

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4163106号
(P4163106)

(45) 発行日 平成20年10月8日(2008.10.8)

(24) 登録日 平成20年8月1日(2008.8.1)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K 14/47	(2006.01)	C07K 14/47	ZNA
A61P 9/12	(2006.01)	A61P 9/12	
A61P 15/00	(2006.01)	A61P 15/00	
A61P 25/16	(2006.01)	A61P 25/16	
A61P 25/18	(2006.01)	A61P 25/18	

請求項の数 8 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-517015 (P2003-517015)	(73) 特許権者	504041457
(86) (22) 出願日	平成14年7月30日(2002.7.30)		ザ ソーク インスティテュート フォー
(65) 公表番号	特表2005-510458 (P2005-510458A)		バイオロジカル スタディーズ
(43) 公表日	平成17年4月21日(2005.4.21)		アメリカ合衆国 92037 カリフォル
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024238		ニア州 ラホーヤ ノース トーリー パ
(87) 国際公開番号	W02003/011823		インズ ロード 10010
(87) 国際公開日	平成15年2月13日(2003.2.13)	(74) 代理人	100077481
審査請求日	平成17年6月23日(2005.6.23)		弁理士 谷 義一
(31) 優先権主張番号	60/309,504	(74) 代理人	100088915
(32) 優先日	平成13年8月1日(2001.8.1)		弁理士 阿部 和夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジーン イー. エフ. リビエ
			アメリカ合衆国 92037 カリフォル
			ニア州 ラホーヤ ブラックゴールド ロ
			ード 9674

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CRFR1 選択的リガンド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CRFR2 に結合するより強い親和性でCRFR1 に結合する38残基のCRFR1リガンドペプチドであって、次式：

$Y_1 - Pro - Pro - R_6 - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - R_{14} - R_{15} - Arg - R_{17} - R_{18} - R_{19} - R_{20} - R_{21} - R_{22} - R_{23} - R_{24} - R_{25} - R_{26} - R_{27} - R_{28} - R_{29} - Gln - Glu - R_{32} - R_{33} - Lys - Arg - R_{36} - R_{37} - R_{38} - R_{39} - R_{40} - R_{41} - NH_2$ [式中、 Y_1 は、15個以下の炭素原子を有するアシル基であり； R_6 は、IleまたはNleであり； R_{14} は、CMLまたはLeuであり； R_{15} はCMLまたはLeuであり； R_{17} は、Glu、CML、またはAsnであり； R_{18} は、Val、CML、またはNleであり； R_{19} は、CML、Leu、またはIleであり； R_{20} は、Glu、またはHisであり； R_{21} は、Nle、またはArgであり； R_{22} は、Ala、またはThrであり； R_{23} は、ArgまたはLysであり； R_{24} は、Ala、Ile、またはAsnであり； R_{25} は、AspまたはGluであり； R_{26} は、Gln、Asn、またはGlyであり； R_{27} は、CML、Glu、Gln、またはLeuであり； R_{28} は、Ala、Lys、またはArgであり； R_{29} は、Gln、またはGluであり； R_{32} は、His、Ala、Gly、leu、Glu、D-His、D-Ser、またはD-Alaであり； R_{33} は、Aib、Ser、Leu、CML、またはIleであり； R_{36} は、Lys、Asn、CML、またはLeuであり； R_{37} は、CML、Leu、またはTyrであり； R_{38} は、Nle、またはLeuであり； R_{39} は、Glu、またはAspであり

10

20

; R₄₀は、Ile、CML、またはGluであり; R₄₁は、Ala、Ile、CML、Val、またはPheであり; ただし、環化結合が31位のGluとR₃₄の間に存在している。]を有することを特徴とするペプチドまたはその非毒性の塩。

【請求項2】

次式:

(シク口31-34) Y₁-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-R₁₄-Leu-Arg-Glu-R₁₈-Leu-R₂₀-Nle-R₂₂-R₂₃-Ala-R₂₅-Gln-Leu-Ala-R₂₉-Gln-Glu-R₃₂-R₃₃-Lys-Arg-R₃₆-R₃₇-Nle-R₃₉-R₄₀-R₄₁-NH₂ [式中、Y₁は、7個以下の炭素原子を有するアシル基であり; R₂₀はGluであり; R₂₂はAlaまたはThrであり; R₂₉はGlnまたはGluであり; R₃₂は、His、Ala、Gly、Leu、またはGluであり; R₃₆は、LysまたはLeuであり; R₃₇はLeuまたはCMLであり; R₃₉はGluまたはAspであり; R₄₀は、Ile、CML、またはGluであり; R₄₁は、Ile、またはAlaであり; 残りの可変基は、請求項1で規定したとおりである]を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

10

【請求項3】

次式:

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂、または

20

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-CML-NH₂; または

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Aib-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-CML-NH₂

30

を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

R₃₂が、His、D-His、またはAlaであることを特徴とする請求項2に記載のCRF。

【請求項5】

R₁₈がValであり、R₂₂がAlaであり、R₂₃がArgであり、R₂₄がAlaであり、R₂₅がGluであり、R₂₈がAlaであり、R₃₉がGluであり、R₄₁がIleであることを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

40

【請求項6】

次式:

(シク口31-34) Y₁-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-R₂₂-R₂₃-Ala-Glu-Gln-R₂₇-Ala-Gln-Gln-Glu-R₃₂-R₃₃-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-R₄₀-Ile-NH₂ [式中、R₂₂はAlaまたはThrであり; R₂₇はLeuまたはCMLであり; R₃₂はHisであり; R₃₃はSerまたはAibであり; R₄₀はIleまたはCMLである]を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチドまたはその非毒性の塩。

【請求項7】

50

次式：

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Asp-Ile-Ala-NH₂、または

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂；または

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Aib-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

【請求項8】

次式：

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-CML-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂、または

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-CML-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂；または

(シク口31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-D-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂

を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、ペプチド、およびそのペプチドを使用する哺乳動物の薬剤治療に関する。より詳細には、本発明は、1ファミリーのCRFレセプターに選択的な、ヘンテトラコンタペプチドCRFのペプチド類似体、そのようなCRF類似体を含む薬剤組成物、そのようなCRF類似体を使用する哺乳動物の治療方法、およびそのようなペプチドを使用して新薬のスクリーニングを行う方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所より与えられた許可番号P01-DK-26741のもと、政府の援助を受けて創出されたものである。米国政府は、本発明の中で一定の権利を有する。

【0003】

ヒツジCRF(oCRF)は、41残基のアミド化されたペプチドとして1981年に特徴付けられた。oCRFは、末梢への注射時に哺乳動物の血圧を低下させ、またACT

10

20

30

40

50

Hおよび エンドルフィンの分泌を刺激する。ラットCRF (rCRF) は、それより後に単離、精製、特徴付けが行われ、特許文献1に記載されているように、同族のアミド化されたヘンテトラコンタペプチドであることがわかった。ヒトCRF (hCRF) のアミノ酸配列は、rCRFと同じものであると決定された。hCRFおよびoCRFは、静脈内 (iv) 投与時に、哺乳動物において腸間膜動脈の血管拡張を引き起こして血圧を低下させる他、ACTHおよび エンドルフィンの分泌を刺激することも報告されている。しかし、脳室内 (icv) 投与時には、交感神経系の活性化に付随して、心拍数および平均動脈血圧が上昇する。

【0004】

もともとは、この視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系での役割に基づいて単離および特徴付けがなされたものの、CRFは、中枢神経系のいたるところに加え、副腎、胎盤、および精巣など、神経以外の組織中にも広く分布し、パラクリン調節因子または神経伝達因子としても働き得ることがわかっている。さらに、不安、うつ病、アルコール依存症、および神経性食欲不振症などの情動障害に、また生殖および免疫応答の調節にCRFが関与していそうなことは、CRFの発現の変化が、重要な生理的および病態生理学的結果を伴い得ることを示唆している。たとえば、HPA系を含む調節ループの乱れは、しばしば循環グルココルチコイド濃度を慢性的に上昇させるが、そのような患者は、躯幹肥満、筋肉の消耗、および受胎能の低下を含むクッシング症候群の身体的特徴を示す。

【0005】

視床下部 - 下垂体 - 副腎の活性化の媒介となる役割に加え、CRFは、ストレス応答の際に生じるものもある自律神経性および行動神経性の変化を調節することも示されている。このような行動神経性の変化の多くは、デキサメタゾン投与によって2倍にならず、下垂体切除に感受性でないので、HPAの活性化とは無関係に生じることが示されている。さらに、CRFをCNSに直接に注入すると、種々のストレスに対する自律神経性および行動神経性の応答が模倣される。CRFの末梢投与は、これらの変化に確かに影響を及ぼさないので、CRFは、食欲の抑制、覚醒の増強、および学習能力を含む機能に関して脳に直接に作用するようである。

【0006】

CRFの解剖学的分布が広範囲であり、生体作用が複合的である結果として、この調節性ペプチドは、多数の生体プロセスの調節に関与していると考えられる。CRFは、炎症性の応答の調節にも関与している。ある動物モデルでは、CRFが炎症誘発性の役割を担うことが認められているが、損傷によって誘発される血管透過性の増大を低減することにより、他では炎症を抑えるようである。

【0007】

最近の臨床データによって、コルチコトロピン放出因子 (「CRT」) は、神経精神医学的な障害や、アルツハイマー病などの神経変性疾患と関連付けられている。アルツハイマー病は、進行性の記憶喪失および痴呆をもたらす神経変性脳疾患である。最近の推定によると、米国では2百万人以上がこの疾患に罹患している。特に、いくつかの系統の証拠は、CRFをアルツハイマー病 (AD) と関連付けている (非特許文献1)。まず第1に、ADに罹患している大脳皮質領域では、CRFが劇的に (50%より多く) 減少し (非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)、相反してCRFレセプターが増大するが (非特許文献3、非特許文献5)、罹患していない大脳皮質領域では、CRFにもCRFレセプターにも量的な変化がない (非特許文献3)。次に、化学親和性架橋の研究によって、AD大脳皮質中の増加したCRFレセプター集団は、正常な生化学的性質を有することが示されている (非特許文献7)。さらに、脳脊髄液中のCRF濃度が低下しているという観察報告 (非特許文献8、非特許文献9) は、世界的な神経心理学的障害の評点とかなりの相関があり、認知障害が重いほど、脳脊髄液中のCRF濃度は低いことが示唆される (非特許文献10)。

【0008】

痴呆の治療に利用できる療法は、ごく限られている。最近認可された薬物 Tacrin

10

20

30

40

50

e (登録商標)は、アルツハイマー病患者の記憶をかるうじて改善するにすぎず、肝臓の酵素を上昇させる望ましくない副作用を伴う。脳C R F含有量の変化は、ある臨床的および病理学的特徴がA Dと共通している神経疾患のパーキンソン病および進行性核上麻痺でも見出されている。パーキンソン病の場合では、C R F含有量が減少し、A Dの場合と同様の染色パターンを示す(非特許文献4、非特許文献5)。進行性核上麻痺では、前頭葉、側頭葉、および後頭葉中のC R Fが、対照の値のほぼ50%に減少する(非特許文献4、非特許文献5)。

【0009】

ある種の抑うつ障害も、C R Fレベルの低下と関連している。季節性うつ病の抑うつ状態にある患者および慢性疲労症候群の疲労期にある患者では、脳脊髄液中のC R Fレベルがより低いことが示されている(非特許文献11)。改善速度の速いうつ病もあるが、多くは最終的に自然に制限されることになり、患者の回復速度には大きな違いがある。治療の主目的は、この種のうつ病の症状の重症度を軽減し、回復速度を速めること、ならびに再発および反復を予防することである。抗うつ薬が通常は投与されるが、重い副作用が結果として生じ得る(たとえば、フルオキセチンの自殺傾向、ブプロピオンの痙攣)。(非特許文献12を参照のこと。)

10

【0010】

低C R Fレベルを徴候とするストレス系の機能低下は、他の障害でも同様に役割を担うことがある。たとえば、ある形の肥満は、視床下部 - 下垂体 - 副腎系の機能低下を特徴とし(非特許文献13、非特許文献14)、ある心的外傷後ストレス症候群の患者は、コルチゾール排泄が低く(非特許文献15)、禁煙中の患者は、アドレナリンおよびノルアドレナリンの排泄、ならびに血中コルチゾール量が減少している(非特許文献16、非特許文献17)。C R Fは、視床下部 - 下垂体 - 副腎系の主要な調節因子であるので、これらの徴候はすべて、このような障害でC R Fが中心的役割を担っていることを指している。これらの障害の治療は効力が弱い。たとえば、肥満治療への最も有効な手法は、行動変更プログラムである。しかし、ほとんどの参加者は、目標体重に到達せず、再発率が高い(非特許文献18を参照のこと)。

20

【0011】

このような障害および疾患の治療の欠陥を考慮して、より有効な治療が求められている。本発明は、C R Fレベルの低下と、神経生理に基づく様々な障害および疾患との相関関係を利用して、遊離のC R Fレベルを上昇させることによりそのような疾患を有効に治療し、さらに、他の関連する利益を提供するものである。その作用は、C R F R 2を媒介とするので、他のC R Fレセプターが活性化されて生じるかもしれない副作用のために非選択的類似体よりもC R F R 2選択的類似体が好ましい。

30

【0012】

特許文献2に示されているものなど、アミノ酸のD - 異性体を含有するC R F作動薬が開発された。他のC R F作動薬は、特許文献3で開示されている。特許文献4および特許文献5で開示されているように、生物作用能(bioactivity)を示す環状C R F作動薬がその後が開発された。

【0013】

C R F - Rは、C R Fに対する細胞のGタンパク質結合応答に関与するレセプタータンパク質サブタイプファミリーを指して用いる。C R F - Rは、ヘテロ三量体Gタンパク質によって、様々な細胞内酵素、イオンチャネル、および輸送体に結合する。Gタンパク質は、原形質膜の細胞内側の面でレセプタータンパク質と会合する。C R F - Rに結合する作動薬は、サブユニット上でG T PがG D Pと交換されるのを触媒し(Gタンパク質の「活性化」)、解離し、1種(または複数)の種々のシグナル伝達酵素およびチャネルを刺激する。Gタンパク質は、特定のエフェクターを優先的に刺激し、したがって、Gタンパク質/レセプター相互作用の特異性によってシグナル伝達の特異性が決定される。C R F - Rタンパク質は、アデニル酸シクラーゼの調節、またおそらくはP I代謝回転を通してシグナル伝達を媒介する。たとえば、C R FがC R F - Rに結合し、それを活性化す

