

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6814754号
(P6814754)

(45) 発行日 令和3年1月20日(2021.1.20)

(24) 登録日 令和2年12月23日(2020.12.23)

(51) Int. Cl.	F I
C 0 7 K 7/02 (2006.01)	C O 7 K 7/02 Z N A
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
請求項の数 7 (全 26 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2017-567791 (P2017-567791)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月21日 (2016. 7. 21)
 (65) 公表番号 特表2018-523636 (P2018-523636A)
 (43) 公表日 平成30年8月23日 (2018. 8. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/067447
 (87) 国際公開番号 W02017/016982
 (87) 国際公開日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)
 審査請求日 令和1年7月17日 (2019. 7. 17)
 (31) 優先権主張番号 15178162. 2
 (32) 優先日 平成27年7月24日 (2015. 7. 24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (73) 特許権者 517450024
 ロシュ・ニンブルゲン・インコーポレイテ
 ッド
 ROCHE NIMBLEGEN, INC
 .
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 19、マディソン、サウス・ローサ・ロー
 ド 500
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BACE1阻害剤ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂x TFA、
 1 H-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu- Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH
 2、
 Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂x
 3TFA、
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH 10
 2x 3TFA、
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂x
 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-N
 H₂x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-
 NH₂x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂
 x 3TFA、

- Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 2TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA、
 Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA、
 H-Tyr-Pro-DLys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 H-Tyr-Pro-Tyr-DLys-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Biotin-PEG2-Cys-PEG8-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Biotin-PEG2-Cys-PEG3-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、及び
 H-Gly-Gly-Gly-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA
 からなる群より選択される化合物又はその薬学的に許容し得る塩である、二重部位 B A C E 1 阻害剤。
- 【請求項 2】**
 化合物が、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA、
 1 H-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2、
 Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x

- 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 2TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA、
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA、及び
 Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA
 からなる群より選択される、請求項 1 記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤。
 【請求項 3】
 薬学的に許容し得る塩がトリフルオロアセタートである、請求項 1 又は 2 記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤。
 【請求項 4】
 治療活性物質として使用するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤。
 【請求項 5】
 上昇した - アミロイドレベル及び / 又は - アミロイドオリゴマー及び / 又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための治療活性物質として使用するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤。
 【請求項 6】
 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤並びに薬学的に許容し得る担体及び / 又は薬学的に許容し得る補助物質を含む医薬組成物。
 【請求項 7】

10

20

30

40

50

上昇した - アミロイドレベル及び/又は - アミロイドオリゴマー及び/又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び/又は予防的処置のための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、二重 B A C E 1 阻害特性を有するペプチド、その製造、それを含有する医薬組成物及び治療活性物質としてのその使用に関する。

【0002】

10

技術分野

本化合物は、A s p 2 (- セクレターゼ、B A C E 1 又はメマブシン - 2) 阻害活性を有し、したがって、上昇した - アミロイドレベル及び/又は - アミロイドオリゴマー及び/又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び/又は予防的処置に使用され得る。

【0003】

背景技術

アルツハイマー病 (A D) は、中枢神経系の神経変性障害であり、そして高齢者人口における進行性認知症の主な原因である。その臨床症状は、記憶、認知、時間及び場所の見当識、判断力並びに論理的思考の機能障害であるが、また重度の情緒障害でもある。現在のところ、この疾患又はその進行を防ぐか、あるいはその臨床症状を安定に回復させることができる利用可能な処置法は存在しない。A D は、高い平均余命を持つ全ての社会において主要な健康問題になっており、そしてまたそれらの医療制度にとって重大な経済的負担にもなっている。

20

【0004】

B A C E 1 酵素は、アルツハイマー病関連 A - ペプチドの生成をもたらす A P P タンパク質のタンパク質分解性切断のうち 1 つを担っている。B A C E 1 酵素の阻害により A - ペプチドの産生を遅延又は停止させることは、有望な治療概念である。

【0005】

活性部位指向型 B A C E 1 阻害剤は、例えば国際公開公報第 2 0 0 6 / 0 0 2 9 0 7 号に記載されており、エキソサイト指向型 (触媒ドメイン) B A C E 1 阻害剤は、例えば Kornacker et al., Biochemistry 2005, 44, 11567-73 に記載されている。さらに、Linning, Organic & Biomolecular Chemistry 10(41), 2012, p8216、国際公開公報第 2 0 0 5 0 9 7 1 9 9 号、US2007149763 及び国際公開公報第 2 0 1 3 0 5 6 0 5 4 号は、ペプチド構造を有する B a c e 1 阻害剤を記載している。

30

【0006】

発明の詳細な説明

本発明の目的は、B A C E 1 酵素の酵素活性部位及び触媒ドメインの両方に結合する二重部位 B A C E 1 阻害剤、前述の化合物の調製、それを含有する医薬及びその製造、並びにアルツハイマー病などの、B A C E 1 活性の阻害に関連する疾患及び障害の治療的及び/又は予防的処置における前述の化合物の使用である。その上、神経組織 (例えば、脳) 内、その上又はその周囲における - アミロイド斑の形成、又は形成及び沈着は、本化合物により、A P P 又は A P P フラグメントからの A 産生を阻害することによって阻害される。

40

【0007】

本明細書に使用される一般用語の以下の定義は、問題となる用語が単独で又は他の基と組み合わせて出現するかにかかわらず適用される。

【0008】

【表1】

アミノ酸	3文字表記	1文字表記
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

表1: 本明細書に使用されるアミノ酸の略号

表2: 本明細書に使用されるアミノ酸の略号

【0009】

用語「Sta」は、スタチン、(3S, 4S)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸 (CAS49642-07-1) を表す。

【0010】

用語「MetSta」は、(3S, 4S)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルチオヘキサン酸 (CAS n/a) (Fmoc保護型のCAS:268542-18-3) を表す。

