

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年3月22日(22.03.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/052002 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/64 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/032984
- (22) 国際出願日: 2017年9月13日(13.09.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-178955 2016年9月13日(13.09.2016) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP). ペプチドリーム株式会社(PEPTIDREAM INC.) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番23号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 山口 孝弘(YAMAGUCHI, Takahiro); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 森裕(MORI, Yutaka); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 齊藤 博直(SAITO, Hironao); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 窪田 秀樹(KUBOTA, Hideki); 〒1038426 東京都中央区

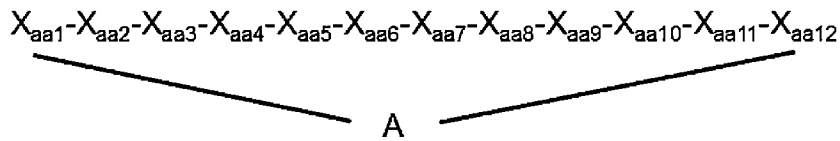
日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 古川 詔大(FURUKAWA, Akihiro); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 大塚 絵里(OTSUKA, Eri); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 石貝 裕(ISHIGAI, Yutaka); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 井尻 宏志(IJIRI, Hiroshi); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番23号 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP). リード パトリック(REID, Patrick); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番23号 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: Thrombospondin 1-BINDING PEPTIDE

(54) 発明の名称: Thrombospondin 1結合ペプチド



(57) Abstract: Provided is a compound which can promote angiogenesis by inhibiting the function of TSP1, and is useful in the treatment or prevention of diseases such as critical limb ischemia. Specifically provided is a macrocyclic polypeptide represented by formula (1) [in the formula: A is selected from among linking groups A₁ to A₆; X_{aa1} is an aliphatic amino acid, aromatic amino acid, basic amino acid, neutral amino acid, or acidic amino acid residue, or is not present; X_{aa2} is an aromatic amino acid or neutral amino acid residue; X_{aa3} is an aliphatic amino acid, aromatic amino acid, or basic amino acid residue; X_{aa4} is Ser, Thr, Ala, or ^mS; X_{aa5} is Gly or Ser; X_{aa6} is a basic amino acid or neutral amino acid residue; X_{aa7} is a neutral amino acid or acidic amino acid residue; X_{aa8} is an aromatic amino acid residue; X_{aa9} is an aliphatic amino acid, neutral amino acid, or aromatic amino acid residue; X_{aa10} is a basic amino acid, aliphatic amino acid, aromatic amino acid, or neutral amino acid residue; X_{aa11} is an aromatic amino acid residue; and X_{aa12} is an aliphatic amino acid, aromatic amino acid, or basic amino acid residue], or a pharmacologically acceptable salt thereof.

WO 2018/052002 A1

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
 NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
 QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
 SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
 UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(57) 要約：TSP1の機能を阻害することで血管新生を促進することができ、重症下肢虚血などの疾患の治療または予防に有用である化合物の提供。式（1）〔式中、Aは、連結基A₁～A₆から選択され、X_{aa1}は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；X_{aa2}は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；X_{aa3}は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；X_{aa4}は、Ser、Thr、Ala、または^mSであり；X_{aa5}は、GlyまたはSerであり；X_{aa6}は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；X_{aa7}は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；X_{aa8}は、芳香族アミノ酸残基であり；X_{aa9}は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基であり；X_{aa10}は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基であり；X_{aa11}は、芳香族アミノ酸残基であり；X_{aa12}は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基である〕で表される大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩など。

明 細 書

発明の名称 : Thrombospondin 1 結合ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、血管新生抑制物質 (thrombospondin 1/TSP1)の機能を阻害することで血管新生を促進することができ、重症下肢虚血などの疾患の治療または予防に有用である大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩に関する。

背景技術

[0002] 重症下肢虚血 (CLI) は、下肢への血流障害によって安静時疼痛が生じ、下肢末梢に潰瘍や壊死が生じた状態である。Fontaine分類ではIIIおよびIV、Rutherford分類では4-6に分類される (非特許文献1)。

[0003] CLIは予後が不良で、死亡率が高いことが問題となっており、CLI患者に対しては、虚血組織での血管再生などにより血管システムを再構築し、酸素および栄養分を虚血組織に送り届けることによって、下肢の潰瘍・壊死の進展を抑制する治療が検討されている (非特許文献2)。これまでに、血管新生を促進する増殖因子を用いた遺伝子治療も試みられているが、動物実験とは異なり、臨床試験では有効性を示すに到っていない。そのような臨床試験成績から、血管新生抑制因子にも焦点が当てられ、血管新生促進因子と血管新生抑制因子とのバランスが重要であるといった仮説が立てられている (非特許文献3および4)。

[0004] 血管新生に対して抑制的に作用することが報告されている糖タンパク質thrombospondin 1 (TSP1)は、活性化血小板から放出され、内皮細胞、平滑筋細胞、腎メサンギウム細胞、尿細管細胞、および有足細胞を含む多くの細胞で合成され、分泌されることが報告されている (非特許文献5~7)。TSP1は末梢血管障害患者の血液およびCLI患者の下肢骨格筋中でその発現が亢進していることから、CLI患者下肢における潰瘍・壊死の進展への関与が示唆されている (非特許文献8および9)。TSP1がラット下肢虚血-再灌流後の血流回復

を抑制すること、TSP1欠損マウスにおいて下肢虚血後の血管新生が亢進することから、TSP1は下肢虚血後の血流回復に対して抑制的に働いていると考えられる（非特許文献10および11）。また、TSP1欠損マウスでは、創傷部位での血流が増加し、創傷サイズの縮小も亢進したことから、CLI患者で認められる傷に対して、TSP1の機能を阻害することにより創傷治癒効果が期待できる（非特許文献12）。

[0005] TSP1は血管新生阻害作用以外にも様々な薬理作用を示し、多くの疾患に関与していると考えられる。TSP1は血小板から分泌されて線溶系PAI-1レベルを増加させ、血栓形成を亢進させる（非特許文献13）。肥満でインスリン抵抗性が生じている患者でTSP1レベルは増加し、TSP1はマクロファージに作用して、肥満により誘発される炎症反応を促進し、インスリン抵抗性を増悪させる（非特許文献14および15）。TSP1は腎有足細胞のアポトーシスを促進して、細胞機能の低下を誘発する（非特許文献16）。TSP1は非食細胞上のsignal-regulatory protein- α に結合してNADPH oxidaseを活性化し、血管弛緩作用を抑制することにより、腎臓での虚血再灌流傷害を誘発する（非特許文献17）。これらの結果から、TSP1阻害により、心筋梗塞、肥満患者における炎症反応やインスリン抵抗性、さらには虚血再灌流傷害を含む腎障害が改善される可能性がある。また、TSP1によって産生された血小板由来のマイクロパーティクルが、鎌型赤血球患者においてvaso-occlusive crisisを誘発する（非特許文献18および19）。さらには、TSP1が単核球の遊走・接着を亢進して、大動脈瘤における炎症反応が増強されることが報告されている（非特許文献20）。TSP1は、癌細胞の細胞増殖、接着、浸潤への作用を介して、癌の抑制や促進に関与している可能性が報告されている（非特許文献21）。

一方、TSP1とCD47受容体との結合を阻害する物質として、抗体（特許文献1）やポリペプチド（特許文献2）が知られている。しかしながら、TSP1に結合する大環状ポリペプチドについてはこれまで知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1 : WO 2008/060785

特許文献2 : US 2014/296477

非特許文献

[0007] 非特許文献1 : Kinlay S. *Circ Cardiovasc Interv.* 2016; 9: e001946.

非特許文献2 : Davies MG. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2012; 8: 20-27.

非特許文献3 : Hellsten Y, Hoier B. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42: 1616-1622.

非特許文献4 : Olfert IM. *Microcirculation* 2016; 23: 146-156.

非特許文献5 : Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. *Nat Med.* 2000; 6: 41-48.

非特許文献6 : Henkin J, Volpert OV. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15(12): 1369-1386.

非特許文献7 : Murphy-Ullrich JE, Iozzo RV. *Matrix Biol.* 2012; 31(3): 152-154.

非特許文献8 : Smadja DM, d'Audigier C, Bieche I, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 551-559.

非特許文献9 : Favier J, Germain S, Emmerich J, et al. *J Pathol* 2005; 207: 358-366.

非特許文献10 : Isenberg JS, Romeo MJ, Abu-Asab M, et al. *Circ Res.* 2007; 100(5): 712-720.

非特許文献11 : Csanyi G, Yao M, Rodriguez AI, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2966-2973.

非特許文献12 : Soto-Pantoja DR, Shih HB, Maxhimer JB, et al. *Matrix Biol.* 2014; 37: 25-34.

非特許文献13 : Prakash P, Kulkarni PP, Chauhan AK. *Blood* 2015; 125(2): 399-406.

非特許文献14 : Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, et al. Diabetes. 2008; 57(2): 432-439.

非特許文献15 : Li Y, Tong X, Rumala C, et al. PLoS One. 2011; 6(10): e26656.

非特許文献16 : Cui W, Maimaitiyiming H, Zhou Q, et al. Biochim Biophys Acta. 2015; 1852(7): 1323-1333.

非特許文献17 : Yao M, Rogers NM, Csanyi G, et al. J Am Soc Nephrol. 2014; 25(6): 1171-1186.

非特許文献18 : Hagag AA, Elmashad G, Abd El-Lateef AE. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014; 6(1): e2014044.

非特許文献19 : Camus SM, Gausseres B, Bonnin P, et al. Blood. 2012; 120(25): 5050-5058.

非特許文献20 : Liu Z, Morgan S, Ren J, et al. Circ Res. 2015; 117(2): 129-141.

非特許文献21 : Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D. et al., The role of thrombospondin-1 in human disease. J Surg Res. 2004;122(1):135-42.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、TSP1の機能を阻害することで血管新生を促進することができ、重症下肢虚血などの疾患の治療または予防に有用である化合物を提供することを目的とする。

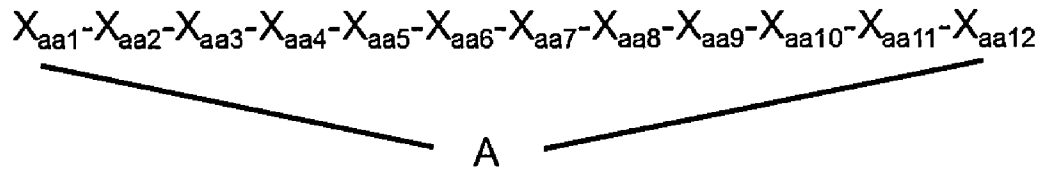
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、特定のアミノ酸配列を有する大環状ポリペプチドがTSP1に結合し、TSP1への細胞の接着を阻害することにより、TSP1の機能を阻害することを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、以下の [1] ~ [34] を提供するものである。

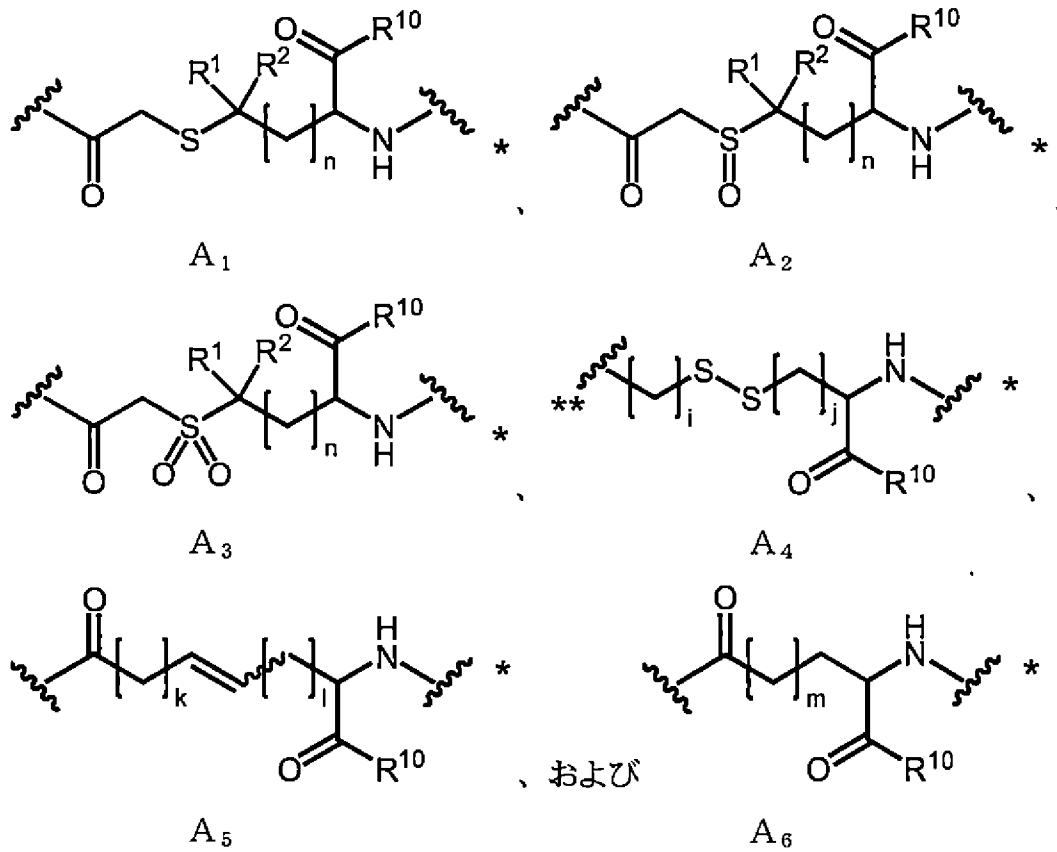
[1] 式 (1)

[0011] [化1]



[0012] [式中、Aは、連結基

[0013] [化2]



[0014] から選択され、

ここで、

[0015] [化3]



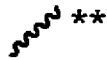
[0016] は、 X_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示すか、または X_{aa1} が存在しない場合には X_{aa2} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[0017] [化4]



[0018] は、 X_{aa12} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

[0019] [化5]



[0020] は、 X_{aa1} の α 炭素への結合点を示すか、または X_{aa1} が存在しない場合には X_{aa2} の α 炭素への結合点を示し、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{10} はアミノまたはヒドロキシであり、

n は0～3の整数であり、

i および j はそれぞれ独立に1～3の整数であり、

k および l はそれぞれ独立に0～3の整数であり、

m は1～7の整数であり；

X_{aa1} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；

X_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa4} は、Ser、Thr、Ala、または mS であり；

X_{aa5} は、GlyまたはSerであり；

X_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

X_{aa8} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基であり；

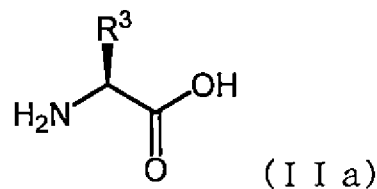
X_{aa10} は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa11} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸は、式 (I I a)

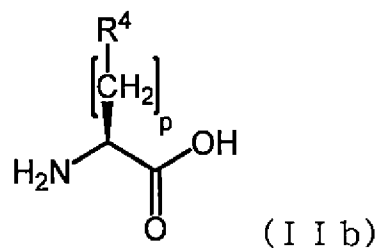
[0021] [化6]



[0022] (式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである) で表されるアミノ酸であり；

芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

[0023] [化7]

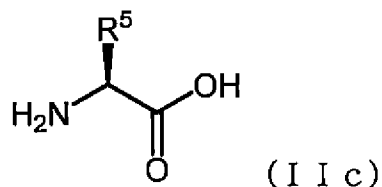


[0024] (式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、

C₁₋₃アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、C₁₋₃アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、pは0～3の整数である)で表されるアミノ酸であり；

塩基性アミノ酸は、式(11c)

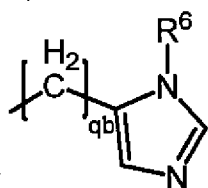
[0025] [化8]



[0026] [式中、R⁵は、

式—(CH₂)_{q_a}NH₂ (式中、q_aは1～6の整数である)、
式

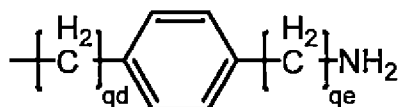
[0027] [化9]



[0028] (式中、R⁶は水素原子またはC₁₋₃アルキルであり、q_bは1～6の整数である)、

式—(CH₂)_{q_c}NHC(=NH)NH₂ (式中、q_cは1～6の整数である)
)、または
式

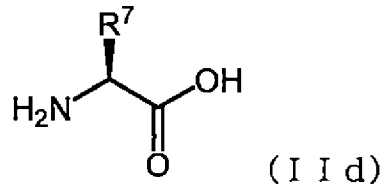
[0029] [化10]



[0030] (式中、 q_d および q_e はそれぞれ独立して 1～3 の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸であり；

中性アミノ酸は、式

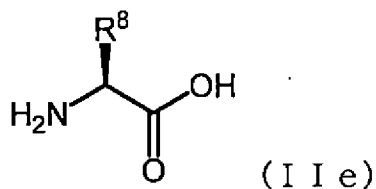
[0031] [化11]



[0032] [式中、 R^7 は、式 $-(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ (式中、 r_a は 1～6 の整数である) または式 $-(CH_2)_{r_b}SH$ (式中、 r_b は 1～3 の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸、Gly、Met、MO1、MO2、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、Thr、C(O)、C(O2)、または Pen であり；

酸性アミノ酸は、式

[0033] [化12]



[0034] [式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ (式中、 s は 1～6 の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸である]

で表される大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[2] $X_{a a 4}$ が Ser である、[1] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[3] $X_{a a 5}$ が Gly である、[1] または [2] に記載の大環状ポリペプチ

ドまたはその薬理上許容される塩。

[4] X_{aa8} が、Trp、2NaI、または6CWである、[1]～[3]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[5] X_{aa8} がTrpである、[4]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[6] X_{aa11} が、Trpまたは2NaIである、[1]～[5]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[7] X_{aa11} がTrpである、[6]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[8] X_{aa1} が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysであるか、あるいは存在しない、[1]～[7]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[9] X_{aa1} が、Arg、Lys、またはGlyであるか、あるいは存在しない、[8]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[10] X_{aa2} が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFである、[1]～[9]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[11] X_{aa2} が2NaIである、[10]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[12] X_{aa3} が、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgである、[1]～[11]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[13] X_{aa3} が、Ile、またはArgである、[12]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[14] X_{aa6} が、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはMO2である、[1]～[13]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[15] X_{aa6} がArg、Lys、His、またはSerである、[14]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[16] X_{aa7} が、AsnまたはAspである、[1]～[15]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[17] X_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetである、[1]～[16]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[18] X_{aa9} がVal、Nle、またはAhpである、[17]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[19] X_{aa10} が、Arg、Lys、His、AMF、Phg、またはValである、[1]～[18]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

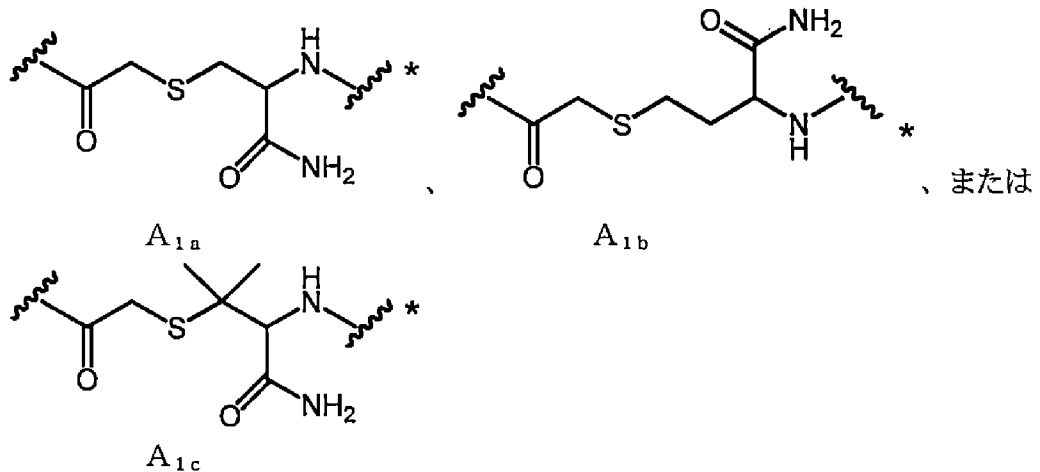
[20] X_{aa10} がArg、Lys、His、Phg、またはValである、[19]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[21] X_{aa12} が、Val、Tle、またはPheである、[1]～[20]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[22] X_{aa12} がValである、[21]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[23] Aが、連結基

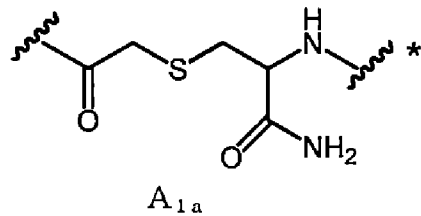
[0035] [化13]



[0036] である、[1]～[22]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[24] Aが

[0037] [化14]



[0038] である、[23]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[25] X_{aa1}が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysであるか、あるいは存在せず；

X_{aa2}が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFであり；

X_{aa3}が、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgであり；

X_{aa4}がSerであり；

X_{aa5}がGlyであり；

X_{aa6}が、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはMO2であり；

X_{aa7}が、AsnまたはAspであり；

X_{aa8}がTrp、2NaI、または6CWであり；

X_{aa9}が、Val、Nle、Ahp、またはMetであり；

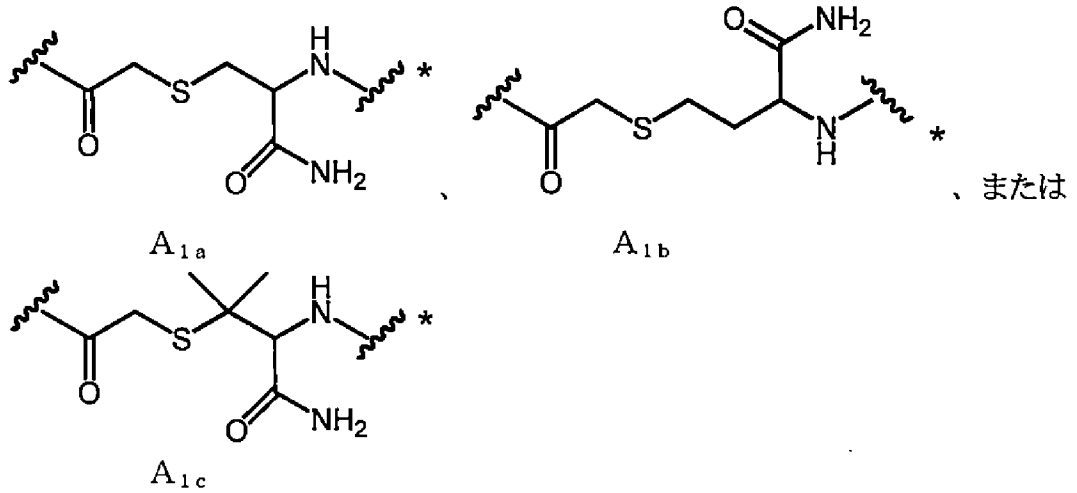
X_{aa10}が、Arg、Lys、His、AMF、Phg、またはValであり；

X_{aa1} がTrpまたは2NaIであり；

X_{aa2} が、Val、Tle、またはPheであり；

Aが、連結基

[0039] [化15]



[0040] である、[1]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩

。

[26] X_{aa1} が、Arg、Lys、またはGlyであるか、あるいは存在せず；

X_{aa2} が2NaIであり；

X_{aa3} が、Ile、またはArgであり；

X_{aa4} がSerであり；

X_{aa5} がGlyであり；

X_{aa6} がArg、Lys、His、またはSerであり；

X_{aa7} が、AsnまたはAspであり；

X_{aa8} がTrpであり；

X_{aa9} がVal、Nle、またはAhpであり；

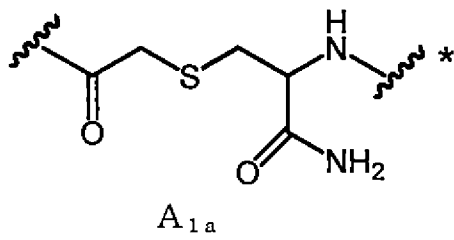
X_{aa10} がArg、Lys、His、Phg、またはValであり；

X_{aa11} がTrpであり；

X_{aa12} がValであり；

Aが

[0041] [化16]

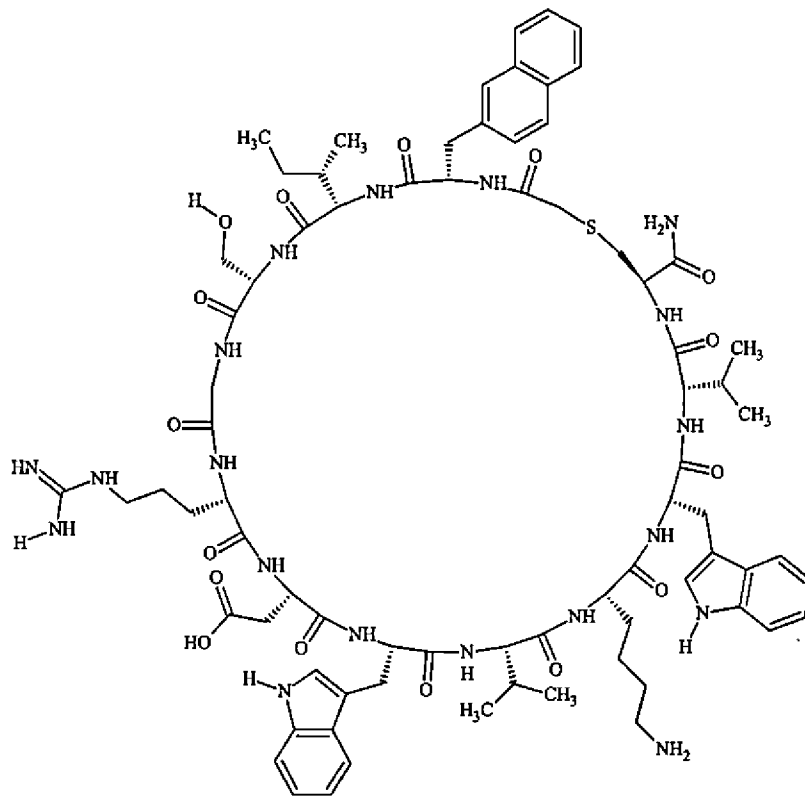
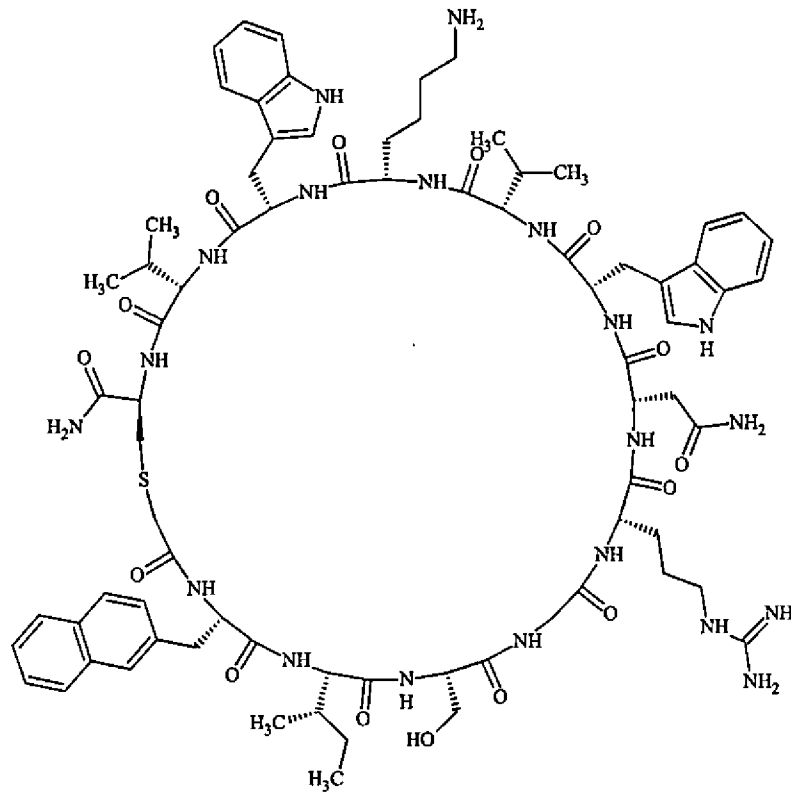


[0042] である、[25]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

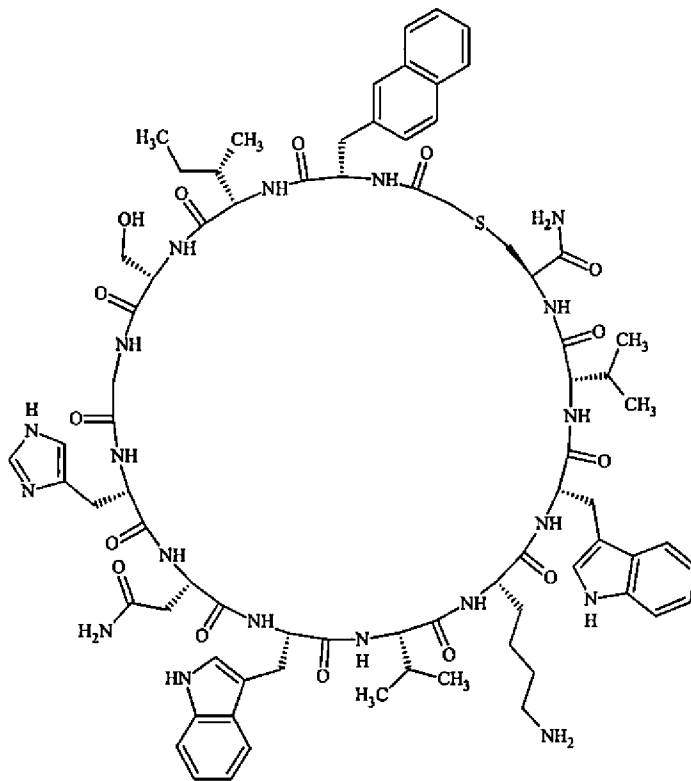
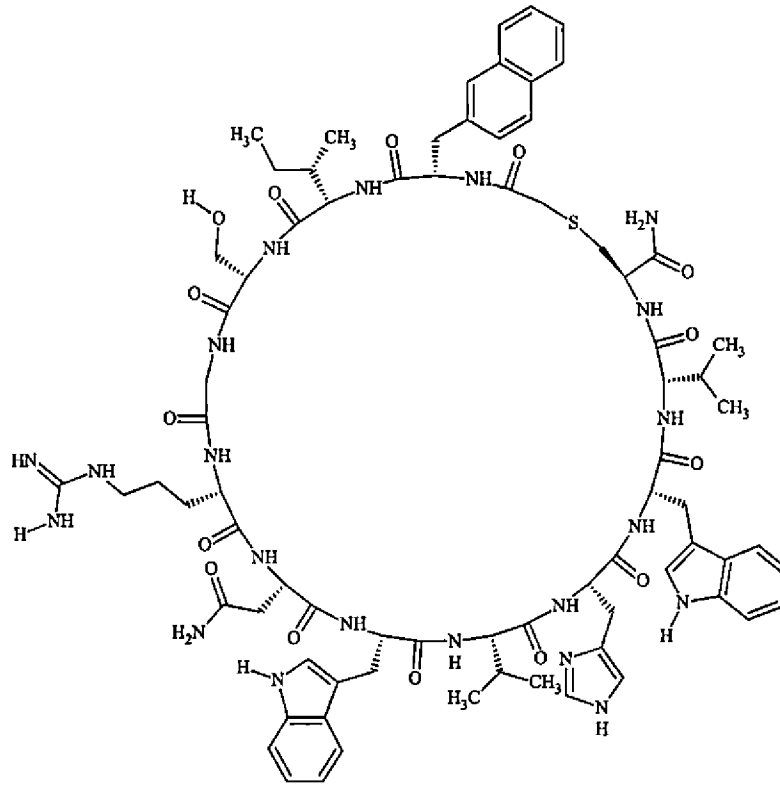
[27]

[0043]

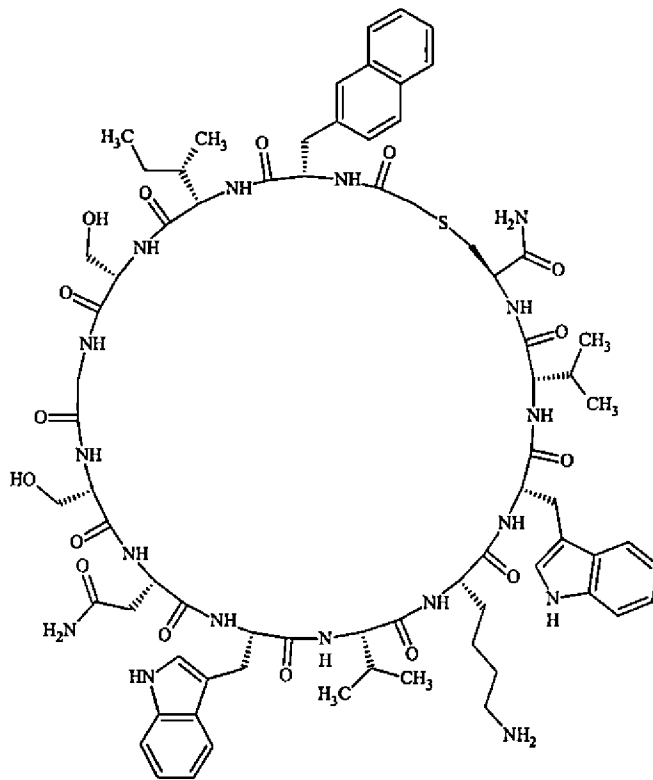
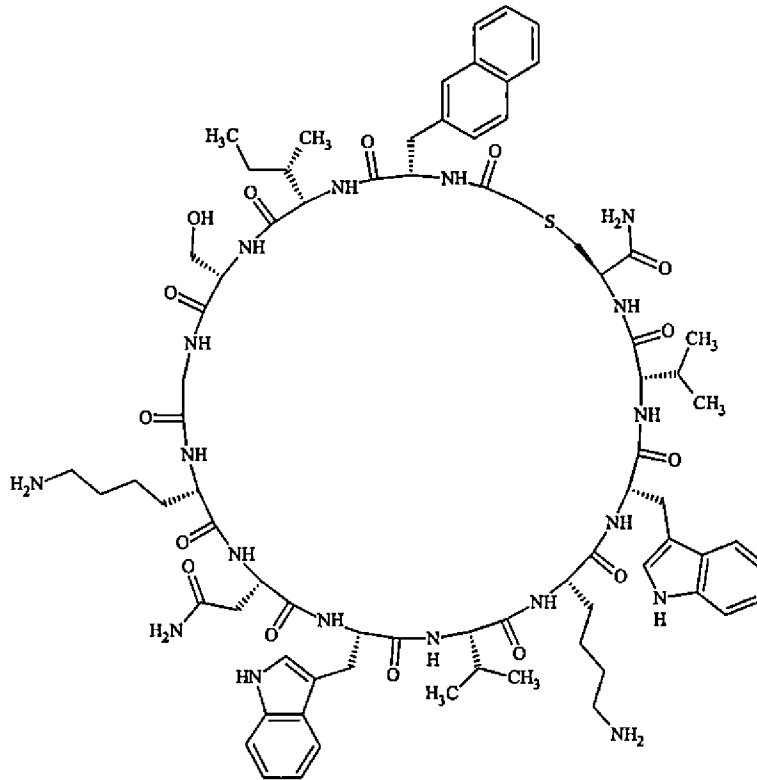
[化17]



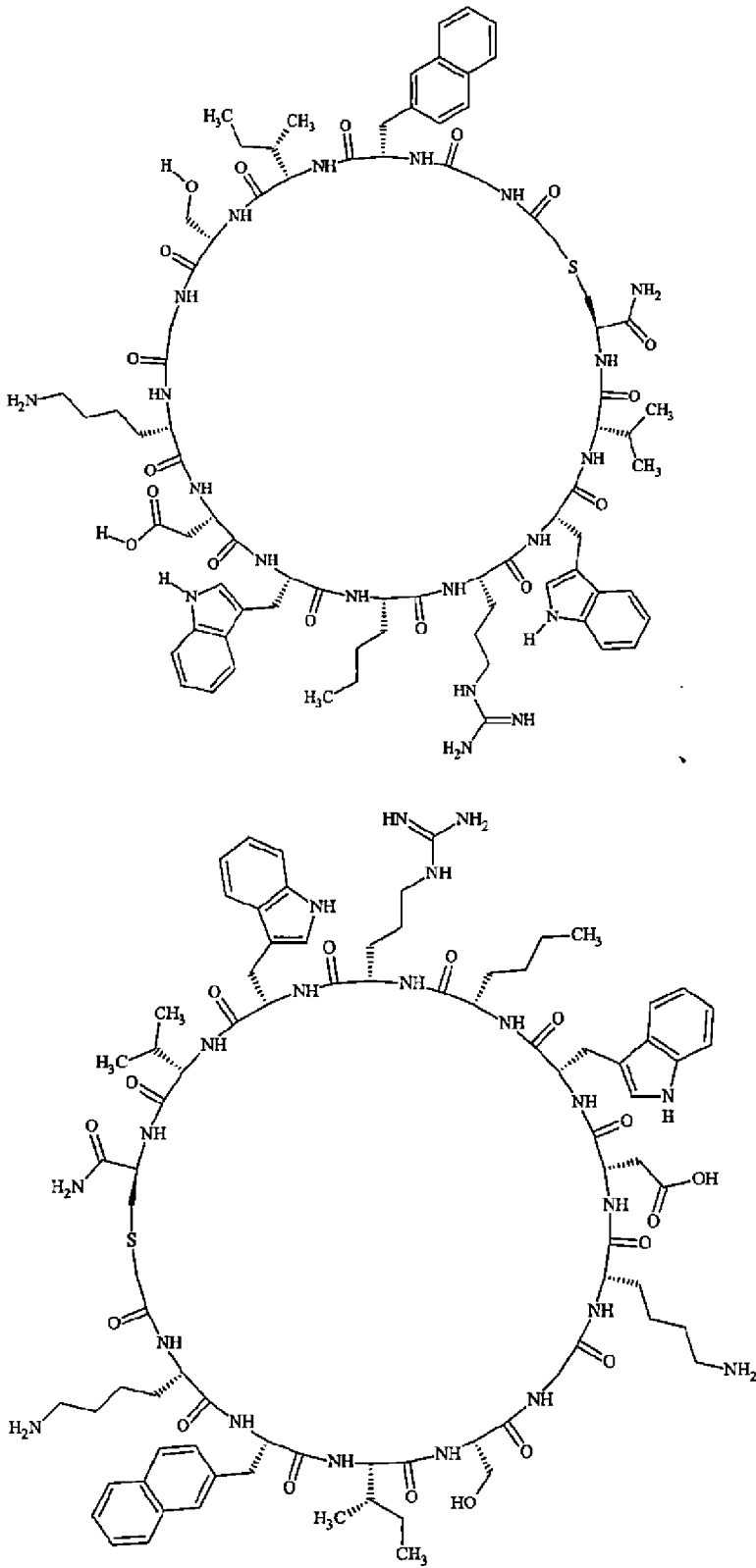
[0044] [化18]



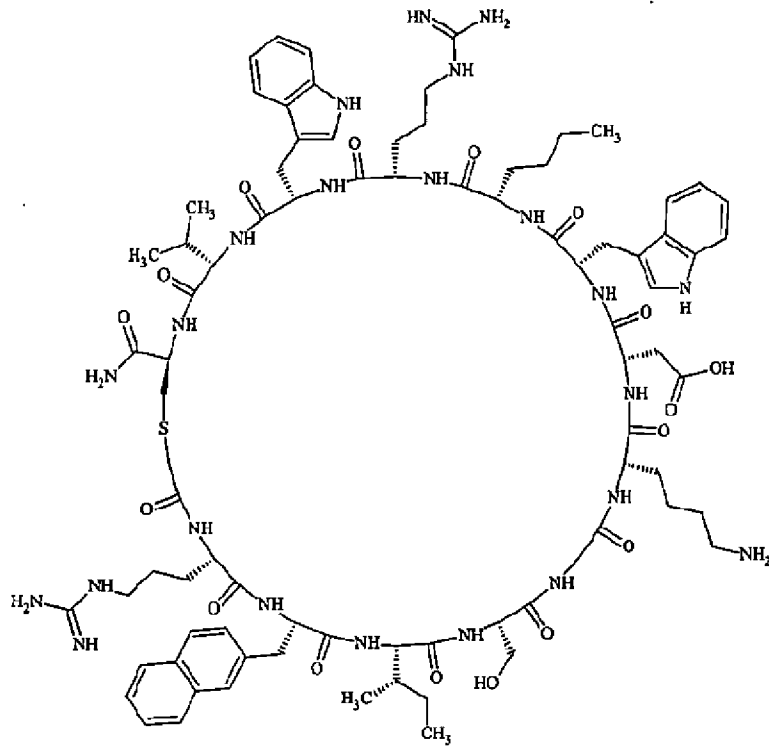
[0045] [化19]