40

50

るときには、アデニル酸シクラーゼが、細胞内cAMPレベルの上昇を引き起こす。試験化合物が細胞内cAMPを上昇させられるかを評価する有効なバイオアッセイは、CRFレセプタータンパク質のシグナル伝達活性を調節できるかを判定する対象となる潜在的な作動薬または拮抗薬の存在下で、CRFレセプタータンパク質を発現させるcDNAを含む細胞を培養して実施する。そのような形質転換細胞では、潜在的な作動薬または拮抗薬の有効性の判定となる細胞内cAMPレベルの上昇または低下をモニタする。細胞内cAMPレベルまたはシクラーゼ活性を測定する方法は、当技術分野でよく知られている。

【0014】

CRFの生理活性は、少なくとも2種の親和性の高いレセプター、すなわち7回膜貫通型ファミリーのレセプターであるCRFR1およびCRFR2の活性化を通して媒介される[非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22、および非特許文献23]。トランスジェニックノックアウト動物[非特許文献24、非特許文献25、および非特許文献26]、アンチセンスオリゴヌクレオチド研究[非特許文献27、非特許文献28、および非特許文献29]、およびCRFR1拮抗薬[非特許文献30、非特許文献31、非特許文献32、および非特許文献33]からの証拠は、CRFR1が、CRFの抗不安効果の媒介に関与しているという証拠を提供する。

【0015】

CRF2は、より最近になって同定されたものであり[非特許文献34、非特許文献35、非特許文献36、および非特許文献37]、少なくとも3種のスプライス変異体として存在する。CRFR1およびCRFR2サブタイプは、そのアミノ酸配列が70%相同的であるが、薬理的にも[非特許文献38および非特許文献39]解剖学的にも[非特許文献40および非特許文献41]異なっていると思われる。

【0016】

CRFR1は、脳や感覚および運動の中継部位にくまなく分布しているが、CRFR2は、末梢部位、たとえば血管、心臓、消化管、肺、および皮膚など、CRFR1の発現がほとんどまたはまったくない体内領域中に発現される。さらに、CRFR1の発現は、新皮質、小脳、および感覚中継構造中で非常に高いが、CRFR2の発現は、一般に皮質下構造に限られる。下垂体内では、CRFR2 mRNAは、散在している細胞中に低レベルで検出可能であり、CRF1レセプターのmRNAは、前葉および中葉中で容易に検出可能である。

【0017】

CRFR1およびCRFR2 mRNAの分布がこのように不均一であることは、CRF関連系での各々のレセプターの機能的役割が特異的であることを示唆している。CRFR1は、主たる神経内分泌下垂体CRFレセプターであり、CRFの皮質および小脳での役割、および感覚性の役割において重要であるとみなすことができる。

【0018】

CRFR1およびCRFR2はともに、霊長類の下垂体、および新皮質(特に、前頭葉前部、帯状回(cingulate)、有線野(striate)、および島皮質)、扁桃核、海馬体のいたるところに見られた。霊長類では、CRFR1とCRFR2の両方が、認知、行動、および下垂体-副腎機能に対するCRFの作用の媒介に関与するといえる。青斑、小脳皮質、孤束核、視床、および線条内に(CRFR2でなく)CRFR1が存在し、脈絡叢、ある種の視床下部核、舌下神経前位核(nucleus prepositus)、および分界条核中に(CRFR1でなく)CRFR2が存在することも、霊長類の各々のレセプターサブタイプが中枢神経系内で別個の機能的役割を担うことを示唆している。たとえば、非特許文献42を参照されたい。

【0019】

CRFは、ストレスに対する内分泌性、自律神経性、行動神経性、および免疫性の応答が調節される際に主要な役割を果たすものと示唆されてきた。多数のCRFレセプターが最近になってクローニングされたことに加え、CRFレセプターの非ペプチドレセプター拮抗薬が発見されたことで、CRF研究の新時代が幕を開けた。現在、CRFの異なるタ

10

20

30

40

50

ーゲットが5種類存在し、特有のcDNA配列、薬理、および局在性を備えている。これらは、3種の異なる遺伝子によってコードされる3つの異なるクラスに分類され、(Gタンパク質結合レセプタースーパーファミリーに属する)CRFR1およびCRFR2、ならびにCRF結合タンパク質と呼ばれている。

【0020】

哺乳動物細胞系でこれらのレセプターを発現させたことで、親和性の高い非ペプチド選択的レセプター拮抗薬の同定が可能になった。自然の哺乳動物リガンドであるoCRFおよびr/hCRFは、CRFR1サブタイプに対する親和性は高いものの、CRFR2ファミリーに対する親和性がそれよりも低く、CRF2に対する標識を無効にする。[¹²⁵I]ソーバジンは、CRFR1とCRFR2サブタイプの両方に対する親和性の高いリガンドとして特徴付けられており、放射性リガンド結合とレセプターオートラジオグラフィの両方の研究において、選択的小分子レセプター拮抗薬発見の助けとなるツールとして使用されている。CRFR1サブタイプを特異的かつ選択的にブロックすることのできるいくつかの非ペプチドCRFR1拮抗物質は、最近になって同定された。CP154, 526、NB127914、およびアンタルミン(Antalarmin)などの化合物は、CRFがcAMPを刺激し、またはCRFが培養ラット下垂体前葉細胞からのACTH放出を刺激するのを抑制する。さらに、末梢に投与したときに、これらの化合物は、*ex vivo*の脳切片中で[¹²⁵I]ソーバジンのCRFR1への結合に競合し、血液脳関門を超えられることを示している。*in vivo*研究では、ラットにおいて、これら化合物を末梢に投与すると、ストレスによって誘発される血漿ACTH濃度の上昇が低減され、末梢でCRFR1をブロックできることが実証されている。さらに、CRFR1拮抗薬の末梢投与では、CRFによって誘発される発作活性が抑制されることも実証されている。これらのデータは、非ペプチドCRFR1拮抗薬が、全身投与時に中枢のCRFR1を特異的にブロックし得ることを明らかに示しており、CRFR1が様々な神経精神医学的疾患および神経変性疾患で担う役割を決定するのに使用できるツールとなることになる。その上、これらの分子は、経口投与で活性をもつこうした疾患向けの潜在的治療薬の発見および開発に有用であることがわかるであろう。非特許文献43。

【0021】

【特許文献1】米国特許第4,489,163号明細書

【特許文献2】米国特許第5,109,111号明細書

【特許文献3】米国特許第5,278,146号明細書

【特許文献4】米国特許第5,824,771号明細書

【特許文献5】米国特許第5,844,074号明細書

【特許文献6】米国特許第4,244,946号明細書

【特許文献7】米国特許第5,064,939号明細書

【特許文献8】米国特許第5,043,322号明細書

【特許文献9】米国特許第4,115,554号明細書(1978年9月19日)

【特許文献10】米国特許第4,133,805号明細書(1979年1月9日)

【特許文献11】米国特許第4,140,767号明細書(1979年2月20日)

【特許文献12】米国特許第4,161,521号明細書(1979年7月17日)

【特許文献13】米国特許第4,191,754号明細書(1980年3月4日)

【特許文献14】米国特許第4,238,481号明細書(1980年12月9日)

【特許文献15】米国特許第4,244,947号明細書(1981年1月13日)

【特許文献16】米国特許第4,261,885号明細書(1981年4月14日)

【特許文献17】国際公開第96/18649号パンフレット

【非特許文献1】Behan et al., Nature 378 (16): 284, 1995

【非特許文献2】Bissette et al., JAMA 254: 3067, 1985

【非特許文献3】DeSouza et al., Brain Research 397: 401, 1986

【非特許文献4】Whitehouse et al., Neurology 37: 905, 1987

【非特許文献5】DeSouza, Hospital Practice 23:59, 1988

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 6】Nemeroff et al., Regul. Peptides 25: 123, 1989
- 【非特許文献 7】Grigoriadis et al., Neuropharmacology 28: 761, 1989
- 【非特許文献 8】Mouradian et al., Neural Peptides 8: 393, 1986
- 【非特許文献 9】May et al., Neurology 37: 535, 1987
- 【非特許文献 10】Pomara et al., Biological Psychiatry 6: 500, 1989
- 【非特許文献 11】Vanderpool et al., J Clin. Endocrinol. Metab. 73: 1224, 1991
- 【非特許文献 12】Klerman et al. in Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, R. F. Prien and D. S. Robinson (eds.), Raven Press, Ltd. N.Y., 1994, p. 281
- 【非特許文献 13】Kopelman et al., Clin. Endocrinol (Oxford) 28: 15, 1988 10
- 【非特許文献 14】Bernini et al., Horm. Res. 31: 133, 1989
- 【非特許文献 15】Mason et al., J. Neu. Men. Dis. 174: 145, 1986
- 【非特許文献 16】West et al., Psychopharmacology 84: 141, 1984
- 【非特許文献 17】Puddy et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 11: 423, 1984
- 【非特許文献 18】Halmi et al. in Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, R. F. Prien and D. S. Robinson (eds.), Raven Press, Ltd. New York, 1994, p. 547
- 【非特許文献 19】Chen R., et al, P.N.A.S., 90: 8967-8971 (1993)
- 【非特許文献 20】Perrin, M., et al., P.N.A.S, 92: 2969-2973 (1995)
- 【非特許文献 21】Lovenberg, T., et al., P.N.A.S., 92: 836-840 (1995) 20
- 【非特許文献 22】K.D. Dieterich et al. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes (1997) 105: 65-82
- 【非特許文献 23】J. Spiess et al. Trends Endocrinol. Metab. (1998) 9: 140-145
- 【非特許文献 24】A. Contarino et al., Brain Res. (1999) 835: 1-9
- 【非特許文献 25】G.W. Smith et al., Neuron (1998) 20: 1093-1102
- 【非特許文献 26】P. Timpl et al., Nature Genet. (1998) 19: 162-166
- 【非特許文献 27】S.C. Heinrichs et al., Regul. Pept. (1997) 71: 15-21
- 【非特許文献 28】G. Liebsch et al., J. Psychiatric Res. (1999) 33: 153-163
- 【非特許文献 29】T. Skutella et al., Neuroscience (1998) 85: 795-805
- 【非特許文献 30】K.E. Habib et al., Proc. Mad. Acad. Sci. USA (2000) 97: 6079-6084 30
- 【非特許文献 31】J. Lundkvist et al., Eur. J. Pharmacol. (1996) 309: 195-200
- 【非特許文献 32】R.S. Mansbach et al., Eur. J. Pharmacol. (1997) 323: 21-26
- 【非特許文献 33】S.C. Weninger et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA (1999) 96: 8283-8288
- 【非特許文献 34】T. Kishimoto et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1108-1112
- 【非特許文献 35】W.A. Kostich et al., Mol. Endocrinol. (1998) 12: 1077-1085
- 【非特許文献 36】T.W. Lovenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 836-840 40
- 【非特許文献 37】M. Perrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 2969-2973
- 【非特許文献 38】D.P. Behan et al., Mol. Psychiatry (1996) 1: 265-277
- 【非特許文献 39】K.D. Dieterich et al., Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes (1997) 105: 65-82
- 【非特許文献 40】D.T. Chalmers et al., J. Neurosci. (1995) 15: 6340-6350
- 【非特許文献 41】D.H. Rominger et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. (1998) 286: 459-468
- 【非特許文献 42】Sanchez et al., J. Comp. Neurol. 408: 365-377
- 【非特許文献 43】McCarthy et al., Cuff Pharm Des. (1999) 5 (5): 289-315 50

- 【非特許文献 4 4】Ruhmann et al. P.N.A.S, 95, 15264-15269 (Dec. 1998)
- 【非特許文献 4 5】Schroder & Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965)
- 【非特許文献 4 6】Burgess, K., Solid-Phase Organic Synthesis (John Wiley & Sons 2000)
- 【非特許文献 4 7】Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, p 2149 (1964)
- 【非特許文献 4 8】Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Oxford Univ Press, 2000)
- 【非特許文献 4 9】Marshak & Liu, Therapeutic Peptides and Proteins : Formulation , Delivery, and Targeting (Current Communications in Molecular Biology) (Cold Spring Harbor Laboratory 1989) 10
- 【非特許文献 5 0】Cabilly, S., Combinatorial Peptide Library Protocols, 1st edition (Humana Press, 1998)
- 【非特許文献 5 1】Crabb, J.W., Techniques in Protein Chemistry V (Academic Press 1994)
- 【非特許文献 5 2】Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (New Directions in Organic and Biological Chemistry) (CRC Press 1997)
- 【非特許文献 5 3】Endocrinology, 91, 562 (1972)
- 【非特許文献 5 4】Perrin, M., et al., Endocrinology, 118, 1171-1179 (1986)
- 【非特許文献 5 5】Chen, et al., P.N.A.S., 90, 8967-8971 (October 1993) 20
- 【非特許文献 5 6】Marki, et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 3178 (1981)
- 【非特許文献 5 7】Rivier, et al., J. Chromatography, 288, 303-328 (1984)
- 【非特許文献 5 8】Hoeger, et al., BioChromatography, 2, 3, 134-142 (1987)
- 【非特許文献 5 9】Munson and Rodbard (1980), Anal. Biochem, 107: 220-239
- 【非特許文献 6 0】C. Rivier et al., Science, 218, 377 (1982)
- 【非特許文献 6 1】Folstein et al., J. Psychiatric Res. 12: 185, 1975
- 【非特許文献 6 2】Stewart and Morris, in Behavioral Neuroscience, R. Saghal, Ed. (IRL Press, 1993) p. 107
- 【非特許文献 6 3】Brits et al., Brain Res. Bull. 6, 71 (1981)
- 【非特許文献 6 4】Pellow et al., J. Neurosci. Meth. 14: 149, 1985 30
- 【非特許文献 6 5】McNamara and Skelton, Brain Res. Rev. 18: 33, 1993
- 【非特許文献 6 6】D S M I V、1 9 9 4 年
- 【非特許文献 6 7】Appel et al., Endoc. 128: 3237, 1991
- 【非特許文献 6 8】Krahn and Gosnell, Psychiat. Med. 7: 235, 1989
- 【非特許文献 6 9】McCarthy et al., Am. J. Physiol. 264: E638, 1993
- 【非特許文献 7 0】Gosnell et al., Peptides 4: 807, 1983
- 【非特許文献 7 1】Hotta et al., Life Sci. 48: 1483, 1991
- 【非特許文献 7 2】LeFeuvre et al., Neuropharmacol. 26: 1217, 1987
- 【非特許文献 7 3】National Center for Health Statistics, "Obese and Overweight Adults in the United States." Series 11, No. B0, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1983 40
- 【非特許文献 7 4】Smith, "Satiety and the Problem of Motivation," in D. W. Pfaff (ed.), The Physiological Mechanisms of Motivation, Springer-Verlag, New York, p. 133-143, 1982
- 【非特許文献 7 5】Rozin, Adv. Study Behav. 6: 21, 1976
- 【非特許文献 7 6】Argiles, Prog. Lipid Res. 28: 53, 1989; Wilding et al., Endocrinol. 132: 1939, 1993
- 【非特許文献 7 7】Drewnowski et al., Am. J. Clin. Nutr. 46: 442, 1987
- 【非特許文献 7 8】Kissileff, Neurosci. Biobehav. Rev. 8: 129, 1984
- 【非特許文献 7 9】Chrousos and Gold, JAMA 267:1244, 1992 50

