

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4886703号  
(P4886703)

(45) 発行日 平成24年2月29日(2012.2.29)

(24) 登録日 平成23年12月16日(2011.12.16)

(51) Int.Cl.

C07K 14/16 (2006.01)  
C07K 1/02 (2006.01)

F 1

C07K 14/16  
C07K 1/02

Z N A

請求項の数 1 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2007-548733 (P2007-548733)  
 (86) (22) 出願日 平成17年12月22日 (2005.12.22)  
 (65) 公表番号 特表2008-526699 (P2008-526699A)  
 (43) 公表日 平成20年7月24日 (2008.7.24)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2005/013854  
 (87) 國際公開番号 WO2006/069729  
 (87) 國際公開日 平成18年7月6日 (2006.7.6)  
 審査請求日 平成20年11月10日 (2008.11.10)  
 (31) 優先権主張番号 60/640,716  
 (32) 優先日 平成16年12月30日 (2004.12.30)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 T  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100146422  
 弁理士 田中 聰  
 (74) 代理人 100113653  
 弁理士 東田 幸四郎  
 (74) 代理人 100116919  
 弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペプチド中間体断片を使用するペプチドT-1249の合成

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) 固体支持体上で合成された、配列

## 【化1】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (配列番号2) 及び

Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-OH (配列番号3)

(式中、ZはNH<sub>2</sub>-末端保護基である)のペプチド中間体断片を提供すること、

(b) 溶液相において、

## 【化2】

Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-OH (配列番号3)

をフェニルアラニンアミド残基と反応させ、

配列

## 【化3】

H-KNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (配列番号4)

を提供すること、および

(c) 溶液相において、

【化4】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (配列番号2)

を

【化5】

H-KNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (配列番号4)

と反応させ、

【化6】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (配列番号1)

10

を提供することの工程を含む、配列

【化7】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (配列番号1)

を有するペプチドを調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固相および液相工程を使用して、T-1249ペプチドを調製するための方法、ならびにこれらの方法において使用され得るT-1249の中間体ペプチド断片に関するものである。より特別には、本発明は、固相アブローチを使用して合成される2つの断片を使用する、T-1249ペプチドの調製に関するものである。

20

【0002】

ペプチド合成についての多くの方法が、文献（例えば、米国特許第6,015,881号、Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4005-4008、Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4009-4012、Kamber et al. (eds), Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden (1992) 525-526、Riniker et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:9307-9320、Lloyd-Williams et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:11065-11133、およびAndersson et al. (2000) Biopolymers 55:227-250参照）に記載される。合成のさまざまな方法は、合成が起こる相、すなわち液相または固相の物理的な状態によって区別される。

30

【0003】

固相ペプチド合成（SPPS）において、アミノ酸またはペプチド基は、固体支持体樹脂へ結合される。次に、連続的なアミノ酸またはペプチド基が、関心対象のペプチド材料が形成されるまで、支持体により結合されたペプチドへ付着される。次に、支持体により結合されるペプチドが典型的に、支持体から開裂され、さらなる工程および／または精製へ供される。いくつかの場合において、固相合成は、成熟ペプチド生成物を産じ、他の場合において、支持体から開裂したペプチド（すなわち、「ペプチド中間体断片」）が、より大きな成熟ペプチド生成物の調製に使用される。

40

【0004】

固相工程から生じたペプチド中間体断片は、液相合成工程（本明細書で「溶液相合成」と呼ばれる。）において互いに結合され得る。溶液相合成は、固相による有用な成熟ペプチドの合成が不可能であるかまたは実用的でないかのいずれかの場合に特に有用であり得る。例えば、固相合成において、より長いペプチドが、不規則な高次構造を結果として採用し得る一方で、固体支持体へなおも付着され、したがって、最終生成物における活性的部分的なまたは完全な損失を生じる。また、ペプチド鎖が支持体樹脂上でより長くなるにつれ、結合および脱保護などの工程段階の効率は妥協され得る。このことは、順に、活性化可能なアミノ酸、共試薬、および溶媒などの出発材料における増大する損失に加えて、上述の問題を補償するために、より長い工程時間を生じ得る。これらの問題は、ペプチド

50

の長さが増大するにつれ増大し得、それゆえ、固相手法のみを使用して合成される長さ30超のアミノ酸の成熟ペプチドを見出すことは、比較的まれである。

#### 【0005】

溶液相結合において、2つのペプチド中間体断片、またはペプチド中間体断片および反応性アミノ酸は、適切な溶媒中で、および通常、結合反応の効率および質を促進させるさらなる試薬の存在下で結合される。ペプチド中間体断片は反応性に配置され、それによりある断片のN末端は、他の断片のC末端へ結合され、または逆もしかりである。さらに、固相合成中に存在する側鎖保護基は、断片の末端の特異的反応性を確実にするため、溶液相結合中に断片上で普遍的に保持される。これらの側鎖保護基は典型的には、成熟ペプチドが形成されるまで除去されない。

10

#### 【0006】

非常に大きなペプチドの合成について、複数の溶液相結合段階が、3または4またはそれより多くのペプチド中間体断片を使用して実施されることは珍しくない。複数のペプチド中間体断片が使用されるときに、溶液相反応における末端から末端への結合反応の一般的な概念が、一般的に理論上直接的であるが、実際には、これはまれな場合である。不純物およびペプチド収量などのさまざまな因子が、全長のペプチドの質および収量に有意な影響を及ぼし得る。それゆえ、ハイブリッドスキームを使用するペプチド合成は、しばしば挑戦的であり、多くの場合、実際の合成が実施されるまで、問題が合成スキームに内在することを予測することは困難である。

#### 【0007】

20

いくつかの場合、溶液相合成は、固相合成の後でペプチド中間体断片の純度を欠くことによって影響され得る。この点については、ペプチド中間体断片を精製段階へ供した後に、断片を溶液相工程において結合させることが必要であり得る。精製もやはり、ペプチド中間体断片の、したがって最終ペプチド生成物の収量における低下を生じ得る。

#### 【0008】

また、成熟ペプチドの収量は、成熟ペプチドを合成するのに必要とされる溶液相段階の数に反比例する。いくつかの場合、ペプチド中間体生成物を利用する3、4、または4を超える溶液相段階が、成熟ペプチドを生じるのに必要とされ得る。どのさらなる溶液相結合段階も、全長のペプチド生成物の回収の低下を生じ得る。それゆえ、全般的な収量を改善するため、結合に關与する段階を最小とすることが一般に望ましい。

30

#### 【0009】

合成スキーム全般での1つ以上の段階における適度の改善は、成熟ペプチドの調製における有意な改善となり得る。このような改善は、時間および試薬の大きな全体的節約に至り得、最終生成物の純度および収量も有意に改善し得る。

#### 【0010】

ハイブリッド合成における改善の重要性の論議が、これらの手順を使用して生じるペプチドのいずれかの種類へ適用可能である一方、それは、治療上有用であり、商業的な医学的使用のためのスケールで製造されるペプチドに関して特に重要である。小分子医薬品の合成が比較的安価となり得る一方、治療用ペプチドなどのより大きな生体分子医薬品の合成の経費は、比較の上で莫大に高くなり得る。これらのより大きな生体分子医薬品の合成工程における非常にわずかな改善でも、他の因子に加えて、試薬の経費、合成時間のため、このような医薬品を製造するのにさらに経済的に実行可能であるかどうかに及ぼす有意な衝撃を有し得る。このような改善は、多くの場合、より大きな生体分子医薬品のこれらのタイプの適切な治療上の選択肢がたとえあったとしても、ほとんどないという事実によって支持されるように、より大きな生体分子医薬品についてのこれらの高い製造経費により、必要である。

40

#### 【0011】

このことは、レトロウィルス感染によって生じる免疫不全疾病の処置のために使用される治療用ペプチドの場合において明確に見られる。抗レトロウィルス活性を有するペプチドは、異なる方法で作用し得、ウィルス粒子とホスト免疫細胞との融合を防止することに

50

よることを含む。多くの場合、伝統的に使用される抗ウィルスが、突然変異によるウィルス耐性のため、これらの疾病的処置に効果的ではなくなるため、これらの新規かつ効果的な治療用ペプチドについての需要は大きい。

#### 【0012】

免疫不全疾病と戦うのに有用な治療用ペプチドのある見込みのあるクラスは、融合阻害剤である。治療用ペプチドのこれらのタイプは、ウィルス力価を低下し、そして免疫不全疾病を有する患者における生活の質を有意に改善し得る。例えば、合成された36個のアミノ酸のペプチドのハイブリッドペプチドT-1249である（エンフィルチドまたはT-20としても公知の）FUZEON（登録商標）ペプチド、ならびにこれらのペプチドの誘導体および対応物は、ヒト免疫不全ウィルス（HIV）および後天性免疫不全症候群（AIDS）の処置における融合阻害剤として有益であることが証明されている。FUZEON（登録商標）ペプチドおよびその誘導体は、HIVに感染した人間における首尾一貫した強力な活性を示すHIVの第一阻害剤である（Kilby et al. (1998) Nat Med 4:1302およびKilby et al. (2002) AIDS Res Hum Retroviruses 18:685）。

#### 【0013】

T-20ペプチドおよびT-1249ペプチドなどの融合阻害剤は、ウィルスとCD4+ホスト細胞の膜との融合に関するHIV1型（HIV-1）の糖タンパク質41エンペロープの領域へ結合する（Wild et al. (1993) AIDS Res. Hum. Retroviruses 9:1051）。融合阻害剤は、細胞の外側に留まり、HIV-1が細胞へに入る前にHIV-1を遮断する。FUZEON（登録商標）ペプチドおよびその誘導体は、in vitroでHIV-1を強力にかつ選択的に阻害することによって、薬物の相互作用、副作用、および細胞毒性を最小とする。

#### 【0014】

これらの関心に加え、ペプチドの大規模生産についての生成物回収および生成物純度に関する問題は、試薬の取り扱い、保存、および廃棄と同様、ペプチド合成スキームの実行可能性に大きく影響を与える。したがって、改善された収量の大きなバッチ量における商業的な関心対象のペプチド材料を効率よく生産できるペプチド合成工程については絶え間ない需要がある。ペプチドの固相合成後の支持樹脂からの開裂したペプチドの回収は、改善が必要とされる合成のある局面である。

#### 【0015】

本発明は、固相および溶液相（「ハイブリッド」）アプローチを使用して合成されるT-1249ペプチドの調製に関するものである。一般に、アプローチは、固相化学物質を使用して、2つの異なるT-1249ペプチドの中間体断片（配列番号2および配列番号3、またはそれらの対応物）を合成することを含む。いくつかの本発明の局面によれば、固相合成の後、これらの特異的T-1249の中間体配列は、それ自体溶液相結合段階に特によく役立つことがわかつてきた。さらに、これらの中間体断片の形成に至る固相段階が、これらの中間体断片の収量および純度を有意に改善するために本発明により改変され得ることもわかつてきた。この改善された収量および純度は、溶液相結合段階へと持ち越され、それにより合成工程全体を改善する。

#### 【0016】

本発明の方法および本明細書に記載のペプチド中間体断片は、特に多くの方法でT-1249合成工程をより効率的にするため、特に有利である。特に、T-1249ペプチドの中間体生成物である配列番号2または配列番号3の形成に至る固相合成段階は、標準的な固相技術において伝統的に使用されるものよりも低い負荷因子で支持体へ第一アミノ酸が結合された支持体樹脂を利用する。好ましくは、このより低い負荷因子を使用すれば、典型的には長い固相により合成された断片である配列番号2または配列番号3のT-1249ペプチドの中間体生成物が、改善された収量および改善された純度で製造されうることがわかつてきた。

#### 【0017】

改善された純度および収量は、溶液相結合段階についての条件を有意に改善し、それに

10

20

30

40

50

より T - 1 2 4 9 の全般的な合成についての改善を生じる。

【 0 0 1 8 】

これまで、最も成功した T - 1 2 4 9 合成のアプローチは、溶液相結合を利用してきており、その中では、3つ以上のペプチド中間体断片が固相合成により調製される。次に、これらの中間体断片が、溶液相結合反応において使用され、最終的な T - 1 2 4 9 成熟生成物を調製する。3つ（またはそれより多く）の断片アプローチに関するいくつかの利点が、中間体の固相合成のより高い質に関して一般に見られ得るが、このことは、いくつかの T - 1 2 4 9 断片を使用する場合では必ずしもではない。特に、良好な純度での残基 27 ~ 38 からなる T - 1 2 4 9 ペプチド中間体断片、および残基 13 ~ 26 からなる T - 1 2 4 9 ペプチド中間体断片を合成することは困難であつてきた。また、中間体断片と関連した不純物が、単離のための特定の溶媒を使用する3つの断片アプローチにおいて潜在的に存在する。10