【0011】

用語「PEG(4)」は、15-アミノ-4, 7, 10, 13, テトラオキサペンタデカン酸 (CAS:n/a) (Fmoc保護型のCAS:557756-85-1) を表す。

【0012】

用語Leu*Alaは、「Tang」ヒドロキシエチレンジペプチドアイソスターを表す(参考文献: A. K. Ghosh, D. Shin, D. Downs, G. Koelsch, X. Lin, J. Ermoloeff and J. Tang, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 3522)。

【0013】

用語「PEG2」は、8-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸 (CAS:n/a) (Fmoc保護型のCAS:166108-71-0) を表す。

【0014】

用語「PEG3」は、12-アミノ-4, 7, 10-トリオキサドデカン酸 (CAS:n/a

10

20

30

40

50

)、F m o c 保護型のCAS:867062-95-1)を表す。

【0015】

用語「薬学的に許容し得る塩」は、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するために適切な塩を表す。無機酸及び有機酸との適切な塩の例は、非限定的に、酢酸、クエン酸、ギ酸、フマル酸、塩酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、硝酸、リン酸、p - トルエンスルホン酸、コハク酸、硫酸 (sulfuric acid、sulphuric acid)、酒石酸、トリフルオロ酢酸 (T F A) などである。特定の塩は、トリフルオロ酢酸塩である。

【0016】

用語「薬学的に許容し得る担体」及び「薬学的に許容し得る補助物質」は、製剤の他の成分と適合性の希釈剤又は賦形剤などの担体及び補助物質を表す。

10

【0017】

用語「医薬組成物」は、特定の成分を予め決定された量又は比率で含む産物、及び特定の成分を特定の量で組み合わせることに直接又は間接的に起因する任意の産物を包含する。好ましくは、医薬組成物は、1つ以上の活性成分及び不活性成分を含む任意の担体を含む産物、並びに成分のうち任意の2つ以上の組合せ、複合体化若しくは凝集に、又は成分のうち1つ以上の解離に、又は成分のうち1つ以上の他の種類の反応若しくは相互作用に、直接又は間接的に起因する任意の産物を包含する。

【0018】

用語「最大半値阻害濃度」(IC_{50})は、インビトロで生物学的過程の50%阻害を得るために必要な特定の化合物の濃度を意味する。 IC_{50} 値は、 pIC_{50} 値 ($-log IC_{50}$) に対数変換することができ、 pIC_{50} においてより高い値は、指数関数的により高い効力を示す。 IC_{50} 値は、絶対値ではないが、実験条件、例えば採用された濃度に依存する。 IC_{50} 値は、Cheng-Prusoffの式を用いて絶対阻害定数 (K_i) に変換することができる (Biochem. Pharmacol. (1973) 22:3099)。用語「阻害定数」(K_i)は、受容体に対する特定の阻害剤の絶対結合親和性を意味する。それは、競合結合アッセイを用いて測定され、競合リガンド (例えば放射性リガンド) が存在しなかったならば特定の阻害剤が受容体の50%を占有する濃度に等しい。 K_i 値は、より高い値が指数的により大きな効力を示す、 pK_i 値 ($-log K_i$) に対数変換することができる。

20

【0019】

「治療有効量」は、病状を処置するために対象に投与された場合に、その病状についてそのような処置をもたらすために十分な化合物の量を意味する。「治療有効量」は、化合物、処置されている病状、処置される重症度又は疾患、対象の年齢及び相対的な健康状態、投与経路及び投与形態、担当の医師又は獣医の判断、並びに他の要因に応じて変動する。

30

【0020】

変数を参照する場合の用語「本明細書に定義される」及び「本明細書に記載される」は、もしあれば、その変数の広い定義、並びに好ましい、より好ましい及び最も好ましい定義を参照により組み入れるものである。

【0021】

化学反応を参照する場合の用語「処置する」、「接触させる」及び「反応させる」は、表示された及び/又は所望の産物を産生するために適切な条件で2つ以上の試薬を添加又は混合することを意味する。表示された及び/又は所望の産物を産生する反応は、最初に添加された2つの試薬の組合せに必ずしも直接的に起因するわけではない場合があること、すなわち最終的に表示された及び/又は所望の産物の形成に至る混合物中に産生される1つ以上の中間体があり得ることが認識されるべきである。

40

【0022】

本発明は、また、医薬組成物、前述の化合物を使用する方法、及びそれを調製する方法を提供する。

【0023】

全ての別々の実施態様を組み合わせることができる。

50

【 0 0 2 4 】

本発明は、B A C E 1 酵素の酵素活性部位及び触媒ドメインの両方に結合する二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 2 5 】

エキソサイトモチーフ及びスタチン型遷移状態ミメティックを含有する活性部位阻害剤は、単独ではB A C E 1 の阻害を示さない。

【 0 0 2 6 】

本発明のある特定の実施態様は、B A C E 酵素の酵素活性部位及び触媒ドメインの両方に結合する、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤であって、エキソサイト阻害部分 (A ') が、リンカー (L ') により該 B A C E 1 阻害剤の活性部位阻害部分 (B ') に結合している二重部位 B A C E 1 阻害剤、又はその薬学的に許容し得る塩に関する。

10

【 0 0 2 7 】

本発明のある特定の実施態様は、L ' が、
 i . - (G l y) _x - [式中、x は 3 である]、
 i i . P E G (4)、及び
 i i i . - G l y - D L y s - G l y -
 からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 2 8 】

本発明のある特定の実施態様は、A ' が、

【 0 0 2 9 】

20

【化 1】

- i. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- ii. Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- iii. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-,
- iv. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-,
- v. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-DLys-Leu- 10
- vi. Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-,
- vii. Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Gln-Gly-
- viii. Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-,
- ix. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-,
- x. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys, 20
- xi. DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- xii. H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-,
- xiii. H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-,
- xiv. H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- xv. Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-.
- xvi. H-Tyr-DLys-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-, 30
- xvii. H-Tyr-Pro-DLys-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- xviii. H-Tyr-Pro-Tyr-DLys-Ile-Pro-Leu-,
- xix. Biotin-PEG2-Cys-PEG8-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-,
- xx. Biotin-PEG2-Cys-PEG3-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-, 及び
- xxi. H-Gly-Gly-Gly-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-. 40

からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明のある特定の実施態様は、A' が、

【 0 0 3 1 】

【化2】

- i. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- ii. Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-,
- iii. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-,
- iv. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-,
- v. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-DLys-Leu- 10
- vi. Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-,
- vii. Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Gln-Gly-
- viii. Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-,
- ix. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-,
- x. Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys, 20
- xi. DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-, 及び
- xii. H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-.
- xiii. H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-,
- xiv. H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-, 及び
- xv. Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-.

