

明 細 書

発明の名称：ペプチド化合物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド化合物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ペプチドはアミノ酸が多数連結した分子であり、生物が生命活動を営む上で不可欠な役割を果たしている。生物学、化学の発展に伴いペプチドの理解が深まるとともに、新規医薬の創出を志向した天然ペプチドの利活用や、ペプチドの人工デザインによる機能性ペプチドの研究、開発が盛んに行われている（非特許文献1）。とりわけ、ペプチドの環化や、構成アミノ酸のN-アルキル化、特にN-メチル化が、膜透過性や代謝安定性向上に寄与することや（非特許文献2、非特許文献3）、細胞内移行や経口剤の開発の鍵となるドラッグライクな環状ペプチド構造の知見や考察が報告され、ペプチド創薬における該構造の重要性の認知度が高まりつつある（特許文献1）。

[0003] ペプチドの合成は、アミド結合の形成により、望みの配列へと伸長することで達成される。より具体的な方法として、液相法と固相法が挙げられる（非特許文献4）。このうち固相法は、ポリマー樹脂（固相合成用樹脂）を固定相として、逐次的にアミノ酸を結合させることにより目的のペプチドを合成する方法である（非特許文献5）。さらに近年は、セルロース等のメンブランを固定相とするペプチドアレイ技術が進化し、少量多検体のペプチドを迅速に自動合成する技術として注目されている（非特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2013/100132

特許文献2：WO2018/225851

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Future Med. Chem., 2009, 1, 1289-1310.

非特許文献2: Acc Chem. Res., 2008, 41, 1331-1342.

非特許文献3: Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52, 254-269.

非特許文献4: Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Volume 3, 2011.

非特許文献5: Solid phase peptide synthesis (Bachem社発行) [2022年1月18日検索]、インターネット <URL: https://www.bachem.com/wp-admin/admin-ajax.php?juwpfisadmin=false&action=wpfd&task=file.download&wpfd_category_id=180&wpfd_file_id=213490&token=&preview=1>

非特許文献6: Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 21, 119-127.

非特許文献7: Methods Mol. Biol., 2009, 570, 157-174.

非特許文献8: Org. Lett. 2021, 23, 6900-6904.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ペプチド固相合成において、セルロース等のメンブランを固定相とするペプチドアレイ技術が進化し、少量多検体のペプチドを迅速に自動合成する技術として注目されている（非特許文献6）。そこで本発明者らは、ドラッグライクなペプチドを合成するために、メンブランを固定相とするペプチドアレイ技術への適用を試みた。しかしながら、ドラッグライクなペプチドはN-アルキルアミノ酸を多く含むためにアミド化反応の合成難易度が高く、ペプチドアレイを用いた合成において既存のアミド化条件を適用したところいずれも低収率となり、十分に満足するアミド化の条件は存在しないことが判明した。例えば、メンブラン固相に結合するN-メチルフェニルアラニンと、続くFmoc-ノルロイシンのアミド化反応において、非特許文献7に記載の反応条件を用いたところ、反応変換率は3~4%という結果であった。また、N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法（特許文献2）に記載がある、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）と1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール（HOAt）を用いた条件を参考に実施したところ

、反応変換率が50～64%という結果であった。

[0007] 反応の詳細を精査したところ、反応系中における活性エステルの失活が確認された。反応変換率の向上を目的として試薬濃度を2倍にして検討したところ、N, N'-ジイソプロピルウレアの結晶が析出した。ペプチドアレイ技術では送液を自動化することで迅速化および効率化が図られるが、結晶が析出することにより目詰まりおよび／または洗浄不足に伴う不純物の増加を引き起こすため、既存条件のまま高い試薬濃度の条件を適用することは困難であった。

[0008] 一局面において本発明は、ペプチド合成法の、とくに縮合反応の工程において、反応変換率を向上させることを課題とする。また、一局面において本発明は、結晶析出を回避することにより自動合成への適用を可能とするアミド化条件を用いて、高純度のペプチド化合物を効率良く製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

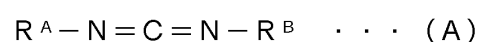
[0009] 上記事情に鑑み、本発明者らは鋭意検討の結果、本発明を完成するに至った。本発明の方法は、メンブランを固定相とするペプチドアレイ技術に限定されることなく、ポリマー樹脂（固相合成用樹脂）を固定相とする固相合成にも適用可能な方法である。

[0010] 例えば、本発明は、以下の[A1]～[A64]を提供する。

[A1] 固相法によるペプチド化合物の製造方法であって、

固相に担持された、アミノ基を有する第一のアミノ酸またはアミノ基を有する第一のペプチドを準備する準備工程；および

第一のアミノ酸または第一のペプチドと、保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のアミノ酸、または保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のペプチドとを、下記一般式(A)で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤、



(式中、 R^A は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 R^A および R^B における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または4～8員環状アミノより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されている。))

および添加剤の存在下で縮合させる縮合工程を含む、前記方法。

[A 2] R^A は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-1] R^A は $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-2] R^A は不斉炭素を有する $C_4 \sim C_8$ 第2級または第3級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-3] R^A は不斉炭素を有する $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-4] R^A は不斉炭素を有する $C_4 \sim C_6$ 第2級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-5] R^A は1-メチルヘプチル、1-メチルブチル、1-エチルプロピルまたはsec-ブチルである、[A 1]に記載の方法。

[A 2-6] R^A はsec-ブチルである、[A 1]に記載の方法。

[A 3] R^B は $C_3 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 R^B における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または4～8員環状アミノより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されている、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-1] R^B は $C_3 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-2] R^B は $C_3 \sim C_{10}$ 第2級もしくは第3級アルキル、または $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-3] R^B は $C_3 \sim C_{10}$ 第2級アルキル、または $C_7 \sim C_{10}$ アリールアルキルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-4] R^B は $C_3 \sim C_6$ 第2級アルキルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-5] R^B は1-メチルベンジル、1-メチルヘプチル、1-メチルブチル、1-エチルプロピルまたはsec-ブチルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 3-6] R^B はsec-ブチルである、[A 1]または[A 2]に記載の方法。

[A 4] R^A は $C_4 \sim C_8$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキル、または $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 4-1] R^A は $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級アルキル、または $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 4-2] R^A は $C_4 \sim C_6$ 第2級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキル、または $C_7 \sim C_{10}$ アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 5] R^A は不斉炭素有する $C_4 \sim C_8$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_3 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 5-1] R^A は不斉炭素有する $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級アルキル、または $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 5-2] R^A は不斉炭素有する $C_4 \sim C_8$ 第2級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級アルキル、または $C_7 \sim C_{10}$ アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 5-3] R^A は不斉炭素有する $C_4 \sim C_6$ 第2級アルキルであり、 R^B

はC₄～C₈第2級アルキル、またはC₇～C₁₀アリールアルキルである、[A 1]に記載の方法。

[A 6] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' -ジ-sec-ブチルカルボジイミド(DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS26)、N' - (1-メチルヘプチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS27)、N, N' -ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン(SS28)、N, N' -ビス(1-エチルプロピル)メタンジイミン(SS29)、およびN' - (1-エチルプロピル) -N- (1-メチルブチル)メタンジイミン(SS30)からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[A 1]～[A 5]のいずれかに記載の方法。

[A 6-1] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' -ジ-sec-ブチルカルボジイミド(DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS26)、N' - (1-メチルヘプチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS27)、N, N' -ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン(SS28)、またはN' - (1-エチルプロピル) -N- (1-メチルブチル)メタンジイミン(SS30)からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[A 1]～[A 5]のいずれかに記載の方法。

[A 6-2] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' -ジ-sec-ブチルカルボジイミド(DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS26)、N' - (1-メチルヘプチル) -N-sec-ブチル-メタンジイミン(SS27)、N, N' -ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン(SS28)、またはN' - (1-エチルプロピル) -N- (1-メチルブチル)メタンジイミン(SS30)である、[A 1]～[A 5]のいずれかに記載の方法。

[A 6-3] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' -ジ-sec-ブチルカルボジイミド(DsBC)である、[A 1]～[A 5]のいずれかに記載

の方法。

[A 6-4] カルボジイミド系縮合剤が、N' - (1-フェニルエチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S S 2 6) である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の方法。

[A 6-5] カルボジイミド系縮合剤が、N' - (1-メチルヘプチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S S 2 7) である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の方法。

[A 6-6] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (S S 2 8) である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の方法。

[A 6-7] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' - ビス (1-エチルプロピル) メタンジイミン (S S 2 9) である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の方法。

[A 6-8] カルボジイミド系縮合剤が、N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (S S 3 0) である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の方法。

[A 7] 添加剤が、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (H O A t)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B t)、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン (H O O B t)、シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル (O x y m a)、および5-(ヒドロキシイミノ)-1, 3-ジメチルピリミジン-2, 4, 6 (1 H, 3 H, 5 H) - トリオン (O x y m a B) からなる群より選択される少なくとも1種である、[A 1] ~ [A 6] のいずれかに記載の方法。

[A 8] 添加剤が、H O A t、H O O B t、およびO x y m aからなる群より選択される少なくとも1種である、[A 1] ~ [A 6] のいずれかに記載の方法。

[A 9] 添加剤が、H O A t、H O O B t、またはO x y m aである、[A 1] ~ [A 6] のいずれかに記載の方法。

[A 1 0] 縮合工程が溶媒中で行われ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 0.4 mol/L 以上、 0.5 mol/L 以上、 0.6 mol/L 以上、または 0.7 mol/L 以上である、[A 1] ~ [A 9] のいずれかに記載の方法。

[A 1 1] 縮合工程が溶媒中で行われ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 4.0 mol/L 以下、 3.0 mol/L 以下、 2.0 mol/L 以下、または 1.0 mol/L 以下である、[A 1] ~ [A 1 0] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 2] 縮合工程が溶媒中で行われ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 $0.4 \sim 4.0 \text{ mol/L}$ 、 $0.5 \sim 3.0 \text{ mol/L}$ 、 $0.6 \sim 2.0 \text{ mol/L}$ 、または $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/L}$ である、[A 1] ~ [A 1 1] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 3] 縮合工程が溶媒中で行われ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/L}$ である、[A 1] ~ [A 1 1] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 4] 固相がメンブランまたは固相合成用樹脂である、[A 1] ~ [A 1 3] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 5] 固相がメンブランである、[A 1] ~ [A 1 3] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 6] メンブランがセルロースメンブラン、ポリプロピレンメンブラン、またはポリアミノエチルメタクリルアミドメンブランである、[A 1 5] に記載の方法。

[A 1 7] メンブランがセルロースメンブランである、[A 1 5] に記載の方法。

[A 1 8] 固相が固相合成用樹脂である、[A 1] ~ [A 1 3] のいずれかに記載の製造方法。

[A 1 9] 固相合成用樹脂が、クロロトリチル (C T C) レジン、トリチル (T r t) レジン、S A S R I N レジン、R i n k アミドレジン、M e r

r i f i e l d レジン、または W a n g レジンである、[A 1 8] に記載の方法。

[A 2 0] 固相合成用樹脂が、クロロトリチル(C T C)レジンである、[A 1 8] に記載の方法。

[A 2 1] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、光開裂性部位、ジスルフィド結合、または酸不安定部位を介して結合されている、[A 1] ~ [A 2 0] のいずれかに記載の方法。

[A 2 1 - 1] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、光開裂性部位を介して結合されている、[A 1] ~ [A 2 0] のいずれかに記載の方法。

[A 2 1 - 2] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、ジスルフィド結合を介して結合されている、[A 1] ~ [A 2 0] のいずれかに記載の方法。

[A 2 1 - 3] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、酸不安定部位を介して結合されている、[A 1] ~ [A 2 0] のいずれかに記載の方法。

[A 2 2] 光開裂性部位がニトロベラトリルオキシカルボニル残基、またはクマリン残基を有する、[A 2 1 - 1] に記載の方法。

[A 2 2 - 1] 光開裂性部位がニトロベラトリルオキシカルボニル残基である、[A 2 1 - 1] に記載の方法。

[A 2 3] 酸不安定部位が、トリチルエステル構造、クロロトリチルエステル構造、アルコキシベンジルエーテル構造、トリアルコキシベンジルアミノカルボニル構造、ジアルコキシフェニル-アルコキシフェニルメチルアミノカルボニル構造、またはアルコキシキサンテン-9-イルアミノカルボニル構造を有する、[A 2 1 - 3] に記載の方法。

[A 2 3 - 1] 酸不安定部位が、クロロトリチルエステル構造を有する、[A 2 1 - 3] に記載の方法。

[A 2 4] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに

対して、1.0当量以上、1.1当量以上、または1.2当量以上のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[A1]～[A23]のいずれかに記載の方法。

[A25] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、5.0当量以下、4.0当量以下、3.0当量以下、2.0当量以下、または1.5当量以下のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[A1]～[A24]のいずれかに記載の方法。

[A26] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.0～5.0当量、1.1～4.0当量、1.1～3.0当量、1.2～2.0当量、または1.2～1.5当量のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[A1]～[A25]のいずれかに記載の方法。

[A27] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.2～1.5当量のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[A1]～[A25]のいずれかに記載の方法。

[A28] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.01当量、0.05当量、0.1当量、0.2当量以上、または0.3当量以上の添加剤を用いる、[A1]～[A27]のいずれかに記載の方法。

[A29] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.0当量以下、0.9当量以下、0.8当量以下、または0.7当量以下の添加剤を用いる、[A1]～[A28]のいずれかに記載の方法。

[A30] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.05～1.0当量、0.1～0.9当量、0.2～0.8当量、または0.3～0.7当量の添加剤を用いる、[A1]～[A29]のいずれかに記載の方法。

[A31] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.3～0.7当量の添加剤を用いる、[A1]～[A29]のい

ずれかに記載の方法。

[A 3 2] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、[A 1] ~ [A 3 1] のいずれかに記載の方法。

[A 3 3] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、 β -分岐アミノ酸、またはN-アルキルアミノ酸（ただし、N-アルキルアミノ酸におけるアルキルは $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または $C_6 \sim C_{10}$ アリーールより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい）である、[A 1] ~ [A 3 2] のいずれかに記載の方法。

[A 3 4] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、アルキルの炭素数が1~8であるN-アルキルアミノ酸（ただし、アルキルは、ハロゲン、シアノ、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または $C_6 \sim C_{10}$ アリーールより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい）である、[A 1] ~ [A 3 2] のいずれかに記載の方法。

[A 3 5] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、N-アルキルアミノ酸、アルキルの炭素数が1~8であるN-アルキルアミノ酸、アルキルの炭素数が1~6であるN-アルキルアミノ酸、アルキルの炭素数が1~3であるN-アルキルアミノ酸、またはN-メチルアミノ酸である、[A 1] ~ [A 3 2] のいずれかに記載の方法。

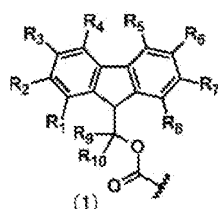
[A 3 6] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、N-メチルアミノ酸である、[A 1] ~ [A 3 2] のいずれかに記載の方法。

[A 3 7] 第二のアミノ酸、または第二のペプチドのC末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、[A 1] ~ [A 3 6] のいずれかに記載の方法。

[A 3 8] 第二のアミノ酸、または第二のペプチドのC末端のアミノ酸が、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、 β -分岐アミノ酸、またはN-アルキルアミノ酸である、[A 1] ~ [A 3 7] のいずれかに記載の方法。

〔A 3 9〕 保護アミノ基における保護基が、下記式（１）で表される基である、〔A 1〕～〔A 3 8〕のいずれかに記載の方法；

〔化1〕



（式中、 $R_1 \sim R_8$ は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ フルオロアルキル、ハロゲン、スルホ、およびトリメチルシリルからなる群より選択され、 $R_9 \sim R_{10}$ は、独立して、水素またはメチルである）。

〔A 4 0〕 保護アミノ基における保護基が、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）基、Fmoc（2, 7tb）基、Fmoc（1Me）基、Fmoc（2F）基、Fmoc（2, 7Br）基、mio-Fmoc基、dio-Fmoc基、tdf-Fmoc基、Fmoc（2TMS）基、Fmoc（2so3h）基、sm-Fmoc基、またはrm-Fmoc基である、〔A 1〕～〔A 3 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 1〕 保護アミノ基における保護基が、Fmoc基である、〔A 1〕～〔A 3 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 2〕 縮合工程が溶媒中で行われる、〔A 1〕～〔A 4 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 3〕 溶媒は、アミド系溶媒、ウレア系溶媒、エーテル系溶媒、ハロゲン系溶媒、ニトリル系溶媒、およびベンゼン系溶媒からなる群より選択される少なくとも1種を含む、〔A 4 2〕に記載の方法。

〔A 4 4〕 溶媒がアミド系溶媒である、〔A 4 3〕に記載の方法。

〔A 4 5〕 アミド系溶媒は、N、N-ジメチルホルムアミド（DMF）、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、ジメチルアセトアミド（DMA）、N-エチル-2-ピロリドン（NEP）、N-ブチル-2-ピロリドン（NBP）、およびホルムアミドからなる群より選択される、〔A 4 4〕に記

載の方法。

[A 4 6] 溶媒がウレア系溶媒である、[A 4 3]に記載の方法。

[A 4 7] ウレア系溶媒は、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (DMI)、およびN, N'-ジメチルプロピレン尿素 (DMPU) からなる群より選択される、[A 4 6]に記載の方法。

[A 4 8] 溶媒がエーテル系溶媒である、[A 4 3]に記載の方法。

[A 4 9] エーテル系溶媒は、テトラヒドロフラン、2-メチルテトラヒドロフラン、4-メチルテトラヒドロピランからなる群より選択される、[A 4 8]に記載の方法。

[A 5 0] 溶媒がハロゲン系溶媒である、[A 4 3]に記載の方法。

[A 5 1] ハロゲン系溶媒は、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタンからなる群より選択される、[A 5 0]に記載の方法。

[A 5 2] 溶媒がニトリル系溶媒である、[A 4 3]に記載の方法。

[A 5 3] ニトリル系溶媒は、アセトニトリルである、[A 5 2]に記載の方法。

[A 5 4] 溶媒がベンゼン系溶媒である、[A 4 3]に記載の方法。

[A 5 5] ベンゼン系溶媒は、ベンゼン、トルエン、キシレンからなる群より選択される、[A 5 4]に記載の方法。

[A 5 6] 縮合工程が、0℃～100℃、10℃～80℃、10℃～60℃、10℃～50℃、10℃～40℃、10℃～35℃、15℃～60℃、20℃～60℃、20℃～40℃、または25℃～40℃で行われる、[A 1]～[A 5 5]のいずれかに記載の方法。

[A 5 7] 縮合工程が、20℃～60℃で行われる、[A 1]～[A 5 5]のいずれかに記載の方法。

[A 5 8] 縮合工程を、2回以上繰り返す、[A 1]～[A 5 7]のいずれかに記載の方法。

[A 5 9] 縮合工程を、2回繰り返す、[A 1]～[A 5 7]のいずれかに記載の方法。

[A 6 0] 縮合工程の後に、固相に担持された、第二のアミノ酸もしくは第二のペプチドにおける保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基の保護基を脱保護する脱保護工程を更に含む、[A 1] ～ [A 5 9] のいずれかに記載の方法。

[A 6 1] 縮合工程と脱保護工程との間に、固相を洗浄する洗浄工程を更に含む、[A 6 0] に記載の方法。

[A 6 2] 縮合工程と脱保護工程を複数回繰り返す（ただし、複数回の縮合工程で用いられる複数の第二のアミノ酸および／または第二のペプチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい）、[A 6 0] または [A 6 1] に記載の方法。

[A 6 3] [A 1] ～ [A 6 2] のいずれかに記載の方法における、上記式 (A) で表されるカルボジイミド系縮合剤の使用。

[A 6 4] [A 1] ～ [A 6 2] のいずれかに記載の方法における、D s B C の使用。

上記一般式 (A) における R^A および R^B の組み合わせに関して、反応系中に活性エステルが長時間高濃度を維持することが可能となり、縮合反応の工程において、反応変換率をより向上させることができる観点からは、[A 4] ～ [A 4 - 2] が好ましく、高濃度においてもカルボジイミド由来のウレアの析出を高度に回避することにより、自動合成においても効率良くアミド化できる観点からは、[A 5] ～ [A 5 - 3] が好ましい。

[0011] [A 1] ～ [A 6 4] においては、固相法によるペプチド化合物の製造方法について説明したが、これらの製造方法は、液相法にも適用することができる。すなわち、本発明の一局面は、以下の [A 1'] を提供する。[A 1'] は、[A 2] ～ [A 6 4] のうち固相以外に関する特徴を含むものであってもよい。

[A 1'] 液相法によるペプチド化合物の製造方法であって、

アミノ基を有する第一のアミノ酸またはアミノ基を有する第一のペプチドを準備する準備工程；および

第一のアミノ酸または第一のペプチドと、保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のアミノ酸、または保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のペプチドとを、上記一般式（A）で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤および添加剤の存在下で縮合させる縮合工程を含む、前記方法。

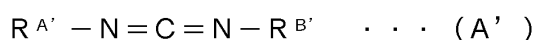
かかる方法によれば、高反応変換率で、目的のペプチド化合物を得ることができる。

[0012] 例えば、本発明はまた、以下の[B1]～[B63]を提供する。

[B1] 固相法によるペプチド化合物の製造方法であって、

固相に担持された、N-アルキルアミノ基を有する第一のアミノ酸、またはN末端にN-アルキルアミノ基を有する第一のペプチドを準備する準備工程；および

第一のアミノ酸または第一のペプチドと、保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のアミノ酸、または保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のペプチドとを、下記一般式（A'）で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤、および



（式中、 $R^{A'}$ は $C_3 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 $R^{B'}$ は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 $R^{A'}$ および $R^{B'}$ における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または4～8員環状アミノより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい。ただし、 $R^{A'}$ における総炭素数は4以上である。）

添加剤の存在下、溶媒中で縮合させ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 $0.4 \sim 4.0 \text{ mol/L}$ である縮合工程を含む、前記方法。

[B 2] $R^{A'}$ は $C_4 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_4 \sim C_6$ アルキル、または C_4 アルキルである、[B 1] に記載の方法。

[B 3] $R^{B'}$ は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、[B 1] または [B 2] に記載の方法。

[B 3-1] $R^{B'}$ は $C_1 \sim C_{10}$ アルキルである、[B 1] または [B 2] に記載の方法。

[B 3-2] $R^{B'}$ は $C_2 \sim C_6$ アルキルである、[B 1] または [B 2] に記載の方法。

[B 3-3] $R^{B'}$ は C_4 アルキルである、[B 1] または [B 2] に記載の方法。

[B 4] カルボジイミド系縮合剤が、D s B C、1-tert-ブチル-3-エチルカルボジイミド (t B E C)、ジtert-ブチルカルボジイミド (D t B C)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (E D C I)、N, N'-ジ-sec-ブチルカルボジイミド (D s B C)、N'-(1-フェニルエチル)-N-sec-ブチル-メタンジイミン (S S 2 6)、N'-(1-メチルヘプチル)-N-sec-ブチル-メタンジイミン (S S 2 7)、N, N'-ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン (S S 2 8)、N, N'-ビス(1-エチルプロピル)メタンジイミン (S S 2 9)、およびN'-(1-エチルプロピル)-N-(1-メチルブチル)メタンジイミン (S S 3 0) からなる群より選択される少なくとも1種である、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 4-1] カルボジイミド系縮合剤が、D s B C、1-tert-ブチル-3-エチルカルボジイミド (t B E C)、ジtert-ブチルカルボジイミド (D t B C)、および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (E D C I) からなる群より選択される少なくとも1種である、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5] カルボジイミド系縮合剤が、N, N'-ジ-sec-ブチルカルボジイミド (D s B C)、N'-(1-フェニルエチル)-N-sec-ブ

チルーメタンジイミン (SS 26)、N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 27)、N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 28)、N, N' - ビス (1-エチルプロピル) メタンジイミン (SS 29)、および N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30) からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5 - 1] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' - ジー sec - ブチルカルボジイミド (DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 26)、N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 27)、N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 28)、または N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30) からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5 - 2] カルボジイミド系縮合剤が、N, N' - ジー sec - ブチルカルボジイミド (DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 26)、N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 27)、N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 28)、または N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30) である、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5 - 3] カルボジイミド系縮合剤が、DsBCである、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5 - 4] カルボジイミド系縮合剤が、N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチルーメタンジイミン (SS 26) である、[B 1] ~ [B 3] のいずれかに記載の方法。

[B 5 - 5] カルボジイミド系縮合剤が、N' - (1-メチルヘプチル)

—N—sec—ブチル—メタンジイミン (SS27) である、[B1] ~ [B3] のいずれかに記載の方法。

[B5-6] カルボジイミド系縮合剤が、N, N'—ビス(1—メチルブチル)メタンジイミン (SS28) である、[B1] ~ [B3] のいずれかに記載の方法。

[B5-7] カルボジイミド系縮合剤が、N, N'—ビス(1—エチルプロピル)メタンジイミン (SS29) である、[B1] ~ [B3] のいずれかに記載の方法。

[B5-8] カルボジイミド系縮合剤が、N'—(1—エチルプロピル)—N—(1—メチルブチル)メタンジイミン (SS30) である、[B1] ~ [B3] のいずれかに記載の方法。

[B6] 添加剤が、HOAt、HOBt、HOObtおよびOxymaからなる群より選択される少なくとも1種である、[B1] ~ [B5] のいずれかに記載の方法。

[B7] 添加剤が、HOAt、HOObt、およびOxymaからなる群より選択される少なくとも1種である、[B1] ~ [B5] のいずれかに記載の方法。

[B8] 添加剤が、HOAt、HOObt、またはOxymaである、[B1] ~ [B5] のいずれかに記載の方法。

[B9] 溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、0.5 mol/L以上、0.6 mol/L以上、または0.7 mol/L以上である、[B1] ~ [B8] のいずれかに記載の方法。

[B10] 縮合工程において、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、3.0 mol/L以下、2.0 mol/L以下、または1.0 mol/L以下である、[B1] ~ [B9] のいずれかに記載の製造方法。

[B11] 縮合工程において、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、0.5~3.0 mol/L、0.6~2.0 mol/L、または0.7~1.0 mol/Lである、[B1] ~ [B10] のいずれかに記載の

製造方法。

[B 1 2] 縮合工程において、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/L}$ である、[B 1] ~ [B 1 0] のいずれかに記載の製造方法。

[B 1 3] 固相がメンブランまたは固相合成用樹脂である、[B 1] ~ [B 1 2] のいずれかに記載の製造方法。

[B 1 4] 固相がメンブランである、[B 1] ~ [B 1 2] のいずれかに記載の製造方法。

[B 1 5] メンブランがセルロースメンブラン、ポリプロピレンメンブラン、またはポリアミノエチルメタクリルアミドメンブランである、[B 1 4] に記載の方法。

[B 1 6] メンブランがセルロースメンブランである、[B 1 4] に記載の方法。

[B 1 7] 固相が固相合成用樹脂である、[B 1] ~ [B 1 2] のいずれかに記載の製造方法。

[B 1 8] 固相合成用樹脂が、クロロトリチル (C T C) レジン、トリチル (T r t) レジン、S A S R I N レジン、R i n k アミドレジン、M e r r i f i e l d レジン、またはW a n g レジンである、[B 1 7] に記載の方法。

[B 1 9] 固相合成用樹脂が、クロロトリチル (C T C) レジンである、[B 1 7] に記載の方法。

[B 2 0] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、光開裂性部位、ジスルフィド結合、または酸不安定部位を介して結合されている、[B 1] ~ [B 1 9] のいずれかに記載の方法。

[B 2 0 - 1] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、光開裂性部位を介して担持されている、[B 1] ~ [B 1 9] のいずれかに記載の方法。

[B 2 0 - 2] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、ジス

ルフィド結合を介して結合されている、[B 1] ~ [B 19] のいずれかに記載の方法。

[B 20-3] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、酸不安定部位を介して結合されている、[B 1] ~ [B 19] のいずれかに記載の方法。

[B 21] 光開裂性部位がニトロベラトリルオキシカルボニル残基、またはクマリン残基を有する、[B 20-1] に記載の方法。

[B 21-1] 光開裂性部位がニトロベラトリルオキシカルボニル残基である、[B 20-1] に記載の方法。

[B 22] 酸不安定部位が、トリチルエステル構造、クロロトリチルエステル構造、アルコキシベンジルエーテル構造、トリアルコキシベンジルアミノカルボニル構造、ジアルコキシフェニル-アルコキシフェニルメチルアミノカルボニル構造、またはアルコキシキサンテン-9-イルアミノカルボニル構造を有する、[B 20-3] に記載の方法。

