

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7257393号

(P7257393)

(45)発行日 令和5年4月13日(2023.4.13)

(24)登録日 令和5年4月5日(2023.4.5)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 7/56 (2006.01)

C 0 7 K 7/56

A 6 1 K 38/12 (2006.01)

A 6 1 K 38/12

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 14 (全111頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-519054(P2020-519054)

(86)(22)出願日 平成30年10月2日(2018.10.2)

(65)公表番号 特表2020-536091(P2020-536091  
A)

(43)公表日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/053871

(87)国際公開番号 WO2019/070643

(87)国際公開日 平成31年4月11日(2019.4.11)

審査請求日 令和3年10月1日(2021.10.1)

(31)優先権主張番号 62/567,323

(32)優先日 平成29年10月3日(2017.10.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 391015708

ブリistol - マイヤーズ スクイブ カン  
パニーBRISTOL - MYERS SQUI  
BB COMPANYアメリカ合衆国08543ニュージャ  
ー州 プリンストン、ルート206ア  
ンド・プロビンス・ライン・ロード

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(74)代理人 100156155

最終頁に続く

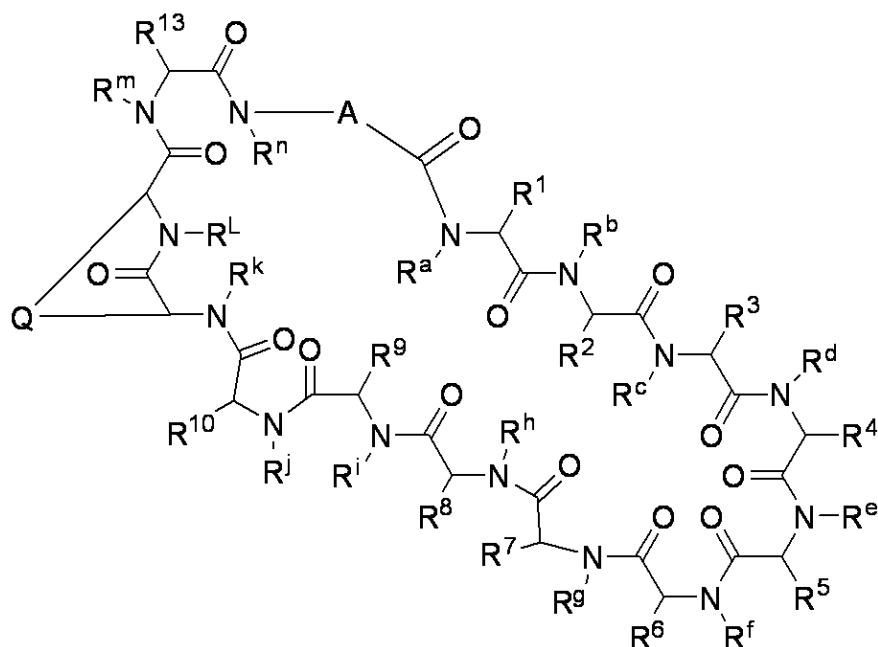
(54)【発明の名称】 免疫調節剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I):

【化 1】



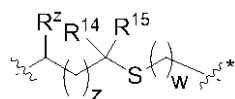
10

〔式中、

Aは

20

【化 2】



〔式中、

【化 3】



30

はカルボニル基の結合点を表し、

【化 4】



は窒素原子の結合点を表し；

z は 0 であり；

w は 1 であり；

R<sup>14</sup> および R<sup>15</sup> は、水素であり；R<sup>z</sup> は -C(O)NHR<sup>16</sup> であり、ここで、R<sup>16</sup> は -CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub> であり、そして、R<sup>17</sup> は水素および -CH<sub>2</sub>OH から選択される）

40

であり；R<sup>c</sup>、R<sup>f</sup>、R<sup>h</sup>、R<sup>i</sup>、および R<sup>m</sup> は水素であり；R<sup>L</sup> はメチルであり；R<sup>n</sup> は水素またはメチルであり；R<sup>a</sup>、R<sup>j</sup>、および R<sup>k</sup> はそれぞれ独立して、水素およびメチルから選択され；R<sup>e</sup> は、水素またはメチルであり；R<sup>1</sup> は、ヒドロキシで適宜置換されていてもよいベンジルであり；R<sup>2</sup> および R<sup>b</sup> は、メチルであるか、あるいは、R<sup>2</sup> および R<sup>b</sup> は、それらが結合する原子と一緒に、ピペリジン、ピペラジン、およびモルホリンから選択される環を形成し；

50

R<sup>3</sup>は、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ および $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ から選択され；

R<sup>4</sup>およびR<sup>d</sup>は、それらが結合する原子と一緒にあって、ピロリジン環を形成し；

R<sup>5</sup>は、 $-\text{CH}_2$ （イミダゾリル）および $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ から選択され；

R<sup>6</sup>は、イソブチル、 $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ 、および $-(\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$ から選択され；

R<sup>7</sup>は、水素であり、R<sup>g</sup>は、水素またはメチルであるか、あるいは、R<sup>7</sup>およびR<sup>g</sup>は、それらが結合する原子と一緒にあって、ヒドロキシで適宜置換されていてもよいピロリジン環を形成し；

R<sup>8</sup>は、 $-(\text{CH}_2)$ インドリルであり；

R<sup>9</sup>は、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ および $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ から選択され；

R<sup>10</sup>は、 $-(\text{CH}_2)$ インドリルおよび $-(\text{CH}_2)$ ベンゾチエニルから選択され、それぞれは適宜、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ で置換されていてもよく；

R<sup>13</sup>は、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ および $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ から選択され；

Qは、1つの炭素 - 炭素二重結合を含み、そして、フェノキシ基を含んでいてもよい5 ~ 12員の炭素鎖である]

で示される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項2】

以下：

10

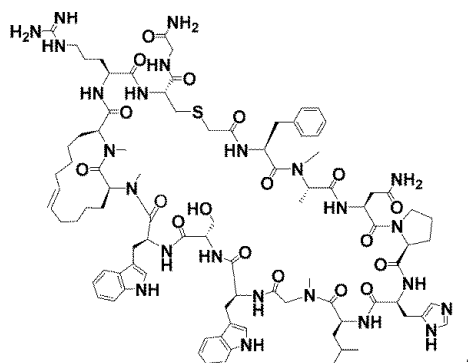
20

30

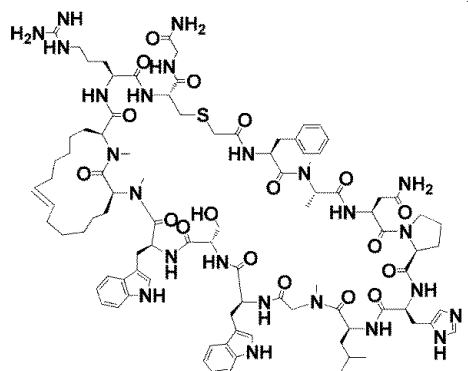
40

50

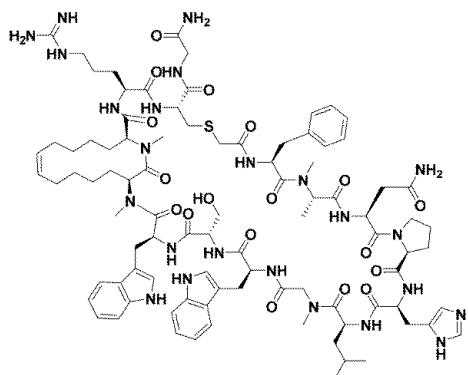
## 【化 5】



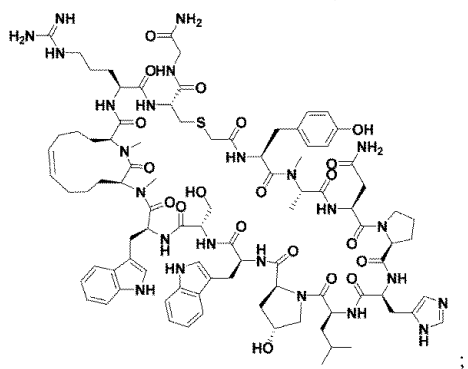
10



20



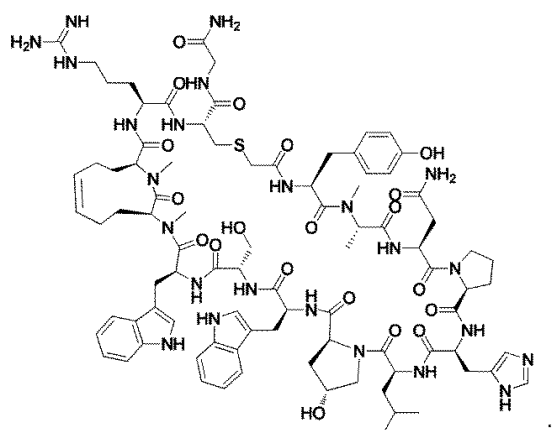
30



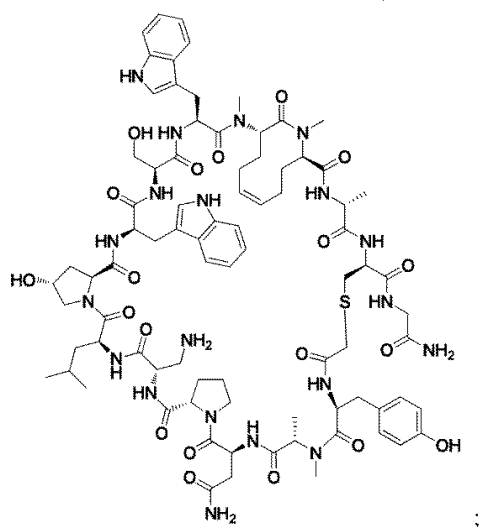
40

50

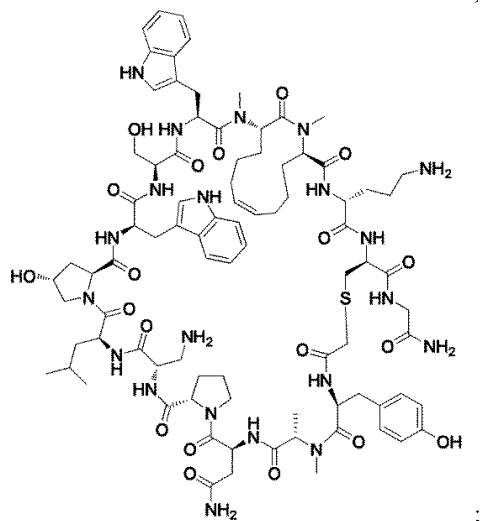
## 【化 6】



10



20



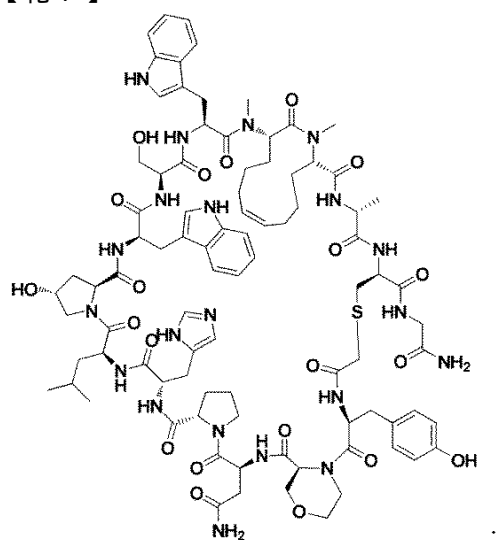
30



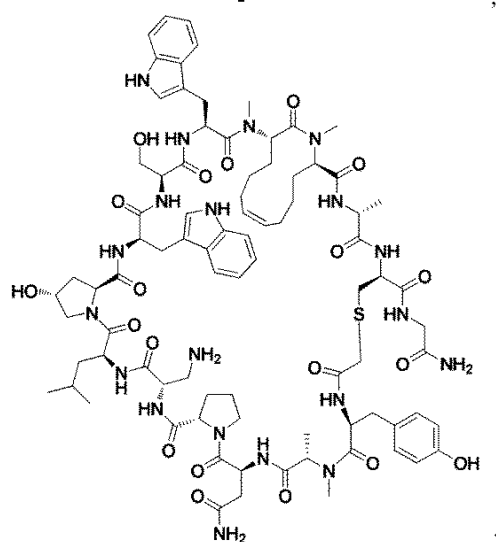
40

50

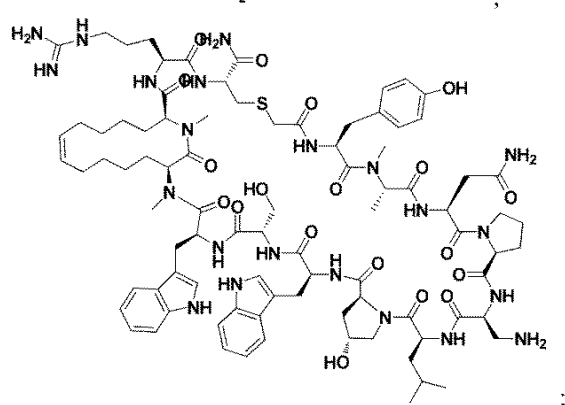
【化 7】



10



20

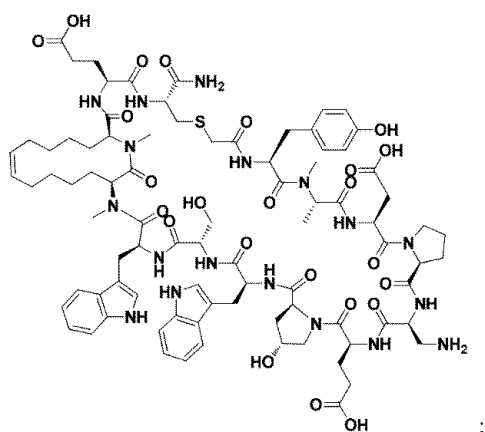


30

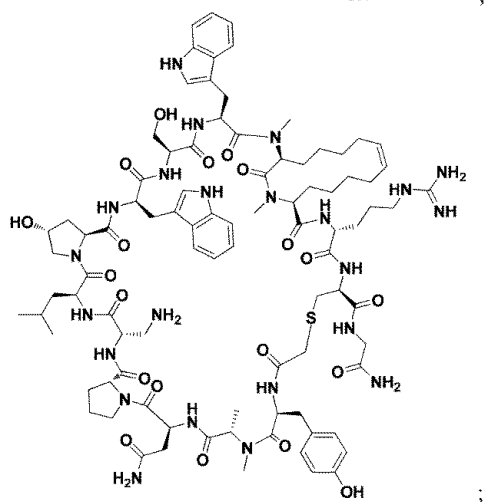
40

50

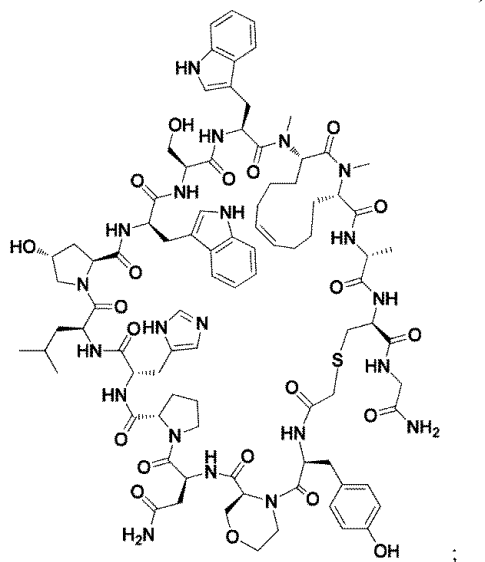
## 【化 8】



10



20



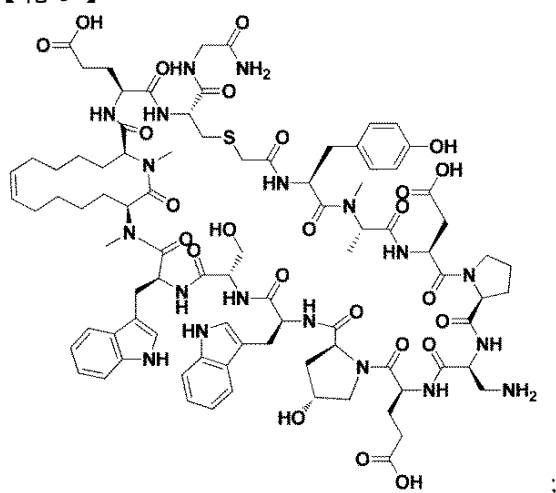
30



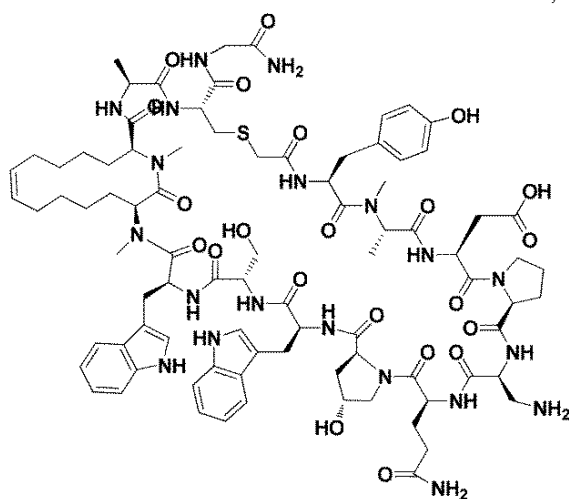
40

50

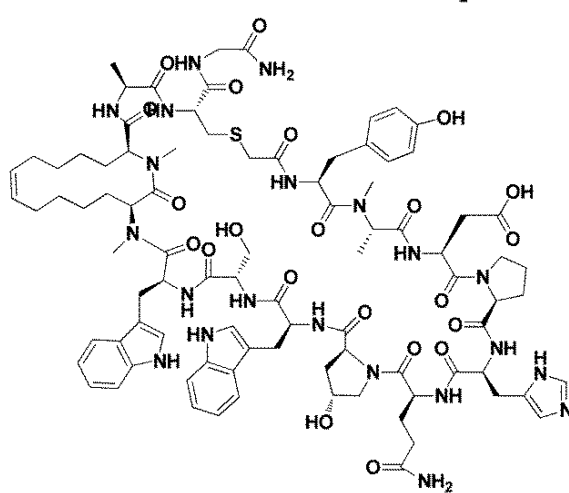
【化 9】



10



20



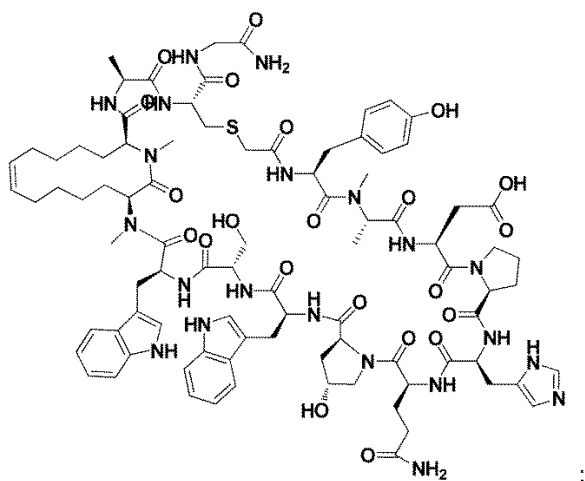
30

40

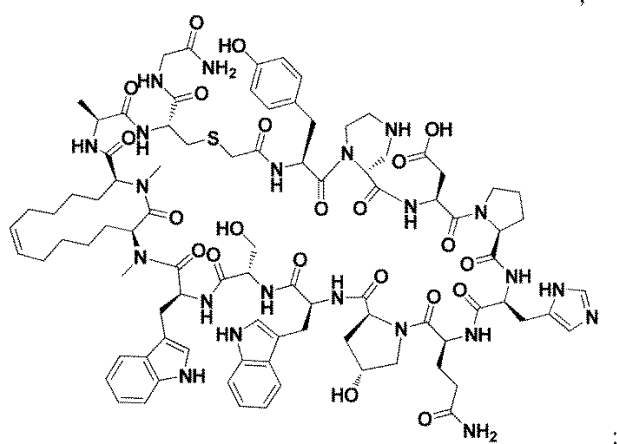
50



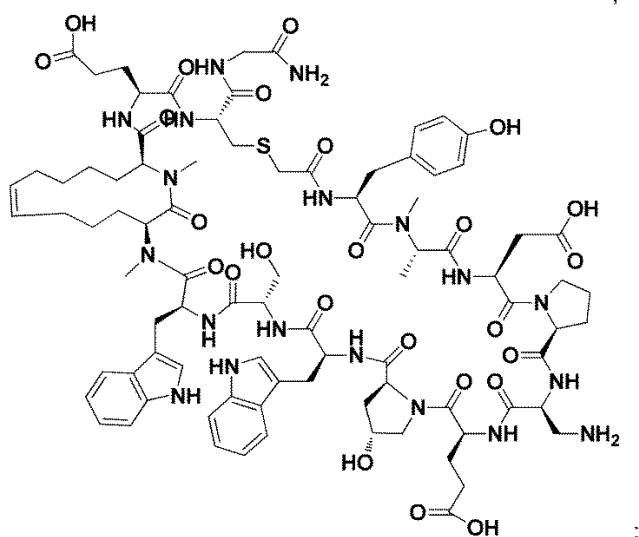
【化 1 0】



10



20

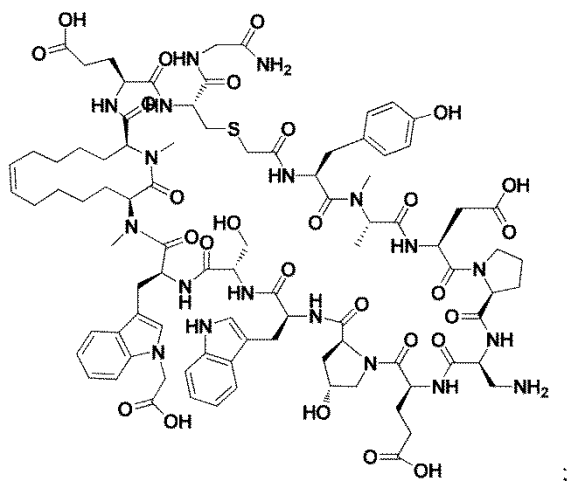


30

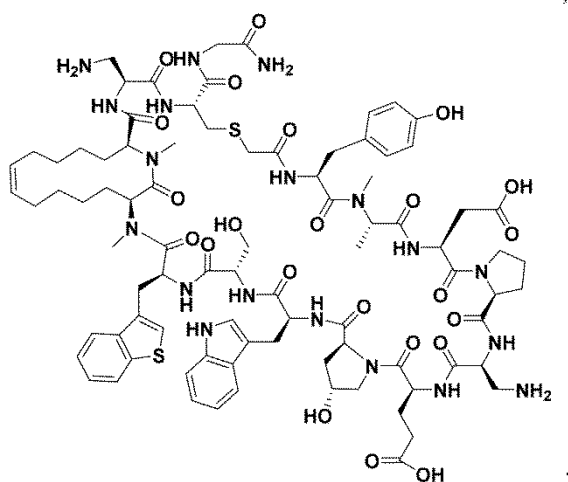
40

50

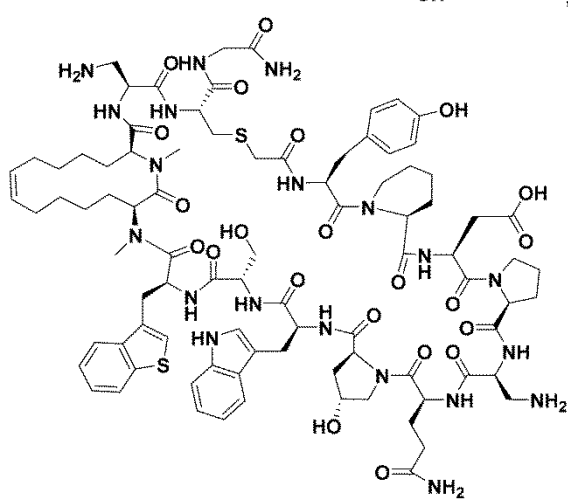
## 【化 1 1】



10



20



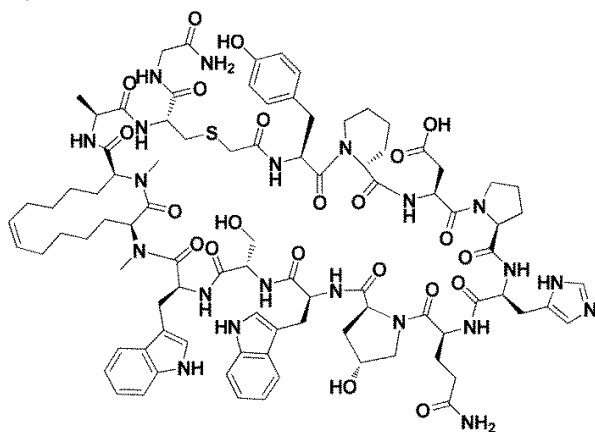
30



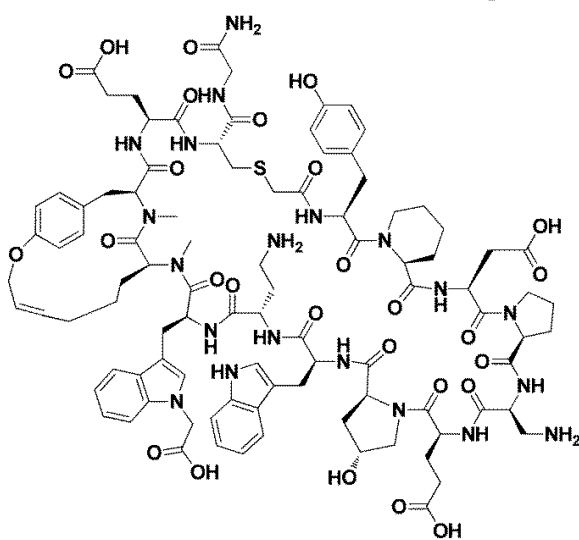
40

50

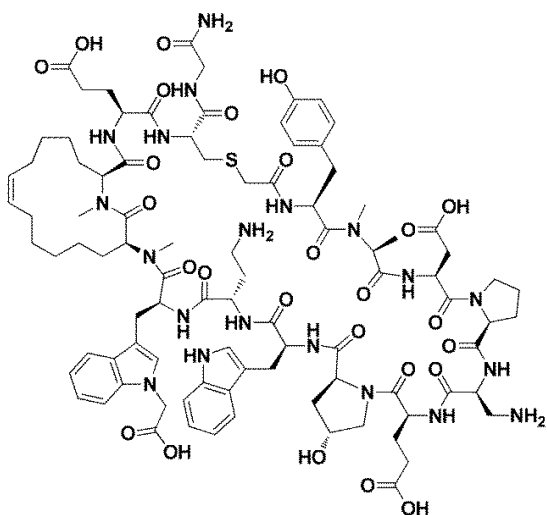
## 【化 1 2】



10



20



30

40

から選択される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む、免疫応答を強化し、刺激し、および / または増加させるための、医薬組成物。

## 【請求項 4】

さらなる薬剤の前、後、または同時に、当該さらなる薬剤と共に使用される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

さらなる薬剤が抗菌剤、抗ウイルス剤、細胞毒性剤、および / または免疫応答調節剤で

50

ある、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

さらなる薬剤が H D A C 阻害剤である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む、癌細胞の成長、増殖、または転移を抑制するための、医薬組成物。

【請求項 9】

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

【請求項 10】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む、感染性疾患を治療するための、医薬組成物。

【請求項 11】

感染性疾患がウイルスによって引き起こされる、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

ウイルスが、H I V、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、ヘルペスウイルス、およびインフルエンザから選択される、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む、敗血症性ショックを治療するための、医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を含む、P D - L 1 と P D - 1 および / または C D 80 との相互作用を阻害するための、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国第 62 / 567, 323 号 ( 2017 年 10 月 3 日出願 ) の利益を主張し、その全体的な内容が援用される。

【0002】

本開示は、P D - 1 / P D - L 1 および C D 80 / P D - L 1 タンパク質 / タンパク質相互作用を阻害し、それによって、癌および感染症などの様々な疾患の改善に有用である、新規な大環状ペプチドを提供する。

【0003】

タンパク質、プログラム死 1 ( P D - 1 ) は、受容体の C D 28 ファミリーの阻害性メンバーであり、これには C D 28、C T L A - 4、I C O S および B T L A もまた含まれる。P D - 1 は活性化 B 細胞、T 細胞、および骨髓細胞上に発現する ( Agata et al., supra; Okazaki et al., Curr. Opin. Immunol., 14:779-782 (2002); Bennett et al., J. Immunol., 170:711-718 (2003) )。

【0004】

P D - 1 タンパク質は、I g 遺伝子スーパーファミリーの一部である、55 k D a I 型膜貫通タンパク質である ( Agata et al., Int. Immunol., 8:765-772 (1996) )。P D - 1 は、膜近位免疫受容体チロシン阻害性モチーフ ( I T I M ) および膜遠位チロシンベースのスイッチモチーフ ( I T S M ) を含む ( Thomas, M.L., J. Exp. Med., 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., Immunol. Today, 18:286-291 (1997) )。C

10

20

30

40

50

T L A - 4 と構造的に類似するが、P D - 1 は、C D 8 0 C D 8 6 ( B 7 - 2 ) 結合に重要な M Y P P Y モチーフがない。P D - 1 の 2 つのリガンド、P D - L 1 ( B 7 - H 1 ) および P D - L 2 ( b 7 - D C ) が特定されている。P D - 1 を発現している T 細胞の活性化は、P D - L 1 または P D - L 2 を発現している細胞との相互作用によって下方制御されることが示されている (Freeman et al., J. Exp. Med., 192:1027-1034 (2000) ); Latchman et al., Nat. Immunol., 2:261-268 (2001); Carter et al., Eur. J. Immunol., 32:634-643 (2002) )。P D - L 1 および P D - L 2 の両方が、P D - 1 に結合するが、他の C D 2 8 ファミリーメンバーには結合しない、B 7 タンパク質ファミリーメンバーである。P D - L 1 リガンドは、様々なヒトの癌に多い (Dong et al., Nat. Med., 8:787-789 (2002) )。P D - 1 および P D - L 1 の相互作用によって、腫瘍浸潤リンパ球の減少、T 細胞受容体介在性増殖の減少、および癌細胞による免疫回避が生じる (Dong et al., J. Mol. Med., 81:281-287 (2003); Blank et al., Cancer Immunol. Immunother., 54:307-314 (2005); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10:5094-5100 (2004) )。P D - 1 と P D - L 1 との局所的な相互作用を阻害することによって、免疫抑制を逆転させることができ、P D - 1 と P D - L 2 との相互作用もまた阻害されている場合、効果は相加的である (Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003) )。

#### 【 0 0 0 5 】

P D - L 1 もまた、C D 8 0 と相互作用することが示されている (Butte MJ et al, Immunity;27:111-122 (2007) )。免疫を示す細胞において、P D - L 1 / C D 8 0 の相互作用は、阻害性のものであることが示されている。この相互作用の遮断は、この阻害性相互作用を抑制することが示されている (Paterson AM, et al., J Immunol., 187:1097-1105 (2011); Yang J, et al. J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011) )。

#### 【 0 0 0 6 】

P D - 1 を発現している T 細胞が、そのリガンドを発現している細胞に接触した時、増殖、サイトカイン分泌、および細胞毒性などの抗原刺激に対する応答において、機能的活性が低下する。P D - 1 / P D - L 1 または P D - L 2 相互作用は、感染症または腫瘍の消散の間、または自己寛容の発達の間、免疫応答を下方制御する (Keir, M.E. et al., Annu. Rev. Immunol., 26:Epub (2008) )。腫瘍疾患または慢性感染症の間に生じるような、慢性抗原刺激は、上昇した量の P D - 1 を発現し、慢性抗原に対する活性に関して機能不全である T 細胞を生じさせる (Kim et al., Curr. Opin. Imm. (2010) において総括される)。これは「T 細胞の疲弊」と呼ばれる。B 細胞もまた、P D - 1 / P D - リガンド抑制および「疲弊」を示す。

#### 【 0 0 0 7 】

P D - L 1 に対する抗体を用いた P D - 1 / P D - L 1 結合の遮断によって、多くの系において T 細胞の活性化を回復させ、増大させることが示されている。進行癌を有する患者は、P D - L 1 に対するモノクローナル抗体を用いた治療で利益を得る (Brahmer et al., New Engl. J. Med. (2012) )。腫瘍および慢性感染症の前臨床動物モデルによって、モノクローナル抗体による P D - 1 / P D - L 1 経路の遮断は、免疫応答を増強させ、腫瘍の拒絶または感染症の制御をもたらすことができることが示されている。P D - 1 / P D - L 1 遮断による抗腫瘍免疫療法は、組織学的に異なる多数の腫瘍に対する治療的免疫応答を増強させる可能性がある (Dong, H. et al., 「B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity」, J. Mol. Med., 81(5):281-287 (2003); Dong, H. et al., 「Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion」, Nat. Med., 8(8):793-800 (2002) )。

#### 【 0 0 0 8 】

P D - 1 / P D - L 1 相互作用による干渉は、慢性感染症による系において、T 細胞活性化の増強を生じる。P D - L 1 の遮断は、慢性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染を有するマウスにおいて、向上したウイルスクリアランスおよび保存された免疫をもたらした (Barber, D.L. et al., 「Restoring function in exhausted CD8 T cells during ch

10

20

30

40

50

ronic viral infection」, Nature, 439(7077):682-687 (2006))。H I V - 1 に感染したヒト化マウスは、ウイルス血症に対する防御の増強と、ウイルス性の C D 4 + T 細胞枯渇を示す (Palmer et al., J. Immunol. (2013))。P D - L 1 に対するモノクローナル抗体を介した P D - 1 / P D - L 1 の遮断によって、H I V 患者 (Day, Nature (2006); Petrovas, J. Exp. Med. (2006); Trautman, Nature Med. (2006); D'Souza, J. Immunol. (2007); Zhang, Blood (2007); Kaufmann, Nature Imm. (2007); Kasu, J. Immunol. (2010); Porichis, Blood (2011))、H C V 患者 (Golden-Mason, J. Virol. (2007); Jeung, J. Leuk. Biol. (2007); Urbani, J. Hepatol. (2008); Nakamoto, PLoS Path. (2009); Nakamoto, Gastroenterology (2008))、および H B V 患者 (Boni, J. Virol. (2007); Fisicaro, Gastro. (2010); Fisicaro et al., Gastroenterology (2012); Boni et al., Gastro. (2012); Penna et al., J. Hep. (2012); Raziorrough, Hepatology (2009); Liang, World J. Gastro. (2010); Zhang, Gastro. (2008)) からの T 細胞に対するインビトでの抗原特異的機能を回復させることができる。

#### 【 0 0 0 9 】

P D - L 1 / C D 8 0 相互作用の遮断もまた、免疫を刺激することが示されている (Yang J., et al., J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011))。P D - L 1 / C D 8 0 相互作用の阻害に起因する免疫刺激は、P D - 1 / P D - L 1 または P D - 1 / P D - L 2 相互作用のさらなる遮断との組み合わせによって増強されることが示されている。

#### 【 0 0 1 0 】

免疫細胞の表現型における変化は、敗血症性ショックの重要な因子であると仮定されている (Hotchkiss, et al., Nat Rev Immunol (2013))。これらとしては、P D - 1 および P D - L 1 の上昇した量 (Guignant, et al, Crit. Care (2011)) が挙げられ、P D - 1 および P D - L 1 の上昇した量を有する敗血症性ショック患者からの細胞は、T 細胞アポトーシスの上昇した量を示す。P D - L 1 に対する抗体は、免疫細胞アポトーシスの量を減少させることができる (Zhang et al, Crit. Care (2011))。さらに、P D - 1 発現を欠いたマウスは、野生型マウスよりも敗血症性ショックに対して耐性がある (Yang J., et al., J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011))。研究によって、抗体を用いた P D - L 1 相互作用の遮断が非適切な免疫応答を抑制し、疾患状態を改善することが明らかになっている。

#### 【 0 0 1 1 】

慢性的な抗原に対する免疫応答の増強に加えて、P D - 1 / P D - L 1 経路の遮断は、慢性感染症との関連での治療ワクチン接種などのワクチン接種に対する応答を高めることも示されている (Ha, S.J. et al., 「Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection」, J. Exp. Med., 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C. et al., 「PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination」, J. Immunol., 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y. et al., 「Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1」, J. Immunother., 34(3):297-306 (2011))。

#### 【 0 0 1 2 】

本明細書に記載される分子は、P D - L 1 の P D - 1 との相互作用を、生化学および細胞に基づく実験系の両方において、遮断する能力を示す。これらの結果は、治療ワクチンなどの、癌または慢性感染症における免疫を増強するための治療的投与に関する可能性と一致する。

#### 【 0 0 1 3 】

本明細書に記載される大環状ペプチドは、P D - L 1 の、P D - 1 および C D 8 0 との相互作用を阻害することができる。これらの化合物は、P D - L 1 への非常に効果的な結合を示し、P D - L 1 と P D - 1 または C D 8 0 のいずれかとの相互作用を遮断することが示されており、向上した T 細胞の機能的活性を促進することができ、それによって非経

