(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6710158号
(P6710158)
(45)発行日　令和2年6月17日(2020.6.17)　(24)登録日　令和2年5月28日(2020.5.28)

(51)Int.Cl.　F I
C07K 1/02 (2006.01)　C07K 1/02 ZNA
C07K 7/06 (2006.01)　C07K 7/06

請求項の数 11　(全 22 頁)

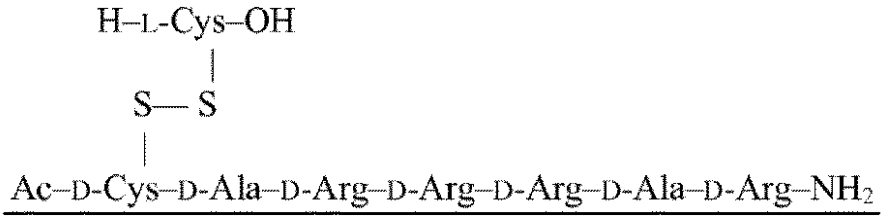
(21)出願番号　特願2016-560462(P2016-560462)
(86)(22)出願日　平成27年4月3日(2015.4.3)
(65)公表番号　特表2017-511332(P2017-511332A)
(43)公表日　平成29年4月20日(2017.4.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/024347
(87)国際公開番号　WO2015/154031
(87)国際公開日　平成27年10月8日(2015.10.8)
審査請求日　平成30年2月9日(2018.2.9)
(31)優先権主張番号　61/974,899
(32)優先日　平成26年4月3日(2014.4.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　500203709
アムジェン　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９１３２０，　サウザンド　オークス，　ワン　アムジェン　センター　ドライブ
(74)代理人　100101454
弁理士　山田　卓二
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100156144
弁理士　落合　康

最終頁に続く

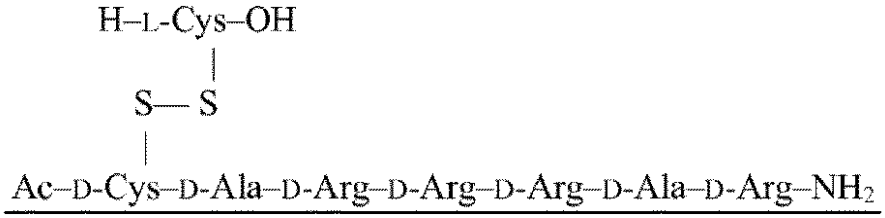
(54)【発明の名称】ＡＭＧ４１６の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
次式：
【化１】



で示されるＡＭＧ４１６の製造方法であって、
Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－ＮＨ$_2$（配列番号４）の構造を有するペプチドを提供すること、および
ペプチドをＬ－Ｃｙｓと接触させてコンジュゲートされた生成物を生成させること
を含んでなる方法。
【請求項２】
前記ペプチドを、Ｌ－Ｃｙｓおよびトリフルオロ酢酸を含む水溶液と接触させる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

コンジュゲートされた生成物を凍結乾燥することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
コンジュゲートされた生成物をイソプロピルアルコールおよびＨＣｌを含む水溶液と接触させ、それによりＡＭＧ４１６ＨＣｌ（配列番号１）を含む沈殿物を生成させることをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
沈殿物をＨＰＬＣにより精製することをさらに含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
次式：
【化２】



で示されるＡＭＧ４１６の製造方法であって、
ＴＦＡの溶液中のＡｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2（配列番号４）の構造を有するペプチドを提供すること；
該ペプチドをＨＰＬＣにより精製すること；
共沸蒸留により溶媒交換を行うこと；および
該ペプチドをＬ－Ｃｙｓと接触させてコンジュゲートされた生成物を生成させること
を含んでなる方法。
【請求項７】
前記ペプチドをイソプロピルアルコール中のＬ－Ｃｙｓおよび水の水溶液と接触させる、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
コンジュゲートされた生成物をイソプロピルアルコールおよびＨＣｌを含む水溶液と接触させ、それによりＡＭＧ４１６ＨＣｌ（配列番号１）を含む沈殿物を生成させることをさらに含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］（配列番号３）の構造を有する樹脂結合ペプチドからＡｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2（配列番号４）の構造を有するペプチドを得ることをさらに含んでなる、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記ペプチドを得ることが、前記樹脂結合ペプチドを、水、トリフルオロ酢酸、トリイソプロピルシランおよびジピリジルジスルフィドを含む溶液と接触させることを含んでなる、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
ペプチドが、Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2（配列番号４）のＴＦＡ塩を含む、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願のクロスリファレンス

本願は、その内容全体が本願明細書の一部を構成する米国仮出願第６１／９７４，８９９号（出願日：２０１４年４月３日）に基づく優先権の利益を主張するものである。

【０００２】

配列表への言及

配列表は、ＥＦＳを介しテキストファイルの形式で電子ファイル（作成日：２０１４年４月３日およびファイル名：0419250488seqlist.txt（２５３１バイト））を提出しており、その内容は本明細書の一部を構成する。

【０００３】

本発明は、ポリペプチド合成、およびより具体的にはＡＭＧ４１６またはその薬学的に許容し得る塩の合成に関する。

【背景技術】

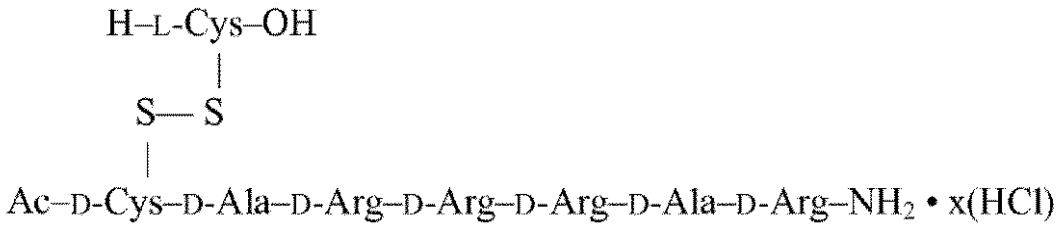
【０００４】

ＡＭＧ４１６は、カルシウム感知受容体の選択的な８アミノ酸合成ペプチドアゴニストである。これは、慢性腎疾患－ミネラルおよび骨障害（ＣＫＤ－ＭＢＤ）を有する血液透析患者における二次性副甲状腺機能亢進症（ＳＨＰＴ）の静脈内治療薬として開発されている。

【０００５】

ＡＭＧ４１６の塩酸塩は以下の化学構造：

【化１】



（配列番号１）を有する。

【０００６】

主鎖は７個のアミノ酸を有し、いずれもＤ配置である。側鎖のシステイン残基はＬ配置である。ＡＭＧ４１６（遊離塩基）の分子式は、$C_{38}H_{73}N_{21}O_{10}S_2$であり、平均分子量（計算値）は１０４８．３Ｄａである。

【０００７】

ＡＭＧ４１６およびその製造方法は、本明細書の一部を構成する国際公開第２０１１／０１４７０７号パンフレットを参照されたい。国際公開第２０１１／０１４７０７号パンフレットに記載されているように、ＡＭＧ４１６は、対応するＦｍｏｃ保護Ｄ－アミノ酸からの固相合成によって構築することができる。樹脂から切断後、Ｂｏｃ－Ｌ－Ｃｙｓ（ＮＰｙＳ）－ＯＨで処理してジスルフィド結合を形成させることができる。次いで、Ｂｏｃ基をトリフルオロアセテート（ＴＦＡ）で脱離し、得られた生成物を逆相高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって精製し、凍結乾燥によってＴＦＡ塩の形態として単離することができる。ＴＦＡ塩は、その後の塩交換の手順を実施することによって、薬学的に許容される塩に変換することができる。このような手順は、当該技術分野において周知であり、例えば、イオン交換技術、場合により、次いで得られた生成物の精製（例えば、逆相液体クロマトグラフィーまたは逆浸透）が挙げられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

ＡＭＧ４１６またはその薬学的に許容される塩（例えば、ＡＭＧ４１６塩酸塩）の効率的な製造方法、特に商業規模の製造に適した方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

上記の問題に鑑み、本発明は、ＡＭＧ４１６またはその薬学的に許容される塩の製造方法を提供することを目的とする。

【００１０】

第１の態様では、ＡＭＧ４１６の製造方法を提供し、この方法はＦｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］（配列番号２）およびＡｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］（配列番号３）からなる群から選択される構造を有する樹脂結合ペプチドを提供すること；固体支持体からペプチドを切断すること；および開裂したペプチドのＤ－Ｃｙｓ残基の側鎖を活性化させることを含んでなる。