【 0 0 1 9 】

別のマイナス面は、3つ（またはそれより多く）の断片アプローチが、2断片アプローチと比較してより多くの単離段階および精製段階を包含し、これらの更なる段階が処理時間を一般に増大させ、合成反応の全般的な収量をその後低下し得ることである。

【 0 0 2 0 】

本発明は固相合成を介して調製されるたつた2つのペプチド中間体断片を利用するため、ある明確な利点は、処理時間が短縮され、処理段階の排除が材料および試薬のより効率的な使用を生じ得ることである。このことは、ペプチド中間体断片が、固相合成における高価な試薬である5つのトリプトファン（W）残基を含む比較的長いペプチドであるため、T - 1 2 4 9 の合成において特に重要である。20

【 0 0 2 1 】

しかしながら、2断片アプローチによる潜在的な欠点は、固相合成によるより長い中間体断片の合成が複雑となり得、しばしば深刻な純度および/または回収問題に至り得ることである。これにもかかわらず、上述のように、本発明は、配列番号2または配列番号3に基づいた配列を有する中間体ペプチド断片を選択した後、低い樹脂負荷因子を使用する固相合成によりこれらの断片を合成する方法によって、中間体断片を良好な収量および純度でうまく生じさせることを示す。このような達成は、固相および溶液相の組み合わせたアプローチを使用してペプチドを合成する従来のアプローチの点を考慮すれば、かなり注目すべきである。30

【 0 0 2 2 】

本発明は、ペプチドの純度の他の局面が改善されることにおいても有利である。特に、配列番号2または配列番号3に記載の配列を有する中間体ペプチド断片は、N末端グルタミン酸（E）残基を含まない。各々の中間体断片がグルタミン酸残基を含む限り、各々の残基は、中間体断片の配列内またはC末端に位置する。N末端にグルタミン酸を有する断片はより多くのピログルタミン酸不純物を含む傾向があるけれども、（配列番号2および配列番号3などの）アミノ酸のこれらの一般的な配列配置を有する断片を使用すれば、中間体断片の純度が有意に高くあり得ることがわかつてきた。

【 0 0 2 3 】

それゆえ、いくつかの局面において、本発明は、（a）グルタミン酸（E）である残基へ第一アミノ酸を結合させた固相合成支持体樹脂を提供する段階であつて、ここでグルタミン酸は0.5以下の負荷因子で結合され、好ましくはグルタミン酸が0.2~0.5の負荷因子で結合される段階、（b）以下の配列40

【 0 0 2 4 】

【 表 3 0 】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-[支持体]

【 0 0 2 5 】

を提供するよう、結合された支持体上の第一アミノ酸へその次のアミノ酸を結合させる段50

階、(c)開裂反応において、支持体から

【0026】

【表31】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2)

【0027】

のペプチド中間体を除去する段階、および次に、

【0028】

【表32】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号1)

10

【0029】

の全部または一部を有するペプチドの合成のために

【0030】

【表33】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2)

【0031】

のペプチド中間体を使用する段階を含む、T-1249ペプチドの合成についてのペプチド中間体断片を調製するための方法を提供する。

20

【0032】

他の局面において、本発明は、(a)トリプトファン(W)である残基へ第一アミノ酸を結合させた固相合成支持体樹脂を提供する段階であって、ここで、トリプトファンは0.5以下の負荷因子で結合され、好ましくはトリプトファンが0.2~0.5の負荷因子で結合される段階、(b)以下の配列

【0033】

【表34】

KNEYELQKLDKWASLWEW-[支持体]

【0034】

30

を提供するため、その次のアミノ酸を第一アミノ酸へ、結合された支持体上で結合させる段階、(c)開裂反応において支持体から

【0035】

【表35】

KNEYELQKLDKWASLWEW (配列番号3)

【0036】

のペプチド中間体を除去する段階、および次に、

【0037】

【表36】

40

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号1)

【0038】

の全部または一部を有するペプチドの合成についての

【0039】

【表37】

KNEYELQKLDKWASLWEW (配列番号3)

【0040】

のペプチド中間体を使用する段階を含む、T-1249ペプチドの合成についてのペプチ

50

ド中間体断片を調製するための方法を提供する。

【0041】

最も好ましくは、本発明は、(a)配列

【0042】

【表38】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE(配列番号2)及び

KNEYELQKLDKWASLWEW(配列番号3)

【0043】

を有するペプチド中間体断片であって、0.5以下負荷因子を使用して、好ましくは0.2~0.5の負荷因子を使用して固体支持体上で合成されたペプチド中間体断片を提供する段階、(b)溶液相において、

【0044】

【表39】

KNEYELQKLDKWASLWEW(配列番号3)

【0045】

のペプチドをフェニルアラニンアミド残基と反応させ、配列

【0046】

【表40】

KNEYELQKLDKWASLWEWF(配列番号4)

【0047】

を提供する段階、および(c)溶液相において、

【0048】

【表41】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE(配列番号2)

【0049】

のペプチドを

【0050】

【表42】

KNEYELQKLDKWASLWEWF(配列番号4)

【0051】

のペプチドと反応させ、

【0052】

【表43】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF(配列番号1)

【0053】

のペプチドを提供する段階を含む、T-1249ペプチドを調製するための方法を提供する。

【0054】

他の局面では、結合段階において、第一アミノ酸は、0.5未満の負荷因子で支持体上に存在する。他の局面では、結合段階において、第一アミノ酸は、0.2~0.45の範囲の負荷因子、または0.25~0.40の範囲の負荷因子で支持体上に存在する。

【0055】

さらに他の局面において、固相合成は、1~1.5当量の量で、アミノ酸を新生ペプチ

10

20

30

40

50

ド鎖へ結合させることによって実施される。

【0056】

後述の本発明の態様は、以下の詳細な記述において開示される精確な形態へ徹底的であるようにまたは本発明を制限するよう企図されるものではない。むしろ、態様は、当業者が、本発明の原理および実際を正しく認識し理解し得るよう、選択され記載される。

【0057】

本明細書で使用される専門用語は、本発明の範囲を制限するよう企図されるものではない。上述の請求項を含む本文を通じて、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、別段に脈絡が明確に記載されない限り、複数の参照を含む。したがって、例えば、「アミノ酸残基」に対する参照は、1つ以上のアミノ酸残基に対する参照であり、当業者に公知のその均等物を含む。本発明において、特定の用語が頻繁に使用され、その意味が本明細書に提供される。別段の定義がなければ、本明細書で使用される用語は、当業者に対して普遍的に理解されるのと同様の意味を有する。いくつかの用語は、明細書において後により詳細に説明され得る。

【0058】

本発明は、T - 1 2 4 9 およびT - 1 2 4 9 対応物の合成を改善するための、特にT - 1 2 4 9 ペプチド中間体断片の固相合成に関する合成の局面を改善するための方法を示す。本発明の方法論は、たった2つの固相合成されたペプチド断片を使用して、T - 1 2 4 9 およびその対応物を作るために有用である。本発明は、一般にT - 1 2 4 9 合成において示すが、本明細書の本発明の教示は、他のペプチドの合成、特に固相および溶液相アプローチの組み合わせを使用して合成されるものへも適用可能である。本発明は、不純物、特にピログルタミン酸塩不純物と関連したペプチド中間体断片の合成へも適用可能である。

【0059】

本明細書に記載の方法は、T - 1 2 4 9 ペプチドのスケールアップした合成の局面を改善するのに特に適している。スケールアップした手順は、流通に有用なペプチド量を提供するように典型的に実施される。例えば、スケールアップした手順におけるペプチドの量は、バッチあたり500 g、または1 kg またはそれより多くであり得、より典型的にはバッチあたり数十～数百kg またはそれより多くであり得る。大規模合成などのスケールアップした合成手順では、1つ以上の大きな反応容器が使用され得る。これらは、合成工程におけるさまざまな段階についての樹脂、溶媒、アミノ酸、および化学物質などの試薬の量を収容でき、例えば100～500 kg 以上の範囲量のペプチドの生産が可能である大きさである。

【0060】

本明細書に記載の方法は、特にスケールアップした手順についてのペプチド合成の局面を改善するのに特に適している。好ましい態様において、本発明の方法は、処理（合成）時間における短縮、生成物の収量における改善、生成物の純度における改善、および必要とされる試薬および出発材料の量の削減などの改善を提供できる。

【0061】

T - 1 2 4 9 ペプチドは、（（カルボキシ末端に対応する）アミド末端への（アミノ末端に対応する）アセチル末端から読み取る）39個のアミノ酸の配列を有する。

【0062】

【表44】

アセチル-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub>

(配列番号1)

【0063】

T - 1 2 4 9 ペプチドの代表的なペプチド断片としては、これらの対応物と同様に、以下の表1に記載されるようなアミノ酸配列を有するものを含むがそれらに制限されない。

10

20

30

40

50

例えば、表では、Fである39番目の位置にあるアミノ酸は、主な代謝産物の場合のようにカルボン酸末端を有し得るか、またはT-1249ペプチド自体の場合におけるアミドとして改変され得る。

【0064】

T-1249は、HIV-1感染の処置に使用される抗レトロウィルス薬である。T-1249は、膜融合に必要とされる高次構造の変化を遮断することによって、HIV-1ウィルス粒子とホスト細胞との融合を遮断するよう機能する。このタイプの活性を有するペプチドを、T-1249活性を有すると本明細書でいう。

【0065】

T-1249は典型的には、T1249生成物を生じるための特異的なペプチド断片の群を合成し、組み合わせるための固相手順および液相手順の両者を利用する。T-1249ペプチドならびにT-1249ペプチドおよびその断片を作る方法は、その全体において参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,469,136号に記載されている。

10

【0066】

本発明は、全長のT-1249対応物およびT-1249ペプチド中間体対応物を含めて、T-1249対応物の合成へも適用可能である。本明細書で使用されるように、「T-1249対応物」は、T-1249またはT-1249中間体断片から派生した化合物を指す。ペプチド対応物には、ペプチドアナログ、ペプチド誘導体、融合化合物、およびそれらの類似物を含むが、それらに限定されない。それゆえ、配列番号2および配列番号3の配列を有するT-1249ペプチド中間体断片を指すとき、それらの対応物はそれぞれ、例えば配列番号2および配列番号3のペプチドアナログ、ペプチド誘導体、融合化合物を含む。

20

【0067】

本明細書に使用されるように、ペプチドアナログとは一般に、別のペプチドまたはペプチド対応物に関連する1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、反転、および/または付加などによって改変されたアミノ酸配列を有するペプチドを指す。置換は、好ましくは保存され得るかまたは高度に保存され得る。保存的な置換とは、一般に同一の正味の電荷および一般に同一の大きさおよび形状を有する別のアミノ酸とのアミノ酸の置換を指す。例えば、脂肪族または置換された脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、それらの鎖における炭素およびヘテロ原子の総数が約4以下まで異なるとき、ほぼ同一の大きさを有する。前記アミノ酸は、それらの側鎖における分岐数が、約1または2以下まで異なるとき、ほぼ同一の形状を有する。側鎖にフェニル基または置換されたフェニル基を有するアミノ酸は、ほぼ同一の大きさおよび形状を有すると考えられる。以下に列挙されるのは、アミノ酸の5つの群である。化合物中のアミノ酸を同一群からの別のアミノ酸と置換すると、一般に保存的な置換が生じる。

30

【0068】

I群：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、およびC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>脂肪族側鎖またはC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>ヒドリキシリにより置換された脂肪族側鎖（直鎖または單一分岐した（monobrancheted））を有する天然には生じないアミノ酸。

40

【0069】

II群：グルタミン酸、アスパラギン酸、およびカルボン酸により置換されるC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>脂肪族側鎖（非分岐または一分岐点）を有する天然には生じないアミノ酸。

【0070】

III群：リジン、オルニチン、アルギニン、およびアミンまたはグアニジノにより置換されるC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>脂肪族側鎖（非分岐または一分岐点）を有する天然には生じないアミノ酸。

【0071】

IV群：グルタミン、アスパラギン、およびアミドにより置換されるC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>脂肪族

50

側鎖（非分岐または一分岐点）を有する天然には生じないアミノ酸。

【0072】

V群：フェニルアラニン、フェニルグリシン、チロシン、およびトリプトファン。

【0073】

「高度に保存的な置換」とは、側鎖に同一の官能基を有し、ほぼ同一の大きさおよび形状を有する別のアミノ酸とのアミノ酸の置換である。脂肪族または置換された脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、それらの側鎖に炭素およびヘテロ原子の総数が2以下までで異なるとき、ほぼ同一の大きさを有する。前記アミノ酸は、それらが側鎖に同一の分岐数を有するとき、ほぼ同一の形状を有する。高度に保存的な置換の例としては、ロイシンについてのバリン、セリンについてのスレオニン、グルタミン酸についてのアスパラギン酸、およびフェニルアラニンについてのフェニルグリシンがある。