30

からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【0032】

本発明のある特定の実施態様は、B'が、

【0033】

【化3】

- i. -Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
- ii. -Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂,
- iii. -Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂, 40
- iv. -Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂, 及び
- v. Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂.

からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【0034】

本発明のある特定の実施態様は、

【0035】

【化4】

- Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA
 1 H-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu- Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 10
 3TFA,
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Gln-Gly-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 20
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 30
 2TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA, 40
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 2TFA,
 Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH₂ x
 2TFA,
 H-Tyr-DLys-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,

H-Tyr-Pro-DLys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
H-Tyr-Pro-Tyr-DLys-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
Biotin-PEG2-Cys-PEG8-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-
Ala-Glu-DPro-NH₂,
ビオチン-PEG2-Cys-PEG3-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-
Ala-Glu-DPro-NH₂, 及び
H-Gly-Gly-Gly-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-
DPro-NH₂ x 3TFA.

10

からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 3 6 】

本発明のある特定の実施態様は、

【 0 0 3 7 】

【化5】

Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA,
 1 H-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu- Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Lcu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 10
 3TFA,
 Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Gln-Gly-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 20
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x 30
 2TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 2TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH₂ x TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA,
 Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x 3TFA, 40
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 3TFA,
 H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH₂ x
 2TFA, 及び
 Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH₂ x
 2TFA.

からなる群より選択される、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【0038】

50

本発明のある特定の実施態様は、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤であって、薬学的に許容し得る塩がトリフルオロアセタートである二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 3 9 】

本発明のある特定の実施態様は、治療活性物質として使用するための本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 0 】

本発明のある特定の実施態様は、B A C E 1 活性の阻害剤として使用するための本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 1 】

発明のある特定の実施態様は、上昇した - アミロイドレベル及び / 又は - アミロイドオリゴマー及び / 又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための治療活性物質として使用するための本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 2 】

本発明のある特定の実施態様は、アルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための治療活性物質として使用するための本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 3 】

本発明のある特定の実施態様は、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤並びに薬学的に許容し得る担体及び / 又は薬学的に許容し得る補助物質を含む医薬組成物に関する。

【 0 0 4 4 】

本発明のある特定実施態様は、B A C E 1 活性の阻害に使用するための医薬を製造するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 5 】

本発明のある特定の実施態様は、上昇した - アミロイドレベル及び / 又は - アミロイドオリゴマー及び / 又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための医薬を製造するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 6 】

本発明のある特定の実施態様は、アルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための医薬を製造するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 7 】

本発明のある特定の実施態様は、B A C E 1 活性の阻害に使用するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 8 】

本発明のある特定の実施態様は、上昇した - アミロイドレベル及び / 又は - アミロイドオリゴマー及び / 又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、特にアルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置に使用するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 4 9 】

本発明のある特定の実施態様は、アルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置に使用するための、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤に関する。

【 0 0 5 0 】

本発明のある特定の実施態様は、B A C E 1 活性の阻害に使用するための、特に、上昇した - アミロイドレベル及び / 又は - アミロイドオリゴマー及び / 又は - アミロイド斑及びさらなる沈着物によって特徴付けられる疾患及び障害、アルツハイマー病の治療的及び / 又は予防的処置のための方法であって、本明細書記載の二重部位 B A C E 1 阻害剤をヒト又は動物に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

その上、本発明は、全ての光学異性体、すなわちジアステレオ異性体、ジアステレオマー混合物、ラセミ混合物、それらの対応する鏡像異性体全て及び／又は互変異性体並びにそれらの溶媒和物を含む。

【0052】

二重部位BACE1阻害剤は、本明細書記載のように調製され得る。出発物質は市販されている場合があり、又は公知の方法により調製される場合がある。

【0053】

酸との対応する薬学的に許容し得る塩は、当業者に公知の標準的な方法によって、例えば、二重部位BACE1阻害剤を例えばジオキサン又はTHFなどの適切な溶媒中に溶解させること、及び適切な量の対応する酸を添加することによって得ることができる。産物は、通常、濾過又はクロマトグラフィーによって単離することができる。塩基を用いた二重部位BACE1阻害剤の薬学的に許容し得る塩への変換は、そのような塩基を用いたそのような化合物の処理によって実施することができる。そのような塩を形成させる可能な一方法は、例えば、適切な溶媒（例えばエタノール、エタノール-水混液、テトラヒドロフラン-水混液）中の化合物溶液に、例えばM(OH)_n [式中、M = 金属陽イオン又はアンモニウム陽イオン、n = 水酸化物陰イオンの数]などの1/n当量の塩基性塩を添加し、蒸発又は凍結乾燥によって溶媒を除去することによる。

【0054】

それらの調製が実施例に記載されていない限り、二重部位BACE1阻害剤及び全ての中間産物は、類似の方法又は本明細書記載の方法に従って調製することができる。出発物質は市販されている、当技術分野において公知である、又は当技術分野において公知若しくはそれに類似の方法によって調製することができる。