[B 22-1] 酸不安定部位が、クロロトリチルエステル構造を有する、[B 20-3] に記載の方法。

[B 23] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.0当量以上、1.1当量以上、または1.2当量以上のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[B 1] ~ [B 22] のいずれかに記載の方法。

[B 24] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、5.0当量以下、4.0当量以下、3.0当量以下、2.0当量以下、または1.5当量以下のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[B 1] ~ [B 23] のいずれかに記載の方法。

[B 25] 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.0~5.0当量、1.1~4.0当量、1.1~3.0当量、1.2~2.0当量、または1.2~1.5当量のカルボジイミド系縮合剤を用いる、[B 1] ~ [B 24] のいずれかに記載の方法。

〔B 2 6〕 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.2～1.5当量のカルボジイミド系縮合剤を用いる、〔B 2 5〕に記載の方法。

〔B 2 7〕 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.01当量以上、0.05当量以上、0.1当量以上、0.2当量以上、または0.3当量以上の添加剤を用いる、〔B 1〕～〔B 2 6〕のいずれかに記載の方法。

〔B 2 8〕 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、1.0当量以下、0.9当量以下、0.8当量以下、または0.7当量以下の添加剤を用いる、〔B 1〕～〔B 2 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 2 9〕 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.05～1.0当量、0.1～0.9当量、0.2～0.8当量、または0.3～0.7当量の添加剤を用いる、〔B 1〕～〔B 2 8〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 0〕 縮合工程において、第二のアミノ酸、または第二のペプチドに対して、0.3～0.7当量の添加剤を用いる、〔B 1〕～〔B 2 8〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 1〕 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、〔B 1〕～〔B 3 0〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 2〕 第一のアミノ酸のN-アルキルアミノ基におけるアルキル、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸のN-アルキルアミノ基におけるアルキルが、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C_1 \sim C_3$ アルキルである（ここでのアルキルは、ハロゲン、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または $C_6 \sim C_{10}$ アリールより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい）、〔B 1〕～〔B 3 1〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 3〕 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が

、アルキルの炭素数が1～8であるN-アルキルアミノ酸（ただし、アルキルは、ハロゲン、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または $C_6 \sim C_{10}$ アリールより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい）である、[B 1]～[B 3 2]のいずれかに記載の方法。

[B 3 4] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、N-アルキルアミノ酸、アルキルの炭素数が1～8であるN-アルキルアミノ酸、1～6であるN-アルキルアミノ酸、アルキルの炭素数が1～3であるN-アルキルアミノ酸、またはN-メチルアミノ酸である、[B 1]～[B 3 2]のいずれかに記載の方法。

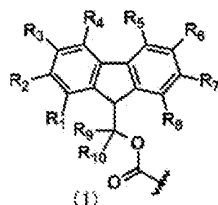
[B 3 5] 第一のアミノ酸のN-アルキルアミノ基におけるアルキル、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸のN-アルキルアミノ基におけるアルキルが、メチル基である、[B 1]～[B 3 4]のいずれかに記載の方法。

[B 3 6] 第二のアミノ酸、または第二のペプチドのC末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、[B 1]～[B 3 5]のいずれかに記載の方法。

[B 3 7] 第二のアミノ酸、または第二のペプチドのC末端のアミノ酸が、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、 β -分岐アミノ酸、またはN-アルキルアミノ酸である、[B 1]～[B 3 6]のいずれかに記載の方法。

[B 3 8] 保護アミノ基における保護基が、下記式（1）で表される基である、[B 1]～[B 3 7]のいずれかに記載の方法；

[化2]



（式中、 $R_1 \sim R_8$ は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ フルオロアルキル、ハロゲン、スルホ、およびトリメチルシリルからなる群より選

択され、 $R_9 \sim R_{10}$ は、独立して、水素またはメチルである）。

[B 3 9] 保護アミノ基における保護基が、Fmoc基、Fmoc(2, 7tb)基、Fmoc(1Me)基、Fmoc(2F)基、Fmoc(2, 7Br)基、mio-Fmoc基、dio-Fmoc基、tdf-Fmoc基、Fmoc(2TMS)基、Fmoc(2so3h)基、sm-Fmoc基、またはrm-Fmoc基である、[B 1] ~ [B 3 7]のいずれかに記載の方法。

[B 4 0] 保護アミノ基における保護基が、Fmoc基である、[B 1] ~ [B 3 7]のいずれかに記載の方法。

[B 4 1] 縮合工程が溶媒中で行われる、[B 1] ~ [B 4 0]のいずれかに記載の方法。

[B 4 2] 溶媒は、アミド系溶媒、ウレア系溶媒、エーテル系溶媒、ハロゲン系溶媒、ニトリル系溶媒、およびベンゼン系溶媒からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[B 4 1]に記載の方法。

[B 4 3] 溶媒がアミド系溶媒である、[B 4 2]に記載の方法。

[B 4 4] アミド系溶媒は、DMF、NMP、DMA、NEP、NBP、およびホルムアミドからなる群より選択される、[B 4 3]に記載の方法。

[B 4 5] 溶媒がウレア系溶媒である、[B 4 2]に記載の方法。

[B 4 6] ウレア系溶媒は、DMI、およびDMPUからなる群より選択される、[B 4 5]に記載の方法。

[B 4 7] 溶媒がエーテル系溶媒である、[B 4 2]に記載の方法。

[B 4 8] エーテル系溶媒は、テトラヒドロフラン、2-メチルテトラヒドロフラン、4-メチルテトラヒドロピランからなる群より選択される、[B 4 7]に記載の方法。

[B 4 9] 溶媒がハロゲン系溶媒である、[B 4 2]に記載の方法。

[B 5 0] ハロゲン系溶媒は、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタンからなる群より選択される、[B 4 9]に記載の方法。

[B 5 1] 溶媒がニトリル系溶媒である、[B 4 2]に記載の方法。

〔B 5 2〕 ニトリル系溶媒は、アセトニトリルである、〔B 5 1〕に記載の方法。

〔B 5 3〕 溶媒がベンゼン系溶媒である、〔B 4 2〕に記載の方法。

〔B 5 4〕 ベンゼン系溶媒は、ベンゼン、トルエン、キシレンからなる群より選択される、〔B 5 3〕に記載の方法。

〔B 5 5〕 縮合工程が、 $0^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、または $25^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ で行われる、〔B 1〕～〔B 5 4〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5 6〕 縮合工程が、 $20^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ で行われる、〔B 1〕～〔B 5 4〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5 7〕 縮合工程を、2回以上繰り返す、〔B 1〕～〔B 5 6〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5 8〕 縮合工程を、2回繰り返す、〔B 1〕～〔B 5 6〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5 9〕 縮合工程の後に、固相に担持された、第二のアミノ酸もしくは第二のペプチドにおける保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基の保護基を脱保護する脱保護工程を更に含む、〔B 1〕～〔B 5 8〕のいずれかに記載の方法。

〔B 6 0〕 縮合工程と脱保護工程との間に、固相を洗浄する洗浄工程を更に含む、〔B 5 9〕に記載の方法。

〔B 6 1〕 縮合工程と脱保護工程を複数回繰り返す（ただし、複数回の縮合工程で用いられる複数の第二のアミノ酸および／または第二のペプチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい。）、〔B 5 9〕または〔B 6 0〕に記載の方法。

〔B 6 2〕 〔B 1〕～〔B 6 1〕のいずれかに記載の方法における、式（A'）で表されるカルボジイミド系縮合剤の使用。

〔B 6 3〕 〔B 1〕～〔B 6 1〕のいずれかに記載の方法における、D s

BCの使用。

[B 6 3 - 1] [B 1] ~ [B 6 1] のいずれかに記載の方法における、
N' - (1 - フェニルエチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S
S 2 6) の使用。

[B 6 3 - 2] [B 1] ~ [B 6 1] のいずれかに記載の方法における、
N' - (1 - メチルヘプチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S
S 2 7) の使用。

[B 6 3 - 3] [B 1] ~ [B 6 1] のいずれかに記載の方法における、
N, N' - ビス (1 - メチルブチル) メタンジイミン (S S 2 8) の使用。

[B 6 3 - 4] [B 1] ~ [B 6 1] のいずれかに記載の方法における、
N' - (1 - エチルプロピル) - N - (1 - メチルブチル) メタンジイミン
(S S 3 0) の使用。

[0013] [B 1] ~ [B 6 3] においては、固相法によるペプチド化合物の製造方法について説明したが、これらの製造方法は、液相法にも適用することができる。すなわち、本発明の一局面は、以下の[B 1']を提供する。[B 1']は、[B 2] ~ [B 6 3]のうち固相以外に関する特徴を含むものであってもよい。

[B 1'] 液相法によるペプチド化合物の製造方法であって、

N - アルキルアミノ基を有する第一のアミノ酸、またはN末端にN - アルキルアミノ基を有する第一のペプチドを準備する準備工程；および

第一のアミノ酸または第一のペプチドと、保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のアミノ酸、または保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のペプチドとを、上記一般式(A')で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤、および添加剤の存在下、溶媒中で縮合させ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、0.4 ~ 4.0 mol / Lである縮合工程

を含む、前記方法。

かかる方法によれば、高反応変換率で、目的のペプチド化合物を得ることができる。

[0014] 例えば、本発明はまた、以下の [C 1] ~ [C 16] を提供する。

[C 1] [A 1] ~ [A 64] または [B 1] ~ [B 63] のいずれかに記載の方法を含む、メンブランに担持されたペプチド化合物の製造方法。

[C 2] メンブランに担持されたペプチド化合物が、N-アルキルアミノ酸由来の構成単位を2以上有する、[C 1] に記載の方法。

[C 3] メンブランに担持されたペプチド化合物が、N-アルキルアミノ酸由来の構成単位を3以上、4以上、5以上、6以上、または7以上有する、[C 1] または [C 2] に記載の方法。

[C 4] メンブランに担持されたペプチド化合物が、N-アルキルアミノ酸由来の構成単位を7以上有する、[C 1] ~ [C 3] のいずれかに記載の方法。

[C 5] メンブランに担持されたペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、7以上、8以上、9以上、または10以上有する、[C 1] ~ [C 4] のいずれかに記載の方法。

[C 6] ペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、10以上有する、[C 1] ~ [C 5] のいずれかに記載の方法。

[C 7] ペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、30以下、25以下、20以下、18以下、17以下、16以下、または15以下有する、[C 1] ~ [C 6] のいずれかに記載の方法。

[C 8] ペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、15以下有する、[C 1] ~ [C 7] のいずれかに記載の方法。

[C 9] [C 1] ~ [C 8] のいずれかに記載の方法によって、メンブランに担持された10種類以上のペプチド化合物を得る工程を含む、メンブランに担持されたペプチドライブラリの製造方法。

[C 10] [C 1] ~ [C 8] のいずれかに記載の方法によって、メンブランに担持された20種類以上、40種類以上、80種類以上、100種類

以上、200種類以上、または384種類以上のペプチド化合物を得る工程を含む、メンブランに担持されたペプチドライブラリの製造方法。

[C11] [C1]～[C8]のいずれかに記載の方法によって、メンブランに担持された384種類以上のペプチド化合物を得る工程を含む、メンブランに担持されたペプチドライブラリの製造方法。

[C12] 自動合成機を用いる、[C1]～[C11]のいずれかに記載の方法。

[C13] メンブランに担持されたペプチド化合物からペプチド化合物を切り出す工程を更に含む、[C1]～[C12]のいずれかに記載の方法。

[C14] 光照射によりペプチド化合物を切り出す、[C13]に記載の方法。

[C15] [C13]または[C14]に記載の方法によって切り出したペプチド化合物を環化する工程を含む、環状ペプチドまたは環状ペプチドライブラリの製造方法。

[C16] 自動合成機を用いる、[C15]に記載の方法。

[0015] 例えば、本発明はまた、以下の[D1]～[D6]を提供する。

[D1] メンブランにリンカーを介して結合したペプチド化合物であって、N-アルキルアミノ酸由来の構成単位を2以上有する、前記ペプチド化合物。

[D2] ペプチド化合物が、N-アルキルアミノ酸由来の構成単位を3以上、4以上、5以上、6以上、または7以上有する、[D1]に記載のペプチド化合物。

[D3] ペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、7以上、8以上、9以上、10以上、または11以上有する、[D1]または[D2]に記載のペプチド化合物。

[D4] ペプチド化合物が、アミノ酸由来の構成単位を、合計で、30以下、25以下、20以下、18以下、17以下、16以下、または15以下有する、[D1]～[D3]のいずれかに記載のペプチド。

[D 5] [D 1] ~ [D 4] のいずれかに記載の、メンブランにリンカーを介して結合したペプチド化合物を10種類以上含む、ペプチドライブラリ。

[D 6] メンブランにリンカーを介して結合したペプチド化合物を、20種類以上、40種類以上、80種類以上、100種類以上、200種類以上、または384種類以上含む、[D 5]に記載のペプチドライブラリ。

[0016] 例えば、本発明はまた、以下の[E 1] ~ [E 3]を提供する。

[E 1] 標的分子に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(1) [C 9] ~ [C 16] のいずれかに記載の方法によりペプチドライブラリ、または環状ペプチドライブラリを合成すること；

(2) 該ペプチドライブラリ、または環状ペプチドライブラリを標的分子と接触させること；

(3) 標的分子に結合するペプチド化合物を選択することを含む、前記方法。

[E 2] 標的分子がタンパク質、核酸、ポリペプチド、または糖鎖である、[E 1]に記載の方法。

[E 3] 標的分子に結合する化合物の選択が、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance) またはアルファスクリーン (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) により実施される、[E 1] または [E 2] に記載の方法。

[0017] 例えば、本発明はまた、以下の[F 1] ~ [F 5]を提供する。

[F 1] D s B Cを含む、ペプチド合成における析出抑制剤。

[F 2] N' - (1-フェニルエチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S S 2 6) を含む、ペプチド合成における析出抑制剤。

[F 3] N' - (1-メチルヘプチル) - N - s e c - ブチル - メタンジイミン (S S 2 7) を含む、ペプチド合成における析出抑制剤。

[F 4] N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (S S 2 8) を含む、ペプチド合成における析出抑制剤。

[F 5] N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30) を含む、ペプチド合成における析出抑制剤。

[0018] 例えば、本発明はまた、以下の [G 1] ~ [G 4] を提供する。

[G 1] N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 26)

[G 2] N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 27)

[G 3] N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 28)

[G 4] N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30)

[0019] 例えば、本発明はまた、以下の [H 1] ~ [H 7] を提供する。

[H 1] N, N' - ジ - sec - ブチルカルボジイミド (DsBC)、N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 26)、N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 27)、N, N' - ビス (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 28)、N, N' - ビス (1-エチルプロピル) メタンジイミン (SS 29)、または N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル) メタンジイミン (SS 30) を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

[H 2] N, N' - ジ - sec - ブチルカルボジイミド (DsBC) を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

[H 3] N' - (1-フェニルエチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 26) を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

[H 4] N' - (1-メチルヘプチル) - N - sec - ブチル - メタンジイミン (SS 27) を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

〔H5〕 N, N' -ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン(SS28)を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

〔H6〕 N, N' -ビス(1-エチルプロピル)メタンジイミン(SS29)、又はN' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル)メタンジイミン(SS30)を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

〔H7〕 N' - (1-エチルプロピル) - N - (1-メチルブチル)メタンジイミン(SS30)を縮合剤として用いて、アミド結合を形成する工程を含む、化合物の製造方法。

〔H8〕 前記アミド結合を形成する工程が、固相又は液相で行われる、〔H1〕～〔H7〕のいずれかに記載の製造方法。

上記番号付けにおいて、従属項が引用する番号は、特に言及がない限りその番号の枝番を含む。例えば、従属項において引用する〔A2〕は、〔A2〕とともに、その枝番である〔A2-1〕～〔A2-6〕を含むことを示す。他の番号付けにおいても同様である。

発明の効果

〔0020〕 本発明の一局面によれば、ペプチド固相合成法の、とくに縮合反応の工程において、反応変換率を向上させることができる。また、本発明の一局面によれば、ペプチド固相合成法の、とくに縮合反応の工程において、結晶析出を回避することにより自動合成への適用を可能とするアミド化条件として、高純度のペプチド化合物を効率良く製造する方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

〔0021〕 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

〔0022〕 (用語の定義等)

本明細書において「1つまたは複数の」とは、1つまたは2つ以上の数を意味する。「1つまたは複数の」が、ある基の置換基に関連する文脈で用い

られる場合、この用語は、1つからその基が許容する置換基の最大数までの数を意味する。「1つまたは複数の」として具体的には、たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、および／またはそれより大きい数が挙げられる。

[0023] 本明細書において、数値範囲を示す「～」とはその両端の値を含み、例えば、「A～B」は、A以上であり、かつB以下である数値範囲を意味する。

[0024] 本明細書において、「下限」とは「以上」および「より多い」の両方の意味を含み、「上限」とは、「以下」および「より少ない」の両方の意味を含む。

[0025] 本明細書において、「約」という用語は、数値と組み合わせて使用される場合、その数値の+10%および-10%の値範囲を意味する。

[0026] 本明細書において、「および／または」との用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば、「A、B、および／またはC」には、以下の7通りのバリエーションが含まれる；

(i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) AおよびB、(v) AおよびC、(vi) BおよびC、(vii) A、B、およびC。

[0027] 本明細書において、「室温」とは約20℃～約25℃の温度を意味する。

[0028] 本明細書における「ハロゲン」としては、F、Cl、BrまたはIが例示される。

[0029] 本明細書において「アルキル」とは、脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される1価の基であり、骨格中にヘテロ原子（炭素および水素原子以外の原子をいう。）または不飽和の炭素-炭素結合を含有せず、水素および炭素原子を含有するヒドロカルビルまたは炭化水素基構造の部分集合を有する。アルキルは直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アルキルとして具体的には、炭素原子数1～20（C₁～C₂₀、以下「C_p～C_q」とは炭素原子数がp～q個であることを意味する）のアルキルであり、好ましくはC₁～C₁₀アルキル、より好ましくはC₁～C₆アルキルが挙げら

れる。アルキルとして、具体的には、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル（2-メチルプロピル）、*n*-ペンチル、*s*-ペンチル（1-メチルブチル）、*t*-ペンチル（1, 1-ジメチルプロピル）、ネオペンチル（2, 2-ジメチルプロピル）、イソペンチル（3-メチルブチル）、3-ペンチル（1-エチルプロピル）、1, 2-ジメチルプロピル、2-メチルブチル、*n*-ヘキシル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、1, 1, 2, 2-テトラメチルプロピル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、1-エチル-1-メチルブチル等が挙げられる。

[0030] 「 $C_3 \sim C_{10}$ 第2級アルキル」の具体例としては、*i*-プロピル、*s*-ブチル、*s*-ペンチル、3-ペンチル、1, 2-ジメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル等が挙げられる。「不斉炭素を有する $C_4 \sim C_{10}$ 第2級アルキル」の具体例としては、*s*-ブチル、*s*-ペンチル、1, 2-ジメチルプロピル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル等が挙げられる。

[0031] 「 $C_4 \sim C_{10}$ 第3級アルキル」の具体例としては、*t*-ブチル、*t*-ペンチル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 1, 2, 2-テトラメチルプロピル、1, 1-ジメチルブチル、1-エチル-1-メチルブチル等が挙げられる。「不斉炭素を有する $C_4 \sim C_{10}$ 第3級アルキル」の具体例としては、1-エチル-1-メチルブチル等が挙げられる。

[0032] 本明細書において「アルケニル」とは、少なくとも1個の二重結合（2個の隣接SP²炭素原子）を有する1価の基である。二重結合および置換分（存在する場合）の配置によって、二重結合の幾何学的形態は、エンタゲゲン（E）またはツザンメン（Z）、シスまたはトランス配置をとることができる。アルケニルは、直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アル

ケニルとして好ましくは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル、より好ましくは $C_2 \sim C_6$ アルケニルが挙げられる。具体的には、たとえば、ビニル、アリル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル（シス、トランスを含む）、3-ブテニル、ペンテニル、3-メチル-2-ブテニル、ヘキセニルなどが挙げられる。

[0033] 本明細書において「アルキニル」とは、少なくとも1個の三重結合（2個の隣接SP炭素原子）を有する、1価の基である。アルキニルは、直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アルキニルとして好ましくは $C_2 \sim C_{10}$ アルキニル、より好ましくは $C_2 \sim C_6$ アルキニルが挙げられる。具体的には、たとえば、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル、3-ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、3-フェニル-2-プロピニル、3-（2'-フルオロフェニル）-2-プロピニル、2-ヒドロキシ-2-プロピニル、3-（3-フルオロフェニル）-2-プロピニル、3-メチル-（5-フェニル）-4-ペンチニルなどが挙げられる。

[0034] 本明細書において「シクロアルキル」とは、飽和または部分的に飽和した環状の1価の脂肪族炭化水素基を意味し、単環、ビスシクロ環、スピロ環を含む。シクロアルキルとして好ましくは $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルが挙げられる。具体的には、たとえば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビスシクロ[2.2.1]ヘプチル、スピロ[3.3]ヘプチルなどが挙げられる。

[0035] 本明細書において「アリール」とは1価の芳香族炭化水素環、および芳香族炭化水素環基を意味する。アリールとして好ましくは $C_6 \sim C_{10}$ アリールが挙げられる。具体的には、たとえば、フェニル、ナフチル（たとえば、1-ナフチル、2-ナフチル）などが挙げられる。

[0036] 本明細書において「ヘテロアリール」とは、炭素原子に加えて1～5個のヘテロ原子を含有する、芳香族性の環状の1価の基、および芳香族複素環基を意味する。環は単環でも、他の環との縮合環でもよく、部分的に飽和されていてもよい。ヘテロアリールの環を構成する原子の数は好ましくは5～1

0 (5～10員ヘテロアリアル)であり、より好ましくは5～7 (5～7員ヘテロアリアル)である。ヘテロアリアルとして具体的には、たとえば、フリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジニル、ピラジニル、トリアジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、アザインドリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、ベンゾジオキサリル、インドリジニル、イミダゾピリジル、ピラゾロピリジル、イミダゾピリジル、トリアゾロピリジル、ピロロピラジニル、フロピリジルなどが挙げられる。

[0037] 本明細書において「アリアルアルキル (アラルキル)」とは、前記定義の「アルキル」の少なくとも一つの水素原子が前記定義の「アリアル」で置換された基を意味する。アリアルアルキルとして、 $C_7 \sim C_{14}$ アリアルアルキルが好ましく、 $C_7 \sim C_{10}$ アリアルアルキルがより好ましい。アリアルアルキルとして具体的には、たとえば、ベンジル、フェネチル、3-フェニルプロピルなどが挙げられる。

[0038] 本明細書において「アルコキシ」とは、前記定義の「アルキル」が結合したオキシ基を意味する。アルコキシとして、好ましくは $C_1 \sim C_6$ アルコキシが挙げられる。アルコキシとして具体的には、たとえば、メトキシ、エトキシ、1-プロポキシ、2-プロポキシ、n-ブトキシ、i-ブトキシ、s-ブトキシ、t-ブトキシ、ペンチルオキシ、3-メチルブトキシなどが挙げられる。

[0039] 本明細書において「アミノ」とは、狭義には $-NH_2$ を意味し、広義には $-NRR'$ を意味し、ここでRおよびR'は独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリアル、またはヘテロアリアルから選択されるか、あるいはRおよびR'はそれらが結合し

ている窒素原子と一緒に環を形成する。アミノとして好ましくは、 -NH_2 、モノ $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルアミノ、ジ $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルアミノ、4～8員環状アミノなどが挙げられる。

[0040] 本明細書において「モノアルキルアミノ」とは、前記定義の「アミノ」のうち、Rが水素であり、かつR'が前記定義の「アルキル」である基を意味する。モノアルキルアミノとして、好ましくは、モノ $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルアミノが挙げられる。モノアルキルアミノとして具体的には、たとえば、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノ、i-プロピルアミノ、n-ブチルアミノ、s-ブチルアミノ、t-ブチルアミノなどが挙げられる。

[0041] 本明細書において「ジアルキルアミノ」とは、前記定義の「アミノ」のうち、RおよびR'が独立して前記定義の「アルキル」である基を意味する。ジアルキルアミノとして、好ましくは、ジ $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルアミノが挙げられる。ジアルキルアミノとして具体的には、たとえば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノなどが挙げられる。

[0042] 本明細書において「環状アミノ」とは、前記定義の「アミノ」のうち、RおよびR'はそれらが結合している窒素原子と一緒に環を形成する基を意味する。環状アミノとして、好ましくは、4～8員環状アミノが挙げられる。環状アミノとして具体的には、たとえば、1-アゼチジル、1-ピロリジル、1-ピペリジル、1-ピペラジル、4-モルホリニル、3-オキサゾリジル、1, 1-ジオキシドチオモルホリニル-4-イル、3-オキサ-8-アザビシクロ[3. 2. 1]オクタン-8-イルなどが挙げられる。

[0043] 本明細書に記載の製造方法において、定義した基が実施方法の条件下で望まない化学的変換を受けてしまう場合、例えば、官能基の保護、脱保護等の手段を用いることにより、該化合物を製造することができる。ここで保護基の選択および脱着操作は、例えば、「Greene's, "Protective Groups in Organic Synthesis" (第5版, John Wiley & Sons 2014)」に記載の方法を挙げることができ、これらを反応条件に応じて適宜用いればよい。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

- [0044] 本明細書における「アミノ基の保護基」には、カルバメート型の保護基、アミド型の保護基、アリアルスルホンアミド型の保護基、アルキルアミン型の保護基、イミド型の保護基などが挙げられる。具体的には、Fmoc、Boc、Alloc、Cbz、Teoc、トリフルオロアセチル、ペンタフルオロプロピオニル、フタロイル、ベンゼンスルホニル、トシル、ノシル、ジニトロノシル、*t*-ブチル、トリチル、クミル、ベンジリデン、4-メトキシベンジリデン、ジフェニルメチリデンなどが例示される。
- [0045] 本明細書において「保護アミノ基」とは、任意の保護基で保護されたアミノ基を意味する。保護アミノ基として具体的には、例えば、上述のアミノ基の保護基で保護されたアミノ基が挙げられる。
- [0046] 本明細書において「ヒドロキシ基の保護基」には、アルキルエーテル型の保護基、アラルキルエーテル型の保護基、シリルエーテル型、炭酸エステル型の保護基などが挙げられる。ヒドロキシの保護基として具体的には、メトキシメチル、ベンジルオキシメチル、テトラヒドロピラニル、*t*-ブチル、アリル、2, 2, 2-トリクロロエチル、ベンジル、4-メトキシベンジル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリル、メトキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニルなどが例示される。
- [0047] 本明細書において、「保護ヒドロキシ基」とは、任意の保護基で保護されたヒドロキシ基を意味する。保護ヒドロキシ基として具体的には、例えば、上述のヒドロキシ基の保護基で保護されたヒドロキシ基が挙げられる。
- [0048] 本明細書において「カルボキシ基の保護基」には、アルキルエステル型の保護基、ベンジルエステル型の保護基、置換されたアルキルエステル型の保護基などが挙げられる。カルボキシ基の保護基として具体的には、メチル、エチル、*t*-ブチル、ベンジル、トリチル、クミル、メトキシトリチル、2-(トリメチルシリル)エチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、アリルなどが例示される。

- [0049] 本明細書において、「保護カルボキシ基」とは、任意の保護基で保護されたカルボキシ基を意味する。保護カルボキシ基として具体的には、例えば、上述のカルボキシ基の保護基で保護されたカルボキシ基が挙げられる。
- [0050] 本明細書における「ペプチド」は、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸がアミド結合あるいはエステル結合して形成されるペプチドであれば特に限定されない。ペプチドとして、好ましくは5～30残基、より好ましくは7～15残基、さらに好ましくは9～13残基のペプチドである。ペプチドは、直鎖ペプチドでも環状ペプチドでもよい。
- [0051] 本明細書における「ペプチド化合物」は、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸がアミド結合および一部がエステル結合によって連結されるペプチド化合物であれば特に限定されないが、好ましくは5～30残基、より好ましくは8～15残基、さらに好ましくは9～13残基のペプチド化合物である。本実施形態において合成されるペプチド化合物は、1つのペプチド中に少なくとも3つのN置換アミノ酸を含むことが好ましく、少なくとも5つ以上のN置換アミノ酸を含むことがより好ましい。これらのN置換アミノ酸は、ペプチド化合物中に連続して存在していても、不連続に存在していてもよい。本実施形態におけるペプチド化合物は、直鎖状でも環状でもよく、環状ペプチド化合物が好ましい。ペプチド化合物として、好ましくは5～30残基、より好ましくは8～15残基、さらに好ましくは9～13残基のペプチド化合物である。また、ペプチド化合物として、1つのペプチド化合物に少なくとも3つのN置換アミノ酸を含むことが好ましく、少なくとも5つ以上のN置換アミノ酸を含むことがより好ましい。これらのN置換アミノ酸は、ペプチド化合物中に連続して存在していても、不連続に存在していてもよい。本実施形態におけるペプチド化合物は、直鎖状でも環状でもよく、環状ペプチド化合物が好ましい。
- [0052] 本明細書における「環状ペプチド化合物」は、直鎖ペプチド化合物の任意の基同士を結合させて環化することにより得ることができる環状のペプチド化合物である。環状ペプチド化合物の環化の態様として、アミド結合のよう

