

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4686696号
(P4686696)

(45) 発行日 平成23年5月25日 (2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日 (2011.2.25)

(51) Int. Cl.

F I

C 0 7 K	7/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/00	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1

請求項の数 20 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願平11-505154
 (86) (22) 出願日 平成10年6月25日 (1998.6.25)
 (65) 公表番号 特表2002-508767 (P2002-508767A)
 (43) 公表日 平成14年3月19日 (2002.3.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU1998/000490
 (87) 国際公開番号 WO1999/000406
 (87) 国際公開日 平成11年1月7日 (1999.1.7)
 審査請求日 平成17年6月24日 (2005.6.24)
 (31) 優先権主張番号 P07550
 (32) 優先日 平成9年6月25日 (1997.6.25)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 504378113
 プロミクス・プロプライエタリー・リミテッド
 PROMICS PTY LIMITED
 オーストラリア2113ニュー・サウス・ウェールズ州マクウォリー・パーク、イッピング・ロード37番、アラナ・セラビユーティクス・リミテッド・オブ・レベル2内
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

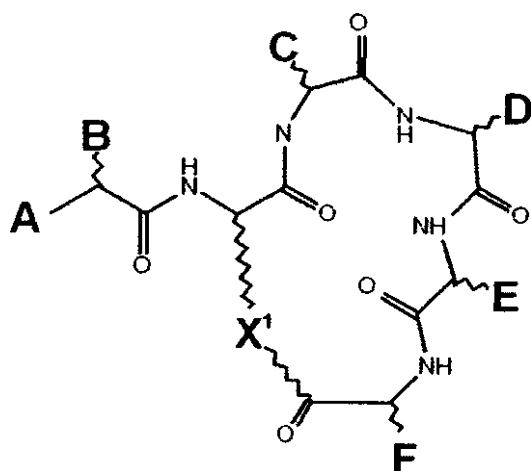
(54) 【発明の名称】 C 5 a 受容体およびGタンパク質結合受容体の環状アゴニストおよびアンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

C 5 a R に対するアンタゴニスト活性を有し、C 5 a 受容体 (C 5 a) に対するアゴニスト活性を有さない化合物であって、下記一般式：

構造 I I



〔式中、

A は、H、NH₂、NHアルキル、N(アルキル)₂、NHアールまたは1～6個の炭素

原子のNHアシル基であり；

Bは、アルキル、アリール、フェニル、ベンジル、ナフチルまたはインドール基、またはL-フェニルアラニンの側鎖、もしくはホモフェニルアラニン、トリプトファン、ホモトリプトファン、チロシンおよびホモチロシンよりなる群から選ばれるD-アミノ酸の側鎖であり；

Cは、プロリン、アラニン、バリン、アスパルテート、グルタメート、グルタミン、アスパラギン、システインおよびメチオニンよりなる群から選ばれるD-、L-またはホモ-アミノ酸の側鎖であり；

Dは、シクロヘキシルアラニン、ホモシクロヘキシルアラニン、ロイシン、ノルロイシン、ホモロイシンおよびホモノルロイシンよりなる群から選ばれるD-アミノ酸の側鎖であり；

Eは、トリプトファンおよびホモトリプトファンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖であり；

Fは、アルギニンおよびホモアルギニンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖であり；

X^1 は、 $-(CH_2)_nNH-$ または $(CH_2)_n-S-$ 、 $-(CH_2)_2O-$ 、 $-(CH_2)_3O-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ または $-CH_2COCHR NH-$ （式中、Rは普通のまたは希なアミノ酸の側鎖である）であり、そして

nは、1～4の整数である]を有する化合物。

【請求項2】

FがL-アミノ酸の側鎖である、請求項1の化合物。

【請求項3】

FがL-アルギニンの側鎖である、請求項1の化合物。

【請求項4】

nが、2または3である、請求項1～3のいずれかの化合物。

【請求項5】

Aが、HまたはNHアセチルである、請求項1～4のいずれかの化合物。

【請求項6】

Bが、インドール、インドールメチル、ベンジル、フェニル、ナフチル、ナフチルメチルまたはシナミル基である、請求項1～5のいずれかの化合物。

【請求項7】

Bが、L-フェニルアラニンの側鎖である、請求項1～5のいずれかの化合物。

【請求項8】

Cが、D-またはL-プロリン、バリン、またはメチオニンの側鎖である、請求項1～7のいずれかの化合物。

【請求項9】

Cが、プロリンまたはメチオニンの側鎖である、請求項8の化合物。

【請求項10】

Dが、D-シクロヘキシルアラニンの側鎖である、請求項1～9のいずれかの化合物。

【請求項11】

Eが、トリプトファンの側鎖である、請求項1～10のいずれかの化合物。

【請求項12】

Fが、アルギニンの側鎖である、請求項1～11のいずれかの化合物。

【請求項13】

X^1 が、オルニチン $((CH_2)_3NH-)$ またはリシン $((CH_2)_4NH-)$ である、請求項1～12のいずれかの化合物。

【請求項14】

化合物11(AcF-[K Pd Cha Wr])、12(AcF-[O Pd Cha Wr])、13(F-[X Pd Cha WR])、14(F[X Pd Cha WR])、15(F-[X² Pd Cha WR])、16(F-[X² Pd Cha Wr])、17(AcF-[O Pd

10

20

30

40

50

C h a W R])、18 (A c F - [O P d C h a W r])、19 ([F W P d C h a W r])、20 (A c F - [K M d C h a W r])、21 (A c F - [K K d C h a W r])、22 (A c F - [X P d C h a W r])、23 (A c F - [X² P d C h a W r])、24 (A c K F - [O P d C h a W r])、25 (F - [O P d C h a W r])、26 (F - [K P d C h a W r])、27 (F - [O P d C h a W r])および28 (F - [K P d C h a W r])よりなる群から選ばれる、請求項1～13のいずれかの化合物、ここで

Xは (C H₂) - N H₂

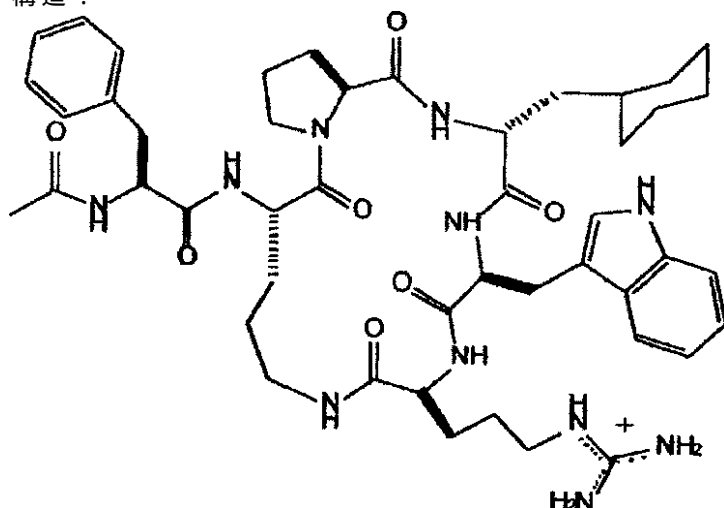
X²は (C H₂)₂ - N H₂

d C h aはD - シクロヘキシルアラニン

を意味する。

【請求項15】

構造：



の化合物。

【請求項16】

請求項1～15のいずれかに記載の化合物を、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に含有する組成物。

【請求項17】

医薬品製造における請求項1～15のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項18】

C5a受容体によって媒介される病的状態を処置するための、請求項1～15のいずれかに記載の化合物を含む医薬組成物。

【請求項19】

炎症状態を処置するための、請求項1～15のいずれかに記載の化合物を含む医薬組成物。

【請求項20】

炎症状態が炎症性関節炎である、請求項19の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、Gタンパク質結合受容体の調節能力を有する新規環状化合物に関する。本発明は、アゴニストとアンタゴニストの両方を提供する。好ましい態様において、本発明は、C5aの環状ペプチド様および環状または非環状の非ペプチド様アゴニストまたはアンタゴニストを提供する。本発明の化合物は、強力かつ選択的であって、種々の炎症状態の処置に有用である。

発明の背景

ヒト補体の活性化は、感染および傷害に対する免疫防御に関与する血漿タンパク質の一つの系であり、多数の急性および慢性の疾患に関する病因に重要な役割を演じる。特に、C5aタンパク質の補体は幅広く究明されてきた。総論については、Whaley (1987) および

10

20

30

40

50

Sim (1993) を参照されたい。表 1 は、疾患における C 5 a の役割についての概略である。

宿主防御において、血漿タンパク質の補体系は、伝染性微生物（バクテリア、ウイルス、寄生虫）、化学的または物理的傷害、放射能または腫瘍形成などの刺激に対して炎症や細胞免疫反応を起こす。補体は相互に関係するタンパク質分解の複雑な経路を通り活性化される。その経路において、多数の生物活性ペプチドが産生され、そのうちのいくつか（例えば、アナフィラトキシン C 3 a および C 5 a）は、細胞成分と相互に作用して炎症性病的過程を伝播させる。補体活性化は、抗原抗体（A g / A b）結合後の古典的経路あるいは抗体非依存の別経路による。活性化が最終的にもたらす末端配列において、C 5 タンパク質が C 5 コンバーターゼによってタンパク質分解開裂を受け、C 5 a および C 5 b に分かれる。10 後者は、バクテリアのような標的細胞の膜に穴をあけて、漏洩、溶解、細胞死に導く「膜攻撃複合体」の集合を容易にする。活性化経路の各段階は、継続的に形成されるプロテアーゼによるタンパク質分解の段階的増幅を避けるために、厳密に調節される。もし、それらの調節機能が失効した場合、補体活性化が遅延し、自己免疫疾患におけるように炎症反応が引き起こされる。

補体系およびその活性化の特徴に関しては広く知られているが、機構的な細部に関してはあまり分かっていない。炎症反応における重要なそして非常に強力な媒介物質は、糖タンパク質血漿 C 5 a であり、肥満細胞、好中球、単核白血球、マクロファージ、非骨髄外細胞および血管内皮細胞上の特異的表面受容体と相互作用する (Gerard and Gerard, 1994)。20 C 5 a R は G タンパク質結合受容体で、7 個の膜貫通ヘリックスを有する (Gerard and Gerard, 1991)。この受容体は、G T P 結合タンパク質のロドプシンのスーパーファミリーの一つであるが、受容体と G タンパク質が活性化の前に結合するロドプシン受容体とは相異なる。

G タンパク質結合受容体は人体に広く存在し、その 80 % はすでに知られた細胞受容体型で成っており、非常に広範囲の内因性リガンドについて細胞膜を通じて情報伝達を媒介する。それらの受容体は、生理学上、病態生理学上プロセスの別の配置に関与する。このプロセスは、心血管に関連するプロセスに限らず、中枢神経系、末梢神経系、生殖、代謝性疾患、消化器疾患、免疫性炎症疾患、成長障害疾患およびその他の細胞調節や増殖性障害の疾患を含む。アゴニストとアンタゴニストの両方の薬剤は、G タンパク質結合受容体の機能を選択的に調節し、重要な治療上の適用性を有する。30

C 5 a は現在知られている最も強力な走化性薬剤の一つで、好中球およびマクロファージを創傷部位に動員して部位の形態を変化させ、細胞外放出を減退させ；カルシウム動員、血管透過性（浮腫）、好中球粘着性を増大させ；平滑筋を収縮させ；炎症メディエータ（ヒスタミン、T N F - 、I L - 1、I L - 6、I L - 8、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどを含む）およびリソソーム酵素の放出を刺激し；酸素ラジカルの形成を促進し；抗体増殖を増大する (Gerard and Gerard, 1994)。C 5 a の過剰発現あるいは過小調節は次のような免疫炎症性状態の病因と関係する。すなわち、関節リウマチ、成人呼吸窮迫症候群 (A R D S)、全身性エリテマトーデス、組織拒絶反応症、虚血性心疾患、再灌流障害、敗血症ショック、乾癬、歯肉炎、粥状動脈硬化症、アルツハイマー病、肺創傷疾患、体外透析後症候群など、および表 1 に概略を示す多数の状態がそれである。40