【0074】

ペプチド誘導体とは一般に、その側鎖基、アルファ炭素原子、末端アミノ基、および/または末端カルボン酸基のうちの1つ以上の化学的改変を有するペプチド、ペプチドアナログ、または他のペプチド対応物を指す。例証として、化学的改変とは、化学的部分を付加すること、新たな結合を作ること、および/または化学的部分を除去することを含むが、それらに限定されない。アミノ酸側鎖基での改変としては、リジンe-アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン、またはリジンのN-アルキル化、グルタミン酸基またはアスパラギン酸カルボン酸基のアルキル化、およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミノ化を含むが、それらに限定されない。末端アミノ基の改変としては、脱アミノ、N-低級アルキル、N-ジ-低級アルキル、およびN-アシル（例えば、-CO-低級アルキル）改変を含むが、それらに限定されない。末端カルボキシ基の改変としては、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、および低級アルキルエステルの改変を含むが、それらに限定されない。したがって、部分的または全体的に保護されるペプチドは、ペプチド誘導体を構成する。

【0075】

参照は、ペプチドの次のセットに対してなされ、表1に記載されるT-1249およびT-1249中間体断片を含む。

【0076】

【表45】

表1

配列番号	アミノ酸配列	T-1249のアミノ酸配列 対応の付番
1	Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE KNEYELQKLDKWASLWEWF	1-39
2	Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE	1-20
3	KNEYELQKLDKWASLWEW	21-38
4	KNEYELQKLDKWASLWEWF	21-39

【0077】

概観を提供するため、本発明の方法に基づき、T-1249ペプチドについての全般的な合成スキームを、次に示す。T-1249（配列番号1）は、T-1249のペプチド中間体断片

【0078】

【表46】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE（配列番号2）及び

KNEYELQKLDKWASLWEW（配列番号3）

【0079】

10

20

30

40

50

の固相合成を含む段階によって調製される。これらのペプチドは、本明細書に記載の方法を使用して合成された後、側鎖により保護された形態において固相樹脂から開裂される。次に、フェニルアラニンアミド残基が、溶液中で

【0080】

【表47】

KNEYELQKLDKWASLWEW (配列番号3)

【0081】

のペプチド中間体へ結合され、

【0082】

【表48】

10

KNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号4)

【0083】

を生じる。次に、

【0084】

【表49】

KNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号4)

【0085】

20

は、溶液中で

【0086】

【表50】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2)

【0087】

へ結合され、

【0088】

【表51】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号1)

30

【0089】

を生じる。

【0090】

本発明によれば、固相合成技術は、

【0091】

【表52】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2)

【0092】

40

の20個のアミノ酸の配列またはその対応物を有するT-1249の第一ペプチド断片(中間体断片1)を調製するのに使用される。固相合成の好ましい方法に関する参照として、ペプチドのC末端部分に存在するアミノ末端グルタミン酸(E)残基(すなわち、配列番号2の20番残基)が固相樹脂へ結合される第一アミノ酸残基であり、こうして固体支持体樹脂に関する位置では断片のアルファアミノ酸を構成する。それゆえ、この好ましい方法では、固相合成は、アミノ末端からカルボキシル末端へとアミノ酸残基を連続して付加することによって進行し、望ましい配列に対応する方法でアミノ酸を連続的に付加する。ペプチド中間体断片の合成は、N末端残基(例えば、配列番号2のN末端トリプトファン(W))が新生ペプチド鎖へ付加された後に完了する。

【0093】

50

固相合成技術は、  
【0094】  
【表53】

KNEYELQKLDKWASLWEW (配列番号3)

【0095】  
の18個のアミノ酸の配列またはその対応物を有するT-1249の第二ペプチド断片(中間体断片2)を調製するのにも使用される。固相合成の好ましい方法に関する参考として、アミノ末端トリプトファン(W)残基(すなわち、配列番号3の18番目の残基)が、固相樹脂へ結合される第一アミノ酸残基であり、こうして固体支持体樹脂に関する位置では断片のアルファアミノ酸を構成する。この好ましい方法では、固相合成は、アミノ末端からカルボキシル末端へとアミノ酸残基を連続して付加することによっても進行し、望ましい配列に対応する方法でアミノ酸を連続的に付加する。ペプチド中間体断片の合成は、N末端残基(例えば、配列番号3のN末端リジン(K))が、新生ペプチド鎖へ付加された後に完了する。

【0096】  
有利なことに、中間体断片1も中間体断片2も、N末端グルタミン酸(E)残基を含まない。各々の中間体断片がグルタミン酸残基を含む限り、各々の残基は、中間体断片の配列内にまたはC末端に位置する。アミノ酸のこれらの一般的な配列配置を有する断片を使用すれば、N末端にグルタミン酸を有する断片が、より多くのピログルタミン酸不純物を含む傾向にあるといえ、中間体断片の純度が有意により高くあり得るということがわかった。

【0097】  
中間体断片1および2はそれぞれ、少なくとも18個のアミノ酸の残基を含むといふことも注目される。これらは、固相合成に関してはかなり大きなペプチド断片であるが、本発明の原理によって、このような大きな断片および結果として生じるT-1249を高い収量および高い純度で合成できる。

【0098】  
本発明によれば、固相樹脂上で合成されるペプチドの相対的な量を適切に調節することによって、有利な効果が、ペプチド中間体断片の収量および純度に関して得ることができると発見された。合成されるペプチドの相対的な量は負荷因子によって調節され得、これはある量の樹脂へ結合されるアルファアミノ酸の量を指し、典型的には固相樹脂の1gあたりのアルファアミノ酸のミリモルとして表される。例えば、0.25の負荷因子は、固相樹脂100gへ実際に結合されるアルファアミノ酸の25mmolに相当するであろう。第一アミノ酸を固相樹脂へ結合する反応は、完全に効率的でなくともよく、それゆえ、結合される実際の量は、出発試薬の100%結合効率および量に基づいた理論上の量よりも少なくてよい。結合される材料の実際の量は、反応が生じた後で決定され得る。実際の結合を決定するため、ペプチドを樹脂から開裂し、例えば標準物質に対するHPLC分析を使用することによってアッセイすることができる。結合される第一アミノ酸残基の実際の量を決定するための方法は、本明細書に記載される。

【0099】  
本発明によれば、(ペプチド中間体断片の配列番号2および配列番号3の配列などの)相対的に長いペプチド断片の収量および純度、それゆえ結果として生じるT-1249ペプチドの収量および純度は、0.5以下などの比較的低い負荷因子でより高い傾向にある。しかしながら、負荷因子が例えば0.2未満である場合、生成物処理量は抑えられ得る。これらの関係を平衡化するため、断片1および2のうちの少なくとも1つ、好ましくは断片1および2の両者に関する負荷因子は、約0.2~約0.50であり、好ましくは約0.2~約0.45の範囲にあり、より好ましくは約0.2~約0.40の範囲にある。例えば、ある代表的な実施態様では、約0.34の負荷因子を使用することが適切であろう。

## 【0100】

この局面を説明するため、以下の固相手順を実施してもよい。適切な樹脂を得、適切な溶媒中で洗浄することによって調製する。次に、活性化可能な保護された形態にある第一アミノ酸を含有する溶液を、洗浄した樹脂へ添加する。望ましい範囲内での負荷因子を達成するため、アミノ酸の量および／または濃度、および／またはHOBTなどの共試薬の存在および濃度、結合反応の時間、結合反応の温度などの他の反応因子を選択し得る。

## 【0101】

Fmoc化学を使用する固相合成を使用して、樹脂へ連結される（配列番号2および配列番号3を含むペプチド中間体断片などの）T-1249中間体断片を調製することができる。ペプチド中間体断片を樹脂上に合成した後、開裂試薬を使用して開裂し、保護された形態での溶液中のペプチド中間体断片を生じる。次に、ペプチド中間体断片を樹脂から分離する。いくつかの場合では、ペプチド中間体断片を、溶液相結合を実施する前に、ペプチド中間体断片を精製するための方法として、沈殿剤と接触する。

10

## 【0102】

固相アプローチを使用してペプチドを合成するための方法は、当技術分野において周知である。したがって、本発明は、T-1249最終生成物の調製において使用され得るペプチド中間体断片を調製するための低い負荷因子を使用するいずれかの固相合成アプローチを使用することを熟慮する。

## 【0103】

例えば、本明細書に記載のT-1249ペプチド中間体断片は、標準的なFmocプロトコールを使用するSSPS技術によって合成され得る。Fmocプロトコールは、例えば、Carpin et al. (1970), J. Am. Chem. Soc. 92(19):5748-5749; Carpin et al. (1972), J. Org. Chem. 37(22) :3404-3409, 「Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis」, Wong C. Chan and Peter D. White Eds. (2000) Oxford University Press Oxford Engに記載されている。

20

## 【0104】

固相ペプチド合成の実際では任意のタイプの支持体を使用することができる。好ましい態様において、支持体は、1つ以上のポリマー、コポリマー、またはポリアミド、ポリスルファミド、置換されたポリエチレン、ポリエチレングリコール、フェノール樹脂、多糖類、またはポリスチレンなどのポリマーの組み合わせから作られ得る樹脂を含む。ポリマー支持体は、ペプチド合成において使用される溶媒に対して十分に不溶性であり不活性であるいずれかの固体でもあり得る。固体支持体は、典型的には成長するペプチドが合成の間では結合され、支持体からペプチドを放出するのに望ましい条件下では開裂され得る連結部分を含む。適切な固体支持体は、光開裂可能な、TFA開裂可能な、HF開裂可能な、フッ素イオン開裂可能な、還元的に開裂可能な、Pd(O)開裂可能な、求核性開裂可能な、またはラジカル性開裂可能なリンカーを有し得る。好ましい連結部分は、開裂したペプチドがなおも実質的に包括的に保護されるような条件下で開裂できる。

30

## 【0105】

合成のある好ましい方法において、ペプチド中間体断片は、トリチル基を含む酸感受性固体支持体上で、より好ましくは、張り出した塩素基を有するトリチル基を含む樹脂、例えば塩化2-クロロトリチル(2-CTC)樹脂上で合成される(Barlos et al. (1989) Tetrahedron Letters 30(30):3943-3946)。例えば、塩化トリチル樹脂、塩化4-メチルトリチル樹脂、塩化4-メトキシトリチル樹脂、4-アミノブタン-1-オール2-クロロトリチル樹脂、4-アミノメチルベンゾイル2-クロロトリチル樹脂、3-アミノブロパン-1-オール2-クロロトリチル樹脂、ブロモ酢酸2-クロロトリチル樹脂、シアノ酢酸2-クロロトリチル樹脂、4-シアノ安息香酸2-クロロトリチル樹脂、グリシノール2-クロロトリチル樹脂、プロピオン酸2-クロロトリチル樹脂、エチレングリコール2-クロロトリチル樹脂、N-Fmocヒドロキシルアミン2-クロロトリチル樹脂、ヒドラジン2-クロロトリチル樹脂も含む。いくつかの好ましい固体支持体は、反応基を固定(anchor)する支持体材料を形成するためにジビニルベンゼンと共に重合され得るポリ

40

50

スチレンを含む。

【0106】

ペプチド材料は典型的に、ビーズ表面およびビーズ内部内の両者で樹脂ビーズへ付着される。Fmocおよび側鎖により保護されるペプチドは、DCMまたは酢酸中の希釈したTFAなどの弱酸性試薬を使用してこの樹脂から保護された状態において簡単に開裂される。

【0107】

固相合成において使用される他の樹脂は、スチレンおよびジビニルベンゼンと、4-ヒドロキシメチルフェニルオキシメチル固定基 (Wang, S.S. 1973, J. Am. Chem. Soc) および4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸樹脂 (Richter et al. (1994), Tetrahedron Letters 35(27):4705-4706)との共重合体を含む「Wang」樹脂を含む。Wang、塩化2-クロロトリチル、および4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸樹脂は、例えばCalbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, Californiaから購入され得る。

【0108】

第一の結合されたアミノ酸を有する支持体を提供するため、樹脂は、例えば洗浄によって調製され得、次に、活性化された保護されたアミノ酸を含有する溶液とともにインキュベーションされ得る。樹脂へ結合される第一アミノ酸およびその次のアミノ酸は、典型的にはN末端保護基、(特定のアミノ酸に依存する)側鎖保護基、および樹脂から張り出した基と反応性のある基または張り出したアミノ酸と反応性のある基を含む。

【0109】

好ましい局面において、第一アミノ酸は、カルボキシ末端で支持体へ付着されるのに対し、N末端基および側鎖基は、保護基によって適切に保護される。典型的な記載として、

【0110】

【表54】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2)

【0111】

のペプチド中間体断片の固相合成は、保護されたグルタミン酸残基を塩化2-クロロトリチル(2-CTC)樹脂へまず負荷することによって、カルボキシ末端からNH<sub>2</sub>-末端の方向へ運搬される。