な炭素－窒素結合による環化、エステル結合やエーテル結合のような炭素－酸素結合による環化、チオエーテル結合のような炭素－硫黄結合による環化、炭素－炭素結合による環化、あるいは複素環構築による環化など、どのような形態であってもよい。これらのうちでは、アミド結合、炭素－硫黄結合または炭素－炭素結合などの共有結合を介した環化が好ましい。アミド結合による環化が特に好ましく、環化に用いられるカルボキシ基やアミノ基の位置は、主鎖上のものでも側鎖上のものでもよい。より好ましくは、側鎖のカルボキシ基とN末端の主鎖のアミノ基によるアミド結合を介した環化である。

[0053] ペプチド化合物の「環化」とは、4以上のアミノ酸残基を含む環状部を形成することを意味する。本明細書における環状ペプチド化合物の環状部に含まれるアミノ酸の数は特に限定されないが、4～20残基、5～15残基、6～13残基が例示される。直鎖状のペプチド化合物を環状ペプチド化合物に変換する方法は、Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations, 3rd Edition(R. C. Larock著)、またはMarch's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7th Edition、(M. B. Smith, J. March著)などに記載の方法により、分子内で結合形成反応を行うことにより実施することができる。結合形成反応の後に、さらに官能基変換反応を行うこともできる。結合形成反応は、カルボン酸とアミンから形成されるC(O)－N結合、酸素原子を利用したC－O－C結合、C(O)－O結合、C(S)－O結合、硫黄原子を利用したC(O)－S結合、C(S)－S結合、C－S－S－C結合、C－S－C結合、C－S(O)－C結合、C－S(O₂)－C結合、窒素原子を利用した、C－N－C結合、C=N－C結合、N－C(O)－N結合、N－C(S)N結合、C(S)－N結合などが例示される。さらに、鈴木反応、Heck反応、Sonogashira反応等の遷移金属を触媒としたC－C結合の形成反応などが挙げられる。結合形成反応の後に、さらに行う官能基変換反応として、酸化反応または還元反応が例示される。具体的には硫黄原子を酸化して、スルホキシド基

やスルホン基に変換する反応が例示される。また、炭素-炭素結合のうち、三重結合や二重結合を還元して、二重結合または単結合に変換する還元反応が例示される。2つのアミノ酸がアミノ酸の主鎖において結合すると、ペプチド結合により閉環構造が形成されるが、2つのアミノ酸の側鎖同士、側鎖と主鎖の結合等により、2つのアミノ酸間の共有結合が形成されてもよい。

[0054] 本明細書において「メンブラン」は、固相法によるペプチド化合物の合成に用いることができるものであれば、特に限定されない。このようなメンブランとして、具体的には、例えば、セルロースメンブラン、ポリプロピレンメンブラン、またはポリアミノエチルメタクリルアミドメンブランなどが挙げられ、セルロースメンブランが好ましい。

[0055] 本明細書において「アミノ基修飾メンブラン」とは、例えばセルロースメンブランやポリプロピレンメンブランの表面にアミノ基を有するような化学修飾がなされたものを示し、固相法によるペプチド化合物の合成に用いることができるものであれば、特に限定されない。このようなアミノ基修飾メンブランとして、具体的には、例えばMethods Mol. Biol., 2009, 570, 157-174にに記載された公知の手法 (Preparation of a Cellulose Membrane for Spot Synthesis) などにより、セルロースメンブランの有する水酸基に、 β -アラニンのカルボキシ基などをエステル結合させて、調製することができる。また、すでにアミノ基修飾されたメンブランとして、具体的には、例えばAmino-PEG500-UC540 Sheets、さらにdisc状に加工されframeに装着されたものとしてCelluSpots 384 frame with acid stable discsをCEM社 (旧Intavis社) などから市販品として入手することができる。なお、本明細書中にて、「メンブランディスク」を「メンブラン」と記載する場合もある。

[0056] 本明細書において、メンブランを含む固相への担持量および担持率は、固相法によるペプチド化合物の合成に用いることができるものであれば、特に限定されない。幾つかの態様において、アミノ酸を伸長する際に担持量および担持率を低減することが可能である。例えばFmoc-Photo-Linkerと4-フェノキシ酪酸を任意の割合で混合させて伸長させるなど、

担持量および担持率を適切に低減させる方法は特に限定されず、どのような方法であってもよい。

[0057] 本明細書において「固相合成用樹脂」は、固相法によるペプチド化合物の合成に用いることができるものであれば、特に限定されない。このような固相合成用樹脂として、具体的には、例えば、CTCレジン、NovaSyn TGTレジン（TGTレジン）、Wangレジン、SASRINレジン、トリチルクロリドレジン（Trtレジン）、4-メチルトリチルクロリドレジン（Mttレジン）、4-メトキシトリチルクロリドレジン（Mmtレジン）などの酸性条件で除去可能なものが挙げられる。樹脂は、用いられるアミノ酸の官能基に合わせて適宜選択することができる。例えば、アミノ酸の官能基としてカルボキシ基（主鎖カルボキシ基、もしくは、AspやGluに代表される側鎖カルボキシ基）、または、芳香環上のヒドロキシ基（Tyrに代表されるフェノール基）を用いる場合には、樹脂として、トリチルクロリドレジン（Trtレジン）もしくは2-クロロトリチルクロリドレジン（CTCレジン）を用いることが好ましい。アミノ酸の官能基として脂肪族ヒドロキシ基（SerやThrに代表される脂肪族アルコール基）を用いる場合には、樹脂として、トリチルクロリドレジン（Trtレジン）、2-クロロトリチルクロリドレジン（CTCレジン）もしくは4-メチルトリチルクロリドレジン（Mttレジン）を用いることが好ましい。なお、本明細書中にて、樹脂をレジンと記載する場合もある。

[0058] 樹脂を構成するポリマーの種類についても特に限定されない。ポリスチレンで構成される樹脂の場合には、100～200 meshもしくは200～400 meshのいずれを用いてもよい。また、架橋率についても特に限定されないが、1% DVB（ジビニルベンゼン）架橋のものが好ましい。また、樹脂を構成するポリマーの種類として、TentaGel（登録商標）、またはChemMatrix（登録商標）が挙げられる。

[0059] 本明細書に記載の化合物は、その塩またはそれらの溶媒和物であることができる。化合物の塩には、例えば、塩酸塩；臭化水素酸塩；ヨウ化水素酸塩

；リン酸塩；ホスホン酸塩；硫酸塩；メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのスルホン酸塩；酢酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、サリチル酸塩などのカルボン酸塩；または、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩、ジアルキルアンモニウム塩、トリアルキルアンモニウム塩、テトラアルキルアンモニウム塩などのアンモニウム塩などが含まれる。これらの塩は、例えば、化合物と、酸または塩基とを接触させることにより製造される。化合物の溶媒和物とは、化合物が溶媒とともに、一つの分子集団を形成したものをさし、溶媒により形成された溶媒和物であれば特に限定されない。その例としては、水和物、アルコール和物（エタノール和物、メタノール和物、1-プロパノール和物、2-プロパノール和物など）、ジメチルスルホキシドなどの単独の溶媒との溶媒和物だけでなく、化合物1分子に対して複数個の溶媒と溶媒和物を形成したもの、または化合物1分子に対して複数種類の溶媒と溶媒和物を形成したものなどが挙げられる。溶媒が水であれば水和物と言う。本発明の化合物の溶媒和物としては、水和物が好ましく、そのような水和物として具体的には1～10水和物、好ましくは1～5水和物、さらに好ましくは1～3水和物が挙げられる。

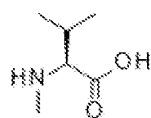
[0060] 本明細書における「アミノ酸」には、天然アミノ酸、および非天然アミノ酸（アミノ酸誘導体ということがある）が含まれる。また本明細書において「アミノ酸」はアミノ酸残基を意味することがある。本明細書における「天然アミノ酸」とは、グリシン（G l y）、アラニン（A l a）、セリン（S e r）、スレオニン（T h r）、バリン（V a l）、ロイシン（L e u）、イソロイシン（I l e）、フェニルアラニン（P h e）、チロシン（T y r）、トリプトファン（T r p）、ヒスチジン（H i s）、グルタミン酸（G l u）、アスパラギン酸（A s p）、グルタミン（G l n）、アスパラギン（A s n）、システイン（C y s）、メチオニン（M e t）、リジン（L y s）、アルギニン（A r g）、プロリン（P r o）を指す。非天然アミノ酸

(アミノ酸誘導体)は特に限定されないが、 β -アミノ酸、D型アミノ酸、N置換アミノ酸、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、側鎖が天然アミノ酸と異なるアミノ酸、ヒドロキシカルボン酸などが例示される。本明細書におけるアミノ酸としては、任意の立体配置が許容される。アミノ酸の側鎖の選択は特に制限を設けませんが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、ヘテロアラルキル基、シクロアルキル基、スピロ結合したシクロアルキル基から自由に選択される。それぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も制限されず、例えば、ハロゲン原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、またはP原子を含む任意の置換基の中から独立して1つまたは2つ以上自由に選択されてよい。すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基など、または、オキソ、アミノカルボニル、ハロゲン原子などが例示される。非限定の一態様において、本明細書におけるアミノ酸は、同一分子内にカルボキシ基とアミノ基を有する化合物であってよい(この場合であっても、プロリン、ヒドロキシプロリンのようなイミノ酸もアミノ酸に含まれる)。

[0061] アミノ酸の主鎖アミノ基は、非置換($-\text{NH}_2$)でも、置換されていてもよい(即ち、 $-\text{NHR}$ 。ここで、Rは置換基を有していてもよいアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、シクロアルキルを示し、またプロリンのようにN原子に結合した炭素鎖と α 位の炭素原子とが環を形成していてもよい。)。このような主鎖アミノ基が置換されているアミノ酸を、本明細書において「N置換アミノ酸」と称する場合がある。本明細書における「N-置換アミノ酸」としては、好ましくはN-アルキルアミノ酸、N- C_1 - C_6 アルキルアミノ酸、N- C_1 - C_4 アルキルアミノ酸、N-メチルアミノ酸、N- C_2 - C_6 アルケニルアミノ酸、N-アリルアミノ酸、N- C_7 - C_{14} アラルキルアミノ酸、N-ベンジルアミノ酸、N-フェネチルアミノ酸が例示されるが、これらに限定されるものではない。

- [0062] 本明細書における「 α , α -ジ置換アミノ酸」は、具体的には、例えば、
 A i b、(Me) A b u、(Me) L e u、(Me) A l g l y、(Me)
 P h e、(Me) P h e (3-I)、1-ACPrC、c V a l、c L e u
 、c H e x、A t h p cなどが挙げられる。
- [0063] 本明細書における「 β -分岐アミノ酸」は、具体的には、例えば、Me V
 a l、D-Me V a l、V a l、I l e、Me I l e、Me C h g、C h g
 、Me G l y (c P e n t)、G l y (c P e n t)、Me G l y (c B u
)、G l y (c B u)、Me G l y (c P r)、G l y (c P r)、Me T
 h r (t B u)、およびT h r (t B u)などが挙げられる。
- [0064] 本明細書において例示される α , α -ジ置換アミノ酸、 β -分岐アミノ酸
 の略称とその構造との関係を以下に示す。なお、以下の表では各アミノ酸は
 F m o c基でアミノ基が保護された形で列挙されているが、F m o c基が除
 去されて遊離のアミノ基を有する各アミノ酸やその残基の略称とそれらの構
 造との関係も以下の表から把握できる。具体的には、例えば、Me V a l-O
 Hが、下記表のF m o c-Me V a l-OHからF m o c基が除去された
 以下の構造を有するアミノ酸であることは当業者に自明であり、そのアミノ
 酸残基であるMe V a lの構造も当業者に自明である。

[化3]



[0065] あ

- [0066] 本明細書における「アミノ酸」にはそれぞれに対応する全ての同位体を含
 む。「アミノ酸」の同位体は、少なくとも1つの原子が、原子番号（陽子数
 ）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子で、天然の存在
 比とは異なる存在比で置換されたものである。本明細書の「アミノ酸」に含
 まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リ
 ン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、 ^2H 、 ^3H

、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 等が含まれる。全ての割合の放射性または非放射性の同位元素を含有する本明細書の化合物は、本発明の範囲に包含される。

[0067] (製造方法)

本実施形態の固相法によるペプチド化合物の製造方法は、固相に担持された第一のアミノ酸または第一のペプチドを準備する準備工程；および第一のアミノ酸または第一のペプチドと、第二のアミノ酸または第二のペプチドとを、縮合剤および添加剤の存在下で縮合させる縮合工程を含む。

[0068] ある態様において、本実施形態の製造方法により得られるペプチド化合物は、固相法によるアミノ酸ないしはペプチドの伸長工程の中間体でも最終産物でもよい。伸長工程は、所望のペプチド化合物のアミノ酸配列の長さに応じて複数回行うことができ、本実施形態による縮合工程は、かかる伸長工程中に少なくとも1回含まれ、複数回含まれてもよい。伸長工程中、本実施形態による縮合工程以外の縮合工程には本技術分野に公知の方法を用いることができる。

[0069] ある態様において、本実施形態の縮合工程が、伸長工程の最終工程に用いられる場合、本実施形態の縮合工程により得られた縮合体が、所望の配列を有するペプチド化合物となり得る。一方、本実施形態の縮合工程に加えて公知の方法によりさらなる伸長が行われ、所望の配列を有するペプチド化合物が得られる場合、本実施形態の縮合工程により得られた縮合体は、ペプチド化合物の部分構造としてその中に含まれる。

[0070] 本実施形態の準備工程では、固相に担持された第一のアミノ酸または第一のペプチドを準備する。固相としては、具体的には、例えば、メンブランまたは固相合成用樹脂が挙げられる。

[0071] 本明細書における、メンブランを含む固相からのペプチドの切り出し工程において、開裂部位の切断の態様として、UV照射による光開裂性部位の切断、還元条件によるジスルフィド結合の切断、弱酸条件による酸不安定性部位の切断など、どのような形態であってもよい。

- [0072] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとは、光開裂性部位を介して結合されていてもよい。光開裂性部位は、光を吸収することで開裂する部位である。光開裂性部位が開裂を起こす吸収波長は300 nm以上、320 nm以上、340 nm以上、または350 nm以上であってよく、500 nm以下、450 nm以下、400 nm以下、380 nm以下、または370 nm以下であってよい。光開裂性部位が開裂を起こす吸収波長は、300 nm以上500 nm以下であってよく、350 nm以上370 nm以下であってよい。照射する光の波長は、取扱性により優れる観点から、UV-A領域の波長であってよい。UV-A領域の波長とは、320～400 nmの波長の光をいう。
- [0073] 光開裂性部位は、ニトロベラトリルオキシカルボニル残基、またはクマリン残基を有してよい。
- [0074] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとは、ジスルフィド結合を介して結合されていてもよい。ジスルフィド結合は、例えば（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンを含む水／DMF溶液などの還元的条件で切断することにより、固相から目的とするペプチドを切り出すことができる。
- [0075] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとは、酸不安定性部位を介して結合されていてもよい。酸不安定性部位は、例えばTFA／DCM溶液やDIPEAを含むTFE／DCM溶液などの酸性条件により分解され、固相から目的とするペプチドを切り出すことができる。
- [0076] 酸不安定性部位は、トリチルエステル構造、クロロトリチルエステル構造、アルコキシベンジルエーテル構造、トリアルコキシベンジルアミノカルボニル構造、ジアルコキシフェニル-アルコキシフェニルメチルアミノカルボニル構造、またはアルコキシキサンテン-9-イルアミノカルボニル構造を有してよい。
- [0077] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとは、酸によるペプチドの切り出しが可能な基によって結合されていてもよい。酸によるペプチドの切り出しが可能な基を有する固相として、具体的には、例えば、CTCレジソ

、NovaSyn TGTレジン（TGTレジン）、Wangレジン、SASRINレジン、トリチルクロリドレジン（Tttレジン）、4-メチルトリチルクロリドレジン（Mttレジン）、4-メトキシトリチルクロリドレジン（Mmtレジン）などの固相合成用樹脂が挙げられる。

[0078] 固相がメンブランである場合、第一のアミノ酸または第一のペプチドのメンブランに対する担持量として、任意の量、例えばFmoc定量法に基づき、 5 nmol/cm^2 以上、 500 nmol/cm^2 以下の量を用いることができ、 20 nmol/cm^2 以上、 50 nmol/cm^2 以上、 100 nmol/cm^2 以上、さらには 200 nmol/cm^2 以上の高い担持量でも反応を効率的に進行させることができる。また、固相が固相合成用樹脂である場合、第一のアミノ酸または第一のペプチドの固相合成用樹脂に対する担持量として、任意の量、例えばFmoc定量法に基づき、 0.1 mmol/g 以上、 0.8 mmol/g 以下の量を用いることができ、 0.2 mmol/g 以上、 0.3 mmol/g 以上、さらには 0.4 mmol/g 以上の高い担持量でも反応を効率的に進行させることができる。

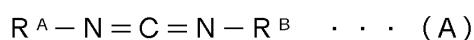
[0079] 本実施形態の縮合工程（縮合反応）において、第二のアミノ酸または第二のペプチドは、第一のアミノ酸または第一のペプチドに対して等量もしくは過剰量で用いられる。具体的には、第一のアミノ酸または第一のペプチドに対する第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル比は、1、2、3、5、7、および10からなる群より選択される下限、および、3、5、7、10、15、25、50、100、300、500および700からなる群より選択される上限との組み合わせによって特定することが可能な範囲とすることができる。第一のアミノ酸または第一のペプチドに対する、第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル比は、1.5以上であることが好ましく、2以上であることがより好ましい。また、第一のアミノ酸または第一のペプチドに対する、第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル比は、50以下であることが好ましく、15以下であることがより好ましい。第一のアミノ酸または第一のペプチドに対する第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル

比は、7～15であることが最も好ましい。

[0080] 本実施形態の縮合工程に用いられる添加剤としては、Oxyma、HOBt、HOObt、またはHOAtなどが挙げられる。

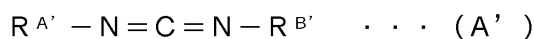
[0081] 本実施形態の縮合工程において、添加剤は、第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル数よりも少ないモル数で用いられる。言い換えると、第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する添加剤のモル比は1未満である。該モル比は、0.8以下、例えば0.1～0.8であることが好ましい。この場合、該モル比としては、例えば、第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する添加剤のモル比は、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6および0.7からなる群より選択される下限、並びに0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7および0.8からなる群より選択される上限との組み合わせによって特定することが可能な範囲とすることができる。第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する添加剤のモル比は、0.3～0.7であることがより好ましい。

[0082] 本実施形態の縮合工程に用いられる縮合剤は、下記一般式(A)で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤を含む。



式中、 R^A は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 R^A および R^B における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または4～8員環状アミノより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい。一般式(A)で表されるカルボジイミド系縮合剤は、具体的には、例えば、DsBC、tBEC、DtBCなどが挙げられる。

[0083] 本実施形態の縮合工程に用いられる縮合剤は、下記一般式(A')で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤を含んでいてもよい。



式中、 $R^{A'}$ は $C_3 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ ア

リールアルキルであり、 $R^{B'}$ は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 $R^{A'}$ および $R^{B'}$ における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または 4 ～ 8 員環状アミノより独立して選択される 1 つまたは複数の基によって置換されていてもよい。ただし、 $R^{A'}$ における総炭素数は 4 以上である。一般式 (A') で表されるカルボジイミド系縮合剤は、具体的には、例えば、DsBC、tBEC、DtBC、EDCI などが挙げられる。

[0084] 本実施形態の縮合工程において、縮合剤は、第二のアミノ酸または第二のペプチドのモル数と等量であるか、それよりも多いモル数で用いられる。具体的には、本実施形態の縮合工程において、第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤のモル比は、1 以上の範囲、2 以上の範囲、3 以上の範囲または 4 以上の範囲とすることができる。より具体的には、第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤のモル比は、1.0、1.1、1.2、1.5、2.0、3.0、および 4.0 からなる群より選択される下限、並びに 1.5、2.0、3.0、4.0、および 5.0 からなる群より選択される上限との組み合わせによって特定することが可能な範囲とすることができる。第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤のモル比の好ましい範囲としては、1.0 ～ 5.0、1.1 ～ 4.0、1.1 ～ 3.0、1.2 ～ 2.0、1.2 ～ 1.5 が挙げられる。

[0085] 本実施形態の縮合工程においては、第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤および添加剤のモル比は、

第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤のモル比を、1.0、1.1、1.2、1.5、2.0、3.0、および 4.0 からなる値より選択される下限、並びに 1.5、2.0、3.0、4.0、および 5.0 からなる値より選択される上限との組み合わせによって特定することが可能な範囲とすることができ、

第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する添加剤のモル比を、0.0、1.0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 および 0

． 7 からなる値より選択される下限、並びに 0． 2、 0． 3、 0． 4、 0． 5、 0． 6、 0． 7、 0． 8、 0． 9 および 1． 0 からなる値より選択される上限との組み合わせによって特定することが可能な範囲とすることができる。

第二のアミノ酸または第二のペプチドに対する縮合剤および添加剤のモル比として、好ましくは、第二のアミノ酸または第二のペプチド：縮合剤：添加剤＝約 2：約 2． 4～3． 2：約 0． 4～1． 4 である。

[0086] 本実施形態の縮合工程は、0～100℃、好ましくは10～60℃、より好ましくは20～50℃の反応温度で行うことができる。

[0087] 本実施形態の縮合工程は、10分～2日間、好ましくは10分～6時間、より好ましくは30分～60分の反応時間で行うことができる。また、2回以上繰り返すこともできる。

[0088] 本実施形態の縮合工程において、添加剤がHOAt、HOObt、またはOxymaであり、かつ縮合剤がDSCであることが好ましい。

[0089] 本実施形態の縮合反応は、適当な溶媒中で行うことができる。溶媒は、非プロトン性溶媒を用いることができ、アミド系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒、アルキルニトリル系溶媒、および尿素系溶媒などが挙げられる。アミド系溶媒として、DMF、DMA、およびNMPが挙げられる。エステル系溶媒として、酢酸エチル、およびジメチルカーボネートなどが挙げられる。エーテル系溶媒として、テトラヒドロフラン、および2-メチルテトラヒドロフランなどが挙げられる。アルキルニトリル系溶媒として、アセトニトリルなどが挙げられる。尿素系溶媒として、DMI、およびTMUなどが挙げられる。

[0090] 本実施形態の縮合工程は、固相に担持された第一のアミノ酸または第一のペプチドに、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤を接触させることにより行うことができる。第一のアミノ酸または第一のペプチドに、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤を接触させる順番は、任意であり、第一のアミノ酸または第一のペプチドに対

し、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤を同時に接触させても、順次接触させてもよい。第一のアミノ酸または第一のペプチドに、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤の全て、あるいはいずれかを事前に混合させたものを接触させてもよい。第一のアミノ酸または第一のペプチドに、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤を接触させる際に、これらを適当な溶媒と混合させたものを用いてもよい。

[0091] 本実施形態の方法は、固相合成装置を用いて行ってもよい。ある態様において、本実施形態の方法は、固相に担持された第一のアミノ酸または第一のペプチドに、第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤および添加剤を適当な溶媒中で混合することによって行うことができる。固相が固相合成用樹脂である場合、固相合成用樹脂とこれらの試薬類とを混合する際には、その前処理として、適当な溶媒との接触により、固相合成用樹脂を膨潤させることで、目的の縮合反応を効率よく進行させることができる。この前処理で用いられる溶媒の量は、膨潤したレジンは溶媒に浸ってさえすれば任意の量を用いることができ、例えば、溶媒としてDMFを用いた場合には、 $3\text{ v/w} \sim 15\text{ v/w}$ 、好ましくは、 $4\text{ v/w} \sim 10\text{ v/w}$ 、より好ましくは $4\text{ v/w} \sim 8\text{ v/w}$ の量を用いることができる。溶媒量が 4 v/w と記載されているものは、樹脂重量1 gに対する溶媒量が4 mLであることを表す。

[0092] 反応終了後は、メンブランまたは固相合成装置から反応液を排出し、残留したメンブランまたは固相合成用樹脂を適当な溶媒で洗浄することで、過剰な試薬や副生成物を排出して、メンブランまたは固相合成用樹脂に結合している目的のペプチド化合物を取得することができる。メンブランまたは固相合成用樹脂を洗浄、および／または膨潤させるために適した溶媒としては、アミド系や溶媒アルコール系溶媒が例示され、DMFまたはエタノールあるいは2-プロパノールが好ましい。これらの溶媒は、複数回使用しても、交互に使用してもよい。膨潤した固相合成用樹脂は、必要に応じて収縮させることができ、それにはアルコール系溶媒、またはエーテル系の溶媒による洗

浄が用いられる。アルコール系溶媒としては、メタノールが好ましく、エーテル系の溶媒としてはメチル tert-ブチルエーテル (MTBE) が好ましい。

- [0093] ある態様において、縮合反応を行う前に第二のアミノ酸または第二のペプチド、縮合剤、および添加剤を溶媒中で事前に混合した混合物を予め調製し、縮合反応に用いてもよい。混合時間は特に限定されないが、好ましくは0分～2時間であり、より好ましくは0分～1時間であり、さらに好ましくは約15分である。
- [0094] 自動合成装置を用いた樹脂の攪拌や振盪は、樹脂を反応溶液に十分浸透させて、望みどおりに反応を進行させる上で重要であり得る。攪拌速度、振盪速度、それらの頻度は特に限定されないが、過度の攪拌は樹脂の物理的損傷を引き起こすおそれがあるため、例えば60 rpmの攪拌を1時間毎に2分間程度実施する例があげられる。また、浸透が十分であれば攪拌や振盪は必ずしも行う必要はない。
- [0095] ある態様において、本実施形態の方法は、メンブランおよび固相合成用樹脂を除去する工程をさらに含んでもよく、これには本技術分野に公知の方法を用いることができる。所望の配列まで伸長させたペプチド化合物をメンブランおよび樹脂から脱離させ、単離することができる。
- [0096] ある態様において、本実施形態の方法は、保護基を除去する工程をさらに含んでもよく、これには本技術分野に公知の方法を用いることができる。例えば、「Greene's, "Protective Groups in Organic Synthesis" (第5版, John Wiley & Sons 2014)」に記載の方法を挙げることができ、これらを反応条件に応じて適宜用いればよい。具体的には、第二のアミノ酸のアミノ基、または第二のペプチドのN末端のアミノ酸のアミノ基が保護基で保護されている場合には、該保護基を除去することで、次の縮合反応に備えることができる。保護基は縮合反応と同時に除去されても、縮合反応とは別個に除去されてもよい。
- [0097] ある態様において、本実施形態は、本実施形態の方法を用いて直鎖ペプチド化合物を得、次いで、Comprehensive Organic Transformations、A Guide

to Functional Group Preparations, 3rd Edition (R. C. Larock著)、またはMarch's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7th Edition (M. B. Smith, J. March著)などに記載された公知の手法によりそのN末端側の基とC末端側の基とを環化することにより、環状ペプチド化合物を製造する方法にも関する。

[0098] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0099] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。なお、実施例中では以下の略号を使用した。

Ac : アセチル

DBU : 1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] -7-ウンデセン

DCE : 1, 2-ジクロロエタン

DCM : ジクロロメタン

DGDE : ジエチレングリコールジエチルエーテル

DIC : N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド

DIPEA : N, N'-ジイソプロピルエチルアミン

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

DMSO : ジメチルスルホキシド

DsBC : N, N'-ジ-sec-ブチルカルボジイミド

tBEC : 1-tert-ブチル-3-エチルカルボジイミド

EDCI · HCl : 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

FA : 脂肪酸

Fmoc : 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

HFIP : 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロイソプロピルアルコール

HOAt : 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール

H O B t : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

H O O B t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン

M e C N : アセトニトリル

N M P : N-メチル-2-ピロリドン

O x y m a : シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル

O x y m a B : 5-(ヒドロキシイミノ)-1, 3-ジメチルピリミジン-2, 4, 6 (1 H, 3 H, 5 H)-トリオン

P y O x i m : [エチルシアノ (ヒドロキシイミノ) アセタト-O 2] トリ1-ピロリジニルホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩

T B M E : t-ブチルメチルエーテル

T F A : トリフルオロ酢酸

T F E : 2, 2, 2-トリフルオロエタノール

T H F : テトラヒドロフラン

T H P : テトラヒドロピラニル

T I P S : トリイソプロピルシラン

[0100] また、LCMS等の分析条件は、下記の表1 および表2 のとおりである。

[表1]

分析条件	装置	カラム (I.D. x 長さ (mm))	移動相	勾配 (A/B)	流速 (ml/分)	カラム温度 (°C)	波長
SGD FA05_1	Acquity UPLC/SGD2	Aldrich Ascendis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0分 間) => 0/100 (0.4分 間)	0.9	35	210-400nm PDA total
SGD FA05_2	Acquity UPLC/SGD2	Aldrich Ascendis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0分 間) => 0/100 (0.4分 間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SGD FA05_3	Acquity UPLC/SGD2	Aldrich Ascendis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0分 間) => 0/100 (0.4分 間)	0.9	55	210-400nm PDA total
SGD AA05long	Acquity UPLC/SGD2	Aldrich Ascendis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH ₄ , H ₂ O B) MeOH	95/5 => 0/100 (4.5分 間) => 0/100 (0.5分 間)	0.9	35	210-400nm PDA total
SMD method_1	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0分 間) => 0/100 (0.5分 間)	1.0	40	190-400nm PDA total
SMD method_2	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR ODS-C18 (3.0 x 50)	A) 0.05% TFA, H ₂ O B) 0.05% TFA CH ₃ CN	95/5 => 5/95 (1.1分 間) => 5/95 (0.6分間)	1.2	40	190-400nm PDA total
SMD method_3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR ODS-C18 (3.0 x 50)	A) 0.05% TFA, H ₂ O B) 0.05% TFA CH ₃ CN	70/30 => 5/95 (2.0分 間) => 5/95 (0.7分間)	1.2	40	190-400nm PDA total

[表2]

分析条件	装置	サンプル注入	モード	Polarity	Resolution	Capillary Temp. (°C)	Capillary voltage (V)	Tube Lens (V)
LFG method 1	Thermo LTQ Orbitrap XL	Direct infusion	Fullscan	Positive	30,000	275	13	100

[0101] 本明細書内に記載するペプチド合成において、表3～5に記載するFmoc保護アミノ酸を用いた。

[表3]

Fmoc- Phe-OH		Fmoc- Tyr(OH)-OH		Fmoc- Ile(OH)-OH	
Fmoc- Ser(OH)-OH		Fmoc- Cys(OH)-OH		Fmoc- Met(OH)-OH	
Fmoc- Thr(OH)-OH		Fmoc- Asp(OH)-OH		Fmoc- Ala(OH)-OH	
Fmoc- Val(OH)-OH		Fmoc- Glu(OH)-OH		Fmoc- Pro(OH)-OH	
Fmoc- Leu(OH)-OH		Fmoc- His(OH)-OH		Fmoc- Gly(OH)-OH	
Fmoc- Ile(OH)-OH		Fmoc- Asn(OH)-OH		Fmoc- Phe(OH)-OH	
Fmoc- Tyr(OH)-OH		Fmoc- Lys(OH)-OH		Fmoc- Arg(OH)-OH	
Fmoc- Trp(OH)-OH		Fmoc- Gln(OH)-OH			

[表4]

略称	構造	略称	構造	略称	構造
Fmoc- Ser(OMe)- OH		Fmoc- His(OMe)- OH		Fmoc- Met(OMe)- OH	
Fmoc- Ser(OMe)- OH		Fmoc- His(OMe)- OH		Fmoc- Met(OMe)- OH	
Fmoc- Ser(OMe)- OH					

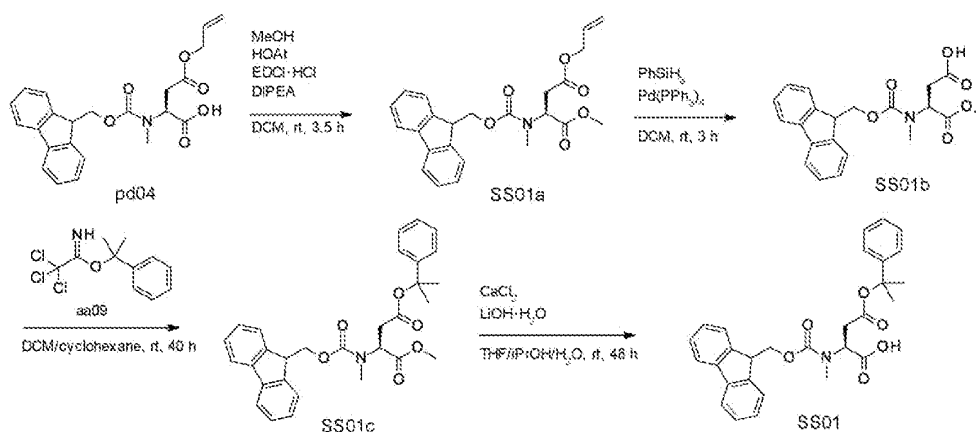
[表5]

略称	構造
Fmoc- MeAsp(O Pis)-OH	

- [0102] 表3記載のFmoc保護アミノ酸は商業的供給業者から購入した。
- 表4記載のFmoc保護アミノ酸はWO2018/225864記載の方法に従って合成した。
- 表5記載のFmoc保護アミノ酸は実施例1-1記載の方法で合成した。
- [0103] 本明細書において、同じ化合物であってもLCMS(ESI)m/zの値±0.2程度、保持時間±0.07分程度の範囲でぶれることがある。
- [0104] 実施例1：本実施例中で使用するFmoc保護アミノ酸、ウレアおよびメン
ブランに担持されたペプチド等の調製
- メンブランディスクとしてはIntavis社(現CEM社)から購入したCelluSpots 384 frame with acid stable discsもしくはRefill of two frames, 384 acid stable discs(アミノ基修飾メンブラン)を用いた。
- [0105] 実施例1-1：化合物SS01、(2S)-2-[9H-フルオレン-9-

イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] - 4 - (1-メチル-1-フェニル-エトキシ) - 4-オキソブタン酸 (Fmoc-Me Asp (OPis) - OH) の合成

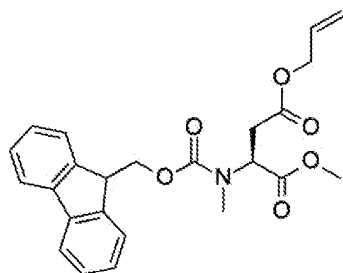
[化4]



上記のスキームに従い (2S) - 2 - [9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] - 4 - (1-メチル-1-フェニル-エトキシ) - 4-オキソブタン酸 (Fmoc-Me Asp (OPis) - OH, SS01) を合成した。

[0106] 実施例 1-1-1 : O4-アリル O1-メチル (2S) - 2 - [9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] ブタンジオアート (化合物 SS01a) の合成

[化5]



窒素雰囲気下、WO2018/124162記載の方法で合成した (S) - 2 - (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) (メチル) アミノ) - 4 - (アリルオキシ) - 4-オキソブタン酸 (化合物 p

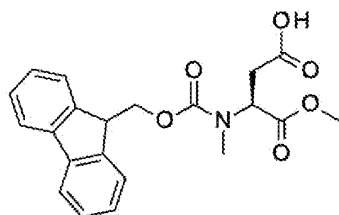
d O 4) (100.0 g, 244.2 mmol) に D C M (1.15 L) を添加し、室温にて E D C I · H C l (60.87 g, 317.5 mmol) および H O A t (43.22 g, 317.5 mmol) を加え 30 分間攪拌した。その溶液にメタノール (8.61 g, 268.7 mmol) および D I P E A (41.04 g, 317.5 mmol) を室温にて加え、3 時間攪拌した。その後 D C M を加えて希釈し、有機層を塩化アンモニウム水溶液および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、化合物 S S O 1 a を粗生成物として 93 g (収率 90%) 得た。

L C M S (E S I) $m/z = 424.1 [M+H]^+$

保持時間: 1.13 分 (分析条件 S M D m e t h o d _ 1)

[0107] 実施例 1-1-2: (3S)-3-[9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル(メチル)アミノ]-4-オキソブタン酸(化合物 S S O 1 b) の合成

[化6]



窒素雰囲気下、化合物 S S O 1 a の粗生成物 (100.0 g, 純度 76%, 179.5 mmol) に D C M (350 mL) を添加し、室温にてテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (2.07 g, 1.795 mmol) およびフェニルシラン (13.60 g, 125.7 mmol) を加え 3 時間攪拌した。その後 T B M E を加えて希釈し、飽和炭酸ナトリウム水溶液で抽出した。得られた水層を T B M E で洗浄後、0.1 M リン酸水溶液を加えて酸性とし、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、化合物 S S O 1 b を 82 g (収率 110%) 得た。

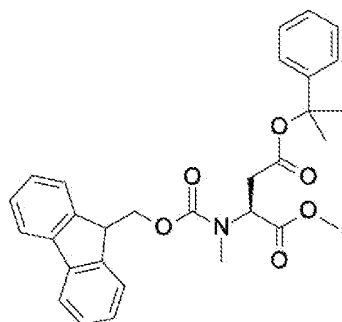
L C M S (E S I) $m/z = 384.4 [M+H]^+$

保持時間: 1.32 分 (分析条件 S M D m e t h o d _ 2)

[0108] 実施例 1-1-3: O 1-メチル O 4-(1-メチル-1-フェニル-エチ

ル) (2S) - 2 - [9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] ブタンジオアート (化合物SS01c) の合成

[化7]



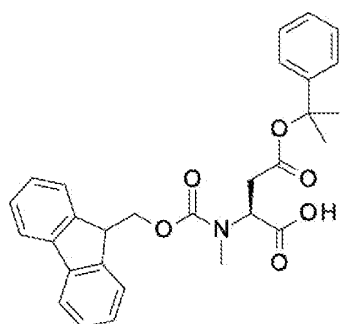
窒素雰囲気下、化合物SS01b (50.00 g, 130.4 mmol) にDCM (100 mL) を添加し、WO2018/124162記載の方法で合成した2, 2, 2-トリクロロアセトイミド酸2-フェニルプロパン-2-イル (化合物a09) (148.0 g, 527.5 mmol) のシクロヘキサン (400 mL) 溶液を室温にて滴下し40時間攪拌した。混合物を濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/石油エーテル) にて精製し、化合物SS01cを68 g (収率101%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 524.2 [M+Na]^+$

保持時間: 1.22分 (分析条件SMD method_1)

[0109] 実施例1-1-4: (2S) - 2 - [9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] - 4 - (1-メチル-1-フェニル-エトキシ) - 4-オキソブタン酸 (化合物SS01、Fmoc-MeAsp (O-Pis) -OH) の合成

[化8]



塩化カルシウム (248.9 g, 2243 mmol) および水酸化リチウム一水和物 (25.10 g, 588.1 mmol) を 2-プロパノール (3 L) および H_2O (750 mL) の混合溶媒に溶解し、氷浴で $0^{\circ}C$ に冷却した。その溶液に化合物 S S O 1 c (75.00 g, 149.5 mmol) の THF (750 mL) 溶液を滴下し、室温にて 48 時間攪拌した。その後混合物を濾過し、濾液を減圧濃縮し揮発性有機化合物を除去した。得られた溶液を酢酸エチルで抽出した。有機層を 1 M リン酸水溶液および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣を TBME およびヘキサンの混合溶媒 (1 : 1) に溶解した。その溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で抽出し、その水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。得られた有機層を 0.1 M リン酸水溶液および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、化合物 S S O 1 を 60 g (収率 82%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 510.5 [M+Na]^+$

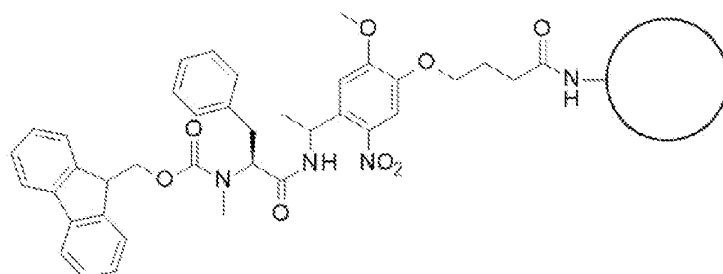
保持時間: 1.95 分 (分析条件 SMD method_3)

[0110] 実施例 1-2: 本実施例中で使用するメンブランに担持されたアミノ酸およびペプチド等の調製

本明細書では、メンブランやレジンと化合物が結合した場合、メンブランやレジン部位を○にて表記する場合がある。また、メンブラン部位の反応点を明確にさせる目的で、○に接続させて反応部位の化学構造を表記させる場合がある。例えば、下記の構造 (Fmoc-MePhe-Photo-Linker-Membrane (化合物 S S O 2)) では、アミノ基修飾メン

ブランのアミノ基がPhoto-Linkerのカルボン酸とアミド結合を形成している。

[化9]

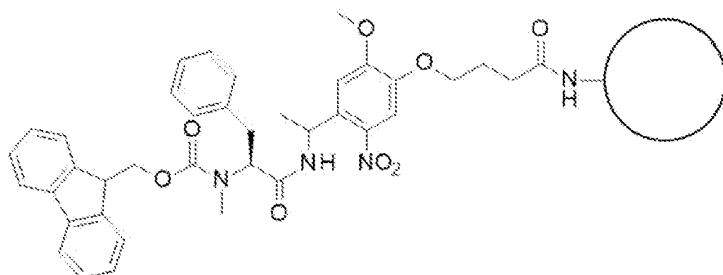


(化合物SS02)

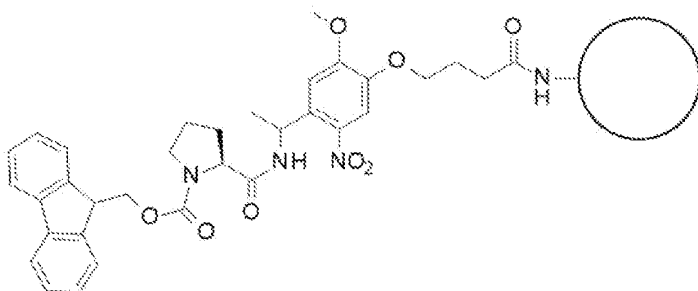
[0111] 本明細書では、アミノ酸の伸長反応の生成物を確認する目的で、伸長後に得られたメンブランを用いた、メンブランからのペプチド切り出し反応後の溶液をLCMSで測定した。具体的な手順を示す。UV照射機器はエム・エル・シー社委託作製のUV-LED照射ボックスMUB-031もしくは株式会社松電舎製の分離型UV-LED照射装置」を使用し、氷上あるいは室温下に置いた反応容器中の伸長後乾燥させたメンブランディスクに対しUV波長365nm、照度380~600mW/cm²で2分30秒間光照射した。その後メンブランに対し100μLのDMSOを添加し、15分以上静置しペプチドを溶解させた。その溶液をLCMSにて分析した。

[0112] 実施例1-2-1：化合物SS02 (Fmoc-MePhe-Photo-Linker-Membrane)、化合物SS03 (Fmoc-Pro-Photo-Linker-Membrane)、化合物SS24 (Fmoc-MeAla-Photo-Linker-Membrane)、化合物SS25 (Fmoc-MeSer (THP)-Photo-Linker-Membrane) の合成

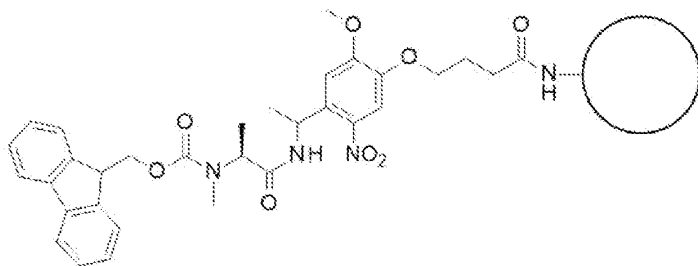
[化10]



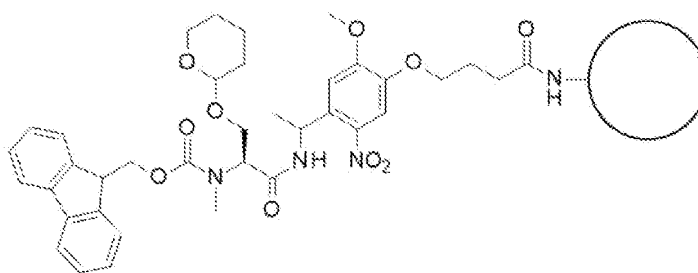
(化合物 SS02)



(化合物 SS03)



(化合物 SS24)



(化合物 SS25)

本実施例中にて使用する化合物 SS02、SS03、SS24 および SS25 の調製は、ペプチド合成機 (Multipec RS; Intavis 社製) を用いて、Fmoc 法により行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。反応条件については WO2018/225851 を参

考にし、以下の操作1または操作2の方法で調製した。なお、化合物SS02の調製においては、Fmoc-Photo-LinkerおよびFmoc-MePhe-OHをこの順で、化合物SS03の調製においては、Fmoc-Photo-LinkerおよびFmoc-Pro-OHをこの順で、化合物SS24の調製においては、Fmoc-Photo-LinkerおよびFmoc-MeAla-OHをこの順で、化合物SS25の調製においては、Fmoc-Photo-LinkerおよびFmoc-MeSer (THP)-OHをこの順で、それぞれFmoc保護アミノ酸として用いた。

[0113] [操作1]

目的とするペプチドを構成するFmoc保護アミノ酸(0.6 mol/L)とカルボン酸の活性化剤としてHOAtもしくはOxymaもしくはHOObt(0.375 mol/L)をNMPに溶解させて溶液1を調製した。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(0.71 mol/L)とN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を混合し、溶液2を調製した。

CelluSpots 384 frame with acid stable discs (Intavis社製アミノ基修飾メンブラン; 以下、「メンブランディスク」ともいう。)をペプチド合成機にセットした。溶液1および溶液2をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

[0114] 脱Fmoc工程

DBUのDMF溶液(2% v/v)を、メンブランディスク1枚あたり2.0 μLおよび4.0 μL添加し、室温にてFmoc基の脱保護を行った。1残基目の伸長前においては脱保護は必要とせず、1残基目伸長以降の脱保護においては2.0 μL添加後に5分間反応させた後、一度溶液を排出し、4.0 μL添加しさらに10分間反応させ、その後溶液を排出した。続いてDMF(メンブランディスク1枚あたり25 μL)で7回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり25 μL)で2回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μL)で2回、エタノール(メンブランディスク

1枚あたり25 μ L)で2回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。

[0115] 伸長工程

溶液1と溶液2を5:6の比率で合成機のmixing vialで混合し15分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり1.2 μ L添加し、室温にて40分間反応することでメンブランディスク上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液を排出した。この縮合反応を更にもう1回繰り返して行った。続いて無水酢酸(Ac_2O)のDMF溶液(4% v/v)を、メンブランディスク1枚あたり4.0 μ L添加し、室温にて未反応アミンのアセチルキャッピングを行った。5分間反応させた後、溶液を排出した。次いでDMF(メンブランディスク1枚あたり25 μ L)で7回洗浄し、引圧で10分間乾燥した。

このFmoc基の脱保護反応に次ぐFmoc保護アミノ酸の縮合反応、アセチルキャッピングを1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでメンブランディスク表面上にペプチドを伸長させた。最後のアミノ酸の伸長後は脱Fmoc工程を行わずに、さらにDMF(メンブランディスク1枚あたり25 μ L)で7回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり25 μ L)で2回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で2回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり25 μ L)で2回または3回洗浄し、引圧で10~15分間乾燥した後、以後の検討に用いた。

[0116] [操作2]

目的とするペプチドを構成するFmoc保護アミノ酸(0.29 mol/L)とカルボン酸の活性化剤としてHOAtもしくはOxymaもしくはHOOBt(0.181 mol/L)をNMP/DMF=6.68/4.34もしくは5/6の溶液に溶解させて溶液1を調製した。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)は原液のまま溶液2として用いた。

CelluSpots 384 frame with acid stable discs(Intavis社製)をペプチド合成機にセットした。溶液1および溶液2をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

[0117] 脱Fmoc工程

〔操作1〕の脱Fmoc工程と同様の方法で行った。

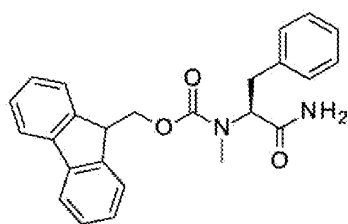
[0118] 伸長工程

溶液1と溶液2を11.29:0.72の比率で合成機のmixing vialで混合し15分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり1.2 μ L添加し、室温にて40分間反応することでメンブランディスク上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液を排出した。この縮合反応を更にもう1回繰り返して行った。その後は〔操作1〕の伸長工程と同様の方法で行った。

[0119] 実施例1-2-2: メンブラン上に担持されたFmoc-MePheあるいはFmoc-Proの切り出しおよび分析

操作1または操作2の方法で調製した化合物SS02、SS03、SS24およびSS25を用いて実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS02*、SS03*、SS24*およびSS25*）の生成を確認した。なお、本実施例において、化合物番号に*を付した場合には、反応の確認のためにメンブランディスクからペプチドを切り出して確認した化合物を示す。

[化11]

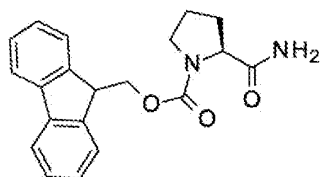


(化合物SS02*)

LCMS (ESI) $m/z = 401.3$ $[M+H]^+$

保持時間: 3.33分 (分析条件SQDAA05long)

[化12]

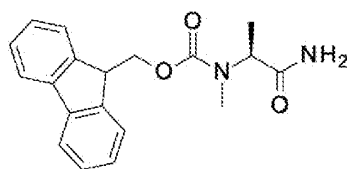


(化合物SS03*)

LCMS (ESI) $m/z = 337.3$ $[M+H]^+$

保持時間: 2.74分 (分析条件SQDAA05long)

[化13]

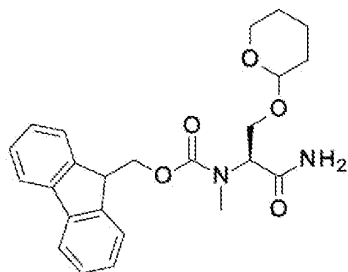


(化合物SS24*)

LCMS (ESI) $m/z = 325.3$ $[M+H]^+$

保持時間: 2.76分 (分析条件SQDAA05long)

[化14]



(化合物SS25*)

LCMS (ESI) $m/z = 425.4$ $[M+H]^+$

保持時間: 3.17分 (分析条件SQDAA05long)

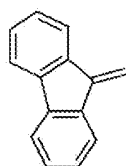
[0120] 実施例1-2-3: メンブラン上に担持されたFmoc-アミノ酸の担持量確認

担持したFmocアミノ酸のメンブランに対する担持量の確認を以下の方法で行った。

操作1または操作2の方法で調製した化合物SS02、SS03、SS24、SS25 (各メンブランディスク1枚) を反応容器に入れ、DBUのD

MF 溶液（2% v/v）をメンブランディスク 1 枚あたり 4.0 μ L 添加し、室温にて 5 分間反応させた後、再度 4.0 μ L 添加し室温にて 10 分間反応させて Fmoc 基の脱保護を行った。その後 DMF をメンブランディスク 1 枚あたり 392 μ L 添加して溶出させ、得られた溶液を LC/MS にて分析した（injection volume: 5 μ L）。

[化15]



（ジベンゾフルベン、化合物 SS04）

保持時間：1.02 分（分析条件 SQDFA05__1）

化合物 SS02 由来の化合物 SS04 の波長 304 nm における UV エリア値：16359.88

化合物 SS03 由来の化合物 SS04 の波長 304 nm における UV エリア値：15793.11

化合物 SS24 由来の化合物 SS04 の波長 304 nm における UV エリア値：18782.30

化合物 SS25 由来の化合物 SS04 の波長 304 nm における UV エリア値：18300.73

[0121] また、Fmoc-Gly-OH（3.51 mg、0.012 mmol）を DBU の DMF 溶液（1.5 mL、0.201 mmol）に溶解させ、室温にて 15 分間反応させて Fmoc 基の脱保護を行った。その後、反応混合液に DMF（148.5 mL）を加えて希釈した。得られた希釈溶液を LC/MS にて分析した（分析条件 SQDFA05__1、injection volume: 5 μ L）。ジベンゾフルベンの波長 304 nm における UV エリア値は 8903.11 であり、この値より 1 nmol あたりの UV エリア値（波長 304 nm）を算出した。これらの値を用いて、以下の式から化合物 SS02 および化合物 SS03 の担持量を算出した。

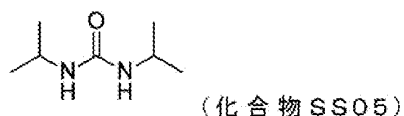
担持量 (nmol) = (化合物SS04のUVエリア値 (波長304 nm)
) / (ジベンゾフルベン1 nmolあたりのUVエリア値 (波長304 nm
))

その結果、化合物SS02、SS03、SS24、およびSS25の担持量をそれぞれ57.9 nmol / メンブランディスク、55.9 nmol / メンブランディスク、66.4 nmol / メンブランディスク、および64.7 nmol / メンブランディスクと算出した。

なお、同様に合成した担持量が異なる別ロットについてもペプチド合成や検討等に使用した。

[0122] 実施例1-3：本実施例中で使用するカルボジイミド由来のウレアの合成
実施例1-3-1：1, 3-ジイソプロピルウレア (DICウレア、化合物SS05) の合成

[化16]

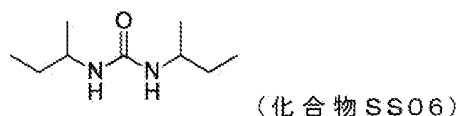


DIC (1.22 mL、7.92 mmol) に室温にてTBME (31.5 mL) を添加した後、5分以上かけて酢酸 (1.178 mL、20.60 mmol) を滴下し反応混合物を室温で1時間半攪拌した。その後生じた沈殿物をろ過により回収し、TBMEを用いて得られた固体を洗浄し、減圧下にて乾燥することで1, 3-ジイソプロピルウレア (DICウレア、化合物SS05) (909.1 mg、80%) を得た。

¹H-NMR (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.48 (2H, d, J = 7.2 Hz), 3.69-3.57 (2H, m), 1.00 (12H, d, J = 6.8 Hz)

[0123] 実施例1-3-2：1, 3-ジ-sec-ブチルウレア (DsBCウレア、化合物SS06) の合成

[化17]

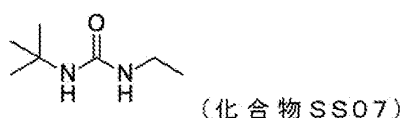


DsBC (0.356 μ L、1.945 mmol) に室温にてTBME (7.73 mL) を添加した後、5分以上かけて酢酸 (0.289 μ L、5.06 mmol) を滴下し反応混合物を室温で15分間攪拌した。その後水 (70.1 μ L、3.89 mmol) を加え、室温で2時間半攪拌した。その後窒素を吹き付けて濃縮し、水を加えた。生じた沈殿物をろ過により回収し、水を用いて得られた固体を洗浄し、減圧下にて乾燥することで1,3-ジ-sec-ブチルウレア (DsBCウレア、化合物SS06) (210.7 mg、63%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.46 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 3.50-3.43 (2H, m), 1.32 (4H, dq, $J = 7.2, 7.2$ Hz), 0.97 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.81 (6H, t, $J = 7.2$ Hz)

[0124] 実施例1-3-3: 1-(tert-ブチル)-3-エチルウレア (tBECウレア、化合物SS07) の合成

[化18]

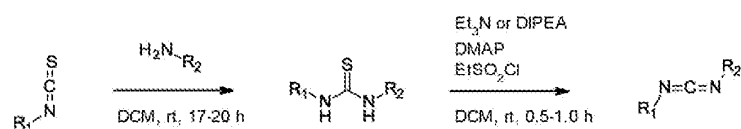


tBEC (0.614 μ L、3.96 mmol) に室温にてTBME (15.7 mL) を添加した後、5分以上かけて酢酸 (0.589 μ L、10.30 mmol) を滴下し反応混合物を室温で2時間半攪拌した。その後窒素を吹き付けて濃縮し、MeCNと水の1:2の混合物を加えた。生じた沈殿物をろ過により回収し、MeCNと水の1:2の混合物を用いて得られた固体を洗浄した。濾液を減圧濃縮し、水を加えた。生じた沈殿物をろ過により回収し、水を用いて得られた固体を洗浄した。2つの得られた固体をMeCNに溶解させた後に混合し、減圧濃縮することで1-(tert-ブチル)-3-エチルウレア (tBECウレア、化合物SS07) (169.2 mg、30%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.53 (2H, br), 2.98-2.91 (2H, m), 1.20 (9H, s), 0.95 (3H, t, $J = 7.2$ Hz)