表 1

疾患における C 5 a の役割

状態／疾患	C5a 水準	C5aR 発現	特記事項
アレルギー	++		アレルギー攻撃が鼻アレルギー症候群に至り、C5a水準が増大した。
アルツハイマー病	++	++	反応性星状膠細胞、小膠細胞、中枢神経系中の内皮細胞などに含まれる受容体を調整すると、補体系はβ-アミロイドで活性化した。
ARDS／呼吸窮迫症	++		
ベーチェット病	++		発作性眼疾患直前にC5a水準が最大となる。
気管支喘息	++		
毛細血管漏洩症候群	++		
慢性肺疾患	++		慢性肺疾患の小児の呼吸器通気からの肺浸出液中のC5a水準が増大した。
チャウクーシュトラウス腭嚢胞性腺維症			顆粒球のC5aに対する過敏性。C5aの形成。／PMNsに対する影響。
空気塞栓症	++		サチュレーションダイビング中にC5a水準が増大した。
糖尿病 I 型	++		発作中にC5aが形成され；新規診断の糖尿病 I 型患者において、単核白血球が活性化した。
家族性地中海熱			C5a不活性化物質の欠如。
ギラン＝バレー虚血性疾患状態／心筋梗塞	++		CSF水準上昇。再灌流後の単核白血球の心筋層中への遊走。s C R 1 により被害が防げた。
木村病			液性因子がC5aに対するPMNsの反応を調節する。
多発性硬化症		++	急性／慢性MSの泡状マクロファージおよび慢性MSの線維性星状膠細胞上の受容体発現が増加した。
髄膜炎			C5aは実験的髄膜炎を誘発し；PMN蓄積が脳脊髄液にみられる。
膵臓炎	++		
透析後症候群	++	—	管材料による補体活性化によってC5aが発現し、C5a水準が慢性症状におけるPMNsおよび単核細胞において減少した。
子癇前症状／重症妊娠中毒症	++		分娩時にC5a水準が上昇した。

10

20

30

40

乾癬	++	鱗屑中のC5a水準が高い。
再灌流障害	++	C 5 抗体が化学反応を抑制する。
網膜炎	++	硝子体液からC5aを検出した。
慢性関節リウマチ	++	C 5 a 濃度が関節の滑液(5 倍)および血漿(3 倍)中で上昇した。
重症先天性好中球減少症	—	
移植／拒絶反応	++	異種移植に見られる損傷を単クローン性抗体が阻止する。腎臓移植拒絶反応を示す患者の血漿および尿中のC5a水準が増大した。

10

C 5 a の炎症作用を制限する新規の薬剤は、慢性炎症随伴疼痛、組織損傷を阻害する効能を有する。その理由によって、C 5 a とその受容体との結合を防ぐ分子は、補体活性化によって起こされた慢性炎症疾患の処置に有用である。重要なのは、そのような化合物が補体媒介免疫メカニズムの究明に貴重な新しい見透しを提供することにある。

論点を変えて、C 5 a 受容体あるいはその他の G タンパク質結合受容体のアゴニストはまた、G タンパク質結合受容体が薬物送達の認識部位に使用される場合か、あるいはそのような受容体が疼痛発作誘発点として、ヒトの免疫システムのある態様を刺激する、例えば

20

癌、ウイルス、あるいは寄生虫感染症などの処置に使用される場合か、において治療効果を有することが判明するであろう。

C 5 a のアゴニストまたはアンタゴニストを開発する一つのアプローチは、C 5 a とその受容体である C 5 a R およびそれらの相互作用を示す三次元構造に関する知識を利用して、受容体に基づく設計を通じて行なうことである。受容体の構造はまだ知られていない。ヒト C 5 a の溶液構造は、強い陽性で、3 K D a 炭水化物によって A s n 6 4 で N - グルコシル化された 7 4 アミノ酸ペプチドであると測定されており、本質的には 4 - ヘリックス線維束である。C - 末端部(残基 6 5 - 7 4、C 5 a 6 5 - 7 4)が未組織化の状態で見られ(Zuiderweg et al,1989)、この C - 末端における配座屈曲性が構造 - 機能研究を極端に解釈困難な状態にしてきた。

30

C 5 a は高度に整った N - 末端コアドメインを有し(残基 1 - 6 4 ; C 5 a 1 - 6 4)、まとまった逆平行の 4 - ヘリックス線維束(残基 4 - 1 2、1 8 - 2 6、3 2 - 3 9、4 6 - 6 3)から成り、ループ(1 3 - 1 7、2 7 - 3 1、4 0 - 4 5)で連結され、さらに、3 二硫化物化学結合(C 2 1 - C y s 4 7、C y s - 2 2 - C y s 5 4、C y s 3 4 - C y s 5 5)によって固定されている。

C 5 a 受容体すなわち C 5 a R の構造は知られてはいないが、ヒトの単球誘導 C 5 a R の C 5 a 結合サブユニットはクローン化され、透過膜 - ヘリックスを有する G タンパク質結合受容体として同定された(Gerard and Gerard,1991)。C 5 a と C 5 a R との相互作用は多数の研究主題となっており、要するに、C 5 a は 2 サイトメカニズムによって結合し、そのメカニズムにおいて、C 5 a の N - 末端コアドメインは受容体認知および結合に

40

関連し、その一方で、C - 末端は受容体活性化に大切な役割りを有することが示唆されている。このメカニズムの構成図を図 1 に示す。C - 末端の「奏効」領域だけが情報伝達に必要なすべての情報資料を有し、受容体のらせん形領域において結合すると考えられている(Siciliano et al,1994;deMartino et al,1995)。

C 5 a の陽性電荷らせん形領域にある N - 末端は、受容体認知および結合に重要な役割りを有し、C 5 a R サイト 1 の陽性電荷細胞外ドメインと結合し、その一方、C 5 a の C 末端「奏効」領域が受容体(サイト 2)のらせん形領域と結合すると考えられており、情報伝達につなげる受容体活性化に重要な役割りを有する(Siciliano et al,1994)。

C 5 a の C - 末端の短いペプチド誘導体が多数発見され、C 5 a のアゴニストであることが判明した(Kawai et al,1991;Kawai et al,1992;Kohl et al,Drapeau et al,1993;Embe

50

r et al,1992;Sanderson et al,1994;Sanderson et al,1995;Finch et al,1997;Tempero et al,1997;Konteatitis et al,1994;DeMartino et al,1995)。それらのアゴニストのいくつかを下記の表2(化合物1-6)に示す。C5a受容体に対する単クローン抗体のような受容体におけるC5aの活性化を阻害する高分子量ポリペプチドも知られている(Morgan et al,1992)。

小分子、N-メチルフェニルアラニン-リジン-プロリン-D-シクロヘキシルアラニン-トリプトファン-D-アルギニン(7、MeF-K-P-dCha-W-R)は、C5a受容体の完全なアンタゴニストであり、分離細胞膜上(Konteatitis et al,1994)または完全無傷の細胞上で試験してアゴニスト活性化を示さない。このヘキサペプチドは、アゴニストNme-F-K-P-dCha-L-rの構造によって開発されたもので、置換基のサイズを漸増(Cha、F、Nph、W)させながらロイシン残基において分子が漸次置換された。これがアゴニスト活性化の減退に効果があった。受容体結合の測定がヒトの分離好中球膜上でなされ、その結果、アンタゴニストが受容体に対するC5aの相対結合親和度のわずかに0.04%を有するにすぎないことが示された(Konteatitis et al,1994)。これらの報告の重要な特徴は、アンタゴニスト7とC5a受容体との結合についての定義にある。これらの報告者は、C-末端アルギニンが受容体結合とアンタゴニスト活性化にとって重要であると述べている。このことはまた、C5aのC-末端の小さいペプチド類似体によるアゴニスト活性化に関するすべての報告について同様である。しかしながら、アンタゴニスト7に関しては、報告者たちはさらに進んで、「C-末端カルボキシル酸はアンタゴニスト活性化および受容体結合にとってきわめて重要な必要物質である」と述べている。

彼らは、カルボキシル酸の必要性は、多分カルボキシル酸と受容体中におけるアルギニン(Arg206)との特殊な相互作用の結果であろうと述べている(DeMartino et al,1995)。この考えはアンタゴニスト7の類似体に対する受容体親和度が大きく減少したことを根拠としていて、その類似体においてD-アルギニン($\text{NH}_2\text{-CH-(CO}_2\text{H)-}(\text{CH}_2)_3\text{NHC(:NH)NH}_2$)が、アグマチン($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{NHC(:NH)NH}_2$)によって置換された。要約すると、DeMartino et alの主張は、D-アルギニンがそのグアニジウム側鎖によって陰性電荷アミノ酸側鎖と、受容体中で相互作用を起こすことである。次いでアンタゴニスト7の陰性電荷C-末端カルボキシル酸と、受容体中の陽性電荷鎖残基との第二の相互作用が起こるとも考えられる。

我々はここにおいて、このヘキサペプチド7および種々の類似体の溶液構造を測定したところ、おどろくべきことに、実際には末端カルボキシル酸基がC5aRとの結合あるいはアンタゴニスト活性に必要ではなく、そのかわりに、これまでに認識されることのなかった異常な構造上の特徴、すなわち配座の回転がC5aアンタゴニストあるいはアゴニストの結合および活性化に重要な役割を果たすことを知った。ヘキサペプチドおよび種々の新しい構造的関連を有するアンタゴニストを、無傷の多形核白血球細胞(PMN)を使用して、それらの受容体結合親和性およびアンタゴニスト活性の両方を調べた。得た結果から、C5aのアンタゴニストまたはアゴニストとC5a受容体との結合にとって、特殊なこれまでに知られていない構造的必要条件があり、これは、Gタンパク質結合受容体ファミリーのリガンドに共通であると考えられている。我々がこの特殊な構造的必要条件を立証したことで、補体系およびC5aに基づく薬剤について、改善された分子プローブを設計し開発することが可能となり、さらに、他のGタンパク質結合受容体を標的とする小分子を設計することができる。情報伝達に極めて重要な役割を有するこれらの受容体は、重要な薬剤標的として、ますます認識されるようになっている(G protein-coupled Receptors, IBC Biomedical Libraryseries, 1996)。

かくして、我々が得た結果から制約構造鑄型を設計することができ、この鑄型によって疎水性基を疎水性配列に集めて、例えば、図1に示すC5a受容体の部位2でGタンパク質結合受容体と相互作用させることができる。このような鑄型や枠組みは、環式または非環式であって、従来C5a受容体活性化またはその他のGタンパク質結合受容体活性化の調節装置であることは示唆されていなかった。

10

20

30

40

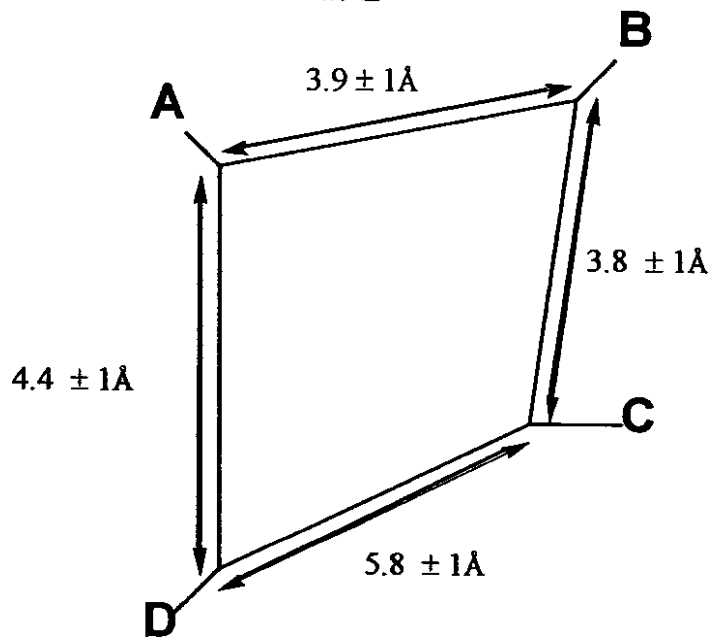
50

発明の要旨

本発明は、Gタンパク質結合受容体の活性に対する環状および非環状調節物質を提供する。

第1観点によると、本発明は、Gタンパク質結合受容体のアンタゴニストであって、アゴニスト活性を有さない化合物を提供する。この化合物は、下記のような概略寸法の枠組みに適合する環状または制約された非環状の構造を有す。

構造 I



式中、数字は、アミノ酸やその類似体または誘導体のC炭素間の距離を意味し、A、B、CおよびDは、隣接のアミノ酸やその類似体または誘導体上に必ずしもあるわけでない。

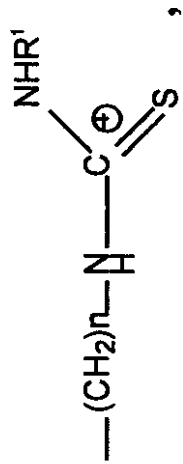
式中、重要なアミノ酸側鎖は、A、B、CおよびDで表されるか、あるいは下記に定義される；

Aは、普通のまたは稀な塩基性の電荷アミノ酸側鎖で、その位置で陽性電荷基を位置づけるのに働き、この中には、限定ではないが、下記の側鎖およびアルギニン側鎖の他の模倣体が含まれる。