【非特許文献 8 0】Klerman et al., Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, Prien and Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., New York, 1994

【非特許文献 8 1】Crawley et al., Peptides 6: 891, 1985

【非特許文献 8 2】DeSouza and Battaglia, Brain Res. 397: 401, 1986

【非特許文献 8 3】Gershon et al., Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, Prien and Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., New York, 1994, p. 467

【非特許文献 8 4】Wei E.T. et al., "Peripheral anti-inflammatory actions of corticotropin-releasing factor", pp. 258-276, Corticotropin-Releasing Factor (Ciba Foundation Symposium 172) John Wiley & Sons, 1993

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

CRFR1は、CRFR2と異なる機能を制御するので、他のファミリーにそれほど影響を与えずに一方のファミリーのレセプターを調節できることは価値があるはずである。oCRFおよびrCRFは、CRFR1とCRFR2の両方のファミリーを実質的に同じように結合する。非特許文献44は、[D-Phe¹¹、His¹²]ソーバジン(11-40)が、CRFR2に選択的に作用し、当時最高のCRFR1拮抗薬の約30%と同等であり、かつこれまでで最高のこの報告される化合物に匹敵するCRFR2拮抗作用に近い競合的拮抗作用を示す拮抗薬であることを報告した。その後、CRFR1選択的作動薬として生理活性をもつCRF類似体、ならびにまた有効な競合的拮抗薬として働いて、CRFR2にはそれほど影響を及ぼさずにCRFR1の活性化を調節する類似体を求めて、探索が続けられている。

20

【課題を解決するための手段】

【0023】

今回、CRFR1のリガンドである1クラスのCRFペプチドが発見されたが、それらは、hCRF/oCRFの類似体であり、好ましくは、未変性のCRF分子の31および34残基に対応する残基間に環化結合を有し、その環化結合が、そのような位置にあるアミノ酸残基の側鎖間のアミド結合であることが好ましい。このような分子のC末端は、未変性のアミドであるが、しかし、N末端は、最初の3残基を除去し、N末端の4位にある残基をアシル化することにより、短縮されていることが好ましい。類似の線状ペプチドも、CRFR1に対する選択性および高い結合強度を示すが、しかし、生物作用能があるとは考えられない。当技術分野でよく知られている技術を使用して、コア構造の環状部分を露出したままにすることにより、選択的作動薬を、CRFR1を選択的にブロックするCRF拮抗薬に変換することができる。

30

【0024】

本発明による薬剤組成物には、薬剤として許容される液体もしくは固体担体中に分散させたこのようなCRFR1リガンドまたはその非毒性の付加塩が含まれる。これらの物質は、生理的pHでの溶解性が高いので、そのような製剤が容易である。本発明によれば、哺乳動物、特にヒトにこのようなペプチドまたは薬剤として許容されるその付加塩を投与して、ACTH、エンドルフィン、リポタンパク質、コルチコステロン、および他のプロオピオメラノコルチン(POMC)遺伝子産物の分泌を調節し、かつ/または気分、行動機能、消化管機能、および自律神経系の活動に影響を及ぼすことができる。たとえば、このようなCRF類似体を投与して、ACTHレベルを上昇させると、ショックや同様の状態を治療することができる。ごく一般には、本発明の化合物の投与を利用すると、特にCRFR1に関連する広範な種類の障害または疾患を治療することができる。特に、本発明の化合物は、動物に投与して、うつ病、不安障害、パニック障害、強迫性障害、反応性高血圧、神経性食欲不振症、過食症、過敏性腸症候群、ストレス誘発性の免疫抑制、およびてんかんを治療することができる。

40

50

【0025】

このペプチドは、CRFレセプターに対する親和性が高いので、CRFレセプターに結合し、かつ/またはそれを活性化するさらにより強力な分子を求めて薬物スクリーニングを行うための価値ある方法の基盤も提供し、放射性的類似体は、CRFR1に選択的に結合するトレーサーとして使用することができ、高処理量のスクリーニングの目的で役立つ。

【0026】

特別な一態様では、本発明は、CRFR2に結合するより実質的に強い親和性でCRFR1に結合する38残基のCRFR1リガンドペプチドを提供するが、そのペプチドは、以下の式を有するペプチドまたはその非毒性の塩であり、その式とは、 Y_1 -Pro-P
ro-R₆-Ser-R₈-Asp-R₁₀-R₁₁-D-Phe-R₁₃-R₁₄-R₁₅-Arg
-R₁₇-R₁₈-R₁₉-R₂₀-R₂₁-R₂₂-R₂₃-R₂₄-R₂₅-R₂₆-R₂₇-R₂₈-R₂₉-
Gln-Glu-R₃₂-R₃₃-R₃₄-Arg-R₃₆-R₃₇-R₃₈-R₃₉-R₄₀-R₄₁-N
H₂ [式中、 Y_1 は、15個以下の炭素原子を有するアシル基、または放射ヨウ素標識され
たチロシンであり；R₆は、Ile、Met、またはNleであり；R₈は、Leuまたは
Ileであり；R₁₀は、LeuまたはCMLであり；R₁₁は、ThrまたはSerであり
；R₁₃は、His、Tyr、またはGluであり；R₁₄は、CMLまたはLeuであり；
R₁₅はCMLまたはLeuであり；R₁₇は、Glu、CML、Asn、またはLysであ
り；R₁₈は、Val、CML、Nle、またはMetであり；R₁₉は、CML、Leu、
またはIleであり；R₂₀は、Glu、D-Glu、またはHisであり；R₂₁は、Nle
e、Leu、CML、またはMetであり；R₂₂は、Ala、D-Ala、Aib、Th
r、Asp、またはGluであり；R₂₃は、ArgまたはLysであり；R₂₄は、Ala
、Gln、Ile、Asn、CML、またはAibであり；R₂₅は、AspまたはGlu
であり；R₂₆は、Gln、Asn、またはLysであり；R₂₇は、CML、Glu、Gln
、またはLeuであり；R₂₈は、Ala、Lys、Arg、またはAibであり；R₂₉
は、Gln、Aib、またはGluであり；R₃₂は、Aib、またはCys以外の天然
アミノ酸のLもしくはD異性体であり；R₃₃は、Aib、またはSer、Asn、Leu
、Ala、CML、もしくはIleのLもしくはD異性体であり；R₃₄はLysまたはOrn
であり；R₃₆は、Lys、Orn、Arg、Har、CML、またはLeuであり；
R₃₇は、CML、Leu、Nle、またはTyrであり；R₃₈は、Nle、Met、CM
L、またはLeuであり；R₃₉は、Glu、Aib、またはAspであり；R₄₀は、Il
e、Aib、CML、Thr、Glu、Ala、Val、Leu、Nle、Phe、Nva、Gly、
またはGlnであり；R₄₁は、Ala、Aib、Ile、CML、Gly、
Val、Leu、Nle、Phe、Nva、またはGlnであり；ただし、環化結合が3
1位のGluとR₃₄の間に存在していてよく、さらにD-Pheの代わりにD-2NaI
またはD-Leuとしてもよい]である。

【0027】

別の特別な態様では、本発明は、CRFR2に結合するよりも実質的に強い親和性でCRFR1に結合する38残基のCRFR1リガンドペプチドを提供するが、そのペプチドは、式 Y_1 -Pro-Pro-A-D-Xaa-B-Glu-Xaa_a-Xaa_b-Xaa_c
-C-NH₂ [式中、 Y_1 は、15個以下の炭素原子を有するアシル基、または放射ヨウ素
標識されたチロシンであり；Aは、r/hCRFまたは他のCRFファミリーペプチドの
対応する配列の、5位のProと12位のPheの間に見られる6アミノ酸残基の配列で
あり；D-Xaaは、D-Phe、D-2NaI、またはD-Leuであり；Bは、r/
hCRFまたは他のCRFファミリーペプチドの対応する配列の、12位のPheと31
位のAlaの間に見られる18アミノ酸残基の配列であり；Xaa_aは、Cys以外の任
意のLもしくはD型天然アミノ酸、またはAibであり；Xaa_bは、Aib、また
はSer、Asn、Leu、Ala、CML、もしくはIleのLもしくはD-異性体で
あり；Xaa_cは、LysまたはOrnのいずれかであり、その側鎖がGluの側鎖にア
ミド環化結合で結合していてよく；Cは、任意のCRFファミリーペプチドのC末端部分

の最後の7アミノ酸残基の配列であり；ただし、A、B、および/またはCにおいて、M e tの代わりにN l eまたはL e uとしてもよい]を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明のCRFレセプターリガンドは、CRFR1レセプター部位で活性を示すので、内分泌、精神医学、および神経性の障害または疾患を含む広範な種類の障害または疾患を治療するための治療薬として使用することができる。より詳細には、本発明のCRFレセプターリガンドは、CRFの過剰分泌から生じる生理的状态または障害を治療するのに有用であるといえる。CRFは、ストレスに対する内分泌、行動神経、および自律神経の応答を活性化し、調整している中枢の神経伝達物質であると考えられるので、本発明のCRFレセプターリガンドは、神経精神医学的な障害の治療に使用できる。本発明のCRFレセプターリガンドによって治療できる神経精神病的障害には、うつ病などの情動障害；一般化した不安障害、パニック障害、強迫性障害、異常な攻撃性など、不安に関連する障害；不安定狭心症や反応性高血圧など、心血管の異常；および神経性食欲不振症、過食症、過敏性腸症候群などの摂食障害が含まれる。CRFレセプターリガンドは、様々な疾患状態に随伴するストレス誘発性の免疫抑制、ならびに発作の治療にも使用できる。本発明のCRFレセプターリガンドの他の使用例には、(リウマチ様関節炎、ブドウ膜炎、喘息、炎症性腸疾患、および消化管の運動性などの)炎症状態、クッシング病、乳児痙攣、てんかん、乳幼児と成人の他の発作、および(アルコール依存症を含む)種々の物質乱用および禁断の治療が含まれる。

10

20

【0029】

本発明のもう1つの実施形態では、1種または複数のCRFレセプターリガンドを含有する薬剤組成物が開示される。投与する目的で、本発明の化合物を薬剤組成物として製剤してよい。薬剤組成物は、本発明のCRFレセプターリガンドと、薬剤として許容される担体および/もしくは希釈剤とを含む。CRFレセプターリガンドは、組成物中に、特定の障害を治療するのに有効な量、すなわち、所望のCRF活性を得るのに十分な量が存在すべきであり、毒性が患者に許容されることが好ましい。好ましくは、本発明の薬剤組成物は、投与経路に応じて用量あたり0.1mgから250mg、より好ましくは1mgから60mgのCRFレセプターリガンドを含んでいてよい。適切な濃度および投与量は、当分野の技術者によって容易に決定することができる。

30

【0030】

ペプチドを規定するのに使用した命名法は、非特許文献45で明細に述べられているものであり、慣例の表示に従って、アミノ基を左側に、カルボキシル基を右側に示す。標準の3文字表記を使用して、-アミノ酸残基を特定し、アミノ酸残基が異性体をもつ場合、別段の指示がない限り、表されているのはL型のアミノ酸である。たとえば、Ser = L-セリン、Orn = L-オルニチン、Nle = L-ノルロイシン、Nva = L-ノルバリン、Agl = アミノグリシン、Abu = L-2-アミノ酪酸、Dbu = L-2,4-ジアミノ酪酸、Dpr = L-2,3-ジアミノプロピオン酸、Hly = L-ホモリジン、およびHar = L-ホモアルギニンとする。さらに、以下の略語を使用する。すなわち、CML = C(CH₃)-L-ロイシン、Aib = C(CH₃)-L-アラニンまたは2-アミノイソ酪酸、Nal = L-(1-もしくは2-ナフチル)アラニン、Pal = L-(2-,3-もしくは4-ピリジル)アラニン、Cpa = L-(2-,3-,もしくは4-クロロ)フェニルアラニン、Aph = L-(2-,3-もしくは4-アミノ)フェニルアラニン、Amp = (2-,3-もしくは4-アミノメチル)フェニルアラニン、Nic = 3-カルボキシピリジン(またはニコチン酸)。

40

【0031】

一般に、CRFR1リガンドは、12位にD-異性体を含み、31位と34位の残基間に環化結合を含むことが好ましく、以下のアミノ酸配列を有するか、または等価なその非毒性の塩であり、その式とは、Y₁-Pro-Pro-R₆-Ser-R₈-Asp-R₁₀-R₁₁-D-Phe-R₁₃-R₁₄-R₁₅-Arg-R₁₇-R₁₈-R₁₉-R₂₀-R₂₁-R₂₂

50

- R₂₃ - R₂₄ - R₂₅ - R₂₆ - R₂₇ - R₂₈ - R₂₉ - Gln - Glu - R₃₂ - R₃₃ - R₃₄ - Arg - R₃₆ - R₃₇ - R₃₈ - R₃₉ - R₄₀ - R₄₁ - NH₂ [式中、Y₁は、15個以下の炭素原子を有するアシル基、または放射ヨウ素標識されたチロシンであり；R₆は、Ile、Met、またはNleであり；R₈は、LeuまたはIleであり；R₁₀は、LeuまたはCMLであり；R₁₁は、ThrまたはSerであり；R₁₃は、His、Tyr、またはGluであり；R₁₄は、CMLまたはLeuであり；R₁₅はCMLまたはLeuであり；R₁₇は、Glu、CML、Asn、またはLysであり；R₁₈は、Val、CML、Nle、またはMetであり；R₁₉は、CML、Leu、またはIleであり；R₂₀は、Glu、D-Glu、またはHisであり；R₂₁は、Nle、Leu、CML、またはMetであり；R₂₂は、Ala、D-Ala、Aib、Thr、Asp、またはGluであり；R₂₃は、ArgまたはLysであり；R₂₄は、Ala、Gln、Ile、Asn、CML、またはAibであり；R₂₅は、AspまたはGluであり；R₂₆は、Gln、Asn、またはLysであり；R₂₇は、CML、Glu、Gln、またはLeuであり；R₂₈は、Ala、Lys、Arg、またはAibであり；R₂₉は、Gln、Aib、またはGluであり；R₃₂は、Aib、またはCys以外の天然アミノ酸のLもしくはD異性体であり；R₃₃は、Aib、またはSer、Asn、Leu、Ala、CML、もしくはIleのLもしくはD異性体であり；R₃₄はLysまたはOrnであり；R₃₆は、Lys、Orn、Arg、Har、CML、またはLeuであり；R₃₇は、CML、Leu、Nle、またはTyrであり；R₃₈は、Nle、Met、CML、またはLeuであり；R₃₉は、Glu、Aib、またはAspであり；R₄₀は、Ile、Aib、CML、Thr、Glu、Ala、Val、Leu、Nle、Phe、Nva、Gly、またはGlnであり；R₄₁は、Ala、Aib、Ile、CML、Gly、Val、Leu、Nle、Phe、Nva、またはGlnであり；ただし、環化結合が31位のGluとR₃₄の間に存在してよく、さらにD-Pheの代わりにD-2NalまたはD-Leuとしてもよい]である。

【0032】

特に好ましい群のCRF作動薬は、(その非毒性の塩を含めて)次のアミノ酸配列、すなわち、

(シクロ31-34) Y₁ - Pro - Pro - R₆ - Ser - R₈ - Asp - Leu - R₁₁ - D-Phe - His - R₁₄ - Leu - Arg - Glu - R₁₈ - Leu - R₂₀ - Nle - R₂₂ - R₂₃ - Ala - R₂₅ - Gln - Leu - Ala - R₂₉ - Gln - Glu - R₃₂ - R₃₃ - R₃₄ - Arg - R₃₆ - R₃₇ - Nle - R₃₉ - R₄₀ - R₄₁ - NH₂ [式中、Y₁は、7個以下の炭素原子を有するアシル基であり；R₂₀はGluまたはD-Gluであり；R₂₂はAlaまたはThrであり；R₂₉はGlnまたはGluであり；R₃₂は、His、Aib、Ala、Gly、Leu、Gln、またはGluであり；R₃₆は、LysまたはLeuであり；R₃₇はLeuまたはCMLであり；R₃₉はGluまたはAspであり；R₄₀は、Ile、CML、またはGluであり；R₄₁は、Ile、Aib、またはAlaであり；残りの可変基は、上で規定したとおりである]を有する。

【0033】

ACTHレベルを上昇させるという見地から特に生物作用能があると考えられる特別な類似体は、

シクロ(31-34) [Ac-Pro⁴、D-Phe¹²、Nle^{21,38}、Glu³¹、Lys³⁴] - r/hCRF(4-41)、

(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴、D-Phe¹²、Nle^{21,38}、Glu³¹、Lys³⁴] - oCRF(4-41)、

(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴、D-Phe¹²、Nle^{21,38}、Glu³¹、Aib³³、Lys³⁴] - r/hCRF(4-41)、

(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴、D-Phe¹²、Nle^{21,38}、CML²⁷、Glu³¹、Lys³⁴] - r/hCRF(4-41)、

(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴、D-Phe¹²、Nle^{21,38}、CML^{27,40}、

Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF (4 - 41)、および
 (シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40},
 Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴] - r / hCRF (4 - 41)である。

【0034】

このペプチドは、全面的固相法、部分的固相法、断片縮合、または古典的な溶液添加など、適切な方法によって合成する。

【0035】

ペプチドの化学合成に共通しているのは、様々なアミノ酸部分の不安定な側鎖基を、その基が最後に除去されるまで、化学反応がその部位で起こらないようにする適切な保護基で保護することである。通常は、アミノ酸または断片上の - アミノ基を保護し、その間にその物質がカルボキシル基の所で反応した後、 - アミノ保護基を選択的に除去して、後続の反応がその位置で起こるようにすることも共通している。したがって、合成での1ステップとして、そのペプチド鎖の中に所望の配列中に位置する各々のアミノ酸残基を含み、それら残基のいくつかが側鎖保護基を有する中間化合物を生成することが一般的である。

【0036】

このペプチドは、非特許文献46および/または非特許文献47に記載のものなど、固相合成を使用して調製することが好ましい。したがって、CRF類似体は、直接的な方法で調製し、次いで生体活性があるかを簡単に試験することができ、これによって、CRFR1リガンドの即座の調製、評価がしやすくなる。1981年1月21日に発行されたRivierらの特許文献6に大体が述べられているように、固相合成は、保護された - アミノ酸を適切な樹脂に結合させることにより、ペプチドのC末端から開始する。CRFR1リガンドの出発材料は、たとえば、 - アミノ保護されたIleをMBHA樹脂に結合させることにより調製することができる。

【0037】

所望のアミノ酸配列が完成した後、樹脂に結合させたまま環化結合を形成させることが求められない限り、中間体ペプチドを以下に述べるとおり樹脂担体から外す。液体フッ化水素(HF)などの試薬で処理することにより外すのであるが、こうすると、ペプチドが樹脂から切断されるだけでなく、残っている側鎖保護基および - アミノ保護基がまだ存在すればそれもすべて切断されて、ペプチドが得られる。フッ化水素を切断に使用する際には、アニソールもしくはクレゾールとメチルエチルスルフィドを捕捉剤として反応容器に含める。配列中にMetが存在するときには、樹脂からペプチドを切断する前に、トリフルオロ酢酸(TFA)/エタンジチオールを用いてBOC保護基を切断して、S-アルキル化を排除してもよい。

【0038】

CRFペプチド類似体の環化ステップは当然、31位と34位の残基間の所望される結合の種類に応じて変わる。アミド環化結合(ラクタム架橋)を得るには、特許文献7および特許文献8が開示されているように、部分的に保護されたペプチドが樹脂に結合したままである間に環化を行うことができる。このような手順では、Asp、Glu、および/またはLysなど、ペプチド中間体中にある他の残基の側鎖が保護されたままである間に、2箇所の所望の側鎖間にアミド環化結合が有効に与えられる。

【0039】

31位残基の側鎖カルボキシル基と34位残基の側鎖アミノ基の間、または、等価な結合であると考えられるがその逆の間でのアミド結合による環化を行うときには、特許文献8に記載されているように、保護されたペプチドをMBHAもしくはBHA樹脂上で合成し、ペプチドが樹脂にまだ結合している間に、特定のカルボン酸側鎖のベンジルエステルをヒドラジドに誘導体化し、次いで、これを選択的に脱保護されたアミノ側鎖と反応させることが好ましい。アミド結合架橋に関与する残基のカルボキシル側鎖には、塩基に不安定な保護基、たとえばOFmを使用し、関与する他方の残基上のアミノ側鎖には、保護基としてFmocを使用して環化を行うことが好ましい。それがアシル化されようとされな

10

20

30

40

50

かろうと、N - 末端残基上の - アミノ保護基、および他の側鎖の保護基がすべてしかるべき位置にある間に、ピペリジンなどを使用して、2 個の塩基不安定基を除去する。この選択的な除去の後、B O P 処理することにより、環化を実現する反応を実施するが、これによって、アミド結合がほぼ完全に生じる。環化した後、H F などの試薬を使用して、ペプチドを完全に脱保護し、樹脂から除去する。任意選択で、T F A を使用して N 末端から B O C 保護基を最初に除去することもできる。

【 0 0 4 0 】

あるいは、このようなアミド結合によるペプチドの環化は、特許文献 9、特許文献 10、特許文献 11、特許文献 12、特許文献 13、特許文献 14、特許文献 15、および特許文献 16 の教示を利用して実施することもできる。

10

【 0 0 4 1 】

実施例で後述するのは、こうしたペプチドを合成するある好ましい方法であるが、しかし、当分野の技術者ならば、本発明のペプチドを合成する技術が容易にわかるであろう。たとえば、非特許文献 48、非特許文献 49、非特許文献 50、非特許文献 51、非特許文献 52 を参照されたい。

【 0 0 4 2 】

単層培養でラットの下垂体前葉細胞を使用して直接的なアッセイを実施すると、候補ペプチドが示す C R F 活性が何であるかを決定することができる。使用する手順は、非特許文献 53 に大体が述べられている。このアッセイは、候補ペプチドが C R F 作動薬として何らかの活性を示し、その細胞上の C R F レセプターを活性化することにより A C T H 分泌を刺激するかを示すものであり、この方法では、高用量の使用によって、固有の C R F 活性を測定する。候補 C R F R 1 リガンドも、非特許文献 54 に記載のものなど、既知の C R F レセプターを使用する結合アッセイで容易に評価される。C R F レセプターおよび結合アッセイの詳細は、本明細書中で後に論じる。ごく一般には、結合アッセイは、(シクロ 30 - 33) [I ¹²⁵ - D - T y r ¹², G l u ³⁰, L y s ³³, N l e ^{21,38}] - r / h C R F (12 - 41) や、D - H i s ³² を有するその類似体など、ヒト C R F - R 1 に対する親和性の高い放射性リガンドを使用し、ヒト C R F - R 1 を用いて実施することができる。たとえば、最初に命名した化合物は、h C R F R 1 に対する結合の K_D が 2 . 0 ナノモル (1 . 4 ~ 2 . 9) であり、これは、比較可能な D - P h e ¹² 類似体と実質的に等しい。C R F - R 1 レセプターを利用する 1 つの代表的な結合アッセイは、非特許文献 55 に記載されている。このようなアッセイは、好ましくは標識された親和性の高い環状 C R F 作動薬もしくは拮抗薬のような、標識された環状 C R F 類似体を使用して、ペプチド状または他の形状の潜在的な C R F 様リガンドをスクリーニングするのに使用すると有利である。

20

30

【 0 0 4 3 】

現在、C R F レセプターは、クローン化されており、前述の非特許文献 55、非特許文献 20、および非特許文献 21 で開示されている。結合親和性は、リガンドとレセプター間の相互作用の強度を指すのに使用する用語である。C R F レセプターに対する結合親和性を明らかにするために、本発明のペプチドは、当技術分野でよく知られている結合アッセイ実験で、¹²⁵I で放射標識した o C R F や [D - T y r ¹², N l e ^{21,38}] - r / h C R F (12 - 41) など、既知の親和性のトレーサーリガンドを使用して容易に評価される。このようなアッセイの結果は、各々のリガンドが C R F レセプターに結合する親和性を示し、既知の標準物質などに対する K_i、すなわち阻害性結合親和性定数で表示される。K_i (阻害性結合親和性定数) は、「標準物質」または「トレーサー」の放射性リガンドを使用して決定され、したがってレセプターまたは結合タンパク質からのトレーサーの置換を測定するのであるが、この定数は、そうしたトレーサーに関して最も正確に表示される。しかし、これらのアッセイが、レセプターなどの濃度を比較的低くした特別な条件下で慎重に実施される限り、算出された K_i は、その解離定数 K_D と実質的に同じになる。解離定数 K_D は、レセプターなどの結合部位の 2 分の 1 (50 %) を占有するのに必要なリガンド濃度を表すものである。K_i を試験することは、標識、たとえば放射ヨウ素標識

40

50

する必要のあるトレーサーが1種だけであるので特に効率的である。CRFレセプターに対する結合親和性の高い所与のリガンドは、空いている結合部位の少なくとも50%に結合するのに非常に少量のリガンドの存在しか必要としないので、そのリガンドとレセプターの K_D 値の数字は小さくなる。一方、特定のCRFレセプターに対する結合親和性の低い所与のリガンドは、そうした部位の50%に結合するのに比較的高濃度のリガンドの存在を必要とするので、そのリガンドとレセプターの K_D 値は、より大きな数字となる。

【0044】

特定のレセプタータンパク質に関して、 K_D が約10nM以下であるCRF類似体ペプチドとは、レセプタータンパク質の活性結合部位の少なくとも50%を占有するのに、約10nM以下のリガンド(すなわち、CRF類似体ペプチド)の濃度が必要となることを意味する。このような値は、放射ヨウ素標識した標準物質とわずか約0.8nM以下のレセプター(約10~20ピコモルのレセプター/膜タンパク質mg)とを使用して得た結果から公正に決定することができる。本発明によって提供される好ましいペプチドは、レセプター結合部位の少なくとも50%を占有(またはそれに結合)するために、約10ナノモル以下のリガンド濃度が必要となるような結合親和性(K_D)を有するので、高い親和性を有するとみなされる。このようなCRF類似体ペプチドには、結合親和性が約2nM以下であるものもある。一般に、この出願の目的では、約5ナノモル以下の解離定数を強い親和性を示すものであるとみなし、約2ナノモル以下の K_D を非常に強い親和性を示すものであるとみなす。上述のように、このようなCRF類似体ペプチドのCRFR1に対する親和性が実質的に高く、したがってその生体への効果が選択的である点が、特に有利であると考えられる。