10

20

30

40

50



## 【化 4】



は窒素原子の結合点を表し；

$z$  は 0、1、または 2 であり；

$w$  は 1 または 2 であり；

$n$  は 0 または 1 であり；

$m$  は 1 または 2 であり；

$m'$  は 0 または 1 であり；

$p$  は 0、1、または 2 であり；

$R^x$  は水素、アミノ、ヒドロキシ、およびメチルから選択され；

$R^{14}$  および  $R^{15}$  は独立して、水素およびメチルから選択され；

$R^2$  は水素および  $-C(O)NHR^{16}$  から選択され；ここで  $R^{16}$  は、水素、 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ 、 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ 、および  $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$  から選択され；ここで、 $R^{17}$  は水素および  $-CH_2OH$  から選択され、 $R^{18}$  は水素およびメチルから選択され；

$R^v$  は水素または天然アミノ酸の側鎖であり；

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

$R^l$  はメチルであり；

$R^n$  は水素またはメチルであるか、あるいは、 $R^v$  および  $R^n$  はピロリジン環を形成し；

$R^a$ 、 $R^j$ 、および  $R^k$  はそれぞれ独立して、水素およびメチルから選択され；

$R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^6$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、および  $R^{13}$  は独立して、天然アミノ酸の側鎖および非天然アミノ酸の側鎖から選択され；

$Q$  は適宜、1つの炭素-炭素二重結合またはフェノキシ基を含んでいてもよい、5～12員の炭素鎖であり；

$R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、および  $R^7$  は独立して、天然のアミノ酸側鎖および非天然のアミノ酸側鎖から選択されるか、あるいは、以下に記載されるジェミナルな  $R$  基を形成し；

$R^b$  はメチルであるか、あるいは、 $R^b$  および  $R^2$  は、それらが結合する原子と一緒にあって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジン、およびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成し；ここで、それぞれの環は適宜、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、およびヒドロキシから独立して選択される、1～4個の基で置換されていてもよく；

$R^d$  は水素またはメチルであるか、あるいは、 $R^d$  および  $R^4$  は、それらが結合する原子と一緒にあって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジン、およびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成することができ；ここで、それぞれの環は適宜、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、ヒドロキシ、およびフェニルから独立して選択される、1～4個の基で置換されていてもよく；

$R^e$  は水素またはメチルであるか、あるいは、 $R^e$  および  $R^5$  は、それらが結合する原子と一緒にあって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジン、およびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成することができ；ここで、それぞれの環は適宜、アミノ、シアノ、メチル、ハロ、およびヒドロキシから独立して選択される、1～4個の基で置換されていてもよく；

$R^g$  は水素またはメチルであるか、あるいは、 $R^g$  および  $R^7$  はそれらが結合する原子と一緒にあって、アゼチジン、ピロリジン、モルホリン、ピペリジン、ピペラジン、およびテトラヒドロチアゾールから選択される環を形成することができ；ここで、それぞれの環は適宜、アミノ、ハロ基で適宜置換されていてもよいベンジル、ベンジロキシ、シアノ、シクロヘキシル、メチル、ハロ、ヒドロキシ、メトキシ基で適宜置換されていてもよいイソキノリニルオキシ、ハロ基で適宜置換されていてもよいキノリニルオキシ、およびテトラゾリルから独立して選択される、1～4個の基で置換されていてもよく；ここで、ピロリジンおよびピペリジン環は適宜、シクロヘキシル、フェニル、またはインドール基に

10

20

30

40

50



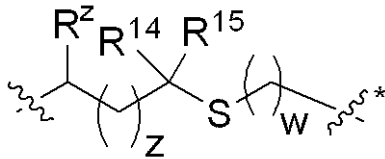
縮合している。]

の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0015】

第一の局面の第一の実施態様において、本開示は、Aが

【化5】



10

である、式(I)の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を開示する。

【0016】

第二の実施態様において、

$z$  は0であり；

$w$  は1であり；

$R^{14}$  および  $R^{15}$  は水素であり；

$R^Z$  は  $-C(O)NHR^{16}$  であり；ここで、 $R^{16}$  は  $-CHR^{17}C(O)NH_2$  である。

【0017】

第三の実施態様において、

$R^1$  は、ヒドロキシで適宜置換されていてもよいベンジルであり；

$R^2$  はメチルであるか、あるいは  $R^b$  と一緒になって、ピペリジン、ピペラジン、およびモルホリンから選択される環を形成し；

$R^3$  は  $-CH_2C(O)NH_2$  および  $-CH_2CO_2H$  から選択され；

$R^4$  は、 $R^d$  と一緒になって、ピロリジン環を形成し；

$R^5$  は  $-CH_2$  (イミダゾリル) および  $-CH_2NH_2$  から選択され；

$R^6$  はイソブチル、 $-(CH_2)_2CO_2H$ 、および  $-(CH_2)_2CONH_2$  から選択され；

$R^7$  は水素であるか、あるいは、 $R^g$  と一緒になって、ヒドロキシで適宜置換されていてもよいピロリジン環を形成し；

$R^8$  は  $-(CH_2)$  インドリルであり；

$R^9$  は  $-CH_2OH$  および  $-(CH_2)_2NH_2$  から選択され；

$R^{10}$  は  $-(CH_2)$  インドリルおよび  $-(CH_2)$  ベンゾチエニルから選択され、それぞれは適宜、 $-CH_2CO_2H$  で置換されていてもよい、

請求項3に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

【0018】

別の実施態様において、本開示は、必要な対象において、免疫応答を強化し、刺激し、および/または増加させる方法であって、治療上の有効量の式(I)に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与することを含む、前記方法を提供する。別の実施態様において、当該方法はさらに、式(I)の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の前、後、または同時に、さらなる薬剤を投与することを含む。別の実施態様において、さらなる薬剤は、抗菌剤、抗ウイルス剤、細胞毒性剤、および/または免疫応答調節剤である。別の実施態様において、さらなる薬剤はHDA C阻害剤である。別の実施態様において、さらなる薬剤はTLR7および/またはTLR8アゴニストである。

【0019】

別の実施態様において、本開示は、必要な対象において、癌細胞の成長、増殖、または転移を阻害する方法であって、治療上の有効量の式(I)の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与することを含む前記方法を提供する。前記阻害は直接的または間接的であることが理解されるべきである。別の実施態様において、癌は、黒色腫、腎細

40

50

胞癌、扁平上皮非小細胞性肺癌（NSCLC）、非扁平上皮NSCLC、大腸癌、去勢抵抗性前立腺癌、卵巣癌、胃癌、肝細胞癌、膵臓癌、頭頸部扁平上皮細胞癌、食道、消化管および乳房の癌、および造血器腫瘍から選択される。

【0020】

別の実施態様において、本開示は、必要な対象において感染性疾患を治療する方法であって、治療上の有効量の式（I）の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与することを含む前記方法を提供する。別の実施態様において、感染性疾患はウイルスによって引き起こされる。別の実施態様において、ウイルスはHIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ヘルペスウイルス、およびインフルエンザから選択される。

【0021】

別の実施態様において、本開示は、必要な対象において敗血症性ショックを治療する方法であって、治療上の有効量の本明細書に記載される1つ以上の大環状ペプチドを対象に投与することを含む方法を提供する。

【0022】

別の実施態様において、本開示は、対象においてPD-L1と、PD-1および/またはCD80との相互作用を阻害する方法であって、治療上の有効量の本明細書に記載の少なくとも1つの大環状ペプチドを対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0023】

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

【0024】

R<sup>2</sup>が環の一部ではない場合の式（I）の化合物において、好ましいR<sup>2</sup>側鎖は、アラニン、セリン、およびグリシンである。

【0025】

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

【0026】

R<sup>4</sup>が環の一部ではない場合の式（I）の化合物において、好ましいR<sup>4</sup>側鎖は、バリン、アラニン、イソロイシン、およびグリシンである。

【0027】

式（I）の化合物において、好ましいR<sup>5</sup>側鎖は、アミノメタン、ヒスチジン、アスパラギン、2,3-ジアミノプロパン、セリン、グリシン、2,4-ジアミノブタン、スレオニン、アラニン、リシン、アスパラギン酸、アラニン、および3-チアゾリルアラニンである。

【0028】

式（I）の化合物において、好ましいR<sup>6</sup>側鎖は、ロイシン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、リシン、3-シクロヘキサン、スレオニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン、アラニン、アルギニン、およびオルニチン（C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>）である。

【0029】

R<sup>7</sup>が環の一部ではない場合の式（I）の化合物において、好ましいR<sup>7</sup>側鎖は、グリ

10

20

30

40

50

シン、2, 4 - ジアミノブタン、セリン、リシン、アルギニン、オルニチン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、アラニン、および2, 4 - ジアミノブタン(C(O)シクロブタン)である。

【0030】

式(I)の化合物において、好ましいR<sup>8</sup>の側鎖は、トリプトファンおよび1, 2 - ベンズイソチアゾリニルアラニンである。

【0031】

式(I)の化合物において、好ましいR<sup>9</sup>の側鎖は、セリン、ヒスチジン、リシン、オルニチン、2, 4 - ジブチルアミン、スレオニン、リシン、グリシン、グルタミン酸、バリン、2, 3 - ジアミノプロパン、アルギニン、アスパラギン酸、およびチロシンである。

10

【0032】

式(I)の化合物において、好ましいR<sup>10</sup>の側鎖は、適宜置換されていてよいトリプトファン、ベンズイソチアゾリルアラニン、1 - ナフチルアラニン、およびメチオニンである。

【0033】

式(I)の化合物において、好ましいR<sup>11</sup>の側鎖は、ノルロイシン、ロイシン、アスパラギン、フェニルアラニン、メチオニン、エトキシメタン、アラニン、トリプトファン、イソロイシン、フェニルプロパン、グルタミン酸、ヘキサン、およびヘプタンである。

【0034】

R<sup>12</sup>が環の一部ではない場合の式(I)の化合物において、好ましいR<sup>12</sup>の側鎖は、ノルロイシン、アラニン、エトキシメタン、メチオニン、セリン、フェニルアラニン、メトキシエタン、ロイシン、トリプトファン、イソロイシン、グルタミン酸、ヘキサン、ヘプタン、およびグリシンである。

20

【0035】

式(I)の化合物において、好ましいR<sup>13</sup>の側鎖は、アルギニン、オルニチン、アラニン、2, 4 - ジアミノブタン、2, 3 - ジアミノプロパン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、リシン、スレオニン、シクロプロピルメタン、グリシン、バリン、イソロイシン、ヒスチジン、および2 - アミノブタンである。

【0036】

本開示に従って、我々は、PD - L1に特異的に結合し、PD - L1と、PD - 1およびCD80との相互作用を阻害することができるペプチドを発見した。これらの大環状ペプチドは、インビトロで免疫調節効果を発揮し、それによって癌および感染症などの様々な疾患の治療のための治療候補となる。

30

【0037】

用語「特異的な結合」または「特異的に結合する」は、タンパク質と、化合物またはリガンドなどの結合分子との相互作用をいう。相互作用は、結合分子によって認識される、タンパク質の特定の構造(すなわち、酵素結合部位、抗原決定基、またはエピトープ)の存在による。例えば、化合物がタンパク質結合部位「A」に特異的な結合を有する場合、結合部位Aを含むタンパク質、およびタンパク質結合部位Aに特異的に結合する標識ペプチドを含む反応において、化合物の存在は、タンパク質に結合する標識ペプチドの量を減少させる。反対に、タンパク質に対する化合物の非特異的な結合は、タンパク質からの標識ペプチドの濃度依存的な置換は生じない。

40

【0038】

本開示は、本化合物中に生じる原子の全ての同位体を含むことを意図する。同位体は同じ原子数を有するが、異なる質量数を有するこれらの原子を含む。一般的な例として、限定されないが、水素の同位体としては、重水素およびトリチウムが挙げられる。炭素の同位体としては、<sup>13</sup>Cおよび<sup>14</sup>Cが挙げられる。本発明の同位体標識した化合物は、一般に、当業者に既知の従来の技術によって、または本明細書に記載されるものと同様の方法によって、他の場合に用いられる非標識試薬の代わりに、適切に同位体標識した試薬を用いて合成することができる。そのような化合物は、例えば、生物学的活性を決定する際の

50

標準および試薬として、様々な潜在的な用途を有しうる。安定な同位体の場合、そのような化合物は、生物学的、薬理的、または薬物動態特性を有利に変更する可能性を有しうる。

【 0 0 3 9 】

本明細書に記載される主題のさらなる局面は、リガンド結合アッセイの開発のために、またはインビボ吸着、代謝、分布、受容体結合もしくは占有、もしくは化合物処分の追跡のために、放射性標識リガンドとしての本開示のペプチドの使用である。例えば、本明細書に記載の大環状ペプチドは、放射性同位体<sup>125</sup>Iを用いて合成される場合があり、得られた放射性標識ペプチドは、結合アッセイの開発または代謝研究のために使用されうる。あるいは、同様の目的のために、本明細書に記載される大環状ペプチドは、当業者に既知の方法を用いて、触媒トリチウム化によって放射性標識形態に変換されうる。

10

【 0 0 4 0 】

本開示の大環状ペプチドはまた、当業者に既知の方法を用いて、放射性トレーサーを加えることによって、PET造影剤として使用することができる。

【 0 0 4 1 】

好ましいペプチドとしては、本明細書に提示される大環状ペプチドの少なくとも1つが挙げられ、これらのペプチドは医薬組成物および組み合わせに含まれうる。

【 0 0 4 2 】

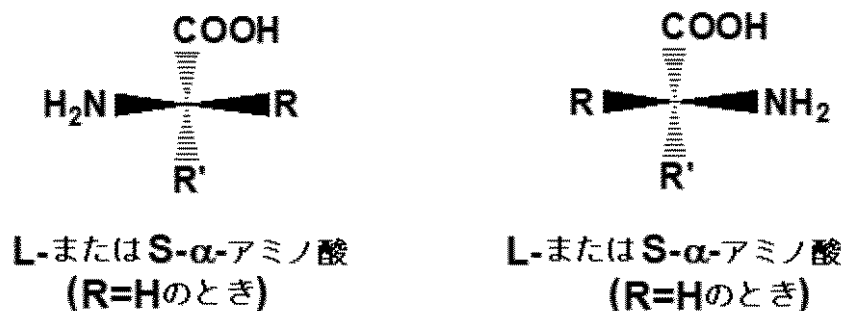
本明細書に提示される定義は、特定の場合に限定されない限り、本明細書全体で使用される用語に、限定されず、適用される。

20

【 0 0 4 3 】

アミノ酸およびペプチド化学の技術分野における当業者は、アミノ酸が一般的な構造：

【 化 6 】



30

[ 式中、RおよびR'は本明細書に記載される通りである、 ]  
によって表される化合物を含むことを知っている。

【 0 0 4 4 】

特に断らない限り、本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、単独で、または他の基の一部として、限定されないが、「 $\alpha$ 」炭素と呼ばれる、同一の炭素に結合したアミノ基およびカルボキシル基を含み、ここで、Rおよび/またはR'は、水素などの、天然または非天然側鎖でありうる。「 $\alpha$ 」炭素における、「S」絶対配置は一般に、「L」または「天然」配置として示される。「R」および「R'」(プライム)置換基の両方が水素である場合、アミノ酸はグリシンであり、キラルでない。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書で用いられる用語「天然アミノ酸側鎖」および「天然に存在するアミノ酸側鎖」は、通常はS配置(すなわち、L-アミノ酸)の、天然に存在するアミノ酸(すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、 $\gamma$ -ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン)の任意の側鎖をいう。

【 0 0 4 6 】

50

本明細書で用いられる用語「非天然アミノ酸側鎖」および「非天然に存在するアミノ酸側鎖」は、通常R配置（すなわち、D-アミノ酸）の、任意の天然に存在するアミノ酸の側鎖、または以下：

C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルコキシC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシカルボニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルファニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アミドC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アミノC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アザインドリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ベンゾチアゾリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ベンゾチエニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ベンジルオキシC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、カルボキシC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ジフェニルメチル、フラニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、イミダゾリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ナフチルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ピリジニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、チアゾリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、チエニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル；

ピフェニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、ピフェニルは適宜メチル基で置換されているもよい；

C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、ニトロ、および-OP(O)(OH)<sub>2</sub>から独立して選択される、1、2、3、4、または5個の基で適宜置換されているもよい、ヘテロシクリル；

インドリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、インドリル部分は適宜、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、カルボキシC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ハロ、ヒドロキシ、およびフェニルから選択される1つの基で置換されているもよく、ここで、フェニルはさらに、適宜、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、およびハロから独立して選択される、1、2、または3つの基で置換されているもよく；

NR<sup>y</sup>R<sup>y'</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>アルキル)、ここで、R<sup>y</sup>およびR<sup>y'</sup>は独立して、水素、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>アルケニルオキシカルボニル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルカルボニル、C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキルカルボニル、フラニルカルボニル、およびフェニルカルボニルから選択され、アルキルリンカーが1つ以上の炭素を含む場合、さらなるNR<sup>y</sup>R<sup>y'</sup>基が鎖に存在しうる；

NR<sup>q</sup>R<sup>t</sup>カルボニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、R<sup>q</sup>およびR<sup>t</sup>は独立して、水素、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、およびトリフェニルメチルから選択される；

C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、ニトロ、および-OP(O)(OH)<sub>2</sub>から独立して選択される、1、2、3、4、または5個の基で適宜置換されているもよい、フェニル；

NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>アルキル)、ここで、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は独立して、水素、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>アルケニルオキシカルボニル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルカルボニル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキルカルボニル、フラニルカルボニル、およびフェニルカルボニルから選択され、アルキルリンカーが1つより多い炭素を含む場合、さらなるNR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>基が鎖に存在しうる；

NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>カルボニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、R<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>は独立して、水素、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、およびトリフェニルメチルから選択され；

フェニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、フェニル部分は適宜、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルホニルアミノ、アミド、アミノ、アミノC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アミノスルホニル、カルボキシ、シアノ、ハロ、ハロC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ヒドロキシ、-NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、ニトロ、および-OP(O)(OH)<sub>2</sub>から独立して選択される、1、2、3、4、または5個の基で置換されているもよく；

フェノキシC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、ここで、フェニルは適宜、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基で置換されているもよい

から選択される、R-またはS-配置（すなわち、それぞれD-またはL-アミノ酸）の

天然に存在するアミノ酸側鎖以外の基をいう。

【0047】

本明細書で用いられる用語「 $C_2 - C_4$ アルケニル」は、少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を含む、2～4個の炭素原子の直鎖または分岐鎖基をいう。

【0048】

本明細書で用いられる用語「 $C_2 - C_7$ アルケニル」は、少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を含む、2～7個の炭素原子の直鎖または分岐鎖基をいう。

【0049】

本明細書で用いられる用語「 $C_2 - C_4$ アルケニルオキシ」は、酸素原子を介して親分子基に結合した、 $C_2 - C_4$ アルケニル基をいう。

10

【0050】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルコキシ」は、酸素原子を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキル基をいう。

【0051】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_4$ アルコキシ」は、酸素原子を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_4$ アルキル基をいう。

【0052】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_6$ アルコキシ」は、酸素原子を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_6$ アルキル基をいう。

【0053】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルコキシ  $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルコキシ基をいう。

20

【0054】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_6$ アルコキシカルボニル」は、カルボニル基を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基をいう。

【0055】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_6$ アルコキシカルボニル  $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_6$ アルコキシカルボニル基をいう。

【0056】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキル」は、1～3個の炭素原子を含む、直鎖または分岐鎖飽和炭化水素に由来する基をいう。

30

【0057】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_4$ アルキル」は、1～4個の炭素原子を含む、直鎖または分岐鎖飽和炭化水素に由来する基をいう。

【0058】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_6$ アルキル」は、1～6個の炭素原子を含む、直鎖または分岐鎖飽和炭化水素に由来する基をいう。

【0059】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキルカルボニル」は、カルボニル基を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキル基をいう。

40

【0060】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキルスルファニル」は、硫黄原子を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキル基をいう。

【0061】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキルスルファニル  $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキルスルファニル基をいう。

【0062】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキルスルホニル」は、スルホニル基を介し

50

て親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキル基をいう。

【0063】

本明細書で用いられる用語「 $C_1 - C_3$ アルキルスルホニルアミノ」は、アミノ基を介して親分子基に結合した、 $C_1 - C_3$ アルキルスルホニル基をいう。

【0064】

本明細書で用いられる用語「アミド」は、 $-C(O)NH_2$ をいう。

【0065】

本明細書で用いられる用語「アミド $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、アミド基をいう。

【0066】

本明細書で用いられる用語「アミノ」は、 $-NH_2$ をいう。

【0067】

本明細書で用いられる用語「アミノ $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合したアミノ基をいう。

【0068】

本明細書で用いられる用語「アミノスルホニル」は、スルホニル基を介して親分子基に結合したアミノ基をいう。

【0069】

本明細書で用いられる用語「アザインドリル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、アザインドリル基をいう。アザインドリル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0070】

本明細書で用いられる用語「ベンゾチアゾリル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、ベンゾチアゾリル基をいう。ベンゾチアゾリル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0071】

本明細書で用いられる用語「ベンゾチエニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、ベンゾチエニル基をいう。ベンゾチエニル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0072】

本明細書で用いられる用語「ベンジルオキシ」は、酸素原子を介して親分子に結合した、ベンジル基をいう。

【0073】

本明細書で用いられる用語「ベンジルオキシ $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、ベンジルオキシ基をいう。

【0074】

本明細書で用いられる用語「ビフェニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、ビフェニル基をいう。ビフェニル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0075】

本明細書で用いられる用語「カルボニル」は、 $-C(O)-$ をいう。

【0076】

本明細書で用いられる用語「カルボキシ」は、 $-CO_2H$ をいう。

【0077】

本明細書で用いられる用語「カルボキシ $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、カルボキシ基をいう。

【0078】

本明細書で用いられる用語「シアノ」は、 $-CN$ をいう。

【0079】

本明細書で用いられる用語「 $C_3 - C_{14}$ シクロアルキル」は、3～14個の炭素原子お

10

20

30

40

50

よび0個のヘテロ原子を有する、飽和単環式、二環式、または三環式炭化水素環系をいう。二環式および三環式環は、縮合、スピロ環、または架橋でありうる。シクロアルキル基の代表的な例としては、限定されないが、シクロプロピル、シクロペンチル、ビシクロ[3.1.1]ヘプチル、およびアダマンチルが挙げられる。

【0080】

本明細書で用いられる用語「C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基を介して親分子に結合したC<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキル基をいう。

【0081】

本明細書で用いられる用語「C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキルカルボニル」は、カルボニル基を介して親分子に結合した、C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>シクロアルキル基をいう。

10

【0082】

本明細書で用いられる用語「フラニルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基を介して親分子に結合した、フラニル基をいう。フラニル基は、基中の任意の置換可能な原子を介してアルキル基に結合しうる。

【0083】

本明細書で用いられる用語「フラニルカルボニル」は、カルボニル基を介して親分子に結合したフラニル基をいう。

【0084】

本明細書で用いられる用語「ハロ」および「ハロゲン」は、F、Cl、Br、またはIをいう。

20

【0085】

本明細書で用いられる用語「ハロC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、1、2、または3個のハロゲン原子で置換された、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基をいう。

【0086】

本明細書で用いられる用語「ハロメチル」は、1、2、または3個のハロゲン原子で置換された、メチル基をいう。

【0087】

本明細書で用いられる用語「ヘテロシクリル」は、窒素、酸素、および硫黄から独立して選択される、1、2、または3個のヘテロ原子を含む、5、6、または7員環をいう。5員環は0~2個の二重結合を有し、6および7員環は0~3個の二重結合を有する。用語「ヘテロシクリル」はまた、ヘテロシクリル環が4~6員の芳香族または非芳香族炭素環に縮合している二環式基、または他の単環式ヘテロシクリル基を含む。本開示のヘテロシクリル基は、基中の炭素原子を介して親分子に結合する。ヘテロシクリル基の例としては、限定されないが、ベンゾチエニル、フリル、イミダゾリル、インドリニル、インドリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、モルホリニル、オキサゾリル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラゾリル、ピリジニル、ピロリジニル、ピロロピリジニル、ピロリル、チアゾリル、チエニル、およびチオモルホリニルが挙げられる。

30

【0088】

本明細書で用いられる用語「ヒドロキシ」は、-OHをいう。

【0089】

本明細書で用いられる用語「イミダゾリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基を介して親分子に結合したイミダゾリル基をいう。イミダゾリル基は、基中の任意の置換可能な原子を介してアルキル基に結合しうる。

40

【0090】

本明細書で用いられる用語「インドリルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基を介して親分子基に結合した、インドリル基をいう。インドリル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0091】

本明細書で用いられる用語「ナフチルC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」は、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル基を介して親分子基に結合した、ナフチル基をいう。ナフチル基は、基中の任意の置換可能な

50



原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0092】

本明細書で用いられる用語「ニトロ」は、 $-NO_2$ をいう。

【0093】

本明細書で用いられる用語「 $NR^aR^b$ 」は、窒素原子を介して親分子に結合した2つの基、 $R^a$ および $R^b$ をいう。 $R^a$ および $R^b$ は独立して、水素、 $C_2 - C_4$ アルケニルオキシカルボニル、 $C_1 - C_3$ アルキルカルボニル、 $C_3 - C_6$ シクロアルキルカルボニル、フラニルカルボニル、およびフェニルカルボニルから選択される。

【0094】

本明細書で用いられる用語「 $NR^aR^b(C_1 - C_3)$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、 $NR^aR^b$ 基をいう。

10

【0095】

本明細書で用いられる用語「 $NR^cR^d$ 」は、窒素原子を介して親分子基に結合した2つの基、 $R^c$ および $R^d$ をいう。 $R^c$ および $R^d$ は独立して、水素、 $C_1 - C_3$ アルキル、およびトリフェニルメチルから選択される。

【0096】

本明細書で用いられる用語「 $NR^cR^d$ カルボニル」は、カルボニル基を介して親分子に結合した、 $NR^cR^d$ 基をいう。

【0097】

本明細書で用いられる用語「 $NR^cR^d$ カルボニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子に結合した、 $NR^cR^d$ カルボニル基をいう。

20

【0098】

本明細書で用いられる用語「フェノキシ」は、酸素原子を介して親分子基に結合した、フェニル基をいう。

【0099】

本明細書で用いられる用語「フェノキシ $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、フェノキシ基をいう。

【0100】

本明細書で用いられる用語「フェニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、フェニル基をいう。

30

【0101】

本明細書で用いられる用語「フェニルカルボニル」は、カルボニル基を介して親分子基に結合した、フェニル基をいう。

【0102】

本明細書で用いられる用語「ピリジニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、ピリジニル基をいう。ピリジニル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0103】

本明細書で用いられる用語「スルファニル」は、 $-S-$ をいう。

【0104】

本明細書で用いられる用語「スルホニル」は、 $-SO_2-$ をいう。

40

【0105】

本明細書で用いられる用語「チアゾリル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、チアゾリル基をいう。チアゾリル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0106】

本明細書で用いられる用語「チエニル $C_1 - C_3$ アルキル」は、 $C_1 - C_3$ アルキル基を介して親分子基に結合した、チエニル基をいう。チエニル基は、基中の任意の置換可能な原子を介して、アルキル基に結合しうる。

【0107】

50

用語「治療する」は、( i ) 疾患、障害、および/または病状の素因を有しうが、それを有するとは未だ診断されていない患者において、疾患、障害、または病状の発生を予防すること；( i i ) 疾患、障害、または病状を抑制すること、すなわち、その進行を停止させること；並びに( i i i ) 疾患、障害、または病状を緩和すること、すなわち疾患、障害、および/もしくは病状、および/または疾患、障害、および/もしくは症状に関連する症状の退縮を引き起こすことをいう。

【 0 1 0 8 】

大環状ペプチドの P D - L 1 への結合は、例えば、均一時間分解蛍光 ( H T R F )、表面プラズモン共鳴 ( S P R )、等温滴定カロリメトリー ( I T C )、核磁気共鳴スペクトロスコピー ( N M R ) などの方法によって測定することができる。さらに、細胞表面に発現する P D - L 1 への大環状ペプチドの結合は、細胞結合アッセイにおいて、本明細書に記載されるように測定することができる。

10

【 0 1 0 9 】

本明細書に記載される治療剤の投与としては、限定されないが、治療上の有効量の治療剤の投が挙げられる。本明細書で用いられる用語「治療上の有効量」は、限定されないが、本明細書に記載される P D - 1 / P D - L 1 結合阻害剤の組成物の投与によって治療可能な病状の、治療または予防のための治療剤の分量をいう。その量は、検出可能な治療的、予防的、または回復的效果を発揮するのに十分な分量である。当該効果としては、例えば、限定されないが、本明細書に列挙される病状の治療または予防が挙げられる。対象についての正確な有効量は、対象の大きさおよび健康状態、治療される病状の性質および程度、治療する医師の推奨、並びに投与のために選択される治療法または治療法の組み合わせに依存する。そのため、事前に正確な有効量を特定することは有用ではない。

20

【 0 1 1 0 】

別の局面において、本開示は、本開示の大環状ペプチドを用いた、対象における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に関する。本明細書において示されるように、本開示の大環状ペプチドは、P D - L 1 に結合し、P D - L 1 と P D - 1 との相互作用を阻害し、P D - 1 との相互作用を阻害することが知られている抗 P D - 1 モノクローナル抗体との P D - L 1 の結合と競合し、C M V 特異的 T 細胞 I F N 分泌を増強させ、H I V 特異的 T 細胞 I F N g 分泌を増強させることができる。その結果、本開示の大環状ペプチドは、(例えば、P D - L 1 阻害ペプチドと対象の抗原との共投与によって)免疫応答を修正し、癌または感染性疾患などの疾患を治療し、防御的自己免疫応答を刺激するか、または抗原特異的免疫応答を刺激するのに有用である。

30

【 0 1 1 1 】

本開示が容易に理解され得るために、いくつかの用語を最初に定義する。さらなる定義が、詳細な説明にわたって記載される。

【 0 1 1 2 】

用語「プログラム死リガンド 1」、「プログラム細胞死リガンド 1」、「タンパク質 P D - L 1」、「P D - L 1」、「P D L 1」、「P D C D L 1」、「h P D - L 1」、「h P D - L I」、「C D 2 7 4」および「B 7 - H 1」は、同義で用いられ、ヒト P D - L 1 のバリエーション、アイソフォーム、種ホモログ、および P D - L 1 と少なくとも 1 つの共通するエピトープを有する類似体を含む。完全な P D - L 1 配列は、G E N B A N K (登録商標)アセッション番号 N P \_ 0 5 4 8 6 2 で見つけることができる。

40

【 0 1 1 3 】

用語「プログラム死 1」、「プログラム細胞死 1」、「タンパク質 P D - 1」、「P D - 1」、「P D 1」、「P D C D 1」、「h P D - 1」および「h P D - I」は、同義で用いられ、ヒト P D - 1 のバリエーション、アイソフォーム、種ホモログ、および P D - 1 と少なくとも 1 つの共通するエピトープを有する類似体を含む。完全な P D - 1 配列は、G E N B A N K (登録商標)アセッション番号 U 6 4 8 6 3 で見つけることができる。

【 0 1 1 4 】

用語「細胞傷害性 T リンパ球抗原 4」、「C T L A - 4」、「C T L A 4」、「C T L

50

A - 4 抗原」および「C D 1 5 2」(例えば、Murata, Am. J. Pathol., 155:453-460 (1999)を参照されたい)は、同義で用いられ、ヒトC T L A - 4のバリエーション、アイソフォーム、種ホモログ、およびC T L A - 4と少なくとも1つの共通するエピトープを有する類似体を含む(例えば、Balzano, Int. J. Cancer Suppl., 7:28-32 (1992)を参照されたい)。完全なC T L A - 4 核酸配列は、G E N B A N K (登録商標)アセッション番号L 1 5 0 0 6で見つけることができる。

【0115】

用語「免疫応答」は、例えば、侵入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌細胞、または自己免疫もしくは病理学的炎症の場合には、通常のヒト細胞もしくは組織の選択的損傷、破壊、またはヒトの体からの排除を生じる、リンパ球、抗原提示細胞、貪食作用、顆粒球、および上記細胞または肝臓によって生産される可溶性高分子(大環状ペプチド、サイトカイン、および補体など)の作用をいう。

10

【0116】

本明細書で用いられる「有害事象(AE)」は、医学的治療の使用に関連する、任意の好ましくない、一般に意図されない、さらに望ましくない、徴候(異常な検査所見など)、症状、または疾患である。例えば、有害事象は、治療に対する応答における、免疫系の活性化、または免疫系細胞(例えば、T細胞)の増殖に関連する。医学的治療は、1つ以上の関連するAEを有する場合があります、それぞれのAEは、同じまたは異なる重症度を有する場合があります。「有害事象を変化させる」ことができる方法に関する言及は、異なる治療レジメンの使用に関連する、1つ以上のAEの発生率および/または重症度を減少させる、治療レジメンを意味する。

20

【0117】

本明細書で用いられる「過増殖性疾患」は、細胞増殖が正常なレベルを超えて増加する状態をいう。例えば、過増殖性疾患または障害としては、悪性疾患(例えば、食道癌、大腸癌、胆道癌)、および非悪性疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症、良性過形成、および良性前立腺肥大化)が挙げられる。

【0118】

本明細書で用いられる「約」または「本質的に~を含む」は、当業者によって決定される、特定の値について許容誤差範囲内であることを意味し、これは値の測定または決定方法、すなわち、測定系の限界に部分的に依存するであろう。例えば、「約」または「本質的に~を含む」は、当技術分野における実施ごとに、1つ以上のある標準偏差の範囲内であることを意味する。あるいは、「約」または「本質的に~を含む」は、最大20%の範囲を意味する。さらに、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、当該用語は、最大で10倍または最大で5倍の値を意味する。特定の値が本出願および特許請求の範囲において提供される場合、特に言及されない限り、「約」または「本質的に~を含む」の意味は、その特定の値の許容誤差範囲内であると推定されるべきである。

30

【0119】

本明細書で記載される、任意の濃度範囲、百分率範囲、比率範囲、または整数範囲は、特に言及されない限り、記載される範囲内の任意の整数値、および適切な場合、その分数(整数の1/10および1/100など)を含むと理解されるべきである。

40

【0120】

競合アッセイ

本開示はまた、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、および少なくとも約100%、参照抗PD-L1抗体(MDX-1105)の結合と競合することができる、大環状ペプチドに関する。そのような大環状ペプチドは、PD-L1に特異的に結合する限り、変異体、保存的置換、機能的置換、および欠失の形態など、本明細書に開示される1つ以上の大環状ペプチドと構造的相同性を共有する。例えば、大環状ペプチドが、参照抗PD-L1抗体と同じPD-L1の領域に実質的に結合する場合、大環状ペプチドは、抗PD-L1モノクローナル抗体が結合するPD

50

- L 1 エピトープと、少なくとも重なる P D - L 1 のエピトープに結合するはずである。重複する領域は、1つのアミノ酸残基から数百個のアミノ酸残基の範囲でありうる。大環状ペプチドは次いで、抗 P D - L 1 モノクローナル抗体の P D - L 1 への結合と競合する、および/または結合を阻害し、それによって抗 P D - L 1 モノクローナル抗体の P D - L 1 への結合は、競合アッセイにおいて、好ましくは少なくとも約 50% 減少するはずである。

#### 【0121】

競合アッセイの目的で参照抗体として用いられうる抗 P D - L 1 抗体は、当技術分野において既知である。例えば、以下の代表的な抗 P D - L 1 抗体が用いられうる：M D X - 1105 (BMS) ; L 01X - C (Serono)、L 1X3 (Serono)、M S B - 0010718C (Serono)、および P D - L 1 プロボディ (Cytomx)、および共有される W O 2007/005874 において開示される P D - L 1 抗体。

10

#### 【0122】

競合アッセイの目的のために、参照抗体として用いられうる抗 P D - 1 抗体は、当技術分野において既知である。例えば、以下の代表的な抗 P D - 1 抗体が用いられうる：ニボルマブ (BMS) ; それぞれ共有される米国特許第 8,008,449 号 (BMS) で開示される、17D8、2D3、4H1、4A11、7D3 および 5F4、M K - 3475 (Merck、米国特許第 8,168,757 号において開示される)、および米国特許第 7,488,802 号において開示される抗体。

20

#### 【0123】

##### 医薬組成物

別の局面において、本開示は、1または組み合わせの、本開示の大環状ペプチドを含む、薬学的に許容可能な担体と共に製剤化された、組成物、例えば、医薬組成物を提供する。そのような組成物は、1または組み合わせの(例えば、2つ以上の異なる)、本開示の大環状ペプチド、または免疫複合体、または二重特異性分子を含みうる。例えば、本開示の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するか、または相補的活性を有する、大環状ペプチド(または免疫複合体もしくは二重特異性)の組み合わせを含むことができる。