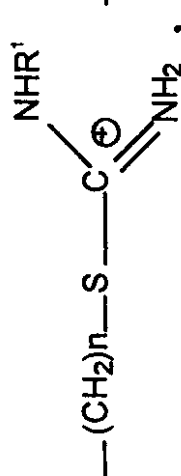
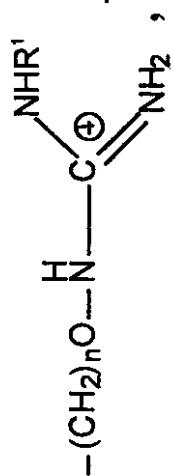
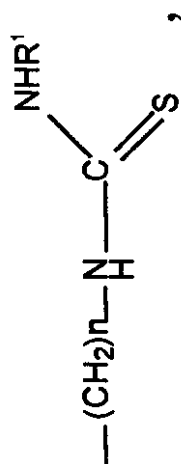
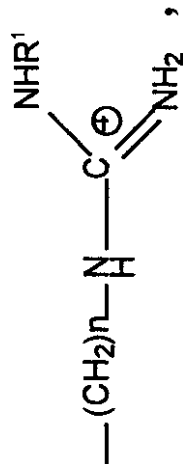
10

20

30



10



20

30

式中、Xは、NCN、NNO₂、CHNO₂またはNSO₂NH₂；

nは、1から4の整数；

Rは、H、アルキル、アリアル、CN、NH₂またはOH基；

Bは、普通のまたは稀な芳香族アミノ酸側鎖で、その位置で芳香族側鎖基を位置づけるのに働き、この中には、限定ではないが、インドール、インドールメチル、ベンジル、フェニル、ナフチル、ナフチルメチル、シナミル基またはこれらの芳香族基の他の誘導体が含まれる；

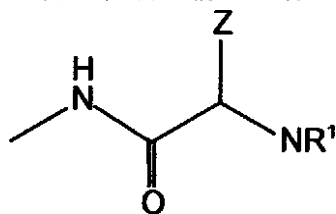
Cは、普通のまたは稀な疎水性のアミノ酸側鎖で、その位置でアルキル、芳香族または他の基を位置づけるのに働き、この中には、限定ではないが、D-またはL-シクロヘキシルアラニン(Cha)、ロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはメチオニンが含まれる；

Dは、普通のまたは稀な芳香族アミノ酸側鎖で、その位置で芳香族側鎖基を位置づけるの

40

50

に働き、次の構造を有す：



式中、Zには、限定ではないが、インドール、インドールメチル、ベンジル、ベンゼン、ナフチル、ナフチルメチルまたはこれらの芳香族基の他の誘導体が含まれる。

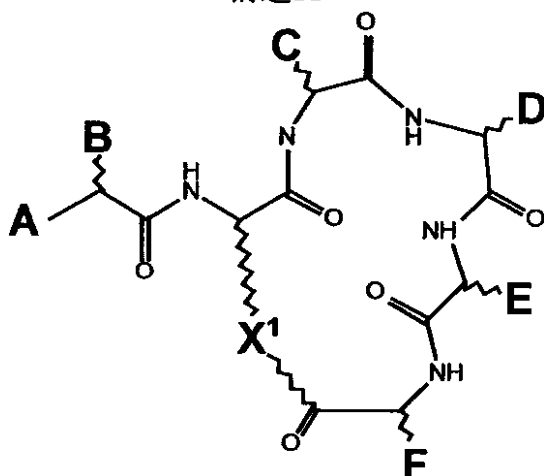
Rは、H、アルキル、芳香族、アシルまたは芳香族アシルであり、限定ではないが、この中にメチル、エチル、プロピル、ブチル、 $-CO-CH_2CH_3$ 、 $-CO-CH_3$ 、 $-CO-CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CO-CH_2Ph$ または $-CO-Ph$ が含まれる。

好ましくは、Gタンパク質結合受容体はC5a受容体である。

他の環状または制約された非環状分子は、本質的にペプチドまたは非ペプチドであり得て、C5a受容体または他のGタンパク質結合受容体との相互作用についてA、B、CおよびDなどの基を支持するものと同様に考え得る。

ひとつの実施態様において、化合物は、C5aRに対するアンタゴニスト活性を有し、C5aアゴニスト活性はなく、次の式を有す：

構造II



式中、Aは、H、アルキル、アリール、 NH_2 、NHアルキル、 $N(アルキル)_2$ 、NHアリールまたはNHアシル；OH、Oアルキル、Oアリールである；

Bは、アルキル、アリール、フェニル、ベンジル、ナフチルまたはインドール基、またはフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、トリプトファン、ホモトリプトファン、チロシンおよびホモチロシンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖である；

Cは、プロリン、アラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパルテート、グルタメート、グルタミン、アスパラギン、リシン、チロシン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、トリプトファン、システインおよびメチオニンよりなる群から選ばれるD-、L-またはホモ-アミノ酸の側鎖である；

Dは、シクロヘキシルアラニン、ホモシクロヘキシルアラニン、ロイシン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモノルロイシンおよびトリプトファンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖である；

Eは、トリプトファンおよびホモトリプトファンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖である；

Fは、アルギニン、ホモアルギニン、リシンおよびホモリシンよりなる群から選ばれるD-またはL-アミノ酸の側鎖である；

X^1 は、 $-(CH_2)_nNH-$ または $(CH_2)_n-S-$ （式中、nは1から4の整数、好ましくは2または3）、 $-(CH_2)_2O-$ 、 $-(CH_2)_3O-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH$

2) 4 - または $-CH_2COCHR NH-$ (式中、R は普通のまたは稀なアミノ酸の側鎖) である。

本明細書の目的のために、用語“アルキル”は、炭素数 1 から 6、好ましくは 1 から 4 の直鎖、分枝または環状の置換または非置換アルキル鎖を意味する。最も好ましくは、アルキル基はメチル基である。用語“アシル”は、炭素数 1 から 6、好ましくは 1 から 4 の置換または非置換アシルを意味する。最も好ましくは、アシル基はアセチルである。用語“アリール”は、置換または非置換のホモ環状またはヘテロ環状のアリール基で、その環が好ましくは 5 または 6 員であるものを意味する。

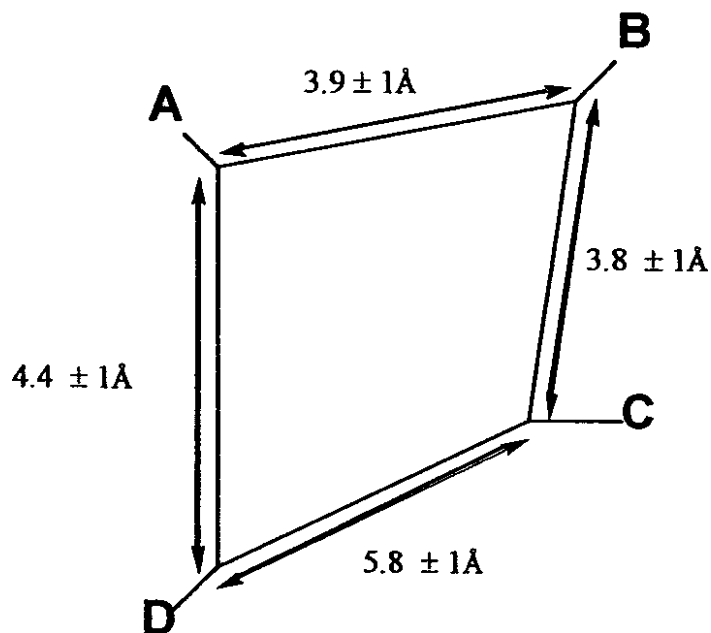
“普通の”アミノ酸は、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパルテート、アスパラギン、グルタメート、グルタミン、システイン、メチオニン、アルギニン、リシン、プロリン、セリン、トレオニンおよびヒスチジンよりなる群から選ばれる L - アミノ酸を意味する。

“稀な”アミノ酸には、限定ではないが、D - アミノ酸、ホモ - アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、デヒドロアミノ酸、芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン以外)、オルト - 、メタ - またはパラ - アミノ安息香酸、オルニチン、シトルリン、ノルロイシン、 γ - グルタミン酸、アミノ酪酸および β - ジ置換アミノ酸が含まれる。

本明細書において、“含む”は、“中に含むが、それに限定されない”ことを意味し、“含んでいる”は、同等の意味であることが明白である。

第 2 の観点において、本発明は G タンパク質結合受容体のアゴニストである化合物を提供し、この化合物は構造 III を有する。

構造 III

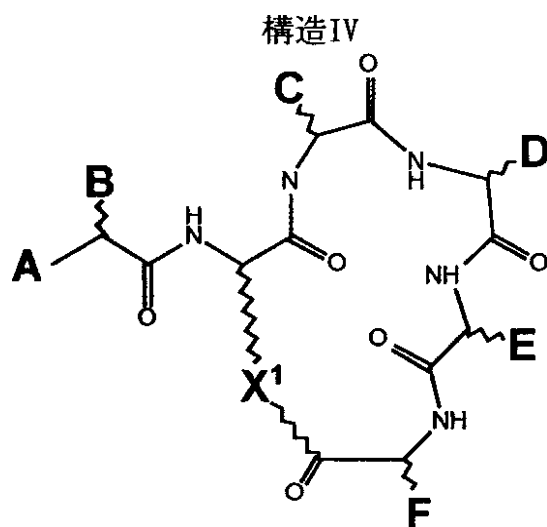


式中、数字は、アミノ酸またはその類似体や誘導体の C 炭素間の距離を意味し、A、B、C および D は、必ずしも隣接のアミノ酸またはその類似体や誘導体上にない。

式中、B は、非芳香族アミノ酸であり、好ましくは、アラニン、ロイシン、バリン、ノルロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、イソロイシン、セリンまたはトレオニンの D - または L - 型である。

A、C および D は上記の通りである。

好ましくは、化合物は構造 IV である。



10

式中、Eは、トリプトファンおよびホモトリプトファン以外のすべてのアミノ酸であり、例えば、アラニン、ロイシン、バリン、ノルロイシン、フェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、イソロイシン、セリン、トレオニンのD-またはL-型である。FおよびX¹は、構造IIで定義した通りである。好ましくは、化合物はC5aのアゴニストである。

第3観点において、本発明は、本発明の化合物および薬学的に許容される担体および賦形剤を含有する組成物を提供する。

20

本発明の組成物は、経口または非経口用に製剤されるが、経口が望ましい。本発明のほとんどの化合物は、全部ではないが、消化酵素の存在で安定である。この安定性は、当業者によく知られている日常的な方法で容易に試験できる。

望む経路で投与するための適当な製剤は、標準的な方法でつくられる。例えば、よく知られた教科書、Remington; The Science and Practice of Pharmacy, Vol. II, 1995 (19th edition), A.R. Gennaro (ed), Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, or Australian Prescription Products Guide, Vol. 1, 1995 (24th edition) J. Thomas (ed), Australian Pharmaceutical Publishing Company Ltd, Victoria, Australiaを参照。

第4観点において、本発明は、Gタンパク質結合受容体が調節する病理的状态を処置する方法を提供する。この方法は、かかる処置を必要とする哺乳動物に本発明の化合物の有効量を投与する過程を含む。

30

好ましくは、Gタンパク質結合受容体が調節する状態は、C5a受容体が調節する状態であり、さらに好ましくはC5aの過剰発現あるいは調節抑制が関与する。かかる状態には、限定でないが、リウマチ様関節炎、成人呼吸窮迫徴候(ARDS)、全身性エリマトーデス、組織移植拒絶、虚血性心疾患、再灌流傷害、敗血症ショック、乾癬、歯肉炎、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー、肺損傷および体外透析後症状が含まれる。

本発明はいかなる意味でも特定の動物や種目の処置に限定されるものでないが、本発明の化合物はヒトの医学的処置に特に有用であり、また獣医学的処置に有用である。ネコやイヌのような家庭での動物、ウシやウマ、ヒツジなどの家畜、およびウシ科、ネコ科、イヌ科、有蹄類などを含む動物園の動物が対象となる。

40

化合物はいかなる適当な用量およびいかなる経路でも投与できる。経口投与が便利であり、受け入れやすいので好ましい。有効量は、個々の処置における処置対象の状態、年齢、体重、基礎的健康状態によって変る。これは、担当医師または獣医師の判断である。適切な用量は、本業界でよく知られた方法を用いて、試行錯誤の試みで容易に決定できる。

【図面の簡単な説明】

図1は、C5aのGタンパク質結合受容体C5aRとの結合についての2部位モデルの図示である。黒棒は -らせん領域を表し、白円筒は透過膜らせんを表す。部位1および2を図上に示す。

図2は、¹H-NMRスペクトルの積重プロットを示し、10分後(開始時プロット)お

50

よび続く25、40、55、70、130、190、250、385、520分後で、D₂Oを含有するd₆-DMSO中の7のTrp(8.10ppm)およびD-Cha(7.90ppm)残基についてアミドNH共鳴の時間依存性遅延を示す。