【0112】

保護基の性質および使用は、当技術分野において周知である。一般に、適切な保護基は、付着される原子または部分、例えば酸素または窒素が、処理および合成中に望ましくない反応で関与することを防止するのを助け得る基のいずれかの種類である。保護基は、側鎖保護基およびアミノ-またはN-末端保護基を含む。保護基は、カルボン酸、チオール、およびそれらの類似物の反応または結合も防止し得る。

【0113】

側鎖保護基とは、ペプチド合成、処理等の段階において使用される化学物質との反応から側鎖の一部を防止するのを助けるアミノ酸の側鎖(すなわち、一般的なアミノ酸式H<sub>2</sub>N-C(R)(H)-COOH)へ結合される化学的な部分を指す。側鎖保護基の選択は、さまざまな因子、例えば実施される合成のタイプ、ペプチドが供されるであろう処理、および望ましい中間体生成物または最終生成物に依存し得る。側鎖保護基の性質は、アミノ酸自体の性質にも依存する。一般に、固相合成中に-アミノ酸基の脱保護中に除去されない側鎖保護基が選択される。それゆえ、-アミノ保護基および側鎖保護基は、典型的には同一ではない。

【0114】

いくつかの場合において、固相合成および他のペプチド処理において使用される試薬のタイプに依存して、アミノ酸は、側鎖保護基の存在を必要としないかもしれない。このようなアミノ酸は典型的には、側鎖に活性酸素、窒素、または他の反応性部分を含まない。

10

20

30

40

50

## 【0115】

側鎖保護基の例は、アセチル( A c )、ベンゾイル( B z )、t e r t - ブチル、トリフェニルメチル( トリチル )、テトラヒドロピラニル、ベンジルエーテル( B z l )および 2 , 6 - ジクロロベンジル( D C B )、t - プトキシカルボニル( B O C )、ニトロ、p - トルエンスルホニル( T o s )、アダマンチルオキシカルボニル、キサンチル( X a n )、ベンジル、2 , 6 - ジクロロベンジル、メチル、エチルおよび t - ブチルエステル、ベンジルオキシカルボニル( Z )、2 - クロロベンジルオキシカルボニル( 2 - C l - Z )、T o s 、t - アミルオキシカルボニル( A o c )、および芳香族または脂肪族ウレタン型保護基、ニトロベリトリルオキシカルボニル( N V O C )などの光解離性基、およびトリメチルシリルオキシカルボニル( T E O C )などのフッ化物不安定基を含む。 10

## 【0116】

好ましい側鎖保護基は、T y r ( Y )、T h r ( T )、S e r ( S )、およびA s p ( D )アミノ酸残基についてのt - B u 基、H i s ( H )、G l n ( Q )、およびA s n ( N )アミノ酸残基についてのトリチル( t r t )基、およびL y s ( K )およびT r p ( W )アミノ酸残基についてのB o c 基を含む。

## 【0117】

例えば、表1に列挙されるペプチド断片のアミノ酸残基の側鎖のいずれかの1つ以上は、t - ブチル( t - B u )、トリチル( t r t )、およびt - ブチルオキシカルボニル( B o c )などの標準的な保護基で保護され得る。t - B u 基は、アミノ酸残基T y r ( Y )、T h r ( T )、S e r ( S )、およびA s p ( D )についての好ましい側鎖保護基であり、t r t 基は、アミノ酸残基H i s ( H )、G l n ( Q )、およびA s n ( N )についての好ましい側鎖保護基であり、B o c 基は、アミノ酸残基L y s ( K )およびT r p ( W )についての好ましい側鎖保護基である。 20

## 【0118】

好ましくは、本発明の各ペプチド断片のアスパラギン残基を、すべて保護する。さらに、トリプトファン残基がB o c 基で保護されることが好ましい。

## 【0119】

アミノ末端保護基は、アミノ酸のアルファアミノ基へ結合された化学部分を含む。典型的には、アミノ末端保護基は、付加されるべき次のアミノ酸の成長しているペプチド鎖への付加の前の脱保護反応において除去されるが、ペプチドが支持体から開裂される際には、維持され得る。アミノ末端保護基の選択は、さまざまな因子、例えば実施される合成のタイプおよび望ましい中間生成物または最終生成物に依存し得る。 30

## 【0120】

アミノ末端保護基の例は、( 1 ) ホルミル、アクリリル( A c r )、ベンゾイル( B z )、およびアセチル( A c )などのアシル型保護基、( 2 ) P - クロロベンジルオキシカルボニル、p - ニトロベンジルオキシカルボニル、p - ブロモベンジルオキシカルボニル、p - メトキシベンジルオキシカルボニルなど、ベンジルオキシカルボニル( Z )および置換されたZなどの芳香族ウレタン型保護基、( 3 ) t - ブチルオキシカルボニル( B O C )、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、アリルオキシカルボニルなどの脂肪族ウレタン保護基、( 4 ) 9 - フルオレニル - メチルオキシカルボニル( F m o c )、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、およびシクロヘキシルオキシカルボニルなどのシクロアルキルウレタン型保護基、および( 5 ) フェニルチオカルボニルなどのチオウレタン型保護基を含む。好ましい保護基は、9 - フルオレニル - メチルオキシカルボニル( F m o c )、2 - ( 4 - ビフェニリル ) - プロピル( 2 )オキシカルボニル( B p o c )、2 - フェニルプロピル( 2 ) - オキシカルボニル( P o c )、およびt - ブチルオキシカルボニル( B o c )を含む。 40

## 【0121】

本発明にしたがえば、保護基は典型的には、固相合成を通じて、および溶液相結合反応へおよび溶液相結合反応を通じて、ペプチド中間体断片上に保持される。( 一般に、溶液

10

20

30

40

50

相結合段階が完了した後、脱保護段階が、ペプチドから1つ以上の保護基を除去するために実施される。)

【0122】

配列番号2および配列番号3を有するペプチド中間体断片の合成のための樹脂へ結合され得る特異的な保護基を有する第一アミノ酸の特異的な例はそれぞれ、F m o c G l u (O t B u ) O H および F m o c T r p ( B o c ) O H であり得る。

【0123】

固相合成のための樹脂を調製するため、樹脂は、溶媒中で前洗浄され得る。例えば、2-C T C樹脂などの固相樹脂は、ペプチドチャンバーへ添加され、適切な溶媒で前洗浄される。洗浄は、樹脂へ結合される第一アミノ酸と接触させるための樹脂を調製するために実施されうる。本質において、前洗浄は、第一アミノ酸の樹脂への効率的結合を促進するために実施され得る。前洗浄溶媒は、結合反応において使用される溶媒（または溶媒の混合物）のタイプに基づいて選択され得、その逆もまたしかりである。

【0124】

洗浄、およびその後の結合反応にも適した溶媒には、ジクロロメタン（D C M）、ジクロロエタン（D C E）、ジメチルホルムアミド（D M F）、塩化メチレン、およびその類似物を、これらの試薬の混合物がある。他の有用な溶媒には、D M S O、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、N-メチルピロリドン、およびそれらの混合物がある。いくつかの場合、結合は、D M F および D C M の混合物などの、2成分溶媒システムにおいて実施され得る。

【0125】

本明細書に記載されるように、約0.2～約0.50、好ましくは約0.2～約0.45、より好ましくは約0.2～約0.40の範囲となるように樹脂上での第一アルファアミノ酸の負荷因子を調節することが望ましい。それゆえ、溶液は、標的範囲において結合因子を提供するであろうアミノ酸のある量を有する溶液が調製される。このことは、結合効率が特定の反応のためのものであることを一般に公知で決定され得る。例えば、約0.34の標的負荷因子を有することが望まれるとき、結合効率が約80%であることが公知であるとすれば、樹脂のグラムあたりアミノ酸0.425mmolを含有する結合溶液が使用されるべきである（0.34/0.8）。

【0126】

結合反応は、結合反応を亢進させるかまたは改善する1つ以上の化合物の存在において実施され得る。反応の速度を増大し得、側鎖反応の速度を低下させ得る化合物には、三級塩基、例えばジイソプロピルエチルアミン（D I E A）およびトリエチルアミン（T E A）の存在下で、保護されたアミノ酸を活性化された種へ変換し得るホスホニウム塩およびウロニウム塩がある（例えば、B O P、P y B O P O、H B T U、およびT B T U はすべて、H O B t エステルを生じる。）。他の試薬は、保護する試薬を提供することによってラセミ化を防止するのを助ける。これらの試薬には、付加された補助求核試薬（例えば、1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール（H O B t）、1-ヒドロキシ-アザベンゾトリアゾール（H O A t）、またはH O S u）とともにカルボジイミド（例えば、D C C またはW S C D I）がある。利用され得る別の試薬には、T B T U である。アジ化物と関連した低ラセミ化によるアジ化物方法と同様に、付加された補助求核試薬とともにまたはそれなしでクロロギ酸イソブチルを使用する、混合した無水物の方法も利用される。化合物のこれらのタイプは、カルボジイミドにより仲介される結合の速度も増大させ得、同様に、A s n およびG l n 残基の脱水も防止し得る。

【0127】

結合の完了は、本明細書に記載の定性的ニンヒドリン検査でモニターされ得る。結合が完了したと決定した後、結合反応混合物を溶媒で洗浄し、ペプチド材料のその次のアミノ酸残基の各々について、結合周期を反復する。最終的な結合サイクルの後、樹脂をN M Pなどの溶媒で洗浄した後、D C Mなどの不活性第二溶媒で洗浄する。

【0128】

10

20

30

40

50

次のアミノ酸を結合させるため、N末端保護基（例えば、Fmoc基）の除去が、N-メチルピロリドン（NMP）またはジメチルホルムアミド（DMF）などの溶媒中で（重量ベースの）20～50%ピペリジンを含む試薬による処理によって典型的に達成される。Fmoc保護基の除去後、数回の洗浄が典型的には実施され、残存するピペリジンおよび（ジベンゾフルベンおよびそのピペリジン付加物などの）Fmoc副産物を除去する。

【0129】

第一アミノ酸が、望ましい負荷因子で樹脂へ結合され、N末端保護基が除去された後、その次のアミノ酸が、ペプチド中間体断片を調製するために付加され得る。その次のアミノ酸は、負荷因子に関連してアミノ酸の化学量論的過剰で利用され得る。しかしながら、本明細書に記載の特異的なT-1249中間体断片の固相合成は、これらの断片の固相合成において使用されるアミノ酸（および相当の試薬）の大過剰量を必要としないことがわかった。一般に、結合段階において使用されるアミノ酸の量は、樹脂上の第一アミノ酸の負荷因子と少なくとも等価である（1当量以上）。好ましくは、結合段階において使用されるアミノ酸の量は、1.3当量（0.3過剰）以上、最も好ましくは約1.5当量（0.5過剰）である。いくつかの場合では、例えば、結合段階は、1～1.5（1より大きく1.5より小さい）範囲のアミノ酸の等価の量を利用する。

【0130】

アミノ酸のこの過剰量（例、約1.5）が完了に至るための結合反応に十分であることがわかった。この過剰量は、脱保護試薬から反応許容過剰塩基も助けることができる。

【0131】

結合、洗浄、N末端脱保護基の脱保護、および洗浄の段階は、望ましいT-1249中間体生成物が形成されるまで反復され得る。

【0132】

固相合成の後、T-1249中間体ペプチドを樹脂から除去するため、開裂したT-1249中間体ペプチドがなおも、十分な側鎖および末端保護基を有するような方法で、開裂処理を実施する。しかるべき位置に保護基を放置することは、開裂中または開裂後のペプチド断片の望ましくない結合または他の望ましくない反応を防止するのを助ける。Fmocまたは同様の化学物質がペプチドを合成するのに使用される場合、保護された開裂は、樹脂を膨潤することもでき、開裂および分離工程に有用であり得るDCMなどの溶媒中の酢酸または希TFAなどの比較的弱酸性の試薬を使用することなどによるいずれかの望ましい様式で達成され得る。DCM中の0.5～10重量%、好ましくは1～3重量%のTFAの使用が好ましい。例えば、米国特許第6,281,335号を参照してほしい。

【0133】

固相樹脂からのペプチド中間体断片の開裂の段階は、次のような典型的な工程のラインに沿って進行し得る。しかしながら、樹脂からペプチド中間体断片を効率よく開裂させるいずれかの適切な工程が使用され得る。例えば、酸性開裂試薬を含有する溶媒の約5～20容積、好ましくは約10容積が、容器へ添加される。樹脂ビーズは、結果として試薬中に浸漬される。開裂反応は、液体含有量を、適切な温度で適切な時間攪拌しながら生じさせる。攪拌は、ビーズが凝集するのを防止するのを助ける。適切な時間および温度の条件は、使用される酸試薬、ペプチドの性質、樹脂の性質、およびそれらの類似項目などの因子に依存するであろう。一般的なガイドラインとして、約-15～約5、好ましくは約-10～約0で約5分間～2時間、好ましくは約25～約45分間攪拌することが適切であろう。開裂時間は、約10分間～約2時間の範囲であり得る。ラージスケールでの生成については、好ましい時間は、約15～50分間の範囲にある。開裂は、反応時に典型的に生じ得る反応熱を収容するような冷却した温度範囲において望ましくは実施される。さらに、開裂反応のより低い温度は、trt基などの酸感受性側鎖保護基をこの段階での除去から保護する。