#### 【0124】

本開示の医薬組成物はまた、組み合わせ療法において、すなわち他の薬剤との組み合わせで、投与することができる。例えば、組み合わせ療法は、大環状ペプチドを、少なくとも1つの他の抗炎症性剤または免疫抑制剤との組み合わせで含むことができる。組み合わせ療法において用いることができる治療剤の例は、本開示の大環状ペプチドの使用に関するセクションで、以下にさらに詳細に記載される。

30

#### 【0125】

本明細書で用いられる「薬学的に許容可能な担体」は、生理学的に許容可能な、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延化剤などが挙げられる。好ましくは、担体は、(例えば、注射または点滴による)静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与に適切である。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち大環状ペプチド、免疫複合体、または二重特異性分子は、酸の作用、および化合物を不活性化しうる他の自然条件から、化合物を保護するための物質でコーティングされうる。

40

#### 【0126】

本開示の医薬化合物は、1つ以上の薬学的に許容可能な塩を含みうる。「薬学的に許容可能な塩」または「治療上許容可能な塩」は、親化合物の目的の生物学的活性を維持し、任意の望ましくない毒性作用を生じない塩をいう(例えば、Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., 66:1-19 (1977)を参照されたい)。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸などの、非毒性の無機酸に由来するもの、並びに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカノン酸、ヒドロキシアリカノン酸、芳香族酸、脂

50

肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性の有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの、並びに N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの、非毒性有機アミンに由来するものが挙げられる。

#### 【 0 1 2 7 】

本開示の医薬組成物はまた、薬学的に許容可能な抗酸化剤を含みうる。薬学的に許容可能な抗酸化剤の例としては、( 1 ) アスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの、水溶性抗酸化剤；( 2 ) パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール ( B H A )、ブチルヒドロキシトルエン ( B H T )、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ - トコフェロールなどの、油溶性抗酸化剤；および( 3 ) クエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸 ( E D T A )、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの、金属キレート剤が挙げられる。

10

#### 【 0 1 2 8 】

本開示の医薬組成物において用いられうる、適切な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール ( グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど )、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合は、必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

20

#### 【 0 1 2 9 】

これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含みうる。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順によって、および様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含有することの両方によって、確実にされうる。糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含むこともまた、望ましくありうる。さらに、注入可能な医薬形態の持続的吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの、吸収を遅延される試薬を含有することによってもたらされうる。

#### 【 0 1 3 0 】

薬学的に許容可能な担体としては、無菌水溶液または分散液、および無菌注入可能な溶液または分散液の即時調製のための無菌散剤が挙げられる。薬学的に活性な物質についてのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において既知である。従来の任意の媒体および薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、本開示の医薬組成物におけるそれらの使用は考慮される。補助的な活性化合物もまた、組成物に含まれうる。

30

#### 【 0 1 3 1 】

治療組成物は一般に、製造および保管の条件下において、無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度の適切な、他の秩序のある構造として製剤化されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール ( 例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど )、およびそれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散媒でありうる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用することによって、分散液の場合は、必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムを、組成物中に含むことが好ましいであろう。注入可能な医薬形態の持続的吸収は、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンなどの、吸収を遅延される試薬を組成物中に含有することによってもたらされうる。

40

#### 【 0 1 3 2 】

無菌注入可能な溶液は、必要量の活性化合物を、1 または組み合わせの前記に列挙された成分と共に、適切な溶媒中に組み込み、次いで、必要に応じて、滅菌精密濾過をすることによって調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒お

50

および前記に列挙されたもののうち必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに組み込むことによって、調製される。無菌注入可能な溶液の調製のための無菌散剤の場合、調製の好ましい方法は、予め無菌濾過されたその溶液からの、任意のさらなる望ましい成分に加えて、活性成分の粉末を生じる、真空乾燥、凍結乾燥（凍結乾燥）である。

#### 【0133】

担体物質と組み合わせて、単一の剤形を生じることができる活性成分の分量は、治療される対象、および特定の投与形態に応じて変化するであろう。担体物質と組み合わせて、単一の剤形を生じることができる活性成分の分量は、一般に治療効果を生じる組成物の分量であるだろう。一般に、100分率で、この分量は、薬学的に許容可能な担体との組み合わせで、約0.01パーセントから約99%の活性成分、好ましくは、約0.1パーセントから約70パーセント、最も好ましくは約1パーセントから約30パーセントの活性成分の範囲であるだろう。

10

#### 【0134】

用量レジメンは、最適な目的の応答（例えば、治療的応答）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよく、あるいは用量は、治療状態の緊急性によって必要とされるように、比例的に減少または増加させてもよい。投与の容易さおよび用量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形に製剤化することが特に有利である。本明細書で用いられる単位剤形は、治療される対象についての単位用量として適した、物理的に別個の単位をいい；それぞれの単位は、必要な医薬担体に関連する、目的の治療効果を生じるように計算された、活性化合物の所定の用量を含む。本開示の単位剤形についての仕様は、（a）活性化合物の固有の特性、および達成される特定の治療効果、および（b）そのような活性化合物を、個々の治療感度について配合することの、当技術分野における固有の制限によって決定され、直接的に依存する。

20

#### 【0135】

大環状ペプチドの投与のために、用量は約0.0001から100mg/kg、およびさらに通常は、0.01から5mg/宿主体重kgの範囲でありうる。例えば、用量は0.3mg/体重kg、1mg/体重kg、3mg/体重kg、5mg/体重kg、または10mg/体重kg、または1-10mg/kgの範囲内でありうる。例示的な治療レジメンは、1日1回、1日2回、週2回、週3回、毎週、2週ごとに1回、3週ごとに1回、4週ごとに1回、月1回、3月ごとに1回、3～6月ごとに1回の投与を伴う。本開示の大環状ペプチドについての好ましい用量レジメンとしては、静脈内投与によって1mg/体重kgまたは3mg/体重kgが挙げられ、大環状分子は、以下の用量スケジュールの1つを用いて投与される：（i）4週間ごとに6回の用量、次いで3ヶ月ごと；（ii）3週間ごと；（iii）3mg/体重kgを1回、次いで3週間ごとに1mg/体重kg。

30

#### 【0136】

いくつかの実施態様において、異なる結合特異性を有する2つ以上の大環状ペプチドは同時に投与され、その場合、投与されるそれぞれの化合物の用量は、示された範囲内に属する。化合物は通常、複数回投与される。単回投与の間の間隔は、例えば、毎週、毎月、3月ごと、または毎年でありうる。間隔はまた、患者の標的抗原に対する大環状ペプチドの血中濃度を測定することによって示されるように、不規則でありうる。いくつかの方法において、用量は約1-1000μg/mlの血漿濃度に達するように調整され、いくつかの方法においては、約25-300μg/mlである。

40

#### 【0137】

あるいは、大環状ペプチドは除毒性製剤として投与することができ、その場合、より少ない頻度の投与が必要である。投与量および頻度は、治療が予防的であるか、治療的であるかによって異なりうる。予防的応用において、比較的低い用量が、長期間にわたって、比較的まれな間隔で投与される。一部の患者は、一生涯治療を受け続ける。治療的応用において、疾患の進行が軽減または終了するまで、および好ましくは、患者が疾患症状の部

50

分的または完全な改善を示すまで、比較的短期間における、比較的高い用量が時に必要とされる。その後、患者は予防的レジメンを投与されうる。

【 0 1 3 8 】

本開示の医薬組成物における活性成分の実際の用量は、患者に対する毒性がなく、特定の患者、組成物、および投与方法について、目的の治療的応答を達成するのに有効である活性成分の用量が得られるように変化しうる。選択される用量は、用いられる本開示の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排出率、治療時間、用いられる特定の組成物と組み合わせで用いられる他の薬物、化合物、および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、病状、健康状態、および既往歴、並びに医薬分野において周知の因子などの、様々な薬物動態的因子に依存する。

10

【 0 1 3 9 】

本開示の大環状ペプチドの「治療的に有効な用量」は好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患無症状期間の頻度および期間の増加、または疾患の苦痛による機能障害または身体障害の予防をもたらす。例えば、腫瘍の治療について、「治療的に有効な用量」は好ましくは、細胞増殖または腫瘍増殖を、未治療の対象と比較して、少なくとも約 20 %、より好ましくは少なくとも約 40 %、さらにより好ましくは少なくとも約 60 %、およびさらにより好ましくは少なくとも約 80 % 阻害する。腫瘍増殖および／または HIV を阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性またはウイルス有効性を予測する動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、当業者に既知のアッセイによるインビトロ阻害など、化合物の阻害能力を試験することによって評価することができる。治療上の有効量の治療化合物は、腫瘍の大きさを減少させ、ウイルス負荷を減少させ、あるいは対象における症状を寛解させることができる。当業者は、対象の大きさ、対象の症状の重症度、および選択される特定の組成物もしくは投与経路などの因子に基づいて、そのような用量を決定することができるだろう。

20

【 0 1 4 0 】

別の局面において、本開示は、本明細書に記載されるように、大環状ペプチドおよび他の免疫調節剤を含む部品の医薬キットを提供する。当該キットはまた、過増殖性疾患（本明細書に記載される癌など）および／または抗ウイルス疾患の治療において用いるための、説明書をさらに含むうる。

30

【 0 1 4 1 】

本開示の組成物は、当技術分野において既知の様々な方法のうちの 1 つ以上を用いて、1 つ以上の投与経路によって投与することができる。当業者によって理解されるように、投与経路および／または投与方法は、目的の結果に応じて変化するであろう。本開示の大環状ペプチドについての好ましい投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄投与経路または他の非経口投与経路、例えば注射または点滴が挙げられる。本明細書で用いられる用語「非経口投与」は、経腸および局所投与以外の、通常注射による投与方法を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内注射および点滴が挙げられる。

40

【 0 1 4 2 】

あるいは、本開示の大環状ペプチドは、局所、上皮、または粘膜投与経路など、例えば、鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下または局所投与などの経口経路（non-parenteral route）によって投与することができる。

【 0 1 4 3 】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システムなどの、制御放出製剤などの急速な放出から化合物を保護する担体と共に製剤化されうる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような製剤を製造するための多くの方法は特許を取得され、一般に当業者に既知である

50

。例えば、Robinson, J.R., ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York (1978)を参照されたい。

【0144】

治療組成物は、当技術分野において既知の医療デバイスを用いて投与することができる。例えば、好ましい実施態様において、本開示の治療組成物は、米国特許第5,399,163号、5,383,851号、5,312,335号、5,064,413号、4,941,880号、4,790,824号、または4,596,556号において開示されるデバイスなどの、無針皮下注射デバイスによって投与することができる。本開示において有用な、周知のインプラントおよびモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号、これは制御された速度において薬物を分配するための、埋め込み可能なマイクロ注入ポンプを開示する；米国特許第4,486,194号、これは皮膚を通して薬物を投与するための治療デバイスを開示する；米国特許第4,447,233号、これは正確な注入速度において薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示する；米国特許第4,447,224号、これは連続的な薬物送達のための可変流量埋め込み可能型注入装置を開示する；米国特許第4,439,196号、これはマルチチャンバーコンパートメントを有する、浸透圧性薬物送達システムを開示する；および米国特許第4,475,196号、これは浸透圧性薬物送達システムを開示する、が挙げられる。これらの特許は引用により本明細書に援用される。他の多くのそのようなインプラント、送達システム、およびモジュールなどは、当業者に既知である。

【0145】

いくつかの実施態様において、本開示の大環状ペプチドは、インビボで適切な分布を確実にするように製剤化されうる。例えば、血液脳関門(BBB)は、親水性の高い多くの化合物を排除する。(必要であれば)本開示の治療化合物がBBBを通過することを確実にするために、それらは例えば、リポソーム中に製剤化されうる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4,522,811、5,374,548、および5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送され、そのため標的の薬物送達を向上させる、1つ以上の部位を含みうる(例えば、Rana de, V.V., J. Clin. Pharmacol., 29:685 (1989)を参照されたい)。例示的な標的化部位としては、葉酸またはビオチン(例えば、米国特許第5,416,016号、Low et al.を参照されたい)；マンノシド(Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:1038 (1988))；大環状ペプチド(Bloeman, P.G. et al., FEBS Lett., 357:140 (1995))；Owais, M. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 39:180 (1995))；界面活性剤タンパク質A受容体(Briscoe et al., Am. J. Physiol., 1233:134 (1995))；p120(Schreier et al., J. Biol. Chem., 269:9090 (1994))が挙げられる；Keinanen, K. et al., FEBS Lett., 346:123 (1994)；Killion, J.J. et al., Immunomethode 4:273 (1994)もまた参照されたい。

【0146】

本開示の使用および方法

本開示の大環状ペプチド、組成物、および方法は、例えば、PD-L1、またはPD-L1の阻害による免疫応答の増強の検出に関する、多くのインビトロおよびインビボでの有用性を有する。例えば、これらの分子は、様々な状況において免疫を増強させるために、インビトロまたはエクスピボで培養中の細胞に、または例えばインビボでのヒト対象に投与されうる。そのため、ある局面において、本開示は、対象における免疫応答が改変されるように、対象に本開示の大環状ペプチドを投与することを含む、対象における免疫応答を改変する方法を提供する。好ましくは、応答は増強され、刺激され、または上方制御される。別の点において、大環状ペプチドは、抗カニクイザル、抗マウス、および/または抗ウッドチャック結合性および治療活性を有しうる。

【0147】

本明細書で用いられる用語「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことが意図される。非ヒト動物としては、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、非ヒト霊長類、ヒツジ、イ

10

20

30

40

50



又、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、ウッドチャック、両生類、および爬虫類などの、全ての脊椎動物が挙げられるが、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、およびウマなどの哺乳動物が好ましい。好ましい対象としては、免疫応答の増強を必要とするヒト患者が挙げられる。この方法は特に、T細胞介在免疫応答を増強することによって治療することができる障害を有する、ヒト患者の治療に適切である。特定の実施態様において、当該方法は特に、インビボでの癌細胞の治療に適切である。免疫の抗原特異性増強を達成するために、大環状ペプチドを対象の抗原と共に投与することができる。PD-L1への大環状ペプチドを別の薬剤と共に投与する場合、2つは、順にまたは同時にのいずれかで投与することができる。

【0148】

10

本開示はさらに、サンプルおよび対照サンプルを、ヒト、ウッドチャック、カニクイザル、および/またはマウスPD-L1と特異的に結合する参照大環状ペプチドと、大環状分子と、ヒト、ウッドチャック、カニクイザル、および/またはマウスPD-L1との複合体形成が可能な条件下で接触させることを含む、サンプル中のヒト、ウッドチャック、カニクイザル、および/またはマウスPD-L1抗原の存在を検出する方法、またはヒト、ウッドチャック、カニクイザル、および/またはマウスPD-L1抗原の量を測定する方法を提供する。次いで、複合体形成を検出し、ここで、対照サンプルと比較して、サンプル間での異なる複合体形成は、サンプル中のヒト、ウッドチャック、カニクイザル、および/またはマウスPD-L1抗原の存在を示す。

【0149】

20

CD28、ICOSおよびCTLA-4と比較して、PD-L1についての本開示の大環状ペプチドの特異的な結合を考慮すると、本開示の大環状ペプチドは、細胞表面におけるPD-L1発現を特異的に検出するために使用することができ、さらに、免疫親和性精製によってPD-L1を精製するために使用することができる。

【0150】

#### 癌

大環状ペプチドによるPD-1の阻害は、患者における癌細胞に対する免疫応答を向上させることができる。PD-1、PD-L1についてのリガンドは、通常のヒト細胞において発現されていないが、様々なヒトの癌において豊富に含まれる(Dong et al., Nat. Med., 8:787-789 (2002))。PD-1およびPD-L1の相互作用によって、腫瘍浸潤リンパ球の減少、T細胞受容体介在性増殖の減少、および癌細胞による免疫回避が生じる(Dong et al., J. Mol. Med., 81:281-287 (2003); Blank et al., Cancer Immunol. Immunother., 54:307-314 (2005); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10:5094-5100 (2004))。免疫抑制は、PD-1のPD-L1への局所的な相互作用を阻害することによって、逆転させることができ、PD-1のPD-L2との相互作用も同様に遮断される場合、その効果は付加的である(Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:12293-12297 (2002); Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003))。以前の研究では、T細胞増殖は、PD-1のPD-L1への相互作用を阻害することによって、回復することができることが示されていたが、PD-1/PD-L1相互作用を阻害することによる、インビボでの癌腫瘍増殖の直接的な効果の報告は存在していなかった。ある局面において、本開示は、癌腫瘍の増殖が阻害されるような、大環状ペプチドを用いたインビボでの対象の治療に関する。大環状ペプチドを単独で使用して、癌腫瘍の増殖が阻害されうる。あるいは、大環状ペプチドは、以下に記載されるように、他の免疫原性剤、標準的な癌治療、または他の大環状ペプチドと組み合わせて用いられうる。

30

40

【0151】

あるいは、ある実施態様において、本開示は、対象に治療上の有効量の大環状ペプチドを投与することを含む、対象における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を提供する。

【0152】

増殖が本開示の大環状ペプチドを用いて阻害されうる、好ましい癌としては、一般に免疫療法に応答する癌が挙げられる。治療のための好ましい癌の限定されない例としては、

50

黒色腫（例えば、転移悪性黒色腫）、腎細胞癌（例えば、淡明細胞癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン難治性前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌）、乳癌、大腸癌、および肺癌（例えば、扁平上皮および非扁平上皮非小細胞性肺癌）が挙げられる。さらに、本開示は、本開示の大環状ペプチドを用いて、その増殖が阻害されうる、難治性または再発性の悪性腫瘍を含む。

#### 【0153】

本開示の方法を用いて治療されうる他の癌の例としては、骨腫瘍、膵臓癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、肛門部癌、胃/胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、頸部癌、膣癌、外陰癌、ホジキン疾患、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髄白血病、慢性骨髄白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病などの慢性または急性白血病、小児固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）腫瘍、原発CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものなどの環境誘発性癌、および前記癌の組み合わせが挙げられる。本開示はまた、転移癌、特にPD-L1を発現する転移癌の治療に有用である（Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144 (2005)）。

10

#### 【0154】

適宜、PD-L1に対する大環状ペプチドは、癌細胞、精製された腫瘍抗原（組み換えタンパク質、ペプチド、および炭水化物分子など）、細胞、および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子を遺伝子導入した細胞などの、免疫原性剤と組み合わせることができる（He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)）。用いることができる腫瘍ワクチンの限定されない例としては、gp100のペプチドなどの黒色腫抗原のペプチド、MAGE抗原、Trp-2、MART1および/またはチロシナーゼ、またはサイトカインGM-CSFを発現するように遺伝子導入した腫瘍細胞（以下でさらに記載される）が挙げられる。

20

#### 【0155】

ヒトにおいて、いくつかの腫瘍は、黒色腫などの免疫原性であることが示されている。PD-L1遮断によってT細胞活性化の閾値を上げることによって、宿主における腫瘍応答が活性化されることが期待できると予想される。

30

#### 【0156】

PD-L1遮断は、ワクチン接種プロトコルと組み合わせた場合、最も有効である可能性がある。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている（Rose nberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., *ASCO Educational Book Spring*: 300-302 (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*: 414-428 (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*: 730-738 (2000)を参照されたい；Restifo, N. et al., *Cancer Vaccines*, Chapter 61, pp. 3023-3043, in DeVita, V. et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition (1997)もまた参照されたい）。これらの戦略の1つにおいて、ワクチンは自己または異種腫瘍細胞を用いて調製される。これらの細胞ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質転換された場合に、最も有効であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種についての抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている（Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3539-3543 (1993)）。

40

#### 【0157】

様々な腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究により、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義が導かれた（Rosenberg, S.A., *Immunity*, 10:281-287 (1999)）。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍および腫瘍が発生した細胞において発現される、分化した抗原、例えば、メラノサイト抗原gp100、MAGE抗原、およ

50

び T r p - 2 である。さらに重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主において発見された腫瘍特異的 T 細胞の標的であることが示されている。P D - L 1 遮断は、これらのタンパク質に対する免疫応答を生じさせるために、腫瘍において発現する組み換えタンパク質および / またはペプチドのコレクションと組み合わせて用いられる。これらのタンパク質は、免疫系によって、通常自己抗原として見なされるため、これらに対して耐性がある。腫瘍抗原はまた、染色体のテロメアの合成に必要であり、ヒトの癌の 85 % より多くにおいて、および限られた数の体細胞組織においてのみ発現する、タンパク質テロメラーゼを含みうる (Kim, N et al., Science, 266:2011-2013 (1994))。 (これらの体細胞組織は、様々な方法によって、免疫攻撃から保護されうる。) 腫瘍抗原はまた、タンパク質配列を変化させる、または 2 つの無関係の配列 (すなわち、フィラデルフィア染色体の b c r - a b l ) 間の融合タンパク質を生じる体細胞突然変異により、癌細胞において発現する「ネオアンチゲン」、または B 細胞腫瘍からのイディオタイプでもありうる。

#### 【 0 1 5 8 】

他の腫瘍ワクチンとしては、ヒトパピローマウイルス (H P V )、肝炎ウイルス (H B V および H C V ) およびカボジヘルペス肉腫ウイルス (K H S V ) などの、ヒトの癌に関連するウイルスからのタンパク質が挙げられうる。P D - L 1 遮断と並行して用いられうる、腫瘍特異的抗原の別の形態は、腫瘍組織そのものから単離した、精製した熱ショックタンパク質 (H S P ) である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞からのタンパク質のフラグメントを含み、これらの H S P は腫瘍免疫を誘発するために、抗原提示細胞に高効率で送達される (Suot, R. et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., Science, 278:117-120 (1997))。

#### 【 0 1 5 9 】

樹状細胞 (D C ) は、抗原特異的応答を予備刺激するために用いることのできる、強力な抗原提示細胞である。D C はエクスピボで生産され、様々なタンパク質およびペプチド抗原、並びに腫瘍細胞抽出物と共に導入されうる (Nestle, F. et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998))。D C はまた、遺伝的手段によって導入されてもよく、これらの腫瘍抗原もまた発現される。D C はまた、免疫付与のため、腫瘍細胞に直接融合される (Kugler, A. et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000))。ワクチン接種の方法として、D C 免疫化を P D - L 1 遮断と効率的に組み合わせて、さらに強力な抗腫瘍応答を活性化することができる。

#### 【 0 1 6 0 】

P D - L 1 遮断はまた、標準的な癌治療と組み合わせてもよい。P D - L 1 遮断は、化学療法レジメンと効率的に組み合わせられうる。これらの例において、投与される化学療法剤の用量を減少させることが可能でありうる (Mokyr, M. et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998))。これらの組み合わせの例としては、大環状ペプチドと、黒色腫の治療のためのダカルバジンとの組み合わせが挙げられる。このような組み合わせの別の例としては、大環状ペプチドと、黒色腫の治療のためのインターロイキン - 2 (I L - 2 ) との組み合わせが挙げられる。P D - L 1 遮断および化学療法の組み合わせ使用の背後にある科学的な根拠は、大半の化学療法化合物の細胞毒性効果によってもたらされる細胞死によって、抗原提示経路における腫瘍抗原の量を増加しうることである。細胞死による P D - L 1 遮断と相乗しうる他の組み合わせ療法は、放射線、外科手術、およびホルモン遮断である。これらのプロトコルのそれぞれは、宿主中で腫瘍抗原源を生じる。血管形成阻害剤はまた、P D - L 1 遮断と組み合わせられうる。血管形成の阻害によって、腫瘍抗原を宿主の抗原提示経路に供給しうる、腫瘍細胞死が生じる。

#### 【 0 1 6 1 】

P D - L 1 阻害性大環状ペプチドはまた、腫瘍細胞に対する F c アルファまたは F c ガンマ受容体発現エフェクター細胞を標的にする二重特異性大環状ペプチドと組み合わせて用いることができる (例えば、米国特許第 5 , 9 2 2 , 8 4 5 号および 5 , 8 3 7 , 2 4 3 号を参照されたい)。二重特異性大環状ペプチドは、2 つの別の抗原を標的にするために用いることができる。例えば、抗 F c 受容体 / 抗腫瘍抗原 (例えば、H e r - 2 / n e

10

20

30

40

50

u) 二重特異性大環状ペプチドは、腫瘍部位にマクロファージを標的化するために用いられている。この標的化は腫瘍特異応答をより効率的に活性化しうる。これらの応答のT細胞の武装は、PD-L1遮断の使用によって増強されるであろう。あるいは、抗原は、腫瘍抗原および樹状細胞特異的な細胞表面マーカーに結合する二重特異性大環状ペプチドを使用することによって、DCに直接送達されうる。

#### 【0162】

腫瘍は、様々なメカニズムによって宿主の免疫監視を回避する。これらのメカニズムの多くは、腫瘍によって発現される、免疫抑制性のタンパク質の不活性化によって克服されうる。これらの例としては、他のTGF-β (Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163:1037-1050 (1986))、IL-10 (Howard, M. et al., Immunology Today, 13:198-200 (1992))、および Fas リガンド (Hahne, M. et al., Science, 274:1363-1365 (1996)) の範疇のものが挙げられる。これらの物質のそれぞれに対する大環状ペプチドは、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進するために、抗PD-L1と組み合わせで用いられうる。

#### 【0163】

宿主の免疫応答を活性化するために用いられ得る他の大環状ペプチドは、PD-L1遮断と組み合わせで用いることができる。これらとしては、DC機能および抗原提示を活性化する樹状細胞表面上の分子が挙げられる。抗CD40大環状ペプチドは、ヘルパーT細胞活性を効果的に置換することができ (Ridge, J. et al., Nature, 393:474-478 (1998))、PD1抗体と併用して用いることができる (Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5):527-540 (2000))。CTLA-4 (例えば、米国特許第5,811,097号)、OX-40 (Weinberg, A. et al., Immunol., 164:2160-2169 (2000))、4-1BB (Melero, I. et al., Nat. Med., 3:682-685 (1997))、およびICOS (Hutloff, A. et al., Nature, 397:262-266 (1999)) などの、T細胞共刺激分子に対する活性化大環状ペプチドはまた、T細胞活性化の程度の上昇をもたらしうる。

#### 【0164】

骨髄移植は現在、様々な造血系起源の腫瘍の治療に用いられる。移植片対宿主病はこの治療の結果であるが、移植片対腫瘍反応から治療上の便益が得られうる。PD-L1遮断は、ドナー移植腫瘍特異的T細胞の有効性を高めるために使用することができる。

#### 【0165】

腫瘍に対する抗原特異的T細胞を得るために、抗原特異性T細胞のエキスビボ活性化および拡大、並びにこれらの細胞の移植患者への養子細胞移植に関する、いくつかの実験的治療プロトコルもまた存在する (Greenberg, R. et al., Science, 285:546-551 (1999))。これらの方法は、CMVなどの感染性薬剤に対する、T細胞応答を活性化させるためにも用いられうる。大環状ペプチドの存在下でのエキスビボ活性化は、養子細胞移植されたT細胞の発生頻度および活性を増加させることが期待されうる。

#### 【0166】

##### 感染性疾患

本開示の他の方法は、特定の毒素または病原体に曝された患者を治療するために用いられる。したがって、本開示の別の局面は、対象を感染性疾患について治療するように、本開示の大環状ペプチドを対象に投与することを含む、対象における感染性疾患の治療方法を提示する。

#### 【0167】

前記の腫瘍への適用と同様に、PD-L1遮断を単体で、またはワクチンとの組み合わせにおけるアジュバントとして、病原体、毒素、および自己抗原に対する免疫応答を刺激するために用いることができる。この治療方法が特に有用でありうる病原体の例としては、現在有効なワクチンが存在しない病原体、または従来のワクチンが完全に有効とはいえない病原体が挙げられる。これらとしては、限定はされないが、HIV、肝炎 (A、B、およびC)、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア (Butler, N.S. et al., Nature Immunology 13, 188-195 (2012); Hafalla, J.C.R., et al. PLOS Pathoge

10

20

30

40

50

ns; February 2, 2012))、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌、緑膿菌が挙げられる。PD-L1遮断は、感染の過程で変化した抗原を提示するHIVなどの、薬剤によって確立された感染症に対して特に有効である。これらの新規エピトープは、抗ヒトPD-L1の投与時に異物として認識され、そのためPD-L1を介した負のシグナルに弱められない強力なT細胞応答を引き起こす。

#### 【0168】

本開示の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性ウイルスのいくつかの例としては、HIV、肝炎(A、B、またはC)、ヘルペスウイルス(例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、およびCMV、エプスタイン・バールウイルス)、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器多核体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクチニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、伝染性軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、ラブドウイルス、JCウイルスおよびアルボウイルス性脳炎ウイルスが挙げられる。

10

#### 【0169】

本開示の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性細菌のいくつかの例としては、クラミジア、リケッチア細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、レンサ球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌およびコノコッキ(conococci)、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シユードモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、桿菌、コレラ、破傷風、ボツリヌス、炭疽菌、ペスト、レプトスピラ、およびライム病菌が挙げられる。

20

#### 【0170】

本開示の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性真菌のいくつかの例としては、カンジタ(アルビカンズ、クルセイ、グラブラータ、トロピカリス、など)、クリプトコッカス・ネオファルマンズ、アスペルギルス(フミガーツス、ニジェール、など)、ケカビ属(ムコール、アブシジア、リゾプス)、スポロトリックス・シェンキイ、プラストミセス・デルマチチジス、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、コクシジオイデス・イミチスおよびヒストプラズマ・カプスラーツムが挙げられる。

#### 【0171】

本開示の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性寄生虫のいくつかの例としては、赤痢アメーバ、大腸バランチジウム、ネグレリア・フォーレリ、アカントアメーバ種、ジアルジア、クリプトスポリジウム種、ニューモシスチス・カリニ、3日熱マラリア病原虫、バベシア・ミクロチ、トリパノソーマ・ブルーセイ、トリパノソーマ・クルーズ、リーシュマニア・ドノバン、トキソプラズマ・ゴンディイ、およびニッポストロンジラス・ブラジリエンシスが挙げられる。

30

#### 【0172】

前記の方法の全てにおいて、PD-L1遮断は、サイトカイン療法(例えば、インターフェロン、VEGF活性またはVEGF受容体を標的にする薬剤、GM-CSF、G-CSF、IL-2)、または腫瘍抗原の提示を促進するために用いられる二重特異性抗体療法(例えば、Holliger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993); Poljak, Structure, 2:1121-1123 (1994)を参照されたい)などの、他の免疫療法の形態と組み合わせることができる。

40

#### 【0173】

##### 自己免疫反応

大環状ペプチドは、自己免疫性応答を誘発し、増大させうる。実際に、腫瘍細胞およびペプチドワクチンを用いた抗腫瘍応答の誘導によって、多くの抗腫瘍応答が、抗自己反応(前記のElsas et al.における、抗CTL A-4 + GM-CSF修飾B16黒色腫において観察された色素脱失); Trp-2ワクチン接種マウスにおける色素脱失(Overwijk, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2982-2987 (1999)); TRAMP腫瘍細胞ワクチンによって引き起こされる自己免疫性前立腺炎(前記のHurwitz, A., (2000

50

))、黒色腫ペプチド抗原ワクチンおよびヒト臨床試験において観測される白斑 (Rosenberg, S.A. et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1):81-84 (1996)) に関連していることが明らかになった。

【0174】

そのため、疾患治療のためのこれらの自己タンパク質に対する免疫応答を効率的に生じさせるためのワクチン接種プロトコルを考案するために、様々な自己タンパク質と組み合わせ、抗PD-L1遮断を用いることを考えることができる。例えば、アルツハイマー病は、脳におけるアミロイド沈着物中のA $\beta$ ペプチドの不適切な蓄積に関連し；アミロイドに対する抗体応答は、これらのアミロイド沈着物を除去することができる (Schenk et al., Nature, 400:173-177 (1999))。

10

【0175】

他の自己タンパク質はまた、アレルギーおよび喘息、並びにリウマチ性関節炎についてのTNF $\alpha$ 、アルファの治療のためのIgEなどの標的として用いられうる。最終的に、様々なホルモンに対する抗体応答は、本明細書に開示される大環状分子の使用によって誘導されうる。生殖ホルモンに対する中和抗体応答は、避妊のために用いられうる。特定の腫瘍の増殖に必要な、ホルモンおよび他の可溶性因子に対する中和抗体応答はまた、可能なワクチンの標的として考えられうる。

【0176】

抗PD-L1大環状分子の使用についての前記の類似の方法は、治療上の自己免疫性応答の誘発に用いられ、アルツハイマー病におけるA $\beta$ 、ペプチドなどの、アミロイド沈着物、TNF $\alpha$ などのサイトカイン、およびIgEなどの他の自己抗原の不適切な蓄積を有する患者を治療することができる。

20

【0177】

ワクチン

大環状ペプチドは、抗PD-1大環状分子を、対象の抗原（例えばワクチン）と共投与することによって、抗原特異的な免疫応答を刺激するために用いられうる。従って、別の局面において、本開示は、対象において抗原に対する免疫応答を増強させるような(i)抗原；および(ii)抗PD-1大環状分子を、対象に投与することを含む、対象において抗原に対する免疫応答を増強させる方法を提供する。抗原は、例えば腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、または病原体からの抗原でありうる。そのような抗原の限定されない例としては、前記の腫瘍抗原（または腫瘍ワクチン）、または前記のウイルス、細菌または他の病原体からの抗原などの前記の節で記述されたものが挙げられる。

30

【0178】

本開示の組成物（例えば、大環状ペプチド、多重特異性および二重特異性分子および免疫結合体）のインビボおよびインビトロの適切な投与経路は、当技術分野において周知であり、当業者によって選択することができる。例えば、組成物は注射（例えば、静脈内または皮下）によって投与することができる。用いられる分子の適切な用量は、対象の年齢および体重、並びに組成物の濃度および/または処方に依存するであろう。

【0179】

前記のように、本開示の大環状ペプチドは、1つ以上の他の治療剤、例えば細胞毒性剤、放射毒性剤、または免疫抑制剤と共に併用投与されうる。ペプチドは、（免疫複合体として）薬剤に結合することができ、あるいは、薬剤と別個に投与することができる。後者（別個の投与）の場合、ペプチドは薬剤の前、後または同時に投与されてもよく、あるいは他の既知の治療、例えば抗癌療法、例えば放射線療法と併用されてもよい。そのような治療剤としては、とりわけ、ドキソルビシン（アドリマイシン）、シスプラチン、ブレオマイシン、サルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、ダカルバジンおよびシクロホスファミド、ヒドロキシ尿素などの、それ自体が患者に対して毒性または準毒性であるレベルでのみ有効である抗腫瘍剤などが挙げられる。シスプラチンは4週間に1回、100 mg / 用量として静脈内投与され、アドリマイシンは21日に1回、60 - 75 mg / m<sup>2</sup>で静脈内投与される。本開示の大環状ペプチドを、化学療法剤と共投与することによって

40

50

、ヒト腫瘍細胞に細胞毒性効果をもたらす異なる機構を介して作用する２つの抗癌剤が提供される。そのような共投与によって、薬物に対する耐性の発達、またはペプチドによって不活性化されうる腫瘍細胞の抗原性の変化による問題を解決することができる。

【 0 1 8 0 】

また、本開示の範囲内には、本開示の組成物（例えば、大環状ペプチド、二重特異性、または多重特異性分子、または免疫結合体）、および使用説明書を含むキットがある。キットはさらに、少なくとも１つの追加の試薬、または本開示の１つ以上のさらなる大環状ペプチド（例えば、大環状分子とは異なるPD-L1抗原のエピトープに結合する、相補的活性を有するヒト抗体）を含みうる。キットは一般に、キットの内容物の意図する使用を示すラベルを含む。用語、ラベルは、キットにおいて、またはキットと共に提供される、またはキットに添付されている、任意の書面または記録を含む。

10

【 0 1 8 1 】

組み合わせ治療

本開示の大環状ペプチドと、他のPD-L1アゴニストおよび／または他の免疫調節剤との組み合わせは、過剰増殖性疾患に対する免疫応答の増強に有用である。例えば、これらの分子は、インビトロまたはエクスピボで培養細胞に、または例えばインビボでヒト対象に投与されて、様々な状況において免疫を向上させることができる。そのため、ある局面において、本開示は、対象の免疫応答を調整するように、本開示の大環状ペプチドを対象に投与することを含む、対象における免疫応答を調整する方法を提供する。好ましくは、応答は向上され、刺激され、上方制御される。別の実施態様において、本開示は、本開示の大環状ペプチドおよび治療量以下の用量の他の免疫調整剤を対象に投与することを含む、免疫賦活性治療剤による、過増殖性疾患の治療に関連する有害事象を変化させる方法を提供する。

20

【 0 1 8 2 】

大環状ペプチドによるPD-L1の遮断は、患者における癌細胞に対する免疫応答を向上させることができる。本開示の大環状ペプチドを用いて、増殖が阻害されうる癌としては、一般的に免疫療法に応答性の癌が挙げられる。本開示の組み合わせ治療による治療のための癌の代表的な例としては、黒色腫（例えば、転移性悪性黒色腫）、腎癌、前立腺癌、乳癌、大腸癌、および肺癌が挙げられる。本開示の方法を用いて治療されうる他の癌の例としては、骨腫瘍、膵臓癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、頸部癌、膣癌、外陰癌、ホジキン疾患、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髄白血病、慢性骨髄白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病などの慢性または急性白血病、小児固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）腫瘍、原発CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものなどの環境誘発性癌、および前記癌の組み合わせが挙げられる。本開示はまた、転移癌の治療に有用である。