図3は、24でd₆-DMSO中の7の20個の最低エネルギー最小化NMR構造の骨格C、N、O原子を示す。

図4は、d₆-DMSO中のプロトンNMRスペクトル由来の7の構造におけるH-結合の模式的図示である。

図5aは、(a)受容体結合を示し、¹²⁵I-C5aのヒトPMNとの結合の7(1); 8(); 9(); 12()による阻害を示す。

図5bは、C5aアンタゴニスト効力をヒトPMNからのミエロペルオキシダーゼI(MPO)放出の7(、n=9)および12(n=4)による阻害として示す。

図5cは、7、15および17のC5aR結合およびアンタゴニスト効力を示す。

A-Cは、ヒトPMNにおけるミエロペルオキシダーゼ放出を阻害するC5aアンタゴニストの濃度増加(上から下へ)の効果を示す(A-C中、n=3)。

A: 0、0.1、0.3、1.0 μMでの7(上から下へ)

B: 0、0.1、0.03、0.1 μMでの15(上から下へ)

C: 0、0.01、0.03、0.1 μMでの17(上から下へ)

D: PMN C5aR受容体についての比較親和性。¹²⁵I-C5aのヒトPMNとの結合の7(上)、15(中)、17(下)による阻害。すべてのデータは、平均±SEMを示す。

図6は、環状C5aアンタゴニストの受容体結合を示し、¹²⁵I-C5aのヒトPMNとの結合の阻害で表す(n=5)。

図7は、7(淡、NMR構造)および12(濃、コンピュータのモデル化構造)の重ね合わせ構造を示す。PheおよびTrp側鎖は、分かりやすくするために12から除かれている。

図8は、ウイスターラットにおけるC5a誘発の好中球減少症の環状アンタゴニストF-[OPdChaWR] 1mg/kg静注による阻害を示す。各群n=3、*P<0.05はC5a処置群のみと比較、結果は平均±SEMで示す。

図9は、ウイスターラットにおける環状アンタゴニストF-[OPdChaWR](0.03-10mg/kg、i.v.、リボポリサッカライド[LPS]の10分前)によるLPS誘発好中球減少症の阻害およびヘマトクリットの変化を示す。横軸: LPS(1mg/kg、i.v.注射)後の時間。縦軸: ゼロ時間との比較におけるヘマトクリット値(A)または循環の多形核(PMN)白血球レベル(B)の変化百分率を示す。

図10は、カラゲナン誘発ウイスターラット足蹠浮腫の環状アンタゴニスト(3D35)AcF-[OPdChaWr](1mg/kg 1回i.p.、カラゲナンの30分前)による阻害を示す。各群4ラットからの結果、平均±SEMである。縦軸: 浮腫容量の変化百分率。横軸: カラゲナン注入後の時間(分)。

本発明の詳細な説明

本発明は、下記の一般的方法、実施例および図面に従って参考としてのみ説明する。本明細書で使用する略号は次のとおりである。

BOP	ベンゾトリアゾール-1-イルーオキシ-トリ-(ジメチルアミノ)
-ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート	
D-Cha	D-シクロヘキシルアラニン
DIPA	ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルフォルマミド
DMSO	ジメチルスルフォキシド
HBTU	O-ベンゾトリアゾールN', N', N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート;
LPS	リボポリサッカライド
PMN	多形核顆粒球

R M S D 二乗平均平方根偏差
 R P - H P L C 逆相高性能液体クロマトグラフィー
 T F A トリフルオロ酢酸；

本明細書を通じて、通常の三文字表記および一文字表記をアミノ酸に使用する。

一般的方法

保護されたアミノ酸および樹脂をNovabiochemから得た。T F A、D I P E AおよびD M F（ペプチド合成等級）をAuspepから購入した。すべての他の材料は、特に断わらない限り試薬等級である。暫定的規模での逆相H P L C分離をVydac C 1 8逆相カラム（2 . 2 × 2 5 cm）で行い、そして分析逆相H P L C分離をWaters Delta - Pak PrepPak C 1 8逆相カラム（0 . 8 × 1 0 cm）で行った。これには、溶媒A = 水/ 0 . 1 % T F Aおよび溶媒B = 水1 0 % / アセトニトリル9 0 %、0 . 0 9 % T F Aの勾配混合物を用いた。ペプチドの分子量の測定は電子噴霧質量分析で3重四極質量分析計（P E S C I E X A P I I I I）により記録した。参照（Haviland et al, 1995）。¹H - N M RスペクトルをBruker ARX 5 0 0 MHzまたはVarian Unity 4 0 0分析計で記録した。プロトン移行は2 D N M R試験（DFCOSY, TOCSY, NOESY）で測定した。

非ペプチド化合物は、通常の有機化学的方法を用いて合成した。化合物は¹H - N M R分光および質量分析で調べた。

ペプチド合成

いくつかの代表的ペプチドを合成した。直線的ペプチド配列をマニュアル工程広範囲固相ペプチド合成によりH B T U活性およびD I E A in situ中性化で会合した。B o c化学をアミノ酸のN - 保護のために用い、B o c基の除去のためにT F Aで1分間2回処理した。ペプチドを完全に脱保護し、開裂するために液体H F（1 0 ml；p - クレゾール（1 ml）；- 5 °C；1 - 2時間）で処理した。分析H P L C（勾配；0 % Bから5 0 % B、4 0分間以上）：7、R t = 3 2 . 0分、[M + H] +（計算）= 9 0 0 . 5、[M + H] +（実測）= 9 0 0 . 7；8、R t = 3 2 . 2分、[M + H] +（計算）= 8 9 9 . 6、[M + H] +（実測）= 8 9 9 . 7；9、R t = 3 0 . 0分、[M + H] +（計算）= 9 0 0 . 5、[M + H] +（実測）= 9 0 0 . 7；1 0、R t = 2 3 . 8分、[M + H] +（計算）= 8 6 0 . 5、[M + H] +（実測）= 8 6 0 . 5。

ペプチドについての構造を下記表4に示す。

a）環1 1の合成

本発明の広範な環状アンタゴニストの合成に使用される一般的方法を示す。例えば、環1 1の場合、その直線的前駆体ペプチドはF m o c化学で合成され、F m o c - D - A r g（M t r）- W a n g樹脂上のH B T U/D I E A活性を利用した。F m o c基の除去は、5 0 % ピペリジン/D M Fで1分間2回処理した。9 5 % T F A/ 2 . 5 % T I P S / 2 . 5 % H₂Oを用いて開裂および脱保護を行うと、M t r - 保護ペプチドが得られ、R P - H P L Cで精製した。保護された精製ペプチドの環化は、3 eq B O Pおよび1 0 eq D I E Aを1 mMの濃度でD M F中1 5時間攪拌して行い、得た環化産物をT F A中1 M T M S B rで完全に脱保護した。最終R P - H P L C精製により所望のペプチドを環化収率5 0 %で得た。R t = 3 7 . 7分、[M + H] +（計算）= 9 1 0 . 5、[M + H] +（実測）= 9 1 0 . 7。

b）環1 2の合成

開裂および完全脱保護ペプチドの環化を、1 mM D M F溶液と3 eq B O Pおよび塩基として1 0 eqピリジンを1 5時間攪拌して行なった。最終R P - H P L C精製により所望のペプチドを環化収率2 2 %で得た。R t = 3 7 . 3分、[M + H] +（計算）= 8 9 6 . 5、[M + H] +（実測）= 8 9 6 . 5。

N M R構造決定

¹H - N M Rスペクトルを化合物7（7 5 0 μl d 6 - D M S O中3 mg、2 . 5 0）について溶媒対照で、Varian Unity 4 0 0分光計により2 4 °Cで記録した。2つの2次元¹H - N M R NOESY（遅延時間2 . 0秒、混合時間5 0 - 3 0 0分）、DFQ - COSYおよびTOCSY（混合時間7 5分）を純位相モードで行った。すべての実験について、データ

10

20

30

40

50

収集時間 = 0 . 1 8 6 秒、スペクトル幅 = 5 5 0 0 Hz、複数点 (t 1 軸) = 1 0 2 4 。データは両軸において、ゼロ付加して、1 0 2 4 の実質点へFourier移行した。

N M R データをSilicon Graphics Indy計算センターでのTRIADソフトウェア (Tripos Associates.) で処理した。2 D N O E 交差ピークを積分し、強 (1 . 8 - 2 . 5) 、中程度 (2 . 3 - 3 . 5) および弱 (3 . 3 - 5 . 0) に分類した。暫定的 3 次元構造を、Diana 2 . 8 (6 9 距離制約、隣接残基について 2 7 およびさらに離れるもの 6 を含む) を用いて重複 2 面角制約法 (R E D A C) で上限および下限距離ファイルから計算した。上限および下限距離をMARDIGRASで正確に計算した。この段階で、可能な水素結合についてペプチドを調べ、結合を距離制約として加えた。5 0 最低エネルギー Diana構造を制約分子動力学 (R M D) および制約エネルギー最小化 (R E M) の対象とした。R E M は、最初に 5 0 段階急勾配低下、次いで 1 0 0 段階共役傾斜最小化法からなった。R M D は、構造の模擬加熱で行い、1 psにつき 3 0 0 K、次いで 1 psにつき 5 0 0 Kで行った。温度を徐々に下げ、2 ps以上で 3 0 0 K最終的に 2 psにつき 2 0 0 Kとした。R E Mを再び 5 0 段階急勾配低下、2 0 0 段階勾配、次いで 3 0 0 段階 Powell最小化を行った。最終構造を調べて、骨格重原子 (N、C および C) を越える平均対の平方自乗平均差異を得る。5 0 構造中 3 0 ですべての骨格原子 (O、N、C) につき平方自乗平均 < 0 . 5 であった。

分子モデル

図 7 に示す環 1 2 のモデルを 7 の N M R 構造からつくった。これには、すべての N M R 制約をなくし、オルニチン側鎖を d - A r g の C - 末カルボキシレートに融合してアミンを形成し、Powell強制場 (1 0 0 0 繰り返し) を用いて最小化した。モデル構造を平方自乗平均 0 . 2 2 4 の N M R 構造に重ねた。

受容体結合アッセイ

新鮮ヒト P M N を (Sanderson et al, 1995) 記載のように単離し、アッセイを行った。これには、緩衝液の 5 0 mM H E P E S、1 mM C a C l 2、5 mM M g C l 2、0 . 5 % ウシ血清アルブミン、0 . 1 % バシトラシンおよび 1 0 0 μ M フェニルメチルスルホニルフルオリド (P M S F) を用いた。4 でのアッセイにおいて、緩衝液、非標識ヒト組換え C 5 a (Sigma) またはペプチド、Hunter/Bolton標識 ¹²⁵ I - C 5 a (~ 2 0 pM) (New England Nuclear, MA) および P M N (0 . 2 × 1 0 6) を、Millipore Multiscreen アッセイプレート (H V 0 . 4 5) に順次加え、最終容量を 2 0 0 μ L / well とした。6 0 分間 4 でインキュベートした後、サンプルを濾過しプレートを 1 回緩衝液で洗った。フィルターを乾燥し、パンチし、L K B ガンマ計で計数した。非特異的結合を 1 mM ペプチドまたは 1 0 0 nM C 5 a で調べた。これは典型的に 1 0 - 1 5 % の全結合をもたらすものであった。

データ解析は非直線の回帰および Dunnett post テストで統計処理した。

ミエロペルオキシダーゼ放出

細胞を (Sanderson et al, 1995) 記載のように単離し、シトチャラシン B とともにインキュベートした (5 μ g / mL、1 5 分間、3 7) 。0 . 1 5 % ゼラチンおよびペプチドを含む Hank ' s Balanced Salt 溶液を 9 6 ウエルプレート (全量 1 0 0 μ L / well) に加え、次いで 2 5 μ L 細胞 4 × 1 0 6 / mL) を加えた。C 5 a に拮抗する各ペプチドの能力を調べるために、細胞を 5 分間 3 7 各ペプチドとともにインキュベートし、C 5 a (1 0 0 nM) を加え、さらに 5 分間インキュベートした。次いで、5 0 μ L のリン酸ナトリウム (0 . 1 M、p H 6 . 8) を各ウエルに加え、プレートを室温に冷やし、等量のジメトオキシベンジジン (5 . 7 mg / mL) と H₂O₂ (0 . 5 1 %) からなる 2 5 μ L の新鮮混合物を各ウエルに加えた。反応を 1 0 分で 2 % アジドナトリウムを加えて停止した。吸光度を 4 5 0 nm で Bioscan 4 5 0 plate reader により測定し、対照値 (ペプチドなし) で修正し、非直線回帰で解析した。

