

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-520855

(P2010-520855A)

(43) 公表日 平成22年6月17日 (2010.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	4 C O 7 6
C O 7 K 5/06 (2006.01)	C O 7 K 5/06	4 C O 8 4
C O 7 K 5/08 (2006.01)	C O 7 K 5/08	4 H O 4 5
C O 7 K 5/10 (2006.01)	C O 7 K 5/10	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-548419 (P2009-548419)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月30日 (2008.1.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年9月28日 (2009.9.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/052467
 (87) 国際公開番号 W02008/095004
 (87) 国際公開日 平成20年8月7日 (2008.8.7)
 (31) 優先権主張番号 60/898,868
 (32) 優先日 平成19年1月31日 (2007.1.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

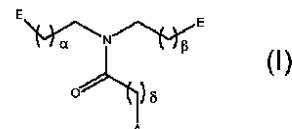
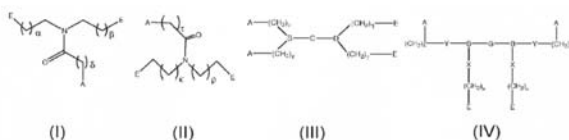
(71) 出願人 503210245
 アフィーマックス・インコーポレイテッド
 A f f y m a x , I n c .
 アメリカ合衆国、94304 カリフォル
 ニア州、パロ・アルト、ミランダ・アベニ
 ュ、4001
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

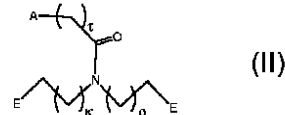
(54) 【発明の名称】 修飾基をポリペプチドおよびその他の高分子に結合するための窒素ベースのリンカー

(57) 【要約】

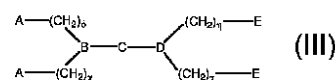
本発明は、ペプチド部分、リンカー部分、ポリ（エチレングリコール）部分などの水溶性ポリマー部分を含む化合物に関する。リンカー部分は、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にある。特定の実施形態では、リンカー部分は、以下の構造を有する〔式中、 a 、およびは各々整数であり、その値は独立に選択される〕。その他の実施形態では、リンカー部分は、以下の構造を有する〔式中、 K 、 p およびは各々整数であり、その値は独立に選択される〕。その他の実施形態では、リンカー部分は以下の構造を有する〔式中、 μ 、およびは各々整数であり、その値は独立に選択される〕。あるいは、リンカー構造は以下の構造を有する場合もある〔式中、 μ および μ は各々整数であり、その値は独立に選択される〕。



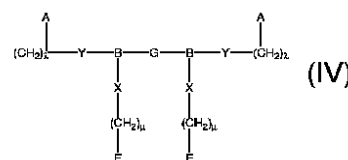
(I)



(II)



(III)



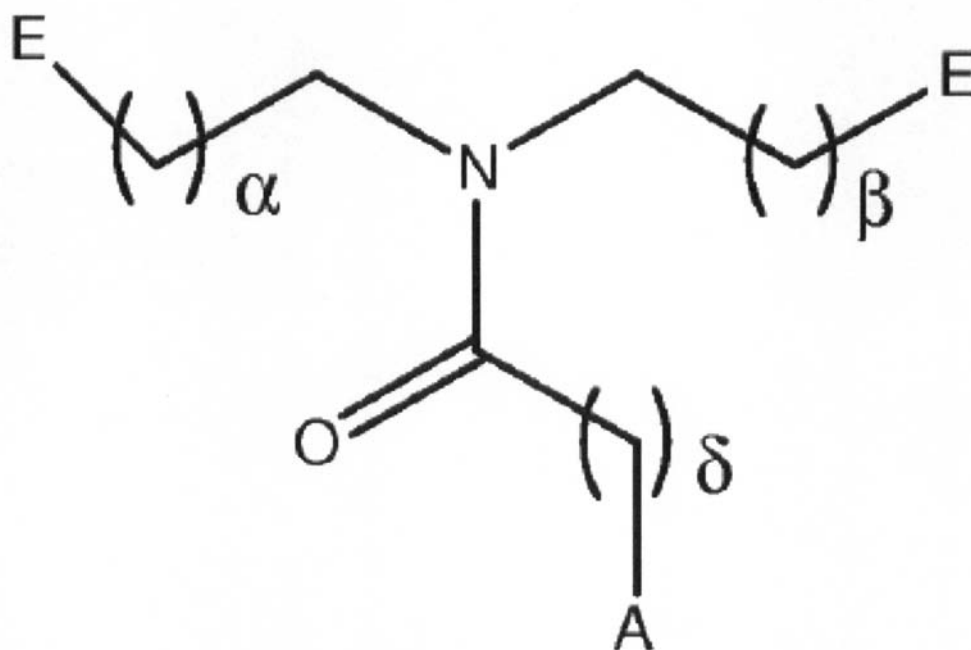
(IV)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造：

【化 5 5】



10

20

[式中、

は、1 7 の整数であり；

は、1 7 の整数であり；

は、2 5 の整数であり；

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H 、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニル
 ルホンのいずれかであり；

E は、 NH_2 、 CO_2H 、 CHO 、マレイミドまたは NHBOc のいずれかである]

30

を有するリンカー部分化合物。

【請求項 2】

= 1 または 2 であり；

= 3 であり；

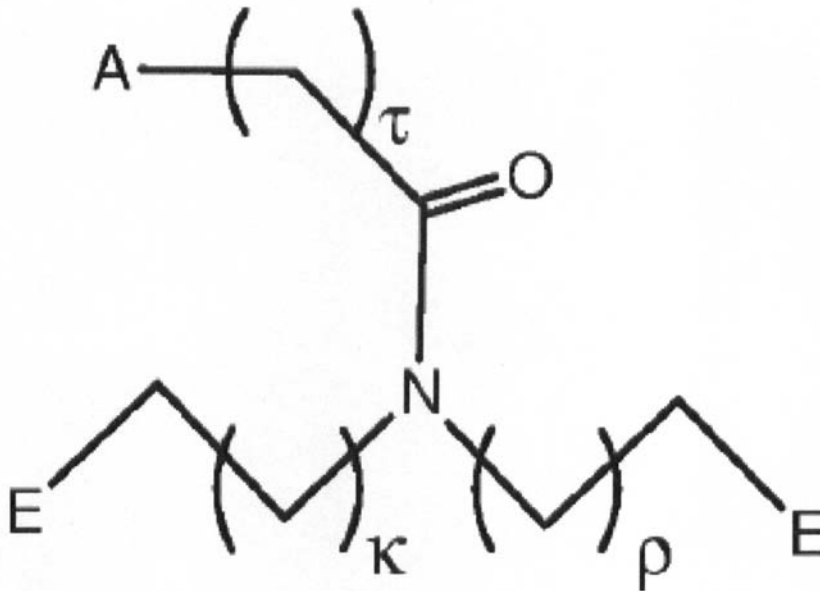
A が、 CO_2H または活性化 CO_2H のいずれかであり；

E が、 NHBOc である、請求項 1 に記載のリンカー部分化合物。

【請求項 3】

以下の構造：

【化 5 6】



10

[式中、

は、0 8 の整数であり；

20

は、0 8 の整数であり；

は、2 5 の整数であり；

A は、NHR または NRBoC のいずれかであり；

R は、アルキルであり；

E は、NH₂、CO₂H、活性化CO₂H、CHO、マレイミドまたはNRBoC のいずれかであり、ここで、R は、H またはアルキルである]
を有するリンカー部分化合物。

【請求項 4】

= 0 であり；

= 3 であり；

30

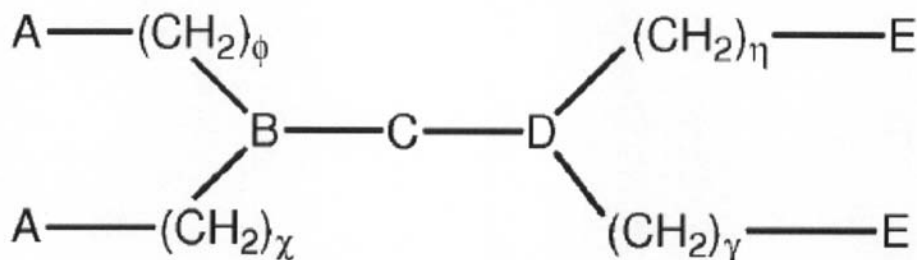
A が、NHBoC であり；

R が、CH₃ であり；E が、CO₂H または CONHS である、請求項 3 に記載のリンカー部分化合物。

【請求項 5】

以下の構造：

【化 5 7】



40

[式中、

は、1 4 の整数であり；

は、1 4 の整数であり；

は、2 8 の整数であり；

は、2 8 の整数であり；

50

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H 、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

B は、 CH または N のいずれかであり；

C は、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) のいずれかであり；

D は、 CH または N のいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

は、2 5 の整数である]

を有するリンカー部分化合物。

【請求項 6】

= 1 であり；

10

= 1 であり；

が、2 3 の整数であり；

が、2 3 の整数であり；

A が、 CO_2H または活性化 CO_2H のいずれかであり；

B が、 N であり；

C が、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) であり；

D が、 N であり；

E が、 NHBOc であり；

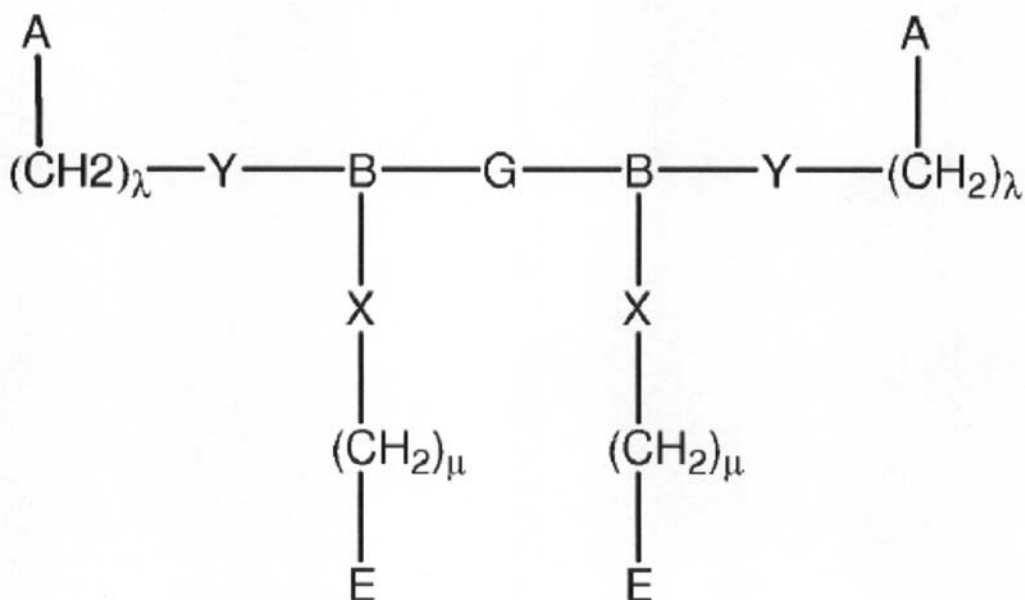
が、2 3 の整数である、請求項 5 に記載のリンカー部分化合物。

20

【請求項 7】

以下の構造：

【化 5 8】



30

[式中、

40

は、1 4 の整数であり；

μ は、1 μ 4 の整数であり；

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H 、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

B は、 CH または N のいずれかであり；

G は、 (CH_2) 、 CO または $\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}$ のいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

X は、 CO 、結合または CONH のいずれかであり；

Y は、 CO 、結合または NHCO のいずれかであり；

は、2 4 の整数である]

50

を有するリンカー部分化合物。

【請求項 8】

が、1 3 の整数であり；

$\mu = 2$ であり；

A が、 CO_2H または活性化 CO_2H のいずれかであり；

B が、N であり；

G が、 (CH_2) 、CO または $\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}$ のいずれかであり；

E が、 NH_2 または NHBOc であり；

X が、CO または結合であり；

Y が、CO または結合であり；

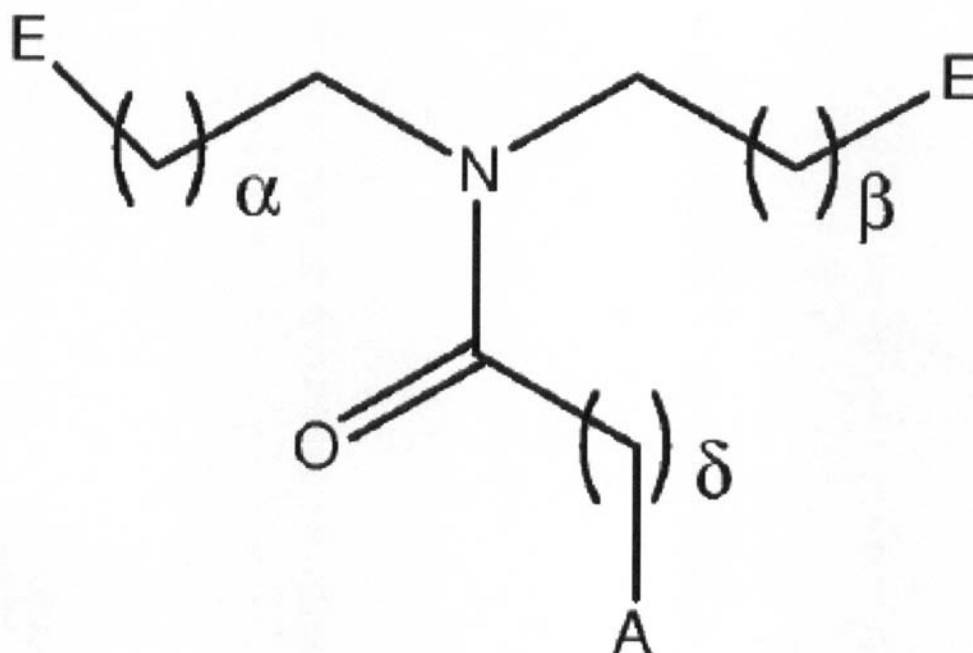
$\mu = 2$ である、請求項 7 に記載のリンカー部分化合物。

10

【請求項 9】

ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 5 9】



20

30

[式中、

は、1 7 の整数であり；

は、1 7 の整数であり；

は、2 5 の整数であり；

A は、CO、NH、NCO、 $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ のいずれかであり；

E は、NH または CO のいずれかである]

40

を有する化合物。

【請求項 10】

$\mu = 1$ または 2 であり；

$\mu = 3$ であり；

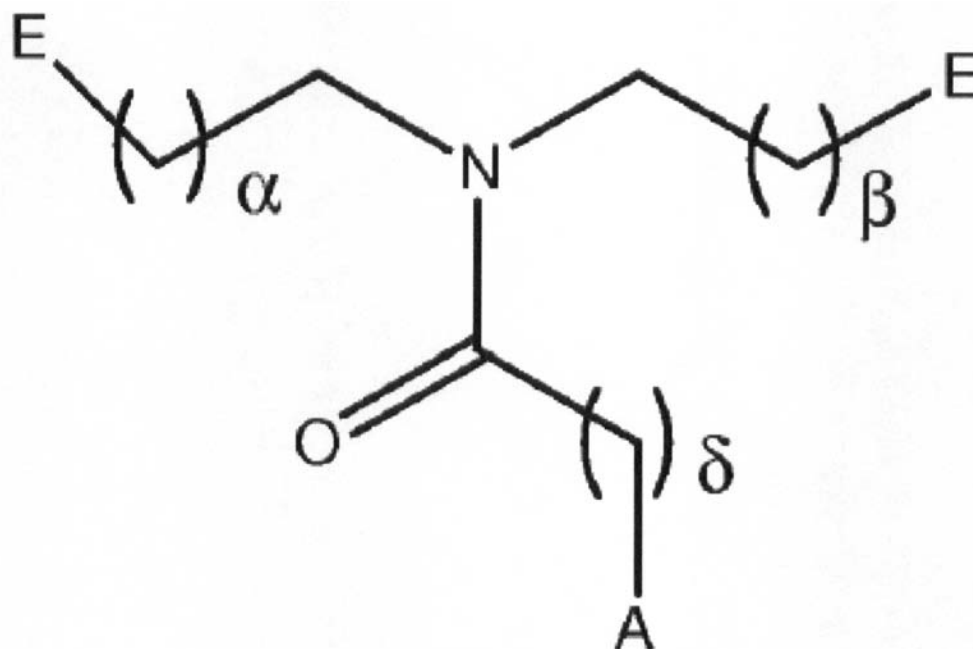
A が、CO であり；

E が、NH である、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

(a) ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 0】



10

20

[式中、

α は、1 7 の整数であり；

β は、1 7 の整数であり；

δ は、2 5 の整数であり；

A は、CO、NH、NCO、SO₂CH₂CH₂のいずれかであり；

E は、NHまたはCOのいずれかである]

を有する化合物と、

(b) 1種または複数の製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび/または担体と

を含む薬剤組成物。

30

【請求項 1 2】

α = 1 または 2 であり；

β = 3 であり；

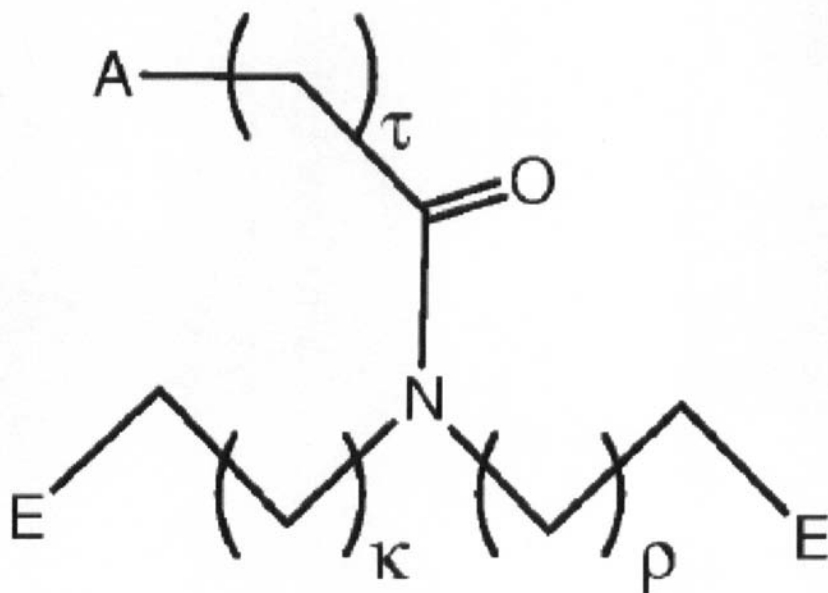
A が、COであり；

E が、NHである、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 1】



10

〔式中、

τ は、0 8 の整数であり；

k は、0 < 8 の整数であり；

ρ は、2 5 の整数であり；

A は、NH または NR であり；

R は、アルキルであり；

E は、NH、CO または NR のいずれかであり、ここで、R は、H またはアルキルである〕

20

を有する化合物。

【請求項 14】

τ = 0 であり；

k = 3 であり；

30

A が、NHR または NR のいずれかであり；

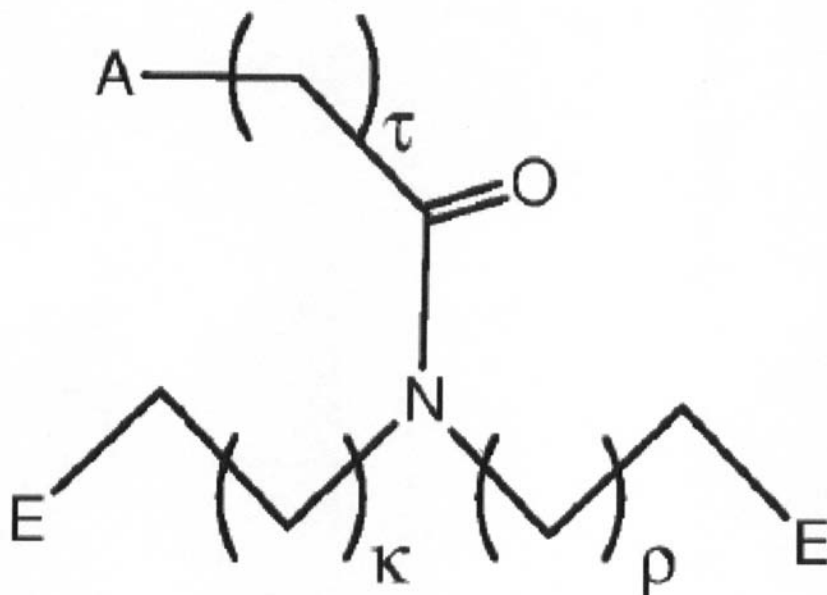
R が、CH₃ であり；

E が、CO である、請求項 13 に記載の化合物。

【請求項 15】

(a) ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、
 リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 2】



10

[式中、

τ は、0 8 の整数であり；

κ は、0 < 8 の整数であり；

ρ は、2 5 の整数であり；

A は、NR であり；

R は、アルキルであり；

E は、NH または CO₂ のいずれかである]

を有する化合物と、

(b) 1 種または複数の製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび / または担体と

を含む薬剤組成物。

20

【請求項 16】

τ = 0 であり；

κ = 3 であり；

A が、NR であり；

R が、CH₃ であり；

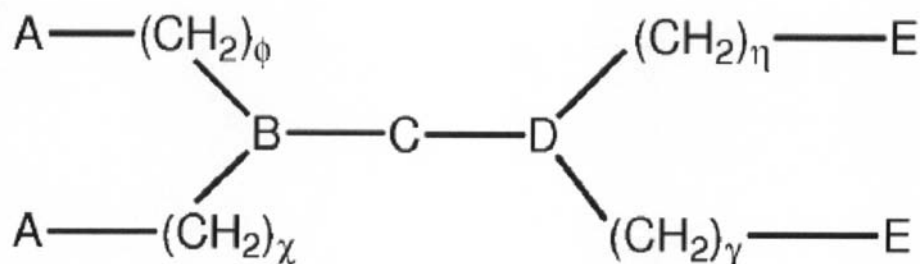
E が、CO である、請求項 15 に記載の化合物。

30

【請求項 17】

ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 3】



40

[式中、

φ は、1 4 の整数であり；

χ は、1 4 の整数であり；

50

は、2 8 の整数であり；
 は、2 8 の整数であり；
 A は、CO、NH、NCO または $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ のいずれかであり；
 B は、CH または N のいずれかであり；
 C は、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) であり；
 D は、CH または N のいずれかであり；
 E は、NH または CO のいずれかであり；
 は、2 5 の整数である]
 を有する化合物。

【請求項 18】

10

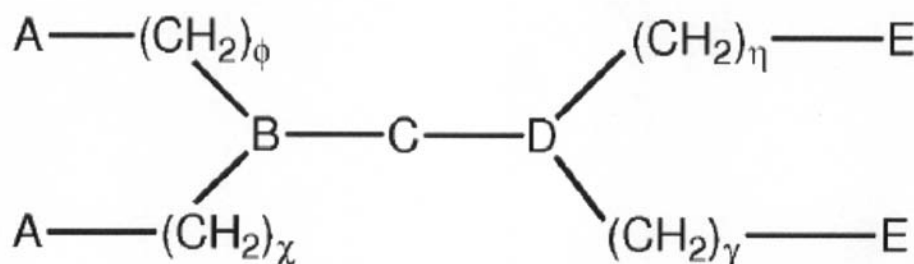
= 1 であり；
 = 1 であり；
 が、2 3 の整数であり；
 が、2 3 の整数であり；
 A が、CO であり；
 B が、N であり；
 C が、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) であり；
 D が、N であり；
 E が、NH であり；
 が、2 3 の整数である、請求項 17 に記載の化合物。

20

【請求項 19】

(a) ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、
 リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 4】



30

[式中、

は、1 4 の整数であり；
 は、1 4 の整数であり；
 は、2 8 の整数であり；
 は、2 8 の整数であり；
 A は、CO、NH、NCO または $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ のいずれかであり；
 B は、CH または N のいずれかであり；
 C は、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) であり；
 D は、CH または N のいずれかであり；
 E は、NH または CO のいずれかであり；
 は、2 5 の整数である]

40

を有する化合物と、

(b) 1 種または複数の製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび / または担体と

を含む薬剤組成物。

【請求項 20】

= 1 であり；
 = 1 であり；

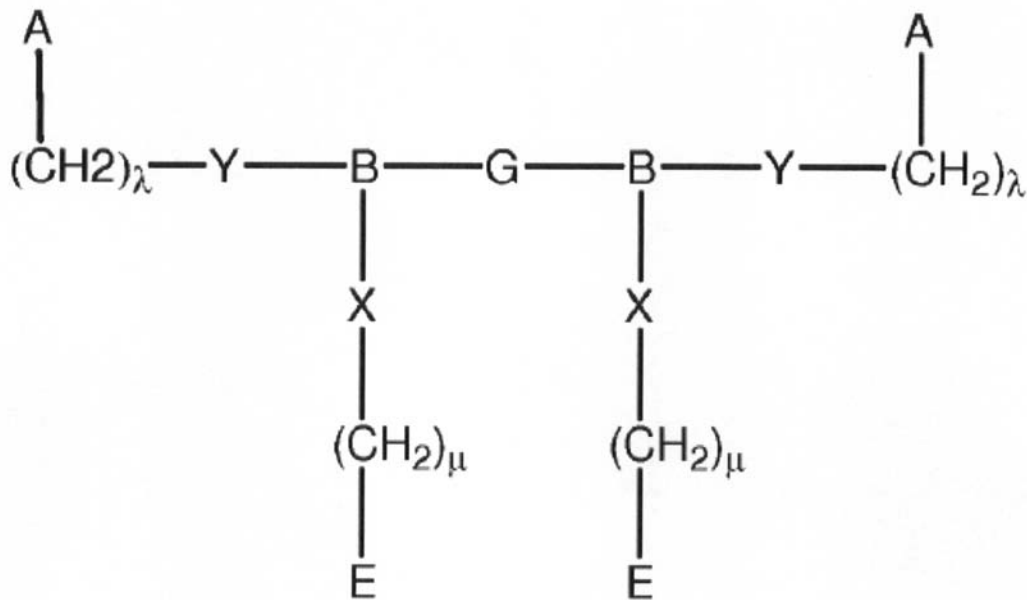
50

が、2 3 の整数であり；
 が、2 3 の整数であり；
 A が、COであり；
 B が、Nであり；
 C が、CO(CH₂) COまたは(CH₂) であり；
 D が、Nであり；
 E が、NHであり；
 が、2 3 の整数である、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカ 10
 ー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 65】



20

[式中、

30

は、1 4 の整数であり；
 μ は、1 μ 4 の整数であり；
 A は、CO、NH、NCOまたはSO₂CH₂CH₂のいずれかであり；
 B は、CHまたはNのいずれかであり；
 G は、(CH₂)、COまたはCOCH₂OCH₂COであり；
 E は、NHまたはCOのいずれかであり；
 X は、CO、結合またはCONHのいずれかであり；
 Y は、CO、結合またはNHCOのいずれかであり；
 は、2 4 の整数である]

を有する化合物と、

40

(b) 1種または複数の製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュ
 バントおよび/または担体。

【請求項 22】

が、1 3 の整数であり；
 $\mu = 2$ であり；
 A が、COであり；
 B が、Nであり；
 G が、(CH₂)、COまたはCOCH₂OCH₂COであり；
 E が、NHであり；
 X が、COまたは結合であり；

50

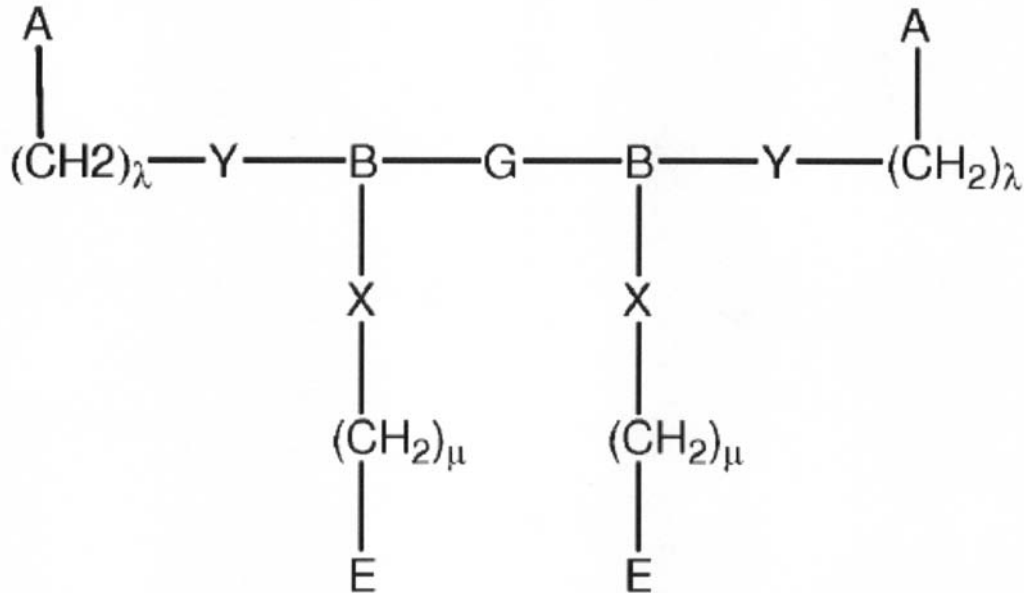
Y が、C O または 結合であり；

= 2 である、請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

(a) ペプチド部分、リンカー部分および水溶性ポリマー部分を含む化合物であって、リンカー部分が、ペプチド部分と水溶性ポリマー部分の間にあり、以下の構造：

【化 6 6】



10

20

[式中、

λ は、1 4 の整数であり；

μ は、1 μ 4 の整数であり；

A は、C O、NH、N C O または S O₂ C H₂ C H₂ のいずれかであり；

B は、C H または N のいずれかであり；

G は、(C H₂)、C O または C O C H₂ O C H₂ C O であり；

E は、NH または C O のいずれかであり；

X は、C O、結合または C O N H のいずれかであり；

Y は、C O、結合または N H C O のいずれかであり；

λ は、2 4 の整数である]

30

を有する化合物と、

(b) 1 種または複数の製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび / または担体と

を含む薬剤組成物。

【請求項 2 4】

λ が、1 3 の整数であり；

μ = 2 であり；

A が、C O であり；

B が、N であり；

G が、(C H₂)、C O または C O C H₂ O C H₂ C O のいずれかであり；

E が、NH であり；

X が、C O または 結合であり；

Y が、C O または 結合であり；

= 2 である、請求項 2 3 に記載の組成物。

40

【請求項 2 5】

水溶性ポリマー部分が、ポリ (エチレングリコール) 部分である、請求項 9 から 2 4 のいずれか一項に記載の化合物。

50

【請求項 26】

ポリ(エチレングリコール)部分の各々の分子量が20 kDaである、請求項25に記載の化合物。

【請求項 27】

ポリ(エチレングリコール)部分が直鎖である、請求項25に記載の化合物。

【請求項 28】

ポリ(エチレングリコール)部分の各々が10～30 kDaの分子量を有する、請求項25に記載の化合物。

【請求項 29】

ポリ(エチレングリコール)部分が、1.20未満の多分散値(M_w/M_n)を有する、請求項25に記載の化合物。

10

【請求項 30】

ペプチド部分が、単一のペプチドを含むペプチド単量体である、請求項9から24のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 31】

ペプチド部分が、リンカー部分によって連結された2種のペプチドを含むペプチド二量体である、請求項9から24のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 32】

各ペプチドが、50個以下のアミノ酸単量体を含む、請求項30に記載の化合物。

【請求項 33】

各ペプチドが、50個以下のアミノ酸単量体を含む、請求項31に記載の化合物。

20

【請求項 34】

ポリ(エチレングリコール)部分が、少なくとも1つの直鎖ポリ(エチレングリコール)鎖を含む、請求項25に記載の化合物。

【請求項 35】

各ポリ(エチレングリコール)鎖が、10～30 kDaの分子量を有する、請求項34に記載の化合物。

【請求項 36】

ペプチド部分が、エリスロポエチン受容体と結合する1種または複数のペプチドを含む、請求項9から24のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 37】

ペプチド部分が、配列番号：1～28のうちの1つである、請求項36に記載の化合物。

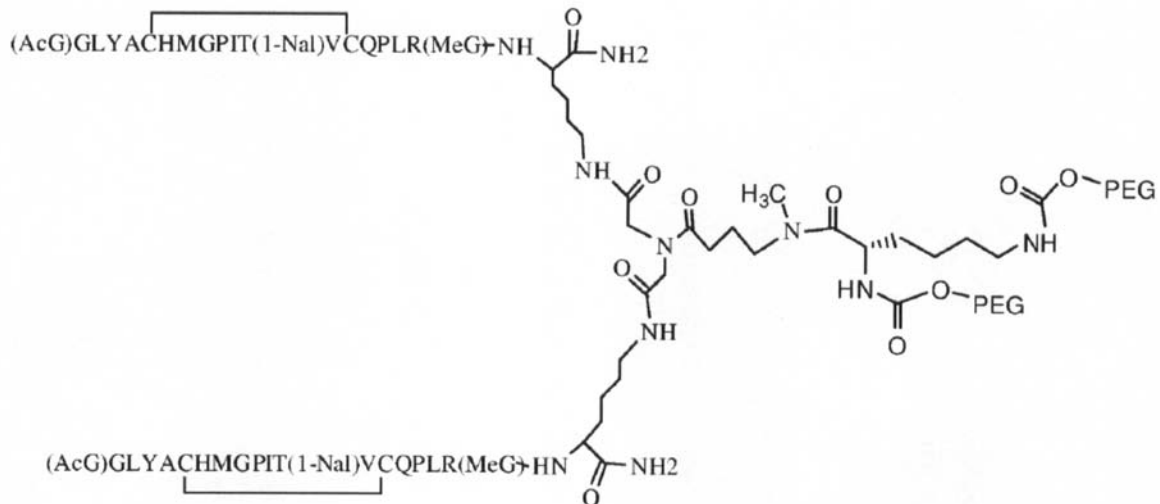
【請求項 38】

N末端リジン残基をさらに含み、リジン残基のアミノ基がリンカー部分化合物と共有結合している、請求項36に記載の化合物。

【請求項 39】

エリスロポエチン受容体(EPO-R)と結合し、これを活性化する化合物であって、次式：

【化 6 7】



10

[式中、

(i) ペプチド二量体の各ペプチド単量体において、各アミノ酸は標準一文字略語で示されており、AcGは、N - アセチルグリシンであり、1 - Nal は、1 - ナフチルアラニンであり、MeG は、N - メチルグリシンであり；

(i i) ペプチド二量体の各ペプチド単量体は、各単量体の 2 つのシステイン (C) 残基間に分子内ジスルフィド結合を含み；

(i i i) PEG は、合わせて約 10,000 ~ 約 60,000 ダルトンの分子量を有する、2 つの直鎖ポリエチレングリコール (PEG) 部分を含む]