【0045】

CRFレセプターを使用するこれらの結合アッセイは、すぐに実施でき、最初に同定し、または合成したペプチドで実施すると、そうしたペプチドが有効なCRFR1選択的リガンドとして見込みがあるかを容易に判定することができる。このような結合アッセイは、当分野の技術者によく知られている様々な方法の中で実施することができる。そうしたアッセイの詳細な例が、非特許文献54に述べられている。さらに、放射ヨウ素標識したチロシン残基を組み込まれた本発明のペプチドは、CRFR1に選択的な有効なトレーサーであり、高処理量スクリーニングに使用することができる。

【0046】

以下の実施例1は、固相法によって問題のCRFR1リガンドを合成する好ましい方法を述べるものである。これらの実施例は、限定するのではなく例示するために示すものである。

【実施例1】

【0047】

アミノ酸配列: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有する(シクロ31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)の合成は、Bachem, Inc.から入手できるものなど、置換範囲が約0.1から0.5ミリモル/樹脂gmである約3グラムのMBHA塩酸塩樹脂上で段階的に行う。この合成は、以下のようなプロトコルを使用して、樹脂1グラムあたり約0.28ミリグラム当量の置換度を有するMBHA樹脂上で、手作業で行う。

【0048】

【表 1】

ステップ	試薬および操作	混合時間分
1	メタノール (MeOH) で洗浄	1
2	10%TEA/DCM (v/v) で洗浄	1
3	メタノール (MeOH) で洗浄	1
4	DCMで洗浄 (3回分)	3
5	80パーセントTFAプラス5パーセントCH ₂ Cl ₂ 中m-クレゾール	10
6	メタノール (MeOH) で洗浄	1
7	DCM中TFA10%	1
8	MeOHで洗浄	1
9	DCM中TFA10%	1
10	DCMで洗浄 (3回分)	3
11	BOC-アミノ酸 (保護された特定のアミノ酸の溶解度に応じて、DCMまたはNMP30ml中に4当量) (1回分) プラスCH ₂ Cl ₂ 中DIC (4当量)	20~30

10

20

【 0 0 4 9 】

脱保護および中和を行った後、樹脂上にペプチド鎖を段々と構築する。一般に、2モルの塩化メチレン中DIC 1当量を加えた樹脂1グラムあたり、1から2ミリモルの塩化メチレン (DCM) 中BOC保護アミノ酸 (たとえば、樹脂の置換度に応じて2~5倍過剰) を20から30分間使用する。BOC-Arg (Tos) を結合させるときには、50% NMPと塩化メチレンの混合物を使用する。SerおよびThrには、ヒドロキシル側鎖の保護基としてBzlを使用する。p-ニトロフェニルエステル (ONp) を使用すると、AsnまたはGlnのカルボキシル末端が活性化されるが、たとえば、BOC-Asn (ONp) は、DMFと塩化メチレンの50%混合物中に1当量のHOBtを使用して、1晩かけて結合させることができる。AsnまたはGlnのアミド基は、活性エステル法の代わりにDIC結合を使用するときには、Xanによって保護する。2-Cl-Zは、Lys側鎖の保護基として使用するが、ラクタム架橋に加わることになるLys残基は例外であり、Lys³⁴の保護にはFmocを使用する。Tosは、Argのグアニジノ基およびHisのイミダゾール基を保護するのに使用し、GluまたはAspの側鎖カルボキシル基は、OFmで保護するGlu³¹を除き、OChxによって保護する。この合成の終わりには、以下の組成物、すなわち、

30

BOC-Pro-Pro-Ile-Ser (Bzl) - Leu-Asp (OChx) - Leu-Thr (Bzl) - D-Phe-His (Tos) - Leu-Leu-Arg (Tos) - Glu (OChx) - Val-Leu-Glu (OChx) - Nle-Ala-Arg (Tos) - Ala-Glu (OChx) - Gln (Xan) - Leu-Ala-Gln (Xan) - Gln (Xan) - Glu (OFm) - His (Tos) - Ser (Bzl) - Lys (Fmoc) - Arg (Tos) - Lys (2Cl-Z) - Leu-Nle-Glu (OChx) - Ile-Ile-樹脂担体が得られる。Xanは、アミノ保護基を非ブロック化するのに利用したTFA処理によって部分的または完全に除去されていることがある。次いで、このペプチド樹脂をTFAで処理して、N末端のBOC保護基を除去する。次いでこれを無水酢酸で処理して、プロリン残基をアセチル化する。

40

【 0 0 5 0 】

次いで、上で言及し、以下でさらに十分に述べる方法によって、残基31と34の環化 (ラクタム化) を行う。ジクロロメタン (DCM) (2x) および1-メチル-2-ピロリジノン (NMP) (2x) で洗浄した後、Glu³¹およびLys³⁴のOFm/Fmoc

50

基をそれぞれ、NMP中20%ピペリジン(1×1分および2×10分)で除去してから、NMP(2×)、DCM中10%ET₃N(v/v)(1×)、メタノール(MeOH)(2×)、およびDCM(2×)で洗浄する。適切な結合剤を使用して、たとえば、過剰のNMP中ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)の存在下、室温で、2倍過剰のHBTUまたはホウ酸O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(TBTU)と30分間反応させることによって、ペプチド樹脂の環化を行う。他の適切な試薬もよく知られており、それを使用してもよい。洗浄した後、所望であれば環化を繰り返して、確実に完成させてもよい。反応の完了は、周知のKaiserニンヒドリン試験によって確認される。

【0051】

最初に-20℃で20分間、次いで0℃で30分間、ペプチド樹脂1グラムあたり1.0gのp-クレゾールおよび15mlのフッ化水素(HF)で処理することによって、得られる環状ペプチド樹脂を切断し、脱保護する。高真空中でHFを除去した後、樹脂およびペプチドを乾燥ジエチルエーテルで洗浄し、次いでペプチドを、0.1%TFAを加えたMeCN:H₂O(60:40)での抽出にかけ、濾過によって樹脂から分離する。

【0052】

非特許文献56、非特許文献57、および非特許文献58に記載されているように、分取HPLCによってペプチドを精製する。HPLCによってクロマトグラフィーの画分を慎重にモニタし、ほぼ純粋な画分だけをプールする。

【0053】

正確な組成物が得られているかを調べるには、一定に沸騰しているHCl、3μlのチオグリコール/ml、および(内部の標準物質として)1ナノモルのNleを含む封をした排気管中で、r/hCRF類似体を140℃で9時間加水分解することができる。Beckman121MBアミノ酸分析装置を使用して、加水分解物のアミノ酸分析を行うと、38残基のペプチド構築物が得られたことが確認されるアミノ酸比が示される。MS分析は、後述のように使用する。

【0054】

逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を使用して、このペプチドが均一であるとの判断を下す。孔径300Åの5μmC₁₈シリカおよびpHの異なるTEAP緩衝液を充填した0.46×25cmカラムを備えたWatersHPLCシステムを使用して、これをさらにRP-HPLCにかける。溶液1000mlあたり1.0mlのTFAからなる0.1%トリフルオロ酢酸水溶液である緩衝液Aと、60%アセトニトリルである緩衝液Bを使用して、精製されたペプチドの脱塩を行う。ペプチドの純度は、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)による測定で約98%である。Cs⁺ガンを装備したJEOLモデルJMS-HX110二重収束質量分析計を用いて、液体2次イオン質量分析(LSIMS)の質量スペクトルを測定する。10kVの加速電圧、および25kVと30kVの間のCs⁺ガンボルト数を用いる。LSIMSを使用して得られた測定値4471.33は、計算値の4470.53と一致している。

【0055】

環化ステップを省いて(すなわち、すべてのGlu残基をOchxで保護し、すべてのLys残基を2Cl-Zで保護するか、または単にHF処理の前にピペリジンでFMOC基を脱封鎖して)、合成を繰り返し、比較できる線状ペプチドを生成する。

【0056】

非特許文献55に記載のとおり、ヒトCRFR1を発現させる細胞を用いる結合アッセイを実施する。CHO細胞中で安定に発現されたCRFR1およびCRFR2に対する試験ペプチドの親和性は、記載のとおり、¹²⁵I-(Nle²¹, Tyr³²)ヒツジCRF(対CRFR1)または[¹²⁵I-Tyr⁰-]Ucn(対CRFR2)の競合的置換によって決定した。少なくとも3回の実験からのデータをプールし、非特許文献59のLIGANDプログラムを使用して、阻害性解離定数(K_i)値(95%信頼限界)を算出した。クローン化されたhCRFR1は、結合した放射性リガンドが競合的に置換されたこ

10

20

30

40

50

とによって判定されるように、環状ペプチドを高い親和性で結合する。K_iは、約1.5 (0.9 ~ 2.6) nMであると決定されたが、これをr/hCRFの約0.95 (0.47 ~ 2.0) nMと比較することができる。線状ペプチドは、2.7 (2.2 ~ 3.4) ナノモルのK_iを示す。ヒトCRFR2を発現させる、安定にトランスフェクトされた同様のCHO細胞での差は歴然としており、環状ペプチドと線状ペプチドでの結果はそれぞれ、224 (140 ~ 370) nMと500 (330 ~ 770) nMであった。

【0057】

CRF作動薬が、ACTHおよび エンドルフィンの分泌に影響を及ぼすかを *in vitro* だけでなく *in vivo* で調べる。非特許文献53に大体が記載されている手順を使用して、培養したラット下垂体細胞によってACTHおよび エンドルフィンの分泌を刺激する *in vitro* 効力を測定し、合成oCRF (実験室標準) またはr/hCRF (代替標準) と比較する。*in vivo* 試験は、非特許文献60に記載の一般の手順を使用して実施する。環状ペプチドの *in vitro* 試験では、標準(oCRF) よりもかなり強い効力が示されるのに対し、線状ペプチドでは、標準よりは強いものの、より弱い効力が示される。環状ペプチドでは、末梢投与時に、血圧をかなり低下させることが示される。

【実施例2】

【0058】

実施例1で大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Asp-Ile-Ala-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-oCRF (4-41) を合成する。対応する線状ペプチドを得るために、環化の前にペプチド樹脂の一部を取り除き、それを切断し、脱保護する。この環状ペプチドは、ACTHおよび -END-LIの分泌を強く刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。線状ペプチドの生理活性は、それよりも非常に有意に低い。しかし、どちらのペプチドも、CRFR1を発現させるCHO細胞への結合は強く、CRFR2を発現させるCHO細胞への結合は弱い。

【実施例3】

【0059】

実施例3A

実施例1で大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Nle-Leu-Glu-Nle-Ala-Lys-Ala-Glu-Gln-Glu-Ala-Glu-Gln-Glu-Ala-Leu-Lys-Arg-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-Ala-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴]-AHC (4-41) を合成する。対応する線状ペプチドを得るために、環化の前にペプチド樹脂の一部を取り除き、それを切断し、脱保護する。この環状ペプチドは、ACTHおよび -END-LIの分泌を強く刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。線状ペプチドの生理活性は、それよりも非常に有意に低い。どちらのペプチドもCRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。

【0060】

実施例3B

実施例1で大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-Glu-Nle-Ala-Arg-Ile-Glu-Asn-Glu-Arg-Glu-Gln-Glu-Gly-Leu-Lys-Arg-

10

20

30

40

50

Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Val - NH₂を有するペプチド(シクロ3
1 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴] - サッ
カーウロテンシン(4 - 41)を合成する。

【0061】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0062】

実施例3C

実施例1で大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - Leu - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Ser - Lys - Arg - Lys - Leu - Nle - Glu - Asn - Phe - NH₂を有するペプチド(シクロ3
1 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴] - ブタ
CRF(4 - 41)を合成する。

10

【0063】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

20

【0064】

実施例3D

実施例1で大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - Leu - Ala - Gln - Glu - Glu - His - Ser - Lys - Arg - Lys - Nle - Nle - Glu - Ile - Phe - NH₂を有するペプチド(シクロ3
1 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,37,38}, Glu³¹, Lys³⁴] -
魚類CRF(4 - 41)を合成する。

【0065】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

30

【0066】

実施例3E

実施例1に大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Nle - Ser - Ile - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Nle - Leu - Arg - Asn - Nle - Ile - His - Arg - Ala - Lys - Nle - Glu - Gly - Glu - Arg - Glu - Gln - Glu - Leu - Ile - Lys - Arg - Asn - Leu - Leu - Asp - Glu - Val - NH₂を有するペプチド(シクロ3
1 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{14,18,24}, Glu³¹, Lys³⁴] -
マギーウロテンシン(4 - 41)を合成する。

40

【0067】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0068】

実施例3F

実施例1に大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Ile - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu -

50

Arg - Asn - Nle - Ile - Glu - Nle - Ala - Arg - Asn - Glu - Asn - Gln - Arg - Glu - Gln - Glu - Gly - Leu - Lys - Arg - Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Val - NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴] - コイウロテンシン(4-41)を合成する。

【0069】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0070】

実施例3G

実施例1に大体を述べた手順を使用して、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Nle-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Nle-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-His-Arg-Ala-Lys-Nle-Glu-Gly-Glu-Arg-Glu-Gln-Glu-Gln-Ile-Lys-Arg-Asn-Leu-Leu-Asp-Glu-Val-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{14,18,24}, Glu³¹, Lys³⁴] - カレイウロテンシン(4-41)を合成する。

【0071】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【実施例4】

【0072】

33位にSerの代わりにAib(2-アミノイソ酪酸)を用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：(シクロ31-34) Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Aib-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド：(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴] - r/hCRF(4-41)を生成する。対応する線状ペプチドを得るために、環化の前にペプチド樹脂の一部を取り除き、それを切断し、脱保護する。この環状ペプチドは、ACTHおよび - END - LIの分泌を強く刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。線状ペプチドの生理活性は、それよりも非常に有意に低い。どちらのペプチドもCRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。

【実施例5】

【0073】

Leu¹⁵の代わりにC Me Leuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-CML-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁵, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴] - r/hCRF(4-41)を生成する。

【0074】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0075】

10

20

30

40

50

実施例 5 A

Leu¹⁴の代わりにC MeLeuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-CML-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁴, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

【0076】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0077】

実施例 5 B

Leu¹⁹の代わりにC MeLeuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-CML-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, CML¹⁹, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

【0078】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0079】

実施例 5 C

Leu²⁷の代わりにC MeLeuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML²⁷, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

【0080】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0081】

実施例 5 D

Leu³⁷の代わりにC MeLeuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-CML-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴, CML³⁷]-r/hCRF(4-41)を合成する。

【0082】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有

10

20

30

40

50

意に低下させる。

【0083】

実施例5E

Glu¹⁷の代わりにC MeLeuを用いて実施例1のように合成を行い、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-CML-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁷, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

10

【0084】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0085】

実施例5F

Leu²⁷の代わりにC MeLeuを用い、His³²の代わりにD-Hisを用いて実施例1のように合成を行い、式：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-D-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML²⁷, Glu³¹, D-His³², Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

20

【0086】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【実施例6】

【0087】

実施例6A

ここではLeu¹⁴の代わりにC MeLeuを用いることを除き、実施例5Cの合成を繰り返して、式Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-CML-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂を有するペプチド(シクロ31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML^{14,27}, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41)を生成する。

30

【0088】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび- END-LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

40

【0089】

実施例6B

ここではVal¹⁸の代わりにC MeLeuを用いることを除き、実施例5Cの合成を再び繰り返して、式Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-CML-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-I

50

Ile - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², CML^{18,27}, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF(4 - 41)を生成する。

【0090】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0091】

実施例6C

Lys³⁶の代わりにC MeLeuを用いることを除き、実施例5Cの合成をもう1度繰り返して、アミノ酸配列Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Ser - Lys - Arg - CML - Leu - Nle - Glu - Ile - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,36}, Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF(4 - 41)を生成する。

10

【0092】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

20

【0093】

His³²の代わりにD - Hisを用いて上の合成を大体繰り返し、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - D - His - Ser - Lys - Arg - CML - Leu - Nle - Glu - Ile - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,36}, Glu³¹, D - His³², Lys³⁴] - r / hCRF(4 - 41)を生成する。

30

【0094】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0095】

実施例6D

Leu³⁷の代わりにC MeLeuを用いて実施例5Cの合成を繰り返し、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Ser - Lys - Arg - Lys - CML - Nle - Glu - Ile - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,37}, Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF(4 - 41)を生成する。

40

【0096】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0097】

実施例6E

ここではIle⁴⁰の代わりにC MeLeuを用いて実施例5Cの合成を繰り返し、

50

アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Ser - Lys - Arg - Lys - Leu - Nle - Glu - CML - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF (4 - 41)のほか、その線状対応物も生成する。

【0098】

HPLCおよびキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)によってペプチドの純度が約95%であることを確認し、質量分析(MS)によって同一性を確認する。液体2次イオン質量分析(LSIMS)を使用して得た、この環状ペプチドの測定値4498.32は、計算値の4498.56と一致している。線状ペプチドの測定値は、4516.45であり、計算値の4516.57に対応している。

10

【0099】

ヒトCRFR1を発現させる細胞を用いる結合アッセイは、実施例1に関して記載したとおりに実施する。少なくとも3回の実験からのデータをプールし、非特許文献59LIGANDプログラムを使用して、阻害性解離定数(K_i)値(95%信頼限界)を算出する。クローン化されたhCRFR1は、結合した放射性リガンドが競合的に置換されたことによって判定されるように、この環状ペプチドを高い親和性で結合する。線状ペプチドは、それより若干高いK_iを示す。ヒトCRFR2を発現させる、トランスフェクトされた同様のCHO細胞では、その差は有意であり、環状ペプチドおよび線状ペプチドでの結果はそれぞれ、共に弱い結合しか示さない。この環状ペプチドは、ACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

20

【0100】

実施例6F

ここではIle⁴¹の代わりにC MeLeuを用いて実施例5Cの合成を繰り返し、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Ser - Lys - Arg - Lys - Leu - Nle - Glu - Ile - CML - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,41}, Glu³¹, Lys³⁴] - r / hCRF (4 - 41)を生成する。

30

【0101】

この環状ペプチドは、CRFR1に強く結合し、CRFR2にはごく弱くしか結合しない。またACTHおよび - END - LIの分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

【0102】

実施例6G

ここではまたSer³³の代わりにAibを用いて実施例6Eの合成を繰り返し、アミノ酸配列：Ac - Pro - Pro - Ile - Ser - Leu - Asp - Leu - Thr - D - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Glu - Val - Leu - Glu - Nle - Ala - Arg - Ala - Glu - Gln - CML - Ala - Gln - Gln - Glu - His - Aib - Lys - Arg - Lys - Leu - Nle - Glu - CML - Ile - NH₂を有するペプチド(シクロ31 - 34) [Ac - Pro⁴, D - Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴] - r / hCRF (4 - 41)のほか、その線状対応物も生成する。

40

【0103】

HPLCおよびキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)によってペプチドの純度が約98%であることを確認し、質量分析(MS)によって同一性を確認する。液体2次イオン

50

質量分析 (LSIMS) を使用して得た、この環状ペプチドの測定値 4496.20 は、計算値の 4496.58 と一致している。線状ペプチドの測定値は、4514.45 であり、計算値の 4514.59 に対応している。

【0104】

ヒト CRFR1 を発現させる細胞を用いる結合アッセイは、実施例 1 に関して記載したとおりに実施する。クローン化された hCRFR1 は、結合した放射性リガンドが競合的に置換されたことによって判定されるように、この環状ペプチドを高い親和性で結合する。線状ペプチドは、それより若干高い K_i を示す。ヒト CRFR2 を発現させる、安定にトランスフェクトされた同様の CHO 細胞では、その差は有意であり、環状ペプチドおよび線状ペプチドでの結果はそれぞれ、共に弱い結合しか示さない。この環状ペプチドは、ACTH および -END-LI の分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

10

【0105】

実施例 6H

ここではまた Ser³³ の代わりに D-Ser を用いて実施例 6E の合成を繰り返し、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-D-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂ を有するペプチド (シクロ 31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, D-Ser³³, Lys³⁴]-r/hCRF (4-41) のほか、その線状対応物も生成する。

20

【0106】

HPLC およびキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) によってペプチドの純度が約 96% であることを確認し、質量分析 (MS) によって同一性を確認する。液体 2 次イオン質量分析 (LSIMS) を使用して得た、この環状ペプチドの測定値 4498.46 は、計算値の 4498.56 と一致している。線状ペプチドの測定値は、4516.27 であり、計算値の 4516.57 に対応している。

【0107】

ヒト CRFR1 を発現させる細胞を用いる結合アッセイは、実施例 1 に関して記載したとおりに実施する。線状ペプチドは、若干高めの K_i を示す。ヒト CRFR2 を発現させる、安定にトランスフェクトされた同様の CHO 細胞では、その差は有意であり、環状ペプチドおよび線状ペプチドでの結果はそれぞれ、共に弱い結合しか示さない。この環状ペプチドは、ACTH および -END-LI の分泌を刺激し、末梢投与時に血圧を非常に有意に低下させる。

30

【0108】

実施例 6I

ここではまた Ser³³ の代わりに D-Ala を用いて実施例 6E の合成を繰り返し、アミノ酸配列：Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-D-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂ を有するペプチド (シクロ 31-34) [Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, D-Ara³³, Lys³⁴]-r/hCRF (4-41) のほか、その線状対応物も生成する。

40

【0109】

HPLC およびキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) によってペプチドの純度が約 97% であることを確認し、質量分析 (MS) によって同一性を確認する。液体 2 次イオン質量分析 (LSIMS) を使用して得た、この環状ペプチドの測定値 4482.47 は、計算値の 4482.57 と一致している。線状ペプチドの測定値は、4500.61 であ

50

り、計算値の4500.58に対応している。

【0110】

ヒトCRFR1を発現させる細胞を用いる結合アッセイは、実施例1に関して記載したとおり実施する。クローン化したhCRFR1は、結合した放射性リガンドが競合的に置換されたことによって判定されるように、この環状ペプチドを高い親和性で結合する。線状ペプチドは、それよりも若干高い K_i を示す。ヒトCRFR2を発現させる、安定にトランスフェクトされた同様のCHO細胞では、その差は有意であるが、環状ペプチドと線状ペプチドでの結果はそれぞれ、両方とも弱くしか結合しないことを示す。この環状ペプチドは、ACTHおよび-END-RIの分泌を刺激し、末梢投与時には血圧を非常に有意に低下させる。

10

【0111】

CRFは、下垂体-副腎皮質系を深く刺激し、脳内で広範なストレス応答の媒介となるように作用する。このようなCRF作動薬は、内因性グルココルチコイド産生が少ない、ある種の患者においてこの系の機能を刺激するのに有用なはずであり、たとえば、外部からグルココルチコイド療法を受けても下垂体-副腎皮質機能が抑制されたままである患者の下垂体-副腎機能を回復させるのに有用なはずである。

【0112】

学習および記憶の向上

上述のように、本発明は、患者に治療有効量のCRFR1リガンドを投与することにより、学習および記憶を向上させる方法を提供する。そのような患者は、痴呆、または学習および記憶の喪失という症状に基づき、臨床での診断を通して確認することができる。健忘障害のある個人は、新しい情報を学習する能力を損なっており、または予め学習した情報や過去の出来事を思い出すことができない。記憶障害は、自発的な想起を必要とする課題を与えると最も明らかとなり、検査官が後で思い出すように患者に刺激を与えるときに明らかになることもある。記憶障害は、社会的または職業的役目に顕著な障害を起こすほど十分に重くなければならず、それまでの機能レベルからの有意な衰えが表われていなければならない。記憶障害は、年齢に関係していることも、疾患もしくは他の原因の結果であることもある。

20

【0113】

痴呆は、臨床的に有意な複合的な認知能力の障害を特徴とし、それまでの機能レベルからの有意な変化に表われる。新しい題材の学習不能、または予め学習した題材の忘却を伴う記憶障害には、痴呆の診断を下す必要がある。記憶は、患者に情報を記録し、憶え、思い出し、認知するよう要求することにより正式に試験することができる。痴呆の診断にはまた、次の認知障害、すなわち、失語、失行、失認、または執行能力障害の少なくとも1つが必要である。これらの、それぞれ言語、運動能力、対象認知、および抽象的思考の障害は、記憶障害と共に、職業的または社会的役目に障害を起こすほど十分に重くなければならず、それまでのより高い機能レベルからの衰えが表われていなければならない。

30

【0114】

さらに、CRFレベルと学習および記憶の障害とを相互に関連させるいくつかの生化学的試験を利用してもよい。たとえば、脳脊髄液中の遊離CRFレベルをELISAまたはRIAによって測定することができる。追加として、またはこのアッセイの代わりに、CRF-BPまたはCRFレセプターに特異的な標識されたりガンドで描かれた脳画像診断を利用して、遊離のレセプターまたはCRF-BPを定量することもでき、こうすると遊離CRFの減少がわかるようになる。最後に、結合していないCRFに特異的なリガンドを用いる脳の画像診断を利用して、脳中遊離CRF量を直接に評価することもできる。

40

【0115】

患者のミニメンタルステータスは、臨床医が患者に学習および記憶障害があるかを判定するのに使用する標準テストである学習および記憶のミニメンタルテスト(Minimental Test for Learning and Memory)によって記録される(非特許文献61)。このテストは、いくつかの簡単な課題および筆記問題を含む

50

。たとえば、頭部外傷、コルサコフ病、または発作の患者を含む、いく例かのタイプの健忘症の患者では、「対連合」学習能力に障害がある (Squire, 1987年)。10組の無関係な単語 (たとえば、軍隊 - テーブル) を患者に読ませる。次いで、患者に、各組の最初の単語を述べたときに2番目の言葉を思い出すように要求する。記憶障害の尺度は、マッチングさせた対照群に対する、思い出された対連合単語数の減少である。これは、迅速に悪化して痴呆または健忘障害の初期段階になる種類の短期作業記憶の指標として役立つ。

【0116】

学習および記憶の向上とは、(a) リガンド阻害薬で治療した患者の作業をプラセボ群のメンバーと比べた統計的に有意な差、または (b) 疾患モデルに直接関係のある測定値について、作業の正常な方向への統計的に有意な変化のどちらかとなる。この戦略は、記憶を向上させる治療上有用なコリン様作用薬の同定にうまく用いられてきた。疾患の動物モデルまたは臨床例は、正常な対照と識別できる定義付けによる症状を示す。したがって、必ずしも完全な症状の逆転でなく、有効な薬物療法の尺度が重要となる。記憶病状の動物モデルおよびヒトモデルでは共に、記憶の課題作業の向上に役立つ臨床的に有効な「認知強化」薬によって向上を促進することができる。たとえば、アルツハイマー病型の痴呆および記憶喪失の患者のコリン様作用薬に代わる療法として機能する認知能力強化薬は、対連合課題などのパラダイムで短期作業記憶を有意に向上させる (DavidsonおよびStem, 1991年)。記憶障害に治療によって介入するための別の潜在的な適用例として示されるのは、年齢に関係のある作業障害であり、これは、加齢マウスでの近時記憶の長期的研究によって有効にモデル化されている (ForsterおよびLal, 1992年)。

【0117】

動物では、有益な認知強化作用および不安に関連した潜在的な副作用があるかCRF感受性ニューロンの活性化を調べるのに利用できる学習および記憶のモデルがいくつか確立されている。認知強化作用は、モリス迷路 (非特許文献62)、Y字迷路 (非特許文献63)、一方向能動的回避試験、および二方向受動的回避試験によって測定し、不安に関連する作用は、高架式十字迷路で評価する。(非特許文献64)

【0118】

モリス水迷路は、学習および記憶の最も確実なモデルの1つであり、様々な薬理作用物の認知強化作用に感度がある (非特許文献65)。この迷路で行われる課題は、動物の空間学習およびヒトの記憶固定に重要な脳領域である脳の海馬の操作に特に感度がある。さらに、モリス水迷路作業の向上は、認知強化薬としての化合物が臨床で効力を発揮する前兆である。たとえば、コリンエステラーゼ阻害薬または選択的ムスカリン性コリン作動薬による治療は、学習および記憶のモリス迷路動物モデル、ならびに痴呆のある臨床集団で学習障害を逆転させる (McNamaraおよびSkelton, 1993年; DavidsonおよびStem, 1991年; McEnteeおよびCrook, 1992年; Dawsonら, 1992年)。その上、この動物パラダイムは、加齢に伴う障害度の増大 (Levyら, 1994年)、および健忘症患者の特徴である、試験前の遅滞または干渉に対する記憶痕跡の脆弱性の増大 (StewartおよびMorris, 1993年) を実際にモデル化している。