抗炎症活性のインビボアッセイ

下記がよく知られたインビボアッセイ系を用いて、本発明の化合物の抗炎症活性が調べられる。すべてのアッセイデータの解析は、非直線回帰解析、Student ' s t - テスト、分散

10

20

30

40

50

分析を用いた。有意水準は $p < 0.05$ である。

(a) カラゲナン足蹠浮腫

麻酔（腹腔内、ケタミンおよびキシラジン）ウイスターラット（150 - 200 g）またはマウスに滅菌空気（20 ml 1日、10 ml 4日）を背中の皮下組織へ注射した。空洞を6日後に使用できる。カラゲナン（2 ml、1% w/w 0.9% 塩類溶液）を空気ポーチに注入し、滲出液を10時間後に採取した。試験化合物を6日後に毎日投与し、抗炎症作用を空気ポーチ滲出液中の細胞を示差計数して調べた。動物を注射後の適当な時に殺し、2 ml 0.9% 塩類溶液を用いて空洞を洗い、ヘパリンを入れた管に洗液を移し、細胞を血球計およびDiff-Quik染色細胞遠心製剤で計数した。

あるいは、通常のカラゲナン足蹠浮腫をウイスターマウスで、カラゲナンを足蹠に注射してつくり、2時間後に可視でき、4時間後に最大となる浮腫が生じた。試験化合物を炎症起剤の40分前に与え、2および4時間後の足蹠をマイクロカリパスで測定した。参照、Fairlie, D.P. et al (1987) およびWalker and Whitehouse (1978)。

(b) アジュバント関節炎

アジュバント関節炎をラット（3種）に、関節原性アジュバントを油状担体とともに（フロインドアジュバント）尾基部に接種して、微生物学的に（殺菌Mycobacterium tuberculosisを注射）または化学的に（アヴリジンで）起こした（参照Whitehouse, M.W., Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases, Eds. Greenwald, R.A.; Diamond, H.S.; Vol. 1, pp. 3-16, CRC Press）。

13日以内に、アジュバント関節炎が、尾の局所的炎症および潰瘍、全4足蹠の腫脹、足蹠および耳の炎症性損傷および体重減少や発熱で表われる。これらの症状は、ヒトの炎症疾患にており（Winter and Nuss, 1966）、ヒトで効果を現すインドメサシンやシクロスポリンなどの薬剤により改善される（例えば、Ward and Cloud, 1966）。14日目での薬剤処置をしないと、関節炎ラットに足蹠の肥厚が生じ、血清中のアルブミンが低下し、急性相反応タンパク質が増加し、バルビテュレートによる睡眠時間の延長で表されるように生体異物の肝代謝を抑制した。

活性を調べるために、アルトリトゲン（日0）の接種10 - 13日後に化合物を4日間経口（10 mg/kg/日以下）または腹腔内投与した。足蹠の厚さおよび尾の容量のマイクロカリパス測定、および炎症損傷の観察によって調べたところ、炎症は前足および後足で認められないか、非常に減少していた。動物を18日目に頸部切断で殺した。ただし、炎症徴候がなかった場合は、倫理委員会の特別の許可を得て観察を続けた。試験をずらして情報量を最大にし、化合物間の初期の比較を可能にした。この日常的なアッセイは、ヒトに用いられる抗炎症剤を同定するのに、よく受け入れられる。

実施例 1 C5a アゴニストの構造 - 活性の関係

強力なアゴニスト活性を有するペプチド配列の研究において構造 - 活性の関係を知らるためにC5aのC末残基に焦点を絞った。これらのペプチドの多くはC5aに関する完全なアゴニストであるが、顕著な低い効力を有する（Sanderson et al, 1994, 1995; Finch et al, 1997）。われわれの最初の構造 - 活性の研究は特に得るところが多かった。C5aのデカペプチドC末（1、C5a65 - 74、ISHKDMQLGR）を2度165YおよびH67F（例えば2）で変異を起こすと、アゴニスト強度に2桁の増加が見られた。これらの結果を表2に要約する。化合物2についてのRamachandranプロットおよび2D NMRスペクトルの解析によると、特定の構造的特徴、すなわち残基65 - 69について振れた“ヘリックス様”骨格配座および残基71 - 74について - 回転が活性の一因であるようであった。これらの結果は、C5a受容体に固く結合するための構造的要件にいくつかの洞察をもたらす。

表 2
C5a アゴニスト類似体*の薬理活性

ペプチド No.	ペプチド	胎児動脈 EC ₅₀ (μM)	PMN酵素放出 EC ₅₀ (μM)	結合親和性 IC ₅₀ (μM)
1	C5a ₆₅₋₇₄ (ISHKDMQLGR)	>1000	>1000	>1000
2	YSFKDMQLGR	9.6	92	1.3
3	YSFKDMPLaR	0.5	72	3.7
4	YSFKPMPLaR	0.2	4.1	6.0
5	C5a ₃₇₋₄₆ -ahxYSFKPMPLaR	0.06	5.9	0.7
6	C5a ₁₂₋₂₀ -ahxYSFKPMPLaR	0.08	0.7	0.07
	C5a	0.02	0.03	0.0006

* Finch et al, 1997

表 2 の化合物 4、5 および 6 は、いままで知られている最も高い親和性の小 C5a アゴニストであり、ヒト胎児動脈において 25 % までの C5a 効力、ヒト PMN 酵素放出アッセイにおいて 5 % C5a 効力および PMN C5a R について 1 % C5a 親和性を有する (Finch et al., 1997)。PMN 受容体について、これらの化合物は、文献にいままで発表されたいかなる小分子よりも最大 100 - 倍の高い明白な親和性を有する。

無傷 PMN 細胞における C5a についてのこれらアゴニスト類似体の “高” 親和性 (70 nM - 6 μM) からして、スパスモゲン活性の発現およびヒト PMN 細胞における酵素放出アッセイに相関するペプチドアゴニストの共通の局所的特徴を同定できた。この好ましい骨格配座はタイプ II - 回転である。

これらの小サイズのアゴニストペプチドは、その親和性、活性、バイオアベイラビリティ

10

20

30

40

50

を最適化するために、合成的修飾が可能であり、もって受容体活性化の構造的プローブとして有用である。

実施例 2 C 5 a アンタゴニストの NMR 構造

2 次元核磁気共鳴分光計を用いて、7 の 3 次元構造を決定した。水中では認められるような構造がなかったが、ジメチルスルフォキシド中ではガンマ - 回転構造が確認された。

2 4 における d 6 - DMSO 中の 7 の 1 D - 1 H - NMR スペクトルは、表 3 に要約するようにアミド NH プロトンについて 4 つの別異の共鳴を示す。その分子内水素結合の関与をはっきりさすために、10 倍過剰の D₂O を溶液に加えて、重水素交換実験を行った。アミド NH 二重線の 2 つがすぐに消え、N 末メチルアミンプロトンに起因する共鳴を伴った。しかし、他の 2 つのアミド NH 共鳴および約 8 . 0 5 ppm での広い共鳴は、最大 6 . 5 時間持続した (図 2) 。これらの 3 つの緩やかな交換プロトンは、T r p および d - C h a のアミド NH、および L y s の側鎖に原因があり、緩やかな交換は水素結合に特徴的である。アミン割当の確認は、プロトン化アミンと、および C H₂ プロトンとの間に認められる交差ピークの TOCSY スペクトルでなされる。アミド NH 化学的交換の温度依存試験 (2 0 - 6 0) (/T = 2 . 5 ppb/deg, dCha - NH; 6 ppb/deg, Trp - NH; 6 . 5 ppb, Lys - NH; 8 . 7 ppb, Arg - NH) でもって、分子内水素結合への d C h A - N H のみの関与を疑問なく確認した。

表 3
d₆-DMSO中の7についての¹H-NMR割当*

残基	¹ HN	Hα	Hβ	Hγ	その他
MePhe	—	4.06	3.09, 3.06	—	c 7.17, 7.29; d2.46; f8.98
Lys	8.83	4.54	1.74, 1.55	1.32	e1.51; f2.74, G7.76 (NH ₂)
Pro	—	4.30	2.084, 1.74	1.88, 1.78	e3.61, f3.48
d-Cha	7.91	4.35	1.19, 1.06	0.76	e1.43, 1.08; f1.61, 1.58; 0.73
Trp	8.01	4.65	3.11, 2.94	—	c6.97, 7.06, 7.13, 7.32, 7.65; g10.80
d-Arg	8.44	4.20	1.73, 1.58	1.42	e3.08; g7.60

a 2.50 ppmでの残基d₆-DMSOについて

b アミドNH, ³JNH-CaH値 (Hz):7.91 (Lys), 7.77 (d-Arg), 8.34 (Trp), 8.53 (d-Cha)

c 芳香族

d N-Me

e Hδ

f Hε

g NH/NH₂アミン

一連の2D ¹H-NMRスペクトルを7について24でd₆-DMSO中測定し、3次元構造を決定した。TOCSYおよびDFQ-COSY実験により、残基タイプを同定し、逐次割当をNOESYデータから行った。NOESYデータから生じた一連の100構造より、最低エネルギー構造の50を制約分子動力法(200K-500K)にかけ、エネルギーを最小にした。根平均平方偏差(rmsd)<0.5(骨格原子)をもつ一連の20計算構造を図3で重ねると回転配座を明白に表した。

NMR制約データ、³JNH-C-H値、重水素交換および温度依存性データを組み合わせると、図4に示すように、最大3水素結合により制約されたヘキサペプチド7が明確になる

10

20

30

40

50

。この証拠は、 $d C h a - N H \dots O C - L y s$ (2.72° , $N - H \dots O$ 角 157° , $C = O \dots H$ 角 84°) 由来の1つの分子内水素結合については非常に強く、逆 - 回転を確定する7員環を形成する。 $d C h a N H - O - T r p N H$ 角は 56.4° である。重水素交換データおよびNMR制約データは、一緒に第2分子内水素結合 $T r p - N H \dots O C - L y s$ (3.31° , $N - H \dots O$ 角 159° , $C O \dots H$ 角 137.3°)、 - 回転に特徴的な10員環を形成する。 および 角 ($\phi_2 = -58.4^\circ$ 、 $\phi_2 = 62.0^\circ$; $\phi = 96.6^\circ$ 、 $\phi_3 = 16.6^\circ$) は、タイプII - 回転に適合する (Bandeekar, 1993; Hutchinson and Thornton, 1994)。この - 回転は、その中に - 回転が存在することで歪められる。

われわれの知る限り、これは、 - 回転内の残基間の分子内水素結合についての最初の例である。しかし、 - 回転の“10員環”内の1残基とその外側の1残基との水素結合については多くの例がある。(Bandeekar, 1993)。第3の水素結合 (2.76° , $N - H \dots O$ 角 160.3°) は、 $L y s$ の側鎖アミンとC末カルボキシレートとの間にあり、NMR制約データ、緩やかなNH/ND交換および $L y s - N H \dots T r p - C H_2$ 間の弱いNOEの検出により示唆された。これは、分子を回転配座中へさらに制約する。このようなイオン対の形成はジメチルスルホキシドなどの二極性の非プロトン溶媒に共通であり、疎水性タンパク質環境にも関係する。

NMR溶媒構造を下記の実施例に記載した環状アンタゴニストのいくつかについて決定した。各例においてタイプII - 回転が環状構造により保存され、安定化されることを示す。

直鎖ペプチド7中の制約 および 回転は環状ペプチドに平行する。われわれはかつて、アシジアシクラミド由来の環状オクタペプチド中で重複する および 回転を検出した (Abbenante et al, 1996)。 - および - 回転の組み合わせも環状のペンタおよびヘキサペプチド、特に代替りのD - およびL - アミノ酸を含有するペプチドで認められている (Marraud and Aubry 1996; Fairlie et al, 1995; Kessler et al, 1995; Stradley et al, 1990)。例えば、タイプII - 回転および逆 - 回転は、エンドテリン受容体について環状アンタゴニスト $c - (D - Glu - Ala - D - allo - Ile - Leu - D - Trp)$ (Ihara et al, 1991; Coles et al, 1993; Ihara et al, 1992; Bean et al, 1994) および $c - (D - Asp - Pro - D - Val - Leu - D - Trp)$ (Bean et al, 1994)、および7つの膜透過ドメインを持つGタンパク質結合受容体のロドプシンファミリーのメンバー (X. - M. Cheng et al, 1994) 内で同定されている。後者の場合、7におけるのと同様に、逆 - 回転が、プロリンを両側からはさむ残基 ($Asp - C O \dots Val - N H$, $Lys - C O \dots d C h a - N H$) の間に形成する。