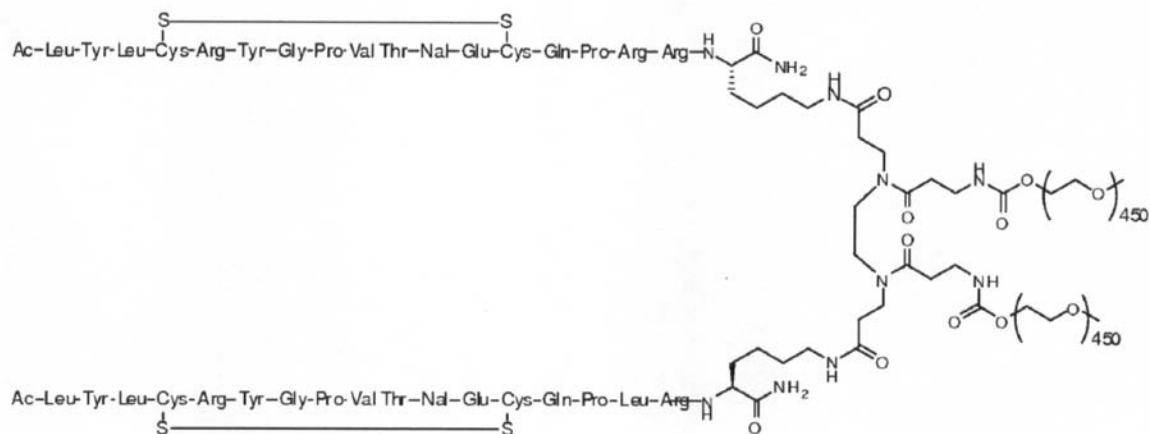
を有する、

ペプチド二量体 (配列番号 : 5) を含む化合物。

【請求項 40】

エリスロポエチン受容体 (EPO - R) と結合し、これを活性化する化合物であって、次式：

【化 6 8】



30

を有する、

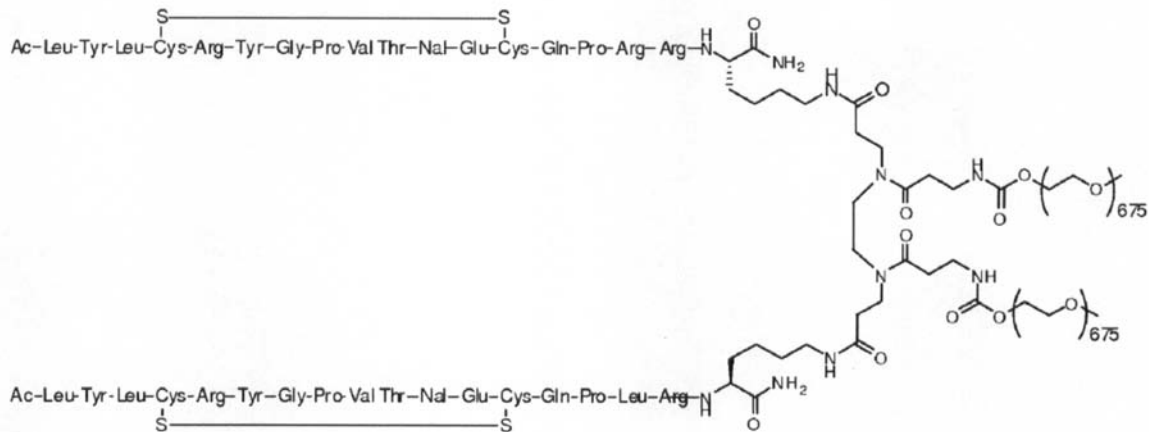
ペプチド二量体 (配列番号 : 16) を含む化合物。

【請求項 41】

エリスロポエチン受容体 (EPO - R) と結合し、これを活性化する化合物であって、次式：

40

【化 6 9】



10

を有する、
ペプチド二量体（配列番号：16）を含む化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2つの分子を共有結合によって連結でき、さらに、ポリ（エチレングリコール）（PEG）などの1個または複数の修飾基の共有結合を提供する新規リンカー分子に関する。さらに、本発明は、このような化合物を含む新規治療用組成物に関する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、タンパク質に関する研究の発展によって、種々の作用を有する多数のペプチドが見出されている。遺伝子組換え技術およびペプチドの有機合成法の進歩によって、これらの生理学的に活性なペプチドおよびその構造的類似体化合物を多量に得ることが可能となった。特異的な活性を有するこれらのペプチドの多くは、医薬品として極めて有用である。

【0003】

このようなペプチドの例として、エリスロポエチン（EPO）受容体（EPO-R）と結合するペプチドが挙げられる。EPOは、165個のアミノ酸、アミノ酸位置24、38、83および126の4つのグリコシル化部位ならびに約34,000の分子量を有する糖タンパク質ホルモンである。EPOは、赤血球前駆細胞の有糸分裂および分化を刺激し、ひいては、赤血球の生成を確実にする。EPOは、赤血球形成の過程において必須であり、このホルモンは、少ない、または欠陥のある赤血球生成を特徴とする血液疾患の診断および治療の両方において有用な適用を有する可能性がある。EPO-Rと相互作用するいくつかのペプチドが発見されている。（例えば、Wrightonらの米国特許第5,773,569号；Wrightonらの米国特許第5,830,851号；およびSmith-SwintoskyらのWO01/91780参照のこと。）

30

40

【0004】

しかし、特に、循環系に投与された場合のペプチドのクリアランスは、通常、極めて速い。したがって、このようなペプチドの持続性を改善することが望まれる。さらに、ペプチドが、異なる種の動物から得られ、ペプチドタンパク質工学によって設計され、かつ/または被験体のものとは異なる構造を有する場合は、抗体の生成による重大な症状を引き起こす危険がある。したがって、また、このようなペプチドの抗原性を改善することも望まれる。これらのペプチドを医薬品として使用するには、改善された抗原性および持続性の両方を有することが必要である。

【0005】

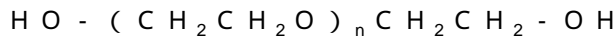
ポリ（エチレングリコール）などの高分子化合物でペプチドを化学修飾することは、種

50

々のペプチドの抗原性および持続性を改善するのに有効であることがわかっている。したがって、ポリ(エチレングリコール)およびポリ(エチレングリコール)誘導体は、ペプチド修飾性高分子試薬として広く用いられている。

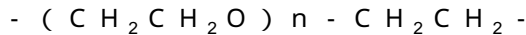
【0006】

ポリ(エチレングリコール)は、その最も一般的な形では、以下の構造を有する。



【0007】

上記のポリマー、 $-$ 、 $-$ ジヒドロキシルポリ(エチレングリコール)は、 $\text{HO} - \text{PEG} - \text{OH}$ (ここで、 $- \text{PEG} -$ 記号は、以下の構造単位を表すと理解される)として簡潔な形で表すことができる。



【0008】

いずれかの特定の理論または作用機序に制限されるものではないが、長い鎖様PEG分子または部分は、水性媒体中にあると、大量に水和され、高速運動中にあると考えられる。この高速運動によって、PEGが大きな容積を一掃し、その他の分子の接近および干渉を妨げると考えられる。結果として、PEGポリマー鎖は、別の化学物質(例えば、ペプチド)に結合されると、このような化学物質を免疫応答およびその他のクリアランス機構から保護することができる。結果として、PEG化は、薬物動態を最適化し、バイオアベイラビリティを増大し、免疫原性および投与頻度を低減することによって、薬効および安全性の改善につながる。

【0009】

例えば、PEGのいくつかの活性な誘導体がペプチド、タンパク質および酵素に結合され、有益な結果となっている。PEGは、有機溶媒に可溶性である。酵素に結合されたPEGは、有機溶媒において可溶性であり、活性であるPEG-酵素コンジュゲートをもたらし得る。タンパク質へのPEGの結合は、非修飾タンパク質と比較して、PEG-タンパク質コンジュゲートの免疫原性および腎臓クリアランスの速度を低減することができ、これは、コンジュゲートの血液循環寿命の著しい増大をもたらし得る。

【0010】

例えば、インターロイキン(Knauf, M. J.ら、J. Biol. Chem. 1988年、263、15、064頁; Tsutsumi, Y.ら、J. Controlled Release 1995年、33、447頁)、インターフェロン(Kita, Y.ら、Drug Des. Delivery 1990年、6、157頁)、カタラーゼ(Abuchowski, A.ら、J. Biol. Chem. 1977年、252、3、582頁)、スーパーオキシドジスムターゼ(Beauchamp, C. O.ら、Anal. Biochem. 1983年、131、25頁)およびアデノシンデアミナーゼ(Chen, R.ら、Biochim. Biophys. Acta 1981年、660、293頁)などの治療用タンパク質とPEGの共有結合は、そのin vivo半減期を延長し、ならびに/またはその免疫原性および抗原性を低減すると報告されている。

【0011】

さらに、表面に結合しているPEGは、表面へのタンパク質および細胞吸着を低減し、表面の電気的特性を変化させ得る。同様に、リボソームに結合しているPEGは、これらの粒子の血液循環寿命の大きな増大と、それによる、その薬物送達の有効性の増大の可能性をもたらし得る(J. M. Harris編、「Biomedical and Biotechnical Applications of Polyethylene Glycol Chemistry」、Plenum、New York、1992年)。

【0012】

PEGおよび結合された高分子間にアミノ酸またはペプチドアーム(peptide arm)が存在することが、適したアミノ酸またはペプチドを用いて導入され得る特性の変化によるいくつかの利点を実証してきた。これらのアミノ酸またはペプチドアームのうち、ノルロイシン(Nle)は、分析目的で用いられ、 ^{14}C またはトリチウム標識されたGlyは、

薬物動態研究のために用いられ、Lysは、分枝のために用いられ、Met - NleまたはMet - Alaは、BrCN処理によるPEG除去のために用いられている (Veronese, F. M. Biomaterials, 2001年、22、405頁)。

【0013】

PEGおよび結合された高分子間にアミノ酸アームを含む、別の公知の種類のPEG誘導体は、三官能性リンカーの2つの官能基によって一緒に連結している2つの直線PEG鎖を特徴とし、第3の官能基はタンパク質を結合するのに用いられる。リジン (Lysine) は、三官能性アミノ酸リンカーであり、2つのPEG鎖は、その および アミノ基と連結しており、カルボン酸基は、タンパク質結合のためにヒドロキシスクシンイミジルエステルとして活性化される。このPEG誘導体は、コンジュゲーションの際に酵素の不活化が少なく、その「傘様」構造は、タンパク質をタンパク質分解から保護するのに、抗体のアプローチにおいて、また免疫原性を低減するのに有効であるという利点を有する (Veronese, F. M. Biomaterials, 2001年、22、405頁)。

10

【0014】

PEG - リンカー - ペプチドまたはPEG - リンカー - リポソームは、活性化基の一部が最終PEG - ペプチドまたはPEG - リポソーム付加物中に組み込まれる時に、望ましくない副生成物として形成されることがある。Francesら (Int. J. Hematol. 1998年、68、1頁) は、このようなリンカーは、いくつかの種類の有害作用を有し得ると開示している：(1) これらのリンカーは、必ずしも免疫学的に不活性ではなく、このような基が、PEGタンパク質の免疫原性/抗原性の原因であるという実験的証拠がある；(2) いくつかのリンカー部分は、酵素的にまたは化学的に切断され得る不安定な結合を含む；(3) 比較的毒性の高い活性化されたPEGに由来するリンカー部分は、規制問題につながり得ることが多い；(4) トリアジン環などの特定のリンカー基は架橋を引き起こし得る。

20

【0015】

PEGに加えて、その他の化合物でペプチドを化学修飾することは、種々のペプチドの活性および持続性を改善するのに有効であることがわかっている。例として、脂肪酸 (Wangら、J. Med. Chem. 2005年、48、3328頁)、能動輸送剤 (例えば、コール酸)、密着結合修飾物質 (tight junction modulators) (JohnsonおよびQuay、Expert Opin. Drug Deliv. 2005年、2、281頁)、ペプチド (例えば、ポリアルギニン)、細胞傷害性薬剤 (例えば、ドキソルビシン)、ヒアルロン酸または炭水化物などのその他のポリマーなどの結合が挙げられる。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

PEGまたは別の化学基の、例えばペプチドとの結合は、リンカー分子の使用によって達成してもよい。これらのリンカー分子は、複数の官能基末端を提供することができ、それによって、単一のリンカーの使用によっていくつかの分子の結合が可能となる。しかし、例えば、PEGまたはその他のモディファイヤーペプチドベースのコンジュゲートの技術分野においてなされた進展にもかかわらず、依然として、分子コンジュゲーションのさらなる方法を提供するための新規リンカー分子の必要性が残っている。

40

【0017】

この節中の、この明細書を通じて、参照文献の引例および/または考察は、このような参照文献が本発明の先行技術であるという承認と解釈されてはならない。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明のリンカーは、少なくとも1つの分子部分 (molecular moiety) を別の分子部分と結合できる。

【0019】

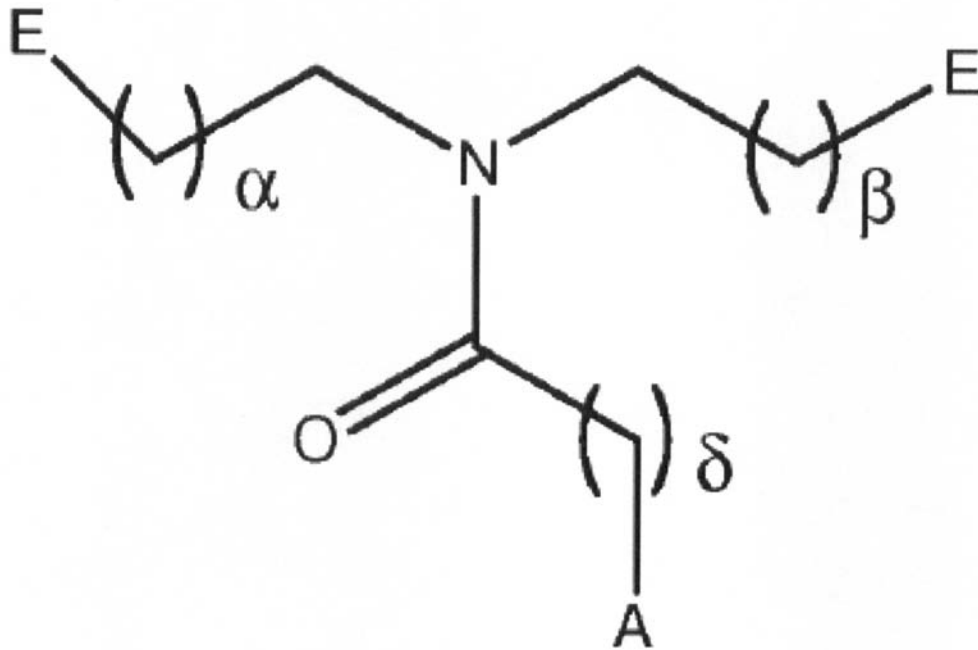
一実施形態は、以下の構造を有するリンカー部分化合物 (linker moiety compound) で

50

ある

【 0 0 2 0 】

【 化 1 】



10

20

[式中、

は、 1 7 の整数であり；

は、 1 7 の整数であり；

は、 2 5 の整数であり；

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H 、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニル
 スルホンのいずれかであり；

E は、 NH_2 、 CO_2H 、 CHO 、マレイミドまたは NHBOc のいずれかである]。

【 0 0 2 1 】

さらなる実施形態は、

= 1 または 2 であり；

= 3 であり；

A が、 CO_2H または活性化 CO_2H のいずれかであり；

E が、 NHBOc である。

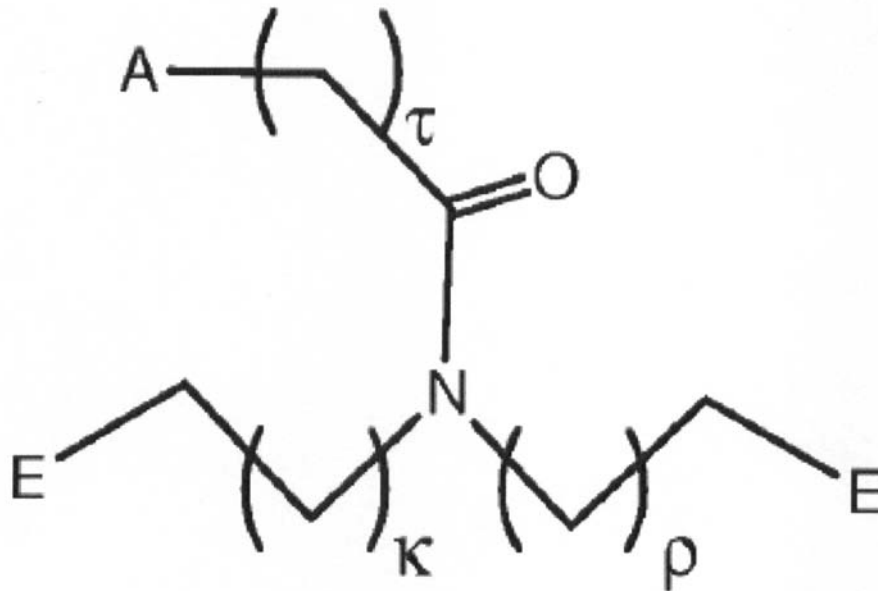
30

【 0 0 2 2 】

別のリンカー部分化合物実施形態は、以下の構造を有するリンカー部分化合物である

【 0 0 2 3 】

【化 2】



10

[式中、

は、0 8 の整数であり；

20

は、0 8 の整数であり；

は、2 5 の整数であり；

A は、NHR または NRBoC のいずれかであり；

R は、アルキルであり；

E は、NH₂、CO₂H、活性化CO₂H、CHO、マレイミドまたはNRBoC のいずれかであり、ここで、R は、H またはアルキルである]。

【0024】

さらなる実施形態は、

= 0 であり；

= 3 であり；

30

A が、NHBoC であり；

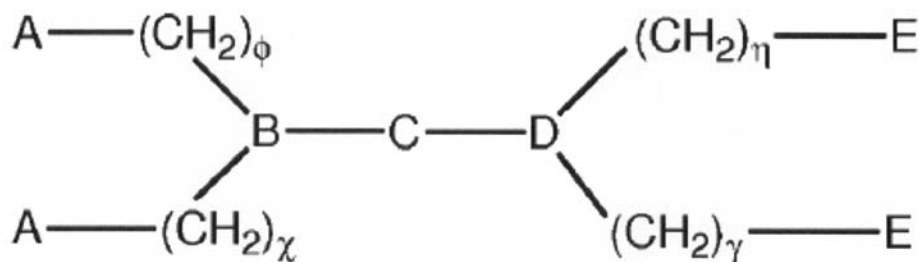
R が、CH₃ であり；E が、CO₂H または CONHS である。

【0025】

別のリンカー部分化合物実施形態は、リンカー部分化合物が、3 個以上の分子を連結し、リンカー部分化合物が、以下の構造を有する

【0026】

【化 3】



40

[式中、

は、1 4 の整数であり；

は、1 4 の整数であり；

は、2 8 の整数であり；

50

は、2 8 の整数であり；

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H 、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

B は、 CH または N のいずれかであり；

C は、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) のいずれかであり；

D は、 CH または N のいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

は、2 5 の整数である。]

【0027】

さらなる実施形態は、

= 1 であり；

= 1 であり；

が、2 3 の整数であり；

が、2 3 の整数であり；

A が、 CO_2H または活性化 CO_2H のいずれかであり；

B が、 N であり；

C が、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) であり；

D が、 N であり；

E が、 NHBOc であり；

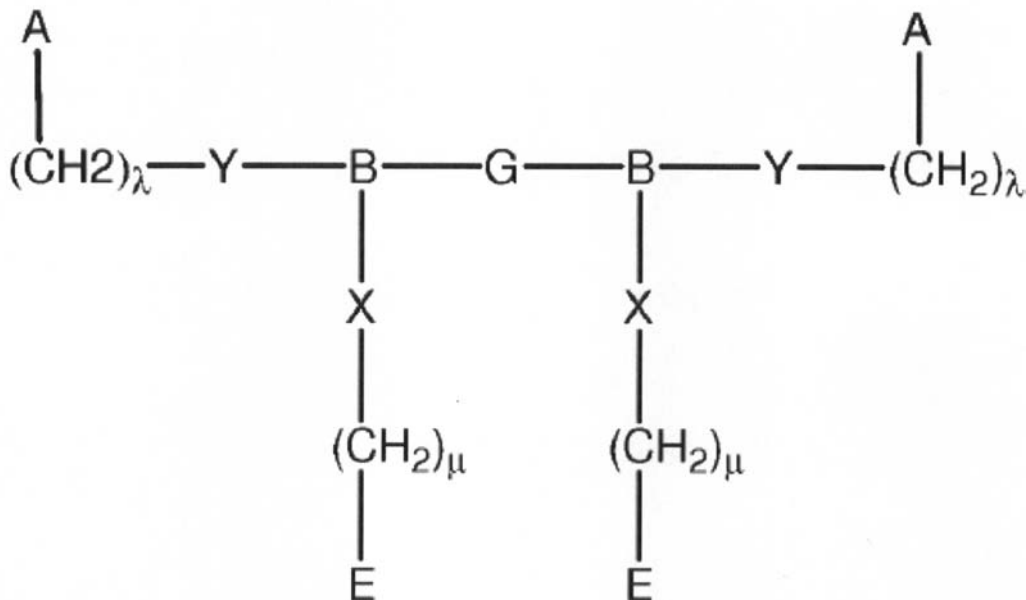
が、2 3 の整数である。

【0028】

別の実施形態は、リンカー部分化合物が3個以上の分子を連結し、リンカー部分化合物が以下の構造を有する

【0029】

【化4】



[式中、

は、1 4 の整数であり；

μ は、1 μ 4 の整数であり；

A は、 CO_2H 、活性化 CO_2H (活性化 CO_2H)、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

B は、 CH または N のいずれかであり；

G は、 (CH_2) 、 CO または $\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}$ のいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

Xは、CO、結合またはCONHのいずれかであり；

Yは、CO、結合またはNHCOのいずれかであり；

は、2 4の整数である】。

【0030】

さらなる実施形態は、

が、1 3の整数であり；

$\mu = 2$ であり；

Aが、CO₂Hまたは活性化CO₂Hのいずれかであり；

Bが、Nであり；

Gが、(CH₂)、COまたはCOCH₂OCH₂COのいずれかであり；

Eが、NH₂またはNHBOcであり；

Xが、COまたは結合であり；

Yが、COまたは結合であり；

= 2である。

10

【0031】

上記のリンカー部分(linker moiety)のさらなる実施形態として、ペプチド部分(peptide moiety)、上記のリンカー部分、水溶性ポリマー部分(water-soluble polymer moiety)を含む化合物が挙げられる。特定の実施形態では、リンカー部分が、ペプチド部分または水溶性ポリマー部分と共有結合するように、Aは、CO、NH、NCOまたはSO₂CH₂CH₂のいずれかであり、Eは、NHまたはCOのいずれかである。

20

【0032】

水溶性ポリマー部分が、ポリ(エチレングリコール)部分(moiety)であることが好ましい。ポリ(エチレングリコール)部分が、直線であり、約2kダルトン~60kダルトンの分子量を有することがより好ましい。ポリ(エチレングリコール)部分が、約20~40kダルトンの分子量を有することがさらに好ましい。ポリ(エチレングリコール)部分が、20kダルトンの分子量を有することが最も好ましい。ポリ(エチレングリコール)部分が、1.20未満、より好ましくは1.1未満、最も好ましくは1.05未満の多分散性(M_w/M_n)を有することが好ましい。特定の実施形態では、2種の水溶性部分が、リンカー部分を介してペプチド部分と結合している。

30

【0033】

本発明での一実施形態では、ペプチド部分は、二量体であり、リンカー部分によって連結された2種の単量体ペプチドを含む。

【0034】

一実施形態では、ペプチド部分は、エリスロポエチン受容体と結合するペプチドから選択される。このようなEPO-R結合ペプチドの限定されない例として、公開国際出願PCT/US00/32224(公開番号WO01/38342A2、米国指定)、PCT/US96/09810(公開番号WO96/40749、米国指定)およびPCT/US01/16654(公開番号WO01/91780A1)；および米国特許第5,767,078号、同第5,773,569号、同第5,830,851号、同第5,986,047号および同第6,221,608号に開示されるものが挙げられる。このようなEPO-R結合ペプチドのさらなる限定されない例は、PCT/US2004/014886(公開番号WO2004/101611)およびPCT/US2004/014889(公開番号WO2004/101606)に開示される。

40

【0035】

本発明はまた、上記の化合物(複数の化合物)を含む薬剤組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】10mg/kgのPEG化ペプチドの単回ボラスIV注射後の雄のSprague-Dawley(スプラグ-ドーリー)ラットにおけるヘモグロビン(Hgb)における変化を示す図である。破線()：化合物I、実線()：化合物XIII。

50

【図 2】10 mg / kg の PEG 化ペプチドの単回ボラス I V 注射後の雄の Sprague-Dawley ラットにおけるヘモグロビン (Hgb) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 V。

【図 3】10 mg / kg の PEG 化ペプチドの単回ボラス I V 注射後の雄の Sprague-Dawley ラットにおけるヘモグロビン (Hgb) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 I V。

【図 4】10 mg / kg の PEG 化ペプチドの単回ボラス I V 注射後の雄の Sprague-Dawley ラットにおけるヘモグロビン (Hgb) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 I I I。

【図 5】実施例 25 の方法に従って、雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球 (reticulocyte) パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 I I I。 10

【図 6】実施例 25 の方法に従って、雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 V。

【図 7】実施例 25 の方法に従って、雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 X I I I。

【図 8】実施例 25 の方法に従って、雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 化合物 I、実線 () : 化合物 I V。 20

【図 9】0.5 mg / kg の化合物 X V I の単回ボラス投与後の雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 皮下注射 (subcutaneous injection) (SC) ; 実線 () : 静脈注射 (intravenous injection) (IV)。

【図 10】0.5 mg / kg の化合物 X V の単回ボラス投与後の雄の Sprague-Dawley ラットにおいて観察された網状赤血球パーセント (Ret %) における変化を示す図である。破線 () : 皮下注射 (SC) ; 実線 () : 静脈注射 (IV)。

【図 11】0.5 mg / kg の化合物 X V I の単回ボラス注射後の雄の Sprague-Dawley ラットにおけるヘモグロビン (Hgb) における変化を示す図である。破線 () : 皮下注射 (SC) ; 実線 () : 静脈注射 (IV)。 30

【図 12】0.5 mg / kg の化合物 X V の単回ボラス注射後の雄の Sprague-Dawley ラットにおけるヘモグロビン (Hgb) における変化を示す図である。破線 () : 皮下注射 (SC) ; 実線 () : 静脈注射 (IV)。

【発明を実施するための形態】

【0037】

定義

ペプチド中のアミノ酸残基は以下のとおりに略記される：フェニルアラニンは P h e または F であり；ロイシンは L e u または L であり；イソロイシンは I l e または I であり；メチオニンは M e t または M であり；バリンは V a l または V であり；セリンは S e r または S であり；プロリンは P r o または P であり；トレオニンは T h r または T であり；アラニンは A l a または A であり；チロシンは T y r または Y であり；ヒスチジンは H i s または H であり；グルタミンは G l n または Q であり；アスパラギンは A s n または N であり；リジンは L y s または K であり；アスパラギン酸は A s p または D であり；グルタミン酸は G l u または E であり；システインは C y s または C であり；トリプトファンは T r p または W であり；アルギニンは A r g または R であり；グリシンは G l y または G である。ペプチド中の非従来アミノ酸は以下のとおりに略記される：1 - ナフチルアラニンは 1 - N a l または N p であり；2 - ナフチルアラニンは 2 - N a l であり；N - メチルグリシン (サルコシンとしても知られている) は M e G または S_c または S a r であり；アセチル化グリシン (N - アセチルグリシン) は A c G である。 40 50

【0038】

「ペプチド」または「ポリペプチド」とは、単量体が、アミド結合によって一緒になって結合している アミノ酸であるポリマーを指す。ペプチドは、2 個、または、多くは、それより多いアミノ酸単量体の長さである。本発明のペプチドは、約 50 個未満のアミノ酸単量体の長さを含むことが好ましい。

【0039】

本明細書において、語句「製薬上許容される」とは、「一般に安全と見なされる」、例えば、生理学的に許容され、ヒトに投与された場合に、通常、アレルギー反応または同様の有害反応、例えば、胃の不調、めまいなどを引き起こさない分子の実体および組成物を指す。本明細書において、用語「製薬上許容される」は、連邦政府または州政府の監督官庁によって承認される、または米国薬局方もしくは動物、さらに詳しくは、ヒトにおいて使用するためのその他の一般に認識される薬局方に列挙されることを意味することが好ましい。用語「担体 (carrier)」とは、それと一緒に化合物が投与される、希釈液 (diluent)、アジュバント (adjuvant)、賦形剤 (excipient) またはビヒクル (vehicle) を指す。このような薬剤担体は、水およびピーナッツオイル、ダイズオイル、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物または合成由来のものを含めたオイルなどの滅菌液体であり得る。水または水溶液生理食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液を、特に注射用溶液のための、担体として用いることが好ましい。適した薬剤担体は、E. W. Martin による「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

10

20

【0040】

本明細書において、用語「アゴニスト」とは、それと相補的な生物学的に活性な受容体と結合し、後者を活性化して、受容体において生物学的反応を引き起こすか、または受容体の既存の生物学的反応を増強するのいずれかである生物学的に活性なリガンドを指す。

【0041】

本明細書において、用語「活性化された CO_2H (activated CO_2H)」または「 COX 」とは、カップリング反応に関与し、通常、アミンまたはヒドロキシ基での処理でアミドまたはエステル結合を形成し得るカルボン酸の活性エステルを指す。好ましい実施形態は、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化カルボキシル基 (N-hydroxysuccinimide activated carboxyl group) である。本発明の別の好ましい実施形態は、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (EDC) などのカップリング剤の存在下で、カルボン酸およびアミンが反応することが可能となる *in situ* 活性化に依存する。

30

【0042】

リンカー部分

本発明のリンカーは、水溶性ポリマー部分であり得る少なくとも 2 つの部分と、ペプチドであり得る第 3 の部分と結合できる。

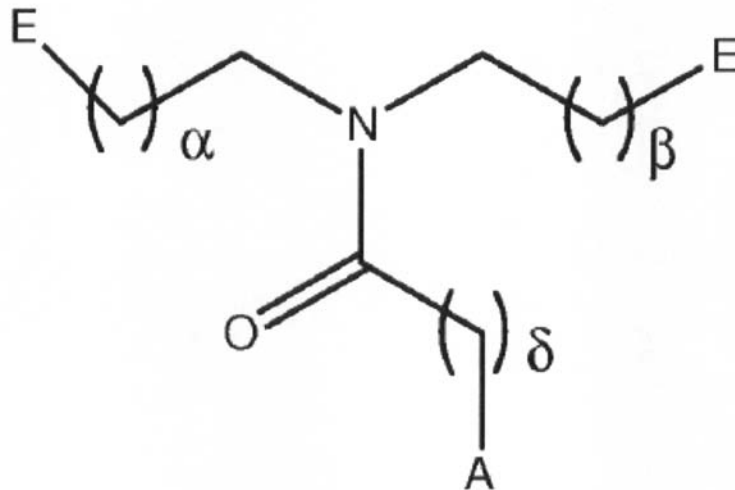
【0043】

本発明の一実施形態では、以下の構造を有するリンカー部分化合物が示される

【0044】

40

【化 5】



10

[式中、 α 、 β および δ は各々、値が独立して選択される整数である]。

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態では、

α は、1 7 の整数であり；

β は、1 7 の整数であり；

δ は、2 5 の整数であり；

20

A は、 CO_2H 、 COX （活性化された CO_2H 、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドによって活性化されたもの）、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかである。

【 0 0 4 6 】

特定の好ましい一実施形態では、

$\alpha = \beta = 1$ または 2 であり；

$\delta = 3$ であり；

A は、 CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）のいずれかであり；

E は、 NHBOc である。

30

【 0 0 4 7 】

別の特定の好ましい実施形態では、

$\alpha = \beta = 2$ であり；

$\delta = 3$ であり；

A は、 CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）のいずれかであり；

E は、 NHBOc である。

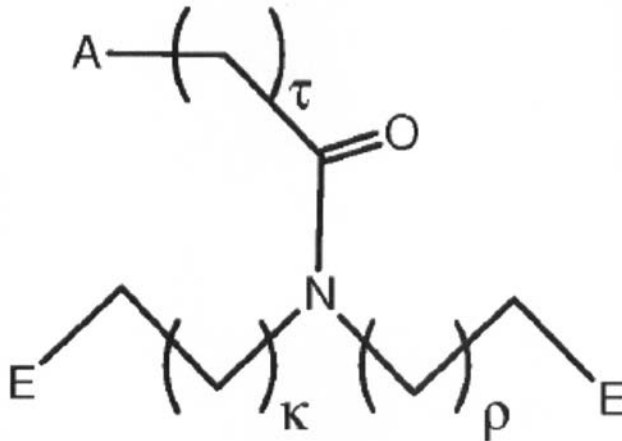
【 0 0 4 8 】

別のリンカー部分化合物実施形態は、以下の構造を有するリンカー部分化合物である

【 0 0 4 9 】

40

【化 6】



10

[式中、

は、0 8 の整数であり；

は、0 8 の整数であり；

は、2 5 の整数であり；

A は、NHR または NRBoC のいずれかであり；

R は、アルキルであり；

20

E は、NH₂、CO₂H、活性化された CO₂H、CHO、マレイミドまたは NRBoC のいずれかであり、ここで、R は、H またはアルキルである]。

【0050】

さらなる実施形態は、

= 0 であり；

= 3 であり；

A は、NRBoC であり；

R は、CH₃ であり；E は、CO₂H または CONHS である。

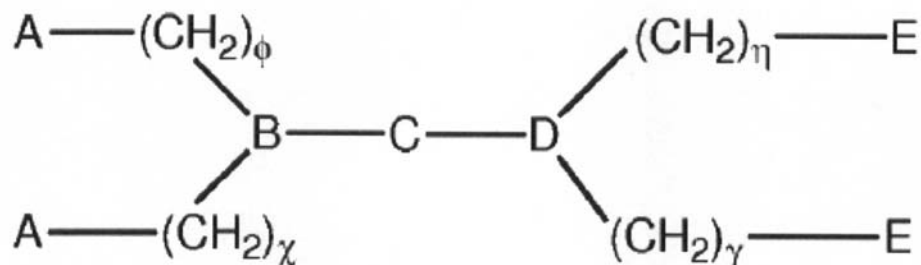
30

【0051】

本発明のもう 1 つの実施形態では、リンカー部分は、以下の構造を有する四官能性リンカーである

【0052】

【化 7】



40

[式中、 ϕ 、 χ 、 η および γ は各々、値が独立に選択される整数である]。

【0053】

好ましい実施形態では、

は、1 4 の整数であり；

は、1 4 の整数であり；

は、2 8 の整数であり；

は、2 8 の整数であり；

A は、CO₂H、COX（活性化された CO₂H、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミ

50

ドによって活性化されたもの)、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

Bは、 CH または N のいずれかであり；

Cは、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) のいずれかであり；

Dは、 CH または N のいずれかであり；

Eは、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

は、2 5の整数である。

【0054】

特に好ましい実施形態では、

= 1であり；

10

= 1であり；

は、2 3の整数であり；

は、2 3の整数であり；

Aは、 CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）のいずれかであり；

Bは、 N であり；

Cは、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO または (CH_2) のいずれかであり；

Dは、 N であり；

Eは、 NHBOc であり；

は、2 3の整数である。

【0055】

20

特定の一実施形態では、

= 1であり；

= 1であり；

は、2 3の整数であり；

は、2 3の整数であり；

Aは、 CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）のいずれかであり；

Bは、 N であり；

Cは、 $\text{CO}(\text{CH}_2)$ CO であり；

Dは、 N であり；

Eは、 NHBOc であり；

30

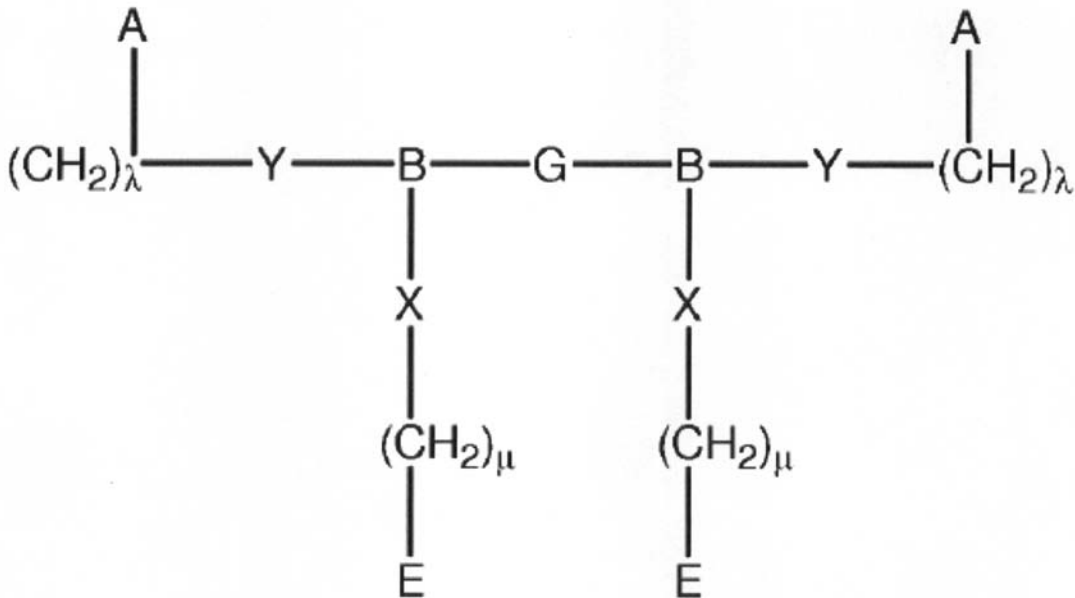
は、2 3の整数である。

【0056】

本発明の別の一実施形態では、リンカー部分は、以下の構造を有する四官能性リンカーである

【0057】

【化 8】



10

[式中、 および μ は各々、値が独立に選択される整数である]。

20

【 0 0 5 8 】

好ましい実施形態では、

λ は、1 4 の整数であり；

μ は、1 μ 4 の整数であり；

A は、 CO_2H 、 COX （活性化された CO_2H 、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドによって活性化されたもの）、 NH_2 、 NCO 、 CHO 、マレイミドまたはビニルスルホンのいずれかであり；