【0119】

この試験は、粉乳が加えてあるために不透明な微温水中に動物を入れる簡単な空間学習課題である。動物は、迷路内および試験空間内に置かれた視覚的な手がかりから踏み台の位置を学習するのであるが、この学習を位置の学習と呼ぶ。

【0120】

以下でより詳細に論じるように、1~3日の各日につき訓練の15分前に、各群の動物に対照溶液または1回分のリガンド阻害薬を経口投与する。対照動物は通常、3日間の訓練後に5秒から10秒以内に踏み台に到達する。リガンド阻害薬の記憶調節作用の尺度は、この時間の変動である。リガンド阻害薬を投与した結果、シナプスCRFの有用性が用

10

20

30

40

50

量依存的に増大し、習得および記憶回復の行動が用量依存的に向上する。

【0121】

視覚的弁別に基づくY字型迷路試験は、動物の学習および記憶のもう1つの検定法である。この迷路では、迷路の2本のアームの末端が、透明なプラスチックパネルになっており、その後40ワットの電球がある。スタートボックスは、手動で作動させるギロチン扉によって第3のアームから隔てられている。最初のトライアルでは、すべての動物に5分間迷路を探索させ、各アームでペレット餌にありつけるようになっている。2日目に、各動物を、扉を閉めた状態のスタートボックスに入れる。扉を開けてすぐに、動物がアームを下り、両方のアームに置かれたペレットを食べるようにする。3日目に、選択地点で1本のアームが封鎖されている群、区別を示す刺激が存在しない群、開いた目標ボックスで2個のペレット餌にありつける群の3群にして動物に6回のトライアルを受けさせる。4～10日目に、ペレット餌のあるアームの先端で光を照らし、ここでも3つの群にして10回試験を行う。動物がペレット餌に到達するのにかかる時間を記録する。

10

【0122】

リガンド阻害薬がY字型迷路において学習および記憶を向上させるのに有効であるかは、次のように試験する。4～10日目の各訓練トライアル単位の15分前に、各群の動物に对照溶液または各投与分のリガンド阻害薬を経口投与する。对照動物は、50%正確な選択をすることが予想される。記憶についての治療効力の尺度は、正確な応答の増加である。

【0123】

一方向能動回避試験は、動物の学習および記憶のもう1つの検定法である。この試験を使用して、年齢に関係した記憶障害の向上を評価することができる。動物をフットショック区画に置き、安全区画への開放扉を回避のための信号として使用する。簡潔に述べると、この試験では、動物を、ステンレス鋼の棒で組み立てられた格子状の床を入れてあるスキナー箱の囲いに入れる。箱の各端にある7ワットの光および音の発生器を条件刺激として使用する。ラットまたはマウスは、扉から向きがそれているフットショック区画に置くことにより最初に訓練を行う。安全区画への扉の開放と同時にショックを与える。時折、この試験を、扉を開放した後に10秒間遅らせてショックを与えることを除き、繰り返す。動物がフットショック区画を離れるのにかかる時間を記録する。

20

【0124】

リガンド阻害薬が一方向回避において記憶および学習を向上させるのに有効であるか、または对照溶液を以下のように試験する。訓練の15分前に動物にリガンド阻害薬を投与する。24時間後、リガンド阻害薬をさらに投与せずに保持されているか各群を試験する。効力の尺度は、フットショック区画を離れるまでの滞在時間の短縮である。

30

【0125】

二方向受動的回避試験は、学習および記憶のもう1つの検定法である。動物をスキナー箱の安全区画に置き、動物がフットショック区画に入るとすぐに、扉が閉じ、弱いショックが与えられる。2番目の区画に入るまでの滞在時間を記録する。1日から7日後に記憶を試験する。そのときは、ショックを与えない。

【0126】

リガンド阻害薬が学習および記憶を向上させるのに有効であるかは、次のように試験する。訓練の直前に、各群の動物に对照溶液または各投与分のリガンド阻害薬を傾向投与する。次いで、フットショック区画に入るまでの滞在時間を測定する。

40

【0127】

高架式十字迷路試験は、明るい開かれた空間対暗い囲まれた空間を使用する接近-回避状況で不安発生応答を測定するものである。両方の空間は、高架式であり、十字の形で交差する2本の通路に仕立てられている。この種の接近-回避状況は、「情動性」の古典的な試験であり、脱抑制およびストレスを生じさせる処置に非常に感度がある。動物を迷路の中央にのせ、5分間の試験期間中に4本のアームすべてに自由に出入りさせる。各アームで過ごした時間を記録する。

50

【0128】

ヒトでは、学習および記憶を向上させる方法は、ウェクスラー記憶検査や対連合記憶課題のような試験によって測定することができる。ウェクスラー記憶検査は、認知機能および記憶容量の広く使用されている筆記試験である。正常な集団では、この標準テストの平均が100であり、標準偏差が15であるので、得点が10～15点低いことで軽い健忘症を、20～30点低いことでより重い健忘症をというように検出することができる(Squire、1987年)。臨床面接を行う間、ミニメンタルテスト、ウェクスラー記憶検査、または対連合学習を含むがこれだけに限らない一連の試験を適用して、記憶喪失の症候を診断する。これらの試験は、一般の認知障害と特殊な学習/記憶容量喪失の両方に対して大体の感度を備えている(Squire、1987年)。痴呆または健忘障害の特殊な診断は別として、これらの臨床手段では、加齢の経過に伴う精神機能の他覚的な減退を反映する、年齢に関係した認知障害で、その対象者の年齢を考えれば正常範囲内にあるものも同定される(非特許文献66)。上述のように、本発明では、たとえば、リガンド阻害薬によって治療した患者の作業をプラセボ群のメンバーと比べて、または同じ患者に課した後続の試験と比べて、対連合試験において正常に向かう方向に統計的に有意な差があれば、学習および記憶の「向上」が存在する。

10

【0129】

摂食量の減少

上述のように、本発明は、患者に治療有効量のCRFR1リガンドを投与することを通して摂食量を減少させる方法を提供する。CRFは、摂食量の重要な調節因子であることがわかっている。たとえば、CRF作動薬の投与、または内在CRFレベルを上昇させる条件(たとえばストレス)によって摂食量は縮小する(非特許文献67、非特許文献68、非特許文献69)。したがって、CRFの投与は、夜間の摂食量を有意に減少させ(非特許文献70)、ラットの体重を減らし(非特許文献71)、褐色脂肪組織中での温度応答を増大させる(非特許文献72)。さらに、既知の最強の摂食刺激物質であるニューロペプチドY(NPY)の作用は、CRFレセプターリガンドを同時投与すると、効力が高まり得る。

20

【0130】

患者は、肥満している状態から確認することができる。肥満した個人は、その個人の年齢、性別、および身長で正常であるとみなされる目標体重よりも目方があり、体格指数(BMI、体重kg/身長m²として算出)が同じ基準集団の上位15パーセント以内に入っていることにより客観的に同定することができる(非特許文献73)。さらに、特定の個人についてCRFが関与しているという証拠は、脳脊髄液中のCRFレベルが低下していることを証明するか、または上述のような脳画像診断を実施することにより得ることができる。視床下部は、摂食および内分泌パラメーターに対するCRFの作用を媒介する共通の脳領域であるので、下垂体ホルモン濃度の変動は、視床下部のCRFレベルの変動をも反映するといえる。

30

【0131】

摂食量の減少は、食事開始の遅れ、および全体からみた食物消費時間もしくは食物消費量の縮小の両方で測定することができる(非特許文献74)。さらに、食物選択状況下で特定の栄養素が選択されることが、飢餓感の詳細を測る補足尺度として役立つ(非特許文献75)。

40

【0132】

2種の食欲調節動物モデルが確立されている。一方は、摂食量の単純な測定法であり、他方は、カフェテリア環境で食物の自己選択を測定するものである。最初の方法では、24時間摂食制限を行った後、その動物の飼育がごの中で、予め秤量した分の実験食に2時間接触させる。60分と120分の時点で、残っているペレットを秤量することにより接触量を測定する。このような試験は、遺伝的な突然変異のために肥満し、過食および乱れた栄養素選択の症状を有効に再現する動物で実施してもよい(非特許文献76)。

【0133】

50

カフェテリア環境では、感覚的な魅力または摂取後の利益に基づく特別な栄養素の好み
が測定されるように、食事は、炭水化物、タンパク質、脂肪など、多量栄養素の割合を様
々にして特別に調製する。食物選択は、一部には、広範な種類の神経化学系によって変更
される。このような試験は、渴望や暴食などの現象に影響し、神経性食欲不振症や肥満な
どの摂食障害の診断に関係する、摂食量調節の微妙な変化の検出に有用である。動物での
基準を定めてから、試験の15分前に各動物にリガンド阻害薬を経口投与する。カフェテ
リア環境で、食餌試験または食物自己選択について記載のとおり摂食量を測定し、試験
結果を基準と比較する。さらに、リガンド阻害薬が食欲調節に及ぼす作用を試験する別の
モデルとなるのが、ニコチン離脱症状動物モデルおよび遺伝的肥満ラット（Zucker
系統）での過食である。簡潔に述べると、ニコチン離脱症状モデルでは、動物に常習的に
ニコチンを投与する。そのような動物では、正常な体重増加が抑制され、食物および水の
摂取量が減少する。ニコチン処置を休止すると、動物の体重と食物および水の摂取量は共
に有意に増加する。ニコチン離脱症状の間にリガンド阻害薬が食欲に及ぼす作用は、ニコ
チン休止後3日目にリガンド阻害薬を投与することにより評価する。

10

【0134】

過食の遺伝的根拠は、マウス（たとえばob/ob）とラット（Zucker系統、f
a/fa）の両方で発見されている。このような動物は、リガンド阻害薬の効力を評価す
る他の過食モデルにもなる。特に、Zuckerラットが被験対象として使用される。1
週間など、設定した期間にわたり、ラットの各群に毎日賦形剤またはリガンド阻害薬処置
を施す。その後の体重増加または摂食量を測定する。（遺伝的に肥満でない）正常なZu
ckerラットを対照として利用する。リガンド阻害薬を投与すると、正常なラットより
も摂食量および体重増加が減少する。

20

【0135】

ヒトでは、肥満は過食だけに関係しているのではなく、甘いものや高脂肪食の摂取が不釣
合いに多いなど、栄養のバランスを欠いた消費にも関係しているといえる。（非特許文献
77）したがって、臨床での食欲調節の証は、量、食事にかかる時間、および選択に関し
て摂取パターンを記録する対照実験食またはカフェテリア式自己選択プロトコルを使用し
て容易に検出される（非特許文献78）。このような試験では、各個人の基準を決定した
後、摂食量またはカフェテリア環境での自己選択を測定する。肥満治療に関して、向上す
るとは、治療を受けた患者がプラセボ群のメンバーと比べて体重減少または摂食量の縮小
を示すことである。さらに、この戦略は、肥満のためのセロトニン様作動薬の同定でも成
功を収めている。

30

【0136】

低CRFレベルに随伴する疾患

上述のように、本発明は、患者にリガンド阻害薬であるCRF/CRF-BP複合体を
治療有効量投与することを通して、低CRFレベルに随伴する疾患を治療する方法を提供
する。その患者は、摂食障害、神経内分泌障害、およびアルツハイマー病などの認知障害
の診断を通して確認できる。さらに、非定型うつ病、季節性うつ病、慢性疲労症候群、肥
満、炎症疾患に対する脆弱性、心的外傷後ストレス障害、精神刺激薬の禁断症状など、C
RFレベルの減少に随伴する他の状態はしばしば、甲状腺機能低下症およびストレス系活
性低下のプロフィールを呈するが、これは、尿中遊離コルチゾールおよび血漿ACTHの
減少を特徴として同定される。したがって、これらの疾患および状態は、一部には、脳C
RFレベルの回復または強化によって解決する見込みがあるはずである（非特許文献79
）。

40

【0137】

このような多様なヒト疾患状態の一群の特徴は、下垂体-副腎系の調節不全であり、脳
CRFの攪乱が推定される。したがって、実験動物でCRF/下垂体-副腎系を実験的に
交替すると、上の症候に必須の特徴、すなわち無気力（behavioral despair）（Pepinら、1992年）、運動疲労（RivestおよびRichard
、1990年）、肥満（Rothwell、1989年）、および精神刺激薬の禁断症状

50

に随伴する過度の覚醒状態（K o o bら、1993年；S w e r d l o wら、1991年）に必須の特徴が再現されるということは、内在C R Fレベルを正常にするように設計された薬物療法の有用性が広いことを示唆している。

【0138】

季節性うつ病（季節にならう主要な抑うつ障害）の必須の特徴は、主うつ病発症期間が年の特徴的な時期に襲来し、緩解することである。大方の場合では、うつ病発症期間は、秋または冬に始まり、春に緩解する。季節に応じて生じる主うつ病発症期間は、しばしば顕著なアネルギー、過眠症、過食、体重増加、および炭水化物への渴望を特徴とし、抑うつ気分があるか、またはほぼすべての活動への関心もしくは喜びが喪失している期間が少なくとも2週間持続していなければならない。

10

【0139】

心的外傷後ストレス障害に必須の特徴は、自身または別の者の健全な身体が死に至り、または重い傷害を受けた事実またはその恐れを含む事象を直接個人的に経験することを含む極端な心的外傷ストレスに曝された後に特徴的な症候が発生することである。その事象に対する応答は、極度の不安、無力感、または恐怖感を伴わなければならない。心的外傷事象は、極度の心理的苦痛または生理的反応性の引き金となる割り込みの記憶再生または悪夢として再度経験される。完全な症候の病像は、1ヶ月より長く続き、臨床的に重要な苦痛または社会的もしくは職業的役目における障害を生じていなければならない。

【0140】

ニコチン離脱症状（ニコチンによって誘発される障害）に必須の特徴は、ニコチン含有製品を長期間（少なくとも数週間）日常的に使用してから使用を突然に休止し、または控えた後に発症する特徴的な離脱症状症候群が存在することである。ニコチン離脱症状の診断には、不快または抑うつ気分、不眠、被刺激性もしくは怒り、不安、集中困難、不穏状態もしくは短気、心拍数の減少、および食欲増加もしくは体重増加のうち4つ以上が確認される必要がある。これらの症状は、臨床的に重要な苦痛、または社会的職業的役目における障害を生じていなければならない。

