

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4358325号
(P4358325)

(45) 発行日 平成21年11月4日(2009.11.4)

(24) 登録日 平成21年8月14日(2009.8.14)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/585 (2006.01)

C O 7 K 14/585 Z N A

C O 7 K 1/10 (2006.01)

C O 7 K 1/10

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平10-235707
 (22) 出願日 平成10年8月21日(1998.8.21)
 (65) 公開番号 特開平11-130799
 (43) 公開日 平成11年5月18日(1999.5.18)
 審査請求日 平成17年5月31日(2005.5.31)
 (31) 優先権主張番号 19736457.8
 (32) 優先日 平成9年8月21日(1997.8.21)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 598080163
 フラウンホッフアーゲーゼルスシャフト ツ
 ァー フェーデルング デア アンゲバン
 テン フォルシュング エー ファー
 ドイツ連邦共和国、80686 ミュンヘ
 ン、ハンザシュトラッセ 27シー
 (74) 代理人 100082670
 弁理士 西脇 民雄
 (72) 発明者 アフロディティー カプルニオトゥ
 ドイツ連邦共和国 D-72074 テュ
 ービンゲン フリードゥリヒ-シャール
 シュトラッセ 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低カルシウム血症のイン・ビボ活性の顕著な増大が可能な超強力なカルシトニン類縁体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトのカルシトニンの位置(17)と位置(21)に、アミノ酸の間のブリッジを有するカルシトニンまたはカルシトニン誘導体において、アミノ酸は、前記位置(17)と位置(21)に、該ブリッジにより18または19員環が形成されるように配列されることを特徴とするカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【請求項 2】

前記位置(17)と位置(21)のアミノ酸の前記ブリッジの形成は、ラクタムブリッジにより行われることを特徴とする請求項1に記載のカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【請求項 3】

前記位置(17)と位置(21)のアミノ酸の前記ブリッジの形成は、所望の連結体により行われることを特徴とする請求項1に記載のカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【請求項 4】

前記位置(17)と位置(21)には、アスパラギン酸とオルニチン、または、オルニチンとアスパラギン酸が存在することを特徴とする請求項1～3の何れかに記載のカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【請求項 5】

前記位置(17)と位置(21)には、アスパラギン酸と α , γ -ジアミノブチル酸、 α , γ -ジアミノブチル酸とアスパラギン酸、グルタミン酸と α , γ -ジアミノブチル酸、

α , γ - ジアミノブチル酸とグルタミン酸、2 - アミノアジピン酸とセリン、セリンと 2 - アミノアジピン酸、グルタミン酸とセリン、または、セリンとグルタミン酸の対が存在することを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れかに記載のカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【請求項 6】

位置 (1) と位置 (7) のシステイン残基は、 α - アミノスベリン酸残基により置換されることを特徴とする請求項 1 ~ 5 の何れかに記載のカルシトニンまたはカルシトニン誘導体。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は、低カルシウム血症作用を有するカルシトニン類縁体 (カルシトニン、およびカルシトニンの誘導体) に関するものである。この種のカルシトニン、およびカルシトニンの誘導体は、例えば、骨多孔症、ページェット病、または高カルシウム血症の治療用として、特に、製薬業界の分野で、および医療の分野で用いられる。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

カルシトニンは、32 個のアミノ酸から構成されるペプチドホルモンである。カルシトニンの低カルシウム血症作用、およびカルシトニンによる骨粗鬆の進行抑制のために、カルシトニンは、薬理学上、非常に重要である。カルシトニンは、骨多孔症、ページェット病、または高カルシウム血症の治療手段として用いられる。ここでは、特に、ヒトカルシトニン (h C t)、豚カルシトニン (p C t)、または、鮭カルシトニン (s C t) や鰻カルシトニン (e C t) のような鰐後種のカルシトニンが用いられる。

20

【 0 0 0 3 】

鰐後種のカルシトニンまたはカルシトニンの誘導体のイン・ビボ活性は、ヒトのカルシトニンの 20 ~ 50 倍である。従って、この種のカルシトニンは、治療を目的として、奨んで用いられる。しかし、鰐後種のカルシトニンは、アミノ酸の配列の点で、ヒトのカルシトニンのペプチドとかなり異なる。例えば、鮭のカルシトニンは、32 個のアミノ酸のうち 16 個に関して、ヒトのカルシトニンと異なる。しかしながら、活性がかなり大きいため、治療を目的とした投薬量を少なくすることが可能なので、これまで用いられている。

30

【 0 0 0 4 】

しかし、鰐後種のカルシトニンは、アミノ酸の相異のために、ヒトに対して、免疫反応を引き起こすという問題点がある。つまり、抗体形成の促進作用が大きいため、投与後、6 ヶ月経過した後でさえ、特定の治療用カルシトニンに対する抗体が形成されてしまうことがよくある。更に引き続いて、このように大きな抗体形成促進作用により、使用カルシトニンに対して、副次的抵抗性を呈すようになり、反応感度が低下する。これにより、他方で、投与量を増加させる必要性が生じ、結局、抗体形成が促進されるため、副次的抵抗力が発生し、更に、副作用 (禁忌) も生じてしまう。

【 0 0 0 5 】

40

周知のカルシトニンのうちで、更に、天然の形態よりも高い活性を有する誘導体が知られている。例えば、h C t のポテンシャル α - 螺旋状領域 (8 - 22) の疎水性を有する側の 3 ~ 5 個のアミノ酸残基を、ロイシンで置換すれば、より活性度の高いカルシトニン類縁体を得られる。この場合には、カルシトニン誘導体の活性は、アミノ酸残基 8 ~ 22 個の間のポテンシャルアンフィフィリック (a m p h i p h i l i c) α - 螺旋状領域と、その分子の生物学的活性との間の緊密な関連性により生じる一方で、多様な分子領域の配列自由度および空間的相互作用にも起因する。

【 0 0 0 6 】

しかし、s C t、および α - アミノスベリン酸 - 1 , 7 - e C t は別として、このような類縁体は、これまで、上述の疾病の治療に対して臨床的に用いられているにすぎない。

50

【 0 0 0 7 】

治療手段として用いられるカルシトニンは蛋白質加水分解速度（イン・ビボ半減期）が大きいために、今のところ、かなり多くの投与量が必要とされることにより、上述のように、急激な抗体形成（副次的抵抗性）、および副作用（禁忌）の可能性が起こるので、生物学的活性または蛋白質加水分解抵抗性を増大させることは非常に重要である。

【 0 0 0 8 】

この種の h C t に関して、低カルシウム血症の活性が高められた配列的に安定な類縁体が、独国特許（D E 4 4 3 1 1 2 1 A 1）に開示されている。この明細書では、h C t の誘導体が記載されており、位置 1 7 と位置 2 1 にあるアミノ酸の間に、共有結合のラクタムブリッジを付加することにより、2 0 員環が形成される。ここで、例えば、位置 1 7 のアミノ酸は、アスパラギン酸、位置 2 1 のアミノ酸は、リジンである。このような h C t 類縁体は、配列安定性と低カルシウム血症の活性が高められている。

10

【 0 0 0 9 】

しかし、上述の疾病の治療に対して、h C t 類縁体を使用可能にするためには、この程度の低カルシウム血症の活性では、尚、不十分である。

【 0 0 1 0 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、配列安定性と生物学的活性が大きなカルシトニン、またはカルシトニンの誘導体を提供することである。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

この目的は、請求項 1 の前提部分と特徴部分に記載されているようなカルシトニン、およびカルシトニンの誘導体により達成される。

20

【 0 0 1 2 】

本発明によるカルシトニン、およびカルシトニンの誘導体は、ヒトのカルシトニンに関して、位置 1 7 と位置 2 1 に対応する位置のアミノ酸の間にブリッジを有する。これらの位置では、この種のアミノ酸は、ブリッジにより、1 8 または 1 9 員環が形成されるように混合される。従来例から知られている 2 0 員環と比べて、本発明によるカルシトニンは、配列安定性が大きいので、蛋白質加水分解速度の進行を遅らせることができる。更に、本発明によるカルシトニン、およびカルシトニンの誘導体は、非常に大きな活性を有するので、投与量を減少させることができる。これらの配列は、ヒトの分子に非常に類似しているので、免疫反応（副次的抵抗性）は全く起こらない。概して、環収縮により、従来例と比べ、活性が非常に大きくなるので、例示している類縁体よりも大きなポテンシャルを有するカルシトニン類縁体の基幹構造として、1 9 または 1 8 員環が適切である。

30

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本発明によるカルシトニン、およびカルシトニンの誘導体に関する有益な実施例を従属請求項に記載している。

【 0 0 1 4 】

所望の連結体により、または、アミノ酸の適切な選択により、ラクタムブリッジを介して、位置 1 7 と位置 2 1 にあるアミノ酸の間にブリッジが架けられる。ヒトのカルシトニンのアスパラギンとトレオニンの代わりに、上記の位置に、アスパラギン酸とオルニチンが存在するカルシトニンは、特に有益な性質を有する。マウスのイン・ビボ試験では、このようなカルシトニンの活性は、ヒトが本来備えるカルシトニンの 3 6 0 倍であり、更に、鮭（s C t）のカルシトニンの 3 倍である。

40

【 0 0 1 5 】

位置 1 7 と位置 2 1 のアスパラギンとトレオニンの代わりに、グルタミン酸と α , γ -ジアミノブチル酸を用いることにより、1 9 員環と活性が大きい類縁体も形成される。

【 0 0 1 6 】

本発明によるカルシトニン誘導体は、1 8 員環を有しており、位置 1 7 と位置 2 1 のアス

50

パラギンとトレオニンのアミノ酸を、各々、アスパラギン酸と α , γ -ジアミノブチル酸で置換することにより得られる。このカルシトニン誘導体は、ヒトが本来備えるカルシトニンの約30倍である。

【0017】

活性が大きく、19または18員環を有する環状体を含有する類縁体の他の数例も、以下に示すカルシトニンの位置17と位置21のアミノ酸対を含めて、本発明に記載している：2-アミノアジピン酸とセリン、セリンと2-アミノアジピン酸、グルタミン酸とセリン、または、セリンとグルタミン酸。

【0018】

しかし、本発明による18または19員環を用いて、上述のように安定性と活性を高めることにより、ヒトのカルシトニンの場合だけでなく、豚のカルシトニン、または、鮭や鰻等の鰻後種のカルシトニン、または、これまでに知られているこれらのカルシトニンの類縁体の場合にも導かれる。例えば、位置1と位置7が α -アミノスベリン酸残基で置換される周知の高活性類縁体の活性は、上記のように、18または19員環を用いることにより、更に高められる。従って、既知の類縁体の場合であっても、本発明による18または19員環を用いて、安定性と活性を向上させることができる。

10

【0019】

本発明によるカルシトニン、およびカルシトニン誘導体に関する数例、および調合剤を以下に示す。

【0020】

20

図1は、ヒトのカルシトニンの主要構造を示す。位置17と位置21には、各々、アスパラギンとトレオニンが存在する。

【0021】

図2は、位置17と位置21のアミノ酸が、各々、アスパラギン酸とオルニチンにより置換された本発明によるヒトのカルシトニンを示しており、それらの側鎖は、ラクタムブリッジを介して、共有結合で連結され、19員環を形成する。この場合には、アミノ酸配列が単独文字コードで記述されているが、位置17と位置21のアミノ酸が、より明確に例示するために、3文字コードで示されており、ラクタムブリッジを介して連結された側鎖は構造式で示されている。更に、Cys¹とCys⁷の間のS-Sブリッジが示されている。

30

【0022】

マウスのイン・ビボ試験では、本発明によるカルシトニンの活性度は、図1で示されているヒトのカルシトニンの活性の363倍である。その結果、図2で示されているカルシトニンは、高活性と高配列安定性を有するので、治療のための投与量を減じることができるという利点がある。これにより、副次的抵抗性の発生が抑制される。更に、この場合、治療用として十分に大きな活性を有する最初のヒトのカルシトニンである。アスパラギン酸によるアスパラギンの置換を除く主要構造は、更に、アミノ酸において(トレオニンの代わりにオルニチンが用いられる)、ヒトが本来備えているカルシトニンの主要構造と僅かに異なるだけなので、極めて僅かな免疫反応しか認められず、その結果、副作用(例えば、副次的抵抗性等)発生が大いに抑制される。

40

【0023】

位置17と位置21のアスパラギン酸とオルニチンの代わりに、各々、対応する位置に、グルタミン酸と α , γ -ジアミノブチル酸を用いることにより、19員環も得られるので、高活性と高安定性を有し、且つ、極めて僅かな免疫反応を有するヒトのカルシトニン誘導体得られる。

【0024】

18員環の例として、ここでは、位置17と位置21に、各々、アスパラギン酸と α , γ -ジアミノブチル酸が配列されるカルシトニン誘導体が提示されている。この方法により、18員環を有するヒトのカルシトニン誘導体得られ、高活性と高配列安定性も有し、ヒトが本来備えているカルシトニンの主要配列との相異点が少ないために、僅かの免疫反