【0134】

開裂処理の終了時に、反応物を急冷する。このことは、例えばピリジンまたは類似物などの適切な塩基を容器へ添加し、さらに5分間～2時間、好ましくは約20分～約40分

10

20

30

40

50

間などのさらなる時間攪拌し続けることによって達成され得る。塩基を添加し、攪拌し続けると、容器の内容物の温度が上昇する。攪拌の終了時に、容器の内容物は、約0～約15、好ましくは約5～約10の範囲の温度であり得る。

【0135】

ペプチド回収の局面を改善するために、樹脂を膨潤および収縮させるなどの因子は、場合により、全般的な合成工程へと組み込められ得る。

【0136】

例えば、開裂後、支持体は、場合により、結果として生じる洗浄物へと開裂ペプチドを抽出するための膨潤試薬で1回以上洗浄され得、洗浄物は、それらの洗浄からペプチドを回収できるよう回収される。例えば、DCM中の希TFAを使用して2-CTC樹脂からペプチドを開裂させることは、膨潤処理のすべてまたは一部をさらに構成するであろう。開裂後および膨潤処理が完了した後、支持体は、ペプチドのさらなる量が収縮洗浄から回収でき、同様に、1回以上のその後の任意の膨潤洗浄からさらなるペプチドを回収する能力を増強できる、1回以上の任意の収縮洗浄へ供され得る。さらなる膨潤処理からなるその後の任意の膨潤洗浄は、収縮処理が完了した後に実施され得る。

10

【0137】

DCMなどの膨潤溶媒が、開裂試薬中の構成要素として使用され得るため、開裂処理は、開裂したペプチドの有意な量が液体へと抽出されるであろう第一膨潤処理も構成し得る。DCM中のTFAで膨潤する場合は、ビーズの容積は、開裂処理の開始時に最大となる傾向にあろう。ビーズは、なおも膨潤されるであろうが、その容積は、ペプチドが液体へと抽出されるため低下する。

20

【0138】

急冷後、容器の内容物を空け、洗浄物へと抽出されたペプチドを回収する。圧力をかけて、フィルターを通じて容器の外へ出た液体によって運搬されるペプチド材料を含有する液体混合物に力を加えてよい。容器中に残存するビーズは、残余DCMをなおも含有するであろうし、ある程度までなおも膨潤されるであろう。残余ペプチドの有意な量は、ビーズ中にも保持される傾向があり、その後の収縮処理および膨潤処理は、残余ペプチドの有意な部分を回収するのを助ける。

【0139】

オプションとして、蒸留またはその類似実験を介する濃縮の前に、回収された開裂試薬を水で洗浄することが望ましくあり得、通常、幾分かの濃縮が達成された後は除く。それゆえ開裂後の水洗浄は、ペプチドの質をある程度まで亢進させるのに有用であると信じられている。水洗浄は、残余TFAおよびその副産物を除去する上で役に立つと信じられている。水洗浄／抽出処理の後、液体混合物を、蒸留装置へと転してもよく、そこで混合物は、例えばDCMまたはその類似物を除去することによってさらに濃縮される。

30

【0140】

開裂している混合物を容器から空け、ペプチド回収のために回収した後、容器の内容物は、さらなるペプチドが抽出され得た後に回収され得る1回以上のさらなる膨潤洗浄へと供され得る。これらのさらなる膨潤洗浄も、容器を洗浄し、残余開裂試薬および副産物を除去するのを助ける。このような成分は、収縮処理による進行の前に望ましくは除去され、それにより収縮液体はそれらとは反応しないであろう。例えば、エタノールがTFAと反応し得る限り、エタノールを含有する収縮液体を添加する前に、容器からTFAを除去することが望ましい。典型的な膨潤洗浄処理は、約2分間～約2時間、好ましくは約10～約50分間攪拌しながら生じ得る。洗浄が実施された後、洗浄物は容器から除去され、次に、他の膨潤洗浄とともに蒸留容器へ添加され得る。場合により、蒸留ポットへ添加される前に、これらのさらなる膨潤洗浄は、もしあれば、不純物を除去するための水抽出処理へ供され得る。

40

【0141】

いくつかの局面において、ペプチド中間体断片は、それらの純度を亢進させる段階を実行することによって、例えば結晶化によって溶液相結合のために調製され得る。T-12

50

49 ペプチド中間体断片の1つ以上は、ペプチド中間体断片を結晶化するために、IPA および DCM、またはIPA および水の混合物など、IPAを含有する溶液で処理され得る。

【0142】

固相合成、樹脂からの開裂、ペプチド中間体のいずれかの洗浄または精製の後、配列

【0143】

【表55】

KNEYELQKLDKWASLWEW (配列番号3)

【0144】

10

を有するペプチド中間体断片を、配列

【0145】

【表56】

KNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号4)

【0146】

を有するペプチド中間体断片を生じるために、フェニルアラニンアミド (F-NH<sub>2</sub>) 残基と反応させる。この溶液相反応は、本明細書に記載されるように、適切な溶液相反応溶液中で実施され得る。このペプチド中間体生成物を、非溶媒、例えば水中で沈殿し、純度を改善するために洗浄することができる。

20

【0147】

T-1249側鎖により保護されるペプチド中間体断片

【0148】

【表57】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (配列番号2) 及び

KNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号4)

【0149】

は、配列

【0150】

30

【表58】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (配列番号1)

【0151】

を有する全長のT-1249ペプチドを形成するため、溶液中で互いに結合される。これらの中間体断片を化学的に配置し、ここで

【0152】

【表59】

KNEYELQKLDKWASLWEWF

40

【0153】

のペプチド中間体断片のN末端を、

【0154】

【表60】

Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE

【0155】

のペプチド断片のC末端へ結合させる。

【0156】

好ましくは、ペプチドは、HPLC特性に基づいた80%以上、またはより好ましくは

50

82.5%、最も好ましくは85%以上の純度レベルで結合反応へ供給される。本発明の方法にしたがえば、低い負荷因子を利用する固相合成は、より高い純度レベルを有するT-1249中間体ペプチド断片を調製するための有意な局面である。

【0157】

ペプチド結合反応は、例えば、New Trends in Peptide Coupling Reagents; Albericio, Fernando; Chinchilla, Rafeal; Dodsworth, David J.; and Najera, Armen; Organic Preparations and Procedures International (2003), 33(3), 203-303において概説されている。

【0158】

ペプチド中間体断片の結合は、in situ結合試薬、例えばBOP、ヘキサフルオロリシン酸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(HBTU)、HATU、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、水溶性カルボジイミドWSCDI)、またはテトラフルオロホウ酸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(TBTU)を使用して実施され得る。他の結合技術は、ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)およびp-ニトロフェノール(HONp)エステルなどのあらかじめ形成された活性エステル、あらかじめ形成された対称性無水物、N-カルボキシ無水物(NCA)、またはフッ化アシルおよび塩化アシルなどのハロゲン化酸を使用する。

【0159】

適切な結合溶媒を、結合反応において使用することができる。使用される結合溶媒が、形成されるペプチド結合のラセミ化の程度、ペプチドおよび/またはペプチド断片の可溶性、および結合反応速度に影響を及ぼし得ることは理解される。

【0160】

いくつかの態様において、結合反応は、水混和性溶媒を含む。水混和性溶媒の例には、例えば、DMSO、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジオキサン、またはそれらの混合物がある。

【0161】

他の態様において、結合反応は、非水混和性溶媒を含む。典型的な非水混和性溶媒は、塩化メチレンである。これらの態様において、非水混和性溶媒は好ましくは、脱保護反応と互換性があり、例えば、非水混和性溶媒が好ましく使用される場合、脱保護反応に負の影響を及ぼさない。

【0162】

ペプチド中間体断片が、T-1249ペプチドを生じるために結合された後、生成物は、側鎖保護基を除去するための脱保護段階へ供され得る。

【0163】

包括的な脱保護による側鎖保護基の除去は典型的に、側鎖保護基を開裂させる酸性溶解(acidolytic)剤を含む脱保護溶液を利用する。包括的な脱保護のために普遍的に使用される酸性溶解試薬には、正味のトリフルオロ酢酸(TFA)、HCl、BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>OまたはMe<sub>3</sub>SiBrなどのルイス酸、液体フッ化水素酸(HF)、臭化水素(HBr)、トリフルオロメタン硫酸、およびそれらの組み合わせがある。脱保護溶液は、1つ以上の適切な陽イオンスカベンジャー、例えば、ジチオスレイトール、アニソール、p-クレソール、エタンジチオール、または硫化ジメチルも含む。脱保護溶液は水も含み得る。本明細書で使用されるように、脱保護組成物中に存在する試薬の量は、典型的には比で表され、個々の成分の量は、「重量部」または「容積部」などの「部」における分子として表され、分母は、組成物中の総部分である。例えば、90:5:5(重量/重量/重量)の比でTFA:H<sub>2</sub>O:DTTを含有する脱保護溶液は、90/100重量部のTFA、5/100重量部のH<sub>2</sub>O、および5/100重量部のDTTを有する。

【0164】

いくつかの態様において、脱保護組成物中の酸性溶解剤、好ましくはTFAの量が90

10

20

30

40

50

/ 100 重量部よりも大きいように、脱保護反応が実施され得る。他の好ましい脱保護組成物は、93 / 100 重量部以上の量で、または93 / 100 ~ 95 / 100 重量部の範囲の量で酸性溶解剤の量を含む。

【0165】

T - 1249ペプチドが脱保護され、最終的な形態になった後、場合により、全般的な合成スキームにおけるこの段階に存在し得る凝集したペプチドを脱凝集させる手順へと、ペプチドのバッチが供され得る。

【0166】

水溶性塩基中にペプチド試料を溶解した後、水溶性混合物を酸性化して塩および共溶媒のうちの少なくとも1つの存在下でペプチドを沈殿させることによって、脱凝集が実施され得る。好ましくは、塩および共溶媒の両者が、脱凝集溶液中に存在する。脱凝集は、比較的低温で（少なくとも、アルカリ媒体のpHを6~7.5の範囲のpHへ低下させ、そのうち最終的に望ましいpH、例えば3~6への酸性化がよりゆっくりと生じ得る酸性化の第一段階において）ペプチドを比較的迅速に沈殿させることによって実施され得る。

【0167】

脱凝集について、水性緩衝性アルカリ溶液は、水、少なくとも1つの塩、および望ましい溶解pHを提供するための少なくとも1つの塩基の十分量を含む成分から一般に派生する。T - 1249ペプチドおよび水性緩衝性アルカリ溶液を構成するさまざまな成分は、いずれかの順序で組み合わせられ得る。実際のある態様では、溶液をその構成成分から調製した後、すでに調製された溶液へペプチドを添加する。実際の別の態様では、ペプチドは、塩を含み、溶解を生じさせるには低すぎのpHを有する水性溶液へ添加され得る。次に、溶解が生じるであろう値までpHを上昇させるために、塩基がこの混合物へ添加される。なおさらに別の選択肢として、塩は、溶解の前、間、および/または後に溶液へ添加され得る。だが一般に、さらに後述にあるように、ペプチドを沈殿させる方法でpHを低下させる前に、塩は溶液中へと組み込まれる。

【0168】

溶液中のペプチドの濃度は、幅広い範囲にわたって変動し得る。一般的なガイドラインとして、溶液中のT - 1249ペプチド濃度は、約3~約6g/Lの範囲にあり得る。

【0169】

望ましいpHを提供するため、多様な1つ以上の塩基が溶液中へと組み込まれ得る。適切な塩基の代表的な例には、NaOHなどの水酸化物塩基、および重炭酸ナトリウムまたは重炭酸カリウムあるいは炭酸ナトリウムまたは炭酸カリウムなどの重炭酸塩基および炭酸塩基がある。水酸化ナトリウム、特に0.5~1N NaOHが好ましい。ペプチドが妥当な時間で溶液中に溶解するであろう望ましい値へpHを調整するために、塩基が使用される。多くのペプチドについて、このことは、約8~約11の範囲の溶解pHに相当する。

【0170】

溶液の塩構成は、結果として生じる沈殿したペプチドの溶解特徴を改善する。特に、より低いpHで水溶液中に迅速に溶解する可溶性ペプチドは、塩が適切な濃度で存在する場合、より一貫して調製される。

【0171】

多様な塩は、本発明の実施において有用であろう。例には、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸アンモニウム、これらのナトリウムおよびカリウム版、これらの組み合わせ、およびそれらの類似物がある。酢酸アンモニウムが最も好ましい。