実施例3 インビトロでの構造と活性の関係

我々は、新規化合物と比較のためにヘキサペプチド7の受容体結合およびアンタゴニスト活性も調べた。Kontetis et al (1994) による従前の報告は、単離PMN膜上受容体 ($IC_{50} 70 nM$) との $C5a$ 結合に競合する7の能力に関するものであったが、必ずしも生理学的に関係するものではなかった。未処理PMN細胞を用い7と $C5a$ との競合を調べ、これらの条件下、7の結合は受容体親和性が非常に低く $IC_{50} 1.8 \mu M$ であることを発見した。7はアゴニスト性を全く有さない完全アンタゴニストであることを確認した。これらの結果を図5aおよび表4に要約する。我々のアッセイでは、未処理PMNにおける $C5a$ Rに対する7の相対親和性(割合)は、単離PMN膜について以前報告されたものに近似していた。

また我々が発見したことは、7が $C5a$ (図5b) とC末端 $C5a_{65-74}$ のC末端アゴニストデカペプチド類似体4 (YSFKPMPLaR) (Finch et al, 1997) との両方に対しアンタゴニスト活性を示したことであり、7が受容体の部位2に作用することを示唆している。化合物7および4は、表4に示すように、未処理多形核白血球の受容体 $C5a$ Rに対し同程度の μM 親和性を有する。

表4のデータからの新規発見によると、結合親和性の対数と、これら部位2アンタゴニストについてのアンタゴニスト効力の対数との間に直線状の相関関係がある(化合物7-1

10

20

30

40

50

2、表4)。この直線関係の重要性は次の通りである。受容体親和性とアンタゴニスト活性が正比例するので、受容体結合を測定する実験的により簡単なアプローチを使用して、これらの小化合物に対するアンタゴニスト活性が算出し得る。但し、アゴニスト活性の証明とはならない。

表4

ヒトPMNにおける受容体結合親和性^aおよびアンタゴニスト活性^b

	化合物	受容体親和性 ^a	アンタゴニスト効力 ^b	アゴニスト活性 ^c	
		IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)		
7	MeFKP(dCha)Wr	1.8 (15)	0.085 (9)	なし	10
8	MeFKP(dCha)Wr-CONH ₂	14 (5)	0.5 (3)	なし	
9	MeFKP(dCha)WR	11 (5)	0.7 (3)	なし	
10	MeFKPLWR	144 (1)	>1000 (3)	nd	
11	Ac-F-[KP(dCha)Wr]	3.2 (40)	0.090 (5)	なし	
12	Ac-F-[OP(dCha)Wr]	0.28 (6)	0.012 (4)	なし	
4	YSFKPMPLaR	6.0 ^d	—	あり	20
1	C5a ₆₅₋₇₄ ISHKDMQLGR	>1000 ^e	—	—	
	C5a	0.0008 (9)	—	あり	

括弧内は実験回数。 アミノ酸含量につき修正した。

角括弧は環状部分を示す。

nd = 測定せず

^a 未処理ヒトPMNに対する¹²⁵I-C5aの結合の50%減少

^b 100 nM C5aにより媒介されるヒトPMN由来ミエロペルオキシダーゼ分泌の50%減少

^c 用量範囲0.1 nM-1 mMのアゴニスト活性

^d Finch et al, 1997; ^e Kawai et al, 1991

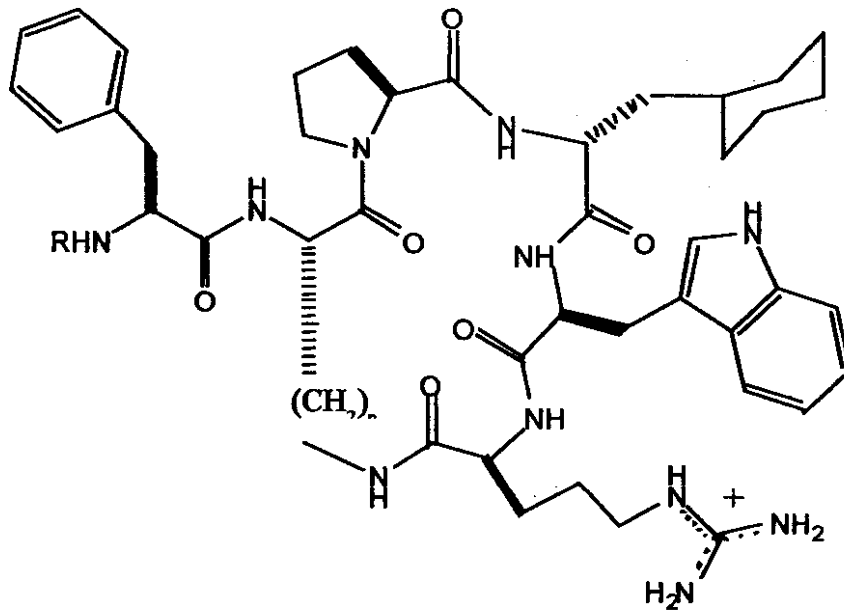
従来の説によると、C5aおよびアゴニストペプチドのC末端は、活性に重要である。受容体の陽性電荷Arg206と相互作用するからである(DeMartino et al, 1995)。C末端カルボン酸は活性に実に重要である(8対7)ことをここで確認したが、この効果の源はカルボン酸陰イオンとLysの陽性電荷アミン側鎖との間の水素結合によるものかもしれないとも考えられた。アミド(8)への変換は、受容体親和性およびアンタゴニスト活性を両方とも約1/5に確実に減少する。Arg-Cのキラリティを変えると(9対7)、活性が同程度減少し、かさの低いLeu残基(10)でdChaを置換すると、受容体結合に不利に働く。しかし、効力は環状化合物11および12では回復し、これらの化合物にいてアミド結合がC末端で寛容され、7のカルボキシレートの利点が分子内水素結合と関係し得るという上記の構造解釈と一致する。11および12の共有アミド結合で7の水素結合を置換すると、より効果的に回転配座を安定化する。

図5Cは、化合物15および17について化合物7に比較して、ヒトPMNにおけるインビトロでのC5aR結合およびアンタゴニスト効力を示す。15および17は何れも、C

5 a の作用および¹²⁵I - C 5 a と受容体との結合を n M 濃度で強力に阻害する（例えば 4、 $K_b = 1.4 \text{ nM}$ ）。環状の性質および N 末端フェニルアラニンでのアセチル化は何れも、典型的にペプチドが遭遇するタンパク質性分解を防ぐので、薬剤候補として非環状ペプチドより環状化合物が適している。結果を表 5 に示す。

表 5

環状分子の受容体結合およびアンタゴニスト活性



化合物	n	R	異性体*	受容体親和性 μM	アゴニスト 活性
13	1	H	S-	9	なし
14			R-	34	なし
15	2	H	S-	0.3	なし
16			R-	3.7	なし
17	3	Ac	S-	0.3	なし
11		Ac	R-	38	なし
18	4	Ac	S-	3.2	なし
12		Ac	R-	51	なし

*A r g 側鎖の立体化学を参照

実施例 4 C 5 a の環状アンタゴニスト

これら環状アンタゴニストのいくつかの例ならびにその明白な受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力の例を、表 4、5 および 6 ならびに図 5 および 6 に示す。表ではアミノ酸の 1 文字表記を用いる。

表 6

アンタゴニスト結合親和性およびアンタゴニスト効力における環状化の効果

	ペプチド	pD ₂ ± SE ^a	IC ₅₀ (μM) ^a	(n)	pD ₂ ± SE ^b	IC ₅₀ (μM) ^b	(n)
11	AcF-[KPdChaWr]	5.49 ± 0.22	3.2	4	7.07 ± 0.29	0.09	5
12	AcF-[OPdChaWr]	6.44 ± 0.14*	0.4	9	7.30 ± 0.09	0.05	9
19	[FWPdChaWr]	4.37 ± 0.36*	43	3	nd		
20	AcF-[KMdChaWr]	4.81 ± 0.06	15	2	nd		
21	AcF-[KKdChaWr]	3.94 ± 0.4	116	3	4.88	13	1

10

アンタゴニスト結合親和性およびアンタゴニスト効力における環内リンカーの長さの効果

22	AcF-[XPdChaWr]	5.02 ± 0.07	9.5	3	4.71 ± 0.23	20	3
23	AcF-[X ² PdChaWr]	4.77 ± 0.14*	17	3	6.09 ± 0.08*	0.8	4
12	AcF-[OPdChaWr]	4.60 ± 0.06*	16	4	6.42 ± 0.10	0.4	4
24	AcKF-[OPdChaWr]	4.96 ± 0.03	11	3	6.73	0.2	1

20

表 6 (続き)

	ペプチド	pD ₂ ± SE ^a	IC ₅₀ (μM) ^a	(n)	pD ₂ ± SE ^b	IC ₅₀ (μM) ^b	(n)
14	F-[XPdChaWr]	4.39 ± 0.10*	41	3	nd		
16	F-[X ² PdChaWr]	5.42 ± 0.05	3.8	3	6.70 ± 0.04	0.4	3
25	F-[OPdChaWr]	5.51 ± 0.07	3.1	3	5.79 ± 0.34*	1.6	3
26	F-[KPdChaWr]	5.09 ± 0.08	8.1	3	5.55 ± 0.57*	2.8	3

30

アンタゴニスト結合親和性およびアンタゴニスト効力における L-A r g の効果

17	AcF-[OPdChaWr]	6.57 ± 0.05*	0.3	3	7.91 ± 0.17*	0.01	3
13	F-[XPdChaWr]	4.98 ± 0.05	10	3	5.63 ± 0.13*	2.4	3
15	F-[X ² PdChaWr]	6.50 ± 0.04*	0.3	5	7.36 ± 0.13	0.04	3
27	F-[OPdChaWr]	7.21 ± 0.01*	0.06	3	7.41 ± 0.14	0.04	3
28	F-[KPdChaWr]	6.50 ± 0.12*	0.3	4	6.69 ± 0.04	0.2	3

40

a pD₂ / IC₅₀ ; [¹²⁵I] C 5 a が未処理 PMN に結合するのを 50 % 阻害するペプチド濃度。IC₅₀ は平均 pD₂ 値の逆対数である。

b pD₂ / IC₅₀ ; PMN から MPO を放出する要因となる C 5 a (100 nM) の能力を 50 % 阻害するペプチド濃度

X = (CH₂) - NH₂

X² = (CH₂)₂ - NH₂

pD₂ 値は平均 ± SE で表わしている。

n 行った実験数を示す。

* NMeFKPdChaWr (p<0.05) と比較した親和性 / 効力の有意な変化

異性体の数を示す。

50

以下の結果となる：

- (1) 環状分子は明らかにより高い受容体親和性を有し、非環状 (直鎖状) ペプチドよりも強力なアンタゴニストとなり得、
- (2) 生じ得る 2 つの環状ジアステレオマーの 1 つが C 5 a 受容体への結合に一貫して好適であり、驚くべきことにそれは、直鎖状化合物で好適であるもの (D-アルギニン) に対し逆の立体配置 (L-アルギニン) であり、
- (3) この環は受容体結合に適当な環サイズを有し、
- (4) 対数 (アンタゴニスト効力) と対数 (受容体親和性) との間に仮直線の関係がある。

表 5 および表 6 は、数例の C 5 a の環状アンタゴニストの C 5 a 受容体親和性について記載しており、ヒト PMN に対する結合能およびヒト PMN に対する C 5 a の阻害、結合を図 6 に示す。驚くことに、これらのデータによると、L-アルギニンが直鎖状化合物 7 と異なり D-アルギニンより好適である。7 では D-アルギニンが受容体に対し L-アルギニンより高い親和性を付与する。またデータから、 $n = 2$ または 3 のときは巨大環の大きさが適当であり、 $n = 1$ の場合は小環の大きさが適当であり、そして明らかに活性の低い $n = 4$ の場合は大環の大きさが適当である。強固な制約環 (constrained cycle) を要するのは、受容体と相互作用する結合側鎖残基、例えば Trp、dCha、Arg および Phe を正確に位置付ける必要があるからであろう。

実施例 5 アンタゴニスト構造のコンピューターモデル

図 7 では、環状アンタゴニスト 12 のコンピューターモデル化構造と非環状アンタゴニスト 7 の NMR 溶液構造との比較をしている。これら骨格構造は極めて類似しており、これら分子の受容体結合配座が同じ回転構造を有することを強く示唆する。化合物 12 (11 よりも更に強力なアンタゴニスト) が、より短いリンカーも有し、回転を固定し、Phe、dCha、Trp および Arg の主要側鎖に影響する配座空間を僅かに変化させる。環によるヘキサペプチド誘導体 12 上の配座限界は、受容体結合親和性が C 5 a の配座的に可動なデカペプチド C 末端全体より 10^4 以上増加する要因である。(1、表 2)。

部位 2 アンタゴニストについて結合親和性とアンタゴニスト効力との間には相関関係がある (化合物 7 - 12、表 2)。従って、アンタゴニスト効力は部位 2 のみに生ずる変化に依存しているようである。このことは、いかなる提唱メカニズムに拘束されることを意図するものでないが、受容体の部位 2 の 7 により誘発される回転配座への配座的变化にアンタゴニズムのメカニズムが関係するためであると考える。

実施例 6 種々の細胞における C 5 a R の特性化

近年、他の型の C 5 a R についての情報はない。以前に我々は、アゴニストに対する機能性 C 5 a R を含む種々の細胞の応答に関する顕著な相違を示した (Sanderson et al, 1994, 1995; Finch et al, 1997)。このたび、我々が提供するものは、ヒト組換え体 C 5 a に関する選択的なアゴニストおよびアンタゴニストの効力および作用を検討した結果の情報である。アゴニストの場合、組織または細胞の選択性により、機能的に異なる受容体が明らかにされ得る。ヒト PMN、U937 細胞、または循環単球を使った結合アッセイを用い、C 5 a R に対する親和性を測定する。他の C 5 a R に対する選択性は特異な競合により確実となる。この併用のアプローチから、新規アゴニストまたはアンタゴニストの医薬的

実施例 7 (a) インビボでの好中球減少症および C 5 a 競合

化合物を C 5 a 誘発性好中球減少症の急性モデルで評価した。図 8 に示されるように、一時的な好中球減少症は C 5 a 静脈注射後 5 分間で最大、深在的となり、有効用量の C 5 a で循環から 90 % を超える循環好中球が消失する。好中球減少症は、血管内皮に循環好中球が一時的に接着することが原因である。実験データによると、C 5 a 静脈注射による好中球減少症は C 5 a アンタゴニストにより阻止される。例えば、 $2 \mu\text{g}$ の C 5 a 静脈注射前に F- [OPdChaWR]、($1 \text{ mg} / \text{kg}$) を投与すると、インビボでは C 5 a 誘発好中球減少症が抑えられる (図 8)。

実施例 7 (b) C 5 a アンタゴニストによるリボポリサッカリド誘発性効果の阻害

L P S はラットにおける急性好中球減少症の原因である。L P S のこの効果が C 5 a アンタゴニストにより阻止されるならば、C 5 a は L P S の急性効果に非常に重要なものである。図 9 に示した結果はこの仮説と一致した。C 5 a アンタゴニストは L P S 変化 10 分前に注射された（ボラス、静脈注射）。ラットを麻酔し、血液サンプル（0.3 ml）を P M N 測定のために採取した。P M N を単離し、定量する。結果から判るように、L P S 静脈注射前に F- [O P d C h a W R]、（1 mg / kg）を投与すると好中球減少症が抑えられる。

また結果は、C 5 a アンタゴニストが L P S によるヘマトクリットの増加を抑え、L P S による血清の血管漏出も抑えることを示す。

これらの結果から、C 5 a 受容体アンタゴニスト（例えば本発明中で記載したもの）が敗血症患者の治療に利用し得ることが分かる。血管内皮への P M N の接着を阻害する能力およびヘマトクリット値の減少により示されるような L P S に対する血管漏出を抑制する能力は、補体系を活性化する炎症刺激物（例えばエンドトキシンまたは L P S）に対する本発明化合物の強力な抗炎症性作用を示している。

実施例 8 環状 C 5 a アンタゴニストのインビボ活性

ラットの予備実験から判るように、表 5 に要約した環状アンタゴニストは、20 mg / kg 未満で活性があり、カラゲナン誘発足蹠浮腫またはアジュバント誘発多発性関節炎の発症を抑制する抗炎症剤として作用する。中程度のアンタゴニストの最大効果用量は 10 mg / kg 以下である（腹膜内注射または経口投与の場合）。現在ヒトに使用されている多くの抗炎症剤は、最初にこのようなアッセイで評価され、さらに炎症ラットモデルでも活性がみられたものである。インビボでのこれら予備実験の効力から、C 5 a アンタゴニストがヒトの炎症の病状に治療効果があることが分かる。

ラットのカラゲナン足蹠浮腫アッセイを用い、化合物 AcF- [O-P-dCha-W-r] は、P M N の C 5 a アンタゴニストとしてインビトロで 17 の 1 / 100 の活性しかないが、カラゲナン注射前 30 分に 1 mg / kg を腹膜内注射すると、インビボ活性を幾分有することが判った。足蹠の膨張を最大 4.5 時間まで測定した。図 10 に示す結果によると、この弱い C 5 a アンタゴニストでさえ 180 および 270 分後の浮腫の進行を有意に阻害する。この抗炎症性活性から、C 5 a 受容体アンタゴニスト（例えば本発明で記載したもの）が、炎症性の刺激に続く血管漏出を含む疾患に治療的活性を有し得ることが分かる。

近年、生物学的活性タンパク質表面となる - および - 回転ペプチドを擬似する多くの試みがあり、R G D（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）ペプチド、ソマトスタチンおよびオピオイドペプチドについて注目すべき擬似体を得られており、構造-活性の関係から誘導された数種を挙げることができる（例えば、Marraud and Aubry, 1996; Fairlie et al, 1995 参照）。これら殆どの例は、ペプチドの環状化を通じて回転構造を維持する。他方、溶液中で事実上回転構造を有することが判明している短い非環状ペプチドは比較的に少ない

(Dyson et al, 1988; Rizo and Gierasch, 1992; Pràcheur et al, 1994)。

短い非環状ペプチドが、生物学的活性の要因となる小集団の回転構造を含み得る無数の溶液構造をとるものと通常されている。

本発明は、配座的に制約された回転を含有する分子について記載する。これらの分子は、ヒト C 5 a が標的とするのと同じヒト細胞の G タンパク質結合受容体と結合するように前もって構成されるものである。本発明は他の G タンパク質結合受容体にも適用できる。

本発明化合物の主要な特徴は、前もって構成された配置であり、少なくとも 3 つの疎水性基および荷電基を隣接空間にもたらし、疎水性表面 'パッチ' を作成する。これらの結果から、C 5 a のさらに強力な配座的制約小分子アンタゴニストを設計または開発できる。上記した先行技術からすると驚くべきことであるが、優れた受容体結合またはアンタゴニスト活性を得るために、C 末端カルボキシレートが本発明の化合物においては必要のないことが判明した。環状アンタゴニストは 'C 末端' アルギニン位でアミド結合を有する。7 のカルボキシレートを共有アミド結合で置換すると、必要とされる回転配座を効果的に

10

20

30

40

50

安定化する。

環状および非ペプチドアンタゴニストは、薬剤としてペプチドよりも重要な利点を幾つか有する。本発明記載の環は、ヒトの血液または血漿において、またはヒトやラットの胃液において、またはペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンのような消化酵素存在下で、37で少なくとも数時間タンパク質分解性破壊に対し安定である。反対に、L-アミノ酸からなる短いペプチドは、これらの条件下では数分以内に構成アミノ酸に急速に分解する。2つ目の利点は、環状および非ペプチド分子が適用する制約単一配座である。一方、非環状もしくは直鎖状ペプチドは可動的でありすぎて、必要な受容体結合構造以外の数種の構造を溶液中で適用してしまう。3つ目に、本発明記載のような環状・非ペプチド化合物は、常により脂溶性であり、あまり経口投与できないペプチドよりも薬剤として薬理学的に生体利用性が高いことである。4つ目は、環状・非ペプチド分子の血漿中半減期が他のペプチドよりも常に長いことである。

本発明は明瞭かつ理解しやすいように詳細に記載しているが、ここに記載の実施態様および方法の種々の修飾および変更が本明細書に開示の発明概念の範囲から逸脱せずに為し得ることは、この分野の当業者には明らかである。

本明細書に引用した参考文献を次頁以下に挙げており、この引用により本明細書の一部とする。

参考文献

Abbenante, G., Fairlie, D.P., Gahan, L.R., Hanson, G.R., Pierens, G.K. and van den Brenk, A.L.

J. Am. Chem. Soc., 1996 118 10384-10388

Bandekar, J.

Vib. Spectros., 1993 5 143-173

Bean, J.W., Peishoff, C.E. and Kopple, K.D.

Int. J. Protein Res., 1994 44 223

Cheng, X.M., Doherty, A.M., Nikam, S.S.

Curr. Med. Chem. 1994 1 271-312

Coles, M., Sowemimo, V., Scanlon, D., Munro, S.L.A., Craik, D.J.

J. Med. Chem., 1993 36 2658

DeMartino, J.A., Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Underwood, D.J., Fischer, P.A., Springer, M.S.

J. Biol. Chem., 1995 270 15966-15969

DeMartino, J.A., Van Riper, G., Siciliano, S.J., Molineaux, C.J., Konteatis, Z.D., Rosen, H., Springer, M.S.

J. Biol. Chem., 1994 269 14446-14450.

Drapeau, G., Brochu, S., Godin, D., Levesque, L., Rioux, F. and Marceau, F.

Biochem. Pharm., 1993 45 1289-1299

Dyson, H.J., Rance, M., Houghten, R.A., Lerner, R.A. and Wright, P.E.

J. Mol. Biol., 1988 201 161-200

Ember, J.A., Sanderson, S.D., Taylor, S.M., Kawahara, M. and Hugli, T.E.

J. Immunol., 1992 148 3165-3173

Fairlie, D.P., Abbenante, G. and March, D.

Curr. Med. Chem., 1995 2 672-705

Fairlie, D.P., Whitehouse, M. and Broomhead, J.

Chem. Biol. Interact., 1987 61 277-291

Finch, A.M., Vogen, S.M., Sherman, S.A., Kirnarsky, L., Taylor, S.M., and Sanderson, S.D.J.

Med Chem., 1997 40 877

Gerard, N. and Gerard, C.

Nature, 1991 349 614-617

Gerard, C. and Gerard, N.P.

10

20

30

40

50

- Ann.Rev.Immunol., 1994 12 775-808
- Haviland, D.L., McCoy, R.L., Whitehead, W.T., Akama, H., Molmenti, E.P., Brown, A., Haviland, J.C., Parks, W.C., Perlmutter, D.H. and Wetzel, R.A.J. Immunol., 1995 154 1861-1869
- Hutchinson, E.G. and Thornton, J.M.
- Protein Sci., 1994 3 2207-2216
- Ihara, M., Fukuroda, T., Saeki, T., Nishikibe, M., Kojiri, K., Suda, H. and Yano, M.
- Biochem.Biophys.Res.Comm., 1991 178 132-137
- Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M., and Yano, M.
- Life Sciences, 1992 50 247 10
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Luly, J.R., Carter, G.W.
- J.Med.Chem., 1991 34 2068-71
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Or, Y.-S., Luly, J.R., and Carter, G.W.
- J.Med.Chem., 1992 35 220-223
- Kessler, H., Diefenbach, B., Finsinger, D., Geyer, A., Gurrath, M., Goodman, S.L., Hoelzemann, G., Haubner, R., Jonczyk, A. et al
- Letts.Pept.Sci., 1995 2 155-160
- Kohl, J., Lubbers, B., Klos, A., et al.
- Eur.J.Immunol., 1993 23 646-652
- Kontetis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Molineaux, C.J., Pandya, S., Fischer, P., Rosen, H., Mumford, R.A., and Springer, M.S. 20
- J.Immunol., 1994 153 4200-4204
- Marraud, M. and Aubry, A.
- Biopolymers, 1996 40 45-83
- Morgan, E.L., Sanderson, S.D., Scholz, W., Noonan, D.J., Weigle, W.O. and Hugli, T.E.
- J.Immunol., 1992 48 3937-3942
- Pràcheur, Bossus, M., Gras-Masse, H., Quiniou, E., Tartar, A. and Craescu, C.T.**
- J. Biochem., 1994 220 415-425** 30
- Rizo, J. and Gierasch, L.M.
- Ann.Rev.Biochem., 1992 61 387
- Sanderson, S.D., Ember, J.A., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Finch, A.M., Taylor, S.M.
- J.Med.Chem., 1994 37 3171-3180
- Sanderson, S.D., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Vogen, S.M., Prakesh, O., Ember, J.A., Finch, A.M. and Taylor, S.M.
- J.Med.Chem., 1995 38 3669-3675
- Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Kontetis, Z., Malkowitz, L., VanRiper, G., Bondy, S., Rosen, H. and Springer, M.S.
- Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1994 91 1214-1218. 40
- Sim, E.
- The Natural Immune System.Humoral Factors., 1993,
IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- Tempero, R.M., Hollingsworth, M.A., Burdick, M.D., Finch, A.M., Taylor S.M., Vogen, S.M., Morgan, E.L., and Sanderson, S.D.
- J.Immunol., 1997 158 1377-1382
- Stradley, S., Rizo, J., Bruch, M., Stroup, A. and Gierasch, L.
- Biopolymers, 1990 29 263-287.
- Walker W.R. and Whitehouse, M.W.
- Agents & Actions, 1978 8 85 50

Ward, J.R. and Cloud, R.S.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 1966 152 116

Whaley, K.