【0055】

親化合物にインピボで戻り変換することが可能な誘導体を提供するために、本発明における二重部位BACE1阻害剤が官能基で誘導体化される場合があることが認識されている。

【0056】

薬理学的試験

二重部位BACE1阻害剤及びその薬学的に許容し得る塩は、貴重な薬理学的特性を有する。本発明の化合物は、BACE1活性の阻害に関連することが見出された。化合物は、本明細書下記の試験に従って研究された。

【0057】

細胞A 低下アッセイ法：

ヒトAPP_{wt}遺伝子(APP695)のcDNAを発現しているベクターを安定的にトランスフェクションされたヒトHEK293細胞を使用して、細胞アッセイ法で化合物の効力を評価した。細胞を細胞培養培地(10%(v/v)ウシ胎仔血清、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン添加イスコフ)中で96ウェルマイクロタイタープレート中に約80%の集密度に蒔き、FCS不含の8% DMSO(DMSOの終濃度を0.8%v/vに保った)含有培地1/10体積中に10x濃度の化合物を添加した。加湿インキュベーターに入れて37℃及び5%CO₂で18~20時間インキュベーション後に、A₄₀濃度の決定のために培養上清を採集した。A₄₀のC末端を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて96ウェルELISAプレート(例えば、Nunc MaxiSorb)をコーティングした(Brockhaus et al., NeuroReport 9, 1481-1486; 1998)。例えば1%BSAで非特異的結合部位をブロッキングし、洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合型A₄₀検出用抗体(例えば、抗体4G8、Senetek, Maryland Heights, MO)と一緒に培養上清を適切に希釈して添加し、5~7時間インキュベートした。続いて、0.05%ツイーン20を含有するトリス緩衝塩類溶液でマイクロタイタープレートのウェルを徹底的に洗浄し、クエン酸緩衝液中でテトラメチルベンジジン/H₂O₂を用いてアッセイ物を呈色させた。1体積の1N H₂SO₄を用いて反応を停止させた後、ELISAリーダーにより波長450nmで反応を測定した。公知量の純粋なA₄₀ペプチド

10

20

30

40

50

を用いて得られた標準曲線から培養上清中の A 濃度を計算した。

【 0 0 5 8 】

【表 2】

実験	名称	系統名	MW	IC 50 (μ M)
1	YPYFIPL-PEG(4)- EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu- PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala- Glu-DPro-NH ₂ x TFA	2168.4	0.0027
2	YPYFIPL-GGG-EVN- Sta-VAEp- NH ₂ x TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly- Gly-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala- Glu-DPro-NH ₂ x TFA	2092.27	0.42
3	YPYFIPL-GkG-EVN- Sta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly- DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val- Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 2TFA	2277.41	0.094

4	YPKFIPL-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2356.44	0.28	
5	YPYFIPk-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2406.45	0.019	
6	YPYFKPA-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2364.37	0.046	
7	YPYFIPL-PEG(4)-EVN-MetSta-VAEf- NH ₂ x TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH ₂ x TFA	2236.5	0.43	10
8	YPYFIPL-PEG(4)-EVN-MetSta-VAEP- NH ₂ x TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH ₂ x TFA	2186.44	0.017	
9	YPYFIPL-GGG-EVN-MetSta-VAEP- NH ₂ x TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-Gly-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH ₂ x TFA	2110.31	1.34	
10	YPYFIPL-GkG-EVN-MetSta-VAEP- NH ₂ x 2TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH ₂ x 2TFA	2295.45	0.47	
11	YPKFIPL-GkG-EVN-MetSta-VAEP- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH ₂ x 3TFA	2374.47	0.76	20
12	YPYFIkL-GkG -EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2422.49	>40	
13	YPYFkPL-GkG -EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2406.45	>40	
14	YPYFKPA-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2364.37	0.071	30
15	TPKPAQG-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Gln-Gly-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2177.14	>40	
16	GARFIPA-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2210.21	0.42	
17	YPKFISA-GkG-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2304.32	0.75	
18	YPYFIPk-GkG-EVN-MetSta-VAEP- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-Pro-NH ₂ x 3TFA	2424.49	0.015	40
19	YPYFIPk-GkG-EVN-MetSta-VAEf- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH ₂ x 3TFA	2474.55	0.19	
20	kPYFIPLGkGEVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	DLys-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu- Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 3TFA	2356.44	2.93	

21	YPKFIPL-PEG(4)-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	1 H-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 3TFA	2247.43	0.052	
22	YPYFIPk-PEG(4)-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 2TFA	2297.44	0.045	
23	YPYFkL-PEG(4)-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 3TFA	2200.33	>40	
24	YPYFkPL-PEG(4)-EVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	H-Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Pro-Leu-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 2TFA	2297.44	>40	10
25	YPYFIPk-PEG(4)-EVN-Leu*Ala-Aep- NH ₂ x 2TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 2TFA	2226.36	0.015	
26	YPYFkLGkGEVN-Leu*Ala-Aep- NH ₂ x 3TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-DLys-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 3TFA	2238.26	0.034	
27	YPYFIPk-PEG(4)-EVN-MetSta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-PEG(4)-Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 2TFA	2315.48	1.01	
28	yPYFIPkGkGEVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 3TFA	H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 3TFA	2406.45	0.063	20
29	yPYFIPLGkGEVN-Sta-VAEp- NH ₂ x 2TFA	H-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x 2TFA	2277.41	0.81	
30	Ac-yPYFIPLGkGEVN-Sta-VAEp- NH ₂ x TFA	Ac-DTyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro- NH ₂ x TFA	2205.43	0.11	
31	YkYFIPLGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	H-Tyr-DLys-Tyr-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂	2422.49	> 40	30
32	YPkFIPLGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	H-Tyr-Pro-DLys-Phe-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂	2356.44	29.29	30
33	YPYkIPLGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	H-Tyr-Pro-Tyr-DLys-Ile-Pro-Leu-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂	2372.44	34.83	
34	Btn-PEG2-C-PEG8-YPYFIPkGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	Biotin-PEG2-Cys-PEG8-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂	3190.52	0.018	
35	Btn-PEG2-C-PEG3-YPYFIPkGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	Biotin-PEG2-Cys-PEG3-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂	2970.26	0.026	40
36	GGGYPYFIPkGkGEVN-Sta-VAEp-NH ₂ .TFA	H-Gly-Gly-Gly-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Ile-Pro-DLys-Gly-DLys-Gly-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x 3TFA	2577.61	0.0064	