50

応しか起こらない。

【0025】

上記のような活性と安定性の向上は、例えば、鮭、鰻、豚、または、これらの既知の類縁体等の既知のカルシトニンで行うこともできる。

【0026】

本発明によるカルシトニンおよびカルシトニン誘導体は、基本的に、ペプチド合成により調合される。

【0027】

図1に示している $\text{cyclo}^{17,21} - [\text{Asp}^{17}, \text{Orn}^{21}] - \text{hCt}$ に関して、合成と純化、特徴、および、生物学的活性の試験を以下に記述する。

10

合成と純化

本発明に記載された配列的に安定しているカルシトニン類縁体の合成のために、ペプチド合成の固相法が、環式ペプチドの調合法と組み合わせて用いられ、Felix A.M. et al. (J. Pept. Prot. Res. 32 (1988), 441 - 445 を参照) による重合支持体 (樹脂) に直接、側鎖によりラクタムブリッジが施される。 hCt 類縁体 $\text{cyclo}^{17,21} - [\text{Asp}^{17}, \text{Orn}^{21}] - \text{hCt}$ の合成に関して、以下に詳細に記述する。

【0028】

固相ペプチド合成の慣例的な方法によれば、まず、ペプチド樹脂 (1) ($\text{N-Boc} - (\text{hCt} (22 - 32)) - \text{MBHA}$) が以下に示すように調合される。

20

【0029】

反応容器内で、HCL 塩の形態で存在する p - メチルベンジドリルアミン ($\text{p-methylbenzhydrylamine}$) 樹脂 4 g が、 0.65 mmol/g の置換段階で、DMF (ジメチルホルムアミド) 内のトリエチルアミンを用いて、まず中和され、DMF とジクロロメタン (DCM) で洗浄される。この後、 Boc-Pro-OH と DCC が、3 倍の濃度 (7.2 mmol) で、ジクロロメタン (30 ml) に加えられ、反応懸濁液が 18 時間振り動かされる。次に、重合体は、DCM、 iPrOH 、DCM と DMF で洗浄され、樹脂の装填は、ピクリン酸法 (0.62 mmol/g) により決定される。残存する自由アミノ群は、DCM (30 ml) 内で、1 時間、無水酢酸 (26 mmol) とピリジン (26 mmol) によりアセチル化が行われ、慣例的になっているように洗浄される。その後のペプチド鎖の伸展のために、DMF 内の TBTU 法 (保護アミノ酸の 3 倍の濃度) が用いられる。カイゼル試験により、カップリングの完了が確認される。 Ile^{27} と Phe^{22} に対しては、ダブルカップリングが行われる。アミノ酸誘導体は、 N-Boc 保護が施され、 Thr が、 Boc-Thr (Bz) として用いられる。 Boc 群の除去のために、30 分間、DCM 内の 50% TFA (トリフルオール酢酸) が用いられる。上記のように得られるペプチド樹脂 1 は、 0.57 mmol/g の置換体を有し、ペプチド樹脂の一部の小部分からペプチド樹脂を除去した後のアミノ酸分析と FAB-MS により特徴づけられる。上記のように得られるペプチド樹脂の一部 (500 mg ; 0.17 mmol) は、 Boc-Orn (Fmoc) (1 mmol) とカップリングが行われた後、ピリジン (1 mmol) の存在下で、無水酢酸 (1 mmol) を用いて、アセチル化が行われる。この時、ここで得られる「希薄」(樹脂の 0.21 mmol/g の置換段階) ペプチド樹脂は、アミノ酸残基 Asp^{17} (1 として記載されているカップリング法) まで伸展される。この場合、 N-Boc 保護アミノ酸誘導体 が用いられ、 Boc-Lys (2CI Z) と Boc-His (BOM) として、 His^{20} と Lys^{18} が用いられる。 Orn^{21} の $\text{N}\alpha$ - Fmoc 群、および、 Asp^{17} の β -カルボキシルのフルオレニルメチル (fluorenylmethyl) エステル (OFm) 保護は、Felix et al. の方法 ($\text{Felix A.M. et al. 2, Int. J. Pept. Protein Res. 32 (1988) 441 - 154}$) による DMF の濃度 20% ピペリジン溶液を用いて処理 (1×1 分; 1×28 分) を行うことにより除去される。その後、保護群により束縛されていない Asp^{17} の側鎖と Orn^{21} の側鎖の間に、DMF (50 mmol) 内の B

30

40

50

OP (ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ (y l o x y) - トリス (ジメチルアミノ) - ホスホニウムヘキサフルオロリン酸) (0.3 mmol)、および、DIEA (0.34 mmol) を、ペプチド樹脂に付加し、振り混ぜる (4 時間) ことにより、ラクタムブリッジが施される。カイゼル試験により、環化の追跡監視が行われる。

【0030】

カップリングの試薬除去の後、上記のように、ペプチド樹脂のアセチル化が行われる。このように、N - Boc 保護アミノ酸を用いて得られたペプチド樹脂が、TBTUカップリング法により、更なる伸展が施される。3 機能アミノ酸の側鎖は、保護され、Asp (β - OCH₃)、Cys (S - p - Mb)、Glu (γ - OBzl)、および Tyr (2 Br Z) である。ここで得られる NH₂ - cyclo^{17,21} - [Asp¹⁷, Orn²¹] - hCt - MHBA の 100 g は、HF / ansiole / ジメチル硫化物 / p - チオクレゾールの混合物 (各比率は、10 / 1 / 1 / 0.2 (v / v / v / w)) で処理され (-20 で 30 分間、および、0 で 1 時間)、0.27 M の最終濃縮では、システインも含有している。保護群により拘束されておらず、樹脂から除去された未処理品は、エーテルを付加することにより沈殿させられ、エーテルで 3 回洗浄され、10% の酢酸 (4 × 20 ml) 内に抽出され、凍結乾燥される。二硫化物のブリッジを閉鎖するための未処理品の空気酸化は、0.1 M の NH₄HCO₃ 溶液内で、暗室 (24 時間) で、かなり希釈 (10⁻⁴ M) されて行われる。その後、溶液は凍結乾燥される。このようにして得られた未処理品は、C¹⁸ コラム上で、予備の逆相 HPLC により純化される。30 ~ 70% の傾度 B が 30 分以上用いられ、A は水内の 0.058% TFA から成り、B は 90% のアセトニトリル内の 0.05% TFA から成る。ペプチドの検出は、220 nm で行われる。

【0031】

19 または 18 員環を有する他の hCt 類縁体の合成と純化は、ほぼ同様な方法で行われる。

特徴

ここで得られる cyclo^{17,21} - [Asp¹⁷, Orn²¹] - hCt の浄化度は、アミノ酸分析により決定される。同一性を実証するために、更に、MALDI - TOF 質量分析法や電気噴射質量分析法が用いられる。類縁体の配列の決定は、円偏光二色性の分光偏光法により行われる。

生物学的活性の試験

類縁体の生物学的活性は、BALB / c のマウスに関する低カルシウム血症のイン・ビボ試験により決定される。

【0032】

表 1 は、ヒトの本来から備わっているカルシトニン (hCt)、および、鮭 (sCT) からのカルシトニンと比較された cyclo^{17,21} - [Asp¹⁷, Orn²¹] - hCt の低カルシウム血症の作用の投与 - 応答の決定値を示す。生物学的活性は、2 μ g の hCt で達成されるように、この試験で最大限に達成され得る低カルシウム血症の作用の活性の比率 (%) で示されている。

【0033】

【表 1】

Concentra- tion of the peptides	Cyclo ^{17,21} - [Asp ¹⁷ ,Orn ²¹]-hCt	hCt	sCt
(ng/ml)	(%)	(%)	(%)
10	86.8	35.2	-
1	76.3	15.8	63.2
0.1	68.4	5.8	51.6
0.01	36.8	-	21.1

10

【 0 0 3 4 】

【 発明の効果 】

本発明の構成によれば、配列安定性と生物学的活性が大きなカルシトニン、またはカルシトニンの誘導体を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

20

【 図 1 】 アミノ酸に関する単独文字コードによるヒトのカルシトニンの主要構造である。

【 図 2 】 アミノ酸に関する単独文字コードによる c y c l o^{17,21} - [A s p¹⁷ , O r n²¹] - h C t の主要構造である。

【 符号の説明 】

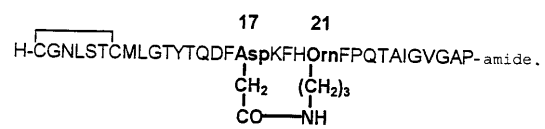
1 7 位置

2 1 位置

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 ユーゲン ベルンハーゲン
ドイツ連邦共和国 D - 7 2 0 7 4 テュービンゲン フリードゥリヒ - シャール - シュトラーセ
6

(72)発明者 ヘーアヴィク ブルンナー
ドイツ連邦共和国 D - 7 0 5 6 9 シュトゥットガルト アン デル ベッテライヒェ 6

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 独国特許出願公開第 0 4 4 3 1 1 2 1 (D E , A 1)
J. Med. Chem. , 1 9 9 5 年 , Vol.38 , pp.836-847

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/585

C07K 1/10

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

Science Direct