20

【0141】

向上するとは、（a）疾患モデルに直接関係のある測定値について、基準または治療前の状態と比べた、治療を受けた個人の症候状態の統計的に有意な変化、または（b）リガンド阻害薬によって治療した患者とプラセボ群の症候状態の統計的に有意な差である。疾患の臨床例は、当然、正常な状態とは区別される症状を示す。うつ病では、いくつかのうつ病評価尺度が使用される。（非特許文献80を参照のこと）。試験の1つであるハミルトンうつ病評価尺度は、うつ病の評価に広く使用されており、治療にตอบสนองして生じた変化の評価にも用いられる。他の試験および尺度は、D S M - I Vマニュアルで見ることができる。ニコチン離脱症状、ならびに他の障害については、障害の重症度を評価する試験がD S M - I Vマニュアルに出ている。

30

【0142】

アルツハイマー病

上述のように、本発明は、患者に治療有効量のC R F R 1リガンドを投与することを通してアルツハイマー病（「A D」）を治療する方法を提供する。その患者は、他の原因にあるとすることのできない痴呆、または学習能力および記憶の喪失といった症状に基づく臨床診断を通して確認することができる。さらに、磁気共鳴画像診断によって判定される脳の萎縮の診断を通して患者を同定してもよい。

40

【0143】

C R Fレベルの低下のアルツハイマー病との関連が示唆されている。A Dに罹患している10人の個人および神経学的に正常な10人の対照から死後に得た脳を研究用に選択した。前頭極、頭頂極、側頭極、および後頭極の基準領域を新鮮な脳から解体し、ドライアイス中で凍らせ、-70で貯蔵しておいたものを、C R FラジオイムノアッセイおよびC R F - B Pアッセイ用に加工した。ホルマリン固定した大脳皮質および海馬のサンプルをパラフィン中に包埋し、順次薄切し、ヘマトキシリン/エオジンおよび銀含浸で染色し

50

た。AD患者の脳の染色された切片を調べると、ADに典型的な神経炎の斑および神経原線維錯綜が豊富に示されたが、対照の場合は何も示されなかった。

【0144】

コリン欠乏に焦点を当てた、確立されているいくつかのアルツハイマー病動物モデルが利用可能である。ADにおけるコリン欠乏の主たる役割は十分に確立されている。ADでは、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性の低下と、前頭葉、後頭葉、側頭葉でのCRFレベルの低下とに有意の正の相関が認められる(DeSouzaら、1986年)。同様に、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性の低下と、これら3皮質中のCRF受容体数の増加とには、負の相関がある(同上)。他の2種の神経変性疾患では、パーキンソン病でCRFとコリンアセチルトランスフェラーゼとにかなり有意な相関があるが、進行性核上麻痺では若干の相関しかない(Whitehouseら、1987年)。

10

【0145】

ラットでは、解剖研究および行動研究によってCRFとコリン作用系の相互作用が証明されている。まず第1に、ある脳幹神経核では、CRFとアセチルコリンエステラーゼが共同で局在しており、またあるコリン作動性ニューロンは、CRFを含んでいる。第2に、CRFは、カルバコール誘発性の挙動を抑制し(カルバコールは、ムスカリン性コリン作用性受容体拮抗薬)、CRFがコリン作用系に影響を及ぼすことが示唆される(非特許文献81)。別のムスカリン性コリン作用性レセプター拮抗薬であるアトロピンで処置すると、CRFレセプターが増加する(非特許文献82)。ひとまとめにして考えると、これらのデータは、CRFとコリン作用系がヒトでも動物でも同様に相互に作用することを示している。

20

【0146】

コリン欠乏に焦点を当てたアルツハイマー病の動物モデルは、アセチルコリンによるシナプス後受容体への刺激をブロックする非選択的シナプス後ムスカリン性受容体拮抗薬であるスコポラミンを投与することにより生み出される。そのような動物では、記憶障害は、行動障害もしくは知覚障害と健忘症もしくは実験的治療による認知強化作用とを識別する受動的回避試験または位置再認試験(delayed-matching-to-position test)によって測定されるのですぐにわかる。したがって、スコポラミンによって健忘症を誘発した後にモリス迷路およびY字型迷路試験を利用して、記憶障害、ならびにリガンド阻害薬の投与に従う後続の強化作用を試験する。モリス迷路では、実験の設計は本質的に上述のとおりであるが、1日から3日の各日の訓練30分前に、臭化水素酸スコポラミンのip注射(0.3mg/kg)によって処置を行うことを含むように変更する。ラットにおいては、この健忘用量のスコポラミンによって、空間および回避学習パラダイムの獲得および保持が損なわれる。リガンド阻害薬の抗健忘作用は、スコポラミンを与えた、または与えない同時対照群に関して測定する。Y字迷路を使用する、スコポラミンによって誘発した健忘の逆転に対するリガンド阻害薬の作用については、上述のY字型迷路試験と同様に実施する。この試験の変更点は、5日から10日目の訓練の30分前に、臭化水素酸スコポラミンのip注射(0.3mg/kg)によって処置を行うことを含む。中枢または全身に投与されたリガンド阻害薬の抗健忘作用を、同時対照群およびスコポラミン処置対照群に関して測定する。

30

40

【0147】

ADにおける認知行動を測定するいくつかの試験が設計されている。(非特許文献83を参照のこと。)そのような試験の1つであるBCRSは、集中力、近時記憶、過去の記憶、見当識、任務遂行およびセルフケアを測定するものである。BCRSは、認知機能のみを測定するように設計されている。この試験、ならびにウェクスラー記憶検査およびアルツハイマー病関連尺度(Alzheimer's Disease-Associated Scale)を使用して、リガンド阻害による治療処置の後に向上があったかを判定することができる。上述のように、本発明では、たとえば、リガンド阻害薬によって治療した患者の作業をプラセボ群のメンバーと比べて、または同じ患者に課した後続の試験と比べて、ウェクスラー記憶検査において正常に向かう方向に統計的に有意な差があれば

50

、アルツハイマー病の「改善」が存在する。さらに、スコポラミンによって誘発したヒトの健忘をモデル系として使用して、リガンド阻害薬の効力を試験することができる。

【0148】

本発明のCRFR1リガンドペプチドはまた、多種類の血管床中、および特に所望の組織および臓器中の血流を調節するのに治療上有用となる。これらのペプチドは、腸間膜血管床を拡張させることが予想されるので、動物、特にヒトおよび他の哺乳動物の消化管への血流を増加させるのに使用すべきはすのものである。CRFは、血管透過性を調節することが示されており（非特許文献84）、これらCRFR1リガンドは、血管からの漏出を低減し、損傷もしくは手術によって生じた組織の腫脹および炎症に対して有益な作用を及ぼすことにもなる。したがって、これらCRFR1リガンドを非経口的に投与して、炎症、腫脹、および浮腫を軽減し、心臓が損傷を受けた後の体液の損失を低減することができる。

10

【0149】

oCRF、r/hCRF、ウロテンシンI、およびソーバジンは、胃酸の産生を抑制することが示されており、本発明のCRFR1リガンドは、哺乳動物において、胃酸の産生を低下させ、かつ/または特定の胃腸機能を抑制することにより胃潰瘍の治療にも有効である見込みがあると考えられる。

【0150】

これらCRFR1リガンドペプチドは、適切な投与を行った後に身体機能をモニターすることにより、内分泌系または中枢神経系の病態が疑われる哺乳動物の視床下部下垂体副腎機能を評価するのに使用してもよい。たとえば、抑うつ性疾患のようなクッシング病および情動障害を評価する診断ツールとして投与を利用することができる。

20

【0151】

CRFR1リガンドまたはその非毒性の付加塩は、通常、薬剤として、または動物用として許容される担体と合わせて、ヒトを含む哺乳動物に投与されるはずである。本明細書では、用語「薬剤として許容される」、「生理的に許容される」、およびその文法上の変形語は、組成物、担体、希釈剤、および試薬を指す限り、交換して使用することが可能である。好ましいことに、この物質は、悪心、めまい、胃の不調など、望ましくない生理的影響を生じることなく、哺乳動物に投与することができる。このペプチドは、純度を少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約97%とすべきである。患者には治療有効量が投与されるはずであるが、治療有効量とは、脳中遊離CRFレベルの上昇、学習および記憶の向上、摂食量の減少、脳中CRF神経回路の活性化、低脳CRFレベルに随伴する疾患の治療、アルツハイマー病に随伴する症状の治療、肥満治療、非定型うつ病の治療、物質乱用離脱症状の治療、産後うつ病または年齢に関係した記憶喪失の治療のいずれかの所望の作用を実現するために算出された量である。当分野の技術者には、その特定の治療に応じて、さらにまたペプチドリガンド阻害薬もしくは非ペプチドリガンド阻害薬のどちらを投与するかに応じて、投与経路が様々に変わることがわかるであろう。投与経路は、非侵襲的または侵襲的(invasive)でよい。非侵襲的投与経路には、経口、頬側/舌下、直腸、経鼻、(経皮および点眼(ophthalmic)を含む)局所、経膈、膀胱内、および経肺投与が含まれる。侵襲的投与経路には、ICV、動脈内、静脈内、皮内、筋肉内、皮下、腹腔内、くも膜下、および眼内投与が含まれる。

30

40

【0152】

動物での脳室内(ICV)注射は、次のように行う。動物にハロタンで麻酔をかけ、KOPF定位固定装置に固定する。側脳室の上方に向けたガイドカニューレを、2本のステンレス鋼製スクリューおよび歯科用セメントを用いて頭蓋骨にはめ込み、固定する。注射するには、60cmのPE10管材料に取り付けた30ゲージのステンレス鋼製カニューレを、ガイドを通してその先端の1mm先にまで挿入する。流れができるまで単に管材料を動物の頭より上に持ち上げることにより、2マイクロリットルのリガンド阻害薬を重力流によって1分間かけて注入する。他の投与経路についての手順は、当技術分野でよく知られている。

50

【 0 1 5 3 】

求められる投与量は、治療対象となる特定の状態、その状態の重症度、および所望の治療に要する期間によって様々となり、1日に多種類の投与を使用することもある。非経口投与では、ラッカセイ油溶液、水性プロピレングリコール溶液、または無菌水溶液を使用することができる。静脈内、筋肉内、皮下（s.c.）、および腹腔内投与には、適切に緩衝剤処理を施した水溶液が特に適する。無菌の水性媒質は用意に入手可能であり、s.c.投与については、トウモロコシ油または3～6%のマンニトール溶液が好ましいといえる。このペプチドは、しばしば酸の付加塩や金属錯体など、薬剤として許容される非毒性の塩の形で投与される。トリフルオロ酢酸およびパモ酸の塩が好ましいといえる。

【 0 1 5 4 】

このペプチドは、医師の指導のもと、1回用量または複数回用量として投与されるはずであり、薬剤組成物は、通常、このペプチドと共に、慣用の薬剤として許容される担体含有する。そのような担体は、当技術分野でよく知られており、通常は非毒性の塩および緩衝液を含有している。そうした担体は、緩衝生理食塩水、リン酸緩衝食塩水のような緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール、デキストランなどの炭水化物；グリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAやグルタチオンなどのキレート剤、補助剤、および保存剤を含むこともある。許容される非毒性の塩には、酸の付加塩、またはたとえば亜鉛、鉄、カルシウム、バリウム、マグネシウム、アルミニウムなどとの金属錯体（本出願の意図では、付加塩であるとみなす）が含まれる。そのような酸の付加塩の例は、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、タンニン酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、アルギン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩などである。活性成分を錠剤の形で投与しようとする場合、錠剤は、トラガカント、コーンスターチ、ゼラチンなどの結合剤；アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含有してよい。液体形態での投与が所望される場合、甘味剤および/または着香剤を使用してもよく、等張性食塩水、リン酸緩衝溶液などで静脈内投与を行ってもよい。

【 0 1 5 5 】

有効な投与量は、一般に、医師に広く知られているような、意図する投与経路や、患者の年齢、体重などの他の要因だけでなく、治療対象となる疾患に応じて変わる。通常、投与量は、1日に宿主動物の体重キログラムあたりペプチド約0.01から約10ミリグラムとなる。ある適応症の治療では、最高で約100mg/kgまでの1日投与量を用いることができる。1日投与量は、1回分として投与しても、最高で3回分まで分割して投与してもよい。

【 0 1 5 6 】

上述のように、CRFレセプターは、現在はクローン化されており、特許文献17に記載されているように、CRFレセプターを使用する結合親和性試験および結合アッセイを、はじめに同定または合成したペプチドを用いて容易に実施し、そのペプチドに有効なCRFR1リガンドである見込みがあるか判定することができる。CRFおよび/またはCRFレセプターと相互に作用する潜在的な薬物を求めて、このようなレセプターアッセイをふるい（screen）として使用することができる。

【 0 1 5 7 】

本明細書では、温度はすべてであり、比率はすべて体積比である。液体物質の百分率も体積比である。

【 0 1 5 8 】

発明者にそれまでにわかっている最良の方式となる好ましい実施形態に関して本発明を説明してきたが、添付の特許請求の範囲で述べる本発明の範囲から逸脱することなく、当分野の技術者に明らかとなるような様々な変更および修正を行ってもよいことを理解されたい。これまでに言及した米国特許の開示をすべて参照により本発明に組み込むことを明示しておく。

10

20

30

40

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 P 25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/32	(2006.01)	A 6 1 P 25/32
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02

(72)発明者 ワイリー ダブリュ . ベイル ジュニア

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホーヤ パルディーズ 1 6 4 3

(72)発明者 マリリン エイチ . パーリン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホーヤ ロビンフッド レーン 8 8 4 4

(72)発明者 ジョセフ ガイラス

アメリカ合衆国 9 2 0 8 4 カリフォルニア州 ビスタ イースト ボビアー ドライブ 8 0
0 アpartment エヌ 8

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 1 8 6 4 9 (WO , A 1)

国際公開第 9 6 / 0 1 9 4 9 9 (WO , A 1)

国際公開第 9 8 / 0 5 4 2 2 2 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/00

A61K 38/00

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed