｌ) とＡｃｔｉｖａｔｏｒ (Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、５―Ｂｅｎｚｙｌｔｈｉｏ－１Ｈ―ｔｅｔｒａｚｏｌｅ ｉｎ Ａｃｅｔｏｎｉｔｒｉｌｅ、１．０ｍｌ) を加えて室温で３０分間振とうさせた後、反応液を除去し、ＣＰＧ担体をアセトニトリルで洗浄し、乾燥させた。

次いでＯｘｉｄｉｚｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ (Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、０．０２Ｍ Ｉｏｄｉｎｅ ｉｎ ＴＨＦ/ Ｐｙｒｉｄｉｎｅ/ Ｗａｔｅｒ、３ｍｌ) を加えて室温で振とうさせた後、反応液を除去した。ＣＰＧ担体をアセトニトリルで洗浄後、乾燥させて標題のＦＩ＿ｄＣ＿Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ ＣＰＧ (４５０ｍｇ) を得た。

少量のＦＩ- ｄＣ- Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ ＣＰＧに２５％アンモニア水溶液を加えて６０℃で１時間半攪拌して担体から切り出し、反応液をＬＣ/ ＭＳで分析することで、反応の進行、およびＦＩ- ｄＣ- Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ (化合物SP８０５) の生成を確認した。

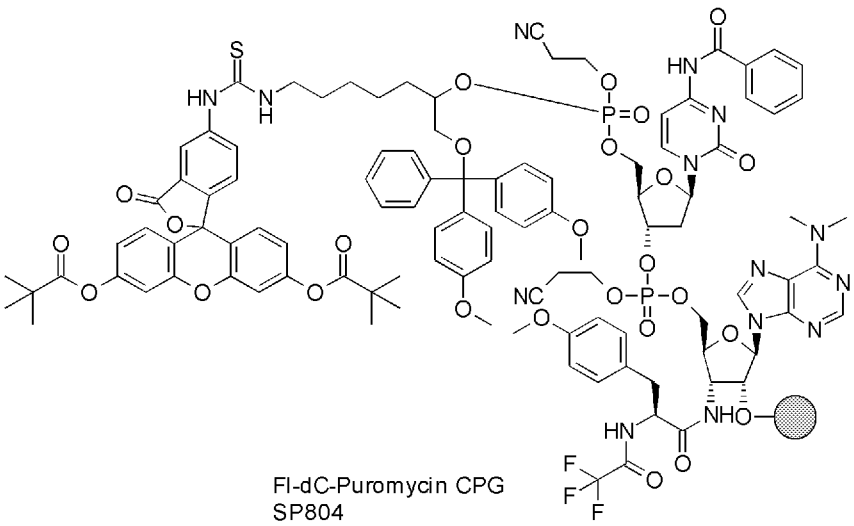
[1737]



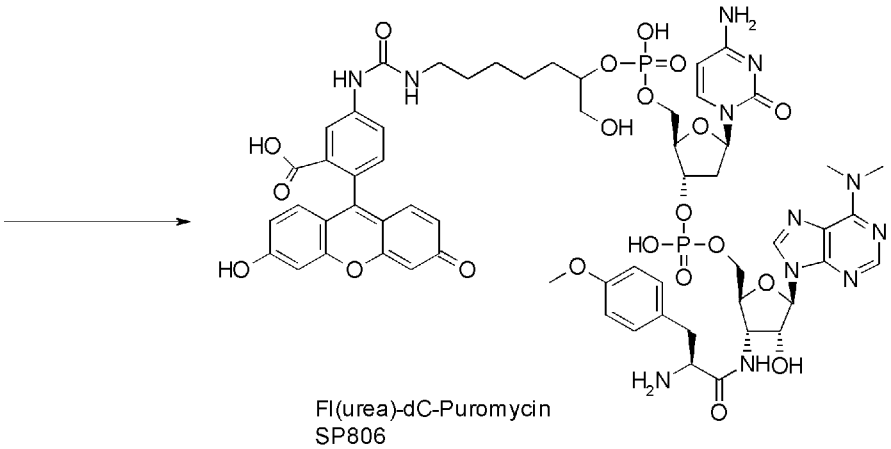
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）m/ｚ＝１６５９．２（M-Ｈ）-

保持時間：０．９４分　（分析条件　ＳＱＤＡＡ０５）

[1738] 5-（3-（6-（（（（（（２Ｒ．３Ｓ．５Ｒ）-５-（４―アミノ_２_ォキソピリミジン_１_（２Ｈ）_―イル）_３_（（（（（２Ｓ．３Ｓ．４Ｒ，５Ｒ）_―3―（（Ｓ）_―2―アミノ－3―（4―メトキシフエニル）プロパンアミド）－５―（６―（ジメチルアミノ）－９Ｈ―プリン－９―イル）_４―ヒドロキシテトラヒドロフラン_２_イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）テトラヒドロフラン_２_イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）_７―ヒドロキシヘプチル）ウレイド）_２-（６―ヒドロキシ－３_オキソ_３Ｈ―キサンテン－９_イル）安息香酸（化合物SP８０６）（ＦＩ（ｕｒｅａ）-ｄＣ-Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ）の合成



Fl-dC-Puromycin CPG
SP804



Fl(urea)-dC-Puromycin
SP806

[1739] Fl-dC-Puromycin CPG（化合物SP804）（44μmolZg、105mg）にOxidizing Solution（Glen Research社製、0.02M Iodine in THF/Pyridine/Water、3ml）を加えて室温で16時間振とうさせた。反応液を除去した後、アセトニトリルで洗浄し、CPG担体を乾燥させた。

その後、CPG担体をDeblocking Mix（Glen Research社製、3%トリクロロ酢酸/DCM）で処理（3mlX4）した後、ジクロロメタンで洗浄し、乾燥させた。

次いでCPG担体に25%アンモニア水溶液（1.0ml）を加えて60℃で1時間半攪拌した。放冷後、反応液をカラムクロマトグラフィ（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）で精製し、標題化合物（

化合物SP806）（2．1mg、33．8%）を黄色固体として得た。

LCMS（ESI）m/z＝1341．8（M-H）-

保持時間：0．44分　(分析条件　SQDFA05)

[1740] 2．濃縮配列の解析

配列解析の結果をもとに、配列番号DME-2からDME—11，DME-13からDME—15に示す鋳型DNAを合成した。これらをECL用転写翻訳液に加えて翻訳によるペプチド合成を行った。ECL用転写翻訳液の組成は下記の通りである。5%（v／v）T7 RNA polymerase RiboMAX Enzyme Mix (Promega社，P1300），2mM GTP，2mM ATP，1mM CTP，1mM UTP，20mM クレアチンリン酸，50mM HEPES—KOH pH7．6，100mM 酢酸カリウム，15mM 酢酸マグネシウム，2mM スペルミジン，1mM ジチオスレイトール，0．5mg/ml E．coli MRE600（RNaseネガティブ）由来tRNA（Roche社），3μM 転写tRNA Ala1B（配列番号MTL-13）、3μM 転写tRNA Tyr1（配列番号MTL_14）、4μg/ml クレアチンキナーゼ，3μg／ml ミオキナーゼ，2unit/ml 無機ピロフォスファターゼ，1．1μg／ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ，0．26μM EF-G，0．24μM RF2，0．17μ,M RF3，0．5μ,M RRF，2．7μM IF1，0．4μM IF2，1．5μ,M IF3，53μM EF-Tu，112μM EF-Ts，1．2μM リボソーム，2．73μM AlaRS，0．09μM GlyRS，0．4μ,M IleRS，0．68μM PheRS，0．16μ,M ProRS，0．04μM SerRS，0．09μM ThrRS，0．03μ,M TrpRS，0．22μ,M TyrRS，0．02μM ValRS，250μM グリシン、250μM イソロイシン、250从M プロリン、250μM スレオニン、250μM トリプトファン、250μM バリン、100μM セリン、5mM N—メチルアラニン、5mM N_メチルフエニルアラニン、2mM D—チロシン，さらにS用ECL

転写翻訳液には、翻訳液S用アミノアシル化tRNA混合物および翻訳液S用Initiator アミノアシル化tRNAを、T用ECL転写翻訳液には0.02μM CysRS、250μMシスティン、および翻訳液T用アミノアシル化tRNA混合物を加えて調製した。

[1741] このECL転写翻訳液に、0.05μM 鋳型DNA，12.5μM FIPu（urea）（化合物SP806）を加え、37℃で1時間、室温で12分間放置することで、C末端がFIPu（urea）にてラベルされたペプチドを合成した。ネガティブコントロールとして用いるサンプルには、鋳型DNAの代わりにNuclease Free waterを添加した。この翻訳混合物5μLに対して、0.5从1の200mM EDTA溶液（pH8.0、Naca Lai社、14362-24）および0.5从1の100mM TCEP溶液（pH6.6）を加え、37℃で120分間保温し、環化反応を行った。環化産物に11μLの脱硫バッファー（15mMシスティン，36mM TCEP）を加え、42℃で1分間加温した後、1M VA-044（Wako社、CAS No.27776-21-2）を4μL加え42℃で1時間静置した。未反応のTCEPを失活させるため、125mMシスティンを3μL加え、さらに42℃で1時間静置した後、1从しの0.5 M Tris、6μL SuperB Lock T20（Pierce社、37516）を加えてECLアツセィ用ペプチド溶液とした。

[1742] 上記のECLアツセィ用ペプチド溶液を用いて、ィムノアツセィを実施した。MSD Streptavidin MULTI-ARRAY 384-well plate（Meso Scale Discovery, L25SB-1）に1ゥエルあたり10μLの500nMビオチン化標的タンパク質を添加し、500rpmで振とうしながら室温で1時間反応させることにより、標的タンパク質の固定化を行った。1ゥエルあたり50μLの2%スキムミルクPBSを添加し、室温で2時間静置することで、ブロッキングを行った。反応液を除去し、0.05%のTween20をふくむPBS（PBST）にて3回洗浄を行った後、10μLのECLアツセィ用ペプチド溶液を添加し、室温にて50分間、500rpmにて振とうした。反応液の除去、PBSTでの洗浄を3回実施した後、2%スキムミルクPBSにて0.5μg／mLに希釈し

たIgG Fraction Monoclonal Mouse Anti—Fluorescein (Jackson Immno Research, 200-002-037) 10μLを添加し、500rpmで振とうしながら室温で50分間反応させた。反応液の除去、PBSTでの洗浄を3回実施した後、2%スキムミルクPBSにて1μg/mLに希釈したSULFO-TAG Anti—Mouse Antibody (Meso Scale Discovery, R32AC-5) 10从1を添加し、500rpmで振とうしながら室温で50分間反応させた。反応液の除去、PBSTでの3回洗浄の後、35μLの2x Read Buffer T (Meso Scale Discovery, R92TC-3)を添加し、SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery)にて測定した。

各サンプルの測定値を表24に示した。

[17743] [表 24]

ECLによるスクリーニング結果

鋳型DNA配列番号	ECL転写翻訳液	標的タンパク質	ECL signal
DME-2		IL-6R	307204
DME-3		IL-6R	69961
DME-4		TNFR1	32050
DME-5		TNFR1	3762
DME-6		TNFR1	3613
DME-7		TNFa	8324
DME-8		TNFa	73257
DME-9	用	TNFa	264265
DME-10	用	TNFa	50669
DME-11	用	TNFa	149328
DME-13	用	IL-6R	537113
DME-14		IL-6R	45610
DME-15		IL-6R	538876
Negative control		TNFa	232
Negative control		TNFa	238
Negative control		TNFR1	293
Negative control		TNFR1	330
Negative control	用	IL-6R	177
Negative control		IL-6R	197

[1744] [巳○1鋳型D—六配列]

配列番号ＤＭＥ―２（配列番号：１６４）

(IL-6R binder) ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCCGATTATTTTTATGCC

GAGGTACGTTCGTAGTACTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1745] 配列番号ＤＭＥ―３（配列番号：１６５）

(IL-6R binder) ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCCGATTATTTGGAGGAT

GCCGAGGTACCGTGTTTACAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1746] 配列番号ＤＭＥ―４（配列番号：１６６）

(TNFR1 binder) ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCTACATTTGGATGAGTAT

GAGGGTTTTTCGTACTAGGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1747] 配列番号ＤＭＥ―５（配列番号：１６７）

(TNFR1 binder) ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCCGTTGATTATTGTTAG

TCGGCTTCTTCGTGAAACTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1748] 配列番号ＤＭＥ―６（配列番号：１６８）

(TNFR1 binder) ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCCGTTGGTTATTACTGT

TCGGCTTAGTCGTGCTAGGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1749] 配列番号ＤＭＥ―７（配列番号：１６９）

ＴＮＦα ｂｉｎｄｅｒ ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTCTTATTGAATGGTGGCT

ATACAGGCGTCCGTTGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1750] 配列番号ＤＭＥ－８（配列番号：１７０）

ＴＮＦα ｂｉｎｄｅｒ ＤＮＡ配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCTATGGTGGGTTTTGGG

TCCGTAGAGTCGTCGGATGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1751] 配列番号DME—9（配列番号：171）

TNFα binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCGAAATTCCGGTTTGGTG

GCTAATGGTTCGTTGGGAAAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1752] 配列番号DME—10（配列番号：172）

TNFα binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCACTATTCCGTACTGGTG

GCTAATGGTTCGTTGGGAAAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1753] 配列番号DME—11（配列番号：173）

TNFα binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCACTTGGATTTTTCTTTG

GCAGCTACTTCGTGTTACTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1754] 配列番号DME_13（配列番号：175）

IL-6R binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCCCGGTTATTTTTATGCC

GAGGGTTATGCGTCCGTTGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1755] 配列番号DME_14（配列番号：176）

IL-6R binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGCATTATTGAATGGCCGAG

GATGTACCAGCGTCCGAGGAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1756] 配列番号DME—15（配列番号：177）

IL-6R binder DNA配列

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATTGTTTGGAGGTGCCCGAG

GTACTGCCGTGAAGCTAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCT

[1757] [ECLペプチド配列]

[1758] 以下に示すペプチドは、いずれもN末端のアミノ基と11残基目のアスパラギン酸の側鎖のカルボン酸との間でペプチド結合が形成された環状ペプチドである。略号は、通常の文献や渡辺化学の商品カタログ記載に沿っているが

、その詳細を以下に示す。

[1759] ＭｅＡｌａ（４－Ｔｈｚ）：（Ｓ）－２－（メチルアミノ）＿３＿（チアゾール＿４＿イル）プロパン酸

ＭｅＰｈｅ（３—Ｃｌ）：（Ｓ）—３—（３—クロロフエニル）－２—（メチルアミノ）プロパン酸

Ｈｙｐ（Ｅｔ）：（２Ｓ，４Ｒ）—４—エトキシピロリジン－２—カルボン酸

γＥｔＡｂｕ：４—（エチルアミノ）ブタン酸

ｎＰｒＧｌｙ：２－（プロピルアミノ）酢酸

ＭｅＰｈｅ：（Ｓ）—２—（メチルアミノ）－３—フエニルプロパン酸

ＭｅＡｌａ：（Ｓ）—２—（メチルアミノ）プロパン酸

ＭｅＧｌｙ：２－（メチルアミノ）酢酸

Ｐｒｏ：（Ｓ）—ピロリジン＿２＿カルボン酸

Ｔｈｒ：（２Ｓ，３Ｒ）—２—アミノ－３—ヒドロキシブタン酸

Ｐｈｇ：（Ｓ）＿２—アミノ－２＿フエニル酢酸

Ｉｌｅ：（２Ｓ，３Ｓ）—２—アミノ－３—メチルペンタン酸

Ｖａｌ：（Ｓ）—２—アミノ－３—メチルブタン酸

Ａｓｐ：（Ｓ）—２—アミノコハク酸

Ｔｒｐ：（３）＿２＿アミノ＿３＿（１Ｈ＿インドール－３＿イル）プロパン酸

ＤＴｙｒ：（Ｒ）—２—アミノ－３—（４—ヒドロキシフエニル）プロパン酸

Ｐｈｅ（４—ＣＦ３）：（Ｓ）—２—アミノ－３—（４—（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸

Ｓｅｒ：（Ｓ）—２—アミノ－３—ヒドロキシプロパン酸

Ｍｅｔ（０２）：（Ｓ）—２—アミノ－４—（メチルスルホニル）ブタン酸

βＡｌａ：３—アミノプロパン酸

Ａｌａ：（Ｓ）＿２—アミノプロパン酸

G ı y : 2 — ﾄ ミ ノ ¾酸

M © S © J : （S） — 3 — ヒ ド ロ キ シ — 2 — （ズ チ ル ト ミ ノ） ｺﾟロﾊﾟﾝ 餬

F ı ᵖu （u ｢ Θ a） : 化 骨 吻 S p 8 0 6

凵ﾝ 60] 配列番号 p ε - 2

(in-gy b!nd ɐ) ペプチド鎖配列

λ la -Pr。-ｉle -ｉle -MePhe -Met（O z） — ﾉ川。 —vp 帥(3-｡1)—eTyr ¯Val

¯Asp ¯Ser−ﾄhr ¯ S 6r ¯G1ｲ — S 6r ¯G1ｲ — S 6r ¯ F ı p u （u

｢ Θ a）

[1.Z6T] 配列番号 p ε - 3

(in-gy b!nd ɐ) ペプチド鎖配列

a ie ¯ᵈr o ¯ i i6¯ ı i6 —ｲ ¯dj ᵖ帥(3-Cl)—Met（O 2） —Pro—MePhe(3-Cl)

—eT ﾊﾉ—Asp ¯ヽ ロ—eT ﾊﾉ — S 6r −G1y − S 6r −G1y — S 6r—G1y— s ｾ − F ı p

u （u r θ a）

[1.Z2] 鍵配列番号 p ε — ｾ

(TNFR1 b!nd ɐ) ペプチド鎖配列

A ie −D汗r ¯ ı le—Trp—Met（O 2） —Ser—Met（O 2） —MeP 帥(3-Cl)—V

al—MePhe—Asp—Thr—MePhe(3-Cl)—Ser—Gly—Ser—Gly—Ser—Gly—S

6r— ｢ ı P u （u r θ a）

[1.Z6S] 配列番号 p 3 - 6

(TNFR1 b!nd ɐ) ペプチド鎖配列

A la -ᵖrO -iveG1y -ı ıe -ıle -Val -SeF -ivSeF -pp9g -pp9g -Asp -MeA ia(4ｲ-T

hz) ¯ｲhr — s 6r ¯G1ｲ — S 6r ¯G1ｲ — S 6r _ε ı p u （u r Θ a）

凵ﾝ6 ひ 配列番号 p ε — 6

(TN ｊfλ1 b!nd ɐ) ペプチド鎖配列

A ie ¯ᵈr o ¯M6G iy ¯Vai ¯ı l6 ¯Thr ¯Vai ¯M6s6r ¯ᵖh9 ¯Ser—Asp—MeAla—M

ᵉᵖ⁴e(3-C1) - SeF -G1y - SeF -G1y - SeF -G1y -S6r -F ı p u （u r Θ a

）

[1.Z66] 配列番号 p ε — ﾝ

α ペプチド 刂

p

6] 列番号 つ

α ペプチド 刂

Ala

1767 配列番号

α ペプチド 刂

Ala

eAla

1768 配列番号 つ 1

α ペプチド 刂

Ala

[1769] 配列番号 ＰＥ－１１

(TNFα ペプチド 刂

Ala Il -Gl

y

[1770] 配列番号 ＰＥ－１３

フチド配列

Ala

ly

1771 配列番号 １４

フチド配列

Ala-Ile-Ile

y y y

1772 配列番号 1

(ＩＬ- ６Ｒ ｂｉｎｄｅｒ)ペプチド配列

γ EtAbu-I Le-Va L-Trp-MePhe(3-C L)-Met (02)-Pro-MePhe(3-C L)-DTyr-Met (02)-Asp-MeALa(4-Thz)-MeALa-Ser-G Ly-Ser-G Ly-Ser-G Ly-Ser - ＦＩＰｕ（ｕｒｅａ）

[1773] 配列番号ＰＥ—２からＰＥ_１１、ＰＥ_１３からＰＥ_１５で示されたペプチドの特徴を以下に示す。

[1774] 共通配列であるＳｅｒ- Ｇｌｙ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ｓｅｒ- ＦＩＰｕ（ｕｒｅａ）を除いた配列は１３アミノ酸で構成されており、１１アミノ酸で環状ペプチド部位を構成し、２アミノ酸で直鎖部位を構成している。含まれるアミノ酸はα、βおよびァアミノ酸であり、アミノ酸側鎖はアルキル基、シクロアルキル基、エーテル基置換シクロアルキル基、水酸基（_ＯＨ）置換アルキル基、スルホン基（_SO_2_Ｒ）置換アルキル基、アリール基、アラルキル基、水酸基（_ＯＨ）置換アラルキル基、ハロゲン基置換アラルキル基、ヘテロアリール基で構成されており、これらのことはいずれもドラッグライクなペプチド化合物として好ましい範囲である。

[1775] 表２５に配列番号と、含まれるＮ—アルキルアミノ酸の数、共通領域であるＳｅｒ—Ｇｌｙ—Ｓｅｒ—Ｇｌｙ—Ｓｅｒ—Ｇｌｙ—Ｓｅｒ—ＦＩＰｕ（ｕｒｅａ）を除き、Ｃ末端をピペリジンアミドとした化合物のｃＩｏｇＰ値を示す。

[表25]

配列番号	N-アルキルアミノ酸の数	clogP 値
PE-2	4	7.2
PE-3	4	11.3
PE-4	3	6.5
PE-5	4	5.5
PE-6	5	6.5
PE-7	5	12.0*
PE-8	4	3.7
PE-9	3	9.1*
PE-10	2	7.8*
PE-11	1	9.9
PE-13	6	6.0
PE-14	5	9.4
PE-15	6	7.3

* は主鎖と側鎖、直鎖部位を個別にcLogP 値を求め、合計することで算出した。

[1776] ＰＥ—2からＰＥ—１１、ＰＥ１３からＰＥ—１５のうち、Ｎ—アルキルアミノ酸を２つ以上有し、かつ、cLogPが６以上を満たすペプチドは１０配列で、いずれか一方を満たすものが３配列あり、これら標的結合ペプチドはドラッグライクネスを有することが十分に期待される化合物群である。

[1777] 3．濃縮され、かつECLでの結さが確認された《プチド配列の化学さ成

ペプチド合成はスキームＪ-１に示すＦｍｏｃ固相ペプチド合成法に従って行った。実施例中のアミノ酸の略号は、通常文献や商品カタログ（渡辺化学）などに記載の略号を用いているが、詳細を以下に示す。

ＭｅＡｌａ（４-Ｔｈｚ）：（Ｓ）-２-（メチルアミノ）－３—（チアゾ—ル_４_イル）プロパン酸

ＭｅＰｈｅ（３—Ｃｌ）：（Ｓ）—３—（３—クロロフエニル）－２—（メチルアミノ）プロパン酸

Ｈｙｐ（Ｅｔ）：（２Ｓ，４Ｒ）—４—エトキシピロリジン－２—カルボン酸

γＥｔＡｂｕ：４—（エチルアミノ）ブタン酸

ｎＰｒＧｌｙ：２-（プロピルアミノ）酢酸

ＭｅＰｈｅ：（Ｓ）―２―（メチルァミノ）－３―フエニルプロパン酸

ＭｅＡｌａ：（Ｓ）―２―（メチルァミノ）プロパン酸

ＭｅＧｌｙ：２－（メチルァミノ）酢酸

Ｐｒｏ：（Ｓ）―ピロリジン_２_カルボン酸

Ｔｈｒ：（２Ｓ，３Ｒ）―２―ァミノ－３―ヒドロキシプタン酸

Ｐｈｇ：（Ｓ）_２―ァミノ－２_フエニル酢酸

Ｉｌｅ：（２Ｓ，３Ｓ）―２―ァミノ－３―メチルペンタン酸

Ｖａｌ：（Ｓ）―２―ァミノ－３―メチルブタン酸

Ａｓｐ：（Ｓ）―２―アミノコハク酸

Ｔｒｐ：（３）_２_ァミノ_３_（１Ｈ_ィンドール－３_ィル）プロパン酸

ＤＴｙｒ：（Ｒ）―２―ァミノ－３―（４―ヒドロキシフエニル）プロパン酸

Ｐｈｅ（４―ＣＦ３）：（Ｓ）―２―ァミノ－３―（４―（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン酸

Ｓｅｒ：（Ｓ）―２―ァミノ－３―ヒドロキシプロパン酸

Ｍｅｔ（０２）：（Ｓ）―２―ァミノ－４―（メチルスルホニル）ブタン酸

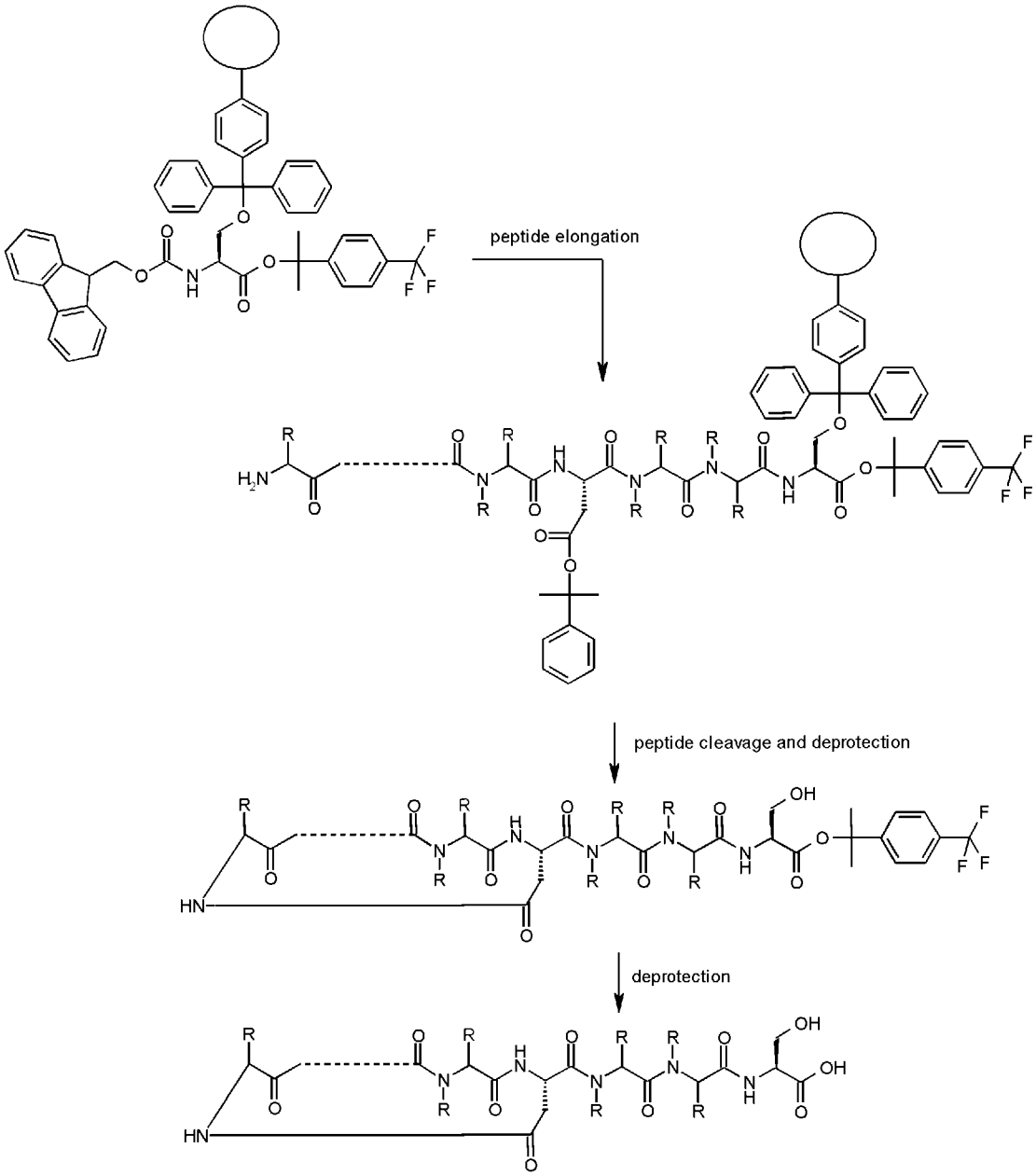
βＡｌａ：３―アミノプロパン酸

Ａｌａ：（Ｓ）_２―ァミノプロパン酸

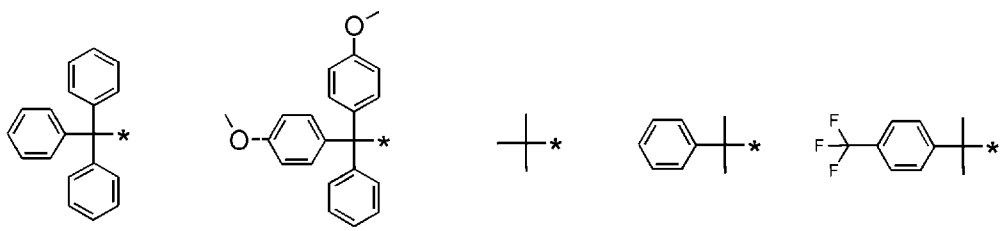
Ｇｌｙ：２―ァミノ酢酸

ＭｅＳｅｒ：（Ｓ）―３―ヒドロキシ－２―（メチルァミノ）プロパン酸

[1778] スキームＪ－１



[1779] 実施例中のＦｍｏｃアミノ酸の保護基の構造を下記に示す。なお、下記構造中の＊印にてそれぞれFmocアミノ酸の極性基と結合している。

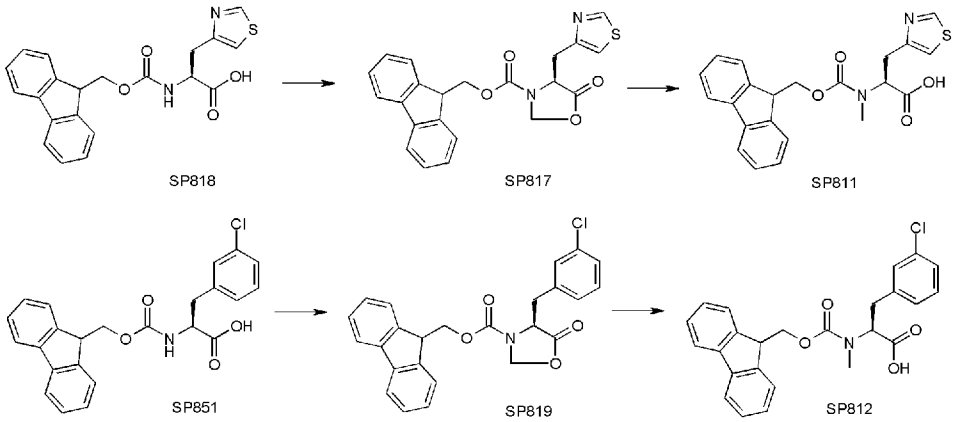


[1780] ペプチド伸長に用いるＦｍｏｃアミノ酸のうち、Ｆｍｏｃ-ＭｅＰｈｅ-０

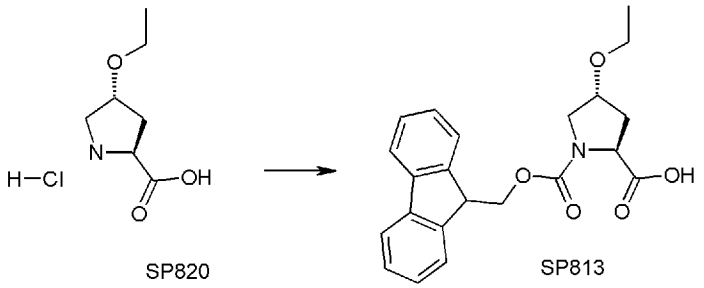
H、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-MeGly-0H、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Phg-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OPis)-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-DTyr(tBu)-OH、Fmoc-Phe(4-CF3)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Met(02)-OH、Fmoc-βAla-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OHは、渡辺化学工業、米国Chempep社、米国Chem-Impex社のいずれかから購入したものを用いた。

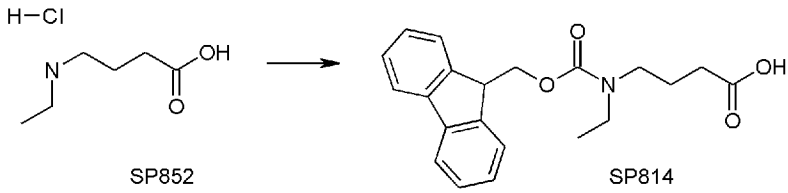
[1781] Fmoc—MeAla(4-Thz)-OH(化合物SP811)、Fmoc—MePhe(3—Cl)-OH(化合物SP812)はスキームK—1に示すスキームに従って合成した。Fmoc_Hyp(Et)-OH(化合物SP813)、Fmoc-γEtAbu-OH(化合物SP814)、Fmoc_nPrGly-OH(化合物SP815)はスキームK_2に示すスキームに従って合成した。Fmoc—MeSer(DMT)—OH(化合物SP816)はスキームK_3に示すスキームに従って合成した。

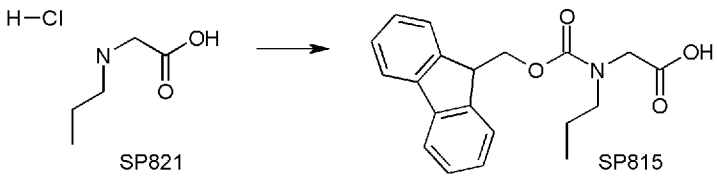
[1782] スキームK—1.



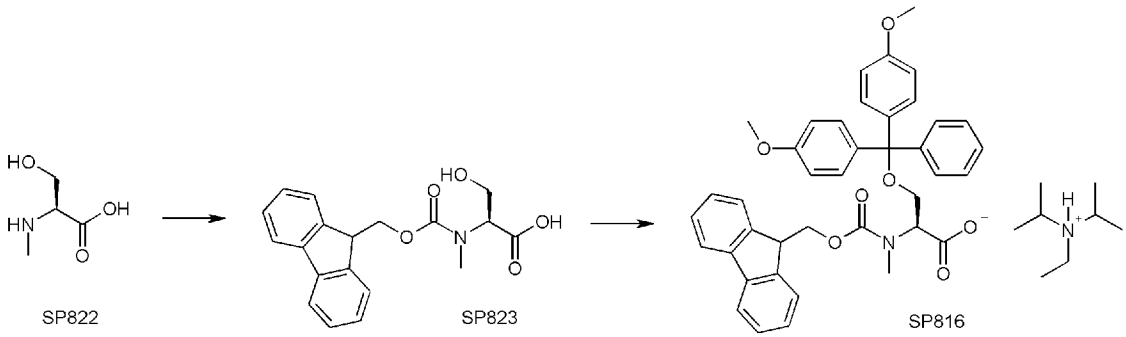
[1783] スキームK—2



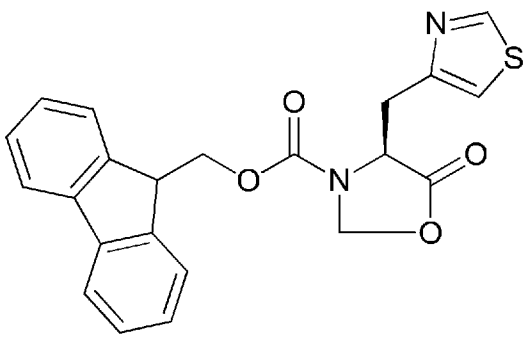




[1784] スキームＫ－３



[1785] ５-オキソ-４-（チアゾール-４-イルメチル）オキサゾリジン-３-カルボン酸（Ｓ）-（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メチル（化合物ＳＰ８１７）の合成

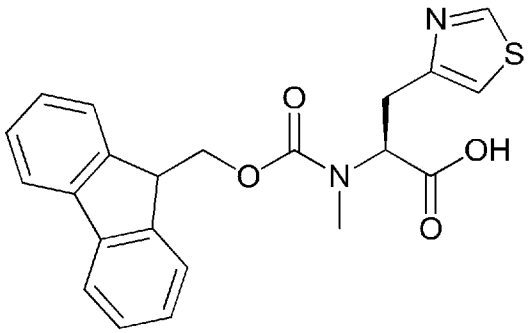


[1786] 窒素雰囲気下、（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）-３-（チアゾール-４-イル）プロパン酸（Ｆｍｏｃ-Ａ

Ｉａ（４-Ｔｈｚ）-ＯＨ、化合物ＳＰ８１８）（５０ｇ、１２７ｍｍｏｌ）、カンファースルホン酸（２．１０ｇ、９．０４ｍｍｏｌ）およびパラホルムアルデヒド（１１０ｇ、３．６６ｍｏｌ）をトルエン（２Ｌ）に溶解し、８０℃で２日間攪拌した。反応液をジエチルエーテルで希釈し、炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順に洗浄した。得られた有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥後に減圧濃縮し、５-オキソ-４-（チアゾール-４-イルメチル）オキサゾリジン-３-カルボン酸（Ｓ）-（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メチル（化合物ＳＰ８１７）（４０．０ｇ、９８％）を粗生成物として得た。

[1787] （Ｓ）-２-（（（（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）-３-（チアゾール-４-イル）プロパン酸（化合物ＳＰ８１１．Ｆｍｏｃ-ＭｅＡＩａ（４-Ｔｈｚ）-０Ｈ）の合成

[1788]

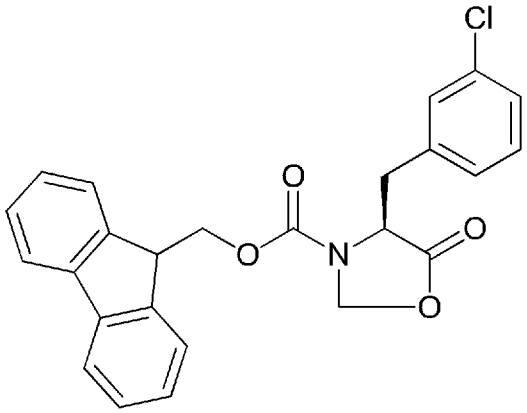


[1789] 窒素雰囲気下、５-オキソ-４-（チアゾール-４-イルメチル）オキサゾリジン-３-カルボン酸（Ｓ）-（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メチル（化合物ＳＰ８１７）（４０．０ｇ、９８．４ｍｍｏｌ）、トリフルオロ酢酸（２４５ｍＬ、３．１８ｍｏｌ）およびトリエチルシラン（１６０ｍＬ、１．００ｍｏｌ）をジクロロメタン（１Ｌ）に溶解し、３５℃で２日間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、ジエチルエーテルに溶解し、炭酸水素ナトリウム水溶液で有機層を洗浄した。水層を硫酸水素カリウム水溶液でｐＨ３に調製し、ジクロロメタンで抽出した。得られた全有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後に減圧濃縮し、（Ｓ）-２-（（（（９Ｈ-フルオレン-９-イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）-３-（チアゾール-４-イル）プロパン酸（化合物ＳＰ８１１，Ｆｍｏｃ-ＭｅＡＩａ（４-Ｔｈｚ）-ＯＨ）（３５ｇ、８７％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４０９ （Ｍ＋Ｈ）＋

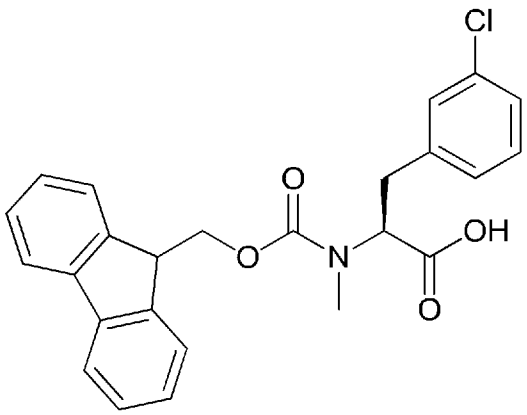
保持時間 :0．４４分 (分析条件ＳＱＤＡＡ５０)

[1790] 4-（3-クロロベンジル）-5-オキソオキサゾリジン-3-カルボン酸 (S)-9H-フルオレン-9-イル）メチル (化合物SP８１９) の合成



[1791] 化合物ＳＰ８１７の製造例と同様の条件で、 (S)-2-（（（（9H-フルオレン-9-イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）-3-(チアゾール-4-イル）プロパン酸 (化合物ＳＰ８１８）の代わりに、 (S)-2-（（（（9H-フルオレン-9-イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）-3-（3-クロロフェニル）プロパン酸 (化合物ＳＰ８５１）（６０．０ｇ、１４２ｍｍｏｌ）を用いることで、4-（3-クロロベンジル）-5-オキソオキサゾリジン-3-カルボン酸 (S)-（9H-フルオレン-9-イル）メチル (化合物ＳＰ８１９）（３９．０ｇ、６３％）を得た。

[1792] (S)-2-（（（（9H-フルオレン-9-イル）メトキシ）カルボニル）(メチル）アミノ）-3-（3-クロロフェニル）プロパン酸 (化合物SP８１２，Ｆｍｏｃ-ＭｅＰｈｅ（3-Ｃｌ）-ＯＨ）の合成

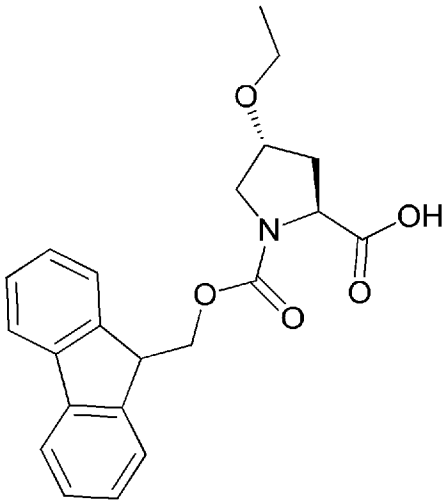


[1793] 化合物ＳＰ８１１の製造例と同様の条件で、5-オキソ-4-（チアゾール-4-ィルメチル）オキサゾリジン-3-カルボン酸 (S)-（9H-フルオレン-9-ィル）メチル (化合物ＳＰ８１７）の代わりに、4-（3-クロロベンジル）-5-オキソオキサゾリジン-3-カルボン酸 (S)-（9H-フルオレン-9-ィル）メチル (化合物ＳＰ８１９）（２０．０ｇ、４６．１ｍｍｏｌ）を用いることで、 (S)-2-（（（（9H-フルオレン-9-ィル）メトキシ）カルボニル） (メチル）アミノ）-3-（3-クロロフエニル）プロパン酸 (化合物SP８１２）（１７．０ｇ、８５％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ４３６ （M+H）+

保持時間 :0．６６分 (分析条件３０Ｄ六六５０）

[1794] （２Ｓ.４Ｒ）-1-（（（9H-フルオレン-9-ィル）メトキシ）カルボニル）-4-エトキシピロリジン-2-カルボン酸 (化合物SP８１３、 Ｆｍｏｃ-Ｈｙｐ（Ｅｔ）-ＯＨ）の合成



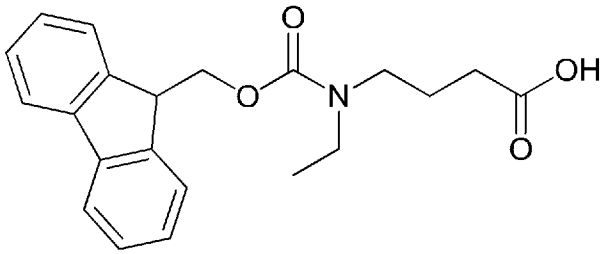
[1795] （２Ｓ,４Ｒ）-4-エトキシピロリジン-2-カルボン酸 塩酸塩 (化合物SP８２０）（４５ｇ、２３０ｍｍｏｌ）を１，４－ジオキサン (５００ｍｌ）と水 (５００ｍｌ）の混合液に溶解し、炭酸カリウム (７９．４ｇ、５７４ｍｍｏｌ）および炭酸 (2,5-ジオキソピロリジン-1-ィル） (9H-フルオレン-9-ィル）メチル (Ｆｍｏｃ―ＯＳｕ、６９．８ｇ、２０７ｍｍｏｌ）を加え、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルで洗浄し、水層を硫酸水素カリウム水溶液でｐＨ３に調整し、酢酸エチルで抽出した。得

られた有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後に減圧濃縮し、(2S,4R)-1-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-4-エトキシピロリジン-2-カルボン酸(化合物SP813、Fmoc-Hyp(Et)-OH)(90.7g、103%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 382 (M+H)+

保持時間:0.92分(分析条件SQDAAO5)

[1796] 4-(((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)プタン酸(化合物SP814、Fmoc-γEtAbu-OH)の合成

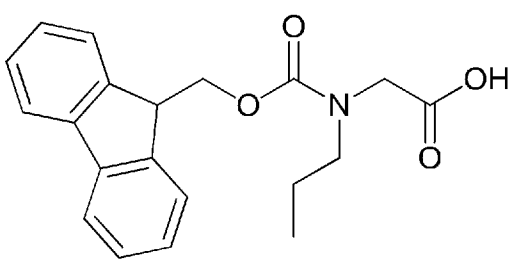


[1797] 化合物SP813の製造例と同様の条件で、(2S,4R)-4-エトキシピロリジン-2-カルボン酸(化合物SP820)の代わりに、4_(エチルアミノ)プタン酸 塩酸塩(化合物SP852)(7.00g、41.8mmol)を用いることで、4_(((((9H—フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)プタン酸(化合物SP814、Fmoc-γEtAbu-OH)(9.60g、65%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 354 (M+H)+

保持時間:0.93分(分析条件SQDAAO5)

[1798] (2-(((((9H—フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)(プロピル)アミノ)酢酸(化合物SP815)の合成

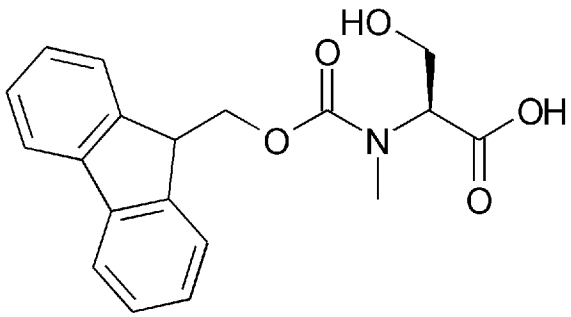


[1799] 化合物ＳＰ８１３の製造例と同様の条件で、(２Ｓ，４Ｒ)＿４―エトキシピロリジン＿２＿カルボン酸(化合物ＳＰ８２０)の代わりに、２＿(プロピルアミノ)酢酸　塩酸塩(化合物ＳＰ８２１)(１０５ｇ、６８４ｍｍｏｌ)を用いることで、(２―((((９Ｈ―フルオレン＿９＿イル)メトキシ)カルボニル)(プロピル)アミノ)酢酸(化合物ＳＰ８１５、Ｆｍｏｃ－ｎＰｒＧｌｙ－ＯＨ)(２１５ｇ、９３％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ)　ｍ/ｚ＝３４０　(Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：０．９４分(分析条件ＳＱＤＡＡＯ５)

[1800] (２Ｓ)－２－(９Ｈ―フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニル(メチル)アミノ)－３－ヒドロキシプロパン酸(化合物SP８２３)の合成

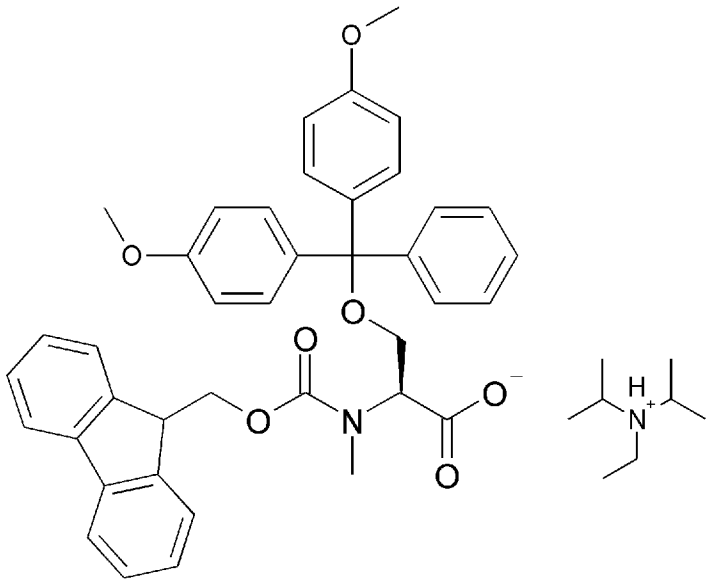


[1801] 窒素雰囲気下、ＦｍｏｃＣｌ(１．３５ｇ、５．２１ｍｍｏｌ)のテトラヒドロフラン(５ｍＬ)溶液を、～―メチル―し―セリン(化合物SP８２２)(６２１ｍｇ、５．２１ｍｍｏｌ)及び炭酸ナトリウム(５８０ｍｇ、５．４７ｍｍｏｌ)のテトラヒドロフラン(１５ｍＬ)―水(２０ｍＬ)溶液に室温にて添加した。反応混合物を同温度にて２０分間撹拌後、ジエチルエ―テル(１ＯｍＬ)及びヘキサン(５ｍＬ)を添加した。得られた混合物を水で抽出し、水相をエーテル(１５ｍＬ)にて洗浄後、濃塩酸(１ｍＬ)を添加した。得られた混合物を酢酸エチルにて3回抽出し、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液/０．０５％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(化合物SP８２３)(１．４９ｇ、８４％)を得た。

ＬＣＭＳ(ＥＳＩ)　ｍ/ｚ＝３４２　(Ｍ＋Ｈ)＋

保持時間：0．６７分（分析条件３０Ｄ「六０５）

[1802] Ｎ＿エチル＿Ｎ―イソプロピルプロパン＿２＿アミニウム　(Ｓ)－２－（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（ビス（４―メトキシフエニル）（フエニル）メトキシ）プロパン酸塩（化合物ＳＰ８１６）の合成



[1803] （２Ｓ）－２－［９Ｈ―フルオレン＿９＿イルメトキシカルボニル（メチル）アミノ］＿３―ヒドロキシプロパン酸（化合物ＳＰ８２３）（９２０ｍｇ、２．７０ｍｍｏｌ）を脱水ピリジン（２．５ｍＬ）に溶解し、減圧下濃縮した。この操作を２回繰り返した後、窒素雰囲気下、脱水ピリジン（２．５ｍＬ）に溶解し、４，４'―ジメトキシトリチルクロリド（９３１ｍｇ、２．７５ｍｍｏｌ）を室温にて添加した。反応混合物を同温度にて１３時間撹拌後、減圧濃縮した。得られた残渣をクロロホルム（１５ｍＬ）に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム（５ｍＬ）で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮してえられた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１％ジイソプロピルエチルアミン含有ジクロロメタン/メタノール）にて精製し、（Ｎ―エチル－Ｎ―イソプロピルプロパン－２―アミニウム（Ｓ）＿２＿（（（（９Ｈ―フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）＿３＿（ビス（４―メトキシフエニル）（フエニル）メトキシ）プロパン酸塩（化合物ＳＰ８１６）（１．９２ｇ、９２％）

を得た。

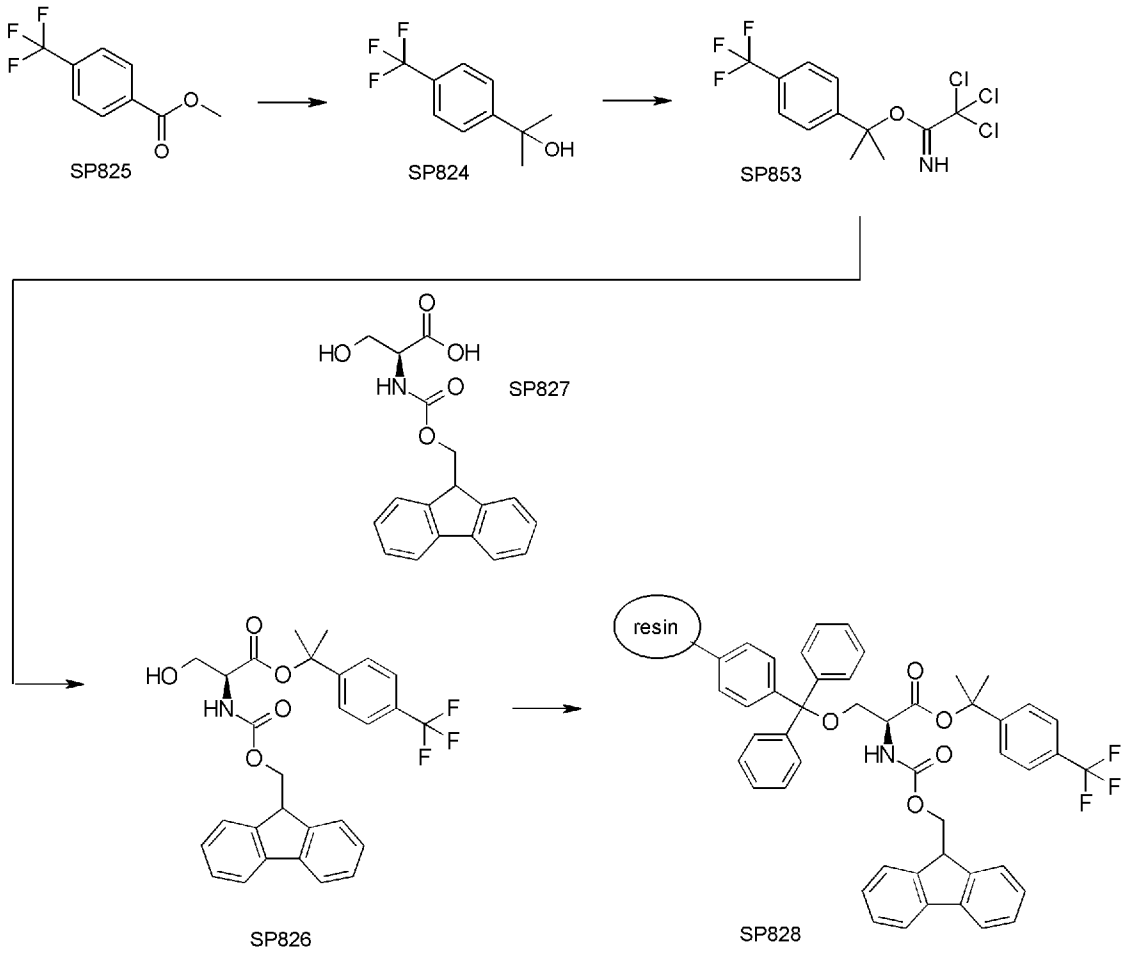
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ ６４２ （M－Ｈ）－

保持時間：０．７２分 (分析条件３０Ｄ六六５０)

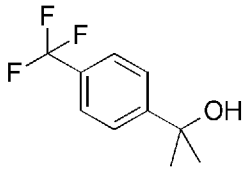
[1804] ペプチド合成の出発原料として、カルボン酸が1-イソプロピル-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン基 (Ｐｉｓ（４—ＣＦ３）基）で保護され、アミノ基がＦｍｏｃ基で保護されたSerを担持させたレジンを用いた。その合成を以下に示す。

[1805] ペプチド合成に用いる、Ｆｍｏｃアミノ酸を担持させたレジンはスキームＬに示すスキームに従って行った。

スキームＬ



[1806] ２－「４－（トリフルオロメチル）フェニル］プロパン－２－オール（化合物ＳＰ８２４）の合成

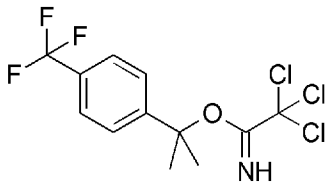


[1807] 窒素雰囲気下、4_（トリフルオロメチル）安息香酸メチル（化合物SP825）（37.1g、181mmol）を脱水THF（90ml）に溶解させ、0℃にてメチルリチウムのジエチルエーテル溶液（1.5M、360ml、544mmol）を2時間かけて滴下し、室温で30分間攪拌した。50%塩化アンモニウム水溶液をゆっくりと加えたのち、酢酸エチル（200mlX2）で抽出した。これを硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮をし、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/DCM=100/0→25/75）で精製し、2_[4_（トリフルオロメチル）フエニル]プロパン_2_オール（化合物SP824）（84%、31.0g）を得た。

保持時間:0.73分（分析条件30D「六05）

^{1}H-NMR（Varian 400-MR, 400 MHz, DMS0-D_6）δ ppm 7.69（2H, d, 8.7 Hz）, 7.65（2H, 8.7Hz）, 5.24（1H, s）, 1.45（6H, s）

[1808] 2，2，2—トリクロロアセトイミド酸__2_（4-（トリフルオロメチル）_フエニル）プロパン_2_イル（化合物SP853）の合成



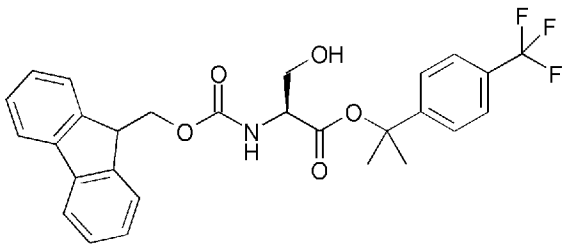
[1809] 2-[4-（トリフルオロメチル）フエニル]プロパン_2_オール（化合物SP824）（27.0g、132mmol）をTHF（54ml）で3回共沸した。窒素雰囲気下、これを脱水THF（270ml）に溶解させ、ナトリウムビス（トリメチルシリル）アミドの脱水THF溶液（1.9M、13.9mし26.4mmol）を加え、室温で30分間攪拌した。これ

にトリクロロアセトニトリル（13．3mし 132mmol）を0℃で加え、30分間攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮をし、得られた残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン）で精製し、2，2，2—トリクロロアセトイミド酸 2_（4-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン—2—イル（化合物SP853）（86%、39．7g）を得た。

保持時間：0．75分（分析条件SQDAA50）

^{1}H-NMR（Varian 400-MR，400 MHz，DMS0-D_6）δ ppm 9．17（1H，s），7．73（2H，d，8．5 Hz），7．63（2H，d，8．5 Hz），1．84（6H，s）

[1810] 2-（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3—ヒドロキシプロパン酸 (S)-2-（4-（トリフルォロメチル）フエニル）プロパン—2—イル（化合物SP826、Fmoc-Ser-0Pis（4-CF3））の合成



[1811] （S）-2-（（（9H—フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_3—ヒドロキシプロパン酸（化合物SP827、Fmoc-Ser-0H）（96．0g、292mmol）をTHF（100ml）で8回共沸した。窒素雰囲気下、これを脱水THF（200ml）に溶解させ、2，2，2—トリクロロアセトイミド酸 2—（4—（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン—2—イル（化合物SP853）（67．9g、195mmol）を加えて、室温で3時間攪拌した。反応混合物をそのままアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（DCM）で精製して減圧下に濃縮した。さらに逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10mM酢酸アン

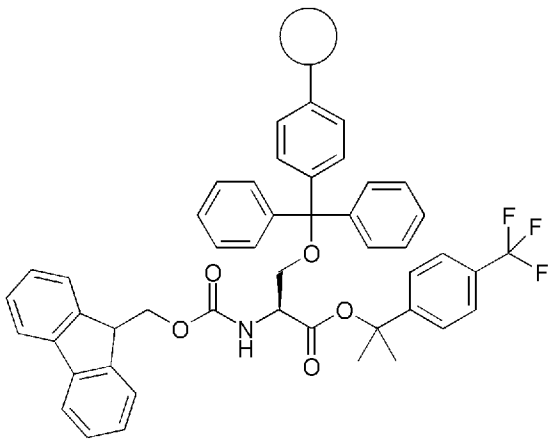
モニウム水溶液/メタノール＝９５/５→０/１００）にて精製し、２＿（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３—ヒドロキシプロパン酸　(Ｓ)-２-（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン—２—イル (化合物SP８２６、Ｆｍｏｃ-Ｓｅｒ-ＯＰｉｓ（４—ＣＦ３）（３８％、３８．４ｇ）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ/ｚ＝５３６　(Ｍ＋Ｎａ)＋

保持時間：０．７２分 (分析条件３０Ｄ六六５０)

[1812] ２-（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）＿３—ヒドロキシプロパン酸　(Ｓ)-２-（４-（トリフルオロメチル）フエニル）プロパン＿２＿イル—トリチルレジン＿(化合物SP８２８、Ｆｍｏｃ-Ｓｅｒ（Ｔｒｔ-Ｒｅｓｉｎ）-ＯＰｉｓ（４-ＣＦ３））の合成

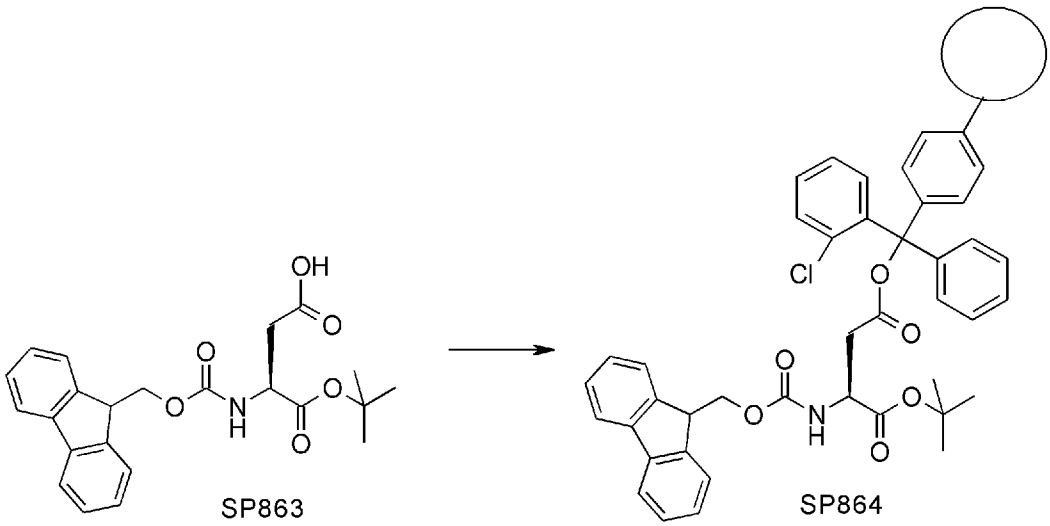
なお、本明細書ではポリマー (例えばレジン）と化合物を結合させた場合、構造式ではポリマー部を○で示す場合がある。○が有する反応性官能基（下の場合にはトリチル基）を示してポリマーと化合物の反応点が理解しやすいように記載する場合がある。以下の例ではレジンのトリチル基とセリンのヒドロキシル基がエーテル結合にて結合しているため、レジンのトリチル基とセリンのエーテル結合部位を記載した。



[1813] フィルター付きの反応容器にトリチルクロライドレジン（１００—２００ｍｅｓｈ、ChemPep社から購入、２３．０ｇ、２５．３ｍｍｏｌ）と脱水ジクロロメタン（２００ｍｌ）を入れ、室温にて１０分間振盪した。窒素圧をかけジクロロメタンを除いた後、２＿（（（（９Ｈ—フルオレン＿９＿イル）

メトキシ）カルボニル）アミノ）_３―ヒドロキシプロパン酸　(S)-2-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)プロパン―2―イル (化合物SP826)（6.49g）の脱水ジクロロメタン（150ml）溶液にDIPEA（11.0ml）を加えた混合液を反応容器に添加し、3時間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン (300ml)に脱水メタノール (30.0ml)およびジイソプロピルエチルアミン (11ml)を加えた混合液を反応容器に添加し、90分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、ジクロロメタン (300ml)を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、再度ジクロロメタン (300ml)を入れ、5分間振盪した。窒素圧をかけ反応液を除いた後、減圧下にレジンを終夜乾燥させ、2_(((9H―フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_3―ヒドロキシプロパン酸　(S)-2-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)プロパン_2_イル―トリチルレジン (化合物SP828、Fmoc-Ser(Trt-Resin)-OPis(CF3))（25.7g、ローディング率 :0.347mmol/g 34.7%）を得た。

[1814] (S)-3-((((9H―フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_4_(tert―ブトキシ)_4_オキソブタン酸_2_クロロトリチルレジン_(化合物SP864)_の合成



[1815] 化合物SP402の製造例と同様の条件で、(S)-3-((((9H-フルオレン_9_イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)_4_オキソ_4

-（ピペリジン_1―イル）プタン酸（化合物SP401）の代わりに、（S）-3-（（（（9H―フルオレン_9_イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_4_（tert―プトキシ）_4_オキソブタン酸（化合物SP863）を用いることで、（S）―3―（（（（9H―フルオレン―9―イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）_4_（tert―プトキシ）_4_オキソブタン酸 2_クロロトリチルレジン（化合物SP864）を得た。

[1816] 化合物SP842、SP844、SP845、SP846、SP848、SP854、SP855、SP856の合成。

[1817] 配列番号PE_2から配列番号PE_15の構造のうち、ランダム領域の13残基にC末端側のSerを追加した化合物（合計14残基ペプチド）を目的化合物が獲得できたことを確認するために合成した。さらに、数化合物については、直鎖部1に相当する部分を削除した11残基ペプチドも合成した。

ポリスチレンレジン（化合物SP828）を用い、Fmocアミノ酸として、Fmoc―MeAla（4-Thz）-OH（化合物SP811）、Fmoc―MePhe（3-Cl）―OH（化合物SP812）、Fmoc―MePhe―OH、Fmoc-MeSer（DMT）-OH（化合物SP816）、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-nPrGly-OH（化合物SP815）、Fmoc-MeGly_OH、Fmoc-Hyp（Et）-0H（化合物SP813）、Fmoc_Pro_OH、Fmoc-Thr（Trt）_0H、Fmoc―Phg_OH、Fmoc-Ile_OH、Fmoc-Val_0H、Fmoc―Asp（Pis）_OH、Fmoc―Trp―OH、Fmoc―DTyr（tBu）_OH、Fmoc-Phe（―F3）_0H、Fmoc―Ser（Trt）_OH、Fmoc-Met（02）_0H、Fmoc―γEtAbu-OH（化合物SP814）、Fmoc―βAla-0H、Fmoc-Ala-0H、Fmoc-Gly-0Hを用いて合成を行った。

[1818] 縮合剤としてジイソプロピルカルボジイミドと、1―ヒドロキシ_7―ア

ザベンゾトリアゾール (ＨＯＡｔ）もしくはエチル (ヒドロキシィミノ）シァノアセタート (Ｏｘｙｍａ）を用い、Ｆｍｏｃ脱保護剤として５％のウレァを含む２０％ピペリジンのジメチルホルムァミド溶液、洗浄溶媒として５％のゥレアを含むジメチルホルムアミドを用いてペプチド鎖の伸長を行った。ペプチドの伸長後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を脱保護し、レジンをジメチルホルムアミド、トリフルオロエタノール、ジクロロメタンで順に洗浄した。塩酸 (ペプチドに対し１０等量）のトリイソプロビルシラン/ ジクロロエタン（＝５/ ９５、ｖ/ ｖ）でペプチドのレジンからの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内溶液を合成用カラムでろ過することでレジンを除き、反応液をジイソプロピルエチルァミン (ペプチドに対し１０等量）と混合し、塩酸を中和した。レジンはジメチルホルムアミドで洗浄を行い、すべての溶液を混合した。

[1819] 得られた溶液に、０＿（７―アザー１Ｈベンゾトリアゾール＿１＿イル）-Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルゥロニゥム ヘキサフルオロホスフエート（ＨＡＴＵ）と、ジイソプロピルエチルァミンを加えてペプチドの環化を行った。反応終了後、減圧下で溶媒留去した。

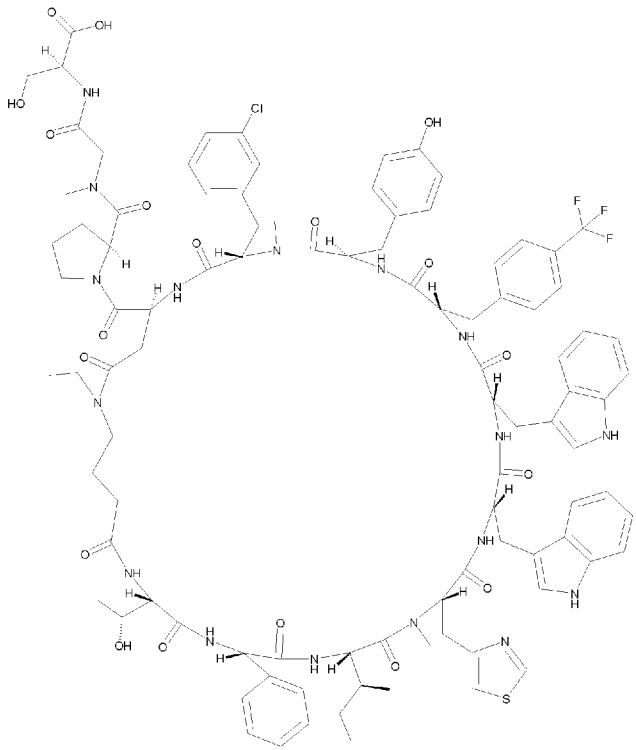
得られた残渣をジクロロエタンに溶解し、ｔ―プチルメチルエーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。遠心分離にて上清を除き、残渣にトリフルオロ酢酸/ トリイソプロビルシラン/ ジクロロエタン (＝５／５／９０）を加え、Ｐｉｓ（４-ＣＦ３）を含む側鎖保護基の脱保護を行った。減圧下で溶媒留去し、得られた粗生成物を高速逆相クロマトグラフィー (ＨＰＬＣ）で精製を行った。

[1820] 化合物SP８４２

配列番号PE_７に由来するペプチド

ァＥｔＡｂｕ氷ーＴｈｒ＿Ｐｈｇ＿ｌｌｅ＿ＭｅＡｌａ（４-Ｔｈｚ）-Ｔｒｐ-Ｔｒｐ-Ｐｈｅ（４―ＣＦ３）-ＤＴｙｒ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）―Ａｓｐ氷ーＰｒｏ-ＭｅＧｌｙ-Ｓｅｒ-０Ｈ

（２つの* 部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１９４５（Ｍ＋Ｈ）＋

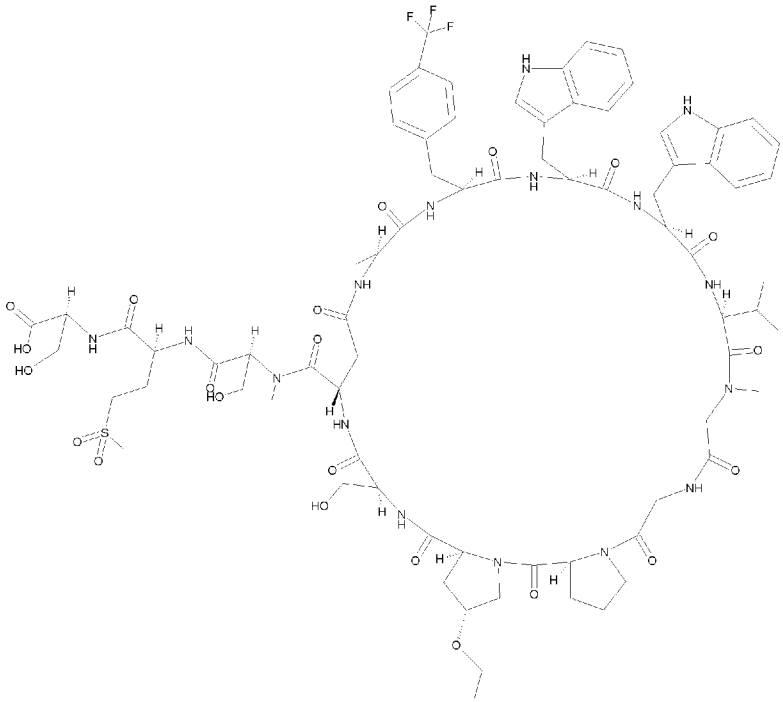
保持時間：０．８１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1821] 化合物SP８４４

配列番号PE_８に由来するペプチド

Ａｌａ＊＿Ｐｈｅ（４—ＣＦ３）-Ｔｒｐ-Ｔｒｐ-ＶａＩ-ＭｅＧｌｙ-Ｇｌｙ-Ｐｒｏ-Ｈｙｐ（Ｅｔ）-Ｓｅｒ-Ａｓｐ*-ＭｅＳｅｒ-Ｍｅｔ（０２）-Ｓｅｒ-０Ｈ

（２つの*部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１６７８ （Ｍ＋Ｈ）＋

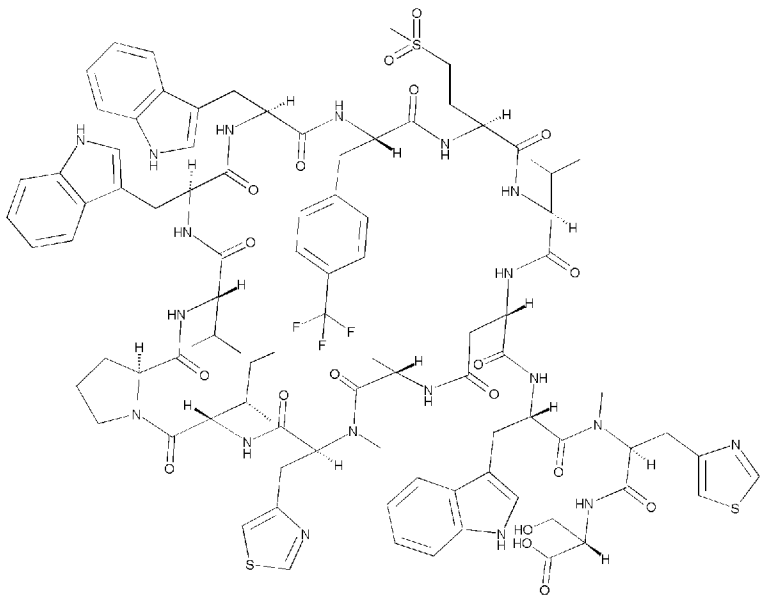
保持時間：０．６４分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1822] 化合物ＳＰ８４５

配列番号ＰＥ＿９に由来するペプチド

Ａｌａ水—ＭｅＡｌａ（４－Ｔｈｚ）－Ｉｌｅ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－Ｔｒｐ－Ｔｒｐ－Ｐｈｅ（４—ＣＦ３）－Ｍｅｔ（０２）＿Ｖａｌ＿Ａｓｐ＊＿Ｔｒｐ－ＭｅＡｌａ（４－Ｔｈｚ）－Ｓｅｒ－０Ｈ

（２つの＊部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １９５５ （Ｍ＋Ｈ）＋

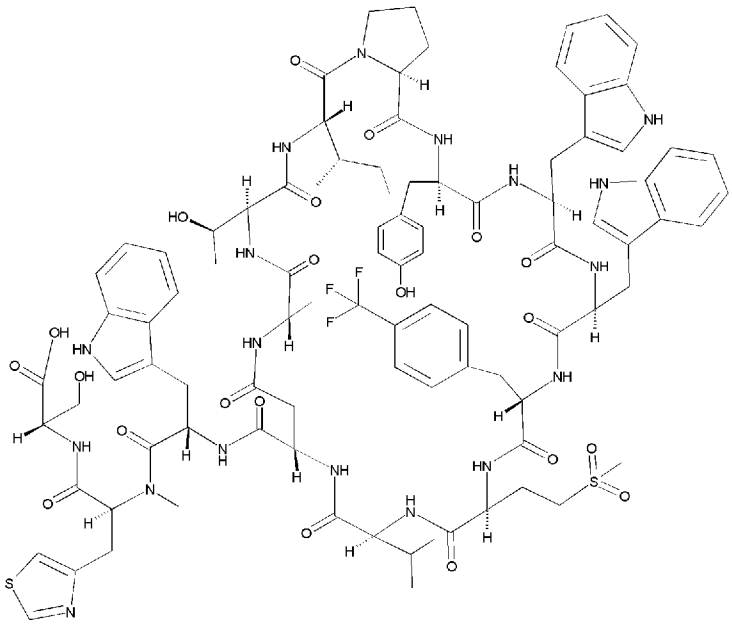
保持時間 :0．８２分 (分析条件３０Ｄ「六0５）

[1823] 化合物ＳＰ８４６

配列番号ＰＥ—１０に由来するペプチド

Ａｌａ氷—Ｔｈｒ_ Ｉｌｅ- Ｐｒｏ- ＤＴｙｒ- Ｔｒｐ- Ｔｒｐ- Ｐｈｅ（４—ＣＦ３）- Ｍｅｔ（０２）- Ｖａｌ- Ａｓｐ* - Ｔｒｐ- ＭｅＡｌａ（４- Ｔｈｚ）- Ｓｅｒ- ０Ｈ

（２つの* 部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ ＝ １９５２ （Ｍ＋Ｈ）＋

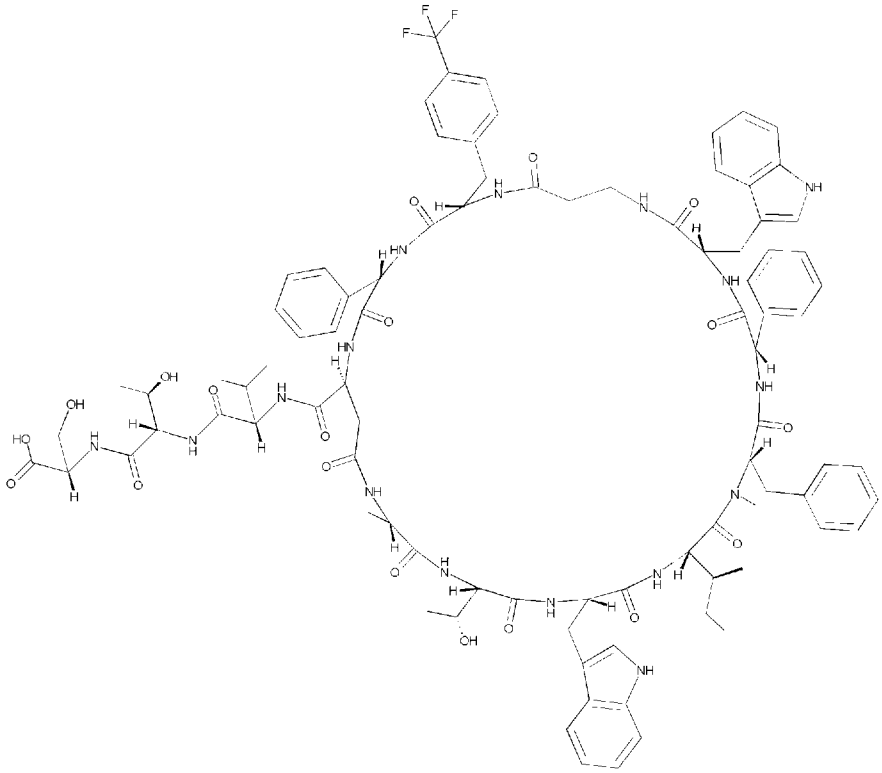
保持時間 :0．７５分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[1824] 化合物ＳＰ８４８

配列番号ＰＥ—１１に由来するペプチド

Ａｌａ氷_ Ｔｈｒ- Ｔｒｐ- Ｉｌｅ- ＭｅＰｈｅ- Ｐｈｇ- Ｔｒｐ- βＡｌａ- Ｐｈｅ（４- ＣＦ３）- Ｐｈｇ- Ａｓｐ* - Ｖａｌ- Ｔｈｒ- Ｓｅｒ- ０Ｈ

（２つの* 部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１７７４ （Ｍ＋Ｈ）＋

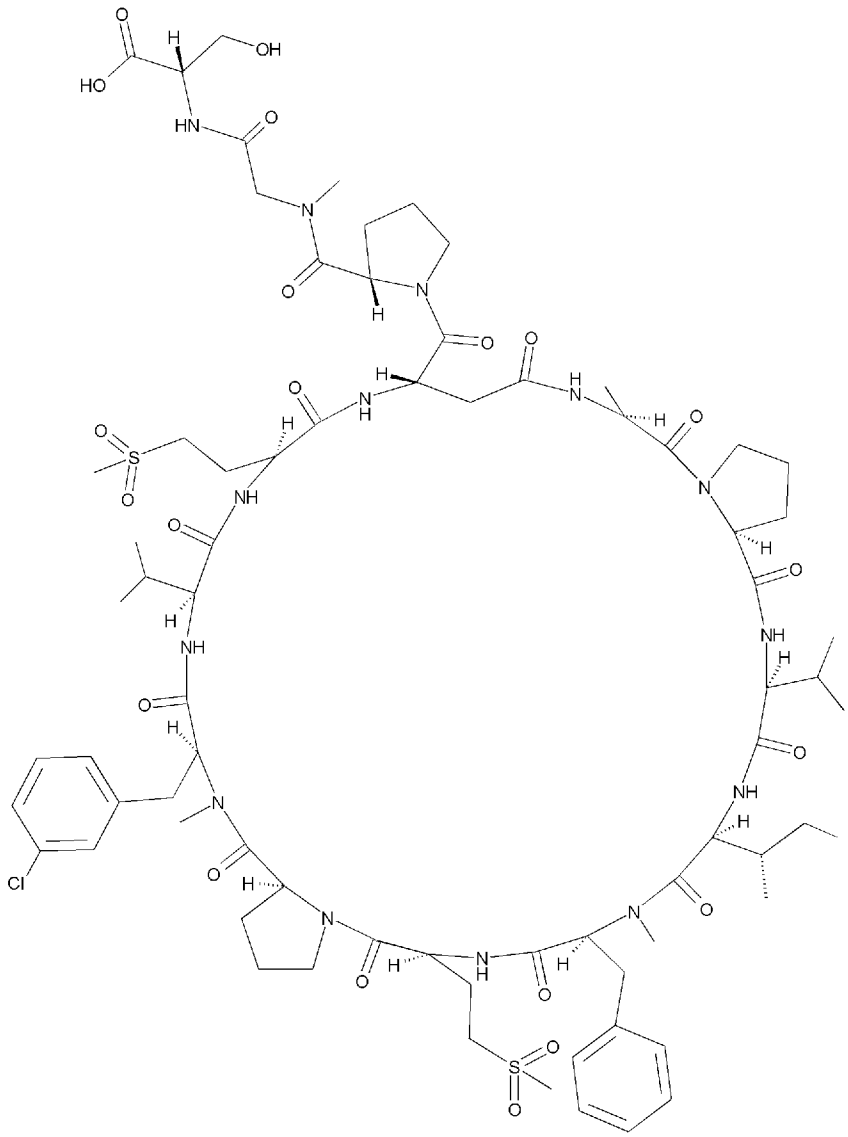
保持時間：０．８１分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1825] 化合物ＳＰ８５４

配列番号ＰＥ—１３に由来するペプチド

Ａｌａ氷—Ｐｒｏ_Ｖａｌ_Ｉｌｅ-ＭｅＰｈｅ-Ｍｅｔ（０２）-Ｐｒｏ—ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｖａｌ-Ｍｅｔ（０２）-Ａｓｐ*-Ｐｒｏ-ＭｅＧｌｙ-Ｓｅｒ-０Ｈ

（２つの*部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１６３０ （Ｍ＋Ｈ）＋

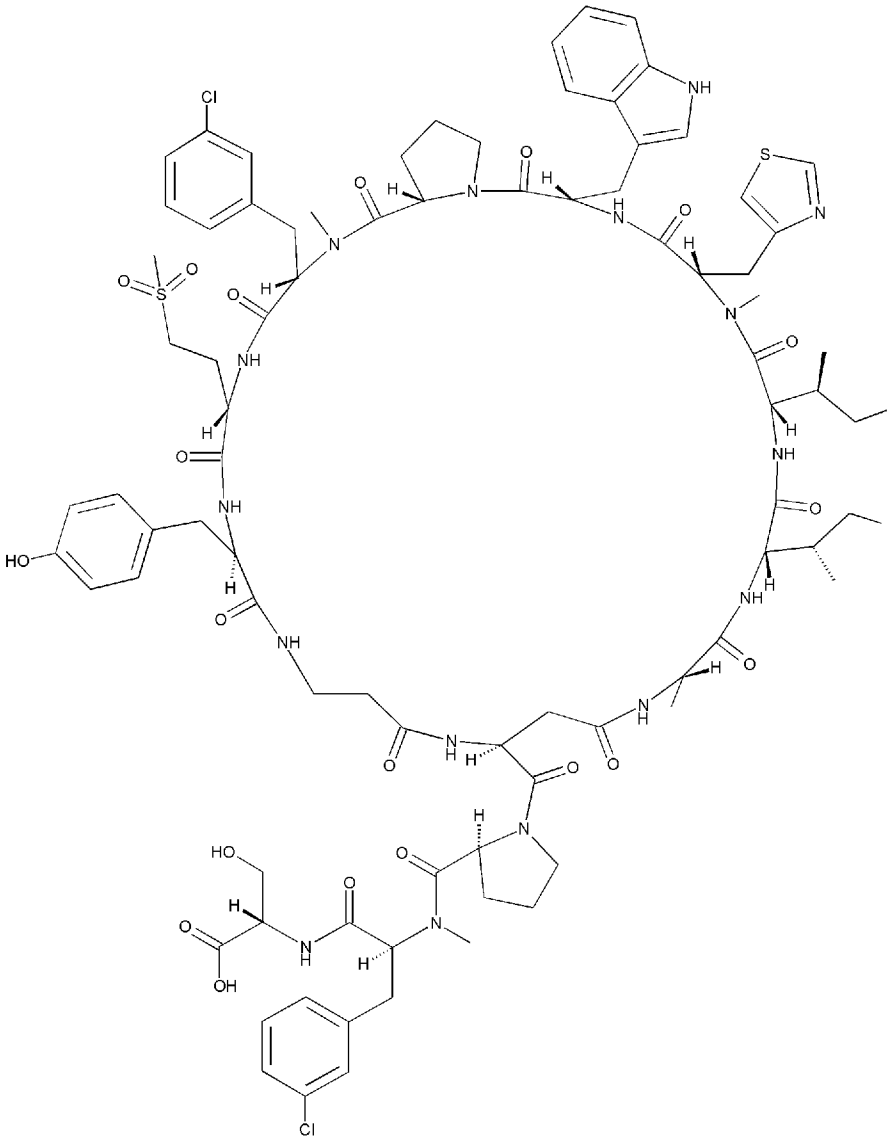
保持時間：０．７０分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1826] 化合物ＳＰ８５５

配列番号ＰＥ—１４に由来するペプチド

Ａｌａ氷ーＩｌｅ-Ｉｌｅ_ＭｅＡｌａ（４-Ｔｈｚ）-Ｔｒｐ-Ｐｒｏ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｍｅｔ（０２）-ＤＴｙｒ-βＡｌａ-Ａｓｐ*-Ｐｒｏ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｓｅｒ-０Ｈ

（２つの*部位にて環化）



ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１８３６ （Ｍ＋Ｈ）＋

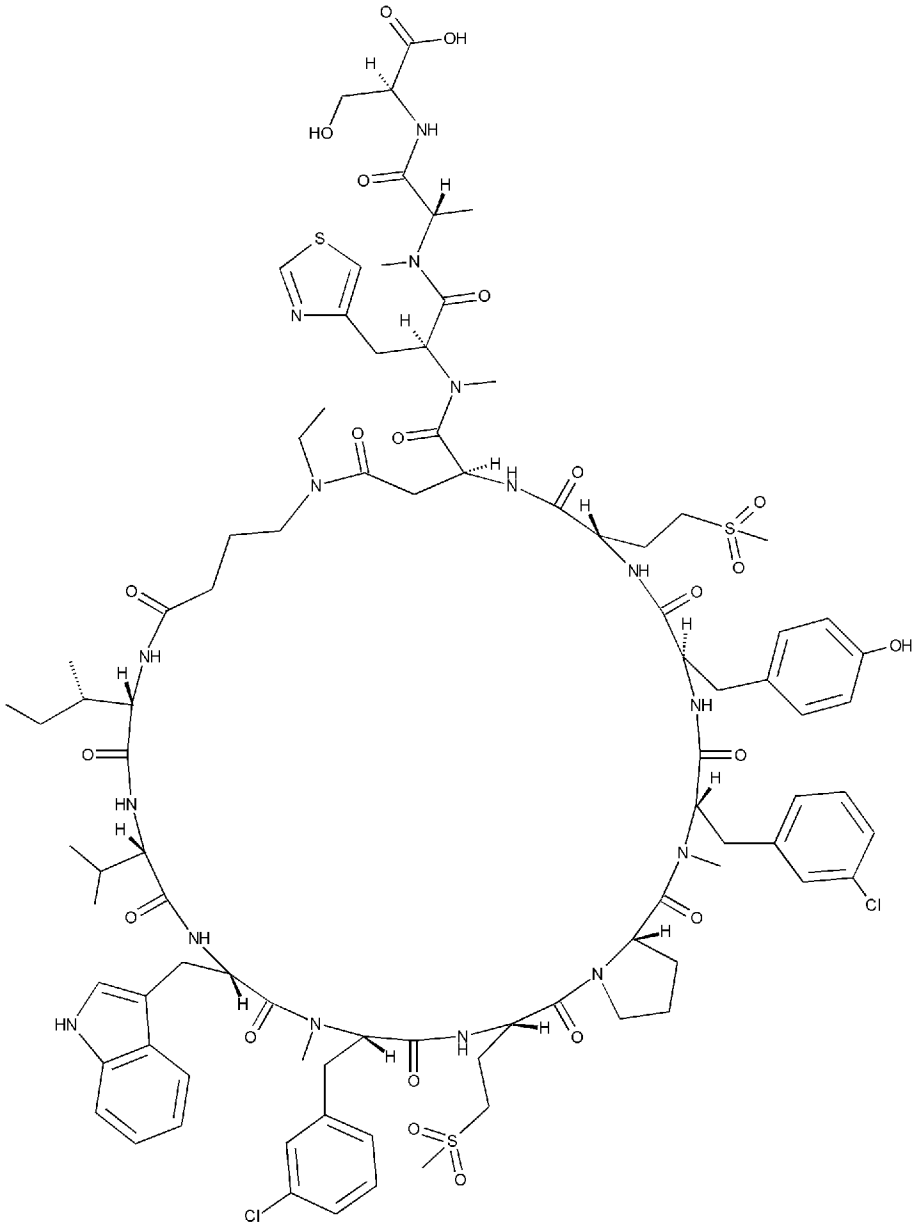
保持時間：０．８０分 (分析条件ＳＱＤＦＡ０５)

[1827] 化合物ＳＰ８５６

配列番号ＰＥ—１５に由来するペプチド

ァＥｔＡｂｕ水—Ｉｌｅ-Ｖａｌ-Ｔｒｐ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｍｅｔ（０２）-Ｐｒｏ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-ＤＴｙｒ-Ｍｅｔ（０２）—Ａｓｐ水—ＭｅＡｌａ（４-Ｔｈｚ）-ＭｅＡｌａ-Ｓｅｒ-０Ｈ

（２つの＊部位にて環化）



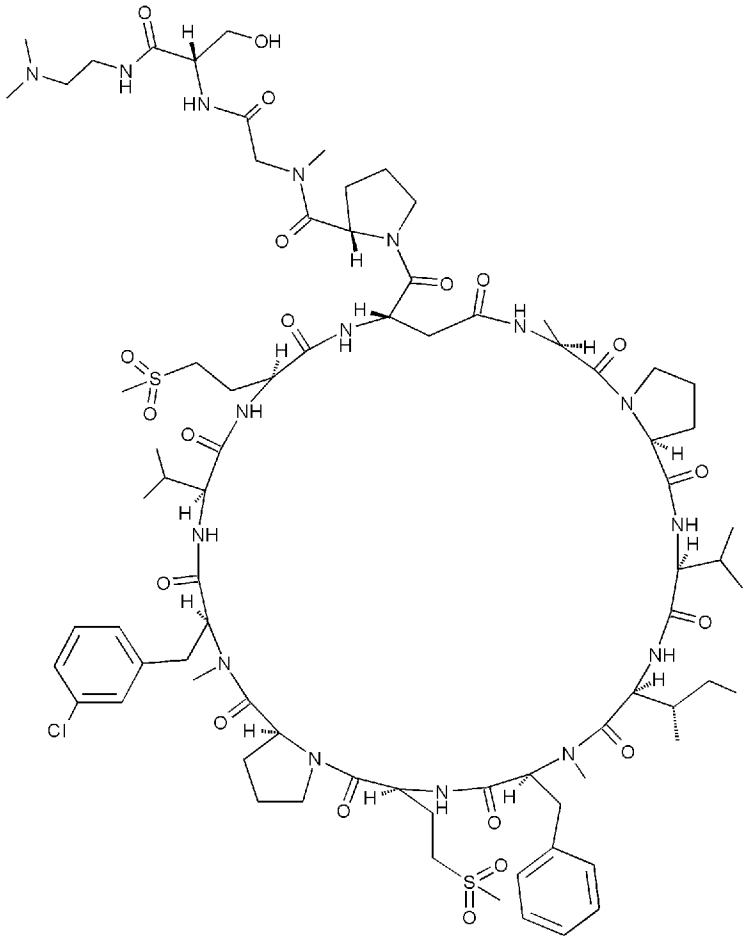
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/ｚ＝１９４４ （Ｍ＋Ｈ）＋

保持時間：０．７６分 (分析条件３０Ｄ「六０５）

[1828] 化さ物ＳＰ８５９のさ成。

Ａｌａ氷—Ｐｒｏ_Ｖａｌ_Ｉｌｅ-ＭｅＰｈｅ-Ｍｅｔ（０２）-Ｐｒｏ—ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｖａｌ-Ｍｅｔ（０２）_Ａｓｐ*_Ｐｒｏ-ＭｅＧｌｙ-Ｓｅｒ-ＮＨ（CH_2）$_2$$NMe_2$

（２つの*部位にて環化）



[1829] ＳＰ８５４（Ａｌａ氷ーＰｒｏ—Ｖａｌ—Ｉｌｅ-ＭｅＰｈｅ-Ｍｅｔ（０２）-Ｐｒｏ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｖａｌ-Ｍｅｔ（０２）-Ａｓｐ*-Ｐｒｏ-ＭｅＧｌｙ-Ｓｅｒ-ＯＨ）をＤＭＦ（２００μｌ）に溶解し、N1,N1-ジメチルエタン-1,2-ジアミン（１．４３μｌ１３．Ｏｍｍｏｌ）、ジィソプロピルエチルァミン（３．８２μｌ、２２．０μｍｏｌ）、Ｏ-（７—アザー１Ｈベンゾトリアゾール_１_イル）_Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎテトラメチルゥロニゥム　ヘキサフルオロホスフエート（ＨＡＴＵ）（５．００ｍｇ、１３．０μｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（１０．０从ｌ）溶液を加え、３０分攪拌した。得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトダラフィー（１ＯｍＭ酢酸アンモニゥム水溶液/メタノール）にて精製し、化合物ＳＰ８５９（Ａｌａ氷ーＰｒｏ_Ｖａｌ_Ｉｌｅ-ＭｅＰｈｅ-Ｍｅｔ（０２）-Ｐｒｏ-ＭｅＰｈｅ（３-Ｃｌ）-Ｖａｌ-Ｍｅｔ（０２）-Ａｓｐ*-Ｐｒｏ-ＭｅＧｌｙ-Ｓｅｒ-ＮＨ（CH_2）$_2$$NMe_2$）（６．８ｍｇ

、９１％）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） m/z = 1698 （M-H）-

保持時間：0．59分 (分析条件30D「六05）

[1830] 4．Surface pLasmon resonance (SPR) を利用した合成ペプチドの標的タンパク質への結合評価

4-1．TNFαへの結合評価

試薬として、以下のものを使用した。Dimethy Lsu Lfoxyde (DMSO), phospha te buffered saLine (以上Sigma-ALdr ich Co. LLC.), surfactant P-20 (GE h ea Lthcare)

合成ペプチドとTNFαとの相互作用解析のSPR実験はBiacoreT200 (GE hea Lt hcare) を用いて、20 oCにて実施した。固定化したタンパク質に対して、合成ペプチドを添加し、相互作用を評価した。

ランニングバッファーとして上述のphosphate buffered saLine (Surfacta nt P-20 およびDMSOをそれぞれ終濃度0.01voL%, 5voL%となるように添加したものを用いた。ビアコア用センサーチップ Series S sensor chip CAP (GE h ea Lthcare) 上に取扱指示書にしたがってCAP reagent を固定化し，ビオチン化したTNFαを固定化させた。解離定数 (K_D) を測定するため、各合成ペプチドを複数の濃度で添加し、固定化TNFαに対する結合のセンサーグラムを得た。

[1831] 得られたセンサーグラムの解析は、T200 eva luat ion software (GE hea lth care) またはScrubber2 (Biolog ic software) を用いて行った。まず、DMSOに対する溶媒補正およびダブルリファレンス（TNFαが固定化されていないフローセルへのセンサーグラム、およびバッファーを添加した場合のセンサーグラムを差し引くことによる補正）を行い、次に、補正後のセンサーグラムに対するカーブフィッティングから、結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off}) を算出し、K_Dを$K_D = k_{off}/$ の関係式を用いて決定した。

以上のように解析して得られたK_Dを以下の表26に示す。

[1832]

[表26]

合成ペプチド名	標的タンパク質	K_D [M]
化合物SP8422	TNF α	1.6E-07
化合物SP8444	TNF α	2.0E-08
化合物SP8445	TNF α	9.4E-07
化合物SP8446	TNF a	2.0E-06
化合物SP8448	TNF α	2.5E-07

[1833] 4-2. IL-6Rへの結合評価

試薬として、以下のものを使用した。Dimethy Lsu Lfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich Co. LLC), HBS-EP, Surfactant P-20 (以上GE healthcare)

合成ペプチドとIL-6Rとの相互作用解析のSPR実験は、BiacoreT200 (GE healthcare) を用いて、20 oCにて実施した。固定化したIL-6Rに対して、合成ペプチドを添加し、相互作用を評価した。

ランニングバッファーとして、上述のHBS-EPにSurfactant P-20およびDMSOをそれぞれ終濃度0.01vol%, 1vol%となるように添加したものを用いた。

ビアコア用センサーチップ Series S sensor chip CAP, (GE healthcare) 上に取扱指示書にしたがってCAP reagentを固定化し, さらにビオチン化IL-6Rを固定化した。

解離定数(K_D)を測定するため、各合成ペプチドを複数の濃度で添加し、固定化IL-6Rに対する結合のセンサーグラムを得た。

得られたセンサーグラムの解析は、T200 evaluation software (GE healthcare) またはScrubber2 (Biologic software) を用いて行った。まず、DMSOに対する溶媒補正およびダブルリファレンス (IL-6Rが固定化されていないフロ—セルへのセンサーグラム、およびバッファーを添加した場合のセンサーグラムを差し引くことによる補正) を行い、次に、補正後のセンサーグラムに対するカーブフィッティングから、結合速度定数(k_{on})、解離速度定数(k_{off})を算出し、K_Dを$K_D=k_{off}/$の関係式を用いて決定した。

以上のように解析して得られたK_Dを以下の表27に示す。

[1834]

[表 27]

合成ペプチド名	標的タンパク質	K_D LM]
化合物SP8556	IL-6R	1.3E-05
化合物SP8555	IL-6R	5.3E-06
化合物SP8554	IL-6R	1.8E-06
化合f SP8559	IL-6R	5.5E-07

[1835] 5．細胞を用いたIL-6R阻害幸験

[実施例27]Human gp130発現Ba/F3細胞を用いた合成ペプチドの中和活性評価

実施例26にて確認されたhuman IL-6 receptor (hIL-6R) 結合活性を有する合成ペプチドの阻害活性は、human gp130 cDNAを導入し強制発現させることによってhIL-6及び可溶型hIL-6R (shIL-6R) 用量依存的に増殖するBa/F3細胞株 (gp130 Ba/F3細胞) を用いて評価した。また、カウンターアツセィとしてgp130 Ba/F3細胞のmouse IL-3 (mIL-3) 用量依存的な増殖に対する合成ペプチドの影響を評価した。

[1836] まず、gp130 Ba/F3細胞を培養液 (賺 BS (Moregate Biotech) 、100 units/mL PeniciLLin - 100 μg/mL Streptomycin (GIBCO) を含むRPMI1640 (GIBCO)) にて1.5X 105個 /mLになるように調製し、96well flat bottom pLate (CORNING) に50 μLずつ播種した。引き続き、60 ng/mLのhIL-6 (鎌倉テクノサィエンス) 及びshIL-6R (中外製薬株式会社) または100 pg/mLのmIL-3 (R&D Systems) を含む培養液を25 μLずつ添加した。続いて、実施例26にて選択、合成した合成ペプチドを希釈公比2、合計6系列となるようにDMS0および培地を用いて調製した (finaL cone. ;≦100 ^mo L/L) 。調製した合成ペプチドをDMS0の最終濃度が0.25%となるように25 μLずつ加え、37℃、5% C02インキュベーターで3日間培養した。培養終了後、各wellにCeLL Counting Kit-8 (D0J IND0) とPBS(-) を等量混合した溶液を20 从しずつ添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にて吸光度 (450 nm/620 nm) を測定した (前値) 。3~4時間ののち、再度プレートリーダーを用いて吸光度を測定した (後値) 。後値から前値を差し引いた値を細胞増殖算出値とし

て、阻害率を計算した。

[1837] hIL-6、shIL-6R、mIL-3非存在下かつ合成ペプチド非存在下の細胞増殖算出値の平均値(A)を100%阻害、hIL-6及びshIL-6RまたはmIL-3存在下かつ合成ペプチド非存在下の細胞増殖算出値の平均値(B)を0%阻害として、hIL-6及びshIL-6RまたはmIL-3存在下かつ合成ペプチド存在下の細胞増殖算出値(C)から合成ペプチドの各濃度の阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (B-C) / (B-A) \times 100$$

その結果、実施例26にて選択、合成した合成ペプチドは卵130 Ba/F3細胞のhIL-6及びshIL-6Rによる細胞増殖を濃度依存的に抑制することが明らかになり、ヒトIL-6シグナリングに対する特異的な阻害活性を有することが示された(図73)。

請求の範囲

[請求項1] 環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

1）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、C末端側に側鎖の1つに反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、N末端側にもう1つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

2）N末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体の反応点と、C末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させ、アミド結合又は炭素—炭素結合を形成させる工程

を含む、前記方法。

[請求項2] 環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

1）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、アミン近傍に反応補助基を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

2）前記反応補助基を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体と、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基をアミド結合させて環状化合物を得る工程

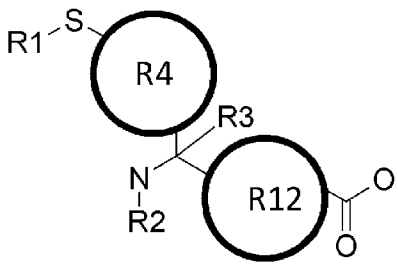
を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 活性エステルがチオエステルである、請求項２に記載の方法。

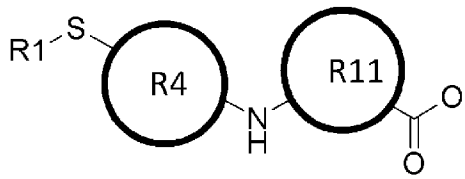
[請求項4] 前記反応補助基が、ＳＨ基である、請求項２又は３に記載の方法。

[請求項5] 前記環状化合物を得る工程の後、反応補助基を除去する工程を含む、請求項３または４に記載の方法。

[請求項6] 前記アミン近傍に反応補助基を有するアミノ酸、アミノ酸類縁体又はＮ末端カルボン酸類縁体が、下記一般式で表される化合物Ｎ＿１または化合物Ｎ―２である、請求項２から５のいずれかに記載の方法；



化合物Ｎ―１



化合物Ｎ―２

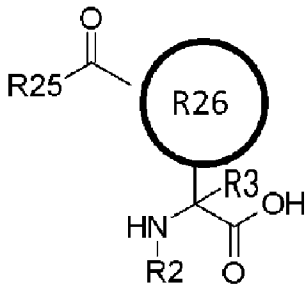
（式中、Ｒ１は、水素原子、Ｓ―Ｒ２３（Ｒ２３は、置換基を有していてもよいアルキル基、アリール基もしくはアラルキル基を示す。）、またはＨＳ基の保護基を示し；

Ｒ２、Ｒ３は、それぞれ独立して、水素原子、または、置換基を有していてもよい、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基もしくはシクロアルキル基を示し；またはＲ２とＲ３が環を形成した置換基、またはＲ２もしくはＲ３がＲ４と環を形成した置換基を示し；

Ｒ４は、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい２価のアラルキル基を示し；

Ｒ１１、Ｒ１２は、それぞれ独立して、単結合、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい２価のアラルキル基を示す。）。

[請求項7] 前記活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体が、下記一般式で表される化合物C_1である、請求項2~6のいずれかに記載の方法；



化合物C－1

(式中、R25は、OH、ハロゲン原子、OR、またはSR1を示し(RはBt、At、NSuまたはPfpを示し、R1は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアリール基または置換基を有していてもよいアラルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいヘテロアリール基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキレン基を示す。)；

R26は、置換基を有していてもよいアルキレン基、置換基を有していてもよいアリーレン基または置換基を有していてもよい2価のアラルキル基を示し；

R2、R3は、それぞれ独立して、水素原子または置換基を有していてもよいアルキル基を示す。)。

[請求項8] 前記環状部を有するペプチド化合物の環状部を構成する、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体の総数が、5~12である、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記環状部を有するペプチド化合物を構成する、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミ

ノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体の総数が、９～１３である、請求項１～８のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

１）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、あるいは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにN末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、N末端の主鎖アミノ基を有するアミノ酸残基、あるいは、主鎖もしくは側鎖にアミノ基を有するアミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

２）N末端のアミノ酸残基、N末端のアミノ酸類縁体残基又はN末端カルボン酸類縁体と活性エステル基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体をアミド結合させて環状化合物を得る工程

を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項11] 活性エステル基がアルキルチオエステル基又はアラルキルチオエステル基であって、工程１）の翻訳合成後に活性化剤を添加させることにより、より活性な活性エステル基に変換させる工程を含む、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 活性剤が、アリールチオール又はN―ヒドロキシスクシンイミドである、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] 翻訳されたチオエステルとの反応性が高い活性化剤と、環化させるアミンとの反応性が高い活性化剤を添加させ、より活性の高い活性エステル基に変換させる工程である、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] アリールチオエステルで活性エステル基に変換させた後、オキシマおよびその誘導体で更に活性の高いエステル基に変換させる工程である、請求項１３に記載の方法。

[請求項15] 工程１）のN末端部位の翻訳合成が、フォルミルメチオニン以外の

翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体をアシル化した翻訳開始ｔＲＮＡを用いて導入する方法にて行われる、請求項１から１４のいずれかに記載の方法。

[請求項16] 工程１）のＮ末端部位の翻訳合成が、開始コドンを読み飛ばし、Ｎ末端にＭｅｔ以外の翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、請求項１０から１４のいずれかに記載の方法。

[請求項17] 工程１）のＮ末端部位の翻訳合成が、アミノペプチダーゼにてＮ末端のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はカルボン酸類縁体を切断する方法を用いて行われる、請求項１０から１４のいずれかに記載の方法。

[請求項18] 前記Ｎ末端部位の翻訳合成が、メチオニン アミノペプチダーゼにて処理することによりＮ末端のフォルミルＭｅｔを除去しＮ末端に他ののの翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、請求項１７に記載の方法。

[請求項19] 前記Ｎ末端部位の翻訳合成が、Ｍｅｔの代わりにノルロイシンを含む翻訳系にて翻訳され、メチオニン アミノペプチダーゼにて処理することによりＮ末端のフォルミルノルロイシンを除去しＮ末端に他ののの翻訳可能なアミノ酸、翻訳可能なアミノ酸類縁体又は翻訳可能なＮ末端カルボン酸類縁体を導入する方法を用いて行われる、請求項１０～１４のいずれかに記載の方法。

[請求項20] 前記Ｎ末端のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はカルボン酸類縁体の除去に、さらに、ペプチドデフオルミラーゼが用いられる、請求項１７から１９のいずれかに記載の方法。

[請求項21] 前記環状部を有するペプチド化合物が、さらに直鎖部を有する、請求項１から２０のいずれかに記載の製造方法。

[請求項22] 前記非環状ペプチド化合物がα—ヒドロキシカルボン酸、及び、側鎖に保護されていてもよいアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類

縁体を含み、工程２）の環状化合物を形成する工程の後で、工程３）α―ヒドロキシカルボン酸部位と側鎖に保護されていてもよいアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体部位を化学反応させて分枝部位を形成させる工程を含む、請求項１から２１のいずれかに記載の方法。

[請求項23] 環状部と直鎖部とを有するペプチド化合物の製造方法であって、

１）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、Ｎ末端カルボン酸類縁体並びにα―ヒドロキシカルボン酸により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、該非環状のペプチド化合物が、

ｉ）Ｃ末端側に側鎖の１つに反応点を有するアミノ酸残基（又はアミノ酸類縁体残基）、及び、Ｎ末端側にもう１つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体を含み、

１ｉ）前記i)に記載の2つの反応点の間にα位にＲｆ５を有するα_ヒドロキシカルボン酸（Ｒｆ５は水素原子、置換されてもよいアルキル基、アラルキル基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、アリケニル基、アルキニル基から選択される）、及び、非環状ペプチド化合物中に保護されていてもよいアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基を含む、

非環状のペプチド化合物である、工程；

２）Ｎ末端側のアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体の反応点と、Ｃ末端側の側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点とを結合させる、環化反応工程；

３）工程１）のｉｉ）に記載のα―ヒドロキシカルボン酸のエステル結合を切断してチオエステル基を発生させる工程

４）工程３）において発生させたチオエステル基と工程１）のｉｉ）に記載のアミノ基を結合させる環化反応工程、

を含む、方法。

[請求項24] 工程１）のｉｉ）に記載のα―ヒドロキシカルボン酸とアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の間に含まれるアミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基の数が７つ以下である、請求項２３に記載の方法。

[請求項25] 工程１）のｉｉ）に記載のα―ヒドロキシカルボン酸が、Ｃｙｓ_Ｐｒｏ_α―ヒドロキシカルボン酸として非環状ペプチド化合物中に含まれる、請求項２３又は２４に記載の方法。

[請求項26] 工程１）のｉ）に記載のＮ末端側にもう１つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体が反応補助基を有している、請求項２３から２５のいずれかに記載の方法。

[請求項27] 工程１）のｉ）に記載のＮ末端側にもう１つの反応点を有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体が反応補助基を有さず、ｉｉ）に記載のアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基のアミノ基が保護基を有し、活性化剤を添加することによって、工程２）の環化反応が行われ、工程２）の環化反応後、工程３）の環化反応前に、前記ｉｉ）に記載のアミノ基を側鎖に有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基のアミノ基の保護基を除去する工程を含む、請求項２３から２６のいずれかに記載の方法。

[請求項28] 環状部を有するペプチド化合物の製造方法であって、

１）アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基、もしくは、アミノ酸残基及び/又はアミノ酸類縁体残基並びにＮ末端カルボン酸類縁体により構成される非環状のペプチド化合物を、該ペプチド化合物をコードする核酸から翻訳して合成する工程であって、

該非環状のペプチド化合物は、側鎖の１つに反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基、及び、Ｎ末端にもう１つの反応点を有するアミノ酸、アミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体を含む、工程；

２）Ｎ末端のアミノ酸残基、Ｎ末端のアミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体の反応点と、側鎖に１つの反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体の反応点とを炭素－炭素結合させる工程

を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項29] Ｎ末端のアミノ酸残基、Ｎ末端のアミノ酸類縁体残基又はＮ末端カルボン酸類縁体の反応点として炭素－炭素２重結合を選択し、側鎖に１つの反応点を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体残基の反応点としてアリールハライドを選択して、遷移金属を触媒とした炭素—炭素結合反応により環化反応を実施する工程を含む、請求項２８に記載の方法。

[請求項30] 遷移金属を触媒とした炭素—炭素結合反応が、Ｐｄを触媒としたＨｅｃｋ型の化学反応である、請求項２９に記載の方法。

[請求項31] 前記環状部を有するペプチド化合物の環状部を形成するアミノ酸又はアミノ酸類縁体の合計が５～１２となる位置に環化反応を実施するための反応点を有する、請求項１から３０のいずれかに記載の方法。

[請求項32] 前記環状部を有するペプチド化合物のアミノ酸及びアミノ酸類縁体残基の総数が９～１３である、請求項３１に記載の方法。

[請求項33] ペプチド化合物のＣ末端と翻訳合成に用いた錶型とがスペーサーを介して結合しているペプチド化合物—核酸複合体を製造することを特徴とする、請求項１～３２のいずれかに記載の方法。

[請求項34] ペプチド化合物－核酸複合体が、翻訳合成に用いられる非環状ペプチド化合物をコードする核酸の３'末端にリンカーを介してピューロマイシンが結合している核酸を用いて合成される、請求項３３に記載の方法。

[請求項35] スペ—サ—がペプチド、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはヘキサエチレングリコールのポリマー、又は、これらの組合せである、請求項３３又は３４に記載の方法。

[請求項36] ペプチド化合物を、互いに異なる配列を有する複数の核酸から成る

核酸ライブラリーを翻訳して製造することを特徴とする、請求項１から３５のいずれかに記載の方法。

[請求項37] 請求項１から３６のいずれかに記載の製造方法により作製されるペプチド化合物又はペプチド化合物－核酸複合体。

[請求項38] 異なる構造を有する複数の請求項３７記載のペプチド化合物又はペプチド化合物—核酸複合体からなるライブラリー。

[請求項39] 以下の（ｉ）～（ｉＶ）を有することを特徴とする、環状部を有するペプチド化合物；

（ｉ）アミノ酸及びアミノ酸類縁体残基数の合計が５～１２からなる環状部を含み、アミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数が９～１３である、

（ｉｉ）Ｎ置換アミノ酸を少なくとも２つ含み、Ｎ置換されていないアミノ酸を少なくとも１つ含む、

（ｉｉｉ）ＣｌｏｇＰ値が６以上である、

（ｉｖ）環状部を形成しているアミノ酸又はアミノ酸類縁体の結合が、アミノ酸又はアミノ酸類縁体の側鎖にある活性エステル基と、他のアミノ酸又はアミノ酸類縁体のアミン基とからなる結合を少なくとも１つ有する。

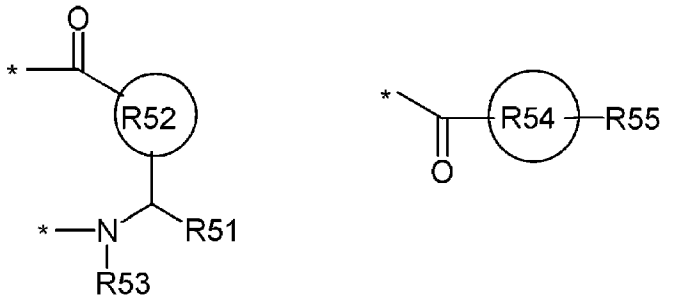
[請求項40] ペプチド化合物に含まれるアミノ酸及びアミノ酸類縁体が、翻訳合成可能なアミノ酸又はアミノ酸類縁体、若しくは、翻訳可能なアミノ酸又はアミノ酸類縁体の側鎖またはＮ置換部位を化学修飾することによって得られるアミノ酸又はアミノ酸誘導体から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体である、請求項３９に記載のペプチド化合物。

[請求項41] さらに、アミノ酸及びアミノ酸類縁体残基数の合計が１～８からなる直鎖部を少なくとも１つ含む、請求項３９又は４０に記載のペプチド化合物。

[請求項42] 環状部を形成しているアミノ酸又はアミノ酸類縁体の結合がアミド結合又は炭素—炭素結合である、請求項３９から４１のいずれかに記

載のペプチド化合物。

[請求項43] 環状部が下記一般式（Ｉ）で示される交差ユニットを含む、請求項３９から４２のいずれかに記載のペプチド化合物；



（Ｉ）

(式中の記号は以下の意味を示す；

Ｒ５１は、置換基を有していても良いＣ１—Ｃ６アルキル基、Ｃ５—Ｃ１０アリール基、アラルキル基、エステル基、又は式１で示されるアミドであり、

Ｒ５２は、置換基を有していても良いＣ１—Ｃ６アルキル基、アリール基、またはアラルキル基であり、

Ｒ５３は、置換基を有していても良いＣ１—Ｃ６アルキル基、もしくは水素原子であるか、または、Ｒ５３とＲ５１とが互いに結合してＣ３-Ｃ５のアルキレン基を形成し窒素原子を含む５員～７員環を形成していてもよく、

Ｒ５４は、０—８アミノ酸残基より構成されるペプチドであり、

Ｒ５５は、置換基を有していても良いＣ１—Ｃ６アルキル基、Ｃ５-Ｃ１０アリール基、アラルキル基、エステル基、置換基を有していても良いアミド基であり、

＊は、環状部における結合部位を示す。)。

[請求項44] 請求項３９から４３のいずれかに記載のペプチド化合物を含む医薬組成物。

[請求項45] 前記医薬組成物が経口剤である、請求項４４の医薬組成物。

[請求項46] 請求項３９から４５のいずれかに記載のペプチド化合物の製造方法であって、工程（ｉ）～（Ｖ）を含む方法：

（ｉ）アミノ酸及びアミノ酸類縁体の総数が９～１３である非環状ペプチド化合物を翻訳合成して、当該非環状ペプチド化合物とそれをコードする核酸配列を有する複合体がリンカーを介して結合している非環状ペプチド化合物－核酸複合体を形成する工程；

（ｉｉ）工程（ｉ）で翻訳合成された複合体の非環状ペプチド化合物をアミド結合又は炭素―炭素結合によって環化し、環状部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の残基数の合計が５～１２となる環状化合物を形成する工程；および、

（ｉｉｉ）工程（ｉｉ）で得られた環状部を有するペプチド化合物―核酸複合体ライブラリーと生体内分子とを接触させ、当該生体内分子に対して結合活性を有する複合体を選択する工程。

[請求項47] さらに、以下の工程を含む、請求項４６に記載の製造方法；

（ｉｖ）前記工程（ｉｉｉ）で選択された複合体の核酸配列からペプチド化合物の配列情報を得る工程、および、

（Ｖ）前記工程（ｉＶ）で得られた配列情報に基づきペプチド化合物を化学合成する工程。

[請求項48] 前記非環状ペプチド化合物がα―ヒドロキシカルボン酸、及び、保護されていてもよい側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体を含み、工程（ｉｉ）の環状化合物を形成する工程の後で、α―ヒドロキシカルボン酸部位と側鎖にアミノ基を有するアミノ酸又はアミノ酸類縁体部位を化学反応させて分枝部位を形成させる工程を含む、請求項４６又は４７に記載の方法。

[請求項49] 生体内分子が、分子量５００未満の化合物が結合し得る領域を有していない分子である、請求項４６から４８いずれかに記載の製造方法。

[請求項50] 生体内分子に対して結合活性を有する複合体が、さらに該生体内分子が他の生体内分子との結合を阻害する活性を有する、請求項４６から４９のいずれかに記載の製造方法。

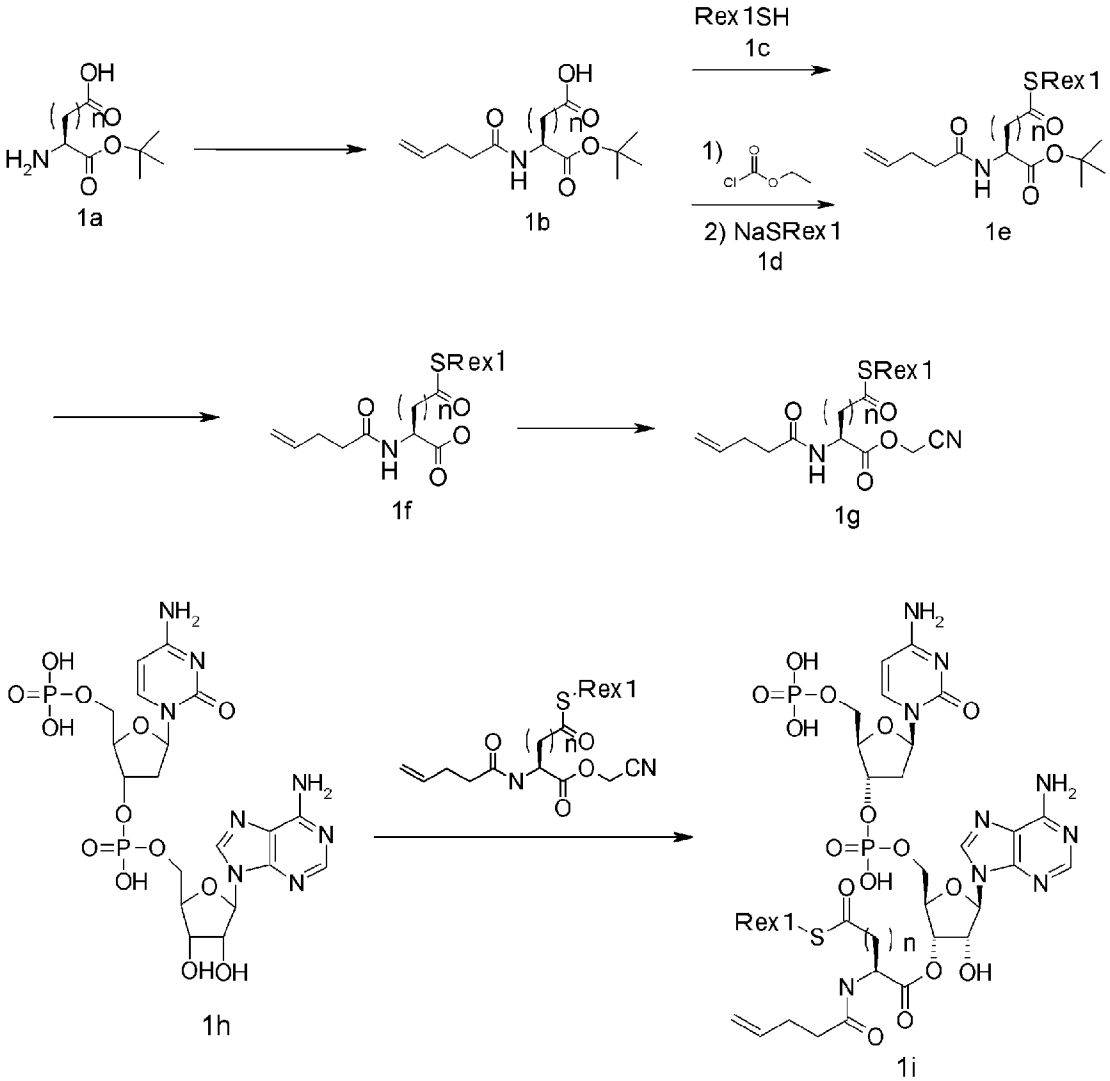
[請求項51] 環化反応するN末端側のアミノ酸又はアミノ酸類縁体が、前記化合物Ｎ—１または化合物Ｎ—２で表わされる化合物から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体であり、Ｃ末端側のアミノ酸又はアミノ酸類縁体が前記化合物Ｃ＿１で表わされる化合物から選択されるアミノ酸又はアミノ酸類縁体であり、工程（ｉｉ）の環状化合物を得る工程の後、反応補助基を除去する工程を含む、請求項４６から５０のいずれかに記載の製造方法。

[請求項52] 核酸配列が3'末端にスペーサーを有し、翻訳合成されるペプチド化合物のＣ末端が、当該スペーサーを介して、当該核酸配列と複合体を形成する、請求項４６から５１のいずれかに記載の製造方法。

[請求項53] ペプチド化合物－核酸複合体が、翻訳合成に用いられる非環状ペプチド化合物をコードする核酸の3'末端にリンカーを介してピューロマイシンが結合している核酸を用いて合成される、請求項５２に記載の方法。

[請求項54] スペ—サ—がペプチド、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはヘキサエチレングリコールのポリマーである、請求項５２又は５３に記載の製造方法。

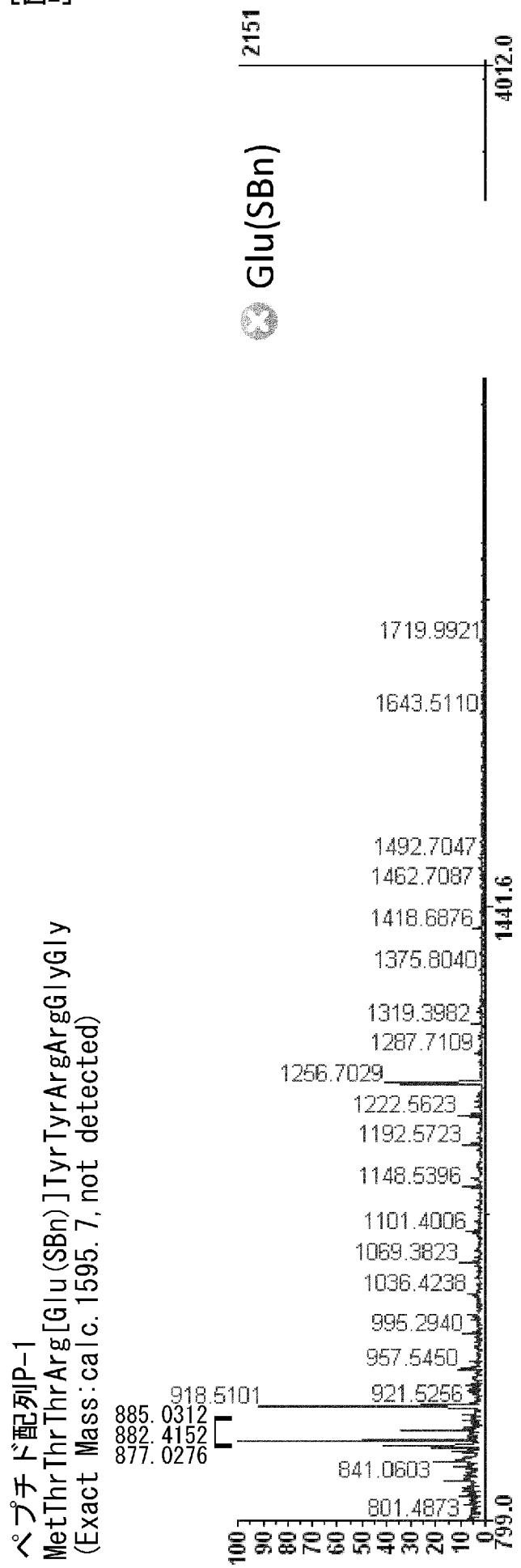
[図1]



合成した化合物

	Rex1＝Me	iPr	Et	tBu	Bn	フェネチル	Phe
I；n＝1	IA	IB	IG	IC	ID	IE	IF
II；n＝2	IIA	－	－	－	IID	－	IIF

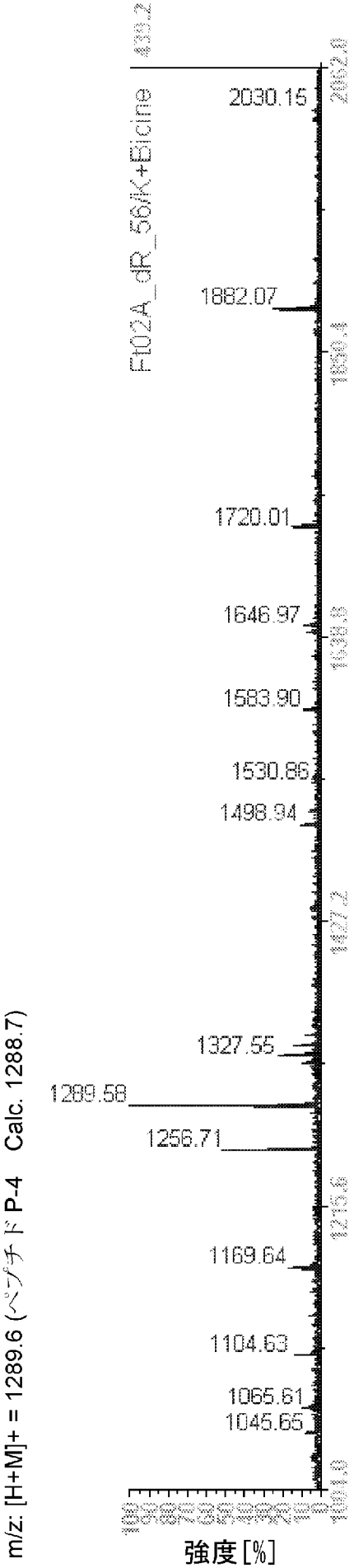
[図2]


ペプチド配列P-1
MetThrThrThrArg[Glu(SBn)]TyrTyrArgArgGlyGly
(Exact Mass:calc.1595.7,not detected)
Glu(SBn)
2151
4012.0
1719.9921
1643.5110
1492.7047
1462.7087
1441.6
1418.6876
1375.8040
1319.3982
1287.7109
1256.7029
1222.5623
1192.5723
1148.5396
1101.4006
1069.3823
1036.4238
995.2940
957.5450
921.5256
918.5101
885.0312
882.4152
877.0276
841.0603
801.4873
799.0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

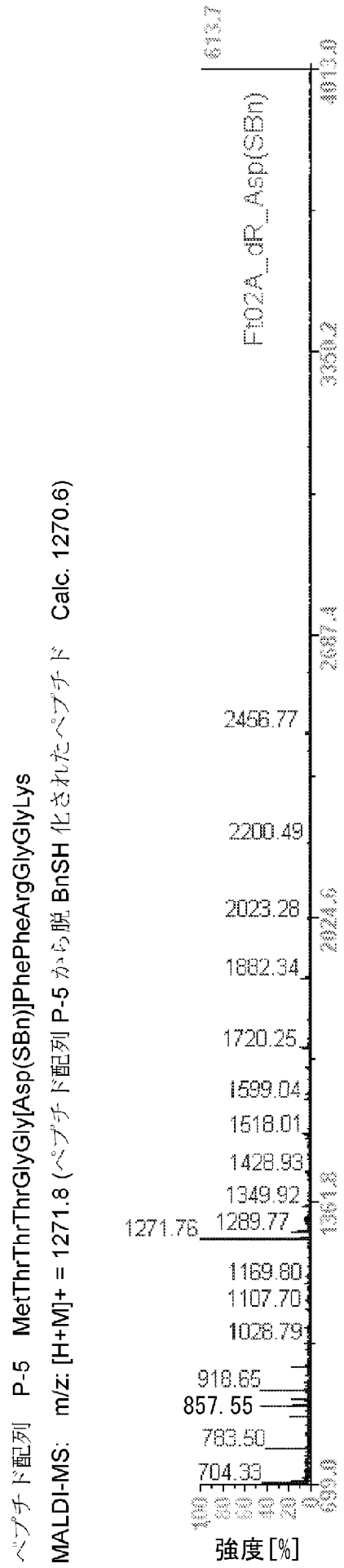
[図3]

ペプチド配列 P-2 MetThrThrThrArg[Asp(SMe)]TyrTyrArgGlyGly
m/z: [H+M]+ = 1302.5 (ペプチド配列 P-2 Calc. 1348.6, 脱 MeSH されたペプチド P-3 Calc. 1301.6)
3786.3
4012.0
3329.4
2646.8
2070.9617
1964.2
1881.8743
1719.8494
1557.8189
1483.5956
1401.5553
1302.4810
1320.4901
1256.6063
1281.6
1171.4506
1085.3270
986.1716
918.4433
794.2655
729.1713
651.7453
599.0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

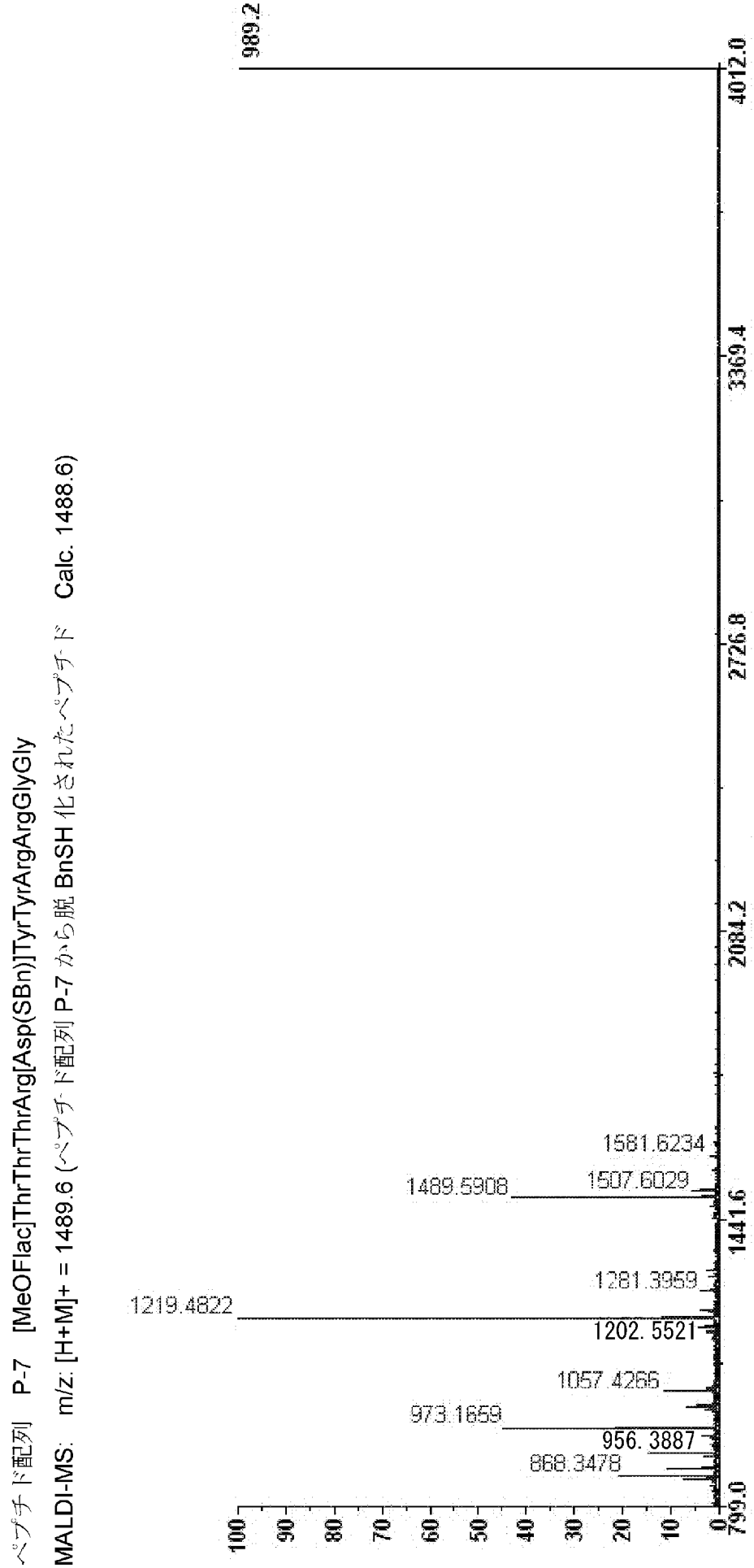
[図4]


Ft02A_dR_56/K+Eicine
2030.15
1882.07
1720.01
1646.97
1583.90
1530.86
1498.94
1327.55
1289.58
1256.71
1169.64
1104.63
1065.61
1045.65
m/z: [H+M]+ = 1289.6 (ペプチドP-4 Calc. 1288.7)
強度[%]

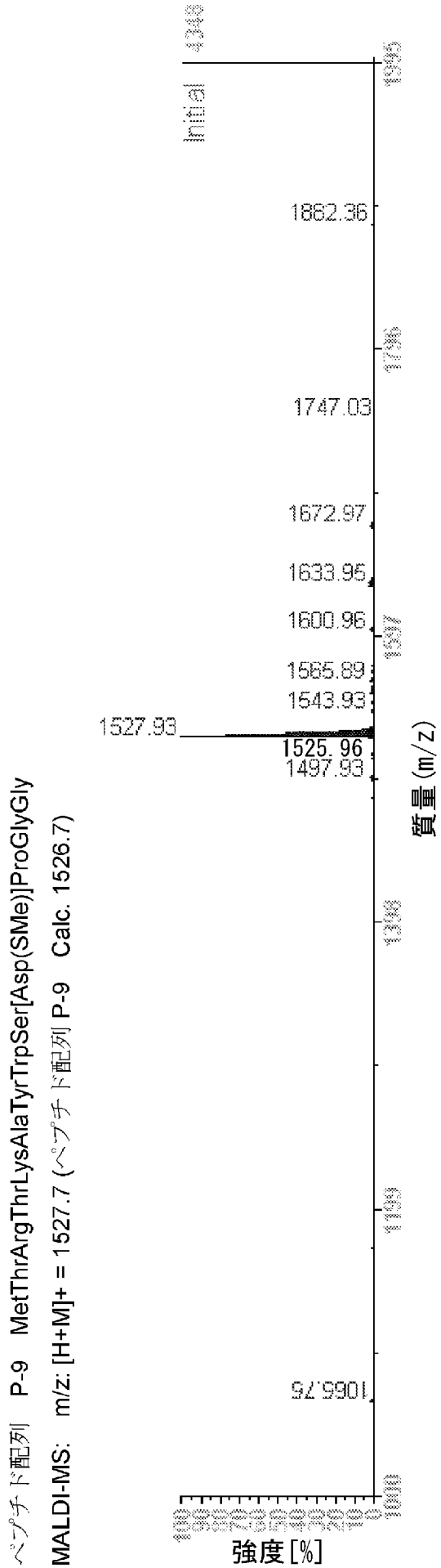
[図5]


ペプチド配列 P-5 MetThrThrThrGlyGly[Asp(SBn)]PhePheArgGlyGlyLys
MALDI-MS: m/z: [H+M]+ = 1271.8 (ペプチド配列 P-5 から脱 BnSH 化されたペプチド Calc. 1270.6)
FI02A_dR_Asp(SBn)
613.7
4013.3
3350.2
2687.4
2024.6
1361.8
699.8
2456.77
2200.49
2023.28
1882.34
1720.25
1589.04
1518.01
1428.93
1349.92
1271.76
1289.77
1169.60
1107.70
1026.79
918.65
857.55
783.50
704.33
100
80
60
40
20
0
強度[%]

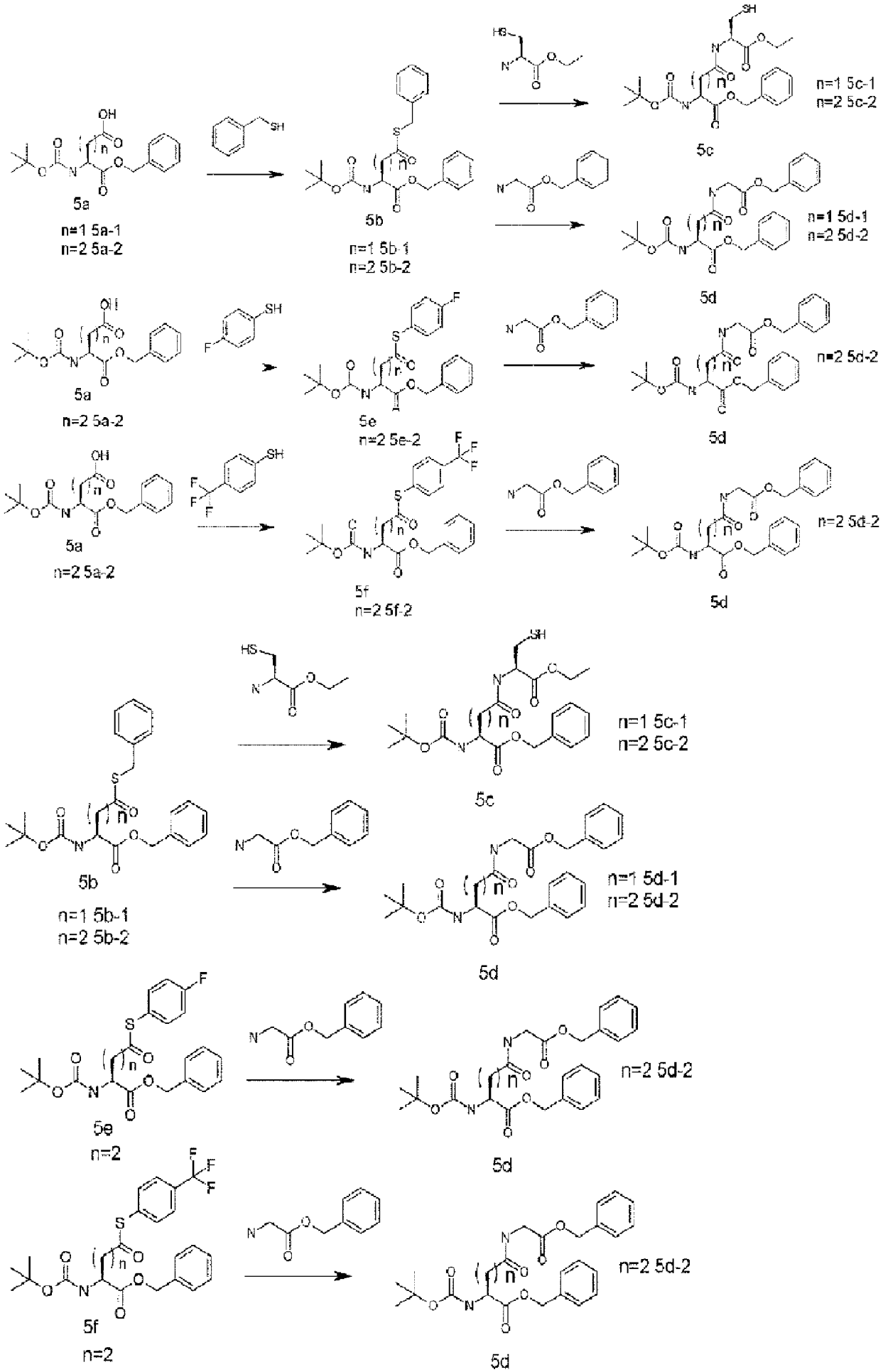
[図6]


ペプチド配列 P-7 [MeOFlac]ThrThrThrArg[Asp(SBn)]TyrTyrArgArgGlyGly
MALDI-MS: m/z: [H+M]+ = 1489.6 (ペプチド配列 P-7 から脱 BnSH 化されたペプチド Calc. 1488.6)
989.2
1581.6234
1489.5908
1507.6029
1281.3959
1219.4822
1202.5521
1057.4266
973.1659
956.3887
868.3478
799.0
1441.6
2084.2
2726.8
3369.4
4012.0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

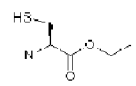
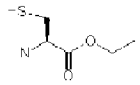
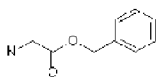
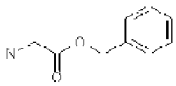
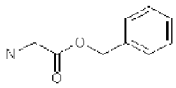
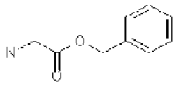
[図7]


ペプチド配列 P-9 MetThrArgThrLysAlaTyrTrpSer[Asp(SMe)]ProGlyGly
MALDI-MS: m/z: [H+M]+ = 1527.7 (ペプチド配列 P-9 Calc. 1526.7)
initial
1862.36
1747.03
1672.97
1633.95
1600.96
1585.89
1543.93
1527.93
1525.96
1497.93
1066.75
強度[%]
質量(m/z)

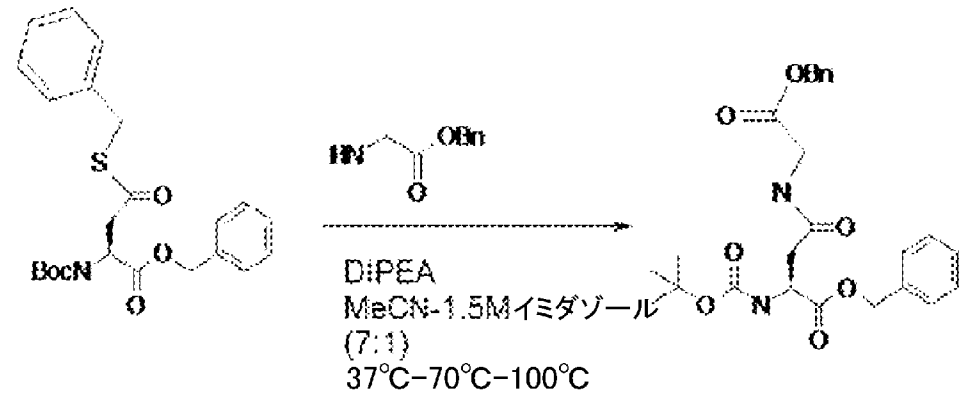
[図8-1]


5a
n=1 5a-1
n=2 5a-2
5b
n=1 5b-1
n=2 5b-2
5c
n=1 5c-1
n=2 5c-2
5d
n=1 5d-1
n=2 5d-2
5e
n=2 5e-2
5f
n=2 5f-2
n=2
OH
SH
HS
F
S
N
O

[図8-2]

エントリー	アミン	チオエステル	pH	温度	時間	転化率
1		5b-1	7.9	50℃	3h	67%(単離収率)
2		5b-2	7.5	50℃	3h	88%(単離収率)
3		5b-1	9	50℃	3d	5b-1: 5d-1:5d-1b =22:1:8 LCMS UV 面積
4		5b-2	8.8	50℃	3d	5b 2:5d 2=22:10 LCMS UV 面積
5		5e-2	8.3	50℃	6h	91%(単離収率)
6		5f-2	7	50℃	45m	90%(単離収率)

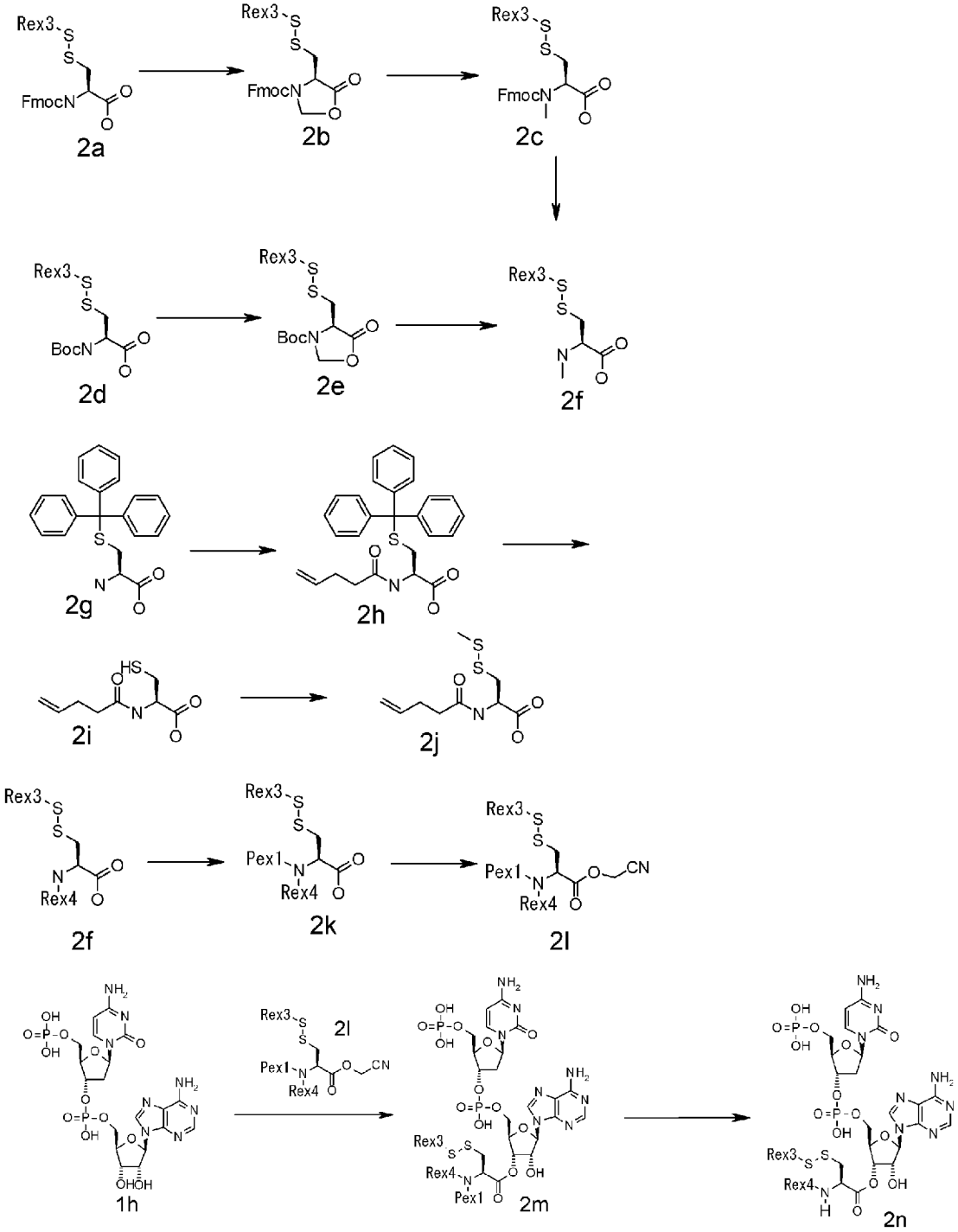
[図9]



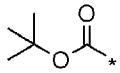
By LC-MS

			TM	TM-Bnなし	SM	SMのチオエステル加水分解体
pH6.4	37℃	1d	4%	9%	87%	0%
	70℃	+3h	4%	13%	83%	0%
	100℃	+6h	1%	31%	64%	3%
pH7.4	37℃	1d	1%	18%	81%	0%
	70℃	+3h	1%	23%	77%	0%
	100℃	+6h	<1%	46%	49%	5%

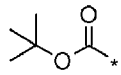
[図10]


Rex3
FmocN
2a
2b
2c
BocN
2d
2e
2f
2g
2h
2i
2j
Pex1
Rex4
2k
2l
CN
1h
2m
2n

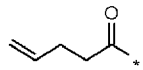
[図11]

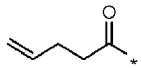
2m－A： Rex3＝tBu、Rex4＝H, Pex1＝ 

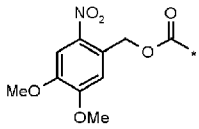
2n－A： Rex3＝tBu、Rex4＝H

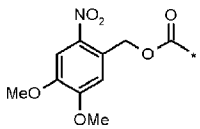
2m－B： Rex3＝ tBu, Rex4＝Me, Pex1＝ 

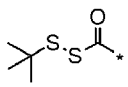
2n－B： Rex3＝ tBu, Rex4＝Me

2m－C： Rex3＝tBu, Rex4＝H, Pex1＝ 

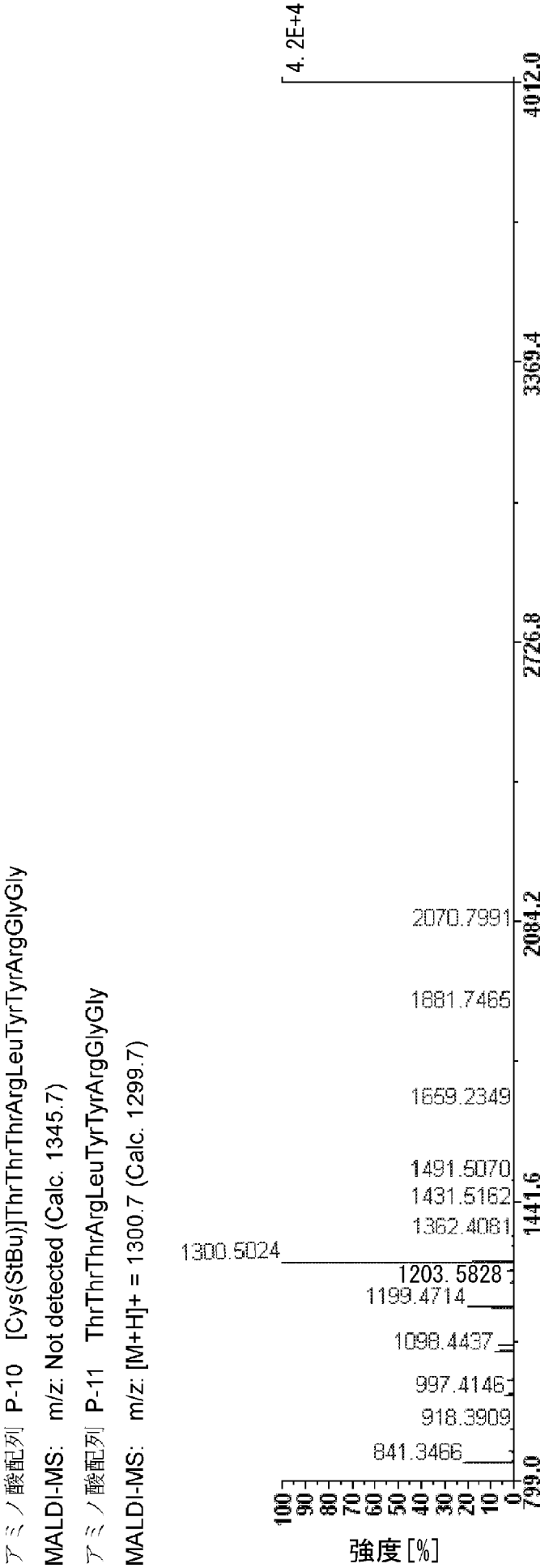
2m－D： Rex3＝Me, Rex4＝H, Pex1＝ 

2m－E： Rex3＝ tBu, Rex4＝H, Pex1＝ 

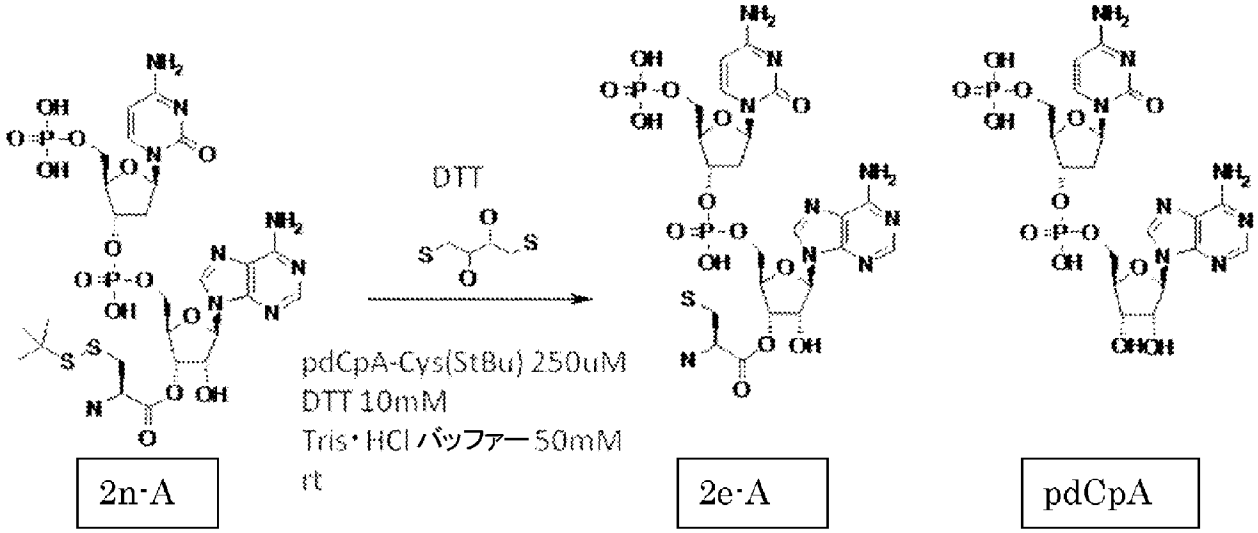
2m－F： Rex3＝Et, Rex4＝Me, Pex1＝ 

2m－G： Rex3＝tBu, Rex4＝Me, Pex1＝ 

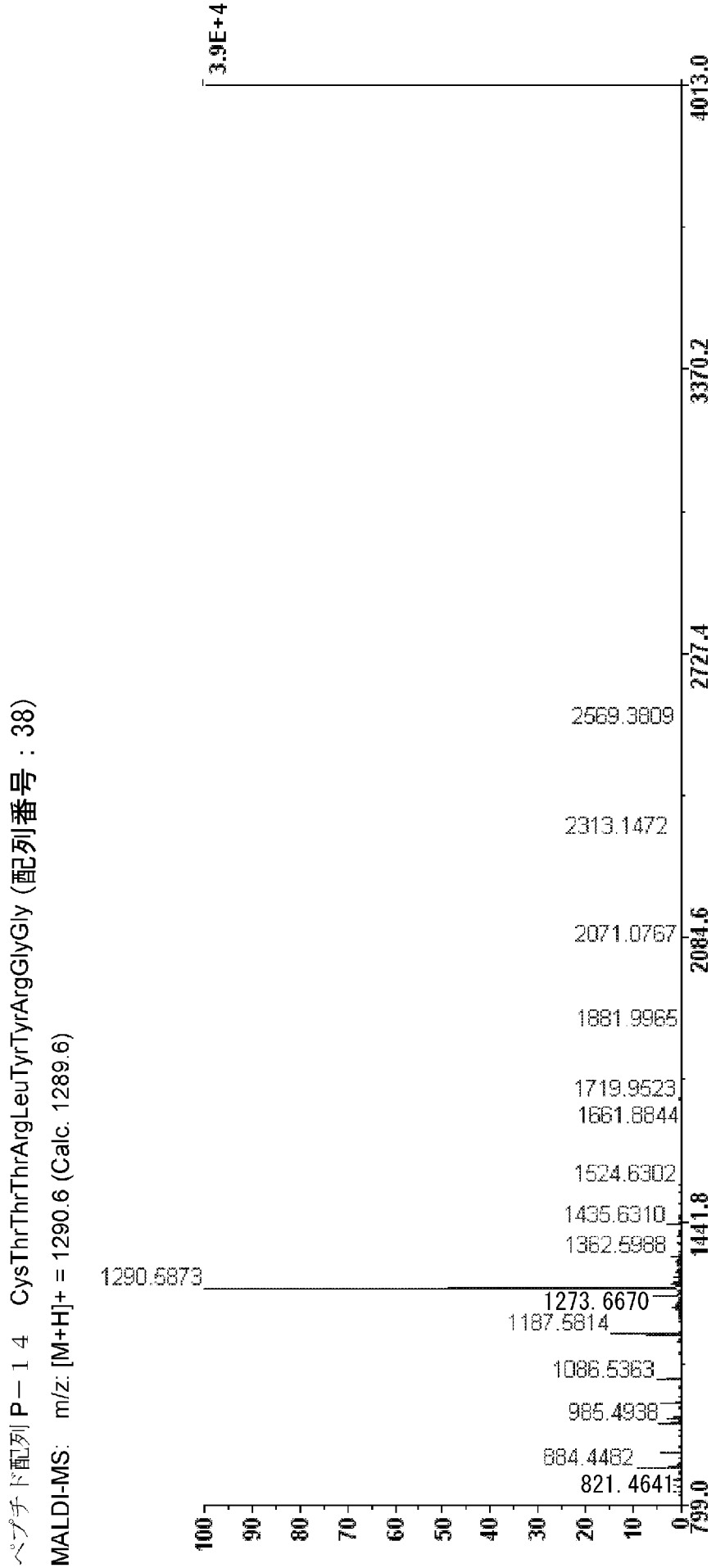
[図12]


アミノ酸配列 P-10 [Cys(StBu)]ThrThrThrArgLeuTyrTyrArgGlyGly
MALDI-MS: m/z: Not detected (Calc. 1345.7)
アミノ酸配列 P-11 ThrThrThrArgLeuTyrTyrArgGlyGly
MALDI-MS: m/z: [M+H]+ = 1300.7 (Calc. 1299.7)
4.2E+4
4012.0
3369.4
2726.8
2084.2
1441.6
799.0
2070.7991
1681.7465
1659.2349
1491.5070
1431.5162
1362.4081
1300.5024
1203.5828
1199.4714
1098.4437
997.4146
918.3909
841.3466
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
強度[%]

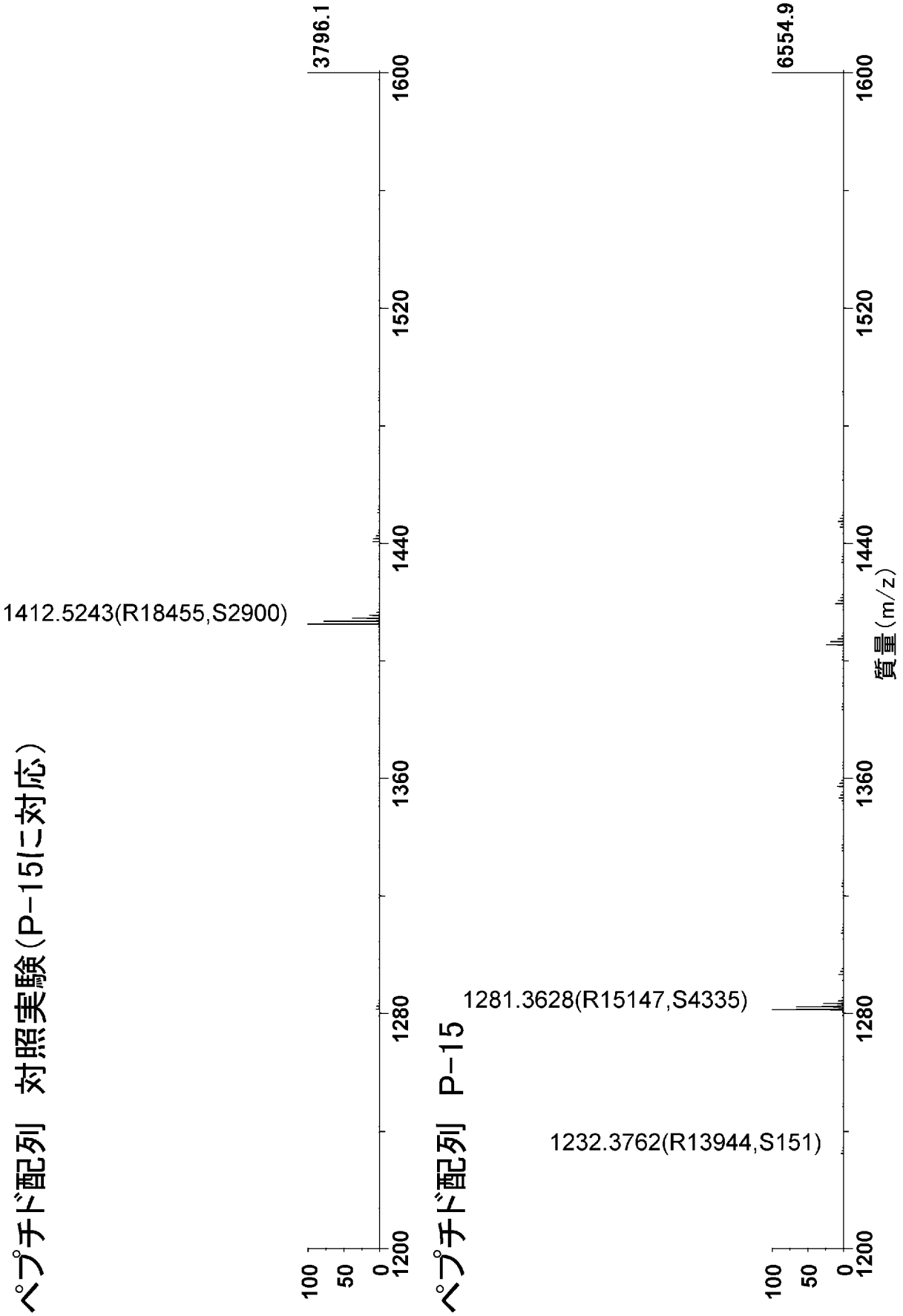
[図13]


DTT
pdCpA-Cys(StBu) 250uM
DTT 10mM
Tris・HCl バッファー 50mM
rt
2n-A
2e-A
pdCpA

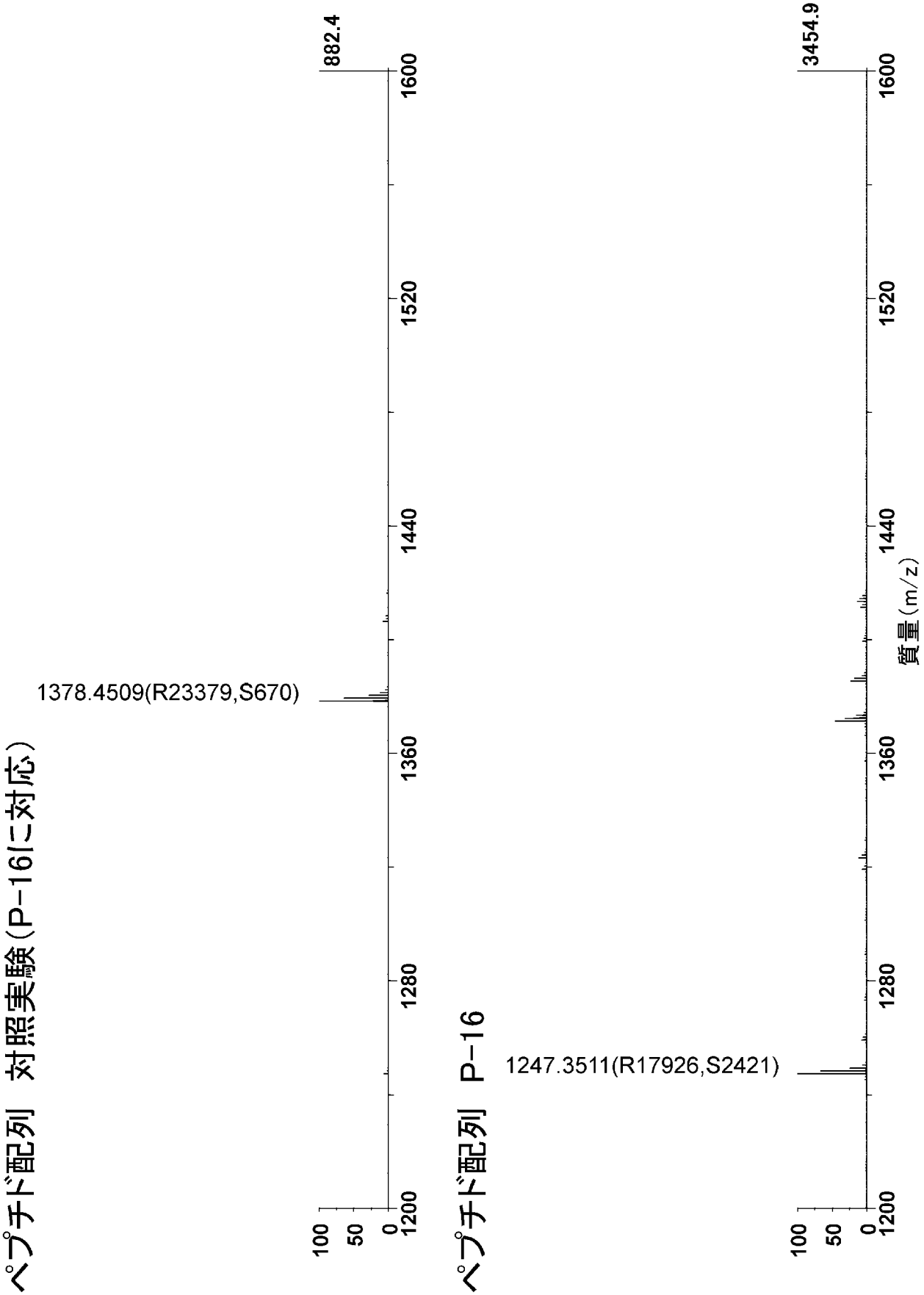
[図14]


ペプチド配列 P－１４ CysThrThrThrArgLeuTyrTyrArgGlyGly (配列番号：38)
MALDI-MS: m/z: [M+H]+ = 1290.6 (Calc. 1289.6)
3.9E+4
4013.0
3370.2
2727.4
2084.6
1441.8
799.0
2569.3809
2313.1472
2071.0767
1881.9965
1719.9523
1661.8844
1524.6302
1435.6310
1362.5988
1290.5873
1273.6670
1187.5814
1086.5363
985.4938
884.4462
821.4641
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

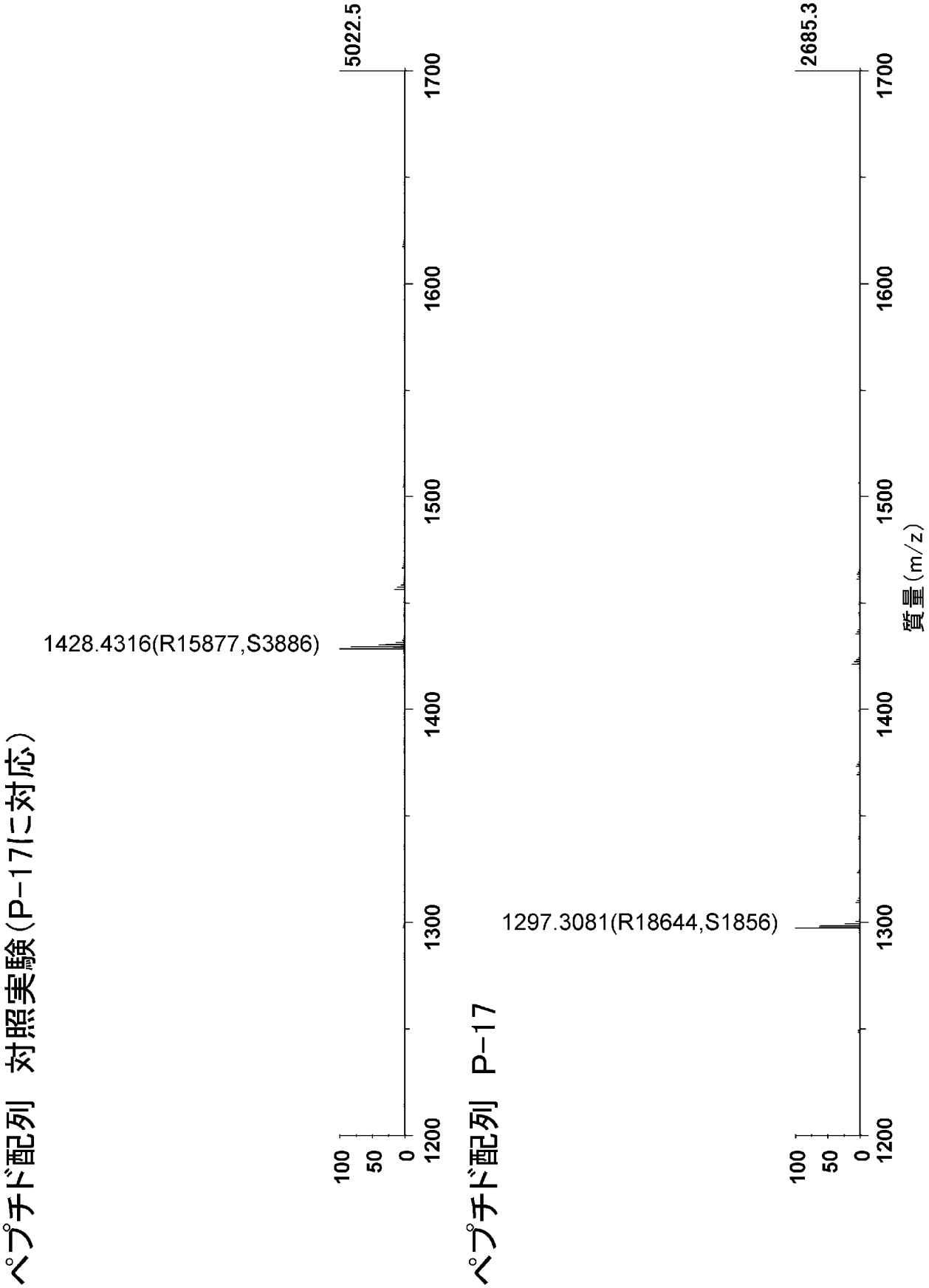
[図15-1]


ペプチド配列 対照実験(P-15に対応)
3796.1
1412.5243(R18455,S2900)
ペプチド配列 P-15
6554.9
1281.3628(R15147,S4335)
1232.3762(R13944,S151)
100
50
0
1200
1280
1360
1440
1520
1600
質量(m/z)

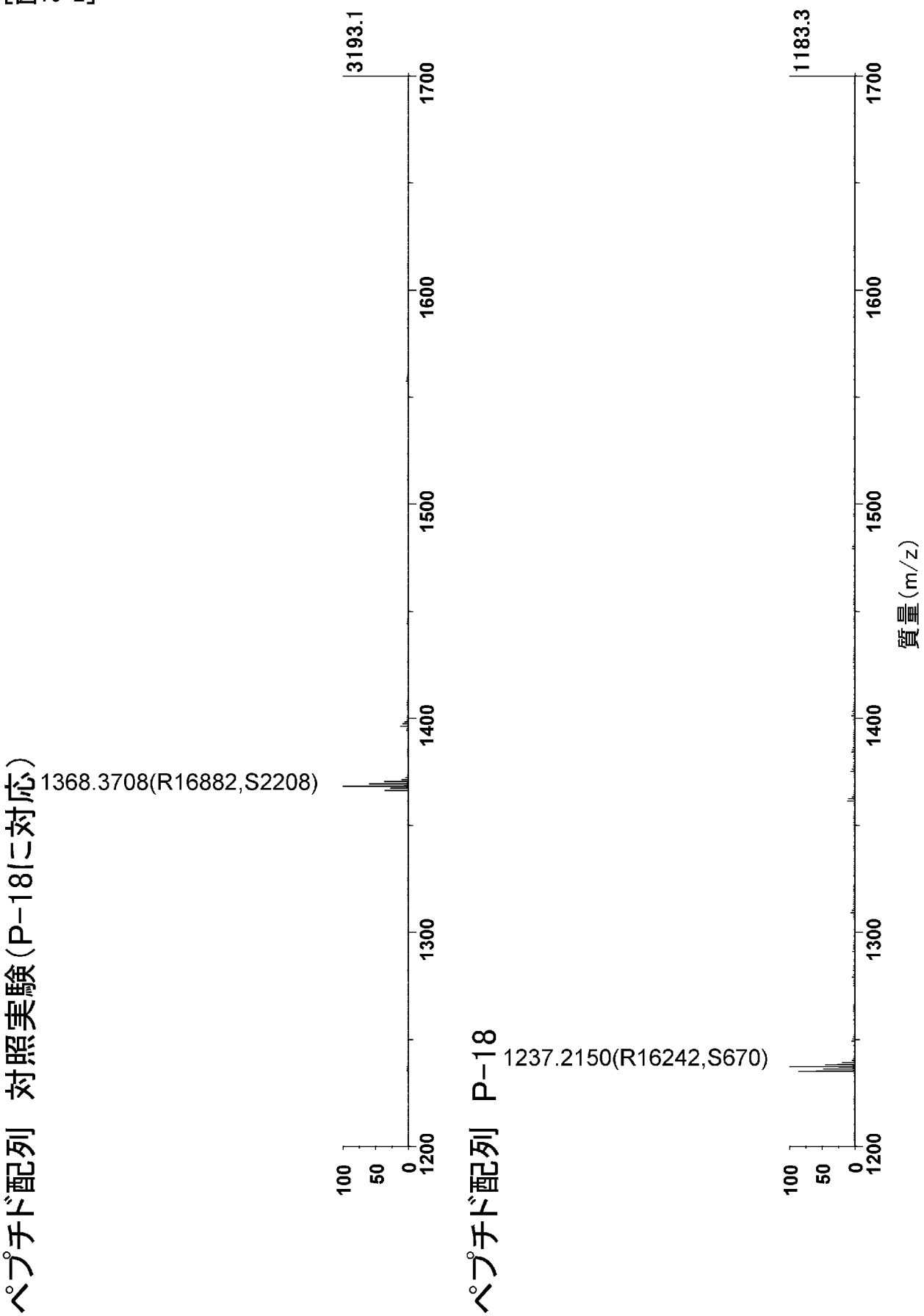
[図15-2]


ペプチド配列 対照実験(P-16に対応)
1378.4509(R23379,S670)
882.4
ペプチド配列 P-16
1247.3511(R17926,S2421)
3454.9
100
50
0
1200
1280
1360
1440
1520
1600
質量(m/z)

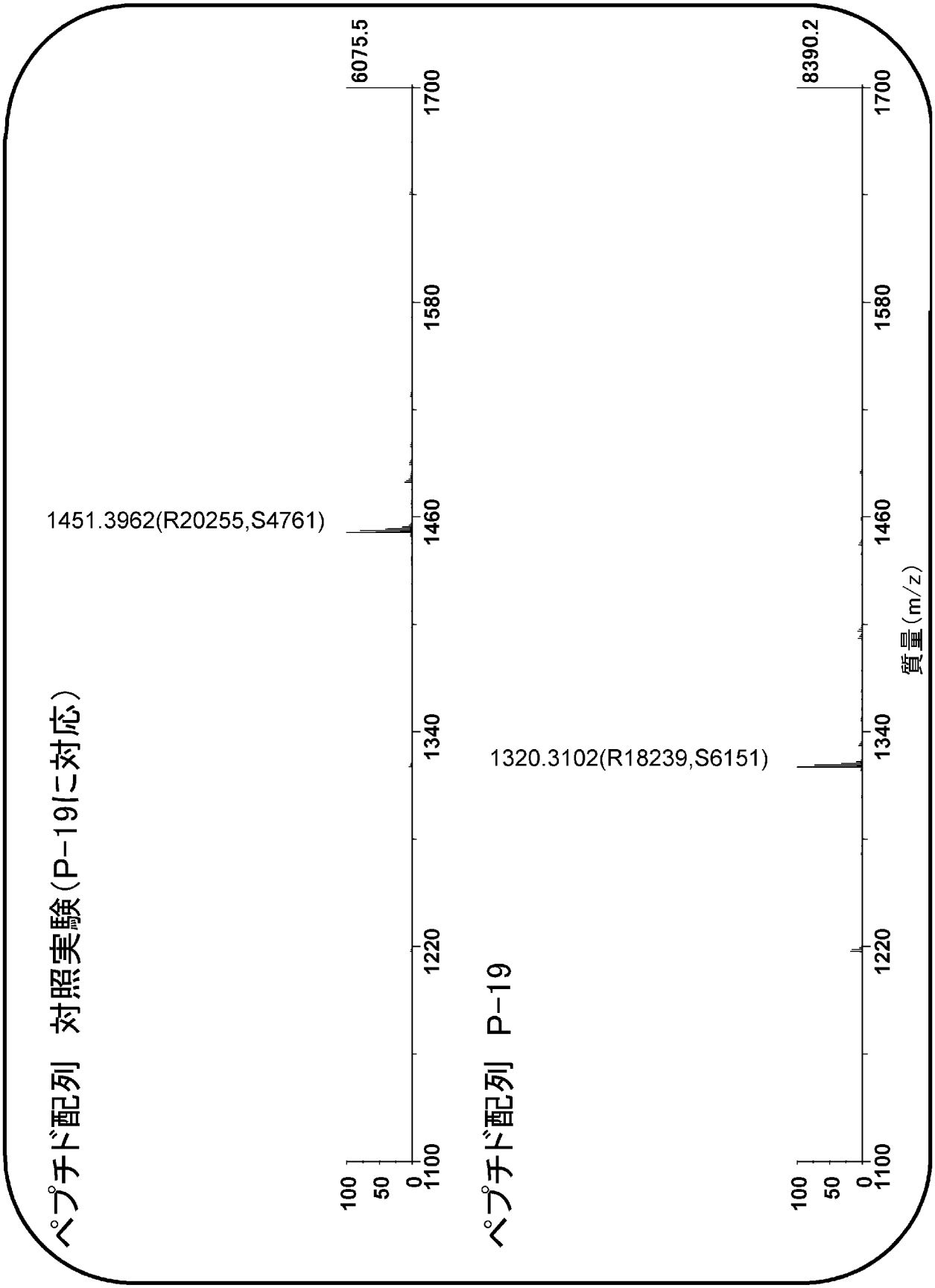
[図16-1]


ペプチド配列 対照実験(P-17に対応)
1428.4316(R15877,S3886)
5022.5
ペプチド配列 P-17
1297.3081(R18644,S1856)
2685.3
100
50
0
1200
1300
1400
1500
1600
1700
質量(m/z)

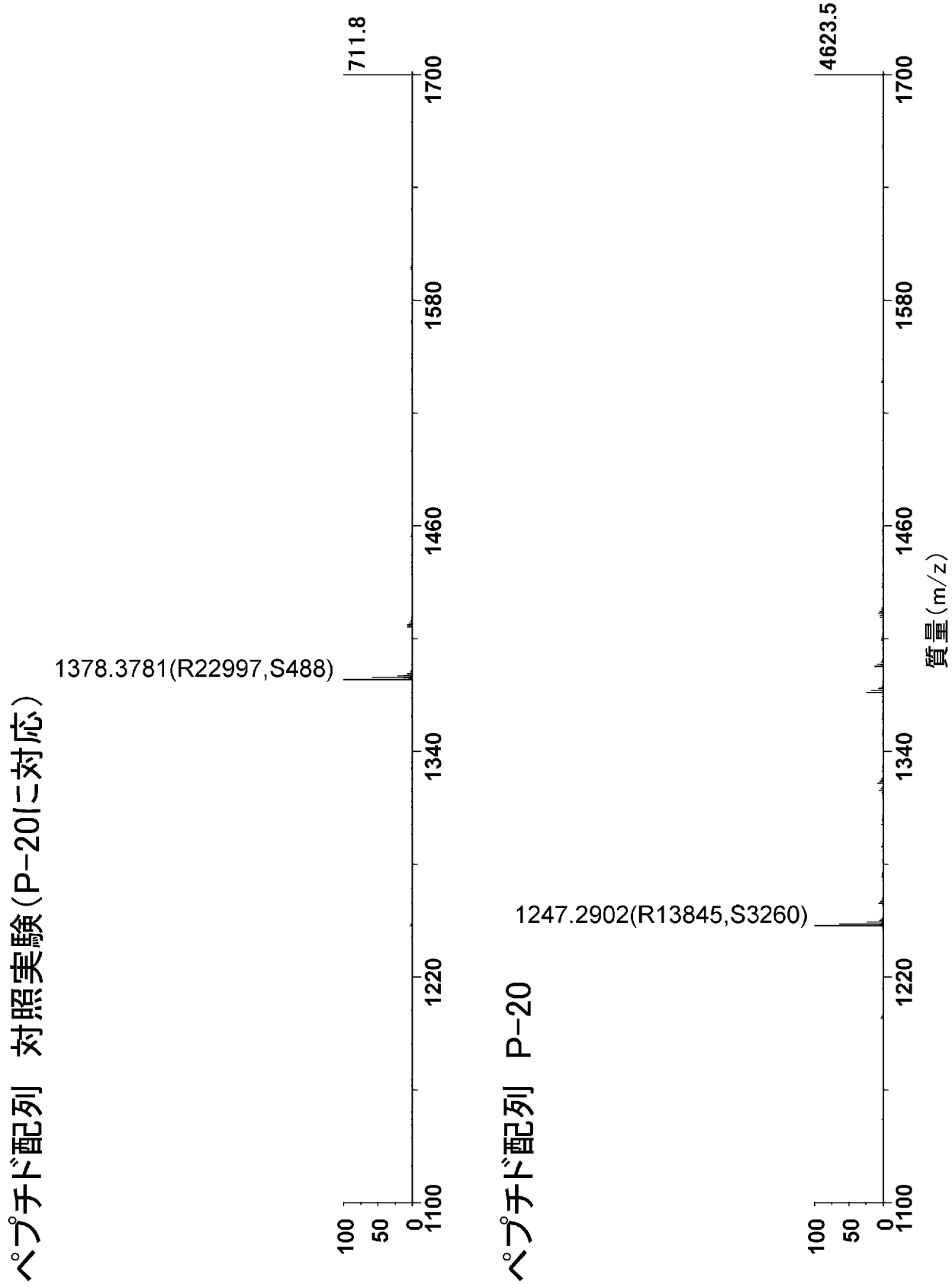
[図16-2]


ペプチド配列 対照実験(P-18に対応)
1368.3708(R16882,S2208)
3193.1
ペプチド配列 P-18
1237.2150(R16242,S670)
1183.3
100
50
0
1200
1300
1400
1500
1600
1700
質量(m/z)

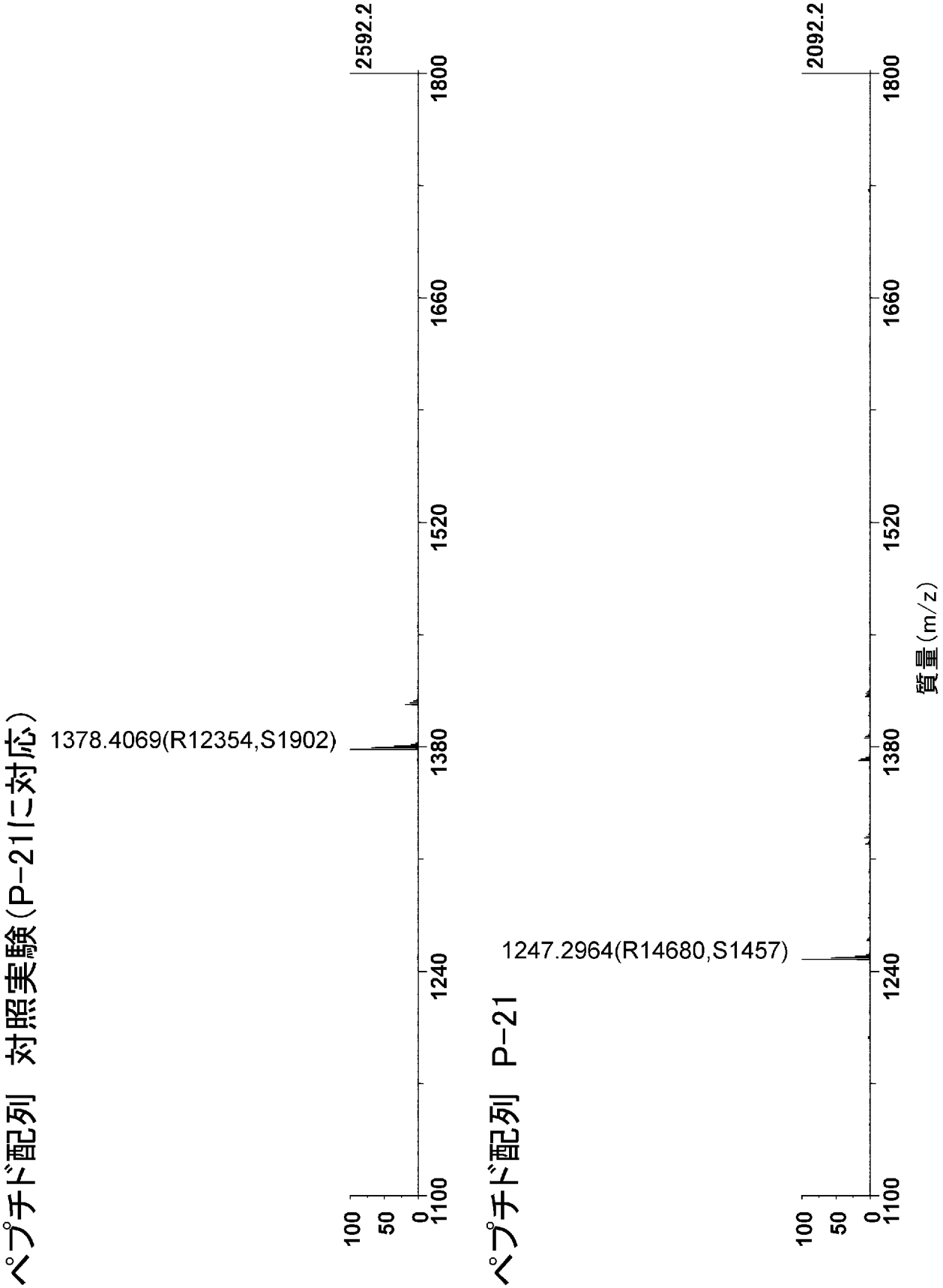
[図17-1]


ペプチド配列 対照実験(P-19に対応)
6075.5
1451.3962(R20255,S4761)
ペプチド配列 P-19
8390.2
1320.3102(R18239,S6151)
100
50
0
1100
1220
1340
1460
1580
1700
質量(m/z)

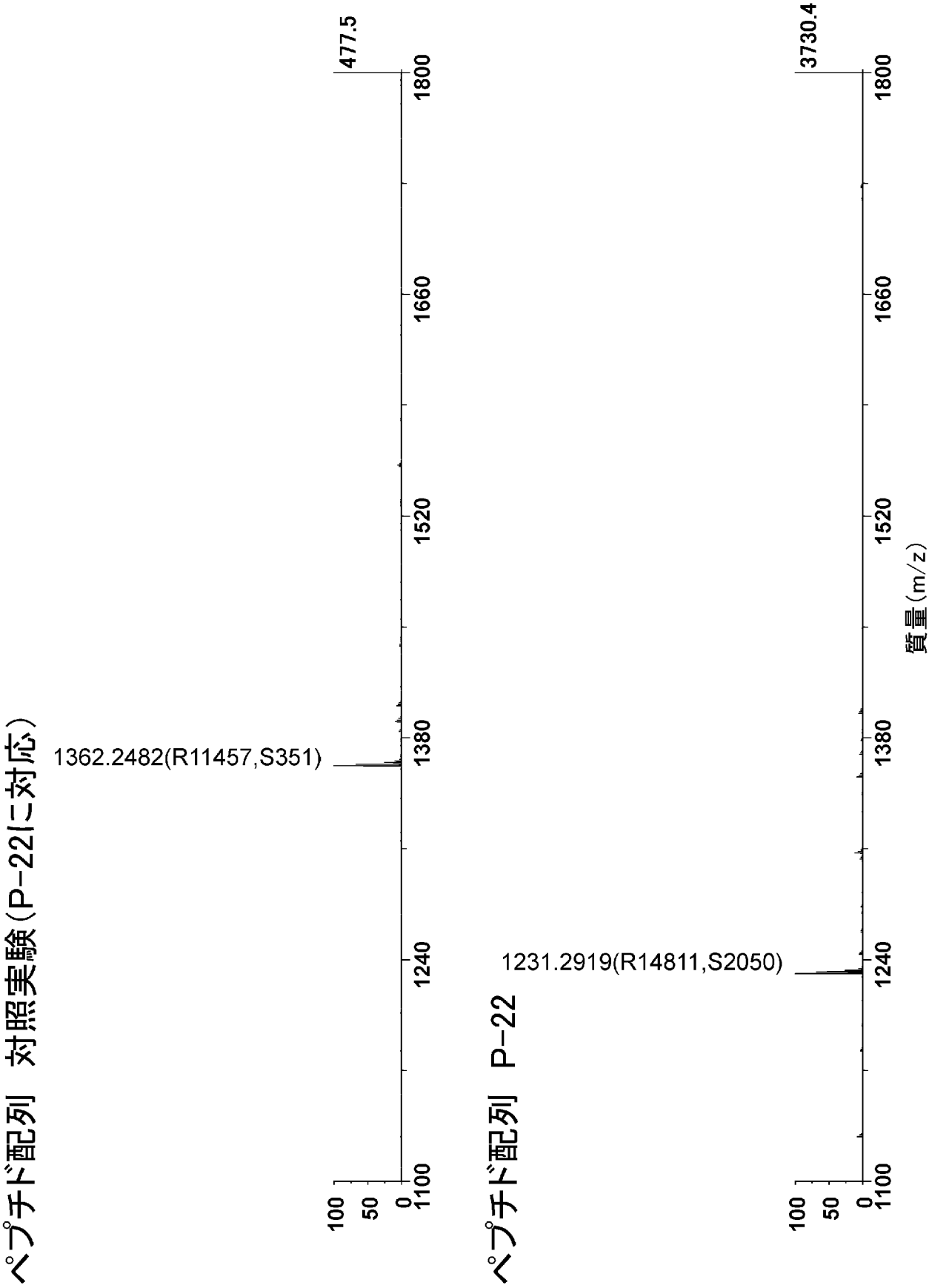
[図17-2]


ペプチド配列 対照実験(P-20に対応)
711.8
1378.3781(R22997,S488)
100
50
0
1100
1220
1340
1460
1580
1700
ペプチド配列 P-20
4623.5
1247.2902(R13845,S3260)
質量(m/z)

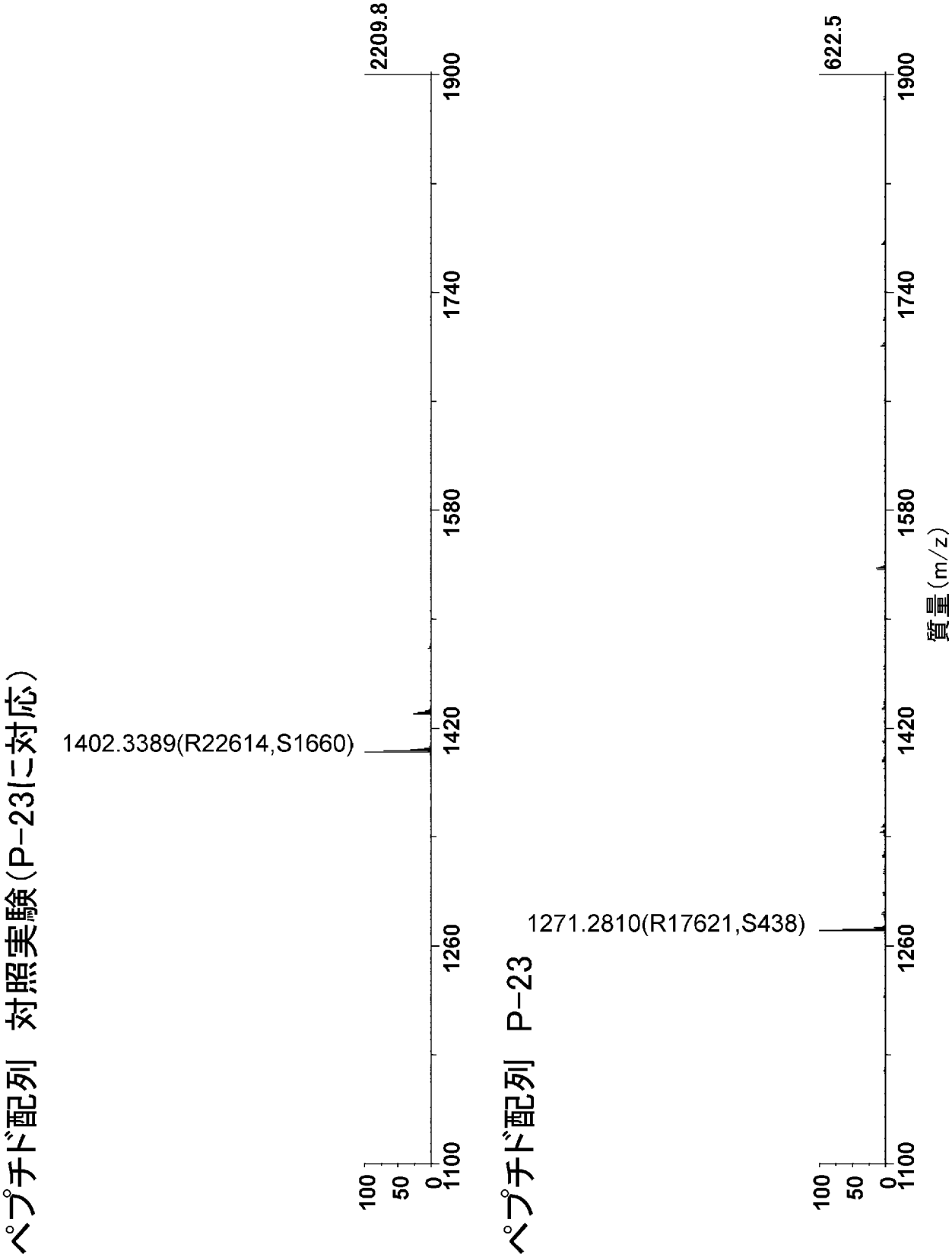
[図18-1]


ペプチド配列 対照実験(P-21に対応)
1378.4069(R12354,S1902)
ペプチド配列 P-21
1247.2964(R14680,S1457)
2592.2
2092.2
1800
1660
1520
1380
1240
1100
100
50
0
質量(m/z)

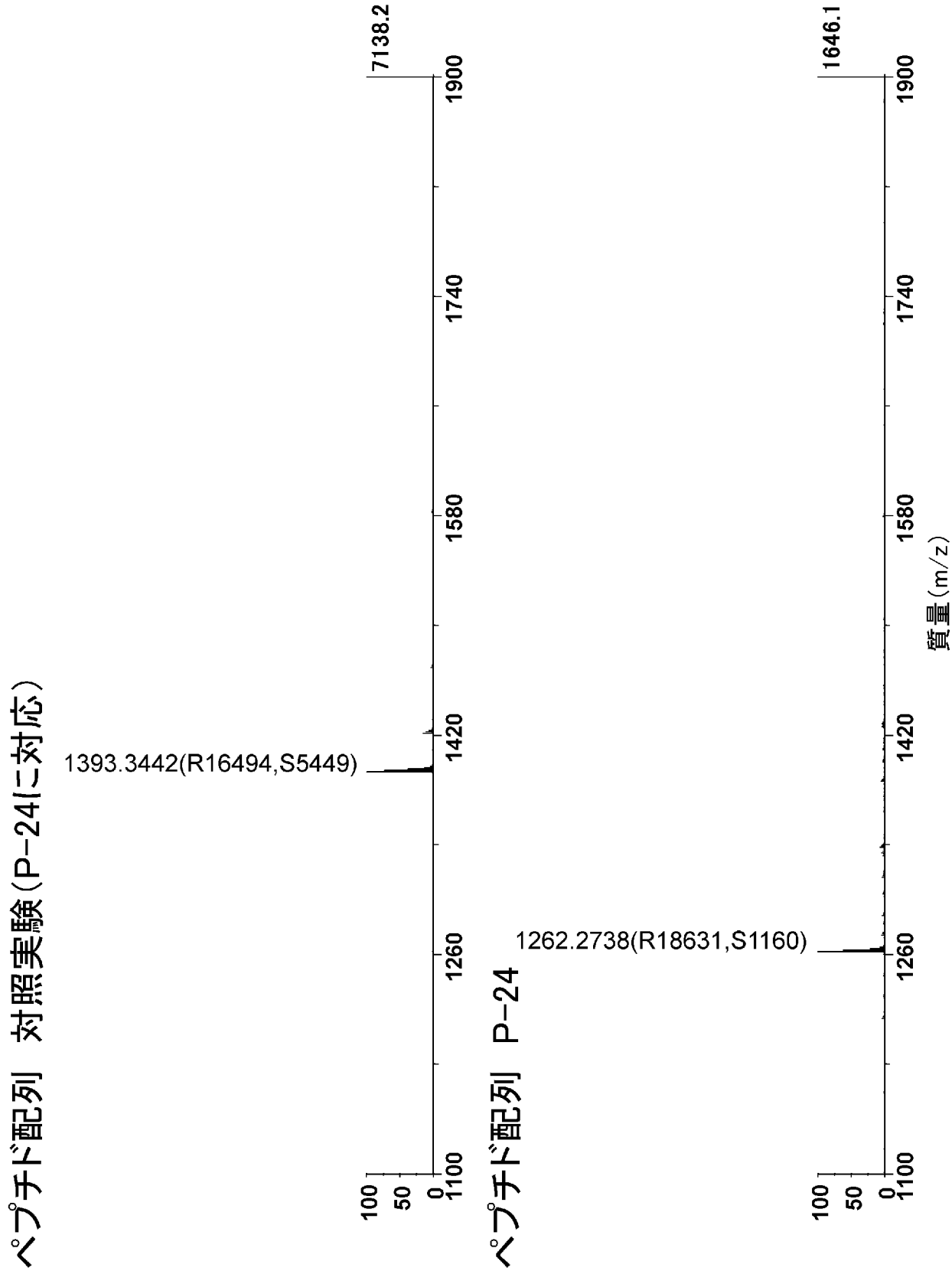
[図18-2]


ペプチド配列 対照実験(P-22に対応)
1362.2482(R11457,S351)
477.5
ペプチド配列 P-22
1231.2919(R14811,S2050)
3730.4
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
質量(m/z)

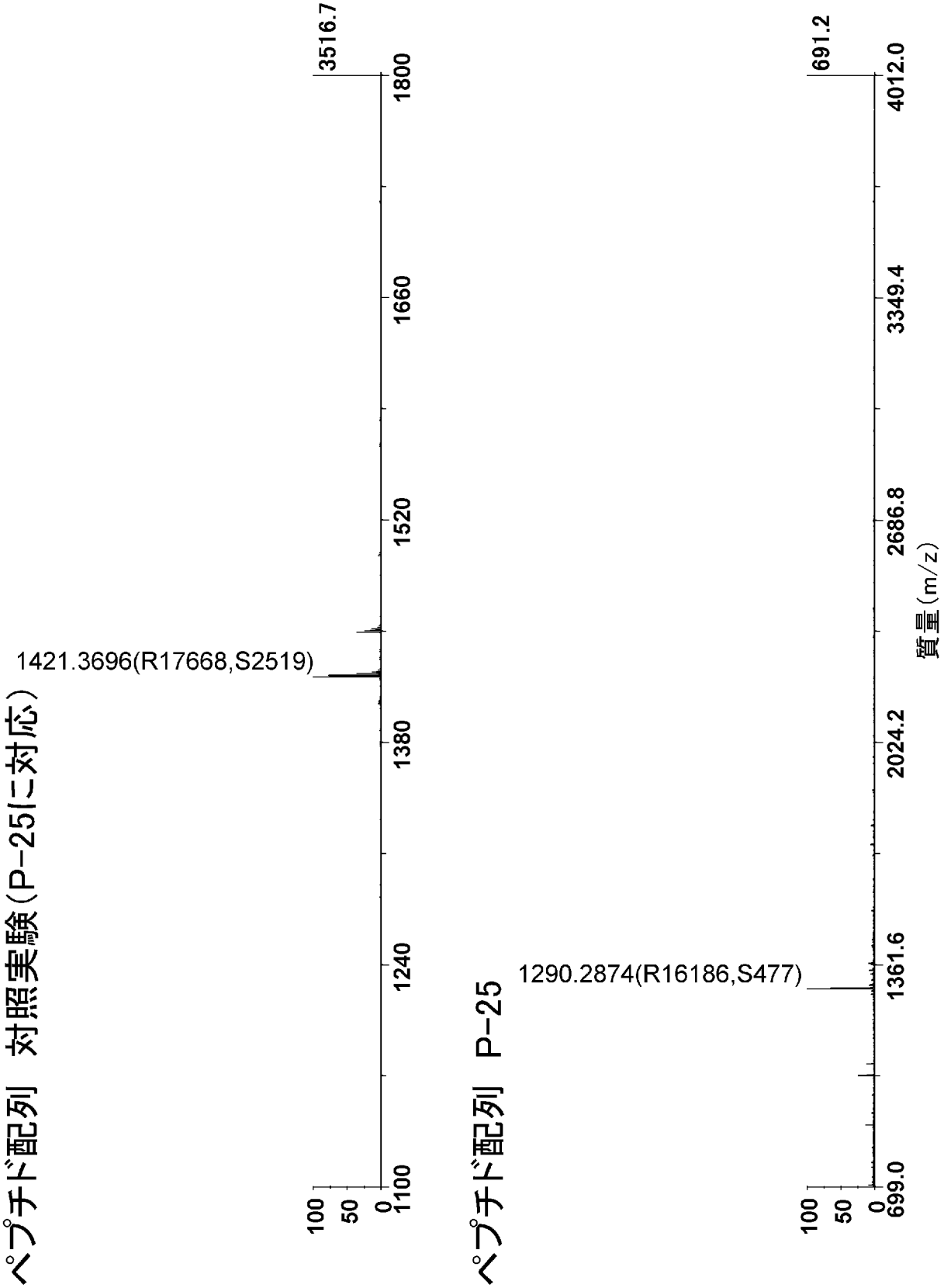
[図19-1]


ペプチド配列 対照実験(P-23に対応)
1402.3389(R22614,S1660)
2209.8
ペプチド配列 P-23
1271.2810(R17621,S438)
622.5
100
50
0
1100
1260
1420
1580
1740
1900
質量(m/z)

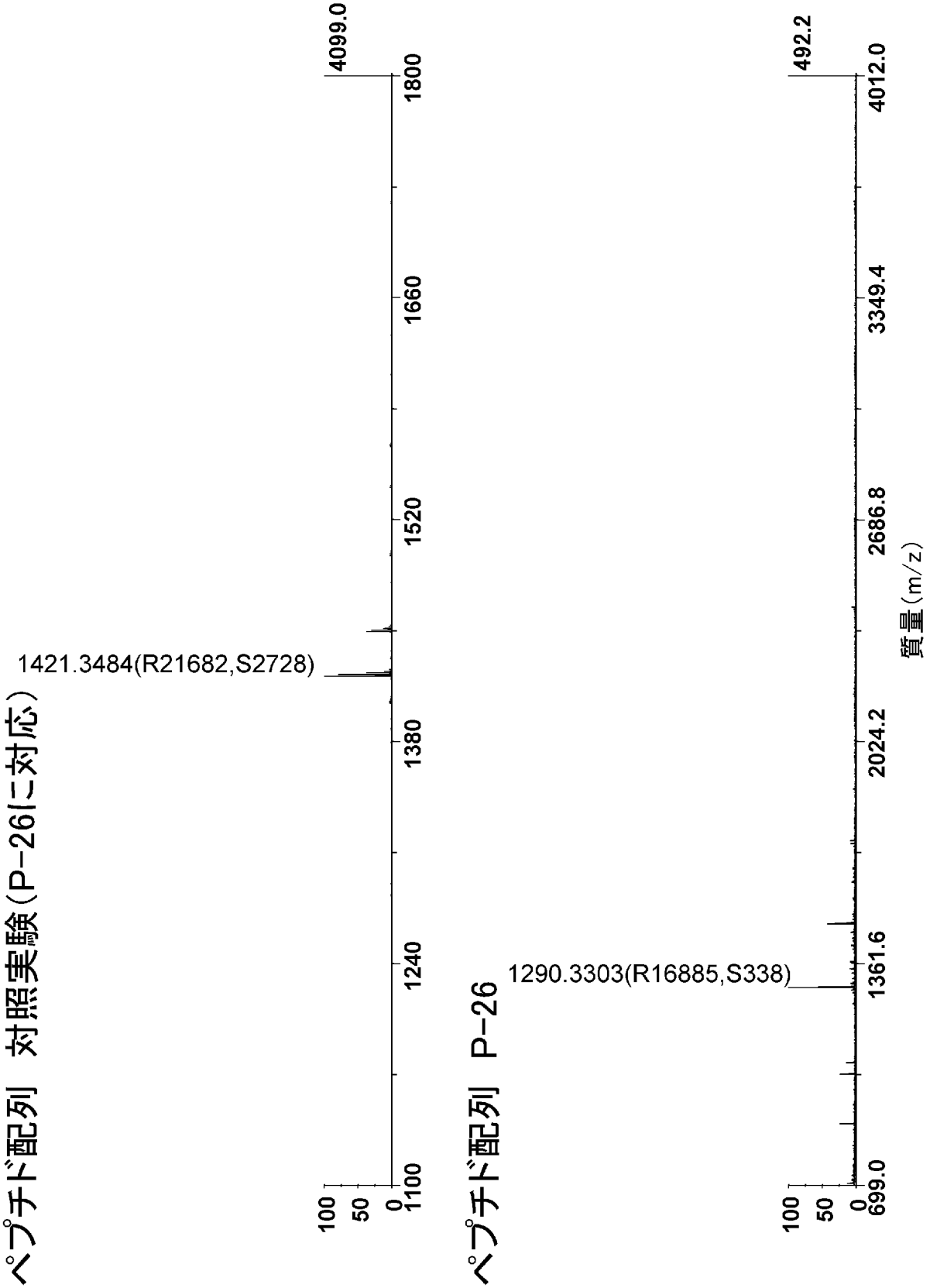
[図19-2]


ペプチド配列 対照実験(P-24に対応)
1393.3442(R16494,S5449)
7138.2
ペプチド配列 P-24
1262.2738(R18631,S1160)
1646.1
100
50
0
1100
1260
1420
1580
1740
1900
質量(m/z)

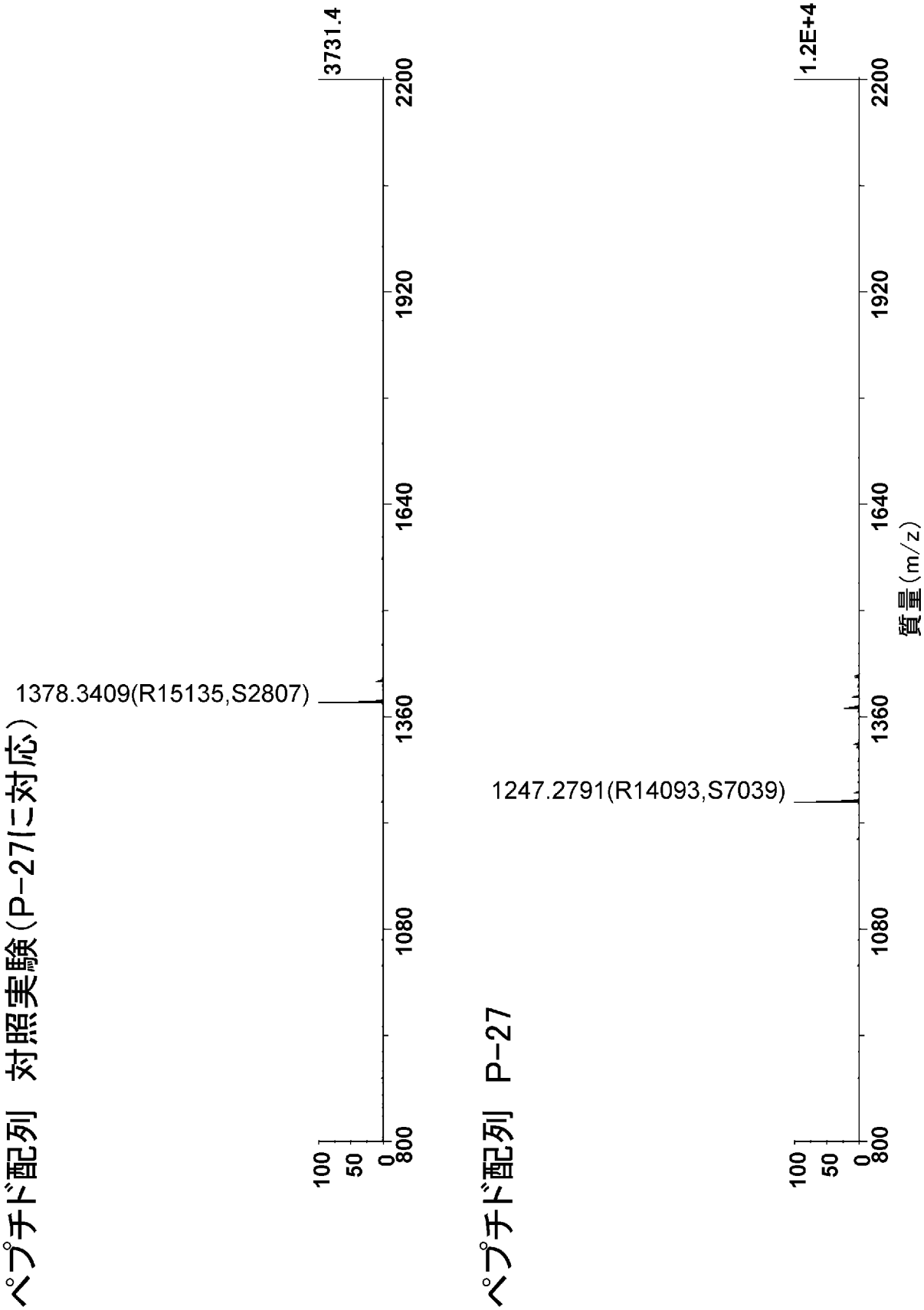
[図20-1]


ペプチド配列 対照実験(P-25に対応)
1421.3696(R17668,S2519)
3516.7
1800
1660
1520
1380
1240
1100
100
50
0
ペプチド配列 P-25
1290.2874(R16186,S477)
691.2
4012.0
3349.4
2686.8
2024.2
1361.6
699.0
100
50
0
質量(m/z)

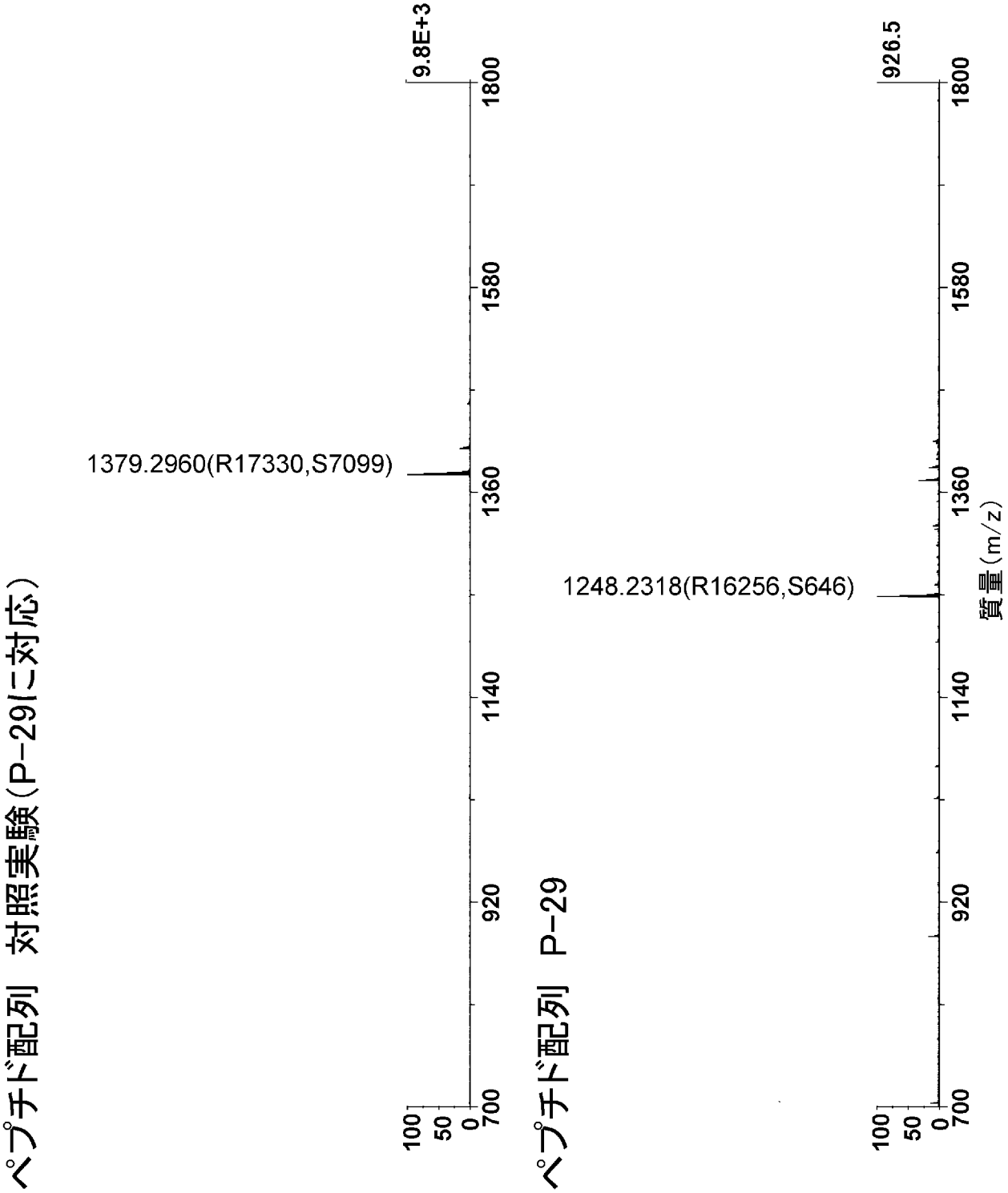
[図20-2]


ペプチド配列 対照実験(P-26に対応)
1421.3484(R21682,S2728)
4099.0
1800
1660
1520
1380
1240
1100
100
50
0
ペプチド配列 P-26
1290.3303(R16885,S338)
492.2
4012.0
3349.4
2686.8
2024.2
1361.6
699.0
100
50
0
質量(m/z)

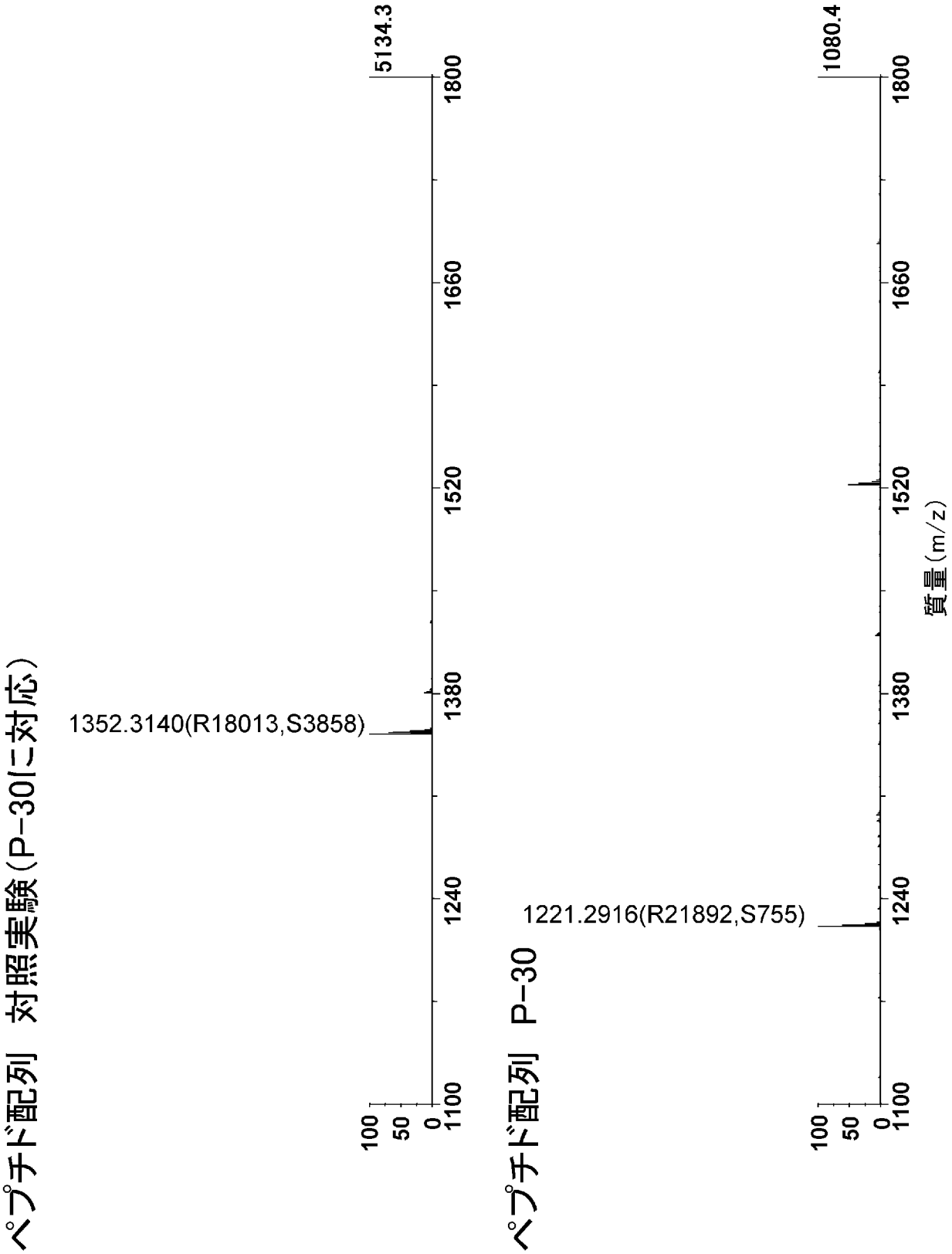
[図21-1]


ペプチド配列 対照実験(P-27に対応)
1378.3409(R15135,S2807)
3731.4
2200
1920
1640
1360
1080
800
100
50
0
ペプチド配列 P-27
1247.2791(R14093,S7039)
1.2E+4
2200
1920
1640
1360
1080
800
100
50
0
質量(m/z)

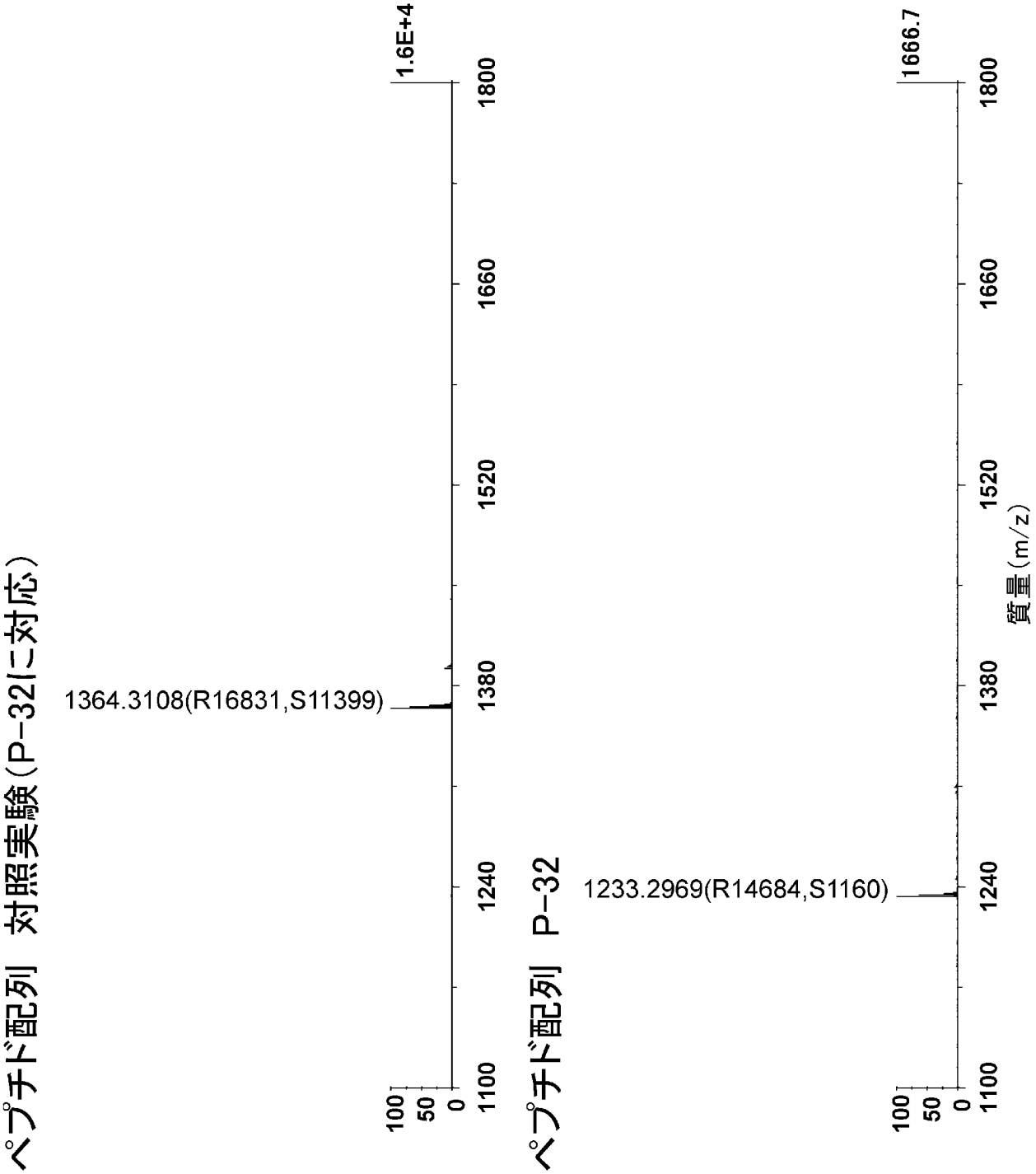
[図21-2]


ペプチド配列 対照実験(P-29に対応)
9.8E+3
1379.2960(R17330,S7099)
1800
1580
1360
1140
920
700
100
50
0
ペプチド配列 P-29
926.5
1248.2318(R16256,S646)
1800
1580
1360
1140
920
700
100
50
0
質量(m/z)

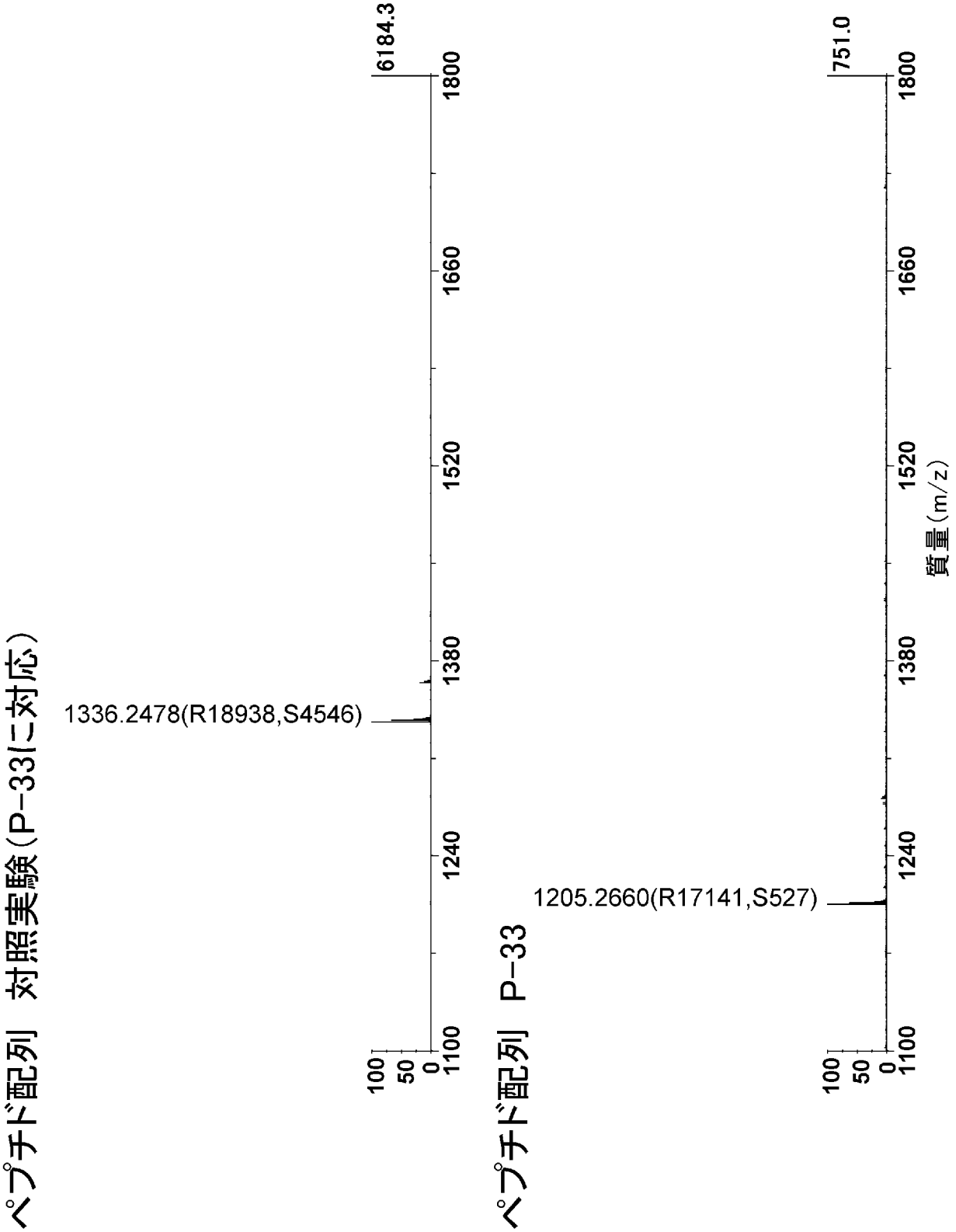
[図22]


ペプチド配列 対照実験(P-30に対応)
1352.3140(R18013,S3858)
5134.3
ペプチド配列 P-30
1221.2916(R21892,S755)
1080.4
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
質量(m/z)

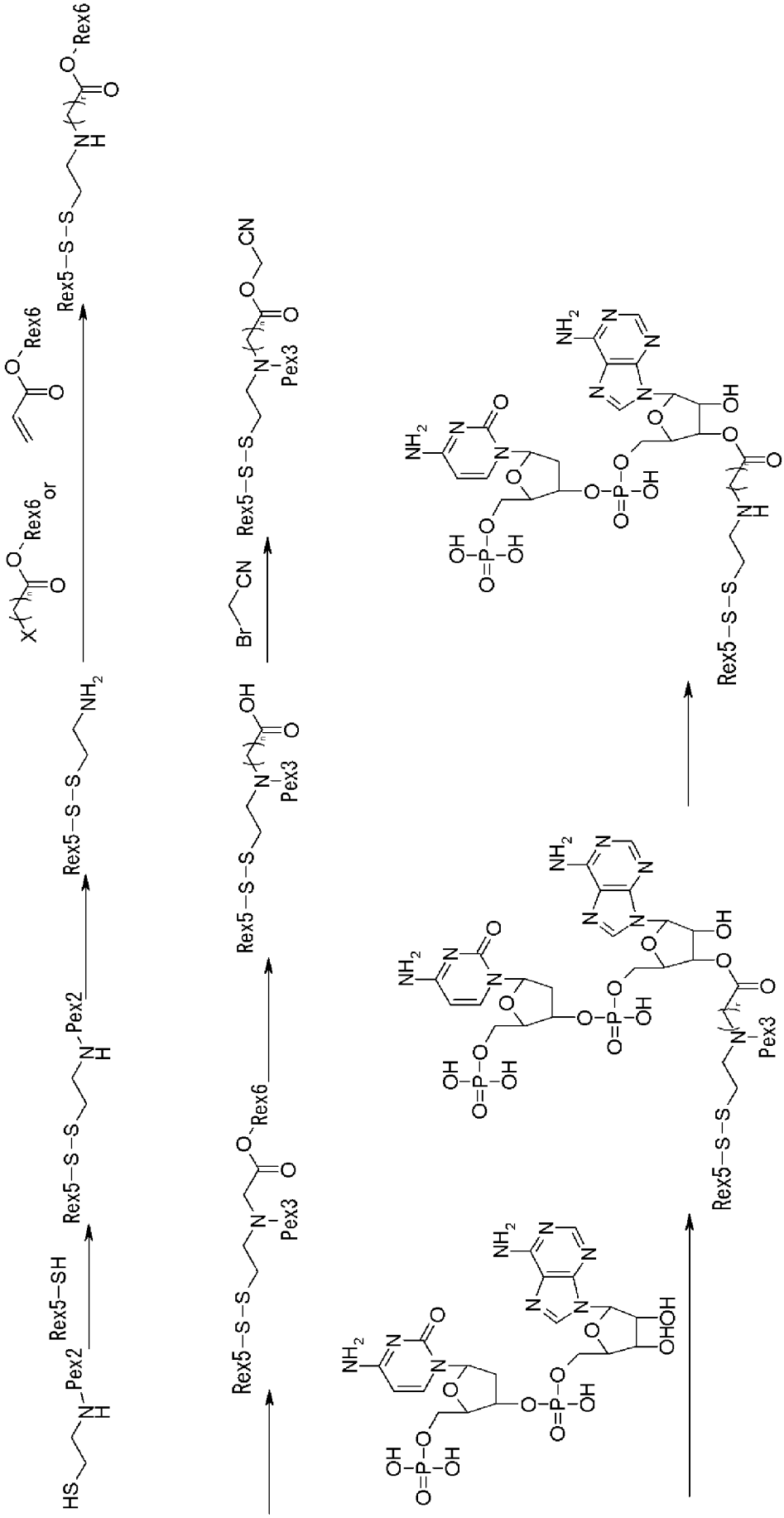
[図23-1]


ペプチド配列 対照実験(P-32に対応)
1364.3108(R16831,S11399)
1.6E+4
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
ペプチド配列 P-32
1233.2969(R14684,S1160)
1666.7
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
質量(m/z)

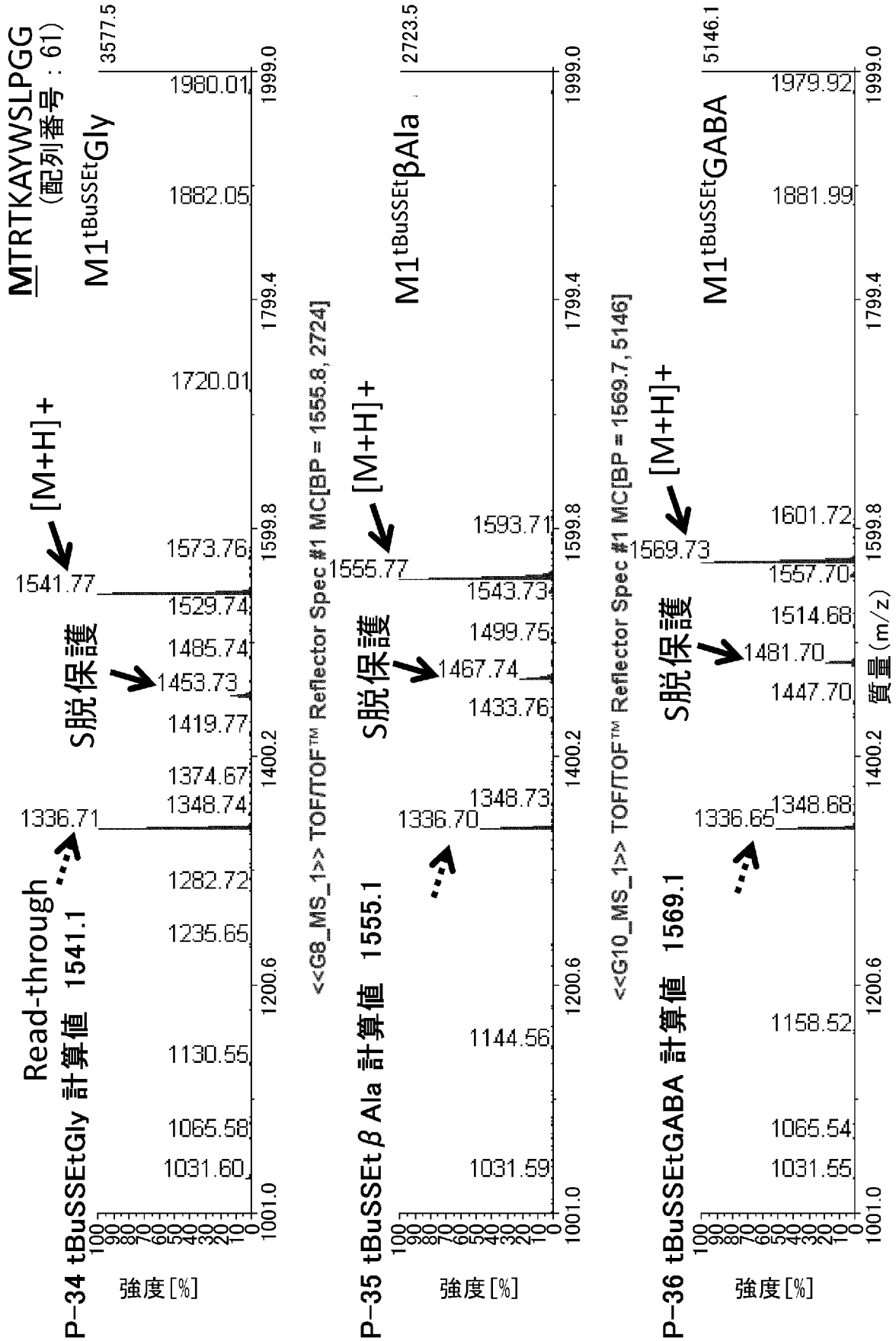
[図23-2]


ペプチド配列 対照実験(P-33に対応)
1336.2478(R18938,S4546)
6184.3
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
ペプチド配列 P-33
1205.2660(R17141,S527)
751.0
100
50
0
1100
1240
1380
1520
1660
1800
質量(m/z)

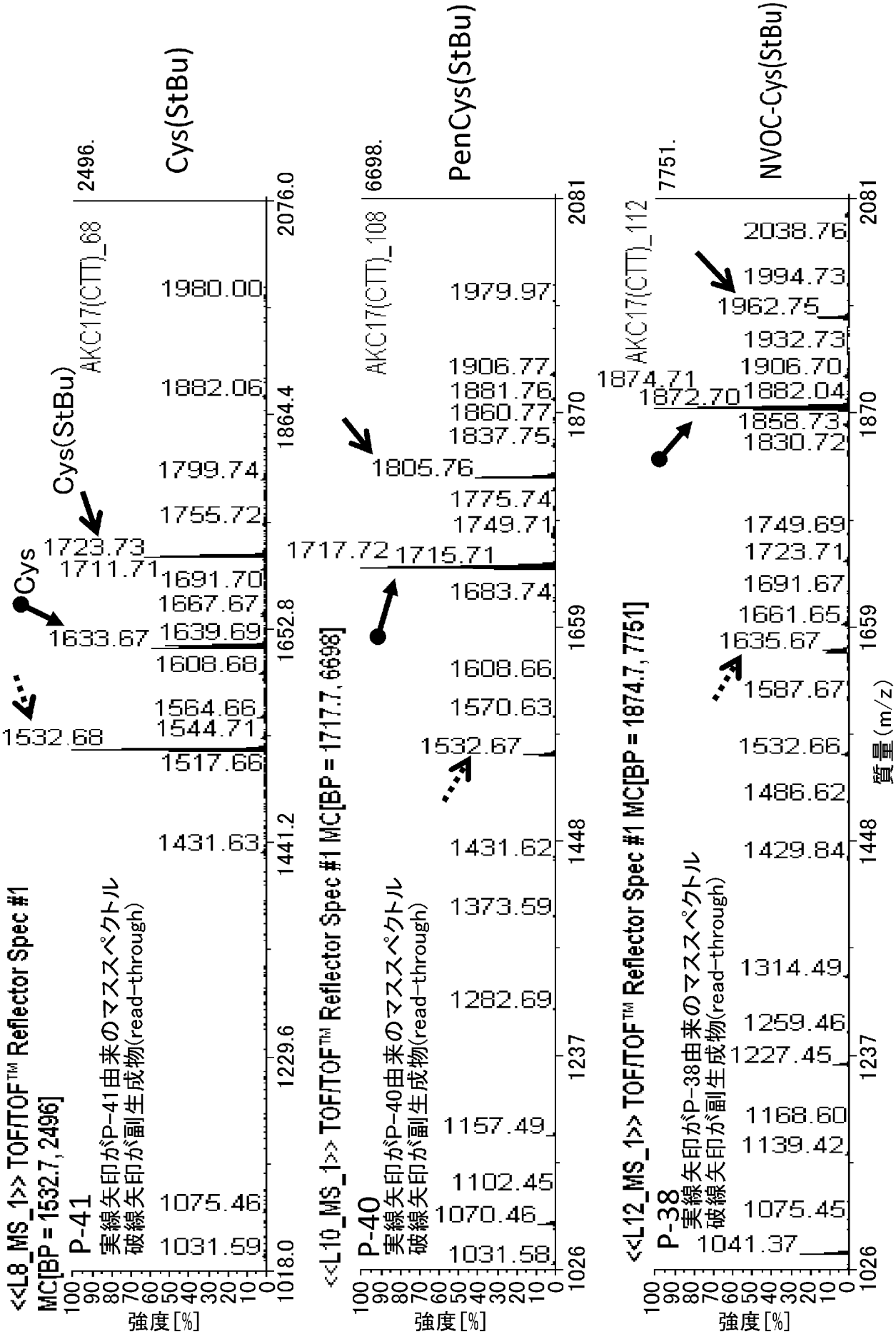
[図24]



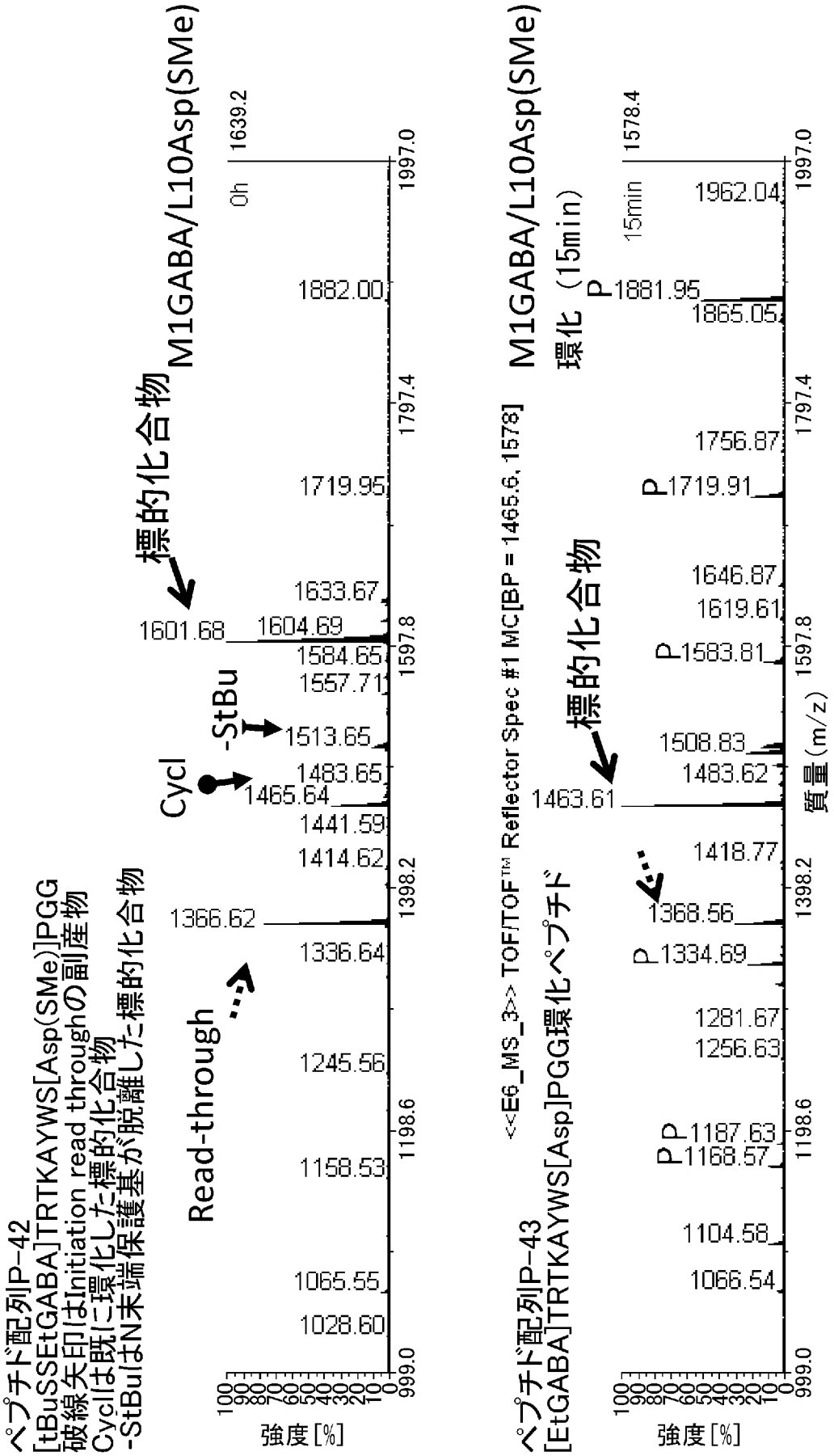
[図25]


MTRTKAYWSLPGG
(配列番号：61)
M1tBuSSEtGly
3577.5
[M+H]+
1541.77
S脱保護
1453.73
Read-through
1336.71
P-34 tBuSSEtGly 計算値 1541.1
<<G8_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1555.8, 2724]
M1tBuSSEtβAla
2723.5
[M+H]+
1555.77
S脱保護
1467.74
1336.70
P-35 tBuSSEtβAla 計算値 1555.1
<<G10_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1569.7, 5146]
M1tBuSSEtGABA
5146.1
[M+H]+
1569.73
S脱保護
1481.70
1336.65
P-36 tBuSSEtGABA 計算値 1569.1
強度[%]
質量(m/z)

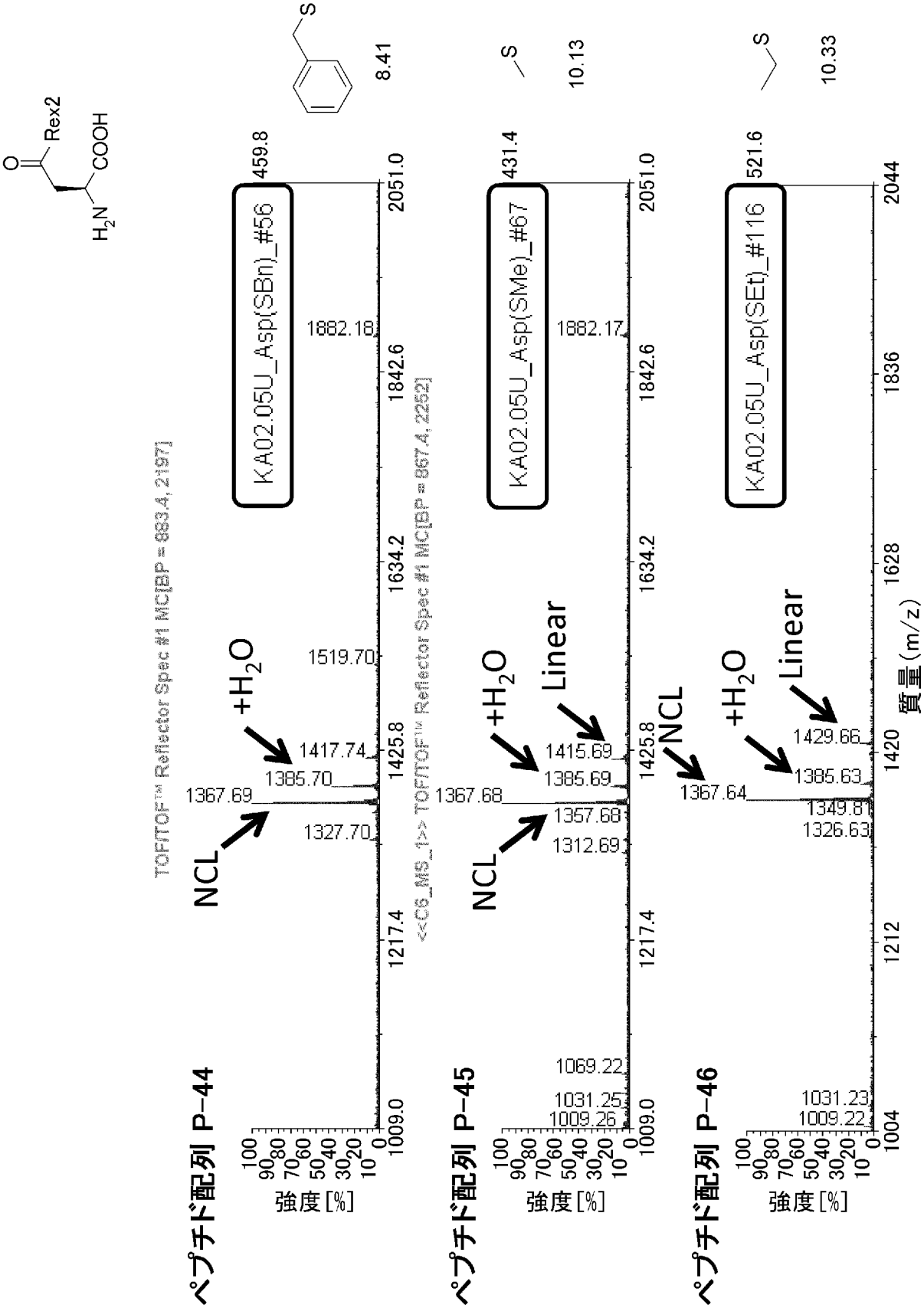
[図26]


<<L8_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1532.7, 2496]
P-41
実線矢印がP-41由来のマススペクトル
破線矢印が副生成物(read-through)
Cys(StBu)
AKC17(CT)_68
2496.
Cys
Cys(StBu)
1980.00
1882.06
1799.74
1755.72
1723.73
1711.71
1691.70
1667.67
1639.69
1633.67
1608.68
1564.66
1544.71
1532.68
1517.66
1431.63
1075.46
1031.59
<<L10_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1717.7, 6698]
P-40
実線矢印がP-40由来のマススペクトル
破線矢印が副生成物(read-through)
PenCys(StBu)
AKC17(CT)_108
6698.
1979.97
1906.77
1881.76
1860.77
1837.75
1805.76
1775.74
1749.71
1717.72
1715.71
1683.74
1608.66
1570.63
1532.67
1431.62
1373.59
1282.69
1157.49
1102.45
1070.46
1031.58
<<L12_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1874.7, 7751]
P-38
実線矢印がP-38由来のマススペクトル
破線矢印が副生成物(read-through)
NVOC-Cys(StBu)
AKC17(CT)_112
7751.
2038.76
1994.73
1962.75
1932.73
1906.70
1882.04
1874.71
1872.70
1858.73
1830.72
1749.69
1723.71
1691.67
1661.65
1635.67
1587.67
1532.66
1486.62
1429.84
1314.49
1259.46
1227.45
1168.60
1139.42
1075.45
1041.37
強度[%]
質量(m/z)

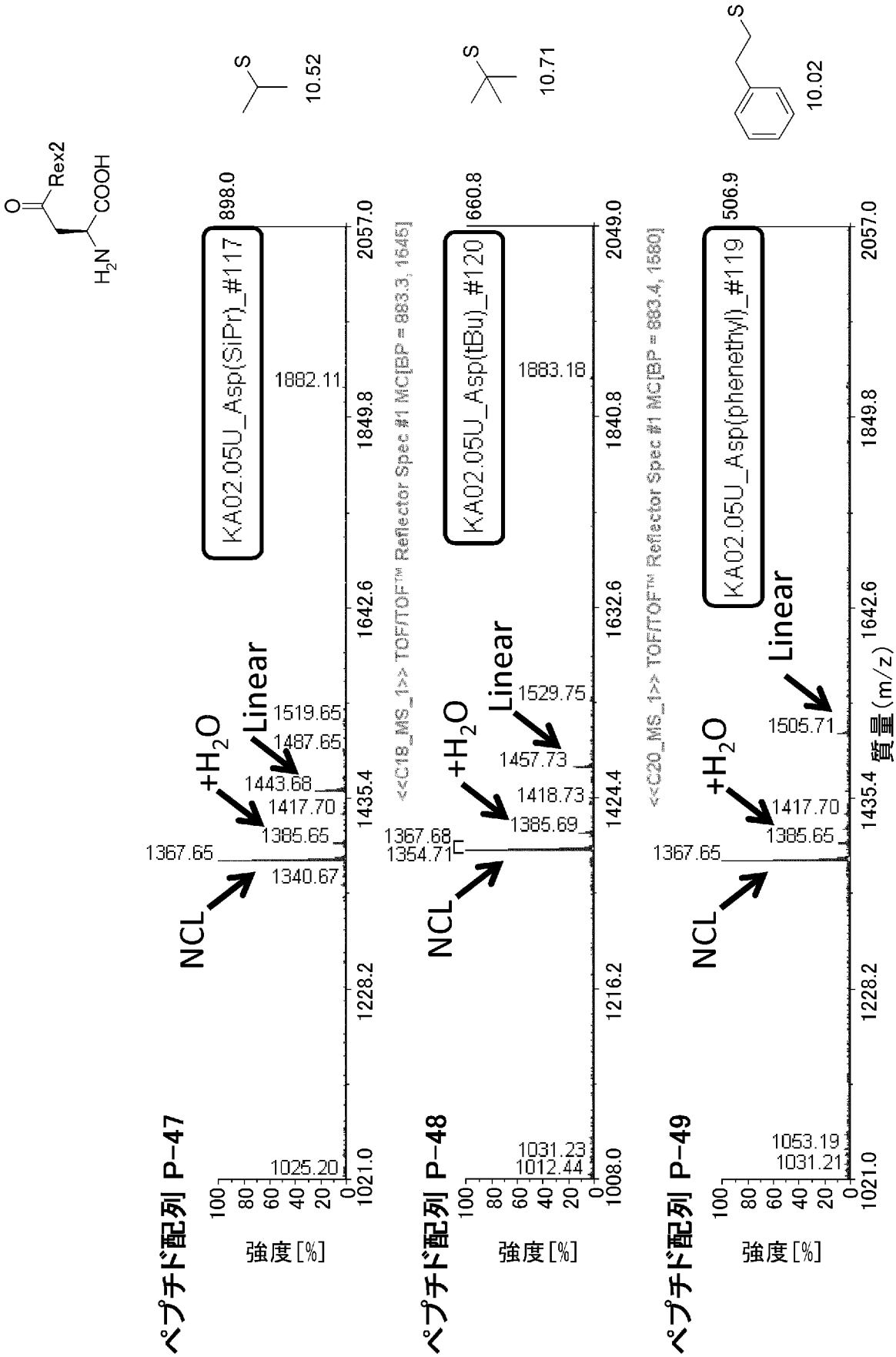
[図27]


ペプチド配列P-42
[tBuSSEtGABA]TRTKAYWS[Asp(SMe)]PGG
破線矢印はInitiation read throughの副産物
Cyclは既に環化した標的化合物
-StBuはN末端保護基が脱離した標的化合物
M1GABA/L10Asp(SMe)
0h
1639.2
標的化合物
1882.00
1719.95
1633.67
1601.68
1604.69
1584.65
1557.71
-StBu
1513.65
Cycl
1483.65
1465.64
1441.59
1414.62
1366.62
Read-through
1336.64
1245.56
1158.53
1065.55
1028.60
1997.0
1797.4
1597.8
1398.2
1198.6
999.0
強度[%]
<<E6_MS_3>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 1465.6, 1578]
ペプチド配列P-43
[EtGABA]TRTKAYWS[Asp]PGG環化ペプチド
M1GABA/L10Asp(SMe)
環化（15min）
15min
1578.4
1962.04
P1881.95
1865.05
1756.87
P1719.91
1646.87
1619.61
P1583.81
1508.83
1483.62
1463.61
標的化合物
1418.77
1368.56
P1334.69
1281.67
1256.63
PP1187.63
1168.57
1104.58
1066.54
質量(m/z)

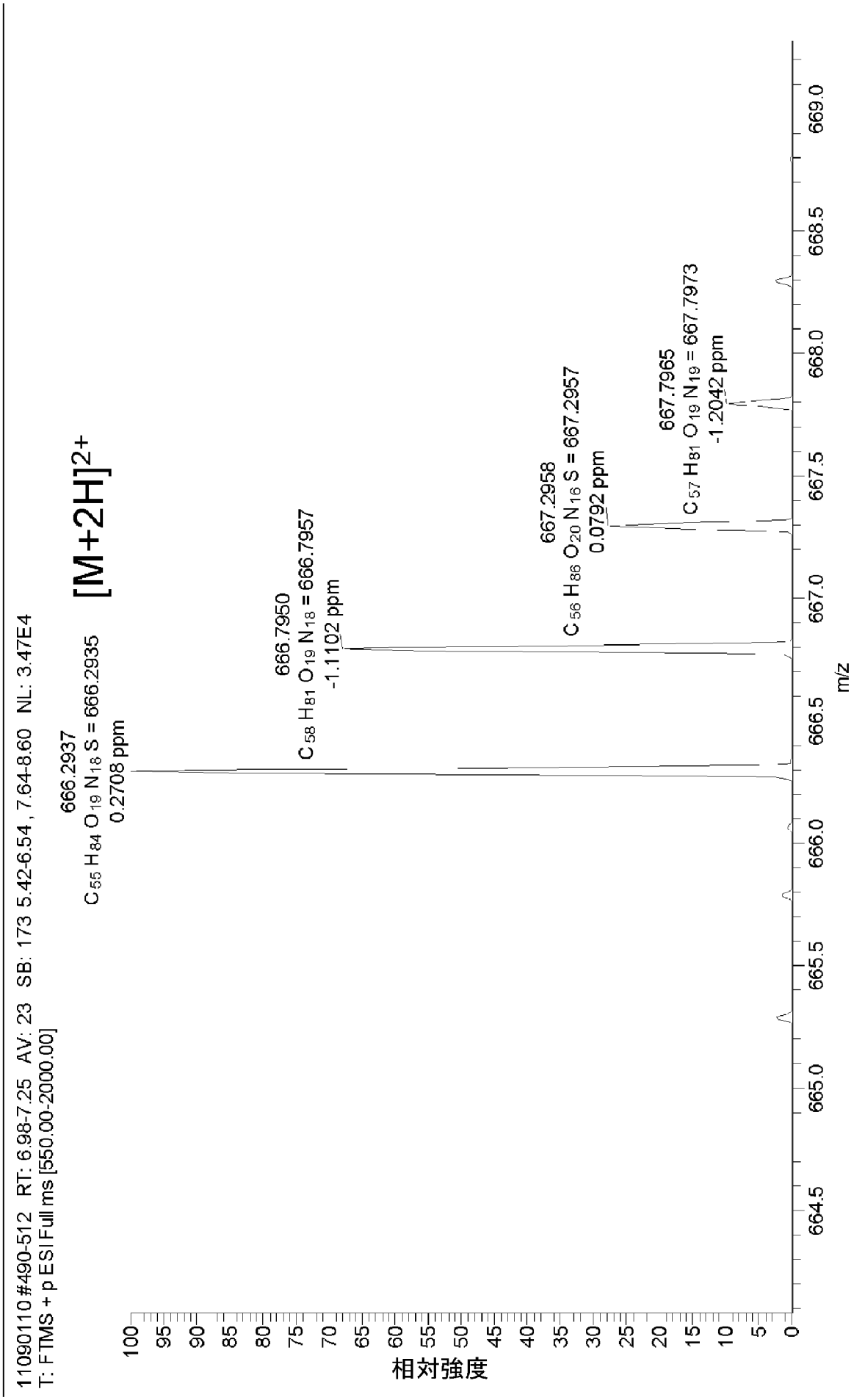
[図28]


Rex2
COOH
H_2N
S
8.41
10.13
10.33
KA02.05U_Asp(SBn)_#56
KA02.05U_Asp(SMe)_#67
KA02.05U_Asp(SEt)_#116
459.8
431.4
521.6
2051.0
1842.6
1634.2
1425.8
1217.4
1009.0
1882.18
1882.17
1519.70
1417.74
1385.70
1367.69
1327.70
1415.69
1385.69
1367.68
1357.68
1312.69
1429.66
1385.63
1367.64
1349.81
1326.63
1069.22
1031.25
1009.26
1031.23
1009.22
2044
1836
1628
1420
1212
1004
NCL
Linear
$+H_2O$
TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 883.4, 21971]
<<C6_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 867.4, 2252]
ペプチド配列 P-44
ペプチド配列 P-45
ペプチド配列 P-46
強度[%]
質量(m/z)

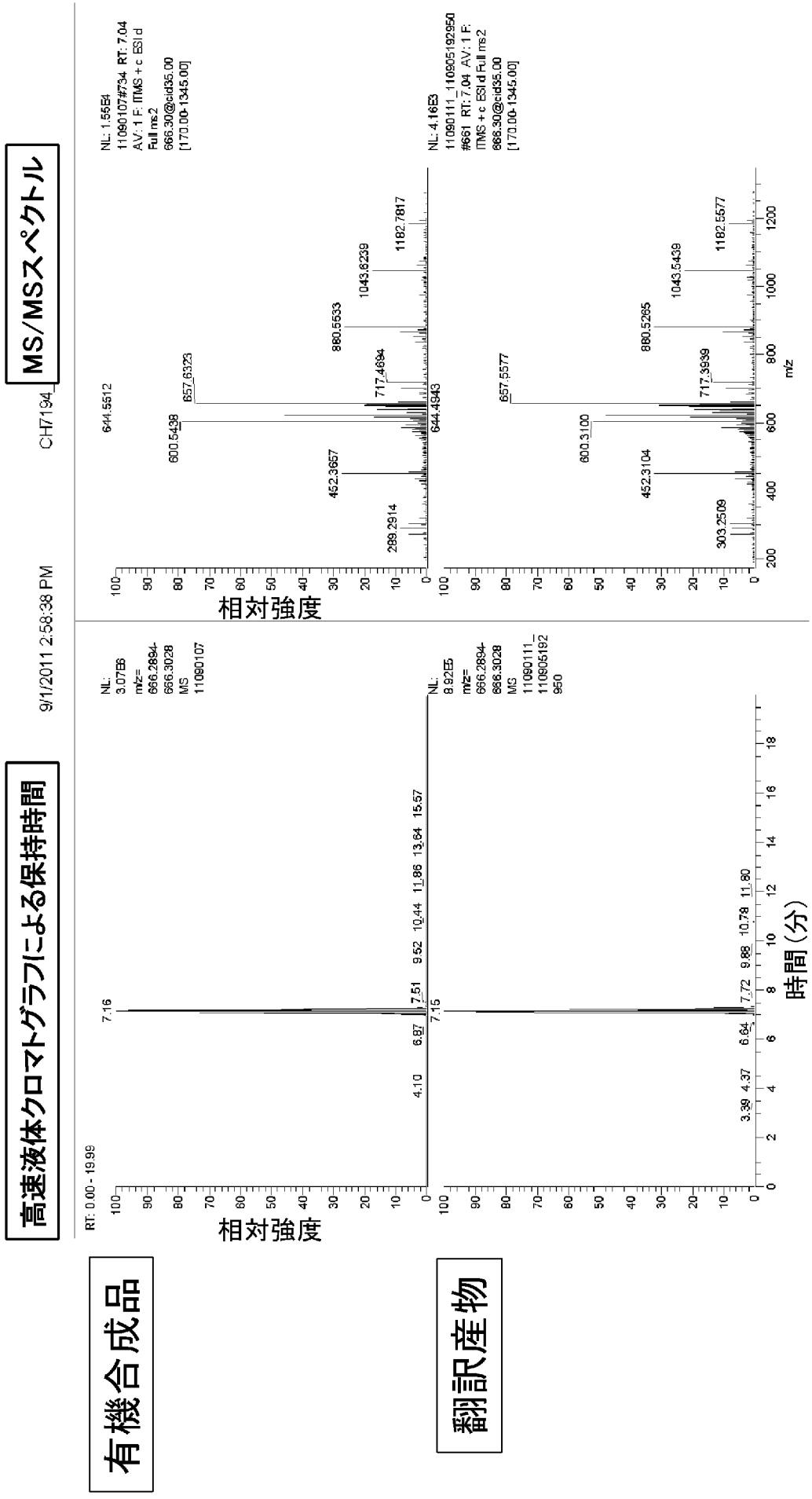
[図29]


Rex2
COOH
H_2N
S
10.52
10.71
10.02
KA02.05U_Asp(SiPr)_#117
KA02.05U_Asp(tBu)_#120
KA02.05U_Asp(phenethyl)_#119
898.0
660.8
506.9
1882.11
1883.18
1519.65
1487.65
1443.68
1417.70
1385.65
1367.65
1340.67
1529.75
1457.73
1418.73
1385.69
1367.68
1354.71
1505.71
1417.70
1385.65
1367.65
NCL
+H_2O
Linear
<<C18_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 883.3, 1645]
<<C20_MS_1>> TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC[BP = 883.4, 1580]
1025.20
1031.23
1012.44
1053.19
1031.21
2057.0
2049.0
1849.8
1840.8
1642.6
1632.6
1435.4
1424.4
1228.2
1216.2
1021.0
1008.0
100
80
60
40
20
0
強度[%]
質量(m/z)
ペプチド配列 P-47
ペプチド配列 P-48
ペプチド配列 P-49

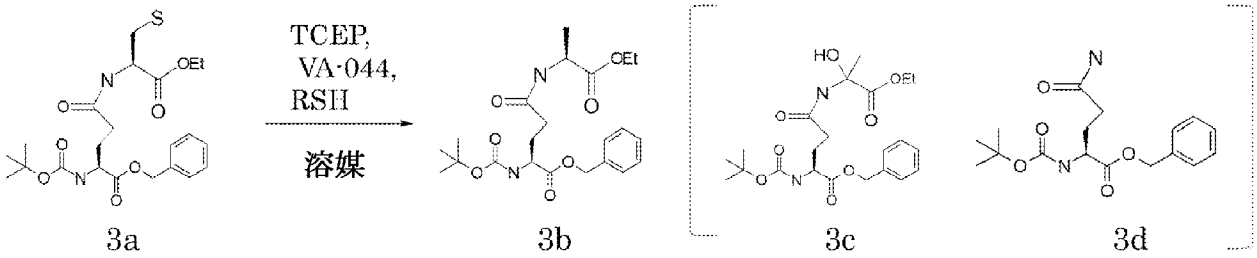
[図30-1]


11090110 #490-512 RT: 6.98-7.25 AV: 23 SB: 173 5.42-6.54 , 7.64-8.60 NL: 3.47E4
T: FTMS + p ESI Full ms [550.00-2000.00]
[M+2H]2+
666.2937
C55 H84 O19 N18 S = 666.2935
0.2708 ppm
666.7950
C58 H81 O19 N18 = 666.7957
-1.1102 ppm
667.2958
C56 H86 O20 N16 S = 667.2957
0.0792 ppm
667.7965
C57 H81 O19 N19 = 667.7973
-1.2042 ppm
相対強度
m/z

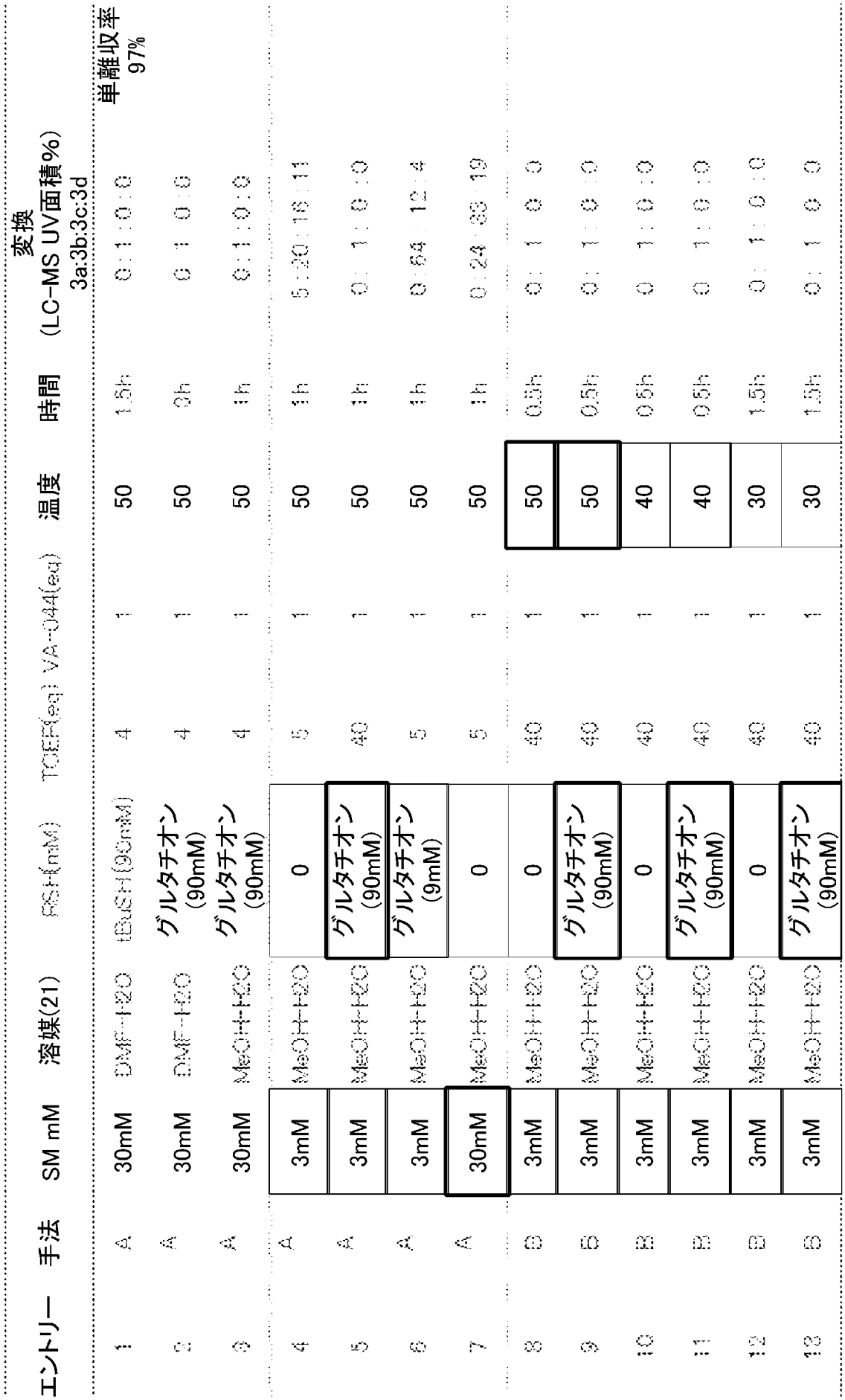
[図30-2]


高速液体クロマトグラフによる保持時間
MS/MSスペクトル
CH7194_
9/1/2011 2:58:38 PM
RT: 0.00 - 19.99
NL: 3.07E8 mz= 666.2894-666.3028 MS 11090107
NL: 8.92E5 mz= 666.2894-666.3028 MS 11090111_110905192950
NL: 1.55E4 11090107#734 RT: 7.04 AV: 1 F: ITMS + c ESI d Full ms2 666.30@cid35.00 [170.00-1345.00]
NL: 4.16E3 11090111_110905192950 #661 RT: 7.04 AV: 1 F: ITMS + c ESI d Full ms2 666.30@cid35.00 [170.00-1345.00]
相対強度
時間（分）
m/z
有機合成品
翻訳産物

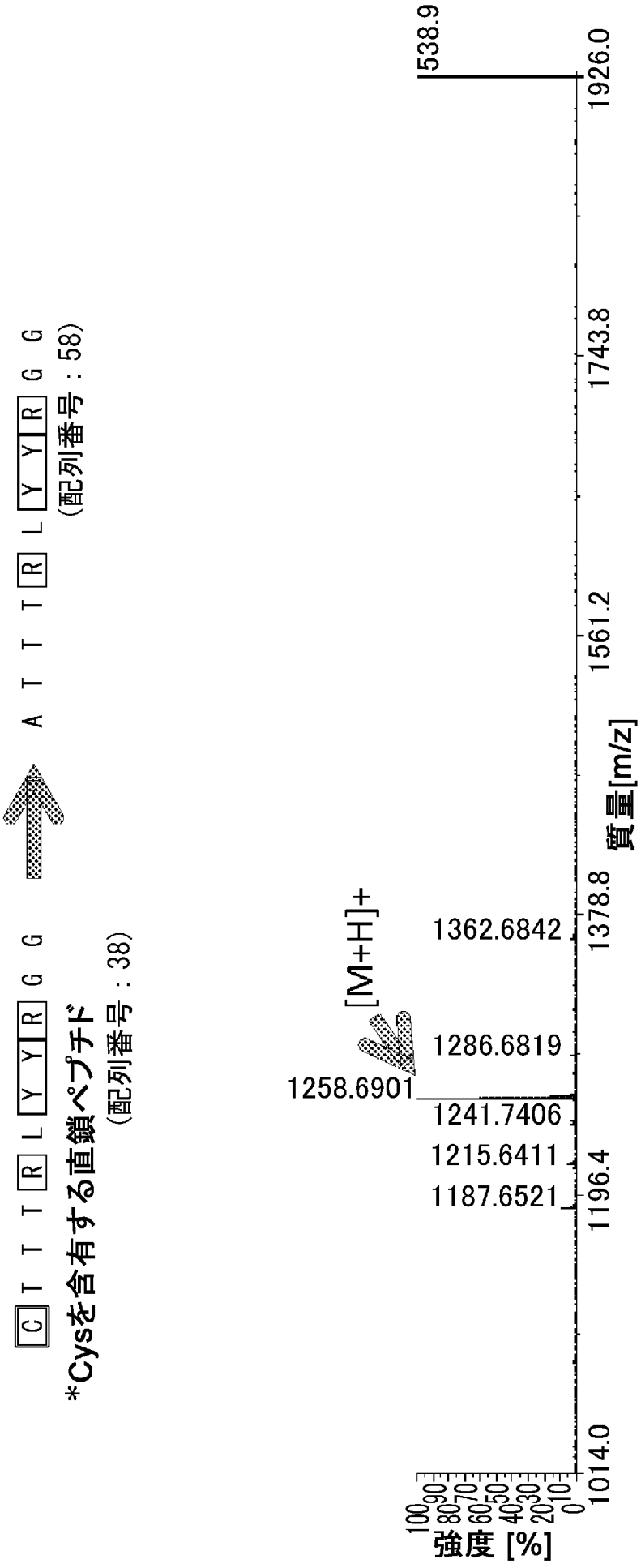
[図31]



[図32]


エントリー
手法
SM mM
溶媒(21)
RSH(mM)
TCEP(eq)
VA-044(eq)
温度
時間
変換
(LC-MS UV面積%)
3a:3b:3c:3d
単離収率
97%
1 A 30mM DMF-H2O tBuSH(90mM) 4 1 50 1.5h 0:1:0:0
2 A 30mM DMF-H2O グルタチオン (90mM) 4 1 50 0h 0:1:0:0
3 A 30mM MeOH-H2O グルタチオン (90mM) 4 1 50 1h 0:1:0:0
4 A 3mM MeOH-H2O 0 5 1 50 1h 5:20:16:11
5 A 3mM MeOH-H2O グルタチオン (90mM) 40 1 50 1h 0:1:0:0
6 A 3mM MeOH-H2O グルタチオン (9mM) 5 1 50 1h 0:64:12:4
7 A 30mM MeOH-H2O 0 5 1 50 1h 0:24:33:19
8 B 3mM MeOH-H2O 0 40 1 50 0.5h 0:1:0:0
9 B 3mM MeOH-H2O グルタチオン (90mM) 40 1 50 0.5h 0:1:0:0
10 B 3mM MeOH-H2O 0 40 1 40 0.5h 0:1:0:0
11 B 3mM MeOH-H2O グルタチオン (90mM) 40 1 40 0.5h 0:1:0:0
12 B 3mM MeOH-H2O 0 40 1 30 1.5h 0:1:0:0
13 B 3mM MeOH-H2O グルタチオン (90mM) 40 1 30 1.5h 0:1:0:0

[図33]

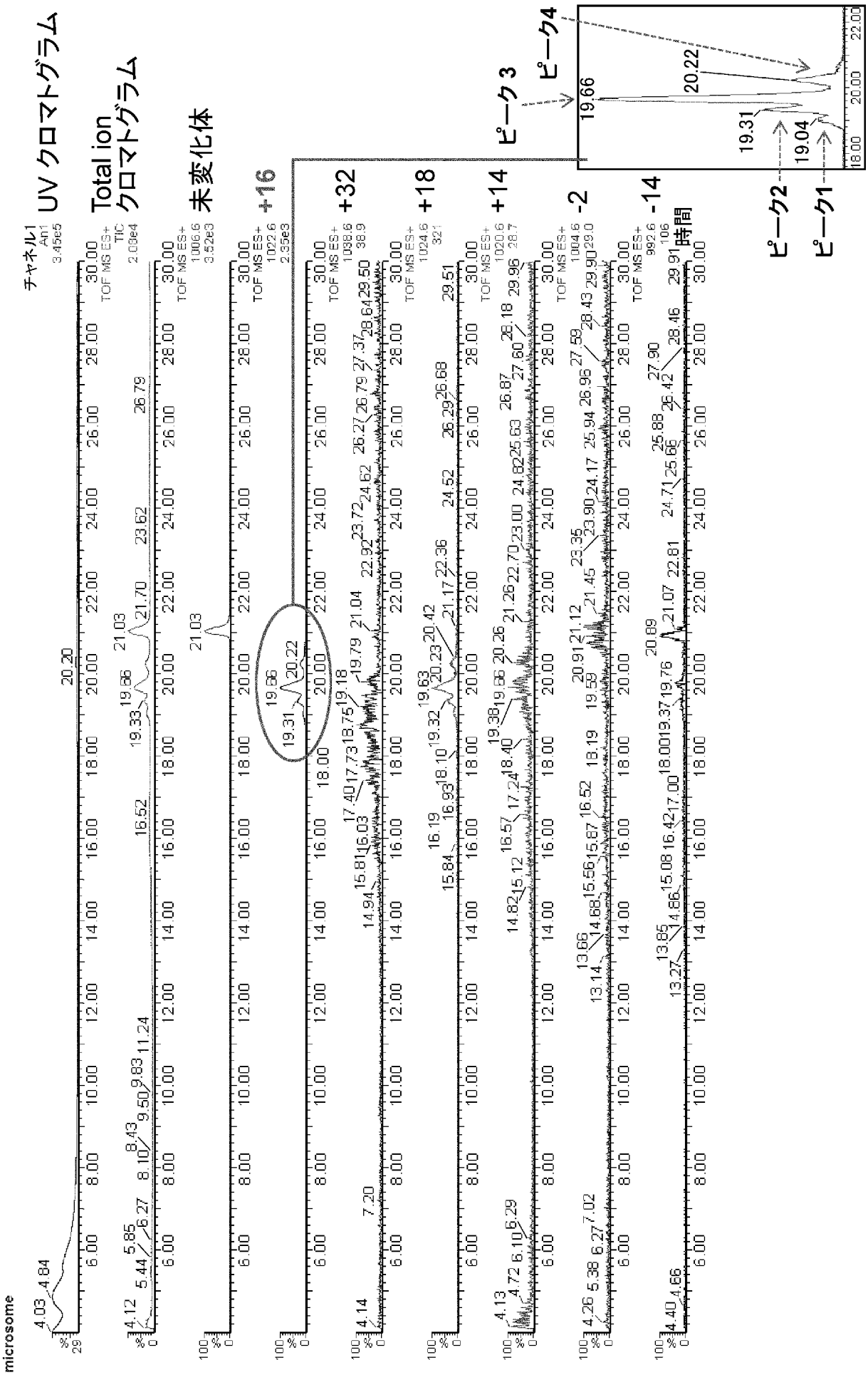

C T T T R L Y Y R G G
*Cysを含有する直鎖ペプチド
(配列番号：38)
A T T T T R L Y Y R G G
(配列番号：58)
[M+H]+
1538.9
1926.0
1743.8
1561.2
1378.8
1362.6842
1286.6819
1258.6901
1241.7406
1215.6411
1196.4
1187.6521
1014.0
質量[m/z]
強度 [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

[図34]

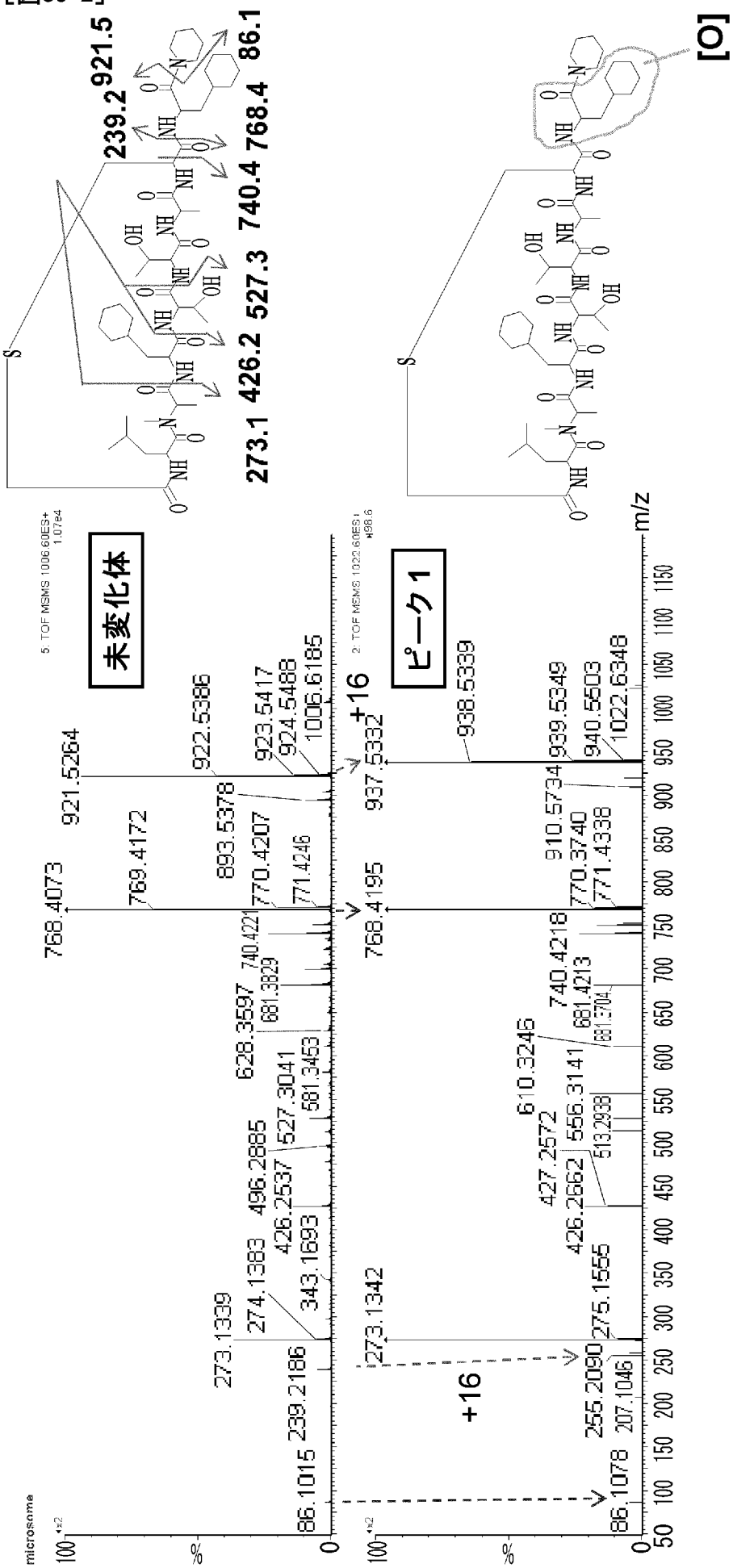
No.	脱硫液	DTT^{OX}(mM)	DMSO(%)	M-PBS(%)	hIL-6R (+)	hIL-6R (-)	S/N
1	-	0	13.4	0.9	982411	2479	396
2	-	0	6.7	0.9	942626	1116	845
3	-	0	3.4	0.9	964610	727	1327
4	-	0	1.7	0.9	941804	596	1580
5	-	0	0.8	0.9	974132	1525	639
6	-	0	0.0	0.9	867860	2859	304
16	-	0	0.0	0.9	870240	602	1446
7	+	0	0.0	1.9	39421	802	49
8	+	0	0.0	3.7	72647	808	90
9	+	1000	13.4	0.9	799381	653	1224
10	+	500	6.7	0.9	814802	590	1381
11	+	250	3.4	0.9	847691	604	1403
12	+	125	1.7	0.9	684333	462	1481
13	+	63	0.8	0.9	503827	452	1115
14	+	0	0.0	0.9	42054	561	75
15	+	0	0.0	0.9	53989	619	87

※脱硫液+DTT^{OX}の時の濃度

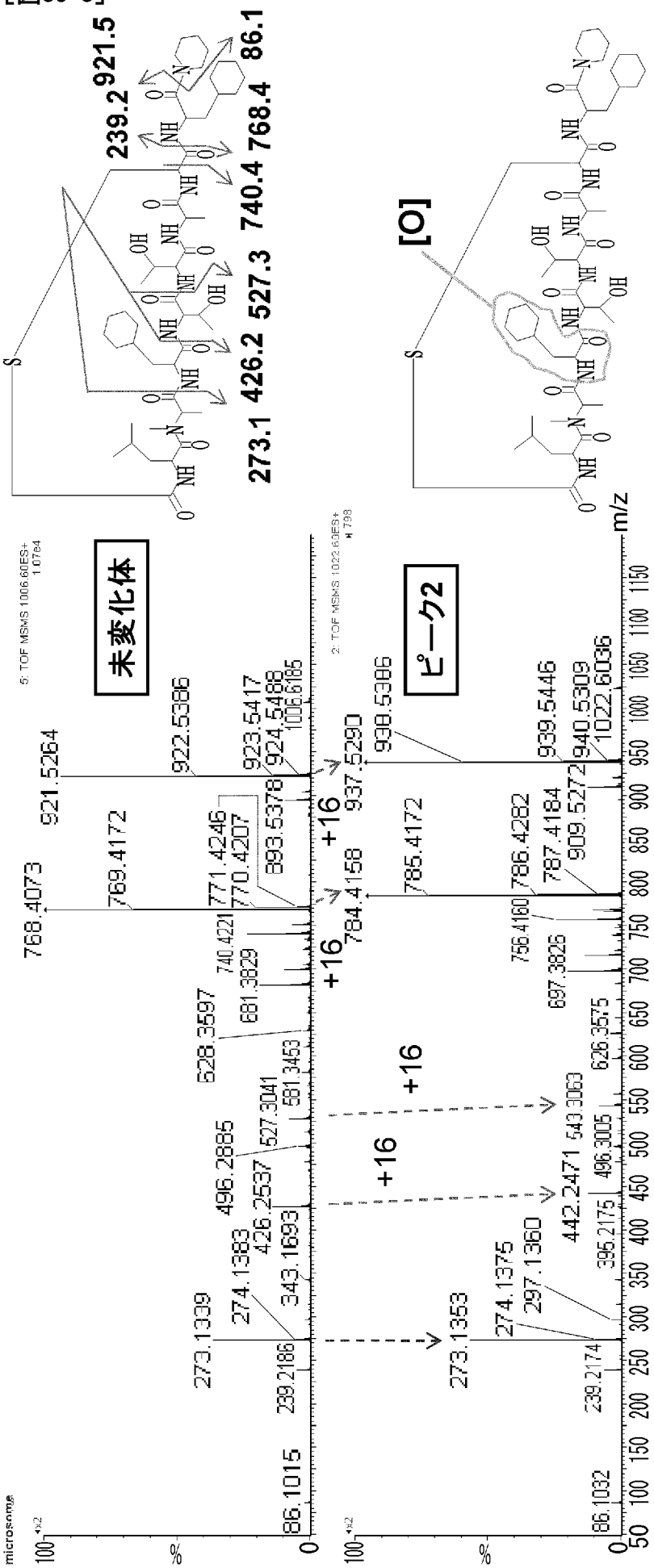
[図35-1]


microsome
チャネル1
An1
3.45e5
UV クロマトグラム
Total ion
クロマトグラム
TIC
2.09e4
未変化体
+16
+32
+18
+14
-2
-14
ピーク3
ピーク4
ピーク2
ピーク1
時間
TOF MS ES+
1006.6
3.52e3
1022.6
2.35e3
1038.6
1024.6
1020.6
1004.6
992.6
19.66
20.22
19.31
19.04
18.00
20.00
22.00

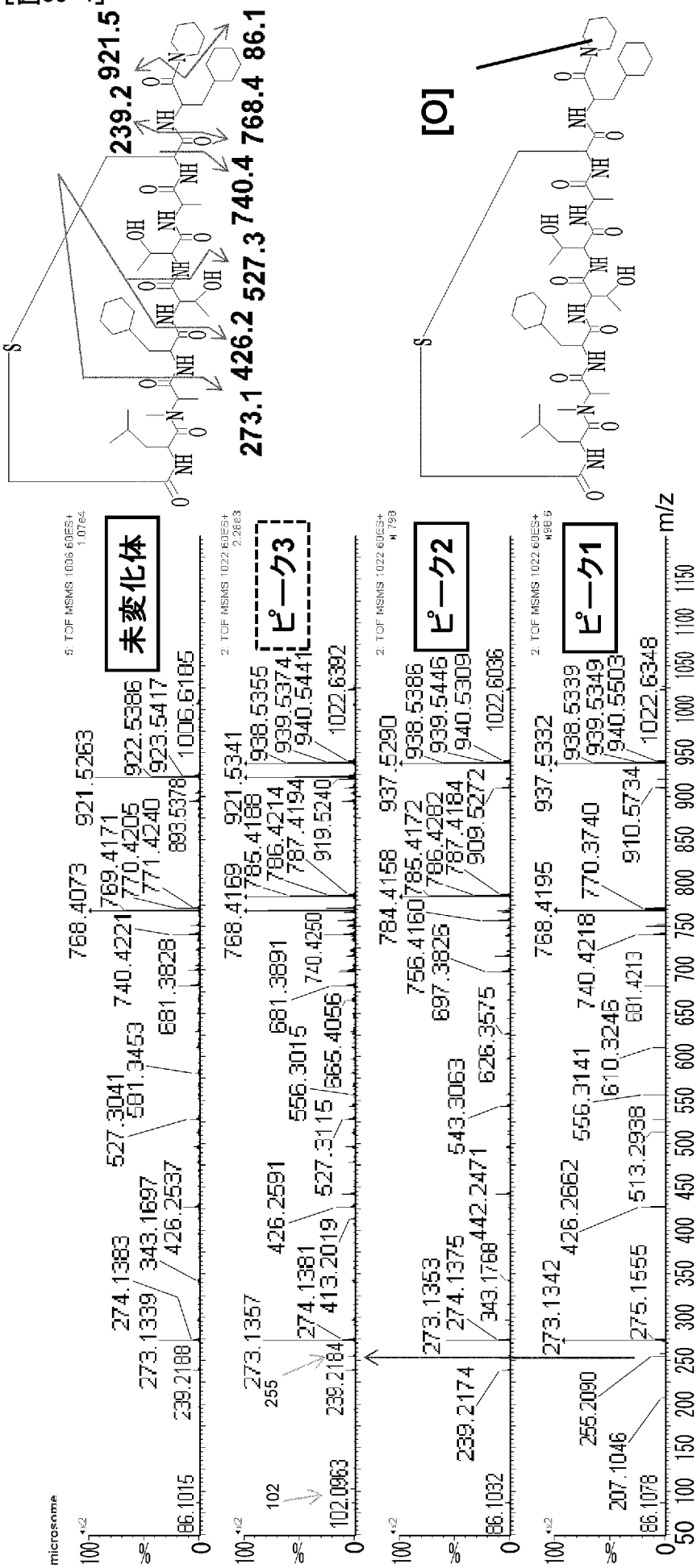
[図35-2]


239.2
921.5
86.1
273.1
426.2
527.3
740.4
768.4
[O]
未変化体
ピーク1
+16
+16
m/z
microsome

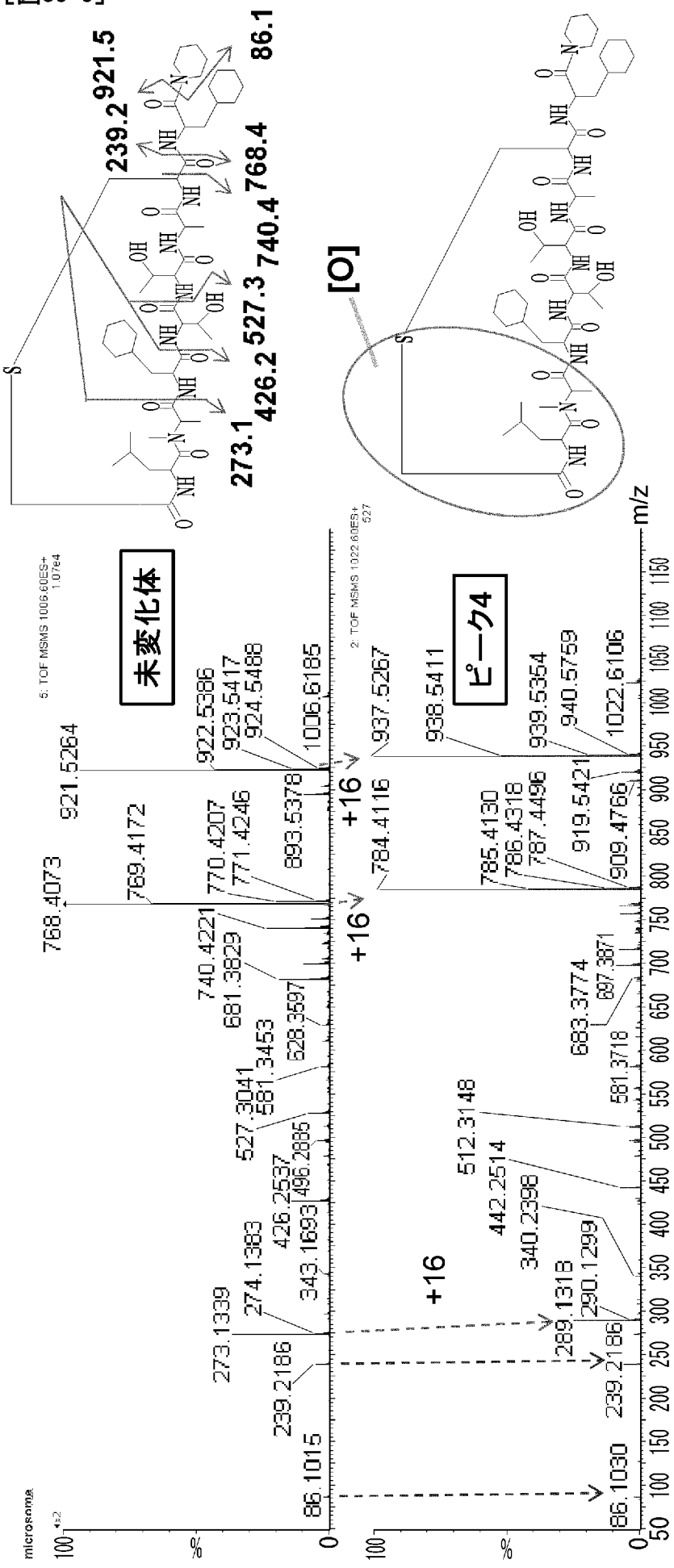
[図35-3]


239.2
921.5
273.1
426.2
527.3
740.4
768.4
86.1
[O]
m/z
未変化体
ピーク2
+16
+16
+16
+16
microsome

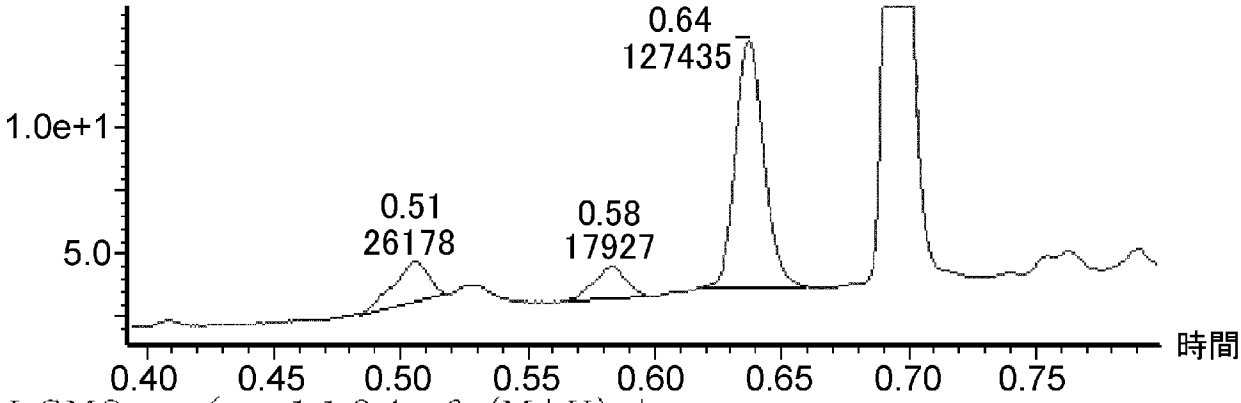
[図35-4]


239.2
921.5
273.1
426.2
527.3
740.4
768.4
86.1
[O]
未変化体
ピーク3
ピーク2
ピーク1
m/z
microsome

[図35-5]


239.2
921.5
86.1
768.4
740.4
527.3
426.2
273.1
[O]
未変化体
ピーク4
+16
+16
+16
m/z
microsoma

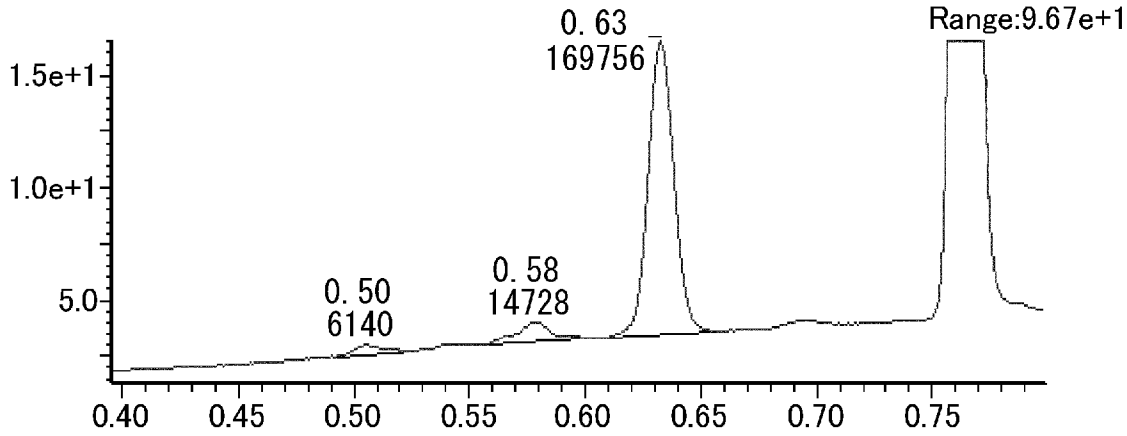
[図36]



ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　１１３４．６（Ｍ＋Ｈ）＋
保持時間：０．６４分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

時間	高さ	面積	面積比(%)
0.51	1599625	26178.15	15.26
0.58	1282475	17927.23	10.45
0.64	9849150	127435.06	74.29

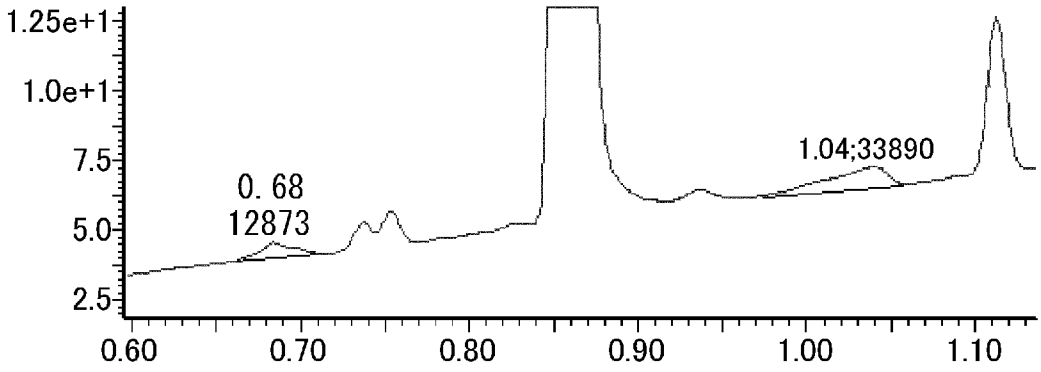
[図37]



ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　１１３４．６（Ｍ＋Ｈ）＋
保持時間：０．６３分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

時間	高さ	面積	面積比(%)
0.50	422808	6139.70	3.22
0.58	865058	14728.07	7.73
0.63	13056954	169755.59	89.05

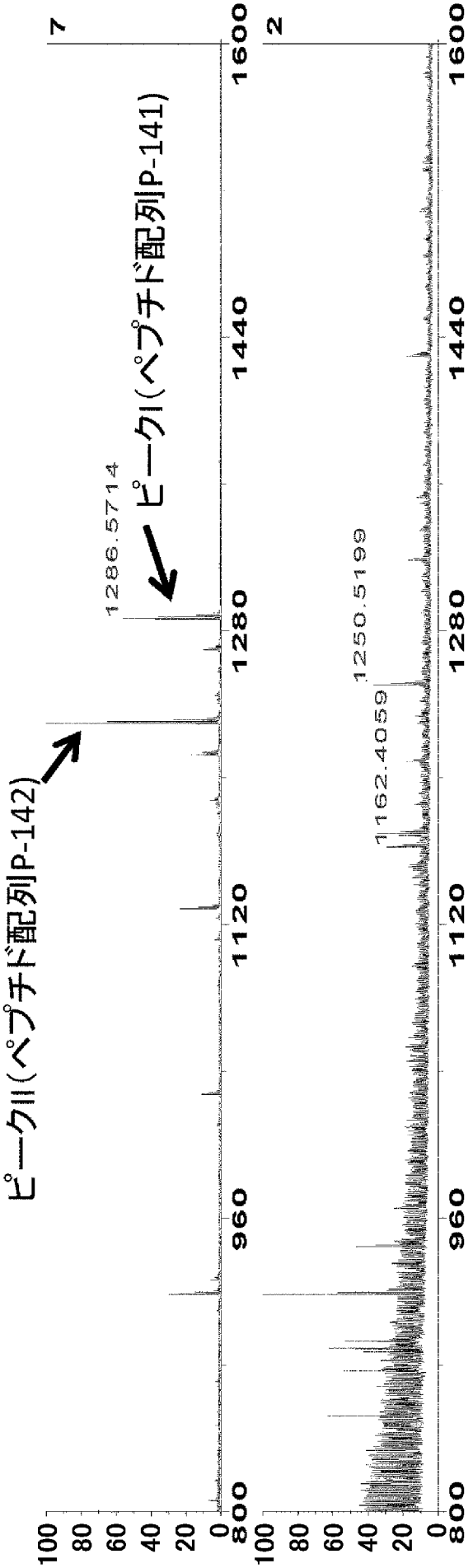
[図38]



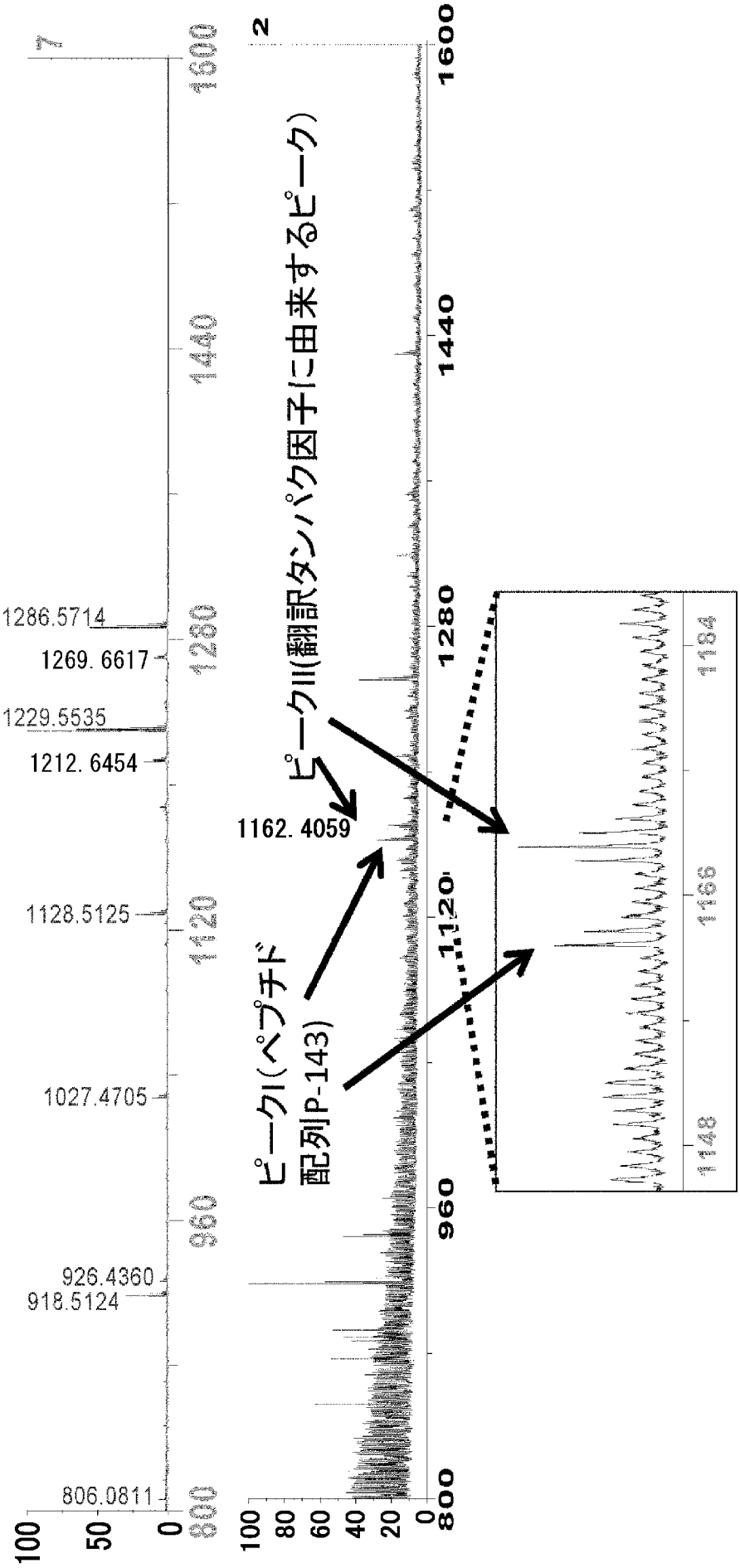
ＬＣＭＳ：ｍ／ｚ　１４１７．０（Ｍ－Ｈ）－
保持時間：１．０４分　（分析条件　ＳＱＤＦＡ０５）

時間	高さ	面積	面積比(%)
0.68	542553	12872.79	27.53
1.04	788104	33889.73	72.47

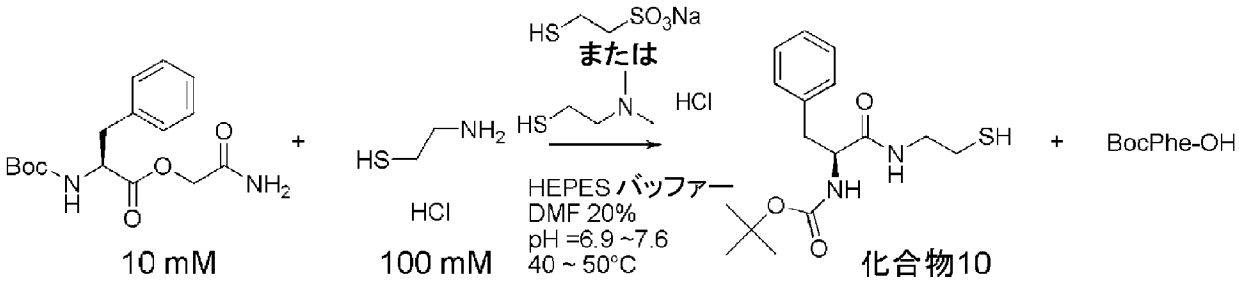
[図39]

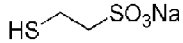
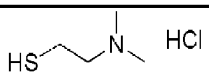

7
2
1286.5714
1250.5199
1162.4059
ピーク1(ペプチド配列P-141)
ピーク11(ペプチド配列P-142)
800
960
1120
1280
1440
1600
0
20
40
60
80
100

[図40]

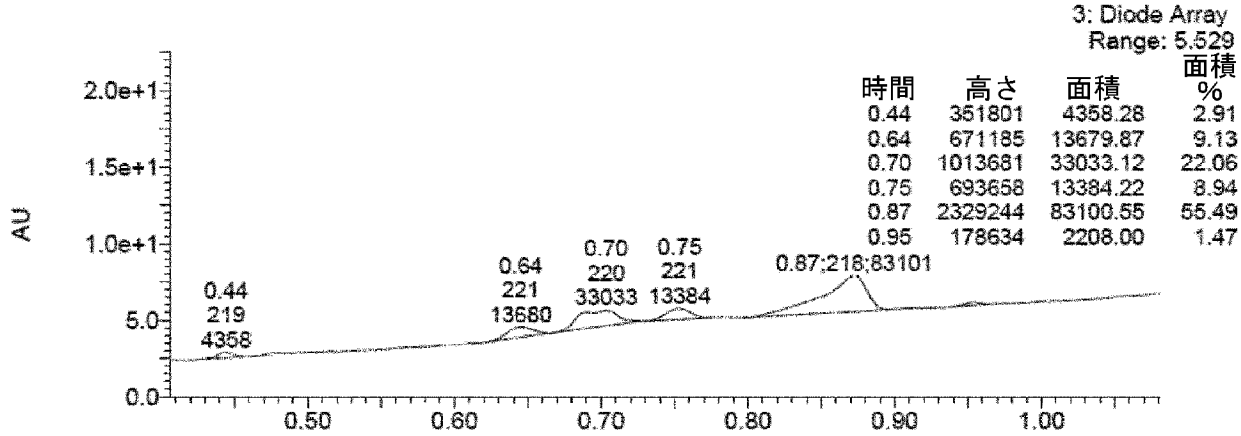

1286.5714
1269.6617
1229.5535
1212.6454
1162.4059
1128.5125
1027.4705
926.4360
918.5124
806.0811
ピークII(翻訳タンパク因子に由来するピーク)
ピークI(ペプチド配列P-143)

[図41]



エントリー	チオール	チオール濃度	SM: BocPhe-OH: 化合物10 (LC 面積 %)
1		0.1 M	10 : 46 : 43
2		1.0 M	16 : 24 : 60
3		0.8 M	6 : 23 : 71
4		3 M	1 : 15 : 84

[図42]

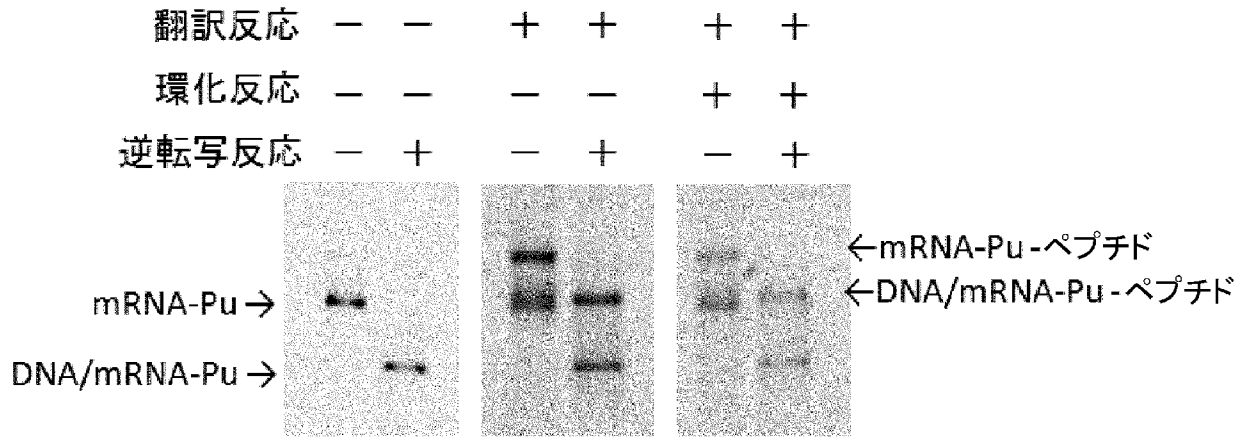


ＬＣＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ ＝ １２６１ （Ｍ＋Ｈ）＋

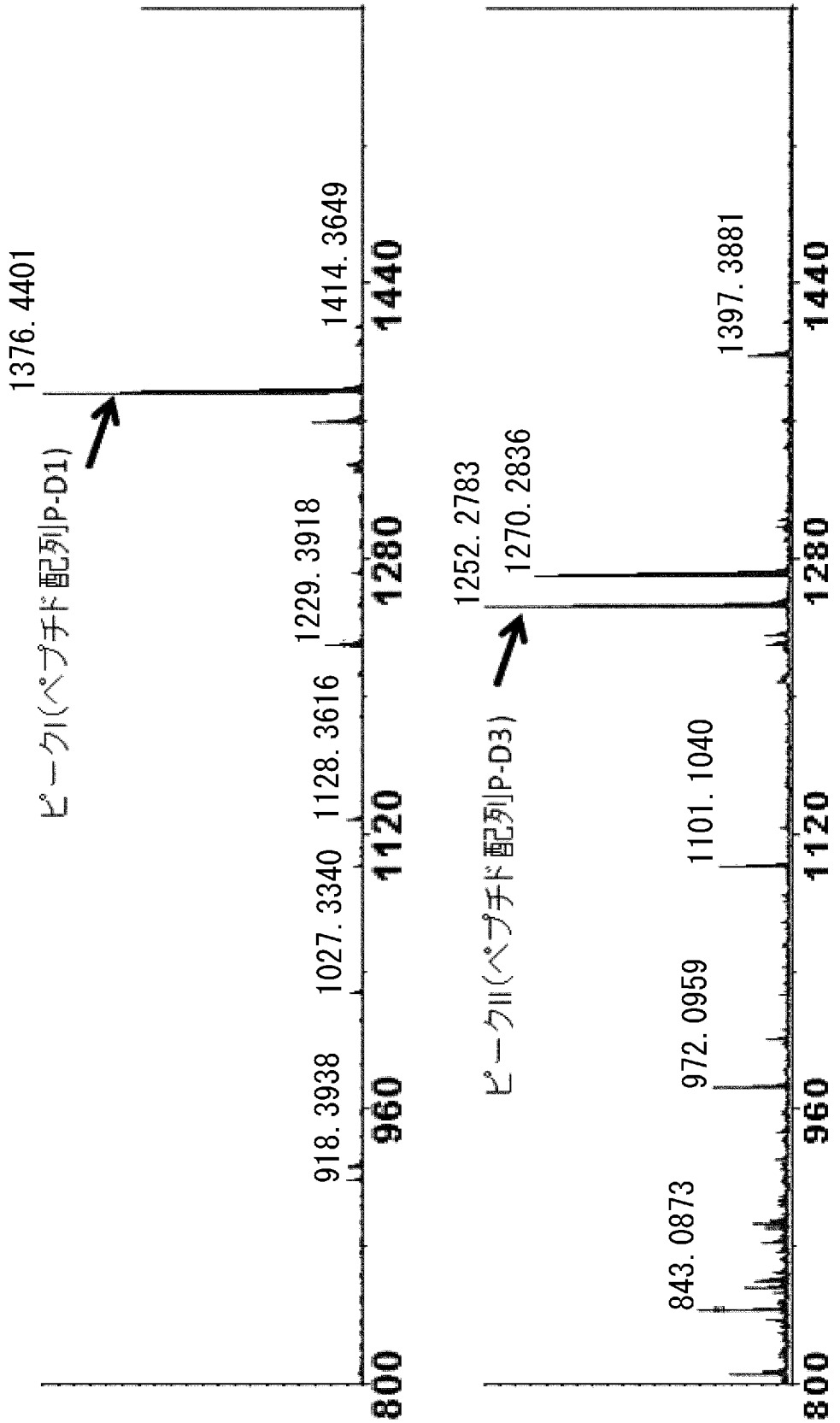
保持時間：０．８７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[図43]

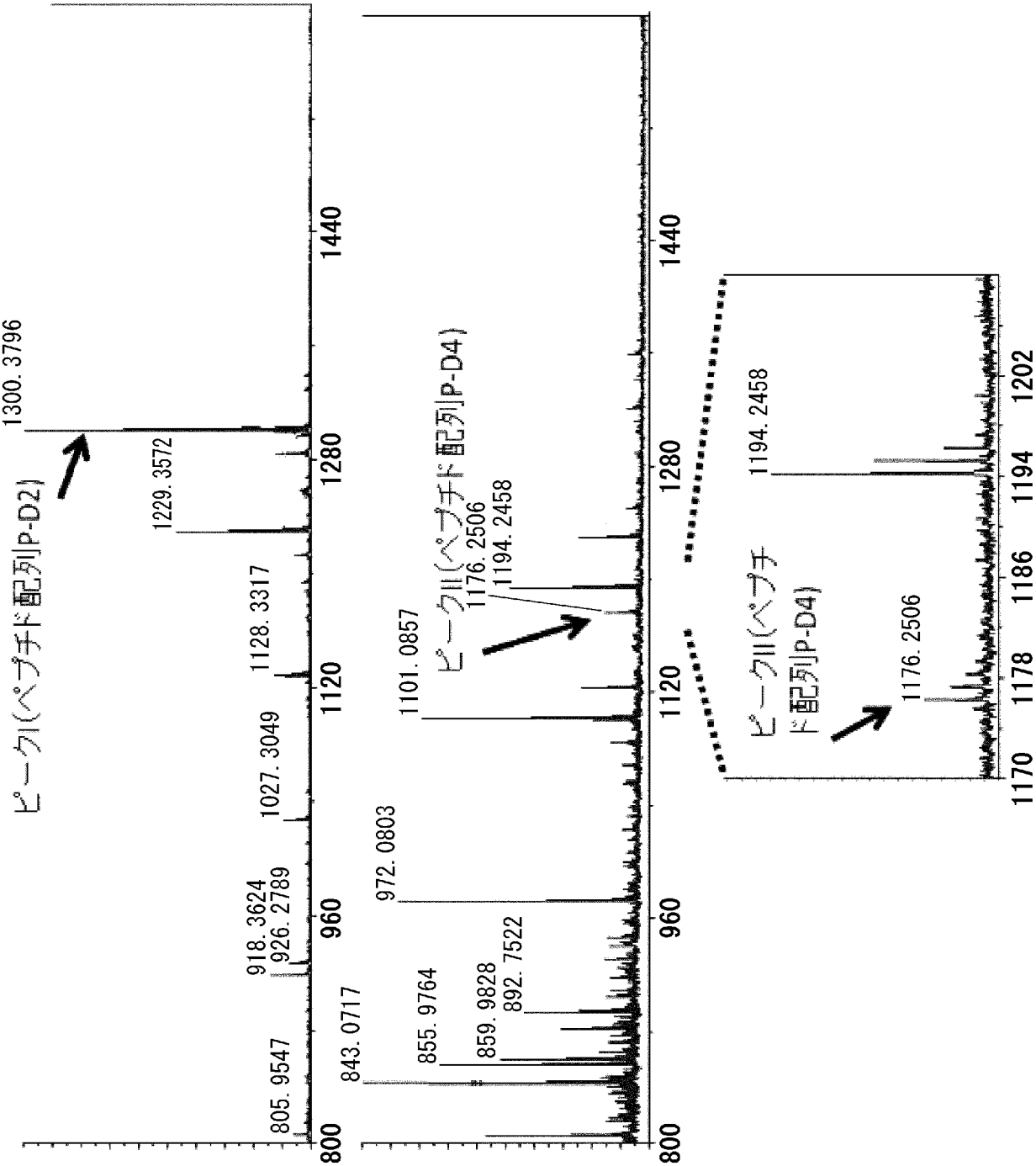
逆転写結果



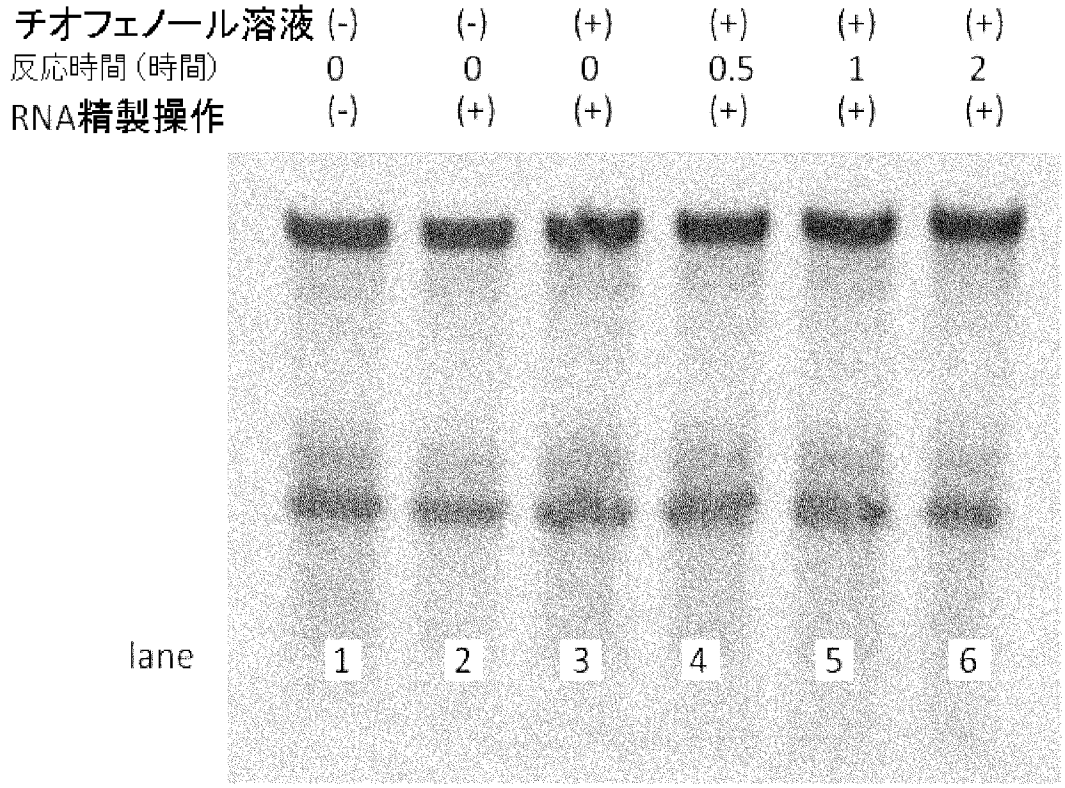
[図44]


ピークI(ペプチド配列P-D1)
1376.4401
1414.3649
1229.3918
1128.3616
1027.3340
918.3938
ピークII(ペプチド配列P-D3)
1252.2783
1270.2836
1397.3881
1101.1040
972.0959
843.0873
800
960
1120
1280
1440

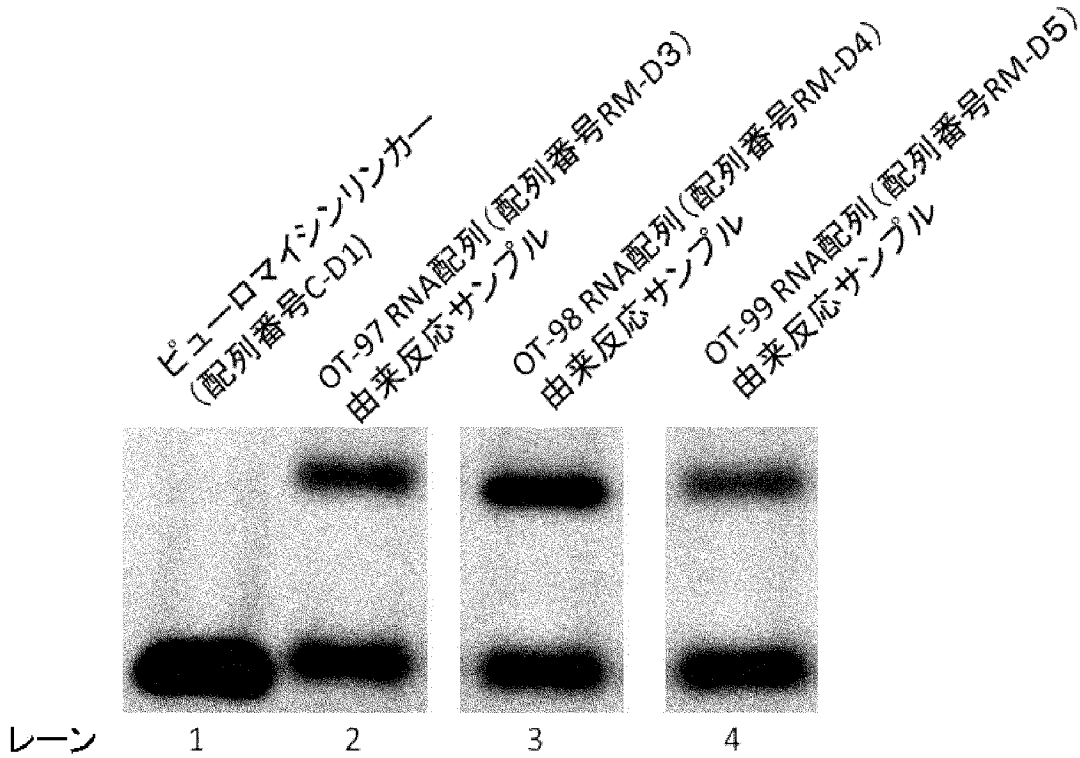
[図45]


ピーク1(ペプチド配列P-D2)
1300.3796
1229.3572
1128.3317
1027.3049
972.0803
926.2789
918.3624
892.7522
859.9828
855.9764
843.0717
805.9547
1101.0857
ピーク2(ペプチド配列P-D4)
1194.2458
1176.2506
ピーク2(ペプチド配列P-D4)
1194.2458
1176.2506
800
960
1120
1280
1440
1170
1178
1186
1194
1202

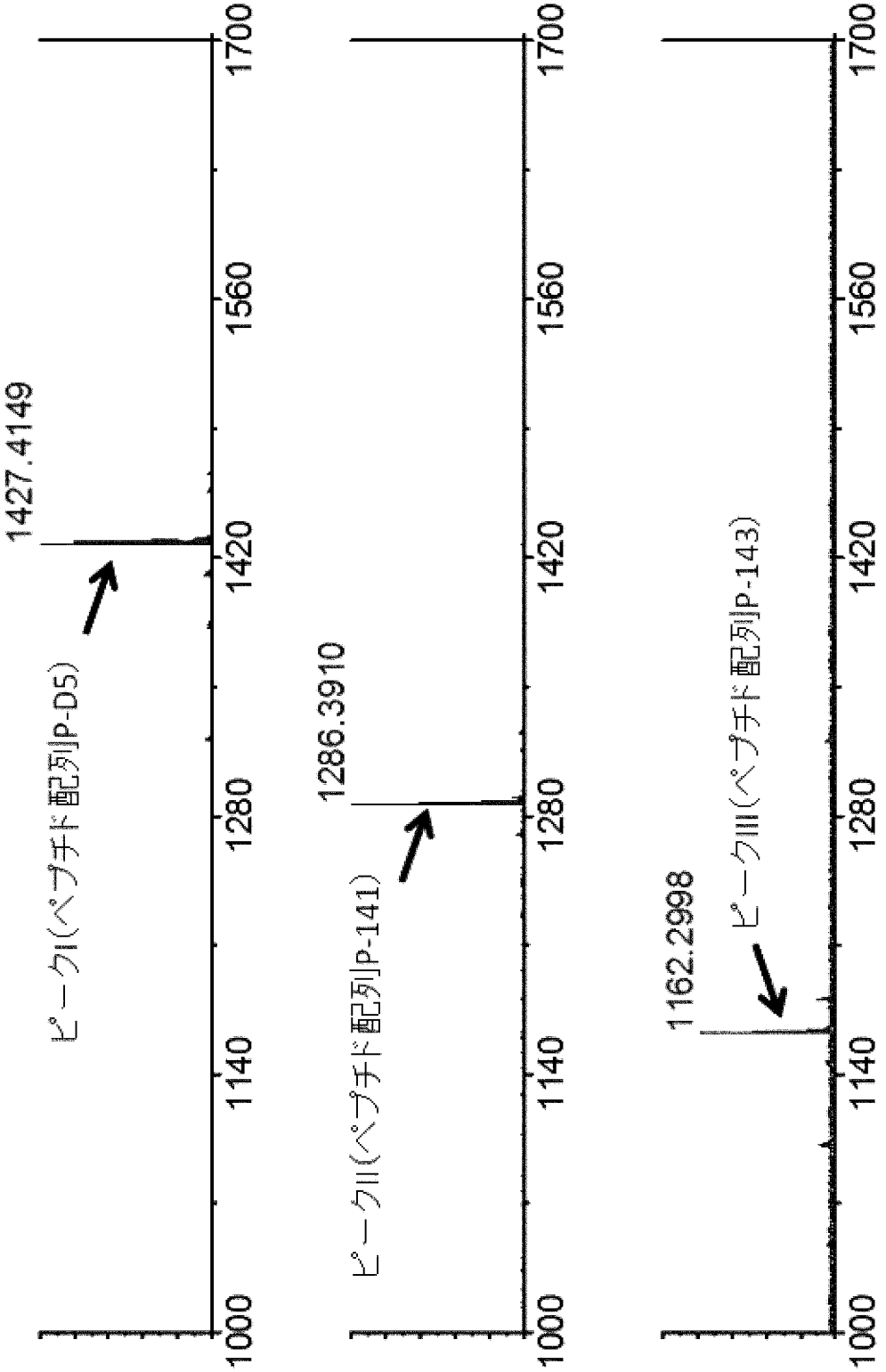
[図46]


チオフェノール溶液 (-) (-) (+) (+) (+) (+)
反応時間（時間） 0 0 0 0.5 1 2
RNA精製操作 (-) (+) (+) (+) (+) (+)
lane 1 2 3 4 5 6

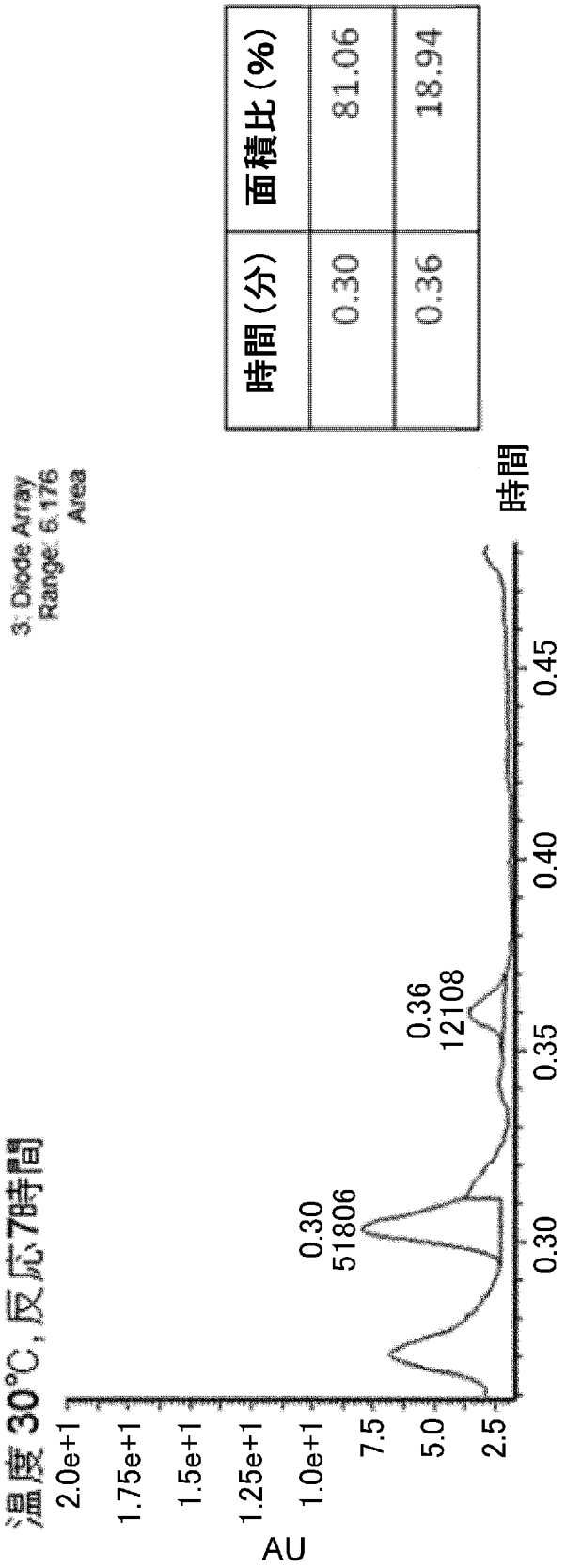
[図47]


ピューロマイシンリンカー（配列番号C-D1）
OT-97 RNA配列（配列番号RM-D3）由来反応サンプル
OT-98 RNA配列（配列番号RM-D4）由来反応サンプル
OT-99 RNA配列（配列番号RM-D5）由来反応サンプル
レーン 1 2 3 4

[図48]

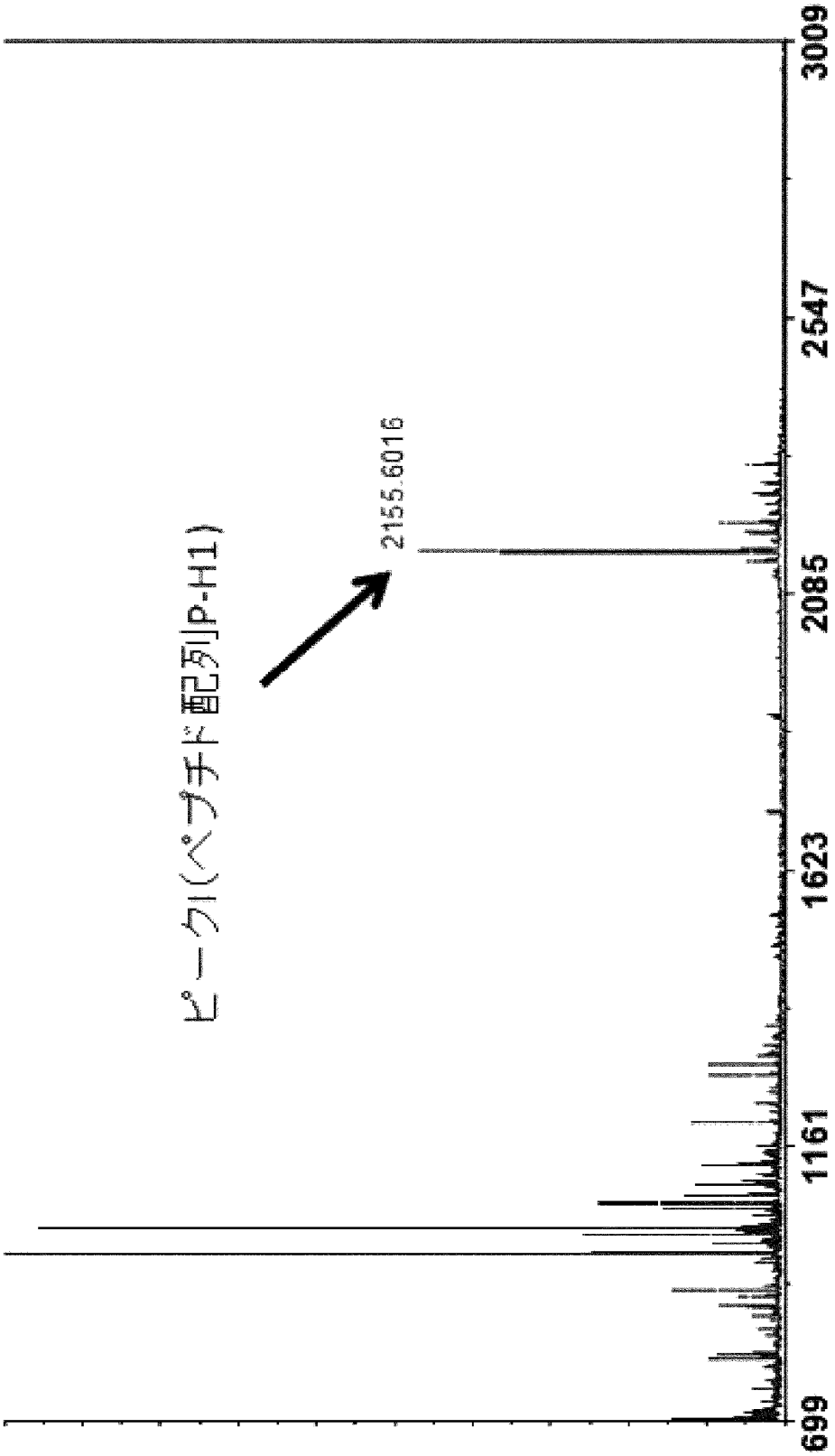

1427.4149
ピークI(ペプチド配列P-D5)
1286.3910
ピークII(ペプチド配列P-141)
1162.2998
ピークIII(ペプチド配列P-143)
1700
1560
1420
1280
1140
1000

[図49]

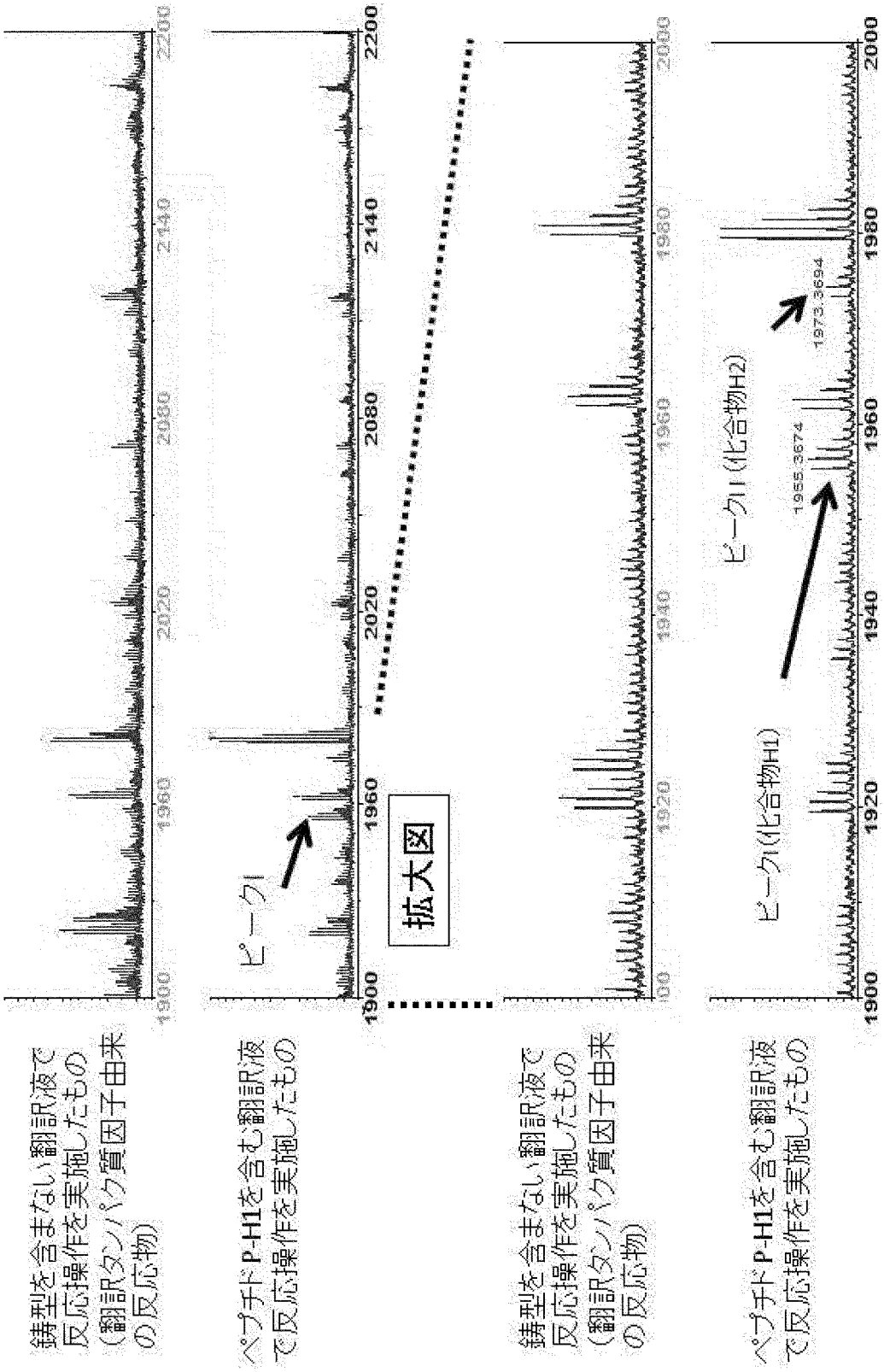


時間（分）	面積比（%）
0.30	81.06
0.36	18.94

[図50]

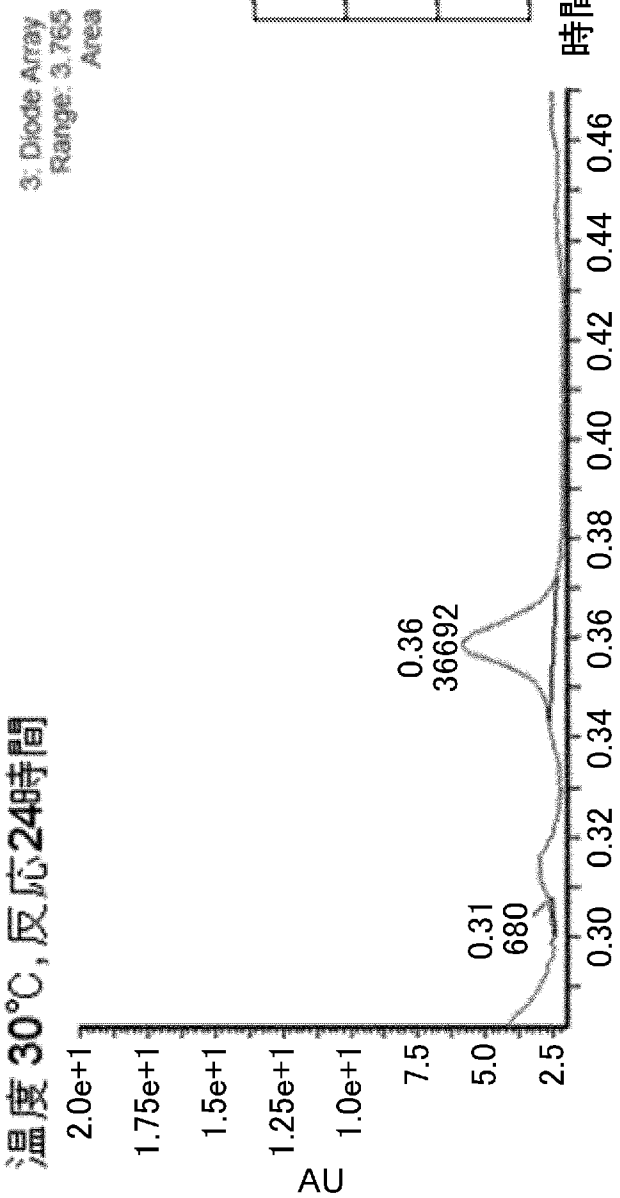


[図51]

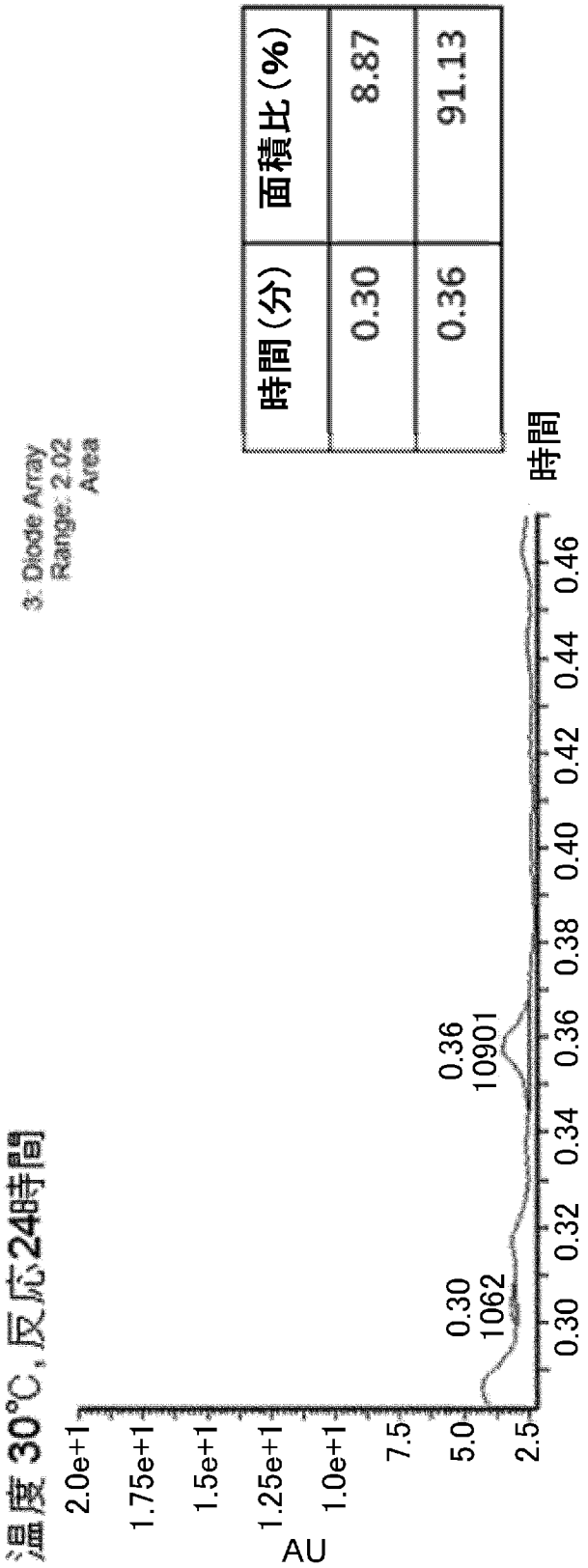

鋳型を含まない翻訳液で反応操作を実施したもの（翻訳タンパク質因子由来の反応物）
ペプチドP-H1を含む翻訳液で反応操作を実施したもの
ピーク1
拡大図
鋳型を含まない翻訳液で反応操作を実施したもの（翻訳タンパク質因子由来の反応物）
ペプチドP-H1を含む翻訳液で反応操作を実施したもの
ピーク1(化合物H1)
ピーク11(化合物H2)
1955.3674
1973.3694

[図52]

時間(分)	面積比(%)
0.31	1.82
0.36	98.18



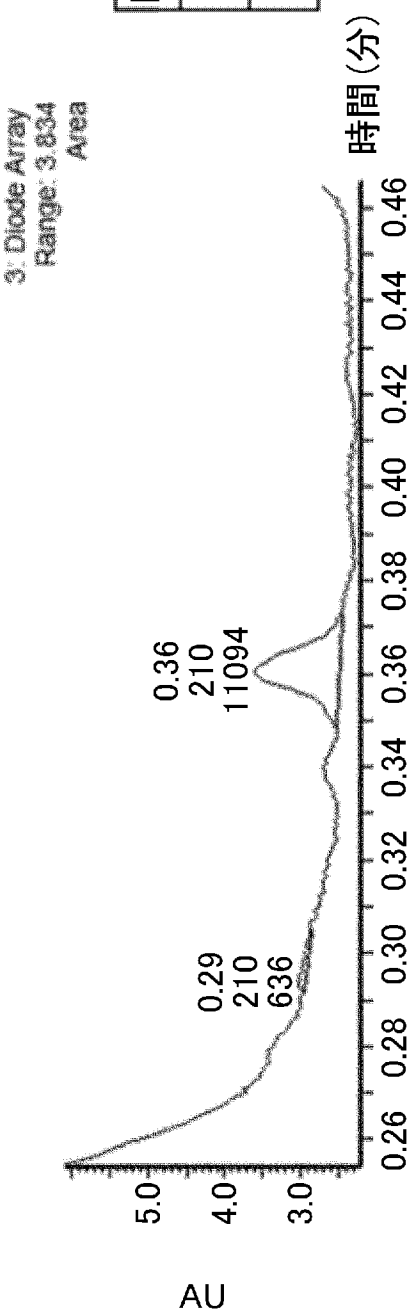
[図53]



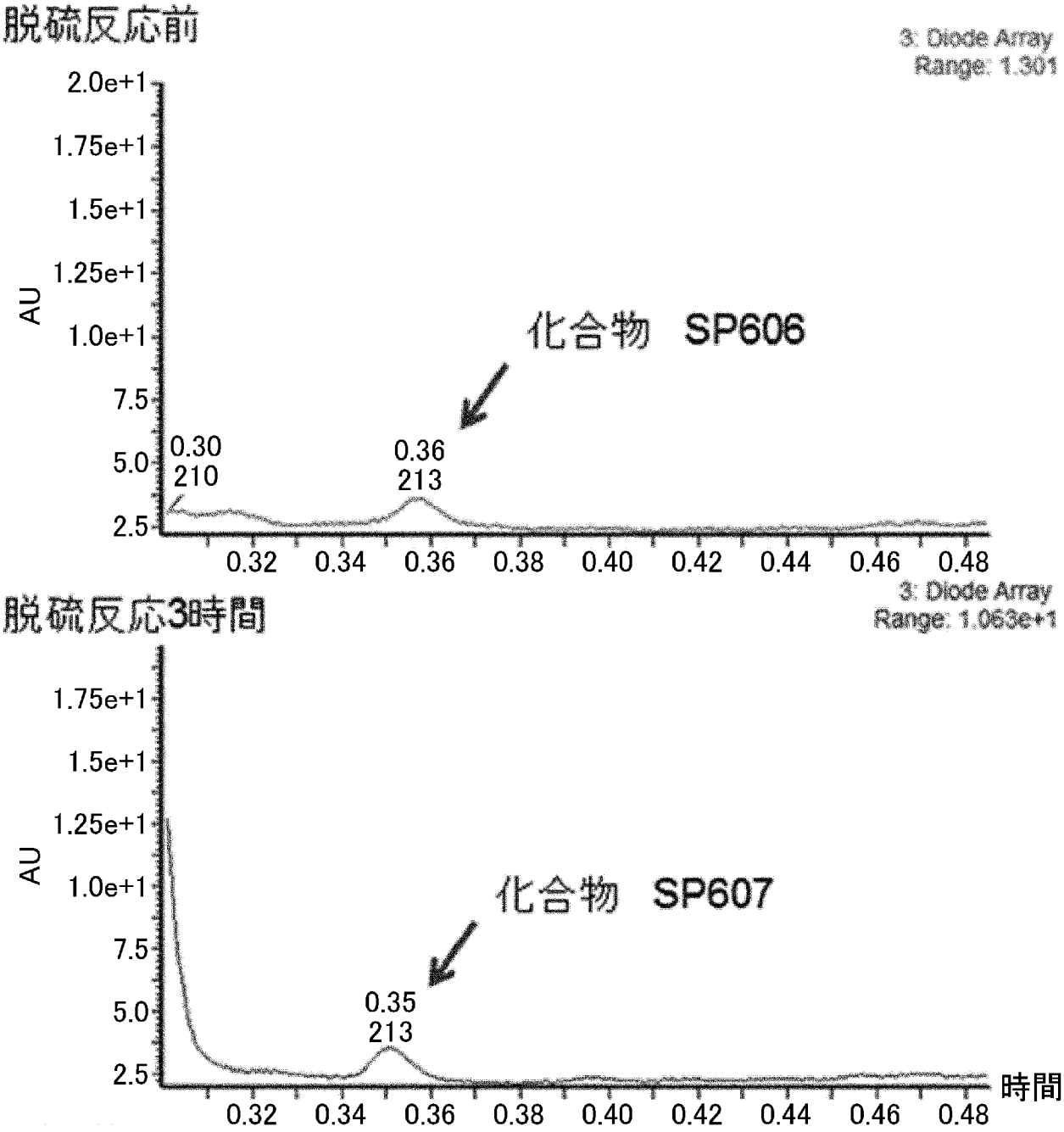
時間(分)	面積比(%)
0.30	8.87
0.36	91.13

[図54]

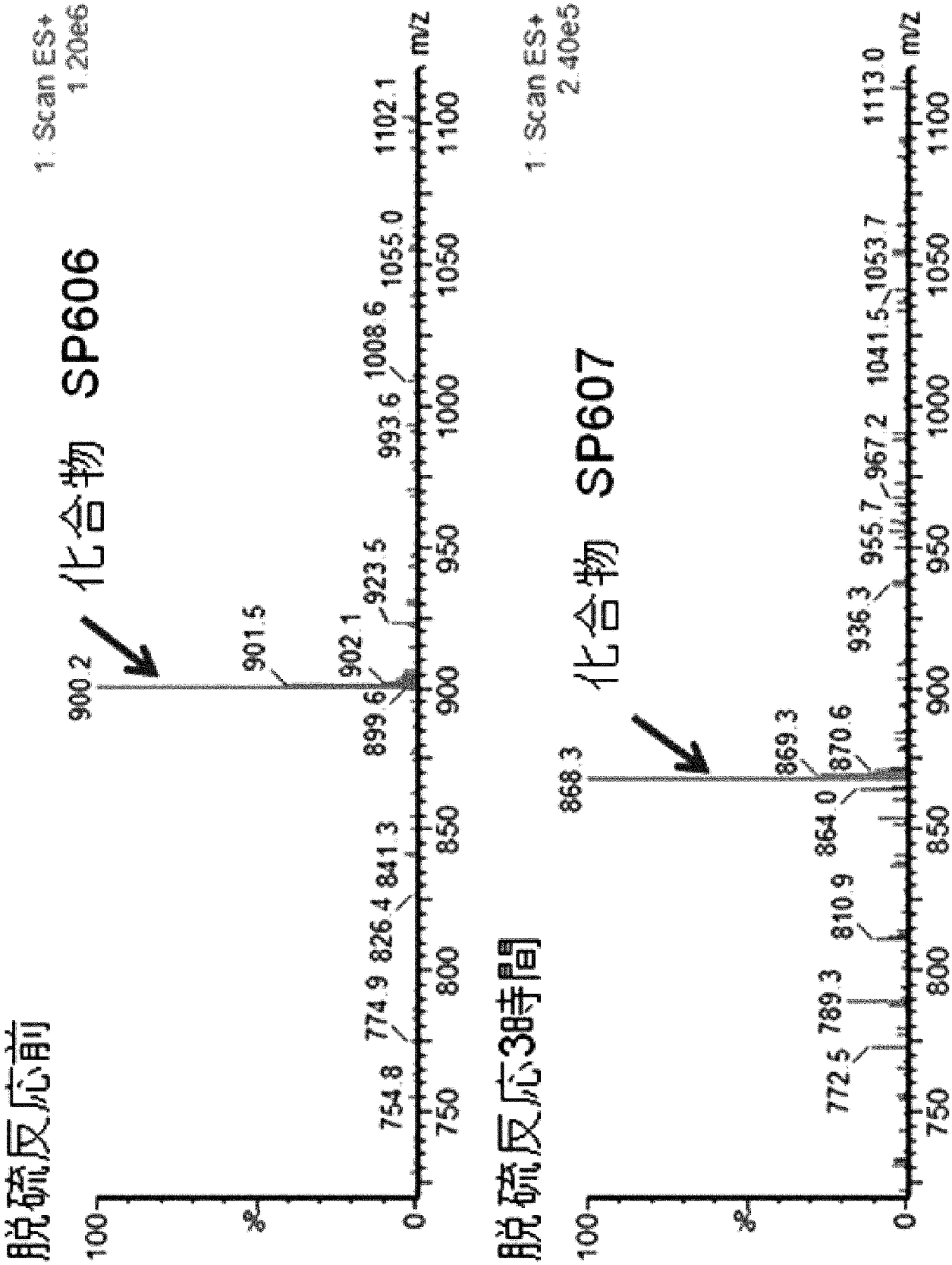
時間(分)	面積比(%)
0.29	5.42
0.36	94.58



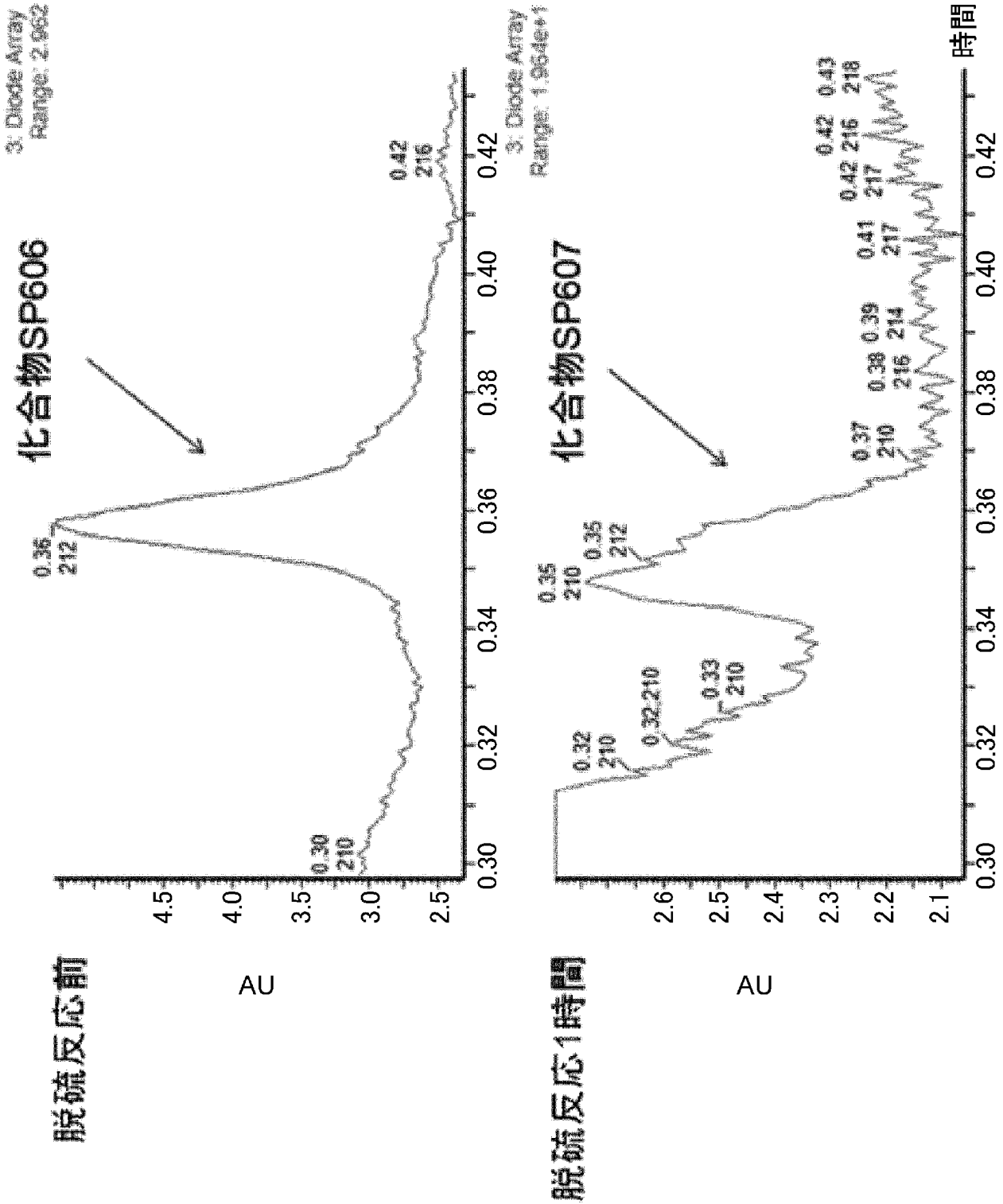
[図55]


脱硫反応前
3: Diode Array
Range: 1.301
2.0e+1
1.75e+1
1.5e+1
1.25e+1
1.0e+1
7.5
5.0
2.5
AU
化合物 SP606
0.30
210
0.36
213
0.32
0.34
0.36
0.38
0.40
0.42
0.44
0.46
0.48
脱硫反応3時間
3: Diode Array
Range: 1.063e+1
1.75e+1
1.5e+1
1.25e+1
1.0e+1
7.5
5.0
2.5
AU
化合物 SP607
0.35
213
時間
0.32
0.34
0.36
0.38
0.40
0.42
0.44
0.46
0.48

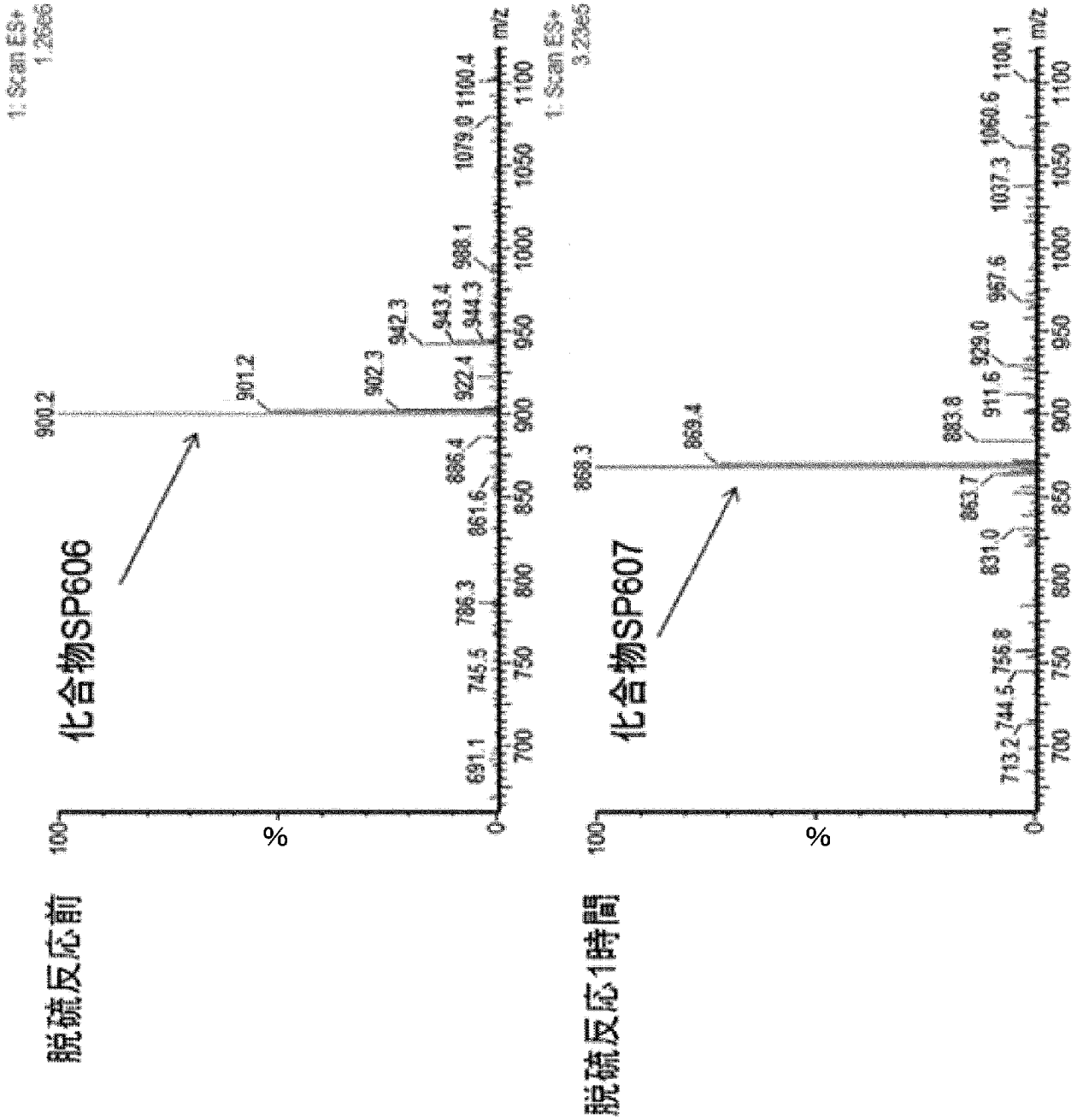
[図56]


脱硫反応前
1: Scan ES+
1.20e6
化合物 SP606
900.2
901.5
902.1
899.6
923.5
993.6
1008.6
1055.0
1102.1
754.8
774.9
826.4
841.3
脱硫反応3時間
1: Scan ES+
2.40e5
化合物 SP607
868.3
869.3
870.6
936.3
955.7
967.2
1041.5
1053.7
1113.0
772.5
789.3
810.9
864.0
m/z
%
100
0
750
800
850
900
950
1000
1050
1100

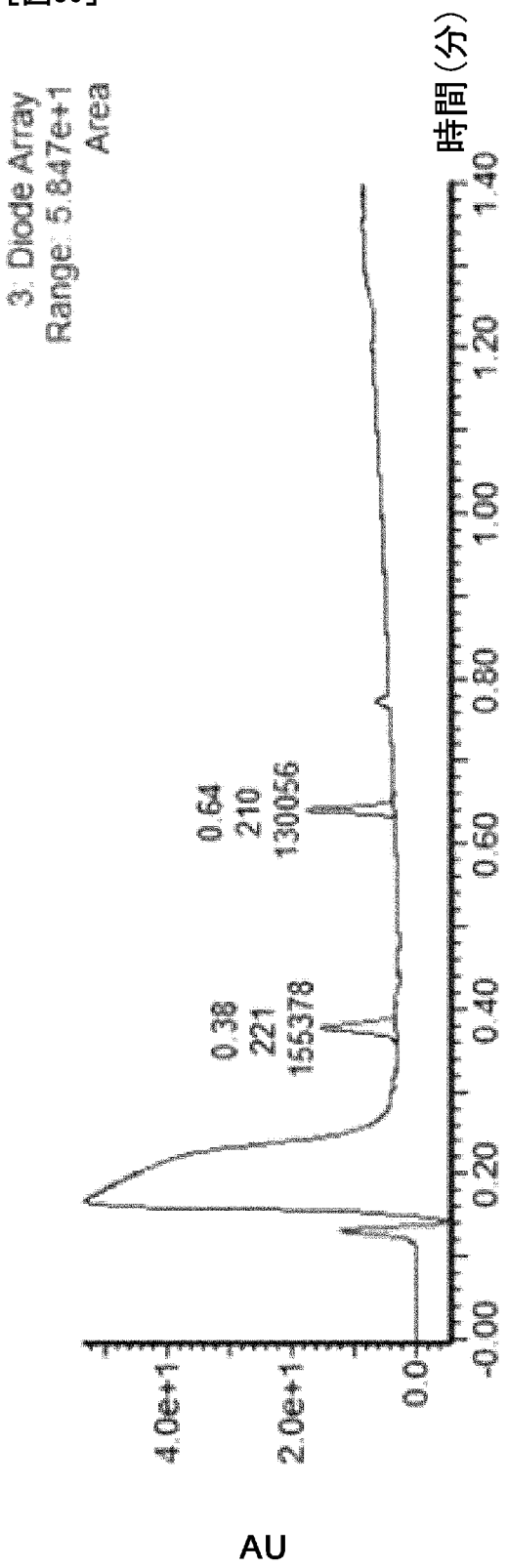
[図57]


3: Diode Array
Range: 2.962
化合物SP606
0.36
212
0.30
210
0.42
216
脱硫反応前
AU
3: Diode Array
Range: 1.954e+1
化合物SP607
0.35
210
0.35
212
0.32
210
0.32 210
0.33
210
0.37
210
0.38
216
0.39
214
0.41
217
0.42 216
0.42
217
0.43
218
脱硫反応1時間
AU
時間
0.30
0.32
0.34
0.36
0.38
0.40
0.42

[図58]

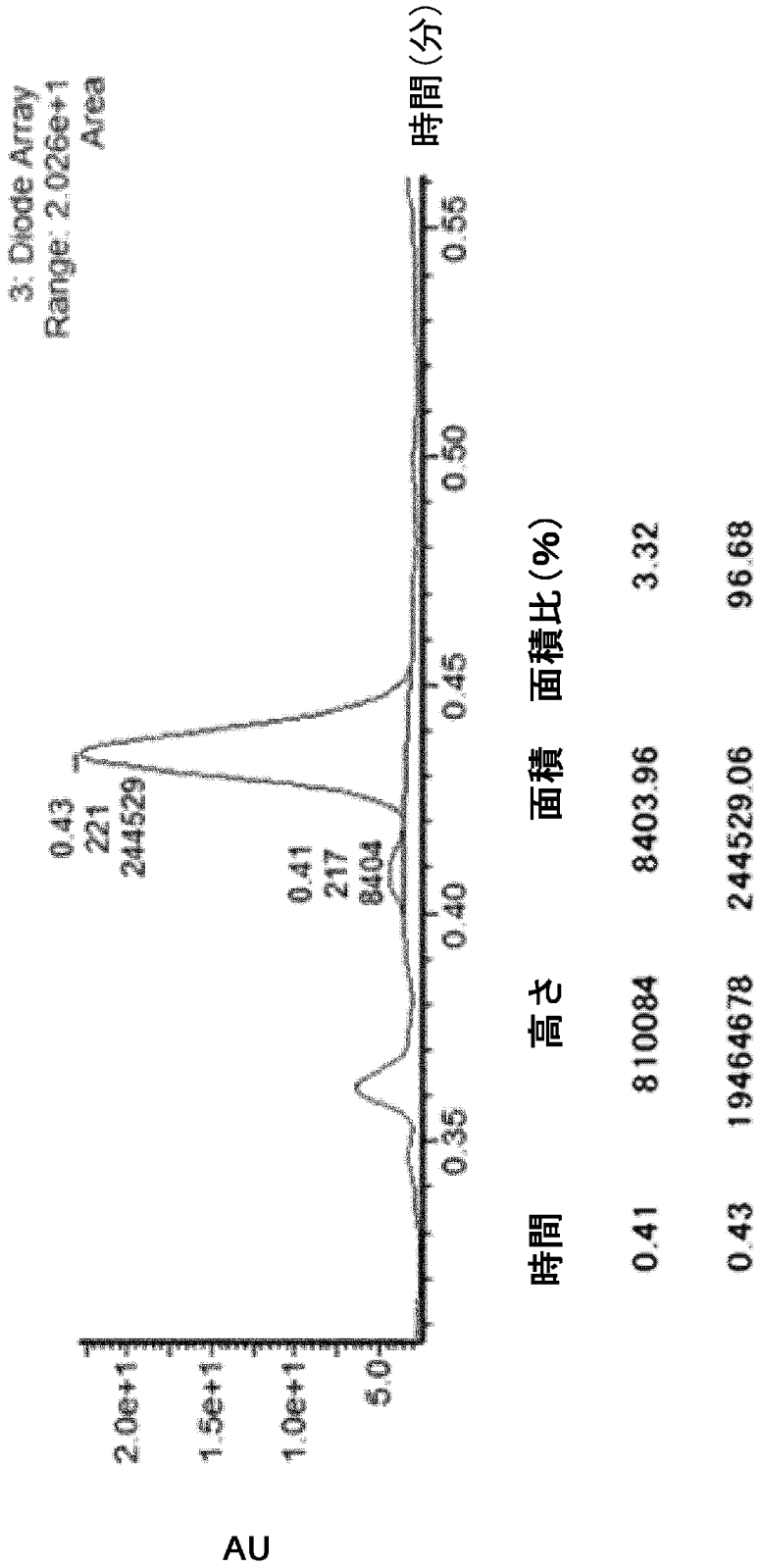

1: Scan ES+
1.25e6
化合物SP606
脱硫反応前
900.2
901.2
902.3
942.3
943.4
944.3
922.4
988.1
1079.0
1100.4
886.4
861.6
786.3
745.5
691.1
1: Scan ES+
3.23e5
化合物SP607
脱硫反応1時間
868.3
869.4
883.8
911.6
929.0
957.6
1037.3
1060.6
1100.1
863.7
831.0
755.8
744.5
713.2
%
m/z

[図59]



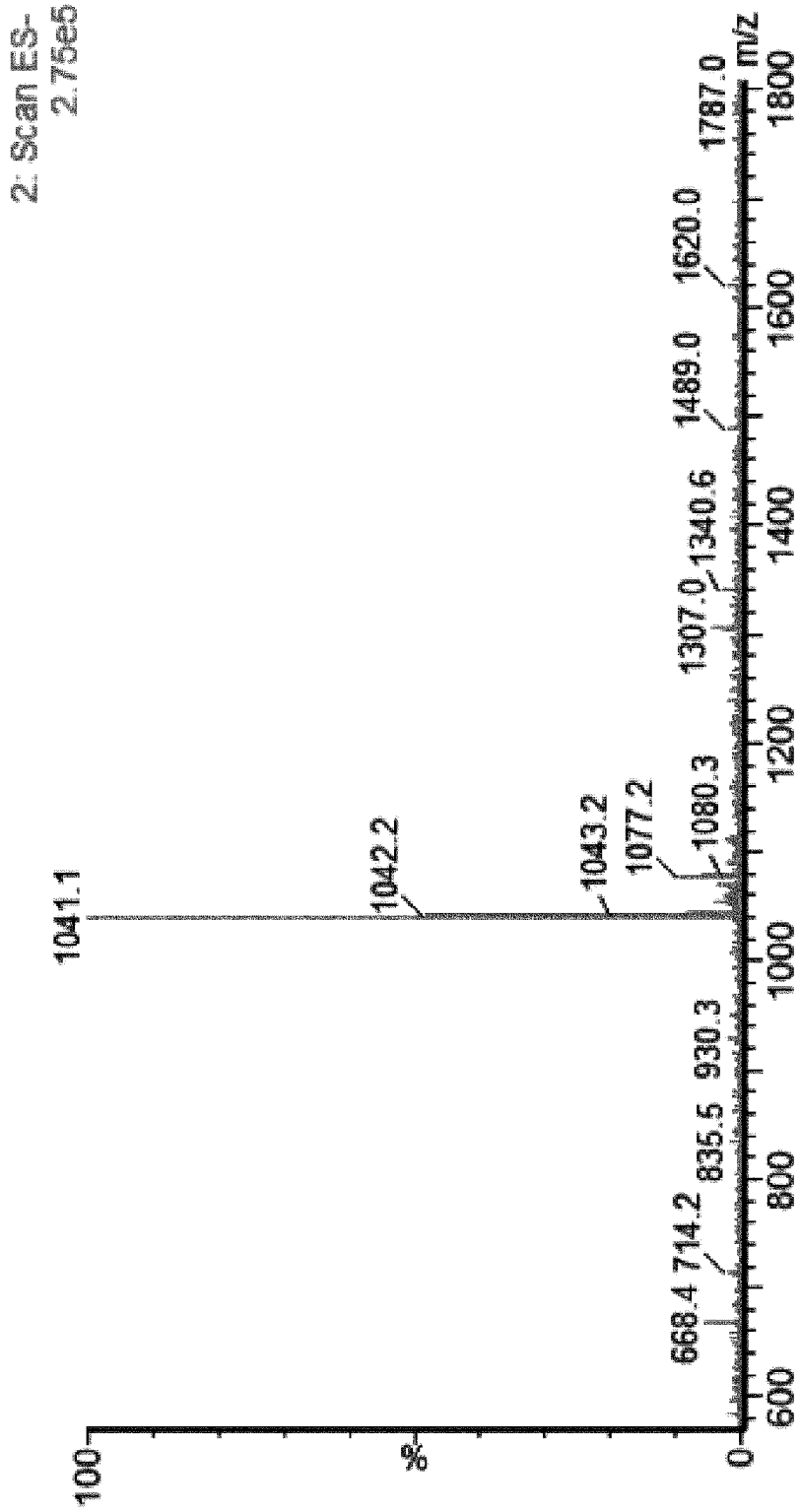
時間	高さ	面積	面積比（%）
0.38	12113958	155378.11	54.44
0.64	14014278	130055.78	45.56

[図60]



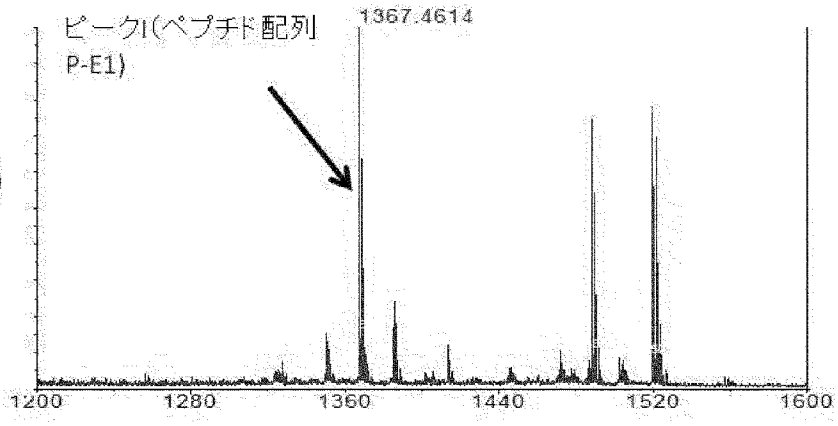
時間	高さ	面積	面積比（%）
0.41	810084	8403.96	3.32
0.43	19464678	244529.06	96.68

[図61]

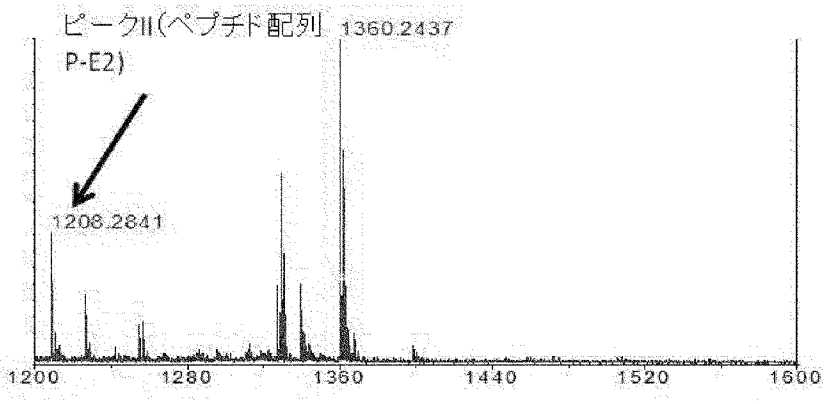

2: Scan ES-
2.75e5
100
%
0
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z
1041.1
1042.2
1043.2
1077.2
1080.3
1307.0
1340.6
1489.0
1620.0
1787.0
668.4
714.2
835.5
930.3

[図62]

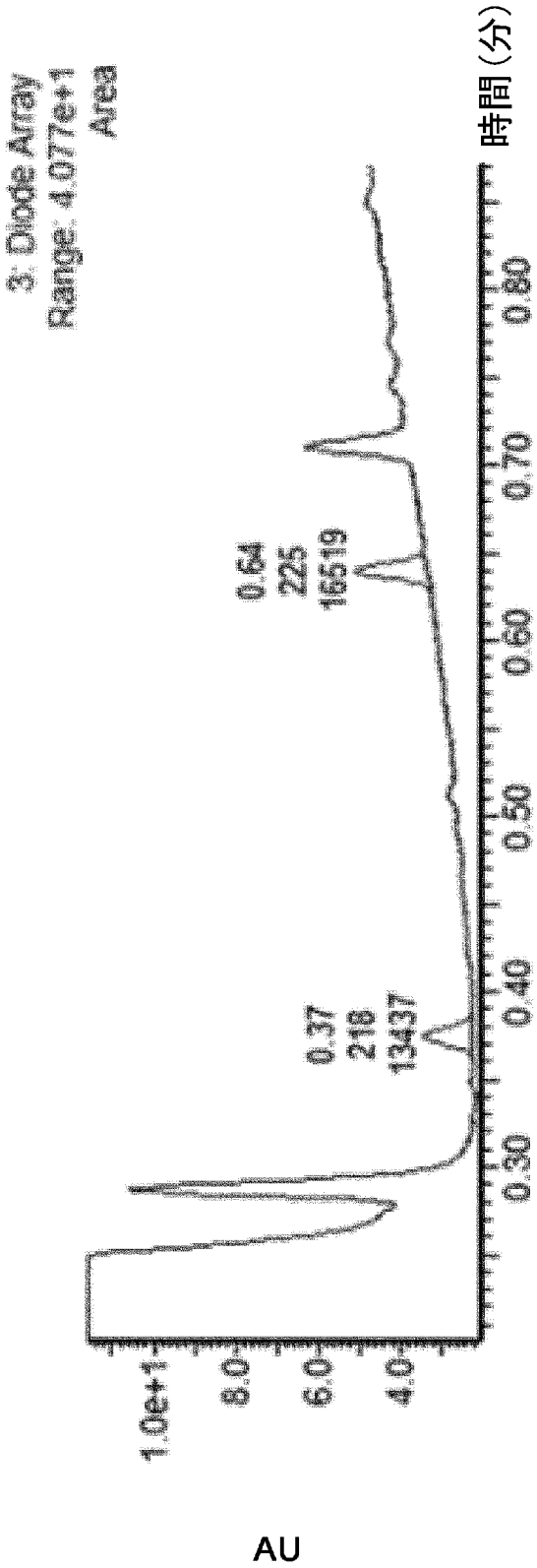
翻訳直後
（酵素処理前）



酵素処理後

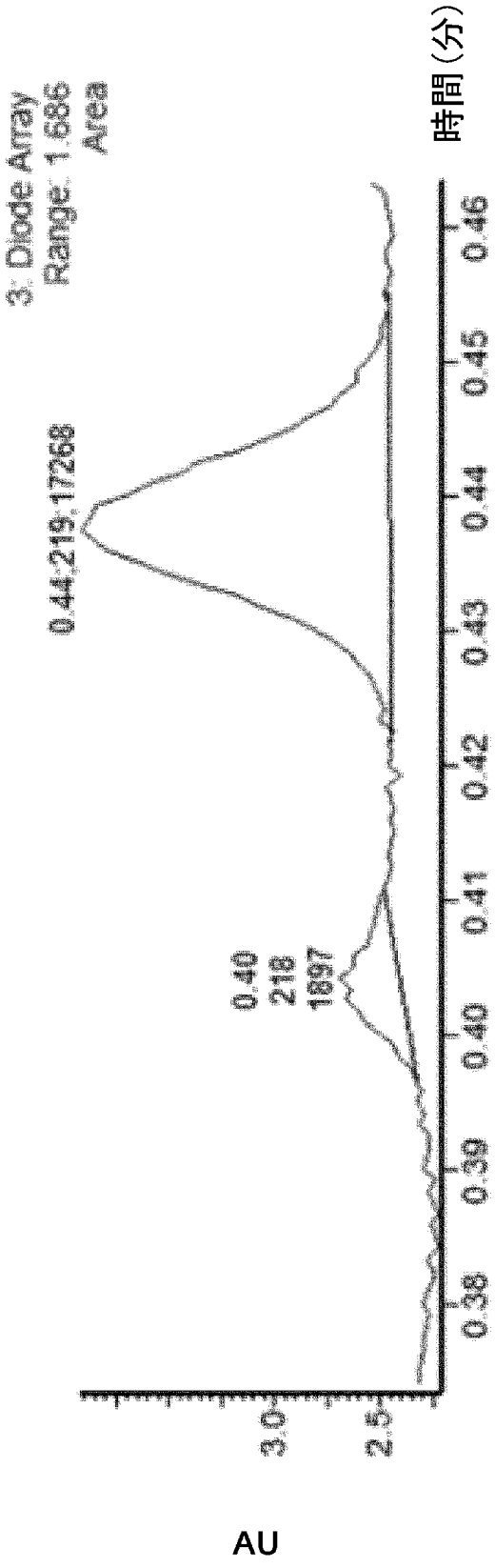


[図63]



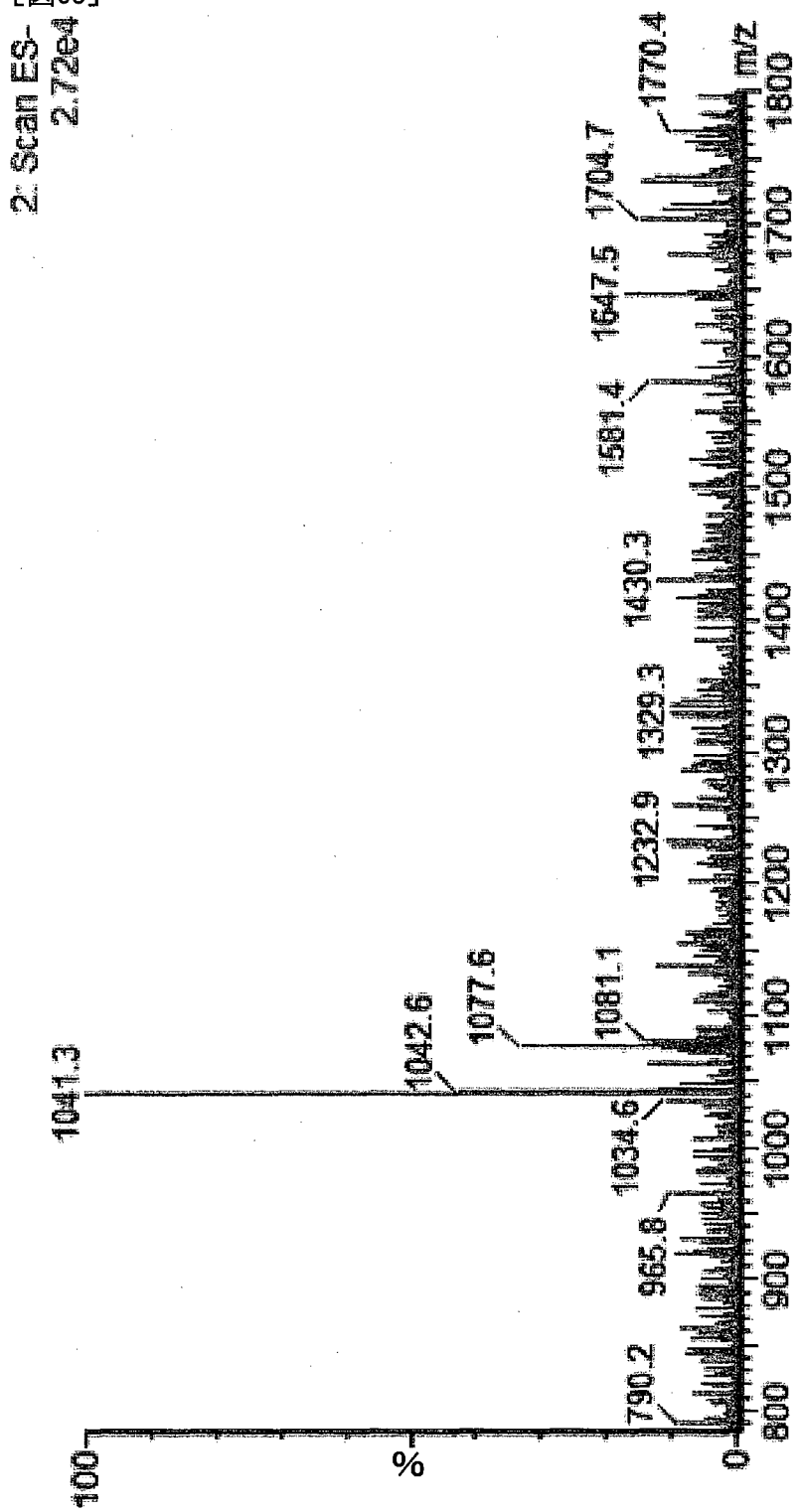
時間	高さ	面積	面積比（%）
0.37	1188706	13437.38	44.86
0.64	1772978	16519.38	55.14

[図64]



時間	高さ	面積	面積比（%）
0.40	282694	1896.75	9.90
0.44	1458952	17268.03	90.10

[図65]


2: Scan ES-
2.72e4
1041.3
1042.6
1077.6
1081.1
1034.6
965.8
790.2
1232.9
1329.3
1430.3
1561.4
1647.5
1704.7
1770.4
m/z
100
%
0
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800

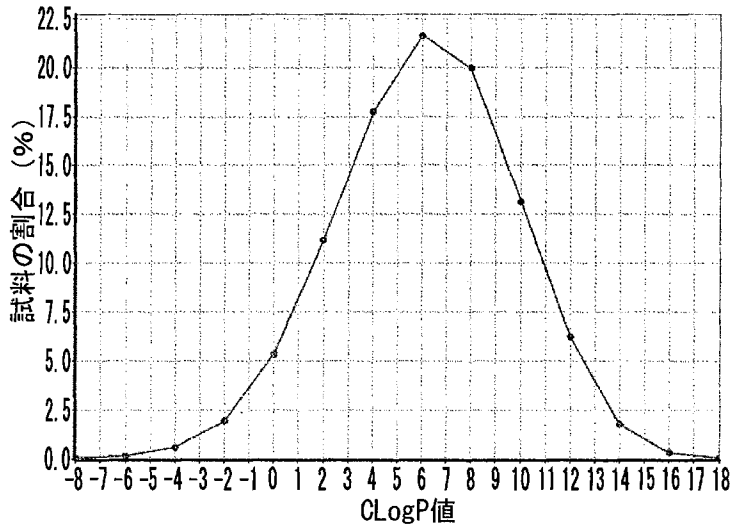
[図66]

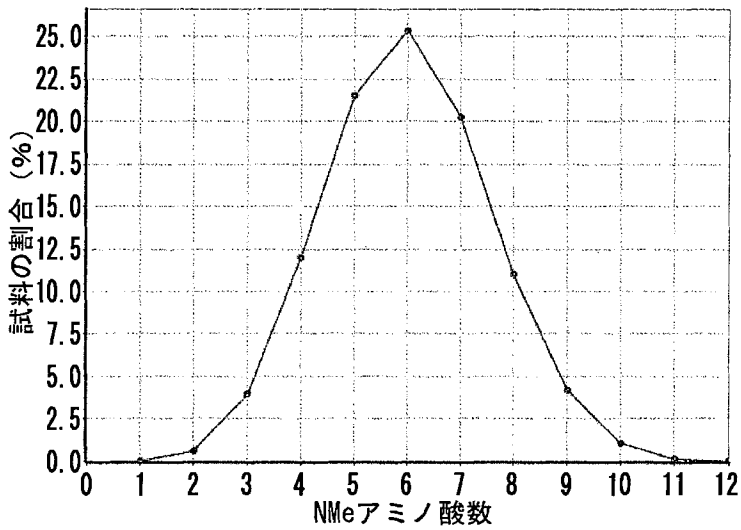
Initiation suppression library

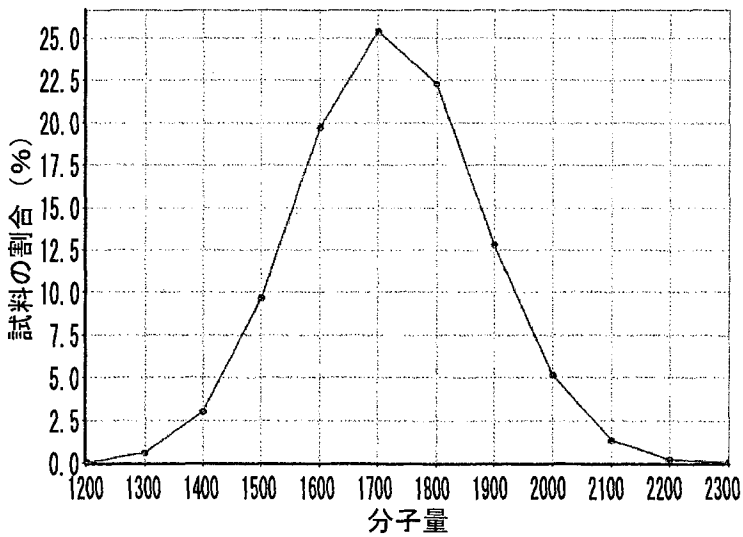
平均 CLOGP 値 6.12

平均 NMe 数 6.0

平均分子量 1719.2







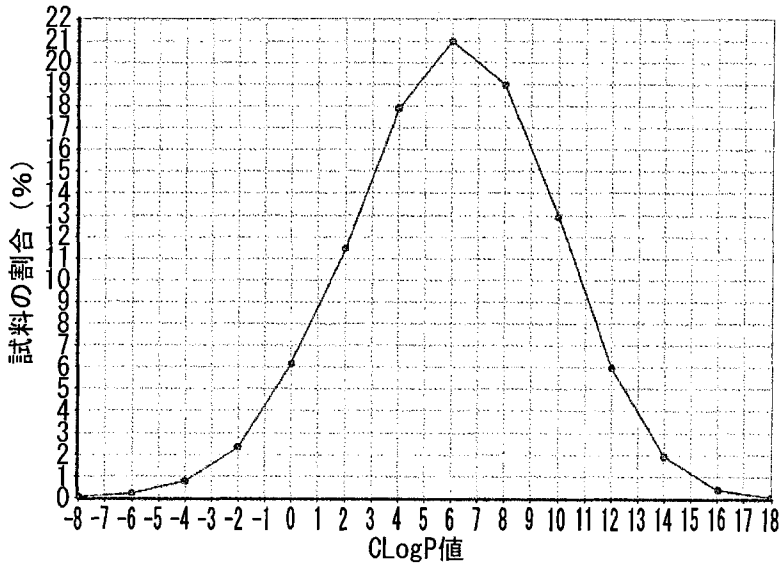
[図67]

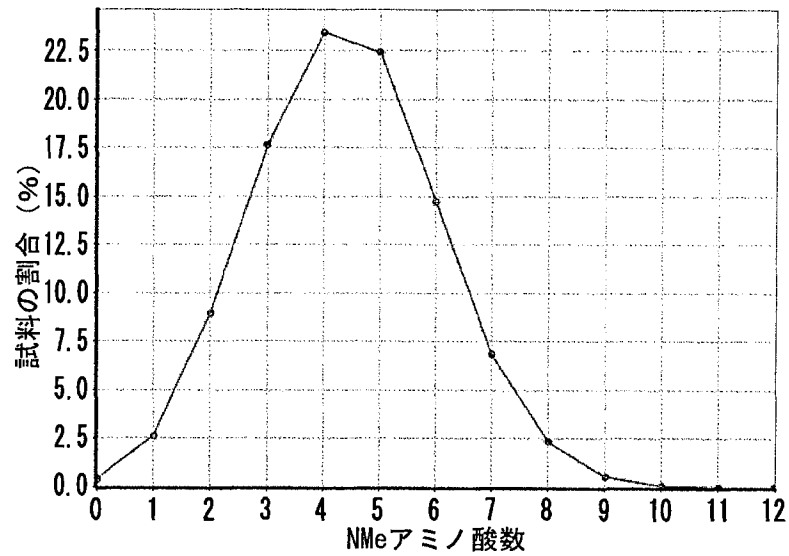
Initiation read through library

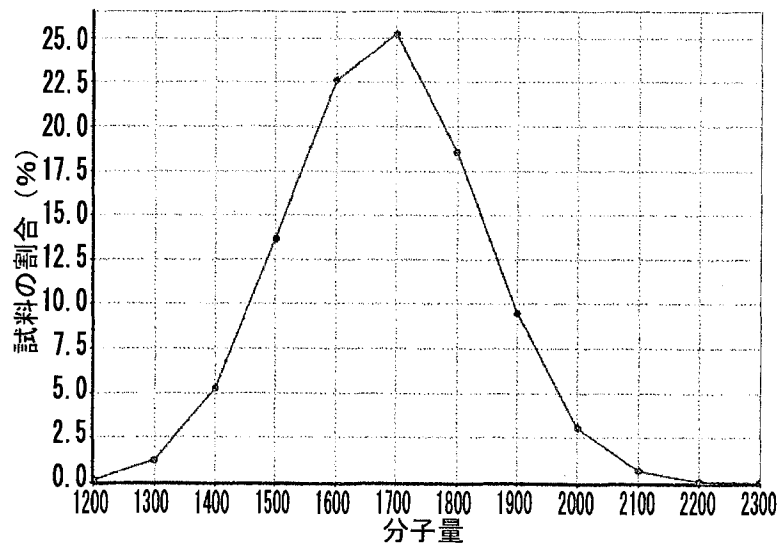
平均 CLOGP 値 5.97

平均 NMe 数 4.4

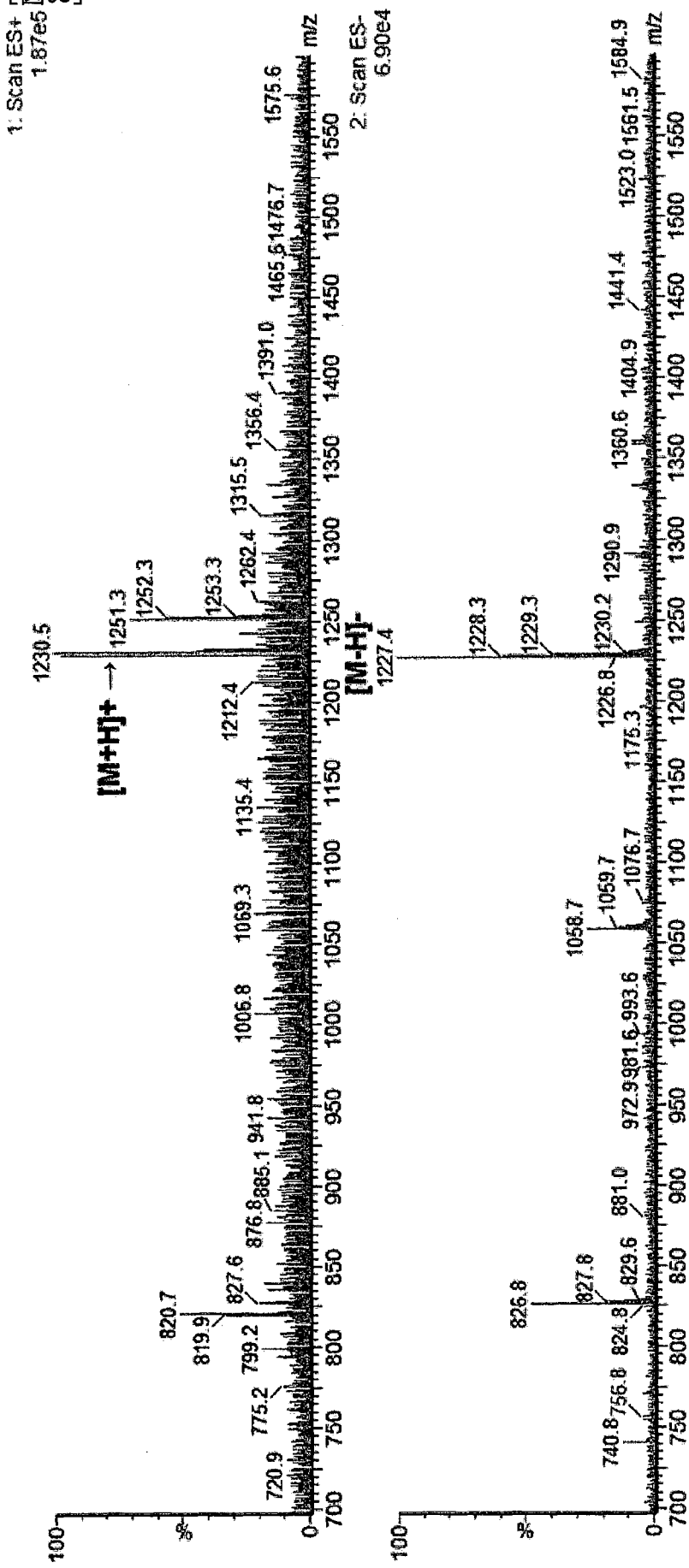
平均分子量 1678.7



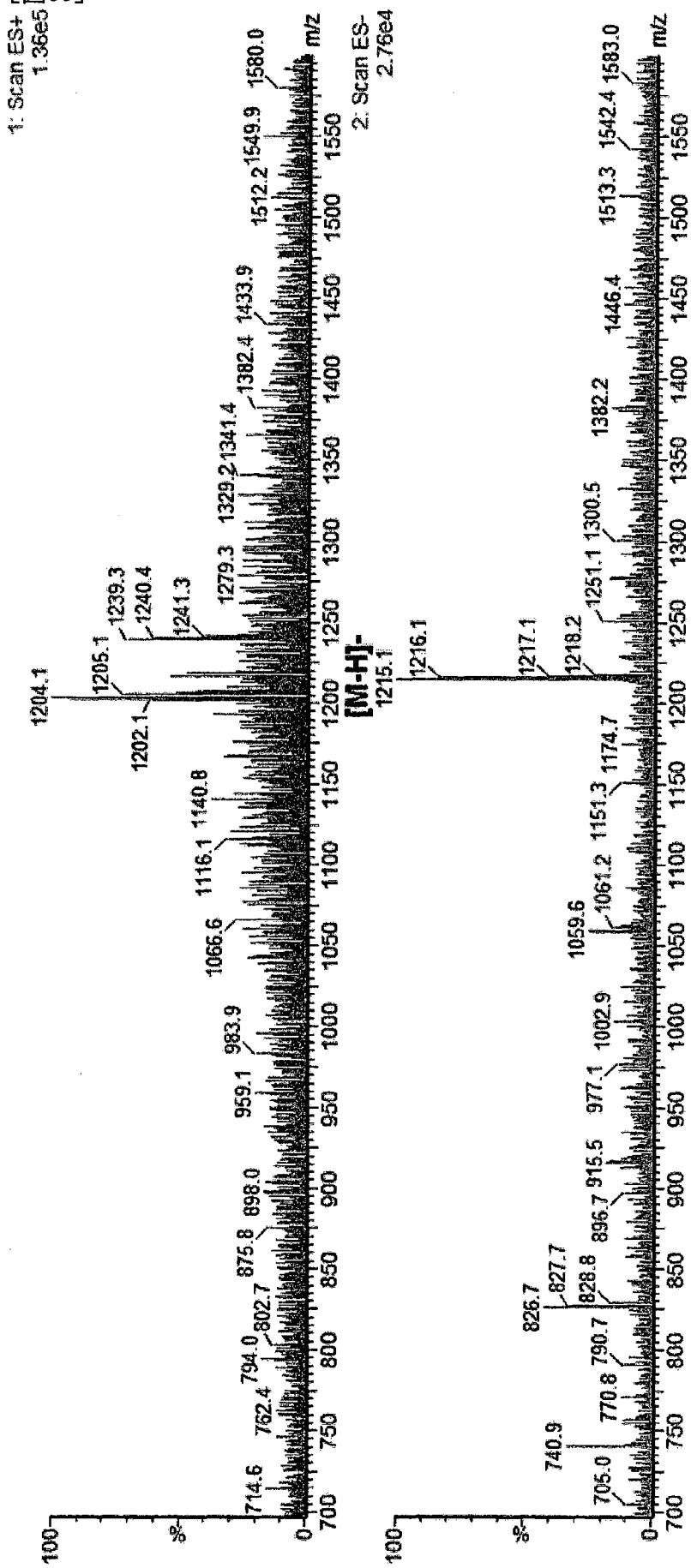




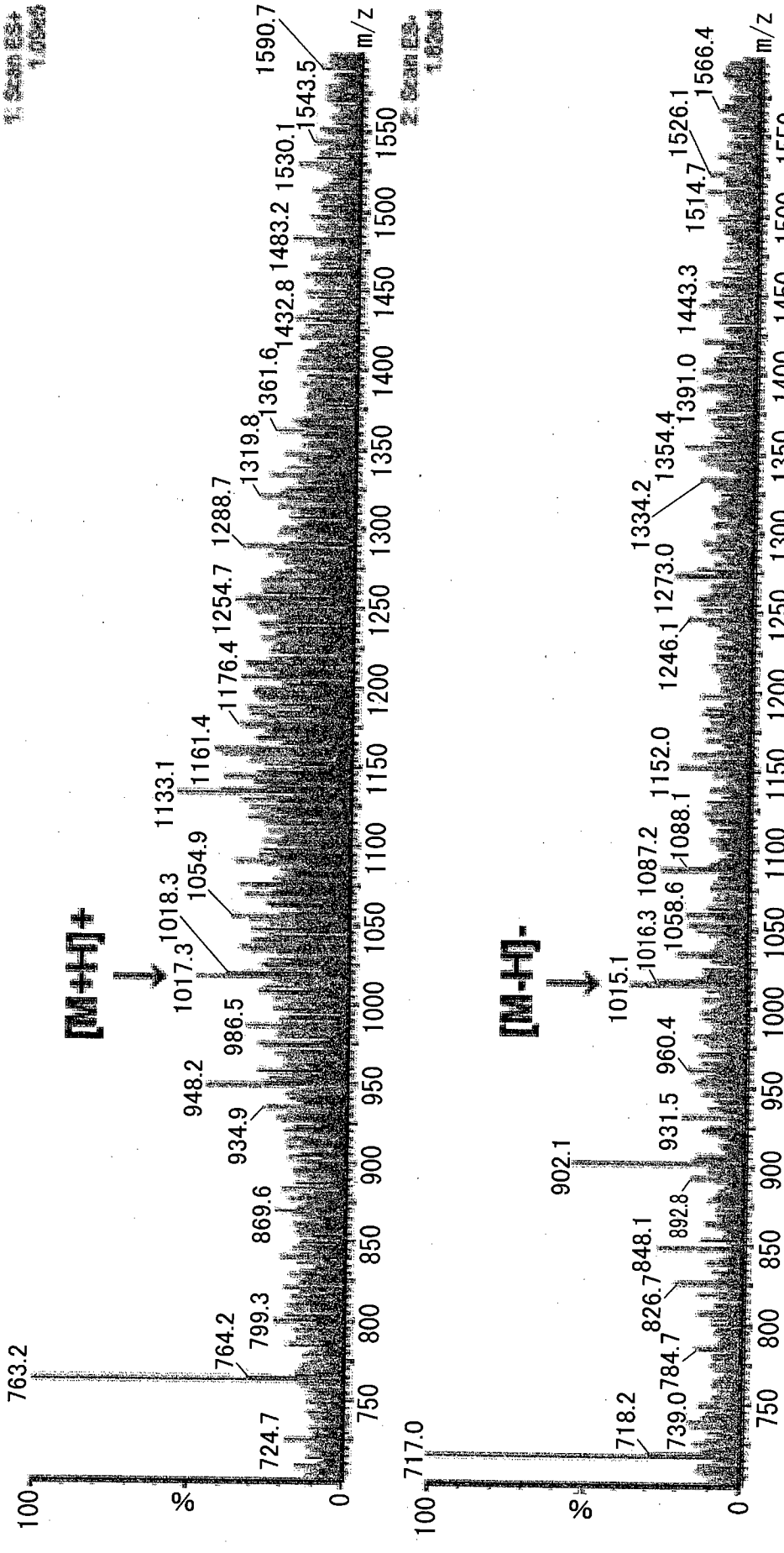
[図68]



[図69]

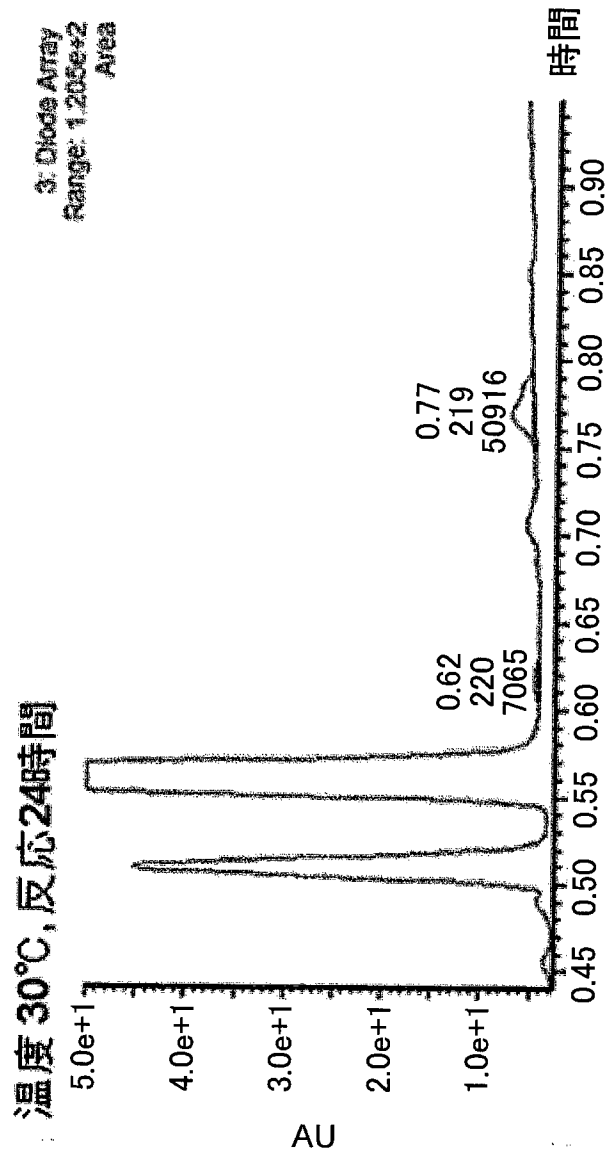


[図70]

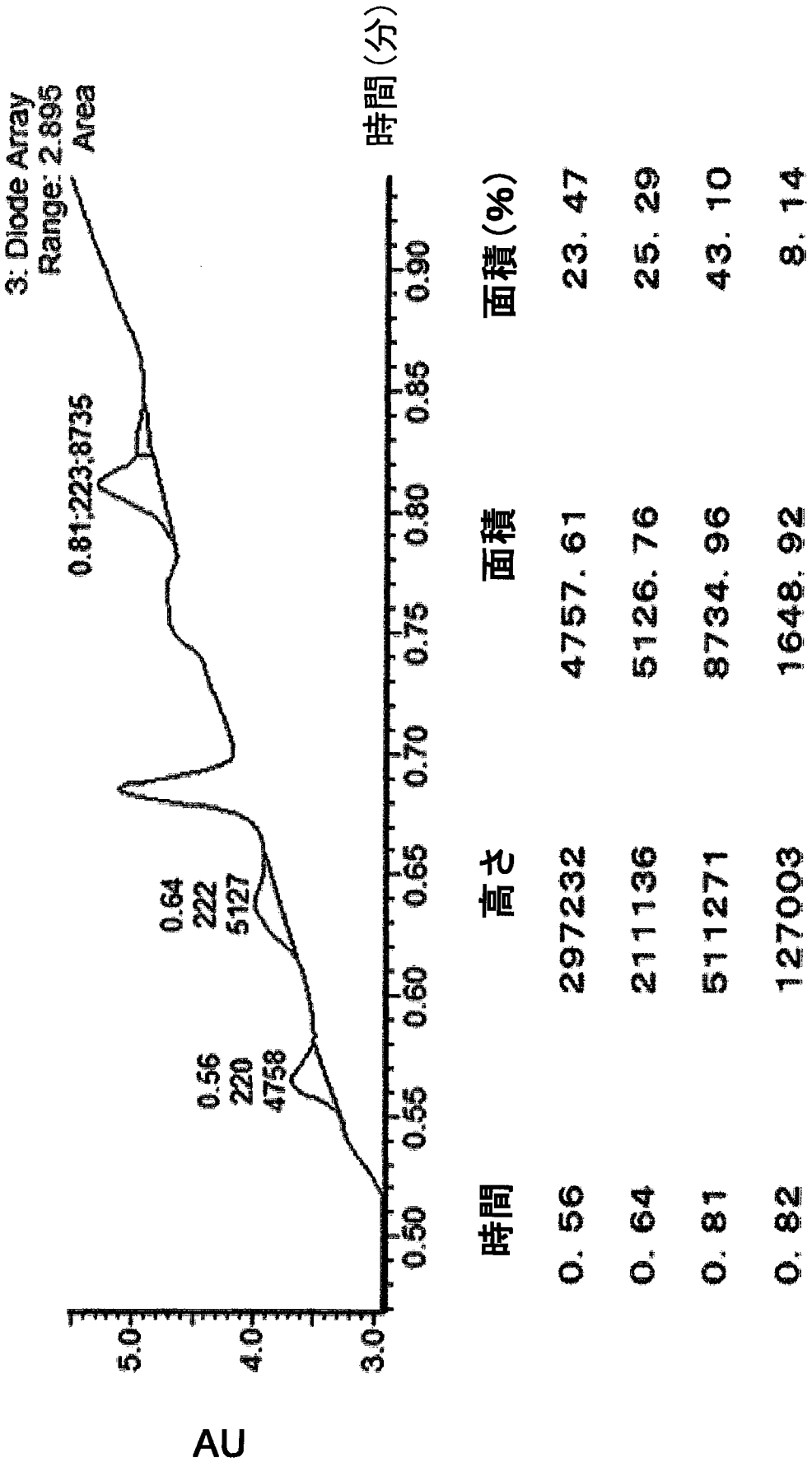


[図71]

時間(分)	面積比(%)
0.62	12.18
0.77	87.82

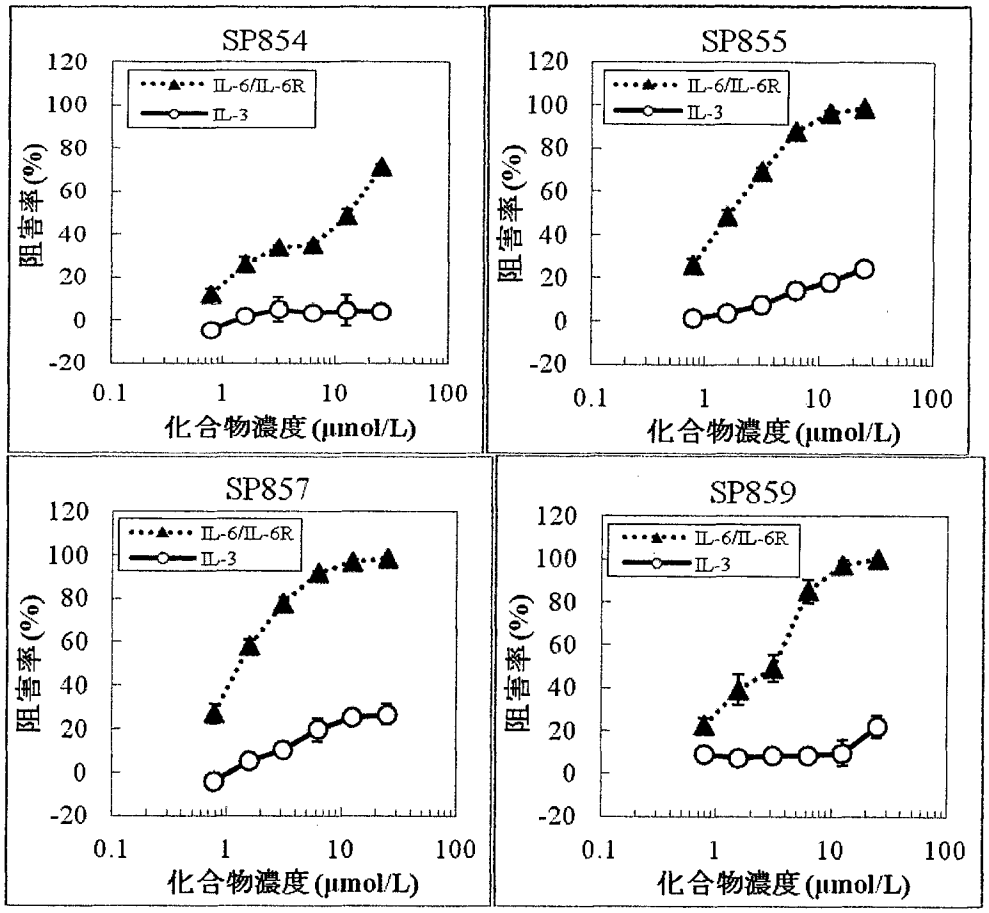


[図72]

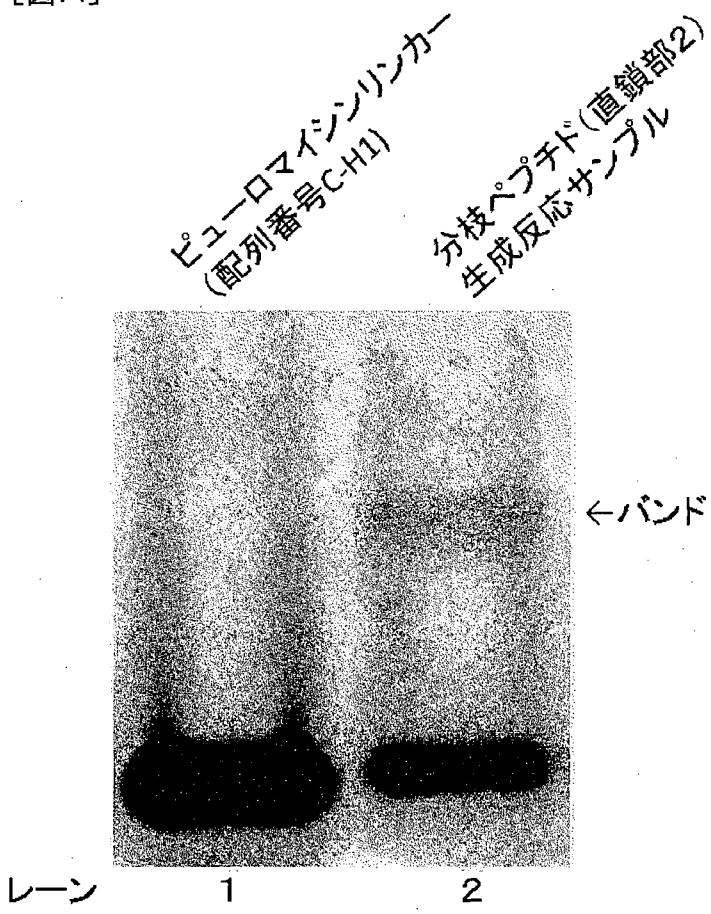


時間	高さ	面積	面積(%)
0.56	297232	4757.61	23.47
0.64	211136	5126.76	25.29
0.81	511271	8734.96	43.10
0.82	127003	1648.92	8.14

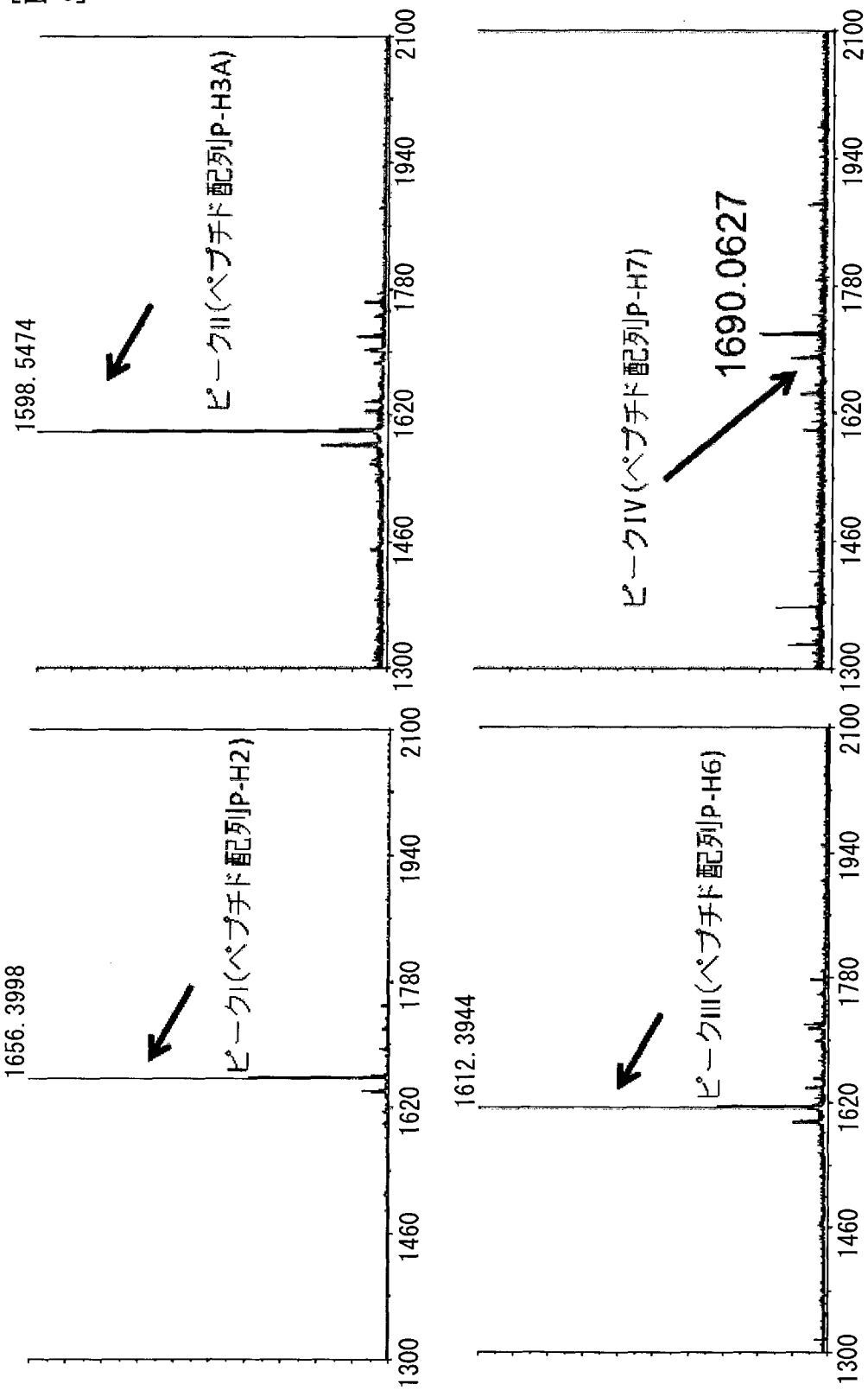
[図73]


SP854
SP855
SP857
SP859
IL-6/IL-6R
IL-3
阻害率(%)
化合物濃度(μmol/L)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100

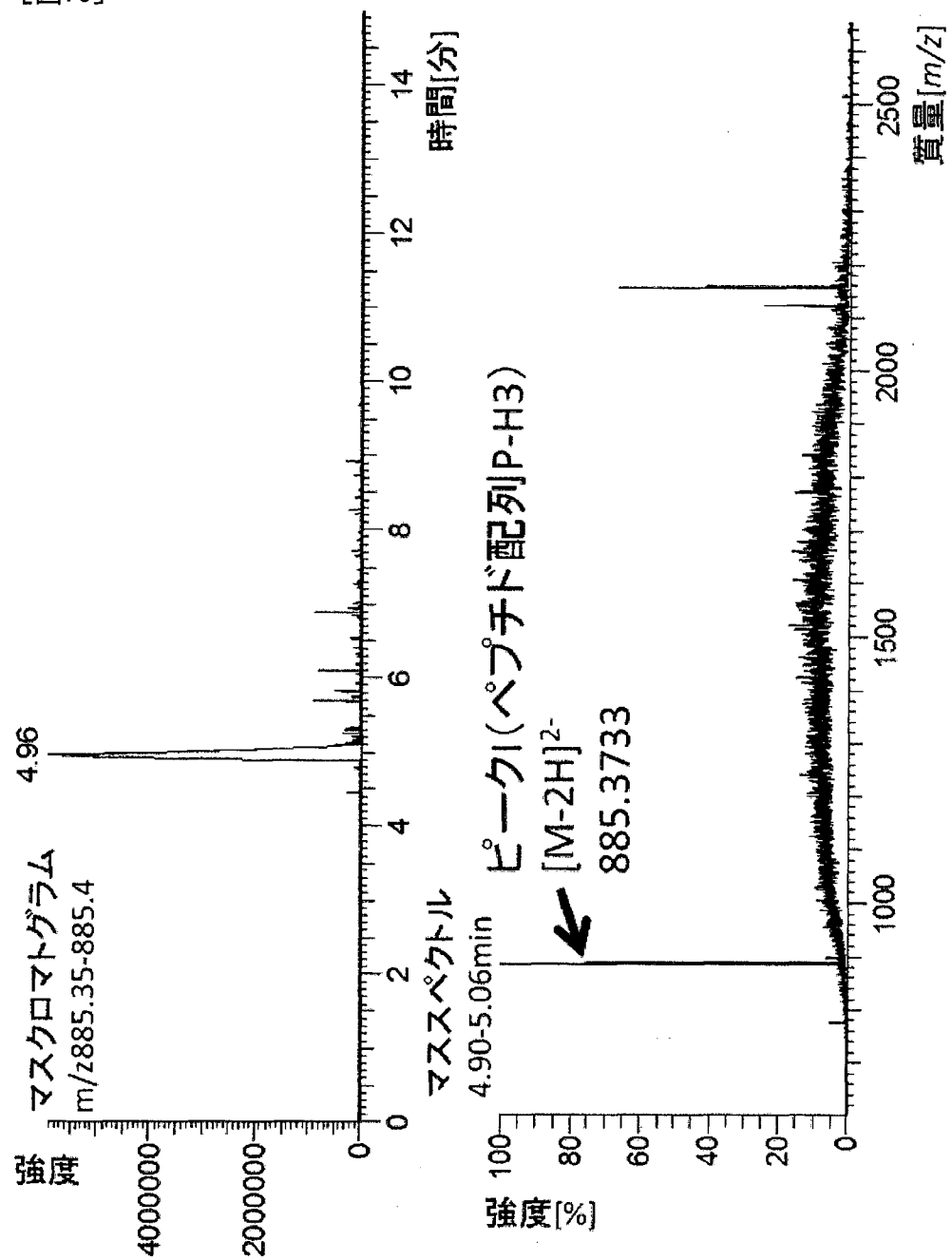
[図74]



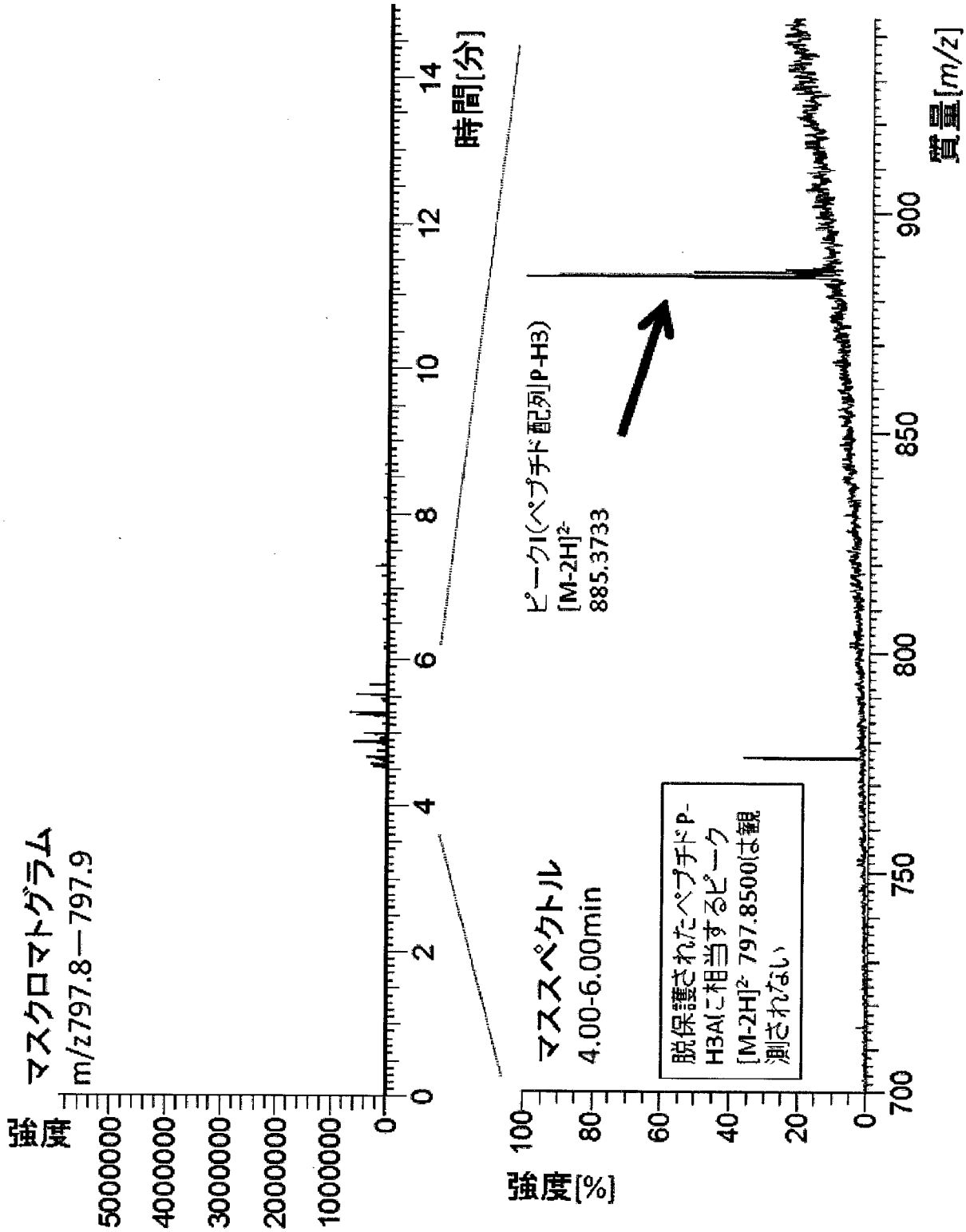
[図75]


1656.3998
ピークI(ペプチド配列P-H2)
1598.5474
ピークII(ペプチド配列P-H3A)
1612.3944
ピークIII(ペプチド配列P-H6)
1690.0627
ピークIV(ペプチド配列P-H7)
1300
1460
1620
1780
1940
2100

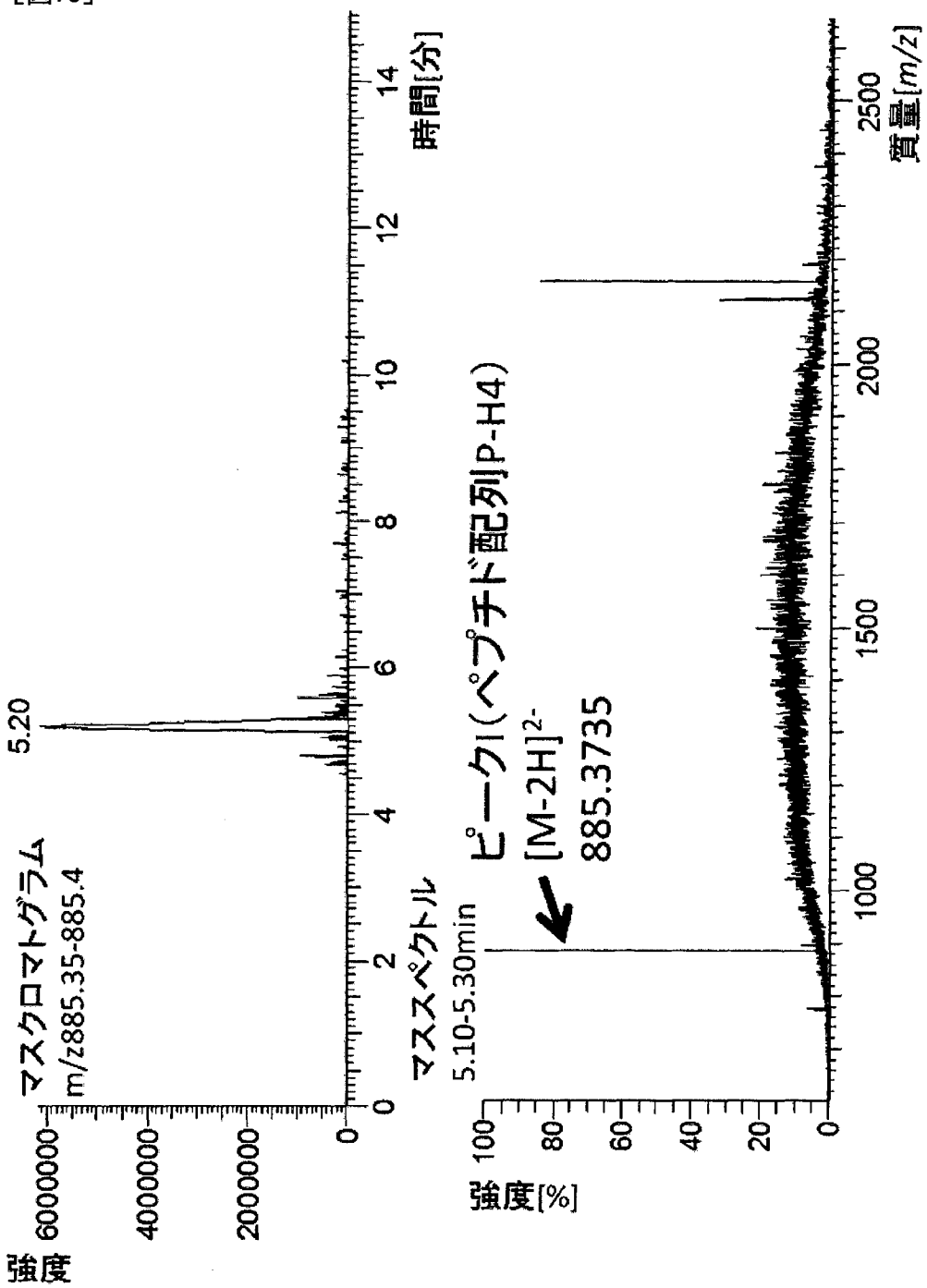
[図76]


マスクロマトグラム
m/z885.35-885.4
4.96
強度
4000000
2000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
時間[分]
マススペクトル
4.90-5.06min
ピーク1(ペプチド配列[P-H3)
[M-2H]2-
885.3733
100
80
60
40
20
0
強度[%]
1000
1500
2000
2500
質量[m/z]

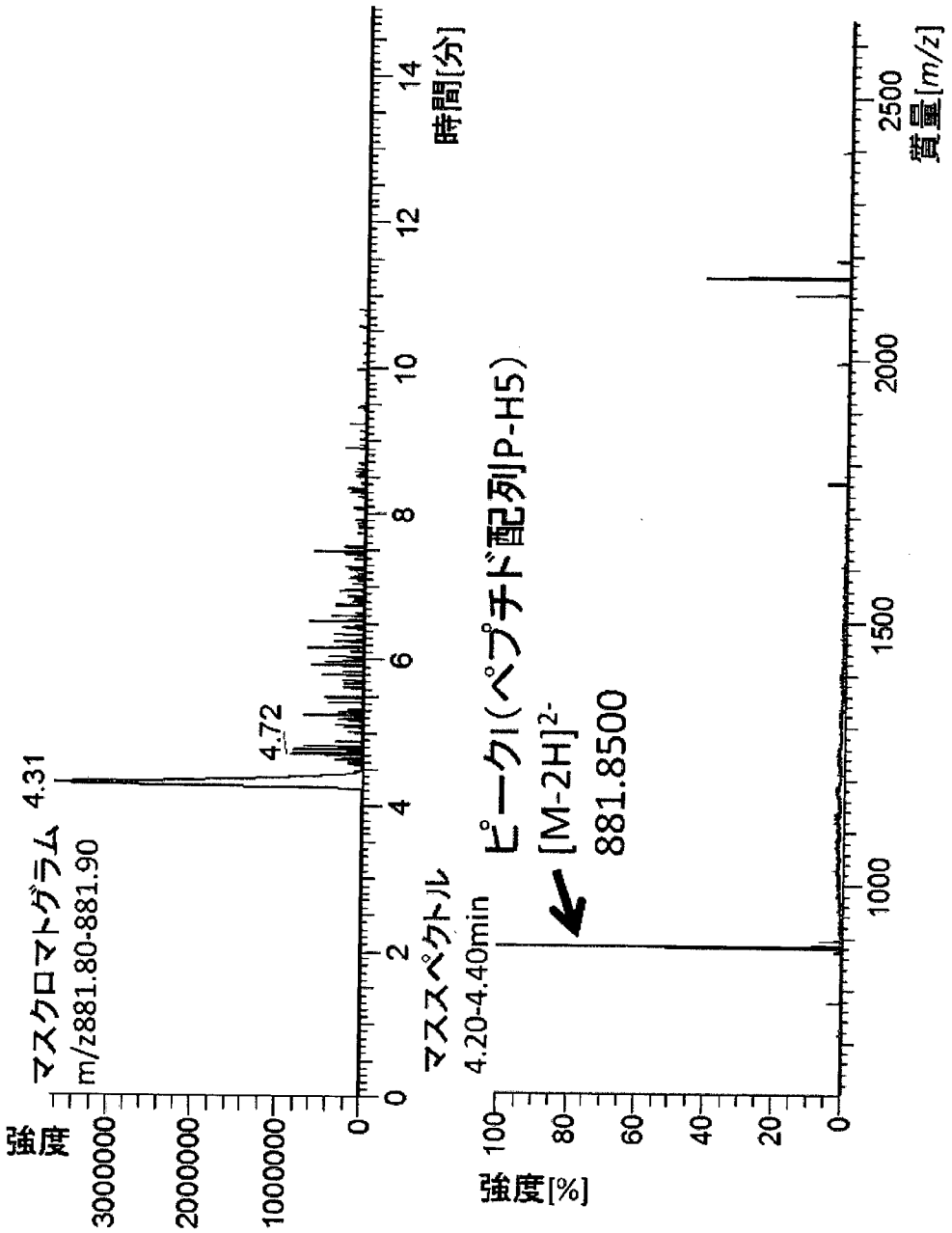
[図77]


マスクロマトグラム
m/z797.8—797.9
強度
時間[分]
ピーク1(ペプチド配列[P-H3)
[M-2H]2-
885.3733
マススペクトル
4.00-6.00min
強度[%]
質量[m/z]
脱保護されたペプチドP-H3Aに相当するピーク
[M-2H]2- 797.8500は観測されない

[図78]

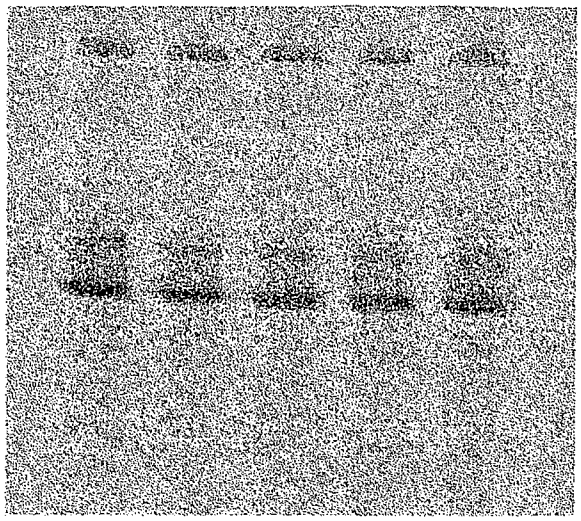

マスクロマトグラム
m/z885.35-885.4
5.20
強度
6000000
4000000
2000000
0
2
4
6
8
10
12
14
時間[分]
マススペクトル
5.10-5.30min
ピーク1(ペプチド配列P-H4)
[M-2H]2-
885.3735
強度[%]
100
80
60
40
20
0
1000
1500
2000
2500
質量[m/z]

[図79]


マスクロマトグラム
m/z881.80-881.90
4.31
4.72
強度
3000000
2000000
1000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
時間[分]
マススペクトル
4.20-4.40min
ピーク1(ペプチド配列P-H5)
[M-2H]2-
881.8500
100
80
60
40
20
0
強度[%]
1000
1500
2000
2500
質量[m/z]

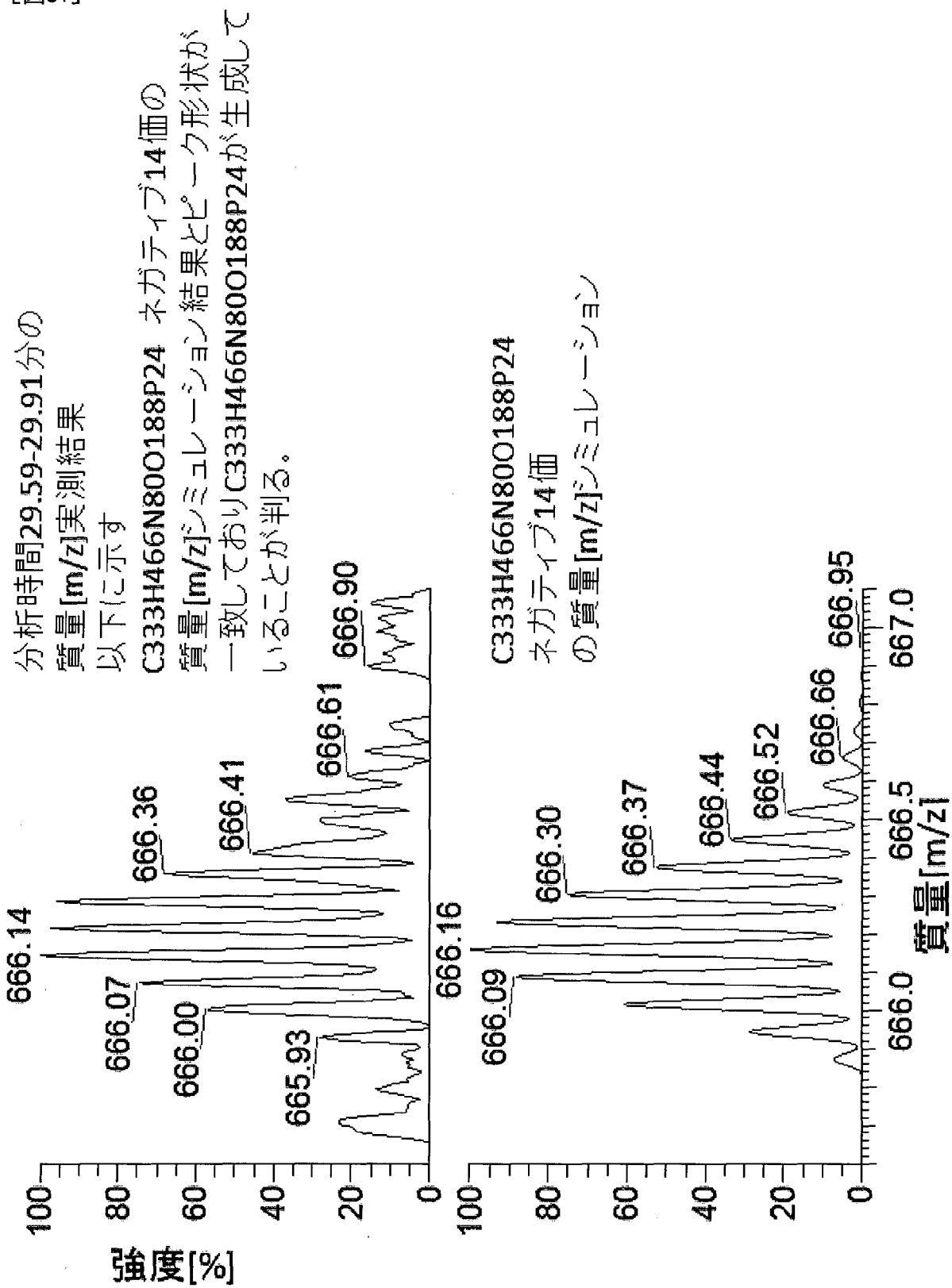
[図80]

反応条件 A B C D E

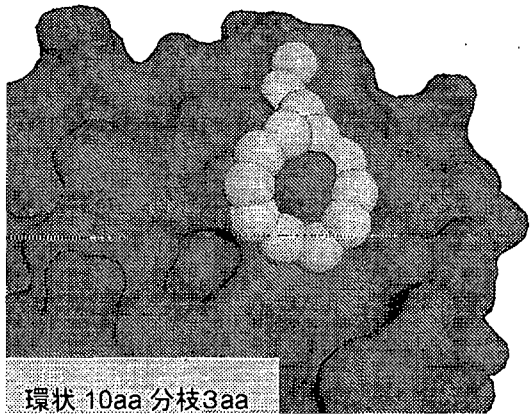


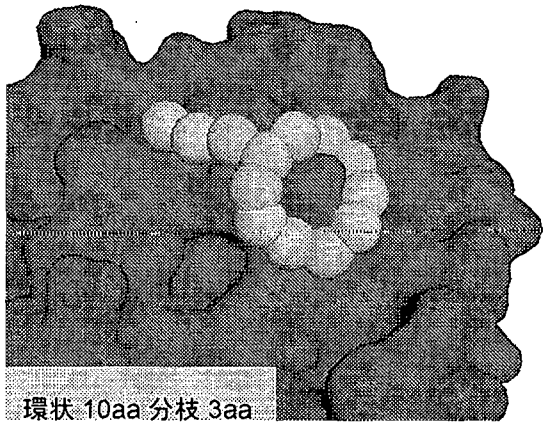
レーン 1 2 3 4 5

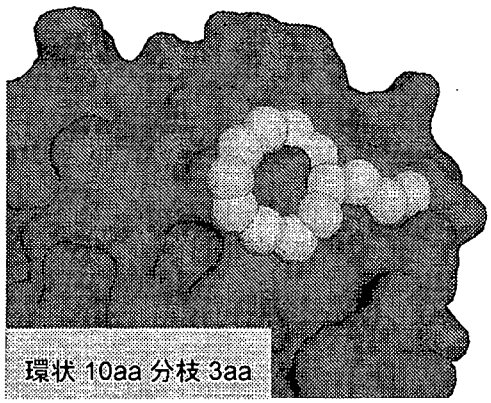
[図81]

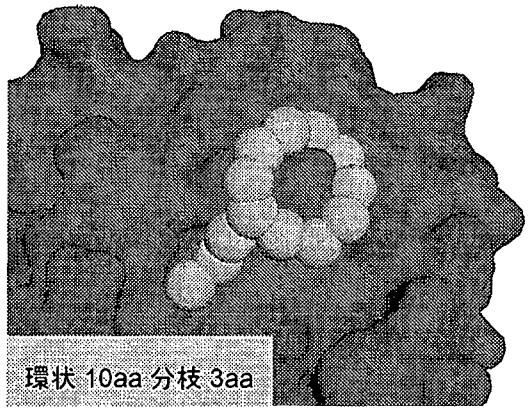

分析時間29.59-29.91分の
質量[m/z]実測結果
以下に示す
C333H466N80O188P24 ネガティブ14価の
質量[m/z]シミュレーション結果とピーク形状が
一致しておりC333H466N80O188P24が生成して
いることが判る。
666.14
666.07
666.00
665.93
666.36
666.41
666.16
666.61
666.90
強度[%]
100
80
60
40
20
0
C333H466N80O188P24
ネガティブ14価
の質量[m/z]シミュレーション
666.09
666.30
666.37
666.44
666.52
666.66
666.95
666.0
666.5
667.0
質量[m/z]

[図82-1]

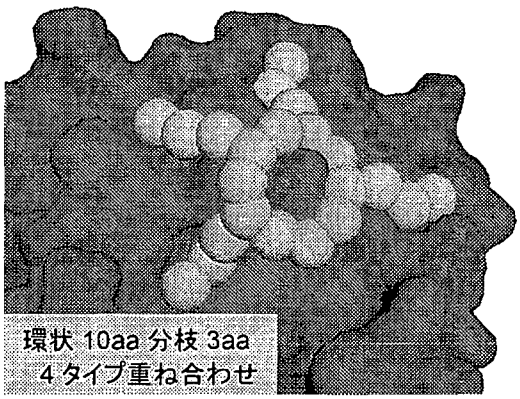

環状 10aa 分枝3aa

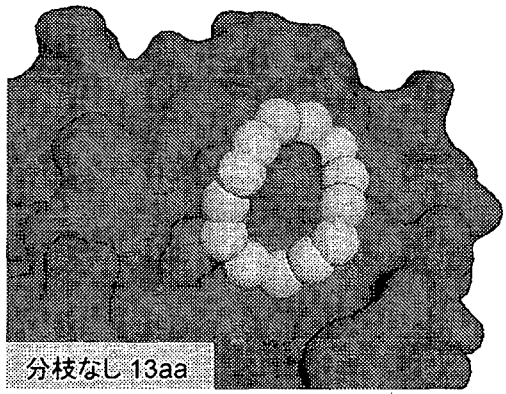

環状 10aa 分枝 3aa

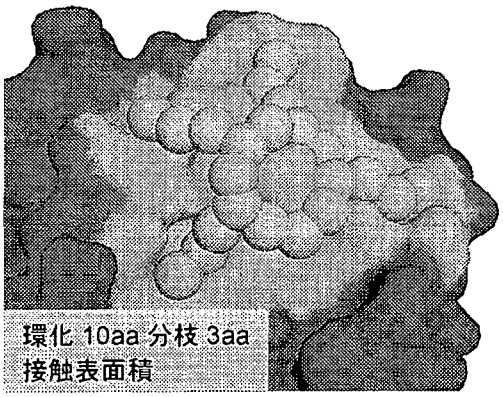

環状 10aa 分枝 3aa

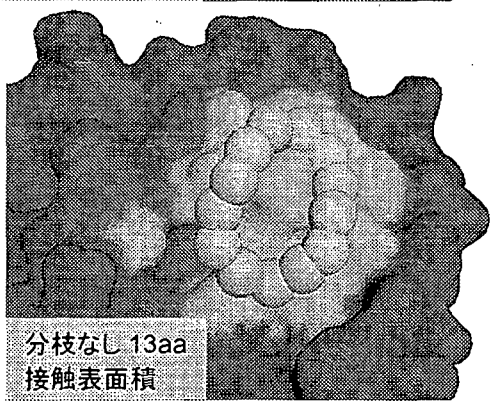

環状 10aa 分枝 3aa

[図82-2]

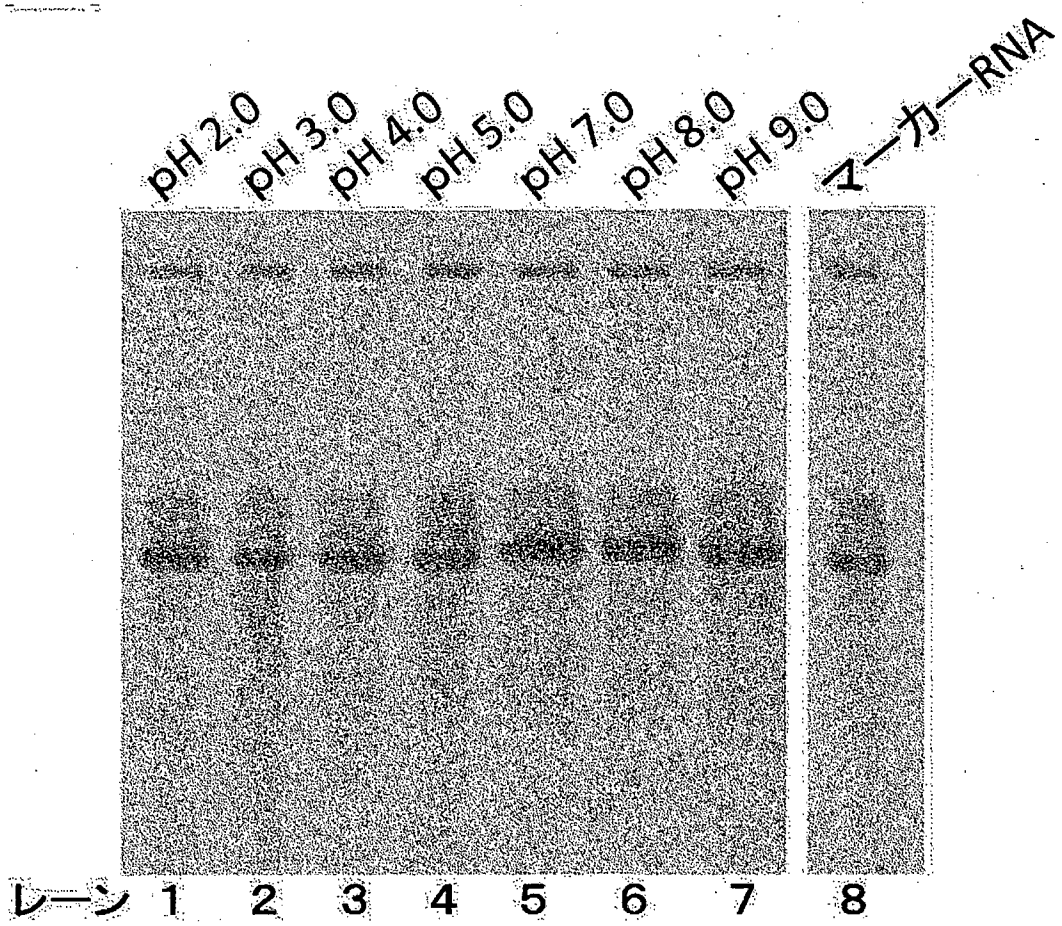

環状 10aa 分枝 3aa
4 タイプ重ね合わせ


分枝なし 13aa


環化 10aa 分枝 3aa
接触表面積


分枝なし 13aa
接触表面積

[図83]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 012 / 084103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K1 / 113 (2006.01)i, CO7K1/05 (2006.01)i, C12P21 /02 (2006.01)i, C40B4 0/1 0 (2006.01)i, C12N1 5/09 (2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K1/ 113, C07K1 / 08, C12P21/ 02, C40B4 0/ 10, C12N1 5/ 09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1 996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/ BI○SIS/MEDLINE /WPI DS (STN), JST Plus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreaml ll), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KATOH T, et al., 'Ribo somal synthe sis of backbone macrocycl ic pepti des', Chem Commun, 2011.07.15, Vol .47, p.9946-9958	1-4, 8, 10, 13, 17, 20, 37, 39-43 1-54
X Y	KAWAKAMI T, et al., 'Diver se backbone- cycl ized pepti des via codon reprogrammi ng', Nat Chem Bio l, 2009, Vol .5, No.12, p.888-890	1-4, 8, 10, 13, 17, 20, 37, 39-43 1-54
X Y	Go suke HAYASH l et al., "Ribo somal synthe sis of non standard cycl ic pept ide s and its appl icat ion to drug dis cove ry", Journal of Japane se Bio chemi cal Society, 25 June 2010 (25.06.2010), vol .82, no.6, page s 505 to 514	1-4, 8, 10, 13, 17, 20, 37-46, 52, 53 1-54

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 Apri l, 2013 (02.04.13)	16 Apri l, 2013 (16.04.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japane se Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/084103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Naohiro TERASAKA et al., "Taisha o Tsukuru 4. Idenshi Ango no Reprogramming ni yoru Tokushu Peptide Library no Kochiku to Seiri Kassei Peptide Tansaku", Experimental Medicine, 01 May 2011 (01.05.2011), vol.29, no.7, pages 1063 to 1070	1-4,8,10,13, 17,20,37-46, 52,53 1-54
X Y	Takeshi HIGUCHI et al., "Programmed Synthesis of Natural Product-like Non-standard Peptides Using the Translation System and Its Application", Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 01 March 2010 (01.03.2010), vol.68, no.3, 217-227	1-4,8,10,13, 17,20,37-46, 52,53 1-54
X	CHATTERJEE J, et al., 'N-methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry', Acc Chem Res, 2008, Vol.41, No.10, p.1331-1342	37,39-43
Y	REDDY P R, et al., 'Synthesis of small cyclic peptides via intramolecular Heck reactions', Tetrahedron Lett, 2003, Vol.44, p.353-356	1-54
Y	KAWAKAMI T, et al., 'Sequential peptide ligation by using a controlled cysteinyl prolyl ester (CPE) auto activating unit', Tetrahedron Lett, 2007, Vol.48, p.1903-1905	1-54
Y	DAWSON P E, et al., 'Synthesis of proteins by native chemical ligation', Science, 1994, Vol.266, p.776-779	1-54
Y	LI X, et al., 'Salicyl aldehyde ester-induced chemoselective peptide ligations: enabling generation of natural peptidic linkages at the serine/threonine sites', Org Lett, 2010, Vol.12, No.8, p.1724-1727	1-54
Y	KLEINEWEISCHEDE R, et al., 'Chemoselective peptide cyclization by traceless Staudinger ligation', Angew Chem Int Ed, 2008, Vol.47, p.5984-5988	1-54
A	Yuki GOTO et al., "Ribosomal synthesis of combinatorial polypeptides containing unusual amino acid blocks", Kagaku Koqyo, 2007, vol.58, no.4, pages 255 to 262	1-54
A	WO 2008/117833 A1 (The University of Tokyo), 02 October 2008 (02.10.2008) & US 2010/0168380 A1 & EP 2141175 A1	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 012 / 084103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOTO Y, et al-, 'Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides', J Am Chem Soc, 2009, Vol.131, p.5040-5041	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 012 / 084103

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

C t1 t1 t1 t1 r1r t(2)

h p α peptıde h t ,
g peptıde p
t ti th ɔ t' poi t t
t
g t h 'ɪ th t h b
p b b, th k' th t ,
th t b b
th ht th t h t ,
t h p h
t t p p
ı t ɔ
t th t
3 4, th t' g t ɪ g ɪ ,
th t , 4, , 23
27.
t th t
3 4, th t' g t ɪ g
ɪ , th t 2 &

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/084103

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/1 13 (2006. 01) i, C07K1/08 (2006. 01) i, C12P21/02 (2006. 01) i, C棚 40/10 (2006. 01) i, C12N15/09 (2006. 01) n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/1 13, C07K1/08, C12P21/02, C40B40/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922—	年
日本国公開実用新案公報	1971—2	年
日本国実用新案登録公報	1996—	年
日本国登録実用新案公報	1994—2	年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	KATOH T, et al., 'Ribosomal synthesis of backbone macrocyclic peptides', Chera Coraraun, 2011. 07. 15, Vol. 47, p. 9946—9958	1-4, 8, 10, 13, 17, 20, 37, 39-43 1-54
X Y	KAWAKAMI T, et al., 'Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprograraraing', Nat Chera Biol, 2009, Vol. 5, No. 12, p. 888-890	1-4, 8, 10, 13, 17, 20, 37, 39-43 1—54

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02. 04. 2013	16. 04. 2013

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100—8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 3644
伊藤 良子
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

c（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー水	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	林剛介他，特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索八の展開，生化学，2010. 06. 25，Vol. 82，No. 6，p. 505-514	1-4，8，10，13，17，20，37-46，52，53 1-54
X Y	寺坂尚紘他，代謝を創る　4．遺伝暗号のリプログラミングによる特殊ペプチドライブラリーの構築と生理活性ペプチド探索，実験医学，2011. 05. 01，Vol. 29，No. 7，ρ· 1063—1070	1-4，8，10，13，17，20，37-46，52，53 1-54
X Y	樋口岳他，擬天然物特殊ペプチドのプログラム翻訳合成と応用，有機合成化学協会誌，2010. 03. 01，Vol. 68，No. 3，217-227	1-4，8，10，13，17，20，37-46，52，53 1-54
X	CHATTERJEE J，et al.，'N-raethylation of peptides : a new perspective in medicinal chemistry'，Acc Chem Res，2008，Vol. 41，No. 10，p. 1331-1342	37，39-43
Y	REDDY P R，et al.，'Synthesis of small cyclic peptides via intramolecular Heck reactions'，Tetrahedron Lett，2003，Vol. 44，p. 353-356	1-54
Y	KAWAKAMI T，et al.，'Sequential peptide ligation by using a controlled cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit'，Tetrahedron Lett，2007，Vol. 48，p. 1903 - 1905	1-54
Y	DAWSON P E，et al.，'Synthesis of proteins by native chemical ligation'，Science，1994，Vol. 266，p. 776—779	1-54
Y	LI X，et al.，'Salicylaldehyde ester-induced chemoselective peptide ligations : enabling generation of natural peptidic linkages at the serine/ threonine sites'，Org Lett，2010，Vol. 12，No. 8，p. 1724-1727	1-54
Y	KLEINEWEISCHEDE R，et al.，'Chemoselective peptide cyclization by traceless Staudinger ligation'，Angew Chem Int Ed，2008，Vol. 47，p. 5984-5988	1-54
A	後藤佑樹他，特殊ペプチドのコンビナトリアル翻訳合成，化学工業，2007，Vol. 58，No. 4，p. 255—262	1-54

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2008/117833 A1 (国立大学法人 東京大学) 2008. 10. 02, & US 2010/0168380 A1 & EP 2141175 A1	1—54
A	GOTO Y, et al. , 'Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides' , J Am Chera Soc, 2009, Vol. 131:, p. 5040-5041	1—54

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/084103

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

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

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

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(別紙参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

□ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III　欄の別紙)

非環状のペプチド化合物を、核酸から翻訳して合成し、C末端側及びN末端側に有するアミノ酸残基、アミノ酸類縁体残基における反応点を結合させ、環状部を有するペプチド化合物を製造する方法は、当業者に公知の技術である (例えば、文献1－5)。したがって、請求項1に係る発明は、文献1－5に記載された発明に対して新規性が認められず、特別な技術的特徴を有しない。

よって、請求の範囲には、以下の特別な技術的特徴を有する2の発明 (群)が含まれる。

(発明1) 請求項1、8、9、15、21、22、31―54に係る発明のうち、アミド結合を形成させる工程を含む発明及び請求項2―7、10―14、16、17―20、23―27からなる発明。

(発明2) 請求項1、8、9、15、21、22、31―54に係る発明のうち、炭素－炭素結合を形成させる工程を含む発明及び請求項28-30からなる発明。