表3:選ばれた例のIC₅₀

【 0 0 5 9 】

エキソサイトモチーフ及びスタチン型遷移状態ミメティックを含有する活性部位阻害剤

50

は、単独ではBACE1阻害を示さない。

【0060】

【表3】

実験	名称	系統名	MW	IC ₅₀ (μ M)
E1	Ac-QQYPYFKPAN-NH ₂	Ac-Gln-Gln-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-Asn-NH ₂	1295.6	> 40
E2	Ac-YPTFKPANGS-NH ₂	Ac-Tyr-Gln-Thr-Phe-Lys-Pro-Ala-Asn-Gly-Ser-NH ₂	1121.6	> 40
E3	Ac-STGARFIPAN-NH ₂	Ac-Ser-Thr-Gly-Ala-Arg-Phe-Ile-Pro-Ala-Asn-NH ₂	1073.6	> 40
E4	Ac-GDYPKFISAN-NH ₂	Ac-Gly-Asp-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Ser-Ala-Asn-NH ₂	1151.6	> 40
E5	Ac-GDYPKFIPAS-NH ₂	Ac-Gly-Asp-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Pro-Ala-Ser-NH ₂	1134.6	> 40
E6	Ac-GSYPKFIDAN-NH ₂	Ac-Gly-Ser-Tyr-Pro-Lys-Phe-Ile-Asp-Ala-Asn-NH ₂	1151.6	> 40
E7	Ac-LTTYPYFKPA-NH ₂	Ac-Leu-Thr-Thr-Tyr-Pro-Tyr-Phe-Lys-Pro-Ala-NH ₂	1240.6	14.41

表4:エキソサイトモチーフの選ばれた例のIC₅₀値

【0061】

【表4】

実験	名称	系統名 Name	MW	IC ₅₀ (μ M)
A1	EVN-Sta-VAEF	Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-NH ₂ x TFA	961.2	> 40
A2	EVN-MetSta-VAEf	Glu-Val-Asn-MetSta-Val-Ala-Glu-DPhe-NH ₂ x TFA	981.65	> 40
A3	EVN-Sta-VAEp	Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-DPro-NH ₂ x TFA	1041.59	> 40

表5:活性部位モチーフの選ばれた例のIC₅₀値

【0062】

医薬組成物

二重部位BACE1阻害剤及び薬学的に許容し得る塩を、治療活性物質として、例えば薬学的調合物の形態で使用することができる。薬学的調合物を、例えば錠剤、コーティング錠、糖衣錠、ゼラチン硬及び軟カプセル剤、液剤、乳剤又は懸濁剤の形態で経口投与することができる。しかし、投与は、例えば坐剤の形態で直腸的に、又は例えば注射液の形態で非経口的にもたらすこともできる。

【0063】

薬学的調合物の産生のために、二重部位BACE1阻害剤及びその薬学的に許容し得る塩を、薬学的に不活性な無機又は有機担体を用いて加工することができる。例えば、錠剤、コーティング錠、糖衣錠及びゼラチン硬カプセル剤用のそのような担体として、ラクトース、コーンスターチ又はその誘導體、タルク、ステアリン酸又はその塩などを使用することができる。ゼラチン軟カプセル剤に適切な担体は、例えば、植物油、ロウ、脂肪、半固形状及び液状ポリオールなどである。しかし、活性物質の性質に応じて、ゼラチン軟カプセル剤の場合、担体は通常必要とされない。液剤及びシロップ剤の産生に適切な担体は、例えば、水、ポリオール、グリセロール、植物油などである。坐剤に適切な担体は、例えば、天然又は硬化油、ロウ、脂肪、半液状又は液状ポリオールなどである。

【0064】

その上、薬学的調合物は、保存料、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着

10

20

30

40

50

色剤、着香料、浸透圧を変動させるための塩、緩衝剤、マスキング剤又は抗酸化剤などの薬学的に許容し得る補助物質を含有することができる。薬学的調合物は、他の薬学的に貴重な物質もなお含有することができる。

【0065】

二重部位BACE1阻害剤又はその薬学的に許容し得る塩及び治療的に不活性な担体を含有する医薬も本発明の目的であり、1つ以上の二重部位BACE1阻害剤及び/又はその薬学的に許容し得る塩並びに所望であれば1つ以上の他の治療的に貴重な物質を、1つ以上の治療的に不活性な担体と一緒にガレヌス投与形態にすることを含むそれらの製造方法も同様である。

【0066】

投薬量は、広い範囲内を変動することができ、もちろん各特定の場合における個別の要件に調整しなければならない。経口投与の場合、成人用投薬量は、二重部位BACE1阻害剤約0.01mg～約1000mg/日又はその薬学的に許容し得る塩の対応量まで変動する可能性がある。1日投薬量は、1回量として、又は分割量で投与される場合があり、加えて、適応とされていることが判明した場合は上限を超える可能性もある。

【0067】

以下の実施例は、本発明を限定せずに例証するが、単にその代表的なものとして役立つ。薬学的調合物は、好都合には、二重部位BACE1阻害剤を約1～500mg、好ましくは1～100mg含有する。本発明による組成物の例は、以下の通りである。