【0172】

溶液中の塩の濃度は、幅広い範囲にわたって変動し得る。塩の1~200mM当量を使用することは、適切であろう塩濃度の一例である。実施の特異的な態様において、塩、特に酢酸アンモニウムの約5~約50mM、より好ましくは約10mM当量を使用することが、適切であるとわかった。

10

20

30

40

50

## 【0173】

溶解温度は一般に、ペプチドが溶解する水溶液の温度を指す。溶解は、いずれかの適切な温度で生じ得る。一般に、約10～約30、好ましくは約10～約25、より好ましくは約15～約20の範囲の1つ以上の温度で維持される溶液中でペプチドを溶解することが好ましいであろう。

## 【0174】

好ましくは共溶媒を、ペプチドのその後の沈殿が共溶媒の存在下で生じるように、溶液へと組み込む。共溶媒は、溶解の前、間、およびまたは後で溶液へ添加され得るが、好ましくは、ペプチドの溶解後に即座に添加される。共溶媒とは、ペプチドが溶解pHで可溶性である1つ以上のさらなる溶媒を指す。好ましくは、ペプチドの理論的な分子量に対するペプチドの測定された分子量の比が、約2：1～約1：1の範囲にあるとき、ペプチドは、25および生理学的pHで可溶性である。共溶媒の例には、アセトニトリル、メタノール、これらの組み合わせ、およびそれらの類似物がある。

10

## 【0175】

本発明の好ましい態様では、溶液に、共溶媒の約2～5容積%、好ましくは約5～約30容積%、およびより好ましくは約10～約20容積%を含有するよう、共溶媒の十分量が添加される。

## 【0176】

溶解後および望ましくは共溶媒の添加後、必要に応じて、ペプチドのさらなる脱凝集を促進するため、さらなる塩基を添加することによって、溶液のpHは場合によりさらに上昇する。次に、溶液は、望ましくは即座にろ過される。0.2ミクロンフィルターを通じての圧力ろ過が適しているであろう。ろ液は、真空下で場合により脱気された後、溶液は適切な時間寝かされ、脱気工程を完了するためにさらに処理される。一般に、ペプチドが、上昇したpHにある（寝かし時間だけではなく、ろ過時間、脱気時間、等も含む）総時間が、約5分間～約6時間、より好ましくは約30分間～約2時間の範囲にあるよう寝かされる。寝かした後、溶液は、場合により再度ろ過され得る。

20

## 【0177】

寝かした後、ペプチドが沈殿するのに効果的な条件下で、溶液のpHは低下し、例えば酸性化される。一般的なガイドラインとして、約3～約6、好ましくは4～約6の範囲の最終pHが適切であり得る。具体例としては、5.3～5.5の最終pHがT-1249ペプチドに関して望ましい。

30

## 【0178】

溶液のpHは好ましくは、1つ以上の酸を溶液へ添加することによって低下する。酸の例には、HCl、硫酸、酢酸、シュウ酸、これらの組み合わせ、およびそれらの類似物がある。酢酸が好ましい。例えば、水溶性の5%または10%の酢酸溶液が適していることがわかつってきた。

## 【0179】

実施のいくつかの態様では、優れた溶解特性を有するペプチド生成物は、pHを中間的なpHへのみ低下させるために比較的迅速に酸が添加してもなお、得ることができる。この初期の比較的迅速な酸の添加の後、最終的な望ましいpHへと溶液のpHを低下させるために、酸を、第二の比較的ゆっくりとした速度で添加する。適切な中間的pH値は、約6～約8の範囲、より好ましくは約6.0～約7.5の範囲であろう。望ましくは、約1時間未満、好ましくは30分以下、より好ましくは15分以下の時間でpHをまず迅速に低下させる。

40

## 【0180】

例えば、実施のある適切な態様では、11のpHでまずT-1249溶液のpHを低下させることを包含する。pHを約6.0の中間的な値へ低下させるために、酸の十分量が、10分間にわたって比較的迅速に添加される。次に、pHを5.3～5.5に低下させるため、10～20分かけてよりゆっくり酸を添加する。

## 【0181】

50

混合物は望ましくは、ペプチドの沈殿を生じさせるために酸を添加する経過の間に十分混合される。一般的なガイドラインとして、混合物のあわ立ちを回避するのに十分な安全上の余裕を残しながら、酸を添加する間、混合物を実施上できるだけ激しく攪拌することが好ましい。

【0182】

ペプチドの沈殿を生じさせる酸の添加は、いずれかの適切な温度で溶液を使用して実施され得る。ガイドラインとして、10～30、好ましくは15～25、最も好ましくは16～18の範囲の温度で沈殿を実施することが適切であろう。

【0183】

沈殿後、ペプチドを、望ましく単離し乾燥した後、他の成分と組み合わせ、凍結乾燥し、包装し、保存し、さらに処理し、および/またはさもなくば取り扱う。このことは、いずれかの適切な様式で達成され得る。ある適切なアプローチにしたがえば、ペプチドは、ろ過を介して回収され、適切なレベルまで最終的な塩含有量を低下させるためにアンプル水洗浄で洗浄した後、乾燥する。

【0184】

ペプチドが、ろ過にとって不適切な形態で沈殿する場合（例えば、沈殿物が「ゲル様」である場合）、ペプチド粒子が、粒子を「硬化させる」ために凝集する望ましい攪拌をともなう寝かし工程へ、沈殿を供することができる。

【0185】

実施の好ましい態様では、この寝かし硬化処理は、冷却/加熱/冷却処理の経過において攪拌しながらペプチドを寝かせることを包含する。これにより、ペプチドの三次構造を過度に損傷せずに、ペプチドのろ過特徴を改善する。実施の特異的な態様では、処理は、好ましくは、0超～約20、好ましくは10～20、より好ましくは約16の範囲にある、周囲温度を下回る第一温度で、5分～48時間、好ましくは30分～8時間、より好ましくは30分～2時間、水性混合物中で粒子を寝かすことを包含した。攪拌は望ましくは、粒子が寝かしの間に十分分散することを確実にするために使用される。

【0186】

次に、混合物の温度は、適度により温かい温度に至る、約2～約30、好ましくは約5～約15上昇し、より温かい温度への移行は、約1分～約48時間、好ましくは5分～8時間、より好ましくは20分～2時間の間にわたって、攪拌しながら生じる。好ましくは、新たな適度により温かい温度は、なおも周囲温度以下である。実施の特異的な態様では、温度を16から21まで約1時間で上昇させることが、適切であるとわかった。攪拌は望ましくは、この移行の間、続行する。次に混合物を、5分～8時間、好ましくは20分～4時間、より好ましくは約3時間、攪拌しながらより温かい温度で寝かせる。

【0187】

この寝かし段階後、混合物の温度は、適度により冷たい温度に至る、約2～約30、好ましくは約5～約15低下し、より冷たい温度への移行は好ましくは、約1分～約48時間、好ましくは5分～8時間、より好ましくは20分～4時間にわたって攪拌しながら生じる。好ましくは、新たな適度により冷たい温度は、約3超～約18の範囲、より好ましくは約10である。実施の特異的な態様では、温度を21から10まで約2時間で低下させることが、適切であることとわかった。次に、混合物は、好ましくは約5分～48時間の間、より好ましくは約6時間、より冷たい温度でさらに寝かされる。

【0188】

この寝かし処理は、ろ液からペプチド粒子をろ過および分離することが、ペプチドの二次構造を過度に変化させることなくより迅速に生じる点で、沈殿した粒子のろ過特徴を改善する。

【0189】

したがって、この寝かしの後、沈殿はろ過され、好ましくは、1psigのN<sub>2</sub>などで圧力ろ過される。フィルターケーキは、望ましくは約3～約20、好ましくは5～約15の範囲、より好ましくは約10の温度などへあらかじめ冷却された水で1回以上洗

10

20

30

40

50

浄され得る。このことは、ケーキの塩含有量を低下させるのを助ける。フィルターケーキは次に、適切な温度で1分～48時間、好ましくは5分～8時間、より好ましくは約6時間の適切な時間、窒素によりケーキに窒素を通過させるなどによって、部分的にまたは完全に乾燥し得る。ほぼ周囲温度にある窒素を使用することは、簡便かつ適切である。ケーキは、乾燥を容易にするために周期的に混合され得る。乾燥は場合により、個別の乾燥装置の中で完了され得る。このような任意の乾燥は好ましくは、真空中で、例えば40mbar未満で、ペプチドを分解しないような適度な温度、例えば約30℃未満の温度、好ましくは約28℃未満の温度で生じる。

#### 【0190】

本発明の原理を、ここに以下の説明としての実施例に関してさらに説明する。

10

#### 【0191】

##### 実施例

次の実施例について、次の標準的な試薬および用語を採用する。

#### 【0192】

##### クロラニル検査

トルエン中のクロラニルの飽和溶液の滴下をアセトン約1mLへ添加することによって、クロラニル検査溶液を調製した。洗浄の滴下をクロラニル検査溶液へ添加することによって、NMP洗浄を検査した。青色または紫色は、二級アミンの存在についての正の表示であり、Fmocにより脱保護された副産物および/または残余ピペリジンがなおも存在することを示す。

20

#### 【0193】

##### ニンヒドリン(カイザー(Kaiser))検査

定性的なニンヒドリン検査において、樹脂2～20mg試料をぬきとり、NMPで洗浄した後、DCMまたはメタノールで洗浄した。エタノール中のフェノールの76%溶液3滴、ピリジン中の0.2mM KCN溶液6滴、およびエタノール中のニンヒドリン0.28M溶液の3滴を試料へ添加し、試料を約100℃で約5分間加熱ブロック中に置いた。試料を取り出し、エタノール/水溶液(9:1)で即時希釈した。青色または紫色は、遊離アミンの存在の正の表示であり、結合反応がまだ完了していないことを示す。正のニンヒドリン検査反応を結合反応の1時間後に観察した場合、結合反応はさらに1時間続行した。正のニンヒドリン検査反応が結合反応の3時間後に生じた場合、容器を排水し、活性化されたアミノ酸および試薬の約1当量を使用して、結合を反復した。

30

#### 【0194】

##### 実施例1. Fmoc-Glu(OtBu)を負荷した2-CTC樹脂の調製

窒素によりバージした1Lのペプチド反応器へ、40gの2-CTC樹脂および400mLのDCMをチャージする。25±2℃で30分攪拌する。その間、1Lフラスコへチャージするのは、9.7gのFmoc-Glu(OtBu)OH、280mLのDMF、40mLのDCM、および5.5gのDIEAである。周囲温度で内容物を攪拌し、固体を溶解する。

40

#### 【0195】

反応器からDCMを排水し、上述のFmoc-Glu(OtBu)OHの調製した溶液をチャージする。混合物を25±2℃で2時間攪拌し、反応器を排水する。

#### 【0196】

反応器へチャージするのは、DIEA:MeOH(40:360mL)の混合物である。内容物を25±2℃で1時間攪拌し、反応器を排水する。

#### 【0197】

樹脂ベッドを1×400mLのDMF、1×200mLのDMF、および4×400mLのDCMで洗浄する。最後の洗浄を次のUV検査についてチェックする。

#### 【0198】

樹脂ベッドを3×400mLのイソプロパノールで洗浄する。樹脂を40±2℃で一定重量まで真空乾燥させる。

50

## 【0199】

収量: 48.9 g

負荷因子分析: 0.44 mmol/g

## 【0200】

実施例2.T-1249中間体断片Ac-AA(1-20)OH(配列番号2)の固相合成

SPPSチャンバーへ、Fmoc-Glu(OtBu)-O-2-CTC(実施例1)樹脂25.0 gおよび250 mLのDCMをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、樹脂ベッドを3×150 mLのNMPで洗浄する。反応器へNMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。10。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。

## 【0201】

プラスコへ、10.1 gのFmoc-Gln(Trt)OH、2.82 gの6-クロロHOBT、2.45 gのDIEA、および113 mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

## 【0202】

分離プラスコにおいて、5.3 gのTBTUおよび68 mLのNMPをチャージする。20周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Gln(Trt)OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。プラスコを50 mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。完了反応のために樹脂ビーズをサンプリングする(カイザー(Kiesel)検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ビーズを4×150 mLのNMPで洗浄する。

## 【0203】

反応器へNMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ビーズを5×150 mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄物をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。30

## 【0204】

プラスコへ、10.1 gのFmoc-Gln(Trt)OH、2.84 gの6-クロロHOBT、2.45 gのDIEA、および80 mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

## 【0205】

分離プラスコにおいて、5.3 gのTBTUおよび68 mLのNMPをチャージする。40周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Gln(Trt)OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。プラスコを50 mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。完了反応について樹脂ビーズをサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを4×150 mLのNMPで洗浄する。

## 【0206】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125 mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150 mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて、定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

## 【0207】

プラスコへ、5.83 gのFmoc-Ile-OH、2.84 gの6-クロロHOBT50

、2.42 g の D I E A、および 113 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0208】

分離フラスコにおいて、5.3 g の T B T U および 68 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - I 1 e - O H 溶液へ添加し、この溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。完了反応について樹脂ビーズをサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の N M P で洗浄する。

【0209】

反応器へ、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0210】

フラスコへ、11.75 g の F m o c - G l n ( T r t ) O H、3.3 g の 6 - クロロ H O B T、2.84 g の D I E A、および 113 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0211】

分離フラスコにおいて、5.3 g の T B T U および 68 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - G l n ( T r t ) O H 溶液へ添加し、この溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の N M P で洗浄する。

【0212】

反応器へ、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0213】

フラスコへ、5.45 g の F m o c - A l a - O H、3.3 g の 6 - クロロ H O B T、2.85 g の D I E A、および 113 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0214】

分離フラスコにおいて、6.18 g の T B T U および 68 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - A l a - O H 溶液へ添加し、この溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の N M P で洗浄する。

【0215】

反応器へ N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

10

20

30

40

50

## 【0216】

フラスコへ、11.75 g の Fmoc - Glu (Trt) OH、3.2 g の 6 - クロロ HOBt、3.1 g の DlEA、および 113 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

## 【0217】

分離フラスコにおいて、7.9 g の TBTU および 68 mL の NMP をチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc - Glu (Trt) OH 溶液へ添加し、この溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の NMP で洗浄する。

10

## 【0218】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間搅拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

## 【0219】

フラスコへ、8.2 g の Fmoc - Glu (Otbu) OH、3.2 g の 6 - クロロ HOBt、2.84 g の DlEA、および 113 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

20

## 【0220】

分離フラスコにおいて、6.18 g の TBTU および 68 mL の NMP をチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc - Glu (Otbu) OH 溶液へ添加し、この溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の NMP で洗浄する。

30

## 【0221】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間搅拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

## 【0222】

フラスコへ、5.83 g の Fmoc - Leu - OH、2.8 g の 6 - クロロ HOBt、2.42 g の DlEA、および 113 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

40

## 【0223】

分離フラスコにおいて、5.3 g の TBTU および 68 mL の NMP をチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc - Leu - OH 溶液へ添加し、この溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを 4 × 150 mL の NMP で洗浄する。

## 【0224】

反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 150 mL の NMP で

50

洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0225】

フラスコへ、5.83gのFmoc-Leu-OH、2.8gの6-クロロHOBt、2.42gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0226】

分離フラスコにおいて、5.3gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Leu-OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0227】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3℃で30分間搅拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3℃で30分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0228】

フラスコへ、5.14gのFmoc-Ala-OH、2.8gの6-クロロHOBt、2.42gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0229】

分離フラスコにおいて、5.3gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Ala-OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0230】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3℃で30分間搅拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3℃で30分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0231】

フラスコへ、6.6gのFmoc-Thr(tBu)-OH、2.8gの6-クロロHOBt、2.42gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0232】

分離フラスコにおいて、5.3gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Thr(tBu)-OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0233】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3℃で30分

10

20

30

40

50

間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0234】

フラスコへ、5.83gのFmoc-ile-OH、2.8gの6-クロロHOBt、2.42gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0235】

分離フラスコにおいて、5.3gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-ile-OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0236】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0237】

フラスコへ、7.73gのFmoc-Lys(Boc)-OH、2.8gの6-クロロHOBt、2.42gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0238】

分離フラスコにおいて、5.3gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Lys(Boc)-OH溶液へ添加し、この溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0239】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0240】

フラスコへ、13.44gのFmoc-Gln(Trt)-OH、3.73gの6-クロロHOBt、3.13gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0241】

分離フラスコにおいて、7.06gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Gln(Trt)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×150mLのNMPで

10

20

30

40

50

洗浄する。

【0242】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0243】

フラスコへ、9.36gのFmoc-Glu(ObtBu)-OH、3.73gの6-クロロHOBT、3.13gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

10

【0244】

分離フラスコにおいて、7.06gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Glu(ObtBu)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0245】

20

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0246】

フラスコへ、11.6gのFmoc-Trp(Boc)-OH、3.73gの6-クロロHOBT、3.13gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0247】

30

分離フラスコにおいて、7.06gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Trp(Boc)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを50mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×150mLのNMPで洗浄する。

【0248】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン125mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×150mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

40

【0249】

フラスコへ、9.36gのFmoc-Glu(ObtBu)-OH、3.73gの6-クロロHOBT、3.13gのDIEA、および113mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0250】

分離フラスコにおいて、7.06gのTBTUおよび68mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-G

50

1 u ( O t B u ) - OH 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。

【 0 2 5 1 】

反応器へ、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

10

【 0 2 5 2 】

フラスコへ、13.44 g の F m o c - G l n ( T r t ) - OH 、3.73 g の 6 - クロロ H O B T 、3.13 g の D I E A 、および 113 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【 0 2 5 3 】

分離フラスコにおいて、7.06 g の T B T U および 68 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - G l n ( T r t ) - OH 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。

20

【 0 2 5 4 】

反応器へ、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【 0 2 5 5 】

30

フラスコへ、11.6 g の F m o c - T r p ( B o c ) - OH 、3.73 g の 6 - クロロ H O B T 、3.13 g の D I E A 、および 113 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【 0 2 5 6 】

分離フラスコにおいて、7.06 g の T B T U および 68 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - T r p ( B o c ) - OH 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 50 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。

40

【 0 2 5 7 】

反応器へ、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20% ピペリジン 125 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 150$  mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【 0 2 5 8 】

フラスコへ、5.62 g の無水酢酸、7.11 g の D I E A 、および 100 mL の N M P をチャージする。溶液を混合して、10 へ冷却する。冷無水酢酸溶液を S P P S 反応

50

器へ添加し、フラスコを 50 mL の NMP ですすぎ、洗浄物を反応器へ添加する。混合物を  $30 \pm 3$  で 1 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザーチェック）。一度反応が完了すると、反応器を排水し、樹脂ベッドを  $5 \times 180$  mL の NMP で洗浄する。樹脂ベッドを  $5 \times 180$  mL の DCM、 $5 \times 180$  mL のイソプロパノールで洗浄する。樹脂を  $40 \pm 2$  で真空乾燥させる。

## 【0259】

収量： 57.83 g

## 【0260】

実施例 3. 固相樹脂からの Ac-AA(1-20)OH(配列番号 2) の開裂および精製  
SPPS 反応器へ、上述の構築された樹脂 30 g および 300 mL の DCM をチャージする。周囲温度で約 5 分間攪拌する。反応器を排水し、DCM 洗浄をさらに 1 回反復する。反応器を  $-10 \pm 5$  へ冷却する。

10

## 【0261】

6 mL のトリフルオロ酢酸および 294 mL の DCM の溶液を調製する。溶液を  $0 \pm 5$  へ冷却する。

## 【0262】

冷 TFA 溶液を反応器へチャージし、スラリーを  $0 \pm 5$  で 45 分間攪拌する。7.6 mL のピリジンを添加し、 $0 \pm 5$  でさらに 5 分間攪拌する。反応器を排水し、樹脂ベッドを周囲温度で  $1 \times 300$  mL の DCM、および  $6 \times 200$  mL の DCM で洗浄する。DCM 溶液を 200 mL の水で洗浄する。DCM 溶液を約 40 mL の容積へ濃縮し、300 mL のイソプロパノールを添加する。DCM を 50 mm 真空下で 4 時間蒸留する。生成物をろ過し、 $2 \times 100$  mL のイソプロパノール (23 mL) で洗浄し、 $40 \pm 2$  で真空乾燥させる。

20

## 【0263】

収量： 14.1 g (54.1%)。7.85 g (30.1%) の第二収穫を母液から得た。

## 【0264】

実施例 4. Fmoc-Trp(Boc) を負荷した 2-CTC 樹脂の調製

Fmoc-Trp(Boc) を負荷した 2-CTC 樹脂を調製するため、工程を実施した。

30

## 【0265】

窒素によりバージされた 1 L のペプチド反応器へ、40 g の 2-CTC 樹脂および 400 mL の DCM をチャージする。 $25 \pm 2$  で 30 分間攪拌する。その間、1 L のフラスコへ、12.66 g の Fmoc-Trp(Boc)OH、280 mL の DMF、40 mL の DCM、および 5.7 g の DIEA をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解する。

## 【0266】

DCM を反応器から排水し、Fmoc-Trp(Boc)OH の上述に調製された溶液をチャージする。混合物を  $25 \pm 2$  で 2 時間攪拌し、反応器を排水する。

## 【0267】

反応器へ、DIEA : MeOH (40 : 360 mL) の混合物をチャージする。内容物を  $25 \pm 2$  で 1 時間攪拌し、反応器を排水する。

40

## 【0268】

樹脂ベッドを 400 mL の DMF、200 mL の DMF、および  $3 \times 400$  mL の DCM で洗浄する。最後の洗浄を UV 検査についてチェックする。

## 【0269】

樹脂ベッドを  $3 \times 400$  mL の NMP で洗浄し、反応器へ NMP 中の 20% ピペリジン 275 mL をチャージする。混合物を  $28 \pm 2$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、段階をさらに 30 分間反復する。反応器を排水し、樹脂ベッドを  $5 \times 300$  mL の NMP、 $5 \times 300$  mL の DCM、および  $3 \times 300$  mL のイソプロパノールで洗浄する。樹脂

50

を  $40 \pm 2$  で一定重量まで真空乾燥させる。

【0270】

収量: 47.4 g

負荷因子分析: 0.4 mmol/g

【0271】

実施例5.T-1249中間体断片 Fmoc-AA(21-38)OH(配列番号3)の固相合成

SPPSチャンバーへ、H-Trp(Boc)-O-2-CTC樹脂(実施例4)20.0 g および 200 mL の DCM をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、樹脂ベッドを  $3 \times 120$  mL の NMP で洗浄する。

10

【0272】

フラスコへ、5.14 g の Fmoc-Glu(Obu)-OH、2.1 g の 6-クロロ HOBt、1.81 g の DIEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0273】

分離フラスコにおいて、3.88 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc-Glu(Obu)-OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 120$  mL の NMP で洗浄する。

20

【0274】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 120$  mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0275】

フラスコへ、6.33 g の Fmoc-Trp(Boc)-OH、2.04 g の 6-クロロ HOBt、1.77 g の DIEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

30

【0276】

分離フラスコにおいて、3.86 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc-Trp(Boc)-OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 120$  mL の NMP で洗浄する。

40

【0277】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 120$  mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0278】

フラスコへ、4.26 g の Fmoc-Leu-OH、2.04 g の 6-クロロ HOBt、1.81 g の DIEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

50

## 【0279】

分離フラスコにおいて、3.87 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc-L-  
e u - OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 3 × 120 mL の NMP で洗浄する。

## 【0280】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 120 mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

10

## 【0281】

フラスコへ、4.62 g の Fmoc-Ser(tBu)-OH、2.06 g の 6-クロロ HOBt、1.8 g の DIEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

## 【0282】

分離フラスコにおいて、3.88 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc-S-  
er(tBu)-OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 3 × 120 mL の NMP で洗浄する。

20

## 【0283】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 120 mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

30

## 【0284】

フラスコへ、3.75 g の Fmoc-Ala-OH、2.05 g の 6-クロロ HOBt、1.76 g の DIEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

30

## 【0285】

分離フラスコにおいて、3.89 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc-A-  
la-OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 3 × 120 mL の NMP で洗浄する。

40

## 【0286】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 120 mL の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

## 【0287】

フラスコへ、6.32 g の Fmoc-Trp(Boc)-OH、2.06 g の 6-クロ

50

□H O B T、1.82 g の D I E A、および 54 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0288】

分離フラスコにおいて、3.87 g の T B T U および 32 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - T r p ( B o c ) - O H 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 4 × 120 mL の N M P で洗浄する。

10

【0289】

反応器へ、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 120 mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0290】

フラスコへ、5.64 g の F m o c - L y s ( B o c ) - O H、2.06 g の 6 - クロ□H O B T、1.79 g の D I E A、および 54 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

20

【0291】

分離フラスコにおいて、3.87 g の T B T U および 32 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - L y s ( B o c ) - O H 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 4 × 120 mL の N M P で洗浄する。

【0292】

反応器へ、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 4 × 120 mL の N M P で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

30

【0293】

フラスコへ、4.95 g の F m o c - A s p ( O t B u ) - O H、2.09 g の 6 - クロ□H O B T、1.76 g の D I E A、および 54 mL の N M P をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0294】

分離フラスコにおいて、3.88 g の T B T U および 32 mL の N M P をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 T B T U 溶液を F m o c - A s p ( O t B u ) - O H 溶液へ添加してこの溶液を S P P S 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の D C M で洗浄し、洗浄物を S P P S 反応器へチャージする。混合物を 30 ± 3 で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする（カイザー検査）。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを 4 × 120 mL の N M P で洗浄する。