B は、 CH または N のいずれかであり；

G は、 (CH_2) 、 CO または $\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}$ のいずれかであり；

E は、 NH_2 、 NHBOc 、 CO_2H 、 CHO またはマレイミドのいずれかであり；

X は、 CO 、結合または CONH のいずれかであり；

Y は、 CO 、結合または NHCO のいずれかであり；

λ は、2 4 の整数である。

30

【 0 0 5 9 】

特に好ましい実施形態では、

λ は、1 3 の整数であり；

$\mu = 2$ であり；

A は、 CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）のいずれかであり；

B は、 N であり；

G は、 (CH_2) 、 CO または $\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}$ のいずれかであり；

E は、 NH または NHBOc であり；

X は、 CO または結合であり；

Y は、 CO または結合であり；

$\lambda = 2$ である。

40

【 0 0 6 0 】

本発明によれば、リンカーの E 末端は、保護基を含む場合があり、これは、水溶性ポリマー部分（好ましくは PEG）が結合される前に、反応性官能基を遊離させるために除去しなくてはならない。リンカーの E 末端の保護基として、BOc および Alloc が挙げることができるが、それらに限定されない。水溶性部分は、リンカーの E 末端に直接的に結合されてもよく、間接的に、例えば、アミドもしくはカルバメート結合を用いて結合されてもよい。本発明のリンカーは、1 つまたは複数の水溶性ポリマー部分の結合を可能に

50

する。

【0061】

本発明によれば、ペプチド部分は、リンカーのA末端に結合されてもよい。リンカーは、ペプチドのC末端またはN末端のいずれと結合させてもよい。したがって、リンカーがペプチドのC末端と結合している実施形態では、Aは NH_2 である。リンカーがペプチドのN末端と結合している実施形態では、Aは、 CO_2H 、 COX （活性化された CO_2H ）または NCO である。代替実施形態では、ペプチドは、システイン中に見られるものなどのチオール側鎖を含み、Aはマレイミドである。その他の実施形態では、ペプチドは、還元的アミノ化反応によって、Aが CHO であるリンカーと結合している遊離アミンを含む。好ましい代替実施形態では、Aが CO_2H または COX （活性化された CO_2H ）である本発明のリンカーは、アミド結合によってペプチド単量体のリジン残基のアミノ基と結合している。前記リジン残基は、ペプチド単量体中のいずれの位置にあってもよい。好ましい実施形態では、リジンはペプチドのC末端に位置する。

10

【0062】

リンカー部分は、ペプチド合成の間にペプチド中に組み込んでもよい。例えば、リンカーが、別の分子部分と結合可能な2種の遊離官能基（例えば、カルボキシル基またはアミノ基）を含む場合は、リンカーを固相支持体にコンジュゲートさせてもよい。その後、標準固相技術によってペプチドをリンカーの遊離官能基上に直接合成してもよい。

【0063】

別の実施形態では、ペプチド合成後に、リンカー部分をペプチドにコンジュゲートさせてもよい。このようなコンジュゲーションは、当技術分野で十分に確立された方法によって達成できる。一実施形態では、リンカーは、合成されたペプチドの標的官能基との結合に適した少なくとも1個の官能基を含む。例えば、遊離アミン基を含むリンカーを、ペプチドのC末端カルボキシル基と反応させてもよい。

20

【0064】

一実施形態では、リンカー部分を、まず、1つまたは2つのペプチドと結合し、後者の場合には、ペプチド二量体を形成する。その後、リンカーの保護基を除去し、2つの反応基を遊離させる。その後、2つの反応基を、2つの水溶性ポリマー部分（好ましくは、PEG部分）と結合する。

【0065】

あるいは、まず、水溶性部分（好ましくは、PEG部分）を、リンカーとコンジュゲートし、続いて、リンカーの反応性官能基を遊離させてもよく、これが1つまたは2つのペプチドと反応でき、後者の場合はペプチド二量体を形成する。

30

【0066】

特定の実施形態では、リンカーは、三官能性であり、A末端が第2のリンカーと結合される。第2のリンカーは1つまたは2つのペプチドと結合でき、後者の場合にはペプチド二量体を形成する。

【0067】

水溶性ポリマー / PEG部分 (Moiety)

本発明の水溶性ポリマー部分として、それだけには限らないが、(a) ポリアルキレングリコールおよびその誘導体、例えば、PEG、mPEG、PEGホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールのプロピレングリコールとの共重合体（ここで、前記ホモポリマーおよび共重合体は、非置換であるか、または一方の末端でアルキル基で置換されている）；(b) セルロースおよびセルロース誘導体、例えば、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロース；(c) デンプンおよびデキストリンおよびその誘導体；(d) デキストランおよびデキストラン誘導体、例えば、硫酸デキストラン、架橋デキストリンおよびカルボキシメチルデキストリン；(e) ヘパリンおよびヘパリンの断片；(f) ポリビニルアルコールおよびポリビニルエチルエーテル；(g) ポリビニルピロリドン；(h) a, b - ポリ[(2 - ヒドロキシエチル) - DL - アスパルタミド；および(i) ポリオキシエチレン化ポリオールが挙げられる。

40

50

【0068】

これらのポリマーは、様々な分子量を有する、直鎖、分枝または星型であり得る。

【0069】

水溶性ポリマー部分は、PEGであることが好ましい。本発明において使用するのに好ましいPEGとして、約2kダルトン(kDa)を超える分子量を有する直鎖PEGがある。PEGは、約10kDa～約60kDaの分子量を有することが好ましい。PEGは、約20kDa～約40kDaの分子量を有することが好ましい。PEGは、約40kDaの分子量を有することが好ましい。2つのPEG部分の合計20～60kダルトンについて、各PEG部分が、10～30kダルトンであることが好ましい。

【0070】

水溶性ポリマー部分は、スペーサーまたはリンカー部分と共有結合している。一実施形態では、PEG部分は、スペーサーまたはリンカーのN末端に結合している。

【0071】

本発明の化合物は、複数の水溶性ポリマー部分(好ましくは、PEG部分)(例えば、2、3、4またはそれ以上)を含むことができ、このような複数の水溶性ポリマー部分の少なくとも1つは、リンカー部分を介して連結している。化合物が2つ以上の水溶性ポリマー部分を含む場合には、複数の水溶性ポリマー部分は同一の化学部分であってもよいし、異なる化学部分(例えば、異なる分子量のPEG)であってもよい。本発明の一実施形態では、水溶性ポリマー部分は、二量体であり、リンカー部分によって連結される2つの単量体PEGを含む。いくつかの場合では、ペグ化度(ペプチドに結合されたPEG部分の数および/またはPEGが結合されているペプチドの総数)は、PEG化反応におけるPEG分子対ペプチド分子の割合によって、ならびに反応混合物中の各々の総濃度によって影響を受け得る。一般に、最適PEG対ペプチド比(過剰の未反応ペプチドおよび/またはPEGを生じさせないための反応効率の点で)は、所望のペグ化度(例えば、モノ、ジ-、トリ-等)、選択されたポリマーの分子量、ポリマーが分枝しているか未分枝であるかどうか、および特定の結合法のための反応条件などの因子によって決まる。

【0072】

当業者に利用可能な、いくつかのPEG結合法がある[例えば、Goodsonら(1990年)Bio/Technology 8:343(PEGylation of interleukin-2 at its glycosylation site after site-directed mutagenesis); EP0401384(coupling PEG to G-CSF); Malikら、(1992年)Exp. Hematol. 20:1028~1035頁(PEGylation of GM-CSF using tresyl chloride); PCT公開番号WO90/12874(PEGylation of erythropoietin containing a recombinantly introduced cysteine residue using a cysteine-specific mPEG derivative); 米国特許第5,767,078号(PEGylation of EPO peptides); 米国特許第5,672,662号(Poly(ethylene glycol) and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications); 米国特許第6,077,939号(PEGylation of an N-terminal-carbon of a peptide); Veroneseら、(1985年)Appl. Biochem. Biotechnol 11:141~142頁(PEGylation of an N-terminal-carbon of a peptide with PEG-nitrophenyl carbonate(「PEG-NPC」) or PEG-trichlorophenyl carbonate); および Veronese(2001年)Biomaterials 22:405~417頁(Review

10

20

30

40

50

article on peptide and protein PEGylation)]。

【0073】

例えば、PEGは、反応性基を介してアミノ酸残基と共有結合によって結合され得る。反応性基は、活性化されたPEG分子が結合され得る（例えば、遊離アミノまたはカルボキシル基）。例えば、N末端アミノ酸残基およびリジン（K）残基は、遊離アミノ基を有し、C末端アミノ酸残基は、遊離カルボキシル基を有する。スルフヒドリル基（例えば、システイン残基上に見られるような）もまた、PEGを結合するための反応性基として使用できる。さらに、活性化された基（例えば、ヒドラジド、アルデヒドおよび芳香族アミノ基）を、ポリペプチドのC末端に特異的に導入するための酵素を使った方法（enzyme-assisted methods）が記載されている [Schwarzら（1990年）Methods Enzymol. 184:160頁；Roseら（1991年）Bioconjugate Chem. 2:154頁；Gaertnerら（1994年）J. Biol. Chem. 269:7224頁]。

10

【0074】

例えば、PEG分子は、異なる反応性部分を有するメトキシル化PEG（「mPEG」）を用いてアミノ基と結合させてもよい。このような反応性部分の限定されない例として、コハク酸スクシンイミジル（SS）、炭酸スクシンイミジル（SC）、mPEG-イミデート、パラニトロフェニルカルボナート（NPC）、プロピオン酸スクシンイミジル（SPA）および塩化シアヌルが挙げられる。このようなmPEGの限定されない例として、mPEG-コハク酸スクシンイミジル（mPEG-SS）、mPEG₂-コハク酸スクシンイミジル（mPEG₂-SS）；mPEG-炭酸スクシンイミジル（mPEG-SC）、mPEG₂-炭酸スクシンイミジル（mPEG₂-SC）；mPEG-イミデート、mPEG-パラ-ニトロフェニルカルボナート（mPEG-NPC）、mPEG-イミデート；mPEG₂-パラ-ニトロフェニルカルボナート（mPEG₂-NPC）；mPEG-プロピオン酸スクシンイミジル（mPEG-SPA）；mPEG₂-プロピオン酸スクシンイミジル（mPEG₂-SPA）；mPEG-N-ヒドロキシスクシンイミド（mPEG-NHS）；mPEG₂-N-ヒドロキシ-スクシンイミド（mPEG₂-NHS）；mPEG-塩化シアヌル；およびmPEG₂-塩化シアヌルが挙げられる。

20

【0075】

PEGの結合が、非特異的であり、特異的PEG結合を含有するペプチドが望まれる場合には、PEG化合物の混合物から所望のPEG化合物を精製してもよい。例えば、N末端がPEG化されたペプチドが望まれる場合には、ランダムにPEG化されたペプチドの集団からN末端がPEG化された形を精製してもよい（すなわち、その他のモノPEG化部分からのこの部分の分離）。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、PEGは、ペプチドまたはスペーサーに部位特異的に結合される。成長ホルモン放出因子の強力な類似体におけるN末端、側鎖およびC末端での部位特異的ペグ化が、固相合成によって実施されている [Felixら（1995年）Int. J. Peptide Protein Res. 46:253頁]。別の部位特異的法は、N末端トレオニンの過ヨウ素酸ナトリウム酸化によって生じたN末端の反応性アルデヒド基を介した部位特異的な方法での、リポソームの表面にグラフトされたPEG鎖の末端とのペプチドの結合に関与する [Zalipskyら（1995年）Bioconj. Chem. 6:705頁]。しかし、この方法は、N末端セリンまたはトレオニン残基を含むポリペプチドに限定される。

40

【0077】

一方法では、選択的N末端ペグ化は、特定のペプチドまたはリンカー部分における誘導体化に利用可能な、異なる種類の第一級アミノ基（リジン対N末端）の反応性の差異を利用する還元的アルキル化によって達成できる。カルボニル基を含有するPEGは、適当な反応条件下で、ペプチドまたはリンカーのN末端に選択的に結合される。例えば、ペプチ

50

ドまたはリンカーのリジン残基の アミノ基と、N末端残基の アミノ基の間の pK_a の差異を利用する pH で反応を実施することによって、選択的にタンパク質を N 末端 PEG 化できる。このような選択的結合によって、ペグ化は、主に、タンパク質の N 末端で起こり、その他の反応性基（例えば、リジン側鎖アミノ基）の著しい修飾はない。還元的アルキル化を用いることで、PEG は、タンパク質とカップリングするための単一の反応性アルデヒドを有するはずである（例えば、PEG プロプリオンアルデヒド（propionaldehyde）を使用してよい）。

【0078】

部位特異的突然変異誘発は、部位特異的ポリマー結合のためのペプチドを調製するために使用できるさらなるアプローチである。この方法によって、ペプチドのアミノ酸配列は、ペプチド内の所望の位置に適当な反応性基を組み込むように設計される。例えば、WO 90/12874 には、システイン残基の挿入またはその他の残基のシステイン残基との置換によって修飾されたタンパク質の部位特異的ペグ化が記載されている。この刊行物にはまた、システイン特異的 mPEG 誘導体を、EPO 上の組換えによって導入されたシステイン残基と反応させることによる mPEG - エリスロポエチン（「mPEG - EPO」）の調製も記載されている。

【0079】

PEG 部分が、スペーサー部分またはリンカー部分と結合している場合には、同様の結合法を使用できる。この場合には、リンカーまたはスペーサーは、反応性基を含み、適当な相補的な反応性基を含有する活性化された PEG 分子を用いて共有結合を達成する。好ましい実施形態では、リンカーまたはスペーサー反応性基は、末端反応性基である（すなわち、リンカーまたはスペーサーの末端に位置する）。

【0080】

ペプチド、ペプチド二量体およびその他の本発明のペプチドベースの分子は、水溶性ポリマー（複数の水溶性ポリマー）と分子（例えば、ペプチド + リンカー / スペーサー）の受容体結合部分を連結するための種々の化学物質のいずれかを用いて水溶性ポリマー（例えば、PEG）と結合させてもよい。典型的な実施形態では、水溶性ポリマー（複数の水溶性ポリマー）と受容体結合部分の共有結合について単一の結合接点を使用するが、代替実施形態では、異なる種類の水溶性ポリマーが、別個の結合接点で受容体結合部分に結合されるさらなる変形をはじめ、複数の結合接点を用いる場合もあり、リンカーおよび / またはペプチド鎖の一方もしくは両方との共有結合接点（複数の共有結合接点）を含み得る。いくつかの実施形態では、二量体またはより高次の多量体は、別個の種類のペプチド鎖を含む（すなわち、ヘテロ二量体またはその他のヘテロ多量体）。例として、制限するものではないが、二量体が、PEG 結合接点を有する第 1 のペプチド鎖を含む場合もあり、第 2 のペプチド鎖が、PEG 結合接点を欠くか、第 1 のペプチド鎖とは異なる連結化学物質を利用する場合もあり、いくつかの変法では、リンカーが、PEG 結合接点を含む、または欠く場合もあり、前記リンカーが、PEG 化されている場合には、第 1 および / または第 2 のペプチド鎖のものとは異なる連結化学物質を利用する場合もある。代替実施形態は、受容体結合部分のリンカー部分に結合された PEG と、分子のペプチド部分のアミノ酸の 1 つの側鎖にコンジュゲートされた異なる水溶性ポリマー（例えば、炭水化物）を使用する。

【0081】

様々なポリエチレングリコール（PEG）種を、受容体結合部分（ペプチド + リンカー / スペーサー）のペグ化に使用してよい。実質的に、任意の適した反応性 PEG 試薬を使用できる。好ましい実施形態では、反応性 PEG 試薬は、受容体結合部分とのコンジュゲーションでカルバメートまたはアミド結合の形成をもたらす。適した反応性 PEG 種として、それだけには限らないが、NOF Corporation（150 - 6019 東京都渋谷区恵比寿 4 丁目 20 - 3 恵比寿ガーデンプレースタワー）の Drug Delivery Systems カタログ（2003 年）および Nektar Therapeutics（490 Discovery Drive, Huntsville, Alab

10

20

30

40

50

ama 35806)のMolecular Engineeringカタログ(2003)において販売中であるものが挙げられる。例えば、限定するものではないが、種々の実施形態において以下のPEG試薬が好ましいことが多い:mPEG2-NHS、mPEG2-ALD、multi-Arm PEG、mPEG(MAL)2、mPEG2(MAL)、mPEG-NH2、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-NPC、mPEG-チオエステル、mPEG-Double Esters、mPEG-BTC、mPEG-Butyrald、mPEG-ACET、ヘテロ官能性PEG(NH2-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEGアクリレート(ACRL-PEG-NHS)、PEG-リン脂質(例えば、mPEG-DSPE)、SUNBRITEシリーズのマルチアームPEG、例えば、当業者によって選択された化学物質によって活性化されたグリセリンベースのPEGのGLシリーズ、任意のSUNBRITE活性化PEG(例えば、それだけには限らないが、カルボキシル-PEG、p-NP-PEG、トレシル-PEG、アルデヒドPEG、アセタール-PEG、アミノ-PEG、チオール-PEG、マレイミド-PEG、ヒドロキシル-PEG-アミン、アミノ-PEG-COOH、ヒドロキシル-PEG-アルデヒド、無水カルボン酸型PEG、官能基を付与されたPEG-リン脂質およびそれらの特定の適用および使用のために当業者によって選択されるその他の同様の、および/または適した反応性PEG。

10

【0082】

ペプチド部分

20

ヒトをはじめとする種々の動物、微生物または植物由来の任意のペプチドならびに遺伝子操作によって、および合成によって作製したものを、ペプチド部分として使用してよい。例として、EPO-Rと結合するペプチド;TPO-Rと結合するペプチド、種々のインターフェロン(例えば、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-)、インターロイキン-2およびインターロイキン-3などのサイトカイン、インスリン、成長ホルモン放出因子(GRF)、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、バソプレシン、コルチコトロピン放出因子(CRF)、血管作用性小腸ペプチド(VIP)、セクレチン、メラノサイト刺激ホルモン(-MSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、コレシストキニン(CCK)、グルカゴン、副甲状腺ホルモン(PTH)、ソマトスタチン、エンドセリン、サブスタンスP、ダイノルフィン、オキシトシンおよび成長ホルモン放出ペプチド[GHRP、例えば、Endocrinology、114、1537(1984年)]などのホルモン、成長ホルモン(GH)、インスリン様成長因子(IGF-I、IGF-II)、-神経成長因子(-NGF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、トランスフォーミング増殖因子、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、血小板由来増殖因子(PDGF)および上皮成長因子(EGF)などの増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、エラスターゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)ピリルビンオキシダーゼ、カタラーゼ、ウリカーゼおよびアスパラギナーゼなどの酵素、ユビキチン、インスリン分泌活性化タンパク質(IAP)、血清胸腺因子(STF)、ペプチド-Tおよびトリプシン阻害剤などのその他のタンパク質ならびにそれらの誘導体が挙げられる。

30

40

【0083】

ペプチド部分は、1種または複数のペプチドを含み、各ペプチドの長さは、50個未満のアミノ酸であることが好ましく、約10~25個の間のアミノ酸がより好ましく、約12~18個の間のアミノ酸が最も好ましい。

【0084】

好ましい一実施形態では、ペプチド部分は、(例えば、Wrightonらの米国特許第5,773,569号;同第5,830,851号;および同第5,986,047号;WrightonらのPCT公開番号WO96/40749;JohnsonおよびZ

50

i v i nの米国特許第5,767,078号およびPCT公開番号96/40772; B a l uのPCT公開番号WO01/38342; およびS m i t h - S w i n t o s k yらのWO01/91780に開示されるもの)に開示されるものなどのEPO-Rと結合するペプチドから選択される。本発明においてペプチド部分として使用できるさらにその他の例示的EPO-R結合性ペプチドは、PCT/US2004/014886(公開番号WO2004/101611)およびPCT/US2004/014889(公開番号WO2004/101606)に記載されており、そのすべてはその全文で参照により組み込まれる。

【0085】

別の好ましい実施形態では、ペプチド部分は、トロンボポエチン受容体(「TPO-R」と結合するペプチドから選択される。このようなTPO-R結合性ペプチドの限定されない例として、米国特許第6,858,630号、同第6,552,008号、同第6,506,362号、同第6,498,155号、同第6,465,430号、同第6,333,031号、同第6,251,864号、同第6,121,238号、同第6,083,913号、同第5,932,546号、同第5,869,451号、同第5,683,983号、同第5,677,280号、同第5,668,110号および同第5,654,276号; ならびに米国特許出願公開第2003/0009018号、同第2002/0177166号および同第2002/0160013号に開示されるものが挙げられる。

10

【0086】

一実施形態では、ペプチド部分は、エリスロポエチン受容体(EPO-R)と結合し、これを活性化するか、またはそうでなければ、EPOアゴニストとして作用する、10~40個またはより多くのアミノ酸残基の長さであり、配列 $X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8$ (配列番号: 1)(式中、各アミノ酸は、標準一文字略語によって示され; X_3 は、Cであり; X_4 は、R、H、LまたはWであり; X_5 は、M、F、YまたはIであり; X_6 は、20種の遺伝的にコードされるL-アミノ酸のいずれか1種から独立に選択され; X_7 は、D、E、I、LまたはVであり; X_8 は、Cである)を有する単量体ペプチドである。

20

【0087】

別の実施形態では、ペプチド部分は、17~約40個のアミノ酸の長さであり、コアアミノ酸配列LYACHMGPI $TX_1VCQPLR$ (配列番号: 2)(式中、各アミノ酸は、標準一文字略語によって示され; X_1 は、トリプトファン(W)、1-ナフチルアラニン(1-Nal)または2-ナフチルアラニン(2-Nal)である)を含む、単量体ペプチドである。

30

【0088】

さらに別の実施形態では、ペプチド部分は、Ac-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Nal(1)-Leu-Ala-Ala-Arg-Sar(配列番号: 3)またはAc-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Sar(配列番号: 4)などの配列を有する、1種または複数のTPO-R結合性ペプチドを含む。

【0089】

好ましい一実施形態では、ペプチドは、以下から選択される:

40

【0090】

【表 1】

配列番号	配列
5	Ac-GGLYACHMGPIT(Nal)VCQPLR(MeG)K
6	Ac-GGLYACHMGPIT(Nal)VCQPLRK
7	Ac-GLYACHMGPIT(Nal)VCQPLR(MeG)K
8	Ac-LYACHMGPIT(Nal)VCQPLR(MeG)K
9	Ac-GLYACHMGPIT(Nal)VCQPLRK
10	Ac-LYACHMGPIT(Nal)VCQPLRK
11	Ac-GGLYLCRYGPVT(Nal)ECQPRR(MeG)K
12	Ac-GGLYLCRYGPVT(Nal)ECQPRRK
13	Ac-GLYLCRYGPVT(Nal)ECQPRR(MeG)K
14	Ac-LYLCRYGPVT(Nal)ECQPRR(MeG)K
15	Ac-GLYLCRYGPVT(Nal)ECQPRRK
16	Ac-LYLCRYGPVT(Nal)ECQPRRK
17	Ac-GGTYSCHFGPLT(Nal)VCRPQGGK
18	Ac-GGTYSCHFGPLT(Nal)VCRPQGK
19	Ac-GGTYSCHFGPLT(Nal)VCRPQK
20	Ac-GTYSCHFGPLT(Nal)VCRPQGGK
21	Ac-TYSCHFGPLY(Nal)VCRPQGGK
22	Ac-GTYSCHFGPLT(Nal)VCRPQGK

10

20

【0091】

別の実施形態では、ペプチドは、本発明のリンカーと共有結合し、ペプチドは、そのC末端にリジンを有し、リジンのアミノ基がそのアミノ基を介してリンカーに共有結合している。

【0092】

一実施形態では、PEG部分は、リンカー部分と直接結合される。

【0093】

別の実施形態では、ペプチドPEG部分は、リンカーを介してスペーサー部分に結合される。

【0094】

この発明のいくつかの実施形態によれば、20種の遺伝的にコードされるL-アミノ酸または立体異性D-アミノ酸のいずれかから独立に選択される、2個以上、好ましくは、2～6個の間のアミノ酸残基が、上記のコア配列のいずれかの末端または両端とカップリングされる。例えば、ペプチドの合成において容易なようにコア配列のいずれかの末端または両端に配列GGが付加されることが多い。本発明はまた、EPO-R結合の特性を保持する、これらのペプチドおよび誘導体およびペプチドのペプチドミメティクスのコンジュゲートを提供する。

30

【0095】

20種の従来アミノ酸の立体異性体（例えば、D-アミノ酸）、 α , α -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸などの非天然アミノ酸、乳酸およびその他の非従来アミノ酸も、本発明の化合物にとって適した成分であり得る。非従来アミノ酸の例として、それだけには限らないが、 β -アラニン、3-ピリジルアラニン、4-ヒドロキシプロリン、 β -ホスホセリン、N-メチルグリシン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、ノル-ロイシン、1-または2-ナフチルアラニン(naphthylalaline)、サルコシンおよびその他の同様のアミノ酸およびイミノ酸が挙げられる。

40

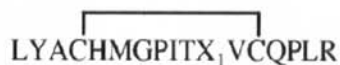
【0096】

好ましい実施形態では、本発明のペプチド部分は、コア配列の2個のシステイン残基の間に分子内ジスルフィド結合を含む。例えば：

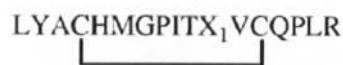
【0097】

50

【化 9】



又は



(配列番号：2)

【0098】

二量体およびオリゴマーペプチド

好ましい実施形態、本発明の単量体ペプチド部分は、二量体化またはオリゴマー化されて、二量体またはオリゴマーを形成する。さらに、このような二量体およびその他のマルチマーはヘテロ二量体またはヘテロマルチマーであってもよい。

10

【0099】

一実施形態では、本発明のペプチド単量体は、ビオチン/ストレプトアビジン系を用いてオリゴマー化できる。ペプチド単量体のビオチン化類似体は、標準技術によって合成できる。例えば、ペプチド単量体は、C末端でビオチン化できる。次いで、ストレプトアビジンと共にインキュベーションすることによって、これらのビオチン化単量体をオリゴマー化する[例えば、4：1モル比、室温で、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)またはHEPES緩衝RPMI培地(Invitrogen)中、1時間]。この実施形態の変法では、いくつかの市販の抗ビオチン抗体の任意の1種[例えば、Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)製のヤギ抗ビオチンIgG]ととのインキュベーションによって、ビオチン化ペプチド単量体をオリゴマー化できる。

20

【0100】

概して、必ずしもそうではないが、分子間ジスルフィド結合の形成以外の技術によって二量体化されたペプチド二量体はまた、ペプチド単量体のシステイン残基間に1つまたは複数のジスルフィド結合を含む。例えば、2つの単量体を、1つまたは複数の分子間ジスルフィド結合によって架橋していてもよい。好ましくは、2つの単量体は、少なくとも1つの分子内ジスルフィド結合を含む。ペプチド二量体の両単量体が、各単量体が環状基を含むよう分子内ジスルフィド結合を含むことが最も好ましい。

【0101】

ペプチド修飾

本発明のペプチド化合物のアミノおよび/またはカルボキシ末端を修飾して、本発明のその他の化合物を作製することもできる。アミノ末端修飾として、メチル化(すなわち、 $-\text{NHCH}_3$ または $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$)、アセチル化(例えば、酢酸または $-\text{クロロ酢酸}$ 、 $-\text{プロモ酢酸}$ または $-\text{ヨード酢酸}$ などのそのハロゲン化誘導体)、ベンジルオキシカルボニル(Cbz)基を付加することまたは $\text{RCOO}-$ によって規定されるカルボキシルレート官能基または $\text{R}-\text{SO}_2-$ (式中、Rは、アルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリールなど、および同様の基からなる群から選択される)によって規定されるスルホニル官能基を含有する任意のブロック基でのアミノ末端のブロックが挙げられる。また、N末端にデスアミノ酸を組み込み(その結果、N末端アミノ基がない)、プロテアーゼに対する感受性を低減し、またはペプチド化合物のコンホメーションを制限することができる。好ましい実施形態では、N末端がアセチル化される。最も好ましい実施形態では、N末端グリシンがアセチル化されて、N-アセチルグリシン(ACG)が生じる。

30

40

【0102】

カルボキシ末端修飾として、遊離酸をカルボキサミド基で置換することまたはカルボキシ末端で環状ラクタムを形成して構造制限を導入することが挙げられる。また、本発明のペプチドを、末端アミノまたはカルボキシル基がなくなるように、環化するか、またはペプチドの末端にデスアミノもしくはデスカルボキシ残基を組み込み、プロテアーゼに対する感受性を低減するか、またはペプチドのコンホメーションを制限することができる。本発明の化合物のC末端官能基として、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ(低級アル

50

キル)、低級アルコキシ、ヒドロキシおよびカルボキシならびにそれらの低級エステル誘導体およびそれらの製薬上許容される塩が挙げられる。

【0103】

20種の遺伝的にコードされるアミノ酸(または立体異性Dアミノ酸)の天然に存在する側鎖を、例えば、アルキル、低級アルキル、環状4員、5員、6員~7員のアルキル、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ(低級アルキル)、低級アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシならびにそれらの低級エステル誘導体などの基で、ならびに4員、5員、6員~7員の複素環式で置換してもよい。特に、プロリン残基の環の大きさが、5員から4員、6員または7員に変化しているプロリン類似体を用いることができる。環状基は、飽和であっても、不飽和であってもよく、不飽和である場合には、芳香族であっても、非芳香族であってもよい。複素環式基は、1個または複数の窒素、酸素および/または硫黄ヘテロ原子を含むことが好ましい。このような基の例として、フラザニル、フリル、イミダゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、モルホリニル(例えば、モルホリノ)、オキサゾリル、ピペラジニル(例えば、1-ピペラジニル)、ピペリジル(例えば、1-ピペリジル、ピペリジノ)、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル(例えば、1-ピロリジニル)、ピロリニル、ピロリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、チオモルホリニル(例えば、チオモルホリノ)およびトリアゾリルが挙げられる。これらの複素環式基は、置換されていても、非置換であってもよい。基が置換されている場合には、置換基は、アルキル、アルコキシ、ハロゲン、酸素または置換もしくは非置換フェニルであり得る。

10

20

【0104】

また、リン酸化およびその他の方法[例えば、Hrubyら(1990年)Biochem J. 268:249~262頁に記載されている]によってペプチド部分を容易に修飾できる。

【0105】

本発明のペプチド部分はまた、同様の生物活性を有する非ペプチド化合物の構造モデルとして役立ち得る。当業者は、リードペプチド化合物として、同一または同様の所望の生物活性を有するが、可溶性、安定性ならびに加水分解およびタンパク質分解に対する感受性に関してリードよりも好都合な活性を有する化合物を構築するために種々の技術が利用可能であるということは認識している[MorganおよびGainor(1989年)Ann. Rep. Med. Chem. 24:243~252頁を参照のこと]。これらの技術として、ペプチド主鎖を、ホスホネート、アミデート、カルバメート、スルホンアミド、第二級アミンおよびN-メチルアミノ酸から構成される主鎖で置換することが挙げられる。

30

【0106】

薬剤組成物

本発明の別の態様では、上記のPEG修飾ペプチドベースの化合物の薬剤組成物が提供される。このような組成物の投与によって軽減されるか、または調節される状態として、上記で示されるものが挙げられる。このような薬剤組成物は、経口、非経口(筋肉内の、腹腔内、静脈内(IV)または皮下注射)、経皮(受動的に、またはイオン導入法もしくはエレクトロポレーションを用いてのいずれかで)、経粘膜(鼻腔の、経膣、直腸または舌下)経路の投与による投与または生体内分解性挿入物を用いる投与のためのものであり得、各経路の投与に適当な剤形で製剤できる。概して、有効量の治療用ペプチド(例えば、EPO-Rと結合するペプチド)を、製薬上許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび/または担体とともに含む薬剤組成物が、本発明によって包含される。このような組成物として、種々のバッファー内容物(例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、pHおよびイオン強度の希釈剤;界面活性剤および可溶化剤などの添加剤(例えば、Tween 80、ポリソルベート80)、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、保存料(例えば、チメルソール(Thimersol)、

40

50

ベンジルアルコール)および増量物質(例えば、ラクトース、マンニトール);材料を、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等といったポリマー化合物の微粒子調製物中に、またはリポソームに組み込んだものが挙げられる。ヒラウロン酸(Hyaluronic acid)もまた使用してよい。このような組成物は、本タンパク質および誘導体の物理的状态、安定性、in vivo放出速度およびin vivoクリアランス速度に影響を及ぼし得る。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版(1990年、Mack Publishing Co.、Easton、PA 18042)1435~1712頁を参照のこと。本組成物は、液体の形で調製してもよいし、乾燥粉末(例えば、凍結乾燥した)形であってもよい。

10

【0107】

経口デリバリー(Delivery、送達)

本明細書において使用するために考慮されるものとして、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences、第18版、1990年(Mack Publishing Co. Easton PA 18042)中、第89章に大まかに記載される経口固体剤形がある。固体剤形は、錠剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤またはロゼンジ剤、カシェ剤、ペレット剤、散剤または顆粒剤を含む。また、リポソームまたはプロテノイド封入を用いて本組成物を製剤してもよい(例えば、米国特許第4,925,673号において報告されるプロテノイドミクロスフェアのように)。リポソーム封入を用いてもよく、リポソームを種々のポリマーで誘導体化してもよい(例えば、米国特許第5,013,556号)。治療薬にとって、あり得る固体剤形の記載は、参照によって本明細書に組み込まれる、Modern Pharmaceutics G. S. BankerおよびC. T. Rhodes編、第10章、1979年中、Marshall, K.によって行われている。通常、製剤は、EPO-Rアゴニストペプチド(またはその化学修飾された形)および胃環境に対する保護を可能にする不活性成分を含み、生物学的に活性な材料を腸内で放出する。

20

【0108】

本明細書において使用するために考慮されるものとして、経口投与のための液体剤形、例えば、製薬上許容される乳濁液、溶液、懸濁液およびシロップがあり、これらは不活性希釈剤;湿潤剤などのアジュバント、乳化剤および懸濁剤ならびに甘味料、矯味剤および芳香剤をはじめとするその他の成分を含み得る。

30

【0109】

ペプチドは、誘導体の経口デリバリーが効果的であるように化学修飾され得る。概して、考慮される化学修飾として、成分分子自体との少なくとも1つの部分の結合があり、ここで、前記部分によって、(a)タンパク質分解の阻害;(b)胃または腸から血流への取り込みが可能になる。また、成分または複数の成分の全体的な安定性の増大および身体における循環時間の増大も望まれる。上記で論じたように、ペグ化は、薬剤使用にとって好ましい化学修飾である。使用できるその他の部分として、以下が挙げられる:プロピレングリコール、エチレングリコールおよびプロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、脂肪酸(例えば、ミリスチン酸)、ペプチド[Den-40
nis, M. S. ら、J. Biol. Chem. 2002年、277、35035頁参照のこと]、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロリン、ポリ-1,3-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソカン[例えば、Enzymes as
Drugs. HocenbergおよびRoberts編(Wiley-Interscience: New York, NY)367~383頁中、Abuchowskiお
よびDavis(1981年)「Soluble Polymer-Enzyme Ad-
ducts」;およびNewmarkら(1982年)J. Appl. Biochem.
4:185~189頁参照のこと]。

【0110】

経口製剤については、放出の位置は、胃、小腸(十二指腸、空腸もしくは回腸)または

50

大腸であり得る。当業者は、胃で溶解しないが、十二指腸または腸中のどこかで材料を放出する利用可能な製剤を有する。放出は、ペプチド（または誘導体）の保護によって、または、腸中などの胃環境を過ぎてのペプチド（または誘導体）の放出のいずれかによって、胃環境の有害な効果を避けることが好ましい。

【0111】

完全な胃での耐性を確実にするためには、少なくとも pH 5.0 に対して不浸透性のコーティングが不可欠である。腸溶コーティングとして使用される、より一般的な不活性成分例として、トリメリット酸酢酸セルロース (CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、酢酸フタル酸セルロース (CAP)、Eudragit L、Eudragit S およびセラックがある。これらのコーティングは、混合フィルムとして用いてもよい。

10

【0112】

胃に対する保護のために意図されるものではない、コーティングまたはコーティングの混合物もまた、錠剤上に用いてもよい。これとして、糖コーティングまたは錠剤を飲み込みやすくするコーティングが挙げられる。カプセル剤は、乾燥治療薬（すなわち、粉末）のデリバリーのためには、ハードシェル（ゼラチンなど）からなる場合もあり、液体形のためには、ソフトゼラチンシェルを用いてもよい。カシエ剤 (cachets) のシェル材料は厚いデンプンまたはその他の食用紙であり得る。丸剤、ロゼンジ剤、成形錠剤または錠剤トリチュレートのために、湿潤集結技術を用いることができる。

20

【0113】

ペプチド（または誘導体）は、粒径約 1 mm の顆粒またはペレットの形で微細な多粒子物として製剤中に含まれ得る。カプセル剤投与のための材料の製剤は、粉末、軽く圧縮されたプラグとして、またはさらに錠剤としてであってもよい。これらの治療薬は圧縮によって調製できる。

【0114】

着色剤および/または矯味剤も含めることができる。例えば、ペプチド（または誘導体）を、製剤し（リポソームまたはマイクロスフェア封入などによって）、次いで、着色剤および矯味剤を含有する冷蔵飲料などの食用製品内にさらに含めてもよい。

【0115】

ペプチド（または誘導体）の容積を、不活性材料で希釈または増量してもよい。これらの希釈剤として、炭水化物、特に、マンニトール、-ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾デキストランおよびデンプンを挙げることができる。三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムをはじめとする特定の無機塩も、増量剤として使用できる。いくつかの市販の希釈剤として、Fast-Flow、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress および Avicell がある。

30

【0116】

崩壊剤 (disintegrants) を、固体剤形への治療薬の製剤において含めることができる。崩壊剤として使用される材料として、それだけには限らないが、デンプン、例えば、デンプンをベースとする市販の崩壊剤、Explotab が挙げられる。グリコール酸ナトリウムデンプン、Amberlite、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン (ultramyllopectin)、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸性カルボキシメチルセルロース、天然のスポンジおよびベントナイトもすべて使用してよい。崩壊剤はまた、不溶性陽イオン交換樹脂であってもよい。粉末ゴムを、崩壊剤として、また結合剤として用いてもよく、寒天、Kara ya またはトラガカントなどの粉末ゴムを挙げることができる。アルギン酸およびそのナトリウム塩も、崩壊剤として有用である。

40

【0117】

結合剤 (binders) を用いて、ペプチド（または誘導体）物質をまとめ、硬い錠剤を形成することができ、これとして、天然物由来の材料、例えば、アラビアガム、トラガカン

50

ト、デンプンおよびゼラチンが挙げられる。その他のものとして、メチルセルロース（M C）、エチルセルロース（E C）およびカルボキシメチルセルロース（C M C）が挙げられる。ポリビニルピロリドン（P V P）およびヒドロキシプロピルメチルセルロース（H P M C）は両方とも、アルコール性溶液中で使用して、ペプチド（または誘導体）を造粒することができる。

【0118】

抗摩擦剤（antifrictional agent）を、ペプチド（または誘導体）の製剤に含め、製剤過程の間に固着するのを防ぐことができる。滑沢剤（lubricants）を、ペプチド（または誘導体）と金型壁（die wall）の間の層として用いることができ、これらとして、それだけには限らないが、ステアリン酸、例えば、そのマグネシウムおよびカルシウム塩、ポリ

10

【0119】

製剤の間に薬剤の流動特性を改善し得る流動促進剤（Glidant）を、圧縮の間の転位を補助するために加えてもよい。流動促進剤として、デンプン、タルク、発熱性シリカおよび水和されたケイアルミン酸を挙げることができる。

【0120】

ペプチド（または誘導体）の、水性環境中への溶解を補助するために、界面活性剤（surfactant）を、湿潤剤（wetting agent）として加えてもよい。界面活性剤として、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウムなどのアニオン性界面活性剤を挙げることができる。カチオン性界面活性剤を使用してもよく、これとして、塩化ベンザルコニウムまたはベンゾエトミウムクロリド（benzethonium chloride）を挙げることができる。界面活性剤として製剤中に含めることができる可能性ある非イオン性界面活性剤の一覧として、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースがある。これらの界面活性剤は、タンパク質または誘導体の製剤中に、単独または種々の比で混合物としてのいずれかで存在し得る。

20

30

【0121】

ペプチド（または誘導体）の取り込みを増強する可能性がある添加剤として、例えば、脂肪酸オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸がある。

【0122】

制御放出経口製剤が望ましいものであり得る。ペプチド（または誘導体）を、拡散または浸出機構のいずれかによる放出を可能にする不活性マトリックス、例えば、ゴム中に組み込むことができる。遅変性マトリックスを、製剤中に組み込んでもよい。いくつかの腸溶コーティングもまた、遅延放出効果を有する。別の形の制御放出として、O r o s 治療システム（A l z a C o r p .）に基づく方法によるものがあり、すなわち、薬物が、単一の小さな開口部を通して、水が入り、薬物を浸透作用によって押し出すことを可能にする半透膜に包まれている。

40

【0123】

その他のコーティングを、製剤に用いてもよい。これらとして、コーティングパン（coating pan）中に適用できる種々の糖類が挙げられる。ペプチド（または誘導体）はまた、フィルムで被覆された錠剤で提供することもでき、この場合に用いられる材料は、2群に分けられる。第1のものは、非腸溶材料であり、これとして、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシ-エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、ナトリウムカルボキシ-メチルセルロース、プロピドン（providone）およびポリエチレングリコールが

50

挙げられる。第2の群は、腸溶材料からなり、これは、一般に、フタル酸のエステルである。

【0124】

材料の混合物を用いて、最適フィルムコーティングを提供してもよい。フィルムコーティングは、パンコーティング機 (pan coater) 中または流動床 (fluidized bed) 中または圧縮コーティングによって実施できる。

【0125】

非経口デリバリー

非経口投与のための本発明に従う調製物は、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液または乳濁液を含む。非水性溶媒またはビヒクルの例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルおよびコーンオイルなどの植物油、ゼラチンおよびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルがある。このような剤形はまた、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含み得る。それらは、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、組成物中に滅菌剤を組み込むことによって、組成物を照射することによって、または組成物を加熱することによって滅菌してもよい。それらはまた、滅菌水またはいくつかのその他の滅菌注射用媒体を用いて、使用の直前に製造してもよい。

10

【0126】

直腸または膣デリバリー

直腸投与または膣投与のための組成物は、坐剤であることが好ましく、これは活性物質に加え、ココアバターまたは坐剤ワックスなどの賦形剤を含み得る。鼻腔のまたは舌下投与のための組成物はまた、当技術分野でよく知られる標準賦形剤を用いて調製される。

20

【0127】

肺デリバリー

本明細書において、EPO-Rアゴニストペプチド（またはその誘導体）の肺デリバリーも考慮される。ペプチド（または誘導体）は、吸入の間に哺乳類の肺にデリバリーされ、肺上皮層を越えて血流に入る [例えば、Adjeiら (1990年) *Pharmaceutical Research* 7: 565 ~ 569 頁; Adjeiら (1990年) *Int. J. Pharmaceutics* 63: 135 ~ 144 頁 (酢酸ロイプロリド); Braquetら (1989年) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13 (付録5): 143 ~ 146 頁 (エンドセリン-1); Hubbardら (1989年) *Annals of Internal Medicine*、第III巻 206 ~ 212 頁 (1 - アンチトリプシン); Smithら (1989年) *J. Clin. Invest.* 84: 1145 ~ 1146 頁 (-1 - プロテイナーゼ); Osweinら (1990年) 「*Aerosolization of Proteins*」、*Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado* (組換えヒト成長ホルモン); Debsら (1988年) *J. Immunol.* 140: 3482 ~ 3488 頁 (インターフェロン - および腫瘍壊死因子); およびPlatzらの米国特許第5, 284, 656号 (顆粒球コロニー刺激因子) 参照のこと。全身作用のための薬物の肺デリバリーのための方法および組成物は、Wongらの米国特許第5, 451, 569号に記載されている。

30

40

【0128】

本発明の実施において使用するために考慮されるものとして、治療用製品の肺デリバリーのために設計された様々な機械装置、例えば、それだけには限らないが、噴霧器 (nebulizers)、定量吸入器 (metered dose inhalers) および粉末吸入器 (powder inhalers) があり、そのすべてが当業者にはよく知られている。本発明の実施に適している市販の装置のいくつかの具体的な例として、Ultravent噴霧器 (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II噴霧器 (Marquest Medical Products, Englewood, CO); Ventolin

50

定量吸入器 (Glaxo Inc.、Research Triangle Park、NC) ; および Spinhaler 粉末吸入器 (Fisons Corp.、Bedford、MA) がある。

【0129】

すべてのこのような装置には、ペプチド (または誘導体) の分散に適した製剤の使用が必要である。通常、各製剤は、用いられる装置の種類に特異的であり、治療において有用な、通常の希釈剤、アジュバントおよび / または担体に加え、適当な噴射剤材料の使用を含み得る。また、リポソーム、マイクロカプセル剤またはミクロスフェア、封入複合体またはその他の種類の担体の使用も考慮される。化学修飾されたペプチドもまた、化学修飾の種類または使用される装置の種類に応じて種々の製剤で調製できる。

10

【0130】

ジェットまたは超音波いずれかの噴霧器 (nebulizer) を用いて使用するのに適した製剤は、通常、溶液 1 mL あたり約 0.1 ~ 25 mg の生物活性タンパク質の濃度で水に溶解されたペプチド (または誘導体) を含む。製剤はまた、バッファーおよび単糖を含み得る (例えば、タンパク質安定化および浸透圧の調節のために)。噴霧器製剤はまた、エアゾールを形成する際の溶液の噴霧によって引き起こされるペプチド (または誘導体) の表面誘起凝集 (surface induced aggregation) を低減または防止するために界面活性剤を含み得る。

【0131】

定量吸入器装置を用いて使用するための製剤は、通常、界面活性剤を用いて噴射剤 (propellant) に懸濁した、ペプチド (または誘導体) を含有する微粉を含む。噴射剤は、この目的のために使用される任意の従来材料、例えば、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボンまたはトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタンまたはそれらの組合せを含めた炭化水素であり得る。適した界面活性剤として、トリオレイン酸ソルビタンおよびダイズレシチンが挙げられる。オレイン酸はまた、界面活性剤としても有用である。

20

【0132】

粉末吸入器装置から分散されるための製剤は、ペプチド (または誘導体) を含有する微粉化乾燥粉末を含み、これとして、増量剤、例えば、粉末の装置からの分散を促進する量、例えば、製剤の 50 ~ 90 重量 % のラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールを挙げることができる。ペプチド (または誘導体) は、遠位肺への最も効果的なデリバリーのためには、10 mm (またはミクロン) 未満、最も好ましくは、0.5 ~ 5 mm の平均粒径を有する微粒子の形で調製されることが最も有利であるはずである。

30

【0133】

鼻腔デリバリー

EPO-R アゴニストペプチド (または誘導体) の鼻腔デリバリーもまた考慮される。鼻腔デリバリーによって、鼻に治療製剤を投与した後に、ペプチドが血流へ直接通過することが可能となり、肺に製剤が沈着する必要がない。鼻腔デリバリーのための製剤として、デキストランまたはシクロデキストランを含むものが挙げられる。

40

【0134】

鼻腔デリバリーを促進するために用いられるその他の浸透促進剤も、本発明のペプチドとともに使用するために考慮される (参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、2003 年 12 月 17 日出願された、国際特許公報番号 WO 2004 056314 に記載されるものなど)。

【0135】

投与量

すべてのペプチド化合物について、さらなる研究が実施されるので、種々の患者における種々の状態の治療にとって適当な投与量レベルに関する情報が現れ、当業者は、治療状況、年齢およびレシピエントの全体的な健康を考慮し、適正な投与を確定することができ

50

るであろう。選択される投与量は、所望の治療効果、投与経路および所望の治療期間に応じて変わる。通常、1日に、0.001～10mg/体重1kgの間の投与量レベルが哺乳類に投与される。通常、静脈注射または注入には、投与量はより低いものであり得る。投与スケジュールは、循環半減期および用いられる製剤に応じて変わり得る。

【0136】

本発明のペプチド（またはその誘導体）は、1種または複数のさらなる有効成分または薬剤組成物とともに投与してよい。

【実施例】

【0137】

以下の実施例は、本発明を例示するが、制限するものではない。

10

【0138】

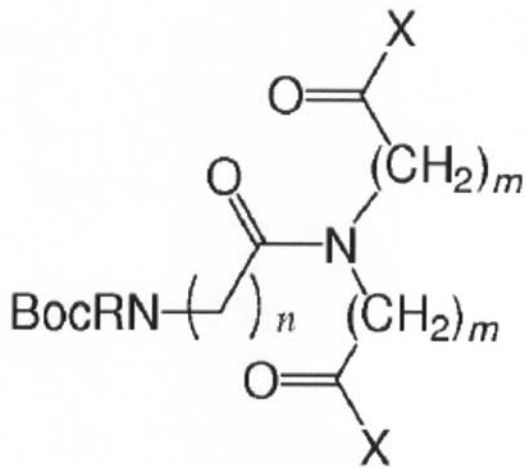
[実施例1]

三官能性リンカーの一般的合成

以下の構造を有する分枝三官能性分子：

【0139】

【化10】



20

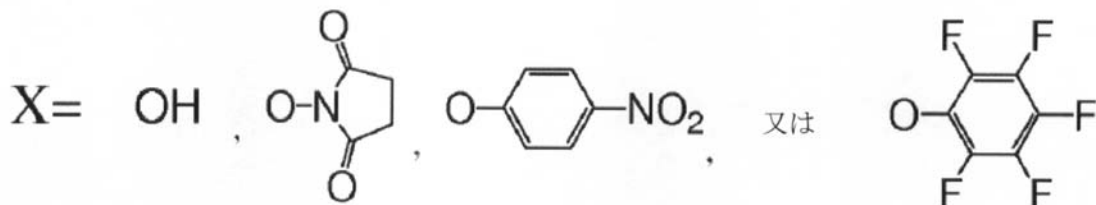
$m = 1 - 5$ 、 $n = 1 - 14$ 、 m 及び n は整数、 $R = H$ 又はアルキル

30

[式中、

【0140】

【化11】



40

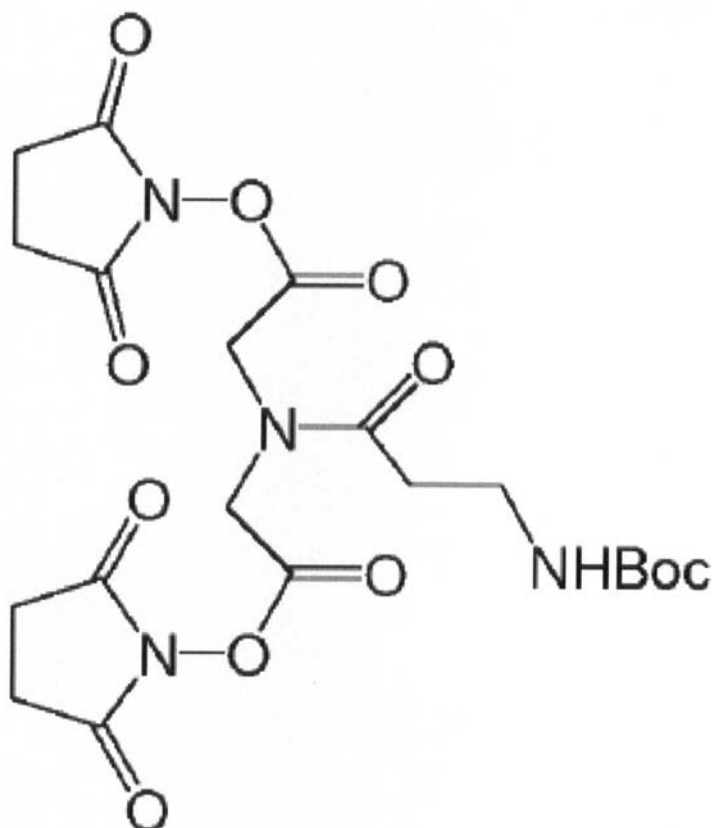
は、以下の反応スキームに従って合成した：

【0141】

$$\begin{array}{c}
 \text{HN} \left(\text{CH}_2 \right)_m \text{CO}_2\text{Et} \\
 \left(\text{CH}_2 \right)_m \text{CO}_2\text{Et}
 \end{array}
 \xrightarrow[\text{カップリング剤}]{\text{BocRN} \left(\text{CH}_2 \right)_n \text{CO}_2\text{H}}
 \begin{array}{c}
 \text{BocRN} \left(\text{CH}_2 \right)_n \text{CO}_2\text{H} \\
 \text{O}
 \end{array}
 \xrightarrow[2) \text{DCC, X-H}]{1) \text{NaOH}}
 \begin{array}{c}
 \text{BocRN} \left(\text{CH}_2 \right)_n \text{CO}_2\text{H} \\
 \text{O}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{C} - \text{X} \\
 \left(\text{CH}_2 \right)_m \text{CO}_2\text{Et} \\
 \text{O}
 \end{array}$$

$m = 1-5$, $n = 1-4$, m 及び n は整数、 $R = \text{H}$ 又はアルキル

ジシクロヘキシル - カルボジイミド (D C C) などのカルボジイミド試薬を用いて、B o c - - アラニン (B o c = t - ブトキシカルボニル) などの N 末端が保護されたアミノ酸を、ジエチルイミノジアセテートなどのイミノジエステルとカップリングする。抽出物を後処理し、単離した後、エステル基をけん化して所望の三官能性リンカーを作製する。アセトニトリル (A C N) 中、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) およびジシクロヘキシル - カルボジイミドで処理することによって、酸性基を N H S エステルとして活性化する。沈殿した尿素を濾過し、抽出物を後処理すると、N H S 活性化リンカーが得られる。ジクロロメタン / ヘキサンからトリチュレートする (trituration) と、リンカーが白色固体として得られ、これは、 - 2 0 で数カ月間安定であるとわかった。



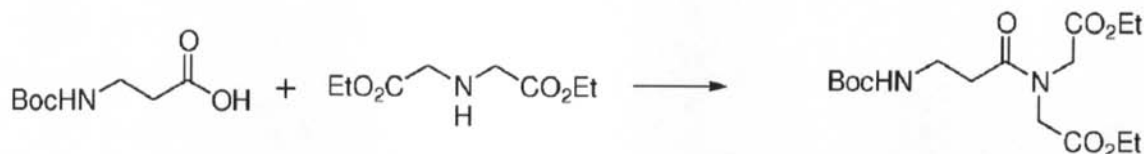
50

を以下に従って作製した：

(ステップ I)

【0146】

【化14】



0 で、200 mL の DCM 中、Boc - - Ala - OH (10.0 g、52.8 mmol) およびジエチルイミノジアセテート (10.0 g、52.8 mmol) の溶液に、DCC (10.5 g、50.9 mmol) を5分かけて加えた。白色の沈殿が2分以内に形成された。反応混合物を室温に加温させ、24時間攪拌した。尿素を、焼結フィルター (中程度の空隙率) を用いて濾去し、溶媒を減圧下で除去した。残渣を500 mL の EtOAc (EtOAc = 酢酸エチル) に溶かし、上記のように濾過し、分液漏斗に移した。有機相を洗浄し (飽和 NaHCO₃、ブライン、1N HCl、ブライン)、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、乾燥させると、無色のオイルが得られた。このオイルを固体化させると、10分以内に白色の結晶固体が得られた。

10

【0147】

(ステップ II)

20

【0148】

【化15】



粗ジエステルを、75 mL の THF (THF = テトラヒドロフラン) および 75 mL の MeOH (MeOH = メタノール) に溶かし、50 mL の水を加えた。この溶液に、25 mL の水中、KOH (KOH = 水酸化カリウム) (8.6 g、153 mmol) の溶液を加えた。反応混合物の色が淡黄色に変わった。12時間攪拌した後 (pH は依然として約 12 であった)、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、得られたスラリーを、Et₂O (Et₂O = ジエチルエーテル) および飽和 NaHCO₃ の間に分配した。合わせた水相を pH 1 に酸性化し、NaCl で飽和し、EtOAc で抽出した。EtOAc 相を洗浄し (ブライン)、乾燥させ (MgSO₄)、濃縮すると、13.97 g の生成物が白色固体として得られた (2段階について 90.2%)。

30

【0149】

注記：DCC 反応を ACN 中で実施した場合には、収率は 73% に低下した。ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) を用いる場合には、クロマトグラフィーなしでは目的生成物から尿素副生成物を除去することができなかった；DCC 尿素は、クロマトグラフィーなしで定量的に除去できた。反応はまた、水溶性カルボジイミドを用いても良好に進行した。

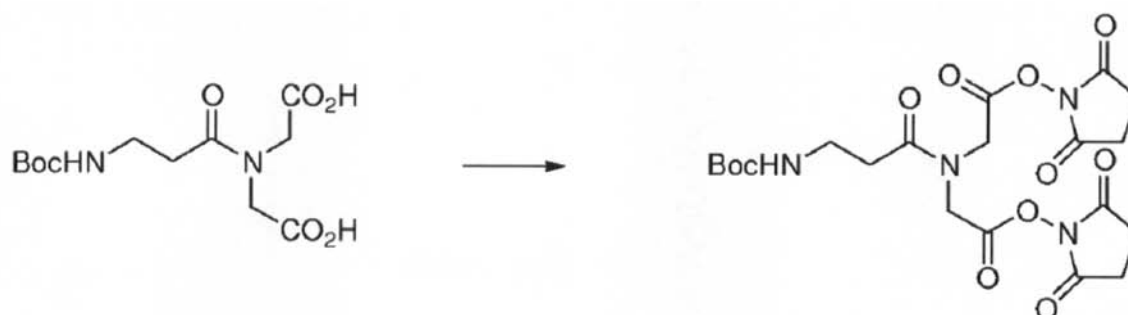
40

【0150】

(ステップ III)

【0151】

【化 16】



10

50 mL の A C N 中、二酸 (1 . 0 0 g 、 3 . 2 9 m m o l) およびヒドロキシスクシンイミド (0 . 9 4 5 g 、 8 . 2 1 m m o l) の溶液に、D C C (1 . 3 6 g 、 6 . 5 9 m m o l) を 5 分かけて加えた。白色沈殿が直ちに形成された。反応混合物を 2 2 時間攪拌し、D C C 尿素を濾過して除去した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を E t O A c (2 5 0 m L) に溶かし、分液漏斗に移した。有機相を洗浄し (飽和 N a H C O ₃、ブライン、1 N H C l、ブライン)、乾燥させ (M g S O ₄)、濃縮すると、白色固体が得られた。この固体を 7 5 m L の A C N に溶かし、濾過し、濃縮すると、1 . 2 8 g の生成物が白色固体として得られた (収率 7 8 . 2 %)。

【 0 1 5 2 】

注記：収率は、T H F 中で 3 1 % に、D N F 中で 6 8 % に (D C C の代わりに D I C を用いた)、D C M / D M F 中で 5 7 % に低下した。出発二酸は、A C N に可溶性であるので、D C C が加えられる前に溶解していなかった材料がある場合には、それを濾去し、廃棄してもよい。

20

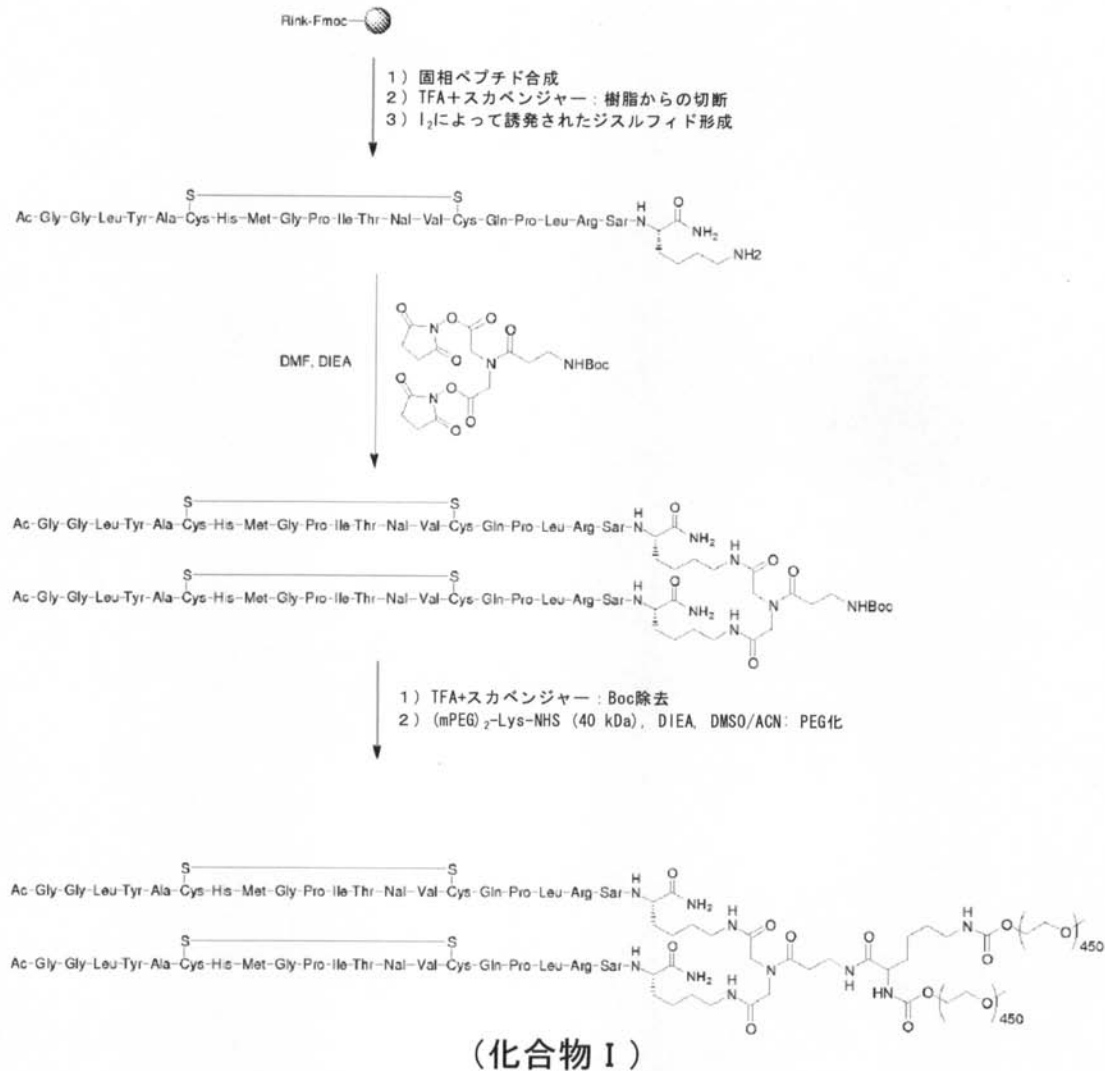
【 0 1 5 3 】

[実施例 3]

三官能性アミンリンカーを用いる C 末端二量体化とそれに続く P E G 化

【 0 1 5 4 】

【化 17】



10

20

30

40

50

ペプチド合成：

単量体ペプチド（配列番号：5を用いて）を、標準Fmoc-アミノ酸（TFA-不安定側鎖保護基）およびACT90ペプチドシンセサイザー（Advanced Chem Tech、Louisville、Kentucky製）でのジイソプロピルカルボジミド（diisopropylcarbodiimide）（DIC）/ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）カップリングを用いて、30gのTentaGel Rink Amide樹脂上で合成した。この樹脂を、85%トリフルオロ酢酸（TFA）、10%トリイソプロピルシラン（TIPS）、2.5%チオアニソール、2.5% H_2O の溶液で3回処理し、各回に、200mLの切断カクテルを用い（初回は2時間、次の2回については1時間攪拌した）、次いで、100mLのTFAですすいだ。ペプチドを含有する切断カクテルを減圧下で約50mLに濃縮し、5倍過剰の冷エーテルに加え、ペプチドを沈殿させた。沈殿をエーテルで2回洗浄し、凍結乾燥機で凍結乾燥させると、11.4gの粗単量体を得られた。この単量体を、300mLのトリフルオロエタノール（TFE）に溶解した。この溶液の50mLアリコート、600mLのMeOHおよび400mLのTFEの溶液に加えた。酢酸中、飽和 I_2 を、黄色が持続するまで攪拌しながら滴下した。MeOH/TFE溶液に、TFE中、50mLのペプチド溶液を加え、続いて、 I_2 /AcOHの添加をさらに5回反復して酸化を完了した。反応混合物を、RP-HPLCおよびLC/MS技術によって分析して反応をモニターした。完了した時点で、固体アスコルビン酸を、溶液が透明になるまで加えた。溶媒混合物を、減圧下で約50mLに濃縮し、5倍過剰の冷エーテルに加え、ペプチドを沈殿させた。この沈殿を、エーテルで2回洗浄し、続いて、RP-

HPLC (Kromasil C18、10 mM、100 C18 支持体、7.5 × 20.5 cm 軸圧縮カラム、移動相 A: 0.12% TFA を含有する水、移動相 B: 0.1% TFA を含有するアセトニトリル (ACN)、10 分間の 10% B、2 分かけて 25% B への、次いで、60 分かけて 35% B への変化の勾配、流速 125 mL/分) で精製した。生成物を含有する画分を、凍結乾燥機で凍結乾燥させた。95% を超える純度の画分を ACN/水に溶解し、合わせ、凍結乾燥機で凍結乾燥させると、ペプチドが白色固体として得られた。

【0155】

二量体化反応:

上記から得られた単量体 (3 g、1.27 mmol) を、30 mL の無水ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (6.3 mmol、5 当量) を加え、混合物を均質まで攪拌した。30 mg/mL の DMSO 中、四官能性活性化リンカーの保存溶液を調製し、この一部 (0.55 当量) を、攪拌しながらペプチド溶液に加えた。2 時間後、反応混合物を HPLC/LCMS によって分析した。反応が完了した後、反応混合物に水 (200 マイクロリットル) を加え、この溶液を凍結乾燥機で凍結乾燥させた。乾燥粉末を精製すると (C18 支持体での逆相 HPLC、アセトニトリル/水/0.1% TFA 10% ACN ~ 35% ACN への 60 分かけた勾配を用いて溶出する)、純粋な Boc 保護二量体を得られた。Boc 保護二量体を、10 mL の 95% TFA/H₂O で 15 分間処理し、続いて、5 倍過剰の冷エーテル中で沈殿させた。沈殿を冷エーテルで 2 回洗浄すると、粗二量体を得られ、これを、上記と同じ逆相 HPLC 法を用いて精製すると、1.8 g の純粋な二量体ペプチドを得られた。

【0156】

ペグ化反応:

上記から得られたペプチド (100 mg、0.020 mmol) を、2 mL の DMSO : アセトニトリルの 80 : 20 混合物に溶解した。活性化された 40 kDa の (mPEG)₂-Lys-NHS (1.23 g、0.030 mmol、Nektar Therapeutics、San Carlos、CA 製) を加え、反応混合物を、均質になるまで激しく攪拌した。DIEA (69 µL、0.4 mmol) を加え、2 時間後に反応混合物を HPLC によって分析すると、完全な反応を示した。20 mL の冷無水ジエチルエーテルを加えることによってペプチドを沈殿させた。得られた沈殿を冷エーテルで 2 回洗浄し、PEG 化ペプチドを強力な陽イオン交換クロマトグラフィー (Source 15S 15 µm 支持体、移動相 A: 0.2% HOAc を含有する、35% ACN/水にペプチドを溶解し、ロードし、移動相 B: 0.2% HOAc を含有する 35% ACN/水中、100 mM NH₄OAc を用いる勾配溶出、125 mm × 35 mm カラム寸法、勾配: 10 分かけて 2% B ~ 20% B、65 分かけて 100% B へ) によって精製した。遊離 PEG が、ボイド (void) 容量の間に溶出された。生成物を含有する画分を凍結乾燥機で凍結乾燥すると、1.2 g の PEG 化ペプチドが、白色粉末として得られた。

【0157】

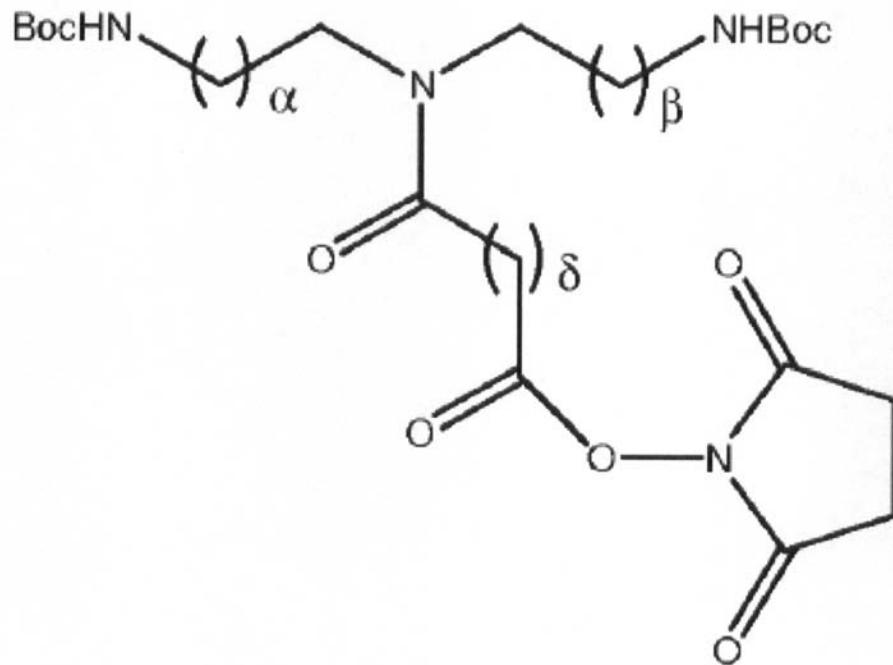
[実施例 4]

三官能性アミンリンカーの一般的合成

以下の構造を有する三官能性、活性化アミンリンカー:

【0158】

【化 1 8】



10

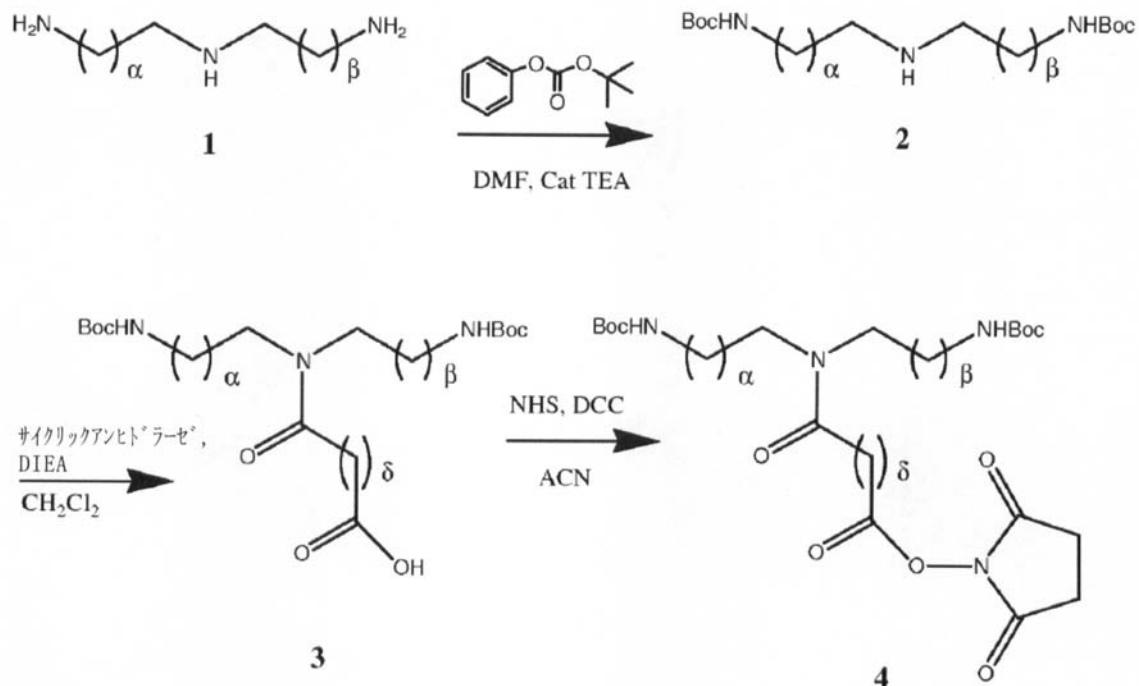
20

[式中、 α は、1 7 の整数であり； β は、1 7 の整数であり； δ は、2 5 の整数である]

を、以下の反応スキームに従って合成した：

【 0 1 5 9】

【化 1 9】



30

40

【 0 1 6 0】

市販のトリアミノ化合物 1 を、触媒量のトリエチルアミン (Cat TEA) の存在下で、ジメチルホルムアミド (DMF) 中、*t*-ブチルフェニルカーボネートで 24 時間処理して、ジ-*t*-ブチルカルバメート中間体 2 を生じさせた。2 の、塩化メチレン中、グルタル酸無水物およびジイソプロピルエチルアミン (DIEA) での処理によって、ジアミノ遊離酸 3 が生じる。アセトニトリル (ACN) 中、*N*-ヒドロキシスクシンイミド (

50

NHS) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) での処理によって、酸性基を、NHS エステルとして活性化する。沈殿した尿素を濾過し、抽出物を後処理することによって、NHS 活性化リンカーが得られた。DCM / ヘキサンからのトリチュレーション (trituration) によって、リンカーが白色固体として得られ、これは - 20 で数カ月安定であるとわかった。

【0161】

このリンカーの限定されない、詳細な合成については、実施例 5 を参照のこと。

【0162】

[実施例 5]

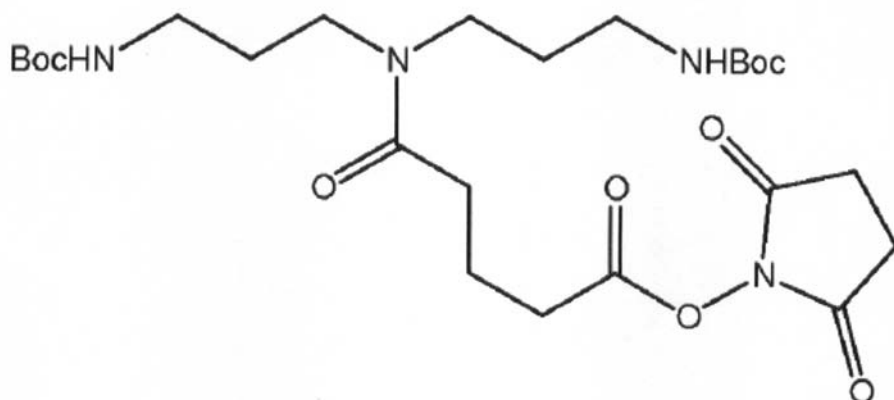
三官能性アミンリンカーの合成およびその NHS エステルとしての活性化

10

以下の構造を有する三官能性、活性化アミンリンカー

【0163】

【化 20】



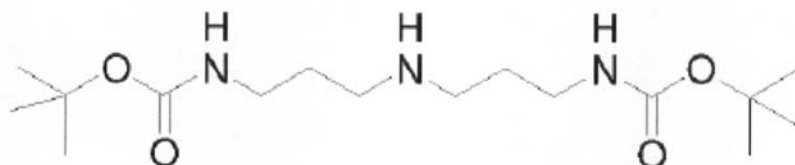
20

を以下の手順に従って作製した：

(ステップ I)

【0164】

【化 21】



30

無水 DMF (50 mL) 中、N - (3 - アミノプロピル) - 1, 3 - プロパンジアミン (0.05 モル) の溶液に、t - ブチルフェニルカーボネート (20 mL、0.11 モル) を滴下した。この溶液に、Et₃N (5 mL) を加えた。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を、リン酸バッファー (2 L、0.025 M K₂HPO₄ および 0.025 M NaH₂PO₄) 中に注ぎ入れ、得られた溶液を、2 M H₂SO₄ を用い、激しく攪拌しながら pH 約 3 に調整した。混合物を、DCM (2 × 250 mL) で抽出し、有機抽出物を廃棄した。水層を、9 N NaOH 水溶液で塩基性化し、次いで、DCM (3 × 250 mL) で抽出した。有機抽出物を、Na₂SO₄ で乾燥させ、減圧下で濃縮し、次いで、真空下で一晩乾燥させると、目的生成物 (15 g、収率 90%) が得られた。

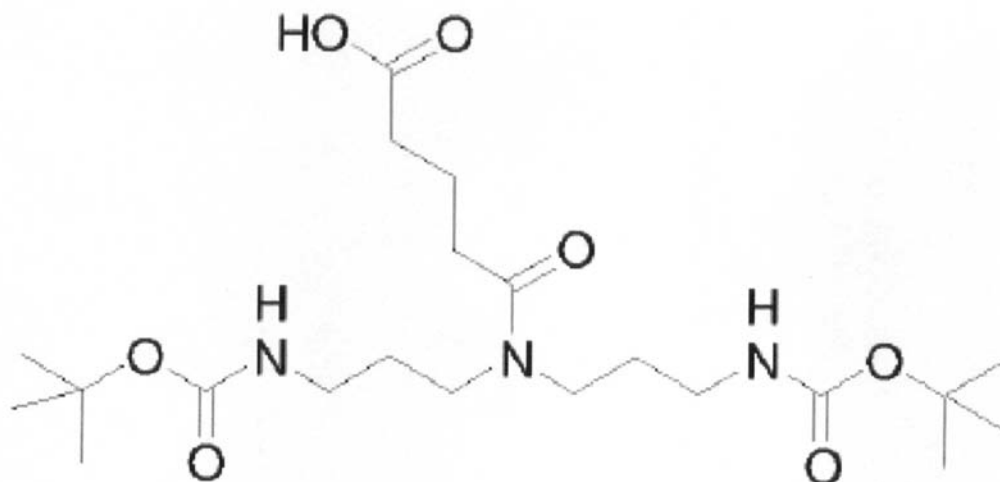
40

【0165】

(ステップ II)

【0166】

【化 2 2】



10

無水DCM(50mL)中、ジ-Boc保護アミン(5g、15mmol)、グルタミン酸無水物(1.64g、14.25mmol)およびEt₃N(3mL、22.5mmol)の混合物を、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を水に溶解した。水溶液を、4~10℃で1N HClを用いてpH約3に酸性化し、DCM(3×150mL)で抽出した。合わせた抽出物を、飽和NaClで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、次いで、減圧下で濃縮すると、目的生成物(6g、90%)が得られた。

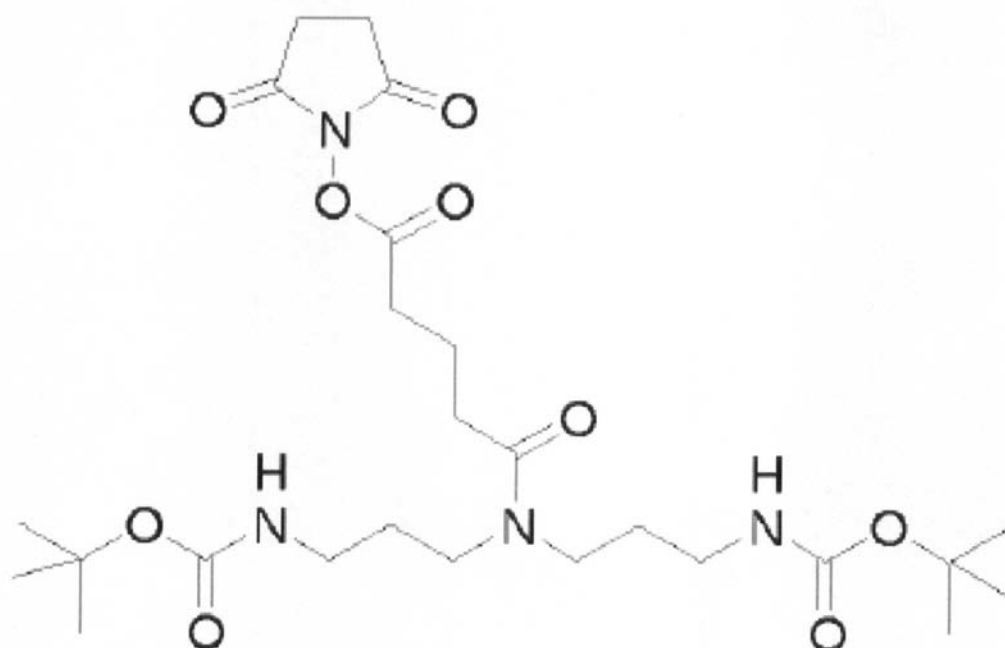
20

【0167】

(ステップIII)

【0168】

【化 2 3】



30

40

無水DCM(50mL)中、上記のステップIIの一酸生成物(2g、5.78mmol)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(731mg、6.36mmol)の混合物を、氷浴中で4℃に冷却した。反応混合物に、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(EDCI)(1.4g、8.7mmol)を少量ずつ加えた。次いで、得られた混合物を、室温に加温し、2時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、残渣を、酢酸エチルおよび水の間に分配した。水層を、EtOAc(2

50

× 100 mL) で抽出した。合わせた有機層を、1 M NaHCO_3 (1 × 100 mL)、続いて、水 (5 × 100 mL) および飽和 NaCl (1 × 100 mL) で洗浄した。抽出物を Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮し、真空中で乾燥させると、最終活性化三官能性リンカーが半固体として得られた (4.9 g、85%)。

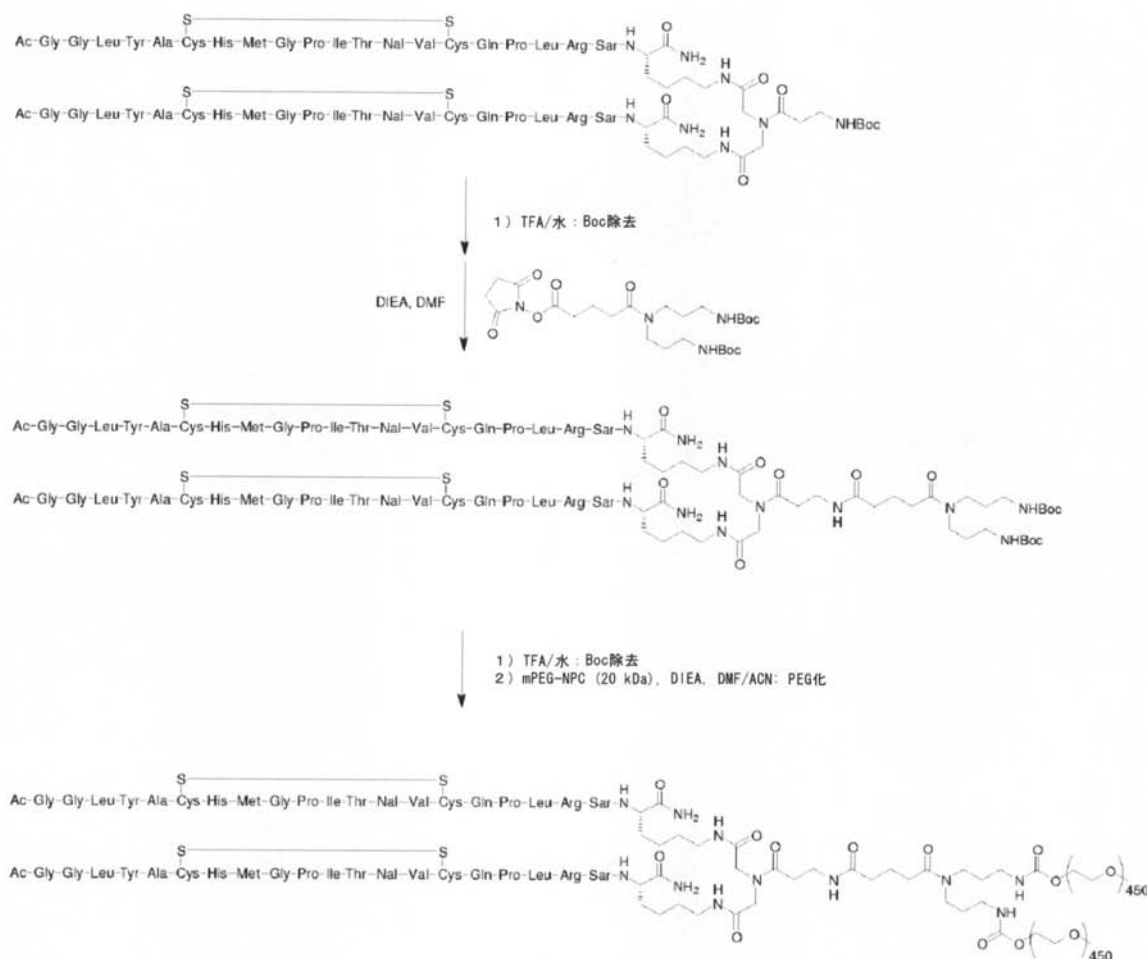
【0169】

[実施例 6]

三官能性リンカーのペプチドとのコンジュゲーションと、その後の PEG 化

【0170】

【化 2 4】



(化合物 I I)

実施例 3 から得られた (配列番号 : 5 を用いて) 二量体ペプチドを、この実施例の出発材料として用い、化合物 I I を合成した。Boc 基の除去は、95% TFA / 水を用いて行った。冷エーテルからペプチドを沈殿させ、TFA / ACN / 0.1% TFA 勾配を用いる C18 カラムでの HPLC によって精製した。生成物を含む画分を、凍結乾燥機で凍結乾燥させると、遊離アミン - ペプチドが白色固体として得られた。0.5 mL の DMF 中、ペプチド (20 mg、1 当量) および DIEA (10 マイクロリットル、10 当量) の溶液を、実施例 5 から得た三官能性活性化リンカー (4.5 mg、2 当量) で処理した。一晩攪拌した後の HPLC 分析によって、ほぼ完全な反応が明らかにされた。反応混合物を、冷エーテルに加えてペプチドを沈殿させた。ビス - Boc 保護リンカー - ペプチドコンジュゲートを減圧下で乾燥させた。

【0171】

ペプチドを、1.9 mL の TFA および 0.1 mL の水の溶液中に溶解し、1 時間攪拌することによって、2 つの Boc 基を除去した。TFA を、減圧下で除去し、残渣を冷エーテルから沈殿させた。ビス - アミンペプチドを、TFA / ACN / 0.1% TFA 勾配

を用いる C 1 8 カラムでの H P L C によって精製した。所望のペプチドを含有する画分を、凍結乾燥機で凍結乾燥させた。

【 0 1 7 2 】

ペグ化反応：

0 . 5 m L の D M F 中、ビス - アミンペプチド (1 0 m g 、 1 当量) の溶液に、D I E A (7 マイクロリットル、2 0 当量)、続いて、m P E G - N P C 2 0 k D a (N O F C o r p . 、 1 2 0 m g 、 3 当量) を加えた。6 時間後、m P E G - N P C (4 0 m g) および A C N (約 5 0 ~ 1 0 0 マイクロリットル) のさらなるアリコートを加えた。イオン交換クロマトグラフィーによる 1 4 時間後の分析によって、完全な反応が明らかにされた。反応混合物を、0 . 2 % H O A c を含有する 2 0 % A C N / 水で希釈し、強力な陽イオン交換クロマトグラフィー (S o u r c e 1 5 S 1 5 μ m 支持体、0 . 2 % H O A c を含有する、2 0 % A C N / 水中、1 0 0 m M N H ₄ O A c を用いる勾配溶出) によって精製した。遊離 P E G が、ボイド容量の間に溶出された。生成物を含有する画分を凍結乾燥機で凍結乾燥すると、5 1 m g の P E G 化ペプチドが、白色粉末として得られた。

10

【 0 1 7 3 】

[実施例 7]

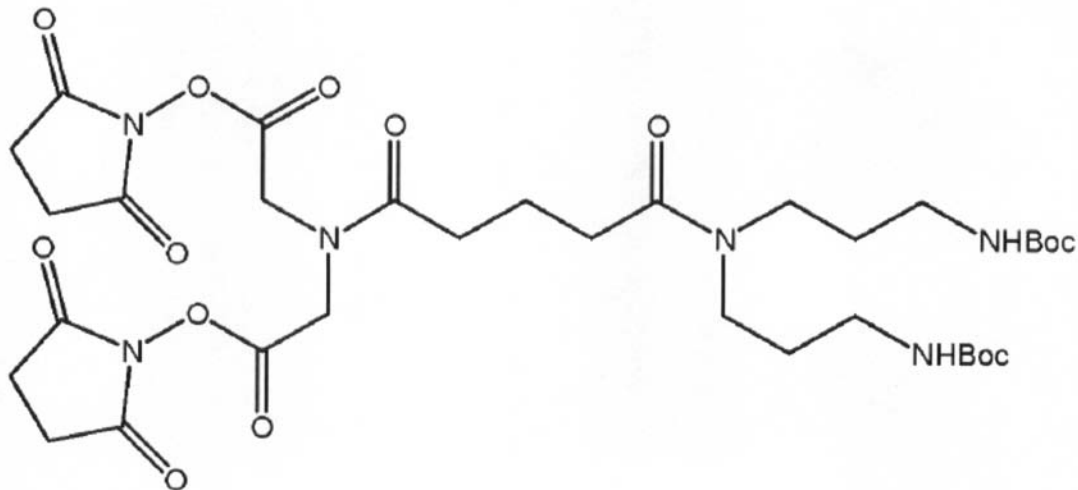
四官能性リンカーの合成および、その N H S エステルとしての活性化

以下の構造を有する四官能性、活性化リンカー

【 0 1 7 4 】

【 化 2 5 】

20

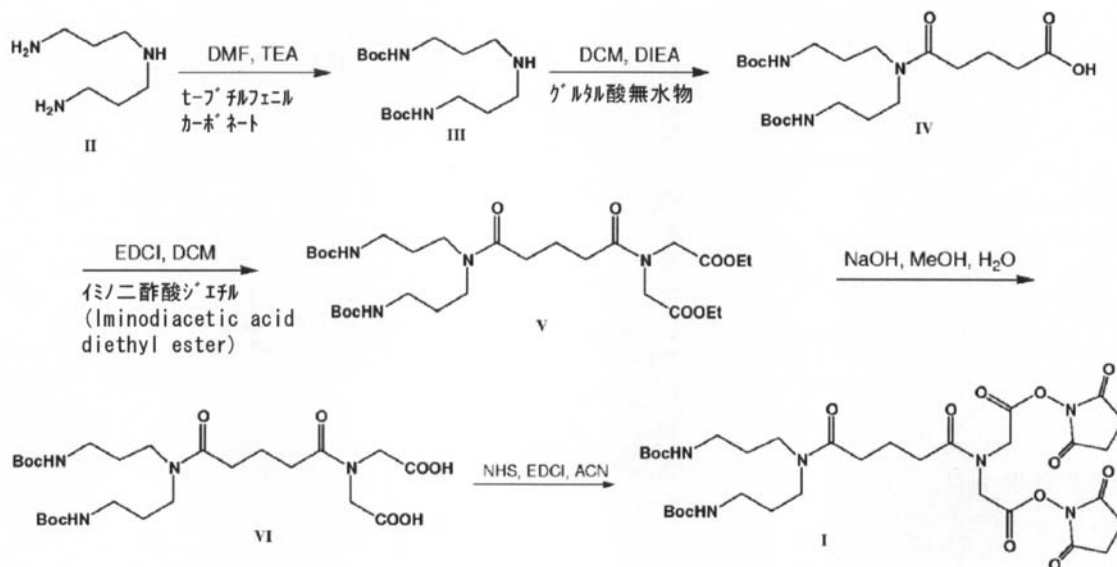


30

を、以下のスキームに従って合成した

【 0 1 7 5 】

【化 2 6】



10

【0176】

ジ - t - ブチルオキシトリアミン (III) :

DMF (50 mL) 中、トリアミン (II) (0.05 モル) の溶液に、t - ブチルフェニルカーボネート (2.3 当量) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、リン酸バッファー (1 L の 0.05 M K_2HPO_4 および 0.05 M NaH_2PO_4) 中に注ぎ入れた。pH を、2 M H_2SO_4 で 3 に調整し、ジエチルエーテル (3 × 250 mL) で抽出した。水相を 10 N NaOH を用いて強アルカリ性にし、DCM (4 × 250 mL) で抽出した。有機相をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮すると、ビス保護されたトリアミン (III) が白色固体として得られた (収率約 60%)。

20

【0177】

ジ Boc アミノ酸 (IV) :

無水 DCM (25 mL) 中、ジ Boc トリアミン (III) (0.01 モル) およびグルタル酸無水物 (0.01 モル) の混合物を、5 に冷却した (氷 - 水浴)。無水 TEA (0.015 モル、1.5 当量) を加え、混合物を室温で 6 時間攪拌した。混合物をさらなる DCM で希釈し、1 N NaHCO_3 (2 回) で洗浄した。有機層を廃棄した。水層を、2 N HCl を用い pH 3 に酸性化し、酢酸エチル (3 回) で抽出した。酢酸エチル層を水およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮すると、(IV) が白色の粘着性固体として得られた (収率約 90%)。

30

【0178】

ジエチルエステルリンカー (V) :

ジ Boc アミノ酸 (IV) (0.01 モル) およびジエチルイミノジアセテート (0.01 モル) を、無水ジクロロメタンに溶解した。これに、N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミドヒドロクロリド (EDCI) (0.012 モル) を加え、反応混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を、さらなる DCM で希釈し、0.1 N HCl 、氷冷 1 N NaHCO_3 、水 (3 回) およびブラインで洗浄した。DCM 層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮すると、ジエチルエステルリンカー (V) が、粘着性半固体として得られた。

40

【0179】

二酸エステルリンカー (Diacid ester linker) (VI) :

先のステップから得たジエチルエステルリンカー (V) を、1 N NaOH および MeOH の 1 : 1 混合物に溶解し、室温で 6 時間攪拌した。MeOH を減圧下で除去し、残渣を水で希釈した。溶液を DCM (2 回) で洗浄した。水層を冷 1 N HCl を用いて中性化し、酢酸エチル (3 回) で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾

50

燥させ、減圧下で濃縮すると、四官能性リンカー（V I）が白色固体として得られた（収率約 65 %、2 段階）。

【0180】

活性化四官能性リンカー（I）：

上記から得た二酸リンカー（V I）（0.005 モル）および N - ヒドロキシスクシンイミド（0.015 モル、3 当量）を、無水アセトニトリルに溶解した。これに、N - （3 - ジメチルアミノプロピル） - N' - エチルカルボジイミドヒドロクロリド（EDCI）（0.0125 mol、2.5 当量）を加え、反応混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を DCM で希釈し、氷冷水（5 回）およびブラインで洗浄した。DCM 相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮すると、活性化四官能性リンカー（I）が、白色固体として得られた（収率約 85 %）。リンカーの構造を ^1H - NMR によって確認した。

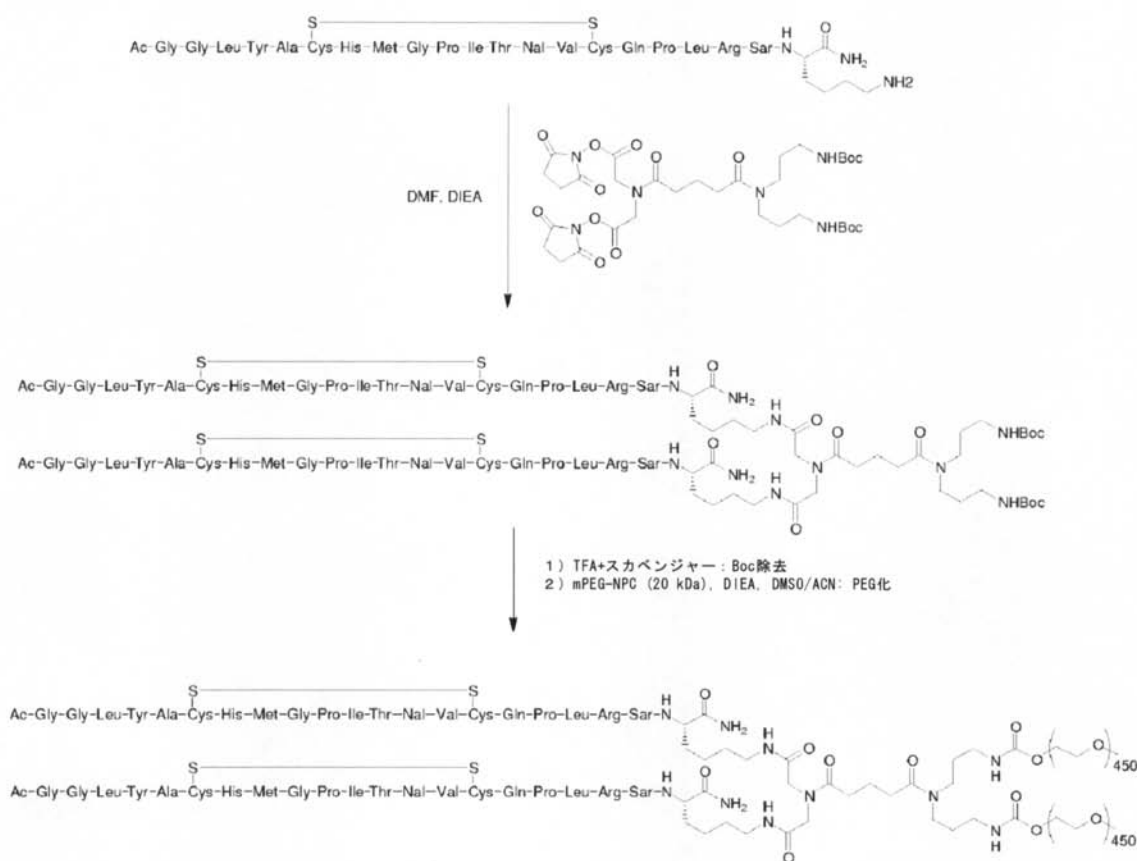
【0181】

[実施例 8]

四官能性リンカーを用いるペプチド二量体化およびその後の PEG 化

【0182】

【化 27】



(化合物 I I I)

ペプチド単量体を、実施例 3 と同様に調製し（配列番号：5 を用いて）、化合物 I I I の合成において初期分子として用いる。0.4 mL の DMF 中、ペプチド（150 mg、2 当量）および DIEA（56 マイクロリットル、10 当量）の溶液に、実施例 7 から得た四官能性活性化リンカー（23 mg、1 当量）を加えた。一晩攪拌した後の HPLC 分析によって、完全な反応が明らかにされた。ペプチドを冷エーテルから沈殿させ、減圧下で乾燥させた。1.9 mL の TFA および 0.1 mL の水の溶液にペプチドを溶解し、1 時間攪拌することによって、2 個の Boc 基を除去した。TFA を減圧下で除去し、残渣を冷エーテルから沈殿させた。ビス - アミンペプチドを、TFA / ACN / 0.1 % TFA

A 勾配を用いる C 1 8 カラムでの H P L C によって精製した。所望のペプチドを含有する画分を凍結乾燥機で凍結乾燥させた。

【 0 1 8 3 】

ペグ化反応：

m P E G - N P C 2 0 k D a (N O F C o r p . , 5 9 6 m g , 3 当量) を、最小の、D M S O : A C N の 7 0 : 3 0 混合物に溶解した。この溶液に、ビス - アミンペプチド (5 0 m g , 1 当量) および D I E A 1 7 マイクロリットル、1 0 当量) を加えた。5 時間後、イオン交換クロマトグラフィーによる分析によって完全な反応が明らかにされた。反応混合物を、冷エーテルに加えて、P E G 化ペプチドを沈殿させた。0 . 2 % H O A c を含有する 3 5 % A C N / 水に P E G 化ペプチドを溶解し、強力な陽イオン交換クロマトグラフィー (S o u r c e 1 5 S 1 5 μ m 支持体、0 . 2 % H O A c を含有する 3 5 % A C N / 水中、1 0 0 m M N H ₄ O A c を用いる勾配溶出) によって精製した。遊離 P E G が、ボイド容量の間に溶出された。生成物を含有する画分を凍結乾燥機で凍結乾燥すると、3 6 0 m g の P E G 化ペプチドが白色粉末として得られた。

【 0 1 8 4 】

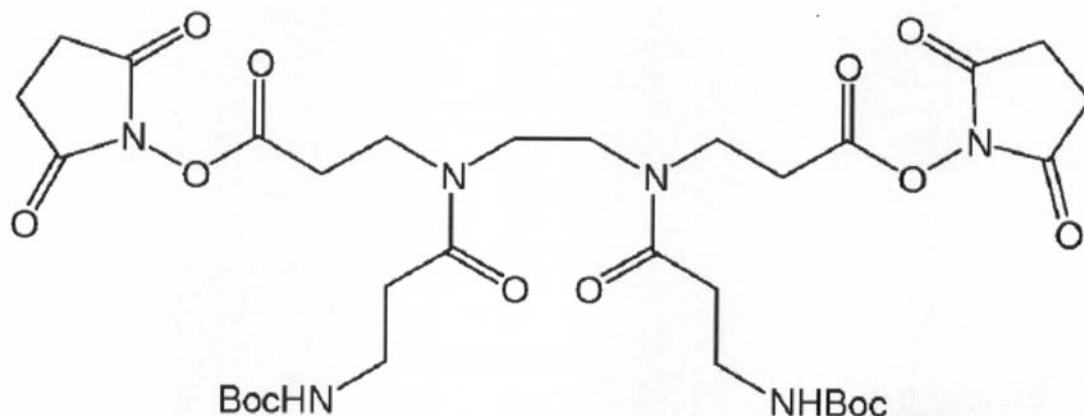
[実施例 9]

四官能性リンカーの合成およびその N H S エステルとしての活性化

以下の構造を有する四官能性、活性化リンカー：

【 0 1 8 5 】

【 化 2 8 】

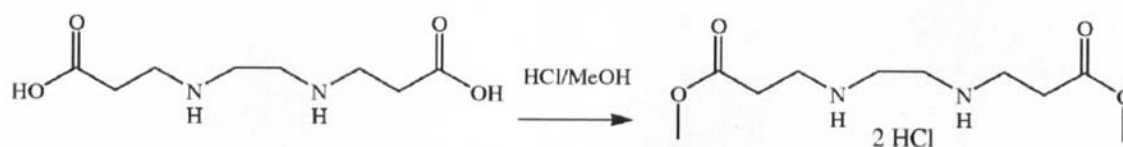


を以下のステップに従って合成した：

(ステップ I)

【 0 1 8 6 】

【 化 2 9 】



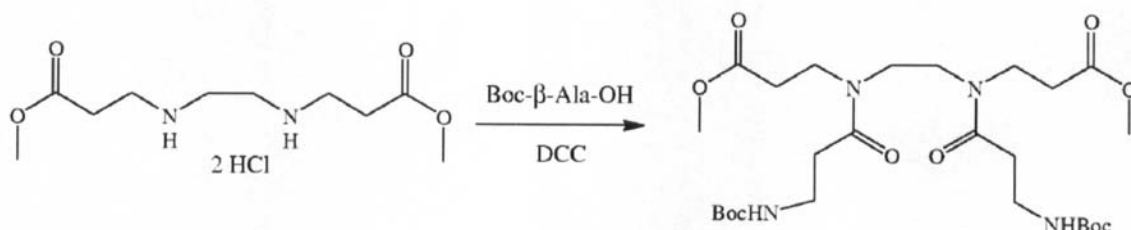
4 0 0 m L のメタノールを入れたフラスコに、塩化アセチル (8 m L , 1 1 2 m m o l) を加えた。この溶液を 1 0 分間攪拌し、T C I A m e r i c a (P o r t l a n d , O r e g o n) 製のエチレンジアミン - N , N ' - ジプロピオン酸ジヒドロクロリド (2 5 . 0 g , 9 0 . 2 m m o l) を加え、反応混合物を 2 4 時間還流した。この溶液を室温に冷却し、次いで、冷凍庫に 1 4 時間入れた。濾過によって白色結晶を回収し、減圧下で乾燥させると、2 7 . 1 2 g のジアミン二塩酸塩生成物が得られた。

【 0 1 8 7 】

(ステップ I I)

【 0 1 8 8 】

【化 3 0】



ジアミン二塩酸塩（5.0 g、16.4 mmol）を、50 mLの水に溶解することによって遊離塩基にし、分液漏斗に移し、100 mLの飽和 NaHCO_3 および25 mLの飽和 NaCl を加え（水相のpHは、約10であった）、クロロホルムで4回抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒を除去すると、1.12 gの無色のオイルが得られた。上記から得た水相を、 NaOH 水溶液を用いてpH12にさらに塩基性にし、クロロホルムで4回抽出した。 Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を除去すると、さらなる2.33 gの無色のオイルが得られた。

10

【0189】

合わせた遊離塩基（3.45 g、14.8 mmol）を、125 mLのアセトニトリルに溶解し、Boc-β-アラニン-OH（4.36 g、23.0 mmol）を加え、氷水浴をフラスコの下に置き、続いて、このフラスコにジシクロヘキシルカルボジイミド（4.74 g、22.97 mmol）を加えた。反応混合物を、室温に加温させ、24時間攪拌し、次いで、濾過して沈殿した尿素を除去した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を、250 mLの酢酸エチルに溶かし、飽和 NaHCO_3 、飽和 NaCl 、1N HCl および飽和 NaCl を用いて逐次洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮すると、6.03 g（収率91%）の白色固体が得られた。

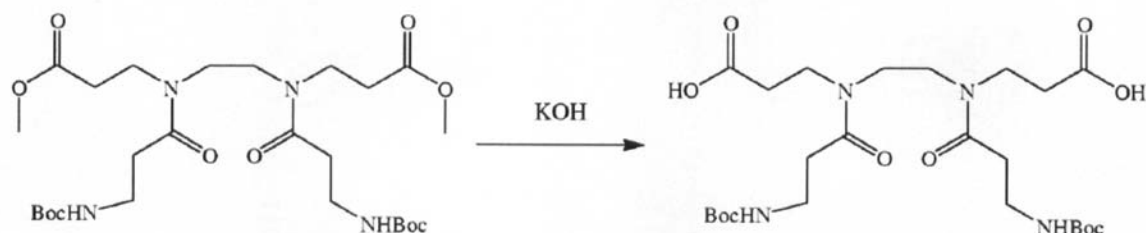
20

【0190】

（ステップIII）

【0191】

【化 3 1】



30

上記から得た粗ジメチルエステル（6.03 g、10.5 mmol）を、75 mLのメタノールおよび50 mLのテトラヒドロフランおよび30 mLの水の混合物に溶解した。20 mLの水中、 KOH （1.89 g、33.7 mmol）の溶液を、室温に加えた。2時間後、HPLC分析によって、生成物への完全変換が明らかにされた。3.5時間後、有機溶媒を減圧下で除去した。溶液を、100 mLの水で希釈し、ジエチルエーテルで抽出し、6N HCl を用いてpH2より低く酸性化し、固体 NaCl を用いて飽和させ、酢酸エチルで抽出した。有機相を、 MgSO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮すると、白色の半固体が得られた。生成物を、少量の HCl を含有する10%メタノール/水から再結晶化させると、3.42 gの二酸が、白色固体として得られた（収率60%）。

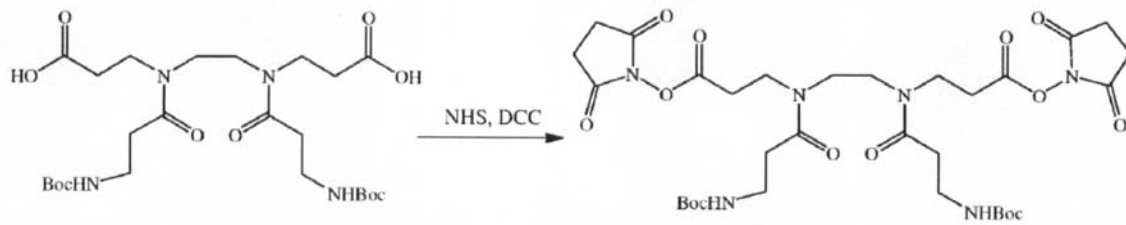
40

【0192】

（ステップIV）

【0193】

【化 3 2】



35 mL の DMF 中、上記から得た二酸 (0.551 g、1.01 mmol) および N - ヒドロキシスクシンイミド (0.28 g、2.42 mmol) の溶液に、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロリド (0.408 g、2.13 mmol) を加えた。26 時間攪拌した後、溶媒を減圧下で除去し、残渣を酢酸エチルおよび飽和 NaHCO₃ 間に分配した。有機相を洗浄し (飽和 NaCl、2 × 10% KHSO₄、飽和 NaCl)、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、濃縮すると、0.385 g (収率 51.5%) のジ - NHS 活性化エステル生成物が白色固体として得られた。

10

【0194】

[実施例 10]

四官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化およびその後の PEG 化

【0195】

【化 3 3】



(化合物 I V)

ペプチド合成：

単量体ペプチド（配列番号：5で示されたペプチドを用いて）を、標準Fmoc-アミノ酸（TFA-不安定側鎖保護基）およびACT90ペプチドシンセサイザー（Advanced ChemTech、Louisville、Kentucky製）でのジソプロピルカルボジミド（diisopropylcarbodiimide）（DIC）/ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）カップリング（0.25M、4当量、2時間カップリング）を用いて、30gのTentaGel Rink Amide樹脂上で合成した。この樹脂を、8

5 / 10 / 2 . 5 / 2 . 5 T F A / T I P S / チオアニソール / 水を用いて切断した。切断カクテルの容積を 1 / 2 に減らし、エーテルを用いて沈殿させた。沈殿を T F E に溶かし、M e O H で 2 m g / m l に希釈した。この攪拌溶液に、A c O H 中、I₂の飽和溶液を、淡黄色が残るまで加えた。この溶液を 15 分間攪拌し、次いで、少量のアスコルビン酸でクエンチした (quenched)。この溶液は、最小容積を残して取り除き、エーテルで沈殿させた。沈殿物を、A C N / 水 / 0 . 1 % T F A 勾配を用いる C 18 カラムでの逆相 H P L C によって精製した。

【0196】

二量体化反応：

純粋な酸化単量体 (80 mg、34 マイクロモル) を、1 mL の D M F に溶解した。これに、10 当量の D I E A (59 マイクロリットル)、続いて、5 mg アリコート 中、0 . 5 当量の実施例 9 の活性化四官能性リンカー (12 . 6 mg、17 マイクロモル) を 2 時間かけて加えた。二量体化は、H P L C によって追跡した。反応が完了した時点で、溶液を 80 / 20 水 / A C N で希釈し、逆相 H P L C によって精製した。純粋な画分を、T F A で処理して、B o c 保護を除去した (反応は H P L C によってモニターした)。遊離ジアミンを、A C N / 水 / 0 . 1 % T F A 勾配を用いる C 18 カラムでの逆相 H P L C によって精製した。

10

【0197】

ペグ化反応：

二量体ペプチド (20 mg、4 マイクロモル) を、175 mg (2 . 2 当量、8 . 8 マイクロモル) N O F C o r p . 製 m P E G - N P C 20 k D a とともに、0 . 5 mL の 70 / 30 D M S O / A C N に溶解した。この粘稠性溶液に、7 マイクロリットルの D I E A (10 当量、40 マイクロモル) を加えた。反応は、H P L C によって追跡した。16 時間後、反応混合物に、さらなる 0 . 5 mL の 70 / 30 D M S O / A C N を加えた。反応は 22 時間で完了した。この溶液を、0 . 2 % A c O H を含有する、80 / 20 水 / A C N で希釈した。溶液の 1 / 3 を、強力な陽イオン交換 S o u r c e 15 S (G E B i o s c i e n c e s 製) を含有するカラムにロードし、複数のカラム容積の溶媒 A (0 . 2 % A c O H を含有する、35 % A C N / 水) をカラムに通した。溶媒 A 中、100 mM N H₄O A c を用いて、P E G 化材料をカラムから溶出した。目的生成物を含有する画分を、凍結乾燥機で凍結乾燥させた。純度 > 95 % の画分を、80 / 20 A C N / 水に溶解し、合わせ、凍結乾燥機で凍結乾燥させると、42 mg の P E G 化ペプチドが白色固体として得られた。

20

30

【0198】

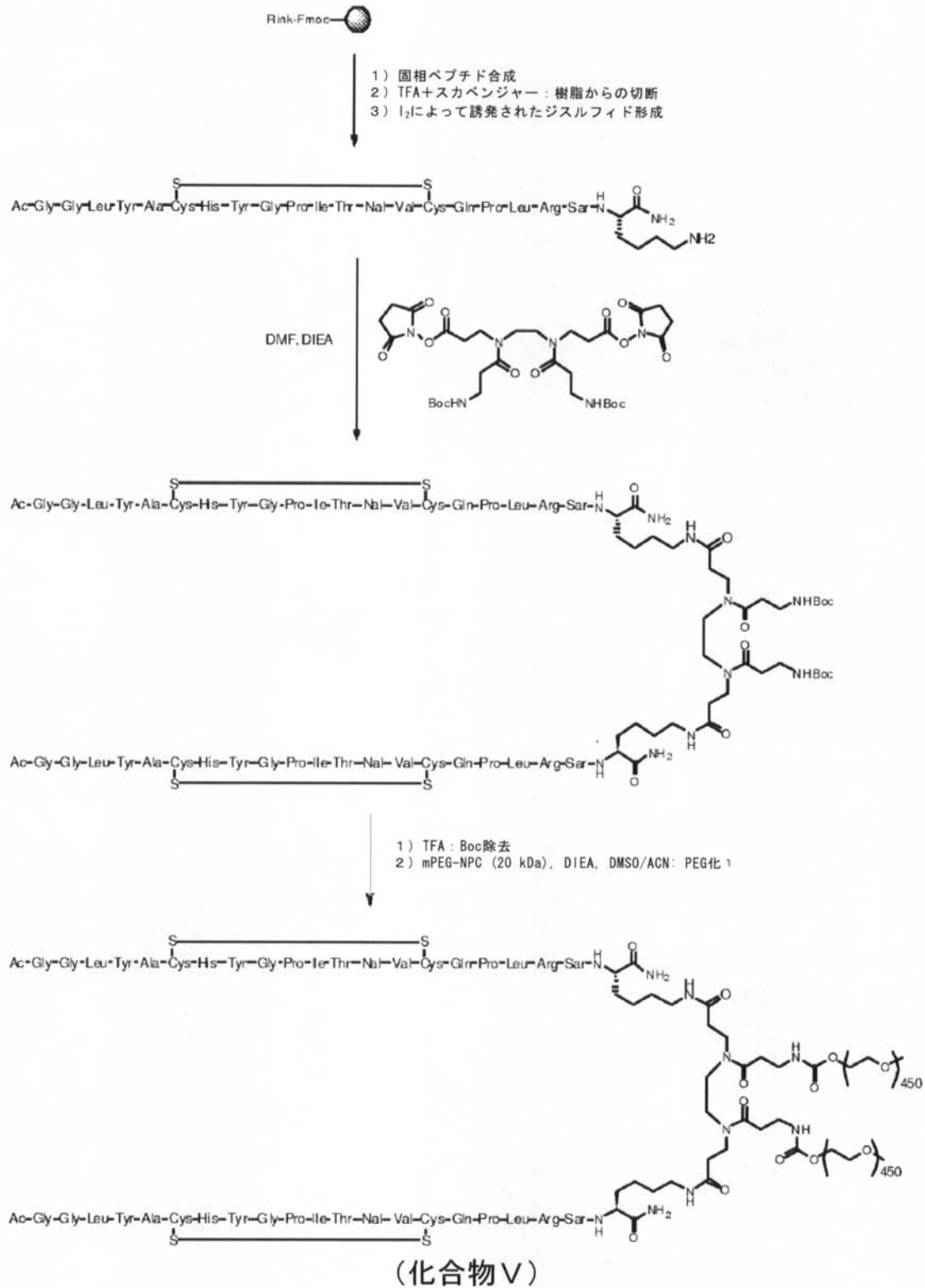
[実施例 11]

四官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化およびその後の P E G 化

以下のコンジュゲート (化合物 V) を、異なるペプチド単量体を用いた (配列 A c - G G L Y A C H Y G P I T (N a l) V C Q P L R (M e G) K、配列番号：24 を用いて) 点を除いて、実施例 10 の手順に従って調製した。

【0199】

【化 3 4】



10

20

30

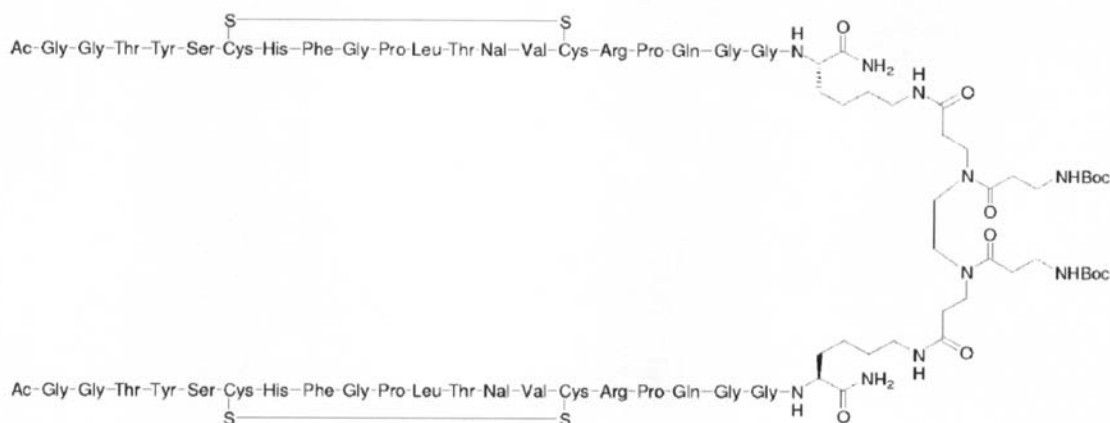
40

【 0 2 0 0 】

[実施例 1 2]

四官能性リンカーを用いるペプチドのC末端二量体化

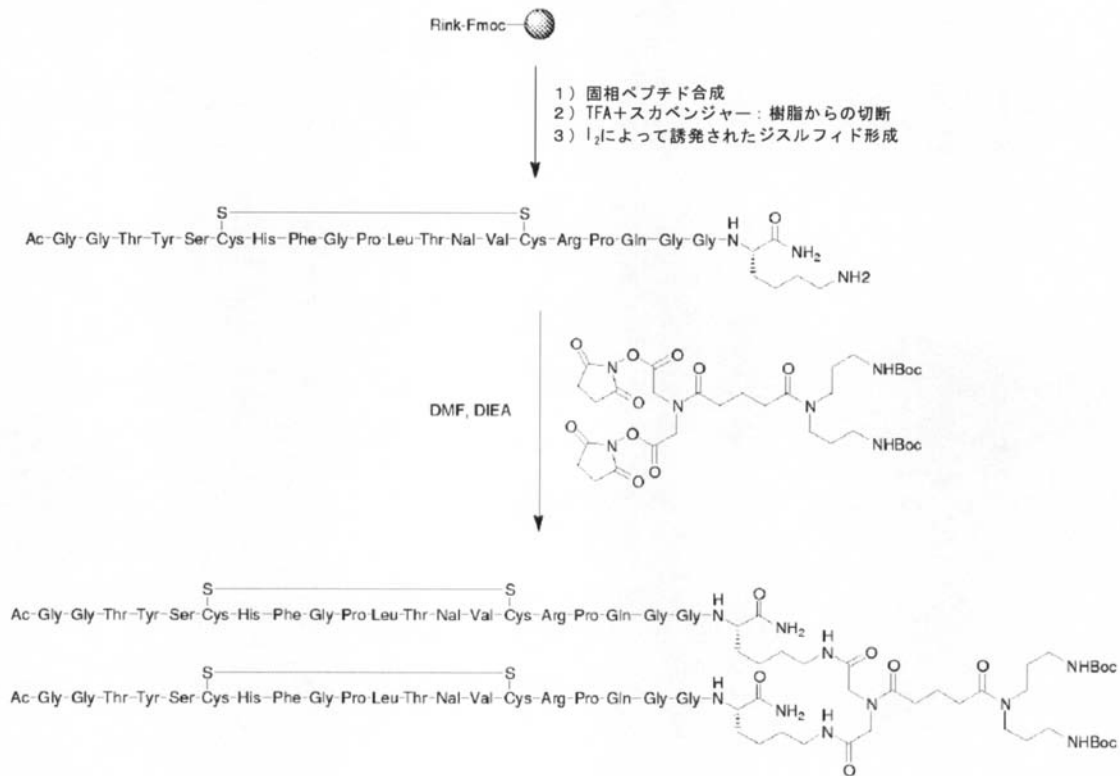
【 0 2 0 1 】

Rink-Fmoc-CC(=O)Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys[SS]Cys-Arg-Pro-Gln-Gly-Gly-N[C@@H](CCCCNC(=O)N)C(=O)N

(化合物 V I)

【 0 2 0 3 】

【化 3 6】



(化合物 V I I)

実施例 10 のペプチド合成および二量体化手順をたどって、化合物 VII (配列番号 : 17 のペプチドを出発材料として用いて) を、4.5 mg の白色固体として調製した。

【 0 2 0 4 】

[实施例 14]

三官能性リンカーを用いるペプチドのC末端二量体化

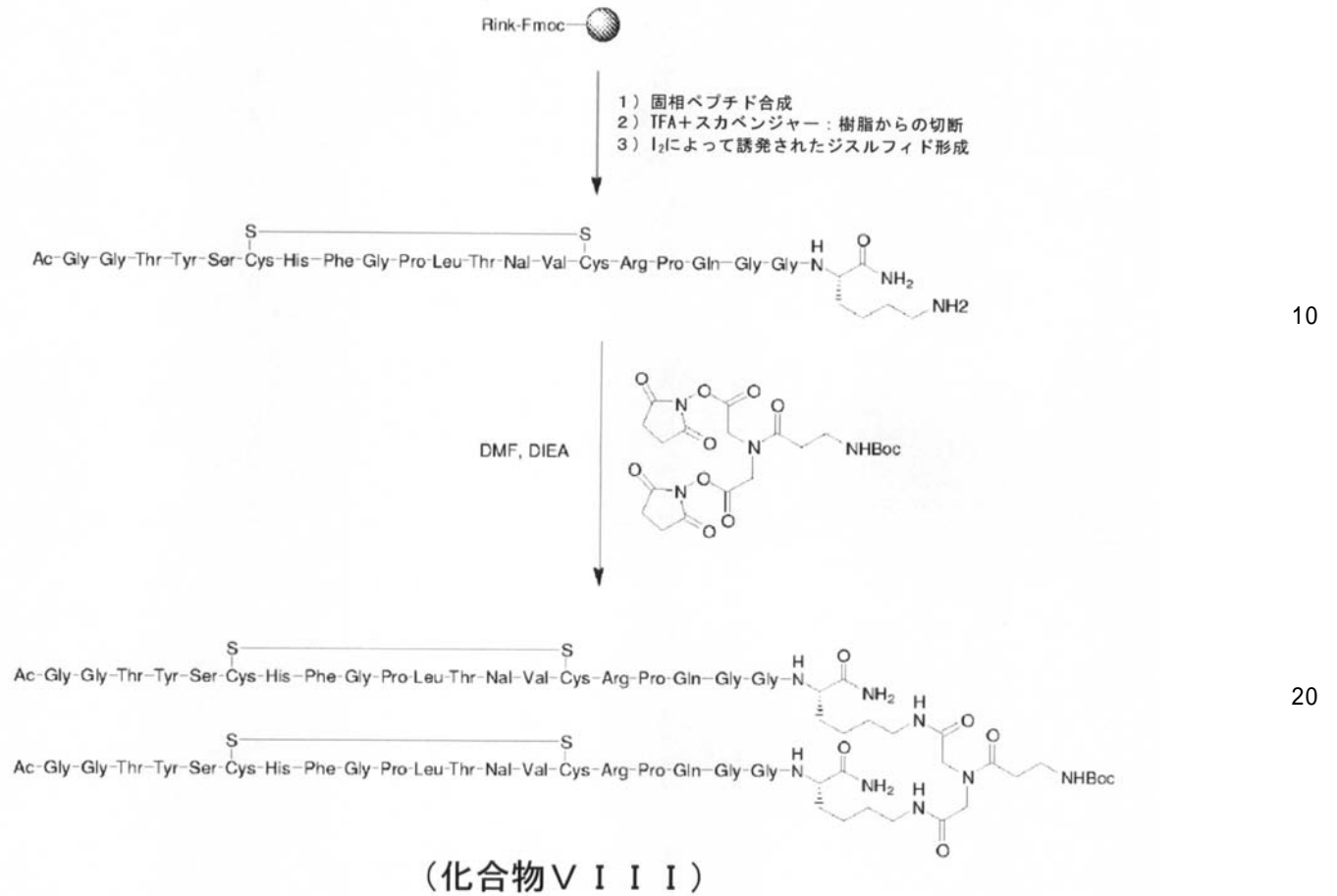
【 0 2 0 5 】

10

20

30

【化 3 7】



10

20

30

実施例 10 のペプチド合成および二量体化手順をたどって、化合物 VII I (配列番号 : 17 のペプチドを出発材料として用いて) を、5 mg の白色固体として調製した。

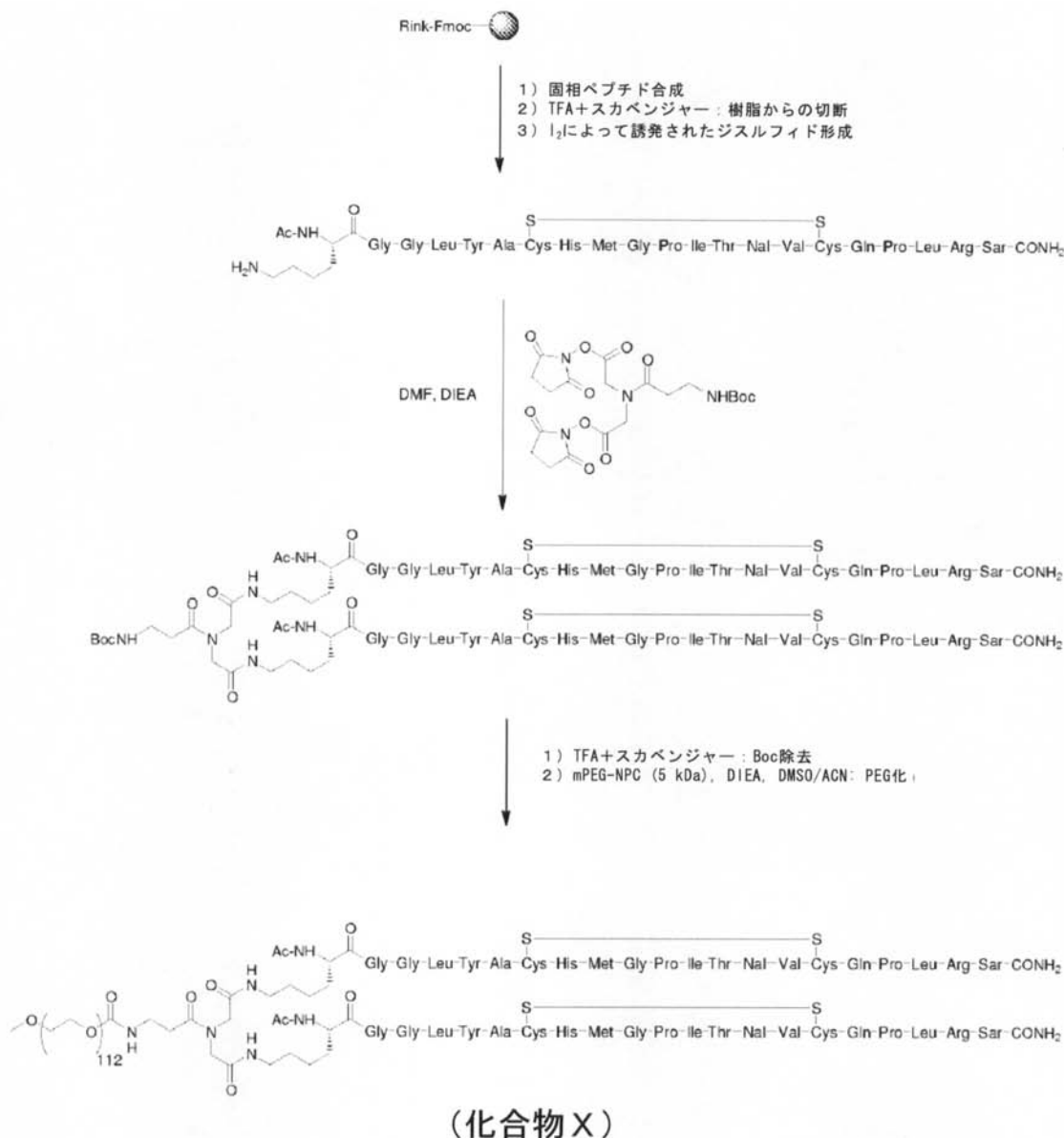
【 0 2 0 6 】

[実施例 15]

四三官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化

【 0 2 0 7 】

【化 3 9】



10

20

30

40

50

ペプチド合成：

直鎖ペプチドAc-K-G-G-L-Y-A-C-H-M-G-P-I-T-Nal-V-C-Q-P-L-R-Sar-アミド(7-15ジスルフィド、配列番号：26)を、実施例3と同様、標準Fmocアミノ酸を用いて調製した。TFA/トリイソプロピルシラン/チオアニソール/水の85/10/2.5/2.5混合物を用いて、樹脂からのペプチドの切断を実施し、得られたペプチドを、冷エーテルから沈殿させた。ACN/水/TFA勾配を用いるC18での精製によって、純粋な単量体ペプチドが得られた。

【0210】

二量体化反応：

二量体化は、10 mLのDMF中、507 mgの単量体、60 mgの実施例2の三官能性リンカーおよび170マイクロリットルのDIEAを用い、実施例3と同様に実施した。1 mLのDMF中、実施例2から得たさらなる6 mgのリンカーを3時間後に加えた。さらに1時間後、200マイクロリットルの水を加え、反応混合物を凍結乾燥機で凍結乾燥させた。粗ペプチドを、ACN/水/TFA勾配を用いるC18カラムでの逆相HPLCによって精製すると、236 mgの二量体のペプチドが白色固体として得られた。乾燥固体を、4 mLの95%TFA/水に溶かし、15分間攪拌し、次いで、冷エーテルに加えて、ペプチドを沈殿させた。固体を、50%ACN/水に溶解し、凍結乾燥機で凍結乾

燥させると、197 mg の二量体のペプチドが白色固体として得られた。

【0211】

ペグ化反応：

上記から得た二量体のペプチド(102 mg)を、3.5 mL の DMSO に溶かし、DIEA(34 マイクロリットル)、続いて、1.5 mL の ACN 中、mPEG-NPC5 kDa(Sun Bio USA、Orinda、CA 製、カタログ番号 PINPC-005、www.sunbio.com)の溶液を加えた。2 時間攪拌した後、HOAc を、溶液が透明になるまで滴下した(約 10 滴)。溶液を、0.2% AcOH を含有する 35% ACN / 水を用いて 10 mL に希釈し、実施例 3 と同様、Source 15 S 支持体での陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製すると、93 mg の白色固体が得られた。粉末(化合物 X)を HPLC(Zorbax 300 SB-C8、ACN / 水 / TFA 勾配)によって分析すると、純度 98.8% であることが明らかになった。ペプチド含量(94%)は、燃焼分析によって、窒素値の実測値 7.83% と、予測値 8.33% との比較に基づいて決定した。

【0212】

[実施例 17]

四官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化およびその後の PEG 化

【0213】

【化 4 0】



10

20

30

40

実施例 10 のペプチド合成、二量体化および PEG 化手順をたどって、上記のコンジュゲート（化合物 X I、配列番号：27 を出発材料として用いて）を調製することができる。位置 1 のグリシンは、アリロキシカルボニル（Alloc）などの直交（orthogonal）N 末端保護基を用いる。切断および二量体化後、Alloc 基を、(Ph₃)₄Pd を、HOAc および N-メチルモルホリンとともに用いて除去する。

【0214】

[実施例 18]

四官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化およびその後の PEG 化

【0215】

50

【化 4 1】



10

20

30

40

実施例 10 の手順をたどって、上記のコンジュゲート（化合物 X I I、配列番号：28 を出発材料として用いて）を調製することができる。位置 16 のリジンは、アリロキシカルボニル（Alloc）などの直交側鎖保護基を用い、位置 1 のグリジンは、Alloc-Gly-OH を用いる。切断および二量体化後、2 つの Alloc 基を、(Ph₃)₄Pd を、HOAc および N-メチルモルホリンとともに用いて除去する。

【0216】

[実施例 19]

四官能性リンカーを用いるペプチドの C 末端二量体化およびその後の PEG 化

50

以下のコンジュゲート（化合物X I I I）を、m P E G - N P C 30 k D a（N O F C o r p、J a p a n 製）を、m P E G - N P C 20 k D aの代わりに用いた点を除いて、実施例10に従って（配列番号：5を用いて）調製した。

【0217】

【化42】



10

【0218】

[実施例 20]

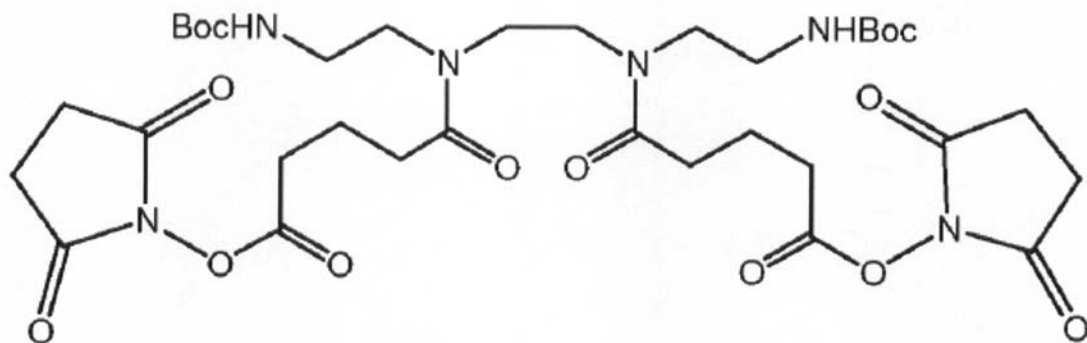
20

四官能性リンカーの合成およびビス-NHSエステルとしての活性化

以下の構造を有する四官能性活性化リンカー：

【0219】

【化43】

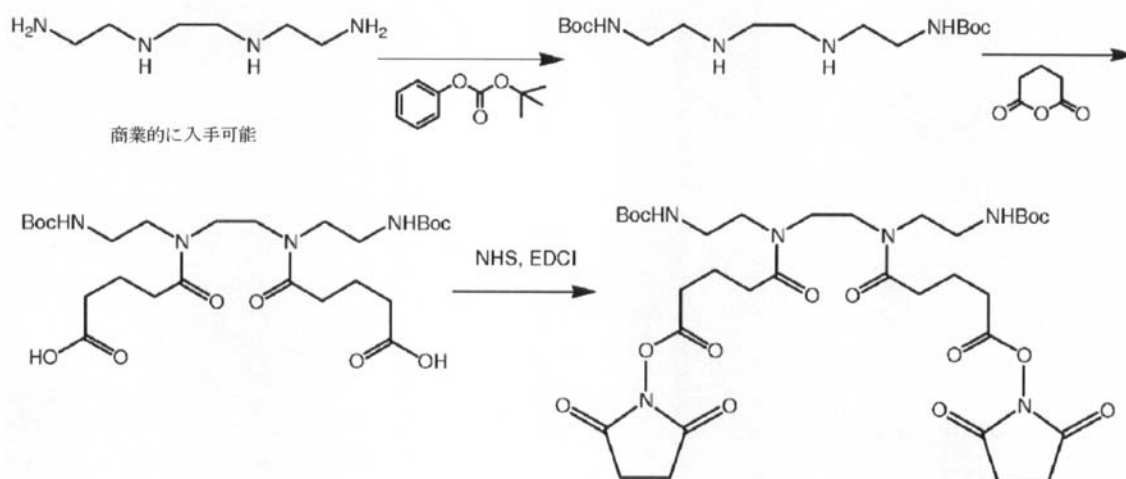


30

を、以下の反応スキームに従って合成した：

【0220】

【化 4 4】



10

【 0 2 2 1】

2.2 当量の *t*-ブチルフェニルカーボネートを含む DMF 中、テトラ - アミンの溶液に、触媒トリエチルアミンを加えた。反応混合物を一晩攪拌した。反応混合物をリン酸バッファー (2 L、0.025 M K_2HPO_4 および 0.025 M NaH_2PO_4) に注ぎ入れ、得られた溶液を、激しく攪拌しながら 2 M H_2SO_4 を用いて pH 約 3 に調整した。混合物を、エーテルで洗浄し (洗浄液は廃棄した)、水層を、9 N $NaOH$ を用いて pH 10 に塩基性にし、次いで、DCM で抽出した。有機抽出物を、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下で濃縮し、次いで、真空下で一晩乾燥させると、目的生成物が得られた。

20

【 0 2 2 2】

無水 DCM (25 mL) 中、ジ Boc テトラ - アミン (1 当量) およびグルタル酸無水物 (2 当量) の混合物を、5 に冷却した (氷 - 水浴)。無水 TEA (1.3 当量) を加え、混合物を室温で 6 時間攪拌した。混合物をさらなる DCM で希釈し、1 N $NaHCO_3$ で洗浄した。有機層を廃棄した。水層を、2 N HCl を用いて pH 3.0 に酸性化し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を、水およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮すると、四官能性リンカーが得られた。

30

【 0 2 2 3】

無水 DMF 中、四官能性リンカー (1 当量) および *N*-ヒドロキシスクシンイミド (2.2 当量) の混合物を、氷浴中で 4 に冷却した。反応混合物に *N*-(3-ジメチルアミノプロピル)-*N'*-エチルカルボジイミドヒドロクロリド (EDCI) (1.1 当量) を、少量ずつ加えた。次いで、得られた混合物を室温に加温させ、2 時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去した後、残渣を、DCM および水の間に分配した。抽出物を、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮し、真空下で乾燥させると、最終活性化四官能性リンカーが灰白色固体として得られた。

【 0 2 2 4】

[実施例 2 1]

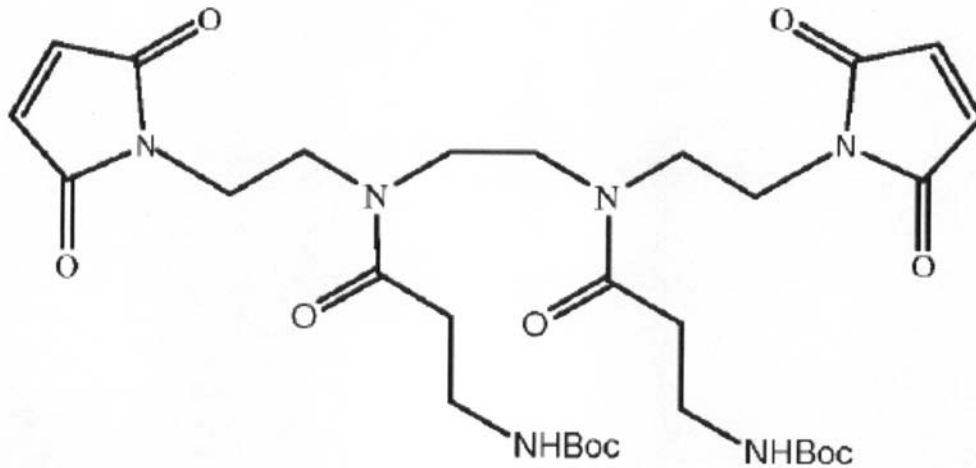
四官能性リンカーの合成

以下の構造を有する四官能性リンカー：

【 0 2 2 5】

40

【化 4 5】

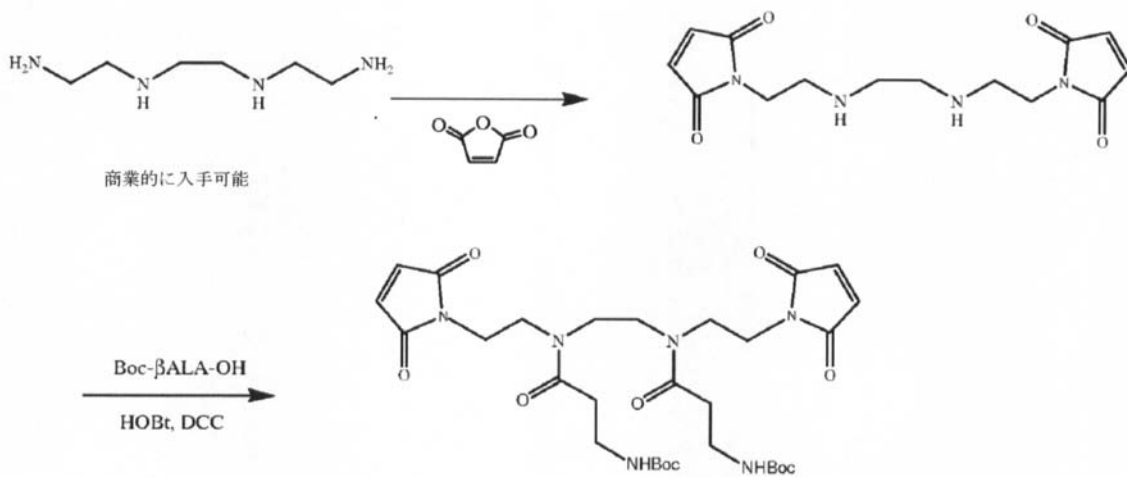


10

を、以下の反応スキームに従って合成した：

【 0 2 2 6】

【化 4 6】



20

30

【 0 2 2 7】

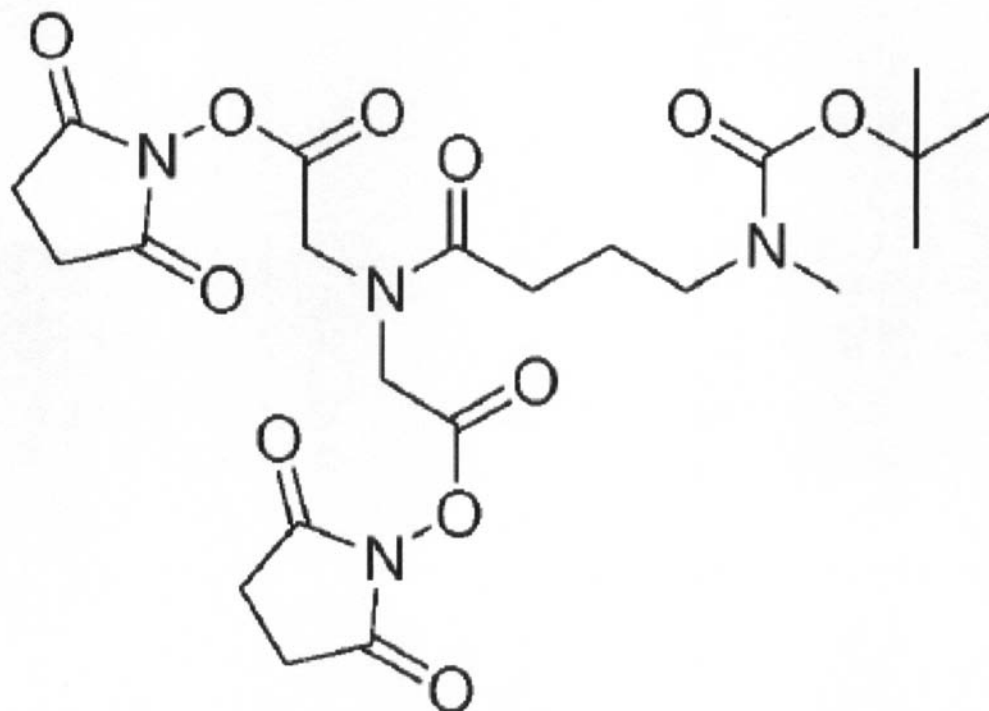
[実施例 2 2]

三官能性リンカーの合成およびペプチドの二量体化およびペグ化

以下の構造を有する三官能性リンカー：

【 0 2 2 8】

【化 4 7】



10

20

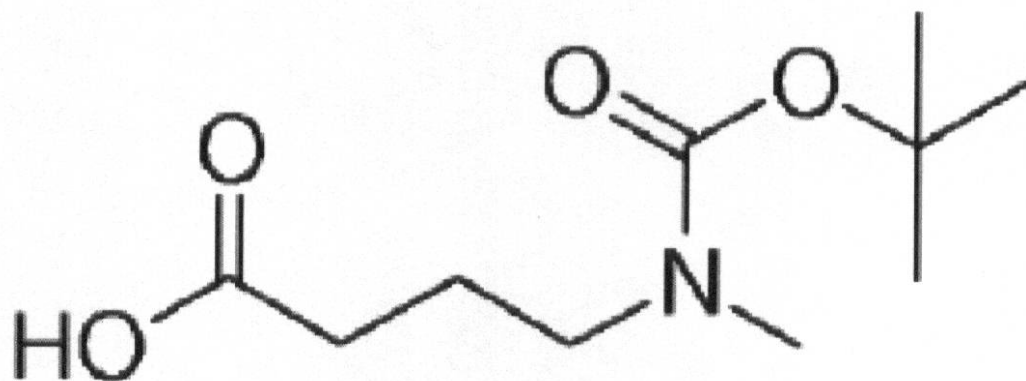
を、以下のプロトコールに従って作製した。

【 0 2 2 9】

(ステップ I)

【 0 2 3 0】

【化 4 8】



30

MeOH (50 mL) および 3 当量の Et₃N (5 mL) 中、4 - (メチルアミノ) 酪酸ヒドロクロリド (5 g、32.5 ミリモル) の混合物に、ジ - t - ブチルジカルボナート (7 g、32.1 mmol) を 10 分間かけて滴下した。反応混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮した。残渣を EtOAc (150 mL) に溶解し、氷冷 0.1 N HCl 水溶液 (2 × 70 mL) で洗浄した。次いで、有機層を、水 (2 × 100 mL) で中性 pH に洗浄し、次いで、飽和 NaCl (1 × 100 mL) で洗浄した。EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮すると、Boc 保護生成物 (6.8 g、収率 96%) が得られた。

40

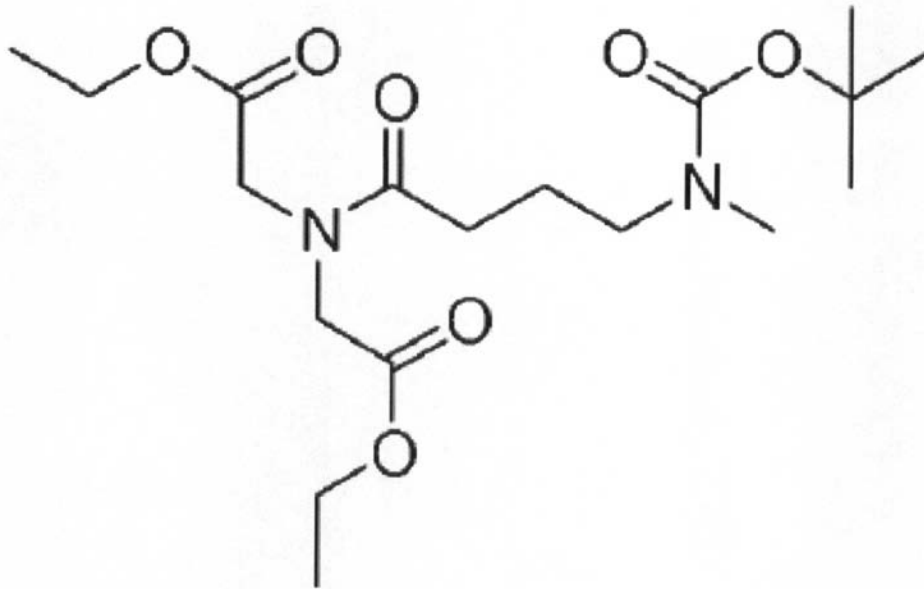
【 0 2 3 1】

(ステップ II)

【 0 2 3 2】

50

【化 4 9】



10

無水DCM(80mL)中、Boc保護4-(メチルアミノ)酪酸(6.8g、31.3mmol)およびジ-エチルイミノジアセテート(5.92g、29.7mmol)の混合物を、氷浴中で4℃に冷却した。反応混合物に、EDCI(7.1g、37.3mmol)を少量ずつ加えた。次いで、得られた混合物を室温に加温させ、4時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、残渣を、酢酸エチル(200mL)および水(100mL)の間に分配した。続いて、有機層をH₂O(4×100mL)、氷冷0.1N HCl(2×100mL)、H₂O(2×100mL)、飽和NaHCO₃(1×100mL)、H₂O(2×100mL)、最後に、続いて、飽和NaCl(1×100mL)で洗浄した。有機層を、Na₂SO₄で乾燥させ、次いで、濃縮すると、目的生成物が得られた(10g、収率86.7%)。

20

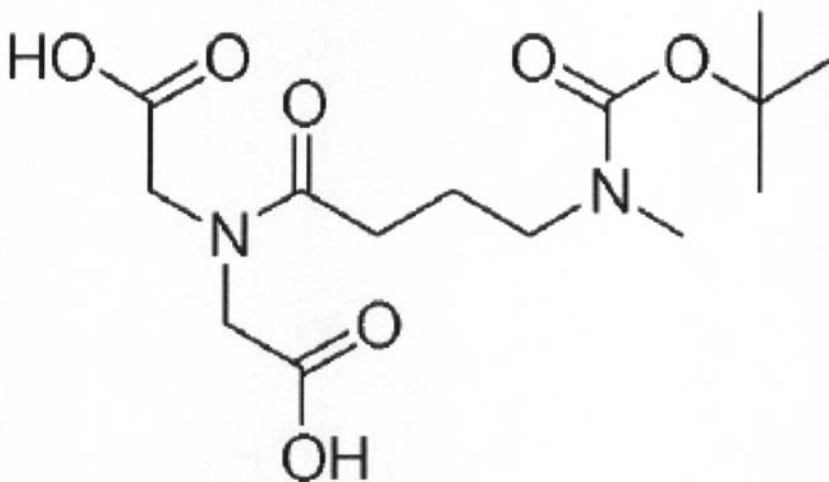
【0233】

(ステップIII)

30

【0234】

【化50】



40

ジエチルエステル生成物(10g、25.7mmol)を、THE中、2N LiOH水溶液(容量で1:1)を用いて、18時間加水分解した。溶媒を除去した後、水層をEtOAc(2×100mL)で洗浄し、有機層を廃棄した。溶液中に氷を加えて0℃で、水層を、6N HClを用いてpH約1に酸性化し、次いで、後に固体NaClを用いて

50

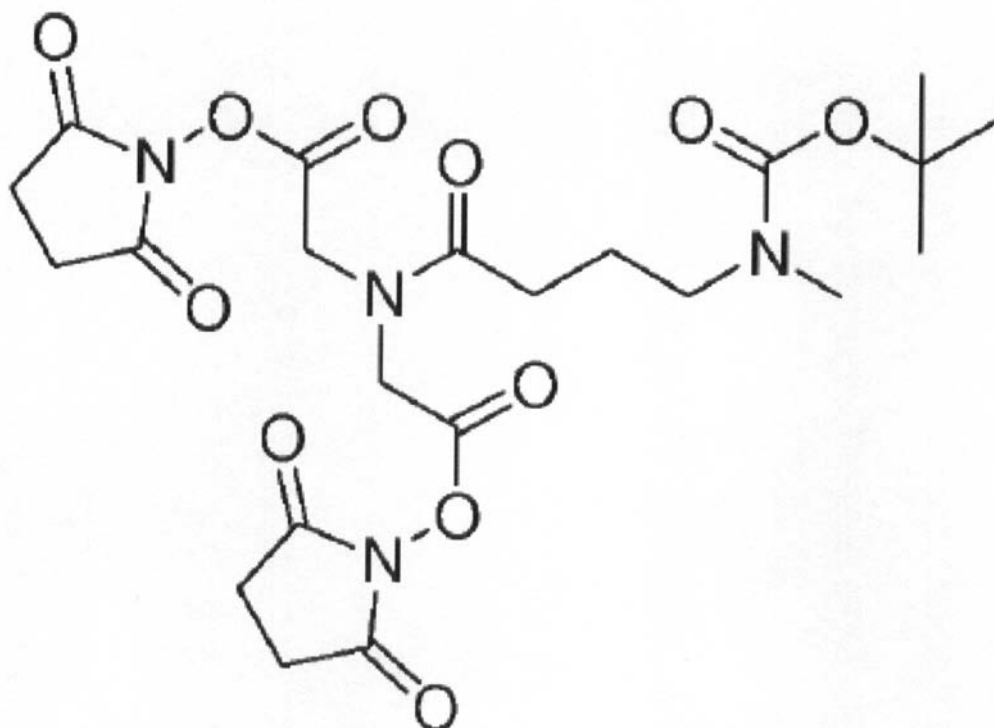
飽和させた。飽和溶液を EtOAc ($5 \times 100 \text{ mL}$) で抽出した。合わせた抽出物を、飽和 NaCl ($3 \times 100 \text{ mL}$) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、次いで、濃縮すると、二酸リンカー (5.8 g 、 68%) が、白色固体として得られた。

【0235】

(ステップIV)

【0236】

【化51】



10

20

無水 DCM (20 mL) 中、上記二酸リンカー (1 g 、 3.0 mmol) および N -ヒドロキシスクシンイミド (760 mg 、 6.6 mmol) の混合物を、氷浴中で 4°C に冷却した。反応混合物に、 N - (3 -ジメチルアミノプロピル) - N' -エチルカルボジイミドヒドロクロリド (EDCI) (1.72 g 、 9.0 mmol) を少量ずつ加えた。次いで、得られた混合物を室温に加温させ、 $3 \sim 4$ 時間攪拌した。溶媒を除去した後、残渣を、酢酸エチルおよび水の間に分配した。水層を、 EtOAc ($2 \times 50 \text{ mL}$) で抽出した。合わせた有機層を、水 ($5 \times 50 \text{ mL}$) および飽和 NaCl ($1 \times 50 \text{ mL}$) で洗浄した。抽出物を、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮し、真空下で乾燥させると、最終活性化リンカーが白色固体として得られた (1.35 g 、 85%) 。

30

【0237】

活性化リンカーを用いるペプチド二量体化：

実施例3に記載されるペプチド単量体 (配列番号：5、 193 mg 、 0.075 mmol) を、無水 DMSO (2 mL) に溶解し、攪拌しながら DIEA を加えた ($70 \mu\text{L}$ 、 0.38 mmol) 。活性化リンカー (21.7 mg 、 0.041 mmol) を 0.5 mL の無水 DMSO に溶解し、次いで、ピペットによって加えた。得られた混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、 HPLC [分析用 HPLC カラム： $\text{Agilent Zorbax 300SB-C8}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $300 \times 2.1 \times 150 \text{ mm}$ (10 分かけて、 $20\% \text{ B} \sim 70\% \text{ B}$ ；移動相として、 $\text{ACN} \& \text{H}_2\text{O}$ 中、 $0.1\% \text{ TFA}$ ； UV 検出器： 210 nm ；流速： 0.5 mL/分)] および LC-MS によって分析した。反応が完了した時点で、混合物を $20 \mu\text{L}$ の H_2O を用いてクエンチし、および凍結乾燥して溶媒を除去した。

40

【0238】

乾燥残渣を、 $\text{TFA} - \text{DCM}$ ($1:1$) (1 mL) で 10 分間で処理して、 Boc -保

50

護基を除去し、 N_2 ガスを溶液上に穏やかに吹き込むことによって、溶媒を乾燥させた。混合物の1/2を、分取HPLC(70分かけて25% B ~ 50% B; 移動相として、ACN & H_2O 中、0.1% TFA; UV検出器: 210 nm; 流速: 30 mL/分)によって精製した。画分を乾燥させた後、二量体のペプチドが、95%の純度の白色粉末(42 mg、収率43%)として単離された。

【0239】

40 kDa PEGを用いる二量体のペプチドのペグ化:

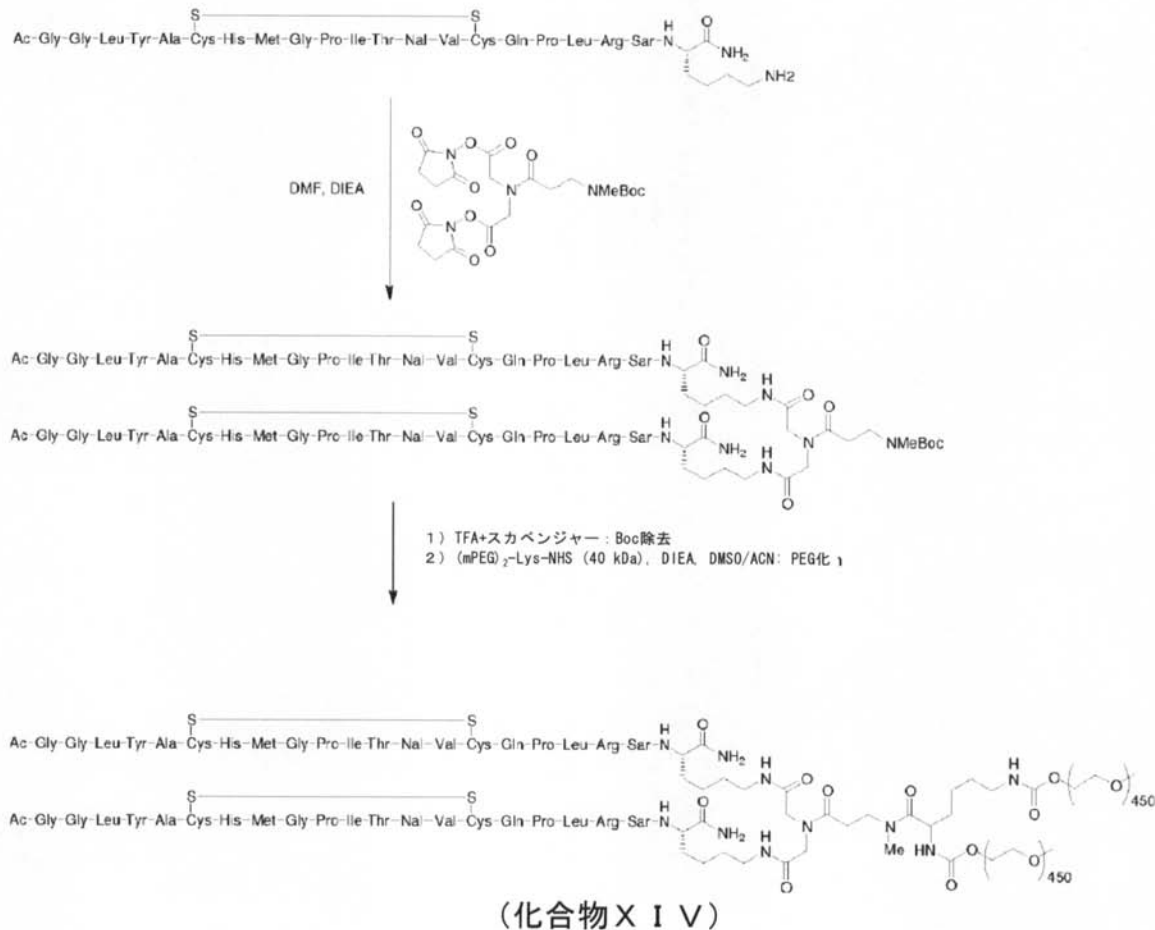
二量体のペプチド(42 mg、0.008 mmol)を、無水DMSO-ACN(容量で3:1)(2 mL)に溶解し、DIEA(10 μ L、7当量)を加えた。無水アセトニトリル(1 mL)に溶解した活性化40 kDa(mPEG)₂-Lys-NHS(480 mg、0.012 mmol、Nektar Therapeutics、San Carlos、CA製)を加え、得られた混合物を室温で一晩攪拌した。HPLCによる分析によって、ペプチド二量体の1/3が出発材料として残存していることが示された。無水アセトニトリル(1 mL)に溶解した活性化PEG試薬(480 mg、0.012 mmol)のさらなる部分を加え、反応混合物を再度、一晩攪拌した。分析用HPLCによって、形成された大部分の生成物と少量の出発材料が示された。溶媒を凍結乾燥した後、実施例3と同様に、混合物を、強力な陽イオンイオン交換カラムに通して、過剰の加水分解されたPEGを除去した。イオン交換精製から回収されたUVによる第1のピークは、80 kDa-PEG化生成物であると同定され、SEC分析によって確認された。イオン交換精製から回収されたUVによる第2のピークは、所望の40 kDa-PEG化生成物(85%純度の)および幾分かの出発物質および不純物であると同定された。分取HPLC(C18、ACN/ H_2O /0.1% TFA勾配)によって、不純物混合物を再精製すると、40 kDa-PEG化コンジュゲート(化合物XIV、32 mg)が95%純度で得られた。

10

20

【0240】

【化 5 2】



10

20

30

40

50

【 0 2 4 1】

[実施例 2 3]

四官能性リンカーを用いるペプチドのC末端二量体化およびその後のPEG化

化合物X Vは以下のとおりに調製した。

【 0 2 4 2】

ペプチド合成：

配列番号：16として示される単量体ペプチドを、標準Fmoc-アミノ酸（TFA-不安定側鎖保護基）およびACT90ペプチドシンセサイザー（Advanced ChemTech、Louisville、Kentucky製）でのジイソプロピルカルボジミド（diisopropylcarbodiimide）（DIC）/ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）カップリング（0.25M、4当量、2時間カップリング）を用いて、30gのTentaGel Rink Amide樹脂上で合成した。この樹脂を、85/10/2.5/2.5 TFA/TIPS/チオアニソール/水で切断した。ジエチルエーテルを加えることによって、ペプチドを溶液から沈殿させた。沈殿を回収し、減圧下で乾燥させ、トリフルオロエタノール（TFE）に溶かし、MeOHで2mg/mlに希釈した（最終比TFE：MeOH 1：4）。この攪拌溶液に、AcOH中、I₂の飽和溶液を、淡黄色が持続するまで加えた。この溶液を15分間攪拌し、次いで、少量のアスコルビン酸でクエンチした。溶液を取り除いて最小容量とし、エーテルを用いて沈殿させた。沈殿を、以下のような水/0.12%TFA（溶媒A）およびACN/0.10%TFA（溶媒B）勾配：5分間の5%Bから、1分かけて20%Bへ、55分かけて40%Bへ、1分かけて95%Bへ、を用いるC18カラムでの逆相HPLCによって精製した。所望のペプチドを含有する画分を合わせ、凍結乾固すると、純粋な単量体ペプチドが得られた。

【 0 2 4 3】

二量体化反応：

純粋な酸化された単量体（1156 mg、498 マイクロモル）を、11 mL の DMF に溶解した。これに、10 当量の DIEA（852 マイクロリットル）、続いて、アリコートの実施例 9 の 0.5 当量の活性化四官能性リンカー（184.6 mg、249 マイクロモル）を 1 時間かけて加えた。二量体化は HPLC によって追跡した。反応が完了した時点で、溶液を、80/20 水/ACN で希釈し、逆相 HPLC によって精製した。純粋な画分を、TFA で処理して、Boc 保護を除去した（反応は、HPLC によってモニターした）。遊離ジアミンを、以下のような水/0.12% TFA（溶媒 A）および ACN/0.10% TFA（溶媒 B）勾配：9 分間の 10% B から、1 分かけて 20% B へ、70 分かけて 35% B へ、次いで、1 分かけて 80% B へ、を用いる C18 カラムでの逆相 HPLC によって精製した。所望のペプチドを含有する画分を合わせ、凍結乾固すると、619 mg の純粋な二量体ペプチドが得られた。

10

【0244】

ペグ化反応：

二量体ペプチド（219 mg、44.2 マイクロモル）および 2917 mg（2.2 当量、97.2 マイクロモル）の NOF Corp 製 mPEG-NPC 30 kDa（ロット番号 M35525）を、20 mL の 70/30 DMSO/ACN に溶解した。この粘稠性溶液に、76 マイクロリットルの DIEA（10 当量、442 マイクロモル）を加えた。反応は HPLC によって追跡した。反応は 5.5 時間で完了した。反応混合物に冷エーテルを加えて、ペプチドを沈殿させ、沈殿を冷エーテルで 3 回洗浄した。ペプチドを、0.2% AcOH を含有する 80/20 水/ACN に溶解した。溶液の 1/3 を、強力な陽イオン交換 Source 15S（GE Biosciences 製）を含有するカラムにロードし、複数のカラム容積の溶媒 A（0.2% AcOH を含有する、35% ACN/水）をカラムに通した。溶媒 A 中、100 mM NH_4OAc を用いて、PEG 化材料をカラムから溶出した。この過程を、残りのペプチド溶液を用いてさらに 2 回反復した。目的生成物を含有する画分を凍結乾固した。純度 > 95% の画分を、さらに 3 回、80/20 ACN/水に溶解し、合わせ、凍結乾燥させ、続いて、以下のような水/0.2% HOAc（溶媒 A）および ACN/0.2% HOAc（溶媒 B）勾配：22% B で開始、10 分かけて 24% B へ、1 分かけて 30% B へ、60 分かけて 40% B へ、次いで、1 分かけて 95% B へ、を用いる C18 カラムでの逆相 HPLC によって精製した。所望のペプチドを含有する画分を合わせ、凍結乾固すると、514 mg の純粋な PEG 化二量体が白色固体として得られた。

20

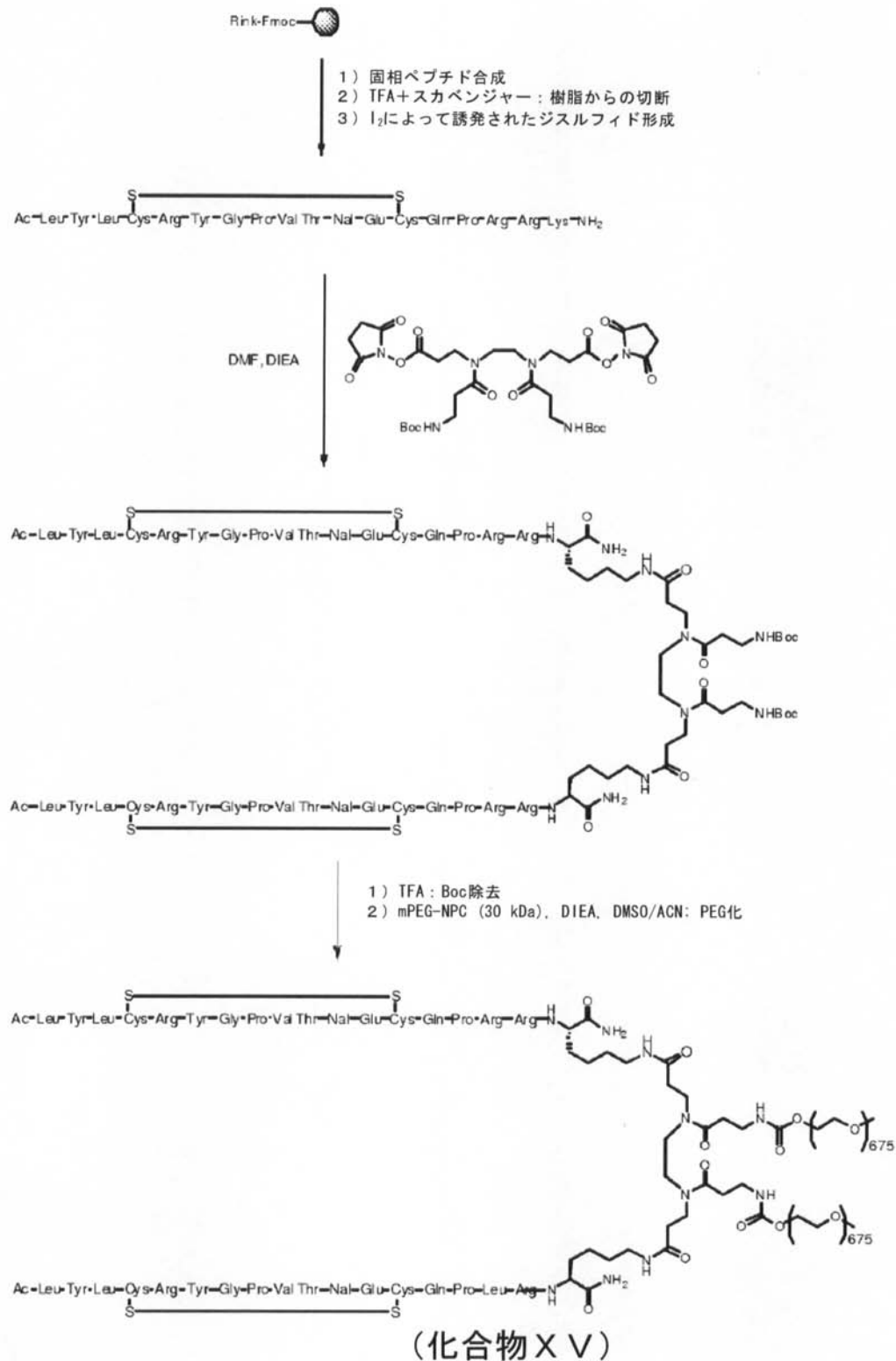
30

【0245】

化合物 XV の合成を以下に示す。

【0246】

【化 5 3】



10

20

30

40

【0247】

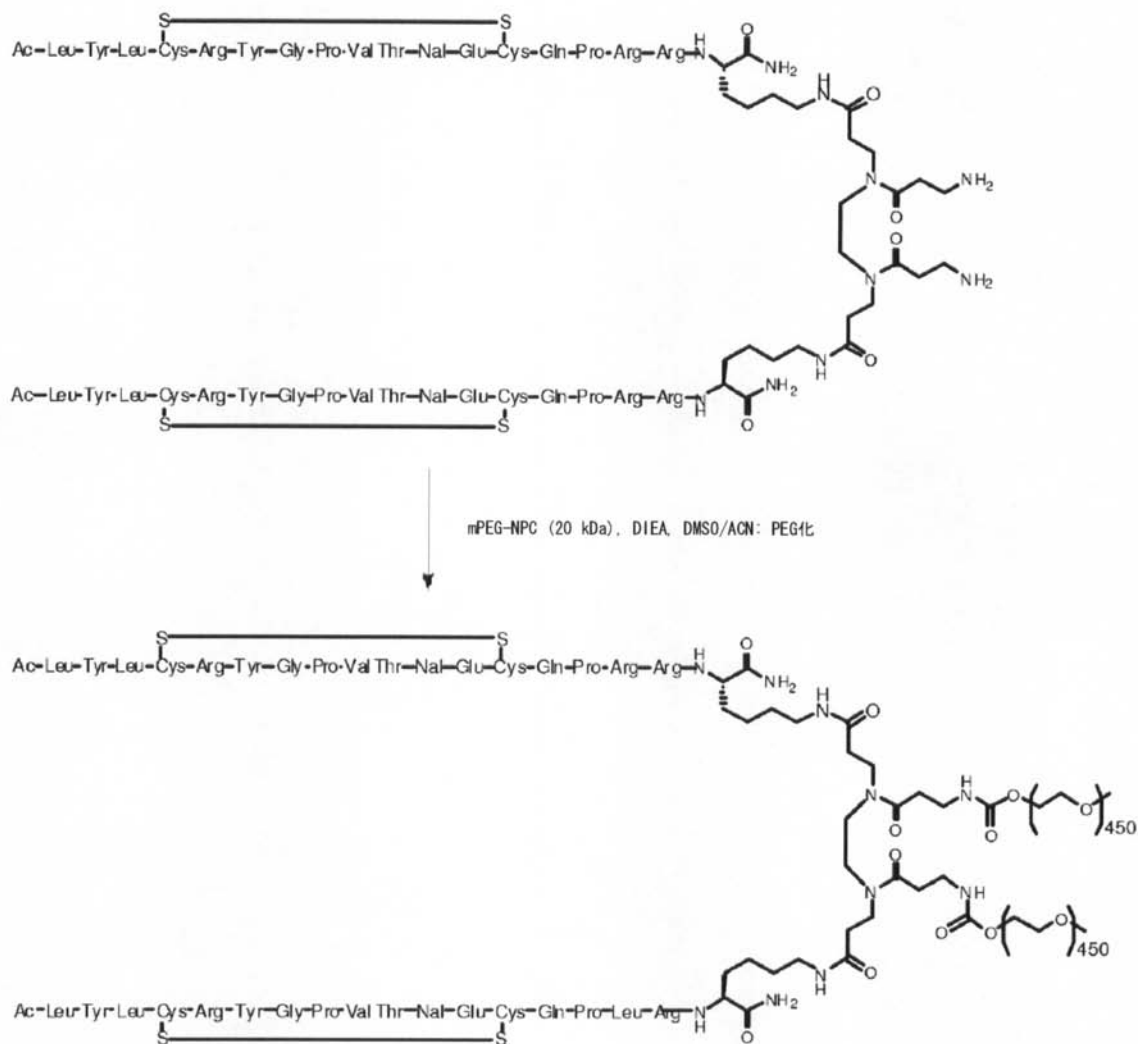
[実施例 24]

20 kDa PEGを用いるPEG化

化合物XVI、2つの20 kDa PEG部分とのコンジュゲートの合成を以下に示す。

【0248】

【化 5 4】



(化合物X V I)

【 0 2 4 9 】

上記の実施例 2 3 から得た二量体ペプチド (79 mg、15.9 マイクロモル) を、700 mg (2.2 当量、34.9 マイクロモル) の NOF Corp 製の mPEG-NPC 20 kDa (MEMP-20T、ロット番号 M4D558) と共に、2.5 mL の 70/30 DMSO/ACN に溶解した。この粘稠性溶液に、28 マイクロリットルの DIEA (10 当量、15.9 マイクロモル) を加えた。反応物を完了のために一晩静置した。反応混合物に冷エーテルを加えて、ペプチドを沈殿させ、沈殿を冷ジエチルエーテルで 3 回洗浄した。ペプチドを 0.2% AcOH を含有する 80/20 水/ACN に溶解した。溶液の半量を、強力な陽イオン交換 Source 15S (GE Biosciences 製) を含有するカラムにロードし、2~3 カラム容積の溶媒 A (0.2% AcOH を含有する 35% ACN/水) をカラムに通した。PEG 化材料を、溶媒 A 中、100 mM NH₄OAc でカラムから溶出した。精製過程をペプチド溶液の残りの部分を用いて反復した。目的生成物を含有する画分を、凍結乾燥機で凍結乾燥させた。純度 > 95% を有する目的生成物の画分を、さらに 3 回、80/20 ACN/水に溶解し、合わせ、凍結乾燥させ、続いて、以下のような水/0.2% HOAc (溶媒 A) および ACN/0.2% HOAc (溶媒 B) 勾配: 22% B から 10 分かけて 24% B へ、1 分かけて 30% B へ、60 分かけて 30%~40% B へ、1 分かけて 95% B へ、を用いる C18 カラムでの逆相 HPLC によって精製した。純粋な PEG-ペプチドコンジュゲートが、470

mg の白色固体として単離された。

【0250】

[実施例 25]

ペプチドの生物学的試験

1. レポーターアッセイ

このアッセイは、ヒト EPO-R を発現するようにトランスフェクトされ、fos プロモーター駆動性ルシフェラーゼリポーター遺伝子構築物をさらにトランスフェクトされたマウスプレ B 細胞株に基づいたものであった。このような細胞は、EPO または別の EPO-R アゴニストに曝露されると、ルシフェラーゼを合成することによって応答する。ルシフェラーゼは、基質ルシフェリンを添加すると光の発光を引き起こす。したがって、このような細胞における EPO-R 活性化のレベルは、ルシフェラーゼ活性の測定によって定量することができる。

10

【0251】

試験ペプチドの活性は、細胞に、試験ペプチドの段階希釈物を加え、次いで、これを 4 時間インキュベートすることによって測定した。インキュベーション後、細胞にルシフェリン基質を加え、光の発光を測定した。EPO を用いて観察されたものと比較して、最大値の半分発光をもたらす試験ペプチドの濃度を、EC50 と記録した。

【0252】

2. 増殖アッセイ

このアッセイは、ヒト EPO-R を発現するようにトランスフェクトされたマウスプレ B 細胞株に基づくものであった。この細胞株の増殖は、EPO-R 活性化に応じて変わる。細胞増殖度は、MTT を用いて定量し、ここで、MTT アッセイにおけるシグナルは、生存細胞数に比例する。試験ペプチドの活性は、細胞に試験ペプチドの段階希釈物を加え、次いで、これを 48 時間インキュベートすることによって測定した。インキュベーション後、細胞に MTT を加え、吸光度を測定した。EPO を用いて観察されたものと比較して最大値の半分の吸光度をもたらす試験ペプチドの濃度を EC50 として記録した。

20

【0253】

3. 競合結合実験 (Competitive Binding Assay)

競合結合算出は、2 つのビーズ: EPO がコンジュゲートされたビーズおよび EPO-R がコンジュゲートされたビーズの近接の関数として光シグナルが生じるアッセイを用いて行う。ビーズ近接は、EPO の EPO-R との結合によって生じる。EPO-R との結合について EPO と競合する試験ペプチドは、この結合を妨げ、光発光の減少を引き起こす。試験ペプチドなしで観察されるものと比較して、光発光の 50% 減少をもたらす試験ペプチドの濃度は IC50 と記録される。

30

【0254】

4. C/CFU-e アッセイ

EPO-R シグナル伝達は、骨髄幹細胞の増殖性赤血球前駆体への分化を刺激する。このアッセイでは、試験ペプチドの、初代ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆体の増殖および分化を刺激する能力を測定した。ヒト骨髄細胞の培養物に試験ペプチドを加え、細胞を 16 日間インキュベートする。その後、赤血球コロニーの数をカウントした。形成されたコロニーの数が、EPO を用いて観察されたものと比較して最大の 90% である試験ペプチドの濃度を EC90 と記録した。

40

【0255】

【表 2】

化合物	レポーターアッセイ EC ₅₀ (nM)	増殖アッセイ EC ₅₀ (nM)	C/BFUEアッセイ EC ₉₀ (nM)
実施例8ペプチド (非PEG化)	0.022	0.22	0.026
実施例11ペプチド (非PEG化)	0.14	0.23	-
化合物III (実施例8)	0.20	0.14	-
化合物IV (実施例10)	0.32	0.19	-
化合物V (実施例11)	0.69	0.44	1.3
化合物XIII (実施例19)	0.70	0.36	-
化合物I (実施例3)	0.37	0.22	1.2

10

【0256】

5. 赤血球増加症のエクスハイポキシック (exhypoxic) マウスバイオアッセイ

試験ペプチドを、CotesおよびBangham (1961年)、Nature 191: 1065~1067頁によって記載された方法から適応させた、赤血球増加症のエクスハイポキシックマウスバイオアッセイにおいて *in vivo* 活性についてアッセイする。このアッセイでは、試験ペプチドの、EPOミメティックとして機能する、すなわち、EPO-Rを活性化し、新規赤血球合成を誘導する能力を調べる。赤血球合成は、放射標識された鉄の、合成された赤血球のヘモグロビンへの組み込みに基づいて定量する。

20

【0257】

BDF1マウスには、7~10日間周囲条件に順応することを許す。すべての動物について体重を調べ、低体重の動物 (<15グラム) は使用しない。マウスを、減圧チャンバー中で合計14日間連続的コンディショニングサイクルに付す。各24時間のサイクルは、0.40±0.02%大気圧で18時間および周囲圧力で6時間からなる。コンディショニング後、マウスを周囲圧力でさらに72時間維持し、その後、投与する。

【0258】

試験ペプチド、または組換えヒトEPO標準を、PBS+0.1%BSAビヒクル (PBS/BSA) で希釈する。まず、ペプチド単量体保存溶液をジメチルスルホキシド (DMSO) 中で可溶化する。陰性対照群は、PBS/BSAを単独で注射された1つの群のマウス、1% DMSOを注射された1つの群を含む。各投与群は、10匹のマウスを含む。マウスには、0.5 mLの適当なサンプルを用いて皮下注射 (首筋) する。

30

【0259】

サンプル注射の48時間後、約0.75 μキュリー/マウスの用量のために、0.2 mLのFe⁵⁹ (Dupont, NEN) の腹膜内注射をマウスに投与する。マウス体重は、Fe⁵⁹の投与の24時間後に調べ、マウスをFe⁵⁹の投与の48時間後に屠殺する。心臓穿刺によって、各動物から血液を採取し、ヘマトクリットを調べる (ヘパリンを抗凝固剤として用いた)。各血液サンプル (0.2 mL) を、Packardガンマカウンターを用いてFe⁵⁹取り込みについて分析する。ノンレスポンドマウス (すなわち、陰性対照群よりも少ない放射性取り込みを有するマウス) は、適切なデータセットから排除する。陰性対照群の53%よりも低いヘマトクリット値を有するマウスも排除する。

40

【0260】

6. ヘモグロビンおよび網状赤血球 (reticulocyte) アッセイ

正常赤血球の (Normocythemic) 雄のSprague-Dawleyラットに、リン酸バッファー中、pH 6.0で製剤された試験ペプチドを用い、10 mg/kg (静脈内に注射された、10 mg/mL溶液の1 mL/kg注射) で投与した。5、9、14、19、23、28、34、43および57日で、血液サンプルを採取し、ヘモグロビンレベルを測定した。図1~4は、実施例3のペプチドと比較した、選択された実施例のペプチドについての、経時的なヘモグロビンの上昇を示す。

50

【 0 2 6 1 】

また、各血液サンプルの網状赤血球パーセント（％）を、チアゾールオレンジ染色およびフローサイトメーター分析（retic-countプログラム）によって調べた。図5～8は、実施例3のペプチドと比較して、選択された実施例のペプチドについて、経時的に観察される網状赤血球パーセントの上昇を示す。

【 0 2 6 2 】

雄のSprague-Dawleyラットにおける観察される網状赤血球パーセント（Ret％）およびヘモグロビン（Hgb）の変化は、化合物XVおよびXVIについて測定した。正常赤血球の雄のSprague-Dawleyラットに、リン酸バッファー中、pH6.0で製剤された試験ペプチドを用い、10mg/kg（静脈内にまたは皮下に注射された、10mg/mL溶液の1mL/kg注射）で投与した。5、9、14、19、23、28、34、43および57日目に、血液サンプルを採取した。各血液サンプルの網状赤血球パーセント（％）は、チアゾールオレンジ染色およびフローサイトメーター分析（retic-countプログラム）によって調べた。これらの結果は、化合物XVIについては図9に、化合物XVについては図10に示されている。ヘモグロビンレベルは、これらの時点で測定し、化合物XVIについては図11に、化合物XVについては図12に示されている。

【 0 2 6 3 】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態による範囲に制限されない。実際、本明細書に記載されるものに加え、本発明の種々の修飾は、以上の説明および付随する図から当業者に明らかになろう。このような修飾は、添付の特許請求の範囲内に入るものとする。

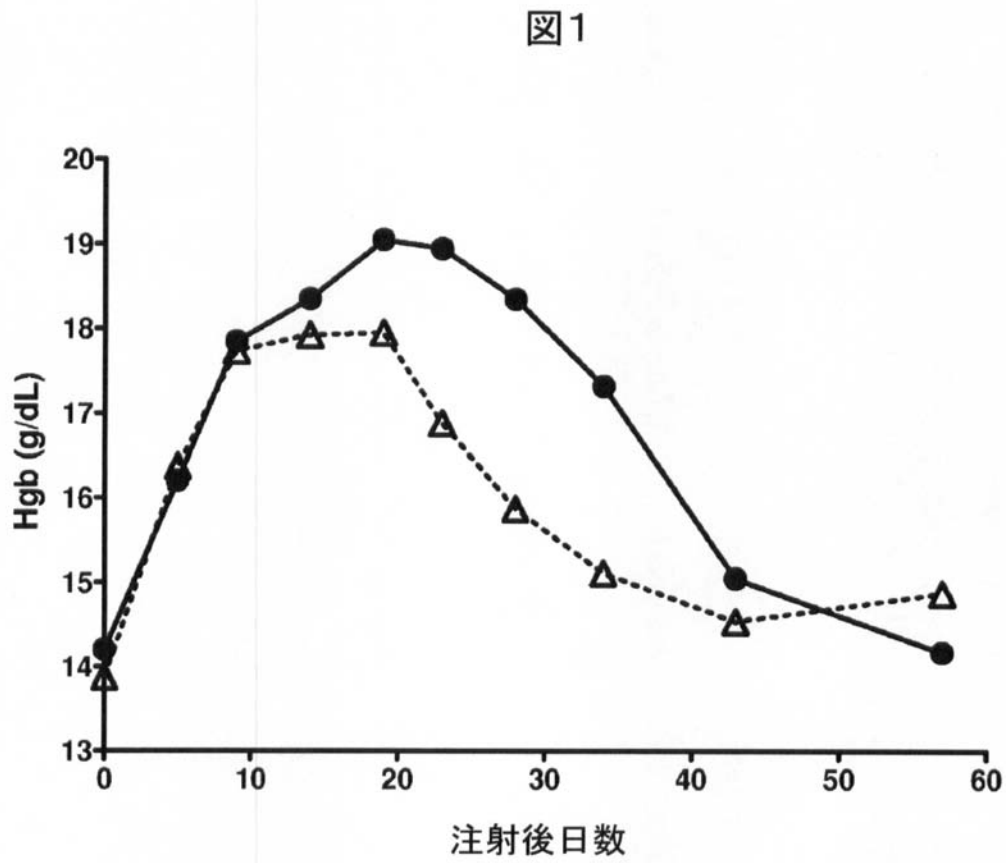
【 0 2 6 4 】

特許、特許出願、プロトコールおよび種々の刊行物をはじめ、多数の参考文献が列挙され、本発明の説明に論じられている。このような参考文献の引用および／または議論は、単に、本発明の説明を明確にするために提供されるのであって、このような参考文献のいずれも、本明細書に記載される本発明の「先行技術」であるということの承認ではない。この明細書に列挙され、論じられるすべての参考文献は、参照によってその全文が、また、各参考文献が参照により個別に組み込まれる場合には同程度に本明細書に組み込まれる。

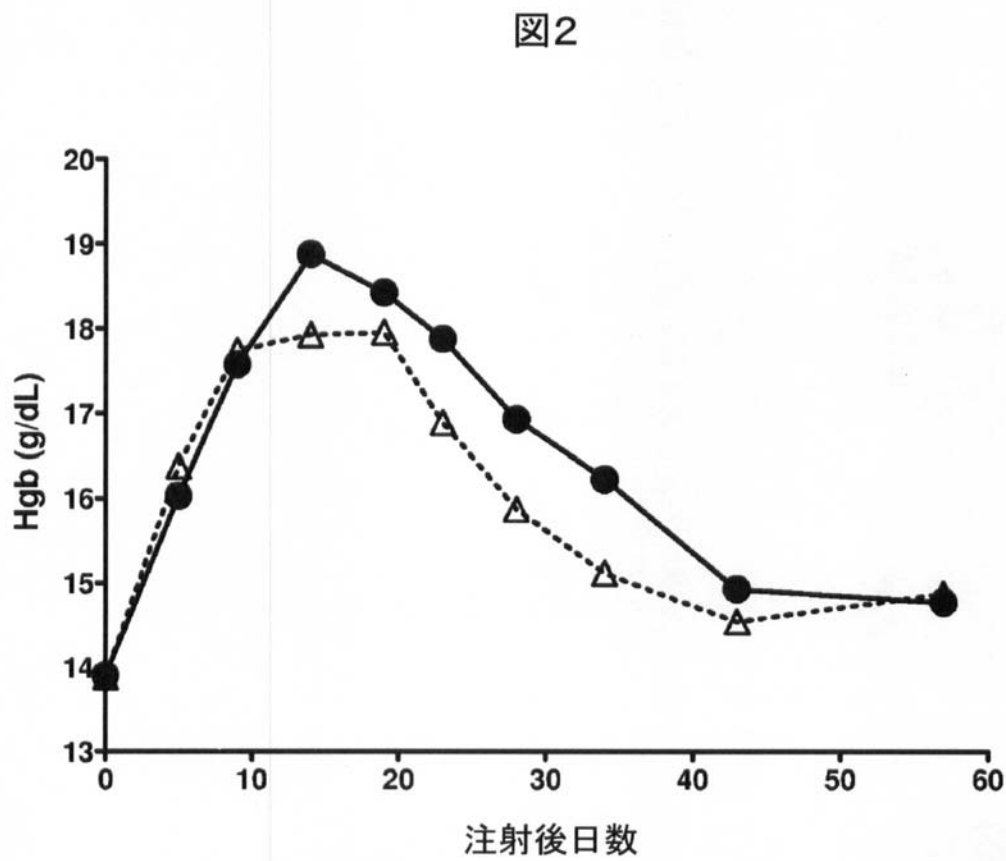
10

20

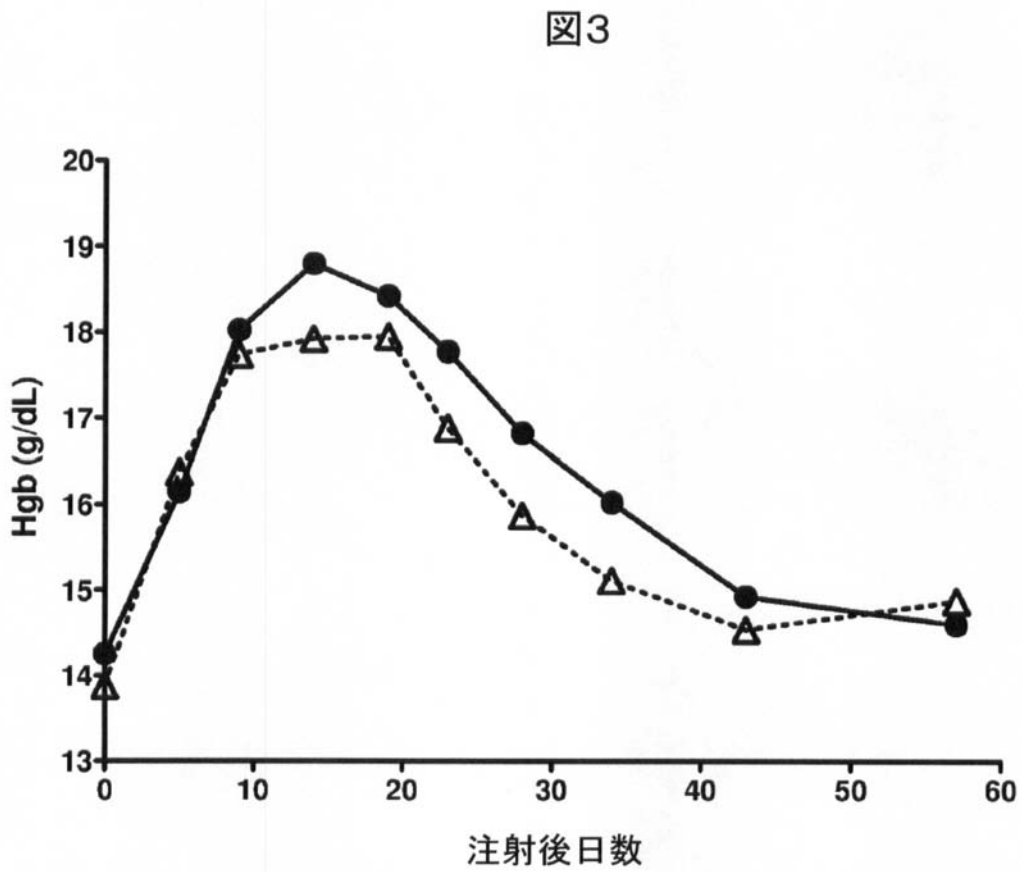
【図1】



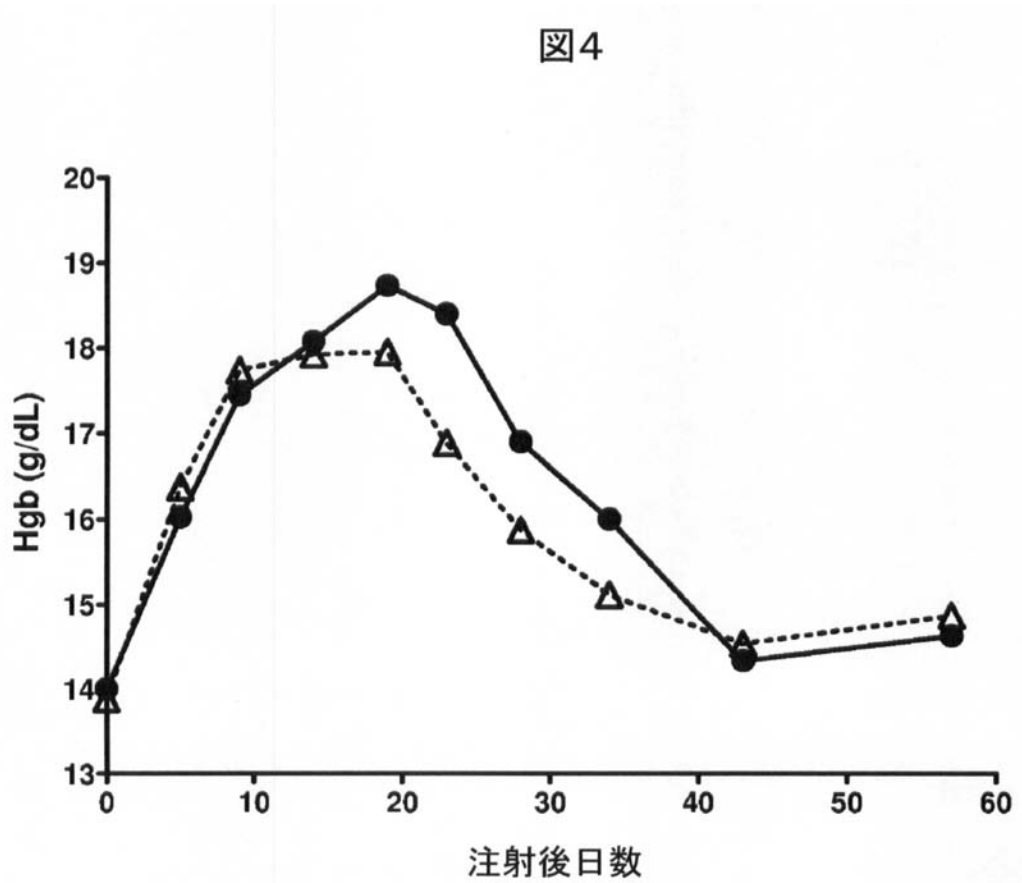
【図2】



【 図 3 】

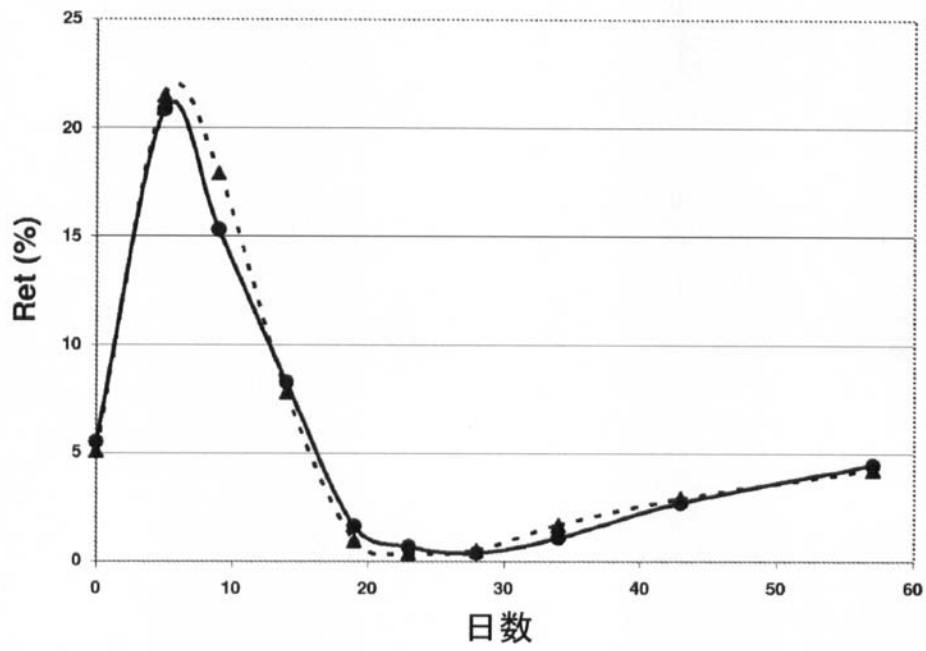


【 図 4 】



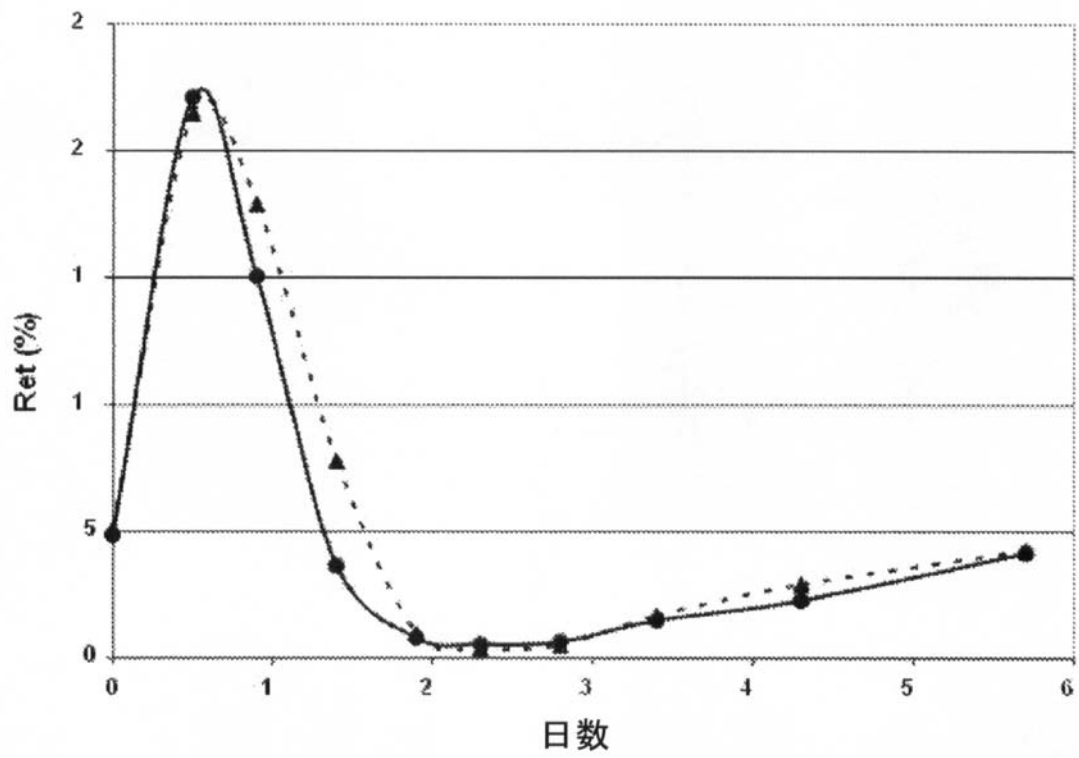
【 図 5 】

図5



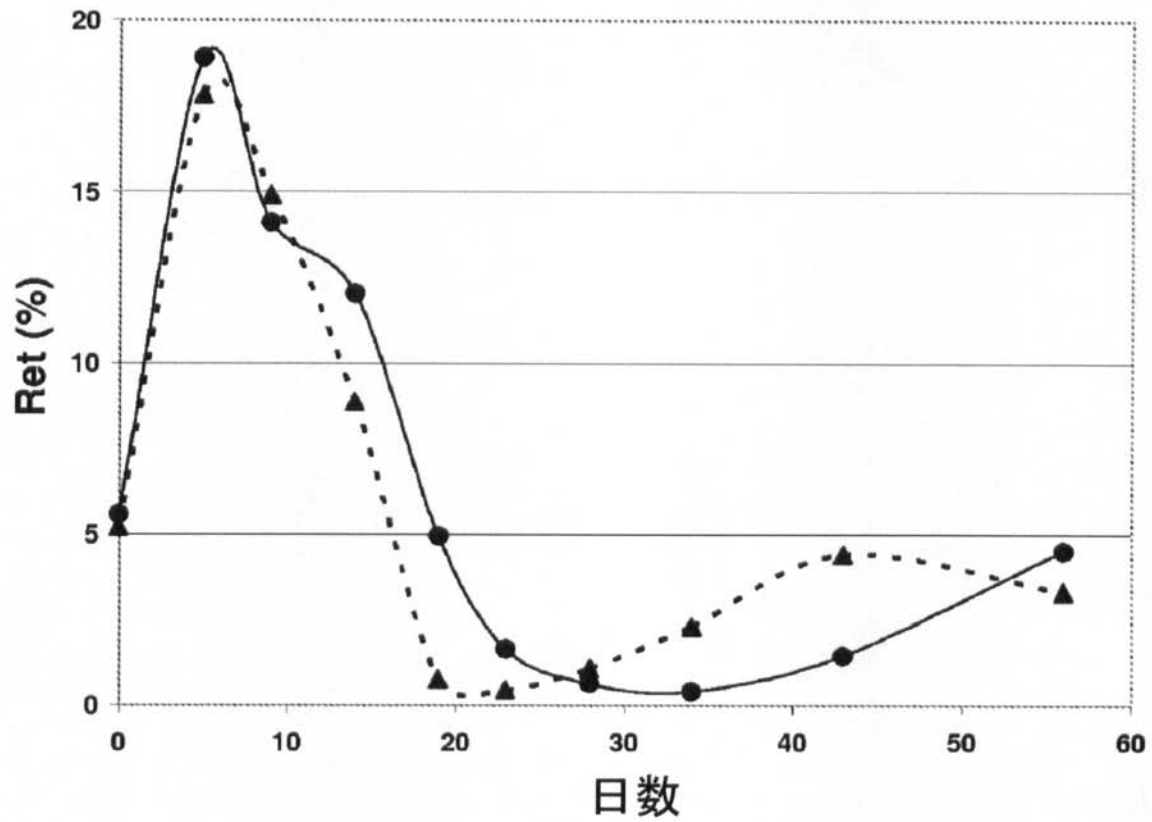
【 図 6 】

図6



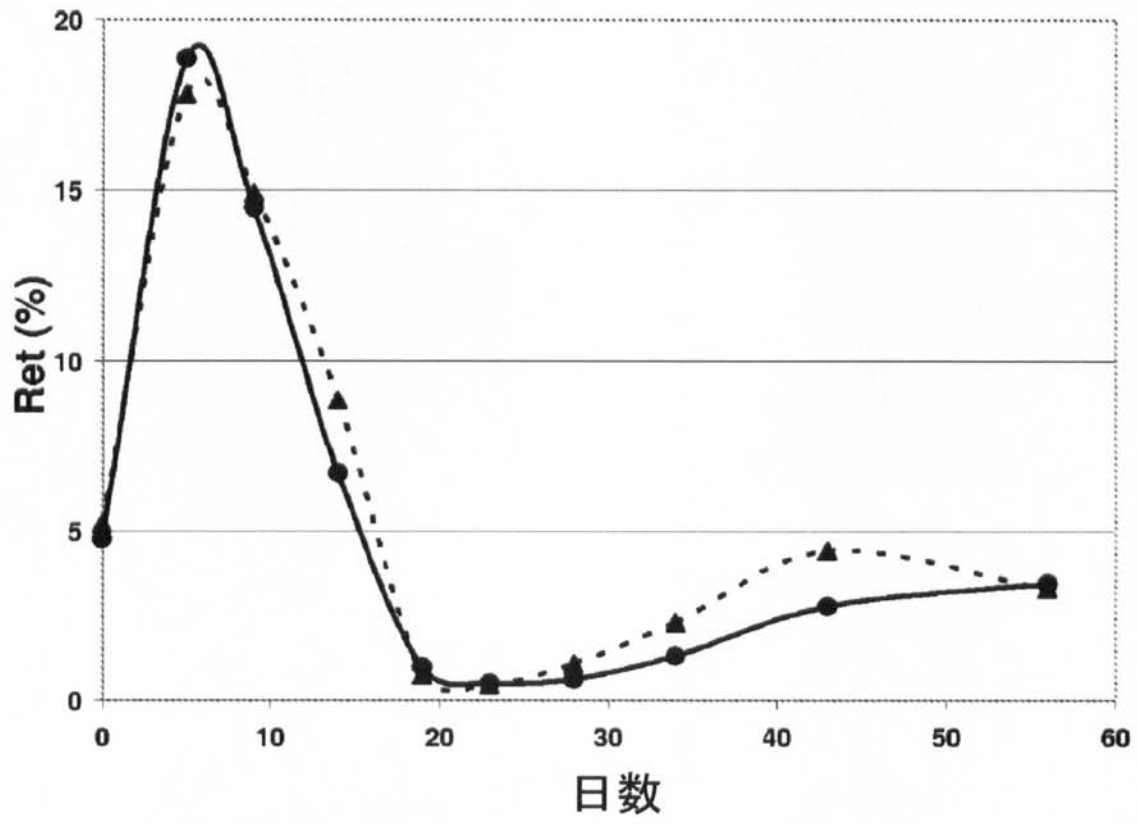
【図 7】

図7



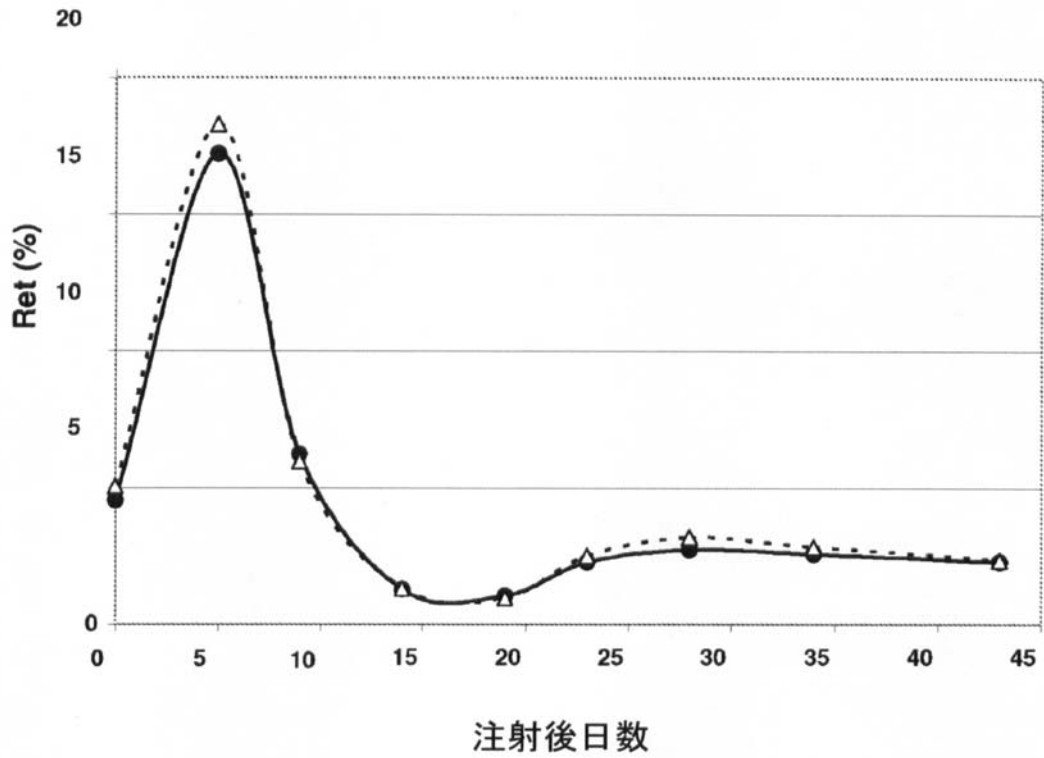
【図 8】

図8



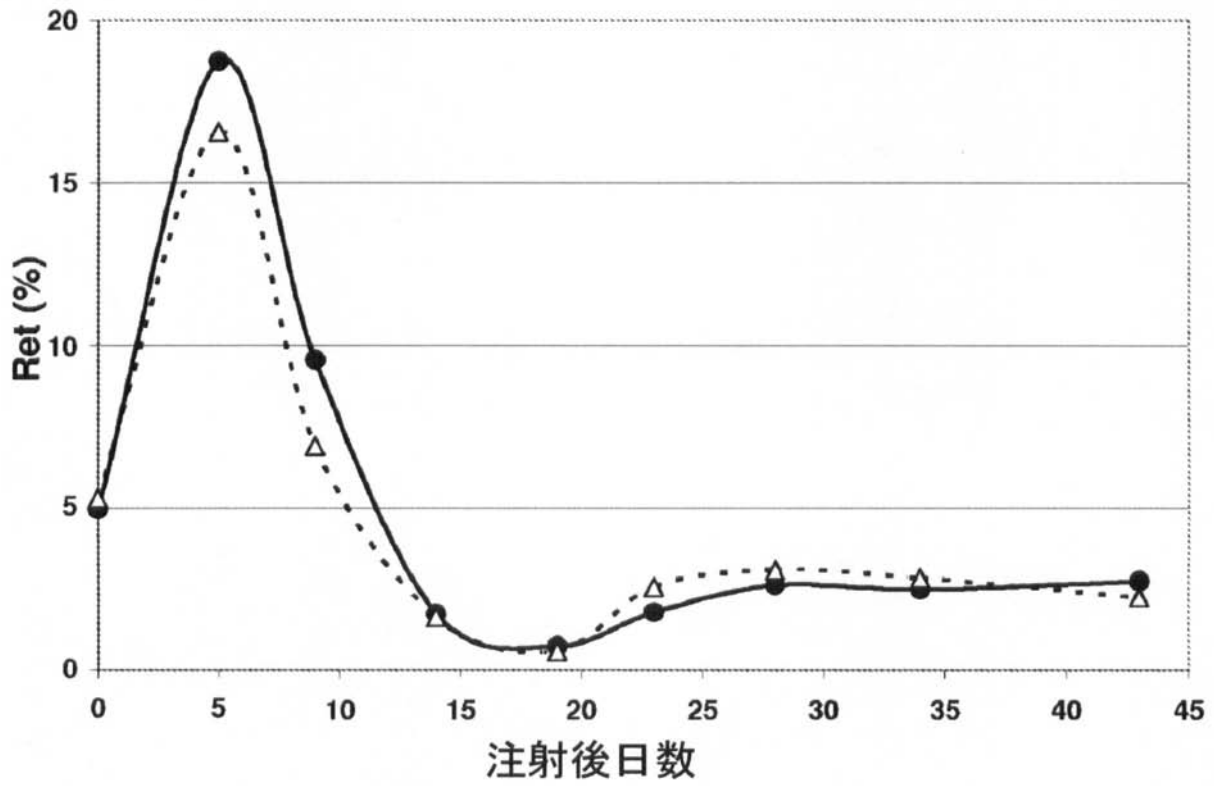
【 図 9 】

図9



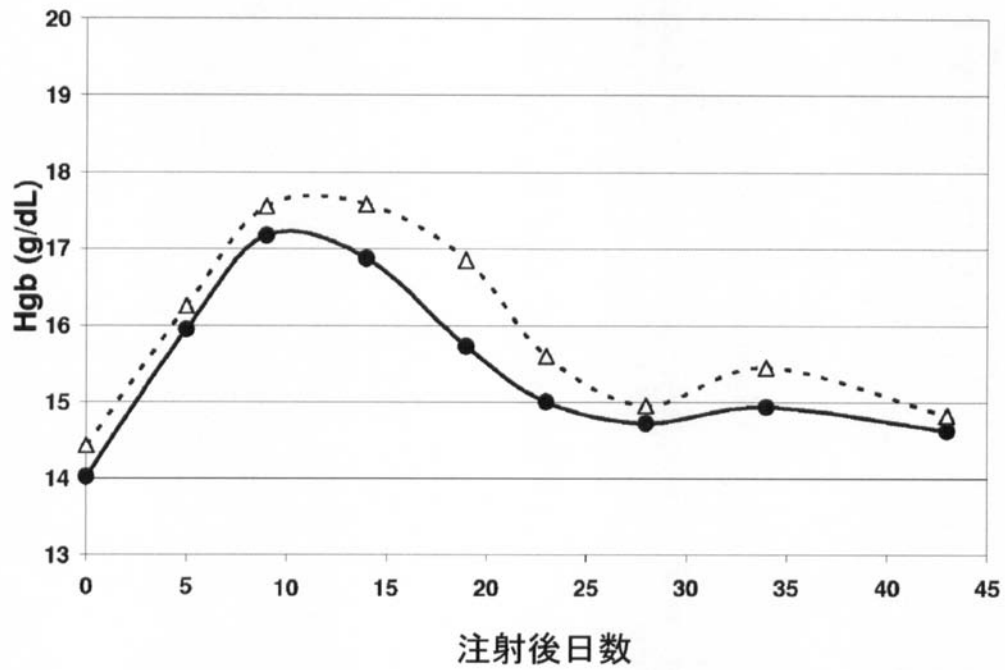
【図 10】

図10



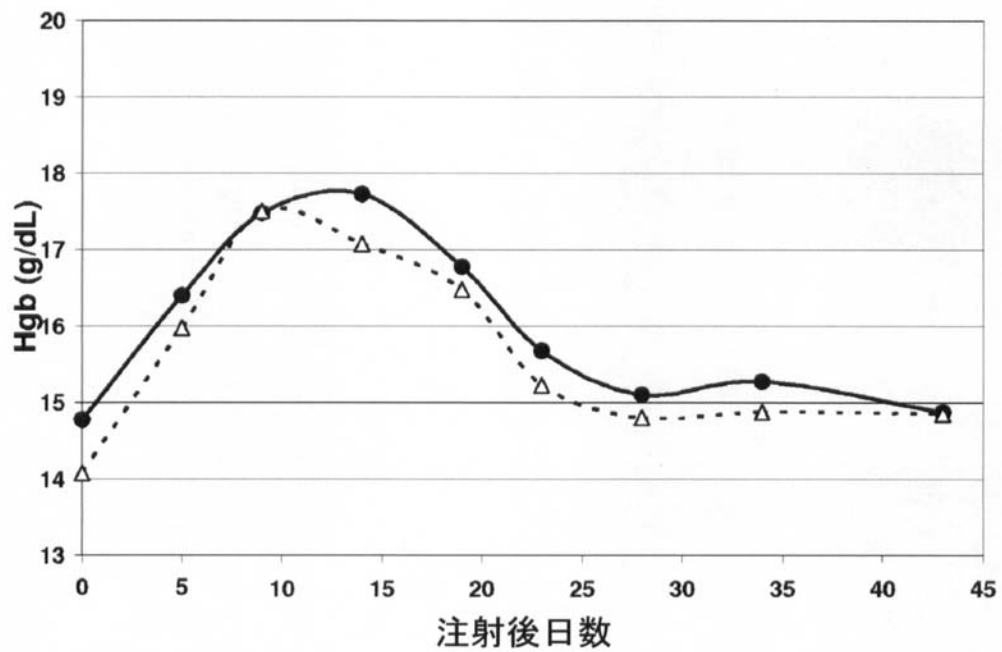
【図 1 1】

図11



【図 1 2】

図12



【配列表】

[2010520855000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)		A 6 1 P 7/06	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)		A 6 1 K 47/34	
		A 6 1 P 43/00 1 2 3	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ホームズ, クリストファー, ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 7 0, サラトガ, ウェストバー ドライブ 1 3 6 3
3

(72)発明者 チャクラバーティ, アンジャン
シンガポール共和国 1 1 7 5 2 5, シンガポール サイエンス パーク サード, ナンバー 0 5
0 1 ガレン, サイエンス パーク ロード 6 1

(72)発明者 フレデリック, ブライアン, ティー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 0 5, ベン ロモンド, グレン アーバー ロード
8 4 7 0

(72)発明者 バン, イージュン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7, ユニオン シティ, トーレー パイン レーン
3 4 2 8 6

(72)発明者 ドン, ヤオファー, エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 0 7, サン フランシスコ, ユニット ビー, ウィス
コンシン ストリート 8 7 8

(72)発明者 アショーカ, バンダリ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 1 4, クパチーノ, ガーデンサイド レーン 1 1 8
7

F ターム(参考) 4C076 AA94 BB01 BB11 BB21 CC14 CC42 EE23A EE59A FF32
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA18 BA19 BA26 BA37 CA59
DB56 MA13 MA16 MA17 MA22 MA23 MA24 MA35 MA36 MA37
MA38 MA41 MA43 MA44 MA52 MA55 MA56 MA60 MA66 NA12
NA14 NA15 ZA511 ZA512 ZA551 ZA552 ZC191 ZC192
4H045 AA10 BA10 BA11 BA12 BA13 BA16 BA41 BA57 EA24 EA28
FA33 FA74

【要約の続き】

【選択図】なし