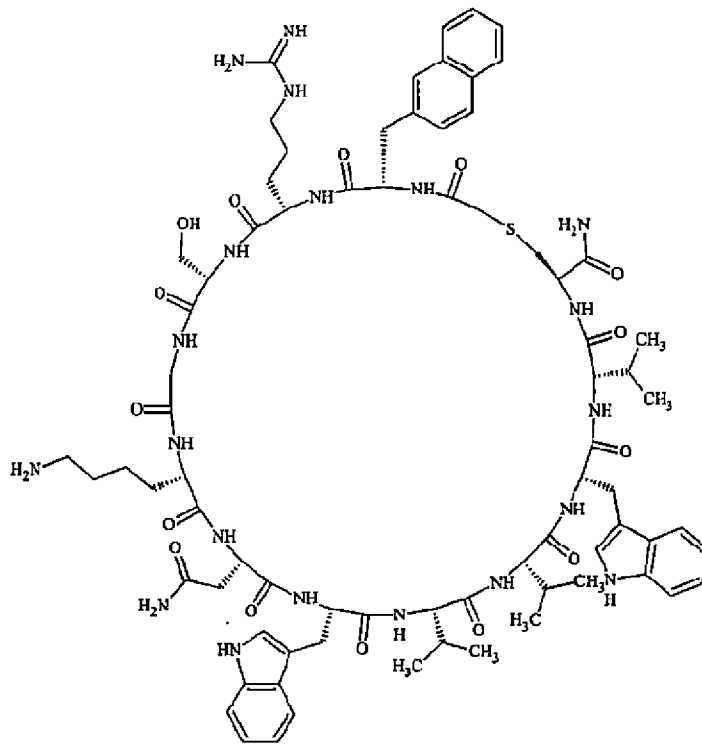
[0048] [化22]



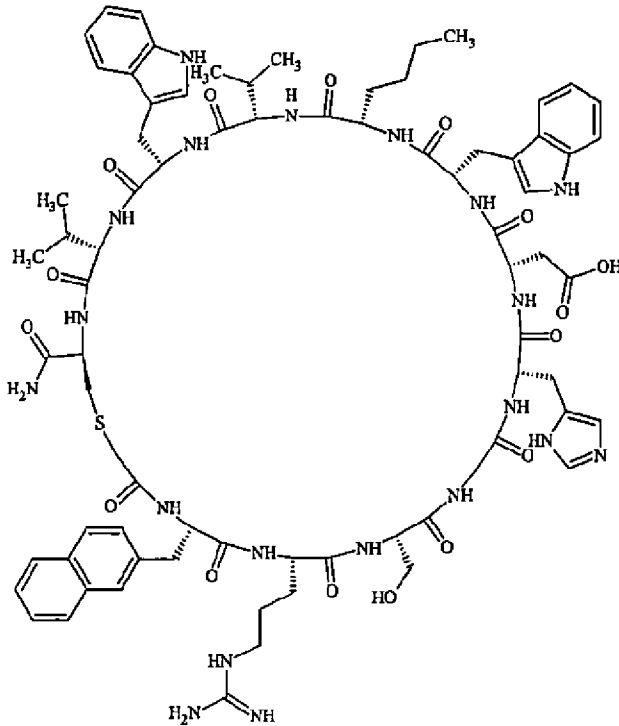
[0049] [化23]



[0050] [化24]



[0053] [化27]



[0054] で表される化合物からなる群より選択される、[26]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[28] [1] ~ [27] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物。

[29] 重症下肢虚血または末梢動脈疾患の治療または予防のための、[28]に記載の医薬組成物。

[30] [1] ~ [27] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を有効成分として含む、血管新生促進剤。

[31] [1] ~ [27] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩の治療または予防有効量をヒトに投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法。

[32] 疾患または症状が、重症下肢虚血または末梢動脈疾患である、[31]に記載の方法。

[33] 重症下肢虚血、末梢血管障害、心筋梗塞、肥満により誘発される炎症、大動脈瘤における炎症、糖尿病性腎症、IgA腎症、慢性腎不全、急性腎不全、腎障害、虚血再灌流障害、狭心症、扁平上皮がん、乳がん、すい臓がん、鎌型赤血球病に伴う血管閉塞 (vaso-occlusive crisis)、血管新生阻害、組織壊死、インスリン抵抗性、または一般的な創傷の治療または予防のための、[28]に記載の医薬組成物。

[34] 疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢血管障害、心筋梗塞、肥満により誘発される炎症、大動脈瘤における炎症、糖尿病性腎症、IgA腎症、慢性腎不全、急性腎不全、腎障害、虚血再灌流障害、狭心症、扁平上皮がん、乳がん、すい臓がん、鎌型赤血球病に伴う血管閉塞 (vaso-occlusive crisis)、血管新生阻害、組織壊死、インスリン抵抗性、または一般的な創傷である、[31]に記載の方法。

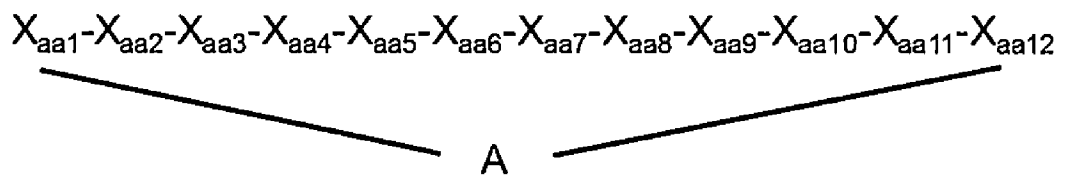
[35] 疾患または症状の治療または予防における使用のための[1]～[27]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[36] 疾患または症状が、重症下肢虚血または末梢動脈疾患である、[35]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[0055] また本発明は、以下の[A1]～[A26]を提供するものである。

[A1] 式(1)

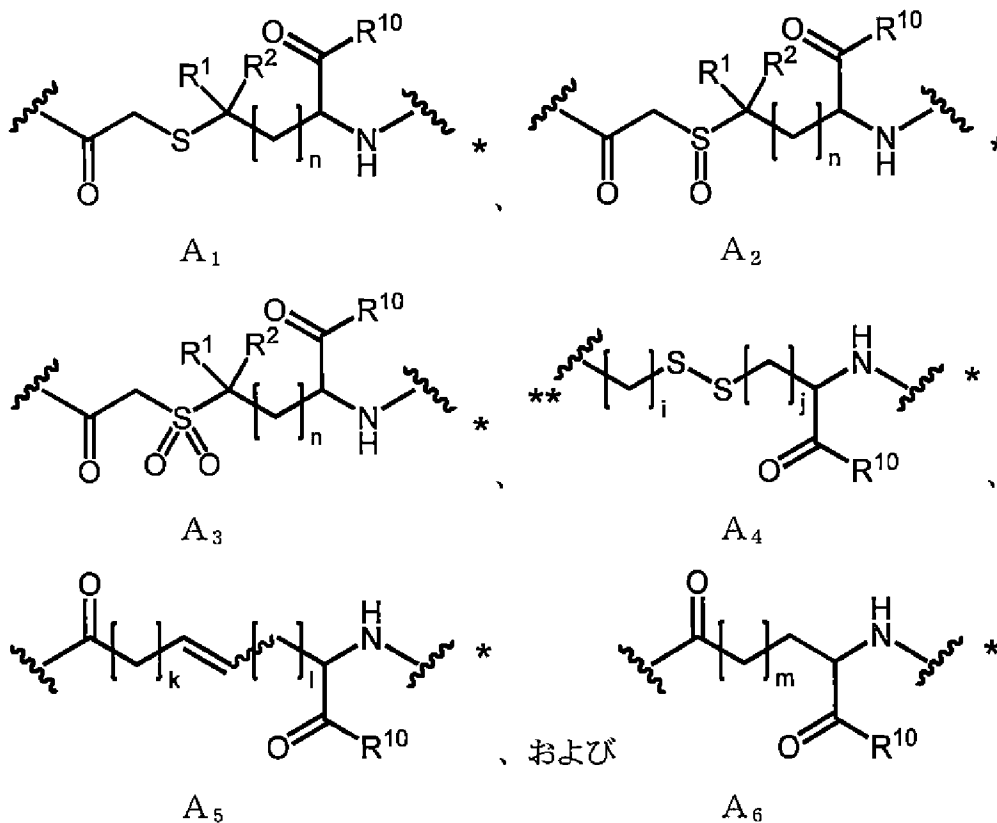
[0056] [化28]



[0057] [式中、Aは、連結基

[0058]

[化29]



[0059] から選択され、

ここで、

[0060] [化30]



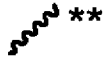
[0061] は、X_{aa1}のN末端アミノ基への結合点を示すか、またはX_{aa1}が存在しない場合にはX_{aa2}のN末端アミノ基への結合点を示し、

[0062] [化31]



[0063] は、 $X_{a a 1 2}$ のC末端カルボニル基への結合点を示し、

[0064] [化32]



[0065] は、 $X_{a a 1}$ の α 炭素への結合点を示すか、または $X_{a a 1}$ が存在しない場合には

$X_{a a 2}$ の α 炭素への結合点を示し、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{10} はアミノまたはヒドロキシであり、

n は0～3の整数であり、

i および j はそれぞれ独立に1～3の整数であり、

k および l はそれぞれ独立に0～3の整数であり、

m は1～7の整数であり；

$X_{a a 1}$ は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；

$X_{a a 2}$ は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 3}$ は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 4}$ は、Ser、Thr、Ala、または^mSであり；

$X_{a a 5}$ は、GlyまたはSerであり；

$X_{a a 6}$ は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 7}$ は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 8}$ は、芳香族アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 9}$ は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基であり；

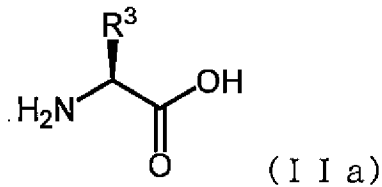
$X_{a a 10}$ は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基であり；

$X_{a a 11}$ は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸は、式 (I I a)

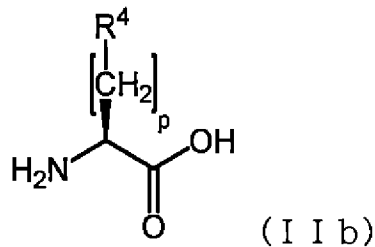
[0066] [化33]



[0067] (式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである) で表されるアミノ酸であり；

芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

[0068] [化34]

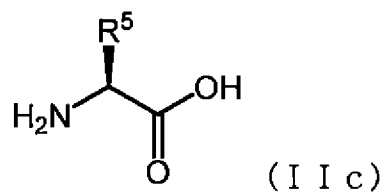


[0069] (式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、 C_{1-3} アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルコキシから選択される1以上の置換基により置換されていてよく、 p は0~3の整数である) で表されるアミノ酸であり；

塩基性アミノ酸は、式 (I I c)

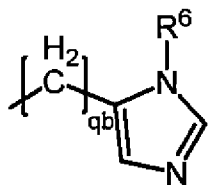
[0070]

[化35]

[0071] [式中、R⁵は、

式—(CH₂)_{q_a}NH₂ (式中、q_aは1～6の整数である)、
式

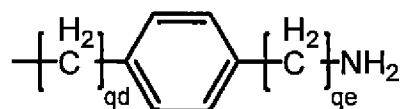
[0072] [化36]



[0073] (式中、R⁶は水素原子またはC₁₋₃アルキルであり、q_bは1～6の整数である)、

式—(CH₂)_{q_c}NHC(=NH)NH₂ (式中、q_cは1～6の整数である)
)、または
式

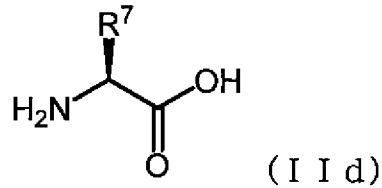
[0074] [化37]



[0075] (式中、q_dおよびq_eはそれぞれ独立して1～3の整数である)で表される基である]で表されるアミノ酸であり；

中性アミノ酸は、式

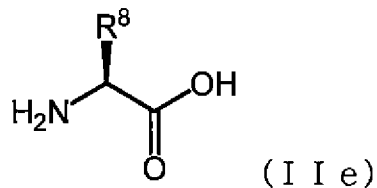
[0076] [化38]



[0077] [式中、 R^7 は、式 $-(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ (式中、 r_a は1~6の整数である) または式 $-(CH_2)_{r_b}SH$ (式中、 r_b は1~3の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸、Gly、Met、MO1、MO2、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、Thr、C(O)、C(O2)、またはPenであり；

酸性アミノ酸は、式

[0078] [化39]



[0079] [式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ (式中、 s は1~6の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸である]

で表される大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A2] $X_{a a 4}$ がSerである、[A1]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A3] $X_{a a 5}$ がGlyである、[A1]または[A2]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A4] $X_{a a 8}$ がTrp、2NaI、または6CWである、[A1]~[A

3] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
。

[A 5] $X_{a a 8}$ が $T r p$ である、[A 4] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 6] $X_{a a 11}$ が、 $T r p$ または $2 N a l$ である、[A 1] ~ [A 5] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 7] $X_{a a 11}$ が $T r p$ である、[A 6] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 8] $X_{a a 1}$ が、 $A r g$ 、 $L y s$ 、 $H i s$ 、 $G l y$ 、 $A l a$ 、 $A s n$ 、 $T h r$ 、 $S e r$ 、 $M e t$ 、 $L e u$ 、 $I l e$ 、 $V a l$ 、 $G l n$ 、 $P h e$ 、 $T y r$ 、 $T r p$ 、または $C y s$ であるか、あるいは存在しない、[A 1] ~ [A 7] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 9] $X_{a a 1}$ が、 $A r g$ 、 $L y s$ 、または $G l y$ であるか、あるいは存在しない、[A 8] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
。

[A 10] $X_{a a 2}$ が、 $P h e$ 、 $T y r$ 、 $T r p$ 、 $2 N a l$ 、 $4 C F$ 、または $D C F$ である、[A 1] ~ [A 9] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 11] $X_{a a 2}$ が $2 N a l$ である、[A 10] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 12] $X_{a a 3}$ が、 $I l e$ 、 $L e u$ 、 $N l e$ 、 $T l e$ 、 $T r p$ 、 $2 N a l$ 、 $4 C F$ 、または $A r g$ である、[A 1] ~ [A 11] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 13] $X_{a a 3}$ が、 $I l e$ である、[A 12] に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 14] $X_{a a 6}$ が、 $A r g$ 、 $L y s$ 、 $H i s$ 、 $S e r$ 、 $C i t$ 、または $M O 2$ である、[A 1] ~ [A 13] のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 15] X_{aa6} がArg、Lys、His、またはSerである、[A 14]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 16] X_{aa7} が、AsnまたはAspである、[A 1] ~ [A 15]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 17] X_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetである、[A 1] ~ [A 16]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 18] X_{aa9} がVal、Nle、またはAhpである、[A 17]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 19] X_{aa10} が、Arg、Lys、His、AMF、またはValである、[A 1] ~ [A 18]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 20] X_{aa10} がArg、Lys、またはHisである、[A 19]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 21] X_{aa12} が、Val、Tle、またはPheである、[A 1] ~ [A 20]のいずれかに記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 22] X_{aa12} がValである、[A 21]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 23] Aが、連結基

[0080]

またはA r gであり；

$X_{a a 4}$ がS e rであり；

$X_{a a 5}$ がG l yであり；

$X_{a a 6}$ が、A r g、L y s、H i s、S e r、C i t、またはM O 2であり

；

$X_{a a 7}$ が、A s nまたはA s pであり；

$X_{a a 8}$ がT r p、2 N a l、または6 C Wであり；

$X_{a a 9}$ が、V a l、N l e、A h p、またはM e tであり；

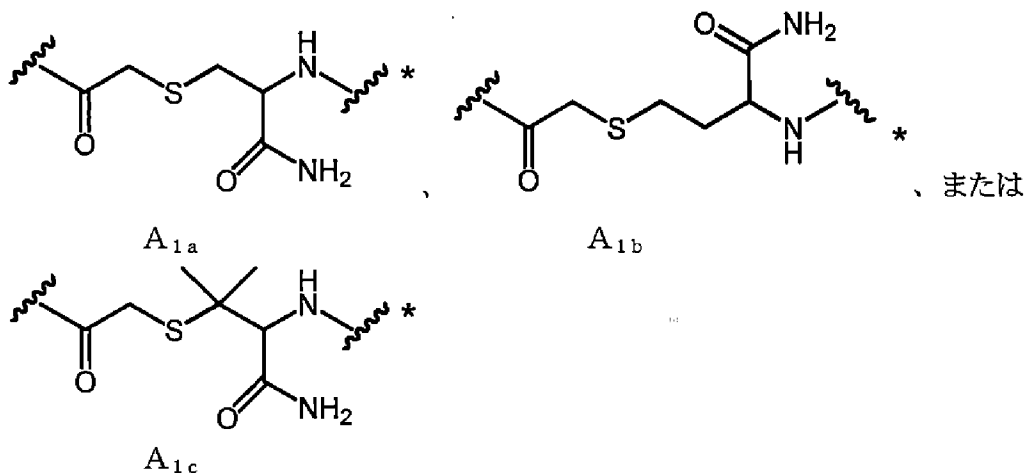
$X_{a a 10}$ が、A r g、L y s、H i s、A M F、またはV a lであり；

$X_{a a 11}$ がT r pまたは2 N a lであり；

$X_{a a 12}$ が、V a l、T l e、またはP h eであり；

Aが、連結基

[0084] [化42]



[0085] である、[A 1]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[A 2 6] $X_{a a 1}$ が、A r g、L y s、またはG l yであるか、あるいは存在せず；

$X_{a a 2}$ が2 N a lであり；

$X_{a a 3}$ が、I l eであり；

X_{aa4} がSerであり；

X_{aa5} がGlyであり；

X_{aa6} がArg、Lys、His、またはSerであり；

X_{aa7} が、AsnまたはAspであり；

X_{aa8} がTrpであり；

X_{aa9} がVal、Nle、またはAhpであり；

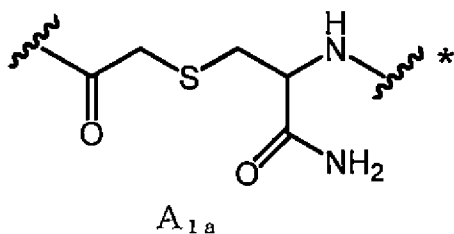
X_{aa10} がArgまたはLysであり；

X_{aa11} がTrpであり；

X_{aa12} がValであり；

Aが

[0086] [化43]



[0087] である、[A25]に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

発明の効果

[0088] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、TSP1に結合し、TSP1への血管内皮細胞などの細胞の接着を阻害することができる。従って本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、TSP1の発現亢進により誘発される疾患または症状の治療または予防に有用である。また本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、血管新生促進剤として有用である。

発明を実施するための形態

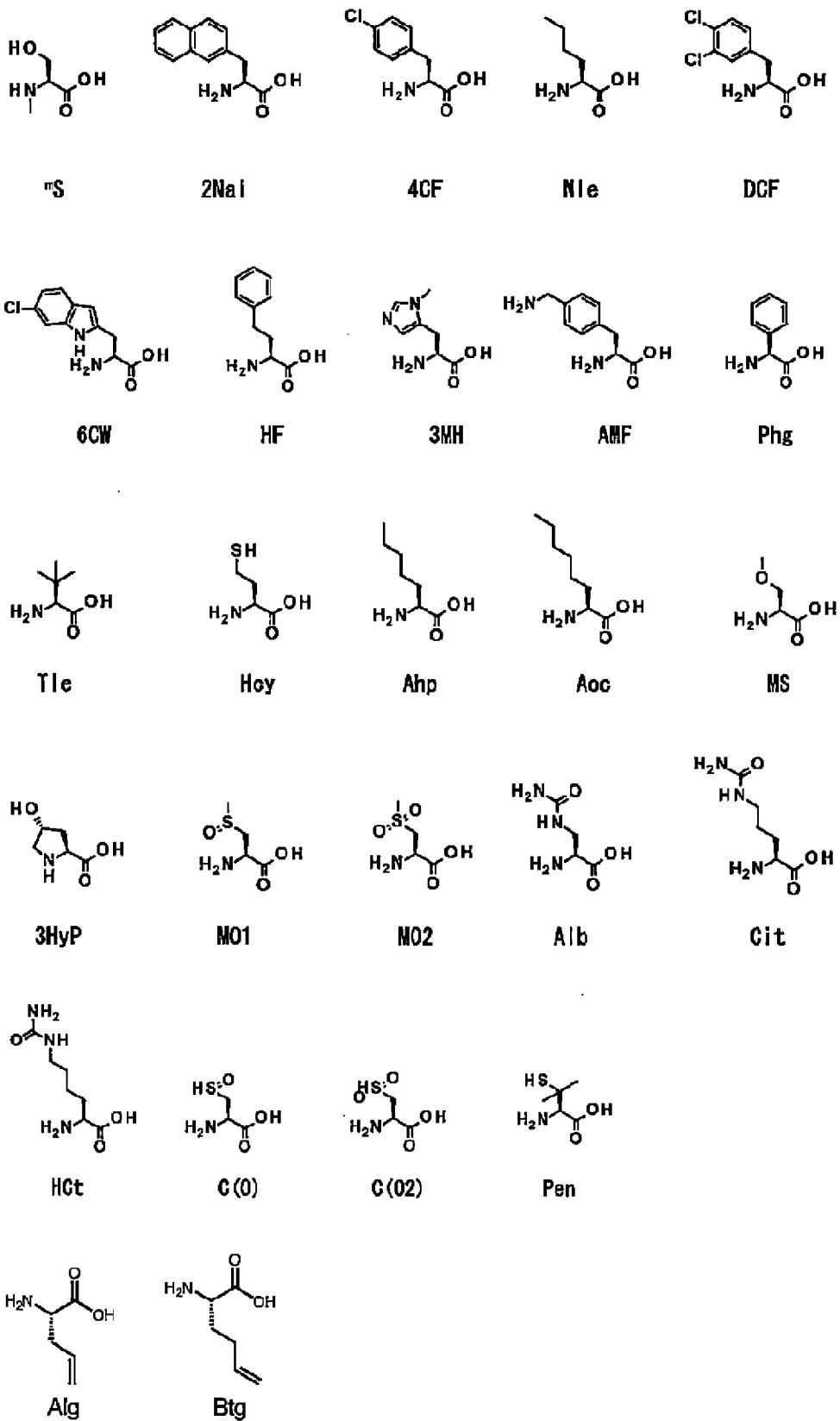
[0089] (定義)

本明細書中、天然アミノ酸は、天然に存在するタンパク質中に通常見出される未修飾のアミノ酸を意味し、具体的には、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを意味する。なお、本明細書においては、天然アミノ酸の表記には、三文字表記または一文字表記を用いる場合がある（すなわち、アラニン：A l aまたはA；アルギニン：A r gまたはR；アスパラギン：A s nまたはN；アスパラギン酸：A s pまたはD；システイン：C y sまたはC；グルタミン酸：G l uまたはE；グルタミン：G l nまたはQ；グリシン：G l yまたはG；ヒスチジン：H i sまたはH；イソロイシン：l l eまたはl；ロイシン：L e uまたはL；リジン：L y sまたはK；メチオニン：M e tまたはM；フェニルアラニン：P h eまたはF；プロリン：P r oまたはP；セリン：S e r又はS；スレオニン：T h rまたはT；トリプトファン：T r pまたはW；チロシン：T y rまたはY；バリン：V a lまたはV）。

[0090] 本明細書中、非天然アミノ酸は、天然アミノ酸以外のアミノ酸を意味し、天然アミノ酸の修飾体も含まれる。本明細書中に記載する非天然アミノ酸の略語を以下に示す。

[0091]

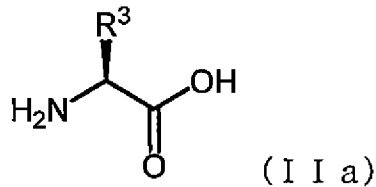
[化44]



[0092] なお、本明細書においてアミノ酸という場合、ポリペプチドの構成アミノ酸についてはアミノ酸残基を意味する。また特に明記しない限り、アミノ酸はL-アミノ酸を意味する。

[0093] 本明細書中、脂肪族アミノ酸は、式 (I I a) :

[0094] [化45]

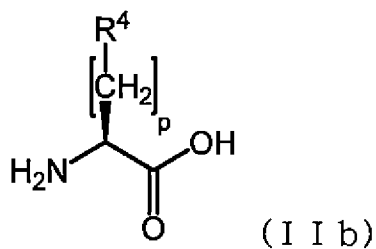


[0095] (式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである) で表されるアミノ酸である。

[0096] 天然の脂肪族アミノ酸としては、Ala、Val、Leu、およびIleが挙げられる。また非天然の脂肪族アミノ酸としては、Nle、Tle、Ahp、Aoc、Alg、Btgなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0097] 本明細書中、芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

[0098] [化46]

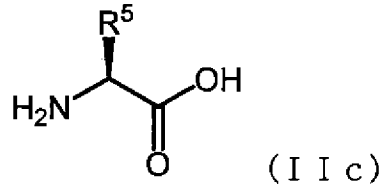


[0099] (式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、 C_{1-3} アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、 p は0~3の整数である) で表されるアミノ酸である。

[0100] 天然の芳香族アミノ酸としては、P h e、T y r、およびT r pが挙げられる。また非天然の芳香族アミノ酸としては、2 N a l、4 C F、D C F、6 C W、H F、P h gなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0101] 本明細書中、塩基性アミノ酸は、式 (I I c)

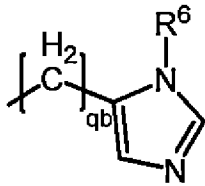
[0102] [化47]



[0103] [式中、R⁵は、

式 - (C H ₂) _{q a} N H ₂ (式中、q a は 1 ~ 6 の 整数 である) 、
式

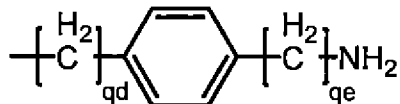
[0104] [化48]



[0105] (式中、R⁶は水素原子またはC₁₋₃アルキルであり、q b は 1 ~ 6 の 整数 である) 、

式 - (C H ₂) _{q c} N H C (= N H) N H ₂ (式中、q c は 1 ~ 6 の 整数 である) 、
または
式

[0106] [化49]

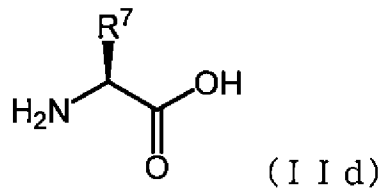


[0107] (式中、 q_d および q_e はそれぞれ独立して 1～3 の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸である。

[0108] 天然の塩基性アミノ酸としては、Lys、His、およびArgが挙げられる。また非天然の塩基性アミノ酸としては、3MH、AMFなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0109] 本明細書中、中性アミノ酸は、式 (IId)

[0110] [化50]



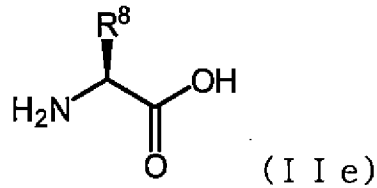
[0111] [式中、 R^7 は、式 $-(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ (式中、 r_a は 1～6 の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または 6) である)、または式 $-(CH_2)_{r_b}SH$ (式中、 r_b は 1～3 の整数 (例えば、1、2、または 3) である) で表される基である] で表されるアミノ酸、Gly、Met、MO1、MO2、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、Thr、C(O)、C(O2)、またはPenである。

[0112] 天然の中性アミノ酸としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Met、Pro、Asn、およびGlnが挙げられる。また非天然の中性アミノ酸としては、MO1、MO2、3HyP、^mS、MS、Alb、Cit、Hct、Hcy、C(O)、C(O2)、Penなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0113] 本明細書中、酸性アミノ酸は、式 (I I e)

[0114]

[化51]



[0115] [式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ （式中、 s は1～6の整数である）で表される基である] で表されるアミノ酸である。

[0116] 天然の酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。

[0117] 本明細書中、 C_{1-3} アルキルは、1～3個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキルであり、例えば、メチル、エチル、1-プロピル、または2-プロピルである。

[0118] 本明細書中、 C_{1-6} アルキルは、1～6個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキルであり、例えば、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-ブチル、2-メチル-1-プロピル、2-メチル-2-プロピル、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-1-ペンチル、3-メチル-1-ペンチル、2-エチル-1-ブチル、2,2-ジメチル-1-ブチル、または2,3-ジメチル-1-ブチルである。

[0119] 本明細書中、 C_{2-6} アルケニルは、2～6個の炭素原子を有し、1以上の二重結合を含む直鎖または分枝鎖アルケニルであり、例えば、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル（アリル）、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-2-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、3-メチル-2-ペンテニルなどが挙げられ、好ましくは、ビニル、2-プロペニル（

アリル)、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニルである。

[0120] 本明細書中、 C_{3-6} シクロアルキルは、3~6個の炭素原子を有する環状アルキル基であり、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、または、シクロヘキシル基である。

[0121] 本明細書中、ハロゲン原子は、F、Cl、Br、またはIである。

[0122] 本明細書中、 C_{1-3} アルコキシは、1個の上記 C_{1-3} アルキル基で置換されたヒドロキシル基であり、例えば、メトキシ、エトキシ、1-プロポキシ、または2-プロポキシである。

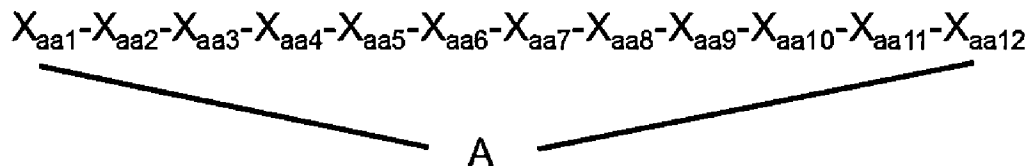
[0123] 本明細書中、TSP1阻害活性とは、TSP1の血管新生阻害作用を含む1つ以上の作用を阻害する活性をいう。TSP1阻害活性は、本願の実施例に示されるヒトTSP1および血管内皮細胞を用いた細胞接着阻害アッセイにより測定される。該アッセイにおいて、被験物質の50%阻害濃度(IC_{50})が200nM以下である場合、TSP1阻害活性を有すると決定される。

[0124] (本発明の大環状ポリペプチド)

本発明は、TSP1阻害活性を有する新規大環状ポリペプチドに関する。

[0125] 一態様において、本発明に係る化合物は、式(1)

[0126] [化52]

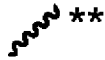


[0127] で表される大環状ポリペプチドである(以下、本発明の大環状ポリペプチドという)。本発明の大環状ポリペプチドにおいては、 $X_{aa1} \sim X_{aa12}$ のアミノ酸、または X_{aa1} が存在しない場合には $X_{aa2} \sim X_{aa12}$ のアミノ酸が、アミド結合により連結されてポリペプチド鎖が形成されており、N末端アミノ酸(X_{aa1} または X_{aa2})とC末端アミノ酸(X_{aa12})とが連結基:Aを介して

[化55]

[0135] は、 $X_{a a 1 2}$ のC末端カルボニル基への結合点を示し、

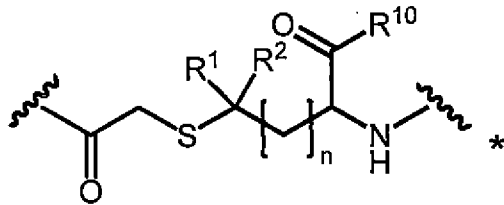
[0136] [化56]



[0137] は、 $X_{a a 1}$ の α 炭素への結合点を示すか、または $X_{a a 1}$ が存在しない場合には $X_{a a 2}$ の α 炭素への結合点を示す。上記連結基に含まれるアミノ酸構造の不斉点はR体であってもS体であってもよい。

[0138] 一態様において、Aは、

[0139] [化57]

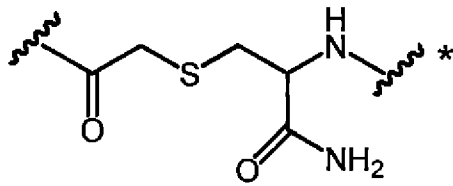


[0140] である（以下、 A_1 という）。連結基 A_1 において、 n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 C_{1-3} アルキルは、好ましくはメチルである。

[0141] A_1 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である、連結基

[0142]

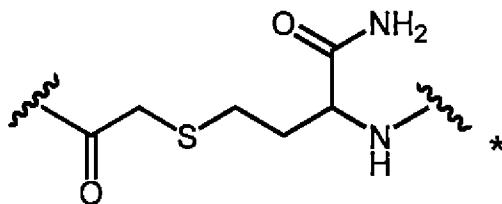
[化58]



[0143] が挙げられる（以下、 A_{1a} という）。 A_{1a} は、例えば、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の-SHを、 X_{aa1} または X_{aa2} のN末端アミノ基に結合した $-COCH_2X$ （ X はClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、CysはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1a} において X_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の連結基を、 A_{1a1} という。

[0144] A_1 の好ましい別の態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が1である、連結基

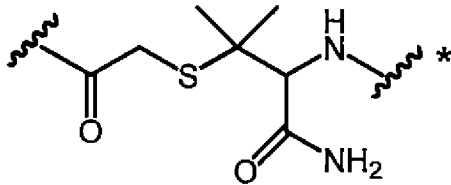
[0145] [化59]



[0146] が挙げられる（以下、 A_{1b} という）。 A_{1b} は、例えば、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合したHcy（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の-SHを、 X_{aa1} または X_{aa2} のN末端アミノ基に結合した $-COCH_2X$ （ X はClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、HcyはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1b} において X_{aa12} のC末端側にアミド結合したHcy（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の連結基を、 A_{1b1} という。

[0147] 連結基 A_1 の好ましい別の態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれメチルであり、 R^{10} がアミノであり、 n が 0 である、連結基

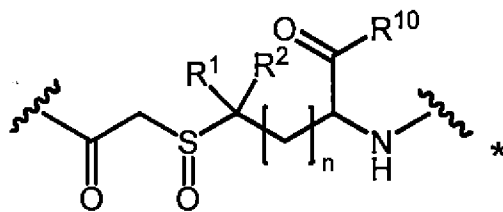
[0148] [化60]



[0149] が挙げられる（以下、 A_{1c} という）。 A_{1c} は、例えば、 X_{aa12} の C 末端側にアミド結合した Pen （ただしカルボキシがアミドに変換されている）の $-SH$ を、 X_{aa1} または X_{aa2} の N 末端アミノ基に結合した $-COCH_2X$ （ X は Cl などの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、 Pen は L-アミノ酸または D-アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1c} において X_{aa12} の C 末端側にアミド結合した Pen （ただしカルボキシがアミドに変換されている）が L-アミノ酸である場合の連結基を、 A_{1c1} という。

[0150] 別の態様において、連結基 A は、

[0151] [化61]



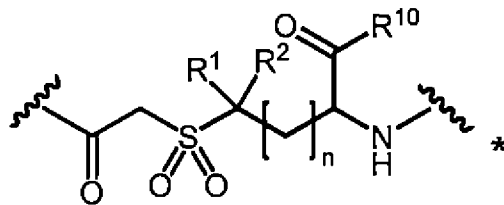
[0152] である（以下、 A_2 という）。 A_2 において、 n は 0～3 の整数（例えば、0、1、2、または 3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。

[0153] A_2 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が 0 である連結基が挙げられる（以下、 A_{2a} という）。 A_{2a} は、例えば上記 A_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとするこ

とにより得ることができる。特に、 A_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとした場合の連結基を、 A_{2a1} という。

[0154] 別の態様において、Aは、

[0155] [化62]

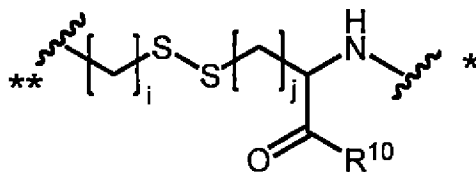


[0156] である（以下、 A_3 という）。 A_3 において、 n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。

[0157] A_3 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である連結基が挙げられる（以下、 A_{3a} という）。 A_{3a} は、例えば上記 A_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホンとすることにより得ることができる。特に、 A_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホンとした場合の連結基を、 A_{3a1} という。

[0158] 別の態様において、Aは、

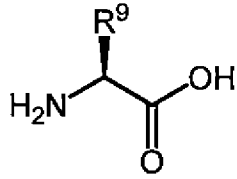
[0159] [化63]



[0160] である（以下、 A_4 という）。 A_4 において、 i および j はそれぞれ独立に1～3の整数（例えば、1、2、または3）であり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。

[0161] Aが A_4 である場合、 X_{aa1} または X_{aa2} は、

[0162] [化64]

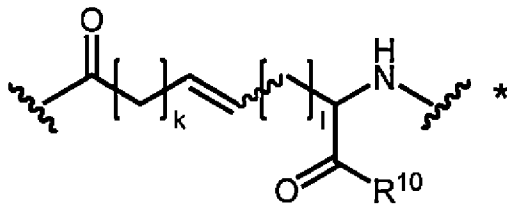


[0163] [式中、 R^9 は、式 $-(CH_2)_tSH$ （式中、 t は1～3の整数（例えば、1、2、または3）である）で表される基である]で表されるアミノ酸の残基である。

[0164] A_4 の好ましい態様において、 i および j はそれぞれ1であり、 R^{10} はアミノである（以下、 A_{4a} という）。 A_{4a} は、例えば、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の $-SH$ を、 X_{aa1} または X_{aa2} の $-SH$ と反応させることにより得ることができる。この場合、CysはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である A_{4a} を、 A_{4a1} という。

[0165] 別の態様において、 A は、

[0166] [化65]

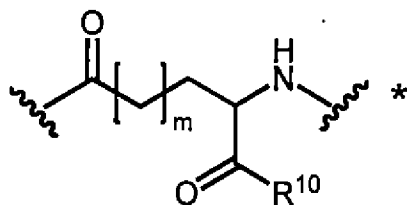


[0167] である（以下、 A_5 という）。 A_5 において、 k および l はそれぞれ独立に0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。連結基 A_5 は、例えば、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合した、側鎖に $-(CH_2)_lCH=CH_2$ を有するアミノ酸（カルボキシがアミドに変換されていてもよい）と、 X_{aa1} または X_{aa2} のN末端アミノ基に結合し

た $-\text{CO}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ とのオレフィンメタセシスにより得ることができる。この場合、 X_{aa12} のC末端側にアミド結合したアミノ酸はL-アミノ酸およびD-アミノ酸のいずれであってもよい。

[0168] 別の態様において、Aは、

[0169] [化66]



[0170] である（以下、 A_6 という）。 A_6 において、 m は1～7の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）であり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 A_6 は、例えば、 A_5 におけるC-C二重結合を還元することにより得ることができる。

[0171] 式(1)において、 X_{aa1} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在しない。好ましい態様において、 X_{aa1} は、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysであるか、あるいは存在せず、より好ましくは、Arg、Lys、またはGlyであるか、あるいは存在しない。

[0172] 式(1)において、 X_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa2} は、芳香族アミノ酸の残基であり、より好ましくは、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFであり、さらに好ましくは、2NaIである。

[0173] 式(1)において、 X_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa3} は、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgであり、よ

り好ましくは、I l e、またはA r gである。

[0174] 式(1)において、 X_{aa4} は、S e r、T h r、A l a、または^mSである。好ましい態様において、 X_{aa4} は、S e rである。

[0175] 式(1)において、 X_{aa5} は、G l yまたはS e rである。好ましい態様において、 X_{aa5} は、G l yである。

[0176] 式(1)において、 X_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa6} は、A r g、L y s、H i s、C i t、S e r、またはM O 2であり、より好ましくは、A r g、L y s、H i s、またはS e rである。

[0177] 式(1)において、 X_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa7} は、A s nまたはA s pである。

[0178] 式(1)において、 X_{aa8} は、芳香族アミノ酸残基である。好ましい態様において、 X_{aa8} は、T r p、2 N a l、または6 C Wであり、より好ましくはT r pである。

[0179] 式(1)において、 X_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa9} は、V a l、N l e、A h p、またはM e tであり、より好ましくは、V a l、N l e、またはA h pである。

[0180] 式(1)において、 X_{aa10} は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa10} は、A r g、L y s、H i s、A M F、P h g、またはV a lであり、より好ましくはA r g、L y s、H i s、P h g、またはV a lである。

[0181] 式(1)において、 X_{aa11} は、芳香族アミノ酸残基である。好ましい態様において、 X_{aa11} は、T r pまたは2 N a lであり、より好ましくは、T r pである。

[0182] 式(1)において、 X_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa12} は、V a l、T l e、またはP h eであり、より好ましくはV a lである。

[0183] 本発明の大環状ポリペプチドの好ましい態様としては、式(1)において

、
Aが連結基 A_{1a} 、 A_{1b} 、または A_{1c} であり；
 X_{aa1} が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysであるか、あるいは存在せず；
 X_{aa2} が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFであり；
 X_{aa3} が、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgであり；
 X_{aa4} がSerであり；
 X_{aa5} がGlyであり；
 X_{aa6} が、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはMO2であり；
；
 X_{aa7} が、AsnまたはAspであり；
 X_{aa8} がTrp、2NaI、または6CWであり；
 X_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetであり；
 X_{aa10} が、Arg、Lys、His、AMF、Phg、またはValであり；
 X_{aa11} がTrpまたは2NaIであり；かつ
 X_{aa12} が、Val、Tle、またはPheである；
大環状ポリペプチドが挙げられる。

[0184] 本発明の大環状ポリペプチドのより好ましい態様としては、式(1)において、

Aが連結基 A_{1a} であり；
 X_{aa1} が、Arg、Lys、またはGlyであるか、あるいは存在せず；
 X_{aa2} が、2NaIであり；
 X_{aa3} が、Ile、またはArgであり；

X_{aa4} が、Serであり；

X_{aa5} が、Glyであり；

X_{aa6} が、Arg、Lys、His、またはSerであり；

X_{aa7} が、AsnまたはAspであり；

X_{aa8} が、Trpであり；

X_{aa9} が、Val、Ile、またはAhpであり；

X_{aa10} が、Arg、Lys、His、Phe、またはValであり；

X_{aa11} が、Trpであり；かつ

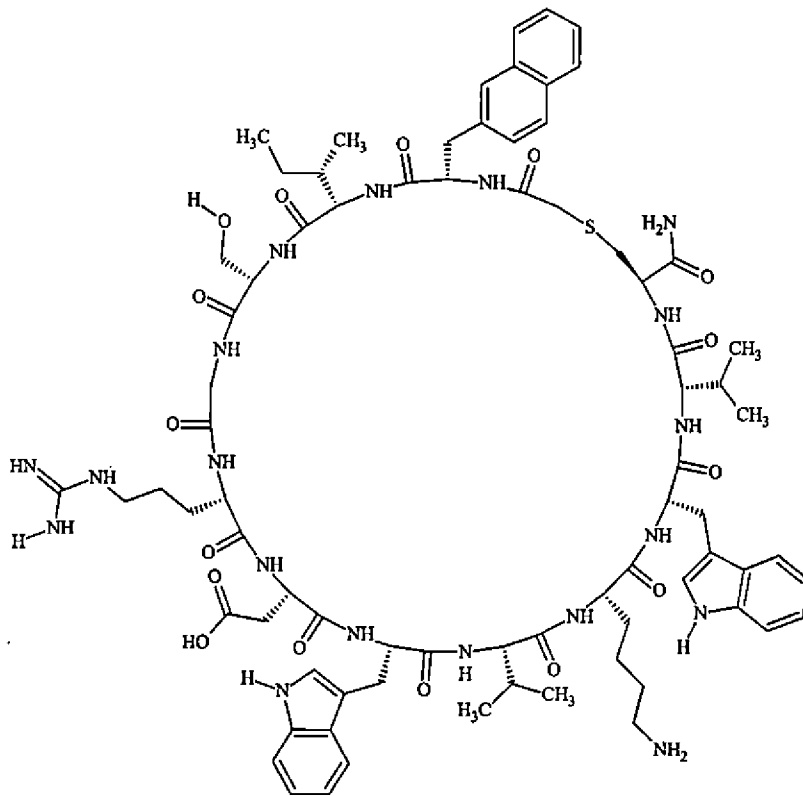
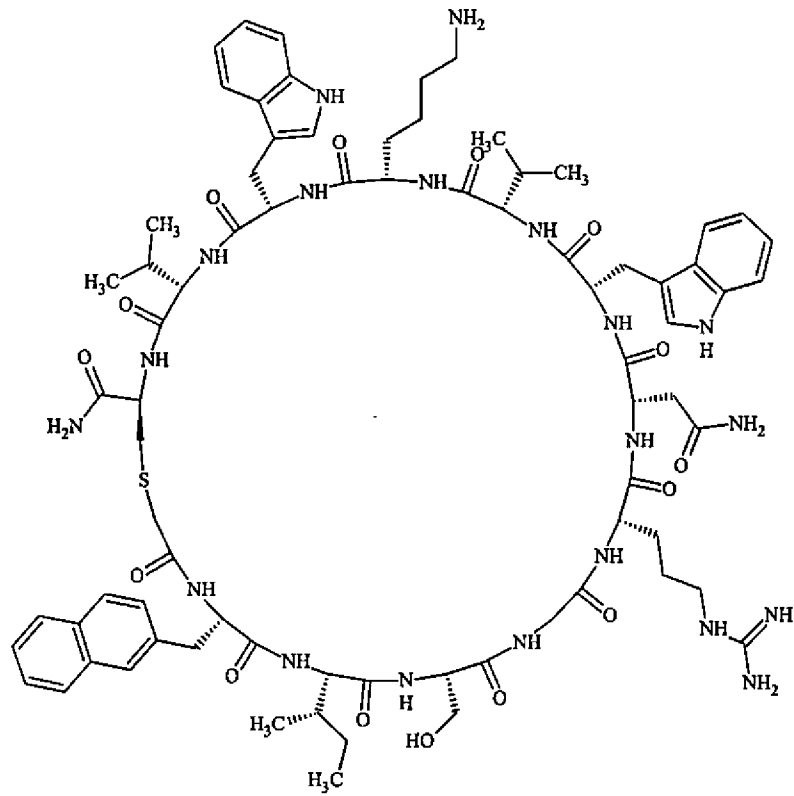
X_{aa12} が、Valである；

大環状ポリペプチドが挙げられる。

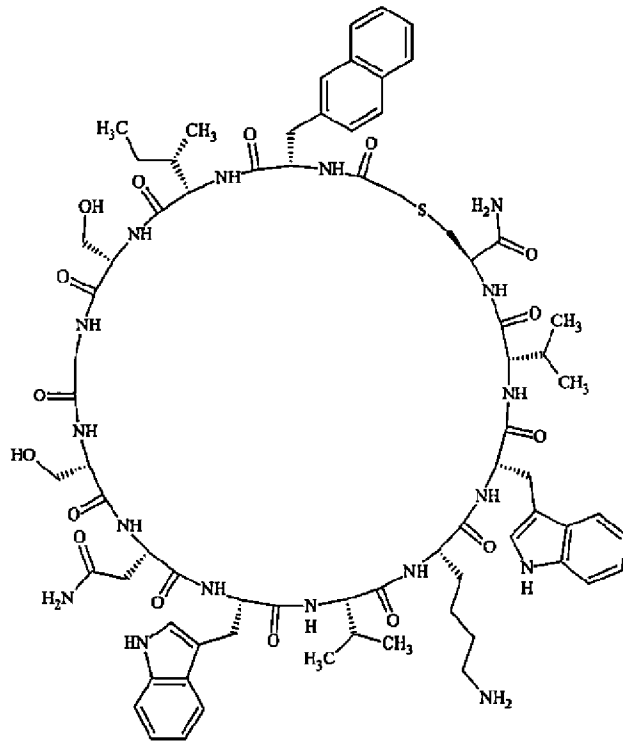
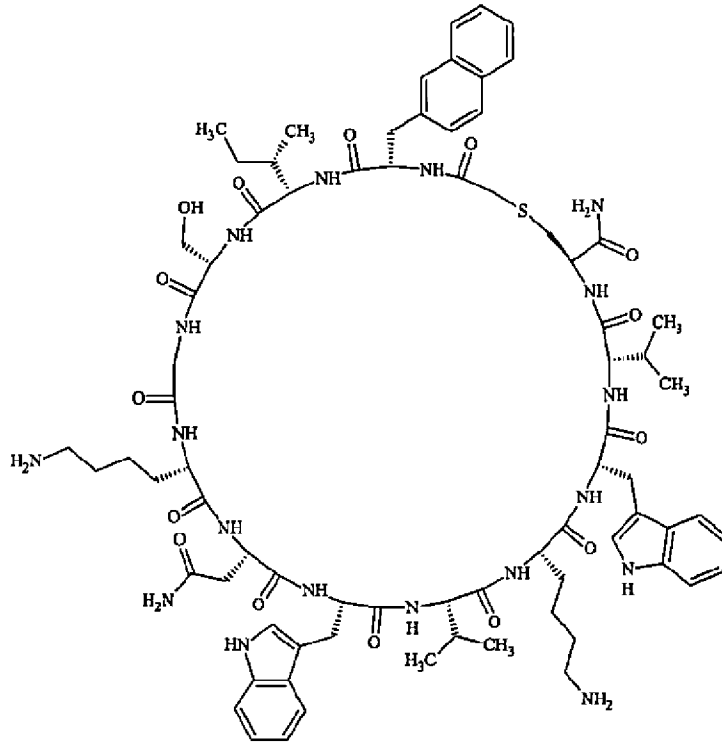
[0185] 本発明の大環状ポリペプチドのさらに好ましい態様としては、

[0186]

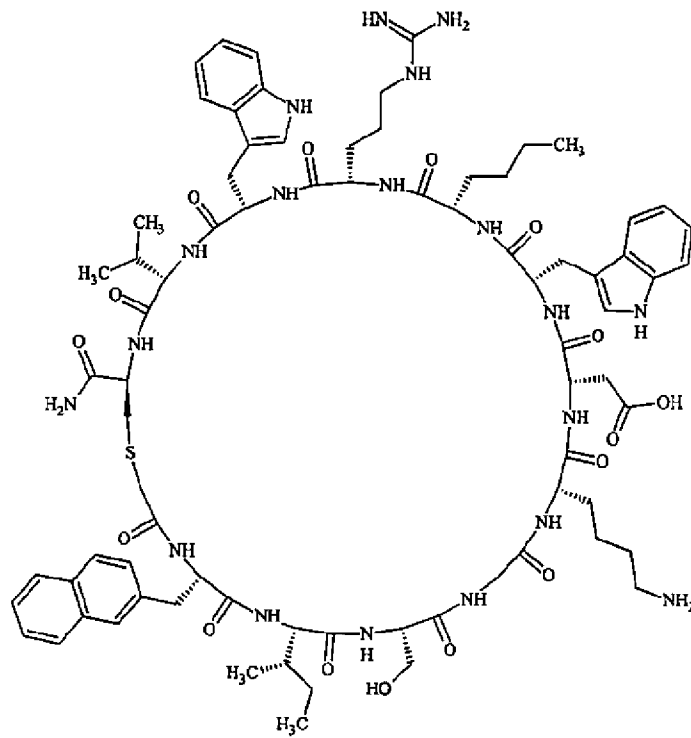
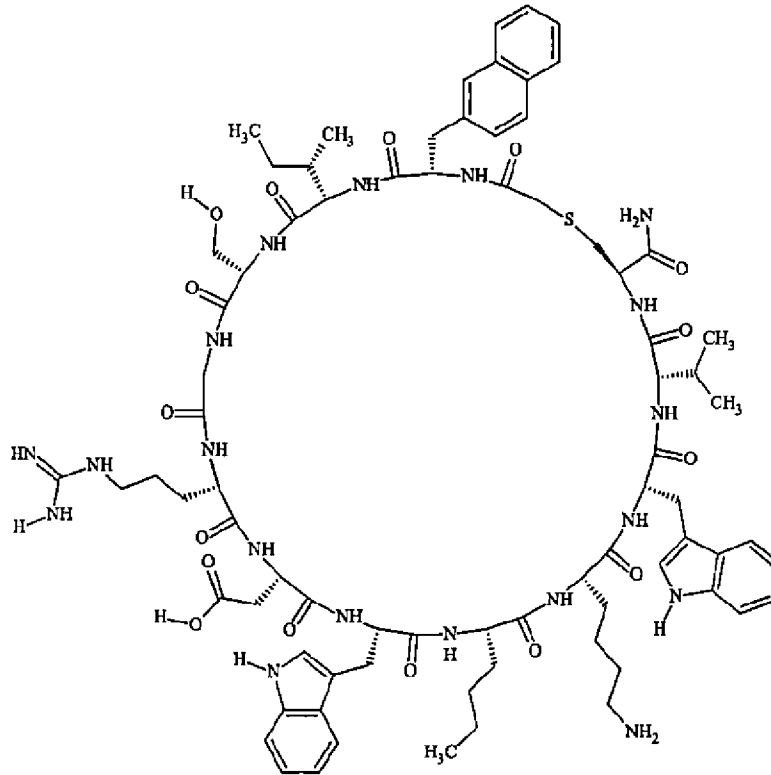
[化67]



[0188] [化69]

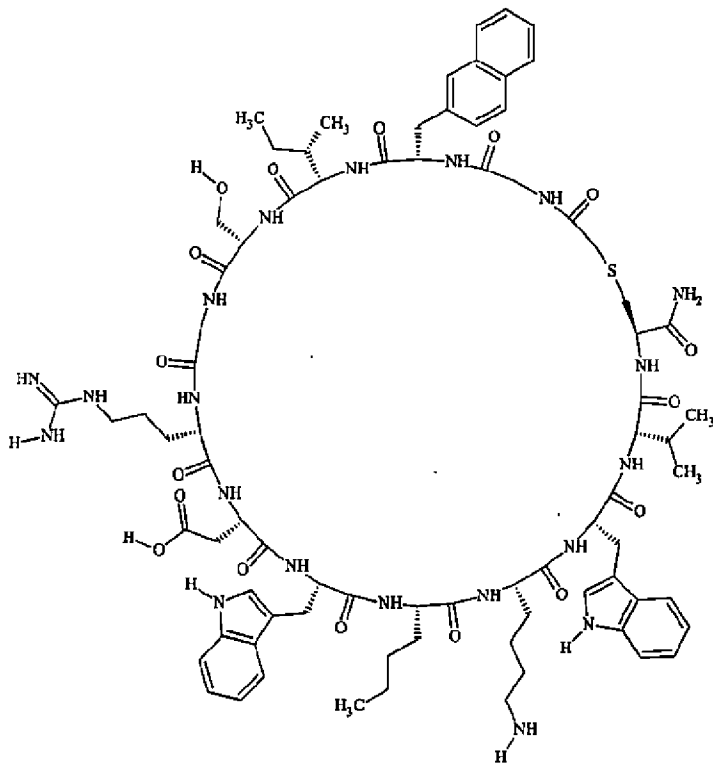
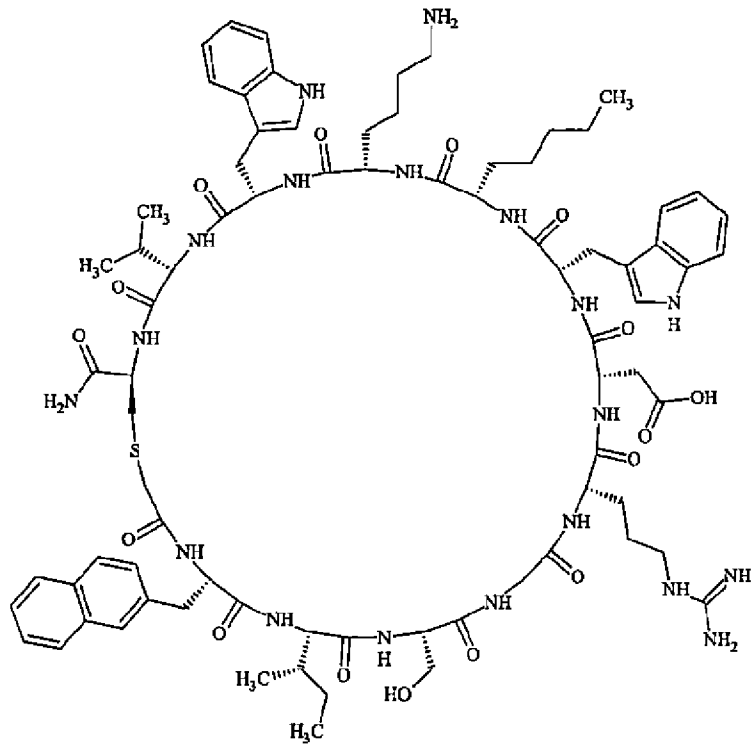


[0189] [化70]



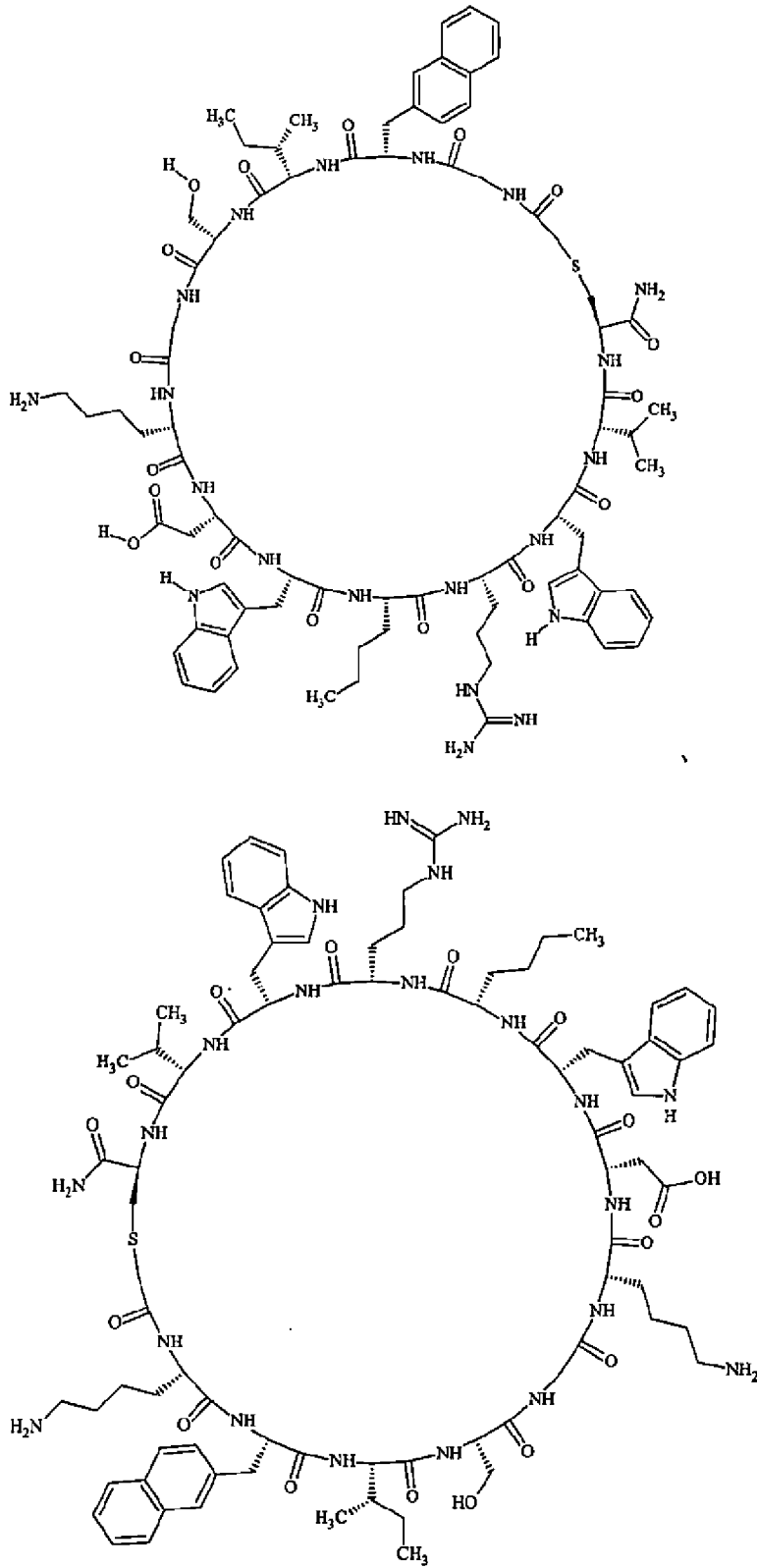
[0190]

[化71]

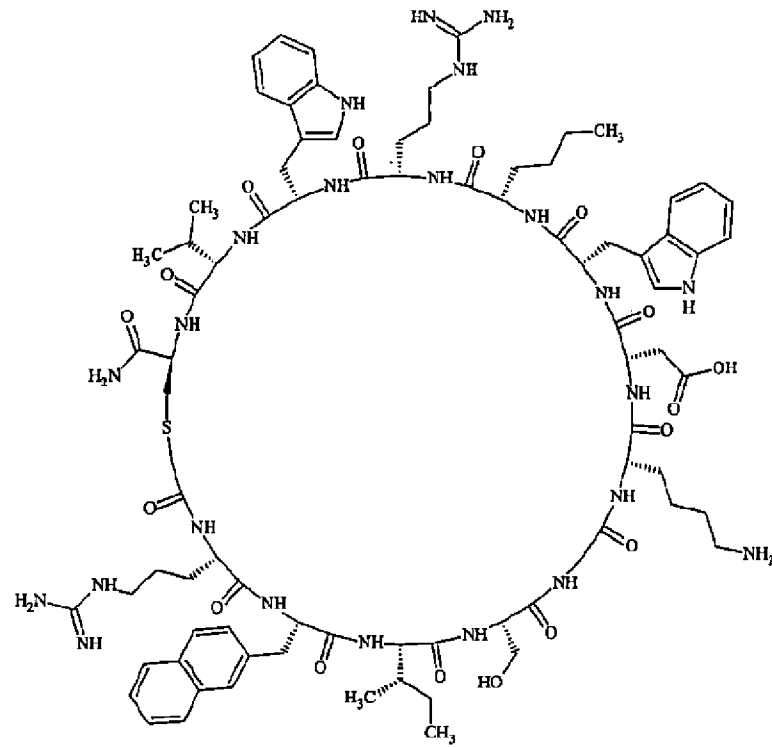


[0191]

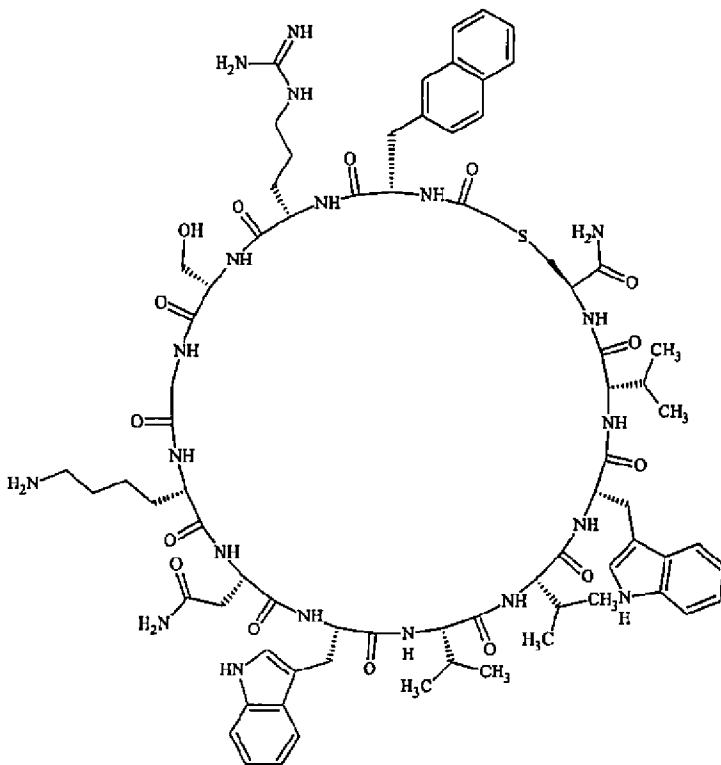
[化72]



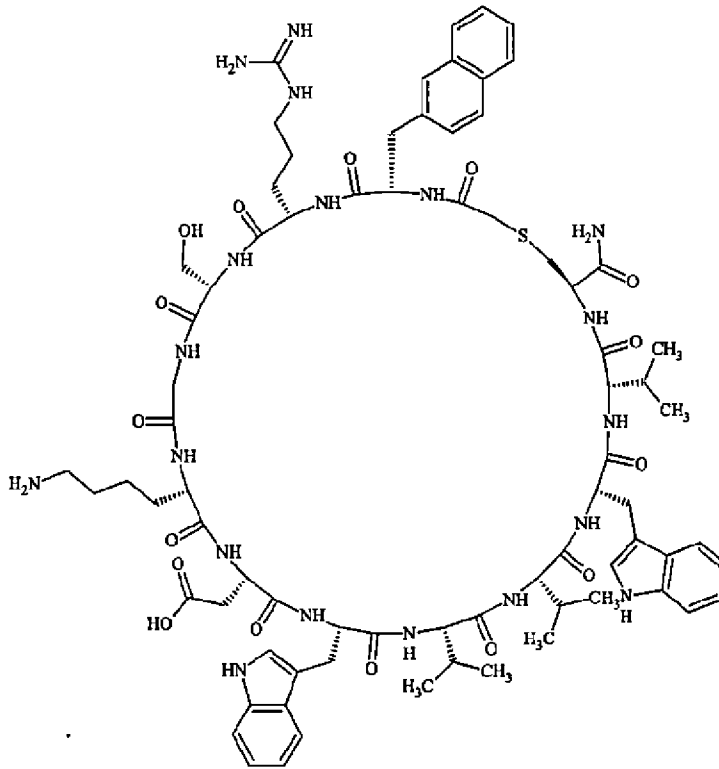
[0192] [化73]



[0193] [化74]

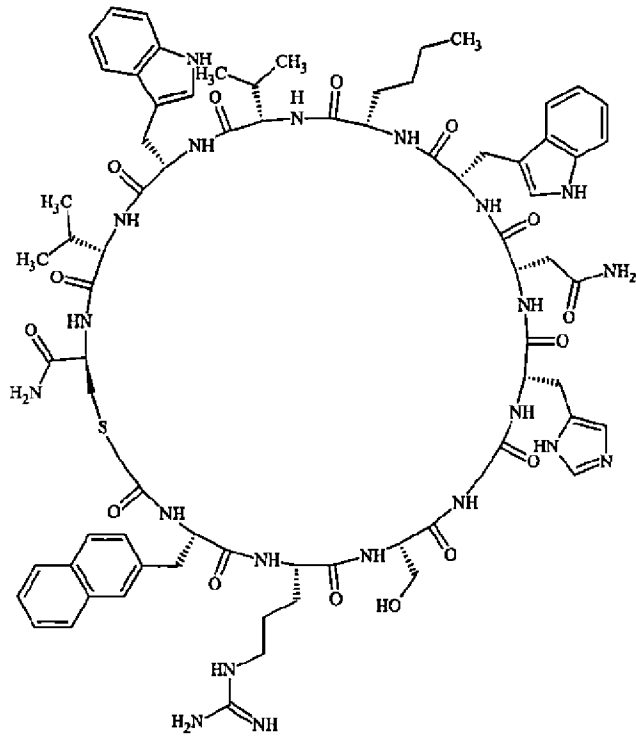


[0194] [化75]



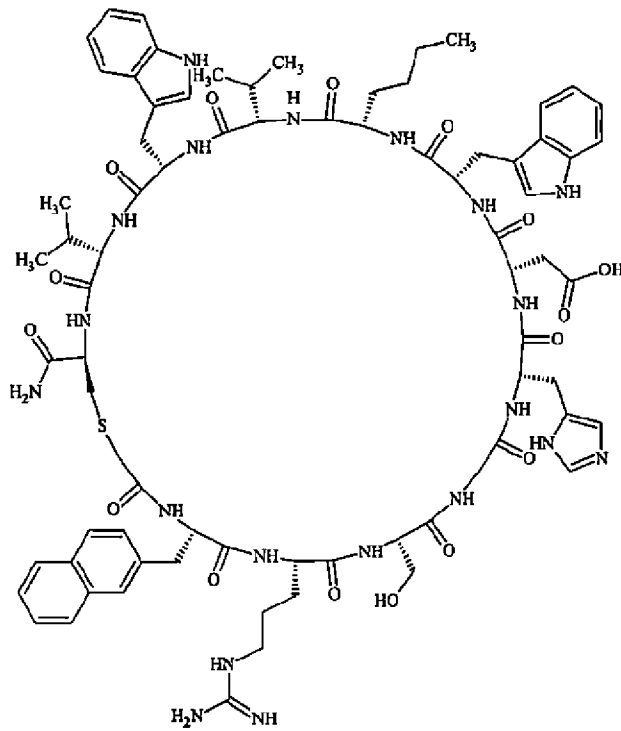
[0195]

[化76]



、および

[0196] [化77]



[0197] で表される化合物からなる群より選択される大環状ポリペプチドが挙げられる。ここに示されたポリペプチドは、後述する実施例 24、40、41、42、43、44、45、58、60、75、76、95、96、および 98～101 の化合物であり、A はいずれも連結基 A_{1a1} である。

[0198] 本発明の大環状ポリペプチドが塩基性基を有する場合、酸と組み合わせられて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。そのような塩としては、例えば、無機酸塩、有機酸塩、アミノ酸塩、およびスルホン酸塩が挙げられる。無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などが挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、フタル酸塩、トリフルオロ酢酸塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などが挙げられる。スルホン酸塩としては、例えば、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸塩、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホン酸塩、4-エチルベンゼンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩などが挙げられる。本発明の大環状ポリペプチドの薬理上許容される塩の好ましい態様としては、酢酸塩、塩酸塩、またはトリフルオロ酢酸塩であり、より好ましくは、酢酸塩である。

[0199] 本発明の大環状ポリペプチドが酸性基を有する場合、塩基と組合わされて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。これらの塩としては、例えば、金属塩、無機アミン塩、有機アミン塩、およびアミノ酸塩が挙げられる。金属塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などが挙げられる。無機アミン塩としては、例えば、アンモニウム塩が挙げられる。有機アミン塩としては、例えば、モルホリン塩、グルコサミン塩、エチレンジアミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ジエタノールアミン塩、ピペラジン

塩、テトラメチルアンモニウム塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、リジン塩、アルギニン塩などが挙げられる。

[0200] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、結晶の形態で使用されてもよく、該結晶は、本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩のみから形成されていても、共結晶や溶媒和物（例えば水和物）を形成していてもよい。本発明の大環状ポリペプチドおよびその薬理上許容される塩は、いずれかを単独でまたは2種以上を適宜組み合わせて用いてもよい。

[0201] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、それを構成する1個以上の原子が非天然の比率で同位体原子に置換された同位体化合物を形成することができる。同位体原子は、放射性または非放射性であり得、例えば、重水素 (^2H ; D)、トリチウム (^3H ; T)、炭素-14 (^{14}C)、ヨウ素-125 (^{125}I) などである。放射性の同位体原子で標識された化合物は、疾患の治療または予防薬、研究用試薬（例えば、アッセイ用試薬）、診断薬（例えば、画像診断薬）などとして使用され得る。本発明は、放射性または非放射性の同位体化合物を包含する。

[0202] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、化学合成、無細胞翻訳系などの当該技術分野において知られている方法で製造することができる。例えば、本発明の大環状ポリペプチドの化学合成は、9-フルオニルメトキシカルボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行うことができる。固相合成には、市販の自動合成機（例えばSyro II (Biotage Japan社)、Liberty Blue (CEM社) など）を用いることができる。

[0203] 例えば、連結基として A_1 を有する本発明の大環状ポリペプチドは、例えば以下の方法に従って得ることができる。

[0204] ペプチド自動合成機を用いて、固相支持体（例えば、Rink Amide Resin AM (Novaviochem社)、2-Chlorotriethyl chloride resin (Novaviochem社) など）に、アミノ基の保護基（例えば、Fmoc基など）で保護されたアミノ酸をC末

端側から順次連結する（C末端アミノ酸はチオールを有するアミノ酸である）。アミノ基の脱保護は当業者に知られた方法（例えば、Fmoc基の場合は20%ピペリジン／1-メチル-2-ピロリジノンなど）で行う。N末端のアミノ酸を連結し、アミノ基を脱保護した後、連結基を形成させるための基（例えば、クロロメチルカルボニル基など）を導入し（例えば、クロロ酢酸をN末端アミノ基と反応させ）、大環状ペプチドを形成する。その後、得られたペプチドをペプチドレジンから、常法（例えば、Rink Amide Resin AMを使用する場合には、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水を使用する条件）により切断する。エーテル沈殿により粗ペプチドを回収したのち、常法（例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー）により目的物を精製する。得られた目的物は常法により所望の塩に変換することができる。

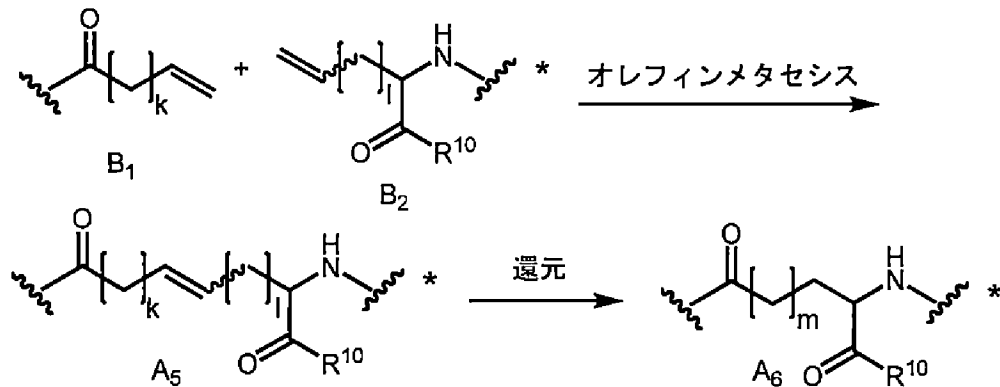
連結基として A_4 を有する本発明の大環状ポリペプチドは、例えば上記方法において最後にN末端のアミノ酸として-SHを含むアミノ酸を連結することにより、さらに連結基を形成させるための基を導入することなく大環状ペプチドを形成することができる。

[0205] 連結基として A_2 または A_3 を有する本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、例えば、 A_1 を有する本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を酸化剤（例えば、*m*-クロロ過安息香酸、過酸化水素水またはジメチルジオキシラン）により酸化することにより得ることができる。

[0206] 例えば、連結基として A_5 または A_6 を有する本発明の大環状ポリペプチドは、例えば以下の方法に従って得ることができる。

[0207]

[化78]



[0208] 末端基 B_1 および B_2 を有するポリペプチドは、ペプチド自動合成機を用いて、固相支持体に、アミノ基の保護基（例えば、Fmoc基など）で保護されたアミノ酸をC末端側から順次連結し（C末端アミノ酸はオレフィンを有するアミノ酸である）、N末端のアミノ酸のアミノ基を脱保護した後、連結基を形成させるための基（例えば、2-プロペニル基など）を導入することにより調製することができる。

末端基 B_1 および B_2 を有するポリペプチドを調製した後に、適切な触媒（例えば、第2世代グラブス触媒）を使用してオレフィンメタセシス反応を行うことにより連結基として A_5 を有する大環状ポリペプチドを調製することができる。該ポリペプチドを適切な条件下（例えば、水素、ウィルキンソン触媒）で還元反応に付すことにより、連結基として A_6 を有する大環状ポリペプチドを得ることができる。

[0209] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、TSP1阻害活性を有し、TSP1への血管内皮細胞の接着を阻害することができるため、血管新生阻害剤として有用である。

[0210] (医薬組成物)

本発明はさらに、本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、優れたTSP1阻害活性を有しており、TSP1の発現亢進により誘発され

る疾患または症状（例えば、血管新生阻害に起因する疾患、血栓形成亢進に起因する疾患、炎症性疾患、腎臓細胞機能低下に起因する疾患、血管弛緩作用の抑制に起因する疾患、虚血性疾患、癌疾患などの疾患、および鎌型赤血球病に伴う血管閉塞（vaso-occlusive crisis）、血管新生阻害、組織壊死、インスリン抵抗性、一般的な創傷などの症状）の治療または予防に有用である。血管新生阻害に起因する疾患としては、例えば、重症下肢虚血、末梢血管障害などが挙げられる。血栓形成亢進に起因する疾患としては、例えば、心筋梗塞、末梢血管障害（PAD）などが挙げられる。炎症性疾患としては、例えば、肥満により誘発される炎症、大動脈瘤における炎症などが挙げられる。腎臓細胞機能低下に起因する疾患としては、例えば、糖尿病性腎症、IgA腎症、慢性腎不全、急性腎不全などが挙げられる。血管弛緩作用の抑制に起因する疾患としては、例えば、腎障害、虚血再灌流障害などが挙げられる。虚血性疾患としては、例えば、心筋梗塞、狭心症などが挙げられる。癌疾患としては、例えば、扁平上皮がん、乳がん、すい臓がんなどが挙げられる。TSP1は、扁平上皮がん、乳がん、およびすい臓がんの進行を促進することが報告されている（例えば、前記非特許文献21、第39頁左欄、下から14行～右欄3行、およびTable 4参照）。好ましい態様において、本発明の医薬組成物は、重症下肢虚血または末梢動脈疾患の治療または予防に有用であり、例えば、重症下肢虚血患者における創傷治癒の促進および重症下肢虚血に対する血管内治療の予後の改善に有用である。

[0211] TSP1は、重症下肢虚血患者の下肢骨格筋中でその発現が亢進していることが知られている。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明の医薬組成物は、TSP1への血管内皮細胞の接着を阻害することにより、TSP1によって阻害されている血管新生を促進することができると考えられる。それにより本発明の医薬組成物は、重症下肢虚血患者における創傷治癒を促進することができ、またカテーテルなどによる血管内治療と組み合わせた場合に当該治療の予後を改善する（例えば、再狭窄を予防する）ことができる。

- [0212] 本発明において、疾患または症状の治療または予防には、該疾患の発症の予防、増悪または進行の抑制または阻害、該疾患に罹患した個体が呈する一つ以上の症状の軽減または増悪もしくはは進行の抑制、二次性疾患の治療または予防などが含まれる。
- [0213] 本発明の医薬組成物は、本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩と、適宜の薬理学上許容される添加剤とを混合して製剤化することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの製剤として経口的に、または、注射剤、経皮吸収剤などの製剤として非経口的に投与することができる。
- [0214] これらの製剤は、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、乳化剤、安定剤、希釈剤、注射剤用溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤などの添加剤を用いて、周知の方法で製造される。
- [0215] 賦形剤としては、例えば、有機系賦形剤または無機系賦形剤が挙げられる。有機系賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖のような糖誘導体；トウモロコシデンプン、馬鈴薯デンプンのようなデンプン誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴムなどが挙げられる。無機系賦形剤としては、例えば、硫酸カルシウムのような硫酸塩が挙げられる。
- [0216] 結合剤としては、例えば、上記の賦形剤；ゼラチン；ポリビニルピロリドン；ポリエチレングリコールなどが挙げられる。
- [0217] 崩壊剤としては、例えば、上記の賦形剤；クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムのような化学修飾された、デンプンまたはセルロース誘導体；架橋ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。
- [0218] 滑沢剤としては、例えば、タルク；ステアリン酸；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイロウのようなワックス類；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；ラウリル硫酸ナトリウムのようなラウリル硫酸塩；上記の賦形剤におけるデンプン誘導体などが挙げられる。
- [0219] 乳化剤としては、例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；ラウリル硫酸ナトリウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコ

ニウムのような陽イオン界面活性剤；ポリオキシエチレンアルキルエーテルのような非イオン界面活性剤などが挙げられる。

[0220] 安定剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラヒドロキシ安息香酸エステル類；クロロブタノールのようなアルコール類；フェノール、クレゾールのようなフェノール類などが挙げられる。

[0221] 希釈剤としては、例えば、水、エタノール、プロピレングリコールなどが挙げられる。

[0222] 注射剤用溶剤としては、例えば、水、エタノール、グリセリンなどが挙げられる。

[0223] 溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0224] 懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。

[0225] 等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

[0226] 緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

[0227] 無痛化剤としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

[0228] 防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

- [0229] 抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。
- [0230] 本発明の医薬組成物が投与される対象は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。
- [0231] 本発明の医薬組成物の投与経路としては、経口投与および非経口投与のいずれでもよく、対象となる疾患に応じて好適な投与経路を選択すればよい。また投与経路は、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明の医薬組成物の投与経路の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。
- [0232] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、治療または予防に有効な量で対象に投与される。「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与経路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。
- [0233] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩の投与量は、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定され、ヒトの成人に対しては、通常、 $0.1 \sim 1000 \text{ mg/kg}$ 、好適には $0.1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ を、1～7日間に1回、または1日2回もしくは3回以上投与することができる。
- [0234] 本発明の医薬組成物は、少なくとも1つの既知の治療剤または治療法と併用してもよい。例えば、重症下肢虚血の治療においては、カテーテルなどの血管内治療の前に、後に、または同時に、本発明の医薬組成物を投与することができる。

本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、薬剤溶出性ステント（DES）によって送達することができる。薬剤溶出性ステントとは、ステント表面に薬剤を担持させ、血管内留置後、薬剤が徐々に溶出されるようにしたステントをいう。

- [0235] また本発明は、本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩の治療または予防有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法に関する。
- [0236] 本発明における「治療または予防有効量」とは、特定の疾患または症状、投与形態および投与径路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患または症状の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。
- [0237] 本発明における「対象」は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。
- [0238] 本発明における「投与すること」には、経口投与および非経口投与が含まれ、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明における「投与すること」の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。
- [0239] 本発明における「疾患または症状」としては、TSP1の発現亢進により誘発される疾患または症状が挙げられる。本発明によれば、重症下肢虚血または末梢動脈疾患を治療または予防することができる。
- [0240] 以下、実施例および試験例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲は、これらに限定されるものではない。

実施例

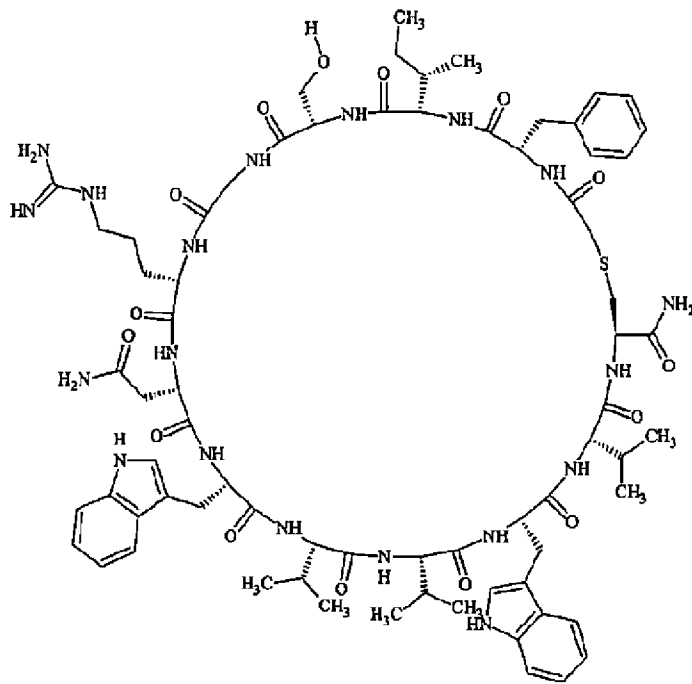
[0241] (実施例 1 ~ 104)

実施例 1 ~ 104 の大環状ポリペプチドの構造式を以下に示す。

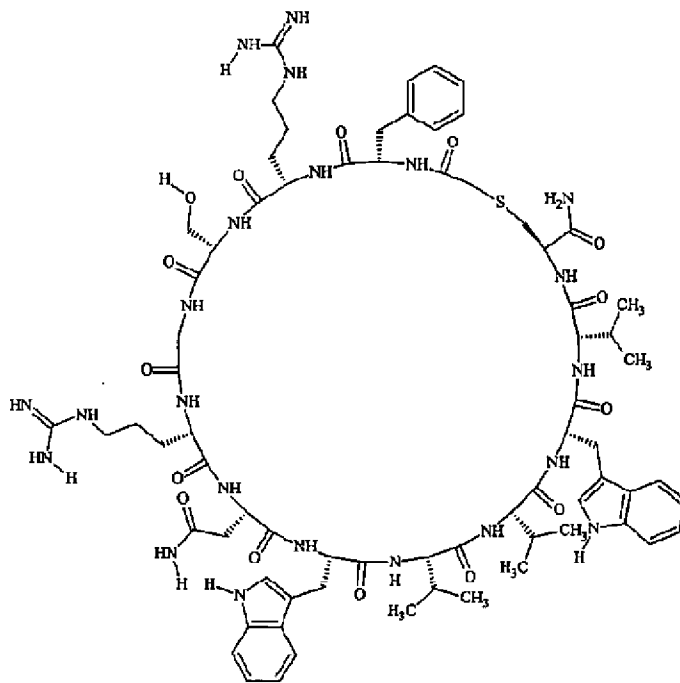
[0242]

[化79]

<化合物1>



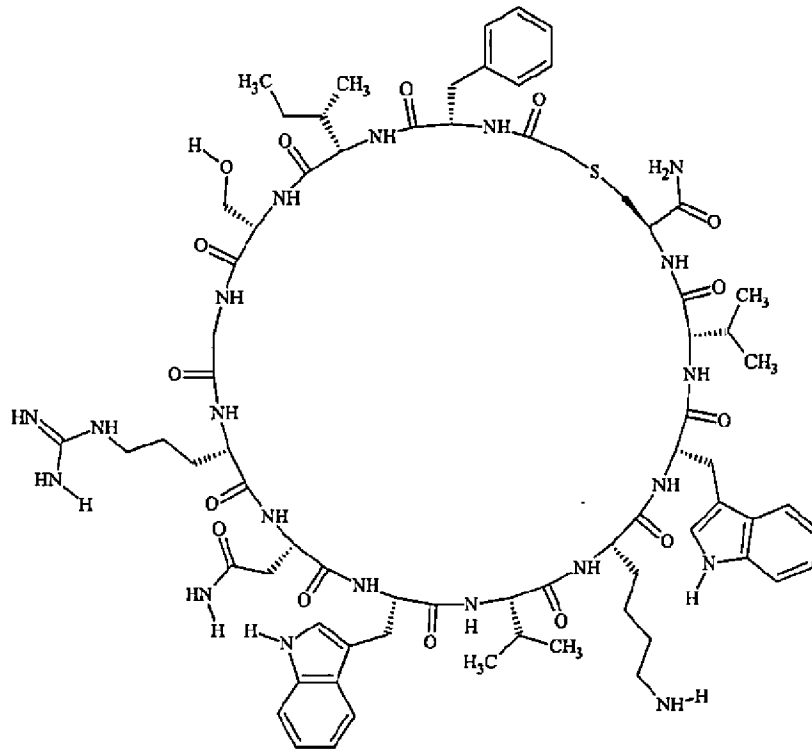
<化合物2>



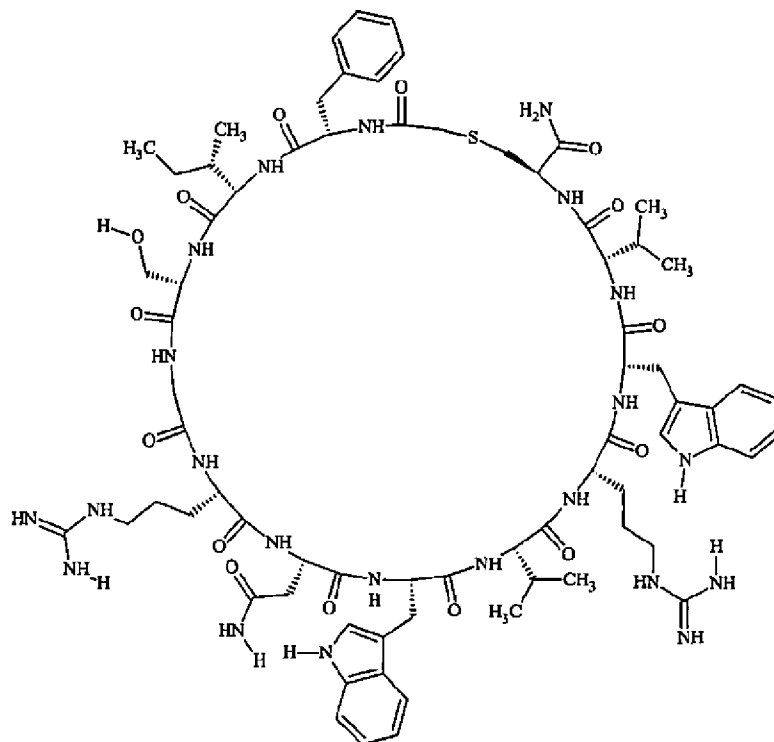
[0243]

[化80]

<化合物 3>

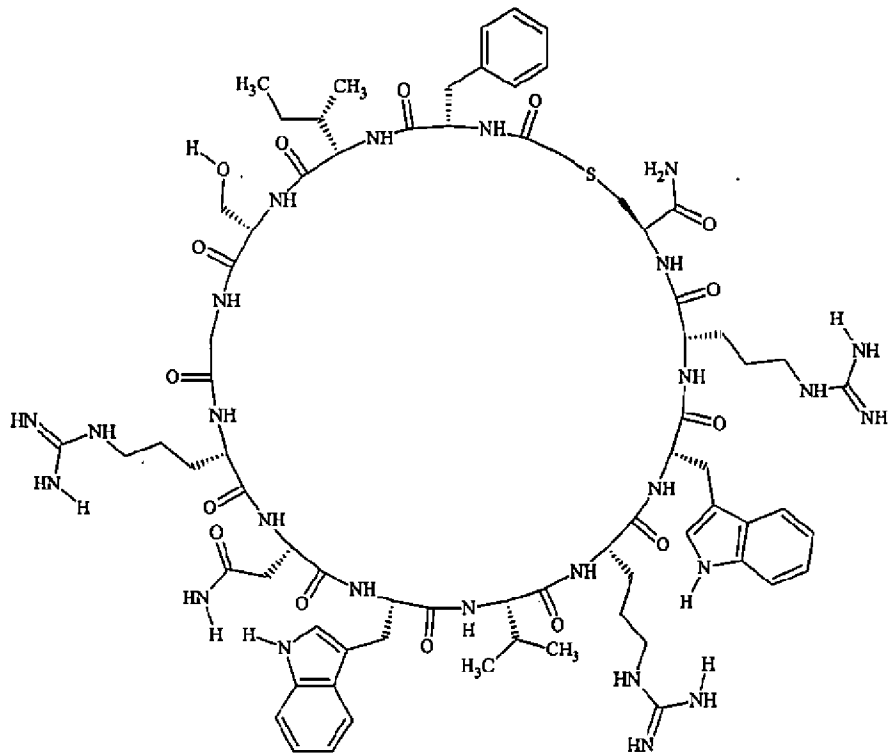


<化合物 4>

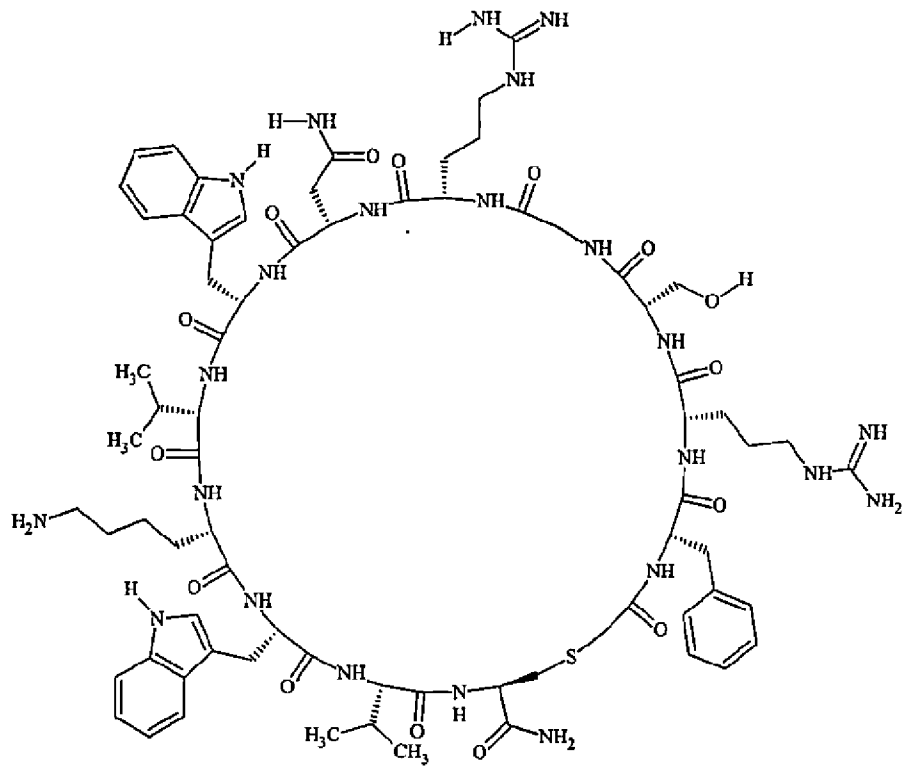


[0244] [化81]

<化合物5>

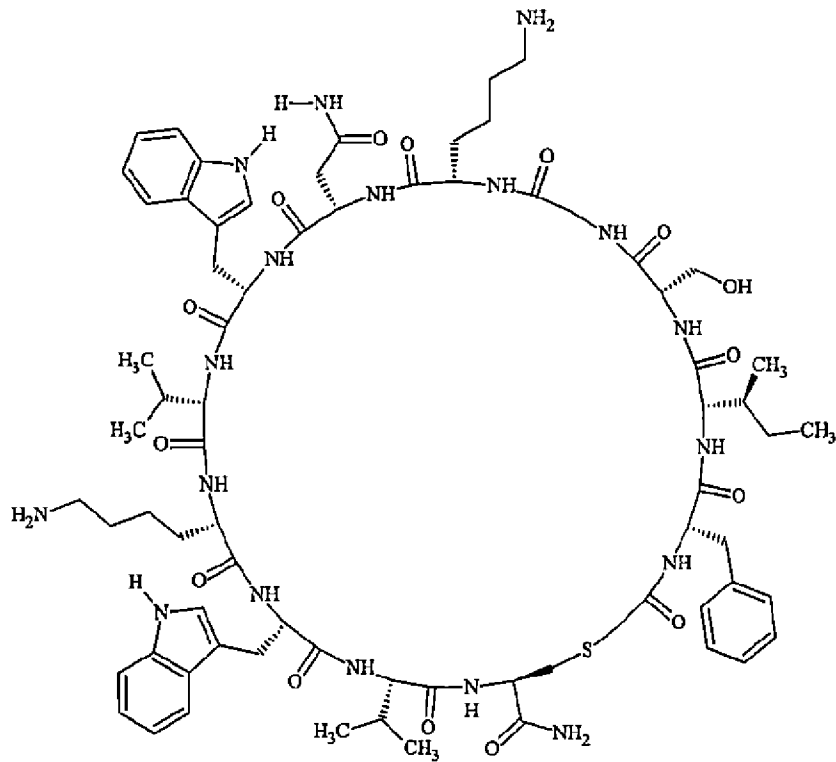


<化合物6>

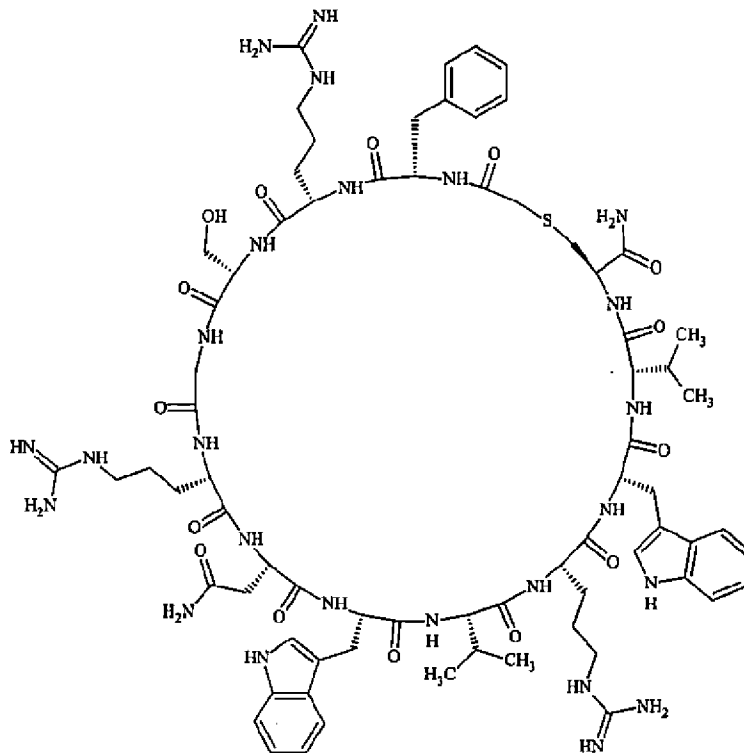


[0245] [化82]

<化合物7>

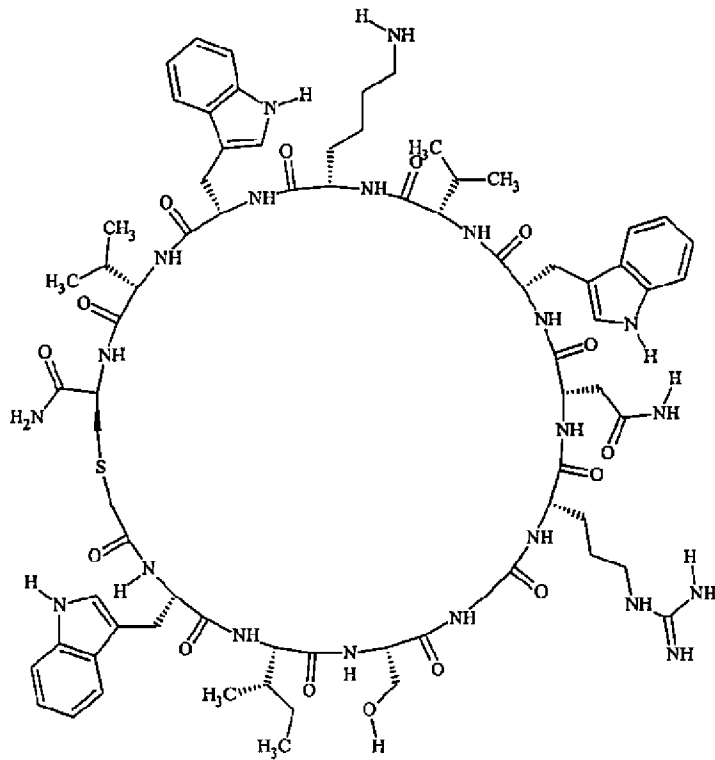


<化合物8>

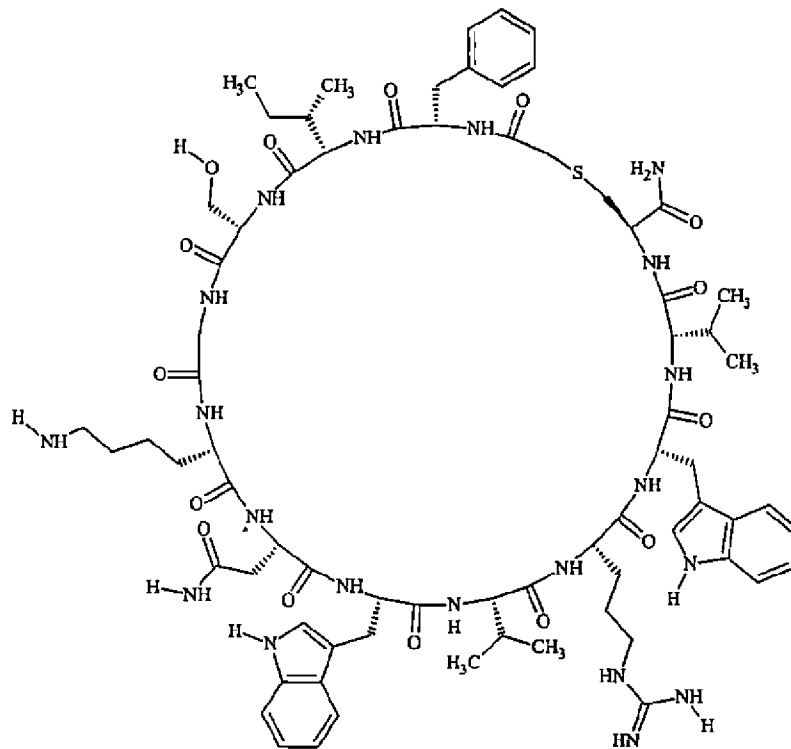


[0246] [化83]

<化合物9>

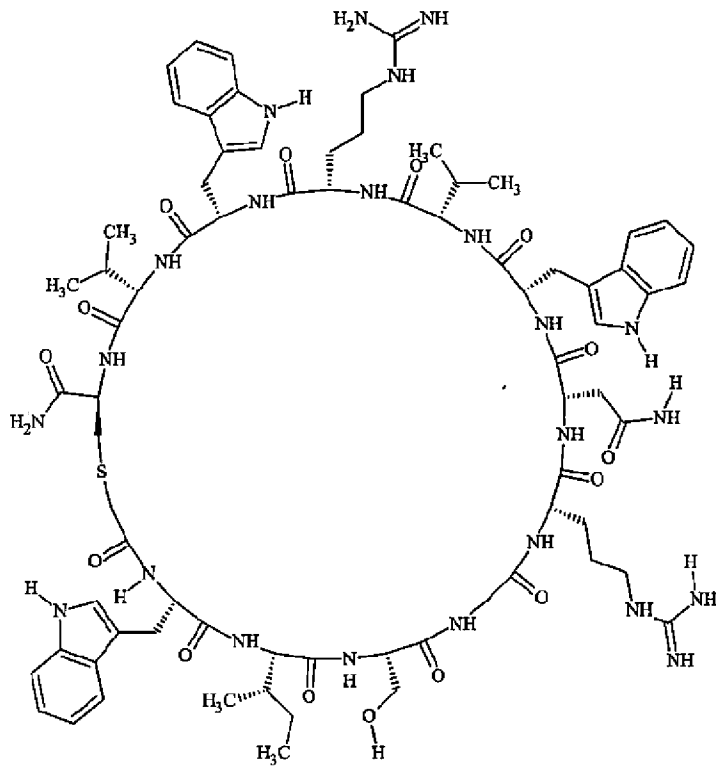


<化合物10>

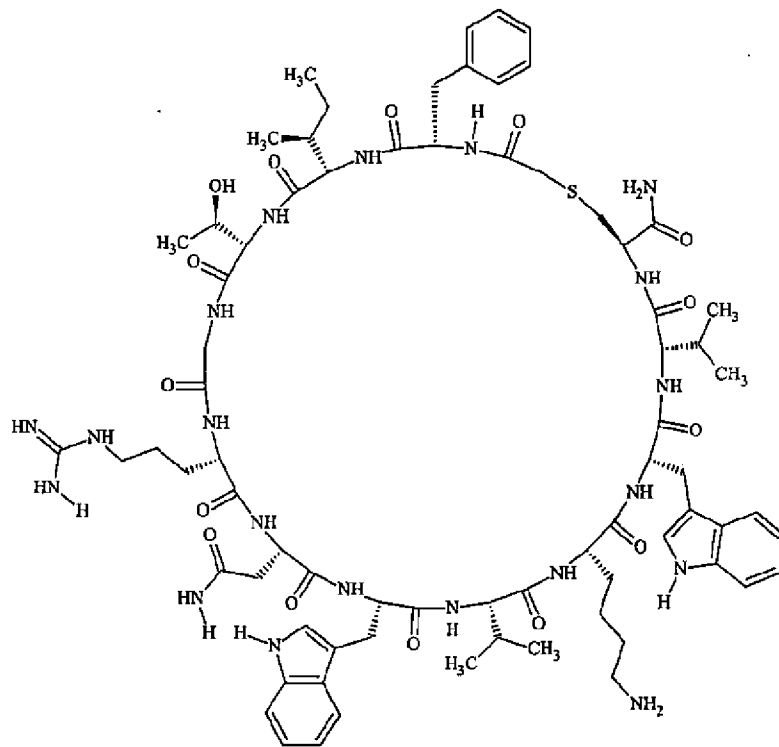


[0247] [化84]

<化合物 1 1>

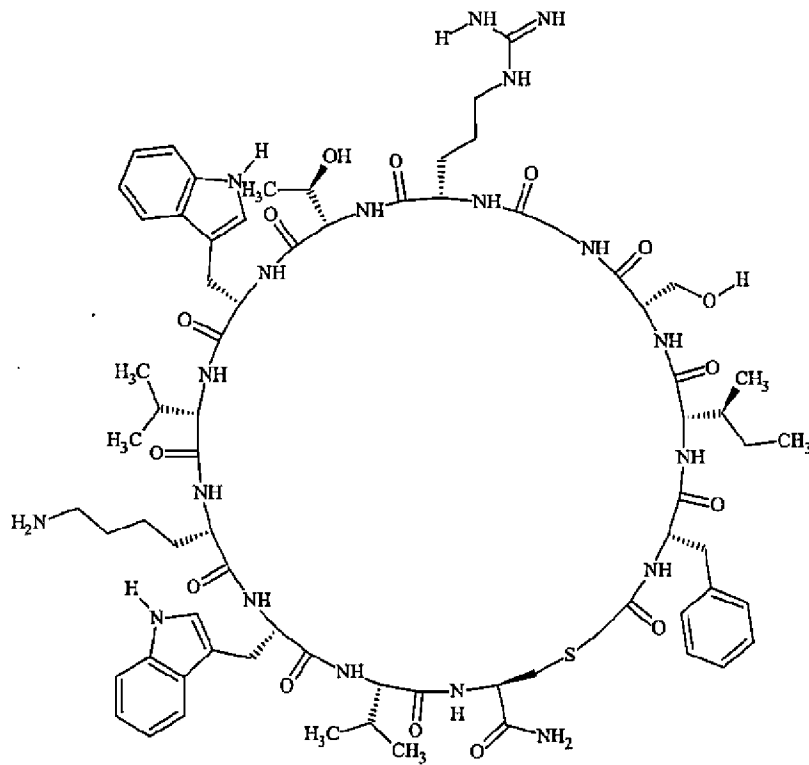


<化合物 1 2>

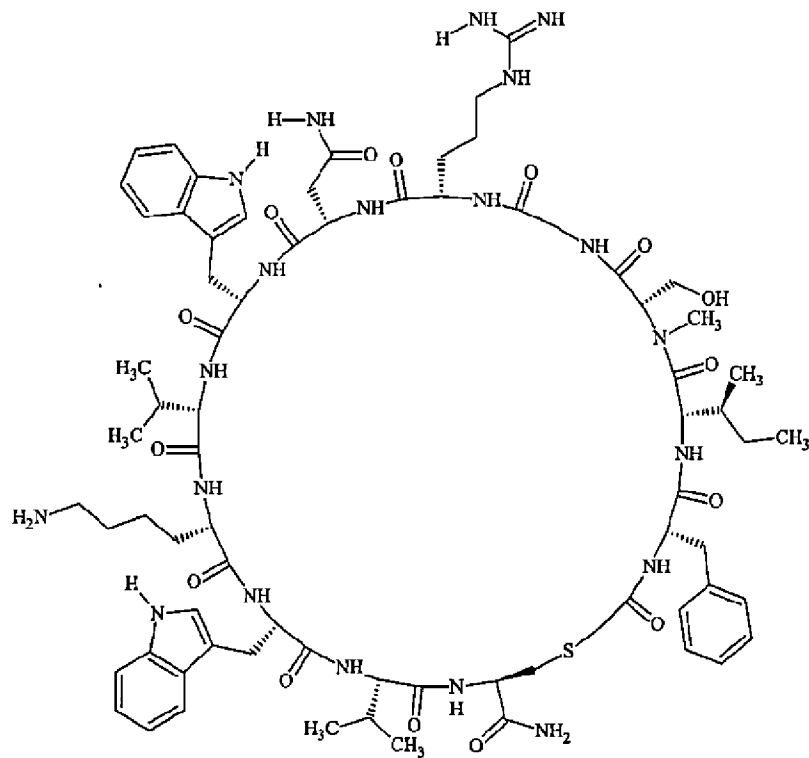


[0248] [化85]

<化合物 1 3>

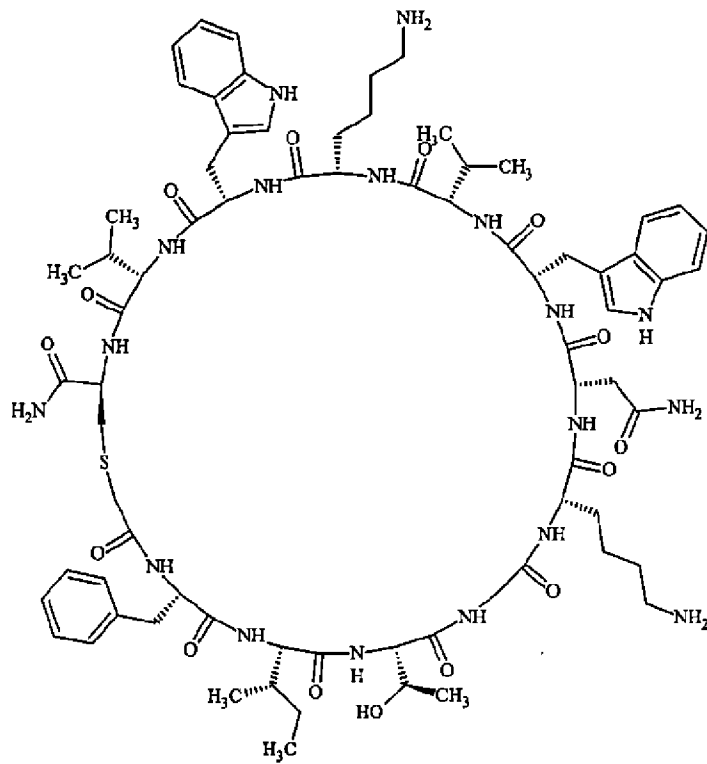


<化合物 1 4>

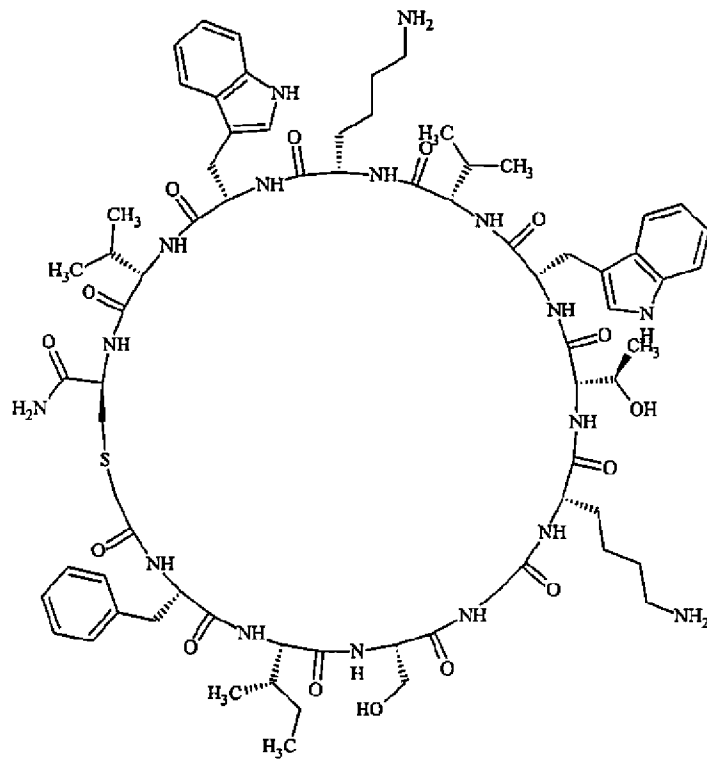


[0250] [化87]

<化合物 17>

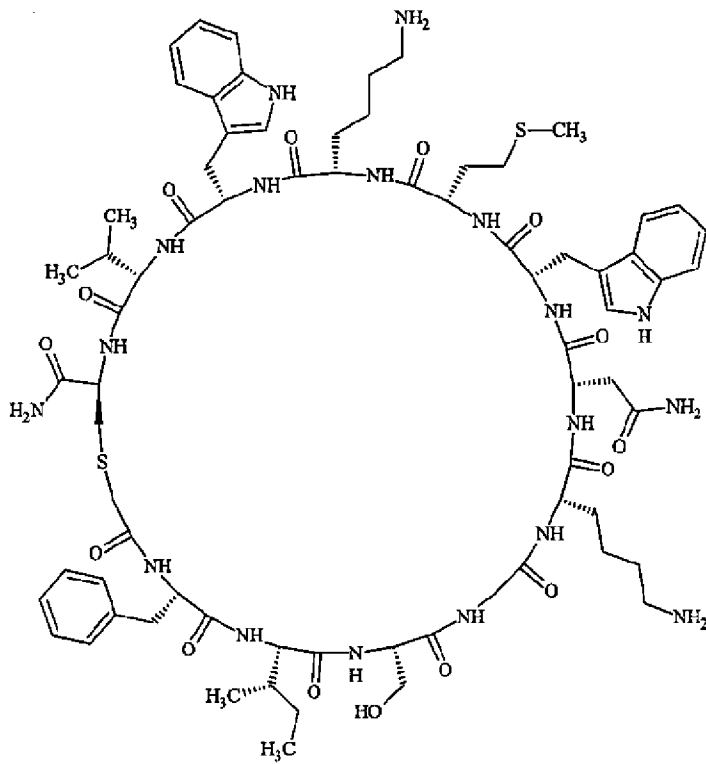


<化合物 18>

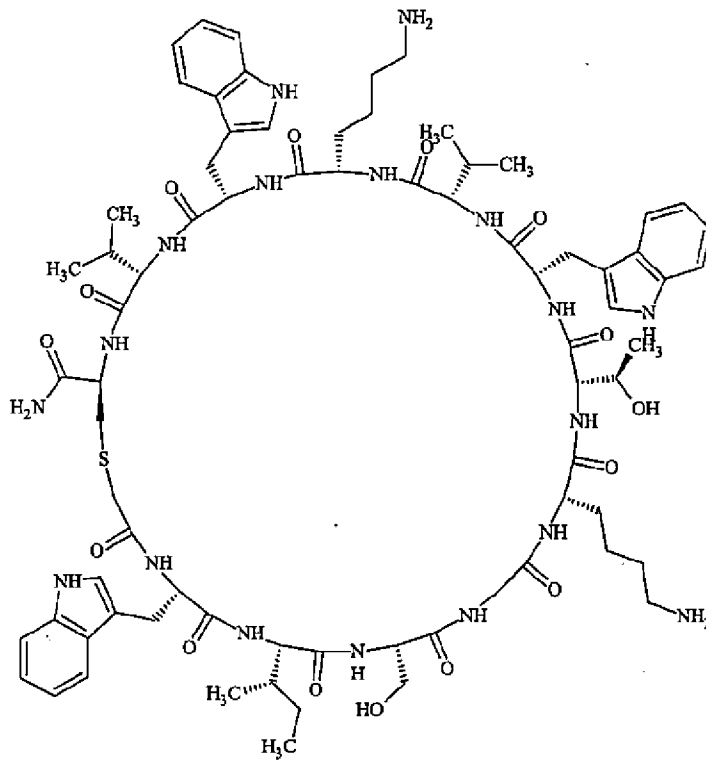


[0251] [化88]

<化合物19>

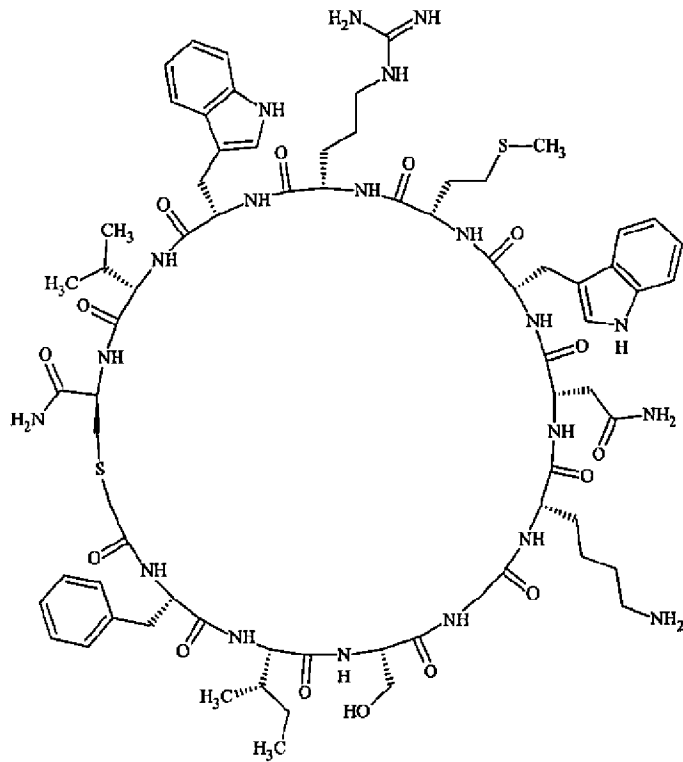


<化合物20>

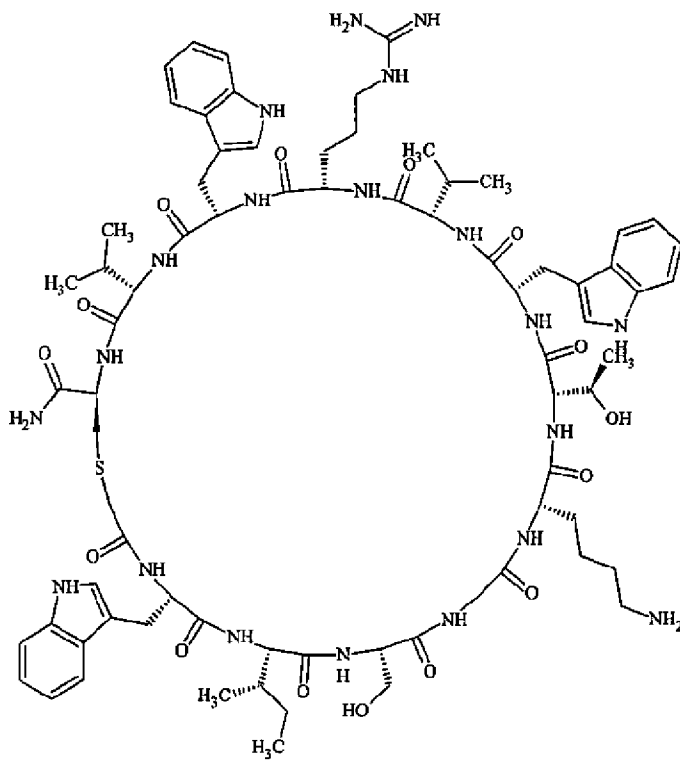


[0252] [化89]

<化合物 2 1>

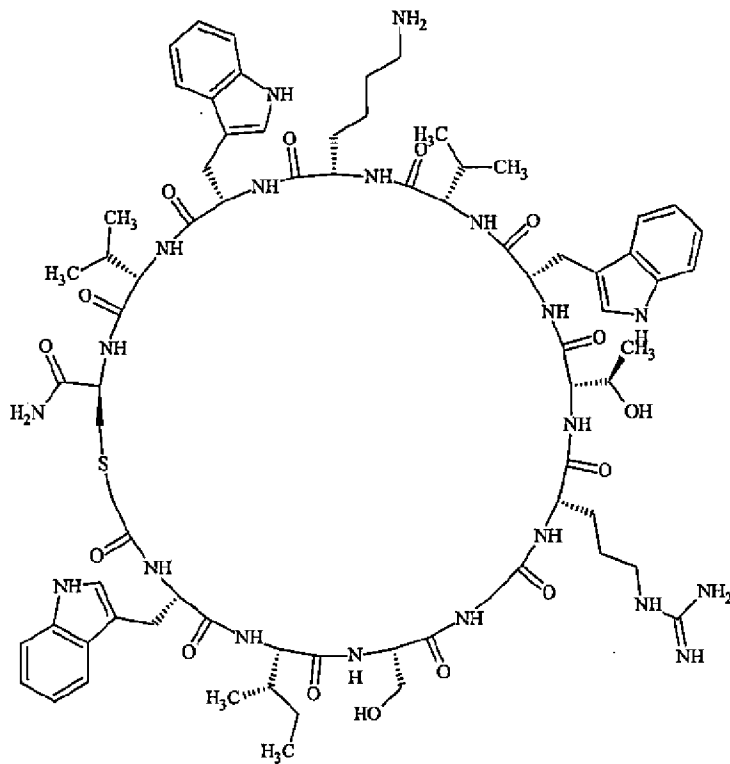


<化合物 2 2>

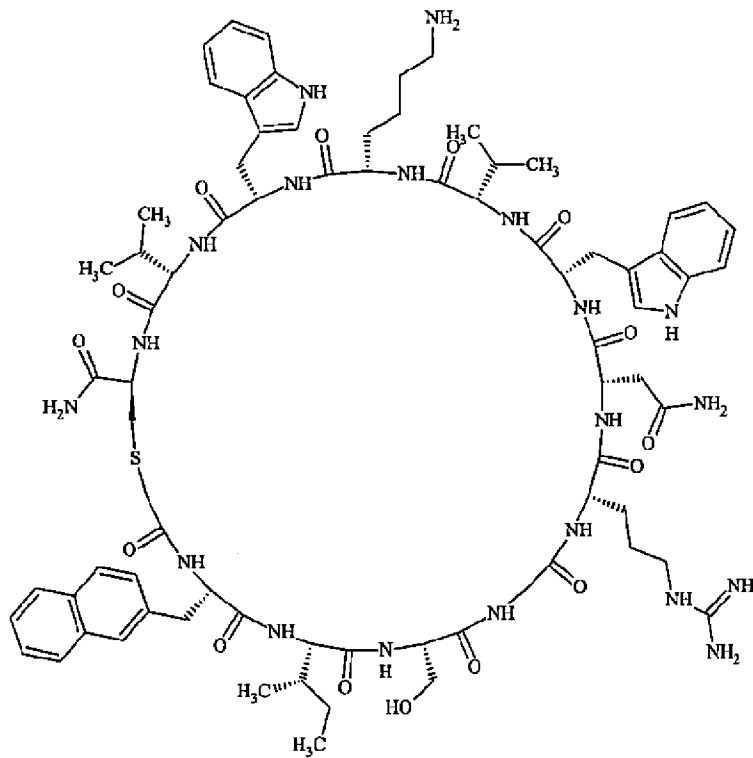


[0253] [化90]

<化合物 2 3>

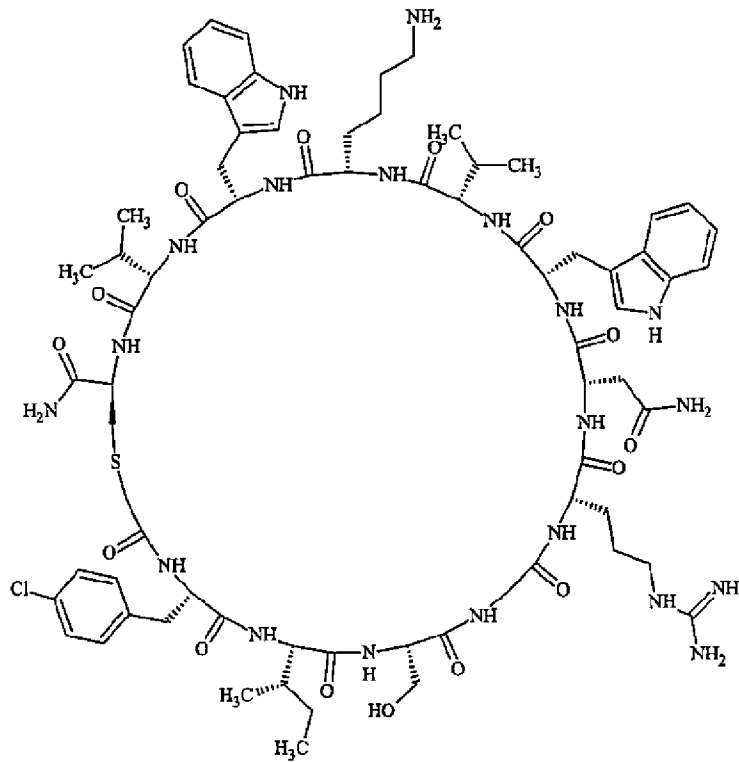


<化合物 2 4>

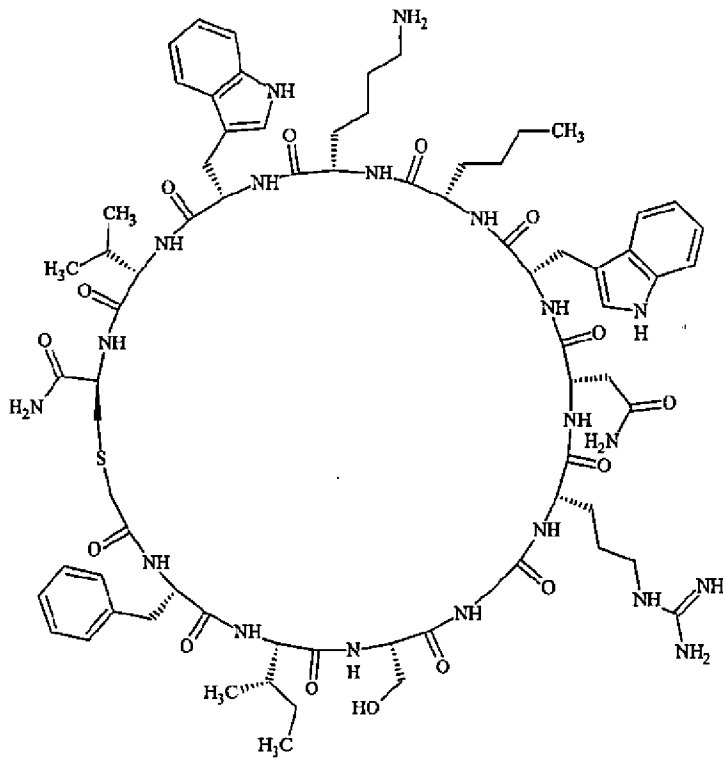


[0254] [化91]

<化合物 2 5>

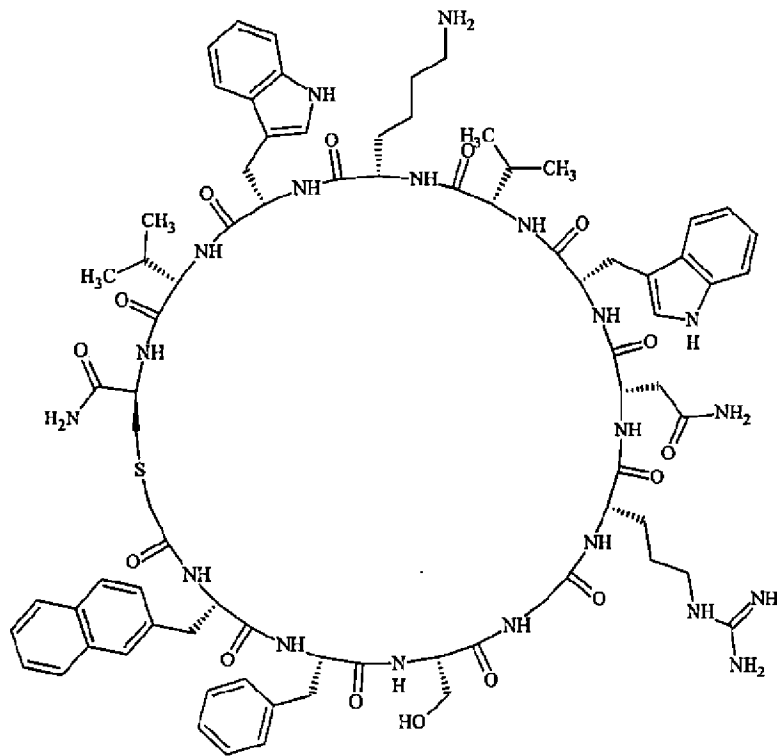


<化合物 2 6>

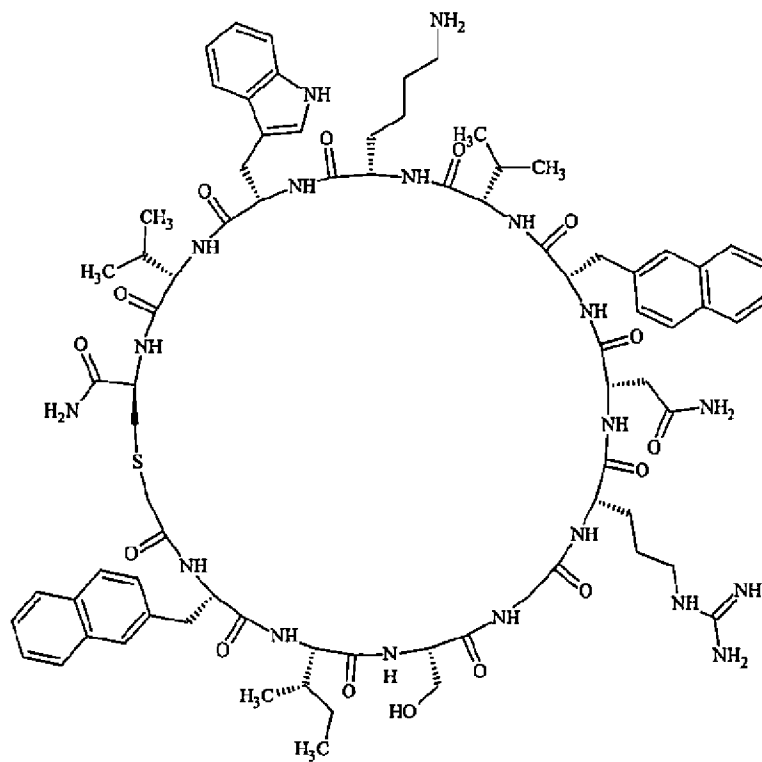


[0255] [化92]

<化合物 27>

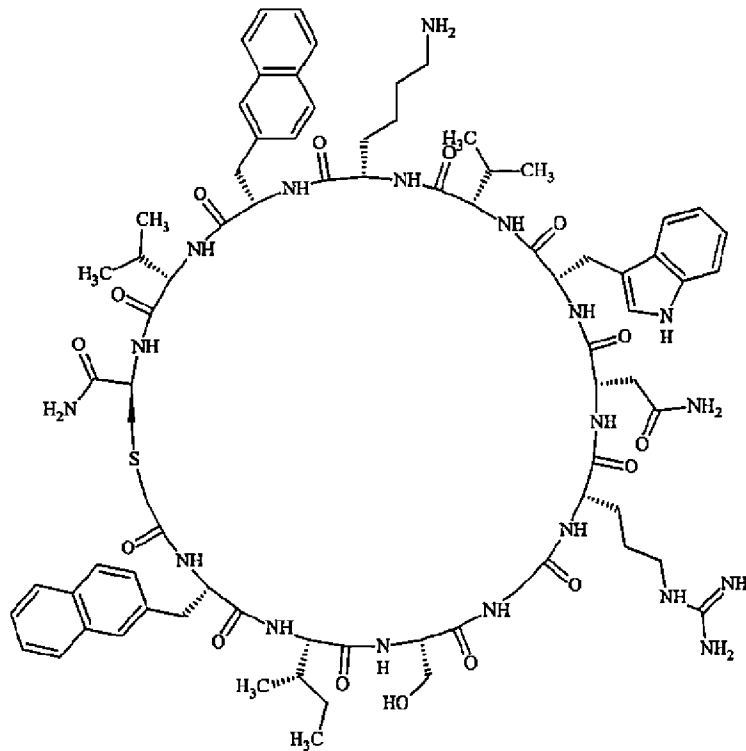


<化合物 28>

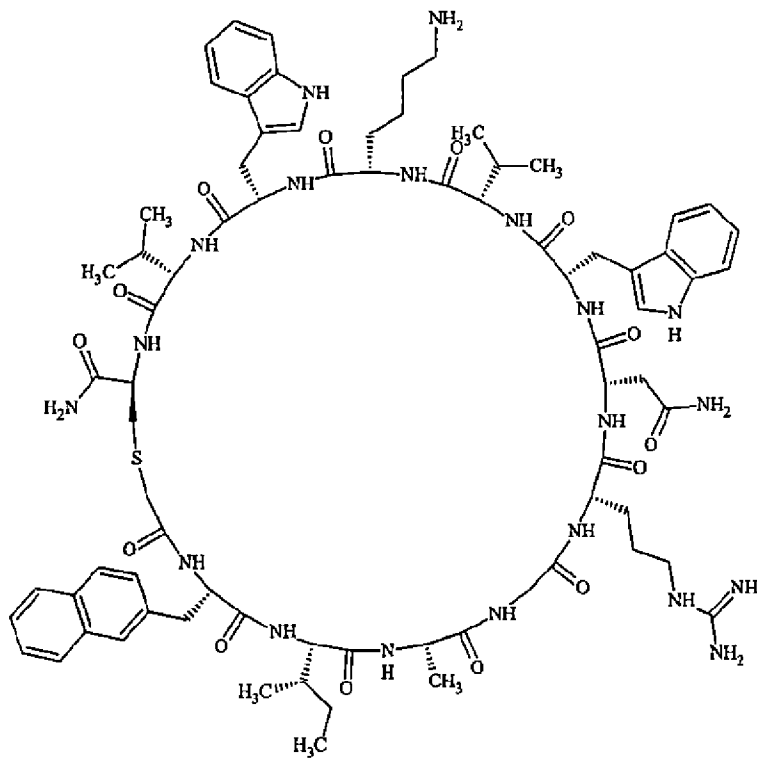


[0256] [化93]

<化合物 29>

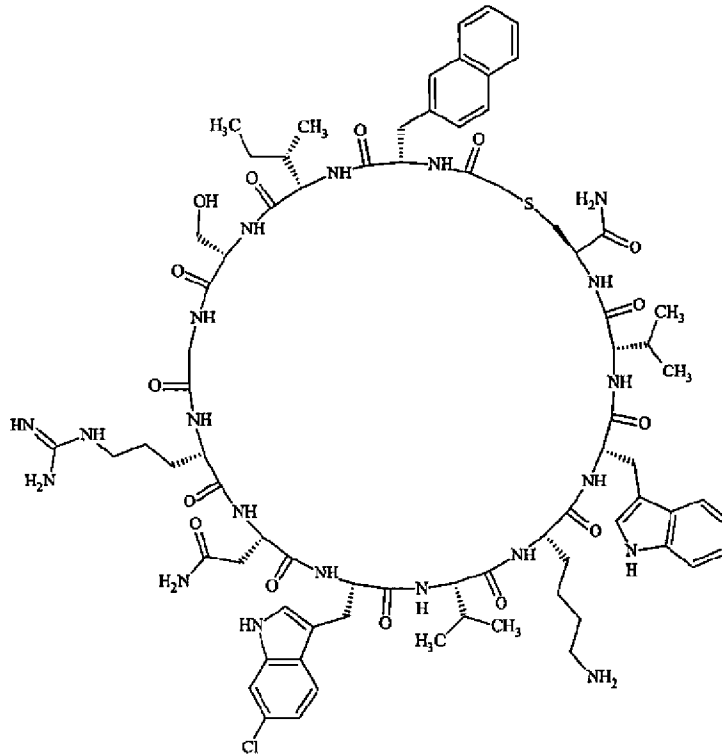


<化合物 30>

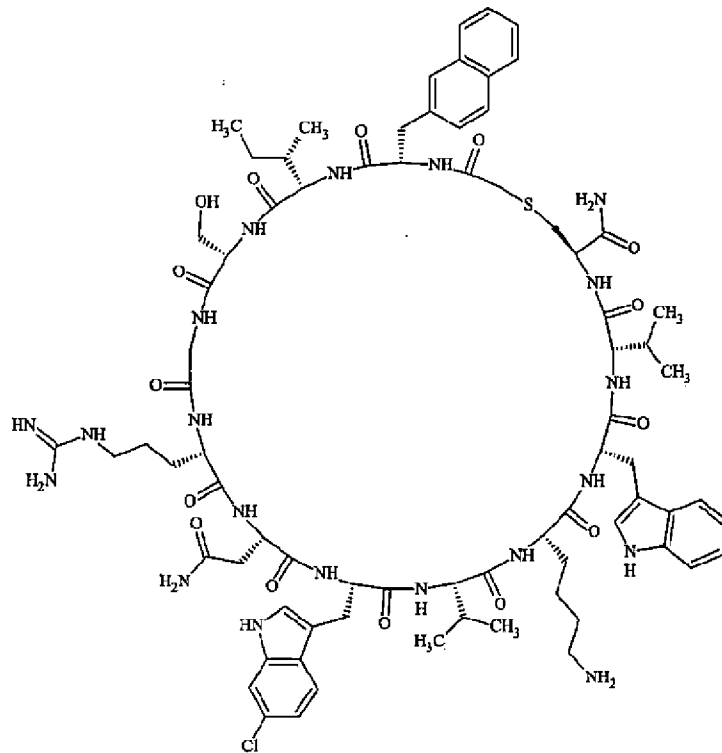


[0259] [化96]

<化合物 3 5 >

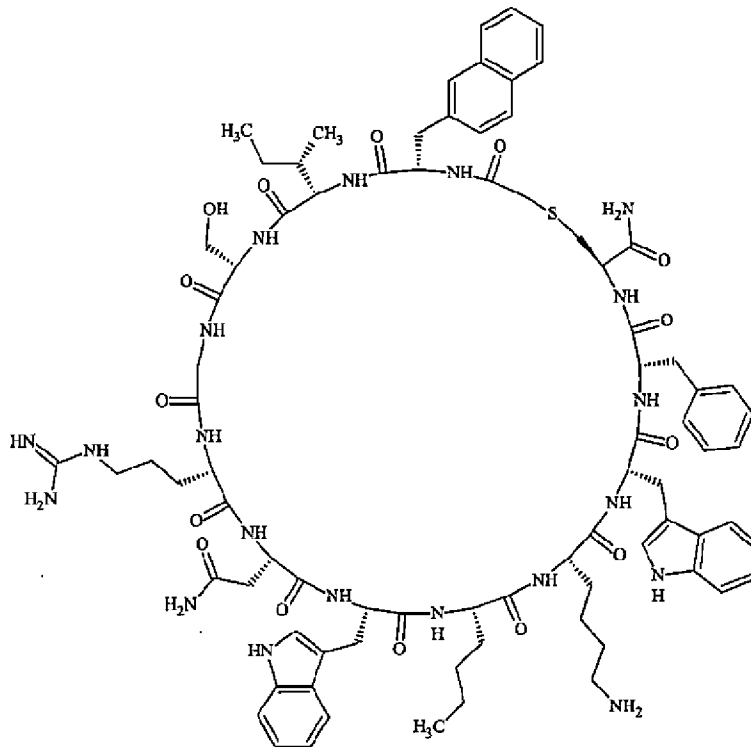


<化合物 3 6 >

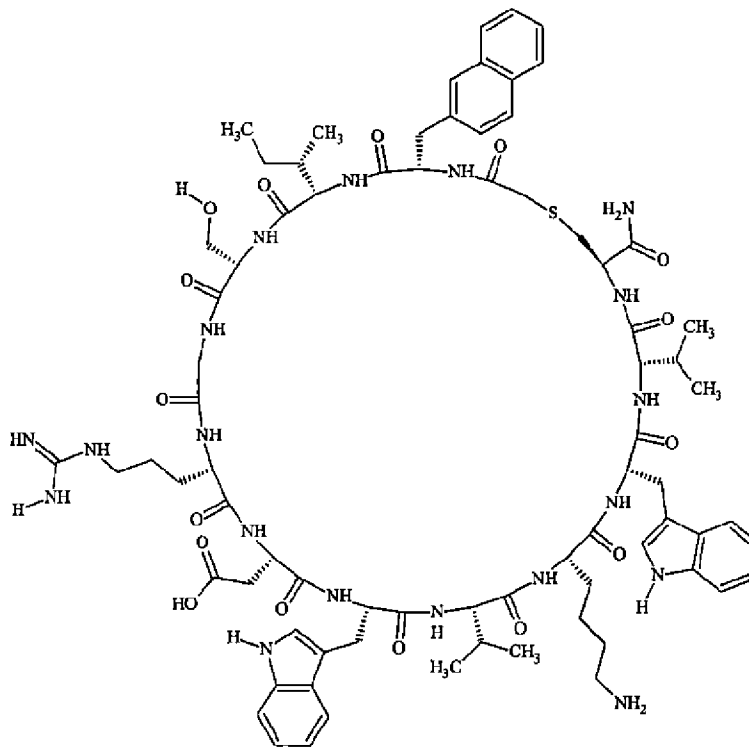


[0261] [化98]

<化合物39>

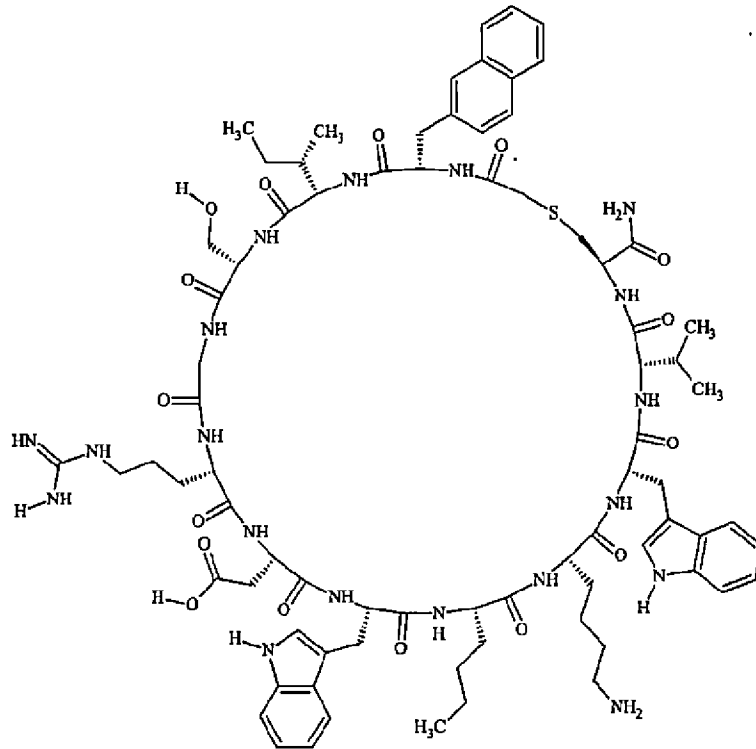


<化合物40>

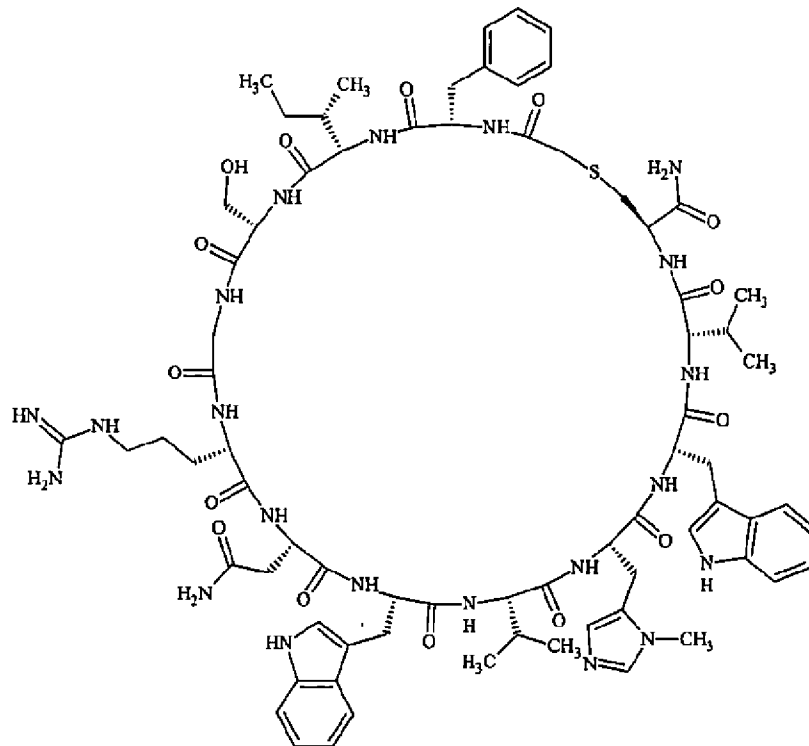


[0264] [化101]

<化合物 4 5>

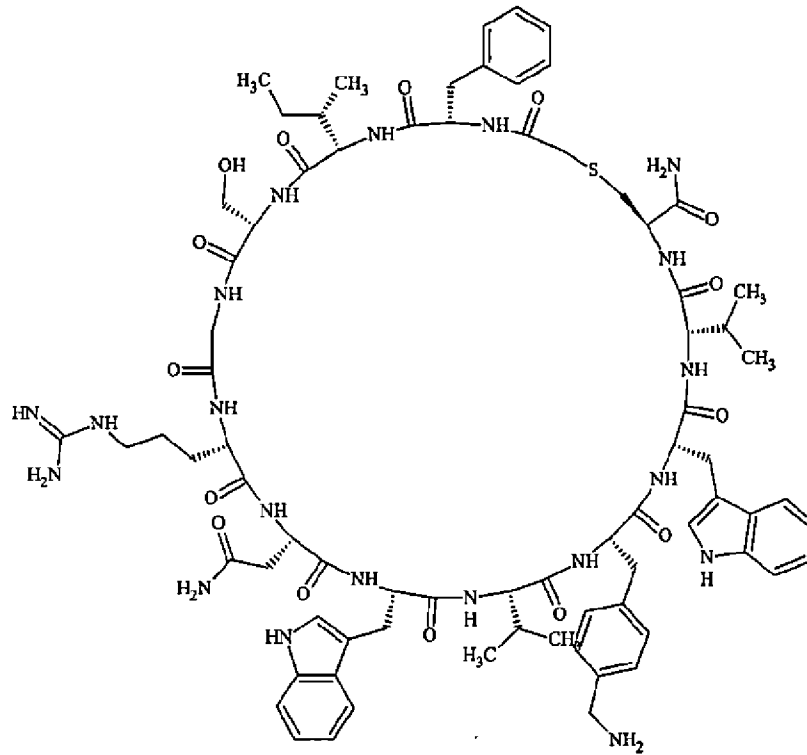


<化合物 4 6>

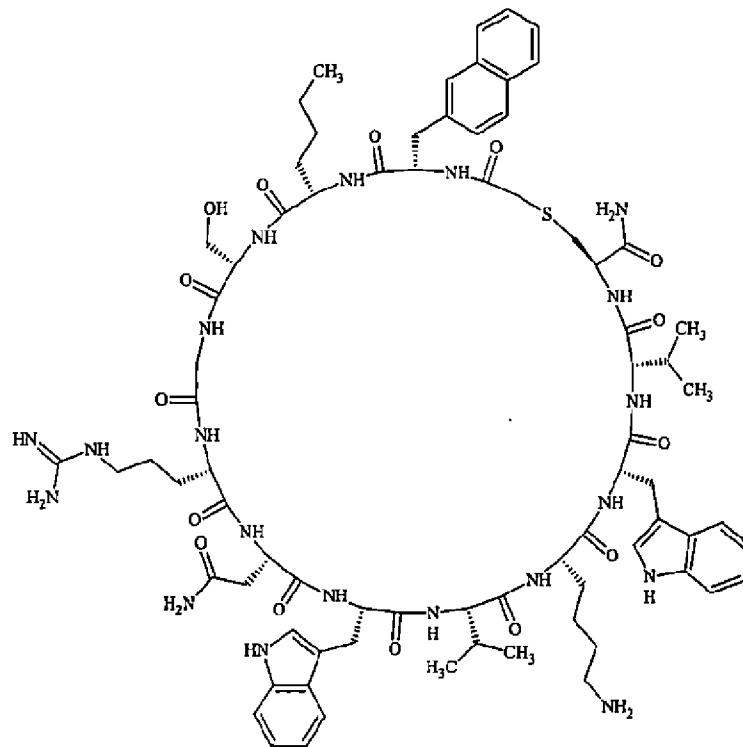


[0265] [化102]

<化合物47>

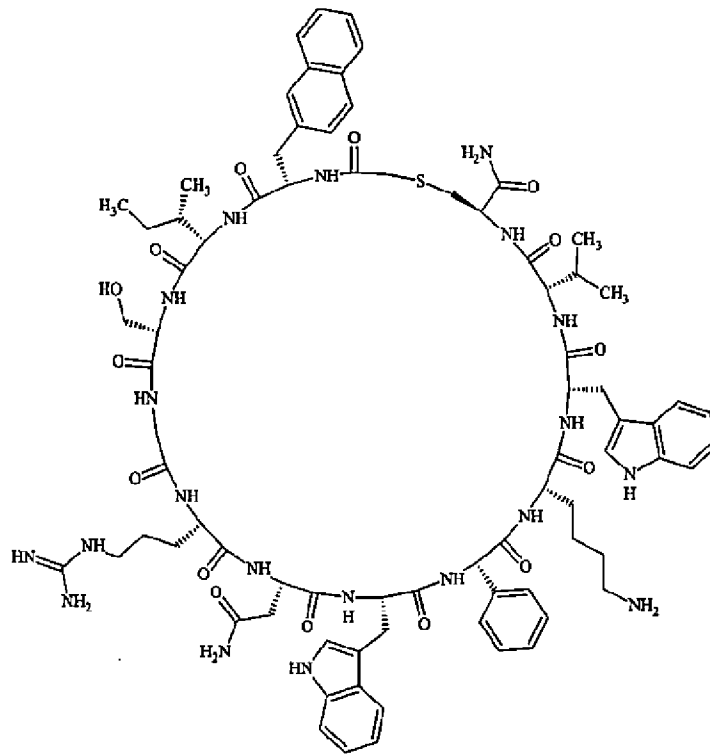


<化合物48>

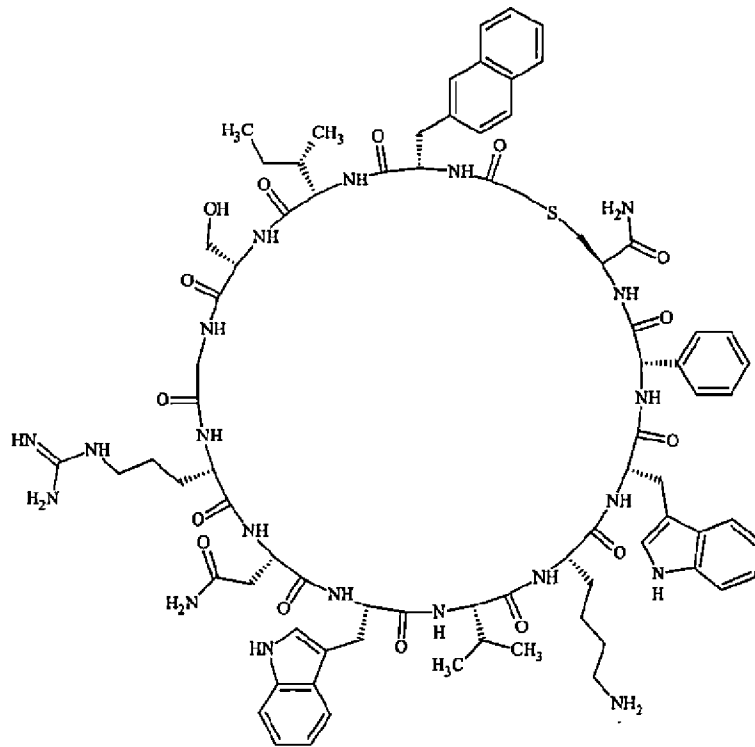


[0267] [化104]

<化合物 5 1>

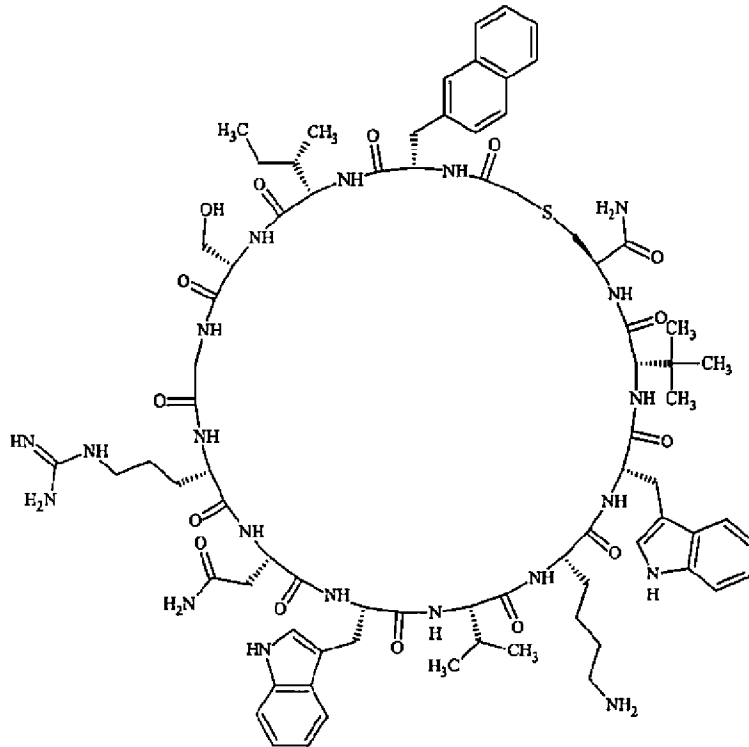


<化合物 5 2>

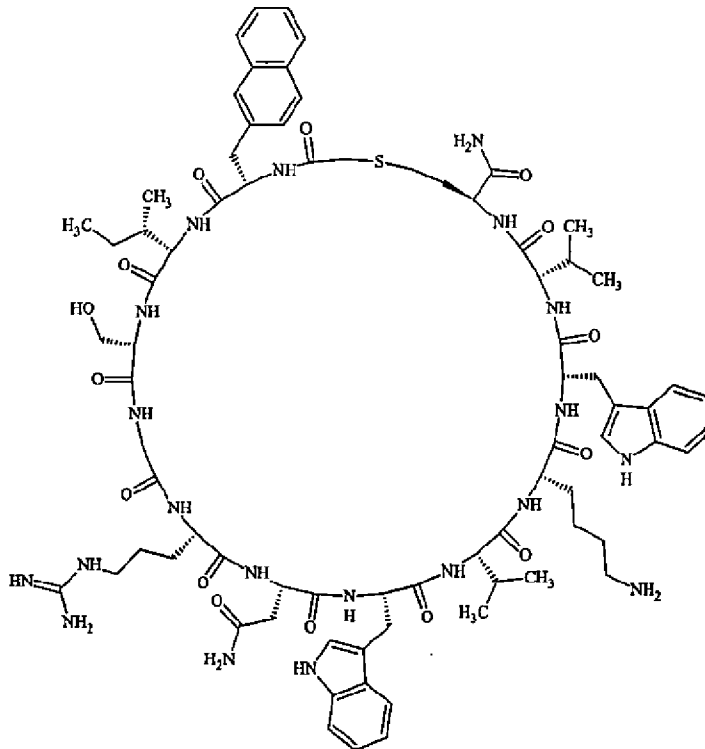


[0268] [化105]

<化合物 5 3>

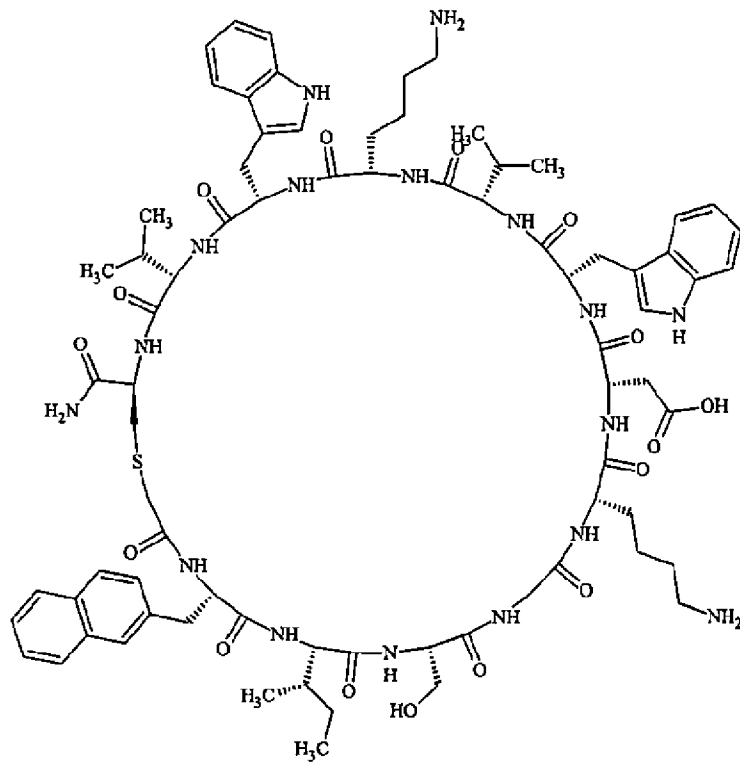


<化合物 5 4>

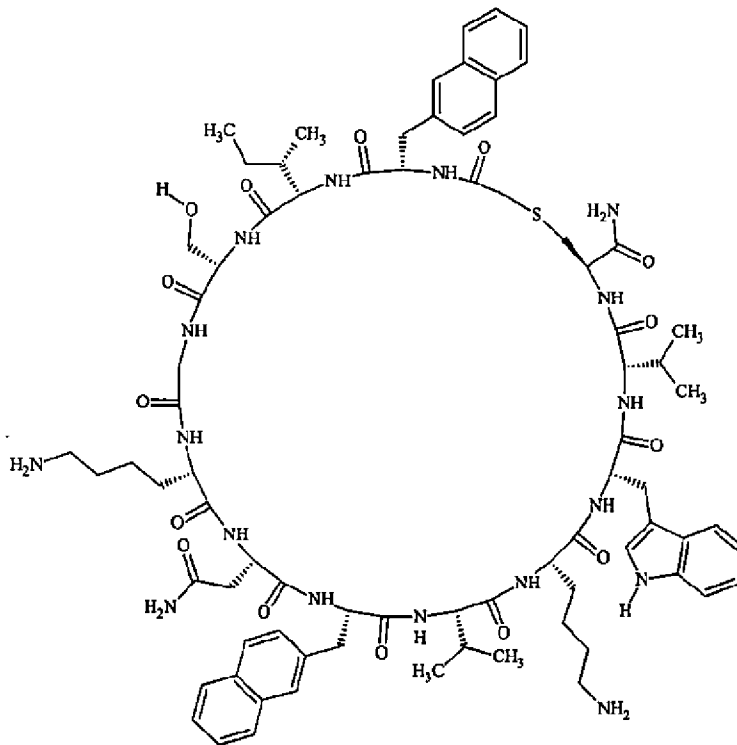


[0269] [化106]

<化合物 5 5>

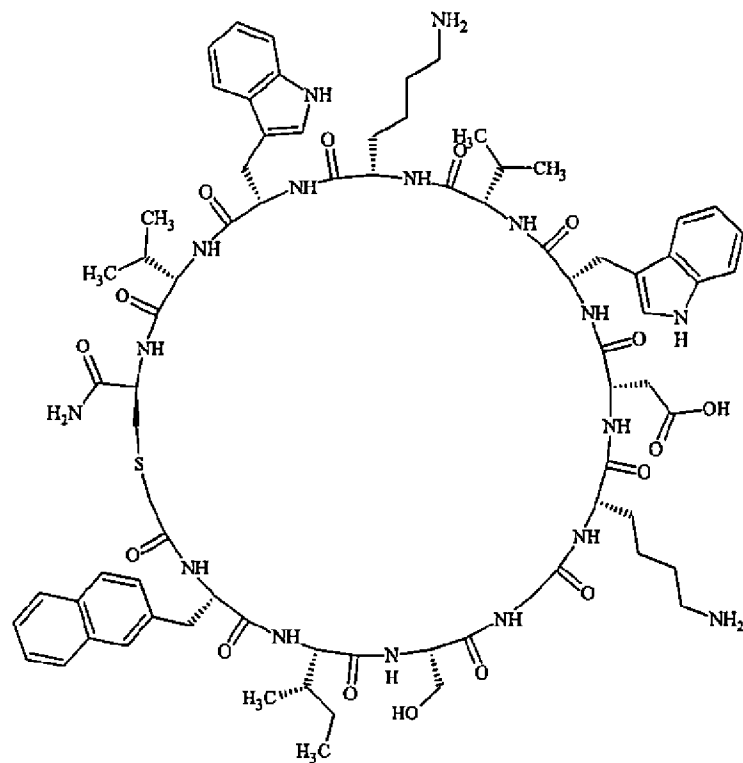


<化合物 5 6>

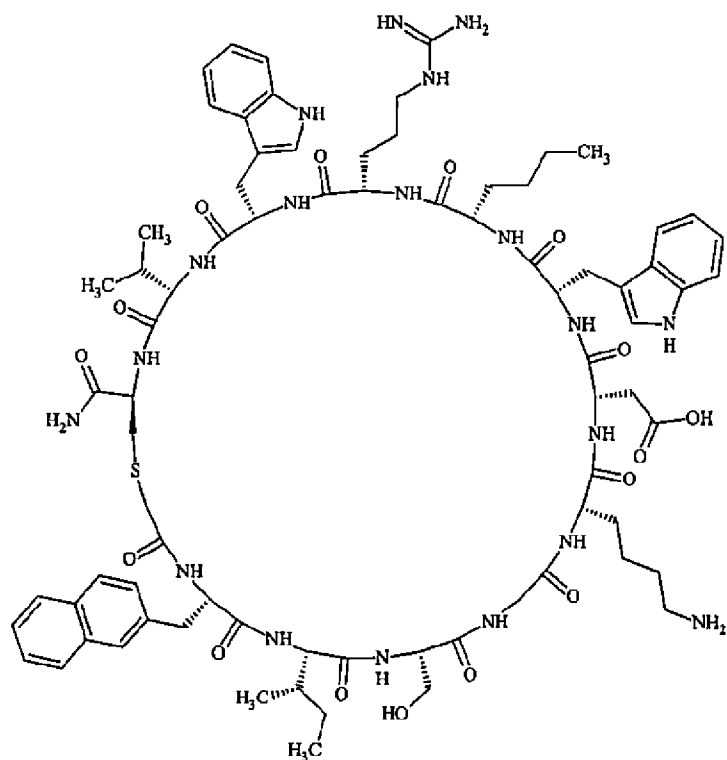


[0270] [化107]

<化合物57>

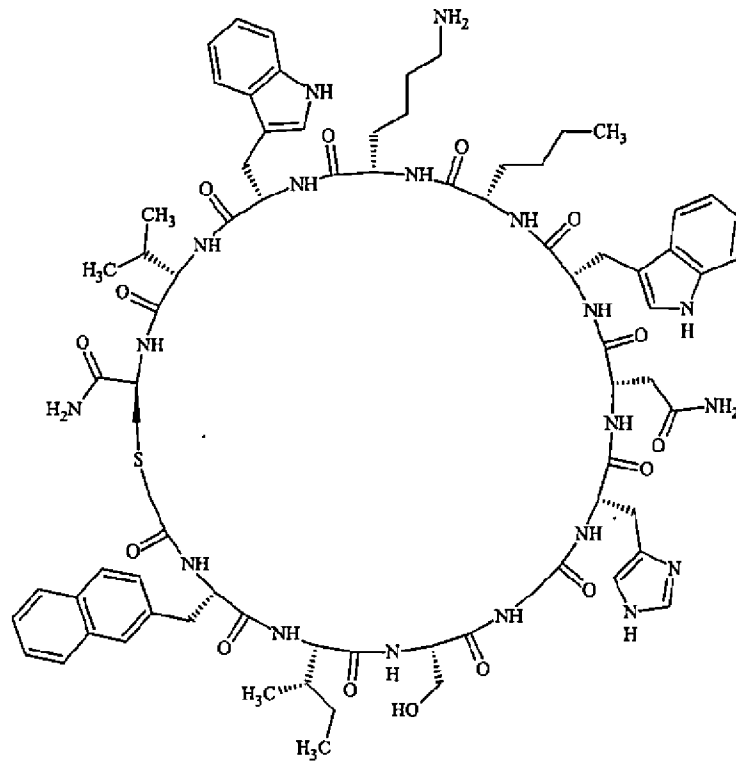


<化合物58>

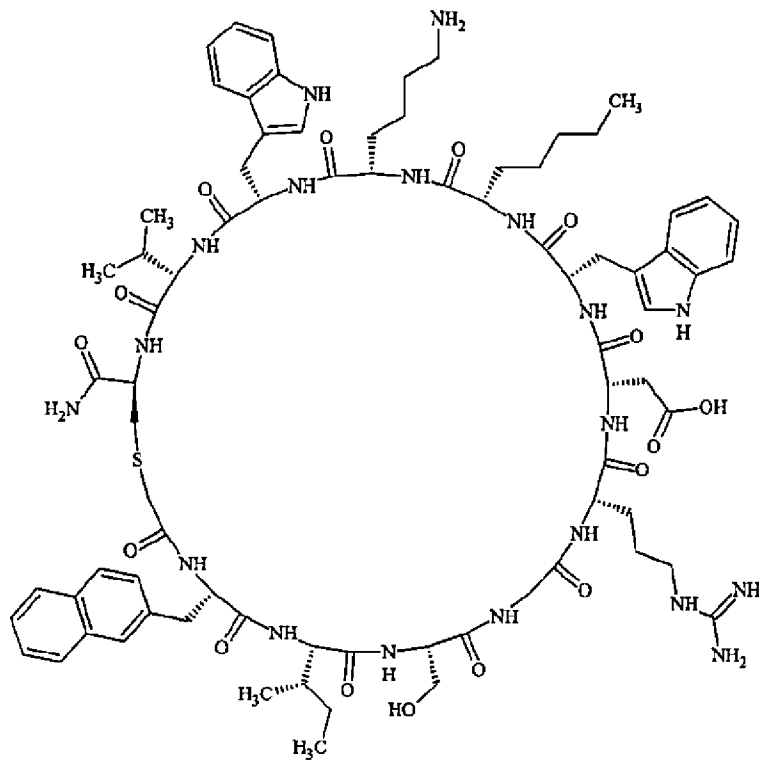


[0271] [化108]

<化合物59>

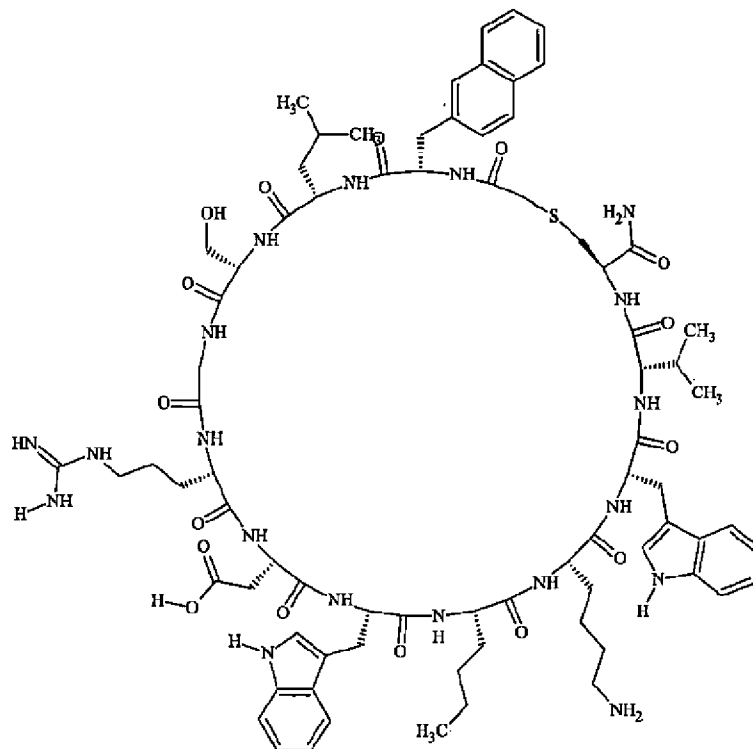


<化合物60>

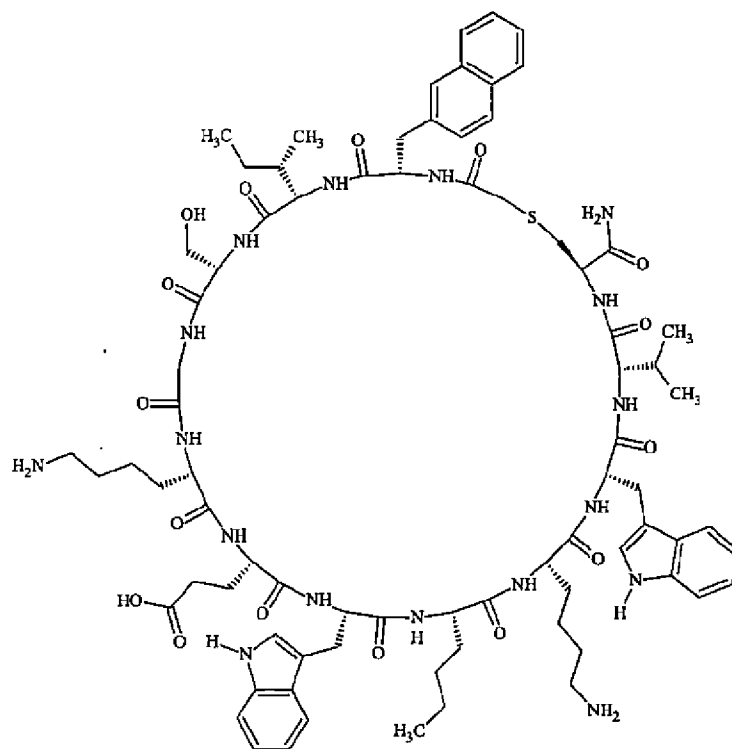


[0273] [化110]

<化合物6 3>

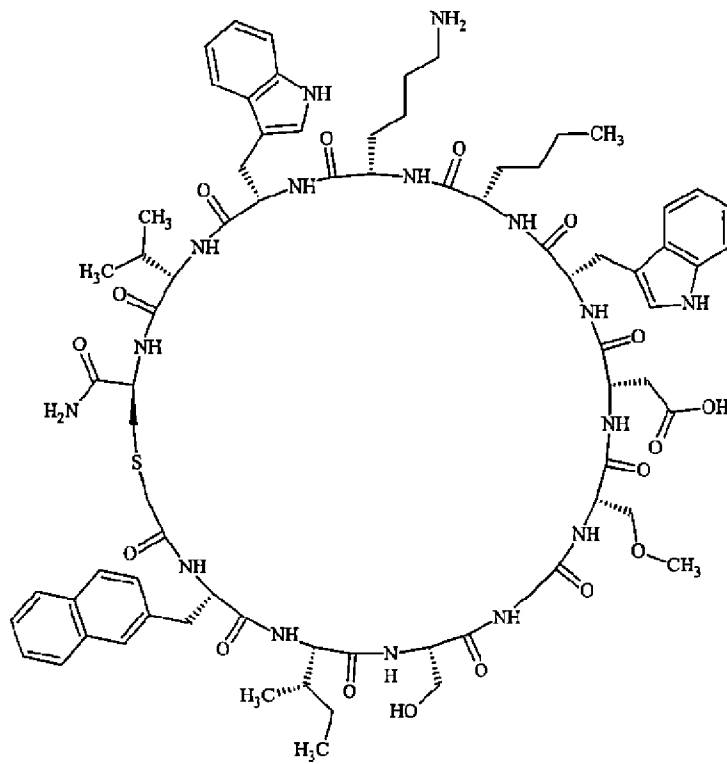


<化合物6 4>

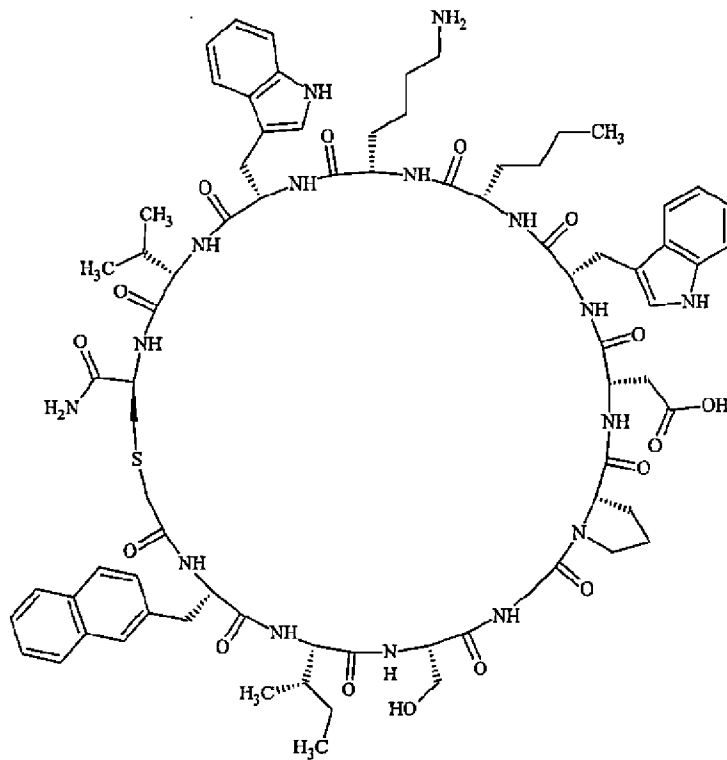


[0275] [化112]

<化合物 6 7>

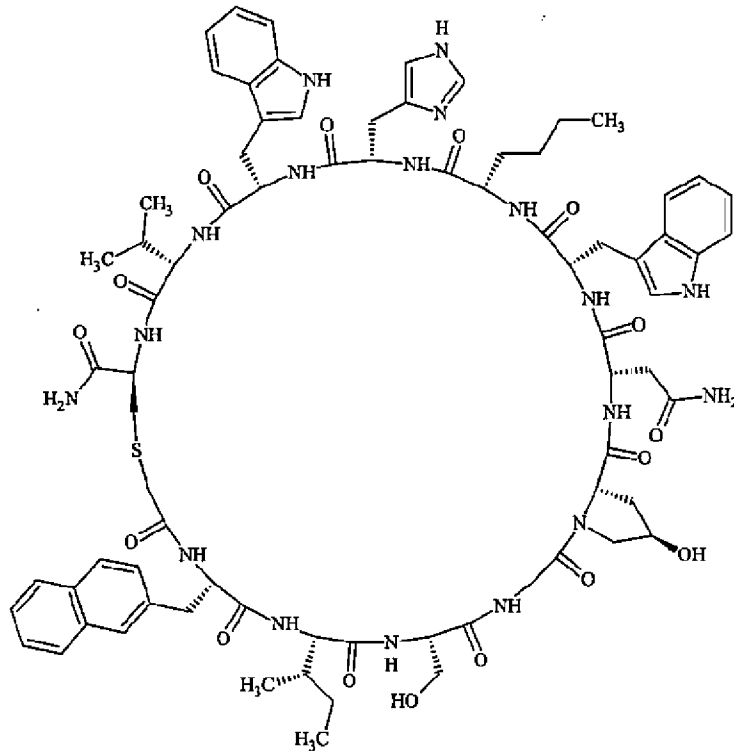


<化合物 6 8>

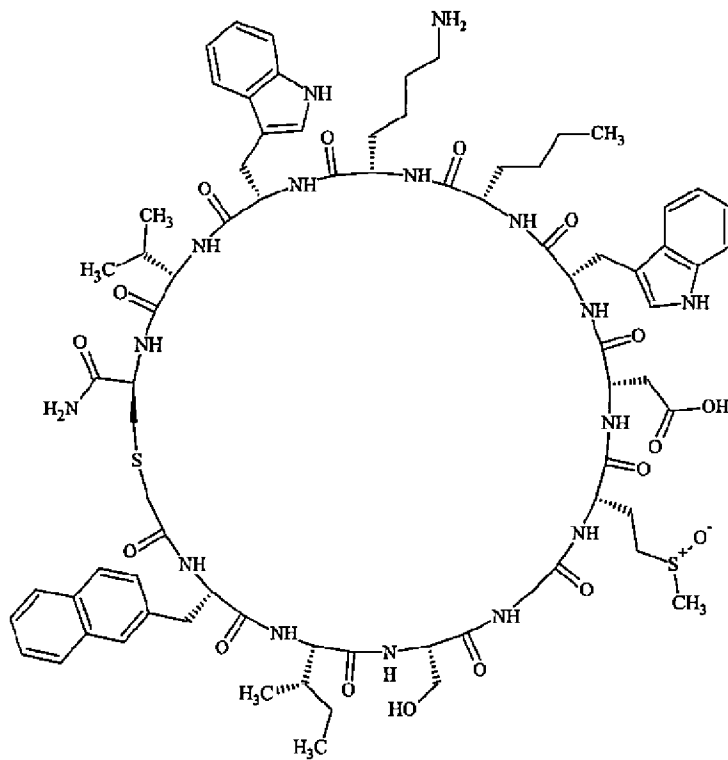


[0276] [化113]

<化合物69>

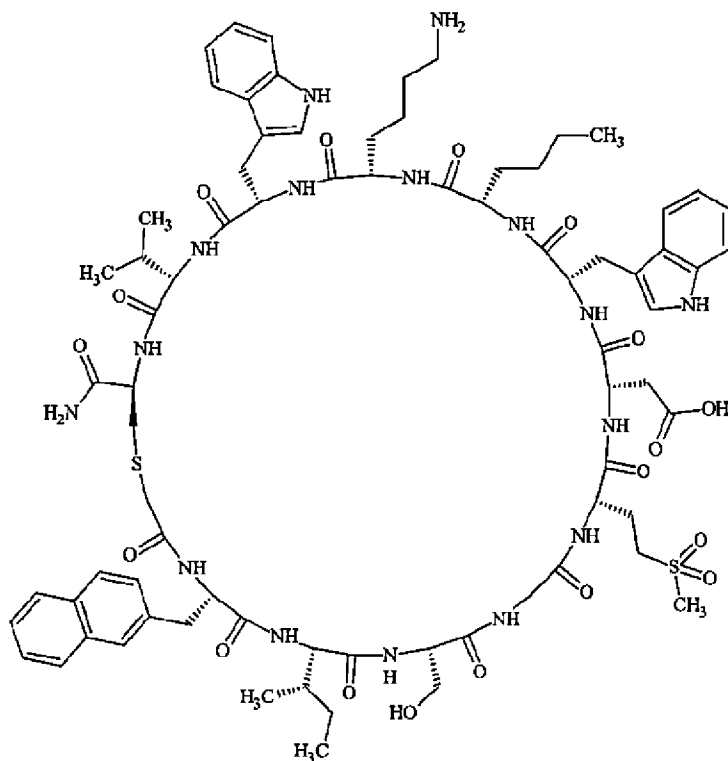


<化合物70>

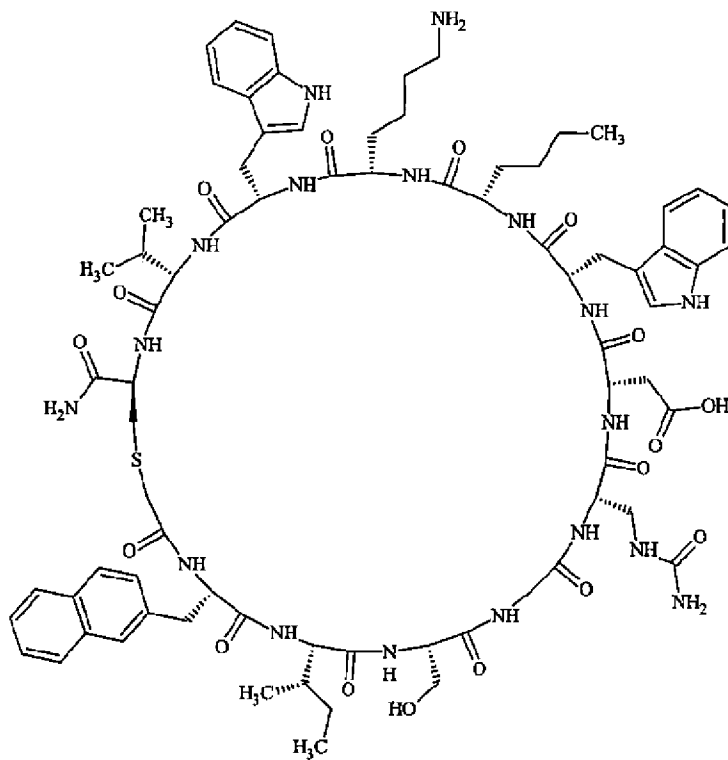


[0277] [化114]

<化合物 7 1>

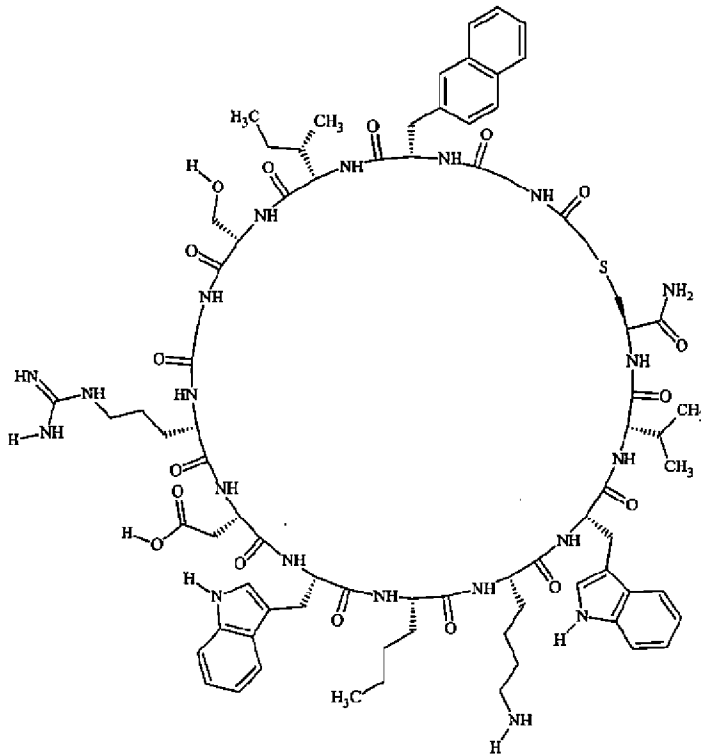


<化合物 7 2>

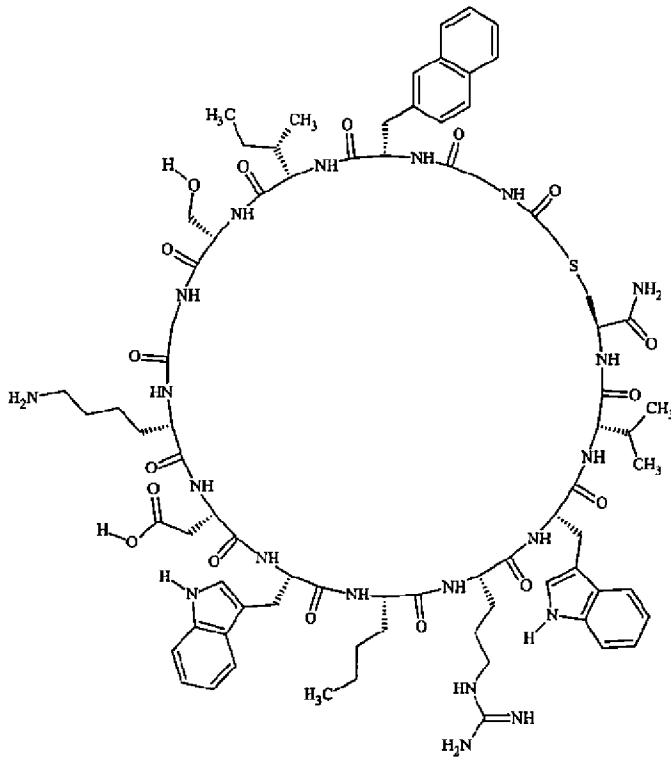


[0279] [化116]

<化合物75>

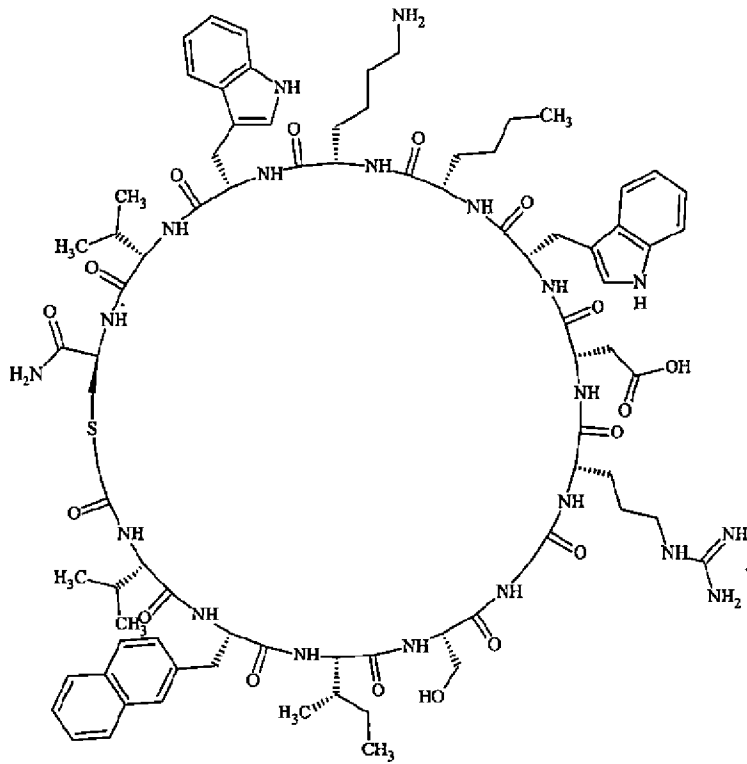


<化合物76>

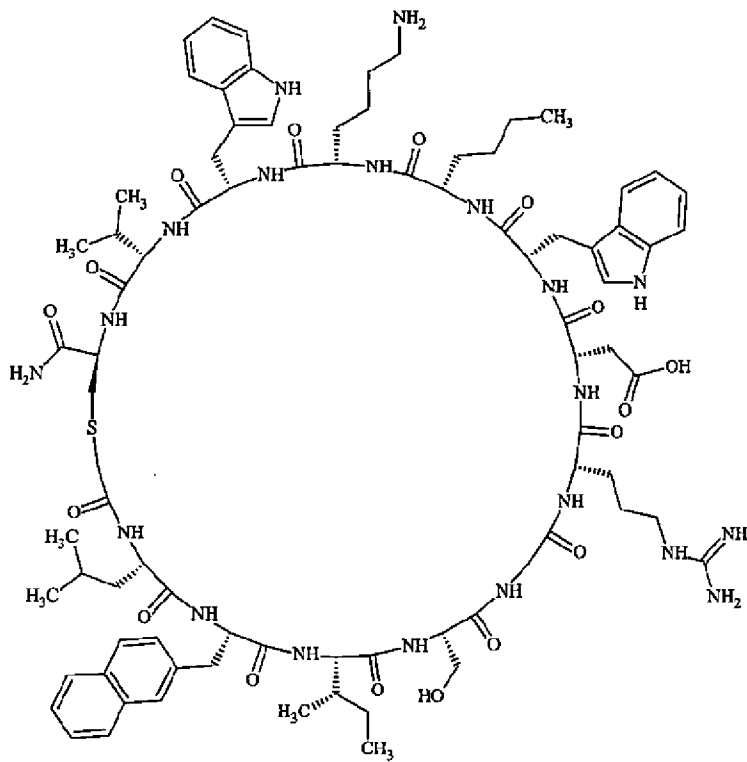


[0282] [化119]

<化合物 8 1>

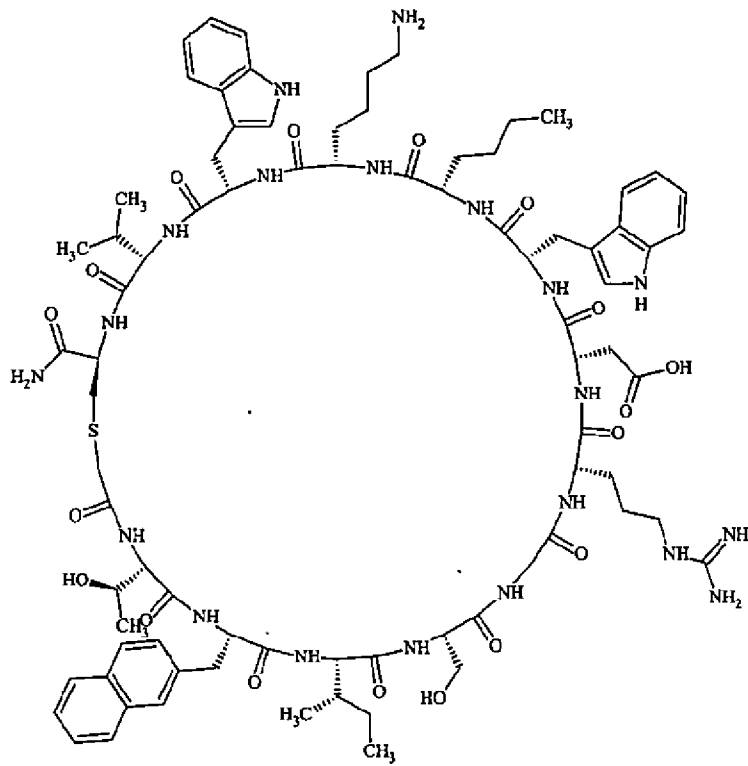


<化合物 8 2>

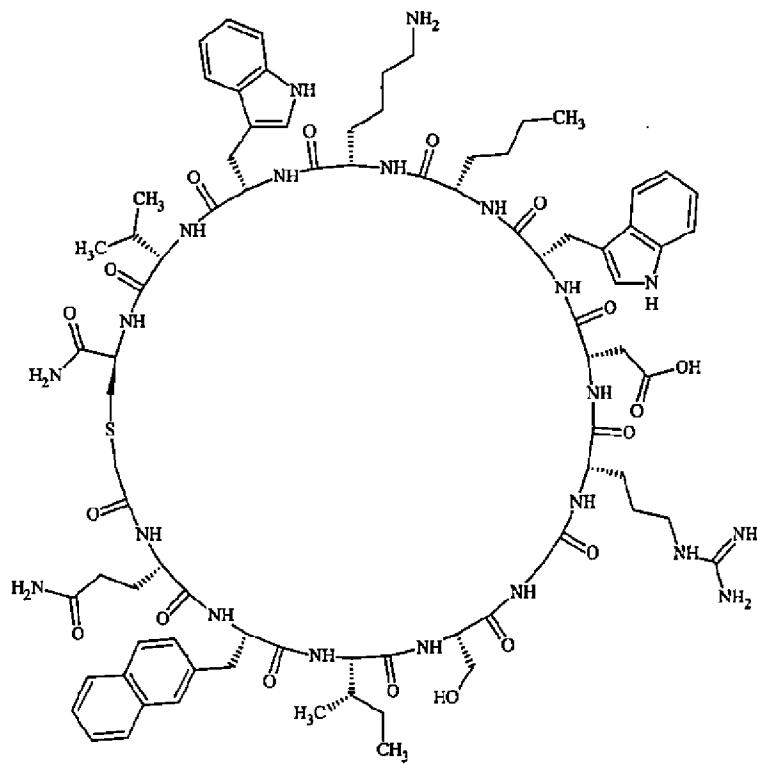


[0284] [化121]

<化合物 8 5>

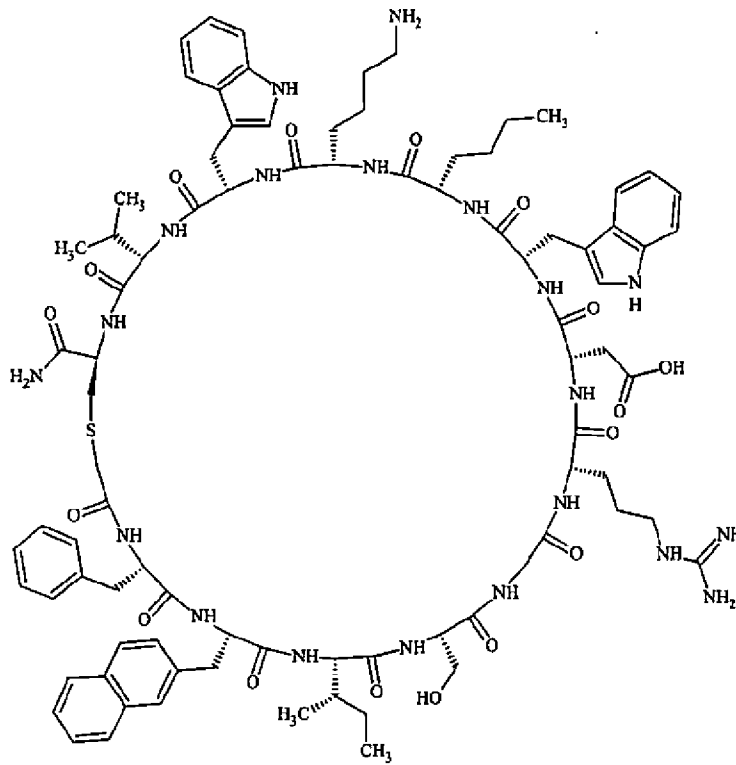


<化合物 8 6>

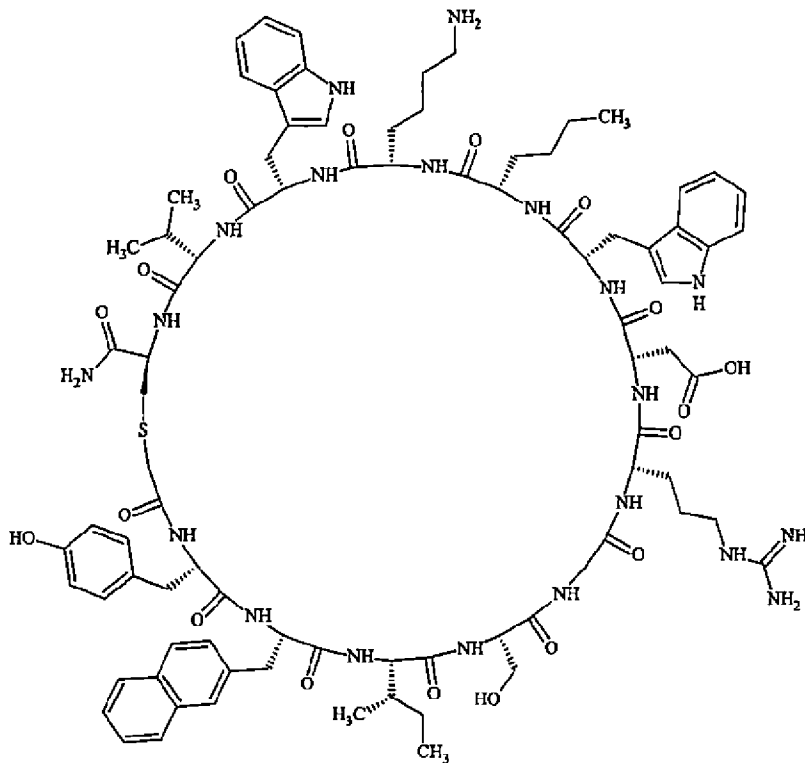


[0285] [化122]

<化合物 87>

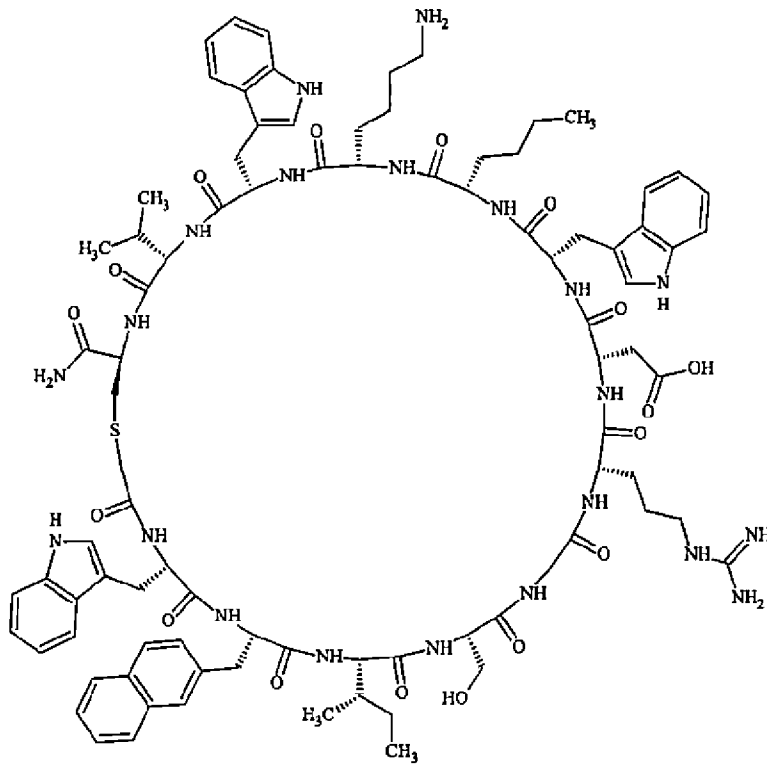


<化合物 88>

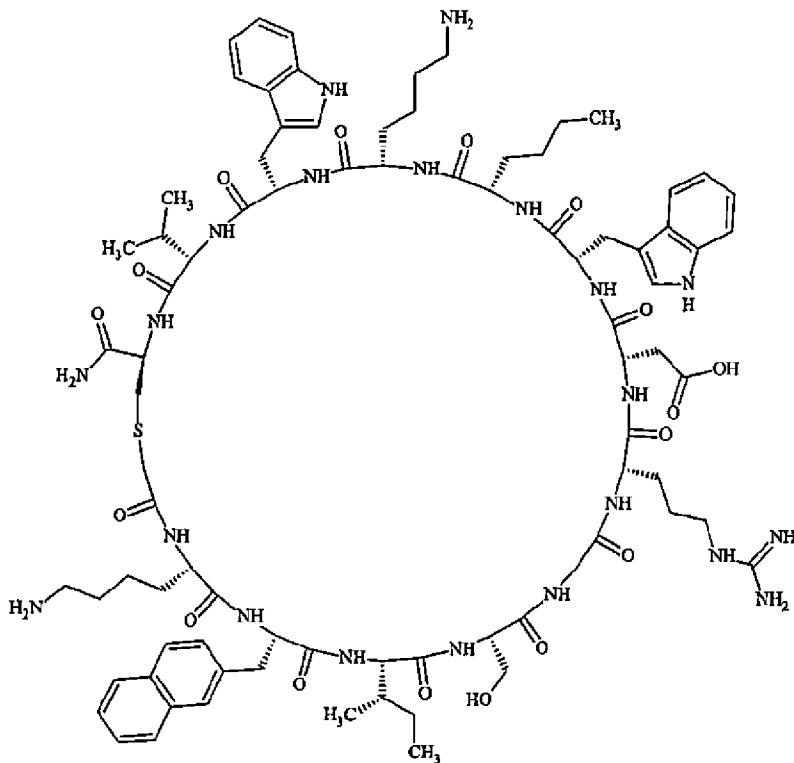


[0286] [化123]

<化合物 8 9>

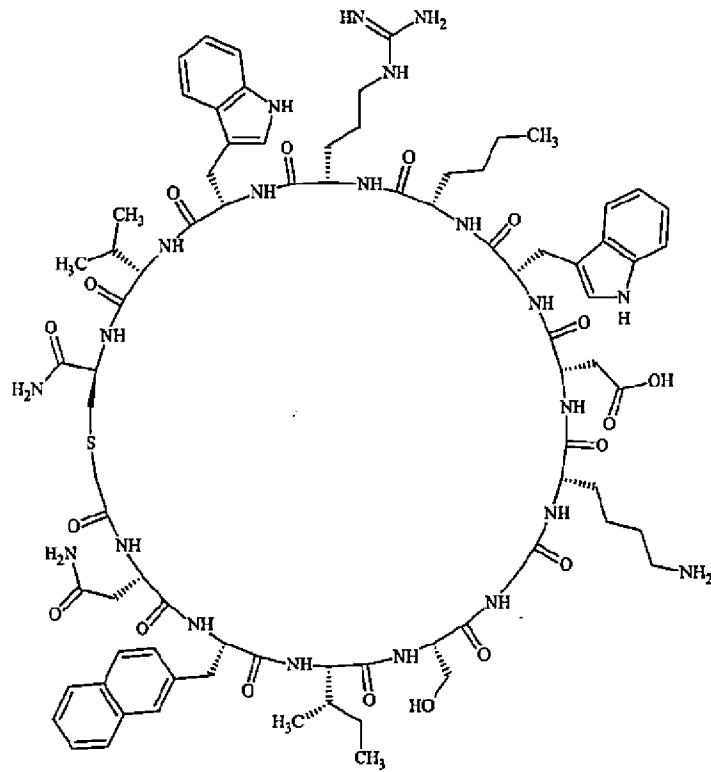


<化合物 9 0>

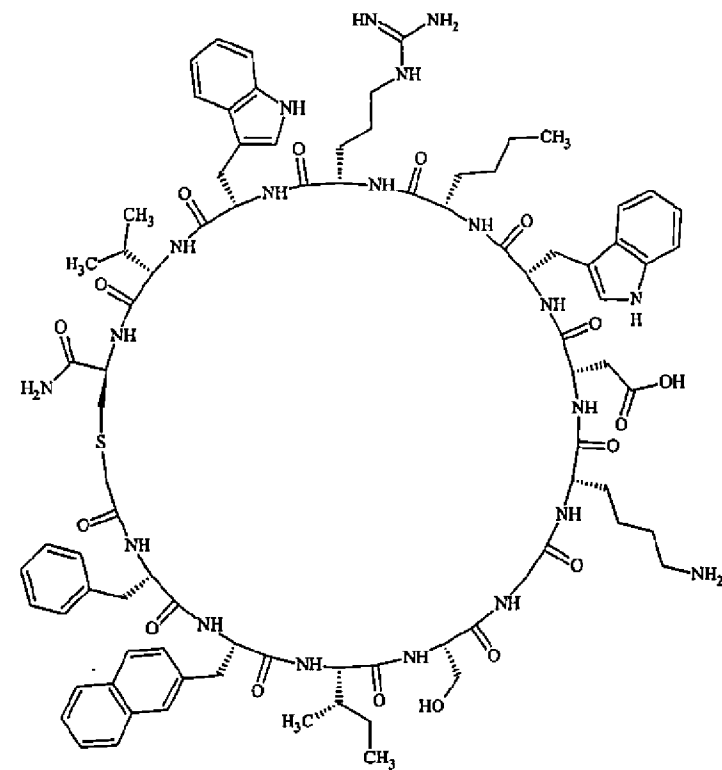


[0288] [化125]

<化合物 9 3>

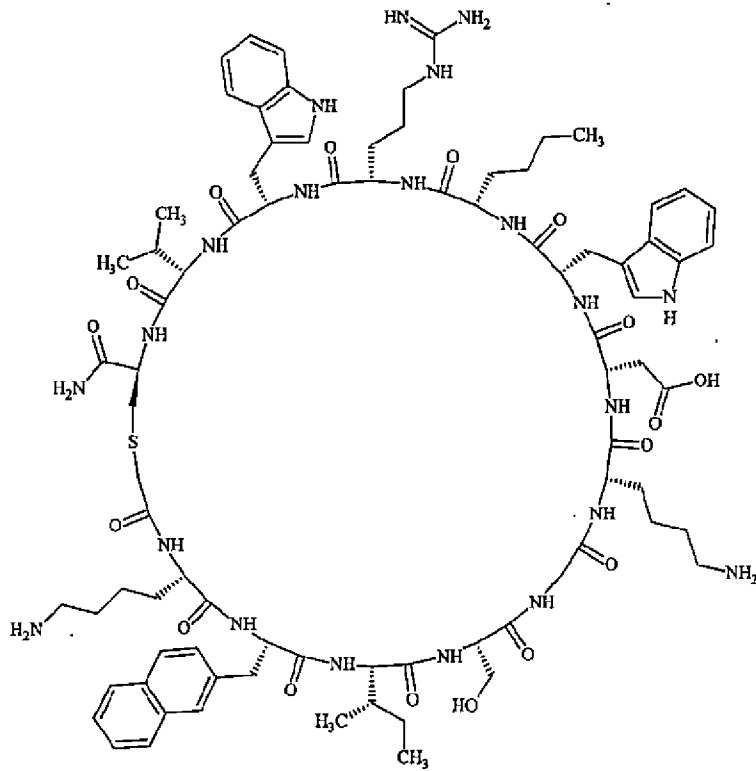


<化合物 9 4>

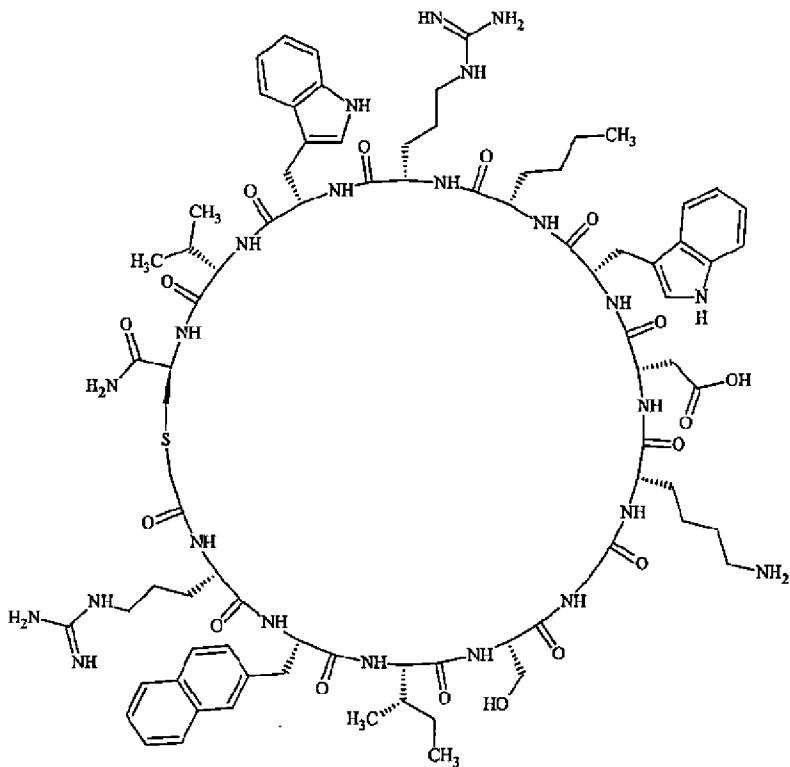


[0289] [化126]

<化合物95>

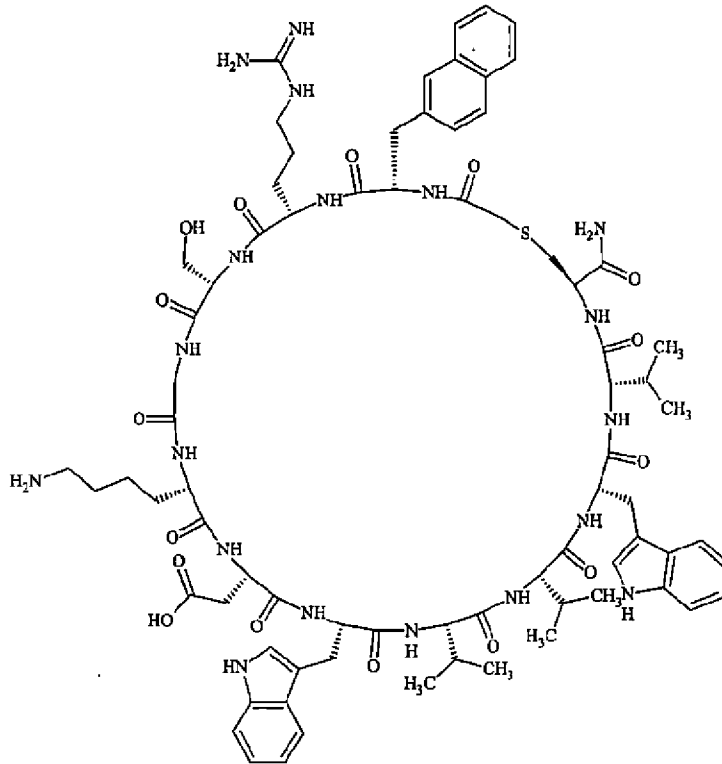


<化合物96>

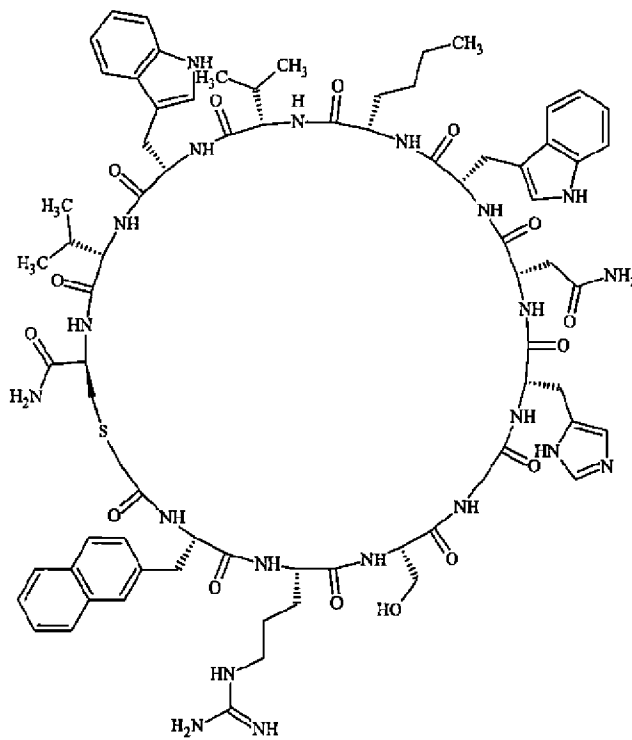


[0291] [化128]

<化合物 99>



<化合物 100>



[0294] また実施例 1 ~ 104 の大環状ポリペプチドを構成する残基を表 1 ~ 4 に示す。表中の 13 番目のアミノ酸は、連結基を構成するアミノ酸であり、その C 末端はアミド基に変換されている。

[0295]

[表1]

化合物	N系	C系	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Cell adhesion IC50 (nM)	SPR hTSP1 Kd(nM)
1	QAC	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	34.9	0.51
2	QAC	NH2		F	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	25.5	0.15
3	QAC	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	20.8	0.25
4	QAC	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	R	W	V	C	11.2	0.26
5	QAC	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	R	W	R	C	33.4	0.9
6	QAC	NH2		F	R	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	27.3	0.44
7	QAC	NH2		F	I	S	G	K	N	W	V	K	W	V	C	20.6	0.12
8	QAC	NH2		F	R	S	G	R	N	W	V	R	W	V	C	33.4	
9	QAC	NH2		W	I	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	27.3	0.23
10	QAC	NH2		F	I	S	G	K	N	W	V	R	W	V	C	10.9	0.091
11	QAC	NH2		W	I	S	G	R	N	W	V	R	W	V	C	26.3	0.14
12	QAC	NH2		F	I	T	G	R	N	W	V	K	W	V	C	22.2	0.38
13	QAC	NH2		F	I	S	G	R	T	W	V	K	W	V	C	18.7	0.096
14	QAC	NH2		F	I	PS	G	R	N	W	V	K	W	V	C	21.4	
15	SS	NH2	C	F	I	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	23.2	
16	QAC	NH2		W	I	S	G	K	N	W	V	K	W	V	C	21	
17	QAC	NH2		F	I	T	G	K	N	W	V	K	W	V	C	17.7	
18	QAC	NH2		F	I	S	G	K	T	W	V	K	W	V	C	13	
19	QAC	NH2		F	I	S	G	K	N	W	M	K	W	V	C	14.1	
20	QAC	NH2		W	I	S	G	K	T	W	V	K	W	V	C	13.1	
21	QAC	NH2		F	I	S	G	K	N	W	M	R	W	V	C	21.3	
22	QAC	NH2		W	I	S	G	K	T	W	V	R	W	V	C	20.3	
23	QAC	NH2		W	I	S	G	R	T	W	V	K	W	V	C	18.6	
24	QAC	NH2		ZnI	I	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	6.1	0.12
25	QAC	NH2		4CF	I	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	7.9	

[0296]

[表2]

26	CJAc	NH2		F	I	S	G	R	N	W	Nle	K	W	V	C	7	
27	CJAc	NH2		2Nal	F	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	32.8	
28	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	2Nal	V	K	W	V	C	29.4	0.55
29	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	V	K	2Nal	V	C	17.5	
30	CJAc	NH2		2Nal	I	A	G	R	N	W	V	K	W	V	C	16.7	
31	CJAc	NH2		2Nal	4CF	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	32.5	
32	CJAc	NH2		2Nal	HF	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	25.9	
33	CJAc	NH2		2Nal	W	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	20.7	
34	CJAc	NH2		DCF	2Nal	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	28.1	
35	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	6CW	V	K	W	V	C	26	
36	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	V	K	6CW	V	C	17.2	
37	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	V	K	W	HF	C	19.6	
38	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	Nle	K	W	V	C	9.2	
39	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	Nle	K	W	F	C	16.3	
40	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	D	W	V	K	W	V	C	16.1	0.34
41	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	N	W	V	H	W	V	C	16.4	0.37
42	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	H	N	W	V	K	W	V	C	32	0.44
43	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	K	N	W	V	K	W	V	C	9.2	0.13
44	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	S	N	W	V	K	W	V	C	30.3	0.58
45	CJAc	NH2		2Nal	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	17.4	0.13
46	CJAc	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	3MH	W	V	C	30.3	
47	CJAc	NH2		F	I	S	G	R	N	W	V	AMF	W	V	C	16.7	
48	CJAc	NH2		2Nal	Nle	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	10.4	
49	CJAc	NH2		2Nal	Phg	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	11.5	
50	CJAc	NH2		2Nal	Tle	S	G	R	N	W	V	K	W	V	C	11.6	

[0298] [表4]

76	CIAC	NH2	G	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	12.8
77	CIAC	NH2		2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C(O)	13.6
78	CIAC	NH2		2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C(O2)	10.7
79	CIAC	NH2		2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	Pen	15
80	CIAC	NH2	A	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	11.5
81	CIAC	NH2	V	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	25.3
82	CIAC	NH2	L	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	29.9
83	CIAC	NH2	I	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	27.1
84	CIAC	NH2	M	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	16.9
85	CIAC	NH2	T	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	15.5
86	CIAC	NH2	Q	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	14.2
87	CIAC	NH2	F	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	15.8
88	CIAC	NH2	Y	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	14.5
89	CIAC	NH2	W	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	23.8
90	CIAC	NH2	K	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	17.2
91	CIAC	NH2	H	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	17.1
92	CIAC	NH2	S	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	15.5
93	CIAC	NH2	N	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	17.8
94	CIAC	NH2	F	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	25.1
95	CIAC	NH2	K	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	10.1
96	CIAC	NH2	R	2NaI	I	S	G	K	D	W	Nle	R	W	V	C	6.2
97	SS	NH2	C	2NaI	I	S	G	R	D	W	Nle	K	W	V	C	21
98	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	K	N	W	V	V	W	V	C	3.9
99	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	K	D	W	V	V	W	V	C	14.2
100	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	H	N	W	Nle	V	W	V	C	19.5
101	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	H	D	W	Nle	V	W	V	C	19.6
102	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	K	D	W	V	Pfig	W	V	C	9.7
103	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	K	N	W	Nle	Pfig	W	V	C	12.4
104	CIAC	NH2		2NaI	R	S	G	K	D	W	Nle	Pfig	W	V	C	19.8

[0299] 表5～7に示す通り、実施例1～104の大環状ポリペプチドを下記の合成法1～5により、またその酢酸塩を合成法6により、合成した。なお、化合物XXX aは、化合物XXXの酢酸塩を示す。

[0300]

[表5]

化合物	分子量	procedure	収率 (%)	MS type	MS 実測値 [M+H]	HPLC condition	Rt (min)
1	1504.76	合成法 2	20	LC-MS	1504.76	条件 1	2.25
2	1547.78	合成法 2	8	MALDI	1547.51	条件 2	14.3
3	1533.80	合成法 2	11	MALDI	1533.52	条件 2	13.9
4	1561.81	合成法 2	6	MALDI	1561.54	条件 2	14.2
5	1618.86	合成法 2	7	MALDI	1618.61	条件 2	12.8
6	1576.82	合成法 2	12	MALDI	1576.78	条件 2	11.2
7	1505.78	合成法 2	17	MALDI	1505.72	条件 2	12.1
8	1604.84	合成法 2	15	MALDI	1604.08	条件 2	13.5
9	1572.83	合成法 2	13	MALDI	1572.19	条件 2	14
10	1533.80	合成法 2	6	MALDI	1533.04	条件 2	14.4
11	1600.85	合成法 2	12	MALDI	1600.04	条件 2	14.1
12	1547.82	合成法 2	6	MALDI	1547.17	条件 2	14.6
13	1520.80	合成法 2	12	MALDI	1520.71	条件 2	12.6
14	1547.82	合成法 2	9	MALDI	1547.58	条件 3	5.74
15	1594.90	合成法 1	14	MALDI	1594.72	条件 4	7.46
16	1544.82	合成法 2	20	MALDI	1544.75	条件 3	5.05
17	1519.81	合成法 2	35	MALDI	1519.74	条件 3	5.59
18	1492.78	合成法 2	20	MALDI	1492.73	条件 3	5.62
19	1537.85	合成法 2	24	MALDI	1537.71	条件 3	5.65
20	1531.82	合成法 2	18	MALDI	1531.72	条件 3	5.35
21	1565.86	合成法 2	27	MALDI	1565.7	条件 3	5.81
22	1559.83	合成法 2	15	MALDI	1559.8	条件 3	5.54
23	1559.83	合成法 2	19	MALDI	1559.7	条件 3	5.48
24	1583.86	合成法 3	32	MALDI	1583.56	条件 2	12.9
25	1568.24	合成法 3	23	MALDI	1567.52	条件 2	12.9
26	1547.82	合成法 3	24	MALDI	1547.49	条件 2	12.9
27	1617.87	合成法 2	17	MALDI	1617.78	条件 3	6.4
28	1594.88	合成法 2	20	MALDI	1594.73	条件 3	6.2
29	1594.88	合成法 2	24	MALDI	1594.73	条件 3	6.3
30	1567.86	合成法 2	21	MALDI	1567.74	条件 3	6.4
31	1652.32	合成法 2	20	LC-MS	1596.82	条件 1	2.15
32	1631.90	合成法 2	16	LC-MS	1568.91	条件 1	2.09
33	1656.91	合成法 2	18	LC-MS	1540.81	条件 1	2.09
34	1686.76	合成法 2	20	LC-MS	1615.8	条件 1	2.19
35	1618.30	合成法 2	12	LC-MS	1646.81	条件 1	2.05
36	1618.30	合成法 2	23	LC-MS	1617.75	条件 1	2.08
37	1645.92	合成法 2	22	LC-MS	1646.81	条件 1	2.17
38	1597.88	合成法 2	26	LC-MS	1597.8	条件 1	2.05
39	1645.92	合成法 2	25	LC-MS	1646.81	条件 1	2.21
40	1584.84	合成法 2	33	LC-MS	1585.78	条件 1	1.63
41	1592.82	合成法 2	21	LC-MS	1592.75	条件 1	1.65
42	1564.81	合成法 2	22	LC-MS	1564.75	条件 1	2
43	1555.84	合成法 2	23	LC-MS	1555.78	条件 1	1.99
44	1514.75	合成法 2	19	LC-MS	1514.72	条件 1	2.08

[0301] [表6]

化合物	分子量	procedure	収率 (%)	MS type	MS 実測値 [M+H]	HPLC condition	Rt (min)
45	1598.87	合成法 2	19	MALDI	1598.78	条件 3	6.35
46	1556.79	合成法 2	8	LC-MS	1556.76	条件 1	1.95
47	1581.84	合成法 2	28	LC-MS	1581.79	条件 1	1.95
48	1583.86	合成法 2	28	LC-MS	1583.8	条件 1	2.03
49	1603.85	合成法 2	21	LC-MS	1603.77	条件 1	2.01
50	1583.86	合成法 2	22	LC-MS	1583.79	条件 1	1.99
51	1617.87	合成法 2	19	LC-MS	1617.79	条件 1	2.01
52	1617.87	合成法 2	20	LC-MS	1617.78	条件 1	2.09
53	1597.88	合成法 2	17	LC-MS	1597.81	条件 1	2.03
54	1597.88	合成法 2	12	LC-MS	1597.83	条件 1	2.05
55	1556.83	合成法 2	22	MALDI	1556.74	条件 3	5
56	1566.86	合成法 2	26	LC-MS	1566.8	条件 1	2.22
57	1570.85	合成法 2	25	LC-MS	1570.79	条件 3	5.18
58	1598.87	合成法 2	20	LC-MS	1598.79	条件 3	5.31
59	1578.84	合成法 2	20	LC-MS	1578.77	条件 3	5.18
60	1612.89	合成法 2	26	LC-MS	1612.81	条件 1	2.13
61	1626.92	合成法 2	23	LC-MS	1626.83	条件 1	2.18
62	1568.84	合成法 2	26	LC-MS	1568.78	条件 1	1.71
63	1598.87	合成法 2	13	LC-MS	1598.79	条件 1	1.74
64	1584.88	合成法 2	8	LC-MS	1584.8	条件 1	1.72
65	1506.74	合成法 2	13	LC-MS	1506.73	条件 1	1.68
66	1464.69	合成法 2	18	LC-MS	1464.71	条件 1	1.66
67	1543.79	合成法 1	14	LC-MS	1543.74	条件 1	2.19
68	1539.80	合成法 1	16	LC-MS	1539.74	条件 1	2.2
69	1563.78	合成法 1	3	LC-MS	1563.72	条件 1	2.17
70	1589.88	合成法 1	10	LC-MS	1589.73	条件 1	2.15
71	1605.88	合成法 1	12	LC-MS	1605.72	条件 1	2.2
72	1571.80	合成法 1	15	LC-MS	1571.75	条件 1	2.15
73	1599.85	合成法 1	12	LC-MS	1599.78	条件 1	2.13
74	1613.88	合成法 1	14	LC-MS	1613.79	条件 1	2.14
75	1655.92	合成法 3	9	LC-MS	1656.83	条件 1	2.21
76	1655.92	合成法 3	9	LC-MS	1656.83	条件 1	2.06
77	1614.87	合成法 4	25	LC-MS	1614.79	条件 1	1.78
78	1630.87	合成法 5	34	LC-MS	1631.79	条件 1	1.71
79	1626.92	合成法 3	9	LC-MS	1627.83	条件 1	1.8
80	1669.94	合成法 2	19	LC-MS	1669.83	条件 1	2.13
81	1698.00	合成法 2	12	LC-MS	1697.86	条件 1	2.17
82	1712.02	合成法 2	20	LC-MS	1711.88	条件 1	2.23
83	1712.02	合成法 2	18	LC-MS	1711.88	条件 1	2.21
84	1730.06	合成法 2	13	LC-MS	1729.83	条件 1	2.16
85	1699.97	合成法 2	13	LC-MS	1699.84	条件 1	2.09
86	1727.00	合成法 2	12	LC-MS	1726.85	条件 1	2.07
87	1746.04	合成法 2	13	LC-MS	1745.86	条件 1	2.19
88	1762.04	合成法 2	10	LC-MS	1761.86	条件 1	2.09

[0302]

[表7]

化合物	分子量	procedure	収率 (%)	MS type	MS 実測値 [M+H]	HPLC conditio	Rt (min)
89	1785.08	合成法 2	10	LC-MS	1784.87	条件 1	2.18
90	1727.04	合成法 2	7	LC-MS	1726.89	条件 1	2
91	1736.01	合成法 2	13	LC-MS	1735.85	条件 1	1.95
92	1685.94	合成法 2	18	LC-MS	1685.83	条件 1	2.1
93	1712.97	合成法 2	15	LC-MS	1712.84	条件 1	2.11
94	1746.04	合成法 2	20	LC-MS	1745.86	条件 1	2.18
95	1727.04	合成法 2	17	LC-MS	1726.89	条件 1	1.98
96	1755.05	合成法 2	7	LC-MS	1754.89	条件 1	1.99
97	1659.97	合成法 1	26	LC-MS	1660.79	条件 1	2.18
98	1569.83	合成法 2	16	LC-MS	1569.78	条件 1	1.64
99	1570.81	合成法 2	15	LC-MS	1570.76	条件 1	1.66
100	1592.82	合成法 2	21	LC-MS	1592.75	条件 1	1.71
101	1593.81	合成法 2	26	LC-MS	1593.74	条件 1	1.72
102	1604.83	合成法 1	19	LC-MS	1604.75	条件 1	1.7
103	1617.87	合成法 1	19	LC-MS	1617.78	条件 1	1.72
104	1618.86	合成法 1	21	LC-MS	1618.77	条件 1	1.74
45a	1598.87	合成法 6	19	LC-MS	1598.79	条件 1	2.11
58a	1598.87	合成法 6	20	LC-MS	1598.79	条件 1	1.7
98a	1569.83	合成法 6	25	LC-MS	1569.78	条件 1	1.63
99a	1570.81	合成法 6	24	LC-MS	1570.77	条件 1	1.66
100a	1592.82	合成法 6	21	LC-MS	1592.77	条件 1	1.72
101a	1593.81	合成法 6	26	LC-MS	1593.75	条件 1	1.74
102a	1604.83	合成法 6	19	LC-MS	1604.75	条件 1	1.68
103a	1617.87	合成法 6	19	LC-MS	1617.79	条件 1	1.69
104a	1618.86	合成法 6	21	LC-MS	1618.76	条件 1	1.74

[0303] 合成法 1

自動合成機Syro II(Biotage Japan社)を用い、9-フルオニルメトキシカルボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行った。

Rink Amide Resin AM (Novaviochem社)の88 μ mol相当を反応用ベッセルに加え、1-メチル-2-ピロリジノン中で、以下の1) および2) に従って順次アミノ酸を連結した。

1) CysおよびHis : N, N-ジイソプロピルカルボジイミド、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)、Fmoc基で保護されたアミノ酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

2) その他のアミノ酸: 0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU)、N, N-ジイソプロピルアミン、Fmoc基で保護されたアミノ酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン/1-メチル-2-ピロリジノンで行った。

N末端のアミノ酸を連結し、Fmoc基を脱保護した後、1-メチル-2-ピロリジノン中で、N, N-ジイソプロピルカルボジイミド、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)、クロロ酢酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

得られたペプチドレジンに1-メチル-2-ピロリジノンで3回、ジクロロメタンで3回洗浄して乾燥し、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水 (体積比で92.5: 2.5: 2.5: 2.5) を2mL加えて室温で3時間攪拌した。

エーテル沈殿により切断された粗ペプチドを回収し、tert-ブチルメチルエーテルで2回洗浄して乾燥した後、ジメチルスルホキシド (8mL) に溶解し、n-プロピルアミン (80 μ L) を加えて終夜静置した。酢酸 (80 μ L) を加えた後、V10 (Biotage Japan社) で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18 (150 x 2.1.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0304] 合成法 2

合成法1に従って、目的物のフラクションを凍結乾燥した後、0.1N塩酸-アセトニトリルに溶解し再び凍結乾燥して、塩酸塩として目的物を得た。

[0305] 合成法 3

自動合成機Liberty Blue (CEM社) を用い、9-フルオニルメトキシカルボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行った。

Rink Amide Resin AM (Bovaviochem社)の100 μ mol相当を反応用ベッセルに

加え、N, N-ジメチルホルムアミド中でN, N-ジイソプロピルカルボジイミド、シアノ（ヒドロキシイミノ）酢酸エチル、Fmoc基で保護されたアミノ酸をそれぞれ5当量加えて反応させ、順次アミノ酸を連結した。

Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン/N, N-ジメチルホルムアミドで行った。

N末端のアミノ酸を連結し、Fmoc基を脱保護した後、N, N-ジメチルホルムアミド中で、N, N-ジイソプロピルカルボジイミド、シアノ（ヒドロキシイミノ）酢酸エチル、クロロ酢酸をそれぞれ5当量加えて反応させた。

得られたペプチドレジンにN, N-ジメチルホルムアミドで3回、ジクロロメタンで3回洗浄して乾燥し、トリフルオロ酢酸-エタンジチオールトリイソプロピルシラン-水（体積比で92.5: 2.5: 2.5: 2.5）を2mL加えて室温で3時間攪拌した。

エーテル沈殿により切断された粗ペプチドを回収し、tert-ブチルメチルエーテルで2回洗浄して乾燥した後、ジメチルスルホキシド（8mL）に溶解し、n-プロピルアミン（80 μ L）を加えて終夜静置した。酢酸（80 μ L）を加えた後、V10（Biotage Japan社）で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18（150 x 21.2 mm, Phenomenex社）を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥した後、0.1N塩酸-アセトニトリルに溶解し再び凍結乾燥して、塩酸塩として目的物を得た。

[0306] 合成法4

合成法2で得た大環状ポリペプチド塩酸塩（40.0mg, 24 μ mol）をアセトニトリル（5mL）、50mM炭酸水素アンモニウム水溶液（5mL）に溶解させた。m-クロロ過安息香酸の100mg/mLアセトニトリル溶液を64 μ L（24 μ mol）加えて攪拌し、室温で静置した。2時間後さらに15 μ L（6 μ mol）加えて1時間静置した。Kinetex5u XB-C18（150 x 21.2 mm, Phenomenex社）を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0307] 合成法 5

合成法 2 で得た大環状ポリペプチド塩酸塩 (40.0mg, 24 μ mol) をアセトニトリル (5mL)、50mM炭酸水素アンモニウム水溶液 (5mL) に溶解させた。m-クロロ過安息香酸の100mg/mLアセトニトリル溶液を127 μ L (48 μ mol) 加えて攪拌し、室温で静置した。2時間後さらに64 μ L (24 μ mol) 加えて1時間静置した。Kinetex5u XB-C18 (150 x 21.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0308] 合成法 6

合成法 1 で得た目的物のトリフルオロ酢酸塩、または合成法 2 で得た目的物の塩酸塩を10%アセトニトリル水溶液に溶解し (5-10mM)、あらかじめ酢酸イオンに置換しておいたダウエックス (登録商標) (1x8 100-200メッシュ、1.2meq/ml、和光純薬工業株式会社) を50当量加えて2時間振とうした。ろ過した後、ろ液を凍結乾燥し、目的物を酢酸塩として得た。

[0309] 実施例 1 ~ 104 の大環状ポリペプチドの合成に用いた天然アミノ酸試薬を表 8 および 9 に示す。また実施例 1 ~ 104 の大環状ポリペプチドの合成に用いたか、または用い得る非天然アミノ酸試薬とその調達先を表 10 ~ 12 に示す。

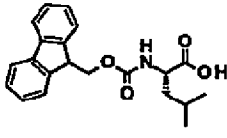
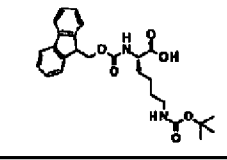
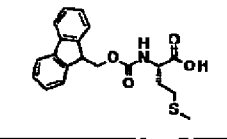
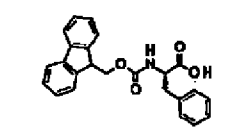
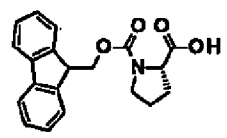
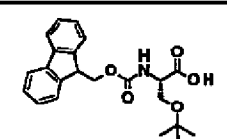
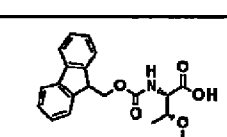
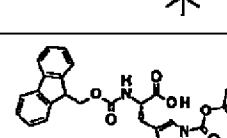
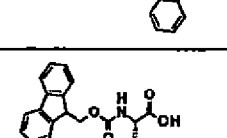
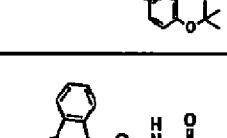
[0310]

[表8]

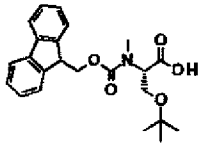
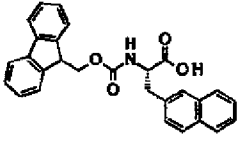
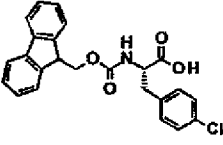
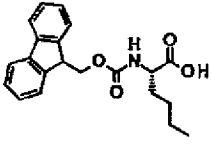
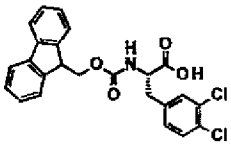
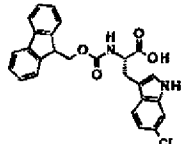
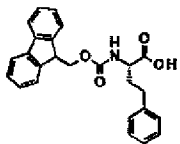
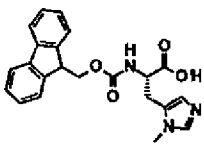
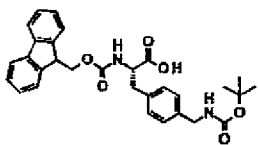
略語	原料構造式
Fmoc-Ala-OH	
Fmoc-Asn(Trt)-OH	
Fmoc-Asp(tBu)-OH	
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	
Fmoc-Cys(Trt)-OH	
Fmoc-Gln(Trt)-OH	
Fmoc-Glu(tBu)-OH	
Fmoc-Gly-OH	
Fmoc-His(Trt)-OH	
Fmoc-Ile-OH	

[0311]

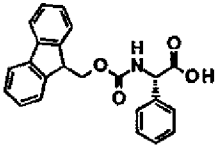
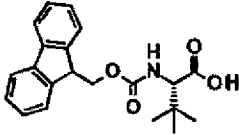
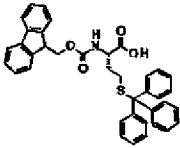
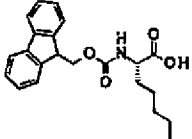
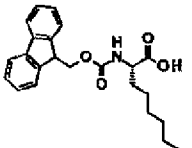
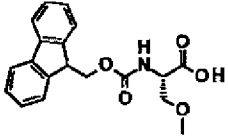
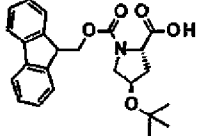
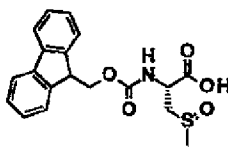
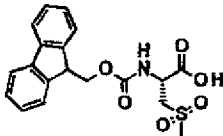
[表9]

略語	原料構造式
Fmoc-Leu-OH	
Fmoc-Lys(Boc)-OH	
Fmoc-Met-OH	
Fmoc-Phe-OH	
Fmoc-Pro-OH	
Fmoc-Ser(tBu)-OH	
Fmoc-Thr(tBu)-OH	
Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	
Fmoc-Val-OH	

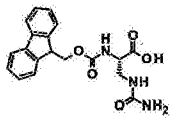
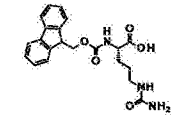
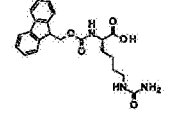
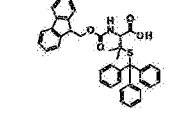
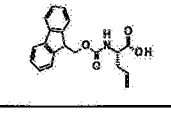
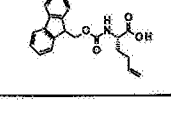
[0312] [表10]

略語	原料構造式	メーカー	カタログ番号
mS		NOVABIO	852289
2NaI		COMBI-BLOCKS	SS-0101
4CF		SIGMAALDRICH	47424-5G
Nle		COMBI-BLOCKS	SS-9964
DCF		WATANABE	M00568-5G
6CW		WATANABE	M02602
HF		WATANABE	L00558-5G
3MH		NOVAVIO	852286
AMF		CHEM-IMPEX	7408

[0313] [表11]

略語	原料構造式	メーカー	カタログ番号
Phg		ANASPEC	21072
Tle		ANASPEC	21070
Hcy		CHEM-IMPEX	05723
Ahp		WATANABE	M01985-1G
Aoc		WATANABE	M00837-1G
MS		WATANABE	K00945-5G
3Hyp		WATANABE	K00438-5G
MO1		COMBI-BLOCKS	SS-0372
MO2		CHEM-IMPEX	03725

[0314] [表12]

略語	原料構造式	メーカー	カタログ番号
Alb		WATANABE	M02521-5G
Cit		WATANABE	M00443
Hct		COMBI-BLOCKS	SS-0910
Pen		WATANABE	M00636-5G
Alg		WATANABE	M01125-5G
Btg		ARKPHARMING	AK102989

[0315] 各大環状ポリペプチドの精製に用いたHPLC条件および保持時間を表5～7に示す。HPLC条件1～4は以下の通りである。

[0316] HPLC条件1

カラム：Kinetex 1.7u XB-C18(50 x 2.1 mm)

移動相：A：0.1% TFA-水 B：0.1% TFA-アセトニトリル

温度：40℃

流速：0.6 ml/min

グラジエント：0.01分 (B10%)、0.33分 (B10%)、0.34分 (B20%)、0.66分 (B20%)、0.67分 (B30%)、0.99分 (B30%)、1.00分 (B40%)、1.33分 (B40%)、1.34分 (B50%)、1.66分 (B50%)、1.67分 (B80%)、2.50分 (B80%)

[0317] HPLC条件2

カラム : Inertsil ODS-3(150 x 4.6 mm)

移動相 : A: 0.1% TFA-水 B: 0.1% TFA-アセトニトリル

温度 : 40°C

流速 : 1.0 mL/min

グラジエント : 0.01分 (B10%)、20.00分 (B70%)

[0318] HPLC条件3

カラム : Inertsil ODS-3(150 x 4.6 mm)

移動相 : A: 0.1% TFA-水 B: 0.1% TFA-アセトニトリル

温度 : 40°C

流速 : 1.5 mL/min

グラジエント : 0.01分 (B25%)、8.00分 (B70%)

[0319] HPLC条件4

カラム : Inertsil ODS-3(150 x 4.6 mm)

移動相 : A: 0.1% TFA-水 B: 0.1% TFA-アセトニトリル

温度 : 40°C

流速 : 1.5 mL/min

グラジエント : 0.01分 (B5%)、8.00分 (B70%)

[0320] また得られた目的物の質量分析を、以下の条件でLC-MSまたはMALDI-TOF-MSにより行った。各大環状ポリペプチドのMS実測値を表5~7に示す。

[0321] LC-MS条件

Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technology社) を用いて測定した。

カラム : Kinetex 1.7u XB-C18(50 x 2.1 mm)

移動相 : A: 0.1% TFA-水 B: 0.1% TFA-アセトニトリル

温度 : 40°C

流速 : 0.6 mL/min

グラジエント：0.01分（B10%）、0.33分（B10%）、0.34分（B20%）、0.66分（B20%）、0.67分（B30%）、0.99分（B30%）、1.00分（B40%）、1.33分（B40%）、1.34分（B50%）、1.66分（B50%）、1.67分（B80%）、2.50分（B80%）

[0322] MALDI-TOF-MS条件

4800 MALDI TOF/TOF (ABSCIEX社) を用いて測定した。マトリックスには α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を用いた。

[0323] （試験例1）細胞接着阻害アッセイ

I. 材料・試薬

- ・96 well Non-treated White with clear bottom (Coster, 3632)
- ・BrightMax adhesive sealing films (EXCEL Scientific WT50)
- ・プロテオセーブ（登録商標）SS 15mL（住友ベークライトMS-52150）
- ・Thrombospondin human platelet (Calbiochem 605225)
- ・HUVEC (KURABO KE-4109P10)
- ・EGM-2 MV (Lonza, CC-3202): HUVEC継代用
- ・Collagen coated dish (IWAKI 4020-010): HUVEC継代用
- ・Lipidure（登録商標）-BL802（日油）5% solution
- ・DMEM low glucose (GIBCO 11054-020)
- ・Albumin solution (35%) fraction V from Bovine (Sigma A7979)
- ・CellTiter-Glo (Promega G7572)

[0324] II. アッセイ

<Plate coat>

Thrombospondin 1 vial (25 μ g)をTBS (+2mM CaCl_2 、以下すべて同じ)に溶解し、200 μ g/mL溶液を調製し、プロテオセーブ（登録商標）15 mLチューブ中で10 μ g/mLになるようにTBSで希釈した。10 μ g/mL溶液を50 μ L/wellで96 well plateに分注し（吸着しやすいのでリザーバーは使用しなかった）、4°Cで一晩静置した。

<Plate blocking>

Lipidure (登録商標) をTBSで10倍希釈し0.5% solutionを調製した。上記<Plate coat>でコートしておいたプレートのバッファーを捨て、使用するすべてのウェルに0.5% solutionを100 μ L/wellで分注し、室温で1時間静置した。

<サンプルの希釈>

希釈バッファー (DMEM +0.5% BSA) を用いて、各サンプルについて0.2 μ M溶液を調製した。0.2 μ M溶液2 μ Lを希釈バッファー500 μ Lで希釈し、希釈サンプルを調製した。Vehicle controlとしてDMSOを用い、サンプルと同様に希釈した。

<サンプル分注>

上記<Plate blocking>のプレートのブロッキング液を捨て、TBS 150 μ L/wellで3回洗浄した。3回目の洗浄液をアスピレーターで完全に吸い、希釈サンプルを50 μ L/well分注し、室温で15~30分間静置した。

<HUVEC播種>

HUVECの維持には、EGM2-MV, collagen coated dishを使用した(10~11継代で増殖が落ちるので、そこで使用終了した)。細胞を0.05% Trypsin EDTAで分散させ、DMEM 0.5% BSAで回収し、1000 rpmで3分間遠心した。上清を除いて、細胞をDMEM bufferで1回洗浄した。細胞をDMEM bufferに再懸濁し、細胞数をカウントし、10000 cells/50 μ Lに希釈した。サンプルを分注してあるプレートに、細胞懸濁液を50 μ L/well分注し、軽く混ぜ、37°Cで2.5時間インキュベーションした。

<洗浄・検出>

細胞の接着を確認した後、アスピレーターで培地を完全に除き、100 μ L/wellのDMEM 0.5% BSAを静かに分注した。アスピレーターでDMEM 0.5% BSAを完全に除き、50 μ L/wellのDMEM 0.5% BSAを分注した。プレートの底にwhiteシールを貼り、CellTiter-Glo (登録商標) 50 μ L/wellを分注し、2分間攪拌した後、室温で8分間静置した。EnVision Xcite Multilabel Reader (Perkin E

lmer社)により発光を検出した。

[0325] 111. 結果

発光の測定値から、各大環状ポリペプチドによる細胞接着阻害についてIC₅₀ (nM) を算出した。得られた結果を表1~4に示す。上記試験結果により、実施例1~104の化合物はTSP1の血管内皮細胞への接着阻害作用を有し、重症下肢虚血または末梢動脈疾患の治療または予防に有用であることが示された。

[0326] (試験例2) SPRによる相互作用解析

SPRによる相互作用解析は、Biacore T200 (GEヘルスケア) を用いて行った。

1. Recombinant-hTSP1の固定化

NTA-Chip(GEヘルスケア: BR100532)に500 μM NiCl₂を流速5 μL/minで1分間injectすることで、NTAを活性化させた。次いで、EDC/NHS mixtureを流速10 μL/minで7分間injectすることで、デキストランのカルボキシル基を活性化させた。NTAおよびカルボキシル基が活性化された基板表面に対し、Recombinant-hTSP1を流速10 μL/minで7分間injectすることで固定化した。Ethanolamineを流速10 μL/minで7分間injectすることで、未反応の活性化カルボキシル基を不活化させた。

なお、10xHBS-P+(GEヘルスケア: BR100671)を1xに希釈し、かつ5mM CaCl₂を添加したものを固定化bufferとして用いた。

EDC/NHS/Ethanolamineとしては、GEヘルスケアから販売されているAmine-coupling kit (BR100050)に含まれる試薬を使用した。

[0327] 11. 検体の測定

測定Bufferは下記に示す組成で調製した。

50mM Tris-HCl pH7.5 / 150mM NaCl / 5mM CaCl₂ / 0.05% Tween20 / 5% DMSO

測定は以下の順で実施した。

1) Startup

基板表面の平衡化のため、測定Bufferを下記の条件でinjectした。

Contact-time:60sec, Dissociate-time:120sec, 流速50ul/min, 温度:25°C
同条件を5回繰り返し平衡化させた。

2) Solvent Correction

Biacore T200はDMSO濃度の変化に対し敏感に反応することから、DMSOによる影響を補正するため、4%-4.4%-4.8%-5.2%-5.6%-6%のDMSO溶液をinjectした。

3) Sample測定

低解離性挙動を有する検体に対し有効なSingle-Cycle kinetics法を採用した。本手法は各濃度域を同一サイクル中でinjectするため、解析において低解離に伴うサイクル間の影響を無視できる点が優れている。

検体は3倍希釈系列で5濃度（100、33、11、3.7および1.2 nM）調製し、濃度の低い順から流速50 μ L/minで3分間、連続的にinjectした。また、最も高い濃度の希釈液をinjectした後、解離時間を20～30分設けた。

なお、検体の測定前に、ベースライン作成のため測定Bufferのみを同条件でinjectした。

[0328] 111. 解析

Biacore T100およびT200に付属のEvaluation softwareを用いて解析した。Solvent correction測定によって得られたDMSO補正曲線を適用した。検体測定データからベースラインデータを差し引いたものに対し、kinetics fittingを実施した。

結合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)からKD値を算出した。得られた結果を表1～4に示す。上記試験結果により、実施例1～7、9～13、24、28、40～45、58、75の化合物はTSP1に直接結合することでTSP1の血管内皮細胞への接着阻害活性を示していることが確認された。したがって、本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、重症下肢虚血または末梢動脈疾患の治療または予防に有用であることが示された。

[0329] (試験例3) 血流改善測定試験

7-9週齢の雄性C57BL/6マウスを日本チャールズ・リバー株式会社より購入

し、FR-2固形飼料（株式会社フナバシファーム）を供与して1週間以上馴化させた。飼育室は午後7時消灯、午前7時点灯の12時間周期の明暗切り替えを行った。イソフルオレイン吸入麻酔下に、マウスの左大腿部を切開し、浅大腿動脈および静脈（深部大腿動脈のすぐ下から膝窩動脈および静脈まで）を結紮し、切除した。モデル作製後、被験物質（化合物24、28、40～45、58）を20 mM乳酸および5% (w/v)ルトロール溶液に溶解し、1日1回腹腔内投与した。

（血流改善測定試験1）

ビヒクル投与群

化合物24（10 mg/kg）投与群

（血流改善測定試験2）

ビヒクル投与群

化合物28（10 mg/kg）投与群

（血流改善測定試験3）

ビヒクル投与群

化合物40（10 mg/kg）投与群

化合物41（10 mg/kg）投与群

（血流改善測定試験4）

ビヒクル投与群

化合物42（10 mg/kg）投与群

化合物43（10 mg/kg）投与群

化合物44（10 mg/kg）投与群

化合物45（10 mg/kg）投与群

（血流改善測定試験5）

ビヒクル投与群

化合物58（10 mg/kg）投与群

虚血肢（左）および非虚血肢（右）の血流を、レーザードップラー血流計

(LDPI、PIM III、Perimed、Inc.) を用いて測定した。血流の値は、非虚血肢に対する虚血肢の比で評価した。

マウスの血流は、手術直後で最も低値を示し、その後、徐々に回復した。本動物モデルで検討したすべての被験物質は、ビヒクル処置と比較して、手術後の血流回復がより改善された。手術後7日目における被験物質投与群の血流は、ビヒクル処置マウスよりも高かった。結果を表13に示す。

[0330] [表13]

		% , ischemia / nonischemia			% change (vs. vehicle)
Exp 1	Vehicle	39.27	±	2.37	
	化合物24	41.20	±	6.18	4.9
Exp 2	Vehicle	40.06	±	5.43	
	化合物28	40.79	±	7.77	1.8
Exp 3	Vehicle	43.74	±	6.56	
	化合物40	46.53	±	7.28	6.4
	化合物41	58.05	±	3.76	32.7
Exp 4	Vehicle	37.33	±	2.92	
	化合物42	47.40	±	5.62	27.0
	化合物43	48.86	±	5.15	30.9
	化合物44	41.25	±	3.54	10.5
	化合物45	65.70	±	6.38	76.0
Exp 5	Vehicle	37.19	±	5.63	
	化合物58	69.00	±	3.49	85.5

産業上の利用可能性

[0331] 本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、TSP1に結合し、TSP1への血管内皮細胞などの細胞の接着を阻害することができる。従って本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、TSP1の発現亢進により誘発される疾患または症状の治療または予防に有用である。また本発明の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩は、血管新生促進剤として有用である。

配列表フリーテキスト

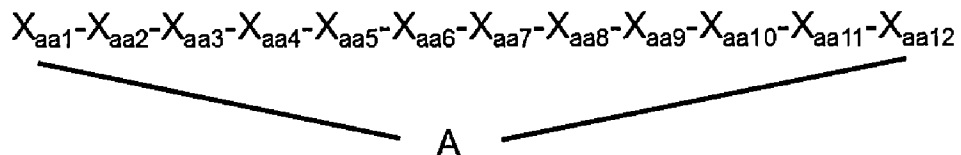
[0332] 配列番号 1 ~ 104 : 実施例 1 ~ 104 の化合物のペプチド領域

配列番号 1 ~ 104 : C末端カルボキシル基のアミド化

請求の範囲

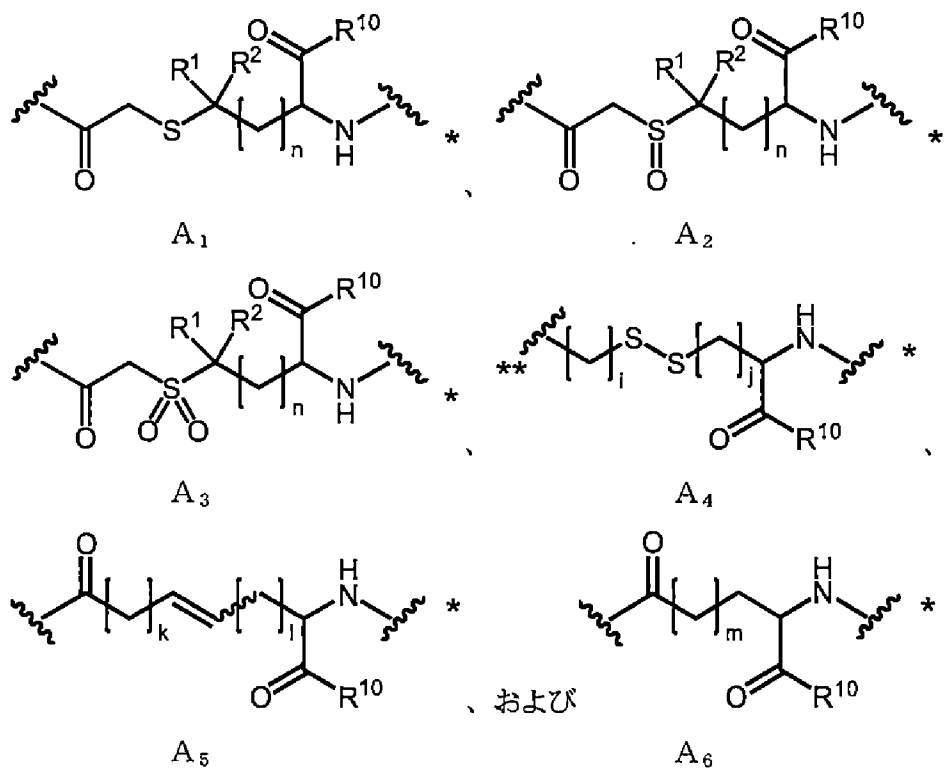
[請求項1] 式(1)

[化1]



[式中、Aは、連結基

[化2]



から選択され、

ここで、

[化3]



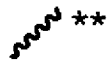
は、 X_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示すか、または X_{aa1} が存在しない場合には X_{aa2} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化4]



は、 X_{aa12} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

[化5]



は、 X_{aa1} の α 炭素への結合点を示すか、または X_{aa1} が存在しない場合には X_{aa2} の α 炭素への結合点を示し、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{10} はアミノまたはヒドロキシであり、

n は0～3の整数であり、

i および j はそれぞれ独立に1～3の整数であり、

k および l はそれぞれ独立に0～3の整数であり、

m は1～7の整数であり；

X_{aa1} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；

X_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa4} は、Ser、Thr、Ala、または^mSであり；

X_{aa5} は、G l yまたはS e rであり；

X_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

X_{aa8} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基であり；

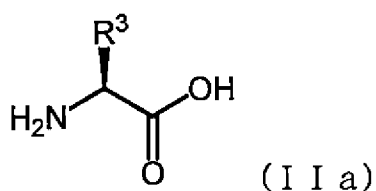
X_{aa10} は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa11} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸は、式 (I I a)

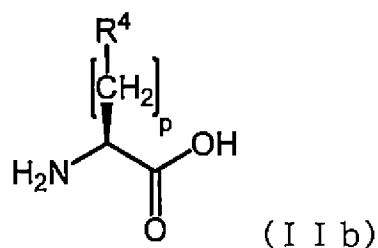
[化6]



(式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである) で表されるアミノ酸であり；

芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

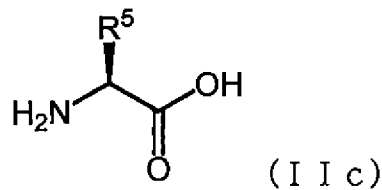
[化7]



(式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、 C_{1-3} アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、 p は0~3の整数である)で表されるアミノ酸であり；

塩基性アミノ酸は、式 (I I c)

[化8]

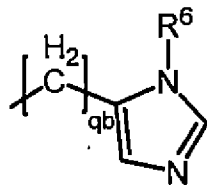


[式中、 R^5 は、

式— $(CH_2)_{q_a}NH_2$ (式中、 q_a は1~6の整数である)、

式

[化9]

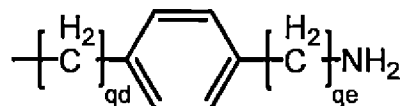


(式中、 R^6 は水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 q_b は1~6の整数である)、

式— $(CH_2)_{q_c}NHC(=NH)NH_2$ (式中、 q_c は1~6の整数である)、または

式

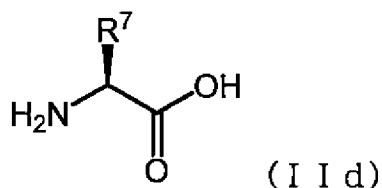
[化10]



(式中、 q_d および q_e はそれぞれ独立して1～3の整数である)で表される基である]で表されるアミノ酸であり;

中性アミノ酸は、式 (I I d)

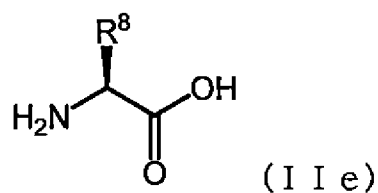
[化11]



[式中、 R^7 は、式 $-(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ (式中、 r_a は1～6の整数である) または式 $-(CH_2)_{r_b}SH$ (式中、 r_b は1～3の整数である) で表される基である]で表されるアミノ酸、Gly、Met、MO1、MO2、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、Thr、C(O)、C(O2)、またはPenであり;

酸性アミノ酸は、式 (I I e)

[化12]



[式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ (式中、 s は1～6の整数

である) で表される基である] で表されるアミノ酸である]

で表される大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項2] X_{aa4} がSerである、請求項1に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項3] X_{aa5} がGlyである、請求項1または2に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項4] X_{aa8} が、Trp、2NaI、または6CWである、請求項1～3のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項5] X_{aa8} がTrpである、請求項4に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項6] X_{aa11} が、Trpまたは2NaIである、請求項1～5のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項7] X_{aa11} がTrpである、請求項6に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項8] X_{aa1} が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysであるか、あるいは存在しない、請求項1～7のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項9] X_{aa1} が、Arg、Lys、またはGlyであるか、あるいは存在しない、請求項8に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項10] X_{aa2} が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFである、請求項1～9のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項11] X_{aa2} が2NaIである、請求項10に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

- [請求項12] X_{aa3} が、I l e、L e u、N l e、T l e、T r p、2 N a l、4 C F、またはA r gである、請求項1～11のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項13] X_{aa3} が、I l e、またはA r gである、請求項12に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項14] X_{aa6} が、A r g、L y s、H i s、S e r、C i t、またはM O 2である、請求項1～13のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項15] X_{aa6} がA r g、L y s、H i s、またはS e rである、請求項14に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項16] X_{aa7} が、A s nまたはA s pである、請求項1～15のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項17] X_{aa9} が、V a l、N l e、A h p、またはM e tである、請求項1～16のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項18] X_{aa9} がV a l、N l e、またはA h pである、請求項17に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項19] X_{aa10} が、A r g、L y s、H i s、A M F、P h g、またはV a lである、請求項1～18のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項20] X_{aa10} がA r g、L y s、H i s、P h g、またはV a lである、請求項19に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項21] X_{aa12} が、V a l、T l e、またはP h eである、請求項1～20のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。
- [請求項22] X_{aa12} がV a lである、請求項21に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

4 C F、または A r g であり；

X_{aa4} が S e r であり；

X_{aa5} が G l y であり；

X_{aa6} が、A r g、L y s、H i s、S e r、C i t、または M O
2 であり；

X_{aa7} が、A s n または A s p であり；

X_{aa8} が T r p、2 N a l、または 6 C W であり；

X_{aa9} が、V a l、N l e、A h p、または M e t であり；

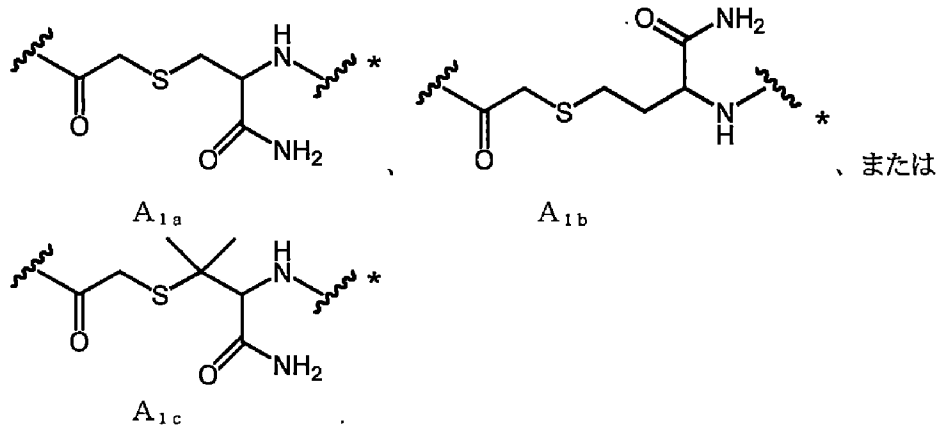
X_{aa10} が、A r g、L y s、H i s、A M F、P h g、または V
a l であり；

X_{aa11} が T r p または 2 N a l であり；

X_{aa12} が、V a l、T l e、または P h e であり；

A が、連結基

[化15]



である、請求項 1 に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容
される塩。

[請求項26]

X_{aa1} が、A r g、L y s、または G l y であるか、あるいは存在
せず；

X_{aa2} が 2 N a l であり；

X_{aa3} が、I l e、またはA r gであり；

X_{aa4} がS e rであり；

X_{aa5} がG l yであり；

X_{aa6} がA r g、L y s、H i s、またはS e rであり；

X_{aa7} が、A s nまたはA s pであり；

X_{aa8} がT r pであり；

X_{aa9} がV a l、N l e、またはA h pであり；

X_{aa10} がA r g、L y s、H i s、P h g、またはV a lであり

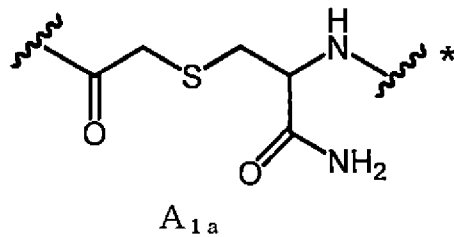
；

X_{aa11} がT r pであり；

X_{aa12} がV a lであり；

Aが

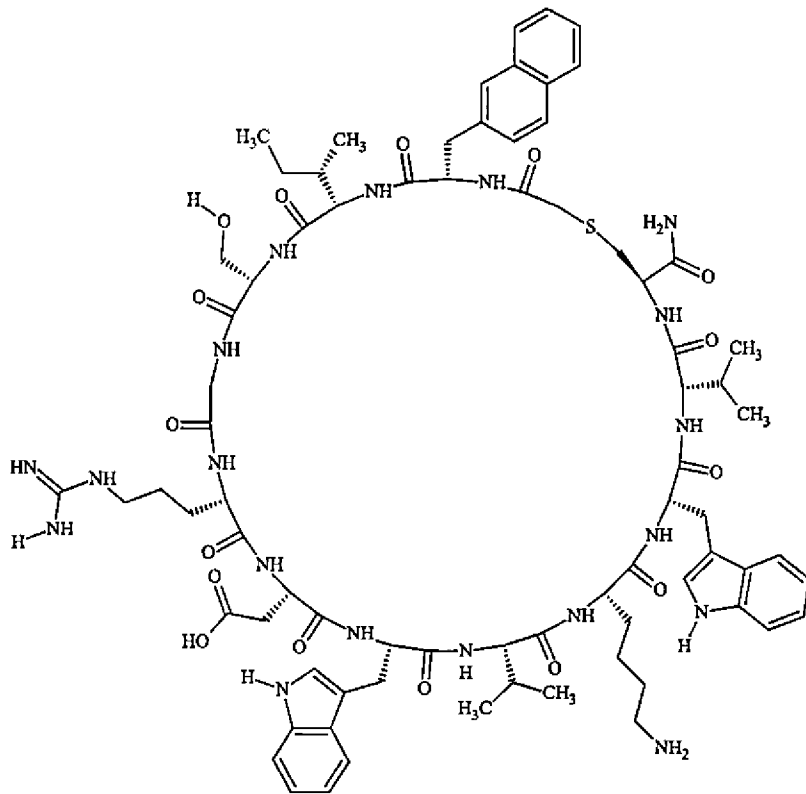
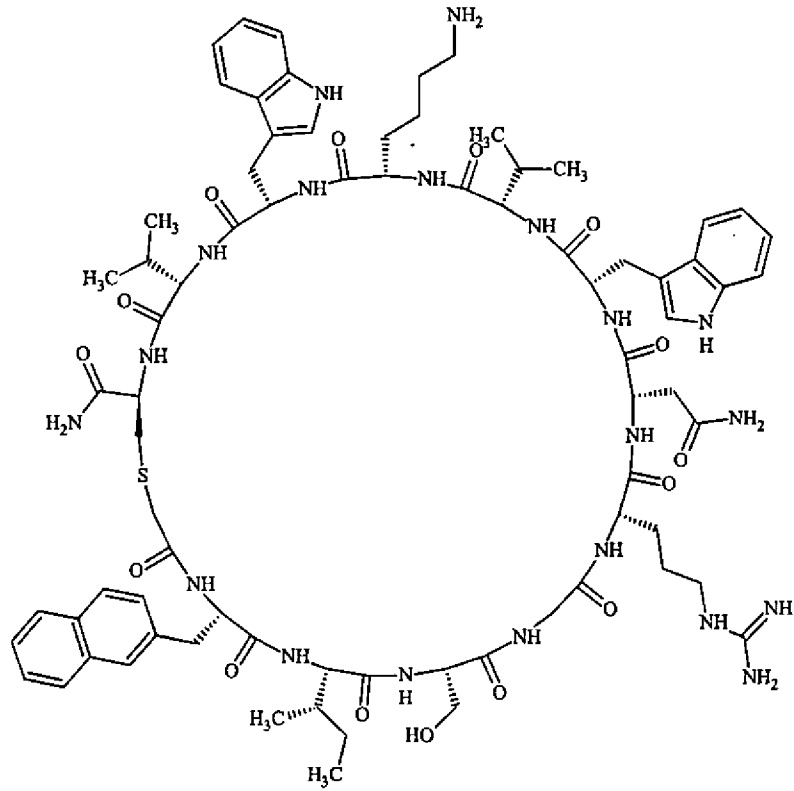
[化16]



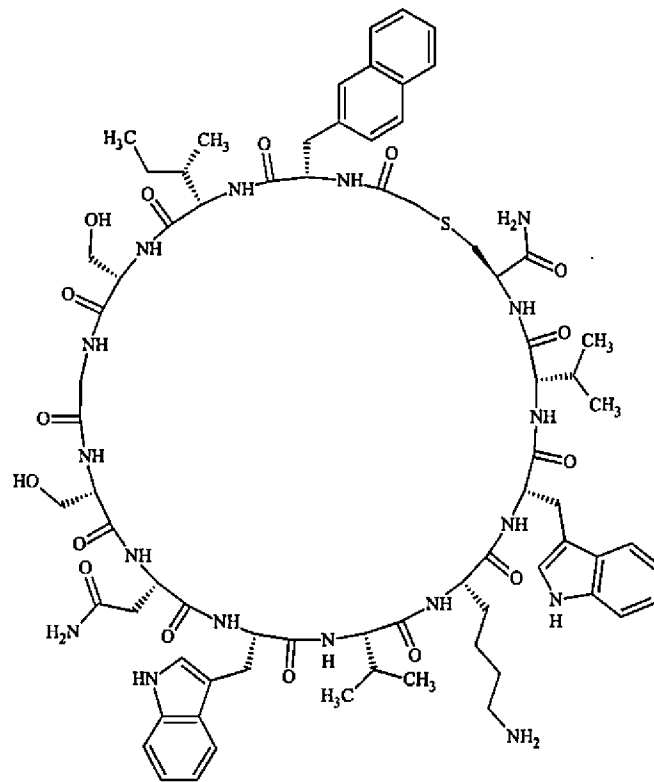
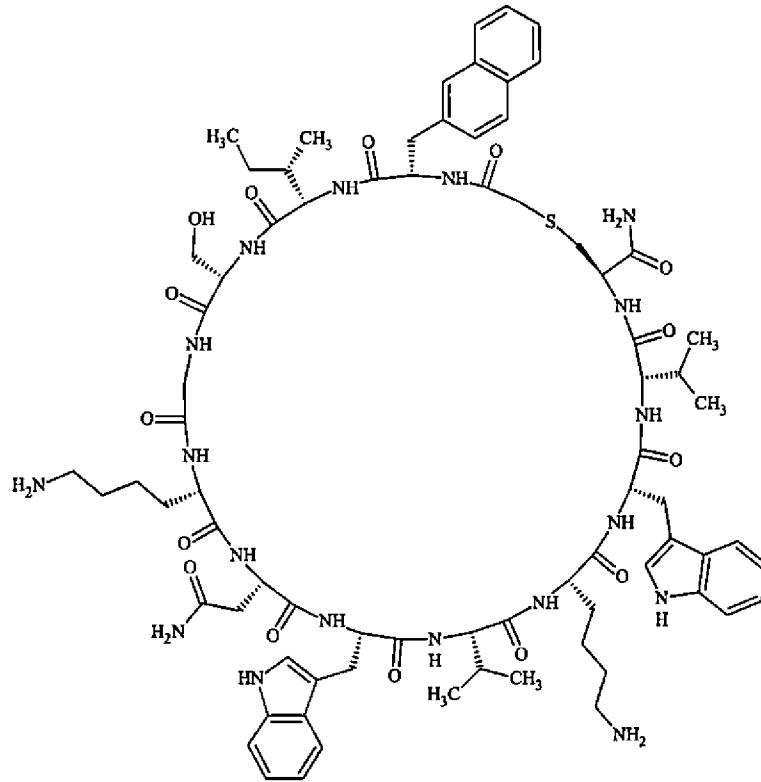
である、請求項25に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項27]

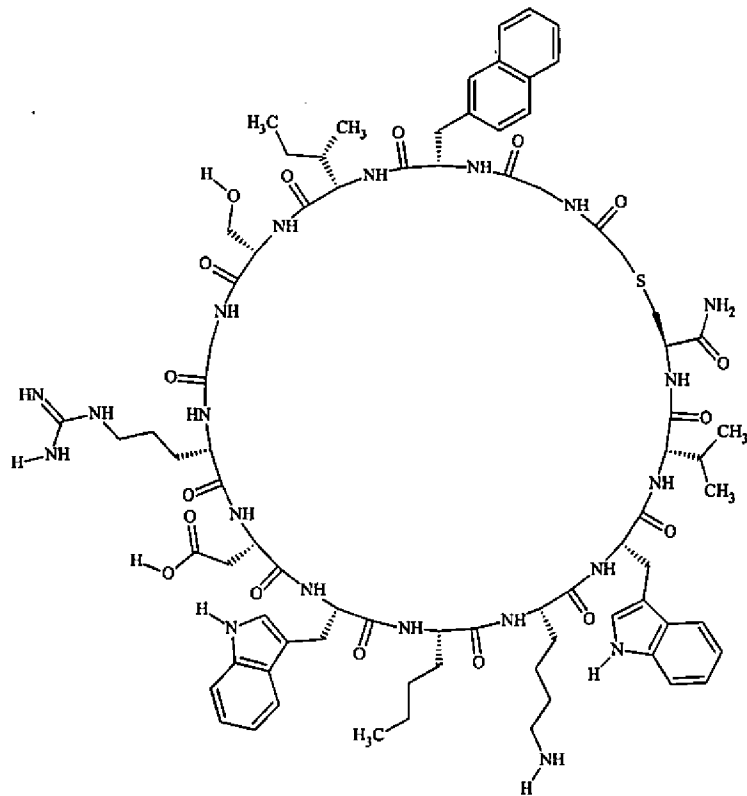
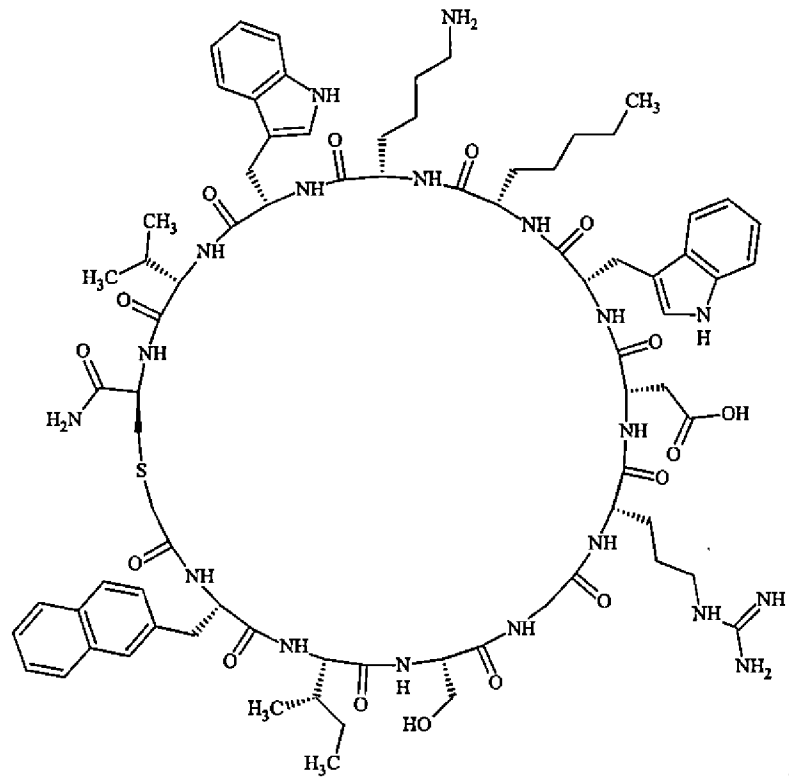
[化17]



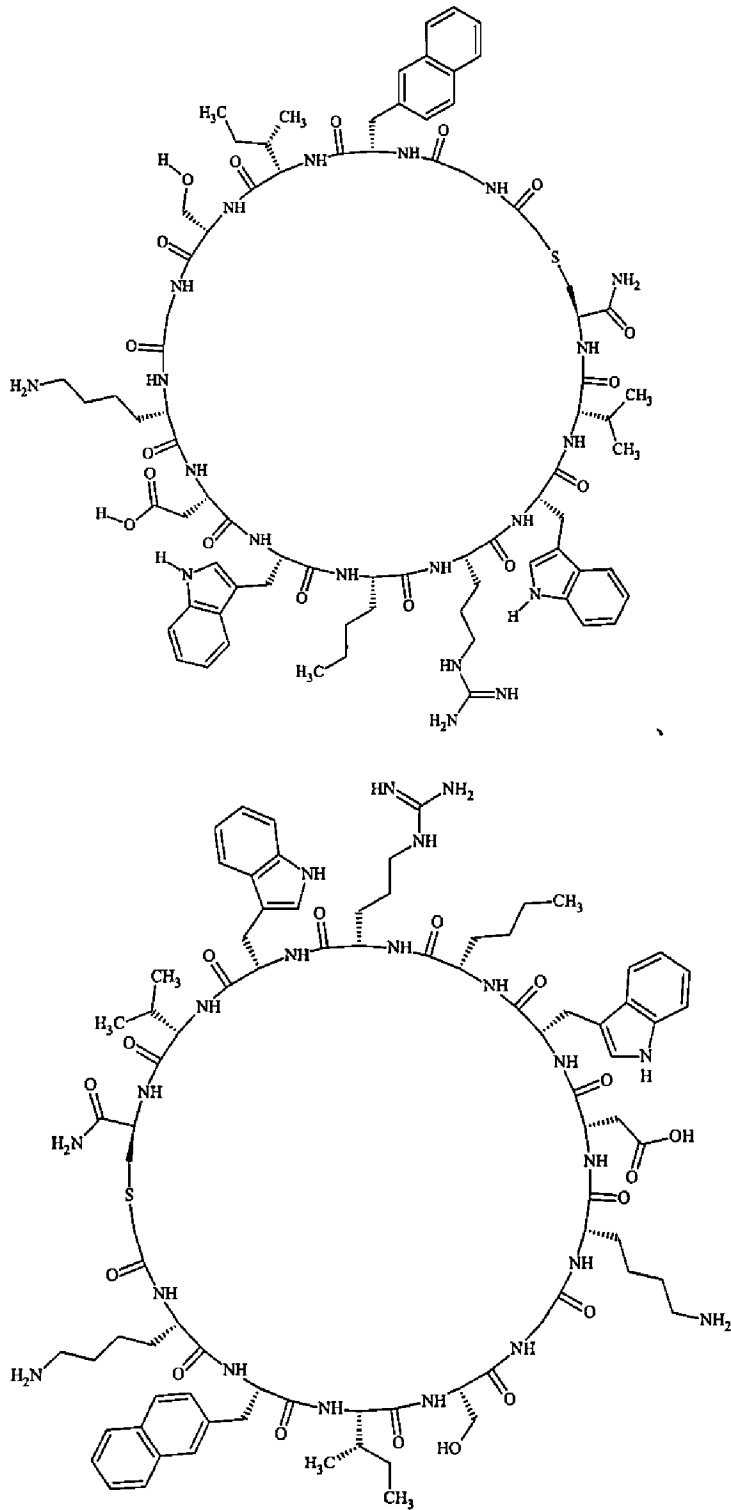
[化19]



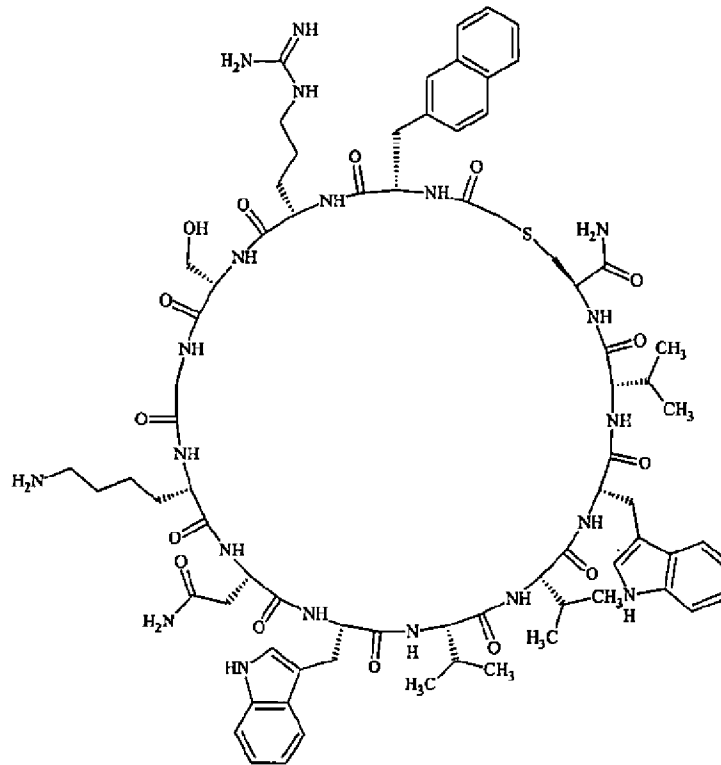
[化21]



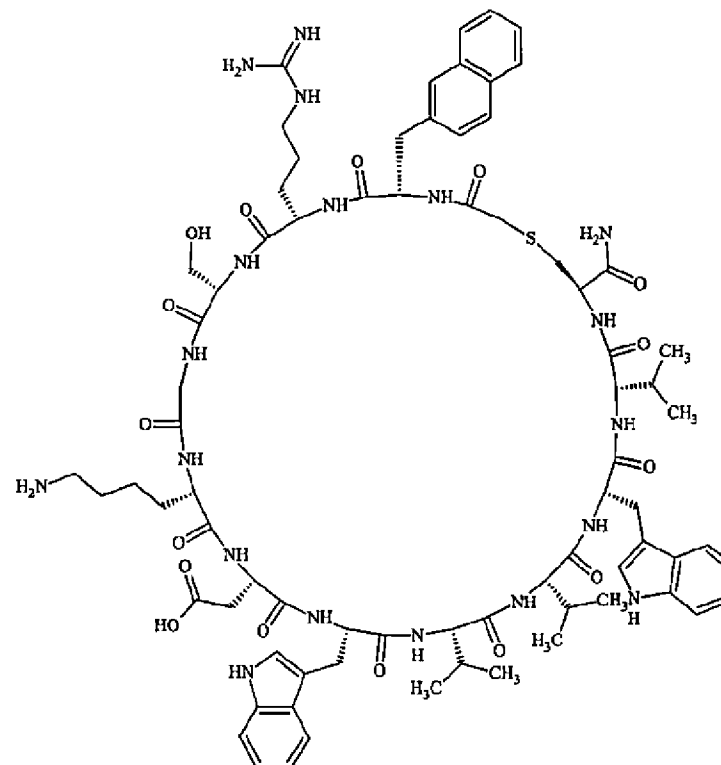
[化22]



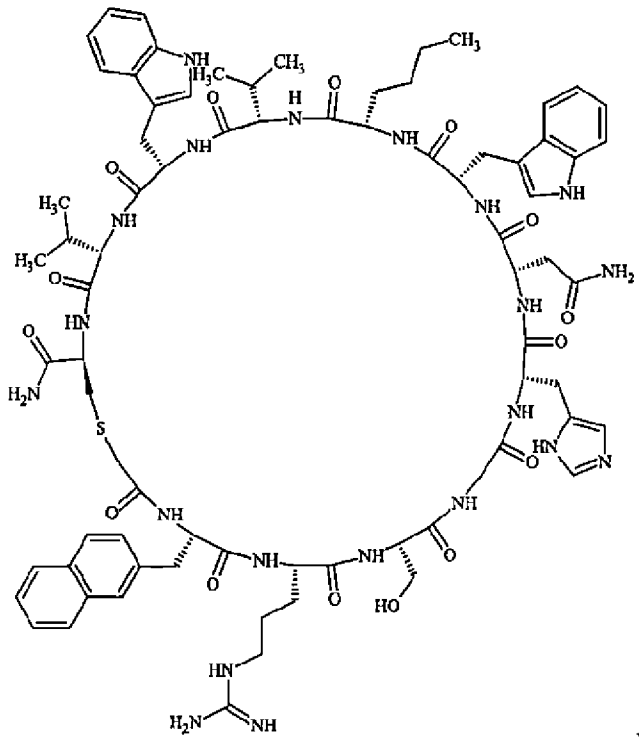
[化24]



[化25]

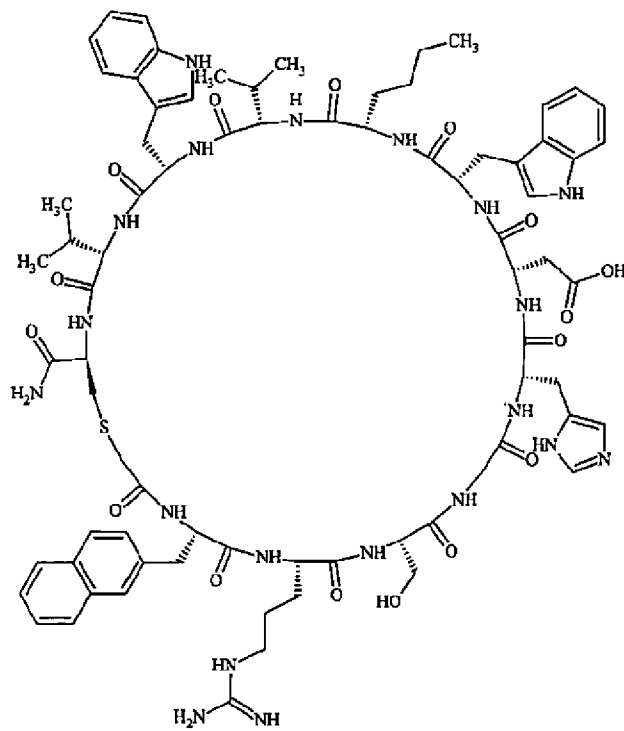


[化26]



、および

[化27]



で表される化合物からなる群より選択される、請求項 26 に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩。

[請求項28] 請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物。

[請求項29] 重症下肢虚血または末梢動脈疾患の治療または予防のための、請求項 28 に記載の医薬組成物。

[請求項30] 請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩を有効成分として含む、血管新生促進剤。

[請求項31] 請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の大環状ポリペプチドまたはその薬理上許容される塩の治療または予防有効量をヒトに投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法。

[請求項32] 疾患または症状が、重症下肢虚血または末梢動脈疾患である、請求項 31 に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/032984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. C07K7/64 (2006.01) i, A61K38/12 (2006.01) i, A61P9/10 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl. C07K7/64, A61K38/12, A61P9/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Japanese Published Examined Utility Model Applications	1922-1996
Japanese Published Unexamined Utility Model Applications	1971-2017
Japanese Examined Utility Model Registrations	1996-2017
Japanese Registered Utility Model Specifications	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-519062 A (BRISTOL MYERS SQUIBB CO.) 30 June 2016, claim 1 & US 2014/0294898 A1, claim 1 & WO 2014/151634 A1 & EP 2970390 A1	1-32
Y	JP 2007-524598 A (DYAX CORP.) 30 August 2007, paragraphs [0092], [0093], [0100], fig. 3, 6 & US 2005/0214859 A1, paragraphs [0118]-[0120], [0131]-[0133], fig. 3, 6 & WO 2004/078778 A2 & EP 1603935 A4	1-32

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 December 2017	Date of mailing of the international search report 19 December 2017
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/032984

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JEANNE, A. et al., Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent, Oncotarget, 22 May 2015, vol. 6, no. 20, pp. 17981-18000, abstract, p. 17982, right column, paragraph 2	1-32
Y	JP 2014-525740 A (UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE) 02 October 2014, claims 1, 6, 10-14 & US 2014/0296477 A1, claims 1, 6, 10-14 & WO 2013/007933 A1 & EP 2729495 A1	1-32
Y	JP 04-288020 A (W. R. GRACE & CO.-CONN.) 13 October 1992, claim 1, paragraphs [0002], [0003], [0045] & US 5190920 A, claim 1, column 1, lines 6-22 & EP 478101 A2	1-32
Y	US 2003/0171298 A1 (INKINE PHARMACEUTICALS MCP HAHNEMANN) 11 September 2003, paragraphs [0005], [0137] (Family: none)	1-32

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/64(2006.01)i, A61K38/12(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/64, A61K38/12, A61P9/10, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2016-519062 A (ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー) 2016.06.30, 請求項1 & US 2014/0294898 A1, Claim 1 & WO 2014/151634 A1 & EP 2970390 A1	1-32
Y	JP 2007-524598 A (ダイアックス、コープ) 2007.08.30, [0092]-[0093], [0100], 図 3, 6 & US 2005/0214859 A1, [0118]-[0120], [0131]-[0133], Fig. 3, 6 & WO 2004/078778 A2 & EP 1603935 A4	1-32

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- | | |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

05.12.2017

国際調査報告の発送日

19.12.2017

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 良子

4 B

3644

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JEANNE A, et al., Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent, Oncotarget, 2015.05.22, Vol.6, No.20, p.17981-18000, 要約, 第17982頁右欄第2段落	1-32
Y	JP 2014-525740 A (ユニヴェルシテ ドゥ ランス シャンパーニ ユ アルデンヌ) 2014.10.02, 請求項1,6,10-14 & US 2014/0296477 A1, Claims 1,6,10-14 & WO 2013/007933 A1 & EP 2729495 A1	1-32
Y	JP 04-288020 A (ダブリュー・アール・グレイス・アンド・カンパ ニー—コネテイカツト) 1992.10.13, 請求項 1, [0002]-[0003], [0045] & US 5190920 A, Claim 1, column 1, line 6-22 & EP 478101 A2	1-32
Y	US 2003/0171298 A1 (INKINE PHARMACEUTICALS MCP HAHNEMANN) 2003.09.11, [0005], [0137] (ファミリーなし)	1-32