【0068】

実施例A

以下の組成の錠剤を通常の方法で製造する。

【0069】

【表5】

成分	mg/錠			
	5	25	100	500
二重部位BACE1阻害剤	5	25	100	500
無水ラクトース DTG	125	105	30	150
Sta-Rx 1500	6	6	6	60
微結晶セルロース	30	30	30	450
ステアリン酸マグネシウム	1	1	1	1
合計	167	167	167	831

表6:あり得る錠剤組成

【0070】

製造手順

1. 成分1、2、3及び4を混合し、精製水を用いて造粒する。
2. 顆粒を50で乾燥させる。
3. 顆粒に適切な粉碎装置を通過させる。
4. 成分5を添加し、3分間混合し、適切なプレス機で圧縮する

【0071】

実施例B - 1

以下の組成のカプセル剤を製造する。

【0072】

10

20

30

40

【表 6】

成分	mg/カプセル			
	5	25	100	500
二重部位BACE1阻害剤	5	25	100	500
ラクトース水和物	159	123	148	-
コーンスターチ	25	35	40	70
タルク	10	15	10	25
ステアリン酸マグネシウム	1	2	2	5
合計	200	200	300	600

10

表7:可能なカプセル剤の成分組成

【 0 0 7 3 】

製造手順

- 成分 1、2 及び 3 を適切なミキサーで 30 分間混合する。
- 成分 4 及び 5 を添加し、3 分間混合する。
- 適切なカプセルに充填する。

【 0 0 7 4 】

二重部位 B A C E 1 阻害剤、ラクトース及びコーンスターチを、最初にミキサーで、次に粉碎機で混合する。混合物をミキサーに戻し、それにタルクを添加し、完全に混合する。この混合物を機械により適切なカプセル、例えばゼラチン硬カプセルに充填する。

20

【 0 0 7 5 】

実施例 B - 2

以下の組成のゼラチン軟カプセル剤を製造する。

【 0 0 7 6 】

【表 7】

成分	mg/カプセル
二重部位BACE1阻害剤	5
黄色ロウ	8
水素化ダイズ油	8
部分水素化植物油	34
ダイズ油	110
合計	165

30

表8:あり得るゼラチン軟カプセル剤の成分組成

40

【 0 0 7 7 】

【表 8】

成分	mg/カプセル
ゼラチン	75
グリセロール 85 %	32
カリオン83	8 (乾物量)
二酸化チタン	0.4
黄色酸化鉄	1.1
合計	116.5

10

表9:あり得るゼラチン軟カプセル剤の組成

【 0 0 7 8 】

製造手順

二重部位 B A C E 1 阻害剤を他の成分の温溶融物中に溶解させ、この混合物を適切なサイズのゼラチン軟カプセルに充填する。充填済みゼラチン軟カプセル剤を通常の手順に従って処理する。

【 0 0 7 9 】

実施例 C

以下の組成の坐剤を製造する：

【 0 0 8 0 】

【表 9】

成分	mg/坐剤1個
二重部位BACE1阻害剤	15
坐剤の塊	1285
合計	1300

20

表10:あり得る坐剤の組成

30

【 0 0 8 1 】

製造手順

坐剤の塊をガラス又はスチール製容器の中で融解させ、十分に混合し45℃に冷却する。その後すぐ、微粉末状二重部位 B A C E 1 阻害剤をそれに添加し、それが完全に分散するまで攪拌する。その混合物を適切なサイズの坐剤鑄型に注ぎ、放冷する。次に、坐剤を鑄型から取り出し、ロウ紙又は金属箔で個包装する。

【 0 0 8 2 】

実施例 D

以下の組成の注射液を製造する：

【 0 0 8 3 】

【表 10】

成分	mg/注射液.
二重部位BACE1阻害剤	3
ポリエチレングリコール 400	150
酢酸	適量でpH5.0にする
注射用水	全量1.0ml

40

表11:あり得る注射液の組成

50

【 0 0 8 4 】

製造手順

二重部位 B A C E 1 阻害剤をポリエチレングリコール 4 0 0 と注射用水（一部）との混合物中に溶解させる。酢酸で pH を 5 . 0 に調整する。残りの量の水の添加により体積を 1 . 0 ml に調整する。溶液を濾過し、適切な過量でバイアル中に充填し、滅菌する。

【 0 0 8 5 】

実施例 E

以下の組成の分包を製造する：

【 0 0 8 6 】

【表 1 1】

成分	mg/包
二重部位BACE1阻害剤	50
微粉ラクトース	1015
微結晶セルロース (AVICEL PH 102)	1400
カルボキシメチルセルロースナトリウム	14
ポリビニルピロリドン K 30	10
ステアリン酸マグネシウム	10
着香添加剤	1
合計	2500

表12:あり得る分包の組成

【 0 0 8 7 】

製造手順

二重部位 B A C E 1 阻害剤をラクトース、微結晶セルロース及びカルボキシメチルセルロースナトリウムと混合し、水へのポリビニルピロリドンの混合物を用いて造粒する。顆粒をステアリン酸マグネシウム及び着香添加剤と混合し、分包に充填する。

【 0 0 8 8 】

実験の部

本発明の例証のために以下の実施例を提供する。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものとして見なされてはならず、単にその代表として見なされるべきである。

【 0 0 8 9 】

C E M L i b e r t y マイクロ波ペプチド合成装置のための一般的手順：

0 . 1 mMol 規模：

F m o c の脱保護：

最初の脱保護のために、洗浄され、予め膨潤された樹脂（4 3 5 mg、0 . 1 mMol、TentaGel S RAM（負荷：0 . 2 3 mMol/g）を、5 0 の（Rapp Polymere, Cat: S30023）をマイクロ波条件においてジメチルホルムアミド（DMF）中 2 0 % ピペリジン溶液（7 . 0 mL）で 3 分間処理した。樹脂を DMF で洗浄し、脱保護のために DMF 中 2 0 % ピペリジン溶液（7 . 0 mL）でマイクロ波条件下において 7 5 で 5 分間処理した。

【 0 0 9 0 】

アミノ酸のカップリング：

洗浄され、予め膨潤された樹脂に、DMF 中 0 . 2 M アミノ酸溶液（2 . 5 mL、5 . 0 eq.）に続いて DMF 中 0 . 5 M（1 - シアノ - 2 - エトキシ - 2 - オキソエチリデンアミノオキシ）ジメチルアミノ - モルホリノ - カルベニウムヘキサフルオロホスファート（COMU）溶液（1 . 0 mL、5 . 0 eq.）（CAS: 1075198-30-9, Iris Biotech, Cat: RL-1175.1000）、続いて N - メチル - 2 - ピロリドン（NMP）中 2 M ジイソプロピルエチルアミン（DIP EA）溶液（0 . 5 mL、1 0 . 0 eq.）を添加した。カップリングの

ために、この反応混合物をマイクロ波条件下において75 で5分間処理した。

【0091】

0.25 mMol 規模：

Fmoc の脱保護：

洗浄され、予め膨潤された樹脂(1.09 g、0.25 mMol、TentaGel S RAM (負荷：0.23 mMol/g)、(Rapp Polymere, Cat: S30023)を最初の脱保護のためにDMF中20%ピペリジン溶液(10.0 mL)でマイクロ波条件下において50 で3分間処理した。樹脂をDMFで洗浄し、脱保護のためにDMF中20%ピペリジン溶液(10.0 mL)でマイクロ波条件下において75 で5分間処理した。

【0092】

アミノ酸のカップリング：

洗浄され、予め膨潤された樹脂に、DMF中0.2 M アミノ酸溶液(5.0 mL、4.0 eq.)に続いてDMF中0.5 M COMU溶液(2.0 mL、4.0 eq.)、(CAS: 1075198-30-9, Iris Biotech, Cat: RL-1175.1000)、続いてNMP中2 M DIPPEA溶液(1.0 mL、8.0 eq.)を添加した。カップリングのためにこの反応混合物をマイクロ波条件下において75 で5分間処理した。

【0093】

最終切断のための一般的手順：

0.1 mMol 規模：

樹脂を CH_2Cl_2 で洗浄し、次に振盪器上で室温のトリフルオロ酢酸(TFA)：トリソプロピルシラン(TIS)：水 95：2.5：2.5の溶液(5 mL)で30分間処理した。樹脂を濾過した。粗ペプチドを Et_2O (35 mL)で沈殿させた。懸濁物を遠心分離し、溶媒をデカントした。固体をアセトニトリル及び水に溶解させ、凍結乾燥し、粗ペプチドを得た。

【0094】

精製のための一般的手順：

粗生成物をアセトニトリル及び水(TFAを0.1%含有)に溶解させ、次に調製用HPLCにより精製した。カラムYMC-Actus Pro C8、5 μm 、75 × 30 mm、水(TFAを0.1%含有)：アセトニトリルが70：30 ~ 2：98の勾配、流速30 mL/min。

【0095】

実施例は、本明細書記載の一般的手順と同様に調製することができる。

【0096】

包括的5アミノ酸長ペプチドアレイを用いたBACE1結合物質の発見

アレイの設計、合成及びバックグラウンド対照：BACE1結合物質を発見するために、2.47 M ペプチド(システインを除く全てのあり得る5アミノ酸長ペプチドの包括的リストを表す)を有するアレイを設計した。各5アミノ酸長ペプチドを、N末端及びC末端の3サイクルのリンカー合成で合成した。リンカー合成のために、G及びSを3：1の比で含む混合物を使用した。ペプチド配列は、以下の形式である：ZZZ-5アミノ酸-ZZZ[配列中、Zはリンカー混合物からのアミノ酸である。ペプチドの合成後、QCのためにアレイをCy5-ストレプトアビジンで予備染色し、333 ng/ml Cy5-ストレプトアビジン(Amersham, UK, cat# PA45001)を含有する結合緩衝液(1%アルカリ可溶性カゼイン、Novagen, Billerica, USA, cat#70955, 0.05%ツイーン20)30 mL中で1時間バックグラウンドシグナルを測定した。アレイを洗浄緩衝液I(Roche/Nimblegen, Madison, USA)中で30秒間洗浄し、0.1 TE緩衝液中で短く洗浄した。マイクロ遠心機で回転させることによってアレイを乾燥させて微量の水を除去し、MS200スキャナー(Roche/Nimblegen)を用いて波長635 nm及び分解能2 μm でスキャンした。このステップの後に、アレイは標的タンパク質と結合する準備ができていた。

【0097】

BACE1のビオチン化：Pierce EZ-link Micro NHS-PEG4-ビオチン化キット、cat#21955を使用してBACE1酵素(WT1-13-2、0.7 mg/ml)をビオチンで標識した。標識化

10

20

30

40

50

のために、BACE1 酵素 70 μl 又は 50 μg を、新鮮調製された NHS - ビオチン水溶液 2 μl と混合し、RT で 1 時間インキュベートした。Micro Bio-Spin 30 クロマトグラフィーカラム (BioRad, cat 732-6223) を使用した反応溶液の 2 回のスピン濾過 (1, 000 g、4 分) によって過剰の遊離ビオチンを除去した。ビオチン化 BACE1 を小分けして -20°C で保存した。

【0098】

結合アッセイ法：データの再現性を保証するためにビオチン化 BACE1 5 μl を結合緩衝液 40 μl と混合し、HX1 ミキサーが付属したアレイに負荷し、4°C で一晩インキュベートした。インキュベーション後に、混合物を除去し、アレイを洗浄緩衝液 I の中で 30 秒間洗浄し、0.1 TE 緩衝液中で短く洗浄した。結合緩衝液 30 ml 中、333 ng/ml ストレプトアビジン - Cy5 (Amersham, UK, cat# PA45001) を用いてビオチン化 BACE1 のところでアレイを 1 時間染色し、上記のように洗浄した。マイクロ遠心機中で回転させることによってアレイを乾燥させて微量の水を除去し、MS200 スキャナー (Roche/Nimblegen) を使用して波長 635 nm 及び分解能 2 μm でデータを取得した。

10

【0099】

データ解析及び結果：NimbleGen DEVA ソフトウェアを使用して画像解析及びシグナル抽出を行った。全ての 5 アミノ酸長配列について BACE1 の結合に起因するビオチン特異的蛍光シグナルを、先に収集したバックグラウンドシグナルに対してプロットした (「アレイの設計、合成及びバックグラウンド対照」を参照されたい)。最大の BACE1 特異的シグナル及び低いバックグラウンドを有する 5 アミノ酸長ペプチド配列がこの解析から

20

。

【0100】

【表12】

コアモチーフ	伸長ライブラリー	伸長ライブラリーから選ばれた配列	二重置換／欠失ライブラリー	置換／欠失ライブラリーから選ばれた配列
YFK	XXYFKXX	YPYFKPA	GQYPYFKPAS QYPYFKPASG	QQYPYFKPAN
PYFK	XXPYFKXX	QYPYFKPA		
YFKP	XXYFKPXX	YPYFKPAS		
TFK	XXTFKXX	YPTFKPA	GGGYPTFKPA GGYPTFKPAG GYPTFKPAGG YPTFKPAGGG	YPTFKPANGS
PKF	XXPKFXX	DYPKFIS DYPKFLP SYPKFID	GDYPKFISGG GDYPKFLPGG GSYPKFIDGG	GDYPKFISAN GDYPKFIPAS GSYPKFIDAN
ARFIP	XXARFIPXX	TGARFIPAN	GTGARFIPAN TGARFIPANG	STGARFIPAN

30

表13

40

【0101】

伸長ペプチドアレイを使用した BACE1 結合物質の最適化

アレイの設計：5 アミノ酸長アレイ実験で特定されたモチーフは、最適な BACE1 結合物質の短いバージョンだけを表す可能性がある。表 2 の列 2 に X で示した全部で 20 種の天然アミノ酸を用いて、5 アミノ酸長のアレイから選択されたコア配列を N 末端及び C 末端の両方から 2 つのアミノ酸だけ伸長することによって新しいアレイを設計することにより、より長いモチーフを見出すことができる。伸長ライブラリーのそれぞれは、5 回の反復で合成された 160, 000 種の独特なペプチドを含む。実施例 1 に記載するように BACE1 結合アッセイ法及び画像処理を行った。

【0102】

50

データ解析及び結果：各コアモチーフについて、BACE1に最高の結合性を有する伸長された配列を表13(3列目)に示す。「YFK」、「PYFK」及び「YFKP」モチーフ(表13の上の3行)についての伸長された配列は、同じYPYFKPA配列を共有し、それらが同じ共通配列に相当することを示唆している。3つの配列DYPKFLP、DYPKFIS、SYPKFIDは、BACE1並びにN末端及びC末端での多様なアミノ酸組成に類似の結合性を有したので、それらを「PKF」モチーフ伸長配列として選択した。

【0103】

二重置換/欠失ペプチドアレイを使用したBACE1結合物質の最適化

アレイの設計：第3ラウンドの結合物質最適化は、伸長アレイ実験で特定された配列をグリシン(G)アミノ酸で伸長して、表13(第4列)に示されるような10アミノ酸長ペプチドにし、続いて参照配列の全てのあり得る単一及び二重置換/欠失変異体を含む二重置換/欠失ライブラリーを設計することを含んでいた。10塩基長ペプチドについて、二重置換/欠失ライブラリーは、約1.65万種の独特なペプチドを含んでいた。各ペプチドを7回の反復で合成した。

10

【0104】

置換/欠失アレイのためのBACE1結合アッセイ法及び画像処理を上記のように行った(包括的5アミノ酸長ペプチドアレイを使用したBACE1結合物質の発見)。

【0105】

データ解析及び結果：異常値を除去し、反復にわたり各ペプチドについてシグナルを平均することを含んだ各ペプチドライブラリーの解析後、最高の結合シグナルを有するペプチド配列を選択した。選択された配列を表13に示す(最後の列)。

20

【配列表】

[0006814754000001.app](#)

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10
- (74)代理人 110001508
 特許業務法人 津国
- (72)発明者 ボーチャンプ, ジェレミー
 スイス国、4 0 7 0 パーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4、ツェーノオー・エフ・
 ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー
- (72)発明者 フレスクゴード, ペル - オーラ
 スイス国、4 0 7 0 パーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4、ツェーノオー・エフ・
 ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー
- (72)発明者 キタス, エリック・アー
 スイス国、4 0 7 0 パーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4、ツェーノオー・エフ・
 ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー
- (72)発明者 リャミチェフ, ビクター
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9、マディソン、サウス・ローサ・ロード 5 0 0、
 シーノオー・ロシュ・ニンブルゲン・インコーポレイテッド
- (72)発明者 パテル, ジガー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9、マディソン、サウス・ローサ・ロード 5 0 0、
 シーノオー・ロシュ・ニンブルゲン・インコーポレイテッド

審査官 馬場 亮人

- (56)参考文献 特表2015-501150(JP,A)
 特表2017-537098(JP,A)
 特表2017-537099(JP,A)
 Science Translational Medicine, 2011年, Vol. 3,
 No. 84, 84ra44, p136-143, doi:10.1126/scitranslmed.3002230

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 2
 A 6 1 K 3 8 / 1 0
 A 6 1 P 3 / 1 0
 A 6 1 P 2 5 / 2 8
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 C 1 2 N 9 / 9 9
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)