30

【 0 1 8 3 】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載される少なくとも１つの大環状ペプチドを含む治療剤の組み合わせは、薬学的に許容可能な担体中の単一の組成物として同時に、またはそれぞれの薬剤が順に投与されうる、別個の組成物として同時に投与されうる。例えば、第二免疫調節剤および本開示の大環状ペプチドは、最初に第二免疫調節剤、次に大環状ペプチドを投与する、あるいは最初に大環状ペプチド、次に第二免疫調節剤を投与するなどのように、順次投与することができる。さらに、組み合わせ治療の複数用量が順次投与される場合、順次投与の順は、それぞれの投与時において、逆転または同じ順で保たれてもよく、順次投与は、同時投与、またはそれらの任意の組み合わせと組み合わせてもよい。例えば、最初の第二免疫調節剤および大環状ペプチドの投与は同時であってもよく、第二の投与は、最初に第二免疫調節剤、次に大環状ペプチドの順であってもよく、第三

40

50

の投与は、最初に大環状ペプチド、次に第二免疫調節剤の順などであってもよい。別の代表的な投与スキームは、最初の投与が最初に大環状ペプチド、次に第二免疫調節剤の順であり、次の投与が同時であってもよい。

#### 【0184】

適宜、大環状ペプチドおよび第二免疫調節剤の組み合わせはさらに、癌細胞、精製された腫瘍抗原（組み換えタンパク質、ペプチド、および炭水化物分子など）、細胞、および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子を遺伝子導入した細胞などの、免疫原性剤と組み合わせることができる（He et al., J. Immunol., 173:4919-4928 (2004)）。用いることができる腫瘍ワクチンの限定されない例としては、gp100のペプチドなどの黒色腫抗原のペプチド、MAGE抗原、Trp-2、MART1および/またはチロシナーゼ、またはサイトカインGM-CSFを発現するように遺伝子導入した腫瘍細胞（以下でさらに記載される）が挙げられる。

10

#### 【0185】

PD-L1大環状ペプチドおよび第二免疫調節剤の組み合わせは、さらにワクチン接種プロトコルと組み合わせることができる。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている（Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000)を参照されたい；Restifo et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023-3043, in DeVita et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)もまた参照されたい）。これらの戦略の1つにおいて、ワクチンを自己または異種腫瘍細胞を用いて調製する。これらの細胞ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質転換された場合に、最も有効であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種についての抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている（Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543 (1993)）。

20

#### 【0186】

様々な腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究により、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義が導かれた（Rosenberg, Immunity, 10:281-287 (1999)）。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍および腫瘍が発生した細胞において発現される、分化した抗原、例えば、メラノサイト抗原gp100、MAGE抗原、およびTrp-2である。さらに重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主において発見された腫瘍特異的T細胞の標的であることが示されている。いくつかの実施態様において、PD-L1大環状ペプチドと第二免疫調節剤の組み合わせは、これらのタンパク質に対する免疫応答を生じさせるために、腫瘍において発現する組み換えタンパク質および/またはペプチドのコレクションと組み合わせて用いられうる。これらのタンパク質は、免疫系によって、通常自己抗原として見なされるため、これらに対して耐性がある。腫瘍抗原はまた、染色体のテロメアの合成に必要であり、ヒトの癌の85%より多くにおいて、および限られた数の体細胞組織においてのみ発現する、タンパク質テロメラーゼを含みうる（Kim, et al., Science, 266:2011-2013 (1994)）。（これらの体細胞組織は、様々な方法によって、免疫攻撃から保護されうる。）腫瘍抗原はまた、タンパク質配列を変化させる、または2つの無関係の配列（すなわち、フィラデルフィア染色体のbcr-abl）間の融合タンパク質を生じる体細胞突然変異により、癌細胞において発現する「ネオアンチゲン」、またはB細胞腫瘍からのイディオタイプでもありうる。

30

40

#### 【0187】

他の腫瘍ワクチンとしては、ヒトパピローマウイルス（HPV）、肝炎ウイルス（HBVおよびHCV）およびカポジヘルペス肉腫ウイルス（KHSV）などの、ヒトの癌に関連するウイルスからのタンパク質が挙げられうる。PD-L1大環状ペプチド遮断と並行して用いられうる、腫瘍特異的抗原の別の形態は、腫瘍組織そのものから単離した、精製した熱ショックタンパク質（HSP）である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞

50



胞からのタンパク質のフラグメントを含み、これらのH S Pは腫瘍免疫を誘発するために、抗原提示細胞に高効率で送達される (Suot, et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura, et al., Science, 278:117-120 (1997))。

#### 【0188】

樹状細胞 (DC) は、抗原特異的応答を予備刺激するために用いることのできる、強力な抗原提示細胞である。DCはエクスピボで生産され、様々なタンパク質およびペプチド抗原、並びに腫瘍細胞抽出物と共に導入されうる (Nestle, et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998))。DCはまた、遺伝的手段によって導入されてもよく、これらの腫瘍抗原もまた発現される。DCはまた、免疫付与のため、腫瘍細胞に直接融合される (Kugler, et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000))。ワクチン接種の方法として、DC免疫化を、抗PD-L1大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせと、効率的にさらに組み合わせ、さらに強力な抗腫瘍応答を活性化することができる。

10

#### 【0189】

抗PD-L1大環状ペプチドとさらなる免疫調節剤との組み合わせは、標準的ながん治療とさらに組み合わせられうる。例えば、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせは、化学療法レジメンと効率的に組み合わせられうる。これらの例において、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせにおいて観察されるように、本開示の組み合わせと共に投与される他の化学療法剤の用量を減少させることが可能でありうる (Mokyr, M. et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998))。これらの組み合わせの例としては、黒色腫の治療のためのダカルバジンとのさらなる組み合わせにおける、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせが挙げられる。別の例としては、黒色腫の治療のためのインターロイキン-2 (IL-2) とのさらなる組み合わせにおける、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせが挙げられる。PD-L1大環状ペプチドおよび他の免疫調節剤と、化学療法との組み合わせ使用の背後にある科学的な根拠は、大半の化学療法化合物の細胞毒性効果によってもたらされる細胞死によって、抗原提示経路における腫瘍抗原の量の増加が生じるはずであることである。細胞死によって、抗PD-L1大環状ペプチドおよびさらなる免疫調節剤との組み合わせと相乗しうる他の組み合わせ療法は、放射線、外科手術、およびホルモン遮断である。これらのプロトコルのそれぞれは、宿主中で腫瘍抗原源を生じる。血管形成阻害剤はまた、PD-L1および第二免疫調節剤の組み合わせと組み合わせられうる。血管形成の阻害によって、腫瘍抗原源を宿主の抗原提示経路に供給しうる、腫瘍細胞死が生じる。

20

30

#### 【0190】

PD-L1および他の免疫調節剤の組み合わせはまた、主要細胞に対するFcアルファまたはFcガンマ受容体発現エフェクター細胞を標的にする二重特異性大環状ペプチドと組み合わせ用いることができる (例えば、米国特許第5,922,845号および5,837,243号を参照されたい)。二重特異性大環状ペプチドは、2つの別の抗原を標的にするために用いることができる。例えば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原 (例えば、Her-2/neu) 二重特異性大環状ペプチドは、腫瘍部位にマクロファージを標的化するために用いられている。この標的化は、腫瘍特異的応答をより効率的に活性化しうる。これらの応答のT細胞の武装は、PD-L1遮断および第二免疫調節剤の組み合わせの使用によって増強されるであろう。あるいは、抗原は、腫瘍抗原および樹状細胞特異的な細胞表面マーカーに結合する二重特異性大環状ペプチドを使用することによって、DCに直接送達されうる。

40

#### 【0191】

別の実施例において、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との組み合わせは、リツキサン (登録商標) (リツキシマブ)、ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ)、ペキサール (登録商標) (トシツモマブ)、ゼヴァリン (登録商標) (イブリツモマブ)、キャンパス (登録商標) (アレムツズマブ)、リンフォシド (エブラツズマブ)、アバスチン (登録商標) (ベバシズマブ)、およびタルセバ (登録商標) (エルロチニブ) などの、抗腫瘍大環状薬剤との組み合わせで用いることができる。例として、理論に限定されたく

50

ないが、抗癌性抗体または毒素に結合した抗癌性抗体による治療によって、第二免疫調節剤の標的またはPD-L1によって介在される、免疫応答が増強されうる、癌細胞死（例えば、腫瘍細胞）が生じうる。ある例示的な実施態様において、過増殖性疾患（例えば、癌腫瘍）の治療としては、大環状ペプチドと第二免疫調節剤との、同時、または順次の組み合わせ、またはそれらの任意の組み合わせにおける、抗癌性抗体が挙げられ、これは宿主による抗腫瘍免疫応答を増強しうる。

#### 【0192】

腫瘍は、様々なメカニズムによって宿主の免疫監視を回避する。これらのメカニズムの多くは、腫瘍によって発現する、および免疫抑制性のタンパク質の不活性化によって克服されうる。これらの例としては、他のTGF-β（Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163:1037-1050 (1986)）、IL-10（Howard, M. et al., Immunology Today, 13:198-200 (1992)）、および Fas リガンド（Hahne, M. et al., Science, 274:1363-1365 (1996)）の範疇のものが挙げられる。別の例において、これらの物質のそれぞれに対する抗体は、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による抗腫瘍免疫応答を促進させるために、大環状ペプチドおよび他の免疫調節剤とさらに組み合わせられうる。

#### 【0193】

宿主の免疫応答を活性化するために用いられうる、他の大環状ペプチドは、本開示の大環状ペプチドとの組み合わせで、さらに用いることができる。これらとしては、DC機能および抗原提示を活性化する、樹状細胞表面上の分子が挙げられる。抗CD40大環状ペプチドは、ヘルパーT細胞活性を効果的に置換することができ（Ridge, J. et al., Nature, 393:474-478 (1998)）、本開示の大環状ペプチドの単体、または抗CTLA-4の組み合わせとの組み合わせにおいて、用いることができる（Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5):527-540 (2000)）。OX-40（Weinberg, A. et al., Immunol., 164:2160-2169 (2000)）、4-1BB（Melero, I. et al., Nat. Med., 3:682-685 (1997)）、およびICOS（Hutloff, A. et al., Nature, 397:262-266 (1999)）などの、T細胞共刺激分子に対する活性化大環状ペプチドはまた、T細胞活性化の程度の上昇をもたらしうる。

#### 【0194】

骨髄移植は現在、様々な造血系起源の腫瘍の治療に用いられる。移植片対宿主病はこの治療の結果であるが、移植片対腫瘍反応から治療上の便益が得られうる。本開示の大環状ペプチドは、単体で、または他の免疫調節剤との組み合わせで、ドナー移植腫瘍特異的T細胞の有効性を高めるために使用することができる。

#### 【0195】

腫瘍に対する抗原特異的T細胞を得るために、抗原特異性T細胞のエキスビボ活性化および拡大、並びにこれらの細胞の移植患者への養子細胞移植に関する、いくつかの実験的治療プロトコルもまた存在する（Greenberg, R. et al., Science, 285:546-551 (1999)）。これらの方法は、CMVなどの感染性薬剤に対する、T細胞応答を活性化させるためにも用いられうる。本開示の大環状ペプチドの存在下でのエキスビボ活性化は、単独で、または別の免疫調節剤との組み合わせで、養子細胞移植されたT細胞の発生頻度および活性を増加させることが期待されうる。

#### 【0196】

いくつかの実施態様において、本開示は、本開示の大環状ペプチドを、治療量以下の用量の他の免疫調節剤との組み合わせで対象に投与することを含む、免疫賦活剤を用いた過増殖性疾患の治療に関連する有害事象を変化させる方法を提供する。例えば、本開示の方法は、非吸収性のステロイドを患者に投与することによって、免疫賦活性治療抗体誘発性大腸炎または下痢の発生を軽減する方法を提供する。免疫賦活性治療抗体を受ける任意の患者は、そのような治療に誘発される大腸炎または下痢を発症するリスクがあるため、この患者集団全体が本開示の方法による治療に適している。ステロイドは、炎症性腸疾患（IBD）を治療し、IBDの憎悪を防止するために投与されているが、これらはIBDを有すると診断されていない患者におけるIBDの予防（発生率の低下）のためには用いら

10

20

30

40

50

れていない。ステロイドに関連する重要な副作用は、非吸収性ステロイドであっても、予防的使用を思いとどまらせてきた。

【 0 1 9 7 】

さらなる実施態様において、本開示の大環状ペプチドは、単体で、または他の免疫調節剤との組み合わせのいずれかで、任意の非吸収性ステロイドの使用とさらに組み合わせることができる。本明細書で使用される「非吸収性ステロイド」は、肝臓での代謝後、ステロイドのバイオアベイラビリティが低い、すなわち約 20 % 未満であるような、広範囲の初回通過代謝を示す糖質コルチコイドである。本開示のある実施態様において、非吸収性ステロイドはブデソニドである。ブデソニドは、局所的に作用する糖質コルチコステロイドであり、これは経口投与後に主に肝臓によって広範囲に代謝される。エントコート（登録商標）EC（Astra-Zeneca）は、回腸および大腸全体への薬物送達を最適化するように開発された、ブデソニドの pH および時間依存性経口製剤である。エントコート（登録商標）EC は、米国において、回腸および / またはその上の大腸に関する、軽度から中程度のクローン病の治療について承認されている。クローン病の治療のための、エントコート（登録商標）EC の通常の経口用量は、6 から 9 mg / 日である。エントコート（登録商標）EC は、腸において放出され、その後腸粘膜に吸収され保持される。腸粘膜の標的組織を通過すると、エントコート（登録商標）EC は、肝臓のシトクロム P 450 系によって、ごくわずかな糖質コルチコイド活性を有する代謝物に、広範囲に代謝される。そのため、バイオアベイラビリティは低い（約 10 %）。ブデソニドの低いバイオアベイラビリティによって、それほど広範囲でない初回通過代謝を有する他の糖質コルチコイドと比較して、治療比率が改善される。ブデソニドは、全身に作用するコルチコステロイドよりも視床下部 - 下垂体抑制が少ないなど、副作用が少なくなる。しかしながら、エントコート（登録商標）EC の慢性投与は、副腎皮質機能亢進症および副腎抑制などの、全身性糖質コルチコイド作用をもたらしうる。Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610 (2004)を参照されたい。

10

20

【 0 1 9 8 】

さらなる実施態様において、PD - L1 および他の免疫調整剤の組み合わせと、非吸収性ステロイドとの組み合わせはさらに、サリチレートと組み合わせることができる。サリチレートとしては、例えば、スルファサラジン（アザルフィジン（登録商標）、Pharmacia & Upjohn）；オルサラジン（ディペンタム（登録商標）、Pharmacia & Upjohn）；バルサラジド（コラザール（登録商標）、Salix Pharmaceuticals, Inc.）；およびメサラミン（アサコール（登録商標）、Procter & Gamble Pharmaceuticals）；ペンタサ（登録商標）、Shire US；カナサ（登録商標）、Axcen Scandipharma, Inc.；ロワサ（登録商標）、Solvay）などの 5 - A S A 剤が挙げられる。

30

【 0 1 9 9 】

用量および製剤

本明細書に記載される、式 I の適切なペプチドおよびさらに具体的な大環状ペプチドは、糖尿病および他の関連する疾患を治療するために、化合物単体で、および / または許容可能な単体との組み合わせで、医薬製剤の形態において、患者に投与することができる。糖尿病の治療の分野における当業者は、そのような治療が必要な、ヒトなどの哺乳動物に対する化合物の用量および投与経路を、容易に決定することができる。投与経路としては、限定されないが、経口、口腔内、直腸、経皮、パッカル、鼻腔内、肺、皮下、筋肉内、皮内、舌下、結腸内、眼内、静脈内、または腸投与が挙げられる。化合物は、許容可能な薬務に基づいて、投与経路に従って製剤化される（Fingl et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chapter 1, p. 1 (1975); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)）。

40

【 0 2 0 0 】

本明細書に記載される、薬学的に許容可能なペプチド組成物は、錠剤、カプセル（それぞれ、除放性または時限放出性製剤を含む）、丸剤、散剤、顆粒、エリキシル、インサイチュゲル、マイクロスフェア、結晶複合体、リポソーム、マイクロエマルジョン、チンキ

50

、懸濁液、シロップ、エアロゾルスプレー、およびエマルジョンなどの、多くの剤形において投与することができる。本明細書に記載される組成物はまた、全て薬学分野における当業者に周知の剤形を用いて、経口、静脈内（ボラスまたは点滴）、腹腔内、皮下、経皮、または筋肉内の形態において投与することができる。組成物は単体で投与されてもよいが、一般に、選択された投与経路および標準的な薬務に基づいて選択された医薬担体と共に投与される。

#### 【0201】

本明細書に記載の組成物についての投与レジメンは、当然のことながら、特定の試薬、および投与形態および投与経路の薬力学的特性；受容者の種、年齢、性別、健康、健康状態、および体重；症状の性質および程度；併用療法の種類；治療の頻度；投与経路、患者の腎臓および肝臓の機能、並びに目的の効果などの既知の因子に応じて変化する。医師または獣医師は、疾患状態を予防し、対抗し、または進行を停止させるのに必要な薬物の有効量を決定し、処方することができる。

10

#### 【0202】

一般的なガイダンスとして、所定の効果について使用される場合、活性成分の毎日の経口用量は、約0.001から1000mg/体重kgの間、好ましくは約0.01から100mg/体重kg/日の間、および最も好ましくは約0.6から20mg/kg/日の間の範囲である。静脈内では、所定の効果について使用される場合、活性成分の毎日の用量は、一定速度の点滴の間、0.001ngから100.0ng/分/体重kgの間である。そのような一定の静脈内点滴は、好ましくは、0.01ngから50ng/分/体重kg、および最も好ましくは0.01ngから10.0mg/分/体重kgの速度で投与することができる。本明細書に記載される組成物は、単回一日用量で投与されてもよく、あるいは、1日用量の総量は、1日2回、3回、または4回の分割用量で投与されてもよい。本明細書に記載される組成物はまた、必要に応じて、数日/数週間/数ヶ月の期間にわたって、薬物の持続放出を可能にするデポー製剤によって投与されてもよい。

20

#### 【0203】

本明細書に記載される組成物は、適切な鼻腔内ビヒクルの局所的使用を介した鼻腔内形態において、または経皮皮膚パッチを用いた経皮経路によって、投与することができる。経皮送達システムの形態において投与される場合、当然のことながら、用量投与は、用量レジメンにわたって、間欠的ではなく連続的である。

30

#### 【0204】

組成物は一般に、意図される投与形態、すなわち経口錠剤、カプセル、エリキシル、噴射剤を含む、または含まないエアロゾルスプレー、およびシロップに関して適切に選択され、従来の薬務と一致する、適切な薬学的な希釈剤、賦形剤、または担体（合わせて、本明細書において薬学的担体と称する）との混合物において投与される。

#### 【0205】

例えば、錠剤またはカプセルの形態における経口投与について、活性な薬学的成分は、限定されないが、ラクトース、デンプン、スクロース、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、マンニトール、およびソルビトールなどの、経口、非毒性、薬学的に許容可能な不活性担体と組み合わせることができ；液体形態における経口投与について、経口薬物成分は、限定されないが、エタノール、グリセロール、および水などの任意の経口、非毒性、薬学的に許容可能な不活性担体と組み合わせることができる。さらに、望ましい場合または必要な場合、適切な結合剤、滑沢剤、崩壊剤、および着色剤はまた、混合物に組み込むことができる。適切な結合剤としては、限定されないが、デンプン、ゼラチン、限定されないが、グルコースまたはベータ-ラクトース、コーン甘味剤などの天然糖、アカシア、トラガカント、またはアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、および蠟などの天然および合成ゴムが挙げられる。これらの剤形において用いられる滑沢剤としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、および塩化ナトリウムが挙げられる。崩壊剤としては、

40

50

限定されないが、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、およびキサンタンガムが挙げられる。

【0206】

本明細書に記載される組成物はまた、小さな単一ラメラ小胞、大きな単一ラメラ小胞、および多層ラメラ小胞などの、ミセルまたはリポソーム送達システムの混合された形態において投与されうる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミン、またはホスファチジルコリンなどの様々なリン脂質から形成することができる。薬物吸収を高めるために、浸透促進剤を加えてもよい。

【0207】

プロドラッグは、医薬品の多くの望ましい品質（すなわち、溶解度、バイオアベイラビリティ、製造など）を向上されることが知られているため、本明細書に記載される化合物は、プロドラッグの形態において送達されうる。そのため、本明細書に記載される主題は、本明細書において請求される化合物のプロドラッグ、それを送達する方法、およびそれを含む組成物を含むことが意図される。

【0208】

本明細書において記載される組成物はまた、標的可能な薬物担体としての可溶性ポリマーと組み合わせられうる。そのようなポリマーとしては、ポリビニル-ピロリドン、ピラン共重合体、ポリヒドロキシプロピル-メタクリルアミド-フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミドフェノール、またはパルミトイル基で置換されたポリエチレンオキシド-ポリリシンが挙げられる。さらに、本明細書に記載される組成物は、薬物の制御放出を達成するのに有用な、生分解性ポリマーの種類、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳とポリグリコール酸との共重合体、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアシレート、およびヒドロゲルの架橋または両親媒性ブロック共重合体と組み合わせられうる。

【0209】

投与に適切な剤形（医薬組成物）は、単位剤形あたり、約0.01ミリグラムから約500ミリグラムの活性成分を含みうる。これらの医薬組成物において、活性成分は通常、組成物の総重量に基づいて、約0.5 - 95重量%の分量で存在する。

【0210】

ゼラチンカプセルは、活性成分、並びにラクトース、デンプン、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、およびステアリン酸などの粉末担体を含みうる。同様の希釈剤を用いて、圧縮錠剤を製造することができる。錠剤およびカプセルの両方は、除放性製品として製造され、数時間にわたる薬物の継続的な放出を提供することができる。圧縮錠剤は、不快な味を隠し、錠剤を大気から保護するために、糖コーティングまたはフィルムコーティングされうるか、あるいは消化管における選択的な崩壊のために腸溶性コーティングされうる。

【0211】

経口投与のための液体剤形は、患者の許容性を高めるために、着色剤および香料を含むことができる。

【0212】

一般的に、水、適切な油、食塩水、デキストロース（グルコース）水溶液、および関連する糖溶液、およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールは、非経口溶液のための適切な担体である。非経口投与のための溶液は、好ましくは、活性成分の水溶性の塩、適切な安定化剤、および必要に応じて、緩衝物質を含む。亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、またはアスコルビン酸などの抗酸化剤は、単体または組み合わせのいずれかで、適切な安定化剤である。また、クエン酸およびその塩、およびEDTAナトリウムが用いられる。さらに、非経口溶液は、塩化ベンザルコニウム、メチル-またはプロピル-パラベン、およびクロロブタノールなどの防腐剤を含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 1 3 】

適切な薬学的な単体は、本分野における標準的な参照テキストである、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company (1995)において記載される。

## 【 0 2 1 4 】

本明細書に記載される化合物の投与のための、代表的な有用な薬学的な剤形は、以下に例示することができる：

## 【 0 2 1 5 】

## カプセル

標準的な 2 ピースの硬ゼラチンカプセルに、100 ミリグラムの粉末活性成分、150 ミリグラムのラクトース、50 ミリグラムのセルロース、および 6 ミリグラムのステアリン酸マグネシウムを充填することによって、多数の単位カプセルを製造することができる。

10

## 【 0 2 1 6 】

## 軟ゼラチンカプセル

ダイズ油、綿実油、またはオリーブ油などの可消化油中の活性成分の混合物を調製し、容積式ポンプを用いてゼラチンに注入して、100 ミリグラムの活性成分を含む軟ゼラチンカプセルを形成することができる。カプセルは洗浄し、乾燥するべきである。

## 【 0 2 1 7 】

## 錠剤

錠剤は、剤形が、例えば、100 ミリグラムの活性成分、0.2 ミリグラムのコロイド状二酸化ケイ素、5 ミリグラムのステアリン酸マグネシウム、275 ミリグラムの微結晶セルロース、11 ミリグラムのデンプン、および 98.8 ミリグラムのラクトースであるように、従来の方法によって製造されうる。嗜好性を向上させるため、または吸収を遅延させるために、適切なコーティングが適用されうる。

20

## 【 0 2 1 8 】

## 注入可能

本明細書に記載されるペプチド組成物の注入可能な製剤は、規制機関によって承認されているものなどの賦形剤の使用を必要とする場合、または必要としない場合がある。これらの賦形剤としては、限定されないが、溶媒および共溶媒、可溶化剤、乳化剤、または濃化剤、キレート剤、抗酸化剤、および還元剤、抗菌防腐剤、緩衝剤、および pH 調整剤、充填剤、保護剤、および張性調節剤、および特別な添加物が挙げられる。注入可能な製剤は、無菌で、発熱物質を含まず、溶液の場合、粒子状物質を含まない必要がある。

30

## 【 0 2 1 9 】

注射による投与に適した非経口組成物は、例えば、共溶媒または他の賦形剤を含んでもよく、含まなくてもよい、薬学的に許容可能な緩衝液中で、例えば、1.5 重量%の活性成分を攪拌することによって製造されうる。溶液は、塩化ナトリウムで等張にし、滅菌される必要がある。

## 【 0 2 2 0 】

## 懸濁液

水性懸濁液は、例えば、各 5 mL が、100 mg の細かく分割された活性成分、20 mg のナトリウムカルボキシメチルセルロース、5 mg の安息香酸ナトリウム、1.0 g のソルビトール溶液、U.S.P.、および 0.025 mL のバニリン、または他の口当たりの良い香料を含むように、経口および/または非経口投与のために製造することができる。

40

## 【 0 2 2 1 】

## 生分解性微粒子

注射による投与に適切な、除放性の非経口組成物は、例えば、適切な生分解性ポリマーを溶媒に溶解させ、ポリマー溶液に活性成分を添加して合わせて、マトリックスから溶媒を除去し、それによってマトリックス全体に分散した活性成分を有するポリマーのマトリ

50

クスを形成することによって製造されうる。

【 0 2 2 2 】

ペプチド合成

本明細書に開示される記載は、化学結合の法則および原理に適合して解釈されるべきである。本開示に包含される化合物は、医薬品としての使用に適切に安定なものであることが理解されるべきである。当業者は、化学結合および安定性の一般原理に基づいて、どの化合物が安定であるか、または安定でないかを知るであろう。

【 0 2 2 3 】

本開示の大環状ペプチドの化学合成は、段階的固相合成、立体構造的に補助されたペプチド断片の再連結による半合成、クローン化または合成ペプチド断片の酵素的連結、および化学的連結などの、当技術分野において認識されている様々な方法を用いて実施することができる。本明細書に記載される大環状ペプチドおよびその類似体の合成に好ましい方法は、Chan, W.C. et al., eds., Fmoc Solid Phase Synthesis, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2: 「Special Methods in Peptide Synthesis, Part A」, pp. 3-284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, New York (1980); および Stewart, J.M. et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)に記載されるものなどの、様々な固相技術を用いた化学合成である。好ましい戦略は、  
- アミノ基の一時的な保護のための Fmoc (9 - フルオレニルメチルメチル - オキシカルボニル) 基と、アミノ酸側鎖の一時的な保護のための tert - ブチル基との組み合わせに基づく (例えば、Atherton, E. et al., 「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」, in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9: 「Special Methods in Peptide Synthesis, Part C」, pp. 1-38, Undenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego (1987)を参照されたい)。

【 0 2 2 4 】

ペプチドは、ペプチドの C 末端から開始する不溶性ポリマー担体 (「樹脂」とも称される) 上で、段階的に合成することができる。アミドまたはエステル結合の形成によって、ペプチドの C 末端アミノ酸を樹脂に付加することによって、合成が開始される。これにより、生じたペプチドは、それぞれ C 末端アミドまたはカルボン酸として、最終的に解離される。

【 0 2 2 5 】

C 末端アミノ酸および合成において用いられる全ての他のアミノ酸は、  
- アミノ保護基が合成中に選択的に除去されうるように、  
- アミノ基および側鎖官能基 (存在する場合) を区別して保護することが必要である。アミノ酸のカップリングは、活性エステルとしてのカルボキシル基の活性化、およびそれを、樹脂に付加された N 末端アミノ酸の保護されていない  
- アミノ酸と反応させることによって行われる。  
- アミノ基の脱保護とカップリングの手順は、全体のペプチド配列が組み立てられるまで繰り返される。次いで、ペプチドは、通常は副反応を制限するための適切なスカベンジャーの存在下で、側鎖の官能基の脱保護を伴って、樹脂から解離される。得られたペプチドを最終的に逆相 HPLC で精製する。

【 0 2 2 6 】

最終的なペプチドの前駆体として必要なペプチジル樹脂の合成は、市販の架橋ポリスチレンポリマー樹脂を利用する (Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA)。C 末端カルボキサミドについて、好ましい固相担体は: 4 - (2', 4' - ジメトキシフェニル - Fmoc - アミノメチル) - フェノキシアセチル - p - メチルベンズヒドリルアミン樹脂 (Rink アミド MBHA 樹脂); 9 - Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ - メリフィールド樹脂 (シーバーアミド樹脂); 4 - (9 - Fmoc) アミノメチル - 3, 5 - ジメトキシフェノキシ) パレリル - アミノメチル - メリフィールド樹脂 (PAL 樹脂) である。最初およびその後のアミノ酸のカップリングは、それぞれ、DIC / HOBt、HBTU / HOBt、BOP、PyBOP から、または D

IC / 6 - Cl - HOBT、HCTU、DIC / HOAtもしくはHATUから生成した、HOBT、6 - Cl - HOBTまたはHOAt活性化エステルを用いて行うことができる。好ましい固相担体は、保護されたペプチド断片のための、2 - クロロトリチルクロライド樹脂および9 - Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ - メリフィールド樹脂（シーバーアミド樹脂）である。最初のアミノ酸を、2 - クロロトリチルクロライド樹脂にロードするには、ジクロロメタンおよびDIEA中で、Fmoc保護アミノ酸を樹脂と反応させることによって最も良く達成される。必要に応じて、少量のDMFを加えて、アミノ酸の溶解を促進することができる。

#### 【0227】

本明細書に記載されるペプチド類似体の合成は、CEMLiberty超音波合成器、またはProtein Technologies, Inc. プレリユード（6チャンネル）またはシンフォニー（12チャンネル）合成器などの、単一または複数チャンネルのペプチド合成器を用いて行うことができる。

#### 【0228】

これらのそれぞれのペプチドのペプチジル樹脂前駆体は、任意の標準的な手順を用いて、切り出しおよび脱保護されうる（例えば、King, D.S. et al., Int. J. Peptide Protein Res., 36:255-266 (1990)を参照されたい）。望ましい方法は、水およびスカベンジャーとしてのTISの存在下で、TFAを用いることである。一般に、ペプチジル樹脂は、室温で2～6時間にわたり、TFA / 水 / TIS（94：3：3、v：v：v；1 mL / 100 mgのペプチジル樹脂）中で攪拌される。次いで、使用した樹脂を濾別し、TFA溶液を濃縮するか、真空中で乾燥させた。得られた粗製ペプチドは、Et<sub>2</sub>Oで沈殿させ洗浄するか、あるいは、分取HPLCによる精製のために、DMSOまたは50%酢酸水溶液中に直接再溶解させる。

#### 【0229】

所定の純度を有するペプチドは、例えば、Watersモデル4000またはShimadzuモデルLC-8A液体クロマトグラフにおいて、分取HPLCを用いた精製によって、得ることができる。粗製ペプチドの溶液をYMC S5 ODS（20×100 mm）カラムに注入し、流速14～20 mL / 分を用いて、いずれも0.1% TFAで緩衝させた、MeCN / 水の直線的勾配によって溶出し、溶出液を220 nmにおけるUV吸光度によって追跡する。精製されたペプチドの構造は、エレクトロスプレーMS分析で確認することができる。

#### 【実施例】

#### 【0230】

本開示、特に例示的なスキームおよびその後の実施例などにおいて用いられる略語は、当業者に周知である。用いられる略語のいくつかは、以下の通りである：HOBTは1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール；HOAtは1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾール；DICはN, N' - ジイソプロピルカルボジイミド；HBTUはO - （ベンゾトリアゾール - 1 - イル） - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート；BOPは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 ヘキサフルオロホスフェート；PyBOPは（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 ヘキサフルオロホスフェート）；HCTUはO - （6 - Cl - 1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル） - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート；HATUは（1 - [ビス（ジメチルアミノ）メチレン] - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾロ[4, 5 - b]ピリジニウム 3 - オキシド ヘキサフルオロホスフェート）；Fmocは9 - フルオレニルメトキシカルボニル；DIEAまたはDPEAはジイソプロピルエチルアミン；DMFはN, N - ジメチルホルムアミド；TFAはトリフルオロ酢酸；TISはトリイソプロピルシラン；Et<sub>2</sub>Oはジエチルエーテル；DMSOはジメチルスルホキシド；DCMは1, 1 - ジクロロメタン；NMMはN - メチルモルホリン；NMPはN - メチルピロリドン；Acはアセチル；minおよびminsは分；hおよびhrおよびhrsは時間；RTは保持時間または室温（文脈により決

10

20

30

40

50



定される) ; A C NまたはM e C Nはアセトニトリル ; T E Sはトリエチルシラン ; p T s O Hはパラ - トリルスルホン酸 ; D E Mはジエトキシメタン ; D C Eはジクロロエタン ; およびE tはエチル。

#### 【 0 2 3 1 】

分析データ :

マスマススペクトロメトリー : 「 E S I - M S ( + ) 」は、陽イオンモードで行われるエレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; 「 E S I - M S ( - ) 」は、陰イオンモードで行われるエレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; 「 E S I - H R M S ( + ) 」は、陽イオンモードで行われる、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; 「 E S I - H R M S ( - ) 」は、陰イオンモードで行われる、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す。検出された分子量は、「 m / z 」単位表示に従って報告される。1 0 0 0より大きい精密質量を有する化合物はしばしば、2 価または3 価イオンとして検出された。

10

#### 【 0 2 3 2 】

分析データ :

マスマススペクトロメトリー : 「 E S I - M S ( + ) 」は、陽イオンモードで行われるエレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; 「 E S I - M S ( - ) 」は、陰イオンモードで行われるエレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; 「 E S I - H R M S ( + ) 」は、陽イオンモードで行われる、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す ; E S I - H R M S ( - ) 」は、陰イオンモードで行われる、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリーを表す。検出された分子量は、「 m / z 」単位表示に従って報告される。1 0 0 0より大きい精密質量を有する化合物はしばしば、2 価または3 価イオンとして検出された。

20

#### 【 0 2 3 3 】

分析 L C M S 条件 A :

カラム : B E H C 1 8、2 . 1 x 5 0 m m、1 . 7 μ m 粒子 ; 移動相 A : 0 . 0 5 % T F A を含む水 ; 移動相 B : 0 . 0 5 % T F A を含むアセトニトリル ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 2 分にわたり、2 % B から 9 8 % B、次いで 9 8 % B で 0 . 5 分間保持 ; 流速 : 0 . 8 m L / 分 ; 検出 : 2 2 0 n m における U V。

#### 【 0 2 3 4 】

分析 L C M S 条件 B :

カラム : B E H C 1 8、2 . 1 x 5 0 m m、1 . 7 μ m 粒子 ; 移動相 A : 0 . 0 5 % T F A を含む、5 : 9 5 アセトニトリル : 水 ; 移動相 B : 0 . 0 5 % T F A を含む、9 5 : 5 アセトニトリル : 水 ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 3 分にわたり、0 - 1 0 0 % B、次いで 0 . 7 5 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 . 1 1 m L / 分。

30

#### 【 0 2 3 5 】

分析 L C M S 条件 C :

カラム : B E H C 1 8、2 . 1 x 5 0 m m、1 . 7 μ m 粒子 ; 移動相 A : 0 . 2 % ギ酸および 0 . 0 1 % T F A を含む、水 ; 移動相 B : 0 . 2 % ギ酸および 0 . 0 1 % T F A を含む、アセトニトリル ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 2 分にわたり、2 % B から 8 0 % B、0 . 1 分にわたり、8 0 % B から 9 8 % B、次いで 9 8 % B で 0 . 5 分間保持 ; 流速 : 0 . 8 m L / 分 ; 検出 : 2 2 0 n m における U V。

40

#### 【 0 2 3 6 】

分析 L C M S 条件 D :

カラム : W a t e r s A c q u i t y U P L C B E H C 1 8、2 . 1 x 5 0 m m、1 . 7 μ m 粒子 ; 移動相 A : 1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5 : 9 5 アセトニトリル : 水 ; 移動相 B : 1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5 : 5 アセトニトリル : 水 ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 3 分にわたり、0 - 1 0 0 % B、次いで 0 . 7 5 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 . 1 1 m L / 分 ; 検出 : 2 2 0 n m における U V。

#### 【 0 2 3 7 】

50

分析 LCMS 条件 E :

カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18、2.1 x 50 mm、1.7  $\mu$ m 粒子; 移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸を含む、5:95 アセトニトリル:水; 移動相 B: 0.1% トリフルオロ酢酸を含む、95:5 アセトニトリル:水; 温度: 50 ; 勾配: 3 分にわたり、0 - 100% B、次いで 0.75 分間、100% B で保持; 流速: 1.11 mL / 分; 検出: 220 nm における UV。

【0238】

分析 LCMS 条件 F :

カラム: Waters Xbridge C18、2.1 x 50 mm; 移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5:95 アセトニトリル:水; 移動相 B: 10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95:5 アセトニトリル:水; 温度: 35 ; 勾配: 4 分にわたり、0 - 100% B、次いで 1 分間、100% B で保持; 流速: 4 mL / 分; 検出: 220 nm における UV。

10

【0239】

分析 LCMS 条件 G :

Finnigan LTQ マススペクトロメーター; カラム: Phenomenex Jupiter C4、1 x 50 mm; 移動相 A: 水中の 1% ギ酸; 移動相 B: アセトニトリル中の 0.1% ギ酸; 温度: 30 ; 勾配: 1% B、1 分間保持; 3 分にわたり、1 - 95% B、次いで 3 分間、95% B で保持; 流速: 0.15 mL / 分。

【0240】

20

分析 HPLC 条件 A :

カラム: YMC Pack ODS - AQ 3  $\mu$ m 150 x 4.6 mm 移動相 A: 0.1% TFA を含む、水; 移動相 B: 0.1% TFA を含む、アセトニトリル; 温度: 60 ; 勾配: 25 分にわたり、35% B から 80% B; 流速: 1 mL / 分; 検出: 217 nm における UV。

【0241】

分析 HPLC 条件 B :

カラム: YMC Pack ODS - AQ 3  $\mu$ m 150 x 4.6 mm 移動相 A: 0.1% TFA を含む、水; 移動相 B: 0.1% TFA を含む、アセトニトリル; 温度: 60 ; 勾配: 25 分にわたり、25% B から 75% B; 流速: 1 mL / 分; 検出: 217 nm における UV。

30

【0242】

分析 HPLC 条件 C :

カラム: YMC Pack ODS - AQ 3  $\mu$ m 150 x 4.6 mm 移動相 A: 0.1% TFA を含む、水; 移動相 B: 0.1% TFA を含む、アセトニトリル; 温度: 60 ; 勾配: 25 分にわたり、20% B から 70% B; 流速: 1 mL / 分; 検出: 217 nm における UV。

【0243】

分析 HPLC 条件 D :

カラム: YMC Pack ODS - AQ 3  $\mu$ m 150 x 4.6 mm 移動相 A: 0.1% TFA を含む、水; 移動相 B: 0.1% TFA を含む、アセトニトリル; 温度: 60 ; 勾配: 25 分にわたり、15% B から 65% B; 流速: 1 mL / 分; 検出: 217 nm における UV。

40

【0244】

分析 HPLC 条件 E :

カラム: YMC Pack ODS - AQ 3  $\mu$ m 150 x 4.6 mm 移動相 A: 0.1% TFA を含む、水; 移動相 B: 0.1% TFA を含む、アセトニトリル; 温度: 60 ; 勾配: 20 分にわたり、25% B から 60% B; 流速: 1.25 mL / 分; 検出: 217 nm における UV。

【0245】

50

分析 H P L C 条件 F :

カラム : Y M C P a c k O D S - A Q 3 u m 1 5 0 x 4 . 6 m m 移動相 A : 0 . 1 % T F A を含む、水 ; 移動相 B : 0 . 1 % T F A を含む、アセトニトリル ; 温度 : 6 0 ; 勾配 : 2 0 分にわたり、2 5 % B から 6 5 % B ; 流速 : 1 . 2 5 m L / 分 ; 検出 : 2 1 7 n m における U V。

【 0 2 4 6 】

分析 H P L C 条件 G :

カラム : S u n f i r e C 1 8 3 . 5 u m 、 3 . 0 x 1 5 0 m m ; 移動相 A : 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸を含む、5 : 9 5 アセトニトリル : 水 ; 移動相 B : 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸を含む、9 5 : 5 アセトニトリル : 水 ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 1 2 分にわたり、1 0 - 1 0 0 % B、次いで 3 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 m L / 分 ; 検出 : 2 2 0 n m における U V。

10

【 0 2 4 7 】

分析 H P L C 条件 H :

カラム : X b r i d g e フェニル 3 . 5 x 1 5 0 u m 、移動相 A : 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸を含む、5 : 9 5 アセトニトリル : 水 ; 移動相 B : 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸を含む、9 5 : 5 アセトニトリル : 水 ; 温度 : 5 0 ; 勾配 : 1 2 分にわたり、1 0 - 1 0 0 % B、次いで 3 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 m L / 分 ; 検出 : 2 2 0 n m における U V。

【 0 2 4 8 】

20

分析 H P L C 条件 I :

カラム : P h e n o m e n e x L u n a 5 u C 1 8 ( 2 ) 1 5 0 x 4 . 6 m m ; 移動相 A : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、水、移動相 B : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、アセトニトリル、勾配 : 2 0 分にわたり、5 - 1 0 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 m L / 分、検出 : 2 2 0 における U V

【 0 2 4 9 】

分析 H P L C 条件 J :

カラム : P h e n o m e n e x L u n a 5 u C 1 8 ( 2 ) 1 5 0 x 4 . 6 m m ; 移動相 A : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、水、移動相 B : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、アセトニトリル、勾配 : 2 0 分にわたり、1 0 - 1 0 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 m L / 分、検出 : 2 2 0 における U V

30

【 0 2 5 0 】

分析 H P L C 条件 K :

カラム - A s c e n t i s E x p r e s s C 1 8 5 0 X 2 . 1 m m - 2 . 7 u m ; 移動相 A : 水中の 0 . 1 % H C O O H、移動相 B : アセトニトリル、勾配 : 1 . 7 分にわたり、0 - 1 0 0 % B、次いで 1 . 5 5 分間、1 0 0 % B で保持 ; 流速 : 1 m L / 分、検出 : 2 5 4 における U V

【 0 2 5 1 】

一般的な方法 :

プレリユード方法 A :

40

全ての操作は、プレリユードペプチド合成器 ( Protein Technologies ) における自動化のもとで行った。特に記載されない限り、全ての操作は、下部フリットが取り付けられた、1 0 または 4 5 m L ポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、プレリユードペプチド合成器と結合する。D M F および D C M を、チューブの上部を介して加えることができ、これによってチューブの両側が均等に洗い流される。残りの試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての溶液をチューブの下部から除去する。「周期的攪拌」は、下部フリットを介した、N<sub>2</sub> ガスの短いパルスを表し ; このパルスは約 5 秒間継続し、3 0 秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から 3 週間を超えて使用しなかった。D M F = ジメチルホルムアミド ; D I C = N , N ' - ジイソプロピルカルボジイミド ; H O A t = 1

50

- ヒドロキシ 7 - アザベンゾトリアゾール；シーバー（シーバー）= Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、ここで、「3 - イルオキシ」はポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いられる樹脂は、シーバーリンカー（窒素においてFmoc保護）を有する、メリフィールドポリマー（ポリスチレン）である；100 - 200メッシュ、1% DV B、0.71 mmol / g ロード。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される。

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

#### 【0252】

「プレリユード方法A」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー - メリフィールド樹脂の約140 mgに相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順から開始した。アミノ酸を、一級アミンN末端にカップリングするには、以下に記載される「シングルカップリング手順」を用いた。Fmoc - N - メチルアミノ酸のカップリング、および二級アミンN末端へのカップリングには、以下に記載される「二級アミンカップリング手順」を用いた。ペプチドのN末端へのクロロアセチル基のカップリングは、以下に記載される「クロロアセチル クロライドカップリング手順」または「クロロ酢酸カップリング手順」によって説明される。

#### 【0253】

樹脂膨潤手順：

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂（140 mg、0.100 mmol）を加えた。樹脂を以下のように3回洗浄した：反応容器にDMF（5.0 mL）およびDCM（5.0 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の底からのN<sub>2</sub>バブリングによって周期的に10分間攪拌し、その後溶媒を排出した。

#### 【0254】

シングルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を、以下のように連続して5回洗浄した；それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を60秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸およびHOAt（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）の溶液を加え、次いでDIC（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）を加えた。混合物を60分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように、連続して4回洗浄した；それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v/v/v、5.0

10

20

30

40

50

m L) の溶液を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0255】

二級アミンカップリング方法；

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF (20 : 80 v / v、5.0 mL) を加えた。混合物を 3 分間、周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF (20 : 80 v / v、5.0 mL) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 60 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸および HOAc (0.2 M / DMF、5.0 mL、5 当量) の溶液、次いで DIC (0.2 M / DMF、5.0 mL、5 当量) を加えた。混合物を 30 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に酢酸無水物：DIEA：DMF (10 : 1 : 89 v / v / v、5.0 mL) の溶液を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0256】

クロロアセチルクロライドカップリング手順；

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF (20 : 80 v / v、5.0 mL) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF (20 : 80 v / v、5.0 mL) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、DIP EA (4.0 mmol、0.699 mL、40 当量)、およびクロロアセチルクロライド (2.0 mmol、0.160 mL、20 当量) の DMF 中の溶液を 3.0 mL 加えた。混合物を 12 から 18 時間周期的に攪拌し、次いで溶液を排出した。樹脂を以下のように連続して 3 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液を排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DCM (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液を排出した。

#### 【0257】

プレリユード方法 B：

全ての操作はプレリユードペプチド合成器 (Protein Technologies) において自動化のもとで行った。全ての手順は、下部フリットが取り付けられた、10 または 45 mL ポリプロピレンチューブにおいて行った。DMF および DCM は、チューブの上部を介して加えることができ、これによってチューブの両側が均等に洗い流される。残りの試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての溶液をチューブの下部から除去する。「周期的攪拌」は、下部フリットを介した、N<sub>2</sub> ガスの短いパルスを表し；このパルスは約 5 秒間継続し、30 秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から 3 週間を超えて使用しなかった。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム；DIP EA = ジイソプロピルエチルアミン；シーバー = Fmoc - アミ

ノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、ここで、「3 - イルオキシ」はポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いた樹脂は、シーバーリンカー（窒素においてFmoc保護）を有するメリフィールドポリマー（ポリスチレン）である；100 - 200メッシュ、1% DVB、0.71 mmol / g ロード。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される：Fmoc - Ala - OH；Fmoc - Arg (Pbf) - OH；Fmoc - Asn (Trt) - OH；Fmoc - Asp (OtBu) - OH；Fmoc - Bzt - OH；Fmoc - Cys (Trt) - OH；Fmoc - Dab (Boc) - OH；Fmoc - Dap (Boc) - OH；Fmoc - Gln (Trt) - OH；Fmoc - Gly - OH；Fmoc - His (Trt) - OH；Fmoc - Hyp (tBu) - OH；Fmoc - Ile - OH；Fmoc - Leu - OH；Fmoc - Lys (Boc) - OH；Fmoc - Nle - OH；Fmoc - Met - OH；Fmoc - [N - Me] Ala - OH；Fmoc - [N - Me] Nle - OH；Fmoc - Phe - OH；Fmoc - Pro - OH；Fmoc - Sar - OH；Fmoc - Ser (tBu) - OH；Fmoc - Thr (tBu) - OH；Fmoc - Trp (Boc) - OH；Fmoc - Tyr (tBu) - OH；Fmoc - Val - OH。

10

#### 【0258】

「プレリユード方法B」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー - メリフィールド樹脂の約140 mg に相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順から開始した。アミノ酸を、一級アミンN末端にカップリングするには、以下に記載される「シングルカップリング手順」を用いた。二級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「二級アミンカップリング」を用いた。ペプチドのN末端へのクロロアセチル基のカップリングは、以下に記載される「クロロアセチル クロライドカップリング手順」または「クロロ酢酸カップリング手順」によって説明される。

20

#### 【0259】

樹脂膨潤手順：

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂（140 mg、0.100 mmol）を加えた。樹脂を以下のように3回洗浄（膨潤）した：反応容器に、DMF（5.0 mL）およびDCM（5.0 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の下部からのN<sub>2</sub>バブリングによって10分間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。

30

#### 【0260】

シングルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を60秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）、次いでHCTU（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）、最後にDIEA（0.8 M / DMF、2.5 mL、20当量）を加えた。混合物を30分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v/v/v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：

40

50

それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 9 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

【 0 2 6 1 】

ダブルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え得られた混合物を 6 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0 . 2 M / DMF 、 5 . 0 m L 、 1 0 当量 ) 、次いで H C T U ( 0 . 2 M / DMF 、 5 . 0 m L 、 1 0 当量 ) 、最後に D I P E A ( 0 . 8 M / DMF 、 2 . 5 m L 、 2 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を容器の上部から DMF ( 4 . 0 m L ) で連続して 3 回洗浄し、得られた混合物を 6 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸 ( 0 . 2 M / DMF 、 5 . 0 m L 、 1 0 当量 ) 、次いで H C T U ( 0 . 2 M / DMF 、 5 . 0 m L 、 1 0 当量 ) 、最後に D I P E A ( 0 . 8 M / DMF 、 2 . 5 m L 、 2 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

【 0 2 6 2 】

二級アミンカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0 . 2 M / DMF 、 2 . 5 m L 、 1 0 当量 ) 、次いで H C T U ( 0 . 2 M / DMF 、 2 . 5 m L 、 1 0 当量 ) 、最後に N M M ( 0 . 8 M / DMF 、 1 . 5 m L 、 1 2 当量 ) を加えた。混合物を 1 2 時間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 9 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

【 0 2 6 3 】

クロロアセチルクロライドカップリング手順 A：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF ( 2 0 : 8 0 v / v 、 5 . 0 m L ) を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、D I P E A ( 4 . 0 m m o l 、 0 . 6 9 9 m L 、 4 0 当量 ) 、およびクロロアセチルクロライド ( 2 . 0 m m o l 、 0 . 1 6 0 m L 、 2 0 当量 ) の DMF 中の溶液を 3 . 0 m L 加えた。混合物を 1 2 から 1 8 時間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 3 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を 9 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞ

れの洗浄について、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。

#### 【0264】

クロロ酢酸カップリング手順B:

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン:DMF (20:80 v/v、5.0 mL) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン:DMF (20:80 v/v、5.0 mL) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した:それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、DMF (2.0 mL)、クロロ酢酸 (1.2 mmol、113 mg、12当量)、およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (1.2 mmol、0.187 mL、12当量) を加えた。混合物を12~18時間にわたり周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した:それぞれの洗浄について、DMF (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した:それぞれの洗浄について、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。

#### 【0265】

プレリユード方法C:

全ての操作は、プレリユードペプチド合成器 (Protein Technologies) において自動化のもとで行った。特に記載されない限り、全ての手順は、下部フリットが取り付けられた、10または45 mL ポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、プレリユードペプチド合成器に結合する。DMF およびDCMは、チューブの上部を介して加えることができ、これによってチューブの両側が均等に洗い流される。残りの試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての溶液をチューブの下部から除去する。「周期的攪拌」は、下部フリットを介した、 $\text{N}_2$  ガスの短いパルスを表し; このパルスは約5秒間継続し、30秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から3週間を超えて使用しなかった。HATU溶液は、準備から5日以内に使用した。DMF = ジメチルホルムアミド; HCTU = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム; HATU = 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム 3-オキシド ヘキサフルオロホスフェート; DIPEA = ジイソプロピルエチルアミン; シーバー = Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、ここで、「3-イルオキシ」は、ポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いる樹脂はシーバーリンカー (窒素においてFmoc保護) を有するメリフィールドポリマー (ポリスチレン) であり; 100-200メッシュ、1% DVB、0.71 mmol/g ロード。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される: Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH。

#### 【0266】



「プレリユード方法C」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー-メリフィールド樹脂の約140 mg に相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順によって開始した。一級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「シングルカップリング手順」を用いた。二級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「二級アミンカップリング手順」を用いた。樹脂の最終的な洗浄には、以下に記載される「最終洗浄手順」を用いた。

10

**【0267】**

樹脂膨潤手順：

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂（140 mg、0.100 mmol）を加えた。樹脂を以下のように3回洗浄（膨潤）した：反応容器にDMF（5.0 mL）およびDCM（5.0 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の下部からのN<sub>2</sub>バブリングによって、10分間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。

**【0268】**

シングルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え得られた混合物を60秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、5.0 mL、10当量）、最後にDIPEA（0.8 M / DMF、2.5 mL、20当量）を加えた。混合物を60分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v/v/v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

20

30

**【0269】**

二級アミンカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、2.5 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、2.5 mL、5当量）、最後にDIPEA（0.8 M / DMF、1.5 mL、12当量）を加えた。混合物を300分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように2回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリット

40

50

から排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、次いで H A T U（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、最後に D I P E A（0.8 M / DMF、1.5 mL、12 当量）を加えた。混合物を 300 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 2 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に酢酸無水物：D I E A：DMF（10：1：89 v / v / v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

10

**【0270】**

カスタムアミノ酸カップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v / v、5.0 mL）を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v / v、5.0 mL）を加えた。混合物を 3 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、0.5 から 2.5 mL、1 から 5 当量）、次いで H A T U（0.2 M / DMF、0.5 から 2.5 mL、1 から 5 当量）、最後に D I P E A（0.8 M / DMF、0.5 から 1.5 mL、4 から 12 当量）を加えた。混合物を 60 分から 600 分間にわたり周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 2 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（2.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に酢酸無水物：D I E A：DMF（10：1：89 v / v / v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を 10 分間にわたり周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

20

30

**【0271】**

最終的な洗浄手順：

樹脂を以下のように連続して 2 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DCM（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 90 秒間にわたり周期的に確認し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

**【0272】**

クロロ酢酸カップリング手順：

手動ステップに注意されたい。前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v / v、5.0 mL）を加えた。混合物を室温で 5 分間振盪させ、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を攪拌し、その後その溶液をフリットから排出した。反応容器に、DMF（2.0 mL）、クロロ酢酸（1.2 mmol、113 mg、12 当量）、および N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド（1.2 mmol、0.187 mL、12 当量）を加えた。混合物を 12 から 18 時間、室温で振盪させ、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 3 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部か

40

50

ら加え、得られた混合物を90秒間攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。

#### 【0273】

プレリユード方法D：

全ての操作は、プレリユードペプチド合成器 (Protein Technologies) において、自動化のもとで行った。特に記載されない限り、全ての操作は、下部フリットが取り付けられた、10または45 mL ポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、プレリユードペプチド合成器に結合する。DMFおよびDCMは、チューブの上部を介して加えることができ、これによってチューブの両側が均等に洗い流される。残りの試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての養液をチューブの下部から除去する。「周期的攪拌」は、下部フリットを介した、 $\text{N}_2$  ガスの短いパルスを表し；このパルスは約5秒間継続し、30秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から3週間を超えて使用しなかった。HATU溶液は、準備から5日以内に使用した。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム；HATU = 1 - [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾロ [4, 5 - b] ピリジニウム 3 - オキシド ヘキサフルオロホスフェート；DIPEA = ジイソプロピルエチルアミン；シーバー = Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、ここで、「3 - イルオキシ」は、ポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いる樹脂は、シーバーリンカー (窒素においてFmoc保護) を有する、メリフィールドポリマー (ポリスチレン) である；100 - 200メッシュ、1% DV B、0.71 mmol / g ロード。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される：Fmoc - Ala - OH；Fmoc - Arg (Pbf) - OH；Fmoc - Asn (Trt) - OH；Fmoc - Asp (OtBu) - OH；Fmoc - Bzt - OH；Fmoc - Cys (Trt) - OH；Fmoc - Dab (Boc) - OH；Fmoc - Dap (Boc) - OH；Fmoc - Glu (Trt) - OH；Fmoc - Gly - OH；Fmoc - His (Trt) - OH；Fmoc - Hyp (tBu) - OH；Fmoc - Ile - OH；Fmoc - Leu - OH；Fmoc - Lys (Boc) - OH；Fmoc - Nle - OH；Fmoc - Met - OH；Fmoc - [N - Me] Ala - OH；Fmoc - [N - Me] Nle - OH；Fmoc - Phe - OH；Fmoc - Pro - OH；Fmoc - Sar - OH；Fmoc - Ser (tBu) - OH；Fmoc - Thr (tBu) - OH；Fmoc - Trp (Boc) - OH；Fmoc - Tyr (tBu) - OH；Fmoc - Val - OH。

#### 【0274】

「プレリユード方法D」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー - メリフィールド樹脂の約140 mg に相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順によって開始した。一級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「シングルカップリング手順」を用いた。二級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「二級アミンカップリング手順」を用いた。樹脂の最終的な洗浄には、以下に記載される「最終洗浄手順」を用いた。

#### 【0275】

樹脂膨潤手順：

40 mL ポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂 (140 mg、0.100 mmol) を加えた。樹脂を以下のように3回洗浄 (膨潤) した：反応容器

に、DMF ( 5 . 0 m L ) および D C M ( 5 . 0 m L ) を加え、その後混合物を、反応容器の下部からの N<sub>2</sub> バブリングによって、10 分間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。

【 0 2 7 6 】

シングルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、5 . 0 m L ) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、5 . 0 m L ) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え得られた混合物を60秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸 ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、次いで H A T U ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、最後に D I P E A ( 0 . 8 M / DMF、0 . 75 m L、5 当量 ) を加えた。混合物を30分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、酢酸無水物：D I E A : DMF ( 10 : 1 : 89 v / v / v、5 . 0 m L ) の溶液を加えた。混合物を15分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

【 0 2 7 7 】

二級アミンカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、5 . 0 m L ) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、5 . 0 m L ) を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器にアミノ酸 ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、次いで H A T U ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、最後に D I P E A ( 0 . 8 M / DMF、0 . 75 m L、5 当量 ) を加えた。混合物を30分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように2回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、次いで H A T U ( 0 . 2 M / DMF、1 . 25 m L、2 . 5 当量 )、最後に D I P E A ( 0 . 8 M / DMF、0 . 75 m L、5 当量 ) を加えた。混合物を30分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように2回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に酢酸無水物：D I E A : DMF ( 10 : 1 : 89 v / v / v、5 . 0 m L ) の溶液を加えた。混合物を15分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように2回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、酢酸無水物：D I E A : DMF ( 10 : 1 : 89 v / v / v、5 . 0 m L ) の溶液を加えた。混合物を15分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF ( 4 . 0 m L ) を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

## 【0278】

最終的な洗浄手順：

樹脂を以下のように連続して2回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、DCM（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

## 【0279】

クロロ酢酸 カップリング手順：

手動ステップに注意されたい。前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を室温で5分間振盪させ、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して5回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、DMF（2.0 mL）、クロロ酢酸（1.2 mmol、113 mg、12当量）、およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（1.2 mmol、0.187 mL、12当量）を加えた。混合物を室温で12から18時間振盪し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して4回洗浄した：それぞれの洗浄について、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。

## 【0280】

CEM方法A：

全ての操作は、CEM Libertyマイクロ波ペプチド合成器（CEM Corporation）において、自動化のものとで行った。特に記載されない限り、全ての操作は、下部フリットがCEM Discoveryマイクロ波ユニットに取り付けられた、30または125 mLポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、CEM Liberty合成器に結合する。DMFおよびDCMは、チューブの上部および下部から加えることができ、これによってチューブの側面を均等に洗い流す。樹脂を上部から移す場合を除き、すべての溶液はチューブの下部から除去する。「周期的なバブリング」は、下部フリットを介した、N<sub>2</sub>ガスの短いバブリングを表す。アミノ酸溶液は一般に、準備から3週間を超えて使用しなかった。HATU溶液は、準備から5日以内に使用した。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム；HATU = 1 - [ビス(ジメチルアミノ)メチレン] - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾロ[4, 5 - b]ピリジニウム 3 - オキシド ヘキサフルオロホスフェート；DIPEA = ジイソプロピルエチルアミン；シーバー = Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、ここで、「3 - イルオキシ」は、ポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いた樹脂は、シーバーリンカー（窒素においてFmoc保護）を有するメリフィールドポリマー（ポリスチレン）である；100 - 200メッシュ、1% DVB、0.71 mmol/gロード。クロロトリチル、または他の酸感受性リンカーなどの、他の一般的な樹脂を合成に用いることができ、特に言及されない限り、シーバーアミド樹脂が特定の実施例において用いられる。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される：Fmoc - Ala - OH；Fmoc - Arg(Pbf) - OH；Fmoc - Asn(Trt) - OH；Fmoc - Asp(OtBu) - OH；Fmoc - Bzt - OH；Fmoc - Cys(Trt) - OH；Fmoc - Dab(Boc) - OH；Fmoc - Dap(Boc) - OH；Fmoc - Glu(Trt) - OH；Fmoc - Gly - OH；Fmoc - His(Trt) - OH；Fmoc - Hyp(tBu) - OH；Fmoc - Ile - OH；Fmoc - Leu - OH；Fmoc - Lys(Boc) - O

H ; Fmoc - Nle - OH ; Fmoc - Met - OH ; Fmoc - [ N - Me ] Ala - OH ; Fmoc - [ N - Me ] Nle - OH ; Fmoc - Orn ( Boc ) - OH ; Fmoc - Phe - OH ; Fmoc - Pro - OH ; Fmoc - Sar - OH ; Fmoc - Ser ( tBu ) - OH ; Fmoc - Thr ( tBu ) - OH ; Fmoc - Trp ( Boc ) - OH ; Fmoc - Tyr ( tBu ) - OH ; Fmoc - Val - OH。

#### 【 0 2 8 1 】

「CEM方法A」の手順は、0.100mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー-メリフィールド樹脂の約140mgに相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100mmolスケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順によって開始した。一級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「シングルカップリング手順」を用いた。二級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「二級アミンカップリング手順」を用いた。クロロアセチル基のペプチドのN末端へのカップリングは、以下に記載される「クロロアセチルクロライドカップリング手順」または「クロロ酢酸カップリング手順」によって説明される。

#### 【 0 2 8 2 】

樹脂膨潤手順：

50mLポリプロピレンコニカルチューブに、メリフィールド：シーバー樹脂（140mg、0.100mmol）を加えた。次いで、DMF（7mL）をチューブに加え、次いでDCM（7mL）を加えた。樹脂を次いで、容器の上部から反応容器に移した。この手順をさらに2回繰り返す。DMF（7mL）を加え、次いでDCM（7mL）を加えた。反応容器の下部から、15分間N<sub>2</sub>バブリングによって、樹脂を膨潤させ、その後溶媒をフリットから排出した。

#### 【 0 2 8 3 】

標準的なカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7mL）洗浄。反応容器に、アミノ酸（0.2M/DMF、2.5mL、5当量）、HATU（0.5M/DMF、1.0mL、5当量）、およびDIPEA（2M/NMP、0.5mL、10当量）を加えた。50℃でカップリングさせたFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OH以外の全てのアミノ酸について、混合物を75℃で5分間、N<sub>2</sub>バブリングによって混合させ、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7mL）洗浄。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v/v/v、5.0mL）の溶液を加えた。混合物を65℃で2分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7mL）洗浄。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【 0 2 8 4 】

ダブルカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を

以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、HATU（0.5 M / DMF、1.0 mL、5 当量）、およびDIEA（2 M / NMP、0.5 mL、10 当量）を加えた。50 でカップリングさせたFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OH以外の全てのアミノ酸について、混合物を75 で5分間、N<sub>2</sub>バブリングによって混合させ、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、HATU（0.5 M / DMF、1.0 mL、5 当量）、およびDIEA（2 M / NMP、0.5 mL、10 当量）を加えた。50 でカップリングさせたFmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OH以外の全てのアミノ酸について、混合物を75 で5分間、N<sub>2</sub>バブリングによって混合させ、反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v / v / v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を65 で2分間周期的にバブリングし、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0285】

##### 二級アミンカップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、5%ピペラジンおよび0.1 M HOBtのDMF（7 mL）中の溶液を加えた。混合物を75 で3分間周期的に攪拌し、次いで溶液を排出した。この手順をさらにもう一回繰り返した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、HCTU（0.5 M / DMF、1.0 mL、5 当量）、およびDIEA（2 M / NMP、0.5 mL、10 当量）を加えた。混合物を全てのアミノ酸について、75 で5分間N<sub>2</sub>バブリングによって混合し（Fmoc-Cys(Trt)-OHおよびFmoc-His(Trt)-OHについては50）、次いで6時間加熱なしで行った。排出した後、樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v / v / v、5.0 mL）を加えた。混合物を65 で2分間、周期的に攪拌し、次いで溶液を排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0286】

##### カスタムアミノ酸カップリング手順：

前のステップからの樹脂を含む反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v / v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v / v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を3分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、HATU（2.5 当量から10 当量）を含むアミノ酸溶液（1.25 mLから5 mL、2.5 当量から10 当量）、および最後にDIEA（2 M / NMP、0.5 mLから1 mL、20 当量）を加えた。混合物を25 から75 で5分から2時間、N<sub>2</sub>バブリングによって混合し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗

浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。反応容器に、酢酸無水物：DIEA：DMF（10：1：89 v/v/v、5.0 mL）の溶液を加えた。混合物を65℃で2分間周期的にバブリングし、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：上部からのDMF（7 mL）洗浄、次いで下部からのDMF（7 mL）洗浄、最後に上部からのDMF（7 mL）洗浄。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0287】

シンフォニー方法A：

全ての操作は、シンフォニーペプチド合成器（Protein Technologies）において、自動化のもとで行った。特に言及されない限り、全ての手順は、下部フリットに取り付けたシンフォニーポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、シンフォニーペプチド合成器に結合する。全ての溶媒、DMF、DCM、アミノ酸、および試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての溶液は、チューブの下部から除去する。「周期的な攪拌」は、下部フリットを介したN<sub>2</sub>ガスの短いパルスを用いる；パルスは約5秒間継続し、15秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から3週間を超えて使用しなかった。HATU溶液は、準備から5日以内に使用した。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウム；HATU = 1 - [ビス(ジメチルアミノ)メチレン] - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾロ[4, 5 - b]ピリジニウム 3 - オキシド ヘキサフルオロホスフェート；NMMe = n - メチルモルホリン；DIEA = ジイソプロピルエチルアミン；シーバー = Fmoc - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ、ここで、「3 - イルオキシ」は、ポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いる樹脂は、シーバーリンカー（窒素においてFmoc保護）を有するメリフィールドポリマー（ポリスチレン）である；100 - 200メッシュ、1% DVB、0.71 mmol/g ロード。Rinkまたは機能化クロロトリチル樹脂などの、他の一般的な酸感受性樹脂もまた、合成に用いることができる。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される：Fmoc - Ala - OH；Fmoc - Arg(Pbf) - OH；Fmoc - Asn(Trt) - OH；Fmoc - Asp(OtBu) - OH；Fmoc - Bzt - OH；Fmoc - Cys(Trt) - OH；Fmoc - Dab(Boc) - OH；Fmoc - Dap(Boc) - OH；Fmoc - Gln(Trt) - OH；Fmoc - Gly - OH；Fmoc - His(Trt) - OH；Fmoc - Hyp(tBu) - OH；Fmoc - Ile - OH；Fmoc - Leu - OH；Fmoc - Lys(Boc) - OH；Fmoc - Nle - OH；Fmoc - Met - OH；Fmoc - [N - Me]Ala - OH；Fmoc - [N - Me]Nle - OH；Fmoc - Phe - OH；Fmoc - Pro - OH；Fmoc - Sar - OH；Fmoc - Ser(tBu) - OH；Fmoc - Thr(tBu) - OH；Fmoc - Trp(Boc) - OH；Fmoc - Tyr(tBu) - OH；Fmoc - Val - OH。

#### 【0288】

「シンフォニー方法A」の手順は、0.050 mmolスケールで行われた実験を用いる、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー - メリフィールド樹脂の約70 mgに相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.050 mmolスケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順によって開始した。一級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「標準的なカップリング手順」を用いた。二級アミンN末端へのアミノ酸のカップリングには、「二級アミンカップリング手順」を用い、カスタムアミノ酸は、以下に記載されるアミノ酸の「ブランクカップリング」の、手動のブランク負荷によってカップリングする。

#### 【0289】



## 膨潤手順：

シンフォニーポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂（70 mg、0.050 mmol）を加えた。樹脂を以下のように3回洗浄（膨潤）した：反応容器にDMF（2.5 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の下部からのN<sub>2</sub>バブリングによって周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、2.5 mL）を加えた。混合物を2.5分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して6回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF（2.5 mL）を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、最後にNMM（0.8 M / DMF、1.25 mL、10当量）を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えたDMF（6.25 mL）によって洗浄し、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、および最後にNMM（0.8 M / DMF、1.25 mL、10当量）を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように3回洗浄した：反応容器にDMF（2.5 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の底からのN<sub>2</sub>バブリングによって、30秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

## 【0290】

## 標準的なカップリング手順：

樹脂を以下のように3回洗浄した：反応容器にDMF（2.5 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の底からのN<sub>2</sub>バブリングによって、30秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、2.5 mL）を加えた。混合物を2.5分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように6回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF（2.5 mL）を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、最後にNMM（0.8 M / DMF、1.25 mL、10当量）を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えたDMF（6.25 mL）で洗浄し、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、最後にNMM（0.8 M / DMF、1.25 mL、10当量）を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF（2.5 mL）を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

## 【0291】

## 二級アミンカップリング手順：

樹脂を以下のように3回洗浄した：反応容器にDMF（2.5 mL）を加え、その後混合物を、反応容器の底からのN<sub>2</sub>バブリングによって、30秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF（20：80 v/v、2.5 mL）を加えた。混合物を2.5分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように6回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF（2.5 mL）を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、次いでHATU（0.2 M / DMF、1.25 mL、5当量）、最後にNMM（0.8 M

/ DMF、1.25 mL、10 当量)を加えた。混合物を300分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えたDMF(6.25 mL)で洗浄し、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸(0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量)、次いでHATU(0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量)、最後にNMM(0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量)を加えた。混合物を300分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF(2.5 mL)を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

10

#### 【0292】

カスタムアミノ酸カップリング手順：

樹脂を以下のように3回洗浄した：反応容器にDMF(2.5 mL)を加え、その後混合物を、反応容器の底からのN<sub>2</sub>バブリングによって、30秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF(20：80 v/v、2.5 mL)を加えた。混合物を2.5分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように6回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF(2.5 mL)を加え、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。手で反応容器にカスタムアミノ酸(0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量)を加えるために、シンフォニーソフトウェアによって合成を停止させ、次いで自動化を再度開始し、HATU(0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量)、および最後にNMM(0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量)を加えた。混合物を300分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えたDMF(2.5 mL)によって、以下のように6回洗浄し、得られた混合物を30秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac<sub>2</sub>O / DIPEA / DMF(v/v/v 1：1：3 2.5 mL)を加えた。混合物を10分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して3回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底からDMF(2.5 mL)を加え、得られた混合物を90秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

20

30

#### 【0293】

シンフォニー方法B：

特に言及されない限り、全ての手順は、下部フリットに取り付けたシンフォニーポリプロピレンチューブにおいて行った。チューブは、チューブの下部および上部の両方を介して、シンフォニーペプチド合成器に結合する。全ての溶媒、DMF、DCM、アミノ酸、および試薬は、チューブの下部から加えられ、フリットを通過して樹脂と接触する。全ての溶液は、チューブの下部から除去する。「周期的な攪拌」は、下部フリットを介したN<sub>2</sub>ガスの短いパルスを行い；パルスは約5秒間継続し、15秒ごとに生じる。アミノ酸溶液は一般に、準備から3週間を超えて使用しなかった。HATU溶液は、準備から5日以内に使用した。DMF = ジメチルホルムアミド；HCTU = 2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム；HATU = 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム 3-オキシドヘキサフルオロホスフェート；NMM = n-メチルモルホリン；DIPEA = ジイソプロピルエチルアミン；シーバー = Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ、ここで、「3-イルオキシ」は、ポリスチレン樹脂の位置および結合の種類を表す。用いる樹脂は、シーバーリンカー(窒素においてFmoc保護)を有するメリフィールドポリマー(ポリスチレン)である；100-200メッシュ、1% DVB、0.71 mmol/gロード。Linkまたは機能化クロロトリチル樹脂などの、他の一般的な酸感受性樹脂もまた用いることができる。用いられる一般的なアミノ酸は、括弧内に示される側鎖保護基と共に、以下に列挙される：Fmoc-Ala-OH；F

40

50

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

10

#### 【 0 2 9 4 】

「シンフォニー方法 B」の手順は、0.050 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、前記のシーバー-メリフィールド樹脂の約 70 mg に相当する。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.050 mmol スケールを超えて拡大することができる。アミノ酸カップリングの前に、全てのペプチド合成手順は、以下で「樹脂膨潤手順」と記載される、樹脂膨潤手順によって開始した。一級アミン N 末端へのアミノ酸のカップリングには、以下に記載される「標準的なカップリング手順」を用いた。二級アミン N 末端へのアミノ酸のカップリングには、「二級アミンカップリング手順 B」を用い、カスタムアミノ酸は、以下に記載されるアミノ酸の「カスタムアミノ酸カップリング手順」の手動ブランク付加によってカップリングし、クロロアセチル無水物は、以下に記載される「最終的なキャップ手順」を用いて、最後の位置に加える。

20

#### 【 0 2 9 5 】

##### 膨潤手順：

シンフォニーポリプロピレン固相反応容器に、メリフィールド：シーバー樹脂 ( 70 mg、0.050 mmol ) を加えた。樹脂を以下のように 3 回洗浄 ( 膨潤 ) した：反応容器に DMF ( 2.5 mL ) を加え、その後反応容器の下部からの N<sub>2</sub> バブリングによって、混合物を 10 分間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器にピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、2.5 mL ) を加えた。混合物を 2.5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 6 回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底から DMF ( 2.5 mL ) を加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量 )、次いで HATU ( 0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量 )、最後に NMM ( 0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量 ) を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えた DMF ( 6.25 mL ) によって洗浄し、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量 )、次いで HATU ( 0.2 M / DMF、1.25 mL、5 当量 )、最後に NMM ( 0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量 ) を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 3 回洗浄した：反応容器に DMF ( 2.5 mL ) を加え、その後混合物を、反応容器の底からの N<sub>2</sub> バブリングによって、30 秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

30

40

#### 【 0 2 9 6 】

##### 標準的なカップリング手順：

樹脂を以下のように 3 回洗浄した：反応容器に DMF ( 2.5 mL ) を加え、その後混合物を、反応容器の底からの N<sub>2</sub> バブリングによって、30 秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF ( 20 : 80 v / v、2.5 mL ) を加えた。混合物を 2.5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底から DM

50

F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、次いで H A T U ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、最後に N M M ( 0 . 8 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 1 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した : D M F ( 2 . 5 m L ) を容器の下部から加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、A c <sub>2</sub> O / D I P E A / D M F ( v / v / v 1 : 1 : 3 2 . 5 m L ) を加えた。混合物を 1 0 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 6 回洗浄した : それぞれの洗浄について、容器の底から D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合 b 通を 9 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

10

#### 【 0 2 9 7 】

二級アミンカップリング方法 :

樹脂を以下のように 3 回洗浄した : 反応容器に D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、その後混合物を、反応容器の底からの N<sub>2</sub> バブリングによって、3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン : D M F ( 2 0 : 8 0 v / v 、 2 . 5 m L ) を加えた。混合物を 2 . 5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した : それぞれの洗浄について、容器の底から D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、次いで H A T U ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、最後に N M M ( 0 . 8 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 1 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えた D M F ( 6 . 2 5 m L ) で洗浄し、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸 ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、次いで H A T U ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、最後に N M M ( 0 . 8 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 1 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 3 回洗浄した : それぞれの洗浄について、容器の底から D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に A c <sub>2</sub> O / D I P E A / D M F ( v / v / v 1 : 1 : 3 2 . 5 m L ) を加えた。混合物を 1 0 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 6 回洗浄した : それぞれの洗浄について、容器の底から D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合物を 9 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

20

30

#### 【 0 2 9 8 】

カスタムアミノ酸カップリング手順 :

樹脂を以下のように 3 回洗浄した : 反応容器に D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、その後混合物を、反応容器の底からの N<sub>2</sub> バブリングによって、3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン : D M F ( 2 0 : 8 0 v / v 、 2 . 5 m L ) を加えた。混合物を 2 . 5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した : それぞれの洗浄について、容器の底から D M F ( 2 . 5 m L ) を加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。カスタムアミノ酸を反応容器に手動で加えるために、システムをシステムによって停止させ、次いで自動化を再開して、反応ベシクルに H A T U ( 0 . 2 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 5 当量 ) 、および最後に N M M ( 0 . 8 M / D M F 、 1 . 2 5 m L 、 1 0 当量 ) を加えた。混合物を 1 5 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した : D M F ( 2 . 5 m L ) を容器の下部から加え、得られた混合物を 3 0 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に A c <sub>2</sub> O / D I P E A / D M F ( v / v / v 1 : 1 : 3 2 . 5 m L ) を加

40

50

えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 6 回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底から DMF (2.5 mL) を加え、得られた混合物を 90 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を直接次のステップに用いた。

#### 【0299】

最終的なキャップ手順：

樹脂を以下のように 3 回洗浄した：反応容器に DMF (2.5 mL) を加え、その後混合物を、反応容器の底からの N<sub>2</sub> バブリングによって、30 秒間周期的に攪拌し、その後溶媒をフリットから排出した。反応容器に、ピペリジン：DMF (20：80 v/v、2.5 mL) を加えた。混合物を 2.5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底から DMF (2.5 mL) を加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、NMM (0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量) を加え、次いでクロロ酢酸無水物 (0.4 M / DMF、1.25 mL、10 当量) を加えた。混合物を 15 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を、容器の下部から加えた DMF (6.25 mL) で洗浄し、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、NMM (0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量) を加え、次いでクロロ酢酸無水物 (0.4 M / DMF、1.25 mL、10 当量) を加えた。混合物を 15 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように 6 回洗浄した：DMF (2.5 mL) を容器の下部から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、Ac<sub>2</sub>O / DIPEA / DMF (v/v/v 1：1：3 2.5 mL) を加えた。混合物を 10 分間周期的に攪拌し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 6 回洗浄した：それぞれの洗浄について、容器の底から DMF (2.5 mL) を加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DCM (2.5 mL) を容器の底から加え、得られた混合物を 30 秒間周期的に攪拌し、その後溶液をフリットから排出した。得られた樹脂を次いで、窒素気流によって 10 分間乾燥させた。

#### 【0300】

一般的な脱保護方法 A：

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法 A」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール (92.5：2.5：2.5：2.5 v/v/v/w) を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、フリットを取り付けた 25 mL シリンジに移した。シリンジに、「脱保護溶液」(5.0 mL) を加えた。混合物を振盪器で 85 分間混合した。溶液を濾過し、濃縮し、ジエチルエーテル (30 mL) で希釈した。沈殿した固形物を 3 分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル (25 mL) に再懸濁させた。懸濁液を 3 分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル (25 mL) に懸濁した。懸濁液を 3 分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空中で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0301】

一般的な脱保護方法 B：

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法 B」の手順は、0.04 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.04 mmol スケールを超えて拡大することができる

。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン（96：4；v：v）を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、フリットを取り付けた10mLシリンジに移した。シリンジに、「脱保護溶液」（2.0 - 3.0 mL）を加えた。混合物を振盪器で1時間または1.5時間混合した。溶液を濾過し、脱保護溶液（0.5 mL）で洗浄し、濃縮し、ジエチルエーテル（30 mL）で希釈した。沈殿した固形物を3分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル（25 mL）に再懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル（25 mL）に懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0302】

一般的な脱保護方法C：

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法C」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール（95：2.5：2.5 v：v：w）を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、Bio-Radチューブに移した。Bio-Radに、「脱保護溶液」（4.0 mL）を加えた。混合物を振盪器で60分間混合した。溶液を濾過し、ジエチルエーテル（30 mL）で希釈した。沈殿した固形物を3分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル（25 mL）に再懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル（25 mL）に懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0303】

一般的な脱保護方法D：

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法D」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは樹脂に結合したシーバーリンカーの量によって決定される。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール（94：3：3 v：v：w）を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、フリットを取り付けた25 mLシリンジに移した。シリンジに「脱保護溶液」（5.0 mL）を加えた。混合物を5分間振盪器で混合した。溶液を濾過し、ジエチルエーテル（30 mL）で希釈した。沈殿した固形物を3分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル（25 mL）に再懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル（25 mL）に懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0304】

一般的な脱保護方法E：

全ての操作は、特に言及されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法E」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは、樹脂に結合したFmoc Gly-Cl Trtリンカーの量によって決定される。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジチオスレイトール（95：2.5：2.5 v：v：w）を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、Bio-Radチューブに移した。Bio-Radチューブに、「脱保護溶液」（2.0 mL）を加えた。混合物を振盪器で3分間混合した。溶液を濾過し、遠心チューブに回収した。Bio-Radチューブに、「脱保護溶液」（2.

10

20

30

40

50

0 mL)を加えた。混合物を振盪器で3分間混合した。溶液を濾過し、遠心チューブに回収した。Bio-Radチューブに、「脱保護溶液」(2.0 mL)を加えた。混合物を振盪器で3分間混合した。溶液を濾過し、遠心チューブに回収した。遠心チューブ中で容器を60分間静置した。回収した溶液を次いで、ジエチルエーテル(30 mL)で希釈し、沈殿が生成した。沈殿した固形物を3分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル(25 mL)に再懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル(25 mL)に懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0305】

一般的な脱保護方法F:

全ての操作は、特に言及されない限り、手動で行った。「一般的な脱保護方法F」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールは、樹脂に結合したRinkリンカーの量によって決定される。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。「脱保護溶液」は、トリフルオロ酢酸:トリイソプロピルシラン:ジチオスレイトール(95:2.5:2.5 v:v:w)を用いて調製した。樹脂を反応容器から除去し、6 mLのBio-Radに移した。Bio-Radに、「脱保護溶液」(4.0 mL)を加えた。混合物を振盪器で90分間混合した。溶液を濾過し、ジエチルエーテル(30 mL)で希釈した。沈殿した固形物を3分間遠心分離した。上清溶液をデカントし、固形物をジエチルエーテル(25 mL)に再懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物をジエチルエーテル(25 mL)に懸濁した。懸濁液を3分間遠心分離した。上清をデカントし、残った固形物を高真空で乾燥させた。粗製ペプチドを、白色から灰白色の固形物として得た。

#### 【0306】

環化方法A

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「環化方法A」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールはペプチドの生成に用いた樹脂のシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、手順において用いたペプチドの量の直接的な決定には基づいていない。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。粗製ペプチド固形物を、アセトニトリル:8 M グアニジン/50 mM トリス水溶液(1:3)(pH 8.6)(7 mL:18 mL、または同様の比率)の溶液に溶解させ、溶液を必要に応じて、NaOH水溶液(1.0 M)を用いてpH = 8.5 - 9.0に調整した。溶液を次いで、振盪器を用いて、12から18時間混合した。反応溶液を濃縮し、残留物を次いでアセトニトリル:水に溶解した。この溶液を逆相HPLCに付し、目的の環状ペプチドを得た。

#### 【0307】

環化方法C:

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「環化方法C」の手順は、0.100 mmolスケールで行われた実験をいい、ここで、スケールはペプチドの生成に用いた樹脂のシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、手順において用いたペプチドの量の直接的な決定には基づいていない。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmolスケールを超えて拡大することができる。粗製ペプチド固形物をアセトニトリル:0.1 M 重炭酸アンモニウムの緩衝水溶液(11 mL:24 mL、または同様の比率)に溶解させ、溶液を次いで、NaOH水溶液(1.0 M)を用いて、慎重にpH = 8.5 - 9.0に調整した。溶液を、振盪器を用いて、12から18時間混合した。反応溶液を濃縮し、残留物を次いでアセトニトリル:水に溶解した。この溶液を逆相HPLCに付し、目的の環状ペプチドを得た。

#### 【0308】

## 環化方法 D :

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「環化方法 D」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールはペプチドの生成に用いた樹脂のシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、手順において用いたペプチドの量の直接的な決定には基づいていない。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。粗製ペプチド固形物を、アセトニトリル：0.1 M 重炭酸アンモニウム緩衝水溶液（11 mL：24 mL）の溶液に溶解し、溶液を次いで、NaOH 水溶液（1.0 M）を用いて、慎重に pH = 8.5 - 9.0 に調整した。溶液を次いで、12 から 18 時間攪拌することによって混合した。反応溶液を濃縮し、残留物を次いでアセトニトリル：水に溶解した。この溶液を逆相 HPLC に付し、目的の環状ペプチドを得た。

10

## 【0309】

## 環化方法 E :

全ての操作は、特に記載されない限り、手動で行った。「環化方法 E」の手順は、0.100 mmol スケールで行われた実験をいい、ここで、スケールはペプチドの生成に用いた樹脂のシーバーリンカーの量によって決定される。このスケールは、手順において用いたペプチドの量の直接的な決定には基づいていない。全ての手順は、スケールの倍数で、記載された体積を調整することによって、0.100 mmol スケールを超えて拡大することができる。粗製ペプチド固形物は、6 M グアニジン HCl 緩衝水溶液（15 mL）に溶解させ、溶液を次いで、12 から 18 時間にわたり攪拌によって混合した。反応溶液を濃縮し、15 mL の DMSO を残留物に加え、生じたスラリーを濾過した。この濾過した溶液を逆相 HPLC に付し、目的の環状ペプチドを得た。

20

## 【0310】

## 手動カップリング手順 A :

前のステップからの樹脂を含む Bio-Rad 反応容器に、ピペリジン：DMF（20：80 v/v、5.0 mL）を加えた。混合物を 5 分間周期的に攪拌し、次いで溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 5 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 60 秒間振盪し、その後溶液をフリットから排出した。反応容器に、アミノ酸（1.2 - 10 当量）一般的に（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、次いで HATU（1.210 当量）一般的に（0.2 M / DMF、2.5 mL、5 当量）、最後に DIPEA（2.4 - 20 当量）一般的に（0.8 M / DMF、1.25 mL、10 当量）を加えた。混合物を 60 分から 18 時間振盪し、次いで反応溶液をフリットから排出した。樹脂を以下のように連続して 4 回洗浄した：それぞれの洗浄について、DMF（4.0 mL）を容器の上部から加え、得られた混合物を 60 秒間振盪し、その後溶液をフリットから排出した。

30

## 【0311】

## マイクロ切り出し A :

樹脂の少ない < 10 mg のサンプルに、2 滴の TIS および 1 mL のトリフルオロ酢酸を加え、室温で 1 時間振盪し、少量を除去し、0.5 mL のアセトニトリルで希釈し、濾過して、HPLC MS トレースを得る。

40

## 【0312】

## 閉環メタセシス手順

磁気攪拌子を備えた 5 mL マイクロ波チューブにおいて、50 mmol の樹脂に、30 mg の HGI を固形物として加え、3 mL の 1,2 ジクロロエタンを加え、N<sub>2</sub> で 2 分間キャップスパージを行う。マイクロ波バイアルを Biotage マイクロ波に移し、100 °C で 1 時間加熱する。Bio-Rad チューブを用いて、樹脂を単離する。3 x 5 mL DMF、次いで 5 x 5 mL DCM で洗浄する。樹脂を切り出しにそのまま用いる。

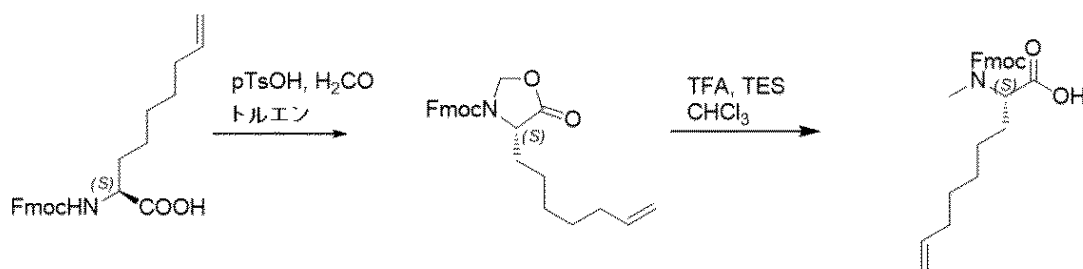
## 【0313】

(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)ノン-8-エン酸

50



## 【化 7】



20 mL バイアル中の (S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) ノン - 8 - エン酸 ( 360 mg、0.915 mmol ) に、トルエン ( 12 mL ) を加え、固体のパラホルムアルデヒド ( 165 mg、5.49 mmol )、および p - トルエンスルホン酸 ( 17.40 mg、0.091 mmol ) を加えた。20 mL のバイアルに、10 個のモレキュラー・シーブを加えた。バイアルに栓をして、110 で 6 時間加熱し、次いで室温に冷却した。シーブを珪藻土 ( セライト ( 登録商標 ) ) のプラグを介した濾過によって除去し、ジクロロメタンで洗浄した。溶媒を真空で留去し、淡黄色の油状物を得た。

## 【 0 3 1 4 】

粗製の (S) - ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 4 - ( ヘプト - 6 - エン - 1 - イル ) - 5 - オキソオキサゾリジン - 3 - カルボキシレート、CHCl<sub>3</sub> ( 4.80 mL )、TFA ( 4.80 mL )、およびトリエチルシラン ( 0.438 mL、2.74 mmol ) で処理した。室温で 2 時間攪拌し、次いで溶媒を留去して、黄色の油状物を得た。

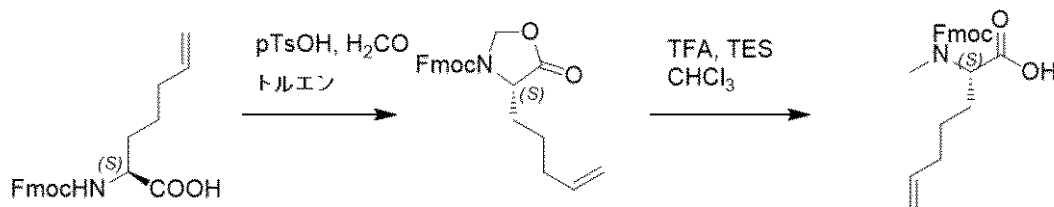
## 【 0 3 1 5 】

粗製の油状物を、20 mL の THF および 10 mL の水に溶解させ、0.1% TFA を含む、0 から 100% の水から、0.1% TFA を含む、アセトニトリル溶液の 15 分の勾配、15 x 2 mL の注入を用いた、Luna C18 30 x 100 カラムにおいて、逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。目的の画分を合わせて、凍結させ、凍結乾燥させて、0.67 グラムを得た。LCMS 条件 D: 保持時間 1.79 分 408.5 M+1。

## 【 0 3 1 6 】

(S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) ( メチル ) アミノ ) ヘプト - 6 - エン酸

## 【化 8】



20 mL バイアル中の (S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) ヘプト - 6 - エン酸 ( 2.5 g、6.84 mmol ) に、トルエン ( 30 mL )、次いでパラホルムアルデヒド ( 1.233 g、41.0 mmol )、および p - トルエンスルホン酸 ( 0.130 g、0.684 mmol ) を加えた。混合物に 5 個のモレキュラー・シーブを加えた。反応液を次いで 6 時間にわたり 110 に加熱し、室温に冷却した。シーブを珪藻土 ( セライト ( 登録商標 ) ) を介した濾過によって除去し、パッドを 30 mL ジクロロメタンで洗浄した。溶媒を真空で流去し、黄色の油状物を得た。

## 【 0 3 1 7 】

粗製の黄色の油状物、(S) - ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 5 - オキソ - 4 - ( ペント - 4 - エン - 1 - イル ) オキサゾリジン - 3 - カルボキシレート、CHCl<sub>3</sub>

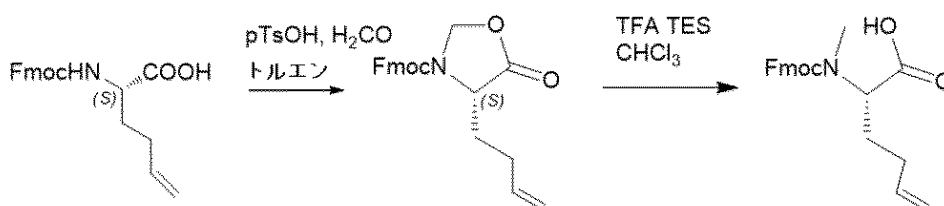
3 ( 1 2 . 0 0 m l )、T F A ( 1 2 . 0 0 m l )、およびトリエチルシラン ( 3 . 2 8 m l、2 0 . 5 2 m m o l ) で処理した。混合物を室温で2時間攪拌し、溶媒を留去して、油状物を得た。粗製の油状物を3 0 m L テトラヒドロフランおよび1 2 m L 水に溶解させ、3 0 × 1 0 0 C 1 8 L u n a カラム 1 5 分にわたり、0 から1 0 0 の0 . 1 % T F A を含む水から0 . 1 % T F A を含む、アセトニトリルで、2 2 × 2 m L 注入によって精製した。目的の画分を合わせて、凍結し、凍結乾燥して、1 . 8 4 3 グラムの固形物を得た。LCMS条件D: 保持時間 1.07分 380.4 (M+1); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 12.76 (br. s., 1H), 7.97 - 7.77 (m, 2H), 7.73 - 7.53 (m, 2H), 7.49 - 7.25 (m, 4H), 5.84 - 5.71 (m, 1H), 5.06 - 4.90 (m, 2H), 4.51 (dd, J=11.1, 4.6 Hz, 1H), 4.44 - 4.24 (m, 4H), 2.78 - 2.64 (m, 3H), 2.09 - 1.92 (m, 3H), 1.87 - 1.63 (m, 3H), 1.62 - 1.54 (m, 1H), 1.26 (quin, J=7.5 Hz, 2H), 1.20 - 0.94 (m, 1H)。

10

## 【0318】

(S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) ( メチル ) アミノ ) ヘキサ - 5 - エン酸

## 【化9】



20

2 0 m L バイアル中の ( S ) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) ヘキサ - 5 - エン酸 ( 1 5 0 0 m g、4 . 2 7 m m o l ) に、トルエン ( 2 4 m L )、次いでパラホルムアルデヒド ( 7 6 9 m g、2 5 . 6 m m o l )、および p - トルエンスルホン酸 ( 8 1 m g、0 . 4 2 7 m m o l ) を加えた。混合物に10個のモレキュラー・シーブを加えた。反応液を6時間にわたり、1 1 0 ° に加熱し、次いで室温に冷却した。シーブを、珪藻土 ( セライト ( 登録商標 ) ) を介した濾過によって除去し、パッドを3 0 m L ジクロロメタンで洗浄した。溶媒を除去し、淡黄色の油状物を得た。

30

## 【0319】

CHCl<sub>3</sub> ( 9 . 6 0 m L ) 中の粗製の黄色の油状物、( S ) - ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 4 - ( ブト - 3 - エン - 1 - イル ) - 5 - オキソオキサゾリジン - 3 - カルボキシレート、T F A ( 9 . 6 0 m L ) およびトリエチルシラン ( 2 . 0 4 5 m l、1 2 . 8 1 m m o l ) で処理した。室温で2時間攪拌し、溶媒を真空で留去し、油状物を得た。

## 【0320】

粗製の油状物を、2 0 m L テトラヒドロフランおよび1 2 m L 水中に溶解させ、3 0 × 1 0 0 C 1 8 L u n a カラム 1 5 分にわたり0 から1 0 0 の0 . 1 % T F A を含む水から0 . 1 % T F A を含むアセトニトリルで、1 6 × 2 m L の注入によって精製した。目的の画分を合わせて、凍結させ、再び凍結乾燥して、固形物を得た ( 0 . 6 7 グラム )。LCMS条件D: 保持時間 1.02分 366.3 (M+1); 分析HPLC条件 G: 保持時間 = 13.22分 91%; 分析HPLC条件 H: 保持時間 = 12.25分 88%; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 12.97-12.63 (br, 1H), 7.99 - 7.81 (m, 2H), 7.78 - 7.54 (m, 2H), 7.52 - 7.24 (m, 4H), 5.90 - 5.61 (m, 1H), 5.13 - 4.84 (m, 2H), 4.52 - 4.22 (m, 4H), 2.83 - 2.63 (m, 3H), 1.98 - 1.74 (m, 4H)

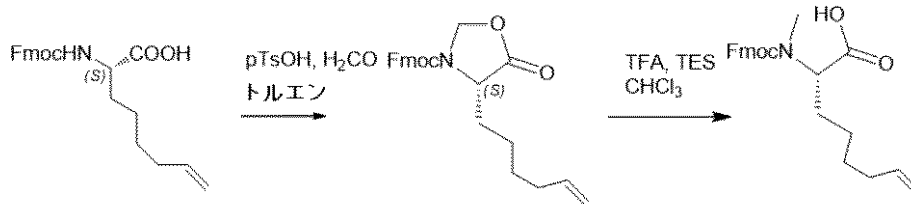
40

## 【0321】

(S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) ( メチル ) アミノ ) オクト - 7 - エン酸

50

## 【化 1 0】



20 mL バイアル中の (S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) オクト - 7 - エン酸 ( 1 . 5 g 、 3 . 9 5 m m o l ) に、トルエン ( 8 m L ) 、次いでパラホルムアルデヒド ( 0 . 7 1 2 g 、 2 3 . 7 2 m m o l ) 、 p - トルエンスルホン酸 ( 0 . 0 7 5 g 、 0 . 3 9 5 m m o l ) 、および 10 個のモレキュラー・シーブを加えた。バイアルに栓をし、反応液を 110 で 6 時間加熱し、室温に冷却した。シーブを珪藻土 ( セライト ( 登録商標 ) ) のプラグを介した濾過によって除去し、20 mL のジクロロメタンで洗浄し、溶媒を留去して、淡黄色の油状物を得た。

## 【 0 3 2 2】

黄色の油状物、(S) - ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 4 - ( ヘキサ - 5 - エン - 1 - イル ) - 5 - オキソオキサゾリジン - 3 - カルボキシレートに、CHCl<sub>3</sub> ( 3 . 2 0 m l ) 、 T F A ( 3 . 2 0 m l ) 、および最後にトリエチルシラン ( 1 . 8 9 4 m l 、 11 . 8 6 m m o l ) を加えた。反応液を室温で 2 時間攪拌し、溶媒を留去して、油状物を得た。

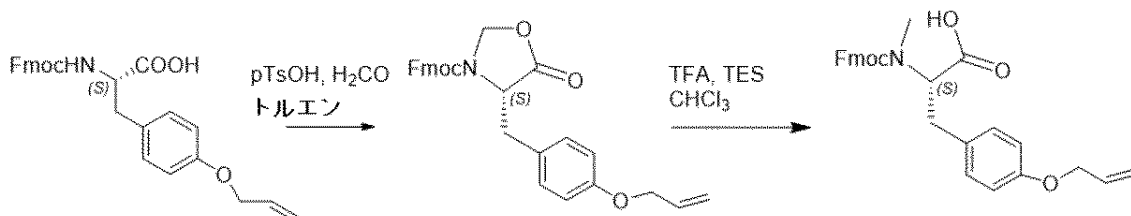
## 【 0 3 2 3】

油状物を 20 mL テトラヒドロフランおよび 12 mL 水に溶解させ、30 x 100 C 18 Phenomenex Luna 15 分にわたり、0 から 100 % の 0 . 1 % T F A を含むアセトニトリル / 調節剤として 0 . 1 % T F A を含む水、16 x 2 mL 注入で精製した。目的の画分を回収し、凍結させ、凍結乾燥して、0 . 8 8 グラムを得た。LCMS 条件 D : 保持時間 1.10 分 394.5 ( M + 1 ) 分析 HPLC 条件 G : 保持時間 14.3 分 90 % ; 分析 HPLC 条件 H : 保持時間 13.1 分 90 % 。 <sup>1</sup> H NMR ( 400 MHz , DMSO - d<sub>6</sub> ) 12.98 - 12.47 ( Br , 1 H ) , 8.04 - 7.76 ( m , 2 H ) , 7.76 - 7.56 ( m , 2 H ) , 7.56 - 7.34 ( m , 4 H ) , 5.78 ( ddt , J = 17.0 , 10.3 , 6.6 Hz , 1 H ) , 5.10 - 4.83 ( m , 2 H ) , 4.50 ( dd , J = 10.9 , 4.6 Hz , 1 H ) , 4.45 - 4.17 ( m , 2 H ) , 2.84 - 2.63 ( m , 2 H ) , 2.01 ( br . s . , 3 H ) , 1.85 - 1.66 ( m , 2 H ) , 1.64 - 1.55 ( m , 1 H ) , 1.42 - 1.05 ( m , 2 H ) , 1.25 - 1.06 ( m , 2 H ) 。

## 【 0 3 2 4】

( S ) - 2 - ( ( ( ( 9 H - 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 - ( アリルオキシ ) フェニル ) プロパン酸

## 【化 1 1】



40 mL バイアル中の ( S ) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) - 3 - ( 4 - ( アリルオキシ ) フェニル ) プロパン酸 ( 1 5 0 0 m g 、 3 . 3 8 m m o l ) に、トルエン ( 2 4 m L ) 、次いでパラホルムアルデヒド ( 6 0 9 m g 、 2 0 . 2 9 m m o l ) 、および p - トルエンスルホン酸 ( 6 4 . 3 m g 、 0 . 3 3 8 m m o l ) 、次いで 10 個のモレキュラー・シーブを加えた。反応液に栓をして、110 で 6 時間加熱し、室温に冷却し、シーブを珪藻土 ( セライト ( 登録商標 ) ) を介した濾過によって除去し、30 mL ジクロロメタンで洗浄し、溶媒を留去して、油状物を得

た。

【 0 3 2 5 】

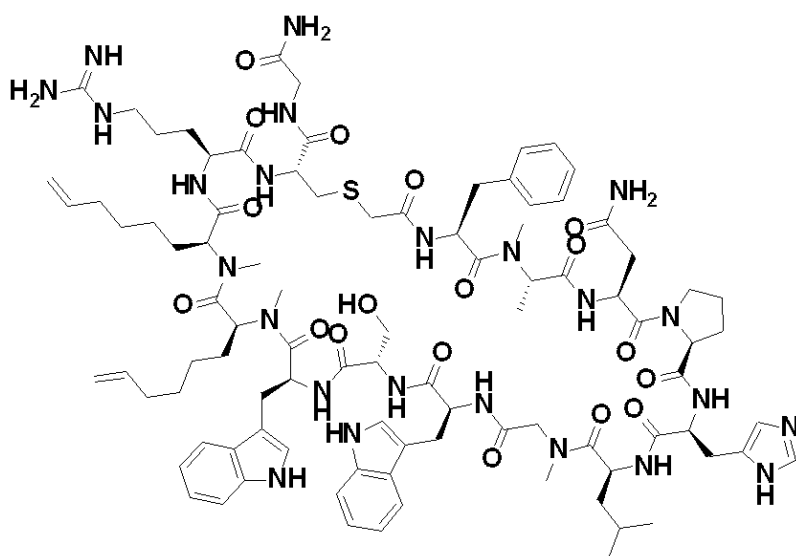
黄色の油状物、(S) - (9H - フルオレン - 9 - イル)メチル 4 - (4 - (アリルオキシ)ベンジル) - 5 - オキソオキサゾリジン - 3 - カルボキシレートを、クロロホルム (9.60 ml)、TFA (9.60 ml)、およびトリエチルシラン (1.621 ml、10.15 mmol) で処理した。溶媒を留去して、油状物を得て、これを30 mL ジクロロメタンに溶解させ、珪藻土 (セライト (登録商標)) を介して濾過した。ペード (pade) を20 mL ジクロロメタンで洗浄し、溶媒を留去して、粗生成物を得て、これを120 g のシリカ Isco (120 g のゴールドカラム)、ヘキサンから酢酸エチルの勾配で精製して、0.582 g の白色の固形物を得た。LCMS条件D: 保持時間 1.10分 394.5 (M+1); 分析HPLC条件 G: 保持時間 14.3分 90%; 分析HPLC条件 H: 保持時間 13.1分 90%

10

【 0 3 2 6 】

R C MオープンAの合成

【 化 1 2 】



20

30

25 mL ポリプロピレン固相反応容器に、シーバー樹脂 (140 mg、0.100 mmol) を加え、反応容器をシンフォニーペプチド合成器に設置した。以下の手順を次いで、順に行った:

「シンフォニー方法A: 樹脂膨潤手順」を行った;

「シンフォニー方法A: 標準的カップリング手順」をFmoc-Gly-OHで行った;

「シンフォニー方法A: 標準的カップリング手順」をFmoc-Cys(Trt)-OHで行った;

「シンフォニー方法A: 二級アミンカップリング手順」をFmoc-Arg(Pbf)-OHで行った;

40

「シンフォニー方法A: 標準的カップリング手順」を(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)オクト - 7 - エン酸で行った;

「シンフォニー方法A: 二級アミンカップリング手順」を(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)オクト - 7 - エン酸で行った;

「シンフォニー方法A: 二級アミンカップリング手順」をFmoc-Trp(Boc)-OHで行った;

「シンフォニー方法A: 標準的カップリング手順」をFmoc-Ser(tBu)-OHで行った;

50

「シンフォニー方法 A：標準的カップリング手順」を Fmoc-Trp(Boc)-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：標準的カップリング手順」を Fmoc-[N-Me]Gly-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：二級アミンカップリング手順」を Fmoc-Leu-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：標準的カップリング手順」を Fmoc-His(Trt)-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：標準的カップリング手順」を Fmoc-Pro-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：二級アミンカップリング手順」を Fmoc-Asn(Trt)-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：標準的カップリング手順」を Fmoc-[N-Me]Ala-OH で行った；

「シンフォニー方法 A：二級アミンカップリング手順」を Fmoc-Phe-OH で行った；

「クロロアセチルクロライドカップリング手順 B」を行った；

「一般的な脱保護方法 C」を行った；

「環化方法 D」を行った。

【0327】

粗製物質は、以下の条件を用いて、分取 LC によって精製した：

カラム：Phen Luna Axia C18 30\*250mm；

移動相 A：95% H<sub>2</sub>O / 5% ACN / 0.05% TFA；移動相 B：95：5% H<sub>2</sub>O / 95% ACN / 0.05% TFA；勾配 30 分で 10% - 100% の勾配、30 ml / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。

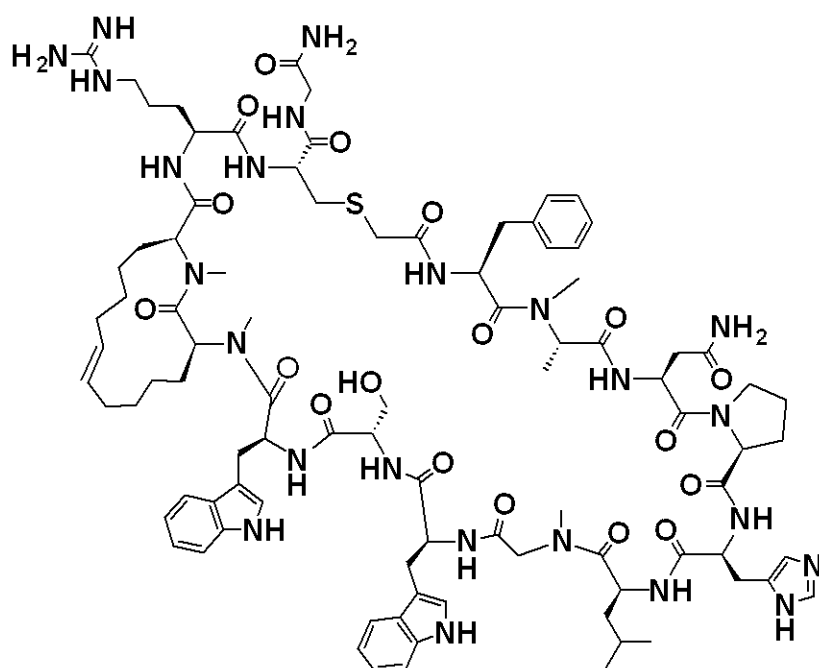
生成物の収量は 15 mg であった。

分析 HPLC 条件 I：保持時間 = 14.982 分；ESI-MS(+) m/z 953.1 (M+2H)

【0328】

実施例 1001 の合成

【化 13】



実施例 RCM オープン A (12 mg、6.30 μmol) を、DCE (8 ml) に溶解させた。ホヴェイダ-グラブス触媒第二世代 (0.790 mg、1.260 μmol) の DCE (0.5 mL) 中の溶液を、次いで加えた。溶液をアルゴンで 5 分間パージし、次

いで72 で一晩加熱し、この時LC-MSによって完全な変換が示された。粗製物質を以下の条件で分取LCによって精製した：

カラム：Phen Luna Axia C18 30 \* 250 mm；

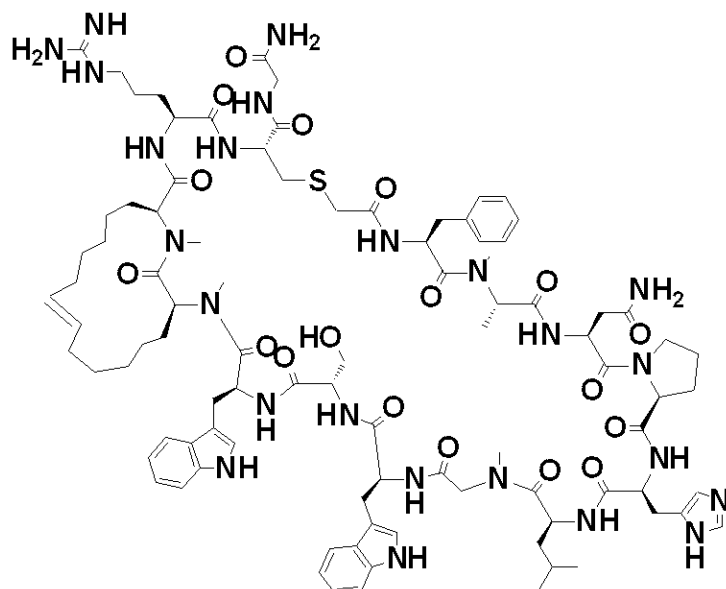
移動相A：95% H<sub>2</sub>O / 5% ACN / 0.05% TFA；移動相B：95 : 5% H<sub>2</sub>O / 95% ACN / 0.05% TFA；勾配 30分で10% - 100%の勾配、30 ml / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は3.8 mgであった。

分析HPLC条件 I： 保持時間 = 14.137 分；ESI-MS(+) m/z 939.4 (M+2H)

【0329】

実施例1002の合成

【化14】



実施例1002は、以下の一般的な手順から成る、RCMオープンAの合成について記載された一般的な合成手順によって合成した：「シンフォニー方法A：樹脂膨潤手順」、  
「シンフォニー方法A：標準的カップリング手順」、「シンフォニー方法A：二級アミンカップリング手順」、「クロロ酢酸カップリング手順B」、「一般的な脱保護方法C」、および「環化方法D」。得られた化合物をDCE (8 ml) に溶解した。ホヴェイダ-グラブス触媒第二世代 (0.790 mg、1.260 μmol) の、DEM (0.5 mL) 中の溶液を次いで加えた。溶液を5分間アルゴンでパージし、次いで72 で一晩加熱し、その時LC-MSによって完全な変換が示された。粗製物質を以下の条件で分取LCによって精製した：カラム：Phen Luna Axia C18 30 \* 250 mm；移動相A：95% H<sub>2</sub>O / 5% ACN / 0.05% TFA；移動相B：95 : 5% H<sub>2</sub>O / 95% ACN / 0.05% TFA；勾配 30分にわたり10% - 100%の勾配、30 ml / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は0.7 mgであった。

分析HPLC条件 I： 保持時間 = 14.661 分；ESI-MS(+) m/z 953.5 (M+2H)

【0330】

実施例1100の合成

10

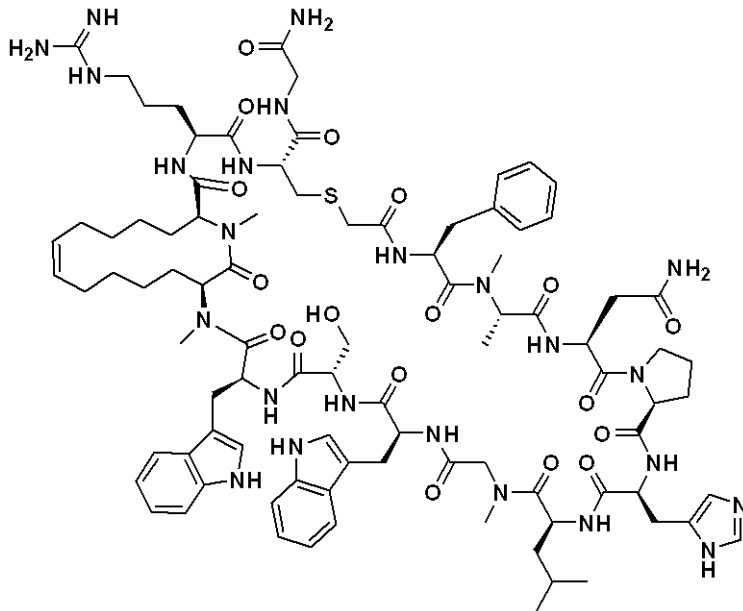
20

30

40

50

## 【化 15】



10

50 mL ポリプロピレンコニカルチューブに、Rink アミド樹脂 (166 mg、0.06 mmol) を加え、反応容器を CEM ペプチド合成器に設置した。以下の手順を次いで、順に行った：

20

「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」を行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-Gly-OH で行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-Cys(Trt)-OH で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-Arg(Pbf)-OH を行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を (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)オクト-7-エン酸で行った；

30

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を (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)オクト-7-エン酸で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-Trp(Boc)-OH で行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-Ser(tBu)-OH で行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-Trp(Boc)-OH で行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-[N-Me]Gly-OH で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-Leu-OH で行った；

40

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-His(Trt)-OH で行った；

「CME 方法 A：シングルカップリング手順」を Fmoc-Pro-OH で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-Asn(Trt)-OH で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-[N-Me]Ala-OH で行った；

「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」を Fmoc-Phe-OH で行った；

「クロロアセチルクロライドカップリング手順 B」を行った；

「閉環メタセシス手順」を行った；

50

「一般的な脱保護方法 C」を行った；  
「環化方法 D」を行った。

【0331】

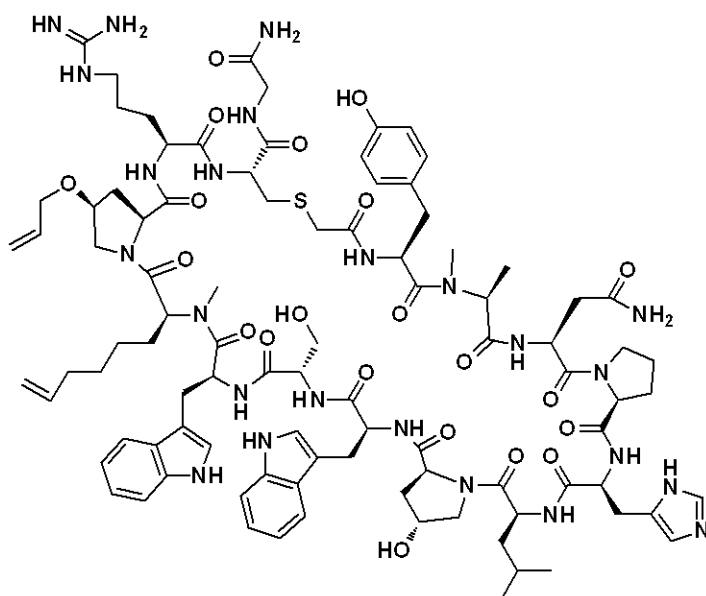
粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 50 - 90 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.3 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 99 % であった。分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.94 分；ESI-MS(+) m/z 938.9 (M+2H)。分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 3.02 分；ESI-MS(+) m/z 939.6 (M+2H)。

10

【0332】

実施例 RCM オープン B の合成

【化 16】



20

30

実施例 RCM オープン B は、以下の一般的な手順から成る、RCM オープン A の合成方法について記載される一般的な合成手順に従って Rink 樹脂で合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：Waters X Bridge C18、19 x 250 mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：25 分にわたり 10 - 60 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。目的の収量は 1.8 mg

40

分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.33 分；ESI-MS(+) m/z 981.8 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.29 分；ESI-MS(+) m/z 982.2 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：981.4776 (M+2H) 観測値：981.4764 (M+2H)

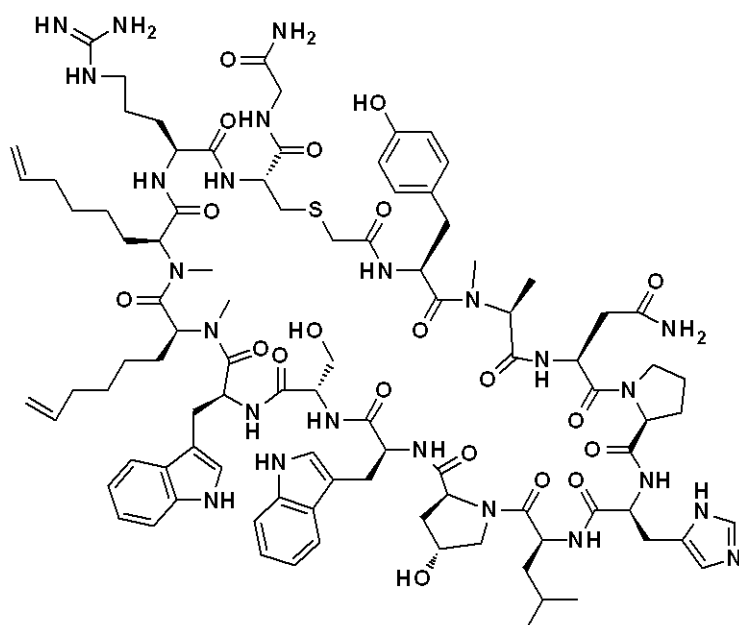
【0333】

実施例 RCM オープン C の合成

50



## 【化 17】



10

実施例 R C M オープン C は、以下の一般的な手順から成る、R C M オープン A の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：W a t e r s X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 5 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：2 5 分にわたり 1 5 - 6 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 0 . 9 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 7 % であった。

20

分析 L C M S 条件 D：保持時間 = 1.64 分；ESI-MS(+) m/z 981.9 (M+2H)。

30

分析 L C M S 条件 E：保持時間 = 1.58 分；ESI-MS(+) m/z 982.1 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：981.4958(M+2H) 観測値：981.4942(M+2H)

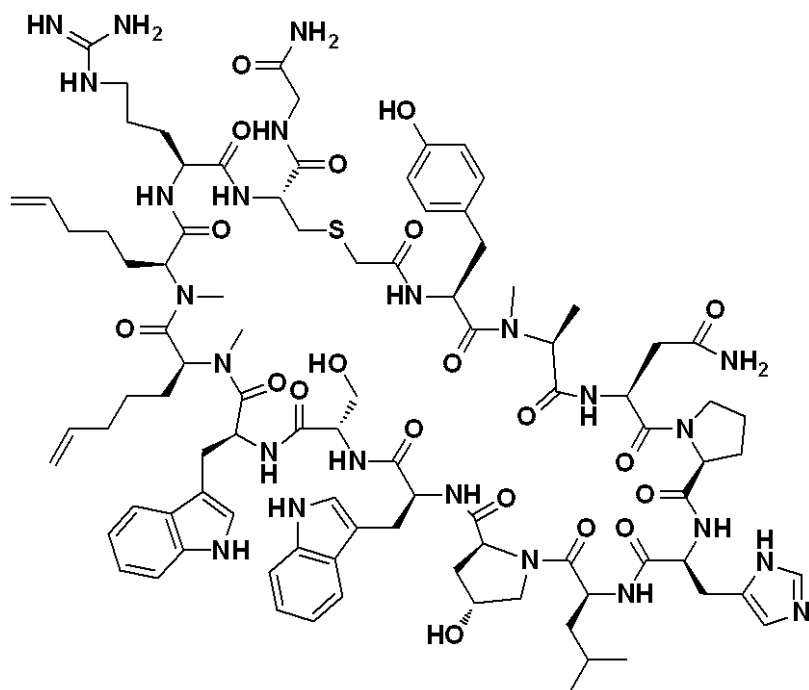
## 【0334】

実施例 R C M オープン D の合成

40

50

## 【化 18】



10

20

実施例 R C M オープン D は、以下の一般的な手順から成る、R C M オープン A の製造について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：W a t e r s X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 5 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：2 5 分にわたり 1 5 - 6 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 4

30

．8 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 5 % であった。

分析 L C M S 条件 D：保持時間 = 1.50 分；ESI-MS(+) m/z 967.9 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 E：保持時間 = 1.44 分；ESI-MS(+) m/z 968.0 (M+2H)。

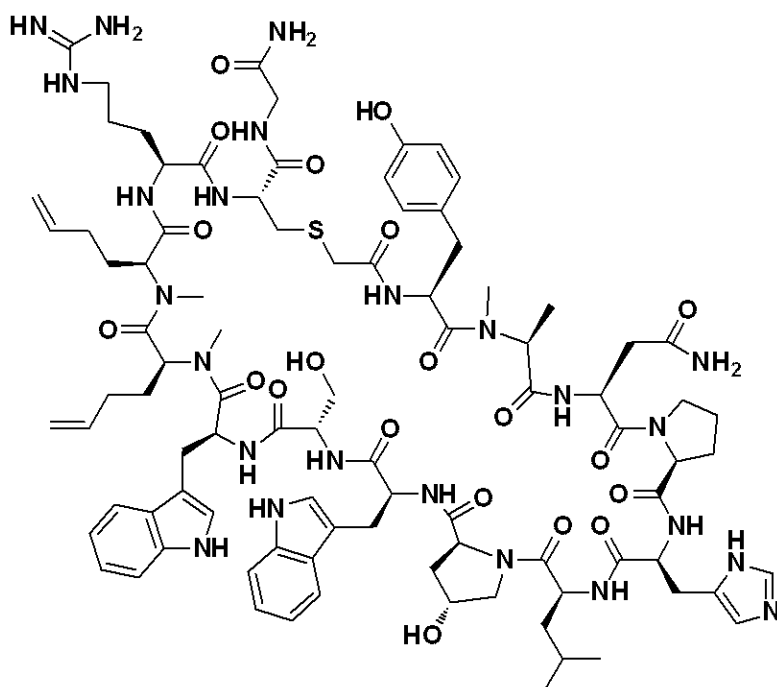
## 【0335】

実施例 R C M オープン E の合成

40

50

## 【化 19】



実施例 R C M オープン E は、以下の一般的な手順から成る、R C M オープン A の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：W a t e r s X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 5 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：2 5 分にわたり 1 0 - 6 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 6

分析 L C M S 条件 D：保持時間 = 1.38 分；ESI-MS(+) m/z 953.9 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 E：保持時間 = 1.32 分；ESI-MS(+) m/z 953.7 (M+2H)。

## 【0336】

実施例 1101 の合成

10

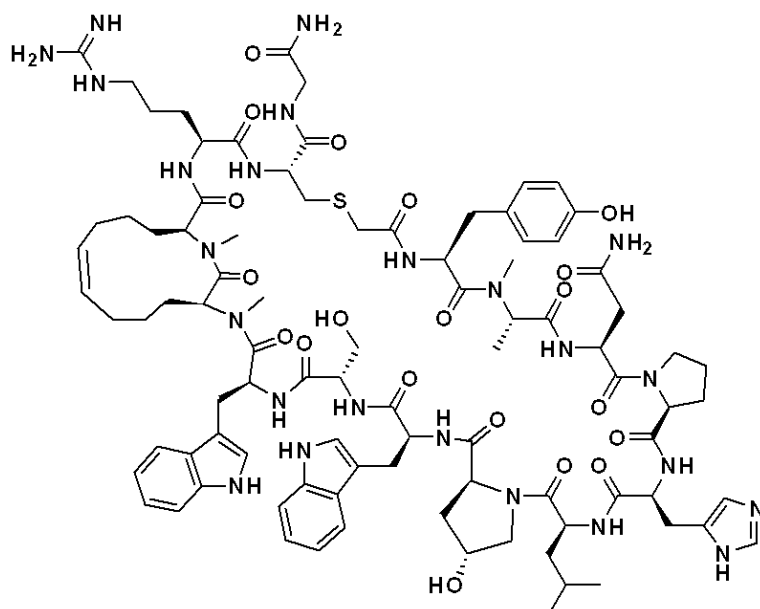
20

30

40

50

## 【化 2 0】



10

実施例 1 1 0 1 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：3 0 分にわたり 3 5 - 7 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2 . 6 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 6 % であった。

20

分析 L C M S 条件 H: 保持時間 = 1.35 分; ESI-MS(+) m/z 955.8 (M+2H)。

30

分析 L C M S 条件 I: 保持時間 = 1.60 分; ESI-MS(-) m/z 952.6 (M+2H)。

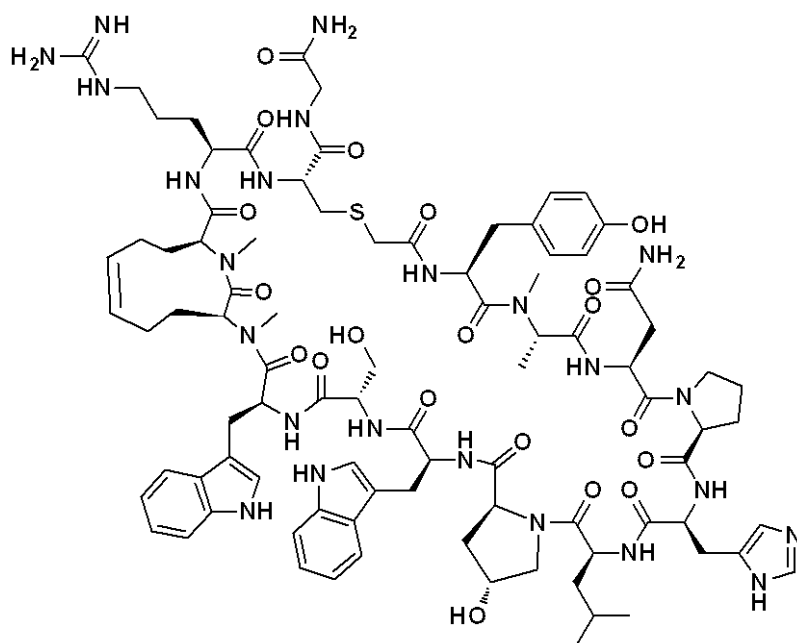
## 【 0 3 3 7】

## 実施例 1 1 0 2 の合成

40

50

## 【化 2 1】



10

実施例 1102 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について気足された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：XBridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり、25 - 70 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 5.0 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 96 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.26 分；ESI-MS(+) m/z 939.9 (M+2H)。

30

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.56 分；ESI-MS(+) m/z 939.9 (M+2H)。

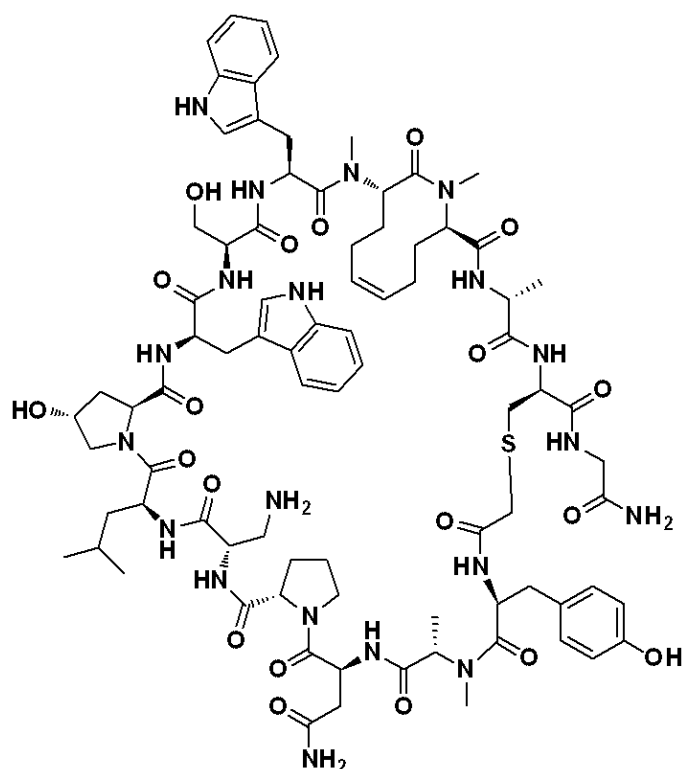
## 【0338】

実施例 1103 の合成

40

50

## 【化 2 2】



実施例 1103 は、以下の一般的な方法から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成方法に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：Waters XBridge C18、19 × 250 mm、5 μm 粒子；移動相 A：0.1% トリフルオロ酢酸を含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：0.1% トリフルオロ酢酸を含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：25 分にわたり、0 - 50% B、次いで 5 分間、100% B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2.8 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 98% であった。

分析 LCMS 条件 D：保持時間 = 1.23 分；ESI-MS(+) m/z 872.1 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 E：保持時間 = 1.23 分；ESI-MS(+) m/z 871.9 (M+2H)。

## 【0339】

実施例 1104 の合成

10

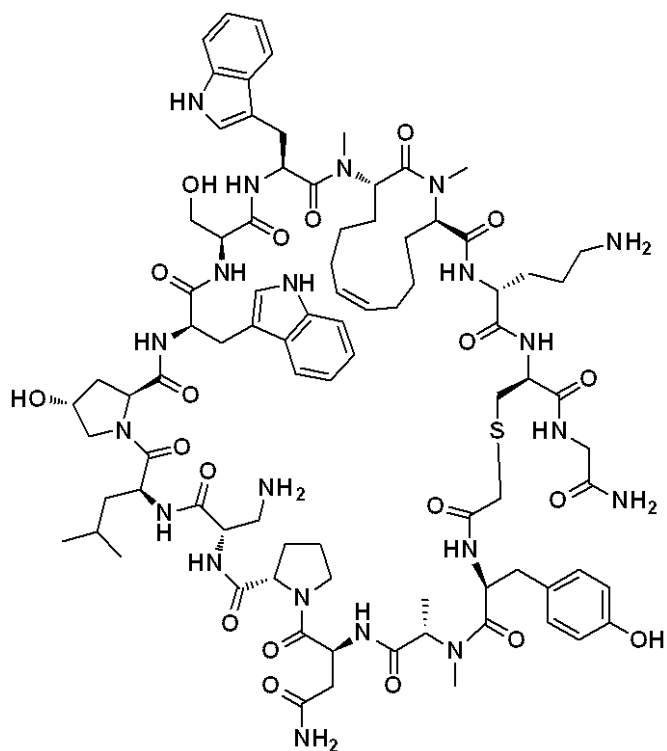
20

30

40

50

## 【化 2 3】



実施例 1104 は、以下の一般的な合成方法から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A : 樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A : シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A : ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 F」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5 : 95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95 : 5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり、45 - 85 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 7 . 6 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 100 % であった。

分析 L C M S 条件 H: 保持時間 = 1.23 分; ESI-MS(+) m/z 907.2 (M+2H)。  
 分析 L C M S 条件 I: 保持時間 = 2.51 分; ESI-MS(+) m/z 907.2 (M+2H)。

## 【 0 3 4 0】

実施例 1105 の合成

10

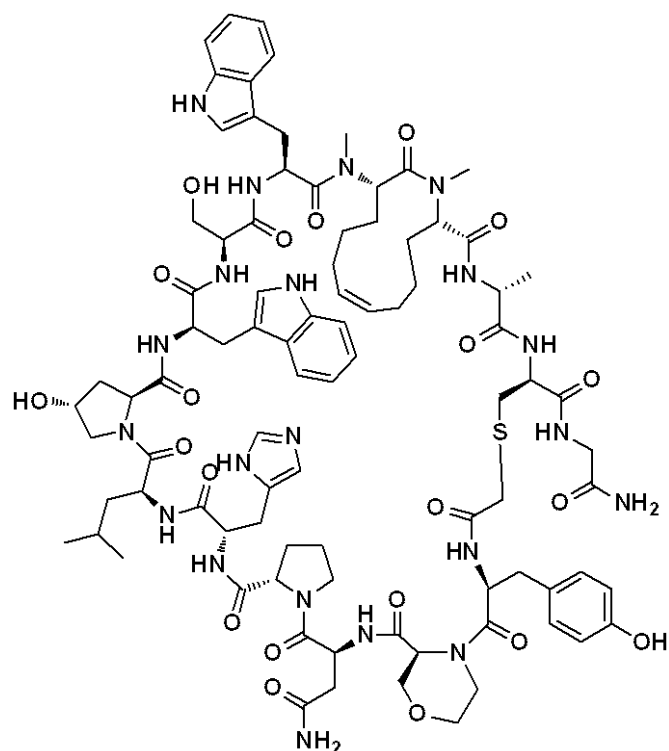
20

30

40

50

## 【化 2 4】



実施例 1105 は、以下の一般的な合成手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A : 樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A : シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A : ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 F」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 40 - 80 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 6 . 7 mg であり、L C M S 解析によって推定した純度は 97 % であった。

分析 L C M S 条件 H: 保持時間 = 1.35 分; ESI-MS(+) m/z 926.2 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I: 保持時間 = 2.43 分; ESI-MS(+) m/z 925.2 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z: 計算値: 924.9300(M+2H) 観測値: 924.9290(M+2H)

## 【 0 3 4 1】

実施例 1106 の合成

10

20

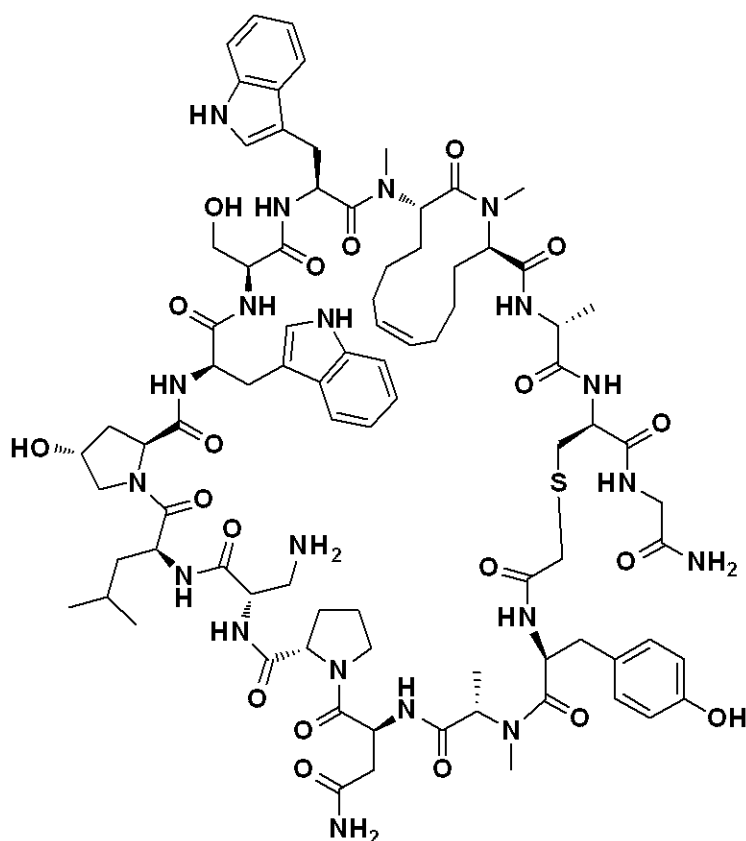
30

40

50



## 【化 2 5】



実施例 1106 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 F」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：XBridge C18、19 x mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり、35 - 75 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：XBridge C18、19 x 200 mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 40 - 85 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2.3 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 97 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.45 分；ESI-MS(+) m/z 885.8 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.86 分；ESI-MS(+) m/z 885.9 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：885.4270 (M+2H)；観測値：885.4264 (M+2H)

## 【0342】

実施例 1107 の合成

10

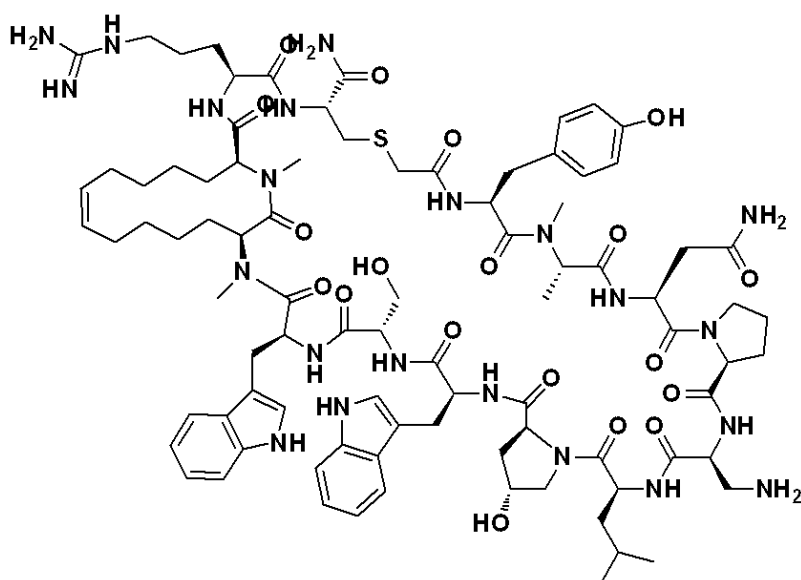
20

30

40

50

## 【化 2 6】



10

実施例 1107 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成方法に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 F」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 45 - 85 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.0 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.55 分；ESI-MS(+) m/z 914.8 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.57 分；ESI-MS(+) m/z 915.2 (M+2H)。

30

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：913.4640 (M+2H)；観測値：913.4623 (M+2H)

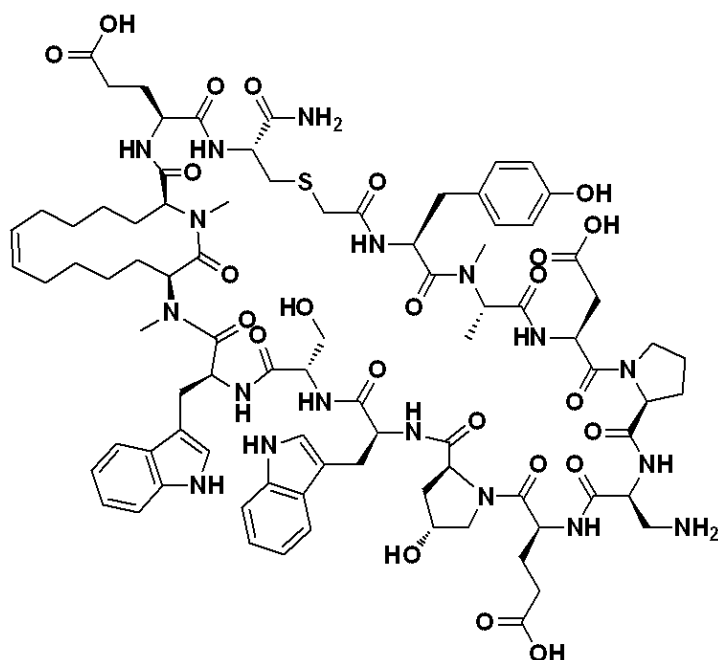
## 【0343】

実施例 1108 の合成

40

50

## 【化 2 7】



10

実施例 1108 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 F」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：XBridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり、40 - 80 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.9 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.55 分；ESI-MS(+) m/z 909.2 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.48 分；ESI-MS(+) m/z 909.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：908.4060(M+2H)；観測値：908.4044(M+2H)

30

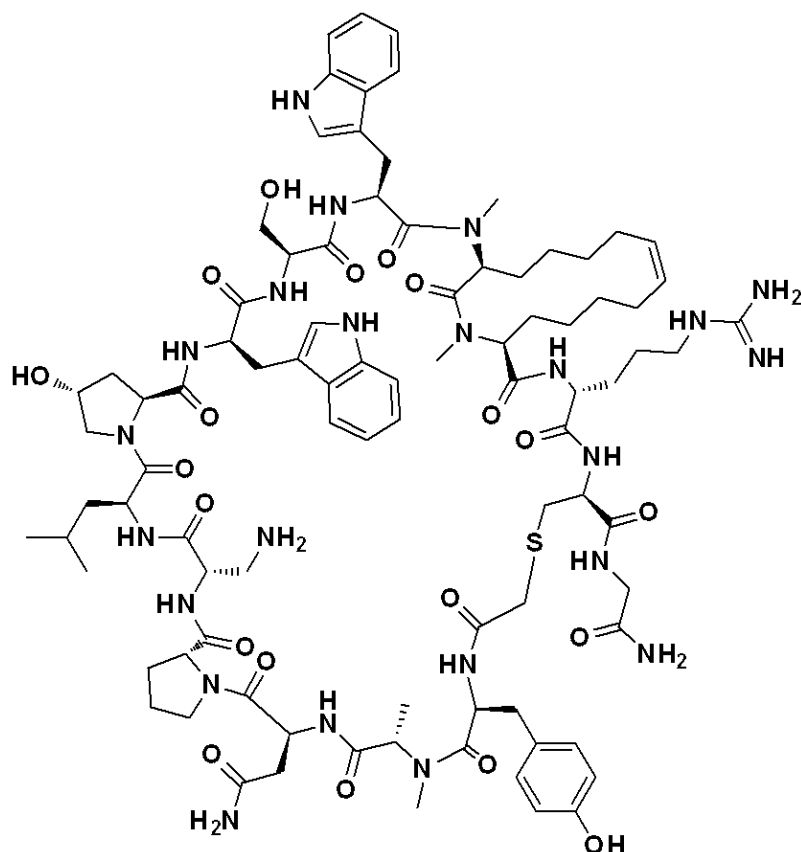
## 【0344】

実施例 1109 の合成

40

50

## 【化 2 8】



10

20

実施例 1109 は、以下の一般的な方法から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：XBridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 45 - 85 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 3.7 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

30

分析 LCMS 条件 H: 保持時間 = 1.47 分; ESI-MS(+) m/z 942.3 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I: 保持時間 = 2.83 分; ESI-MS(+) m/z 942.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z: 計算値: 941.9747 (M+2H); 観測値: 941.9728 (M+2H)

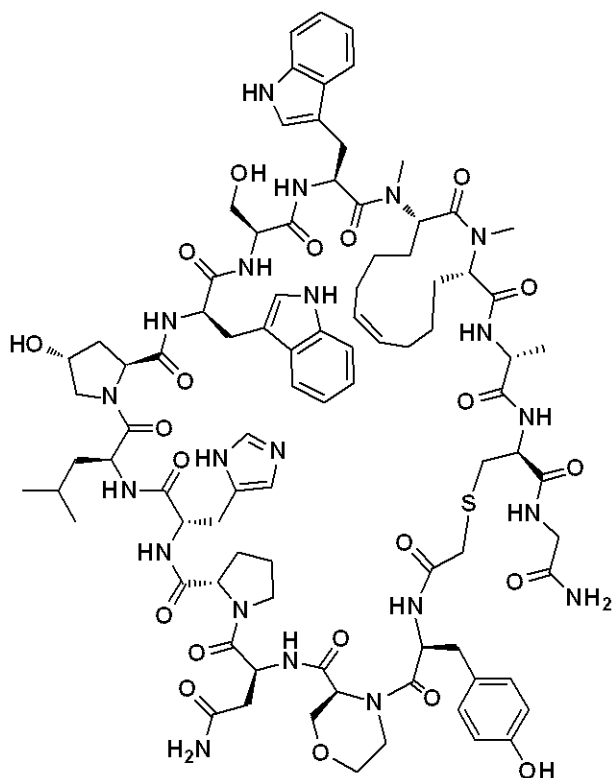
## 【0345】

実施例 1110 の合成

40

50

## 【化 2 9】



実施例 1110 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 45 - 85 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 5 - 45 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2.3 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.46 分；ESI-MS(+) m/z 924.9 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.91 分；ESI-MS(+) m/z 925.2 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：924.9300 (M+2H)；観測値：924.9273 (M+2H)

## 【0346】

実施例 1111 の合成

10

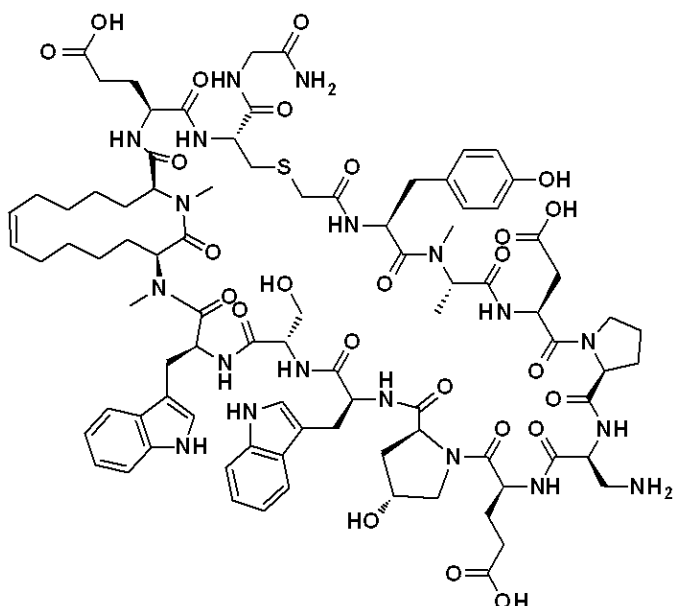
20

30

40

50

## 【化 3 0】



10

実施例 1 1 1 1 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：2 0 分にわたり 4 0 - 8 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件によって、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり 1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2 . 6 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 7 % であった。

20

30

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.66 分；ESI-MS(+) m/z 942.0 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.80 分；ESI-MS(+) m/z 943.6 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：936.9154(M+2H)；観測値：936.9167(M+2H)

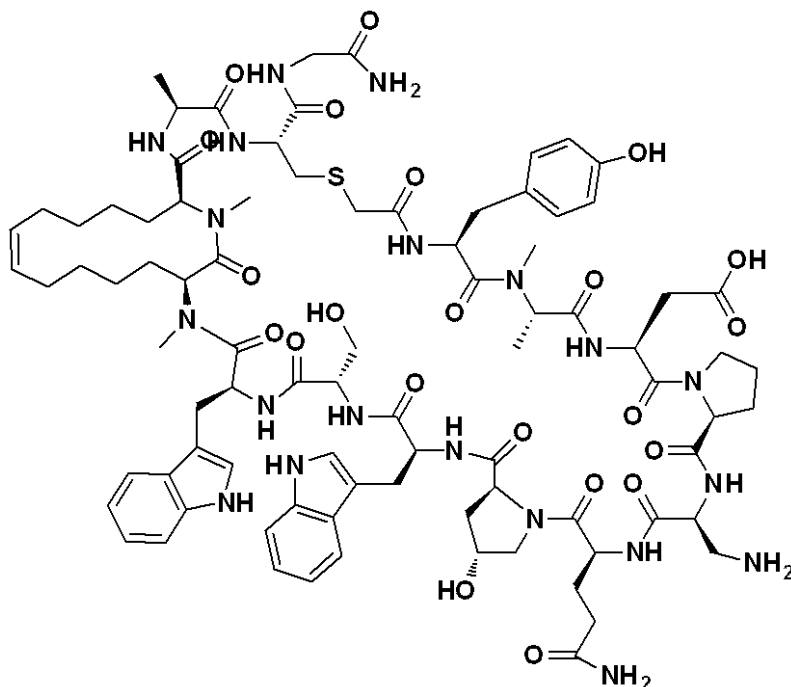
## 【 0 3 4 7】

実施例 1 1 1 2 の合成

40

50

## 【化 3 1】



実施例 1 1 1 2 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された、一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：3 0 分にわたり 4 5 - 8 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：2 0 分にわたり 1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 9 . 0 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 1 0 0 % であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.54 分；ESI-MS(+) m/z 908.3 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.65 分；ESI-MS(+) m/z 908.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：907.4220(M+2H)；観測値：907.4199(M+2H)

## 【 0 3 4 8】

実施例 1 1 1 3 の合成

10

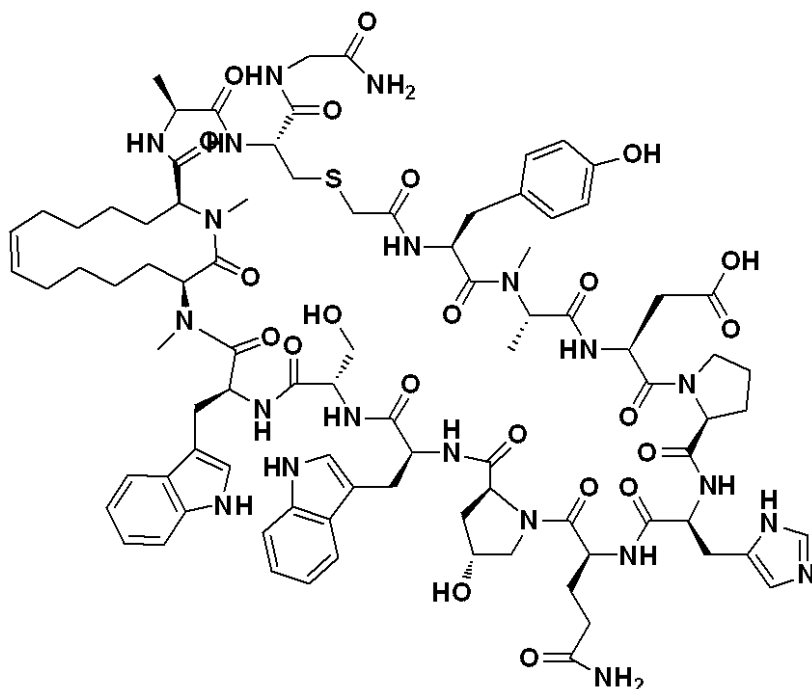
20

30

40

50

## 【化 3 2】



実施例 1 1 1 3 は、以下の一般的な合成手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：20 分にわたり、40 - 80 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり、10 - 50 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2 . 5 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

分析 LCMS 条件 H: 保持時間 = 1.54 分; ESI-MS(+) m/z 933.4 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I: 保持時間 = 3.01 分; ESI-MS(+) m/z 933.4 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z: 計算値: 932.9274(M+2H); 観測値: 932.9261(M+2H)

## 【 0 3 4 9】

実施例 1 1 1 4 の合成

10

20

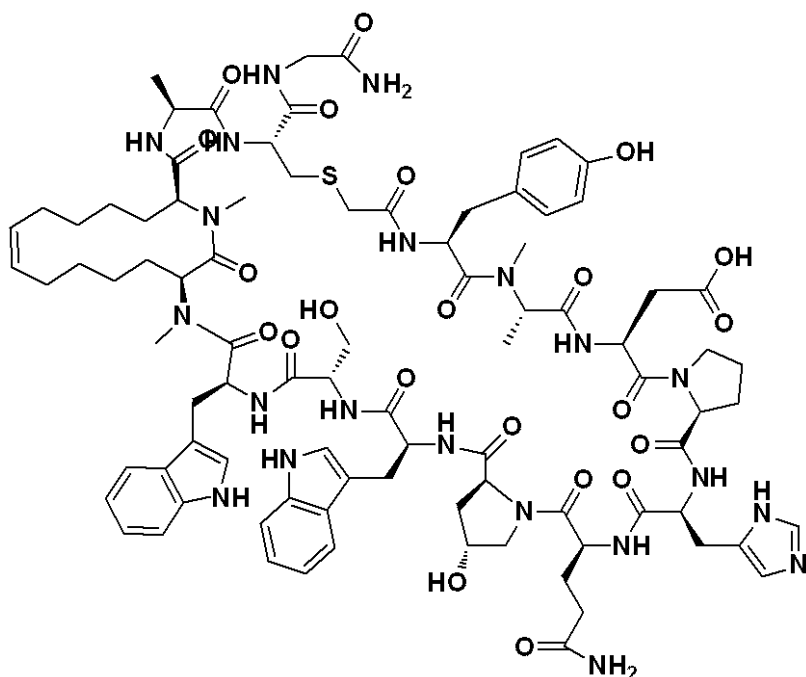
30

40

50



## 【化 3 3】



実施例 1 1 1 4 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：2 0 分にわたり 4 0 - 8 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件

を用いて、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり 1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 5 . 4 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 1 0 0 % であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.56 分；ESI-MS(+) m/z 933.4 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 3.03 分；ESI-MS(+) m/z 933.4 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：932.9274(M+2H)；観測値：932.9263(M+2H)

## 【 0 3 5 0】

実施例 1 1 1 5 の合成

10

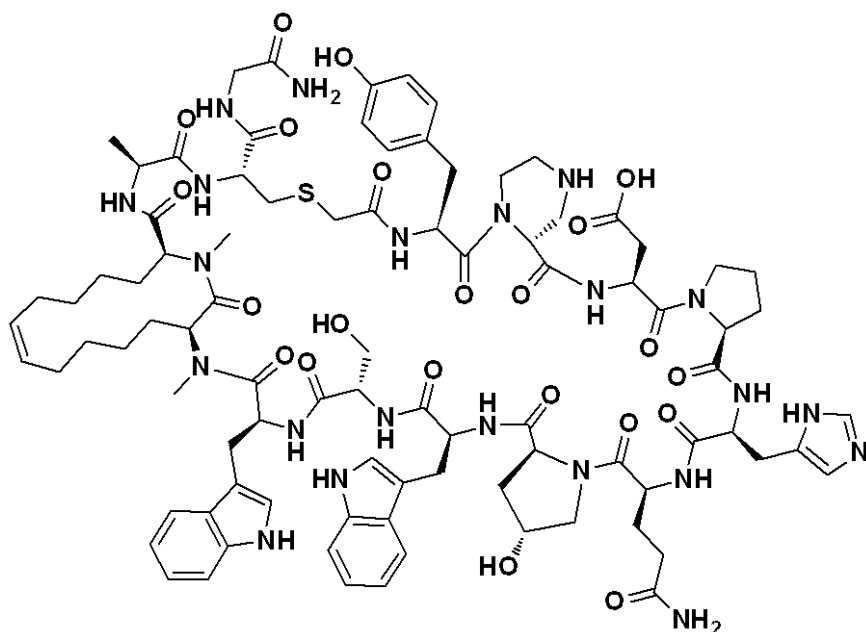
20

30

40

50

## 【化 3 4】



実施例 1 1 1 5 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり 5 - 4 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 8 . 3 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 8 % であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.41 分；ESI-MS(+) m/z 947.3 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.59 分；ESI-MS(+) m/z 947.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：946.4329(M+2H)；観測値：946.4296(M+2H)

## 【 0 3 5 1】

実施例 1 1 1 6 の合成

10

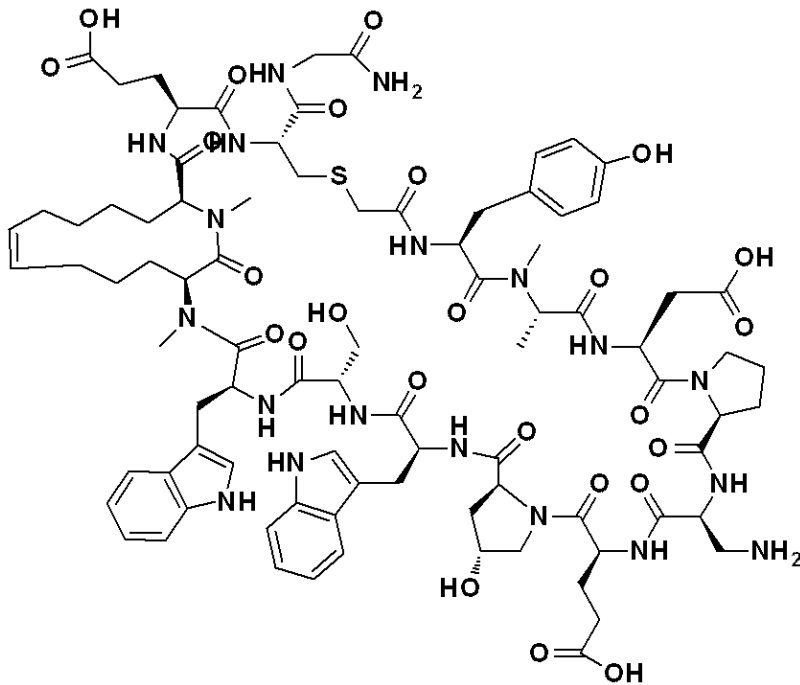
20

30

40

50

## 【化 3 5】



実施例 1 1 1 6 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：3 0 分にわたり 2 5 - 7 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥した。生成物の収量は 1 0 . 6 m g

であり、L C M S 解析によって推定した純度は 1 0 0 % であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.46 分；ESI-MS(+) m/z 930.1 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.84 分；ESI-MS(+) m/z 930.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：929.9097(M+2H)；観測値：929.9097(M+2H)

## 【 0 3 5 2】

実施例 1 1 1 7 の合成

10

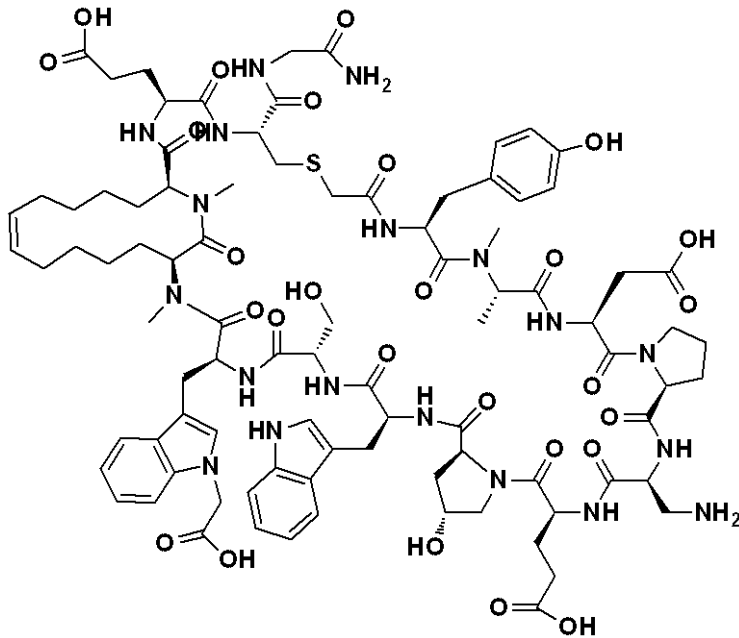
20

30

40

50

## 【化 3 6】



10

実施例 1 1 1 7 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 35 - 75 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 0 - 40 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 5.5 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 98 % であった。

20

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.46 分；ESI-MS(+) m/z 966.5 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.84 分；ESI-MS(+) m/z 966.6 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：965.9195(M+2H)；観測値：965.9173(M+2H)

30

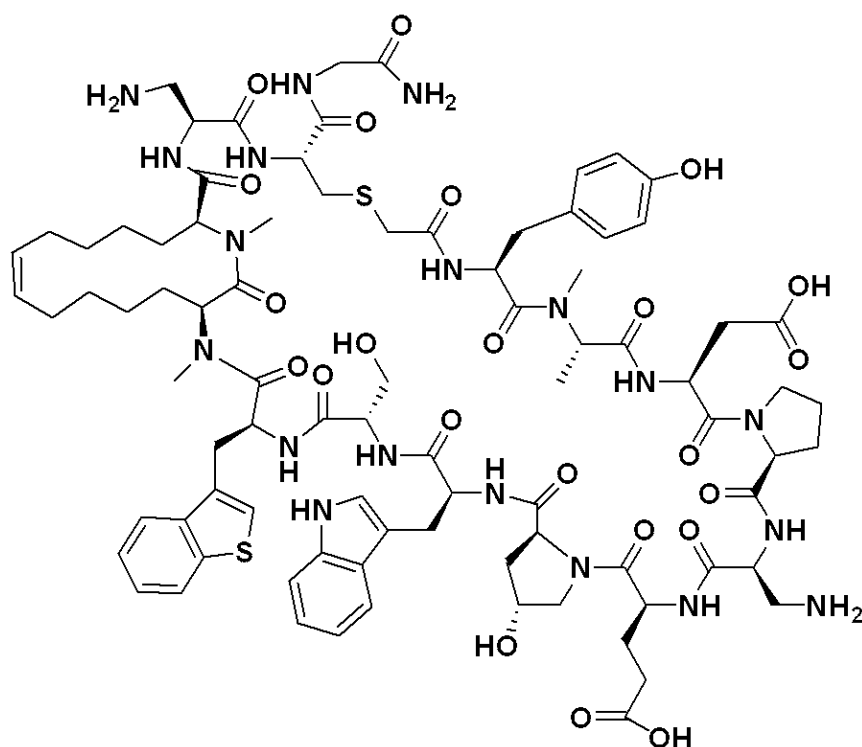
## 【 0 3 5 3】

実施例 1 1 1 8

40

50

## 【化 3 7】



実施例 1118 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成方法に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 10 - 50 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 15 - 55 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 15 - 55 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 4.4 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 100 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.69 分；ESI-MS(+) m/z 924.0 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 3.31 分；ESI-MS(+) m/z 924.4 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：923.9000 (M+2H)；観測値：923.8970 (M+2H)

## 【0354】

実施例 1119 の合成

10

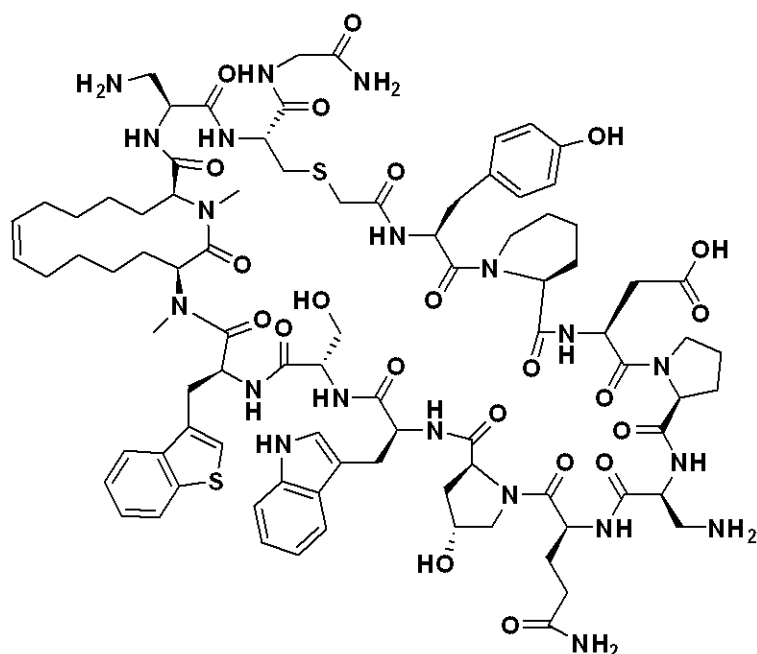
20

30

40

50

## 【化 3 8】



実施例 1119 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 メタノール：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 メタノール：水；勾配：30 分にわたり 40 - 80 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.5 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 88 % であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.73 分；ESI-MS(+) m/z 937.2 (M+2H)。

分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.96 分；ESI-MS(+) m/z 937.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：936.4158(M+2H)；観測値：936.4139(M+2H)

## 【0355】

実施例 1120 の合成

10

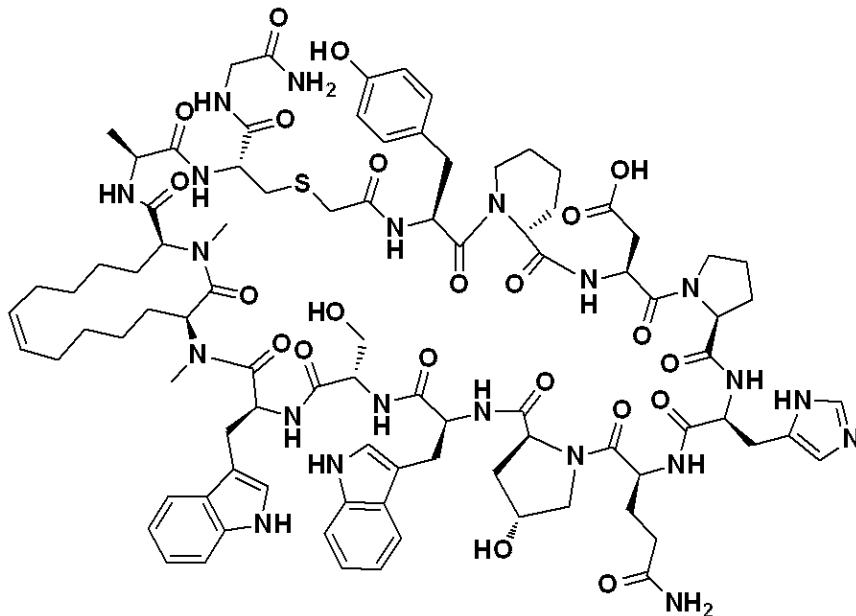
20

30

40

50

## 【化 3 9】



10

実施例 1120 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムを含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 5 - 45 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 x 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：0.1 % トリフルオロ酢酸を含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 15 - 55 % B、次いで 5 分間、100 % B で保持；流速：20 mL/分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.6 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 99 % であった。分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.58 分；ESI-MS(+) m/z 946.4 (M+2H)。分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 3.08 分；ESI-MS(+) m/z 946.4 (M+2H)。ESI-HRMS(+) m/z：計算値：945.9352(M+2H)；観測値：945.9328(M+2H)

20

30

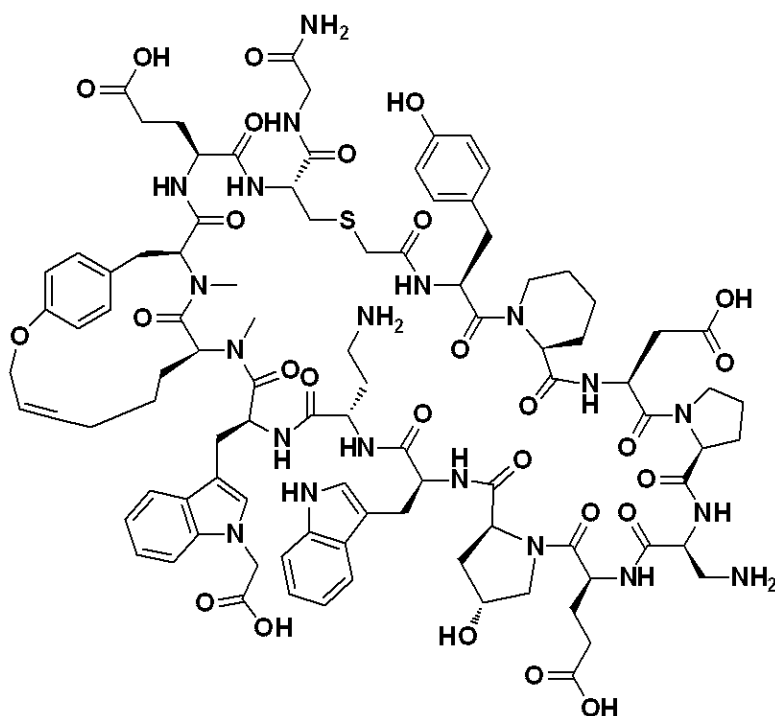
## 【0356】

実施例 1121 の合成

40

50

## 【化 4 0】



10

20

実施例 1 1 2 1 は、以下の一般的な手順から成る、実施例 1 1 0 0 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「閉環メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。

## 【 0 3 5 7】

粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：1 0 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 mM 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 メタノール：水；勾配：3 0 分にわたり 4 0 - 8 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 mm、5  $\mu$ m 粒子；移動相 A：1 0 mM 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 mM 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり 1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 2 . 1 mg であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 9 % であった。

30

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.22 分；ESI-MS(+) m/z 1010.6 (M+2H)。

40

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.57 分；ESI-MS(+) m/z 1010.7 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：1010.4327(M+2H)；観測値：1010.4290(M+2H)

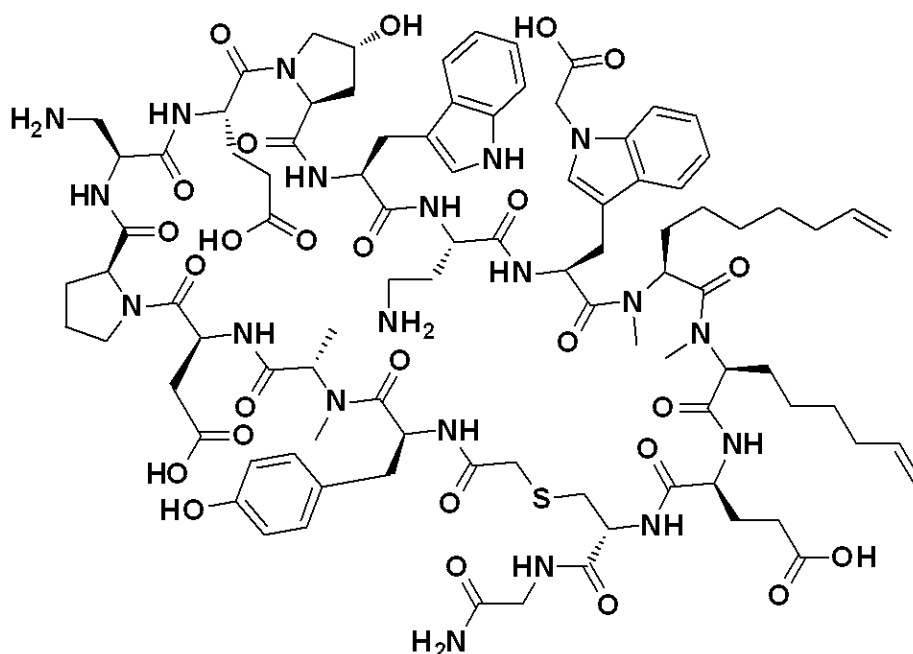
## 【 0 3 5 8】

実施例 R C M オープン F の合成

50



## 【化 4 1】



10

実施例 R C M オープン F は、以下の一般的な合成手順から成る、R C M オープン A の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、5 : 9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む、9 5 : 5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり 1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5 : 9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5 : 5 メタノール：水；勾配：1 5 分にわたり 4 5 - 8 5 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 0 . 8 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 1 0 0 % であった。

20

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.42 分；ESI-MS(+) m/z 993.8 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.92 分；ESI-MS(+) m/z 993.7 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：993.4587(M+2H)；観測値：993.4552(M+2H)

30

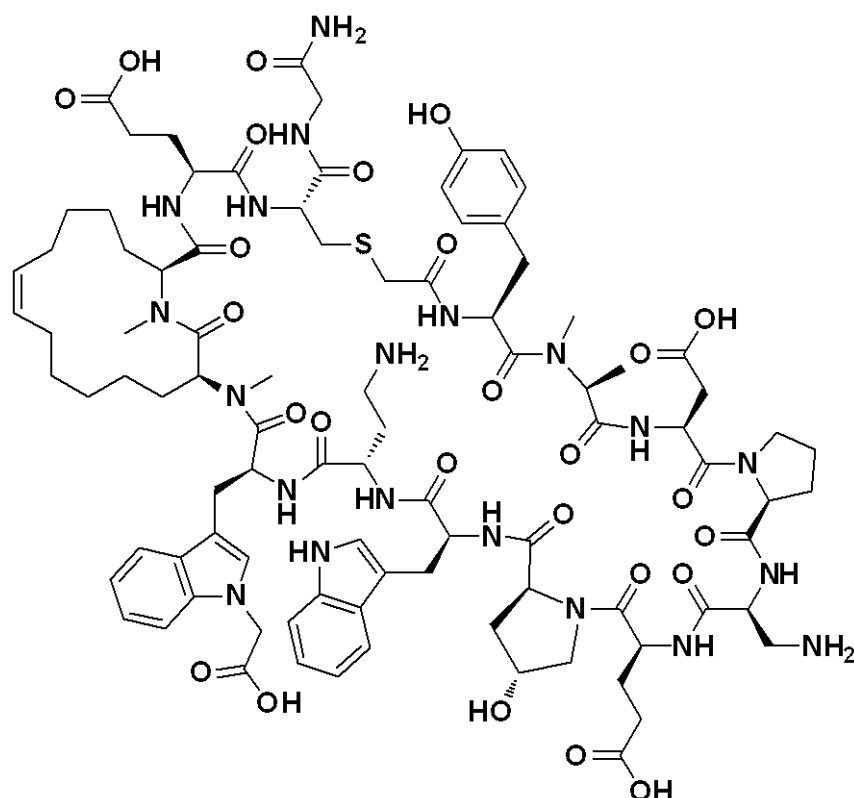
## 【 0 3 5 9】

実施例 1 1 2 2 の合成

40

50

## 【化 4 2】



実施例 1122 は、以下の一般的な合成手順から成る、実施例 1100 の合成について記載された一般的な合成手順に従って、Rink 樹脂において合成した：「CME 方法 A：樹脂膨潤手順」、「CME 方法 A：シングルカップリング手順」、「CME 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「平版メタセシス手順」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 LC/MS によって精製した：カラム：X Bridge C18、19 × 200 mm、5 μm 粒子；移動相 A：0.1% トリフルオロ酢酸を含む、5：95 アセトニトリル：水；移動相 B：0.1% トリフルオロ酢酸を含む、95：5 アセトニトリル：水；勾配：30 分にわたり 15 - 55% B、次いで 5 分間、100% B で保持；流速：20 mL / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1.7 mg であり、LCMS 解析によって推定した純度は 99% であった。

分析 LCMS 条件 H：保持時間 = 1.28 分；ESI-MS(+) m/z 980.6 (M+2H)。

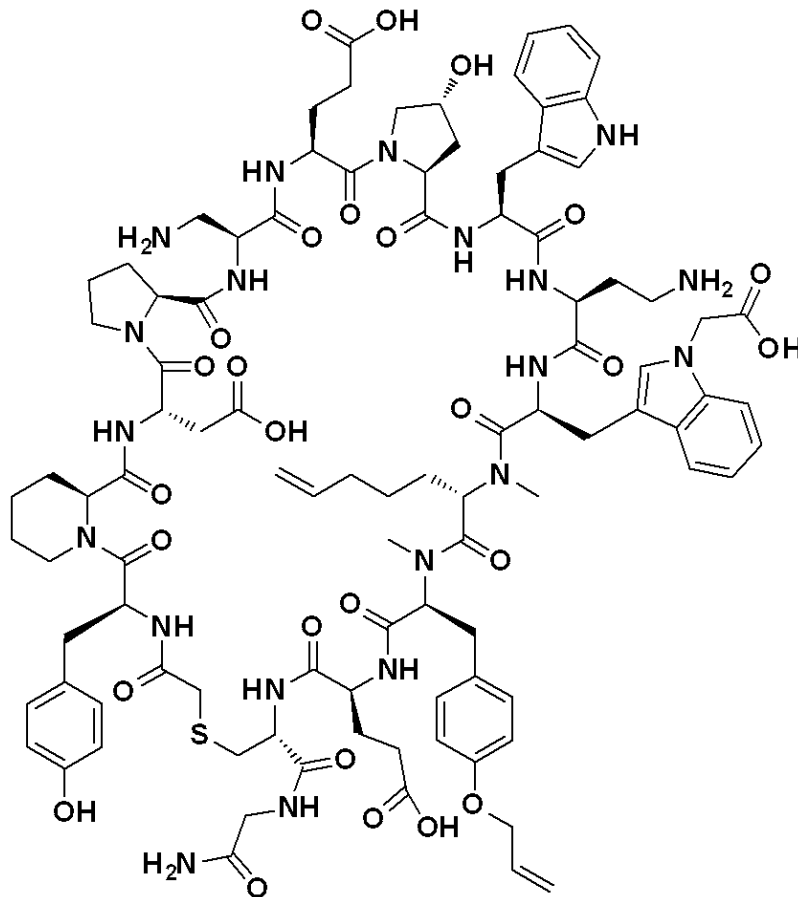
分析 LCMS 条件 I：保持時間 = 2.76 分；ESI-MS(+) m/z 979.9 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：979.4431 (M+2H)；観測値：979.4406 (M+2H)

## 【0360】

実施例 RCM オープン G の合成

## 【化 4 3】



実施例 R C M オープン G は、以下の一般的な手順から成る、R C M オープン A の合成について記載された一般的な合成手順に従って、R i n k 樹脂において合成した：「C M E 方法 A：樹脂膨潤手順」、「C M E 方法 A：シングルカップリング手順」、「C M E 方法 A：ダブルカップリング手順」、「クロロアセチルクロライドカップリング手順 A」、「一般的な脱保護方法 B」、および「環化方法 C」。粗製物質を以下の条件で分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 メタノール：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウム；9 5：5 メタノール：水；勾配：3 0 分にわたり 4 0 - 8 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。物質をさらに、以下の条件を用いて、分取 L C / M S によって精製した：カラム：X B r i d g e C 1 8、1 9 x 2 0 0 m m、5 μ m 粒子；移動相 A：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、5：9 5 アセトニトリル：水；移動相 B：1 0 m M 酢酸アンモニウムを含む、9 5：5 アセトニトリル：水；勾配：3 0 分にわたり、1 0 - 5 0 % B、次いで 5 分間、1 0 0 % B で保持；流速：2 0 m L / 分。目的の生成物を含む画分を合わせて、遠心蒸発によって乾燥させた。生成物の収量は 1 . 9 m g であり、L C M S 解析によって推定した純度は 9 9 % であった。

分析 L C M S 条件 H：保持時間 = 1.37 分；ESI-MS(+) m/z 1024.8 (M+2H)。

分析 L C M S 条件 I：保持時間 = 2.82 分；ESI-MS(+) m/z 1024.8 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z：計算値：1024.4484(M+2H)；観測値：1024.4454(M+2H)

## 【0 3 6 1】

均一時間分解蛍光 (H T R F) 結合アッセイを用いた、P D - L 1 に対する P D - 1 の結合と競合する、大環状ペプチドの能力の試験方法

本開示の大環状ペプチドの、P D - L 1 に結合する能力を、P D - 1 / P D - L 1 均一時間分解蛍光 (H T R F) 結合アッセイを用いて調査した。

## 【0 3 6 2】

10

20

30

40

50

## 方法

可溶性PD-1の可溶性PD-L1に対する結合の均一時間分解蛍光(HTRF)アッセイ。可溶性PD-1および可溶性PD-L1は、膜貫通領域を除去し、異種配列、具体的には、ヒト免疫グロブリンG配列(Ig)のFc部位またはヘキサヒスチジンエピトープタグ(His)を融合させた、カルボキシル末端切断を有するタンパク質をいう。全ての結合試験は、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミンおよび0.05%(v/v)Tween-20を添加した、dPBSから成るHTRFアッセイ緩衝液において行った。PD-1-Ig/PD-L1-His結合アッセイについて、阻害剤は4μlのアッセイ緩衝液中のPD-L1-His(10nM最終)と、15分間予めインキュベートし、次いで1μlのアッセイ緩衝液中のPD-1-Ig(20nM最終)を添加し、さらに15分間インキュベートした。ヒト、カニクイザル、マウス、または他の種からのPD-L1融合タンパク質を用いた。HTRF検出は、ユーロピウム クリプテート標識抗Igモノクローナル抗体(1nM最終)およびアロフィコシアニン(APC)標識抗Hisモノクローナル抗体(20nM最終)を用いて行った。抗体をHTRF検出緩衝液中で希釈し、5μlを結合反応の上部に分注した。反応を30分間平衡化させ、シグナル(665nm/620nm比)を、EnVisionフルオロメーターを用いて得た。さらなる結合アッセイは、PD-1-Ig/PD-L2-His(それぞれ、20および5nM)、CD80-His/PD-L1-Ig(それぞれ、100および10nM)およびCD80-His/CTLA4-Ig(それぞれ、10および5nM)間において確立した。ビオチニル化化合物第71番およびヒトPD-L1-His間の結合/競合試験は、以下のように行った。大環状ペプチド阻害剤を、4μlのアッセイ緩衝液中のPD-L1-His(10nM最終)で、60分間予めインキュベートし、次いで1μlのアッセイ緩衝液中でビオチニル化化合物第71番(0.5nM最終)を加えた。結合を30分間平衡化させ、次いで5μlのHTRF緩衝液中のユーロピウム クリプテート標識ストレプトアビジン(2.5pM最終)およびAPC標識抗His(20nM最終)を加えた。反応を30分間平衡化させ、シグナル(665nm/620nm比率)を、EnVisionフルオロメーターを用いて得た。

## 【0363】

組み換えタンパク質。C末端ヒトIgエピトープタグ[hPD-1(25-167)-3S-IG]を有するカルボキシル切断ヒトPD-1(アミノ酸25-167)、およびC末端Hisエピトープタグ[hPD-L1(19-239)-タバコ静脈斑点ウイルスプロテアーゼ切断部位(TVMV)-His]を有するヒトPD-L1(アミノ酸18-239)を、HEK293T細胞に発現させ、組み換えタンパク質A親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって順次精製した。ヒトPD-L2-His(Sino Biologicals)、CD80-His(Sino Biologicals)、CTLA4-Ig(RnD Systems)は全て、市販源から入手した。

## 【0364】

## 【化44】

組み換えヒトPD-1-Igの配列

## hPD1(25-167)-3S-IG

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

(配列番号:1)

10

20

30

40

50

## 【化 4 5】

組み換えヒトPD-L1-TVMV-His (PD-L1-His) の配列  
hPDL1(19-239)-TVMV-His

```

1  FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
51 HGEEDLKVQH SSYRQARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101 GGADYKRITV KVNAPYNKIN QRILVVDPT SEHELTCAE GYPKAEVIWT
151 SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTNEIFY CTFRRLDPEE
201 NHTAELVIPE LPLAHPNER TGSSETVRFQ GHHHHHHH

```

(配列番号：2)

## 【0365】

結果を表1に示す。示されるように、本開示の大環状ペプチドは、PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His) に対するPD-1-Igの結合活性の強力な阻害を示した。範囲は以下の通りである：A = 0.10 - 2  $\mu$ M；B = 0.01 - 0.099  $\mu$ M；C = 0.002 - 0.0099  $\mu$ M。

## 【表1】

表1

実施例番号	HTRFIC50 ( $\mu$ M) または範囲
実施例1001	B
実施例1002	B
実施例1100	B
実施例1101	A
実施例1102	A
実施例1103	1.50
実施例1104	B
実施例1105	A
実施例1106	A

【表 2】

実施例 1 1 0 7	B
実施例 1 1 0 8	C
実施例 1 1 0 9	C
実施例 1 1 1 0	B
実施例 1 1 1 1	C
実施例 1 1 1 2	C
実施例 1 1 1 3	C
実施例 1 1 1 4	C
実施例 1 1 1 5	0 . 0 1 1
実施例 1 1 1 6	B
実施例 1 1 1 7	C
実施例 1 1 1 8	C
実施例 1 1 1 9	C
実施例 1 1 2 0	0 . 0 0 4
実施例 1 1 2 1	B
実施例 1 1 2 2	C

## 【 0 3 6 6 】

本開示は、前記の例示的な実施例に限定されず、その本質的な特性から逸脱することなく、他の特定の形式で実施することができることが当業者に明らかであろう。したがって、実施例はあらゆる点において例示的であり、限定的でないと思なされることが望ましく、前記の実施例ではなく付属の特許請求の範囲についての言及、特許請求の範囲と均等な意味および範囲内の全ての変更は、そのため、そこに含まれることが意図される。

## 【配列表】

0007257393000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/22	
			A 6 1 P	31/16	

弁理士 水原 正弘

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 マイケル・マシュー・ミラー

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

(72)発明者 マーティン・パトリック・アレン

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

(72)発明者 リン・リー

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

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 1 8 3 0 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 6 6 4 6 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )