

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3553062号  
(P3553062)

(45) 発行日 平成16年8月11日(2004.8.11)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> F I  
**A 6 1 K 38/00** A 6 1 K 37/02  
**A 6 1 P 43/00** A 6 1 P 43/00 1 1 1  
**// C 0 7 K 7/06** C 0 7 K 7/06 Z N A

請求項の数 24 (全 25 頁)

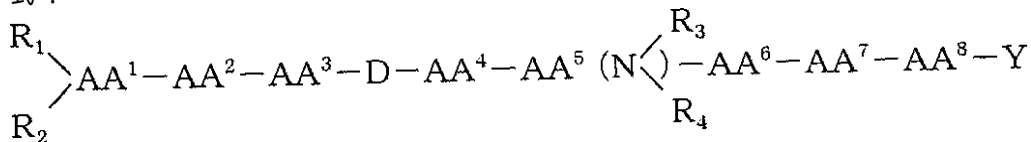
<p>(21) 出願番号 特願平6-504762                  (86) (22) 出願日 平成5年7月27日(1993.7.27)                  (65) 公表番号 特表平6-511495                  (43) 公表日 平成6年12月22日(1994.12.22)                  (86) 国際出願番号 PCT/US1993/007036                  (87) 国際公開番号 W01994/002163                  (87) 国際公開日 平成6年2月3日(1994.2.3)                  審査請求日 平成10年10月23日(1998.10.23)                  (31) 優先権主張番号 07/919,537                  (32) 優先日 平成4年7月27日(1992.7.27)                  (33) 優先権主張国 米国(US)                  (31) 優先権主張番号 08/078,419                  (32) 優先日 平成5年6月17日(1993.6.17)                  (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者                  ジ アドミニストレイターズ オブ ザ                  トュラン エデュケーションアル ファンド                  アメリカ合衆国、70112 ルイジアナ                  州、ニューオーリンズ、リュラン アベニ                  ュー 1430                  (73) 特許権者                  ソシエテ・ドゥ・コンセイユ・ドゥ・ルシ                  エルシュ・エ・ダプリケーション・シャン                  ティフィック・エス・ア・エス                  フランス共和国エフ-75016 パリ、                  リュー・デュ・ドクトゥール・ブランシュ                  51-53                  (74) 代理人                  弁理士 朝日奈 宗太                  最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 ニューロメジンB受容体拮抗物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：



(式中、

AA<sup>1</sup>は芳香族 - アミノ酸のD - またはL - 異性体；

AA<sup>2</sup>はCysのD - またはL - 異性体；

AA<sup>3</sup>はF<sub>5</sub>Phe、Phe、またはX - Phe(ここでXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)

；

AA<sup>4</sup>はTrpまたは芳香族 - アミノ酸；

AA<sup>5</sup>はLysまたはOrn；

AA<sup>6</sup>はLeu、Ile、Nle、Val、Nal、Trp、Me - Trp、Bpa、F<sub>5</sub>Phe、Phe、またはX - Phe(ここでXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)；

AA<sup>7</sup>はCysのD - またはL - 異性体；

AA<sup>8</sup>は芳香族 - アミノ酸、ThrおよびSerよりなる群から選ばれたD - またはL - 異性体

；

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキ

ニル、フェニル、ナフチル、 $C_{7-12}$ のフェニルアルキル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルケニル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルキニル、 $C_{11-20}$ のナフチルアルキル、 $C_{12-20}$ のナフチルアルケニル、または $C_{12-20}$ のナフチルアルキニル、COE、またはCOOE（ここでEは $C_{1-12}$ のアルキル、 $C_{2-12}$ のアルケニル、 $C_{2-12}$ のアルキニル、フェニル、ナフチル、 $C_{7-12}$ のフェニルアルキル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルケニル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルキニル、 $C_{11-20}$ のナフチルアルキル、 $C_{12-20}$ のナフチルアルケニル、または $C_{12-20}$ のナフチルアルキニルを表わす）を表わし、 $R_1$ または $R_2$ のうちの1つがCOEまたはCOOEであれば、他はHでなければならない；

$R_3$ および $R_4$ はそれぞれ独立にH、 $C_{1-12}$ のアルキル、 $C_{2-12}$ のアルケニル、 $C_{2-12}$ のアルキニル、フェニル、ナフチル、 $C_{7-12}$ のフェニルアルキル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルケニル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルキニル、 $C_{11-20}$ のナフチルアルキル、 $C_{12-20}$ のナフチルアルケニル、または $C_{12-20}$ のナフチルアルキニルを表わし；さらに

YはOR<sub>5</sub>またはNR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、（ここで $R_5$ 、 $R_6$ および $R_7$ はそれぞれ独立にH、 $C_{1-12}$ のアルキル、 $C_{2-12}$ のアルケニル、 $C_{2-12}$ のアルキニル、フェニル、ナフチル、 $C_{7-12}$ のフェニルアルキル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルケニル、 $C_{8-12}$ のフェニルアルキニル、 $C_{11-20}$ のナフチルアルキル、 $C_{12-20}$ のナフチルアルケニル、または $C_{12-20}$ のナフチルアルキニルを表わす）を表わす；

ただし、AA<sup>1</sup>およびAA<sup>2</sup>の両方ともD - 異性体とすることはできない；

またさらに、AA<sup>8</sup>がThrまたはSerであればAA<sup>6</sup>はValとすることはできない）

で示されるオクタペプチドからなり、ニューロメジンBにより誘導されるイノシトールリン酸の合成を阻害する、ニューロメジンB受容体拮抗剤。

【請求項2】

AA<sup>3</sup>がTyrである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項3】

AA<sup>4</sup>がTrpまたはIleである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項4】

AA<sup>4</sup>がTrpまたはIleである請求項2記載の拮抗剤。

【請求項5】

$R_3$ および $R_4$ がそれぞれ独立にHである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項6】

$R_3$ および $R_4$ がそれぞれ独立にHである請求項4記載の拮抗剤。

【請求項7】

AA<sup>5</sup>がLysである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項8】

AA<sup>6</sup>がValである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項9】

AA<sup>6</sup>が芳香族 - アミノ酸である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項10】

AA<sup>8</sup>がThrである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項11】

AA<sup>8</sup>が芳香族 - アミノ酸である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項12】

AA<sup>1</sup>がD - 異性体であってAA<sup>8</sup>がL - 異性体である、またはAA<sup>1</sup>がL - 異性体であってAA<sup>8</sup>がD - 異性体である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項13】

前記オクタペプチドが式：

H<sub>2</sub> - D - Ile - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Ile - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Ile - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Ile - Cys - Thr - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Ile - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Ile - Cys - Ile - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Ile - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Ile - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - D - Ile - NH<sub>2</sub>；

10

20

30

40

50

H<sub>2</sub> - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - D - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Nal - D - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - D - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Trp - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Phe - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Nal - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ;  
 H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Nal - Cys - Thr - NH<sub>2</sub> ;

または

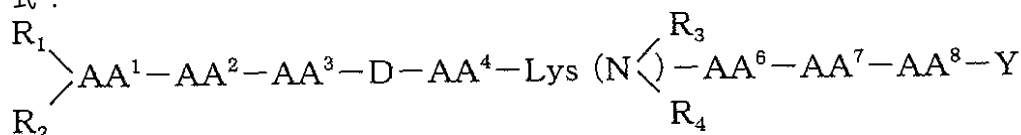
H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Orn - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>

である請求項 1 記載の拮抗剤。

10

【請求項 1 4】

式：



(式中、

AA<sup>1</sup>は芳香族 - アミノ酸の D - または L - 異性体；

AA<sup>2</sup>はCysの D - または L - 異性体；

AA<sup>3</sup>はF<sub>5</sub>Phe、Phe、または X - Phe (ここで X はハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)

20

；

AA<sup>4</sup>はTrpまたは芳香族 - アミノ酸；

AA<sup>6</sup>はThrまたはSer；

AA<sup>7</sup>はCysの D - または L - 異性体；

AA<sup>8</sup>は芳香族 - アミノ酸よりなる群から選ばれた D - または L - 異性体；

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニル、COE、またはCOOE (ここでEはC<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わし、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>のうちの1つがCOEまたはCOOEであれば、他はHでなければならない；

30

R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わし；さらに

YはOR<sub>5</sub>またはNR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、(ここでR<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わす；

40

ただし、AA<sup>1</sup>およびAA<sup>2</sup>の両方ともD - 異性体とすることはできない)

で示されるオクタペプチドからなり、ニューロメジン B により誘導されるイノシトールリン酸の合成を阻害する、ニューロメジン B 受容体拮抗剤。

【請求項 1 5】

AA<sup>1</sup>D - Pheである請求項14記載の拮抗剤。

【請求項 1 6】

AA<sup>3</sup>がTyrである請求項14記載の拮抗剤。

【請求項 1 7】

50

AA<sup>4</sup>がTrpである請求項14記載の拮抗剤。

【請求項18】

AA<sup>3</sup>がTyrである請求項15記載の拮抗剤。

【請求項19】

AA<sup>4</sup>がTrpである請求項15記載の拮抗剤。

【請求項20】

AA<sup>3</sup>がTyrである請求項19記載の拮抗剤。

【請求項21】

AA<sup>5</sup>がLysである請求項14記載の拮抗剤。

【請求項22】

AA<sup>6</sup>がThrである請求項14記載の拮抗剤。

【請求項23】

AA<sup>1</sup>がD - 異性体であってAA<sup>8</sup>がL - 異性体である、またはAA<sup>1</sup>がL - 異性体であってAA<sup>8</sup>がD - 異性体である請求項14記載の拮抗剤。

【請求項24】

前記オクタペプチドが式：

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys ( iPr ) - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys ( diEt ) - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Ser - Cys - Thr - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> - D - Nal - D - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>；

または

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Phe - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>である請求項14記載の拮抗剤。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

哺乳動物のボンベシン ( Bn ) 関連ペプチド、ガストリン - 放出ペプチド ( GRP ) およびニューロメジン B ( NMB ) は、広範な生物学的および薬理学的効果を有する。これらには、数多くの胃腸のホルモンおよびペプチドの放出刺激、外分泌腺分泌の化学走性 ( chemotaxis ) の刺激、平滑筋の収縮、温度調節などの中樞神経系における効果、行動の効果、日リズムの維持、TSH放出および飽満 ( satiety ) の障害が含まれる。Bn - 関連ペプチドはまた、数多くの正常細胞 (たとえば、気管支細胞、子宮内膜口細胞および3T3細胞) と同様、ヒト小細胞肺癌細胞、ラット肝細胞性腫瘍細胞、前立腺細胞および乳房腺がん細胞などの腫瘍細胞における成長因子としても機能する。

近年の構造 - 機能およびクローニングの研究で少なくとも2つのクラスの受容体がBn - 関連ペプチドの作用を媒介していることが立証されている。1つのクラス、好GRP ( GRP - preferring ) のサブタイプ ( GRP受容体またはGRP - R ) は、GRPに対して高い親和性を有し、NMBに対して低い親和性を有する一方、いま1つのクラス、好NMB ( NMB - preferring ) サブタイプ ( NMB受容体またはNMB - R ) は、NMBに対して高い親和性を有し、GRPに対してはより低い親和性を有する。いずれのクラスの受容体も中枢神経系ならびに胃腸管のいずれにも広く存在している。近年まで、Bn - 関連ペプチドが種々のプロセスを媒介することにおける薬理学的重要性もしくは、どの受容体のサブタイプが、Bn - 関連ペプチドの種々の報告されている生物学的効果を媒介しているかは明らかでなかった。

5つの異なるクラスのBn - 受容体拮抗物質が発表されている。ジェンセン、アールティ - ( Jensen, R.T. ) ら、トレンドズ イン ファーマコロジカル サイエンス ( Trends Pharmacol. Sci. ) 12巻13頁 ( 1991 )。これらのクラスの多くのはGRP受容体に対する高い有効性、作用の長期持続性および選択性を有し、したがって種々の薬理学的結果を媒介する際のGRPまたはGRP受容体の役割を生体内においても規定するのに有用である。しかしながら現時点では、満足できるほど選択的なまたは強力なNMB受容体に対する拮抗物質は発表

10

20

30

40

50

されていない。さらに、NMBに対して適用されるばあい、強力で選択的な受容体の拮抗物質をつくるための方法論で成功裡に用いられたものはない（たとえばNMB受容体拮抗物質をもたらすNMB偽ペプチドまたはdesMet<sup>9</sup>NMBまたはdesMet<sup>9</sup>NMBエステルの合成など）。NMB-Rに対する選択的な拮抗物質がないので、NMBの薬理的意義を評価することは困難となっている。

近年、天然のソマトスタチン(SS)、ソマトスタチン-14(SS-14)が、ポンペシン受容体を有することが知られている3T3細胞およびヒト小細胞肺癌細胞のトライトン(triton)抽出物中の120kDの蛋白質と<sup>125</sup>I-GRPとの交差結合を阻害することが報告された。また最近の研究で、SS-14がオピエイト(opiate)受容体との結合をも弱く阻害することができることも立証され、つづいて構造-機能を調べることによって、強力なミューオピオイド受容体拮抗物質として機能する、種々のD-アミノ酸で置換されたおよびつなぎとめられたアミノ酸で置換された環状ソマトスタチン類似体が同定されることとなった。

発明の概要

略語

Nal = 3 - (2 - ナフチル) - アラニンまたは 3 - (1 - ナフチル) - アラニン

Bpa = 3 - (4 - ピフェニル) - アラニン

X - Phe = ベンゼン環で p -、o - または m - 置換を有するフェニルアラニン、たとえば、3 - (4 - クロロフェニル) - アラニン

F<sub>5</sub>Phe = 3 - (ペンタフルオロフェニル) - アラニン

Ile = ノルロイシン

Me - Trp = インドール環の窒素がメチルに置換されたTrp

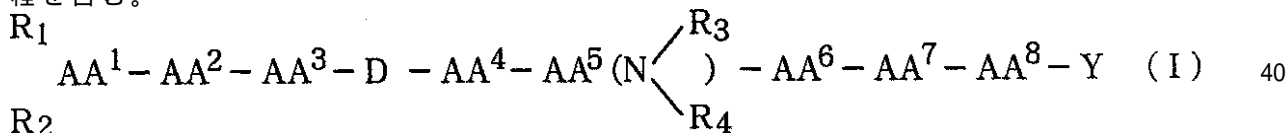
$\text{Lys} \left( \begin{array}{l} \text{R}_3 \\ \text{R}_3 \end{array} \right) = \epsilon \text{ アミノ基が } \text{R}_3 \text{ および } \text{R}_4 \text{ で置換をうけた Lys。}$

したがって、Lys(iPr)およびLys(diEt)は、 $\epsilon$ アミノ基がそれぞれイソプロピル基で1つ置換された、および2つのエチル基で2つ置換されたLys残基を表わす。

$\text{Orn} \left( \begin{array}{l} \text{R}_3 \\ \text{R}_3 \end{array} \right) = \delta \text{ アミノ基が } \text{R}_3 \text{ および } \text{R}_4 \text{ で置換をうけた Orn}$

本発明は、ニューロメジンBによって誘導される細胞の生化学的活性を選択的に阻害する方法に関する。

方法の実施態様の1つには、下記の式で示されるオクタペプチドと細胞とを接触させる工程を含む。



(式中、

AA<sup>1</sup>は芳香族 - アミノ酸のD - またはL - 異性体；

AA<sup>2</sup>はCysのD - またはL - 異性体；

AA<sup>3</sup>はF<sub>5</sub>Phe、Phe、またはX - Phe(ここでXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)；

；

AA<sup>4</sup>はTrpまたは芳香族 - アミノ酸；

AA<sup>5</sup>はLysまたはOrn；

AA<sup>6</sup>はLeu、Ile、Ile、Val、Nal、Trp、Me - Trp、Bpa、F<sub>5</sub>Phe、Phe、またはX - Phe(ここ 50

でXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)；

AA<sup>7</sup>はCysのD - またはL - 異性体；

AA<sup>8</sup>は芳香族 - アミノ酸、ThrおよびSerよりなる群から選ばれたD - またはL - 異性体；

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニル、COE、またはCOOE(ここでEはC<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わし、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>のうちの1つがCOEまたはCOOEであるばあい、他はHでなければならない；

R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わし；さらに

YはOR<sub>5</sub>またはNR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、(ここでR<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わす；

ただし、AA<sup>1</sup>およびAA<sup>2</sup>の両方ともD - 異性体とすることはできない；またさらに、AA<sup>8</sup>がThrまたはSerであればAA<sup>6</sup>はValとすることはできない)。

この実施態様を行なうのに用いることができるオクタペプチドには以下のものが含まれるが、これらに限定されるものではない：

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 1)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Nal - Cys - Thr - NH<sub>2</sub> (類似体 # 2)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Nal - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 3)；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 4)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - D - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 8)；

H<sub>2</sub> - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - D - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 9)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - D - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 10)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - D - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 11)；

H<sub>2</sub> - D - Trp - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 12)；

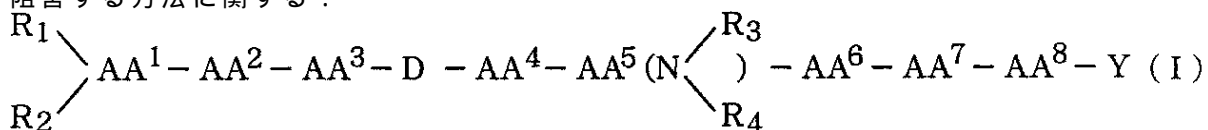
H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Phe - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 13)；

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Nal - Lys - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 17)；

H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Nal - Cys - Thr - NH<sub>2</sub>；および

H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Orn - Val - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>。

本発明のいま1つの実施態様は、細胞を以下の式で示されるオクタペプチドと接触させる工程を含んでなる、ニューロメジンBによって誘導される細胞の生化学的活性を選択的に阻害する方法に関する：



(式中、

AA<sup>1</sup>は芳香族 - アミノ酸のD - またはL - 異性体；

AA<sup>2</sup>はCysのD - またはL - 異性体；

AA<sup>3</sup>はF<sub>5</sub>Phe、Phe、またはX - Phe(ここでXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)；

；

10

20

30

40

50

AA<sup>4</sup>はTrpまたは芳香族 - アミノ酸 ;

AA<sup>5</sup>はLysまたはOrn;

AA<sup>6</sup>はThrまたはSer;

AA<sup>7</sup>はCysのD - またはL - 異性体 ;

AA<sup>8</sup>は芳香族 - アミノ酸よりなる群から選ばれたD - またはL - 異性体 ;

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニル、COE、またはCOOE(ここでEはC<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わし、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>のうちの1つがCOEまたはCOOEであるばあい、他はHでなければならない ;

R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わし ; さらに

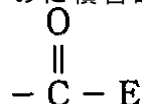
YはOR<sub>5</sub>またはNR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、(ここでR<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>はそれぞれ独立にH、C<sub>1-12</sub>のアルキル、C<sub>2-12</sub>のアルケニル、C<sub>2-12</sub>のアルキニル、フェニル、ナフチル、C<sub>7-12</sub>のフェニルアルキル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルケニル、C<sub>8-12</sub>のフェニルアルキニル、C<sub>11-20</sub>のナフチルアルキル、C<sub>12-20</sub>のナフチルアルケニル、またはC<sub>12-20</sub>のナフチルアルキニルを表わす)を表わす ; ただし、AA<sup>1</sup>およびAA<sup>2</sup>の両方ともD - 異性体とすることはできない)。

この第2の実施態様を行なうのに用いることができるオクタペプチドには以下のものが含まれるが、これらに限定されるものではない :

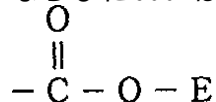
H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 7) ; H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys (iPr) - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 15) ; H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys (diEt) - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> (類似体 # 16) ; H<sub>2</sub> - D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Ser - Cys - Thr - NH<sub>2</sub> ; H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ; H<sub>2</sub> - D - Nal - D - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub> ; および H<sub>2</sub> - D - Nal - Cys - Phe - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Nal - NH<sub>2</sub>。

式(I)において、ポリペプチド鎖の慣習的な表記にしたがって、N - 末端は左にあり、C - 末端は右にある。ペプチド配列におけるAA<sup>1</sup>、AA<sup>2</sup>などの記号は、アミノ酸残基、すなわち、N - 末端にあるばあいは = N - CH(R) - CO - またはN - 末端にないばあいは - NH - CH(R) - CO - (ここでRはそのアミノ酸残基の側鎖を示す)を表わす。したがってValに対してRは - CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。またアミノ酸残基が光学的に活性であるばあい、D - 体と明記しないかぎり、意味するのはL - 体の配置である。

式(I)で、2つのCys残基(すなわち、AA<sup>2</sup>およびAA<sup>7</sup>)はジスルフィド結合を介して互いに結びついている。しかしながら、2つのCys残基のあいだのジスルフィド結合を示すのに慣習的に用いられる線は、便宜上ここでは省略している。COEは



ならびにCOOEは



を表わす。

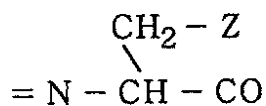
「芳香族 - アミノ酸」によって意味するのは、式

10

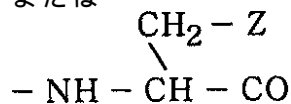
20

30

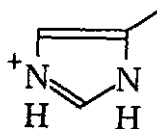
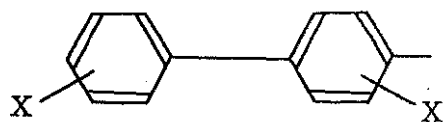
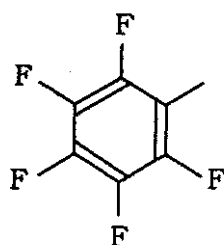
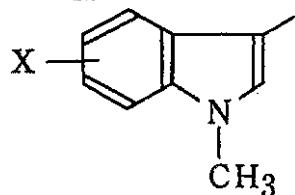
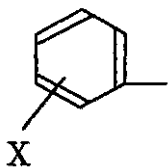
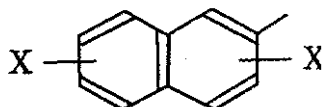
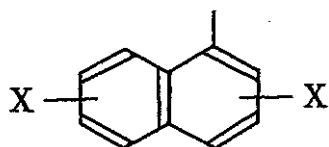
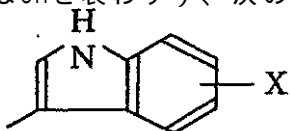
40



または



(ここでZは芳香族を含む一部分を表わす)の、アミノ酸残基である。Zの例にはベンゼン環および芳香環上にXで置換をうけたかうけていない(ここでXはハロゲン、NO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、またはOHを表わす)、次の構造が含まれるが、これらに限定されない:



本発明の芳香族 - アミノ酸の他の例は、MeHis、His( - Me)またはHis( - Me)などの置換をうけたHisである。

式(I)で示されるオクタペプチドの薬学上許容しうる塩を、その疾病がNMBにより誘導される生化学的活性から生じるものである患者に対して投与することもまた、本発明の範

10

20

30

40

50

囲のなかにある。換言すれば、オクタペプチドは薬学上許容しうる塩、たとえば酸付加塩、または金属複合体（たとえば亜鉛、鉄などとの）のかたちで供給することができる。酸付加塩として実例となる例は、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸またはトルエンルホン酸などの有機酸とのもの、タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどの重合酸とのもの、ならびに塩酸、臭酸、硫酸またはリン酸などの無機酸とのものである。

「ニューロメジン B により誘導される細胞の生化学的活性を選択的に阻害する」に引用される「選択的に」の語は、GRPで刺激されるアミラーゼ放出よりもNMBで刺激されるイノシトールリン酸の合成を優先的に阻害することをいう。本発明を行なうのに用いられる類似体のこのような優先性は、後の表 2 に明瞭に示している。

本発明の他の特徴および利点は、以下の図面および好ましい実施態様の記載、ならびに添付の請求の範囲より明らかとなるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

まず図面を説明する。

図 1 は、NMB - R がトランスフェクトされた細胞上のNMB受容体に対する $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの結合を、種々のソマトスタチンオクタペプチド類似体が阻害する能力を示すグラフである。

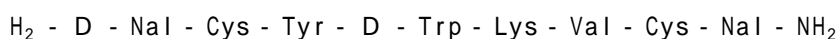
図 2 は、NMBがトランスフェクトされた細胞においてNMBで刺激される[ $^3\text{H}$ ] イノシトールリン酸 ( IP ) の増大を、SS - 14、SS - 28および種々の環状ソマトスタチンオクタペプチド類似体が阻害する能力を示すグラフである。

図 3 は、NMB - R がトランスフェクトされた細胞においてNMBで刺激される[ $^3\text{H}$ ] IPの増大の量 - 依存性曲線に対する、環状SS - オクタ ( すなわち、類似体 # 1 ) の濃度の増大の効果を示すグラフである。

図 4 は、NMB - R がトランスフェクトされた細胞への $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの結合をNMBが阻害する量 - 阻害曲線に対する、一定の濃度の環状SS - オクタ ( すなわち、類似体 # 1 ) の効果を示すグラフである。

#### 好ましい実施態様の記載

特定のソマトスタチンオクタペプチド類似体は、NMB - R 受容体拮抗物質として機能し、GRP - R よりもNMB - R に対して100 - 倍より大の親和性を有する。もっとも強力な類似体、環状SS - オクタすなわち



は、NMB - R がトランスフェクトされた3T3細胞上 ( Kd 216 nM )、ならびに膠芽腫 ( glioblastoma ) C - 6 細胞上 ( Kd 59 nM ) のNMB受容体への $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの結合を阻害した。この類似体は、ラット膵腺房のGRP - R に対して100倍低い親和性を有していた。数多くの構造的に関連するSS - オクタペプチド類似体を合成して行なった、構造 - 機能の研究で、天然のSS - 14またはSS - 28以外のこれらの類似体もまたそれぞれNMB受容体の結合を阻害することが示された。[ SS - 14およびSS - 28の構造については、当該技術分野においてよく知られており、たとえば、バケム ( Bachem ) カリフォルニア1991 ~ 1992カタログ、トランス ( Torrance )、カリフォルニアを参照のこと ] ポジション 1、2、7および8における立体化学、ポジション 1、3および4における置換基の疎水性および環の大きさならびにポジション 5 における基の塩基性のすべてが、NMB - R への親和性を決定するうえで重要である。各SS - オクタ類似体はNMB - R がトランスフェクトされた細胞において[ $^3\text{H}$ ] IPを増大させなかった；しかしながら、それぞれの物質はNMBで刺激される増大を阻害した。各SS - オクタ類似体の結合阻害能は、NMBで刺激される[ $^3\text{H}$ ] IPの増大の阻害能に密接に関連していた。

もっとも強力な類似体、環状SS - オクタは、NMB量 - 応答曲線を平行に右側へシフトさせ、シルド ( Schild ) プロットは全体として有意に変化せず、親和性は230nMであった。さらに、0.5  $\mu\text{M}$  の環状SS - オクタは、NMB - R への親和性の減少を引き起こし、NMB - R 結合部位の数には変化をきたさないことから、競合拮抗性を示している。環状SS - オクタは

10

20

30

40

50

、膵腺房上のGRP受容体からのBn - 刺激性アミラーゼ放出またはC - 6細胞におけるエンドセリンによる [ $^3\text{H}$ ] IPの増大を阻害せず、またBn - 非関連ペプチドに対する多くの異なるリガンドの結合をも阻害しなかった。構造 - 機能の研究でSS - オクタ類似体もまた、SS受容体およびミュー - オピオイド受容体と相互作用することが示された；しかし、これら受容体およびNMB - Rに対する親和性のあいだには相関がなく、これらの活性が分離されることが示している。この結果は、GRP受容体よりもNMBに対して100倍よりも大の選択性を有する拮抗物質の1つのクラスを、はじめて示すものである。

当業者は、本明細書中の記載にもとづいて本発明をその十分な範囲にまで利用することができると思えるものである。それゆえ以下の実施態様は、単なる例示であって、開示の残余をいかにしようにも何ら制限しないよう解釈されるべきものである。

10

#### 実験情報

##### 材料：

ラット膠芽腫C - 6細胞は、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) (ロックビレ (Rockville)、メリーランド) から、ダルベッコ変法必須培地、ウシ胎児血清、およびゼネチシン (Geneticin) アミノグリコシド G - 418) はギブコ (GIBCO) (ウォルサム (Waltham)、マサチューセッツ) から、ならびに細胞培養フラスコおよび24 - 穴プレートはコスター (Costar) 社 (ケンブリッジ、マサチューセッツ) から入手した。

ウシ血清アルブミン (フラクションV) およびヘベスは、ベーリンガー マンハイム バイオケミカルズ (Boehringer Mannheim Biochemicals) (インディアナポリス、インディアナ) から；ダイズ トリプシン インヒビター、EGTA、およびバシトラシンは、シグマ ケミカル (Sigma Chemical) 社 (セント ルイス、ミズリー) から；グルタミンはメディア セクション (Media Section)、ナショナル インスティテュート オブ ヘルス (National Institutes of Health) (ベセスダ、メリーランド) から；NMB、[ Tyr<sup>4</sup> ] Bn、ボンベシン、GRPおよびエンドセリン 1 (ET - 1) はペニンシュラ ラボラトリーズ (Peninsula Laboratories) (ベルモント、カリフォルニア) から；Na<sup>125</sup>Iは、アマーシャム (Amersham) 社 (アーリントン ハイツ (Arlington Heights)、イリノイ) から；myo - [ 2 - <sup>3</sup>H ] イノシトール (16 ~ 20Ci/ミリモル) はニュー - イングランド nuklear (New England Nuclear) (ボストン、マサチューセッツ) から；ソマトスタチン - 14 (SS - 14) およびソマトスタチン - 28 (SS - 28) はバケム、(トレンス、カリフォルニア) から；ドウエックス (Dowex) AG 1 - X8陰イオン交換樹脂 (100 ~ 200メッシュ、ギ酸型) はバイオ - ラッド (Bio - Rad) (リッチモンド、カリフォルニア)；ヒドロ - フルオー (Hydro - Fluor) シンチレーション液、メタノール (絶対)、および塩酸はジェー ティー ベイカー ケミカル (J.T.Baker Chemical) 社 (フィリップスバーグ (Phillipsburg)、ニュージャージー) から入手した。

20

30

##### 方法：

##### 細胞系のトランスフェクションおよび維持

前に発表されたように、(ワダ、イー (Wada, E.) ら、ニューロン (Neuron) 6巻421頁 (1991)) 安定にトランスフェクトされたラットNMB受容体を発現しているBALB 3T3細胞 (NMB - Rがトランスフェクトされた細胞) は、ラット食道からつくった全長の好NMBボンベシン受容体クローンのリン酸カルシウム沈殿を用いてえられ、pCD2プラスミドの修飾バージョンのなかにサブクローン化した。細胞は集密となった時点で3 ~ 4日ごとに1mMEDTA中0.1%トリプシンを用いて継代した。ラット膠芽腫C - 6腫瘍細胞は同様に維持し、集密となった時点で毎週継代した。両細胞系とも、5%二酸化炭素雰囲気中で37℃にて培養した。ラットAR 42J膵腺房細胞は、抗生物質なしで、10% (容量/容量) ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。インキュベーションを行なう雰囲気は37℃にて10%二酸化炭素 - 90%加湿した空気であるものであった。

40

##### ラット膵腺房の調製

モルモットからの分散腺房は、前に発表されたように調製した (ジェンセン、アール ティーら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J.Biol.Chem.) 257巻5554

50

頁 (1982) ; およびペイキン、エス アール (Peikin, S.R.) ら、アメリカン ジャーナル オブ フィジオロジー (Am.J.Physiol.) 235巻G743頁 (1978) )。

#### ペプチドの調製

ペプチドは、メチルベンズヒドリルアミン樹脂上に標準固相法を用いて合成し、フッ化水素/アニソール混合物を用いて切断した。ペプチドは90%希釈酢酸溶液中で $I_2$ を用いて滴定することにより環化し、50%酢酸中セファデックス (Sephadex) G - 25を用いたゲル濾過およびアセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸緩衝液を用いたC18シリカのグラジエント溶出によって精製した。方法は前に詳しく記載されている (ササキ、ワイ (Sasaki, Y.) ら、ジャーナル オブ メディカル ケミストリー (J.Med.Chem.) 30巻1162頁 (1987) ) ; スチュワート、ジェイ エム (Stewart, J.M.) ら、ソリッド フェーズ ペプチド シンセシス (Solid Phase Peptide Synthesis)、第2版、ピアス ケミカル (Pierce Chemical) 社、ロックフォード (Rockford)、イリノイ (1984) ; コイ、ディー エッチ (Coy, D.H.) らテトラヘドロン (Tetrahedron)、44巻835頁 (1988) )。近質性は薄層クロマトグラフィー、分析HPLC、アミノ酸分析および質量分析スペクトルにより評価し、各ペプチドが96%より大の均質性を有すると確定した。

下記は類似体 # 1 の合成に関する詳細な記載である。本発明の他のペプチドは本明細書中に開示される合成法に適切な修飾をなすことにより当業者の能力の範囲内で調製することができる。

ステップ1: Boc - D - Nal - S - メチルベンジル - Cys - O - プロモベンジロキシカルボニル - Tyr - D - Trp - N - ベンジロキシカルボニル - Lys - Val - S - メチルベンジル - Cys - Nal - ベンズヒドリルアミン樹脂の調製

塩素イオン型のベンズヒドリルアミン - ポリスチレン樹脂 (アドバンスド ケムテック (Advanced ChemTech) 社) (1.2g、0.5ミリモル) を、下記の反応サイクルを行なうようにプログラムされたアドバンスド ケムテックペプチド合成機の反応容器中に入れた: (a) 塩化メチレン; (b) 塩化メチレン中33%トリフルオロ酢酸 (2回、それぞれ1および25分間); (c) 塩化メチレン; (d) エタノール; (e) 塩化メチレン; (f) クロロホルム中10%トリエチルアミン。

中和した樹脂を t - ブチロキシカルボニル (「Boc」) - Nal およびジイソプロピルカルボジイミド (それぞれ1.5ミリモル) とともに塩化メチレン中で1時間攪拌し、そののちえられたアミノ酸樹脂を、前記洗浄プログラムの段階 (a) から (g) までのサイクルにかけた。ついで下記のアミノ酸 (1.5ミリモル) を引き続き同じ手順で結合させた: Boc - S - メチルベンジル - Cys、Val、Boc - N - ベンジロキシカルボニル - Lys、Boc - D - Trp、Boc - O - プロモベンジロキシカルボニル - Tyr、および Boc - S - メチルベンジル - Cys および Boc - D - Nal。洗浄ならびに乾燥ののち完成したペプチド樹脂は1.78gの重量であった。

ステップ2: H - D - Nal - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys - Nal -  $NH_2$  の調製

ステップ1でえられたペプチド樹脂 (1.78g、0.5ミリモル) はアニソール (5ml)、ジチオスレイトール (100mg) および無水フッ化水素 (35ml) と0にて混合し、45分間攪拌した。過剰のフッ化水素は乾燥窒素流下で速やかに蒸発させ、エーテルにて遊離ペプチドを沈殿させて洗浄した。粗ペプチドを500mlの90%酢酸中に溶解し、その溶液に不変の茶色が観察されるようになるまで $I_2$ /メタノールの濃縮溶液を加えた。アスコルビン酸の添加により過剰の $I_2$ を除去し、溶液を少量にまで蒸発させて、セファデックス G - 25のカラム (2.5 x 90cm) に付し、50%酢酸を用いて溶出した。ついでUV吸収および薄層クロマトグラフィー (「TLC」) により主成分を含むとする画分を集めて少量にまで蒸発させ、そののちバイダック (Vydac) オクタデシルシラン (10~15 $\mu$ ) のカラム (1.5 x 70cm) に付し、ついで0.1%トリフルオロ酢酸水溶液中アセトニトリルの直接的濃度勾配で溶出した。画分は、TLCおよび分析高速液体クロマトグラフィー (「HPLC」) により調べて、最高の純度のものがえられるように集めた。

水から溶液をくり返し凍結乾燥して、白い綿毛状粉末として151mgの生成物をえた。生成物はHPLCおよびTLCにより均質であることがわかった。酸加水分解物のアミノ酸分析、お

10

20

30

40

50

よび高速原子衝撃質量分析 (FAB MS) により、オクタペプチドの組成を確認した。

$^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの調製

$^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMB (2200Ci/ミリモル) は、近年発表されたように (ベニヤ、アール  
 プイ (Benya, R.V.) ら、モレキュラー ファーマコロジー (Mol. Pharmacol.) 42巻1058  
 頁 (1992)) イオド - ジェン (Iodo - Gen) を用いて調製した。手短に言うと、20  $\mu\text{l}$  の0  
 .5Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 中2mCiのNa<sup>125</sup>Iとともに8.0  $\mu\text{g}$  の [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBに  
 、0.4  $\mu\text{g}$  のイオド - ジェンを加えた。22 にて6分間インキュベートしたのち300  $\mu\text{l}$  の  
 1.5Mジチオスレートルを加え、反応混合液を80 にて60分間インキュベートした。5ml  
 のメタノール、5mlの0.1%トリフルオロ酢酸、ならびに5mlの水で洗浄することにより調  
 製しておいたセブ - パック (Sep - Pak) カートリッジ (ウォーターズ アソシエーツ (Wa  
 ters Associates)、ミルフォード、マサチューセッツ) に反応混合液を付すことによっ  
 て遊離の<sup>125</sup>Iを分離した。0.1%トリフルオロ酢酸中60%アセトニトリルで200 -  $\mu\text{l}$  づつ  
 連続的に (10回) 遊離の<sup>125</sup>Iを溶出した。放射活性標識したペプチドは、もっとも高い放  
 射活性を有する3回の溶出分を合わせて、さらにそれらを046 - x 25 - cmの $\mu$  ボンダパッ  
 ク (BondaPak) カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフ (ウォーターズ アソシエイ  
 ツ、モデル204、レオダインインジェクター付) に付して非標識ペプチドから分離した  
 。カラムは流速1.0ml/min、60分間で0.1%トリフルオロ酢酸中アセトニトリルの16~64%  
 (容量/容量) の直線的濃度勾配にて溶出した。 $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBは、1% (質量  
 /質量) BSAを用いて - 20 にて保存し、少なくとも6週間は安定であった。

C - 6 膠芽腫およびNMB - Rがトランスフェクトされた細胞への $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの  
 結合

ラット膠芽腫C - 6またはNMB - Rがトランスフェクトされた細胞を用いる結合実験は、  
 前に発表されたように (ベニヤ、アール プイら、モレキュラー ファーマコロジー42巻  
 1058頁 (1992) ; およびウォン、エル - エッチ (Wang, L - H.) ら、バイオケミカル ジャ  
 ーナル (biochem. J.) 286巻641頁 (1992))、標準緩衝液 (130nM NaCl、7.7mM CK1、1.0  
 mM EGTA、0.02%ダイズ トリプシンインヒビター) に加えて50mMヘペス、1mM MgCl<sub>2</sub>、1.  
 5mM CaCl<sub>2</sub>、2.2mM KHPO<sub>4</sub>、0.015%グルタミン、および0.2%BSA (質量/容量) (pH7.4)  
 よりなる結合用緩衝液中に、ばらばらにした (disaggregated) 細胞を懸濁することによ  
 り行なった。インキュベーションには、75pM  $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBおよび15  $\times 10^6$  C - 6  
 細胞/mlまたは2  $\times 10^6$  NMB - Rトランスフェクト細胞/mlを含み、22 にて60分間行なった  
 。 $^{125}\text{I}$  - [ D - Tyr<sup>0</sup> ] NMBの非飽和 (nonsaturable) 結合は、インキュベーション混合液  
 に $\mu\text{M}$ 単位でNMBが含まれているばあいC - 6細胞またはNMB - Rがトランスフェクトされ  
 た細胞と結合した放射活性の量であった。非飽和結合はすべての実験で総結合の15%より  
 小であった ; すべての値を本明細書中に飽和 (saturable) 結合 (すなわち、総結合から  
 非飽和結合を引いた結合) として報告する。

$^{125}\text{I}$  - 標識 [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシンの腺房への結合。

$^{125}\text{I}$  - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシン (2000Ci/ミリモル) は、前に発表された方法 (ジェンセン、  
 アール ティーら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエ  
 ンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、75巻6139頁 (1978)) の変法 (ボン シュレンク (Vo  
 n Srenck) ら、アメリカン ジャーナル オブ フィジオロジー 256巻G747頁 (1989)  
 ) を用いて調製した。 $^{125}\text{I}$  - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシンは、セブ - パックカートリッジを用いて  
 $^{125}\text{I}$ より分離し、 $\mu$  ボンダパックC<sub>18</sub>のカラム (0.46  $\times$  25cm) を用いた逆相高压液体クロ  
 マトグラフィーにより非標識ペプチドから分離した。カラムは流速1ml/minにてアセトニ  
 トリル (22.5%) とリン酸トリエチルアンモニウム (0.25M、pH7.3) (77.5%) を用いて  
 イソクラティックで溶出した。インキュベーションには、50pM<sup>125</sup>I - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシ  
 ンを含み、37 にて60分間、膵腺房とともに行なった。 $^{125}\text{I}$  - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシンの非飽  
 和結合は、インキュベーション中に50pM  $^{125}\text{I}$  - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシン + 1  $\mu\text{M}$  ボンベシ  
 ンが含まれているばあいに腺房と結合した放射活性の量である。示されるすべての値は、飽  
 和結合、すなわち、 $^{125}\text{I}$  - [ Tyr<sup>4</sup> ] ボンベシンのみで測定した結合 (総結合) から1  $\mu\text{M}$   
 の非標識ボンベシンの存在下で測定した結合 (非飽和結合) を差し引いた結合に対する。

10

20

30

40

50

非飽和結合はすべての実験で総結合の10%より小であった。

#### 膜受容体アッセイ

膜はラット嗅球 (NMB膜受容体アッセイ)、AR42J細胞 (GRPおよびソマトスタチン膜受容体アッセイ)、モルモット大脳 ( $N_1$ 、ヒスタミン $H_1$ 、およびシグマ オピオイド膜受容体アッセイ)、ラット膵臓 ( $CCK_A$ 受容体アッセイ)、ラット大脳皮質 ( $CCK_B$ 、PYY、ニューロテンシン、 $\alpha_1$ -アドレナリン作動性、 $\alpha_2$ -アドレナリン作動性、ムスカリン様コリン作動性、神経系ベンゾジアゼピン、末梢系ベンゾジアゼピン、アデノシン、カルシウムチャンネル、およびN-メチル-D-アスパルテート膜受容体アッセイ) A10平滑筋細胞 ( $ET_A$ 膜受容体アッセイ)、ラット前脳 (TRH、ミュー-およびデルタ オピオイド膜受容体アッセイ)、ラット線条体 (ドーパミン $_1$  およびドーパミン $_2$  膜受容体アッセイ)、ならびにラット前皮質 (セロトニン $_2$  膜受容体アッセイ) から調製した。膜は、以下にとくに別記しない限りにおいては氷冷 (50mM トリス - 塩酸中で、ポリトロン (Polytron) (6、15秒に設定) を用いて調製し、39,000xg/10分間で2度、そのあいだで新鮮な緩衝液中に再懸濁して遠心を行なった。NMBおよびGRP膜受容体アッセイについては、最終のペレットは0.1mg/mlのバシトラシン、および0.1% BSAを含む50mM トリス - 塩酸中に再懸濁し、ソマトスタチン受容体アッセイについては10mM トリス - 塩酸中に再懸濁した。NMBおよびGRP膜結合アッセイについては、50pM  $^{125}I$ -NMB (または50pM  $^{125}I$ -[Tyr $^4$ ]Bn) を用い、4にて30分間インキュベーションを行ない、一方ソマトスタチンアッセイについてはインキュベーションは30にて25分間、0.1% BSA、5mM  $MgCl_2$  バシトラシン (0.02mg/ml)、トラスロール (trasyolol) (200KIU/ml) およびフッ化フェニルメチルスルフォニル (PMSF) (0.02mg/ml) を含む50mMヘペス (pH7.4) 中で、50pM  $^{125}I$ -[Tyr $^1$ ]ソマトスタチンを用いて行なった。インキュベーションは、前もって0.1% ポリエチレンイミン中に浸しておいたGF/Bフィルターを通して速やかに濾過することによって終了した (NMBおよびGRP受容体アッセイ)。各フィルターを氷冷緩衝液の5ml部分で3回洗浄した。種々の膜結合アッセイに対して用いられたリガンドは、[ $^3H$ ] サブスタンス P ( $NK_1$ 受容体)、[ $^{125}I$ ] エンドセリン-1 (エンドセリン $_A$ 受容体)、[ $^{125}I$ ] H5CCK-8 ( $CCK_A$ および $CCK_B$ 受容体)、[ $^{125}I$ ] PYY (PYY受容体)、[ $^3H$ ] ニューロテンシン (ニューロテンシン受容体)、[ $^3H$ ] ブラッディキニン (ブラッディキニン $_2$ 受容体)、[ $^3H$ ] 3-meHis TRH (TRH受容体)、[ $^3H$ ] プラゾシン (prazosin) ( $\alpha_1$ アドレナリン作動性受容体)、[ $^3H$ ] クロニジン (clonidine) ( $\alpha_2$ アドレナリン作動性受容体)、[ $^3H$ ] ジヒドロアルプレノロール (dihydroalprenolol) ( $\alpha_1$ アドレナリン作動性受容体)、[ $^3H$ ] QNB (ムスカリン様コリン作動性受容体)、[ $^3H$ ] R015-1788 (ベンゾジアゼピン-神経受容体)、[ $^3H$ ] R05-4864 (ベンゾジアゼピン-末梢受容体) [ $^3H$ ] Sch23390 (ドーパミン $_1$ 受容体)、[ $^3H$ ] スピペロン (spiperone) (ドーパミン $_2$ 受容体)、[ $^3H$ ] ケタンセリン (ketanserin) (セロトニン $_2$ 受容体)、[ $^3H$ ] ピリラミン (pyrilamine) (ヒスタミン $H_1$ 受容体)、[ $^3H$ ] シクロヘキシルアデノシン (アデノシン $_1$ 受容体)、[ $^3H$ ] MK-801 (N-メチル-D-アスパルテート受容体)、[ $^3H$ ] ペンタゾシン (pantazocine) (シグマ オピオイド受容体)、[ $^3H$ ] DAGO (ミュー オピオイド受容体) ならびに [ $^3H$ ] DPDPE (デルタ オピオイド受容体) であった。

#### ホスホイノシチド類の測定

C-6細胞およびNMB-Rがトランスフェクトされた細胞中の総ホスホイノシチド類は、前に発表されたように、若干修飾を加えて (ベニヤ、アール プイら、モレキュラー ファーマコロジー42巻1058頁 (1992) ; およびウォン、エル-エイチら、バイオケミカル ジャーナル286巻641頁 (1992) ) 測定した。細胞は24-穴プレート中で集密となるまで成長させ、ついで2% ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法必須培地中、100  $\mu$ ci/ml myo-[2- $^3H$ ] イノシトールを37にて48時間負荷した。細胞を洗浄し、ホスホイノシチド緩衝液 (標準緩衝液にさらに10mM LiCl、20mMヘペス、2mM  $CaCl_2$ 、2% BSA、および1.2mM  $MgSO_4$ を含む) 中で37にて15分間、ついで種々の濃度の作動物質または3nMのNMB (最高有効濃度の半分) および異なる濃度で可能性のある拮抗物質とともに60分間インキュベートした。氷冷したメタノール中1%塩酸を用いて反応を停止し、ついでイノシトールホス

10

20

30

40

50

フェート (IP) 類を前に発表されたように (ボローナ、エム (Bologna, M.) ら、キャンサー (Cancer) 63巻1714頁 (1989) ; およびエンド、ティエ (Endo, T.) ら、エンドクリノロジー (Endocrinol.) 131巻313頁 (1991) ) 単離した。手短に言うと、イオン交換カラムに付したのち、遊離の [ $^3\text{H}$ ] グリセロホスホリルイノシトールを60mMギ酸ナトリウム中5mMのテトラホウ酸2ナトリウムを用いて洗浄することにより除去した。そののち、前に発表されたように (ベニヤ、アール ブイラ、モレキュラー ファーマコロジー42巻1058頁 (1992) およびウォン、エル - エッチら、バイオケミカル ジャーナル286巻641頁 (1992) ) 総 [ $^3\text{H}$ ] イノシトールホスフェート類を1.0mMギ酸アンモニウム中100mMギ酸を用いて溶出した。

結果 :

SS - 14、SS - 28および種々の環状SS - オクタ類似体がNMBおよびGRP受容体と相互作用する能力を調べるために、NMB - Rがトランスフェクトされた細胞への $^{125}\text{I}$  - [D - Tyr<sup>0</sup>] NMBのまたはラット膵腺房上のGRP受容体への $^{125}\text{I}$  - [D - Tyr<sup>4</sup>] Bnのいずれかの結合をそれぞれが阻害する能力を測定した。10  $\mu\text{M}$  でSS - 14およびSS - 28は、NMB - Rがトランスフェクトされた細胞への $^{125}\text{I}$  - [Tyr<sup>0</sup>] NMBの結合の阻害を引き起こさなかった ; しかし、各環状SS - オクタペプチド類似体はこれらの細胞への $^{125}\text{I}$  - [Tyr<sup>0</sup>] NMBの結合の有意な阻害を引き起こした (図1)。環状SS - オクタ (#1; 表1) はもっとも強力であり0.1  $\mu\text{M}$  で $^{125}\text{I}$  - [Tyr<sup>0</sup>] NMBの結合の検出可能な阻害を引き起こし、216nMで阻害の最高の半分阻害し、3  $\mu\text{M}$  で完全に阻害した (図1; 表1)。環状SS - オクタは、[Phe<sup>6</sup>] - 環SS - オクタ (#13; 表1) よりも2倍強力であり ; さらに [D - Nal<sup>4</sup>] - 環SS - オクタ (#17; 表1) (K<sub>1</sub>, 400nM; 表1) は同じくらいの強さであって ; [Nal<sup>6</sup>, Thr<sup>8</sup>] - 、 [Nal<sup>6</sup>] - および [D - Phe<sup>1</sup>] - 環状SS - オクタ (図1) (#2 ~ 4; 表1; K<sub>1</sub> 700 ~ 800nM) よりも4倍強力で ; [Nal<sup>1</sup>, D - Nal<sup>8</sup>] - 環状SS - オクタ、 [D - Cys<sup>2</sup>] - および [D - Cys<sup>7</sup>] - 環状SS - オクタ (図1) (#9 ~ 11; 表1; K<sub>1</sub> 1 ~ 1.2  $\mu\text{M}$ ) よりも6倍強力で ; [D - Nal<sup>8</sup>] - 、 [D - Trp<sup>1</sup>] - および [D - Phe<sup>1</sup>, Lys (iPr)<sup>5</sup>, Thr<sup>6</sup>] - 環状SS - オクタ (#8、12および15; 表1; K<sub>1</sub> 1.4 ~ 2.3  $\mu\text{M}$ ) よりも9倍強力で ; [D - Phe<sup>1</sup>, Lys (diEt)<sup>5</sup>, Thr<sup>6</sup>] 環状SS - オクタ (#7および16; 表1; K<sub>1</sub> 3.9 ~ 4.4  $\mu\text{M}$ ) よりも18倍強力かつ、 [His<sup>3</sup>] - 環状SS - オクタ (#14; 表1; K<sub>1</sub> 9.9  $\mu\text{M}$ ) よりも45倍強力かつ、 [Thr<sup>8</sup>] - 、 [Thr<sup>6,8</sup>] - 、 [Phe<sup>3</sup>, Thr<sup>6,8</sup>] - 、 および [D - Phe<sup>1</sup>, Nal<sup>3</sup>, Thr<sup>8</sup>] - 環SS - オクタ (#5、6、18および19; 表1; K<sub>1</sub> 14 ~ 19  $\mu\text{M}$ ) よりも69倍強力であった。SS - 14およびSS - 28とは対照的  
しかし同様に環状SS - オクタペプチドのうち13が、ラット膵腺房上のGRP受容体への $^{125}\text{I}$  - [Tyr<sup>4</sup>] Bnの結合の阻害を引き起こさず、残りの6つの類似体はこの受容体に対して非常に低い親和性を有し、それぞれ15  $\mu\text{M}$  よりも大きい親和性を有していた (表1)。環状SS - オクタ、 [Phe<sup>6</sup>] - 環SS - オクタおよび [D - Nal<sup>4</sup>] - 環状SS - オクタ (#1、13および17; 表1) の3つのもっとも強力な類似体は、NMBに対してGRP受容体よりも84倍、100倍より大ならびに100倍より大の親和性を有していた (表1)。

10

20

30

表1: C-6細胞またはトランスフェクトされたBALB 3T3細胞上のNMB受容体もしくはラット膵腺房上のGRP受容体に対する、SS-14、SS-28または種々のSS-オクタペプチド類似体の親和性。

類似体 #	NMB受容体			GRP受容体		
	C-6細胞	トランスフェクトされた細胞		ラット膵腺房		
	Ki (nM) 123I-NMB 結合	IC50 (nM) NMB-刺激 (3H) IP	Ki (nM) 123I-NMB 結合	IC50 (nM) アミラーゼ 放出	Ki (nM) 123I [Tyr4] Bn 結合	
1	59 ± 9	885 ± 98	216 ± 36	--	18264 ± 2110	10
2	226 ± 36	6673 ± 435	772 ± 94	--	16291 ± 3818	
3	997 ± 76	2880 ± 188	697 ± 64	--	--	
4	848 ± 191	3757 ± 568	818 ± 68	--	21947 ± 4265	
5	3792 ± 1084	--	14766 ± 2651	--	--	
6	8286 ± 2427	--	16398 ± 4455	--	--	
7	1452 ± 78	36235 ± 4974	4362 ± 328	--	30981 ± 4653	
8	670 ± 73	5187 ± 987	1924 ± 201	--	--	20
9	1159 ± 214	4413 ± 451	1156 ± 229	--	--	
10	1147 ± 518	3992 ± 781	960 ± 109	--	--	
11	1740 ± 345	1427 ± 119	1077 ± 199	--	--	
12	1778 ± 109	4688 ± 927	1411 ± 127	--	--	
13	213 ± 13	1173 ± 114	397 ± 72	--	--	
14	4944 ± 930	11865 ± 1835	9863 ± 1294	--	--	
15	1142 ± 105	9897 ± 2312	2328 ± 397	--	38127 ± 21549	30
16	1089 ± 38	7212 ± 2795	3951 ± 509	--	--	
17	313 ± 33	1779 ± 295	399 ± 68	--	--	
18	8322 ± 957	> 10 μM	19816 ± 4235	--	61637 ± 21512	
19	8485 ± 1165	> 10 μM	14341 ± 1819	--	--	
SS-14	--	--	--	--	--	
SS-15	--	--	--	--	--	

-- = 10 μMまでの濃度で作動または拮抗活性がない。IC50 = 示した作動物質の最高の阻害の半分を引き起こす濃度。Ki = チェン、ワイシー (Cheng, Y.C.) ら、バイオケミカル ファーマコロジー 22巻2099頁 (1973) の方法によって計算した、示した受容体に対する示したペプチドの親和性。

SS-14、SS-28または種々の環状SS-オクタペプチド類似体が作動物質または拮抗物質としてBn受容体サブタイプに機能するかどうか決定するために、それらが10 μMで、NMB-Rがトランスフェクトされた細胞における[3H] IPの増大を刺激する能力またはGRP受容体をもっているラット膵腺房からのアミラーゼ放出を刺激する能力もしくはBnで刺激されるアミラーゼ放出を阻害する能力を検討した (表2)。SS-14もSS-28も19のSS-オクタペプチド類似体のいずれもが、10 μMの濃度では作動活性を有さず、NMB-Rがトランスフェクトされた細胞における[3H] IPの増大も、GRP受容体を有するラット膵腺房からの

アミラーゼ放出をも刺激しなかった(表2)。同様にこれらのペプチドのいずれもがこの濃度で、ラット膵腺房において0.3nM Bnによって引き起こされるアミラーゼ放出の増大を変化させなかった(表2)。一方SS-14、SS-28および3つの環状SS-オクタペプチド類似体(#5、6および18;表2)は、NMB-Rがトランスフェクトされた細胞中3nMのNMBにより引き起こされる[<sup>3</sup>H]IPの14倍の増大に対して何らの効果も有さず、環状SS-オクタペプチド類似体のうち16がいくぶん阻害を引き起こした(表2)。5つの類似体(#1、10、11、13および17;表2)が10μMで、NMBで刺激される[<sup>3</sup>H]IPの増大を完全に阻害した。

表2: NMB-Rがトランスフェクトされた細胞における、NMBで刺激される $[^3\text{H}]$  IPの増大またはラット膵腺房のアミラーゼ放出をSS-14、SS-28および関連するオクタペプチド類似体に変化させる能力。

類似体 #	NMB-Rがトランスフェクトされた細胞 $[^3\text{H}]$ IP (dpm $\times 10^3$ )		ラット膵腺房 アミラーゼ放出 (総計に対する%)	
	単独 (10 $\mu\text{M}$ )	プラスNMB (3nM)	単独 (10 $\mu\text{M}$ )	プラスBn (0.3nM)
	13 $\pm$ 3	186 $\pm$ 58	4 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1
1	12 $\pm$ 2	8 $\pm$ 4*	5 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2
2	11 $\pm$ 2	39 $\pm$ 7*	5 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
3	11 $\pm$ 1	65 $\pm$ 15*	3 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1
4	13 $\pm$ 1	33 $\pm$ 4*	4 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1
5	11 $\pm$ 2	179 $\pm$ 13	3 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
6	11 $\pm$ 2	188 $\pm$ 30	3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2
7	15 $\pm$ 1	99 $\pm$ 24*	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
8	10 $\pm$ 3	67 $\pm$ 13*	2 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
9	8 $\pm$ 2	28 $\pm$ 6*	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
10	10 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2*	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
11	10 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4*	2 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
12	9 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
13	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 4*	3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
14	8 $\pm$ 1	97 $\pm$ 7*	2 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
15	11 $\pm$ 1	67 $\pm$ 7*	4 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2
16	11 $\pm$ 2	73 $\pm$ 15*	5 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
17	12 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2*	4 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1
18	11 $\pm$ 1	143 $\pm$ 11	3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
19	10 $\pm$ 1	119 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2
SS-14	14 $\pm$ 1	182 $\pm$ 24	3 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
SS-28	12 $\pm$ 1	177 $\pm$ 13	4 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1

\*=ソマトスタチン類似体を加えないときの値と比較 ( $p < 0.05$ )。ラット膵腺房または $[^3\text{H}]$  myo- $[2-^3\text{H}]$  イノシトールを負荷したNMB-Rがトランスフェクトされた細胞を無添加あるいはソマトスタチンオクタペプチド類似体、Bn、またはNMB、もしくは組合わせて添加して37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間インキュベートした。腺房からのアミラーゼ放出は、インキュベーション中に放出された総細胞アミラーゼの示されたパーセントであらわした。 $[^3\text{H}]$  IPはdpmであらわしている。阻害効果を調べるため、ソマトスタチン類似体 (10  $\mu\text{M}$ ) の、0.3nMのBnで刺激されるアミラーゼ放出または4nMのNMBで刺激される $[^3\text{H}]$  IPの増大に対する効果を測定した (これらは、それぞれ最高有効作用物質濃度の半分の値である)。結果は、すくなくとも4つの別々の実験の平均 $\pm$  ISEMであり、各実験においてそれぞれの値をデュプリケートで測定した。

NMB-Rがトランスフェクトされた細胞における、NMBで刺激される $[^3\text{H}]$  IPの増大をSS-オクタペプチド類似体が阻害する相対的な能力を測定するために、各類似体に対して量-阻害曲線を決定した (図2)。環状SS-オクタ (#1、表1) がもっとも強力で、0.3  $\mu\text{M}$  で検出しうる阻害を引き起こし、885  $\mu\text{M}$  で最高の半分を阻害し、さらに10  $\mu\text{M}$  で完全に阻害した (図2)。相対的な力は: 環状SS-オクタ (#1、 $\text{IC}_{50}$  885nM) > [D-Cys<sup>7</sup>] -、[Phe<sup>6</sup>] -、[D-Nal<sup>4</sup>] - 環状SS-オクタ (#11、13および17; 表1);  $\text{IC}_{50}$  1

10

20

30

40

50

.2~1.8  $\mu$  M) > [Nal<sup>6</sup>, Thr<sup>8</sup>] -、[Nal<sup>6</sup>] -、[D - Phe<sup>1</sup>] - 環状SS - オクタ (# 2 ~ 4; 表 1); IC<sub>50</sub> 3 ~ 6.6  $\mu$  M) > [D - Nal<sup>8</sup>]、[Nal<sup>1</sup>, D - Nal<sup>8</sup>] -、[D - Cys<sup>2</sup>] -、[D - Trp<sup>1</sup>] - 環状SS - オクタ (# 8 ~ 10、12; 表 1; IC<sub>50</sub> 4.4 ~ 5.2  $\mu$  M) > [D - Phe<sup>1</sup>, Lys(iPr)<sup>5</sup>, Thr<sup>6</sup>] -、[D - Phe<sup>1</sup>, Lys(diEt)<sup>5</sup>, Thr<sup>6</sup>] - 環状SS - オクタ (# 15 および 16; 表 1; IC<sub>50</sub> 7.2 ~ 9.8  $\mu$  M) > [His<sup>5</sup>] - 環状 - SS - オクタ (# 14; 表 1、IC<sub>50</sub> 11.8  $\mu$  M) > [D - Phe<sup>1</sup>, Thr<sup>6</sup>] -、[D - Phe<sup>1</sup>, Nal<sup>3</sup>, Thr<sup>8</sup>] -、[Phe<sup>3</sup>, Thr<sup>6,8</sup>] - 環状 - SS - オクタ (# 7、18 および 19; 表 1、IC<sub>50</sub> > 10  $\mu$  M) > SS - 14、SS - 28、[Thr<sup>8</sup>] -、[Thr<sup>6,8</sup>] - 環状 - SS - オクタ (# 5 および 6、10  $\mu$  M で活性なし) であった。

異なるSS - オクタペプチド類似体がNMB - 受容体を占める能力とNMB - R がトランスフェクトされた細胞への<sup>125</sup>I - [D - Tyr<sup>0</sup>] NMBの結合を阻害する能力ならびに、これらの細胞内でNMBにより刺激される [<sup>3</sup>H] IPの増大を阻害する能力のあいだには概ね近密な一致がみられた (図 1、2; 表 1)。

環状SS - オクタのうち18の環状SS - オクタペプチド類似体をつくって、NMB受容体拮抗物質として機能する能力を決定するうえでの環状SS - オクタ中の異なるアミノ酸置換の重要性を調べた (# 1; 表 1、2)。類似体 8 ~ 11 (表 1、2) で、環状SS - オクタのポジション 1、2、7、8 における立体化学の重要性を調べた。Cys<sup>1</sup> または Cys<sup>7</sup> を D - Cys に変えると、いずれを置換しても親和性が 5 倍低下するという、同等の効果があった (# 1、10 および 11 を比較のこと; 表 1)。同様に、ポジション 8 に D - Nal を挿入すると親和性の 6 倍の低下を引き起こし (# 1 および 8 を比較のこと; 表 1)、そしてさらに Nal<sup>1</sup> の代わりに D - Nal<sup>1</sup> を加えると、それ以上には親和性は変化しなかった (# 1、8 および 9 を比較のこと; 表 1)。ポジション 1 (類似体 # 4 および 12; 表 1)、ポジション 3 (# 18 および 19; 表 1) ならびにポジション 4 (# 17; 表 1) について、置換されたアミノ酸の疎水性ならびに環の大きさの重要性を調べた。異なる環の大きさを有し疎水性のより小さい基である D - Phe<sup>1</sup> または D - Trp<sup>1</sup> の挿入は中程度の効果しか有さず、減少させる力は 4 ~ 7 倍であった (# 1、4 および 12 を比較のこと; 表 1)。これに対して、より疎水性の基である Nal<sup>3</sup>、D - Phe<sup>3</sup> を Tyr<sup>3</sup> にかえて挿入すると親和性に対する効果はほとんどなく (# 5 および 6 を # 18 および 19 と比較されたい; 表 1)、類似体のなかに Thr<sup>8</sup> の置換を加えたばかり (# 5; 表 1) では、親和性の変化は生じなかった。同様に、より疎水性の強い基の D - Nal を、ポジション 4 の D - Trp にかえて挿入しても、(# 1 および 17 を比較のこと; 表 1) ほとんど親和性に対する効果はなかった。環状SS - オクタのポジション 6 での Val の置換の重要性を類似体 (# 3 および 13; 表 1) で調べた。Phe<sup>6</sup> (# 13; 表 1) または Nal<sup>6</sup> (# 3; 表 1) のいずれかの置換は、親和性を少しだけ (2 ~ 3 倍) 減少させた。それと同様のポジションに Thr<sup>8</sup> を挿入することは、いくつかの高親和性SS または ミュー受容体作動物質で用いられているが (マウラー、アール (Maurer, R.) ら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA79 巻 4815 頁 (1982); ペルトン、ジェーティー (Pelton, J.T.) ら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス 82 巻 236 頁 (1985); グリヤ、ケイ (Gulya, K.) ら、ライフ サイエンス (Life Sci.) 38 巻 2225 頁 (1986); および ウォーカー、ジェー エム (Walker, J.M.) ら、ペプタイズ 8 巻 869 頁 (1987))、NMB 受容体の親和性の劇的な (80 倍) 低下をひき起こした (# 1 および 5 を比較されたい; 表 1)、一方 Val<sup>6</sup> の代わりに Nal を挿入することは、Thr<sup>8</sup> の置換を補い、4 倍だけの低下を引き起こすこととなった (# 1、2 および 5 を比較されたい; 表 1)。ポジション 5 において、塩基性がより低い基である His<sup>5</sup> を Lys の代わりに置換すると、親和性の顕著な、50 倍の低下が引き起こされた (# 1 および 4 を比較されたい; 表 1)。

Lys<sup>3</sup> の第 1 級アミノ基の有効性を、ジエチル Lys<sup>3</sup> または イソプロピル Lys<sup>3</sup> をつくることにより変化させても、NMB 受容体に対する親和性はほとんど変化しなかった (# 7、15 および 16 を比較されたい; 表 1)。

さらにもっとも強力な類似体、環状SS - オクタ (# 1; 表 1、2) の阻害作用を調べるために、NMB - R がトランスフェクトされた細胞における、NMB で刺激される [<sup>3</sup>H] IP の増大の量 - 応答曲線 (図 3) またはこれらの細胞への<sup>125</sup>I - [D - Tyr<sup>0</sup>] NMB の結合に体する NMB

10

20

30

40

50

の量 - 阻害曲線 (図 4) に影響をおよぼす能力を決定した。1  $\mu\text{M}$ 、3  $\mu\text{M}$  または 10  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタを添加すると、十分に高濃度の NMB を用いたばあいには NMB で刺激される [ $^3\text{H}$ ] IP の増大の量 - 応答曲線は平行に右側へシフトするが、増強の最大は変化させなかった (図 3)。右側へのシフトの大きさは、用いられた環状 SS - オクタの濃度および NMB の濃度に比例していた (図 3)。これらのデータをシルドのかたちでプロットすると (シルド、エッチ オー (Schild, H. O.) プリティッシュ ジャーナル オブ ファーマコロジー (Br. J. Pharmacol.) 4 巻 277 頁 (1949)) (図 3、挿入)、回帰方程式  $y = 1.1 (+ 0.2) x \pm 7.3$  で相関係数 0.8 ( $p < 0.001$ ) が与えられ、傾斜は全体として有意に異ならなかった。これらのデータから NMB 受容体に対する環状 SS - オクタの親和性を計算すると  $231 \pm 43 \text{ nM}$  の親和性がえられた。非線形最小二乗曲線適合プログラム (nonlinear least - squares curve fitting program) (ムンソン、ピー ジェー (Munson, P. J.) ら、アニュアル バイオケミストリー (Ann. Biochem.) 107 巻 220 頁 (1980)) を用いて、NMB - R がトランスフェクトされた細胞への  $^{125}\text{I}$  - [D - Tyr<sup>0</sup>] NMB の結合に対する NMB の阻害能の量 - 応答曲線に、0.5  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタが影響をおよぼす能力を分析すると、環状 SS - オクタは競合的拮抗物質として機能していることが確認された (図 4)。とくに、0.5  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタは NMB 受容体に対する NMB の親和性の減少を引き起こした (環状 SS - オクタなしでは  $K_d$  は  $3.1 \pm 0.2$  で、0.5  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタが存在すると  $K_d$  は  $6.0 \pm 0.5$ 、 $p < 0.01$ )。これとは対照的に、0.5  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタの存在下で NMB 結合部位の総数は変化しなかった (環状 SS - オクタなし =  $7.6 \pm 0.5 \text{ pm/mg}$  タンパクならびに 0.5  $\mu\text{M}$  の環状 SS - オクタ存在 =  $6.6 \pm 0.5 \text{ pm/mg}$  タンパク)。

環状 SS - オクタ類似体の阻害効果の特異性を調べるために、これら類似体の多くが、C - 6 膠芽腫細胞上の NMB 受容体と相互作用する能力ならびにこれらの細胞での生物学的応答を変化させる能力はもちろんのこと、相異なる受容体に対する多くの相異なるリガンドの結合を阻害する能力を測定した。C - 6 膠芽腫細胞は NMB 受容体をもっていることが示されており (リン、ダブリュー ダブリュー (Lin, W. W.) ら、ジャーナル オブ ニューロサイエンス (J. Neurosci.) 12 巻 1077 頁 (1992)) それゆえこれらの細胞上の天然の受容体と SS - オクタペプチド類似体が相互作用する能力を、NMB - R がトランスフェクトされた細胞上の NMB 受容体と相互作用する能力と比較した。表 1 に示されるように、SS - 14 および SS - 28 は C - 6 細胞に対する  $^{125}\text{I}$  - [D - Tyr<sup>0</sup>] NMB の結合を阻害せず、環状 SS - オクタは  $50 \pm 9 \text{ nM}$  の親和性を有するもっとも強力な SS - オクタペプチド類似体であった。他の 18 の SS オクタペプチド類似体の親和性は、概ね NMB - R がトランスフェクトされた細胞上の NMB 受容体のばあいに見られたものと良好に一致していた (表 1)。もっとも強力な類似体のうち 2 つ、環状 SS オクタ (#1; 表 1) および [NaI<sup>6</sup>, Thr<sup>8</sup>] - 環状 SS - オクタ (#2; 表 1) の阻害作用の特異性を、C - 6 膠芽腫細胞で調べた。これは、これらの SS - オクタペプチド類似体がそれぞれこれらの細胞において NMB で刺激される [ $^3\text{H}$ ] IP の増大を阻害するものの、エンドセリン - 1 で刺激される [ $^3\text{H}$ ] IP の増大には何の効果も示さないためである (表 3)。さらに、もっとも強力な SS オクタペプチド類似体、環状 SS - オクタ (#1; 表 1、2) は 1  $\mu\text{M}$  で (ラット嗅球膜上の NMB 受容体に対する結合を 95% より大きく阻害する濃度)、「方法」に記載されるように調べた、種々の組織の形質膜上の、 $\text{CCK}_A$ 、 $\text{CCK}_B$ 、エンドセリン<sub>A</sub>、PYY、ブラッディキニン<sub>1</sub>、TRH、 $\alpha_1$  - または  $\alpha_2$  アドレナリン作動性、 $\beta_1$  - アドレナリン作動性、ムスカリン様コリン作動性、ベンゾジアゼピン - 神経または末梢性、ドーパミン<sub>2</sub>、ヒスタミン<sub>H1</sub>、アデノシン<sub>1</sub>、シグマまたはデルタオピオイド、N - メチル - D - アスパルテート各受容体に対する結合を阻害しなかった。

10

20

30

40

表 3 : C-6膠芽腫細胞においてNMBおよびエンドセリンで刺激されるイノシトールホスフェート類の増大を2つの環状ソマトスタチンオクタペプチド類似体が阻害する能力

添加したペプチド	単 独	[ <sup>3</sup> H] IP (dpm × 10 <sup>3</sup> )	
		[Nal <sup>6</sup> , Thr <sup>8</sup> ] - 環状SS - オクタ (10 μM)	環状SS - オクタ (10 μM)
な し	7.2 ± 1.0	7.3 ± 1.2	7.4 ± 1.3
ET-1 (0.1nM)	11.0 ± 2.1	11.2 ± 1.9	10.9 ± 1.8
NMB (10nM)	21.0 ± 1.8	14.3 ± 4.2*	7.5 ± 1.0**

SS - オクタペプチド類似体を加えない値に比較して有意に差がある (\* = p < 0.05)、(\*\* = p < 0.01)。C-6膠芽腫細胞 (50,000細胞/ウェル) をmyo-[2-<sup>3</sup>H]イノシトールとともに2日間インキュベートし、洗浄したのち「方法」に記載のように10mM LiClを含むホスホイノシチド緩衝液中で37°Cにて60分間、示したペプチドを加えてまたは加えないでインキュベートした。「方法」に記載のように、ドゥエックスAG1-X8陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて [<sup>3</sup>H] IPを測定した。結果は3つの実験からの平均 ± SEMであり、各実験においてそれぞれの値はデュプリケートで測定した。

環状SS - オクタは、ラット前脳膜上のミュー オピオイド受容体に対する [<sup>3</sup>H] DAGOの結合を阻害し、親和性は430 ± 130nMであり (表 4)、さらにラット膵臓の膜上のCCK<sub>A</sub>受容体に対する<sup>125</sup>I - CCK - 8の結合を阻害し、親和性は5537 ± 7nMであった。これまでの研究で種々のSS類似体がソマトスタチン受容体はもちろんのことミュー オピオイド受容体に対しても高い親和性を有することが報告されている (マウラー、アールら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミーオブ サイエンスUSA、79巻4815頁 (1982) ; ペルトン、ジェー ティーら、プロシーディングズ オブ ナショナルアカデミー オブ サイエンス82巻236頁 (1985) ; グリヤ、ケイら、ライフ サイエンス38巻2225頁 (1986) ; およびウオーカー、ジェー エムら、ペプタイズ 8 巻869頁 (1987) )。SS - 14およびSS - 28ならびに種々のSSオクタペプチド類似体が、同じ種由来の膜にあるBn受容体、ソマトスタチンおよびミュー オピオイド受容体の両方のサブタイプと相互作用する能力を比較するために、これらペプチドのそれぞれがラット膵臓腺房細胞腫瘍、AR 42J細胞からの細胞膜に対する<sup>125</sup>I - [Tyr<sup>11</sup>] SS - 14または<sup>125</sup>I - [Tyr<sup>4</sup>] Bnの結合、ラット嗅球膜上のNMB受容体への<sup>125</sup>I - NMBの結合、ならびにラット前脳膜への [<sup>3</sup>H] DAGOの結合を阻害する能力を測定した (表 4)。NMBもGRPもいずれもが10 μ Mまでの濃度で、AR 42J細胞上のソマトスタチン受容体への、またはラット前脳膜上のミュー オピオイド受容体への<sup>125</sup>I - [Tyr<sup>11</sup>] SS - 14の結合を阻害せず、SS - 14もSS - 28もいずれもが10 μ Mまでの濃度で、AR 42J細胞膜上のGRP受容体、ラット嗅球膜上のNMB受容体またはラット前脳膜上のミュー オピオイド受容体に対する結合を阻害しなかった (表 4)。種々のSS - オクタペプチド類似体のラット嗅球膜上のNMB受容体に対する親和性と、AR 42J細胞上のソマトスタチン受容体に対するそれらの親和性 (r = 0.1、p > 0.8)、ラット膵臓膜上のGRP受容体に対するそれらの親和性 (r = 0.01、p > 0.5) またはラット前脳からの膜上のミュー

10

20

30

40

50

ー オピオイド受容体に対するそれらの親和性 ( $r = 0.1$ ,  $p > 0.7$ ) とのあいだに相関はなかった (表 4)。たとえば、環状SS類似体、環状SS - オクタ (#1; 表 1)、[NaI<sup>6</sup>, Thr<sup>8</sup>] - 環状SS - オクタ (#2; 表 1)、[D - Phe<sup>1</sup>] 環状SS - オクタ (#4; 表 1)、[D - Cys<sup>7</sup>] 環状SS - オクタ (#11; 表 1) および [Phe<sup>6</sup>] 環状SS - オクタは、NMB受容体に対する強さにおいては5倍より低くしか変動しないが、一方ソマトスタチン受容体に対する親和性については800倍も変動し、ミュー オピオイド受容体に対しては5000倍よりも大きく変動する (表 4)。一方SS - オクタ類似体のほとんどはNMB受容体よりもソマトスタチン受容体に対して有意に高い親和性を有していたが、1つの類似体、[His<sup>5</sup>] - 環状SS - オクタはNMB受容体に対して3倍高い親和性を有していた。もっとも強力なNMB受容体拮抗物質、環状SS - オクタ (#1; 表 4) はミューオピオイド受容体よりもNMB受容体に対して10倍大きな親和性を有しており、1つの類似体 (#11; 表 4) は、50倍よりも高い親和性を有していた。これらのデータは、環状SS - オクタペプチドの、高親和性のNMB受容体占有に対する構造上の必要条件が、高親和性のソマトスタチンまたはミューオピオイド受容体占有に対して要求されるのと顕著に異なることを示している。

表4：AR 42J細胞、ラット嗅球、または前脳のそれぞれからの形質膜上のニューロメジンB、GRP、ソマトスタチンまたはミューオピオイド受容体に対するNMB、GRP、SS-14、SS-28および種々のSSオクタペプチド類似体の親和性の比較。

類似体 #	AR 42J細胞膜		ラット嗅球	ラット前脳
	$^{125}\text{I}$ - [Tyr <sup>11</sup> ] SS-14	$^{125}\text{I}$ - [Tyr <sup>4</sup> ] Bn	$^{125}\text{I}$ -NMB	[ <sup>3</sup> H] DAGO
NMB	> 10,000	19 ± 1	1.1 ± 0.2	> 10,000
GRP	> 10,000	1.8 ± 0.1	297 ± 15	> 10,000
SS-14	0.13 ± 0.01	> 50,000	> 40,000	> 10,000
SS-28	0.40 ± 0.20	> 10,000	> 10,000	> 10,000
1	0.80 ± 0.50	2870 ± 520	43 ± 9	430 ± 130
2	0.50 ± 0.10	950 ± 70	85 ± 20	1.9 ± 0.7
4	0.24 ± 0.13	2000 ± 150	245 ± 130	650 ± 130
5	0.29 ± 0.03	3900 ± 1200	800 ± 200	2.0 ± 1.4
7	0.86 ± 0.23	750 ± 10	740 ± 160	200
8	3.9 ± 0.1	4100 ± 750	1480 ± 500	280
9	2.8 ± 0.7	1540 ± 180	590 ± 170	1160
10	91 ± 23	1500 ± 160	920 ± 350	1020
11	48 ± 3	7620 ± 1260	230 ± 70	> 10,000
12	3.1 ± 1.6	2100 ± 150	1180 ± 520	> 10,000
13	194 ± 27	2150 ± 200	270 ± 90	1640
14	1870 ± 30	3100 ± 700	470 ± 240	500
17	570 ± 180	3710 ± 200	850 ± 300	1570

「方法」に記載のようにラット嗅球、ラット前脳またはAR 42J細胞から調製した膜を、「方法」に記載のように、示したリガンドとインキュベートした。親和性はチェン、ワイシーら、バイオケミカルファーマコロジー22巻2099頁(1973)の方法によって計算した。結果は少なくとも3つの実験からの平均±ISEMである。

種々の環状SS-オクタペプチド類似体が、SS受容体を占有することによってNMB受容体への親和性を変化させないことのさらなる証拠は、膠芽腫C-6細胞またはNMB-Rがトランスフェクトされた細胞に対する $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>11</sup>]SS-14の飽和結合がまったく検出されないことである(n=3)。高親和性のSS受容体をもっていることが示されている分散モルモット膵腺房に、用いられた $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>11</sup>]SS-14は結合した(エステーブ、ジェーピー(Esteve, J.P.)ら、アメリカンジャーナルオブフィジオロジー247巻G62頁(1984))。

他の実施態様

前記した記載事項から当業者は本発明の本質的な特性を容易につきとめることができ、本発明の意図と範囲から逸脱することなく、種々の用途や条件に適応するように種々の変化

10

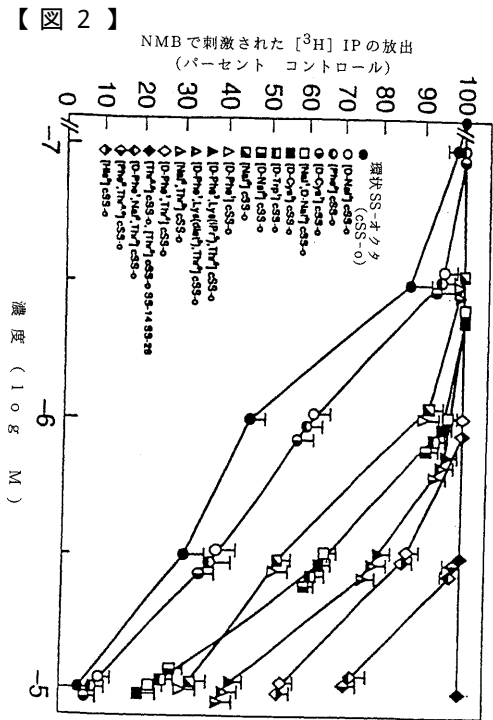
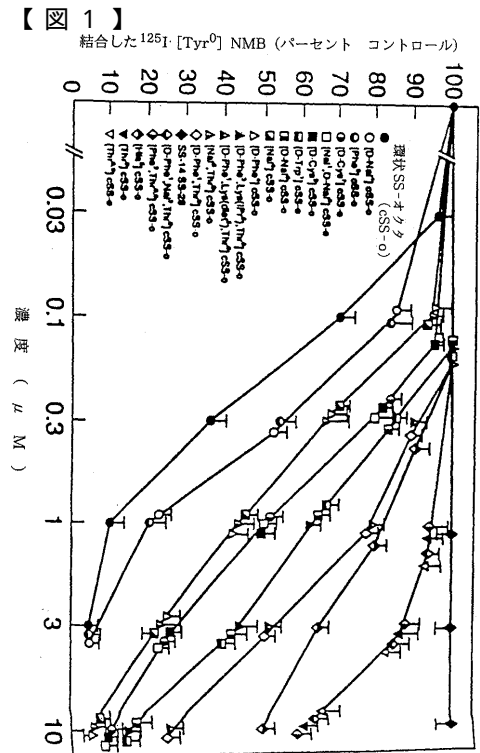
20

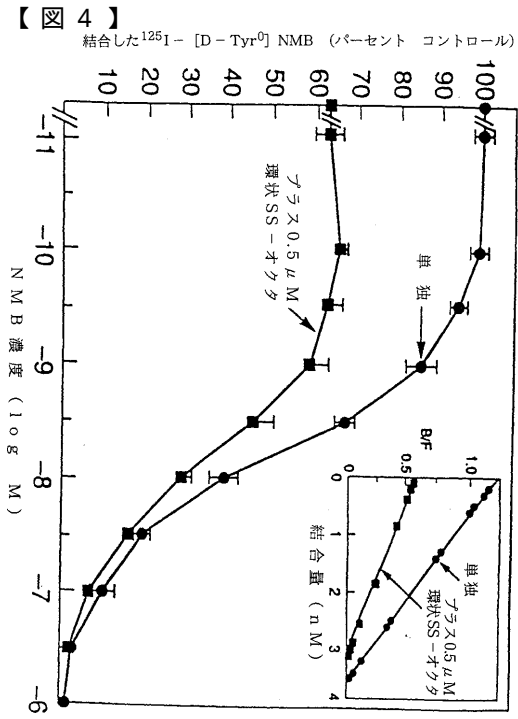
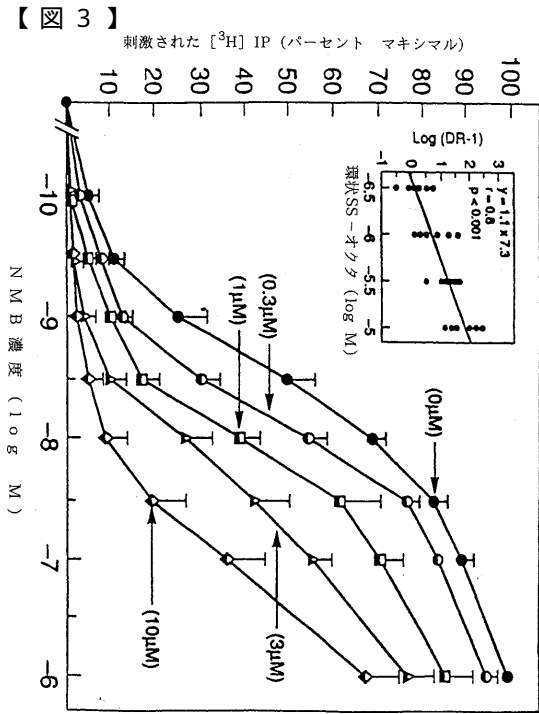
30

40

50

および修飾をなすことができる。したがって、他の実施態様もまた請求の範囲内にあるものである。





---

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 佐木 啓二

(74)代理人

弁理士 河村 洵

(74)代理人

弁理士 日野 真美

(72)発明者 コイ、デビッド エイチ

アメリカ合衆国、70115 ルイジアナ州、ニューオーリンズ、ペリエヤー ストリート 43  
19

(72)発明者 テイラー、ジョン イー

アメリカ合衆国、01568 マサチューセッツ州、アプトン、フィスク ミル ロード 74

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00215717 (EP, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

A61K 38/00

A61P 43/00

C07K 7/06

BIOSIS(DIALOG)

CAPLUS(STN)

MEDLINE(STN)

EMBASE(STN)