[0125] 実施例 1-4 : 本実施例中で使用するカルボジイミドの合成

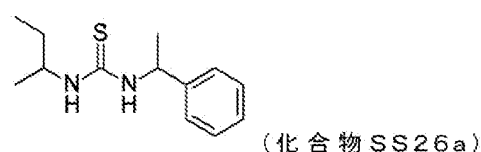
[化19]



上記のスキームに従い $N'-(1\text{-フェニルエチル})-N\text{-sec-ブチル-メタンジイミン}$ (SS26)、 $N'-(1\text{-メチルヘプチル})-N\text{-sec-ブチル-メタンジイミン}$ (SS27)、 N,N' -ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン (SS28)、 N,N' -ビス(1-エチルプロピル)メタンジイミン (SS29)、および $N'-(1\text{-エチルプロピル})-N-(1\text{-メチルブチル})\text{-メタンジイミン}$ (SS30) を合成した。

[0126] 実施例 1-4-1 : $1-(1\text{-フェニルエチル})-3\text{-sec-ブチル-チオウレア}$ (化合物 SS26a) の合成

[化20]



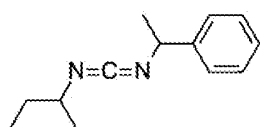
2-イソチオシアナトブタン (500 μL 、4.08 mmol) および 1-フェニルエタンアミン (567 μL 、4.49 mmol) を室温にて DCM (20.4 mL) へ添加し、室温で 17 時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル / n -ヘキサン) にて 2 回精製し、化合物 SS26a をジアステレオマー混合物として 874.6 mg (収率 91%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 237.1 [M+H]^+$

保持時間 : 0.77 分 (分析条件 SQDFA05_1)

[0127] 実施例 1-4-2 : $N'-(1\text{-フェニルエチル})-N\text{-sec-ブチル-メタンジイミン}$ (SS26) の合成

[化21]



(化合物SS26)

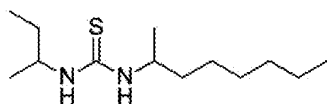
化合物SS26a (149.6 mg、0.633 mmol) をDCM (6.329 mL) へ添加し、氷冷下にてトリエチルアミン (265 μ L、1.899 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (77 mg、0.633 mmol) およびエタンスルホニルクロリド (120 μ L、1.266 mmol) を添加した。氷冷下で5分攪拌後室温へ昇温し室温にて1時間攪拌した。混合物にISOLUTE (登録商標) HM-N (Biotage社製) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/n-ヘキサンおよびDCM) にて複数回精製し、化合物SS26をジアステレオマー混合物として35.21 mg (収率28%) 得た。

MS (ESI) $m/z = 203.2$ $[M+H]^+$ (分析条件LTQ method_1)

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.38–7.25 (5H, m), 4.62 (1H, q, $J = 6.4$ Hz), 3.31–3.22 (1H, m), 1.45 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.42–1.25 (2H, m), 1.06 (3H, d and d, $J = 6.4$ Hz), 0.81 (3H, t and t, $J = 7.6$ Hz)

[0128] 実施例1-4-3: 1-(1-メチルヘプチル)-3-sec-ブチル-チオウレア (化合物SS27a) の合成

[化22]



(化合物SS27a)

2-イソチオシアナトブタン (300 μ L、2.45 mmol) および2-オクタンアミン (452 μ L、2.69 mmol) を室温にてDCM (1

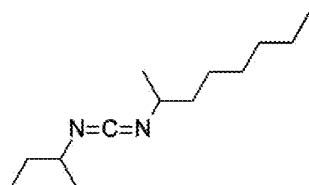
2. 2 mL) へ添加し、室温で 17 時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／*n*-ヘキサン）にて 2 回精製し、化合物 SS 27 a をジアステレオマー混合物として 552.0 mg（収率 92%）得た。

LCMS (ESI) $m/z = 245.2 [M+H]^+$

保持時間：0.94 分（分析条件 SQDFA05_1）

[0129] 実施例 1-4-4：N'-(1-メチルヘプチル)-N-sec-ブチル-メタンジイミン (SS 27) の合成

[化23]



(化合物 SS 27)

化合物 SS 27 a (150 mg、0.614 mmol) を DCM (6.136 mL) へ添加し、氷冷下にて DIPEA (315 μ L、1.841 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (75 mg、0.614 mmol) およびエタンスルホニルクロリド (116 μ L、1.227 mmol) を添加した。氷冷下で 5 分攪拌後室温へ昇温し室温にて 1 時間攪拌した。混合物に ISOLUTE（登録商標）HM-N（Biotage 社製）を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／*n*-ヘキサンおよび DCM）にて数回精製し、化合物 SS 27 をジアステレオマー混合物として 22.83 mg（収率 18%）得た。

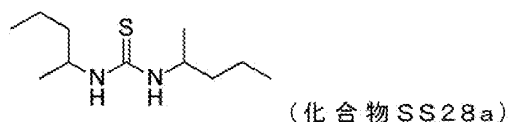
MS (ESI) $m/z = 211.2 [M+H]^+$ （分析条件 LTQ method_1）

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.38–3.24 (2H, m), 1.48–1.25 (12H, m), 1.14 (6H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.88 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 0.86 (3H, t, $J = 7.6$ Hz)

[0130] 実施例 1-4-5：1, 3-ビス(1-メチルブチル)チオウレア（化合物

SS28a) の合成

[化24]



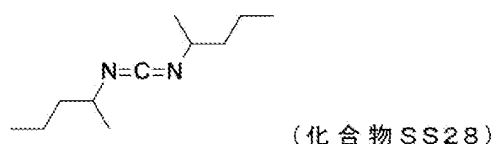
2-イソチオシアナトペンタン (300 μ L、2.16 mmol) および 2-ペンタンアミン (280 μ L、2.38 mmol) を室温にて DCM (10.8 mL) へ添加し、室温で 20 時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル／*n*-ヘキサン) にて精製し、化合物 SS28a をジアステレオマー混合物として 426.8 mg (収率 91%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 217.2$ [M+H]⁺

保持時間: 0.82 分 (分析条件 SQDFA05_1)

[0131] 実施例 1-4-6: N, N'-ビス(1-メチルブチル)メタンジイミン (SS28) の合成

[化25]



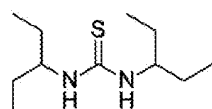
化合物 SS28a (199.8 mg、0.923 mmol) を DCM (9.233 mL) へ添加し、氷冷下にてトリエチルアミン (386 μ L、2.77 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (113 mg、0.923 mmol) およびエタンスルホニルクロリド (175 μ L、1.847 mmol) を添加した。氷冷下で 5 分攪拌後室温へ昇温し室温にて 1 時間攪拌した。混合物に ISOLUTE (登録商標) HM-N (Biotage 社製) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル／*n*-ヘキサンおよび DCM) にて数回精製し、化合物 SS28 をジアステレオマー混合物として 36.30 mg (収率 22%) 得た。

MS (ESI) $m/z = 183.2$ $[M+H]^+$ (分析条件 L T Q method_1)

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.39-3.33 (2H, m), 1.42-1.23 (8H, m), 1.14 (6H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.91-0.83 (6H, m)

[0132] 実施例 1-4-7 : 1, 3-ビス (1-エチルプロピル) チオウレア (化合物 SS29a) の合成

[化26]



(化合物 SS29a)

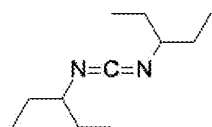
3-イソチオシアナトペンタン (300 μL 、2.18 mmol) および 3-ペンタンアミン (279 μL 、2.40 mmol) を室温にて DCM (10.9 mL) へ添加し、室温で 20 時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ n -ヘキサン) にて精製し、化合物 SS29a を 401.4 mg (収率 85%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 217.2$ $[M+H]^+$

保持時間 : 0.79 分 (分析条件 SQDFA05_1)

[0133] 実施例 1-4-8 : N, N'-ビス (1-エチルプロピル) メタンジイミン (SS29) の合成

[化27]



(化合物 SS29)

化合物 SS29a (200.8 mg、0.928 mmol) を DCM (9.280 mL) へ添加し、氷冷下にて トリエチルアミン (388 μL 、2.78 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (113 mg、0.928 mmol) および エタンスルホニルクロリド (175 μL 、1.856 mmol)

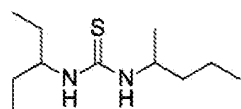
1) を添加した。氷冷下で5分攪拌後室温へ昇温し室温にて0.5時間攪拌した。混合物にISOLUTE (登録商標) HM-N (Biotage社製) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ *n*-ヘキサンおよびDCM) にて数回精製し、化合物SS29を37.59mg (収率22%) 得た。

MS (ESI) $m/z = 183.2$ $[M+H]^+$ (分析条件LTQMethod_1)

$^1\text{H-NMR}$ (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.08 (2H, tt, $J = 4.8$ Hz, 8.0 Hz), 1.56-1.30 (8H, m), 0.89 (12H, t, $J = 7.2$ Hz)

[0134] 実施例1-4-9: 1-(1-エチルプロピル)-3-(1-メチルブチル)チオウレア (化合物SS30a) の合成

[化28]



(化合物SS30a)

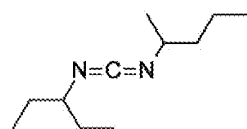
2-イソチオシアナトペンタン (300 μL , 2.16 mmol) および 3-ペンタンアミン (276 μL , 2.37 mmol) を室温にてDCM (10.8 mL) へ添加し、室温で20時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ *n*-ヘキサン) にて精製し、化合物SS30aをジアステレオマー混合物として418.3mg (収率90%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 217.2$ $[M+H]^+$

保持時間: 0.80分 (分析条件SQDFA05_1)

[0135] 実施例1-4-10: N'-(1-エチルプロピル)-N-(1-メチルブチル)メタンジイミン (SS30) の合成

[化29]



(化合物SS30)

化合物SS30a (201.1 mg, 0.929 mmol) をDCM (9.294 mL) へ添加し、氷冷下にてトリエチルアミン (389 μ L, 2.79 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (114 mg, 0.929 mmol) およびエタンスルホニルクロリド (176 μ L, 1.859 mmol) を添加した。氷冷下で5分攪拌後室温へ昇温し室温にて0.5時間攪拌した。混合物にISOLUTE (登録商標) HM-N (Biotage社製) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/n-ヘキサンおよびDCM) にて数回精製し、化合物SS30をジアステレオマー混合物として46.88 mg (収率28%) 得た。

MS (ESI) $m/z = 183.2$ [M+H]⁺ (分析条件LTQ method_1)

¹H-NMR (BRUKER Ascend 400, 400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.40-3.33 (1H, m), 3.11-3.05 (1H, m), 1.55-1.27 (8H, m), 1.14 (3H, d and d, J = 6.4 Hz), 0.91-0.85 (9H, m)

[0136] 実施例2：メンブタン上のペプチド合成において、伸長工程について試薬の種類および反応条件の検討をした実験

ペプチドの固相合成においては、脱Fmoc、メンブタン洗浄を経て、続くアミノ酸の伸長を行う。本実験では、メンブタンに担持されたペプチド配列 (化合物SS02) を用い、アミノ酸の伸長工程の試薬や当量比などの反応条件を変更し、目的の伸長反応の反応効率の程度を比較することでメンブタン上のペプチド合成における好ましい試薬および反応条件の範囲を特定した。

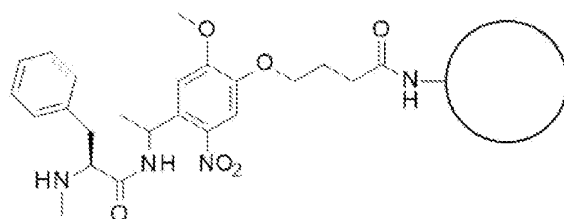
アミノ酸の伸長効率を評価するにあたり、出発原料残存率を確認するためにGlycine cappingを実施した。すなわち、目的のアミノ酸の伸長反応を実施した後、続けてFmoc-Gly-OHの伸長反応を実施し未反応のアミンと反応させた。その後実施例1-2に記載の方法でメンブタンから切り出し、目的のアミノ酸が伸長したペプチドとFmoc-Gly

－OHが伸長したペプチドのUVエリア値を比較することで目的のアミノ酸の伸長効率を算出した。

[0137] 参照例 2－1 : Methods Mol. Biol., 2009, 570, 157-174記載の反応条件でのメンブラン上のペプチド合成実験

参照例 2－1－1 : メンブラン上に担持されたMePhe上のFmoc基の除去

[化30]

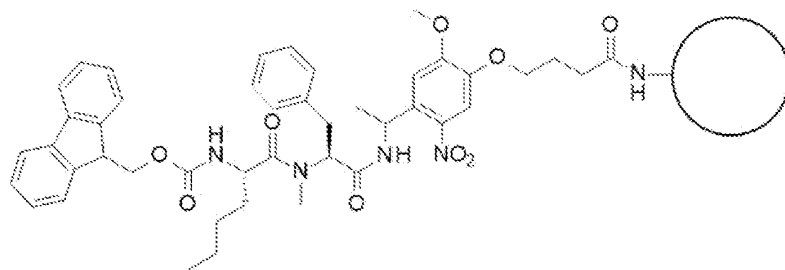


(化合物SS08)

実施例 1－2－1 にて既に調製済みのペプチドの担持されたメンブランディスク (化合物SS02) 1枚を反応容器に入れ、DBUのDMF溶液 (2% v/v) を4.0 μ L添加し、室温にて5分間反応させた後、再度4.0 μ L添加し室温にて10分間反応させてFmoc基の脱保護を行った。溶液を排出した後、メンブランをDMF (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で4回、エタノール (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で3回洗浄し、空気乾燥することで化合物SS08を得た。

[0138] 参照例 2－1－2 : メンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc－Nle－OHの伸長反応

[化31]



(化合物SS09)

ペプチド合成機 (MultiPep RS ; Intavis社製) を使用したメンブラ

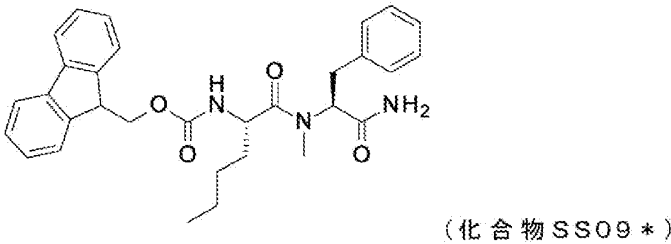
ン上への天然ペプチド合成の報告 (Methods Mol. Biol., 2009, 570, 157-174) を参考に、メンブラン上のMePheに対するFmoc-Nle-OHの伸長反応を行った。

Fmoc-Nle-OH (0.45 mol/L) とHOBt (0.675 mol/L) をNMPに溶解させた溶液とDIC (1.485 mol/L) をNMPに溶解させた溶液を3:1の比率で混合し、15分間静置した後にその溶液を反応容器に入れた参照例2-1-1で得られたメンブラン (化合物SS08) に対し1.2 μ L添加し、室温で所定の時間静置した。続いて、メンブランをDMF (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で3回、エタノール (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で3回洗浄し、空気乾燥した。続いてFmoc-Gly-OH (0.6 mol/L) とHOAt (0.375 mol/L) をNMPに溶解させた溶液とDIC (0.71 mol/L) をDMFに溶解させた溶液を5:6の比率で混合し、10~15分間静置した後にその溶液を反応容器内のメンブランに対し3.0 μ L添加した。蓋をして室温で25~60分間静置した後、溶液をメンブランから排出し、再度上記のFmoc-Gly-OHの伸長反応を行った。溶液を排出した後、メンブランをDMF (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で3~4回、エタノール (メンブランディスク1枚あたり100 μ L) で3回洗浄し、空気乾燥した。

[0139] 参照例2-1-3: メンブラン上に担持されたFmoc-Nle-MePheの切り出しおよび分析

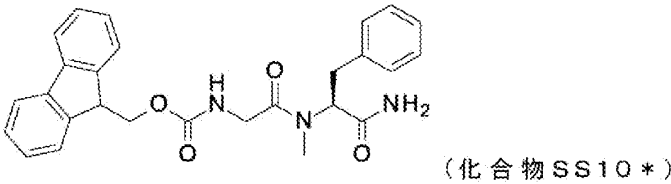
参照例2-1-2で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド (化合物SS09*) およびFmoc-Nle-OHの代わりにFmoc-Gly-OHが伸長したペプチド (化合物SS10*) の生成を確認した。

[化32]



LCMS (ESI) m/z=514.5 [M+H]⁺
保持時間：3.64分(分析条件SQDAA05long)

[化33]



LCMS (ESI) m/z=458.3 [M+H]⁺
保持時間：3.20分(分析条件SQDAA05long)

[0140] LCデータの各化合物ピークのUVエリア値(波長299nm)を用いて、伸長効率を以下の式から算出した。

伸長効率(%)=(SS09*のUVエリア値)/(SS09*のUVエリア値とSS10*のUVエリア値の合算値)×100

[0141] 参照例2-1の条件および結果を以下の表6に示す。

[表6]

参照例番号	No.	Fmoc-保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボシムド (反応溶液中濃度)	反応溶媒	反応時間	目的ペプチド	伸長効率
2-1	1	Fmoc-Nhe-OH (0.34mol/L)	HOBt (0.51mol/L)	DIC (0.37mol/L)	NMP	30分	SS09*	3%
	2					60分		4%

Methods Mol. Biol., 2009, 570, 157-174を参考にした反応条件における伸長効率は、60分後でも4%と極めて低い結果であった。

[0142] 参照例2-2：WO2018/225851記載の反応条件でのメンブラン上のペプチド合成実験

参照例2-2-1：メンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc

－N l e－OHの伸長反応

参照例 2－1－1 で得られたメンブラン（化合物 S S O 8）を使用し、N－置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法（W O 2 0 1 8／2 2 5 8 5 1）を参考に反応条件を設定し、メンブラン上の M e P h e に対する F m o c－N l e－OH の伸長反応を行った。

F m o c－N l e－OH（0. 6 m o l／L）と H O A t（0. 3 7 5 m o l／L）を NMP もしくは DMF に溶解させた溶液と D I C（0. 7 1 m o l／L）を DMF に溶解させた溶液を 5：6 の比率で混合し、1 5 分間静置した後にその溶液を反応容器に入れた参照例 2－1－1 で得られたメンブラン（化合物 S S O 8）に対し 1. 2 μ L 添加し、室温で所定の時間静置した。以降は参照例 2－1 と同様の方法で行った。

[0143] 参照例 2－2－2：メンブラン上に担持された F m o c－N l e－M e P h e の切り出しおよび分析

参照例 2－2－1 で得られたメンブランに対し実施例 1－2 に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物 S S O 9＊）および F m o c－N l e－OH の代わりに F m o c－G l y－OH が伸長したペプチド（化合物 S S 1 0＊）の生成を確認した。伸長効率は参照例 2－1 記載の計算式に従い算出した。

参照例 2－2 の条件および結果を以下の表 7 に示す。

[表7]

参照例番号	Nlc	Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジイミド (反応溶液中濃度)	反応溶媒	反応時間	目的ペプチド	伸長効率
2－2	1	Fmoc-Nle-OH (0.27mol/L)	HOAt (0.17mol/L)	DMC (0.38mol/L)	NMP/DMF=5/5	30分	SS09*	50%
	2				DMF	60分		52%
	3					30分		52%
	4					60分		54%

[0144] W O 2 0 1 8／2 2 5 8 5 1 記載の反応条件における伸長効率は、6 0 分後でも 5 2 %（NMP/DMF＝5/6 の混合溶媒使用）および 6 4 %（DMF 溶媒使用）と低い結果であった。なお、反応時間 3 0 分と 6 0 分で伸長効率の変化は軽微であった。

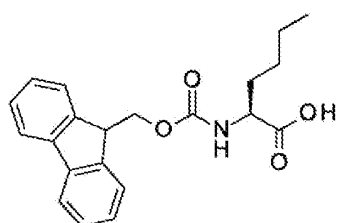
[0145] 参照例 2－3：試薬高濃度条件でのメンブラン上のペプチド合成実験

参照例 2-3-1 : メンブラン上に担持された Me P h e に対する F m o c - N l e - O H の伸長反応

参照例 2-1-1 で得られたメンブラン（化合物 S S 0 8）を使用し、伸長効率を上げるために試薬濃度を上げてメンブラン上の Me P h e に対する F m o c - N l e - O H の伸長反応を行った。

F m o c - N l e - O H (0.62 mol/L) と H O A t (0.193 mol/L もしくは 0.387 mol/L) を N M P / D M F = 5 / 6 もしくは 6.68 / 4.34 の溶液、あるいは D M F に溶解させた溶液と D I C (原液) を 10 : 1.353 の比率で混合し、15 分間静置した後にその溶液を参照例 2-1-1 で得られたメンブラン（化合物 S S 0 8）に対し 1.2 μ L 添加し、室温で 60 分間静置した。この際、15 分間静置した溶液の一部を Me C N で希釈し、その溶液を L C M S を用いて分析した（分析条件 S Q D F A 0 5 __ 1）。また、反応時間経過したメンブランに 1 mL の Me C N を添加し、メンブランに染み込んだ反応溶液を溶解させ、その Me C N 溶液を L C M S を用いて分析した（分析条件 S Q D F A 0 5 __ 1）。

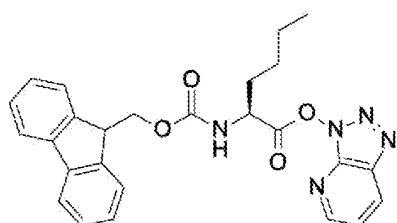
[化34]



(Fmoc-Nle-OH)

L C M S (E S I) $m/z = 354.3$ [M+H]⁺
保持時間 : 0.89 分 (分析条件 S Q D F A 0 5 __ 1)

[化35]



(化合物 SS11)

LCMS (ESI) $m/z = 472.3 [M+H]^+$

保持時間：1.02分（分析条件SQDFA05_1）

[0146] それぞれの分析結果における活性エステル（化合物SS11）のUVエリア値の割合（波長299nm）を以下の式から算出した。

活性エステルのUVエリア値の割合（％）＝（活性エステルのUVエリア値）／（Fmoc-Nle-OHのUVエリア値＋活性エステルのUVエリア値＋ピーク1のUVエリア値＋ピーク2のUVエリア値）×100

なお、ピーク1は保持時間1.07分のピークで、Fmoc-Nle-OHとDICから成る生成物と推定され、ピーク2は保持時間1.22分のピークで、Fmoc-Nle-OHの二量体と推定される。

以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0147] 参照例2-3-2：メンブラン上に担持されたFmoc-Nle-Meph eの切り出しおよび分析

参照例2-3-1で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS09*）およびFmoc-Nle-OHの代わりにFmoc-Gly-OHが伸長したペプチド（化合物SS10*）の生成を確認した。伸長効率は参照例2-1記載の計算式に従い算出した。

縮合剤としてDICを用いた試薬高濃度条件における伸長効率は、後述の表9に記載の通り、83%～96%と高い結果を与えた。しかしながら、いずれの条件においても析出物が発生し、自動合成に適用することが困難な条件であった。

[0148] 実施例2-4：DICをDsBCに変えた反応条件でのメンブラン上のペプチド合成実験

実施例2-4-1：メンブラン上に担持されたMeph eに対するFmoc-Nle-OHの伸長反応

参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、DICをDsBCに変更した反応条件でメンブラン上のMeph eに対するF

Fmoc-Nle-OH の伸長反応を行った。

Fmoc-Nle-OH (0.63 mol/L)と HOAt (0.198 mol/L もしくは 0.397 mol/L)を $\text{NMP/DMF}=5/6$ もしくは $6.68/4.34$ の溶液、あるいは DMF に溶解させた溶液と DsbC (原液)を $10:1.642$ の比率で混合し、 15 分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン (化合物 SS08) に対し $1.2 \mu\text{L}$ 添加し、室温で所定の時間静置した。この際、 15 分間静置した溶液の一部を MeCN で希釈し、その溶液を LCMS を用いて分析した (分析条件 SQDFA05_1)。また、反応時間経過したメンブランに 1 mL の MeCN を添加し、メンブランに染み込んだ反応溶液を溶解させ、その MeCN 溶液を LCMS を用いて分析した (分析条件 SQDFA05_1)。それぞれの分析結果における活性エステル (化合物 SS11) の UV エリア値の割合 (波長 299 nm) を以下の式から算出した。

活性エステルの UV エリア値の割合 (%) = (活性エステルの UV エリア値) / (Fmoc-Nle-OH の UV エリア値 + 活性エステルの UV エリア値 + ピーク2の UV エリア値 + ピーク3の UV エリア値) $\times 100$

なお、ピーク3は保持時間 1.15 分のピークで、 Fmoc-Nle-OH と DsbC から成る生成物と推定され、ピーク2は保持時間 1.22 分のピークで、 Fmoc-Nle-OH の二量体と推定される。

以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0149] 実施例2-4-2：メンブラン上に担持された Fmoc-Nle-MePhe の切り出しおよび分析

実施例2-4-1で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド (化合物 SS09*) および Fmoc-Nle-OH の代わりに Fmoc-Gly-OH が伸長したペプチド (化合物 SS10*) の生成を確認した。伸長効率は参照例2-1記載の計算式に従い算出した。

参照例2-3および実施例2-4の条件および結果を以下の表8および表

9に示す。

[表8]

参照例または実施例番号	No.	Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジミド (反応溶液中濃度)	反応溶媒	反応時間
2-3	1	Fmoc-Met-OH (0.55mol/L)	HOAt (0.17mol/L)	DIC (0.77mol/L)	NMP/DMF=5/5	60分
	2		NMP/DMF=6.68/4.34			
	3		DMF			
	4		NMP/DMF=5/5			
	5		NMP/DMF=6.68/4.34			
2-4	6		HOAt (0.34mol/L)	DMF		
	1	Fmoc-Met-OH (0.55mol/L)	HOAt (0.17mol/L)	DsBC (0.77mol/L)	NMP/DMF=5/5	60分
	2		NMP/DMF=6.68/4.34			
	3		DMF			
	4		NMP/DMF=5/5			
	5		NMP/DMF=6.68/4.34			
6	DMF					

[表9]

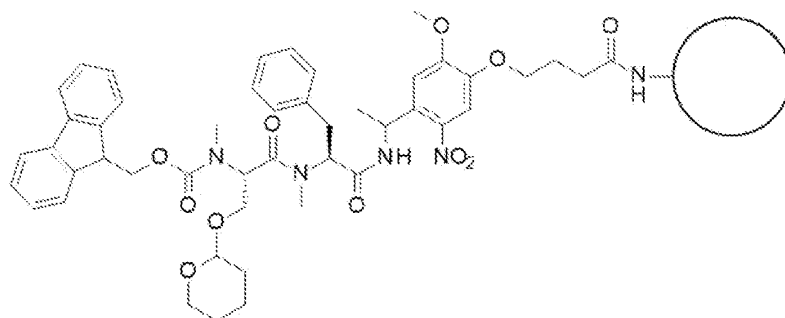
参照例または実施例番号	No.	Preactivation: 15分 後の析出物の有無	spot時の活性エステルの UVエリアの割合	60分後の活性エステルの UVエリアの割合	活性エステルの 残存率	目的ペプチド	伸長効率
2-3	1	有	32%	8%	25%	SSDS*	93%
	2		37%	9%	24%		88%
	3		31%	14%	47%		96%
	4		56%	12%	22%		90%
	5		64%	15%	23%		83%
2-4	6	無	55%	17%	31%	SSDS*	93%
	7		32%	18%	59%		97%
	8		32%	30%	63%		97%
	9		36%	36%	83%		98%
	10		57%	17%	30%		91%
	11		55%	18%	29%		90%
	12		56%	21%	38%		94%

縮合剤としてDsBCを用い、試薬高濃度条件において縮合を検討した結果、表9に記載の通り伸長効率は90%~98%と高い結果を示した。本条件ではいずれも析出物の発生がないことから、自動合成への適用が可能である。

[0150] 実施例2-5：他のFmoc保護アミノ酸および種々の活性化剤を用いたメンブラン上のペプチド合成におけるDsBC使用とDIC使用の効果比較実験

実施例2-5-1：DsBC使用条件でのメンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc-MeSer(THP)-OHの伸長反応

[化36]



(化合物SS12)

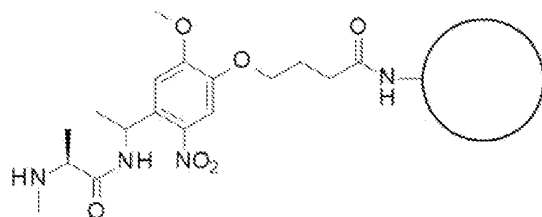
参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、実施例2-4-1の反応条件を参考にメンブラン上のMePheに対するFmoc-MeSer(THP)-OHの伸長反応を行った。Fmoc-MeSer(THP)-OH (0.63 mol/L) とHOAtもしくはHOObt (0.198 mol/L) をDMFに溶解させた溶液とDsBC（原液）を10:1.642の比率で混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）に対し1.2 μL添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0151] 参照例2-5-2：DIC使用条件でのメンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc-MeSer(THP)-OHの伸長反応

参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、参照例2-3-1の反応条件を参考にメンブラン上のMePheに対するFmoc-MeSer(THP)-OHの伸長反応を行った。Fmoc-MeSer(THP)-OH (0.62 mol/L) とHOAtもしくはHOObt (0.193 mol/L) をDMFに溶解させた溶液とDIC（原液）を10:1.353の比率で混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）に対し1.2 μL添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0152] 実施例2-5-3：DsBC使用条件でのメンブラン上に担持されたMeAlaに対するFmoc-MeAsp(OPis)-OHの伸長反応

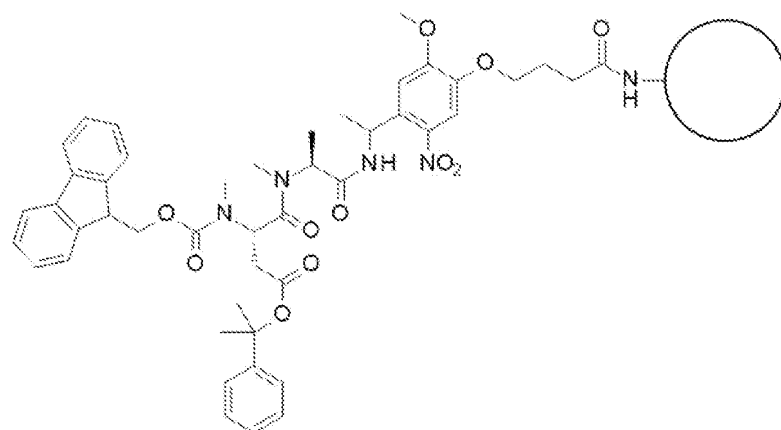
[化37]



(化合物 SS31)

実施例 1-2-1 にて既に調製済みのペプチドの担持されたメンブランディスク (化合物 SS24) を用いて、参照例 2-1-1 記載の方法に従い Fmoc 基を除去し、化合物 SS31 を得た。

[化38]



(化合物 SS32)

得られたメンブラン (化合物 SS31) を使用し、実施例 2-4-1 の反応条件を参考にメンブラン上の MeAla に対する Fmoc-MeAsp (OPis)-OH の伸長反応を行った。Fmoc-MeAsp (OPis)-OH と Oxyma (0.198 mol/L) を DMF に溶解させた溶液と DsBC (原液) を 10 : 1.642 の比率で混合し、15 分間静置した後、その溶液をメンブラン (化合物 SS31) に対し 1.2 μL 添加し、室温で 30 分間静置した。以降は参照例 2-1 と同様の方法で行った。

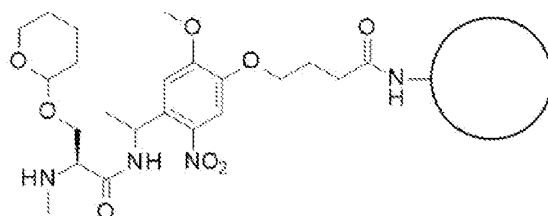
[0153] 参照例 2-5-4 : DIC 使用条件でのメンブラン上に担持された MeAla に対する Fmoc-MeAsp (OPis)-OH の伸長反応

実施例 2-5-3 で得られたメンブラン (化合物 SS31) を使用し、参

照例 2-3-1 の反応条件を参考にメンブラン上の MeAla に対する Fmoc-MeAsp(OPis)-OH の伸長反応を行った。Fmoc-MeAsp(OPis)-OH (0.62 mol/L) と OxyMa (0.193 mol/L) を DMF に溶解させた溶液と DIC (原液) を 10:1.353 の比率で混合し、15 分間静置した後にその溶液をメンブラン (化合物 SS31) に対し 1.2 μ L 添加し、室温で 30 分間静置した。以降は参照例 2-1 と同様の方法で行った。

[0154] 実施例 2-5-5 : DsBC 使用条件でのメンブラン上に担持された MeSer(THP) に対する Fmoc-MePhe-OH の伸長反応

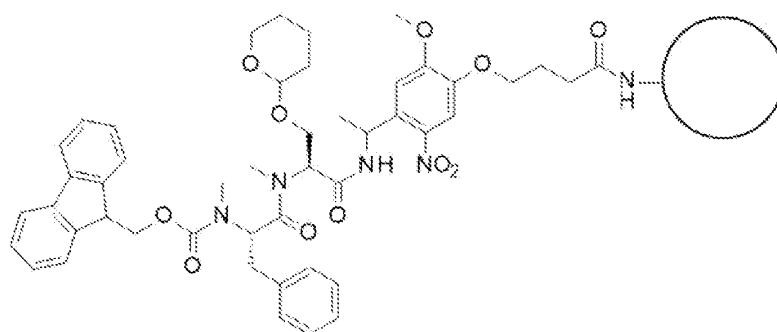
[化39]



(化合物 SS33)

実施例 1-2-1 にて既に調製済みのペプチドの担持されたメンブランディスク (化合物 SS25) を用いて、参照例 2-1-1 記載の方法に従い Fmoc 基を除去し、化合物 SS33 を得た。

[化40]



(化合物 SS34)

得られたメンブラン (化合物 SS33) を使用し、実施例 2-4-1 の反応条件を参考にメンブラン上の MeSer(THP) に対する Fmoc-MePhe-OH の伸長反応を行った。Fmoc-MePhe-OH (0.6

3 mol/L) と HOAt (0.198 mol/L) を DMF に溶解させた溶液と DsBC (原液) を 10 : 1.642 の比率で混合し、15 分間静置した後にその溶液をメンブラン (化合物 SS33) に対し 1.2 μ L 添加し、室温で 30 分間静置した。以降は参照例 2-1 と同様の方法で行った。

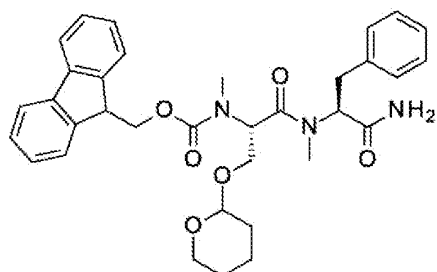
[0155] 参照例 2-5-6 : DIC 使用条件でのメンブラン上に担持された MeSer (THP) に対する Fmoc-MePhe-OH の伸長反応

実施例 2-5-5 で得られたメンブラン (化合物 SS33) を使用し、参照例 2-3-1 の反応条件を参考にメンブラン上の MeSer (THP) に対する Fmoc-MePhe-OH の伸長反応を行った。Fmoc-MePhe-OH (0.62 mol/L) と HOAt (0.193 mol/L) を DMF に溶解させた溶液と DIC (原液) を 10 : 1.353 の比率で混合し、15 分間静置した後にその溶液をメンブラン (化合物 SS33) に対し 1.2 μ L 添加し、室温で 30 分間静置した。以降は参照例 2-1 と同様の方法で行った。

[0156] 実施例 2-5-7 : メンブラン上に担持された各種ペプチドの切り出しおよび分析

実施例 (参照例) 2-5-1 ~ 2-5-6 で得られたメンブランに対し実施例 1-2 に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド (化合物 SS12*、SS32* および SS34*) ならびに望みの Fmoc 保護アミノ酸の代わりに Fmoc-Gly-OH が伸長したペプチド (化合物 SS10*、SS35* および SS36*) (これらを Glycine capping 体と呼ぶこともある) の生成を確認した。

[化41]

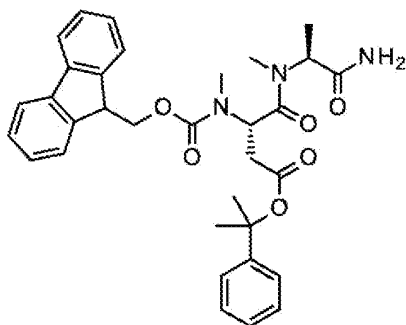


(化合物 SS12*)

LCMS (ESI) $m/z = 586.5$ $[M+H]^+$

保持時間：3.61分 (分析条件SQDAA05long)

[化42]

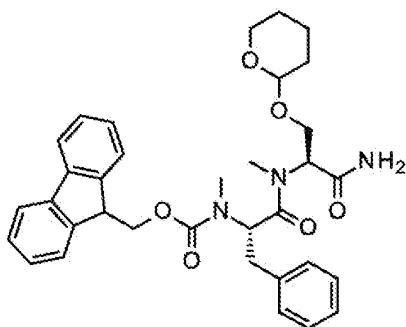


(化合物SS32*)

LCMS (ESI) $m/z = 572.5$ $[M+H]^+$

保持時間：3.52分 (分析条件SQDAA05long)

[化43]

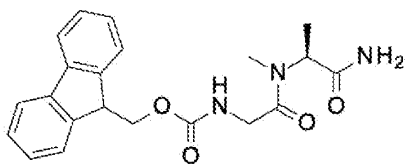


(化合物SS34*)

LCMS (ESI) $m/z = 586.4$ $[M+H]^+$

保持時間：3.56分 (分析条件SQDAA05long)

[化44]

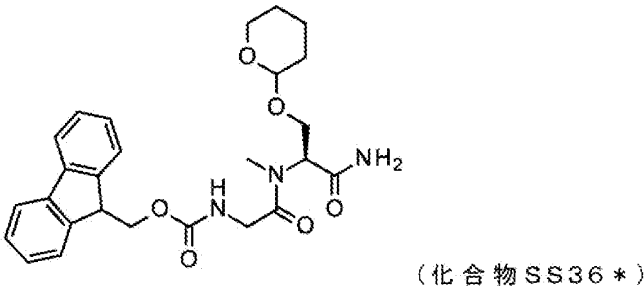


(化合物SS35*)

LCMS (ESI) $m/z = 382.3$ $[M+H]^+$

保持時間：2.58分 (分析条件SQDAA05long)

[化45]



LCMS (ESI) m/z=482.4 [M+H]⁺
保持時間：3.03分(分析条件SQDAA05long)

[0157] LCデータの各化合物ピークのUVエリア値(波長299nm)を用いて、伸長効率を参照例2-1記載の計算式に従い以下の式から算出した。
伸長効率(%)=(目的ペプチドのUVエリア値)/(目的ペプチドのUVエリア値とGlycine capping体のUVエリア値の合算値)×100

実施例(参照例)2-5-1~2-5-6の条件および結果を以下の表10に示す。

[表10]

実施例もしくは参照例	試料	原料のマンブレンの化学物質番号およびマンブレン上のアミノ酸	Fmoc-保護アミノ酸(反応溶媒中濃度)	活性化剤(反応溶媒中濃度)	カルボジイミド(反応溶媒中濃度)	Preactivation 15分後の析出物の有無	目的ペプチド	Glycine capping体	伸長効率
実施例2-5-1	1	S126 MePhe	Fmoc-MeSer(Trt)-OH (0.55mol/L)	HQVA (0.17mol/L)	DEBC (0.77mol/L)	無	S12*	S14*	92%
	2			HQOBA (0.17mol/L)	DEBC (0.77mol/L)	無	S12*	S10*	97%
	3			HQVA (0.17mol/L)	DEC (0.77mol/L)	※	S12*	S13*	93%
参照例2-5-2	4			HQOBA (0.17mol/L)	DEC (0.77mol/L)	※	S12*	S10*	99%
実施例2-5-3	5	S131 MeAsp	Fmoc-MeAsp(OtBu)-OH (0.75mol/L)	Drypsa (0.17mol/L)	DEBC (0.77mol/L)	無	S13*	S13B*	77%
参照例2-5-4	6	S133 MeSer(Trt)	Fmoc-MePhe-OH (0.55mol/L)	Drypsa (0.17mol/L)	DEC (0.77mol/L)	※	S13*	S13B*	98%
実施例2-5-5	7			HQOBA (0.17mol/L)	DEBC (0.77mol/L)	無	S134*	S13B*	99%
参照例2-5-6	8			HQOBA (0.17mol/L)	DEC (0.77mol/L)	※	S134*	S13B*	99%

縮合剤としてDICを用いた条件においては、いずれも析出物が発生し自動合成に適用することが困難な条件であった。一方で縮合剤としてDEBCを用いた本条件では、種々のFmoc保護アミノ酸および活性化剤を用いた種々のペプチドへの縮合においても析出物の発生がなく、自動合成に適用が可能な条件であり、また伸長効率においてもDICを用いた条件と同等かそれ以上の高い伸長効率であった。

[0158] 実施例 2-6 : ウレアの溶解度検証実験

実施例 2-6-1 : D I Cウレア、D s B Cウレアおよび t B E Cウレアの DMF に対する溶解度確認実験

参照例 2-3、実施例 2-4 および 2-5 の伸長工程にて実施されている P reactivation の際のカルボジイミドの濃度は 0.77 mol/L である。カルボジイミドが全てウレアに変換された場合にその析出が起こるリスクを確認するため、参照例 2-3 で析出物が確認された D I C および実施例 2-4 および 2-5 にて析出物が確認されなかった D s B C 由来のウレアを用いて、それらの NMP および DMF への溶解度を以下の手順に従い確認した。

1. 5 mL スクリューキャップバイアルに実施例 1-3 にて合成した D I C ウレア（化合物 S S O 5）および D s B C ウレア（化合物 S S O 6）を表 11 記載の重量測り取り、各濃度になるように NMP あるいは DMF を添加した。室温にて 5 分以上攪拌し、その後静置してウレアの溶解の有無を確認した。その結果、D I C ウレアである化合物 S S O 5 は NMP では 0.34 M 以上、DMF では 0.17 M 以上の濃度で固体が溶解しきらなかったのに対し、D s B C ウレアである化合物 S S O 6 は NMP、DMF いずれも 0.77 M で完全に溶解し 24 時間以上経過しても再析出が確認されなかった。

[0159] [表11]

ウレア	ウレアの重量	溶媒	濃度	溶解したか
DICウレア (SS05)	5.26 mg	NMP	0.17 M	溶解した
	5.26 mg		0.34 M	溶解しきらなかった
	8.11 mg		0.38 M	溶解しきらなかった
	8.83 mg		0.51 M	溶解しきらなかった
	9.74 mg		0.77 M	溶解しきらなかった
	9.39 mg	DMF	0.17 M	溶解しきらなかった
	5.83 mg		0.34 M	溶解しきらなかった
	8.24 mg		0.38 M	溶解しきらなかった
	8.91 mg		0.51 M	溶解しきらなかった
	9.79 mg		0.77 M	溶解しきらなかった
DsBCウレア (SS06)	11.00 mg	NMP	0.77 M	溶解した
	15.06 mg	DMF	0.77 M	溶解した

[0160] 実施例 2-6-2 : t B E Cウレアの DMF に対する溶解度確認実験

D I C および D s B C とアルキル基の異なる t B E C を用いて実施例 2-6-1 と同様の実験を行った。1. 5 mL スクリューキャップバイアルに、実施例 1-3 にて合成した t B E C ウレア（化合物 S S O 7）を 10.18

mg および 10.19 mg 測り取り、0.77 mol/L になるようにそれぞれ NMP あるいは DMF を添加した。室温にて 5 分以上攪拌し、その後静置してウレアの溶解の有無を確認した。その結果、tBEC ウレアも DsBC ウレアと同様に完全に溶解し 24 時間以上経過しても再析出は確認されなかった。

[0161] 実施例 2-7：他のカルボジイミドを用いた高濃度条件でのメンブラン上のペプチド合成実験

実施例 2-7-1：tBEC を用いたメンブラン上に担持された MePhe に対する Fmoc-Nle-OH の伸長反応

参照例 2-1-1 で得られたメンブラン（化合物 S S 0 8）を使用し、実施例 2-4-1 の反応条件を参考に実施例 2-6 でそのウレアの DMF への良好な溶解度が確認された tBEC を用いてメンブラン上の MePhe に対する Fmoc-Nle-OH の伸長反応を行った。

Fmoc-Nle-OH (0.62 mol/L) と HOAt (0.194 mol/L) を DMF に溶解させた溶液と tBEC（原液）を 10 : 1.355 の比率で混合し、15 分間静置した後にその溶液を参照例 2-1-1 で得られたメンブラン（化合物 S S 0 8）に対し 1.2 μ L 添加し、室温で 30 分間静置した。以降は参照例 2-1 と同様の方法で行った。

[0162] 実施例 2-7-2：メンブラン上に担持された Fmoc-Nle-MePhe の切り出しおよび分析

実施例 2-7-1 で得られたメンブランに対し実施例 1-2 に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物 S S 0 9*）および Fmoc-Nle-OH の代わりに Fmoc-Gly-OH が伸長したペプチド（化合物 S S 1 0*）の生成を確認した。伸長効率は参照例 2-1 記載の計算式に従い算出した。

実施例 2-7 の結果を以下の表 1 2 に示す。

[0163]

[表12]

実施例番号	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジイミド (反応溶液中濃度)	Preactivation 15分後の 析出物の有無	伸長効率
2-7	HQAt (0.17mol/L)	tBEC (0.77mol/L)	無	87%

縮合剤としてD s B Cの代わりにt B E Cを用いた縮合反応においても、表12に記載の通り析出物の発生がなくF m o c保護アミノ酸の伸長が可能であった。

[0164] 実施例2-7-3：種々の縮合剤を用いたメンブラン上に担持されたMe P h eに対するF m o c-N l e-OHの伸長反応

参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物S S O 8）を使用し、実施例2-4-1の反応条件を参考に実施例1-4で合成した種々のカルボジイミドを用いてメンブラン上のMe P h eに対するF m o c-N l e-OHの伸長反応を行った。

以下の表13に従いF m o c-N l e-OHとH O A tをDMFに溶解させた溶液とカルボジイミド（原液）を混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物S S O 8）に対し1、2 μ L添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0165] [表13]

実施例番号	No.	溶液A		溶液B	溶液Aと溶液Bの混合比率
		Fmoc-Nle-OHの DMF溶液中濃度	HQAtのDMF溶液 濃度	カルボジイミド (原液の濃度)	
2-7	1	0.65mol/L	0.20mol/L	SS26 (4.66mol/L)	10 : 1.964
	2	0.68mol/L	0.21mol/L	SS27 (3.97mol/L)	10 : 2.402
	3	0.68mol/L	0.21mol/L	SS28 (4.54mol/L)	10 : 2.041
	4	0.68mol/L	0.20mol/L	SS29 (4.58mol/L)	10 : 2.020
	5	0.68mol/L	0.20mol/L	SS30 (4.58mol/L)	10 : 2.017

[0166] 実施例2-7-4：メンブラン上に担持されたF m o c-N l e-M e P h eの切り出しおよび分析

実施例2-7-3で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法

でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS09*）およびFmoc-Nle-OHの代わりにFmoc-Gly-OHが伸長したペプチド（化合物SS10*）の生成を確認した。伸長効率は参照例2-1記載の計算式に従い算出した。

結果を以下の表14に示す。

[0167] [表14]

実施例番号	No.	Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジミド (反応溶液中濃度)	Preactivation 15分後の 析出物の有無	伸長効率
2-7	1	Fmoc-Nle-OH (0.55mol/L)	HOAt (0.17mol/L)	SS26 (0.77mol/L)	無	98%
	2			SS27 (0.77mol/L)	無	99%
	3			SS28 (0.77mol/L)	無	97%
	4			SS29 (0.77mol/L)	有	99%
	5			SS30 (0.77mol/L)	無	98%

縮合剤として、いずれのカルボジミドを用いた場合でも、表14に記載の通り伸長効率は97%~99%と高い結果を示した。また、化合物SS26、SS27、SS28およびSS30を用いた縮合反応においては析出物の発生がなくFmoc保護アミノ酸の伸長が可能であり、自動合成に適用することが可能な条件であった。

[0168] 実施例2-8：種々の反応温度、反応溶媒および試薬の当量でのメンブラン上のペプチド合成実験

実施例2-8-1：種々の反応温度、反応溶媒および試薬の当量比でのメンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc-Nle-OHの伸長反応

参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、実施例2-4-1の反応条件をもとに反応温度、反応溶媒および試薬の当量を変更してメンブラン上のMePheに対するFmoc-Nle-OHの伸長反応を行った。

以下の表15に従いFmoc-Nle-OHとHOAtを各種反応溶媒に溶解させた溶液とDsBC（原液）を混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）に対し1.

2 μL 添加し、種々の温度で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0169] [表15]

実施例番号	No.	溶液A			溶液B (pH8.0の濃度)	溶液Aと溶液Bの混合比率	反応温度
		Fmoc-Gly-OHの濃度	HOBtの濃度	溶媒			
2-8	1	0.53mol/L	0.23mol/L	DMSO	5:48mol/L	10:1.642	40℃
	2	0.53mol/L	0.23mol/L	DMSO		10:1.642	50℃
	3	0.53mol/L	0.23mol/L	DMSO		10:1.642	室温
	4	0.53mol/L	0.23mol/L	トルエン/DMF=1/1		10:1.642	室温
	5	0.53mol/L	0.23mol/L	DCE/DMF=1/4		10:1.642	室温
	6	0.53mol/L	0.23mol/L	DCE/DMF=1/1		10:1.642	室温
	7	0.53mol/L	0.485mol/L	DMSO		10:1.642	室温
	8	0.53mol/L	0.14mol/L	DMSO		10:1.642	室温
	9	0.53mol/L	0.19mol/L	DMSO		10:1.385	室温
	10	0.53mol/L	0.19mol/L	DMSO		10:1.427	室温
	11	0.53mol/L	0.23mol/L	DMSO		10:2.487	室温

[0170] 実施例2-8-2：メンブラン上に担持されたFmoc-Nle-MePheの切り出しおよび分析

実施例2-8-1で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS09*）およびFmoc-Nle-OHの代わりにFmoc-Gly-OHが伸長したペプチド（化合物SS10*）の生成を確認した。伸長効率は参照例2-1記載の計算式に従い算出した。

結果を以下の表16に示す。

[0171] [表16]

実施例番号	No.	Fmoc-Gly-OH 20 反応溶液の濃度	HOBt 20 反応溶液の濃度	DMSO 20 反応溶液の濃度	トルエン/DMF/DCM/CH ₂ Cl ₂ 20 反応溶液の濃度	溶媒	反応温度	伸長効率 (%) 反応溶液の濃度	伸長効率 (%)
2-8	1	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	40℃	8	50%	
	2	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	50℃	8	50%	
	3	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	室温	8	50%	
	4	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	トルエン/DMF=1/1	室温	8	50%	
	5	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	DCE/DMF=1/4	室温	8	50%	
	6	0.53mol/L	0.23mol/L	3.00:0.34:1.41	DCE/DMF=1/1	室温	8	50%	
	7	0.53mol/L	0.485mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	室温	8	50%	
	8	0.53mol/L	0.14mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	室温	8	50%	
	9	0.53mol/L	0.19mol/L	3.00:0.34:1.41	DMSO	室温	8	50%	
	10	0.53mol/L	0.68mol/L	3.00:0.34:1.25	DMSO	室温	8	97%	
	11	0.53mol/L	1.08mol/L	3.00:0.34:1.20	DMSO	室温	8	98%	

表16に記載の通り、反応温度が40℃または60℃の場合においても、析出物の発生がなく、高い伸長効率を示した。また、ウレア系溶媒、ベンゼン系溶媒、ハロゲン系溶媒およびエーテル系溶媒を含む反応溶媒を用いた場合においても、析出物の発生がなく、高い伸長効率を示した。さらに、添加剤（ここではHOAtの場合を示した。）および縮合剤の比率を変更した場合においても、析出物の発生がなく、Fmoc保護アミノ酸の伸長が可能であった。

[0172] 一般的な天然アミノ酸から成るペプチドアレイ合成において広く実施されている伸長工程である参照例 2-1 記載の伸長工程において、また N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法として報告されている反応条件を参考にした参照例 2-2 の伸長工程においては、メンブラン上の MePhe に対する Fmoc-Nle-OH の伸長効率は 3~4% ならびに 50~64% にとどまった。伸長効率を上げるために試薬濃度を上げて伸長反応を行った参照例 2-3 記載の方法では伸長効率は 83%~96% まで向上したが、活性エステルの濃度は伸長反応開始後 30 分後の時点ですでに顕著に低下しており、また 15 分間の Preactivation の間に生成した DIC ウレアの析出が別の課題となることが確認できた。OxymaPure と DIC, DIC などのカルボジイミドとの組み合わせにおいて発生する青酸の回避を目的としてカルボジイミドの種類を検討した論文があり、DIC を使用した場合に比べると DsBC の使用はアミド化の反応性が劣る旨の記載がある (Org. Lett. 2021, 23, 6900-6904.)。しかしながら、参照例 2-3 記載の高濃度条件において、使用するカルボジイミドを DsBC へ変更した実施例 2-4 記載の方法では、参照例 2-3 の結果と比較して伸長効率の改善が確認された。この際、DIC を用いた場合よりも活性エステルが高濃度状態を長時間維持できていることが確認できた。さらに、DsBC を用いた場合には 15 分間の Preactivation の間に生成した DsBC ウレアの析出は見られなかった。また、実施例 2-5 の通り、本反応条件はアミノ酸や活性化剤が異なる場合にも適用可能であり、ウレアの析出は見られることなく望みのペプチドの生成が確認できた。実際、実施例 2-6 の通り DsBC は全てウレアに変換されても析出のリスクは極めて低いことが確認できた。また、DsBC とアルキル基の異なる tBEC においても同様にウレアの析出のリスクが極めて低いことが確認できた。さらに、化合物 SS26、SS27、SS28 および SS30 を用いた縮合反応においても、実施例 2-7 の通り Preactivation 溶液中に析出物は観測されず Fmoc 保護アミノ酸の伸長が可能であった。さらに、実施例 2-8 の通り、ウレアの析出なく望みのペプチドの生成が可能な DsBC を用いた

反応条件として、40℃、60℃などの昇温条件や多様な反応溶媒、試薬の当量比に関しても変更可能な点を確認した。

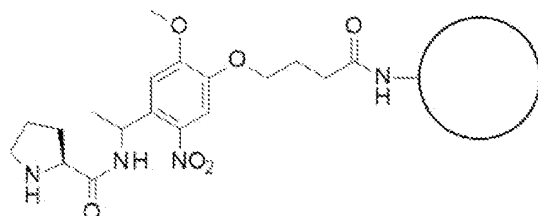
以上、実施例2の結果より、メンブラン上のペプチド合成の伸長工程において、伸長効率を改善しつつカルボジイミド由来のウレア析出の抑制が可能なカルボジイミドの種類含む反応条件の一部が特定された。

[0173] 実施例3：基質の適用範囲拡大、ペプチド合成機による自動合成への適用実験

本実験では、実施例2で特定したメンブラン上のペプチド合成における好まれる反応条件を用いて、他のアミノ酸の伸長反応を実施した。アミノ酸の伸長効率の評価は実施例2と同様の方法にて行った。また、本条件のペプチド合成機への適用を実施した。

[0174] 実施例3-1：様々なアミノ酸および活性化剤を用いたメンブラン上のペプチド合成実験

実施例3-1-1：メンブラン上に担持されたPro上のFmoc基の除去
[化46]

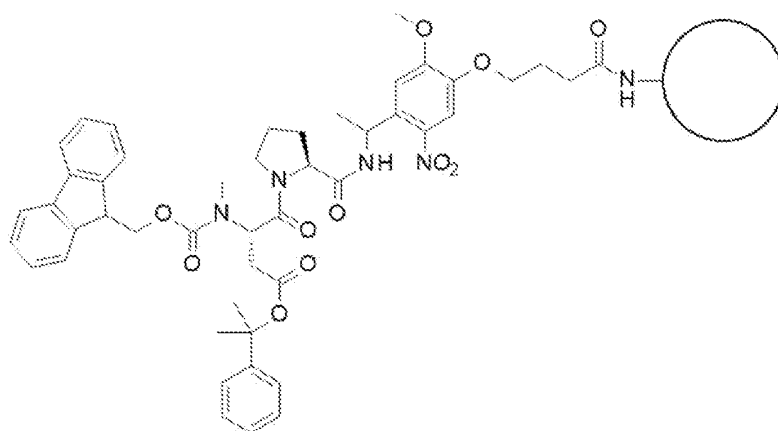


(化合物SS13)

実施例1-2-1にて既に調製済みのペプチドの担持されたメンブランディスク(化合物SS03)を用いて、参照例2-1-1記載の方法に従いFmoc基を除去し、化合物SS13を得た。

[0175] 実施例3-1-2：メンブラン上に担持されたProに対するFmoc保護アミノ酸の伸長反応

[化47]



(化合物SS14)

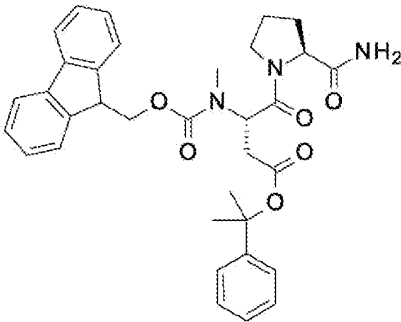
実施例3-1-1で得られたメンブラン（化合物SS13）を使用し、DICをtBECに変更した反応条件でメンブラン上のProに対するFmoc-Asp(OPis)-OHの伸長反応を行った。

Fmoc-Asp(OPis)-OH (0.62 mol/L) と活性化剤 (0.194 mol/L もしくは 0.387 mol/L) をDMFに溶解させた溶液とtBEC（原液）を10:1.355の比率で混合し、15分間静置した後にその溶液をメンブランに対し1.2 μL添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0176] 実施例3-1-3：メンブラン上に担持された各種ペプチドの切り出しおよび分析

実施例3-1-2で得られたメンブランに対し実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS14*）および望みのFmoc保護アミノ酸の代わりにFmoc-Gly-OHが伸長したペプチド（化合物SS15*）の生成を確認した。

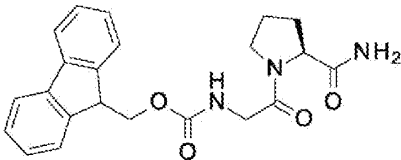
[化48]



(化合物 SS14*)

LCMS (ESI) m/z = 584.5 [M+H]⁺
保持時間：3.55分 (分析条件SQDAA05long)

[化49]



(化合物 SS15*)

LCMS (ESI) m/z = 394.3 [M+H]⁺
保持時間：2.61～2.62分 (分析条件SQDAA05long)
伸長効率は実施例2～5記載の計算式に従い算出した。
結果を以下の表17に示す。

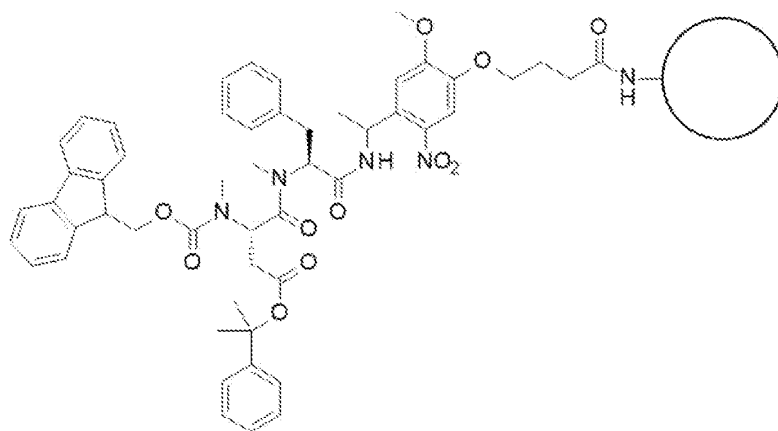
[0177] [表17]

実施例番号	No.	原料のメンブレン化合物番号 およびメンブレン上のアミノ酸	Fmoc-保護アミノ酸	活性化剤 (反応溶液中濃度)	Preactivation 15分後 の析出物の有無	目的ペプチド	Glycine conjugate	伸長効率
例1	1	SG13 Pro	Fmoc-MetAsp(OPiv)-OH	HQAT (0.17mol/L)	無	SS14*	SS15*	84%
	2			HQAT (0.34mol/L)				82%
	3			HQAT (0.17mol/L)				97%
	4			Oxynta (0.17mol/L)				98%

いずれの配列およびいずれの活性化剤を用いた場合においても、Preactivation溶液中の析出物は観測されず目的ペプチドの合成が可能であった。

[0178] 参照例3-1-4：DIC使用条件でのメンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc保護アミノ酸の伸長反応

[化50]



(化合物SS37)

種々のN-アルキルアミノ酸の伸長反応について、本条件の有効性を確認すべく、参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、参照例2-3-1の反応条件を参考にメンブラン上のMePheに対するFmoc-Asp(OPis)-OHの伸長反応を行った。

後述の表18に従いFmoc-Asp(OPis)-OHとOxymaをDMFに溶解させた溶液とDIC（原液）を混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）に対し1.2 μ L添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例2-1と同様の方法で行った。

[0179] 実施例3-1-5：メンブラン上に担持されたMePheに対するFmoc保護アミノ酸の伸長反応

参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）を使用し、実施例2-7-3の反応条件を参考に実施例1-4で合成した種々のカルボジイミドを用いてメンブラン上のMePheに対するFmoc-Asp(OPis)-OHの伸長反応を行った。

以下の表18に従いFmoc-Asp(OPis)-OHとOxymaをDMFに溶解させた溶液と各種カルボジイミド（原液）を混合し、15分間静置した後にその溶液を参照例2-1-1で得られたメンブラン（化合物SS08）に対し1.2 μ L添加し、室温で30分間静置した。以降は参照例

2－1と同様の方法で行った。

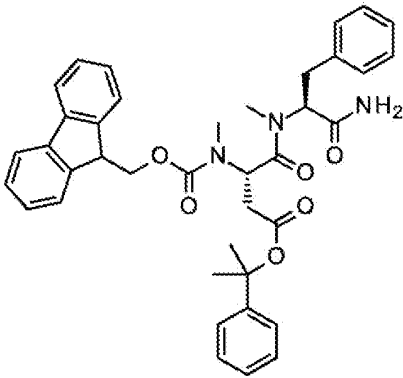
[0180] [表18]

実施例もしくは 参照例番号	No.	溶液A		溶液B	溶液Aと溶液Bの混合比率
		Fmoc-MeAspi(OPie)-OHの DMF溶液中濃度	OxymaのDMF溶液中濃度	カルボジミド (neatの濃度)	
参照例3－1～4	1	0.62mol/L	0.19mol/L	DIC (0.48mol/L)	10：1.353
	2	0.63mol/L	0.20mol/L	DiBC (5.48mol/L)	10：1.642
	3	0.65mol/L	0.20mol/L	SS26 (4.89mol/L)	10：1.864
実施例3－1～5	4	0.68mol/L	0.21mol/L	SS27 (3.97mol/L)	10：2.402
	5	0.66mol/L	0.21mol/L	SS28 (4.54mol/L)	10：2.041
	6	0.66mol/L	0.20mol/L	SS29 (4.68mol/L)	10：2.023
	7	0.66mol/L	0.20mol/L	SS30 (4.59mol/L)	10：2.017

[0181] 実施例3－1－6：メンブラン上に担持された各種ペプチドの切り出しおよび分析

参照例3－1－4ならびに実施例3－1－5で得られたメンブランに対し実施例1－2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS37＊）および望みのFmoc保護アミノ酸の代わりにFmoc－Gly－OHが伸長したペプチド（化合物SS10＊）の生成を確認した。

[化51]



（化合物SS37＊）

LCMS（ESI） m/z＝648.5 [M+H]⁺

保持時間：3.80分（分析条件SQDAA05long）

伸長効率は実施例2－5記載の計算式に従い算出した。

結果を以下の表19に示す。

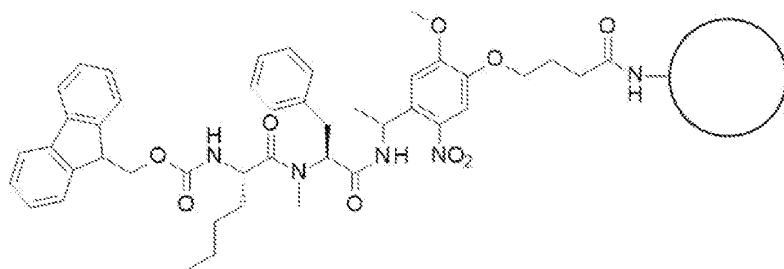
[0182] [表19]

実施例または参照例 番号	No.	Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジイミド (反応溶液中濃度)	Presactivation 15分後の 析出物の有無	伸長効率
参照例3-1-4	1	Fmoc-MeAsp(OPiv)-OH (0.55mol/L)	Chyma (0.17mol/L)	DIC (0.77mol/L)	有	49%
実施例3-1-5	2			DsBC (0.77mol/L)	無	55%
	3			SS26 (0.77mol/L)	無	56%
	4			SS27 (0.77mol/L)	無	64%
	5			SS28 (0.77mol/L)	無	59%
	6			SS29 (0.77mol/L)	有	71%
	7			SS30 (0.77mol/L)	無	54%

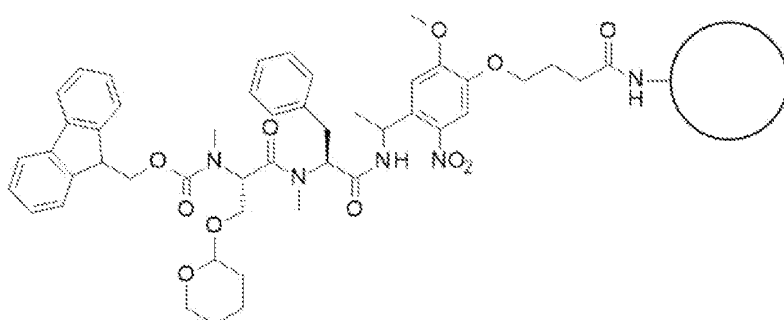
縮合剤としてD I Cを用いた条件においては、伸長効率は49%にとどまり、さらに析出物が発生し自動合成に適用することが困難な条件であった。一方で縮合剤としてD s B Cや種々のカルボジイミドを用いた場合では、表19に記載の通り伸長効率は55%～71%とD I C使用時よりも高い結果を示した。またD s B Cや化合物SS26、SS27、SS28およびSS30を用いた縮合反応においては析出物の発生がなくF m o c保護アミノ酸の伸長が可能であり、自動合成に適用することが可能な条件であった。

[0183] 実施例3-2：ペプチド合成機によるメンブラン上のペプチド合成実験

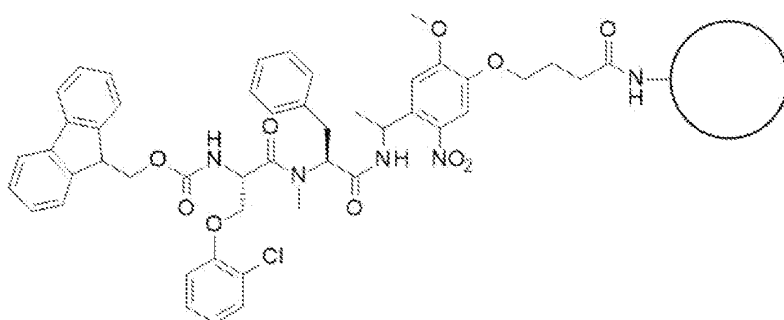
[化52]



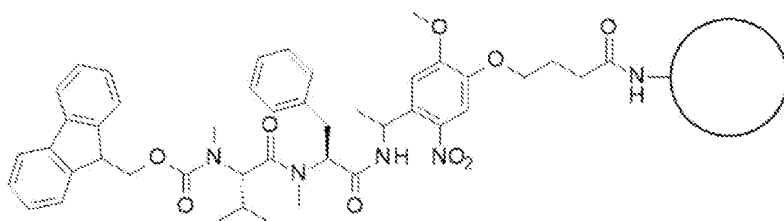
(化合物SS09)



(化合物SS12)



(化合物SS16)



(化合物SS17)

[0184] 実施例2で特定したメンブラン上のペプチド合成における好まれる反応条件を自動合成機での合成に適用した。ペプチド合成機 (Multi pep RS ; I n t

a v i s社製)を用いて、F m o c法により行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従い、以下の方法で実施した。なお、F m o c保護アミノ酸の種類が違っていても安定して高い伸長効率を獲得するために、自動合成機ではダブルカップリングを実施した。例えば、シングルカップリングで伸長効率が90%程度であれば、ダブルカップリングを実施することで伸長効率は99%程度となることが期待される。

伸長するF m o c保護アミノ酸(0.63 mol/L)とH O A tもしくはO x y m aもしくはH O O B t(0.198 mol/Lもしくは0.397 mol/L)をDMFに溶解させて溶液1を調製した。D s B Cは原液のまま溶液2として用いた。

F m o c保護アミノ酸伸長後にG l y c i n e c a p p i n gをするために、F m o c-G l y-OH(0.6 mol/L)とH O A t(0.375 mol/L)をNMPに溶解させて溶液3を調製した。D I C(0.71 mol/L)とDMFを混合し、溶液4を調製した。

CelluSpots 384 frame with acid stable discs(I n t a v i s社製)に実施例1-2-1で得られたメンブラン(化合物S S O 2)を装着し、ペプチド合成機にセットした。溶液1~4をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

[0185] 脱F m o c工程

D B UのDMF溶液(2% v/v)を、メンブランディスク1枚あたり2.0 μLおよび4.0 μL添加し、室温にてF m o c基の脱保護を行った。2.0 μL添加後に5分間反応させた後、一度溶液を排出し、4.0 μL添加しさらに10分間反応させ、その後溶液を排出した。続いてDMF(メンブランディスク1枚あたり25 μL)で7回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり25 μL)で2回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μL)で2回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり25 μL)で2回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。

[0186] 伸長工程(ダブルカップリング)

溶液1と溶液2を10:1.642の比率で合成機のmixing vialで混合し15分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり1.2 μ L添加し、室温にて40分間反応することでメンブランディスク上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液を排出した。次いでDMF（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で4回、エタノール（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で3回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。その後縮合反応、洗浄および乾燥を更にもう1回繰り返して行った。

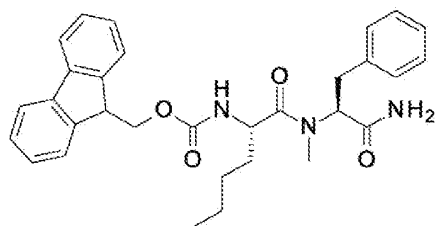
[0187] Glycine capping工程

続いて溶液3と溶液4を5:6の比率で合成機のmixing vialで混合し15分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり3.0 μ L添加し、室温にて40分間反応することでGlycine cappingを行った後、溶液を排出した。その後上記のFmoc-Gly-OHの伸長反応を再度行った。次いでDMF（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で7回洗浄し、引圧で10分間乾燥した。アミノ酸の伸長後は脱Fmoc工程を行わずに、さらにDMF（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で7回、エタノール（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で2回、エタノール（メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L）で2回、エタノール（メンブランディスク1枚あたり25 μ L）で3回洗浄し、引圧で10分間乾燥した。

調製した化合物SS09、化合物SS12、化合物SS16および化合物SS17を用いて実施例1-2に記載の方法でペプチドの切り出しを行い、目的ペプチド（化合物SS09*、化合物SS12*、化合物SS16*および化合物SS17*）の生成を確認した。

[0188]

[化53]

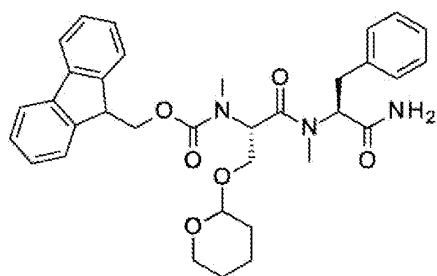


(化合物SS09*)

LCMS (ESI) $m/z = 514.4$ $[M+H]^+$

保持時間: 3.63分 (分析条件SQDAA05long)

[化54]

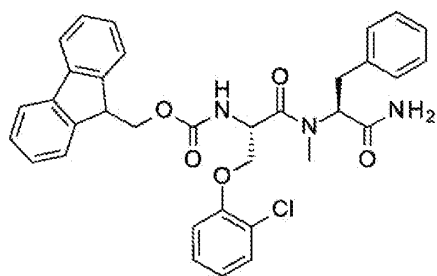


(化合物SS12*)

LCMS (ESI) $m/z = 586.4$ $[M+H]^+$

保持時間: 3.61分 (分析条件SQDAA05long)

[化55]

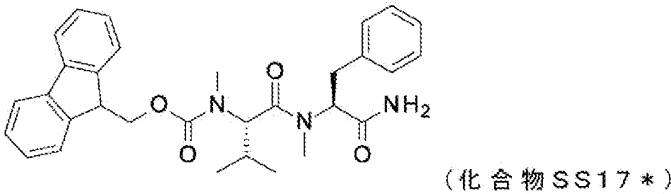


(化合物SS16*)

LCMS (ESI) $m/z = 598.3$ $[M+H]^+$

保持時間: 3.72分 (分析条件SQDAA05long)

[化56]



LCMS (ESI) m/z = 514.4 [M+H]⁺
保持時間：3.49分 (分析条件SQDAA05long)

[0189] 実施例3-2の結果を以下の表20に示す。

[表20]

実施例番号	No.	Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジミド (反応溶液中濃度)	目的ペプチド	伸長効率
3-2	1	Fmoc-Nle-OH (0.55mol/L)	HQAt (0.17mol/L)	DsRC (0.77mol/L)	SS09*	>99%
	2	Fmoc-MeSer(THP)-OH (0.55mol/L)	HQOBt (0.17mol/L)		SS12*	>99%
	3	Fmoc-Ser(Ph-2-Cl)-OH (0.55mol/L)	HQOBt (0.17mol/L)		SS16*	>99%
	4	Fmoc-MeVal-OH (0.55mol/L)	Oxyma (0.34mol/L)		SS17*	87%

いずれの基質においてもDsBC由来のウレアの析出は観察されず、ペプチド合成機による自動合成が可能であった。

[0190] 実施例3-3：ペプチド合成機を利用したメンブラン上の環状ペプチド合成実験

実施例2で特定したメンブラン上のペプチド合成における好まれる反応条件を自動合成機での合成に適用し、環状ペプチドの並列合成を行った。

[0191] 実施例3-3-1：ペプチド合成機によるメンブラン上のペプチド伸長

実施例1-2および3-2の反応条件を参考に自動合成機にてペプチドの伸長を実施し以下の表21記載の配列を伸長した。

[0192]

[表21]

4-3-38-3	4-3-38-3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1
----------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	---

[0193] ペプチド合成機 (Multi pep RS ; I n t a v i s 社製) を用いて、F m o c 法により行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従い、以下の方法で実施した。なお、F m o c 保護アミノ酸の種類が違っていても安定して高い伸長効率を獲得するために、自動合成機ではダブルカップリングを実施した。

1 残基目の伸長でメンブラン上の反応点の数を調整するために、F m o c - P h o t o - L i n k e r (0 . 0 7 2 m o l / L) 、 4 - フェノキシ酪酸 (0 . 2 2 m o l / L) および H O B t (0 . 1 8 1 m o l / L) を D M F に溶解させて溶液 1 を調製した。D I C は原液のまま溶液 2 として用いた。2 残基目以降の伸長で使用する溶液として、伸長する F m o c 保護アミノ酸 (0 . 6 3 m o l / L) と H O A t もしくは O x y m a もしくは H O O B t (0 . 1 9 8 m o l / L もしくは 0 . 3 9 7 m o l / L) を D M F もしくは N M P に溶解させて溶液 3 を調製した。その組み合わせを以下の表 2 2 に記載した。D s B C は原液のまま溶液 4 として用いた。

[0194] [表22]

実施例番号	溶液2			実施例番号	溶液3		
	Fmoc-保護アミノ酸 (濃度2中濃度)	活性化剤 (濃度2中濃度)	溶媒		Fmoc-保護アミノ酸 (濃度3中濃度)	活性化剤 (濃度3中濃度)	溶媒
3-3-1	Fmoc-Met-OH (0.63mol/L)	Oxyma (0.397mol/L)	NMP	3-3-1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Ala-Leu-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	NMP		Fmoc-Ser(tBu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Ala-Phe(t-CO)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Ser(tBu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Met-Phe-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Ala-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Ala-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP
	Fmoc-Me-Ser(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP		Fmoc-Phe(t-Bu)-OH (0.63mol/L)	HOBt (0.198mol/L)	DMP

CelluSpots 384 frame with acid stable discs (I n t a v i s 社製) をペプチド合成機にセットした。溶液 1 ~ 4 をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

[0195] 脱Fmoc工程

[1 残基目]

メンブラン上のN末端にはFmoc基が存在していないためこの操作は省略した。

[2 残基目以降]

DBUのDMF溶液(2% v/v)を、メンブランディスク1枚あたり6.0 μ L添加し、室温にてFmoc基の脱保護を行った。6.0 μ L添加後に15分間反応させ、その後溶液を排出した。続いてDMF(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で7回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で6回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。

[0196] 伸長工程(ダブルカップリング)

[1 残基目]

溶液1と溶液2を11.29:0.72の比率で合成機のmixing vialで混合し15分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり1.2 μ L添加し、室温にて40分間反応することでメンブランディスク上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液を排出した。次いでDMF(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で4回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で3回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。その後縮合反応を更にもう1回30分間行い、次いでDMF(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で7回、エタノール(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で5回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。

[2 残基目以降]

溶液3と溶液4を10.31:0.169の比率で合成機のmixing vialで混合し10分間静置した後に、メンブランディスクに1枚あたり1.2 μ L添加し、室温にて30分間反応することでメンブランディスク上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液を排出した。次いでDMF(メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L)で4回、

エタノール（メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L）で3回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。その後縮合反応を更にもう1回30分間行い、続いて無水酢酸（Ac₂O）のDMF溶液（4% v/v）を、メンブランディスク1枚あたり4.0 μ L添加し、室温にて未反応アミンのアセチルカップリングを行った。5分間反応させた後、溶液を排出した。次いでDMF（メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L）で7回洗浄し、引圧で10分間乾燥した。

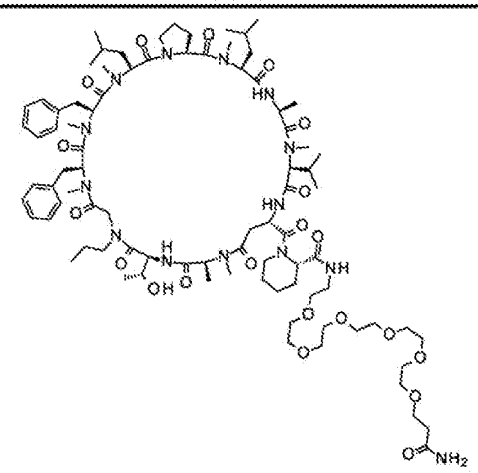
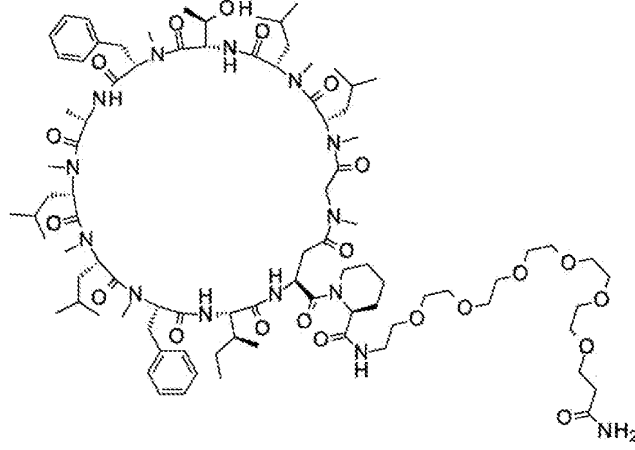
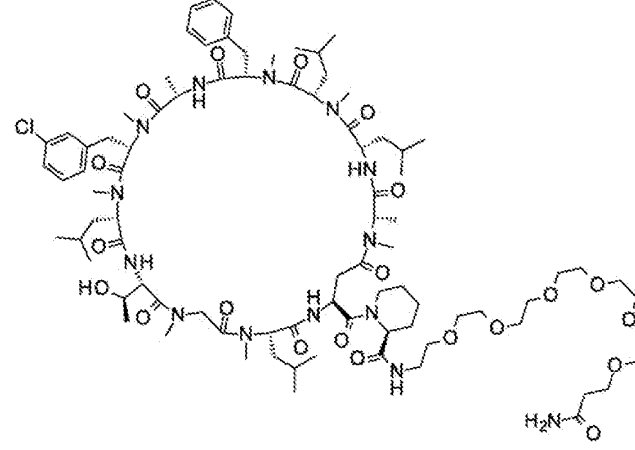
このFmoc基の脱保護反応に次ぐFmoc保護アミノ酸の縮合反応、アセチルカップリングを1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでメンブランディスク表面上にペプチドを伸長させた。最後のアミノ酸の伸長、アセチルカップリング、DMF洗浄、乾燥後にさらにエタノール（メンブランディスク1枚あたり37.5 μ L）で6回洗浄し、引圧で15分間乾燥した。

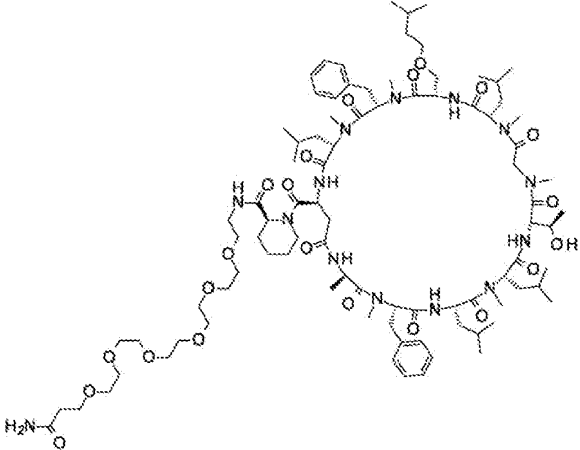
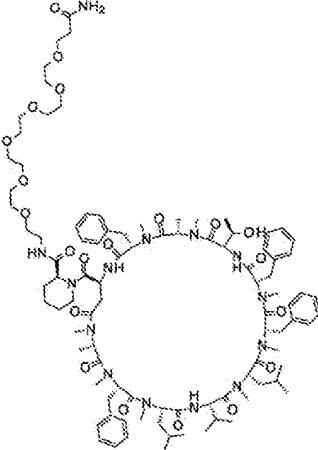
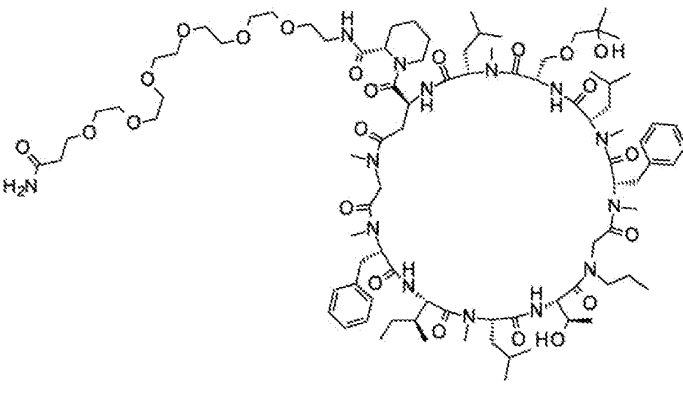
[0197] 実施例3-3-2：メンブラン上の各種ペプチドの脱保護、環化、切り出しおよび分析

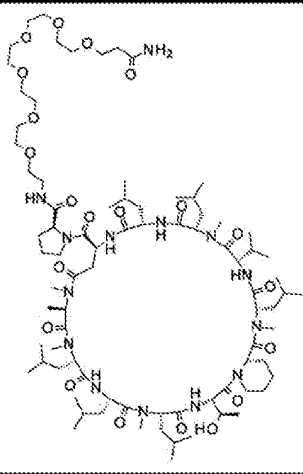
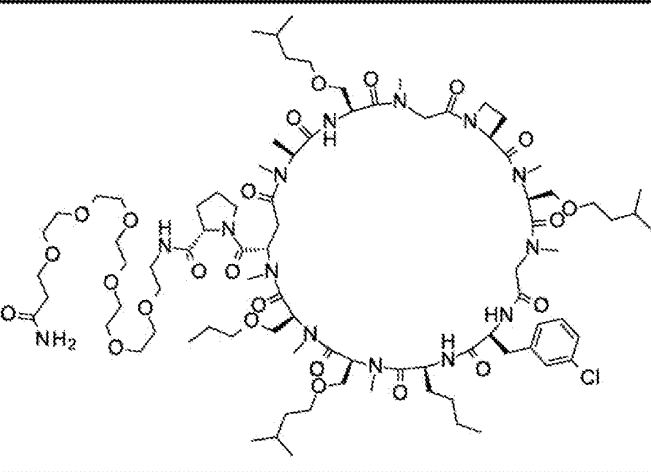
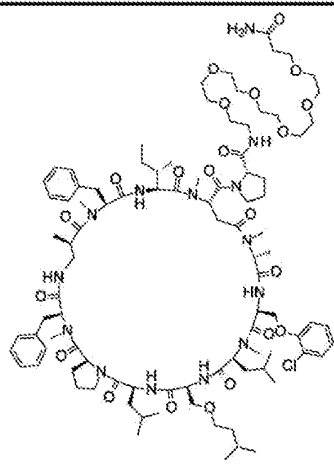
実施例3-3-1で得られたメンブラン（化合物SS38～SS46）を使用し、脱保護反応、環化反応、メンブランからの切り出しならびに分析を実施し以下の表23記載の目的ペプチド（化合物SS47～SS55）の生成を確認した。

[0198]

[表23]

化合物番号	構造
SS47	 Chemical structure of SS47, a macrocyclic peptide. The structure features a large ring composed of various amino acid residues, including proline, leucine, and phenylalanine. A long, flexible side chain extends from the ring, containing several ether linkages and terminating in a primary amide group (CONH_2).
SS48	 Chemical structure of SS48, a macrocyclic peptide. The structure features a large ring composed of various amino acid residues, including proline, leucine, and phenylalanine. A long, flexible side chain extends from the ring, containing several ether linkages and terminating in a primary amide group (CONH_2).
SS49	 Chemical structure of SS49, a macrocyclic peptide. The structure features a large ring composed of various amino acid residues, including proline, leucine, and phenylalanine. A long, flexible side chain extends from the ring, containing several ether linkages and terminating in a primary amide group ($\text{H}_2\text{N}-\text{CONH}_2$).

化合物番号	構造
SS50	 Chemical structure of SS50: A macrocyclic molecule featuring a long side chain with an amide linkage and a terminal amine group (H_2N).
SS51	 Chemical structure of SS51: A macrocyclic molecule featuring a long side chain with an amide linkage and a terminal amine group (NH_2).
SS52	 Chemical structure of SS52: A macrocyclic molecule featuring a long side chain with an amide linkage and a terminal amine group (H_2N).

化合物番号	構造
SS53	
SS54	
SS55	

[0199] [N末端のFmoc基の除去]

メンブランディスクを1枚ずつ反応容器に入れ、DBUのDMF溶液（2% v/v）をメンブランディスク1枚あたり4.0 μ L添加し、室温にて5分間反応させた後、再度4.0 μ L添加し室温にて10分間反応させてFmoc基の除去を行った。続いてメンブランディスク1枚あたり100 μ LのDMFで4回、100 μ LのDCMで3回洗浄し、風乾した。

[0200] [側鎖官能基の保護基の除去]

HPIP（2.47 mL）、TIPS（51.2 μ L）、DCE（21.3 μ L）を混合した溶液に21.9 mgの硫酸水素テトラメチルアンモニウムを溶解させて0.05 Mの硫酸水素テトラメチルアンモニウム溶液を調製した。

メンブランディスクを1枚ずつ反応容器に入れ、調製した溶液をメンブランディスク1枚あたり150 μ L添加し、室温にて4.5時間反応させてPis基およびTHP基の除去を行った。続いてメンブランディスク1枚あたり100 μ LのNMPで2回洗浄し、その後100 μ LのDIPEAのNMP溶液（60 mM）を添加し室温で5分間静置した。溶液を排出し、続いて100 μ LのNMPで1回、DCMで3回洗浄し、風乾した。

[0201] [環化反応]

NMP（184 μ L）とTHF（1.66 mL）を混合した溶液にPyOxim（49.8 mg）を溶解させ、DIPEA（19.7 μ L）を添加することで50 mM PyOxim/60 mM DIPEA溶液を調製した。

メンブランディスクを1枚ずつ反応容器に入れ、調製した溶液をメンブランディスク1枚あたり150 μ L添加し、50℃に昇温して2時間反応させて環化反応を行った。続いてメンブランディスク1枚あたり100 μ LのDMFで4回、100 μ LのDCMで3回洗浄し、風乾した。

[0202] [切り出し、分析]

メンブランディスクを1枚ずつ反応容器に入れ、実施例1-2に記載の方法を参考にして以下の手順でペプチドの切り出しおよび分析を行い、目的のペプチド（化合物SS47～SS55）の生成を確認した。

室温下に置いた反応容器中のメンブランディスクに対しDMSOを10 μ L添加した。続いてUV波長365nm、照度380～600mW/cm²で2分30秒間光照射した。その後メンブランに対し10 μ LのDMSOを添加し、15分以上静置しペプチドを溶解させた。その溶液をLCMSにて分析した。

[0203] LCデータの各化合物ピークのUVエリア値（波長210～400nm PDAtotal）を用いて、目的ペプチドの純度を以下の式から算出した。

純度（%）＝（目的ペプチドのUVエリア値）／（バックグラウンドおよびFmoc-PEG6-OH中に含まれる不純物由来のピークを除いた全ピークのUVエリア値の合算値）×100

なお、Fmoc-PEG6-OH中に含まれる不純物はFmoc基が酸化され脱保護されなくなった化合物と推定される。

[0204] 実施例3-3の結果を以下の表24に示す。

[表24]

化合物番号	分析条件	LCMS (ESI) m/z		保持時間 (分)	純度 (%)
SS47	SQDAA05long	1702.4	[M+H] ⁺	3.79	41.7
SS48	SQDAA05long	1746.3	[M+H] ⁺	4.04	37.1
SS49	SQDAA05long	1738.4	[M+H] ⁺	3.87	46.0
SS50	SQDAA05long	1776.2	[M+H] ⁺	4.02	67.1
SS51	SQDAA05long	1828.1	[M+H] ⁺	4.03	58.9
SS52	SQDAA05long	1806.1	[M+H] ⁺	3.93	67.6
SS53	SQDAA05long	1676.4	[M+H] ⁺	3.94	53.1
SS54	SQDAA05long	1806.1	[M+H] ⁺	3.96	68.8
SS55	SQDAA05long	1856.1	[M+H] ⁺	4.03	66.6

[0205] 精製工程を行う前の粗生成物の段階において、37～69%の純度で目的の環状ペプチドを得た。本反応条件を自動合成機でのペプチド伸長に適用し、メンブラン上での環状ペプチドの並列合成が可能であることが示された。

[0206] 実施例4：適用可能な担体の範囲の検討実験

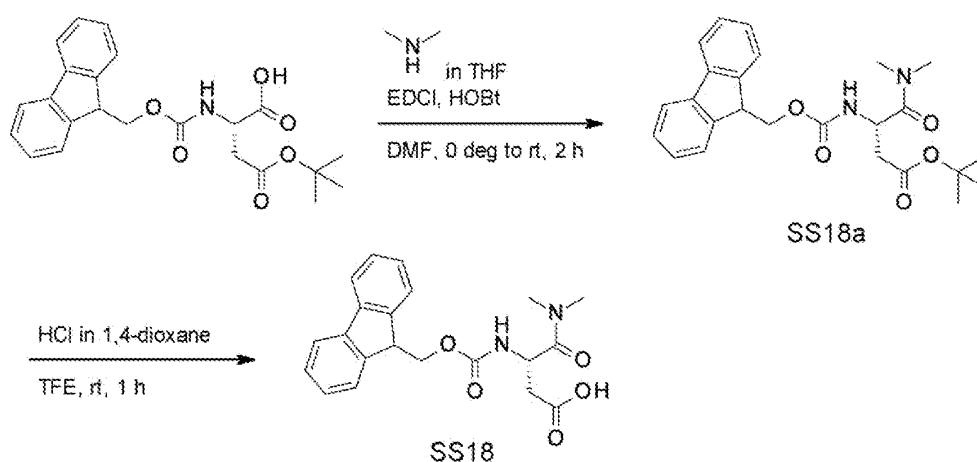
本実験では、N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法（WO2018/225851）に従った反応条件および実施例2で特定したメンブラン上のペプチド合成における好まれる反応条件を用いて、レジン上のペプチド合

成実験を実施した。Cl-Trt (2-Cl) レジン (1.25~1.60 mmol/g, 100-200 mesh, 1%DVB) は渡辺化学工業株式会社またはSUNRESIN社から購入した。

[0207] 実施例4-1: Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin-NMe₂の合成

実施例4-1-1: (3S)-4-(ジメチルアミノ)-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (Fmoc-Asp-NMe₂, SS18) の合成

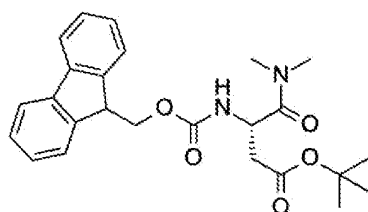
[化57]



上記のスキームに従い (3S)-4-(ジメチルアミノ)-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (Fmoc-Asp-NMe₂, SS18) を合成した。

[0208] 実施例4-1-2: (3S)-4-(ジメチルアミノ)-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸-2-メチルプロパン-2-イル (Fmoc-Asp(OtBu)-NMe₂, 化合物SS18a) の合成

[化58]



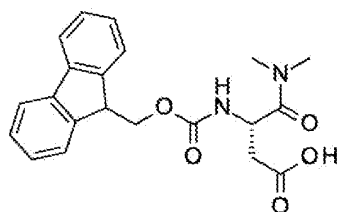
商業的供給業者から購入したFmoc-Asp(OtBu)-OH (25.0 g, 60.8 mmol) を出発原料として合成を実施した。窒素気流下にて、反応容器にFmoc-Asp(OtBu)-OH (25.0 g, 60.8 mmol)、EDCI・HCl (14.0 g, 72.9 mmol)、およびDMF (122 mL) を加え、室温にて5分攪拌した後、0℃に冷却した。0℃にてHOBt (9.03 g, 66.8 mmol) を加え、45分間攪拌した。0℃にてジメチルアミン (2 mol/L THF solution, 31.3 mL, 62.6 mmol) を15分かけて滴下後、0℃にて1時間攪拌した。さらに水浴にて1時間攪拌した後、反応液に酢酸エチル/TBME (1/1, 250 mL) を加え、有機層を0.5 mol/L 塩酸水溶液 (200 mL) で1回、水 (200 mL) で2回で順に洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、化合物SS18aを粗生成物として29.8 g (収率112%) 得た。

LCMS (ESI) $m/z = 461.3$ $[M+Na]^+$

保持時間: 0.88分 (分析条件分析条件SQDFA05_2)

[0209] 実施例4-1-3: (3S)-4-(ジメチルアミノ)-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (Fmoc-Asp-NMe₂、化合物SS18) の合成

[化59]



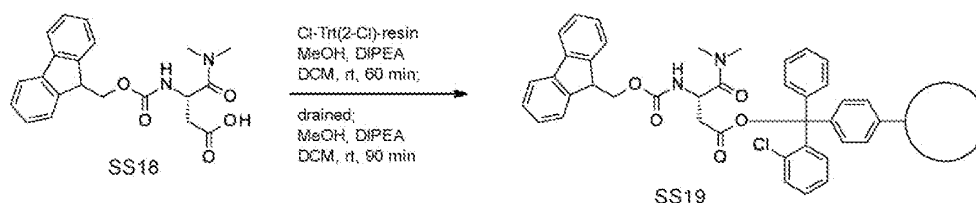
反応容器に化合物SS18aの粗生成物(29.8g)、TFE(270 mL)を加え、次いで4 mol/L塩酸ジオキサン溶液(15.2 mL, 60.8 mmol)を滴下した後、反応液を室温にて1時間攪拌した。反応液をTBME(500 mL)で希釈した後、5%炭酸ナトリウム水溶液(600 mL)で抽出した。得られた水層に85%リン酸水溶液(40~50 mL)を加えてpH 2~3付近まで酸性とし、水層をTBME(400 mL)で抽出した。得られた有機層を10%塩化ナトリウム水溶液(400 mL)、水(400 mL)で洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥材を濾去後、濾液を減圧濃縮し、化合物SS18を21.4 g(収率92%)得た。

LCMS (ESI) $m/z = 383.2 [M+H]^+$

保持時間: 0.66分(分析条件分析条件SQDFA05_2)

[0210] 実施例4-1-4: (3S)-4-(ジメチルアミノ)-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin)-NMe₂、化合物SS19)の合成

[化60]



フィルター付きの反応容器に2-クロロトリチルクロライドレジン(1.44 mmol/g, 39.0 g, 56.2 mmol)とDCM(390 mL)を入れ、室温にて20分間振盪した。窒素圧をかけてDCMを除いた後、化合物SS18(10.7 g, 28.0 mmol)、メタノール(9.05 mL, 224 mmol)、DIPEA(23.5 mL, 134 mmol)、およびDCM(273 mL)の混合液を反応容器に添加し、室温にて60分間振盪した。窒素圧をかけて反応液を除いた後、メタノール(36.2 mL

, 895 mmol)、DIPEA (23.5 mL, 134 mmol)、およびDCM (273 mL) の混合液を反応容器に添加し、室温にて90分間振盪した。窒素圧をかけて反応液を除いた後、DCM (390 mL) を入れ5分間振盪した後に窒素圧をかけて反応液を除いた。このDCMを用いたレジンの洗浄操作を3回繰り返し、得られたレジンを減圧下で一晩乾燥させ、化合物SS19を45.0 g得た。

[0211] Fmoc定量法

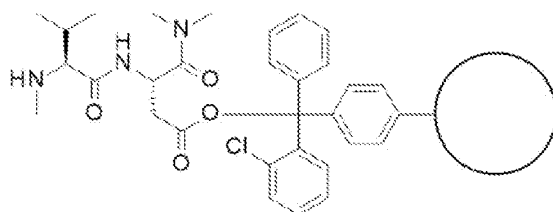
担持量の確認のため、得られた化合物SS19 (10.48 mg) を反応容器に入れ、DMF (4.0 mL) を加えて、室温にて30分間振盪した。その後、DBU (40 μ L) を加えて30℃で15分間振盪した。その後、反応混合液が10.0 mLになるようにDMFを加え、その溶液80 μ LをDMF (920 μ L) で希釈した。得られた希釈溶液をLC/MSで分析し (分析条件SQDFA05__1、injection volume: 5 μ L)、ジベンゾフルベンのUVarea値 (294 nmにおけるUVarea値: 4929.82、304 nmにおけるUVarea値: 4428.76) より、化合物SS19の担持量を0.469 mmol/gと算出した。(濃度既知のFmoc-Gly-OH (商業的供給業者から購入) とDBUの混合溶液を標準物質として測定日毎に波長294 nmと304 nmにおけるジベンゾフルベンのUVarea値をもとに作成した検量線を用い、各々の波長で算出された担持量の平均値をレジンの担持量とした。)

なお、同様に合成した担持量が異なる別ロットについてもペプチド合成や検討等に使用した。

[0212] 実施例4-2: レジン上の異なる反応条件でのペプチド合成実験

実施例4-2-1: 化合物SS20 (MeVal-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-NMe2) の調製

[化61]



(化合物SS20)

化合物SS20の調製は、N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法（WO2018/225851）に従い、ペプチド合成機（Multi pep RS；Intavis社製）を用いて、Fmoc法により行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

目的とするペプチドを構成するFmoc-MeVal-OH（0.6mol/L）とカルボン酸の活性化剤としてHOAt（0.375mol/L）をNMPに溶解させて溶液1を調製した。DIC（0.71mol/L）とDMFを混合し、溶液2を調製した。

実施例4-1-4にて調製した（3S）-4-（ジメチルアミノ）-3-（9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ）-4-オキソブタン酸-2-クロロトリチルレジン（化合物SS19、Fmoc-Asp（O-Trt（2-Cl）-resin）-NMe2）（1カラムあたり100mg）を固相反応容器に加え、ペプチド合成機にセットした。このレジン（100mg）にDCM（1.0mL）を加えて30分程度静置することでレジンの膨潤を行った。溶液1および溶液2をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。溶液をフリットから排出し、続いてレジンをDMF（1カラムあたり0.7mL）にて2回洗浄した。

[0213] 脱Fmoc工程

DBUのDMF溶液（2%v/v、1カラムあたり0.7mL）を添加し、室温～30℃にてFmoc基の脱保護を行った。4.5分間反応させた後、溶液をフリットから排出した。続いてDMF（1カラムあたり0.7mL）で4回洗浄した。

[0214] 伸長工程

溶液1 (0.3 mL) と溶液2 (0.36 mL) を合成機の *mixing vial* で混合した後に、レジンに添加し、固相反応容器を40℃まで加温し、2.5時間反応することでレジン上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液をフリットから排出した。次いでレジンをDMF (1カラムあたり0.7 mL) で3回洗浄した。

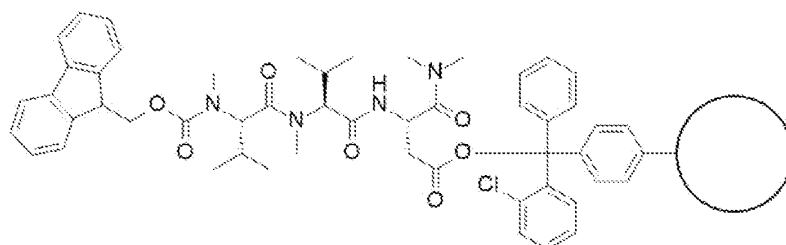
[0215] 脱Fmoc工程

DBUのDMF溶液 (2% v/v、1カラムあたり0.7 mL) を添加し、室温～35℃にてFmoc基の脱保護を行った。10分間反応させた後、溶液をフリットから排出した。続いてDMF (1カラムあたり0.7 mL) で4回洗浄した。

反応終了後も合成機にセットしたままの状態では参照例4-2-2aまたは実施例4-2-2b記載の実験に用いた。

[0216] 実施例4-2-2：種々の反応条件でのレジン上に担持されたMeValに対するFmoc-MeVal-OHの伸長反応

[化62]



(化合物SS21)

レジン上に担持されたMeValに対するFmoc-MeVal-OHの伸長反応を、N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法 (WO2018/225851) に従った反応条件あるいは実施例2で特定したメンブラン上のペプチド合成における好まれる反応条件を用いて実施し化合物SS21を合成した。

[0217] 参照例4-2-2a：WO2018/225851記載の反応条件でのレジン上に担持されたMeValに対するFmoc-MeVal-OHの伸長反応

実施例4-2-1で調製したMeVal-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-NMe₂(化合物SS20、1カラムあたり100mg)を使用し、ペプチド合成機(Multi pep RS; Intavis社製)を用いて、実施例2-4のNo.1記載の反応条件で、Fmoc-MeVal-OHの伸長反応を行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

Fmoc-MeVal-OH(0.6mol/L)とHOAt(0.375mol/L)をNMPに溶解させて溶液1を調製した。DIC(0.71mol/L)とDMFを混合し、溶液2を調製した。

溶液1および溶液2をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

溶液1(0.3mL)と溶液2(0.36mL)を合成機のmixing vialで混合した後に、レジンに添加し、固相反応容器を40℃まで加温し、2.5時間反応することでレジン上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液をフリットから排出した。次いでレジンをDMF(1カラムあたり0.7mL)で3回洗浄した。

[0218] 実施例4-2-2b: DsBCを用いた試薬高濃度反応条件でのレジン上に担持されたMeValに対するFmoc-MeVal-OHの伸長反応

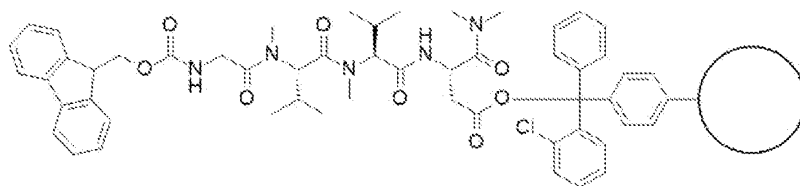
実施例4-2-1で調製したMeVal-Asp(O-Trt(2-Cl)-resin)-NMe₂(化合物SS20、1カラムあたり100mg)を使用し、実施例2-4の反応条件を参考にしてDsBCを用いて試薬濃度を上げて、実施例2-4のNo.2~No.5記載の反応条件で、レジン上のMeValに対するFmoc-MeVal-OHの伸長反応を行った。

Fmoc-MeVal-OH(0.63mol/L)とHOAt(0.198mol/Lもしくは0.397mol/L)をDMFに溶解させて調製した溶液1(601μL)とDsBC(原液)(98.7μL)を混合した後に、その混合溶液660μLをレジンに添加し、固相反応容器を40℃または50℃まで加温し、2.5時間反応することでレジン上のアミノ基とF

moc保護アミノ酸の縮合反応を行った。その後、溶液をフリットから排出した。次いでレジンをDMF（1カラムあたり0.7mL）で3回洗浄した。

[0219] 実施例4-2-3：化合物SS22の調製

[化63]



(化合物SS22)

参照例4-2-2aあるいは実施例4-2-2bで得られた化合物SS21を使用し、N-置換アミノ酸を含むペプチドの合成方法（WO2018/225851）に従い、レジン上のMeValに対するFmoc-Gly-OHの伸長反応を行った。本実施例は、ペプチド合成機（Multi pep RS; Intavis社製）を用いて、Fmoc法により行った。操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

目的とするペプチドを構成するFmoc-Gly-OH（0.6mol/L）とカルボン酸の活性化剤としてHOAt（0.375mol/L）をNMPに溶解させて溶液1を調製した。DIC（0.71mol/L）とDMFを混合し、溶液2を調製した。

参照例4-2-2aあるいは実施例4-2-2bにて調製した化合物SS21（1カラムあたり100mg）を固相反応容器に加え、ペプチド合成機にセットした。溶液1および溶液2をペプチド合成機にセットし、ペプチド合成機による自動合成を開始した。

[0220] 脱Fmoc工程

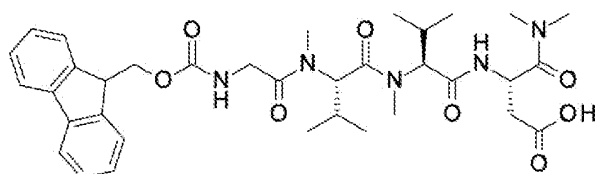
DBUのDMF溶液（2% v/v、1カラムあたり0.7mL）を添加し、室温～35℃にてFmoc基の脱保護を行った。10分間反応させた後、溶液をフリットから排出した。続いてDMF（1カラムあたり0.7mL）で4回洗浄した。

[0221] 伸長工程

溶液1 (0.3 mL) と溶液2 (0.36 mL) を合成機の *mixing via* で混合した後に、レジンに添加し、固相反応容器を40℃まで加温し、2.5時間反応することでレジン上のアミノ基とFmoc保護アミノ酸の縮合反応を行った後、溶液をフリットから排出した。次いでレジンをDMF (1カラムあたり0.7 mL) で3回洗浄した。さらにDCM (1カラムあたり1.0 mL) で4回洗浄し、乾燥させた後、以後の検討に用いた。

得られたレジンの一部に対し、DIPEA (0.042 mol/L) を含むTFE/DCM溶液 (1/1 (v/v)) にてペプチドの切り出しをおこなった。切り出した溶液をLCMSにて分析したところ、目的ペプチド (化合物SS22*) の生成が確認された。また、目的ペプチドの他にMeValが一つ欠損した化合物SS23*の生成も確認された。

[0222] [化64]

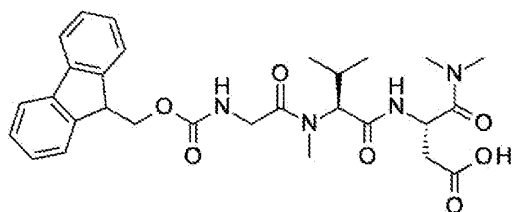


(化合物SS22*)

LCMS (ESI) $m/z = 666.7$ $[M+H]^+$

保持時間: 0.80分 (分析条件SQDFA05_3)

[化65]



(化合物SS23*)

LCMS (ESI) $m/z = 553.5$ $[M+H]^+$

保持時間: 0.72分 (分析条件SQDFA05_3)

LCデータの各化合物ピークのUVエリア値 (波長299 nm) を用いて、伸長効率を以下の式から算出した。

伸長効率（％）＝（化合物SS22＊のUVエリア値）／（化合物SS22＊のUVエリア値と化合物SS23＊のUVエリア値の合算値）×１００

[0223] 実施例４の結果を以下の表２５に示す。

[表25]

参照例または実施例番号	No.	参照例4-2-2aまたは実施例4-2-2bの反応条件					目的ペプチド	伸長効率
		Fmoc保護アミノ酸 (反応溶液中濃度)	活性化剤 (反応溶液中濃度)	カルボジイミド (反応溶液中濃度)	反応溶媒	反応温度		
4-2-2a	1	Fmoc-MeVal-OH (0.27mol/L)	HQAt (0.17mol/L)	DIC (0.30mol/L)	NMP/DMF=5/5	40℃	SS22*	50%
4-2-2b	2	Fmoc-MeVal-OH (0.55mol/L)	HQAt (0.17mol/L)	Dx8C (0.77mol/L)	NMP	40℃	SS22*	74%
	3				DMF	50℃		85%
	4		HQAt (0.34mol/L)		DMF	40℃		83%
	5				DMF	50℃		88%

[0224] レジン上でのFmoc保護アミノ酸の伸長においても、本発明反応条件下で伸長を行うことで伸長効率の改善が確認された。

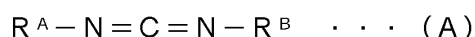
請求の範囲

[請求項1]

固相法によるペプチド化合物の製造方法であって、

固相に担持された、アミノ基を有する第一のアミノ酸またはアミノ基を有する第一のペプチドを準備する準備工程；および

第一のアミノ酸または第一のペプチドと、保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のアミノ酸、または保護アミノ基および／または保護ヒドロキシ基、ならびにカルボキシ基を有する第二のペプチドとを、下記一般式（A）で表される少なくとも1種のカルボジイミド系縮合剤、



（式中、 R^A は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルであり、 R^A および R^B における各基は、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ジ $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、または4～8員環状アミノより独立して選択される1つまたは複数の基によって置換されていてもよい。）

および添加剤の存在下で縮合させる縮合工程を含む、前記方法。

[請求項2]

R^A は $C_4 \sim C_8$ 第2級または第3級アルキルであり、 R^B は $C_4 \sim C_{10}$ 第2級または第3級アルキル、または $C_7 \sim C_{14}$ アリールアルキルである、請求項1に記載の方法。

[請求項3]

カルボジイミド系縮合剤が、N, N' -ジ-sec-ブチルカルボジイミド（DsBC）、N' -（1-フェニルエチル）-N-sec-ブチル-メタンジイミン、N' -（1-メチルヘプチル）-N-sec-ブチル-メタンジイミン、N, N' -ビス（1-メチルブチル）メタンジイミン、N, N' -ビス（1-エチルプロピル）メタンジイミン、およびN' -（1-エチルプロピル）-N-（1-メチルブチル）メタンジイミンからなる群より選択される少なくとも1種を含む

む、請求項1または2に記載の方法。

[請求項4] 添加剤が、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン (HOObt)、シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル (Oxyma)、および5-(ヒドロキシイミノ)-1,3-ジメチルピリミジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン (Oxyma B) からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 縮合工程が溶媒中で行われ、溶媒中におけるカルボジイミド系縮合剤の濃度が、0.4 mol/L以上、0.5 mol/L以上、0.6 mol/L以上、または0.7 mol/L以上である、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 固相がメンブランまたは固相合成用樹脂である、請求項1~5のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項7] メンブランがセルロースメンブラン、ポリプロピレンメンブラン、またはポリアミノエチルメタクリルアミドメンブランである、請求項6に記載の方法。

[請求項8] 固相と、第一のアミノ酸または第一のペプチドとが、光開裂性部位、ジスルフィド結合、または酸不安定部位を介して結合されている、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 第一のアミノ酸、または第一のペプチドのN末端のアミノ酸が、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、 β -分岐アミノ酸、またはN-アルキルアミノ酸 (ただし、N-アルキルアミノ酸におけるアルキルはC₃~C₆シクロアルキル、C₂~C₆アルケニル、C₂~C₆アルキニル、またはC₆~C₁₀アリールより独立して選択される1つまたは複数の基に

よって置換されていてもよい)である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項11] 第二のアミノ酸、または第二のペプチドのC末端のアミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 請求項1～11のいずれか一項に記載の方法における、式(A)で表されるカルボジイミド系縮合剤の使用。
- [請求項13] 請求項1～11のいずれか一項に記載の方法を含む、メンブランに担持されたペプチド化合物の製造方法。
- [請求項14] 請求項13に記載の方法によって、メンブランに担持された10種類以上のペプチド化合物を得る工程を含む、メンブランに担持されたペプチドライブラリの製造方法。
- [請求項15] 自動合成機を用いる、請求項13または14に記載の方法。