(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
2018年12月13日(13.12.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/225851 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 1/06 (2006.01) *A61K 38/12* (2006.01)
C07K 11/02 (2006.01) *C40B 50/14* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/021998

(22) 国際出願日： 2018年6月8日(08.06.2018)

(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 2017-114073 2017年6月9日(09.06.2017) JP

(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: 野 村 研 一 (**NOMURA, Kenichi**); 〒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). 村岡 照茂(**MURAOKA, Terushige**); 〒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 幹將(**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). 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).

(74) 代理人: 春名 雅夫, 外(**HARUNA, Masao** et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町１－１－１ 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** METHOD FOR SYNTHESIZING PEPTIDE CONTAINING N-SUBSTITUTED AMINO ACID

(54) 発明の名称： Ｎ－置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法

(57) **Abstract:** A method for producing a peptide containing an N-substituted amino acid or an N-substituted amino acid analogue according to the present invention includes the steps of: preparing an Fmoc-protected amino acid, an Fmoc-protected amino acid analogue or an Fmoc-protected peptide; deprotecting a protecting group having an Fmoc structure in each of the Fmoc-protected amino acid and others with a base; and adding a fresh Fmoc-protected amino acid or the like to form an amide bond. The method is characterized in that, when the production of the peptide is carried out by a solid phase method, the produced peptide is cleaved out from the solid phase under such a condition that the peptide can become weakly acidic compared with TFA. The method is also characterized in that at least one side chain in the produced peptide has a protecting group that cannot be deprotected under a basic condition and can be deprotected under a condition that is weakly acidic compared with TFA.

(57) 要約：本発明に係るN-置換アミノ酸又はN-置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法は、Fmoc保護アミノ酸、Fmoc保護アミノ酸類縁体、またはFmoc保護ペプチドを準備する工程、Fmoc保護アミノ酸等のFmoc骨格を有する保護基を塩基で脱保護する工程、および 新たなFmoc保護アミノ酸等を添加して、アミド結合を形成する工程を含み、 ペプチドの製造が固相法によって行われる場合には、得られたペプチドを、TFAよりも弱酸となる条件下で固相から切り出すことを特徴とする。また、得られたペプチドの少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されずTFAよりも弱酸となる条件下で脱保護される保護基を有することを特徴とする。

WO 2018/225851 A1

［続葉有］

規則4.17に規定する申立て：

一　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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： Ｎ－置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法

技術分野

[0001] 本発明は、Ｎ－置換アミノ酸を含むペプチドの合成において、高純度かつ高い合成効率にて合成することが可能なペプチドの新規な合成方法に関する。

背景技術

[0002] ペプチドは医薬品としてこれまでに４０種以上が上市されている価値の高い化学種である（非特許文献１）。中でも、環状ペプチドやＮ－メチル化（もしくはＮ－アルキル化）された非天然型ペプチドは、脂溶性の向上による膜透過性の向上や、加水分解酵素への耐性獲得による代謝安定性の向上が見込まれている（非特許文献２）。最近、細胞内へ移行させたり、経口剤としたりするための鍵となるドラッグライク（薬らしさ：好ましくは、膜透過性と代謝安定性の両立を示す。）な環状ペプチドについての考察が進行している（非特許文献３、４）。また、ドラッグライクな環状ペプチドに必要とされる条件を明らかにした特許文献が公開され（特許文献１）、創薬におけるその重要性とその認知度が高まってきている。

[0003] 一方で、Ｎ－アルキルアミノ酸などに代表される非天然型アミノ酸を数多く含むペプチド合成法の開発の進捗は比較すると限定的である。多くが天然型ペプチドで確立された手法をそのまま非天然型ペプチドに適用している。

[0004] ペプチドの合成法として、Ｆｍｏｃ法とＢｏｃ法が広く知られており、これらの多くの知見は、天然型ペプチドの合成法の開発から得られた。Ｆｍｏｃ基は酸に対して安定であるため、Ｎ末端のアミノ基をＦｍｏｃ基で保護した場合、その脱保護反応はＤＢＵやピペリジンといった塩基によって行う。そのため、ペプチド側鎖官能基の保護基として、例えば酸にて脱保護可能なものを利用し、Ｎ末端のアミノ基の選択的な脱保護を行ってペプチド鎖の伸長を行う。良く利用される保護基として、Ｆｍｏｃ法ではアミノ酸側鎖の保

護基にはｔ－ブチル（ｔＢｕ）基やトリチル（Ｔｒｔ）基など、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）程度の酸での脱保護が可能なものを採用でき、Ｂｏｃ法に比べて温和な条件にて、樹脂からのペプチドの切り出し工程や側鎖官能基の保護基の脱保護をおこなうことができる。

[0005] しかしながら、比較的温和な条件での樹脂からの切り出し工程や側鎖官能基の保護基の脱保護を行えるＦｍｏｃ法による固相合成法においても、ＴＦＡを用いた樹脂からの切り出し工程もしくは側鎖官能基に有する保護基の脱保護工程において、Ｎ－アルキル化されたペプチド合成には以下のような問題点があることが明らかになってきた。

[0006] 通常、Ｆｍｏｃ法にてペプチド合成を行った場合、樹脂からの切り出し工程や側鎖官能基の保護基の脱保護は、ＴＦＡを用いることが一般的である。多くの場合、樹脂からの切り出し反応と側鎖官能基の脱保護反応を、９０％ＴＦＡ水溶液を用いて、同時に行う。しかしながら、Ｎ－メチル化されたペプチド、特にＮ－メチルアミノ酸が連続している配列の場合には、オキサゾロニウム経由での酸加水分解が進行し、ペプチド鎖が切断されてしまう副反応が知られている（非特許文献５、６）。また、セリンやスレオニンといったβ－ヒドロキシ基を有するアミノ酸が配列中に含まれているペプチドの場合には、ＴＦＡを用いたこれらの工程において、酸加水分解だけでなく、Ｎ→Ｏアシルシフト反応も副反応として進行し、デプシペプチド化してしまう可能性があることが知られている（非特許文献７、８）。

[0007] この酸を用いた切り出し工程および脱保護工程における加水分解の問題に対しては、低濃度のＴＦＡ溶液を用いて、反応時間を短く制御することで回避しようとする試みが行われている。例えばAlbericioらの報告によると、NMe-IB-01212と命名されたペプチドの固相合成の際、Ｎ－メチル化された環状ヘキサペプチドに含まれるアミノ基上のＢｏｃ基の脱保護をＴＦＡ－ＤＣＭ（１：１）の溶液で行った場合、Ｎ－Ｍｅ部位でのペプチドの分解が認められた。分解を避けるべく、より低濃度のＴＦＡを用いたり、反応時間を最小限にしたりすることで改善を試みているものの、充分な改善には至っていな

い（非特許文献９）。そもそも、これまでのペプチド合成に汎用される保護基では、低濃度のＴＦＡ溶液での脱保護工程では、樹脂からの切り出し反応は満足できる速度にて進行する一方、側鎖の脱保護反応が進行しないか、進行が極端に遅い場合がある。

[0008] また、高度にＮ－メチル化されたペプチドの加水分解と同じ反応機構で進行するＮ末端のＡｃ－ＭｅＰｈｅの切断を防ぐために、FangらはＴＦＡを用い、反応温度を４℃まで低下させてＡｒｇ側鎖の保護基であるＰｂｆ基の脱保護を行っている（非特許文献１０）。しかし温度を下げるこの方法においても、Ａｃ－ＭｅＰｈｅの切断を完全に防ぎきることは難しく、目的物が極大となる時間で反応を停止させるに留まっている。

[0009] さらに、脱保護時の問題点に加えて、伸長工程における低反応性の問題も知られている。新たに形成させるアミド結合のＮ末端がＮ－メチルアミノ酸である場合、その２級アミンの嵩高さによって、続くアミノ酸とのアミド形成反応（伸長反応）が十分に進行しない場合がある（非特許文献２、５）。

[0010] この伸長工程での問題点に対しては、全く同じ反応条件を２度かそれ以上繰り返すことによって、未反応点を減らすという工夫がなされてきた（２度繰り返す方法はダブルカップリングと呼ばれている）。また、縮合するアミノ酸の活性化について、例えばより高活性な酸ハライドに替えることによって、縮合効率を改善しようと取り組まれてきた（非特許文献１１）。しかしながら、ダブルカップリングのように同じ反応条件を繰り返し行う場合には、時間と試薬コストが２倍かそれ以上かかってしまうし、酸ハライドでの縮合を行う場合には、要事調製が必要であり、なおかつ生成した酸ハライドがペプチド合成の工程の間に安定に存在し得るかの点にも懸念が残る。また、反応によってＨＣｌやＨＦが発生してしまうため、脱保護反応が進行してしまう懸念があるという点も問題となりうる。

[0011] その他の伸長工程での低反応性の改善策としては、樹脂のローディング量を下げることにより、固相上でのペプチド鎖どうしの密度を低減して縮合効率を上げたり、反応溶液を高濃度化する工夫が試されたりしてきた（非特許

文献９）。また最近では、マイクロウェーブを照射することによって反応温度を上昇させて、縮合効率を改善しようとする取り組みもなされている（非特許文献１２、１３）。

[0012] しかしながら、Ｎ－メチル化されたペプチド合成において、合成するペプチドの純度低下や収量低下、場合によっては目的物が全く得られなくなる懸念に対して、抜本的な解決策は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開番号 WO 2013/100132 A1

非特許文献

[0014] 非特許文献1：S. R. Gracia, et al. 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2：J. Chatterjee, et al. N-Methylation of peptides: A new perspective in medicinal chemistry. Acc. Chem. Res., 2008, 41, 1331.

非特許文献3：J. E. Bock, et al. Getting in Shape: Controlling Peptide Bioactivity and Bioavailability Using Conformational Constraints. ACS Chem. Biol., 2013, 8, 488.

非特許文献4：K. Jpsephson, et al. mRNA display: from basic principles to macrocycle drug discovery. Drug Discovery Today, DOI:10.1016/j.drudis.2013.10.011

非特許文献5：M. Teixido, et al. Solid-phase synthesis and characterization of N-methyl-rich peptides. J. Peptide Res., 2005, 65, 153.

非特許文献6：J. Urban, et al. Lability of N-alkylated peptides towards TFA cleavage. Int. J. Pept. Prot. Res., 1996, 47, 182.

非特許文献7：L. A. Carpino, et al. Dramatically enhanced N→O acyl migration during the trifluoroacetic acid-based deprotection step in solid phase peptide synthesis. Tetrahedron Lett., 2005, 46, 1361.

非特許文献8：H. Eberhard, et al. N→O-Acyl shift in Fmoc-based synthesis of phosphopeptides. Org. Biomol. Chem., 2008, 6, 1349.

非特許文献9：E. Marcucci, et al. Solid-Phase Synthesis of NMe-IB-01212, a Highly N-Methylated Cyclic Peptide. Org. Lett., 2012, 14, 612.

非特許文献10：W.-J. Fang, et al. Deletion of Ac-NMePhe1 From [NMePhe1]arodyn Under Acidic Conditions, Part 1: Effects of Cleavage Conditions and N-Terminal Functionality. Peptide Science Vol. 96, 97

非特許文献11：L. A. Carpino, et al. Stepwise Automated Solid Phase Synthesis of Naturally Occurring Peptaibols Using FMOC Amino Acid Fluorides. J. Org. Chem., 1995, 60, 405.

非特許文献12：H. Rodriguez, et al. A convenient microwave-enhanced solid-phase synthesis of short chain N-methyl-rich peptides. J. Pept. Sci., 2010, 16, 136.

非特許文献13：R. Roodbeen, et al. Microwave Heating in the Solid-Phase Synthesis of N-Methylated Peptides: When Is Room Temperature Better? Eur. J. Org. Chem., 2012, 7106.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明者らは、ドラッグライクなペプチドとなり得るＮ－アルキル化されたアミノ酸を含む環状ペプチドに注目し、このような特徴を有するペプチド化合物をパラレル合成する方法を検討した。その結果、ドラッグライクなペプチドとなり得るＮ－アルキル化されたアミノ酸を含む環状ペプチドにおいては、これまでのＴＦＡによる合成方法では、上記の既知文献に記載の化合物において見出されていた課題が顕著となり、当該環状ペプチドが単離できない原因となることを見出した。具体的には、Ｎ－アルキル化されたアミノ酸を含むペプチドの場合には、ＴＦＡを用いた酸性条件での反応（固相からの切り出し工程もしくは側鎖官能基の保護基の脱保護）において、ペプチド鎖が切断されてしまう副反応が主反応となり、目的とするペプチドを得るこ

とが困難となることを見出した。また、β－ヒドロキシ基を有するアミノ酸がペプチド中に含まれる場合には、同じくＴＦＡを用いた酸性条件での反応において、Ｎ→Ｏアシルシフト反応が進行し、目的とするペプチドを得ることが困難となることを見出した。これらの問題点は、上記の既知文献の化合物において見出された課題であったが、本発明者は、さらに、他の多くのペプチドにおいても同様に観察される問題であることを見出した。これらの問題点に加え、さらに、β位に限らずヒドロキシ基を骨格内に有するアミノ酸を含むペプチドを、ＴＦＡを用いた酸性条件で反応を行った場合、そのヒドロキシ基がＴＦＡエステル化してしまうという問題点も見出した。

[0016] また、本発明者らは、ドラッグライクなペプチドとなり得るＮ－アルキル化されたアミノ酸を含むペプチド合成の工業化を考慮した場合、脱保護反応や伸長反応そのものだけでなく、その後処理工程および大量合成の点からも、これまでのＴＦＡを用いる脱保護法では工業化の実現が著しく困難であることを見出した。例えばＴＦＡ／ＤＣＭ溶液を濃縮によって溶媒留去する場合には、濃縮が進むにつれてＴＦＡ濃度が上昇してしまい、濃縮と同時に加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトなどの問題が起こり、結果的に目的化合物が得られない、もしくは著しい収率の低下の原因となる。また濃縮工程を低温下で行う必要性もでてくる。たとえＴＦＡが低濃度であっても、目的物に対してＴＦＡは大過剰に含まれているため、これらを中和して反応停止をしようとすると、加える塩基の量も大過剰となってしまい、大過剰の塩が目的のペプチドとともに残留することとなり、精製工程に煩雑さが加わる。さらに、ＴＦＡそのものはペプチドを効果的に溶解させる溶媒であるものの、ＴＦＡ溶液を低濃度化してしまうと、ペプチドの溶解性の低下につながる。溶解性については工業化を考慮した場合のみならず、多くの異なるペプチド化合物を一挙に扱うパラレル合成では、一群のペプチドに対して高い溶解度を有する溶媒を選択する必要性がある。

[0017] 加えて、本発明者らは、これまで積極的な取り組みが行われていなかった、側鎖に保護基がついた官能基を有するＦｍｏｃ－アミノ酸の保護基の立体

的な大きさを低減することによる、反応性の向上にも着目した。例えばスレオニン（Ｔｈｒ）はヒドロキシル基を有するため、続くアシル化の際にアミノ基で選択的に反応を進行させるにはヒドロキシル基に対する保護基が必要となる。しかしながらβ－位に枝分かれした２級アルコールを側鎖官能基として有するため、その嵩高さからＴｈｒの保護体は縮合効率が比較的低い。Ｔｈｒの保護基としてペプチド合成で一般的に用いられているのは、アセチル（Ａｃ）基、ｔＢｕ基、Ｔｒｔ基、ベンジル（Ｂｎ）基、ｔ－ブチルジメチルシリル（ＴＢＳ）基などであるが（Albert Isidro-Llobet, et al. Amino Acid-Protecting Groups. Chem. Rev., 2009, 109, 2455., 渡辺化学試薬カタログ Amino acids & chiral building blocks to new medicine 2012-14）、Ｔｒｔ基やＴＢＳ基に関してはその嵩高さのために、縮合効率が低下してしまう。また、酸での脱保護が可能なｔＢｕ基でも、脱保護には高濃度のＴＦＡ条件が必要となるため、既に述べた脱保護の際の問題点が顕在化する。その他の保護基については酸を用いて容易に外すことのできる保護基とはいえない。つまり、縮合効率を低減しない立体的に小さい保護基であり、なおかつ上記の酸加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトの問題を回避できる程度の酸によって容易に脱保護が可能な保護基を見出す必要がある。これと同じことは、β－位には枝分かれ部位を持たないものの、Ｎ－置換によって嵩高くなったＮ－メチルセリン（ＭｅＳｅｒ）や、その他ヒドロキシ基を官能基として有するアミノ酸の場合に広く該当する。

[0018] すなわち、本発明は、Ｎ－置換されたアミノ酸を含むペプチドをパラレル合成していく中で顕著化することが見出された、ＴＦＡを用いた脱保護工程でのペプチドの酸加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフト、ヒドロキシ基のＴＦＡエステル化などの副反応の問題を軽減でき、かつペプチドの溶解性を担保した新規反応工程を見いだすことを課題とする。また、側鎖官能基に適切な保護基（伸長時の低反応性を改善する目的で保護基の嵩高さを低減するという観点と、本発明による脱保護条件にて脱保護可能であるという観点において適切な保護基）を用いることによって、Ｎ－置換されたアミノ酸を含むペプ

チドを高純度かつ高い合成効率にて得る方法を提供することを課題とする。

[0019] つまり、様々な配列を持つＮ－置換されたアミノ酸を含むペプチド化合物をパラレル合成するにあたり、

（１）酸添加時（固相からの切り離し反応時および側鎖脱保護反応時）の加水分解、特にＮ－置換されたアミノ基に由来する加水分解を抑制するために必要な反応条件を見出すこと、

（２）酸添加時の実用的な後処理が可能となる反応条件を見出すこと、

（３）非天然型ペプチド化合物の特異な溶解性を考慮した溶媒を含む反応条件を見出すこと、

（４）非天然型ペプチド化合物が、ヒドロキシル基などの官能基を含む場合に、脱保護後の副反応（Ｎ→Ｏアシルシフトやヒドロキシル基と反応試薬との副反応（例えばＴＦＡを試薬とした場合のＴＦＡアシル化反応）を抑制すること、

を課題とする。

加えて、アミノ酸側鎖の各官能基に対して、上記４つの条件を満足する保護基を見出すことを課題とする。

さらに、Ｎ－置換されたアミノ酸を含むペプチド化合物の工業的な生産をも考慮し、特定の配列に対する最適化にも適用可能な製造方法を見出すことも課題とする。

課題を解決するための手段

[0020] 本発明者らは、Ｎ－置換されたアミノ酸を含む環状ペプチドの効率的な合成を実現させるために、既知文献に記載の化合物の合成に、ＴＦＡを用いた従来のペプチド合成法を用いた場合に見られた課題に加えて、一般的に実施される改良方法、例えば、ＴＦＡの濃度を低下させる方法、或いは、反応温度を低下させる方法では十分に解決することができなかった、加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトの進行の抑制、実用的な後処理法の確立、ヒドロキシル基がある場合のＴＦＡエステル形成の抑制、ペプチドの溶解性を担保できる溶媒の選択といった数多くの課題を解決することができる新規な方法を見出

した。当該新規な方法では、従来のペプチド合成で使用されていたＴＦＡは全く使用されず、目的物を高い選択性で得ることに成功した。

[0021] 本発明の一つの態様では、固相からの切り出し工程にはＴＦＡを使用せず、より弱い酸、例えば２，２，２－トリフルオロエタノール（ＴＦＥ）やヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）といった酸を用いる。加えて、本発明の別の態様では、切り出し工程では脱保護されない側鎖官能基の保護基を用いる。ＴＦＥやＨＦＩＰなどのＴＦＡより弱い酸を使用した切り出し工程では、ＴＦＡを用いる場合とは異なり、反応後の濃縮によってもアミド結合の加水分解などの副反応の速度は十分小さい。とりわけ、ＴＦＥやＨＦＩＰなどのＴＦＡより弱い酸を使用した場合には、高度にＮ－置換されたアミノ酸を含むペプチドや、より副反応の生じやすい環化ペプチドでも副反応速度は小さい。このため、目的化合物を主生成物として得ることができる。本発明の別の態様では、切り出し工程では、（１）ペプチドの副反応（加水分解など）を抑制する一方で、固相からの切り出し反応が円滑に進行する、（２）濃縮などの後処理を行っても副反応の速度は十分に遅い、（３）脂溶性の高い非天然ペプチドに対しても高い溶解性を示す、（４）側鎖官能基の保護基を保持したまま切り出しが可能となる、という条件を満たす試薬を用いる。このような条件を満たす試薬を用いることで、Ｎ－置換アミノ酸を数多く含むペプチドの合成、特にＮ－アルキル基を数多く含むドラックライクなペプチドの合成が可能となる。このような条件を満たす試薬は、パラレル合成時のみならず、特定のペプチドを工業的に合成する場合にも利用することができる。

[0022] 本発明の一つの態様において、加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトを抑制し、目的の主反応である脱保護反応を促進できるように側鎖の保護基を脱保護できる、ペプチドの合成方法を提供する。加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトの進行には、酸の強度（プロトン濃度）のみが重要となる可能性がある。そこで、ＴＦＡなどの強酸の替わりに、酸性度を弱くした弱酸を用いることで、加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトの進行を抑制することができることを見

出した。また、目的の脱保護が進行するには、酸の強度（プロトン濃度）に加え、保護されている官能基から、保護基がカチオン種（カルボカチオンやオキソニウムカチオン）として脱離する段階も重要となる場合がある。そこで、保護基がカチオン種として脱離する工程を促進する溶媒として、イオン化能を有する溶媒を使用することで、上記弱酸での脱保護が促進されることを見出した。

[0023] 加えて、特許文献１に記載のドラッグライクなペプチドの効率の高い合成法を確立するため、中性条件下でイオン化程度が小さい側鎖を有するアミノ酸の側鎖官能基、例えば、ＳｅｒやＴｈｒのようなアミノ酸の側鎖官能基であるヒドロキシル基、その他ヒドロキシ基を側鎖内に有するアルキルアルコール基、Ｔｙｒのようなアミノ酸の側鎖官能基であるフェノール基、Ｈｉｓのようなアミノ酸の側鎖官能基であるイミダゾール基、ＡｓｐやＧｌｕのようなアミノ酸の側鎖官能基である側鎖カルボン酸、及び、ペプチド又はアミノ酸の主鎖のカルボン酸、の保護基として、樹脂から切り出す際の弱酸条件下では脱保護されず、上記の弱酸条件下では脱保護できる保護基を見出した。

[0024] 更に加えて、伸長反応の際に低反応性が懸念されるβ－ヒドロキシ－α－アミノ酸（例えばＴｈｒ、Ｓｅｒ、及び、それらの誘導体）などのアミノ酸が保護基を有する場合に、上記の弱酸条件での脱保護が可能であり、かつ、伸長反応時の低い反応性を改善できる保護基を見出した。

[0025] すなわち、本発明は次の通りである。

〔１〕 以下の工程：

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている

主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）工程１）で準備されたＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを固相に担持する工程、

３）固相に担持されたＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

４）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程、及び、

５）工程４）で得られたペプチドを、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で固相から切り出す工程、

を含む、少なくとも１つのＮ－置換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法。

〔２〕　前記工程４）で得られたペプチドを構成するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されず、かつ第１の酸で脱保護される保護基で保護されており、前記工程５）の前又は後で、該第１の酸にて該保護基を脱保護する工程をさらに含み、かつ

前記工程５）において、第２の酸を用いてペプチドを切り出す、〔１〕に記載の製造方法であって、

第１の酸および第２の酸がいずれもＴＦＡよりも弱酸であり、かつ第１の酸の酸度が第２の酸の酸度よりも高い、製造方法。

〔３〕　以下の工程：

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている

主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

３）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程であって、この工程で得られるペプチドを構成するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されずＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護される保護基を有する工程、及び、

４）前記側鎖の保護基を、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護する工程、

を含む、少なくとも１つのＮ－置換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法。

〔４〕　ペプチドの製造が固相法によって行われる、〔３〕に記載の製造方法。

〔５〕　前記工程３）で得られたペプチドを、前記工程４）の前又は後で前記工程４）で用いられる弱酸条件よりも更に弱酸となる条件下で固相から切り出す工程をさらに含む、〔４〕に記載の製造方法。

〔６〕　ペプチドの製造が液相法によって行われる、〔３〕に記載の製造方法。

〔７〕　〔１〕の工程４）又は〔３〕の工程３）が、

新たに添加したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護してアミノ基を露出する工程、および

更に新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程をさらに含み、

これらの工程を１回または複数回繰り返す、〔１〕から〔６〕のいずれか

に記載の製造方法。

〔８〕　製造されたペプチドが、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をＣ末端側に含み、かつもう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カルボン酸類縁体をＮ末端側に含む、〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の製造方法。

〔９〕　前記１つの反応点と前記もう一つの反応点とを結合させ、前記ペプチドを環化させる工程をさらに含む、〔８〕に記載の製造方法。

〔１０〕　前記もう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カルボン酸類縁体がＮ末端にあり、かつ前記結合がアミド結合である、〔９〕に記載の製造方法。

〔１１〕　前記もう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カルボン酸類縁体がＮ末端にあり、かつ前記結合が炭素－炭素結合である、〔９〕に記載の製造方法。

〔１２〕　ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で行われる工程が、水中でのｐＫａの値が０～９である弱酸を、イオン化能Y_{OTs}値が正の値で水中でのｐＫａが５～１４である溶媒に含む、弱酸溶液を用いて行われる、〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１３〕　溶媒がフルオロアルコールである、〔１２〕に記載の製造方法。

〔１４〕　フルオロアルコールがＴＦＥ又はＨＦＩＰである、〔１３〕に記載の製造方法。

〔１５〕　側鎖の保護基が、ｐＨ１からｐＨ７の範囲で脱保護される保護基であるか、又は１０％以下のＴＦＡにおいて脱保護される保護基である、〔２〕から〔１４〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１６〕　側鎖の保護基が以下のａ）～ｄ）から選択される、〔２〕から〔１５〕のいずれかに記載の製造方法：

ａ）側鎖の保護基がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｈｙｐ、及び、それらの誘導体の側鎖のヒドロキシル基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格基、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格及びＢｏｃ骨格から

選ばれるいずれかの保護基；

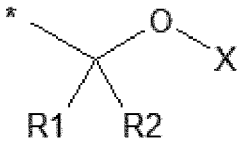
ｂ）側鎖の保護基がＴｙｒ及びその誘導体の側鎖のヒドロキシル基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格、Ｂｏｃ骨格及びｔＢｕ骨格から選ばれるいずれかの保護基；

ｃ）前記側鎖の保護基がＨｉｓ及びその誘導体の側鎖のイミダゾール環の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格及びＴｒｔ骨格から選ばれるいずれかの保護基；

ｄ）前記側鎖の保護基がＡｓｐ、Ｇｌｕ、及び、それらの誘導体の側鎖のカルボン酸基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、ｔＢｕ骨格、フェニル－ＥＤＯＴｎ骨格及び保護をするカルボン酸基の炭素原子を３つのアルコキシ基が置換した骨格に変換したオルトエステル骨格から選ばれるいずれかの保護基；

＜ＭＯＭ骨格を有する保護基＞

[化1]



（式中、

Ｒ１はＨであり、Ｒ２はＨであり、かつＸはメチル、ベンジル、４－メトキシベンジル、２，４－ジメトキシベンジル、３，４－ジメトキシベンジル、または２－トリメチルシリルエチルであるか、

Ｒ１はメチルであり、Ｒ２はＨであり、かつＸはエチルであるか、

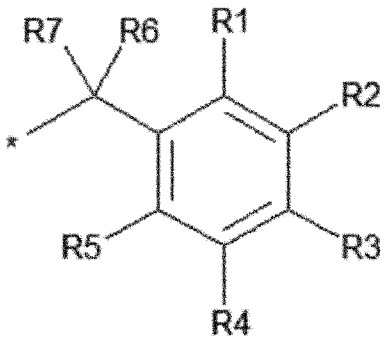
Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３は、いずれもメチルであるか、または

Ｒ１とＸは、一緒になって－CH_2－CH_2－CH_2－または－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－を形成し、かつＲ２はＨであり

ここで、Ｒ１、Ｒ２、およびＸのいずれかがメチルまたはエチルである場合、これらの基はさらにアルキル、ベンジル、またはアリールで置換されていてもよい。）

＜Ｂｎ骨格を有する保護基＞

[化2]



（式中、

Ｒ１～Ｒ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ６およびＲ７はアルキルであるか、

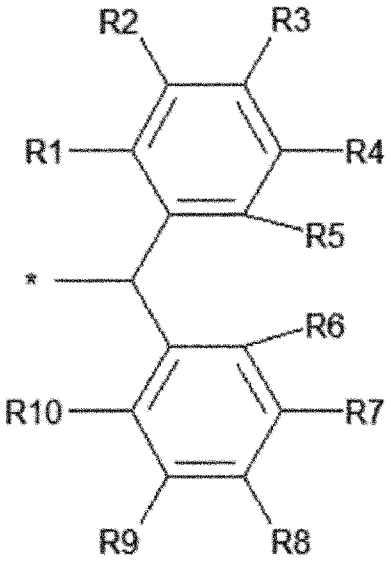
Ｒ１、Ｒ２、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、Ｒ３はメトキシであり、かつＲ６およびＲ７はＨであるか、

Ｒ１およびＲ３がメトキシであり、Ｒ２、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ６およびＲ７はＨであるか、または

Ｒ１、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ２とＲ３は一緒になって－Ｏ－CH_2－Ｏ－を形成する。）

＜Ｄｐｍ骨格を有する保護基＞

[化3]



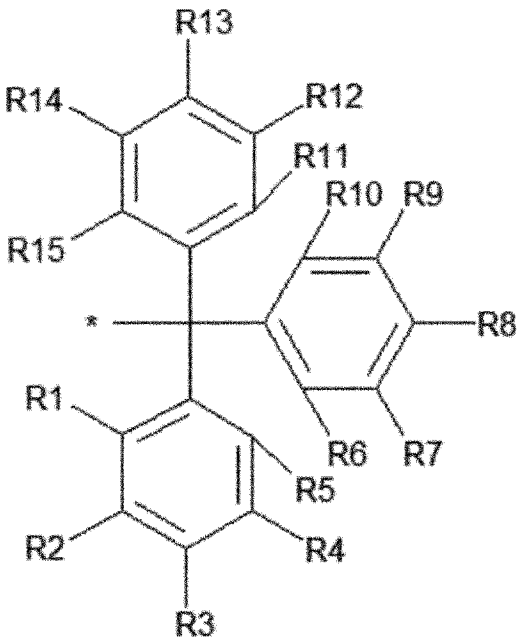
（式中、

Ｒ１～Ｒ１０は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、または

Ｒ１～Ｒ４およびＲ７～Ｒ１０は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ５およびＲ６は一緒になって－Ｏ－または－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－を形成する。）

＜Ｔｒｔ骨格を有する保護基＞

[化4]



（式中、

Ｒ１～Ｒ１５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、

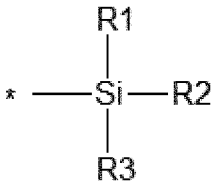
Ｒ１、Ｒ２、およびＲ４～Ｒ１５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ３は、メチルまたはメトキシであるか、

Ｒ１はＣｌであり、かつＲ２～Ｒ１５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、または

Ｒ１～Ｒ４、およびＲ７～Ｒ１５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ５とＲ６は一緒になって－Ｏ－を形成する。）

＜シリル骨格を有する保護基＞

[化5]

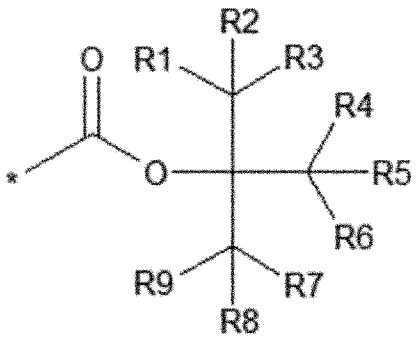


（式中、

Ｒ１～Ｒ３は、それぞれ独立してアルキル、またはアリールである。）

＜Ｂｏｃ骨格を有する保護基＞

[化6]



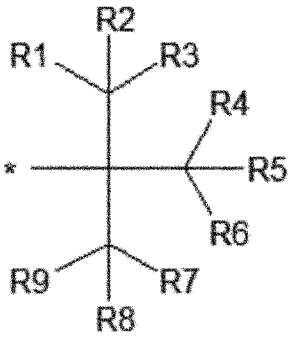
（式中、

Ｒ１～Ｒ９は、それぞれ独立してＨ、アルキル、またはアリールである。

）

＜ｔＢｕ骨格を有する保護基＞

[化7]



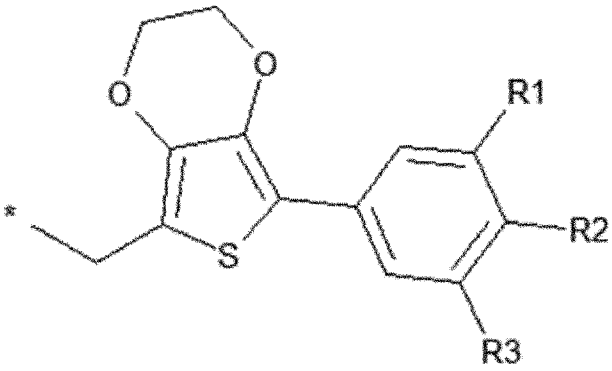
（式中、

Ｒ１～Ｒ９は、それぞれ独立してＨ、アルキル、またはアリールである。

）

＜フェニル－ＥＤＯＴｎ骨格を有する保護基＞

[化8]



（式中、

Ｒ１～Ｒ３は、それぞれ独立して、Ｈ、またはメトキシである）。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、Ｎ－置換アミノ酸を含むペプチドを高い合成効率にて高純度で得ることができる。

[0027] 例えば、側鎖に保護基を有するアミノ酸を含むペプチド配列の場合、

（１）本発明によって見出した、ＴＦＡに比べて弱酸である酸とイオン化能を示す溶媒との組み合わせによって、ペプチド鎖の酸加水分解や、β－ヒド

ロキシ－α－アミノ酸（例えば、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、及び、それらの誘導体）が含まれている配列において起こり得るＮ→Ｏ－アシルシフトやＴＦＡエステル化などを最小限に抑制して脱保護でき、かつ

（２）当該アミノ酸をアミド結合形成反応にて伸長する際に、一般的なペプチド合成に用いられている保護基を有している場合に比べて、反応速度および反応効率を改善できる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]図１は、Ｎ－メチルアミノ酸を配列中に含む環状ペプチドの基本合成ルートを示す図である。

[図2]図２は、０．１Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３１）、目的物の加水分解体（ＴＭ＋H_2O）および目的物のＨＦＩＰによる加溶媒分解体（ＴＭ＋ＨＦＩＰ）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図3]図３は、０．０５Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３１）、目的物の加水分解体（ＴＭ＋H_2O）および目的物のＨＦＩＰによる加溶媒分解体（ＴＭ＋ＨＦＩＰ）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図4]図４は、０．０５Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）および目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図5]図５は、０．０５Ｍシュウ酸／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３１）、目的物の加水分解体（ＴＭ＋H_2O）および目的物のＨＦＩＰによる加溶媒分解体（ＴＭ＋ＨＦＩＰ）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図6]図６は、０．０５Ｍマレイン酸／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保

護条件下における、目的のペプチド（化合物１３１）、目的物の加水分解体（ＴＭ＋H_2O）および目的物のＨＦＩＰによる加溶媒分解体（ＴＭ＋ＨＦＩＰ）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図7]図７は、０．０５Ｍシュウ酸／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）および目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図8]図８は、０．０５Ｍマレイン酸／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）および目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図9]図９は、０．０５Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３７）および目的物のＨＦＩＰによる加溶媒分解体（いずれかのアミド結合がＨＦＩＰによって加溶媒分解を受けたもの）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図10]図１０は、０．０５Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＴＦＥ（２％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３７）および目的物のＴＦＥによる加溶媒分解体（いずれかのアミド結合がＴＦＥによって加溶媒分解を受けたもの）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図11]図１１は、０．１Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）を脱保護条件とし、その溶液に塩基（ＤＩＰＥＡ）を加えて反応を停止させた場合における、目的のペプチド（化合物１３５）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図12]図１２は、０．１Ｍ硫酸水素テトラメチルアンモニウム／ＨＦＩＰ溶液（２％ＴＩＰＳ）を脱保護条件とし、その溶液に塩基（ＤＩＰＥＡ）を加えて反応を停止させた場合における、目的のペプチド（化合物１３３）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図13]図１３は、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（Ｔｒｔ）－ＯＨを添加した場合におけ

る、目的のペプチド（化合物１１２）および目的のペプチドからＴｈｒが抜けたもの（化合物１１３）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図14]図１４は、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ＴＨＰ）－ＯＨを添加した場合における、目的のペプチド（化合物１１４）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。目的のペプチド（化合物１１４）からＴｈｒが脱落したもの（化合物１１３）は検出されなかった。

[図15]図１５は、Ｆｍｏｃ－ＭｅＳｅｒ（ＤＭＴ）－ＯＨ・０．７５ＤＩＰＥＡを用いて合成を行った場合における、目的のペプチド（化合物１１５）および目的のペプチドからＭｅＳｅｒが抜けたもの（化合物１１６）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図16]図１６は、Ｆｍｏｃ－ＭｅＳｅｒ（ＴＨＰ）－ＯＨ（化合物６）を用いて合成を行った場合における、目的のペプチド（化合物１１５）および目的のペプチドからＭｅＳｅｒが抜けたもの（化合物１１６）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図17]図１７は、５％ＴＦＡ／ＤＣＥ（５％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３１）および目的物の加水分解体（ＴＭ＋H_2O）の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図18]図１８は、５％ＴＦＡ／ＤＣＥ（５％ＴＩＰＳ）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）、目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体、目的物の１つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物および目的物の２つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図19]図１９は、５％ＴＦＡ／ＤＣＥ（５％ＴＩＰＳ）（０度）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）、目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体、目的物の１つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物および目的物の２つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図20]図２０は、５％ＴＦＡ／ＤＣＥ（５％ＴＩＰＳ）（２５度）の脱保護条件下における、目的のペプチド（化合物１３３）、目的物のＮ→Ｏ－アシルシフト体、目的物の１つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物および目的物の２つのヒドロキシル基がＴＦＡエステル化した化合物の検出を示すＬＣＭＳで分析した結果を示す図である。

[図21]図２１は、液相における伸長反応を含む合成法を示す図である。

発明を実施するための形態

[0029] ある態様において、本発明は以下の工程を含む、少なくとも１つのＮ－置換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法に関する。

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）工程１）で準備したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを固相に担持する工程、

３）固相に担持したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

４）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程、及び、

５）工程４）で得られたペプチドを、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で固相から切り出す工程。

[0030] 別の態様において、本発明は以下の工程を含む、少なくとも１つのＮ－置

換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法に関する。

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

３）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程であって、この工程で得られるペプチドを構成するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されずＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護される保護基を有する工程、及び、

４）前記側鎖の保護基を、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護する工程。

上記ペプチドの製造は、固相法によって行われていても、液相法によって行われていてもよい。

[0031] 本発明における「ペプチド」は、アミノ酸及び／又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ペプチドであれば特に限定されないが、好ましくは５～３０残基、より好ましくは７～１５残基、さらに好ましくは９～１３残基のペプチドである。本発明において合成されるペプチドは、１つのペプチドの中に、少なくとも１つ以上Ｎ－置換されているアミノ酸又はアミノ酸類縁体（Ｎ－置換アミノ酸ともいう）を含むものとし、

好ましくは２つ以上、より好ましくは３つ以上、さらに好ましくは５つ以上のＮ－置換アミノ酸を含む。これらのＮ－置換アミノ酸は、ペプチド中に連続して存在していても、不連続に存在していてもよい。

本発明におけるペプチドは、直鎖ペプチドでも環状ペプチドでも良く、環状ペプチドであることが好ましい。

[0032] 本発明における「環状ペプチド」は、本発明の方法に従って直鎖ペプチドを合成した後に、環化することにより得ることができる。環化は、アミド結合のような炭素－窒素結合による環化、エステル結合やエーテル結合のような炭素－酸素結合による環化、チオエーテル結合のような炭素－硫黄結合による環化、炭素－炭素結合による環化、あるいは複素環構築による環化など、どのような形態であってもよい。特に制限されないが、アミド結合あるいは炭素‐炭素結合などの共有結合を介した環化が好ましく、側鎖のカルボン酸基とＮ末端の主鎖のアミノ基によるアミド結合を介した環化が特に好ましい。環化に用いられるカルボン酸基やアミノ基等の位置は、主鎖上のものでも、側鎖上のものでもよく、環化可能な位置にあれば、特に制限されない。

[0033] 本発明における「Ｎ－置換アミノ酸」とは、後述する「アミノ酸」又は「アミノ酸類縁体」のうち、主鎖アミノ基が、Ｎ－置換されているアミノ酸又はアミノ酸類縁体を意味し、Ｎ－メチル化などのＮ－アルキル化されているアミノ酸又はアミノ酸類縁体が好ましい。Ｎ－置換アミノ酸として具体的には、アミノ酸又はアミノ酸類縁体の主鎖アミノ基が、ＮＨＲ基であって、Ｒは、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、またはシクロアルキル基であるものか、またプロリンのようにＮ原子に結合した炭素原子とα位からの炭素原子が環を形成するものが挙げられる。置換されていてもよい各基の置換基は、特に制限されず、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。

このようなＮ－置換アミノ酸として具体的には、アルキル基、アラルキル基、シクロアルキル基などが好ましく用いられる。

[0034] 本発明における「アミノ酸」とは、α、βおよびγ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、Ｖａｌ、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限定されないが、例えば、水素原子、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、シクロアルキル基が挙げられる。アミノ酸側鎖は、それぞれ置換基が付与されていてもよく、例えば、Ｎ原子、Ｏ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。置換基の数は特に限定されず、１つ、或は、２つ以上有していても良い。

[0035] 本発明における「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、アミノ酸と同様に特に限定されないが、例えば、水素原子、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、シクロアルキル基が挙げられる。α－ヒドロキシカルボン酸の立体構造はアミノ酸のＬ型に対応するものでもＤ型に対応するものでもよい。側鎖は特に限定されないが、例えば、Ｎ原子、Ｏ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。置換基の数は特に限定されず、１つ、或は、２つ以上有していても良い。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。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。

[0036] 本発明において合成されるペプチドを構成する「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、例えば、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、塩素原子が挙げられ、具体的には、例えば、^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{18}Ｆ、^{36}ＣｌＩが挙げられる。

[0037] アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体は、置換基を１つ、或は、２つ以上有していてもよい。そのような置換基として、例えば、Ｏ原子、Ｎ原子、Ｓ原子、Ｂ原子、Ｐ原子、Ｓｉ原子、ハロゲン原子由来の置換基が挙げられる。

[0038] ハロゲン由来の置換基としては、フルオロ（－Ｆ）、クロロ（－ＣｌＩ）、ブロモ（－Ｂｒ）、ヨウド（－Ｉ）などが挙げられる。

[0039] Ｏ原子由来の置換基としては、ヒドロキシル（－ＯＨ）、オキシ（－ＯＲ）、カルボニル（－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）、カルボキシル（－CO_2Ｈ）、オキシカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ）、カルボニルオキシ（－Ｏ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）、チオカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＳＲ）、カルボニルチオ基（－Ｓ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）、アミノカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＮＨＲ）、カルボニルアミノ（－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）、オキシカルボニルアミノ（－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ）、スルホニルアミノ（－ＮＨ－SO_2－Ｒ）、アミノスルホニル（－SO_2－ＮＨＲ）、スルファモイルアミノ（－ＮＨ－SO_2－ＮＨＲ）、チオカルボキシル（－Ｃ（＝Ｏ）－ＳＨ）、カルボキシルカルボニル（－Ｃ（＝Ｏ）－CO_2Ｈ）が挙げられる。

[0040] オキシ（－ＯＲ）の例としては、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アラルキルオキシなどが挙げられる。

[0041] カルボニル（－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）の例としては、ホルミル（－Ｃ＝Ｏ－Ｈ）、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アラルキルカルボニルなどが挙げられる。

[0042] オキシカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ）の例としては、アルキルオキシカルボニル、シクロアルキルオキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシカルボニル、アラルキルオキシカルボニルなどが挙げられる。

（－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ）

[0043] カルボニルオキシ（－Ｏ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）の例としては、アルキルカルボニルオキシ、シクロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、ヘテロアリールカルボニルオキシ、アラルキルカルボニルオキシなどが挙げられる。

[0044] チオカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＳＲ）の例としては、アルキルチオカルボニル、シクロアルキルチオカルボニル、アルケニルチオカルボニル、アルキニルチオカルボニル、アリールチオカルボニル、ヘテロアリールチオカルボニル、アラルキルチオカルボニルなどが挙げられる。

[0045] カルボニルチオ（－Ｓ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）の例としては、アルキルカルボニルチオ、シクロアルキルカルボニルチオ、アルケニルカルボニルチオ、アルキニルカルボニルチオ、アリールカルボニルチオ、ヘテロアリールカルボニルチオ、アラルキルカルボニルチオなどが挙げられる。

[0046] アミノカルボニル（－Ｃ＝Ｏ－ＮＨＲ）の例としては、アルキルアミノカルボニル、シクロアルキルアミノカルボニル、アルケニルアミノカルボニル、アルキニルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、ヘテロアリールアミノカルボニル、アラルキルアミノカルボニルなどが挙げられる。これらに加えて、－Ｃ＝Ｏ－ＮＨＲ中のＮ原子と結合したＨ原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0047] カルボニルアミノ（－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ）の例としては、アルキルカルボニルアミノ、シクロアルキルカルボニルアミノ、アルケニルカルボニルアミノ、アルキニルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、ヘテロアリールカルボニルアミノ、アラルキルカルボニルアミノなどが挙げられる。こ

れらに加えて－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－Ｒ中のＮ原子と結合したＨ原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0048] オキシカルボニルアミノ（－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ）の例としては、アルコキシカルボニルアミノ、シクロアルコキシカルボニルアミノ、アルケニルオキシカルボニルアミノ、アルキニルオキシカルボニルアミノ、アリールオキシカルボニルアミノ、ヘテロアリールオキシカルボニルアミノ、アラルキルオキシカルボニルアミノなどが挙げられる。これらに加えて、－ＮＨ－Ｃ＝Ｏ－ＯＲ中のＮ原子と結合したＨ原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0049] スルホニルアミノ（－ＮＨ－SO_2－Ｒ）の例としては、アルキルスルホニルアミノ、シクロアルキルスルホニルアミノ、アルケニルスルホニルアミノ、アルキニルスルホニルアミノ、アリールスルホニルアミノ、ヘテロアリールスルホニルアミノ、アラルキルスルホニルアミノなどが挙げられる。これらに加えて、－ＮＨ－SO_2－Ｒ中のＮ原子と結合したＨ原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0050] アミノスルホニル（－SO_2－ＮＨＲ）の例としては、アルキルアミノスルホニル、シクロアルキルアミノスルホニル、アルケニルアミノスルホニル、アルキニルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、ヘテロアリールアミノスルホニル、アラルキルアミノスルホニルなどが挙げられる。これらに加えて、－SO_2－ＮＨＲ中のＮ原子と結合したＨ原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0051] スルファモイルアミノ（－ＮＨ－SO_2－ＮＨＲ）の例としては、アルキルスルファモイルアミノ、シクロアルキルスルファモイルアミノ、アルケニルスルファモイルアミノ、アルキニルスルファモイルアミノ、アリールスルフ

ァモイルアミノ、ヘテロアリールスルファモイルアミノ、アラルキルスルファモイルアミノなどが挙げられる。さらに、－ＮＨ－ＳＯ$_2$－ＮＨＲ中のＮ原子と結合した２つのＨ原子はアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より独立して選択される置換基で置換されていてもよく、またこれらの２つの置換基は環を形成しても良い。

[0052] Ｓ原子由来の置換基としては、チオール（－ＳＨ）、チオ（－Ｓ－Ｒ）、スルフィニル（－Ｓ＝Ｏ－Ｒ）、スルホニル（－Ｓ（Ｏ）$_2$－Ｒ）、スルホ（－ＳＯ$_3$Ｈ）が挙げられる。

[0053] チオ（－Ｓ－Ｒ）の例としては、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、アラルキルチオなどの中から選択される。

[0054] スルフィニル（－Ｓ＝Ｏ－Ｒ）の例としては、アルキルスルフィニル、シクロアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、アラルキルスルフィニルなどが挙げられる。

[0055] スルホニル（－Ｓ（Ｏ）$_2$－Ｒ）の例としては、アルキルスルホニル、シクロアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、アラルキルスルホニルなどが挙げられる。

[0056] Ｎ原子由来の置換基としては、アジド（－Ｎ$_3$、「アジド基」ともいう）、シアノ（－ＣＮ）、１級アミノ（－ＮＨ$_2$）、２級アミノ（－ＮＨ－Ｒ）、３級アミノ（－ＮＲ（Ｒ’））、アミジノ（－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$）、置換アミジノ（－Ｃ（＝ＮＲ）－ＮＲ’Ｒ’’）、グアニジノ（－ＮＨ－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$）、置換グアニジノ（－ＮＲ－Ｃ（＝ＮＲ’’’）－ＮＲ’Ｒ’’）、アミノカルボニルアミノ（－ＮＲ－ＣＯ－ＮＲ’Ｒ’’）が挙げられる。

[0057] ２級アミノ（－ＮＨ－Ｒ）の例としては、アルキルアミノ、シクロアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ヘテロ

アリールアミノ、アラルキルアミノなどが挙げられる。

[0058] ３級アミノ（－ＮＲ（Ｒ’））の例としては、例えばアルキル（アラルキル）アミノなど、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルなどの中からそれぞれ独立して選択される、任意の２つの置換基を有するアミノ基が挙げられ、これらの任意の２つの置換基は環を形成しても良い。

[0059] 置換アミジノ（－Ｃ（＝ＮＲ）－ＮＲ’Ｒ’’）の例としては、Ｎ原子上の３つの置換基Ｒ、Ｒ’、およびＲ’’が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、例えばアルキル（アラルキル）（アリール）アミジノなどが挙げられる。

[0060] 置換グアニジノ（－ＮＲ－Ｃ（＝ＮＲ’’’）－ＮＲ’Ｒ’’）の例としては、Ｒ、Ｒ’、Ｒ’’、およびＲ’’’が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、あるいはこれらが環を形成した基などが挙げられる。

[0061] アミノカルボニルアミノ（－ＮＲ－ＣＯ－ＮＲ’Ｒ’’）の例としては、Ｒ、Ｒ’、およびＲ’’が、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、あるいはこれらは環を形成した基などが挙げられる。

[0062] Ｂ原子由来の置換基としては、ボリル（－ＢＲ（Ｒ’））やジオキシボリル（－Ｂ（ＯＲ）（ＯＲ’））などが挙げられる。これらの２つの置換基ＲおよびＲ’は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルなどの中からそれぞれ独立して選択されるか、あるいはこれらは環を形成してもよい。

[0063] このように、本発明のアミノ酸あるいはアミノ酸類縁体には、通常低分子化合物にて利用されるＯ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な置換基を１つあるいは２つ以上有していてもよい。これら置換基はさらに別の置換基により置換されていてもよい。

[0064] なお、本明細書において、本発明で合成されるペプチドを構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」は、それぞれ、「アミノ酸残基」、「アミノ酸類縁体残基」ということもある。

[0065] 本発明において「Ｆｍｏｃ保護アミノ酸」および「Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体」とは、それぞれ以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有する、アミノ酸およびアミノ酸類縁体である：

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基。

[0066] 本発明における「Ｆｍｏｃ骨格を有する保護基」とは、Ｆｍｏｃ基またはＦｍｏｃ基の構成骨格の任意の位置に任意の置換基が導入された基を意味する。Ｆｍｏｃ骨格を有する保護基として具体的には、例えば、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）基、2,7-ジ-tert-ブチル-Fmoc（Fmoc*)基、2-フルオロ-Fmoc（Fmoc(2F))基、2-モノイソオクチル-Fmoc（mio-Fmoc)基、2,7-ジイソオクチル-Fmoc（dio-Fmoc)基などが挙げられる。本発明においては、Ｆｍｏｃ骨格を有する保護基に代えて、塩基性条件もしくは塩基性を示す求核種（例えば、ピペリジンやヒドラジン）にて脱保護可能な保護基を利用することもできる。このような保護基として具体的には、例えば、2-(4-ニトロフェニルスルホニル)エトキシカルボニル（Nsc)基、(1,1-ジオキソベンゾ[b]チオフェン-2-イル)メチルオキシカルボニル（Bsmoc)基、(1,1-ジオキソナフト[1,2-b]チオフェン-2-イル)メチルオキシカルボニル（α-Nsmoc）基、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-イリデン)-3-メチルブチル（ivDde)基、テトラクロロフタロイル（TCP)基、2-[フェニル(メチル)スルホニオ]エチルオキシカルボニルテトラフルオロボレート（Pms)基、エタンスルホニルエトキシカルボニル（Esc)基、2-(4-スルホフェニルスルホニル)エトキシカルボニル（Sps)基などが挙げられる。また、酸や塩基以外の脱保護が可能な保護基を利用することもできる。このような保護基として具体的には、例えば、パラジウム等の遷移金属触媒存在下での水素添加にて脱保護可

能なベンジルオキシカルボニル（Z)基、パラジウム触媒とスカベンジャーとの組み合わせ（例えば、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）（$Pd(PPh_3)_4$）とフェニルシランとの組み合わせ）にて脱保護可能なアリルオキシカルボニル（Alloc)基、アルキルチオールまたはアリールチオールと塩基との組み合わせにて脱保護可能なo-ニトロベンゼンスルホニル（oNBS, Ns)基、2,4-ジニトロベンゼンスルホニル（dNBS)基及びジチアスクシノイル（Dts)基、遷移金属触媒存在下での水素添加もしくは亜ジチオン酸ナトリウム（$Na_2S_2O_4$）などの還元剤により還元的に脱保護可能なp-ニトロベンジルオキシカルボニル（pNZ)基などが挙げられる（参考文献：Amino Acid-Protecting Groups, Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504）。

[0067] Ｆｍｏｃ法を用いる本発明においては、例えば、主鎖のアミノ基がＦｍｏｃ基により保護され、必要に応じて側鎖の官能基がピペリジンやＤＢＵなどの塩基性で切断されない保護基で保護され、かつ主鎖のカルボン酸基が保護されていない、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸又はＦｍｏｃ保護アミノ酸類縁体を好ましく用いることができる。Ｆｍｏｃ骨格を有する保護基で保護されたアミノ基と保護基のないカルボン酸基を有するＦｍｏｃ保護アミノ酸又はＦｍｏｃ保護アミノ酸類縁体もまた好ましく用いることができる。

[0068] 本発明において、Ｆｍｏｃ－保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドが側鎖の官能基を有する場合、該官能基は保護基で保護されていることが好ましい。側鎖の官能基が保護基で保護されている場合、任意の条件で脱保護可能な周知の保護基を用いることができる。このような保護基としては、塩基性条件下で切断されず、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護される保護基が好ましい。酸性で脱保護可能な保護基としては、例えば、ｐＨ１からｐＨ７の範囲、好ましくはｐＨ２からｐＨ６の範囲で脱保護可能な保護基が挙げられる。あるいは、１０％以下のＴＦＡにおいて脱保護可能な保護基、もしくは、後述の構造をもつ保護基を用いることができる。本発明では、側鎖の保護基としては、周知の保護基を使用することができる。例えば以下の文献ｉ）やｉｉ）の記載に保護基の中から上記条

件を満たすものを側鎖の保護基として採用することもできる。

非特許文献ｉ）Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition,

非特許文献ｉｉ）Chemical Reviews, 2009, 109(6), 2455-2504.

[0069] 本発明の方法は、パラレル合成によるペプチド合成に利用できる。この場合、アミノ酸の側鎖に保護基は必ずしも必要ではないが、側鎖に保護基が必要な場合には、用いられる保護基が、本発明の脱保護条件下において速やかに脱保護されることが好ましい。側鎖の保護基は、２４時間以内に５０％が脱保護されることが好ましく、４時間以内に９０％が脱保護されることが特に好ましい。このような条件を満たす保護基として、後述のＴｒｔ骨格、ＴＨＰ骨格、ＴＨＦ骨格、ＴＢＳ骨格を有する保護基が好ましい。また、酸によって容易に脱保護でき、かつ伸長時に高い反応性を有するためには、官能基に直結する保護基側の原子に少なくとも１つ水素原子が置換している（Ｔｒｔ骨格の保護基よりも立体的に嵩の低い）保護基が好ましい。そのうち、水素以外の置換基が環を形成している保護基がより好ましく、特にＴＨＰ、ＴＨＦが好ましい。

[0070] 本発明の方法は工業的なペプチド合成にも利用できる。この場合も、パラレル合成と同様に、必ずしもアミノ酸の側鎖に保護基を有する必要はないが、側鎖に保護基を有する場合には、パラレル合成と同様の保護基を有することが好ましい。合成されるペプチドの配列に脱保護時の加水分解及びＮ→Ｏ－アシルシフトの問題はないが、保護基の嵩高さによる伸長反応の問題がある場合には、脱保護時に一般的に用いられるＴＦＡなどの強酸を用いてもよい。また、合成されるペプチドの伸長反応に問題がない場合は、嵩高い保護基を用いることもできる。

[0071] 本発明において「ＴＦＡよりも弱酸となる条件」として、好ましくは、水中でのｐＫａの値が０～９である弱酸を、イオン化能Y_{OTs}値が正の値で水中でのｐＫａが５～１４である溶媒に含む、弱酸溶液を用いる条件が挙げられる。

[0072] 「水中でのｐＫａの値が０～９である弱酸」として、より好ましくは水中でのｐＫａが１～５の弱酸である。このような弱酸として具体的には、硫酸水素テトラメチルアンモニウム（水中でのｐＫａ＝２．０）、シュウ酸（水中でのｐＫａ＝１．２３）、マレイン酸（水中でのｐＫａ＝１．９２）などが挙げられる。ＴＦＡよりも弱酸となる条件を満たせば、溶媒に溶解させる弱酸の濃度は任意でよい。

[0073] 「イオン化能Y_{OTs}値が正の値で水中でのｐＫａが５～１４である溶媒」として好ましくは、フルオロアルコールが挙げられる。フルオロアルコールとは、アルコールを構成する炭素原子のうちヒドロキシル基が結合している炭素原子以外の炭素原子にフッ素原子が結合したものの総称を意味する。本発明においては、２，３，４，５，６－ペンタフルオロフェノールなど、ヒドロキシル基が芳香環に結合したものもフルオロアルコールに含まれる。フルオロアルコールとしては、２，２，２－トリフルオロエタノール（ＴＦＥ）やヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）が好ましい。

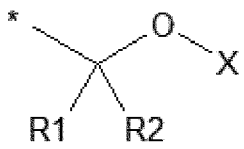
[0074] 本発明においては、ＴＦＡよりも弱酸となる条件を満たせば、前記弱酸溶液にはさらに他の有機溶媒（例えば、ジクロロメタンや１，２－ジクロロエタンなど）やカチオン捕捉剤（例えば、トリイソプロピルシランなど）なども添加することができる。

[0075] 本発明においてＦｍｏｃ保護アミノ酸またはＦｍｏｃ保護アミノ酸類縁体がその側鎖に保護基を有する場合、側鎖の保護基として好ましくは以下のものを挙げることができる。

[0076] 側鎖の保護基がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｈｙｐ、およびそれらの誘導体のヒドロキシル基の保護基である場合、以下の一般式で表されるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格、またはＢｏｃ骨格を有する保護基が好ましい。

[0077]

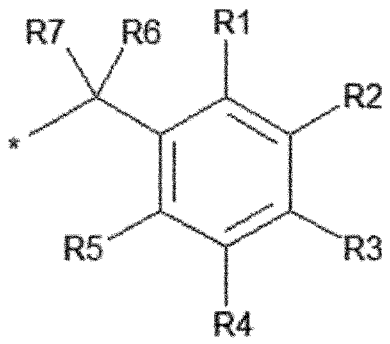
[化9]



MOM 骨格

ＭＯＭ骨格を有する保護基の代表例としては、ＭＯＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｍｅ）、ＥＥ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｅｔ）、ＭＩＰ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｍｅ，Ｘ＝Ｍｅ）、ＴＨＰ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で４つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＴＨＦ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で３つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＳＥＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝２－トリメチルシリルエチル）などが挙げられる。骨格上の置換基のＭｅやＥｔについては他のアルキル基、ベンジル基、アリール基などで置換しているものも用いることができる。

[0078] [化10]

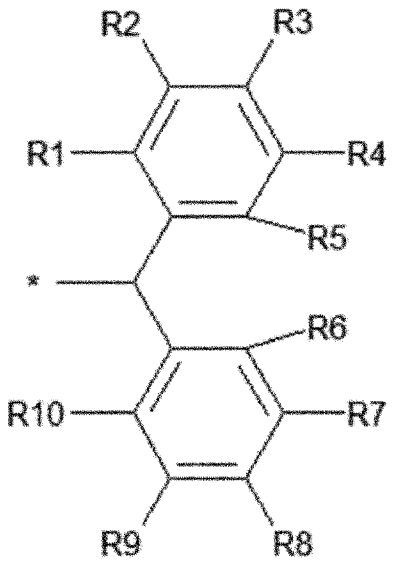


Bn 骨格

Ｂｎ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｐｉｓ（Ｒ６＝Ｍｅ，Ｒ７＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＰＭＢ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＤＭＢ（Ｒ１＝ＯＭｅ，Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。置換基のＭｅの替わりに他のアルキル基を用いてもよい。またベンゼン環上にアルキル基、アリール基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

[0079]

[化11]



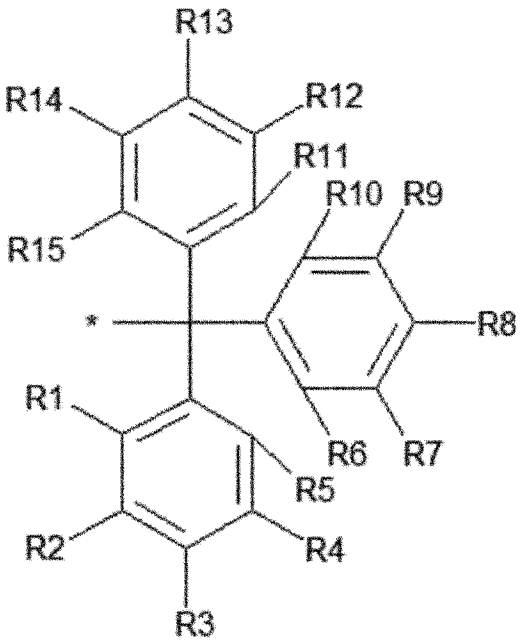
Dpm 骨格

Ｄｐｍ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｄｐｍ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば酸素原子を介して架橋されたＸａｎ基や、炭素原子２つを介して架橋されたジベンゾスベリル基などを用いてもよい。

[0080]

[化12]

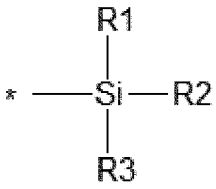


Trt 骨格

Ｔｒｔ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｔｒｔ（すべてのＲ＝Ｈ）、Ｍｍｔ（Ｒ３＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｍｔｔ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｄｍｔ（Ｒ３＝ＯＭｅ，Ｒ８＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｃｌｔ（Ｒ１＝Ｃｌ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば酸素原子を介して架橋されたピキシル（Pixyl）基を用いることもできる。

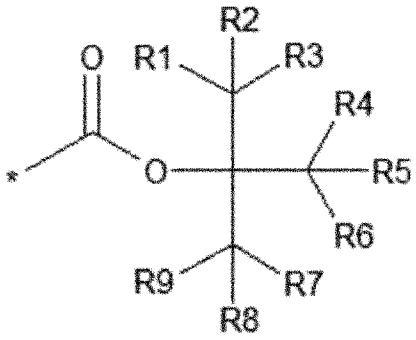
[0081] [化13]



シリル骨格

シリル骨格を有する保護基の代表例としては、ＴＢＳ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｍｅ，Ｒ３＝ｔＢｕ）などが挙げられる。このＭｅやｔＢｕの替わりに、他のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

[0082] [化14]

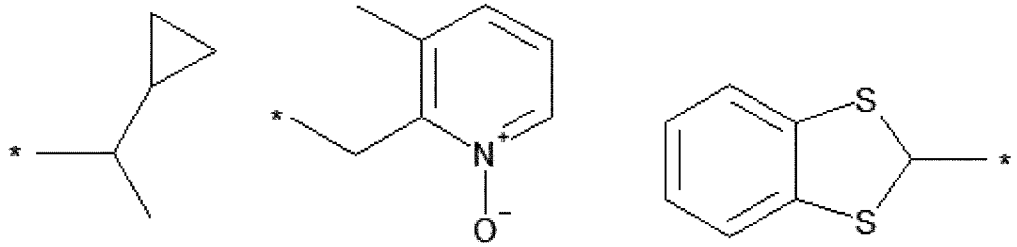


Boc 骨格

Ｂｏｃ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｂｏｃ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられるが、他のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

[0083] その他、以下に示す保護基を用いることもできる。

[化15]



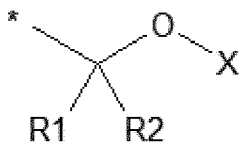
MCPM 3-Me-2-picolyl N-oxido Bdt

[0084] これらの保護基の中で、特にＴＨＰ、Ｔｒｔが好ましい。またアミノ酸残基がＳｅｒである場合には、側鎖の保護基はＴＨＰ、Ｔｒｔが特に好ましく、アミノ酸残基がＴｈｒである場合には、側鎖の保護基はＴＨＰが特に好ましい。

[0085] 側鎖の保護基が例えばＴｙｒ、Ｄ－Ｔｙｒ、Ｔｙｒ（３－Ｆ）など、アリール基に置換したヒドロキシル基を有するアミノ酸の保護基である場合、例えば、以下の一般式で表されるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格、Ｂｏｃ骨格、ｔＢｕ骨格を有する保護基が好ましい。

[0086]

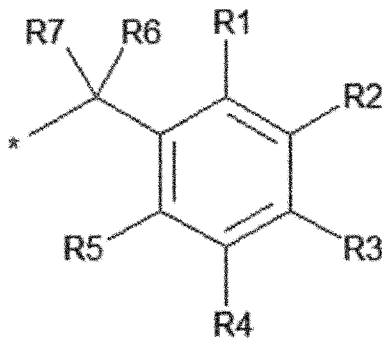
[化16]



MOM骨格

ＭＯＭ骨格を有する保護基の代表例としては、ＭＯＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｍｅ）、ＢＯＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｂｎ）、ＥＥ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｅｔ）、ＴＨＰ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で４つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＴＨＦ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で３つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＳＥＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝２－トリメチルシリルエチル）などが挙げられる。骨格上の置換基のＭｅやＥｔについては他のアルキル基、ベンジル基、アリール基などで置換しているものも用いることができる。

[0087] [化17]

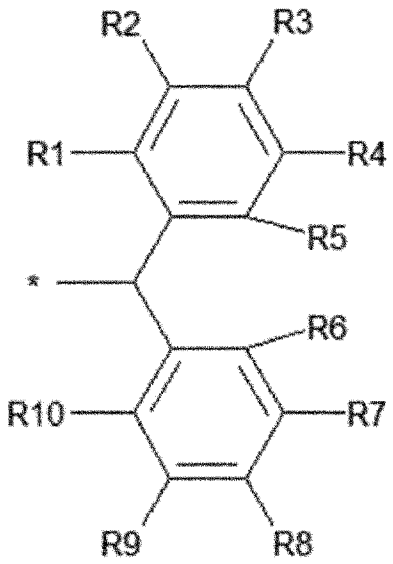


Bn骨格

Ｂｎ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｐｉｓ（Ｒ６＝Ｍｅ，Ｒ７＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＰＭＢ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＤＭＢ（Ｒ１＝ＯＭｅ，Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。置換基のＭｅの替わりに他のアルキル基を用いてもよい。またベンゼン環上にアルキル基、アリール基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

[0088]

[化18]



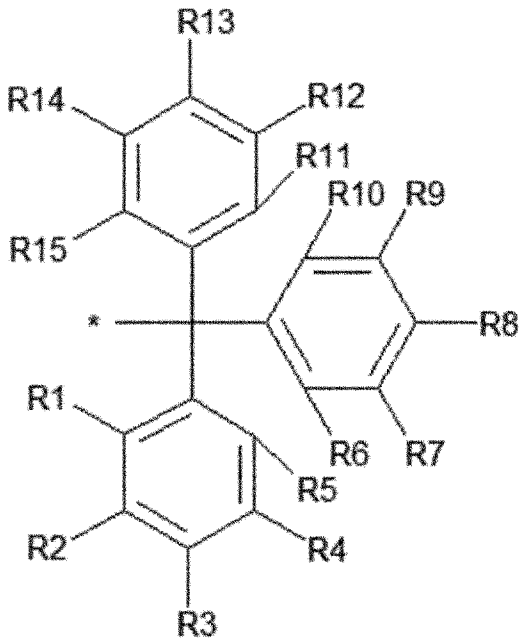
Dpm 骨格

Ｄｐｍ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｄｐｍ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば酸素原子を介して架橋されたＸａｎ基や、炭素原子２つを介して架橋されたジベンゾスベリル基などを用いてもよい。

[0089]

[化19]

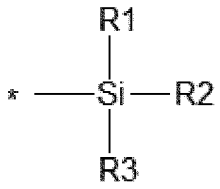


Trt骨格

Ｔｒｔ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｔｒｔ（すべてのＲ＝Ｈ）、Ｍｍｔ（Ｒ３＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｍｔｔ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｃｌｔ（Ｒ１＝Ｃｌ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば酸素原子を介して架橋されたピキシル（Pixyl）基を用いることもできる。

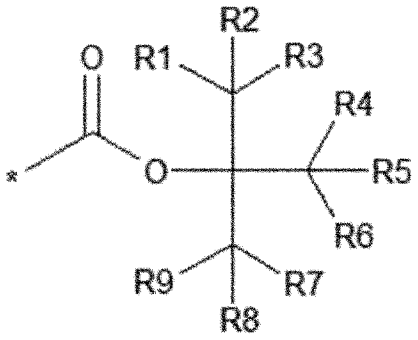
[0090] [化20]



シリル骨格

シリル骨格を有する保護基の代表例としては、ＴＢＳ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｍｅ，Ｒ３＝ｔＢｕ）などが挙げられる。このＭｅやｔＢｕの替わりに、他のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

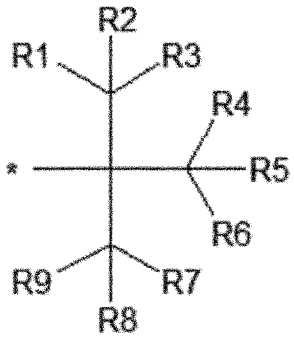
[0091] [化21]



Boc骨格

Ｂｏｃ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｂｏｃ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられるが、他のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

[0092] [化22]



tBu骨格

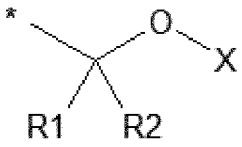
ｔＢｕ骨格を有する保護基の代表例としては、ｔＢｕ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられる。Ｈ以外のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

[0093] これらの保護基の中で、特にｔＢｕ、Ｐｉｓ、Ｔｒｔ、Ｃｌｔ、ＴＨＰ、ＴＨＦが好ましい。またアミノ酸残基がＴｙｒ、Ｄ－Ｔｙｒである場合には、側鎖の保護基はｔＢｕ、Ｔｒｔ、Ｃｌｔ、ＴＨＰが特に好ましく、アミノ酸残基がＴｙｒ（３－Ｆ）である場合には、側鎖の保護基はｔＢｕ、Ｐｉｓが特に好ましい。

[0094] 側鎖の保護基が例えばＨｉｓ、ＭｅＨｉｓなど、側鎖にイミダゾールを有するアミノ酸の保護基である場合、例えば、以下の一般式で表されるＭＯＭ

骨格、Ｂｎ骨格、Ｔｒｔ骨格を有する保護基を用いることが好ましい。

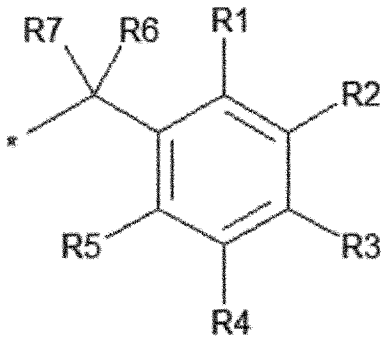
[0095] [化23]



MOM 骨格

ＭＯＭ骨格を有する保護基の代表例としては、ＭＢｏｍ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝４－メトキシベンジル）、２，４－ＤＭＢｏｍ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝２，４－ジメトキシベンジル）、３，４－ＤＭＢｏｍ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝３，４－ジメトキシベンジル）、ＥＥ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｅｔ）、ＴＨＰ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で４つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＴＨＦ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で３つの炭素原子で環構造をもつもの）などが挙げられる。骨格上の置換基のＭｅやＥｔについては他のアルキル基、ベンジル基、アリール基などで置換しているものも用いることができる。

[0096] [化24]

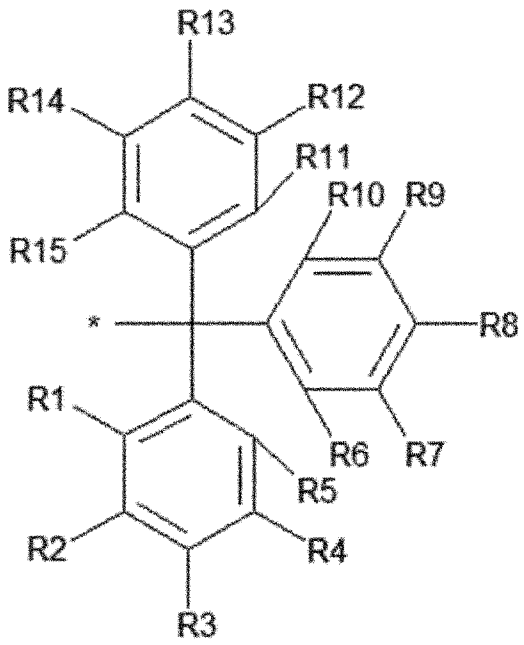


Bn 骨格

Ｂｎ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｐｉｓ（Ｒ６＝Ｍｅ，Ｒ７＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＰＭＢ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＤＭＢ（Ｒ１＝ＯＭｅ，Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。置換基のＭｅの替わりに他のアルキル基を用いてもよい。またベンゼン環上に

アルキル基、アリール基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

[0097] [化25]



Trt骨格

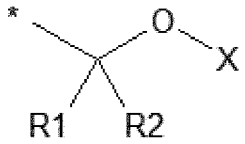
Ｔｒｔ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｔｒｔ（すべてのＲ＝Ｈ）、Ｍｍｔ（Ｒ３＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｍｔｔ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＣｌｔＲ１＝Ｃｌ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

[0098] これらの中で、特にＴｒｔが好ましい。またアミノ酸残基がＨｉｓ、ＭｅＨｉｓである場合には、側鎖の保護基はＴｒｔが特に好ましい。

[0099] また、例えば、主鎖のカルボン酸基を「遊離の又は活性エステル化されたカルボン酸基」として用いる場合にはＡｓｐ、Ｇｌｕ、およびその誘導体の側鎖のカルボン酸基の保護基として、また、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、およびその誘導体の側鎖のカルボン酸基を「遊離の又は活性エステル化されたカルボン酸基」として用いる場合には主鎖のカルボン酸基の保護基として、例えば、以下の一般式で表されるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、ｔＢｕ骨格、フェニル－ＥＤＯＴｎ骨格を有する保護基を用いることができる。また、カルボン酸基由来の炭素原子に３つのアルコキシ基が結合したオル

トエステル骨格を有する保護基もカルボン酸の保護基として用いることができる。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。

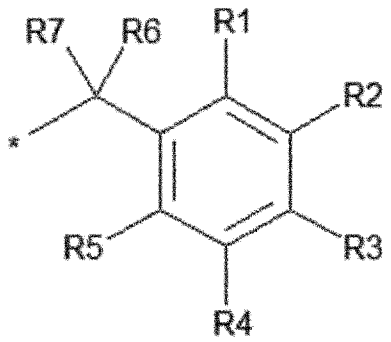
[0100] [化26]



MOM 骨格

ＭＯＭ骨格を有する保護基の代表例としては、ＢＯＭ（Ｒ１＝Ｈ，Ｒ２＝Ｈ，Ｘ＝Ｂｎ）、ＴＨＰ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で４つの炭素原子で環構造をもつもの）、ＴＨＦ（Ｒ２＝Ｈ，Ｒ１とＸの間で３つの炭素原子で環構造をもつもの）などが挙げられる。骨格上の置換基は他のアルキル基、ベンジル基、アリール基などで置換しているものも用いることができる。

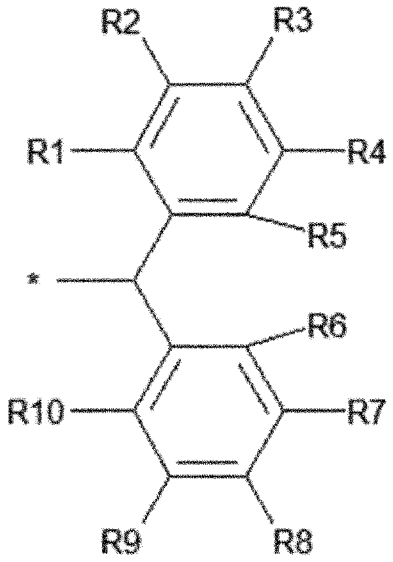
[0101] [化27]



Bn 骨格

Ｂｎ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｐｉｓ（Ｒ６＝Ｍｅ，Ｒ７＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＰＭＢ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ＤＭＢ（Ｒ１＝ＯＭｅ，Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、ピペロニル（Ｒ２とＲ３に酸素原子が置換しており、その酸素原子どうしが１つの炭素原子で架橋されている構造で、その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。置換基のＭｅの替わりに他のアルキル基を用いてもよい。またベンゼン環上にアルキル基、アリール基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

[0102] [化28]



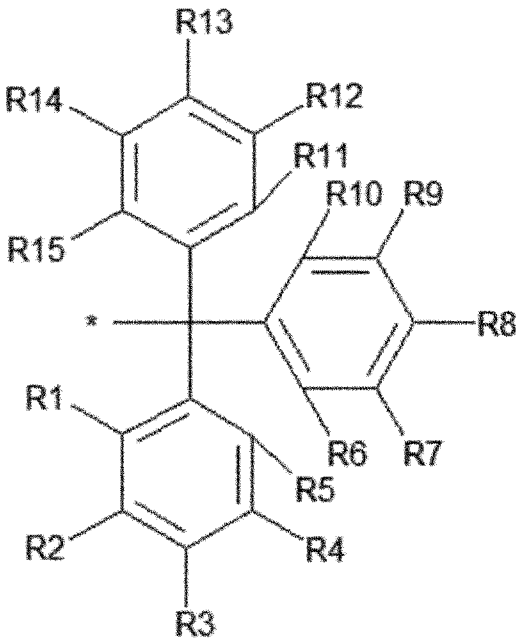
Dpm 骨格

Ｄｐｍ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｄｐｍ（すべてのＲ＝Ｈ）が挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば炭素原子２つを介して架橋されたジベンゾスベリル基などを用いてもよい。

[0103]

[化29]

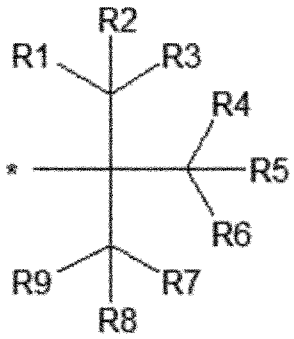


Trt 骨格

Ｔｒｔ骨格を有する保護基の代表例としては、Ｔｒｔ（すべてのＲ＝Ｈ）、Ｍｍｔ（Ｒ３＝Ｍｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｍｔｔ（Ｒ３＝ＯＭｅ，その他のＲ＝Ｈ）、Ｃｌｔ（Ｒ１＝Ｃｌ，その他のＲ＝Ｈ）などが挙げられる。芳香環上にアルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン基などが置換していてもよい。

また、Ｒ５とＲ６の間で架橋したもの、例えば酸素原子を介して架橋されたピキシル（Pixyl）基を用いることもできる。

[0104] [化30]

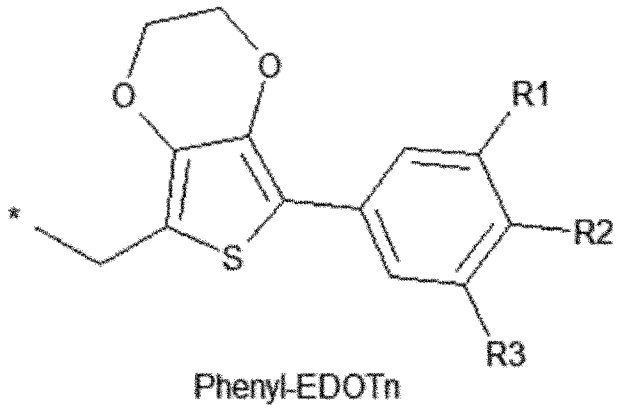


tBu 骨格

ｔＢｕ骨格を有する保護基の代表例としては、ｔＢｕ（すべてのＲ＝Ｈ）

、Ｍｐｅ（Ｒ１＝Ｍｅ，Ｒ４＝Ｍｅ，そのほかのＲ＝Ｈ）などが挙げられる。他のアルキル基、アリール基などが置換していてもよい。

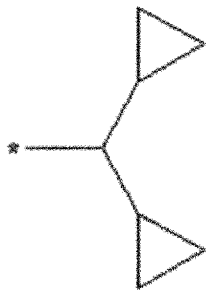
[0105] [化31]



Phenyl-EDOTn

フェニル－ＥＤＯＴｎとしては、（ｉ）Ｒ１＝Ｒ２＝Ｒ３＝ＯＭｅ、（ｉｉ）Ｒ１＝Ｒ２＝ＯＭｅ，Ｒ３＝Ｈ、（ｉｉｉ）Ｒ１＝Ｒ２＝Ｈ，Ｒ３＝ＯＭｅ、もしくは（ｉｖ）Ｒ１＝Ｒ２＝Ｒ３＝Ｈの置換基の組み合わせを有するものを用いることができる。

[0106] [化32]



dicyclopropylmethyl

ジシクロプロピルメチル基を用いることもできる。

[0107] これらの中では、特にｔＢｕ、Ｐｉｓ、Ｔｒｔが好ましい。

[0108] 本発明において「Ｆｍｏｃ保護ペプチド」とは前記「Ｆｍｏｃ保護アミノ酸」および前記「Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体」の両方又はいずれか一方を含むペプチドを意味する。このようなペプチドとして、例えば、上述のＦｍｏｃ保護アミノ酸とＦｍｏｃ保護アミノ酸類縁体のいずれか又は両方を含めて２分子以上有しているジペプチドやオリゴペプチドが挙げられる。

[0109] 本発明の固相法によるペプチドの合成では、樹脂を用いてＦｍｏｃ保護ア

ミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチド（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸等ということがある）を固相に担持することができる。用いられる樹脂のＦｍｏｃ保護アミノ酸等との結合に用いられる基（樹脂結合基）は、酸によるペプチドの切り出しが可能であれば特に限定されない。Ｆｍｏｃ保護アミノ酸等の担持量、担持率についても特に限定されない。本発明においては、例えば、トリチルクロリド樹脂（Ｔｒｔ樹脂）、２－クロロトリチルクロリド樹脂（Ｃｌｔ樹脂）、４－メチルトリチルクロリド樹脂（Ｍｔｔ樹脂）、４－メトキシトリチルクロリド樹脂（Ｍｍｔ）を用いることができる。樹脂は、特に、固相合成ハンドブック（メルク株式会社発行、平成１４年５月１日発行）に記載されている酸感受性として「Ｈ（＜５％ＴＦＡ ｉｎ ＤＣＭ）」と判定されている樹脂結合基を有することが好ましく、用いられるアミノ酸側の官能基に合わせて適宜選択することができる。例えば、アミノ酸側の官能基としてカルボン酸（主鎖カルボン酸、もしくは、ＡｓｐやＧｌｕに代表される側鎖カルボン酸）、又は、芳香環上のヒドロキシ基（Ｔｙｒに代表されるフェノール基）を用いる場合には、樹脂として、トリチルクロリド樹脂（Ｔｒｔ樹脂）もしくは２－クロロトリチルクロリド樹脂（Ｃｌｔ樹脂）を用いることが好ましい。アミノ酸側の官能基として脂肪族ヒドロキシ基（ＳｅｒやＴｈｒに代表される脂肪族アルコール基）を用いる場合には、樹脂として、トリチルクロリド樹脂（Ｔｒｔ樹脂）、２－クロロトリチルクロリド樹脂（Ｃｌｔ樹脂）もしくは４－メチルトリチルクロリド樹脂（Ｍｔｔ樹脂）を用いることが好ましい。

樹脂を構成するポリマーの種類についても特に限定されない。ポリスチレンで構成される樹脂の場合には、１００－２００ｍｅｓｈもしくは２００－４００ｍｅｓｈのいずれを用いても良い。また、架橋率についても特に限定されないが、１％ＤＶＢ（ジビニルベンゼン）架橋のものが好ましい。

[0110] Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体、或は、Ｆｍｏｃ保護ペプチドのＣ末端に位置するアミノ酸の遊離のカルボン酸基または活性エステル化されたカルボン酸基と樹脂結合基との化学反応により、Ｆｍｏｃ保

護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体、またはＦｍｏｃ保護ペプチドを樹脂に担持させる。このとき、遊離のカルボン酸は、アミノ酸又はアミノ酸類縁体の主鎖カルボン酸であってもよいし、側鎖カルボン酸（Ａｓｐ等）でもよい。カルボン酸基の代わりに、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＣ末端に位置するアミノ酸の、主鎖又は側鎖の遊離のＯＨ基、或は、遊離のＳＨ基を固相との担持に用いることもできる。

[0111] 固相に担持したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基により脱保護し、アミノ基を露出する。ここで用いられる塩基は、特に限定されないが、ペプチド合成で一般に使用される脱保護剤を用いることができる（例えば、Amino Acid-Protecting Groups (Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504)）。そのような脱保護剤としては、例えば、２級アミン、アミジン骨格を有する塩基、グアニジン骨格を有する塩基が好ましい。２級アミンとして具体的には、例えば、ピペリジン、モルホリン、ピロリジン及びピペラジンが挙げられる。アミジン骨格を有する塩基として具体的には、例えば、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］ウンデカ－７－エン（ＤＢＵ）及び１，５－ジアザビシクロ［４．３．０］－５－ノネン（ＤＢＮ）が挙げられる。グアニジン骨格を有する塩基として具体的には、例えば、１，１，３，３－テトラメチルグアニジンが挙げられる。

[0112] 前記露出したアミノ基と新たに添加したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドの遊離の又は活性エステル化されたカルボン酸基とを縮合し、ペプチド結合を形成する。

[0113] アミノ基とカルボン酸基を縮合するときの縮合剤としては、アミド結合を形成できるものであれば特に限定されず、ペプチド合成で一般に使用される縮合剤が好ましい（例えば、Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup (Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602)）。このような縮合剤として具体的には例えば、カルボジイミド骨格を有する縮合剤が挙げられる。例えば

、カルボジイミド骨格を有する縮合剤は、活性エステルを形成できるヒドロキシ化合物と組合せて、縮合反応に用いることができる。カルボジイミド骨格を有する縮合剤としては、例えば、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、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・ＨＣＩ）などが挙げられる（例えば、WATANABE Chemicalのカタログ、Amino acids and chiral building blocks to new medicine参照）。活性エステルを形成できるヒドロキシ化合物としては、例えば、１－ヒドロキシ－１Ｈ－ベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）、２－シアノ－２－（ヒドロキシイミノ）酢酸エチル（ｏｘｙｍａ）、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またはＨＯＤｈｂｔ）、Ｎ－ヒドロキシ－５－ノルボルネン－２，３－ジカルボキシミド（ＨＯＮＢ）、２，３，４，５，６－ペンタフルオロフェノール（ＨＯＰｆｐ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＨＯＳｕ）、６－クロロ－１－ヒドロキシ－１Ｈ－ベンゾトリアゾール（ＣＩ－ＨＯＢｔ）が挙げられる（例えば、WATANABE Chemicalのカタログ、Amino acids and chiral building blocks to new medicine参照）。また、これらの骨格を有する塩、例えばｏｘｙｍａのカリウム塩であるＫ－ｏｘｙｍａなども用いることができる。これらの中では特にＨＯＢｔ、ＨＯＡｔ、ｏｘｙｍａ、ＨＯＯＢｔが好ましい。中でも、ＤＩＣとＨＯＡｔとを組み合わせて用いること、あるいはＤＩＣとｏｘｙｍａとを組み合わせて用いることが好ましい。その他に、ホスホニウム系縮合剤・ウロニウム系縮合剤としてＯ－（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（ＨＢＴＵ）、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リン酸塩（ＨＡＴＵ）、Ｎ－［１－（シアノ－２－エトキシ－２－オキソエチリデンアミノオキシ）ジメチルアミノ（モルホリノ）］ウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＣＯ

ＭＵ）、Ｏ－［（エトキシカルボニル）シアノメチレンアミノ］－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（ＨＯＴＵ）、Ｏ－（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テトラフルオロホウ酸塩（ＴＢＴＵ）、Ｏ－（７－アザ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テトラフルオロホウ酸塩（ＴＡＴＵ）、１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ－トリ（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＰｙＢＯＰ）、１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ－トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＢＯＰ）、ブロモトリ（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＰｙＢｒｏＰ）、クロロトリ（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＰｙＣｌｏＰ）、（７－アザ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ヘキサフルオロリン酸（ＰｙＡＯＰ）、ブロモトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロリン酸（Ｂｒｏｐ）、３－（ジエトキシホスホリルオキシ）－１，２，３－ベンゾトリアジン－４（３Ｈ）－オン（ＤＥＰＢＴ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）ウロニウムテトラフルオロホウ酸（ＴＳＴＵ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）ウロニウムヘキサフルオロリン酸（ＨＳＴＵ）、Ｏ－（３，４－ジヒドロ－４－オキソ－１，２，３－ベンゾトリアジン－３－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸塩（ＴＤＢＴＵ）、テトラメチルチウロニウムＳ－（１－オキシド－２－ピリジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラフルオロホウ酸塩（ＴＯＴＴ）、Ｏ－（２－オキソ－１（２Ｈ）ピリジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸（ＴＰＴＵ）のうちのいずれかと、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ）、２，４，６－トリメチルピリジン（２，４，６－コリジン）、２，６－ジメチルピリジン（２，６－ルチジン）のうちのいずれかの塩基とを組み合わせて縮合反応に利用することができる

。特にＨＡＴＵとＤＩＰＥＡと組み合わせて用いること、あるいはＣＯＭＵとＤＩＰＥＡとを組み合わせて用いることが好ましい。その他に、Ｎ，Ｎ’－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）、１，１’－カルボニル－ジ－（１，２，４－トリアゾール）（ＣＤＴ）、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塩化物（ＤＭＴ－ＭＭ）、プロピルホスホン酸無水物（Ｔ３Ｐ）などの縮合剤を利用することもできる。

[0114] 本発明の製造方法は、新たに添加したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護してアミノ基を露出する工程、および

更に新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程をさらに含む。これらの工程は１回または複数回繰り返してもよい。本発明の方法は、Ｆｍｏｃ骨格を有する保護基の脱保護と、次の新しいＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドとの縮合反応を繰り返すことによって目的のペプチド配列を得ることが可能である。

[0115] 本発明を固相法にて実施する場合、目的のペプチドが得られた後、固相からの切り出しが行われる（切り出し工程）。また、切り出し工程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。本発明においては、切り出し時点で、保護基で保護されている側鎖官能基は脱保護されていても、されていなくてもよく、いくつかの保護基のうち一部のみが脱保護されていてもよい。側鎖官能基が保護されたまま、切り出し工程が行われることが好ましい。

[0116] 本発明の切り出し工程の反応条件として具体的には、弱酸となる条件が好ましく、特にＴＦＡよりも弱酸となる条件が好ましい。このような弱酸として具体的には、水中でのｐＫａの値がＴＦＡよりも高い値を示す酸が好ましい。より具体的には、ｐＫａの値が０～１５の範囲にあるものが好ましく、水中でのｐＫａ値が６～１５の範囲にあるものがより好ましい。本工程で用

いられるＴＦＡよりも弱酸となる酸としては、例えば、ＴＦＥ、ＨＦＩＰなどが挙げられる。弱酸をＴＦＥ／酢酸のように２つかそれ以上を任意の割合で組み合わせてもよい。またＤＣＭ、ＤＣＥ、水などの任意の溶媒を任意の割合で混合してもよい。このような弱酸と溶媒の組み合わせとして、特にＴＦＥとＤＣＭの組み合わせが好ましい。切り出しに用いられる溶液には、他の有機溶媒や試薬（例えば、ＤＩＰＥＡなど）やカチオン捕捉剤（例えば、トリイソプロピルシランなど）などを添加してもよい。

[0117] 合成されたペプチドの側鎖の保護基を脱保護する前に切り出し工程を行う場合、切り出しに用いられる弱酸は、脱保護反応で用いられる酸よりも弱酸であることが好ましい。この場合、あらかじめＴＦＡより弱酸となる酸度の異なる２種類の酸を準備しておき、より弱酸となる酸を切り出しに用いる。

合成されたペプチドの側鎖の保護基を脱保護した後に切り出し工程を行う場合、切り出しに用いられる弱酸は、ＴＦＡより弱酸であれば特に限定されない。

[0118] 本発明の側鎖の保護基の脱保護工程においては、加水分解やＮ→Ｏ－アシルシフトなどの副反応を低減させて望みの脱保護反応を選択的に行うことが可能である。側鎖の保護基の脱保護は、ＴＦＡよりも弱酸となる条件で行うことが好ましい。反応は任意の温度で行うことができ、０～４０℃で行うことが好ましい。脱保護完結時もしくは脱保護途中で反応を停止する際に、例えばアンモニアや１級～３級アミンなどの塩基を用いることができる。また塩基性ヘテロ環化合物（例えばピリジンやイミダゾール、またそれらの類縁体）などを用いることもできる。

[0119] 本発明の製造方法で合成されたペプチドに、更に改変や修飾を加える場合、それらの工程は切り出し工程の前後いずれにおいても実施することができる。

[0120] 本発明の製造方法により製造されたペプチドは、１つの反応点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Ｃ末端側に含み、かつもう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カルボン酸類縁体

をＮ末端側に含む、ペプチドであることができる。このようなペプチドは、例えばＣ末端側の側鎖に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が含まれ、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カルボン酸類縁体が含まれるように、原料のＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体及びＦｍｏｃ保護ペプチドを選択することにより製造できる。

[0121] このペプチドは、１つの反応点ともう１つの反応点とを結合させて環化することができる。本発明の製造方法は、このような環化工程を含み得る。具体的には、ＷＯ２０１３／１００１３２の記載に基づいて環化工程を実施することができる。

[0122] 環化工程を、切り出し工程後に実施する場合は、切り出し工程により得られた反応溶液（切り出し溶液）を減圧下濃縮した残渣を環化工程に用いてもよく、切り出し溶液をそのまま環化工程に用いてもよい。

[0123] 本発明において、「カルボン酸類縁体」に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つ以上の化合物や、アミノ基を持たない様々なカルボン酸誘導体や、２残基～４残基から形成されるペプチドや、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が含まれる。また、「カルボン酸類縁体」は、環化に使用できるホウ酸やホウ酸エステル部位を有していてもよい。また、「カルボン酸類縁体」は、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、置換されてもよく、例えば、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選択（自由な置換基）される。

[0124] 環化工程は、上記２つの反応点を、例えば、アミド結合、ジスルフィド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、チオエステル結合、または、炭素-炭素結合によって環化する工程を含むが、これに限定されない。

[0125] アミド結合形成による環化は、例えば、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（主鎖のアミノ基あるいは、側鎖に存在するアミノ基）と、側鎖に１つのカルボン酸を有するアミノ酸残基又はアミノ酸類縁体の反応点とでアミド結合を形成させることによる環化である。これらの反応において、縮合剤としては、上述のペプチド結合で用いられるものと同様のものを用いることができる。具体的には、例えばＨＡＴＵとＤＩＰＥＡの組み合わせ、ＣＯＭＵとＤＩＰＥＡの組み合わせなどを用いて側鎖カルボン酸とＮ末端主鎖のアミノ基とを、または側鎖アミノ基とＣ末端主鎖のカルボン酸とを縮合することができる。この際、Ｃ末端側のカルボン酸の保護基と環化に供する側鎖のカルボン酸の保護基、もしくはＮ末端側の主鎖のアミノ基の保護基と環化に供する側鎖のアミノ基の保護基は、その直交性を考慮して選択することが好ましい。この一連のペプチド合成において好ましい保護基は前述のとおりである。

[0126] 炭素－炭素結合形成による環化は、例えば、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で炭素－炭素結合を形成させることによる環化である。具体的には、例えば、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、アルケニル基を選択し、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ルケニル基を選択して、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ことができる。このとき、触媒として使用する遷移金属としては、例えば、ルテニウム、モリブデン、チタン、タングステンが挙げられる。例えば、ルテニウムを用いた場合は、メタセシス反応によって環化反応を実施することができる。また、例えば、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、および側鎖に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、アリールハライドおよびボロン酸もしくはボロン酸類縁体の組み合わせを採用し、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ことができる。このとき、触媒として使用する遷移金属としては、パラジウム、ニッケル、鉄が挙げられる。例えば、パラジウムを用いた場合は、鈴木反応によって環化反応を実施することができる。また、例えば、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、および側鎖に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、アルケニル基およびアリールハライドもしくはアルケニルハライドの組み合わせを採用し、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ことができる。このとき、触媒として使用する遷移金属としては、パラジウム、ニッケルが挙げられる。例えば、パラジウムを用いた場合は、Ｈｅｃｋ型の化学反応によって環化反応を実施することができる。また、例えば、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、および側鎖に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、アセチレン基およびアリールハライドもしくはアルケニルハライドの組み合わせを選択し、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ことができる。このとき、触媒として使用する遷移金属としては、パラジウム、銅、金、鉄が挙げられる。例えば、パラジウムと銅の組み合わせを用いた場合は、薗頭反応によって環化反応を実施することができる。

[0127] 本発明においては、得られた生成物を必要に応じて精製することができる。例えば、逆相カラムや、分子ふるいカラムなどのペプチドの一般的な精製方法を用いることができる。また、適切な溶媒を用いて結晶化や固化により精製することもできる。精製の前に減圧下濃縮をすることも可能である。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0128] 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。

[0129] 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
ＤＣＥ	１，２－ジクロロエタン
ＤＭＦ	Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
ＤＩＣ	Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド
ＤＩＰＥＡ	Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＢＵ	１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン
ＮＭＰ	Ｎ－メチル－２－ピロリドン
ＦＡ	ギ酸
ＴＦＡ	トリフルオロ酢酸
ＴＦＥ	２，２，２－トリフルオロエタノール
ＨＦＩＰ	１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロイソプロピルアルコール
ＨＯＡｔ	１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール
ＨＯＢｔ	１－ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＷＳＣＩ・ＨＣＩ	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
ＴＢＭＥ	ｔ－ブチルメチルエーテル
ＴＩＰＳ	トリイソプロピルシラン
ＨＡＴＵ	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リン酸塩

[0130] また、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（渡辺化学、和光純薬から購入）を用いた。例えばＤＣＭ、ＤＭＦ、ＮＭＰ、２％ＤＢＵ ｉｎ ＤＭＦ、２０％ピペリジン 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、超脱水溶媒、無水溶媒（関東化学、和光純薬などから購入）を用いた。

[0131] ＬＣＭＳの分析条件は、表１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
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O 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_2O 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_2O 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_2O 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

[0132] 実施例１．Ｎ－メチルアミノ酸を配列中に含む環状ペプチドの基本合成ルート

Ｎ－メチルアミノ酸を配列中に含む環状ペプチドの合成は、Ｆｍｏｃ法による固相合成を採用し、以下の５段階の工程による図１に記載の合成ルートで行った。

Ａ）ペプチド合成機を用いＦｍｏｃ法によって、その側鎖のカルボン酸を２－クロロトリチルレジンに担持させたＡｓｐのＮ末端からペプチドを伸長する工程

Ｂ）２－クロロトリチルレジンからペプチドを切り出す工程

Ｃ）切り出したペプチドのＡｓｐの側鎖のカルボン酸（白丸ユニット）と、ペプチド鎖Ｎ末端（三角ユニット）のアミノ基とを縮合し、アミド結合によって環化する工程

Ｄ）ペプチド鎖に含まれる側鎖官能基の保護基を脱保護する工程

Ｅ）分取ＨＰＬＣによって化合物を精製する工程。

[0133] 本実施例においては、特に記述がない限り、この基本合成ルートに基づいて環状ペプチドの合成を行った。

[0134] ペプチド合成機によるペプチド合成に用いるＦｍｏｃ－アミノ酸

本実施例に記載するペプチド合成において、ペプチド合成機による合成（前記工程Ａ）には、以下のＦｍｏｃ－アミノ酸を用いた。

[0135] Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-D-Tyr(Clt)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-

MeGly-OH、Fmoc-MeLeu-OH、Fmoc-Phe(4-CF3)-OH、Fmoc-b-Ala-OH、Fmoc-b-MeAla-OH、Fmoc-Nle-OH、Fmoc-Met(O2)-OH、Fmoc-Phe(3-Cl)-OH、Fmoc-MeVal、およびFmoc-Val-OH。

これらは渡辺化学、Chempep社、またはChem-Impex社などから購入した。

[0136] Fmoc-MeSer(DMT)-OH、Fmoc-MePhe(3-Cl)-OH、Fmoc-MeAla(4-Thz)-OH、Fmoc-Hyp(Et)-OH、およびFmoc-γEtAbu-OH、Fmoc-nPrGly-OH。

これらは、文献記載の方法にて合成した（文献：国際公開番号 WO 2013/100132 A1）。

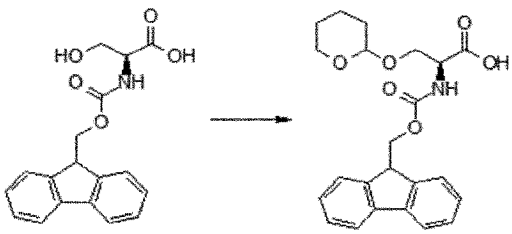
[0137] Fmoc-Ser(THP)-OH（化合物１）、Fmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）、Fmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）、Fmoc-MeHis(Trt)-OH（化合物７）、Fmoc-D-Tyr(THP)-OH（化合物８）、Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH（化合物１１）、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH（化合物１３）、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH（化合物１６）、およびFmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH（化合物２２）。

これらは以下のとおり合成した。なお、これらの合成したＦｍｏｃ－アミノ酸は、ペプチド合成だけでなく、側鎖官能基の保護基もしくはＣ末端カルボン酸基の保護基の脱保護検討にも用いた。

[0138] 実施例１－１：

(2S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸（化合物１、Fmoc-Ser(THP)-OH）の合成

[化33]



化合物１

(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（Fmoc-Ser-OH、渡辺化学より購入、1.0g, 3.06mmol）とp-ト

ルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS、0.038 g, 0.153 mmol）の混合物にトルエン（10 mL）を加えて、減圧下トルエンを留去することで共沸により含まれている水分を除去した。得られた残渣に超脱水テトラヒドロフラン（THF、6.1 mL）と3,4-ジヒドロ-2H-ピラン（1.9 mL, 21.3 mmol）を加え、窒素雰囲気下、５０度にて４時間撹拌した。LCMS（SQDFA05）にて原料の消失を確認後、混合物を２５度まで冷却し、酢酸エチル（6 mL）を加えた。続いて飽和塩化ナトリウム水溶液（6 mL）を加えて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル（6 mL）で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和塩化ナトリウム水溶液（6 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去した。

得られた残渣をテトラヒドロフラン（THF、12.2 mL）に溶解させ、次いでpH 8.0に調製した1.0 M リン酸緩衝液（12.2 mL）を加えた。この混合物を５０度で３時間撹拌した。２５度まで冷却した後、酢酸エチル（12.2 mL）を加え、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル（12.2 mL）を加えて抽出を行った後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（12.2 mL）で２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプにて減圧下、２５度で３０分乾燥させた。

得られた残渣をジクロロメタン（7 mL）に溶解させ、次いでヘプタン（16.6 mL）を加えた。制御した減圧下（～100 hPa）、ジクロロメタンのみを留去し、得られた混合物をろ過して固体を得た。このヘプタンでの洗浄操作を２度繰り返した。得られた固体をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させ、1.40 gの残渣を得た。

得られた残渣にt-ブチルメチルエーテル（TBME、25 mL）とpH 2.1の0.05 M リン酸水溶液（70 mL）を加えて、２５度にて５分間撹拌した後、有機層と水層を分離した。水層にt-ブチルメチルエーテル（TBME、25 mL）を加えて抽出した後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（25 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。残渣をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させることで、(

2S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸（化合物１、Fmoc-Ser(THP)-OH、1.22 g, 30 mol%のt-ブチルメチルエーテル（TBME）が残留）を得た。得られたFmoc-Ser(THP)-OHは－２５度の冷凍庫にて保存した。

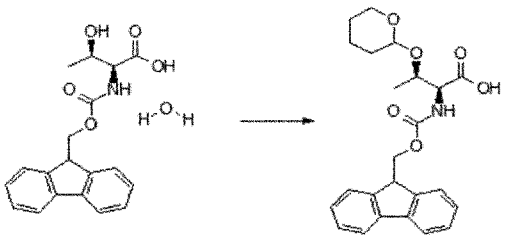
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４１０．２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0139] 実施例１－２：

(2S,3R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ブタン酸（化合物２、Fmoc-Thr(THP)-OH）の合成

[化34]



化合物２

(2S,3R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヒドロキシブタン酸 一水和物（Fmoc-Thr-OHの一水和物、東京化成より購入、5.0 g, 13.9 mmol）とp-トルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS、0.175 g, 0.70 mmol）の混合物にトルエン（50 mL）を加えて、減圧下トルエンを留去することで共沸により含まれている水分を除去した。得られた残渣に超脱水テトラヒドロフラン（THF、28 mL）と3,4-ジヒドロ-2H-ピラン（8.8 mL, 97 mmol）を加え、窒素雰囲気下、５０度にて４時間攪拌した。LCMS（SQDFA05）にて原料の消失を確認後、混合物を２５度まで冷却し、酢酸エチル（30 mL）を加えた。続いて飽和塩化ナトリウム水溶液（30 mL）を加えて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル（30 mL）で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和塩化ナトリウム水溶液（30 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去し、粗生成物を9.3 g得た。

得られた粗生成物のうち、4.65 gをテトラヒドロフラン（THF、30 mL）に溶解させ、次いでpH 8.0に調製した1.0 M リン酸緩衝液（30 mL）を加えた。この混合物を５０度で４時間攪拌した。２５度まで冷却した後、酢酸エチル（30 mL）を加え、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル（30 mL）を加えて抽出を行った後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（30 mL）で２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプにて減圧下、２５度で３０分乾燥させた。

得られた残渣をジエチルエーテル（50 mL）に溶解させ、次いでヘプタン（50 mL）を加えた。制御した減圧下（～100 hPa）、ジエチルエーテルのみを留去し、得られた混合物をろ過して固体を得た。このヘプタンでの洗浄操作を２度繰り返した。得られた固体をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させ、Fmoc-Thr(THP)-OHのナトリウム塩（2.80 g, 6.26 mmol）を得た。

得られた全量のFmoc-Thr(THP)-OHのナトリウム塩に酢酸エチル（50 mL）とpH 2.1の0.05 M リン酸水溶液（140 mL）を加えて、２５度にて５分間攪拌した後、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル（50 mL）を加えて抽出した後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（50 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。残渣をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させた後、得られた固体をt-ブチルメチルエーテル（TBME、50 mL）に溶解させ、溶媒を減圧下留去した。さらにポンプにて減圧下、２５度で１時間乾燥させることで、(2S,3R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ブタン酸（化合物２、Fmoc-Thr(THP)-OH、2.70 g, 30mol%のt-ブチルメチルエーテル（TBME）が残留）をTHP保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマーとして得た。得られたFmoc-Thr(THP)-OHは－２５度の冷凍庫にて保存した。

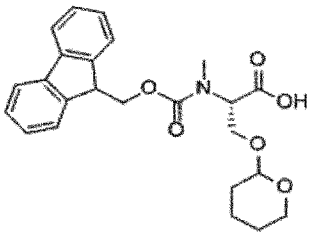
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４２４．２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：０．８４分、０．８５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0140] 実施例１－３：

(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-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸（化合物６、Fmoc-MeSer(THP)-OH）の合成

[化35]



化合物６

(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-ヒドロキシプロパン酸（Fmoc-MeSer-OH）は文献記載の方法にて合成した（文献：国際公開番号 WO 2013/100132 A1）。(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-ヒドロキシプロパン酸（Fmoc-MeSer-OH、15 g、43.9 mmol）のテトラヒドロフラン（88 mL）溶液に、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS、0.552 g, 2.197 mmol）と3,4-ジヒドロ-2H-ピラン（23.85 mL）を加え、５０度にて４時間攪拌した。混合物を２５度まで冷却し、酢酸エチル（90 mL）を加えた。続いて飽和塩化ナトリウム水溶液（90 mL）にて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル（90 mL）で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和塩化ナトリウム水溶液（90 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去した。

得られた残渣のうち、15.0 gをテトラヒドロフラン（175 mL）に溶解させ、次いでpH 8.0に調製した1.0 M リン酸緩衝液（175 mL）を加えた。この混合物を５０度で３時間攪拌した。２５度まで冷却した後、酢酸エチル（175 mL）を加え、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル（175 mL）を加えて抽出を行った後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（175 mL）で２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。

得られた残渣をジクロロメタン（100 mL）に溶解させ、次いでヘプタン（250 mL）を加えた。制御した減圧下（～100 hPa）、ジクロロメタンのみを留去し、得られた混合物をろ過して固体を得た。このヘプタンでの洗浄操作を２度繰り返した。得られた固体をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させた。

得られた残渣にt-ブチルメチルエーテル（TBME、250 mL）とpH 2.1の0.05 M リン酸水溶液（700 mL）を加えて、２５度にて５分間攪拌した後、有機層と水層を分離した。水層にt-ブチルメチルエーテル（TBME、250 mL）を加えて抽出した後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液（250 mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。残渣をポンプにて減圧下、２５度で２時間乾燥させることで、(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-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸（化合物６、Fmoc-MeSer(THP)-OH、9.0 g、30mol%のt-ブチルメチルエーテル（TBME）が残留）を得た。得られたFmoc-MeSer(THP)-OHは－２５度の冷凍庫にて保存した。

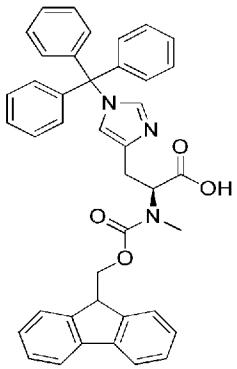
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４２６．４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８６分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0141] 実施例１－４：

(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-(1-トリチル-1H-イミダゾール-4-イル)プロパン酸（化合物７、Fmoc-MeHis(Trt)-OH）の合成

[化36]



化合物７

3000 mLのフラスコに、(S)-3-(1H-イミダゾール-4-イル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 塩酸塩（75 g、364.71 mmol）のジクロロメタン（1000 mL）溶液とジクロロジメチルシラン（51 g, 395.16 mmol）、トリエチルアミン（40 g, 395.30 mmol）を加えた。続いて、(クロロメタントリイル)トリベンゼン（Trt-Cl、111 g、398.17 mmol）のジクロロメタン（500 mL）溶液とトリエチルアミン（40 g, 395.30 mmol）を加えた。得られた反応溶液を加熱還流下、４時間攪拌し、さらに２０度にて２時間攪拌した。反応溶液にメタノールを加えて反応を停止し、続いて減圧下、溶媒を留去した。トリエチルアミンでpHを８～８．５とし、125 gの固体を得た。

得られた固体に1,4-ジオキサン（1000 mL）、炭酸カリウム（84 g、603.39 mmol）、水（1000 mL）を加えた。さらに炭酸（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（Fmoc-OSu、102 g、302.38 mmol）を加えて、０度にて２時間攪拌した。得られた反応溶液をジエチルエーテル（2000 mL）にて洗浄した後、酢酸を用いて溶液のpHを６～７に調整した。得られた固体をろ過することで、(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-(1-トリチル-1H-イミダゾール-4-イル)プロパン酸（化合物７、Fmoc-MeHis(Trt)-OH、155 g）を得た。

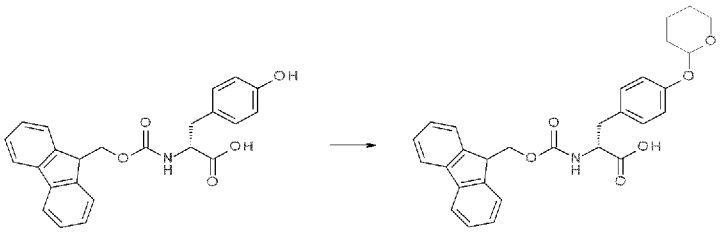
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝６３４．４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：１．０７分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0142] 実施例１－５：

(2R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（化合物８、Fmoc-D-Tyr(THP)-OH）の合成

[化37]



化合物８

(R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸（Fmoc-D-Tyr-OH, 渡辺化学より購入, 500 mg, 1.24 mmol)と触媒量のパラトルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS, 15.6 mg, 0.062 mmol)にトルエン（5.0 mL)を加え、減圧下トルエンを留去することで共沸により含まれている水分を除去した。得られた残渣をテトラヒドロフラン（THF）(2.5 mL)に溶解させ、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン（785 μL, 8.68 mmol）を加え、窒素雰囲気下、50度にて4時間攪拌した。反応液を25度に冷却し、酢酸エチル（3 mL）を加えた。続いて飽和食塩水（3 mL）を加えて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル(3 mL）で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和食塩水（3mL）にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで減圧下乾燥させ596mgの残渣を得た。

得られた残渣（300 mg)をテトラヒドロフラン（THF）（2.5 mL）に溶解させ、1.0 Mのリン酸水溶液（pH 8.0, 2.5 mL)を加えて50度で3時間攪拌した。反応液に酢酸エチル(3 mL)を加え、有機層と水層を分離し、水層を酢酸エチル（3 mL)で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、飽和食塩水（3 mL）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、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで減圧下30分乾燥させた。

得られた残渣をジクロロメタン（DCM）(2 mL)に溶解させ、ヘプタン（5 mL

)を加えた。ジクロロメタン（DCM)のみをエバポレーターにより除去し、得られた白色固体をろ過により集めた。得られた白色固体に対して、同様の操作を2回繰り返した。そのようにして得られた白色固体をポンプで減圧下2時間乾燥させた。

上記の白色固体にt-ブチルメチルエーテル（TBME）(4.6 mL)と0.05 Mリン酸水溶液（pH 2.1, 13 mL)を加え、25度で5分撹拌した。有機層を分離した後、水層をt-ブチルメチルエーテル（TBME）(4.6 mL)で抽出した。得られた有機層を集め、飽和食塩水（4.6 mL)で2回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣を逆相クロマトグラフィー(Wakosil 25C18 10 g, 水／アセトニトリル)により精製することで(2R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（化合物８、Fmoc-D-Tyr(THP)-OH, 173 mg）をTHP保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマーとして57%の収率で得た。

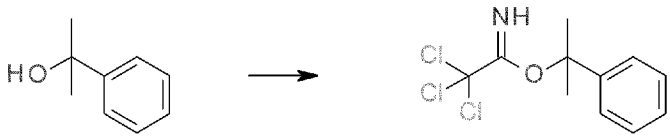
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４８８．４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．９２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0143] 実施例１－６：

2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物９)の合成

[化38]



化合物９

2-フェニルプロパン-2-オール（Wako社より購入, 2.0 g, 14.7 mmol)のジエチルエーテル(Et_2O)溶液(4.8 mL)に1.9 M NaHMDSのテトラヒドロフラン(THF)溶液(850 μL, 1.62 mmol)を滴下により22度で加えた。反応液を同じ温度で20分撹拌した後、0度に冷却し、2,2,2-トリクロロアセトニトリル（1.47 mL,

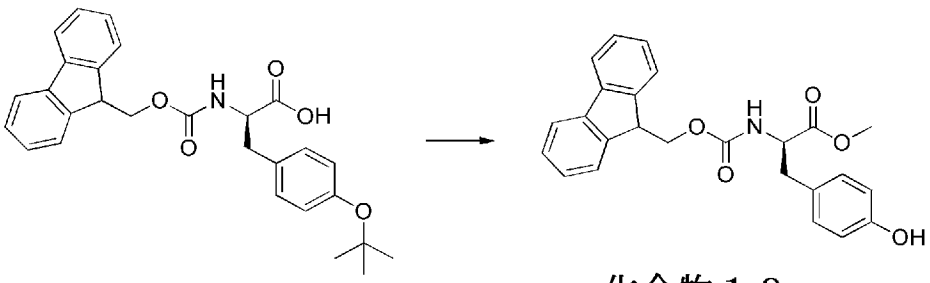
14.7 mmol)を滴下しながら加えた。反応液を0度で10分攪拌した後、15度に昇温し、さらに1時間攪拌した。反応液をエバポレーターにより濃縮し、得られた残渣にヘキサン（1.8 mL)とメタノール（65 μL)を加え15度で15分攪拌した。得られた固体をろ過し、ヘキサン（2.0 mL)で3回洗浄し、2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物９)を4.19 g得た。更なる精製はせずにこのまま反応に用いた。

^{1}H NMR (Varian 400-MR, 400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.89 (6H, s), 7.28 (1H, m), 7.36 (2H, m), 7.43 (2H, m), 8.20 (1H, brs)

[0144] 実施例１－７：

2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (R)-メチル（化合物１０、Fmoc-D-Tyr-OMe）の合成

[化39]



化合物１０

窒素雰囲気下、(R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-(tert-ブトキシ)フェニル)プロパン酸（Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH、渡辺化学より購入、5.0 g、10.88 mmol）とメタノール（8.80 mL、218 mmol）の混合物に塩化チオニル（1.59 mL、21.76 mmol）を０度にて滴下した。得られた反応溶液を２５度にて３時間攪拌し、続いて減圧下、溶媒を留去した。得られた残渣を酢酸エチルに溶解させ、溶液を飽和塩化ナトリウム水溶液にて２度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、ろ過にて固体を取り除き、減圧下、溶媒を留去し、2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (R)-メチル（化合物１０、Fmoc-D-Tyr-OMe、4.50 g）を得た。

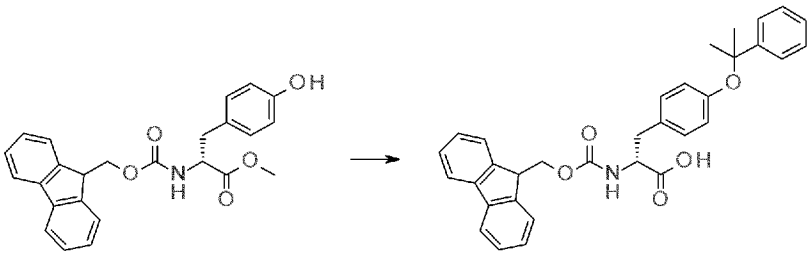
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４１８．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．８１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0145] 実施例１－８：

(R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（化合物１１，Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH）の合成

[化40]



化合物１０　　化合物１１

2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (R)-メチル（化合物１０、Fmoc-D-Tyr-OMe, 100 mg, 0.24 mmol）のテトラヒドロフラン(THF)溶液(240 μL)に別途調整した10M 2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物９)のシクロヘキサン溶液（60 μL)と触媒量のボロントリフルオリド―エチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 4.55 μL, 0.036 mmol）を0度にて滴下しながら加えた。反応液を25度で1時間攪拌した後、同量の10M 2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物９)のシクロヘキサン溶液（60 μL)とボロントリフルオリド―エチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 4.55 μL, 0.036 mmol）を再び加え、反応液を25度でさらに30分攪拌した。反応液をジクロロメタン(DCM)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出後、飽和食塩水で有機層を洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣にジクロロメタン(DCM)/ヘキサン = 1/1の溶液を加え、ろ過により沈殿物を除去した。ろ液をエバポレーターにより濃縮し、得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(purif pack（登録商標） SIZE 20, ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、混合物として2-((((9H-フルオレ

ン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸 (R)-メチル (Fmoc-D-Tyr(Pis)-OMe) を得た。

上述の得られた混合物をジクロロエタン(DCE) (535 μL)に溶解させ、水酸化トリメチルスズ(IV) (Me_3SnOH, 58.1 mg, 0.321 mmol)を加え、60度で7時間攪拌した。反応液に水酸化トリメチルスズ(IV) (Me_3SnOH, 29.1 mg, 0.161 mmol)をさらに加え、60度で15時間攪拌した。反応液をエバポレーターにより濃縮し、t-ブチルメチルエーテル (TBME、1 mL)と0.05 Mリン酸水溶液 (pH 2.1, 2 mL)を加え、25度で5分攪拌した。有機層を分離した後、水層をt-ブチルメチルエーテル (TBME、1 mL)で2回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(purif pack (登録商標) SIZE 20, ジクロロメタン／メタノール)で精製し、(R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸 (化合物１１, Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH, 33 mg)を2段階収率39%で得た。

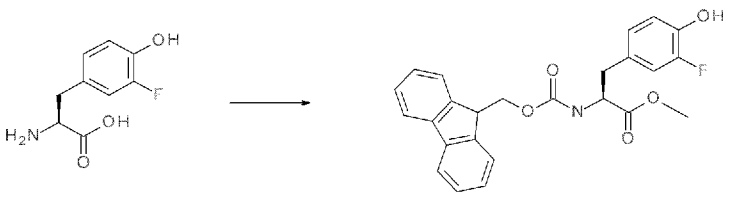
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５２２．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：１．００分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0146] 実施例１－９：

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-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (S)-メチル (化合物１２、Fmoc-Tyr(3-F)-OMe) の合成

[化41]



化合物１２

(S)-2-アミノ-3-(3-フルオロ-4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (H_2N-Tyr(3-F)-OH, Astatech社より購入、2.0 g, 10.0 mmol)を10% 炭酸ナトリウム水

溶液に溶かした後、滴下ロートで、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（Fmoc-OSu, 3.39 g, 10.0 mmol)の1.4-ジオキサン（35 mL)の溶液を0度で添加した。反応液を25度で40分攪拌した後、水(35 mL)、ジエチルエーテル(70 mL)を加え、ジエチルエーテルで3回洗浄した。5N 塩酸水溶液で水層のpHを2～3に調整した後、酢酸エチルで３回抽出（100 mL×3）した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。更なる精製はせずに得られた残渣（4.08 g）をそのまま次の反応に用いた。

上記の残渣(1.04 g)をメタノール(10 mL)に溶かし、チオニルクロライド($SOCl_2$, 539 μL, 7.38 mmol)を滴下しながら0度で加えた。反応液を60度で1時間攪拌した後、室温に冷却し、エバポレーターを用いて溶媒を留去した。得られた残渣に酢酸エチル、水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(purif pack（登録商標） SIZE 200, ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(3-フルオロ-4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸（S)-メチル（化合物１２、Fmoc-Tyr(3-F)-OMe, 900mg, 2.07 mmol)を2段階収率84%で得た。

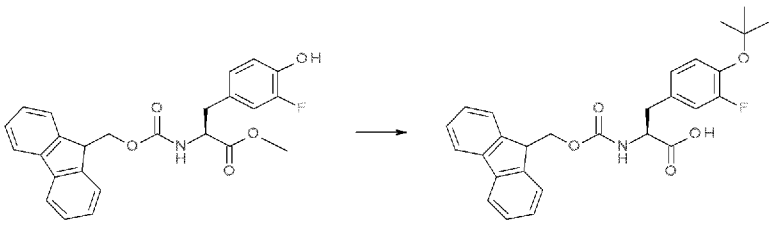
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４３６．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．８２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0147] 実施例１－１０：

(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-(tert-ブトキシ)-3-フルオロフェニル)プロパン酸（化合物１３、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH）の合成

[化42]



化合物１２　　化合物１３

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-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (S)-メチル（化合物１２、Fmoc-Tyr(3-F)-OMe, 300 mg, 0.689 mmol）のテトラヒドロフラン(THF)溶液(690 μL)に2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 tert-ブチル（308 μL, 1.72 mmol)と触媒量のボロントリフルオリド―エチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 13.1 μL, 0.103 mmol）を0度にて滴下しながら加えた。反応液を25度で1時間攪拌した後、同量の2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 tert-ブチル（308 μL, 1.72 mmol)とボロントリフルオリドーエチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 13.1 μL, 0.103 mmol）を再び加え、反応液を25度でさらに1時間攪拌した。反応液をジクロロメタン(DCM)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で有機層を洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(purif pack（登録商標） SIZE 60, ヘキサン／酢酸エチル)にて精製し、混合物として2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-(tert-ブトキシ)-3-フルオロフェニル)プロパン酸 (S)-メチル (Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OMe)を得た。

上述の得られた混合物(40 mg)をジクロロエタン(DCE) (810 μL)に溶解させ、水酸化トリメチルスズ(IV) (Me_3SnOH, 29.4 mg, 0.163 mmol)を加え、60度で1時間攪拌した。反応液にギ酸（15.35 μL, 0.407 mmol)を加えた後、逆相クロマトグラフィー(Wakosil 25C18 10 g, 0.1% ギ酸水溶液／0.1% ギ酸アセトニトリル溶液)により精製することで(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)

メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-(tert-ブトキシ)-3-フルオロフェニル)プロパン酸（化合物１３、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH, 27mg, 56.5μmol）を2段階収率93%で得た。

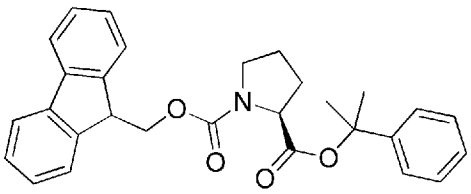
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４７８．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．９４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0148] 実施例１－１１：

ピロリジン-1,2-ジカルボン酸 2-(2-フェニルプロパン-2-イル) (S)-1-((9H-フルオレン-9-イル)メチル) （化合物１４、Fmoc-Pro-OPis）の合成

[化43]



化合物１４

2-フェニル-2-プロパノール(14.2 g, 104 mmol)と脱水ジエチルエーテル(35 mL)との混合物を、窒素雰囲気下、室温にて1.9 M NaHMDS（テトラヒドロフラン溶液、0.85 mL、1.62 mmol）を３分以上かけて滴下し、その後室温にて３０分間攪拌した。

続いて、反応液を０度に氷冷し、トリクロロアセトニトリル（11.5 mL, 115 mmol）を５分以上かけて滴下した。混合物を０度にて１０分間、その後氷浴から外して室温にてさらに１時間攪拌した。得られた混合物を０度に氷冷し、(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、42.3 g, 125 mmol）とジクロロメタン（100 mL）との混合物を１５分かけて加えた。０度にて３０分攪拌した後、ろ過し、ヘキサン－ジクロロメタン（5/1）溶液にて洗浄し、続いて減圧下、溶媒を留去した。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）にて精製し、ピロリジン-1,2-ジカルボン酸 2-(2-フェニルプロパン-2-イル) (S)-1-((9H-フルオレン-9-イル)メチル) （化合物１４、Fmoc-Pro-

OPis、26.3 g, 57.7 mmol）を得た。

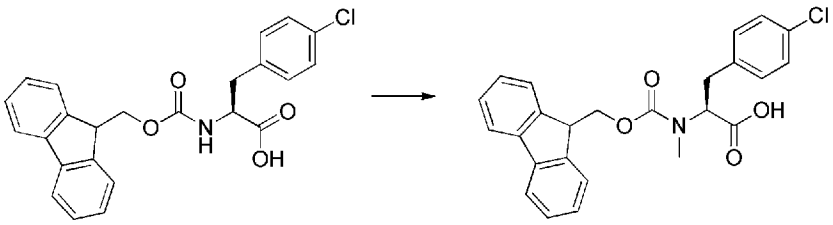
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４５６．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７６分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0149] 実施例１－１２：

(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-(4-クロロフェニル)プロパン酸（化合物１６、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH）の合成

[化44]



化合物１６

(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(4-クロロフェニル)プロパン酸（Fmoc-Phe(4-Cl)-OH、170 g、402.96 mmol）のトルエン（2.5 L）溶液にパラホルムアルデヒド（48 g、1.60 mol）と10-カンファスルホン酸（CSA、4.6 g、19.83 mmol）を加え、１１０度にて１６時間攪拌した。続いて反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（1 L）にて２回、飽和塩化ナトリウム水溶液（1 L）にて２回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、固体をろ過にて取り除き、減圧下、溶媒を留去して160 gの4-(4-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)メチルを得た。

同様の操作にて調製した別ロットと混合した4-(4-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（230 g、530.10 mmol）のジクロロメタン（2.5 L）溶液にトリエチルシラン（881 g、7.58 mol）とトリフルオロ酢酸（TFA、2518 g、22.28 mol）を混合し、３０度にて１２時間攪拌した。続いて減圧下、溶媒を留去し、得られた残渣をジクロロメタン／ヘキサン（1/10, v/v）にて再結晶することにより、(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-(4-ク

ロロフェニル)プロパン酸（化合物１６、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH、205 g）を得た。

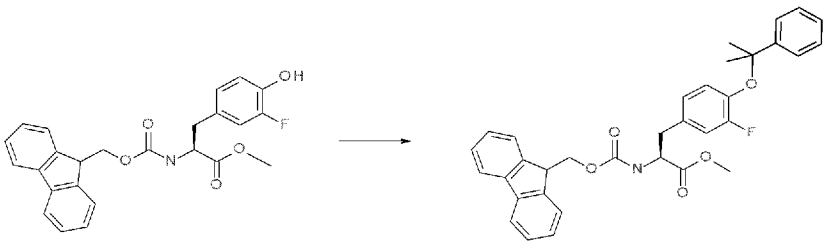
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４３６．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．９９分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0150] 実施例１－１３：

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-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸 (S)-メチル（化合物２１、Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OMe）の合成

[化45]



化合物１２　　化合物２１

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-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (S)-メチル（化合物１２、Fmoc-Tyr(3-F)-OMe、200 mg, 0.459 mmol）をTHF(460 μL)に溶かした後、別途調整した2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物９、322 mg, 1.15 mmol)と触媒量のボロントリフルオリド－エチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 8.73 μL, 0.069 mmol）を0度にて滴下しながら加えた。反応液を室温にて30分攪拌後、同量の2,2,2-トリクロロアセトイミド酸 2-フェニルプロパン-2-イル(322 mg, 1.15 mmol)と触媒量のボロントリフルオリドーエチルエーテル コンプレックス（BF_3-OEt, 8.73 μL, 0.069 mmol）を0度にて滴下しながら加えた。反応液を室温にて30分さらに攪拌した後、反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を氷冷下加えた。ジクロロメタンで抽出後、飽和食塩水で有機層を洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣をジクロロメタン/ヘキサン＝1/1（20mL, 10mL）で2回洗浄し

、白色固体をろ過により除いた。得られたろ液を濃縮し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(purif pack（登録商標） SIZE 20, ヘキサン／酢酸エチル, 0.1% ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）)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-(3-フルオロ-4-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（S)-メチル（化合物２１、Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OMe、210 mg, 0.379 mmol）を83%の収率で得た。

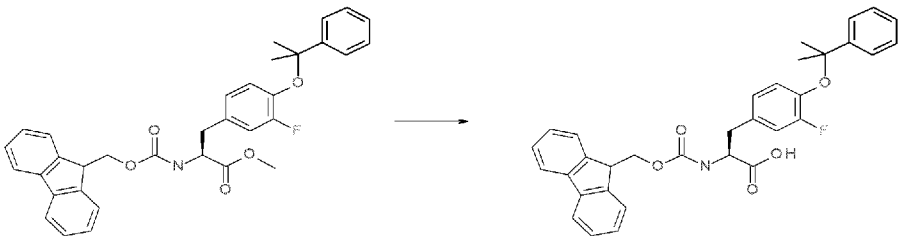
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５５４．４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：１．０９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0151] 実施例１－１４：

(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-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（化合物２２、Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH）の合成

[化46]



化合物２１ 化合物２２

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-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（S)-メチル（化合物２１、Fmoc-Tyr(3-F, Pis)-OMe、210 mg, 0.379 mmol）をジクロロエタン(DCE)（1.26 mL)に溶解させ、水酸化トリメチルスズ(IV)（Me_3SnOH, 137 mg, 0.379 mmol)を加え、60度で3時間攪拌した。反応液をエバポレーターにより濃縮し、t-ブチルメチルエーテル（TBME、2.0 mL)と0.05 Mリン酸水溶液（pH 2.1, 4.0 mL)を加え、25度で15分攪拌した。有機層を分離した後、水層をt-ブチルメチルエーテル（TBME 、1mL）で2回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプで乾燥させた。得られた残渣を0.1% ギ酸アセトニトリル溶液で溶かし、15分攪拌した後、得られ

た溶液を逆相クロマトグラフィー(Wakosil 25C18 30 g, 0.1% ギ酸水溶液／0.1% ギ酸アセトニトリル)により精製することで(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(3-フルオロ-4-((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸（化合物２２、Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH、190 mg, 0.352 mmol）を収率93%で得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５３８．２（Ｍ－Ｈ）－

保持時間：１．００分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

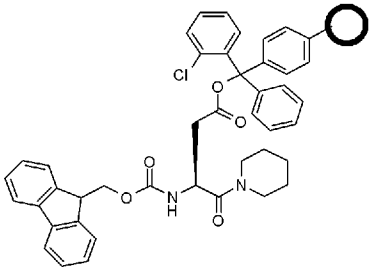
[0152] ペプチド合成機によるペプチド合成に用いるレジンとFmoc-アミノ酸との結合体の合成

ペプチド合成機によるペプチド合成に用いるレジンとFmoc-アミノ酸との結合体は、以下のとおり合成した。

[0153] 実施例１－１５：

(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５０、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip）の合成

[化47]



化合物５０

(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５０、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip）は、文献記載の方法にて合成した（文献：国際公開番号 WO 2013/100132 A1）。

[0154] 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〇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、〇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

。例えば、上記の構造（Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０））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。なお、pipとはピペリジンを意味し、上記の構造ではC末端のカルボン酸基がピペリジンとアミド結合を形成している。

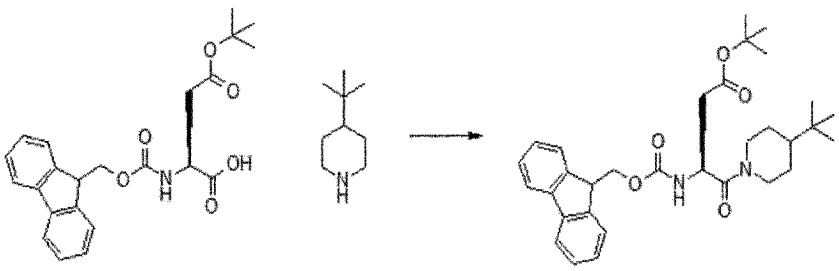
[0155] 実施例１－１６

Fmoc-Asp-piptBu（化合物５１）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５２）の合成

[0156] 実施例１－１６－１：

3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(4-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸（S)-tert-ブチル（化合物５３、Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu）の合成（なお、piptBuとは4-(tert-ブチル)ピペリジンを意味し、ここではC末端のカルボン酸基が4-(tert-ブチル)ピペリジンとアミド結合を形成していることを示している。）

[化48]



化合物５３

(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（10 g、24.30 mmol）と4-(tert-ブチル)ピペリジン塩酸塩（4.10 g、23.09 mmol）と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（HOBt、3.61 g）をDMF（80 mL）に溶解し、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、5.59 g）を加え、０度にて３０分間攪拌した。続いて、4-メチルモルホリン（2.54 mL）を加え、室温にて１時間攪拌した。反応溶液にヘキサン-酢酸エチル（1/1, v/v, 500 mL）を加え、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液で２回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で２回、飽和塩化ナトリウム水溶液で１回洗浄した。得

られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、固体をろ過にて取り除き、減圧下、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（移動層：ヘキサン－酢酸エチル）にて精製し、3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(4-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸 (S)-tert-ブチル（化合物５３、Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu、11.5 g、21.51 mmol）を得た。

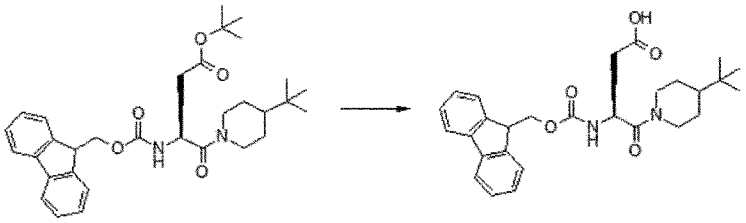
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５３５．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：１．１７分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0157] 実施例１－１６－２：

(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-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸（化合物５１、Fmoc-Asp-piptBu）の合成

[化49]



化合物５３　　化合物５１

3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(4-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸 (S)-tert-ブチル（化合物５３、Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu、2.0 g、3.74 mmol）にトルエンを加え、減圧下、溶媒を留去することで、共沸によって含まれる水を取り除いた。得られた残渣をジクロロメタン（1.66 mL）に溶解し、カールフィッシャー測定にて、含まれる水分量が110 ppmであることを確認した。続いて、０度にて５分間攪拌し、トリフルオロ酢酸（TFA、1.66 mL）を０度にて滴下し、５分間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、４時間攪拌を続けた。混合物を０度に冷却し、トリエチルアミン（3.1 mL）を滴下した。混合物をジクロロメタン（30 mL）にて希釈し、５％りん酸二水素ナトリウム水溶液（5% NaH_2PO_4aq、pH 4.4）に

て洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、固体をろ過にて取り除いた後に、減圧下、２０度にて溶媒を留去した。得られた残渣を^{19}FNMR測定（DMSO-d6）し、TFAの残留が確認されたため、残渣を再びジクロロメタン（30 mL）にて希釈し、５％りん酸二水素ナトリウム水溶液（5% NaH_2PO_4aq、pH 4.4）にて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、固体をろ過にて取り除いた後に、減圧下、２０度にて溶媒を留去し、(S)-3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(4-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸（化合物５１、Fmoc-Asp-piptBu、1.73 g）を得た。^{19}FNMRにてTFAの残留が検出限界以下であることを確認した。

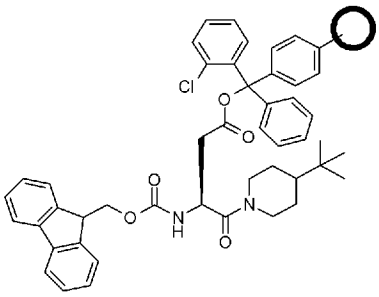
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４７９．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：１．００分（分析条件ＳＱＤＡＡ０５）

[0158] 実施例１－１６－３：

(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-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５２、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-piptBu）の合成

[化50]



化合物５２

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（1.60 mmol/g, 100-200mesh, 1%DVB, 渡辺化学から購入、4.52 g, 7.23 mmol）と脱水ジクロロメタン（72 mL）を入れ２５度にて１０分間振とうした。窒素圧をかけて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-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸（化合物５１、Fmoc-Asp-piptBu、1.73 g）と脱水ジクロロメタン（72 m

L）に脱水メタノール（1.17 mL, ）およびジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 3.02 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、１５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（72 mL）に脱水メタノール（9.0 mL）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 3.02 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、９０分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタンを入れ、５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた。このジクロロメタンでのレジンの洗浄を５回繰り返し、得られたレジンを減圧下で一晩乾燥させ、(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-(tert-ブチル)ピペリジン-1-イル)-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５２、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-piptBu、5.23 g）を得た。

得られたFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-piptBu（化合物５２、16.5 mg）を反応容器に入れ、２０％ピペリジン／DMF溶液（1 mL)を加え、２５度にて３０分間振とうした。反応混合液から30 μLを取りだし、これをDMF（2.97 mL）で希釈し、その吸光度(301.2 nm)を測定し（Shimadzu, UV-1600PC（セル長1.0 cm）を用いて測定）、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-piptBu（化合物５２）のローディング量を0.356 mmol/gと算出した。

なお、同様に合成したローディング量が異なる別ロットについてもペプチド合成に使用した。

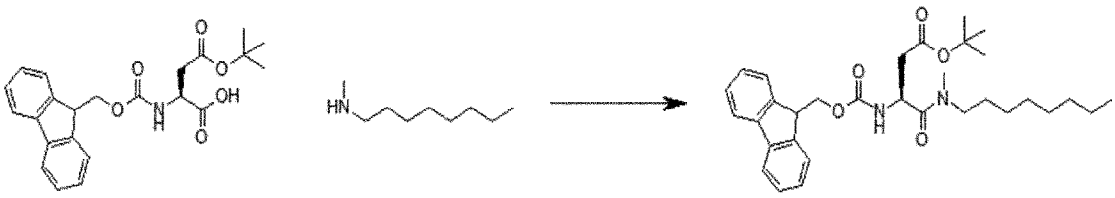
[0159] 実施例１－１７：

Fmoc-Asp-MeOctyl（化合物５４）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５５）の合成

[0160] 実施例１－１７－１：

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(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 (S)-tert-ブチル（化合物５６、Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl）の合成（なお、MeOctylとはN-メチルオクタン-1-アミンを意味し、ここではC末端のカルボン酸基がN-メチルオクタン-1-アミンとアミド結合を形成していることを示している。）

[化51]



化合物５６

300 mLのフラスコに(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（Fmoc-Asp(OtBu)-OH、8.00 g、19.44 mmol）とDMF（65 mL）を加えて室温にて５分間攪拌した。続いて4-メチルモルホリン（2.57 mL）と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 ヘキサフルオロリン酸塩（HATU、8.87 g、23.33 mmol）を加えて、０度にて５分間攪拌した。さらに、N-メチルオクタン-1-アミン（3.35 mL、18.47 mmol）を２分間かけて滴下し、得られた反応溶液を０度にて３０分間攪拌した。この反応溶液に、ヘキサン－酢酸エチル（1/1, v/v, 400 mL）を加え、水（400 mL）、飽和塩化アンモニウム水溶液（400 mL）、50%炭酸水素ナトリウム水溶液（400 mL）、水（400 mL×2）、飽和塩化ナトリウム水溶液（400 mL）にて洗浄した。得られた有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、固体を取り除き、減圧下、溶媒を留去した。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）にて精製し、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(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 (S)-tert-ブチル（化合物５６、Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl、10.2 g、19.00 mmol）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５３７．５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８４分（分析条件ＳＱＤＦＡ５０）

[0161] 実施例１－１７－２：

(S)-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(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸（化合物５４、Fmoc-Asp-MeOctyl）の合成

[化52]



化合物５６ 化合物５４

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(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 (S)-tert-ブチル（化合物５６、Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl、8.1 g、15.09 mmol）にトルエンを加え、減圧下、溶媒を留去することで、共沸によって含まれる水を取り除いた。得られた残渣にジクロロメタン（脱水、6.7 mL）に溶解し、カールフィッシャー測定にて、含まれる水分量が380 ppmであることを確認した。続いて、０度にて５分間攪拌し、トリフルオロ酢酸（TFA、6.7 mL）を０度にて５分間かけて滴下し、その後５分間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、４時間攪拌を続けた。混合物を０度に冷却し、トリエチルアミン（12.62 mL）を滴下した。混合物をジクロロメタン（100 mL）にて希釈し、５％りん酸二水素ナトリウム水溶液（5% NaH_2PO_4aq）にて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、固体をろ過にて取り除いた後に、減圧下、２０度にて溶媒を留去した。得られた残渣を^{19}FNMR測定（DMSO-d6）し、TFAの残留が確認されたため、残渣を再びジクロロメタンに溶解し、５％りん酸二水素ナトリウム水溶液（5% NaH_2PO_4aq）にて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、固体をろ過にて取り除いた後に、減圧下、２０度にて溶媒を留去し、(S)-3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(メチル(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸（化合物５４、Fmoc-Asp-MeOctyl、6.61 g、13.75 mmol）を得た。^{19}FNMRにてTFAの残留が検出限界以下であることを確認した。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４８１．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

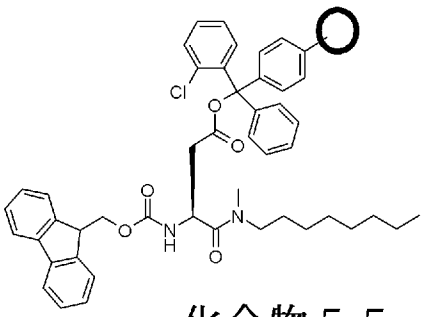
保持時間：０．６５分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0162] 実施例１－１７－３：

(S)-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(

オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５５、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-MeOctyl）の合成

[化53]



化合物５５

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（1.60 mmol/g, 100-200mesh, 1%DVB, 渡辺化学から購入、16.3 g, 26.1 mmol）と脱水ジクロロメタン（261 mL）を入れ２５度にて１０分間振とうした。窒素圧をかけて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-(メチル(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸（化合物５４、Fmoc-Asp-MeOctyl、6.28 g、13.07 mmol）と脱水ジクロロメタン（261 mL）に脱水メタノール（4.23 mL, ）およびジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 10.9 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、１５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（261 mL）に脱水メタノール（32.4 mL）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 10.9 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、９０分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタン（261 mL）を入れ、５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた。このジクロロメタンでのレジンの洗浄を２回繰り返し、得られたレジンを減圧下で一晩乾燥させ、(S)-3-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(メチル(オクチル)アミノ)-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５５、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-MeOctyl、18.2 g）を得た。

ローディング量：0.366 mmol/g

なお、同様に合成したローディング量が異なる別ロットについてもペプチド

合成に使用した。

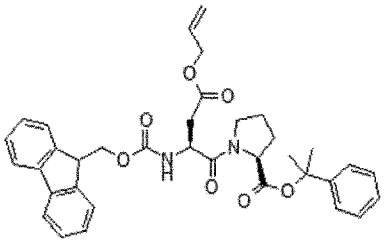
[0163] 実施例１－１８：

Fmoc-Asp-Pro-OPis（化合物５７）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５８）の合成

[0164] 実施例１－１８－１：

1-((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-オキソブタノイル)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-フェニルプロパン-2-イル（化合物５９、Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis）の合成

[化54]



化合物５９

既に記載した方法にて調製したピロリジン-1,2-ジカルボン酸 2-(2-フェニルプロパン-2-イル) (S)-1-((9H-フルオレン-9-イル)メチル)（化合物１４、Fmoc-Pro-OPis、20.0 g, 43.9 mmol)の脱水DMF（40 mL）溶液を水浴にて２０度に冷却した。これに1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU、6.57 mL, 43.9 mmol）を７分かけて滴下し、その後室温にて５分間攪拌した。続いて、反応液を０度に冷却し、ピリジン塩酸塩（5.07 g, 43.9 mmol）を加え、０度にて１０分間攪拌した。その後、(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（Fmoc-Asp(OAll)-OH、17.35 g, 43.9 mmol）、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、11.8 g, 61.4 mmol）、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール（HOAt、7.17 g, 52.7 mmol）の混合物を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、7.6 mL, 43.9 mmol）を７分かけて０度にて滴下した。反応液を室温にて２０分攪拌した。得られた反応液にヘキサン（50 mL）、ジエチルエーテル（50 mL）、飽和炭酸水素ナトリウ

ム水溶液（10 mL）、飽和塩化ナトリウム水溶液（50 mL）を加えて、水層をジエチルエーテルにて２度抽出した。得られた有機層をすべて合わせて、飽和塩化ナトリウム水溶液（50 mL）にて３度洗浄した後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下、溶媒を除き、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（移動層：ヘキサン－酢酸エチル）にて精製し、1-((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-オキソブタノイル)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-フェニルプロパン-2-イル（化合物５９、Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis 、24.5 g, 40.1 mmol）を得た。

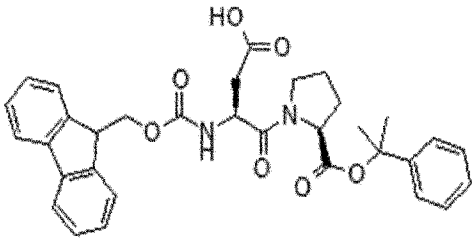
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝６１１．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：１．０３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0165] 実施例１－１８－２：

(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-((S)-2-(((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)カルボニル)ピロリジン-1-イル)ブタン酸（化合物５７、Fmoc-Asp-Pro-OPis）の合成

[化55]



化合物５７

1-((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-オキソブタノイル)ピロリジン-2-カルボン酸 (S)-2-フェニルプロパン-2-イル（化合物５９、Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis 、24.16 g, 39.6 mmol）とテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) ($Pd(PPh_3)_4$、0.114 g, 0.099 mmol）とを300 mLのふた口フラスコに入れ、フラスコ内を窒素置換した。続いてジクロロメタン（40 mL）を加え、室温にて攪拌した後、水浴にて１４度に冷却した。フェニルシラン（3.30 mL, 26.7 mmol）を５分かけて滴下し、反応液を窒素雰囲気下１４～１７度にて３５分間攪拌した。続

いて、SHシリカ（Fuji Silysia製、５ｇ）とメタノール（32.1 mL）とを加えた後、Kieselgel 60（15 g）を加えた。さらにメタノール（30 mL）、SHシリカ（Fuji Silysia製、５ｇ）、Kieselgel 60（25 g）を加え、混合物を１７～２４度にて液相が無色となるまで攪拌した。得られた混合物をセライトろ過し、ジクロロメタン－メタノール（10/1，v/v）にて洗浄し、減圧下、溶媒を留去し、(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-((S)-2-(((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)カルボニル)ピロリジン-1-イル)ブタン酸（化合物５７、Fmoc-Asp-Pro-OPis）の粗生成物（25.38 g）を得た。得られた粗生成物は精製せずに、続くレジンへの担持に用いた。

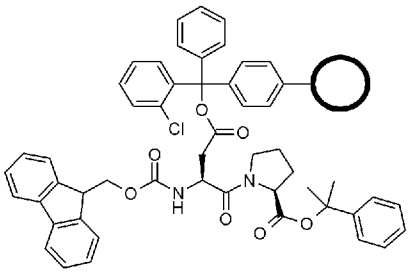
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝５７１．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．８８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0166] 実施例１－１８－３：

(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-((S)-2-(((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)カルボニル)ピロリジン-1-イル)ブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５８、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis）の合成

[化56]



化合物５８

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（1.60 mmol/g，100-200mesh，1%DVB，渡辺化学から購入、47.8 g，76.48 mmol）と脱水ジクロロメタン（150 mL）を入れ２５度にて３５分間振とうした。窒素圧をかけてジクロロメタンを除いた後、調製した(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-((S)-2-(((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)カルボニル)ピロリジン-1-イル)ブタン酸（化合物５７、Fmoc-Asp-Pro-OPis、21.94 g、38.4 mmol)の脱水ジクロロメタン（115 mL）に脱水メタノール（3.11 mL）およびジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 32.1 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、４５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（100 mL）に脱水メタノール（55 mL）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA, 25 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、９０分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタン（100 mL）を入れ、５分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた。このジクロロメタン（100 mL）でのレジンの洗浄を４回繰り返し、得られたレジンを減圧下で１５時間半乾燥させ、(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-((S)-2-(((2-フェニルプロパン-2-イル)オキシ)カルボニル)ピロリジン-1-イル)ブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物５８、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis、61.55 g）を得た。

得られたFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis（化合物５８、12.3 mg)を反応容器に入れ、DMF（0.2 mL)およびピペリジン（0.2 mL)を加え、２５度にて３０分間振とうした。反応容器にDMF（1.6mL)を加えた後、反応混合液から0.4 mLを取りだし、これをDMF（9.6 mL)で希釈し、その吸光度(301.2 nm)を測定した（Shimadzu, UV-1600PC（セル長1.0 cm）を用いて測定）。次の計算式により、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis（化合物５８）のローディング量を0.3736 mmol/gと算出した。

(吸光度(301.2 nm) ×1000×50)/(レジン重量(mg)×7800) = (0.717×1000×50)/(12.3×7800) = 0.3736 mmol/g

なお、同様に合成したローディング量が異なる別ロットについてもペプチド合成に使用した。

[0167] 実施例２．ペプチド合成機によるペプチドの化学合成（工程Ａ～工程Ｃ）

特別な記載がない限り、上記の基本合成ルートでのペプチド合成は以下の

方法にて行った。

[0168] 実施例２－１：自動合成機によるペプチド固相合成（工程Ａ）

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。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。

[0169] Ｎ末端がFmocで保護されたアスパラギン酸の側鎖のカルボン酸部位と結合した2-クロロトリチルレジン（１カラムあたり100 mg）と、各種Fmoc-アミノ酸（0.6 mol/L, Fmoc-MeHis(Trt)-OHの場合は0.5 mol/L）と1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール（HOAt）もしくはoxyma（0.375 mol/L）のNMP溶液と、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）のN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）溶液（10%v/v）とを合成機にセットした。なお、Fmoc-アミノ酸がFmoc-Ser(THP)-OH（化合物１）、Fmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）、またはFmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）である場合は、これらFmoc-アミノ酸はNMP溶液においてoxymaと共存させ、さらにモレキュラシーブス４Ａ 1/8（和光純薬工業）もしくはモレキュラシーブス４Ａ 1/16（和光純薬工業）を添加して合成機にセットした。

[0170] Fmoc脱保護溶液としてジアザビシクロウンデセン（DBU）のDMF溶液（2%v/v）を用いた。レジンをDMFにて洗浄した後、Fmoc基を脱保護し、次いで新たなFmocアミノ酸との縮合反応を行った。これを１サイクルとして、このサイクルを複数回繰り返すことでレジン表面上にペプチドを伸長させた。

[0171] 実施例２－２：伸長したペプチドのレジンからの切り出し（工程Ｂ）

上記の方法によって伸長したペプチドの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。続いてDCMにてレジンを再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM (1/1, v/v, 2 mL)を加えて室温にて２時間振とうした。続いて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、残ったレジンをさらにTFE/DCM (1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

[0172] 実施例２－３：切り出したペプチドの環化（工程Ｃ）

切り出し後に減圧下濃縮した残渣をDMF/DCM（1/1, v/v, 8 mL)に溶解した。0.5 M 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）/DMF溶液（用いたレジン上のモル数（ローディング量(mmol/g)に使用したレジン量(通常は0.10 g)をかけたもの）に対して１．５等量となる容量）と、DIPEA（用いたレジン上のモル数に対して１．８等量）を加え、室温にて２時間振とうした。その後、減圧下溶媒を留去した。目的の環状ペプチドの生成をLCMS測定によって確認した。

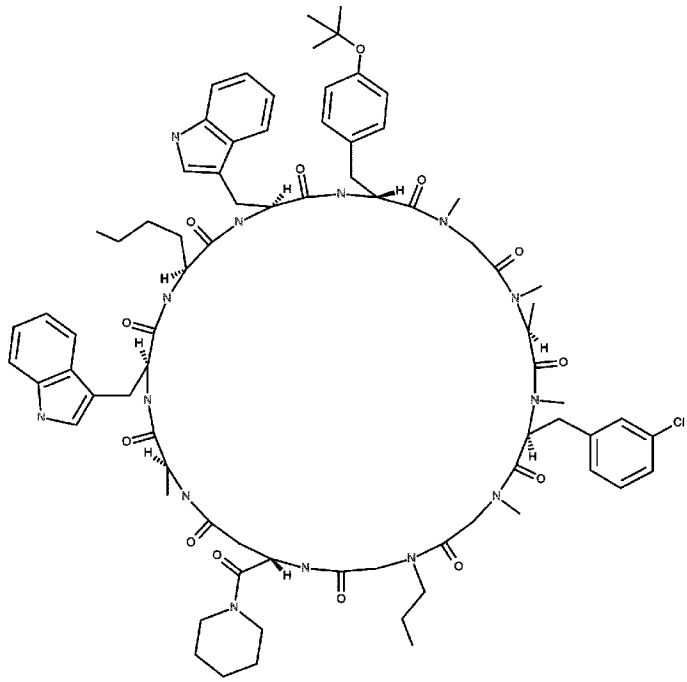
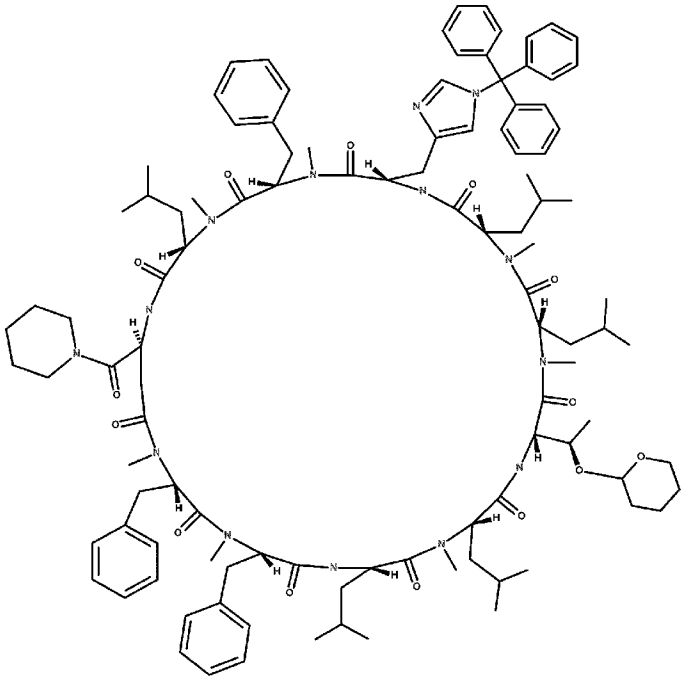
[0173] 以上の方法によって、後述する脱保護反応の検討に用いるペプチドPep1-Pep7を合成した。Pep1～Pep7の配列を表２－１に、構造を表２－２に、LCMSデータを表２－３に示す。以後で行う脱保護条件の検討（脱保護時にみられる加水分解やN→O-アシルシフトの不具合の程度、もしくは検討する溶液に共存させるペプチド）は、この過程において得られた環状ペプチドを含む残渣を用いて評価した。

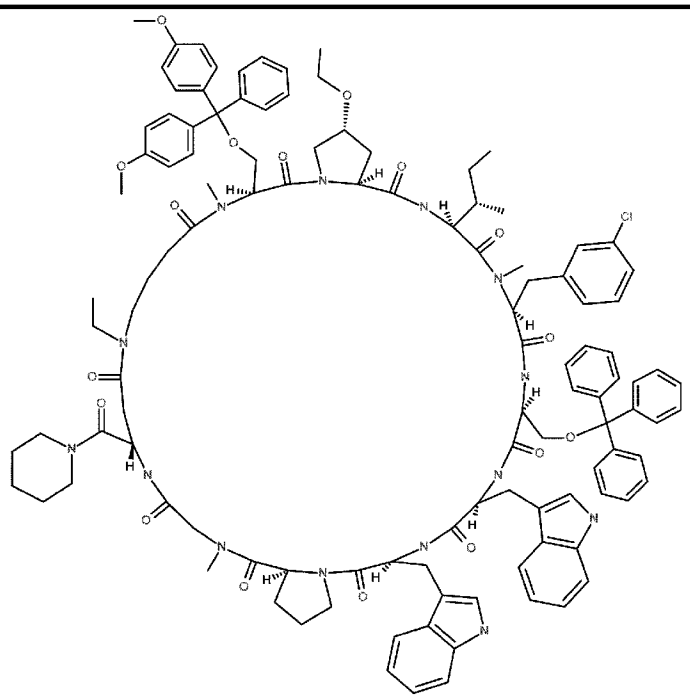
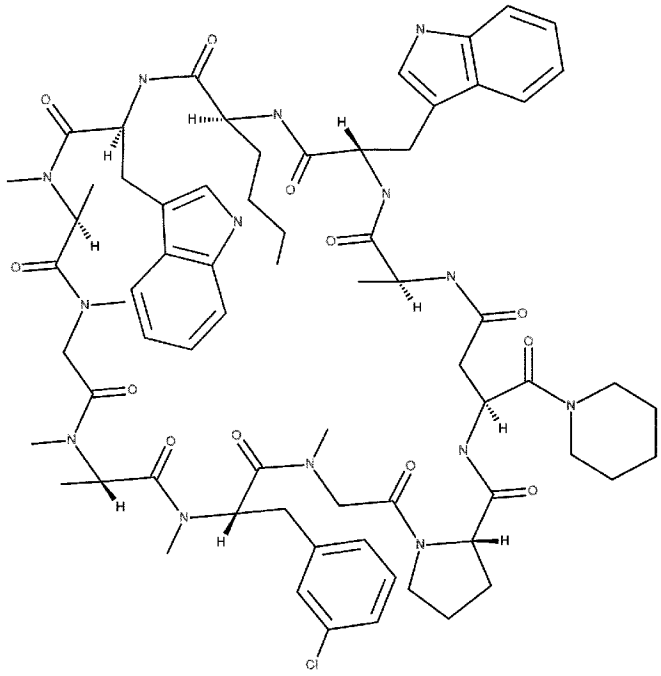
[0174]

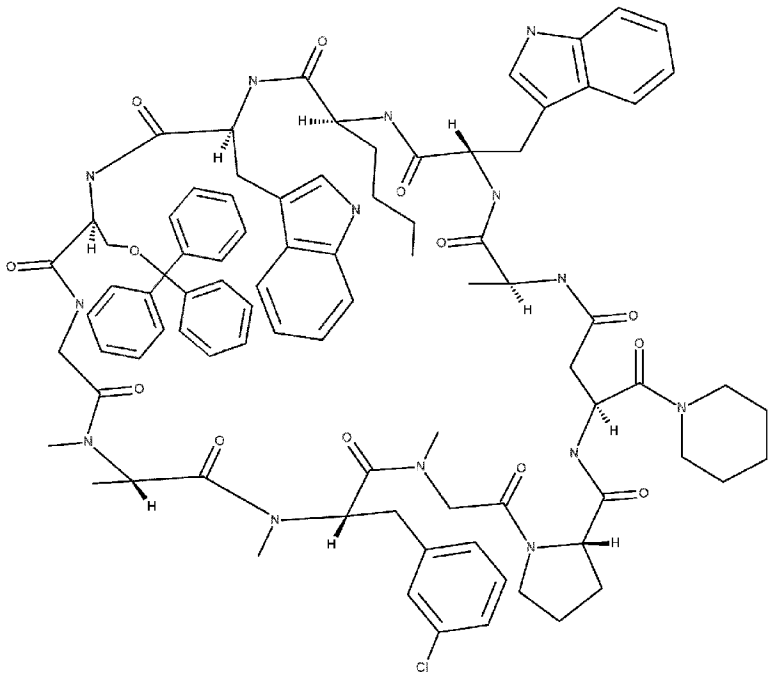
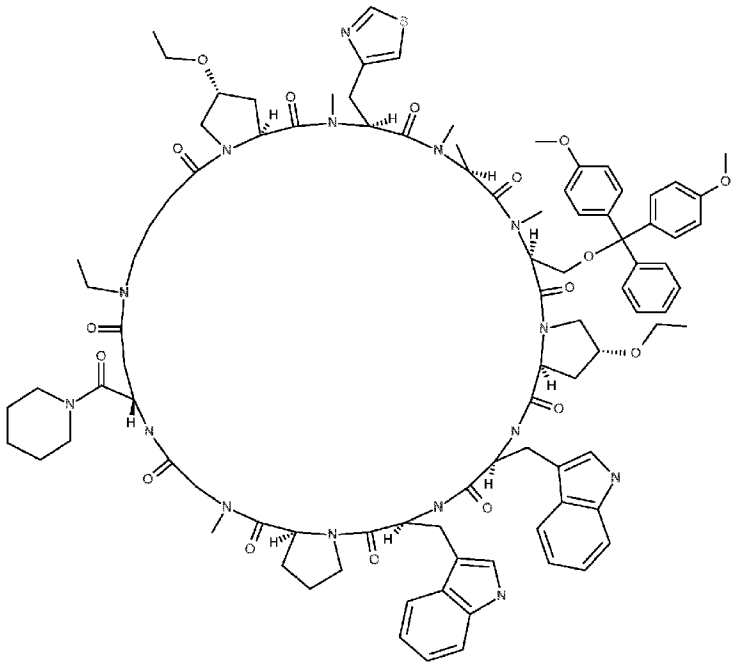
[表2-1]

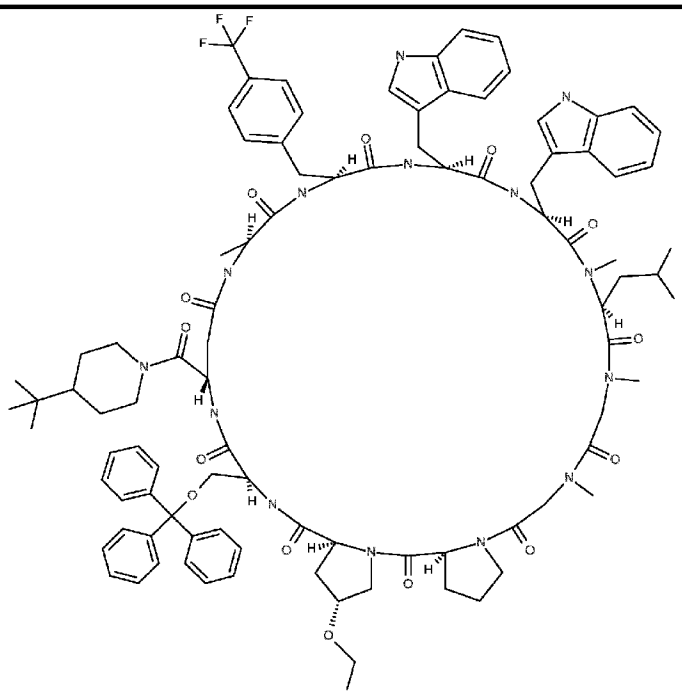
		MW（環化体）	EM（環化体）	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	使用したレジン	レジンのローディング量
Pep-1	化合物101	1480.2	1478.75	Ala	Trp	Nle	Trp	D-Tyr(tBu)	MeGly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	nPrGly	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-2	化合物102	1852.4	1851.11	MePhe	MePhe	Leu	MeLeu	Thr(THP)	MeLeu	MeLeu	His(Trt)	MePhe	MeLeu	Asp	pip	化合物50	0.366 mmol/g
Pep-3	化合物103	2018.8	2016.97	g-EtAbu	MeSer(DMT)	Hyp(Et)	Ile	MePhe(3-Cl)	Ser(Trt)	Trp	Trp	Pro	MeGly	Asp	pip	化合物50	0.316 mmol/g
Pep-4	化合物104	1344.0	1342.66	Ala	Trp	Nle	Trp	MeAla	MeGly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	Pro	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-5	化合物105	1574.3	1572.74	Ala	Trp	Nle	Trp	Ser(Trt)	Gly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	Pro	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-6	化合物106	1775.1	1773.86	g-EtAbu	Hyp(Et)	MeAla(4-Thz)	MeAla	MeSer(DMT)	Hyp(Et)	Trp	Trp	Pro	MeGly	Asp	pip	化合物50	0.316 mmol/g
Pep-7	化合物107	1734.0	1732.87	Ala	Phe(4-CF3)	Trp	Trp	MeLeu	MeGly	MeGly	Pro	Hyp(Et)	Ser(Trt)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g

[0175] [表2-2]

Pep-1	化合物101	
Pep-2	化合物102	

Pep-3	化合物103	
Pep-4	化合物104	

Pep-5	化合物105	
Pep-6	化合物106	

Pep-7	化合物107	

[0176] [表2-3]

		LCMS条件	保持時間(分)	LCMS (ESI) m/z
Pep-1	化合物101	SQDFA05	0.93	1480.1 (M+H)+
Pep-2	化合物102	SQDFA50	1.00	1852.3 (M+H)+
Pep-3	化合物103	SQDFA05	0.78 (30%), 1.06 (70%)	1474.1, 1716.2 (M+H)+
Pep-4	化合物104	SQDFA05	0.78	1343.9 (M+H)+
Pep-5	化合物105	SQDFA05	1.01	1574.2 (M+H)+
Pep-6	化合物106	SQDFA05	0.68	1473.1 (M+H)+
Pep-7	化合物107	SQDFA05	1.10	1734.2 (M+H)+

[0177] 実施例３．弱酸（水中でのpKaが0～9）と、溶媒（Y_{OTs}値が正の値であり、弱酸性であり（水中でのpKaが5～14）、かつ求核性が低い溶媒）との弱酸溶液を用いた、ペプチドの側鎖官能基の保護基の脱保護（工程Ｄ）

[0178] 実施例３－１．Fmoc-アミノ酸の側鎖官能基の保護基の上記弱酸溶液による脱保護可能性

ペプチド合成に用いるFmoc-アミノ酸の側鎖官能基の保護基が、TFAよりも弱酸となる条件、すなわち水中でのpKaが0～9である弱酸を、Y_{OTs}値が正の値であり、弱酸性であり（水中でのpKaが5～14）、かつ求核性が低い溶媒に溶解した溶液中で脱保護可能かどうかを検討した。

[0179] 具体的には、弱酸として硫酸水素テトラメチルアンモニウム（pKa 2.0）を

用い、また溶媒として、HFIP（Y_{OTs}値が3.82（文献値: Prog. Phys. Org. Chem. 1990, 17, 121-158）、pKa 9.30）を用いた。より具体的には、0.1 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS)もしくは0.05 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS)のいずれかの溶液を用いた。

[0180] 実施例３－１－１：0.1 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS)の調製

0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS）は、HFIP (11.66 mL), TIPS (0.24 mL), DCE (0.10 mL)を混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに68.5 mgの硫酸水素テトラブチルアンモニウムを溶解させて調製した。

[0181] 実施例３－１－２：0.05 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS)の調製

0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）は、HFIP (11.66 mL), TIPS (0.24 mL), DCE (0.10 mL)を混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに34.3 mgの硫酸水素テトラブチルアンモニウムを溶解させて調製した。

[0182] 以下のmethod Aもしくはmethod Bによって、側鎖に保護基の付いたFmoc-アミノ酸、または側鎖に保護基の付いたアミノ酸残基を含むペプチドの脱保護を行った。

[0183] 実施例３－１－３：method A

側鎖に保護基の付いたFmoc-アミノ酸（4.0 umol）とペプチド（既に合成した環状ペプチドPep 1～Pep 6のいずれか（環化後の残渣）；最大で3.66 umol）の混合物に対し、0.1 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS）(0.20 mL)もしくは0.05 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS）(0.40 mL)を加えて３分間振とうし、その後２５度にて静置し、一定時間後にLCMS(FA05)を測定した。脱保護の進行は、脱保護体と被保護体のUVエリア比より算出した。

[0184] 実施例３－１－４：method B

側鎖に保護基の付いたアミノ酸残基を含むペプチド（既に合成した環状ペプチドPep 1～Pep 6のいずれか（環化後の残渣）；最大で3.66 umol）に対し、0.1 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS) (0.20 mL)もしくは0.05 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS) (0.40 mL)を加えて３分間振とうし、その後２５度にて静置し、一定時間後にLCMS(FA05)を測定した。脱保護の進行は、脱保護体と被保護体のUVエリア比より算出した。

[0185] method AおよびMethod Bに用いたペプチドは、既に記載の方法によって伸長およびレジンからの切り出しをし、さらに既に記載の方法によって環化反応後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下濃縮を行ったものを用いた。

[0186] 評価結果は以下の表３のとおりである。

[表3]

run	保護付き アミノ酸	method	共存ペプチド	条件	時間 (h)	脱保護 (%)
1	D-Tyr(tBu)	B	Pep 1（化合物１０１）	0.1 M	24	>99%
2		B	Pep 1（化合物１０１）	0.05 M	24	81%
3	Tyr(3-F,tBu)	A	Pep 2（化合物１０２）	0.1 M	22	65%
4		A	Pep 2（化合物１０２）	0.05 M	19	19%
5	MeHis(Trt)	A	Pep 2（化合物１０２）	0.05 M	4	>99%
6	Thr(THP)	B	Pep 2（化合物１０２）	0.05 M	2	>99%
7	MeSer(DMT)	B	Pep 3（化合物１０３）	0.05 M	4	>99%
8	MeSer(THP)	A	Pep 4（化合物１０４）	0.05 M	1	>99%
9	Ser(Trt)	B	Pep 5（化合物１０５）	0.05 M	4	>99%
10	Ser(THP)	A	Pep 3（化合物１０３）	0.05 M	1	>99%
11	Pro-OPis	A	Pep 2（化合物１０２）	0.05 M	2	>99%
12	D-Tyr(Clt)	A	Pep 5（化合物１０５）	0.05 M	1	>99%
13	D-Tyr(THP)	A	Pep 6（化合物１０６）	0.05 M	1.25	>99%
14	D-Tyr(Pis)	A	Pep 6（化合物１０６）	0.05 M	1.25	>99%
15	Tyr(3-F,Pis)	A	Pep 3（化合物１０３）	0.05 M	1	>99%

[0187] 脱保護後のFmoc-アミノ酸のLCMS測定結果は以下のとおりである。

Fmoc-Tyr(3-F)-OH （run3、run4、run15の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４２２．３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

Fmoc-MeHis-OH　（run5の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３９２．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．４７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

Fmoc-MeSer-OH　（run8の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３４２．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

Fmoc-Ser-OH　（run10の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３２８．２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

Fmoc-Pro-OH　（run11の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝３３８．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

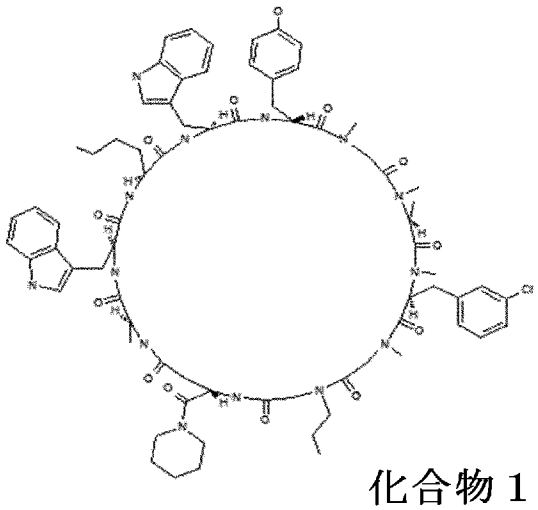
保持時間：０．７５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

Fmoc-D-Tyr-OH　（run12～14の脱保護生成物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４０４．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0188] [化57]



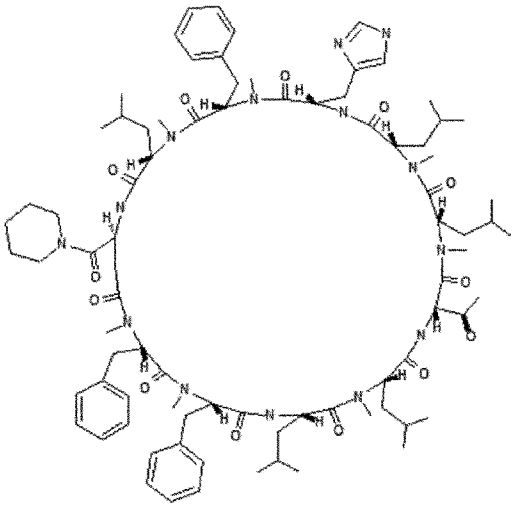
化合物１３１

Pep 1（化合物１０１）の脱保護生成物（run1, run2の脱保護生成物、化合物１３１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２４．０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0189] [化58]



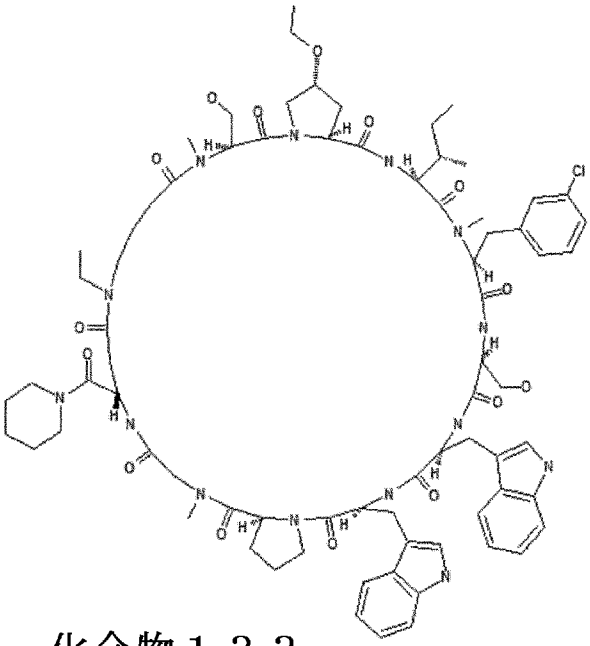
化合物１３２

Pep 2（化合物１０２）の脱保護生成物（run6の脱保護生成物、化合物１３２）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５２６．３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0190] [化59]



化合物１３３

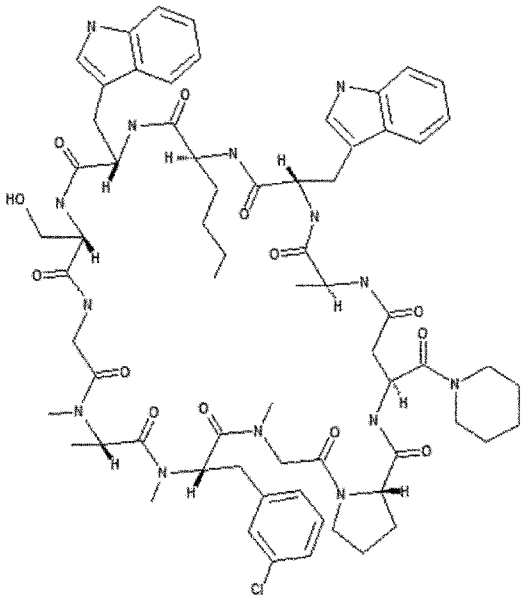
Pep 3（化合物１０３）の脱保護生成物（run7の脱保護生成物、化合物１３３

）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７４．１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0191] [化60]



化合物１３５

Pep 5（化合物１０５）の脱保護生成物（run9の脱保護生成物、化合物１３５）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１３３１．７（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0192] この結果から、これらの保護基は0.1 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS)もしくは0.05 M硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS)の条件にて脱保護が進行することが確認できた。

[0193] なお、側鎖の保護基は、TFE-DCM (1/1, v/v)溶液、もしくはTFE-DCM(1/1, v/v)/DIPEA(用いたレジンのローディング量に用いたレジン量をかけて出した理論量のモル数に対して1.8 equiv.を添加)溶液を用いたペプチド切り出し条件では影響を受けない。よって、切り出し工程に続く、ペプチド主鎖のN末端とAsp側鎖のカルボン酸部位での分子内環化では、アミノ酸側鎖官能基は保護されたまま維持される。これにより、アミノ酸側鎖の官能基が求核種として

作用する、望ましくない環化反応を抑制できる。

[0194] ３－２．Fmoc-アミノ酸の側鎖官能基の保護基を上記弱酸溶液で脱保護した際の、加水分解およびN→O-アシルシフト体生成の抑制可能性

[0195] 実施例３－２－１：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１、Pep1）の、0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、レジン担持量：0.342 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にてH-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１）を合成した。環化後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下濃縮を行った。

この１０等分した１つの試験管に対し、0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに68.5 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.20 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて２４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行ったところ、側鎖の脱保護（D-Tyr(tBu)のtBu基の脱保護）の完結が確認できた。またこのとき、目的の脱保護されたペプチド（化合物１３１）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマススペクトルを示す化合物）と、加水分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が水分にて加溶媒分解されたもののマススペクトルを示す化合物）の比は７２：１０：１８であった（図２）。なお、本実施例に記載の「TM+H_2O」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つが加水分解を受けた化合物を表し、「TM+HFIP」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つがHFIPによって加溶媒分解を受けた化合物を表

す。

[0196] 図２のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２４．０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体（TM+H_2O）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４４２．０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

HFIPによる加溶媒分解体（TM+ HFIP）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５９２．０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６９分、０．７１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0197] 実施例３－２－２：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１、Pep1）の、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

化合物１０１（Pep1）を合成した後、上記の操作において１０等分した別の１つに対し、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに34.3 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて２４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（D-Tyr(tBu)のtBu基の脱保護）は８１％進行し、このとき、目的の脱保護されたペプチド（化合物１３１）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）と、加水分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が水分にて加水分解されたもののマスを示す化合物）の比は９３：３：４であった（図３）。なお、「TM+H_2O」とは、目的物のいずれかのアミド

結合の１つが加水分解を受けた化合物を表す。同様に、「TM+HFIP」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つがHFIPによって加溶媒分解を受けた化合物を表す。

[0198] 図３のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２４．１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４４２．０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

HFIPによる加溶媒分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５９２．０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６９分、０．７１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0199] 後述の比較例のとおり、H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１、Pep1）は、5% TFA/DCEの条件にて脱保護すると、２５度で２時間半後には加水分解が87%進行してしまった。

これに対して、同じペプチド配列に対して、5% TFAの替わりに0.1 Mまたは0.05 Mの硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS)を用いることで、加水分解体（および加溶媒分解体）の生成を大幅に低減することができた。またこの結果は、TFAよりも弱酸となる条件を満たせば、弱酸の濃度を任意に調節できる可能性を示唆する。

[0200] 実施例３－２－３：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）の、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、ローディング：0.316 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にてH-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）を合成した。環化後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下濃縮を行った。

この１０等分した１つの試験管に対し、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに34.3 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて静置し、４時間の段階でLCMS(SQDFA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（MeSer(DMT)のDMT基の脱保護、およびSer(Trt)のTrt基の脱保護）の完結が確認できた。またこのとき、脱保護された目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）と、目的のペプチドのN→O-アシルシフト体（デプシペプチド）のLCでのUVエリア比は、９６：４であった。反応開始から２２時間、２５度で静置した段階でLCMS(SQDFA05)の測定を行った結果は、脱保護された目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）と、目的のペプチドのN→O-アシルシフト体（デプシペプチド）のLCでのUVエリア比は、８３：１７であった（図４）。

[0201] 図４のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７４．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

N→O-アシルシフト体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７４．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0202] 後述のとおり、H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）は、5% TFA/DCEの条件にて脱保護すると、２５度で２時間後にはN→O-アシルシフトが70%進行してしまった。

これに対し、同じペプチド配列に対して、5% TFAの替わりに0.05 Mの硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS)を用いることで、N→O-アシルシフト体の生成を大幅に低減することができた。

[0203] 実施例３－２－４：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１、Pep1）の、0.05 M シュウ酸/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

化合物１０１（Pep1）を合成した後、上記の操作において１０等分した別の１つに対し、0.05 M シュウ酸/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに18.0 mgのシュウ酸を溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（D-Tyr(tBu)のtBu基の脱保護）は完結し、このとき、目的の脱保護されたペプチド（化合物１３１）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）と、加水分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が水分にて加水分解されたもののマスを示す化合物）

の比は７９：１７：４であった（図５）。なお、「TM+H_2O」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つが加水分解を受けた化合物を表す。同様に、「TM+HFIP」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つがHFIPによって加溶媒分解を受けた化合物を表す。

[0204] 図５のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２３．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４４１．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

HFIPによる加溶媒分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５９１．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６８分、０．７１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0205] 実施例３－２－５：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０１、Pep1）の、0.05 M マレイン酸/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

化合物１０１（Pep1）を合成した後、上記の操作において１０等分した別の１つに対し、0.05 M マレイン酸/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに23.2 mgのシュウ酸を溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（D-Tyr(tBu)のtBu基の脱保護）は完結し、このとき、目的の脱保護されたペプチド（化合物１３１）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）と、加水分解体（ペプチド

のいずれかのアミド結合が水分にて加水分解されたもののマスを示す化合物）の比は８１：１２：７であった（図６）。なお、「TM+H_2O」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つが加水分解を受けた化合物を表す。同様に、「TM+HFIP」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つがHFIPによって加溶媒分解を受けた化合物を表す。

[0206] 図６のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２３．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４４１．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

HFIPによる加溶媒分解体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５９１．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６８分、０．７１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0207] 実施例３－２－６：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）の、0.05 M シュウ酸/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

化合物１０３（Pep3）を合成した後、上記の操作において１０等分した別の１つに対し、0.05 M シュウ酸/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに18.0 mgのシュウ酸を溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(SQDFA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（MeSer(DMT)のDMT基の脱保護、およびSer(Trt)のTrt基の脱保護）の完結が確認できた。またこのとき、脱保護された目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(E

t)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）と、目的のペプチドのN→O-アシルシフト体（デプシペプチド）のLCでのUVエリア比は、８６：１４であった（図７）。

[0208] 図７のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

N→O-アシルシフト体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0209] 実施例３－２－７：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）の、0.05 M マレイン酸/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護

化合物１０３（Pep3）を合成した後、上記の操作において１０等分した別の１つに対し、0.05 M マレイン酸/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに23.2 mgのシュウ酸を溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(SQDFA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（MeSer(DMT)のDMT基の脱保護、およびSer(Trt)のTrt基の脱保護）の完結が確認できた。またこのとき、脱保護された目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）と、目的のペプチ

ドのN→O-アシルシフト体（デプシペプチド）のLCでのUVエリア比は、８６：１４であった（図８）。

[0210] 図８のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

N→O-アシルシフト体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0211] これらの結果より、弱酸として硫酸水素テトラメチルアンモニウム（pKa 2.0）の替わりに、シュウ酸（pKa 1.23）やマレイン酸（pKa 1.92）を用いた場合でも、加水分解や加溶媒分解、N→O-アシルシフトを抑えながら脱保護を進行させることができた。

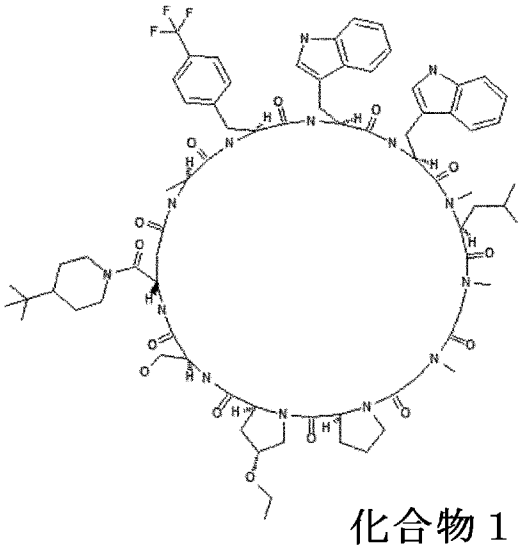
[0212] 実施例３－２－８：

H-Ala-Phe(4-CF3)-Trp-Trp-MeLeu-MeGly-MeGly-Pro-Hyp(Et)-Ser(Trt)-Asp-pip(tBu)のN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０７、Pep7）の、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP (2% TIPS)を脱保護条件として用いた脱保護と、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/TFE (2% TIPS)を脱保護条件として用いた脱保護との比較

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-piptBu（化合物５２、ローディング：0.356 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にてH-Ala-Phe(4-CF3)-Trp-Trp-MeLeu-MeGly-MeGly-Pro-Hyp(Et)-Ser(Trt)-Asp-pip(tBu)のN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０７）を合成した。環化後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下留去した。

この１０等分した１つの試験管に対し、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 23.32 mL, TIPS: 0.48 mL, DCE: 0.20 mLを混合した溶液に205.8 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、２５度にて４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（Ser(Trt)のTrt基の脱保護）は完結し、このとき、脱保護された目的のペプチド（化合物１３７）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）とのUVエリア比は５３：４７であった（図９）。なお、「TM+HFIP」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つがHFIPによって加溶媒分解を受けた化合物を表す。

[0213] [化61]



化合物１３７

[0214] 図９のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３７）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４９２．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．９０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

HFIPによる加溶媒分解体（いずれかのアミド結合がHFIPによって加溶媒分解を受けたもの）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１６６０．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0215] １０等分した他のもう１つの試験管に対し、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/TFE溶液（2% TIPS）（TFE: 23.32 mL, TIPS: 0.48 mL, DCE: 0.20 mLを混合した溶液に205.8 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、２５度にて静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、４時間後には側鎖の脱保護（Ser(Trt)のTrt基の脱保護）は96%進行し、このとき、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるTFEにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）はLCMSにて検出限界以下であった。反応を２０時間後に確認したところ、側鎖の脱保護（Ser(Trt)のTrt基の脱保護）は完結し、このとき、脱保護された目的のペプチド（化合物１３７）と、加溶媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるTFEにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）とのUVエリア比は９７：３であった（図１０）。なお、本実施例中に記載の「TM+TFE」とは、目的物（TM）がTFEによって溶媒和された化合物（任意のアミド結合の１つがTFEによって加溶媒分解を受けた化合物）を表す。

[0216] 図１０のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３７）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４９２．２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．９０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

TFEによる加溶媒分解体（いずれかのアミド結合がTFEによって加溶媒分解を受けたもの）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５９２．０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0217] 以上の結果は、弱酸を溶解させる溶媒としてHFIPの替わりにTFEを用いることが可能であることを示した。またこの結果は、Y_{0Ts}値が正の値であり、溶媒自体が弱酸性であり（水中でのpKaが5～14）、かつ求核性が低いという条件を満たせば、任意の溶媒を用い得る可能性を示唆する。

[0218] 実施例３－２－９：

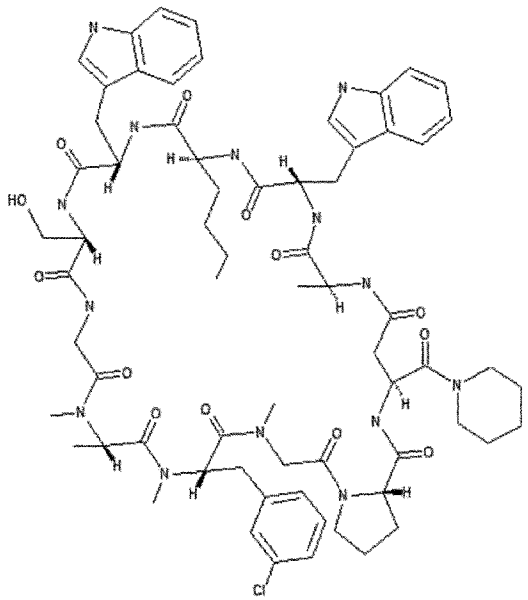
0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護、およびその溶液に塩基（DIPEA）を加えての反応停止

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、ローディング：0.342 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にてH-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(Trt)-Gly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-Pro-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０５、Pep5）を合成した。環化後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下濃縮を行った。

この１０等分した２つの試験管に対し、それぞれ0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに68.5 mgの硫酸水素テトラブチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(SQDFA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（Ser(Trt)のTrt基の脱保護）は完結し、このとき、目的の脱保護されたペプチド（化合物１３５）以外の加媒分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が溶媒であるHFIPにて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）や、加水分解体（ペプチドのいずれかのアミド結合が水分にて加溶媒分解されたもののマスを示す化合物）のマスを示すピークは検出されなかった（図１１）。この反応混合物にそれぞれジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、14 μL, 硫酸水素テトラメチルアンモニウムに対して２等量）を加えて１つの試験管は２５度にて１８時間静置をし、もう１つの試験管は減圧下濃縮を行った。これらのLCMS(SQDFA05)を測定したところ、脱保護された目的のペプチド以外の加溶媒分解体や加水分解体のマスを示すピークは、この時点でも検出されなかった（図１１）。

[0219]

[化62]



化合物１３５

[0220] 図１１のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３５）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１３３１．９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0221] 実施例３－２－１０：

0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を脱保護条件として用いた脱保護、およびその溶液に塩基（DIPEA）を加えての反応停止

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、ローディング：0.316 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にてH-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAspの側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した環状化合物（化合物１０３、Pep3）を合成した。環化後、減圧下濃縮を行った残渣をジクロロメタンに溶解して試験管に１０等分した後、溶媒を再び減圧下濃縮を行った。

この１０等分した２つの試験管に対し、それぞれに0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）（HFIP: 11.66 mL, TIPS: 0.24 mL, DCE: 0.10 mLを混合した溶液から4 mLを抜き取り、これに68.5 mgの硫酸水

素テトラメチルアンモニウムを溶解させたもの）を0.40 mL加えた。ラバーセプタムにて試験管に栓をし、３分間振とうしたのちに２５度にて４時間静置し、LCMS(FA05)にて反応の確認を行った。その結果、側鎖の脱保護（MeSer(DMT)のDMT基の脱保護、およびSer(Trt)のTrt基の脱保護）は完結し、脱保護された目的のペプチド（化合物１３３）と、目的のペプチドのN→O-アシルシフト体（デプシペプチド）のLCでのUVエリア比は、９３：７であった。

この反応混合物にそれぞれジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、14 μL, 硫酸水素テトラメチルアンモニウムに対して２等量）を加えて１つの試験管は２５度にて１８時間静置をし、もう１つの試験管はDIPEAを加えた直後に減圧下濃縮を行った。これらのLCMS(FA05)を測定したところ、１８時間静置したものに関しては目的ペプチドとそのN→O-アシルシフト体のUVエリア比は変化せず、減圧下濃縮を行ったものに関しては、目的ペプチドとそのN→O-アシルシフト体のUVエリア比は９８：２となった（図１２）。

[0222] 図１２に記載のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７４．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

N→O-アシルシフト体

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７４．１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６４分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0223] 以上の結果は、脱保護反応終了後（もしくは反応を停止したい時）にDIPEAを加えることで、加水分解（加溶媒分解）やN→O-アシルシフトの問題を抑制した状態で後処理が可能であることを示した。

[0224] 実施例４．側鎖ヒドロキシル基の保護基としてTHP基を用いた場合のThrとMeSerの反応性

伸長反応時の低反応性が懸念されるThrとMeSerの側鎖ヒドロキシル基の保護基としてTHP基を用いた場合の反応性について以下の実験を行った。

[0225] 実施例４－１：

レジン上にて伸長したペプチドで、N末端にN-メチルアミノ基がある化合物（H-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-2-Cl-Trt-resin)-pipに対するFmoc-Thr(Trt)-OHとFmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）の伸長反応性の比較評価

伸長反応性の比較評価は、立体障害によってアミノ基の反応性が低いMePhe(3-Cl)をN末端に有する配列にて行った。

Fmoc-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物１０８）は既に記載の方法で調製したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、ローディング：0.329 mmol/g, 100 mg)をレジンとして用い、既に記載の方法にて合成した。

得られたFmoc-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物１０８）にジクロロメタン（600uL）を加え、３０分静置してレジンを膨潤させた。液相を除いた後、続いてレジンをDMF（600uL）にて３度洗浄した。得られたレジンに2% DBU/DMF (v/v, 600uL)を加えて２０分間振とうさせ、液相を取り除いた。レジンをDMF（600uL）で３度洗浄した。

このレジンに対し、0.60 M Fmoc-Thr(Trt)-OH/0.375 M oxymaのNMP溶液（300 uL）と10%(v/v) DIC/DMF （300uL）とを混合した溶液、もしくは0.60 M Fmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）/0.375 M oxymaのNMP溶液（300 uL）と10%(v/v) DIC/DMF （300uL）とを混合した溶液を加えて振とうした。振とう中、１時間、２時間、４時間の段階で反応中のレジンをそれぞれ～10mgずつ取り出し、取りだしたレジンをDMF（600uL）にて３度洗浄し、さらに2% DBU/DMF (v/v, 600uL)を加えて２０分間振とうさせ、液相を取り除いた。レジンをDMF（600uL）で３度、さらにジクロロメタン（600uL）で３度洗浄した。

得られたレジンにTFE/DCM (1/1, v/v, 1 mL)を加えて１０分間振とうし、レジンをろ過で取り除いた後に、液相を減圧下濃縮した。残渣をLCMS（分析条件SQDFA05）にて分析した。結果を表４に示す。

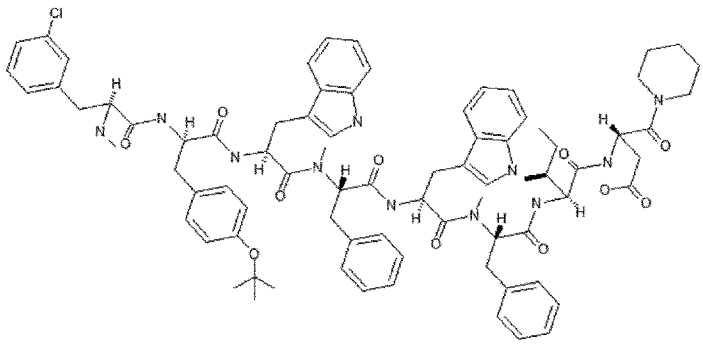
[0226]

[表4]

伸長する アミノ酸残基	１ｈ （未反応体/伸長体）	２ｈ （未反応体/伸長体）	４ｈ （未反応体/伸長体）
Thr(Trt)	99/1	97/3	88/12
Thr(THP)	84/16	69/31	22/78

[0227] 表中における未反応体/伸長体の比はLCのUVエリア比を示す。表中の未反応体はH-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip（化合物１０９）を意味し、伸長体は、H-Thr(Trt)-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip（化合物１１０：Fmoc-Thr(Trt)-OHを添加した場合）もしくはH-Thr(THP)-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip（化合物１１１：Fmoc-Thr(THP)-OH を添加した場合）を意味する。

[0228] [化63]



化合物１０９

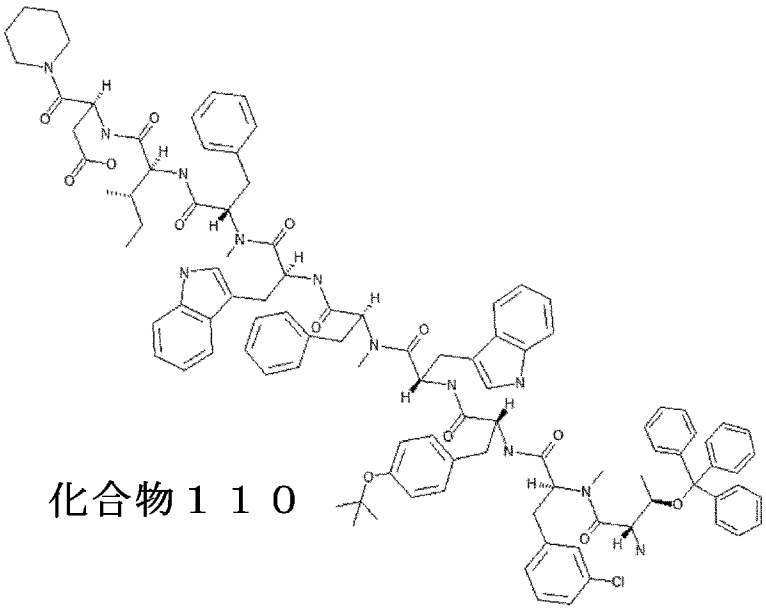
未反応体（化合物１０９）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２２．９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７７分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0229]

[化64]



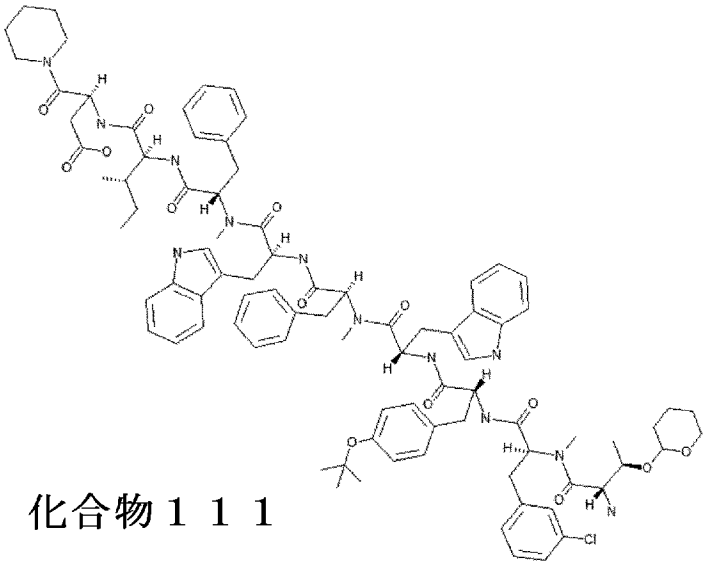
化合物１１０

伸長体（Thr(Trt)）（化合物１１０）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１７６６．２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．９２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0230] [化65]



化合物１１１

伸長体（Thr(THP)）（化合物１１１）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１６０８．１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．８０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0231] 実施例４－２：

H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(PG)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pipを合成機にて合成した際の、Fmoc-Thr(Trt)-OHもしくはFmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）の伸長反応性

立体障害によって反応性が低いMePheをN末端に有する配列、およびThrのアミノ基に対して立体的に嵩高いMeLeuをN末端に有する配列に対してThrを伸長することにより、伸長反応性を検討した。

H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(PG)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（Thr側鎖のPGは保護基を表し、本実験ではTrt保護もしくはTHP保護を表す）は、既に記載の方法で調製したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、100 mg）をレジンとして用い、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。その際に、Thrの伸長においてはFmoc-Thr(Trt)-OHもしくはFmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）を用いた。

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およびDCMにて洗浄した。

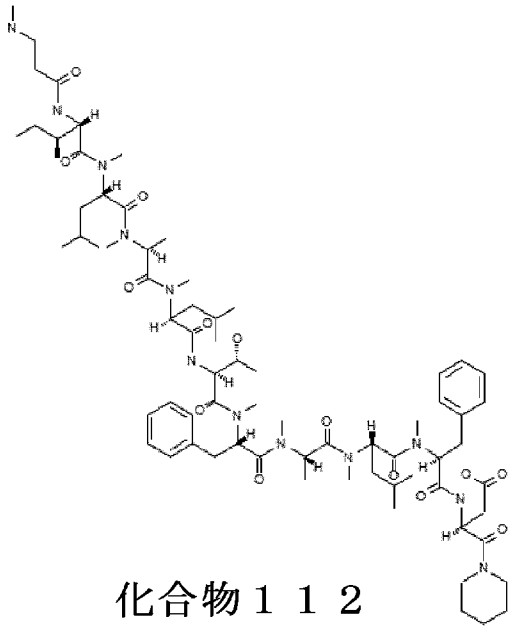
レジンをDCMにて再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM (1/1, v/v, 2 mL)を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いてチューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、残ったレジンをさらにTFE/DCM (1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。

切り出し後、Fmoc-Thr(Trt)-OHを用いた際には、続いて4N HCl/1,4-ジオキサン(19.5 uL)とTIPS (0.25 mL)とDCM (0.73 mL)を混合した溶液を用いて２５度にて５分間振とうしてThr(Trt)のTrt基の脱保護をおこない、続いてDIPEA (24 uL)を加えることで酸の中和をし、LCMSにて伸長反応性を検討した。

[0232] この生成物のLCMSの結果を図１３に示す。目的のペプチド（化合物１１２、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip）と目的のペプチドからThrが抜けたもの（化合物１１３、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu- MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip）が同じ保持時間０．６９分において見られた。またMS（ネガティブモード）より、Thrが脱落した

ペプチドがおよそ３０％含まれていた。

[0233] [化66]



化合物１１２

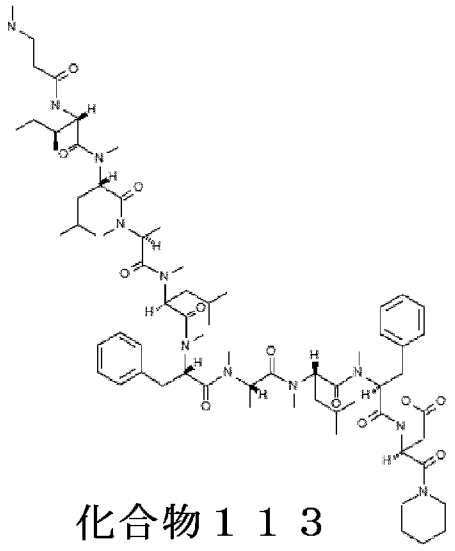
[0234] 図１３のデータを以下に示す。

目的物（化合物１１２、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１３７３．６（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６９分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0235] [化67]



化合物１１３

目的物－Thr（化合物１１３、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu- MePhe-MeA

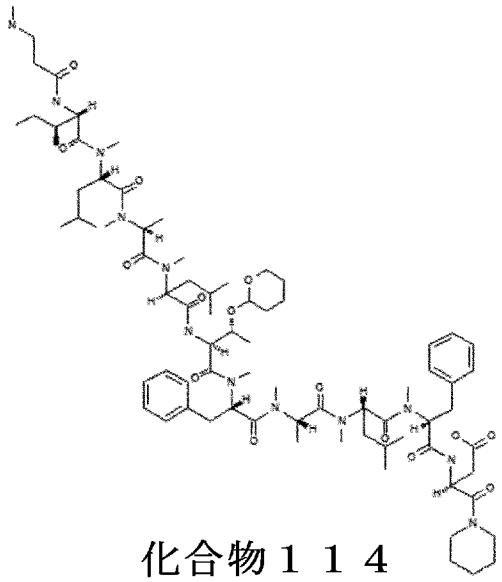
la-MeLeu-MePhe-Asp-pip)

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１２７２．６（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６９分（分析条件ＳＱＤＡＡ５０）

[0236] この生成物のLCMSの結果を図１４に示す。Fmoc-Thr(Trt)-OHを添加した場合とは対象的に、Fmoc-Thr(THP)-OHを添加した場合は、目的のペプチド（化合物１１４、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(THP)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip）からThrが脱落したもの（化合物１１３、H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu- MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip）は検出されなかった。なお、Fmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）を用いた際には、レジンからの切り出し後に脱保護の操作を行わずに、切り出し溶液をそのままLCMS測定したため、Thr側鎖のTHP保護は残存したままであった。

[0237] [化68]



化合物１１４

[0238] 図１４のデータを以下に示す。

目的物（化合物１１４）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４５８．１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0239] 以上の結果より、一般的なペプチド合成にてThrを伸長する際に使用されているFmoc-Thr(Trt)-OHと比較してFmoc-Thr(THP)-OH（化合物２）の反応性は高いことが示された。特にN末端がN-アルキル化された嵩高いアミノ基を伸長

する際には高い縮合効率が達成できることが示された。また続く伸長反応において、Thr(THP)のN末端アミノ基に対する嵩高いFmoc-アミノ酸（この場合はFmoc-MeLeu-OH）の伸長も問題なく進行することが確認できた。

[0240] 実施例４－２：

H-MeSer(PG)-MeVal-MeHis(Trt)-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis(Trt)-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPisを合成機にて合成した際の、Fmoc-MeSer(DMT)-OHもしくはFmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）を用いた場合の、MeSerの伸長反応性の確認

H-MeSer(PG)-MeVal-MeHis(Trt)-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis(Trt)-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis（MeSer側鎖のPGは保護基を表し、本実験ではDMT保護もしくはTHP保護を表す）は、既に記載の方法で調製したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis（化合物５８、ローディング量0.3736 mmol/g、100 mg）をレジンとして用い、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。その際に、MeSerの伸長においてはFmoc-MeSer(DMT)-OHもしくはFmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）を用いた。

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およびDCMにて洗浄した。

得られたレジンを減圧下乾燥させた後、それぞれのレジンを30 mgずつ取り出した。

取りだした各々30 mgのレジンをDCMにて再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM（1/1, v/v, 2 mL)を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いて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、残ったレジンをさらにTFE/DCM（1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

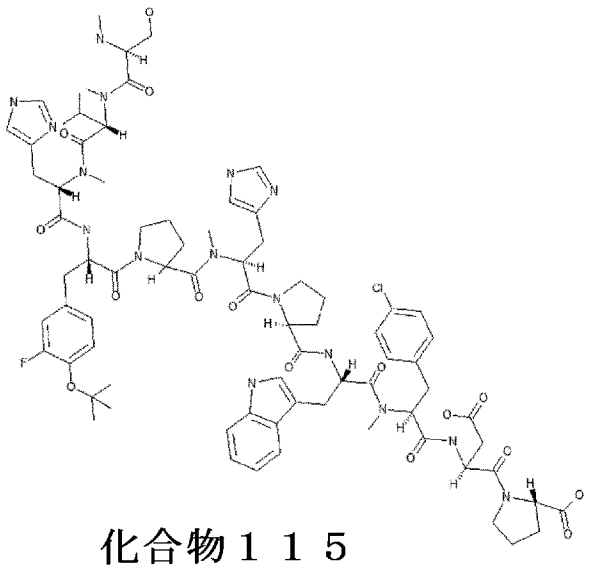
得られた残渣に、既に記載の方法にて調製した0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を1.3 mL加え、残渣を溶解させた後、室温にて１時間静置し、Tyr(3-F)の側鎖tBu保護以外の側鎖保護基（MeSer側

鎖のDMT保護もしくはTHP保護、およびMeHis側鎖のTrt保護）および主鎖C末端のPis保護を脱保護し、LCMSを測定することで、反応の確認をおこなった。

[0241] Fmoc-MeSer(DMT)-OH・0.75 DIPEAを用いて合成を行った場合のLCMSの結果を図１５に示す。目的のペプチド（化合物１１５、H-MeSer-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH）と目的のペプチドからMeSerが抜けた化合物（化合物１１６、H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH）が同じ保持時間０．５０分に見られた。

またMS（ネガティブモード）より、MeSerが抜けたペプチド（化合物１１６、H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH）が50%含まれていることが分かった。

[0242] [化69]



化合物１１５

[0243] 図１５のデータを以下に示す。

目的物（化合物１１５）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５５９．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

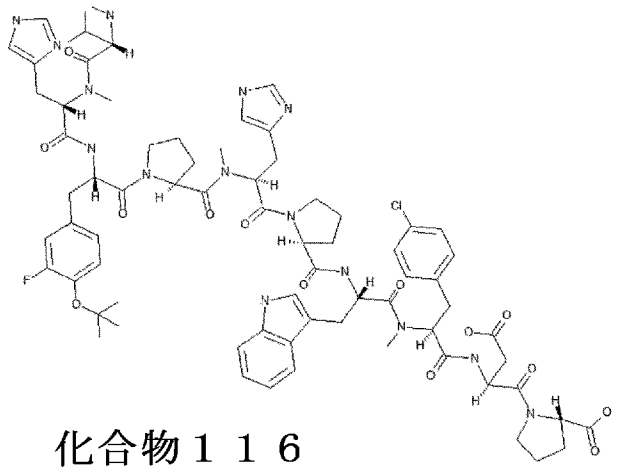
保持時間：０．５０分（分析条件SQDFA50）

目的物－ＭｅＳｅｒ（化合物１１６）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４５８．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．５０分（分析条件SQDFA50）

[0244] [化70]



化合物１１６

[0245] これに対し、Fmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）を用いて合成を行った場合のLCMSの結果を図１６に示す。目的のペプチド（化合物１１５、H-MeSer-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH）と目的のペプチドからMeSerが抜けた化合物（化合物１１６）が同じ保持時間０．５０分において見られたものの、MS（ネガティブモード）より、MeSerが抜けたペプチド（化合物１１６、H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH）は10%以下であることが確認された。

[0246] 図１６のデータを以下に示す。

目的物（化合物１１５）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５５９．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．５０分（分析条件ＳＱＤＦＡ５０）

目的物－MeSer（化合物１１６）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４５８．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．５０分（分析条件ＳＱＤＦＡ５０）

[0247] 以上の結果より、Fmoc-MeSer(DMT)-OHと比較してFmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）の反応性は高く、N末端がN-メチル化されたアミノ基に対する伸長の際には高い縮合効率が達成できることが示された。

[0248] ５．5% TFA中での環化したペプチドの脱保護（比較例）

[0249] 比較例１：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０１、Pep-1）の側鎖保護基の脱保護（D-Tyr(tBu)のtBu保護の脱保護）（5% TFA/DCE（5% TIPS)を用いた場合）

既に記載の方法にて合成したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、レジン担持量0.373 mmol/g、100 mg）を用いて、合成機上でペプチド伸長を行い、H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pipを得た。

続いてDCMにてレジンを再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM（1/1, v/v, 2 mL)を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いて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、残ったレジンをさらにTFE/DCM（1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

得られた残渣をDMF/DCM（1/1, v/v, 8 mL)に溶解し、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、21 mg）/DMF溶液（0.5 M）と、DIPEA（12 μL）/DMF（88 μL）溶液を加え、室温にて２時間攪拌した。LCMS測定（分析条件SQDFA05）にて反応の確認をし、H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０１、Pep-1）の生成を確認した。

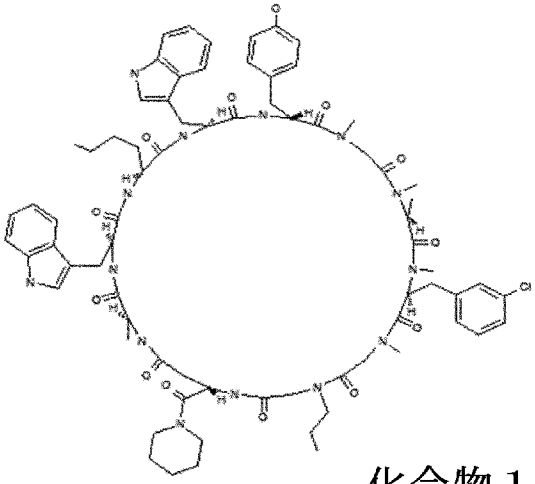
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４８０．０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．９３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

その後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に5% TFA/DCE（5% TIPS）（8 mL, 含有水分量は<200 ppmであることをカールフィッシャー測定にて確認）を加えて２時間３０分攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残渣のLCMS(FA05)測定を行ったところ、目的物であるH-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１３１）と、その加水分解体（いずれ

かのアミド結合が加水分解されたもの）のMSが確認され、対応するUVエリアの比は１３：８７であった（図１７）。LCの測定結果を図１７に示す。なお、本実施例中に記載の「TM+H_2O」とは、目的物のいずれかのアミド結合の１つが加水分解を受けた化合物を表す。

[0250] [化71]



化合物１３１

[0251] 図１７のデータを以下に示す。

目的物（化合物１３１、H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４２４．０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

加水分解体（H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物の、いずれかのアミド結合が加水分解されたもの）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４４２．０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0252] この結果より、5% TFA/DCE (5% TIPS)を用いた脱保護においては、高度にN-メチル化されていて特にN-メチルアミノ酸が連続する配列を有する環状ペプチドの場合には、目的物のおよそ９割が加水分解され、目的物の取得が困難になることが確認された。

[0253] 比較例２：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０３、Pep3）の側鎖保護基（MeSer側鎖のDMT保護およびSer側鎖のTrt保護）の脱保護（5% TFA/DCE（5% TIPS)を用いた場合）

既に記載の方法にて合成したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pip（化合物５０、レジン担持量0.316 mmol/g、100 mg）を用いて、合成機上でペプチド伸長を行い、H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-pipを得た。

続いてDCMにてレジンを再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM（1/1, v/v, 2 mL)を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いて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、残ったレジンをさらにTFE/DCM（1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。

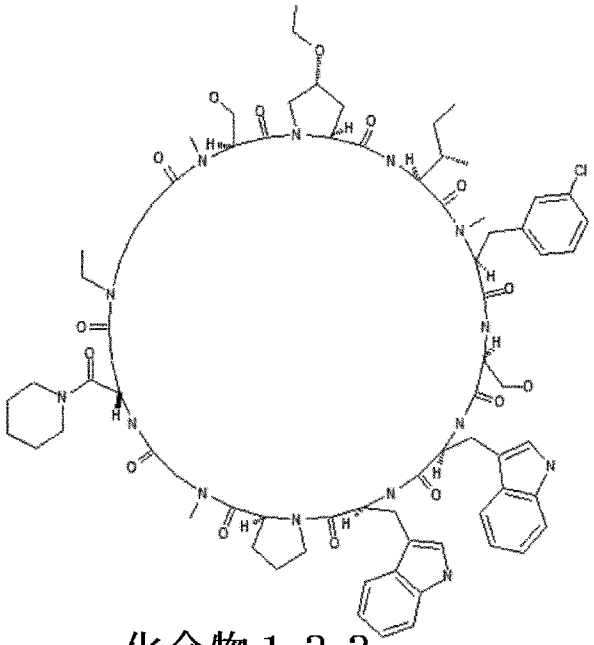
ペプチドのレジンからの切り出し操作を２度繰り返し、得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

得られた残渣をDMF/DCM（1/1, v/v, 8 mL)に溶解し、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、18 mg）/DMF溶液（0.5 M）と、DIPEA（9.9 μL）/DMF（39.6 μL）溶液を加え、室温にて２時間攪拌した。LCMS測定（SQDFA05）にて反応の確認をしたところ、H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０３、Pep3）からMeSerの側鎖のDMT保護が外れたものが７０％（LCMS（ESI） m/z = 1716.2 $(M+H)^+$、保持時間：１．０６分）、MeSerの側鎖のDMT保護およびSerの側鎖のTrt保護の両方が外れたものが３０％（LCMS（ESI） m/z = 1474.1 $(M+H)^+$、保持時間：０．７８分）確認された。割合はLCのUVエリア比によって算出した。その後、減圧下溶媒を留去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、試験管に１０等分した

。これらを減圧下濃縮し、ジクロロメタンを取り除いた。なお、上述の実施例において使用された「環化後の残渣」とは、この１０等分した後に減圧濃縮して得られた残渣のことを指す。

このうちのひとつの試験管に5% TFA/DCE (5% TIPS) (0.8 mL, 含有水分量は32.5 ppm、カールフィッシャーにて測定）を加えて３分間振とうし、その後２５度にて２時間静置した。減圧下、溶媒を留去し、残渣のLCMS(FA05)測定を行ったところ、目的物であるH-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１３３）と、目的物のN→O-アシルシフト体と、目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化したものと、目的物の２つのヒドロキシル基がTFAエステル化したもののUVエリア比は17:46:32:5であることが確認された。LCの測定結果を図１８に示す。

[0254] [化72]



化合物１３３

[0255] 図１８のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物のN→O-アシルシフト体（目的物の２つのヒドロキシル基のうち、いずれかもしくは両方でN→O-アシルシフトが進行した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５６９．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物の２つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１６６５．９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．９９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0256] この結果より、MeSerやSerなどのβ-ヒドロキシル基を有するアミノ酸を配列中に含む場合には、5% TFA/DCE (5% TIPS)を用いた脱保護においては、N→O-アシルシフトが進行してしまうことが確認された。またこの条件下での脱保護においては、２つの側鎖ヒドロキシル基のうちのどちらか、もしくは両方がTFAエステル化してしまうことが確認された。これらの望まない反応によって、目的物の取得が困難になることが確認された。

[0257] N→O-アシルシフト体の生成やヒドロキシル基のTFAエステル化を抑制するのを目的とし、反応温度を０度に低下させた試験、およびTFA濃度を低下させた試験を行った。

[0258] 比較例３：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０３、Pep3）の側鎖保護基（MeSer側鎖のDMT保護およびSer側鎖のTrt保護）の脱保護（5% TFA/DCE (5% TIPS)を用いて０度で行った場合）

上記環化後、１０等分したうちのひとつの試験管に、5% TFA/DCE (5% TIPS

）（0.8 mL，含有水分量は36.6 ppm、カールフィッシャーにて測定）を０度にて加えて１分間振とうし、その後０度のまま４時間静置した。反応溶液のLCMS(FA05)測定を行ったところ、目的物であるH-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１３３）と、目的物のN→O-アシルシフト体と、目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化したものと、目的物のN→O-アシルシフト体の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化したもののUVエリア比は56:12:21:11であることが確認された。LCの測定結果を図１９に示す。

[0259] 図１９のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物のN→O-アシルシフト体（目的物の２つのヒドロキシル基のうち、いずれかもしくは両方でN→O-アシルシフトが進行した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５６９．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物のN→O-アシルシフト体の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５６９．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0260] 比較例４：

H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeG

ly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１０３、Pep3）の側鎖保護基（MeSer側鎖のDMT保護およびSer側鎖のTrt保護）の脱保護（2% TFA/DCE（5% TIPS)を用いて２５度で行った場合）

上記環化後、１０等分したうちのひとつの試験管に、2% TFA/DCE（5% TIPS）（0.8 mL，含有水分量は30.1 ppm、カールフィッシャーにて測定）を２５度にて加えて１分間振とうし、その後室温にて４時間静置した。反応溶液のLCMS(FA05)測定を行ったところ、目的物であるH-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物（化合物１３３）と、目的物のN→O-アシルシフト体と、目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化したものと、目的物の２つのヒドロキシル基がTFAエステル化したものと、目的物のN→O-アシルシフト体の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化したもののUVエリア比は30:34:24:3:9であることが確認された。LCの測定結果を図２０に示す。

[0261] 図２０のデータを以下に示す。

目的のペプチド（化合物１３３、H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pipのN末端アミノ基とAsp側鎖カルボン酸とでアミド結合を形成した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７８分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物のN→O-アシルシフト体（目的物の２つのヒドロキシル基のうち、いずれかもしくは両方でN→O-アシルシフトが進行した化合物）

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４７３．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６５分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５６９．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．８９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物の２つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１６６５．７（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．９９分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

目的物のN→O-アシルシフト体の１つのヒドロキシル基がTFAエステル化した化合物

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１５６９．８（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0262] 以上の結果より、N→O-アシルシフトの問題や化合物中に含まれるヒドロキシル基のTFAエステル化といった問題は、反応温度を低下させることや、より低濃度のTFA溶液を用いるだけでは完全には解決できなかった。

[0263] 実施例６．本発明のパラレル合成（固相法）への適用

[0264] 実施例６－１：

N末端のアミノ基とアスパラギン酸の側鎖カルボン酸基とでアミド環化したペプチド群の合成

C末端がアミド化（ピペリジン、4-(tert-ブチル)ピペリジン、N-メチルオクタン-1-アミンのいずれかにてアミド化）されているか、もしくはC末端にプロリンが結合しているアスパラギン酸の側鎖のカルボン酸基と、N末端の主鎖アミノ基とがアミド結合により環化したペプチド群を合成した。

[0265] 化合物５０（化合物４８（Fmoc-Asp-pip）を担持させた２－クロロトリチルレジン）もしくは化合物５２（化合物５１（Fmoc-Asp-piptBu）を担持させた２－クロロトリチルレジン）もしくは化合物５５（化合物５４（Fmoc-Asp-MeOctyl）を担持させた２－クロロトリチルレジン）もしくは化合物５８（化合物５７（Fmoc-Asp-Pro-OPis）を担持させた２－クロロトリチルレジン）のいずれか100 mgを用い、Fmocアミノ酸として、Fmoc-MeVal-OH、Fmoc-MePhe(3-Cl)-OH（化合物１５）、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH（化合物１６）、Fmoc-MeHis(Trt)-OH（化合物７）、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-MeSer(DMT)-OH（化合物５）、Fmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-nPrGly-OH（化合物２０）、Fmoc-MeGly-OH、Fmoc-Hyp(Et)-OH（化合物１８）、Fmoc-Pro-OH、Fm

oc-Thr(THP)-OH（化合物２）、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH（化合物１３）、Fmoc-Phe(4-CF3)-OH、Fmoc-Phe(3-Cl)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Met(O2)-OH、Fmoc-b-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OHなどを用いてペプチドの伸長を行った。（MeSerの伸長においてはPS-53, PS-54（表５－１）においてはFmoc-MeSer(DMT)-OH（化合物５）を用い、それ以外についてはFmoc-MeSer(THP)-OH（化合物６）を用いた。）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。

[0266] 続いてDCMにてレジンを再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM (1/1, v/v, 2 mL)とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、用いたレジン上のモル数（ローディング量(mmol/g)に使用したレジン量(通常は0.10 g)をかけたもの）に対して１．８等量となる容量）を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いて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、残ったレジンをさらにTFE/DCM (1/1, v/v, 1 mL)にて２回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

[0267] 得られた残渣をDMF/DCM (1/1, v/v, 8 mL)に溶解し、0.5 M 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）/DMF溶液（用いたレジンのモル数（レジンのローディング量(mmol/g)に使用したレジン量(0.1 g)をかけたもの）に対して１．５等量となる容量）と、DIPEA（用いたレジンのモル数に対して１．８等量）を加え、室温にて２時間攪拌した。その後、減圧下溶媒を留去した。

[0268] 得られた残渣に対して、脱保護は以下のとおり行った。

配列中にTyr(3-F,tBu)を含む場合には、既に記載の方法にて調製した0.1 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を2 mL加え、残渣を溶解させた後、室温もしくは３０度にて２４時間静置した。配列中にTyr(3-F)を含まない場合には、既に記載の方法にて調製した0.05 M 硫酸水素テ

トラメチルアンモニウム/ HFIP溶液（2% TIPS）を4 mL加え、残渣を溶解させた後、室温にて４時間静置した。一定時間静置した後、ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、70 μL）を加え、減圧下溶媒を留去した。

[0269] 減圧下、溶媒を留去した後、DMFに溶解した。不溶物をフィルターろ過にて取り除いた後、preparative-HPLCで精製し、標題のアミド環化した環状ペプチド（PS-1～PS-54）を得た。PS-1～PS-54の配列を表５－１に、構造を表５－２に、また、得られたペプチド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と純度および収量を表５－３にそれぞれ示す。

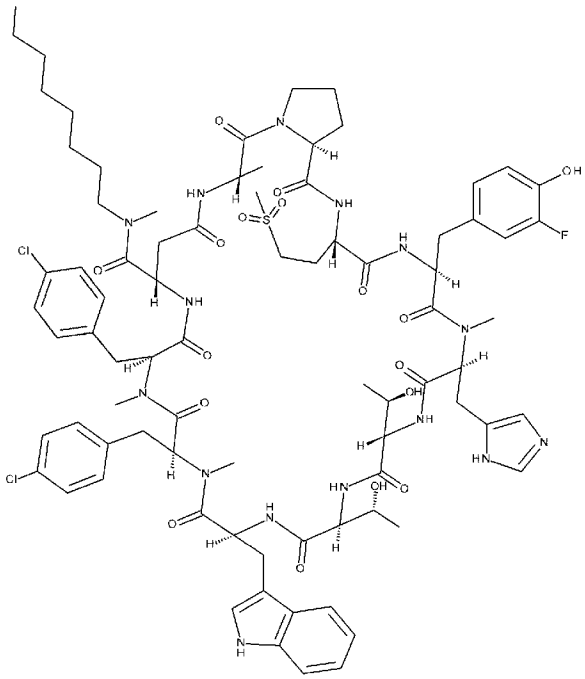
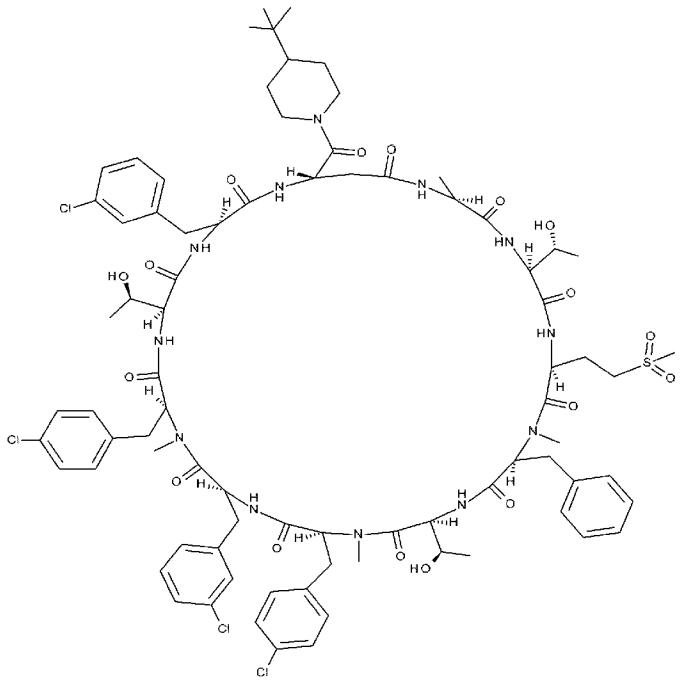
[0270]

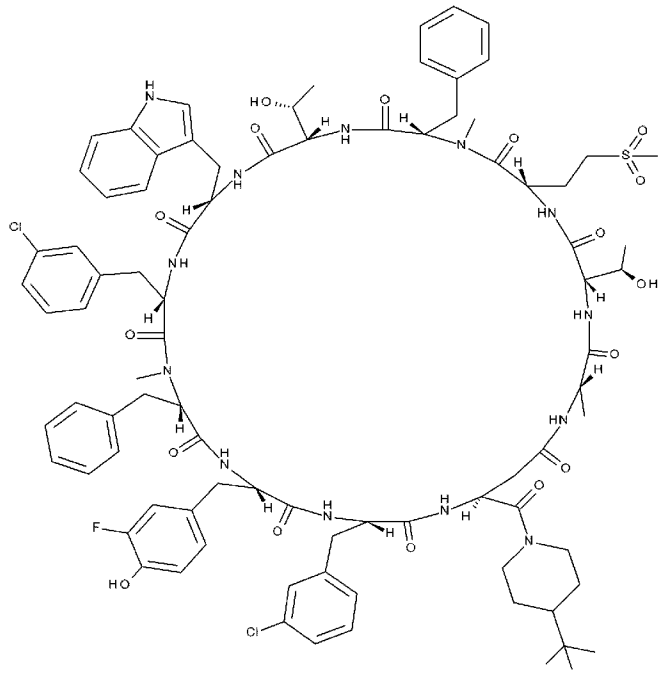
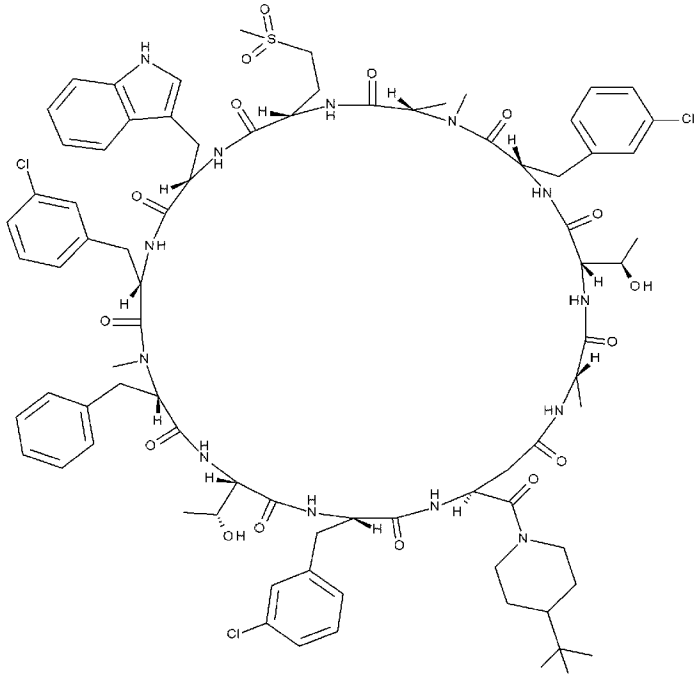
[表5-1]

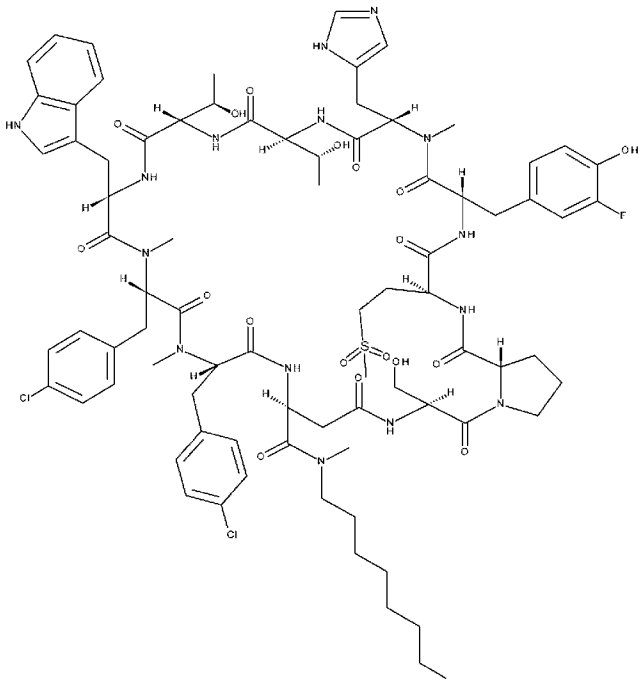
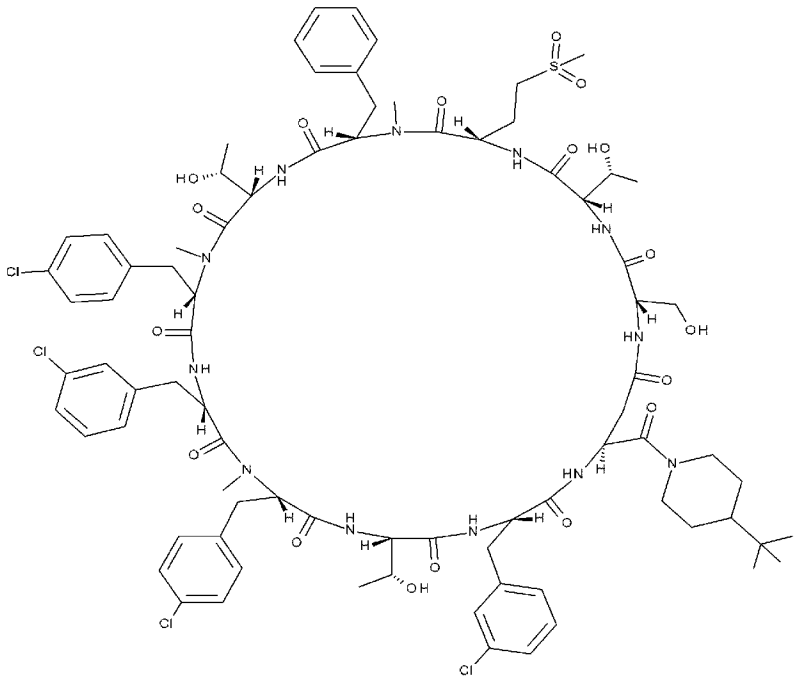
	MW	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	使用したレジン	レジンのローディング量
PS-1	1683.8	Ala	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-2	1691.6	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-3	1727.8	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-4	1652.2	Ala	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-5	1699.8	Ser	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-6	1707.6	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-7	1745.8	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-8	1655.6	Ala	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-9	1665.5	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-10	1701.7	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-11	1626.1	Ala	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-12	1671.6	Ser	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-13	1681.5	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-14	1717.7	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-15	1642.1	Ser	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-16	1543.09	Ala	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-17	1590.3	Ala	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	pip	化合物50	0.330 mmol/g
PS-18	1808.4	Ala	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-19	1664.23	Ala	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-20	1561.11	Ser	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-21	1664.43	Ser	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-22	1824.4	Ser	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-23	1680.23	Ser	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-24	1516.97	Ala	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-25	1620.29	Ala	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-26	1780.26	Ala	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-27	1638.11	Ala	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-28	1532.97	Ser	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-29	1636.29	Ser	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-30	1796.26	Ser	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-31	1654.11	Ser	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-32	1575.57	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-33	1676.5	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-34	1608.04	Ala	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-35	1513.95	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-36	1379.94	Ser	bAla	Met(O2)	Gly	MePhe(3-Cl)	Pro	bAla	Met(O2)	MeSer	MePhe	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-37	1591.57	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-38	1692.5	Ser	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-39	1624.04	Ser	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-40	1529.95	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-41	1392.08	Ala	bAla	Met(O2)	Gly	MePhe(3-Cl)	Pro	bAla	Met(O2)	MeSer	MePhe	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-42	1603.7	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g

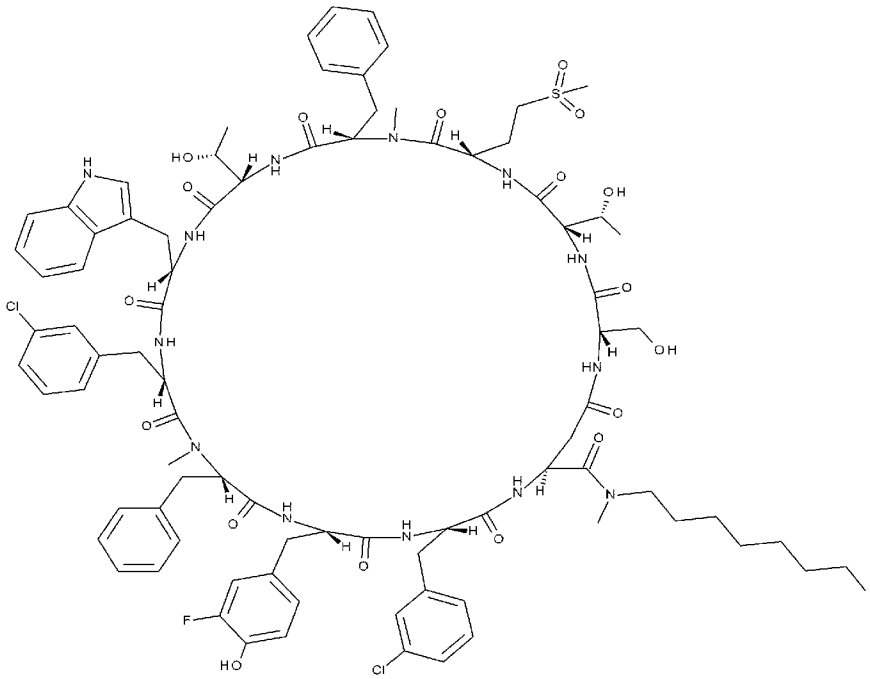
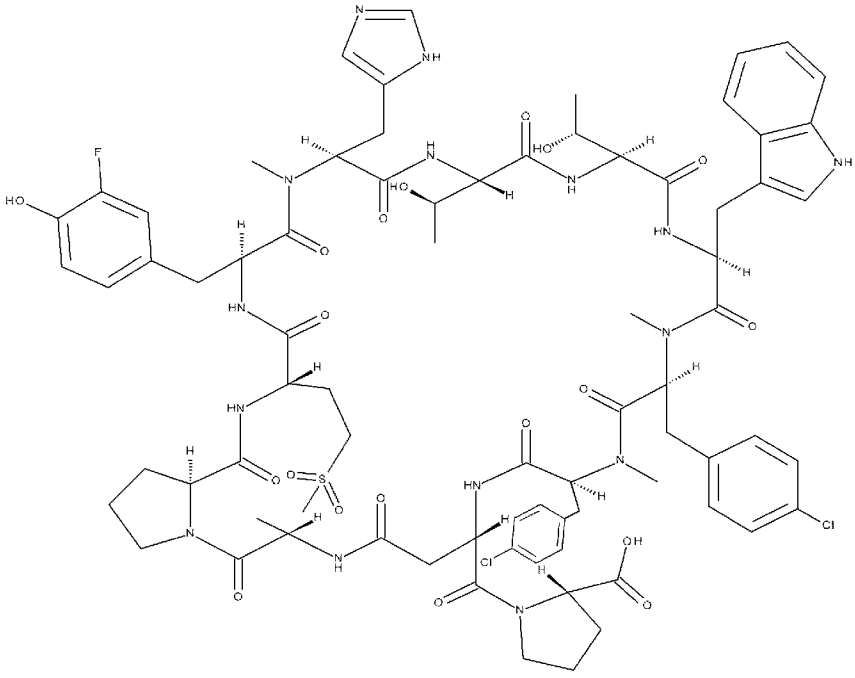
PS-43	1702.62	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-44	1619.7	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-45	1718.62	Ser	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-46	1650.16	Ser	Met(O2)	MeSer	MeVal	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-47	1634.16	Ala	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-48	1483.97	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	pip	化合物50	0.320 mmol/g
PS-49	1650.16	Ser	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-50	1556.07	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-51	1397.47	Ala	Pro	bAla	Phe(4-CF3)	Thr	Ser	bAla	Trp	Trp	Val	Asp	Pro	化合物58	0.3573 mmol/g
PS-52	1579.00	Ala	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	MeHis	MeGly	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	MeHis	Thr	Asp	Pro	化合物58	0.3573 mmol/g
PS-53	1789.9	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Met(O2)	Trp	MePhe	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-54	1763.8	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Met(O2)	Trp	MePhe	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.375 mmol/g

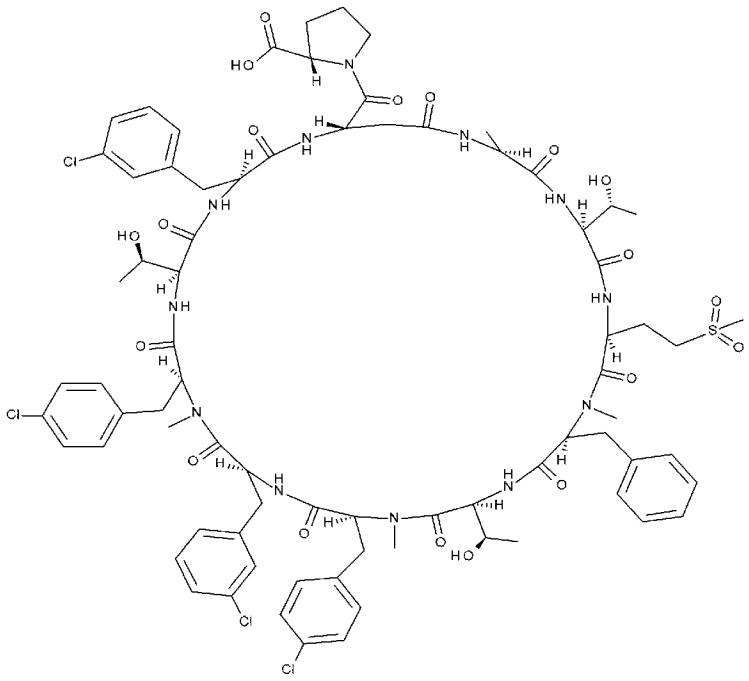
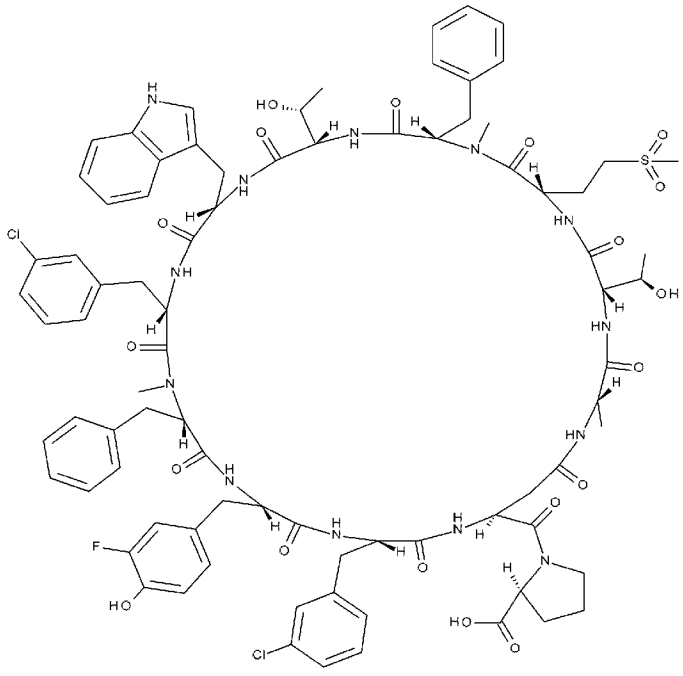
[0271] [表5-2]

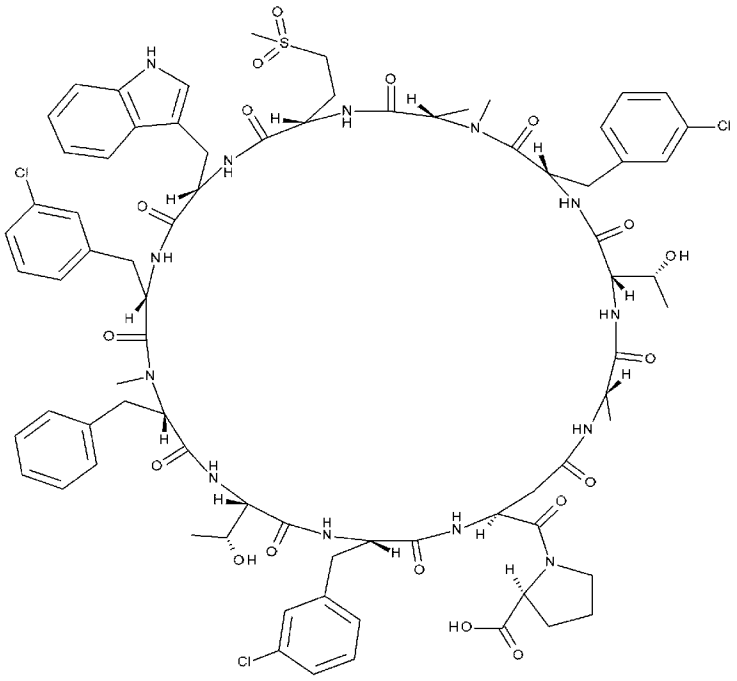
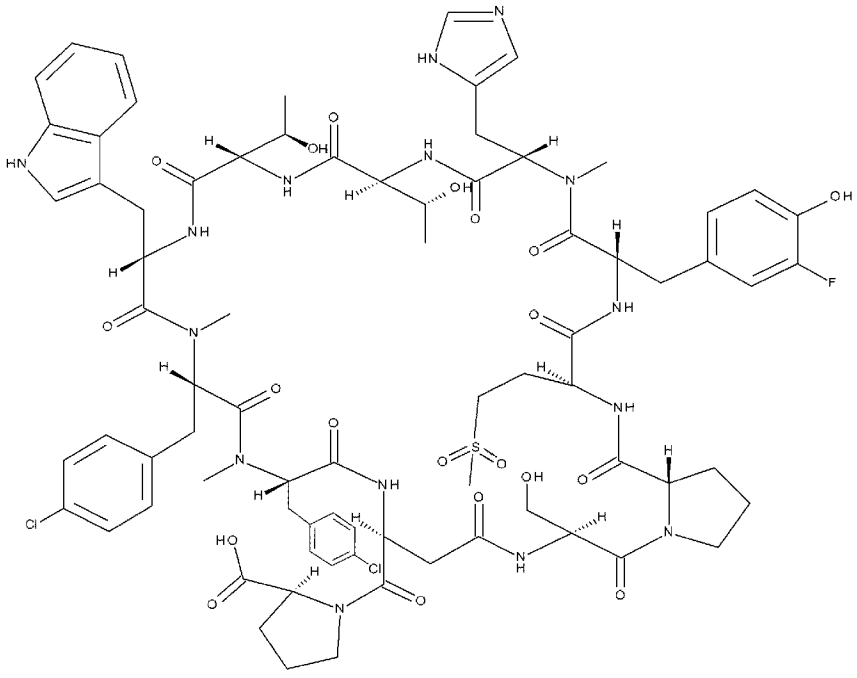
PS-1	
PS-2	

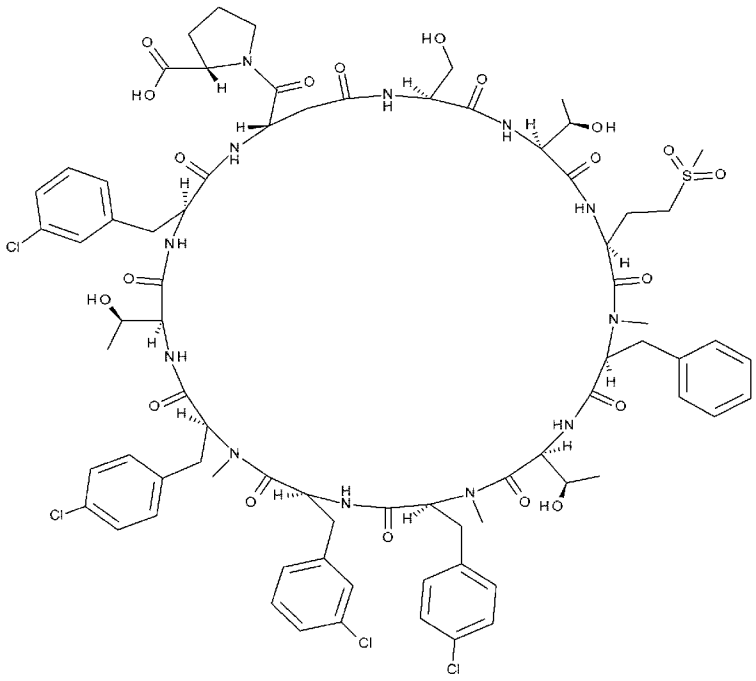
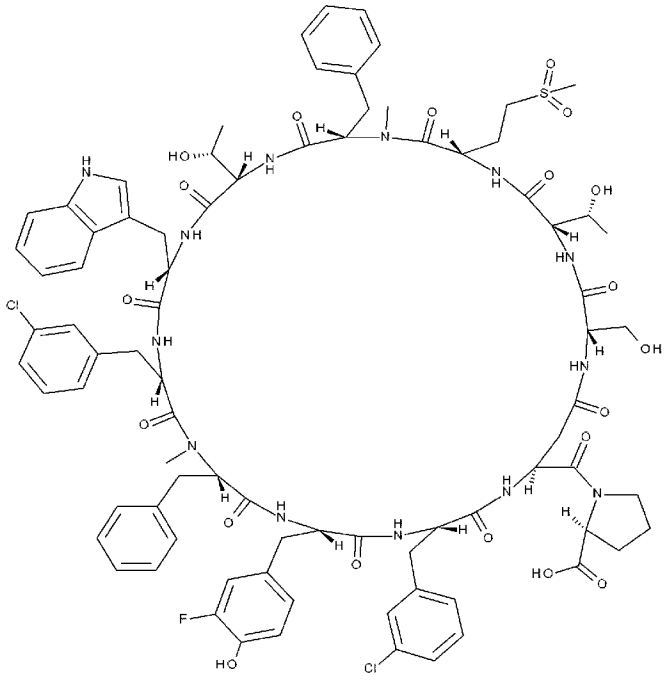
PS-3	
PS-4	

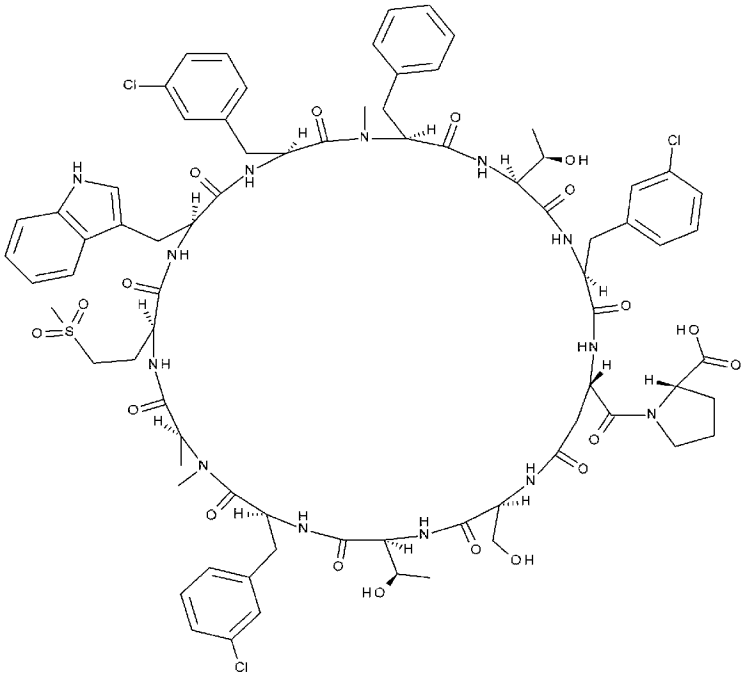
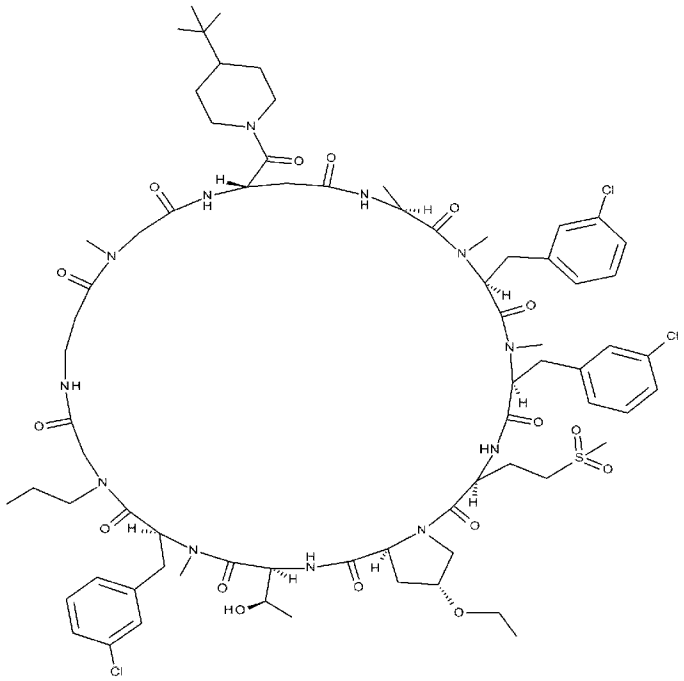
PS-5	
PS-6	

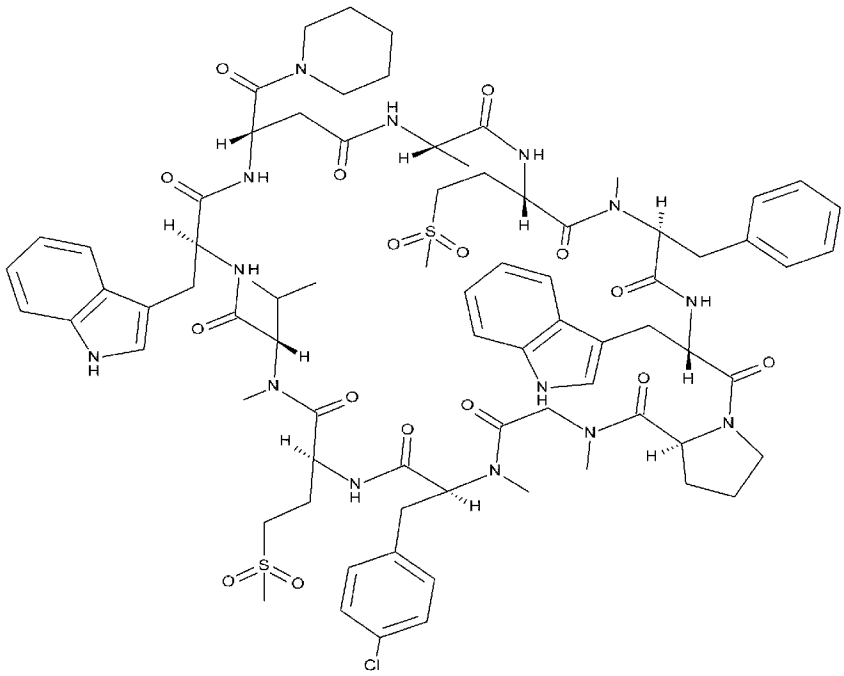
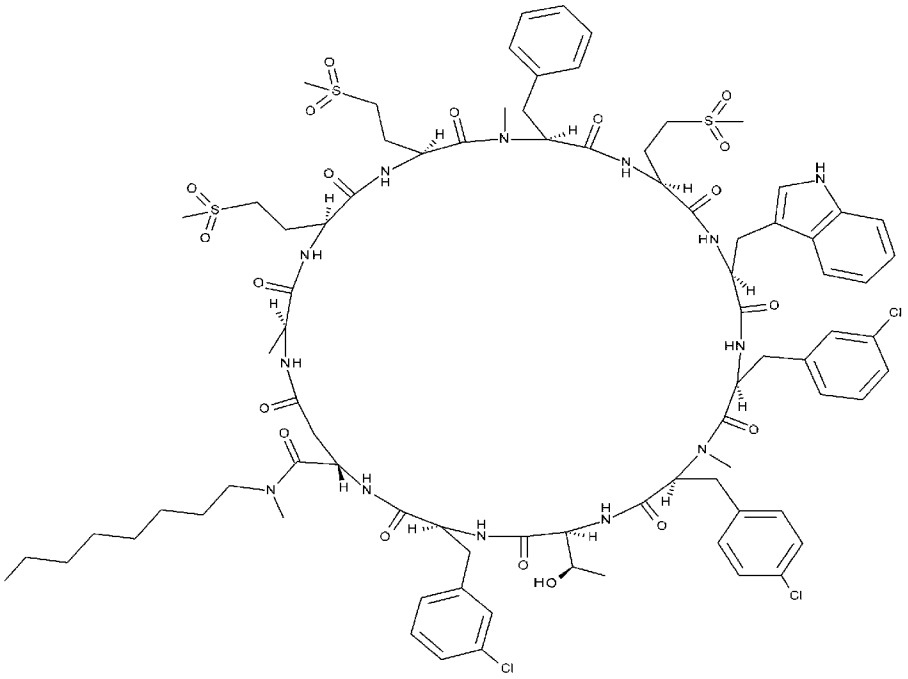
PS-7	
PS-8	

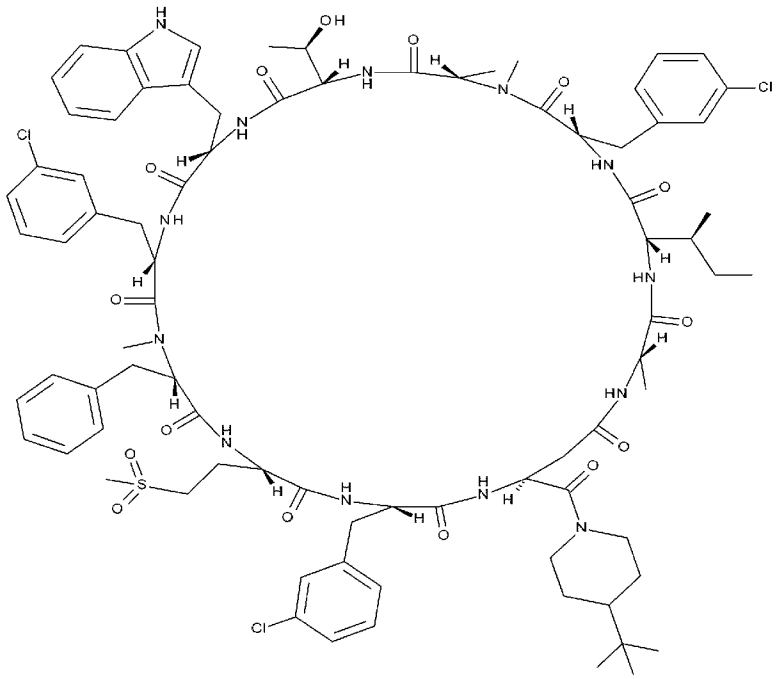
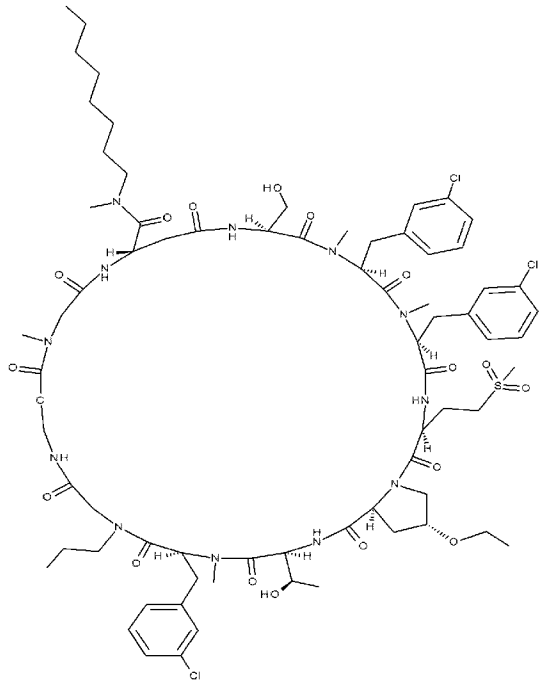
PS-9	
PS-10	

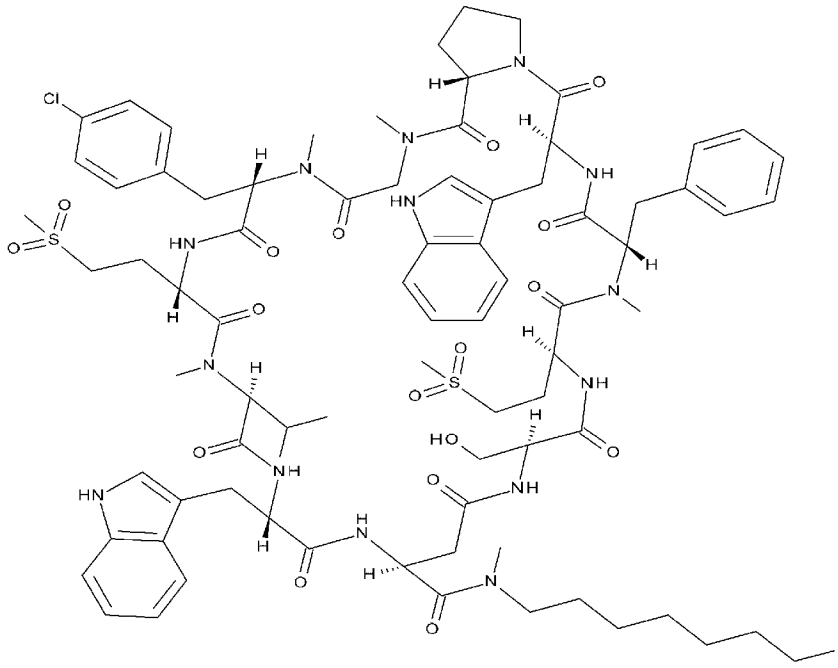
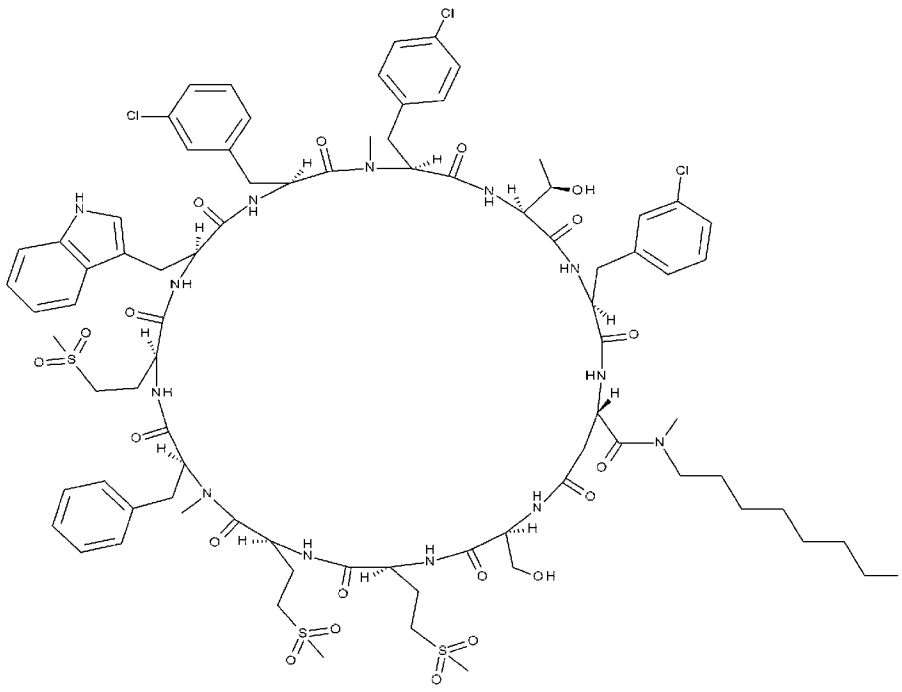
PS-11	
PS-12	

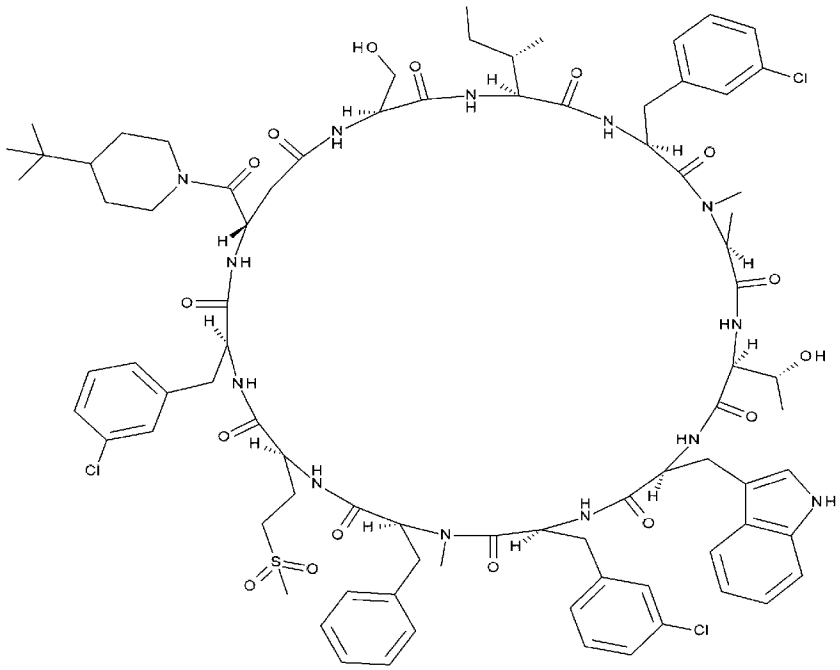
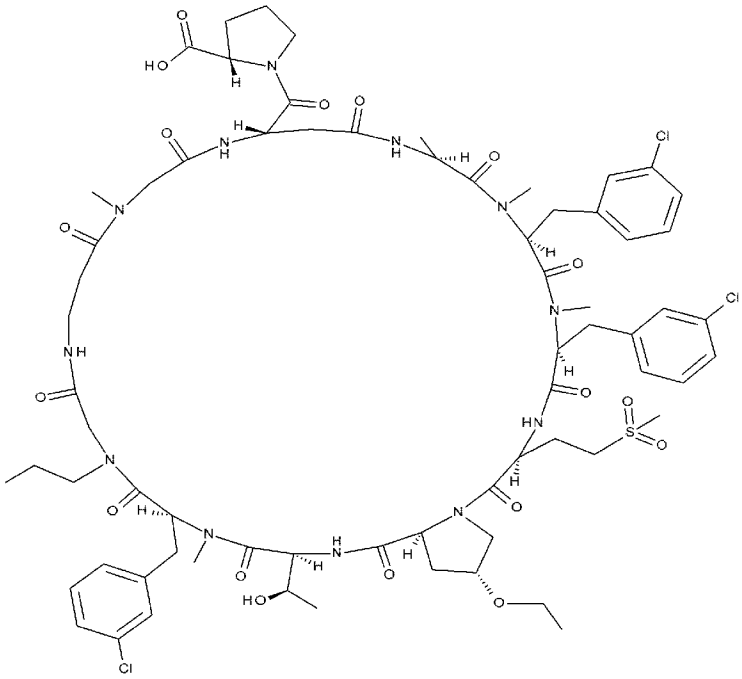
PS-13	
PS-14	

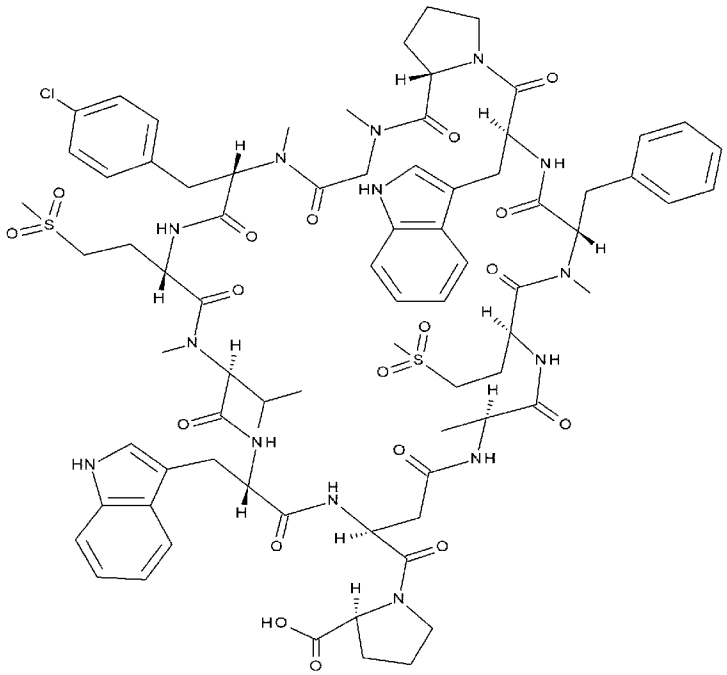
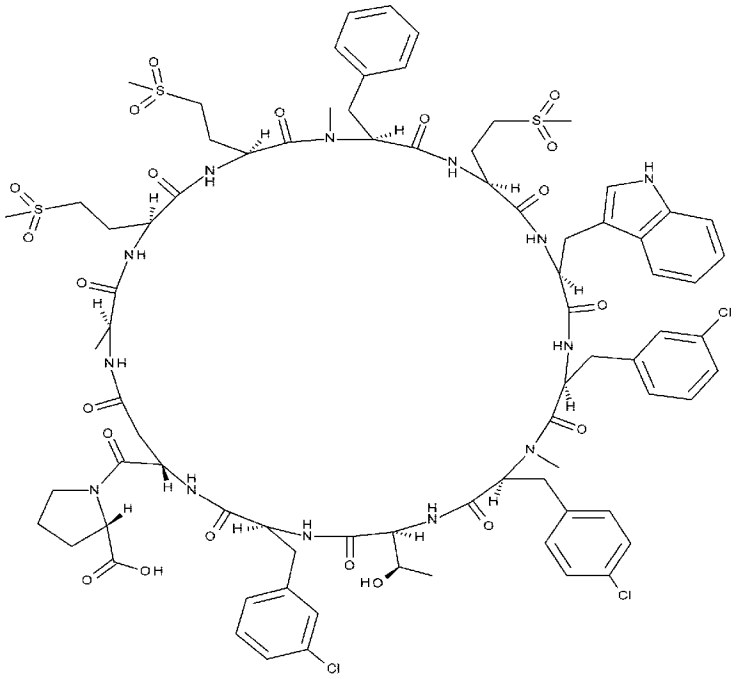
PS-15	
PS-16	

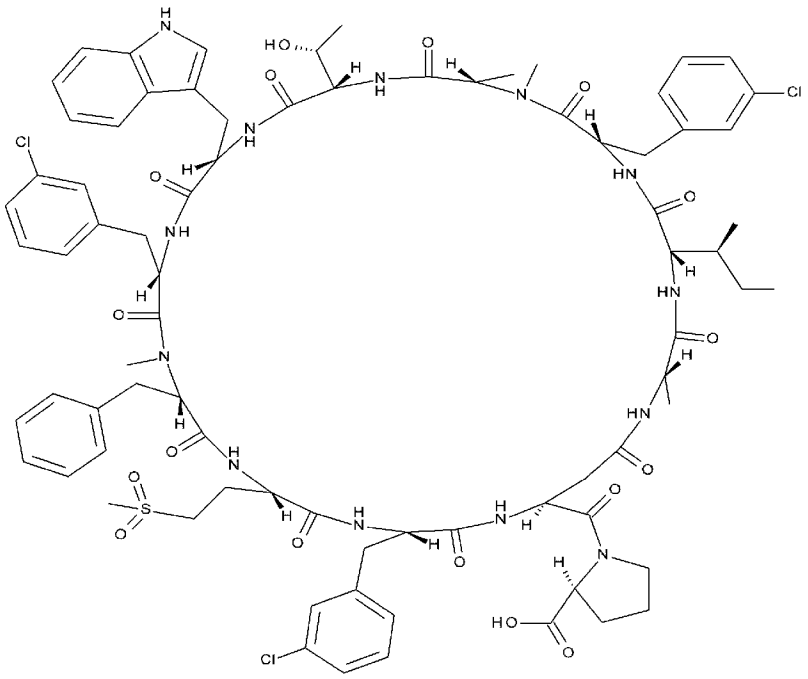
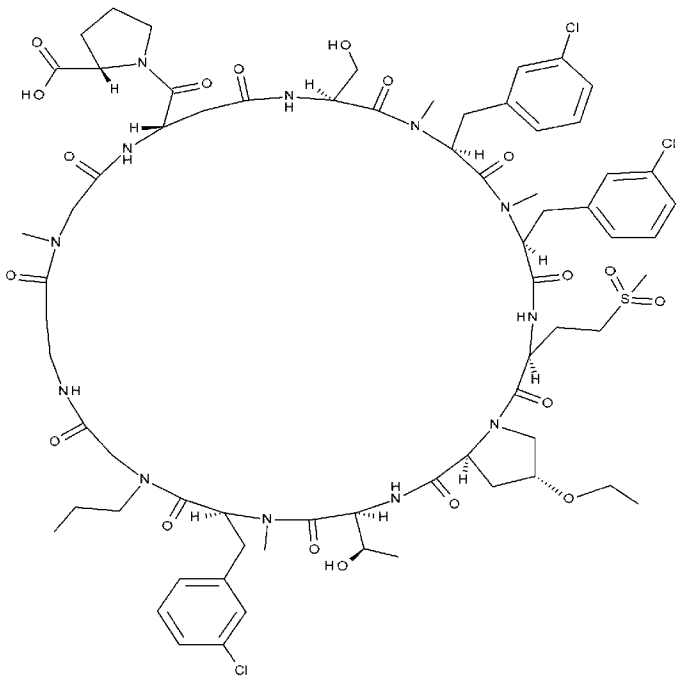
PS-17	
PS-18	

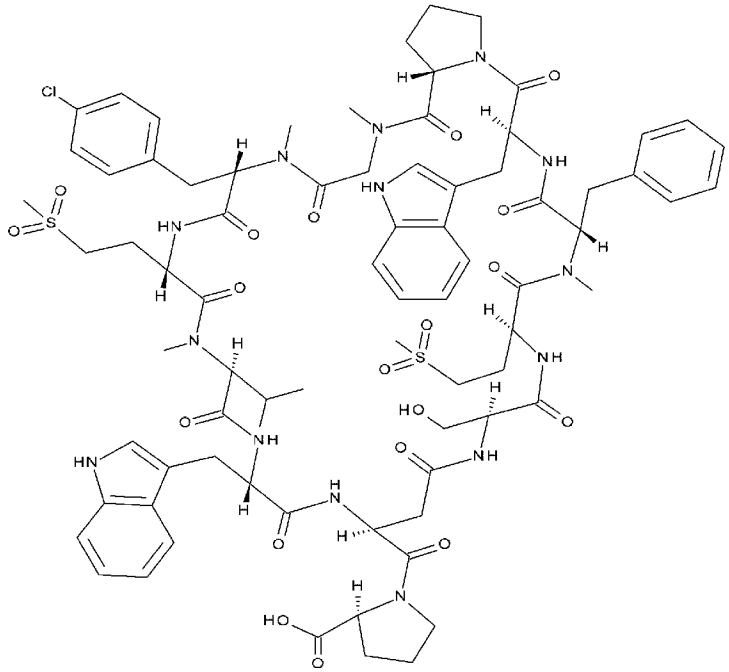
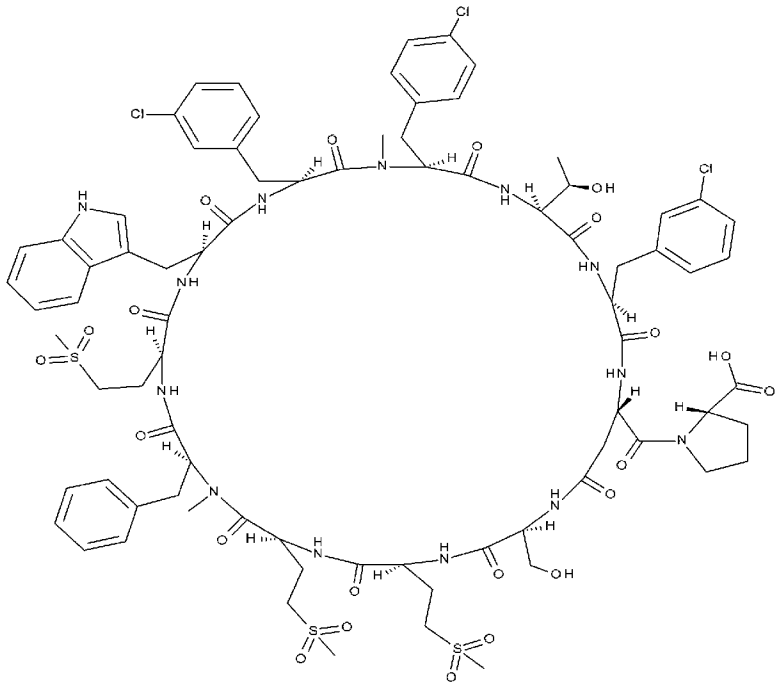
PS-19	
PS-20	

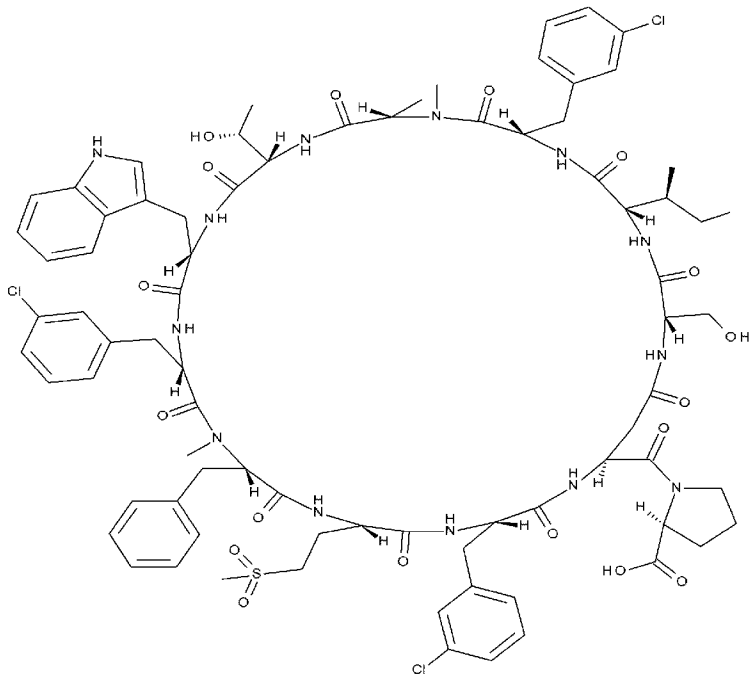
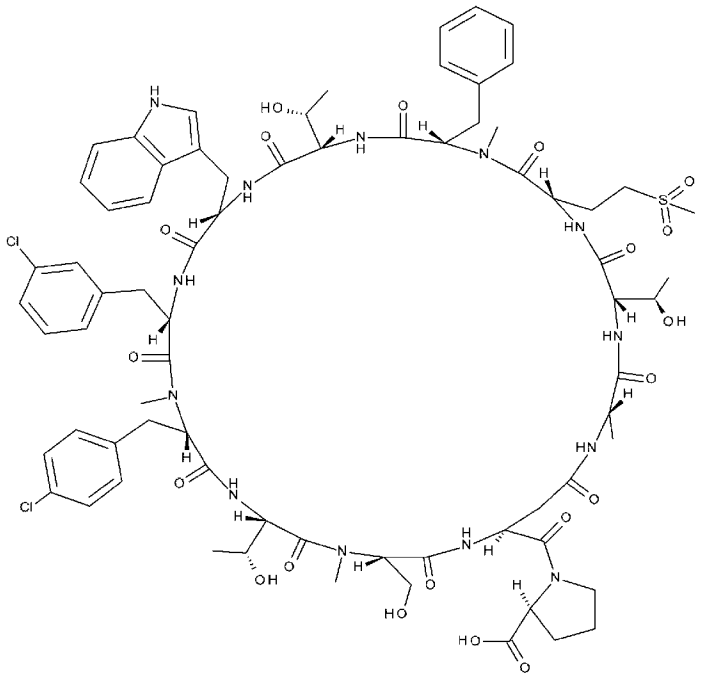
PS-21	
PS-22	

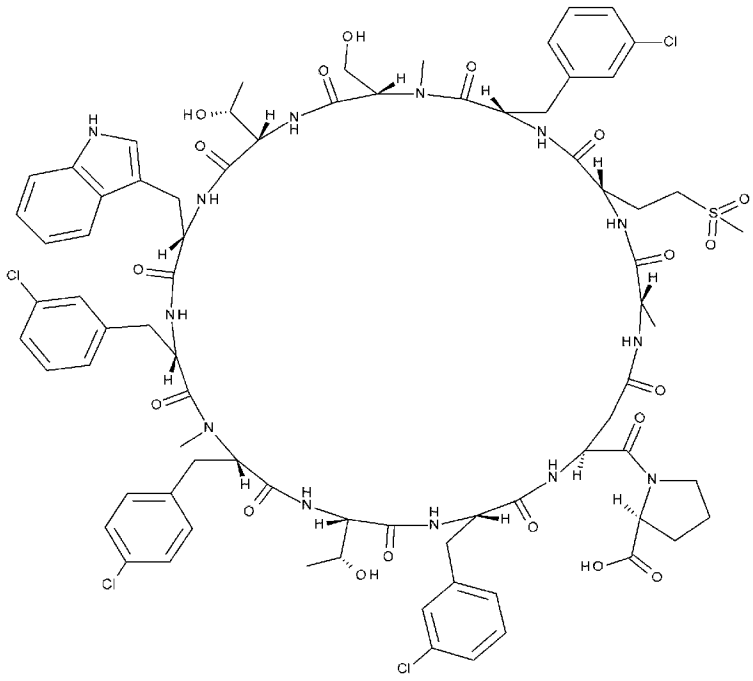
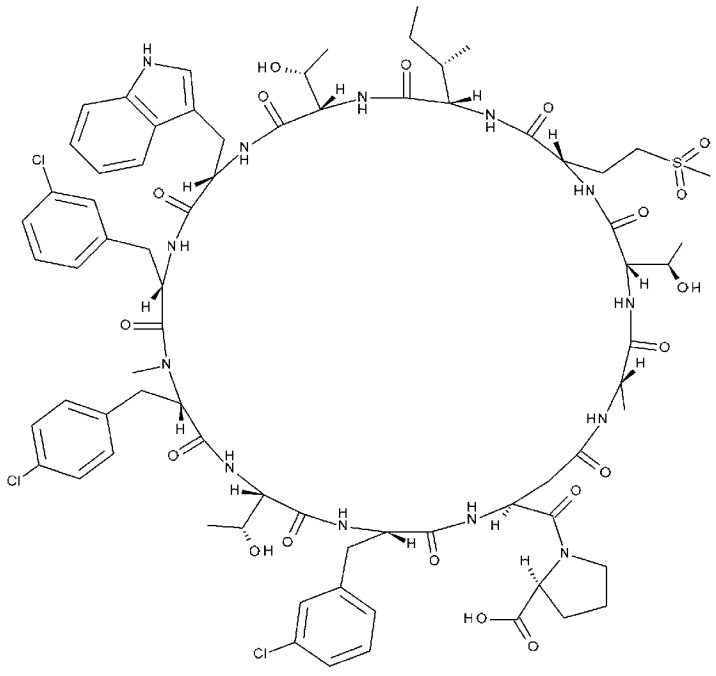
PS-23	
PS-24	

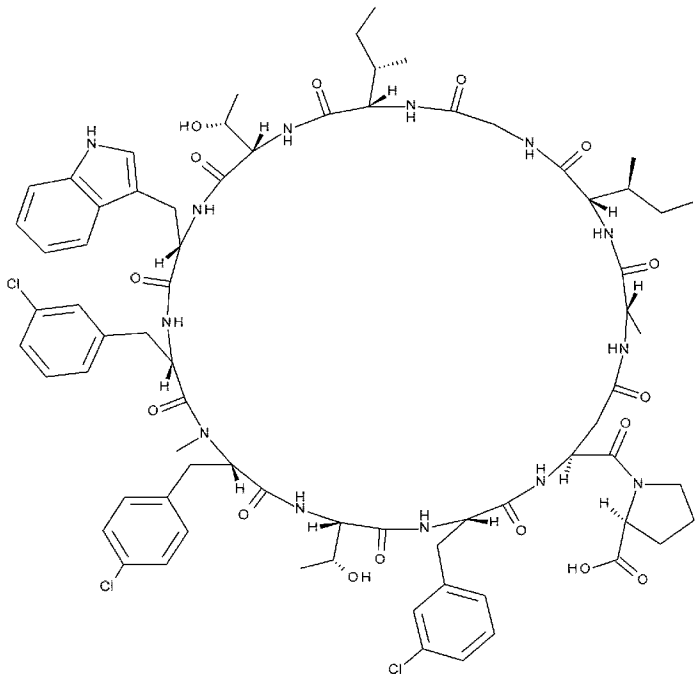
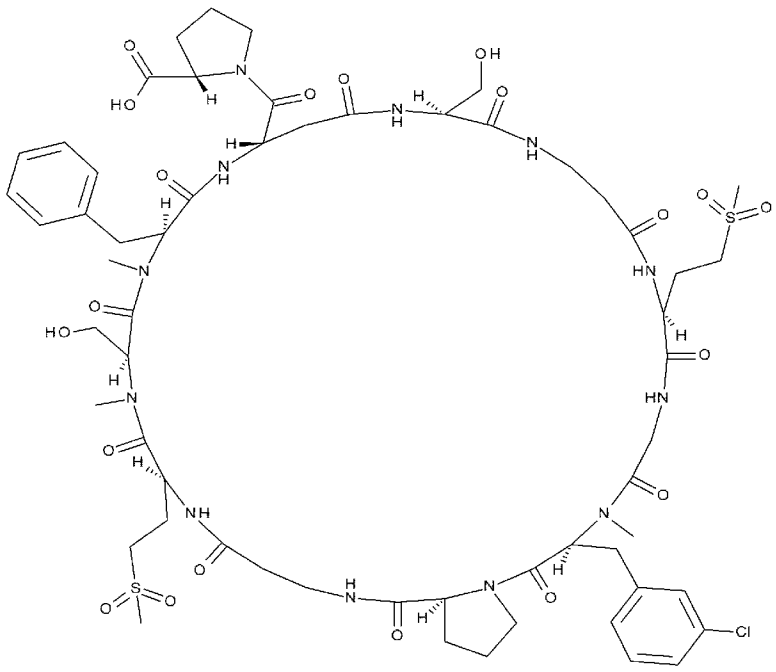
PS-25	
PS-26	

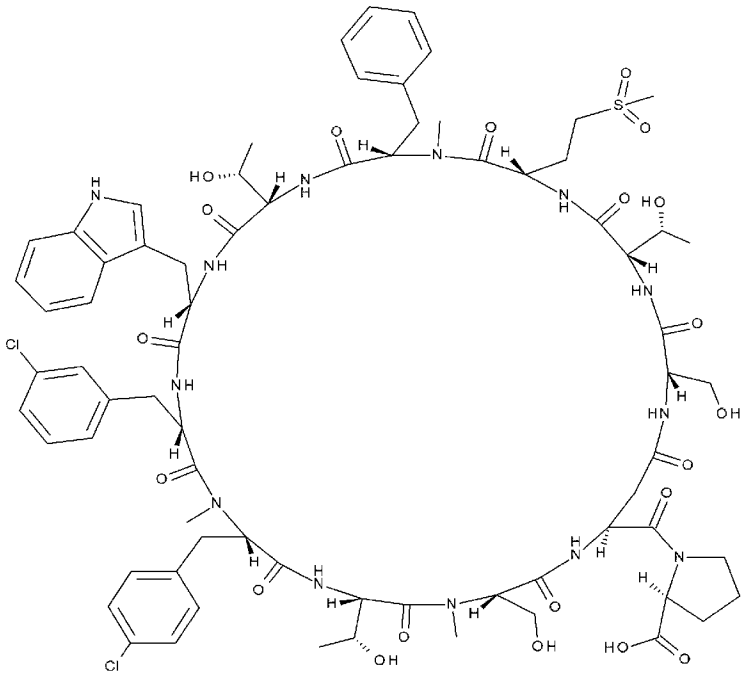
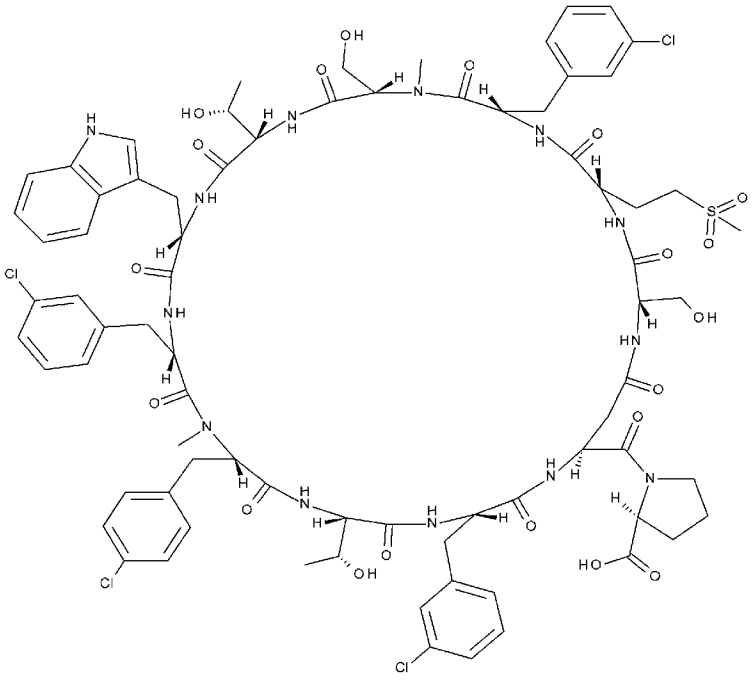
PS-27	
PS-28	

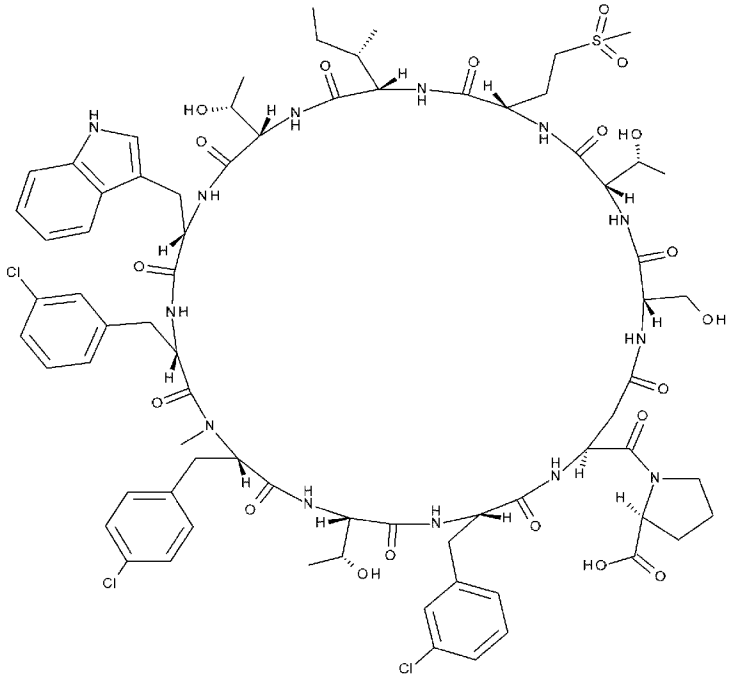
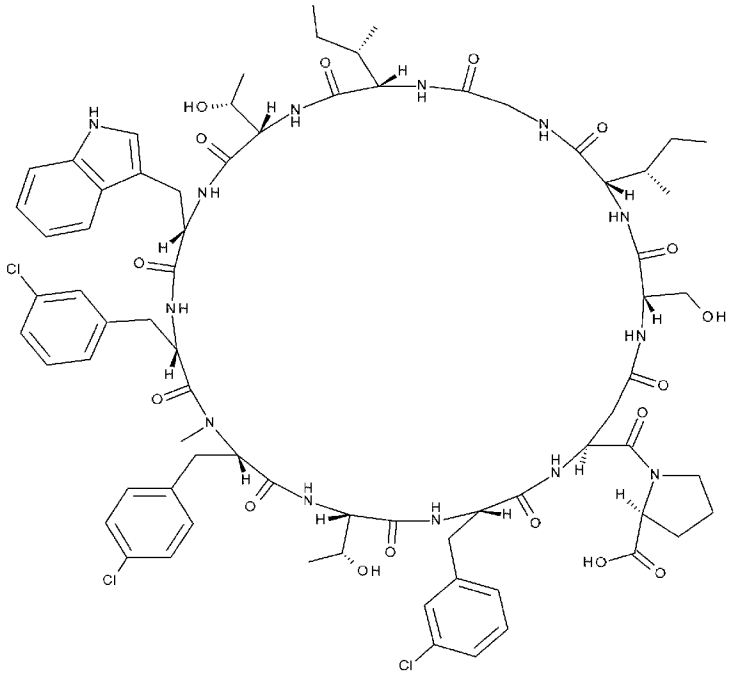
PS-29	
PS-30	

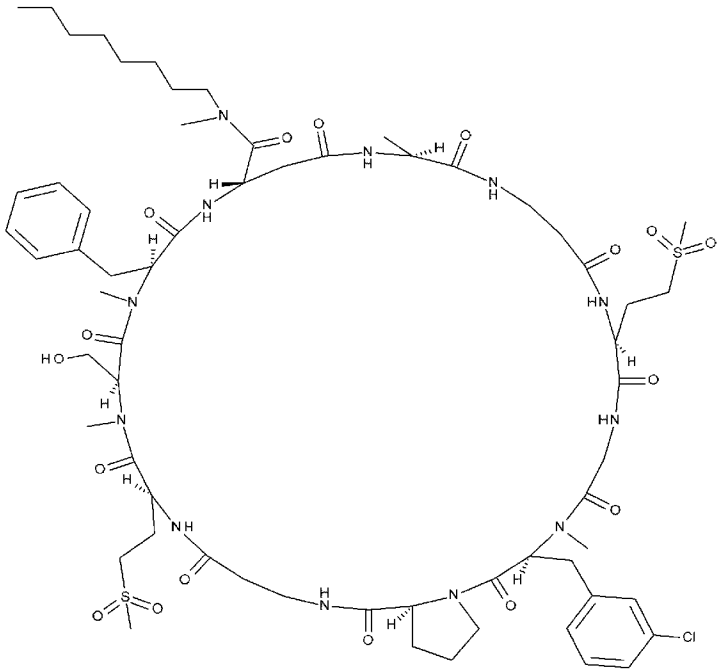
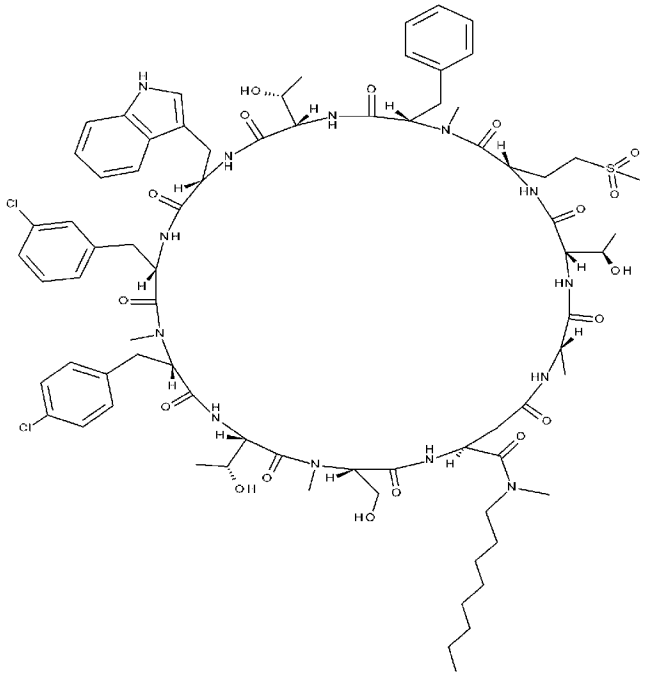
PS-31	
PS-32	

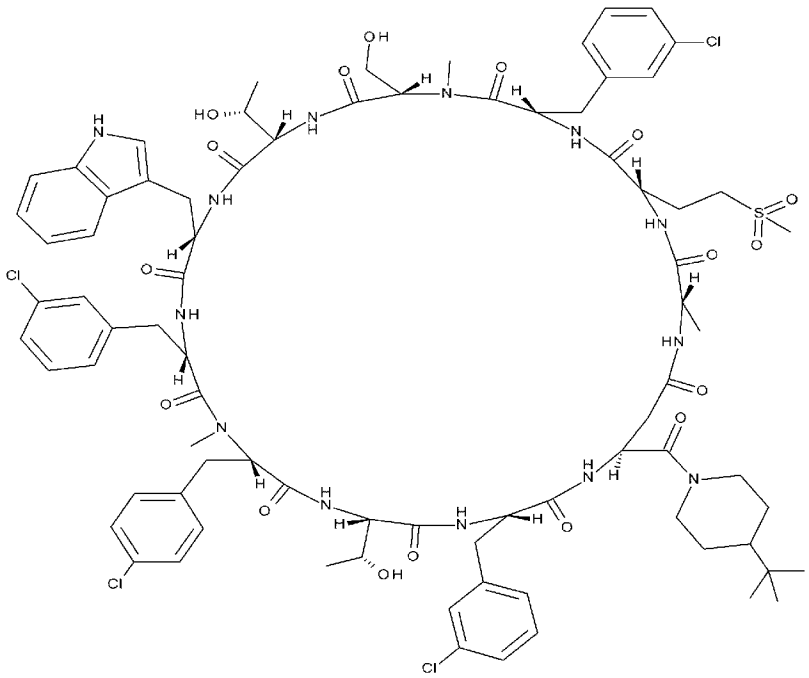
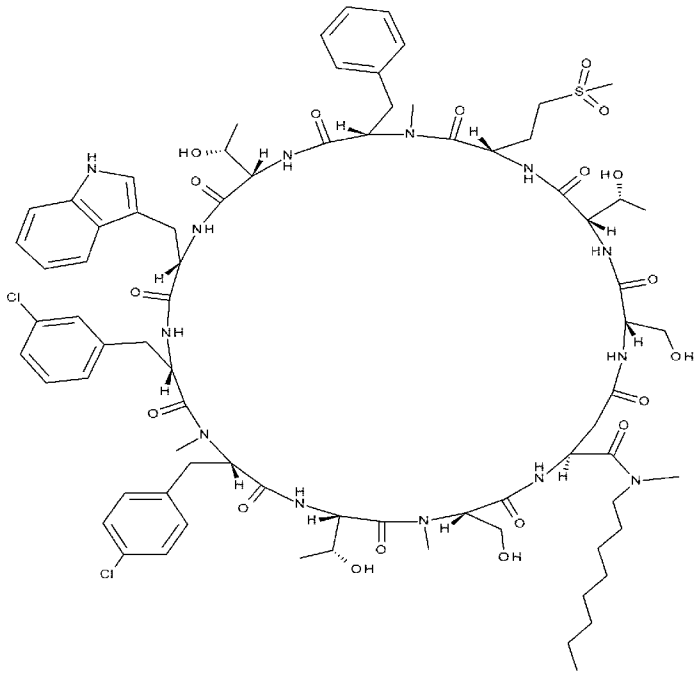
PS-33	
PS-34	

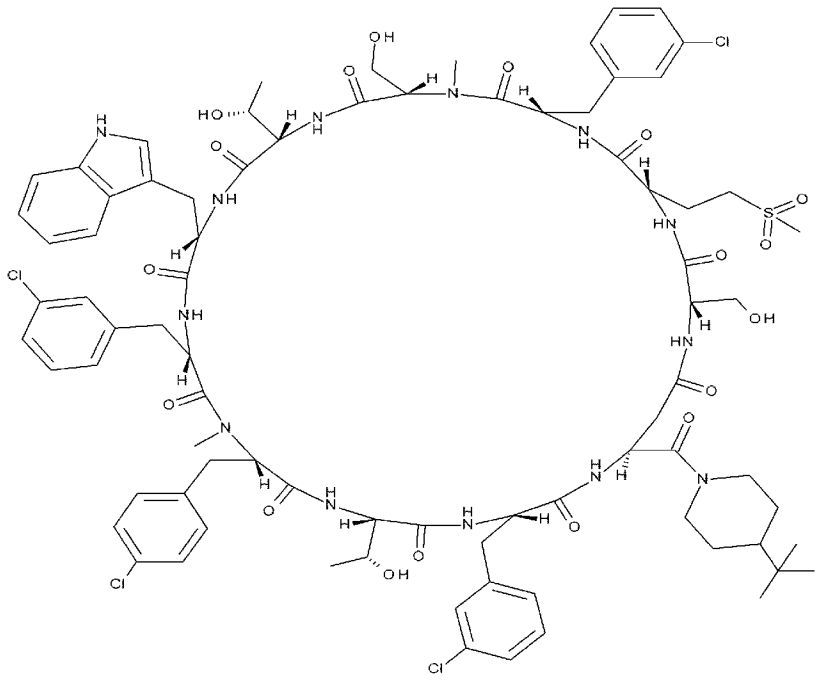
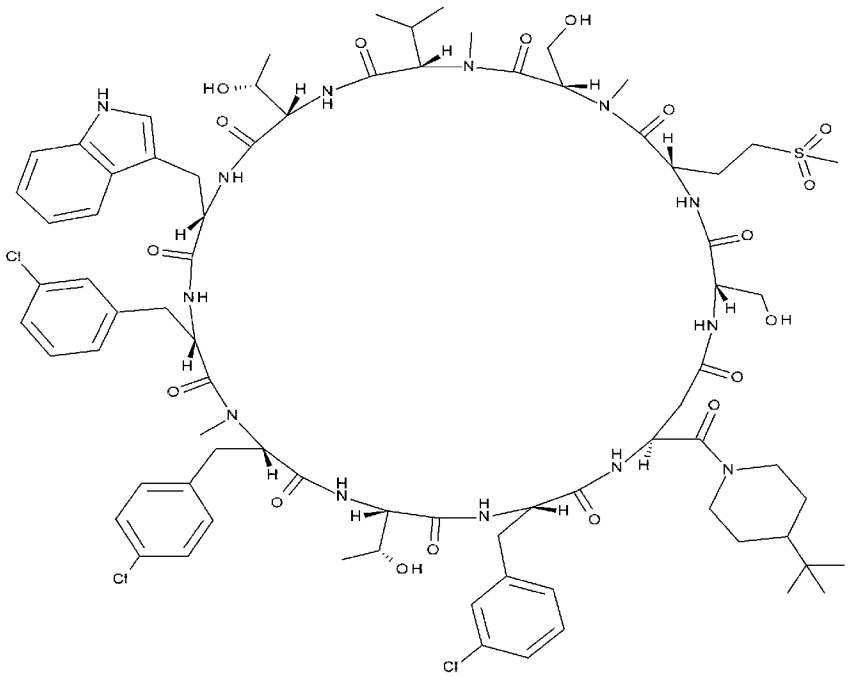
PS-35	
PS-36	

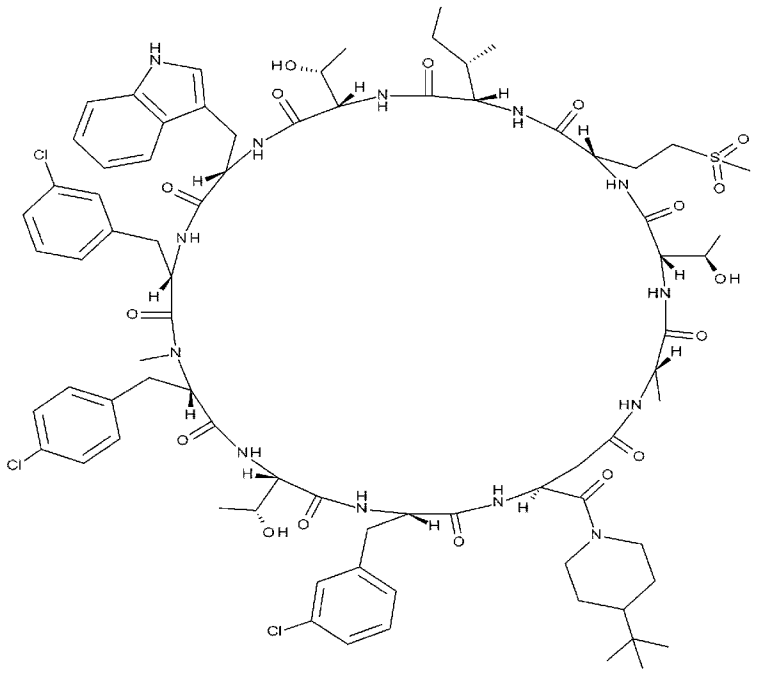
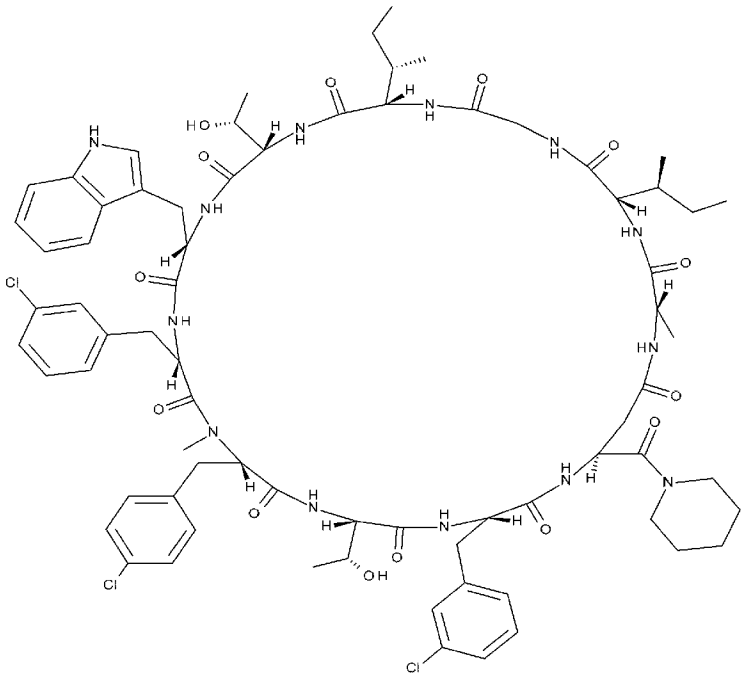
PS-37	
PS-38	

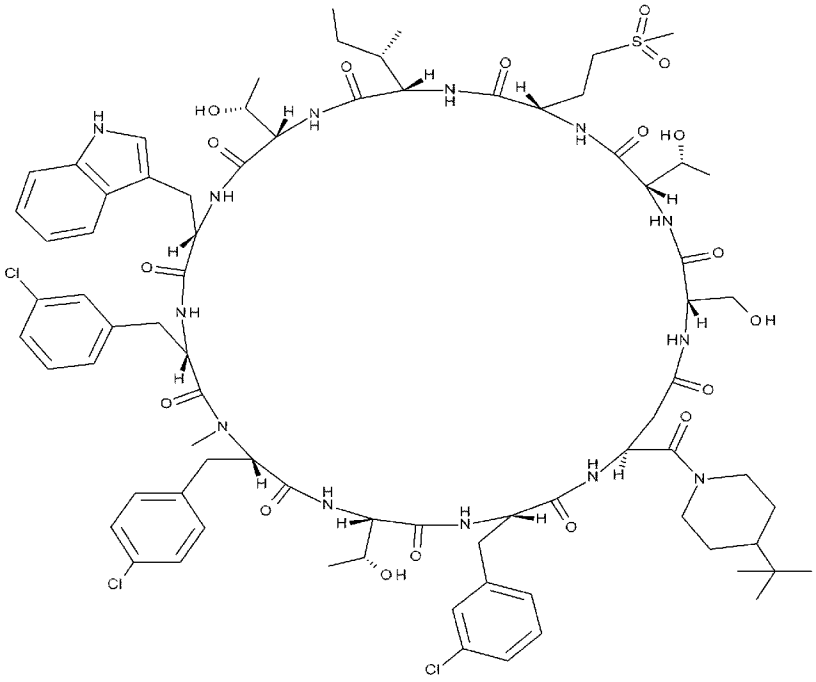
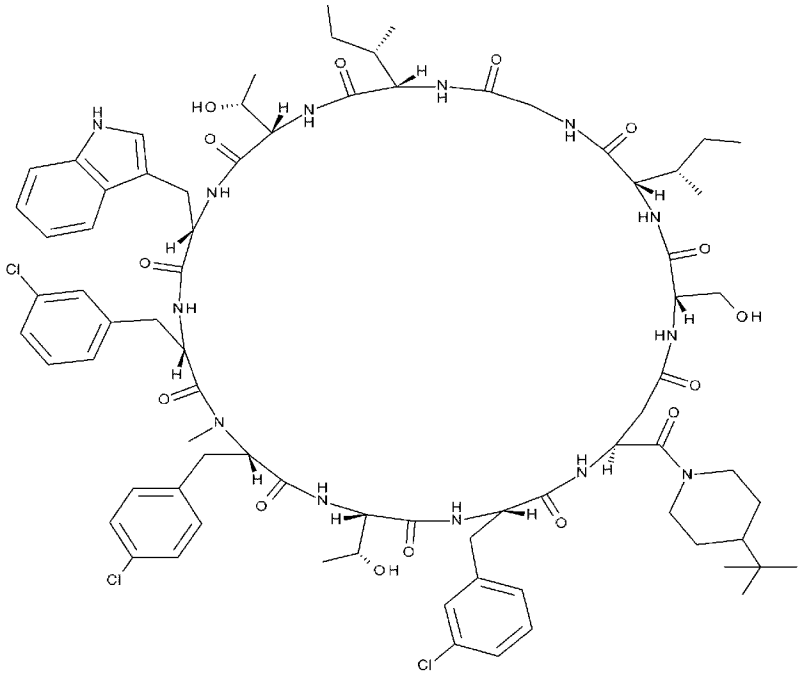
PS-39	
PS-40	

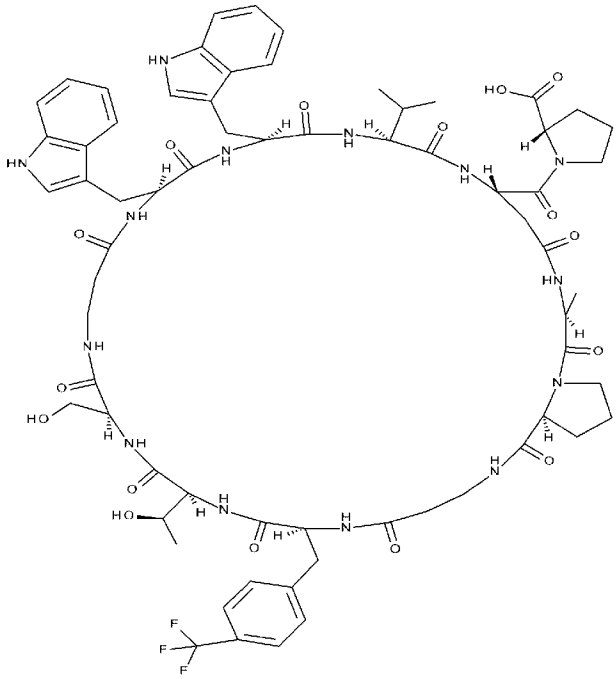
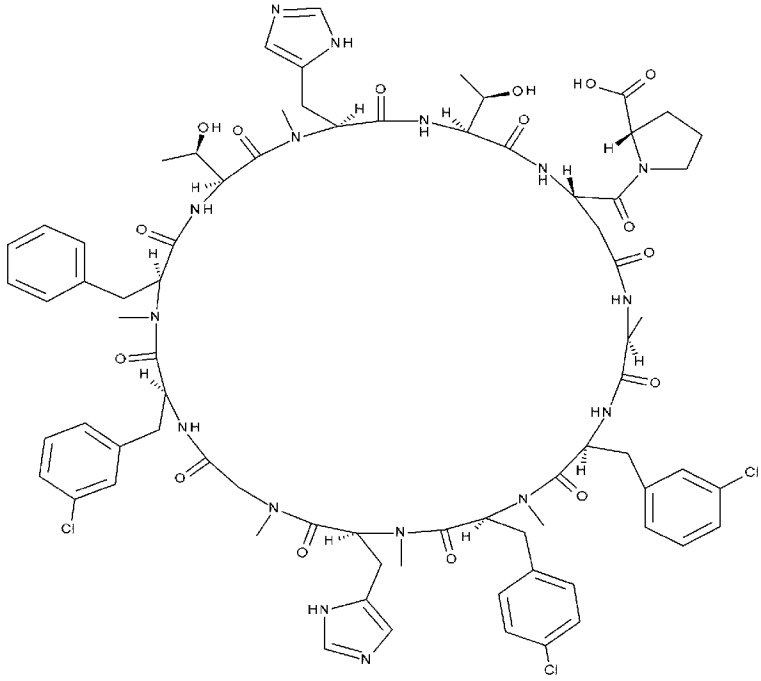
PS-41	
PS-42	

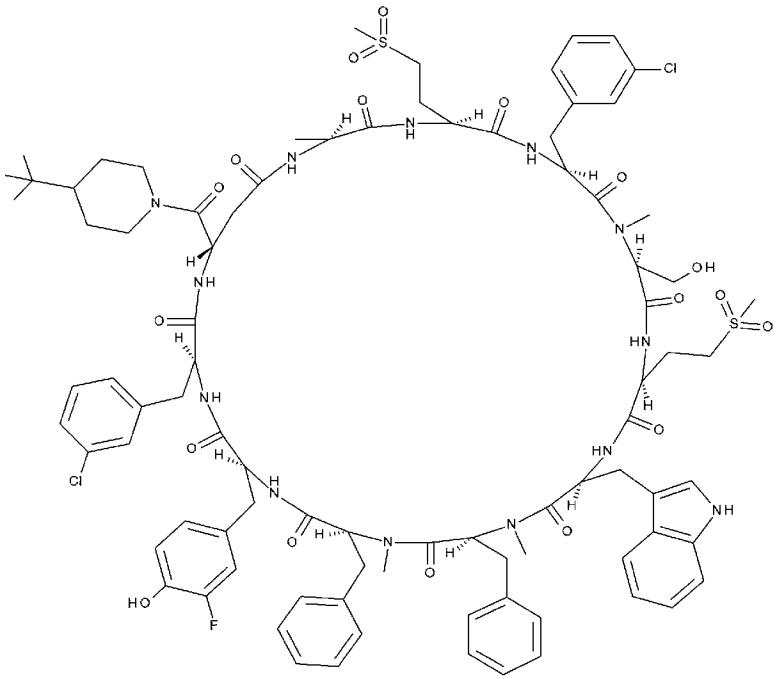
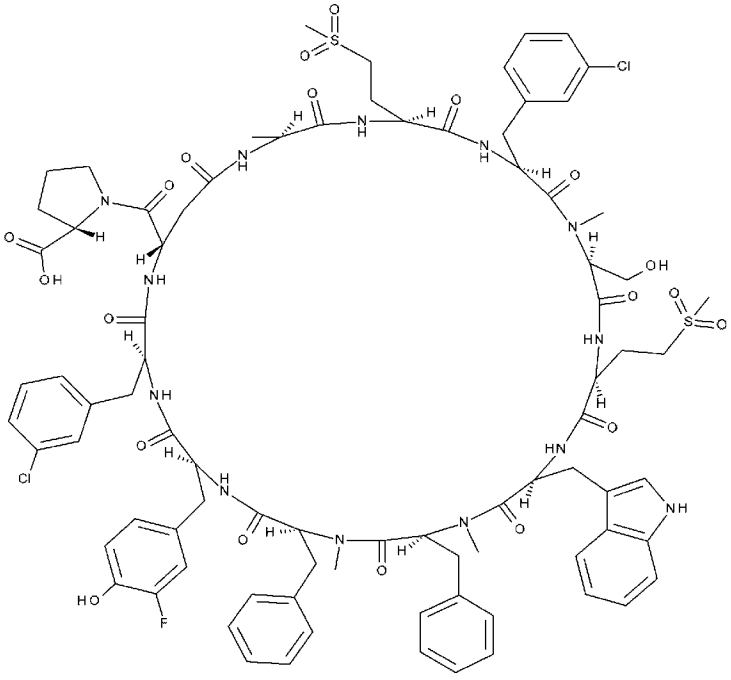
PS-43	
PS-44	

PS-45	
PS-46	

PS-47	
PS-48	

PS-49	
PS-50	

PS-51	
PS-52	

PS-53	
PS-54	

[0272]

[表5-3]

	LCMS条件	保持時間（分）	LCMS(ESI) m/z		純度（%）	収量（mg）
PS-1	SQDFA05	0.75	1682.8	(M+H)+	85	4.81
PS-2	SQDFA05	1.09	1689.7	(M+H)+	95	5.15
PS-3	SQDFA05	0.98	1726.7	(M+H)+	90	8.08
PS-4	SQDFA05	1.04	1650.8	(M+H)+	95	13.82
PS-5	SQDFA05	0.74	1698.8	(M+H)+	95	4.9
PS-6	SQDFA05	1.08	1705.9	(M+H)+	95	10.61
PS-7	SQDFA05	1.02	1744.7	(M+H)+	95	6.53
PS-8	SQDFA05	0.57	1654.7	(M+H)+	95	8.86
PS-9	SQDFA05	0.93	1663.5	(M+H)+	95	9.09
PS-10	SQDFA05	0.84	1700.7	(M+H)+	90	10.5
PS-11	SQDFA05	0.89	1624.7	(M+H)+	95	11.32
PS-12	SQDFA05	0.58	1670.7	(M+H)+	95	3.32
PS-13	SQDFA05	0.92	1679.6	(M+H)+	95	8.71
PS-14	SQDFA05	0.83	1716.7	(M+H)+	95	7.4
PS-15	SQDFA05	0.88	1640.7	(M+H)+	95	7.9
PS-16	SQDFA05	0.99	1541.9	(M+H)+	70	4.94
PS-17	SQDFA05	0.81	1589.9	(M+H)+	85	11.3
PS-18	SQDFA05	1.06	1806.8	(M+H)+	90	11.94
PS-19	SQDFA05	1.08	1662.8	(M+H)+	90	13.25
PS-20	SQDFA05	1.02	1559.7	(M+H)+	60	1.77
PS-21	SQDFA05	0.93	1663.9	(M+H)+	90	4.33
PS-22	SQDFA05	1.05	1822.8	(M+H)+	90	11.56
PS-23	SQDFA05	1.07	1678.8	(M+H)+	95	6.02
PS-24	SQDFA05	0.79	1515.7	(M+H)+	75	3.52
PS-25	SQDFA05	0.76	1619.9	(M+H)+	70	8.35
PS-26	SQDFA05	0.88	1778.5	(M+H)+	80	11.88
PS-27	SQDFA05	0.91	1636.8	(M+H)+	80	13.93
PS-28	SQDFA05	0.77	1531.7	(M+H)+	70	6.43
PS-29	SQDFA05	0.73	1635.7	(M+H)+	91	3.78
PS-30	SQDFA05	0.87	1794.7	(M+H)+	95	11.86
PS-31	SQDFA05	0.91	1652.7	(M+H)+	83	10.83
PS-32	SQDFA05	0.74	1574.7	(M+H)+	95	13.75
PS-33	SQDFA05	0.86	1674.6	(M+H)+	94	15.42
PS-34	SQDFA05	0.84	1606.6	(M+H)+	95	12.53
PS-35	SQDFA05	0.89	1512.7	(M+H)+	95	16.18
PS-36	SQDFA05	0.53	1379.7	(M+H)+	80	2.12
PS-37	SQDFA05	0.73	1590.7	(M+H)+	95	15.65
PS-38	SQDFA05	0.85	1690.4	(M+H)+	95	11.25
PS-39	SQDFA05	0.82	1622.6	(M+H)+	95	11.33
PS-40	SQDFA05	0.87	1528.7	(M+H)+	94	11.61
PS-41	SQDFA05	0.73	1391.7	(M+H)+	90	2.32
PS-42	SQDFA05	0.92	1602.7	(M+H)+	90	6.54
PS-43	SQDFA05	1.02	1700.6	(M+H)+	90	5.83
PS-44	SQDFA05	0.91	1618.9	(M+H)+	90	4.85
PS-45	SQDFA05	1.00	1716.7	(M+H)+	90	3.93
PS-46	SQDFA05	0.98	1648.7	(M+H)+	90	4.77
PS-47	SQDFA05	0.99	1632.7	(M+H)+	90	3.64
PS-48	SQDFA05	0.96	1482.7	(M+H)+	90	4.81
PS-49	SQDFA05	0.97	1648.7	(M+H)+	90	3.15
PS-50	SQDFA05	1.05	1554.8	(M+H)+	90	6.01
PS-51	SQDFA05	0.62	1396.7	(M+H)+	71	2.98
PS-52	SQDFA05	0.56	1577.6	(M+H)+	95	6.4
PS-53	SQDFA05	0.93	1788.7	(M+H)+	89	7.4
PS-54	SQDFA05	0.78	1762.7	(M+H)+	85	2.8

[0273] 実施例７．本発明の液相法への適用

液相法での伸長反応を含む合成を以下に示す。

[0274] 部分的な液相法への応用

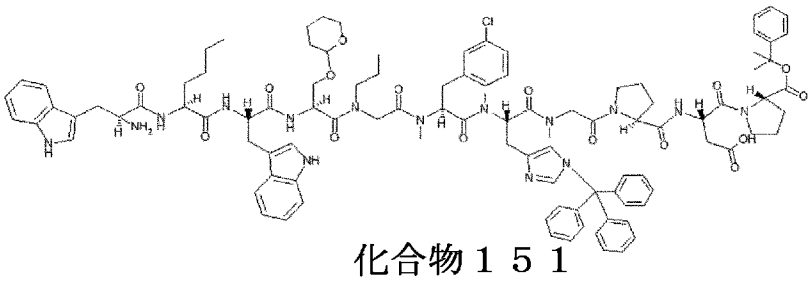
液相でのFmoc-Ala-OSu（化合物１５２）とH-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５１）とのカップリングを含む、環状ペプチド（化合物１５４、H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OHの主鎖N末端のアミノ基とAspの側鎖カルボン酸基との間でアミド結合を形成した環状ペプチド）の合成

液相法での伸長反応を含む図２１に記載の合成ルートにて、ペプチドの合成を行った。

[0275] 実施例７－１：

H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５１）の合成

[化73]



化合物１５１

既に記載の方法にて合成したFmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis（化合物５８、ローディング量0.3736 mmol/g、200 mg）を使用し、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。

続いてDCMにてレジンを再膨潤させた後、レジンにTFE/DCM（1/1, v/v, 4 mL)とジイソプロピルエチルアミン（24 μL）を加えて室温にて２時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。続いて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、残ったレジンをさらにTFE

/DCM (1/1, v/v, 2 mL)にて２回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮して、標題の化合物（化合物１５１、H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis、113.8 mg）を得た。精製は行わずに次の工程に用いた。

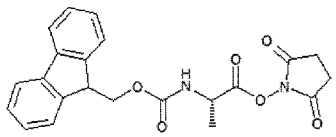
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１８６０．９（Ｍ＋Ｈ）$^+$

保持時間：０．７２分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0276] 実施例７－２：

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 (S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル（化合物１５２、Fmoc-Ala-OSu）の合成

[化74]



化合物１５２

(S)-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、1.00 g、3.21 mmol）と1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン（HOSu、0.554 g、4.82 mmol）とジクロロメタン（6.4 mL）を窒素雰囲気下混合した。この混合物を０度に氷冷し、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、0.924 g、4.82 mmol）を加え、得られた反応溶液を０度にて１時間、室温にて１５時間攪拌した。続いて、減圧下、溶媒を留去し、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、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 (S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル（化合物１５２、Fmoc-Ala-OSu、1.05 g）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝４０９．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

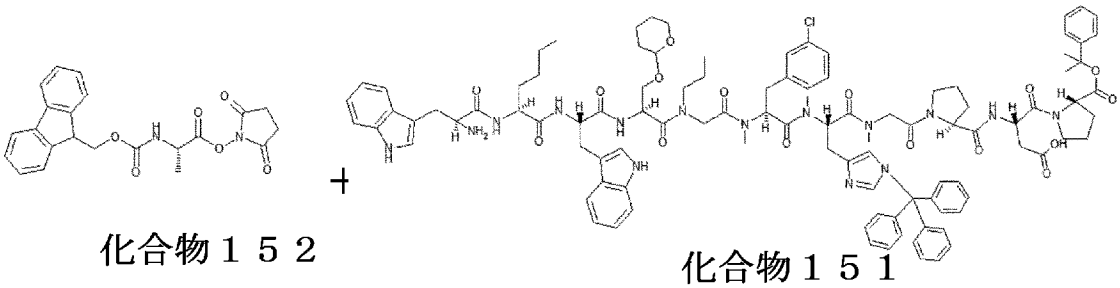
保持時間：０．８０分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0277] 実施例７－３：

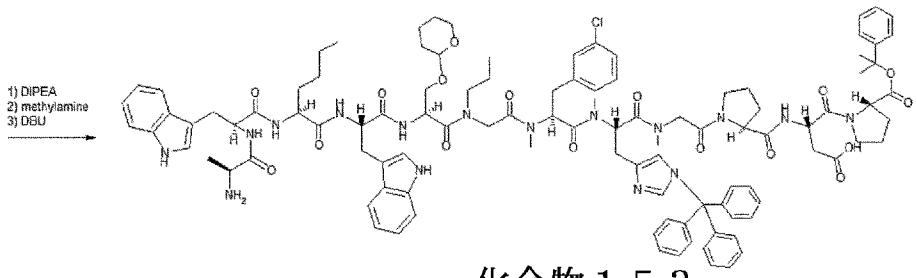
2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)プロパン酸 (S)-

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル（化合物１５２、Fmoc-Ala-OSu）とH-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５１）とのカップリングと、続く脱Fmoc反応

[化75]



化合物１５２ 化合物１５１



化合物１５３

得られたH-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５１、113.8 mg）のジクロロメタン（245 μL）溶液に、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 (S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル（化合物１５２、Fmoc-Ala-OSu、26.2 mg）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、12.8μL）を加え、２５度にて１時間攪拌した。続いて、反応溶液にメチルアミン（40%メタノール溶液、11.9 μL）を加えて３０分間攪拌した後、DBU（11.1 μL）を加えてさらに３０分間攪拌した。得られ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）にて精製を行い、得られたフラクションを凍結乾燥した。得られた残渣をジクロロメタンに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄し、H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５３、79.3 mg、0.041 mmol）を得た。

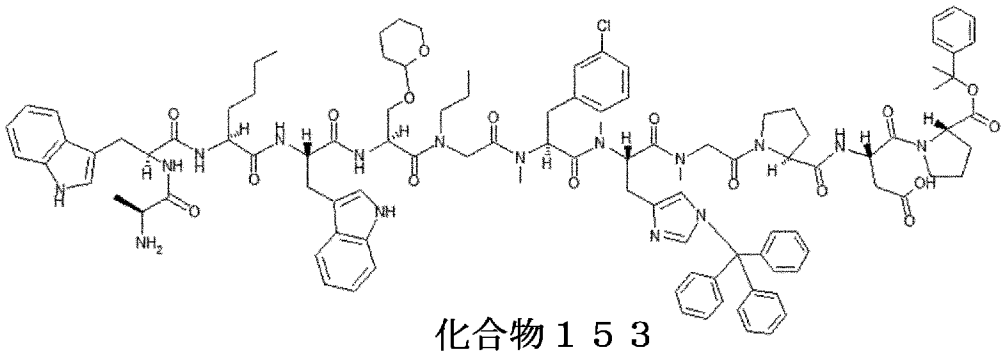
ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１９３１．８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．７３分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

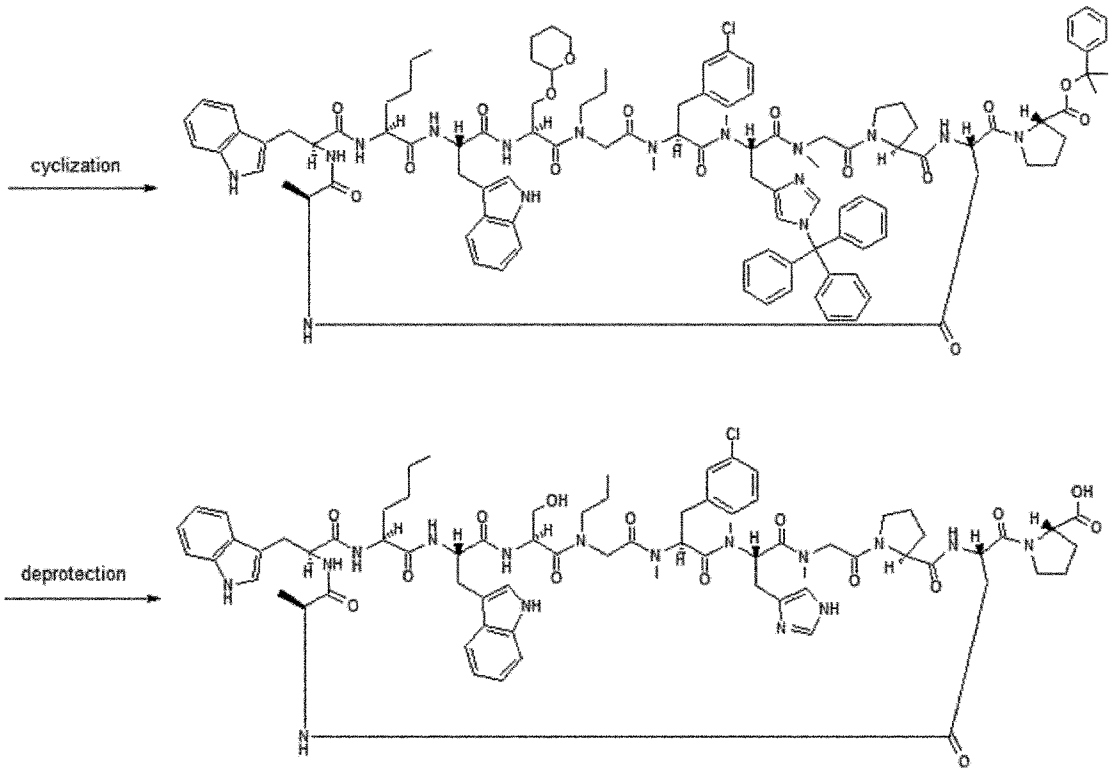
[0278] 実施例７－４：

H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OHのN末端アミノ基とAsp側鎖のカルボン酸基とがアミド環化した化合物（化合物１５４）の合成（化合物１５３の環化反応と、続く脱保護反応）

[化76]



化合物１５３



化合物１５４

得られたH-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis（化合物１５３、79.3 mg、0.041 mmol）をDMF（20 mL）とジクロロメタン（20 mL）に溶解させ、HATU（17.2 mg、0.045 mmol）と

ジイソプロピルエチルアミン（10.8 μL、0.062 mmol）を加えて、２５度にて２時間攪拌した。続いて、減圧下、溶媒を留去した後、0.05 M 硫酸水素テトラメチルアンモニウム/HFIP（2% TIPS)溶液（本実施例に既に記載の方法にて調製、8 mL）を加えて２５度にて１時間静置した。得られた反応溶液にジイソプロピルエチルアミン（140 μL）を加え、減圧下、溶媒を留去した。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）にて精製を行い、得られたフラクションを凍結乾燥することで、H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OHのN末端アミノ基とAsp側鎖のカルボン酸基とがアミド環化した化合物（化合物１５４、59 mg、0.040 mmol、98%）を得た。

ＬＣＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１４６９．７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

保持時間：０．６１分（分析条件ＳＱＤＦＡ０５）

[0279] 液相でのセグメントカップリングを含む上述のペプチド合成のとおり、本発明の合成法は液相法にも適用可能である。

産業上の利用可能性

[0280] 本発明によれば、医薬品としての有用性が期待できるＮ－置換アミノ酸を含むペプチドを、高純度かつ高い合成効率にて合成することができる。本発明は、医薬品の原料となりうるＮ－置換アミノ酸を含むペプチドの工業的な生産の分野等において有用である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の工程：

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）工程１）で準備されたＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを固相に担持する工程、

３）固相に担持されたＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

４）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程、及び、

５）工程４）で得られたペプチドを、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で固相から切り出す工程、

を含む、少なくとも１つのＮ－置換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類縁体を含むペプチドの製造方法。

[請求項2] 前記工程４）で得られたペプチドを構成するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されず、かつ第１の酸で脱保護される保護基で保護されており、前記工程５）の前又は後で、該第１の酸にて該保護基を脱保護する工程をさらに

含み、かつ

前記工程５）において、第２の酸を用いてペプチドを切り出す、請求項１に記載の製造方法であって、

第１の酸および第２の酸がいずれもＴＦＡよりも弱酸であり、かつ第１の酸の酸度が第２の酸の酸度よりも高い、製造方法。

[請求項3] 以下の工程：

１）以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸）、以下のｉ）及びｉｉ）の官能基をそれぞれ少なくとも１つ有するアミノ酸類縁体（Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体）、又は、該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸及び該Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体の両方又はいずれか一方を含むペプチド（Ｆｍｏｃ保護ペプチド）を準備する工程；

ｉ）Ｆｍｏｃ骨格を有する少なくとも１つの保護基により保護されている主鎖のアミノ基、

ｉｉ）遊離の又は活性エステル化された少なくとも１つのカルボン酸基、

２）Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護し、アミノ基を露出する工程、

３）新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程であって、この工程で得られるペプチドを構成するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の少なくとも１つの側鎖が、塩基性条件下では脱保護されずＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護される保護基を有する工程、及び、

４）前記側鎖の保護基を、ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で脱保護する工程、

を含む、少なくとも１つのＮ－置換アミノ酸又はＮ－置換アミノ酸類

縁体を含むペプチドの製造方法。

[請求項4] ペプチドの製造が固相法によって行われる、請求項３に記載の製造方法。

[請求項5] 前記工程３）で得られたペプチドを、前記工程４）の前又は後で前記工程４）で用いられる弱酸条件よりも更に弱酸となる条件下で固相から切り出す工程をさらに含む、請求項４に記載の製造方法。

[請求項6] ペプチドの製造が液相法によって行われる、請求項３に記載の製造方法。

[請求項7] 請求項１の工程４）又は請求項３の工程３）が、

新たに添加したＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドのＦｍｏｃ骨格を有する保護基を塩基で脱保護してアミノ基を露出する工程、および

更に新たなＦｍｏｃ保護アミノ酸、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸類縁体又はＦｍｏｃ保護ペプチドを添加して、アミド結合を形成する工程をさらに含み、

これらの工程を１回または複数回繰り返す、請求項１から６のいずれかに記載の製造方法。

[請求項8] 製造されたペプチドが、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をＣ末端側に含み、かつもう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カルボン酸類縁体をＮ末端側に含む、請求項１から７のいずれかに記載の製造方法。

[請求項9] 前記１つの反応点と前記もう一つの反応点とを結合させ、前記ペプチドを環化させる工程をさらに含む、請求項８に記載の製造方法。

[請求項10] 前記もう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カルボン酸類縁体がＮ末端にあり、かつ前記結合がアミド結合である、請求項９に記載の製造方法。

[請求項11] 前記もう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カルボン酸類縁体がＮ末端にあり、かつ前記結合が炭素－炭素結

合である、請求項９に記載の製造方法。

[請求項12] ＴＦＡよりも弱酸となる条件下で行われる工程が、水中でのｐＫａの値が０～９である弱酸を、イオン化能Y_{OTs}値が正の値で水中でのｐＫａが５～１４である溶媒に含む、弱酸溶液を用いて行われる、請求項１から１１のいずれかに記載の製造方法。

[請求項13] 溶媒がフルオロアルコールである、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項14] フルオロアルコールがＴＦＥ又はＨＦＩＰである、請求項１３に記載の製造方法。

[請求項15] 側鎖の保護基が、ｐＨ１からｐＨ７の範囲で脱保護される保護基であるか、又は１０％以下のＴＦＡにおいて脱保護される保護基である、請求項２から１４のいずれかに記載の製造方法。

[請求項16] 側鎖の保護基が以下のａ）～ｄ）から選択される、請求項２から１５のいずれかに記載の製造方法：

ａ）側鎖の保護基がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｈｙｐ、及び、それらの誘導体の側鎖のヒドロキシル基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格基、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格及びＢｏｃ骨格から選ばれるいずれかの保護基；

ｂ）側鎖の保護基がＴｙｒ及びその誘導体の側鎖のヒドロキシル基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、シリル骨格、Ｂｏｃ骨格及びｔＢｕ骨格から選ばれるいずれかの保護基；

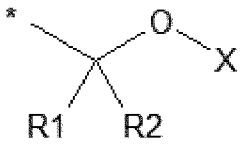
ｃ）前記側鎖の保護基がＨｉｓ及びその誘導体の側鎖のイミダゾール環の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格及びＴｒｔ骨格から選ばれるいずれかの保護基；

ｄ）前記側鎖の保護基がＡｓｐ、Ｇｌｕ、及び、それらの誘導体の側鎖のカルボン酸基の保護基である場合、以下の一般式で表わされるＭＯＭ骨格、Ｂｎ骨格、Ｄｐｍ骨格、Ｔｒｔ骨格、ｔＢｕ骨格、フェニル－ＥＤＯＴｎ骨格及び保護をするカルボン酸基の炭素原子を３つの

アルコキシ基が置換した骨格に変換したオルトエステル骨格から選ばれるいずれかの保護基；

＜ＭＯＭ骨格を有する保護基＞

[化1]



（式中、

Ｒ１はＨであり、Ｒ２はＨであり、かつＸはメチル、ベンジル、４－メトキシベンジル、２，４－ジメトキシベンジル、３，４－ジメトキシベンジル、または２－トリメチルシリルエチルであるか、

Ｒ１はメチルであり、Ｒ２はＨであり、かつＸはエチルであるか、

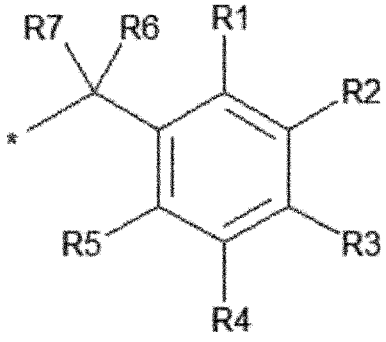
Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３は、いずれもメチルであるか、または

Ｒ１とＸは、一緒になって－CH_2－CH_2－CH_2－または－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－を形成し、かつＲ２はＨであり

ここで、Ｒ１、Ｒ２、およびＸのいずれかがメチルまたはエチルである場合、これらの基はさらにアルキル、ベンジル、またはアリールで置換されていてもよい。）

＜Ｂｎ骨格を有する保護基＞

[化2]



（式中、

Ｒ１～Ｒ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ６およびＲ７はアルキルであるか、

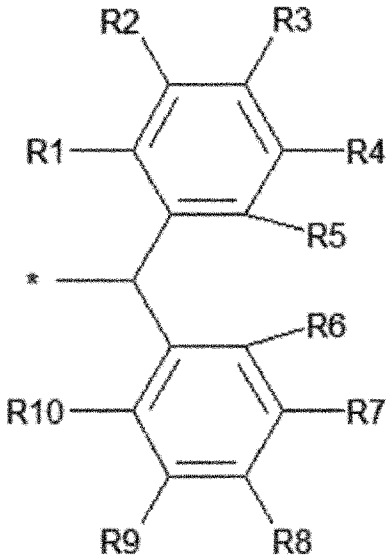
Ｒ１、Ｒ２、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、Ｒ３はメトキシであり、かつＲ６およびＲ７はＨであるか、

Ｒ１およびＲ３がメトキシであり、Ｒ２、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ６およびＲ７はＨであるか、または

Ｒ１、Ｒ４、およびＲ５は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、またはハロゲンであり、かつＲ２とＲ３は一緒になって－Ｏ－CH_2－Ｏ－を形成する。）

＜Ｄｐｍ骨格を有する保護基＞

[化3]



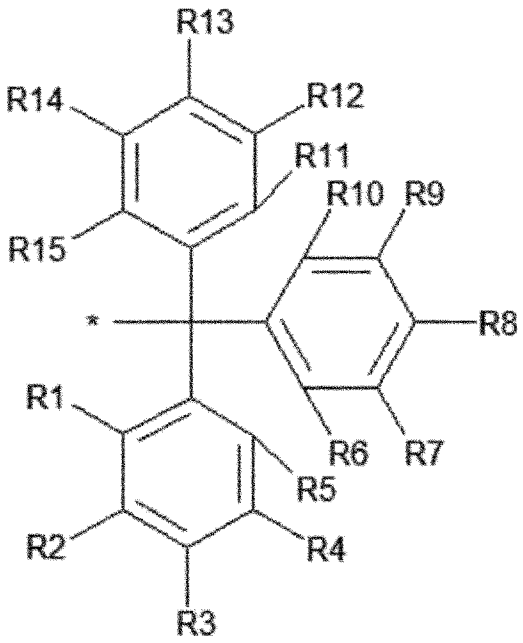
（式中、

Ｒ１～Ｒ１０は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、または

Ｒ１～Ｒ４およびＲ７～Ｒ１０は、それぞれ独立してＨ、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ５およびＲ６は一緒になって－Ｏ－または－CH_2－CH_2－を形成する。）

＜Ｔｒｔ骨格を有する保護基＞

[化4]



（式中、

Ｒ１～Ｒ１５は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、

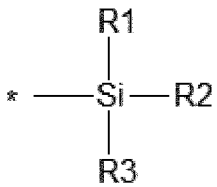
Ｒ１、Ｒ２、およびＲ４～Ｒ１５は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ３は、メチルまたはメトキシであるか、

Ｒ１はＣｌであり、かつＲ２～Ｒ１５は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであるか、または

Ｒ１～Ｒ４、およびＲ７～Ｒ１５は、それぞれ独立してH、アルキル、アリール、アルコキシ、またはハロゲンであり、かつＲ５とＲ６は一緒になって－Ｏ－を形成する。）

＜シリル骨格を有する保護基＞

[化5]

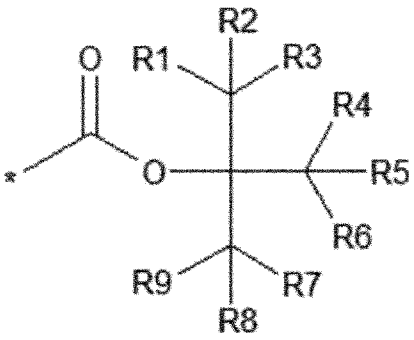


（式中、

Ｒ１～Ｒ３は、それぞれ独立してアルキル、またはアリールである。）

＜Ｂｏｃ骨格を有する保護基＞

[化6]

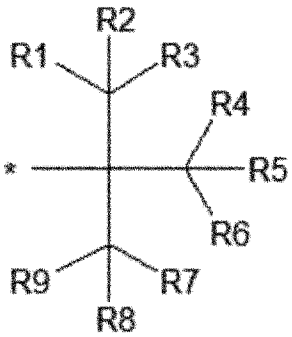


（式中、

Ｒ１～Ｒ９は、それぞれ独立してＨ、アルキル、またはアリールである。）

＜ｔＢｕ骨格を有する保護基＞

[化7]

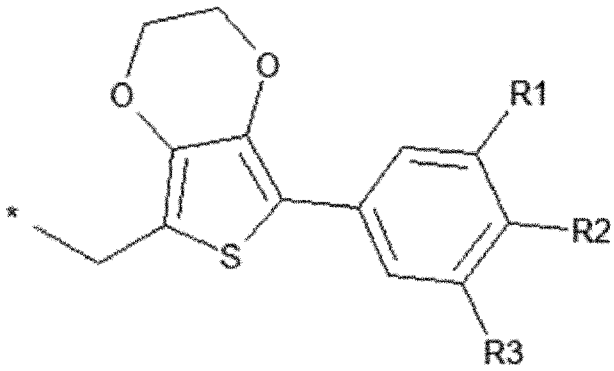


（式中、

Ｒ１～Ｒ９は、それぞれ独立してＨ、アルキル、またはアリールである。）

＜フェニル－ＥＤＯＴｎ骨格を有する保護基＞

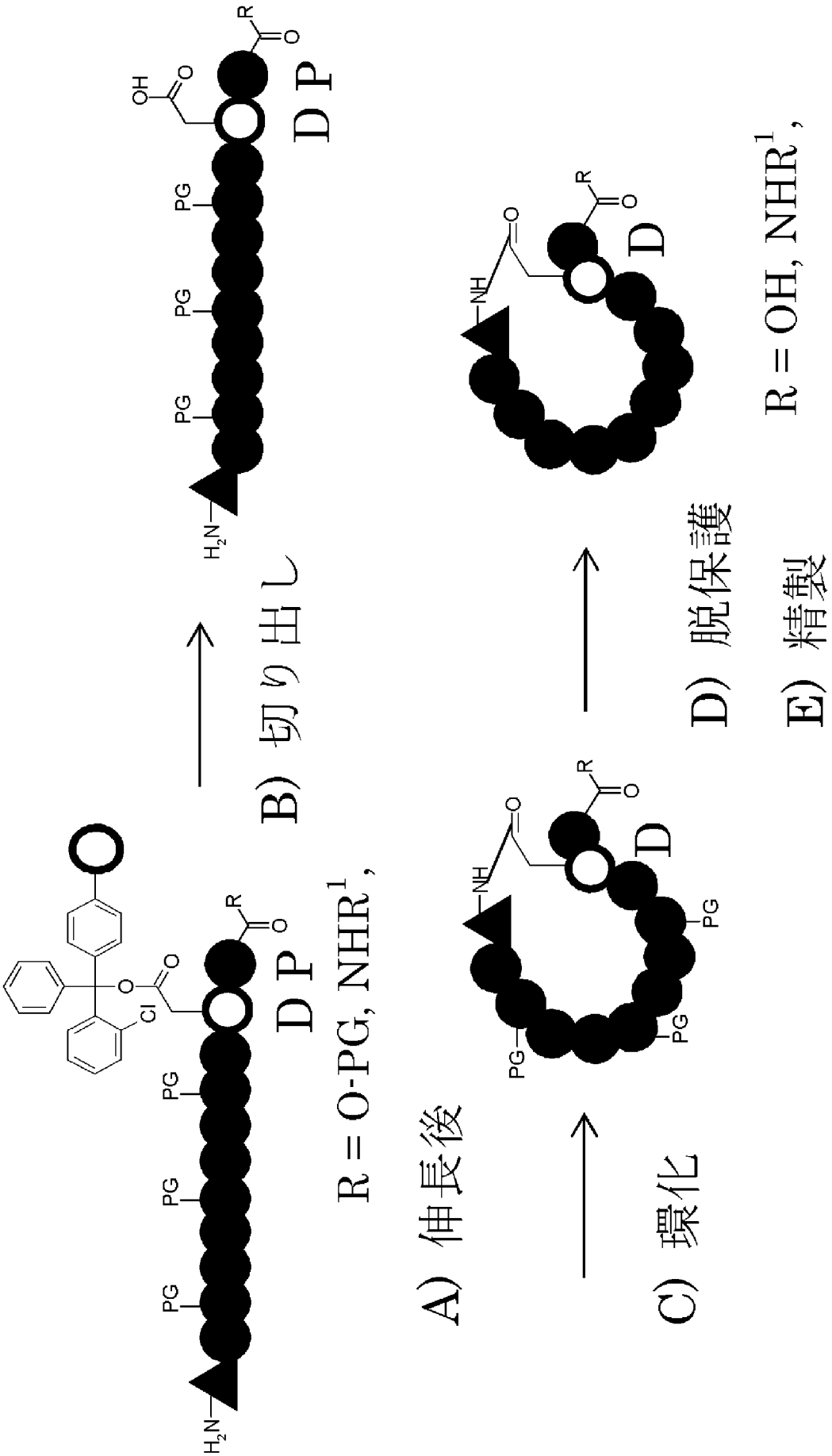
[化8]



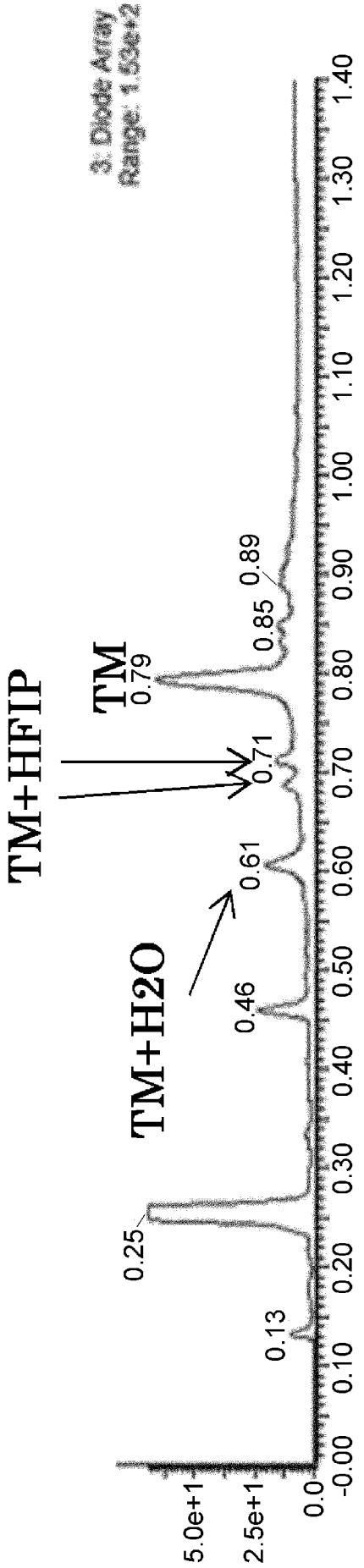
（式中、

Ｒ１～Ｒ３は、それぞれ独立して、Ｈ、またはメトキシである）。

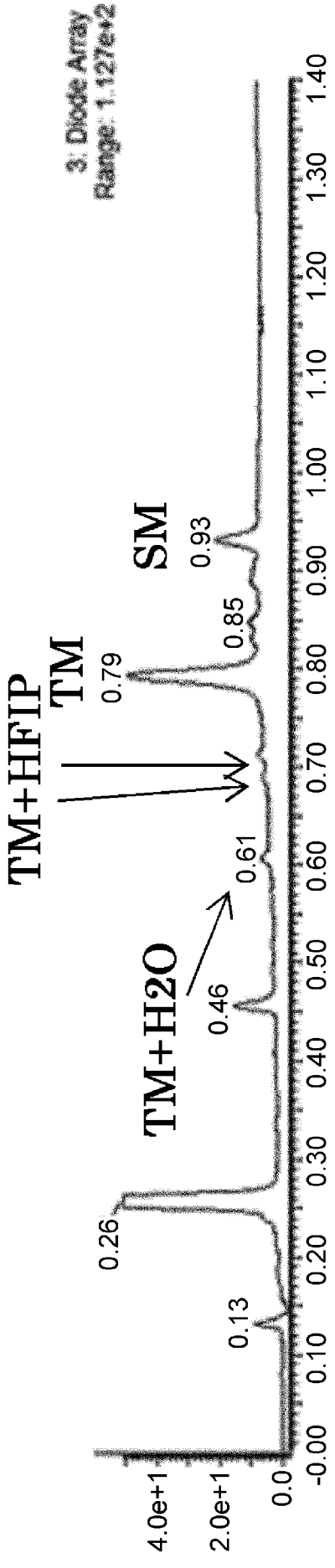
[図1]


A) 伸長後
B) 切り出し
C) 環化
D) 脱保護
E) 精製
R = O-PG, NHR1,
R = OH, NHR1,
DP
D
PG
NH
R
O
OH
Cl
H2N

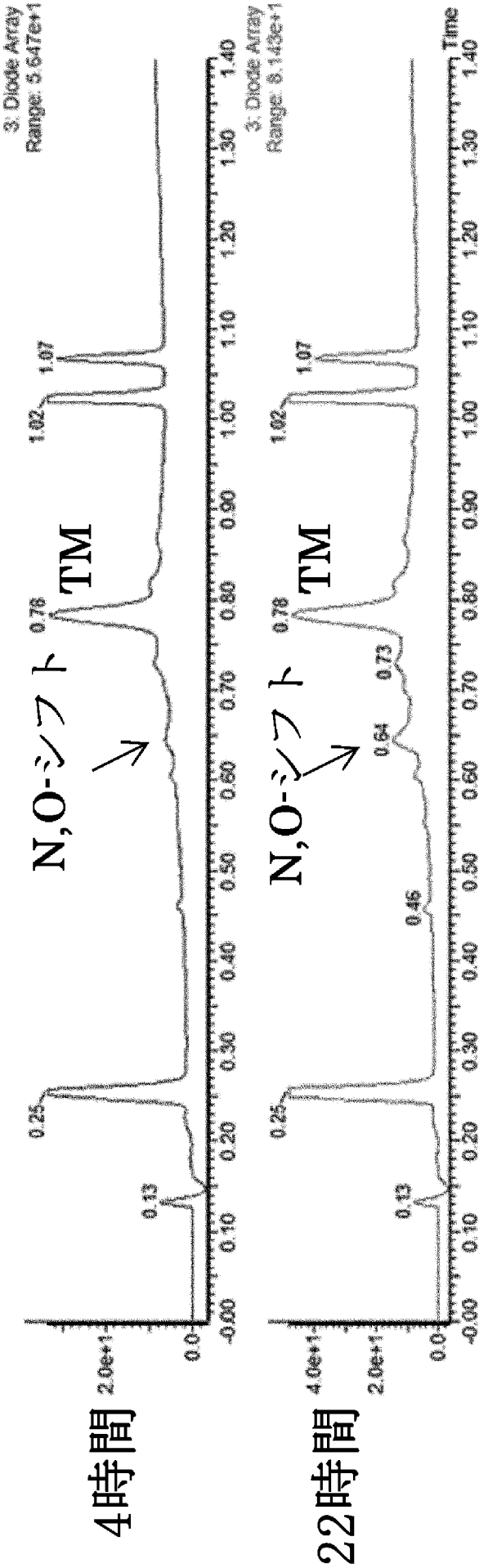
[図2]


3: Diode Array
Range: 1.53e+2
TM+HFIP
TM
TM+H2O
0.25
0.13
0.46
0.61
0.71
0.79
0.85
0.89
5.0e+1
2.5e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

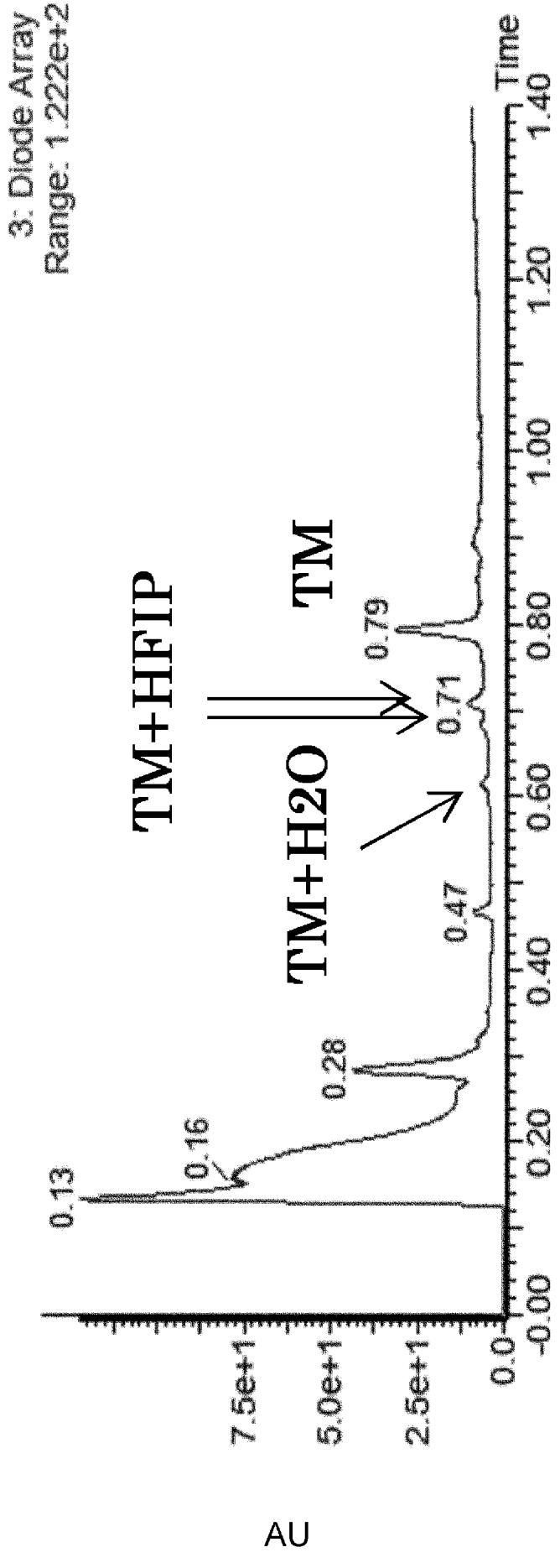
[図3]


3: Diode Array
Range: 1.127e+2
TM+HFIP
TM
SM
TM+H2O
0.26
0.13
0.46
0.61
0.79
0.85
0.93
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

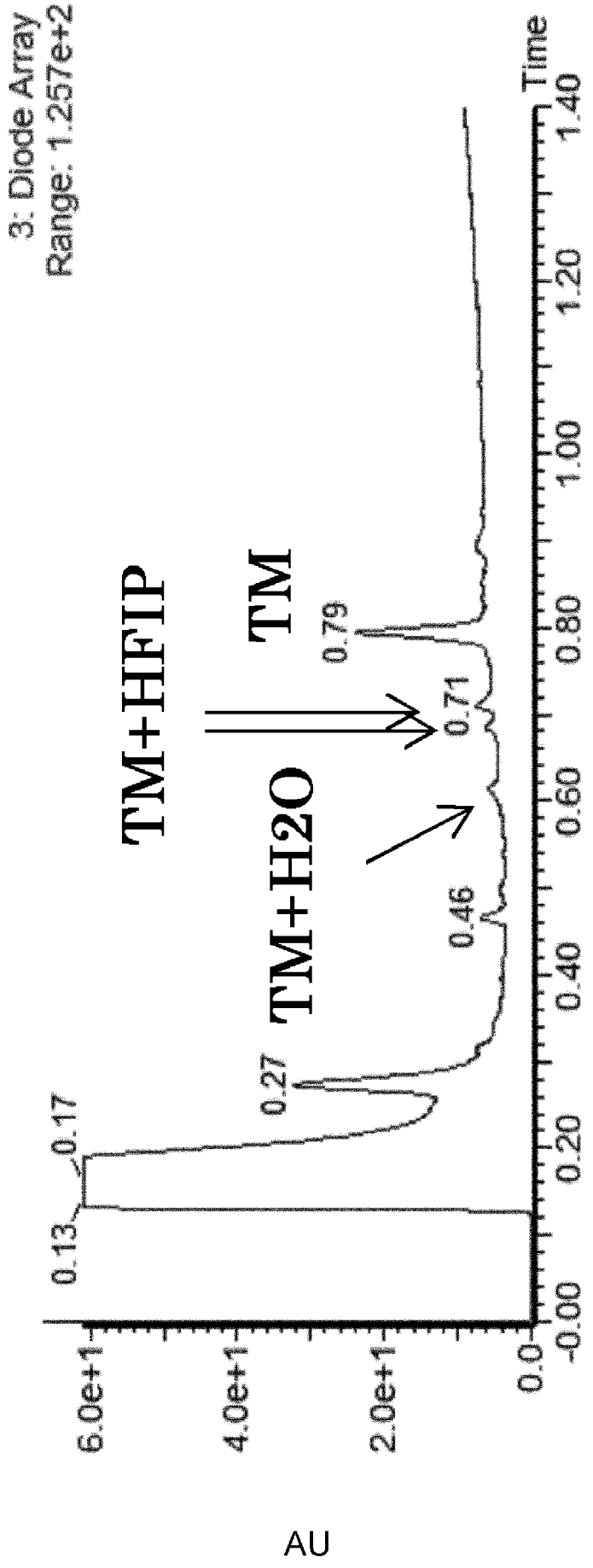
[図4]


3: Diode Array
Range: 5.647e+1
3: Diode Array
Range: 8.143e+1
Time
N,O-シフト
TM
N,O-シフト
TM
0.13
0.25
0.46
0.64
0.73
0.78
1.02
1.07
4時間
22時間

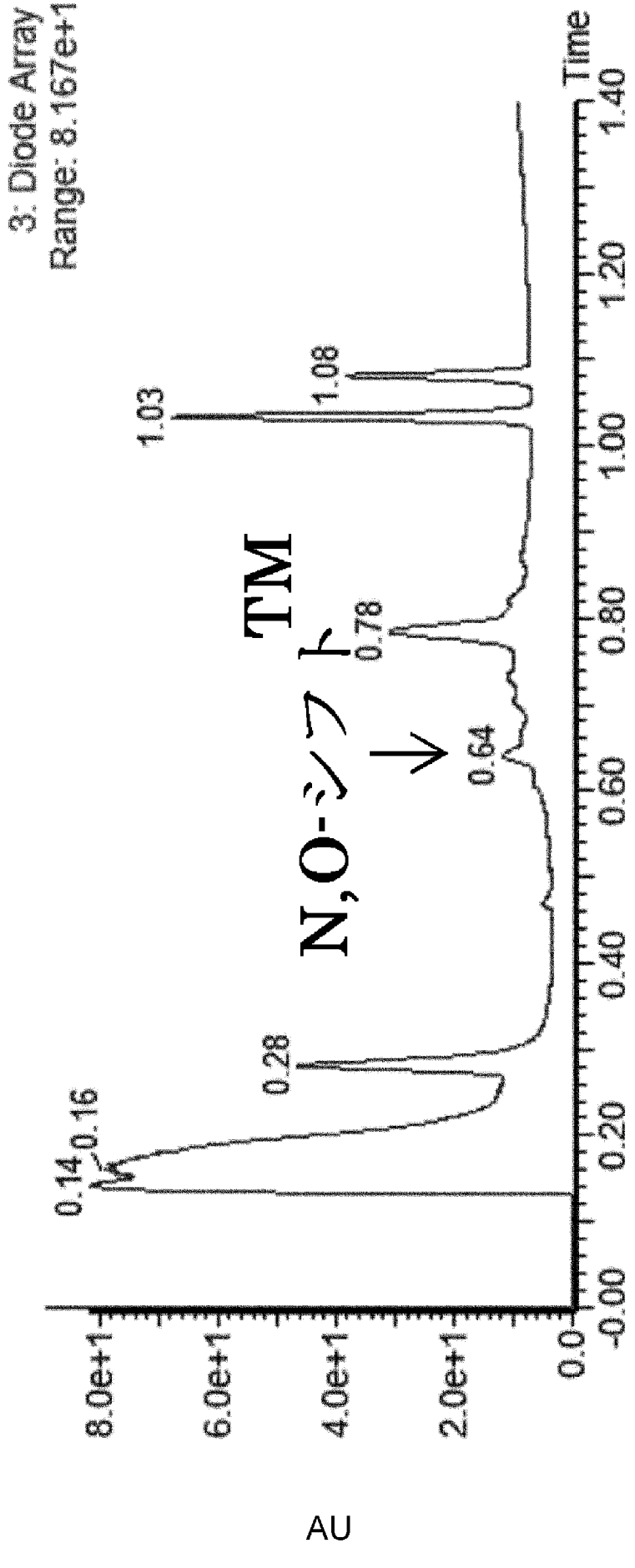
[図5]


3: Diode Array
Range: 1.222e+2
Time
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-0.00
0.0
2.5e+1
5.0e+1
7.5e+1
AU
0.13
0.16
0.28
0.47
0.71
0.79
TM+HFIP
TM
TM+H2O

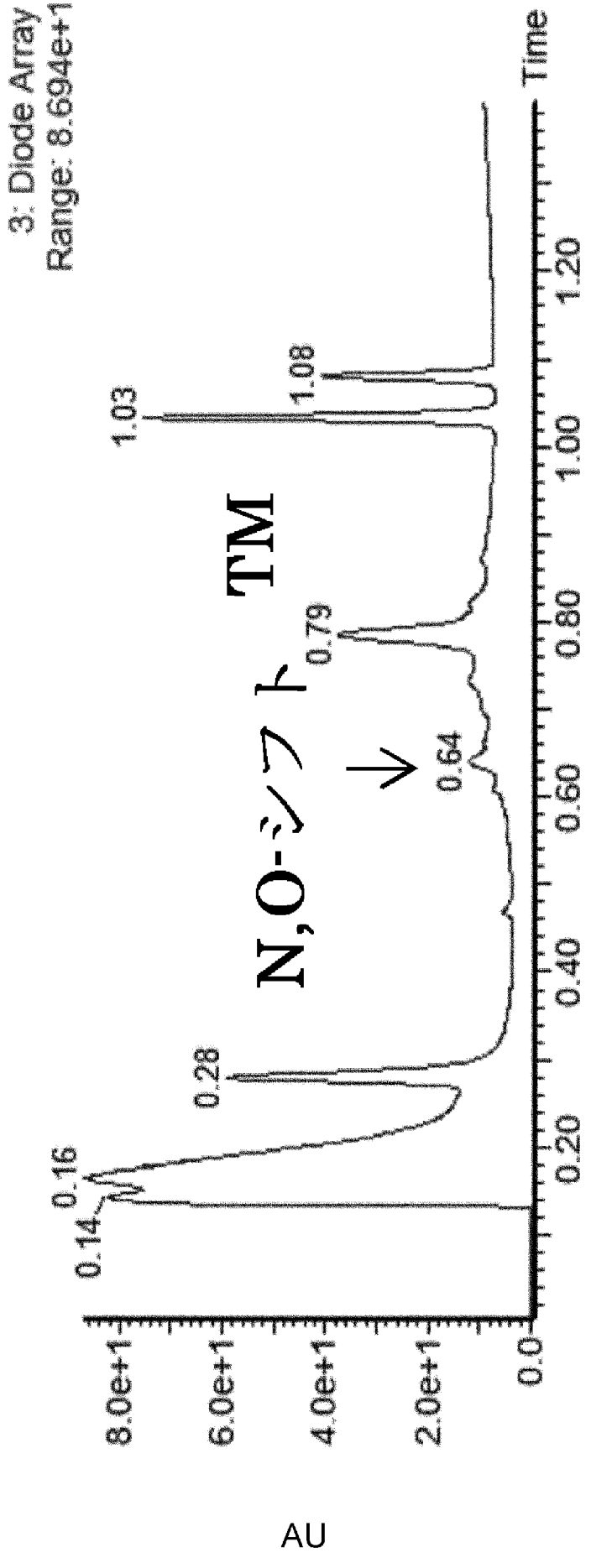
[図6]


3: Diode Array
Range: 1.257e+2
Time
AU
TM+HFIP
TM
TM+H2O
0.13
0.17
0.27
0.46
0.71
0.79
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40

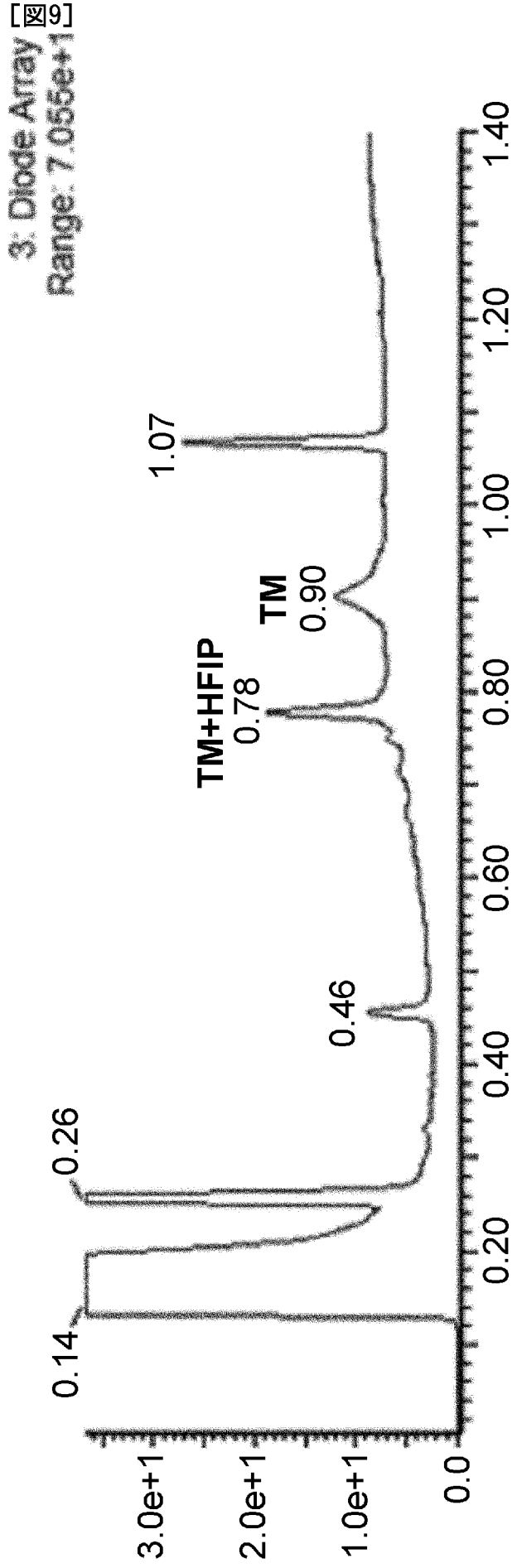
[図7]


3: Diode Array
Range: 8.167e+1
Time
AU
TM
N,O-シフト
0.14
0.16
0.28
0.64
0.78
1.03
1.08
-0.00
0.0
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
2.0e+1
4.0e+1
6.0e+1
8.0e+1

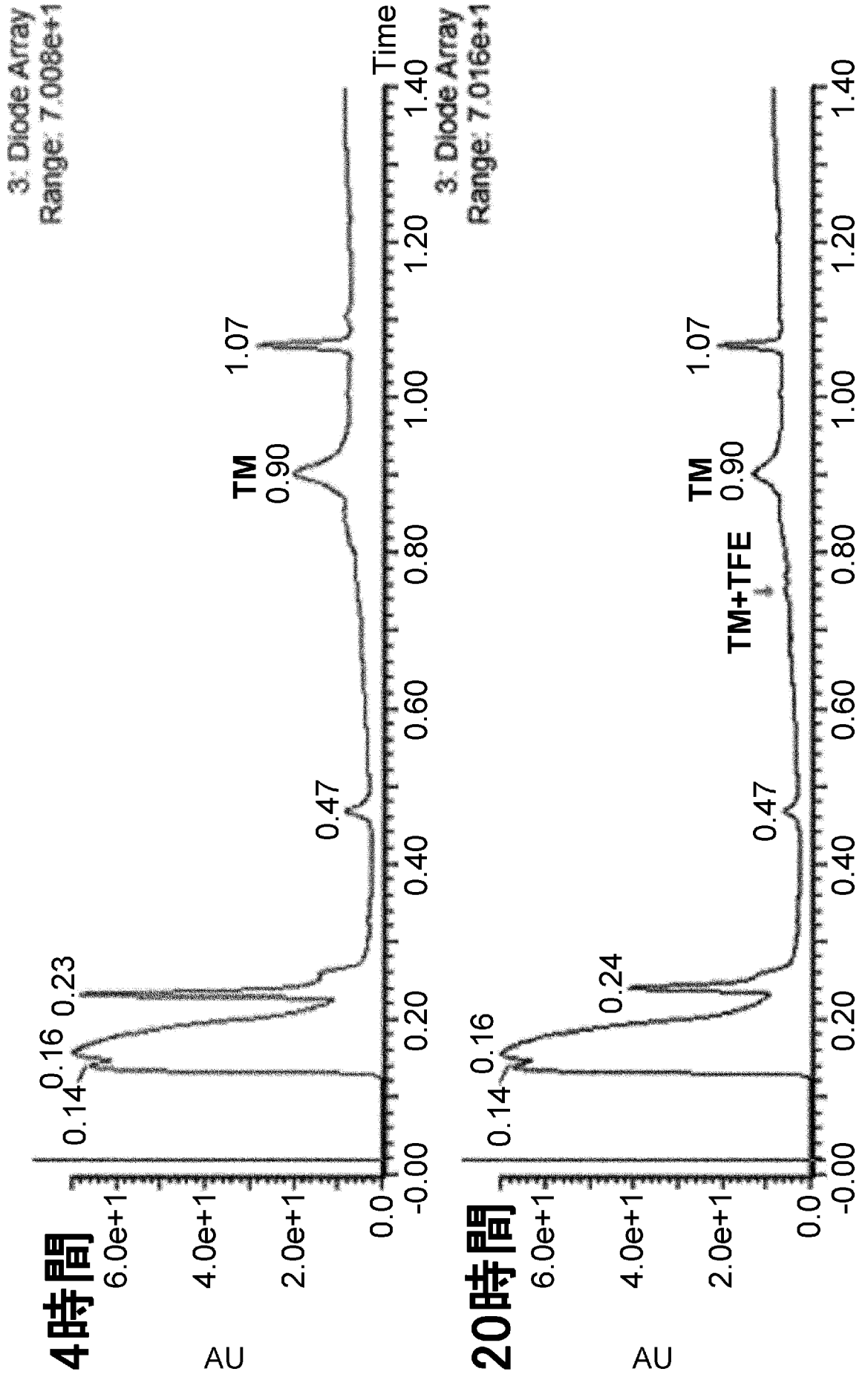
[図8]


3: Diode Array
Range: 8.694e+1
Time
1.03
1.08
0.79
0.64
0.28
0.16
0.14
N,O-シフト
TM
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.0
8.0e+1
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
AU

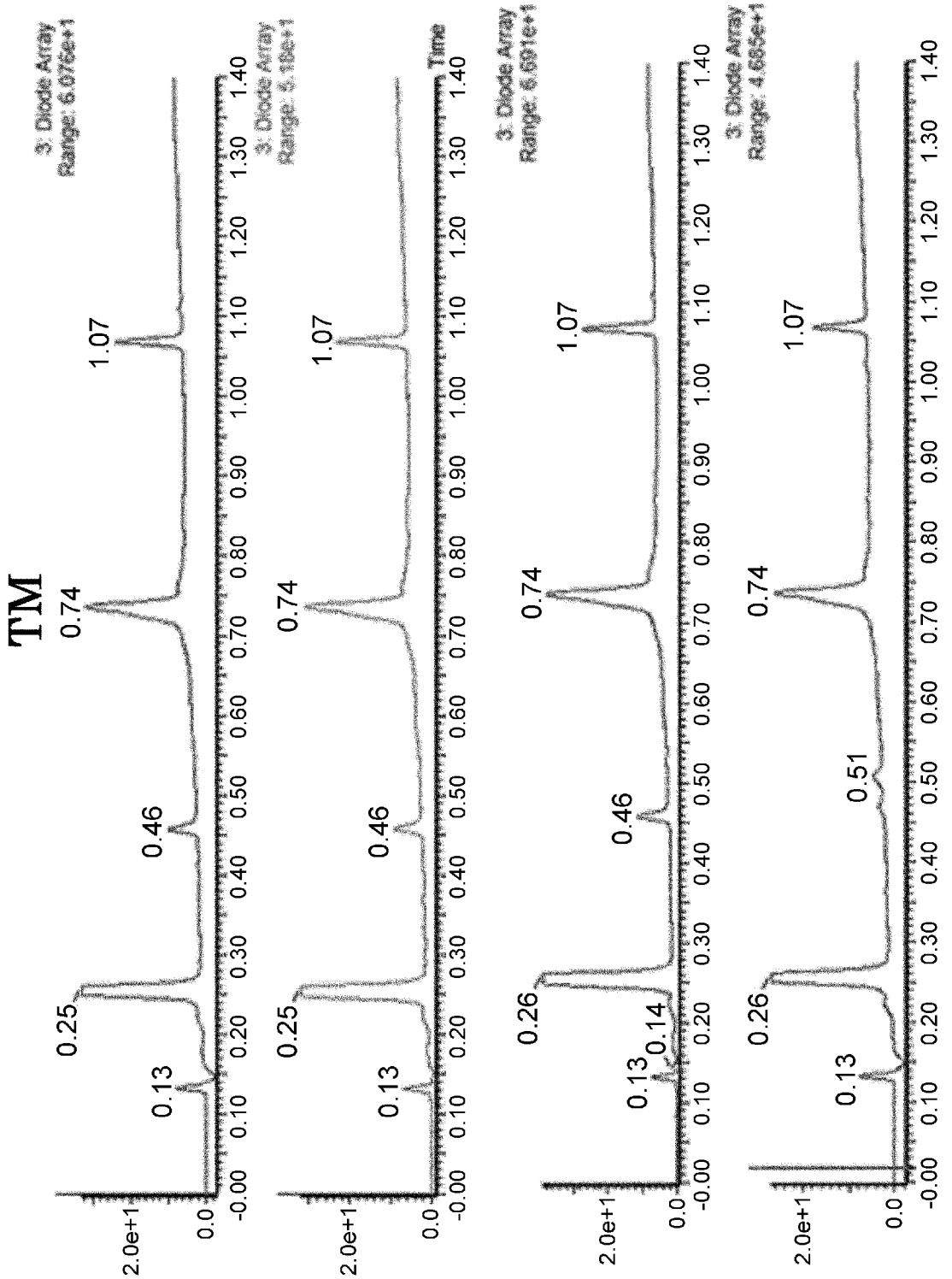
[図9]


3: Diode Array
Range: 7.055e+1
3.0e+1
2.0e+1
1.0e+1
0.0
0.14
0.26
0.46
TM+HFIP
0.78
TM
0.90
1.07
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40

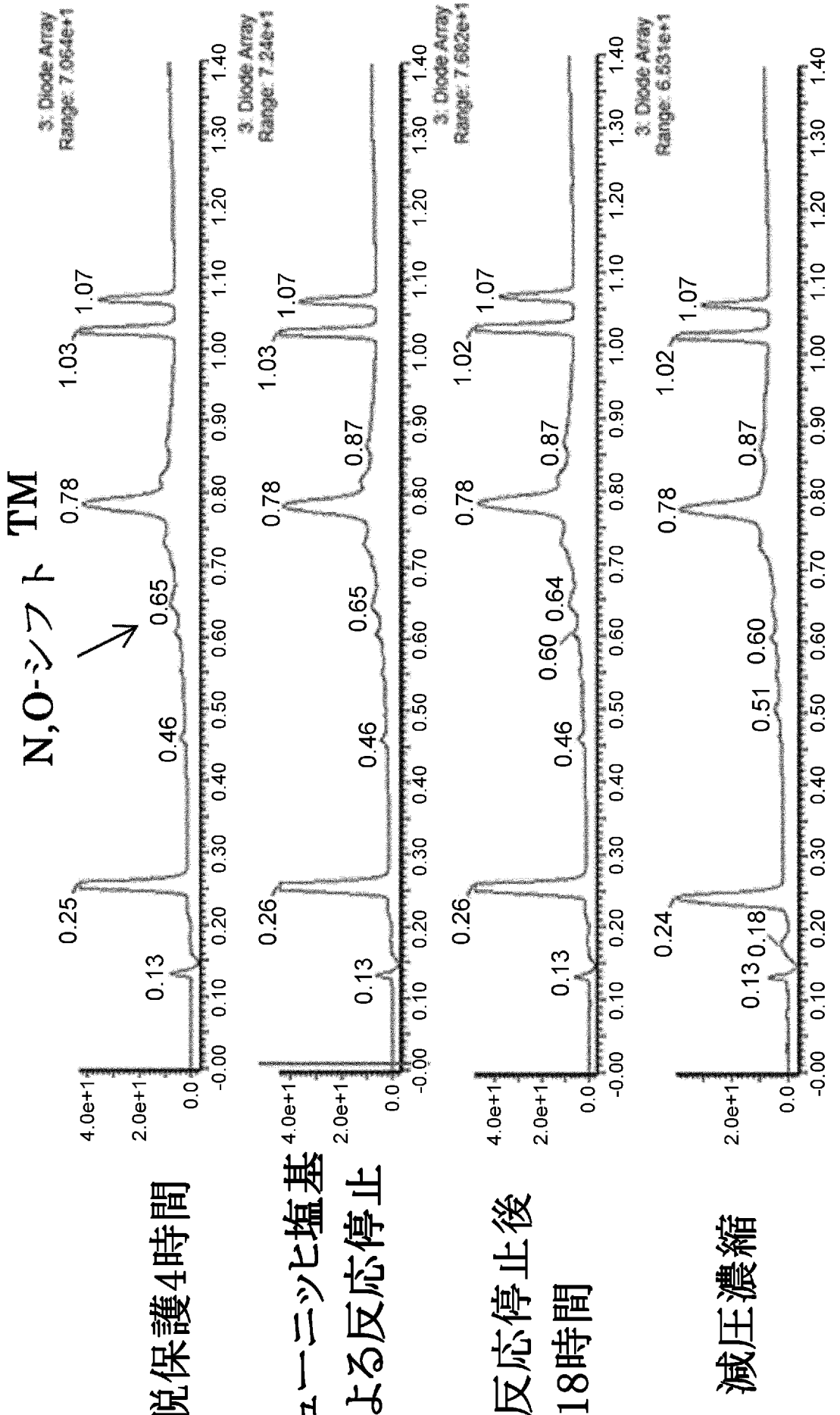
[図10]


4時間
3: Diode Array
Range: 7.008e+1
AU
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
Time
0.14
0.16
0.23
0.47
TM
0.90
1.07
20時間
3: Diode Array
Range: 7.016e+1
AU
0.14
0.16
0.24
0.47
TM
0.90
TM+TFE
1.07

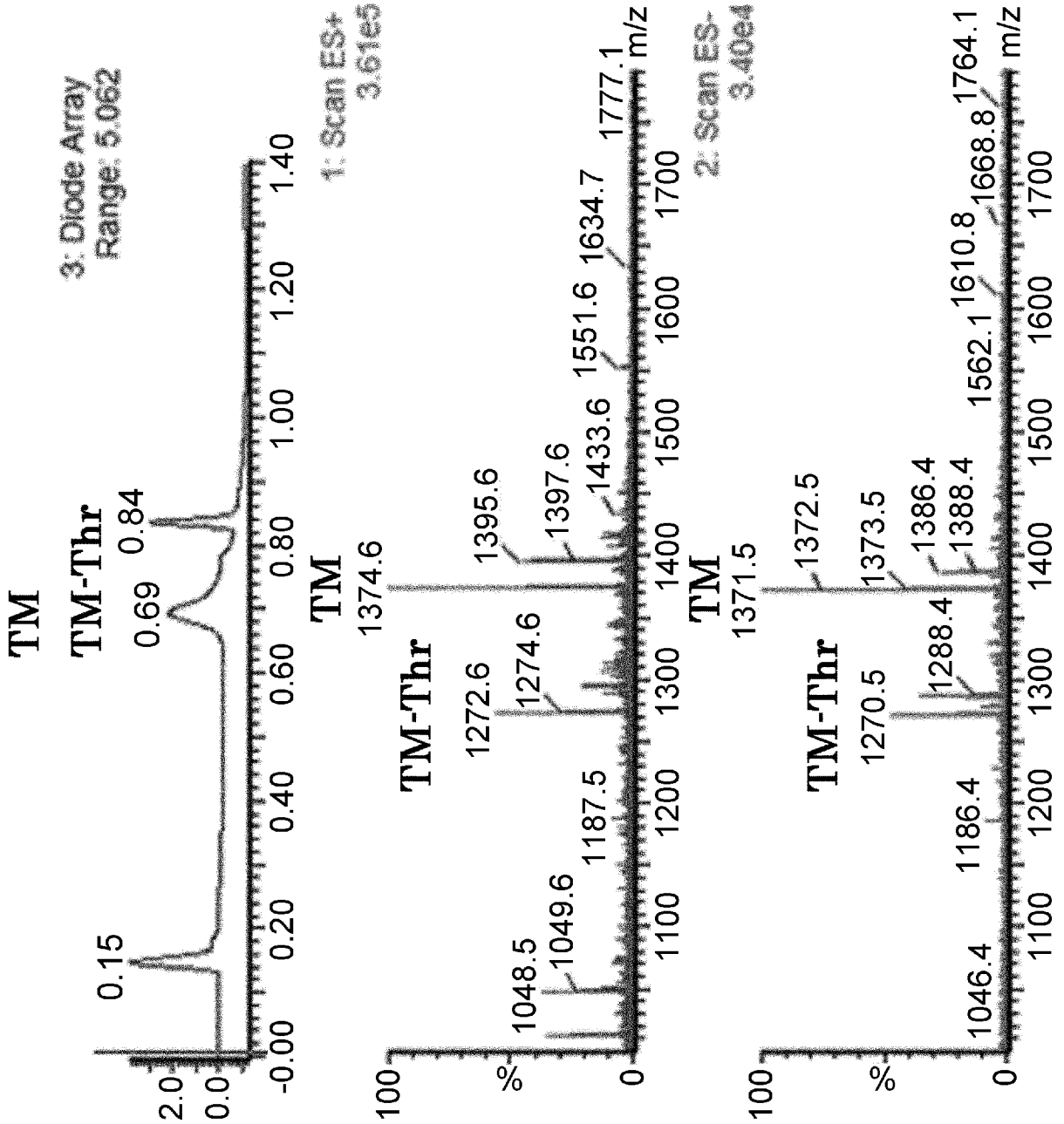
[図11]


TM
脱保護4時間
ヒューニッヒ塩基による反応停止
反応停止後18時間
減圧濃縮
3: Diode Array
Range: 6.076e+1
Range: 5.18e+1
Range: 6.691e+1
Range: 4.685e+1
Time
0.13
0.14
0.25
0.26
0.46
0.51
0.74
1.07
2.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

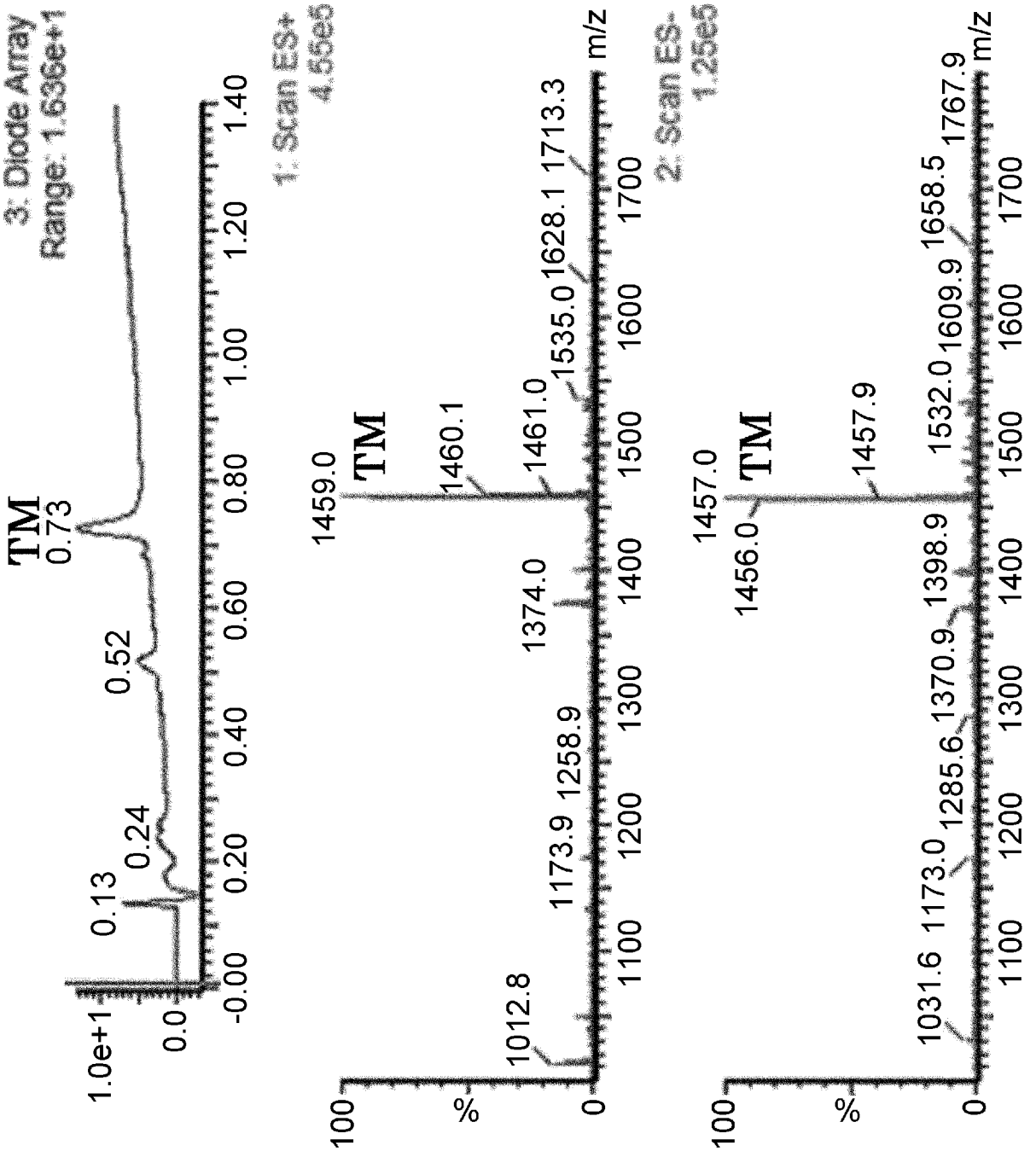
[図12]


N,O-シフト TM
脱保護4時間
ヒューニッヒ塩基による反応停止
反応停止後18時間
減圧濃縮
3: Diode Array
Range: 7.064e+1
Range: 7.24e+1
Range: 7.662e+1
Range: 6.531e+1
0.13
0.25
0.46
0.65
0.78
1.03
1.07
0.26
0.87
0.60
0.64
0.51
0.24
0.18
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

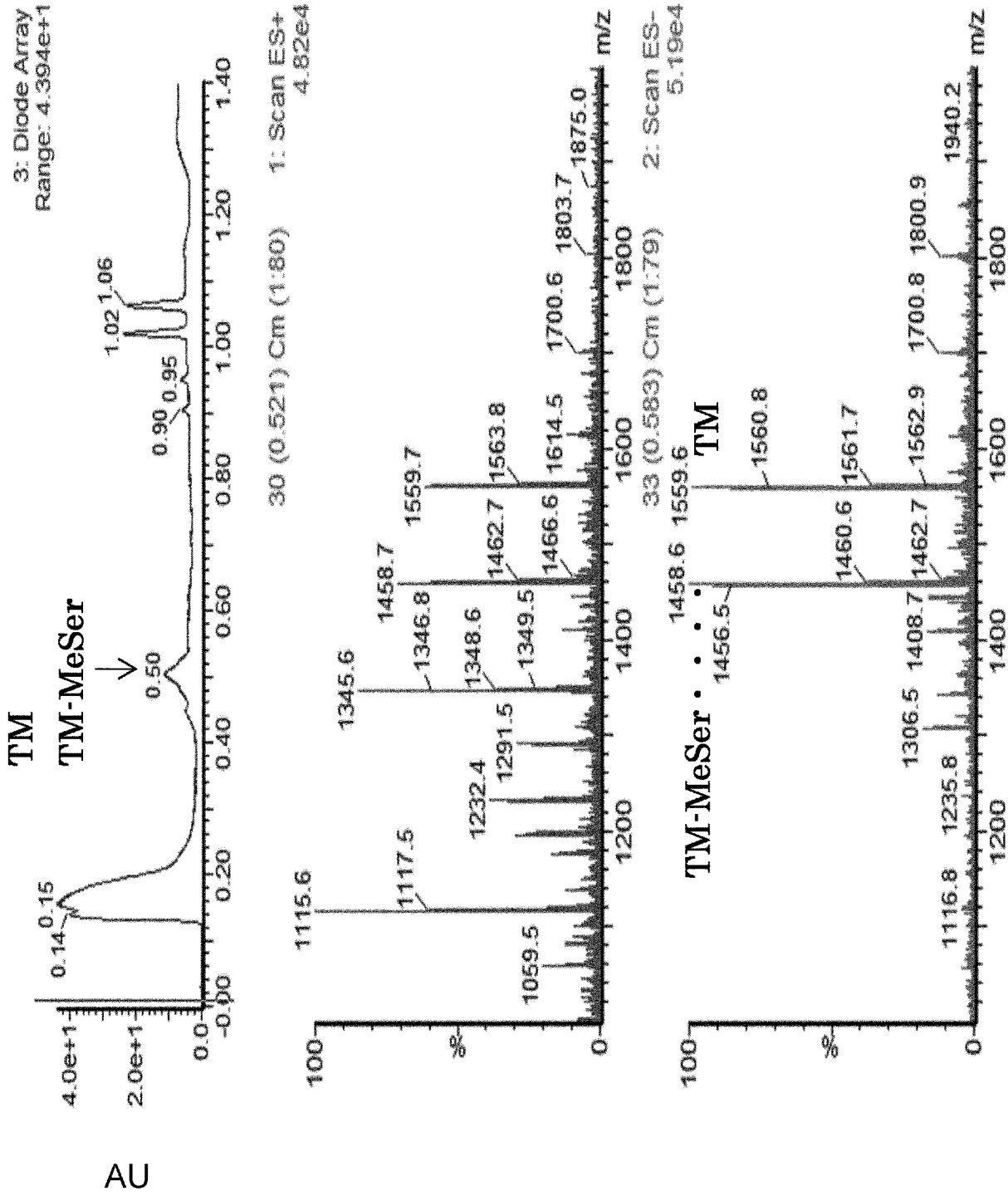
[図13]


TM
TM-Thr
3: Diode Array
Range: 5.062
0.15
0.69
0.84
2.0
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1: Scan ES+
3.61e5
TM
1374.6
TM-Thr
1272.6
1274.6
1395.6
1397.6
1433.6
1551.6
1634.7
1777.1
1048.5
1049.6
1187.5
100
%
0
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
m/z
2: Scan ES-
3.40e4
TM
1371.5
TM-Thr
1270.5
1288.4
1372.5
1373.5
1386.4
1388.4
1562.1
1610.8
1668.8
1764.1
1046.4
1186.4
100
%
0
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
m/z

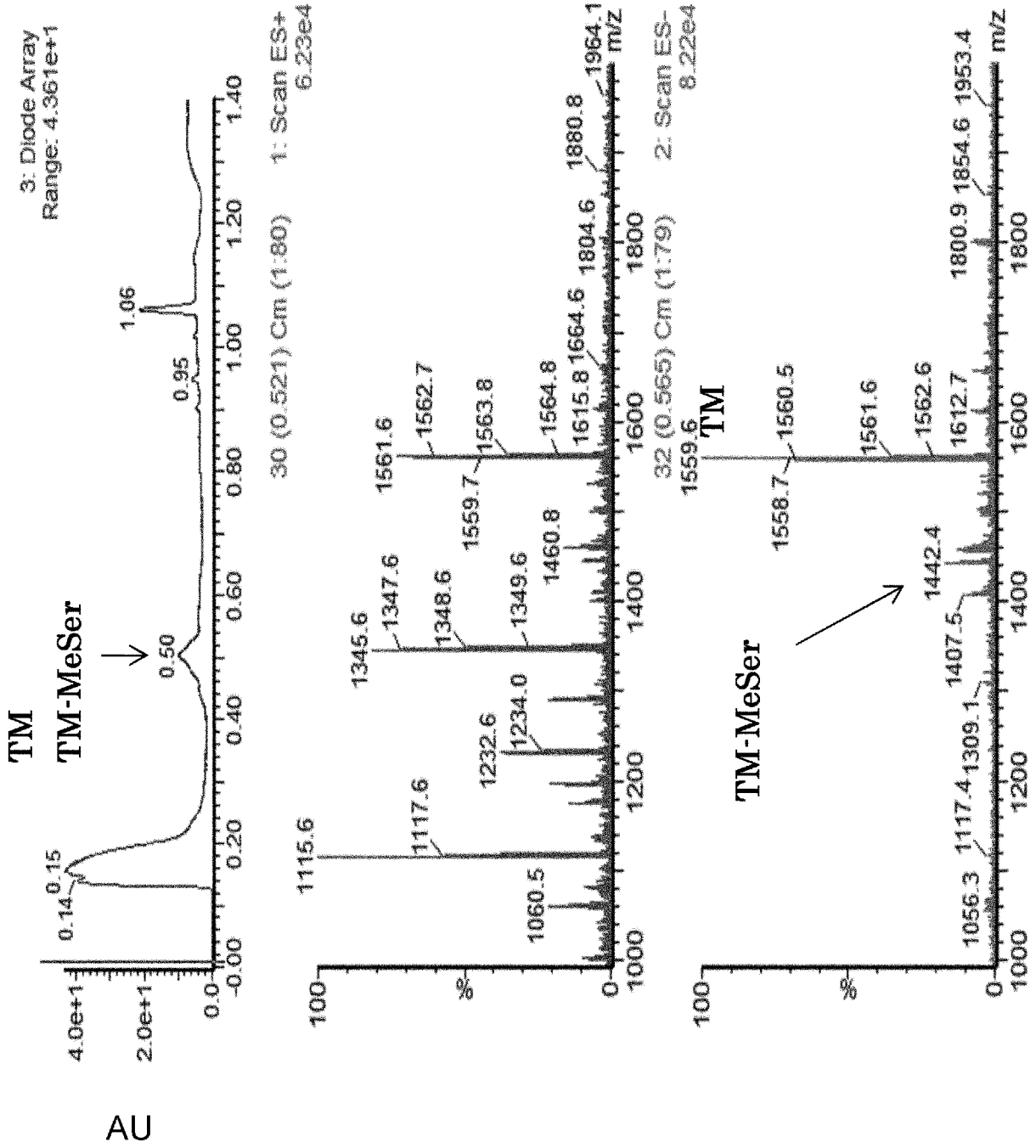
[図14]


3: Diode Array
Range: 1.636e+1
TM
0.73
0.52
0.24
0.13
1.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1: Scan ES+
4.55e5
1459.0
TM
1460.1
1461.0
1535.0
1628.1
1713.3
1374.0
1258.9
1173.9
1012.8
100
%
0
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
m/z
2: Scan ES-
1.25e5
1457.0
1456.0
TM
1457.9
1532.0
1609.9
1658.5
1767.9
1398.9
1370.9
1285.6
1173.0
1031.6
100
%
0
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
m/z

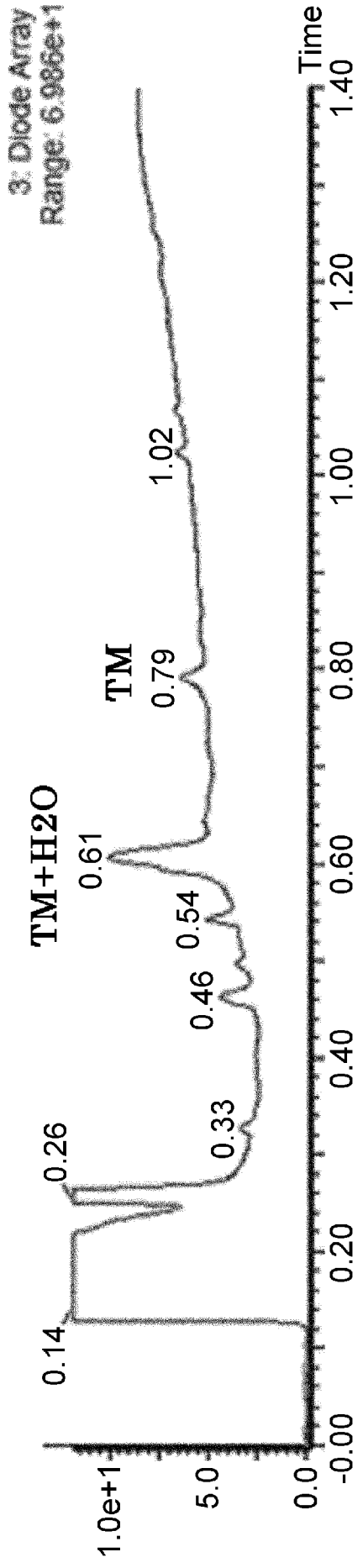
[図15]


TM
TM-MeSer
3: Diode Array
Range: 4.394e+1
AU
30 (0.521) Cm (1:80)
1: Scan ES+
4.82e4
33 (0.583) Cm (1:79)
2: Scan ES-
5.19e4
m/z
%

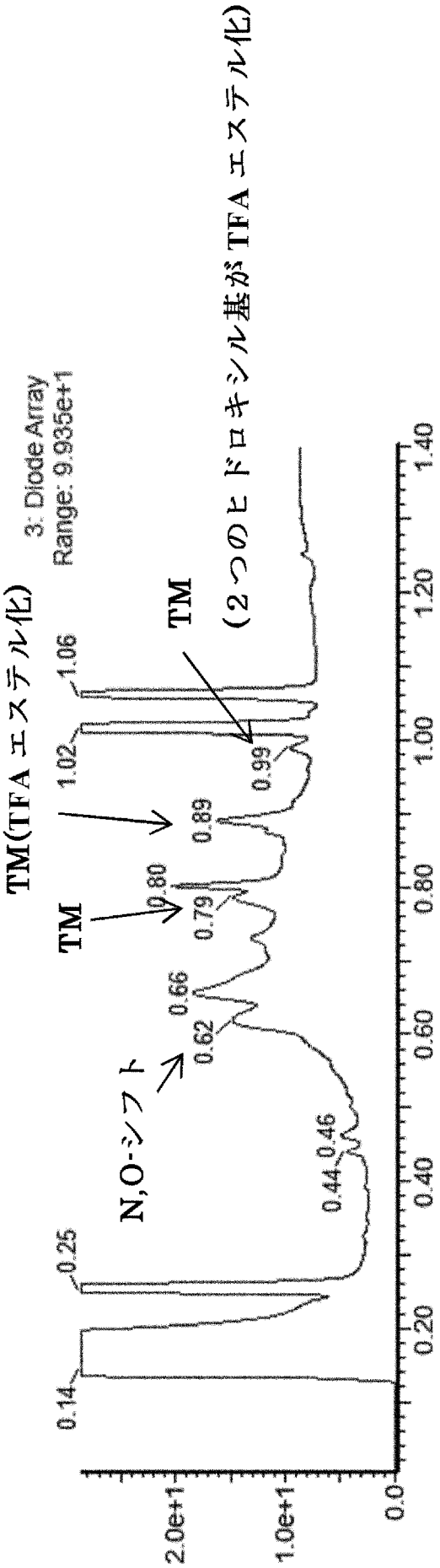
[図16]


TM
TM-MeSer
3: Diode Array
Range: 4.361e+1
AU
30 (0.521) Cm (1:80)
1: Scan ES+
6.23e4
32 (0.565) Cm (1:79)
2: Scan ES-
8.22e4
m/z
%

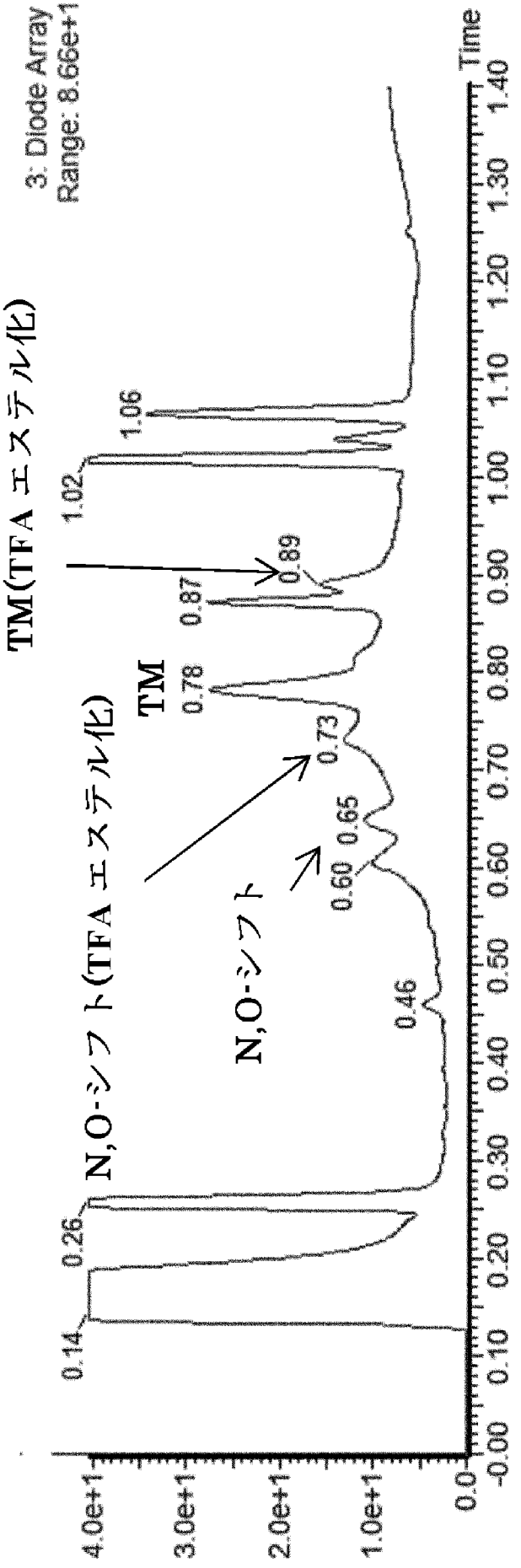
[図17]


3: Diode Array
Range: 6.986e+1
Time
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-0.00
1.0e+1
5.0
0.0
0.14
0.26
0.33
0.46
0.54
0.61
TM+H2O
0.79
TM
1.02

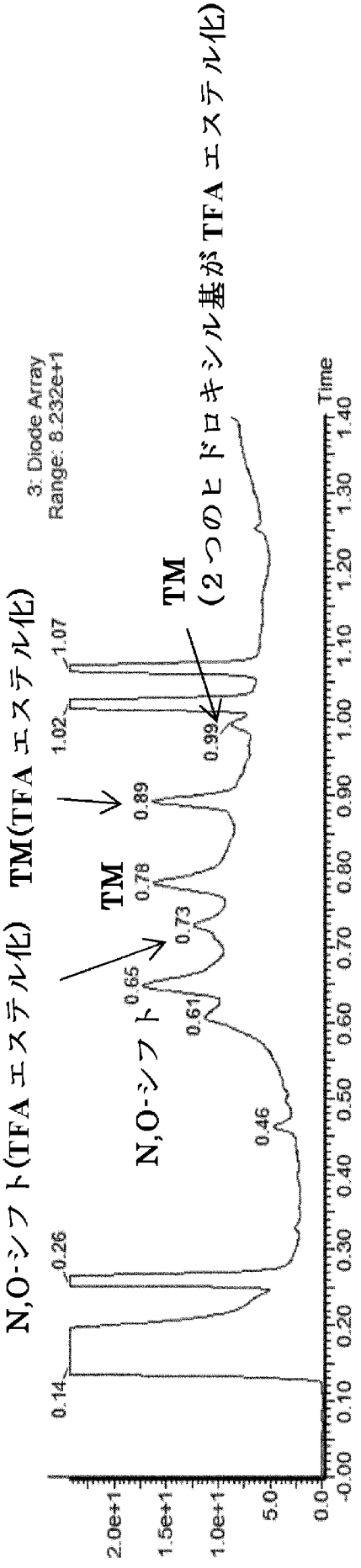
[図18]


TM(TFA エステル化)
3: Diode Array
Range: 9.935e+1
TM
TM
(2つのヒドロキシル基がTFA エステル化)
N,O-シフト
0.14
0.25
0.44
0.46
0.62
0.66
0.79
0.80
0.89
0.99
1.02
1.06
2.0e+1
1.0e+1
0.0
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40

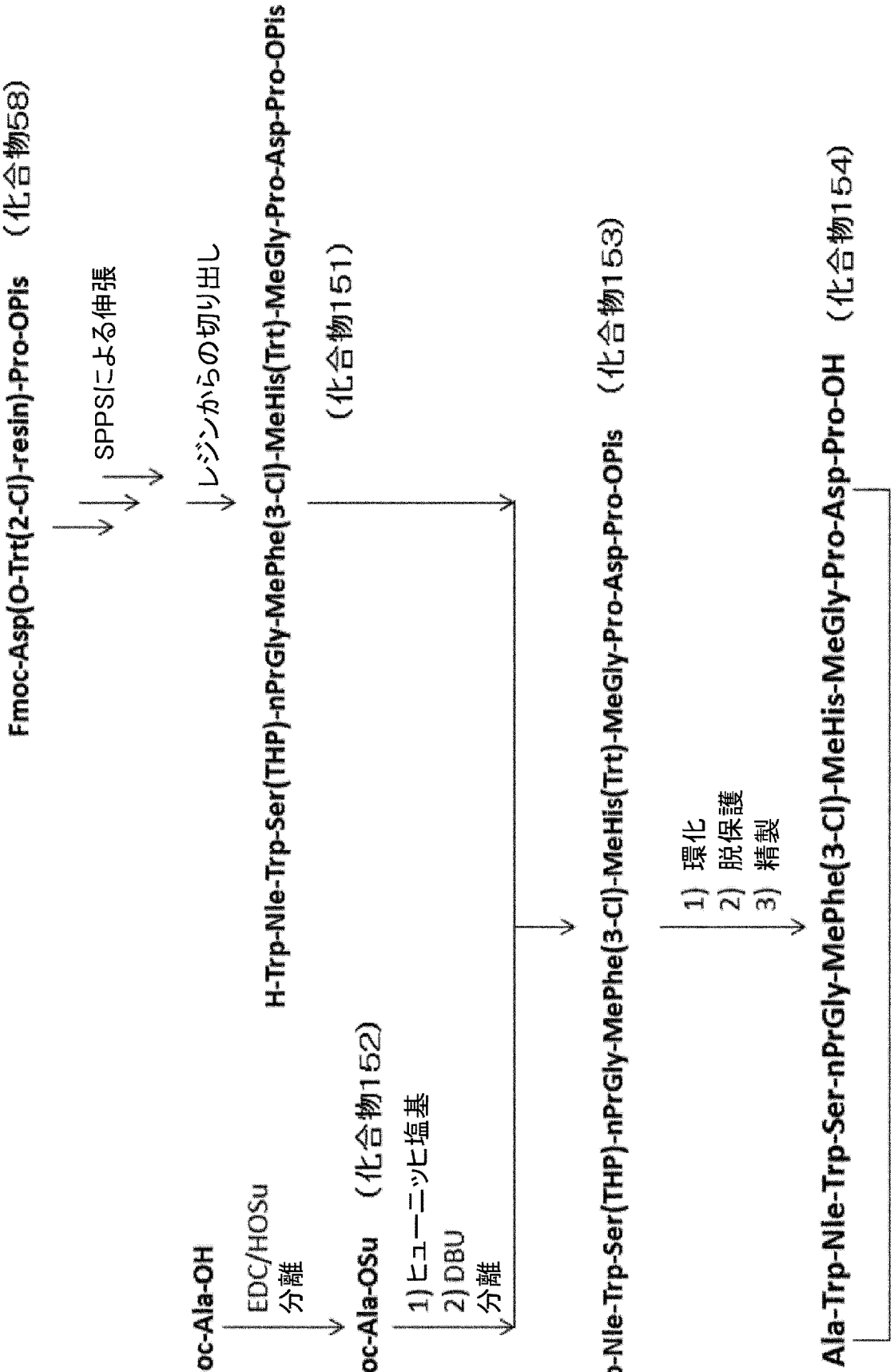
[図19]


3: Diode Array
Range: 8.66e+1
TM(TFA エステル化)
N,O-シフト(TFA エステル化)
TM
N,O-シフト
0.14
0.26
0.46
0.60
0.65
0.73
0.78
0.87
0.89
1.02
1.06
Time
4.0e+1
3.0e+1
2.0e+1
1.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

[図20]


N,O-シフト(TFA エステル化)
TM(TFA エステル化)
3: Diode Array
Range: 8.232e+1
TM
(2つのヒドロキシル基が TFA エステル化)
TM
N,O-シフト
0.14
0.26
0.46
0.61
0.65
0.73
0.78
0.89
0.99
1.02
1.07
Time
2.0e+1
1.5e+1
1.0e+1
5.0
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

[図21]


Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-Pro-OPis （化合物58）
SPPSによる伸張
レジンからの切り出し
H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis
（化合物151）
Fmoc-Ala-OH
EDC/HOSu
分離
Fmoc-Ala-OSu （化合物152）
1) ヒューニッヒ塩基
2) DBU
分離
H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis （化合物153）
1) 環化
2) 脱保護
3) 精製
Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OH （化合物154）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/021998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K1/06(2006.01)i, C07K11/02(2006.01)i, A61K38/12(2006.01)n, C40B50/14(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)
Int.Cl. C07K1/06, C07K11/02, A61K38/12, C40B50/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 2177533 A1 (SZENTAGOTHAY REGIONAL UNIVERSITY SCIENCE CENTER (OF SEMMELWEIS UNIVERSITY)) 21 April 2010, paragraphs [0028]-[0040] & WO 2010/040830 A1, page 10, line 22 to page 13, line 22	1, 7-14 2-6, 15-16
X A	EP 2380596 A1 (TECHNISCHE UNIVERSITAT MUNCHEN) 26 October 2011, paragraphs [0279]-[0283] & US 2013/0129622 A1, paragraphs [0343]-[0347]	1, 7-14 2-6, 15-16
X A	WO 2015/185162 A1 (TECHNISCHE UNIVERSITAT MUNCHEN) 10 December 2015, page 66, lines 28-69 & US 2018/0037608 A, paragraphs [0471]-[0487]	1, 7-14 2-6, 15-16

☒ 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 the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 August 2018 (27.08.2018)	04 September 2018 (04.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/021998

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEHRENDT, Raymond et al., "Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis", J. Pept. Sci. 2016, vol. 22, pp. 4-27, in particular, summary	1-16
A	CHATTERJEE, Jayanta et al., "N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry", ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, 2008, vol. 41, no. 10, pp. 1331-1342, in particular, summary	1-16
A	ALBERICIO, Fernando et al., "Fmoc Methodology: Cleavage from the Resin and Final Deprotection, Amino Acids", Peptides and Proteins in Organic Chemistry, 2011, vol. 3, pp. 349-369, ISBN: 978-3-527-32102-5, in particular, page 365, lines 3-14	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０２１９９８

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K1/06(2006.01)i, C07K11/02(2006.01)i, A61K38/12(2006.01)n, C40B50/14(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.　C07K1/06, C07K11/02, A61K38/12, C40B50/14

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/A	EP 2177533 A1 (Szentagothay Regional University Science Center (of Semmelweis University)) 2010.04.21, 段落[0028]-[0040] & WO 2010/040830 A1, 第10頁第22行－第13頁第22行	1, 7-14/2-6, 15-16
X/A	EP 2380596 A1 (Technische Universitat Munchen) 2011.10.26, 段落[0279]－[0283] & US 2013/0129622 A1, 段落[0343]－[0347]	1, 7-14/2-6, 15-16

☑　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
２７．０８．２０１８	０４．０９．２０１８

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　６１１５
田ノ上　拓自
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＊	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/ A	WO 2015/185162 A1 (TECHNISCHE UNIVERSITAT MUNCHEN) 2015.12.10, 第66頁第28行－第69頁 & US 2018/0037608 A, 段落[0471]-[0487]	1, 7-14/ 2-6, 15-16
A	BEHRENDT, Raymond et al., Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis, J. Pept. Sci. 2016年, Vol.22, p.4-27, 特に要旨	1-16
A	CHATTERJEE, Jayanta et al., N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry, ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, 2008年, Vol. 41, No. 10, p.1331-1342, 特に要旨	1-16
A	ALBERICIO, Fernando et al., Fmoc Methodology: Cleavage from the Resin and Final Deprotection, Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, 2011年, Vol.3, p.349-369, ISBN: 978-3-527-32102-5, 特に第365頁第3-14行	1-16