Complement in Health and Disease. Immunology and Medicine Series, Ed. Reeves, W.G., 1987, MTP Press Ltd, Lancaster

Whitehouse, M.W.

Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases, Eds. Greenwald, R.A., Diamond, H.S., Vol. 1, pp 3-16 CRC Press

Winter, C.A. and Nuss, G.W.

Arth. & Rheumatism, 1966 9 394

Zhang, X., Boyar, W., Galakatos, N. and Gonella, N.C.

Protein Sci., 1997 6 65-72

Zuiderweg, E.R.P., Nettesheim, D.G., Molison, K.W., Carter, G.W.

Biochemistry, 1989 28 172-185; 29 2895-2905

10

【図 1】

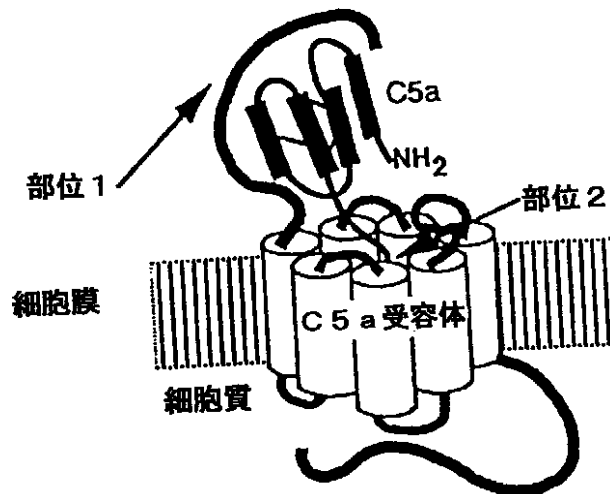


Fig. 1

【図 2】

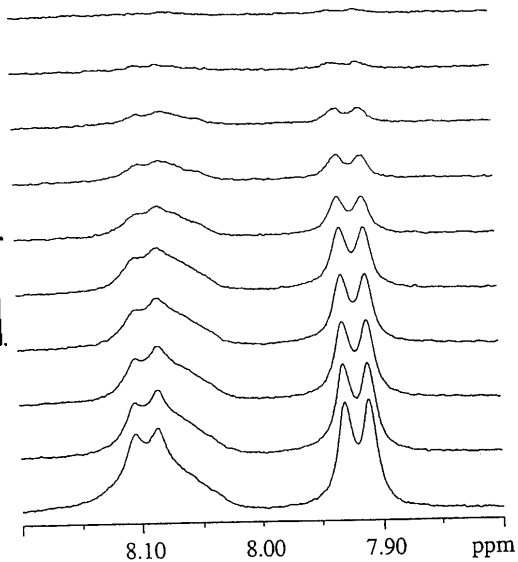


Fig. 2

【図 3】

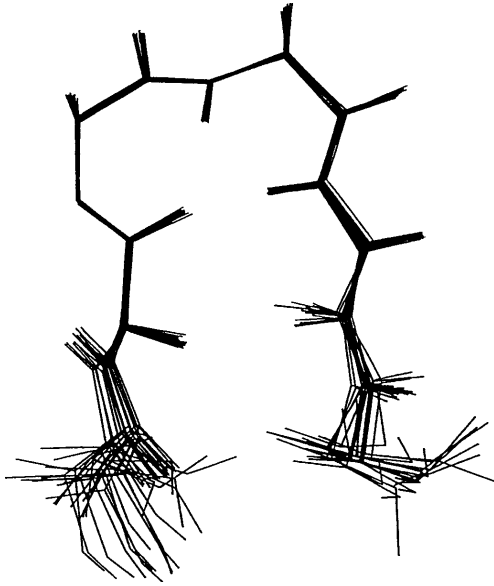


Fig. 3

【図 4】

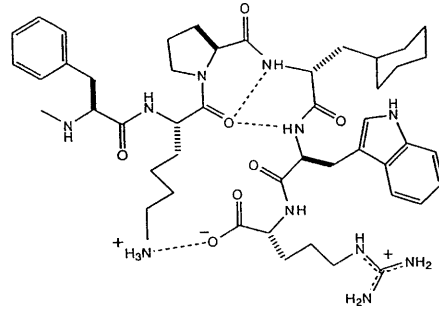


Fig. 4

【図 5 a】

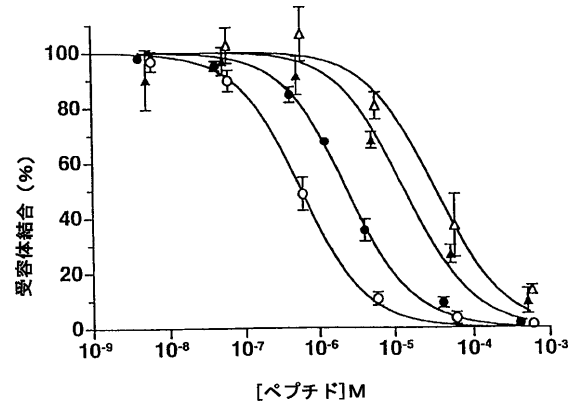


Fig. 5a

【図 5 b】

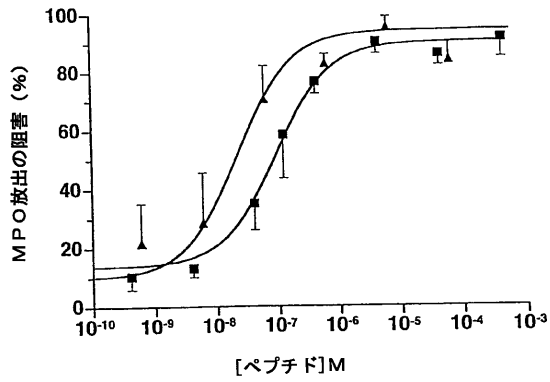


Fig. 5b

【図 5 c】

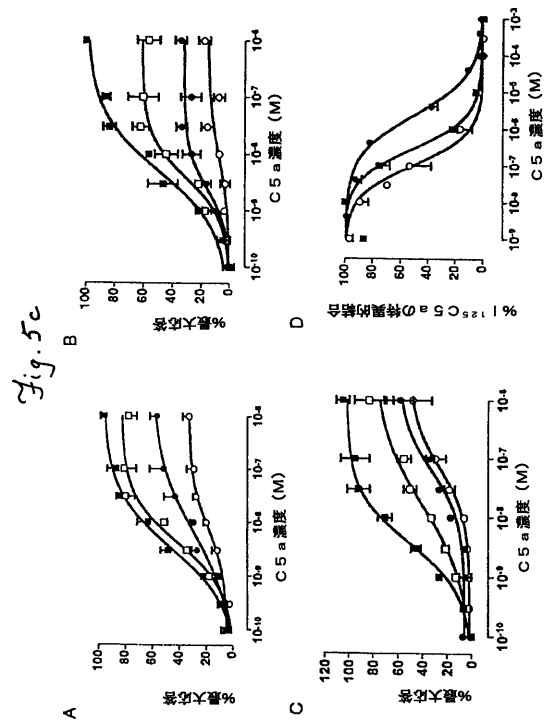


Fig. 5c

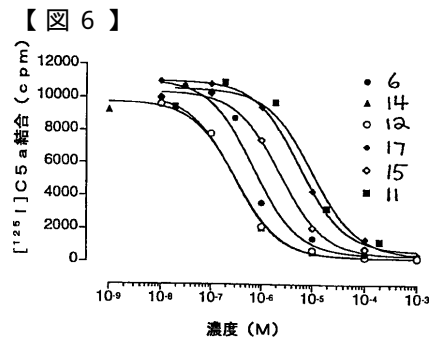


Fig. 6

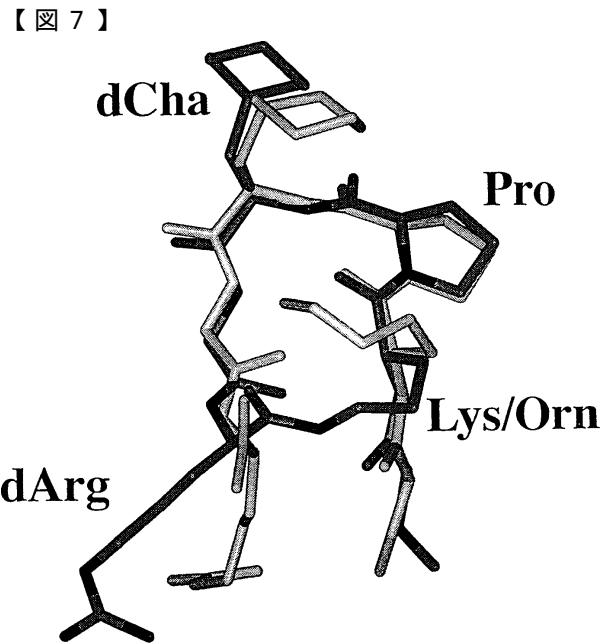


Fig. 7

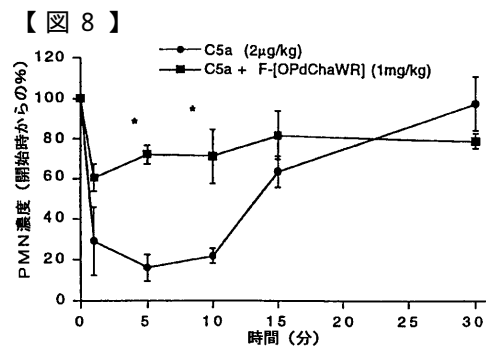


Fig. 8

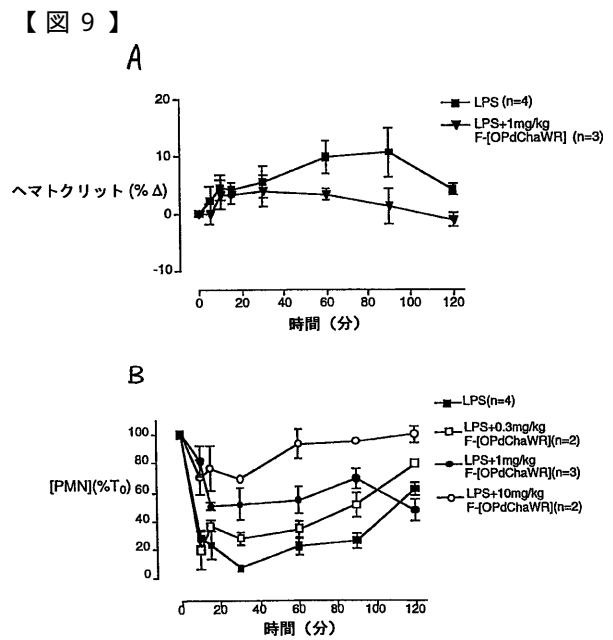
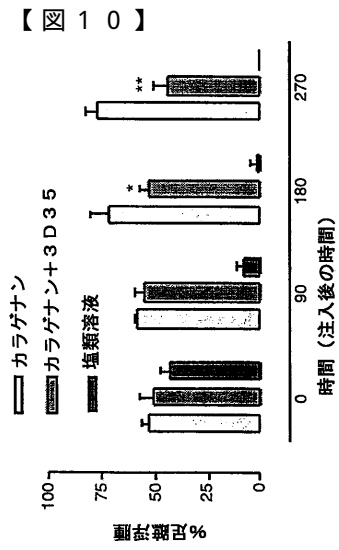


Fig. 9

*Fig. 10*

フロントページの続き

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 フェアリー, デイビッド

オーストラリア 4 1 2 7 クイーンズランド州スプリングウッド、トレバリヤン・ドライブ 7 3 番

(72)発明者 テイラー, スティーブン・マックスウェル

オーストラリア 4 3 0 0 クイーンズランド州ベルパード・パーク、パーディタ・ストリート 8 番

(72)発明者 フィンチ, アンジェラ・モニック

オーストラリア 4 5 0 2 クイーンズランド州ナラングバ、パイオニア・ドライブ

(72)発明者 ウォン, アラン

オーストラリア 4 6 7 0 クイーンズランド州バンダバーグ、グレイ・アベニュー 1 9 番

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 2 5 9 5 7 (WO, A 1)

国際公開第 9 2 / 0 1 1 8 5 8 (WO, A 1)

Biopolymers, 1 9 9 6 年, Vol.40, p.141-155

J.Biol.Chem., 1 9 9 5 年, Vol.270, No.27, p.15966-15969

Immunology, 1 9 9 5 年, Vol.86, p.149-154

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07K 7/00

A61K 38/00

A61P 9/10

A61P 11/00

A61P 17/06

A61P 19/02

A61P 25/28

A61P 29/00

A61P 37/06

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)