【００１１】

第１の態様に関連する１つ以上の実施形態では、切断および活性化工程は同じ容器内で行われる。

【００１２】

１または複数のさらなる実施形態では、樹脂に結合したペプチドを、水、トリフルオロ酢酸、トリイソプロピルシランおよびジピリジルジスルフィドを含有してなる溶液と接触させる。

【００１３】

第２の態様では、ＡＭＧ４１６の製造方法を提供し、該方法は、Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2（配列番号４）の構造を有するペプチドを提供すること；ペプチドをＬ－Ｃｙｓと接触させてコンジュゲートされた生成物を生成させることを含む。

【００１４】

第２の態様に関連するいくつかの実施形態では、ペプチドをＬ－Ｃｙｓおよびトリフルオロ酢酸を含む水溶液と接触させる。

【００１５】

第２の態様に関連するいくつかの更なる実施形態では、この方法は、コンジュゲートした生成物を凍結乾燥することをさらに含む。

【００１６】

さらにいくつかのさらなる実施形態では、第２の態様の方法は、コンジュゲートした生成物をイソプロピルアルコール（ＩＰＡ）および塩酸（ＨＣｌ）を含む水溶液と接触させ、それによってＡＭＧ４１６ＨＣｌを含む沈殿物を生成させる工程をさらに含む。

【００１７】

第２の態様に関連するなおさらなる１以上のさらなる実施形態では、本方法は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって沈殿物を精製することをさらに含む。

【００１８】

さらに第３の態様では、ＡＭＧ４１６の製造方法が提供され、該方法は、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］（配列番号２）およびＡｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］（配列番号３）からなる群から選択される構造を有する樹脂結合ペプチドを提供すること；ペプチドを固相支持体から切断すること（すなわち、非担持ペプチドを提供すること）；および非担持ペプチドのＤ－Ｃｙｓ残基の側鎖を活性化してＡＭＧ４１６　ＳＰｙ中間体（ここで、ＳＰｙは２－ピリジンスルフェニルまたはＳ－Ｐｙｒである）を生成し、ＡＭＧ４１６　ＳＰｙ中間体を０．１％ＴＦＡ水溶液（トリフルオロ酢酸溶液）に溶解し、ＡＭＧ４１６　ＳＰｙ誘導体をＨＰＬＣで精製することを含んでなる。

【００１９】

第３の態様に関連するいくつかの実施形態では、この方法は、ＡＭＧ４１６　ＳＰｙ中

間体の共沸蒸留によって溶媒交換を行い、新しい溶媒、例えば水およびイソプロピルアルコール中のＡＭＧ４１６　ＳＰｙの溶液を生成することをさらに含んでなる。

【００２０】

第３の態様に関連するさらにいくつかの実施形態では、本方法は、ＡＭＧ４１６　ＳＰｙの、いくつかの実施形態ではそのトリフルオロ酢酸塩の形態の、イソプロピルアルコール－水の溶液をＬ－Ｃｙｓを含む水溶液と接触させることをさらに含む。

【００２１】

第４の態様では、Ｈ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、すなわち本明細書で提供される特定の合成方法のための適切な出発物質の製造方法が提供される。

【００２２】

第４の態様に関連するいくつかの実施形態では、この方法は、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ－ＯＨをＮａＩ（ヨウ化ナトリウム）の存在下でＢｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨに変換することを含む。いくつかのさらなる実施形態では、ヨウ化ナトリウムは、約５モル％の濃度で存在する。

【００２３】

第４の態様に関連するいくつかのさらなる実施形態では、本方法は、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨをＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨに変換し、Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨをＩＰＡ／水溶媒系中で結晶化することを更に含んでなる。

【００２４】

本明細書に記載の方法のさらなる実施形態は、以下の説明、実施例、および請求項から明らかであろう。前述及び以下の説明から理解されるように、本明細書に記載された各特徴、及びそのような特徴の２以上の各組み合わせは、本開示の範囲内に包含され、相互に矛盾しない。さらに、任意の特徴または特徴の組合せは、本発明の任意の実施形態から具体的に除外されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】図１はＡＭＧ４１６（Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｌ－Ｃｙｓ－ＯＨ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2）（配列番号１）の化学構造を示す。

【００２６】

【図２】図２はＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＡＭ樹脂およびＡｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－樹脂（配列番号３）の化学構造を示す。

【００２７】

【図３】図３は、ペプチジル－樹脂（Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＮＨ－樹脂）（配列番号３）からＳＰｙ中間体（Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（ＳＰｙ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ－NH_2）（配列番号４）が形成する反応スキームを示す。

【００２８】

【図４】図４は、ＳＰｙ中間体（$AA^{1-7(SPy)}$）からＡＭＧ４１６のＴＦＡ塩が形成する反応スキームを示す。

【００２９】

【図５】図５は、ＡＭＧ４１６のＴＦＡ塩からＡＭＧ４１６の塩酸塩が形成する反応スキームを示す。

【００３０】

【図６】図６は、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ－ＯＨからＢｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨが形成する反応スキームを示す。

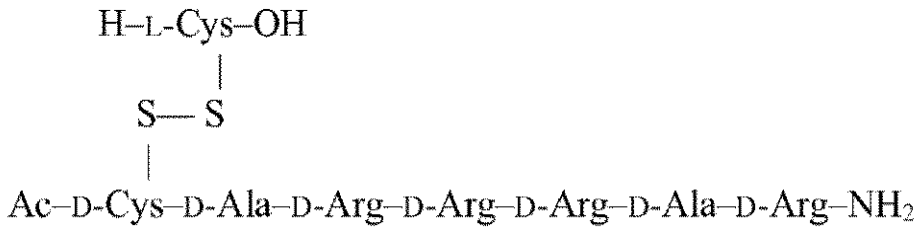
【００３１】

【図７】図７は、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨからＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ

が形成する反応スキームを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
以下に本発明をより詳細に記載する。但し、本発明は、多くの異なる形態で実施されてもよく、本明細書に記載の実施形態に限定されるものと解釈されるべきではなく；むしろ、これらの実施形態は、本開示が詳細かつ完全であり、その範囲を当業者に完全に伝えるように提供される。
【００３３】
本明細書中、上記または下記で引用された全ての刊行物、特許および特許出願は、特に記載しない限り、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。同一の用語が、参照により本明細書に組み入れられた刊行物、特許、または特許出願および本開示において定義されている場合、本開示における定義が支配的な定義（controlling definition）を表す。
【００３４】
本明細書で使用されるセクション見出しは、単に明細書の構成上の目的のためのものであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。
【００３５】
本明細書中で他に定義されない限り、本出願に関連して使用される科学技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈によって特に要求されない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。
【００３６】
一般に、本明細書に記載の分子生物学およびタンパク質化学に関連して使用される命名法および技術は、当技術分野で周知且つ一般的に使用されているものである。本出願の方法および技術は、特に記載しない限り、一般的に、当技術分野で周知の慣用法に従って、および本明細書全体にわたって引用され議論されている様々な一般的なおよびより具体的な参考文献に記載されているとおりに行われる。例えば、本明細書の一部を構成する、Laszlo, Peptide-Based Drug Design: Methods and Protocols, Humana Press (2008)；Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press (2005)；Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)を参照。精製技術は、当技術分野で一般的に行われているか、または本明細書に記載されているように、製造業者の仕様書に従って実施される。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、および薬学／製薬化学に関連して一般的に用いられる用語および実験手順や技術は、当該技術分野で周知であり一般的に用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、医薬品の製造、製剤化、薬物送達、および患者の治療に用いることができる。
【００３７】
本発明は、本明細書に記載された特定の方法論、プロトコル、および試薬等に限定されず、変更できると理解される。本明細書で使用する用語は、単に特定の実施形態を説明するものであり、特許請求の範囲によって定義される、開示された範囲に限定されるものではない。
【００３８】
「約」という用語は、特に所与の量に関して、プラスまたはマイナス５％の偏差を包含することを意味する。
【００３９】
Ｉ．一般的な定義
特に断りのない限り、冠詞「ａ」および「ａｎ」は、本明細書では、１つまたは複数（すなわち、少なくとも１つ）の文法的目的語を指すために用いられる。例として、「ある要素」は、１つの要素または２つ以上の要素を意味する。
【００４０】
用語「ＡＭＧ４１６」（エテルカルシチドとしても知られ、以前はベルカルセチドまた

はＫＡＩ－４１６９としても知られている）は、化学名：
Ｎ－アセチル－Ｄ－システイニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギンアミドとＬ－システインとのジスルフィドであり、以下の構造式：

【化２】



を有する。

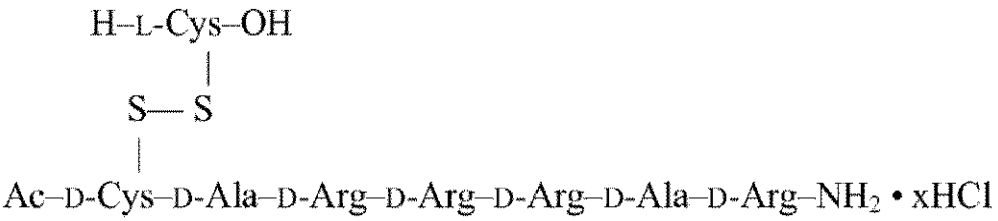
【００４１】

ＡＭＧ４１６、または本明細書に記載の任意の化合物またはＡＭＧ４１６フラグメント、中間体、または前駆体とは、その中性の非荷電形態、ならびにその薬学的に許容される塩、水和物および溶媒和物を包含すると解釈される。

【００４２】

用語「ＡＭＧ４１６塩酸塩」および「ＡＭＧ４１６ＨＣｌ」は交換可能であり、以下の構造式：

【化３】



を有する塩酸塩形態のＡＭＧ４１６を指す。

【００４３】

一般に、ｘは３～５の値（例えば、３、４または５）を有する。

【００４４】

「薬学的に許容される塩」は、患者に重大な有害な毒物学的影響を引き起こさない塩形成に適した少なくとも１つの基を有する化合物の塩の形態を指す。「薬学的に許容される塩」という用語は、ある態様では、１つ以上のイオン化可能なアミン基を有する本明細書に記載の化合物、例えばＡＭＧ４１６、ならびにＡＭＧ４１６断片、中間体、前駆体の比較的非毒性の無機または有機酸付加塩を意味し得る。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプタン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。（例えば、Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19参照）。さらなる適切な薬学的に許容される塩形態は、例えば、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zurich:Wiley-VCH/VHCA, 2002; P. H. Stahl and C. G. Wermuth, Edsに記載されている。

【００４５】

本明細書中で使用される、用語「アミノ酸」と「残基」は交換可能であり、ペプチドまたはポリペプチドの文脈で使用される場合、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸の両方、ならびにアミノ酸類似体、アミノ酸模倣体および天然に存在するアミノ酸と化学的に類似している非天然アミノ酸を意味する。「遊離アミノ酸」または「遊離アミノ基」は、－ＮＨ$_2$の形態である、すなわち保護されていないアミノ基を有するアミノ酸、ペプチド断片またはペプチドをいう。

【００４６】
本明細書で使用される語句「保護基」または「ＰＧ」は、望ましくない化学変換から潜在的に反応性の官能基を保護する一時的な置換基をいう。そのような保護基の例としては、カルボン酸のエステル、アルコールのシリルエーテル、並びにアルデヒドおよびケトンのアセタールおよびケタールが挙げられる。
例えば、Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 4th ed.; Wiley: New York, 2007; Isidro-Llobet, A., et al., Amino Acid-Protecting Groups, Chem. Rev 2009, 109, 2455-2504参照。本明細書に記載の反応性アミノ酸またはペプチドフラグメントは、しばしば、対象の化学変換の標的ではない官能基上に１以上の保護基を適切に含んでいる。保護基の例としては、例えば、カルボキシベンジル（ベンジルオキシカルボニルとしても称される）（「Ｃｂｚ」または「Ｚ」）、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、２，２，４，６，７－ペンタメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル（Ｐｂｆ）、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）、トリチル（Ｔｒｔ）、メチルエステル（ＯＭｅ）、２－ピリジンスルフェニル（ＳＰｙまたはＳ－Ｐｙｒ）、アミドなどが挙げられる。本明細書中に記載の簡略化した構造において、Ｃ末端の－NH_2はアミド保護基（～Ｃ（Ｏ）NH_2）を意味し、Ｎ末端の「Ｈ」は遊離アミノ基を意味し、括弧内の保護基は、保護基がオルニチンのδ窒素上にあることを意味する。

【００４７】
本明細書で用いられているように、用語「保護除去剤」または「脱保護剤」は交換可能に用いることができ、アミノ酸に結合したアミノ保護剤を除去するための化学試薬であり、このアミノ保護剤は、ＦｍｏｃやＢｏｃ等が挙げられるがこれらに限定されない、当分野で周知のものであり得る。

【００４８】
本明細書中で互換的に使用される用語「カップリング剤」、「縮合剤」、「活性化剤」、「縮合活性化剤」は、本明細書において交換可能に用いられ、１つのアミノ酸に由来するアミノ基と別のアミノ酸に由来するカルボキシル基との、ペプチド結合形成反応を促進する化学物質を意味する。例示的なカップリング剤は、当該技術分野において周知であり、カルボジイミド（例えば、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、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（ＨＡＴＵ）、［ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ（ジメチルアミノ）メチリデン］ジメチルアザニウム；テトラフルオロボレート（ＴＢＴＵ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート、Ｏ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ））が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、El-Faham, A. and Albericio, F., "Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup", Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602参照。このような化合物は、市販の業者から容易に入手可能である。

【００４９】
本明細書で用いられる用語「切断剤」は、樹脂に結合したペプチドを樹脂から分離することができる化学物質を指す。切断剤は、当業者に周知であり、ＴＦＡおよびＨＣｌ溶液を含む酸性溶液が挙げられる。

【００５０】
用語「治療する」は、軽減；寛解；徴候または症状の減少または傷害、病理または状態を患者がより許容しやすくする；悪化または衰退の速度の遅延；悪化の最終点の低下をより少なくする；患者の肉体的または精神的健康の改善等の客観的または主観的パラメータを含む、傷害、病理または状態の治療または改善における成功のなんらかの兆候を指す。徴候または症状の治療または改善は、身体検査の結果を含む、客観的パラメータまたは主

観的パラメータに基づくことができる。例えば、本明細書中に示された特定の方法は、血清無処置副甲状腺ホルモン（ｉＰＴＨ）を減少させることによりＣＫＤ－ＭＢＤを有する血液透析患者におけるＳＨＰＴを首尾よく治療する。

【００５１】

「有効量」は、一般に、症状の重篤度および／または頻度を減少させ、症状および／または根本原因を排除し、症状および／または根本原因の発生を予防し、および／または疾患状態（例えば、上昇したＰＴＨレベル）に起因するか、または関連する損傷を改善または修繕するのに十分な量である。「治療上有効な量」は、疾患状態または症状、特に疾患状態に関連する状態または症状を改善するのに、あるいはそうでなければ、疾患状態または関連する任意の他の望ましくない症状の進行を、それが何であれ、予防、妨害、遅延または逆転するのに十分な量である。完全な治療効果は、１回の投与によって必ずしも生じるわけではなく、一連の用量を投与してはじめて生じることもある。したがって、治療上有効な量は、１回以上の投与で投与され得る。

【００５２】

本明細書で使用する「治療上有効な用量」および「治療上有効な量」という用語は、研究者、医師、または他の臨床従事者が試みる、組織系、動物またはヒトにおいて、処置されている疾患または障害の徴候または症状の緩和または改善を含む生物学的または医学的応答を生じさせる量（すなわち１以上の所望の生物学的応答または医学的応答（例えばｉＰＴＨの低下）の観察可能なレベルを裏付けるベルカルセチドの量）を意味する。

【００５３】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は互換的であり、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、１つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の類似体または模倣体、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーであるアミノ酸ポリマーにも適用される。これらの用語は、例えば糖タンパク質を形成するための炭水化物残基の付加によって修飾された、またはリン酸化された、アミノ酸ポリマーも包含し得る。ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、液相合成または固相合成によって、または遺伝子操作された細胞または組換え細胞によって産生され得、アミノ酸配列を有する分子を含む。

【００５４】

ペプチドまたはポリペプチドの「変異体」は、別のポリペプチド配列と比較して、１以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列に挿入、欠失および／または置換されているアミノ酸配列を含む。変異体には、融合タンパク質も含まれる。

【００５５】

ペプチドまたはポリペプチドの「誘導体」は、例えば別の化学的部分への結合を介して、挿入、欠失または置換変異体とは異なるいくつかの方法で化学的に修飾されたペプチドまたはポリペプチドである。そのような修飾には、ペプチドまたはポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシ末端への基の共有結合付加、例えば、アミノ末端のアセチル化および／またはペプチドまたはポリペプチドのカルボキシ末端のアミド化が含まれる。

【００５６】

用語「アミノ酸」は、当技術分野におけるその通常の意味を含む。２０種の天然に存在するアミノ酸およびその略語は、慣用の使用法に従う。本明細書の一部を構成するImmunology-A Synthesis, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991)を参照。１９個の一般的なアミノ酸（グリシンを除く）の立体異性体（例えば、Ｄ－アミノ酸）、α－、α－ジ置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸などの非天然アミノ酸、および他の非一般的なアミノ酸もまた、ポリペプチドに適した構成要素であり、「アミノ酸」の語句に含まれる。非一般的なアミノ酸の例としては、ホモシステイン、オルニチン、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリシン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリ

シン、σ－Ｎ－メチルアルギニン、および他の同様のアミノ酸およびイミノ酸（例えば、４－ヒドロキシプロリン）が挙げられる。本明細書で使用されるポリペプチド表記法では、標準的な使用および慣例に従って、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシル末端方向である。

【００５７】

本明細書で使用される「被験者」または「患者」は任意の哺乳動物である。典型的な実施形態では被検者または患者はヒトである。

【００５８】

用語「ｑ．ｓ．」は、所望の機能を達成するのに十分な量、例えば溶液を所望の体積（すなわち、１００％）にするために十分な量を添加することを意味する。

【００５９】

ＩＩ．実施形態

１つ以上の実施形態において、ＡＭＧ４１６塩酸塩は、以下のような一連の工程によって製造される：例示的な工程として、ＡＭＧ４１６の７残基（seven-member）の線状フラグメントの固相ペプチド合成（段階Ｉ）、付随する側鎖脱保護およびシステイン活性化を伴う、ペプチドからのペプチド鎖の切断（段階ＩＩ）、続いて粗製のＡＭＧ４１６を得るＬ－Ｃｙｓとのin situでのコンジュゲーション（ジスルフィド形成）（段階ＩＩＩ）、その直後、いくつかの実施形態では、精製されたＡＭＧ４１６ＴＦＡ塩を得る分取ＨＰＬＣおよび凍結乾燥（段階ＩＶ）。段階ＩＶの後は、沈殿による塩交換（ＴＦＡからＨＣｌ）、そしていくつかの実施形態では、その後の精密濾過および凍結乾燥によって精製されたＡＭＧ４１６塩酸塩を得る（段階Ｖ）。

【００６０】

固相ペプチド合成

ＡＭＧ４１６の７残基の線状フラグメントは、固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）を含む当技術分野で公知の任意の方法によって合成することができる。本明細書で使用される「固相合成」または「固相ペプチド合成」という用語は、成長中のペプチド鎖が固体支持体に連結される、当業者に周知の方法を指す。

固相合成は、典型的には以下の工程を含んでなる：（ｉ）第１のアミノ酸（そのアミノ基はブロックされているかまたは「保護されている」）を固相担体に共有結合させる工程；（ｉｉ）脱保護剤を用いてアミノ基から保護基を脱離する工程；（ｉｉｉ）第２のアミノ酸（そのアミノ基はブロックされている）のカルボキシルを活性化し、第２のアミノ酸を固相担体に結合した第１のアミノ酸と接触させて、ジペプチド（そのアミノ基はブロックされている）を得る工程；（ｉｖ）ペプチド結合形成ステップを繰り返し、ペプチド鎖をＣ末端からＮ末端へ伸長させる工程；および（ｖ）アミノ基の保護基を脱離し、切断剤で固相担体からペプチド鎖を分離してペプチドを得る工程。

【００６１】

固相合成の適切な技術は、当技術分野で周知であり、Merrifield, in Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds. 1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963); Davis et al., Biochem. Intl. 10:394-414 (1985); Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (1969); U.S. Pat. No. 3,941,763; Finn et al., The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 105-253 (1976); and Erickson et al., The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 257-527 (1976)に記載されているものが含まれる。Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Additional Supplementary Volumes to the 4th Ed., Vol E22A, "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics", Editor-in-Chief M. Goodman. Georg Thieme Verlag: Stuttgard and New York. 2002, pp. 685-877; Chan, W.C., White, P.D., "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach". Oxford University Press, (200), p. 9-109.もまた参照されたい。固相合成は、しばしば、小さなペプチドを製造する最も費用効果の高い方法の１つであるため、典型的には、ＡＭＧ４１６のような個々のペプチドを作製するための好ましい技術である。

【００６２】

いくつかの実施形態では、ＡＭＧ４１６の主鎖線状フラグメントは、Ｆｍｏｃ保護を用いた標準的な固相ペプチド合成プロトコルと、例えばＳｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈから入手可能なＲｉｎｋアミド（ＲＡＭ）樹脂を用いて、ペプチドのＮ末端のアセチル化と共に、Ｃ末端樹脂結合アミドを得る。いくつかの他の実施形態では、他の樹脂およびリンカーを使用することができる（例えば、三環系アミドリンカー樹脂とも称されるＲａｍａｇｅアミドＡＭ樹脂）。一実施形態では、主鎖線状フラグメントの構築は以下の工程を含んでなる：（ｉ）Ｆｍｏｃ－ＲｉｎｋアミドＡＭ樹脂を脱保護剤と混合して、ＲｉｎｋアミドＡＭ樹脂を得る工程；（ｉｉ）Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨをＲｉｎｋアミドＡＭ樹脂と縮合させてＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＲｉｎｋアミドＡＭ樹脂を得る工程；（ｉｉｉ）工程（ｉ）のＦｍｏｃ脱保護と、工程（ｉｉ）の樹脂上でのアミノ酸とポリペプチドとの縮合を、ＡＭＧ４１６の主鎖線状フラグメントの残りのアミノ酸残基のそれぞれについてＣ末端からＮ末端へと繰り返し（例えば、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－ＯＨおよびＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを用いて）配列番号２で示されるポリペチド樹脂を形成し；および（ｉｖ）工程（ｉ）のＦｍｏｃ脱保護とＮ末端のアセチル化を繰り返して配列番号３で表されるポリペプチド樹脂を形成する工程。図２を参照。

Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］

（配列番号２）

Ａｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－［樹脂］

（配列番号３）

【００６３】

典型的には、Ｆｍｏｃ保護基の開裂は、ＤＭＦ中のピペリジンのような脱保護剤を用いて達成される。一実施形態において、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸のカップリングは、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）などの溶媒中、カルボジイミドカップリング剤、Ｎ,Ｎ－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）のような適切なカップリング剤を用いて、場合により２－シアノ－２－（ヒドロキシイミノ）酢酸エチル（Oymyma）のような添加剤の存在下で、システインを除く全てのアミノ酸について行う。システインでペプチド鎖を伸長する場合、カップリングは、典型的には、Ｎ,Ｎ－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）を用い、ジメチルホルムアミド－ジクロロメタン（即ち、ＤＭＦ、ＤＣＭ、ＨＯＢｔ、ＤＩＣ）などの溶媒系中、ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢＴ）などのベンゾトリアゾール添加剤の存在下で行う。

【００６４】

Ｎ末端のアセチル化は、当該分野で公知の任意の方法によって行うことができる。一実施形態では、Ｎ末端のアセチル化は、例えば、ピリジンおよびＤＭＦ中、無水酢酸（Ac_2O）を用いて行う。

【００６５】

樹脂からの切断

ペプチドは、支持体から切り離し、保護基を当技術分野で公知の任意の手段によって側鎖から脱離することができる。例えば、Synthetic Peptides: A User's Guide (G.A. Grant, ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1992; and Chan, W.C., White, P.D. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach", Oxford University Press (2000), p.64-66および105-109参照。

【００６６】

一実施形態において、ペプチジル－樹脂を、水（例えば、脱イオン水（ＤＩＷ））トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、トリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）およびジピリジルジスルフィド（ＤＰＤＳ）を含むカクテル溶液に添加する。これによりペプチドが樹脂から分離し、同時に側鎖の脱保護とシステイン活性化が行われ、ｉｎ－ｓｉｔｕでのＬ－Ｃｙｓへのコンジュゲーションの準備が整う。７アミノ酸のＳＰｙ中間体（$AA^{1-7(SPy)}$）

が生成する。図３参照。ＳＰｙ中間体の配列は配列番号４に示されている。

Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2
（配列番号４）
【００６７】
ｉｎ－ｓｉｔｕコンジュゲーションおよび分取ＨＰＬＣ
ＳＰｙ中間体は、当該分野で公知の任意の方法によってＬ－Ｃｙｓにコンジュゲートすることができる。一実施形態において、Ｌ－Ｃｙｓのコンジュゲーションは、水性ＴＦＡ中で行われる。
【００６８】
生成したＡＭＧ４１６（ＴＦＡ塩）は、当該分野で公知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、ＡＭＧ４１６（ＴＦＡ塩）を高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって精製する。例えば、一実施形態では、ＡＭＧ４１６（ＴＦＡ塩）の精製および濃縮は、逆相ＨＰＬＣ精製工程および逆相ＨＰＬＣ濃縮工程を含む。図４を参照。
【００６９】
ＡＭＧ４１６（ＴＦＡ塩）を含有する精製・濃縮した試料を凍結乾燥してもよい。
【００７０】
塩変換
ＴＦＡ塩は、当該分野で公知の任意の手段によって、塩酸塩のような薬学的に許容される塩に変換することができる。
【００７１】
一実施形態において、凍結乾燥されたＡＭＧ４１６のＴＦＡ塩は、イソプロピルアルコール（ＩＰＡ）の水溶液に溶解される。次いで、ＴＦＡ塩溶液を、塩交換および塩酸塩の沈殿のためにＨＣｌ溶液に添加する。次いで、沈殿物を水で再構成し、マイクロフィルター（例えば、０．２μｍフィルター）を用いて濾過し、凍結乾燥してＡＭＧ４１６の塩酸塩を単離してもよい。図５参照。
【００７２】
ＳＰｙ中間体の精製
別の実施形態では、ＳＰｙ中間体は、Ｌ－Ｃｙｓへのコンジュゲーションの前に精製される。一般に、ＳＰｙ中間体、特にペプチド－ＳＰｙ中間体は、非常に不安定であると考えられ、すなわち、ＨＰＬＣなどの効率的な精製に耐えるのに十分に安定でないと考えられる。しかしながら、本明細書で提供される方法を達成するに際して、予期しないことに、本明細書に記載の方法に従って製造されたペプチド－ＳＰｙ中間体が、確かに、別の精製工程に耐えるのに十分に安定であることが本出願人によって見い出された。さらに、Ｌ－Ｃｙｓへのコンジュゲーションに先立つこのような中間体の精製は、実際に最終的なペプチド医薬品の製造効率を増大し、製造コストを低下させることができることが見い出された。
【００７３】
例示的な実施形態では、別の方法を以下のように行う。後述する方法および実施例５の方法は、中間体が安定なままであり、例えばジスルフィド結合形成を介してチオール含有部分への結合に適している、本明細書に記載のＳＰｙ中間体の精製に有用である。例えば、ペプチド－Ｓｐｙ中間体は、約０．２％以下のＴＦＡ、例えば、約０．０５％～０．１５％のＴＦＡまたは約０．１％のＴＦＡを含む水溶液に溶解した後、クロマトグラフィーによる精製のため直接ＨＰＬＣカラムに適用する。次いで、ペプチド－Ｓｐｙ中間体を含有するＨＰＬＣ画分の溶媒交換を、例えば共沸蒸留によって行うことができる。水／イソプロパノールの混合物のような適切な溶媒へのペプチド－ＳＰｙ中間体の溶媒交換の後、Ｌ－Ｃｙｓのようなチオール含有部分をペプチド－ＳＰｙ中間体溶液に直接添加してコンジュゲーションを行う。次いで、例えば溶液中で、得られた共役生成物を塩交換に利用することができる。
【００７４】

前述の精製方法の特定の実施形態は以下の通りである。最初のペプチド支持体からのペプチドの切断およびＡＡ$^{1-7(SPy)}$の単離後、中間体を０．１％ＴＦＡおよびアセトニトリルに溶解し、固定相ＨＰＬＣカラムで精製し、上記のように精製した。０．１％ＴＦＡ溶液の使用は、例えば０．２％ＴＦＡ溶液の使用と比較した場合、ＨＰＬＣ精製に複数の利点を有する。例えば、０．１％ＴＦＡは、より高濃度のＴＦＡ溶液よりも、精製プロセス中の固定相への損傷が少ない。すなわち、このように最適化された濃度のＴＦＡを用いることにより、固定相の分解が少なくなり、それによって固定相の寿命が長くなる。さらに、ペプチド－ＳＰｙ中間体（例えば、ＡＡ$^{1-7(SPy)}$）の生成物は極性がより低く、逆相固定相に中間生成物がより良好に保持される。その結果、各精製操作では、固定相への負荷量を非常に高くすることができる。いくつかの実施形態では、許容負荷量の増大によって、製造プロセスの処理能力は１．５～２倍、または約１．５倍に増大する。

【００７５】

次いで、ＴＦＡ塩としてのＳＰｙ中間体を含むＨＰＬＣ画分を、十分な量のＩＰＡを添加して共沸蒸留に供し、溶媒をアセトニトリルおよび水から、Ｌ－Ｃｙｓコンジュゲーションおよび塩交換に適したＩＰＡ溶液中の１５％水に交換する。この方法は、コンジュゲーションと塩交換の両方を単一の容器内で行うことができ、さらに製造プロセスの効率と実行可能性が改善するので、特に有利である。

【００７６】

Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ出発物質の製造

ＡＭＧ４１６は、７個のアミノ酸の線状配列を含んでなり、そのうちの４個はＤ－アルギニンである。ＡＭＧ４１６の合成に用いられるＤ－アルギニンのＦｍｏｃ誘導体であるＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを合成する方法を本明細書に記載する。高品質のＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ出発材料の使用は、段階Ｉから段階ＩＩＩまでの粗製のＡＭＧ４１６にさらなる純度を与え、それによって段階ＩＶにおける精製収率を高めることができる。さらに重要なことに、高品質で高純度の出発材料を使用することにより、所望の純度のＡＭＧ４１６を確保するための望ましく且つ有利な調節要素を提供することができる。より高収率で得られ、必要とする単位操作がより少なく、より確かな品質管理を提供し、大規模製造に適した、高品質のＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨおよびＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを製造するための新しい方法が開発された。要約すれば、本明細書に記載のＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの製造方法によって、品質における潜在的な利益を伴ってＡＭＧ４１６製造の実行可能性が有意に増加する。

【００７７】

文献に見出されるＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの最も簡潔な合成の１つであり、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの商業的規模の合成に用いることができる、合成経路は以下の通りである。例えば、中国特許第ＣＮ１０１２５０１７２Ｂ（２０１２年５月２日）を参照。合成は、ジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカーボネート（Boc_2O）でＤ－Ａｒｇのアミノ基を保護することにより開始し、単離後にほぼ定量的収率でＢｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ－ＯＨが得られる。工程２では、側鎖のグアニジン基を水酸化ナトリウム水溶液などの塩基の存在下、Ｐｂｆ基で保護する。生成物は単離せず、ＩＰＡ（イソプロピルアルコール）溶液として次の工程に直接使用される。工程３では、酸性条件下でＢｏｃ保護基を除去し、対応する生成物、Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを結晶性の中間体として単離する。この方法の工程４では、Ｆｍｏｃ保護基をアミノ官能基に導入して、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを最終生成物として得る。工程２と工程４の生成物はいずれも非晶質の物質である、すなわち不純物を排除する能力が限られているので、結晶性の中間体Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ（工程３の生成物）は、最終製品の純度に影響を及ぼし純度を確保するうえで考慮すべき点（control point）となる。

【００７８】

高純度の生成物を得ることは、文献に報告されている製造法に頼る場合には重要な課題である。純度の要求を満たすためには、通常、複数回の再結晶が必要である。一例として、Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨは、純度を所望のレベルに高めるために、ＥｔＯＨ／Ｅｔ

ＯＡｃ／水の３相溶媒系で７回再結晶される。さらに、工程２では、大過剰の水酸化ナトリウムおよびＰｂｆＣｌの存在下でさえ、出発物質の２０～３０％が未反応のままであり、全体の収率（工程１～３）は典型的には４０％未満に過ぎない。

【００７９】

開発され、本明細書に記載され、図６および図７に示された改良された製造方法は、既知の製造方法よりもいくつかの利点を提供する。ＮａＩは、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ－ＯＨをＢｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨに変換するための触媒として導入される（図６の工程２参照）。ヨウ化ナトリウムの取り込みは、反応速度論を有意に改善するのに有効であり、その結果、工程２の変換率を９５％以上に増加させることができ、アッセイ収率を約９０％まで改善することができる。加えて、不純物の総量も減少する。

【００８０】

Ｄ－Ｏｒｎ（Ｐｂｆ）－ＯＨおよびＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨのエチルエステルは、それぞれ工程２および工程３（図７）で形成される鍵となる不純物であり、結晶化によって除去することが困難であるため、複数の再結晶が必要となる。本明細書に記載の改善された方法は、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨがＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨに変換される工程３の溶媒として、より一般的に使用されるＥｔＯＡｃと比較して、立体障害のあるエステルであるイソプロピルアセテート（ＩＰＡｃ）の使用を含んでなる。ＩＰＡｃを使用することにより、強酸ＨＣｌによって触媒される副反応であるエステル交換反応の速度が有意に遅くなる。その結果、対応する不純物であるＤ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨのエステルの量は、約０．５％未満に減少する（これに対しＥｔＯＡｃを使用する製法では１．０％以上）。さらに、イソプロピルアルコール（ＩＰＡ）／水は、すべての製造工程における不純物を除去する上、結晶化工程における製品損失を最小限にすることができる、より強力な溶媒系であることがわかった。実験室規模（２０ｇ）で実施した試験では、Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ（工程３の中間体）の純度は２回の結晶化だけで９９．７％以上に改善され、全体の収率（工程１～３）は約７０％であった。この改良されたプロセスの一実施形態は、以下の実施例６に記載されている。

【００８１】

当業者は、本発明がＡＭＧ４１６の変異体および誘導体にも及ぶことを容易に認識するであろう。例えば、一実施形態では、本明細書に記載した方法は、Ｎ－アセチル－Ｄ－システイニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギンアミドとＤ－システインとのジスルフィドについても用いることができる。別の実施形態では、開示された製剤はまた、Ｎ－アセチル－Ｌ－システイニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アルギンアミドとＤ－システインとのジスルフィドおよび／またはＮ－アセチル－Ｌ－システイニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アルギニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アルギニンアミドとＬ－システインとのジスルフィドについて用いることができる。別の実施形態では、開示された製剤は、Ｎ－アセチル－Ｄ－システイニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギンアミドとＬ－システインとのジスルフィドおよび／またはＮ－アセチル－Ｄ－システイニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アルギニル－Ｄ－アラニル－Ｄ－アルギンアミドとＤ－システインとのジスルフィドについて用いることができる。さらに、本方法は、国際公開第２０１１／０１４７０７号パンフレットの表１、表２、表３、表４、表５、表６、表７、表８、表９および／または表１０に記載された１以上の化合物を製造するために利用することができる。さらなる実施形態では、本明細書に記載された方法は、国際公開第２０１１／０１４７０７号パンフレットに記載された化合物を製造するために用いることができる。

【実施例】

【００８２】

実施された実験および達成された結果を含む以下の実施例は、単に例示を目的として記載するものであり、特許請求の範囲を限定するものであると解釈してはならない。

【００８３】
実施例１Ａ
主鎖線状フラグメントの合成
主鎖線状フラグメントの合成を図２に示す。Ｒｉｎｋ Ａｍｉｄｅ AM樹脂（アミノメチル樹脂に結合したＦｍｏｃ ２，４－ジメトキシ－４’（カルボキシメチルオキシ）－ベンズヒドリルアミン）（１ｋｇ）をＤＭＦ（５．８Ｌ／ｋｇ）に加え、溶液を２２℃で撹拌した。樹脂を濾過し、スラリーを洗浄した。サンプルを、残留Ｆｍｏｃ（ＵＶ試験）および残留ピペリジン（ｐＨ）について試験した。Ｆｍｏｃ脱保護が行われたことを確認するために、Ｋａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラー試験を行った。

【００８４】
最初の６つのアミノ酸誘導体のカップリングは、予備活性化、カップリングおよび洗浄を同じ手順で行った。１．６当量の保護されたＦｍｏｃアミノ酸をＤＭＦ（２２℃、８．９Ｌ／ｋｇ）に添加した。次いで、Ｏｘｙｍａ（２．４５当量）を添加した。溶液を２１℃に冷却し、ＤＩＣ（２．１３当量）を加え、反応を進行させた。予め活性化した溶液を樹脂と混合し、反応を進行させた。ＤＩＣ（１．０７当量）を加え、反応を２２℃で進行させた。サンプルは、Ｋａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラー試験を用い、不完全なカップリングについて試験した。この物質を洗浄し、続いてＦｍｏｃ脱保護し、さらに洗浄した。サンプルを、残留Ｆｍｏｃ（ＵＶ試験）および残留ピペリジン（ｐＨ）について試験した。Ｋａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラーテストを行い、Ｆｍｏｃ脱保護が確実に行われたことを確認した。

【００８５】
１．６当量のＦｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨをＤＭＦ：ＤＣＭ（１：１．７）溶液に添加し（１２Ｌ／ｋｇ）、ＨＯＢｔ・$Ｈ_2Ｏ$（２．４５当量）を添加した。溶液を２０℃に冷却し、ＤＩＣ（２．１３当量）を加え、反応を進行させた。予め活性化した溶液を樹脂と混合し、反応を２２℃で進行させた。ＤＭＦ／ＤＣＭ比が約１：１であるＳＰＰＳ反応に１．０７当量のＤＩＣを加えた。２２℃で反応を進行させた。サンプルは、Ｋａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラー試験を用いて不完全結合について試験した。

【００８６】
この物質を洗浄した後、Ｆｍｏｃ脱保護し、さらに洗浄した。サンプルを、残留Ｆｍｏｃ（ＵＶ試験）および残留ピペリジン（ｐＨ）について試験した。Ｋａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラーテストを行い、Ｆｍｏｃ脱保護が確実に行われたことを確認した。

【００８７】
ＤＭＦ（０Ｌ／ｋｇ）；無水酢酸（１．０６Ｌ／ｋｇ）およびピリジン（１．０６Ｌ／ｋｇ）を溶液に添加し、溶液を予備活性化のために撹拌した。予備活性化溶液を樹脂と混合し、２２℃で攪拌した。この物質を濾過し、洗浄した。サンプルをＫａｉｓｅｒおよび／またはＴＮＢＳカラー試験を用い、不完全なキャッピングについて試験した。この物質をスラリー洗浄した。樹脂を撹拌せずに窒素下で乾燥させた。乾燥した樹脂のサンプルを採取し、ＬＯＤおよび残留溶媒について試験した。図２を参照。

【００８８】
実施例１Ｂ
主鎖線状フラグメントの合成
ＡＭＧ４１６主鎖線状フラグメントの合成を図２に示す。ペプチド鎖は、Ｒｉｎｋ ＡＭアミド樹脂上でＣ末端からＮ末端へ１サイクルにつき１アミノ酸ずつ構築した。各サイクルは２つの反応ステップからなる：１）Ｎ末端からのＦｍｏｃ切断；２）次のＦｍｏｃ保護アミノ酸のカップリングまたは最終的なアセチル化。

【００８９】
ＳＰＰＳの開始：Ｒｉｎｋ ＡＭアミド樹脂（１．０モル）をＳＰＰＳ反応器に移し、Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）で洗浄した。

【００９０】
Ｆｍｏｃ開裂：前の工程で得た樹脂を、ＤＭＦ中の２０％ピペリジンの溶液中に少なく

とも１０分間懸濁させた。Ｆｍｏｃ開裂の完了を紫外線（ＵＶ）吸収測定によってモニターした。Ｆｍｏｃ開裂の完了後、中性ｐＨに達するまで、樹脂をＤＭＦおよびイソプロパノール（ＩＰＡ）で交互に洗浄した。

【００９１】

Ｆｍｏｃ－アミノ酸カップリング：Ｆｍｏｃ開裂工程の後、樹脂を、ＤＭＦ中の、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸誘導体（＞１．２モル）および活性化試薬（＞１．８モル）（Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）およびエチル（ヒドロキシイミノ）－シアノアセテート（Oxyma））の溶液と混合することにより、カップリング反応を行った。Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨのカップリングには、ＤＩＣおよび１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢｔ）を活性化剤として用い、ＤＭＦとジクロロメタン（ＤＣＭ）の混合物を反応溶媒として使用した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。Ｋａｉｓｅｒ試験およびＴＮＢＳ試験を行い、カップリングの完了をモニターした。プロセスを次のサイクルに移行する前に、ＫａｉｓｅｒテストとＴＮＢＳテストの両方で陰性の結果が必要であるとした。各カップリングまたはキャッピング工程の後、樹脂をＤＭＦおよびＩＰＡで交互に洗浄した。

【００９２】

最終的なアセチル化：最終的なＦｍｏｃ脱保護の後、ＤＭＦ中の無水酢酸およびピリジンを用いて、ペプチドのＮ末端アミノ基をアセチル化した。Ｋａｉｓｅｒ試験およびＴＮＢＳ試験を行いアセチル化の完了を確認した。アセチル化が不完全であれば、Ｋａｉｓｅｒ試験およびＴＮＢＳ試験の両方の陰性の結果が得られるまで、同じアセチル化手順を繰り返した。

【００９３】

最後に、樹脂（ＡＭＧ４１６－樹脂）上の薬物の保護されたペプチド骨格を濾過により単離し、ＤＭＦ、ＩＰＡおよびアセトニトリル（ＡＣＮ）で洗浄し、減圧下で乾燥させた。

【００９４】

実施例２Ａ

樹脂からの主鎖線状フラグメントの切断

カクテル溶液は、ＤＩＷ（０．１６Ｌ／ｋｇ）；ＴＦＡ（５．６４Ｌ／ｋｇ）；ＴＩＰＳ（０．４６当量）およびＤＰＤＳ（６．４１当量）を室温にて混合した後、溶液を０±２℃に冷却することにより調製した。樹脂上のペプチドを０±２℃でカクテル溶液に添加し、溶液を２５℃に加熱し、反応を進行させた。樹脂を濾過により除去し、洗浄した。溶液を－１０℃に保持し、－１０℃でＩＰＥ：ＭｅＣＮ（２４．５Ｌ／ｋｇ）の６．８：１溶液を時間と共に添加して、温度および沈殿を制御した。反応を進行させ、ＡＭＧ４１６ＳＰｙ中間体を－５℃で濾過し、洗浄した。ＳＰｙ中間体を完全真空下、２０℃で乾燥させた。図３を参照。

【００９５】

実施例２Ｂ

樹脂からの主鎖線状フラグメントの切断

切断用溶液は、反応器内でＴＦＡ、H_2O、およびトリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）を９６．９：２．６：０．５（ｖ／ｖ／ｖ）の比で混合することによって調製した。切断用溶液に、Ｄシステインのスルフヒドリル基の活性化剤としてＤＰＤＳ（＞１．２モル）を添加した。ＡＭＧ４１６－樹脂（１．０モル）を反応器に入れ、反応混合物を室温で１時間以上撹拌した。樹脂を濾別した。濾液と洗浄液を別の反応器に移し、冷却した。次いで、この溶液に、ジイソプロピルエーテル（ＩＰＥ）とＡＣＮの冷却貧溶媒混合物を加えて、ＡＭＧ４１６－ＳＰｙを沈殿させた。懸濁液をフィルタードライヤーを介して濾過し、続いてＡＭＧ４１６－ＳＰｙのフィルターケーキをＡＣＮおよびＩＰＥで洗浄し、減圧下、約２０℃にてフィルタードライヤーで乾燥した。

【００９６】

実施例３

Ｌ－Ｃｙｓとのｉｎ－ｓｉｔｕコンジュゲーション／分取ＨＰＬＣ
ＡＭＧ４１６ ＳＰｙ中間体（１．０モル）を０．２％ＴＦＡ溶液に添加した。Ｌシステイン（＞１．１モル）を溶液に添加し、反応を室温で少なくとも１５分間進行させた。
【００９７】
粗製のＡＭＧ４１６の精製は、ＡＣＮ／H_2Oを移動相として使用し、ＴＦＡを修飾剤として使用するＣ１８シリカゲル固定相を用いる分取クロマトグラフィーによって行った。段階ＩＩＩで得た粗製のＡＭＧ４１６溶液をカラムに負荷し、直線勾配法を精製工程に用いた。２３０ｎｍでのＵＶ吸光度によって溶出をモニターした。各ローディング後、安定したＵＶベースラインが達成されるまで、カラムを水中８０％ＡＣＮ（ｖ／ｖ）でフラッシュした。フラクションを５℃で保存し、それらをサンプリングし、次いで所望の純度を有するフラクション（ＨＰＬＣで決定）をプールした。精製操作で得たプールを、同じＨＰＬＣカラムを用いて濃縮操作を行うことによって濃縮した。フラクションを５℃で保存した。所望の純度を有するフラクション（ＨＰＬＣにより決定）を凍結乾燥してＡＭＧ４１６ＴＦＡ塩を単離した。図４を参照。
【００９８】
実施例４
塩の変換
ＡＭＧ４１６ＴＦＡ塩を、完全な溶解が観察されるまで１０℃でＩＰＡ（ｖ／ｖ）１０Ｌ／ｋｇ中の１５％水の溶液に添加した。この溶液を１２ＭのＨＣｌ水溶液（０．２７Ｌ／ｋｇ）およびＩＰＡ（４９．４Ｌ／ｋｇ）に３時間かけて表面下添加を介して添加し、ＡＭＧ４１６ ４．５塩酸塩を直接沈殿させた。このバッチを３時間熟成させ、分析のためにサンプリングした。
【００９９】
この物質を濾過し、９６重量％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）でスラリーを洗浄した。次いで、ケーキを９６重量％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）中で４時間再スラリー化した。この物質を濾過し、さらに９６％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）、次いでＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）でスラリーを洗浄した。この物質を完全真空下、２５℃で乾燥させた。乾燥ケーキを水（８Ｌ／ｋｇ）に溶解し、バッチを蒸留により濃縮して残留ＩＰＡを除去し、所望の濃度にした。蒸留中溶液の温度を２５℃以下に保った。図５を参照。
【０１００】
実施例５
ＳＰｙ中間体の精製およびＡＭＧ４１６ＨＣｌの生成
ＡＭＧ４１６塩酸塩の製造方法の別法を記載する。上記実施例２に記載したように、ＳＰｙ中間体を、樹脂からの切断、沈殿および濾過後、完全真空下２０℃で乾燥させた。次いで、沈殿物を０．１％ＴＦＡ水溶液に溶解し、ＨＰＬＣ精製のためにＣ－１８カラムに充填した。カラムを＜６０バールで運転し、溶液温度は全体を通して１５～２５℃とした。溶出液は０．１％ＴＦＡアセトニトリル溶液と０．１％ＴＦＡ水溶液を用いた。フラクションを５℃で保存し、それらをサンプリングした後、フラクションをプールした。２回の操作で集めた混合プールを希釈し、同じＨＰＬＣカラムを使用して濃縮／精製操作を行い、総容量を減少させてさらなる不純物を除去した。フラクションは５℃で保存した。
【０１０１】
ＡＭＧ４１６ ＳＰｙ中間体を含むフラクションを共沸蒸留して、溶媒を、０．１％ＴＦＡのＩＰＡ溶液から１５％水のＩＰＡ溶液に交換し、必要に応じてＩＰＡを追加した。次いで、得られたＡＭＧ４１６ ＳＰｙ中間体のＩＰＡ中の溶液に、Ｌシステイン１．１５当量を添加し、室温で反応を進行させてコンジュゲーションを生じさせ、実施例４に上記したようにＡＭＧ４１６ ＴＦＡ塩を形成させた。ＡＭＧ４１６ ＴＦＡの溶液を、１２Ｍの水性ＨＣｌ（０．２７Ｌ／ｋｇ）およびＩＰＡ（４９．４Ｌ／ｋｇ）の溶液に、表面下添加を介して３時間かけて添加し、ＡＭＧ４１６ ４．５塩酸塩を直接沈殿させた。バッチを３時間熟成させ、分析のためにサンプリングした。
【０１０２】

この物質を濾過し、９６重量％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）でスラリーを洗浄した。次いで、ケーキを９６重量％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）中で４時間再スラリー化した。この物質を濾過し、さらに９６％ＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）、次いでＩＰＡ（１０Ｌ／ｋｇ）でスラリーを洗浄した。この物質を完全真空下、２５℃で乾燥させた。乾燥ケーキを水（８Ｌ／ｋｇ）に溶解し、バッチを蒸留により濃縮して残留ＩＰＡを除去し、所望の濃度にした。蒸留中溶液の温度を２５℃以下に保った。

【０１０３】

実施例６

Ｈ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの合成

実施例１に記載の主鎖線状フラグメントの合成は、線状フラグメントの７残基のうちの４つを構成するＤ－アルギニンサブユニットの付加にＦｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの使用を必要とする。Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを合成するための改良された、より効率的な方法を以下に記載する。

【０１０４】

ジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカーボネート（Boc_2O）によるＤ－Ａｒｇのアミノ基の保護から合成を開始し、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ－ＯＨを、文献に記載された標準的な手順で結晶化により単離した後、ほぼ定量的収率で得る。アルギニンの側鎖のグアニジン基を、塩基としてＮａＯＨ水溶液（４．３当量）／ＮａＩ（５％モル）の存在下、Ｐｂｆ－Ｃｌ（１．３当量）の１０／１アセトン／ＴＨＦ溶液の１時間の添加（０～５℃）によりＰｂｆ基で保護し、Ｂｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ（アッセイ収率８５～９０％）を生成させる。図６参照。ＩＰＡｃ溶液中のＢｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを４．８当量の濃ＨＣｌで２０℃にて約６時間処理した。反応後、有機層を捨て、ＮａＯＨを用いてｐＨを５に調整して粗製物を水層から単離した後、白色の懸濁液が観察された。図７参照。上清が２０℃で約３ｍｇ／ｍＬの濃度を有するとき、上清を室温で濾過し、得られたケーキを水で洗浄し、真空下で乾燥させた。この工程後の全体のアッセイ収率は約８０～８５％であった。Ｈ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの純度は、３／１の水／ＩＰＡ（ｖ／ｖ）からの最初の再結晶により＞９８．５％に増大した。上清が約７ｍｇ／ｍＬの濃度を有するとき、これを濾過し、真空下で乾燥させた。この工程後、全体のアッセイ収率は約７５％であった（典型的には、この工程で約１０％の生成物損失が観察される）。２回目の再結晶を４／１の水／ＩＰＡ（ｖ／ｖ）から行った。上清濃度が約３．７ｍｇ／ｍＬであるとき濾過を行った。２回目の再結晶により、Ｈ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨの純度は、ＨＰＬＣによる面積百分率による純度（ＬＣＡＰ）が約９９．８４に増大し、ＬＣＡＰが０．２を超える不純物は含まれなかった。この工程の典型的な収率は約９３％であり、約５％の生成物損失がある。次いで、標準プロトコルに従ってＨ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨをＦｍｏｃＯＳｕと反応させ、生成物Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨを文献の標準手順を用いて単離した。

【図１】

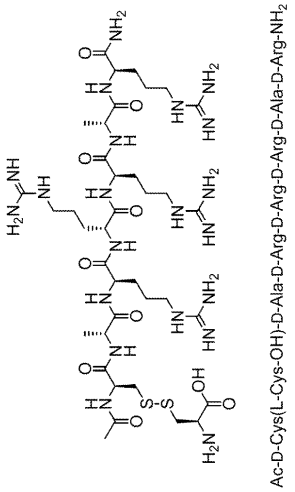


FIG. 1

【図２】

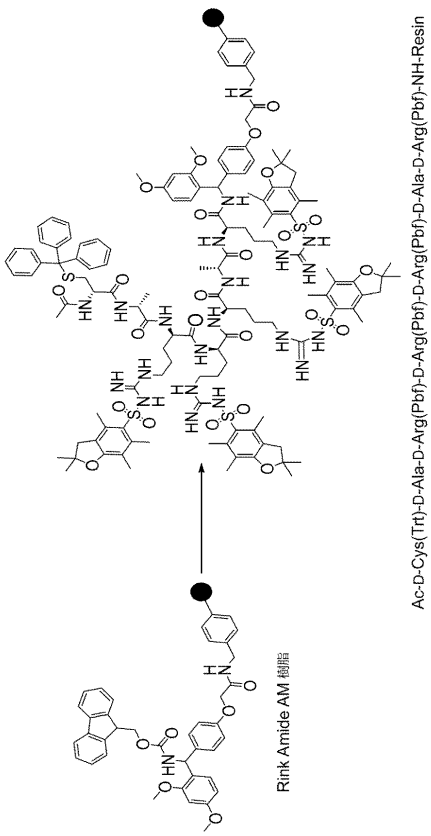


FIG. 2

【図３】

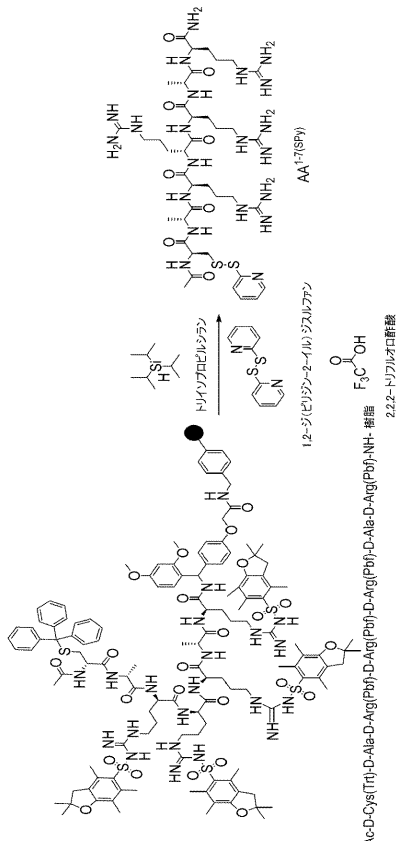


FIG. 3

【図４】

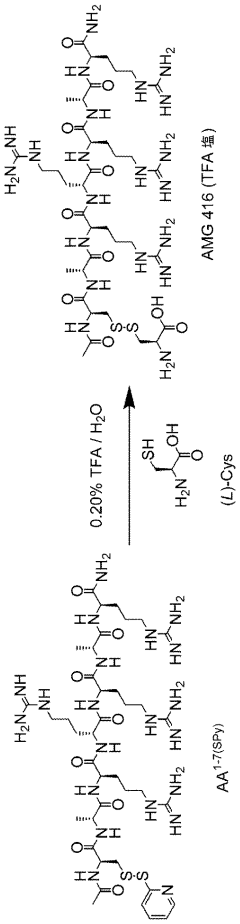


FIG. 4

【図５】

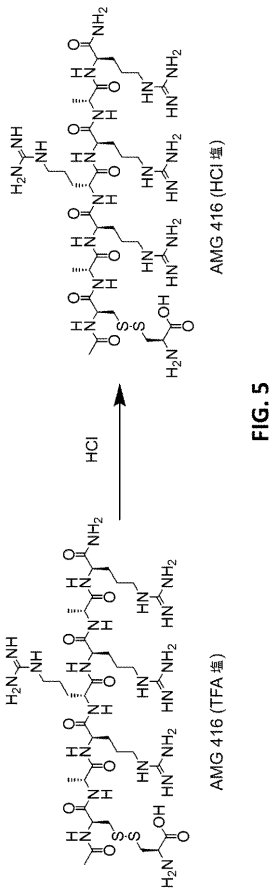


FIG. 5

【図６】

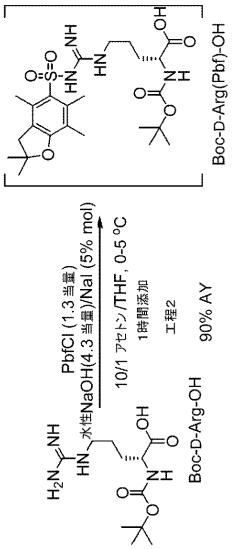


FIG. 6

【図７】

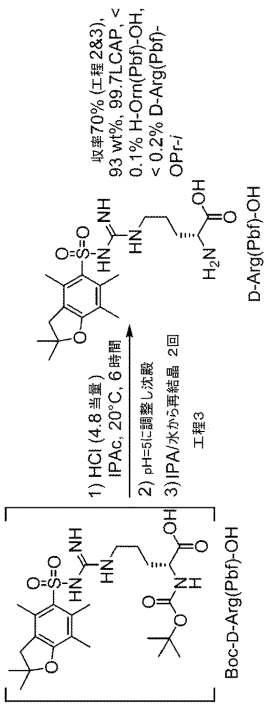


FIG. 7

【配列表】
0006710158000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジェローン・ベゼマー
アメリカ合衆国９１３６０カリフォルニア州サウザンド・オークス、カミーノ・マンザナス６５４番
(72)発明者 イン・チェン
アメリカ合衆国９１３２０カリフォルニア州ニューベリー・パーク、ハニー・クリーク・コート１４２９番
(72)発明者 リチャード・クロケット
アメリカ合衆国９１３６０カリフォルニア州サウザウンド・オークス、ブライアー・クリフ・ロード８６７番
(72)発明者 ケビン・クロスリー
アメリカ合衆国９１３６２カリフォルニア州サウザンド・オークス、アレッポ・コート１７９９番
(72)発明者 ション・ツイ
アメリカ合衆国０２４２１マサチューセッツ州レキシントン、リンカーン・ストリート３９１番
(72)発明者 リアン・ホアン
アメリカ合衆国９３０６５カリフォルニア州シミ・バレー、ラッシュ・ヘイブン・ウェイ１６５４番
(72)発明者 シアン・ジョーンズ
アメリカ合衆国９１３２０カリフォルニア州ニューベリー・パーク、サイプレス・アベニュー７８４番
(72)発明者 アッシャー・ロウアー
アメリカ合衆国９３０２１カリフォルニア州ムーアパーク、ティンバーデイル・ロード４３０５番
(72)発明者 クリシュナクマール・ランガナタン
アメリカ合衆国９１３２０カリフォルニア州サウザンド・オークス、ブロッサム・コート１７５２番

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 国際公開第２０１１／０１４７０７（WO, Ａ１）
特開２０１４－０４３４６８（ＪＰ, Ａ）
米国特許出願公開第２０１４／００２４５９２（ＵＳ, Ａ１）
Helvetica Chimica Acta, 1979年, Vol.62, Fasc.7, Nr.253, p.2507-2510

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）