40

【0295】

反応器へ、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージし、30 ± 3 で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、N M P 中の 20 % ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を 30 ± 3 で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを 5 × 120 mL

50

のNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0296】

フラスコへ、4.25gのFmoc-Leu-OH、2.09gの6-クロロHOBt、1.78gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0297】

分離フラスコにおいて、3.86gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Leu-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×120mLのNMPで洗浄する。

【0298】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージし、30±3℃で30分間搅拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージする。混合物を30±3℃で30分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0299】

フラスコへ、6.40gのFmoc-Lys(Boc)-OH、2.33gの6-クロロHOBt、2.13gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0300】

分離フラスコにおいて、4.41gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Lys(Boc)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×120mLのNMPで洗浄する。

【0301】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージし、30±3℃で30分間搅拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージする。混合物を30±3℃で30分間搅拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0302】

フラスコへ、8.35gのFmoc-Gln(Trt)-OH、2.33gの6-クロロHOBt、2.09gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で搅拌して固体を溶解した後、10℃へ冷却する。

【0303】

分離フラスコにおいて、4.38gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10℃へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Gln(Trt)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3℃で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×120mLのNMPで洗浄する。

【0304】

10

20

30

40

50

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0305】

フラスコへ、4.38gのFmoc-Leu-OH、2.33gの6-クロロHOBT、2.06gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0306】

分離フラスコにおいて、4.37gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Leu-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを3×120mLのNMPで洗浄する。

【0307】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0308】

フラスコへ、5.81gのFmoc-Glu(OctBu)-OH、2.35gの6-クロロHOBT、2.08gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0309】

分離フラスコにおいて、4.39gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Glu(OctBu)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを4×120mLのNMPで洗浄する。

【0310】

反応器へ、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージし、30±3で30分間攪拌する。反応器を排水し、NMP中の20%ピペリジン100mLをチャージする。混合物を30±3で30分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0311】

フラスコへ、6.29gのFmoc-Tyr(OctBu)-OH、2.33gの6-クロロHOBT、2.11gのDIEA、および54mLのNMPをチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10へ冷却する。

【0312】

分離フラスコにおいて、4.39gのTBTUおよび32mLのNMPをチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Tyr(OctBu)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー

10

20

30

40

50

検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $3 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。

【0313】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0314】

10 フラスコへ、5.81 g の Fmoc - Glu(OtBu) - OH、2.34 g の 6 - クロロ HOBt、2.06 g の DlEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0315】

分離フラスコにおいて、4.37 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc - Glu(OtBu) - OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。

20

【0316】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $5 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

【0317】

10 フラスコへ、8.13 g の Fmoc - Asn(Trt) - OH、2.32 g の 6 - クロロ HOBt、2.17 g の DlEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

30

【0318】

分離フラスコにおいて、4.37 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする。周囲温度で攪拌して固体を溶解し、10 へ冷却する。冷 TBTU 溶液を Fmoc - Asn(Trt) - OH 溶液へ添加してこの溶液を SPPS 反応器へチャージする。フラスコを 24 mL の DCM で洗浄し、洗浄物を SPPS 反応器へチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 3 時間攪拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを  $4 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。

【0319】

反応器へ、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージし、 $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌する。反応器を排水し、NMP 中の 20% ピペリジン 100 mL をチャージする。混合物を  $30 \pm 3$  で 30 分間攪拌し、反応器を排水する。樹脂ベッドを  $4 \times 120\text{ mL}$  の NMP で洗浄する。最後の洗浄をピペリジンレベルについて定性的ニンヒドリン検査によりサンプリングする。

40

【0320】

フラスコへ、6.38 g の Fmoc - Lys(Boc) - OH、2.33 g の 6 - クロロ HOBt、2.16 g の DlEA、および 54 mL の NMP をチャージする。内容物を周囲温度で攪拌して固体を溶解した後、10 へ冷却する。

【0321】

分離フラスコにおいて、4.39 g の TBTU および 32 mL の NMP をチャージする

50

。周囲温度で搅拌して固体を溶解し、10へ冷却する。冷TBTU溶液をFmoc-Lys(Boc)-OH溶液へ添加してこの溶液をSPPS反応器へチャージする。フラスコを24mLのDCMで洗浄し、洗浄物をSPPS反応器へチャージする。混合物を30±3で3時間搅拌する。樹脂ビーズを完了反応についてサンプリングする(カイザー検査)。カイザー検査は、不完全な反応を示した。樹脂ベッドを、30mLのNMP中の2.83gのFmoc-Lys(Boc)OH、1.04gの6-クロロHOBt、1.01gのDIEAで処理した。22mLのNMP中の1.94gのTBTUの溶液を添加し、混合物をさらに3時間搅拌し、サンプリングした。一度反応が完了すると、反応器を排水して樹脂ベッドを5×120mLのNMPで洗浄する。樹脂ベッドを6×120mLのDCM、4×120mLのイソプロパノールで洗浄する。樹脂を40±2で真空乾燥させる。 10

## 【0322】

収量：46.77g

## 【0323】

実施例6. 固相樹脂からのFmoc-AA(21-38)OH(配列番号3)の開裂および精製

## 【0324】

## 【表61】

Fmoc-Lys-Asn-Glu-Tyr-Glu-Leu-Gln-Lys-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Glu-Trp-O-2-CTC樹脂 [断片Fmoc-AA(21-38)O-2-CTC樹脂]

20

## 【0325】

の開裂

## 【0326】

SPPS反応器へ、200mLの2%v/vトリフルオロ酢酸/DCM溶液をチャージする。溶液を0±5へ冷却し、Fmoc-AA(21-38)O-2-CTC樹脂20.02gを添加する。混合物を45分間搅拌する。5.1mLのピリジンを添加し、混合物を周囲温度へ加温する。反応器を排水し、樹脂ベッドを7×100mLのDCMで洗浄する。合わせたDCM洗浄物を2×250mLの水で洗浄する。DCM溶液を真空下で約250mLの容積へと濃縮する。250mLのヘプタンを添加し、さらに200mLの蒸留物を回収するまで蒸留し続ける。250mLのヘプタンを添加し、生成物が沈殿するまで蒸留し続ける。生成物をろ過し、3×50のヘプタンで洗浄する。湿性ケーキを250mLのヘプタン中で懸濁し、周囲温度で30分間搅拌する。生成物をろ過し、2×75mLのヘプタンで洗浄する。生成物を真空乾燥させる。 30

30

## 【0327】

収量：12.34g(89.8%)

## 【0328】

実施例7. H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>(配列番号4)の固相合成

PhenH<sub>2</sub>をFmoc-AA(21-38)OHへ溶液相結合させることによって、T-1249中間体断片H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>を調製した。 40

40

## 【0329】

H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>の調製を、Fmoc-AA(21-38)OH3.00gで出発することで実施した。実施例6に記載されるようなFmoc-AA(21-38)OH(3.00g)、PhenH<sub>2</sub>-HCl(0.74g、3.68mmol、1.3当量)、および6-クロロHOBt(0.96g、5.66mmol、2.0当量)をDMF(100mL、8.3容積)中に溶解した。溶液を-10へ冷却し、DMF(5mL、3.6容積)中のDIEA(1.4mL、7.92mmol、2.8当量)を添加した。TBTU(1.2g、3.68mmol、1.3当量)を一度に添加した後、DMF(15mL)ですすいだ。反応混合物を-10で一晩搅拌し、そして周囲温度へ加温した。さらに4時間搅拌し続けた。出発物質の0.4%Fmoc-AA(21-38)OH 50

50

が残存することを示すHPLC分析によって、反応の完了をモニターした。ピペリジン(1.23mL、14.43mmol、5.1当量)を添加し、溶液を30で3時間攪拌した。1%未満のFmoc-AA(21-38)NH<sub>2</sub>を示すHPLC分析によって、Fmoc除去の完了をモニターした。水(100mL、8.3容積)を添加して生成物を沈殿させた。固体を吸引ろ過により回収し、水で洗浄した。周囲温度で一晩乾燥させると、11.85g(101%、%AN HPLC)を生じた。

#### 【0330】

中間体Fmoc-AA(21-39)NH<sub>2</sub>をピペリジンで処理して、Fmoc保護基を除去し、生成物H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>を吸引ろ過により単離した。湿性ケーキを1:1のEtOH:水中に30分間懸濁した。1:2のMTBE:ヘプタン中の別の再スラリーをろ過後、乾燥させて、84.1%(AN HPLC)の純度を有するH-AA(21-39)NH<sub>2</sub> 2.67g(90.7%)を得た。

10

#### 【0331】

HPLC条件:

カラム: Betabasic C-18、150×4.6mm、3μm、150

流速: 1.5mL/分

検出: 262nmでのUV

移動相: A: 0.15%TFA/水

B: 0.05%TFA/ACN

C: 0.05%TFA/THF

20

保持時間: 約12分

#### 【0332】

実施例8.Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub>(配列番号1)の溶液相合成

Ac-AA(1-20)OHをH-AA(21-39)NH<sub>2</sub>と溶液相結合させることによって、T-1249の最終生成物を調製した。

#### 【0333】

H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>(2.07g、0.53mmol、1.2当量)、Ac-AA(1-20)OH(2.0g、0.44mmol、1当量)、および6-クロロHOBt(0.15g、0.89mmol、2.0当量)をDMF(33mL、16容積、15分)中に溶解した。溶液を0±5へ冷却し、DIEA(0.16g、1.3mmol、3.0当量)の後にTBTU(0.0.18g、0.57mmol、1.3当量)を添加した。0で1.5時間攪拌した後、溶液を周囲温度へ加温し、反応が完了するまで攪拌した。水(40mL)を滴下して添加した。結果として生じるスラリーを周囲温度で0.8時間攪拌し、生成物を吸引ろ過により単離した。周囲温度で一晩乾燥させると、72.1%(AN HPLC)の純度を有するAc-AA(1-39)NH<sub>2</sub> 4.07g(95.1%)を付与した。

30

#### 【0334】

HPLC条件:

カラム: Betabasic C-18、150×4.6mm、3μm、150

流速: 1.5mL/分

40

検出: 262nmでのUV

移動相: A: 0.15%TFA/水

B: 0.05%TFA/ACN

C: 0.05%TFA/THF

保持時間: 約25分

#### 【0335】

実施例9.Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub>の側鎖脱保護によるT-1249の調製

Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub>(5.00g)をDCM(50mL、10容積)中に溶解し、TFA:DTT:水(35mLのTFA、2.52gのDTT、0.85mLの水)の新鮮に調製された溶液35mLで処理した。溶液を周囲温度で6.5時間攪拌し、0

50

± 5 ℃ へ冷却した。M T B E ( 1 5 0 m L ) を添加し、沈殿物を吸引ろ過により回収した。細かい粉末をアセトニトリル ( 1 3 0 m L ) 、 D I E A ( 2 . 6 m L ) 、酢酸 ( 1 . 9 1 m L ) 、および水 ( 5 . 6 m L ) の溶液中に懸濁した。スラリーを 4 0 ℃ で一晩攪拌して、トリプトファンのインドール側鎖の脱カルボキシル化をさせ、周囲温度へ冷却し、生成物を吸引ろ過により回収した。周囲温度で真空オープン中で一晩乾燥させると、T - 1 2 4 9 の 2 . 9 8 g ( 1 0 0 . 4 % ) を付与した。T - 1 2 4 9 の純度は、 6 1 % ( A N ) および 4 2 % ( 重量 / 重量 ) であった。

### 【 0 3 3 6 】

H P L C 条件 :

カラム : B e t a b a s i c C - 1 8 、 1 5 0 × 4 . 6 m m 、 3 μ m 、 1 5 0

10

流速 : 1 . 6 m L / 分

検出 : 2 2 0 n M での U V

移動相 : A : 水中の 0 . 1 0 % T F A / A C N 中の 0 . 0 7 5 % T F A / M e O H 、 5 5 / 4 1 / 0 . 4

B : 水中の 0 . 1 0 % T F A / A C N 中の 0 . 0 7 5 % T F A / M e O H 、 4 2 / 5 4 / 0 . 4

C : C A N 中の 0 . 0 7 5 % T F A

保持時間 : 約 9 分

### 【 配列表】

0004886703000001.app

20

---

フロントページの続き

(72)発明者 ハン , ユン - クウェイ

アメリカ合衆国、コロラド 80027、ルイビル、パインハースト・コート 816

(72)発明者 ホッジス , エル・マーク

アメリカ合衆国、コロラド 80504、ロングモント、イーグル・ブルバード 4869

(72)発明者 ジョンストン , デーヴィッド・エー

アメリカ合衆国、コロラド 80027、ルイビル、イーグル・コート 1037

(72)発明者 カトリ , ハイラル・エヌ

アメリカ合衆国、コロラド 80027、ルイビル、ウェスト・ライラック・コート 638

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 米国特許第06469136(US, B1)

米国特許第06015881(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07K 1/00-1/10

C07K 14/16

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq